

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5435871号  
(P5435871)

(45) 発行日 平成26年3月5日(2014.3.5)

(24) 登録日 平成25年12月20日(2013.12.20)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 7/00	(2006.01) C 12 N 7/00
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
A 61 K 35/76	(2006.01) A 61 K 35/76
A 61 K 38/00	(2006.01) A 61 K 37/02
A 61 K 48/00	(2006.01) A 61 K 48/00

請求項の数 65 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-548838 (P2007-548838)
(86) (22) 出願日	平成18年1月2日(2006.1.2)
(65) 公表番号	特表2008-526189 (P2008-526189A)
(43) 公表日	平成20年7月24日(2008.7.24)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/000010
(87) 国際公開番号	W02006/070024
(87) 国際公開日	平成18年7月6日(2006.7.6)
審査請求日	平成20年12月22日(2008.12.22)
(31) 優先権主張番号	102004063662.1
(32) 優先日	平成16年12月31日(2004.12.31)
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)

(73) 特許権者	501488619 ホルム, ペル・ゾンネ H O L M, P e r S o n n e ドイツ国、8 2 2 5 6 フエルステンフェ ルトブルック、マイゼンシュトラーセ 2 7
(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(74) 代理人	100113653 弁理士 東田 幸四郎
(74) 代理人	100116919 弁理士 斎藤 房幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E 1 -マイナスアデノウイルス及びその使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アデノウイルスが、下記：

- 欠損している機能的野生型 E 1 領域、ここで前記欠損している機能的野生型 E 1 領域は、タンパク質 IX マイナスである、及び

- E 1 B 5 5 K をコードする核酸及び E 4 o r f 6 をコードする核酸、ここで E 1 B 5 5 K をコードする核酸は、プロモーターのコントロール下にあり、E 4 o r f 6 をコードする核酸は、プロモーターのコントロール下にあり、E 4 o r f 6 タンパク質及び E 1 B 5 5 K タンパク質の複合体が、アデノウイルスに感染した細胞の核内への Y B - 1 の輸送のためのトランスポーターを形成する

を含むこと、そして、

前記アデノウイルスが、タンパク質 IX をコードする組換え核酸を含み、タンパク質 IX を発現し、

ここでアデノウイルスは、核内に Y B - 1 を有するか、または細胞周期から独立して核内に Y B - 1 を有する細胞内で複製可能であるが、Y B - 1 が調節解除されたところのか、または調節解除された場合の細胞内で複製欠損である

ことを特徴とする、アデノウイルス。

## 【請求項 2】

欠損している機能的野生型 E 1 A 領域が E 1 A マイナスであることを特徴とする、請求項 1 に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 3】

欠損している機能的野生型 E 1 領域が E 1 B マイナスであることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 4】

欠損している野生型 E 1 領域が E 1 B 5 5 K マイナス及び / 又は E 1 B 1 9 K マイナスであることを特徴とする、請求項 3 に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 5】

前記トランスポーターがアデノウイルスによって提供されるトランスポーターであることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 6】

前記トランスポーターが少なくとも二つのファクターの複合体であり、各ファクターが核酸によってコードされ、両核酸が共通のプロモーターによってコントロールされることを特徴とする、請求項 1 に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 7】

両核酸が発現強度をコントロールする要素によって結合され、前記要素が I R E S を含む群から選択されることを特徴とする、請求項 6 に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 8】

前記トランスポーターが少なくとも二つのファクターの複合体であり、各ファクターが核酸によってコードされ、両核酸が適切なプロモーターによってコントロールされることを特徴とする、請求項 1 に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 9】

前記プロモーターがアデノウイルス E 4 プロモーターとは異なり、かつ、アデノウイルス E 1 B プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 10】

前記プロモーターが組織特異的プロモーター、腫瘍特異的プロモーター、C M V プロモーター、ウイルスプロモーターおよびアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、ただし、これらは、E 4 プロモーター、E 1 B プロモーターおよび E 2 後期プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 11】

トランスポーターをコードする前記核酸が E 1 B 5 5 K の 3' 末端に 3' - U T R を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 12】

トランスポーターをコードする核酸がタンパク質 I X をコードすることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 13】

アデノウイルスが E 1 B 5 5 K および E 1 B 1 9 K をコードする核酸を含み、E 1 B 5 5 K および E 1 B 1 9 K がプロモーターのコントロール下にあることを特徴とする、請求項 1 または 1 2 に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 14】

アデノウイルスが E 1 B 5 5 K および / または E 1 B 1 9 K および / またはタンパク質 I X をコードする核酸を含み、E 1 B 5 5 K および / または E 1 B 1 9 K および / またはタンパク質 I X をコードする核酸がプロモーターのコントロール下にあり、前記プロモーターが E 1 A 依存性プロモーターとは異なることを特徴とする、請求項 1 または 1 2 に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 15】

前記欠損している機能的野生型 E 1 領域が E 1 A 1 3 S マイナスおよび / または E 1 A 1 2 S マイナスであることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

## 【請求項 16】

10

20

30

40

50

前記欠損している機能的野生型 E 1 領域が E 1 A 1 3 S マイナスであることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 1 7】

前記欠損している野生型 E 1 領域が E 1 A 1 3 S マイナスおよび E 1 A 1 2 S マイナスであり、前記アデノウイルスが E 1 A 1 2 S タンパク質をコードする核酸を含み、前記核酸が、異種核酸であることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 1 8】

E 1 A 1 2 S タンパク質をコードする核酸がプロモーターのコントロール下にあり、前記プロモーターが Y B - 1 依存性プロモーター、またはアデノウイルス E 2 後期プロモーター、MDR プロモーターおよび DNA ポリメラーゼ プロモーターを含む群から選択されるプロモーターであることを特徴とする、請求項 1 7 に記載のアデノウイルス。

10

【請求項 1 9】

前記アデノウイルスがタンパク質 IX をコードする核酸を含み、E 1 A 1 2 S をコードする核酸およびタンパク質 IX をコードする核酸が共通のプロモーターのコントロール下にあり、両核酸が発現をレギュレーションする要素によって互いに連結されており、前記要素が IRS を含む群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 2 0】

E 1 A 1 2 S タンパク質をコードする前記核酸およびタンパク質 IX をコードする前記核酸がそれぞれプロモーターのコントロール下にあり、前記プロモーターが同一のプロモーターであることを特徴とする、請求項 1 7 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

20

【請求項 2 1】

前記プロモーターが Y B - 1 依存性プロモーター、またはアデノウイルス E 2 後期プロモーター、MDR プロモーターおよび DNA ポリメラーゼ プロモーターを含む群から選択されるプロモーターであることを特徴とする、請求項 1 9 または 2 0 に記載のアデノウイルス。

【請求項 2 2】

前記アデノウイルスが Y B - 1 をコードする核酸を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

30

【請求項 2 3】

E 1 A 1 2 S タンパク質をコードする核酸および Y B - 1 をコードする前記核酸が共通のプロモーターのコントロール下にあり、両核酸が発現をレギュレーションする要素によって互いに連結されており、前記要素が IRS を含む群から選択されることを特徴とする、請求項 2 2 に記載のアデノウイルス。

【請求項 2 4】

Y B - 1 をコードする前記核酸および E 1 A 1 2 S タンパク質をコードする核酸がそれぞれプロモーターのコントロール下にあり、前記プロモーターが同一のプロモーターであることを特徴とする、請求項 2 2 に記載のアデノウイルス。

40

【請求項 2 5】

プロモーターが Y B - 1 依存性プロモーターであり、アデノウイルス E 2 後期プロモーター、MDR プロモーターおよび DNA ポリメラーゼ プロモーターを含む群から選択されることを特徴とする、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 2 6】

E 1 A 1 2 S をコードする核酸が E 3 領域または E 4 領域内にクローニングされていることを特徴とする、請求項 1 6 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 2 7】

E 1 A 1 2 S をコードする核酸およびタンパク質 IX をコードする核酸または Y B - 1 をコードする核酸が E 3 領域または E 4 領域内にクローニングされていることを特徴とす

50

る、請求項 1\_6 ~ 2\_6 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 2 8】

前記アデノウイルスが少なくとも一つの、E 3 領域内にクローニングされているトランスジーンを含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 2\_7 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 2 9】

前記アデノウイルスが少なくとも一つの、E 4 領域内にクローニングされているトランスジーンを含むことを特徴とする、請求項 2\_8 に記載のアデノウイルス。

【請求項 3 0】

R G D モチーフをコードする核酸を含み、前記 R G D モチーフがファイバーノブの H I ループドメイン内にクローニングされている、請求項 1 ~ 2\_9 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。 10

【請求項 3 1】

さらに M L P 遺伝子および / または E 2 A 遺伝子と E 2 B 遺伝子および / または E 3 遺伝子および / または E 4 遺伝子を含む、1 ~ 3\_0 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 3 2】

前記アデノウイルスが核内に Y B - 1 を含まない細胞内で複製欠損であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3\_1 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。

【請求項 3 3】

前記アデノウイルスが腫瘍細胞内、または細胞分裂阻害剤および / または放射線に対し耐性である腫瘍細胞内で複製することができる特徴とする、請求項 1 ~ 3\_2 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルス。 20

【請求項 3 4】

前記細胞が多剤耐性であることを特徴とする、請求項 3\_3 に記載のアデノウイルス。

【請求項 3 5】

請求項 1 ~ 3\_4 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルスをコードする核酸。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 3\_4 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルスまたは請求項 3\_5 に記載の核酸または前記核酸を含むベクターまたは該核酸を含む複製システムの、腫瘍および / または癌を形成する細胞が核内に Y B - 1 を有するか、または調節解除された Y B - 1 を有する、腫瘍および / または癌の処置のための薬剤の製造、および / または細胞が細胞分裂阻害剤および / または放射線に対して耐性である腫瘍細胞である、細胞分裂阻害剤および / または放射線に対する細胞の感受性の回復のための薬剤の製造のための、使用。 30

【請求項 3 7】

請求項 1 ~ 3\_4 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルスまたは請求項 3\_5 に記載の核酸の細胞内でのインビトロ複製のための使用であって、前記細胞が核内に Y B - 1 を含むか、または前記細胞周期から独立して核内に Y B - 1 を含むか、または前記細胞が調節解除された Y B - 1 を含む、使用。

【請求項 3 8】

前記細胞が、前記細胞に適用されたかまたは前記細胞に適用される、放射線、細胞分裂阻害剤の投与および温熱療法を含む群から選択される手段の後かまたは手段によって前記核内に Y B - 1 を含むことを特徴とする、請求項 3\_7 に記載の使用。

【請求項 3 9】

腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部が細胞周期から独立して核内に Y B - 1 を含む細胞であるか、または前記腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部が腫瘍細胞であり、細胞分裂阻害剤および / または放射線に対して耐性である腫瘍細胞であることを特徴とする、請求項 3\_6 に記載の使用。

【請求項 4 0】

前記腫瘍を形成する細胞またはその一部が、細胞分裂阻害剤に対する耐性または多剤耐

10

20

30

40

50

性であることを特徴とする、請求項3\_9に記載の使用。

【請求項4\_1】

前記細胞が、膜結合輸送タンパク質P糖タンパク質の過発現を示すことを特徴とする、請求項3\_6～4\_0のいずれか1項に記載の使用。

【請求項4\_2】

前記細胞が核内にYB-1を有するか、または腫瘍を形成する細胞またはその一部が核内にYB-1を有することを特徴とする、請求項3\_6～4\_1のいずれか1項に記載の使用。

【請求項4\_3】

前記腫瘍が核内へのYB-1の輸送の誘導後に核内にYB-1を含むことを特徴とする、請求項3\_6～4\_2のいずれか1項に記載の使用。

【請求項4\_4】

前記核内へのYB-1の輸送が放射線、細胞分裂阻害剤および温熱療法の適用を含む群から選択される少なくとも一つの手段によってトリガーされることを特徴とする、請求項4\_3に記載の使用。

【請求項4\_5】

腫瘍の処置のためのおよび／または細胞分裂阻害剤および／または放射線に対する細胞の感受性の回復のための薬剤の製造のための請求項1～3\_4のいずれか1項に記載のアデノウイルスをコードする核酸の使用であって、前記細胞が、細胞分裂阻害剤および／または放射線に対して耐性である腫瘍細胞であり、前記耐性が因子により媒介され、因子の転写、翻訳および／または活性がYB-1によりコントロールされる、使用。

【請求項4\_6】

腫瘍を形成する細胞またはその一部が、細胞分裂阻害剤に対して耐性であるか、または多剤耐性であることを特徴とする、請求項4\_5に記載の使用。

【請求項4\_7】

請求項3\_6～4\_4のいずれか1項に記載の使用のための請求項3\_5に記載の核酸を含むベクター。

【請求項4\_8】

請求項1～3\_4のいずれか1項に記載のアデノウイルスまたは請求項3\_5に記載の核酸を含む医薬組成物。

【請求項4\_9】

前記組成物が少なくとも一つのさらなる医薬的に活性な薬剤を含む、請求項4\_8に記載の医薬組成物。

【請求項5\_0】

前記医薬的に活性な薬剤がサイトカイン、メタロプロテイナーゼ阻害剤、血管新生阻害剤、細胞分裂阻害剤、細胞周期阻害剤、プロテオソーム阻害剤、組換え抗体、シグナル変換カスケードおよびタンパク質キナーゼの阻害剤を含む群から選択される、請求項4\_9に記載の医薬組成物。

【請求項5\_1】

前記組成物が少なくとも二つの化合物の組み合わせを含み、任意の化合物がそれぞれそして独立して細胞分裂阻害剤を含む群から選択されることを特徴とする、請求項4\_8～5\_0のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項5\_2】

少なくとも二つの化合物が異なる標的分子を標的にすることを特徴とする、請求項5\_1に記載の医薬組成物。

【請求項5\_3】

少なくとも二つの化合物が異なる作用機序による活性を有することを特徴とする、請求項5\_0～5\_2のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項5\_4】

少なくとも一つの化合物がアデノウイルスが複製している細胞の感染性を高めることを

10

20

30

40

50

特徴とする、請求項 5\_1 ~ 5\_3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5 5】

少なくとも一つの化合物が、前記化合物の有効性を増加させ、前記化合物が一度でアデノウイルスの、又はアデノウイルスが複製する細胞におけるアデノウイルスの取り込みを媒介することを特徴とする、請求項 5\_1 ~ 5\_4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5 6】

少なくとも一つの化合物が核内への Y B - 1 の輸送を媒介するか、または増加させることを特徴とする、請求項 5\_1 ~ 5\_5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5 7】

少なくとも一つの化合物がヒストンデアシラーゼ阻害剤であることを特徴とする、請求項 5\_1 ~ 5\_6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。 10

【請求項 5 8】

ヒストンデアシラーゼ阻害剤がトリコスタチン A、F R 9 0 1 2 2 8、M S - 2 7 - 2 7 5、N V P - L A Q 8 2 4、P X D 1 0 1、アピシジン及びスクリプタイトを含む群から選択されることを特徴とする、請求項 5\_7 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 9】

少なくとも一つの化合物がトリコスタチン A、F R 9 0 1 2 2 8、M S - 2 7 - 2 7 5、N V P - L A Q 8 2 4、P X D 1 0 1、アピシジン及びスクリプタイトを含む群から選択されることを特徴とする、請求項 5\_1 ~ 5\_7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。 20

【請求項 6 0】

少なくとも一つの化合物がトポイソメラーゼ阻害剤であることを特徴とする、請求項 5\_1 ~ 5\_9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 6 1】

前記トポイソメラーゼ阻害剤がカンプトテシン、イリノテカン、トプテカン、D X - 8 9 5 I f、S N - 3 8、9 - アミノカンプトテシン、9 - ニトロカンプトテシン、ダウノルビシン及びエトポシドを含む群から選択されることを特徴とする、請求項 6\_0 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 2】

前記組成物がトリコスタチン A 及びイリノテカンを含むことを特徴とする、請求項 4\_9 ~ 6\_1 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。 30

【請求項 6 3】

前記アデノウイルスが少なくとも二つの化合物の一つまたは両者または全部から分離されていることを特徴とする、請求項 4\_8 ~ 6\_2 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 6 4】

少なくとも 1 単位用量のアデノウイルスが少なくとも 1 単位用量のまたは全部のさらなる医薬的に活性な化合物、または一つの化合物または少なくとも二つの化合物から分離されていることを特徴とする、請求項 6\_3 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 5】

請求項 1 ~ 3\_4 のいずれか 1 項に記載のアデノウイルスおよび少なくとも二つの医薬的に活性な薬剤を含み、各医薬的に活性な薬剤が個々にかつ独立して細胞分裂阻害剤を含む群から選択されるキット。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は E 1 - マイナス・アデノウイルスおよびその核酸コードするおよびその使用に関する。

【0 0 0 2】

多くの治療的な構想が、腫瘍の処置において、現在使用されている。手術を使用することを除くと、化学療法および放射線療法が、支配的である。全てのこれらの技術は、しかしながら、患者のための相当な副作用を伴う。複製選択的な腫瘍退縮性ウイルスの使用は、 50

腫瘍の処置のための新規なプラットフォームを提供する。それに関連して、ウイルスの選択的な腫瘍内複製が始まると、ウイルス複製、感染した腫瘍細胞の溶解および隣接した腫瘍細胞へのウイルスの伸展をもたらす。ウイルスの複製能力が腫瘍細胞に限定されていることから、正常組織は複製から、そして、ウイルスによる溶解を免れる。

#### 【0003】

目下のところ、いくつかのウイルス・システムが、腫瘍溶解を目的とする臨床試験に付されている。この種のアデノウイルスのための1つの実施例は、D11520（オニキス015）であり、臨床I相およびII相において首尾よく使用された（Khuri, F.ら、Nature Medicine 6, 879-885, 2000）。オニキス015は、完全に欠失されたE1B-55kDaの遺伝子を有するアデノウイルスである。アデノウイルスのE1B-55kDaのタンパク質の完全な欠失は、p53欠損を有する細胞の複製そして細胞溶解はアデノウイルスベクターを用いて可能であり、（Kirn, D.ら、Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 17, 391a, 1998）、それによって、正常細胞は害されないと発見に基づく。より詳しくは、E1B-55kDaの遺伝子産物は、p53の阻害、ウイルスmRNAの輸送及び宿主細胞のタンパク質合成のスイッチオフに関与する。p53の阻害は、p53およびE1B-55kDaのタンパク質をコードするアデノウイルス及び/又はE1B-55kDa及びE4orf6からなる複合体の生成を経て起こる。TP53によってコードされるp53は、複合体調節メカニズムのための開始点であり（Zambetti, G.P.ら、FASEB J. 7, 855-865, 1993）、特に、アデノウイルスのようなウイルスの細胞複製の効果的な抑制をもたらす。遺伝子TP53は、ヒト腫瘍の約50%において欠失するかまたは突然変異しており、化学療法または放射線療法のために、そして、このように通常不成功の腫瘍処置において-所望の-アポトーシスの不在という結果になる。

