

(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 1

C 12 N	15/34	(2006.01)	C 12 N	15/34	Z N A
A 61 K	38/16	(2006.01)	A 61 K	38/16	
A 61 P	1/00	(2006.01)	A 61 P	1/00	
A 61 P	1/04	(2006.01)	A 61 P	1/04	
A 61 P	1/10	(2006.01)	A 61 P	1/10	

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 イット 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】デスマグレイン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 線維多量体であつて、前記組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドが、

a ) デスマグレイン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つて、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 11 線維ポリペプチドシャフトドメイン、 A d 14 線維ポリペプチドシャフトドメイン、および A d 14 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 への結合に必要である 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、上皮細胞のデスマグレイン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 線維多量体であつて、前記組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチドが、

a ) デスマグレイン 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つて、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、上皮細胞のデスマグレイン 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】**

GVLTLKCLTPLTTGGSQLQLVGGGLT(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omainが、配列番号 1 3 :

10

20

40

50

## 【化15】

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10】

前記ノブドメインが、配列番号14：

## 【化16】

WTGVNPT(E/R)ANCG(M/I)(M/I)(D/N/A)SSESNDCKLILTVKTGALVTAFVYVIGVSN(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)QTSATTLVTSPTFYIRED .

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、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12】

30

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由來ペプチドドメインが、EVSALEK(配列番号22)および/またはKVSALEKE(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、請求項1に記載の組換えA d B - 2 / 3線維多量体。

## 【請求項13】

前記A d B - 2 / 3線維ポリペプチドが、  
 a) それが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12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14】

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13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15】

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14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16】

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 1 5 に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

**【請求項 1 7】**

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 1 6 に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維多量体。

**【請求項 1 8】**

a ) 請求項 1 から 1 7 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。

**【請求項 1 9】**

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 1 8 に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 0】**

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 1 7 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 1 8 または 1 9 に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 1】**

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、囊胞性線維症、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、肺炎、肺管障害、胆管閉塞症、胆囊炎、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 2 0 に記載の組成物または医薬組成物。

**【請求項 2 2】**

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 1 7 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 1 8 または 1 9 に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 3】**

診断薬またはイメージング剤を含む、請求項 2 2 に記載の組成物または医薬組成物。

**【請求項 2 4】**

デスマグレイン 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 1 7 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 1 8 または 1 9 に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 5】**

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 1 7 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 1 8 または 1 9 に記載の医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

関連出願への相互参照

この出願は、2010年6月10日に出願された米国仮出願第 6 1 / 3 5 3 , 6 5 2 号、2011年1月5日に出願された米国仮出願第 6 1 / 4 3 0 , 0 9 1 号、および2011年4月1日に出願された米国仮出願第 6 1 / 4 7 0 , 6 6 3 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。

**【0 0 0 2】**

政府の権利についての声明

10

20

30

40

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(Ad~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ら、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(Norrbom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PtDd $5 \times 10^6$ 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

【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(Fleiss

40

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と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、囊胞性線維症、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、肺炎、肺管障害、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、胆囊炎、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ます。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、またはそれらの機能的等価物である。別の実施形態では、AdB-2/3線維多量体は、AdB-2/3ビリオン、AdB-2/3カプシド、AdB-2/3の12面体粒子(PtDd)、組換えAdB-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、AdB-2/3線維多量体は、Ad3のPtDdまたは結合開口薬(junction opener)1(JO-1)(配列番号20)を含む。

#### 【0011】

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こと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(immunoconjugate)、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(trastuzumab)、セツキシマブ(cetuximab)、ペルツズマブ(pertuzumab)、アポマブ(apomab)、コナツムマブ(conatumumab)、レクサツムマブ(exatumumab)、ベバシズマブ(bevacizumab)、ベバシズマブ(bevacizumab)、デノスマブ(denosumab)、ザノリムマブ(zanolimumab)、リンツズマブ(lintuzumab)、エドレコロマブ(edrecolomab)、リツキシマブ(rituximab)、チシリムマブ(ticilimumab)、トシツモマブ(tositumomab)、アレムツズマブ(alemtuzumab)、エプラツズマブ(epratuzumab)、ミツモマブ(mitumomab)、ゲムツズマブ(gemtuzumab)、オゾガマイシン(ozogamicin)、オレゴボマブ(oregovomab)、ペムブモマブ(pemtumomab)、ダクリズマブ(daclizumab)、パニツムマブ(panitumumab)、カツマキソマブ(catumaxomab)、オファツムマブ(ofatumumab)、およびイブリツモマブ(ibritumomab)が挙げられる。

#### 【0012】

好ましい一実施形態では、上皮組織に関連する障害は、Her-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Her-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、AdB-2/3線維多量体が、Ad3のPtDd、JO-1(配列番号20)、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。

#### 【0013】

別の好ましい実施形態では、上皮組織に関連する障害は、EGFR陽性腫瘍を含む。例示的なEGFR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、AdB-2/3線維多量体が、Ad3のPtDd、JO-1(配列番号20)、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。

#### 【0014】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、上皮組織に関連する障害は固体腫瘍を含み、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体腫瘍である。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体腫瘍としては、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ビリオン、AdB-2/3カプシド、AdB-2/3の12面体粒子（PtdDd）、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PtdDdまたは結合開口薬1（J0-1）（配列番号20）を含む。

10

20

#### 【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

30

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KVSALEKE（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

40

50

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Ad3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AdB-2/3線維ポリペプチドは、JO-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、AdB-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AdB-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AdB-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。好ましい一実施形態では、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、デスマグレイン2(DSG2)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、DSG2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を提供する。本発明のこの態様の方法は、DSG2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(EMT)を誘導する方法であって、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一実施形態では、AdB-2/3線維多量体は、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。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線維多量体、またはその機能的等価物であり；AdB-2/3線維多量体は、AdB-2/3ビリオン、AdB-2/3カプシド、AdB-2/3の12面体粒子(PtDd)、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；AdB-2/3線維多量体は、Ad3のPtDdを含み；AdB-2/3線維多量体は、結合開口薬1(JO-1)(配列番号20)を含み；AdB-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、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)AdB-2/3線維多量体とDSG2を、DSG2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、

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。

(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 11 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 14 線維ポリペプチドシャフトドメイン、A d 14 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 :

【化 1 3 】

GVL(T/S)LKC(L/V)(T/N)PLTT(T/A)(G/S)GSLQLKVG(G/S)GLTV(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 )

各シャフトドメインが、配列番号 1 2 :

【化 1 4 】

GVLTGKCLTPPTGGSQLQVKGGGLT(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、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

10

20

30

40

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 :

10

【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 .

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 1 0 )

前記ノブドメインが、配列番号 1 4 :

【化 1 6 】

WTGVNPT(E/R)ANCO(M/I)(M/I)(D/N/A)SSESNDCKLILTVKTGALVTAFFVYIGVSN(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)QTSATTLVTSPTFYIIREDD .

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 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、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 1 2 )

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 1 1  
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 3 )

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 1 2 までのいずれか一項に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプ

50

チド。

(項目14)

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13に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目15)

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14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16)

多量体形成している、項目1から15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17)

二量体形成している、項目1から15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18)

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17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19)

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18に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

20

(項目20)

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19に記載の組換え A d B - 2 / 3 線維ポリペプチド。

(項目21)

項目1から19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22)

項目21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23)

項目22に記載の組換え発現ベクターを含む宿主細胞。

(項目24)

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25)

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が、項目16から20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23に記載の医薬組成物。

40

(項目26)

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、囊胞性線維症、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、肺炎、肺管障害、胆管閉塞症、胆囊炎、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、腎孟腎炎、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、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28に記載の方法。

10

(項目 30)

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26から29までのいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 31)

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26から30までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 32)

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26から31までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 33)

前記AdB-2/3線維多量体がAd3のPtDdを含む、項目26から32までのいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 34)

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。

40

(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、アポマブ、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、エプラツズマブ、ミツモマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、オ

50

レゴボマブ、ペムブモマブ、ダクリズマブ、パニツムマブ、カツマキソマブ、オファツムマブ、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。

10

(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AdB-2/3線維多量体が、Ad3のPtdD、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。

20

(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)

30

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AdB-2/3線維多量体が、Ad3のPtdD、JO-1、またはそ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。

40

(項目52)

前記AdB-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AdB-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AdB-2/3線維多量体、またはその

50

機能的等価物を投与することを含む、方法。

(項目 5 5 )

前記障害が、A d B - 2 / 3 ウィルス感染症または固形腫瘍である、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6 )

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 5 5 に記載の方法。

10

(項目 5 7 )

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 5 4 から 5 6 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 8 )

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 5 4 から 5 7 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 9 )

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 5 4 から 5 8 までのいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 6 0 )

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 5 4 から 5 9 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 1 )

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 5 4 から 5 9 までのいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 6 2 )

前記 A d B - 2 / 3 線維多量体が二量体である、項目 5 4 から 6 1 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 3 )

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 6 2 に記載の方法。

(項目 6 4 )

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 6 5 )

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 6 4 に記載の方法。

(項目 6 6 )

前記上皮組織が固形腫瘍を含む、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 7 )

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、胃の腫瘍からなる群より選択される、項目 6 5 に記載の方法。

50

癌、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)

デスマグレイン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)

10

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)

20

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、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)

30

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と

50

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78)

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77に記載の方法。

(項目79)

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77または78のいずれか一項に記載の方法。

(項目80)

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77から79までのいずれか一項に記載の方法。

10

(項目81)

前記AdB-2/3線維多量体が、Ad3のPtDdを含む、項目77から80までのいずれか一項に記載の方法。

(項目82)

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77から80までのいずれか一項に記載の方法。

20

(項目83)

前記AdB-2/3線維多量体が二量体である、項目77から82までのいずれか一項に記載の方法。

(項目84)

前記AdB-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83に記載の方法。

(項目85)

前記AdB-2/3線維多量体がJO-1二量体を含む、項目24または25に記載の医薬組成物。

(項目86)

30

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24、25または85のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1は、Ad受容体の同定およびAdの付着についての競合試験のツールを示す図である。a) Ad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37/38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。PtDdは、ペントンベースおよび三量体の線維を含有する12ユニットを保有する。BsDd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Ad14ウイルス、Ad14aウイルス、Ad11ウイルスおよびAd35ウイルスの、Ad3のBsDd、PtDd、または抗CD46抗体(aCD46)と一緒にプレインキュベートした後の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。特に、PtDdがAd35を部分的に遮断するという所見は、HeLa細胞においてDSG2とCD46が物理的に近傍にあることに起因し得る。d) Ad3線維ノブとBsDd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Ad3付着試験(BsDd+Ad3K)。Ad3Kのモル濃度は競合のために使用したPtDd内部の線維ノブのモル濃度と同等であった。e) Ad3-GFPベクターの略図である。ベクターは、野生型Adに基づき、ヌクレオチド29, 8

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)ウエスタンプロットである。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ビリオンおよび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Ramos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細胞はチャイ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Ramos細胞から膜タンパク質画分を調製した。タンパク質プロットを、Ad5/35++ビリオン(d)と、Ad3ビリオンまたは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プロットを、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  
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<sup>1</sup> の組換えヒト DSG2 タンパク質と一緒にプレインキュベートした。 PBS と一緒にインキュベートしたウイルス粒子の付着を 100 % とした。 Ad11 の付着を分析するために、細胞を、 50 μg / m<sup>1</sup> の Ad35K とも一緒に氷上で 1 時間インキュベートした後に Ad11 ウィルスを加えて CD46 を遮断した。 b ) 組換え DSG1 タンパク質、組換え DSG2 タンパク質または組換え DSC2 タンパク質による Ad 形質導入の競合。 c ) DSG2 特異的抗体による <sup>3</sup>H - Ad 結合の競合。 n = 5 。 PBS 対 6D8 : P = 0.013 ; PBS 対 8E5 : P = 0.0014 。異なる DSG2 ドメインに対する mA b の特異性は以下の通りである ( DSG2 の略図については、図 1f を参照されたい) : 20G1 ( プロペプチド領域 ) 、 7H9 ( Pro / EC1 ) 、 13B11 ( EC1 / EC2 ) 、 10D2 ( EC1 / EC2 ) 、 8E5 ( EC3 ) 、 6D8 ( EC3 / EC4 ) 。 d ) および e ) siRNA に媒介される DSG2 の下方制御の、 Ad 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 18 時間の時点では、 Ad35 - GFP および Ad5 / 35 - GFP について GFP レベルは同程度であり、それにより、第一世代の Ad5 / 35 - GFP 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 ) Ad3 - GFP を感染させた BT474 細胞の、感染の 7 日後の細胞溶解。 siRNA 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 MOI 、すなわち、 DSG2 siRNA で処置した細胞および対照 siRNA で処置した細胞に対して、それぞれ細胞当たり 1.0 pfu の MOI および細胞当たり 0.5 pfu の MOI 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、 DSG2 siRNA 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、 Ad3 の側方伝播における DSG2 の重要性を示している。 g ) Ad3 - GFP 感染細胞の、感染の 7 日後の細胞溶解。 siRNA をトランスフェクトした小気道上皮細胞を、調整した MOI で感染させた。 7 日後に、細胞の生存率を WST - 1 アッセイによって測定した。 PBS で処置した細胞の生存率を 100 % とした。 n = 3 。 Ad3 - GFP siRNA / 対照 siRNA 対 Ad3 - GFP DSG2 siRNA : P < 0.001 。

【図 4 】図 4 は、 Ad 受容体としての DSG2 の検証を示すグラフである。「機能獲得」試験。 a ) 異なる DSG2 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 ( erythromyeloblastoid ) 白血病 K562 細胞およびバーキット B 細胞リンパ腫である BJAB 細胞および Ramo s 細胞を、 Ad3 - GFP および Ad5 / 35 - GFP に MOI を上昇させて感染させ、 18 時間後に GFP 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 10 % 未満であった。 b ) DSG2 の異所発現。ヒト組織球性リンパ腫 U937 細胞を、 EF1 プロモーターの制御下で、 DSG2 cDNA 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 > 98 % において安定な DSG2 の発現が検出された。 c ) <sup>3</sup>H - Ad3 および <sup>3</sup>H - Ad35 の、 Raji 細胞、 U937 細胞および DSG2 を発現している U937 ( U937 - DSG2 ) 細胞への付着。 Ad35 の付着は CD46 によって媒介され、可溶性の CD46 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 ) U937 細胞および U937 - DSG2 細胞に Ad3 - GFP および Ad5 / 35 - GFP を形質導入した後の GFP の発現。 n = 3 。

【図 5 】図 5 は、ヒト上皮細胞における DSG2 の局在および Ad3 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、 DSG2 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 T84 細胞の、 DSG2 ( 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。 XY 平面および XZ 平面が示されている。 c ) Ad3 と DSG2 の結合。 T84 細胞を、 Cy3 で標識した Ad3 粒子 ( 赤色 ) と一緒に 15 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 XZ 画像の方が拡大率が高い。少なくとも 2 つの ( 緑色の ) DSG2 シグナルが 1 つの ( 赤色の ) Cy3 - Ad3 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 (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 PtDd 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 XZ パネルは、 DSG2 (赤色) と E - カドヘリン (緑色) の共局在を示す。下の XZ パネルは、紫色の Cy 5 - PtDd 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 (PtDd) および緑色の E - カドヘリンチャネルを示す。薄い矢印は、膜局在 PtDd を示し、太い矢印は、細胞質内の DSG2 を標識する。e ) ヒト子宮頸癌 HeLa 細胞 (上の XZ パネルおよび XY パネル) および Cy3 - Ad3 と一緒に 15 分間インキュベートした HeLa 細胞 (下の XZ 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 μm である。

10

【図 6】図 6 は、上皮細胞において Ad3 ビリオンおよび PtDd 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 PtDd によって誘発される表現型の変化。BT474 細胞  $1 \times 10^5$  個を、 50 ng の PtDd または BsDd 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 ZY 共焦点画像 (a, b) で 20 μm であり、標準の免疫蛍光試験 (c, d) では 40 μm 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 (PtDd 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 ) BT474 細胞を、示されている濃度の PtDd 特異的抗体、 BsDd 特異的抗体、 DSG2 特異的抗体 (10D2, 13B11、または 6D8) 、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に分析した、 ERK1 / 2 - MAPK および PI3K のリン酸化のウエスタンプロット分析。経路を阻害するために、細胞を、 Erk1 / 2 阻害剤である UO126 (5 μM) または PI3K 阻害剤である Wortmannin (2.5 μM) を用いて一晩処置した後に PtDd 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。