#### 【0004】

腫瘍溶解性アデノウイルスの更なる構想は、E1Aタンパク質が、Rb/E2Fおよび/またはp107/E2Fおよび/またはp130/E2Fの結合に影響を及ぼさない、特定の欠失形態にあるか又は1またはいくつかの突然変異を含む場合、このアデノウイルスが感染細胞をS期への進入を誘導せず、機能的Rbタンパク質を有しない腫瘍細胞において複製することができる発見に基づく。加えて、E1Aタンパク質は、N末端で欠失することができ、E1Aタンパク質のアミノ酸位置1~76の領域における1またはいくつかの突然変異を含むことができ、E1Aのp300への結合を阻害し、そして腫瘍細胞におけるより選択的な複製を提供する。これらの方法は、欧州特許EP 0 931 830に例示的な様式で記載されている。この種のウイルスの例は、AdD24、d1922~947、E1Ad/01/07及びCB016である（Howe, J. A.ら、Molecular Therapy 2, 485-495, 2000、Fueyo, J.ら、Oncogene 19, 2-12, 2000、Heise, C.ら、Nature Medicine 6, 11341139, 2001、Balague, C.ら、J. Virol. 75, 7602-7611, 2001）。これらのアデノウイルスシステムは先行技術として知られており、機能的Rbタンパク質及びそれぞれ、インタクトなRbタンパク質およびE2Fをからなっている複合体が有効なインピボでの複製をブロックし、そして、Rb-ネガティブ/突然変異された細胞だけで、インピボでのアデノウイルス複製を示すことを前提として、E1Aタンパク質における異なった欠失を含む。従来の技術に従うこれらのアデノウイルスシステムは、E1Aに基づき、初期E2プロモーター（E2初期プロモーター）及びフリーのE2Fによって、インピボでの複製をコントロールする（Dyson, N. Genes & Development, 12, 2245-2262, 1998）。腫瘍溶解性アデノウイルスシステムの他の形態は、

#### 【0005】

ウイルスの癌遺伝子E1Aを特異的に発現する選択的なプロモーターの使用に基づき、腫瘍細胞における選択的な複製を提供する（Rodriguez, R.ら、Cancer Res. 57, 2559-2563, 1997）。

#### 【0006】

上述の通り、それぞれの構想の基礎をなしている作用様式に適切である細胞バックグラウンドの選択は、アデノウイルス腫瘍溶解性ウイルスのさまざまな構想にとって重要である。

る。換言すれば、異なった分子生物学的必要条件が現実になる場合、現在公知のさまざまなアデノウイルスシステムを、使用できるだけである。これは、異なった患者グループへのこの種のシステムの使用を制限する。

【0007】

腫瘍疾患の処置における特定の課題は、一旦患者が、細胞増殖抑止剤に対する腫瘍の耐性の特に良く研究された形態を示す、いわゆる多剤耐性 (MDR) になると生じる (Gott esman and Pastan, Annu. Rev. Biochem. 62, 385-427, 1993)。それは、いわゆる ABC 輸送体に属する膜結合型輸送タンパク質 P 糖タンパク質の過剰発現に基づく (Stein, U. ら、JBC 276, 28562-69, 2001, J. Wijnholds, Novartis Found Symp., 243, 69-79, 2002)。Bargou, R. C. ら、および Oda, Y. らは、(Bargou, R. C. ら、Nature Medicine 3, 447-450, 1997, Clin. Cancer Res. 4, 2273-2277, 1998) ヒト転写因子 Yb-1 の核局在化が P 糖タンパク質の発現の活性化に直接に関与することを示すことができた。更なる研究は、Yb-1 が、さまざまなストレス状態、例えば UV 照射、細胞増殖抑止剤の投与 (Koike, K. ら、FEBS Lett 17, 390-394, 1997) および温熱療法 (Stein, U. ら、JBC 276, 28562-69, 2001) によって、核に輸送されることを確認した。更なる研究は、Yb-1 の核局在化が他の ABC トランスポーターに影響を及ぼすことを確認した。この ABC トランスポーターは、MRP (多種薬剤の耐性関連のタンパク質) と称し、そして、非定型の、非 P 糖タンパク質依存性多剤耐性の形成に関与する (Stein, U. ら、JBC 276, 28562-69, 2001)。

【0008】

本発明の基礎をなしている課題は、生物、より具体的には、ヒト及び一群の患者を、それぞれ、腫瘍溶解性な活性薬剤で治療することを可能にする、技術的な教示、特に手段を提供することである。細胞増殖抑止剤、特に多剤耐性を有するそれらに対して耐性を示す腫瘍病を患っている患者において腫瘍溶解を引き起こすために適切である手段を提供することは、本発明の基礎となる更なる課題である。本発明の基礎をなしているさらなる課題は、細胞溶解に適しているアデノウイルスを提供することである。本発明の基礎をなしている他の課題は、腫瘍細胞において、特に細胞周期から独立している核内に Yb-1 を有する腫瘍細胞において、又は調節解除された Yb-1 を有する腫瘍細胞において複製し、そして、特に高い粒子生成を示すウイルスを提供することである。

【0009】

本発明によると、課題は、添付した独立項の主題により解決される。好ましい実施態様は、また、取り付けられた従属クレームからとられることが可能である。

【0010】

第1の形態において、課題はまた、ウイルス、好ましくはアデノウイルスによって、本発明によって解決される、ここで、ウイルスは、

- 欠損している機能的野生型 E1 領域、及び
- ウィルスに感染した細胞の核内への Yb-1 の輸送のためのトランスポーターを含む。

【0011】

第1の形態の実施態様において、ウイルスがタンパク質 IX をコードする核酸を含み、タンパク質 IX を発現する。

【0012】

第1の形態の実施態様において、欠損している機能的な野生型 E1A 領域は、E1A-マイナスである。

【0013】

第1の形態の実施態様において、欠損している機能的な野生型 E1 領域は、E1B-マイナスである。

【0014】

欠損している野生型 E1 領域が E1B55K マイナス及び / 又は E1B19K マイナス及び / 又はタンパク質 IX マイナスである。

10

20

30

40

50

## 【0015】

第1の形態の実施態様において、トランスポーターは、ウイルスにより提供されるトランスポーターである。

## 【0016】

第1の形態の好ましい実施態様において、トランスポーターは、ウイルストランスポーターである。

## 【0017】

第1の形態の実施態様において、トランスポーターは、タンパク質 E 4 or f 6 を含む。

## 【0018】

第1の形態の実施態様において、トランスポーターは、タンパク質 E 1 B 5 5 K を含む。

## 【0019】

第1の形態の実施態様において、トランスポーターは、E 4 or f 4、及び、E 1 B 5 5 K の複合体を含む。

## 【0020】

第1の形態の実施態様において、前記トランスポーターが核酸によってコードされ、前記核酸がプロモーターのコントロール下にある。

## 【0021】

第1の形態の好ましい実施例において、前記トランスポーターが少なくとも二つのファクターの複合体であり、各ファクターが核酸によってコードされ、両核酸が共通のプロモーターによってコントロールされる。

## 【0022】

第1の態様の好ましい実施例において、両核酸が発現強度をコントロールする要素によって結合され、前記要素が好ましくは I R E S を含む群から選択される。

## 【0023】

第1の形態の好ましい別の実施例において、前記トランスポーターが少なくとも二つのファクターの複合体であり、各ファクターが核酸によってコードされ、両核酸が適切なプロモーターによってコントロールされる。

第1の形態の実施態様において、プロモーターが E 4 プロモーター、特にアデノウイルス E 4 プロモーターとは異なり、かつ、E 1 B プロモーター、特にアデノウイルス E 1 B プロモーターとは異なる。

## 【0024】

第1の態様の実施態様において、プロモーターが組織特異的プロモーター、腫瘍特異的プロモーター、C M V プロモーター、ウイルスプロモーター、特にアデノウイルスプロモーターを含む群から選択され、ただし、これらは、E 4 プロモーター、E 1 B プロモーターおよび好ましくは E 2 後期プロモーターとは異なる。

## 【0025】

第1の態様の実施態様において、トランスポーターをコードする前記核酸が E 1 B 5 5 K の 3' 末端に 3' - U T R を有する。

## 【0026】

第1の形態の実施態様において、欠損している野生型 E 1 領域が E 1 B 5 5 K ポジティブである場合は、前記トランスポーターをコードする核酸が E 1 B 5 5 K をコードする核酸を含まない。

## 【0027】

第1の形態の実施態様において、トランスポーターをコードする前記核酸が E 1 B 5 5 K および E 1 B 1 9 K をコードする。

## 【0028】

第1の態様の実施態様において、トランスポーターをコードする前記核酸がタンパク質 I X をコードする。

10

20

30

40

50

## 【0029】

第1の形態の好ましい実施例において、E 1 B 5 5 KおよびE 1 B 1 9 Kをコードする前記核酸がプロモーターのコントロール下にある。

## 【0030】

第1の形態の他の好ましい実施例において、E 1 B 5 5 Kおよび/またはE 1 B 1 9 Kおよび/またはタンパク質IXをコードする前記核酸がプロモーターのコントロール下にあり、前記プロモーターがE 1 A依存性プロモーターとは異なる。

## 【0031】

第1の形態の実施態様において、欠損している機能的野生型E 1領域がE 1 A 1 3 Sマイナスおよび/またはE 1 A 1 2 Sマイナスである。

10

## 【0032】

第1の形態の実施態様において、欠損している機能的野生型E 1領域がE 1 A 1 3 Sマイナスである。

## 【0033】

好ましくは第1の形態の実施態様において、好ましくは、前記欠損している野生型E 1領域がE 1 A 1 3 AマイナスおよびE 1 A 1 2マイナスであり、前記ウイルスがE 1 A 1 2 Sタンパク質をコードする核酸を含み、好ましくは、前記核酸が、異種核酸である。

## 【0034】

第1の形態の好ましい実施例において、E 1 A 1 2 Sタンパク質をコードする前記核酸がプロモーターのコントロール下にあり、好ましくは、前記プロモーターがY B - 1依存性プロモーター、より好ましくは、アデノウイルスE 2後期プロモーター、MDRプロモーターおよびDNAポリメラーゼプロモーターを含む群から選択される。

20

## 【0035】

第1の態様、及び、特に前の実施態様において、前記トランスポーターをコードする前記核酸がE 4 or f 6およびE 1 B 5 5 Kをコードする。

## 【0036】

第1の態様、及び、特に前の実施態様において、前記ウイルスがタンパク質IXをコードする核酸を含み、好ましくは、E 1 A 1 2 Sをコードする前記核酸およびタンパク質IXをコードする前記核酸が共通のプロモーターのコントロール下にあり、より好ましくは、両核酸が発現をレギュレーションする要素によって互いに連結されており、より好ましくは、前記要素がIRESを含む群から選択される。

30

## 【0037】

第1の形態の実施態様において、E 1 A 1 2 Sタンパク質をコードする前記核酸および前記タンパク質IXをコードする前記核酸がそれぞれプロモーターのコントロール下にあり、好ましくは、前記プロモーターが同一のプロモーターである。

## 【0038】

第1の形態の好ましい実施例において、プロモーターがY B - 1依存性プロモーターであり、好ましくは、アデノウイルスE 2後期プロモーター、MDRプロモーターおよびDNAポリメラーゼプロモーターを含む群から選択される。

## 【0039】

40

第1の形態の実施態様において、ウイルスがY B - 1コード核酸を含む。

## 【0040】

第1の態様、及び、特に前の実施態様において、E 1 A 1 2 Sタンパク質をコードする前記核酸およびY B - 1をコードする前記核酸が共通のプロモーターのコントロール下にあり、好ましくは、両核酸が発現をレギュレーションする要素によって互いに連結されており、好ましくは、前記要素がIRESを含む群から選択される。

## 【0041】

第1の形態の好ましい別の実施例において、Y B - 1をコードする前記核酸およびE 1 A 1 2 Sタンパク質をコードする前記核酸がそれぞれプロモーターのコントロール下にあり、好ましくは、前記プロモーターが同一のプロモーターである。

50

## 【0042】

第1の形態の好ましい実施例において、プロモーターがYB-1依存性プロモーターであり、好ましくは、アデノウイルスE2後期プロモーター、MDRプロモーターおよびDNAポリメラーゼプロモーターを含む群から選択される。

## 【0043】

第1の形態の実施態様において、E1A12Sをコードする前記核酸がE3領域またはE4領域内にクローニングされている。

## 【0044】

第1の形態の実施態様において、E1A12Sをコードする前記核酸およびタンパク質IXをコードする前記核酸またはYB-1をコードする前記核酸がE3領域またはE4領域内にクローニングされている。10

## 【0045】

第1の形態の実施態様において、タンパク質IXをコードする前記核酸の前記発現がE1B19KまたはE12ASによるE1Bとは異なるプロモーターによってコントロールされる。

## 【0046】

第1の形態の実施態様において、ウイルスが少なくとも一つの、好ましくは、E3領域内にクローニングされているトランスジーンを含む。

## 【0047】

第1の形態の好ましい実施例において、ウイルスが少なくとも一つの、好ましくは、E4領域内にクローニングされているトランスジーンを含む。20

## 【0048】

第1の形態の実施態様において、RGDモチーフをコードする核酸を含み、好ましくは、前記RGDモチーフがファイバーノブのヘルループドメイン内にクローニングされている。

## 【0049】

第1の形態の実施態様において、ウイルスは、さらに、MLP遺伝子および/またはE2A遺伝子とE2B遺伝子および/またはE3遺伝子および/またはE4遺伝子を含む。

## 【0050】

第1の形態の実施態様において、ウイルスは、核内にYB-1を含まない細胞内で複製欠損である。30

## 【0051】

第1の形態の実施態様において、ウイルスが核内にYB-1を有する、特に細胞周期から独立して核内にYB-1を有する細胞内で複製可能である。

## 【0052】

第1の形態の別の実施例において、ウイルスは、YB-1が調節解除されたところのかまたは調節解除された場合の細胞内で複製欠損である。

## 【0053】

第1の形態のさらなる別の実施例において、ウイルスは、腫瘍細胞内、好ましくは、細胞分裂阻害剤および/または放射線に対して耐性である腫瘍細胞内で複製することができる。40

## 【0054】

第1の形態の好ましい実施例において、細胞は、多剤耐性である。

## 【0055】

第2の形態において、課題は、発明の第1の態様に従ってウイルスをコードする核酸によって、本発明によって解決される。

## 【0056】

第3の形態において、課題は、第1の態様のウイルスまたは第2の態様の核酸または前記核酸またはその一部を含むベクターまたは該核酸を含む複製システムの、薬剤の製造のための、使用によって、本発明によれば解決される。50

## 【0057】

第4の態様において、課題は、第1の態様のウイルスまたは第2の態様の核酸の細胞内での複製のための使用であって、前記細胞が核内にYB-1を含み、好ましくは、前記細胞周期から独立して核内にYB-1を含むか、または前記細胞が調節解除されたYB-1を含むかまたは前記細胞が腫瘍細胞であり、好ましくは、前記腫瘍細胞が細胞分裂阻害剤および/または放射線に対して耐性である、使用よって、本発明によれば解決される。

## 【0058】

第4の形態の実施態様において、細胞が、前記細胞に適用されたかまたは前記細胞に適用されており、放射線、細胞分裂阻害剤および温熱療法を含む群から選択される手段の後かまたは手段によって前記核内にYB-1を含む。

10

## 【0059】

第3の形態の実施態様において、薬剤が腫瘍および/または癌の処置のためおよび/または細胞分裂阻害剤および/または放射線に対する細胞の感受性の回復のためであり、好ましくは、前記細胞が細胞分裂阻害剤および/または放射線に対して耐性である腫瘍細胞である。

## 【0060】

第3の形態の実施態様において、腫瘍を形成する前記細胞の少なくとも一部が前記核内にYB-1を有する細胞であり、好ましくは、前記細胞周期から独立して核内にYB-1を含むか、または前記腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部が調節解除されたYB-1を有するかまたは前記腫瘍を形成する細胞の少なくとも一部が腫瘍細胞であり、より好ましくは、細胞分裂阻害剤および/または放射線に対して耐性である腫瘍細胞である。

20

## 【0061】

第3の形態の好ましい実施態様において、細胞、具体的には、前記腫瘍を形成する前記細胞またはその一部が耐性、特に、薬物、好ましくは、抗腫瘍剤、より好ましくは、細胞分裂阻害剤に対する多剤耐性である。

## 【0062】

第3及び第4の形態の実施態様において、細胞が発現、より好ましくは、膜結合輸送タンパク質P糖タンパク質の過発現を示す。

## 【0063】

第3及び第4の形態の実施態様において、細胞が前記核内にYB-1を有する、具体的には、腫瘍を形成する前記細胞またはその一部が前記核内にYB-1を有する。

30

## 【0064】

第3及び第4の形態の実施態様において、腫瘍が前記核内へのYB-1の輸送の誘導後に前記核内にYB-1を含む。

## 【0065】

第3及び第4の形態の好ましい実施態様において、核内へのYB-1の前記輸送が放射線、細胞分裂阻害剤および温熱療法の適用を含む群から選択される少なくとも一つの手段によってトリガーされる。

## 【0066】

第3及び第4の形態の好ましい実施例において、手段が細胞、器官または生物に適用される。

40

## 【0067】

第5の形態において、課題は、第1の態様またはその一部に従って、ウイルス、特にアデノウイルスまたはその一部をコードする核酸を含み、ヘルパーウィルスの核酸を含む、ウイルス複製システム、具体的にはアデノウイルス複製システムの使用であって、前記ヘルパーウィルスの核酸がYB-1をコードする核酸配列を含み、場合により、前記ウイルスと相補的である、好ましくは、薬剤の製造のための、より好ましくは、腫瘍および/または癌の処置のための、および/または細胞分裂阻害剤および/または放射線に対する細胞の感受性の回復のための使用であって、前記細胞が好ましくは、細胞分裂阻害剤および/または放射線に対して耐性である腫瘍細胞である、使用よって、本発明により解決

50

される。

【0068】

第5の形態の実施態様において、ウイルス核酸、好ましくは、アデノウイルス核酸および／またはヘルパーウイルスの核酸が複製可能なベクターとして存在する。

【0069】

第6の形態において、課題は、薬剤の製造のための、具体的には、腫瘍の処置のためのおよび／または細胞分裂阻害剤および／または放射線に対する細胞の感受性の回復のための薬剤の製造のための第1の態様に従うウイルス、好ましくは、アデノウイルスをコードする核酸の使用であって、前記細胞が、好ましくは、細胞分裂阻害剤および／または放射線に対して耐性である腫瘍細胞である、使用によって、本発明により解決される。

10

【0070】

第6の形態の実施態様において、細胞、好ましくは、腫瘍を形成する前記細胞またはその一部が、耐性、特に、薬物、好ましくは、抗腫瘍剤、より好ましくは、細胞分裂阻害剤に対する多剤耐性である。

【0071】

第6の形態の実施態様において、細胞、好ましくは、腫瘍を形成する前記細胞またはその一部が、耐性、特に、薬物、好ましくは、抗腫瘍剤、より好ましくは、細胞分裂阻害剤に対する多剤耐性である。

【0072】

第7の形態において、好ましくは、第3及び第4の形態による使用のために、課題は、第2の形態による核酸を含むベクターによって、本発明により解決される。

20

【0073】

第8の形態において、課題は、細胞、腫瘍組織または患者の細胞が第1の形態のウイルス、特にアデノウイルスまたは第1の形態の核酸と接触および／または処置することができる／すべきであるか否かを決定するための、細胞、腫瘍組織または患者の細胞の特徴づけのためのYB-1と相互作用する薬剤の使用

【0074】

第8の形態の実施態様において、薬剤が抗体、高アフィニティー結合ペプチド、アンチカリン、アブタマー、アブタザイムおよびスピーゲルマーを含む群から選択される。

【0075】

30

第9の形態において、課題は、第1の形態によるウイルスまたは第2の形態の核酸または第5の形態のウイルス複製システムを含む医薬組成物によって、本発明により解決される。

【0076】

第9の形態の実施態様において、組成物が少なくとも一つのさらなる医薬的に活性な薬剤を含む。

【0077】

第9の形態の好ましい実施態様において、薬学的に活性薬剤は、部位カイン、メタロプロテイナーゼ阻害剤、血管新生阻害剤、細胞分裂阻害剤、細胞周期阻害剤、プロテオソーム阻害剤、組換え抗体、シグナル変換カスケードおよびタンパク質キナーゼの阻害剤を含む群から選択される。

40

【0078】

第9の形態の実施態様において、組成物は、少なくとも二つの化合物の組み合わせを含み、好ましくは、任意の化合物がそれぞれとして独立して部位カインを含む群から選択される。

【0079】

好ましい第9の形態の実施態様において、少なくとも二つの化合物が異なる標的分子を標的にする。

【0080】

第9の形態の実施態様において、少なくとも二つの化合物が異なる作用機序によって活

50

性である。

【0081】

第9の形態の実施態様において、少なくとも一つの化合物は、ウイルスが複製している細胞の感染性を高める。

【0082】

第9の形態の実施態様において、少なくとも一つの化合物が前記細胞内の化合物の有効性に影響し、好ましくは、前記化合物の有効性を増加させ、前記化合物が一度でウイルスの、又は前記細胞、好ましくはウイルスが複製する細胞におけるウイルスの取り込みを媒介する。

【0083】

第9の実施態様において、少なくとも一つの化合物が前記核内へのYB-1の輸送を媒介する、好ましくは増加させる。

【0084】

第9の形態の実施態様において、少なくとも一つの化合物は、ヒストンデアシラーゼ阻害剤である。

【0085】

第9の形態の好ましい実施態様において、ヒストンデアシラーゼ阻害剤がトリコスタチンA、FR901228、MS-27-275、NVP-LAQ824、PXD101、アピシジン及びスクリプタイトを含む群から選択される。

【0086】

第9の形態の実施態様において、少なくとも一つの化合物は、トリコスタチンA、FR901228、MS-27-275、NVP-LAQ824、PXD101、アピシジン及びスクリプタイトを含む群から選択される。

【0087】

第9の形態の実施態様において、少なくとも一つの化合物は、トポイソメラーゼ阻害剤である。

【0088】

第9の形態の好ましい実施態様において、トポイソメラーゼ阻害剤は、カンプトテシン、イリノテカン、トプテカン、DX-895If、SN-38、9-アミノカンプトテシン、9-ニトロカンプトテシン、ダウノルビシン及びエトボシドを含む群から選択される。

【0089】

第9の形態の実施態様において、組成物は、トリコスタチンA及びイリノテカンを含む

【0090】

第9の形態の実施態様において、ウイルス、特に本発明の第1の態様によるウイルスが前記少なくとも二つの化合物の一つまたは両者または全部から分離されている。

【0091】

第9の形態の好ましい実施態様において、少なくとも1単位用量のウイルスが少なくとも1単位用量のまたは全部のさらなる医薬的に活性な化合物、または一つの化合物または少なくとも二つの化合物から分離されている。

【0092】

第10の形態において、課題は、ウイルス、好ましくは本発明の第1の態様によるウイルスおよび少なくとも二つの医薬的に活性な薬剤を含み、各医薬的に活性な薬剤が個々にかつ独立して細胞分裂阻害剤を含む群から選択されるキットによって、本発明により解決される。

【0093】

本発明は、その本発明によるウイルス、すなわち、野生型アデノウイルス存在する機能的なE1領域を欠き、及び、同時に、トランスポーター、トランスポーターのためのコードを含み、細胞周期から独立している核またはYB-1が調節解除されている細胞においてYB-1を含む細胞において複製することができるという驚くべき発見に基づく。

10

20

30

40

50

## 【0094】

加えて、本発明者は、本発明によるウイルスが、また、特に、複製がY B - 1によって媒介されるとき、E 1 A 1 3 Sとは独立して複製することができることを発見した。これに関して、複製は、上記のとおり、それらの細胞において、特に生じる。ここで用いられる、核内にY B - 1を含む細胞、好ましくは、細胞周期から独立して核内にY B - 1を含む細胞は、本発明によるウイルスの使用による核において、特に、それらを有する細胞の感染のために、核内にY B - 1を含む細胞を含む。

## 【0095】

最後に、本発明者は、腫瘍退縮性ウイルスとして使用されるときに、タンパク質IXが重要なファクター、特に本発明によるウイルスの有効性のために重要なファクターであること、そして、このファクターが、ここで開示された構築物によって発見され、E 1 A 1 3 Sとは独立した複製を介在するY B - 1における高い粒子形成をもたらすことを発見した。

## 【0096】

調節解除された形態におけるY B - 1を含む細胞は、少なくとも一つの下記の特性を有するおよび/またはY B - 1を含み、Y B - 1は、下記特性の少なくとも一つを奏する。  
(1) Y B - 1は、好ましくは細胞周期とは独立して、細胞において過剰発現し、それによって、好ましくは、発現のための手段として、正常細胞におけるY B - 1の発現、すなわち、腫瘍細胞とは異なる細胞または細胞および細胞系、たとえば、肝細胞および纖維芽細胞系W I 3 8及びC C D 3 2 - L uに言及する。好ましくは、過剰発現は、約2~10、好ましくは5~10のファクターで増加する発現である。発現、特に過剰発現を測定するための方法は、当業者にとって公知であり、特に、それぞれ好ましくは、Y B - 1に関するかまたはY B - 1の、タンパク質、特にY B - 1濃度の測定、R N A、特にY B - 1のR N Aの測定、ウエスタンプロット分析、ノーザンプロット分析およびR T - P C Rを含む。Y B - 1でなくてもここに記載された代わりのマーカーも使用することができる。Y B - 1の過剰発現を示す細胞系の例は、下記である。結腸癌細胞系2 5 7 R D B、膵臓癌細胞系1 8 1 R D B、乳癌細胞系M C F - 7 A d r、前立腺癌細胞系D U 1 4 5、前立腺癌細胞系P C 3、神経膠腫細胞系U 3 7 3、神経膠腫細胞系U 8 7、肺癌細胞系A 5 4 9、肝臓癌細胞系H e p 3 B及びH e p G 2。細胞に存在するY B - 1は、本発明によるウイルスの複製を可能にする。該条件下での複製効力が強く減らされた複製とは異なることが本発明において好ましい。

## 【0097】

ここで用いられる実施態様において、用語、機能的な野生型E 1領域は、特に野生型アデノウイルスA d 5に含まれているE 1領域をいう。実施態様において、用語、機能的な野生型E 1領域を欠損するは、野生型のアデノウイルスに含まれる一つまたはいくつかの機能および機能性を含まないかまたは完全に含まないE 1領域をいう。一般に機能として以下において称される、機能性または機能は、核酸またはタンパク質、好ましくはタンパク質によって示されるかまたは媒介される。

## 【0098】

本発明について、機能の欠如は、翻訳レベルで活性ではない機能によって生じができる、すなわち、それをコードする核酸がウイルスゲノムにおいてまだあるにもかかわらず、機能を媒介するタンパク質が存在しない。これは、例えば、活性ではない、好ましくは、それぞれの特徴についての野生型のウイルスに存在するような調節およびコントロールコンテキストにはない、翻訳をコントロールしている調節エレメントによって、達成されることが可能であり、これによって、特に、m R N Aの安定性を提供する該調節エレメントは、例えば、m R N Aの3' U T Rに存在する。

## 【0099】

本発明と関連して機能の欠如は、代替的にまたは追加的に、転写レベルで活性ではない機能によって、生じることがありえる、すなわち、機能の媒介となっているタンパク質が存在せず、そして、それをコードする核酸はウイルスゲノムに含まれないかまたは完全に

10

20

30

40

50

含まれない。核酸が、機能の減失をもたらす一つまたはいくつかの突然変異を含むことは、この実施態様の範囲内である。好ましくは、該突然変異は、点突然変異および／またはいくつかの塩基を含む欠失および／または転写読み枠またはタンパク質をコードする核酸の完全な欠失である。

【0100】

タンパク質が野生型の対応するタンパク質の機能または活性の全てを呈するというわけではない場合、機能は、上記の意味において、欠損している。実施態様において、活性のための手段は、該条件下で成し遂げられる複製の範囲であり、それによって、好ましくは、強く異なる複製とは異なる。

【0101】

本発明の好ましい実施態様において、野生型ウイルスと比較して、異なる調節性コンテキストのウイルスに含まれるとき、また、機能は、欠損している。異なる調節性のコンテキストは、実施態様1にあり、それによって、他機能と比較して、異なる時点で機能は発現され、および／または転写および／または翻訳をコントロールするかまたは影響する異なる要素のコントロール下である。該要素は、特定の実施態様においてはプロモーターである。

【0102】

上記の意味において、機能の欠如は、また、「マイナス」としてそれぞれの機能を参照することによって、ここで表される。例えば、E1A13Sの欠如は、E1A13Sマイナスと称する。

20

【0103】

実施態様において、強く減らされた複製とは、特に、野生型と比較して2倍に、好ましくは5倍に、より好ましくは10倍に、そして最も好ましくは100倍に、減らされる複製である。好ましい実施態様において、複製の比較は、同一であるか類似した細胞系、同一であるか類似した感染のウイルス力価（感染の多重度、MOI、またはブラーク形成単位、pfu）および／または同一であるか類似したアッセイ条件を使用して実行される。複製は、特に粒子生成を意味する。さらなる実施態様において、複製のための手段は、ウイルス核酸合成の範囲でありえる。ウイルス核酸の合成の程度を決定する方法は、粒子形成の測定方法であるとして、当業者にとって公知である。

【0104】

30

本発明によるウイルスは、核内にYB-1の輸送のためのトランスポーターを含む。好ましい実施態様において、トランスポーターは、タンパク質、好ましくはウイルスタンパク質である。細胞の核にトランスポーターにより輸送されるYB-1は、特に本明細書で定義されるように、好ましくは調節解除されたYB-1である。しかし、また、YB-1が、代替的にまたは調節解除されたYB-1に加えたYB-1であり、本発明のウイルスによってコードされるYB-1であり、そして前記ウイルスが感染している細胞において、前記ウイルスにより発現されることは、本発明の範囲内である。

【0105】

本発明のウイルスが核内にYB-1を輸送する細胞は、好ましくは、調節解除されたYB-1を含む細胞である。

40

【0106】

ウイルスが該トランスポーターを含むかまたはそれをコードするかどうかを決定することは当業者の技術の範囲内である。実施態様において、細胞を用いることができ、該細胞は子宮頸癌細胞系HeLaまたは骨肉腫細胞系U2OSのような核内に細胞周期とは独立した様式でYB-1を含まず、そして感染、続くウイルスの複製、感染している細胞が核内に、YB-1を含むかどうかを決定することができる。別の実施態様において、使用される細胞は、調節解除されたYB-1を含む細胞である。該実験条件下の核内のYB-1の検出は、本願明細書に記載されている手段、特にYB-1に向けられた抗体を使用することにより、当業者により実行されることができる。ウイルスの影響下で、YB-1が核内で検出されたときは、試験されたウイルスはトランスポーターを含む。

50

## 【0107】

E 1 領域内でコードされた一方または両方のタンパク質群に関して、E 1 領域が上記の意味における「マイナス」であるのは、本発明の範囲内である。

## 【0108】

二つのタンパク質群は、E 1 A タンパク質、特に E 1 A 13S タンパク質、また、本明細書において、13S E 1 A とも称される、及び、E 1 B タンパク質、特に E 1 B 55K タンパク質、また、本明細書において、E 1 B 55K とも称される、E 1 B 19K タンパク質、本明細書において、E 1 B 19K とも称される、及びタンパク質 IX の群である。

## 【0109】

E 1 A プロモーター、好ましくは、アデノウイルス E 1 A プロモーター、より好ましくは、野生型のアデノウイルス E 1 A プロモーターと異なるプロモーターのコントロール下である場合、ウイルスが E 1 A 13S マイナスであること；E 1 A プロモーター、好ましくはアデノウイルス E 1 A プロモーター、より好ましくは、野生型のアデノウイルス E 1 A プロモーターと異なるプロモーターのコントロール下である場合、ウイルスが、E 1 A 12S マイナスであること；E 1 B プロモーター、好ましくはアデノウイルス E 1 B プロモーターとは異なるプロモーターのコントロール下である場合、ウイルスが、E 1 B 55K マイナスであること；E 1 B プロモーター、好ましくはアデノウイルス E 1 B プロモーター、より好ましくは、野生型アデノウイルス E 1 B プロモーターと異なるプロモーターのコントロール下である場合、ウイルスが、E 1 B 19K マイナスであること；E 1 B IX プロモーター、好ましくはアデノウイルス E 1 B IX プロモーター、より好ましくは、野生型アデノウイルス E 1 B IX プロモーターと異なるプロモーターのコントロール下である場合、ウイルスが、タンパク質 IX マイナスであること；そして、E 1 B IX プロモーターのコントロール下であるときは、プロモーターは、ウイルスファクター特に E 1 B IX プロモーターの活性をコントロールするファクターの欠如のために不活性であり、したがって後者は、調節コンテキストが変化し、より詳しくは調節コンテキストが間接的に変化するかまたはより高い統合または調節レベルで変化した例であること；は本発明の実施態様の範囲内である。一般に、用語変換した調節コンテキストは、間接的にまたはより高い統合または調節のレベルで活性である変化も含む、しかしながら、いかなるケースにおいても、野生型、特に、野生型アデノウイルスの環境とは異なる。

## 【0110】

本発明の実施態様では、ウイルスは E 1 A 13S マイナスである。さらなる実施態様では、ウイルスは E 1 A 12S マイナスである。これと関連して、ウイルスの E 1 A 12S は、その活性が Y B - 1 によって制御されるプロモーターの制御下にある、特に Y B - 1 によって活性化される場合に特に好ましい。これらのプロモーターは本明細書では Y B - 1 依存的プロモーターと呼ばれる。特に好適な Y B - 1 依存的プロモーターはアデノウイルス E 2 後期プロモーターである。この構築によって、Y B - 1 が核酸内に存在する場合にのみウイルス複製中の E 1 A 12S の活性化が保証される。これは、調節解除された Y B - 1 を感染細胞の核内に転位させる本発明のウイルストランスポーターを介した調節解除された Y B - 1 を有する細胞の場合に成立する。野生型における発現と比較して、ウイルストランスポーターおよび E 1 A 12S の経時的に逆転した発現に起因して、E 1 A 12S は調節解除された Y B - 1 を含む細胞において特異的に発現されるため、ウイルス複製がこれらの細胞に限られ、結果的に溶解がこれらの細胞に限定され、このことは特に安全性という点でこのウイルスの顕著な利点を示す。

## 【0111】

これを考慮すると、粒子数は、Y B - 1 依存性複製において、増加した。本発明者は、Y B - 1 依存性複製において、タンパク質 IX が重要な役割を奏し、そして、その発現が E 1 B 領域のタンパク質によって、好ましくは提供されるトランスポーターの発現の上記経時的な変化によって、不变のままであり、及び、本願明細書において開示される構築物

10

20

30

40

50

が理解される場合、E 1 A 1 2 S は影響を受けないことを認めた。Y B - 1 依存性複製のための従来技術において記載されているアデノウイルス構築物は、顕著な腫瘍溶解特性にもかかわらず、例えば、別の腫瘍溶菌ウイルスの適用を必要とする、いくつかの適用のためには低い粒子形成を示した。該ウイルスの他の適用は、原則として、可能である、しかしながら、ほとんどの場合所望されない。本願明細書において記載されている構築物については、粒子形成は、明らかに増加させることができた。その範囲において、本発明は、タンパク質IXおよび/またはそれをコードする核酸の、Y B - 1 依存性複製ウイルス、特にアデノウイルスと関連する、ウイルスの形成、特にアデノウイルス粒子の形成のための、使用に関する。さらにまた、本発明は、薬剤の製造のためのY B - 1 依存的様式で複製している、ウイルス、好ましくはアデノウイルスの使用に関し、前記ウイルスは、タンパク質IXおよび/またはそれをコードする核酸を含む。特に好ましい実施態様において、薬剤は、本願明細書において記載されているような腫瘍及び腫瘍疾患の処置のためである。さらなる、追加のか又は他の実施態様において、薬剤は、本願明細書において記載される動物細胞において耐性を逆転させるためおよび/または細胞増殖抑制剤および/または放射線に対する細胞の感受度の回復のためにあり、それによって、細胞は、好ましくは、耐性、特に本願明細書に記載される細胞増殖抑制剤及び放射線に対する耐性を示す腫瘍細胞である。10

#### 【0112】

さまざまなトランスジーンがウイルスゲノム内の適切な部位でクローニングされることは、本発明の範囲内である。特に好ましいのは、領域E 1、E 2 A、E 2 B、E 3 及びE 4 である。E 1 領域へのトランスポーターのクローニングは、特に好ましい。ウイルスゲノムの前記部位へのこれらのトランスジーンのクローニングが該部位によってコードされる遺伝子を部分的にまたは完全に不活性化できるかまたは欠失させることは当業者に理解される。しかしながら、それぞれの部位によってコードされる遺伝子が部分的にまたは完全に活性ままであることは、本発明の範囲内である。20

#### 【0113】

本発明のウイルスは、好ましくはアデノウイルスである。

#### 【0114】

用語疾患または状態の処置は、好ましい実施態様において、該疾患または状態の予防も含む。30

#### 【0115】

アデノウイルスのタンパク質IXはカプシド構造を強固にして、ビリオン内におけるウイルスDNAのパッケージングに重要である (Boulangerら、Journal of Virology, 44, 783-800, 1979; Jones und Shenk, Cell, 17, 683-689, 1979)。遺伝子はウイルスゲノム内の3581 - 4071位に位置するが (Colby und Shenk T, Journal of Virology, 1981, 39, 977-980)、タンパク質IXの遺伝子は複製中のDNA分子からのみ発現される (Matusi Tら、Molecular and Cellular Biology, 1986, 6, 4149-4154)。

#### 【0116】

先行技術に記載されており、Y B - 1 依存的な複製を行うウイルスXvir03-3 UTRは、3' UTR配列は同じものを含んでいるため、本発明と関連して一時的に実施された分析で示されたように、タンパク質IXの他、プロモーターを含んでいる。一方、該タンパク質は腫瘍細胞内では弱くしか発現しておらず、野生型ウイルスと比較して、粒子形成は比較的低い。ウイルスXvir03-3 UTRは、Xvir03-3 UTR内に導入された異種CMVプロモーター (Clontech: Plasmid pShuttle) によって媒介されるように、ウイルスタンパク質E1B55kおよびE4orf6を発現する。CMVプロモーターよりも、E1A発現と関連して本明細書で開示されている全てのプロモーターも使用可能である。両遺伝子のオープンリーディングフレームは、いわゆるIRES配列 (内部リボソーム侵入部位、英語: internal ribosomal entry site) によって互いに結合されている (Pelletier, J. and Sonenberg, N. Nature, 1988, 334, 320-325)。このエレメント (Novagen: pCITE) は1つのmRNAから2つのタンパク質の発4050

現を可能にする。1つのRNAから2つのタンパク質の発現のための別の選択肢は短鎖ペプチド(2A)の使用であり、これは口蹄疫ウイルスに由来する(Pablo de Felipe, Genetic Vaccines and Therapy, 2004, 2, 13)。原理上、このエレメントは本明細書に記載の様々な態様において調節IRES配列の代用として使用可能である。

【0117】

本出願以前には未知であった、YB-1依存的に複製するウイルス、特にアデノウイルスにおけるタンパク質IXの発現調節バックグラウンドから、YB-1依存的な複製と関連した、YB-1依存的に複製するウイルスの場合に、基本的に以下の異なる戦略によってタンパク質IXを発現可能であることを本発明者は認識した：