20

【図 7】図 7 は、上皮乳がん細胞 (epithelial breast cancer cell) における、 Ad3 ビリオンまたは PtDd と DSG2 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 ) BT474 細胞の単層を通じた FITC - デキストラノン拡散。孔サイズが 0.4 μm の transwell チャンバー内で培養した BT474 細胞を、 0.5 μg / ml の BsDd 、 PtDd 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 - デキストラノ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。BsDd 対 PtDd : P < 0.001 。b ) PtDd による <sup>3</sup>H - Ad3S の取り込みの容易化。左側のパネル : T84 細胞の細胞間結合における CD46 の閉じ込め。黄色シグナルをもたらす CD46 および細胞間結合タンパク質クローディン 7 の共局在。右側のパネル : <sup>3</sup>H - Ad3S の付着。BT474 細胞を、 PtDd または BsDd 、および <sup>3</sup>H - Ad3S 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 度 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 ovc316 腫瘍を担持するマウスに、 50 μg の PtDd または BsDd を静脈内注射した 8 時間後に、  $1 \times 10^9$  pfu の Ad5 / 35 - bGal を静脈内注射した。注射した 72 時間後に切片を X - ga1 で染色した。スケールバーは 40 μm である。d ) Her2 / neu 陽性ヒト乳がん細胞株 BT474 における Her2 / neu およびクローディン 7 についての共焦点顕微鏡写真。これらの細胞は、单層を形成しない。PBS で処置した細胞では、大部分の Her2 / neu シグナル (緑色) がクローディン 7 (赤色) と共に局在し、黄色シグナルをもたらすことに注目されたい。PtDd で処置すると、クローディン 7 シグナルは減少するが、一方、細胞表面上に現れる Her2 / neu 染色は増える。e ) PBS または PtDd を用いて処置した 2 時間後の BT474 細胞の共焦点顕微鏡写真。f ) Ad3 および PtDd は、ハーセプチンによる Her2 / 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 ) Ad3 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 m m 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 発現力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 発現力セットを含有する、 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プロット分析。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IgGHRP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プロット。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ラミドゲルに流した。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 $1 \times 10^5$ 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発現力セットを含有する、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

3 - K / S 2 / K n + Ad 3 - E / S 2 / K n : P = 0 . 0 3 ; Ad 3 - K / S 2 / K n 対 Ad 3 - K / S 2 / K n + Ad 3 - E / S 2 / K n : P = 0 . 6 2 。 C ) Ad 3 線維ノブと抗 His 抗体の架橋。5 mg / ml の Ad 3 線維ノブを、20 mg / 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 100 pfu の Ad 3 - GFP ウィルスを添加し、B ) に記載の通り GFP を分析した。「ノブ」と「ノブ+抗 His」の間の差異は、Ad 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 12】図 12 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 Ad 3 線維ノブタンパク質である Ad 3 - K / S / K n および Ad 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 60 kDa である。B ) クーマシープルーカー染色したゲル。試料を、トリス / グリシン / 0 . 1 % SDS 緩衝液中 4 ~ 15 % 勾配のポリアクリルアミドゲルに流した。UB - 煮沸していない試料、B - 煮沸した試料。Laemmli 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 25 kDa 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 Ad 3 - K / S / K n および Ad 3 - E / S / K n と混合した Ad 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 Ad 3 線維ノブまたは PtdD による、<sup>3</sup>H - Ad 3 の付着の遮断。PBS と一緒にインキュベートした細胞への Ad の付着を 100 % とした。N = 3 。E ) 組換え Ad 3 線維ノブまたは PtdD による、<sup>3</sup>H - Ad 5 の付着の遮断。PBS と一緒にインキュベートした細胞への Ad の付着を 100 % とした。N = 3 。F および G ) Ad 3 - GFP の形質導入の競合。HeLa 細胞を、漸増濃度の線維ノブまたは PtdD と一緒に 60 分インキュベートし、次いで、Ad 3 - GFP を細胞当たり 100 pfu の MOI で 60 分にわたって感染させ、その後ウィルスを除去し、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 (F) および平均の GFP 蛍光 (G) 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。H および I ) F および G ) と同じ試験を、Ad 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 Ad 3 - K / S 2 / K n を用いて実施した。

【図 13】図 13 は、Ad 3 - K / S / K n + Ad 3 - E / S / K n の SPR 分析および Ad 3 - K / S / K n と DSG2 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 mg / ml および 10 mg / ml) で DSG2 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 ) DSG2 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。Ad 3 線維ノブ (非二量体形成性)、Ad 3 - K / S / K n および Ad 3 - E / S / K n + Ad 3 - K / S / K n を 10 mg / ml で、および PtdD を 3 mg / ml で注入して、全ての反応を約 100 RU に正規化する (12 面体は 12 個の線維を有すること、および SPR 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 SPR データの要約および注入を終えた 150 秒後に算出された残りのシグナル。D ) 上皮の結腸がん T84 細胞上の DSG2 および Ad 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 XZ 共焦点像の層が示されている。細胞を、Cy - 3 で標識した Ad 3 粒子に 15 分曝露させ、洗浄し、固定し、抗 DSG2 抗体 (緑色) で染色した。Ad 3 粒子は赤色で現れる。スケールバーは 20 mm である。右側のパネルは、Ad 3 粒子が群がる 2 つの DSG2 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 mm 深部の XY 切片。この画像は、Ad 3 が、細胞表面上に露出している DSG2 分子と結合することを示唆している。DSG2 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チャンバー内で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（デスマソームの上）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40,000×である。E)より高い拡大率（100,000×）により、Ad3-K/S/Knで処置した後のデスマ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。

【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チャンバー内で培養した極性T84細胞を通じた<sup>14</sup>C-PAGE-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-PAGE-4,000を内部チャンバーに加えた。他に記載の通り（1）、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。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バーに加えた後、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）。希釀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。<sup>\*</sup>：希釀緩衝液と比較してP<0.05。C) 希釀緩衝液または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)または希釀緩衝液を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、希釀緩衝液（上のパネル）またはAd3-K/S/Kn(40mg/ml)と一緒に内部チャンバーに加えた。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

10

20

30

40

50

実験の独立した 10 画像からの G F P 陽性細胞を計数した。スケールバーは 20 mm である。F) Ad5 - G F P 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 40 mg / 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 - G F P 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 ウィルス粒子の構造。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）（PtdDd）。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 10 mg / 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、デスマソーム、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 はデスマ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 (5 µg / 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 °C 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 40 µm 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 °C 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（Amievaら、2003 年）を固定液と一緒に加えた。密着結合（デスマソームの上、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 1 µm 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-P EG-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-P EG-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（Amieva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 × 10<sup>6</sup> 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 200 mm<sup>3</sup> に達した時、JO-1 (200 µl の PBS 中 2 mg / 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 200 µl 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 20 µm 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エスタンプロット分析（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。右側のパネル：

ル：同じ抗 DSG2 抗体を腫瘍組織のウエスタンプ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、Erk1/2、リン酸化された Erk1/2、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プロット分析。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 Erk1/2 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、JO - 1 により、HCC1954 乳がん上皮内腫瘍 (breast cancer tumors in situ) 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。10 腫瘍を担持するマウスに、PBS または JO - 1 (2 mg / kg) 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 12 時間後に腫瘍を採取した。A) 切片を、ヒト IgG (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 20 μm である。B) 腫瘍におけるヒト IgG (トラスツズマブ) についてのウエスタンプロット分析。Ig の重鎖 (HC) および軽鎖 (LC) が矢印により示されている。膜にプロッティングされた総タンパク質についての Ponc eau 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、JO - 1 により、HCC1954 乳がん上皮内腫瘍 (breast cancer tumors in situ) 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。20 腫瘍を担持するマウスに、PBS または JO - 1 (2 mg / kg) 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 12 時間後に腫瘍を採取した。A) 切片を、ヒト IgG (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 20 μm である。B) 腫瘍におけるヒト IgG (トラスツズマブ) についてのウエスタンプロット分析。Ig の重鎖 (HC) および軽鎖 (LC) が矢印により示されている。膜にプロッティングされた総タンパク質についての Ponc eau 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、JO - 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 mAb による死滅が増加することを示す図である。30 A) 極性 BT474 細胞培養物に対する Her2/neu 染色（緑色）および DSG2 染色（赤色）の共焦点顕微鏡写真 (XY 画像および XZ 画像)。PBS 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、JO - 1 (20 μg / 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 度でインキュベートし、1 時間後および 16 時間後に分析した。XY 画像は、細胞表面（左側）および細胞表面の 2 μm 下の切片を示す。スケールバーは 40 μm である。B) 極性 A549 肺がん細胞に対する EGFR (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。40 C) JO - 1 により、トラスツズマブによる Her2/neu 陽性乳がん細胞の死滅が増強される。BT474 細胞を、JO - 1 (5 μg / ml) または PBS と一緒にインキュベートした。1 時間にトラスツズマブ (15 μg / ml) を加えた。3 時間に、以前に記載の通り (Wangら、2010 年) WST - 1 アッセイによって細胞の生存率を測定した。PBS で処置した細胞の生存率を 100 % とした。n = 5、トラスツズマブ対 JO - 1 + トラスツズマブについて P < 0.05。代表的な画像が示されている。実験を 3 回繰り返した。D) JO - 1 により、EGFR 陽性 A549 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 JO - 1 + セツキシマブに対して P < 0.05。

【図 20】図 20 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。50 A) 合計  $4 \times 10^6$  個の BT474 - M1 細胞、(BT474 の腫瘍形成性サブクローン) を、CB17 - SCID / ベージュ

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日目における腫瘍体積は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 Her 2/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1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、Her 2/neu陽性胃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：Her 2/neu陽性ヒト胃がん細胞 (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：皮下のヒト胃がん (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、 $P < 0.01$ 。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日目まで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來の肺。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(2mg/kg)または腹腔内注射(4mg/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、1mg/kgのJO-1を静脈内注射し、1mg/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100mm<sup>3</sup>に達した時)、マウスに2mg/kgのPtDdを静脈内注射し、その10時間後にセツキシマブ(10mg/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2mg/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(10mg/kg)またはPBSを腹腔内注射した。この処置を38日目まで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來の肺。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。

【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(2mg/kg)または腹腔内注射(4mg/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、1mg/kgのJO-1を静脈内注射し、1mg/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100mm<sup>3</sup>に達した時)、マウスに2mg/kgのPtDdを静脈内注射し、その10時間後にセツキシマブ(10mg/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2mg/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(10mg/kg)またはPBSを腹腔内注射した。この処置を38日目まで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來の肺。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。

【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HCC1954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。

【図24】図24は、Ad3、Ad7、Ad11、Ad14、およびAd14a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. Deutshcer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 Human 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(A1a; 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、「Ad3」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

10

20

30

40

50

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、デスマグレイン (desmoglein) - 2 (DSG2) 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。 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。上皮細胞では、 DSG2 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觸している一連のタンパク質と相互作用する。 DSG2 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 DSG2 と結合することは、 DSG2 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、 DSG2 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 】

DSG2 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、囊胞性線維症、間質性肺疾患、肺炎を含む）、脾管障害、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）、胰管障害（これらに限定されないが、胰炎を含む）、および胆管障害（これらに限定されないが、胆管閉塞症、胆囊炎、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、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304050

転移した腫瘍を包含する。

**【0035】**

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（recurrence）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（recurrence）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。

**【0036】**

20

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。

**【0037】**

30

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。

**【0038】**

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。

40

**【0039】**

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。

**【0040】**

本明細書で使用される場合、「AdB-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DSG2を使用する任意のアデノウイルス血清型である。今まで、Ad3、Ad7、Ad11、Ad14、およびAd14aの血清型が同定されている。他のAd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DSG2結合アクセイに基づいて、AbD-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DSG2を含有するセンサーを使用した表面プラズモン共鳴（

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 】

アデノウイルスピリオンは、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；いくつもの 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 卷 : 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ピ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產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、JO-1（実施例において自己二量体形成性Ad3線維誘導体と記載されている）は、単鎖の組換えAdB-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、JO-1は、本発明によるAdB-2/3線維多量体である。

#### 【0046】

多量のAdB-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、PtdD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AdB-2/3線維多量体（例えば、JO-1など）を組換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

#### 【0047】

したがって、本発明の方法は、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存在しない修飾（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、AdB-2/3線維多量体の「等価物」であり、DSG2と結合する働きをし、また、多量体形成し、DSG2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。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。1つの非限定的な例では、標識した化合物（例えば、FITC-デキストランなど）の、候補AdB-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AdB-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、CD46、クローディン7、およびZO-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

#### 【0048】

AdB-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AdB-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（Huang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AdB-2/3ウイルス、およびAd5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。40

#### 【0049】

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-Ab1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)、インターラーティング抗生物質、キナーゼ阻害剤、ラバマイシン阻害剤の哺乳動物標的、マイクロRNAのマイトジエ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(アデノシン二リン酸)-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。  
10

#### 【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、アバジコン、ベンダムスチン、プロスタリシン、ブルファン、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бин、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、ミトプロニトール、ミトラクトール、ニムスチン、ナイトロジエンマスターD-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、マトリックスマタロプロテイナーゼ-2(MMP-2)阻害剤、マトリックスマ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)(ペメトレキセドニナトリウム、LY231514、MTA)、5-アザシチジン、XELODA(登録商標)(カペシタбин)、カルモフルール、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бин、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-リボフラノシリルイミダゾール-4-カルボキサミド)、エノシタбин、エチニルシチジン(ethynodiolide)、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бин)、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(pralatraxate)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、リバビリン、トリアピン(triapine)、トリメトレキサート、S-1、チアゾフリン、テガフルール、TS-1、ビダラビンなどを含めた代謝拮抗  
20  
30  
40  
50