【0118】

1. 好ましくはタンパク質E1A12Sおよびタンパク質E1B19の発現を制御する非依存的プロモーターによる。

【0119】

非依存的プロモーターは好ましくはE1B IXプロモーターとは異なるプロモーターである。好ましくは、非依存的プロモーターは組織特異的プロモーター、腫瘍特異的プロモーター、YB-1依存的ウイルスプロモーターを含むグループから選択される。

【0120】

2. E1A12Sによるタンパク質IXの発現制御。感染細胞におけるS期誘導は、E1A12Sタンパク質の発現によって起こり、これは天然型プロモーターによるタンパク質IXの活性化をもたらす。

【0121】

原理上、該プロモーターはトランスポーターの発現のために使用され、野生型ウイルスにおけるトランスポーターの発現を制御するプロモーターとは異なることは本発明の範囲内である。好適な実施態様では、このことはE155kがE1Bとは異なるプロモーターによって制御され、E4orf6はE4プロモーターとは異なるプロモーターによって制御されることを意味する。別の実施態様では、プロモーターはE1A非依存的、即ち、その活性がE1Aの影響を受けないプロモーターである。好適なプロモーターはこのように、特に本明細書に記載されているプロモーターである、組織特異的プロモーター、腫瘍特異的プロモーター、ウイルスプロモーターである。

【0122】

特にその任意の態様と関連して、本発明の範囲内において使用可能なYB-1依存的プロモーターは、アデノウイルスE2後期プロモーター、MDRプロモーター[Steinら、J. Biol. Chem., 2001, 276, 28562-28569]、DNAポリメラーゼプロモーターの他[En-Niaら、J. Biol. Chem., 2004, Epub ahead of print]であるが、これらに限定されるわけではない。

【0123】

本発明の範囲内において有用な適当な非アデノウイルスプロモーターは、サイトメガロウイルスプロモーター、RSV(ラウス肉腫ウイルス)プロモーター、アデノウイルスベースのプロモーターVaiおよび非ウイルスYB-1プロモーター(Makino Y.ら、Nucleic Acids Res. 1996, 15, 1873-1878)を含むグループから選択可能である。本明細書で開示されている発明の任意の態様と関連して使用可能な別のプロモーターは、テロメラーゼプロモーター、フェトプロテイン(AFP)プロモーター、癌胎児性抗原プロモーター(CEA)(Cao, G., Kuriyama, S., Gao, J., Mitoro, A., Cui, L., Nakatani, T., Zhang, X., Kikukawa, M., Pan, X., Fukui, H., Qi, Z. Int. J. Cancer, 78, 242-247, 1998)、Lプラスチンプロモーター(Chung, I., Schwartz, P.E., Crystal, R.C., Pizzorno, G., Leavitt, J., Deisseroth, A.B. Cancer Gene Therapy, 6, 99-106, 1999)、アルギニンバソプレシンプロモーター(Coulson, J.M., Staley, J., Woll, P.J. British J. Cancer, 80, 1935-1944, 1999)、E2fプロモーター(Tsukadaら、Cancer Res., 62, 3428-3477, 2002)、ウロプラキンIIプロモーター(Zhangら、Cancer Res., 62, 3743-3750, 2002)、PSAプロモーター(Hallenbeck PL, Chang, YN, Hay, C, Golightly,

10

20

30

40

50

D., Stewart, D., Lin, J., Phipps, S., Chiang, YL. Human Gene Therapy, 10, 1721-1733, 1999) である。さらにドイツ特許出願 D E 1 0 1 5 0 9 8 4 . 7 で開示されているアデノウイルスの Y B - 1 依存的 E 2 後期プロモーターは、本発明の範囲内で使用できるプロモーターである。

#### 【 0 1 2 4 】

テロメラーゼプロモーターから、それがヒト細胞にとって重要であることは公知である。テロメラーゼ活性は、エンザイムの触媒サブユニットであるテロメラーゼリバーストランスクリプターゼ遺伝子 (h T E R T) の転写コントロールによってコントロールされる。テロメラーゼの発現は、ヒト腫瘍細胞の 85% において活性である。対照的に、それは、生殖細胞及び胎組織を除く大部分の正常細胞において、不活性である (Braunstein, I. ら、Cancer Research, 61, 5529-5536, 2001; Majumdar, A. S. ら、Gene Therapy 8, 568-578, 2001)。h T E R T プロモーターのより詳細な分析は、それぞれ、出発コドンから離れた 283 bp 及び 82 bp であるプロモーターの断片が腫瘍細胞における特定の発現に充分であることを示した (Braunstein I. ら ; Majumdar AS ら、前記)。したがって、このプロモーター及び特定の断片は、それぞれ、腫瘍細胞だけにおいて、遺伝子、特にトランスジーン、好ましくは本願明細書において開示されるトランスジーンの特異的な発現を提供することに適している。

#### 【 0 1 2 5 】

該プロモーターは、また、腫瘍細胞だけにおいて、本発明のウイルスの、改変癌遺伝子、好ましくは E 1 A 癌遺伝子タンパク質の発現を可能にする。また、実施態様において、トランスジーン、特に、E 4 o r f 6、E 1 B 5 5 k D、A D P、及び、Y B - 1 を含む群から選択される特定のトランスジーンは、これらのプロモーターのうちの一つのコントロール下のアデノウイルスベクターにおいて、発現される。トランス活性化癌遺伝子タンパク質、特に E 1 A タンパク質の読み枠がアデノウイルスシステムの遺伝子産物の一つ又はいくつか有するフレームであることは、本発明の範囲内である。このトランス活性化 E 1 A タンパク質の読み枠は、しかしながら、そこから独立していてもよい。

#### 【 0 1 2 6 】

本明細書で使用されているように、トランス遺伝子という用語は、一実施態様では、ウイルス、特に野生型アデノウイルス、より好ましくはアデノウイルス A d 5 野生型に含まれない全ての遺伝子、もしくは本明細書で定義される異なる調節コンテクストに含まれる全ての遺伝子を含む。本明細書に記載の 1 つ以上のトランス遺伝子は、1 つ以上のヘルパーウイルスによってコードおよび / または発現されることは本発明の一実施態様の範囲内である。

#### 【 0 1 2 7 】

本明細書に記載の知見および方法、使用、または核酸、タンパク質、複製系などはそれぞれ必ずしもアデノウイルスに限定されるわけではない。原理上、該システムは本明細書にも含まれる、そして開示される他のウイルスにも存在する。

#### 【 0 1 2 8 】

本発明のウイルスを使用する場合、または本発明に従って使用する場合、記載のウイルスは野生型ウイルス、好ましくは野生型アデノウイルスと同程度にまで複製し、該程度は、先行技術に従った 1 0 - 1 0 0 p f u / 細胞と比較して、1 - 1 0 p f u / 細胞の感染数で既に実現可能である。

#### 【 0 1 2 9 】

本発明のウイルスは、先行技術の Y B - 1 依存的ウイルスと比較して、粒子形成の顕著な増大をもたらす。好ましくは、粒子形成はファクター 2 ~ 5 0 、より好ましくはファクター 1 0 ~ 5 0 だけ増加する。

#### 【 0 1 3 0 】

最後に、実施態様において、本発明によれば使用されるアデノウイルスは、E 1 B 欠損、特に E 1 B 1 9 K 欠損である。一般に本願明細書において使用される欠損は、E 1 B が野生型に固有の特性の全部を示さず、そして、これらの特性のうちの少なくとも一つが

なくなっている状態を意味する。アデノウイルス B C L 2 ホモログ E 1 B 1 9 k は、プロアポトーシスタンパク質 B a k 及び B a x との相互作用によって、E 1 A 誘導アポトーシスを防止する。このため、最大の複製および / または粒子形成は、感染細胞において可能である (Ramya Sundararajan and Eileen White, *Journal of Virology* 2001, 75, 7506-7516)。もし存在すれば、アデノウイルス死亡タンパク質の機能を最小にすることから、E 1 B 1 9 k の欠如は、ウイルスのより良好な遊離をもたらす。該欠失によって、ウイルスにより誘導される細胞変性効果は増加し、そして、感染した腫瘍細胞の亢進された溶解をもたらす (Ta-Chiang Liuら、*Molecular Therapy*, 2004)。加えて、E 1 B 1 9 K の欠如は、腫瘍細胞における該組換えアデノウイルスの複製への影響を有さない TNF - をもたらすが、正常細胞において、TNF - での処置は、複製の減少、及び、感染性のウイルスの遊離をもたらす。このように、選択性及び特異性が増加した (Ta-Chiang Liuら、*Molecular Therapy* 2004, 9, 786-803)。 10

#### 【 0 1 3 1 】

本発明のために必須ではないアデノウイルス核酸配列を欠失及び突然変異させることは、当業者の技術の範囲内である。また、該欠失は、例えば、本願明細書に記載される、E 3 及び E 4 の一部をコードする核酸に関連があつてもよい。E 4 が欠失する場合、該欠失がタンパク質 E 4 o r f 6 に及ばない、換言すれば、本発明にしたがつて使用されるアデノウイルスが E 4 o r f 6 をコードすることは特に好ましい。好ましい実施態様において、該アデノウイルス核酸がウイルスカプシド内にまだパックされることができ、及び、このように感染性粒子形成される。これは、等しく本発明による核酸の使用に適用する。一般に、アデノウイルスシステムが単一またはいくつかの発現産物に関して欠損してもよいことは、留意しなければならない。これについて、発現産物をコードする核酸の完全な欠失又は突然変異、又は実質的に発現産物がもはや全く形成されないような、該核酸の欠失または突然変異、プロモーターまたは転写因子のようなそれぞれ制御及び発現コントロール要素の欠損、又は、核酸のレベル (プロモーターの欠如、シス作用要素) 又は翻訳及び転写のそれぞれのレベル (トランス作用要素) でその野生型と異なる活性に基づいてよい点に留意する必要がある。特に、後者の形態は、それぞれ細胞バックグラウンドに強く依存できる。 20

#### 【 0 1 3 2 】

本発明によるウイルスの Y B - 1 依存性複製は、以下に説明するように、野生型のアデノウイルスの複製に関して起こる。 30

#### 【 0 1 3 3 】

ウイルス感染中、まず「初期遺伝子」 E 1 、 E 2 、 E 3 、 E 4 が発現される。「後期遺伝子」群はウイルスの構造タンパク質の合成に関与している。異なる E 1 A 、 E 1 B タンパク質をコード化する 2 つの転写単位 E 1 A 、 E 1 B を含む E 1 領域は、 E 2 、 E 3 、 E 4 遺伝子の転写を誘導するため、初期・後期遺伝子いずれの活性化においても重要な役割を果たす (Nevins, J. R., *Cell* 26, 213-220, 1981)。また、 E 1 A タンパク質は休止中の細胞において D N A 合成を開始させて、 S 期への移行を引き起こすことができる (Boulanger and Blair, 1991 参照)。また、それらは R b クラスの腫瘍抑制因子と相互作用する (Whyte, P. ら、*Nature* 334, 124-127, 1988)。この過程で、細胞の転写因子 E 2 F が放出される。次に、 E 2 F 因子が細胞およびウイルスの両遺伝子の対応するプロモーター領域 (特にアデノウイルスの E 2 初期プロモーター) に結合して、転写、ひいては複製を開始させる (Nevins, J. R., *Science* 258, 424-429, 1992)。 40

#### 【 0 1 3 4 】

E 2 領域の遺伝子産物は、それらが 3 つの必須タンパク質をコードするため、複製の開始および完了において特に必要とされる。E 2 タンパク質の転写は、「 E 2 初期 E 2 F 依存的プロモーター」という 2 つのプロモーターによって制御されており、本明細書では E 2 初期プロモーターまたは初期 E 2 プロモーター、および「 E 2 後期プロモーター」とも呼ばれる (Swaminathan and Thimmapaya, *The Molecular Repertoire of Adenoviruses I II: Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 199, 177-194, Springer Ve 50

rlag 1995)。また、E 4 領域の産物は、E 1 A および E 1 B - 55 kDa タンパク質とともに、E 2 F の活性および p53 の安定性において重要な役割を果たす。例えば、E 2 プロモーターは、E 2 F および DP1 を含むヘテロ二量体と、E 4 領域によってコード化される E 4 orf6 / 7 との直接の相互作用によってさらにトランス活性化される (Swaminathan and Thimmapaya, JBC 258, 736-746, 1996)。さらに、感染の溶菌サイクルを成功裏に完了させるために、E 1 B - 55 kDa および E 4 orf6 を含む複合体は p53 によって不活性化される (Steegenga, W. T. ら、Oncogene 16, 349-357, 1998)。また、E 1 B - 55 kDa は、E 4 orf6 タンパク質と相互作用する際に、ウイルス RNA の核外への輸送を促進させるが、細胞の RNA は核内に保持されるため、この意味でさらに重要な機能を有する (Bridge and Ketner, Virology 174, 345-353, 1990)。さらに重要な知見は、E 1 B - 55 kDa / E 4 orf6 を含むタンパク質複合体が、いわゆる「ウイルス封入体 (viral inclusion body)」内に局在することである。これらの構造は複製および転写の場と考えられる (Ornelles and Shenk, J. Virology 65, 424-429, 1991)。

## 【0135】

E 3 領域は、複製、特にアデノウイルスの放出において重要なもう 1 つの領域である。E 3 領域は、インビトロ (即ち、細胞培養) においてアデノウイルスの感染サイクルに必須ではない比較的小さな様々なタンパク質の遺伝情報をより正確に含んでいる。しかし、それらは、特に免疫調節機能およびアポトーシス機能を有するため、インビトロでの急性および / または潜伏感染中のウイルスの生存において重要な役割を果たす (Marshall S. Horwitz, Virologie, 279, 1-8, 2001; Russell, 前記)。約 11.6 kDa の大きさを持つタンパク質が細胞死を誘導することが示されている。このタンパク質は、その機能のため、ADP (adenovirus death protein: アデノウイルス死タンパク質) と名付けられている (Tollefson, J. Virology, 70, 2296-2306, 1996)。該タンパク質は主に感染サイクルの後期に形成される。さらに、該タンパク質の過剰発現によって、感染細胞のより良好な溶解がもたらされる (Doronin ら、J. Virology, 74, 6147-6155, 2000)。これと一致して、各遺伝子およびタンパク質は本発明のウイルス内にそれぞれ含まれる。

## 【0136】

本発明に従った、特に全身投与と関連するアデノウイルスの薬剤としての使用は、アデノウイルスの適当なターゲティングによって向上できる。腫瘍細胞のアデノウイルス感染は、特にコクサッキーウイルスアデノウイルス受容体 CAR および特定のインテグリンの存在にある程度左右される。これらが細胞内、特に腫瘍細胞内において強く発現される場合、既に非常に低い力価 (pfu / 細胞) で感染可能である。組換えアデノウイルスのいわゆる再ターゲティングを実現するために、例えば、タンパク質 IX のファイバーノブ (fiber knob) 領域および C 末端への異種配列の挿入、二重特異性抗体の使用、アデノウイルスのポリマーコーティング、Ad-fiber 内へのリガンドの導入、それぞれ血清型 5 kDa および血清型 5 ファイバーシャフト (fiber shaft) の置換、血清型 3 kDa および Ad35 ファイバーシャフト、ペントン基の kDa および修飾による異なる戦略が今までに取られてきた (Nicklin S. A. ら、Molecular Therapy 2001, 4, 534-542; Magnusson, M. K. ら、J. of Virology 2001, 75, 7280-7289; Barnett B. G. ら、Biochimica et Biophysica Acta 2002, 1575, 1-14; Dimitrov D. I. ら、Journal of Virology, 2002, 76, 6893-6899; Mizuguchi und Hayakawa, Human Gene Therapy, 2004, 15, 1034-1044)。本発明のアデノウイルスおよび本発明に従って使用されるアデノウイルスと関連する別の設計および特性を実現することは、本発明の様々な実施態様において、本発明の範囲内である。

## 【0137】

E 1 B 55 kDa、E 4 orf6、ADPなどを含む様々なトランス遺伝子は、特にそれらがウイルス遺伝子の場合、原理上、各ウイルス、好ましくはアデノウイルス、さらに好ましくはアデノウイルス Ad5 からクローニングできる。様々なプラスミドが先行技術において追加的に記載されており、これらは各遺伝子を含み、これらから該遺伝子を適時回収可能であり、これらを本発明に従って使用されるウイルスの他、本発明に従った両方の

10

20

30

40

50

アデノウイルスに導入できる。E 1 B 5 5 k D を発現するプラスミドの例は、例えば、Dobbelstein, M. ら、EMBO Journal, 16, 4276-4284, 1997に記載されている。E 1 B 5 5 K 遺伝子のコーディング領域は、例えば、p D C R E 1 B プラスミドからB a m H I によってこの遺伝子の3' 非コード領域 (3' UTR 領域は好ましくはアデノウイルスの野生型ゲノムの約3507 ~ 4107位にある)と共に切り出すことができる。3' 非コード領域の他、E 1 B 5 5 k D を含む各断片は、アデノウイルス5型の2019 ~ 4107位のヌクレオチドに対応する。しかし、E 1 B 5 5 k D 遺伝子がそれぞれB a m H I、B f r I、X b a I 制限酵素でプラスミドから切り出され、それに統いてアデノウイルスにクローニングされることも本発明の範囲内である。この遺伝子の類似物質、特に3' 領域の類似物質を本発明において使用できることも本発明の範囲内である。3' UTR 領域の類似物質は、3' UTR 領域と同じ作用、特に遺伝子、好ましくはE 1 B 5 5 k D 遺伝子の発現に関して同じ作用を有する任意の配列である。該類似物質は、当業者が実施する通常の実験（例、3' UTR 領域の1つ以上のヌクレオチドの伸長または短縮、そして次にこのようにして得られた類似物質が過去に記載された3' UTR 領域と同じ作用を依然として有しているか否かを試験する）によって判定できる。一実施態様では、3' UTR 領域はこのように遺伝子の各類似物質および任意の類似物質を含む。10

#### 【0138】

治療用遺伝子またはトランス遺伝子が、好適な実施態様において、好ましくは特異的プロモーター、特に腫瘍特異的プロモーターまたは組織特異的プロモーターの制御下にクローニングされたウイルスは、本発明に従ったウイルスをさらに発展させたものである。E 4 領域が機能的に不活性である、または好ましくは欠失されていることも該ウイルスの範囲内である。本明細書に記載のトランス遺伝子もE 4 領域内にクローニング可能であり、これはE 3 領域内へのトランス遺伝子のクローニングの代わり、もしくは追加的に実施可能であり、E 3 領域は部分的または完全に無傷でありうる。本明細書で使用されるトランス遺伝子は、治療用遺伝子またはウイルス遺伝子、好ましくはアデノウイルス遺伝子であり、好ましくは野生型アデノウイルスのゲノム中には存在せず、現在特定のウイルス中に位置するゲノム部位には存在しない。20

#### 【0139】

治療用遺伝子はプロドラッグ遺伝子、サイトカイン遺伝子、アポトーシス誘導遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、メタロプロテイナーゼインヒビター遺伝子、および/または血管形成抑制剤、チロシンキナーゼインヒビター遺伝子でありうる。また、s i R N A、アプタマー、アンチセンス分子、リボザイムは好ましくは癌関連標的分子に対して発現可能である。好ましくは、個別の、もしくはいくつかの標的分子を、耐性関連因子、抗アポトーシス因子、癌遺伝子、血管形成因子、D N A 合成酵素、D N A 修復酵素、増殖因子およびその受容体、転写因子、メタロプロテイナーゼ、特にマトリクスメタロプロテイナーゼ、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子から選択される。これらの好ましい実施態様は本明細書において既に開示されている。30