薬； A T - 1 0 1 ( ( - ) ゴシポール) 、 G E N A S E N S E ( 登録商標 ) ( G 3 1 3 9 10  
 またはオブリメルセン ( B c 1 - 2 - ターゲティングアンチセンスオリゴヌクレオチド )  
 ) 、 I P I - 1 9 4 、 I P I - 5 6 5 、 N - ( 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 - - ( ( ( 1 R ) - 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 ) ( A B T - 7 3 7 ) 、 N - ( 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 - ( ( ( 1 R ) - 3 - ( モル 20  
 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 ( A B T - 2 6 3 )  
 、 G X - 0 7 0 ( オバトクラックス ) などを含めた B c 1 - 2 タンパク質阻害剤 ; D A S 25  
 A T I N I B ( 登録商標 ) ( B M S - 3 5 4 8 2 5 ) 、 G L E E V E C ( 登録商標 ) ( イ  
 マチニブ ) などを含めた B c r - A b 1 キナーゼ阻害剤 ; A Z D - 5 4 3 8 、 B M I - 1  
 0 4 0 、 B M S - 0 3 2 、 B M S - 3 8 7 、 C V T - 2 5 8 4 、 フラボピリドール ( f l  
 a v o p y r i d o l ) 、 G P C - 2 8 6 1 9 9 、 M C S - 5 A 、 P D 0 3 3 2 9 9 1 、  
 P H A - 6 9 0 5 0 9 、 セリシクリブ ( s e l i c i c i l i b ) ( C Y C - 2 0 2 、 R -  
 ロスコビチン ) 、 Z K - 3 0 4 7 0 9 などを含めた C D K 阻害剤 ; A B X - E G F 、 抗 E 30  
 G F R 免疫リポソーム ( i m m u n o l i p o s o m e ) 、 E G F - ワクチン、 E M D -  
 7 2 0 0 、 E R B I T U X ( 登録商標 ) ( セツキシマブ ) 、 H R 3 、 I g A 抗体、 I R E  
 S S A ( 登録商標 ) ( ゲフィチニブ ) 、 T A R C E V A ( 登録商標 ) ( エルロチニブまたは O S I - 7 7 4 ) 、 T P - 3 8 、 E G F R 融合タンパク質、 T Y K E R B ( 登録商標 )  
 ( ラパチニブ ) などを含めた E G F R 阻害剤 ; C P - 7 2 4 - 7 1 4 、 C I - 1 0 3 3 ( 35  
 カネルチニブ ) 、 H E R C E P T I N ( 登録商標 ) ( トラスツズマブ ) 、 T Y K E R B ( 登録商標 )  
 ( ラパチニブ ) 、 O M N I T A R G ( 登録商標 ) ( 2 C 4 、 ペルツズマブ ) 、 T A K - 1 6 5 、 G W - 5 7 2 0 1 6 ( イオナファルニブ ( i o n a f a r n i b ) ) 、  
 G W - 2 8 2 9 7 4 、 E K B - 5 6 9 、 P I - 1 6 6 、 d H E R 2 ( H E R 2 ワクチン )  
 、 A P C - 8 0 2 4 ( H E R - 2 ワクチン ) 、 抗 H E R / 2 n e u 二重特異性抗体、 B 7  
 . h e r 2 I g G 3 、 A S H E R 2 三機能性二重特異性抗体、 m A b A R - 2 0 9 、 40  
 m A b 2 B - 1 などを含めた E r b B 2 受容体阻害剤 ; ロミデプシン、 L A Q - 8 2 4  
 、 M S - 2 7 5 、 トラポキシン、 ヒドロキサミン酸サブエロイルアニリド ( S A H A ) 、  
 T S A 、 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 ; 1 7 - A A G - n a  
 b 、 1 7 - A A G 、 C N F - 1 0 1 、 C N F - 1 0 1 0 、 C N F - 2 0 2 4 、 1 7 - D M 45  
 A G 、 ゲルダナマイシン、 I P I - 5 0 4 、 K O S - 9 5 3 、 M Y C O G R A B ( 登録商  
 標 ) ( H S P - 9 0 に対するヒト組換え抗体 ) 、 N C S - 6 8 3 6 6 4 、 P U 2 4 F C 1  
 、 P U - 3 、 ラディシコール、 S N X - 2 1 1 2 、 S T A - 9 0 9 0 V E R 4 9 0 0 9  
 などを含めた H S P - 9 0 阻害剤 ; T R A I L 、 T R A I L 受容体または細胞死受容体 ( 例  
 えば、 D R 4 および D R 5 ) を標的とする抗体または他の作用剤、 例えば、 アポマブ ( 50  
 a p o m a b ) 、 コナツムマブ ( c o n a t u m u m a b ) 、 E T R 2 - S T 0 1 、 G D  
 C 0 1 4 5 、 ( レクサツムマブ ) 、 H G S - 1 0 2 9 、 L B Y - 1 3 5 、 P R O - 1 7 6  
 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 ; シスプラチニン、 E  
 L O X A T I N ( 登録商標 ) ( オキサリプラチニン ) エプタプラチニン ( e p t a p l a t i  
 n ) 、 ロバプラチニン、 ネダプラチニン、 P A R A P L A T I N ( 登録商標 ) ( カルボプラチ  
 ニン ) 、 サトラプラチニン、 ピコプラチニン ( p i c o p l a t i n ) などを含めた プラチナ化  
 学療法薬 ; A V A S T I N ( 登録商標 ) ( ベバシズマブ ) 、 A B T - 8 6 9 、 A E E - 7  
 8 8 、 アキシチニブ ( A G - 1 3 7 3 6 ) 、 A Z D - 2 1 7 1 、 C P - 5 4 7 、 6 3 2 、  
 I M - 8 6 2 、 M A C U G E N ( ペガプラチニブ ( p e g a p t a m i b ) 、 N E X A V A  
 R ( 登録商標 ) ( ソラフェニブ、 B A Y 4 3 - 9 0 0 6 ) 、 パゾパニブ ( G W - 7 8 6 0  
 3 4 ) 、 バタラニブ ( P T K - 7 8 7 、 Z K - 2 2 2 5 8 4 ) 、 S U T E N T ( 登録商標 )  
 ( スニチニブ、 S U - 1 1 2 4 8 ) 、 V E G F ト ラップ、 Z A C T I M A T h i ( バン  
 デタニブ、 Z D - 6 4 7 4 ) などを含めた V E G F R 阻害剤 ; 樹状細胞療法 ( シプロイセ 55  
 50

ルT、Provenge(登録商標)；アクラルビシン、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(becatencarin)、ベロテカン、BN-80915、CAMPOTOSAR(登録商標)(塩酸イリノテカン)、カンプトテシン、デクスラゾキサン(dexrazoxine)、ジフロモテカン(diflomotecan)、エドテカリン、ELLENCE(登録商標)またはPHARMORUBICIN(登録商標)(エピルビシン)、エトポシド、エクサテカン(exatecan)、アブラキサン、イリノテカン(irinotecan)、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(orathecain)、ピラルビシン(pirarubicin)、ピキサントロン、ルビテカン(rubitecan)、ソブゾキサン、SN-38、タフルボシド(tafluposide)、トポテカンなどを含めたトポイソメラーゼ阻害剤；AVASTIN(登録商標)(ベバシズマブ)、CD40特異的抗体、chTNT-1/B、デノスマブ、ERBITUX(登録商標)(セツキシマブ)、HUMAX-CD4(登録商標)(ザノリムマブ(zanolimumab))、IGF-IR特異的抗体、リンツズマブ(lintuzumab)、PANOREX(登録商標)(エドレコロマブ)、RENCAREX(登録商標)(WX G250)、RITUXAN(登録商標)(リツキシマブ)、チシリムマブ、トラストツズマブ(trastuzimab)などを含めた抗体；ARIMIDEX(登録商標)(アナストロゾール)、AROMASIN(登録商標)(エキセメスタン)、アルゾキシフェン、CASODEX(登録商標)(ビカルタミド)、CETROTIDE(登録商標)(セトロレリクス)、デガレリクス、デスロレリン、DESOPAN(登録商標)(トリロスタン)、デキサメタゾン、DROGENIL(登録商標)(フルタミド)、EVISTA(登録商標)(ラロキシフェン)、AFEMEA(登録商標)(ファドロゾール)、FARESTON(登録商標)(トレミフェン)、FASLODEX(登録商標)(フルベストラント)、FEMARA(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、HECTOROL(登録商標)(ドキセルカルシフェロール)、RENADEL(登録商標)(セベラマー炭酸塩)、ラソフォキシフェン、酢酸リュープロリド、MEGACE(登録商標)(メゲストロール(megesterol))、MIFEPREX(登録商標)(ミフェプリiston)、NILANDRON(登録商標)(ニルタミド)、NOLVADEX(登録商標)(クエン酸タモキシフェン)、PLENAXIS(登録商標)(アバレリクス)、プレドニゾン、PROPECIA(登録商標)(フィナステリド)、トリロスタン(rilostane)、SUPREFACT(登録商標)(ブセレリン)、TRELSTAR(登録商標)(黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH))、VANTAS(登録商標)(ヒストレリンインプラント(Histrelin implant))、VETORYL(登録商標)(トリロスタンまたはモドラスタン(modrastane))、ZOLADEX(登録商標)(fosrelin(fosrelin)、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-2a、インターフェロンアルファ-2b、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ-1a、ACTIMMUNE(登録商標)(インターフェロンガンマ-1b)またはインターフェロンガンマ-n1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、ALFAFERONE(登録商標)(IFN-アルファ)、BAM-002(酸化型グルタチオン)、BEROMUN(登録商標)(タソネルミン)、BEXXAR(登録商標)(トシツモマブ)、CAMPATH(登録商標)(アレムツズマブ)、CTL4(細胞傷害性リンパ球抗原4)、デカルバジン、デニロ

イキン(denileukin)、エプラツズマブ、GRANOCYTE(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、MDX-010(抗CTL4)、黒色腫ワクチン、ミツモマブ(mitumomab)、モルグラモスチム、MYLOTARG(商標)(ゲムツズマブ、オゾガマイシン)、NEU

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 - mu 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 - ゲラン桿菌)、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) (ゲムシタビン)、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ビン)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；バタブリソウ (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ニアミド、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)、ビンフルニン、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R N A )、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 - アンドロスター - 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 (コンプレタスタチン (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) (ヒドロキシドキソルビシン) ; O : ビンクリスチン (O N C O V I N (登録商標) ) ; P : ブレドニゾン)、C Y P A T (登録商標) (酢酸シプロテロン)、コンプレタスタチン (c o m b r e a s t a t i n ) A 4 P 、D A B (3 8 9 ) E G F (H i s - A 1 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 (メシリ酸エキサテカン)、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

E N S E (登録商標)、G M K (ガングリオシド結合体化ワクチン)、G V A X (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 (h i s t e r e l i n)、ヒドロキシカルバミド、イバンドロン酸 (i b a n d r o n i c a c i d)、I G N - 1 0 1 、I L - 1 3 - P E 3 8 、I L - 1 3 - P E 3 8 Q Q R (シントレデキン・ベストドクス (c i n t r e d e k i n b e s u d o t o x))、I L - 1 3 - 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、J U N O V A N (登録商標) またはM E P A C T (登録商標) (ミファムルチド)、ロナファルニブ、5 , 1 0 - 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)、N E O V A S T A T (登録商標) (A E - 9 4 1 )、N E U T R E X I N (登録商標) (グルクロン酸トリメトレキサート)、N I P E N T (登録商標) (ペントスタチン)、O N C O N A S E (登録商標) (リボヌクレアーゼ酵素)、O N C O P H A G E (登録商標) (黒色腫ワクチン治療薬)、O N C O V A X (登録商標) (I L - 2 ワクチン)、O R A T H E C I N (登録商標) (ルビテカン (r u b i t e c a n))、O S I D E M (登録商標) (抗体ベースの細胞薬 (c e l l d r u g))、O V A R E X (登録商標) M A b (マウスモノクローナル抗体)、パクリタキセル、P A N D I M E X (登録商標) (2 0 (S) プロトパナキサジオール (a P P D) および2 0 (S) プロトパナキサトリオール (a P P T) 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、P A N V A C (登録商標) - V F (治験がんワクチン)、ペグアスパラガーゼ、P E G 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、レビマスター、R E M O V A B (登録商標) (カツマキソマブ)、R E V L I M I D (登録商標) (レナリドマイド)、R S R 1 3 (エファプロキシラル)、S O M A T U L I N E (登録商標) L A (ランレオチド)、S O R I A T A N E (登録商標) (アシトレチン)、スタウロスポリン (S t r e p t o m y c e s s t a u r o s p o r e s)、タラボスタッフ (P T 1 0 0)、T A R G R E T I N (登録商標) (ベキサロテン)、T A X O P R E X I N (登録商標) (D H A - パクリタキセル)、T E L C Y T A (登録商標) (カンホスファミド (c a n f o s f a m i d e)、T L K 2 8 6)、テミリフェン (t e m i l i f e n e)、T E M O D A R (登録商標) (テモゾロミド)、テスミリフェン (t e s m i l i f e n e)、サリドマイド、T H E R A T O P E (登録商標) (S T n - K L H)、チミタク (2 - アミノ - 3 , 4 - ジヒドロ - 6 - メチル - 4 - オキソ - 5 - (4 - ピリジルチオ) キナゾリジヒドロクロリド)、T N F E R A D E (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)、T R A C L E E R (登録商標) またはZ A V E S C A (登録商標) (ボセンタン)、トレチノイン (R e t i n - A)、テトランドリン、T R I S E N O X (登録商標) (三酸化ヒ素)、V I R U L I Z I N (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)、X C Y T R I N (登録商標) (モテキサフィンガドリニウム)、X I N L A Y (登録商標) (アトラセンタン)、X Y O T A X (登録商標) (パクリタキセルポリグルメクス)、Y O N D E L I S (登録商標) (トラベクテジン)、Z D - 6 1 2 6 、Z I N E C A R D (登録商標) (デクスラゾキサン)、Z O M E T A (登録商標) (ゾレドロン酸)、クリゾチニブ、ゾルビ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、デスマグレイン - 2 と結合する化合物、好ましくは、D S G 2 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 - 6 0 、ヨウ素 1 3 1 、イリジウム - 1 9 2 、ストロンチウム 8 9 、サマリウム 1 5 3 、レニウム 1 8 6 および鉛 2 1 2 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

10

20

30

30

40

50

、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、エプラツズマブ、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、オファツムマブ、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Campbell、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】

10

【表1】

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がん(non-squamous non-small cell lung cancer) (NSCLC)、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)、乳がんおよび膵がん、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-特異的マバツムマブ(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、膵がん
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がん(NSCLC)*、転移性乳がん*

【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ティングすること(「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Oli、Adv. Immunol.、44巻：65～92頁(1988年)；Verhoefferら、Science 239巻：1534～1536頁(1988年)；Padlan、Molec. Immunol. 28巻：489～498頁(1991年)；Padlan、Molec. Immunol. 31巻(3号)：169～217頁(1994年)；およびKettleborough、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') 断片を生成することができる。生じた  $F(ab') 断片を、ジスルフィド架橋が減るよう処理して  $Fab'$  断片を作製することができる。 $Fab'$  断片は、IgG抗体をパバイ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ます。 $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も作製することができる。 $Fab'$  断片は、 $F(ab') 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') 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ます。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') 断片の一部をコードするキメラ遺伝子は、そのような切斷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  $F(ab)_2$  および  $F(ab')_2$  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) 抗体の单一の腕の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または機能的なパラ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、および脾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ざ瘡様発疹など）を限定する機能を果たし得る。20

#### 【 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。30

#### 【 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、40

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。

#### 【0060】

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、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て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、巨大分子が粘膜閥門を通って通過することを可能にする能力を保有する、*Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) により產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ディン3およびクローディン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 (Graghty RJら (1998年) Science 280巻: 1618~1620頁) がある。

#### 【0061】

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); ACCUNEB (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 (pirbuterol) (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、トリア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 (formoterol) (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 (COMBİVENT (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 (tiopropiom) (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。

#### 【0062】

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

10

20

30

40

50

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クタ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。好みの一実施形態では、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。

### 【0063】

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クタ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 - ヒドロキシ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 ' - イソチオシアノ酸スチルベン - 2 , 2 ' ジスルホン酸、アクリジン、アクリジンイソチオシアネート、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 - ビニルスルホニル ] フェニルナフトイルイミド（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 ' ' - ジブロモピロガロール - スルホナフタレン（ブ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 ' - ディ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 ' - ディ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、ダニシルクロリド）、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、臭化工チジウム、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、ピレン酔酸、スクシンイミジル 1 - ピレン酔酸、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 (R h o d ) 、 5 , 6 - テトラメチルローダミン、ローダミン B 、ローダミン 1 2 3 、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 1 0 1 、スルホローダミン 1 0 1 のスルホニルクロリド誘導体 (T e x a s R e d ) 、 N , N , N ' , N ' - テトラメチル - 6 - カルボキシローダミン (T A M R A ) 、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 (T R I T C ) 、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、M o l e c u l a r P r o b e s 、E u g e n e 、O r e g およびR e s e a r c h O r g a n i c s 、C l e v e l a n d 、O h i o 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

#### 【 0 0 6 4 】

別の例では、イメージング剤は、磁気共鳴画像法 (M R I) 作用剤を含んでよく、一方、診断薬は、M R I 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。M R I 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M R I 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M R I 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 - N H <sub>2</sub> - B z - D T P A 、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 (D T P A ) 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M R I 作用剤を組み入れることにより、大きなT 1 弛緩（高い対比）および單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。M R I 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、M R I 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、1 8 F 、または6 4 C u もしくは6 8 G a 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P E T 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、S P E C T 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、P E T 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

#### 【 0 0 6 5 】

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 (P E T) 作用剤、コンピュータ断層撮影法 (C T) 作用剤、磁気共鳴画像法 (M R I) 作用剤、核磁気イメージング剤 (N M I) 、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>1 2 3</sup>I 、<sup>1 2 5</sup>I 、<sup>1 3 1</sup>Iなどを含めたヨウ素 (I) 、バリウム (B a ) 、ガドリニウム (G d ) 、<sup>9 9</sup>T c を含めたテクネチウム (T c ) 、<sup>3 1</sup>P を含めたリン (P ) 、鉄 (F e ) 、マンガン (M n ) 、タリウム (T l ) 、<sup>5 1</sup>C r を含めたクロム (C r ) 、<sup>1 4</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 1 1 、窒素 1 3 、酸素 1 5 、フッ素 1 8 、<sup>1 1</sup>C - 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 1 8 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P E T 作用剤を使用することができる。

30

#### 【 0 0 6 6 】

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A d B - 2 / 3 多量体との共有結合性結合体化は

40

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体腫瘍を含む。種々の非限定的な実施形態では、固体腫瘍は、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、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。10

#### 【 0 0 6 8 】

さらに別の態様では、本発明は、デスマグレイン 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 ) 細胞への 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 】

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。

#### 【 0 0 7 2 】

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、腔投与経路、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好ましい場合がある。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好ましい場合がある。

10

20

#### 【 0 0 7 3 】

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ポ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、特にポリエチレンギリコール（P E G）の共有結合による付着が用いられている。

#### 【 0 0 7 4 】

30

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 の間にわたらる。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。

40

#### 【 0 0 7 5 】

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 /

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】

10

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。好ましい一実施形態では、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。

20

## 【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ビリオン、AdB-2/3カプシド、AdB-2/3の12面体粒子（PtdDd）（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PtdDdなどのAdB-2/3のPtdDd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。

30

## 【0078】

40

50

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 ウィ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（d e i m m u n i z e d）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】

10

20

30

40

## 【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 ウィ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A dB-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A dB - 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A dB - 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】

30

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.