#### 【0140】

一実施態様では、耐性関連因子は好ましくはP 糖タンパク質、M R P、G S T を含むグループから選択され、これらをコードする核酸も含む。40

#### 【0141】

好適な実施態様において使用可能なプロドラッグ遺伝子は、例えば、シトシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ、プリンヌクレオチドホスフォリラーゼ (P N P) である (Kirn ら、Trends in Molecular Medicine, volume 8, no. 4 (suppl), 2002; Wybranietz W.A. ら、Gene Therapy, 8, 1654-1664, 2001; Niculescu-Duvaz ら、Curr. Opin. Mol. Therapy, 1, 480.486, 1999; Koyama ら、Cancer Gene Therapy, 7, 1015-1022, 2000; Rogers ら、Human Gene Therapy, 7, 2235-2245, 1996; Lockett ら、Clinical Cancer Res., 3, 2075-2080, 1997; Vijayakrishna ら、J. Pharmacol. And Exp. Therapeutics, 304, 1280-1284, 2003)。50

## 【0142】

好適な実施態様において使用可能なサイトカインは、例えば、G M - C S F、T N F - 10、I L - 1 2、I L - 2、I L - 6、C S F またはインターフェロン である (Gene Therapy, Adavnces in Pharmacology, volume 40, editor; J. Thomas August, Academic Press; Zhang and Degroot, Endocrinology, 144, 1393-1398, 2003; Descamps ら、J. Mol. Med., 74, 183-189, 1996; Majumdar ら、Cancer Gene Therapy, 7, 1086-1099, 2000)。

## 【0143】

一実施態様では、抗アポトーシス因子はB C L 2 を含むグループから選択され、これらをコード化する核酸も含む。一態様の場合、癌遺伝子はR a s、特に変異R a s、R b、M y c を含むグループから選択され、これらをコード化する核酸も含む。一実施態様では、血管新生因子はV E G F およびH M G タンパク質を含むグループから選択され、これらをコード化する核酸も含む。一態様の場合、D N A 合成酵素はテロメラーゼを含むグループから選択され、これらをコード化する核酸も含む。一実施態様では、D N A 修復酵素はK u - 8 0 を含むグループから選択され、これらをコード化する核酸も含む。一実施態様では、増殖因子はP D G F、E G F、M - C S F を含むグループから選択され、これらをコード化する核酸も含む。さらなる実施態様では、受容体は特に増殖因子の受容体であり、好ましくは、増殖因子はP D G F、E G F、M - C S F を含むグループから選択され、これらをコード化する核酸も含む。一実施態様では、転写因子はY B - 1 を含むグループから選択され、これらをコード化する核酸も含む。一実施態様では、メタロプロテイナーゼは特にマトリクスマタロプロテイナーゼである。好適な態様の場合、マトリクスマタロプロテイナーゼはM M P - 1 およびM M P - 2 を含むグループから選択され、これらをコード化する核酸も含む。一実施態様では、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子はu P a - R を含むグループから選択され、これらをコード化する核酸も含む。

## 【0144】

好適な実施態様において使用可能なアポトーシス誘導遺伝子は、例えば、デコリン (Tr alhao ら、FASEB J, 17, 464-466, 2003) 、網膜芽細胞腫 (Zhang ら、Cancer Res., 63, 7 60-765, 2003) 、Bax およびBad (Zhang ら、Hum. Gene Ther., 20, 2051-2064, 2002) 、アポプチン (Noteborn and Pietersen, Adv. Exp. Med. Biol., 465, 153-161, 2000) 、ADP (Toth ら、Cancer Gene Therapy, 10, 193-200, 2003) 、bcl-xs (Sumantran ら、Cancer Res, 55, 2507-2512, 1995) E4orf4 (Braithwaite and Russell, Apoptosis, 6, 359-370, 2001) 、FasL、Apo-1、Trail (Boehringer Manheim, Guide to Apoptotic Pathways , Arai ら、PNAC, 94, 13862-13867, 1997) 、Bims (Yamaguchi ら、Gene Therapy, 10, 37 5-385, 2003) 、GNR163 (Oncology News, 17 June, 2000) である。

## 【0145】

好適な実施態様において使用可能な腫瘍抑制遺伝子は、例えば、E 1 A、p 5 3、p 1 6、p 2 1、p 2 7、M D A - 7 である (Opalka ら、Cell Tissues Organs, 172, 126-13 2, 2002, Ji ら、Cancer Res., 59, 3333-3339, 1999, Su ら、Oncogene, 22, 1164-1180, 2003)。

## 【0146】

好適な実施態様において使用可能な血管新生インヒビターは、例えば、エンドスタチン 40 またはアンジオスタチン (Hajitou ら、FASEB J., 16, 1802-1804, 2002) および抗V E G F 抗体 (Ferrara, N., Semin Oncol 2002 Dec; 29 (6 suppl 16): 10-4) である。

## 【0147】

好適な実施態様において使用可能なメタロプロテイナーゼインヒビターは、例えば、T i m p - 3 (Ahonen ら、Mol Therapy, 5, 705-715, 2002)、P A I - 1 (Soff ら、J. Clin. Invest., 96, 2593-2600, 1995) 、Timp-1 (Brandt K. Curr. Gene Therapy, 2, 255-271, 2002) である。

## 【0148】

本発明のグループIアデノウイルスおよびグループIIアデノウイルスによって発現可 50

能な本発明の意味での別のトランス遺伝子もチロシンキナーゼインヒビターである。例示的なチロシンキナーゼは E G F R (上皮増殖因子受容体) である [Onkologie, Entstehung und Progression maligner Tumoren; 著者:Christoph Wagner, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999]。好適なチロシンキナーゼインヒビターはハーセプチンである [Zhang Hら、Cancer Biol Ther. 2003, Jul-Aug; 2 (4suppl1): S122-6]。

【0149】

本明細書で使用される、s i R N A (短鎖干渉R N A) は、塩基の相同性に起因して互いにハイブリダイズする 2 本の、好ましくは別々の R N A 鎖からなり、これらが本質的に塩基対を作つて存在し、好ましくは、鎖長は最高 50 ヌクレオチド、好ましくは 18 - 30 ヌクレオチド、より好ましくは 25 ヌクレオチド未満、最も好ましくは 21、22、23 ヌクレオチドであり、これらの数字は s i R N A の一本鎖、特により正確には第二の一本鎖とハイブリダイズする、もしくは塩基対を作る一本鎖の鎖長を示す。このために必要な特異性は、s i R N A の配列、そしてその結合部位によって媒介される。分解の標的配列は、第一または第二の s i R N A 形成鎖と本質的に相同である。厳密な作用機序は依然として不明であるが、s i R N A は進化の途中で別の対立遺伝子を阻害して、ウイルスから自身を守るための細胞の生物学的戦略と予測される。s i R N A 媒介性 R N A 干渉は、遺伝子特異的な二本鎖 R N A の導入によってタンパク質の発現の特異的抑制または完全な除外の方法として使用される。高等動物では、19 - 23 ヌクレオチドを含む s i R N A が、インターロイキン反応などの非特異的な防衛反応を活性化させないため、この範囲で特に適している。対称な 2 ヌクレオチドの 3 突出を有する 21 ヌクレオチドの二本鎖 R N A の直接的トランスフェクションは、哺乳動物細胞において R N A 干渉を媒介するのに適しており、リボザイムやアンチセンス分子などの他の技術と比較して非常に効率的であった (Elbashir, S. Harborth J. Lendeckel W. Yalcin, A. Weber K, Tuschl T: Duplicates of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 2001, 411: 494-498)。標的遺伝子の発現を抑制するために数本の s i R N A 分子だけで十分である。特に干渉現象の一過性および s i R N A 分子の特異的デリバリーにおける外来 s i R N A の限界を回避するために、内因性 s i R N A 発現を可能にする先行技術のベクターを使用する。該目的のために、例えば、9 ヌクレオチドのスペーサー配列によって隔てられた、センスおよびアンチセンス両方向の 19 ヌクレオチド長の標的配列を含むベクターに 64 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを導入する。結果として得られる転写産物は、例えば 19 塩基対のステム構造 (ステム) を有するヘアピン構造に折りたたまれる。ループは細胞内において急速に分解され、機能的な s i R N A 分子が産生される (Brummelkampら、Science, 296, 550-553, 2002)。

【0150】

さらなる形態において、本発明は、少なくとも本発明によるウイルスを含む薬剤に関する。さらなる形態において、本発明は、薬剤の製造のための本発明のウイルスの使用に関する。これに関して、薬剤は、腫瘍及び癌病の処置のためにある。腫瘍及び癌病は、好ましくは、本願明細書において記載されているそれらである。好ましくは、腫瘍及び癌疾患は、それぞれ耐性を有する。好ましくは、耐性は、本願明細書に記載される耐性、特に好ましくは多剤耐性、細胞増殖抑制剤および/または放射線に対する多剤耐性である。さらなる形態において、薬剤は、細胞増殖抑制剤および/または放射線に対する細胞の感度を回復するためであり、それによって、細胞は、好ましくは、細胞増殖抑制剤および/または放射線に対して耐性を示す腫瘍細胞である。感度の回復は、「薬感受度の回復」と英語で呼ばれる過程である。

【0151】

なお更なる実施態様において、薬剤は、さらに、少なくとも一つの薬学的に活性な化合物を含む。

【0152】

好適な一実施態様では、薬学的に活性な化合物は、サイトカイン、メタロプロテイナーゼ阻害剤、血管新生阻害剤、結腸癌に対するイリノテカンや C P T - 11 および白血病に

10

20

30

40

50

に対するダウノルビシン、CDK2 / サイクリンEキナーゼ活性を阻害して結腸癌に対して使用可能なCYC202などの細胞周期阻害剤 (McClue SJ, Int. J. Cancer 2002, 102, 463-468) Raf-1を阻害して、例えば、乳癌に効果的なBAY43-9006 (Wihelm SMら、Cancer Res.2004, 64, 7099-7109)、26Sプロテアソーム活性を阻害して扁平上皮癌に対して使用されるPS-341などのプロテアソーム阻害剤 (Fribley Aら、Mol Cell Biol 2004 Nov; 24(22): 9695-704)、EGF受容体に対する組換え抗体 (Herceptin for breast carcinoma and prostate tumor; H.G. van der Poel, European Urology 2004, 1-17; Erbitux against head and neck tumors; Bauman Mら、Radiother. Oncol., 2004, 72, 257-266)、特にc-kitを抑制して胃腸腫瘍に対して使用可能なST1571などのシグナル伝達系の阻害剤 (H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、特に前立腺癌に対して使用可能なエンドセリン阻害剤であるABT-627 (H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、VEGFRチロシンキナーゼ受容体のリン酸化を阻害して膠芽細胞腫や前立腺癌に対して使用可能なSU5416 (Bischof Mら、Int. J Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2004; 60(4): 1220-32)、EGFRチロシンキナーゼ活性を阻害して、特に前立腺癌に対して使用可能なZD1839 (H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、mTORを阻害して前立腺癌に対して使用可能なCCI-779やRAD001などのラバマイシン誘導体である。本明細書に記載の様々なアデノウイルスや本発明に従って使用されるアデノウイルスが原理上これと関連して記載される各適用および任意の適応に対する上記の各化合物および任意の化合物と共に使用可能であることは本発明の範囲内である。特に好適な一実施態様では、適応は過去に記載された薬学的に活性な化合物または薬剤に対して記載された適応である。 10 20

#### 【0153】

本発明者はさらに驚くべきことに、少なくとも2つの化合物の併用によって本明細書に記載のウイルスおよび特に本発明に従って使用されるウイルスの有効性を高めることが可能であることを見出しており、少なくとも2つの化合物のそれぞれは細胞増殖抑制剤を含むグループから個別および無関係に選択される。化合物は、好ましい実施態様において、薬学的に活性な化合物である。

#### 【0154】

本明細書の好適な一実施態様において使用されているように、細胞増殖抑制剤は特に化学的化合物または生物学的化合物であり、これらは細胞または該細胞を含む生物への投与中または投与後に、細胞分裂および(または)細胞増殖を停止させる、および(または)細胞分裂および(または)細胞増殖を停止または減速させる。細胞増殖抑制剤は、細胞または該細胞を含む生物においてのみ上記の意味で細胞増殖抑制性となる化合物または薬剤も含む。この範囲において、細胞増殖抑制剤という用語は、細胞増殖抑制前も含む。 30

#### 【0155】

細胞増殖抑制剤は作用機序に従ってグループ分けされる。原理上、全てが本発明の範囲内で使用可能な以下のグループは区別される：

#### 【0156】

- アルキル化剤、即ち、タンパク質の他、核酸のリン酸基、アミノ基、スルフヒドリル基、カルボキシ基、ヒドロキシ基のアルキル化によって細胞毒性作用を生じる化合物。該化合物はそれ自体が発癌性を有する場合が多い。細胞増殖抑制剤のこのグループの典型例は、シスプラチニンおよびプラチニン誘導体であるシクロホスファミド、ダカルバジン、マイトマイシン、プロカルバジンである。 40

#### 【0157】

- 代謝拮抗産物、即ち、構造的類似性または結合能に起因して、代謝過程を遮断する、またはそれに影響を与える化合物。代謝拮抗産物のグループ内では、構造的に類似した代謝拮抗産物、構造を変化させる代謝拮抗産物、間接的に作用する代謝拮抗産物間で区別される。構造的に類似している代謝拮抗産物は、化学的類似性に起因して、その機能を発揮することなく競合する。構造を変化させる代謝産物は、機能または吸収を妨げる、もしくは代謝産物を化学的に修飾する代謝産物に結合する。間接的に作用する代謝拮抗産物は、 50

例えば、イオンの結合によって代謝産物の機能を妨げる。このグループの典型例は、メトトレキセートなどの葉酸拮抗剤、フルオロウラシルなどのピリミジン類似物質、アザチオプリンやメルカプトプリンなどのプリン類似物質である。

【0158】

- 有糸分裂阻害剤、即ち、細胞分裂を阻害する化合物。有糸分裂阻害剤のグループ内では、細胞分裂毒、紡錘体毒、染色体毒間で区別される。このグループの典型例はタキサンおよびビンカアルカロイドである。タキサンは次にタキソールとタキソテールの2つの主要なグループに分けることができ、特に好ましいタキソールはパクリタキセルであり、特に好ましいタキソテールはドセタキセルである。

【0159】

- D N A 依存性 R N A ポリメラーゼに対する抑制効果を有する抗生物質。典型例は、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、マイトマイシンなどのアントラサイクリンである。

【0160】

- トポイソメラーゼ阻害剤、特にトポイソメラーゼ I 阻害剤。トポイソメラーゼ阻害剤は、3段階の過程で D N A のねじれ数の変化を触媒することで D N A の三次構造を決定する化合物である。本質的に、2つの型のトポイソメラーゼが区別される。I型トポイソメラーゼは、D N A鎖のみを切断して、A T P 非依存性であるが、I I型トポイソメラーゼはD N Aの両方の鎖を切断し、A T P 依存性である。トポイソメラーゼ I 阻害剤の典型例はイリノテカンおよびトポテカンであり、トポイソメラーゼ I I 阻害剤の典型例はエトボシドおよびダウノルビシンである。

【0161】

本発明の範囲内で、少なくとも1つおよび好ましくは2つの薬剤が上記のグループから選択される。一方、特に3、4、5つの異なる薬剤が選択されることも本発明の範囲内である。1つだけ、好ましくは2つの薬剤をウイルスと併用する、本発明の実施態様と関して以下のコメントがなされた。これらの考察は基本的に1つ以上の薬剤が使用される実施態様にも適用可能である。

【0162】

好ましくは、薬剤は、それらが異なる標的分子を対象とする、もしくは異なる分子を標的とする、と文献中に記載されているように互いに異なる。薬剤が、同じ標的分子に結合する2つ以上の異なる薬剤を含むことは本発明の範囲内である。該薬剤が標的分子の第一部位に結合して、次に該薬剤が標的分子の第二部位に結合することも本発明の範囲内である。

【0163】

少なくとも2つの薬剤が異なる作用機序で活性であることも本発明の範囲内である。「活性である」とは、好適な一実施態様では、化合物の作用を阻害する、もしくは遅らせる細胞増殖および/または細胞分裂が異なる作用機序により媒介されることを意味する。特に好適な一態様の場合、「活性である」という用語は、1つおよび/または両方の薬剤が使用されない場合と比較して、ウイルス、特に本発明のウイルス、本明細書に記載のウイルスおよび本発明に従って使用されるウイルスの複製効率が増大することを意味する。ウイルス複製の効率測定値として、好ましくは細胞溶解に必要なウイルス数を使用し、好ましくは p f u / 細胞で表す。

【0164】

特に好適な実施態様では、少なくとも2つの薬剤の内、少なくとも1つが、ウイルス複製を生じる、好ましくは選択的に生じる、好ましくは本明細書に記載のウイルスおよび/または本明細書に従って使用されるウイルスによる細胞の感染性を増大させる薬剤である。これは、例えば、細胞によるウイルスの取り込みによって実施可能である。ウイルス、特にアデノウイルスの取り込みは、例えば、コクサッキーウイルスアデノウイルス受容体 ( C A R ) によって媒介される ( Mizuguchi und Hayakawa, GENE 285, 69-77, 2002 )。C A R の発現上昇は、例えば、トリコスタチン A によって生じる ( Vigushinら, Clinical

10

20

30

40

50

Cancer Research, 7, 971-976, 2001)。

【0165】

別の一実施態様では、少なくとも2つの薬剤の内、1つは細胞内成分の有効性を増大させ、該成分は、ウイルス、本明細書に記載のウイルスおよび/または本発明に従って使用されるウイルスの複製を増大させる薬剤である。

【0166】

別の一実施態様では、少なくとも2つの薬剤の内1つはYB-1の核内への輸送を媒介する薬剤である。該薬剤は、トポイソメラーゼ阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、有糸分裂阻害剤を含むグループから選択される。好ましいトポイソメラーゼ阻害剤は、カンプトテシン、イリノテカン、エトポシド、そしてこれらの類似物質である。好ましい有糸分裂阻害剤は、ダウノルビシン、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセルである。好ましいアルキル化剤はシスプラチンおよびその類似物質である。好ましい代謝拮抗剤はフルオロウラシルおよびメトトレキサートである。

10

【0167】

特に好適な一実施態様では、少なくとも2つの薬剤の内1つは、細胞の感染性、特にCARの発現を増大させる薬剤であり、少なくとも2つの薬剤の2番目はYB-1の核内輸送を増大させる薬剤であり、好ましくは化合物として、好ましくは上記の必要な各特性を示す化合物が使用される。CARの発現を増やしている化合物のクラスの例は、ヒストンデアセチラーゼインヒビターであり、そして、核内へのYB-1の輸送を増やしている化合物のクラスの例は、トポイソメラーゼインヒビターである。

20

【0168】

さらなる実施態様において、少なくとも二つの薬剤のうちの一つはヒストンデアセチラーゼインヒビターであり、そして、少なくとも二つの薬剤の他の一つはトポイソメラーゼインヒビターである。

【0169】

別の一実施態様では、少なくとも2つの薬剤の内1つはヒストンデアセチラーゼ阻害剤である。好ましいヒストンデアセチラーゼ阻害剤は、トリコスタチンA、FR901228、MS-27-275、NVP-LAQ824、PXD101を含むグループから選択される。トリコスタチンAは、例えば、Vigushinら、Clinical Cancer Research, 7, 971-976, 2001に記載されている。FR901228は、例えば、Kitazonoら、Cancer Res., 61, 6328-6330, 2001に記載されている。MS-27-275は、Jaboinら、Cancer Res., 62, 6108-6115, 2002に記載されている。PXD101は、Plumbら、Mol. Cancer Ther., 8, 721-728, 2003に記載されている。NVP-LAQ824は、Atadjaら、Cancer Res., 64, 689-695, 2004に記載されている。

30

【0170】

一実施態様では、少なくとも1つの薬剤は、トリコスタチンA(膠芽細胞腫に対する; Kim JHら、Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 2004, 59, 1174-1180)、FR901228(膵臓腫瘍に対する; Sato Nら、Int. J. Oncol. 2004, 24, 679-685)、MS-27-275(前立腺癌に対する; Camphausen Kら、Clinical Cancer Research 2004, 10, 6066-6071)、NVP-LAQ824(白血病に対する; Nimmanapalli Rら、Cancer Res. 2003, 63, 5126-5135)、PXD101(卵巣癌に対する; Plumb JAら、Mol. Cancer Ther. 2003, 2, 721-728)、スクリプタيد(乳癌に対する; Keen JCら、Breast Cancer Res. Treat. 2003, 81, 177-186)、アビシジン(黒色腫に対する; Kim SHら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004, 315, 964-970)、C1-994(多様な腫瘍に対する; Nemunaitis JJら、Cancer J. 2003, 9, 58-66)を含むグループから選択される。ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の作用機序は特に、Lindemann RKら、Cell Cycle 2004, 3, 77-86に記載されている。これらと関連する、本明細書に記載の各適応および任意の適応に対して、原理上、本明細書に記載の様々なアデノウイルスおよび本発明に従って使用されるアデノウイルスを上記の化合物と併用できることは本発明の範囲内である。特に好適な一実施態様では、適応は、上記の薬学的に活性な各化合物および任意の化合物に関して記載

40

50

されている適応である。

【0171】

さらに別の一実施態様では、少なくとも2つの薬剤の内1つはトポイソメラーゼ阻害剤、好ましくはトポイソメラーゼI阻害剤である。好ましいトポイソメラーゼ阻害剤は、カンプトテシン、イリノテカン、トポテカン、SN-38、9-アミノカンプトテシン、9-ニトロカンプトテシン、DX-895If、ダウノルビシンを含むグループから選択される阻害剤である。イリノテカンおよびSN-38は、例えば、Gilbertら、Clinical Cancer Res., 9, 2940-2949, 2003に記載されている。DX-895Ifは、van Hattumら、British Journal of Cancer, 87, 665-672, 2002に記載されている。カンプトテシンは、Avemannら、Mol. Cell. Biol., 8, 3026-3034, 1988に記載されている。9-アミノカンプトテシン、9-ニトロカンプトテシンは、Rajendraら、Cancer Res., 63, 3228-3233, 2003に記載されている。ダウノルビシンは、M. Binaschiら、Mol. Pharmacol., 51, 1053-1059に記載されている。

【0172】

好適な一実施態様では、トポイソメラーゼ阻害剤は、カンプトテシン、イリノテカン、トポテカン、DX-895If、SN-38、9-アミノカンプトテシン、9-ニトロカンプトテシン、エトポシド、ダウノルビシンを含むグループから選択される。これらは様々な腫瘍、例えば、結腸腫瘍、肺腫瘍、卵巣癌、前立腺癌に対して使用可能である。適用の範囲は、特に、Recchia Fら、British J. Cancer 2004, 91, 1442-1446, Cantore Mら、Oncology 2004, 67, 93-97、Maurel J.ら、Gynecol. Oncol 2004, 95, 114-119、Ami n A.ら、Urol. Oncol. 2004, 22, 398-403、Kindler HLら、Invest. New Drugs 2004, 22, 323-327、Ahmad T.ら、Expert Opin. Pharmacother. 2004, 5, 2333-2340、Azzariti A.ら、Biochem Pharmacol. 2004, 68, 135-144、Le QTら、Clinical Cancer Res. 2004, 10, 5418-5424に記載されている。これらと関連する、本明細書に記載の各適応および任意の適応に対して、原理上、本明細書に記載の様々なアデノウイルスおよび本発明に従って使用されるアデノウイルスを上記の化合物と併用できることは本発明の範囲内である。特に好適な一実施態様では、適応は、上記の薬学的に活性な各化合物および任意の化合物に関して記載されている適応である。

【0173】

本発明の各態様および任意の態様の好適な実施態様では、さらに薬学的に活性な化合物が、サイトカイン、メタロプロテイナーゼ阻害剤、血管形成抑制剤、結腸癌に対するイリノテカンやCPT-11および白血病に対するダウノルビシン、CDK2/サイクリンEキナーゼ活性を阻害して結腸癌に対して使用可能なCYC202などの細胞周期阻害剤(McClue SJ, Int. J. Cancer 2002, 102, 463-468)Raf-1を阻害して、例えば、乳癌に効果的なBAY43-9006(Wilhelm SMら、Cancer Res. 2004, 64, 7099-7109)、26Sプロテアソーム活性を阻害して脳腫瘍に対して使用されるPS-341などのプロテアソーム阻害剤(Yin D.ら、Oncogene 2004)、EGF受容体に対する組換え抗体(Herceptin for breast carcinoma and prostate tumor; H.G. van der Poel, European Urology 2004, 1-17; Erbitux against head and neck tumors; Bauman Mら、Radiother. Oncol., 2004, 72, 257-266)、特にc-kitを抑制して胃腸腫瘍に対して使用可能なST1571などのシグナル伝達系の阻害剤(H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、特に前立腺癌に対して使用可能なエンドセリン阻害剤であるABT-627(H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、VEGFRチロシンキナーゼ受容体のリン酸化を阻害して頭頸部腫瘍に対して使用可能なSU5416(Cooneyら、Cancer Chemother. Pharmacol 2004)、EGFRチロシンキナーゼ活性を阻害して、特に前立腺腫瘍に対して使用可能なZD1839(H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)、mTORを阻害して前立腺腫瘍に対して使用可能なCCI-779やRAD001(H.G. van der Poel, European Urology 2004, 45, 1-17)などのラバマイシン誘導体である。本明細書に記載の様々なアデノウイルスおよび本発明に従って使用されるアデノウイルスが、原理上これらと関連して記載される各適用および任意の適応に対する

10

20

30

40

50

上記の各化合物および任意の化合物と共に使用可能であることは本発明の範囲内である。特に好適な一実施態様では、適応は過去に記載された薬学的に活性な化合物または薬剤に対して記載された適応である。

#### 【0174】

一実施態様では、本発明に従った方法および／または本発明に従って調製された方法は、本発明のウイルスと併用または同時投与される少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つの薬剤の1つ以上から分離されたウイルスを含んでいる。ウイルスが、ウイルスと併用される任意の薬剤から分離されることが好ましい。好ましくは、分離は空間的分離である。空間的分離は、ウイルスが薬剤とは異なるパッケージに存在させることができる。好ましくは、パッケージは1単位用量、即ち、ウイルスおよび薬剤は1用量としてパックされている。次に1単位用量を合わせて、パッケージを形成できる。一方、ウイルス1用量を1つ以上の薬剤の1以上の単位用量と合わせる、もしくはパックすることも本発明の範囲内である。

#### 【0175】

パッケージの種類は、当業者には既知の投与方法に左右される。好ましくは、ウイルスは凍結乾燥状態または適当な液相に存在する。好ましくは、薬剤は固形状、例えば、錠剤またはカプセルで存在するが、これらに限定されるわけではない。代わりに、薬剤は液状でも存在できる。

#### 【0176】

ウイルスを全身または局所投与することは本発明の範囲内である。ウイルスと併用される薬剤は、個別に、また互いに別々に、もしくは共に全身または局所投与されることも本発明の範囲内である。他の投与方法は当業者には既知である。

#### 【0177】

ウイルスおよびウイルスと併用される薬剤は、経時的に異なる方法または同時に投与されることは本発明の範囲内である。経時的な方法と関連して、ウイルス投与前に薬剤を投与することが好ましい。ウイルスより前にどのくらいの期間、薬剤が投与されるかは、使用される薬剤の種類に左右され、使用される薬剤の作用機序から当業者には明らかである。また、少なくとも2つの薬剤の投与は、同じ、または異なる時間点で起こることが可能である。経時的に異なる投与と関連して、時間点はここでも薬剤の作用機序に起因しており、これに基づいて、当業者が判断できる。

#### 【0178】

本明細書において薬学的組成物とも呼ばれる、本発明に従った薬剤と関連する上記の考察は、概して、ウイルス複製、好ましくは本発明に従ったインビトロでのウイルス複製で使用可能な組成物を含む任意の組成物にも適用可能である。上記の考察は、本発明に従ったキットおよび本発明に従って使用されるキットのそれぞれにも適用可能であり、キットは本明細書に記載のウイルスおよび本明細書に従って使用されるウイルスとは別に、本明細書に記載の薬剤または薬剤の併用も含みうる。該キットは、ウイルスおよび／または使える状態の1つ以上の薬剤、そして好ましくは使用説明書を含む。さらに、上記の考察は、本明細書で開示される核酸、本明細書に従って使用される核酸、本発明に従った複製系およびこれをコード化する核酸、本発明に従って使用される複製系および本発明に従って使用されるこれをコード化する核酸にも適用され、また、逆も同様である。

#### 【0179】

本明細書で開示されるアデノウイルスが本発明に従って使用される製品と関連する、もしくは製品用である薬剤は、通常、全身投与を目的としているが、局所投与またはデリバリーも本発明の範囲内である。適用では、特にこれらの細胞にアデノウイルスを感染させることを目的としているが、ここでは特にアデノウイルスの複製が起こることを目的としており、好ましくは因果関係において状態、通常は疾患に関与しており、発明の薬剤はその診断および／または予防および／または治療に使用される。

#### 【0180】

該薬剤は、好ましくは腫瘍疾患の治療用である。これらの腫瘍は、腫瘍疾患の発症機序

10

20

30

40

50

、特に病理学的機序に起因して、Y B - 1 が核内に既に位置するか、もしくは細胞核内の Y B - 1 の存在が外因的処置によって生じてあり、該外因的処置は Y B - 1 の核内移行に適しているか、もしくは核内で Y B - 1 を誘導または発現させる場合に特に好ましい。腫瘍または腫瘍疾患という用語は、本明細書においては良性腫瘍の他に悪性腫瘍、そして各疾患を含める。一実施態様では、薬剤は少なくとも1つの医薬的にさらに活性な化合物を含む。医薬的にさらに活性な化合物または薬剤の性質または量は、薬剤が使用される適応の種類に左右される。薬剤が腫瘍疾患の治療および／または予防に使用される場合、通常、シスプラチニンおよびタキソールなどの細胞増殖抑制剤、ダウノプラスチニン、ダウノルビシン、アドリアマイシンおよび／またはミトキサントロンまたは他の細胞増殖抑制剤、または本明細書に記載の細胞増殖抑制剤群が使用される。

10

#### 【 0 1 8 1 】

本発明に従った薬剤は、様々な剤形、好ましくは液状で存在できる。さらに、薬剤は、剤形の技術分野における当業者には既知の安定剤、緩衝剤、保存剤などのアジュバントを含む。

#### 【 0 1 8 2 】

本発明者は、驚くべきことに本発明のウイルスを細胞周期とは無関係に核内に Y B - 1 を含むこれらの腫瘍および調節解除された Y B - 1 を含む該腫瘍に対して高い成功率で使用可能であることを見出している。通常、Y B - 1 は細胞質、特に核周囲の細胞質にも存在している。Y B - 1 は細胞周期の S 期において腫瘍細胞の他、正常細胞の核内にも存在している。しかし、これは該変形アデノウイルスの使用時にウイルス性の腫瘍崩壊をもたらすには不十分である。先行技術において報告される該弱毒化アデノウイルスの比較的低い効率は、最終的にはその誤った適用に基づいている。換言すると、該アデノウイルス系は、本明細書に記載の弱毒化アデノウイルスまたは変形アデノウイルスを使用したウイルス性の腫瘍崩壊での分子生物学的な必要条件が満たされる条件下において特に高い有効性で使用可能である。該必要条件は、その細胞が細胞周期とは無関係に核内に Y B - 1 を含む、もしくは調節解除された Y B - 1 を含む腫瘍疾患において与えられる。この形式の核局在化は、腫瘍自体の性質によって起こるか、もしくは本明細書に記載の本発明に従った薬剤または本明細書に記載の方法の適用によって起こりうる。したがって、本発明はそれ腫瘍および腫瘍疾患の新しいグループ、ひいては本発明のウイルス、特に選考技術において既に記載されている弱毒化または変形アデノウイルスを使用して治療可能な患者も定義している。

20

#### 【 0 1 8 3 】

下記に結び付けられることを望まずに、「調節解除された」 Y B - 1 は、過剰発現するカリニン酸化された Y B - 1 であるようである。これは、下記の事実に基づく。セリン／トレオニンキナーゼである A k t は、転写因子及び細胞周期タンパク質のリン酸化によって、腫瘍細胞の成長を促進する (Nicholson KM and Anderson NG, Cell. Signal., 14, 381-395, 2002)。加えて、活性化された A k t (リン酸化 A k t ) が、Y B - 1 とポジティブな様式で関連し、及び、A k t が Y B - 1 に結合しており、及び、低温ショックドメインの位置 102 のセリンでリン酸化することを発見した。これは、Y B - 1 の細胞内の局在化、及び、それ自体で直ちにその機能を変えるシグナル伝達経路があることを示している。加えて、このリン酸化は、M D R 及び M R P のようなタンパク質の産生を増やし、そして、それはストレス応答、細胞増殖及び癌化に関与する (Evdokimova Vら、Molecular and Cellular Biology, 26, 277-292, 2006)。A k t による Y B - 1 のリン酸化は、しかしながら、その C a p 結合能を弱め、それによって、サイレント m R N A 種の翻訳活性化がより容易になる (Evdokimova Vら、Molecular and Cellular Biology, 26, 277-292, 2006)。A k t は正常細胞において活性ではないことから、Y B - 1 はリン酸化された形態で存在しないが、Y B - 1 は調節解除されている、すなわち、該細胞において、リン酸化および／または過剰発現する。

30

#### 【 0 1 8 4 】

本発明のウイルスを使用して治療可能な腫瘍及び腫瘍疾患の患者の別のグループは、本

40

50

発明のウイルスの使用を含め、特定の条件を適用または実現させた際に Y B - 1 が核内へ移動する、核内へ誘導される、もしくは核内へ輸送されることの確かな患者である。この患者グループと関連する本発明のウイルスの使用は、この範囲においてウイルス複製の誘導が Y B - 1 の核局在化およびそれに続く Y B - 1 の E 2 後期プロモーターへの結合に基づくとの知見に基づいている。このことは、Y B - 1 核陽性細胞および / または Y B - 1 が本適用の意味において調節解除された状態で存在する細胞にも適用される。この範囲において、本発明のアデノウイルスは、これらの特性を有する細胞を含む、特にこれらの細胞が治療される各疾患の成立に関与する場合、疾患および患者グループの治療において本発明に従って使用可能である。本発明のウイルス、特にアデノウイルスを使用して治療可能な別の患者グループは、後述の処理の結果として Y B - 1 核陽性である患者および / または好ましくは治療の意味で、本明細書に記載の処置の 1 つを施された患者、本発明のウイルス投与を経験した患者、もしくは本発明のウイルス投与と共にこれらを経験した患者である。Y B - 1 核陽性の患者とは細胞周期とは無関係に Y B - 1 を核内、特に多数の腫瘍形成細胞内に有する患者であることは本明細書の範囲内である。これらの処置は、本明細書に大まかに記載されている、および / または腫瘍の治療と関連して使用される該細胞増殖抑制剤の投与を含む。さらにこの処置グループは、放射線照射、特に腫瘍の治療と関連する使用される放射線照射を含む。放射線照射は、特に高エネルギー放射線照射、好ましくは放射能による放射線照射、好ましくは腫瘍の治療と関連して使用される放射線照射を意味する。別の処置は、温熱療法および温熱療法の適用、好ましくは腫瘍の治療と関連して使用される温熱療法である。特に好適な態様の場合、温熱療法は局所的に適用される。最後に、別の処置はホルモン療法、特に腫瘍の治療と関連して使用されるホルモン療法である。該ホルモン療法と関連して、抗エストロゲンおよび (または) 抗アンドロゲンが使用される。これと関連して、タモキシフェンなどの抗エストロゲンが、特に乳癌の治療において使用され、抗アンドロゲン、例えばフルタミドおよび酢酸シプロテロンは、前立腺癌の治療に使用される。  
10  
20  
20

#### 【 0 1 8 5 】

本発明の開示の意味で、核内に内在的に Y B - 1 を含む、または誘導および核内への能動的な導入後に核内に Y B - 1 を含む、もしくは調節解除された Y B - 1 を含む腫瘍形成細胞の一部は本発明の範囲内である。好ましくは、腫瘍形成細胞の約 5 % またはそれ以上 (即ち、6 %、7 %、8 % など) が Y B - 1 核陽性の細胞または調節解除された Y B - 1 の存在する細胞である。乳癌、骨肉腫、卵巣癌、滑膜癌、肺癌などの他の腫瘍の場合、調節解除された Y B - 1 を含む腫瘍細胞または細胞周期とは無関係に核局在を示す腫瘍細胞の割合は、約 30 - 50 % でありうる [ Kohno K. ら、BioAssays 2003, 25, 691-698 ]。該腫瘍は、好ましくは、本発明のアデノウイルスを使用して処置可能である。Y B - 1 の核局在化は、外部ストレスおよび局所的に加えられたストレスのそれぞれによって誘導できる。この誘導は照射、特に UV 照射、特に本明細書で開示される細胞増殖抑制剤の投与、温熱療法によって起こりうる。温熱療法と関連して、非常に特異的な方法、特に局所的な方法で実現可能であり、ひいては Y B - 1 の特異的な核内輸送も起こり、このためにアデノウイルスの複製のための必要条件ひいては細胞および腫瘍の溶解のための必要条件が与えられ、これは好ましくは局所に限定されることが重要である ( Stein U, Jurchott K, Walther W, Bergmann, S, Schlag PM, Royer HD. J Biol Chem. 2001, 276(30): 28562-9; Hu Z, Jin S, Scotto KW. J Biol Chem. 2000 Jan 28; 275(4): 2979-85; Ohga T, Uchiumi T, Makino Y, Koike K, Wada M, Kuwano M, Kohno K. J Biol Chem. 1998, 273(11): 5997-6000 )。  
30  
40  
40

#### 【 0 1 8 6 】

本明細書に記載のアデノウイルスが本発明に従って使用される溶解用の細胞の特性について、一実施態様では、これらが耐性、好ましくは多剤耐性またはポリ耐性であることが予想される。本明細書で使用される耐性とは、本明細書に記載の細胞増殖抑制剤および (または) 放射線照射に対する耐性を示す。この多剤耐性は、好ましくは、同じおよび対応する患者グループが示す、各細胞ひいては腫瘍の判定マーカーである膜結合型輸送タンパ  
50