## 【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】

GVLTLKCLTPLTTGGSQLQLVGGGLT(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)GLTFNSNNIC(D/N)DNINTL

## 【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(Ad3)、配列番号2(Ad7)、配列番号3(Ad11)、配列番号4(Ad14)、および配列番号5(Ad14(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。AdB-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、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。DSG2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Adウイルス血清型のノブドメインの機能的等価物は、DSG2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、評価されている組換えポリペプチドがDSG2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。

#### 【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.
```

#### 【0098】

によるアミノ酸配列を含む、またはそれからなる。

#### 【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)SSESNDCKLILTVKTGALVTAFVYVIGVSN(N/D)FNMLTT(
Y/H)(R/K)NINFTAELFFDS(A/T)GNLLT(S/R)LSSLKPLNHKGQNMTGA(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)QTSATTLVTPFTFYIREDD
```

#### 【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(Ad3)、配列番号7(Ad7)、配列番号8(Ad11)、配列番号9(Ad14)、および配列番号10(Ad14a)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。AdB-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

10

20

30

40

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。

#### 【0103】

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有する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 フクロー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 卷：5 3 9 頁（1 9 9 1 年）、B a r a h m a n d - P o u r 、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 卷：1 2 1 ~ 1 2 8 頁（1 9 9 6 年）；K l e m m 、A n n u . R e v . I m m u n o l . 1 6 卷：5 6 9 ~ 5 9 2 頁（1 9 9 8 年）；K l e m m 、A n n u . R e v . I m m u n o l . 1 6 卷：5 6 9 ~ 5 9 2 頁（1 9 9 8 年）；H o 、N a t u r e . 3 8 2 卷：8 2 2 ~ 8 2 6 頁（1 9 9 6 年）；およびP o m e r a n z 、B i o c h e m . 3 7 卷：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 . 、E M B O J 7 卷（1 9 8 8 年）3 8 0 7 ~ 3 8 1 6 頁；H a u g e n 、T . 、E M B O J 7 卷（1 9 8 8 年）4 2 4 5 ~ 4 2 5 3 頁；M c B r i d e 、A . 、E M B O J 7 卷（1 9 8 8 年）5 3 3 ~ 5 3 9 頁；M c B r i d e 、A . 、P r o c N a t l A c a d S c i U S A 8 6 卷（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 1 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。

#### 【0104】

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 卷：7 0 7 1 ~ 7 0 7 8 頁（1 9 9 6 年）)。

#### 【0105】

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、10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、G1y-G1y-G1y-Ser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DSG2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】**

好ましい一実施形態では、組換えAdB-2/3ポリペプチドは、  
(a)それが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と  
(b)Ad3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、EVSALEK(配列番号22)および/またはKVSALE(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AdB-2/3ポリペプチドは、JO-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Histタグを有するJO-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、HIS、CBP、CYD(共有結合性だが解離可能なNorpDペプチド)、Strep II、FLAG、HPC(プロテインCの重鎖)ペプチドタグ、GST親和性タグおよびMBP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Antithozoa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

**【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、JO-1(配列番号20)多量体は、JO-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JO-1二量体を含む(すなわち:JO-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、AdB-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

40

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。

#### 【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。

#### 【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、本発明の治疗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、ならびにレラキ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、エプラツズマブ、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、オファツムマブ、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。

#### 【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、ポリア配列、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、

10

20

30

40

50

C M V、S V 4 0、R S V、アクチン、E Fを含めた種々のプロモーターのいずれかによつて駆動される)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)であつてよい。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、したがつて、標準の技法によつ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つ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つても真核生物であつてもよい。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デキストラノ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つ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つてもよい。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P t D d、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P t D d(例えば、Ad3のP t D d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、アポマブ、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、エプラツズマブ、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、オファツムマブ、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、規定のリングル液または乳酸リングル液、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、リポソーム、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。2030

**【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、組成物を不活性な增量剤または希釈剤、例えば、スクロース、コーンスター、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。

10

#### 【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) 強度調整剤；(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、チメロサール、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、ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタントリラウレート、ソルビタントリステアレート、ソルビタントリオレエート(sorbitan trioleaste)、またはそれらの組み合わせを含む。医薬組成物は、強度調整剤、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。例示的な強度調整剤としては、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。

20

#### 【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。

30

#### 【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

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、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EMT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、1種またはそれより多い種の試験化合物の存在下、D S G 2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、D S G 2との結合についてA d B - 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、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EMT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を提供する。10

**【0128】**

D S G 2との結合についてA d B - 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D S G 2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D S G 2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、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、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A d B - 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、A d B - 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、A d B - 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、D S G 2はA d B - 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、A d B - 2 / 3とD S G 2の結合を減らすことができる化合物は、A d B - 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

**【0129】**

この態様では、A d B - 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A d B - 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、A d B - 2 / 3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12面体粒子(P t D d)(A d B - 2 / 3の複製時にそれらにより產生されるウイルス成分の12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、J O - 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A d B - 2 / 3多量体とD S G 2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、D S Gは、組換えD S G 2を含む。別の実施形態では、方法は、細胞50

表面上に D S G 2 ( 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。

**【 0 1 3 2 】**

1 つの非限定的な実施形態では、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、 D S G 2 と結合する A d B - 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。

**【 0 1 3 3 】**

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、 D S G 2 を発現している上皮細胞に機能的な A d B - 2 / 3 ピリオング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

**【 0 1 3 4 】**

別の実施形態では、 D S G 2 を発現している細胞抽出物を電気泳動によって分離し、ウエスタンプロット分析し、標識した A d B - 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プロットを探索する。別の実施形態では、 W a n g ら、 J . V i r o l o g y ( 2 0 0 7 年 ) 8 1 巻 : 1 2 7 8 5 ~ 1 2 7 9 2 頁 ; および W a n g ら ( 2 0 0 8 年 ) 8 2 巻 : 1 0 5 6 7 ~ 1 0 5 7 9 年に記載のものなどのドットプロットアッセイを使用することができる。

**【 0 1 3 5 】**

A d B - 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

**【 0 1 3 6 】**

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ールを用いた標準の B o c ( N - アミノ保護された N - t - プ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 ( F m o c ) アミノ酸であってよい。 F m o c N - アミノ保護されたアミノ酸および B o c N - アミノ保護されたアミノ酸はどちらも、 S i g m a 、 C a m b r i d g e

30

R e s e a r c h B i o c h e m i c a l 、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。

**【 0 1 3 7 】**

40

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、 H a r l o w および L a n e 、 A n t i b o d i e s ; A L a b o r a t o r y M a n u a l 、 C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y 、 C o l d S p r i n g H a r b o r 、 N . Y . 、 ( 1 9 8 8 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。

**【 0 1 3 8 】**

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、 S a m b r o o k ら、 1 9 8 9 年、上記を参照されたい）。核酸は、 D N

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。10

#### 【実施例】

##### 【0140】

###### (実施例1)

デスマグレイン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(Ad)血清型Ad3、Ad7、Ad11、およびAd14によって使用される主要な高親和性受容体としてデスマグレイン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Ad3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。20

##### 【0141】

###### 諸言

ヒトアデノウイルス(Ad)は、現在55血清型を含有する6種(A~F)に分類されている。Ad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Ad血清型の場合は違う。最近、本発明者らはこ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<sup>2</sup>。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、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(Ad11)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。40

##### 【0142】

B種Adは、一般的なヒト病原体である。2005年から、血清型Ad3、Ad7、およびAd14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、Ad14の新規の病原性が高く毒性が強いと思われる株であるAd14aが発見された<sup>3~4</sup>。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<sup>5</sup>。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、AdB-2/3と称する。

##### 【0143】

AdB-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性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、およびデスマソーム）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<sup>1~1</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>1~2</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>1~3</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>1~4</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>1~5~1~8</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>2~1~9~2~3</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マグレイン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>2~4</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觸している一連のタンパク質と相互作用する<sup>2~5</sup>。DSG2は、胃がん<sup>2~6</sup>、扁平上皮癌<sup>2~7</sup>、黒色腫<sup>2~8</sup>、転移性前立腺がん<sup>2~9</sup>、および膀胱がん<sup>3~0</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>3~1</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>3~2</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（Bsd）またはAd3ペントンベースと線維（Ptdd）で構成される組換えAd3-12面体を利用した（図1b）<sup>3~3</sup>。PtddはAd3の細胞への付着を遮断するが、Bsd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、50

図1c)。細胞をP<sub>t</sub>D<sub>d</sub>と一緒にプレインキュベートすることにより、B<sub>s</sub>D<sub>d</sub>と混合したA<sub>d</sub>3ノブよりもA<sub>d</sub>3の結合が阻害された(図1d)。形質導入試験では、P<sub>t</sub>D<sub>d</sub>は、A<sub>d</sub>3ベクター(A<sub>d</sub>3-GFP)を効率的に遮断したが、A<sub>d</sub>35ベクター(A<sub>d</sub>35-GFP(受容体としてCD46を使用する))の形質導入は遮断せず(図2b)、P<sub>t</sub>D<sub>d</sub>のA<sub>d</sub>3と競合する能力も確認された。A<sub>d</sub>3-GFP(図1e)およびA<sub>d</sub>35-GFP<sup>3,4</sup>は、E3領域にCMV-GFP発現カセットを挿入した、野生型A<sub>d</sub>3ベースのベクターおよび野生型A<sub>d</sub>35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<sub>d</sub>3ウイルスの結合を比較した(図2c)。A<sub>d</sub>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<sub>d</sub>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<sub>d</sub>3の結合は、Ramos(ヒトバーキットリンパ腫)細胞においてのみ見られなかった。

## 【0148】

A<sub>d</sub>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、プロッティングした。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<sub>d</sub>受容体であるCD46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、CD46-ターゲティングA<sub>d</sub>5/35++ビリオンと一緒にインキュベートし<sup>3,5</sup>、CD46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<sub>d</sub>3ビリオンと一緒にインキュベートすることにより、160kDaの分子量および90kDa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<sub>d</sub>3のP<sub>t</sub>D<sub>d</sub>は、130kDa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<sub>d</sub>3と結合しない細胞では、160kDaのバンドおよび90kDa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130kDaのP<sub>t</sub>D<sub>d</sub>結合バンドが現れ、これは、それがA<sub>d</sub>3ウイルス受容体ではないことを示している。160kDa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、160kDaのバンドおよび90kDa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、160kDaのバンドが完全なサイズのDSG2を表すこと、および90kDa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プ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<sub>d</sub>3ビリオンはDSG2と相互作用するが、A<sub>d</sub>2ビリオンまたはA<sub>d</sub>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<sub>t</sub>D<sub>d</sub>はDSG2と結合したが、B<sub>s</sub>D<sub>d</sub>粒子はDSG2と結合しなかった(図2h)。P<sub>t</sub>D<sub>d</sub>-DSG2相互作用のK<sub>D</sub>(平衡解離定数)は2.5nMであった。固定化したDSG2とP<sub>t</sub>D<sub>d</sub>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)。結合動力学のSPR分析により、A<sub>d</sub>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】

10

20

30

40

50

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(デスマグレイン1 - D S G 1 およびデスマコリン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( $P < 0 . 0 0 1$ )(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293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 の発現の百分率が実現されるように)、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ークが見いだされた。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%でブロートーに達した。A d 3 の感染におけるD S G 2 の決定的な役割を決定的に証明するために、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)。

【0153】

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15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15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。

【0154】

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)。

【0155】

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。

【0156】

A d 3 とD S G 2 の相互作用によりEM 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、EM Tが誘発されることを見いだした。EM 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EM 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ポカリン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12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430の遺伝子が>1.5倍に上方制御され、352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、Pathway - Express 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)、マイトジエン活性化プロテインキナーゼ(M A P K aka 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EM Tに関与す

10

20

30

40

50

るいくつも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プロット分析により、P t D d は、PI3K およびMAPK / ERK1 / 2、すなわち、EMT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6f）。これらの経路の活性化は、DSG2特異的mAb（6D8、およびそれよりも劣った程度で、10D2、および13B11）によっても誘発されたが、CD46を対象とするmAbでは誘発されなかつた。DSG2 siRNAをトランスフェクトした細胞におけるMAPK / ERK1 / 2 およびPI3Kのリン酸化が減少したが、対照siRNAで処置した細胞ではそれが減少しなかつたので、経路のP t D d による活性化はDSG2によって媒介される。最後に、細胞を、ERK1 / 2阻害剤であるUO126（上のパネル）またはPI3K阻害剤であるWortmannin（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つた。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Ad3またはAd3P t D d がDSG2と結合することによりEMTが誘発されることが示唆されている。  
10

#### 【0158】

Ad3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。Ad3ビリオンに誘発されるEMTまたはAd3のP t D d に誘発されるEMT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閑門の性質について試験した。まず、4kDaのFITC - デキストランの、transwellチャンバー内で培養した集密的な極性BT474細胞を通る流束を測定した（図7a）。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（PBS）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は増加しないことが見いだされた。次いで、Ad3に誘発されるEMTまたはP t D d に誘発されるEMT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、Ad35およびAd5 / 35に対する高親和性受容体であるCD46である<sup>8</sup>。多数のCD46分子がBT474細胞の結合に局在することが確認された（図7b、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 - Ad35のBT474細胞への付着が有意に増加した（図7b、右側のパネル）。皮下の上皮腫瘍においてin vivoで、CD46 - ターゲティングAd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7c）。Ad5 / 35 - bGal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。Ad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1μg当たり2.3 (+/- 0.2) × 10<sup>5</sup> rlu、2.7 (+/- 0.6) × 10<sup>5</sup> rlu、および3.8 (+/- 3.5) × 10<sup>5</sup> rluであった。  
20  
30

#### 【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ニ（トラスツズマブ）に対する受容体であるHer2/neuが、細胞間結合タンパク質であるクローディン7と共に染色されることが見いだされた（図7d）。これは、Her2/neu分子の全てがハーセプチニと接近できるわけではないことを示唆している。Her2/neu陽性乳がん細胞株BT474をP t D d と一緒にインキュベートすることにより、Her2/neuの細胞表面への再局在が誘発された（図7e）。この知見を強化するために、Ad3またはAd3P t D d により、ハーセプチニによるBT474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>4,1</sup>、ハーセプチニにより、BT474細胞のおよそ25%の死が引き起こされた（図7f）。BT474細胞を、UVにより不活化したAd3粒子またはP t D d と一緒にプレインキュベートすることにより、ハーセプチニ細胞傷害性が2倍超増加した。UVにより不活化したAd5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ニによる死滅に  
40  
50

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つた（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）。EMT に関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を試験した。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 10 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つ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）。

#### 【 0 1 6 0 】

##### 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、ii ) A d と D S G 2 の相互作用により細胞間結合が開口し、したがつて、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。 20

#### 【 0 1 6 1 】

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つた。A d 3 線維ノブドメインをベイ 30 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つた<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。

#### 【 0 1 6 2 】

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 の結合によつ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。これに沿つて、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>。 40

#### 【 0 1 6 3 】

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 50

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。

#### 【 0 1 6 4 】

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 7 6 % 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

#### 【 0 1 6 5 】

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閑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 / 3 5 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ることを実証した。20

#### 【 0 1 6 6 】

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。

#### 【 0 1 6 7 】

##### 方法

30

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 1 2 面体（P t D d ）および基部の 1 2 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 2 0 G 1 、 7 H 9 、 1 3 B 1 1 、 1 0 D 2 および 8 E 5<sup>4 9</sup> を、ハイブリドーマ培養物の上清から精製した。

#### 【 0 1 6 8 】

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 × 1 0<sup>5</sup> 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 μm ）( 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 1 0 日間にわたって培養した。40

#### 【 0 1 6 9 】

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 1 1 p ( S l o b i t s k i 株 ) 、 A d 1 4 ( D e W i t 株 ) 、および A d 3 5 ( H o l d e n 株 ) を、 A T C C から得た。A d 1 4 a は A d 1 4 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-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のシリングおよび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-メルカプトエタノール、1mMのPMSF、0.5%のBrrij96V(Fluka、St Louis、MO)に再懸濁させた。デスマソームタンパク質は、極めて不溶性であるのでBrrij96Vを界面活性剤として使用することが役立った。  
10  
20