ク質である、P糖タンパク質の発現、好ましくは過剰発現と同時に起こる。本明細書で使用される耐性という用語は、非典型的な耐性も示しているMRPなどのP糖タンパク質以外が媒介する耐性の他、典型的な耐性も示しているP糖タンパク質が媒介する耐性を含む。本明細書で言及され、腫瘍および患者それぞれに特徴的な、治療すべき別の耐性は、以下の遺伝子によって媒介されるが、これらに限定されるわけではない：MDR、MRP、トポイソメラーゼ、BCL2、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、タンパク質キナーゼC(PKC)。細胞増殖抑制剤の作用は特にアポトーシス誘導に基づいているため、アポトーシス関連遺伝子の発現は耐性成立に重要な役割を果たしており、この範囲において、以下の因子も関連する：Fas、BCL2ファミリー、HSP70、EGFR [Kimら、Cancer Chemther. Pharmacol. 2002, 50, 343-352]。YB-1発現と相関関係のある別のマーカーはトポイソメラーゼIIである。この範囲において、核内のYB-1の測定ではなく、もしくは測定に加えて、トポイソメラーゼIIの発現または本明細書に記載の他のマーカーいずれかを、成功を期待して、本発明のアデノウイルスで患者の治療が可能であるか否かを判断するためのスクリーニング方法において使用可能である。原理上、P糖タンパク質と同様に使用可能な別のマーカーはMRPである。少なくとも結腸癌細胞または結腸癌患者が侵される程度の別のマーカーはPCN(増殖性細胞核抗原)(Hasan S.ら、Nature, 15, 387-391, 2001)であり、例えばShibaoによって記載されている(Shibao K.ら、Int. Cancer, 83, 732-737, 1999)。最後に、少なくとも乳癌および骨肉腫の細胞において、MDR(英語：多剤耐性)の発現は、上記の意味でマーカーである(Oda Y.ら、Clin. Cancer Res., 4, 2273-2277)。本発明に従って使用可能な別のマーカーはp73である(Kamiya, M., Nakazato, Y., J Neurooncology 59, 143-149 (2002); Stieweら、J. Biol. Chem., 278, 14230-14236, 2003)。

#### 【0187】

医薬・臨床の意味において本来ならもはや治療できず、そのため成功を期待しての先行技術の方法を利用した腫瘍疾患のさらなる治療はもはや不可能であり、特に細胞増殖抑制剤および放射線照射がもはやまず不可能であり、腫瘍に影響を及ぼす、または縮小させるという意味においてもはや成功裏に実施することは不可能な場合、これらの患者も本明細書に記載のアデノウイルスを本発明に従って使用する処置法の対象にできることは本発明の特に有利な点である。本明細書において、腫瘍という用語は、内因性に、好ましくは細胞周期とは無関係に、もしくは本明細書で開示される外的処置によって細胞核内にYB-1を含む、および/または調節解除されたYB-1を含む腫瘍または癌疾患も一般に示す。

#### 【0188】

さらに、本明細書に記載のウイルスは原理上、腫瘍の治療のために使用可能である。

#### 【0189】

本明細書に記載のウイルスによって特に治療可能な腫瘍は、好ましくは神経系腫瘍、眼腫瘍、皮膚腫瘍、軟組織腫瘍、胃腸腫瘍、呼吸器系腫瘍、骨格腫瘍、内分泌系腫瘍、女性生殖器系腫瘍、乳線腫瘍、男性生殖器系腫瘍、尿排泄系腫瘍、混合腫瘍および胚芽腫を含む造血系腫瘍を含むグループから選択される腫瘍である。これらの腫瘍は、特に本明細書で定義される特に耐性な腫瘍である。

#### 【0190】

神経系の腫瘍グループは好ましくは以下を含む：

1. 脳(頭蓋内)腫瘍の他、頭部腫瘍、好ましくは星膠腫、乏突起膠腫、髓膜腫、神経芽細胞腫、節神経腫、脳室上衣腫、神経鞘腫、神経線維腫、血管芽細胞腫、脂肪腫、頭蓋咽頭腫、奇形腫および軟骨腫

2. 脊髄腫瘍および脊柱管腫瘍、好ましくは膠芽腫、髓膜腫、神経芽細胞腫、神経線維腫、骨肉腫、軟骨肉腫、血管肉腫、線維肉腫および多発性骨髄腫

3. 末梢神経腫瘍、好ましくは神経鞘腫、神経線維腫、神経線維肉腫および神経周囲の線維芽細胞腫

#### 【0191】

10

20

30

40

50

眼腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

1. 眼瞼腫瘍および眼瞼腺腫瘍、好ましくは腺腫、腺癌、乳頭腫、組織球腫、肥満細胞腫、基底細胞腫、黒色腫、扁平上皮癌、線維腫および線維肉腫
2. 結膜腫瘍および瞬膜腫瘍、好ましくは扁平上皮癌、血管腫、血管肉腫、腺腫、腺癌、線維肉腫、黒色腫および乳頭腫
3. 眼窩腫瘍、視神経腫瘍、眼球腫瘍、好ましくは網膜芽細胞腫、骨肉腫、肥満細胞腫、髄膜腫、細網細胞腫、膠腫、神経鞘腫、軟骨腫、腺癌、扁平上皮癌、形質細胞腫、リンパ腫、横紋筋肉腫および黒色腫

【0192】

皮膚腫瘍のグループは好ましくは以下を含む：

- 組織球腫、脂肪腫、線維肉腫、線維腫の腫瘍、肥満細胞腫、悪性黒色腫、乳頭腫、基底細胞腫、角化性棘細胞腫、血管周囲細胞腫、毛包腫、汗腺腫瘍、脂腺腺腫、血管腫、血管肉腫、脂肪腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、形質細胞腫およびリンパ管腫

【0193】

軟部組織腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

- 胞巣状軟組織肉腫、類上皮細胞肉腫、軟組織の軟骨肉腫、軟組織のユーリング肉腫、原始神経外胚葉腫瘍 (PNET)、線維肉腫、線維腫、平滑筋肉腫、平滑筋腫、脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫、悪性血管外皮細胞腫、血管腫、血管肉腫、悪性間葉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST)、悪性神経鞘腫、悪性メラニン細胞神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫、リンパ管腫およびリンパ管肉腫

【0194】

胃腸腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

1. 口腔腫瘍および舌腫瘍、好ましくは扁平上皮癌、線維肉腫、メルケル細胞腫瘍、誘導性の纖維性エナメル上皮腫、線維腫、線維肉腫、ウイルス性乳頭腫、特発性乳頭腫、鼻咽頭ポリープ、平滑筋肉腫、筋原細胞腫およびマスト細胞腫瘍
2. 唾液腺腫瘍、好ましくは腺癌
3. 食道腫瘍、好ましくは扁平上皮癌、平滑筋肉腫、線維肉腫、骨肉腫、バレット癌および食道周囲腫瘍
4. 外分泌脾臓腫瘍、好ましくは腺癌
5. 胃腫瘍、好ましくは腺癌、平滑筋腫、平滑筋肉腫および線維肉腫

【0195】

呼吸器系腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

1. 鼻および鼻腔の腫瘍、咽頭および気管の腫瘍、好ましくは扁平上皮癌、線維肉腫、線維腫、リンパ肉腫、リンパ腫、血管腫、血管肉腫、黒色腫、肥満細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、膨大細胞腫 (横紋筋肉腫)、腺癌および筋原細胞腫
2. 肺腫瘍、好ましくは扁平上皮癌、線維肉腫、線維腫、リンパ肉腫、リンパ腫、血管腫、血管肉腫、黒色腫、肥満細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、膨大細胞腫 (横紋筋肉腫)、腺癌、筋原細胞腫、小細胞癌、非小細胞癌、気管支腺癌、気管支肺胞腺癌および胞巣状腺癌

【0196】

骨格腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

- 骨肉腫、軟骨肉腫、傍骨性骨肉腫、血管肉腫、滑膜細胞肉腫、血管肉腫、線維肉腫、悪性間葉腫、巨大細胞腫、骨腫および多小葉骨腫

【0197】

内分泌系腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

1. 甲状腺/副甲状腺、好ましくは腺腫および腺癌
2. 副腎、好ましくは腺腫、腺癌および褐色細胞腫 (副腎髓質腫)
3. 視床下部/脳下垂体腫瘍、好ましくは腺腫および腺癌
4. 内分泌脾臓腫瘍、好ましくは膵島細胞腫 (細胞腫、APUDoma) およびゾリンジャー・エリソン症候群 (膵細胞のガストリン分泌腫瘍)
5. 多発性内分泌腫瘍 (MEN) と非クロム親和性傍神経節腫

10

20

30

40

50

## 【0198】

女性生殖器系腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

1. 卵巣腫瘍、好ましくは腺腫、腺癌、囊胞腺腫および未分化癌
2. 子宮腫瘍、好ましくは平滑筋腫、平滑筋肉腫、腺腫、腺癌、線維腫、線維肉腫および脂肪腫
3. 頸管腫瘍、好ましくは腺癌、腺腫、平滑筋肉腫および平滑筋腫
4. 脇および外陰の腫瘍、好ましくは平滑筋腫、平滑筋肉腫、線維平滑筋腫、線維腫、線維肉腫、ポリープおよび扁平上皮癌

## 【0199】

乳腺腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

線維腺腫、腺腫、腺癌、間葉系腫瘍、癌腫、癌肉腫

10

## 【0200】

男性生殖器系腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

1. 睾丸腫瘍、好ましくは精上皮腫、間質細胞腫瘍およびセルトリ細胞腫
2. 前立腺腫瘍、好ましくは腺癌、未分化癌、扁平上皮癌、平滑筋肉腫および移行上皮癌
3. 陰茎および外性器の腫瘍、好ましくは肥満細胞腫および扁平上皮癌

## 【0201】

尿排泄系腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

1. 腎腫瘍、好ましくは腺癌、移行上皮癌（上皮性腫瘍）、線維肉腫、軟骨肉腫（間葉系腫瘍）、ウィルムス腫瘍、腎芽細胞腫および腺肉腫（胎児性多能性芽腫）
2. 輸尿管腫瘍、好ましくは平滑筋腫、平滑筋肉腫、線維乳頭腫、移行上皮癌
3. 膀胱腫瘍、好ましくは移行上皮癌、扁平上皮癌、腺癌、ぶどう状（胎児性横紋筋肉腫）、線維腫、線維肉腫、平滑筋腫、平滑筋肉腫、乳頭腫および血管肉腫
4. 尿道腫瘍、好ましくは移行上皮癌、扁平上皮癌および平滑筋肉腫

20

## 【0202】

造血系腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

1. リンパ腫、リンパ性白血病、非リンパ性白血病、骨髄増殖性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫

## 【0203】

30

混合腫瘍および胎児性腫瘍のグループは、好ましくは以下を含む：

血管肉腫、胸腺腫および中皮腫

## 【0204】

特に好適な実施態様では、これらの腫瘍は乳癌、卵巣癌、前立腺癌、骨肉腫、膠芽腫、黒色腫、小細胞肺癌および大腸癌を含むグループから選択される。さらなる腫瘍は、本明細書に記載される耐性の腫瘍、好ましくは多剤耐性の腫瘍、また特に上記のグループの腫瘍である。特に好ましい腫瘍は、乳房腫瘍、骨腫瘍、胃腫瘍、腸腫瘍、胆嚢腫瘍、脾臓腫瘍、肝臓腫瘍、腎臓腫瘍、脳腫瘍、卵巣腫瘍、皮膚および皮膚付属器の腫瘍、頭頸部腫瘍、子宮腫瘍、滑膜腫瘍、咽頭腫瘍、食道腫瘍、舌腫瘍と前立腺腫瘍を含むグループから選択される腫瘍である。腫瘍は、それらの徴候に関して本明細書で開示される腫瘍であることが好ましい。

40

## 【0205】

本発明のウイルスを使用して治療可能な別の腫瘍は、白血病腫瘍および転移性腫瘍、特に前述の腫瘍の転移性腫瘍である。本発明に従って治療可能なさらなる腫瘍は、原発腫瘍、二次性腫瘍、三次性腫瘍、転移性腫瘍を含むグループから選択される。以下の特徴、即ち、理由を問わず、腫瘍が細胞周期とは無関係に核内にYB-1を有する、および/または腫瘍が調節解除されたYB-1を含む、少なくとも1つを腫瘍が有することが好ましい。本発明のウイルスを使用して治療可能なさらなる腫瘍グループは、本明細書で開示される耐性の1つ以上を有するという条件で、上記の腫瘍および本発明のウイルスを使用して治療可能であると記載されている腫瘍の全てである。

50

## 【0206】

好ましくは細胞周期とは無関係に核内に Y B - 1 を含まない、または調節解除された Y B - 1 を含まない、該腫瘍が本発明のウイルスを使用して治療可能であることもさらに本発明の範囲内である。これは特にウイルス自体が Y B - 1 をコード化する場合に実現される。Y B - 1 の特異的発現、ひいては特異的ウイルス複製の理由で、好適な実施態様では、ウイルスの発現は好ましくは高度に調節されたプロモーターの制御下に置かれる。該プロモーターは、ウイルスが目的細胞内でのみ複製可能なように、特異的な活性化が可能な任意のプロモーターでありうる。特に好適なプロモーターは、特に当業者には既知の腫瘍特異的プロモーターおよび組織特異的プロモーターである。さらにまた、アデノウイルス主要後期プロモーター (MLP) が発現されるように、ウイルスゲノム内に Y B - 1 をコードする配列をクローニングすることは可能である。このプロモーターは、大部分はアデノウイルス複製の開始後に活性である (Tollefson A. E. ら、Journal of Virology 66, 3 633-3642, 1992; Bauzon M. ら、Molecular Therapy 7, 526-534, 2003)。

10

## 【0207】

Y B - 1 は、逆方向 C A A T 配列、いわゆる Y ボックスに結合する高度に保存されたグループに属する。これらは転写および翻訳の両レベルで調節的に活性化できる (Wolffe, A.P. Trends in Cell Biology 8, 318-323, 1998)。

## 【0208】

本発明に従って使用されるウイルスの一実施態様では、ウイルスの一部となる Y B - 1 をコードする核酸は、Y B - 1 の核内輸送を媒介する核酸配列も含むことができる。例えば Onyx - 015、Ad 24、d1922 - 947、E1Ad / 01 / 07、CB0 16、d1520などの先行技術において既知のアデノウイルスおよび特許 EP 0 9 31 830 に記載のアデノウイルスの他、本発明に従った核酸、ウイルス、ウイルス系は、単独使用、もしくはアデノウイルスおよびアデノウイルス系、ひいては対応する核酸として、これと関連して本発明に従ったこれらの核酸との併用が可能である。核酸輸送に適した核酸配列は当業者には既知であり、例えば (Whittaker, G.R. ら、Virology, 246, 1-23, 1998; Friedberg, E.C., TIBS 17, 347, 1992; Jans, D.A. ら、Bioessays 2000 Jun; 22(6): 532-44; Yoneda, Y., J. Biochem. (Tokyo) 1997 May; 121(5): 811-7; Boulikas, T., Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr. 1993; 3(3): 193-227; Lyons RH, Mol. Cell Biol., 7, 2451-2456, 1987) に記載されている。核輸送を媒介する核酸配列と関連して、異なる原理を利用できる。該原理は、例えば、Y B - 1 がシグナルペプチドとの融合タンパク質として形成され、そして核内に導入されて、これによって本発明のアデノウイルス複製が起こりうる。

20

## 【0209】

本発明に従って使用されるアデノウイルスの設計において実現可能な別の原理は、好ましくは細胞質内での合成から始まり、細胞核内に Y B - 1 を導入する、もしくは細胞核内に Y B - 1 を転位させ、そこでウイルス複製を促進させるトランスポーター配列によってもらすことが可能である。核輸送を媒介する特に効果的な核酸配列の一例は、HIV の T A T 配列であり、これは Efthymiadis, A., Briggs, L.J., Jans, D.A., JBC 273, 1623-1628, 1998 に記載されている種類の他の適当な核酸配列の 1 つである。本発明に従って使用されるアデノウイルスが、核輸送をコード化しているペプチドをコード化する核酸配列を含むことは本発明の範囲内である。

30

## 【0210】

Y B - 1 が全長で、特に野生型 Y B - 1 と一致する形で存在することは本発明の範囲内である。Y B - 1 が、例えば短縮化または切断された誘導体として使用される、もしくは存在することは本発明の範囲内である。本発明において使用される、もしくは存在する Y B - 1 の誘導体は、E2 後期プロモーターに結合可能であり、ひいてはアデノウイルスの E2 領域の遺伝子発現を活性化する Y B - 1 である。該誘導体は特に本明細書で開示される Y B - 1 を含む。別の誘導体は、N 末端、C 末端、またはアミノ酸配列の範囲内の 1 つ以上のアミノ酸の欠失によって作成可能である。Y B - 1 断片が、本発明の意味において

40

50

、Y B - 1タンパク質として使用される、およびY B - 1タンパク質を示すことも本発明の範囲内である。様々なY B - 1断片が、Jurchott Kら [JBC 2003, 278, 27988-27996] の論文において開示されており、これらはC末端およびN末端の欠失を特徴とする。様々なY B - 1断片の分布は、C末端の他、コールドショックドメイン (C S D) が細胞周期によって制御されるY B - 1の核内輸送において重要であることを示した。このため切断Y B - 1 (本明細書においてはY B - 1タンパク質とも呼ばれる) が、本発明に従ったE 1 B 5 5 k およびE 4 o r f 6 の発現との組み合わせで、より良好に核内に移動して、ひいては野生型Y B - 1と比較して必ずしもE 2後期プロモーターにより良好に結合することなくC P E をより強力に誘導することも本発明の範囲内であり、ここでは切断Y B - 1もより良好に核内に移動して、両活性、つまりC P E の誘導およびE 2後期プロモーターへの結合を示すことは除外できない。最後に、該切断Y B - 1断片もより良好に核内に移動して、より良好にC P E を誘導することなくE 2後期プロモーターにより良好に結合可能である。切断Y B - 1タンパク質または断片が、完全長Y B - 1と関連して本明細書に記載の別の配列、特に核局在化シグナル配列 (N L S) などを含むことも本発明の範囲内である。10

#### 【0211】

本発明は、別の態様において、好ましくは腫瘍または腫瘍疾患を患有、もしくは腫瘍または腫瘍疾患を患有ことが疑われる患者、および本発明のウイルスを使用して治療可能な患者のスクリーニング方法と関連しており、方法は以下の段階を含む：

- 患者の検体、好ましくは腫瘍組織の検体の分析。
- Y B - 1が細胞周期とは無関係に核内に局在するか否か、または細胞が、検体の1つ以上の細胞において調節解除された / 過剰発現Y B - 1を含むか否かの判定。20

#### 【0212】

Y B - 1の代わりに、もしくはY B - 1に加えて、好ましくは代理マーカーとして機能する、もしくは機能することが知られている上記のマーカーの存在も評価可能である。

#### 【0213】

本発明に従った方法の一実施態様では、Y B - 1に対するアンチカリンの他、抗Y B - 1抗体、Y B - 1特異的に結合するペプチド、Y B - 1に対するアプタマー、Y B - 1に対するスピーゲルマー (spiegelmer) を含むグループから選択される薬剤による腫瘍組織の分析が検討される。原理上、各マーカーに対して同じ種類の薬剤も製造・使用できる。30  
抗体、特にモノクローナル抗体の製造は、当業者には既知である。Y B - 1またはマーカーの特異的検出用の別の薬剤は、高い親和性で標的構造に結合するペプチドであり、本発明の場合にはY B - 1または該マーカーである。先行技術において、該ペプチドを作成するための方法は、例えばファージディスプレイなどが知られている。該目的のために、個々のペプチドの長さが約8 - 20アミノ酸であり、ライブラリーサイズが約10<sup>2</sup> - 10<sup>18</sup>、好ましくは10<sup>8</sup> - 10<sup>15</sup>の異なるペプチドである、ペプチドライブラリーから始める。ポリペプチドに結合する標的分子の特定構造はいわゆるアンチカリンとよばれ、これは例えばドイツ特許出願DE 197 42 706に記載されている。

#### 【0214】

Y B - 1または本明細書で開示される対応する代替マーカーへの特異的結合、ひいては細胞周期とは無関係なY B - 1の核局在化の検出のための別の薬剤は、いわゆるアプタマー、即ち、RNAまたはDNAに基づき、一本鎖または二本鎖のいずれかで存在して、標的分子に特異的に結合するD核酸である。アプタマーの作成は、例えば欧州特許EP 0