#### 【0171】

Ad3およびPtdDを用いたウエスタンプロット。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Brrij96V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。  
30

#### 【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。  
40

#### 【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、CAAUAUACCUGUAGUAGAA(配列番号29)、GAGAGGAUCUGUCCAAGAA(配列番号30)、CCUUAGAGCUACGCAUUAA(配列番号31)およびCCAG  
50

UGUUCUACCUAAAUA(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>52</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>53</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CB17SCID - 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10mg/kgの用量で腹腔内に注射した。PTDdを2mg/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>54</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., Veiseh, 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. Fischetti, 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). 10
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). 20
30. Abiod, 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). 30
34. Gao, W., Robbins, P.D. & Gamblotto, 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). 40

## 【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】

50

(実施例 2 )

ウイルスがデスマグレイン 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。

【 0 1 8 3 】

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 Ad 3 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、デスマグレイン 2 (DSG 2) を同定した。本実施例では、Ad 3 と DSG 2 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 CD 46 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 Ad 3 線維ノブでは、Ad 3 の感染は非効率的にしか遮断されない。Ad 3 内の DSG 2 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、Ad 3 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 (Ad 3 - K / S / Kn)。Ad 3 - K / S / Kn は DSG 2 と高親和性で結合し、Ad 3 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、Ad 3 - K / S / Kn は、DSG 2 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 Ad 3 - 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 Her 2 / neu への接近が増大した。Ad 3 - 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 Ad 5 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、Her 2 / neu 陽性乳がん細胞を Ad 3 - K / S / Kn で前処置することにより、Her 2 / 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（ハーセプチニン）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 Ad 3 - 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。

【 0 1 8 4 】

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 CD 46 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。

【 0 1 8 5 】

この試験では、Ad 3 と DSG 2 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、DSG 2 と高親和性で結合するためには Ad 3 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 CD 46 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 Ad 3 - DSG 2 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、Ad 3 にとって機能的に重大である。

【 0 1 8 6 】

材料および方法

タンパク質および抗体。組換えヒト DSG 2 タンパク質は Leinco Technologies, Inc. (St. Louis, MO) から入手した。組換え Ad 3 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

10

20

30

40

50

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(34)。組換えAd3ペントン12面体(PtDd)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)。

#### 【0187】

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DSG2(R&D Systems, Inc.、Minneapolis, MN)、マウスマAb抗DSG2(クローン6D8)(Cell Sciences, Canton, MA)、ウサギ抗クローディン7(abcam, Cambridge, MA)、FITCと結合体化したヤギ抗アデノウイルス(Millipore Billerica, MA)、モノクローナル抗6xHis(Serotec, MCA1396)、ウサギ抗ZO-1抗体(Cel1 Signaling Technology Inc., Beverly, MA)。精製された組換えAd3ノブに対するポリクローナルウサギ抗体は、PickCell Laboratories B.V.(Amsterdam, The Netherlands)によって作製された。モノクローナル抗DSG2抗体である20G1、7H9、13B11、10D2および8E5(12)は、ハイブリドーマ培養物の上清から精製した。

#### 【0188】

組換えAd3線維ノブ。組換えAd3線維ノブであるS/Kn、S2/Kn、S3/Kn、S4/Kn、S5/Kn、およびS6/Knを、Ad3ゲノムDNAを鑄型として用いたPCRによって生成した。次いで、PCR産物を、BcI/HindIII断片またはBamHI/HindIII断片としてE.coli発現ベクター-pQE30にクローニングした。以下のプライマーを使用した：

#### 【0189】

#### 【化7】

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

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

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

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

S2/Kn-フォワード：5'-TTACTGATGAATTCTGGATCC AACAAACTTGCAGTAACTCGGAAATGG-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ス：5' -A G C T A A T T A A G C T T A G T C A T C T T C T C T A A T A T A G G -3'（配列番号39）

#### 【0190】

Ad3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、BamHI断片としてpQE30にクローニングした。

#### 【0191】

## 【化8】

pQE30-Kcoli用：

5' ATCAAAGGTAAGCGCTTAAAGGAGAAAGTTCAGCACTAAAGAAAAGGTATCCGCTTAAAGGAGAAAGTTCAGC  
ACTTAAAGAAAAAGTGTCCGCTCTGAAAGAAG-3' (配列番号40) および

5' GATCCTCTTCAGAGCGGACACTTTCTTAAGTGCTGAAACTTCTCCTTAAAGCGGATACCTTCTTAAGT  
GCTGAAACTTCTCCTTAAAGCGCTTACCTT-3' (配列番号41)

pQE30-Ecoil用

5' ATCAGAGGTAAGCGCTTAGAGAAAGAAGTTCAGCACTTGAGAAGGAGGTATCCGCTTAGAGAAAGAAGTTCAGC  
ACTTGAGAAGGAAGTGTCCGCTGGAAAAAG-3' (配列番号42) および

5' GATCCTTTCCAGAGCGGACACTCCTCTCAAGTGCTGAAACTTCTCTAAAGCGGATACCTCCTCTCAAGT  
GCTGAAACTTCTTCTAAAGCGCTTACCTCT-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' ATCTAGGATCCGGTGGCGGTCTGGCGGTGGCTCCGGTGGCGGTCTAACAAACTTGAGTAAACTCGGAAATGGTC  
TTACATTGACT-3' (配列番号44)

20

リバース：5' AGCTAATTAAAGCTTAGTCATCTCTCTAAATATA  
GG-3' (配列番号45)

## 【0194】

次いで、PCR 産物を、pQE30-Kcoli 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' TTATTGCTACTGGATCCGGTGGCGGTCTGGCGGTGGCTCCGGTGGCGGTCTAACATTCTATTGACTGAAATAACA  
C-3' (配列番号46)

リバース：5' AGCTAATTAAAGCTTAGTCATCTCTCTAAATATA  
GG-3' (配列番号47)

## 【0196】

次いで、PCR 産物を、pQE30-Kcoli 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, ATCC) 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。BTK474-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 (ATCCCCL-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 × 10<sup>5</sup> 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)。Ad5/3S-GFP および Ad5-GFP は、Ad3S 線維および Ad5 線維と CMV-GFP 発現力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 発現力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 発現力セットが 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'-GACACGGAAACCGGTCTCCAACTGTGCCTTCTTACTCC-3') (配列番号48)

、SR (5'-GCAGTTGGCTTCTGGTTTGACCTGTCCACAAAGTTAGCTTATCATTATTTGTTCC-3') (配列番号49)、KF (5'-GGAAACAAAAATAATGATAAGCTAACCTTGAGCACGGTCCAAAACCAGAAGCCAATGC-3') (配列番号50)、KR (5'-TGAAAATAAACACGTTGAAACATAACACAATAGTTCTTATTCTGGGCATTAGTCATCTCTCAATATAGGAAAGGTAAATG-3') (配列番号51)、R1 (5'-CATTACCTTTCCCTATATTAGAGAAGATGACTAAATGCCAAGAATAAAGAAACTAGTTGTTATGTTCAACGTGTTATTTCA-3') (配列番号52) および R2 (5'-ATACTTAGGGTACCAATCGATATGCCACGTGGTTCTGTGGTCCC-3') (配列番号53)。Ad5/3S-GFP 用、SF (5'-ACGAAACCGGTCTCCAACTGTGCCTTCTTACTCCTCCCTTGATCC CCAAATGGGTTCAAGAGAGTCCCCCTGGGTTTAAGTCTTAAATGTG-3') (配列番号54)、KR (5'-GAAA AATAAACACGTTGAAACATAACACACTCGAGTCTTATTCTGGGCATTAGTCATCTCTCAATATAGGAAAGGTA ATG-3') (配列番号55)、R1 (5'-CATTACCTTTCCCTATATTAGAGAAGATGACTAAATGCCAAGAATA AAGACTCGAGTGTGTTATGTTCAACGTGTTATTTTC-3') (配列番号56) および R2 (5'-ATACTTAGGG TACCAATCGATATGCCACGTGGGTTCTGTGGTCCC-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 発現力セットを含有するシャトルプラスミドを、E.coli 株 B J 1583 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 PaciI 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】

260 nm 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。Vero sen e 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 度 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

10

20

50

30

40

50

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（V.P.）の数を、ビ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（P.t.D.d.、線維ノブ、抗体）4.5 μgを接着緩衝液中、4℃で60分にわたり付着させ、細胞をP.B.S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、<sup>3</sup>Hで標識したA.d.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M.O.Iで1時間にわたってA.d.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G.F.Pの発現をフローサイトメトリーによって測定した。

## 【0203】

10

A.d.5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（M.O.I、ウイルス濃度、曝露時間）を用いた（33）。

## 【0204】

20

ウエスタンプロット：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 μgのタンパク質を2×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（U.B.）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 μgのタンパク質を2×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】

30

浸透性アッセイ。合計5×10<sup>5</sup>個のT84細胞を、12 mmのtranswellインサート（PET膜、孔サイズ0.4 μm（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（D MEM、1% FBS、2 mMのMgCl<sub>2</sub>、20 mMのHEPES）中のDSG2リガンド（20 μg/ml）に室温で15分間曝露させた。次いで、D MEM/K12培地で希釈した1 mCiの[<sup>14</sup>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）。

40

## 【0207】

トラスツズマブ細胞毒性アッセイ。ウェル当たり5×10<sup>4</sup>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 μg/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 μg/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P.B.Sで2回洗浄し、次いで、メタノール/アセトン（1:1 vol/vol）

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 PBS で 2 回洗浄し、500 μl の PBS / 2 % の粉乳を用いて室温で 20 分間遮断した。抗体染色を、100 μl の PBS 中、37 で 90 分間または 4 で一晩実施した。必要であれば、PBS 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。PBS 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。Leica D F C 3 0 0 F X デジタルカメラを用いて写真を取得した。Zeiss META 共焦点顕微鏡で、40 × 油浸レンズ ( oil lens ) または 100 × 油浸レンズおよび Zeiss 510 ソフトウェア ( Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY ) を使用して共焦点像を取得した。

10

## 【 0 2 0 9 】

電子顕微鏡。Transwell チャンバー内の極性細胞を、半強度カルノフスキーフィクシヨン試薬 ( 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、アンモニア処理されている ) は、Alfa Aesar ( Ward Hill, MA ) から購入した。1 % の OsO<sub>4</sub> - リン酸緩衝液を用いた後固定を行った。次いで、Transwell チャンバーから膜を取り取り、Medcast ( Ted Pella, Redding, CA ) 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 JEOL JEM 1200 EX II 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 i TEM ソフトウェアを使用した。

20

## 【 0 2 1 0 】

siRNA 試験。DSG2 特異的 siRNA のセットは、Dharmacon ( Theermo Scientific ) によって合成された。標的配列は、CAAUAAUACCUGUAAGUAGAA ( 配列番号 29 ) 、GAGAGGAUCUGUCCAAAGAA ( 配列番号 30 ) 、CCUUAGAGCUACGCCAUAAA ( 配列番号 31 ) および CCA GUGUUCUACCUAAAAA ( 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。合計 1 × 10<sup>5</sup> 個の HeLa に、1 ug の DSG2 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、上記の通り versene を用いて細胞を収集し、<sup>3</sup>H - Ad 3 ウイルスまたは <sup>3</sup>H - Ad 35 ウイルスの付着を分析した。siRNA をトランスフェクトした 48 時間後、細胞を、Ad ベクターを 50 pfu / 細胞の MOI で用いて感染させ、18 時間後に GFP の発現を分析した。

30

## 【 0 2 1 1 】

表面プラズモン共鳴 ( SPR ) 分析。BIAcore X 機器で取得を行った。全ての実験において、2 mM の CaCl<sub>2</sub> を補充した HBS - N ( GE - Healthcare, Pittsburgh, PA ) をランニング緩衝液として、毎分 5 μl の流速で使用した。DSG2 ( Leinco Technology, Inc. ) を 10 mM の酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.2 中に 0.1 μg / 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、エチル (ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド ( EDC ) / N - ヒドロキシスクシンイミド ( 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 Ad 3 線維ノブまたは PtdD 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 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。

40

## 【 0 2 1 2 】

ビオチン化したリガンドを用いた実験のために、CM4 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、ストレプトアビシン ( 酢酸緩衝液中 0.1 μg / ml )

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、ビオチン化したリガンドをこれらの 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 ピリオングまたは PtdDd 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（PtdDd 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 発現力セットを含有する 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 ピリオング内の DSG2 相互作用ドメインに対する競合剤として使用した PtdDd 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 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（14、35）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产生させた（図10A）。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プロット分析により、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10B、C）。以前に観察された通り（33）、A d 3 線維ノブ + 1つのシャフトドメイン（S / K n ）はウエスタンプロット分析において D S G 2 と結合せず、これは、A d 3 ノブコンフォー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10D、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10F）。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10G）、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ので、A d 3 に独特的な新しいA d 結合戦略であると思われた（図10H）。

### 【 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、高親和性で互いに相互作用する 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（17）。それぞれ E V S A L E K (配列番号22) (K - コイル) の5つの反復および K V S A L K E (配列番号23) (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11A）。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11B）。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

10

20

30

40

50

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 ( $P < 0.05$ )、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)。

#### 【0218】

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 65 ~ 70 kDa) 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 のどちらにあっても、A d 3 のHe 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)。He 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)。

#### 【0219】

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値に依存するはずであり、数値は、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  $2 \times$  三量体、P t D d については  $12 \times$  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 (33)) (「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 A d 3 - K / S / K n および A d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K n が、A d 3 線維ノブよりもゆっくりと D S G 2 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、A d 3 - K / S / K n および A d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K n がいくつかの D S G 2 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、A d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K n 内の全ての二量体が A d 3 - K / S / K n 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。

## 【 0 2 2 0 】

10

A d 3 といいくつかの D S G 2 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 1 3 D および E）。C y 3 で標識した A d 3 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 D S G 2 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、P t D d と D S G 2 が結合することにより、上皮細胞において上皮間葉転換（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された。

## 【 0 2 2 1 】

20

多量体の D S G 2 リガンド（A d 3 ビリオン、P t D d、A d 3 - K / S / K n）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、およびデスマソーム）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 1 4 A は、極性結腸がん T 8 4 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 X Z 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 およびデスマソームタンパク質である D S G 2 がマーカーとなる長い垂直方向の筋として目に見える。D S G 2（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 Z O - 1 は、D S G 2 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、X Y 画像においても可視化され、頂端の細胞表面の Z O - 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 μm 深部の切片は、D S G 2 染色を示す（図 1 4 B）。重要なことに、T 8 4 細胞を A d 3 - K / S / K n 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 1 4 A、下のパネル）D S G 2 および Z O - 1 に対する染色が減少する（図 1 4 C）ことに反映される。

30

## 【 0 2 2 2 】

40

A d 3 - K / S / K n 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マソーム結合を示す（図 1 4 D、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 A d 3 - K / S / K n と一緒にインキュベートすることにより、A d 3 - K / S / K n 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 1 4 D、右側のパネル）。図 1 4 E では、A d 3 - K / S / K n で処置した細胞においてデスマ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。A d 3 - K / S / K n に加えて、A d 3 ビリオン、P t D d、および A d 3 - K / S / K n + A d 3 - E / S / K n 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 A d 3 線維ノブ（非二量体形成性）または A d 3 - E / S / K n、すなわち、多量体形成することができない D S G 2 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 A d 3 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。

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-P E G - 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抗体の一つ(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Ad5-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ビ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】

10

20

30

40

50

### 考察

この試験では、2つの発見：i) 高親和性かつ安定なD S G 2との結合を実現するためにはA d 3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A d 3 - 線維ノブ / D S G 2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】

C A Rと相互作用するA d 5、D S G 2と相互作用するA d 3、およびC D 4 6と相互作用するA d 3 5による感染を含めたA d 感染の大部分は、気道上皮を標的とする(22)。A d 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、ウイルスが上皮の閑門を破壊し、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。C A R結合性A d およびC D 4 6結合性A d 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、A d 1 1とC D 4 6の相互作用について示されている通り、最初のA d 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)；A d 1 1以外のA d が後者の機構を使用することはまだ示されていない。C A Rと相互作用するA d およびC D 4 6と相互作用するA d 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、D S G 2結合性A d 3の場合とは違う。A d 3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、大概は、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、A d ピリオン、A d 3のP t D d または二量体のA d 3 - K / S / K n 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D S G 2分子への同時の結合を実現すると思われる。A d 3 - D S G 2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。V i b r i o c h o l e r a株は、腸の上皮の結合を可逆的に変化させ、巨大分子が粘膜閑門を通って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(6)。C l o s t r i d i u m p e r f r i n g e n s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A d、H P V、H T L V - 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Z O - 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、P I 3 K / M A P Kリン酸化、m R N A発現アレイ、および代謝経路阻害手法を用いた実施例1において、A d 3ピリオンおよびA d 3のP t D dがD S G 2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。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、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、H e r 2 / n e u)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、A d 3 - K / S / K n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、E M)および機能的なデータ(浸透性、トラスツズマブによる死滅、A d 5の感染)を提供する。重要なことに、多量体形成し、D S G 2を群がらせることができない他のD S G 2リガンド、例えば、単量体のA d 3 - E / S / K nまたはD S G 2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、Ad3が、DSG2／デスマ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。Ad3-DSG2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DSG2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。

#### 【0228】

Ad3の感染機構の考察では、Ad3の複製時に、PtdDが、感染性ウイルス当たりPtdD<sub>5.5 × 10<sup>6</sup></sub>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、PtdDの形成が、Ad3にとって機能的に重要である、すなわち、Ad3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Ad5の感染において起こると思われる。Ad5の複製時に線維が過剰に産生されることにより、CAR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、32)。最近、(in vitro試験に基づいて)CD46は極性呼吸上皮細胞の頂端に露出しており、したがって、in vivoにおける初感染のAd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、CD46の発現パターンがAdの形質導入と相關しなかったヒトCD46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(19)。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Ad35と接近できないCD46が見いだされた(33)。この時点では、本発明者らは、CD46結合性Adがどのように上皮性閑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。  
10  
20

#### 【0229】

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、Ad3-K/S/Kn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(26-27)。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、Her2/neuまたはEGFR1)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(33)。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(10)の有効性も改善される可能性がある。最後に、Ad3-K/S/Knにより、Ad5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。Ad3-K/S/Knのバイオテクノロジーへの適用性は、その产生および精製の容易さによって、およびそれが自然発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。  
30

#### 【0230】

結論として、本発明者らの試験により、上皮細胞へのAd3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Ad3-K/S/Kn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。

#### 【0231】

実施例2の参考文献

#### 【0232】

## 【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.
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. Pumplin, 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.
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】

10

20

30

## 【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. Beavil, C. P. Soh, T. J. Wickham, P. W. Roelvink, I. Kovacs, 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. Rajecki, 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 GM-CSF. *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. Kalyuzhniy, 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.

## 【0236】

## (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 (mAb) 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マグレイン2 (DSG2) 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 (JO-1) を生成した。Her2/neu陽性ヒトがん細胞株およびEGFR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、JO-1により細胞間結合におけるDSG2二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。JO-1に誘発される上皮の結合の変化により、抗Her2/neu mAbであるトラスツズマブ(ハーセプチニン)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Her2/neuへの接近の改善が可能になった。これは、Her2/neu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、JO-1とEGFRターゲティングmAb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EGFR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。JO-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。 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)。

## 【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)。

## 【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つても、がん療法に対する物理的閑門が創出される(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-Ferraroら、2011年)に対する抵抗性の増加と相關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、およびデスマソーム)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(Turley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(Koesterら、2003年)。デスマグレイン1、2、および3(DSG1~3)およびデスマコリン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マソームにおいて共に見いだされる。デスマ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、デスマプラキン、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。デスマグレイン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(Abbood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。

## 【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(Fuschiotiら、2006年; Norrbyら、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。

## 【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。

## 【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。

## 【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、クローディン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)。デスマソームタンパク質であるDSG2は、クローディン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、クローディン7の染色が増加し、これは、大概は、クローディン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。デスマソーム結合および接着結合に対して頂端に局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>1-4</sup>C

10

20

30

40

50

- P E G - 4 0 0 0 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 1 6 E）。重要なことに、D S G 2 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D S G 2 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、J O - 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。J O - 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、J O - 1 の効果は一過性である。J O - 1 を細胞上に放置した場合、最初に J O - 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）。

## 【 0 2 4 4 】

*i n v i v o*において、J O - 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m A b の浸透が増大する。乳がん異種移植モデルを使用して、*i n v i v o*における上皮の結合に対する J O - 1 の効果を試験した。ヒト乳がん H C C 1 9 5 4 細胞を、C B 1 7 - S C I D / 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、2 0 0 4 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 2 0 0 mm<sup>3</sup> に達した時、J O - 1 を静脈内注射した。J O - 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、J O - 1 は腫瘍内に蓄積した（図 1 7 A、左側の 3 つのパネル）。これは、腫瘍溶解物のウエスタンプロット分析によっても確認された（図 1 7 A、右側のパネル）。P B S 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 D S G 2 の分析により、膜局在シグナルが示された（図 1 7 B、左側のパネル）。J O - 1 を注射した 1 時間後には、D S G 2 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、D S G 2 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）。D S G 2 の細胞外ドメインに対する抗 D S G 2 抗体を使用したウエスタンプロット分析により、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產生される D S G 2 細胞外ドメイン（E C D）のより小さな断片が明らかになった（図 1 7 B、右側のパネル）。総合すると、これらのデータにより、J O - 1 により、D S G 2 E C D 内部の切断および D S G 2 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 D S G 2 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。J O - 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。

## 【 0 2 4 5 】

上記の実施例において、*i n v i t r o* 試験において、A d 3 が上皮細胞の D S G 2 と結合することにより、上皮間葉転換（EMT）に関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 E r k 1 / 2 (MAPK) の活性化が挙げられる（Turley ら、2 0 0 8 年）。異種移植腫瘍を用いた本発明者らの試験では、J O - 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 1 7 C、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 E r k 1 / 2 が増大した（図 1 7 C、p E r k 1 / 2 P B S と J O - 1 を比較（1 時間））。E R K 1 / 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、2 0 0 7 年；Larsen ら、2 0 0 3 年；Turley ら、2 0 0 8 年）。J O - 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 E r k 1 / 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 1 7 C、右側のパネル）。全体的に、これらの試験は、H C C 1 9 5 4 腫瘍において、*i n v i v o*において J O - 1 により E r k 1 / 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、JO-1がDSG2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) DSG2 ECDの切断、およびその後の内部移行を伴うDSG2二量体の破壊；ならびにii) Erk1/2の活性化によるEMT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JO-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IgG1 mAb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10mg/kgの用量で腹腔内に注射した。ヒトIgG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プ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JO-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つたことのいずれかを示している。

#### 【0247】

mAb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、Her2/neuと接着結合タンパク質であるクローディン7の共染色が見いだされた（図19A）。乳がんBT474細胞の共焦点顕微鏡写真により、Her2/neu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、Her2/neu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（Vermeirら、2003年）。Her2/neu陽性乳がん細胞株BT474（図19）またはHCC1954（示されていない）をJO-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、Her2/neu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、JO-1に媒介される結合の開口により、Her2/neu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JO-1の効果は一過性であり、細胞の形態は、JO-1パルス処置した16時間後までに对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、EGFR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、EGFR1（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關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-rasの突然変異を有するので（Karamouzisら、2007年）、肺がんモデル（A549細胞）に焦点を合わせている。Her2/neuに関して観察されたことと同様に、A549細胞をJO-1と一緒にインキュベートすることにより、EGFRが細胞表面に移行した。

#### 【0248】

mAb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BT474乳がんのin vitroにおける死滅およびセツキシマブによるA549肺がん細胞のin vitro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JO-1で前処置することにより、どちらの抗体もin vitro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、JO-1により、結合の開口が媒介され、それにより、mAb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、JO-1で前処置することにより、異種移植モデルにおけるmAb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in vivo試験を実施した。

10

20

30

40

50

## 【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、Her 2 / neu 陽性 BT 474 - M 1 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 20 A）。BT 474 - M 1 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 20 A）。これらの発見は、このモデルにおいて Pt D d 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）。

## 【0251】

第 2 の乳がんモデルは HCC 1954 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 20 B）。BT 474 - M 1 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、Pt D d の増強効果に匹敵した（データは示していない）。Pt D d 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 17 A および C を参照されたい）。他方では、結合の開口、すなわち、DSG 2 の切断または E rk 1 / 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 20 C）。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。

## 【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、Her 2 / neu 陽性胃がん（NCI - N 87）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 - N 87 培養物および異種移植腫瘍において Her 2 / neu とクローディン 7 の共染色が見いだされ、これは、Her 2 / 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 - N 87 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。

## 【0253】

J O - 1 により、*in vivo* でセツキシマブ療法が改善される。A 549 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 A 549 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 22 A）。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 Pt D d で見られるのと同程度に増強された（図 22 B）。

## 【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

10

20

30

40

50

、 A 5 4 9 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 3 7 日以内に罹患し、腫瘍は肺に優勢に局在した（図 2 2 C、「P B S」群）。マウスの処置は、1 0 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 2 7 日前に開始した。全ての動物を 4 0 日目に屠殺した。対照群、J O - 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、J O - 1 + セツキシマブで処置した動物の肺の 8 0 % 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、P B S 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 2 2 C、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 J O - 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

#### 【 0 2 5 5 】

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ラキ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 J O - 1 の効果がさらに増大するかどうかを試験するために、H C C 1 9 5 4 モデルを利用した（図 2 3 A）。レラキシン遺伝子を腫瘍に送達するために、造血幹細胞（H S C）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、骨髄から骨髄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関マクロファージ（T A M）に分化する腫瘍間質に動員するいくつものケモカインを分泌するという知見を利用する。T A M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、骨髄由来 H S C に、ドキシサイクリン（D o x）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 e x v i v o で形質導入すること、およびこれらの細胞を、骨髄に植え付け、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髄調整（m y e l o - c o n d i t i o n e d）レシピエントに移植することを伴う。この試験（図 2 3 B）により、レラキシンの発現単独で、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。20

レラキシンの発現と J O - 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、レラキシン + トラスツズマブ療法または J O - 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 J O - 1 / レラキシン / 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 i n v i t r o で培養することができた。特に、三重の組み合わせ（J O - 1 / レラキシン / 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。30

#### 【 0 2 5 6 】

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

#### 【 0 2 5 7 】

J O - 1 に対する抗体の存在下での、i n v i t r o 細胞毒性アッセイに対する効果。A d 3 は、広範に分布した病原体である。そのため、J O - 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 3 0 のうち 1 0 が、中和性 A d 3 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 A d 3 抗体の血清分布率は約 4 0 % であるという報告と一致する（S a k a m o t o ら、1995年）。しかし、本発明者らは、抗 A d 3 抗体陽性ヒト血清が J O - 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閑門に加えて、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關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-Ferraro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、巨大分子が粘膜閑門

10

20

30

40

50

を通って通過することを可能にすることができるZona occludens毒素(Zot)を產生する(Fasanoら、1991年)。Zot由来のヘキサペプチド(AT-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、JO-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DSG2二量体の破壊および/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、いくつもの病原体は、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Candida albicans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(FrankおよびHostetter、2007年)。さらに、Bacteroides fragilisエンテロトキシンおよびPorphyromonas gingivalis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(Katzら、2000年; Wu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、Ad3が同様の機構を使用して気道内の上皮性閑門を突破することが示唆されている。本発明者らは現在、DSG2切断の機構について試験している。進行中の試験では、JO-1の結合により、DSG2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、DSG2二量体の溶解により、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(Koesterら、2003年)。

#### 【0263】

上記のin vitro試験に基づいて、Ad3がDSG2と結合することにより、Erk1/2およびEMTに関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JO-1を注射してから1時間以内に腫瘍におけるErk1/2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(Kleissnerら、2009年)。本発明者らは現在、上皮の結合の維持におけるDSG2の役割をよりよく説明するために、種々のDSG2ノックアウトモデルおよび切断/突然変異DSG2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、DSG2は胃腸管および気道で発現される(Liら、2011年)。DSG2のマウスオルソログはAd3またはJO-1によって認識されないので(Wangら、2011年b)、正常なマウスにおける安全性試験は比較的不十分である。したがって、ヒトDSG2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DSG2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JO-1がヒトDSG2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。DSG2-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JO-1を注射すること(2mg/kg)による重大な副作用は見いだされなかった(Liら、2011年)。正常な上皮細胞内のDSG2は、静脈内に適用されたJO-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性化の欠如が増すことにより、上皮腫瘍のJO-1に対する反応性がより高くなる可能性がある。JO-1リガンドを静脈内注射した後の毒性がないことは、Ad3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、DSG2と結合し、JO-1と同じ様に結合に作用する。Ad5/3腫瘍退縮ベクターまたはAd3腫

10

20

30

40

50

癌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 (Hemminckら、2010年; Koski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、非ヒト靈長類および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に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（ドキソルビシン、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、非小細胞肺がん患者においては、セツキシマブを化学療法薬（ビノレルビン+シスプラチニン）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 (Thommas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され、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; Disisら、1994年; Disisら、2000年; Feuererら、2001年; Tosoら、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)、(Haradaら、1996年)、(Schmittら、2007年)、(Trojanら、2005年)、(Abbold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、他の全てのデスマー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、浸潤性の脾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プ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)、マウスマAb抗DSG2(クローン6D8)(Cell Sciences, Canton, MA)、ウサギ抗クローディン7(Abcam, Cambridge, MA)、抗ヒトIgG-FITC(Santa Cruz)、ウサギ抗EGFR(Abcam)、マウスマAb抗Her2/neu(Abcam)、マウスマAb抗E-カドヘリン(Cell Signaling)、マウスマAb抗ヒトIgG Fc(R&D Systems)、ホスホ-p44/42 MAPKに対するマウスマAb(Erk1/2)(Thr202/Tyr204)(Cell Signaling)、マウスマAb抗Erk1/2(Cell Signaling)、マウスマAb抗ホスホ-E-カドヘリン(pS838/840)(Epitomics, Inc.)、マウスマAb抗6-His(Qiagen)。

## 【0270】

細胞株。BT474-M1細胞は、10%のFBS、1%のPen/Strepおよび2 mM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RMP1中で培養した。SKOV3-1ip1細胞はMEBM培地中で培養した。結腸がんT84細胞は、10%のFBS、Glut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、1.4×10<sup>5</sup>T84細胞をコラーゲンでコーティングした6.5 mmのTranswellインサート(孔サイズ0.4 μm)(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度で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度で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(クローディン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度で一晩染色した。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VECTOR SHIELD(Vector Labs)を用いてガラススライドをマウントした。写真をLeica DFC300 FXデジタルカメラを使用して得た。Zeiss META共焦点顕微鏡で、40×油浸レンズまたは100×油浸

10

20

30

40

50

レンズおよびZeiss 510ソフトウェア(Zeiss MicroImaging、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DGS2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】

ウエスタンプロット。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。ウエスタンプ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7 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

#### 【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:

30

#### 【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)

40

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0.4μm]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MgCl<sub>2</sub>、20mMのHEPES)中でDSG2リガンド(20μg/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[<sup>14</sup>C]ポリエチレングリコール-4000(PAGE-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(500ng/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(15μg/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フィックス液(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OsO<sub>4</sub>-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取り取り、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CB17SCID-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10mg/kgの用量で腹腔内に注射した(i.p.)。PTDdまたはJO-1を2mg/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1,000mm<sup>3</sup>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CB17SCID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10mg/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CB17SCID-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(2mg/kg i.v.)およびセツキシマブ(10mg/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徵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（P B S 中 1 5 %）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 J O - 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vantと混合した J O - 1 を皮下注射した（Liら、2009年）。

#### 【0282】

H S C ベースのレラキシンの発現：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 C B 17 - S C I D - ベージュマウスであり、レンチウイルスペクターで形質導入された、5 - F U - 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 c G y 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 H C C 1 9 5 4 を乳房の脂肪パッドに注射した。ドキシサイクリン（D o x ）の制御下で、レラキシンを発現しているレンチウイルスペクターについては、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 F C S を含有する M E M 中に 1 : 2 から 1 : 1 , 204まで段階的に希釈した。10 μl の M E M 中の野生型 A d 5 または野生型 A d 1 1 の細胞当たり合計 20 のプラーク形成単位（P F U ）を各血清希釈液 100 μl 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 μl を 293 増殖培地 45 μl 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 μl 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（C P E ）の存在について分析し、1 : 2 以上の希釈度において C P E 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 + / - S D として表されている。多数の試験に対して、適用可能な場合ステュードントの t 検定または二元配置 A N O V A を適用した。p 値 < 0 . 0 5 を有意とみなした。

#### 【0285】

##### 実施例 3 の参考文献

#### 【0286】

#### 【数 1 0 】

Abbad, 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】

## 【数11】

- 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. Schirrmacher, 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. Existence of 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. Pumplin, 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. Schirrmacher, 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

## 【0288】

## 【数12】

- 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. 10
- 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. 20
- 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. 30
- Koski, A., L. Kangasniemi, S. Escutenaire, S. Pesonen, V. Cerullo, I. Diaconu, P. Nokisalmi, M. Raki, M. Rajecki, 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. 40

## 【0289】

## 【数13】

- 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*
- 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 (Erbitux) efficacy in KRAS wild-type tumor cells. *J Cell Biochem* 112:10-29.
- 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.
- 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

## 【0290】

## 【数14】

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.

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.

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.

Vermeer, P.D., L.A. Einwalter, T.O. Moninger, T. Rokhlin, 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*

## 【0291】

10

20

30

40

【数15】

- 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. Kalyuzhniy, 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.

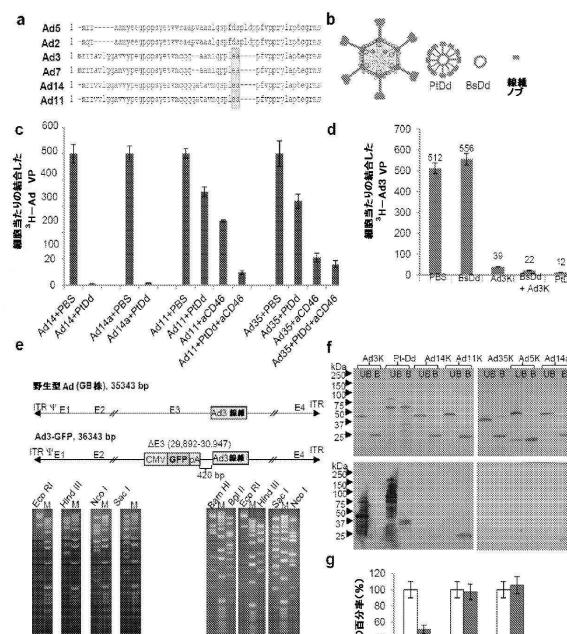
Wu, S., K.C. Lim, J. Huang, R.F. Saidi, and C.L. Sears. 1998. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14979-14984.

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* 16:77-85.

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.

【圖 1】



## FIGURE 1

【图2】

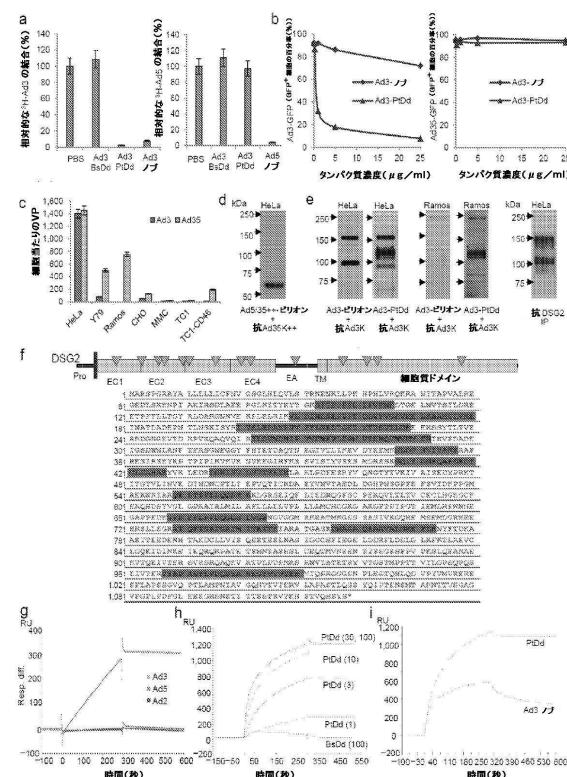


FIGURE 2

【図3】

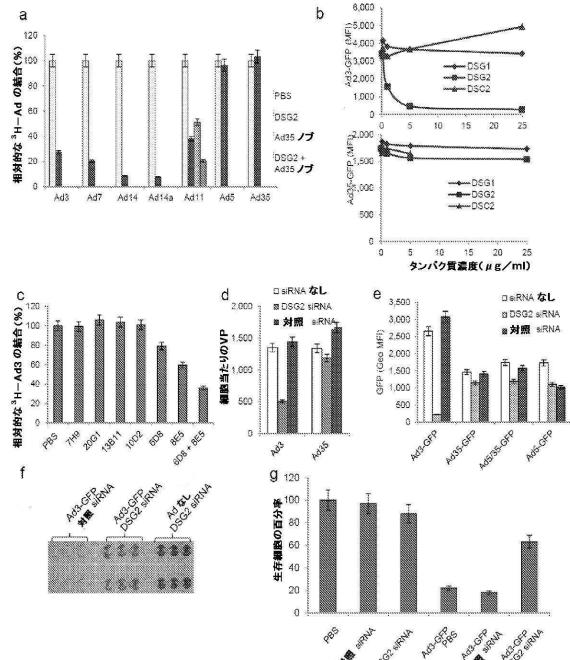


FIGURE 3

【図4】

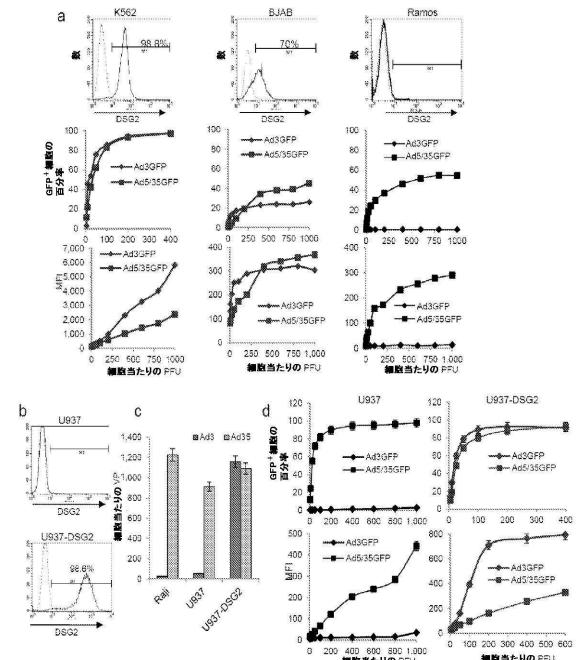


FIGURE 4

【図5】

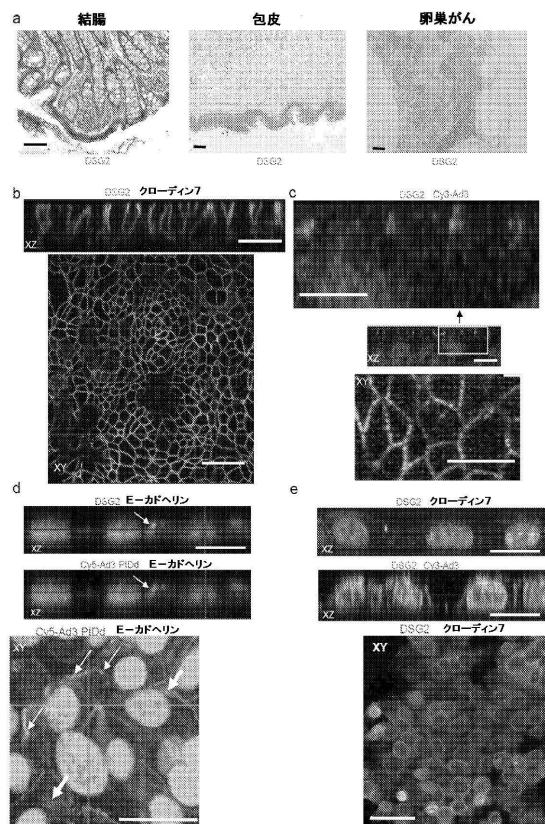


FIGURE 5

【図6】

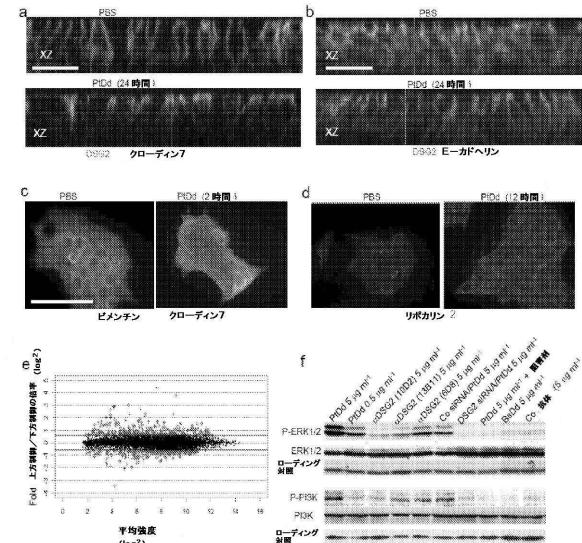


FIGURE 6

【図7】

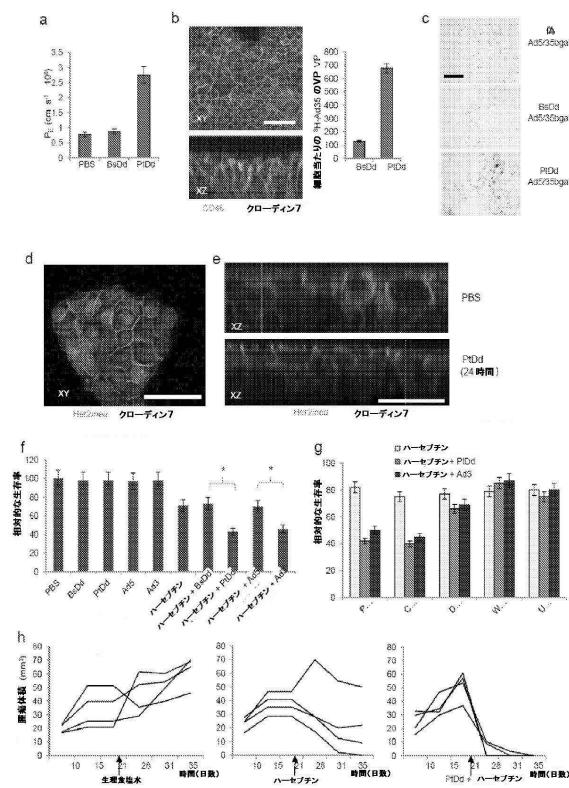


FIGURE 7

【図8】

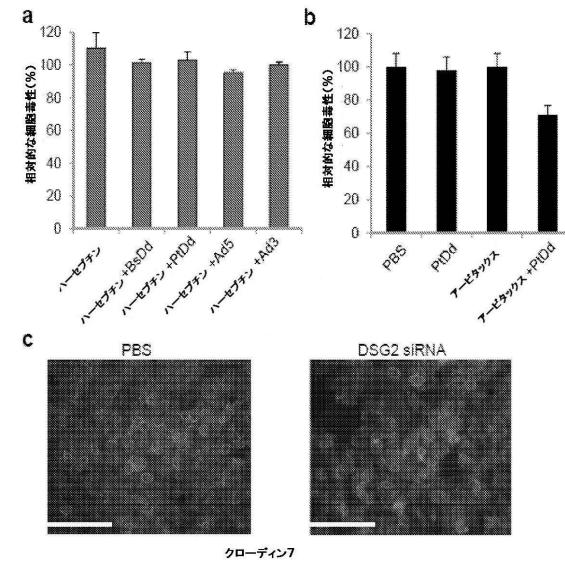


FIGURE 8

【図9】

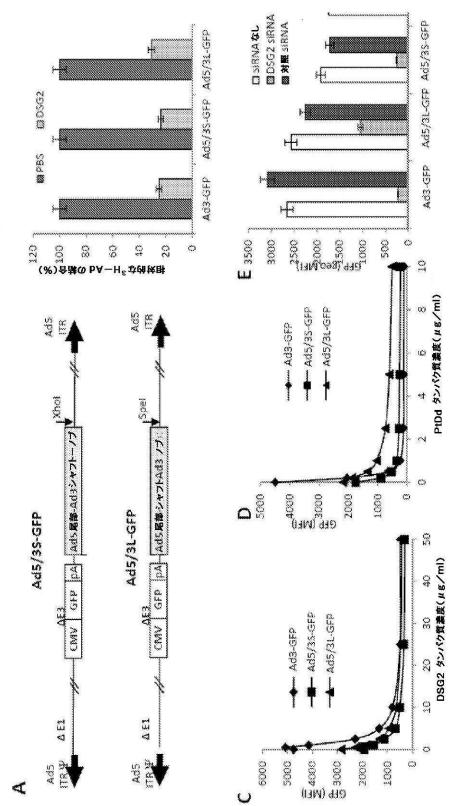


FIGURE 9

【図10】

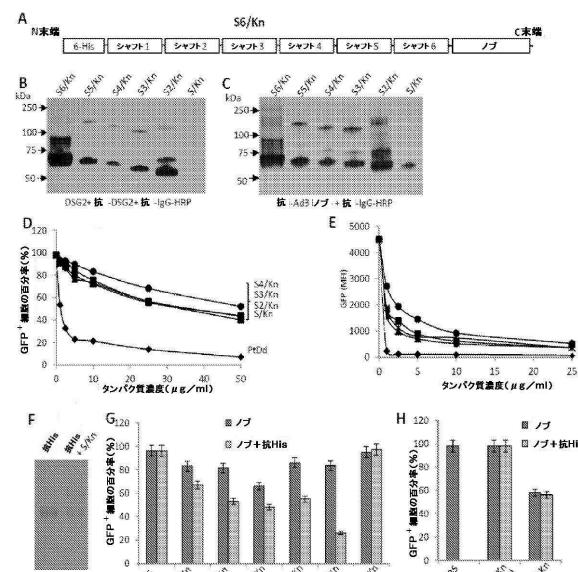


FIGURE 10

【図11】

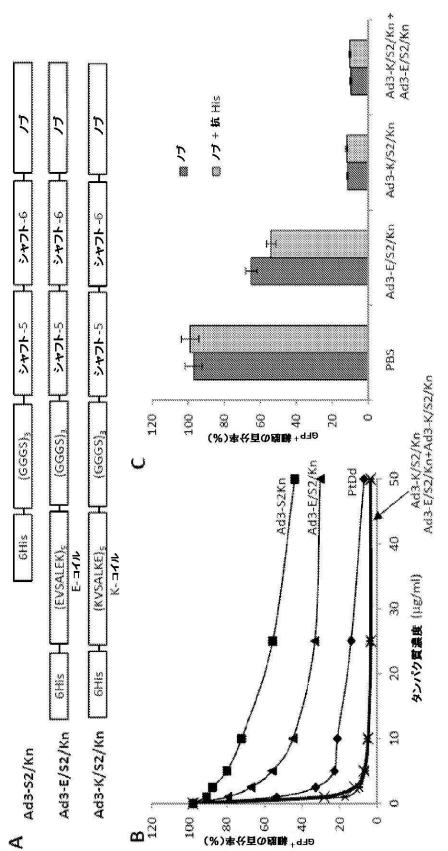


FIGURE 11

【図12】

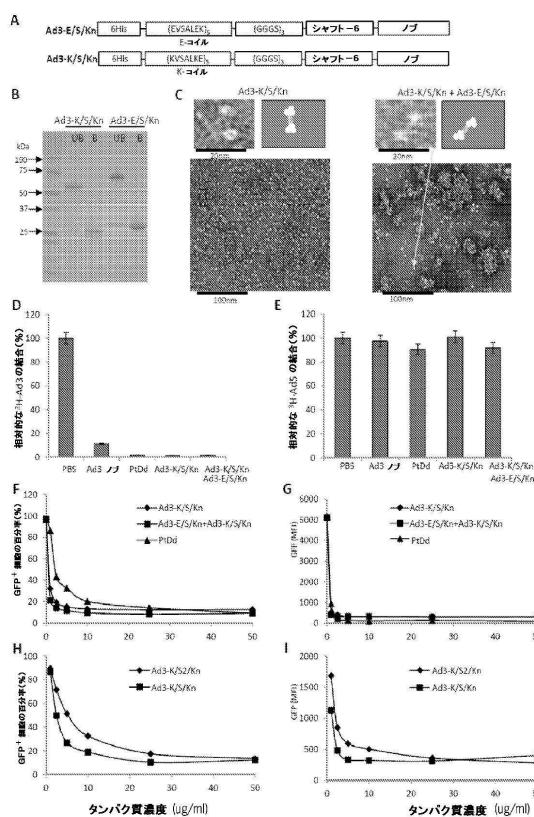


FIGURE 12

【図13】

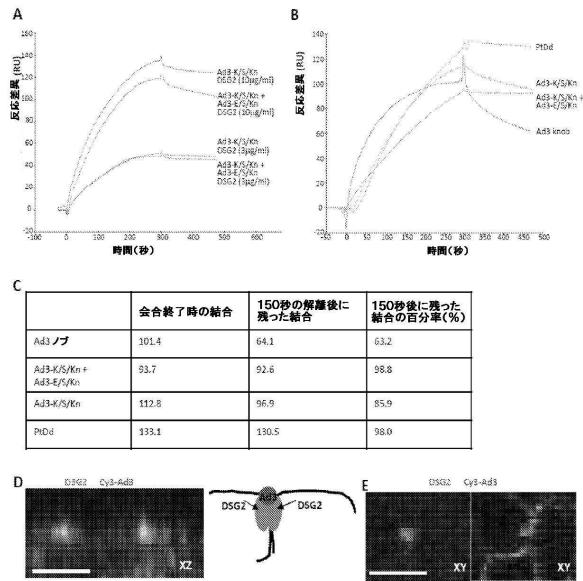


FIGURE 13

【図14】

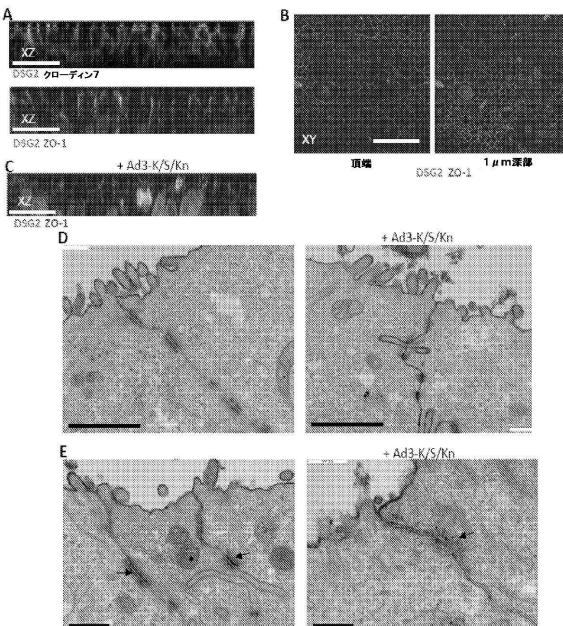


FIGURE 14

【図15】

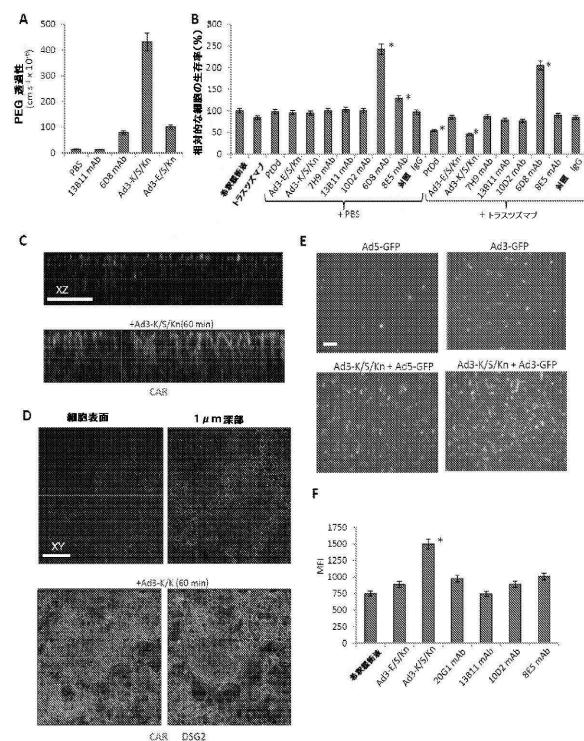


FIGURE 15

【図16】

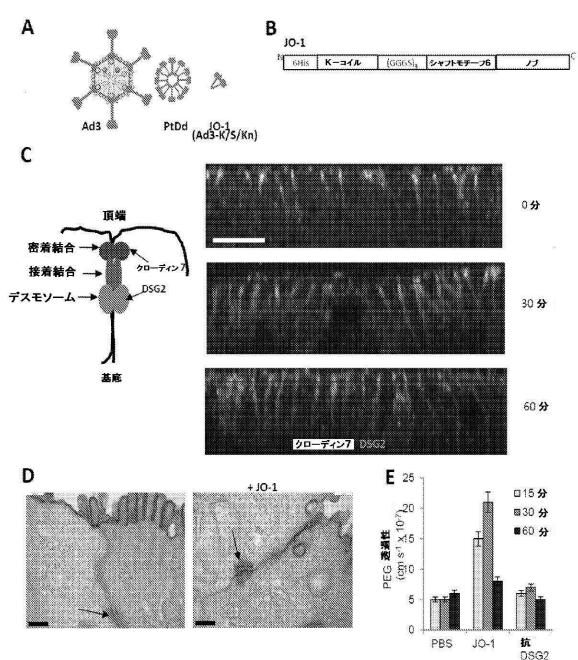


FIGURE 16

【図17】

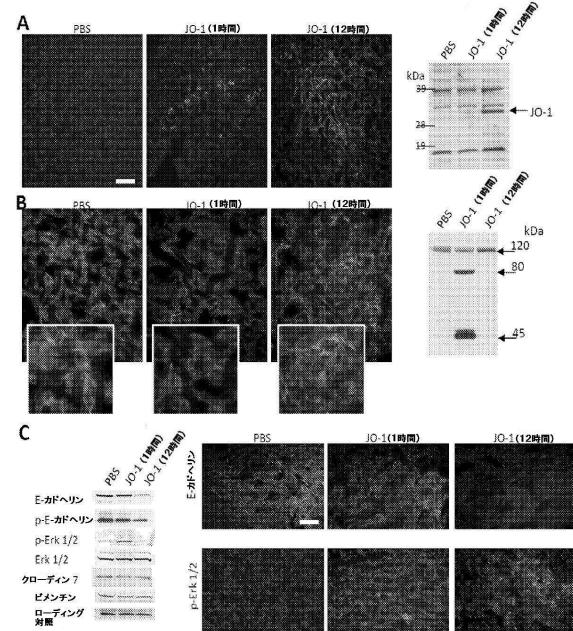


FIGURE 17

【図18A】

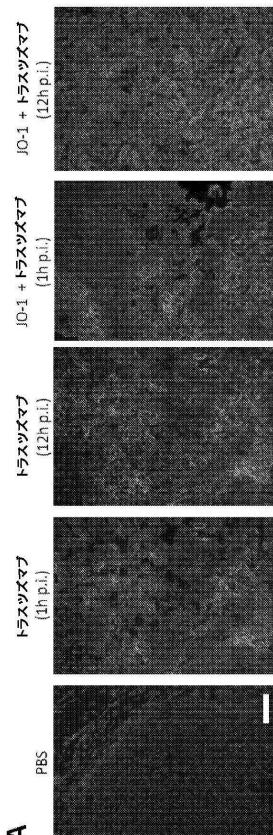


FIGURE 18A

【図 18B】

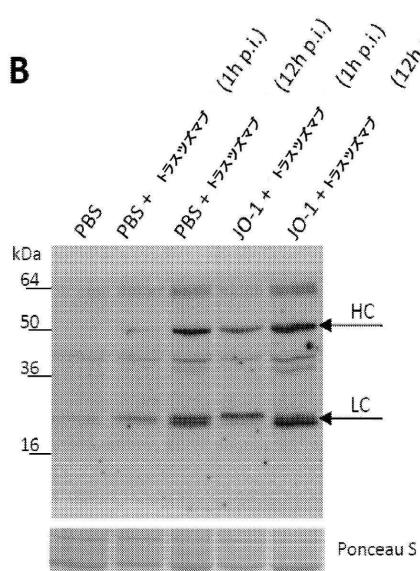


FIGURE 18B

【図 19】

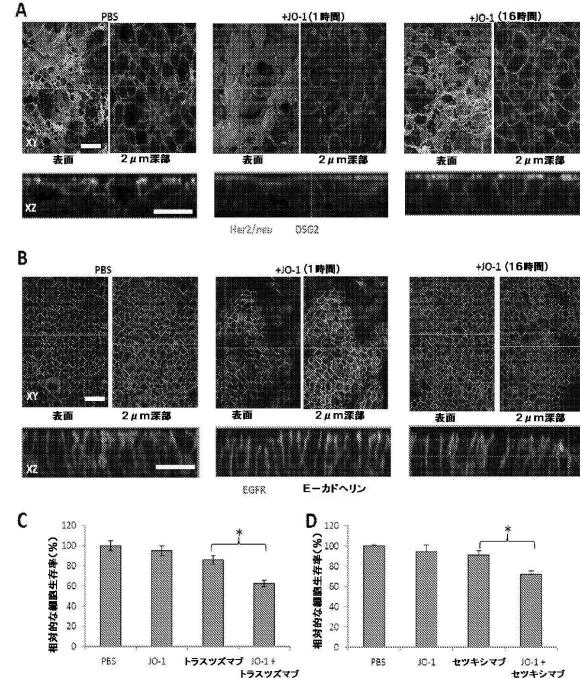


FIGURE 19

【図 20】

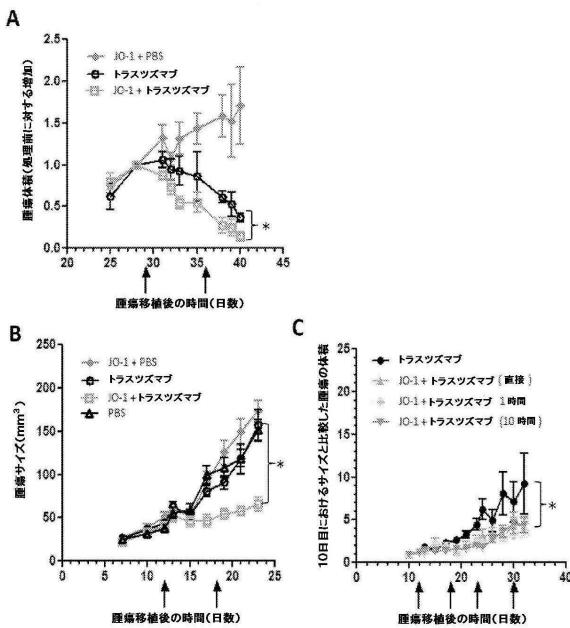


FIGURE 20

【図 21】

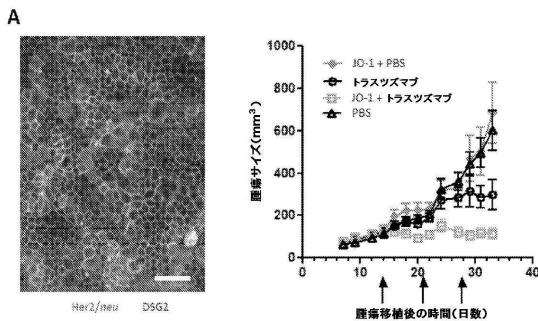


FIGURE 21

【図 22 A】

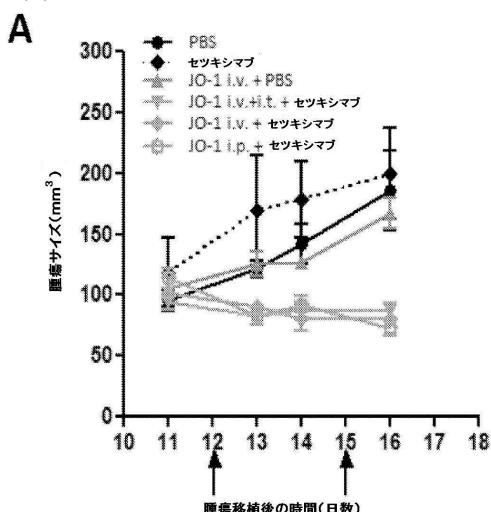


FIGURE 22A

【図 22 B】

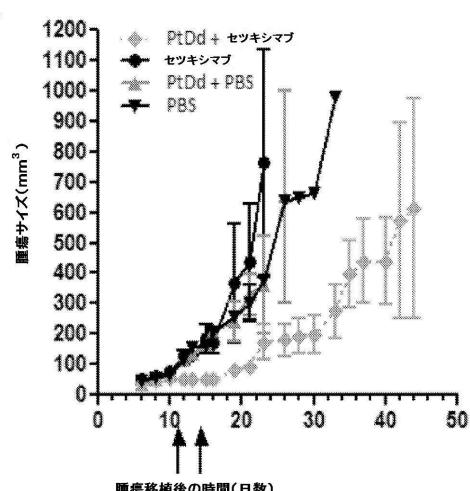


FIGURE 22B

【図 22 C】

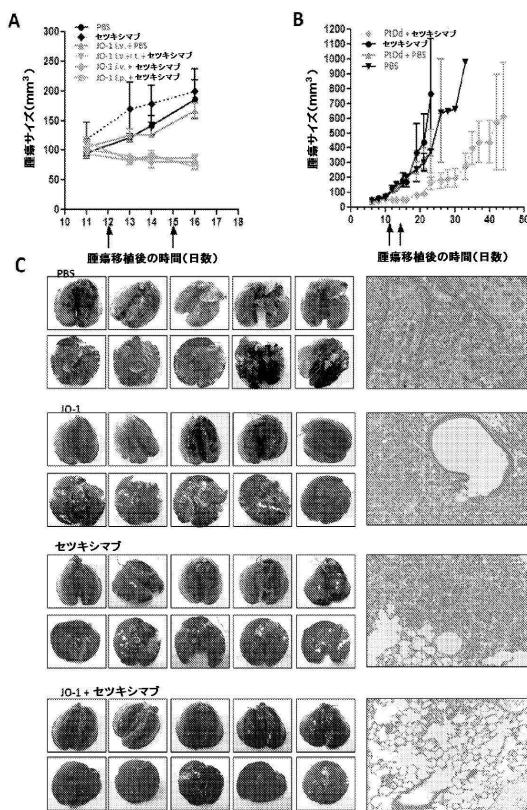


FIGURE 22C

【図 23】

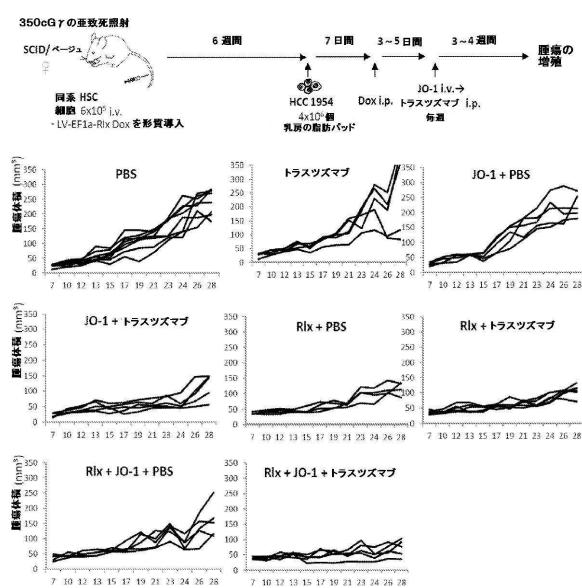


FIGURE 23

【図24】

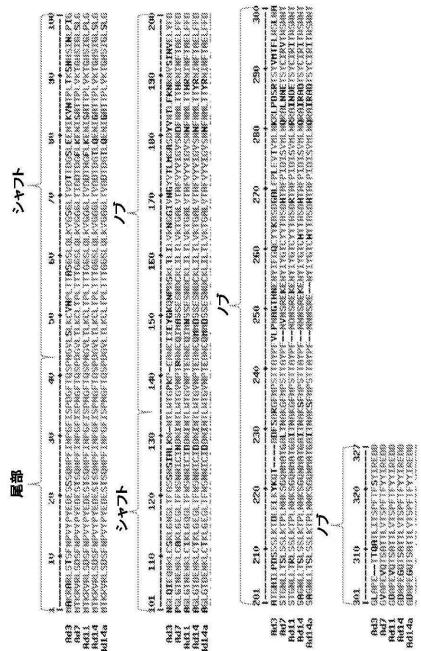


FIGURE 24

【配列表】

[0006499825000001.app](http://0006499825000001.app)

## フロントページの続き

			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 98115, シアトル, 29ティーエイチ アベニュー エヌ  
イー 7251

(72)発明者 ワン, ホンジー

アメリカ合衆国 ワシントン 98115, シアトル, エヌイー 65ティーエイチ ストリ  
ート 5721

## 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