533 838に記載されている。アプタマーの特別な実施態様は、いわゆるアプタザイムであり、例えば、Piganeau, N.ら (2000), Angew. Chem. Int. Ed., 39, no. 29, pp 4369-4373に記載されている。これらがアプタマーの構成成分とは別にリボザイムの構成成分からなり、結合またはアプタマー構成成分へ結合する標的分子の放出時にリボザイムが触媒活性を有し、シグナル発生に伴って核酸基質を切断する限りにおいて、これらはアプタマーの特別な実施態様である。40

#### 【0215】

50

アプタマーの別の形態は、いわゆるスピーゲルマー、即ち、L-核酸を含む標的分子に結合する核酸である。該スピーゲルマーの作成方法は、例えば、WO 98 / 08856に記載されている。

【0216】

腫瘍組織の検体は、穿刺または外科手術によって採取される。細胞周期とは無関係にYB-1が核内に位置するか否かに関しては、顕微鏡技術および(または)通常抗体または上記の別の薬剤のいずれかを使用した免疫組織解析の利用によって評価される場合が多い。核内のYB-1およびその核局在化が細胞周期と無関係であること別の検出方法は、当業者には既知である。例えば、YB-1の局在化は、YB-1染色された組織切片のスクリーニング時に容易に検出可能である。YB-1が核内に存在する頻度は、核局在化が細胞周期とは無関係であることを既に示唆している。核内における細胞周期非依存的なYB-1の検出のさらなる可能性は、YB-1染色、YB-1が核内に局在するか否かの評価、そして細胞分裂の相の判定である。一方、上記およびYB-1の検出はそれぞれYB-1に対する前述の薬剤を使用しても実施可能である。薬剤は当業者には既知の方法によって検出される。該薬剤はYB-1に特異的であり、この範囲において分析される検体中の他の構造、特に細胞の他の構造には結合しないため、薬剤の適当な標識およびそれらのYB-1に対する特異的結合に起因する該薬剤の局在化およびYB-1の局在化はいずれも適宜に検出・評価できる。薬剤の標識方法は当業者には既知である。

10

【0217】

本明細書に記載のウイルスは、本発明のウイルスか否か、もしくは本発明に従って使用されるか否かを問わず、疾患、特に腫瘍疾患、より好ましくは腫瘍細胞の少なくとも一部が多剤耐性、特に多剤耐性を示す腫瘍疾患と関連して使用可能であることも本発明の範囲内であり、ここでYB-1は調節解除された型として存在する。これは、細胞および疾患が、YB-1が核内に、好ましくは細胞周期とは無関係に存在する場合での細胞および疾患を示しているという条件で、細胞および腫瘍と関連して本明細書に記載の他の各態様および任意の態様にも適用される。

20

【0218】

本発明に従った、および本明細書で開示されるウイルスは、好ましくはアデノウイルスであるが、洞察、方法および使用、核酸、タンパク質、複製系などはアデノウイルスに限定されず、他のウイルスおよびウイルス系に適用される。

30

【0219】

アデノウイルスおよびアデノウイルス系の作成の他、任意の使用を含む、当該考査は、これをコード化する核酸、ひいてはその逆の場合にも適用される。

【0220】

本発明と関連して、本発明に従って使用されるアデノウイルスおよびこれをコード化する核酸は、それぞれそれ自体で、もしくは別の核酸配列との組み合わせで複製を起こす、対応する任意のアデノウイルス核酸とすることが可能である。本明細書で説明されているように、ヘルパーウィルスによって、複製に必要な配列および(または)遺伝子産物を供給可能である。コード核酸配列が言及される範囲、およびそれらが既知の核酸である範囲において、同一の配列だけでなく、それに派生する配列も使用されることは本発明の範囲内である。派生する配列は、特に、派生ではない配列の機能の1つに対応する機能を有する核酸またはポリペプチドを問わず、依然として遺伝子産物をもたらす配列である。これは、当業者には既知の簡単な通常の試験によって判定可能である。派生する核酸配列の一例は、同じ遺伝子産物、特に同じアミノ酸配列をコード化するが、遺伝暗号の縮重に起因して異なる塩基配列を示す核酸配列である。

40

【0221】

ヘルパーウィルスの有無を問わず、本発明のウイルスが複製系として存在することは、本発明の範囲内である。

【0222】

本発明に従った該アデノウイルス複製系の場合、アデノウイルス核酸および/または核

50

酸が、複製可能なベクターとして存在することは、さらに本発明の範囲内である。

【0223】

本発明に従って使用されるアデノウイルスをコード化する核酸が、発現ベクター内に存在すること、および該発現ベクターが本発明に従って使用されることは、さらに本発明の範囲内である。

【0224】

さらなる態様では、本発明は少なくとも2つのベクターを含むベクターグループとも関連しており、該ベクターグループはその全体で本明細書に記載のアデノウイルス複製系を構成しており、該ベクターグループは本発明に従って使用される。アデノウイルス複製系の各成分が、別のベクター、好ましくは発現ベクターに存在することは本発明の範囲内である。

10

【0225】

最後に、本発明は、さらなる態様において、本発明に従って使用されるウイルスをコードする1つ以上の核酸を含む細胞の使用と関連しており、該細胞は、様々なアデノウイルスに関して本明細書に記載される全く同じ目的のために、本発明に従った対応するウイルス複製系および/または対応するベクターおよび/またはベクターグループに関する本発明に従って使用される。

20

【0226】

上記のウイルスの構築、特にこれらの核酸およびこれらをコード化する核酸は、細胞内、好ましくは腫瘍細胞内に複数で導入することも可能であり、これによって様々な個々の成分の存在に起因して、個々の成分が1つの核酸および1つ以上のウイルスからそれぞれ派生したかのように共に行動する。

20

【0227】

本発明に従って使用され、ウイルス、ウイルス系、これらの部分をコードする核酸は、ベクターとしても存在できる。好ましくは、これらのベクターはウイルスベクターである。核酸がウイルスの核酸を含む場合、好ましくは、ウイルス粒子はベクターである。一方、該核酸がプラスミドベクター内に存在することも本発明の範囲内である。いずれの場合にも、ベクターは、挿入された核酸の増殖、即ち、挿入された核酸の複製および選択的発現を可能にするエレメントを含む。適当なベクター、好ましくは発現ベクター、および各エレメントは、当業者には既知であり、例えばGrunhaus, A., Horwitz, M.S., 1994に記載されており、クローニングベクターとしてのアデノウイルスは、Rice, C., editor, *Seminars in Virology*, London: Saunders, Scientific Publicationsに記載されている。

30

【0228】

ベクターグループと関連する態様では、該核酸の様々なエレメントが必ずしも1つのベクターのみに含まれないという前述の実施態様を考慮に入れている。これに応じて、ベクターグループは少なくとも2つのベクターを含む。これとは別に、ベクターに関する記載は、ベクターおよびベクターグループにもそれぞれ適用可能である。

【0229】

本発明に従って使用されるウイルス、特にアデノウイルスは、本明細書において開示される様々な核酸および遺伝子産物によって特徴付けられ、その他の点では、好ましくは当業者には既知であり、野生型アデノウイルスに固有の全てのエレメントを含むことができる(Shenk, T.: *Adenoviridae: The virus and their replication*. Fields Virology, vol. 3, editors Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M.ら、Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, chapter 67)。

40

【0230】

別の態様では、本発明は、本発明のウイルス投与、該核酸、ベクター、複製系、薬剤、薬学的組成物を含む腫瘍疾患の処置法と関連している。腫瘍疾患は本明細書に記載の腫瘍疾患である。患者には該治療が必要であり、好ましくは本明細書で開示される患者のグループから選択される患者である。

【0231】

50

異論がない場合、各ウイルス、核酸、ベクター、複製系、薬剤、薬学的組成物に関して開示される特徴および実施態様は、それぞれ本発明に従って、本発明の範囲内であり、また、本発明によって使用されるウイルス、核酸、ベクター、複製システム、薬剤及び医薬組成物は、各々及び他の本発明の態様及びその逆のいずれにおいても適用可能である。

【0232】

図1は、E2F及びYB-1によるE2後期及びE2初期プロモーターによるアデノウイルスのE2領域レギュレーションの概略図である。図1中、関与するプロモーター、すなわち、E2初期及びE2後期プロモーターをそれぞれ、E2F及びYB-1による結合性及び活性化に関して示す。野生型E1Aタンパク質は、E2Fの網膜芽細胞腫タンパク質Rbへの結合を妨げる。こうして遊離したE2Fは、E2初期プロモーターに結合し、これによりアデノウイルス複製を誘導する。8~12時間後に、いわゆるスイッチがE2後期プロモーターに生じる。これは、細胞質から核へのYB-1の移行のときのみ可能である。核移行の後、YB-1は、E2後期プロモーターへの結合によりE2遺伝子発現を活性化する。

10

【0233】

E2F/RBの結合メカニズム及びE2FのE1Aに媒介された遊離は、本発明の基礎をなしているメカニズムと実質的に異なる。Rbタンパク質からのE2Fの遊離は、アデノウイルス複製の決定的な工程とは言わないまでも、ヒト転写因子YB-1の核局在化を除き、従来技術で想定されていたほど重要ではない。この転写因子は、大部分の細胞周期にわたる正常細胞中、細胞質にのみ存在する。これは、アデノウイルスでの感染後、特定の条件下で核内に誘導されるか、あるいは、異なる腫瘍疾患、すなわち、乳癌、卵巣の癌腫、前立腺癌、骨肉腫、グリア芽細胞腫、黒色腫、小細胞肺癌、及び、大腸癌を含むがこれらに限定されない、のような異なる細胞メカニズム中の核内にすでに存在する。

20

【0234】

実施例1：

アデノウイルスを発現している様々なタンパク質IXの設計

図2に示された野生型アデノウイルスのウイルス核酸のデザインから出発して、YB-1に依存する様式で複製するアデノウイルスによるタンパク質IXの発現について、本願明細書において開示される様々なデザイン原理を具現化し、図3、4、5及び5aに示した。全てのデザインが、野生型中に自然に存在するE1Aプロモーターによってそれぞれコントロールされないという意味において、一般にE1A13S-マイナス及びE1A12S-マイナスである。

30

【0235】

図3に図示するように、アデノウイルスXvir05/プロモーターは、さらに、タンパク質IXが野生型中に存在する調節性コンテキストに含まれず、タンパク質IXが発現していないという意味において、E1B19K-マイナス及びタンパク質IX-マイナスである。むしろ、発現はE2後期プロモーターによってコントロールされる。しかしながら、タンパク質IXはE3領域内にクローニングされ、原則として、E4領域内にもクローニングされる。E2A、E2B、E4及びMLPのための遺伝子は依然として存在し、また発現しうる。E4orf6及びE1B55Kからなるトランスポーターは、CMVプロモーターのコントロール下にあるカセットE4orf6-IRES-E1B55Kにより形成される。しかしながら、それぞれのカセットは、E1領域内にクローニングされ、また、他の領域、例えばE3またはE4領域内にクローニングすることができる。

40

【0236】

図4に図示するように、アデノウイルスXvir05/E1A12Sのアデノウイルスはさらに、タンパク質IXが野生型中に存在する調節性コンテキスト中に存在せず、タンパク質IXが発現していないという意味において、E1B19K-マイナス及びタンパク質IX-マイナスである。むしろ、発現は、E2後期プロモーターによりコントロールされるE1A12Sによって起こり、結果としてE1B55Kコード領域に含まれるタンパク質IXの読み枠が活性化される。しかしながら、タンパク質E1A12SはE3領域内

50

にクローニングされるが、E 4 領域内にもクローニングすることができる。E 2 A、E 2 B、E 4、及びMLPのための遺伝子は、依然として存在し、また発現されうる。E 4 or f 6 及びE 1 B 5 5 K からなるトランスポーターは、CMVプロモーターのコントロール下にあるカセットE 4 or f 6 - IRES - E 1 B 5 5 K により形成される。しかしながら、それぞれのカセットはE 1 領域内にクローニングされ、また、E 3 またはE 4 領域内のような異なる領域内にクローニングすることができる。

【0237】

図5に図示するように、アデノウイルスXvir 05/E 1 B 19 Kのアデノウイルスはさらに、タンパク質IXが野生型中に存在するような調節性コンテキスト中に含まれないという意味において、E 1 B 19 K - マイナス及びタンパク質IX - マイナスである。むしろ、CMVプロモーターのコントロール下で発現し、E 1 B 5 5 K 読み枠中に含まれるタンパク質IXの読み枠の発現を可能にするタンパク質E 1 B 19 Kにより、発現がコントロールされる。E 2 A、E 2 B、E 3、E 4、及びMLPのための遺伝子は、依然として存在し、また発現されうる。E 4 or f 6 及びE 1 B 5 5 K からなるトランスポーターは、CMVプロモーターのコントロール下にあるカセットE 4 or f 6 - RSV - プロモーター - E 1 B 領域により形成される。しかしながら、それぞれのカセットは、E 1 領域内にクローニングされ、また、異なる領域内、例えばE 3 またはE 4 領域内にクローニングすることができる。

【0238】

図5aに図示するように、アデノウイルスXvir 05/E 3 - IXのアデノウイルスはさらに、タンパク質E 1 B 19 Kが野生型の調節性コンテキスト中に含まれず、タンパク質IXが発現していないという意味において、E 1 B 19 K - マイナス及びタンパク質IX - マイナスである。むしろ、発現は、天然のE 3 プロモーターによりコントロールされる。E 2 A、E 2 B、E 4、及びMLPのための遺伝子は、依然として存在し、また、発現されうる。E 4 or f 6 及びE 1 B 5 5 K からなるトランスポーターは、CMVプロモーターのコントロール下にあるカセットE 4 or f 6 - IRES - E 1 B 5 5 K により形成される。しかしながら、それぞれのカセットはE 1 領域内にクローニングされ、また、他の領域内、例えばE 3 またはE 4 領域内にクローニングすることができる。

【0239】

図6～9は、本発明のアデノウイルスのさらなる実施態様を示す。

【0240】

図6中に図示されるウイルスは、図5に図示するアデノウイルスXvir 05/E 1 B 19 Kのさらなる発展である。Xvir 05/E 1 B 19 Kに加えて、このウイルスは、E 2 後期プロモーターのコントロール下にありかつE 1 A 1 2 S、YB - 1 及びそれを独立してコードする核酸をそれぞれ含むカセットを含み、これにより、両読み枠をIRESにより互いに分離する。実施態様において、YB - 1 コード核酸はカセットに含まれない。ウイルスにより発現されるYB - 1 のための核酸は、結果として調節解除されたYB - 1 で細胞中により顕著な複製を行う。

【0241】

図8に図示するアデノウイルスは、図6に図示するアデノウイルスのさらなる発展であり、E 2 後期プロモーターのコントロール下にあるカセットがE 1 A 1 2 S、YB - 1、及びそれを独立してコードする核酸をそれぞれ含み、これがE 4 領域内にクローニングされ、様々なトランスジーンが、アポトーシス誘導遺伝子、プロドラッグ遺伝子、sirNA、腫瘍サプレッサー遺伝子、及びサイトカインなどのE 3 プロモーターのコントロール下にあるE 3 領域にクローニングされる。あるいは、本願明細書において、開示される様々なトランスジーンは、この領域内にクローニングすることができる。

【0242】

最後に、図9に図示するように、本発明のアデノウイルスは図8に図示するアデノウイルスのさらなる発展であり、ここでさらに、ウイルスのターゲティングのために有利なRGDモチーフがクローニングにより組み込まれた。それは、アデノウイルスゲノム中の織

10

20

30

40

50

維タンパク質中、およそ位置 32675 - 32685 に見つけることができる。特定の位置詳細におけるこれらの変異は、野生型アデノウイルスの配列とは異なり、種々のデータバンクまたはデータバンクエントリー内で異なる長さを有するという事実により生じる。

【0243】

図7に図示する本発明のアデノウイルスは、図3に図示するウイルスに基づく。それに対しても、このアデノウイルスは、しかしながら、E4orf6及びE1B55Kからなるカセットを含まないが、両方とも別々のプロモーター、すなわち、CMVプロモーター及びRSVプロモーターによりコントロールされる。クローニングは、E1領域内に行われた。加えて、アデノウイルスは、タンパク質IXをコードしかつIRESによりE1A12Sの一つから分離されるE2後期プロモーター、いまだ核酸のコントロール下にあるE1A12Sをコードする核酸から離れて含む。また、このカセットは、タンパク質IXをコードする核酸なしで、原則として設計されうる。さらなる実施態様において、カセットはE4領域内にクローニングされる。最後に、このウイルスはまた、E3またはE4領域中に、図8に図示するウイルスと関連して説明したように、トランスジーンを含みうる。このアデノウイルスのさらなる実施態様において、RGDモチーフが含まれる。

【0244】

実施例2：

タンパク質IX発現の検出

この実験を、YB-1媒介複製において、効果的な粒子形成のためのタンパク質IXの発現の関連性を確認するために行った。この目的のために、従来技術に記載され、図11に図示する腫瘍溶解性YB-1依存性複製アデノウイルスXvir-03-03-UTRを使用した。

【0245】

実験を行う際、以下の通りに進めた：10cm皿につき、10<sup>6</sup>の293及び257RD-B細胞をプレートした。翌日、細胞を図11に図示するように、感染無し(K)、あるいは野生型アデノウイルスまたはXvir-03で感染させた。無血清DMEM培地1.5ml中37℃で1時間感染させた。その後、感染培地を取り除き、10mlの完全培地(10%のFCS/DMEM)に置き換えた。24~48時間後に、RNAを単離した。その後、ノーザンプロット分析を実行した。この目的のために、各10μgのRNAを3%のホルムアルデヒドを含むアガロースゲル中で電気泳動により分離し、その後ナイロン膜上へプロットし、386bpプローブにハイブリダイズさせた。PCRにより発生したプローブとして、P32でラベルしたプローブを、ターゲットタンパク質IXに使用した。下記のプライマーを、PCR用に使用した：5'-TATTTGACAAACGCG、5'-TTTTAAACCGCATGGG。野生型のアデノウイルスゲノム中のプローブの位置は、位置3648~4033の間にある。使用されるウイルスは、タンパク質IXの発現を示さないXvir-03である。

【0246】

この実験の結果を図10に図示する。

【0247】

図11から分かるように、ウイルスXvir-03-03-UTRは、野生型アデノウイルスと比較して腫瘍細胞257RD-B中において発現の低減を示す。E1A、及び、E1Bタンパク質、特にまた、E1B19Kタンパク質を発現する293の細胞において、充分なタンパク質IXが発現される。

【0248】

実施例3：

組換えアデノウイルスXvir-05、Xvor-05/タンパク質IX、Xvir-05/01、及びXvir-05/02のデザイン

ベクターXvir-05において、特にウイルスタンパク質E4orf6及びE1B55Kの発現は、発現カセットCMV-E4orf6及びRSV-E1B-領域により起こる。これにより、核内へのYB-1の転位がもたらされる。E1A12S遺伝子産物、加え

10

20

30

40

50

てYB-1遺伝子産物は、E2後期プロモーターのコントロール下、さらにウイルス複製を促進する。加えて、ウイルスは、ABCトランスポーターMRP及びMDR1の発現を阻害できる。加えて、タンパク質E1B19K及びタンパク質IXは、カセットRSV-E1B領域の一部として発現する。

【0249】

ベクターXvir05-タンパク質IXは、さらなるベクター発展である。そこで、発現カセットE2late-E1A12S-ires-タンパク質IXに存在するアデノウイルス・タンパク質IXの発現が確実になる。ベクターは、全部のE1B領域ではなく、E1B55kの読み取り枠のみを含む。

【0250】

完全なE1B領域、すなわち、E1B19k、E1B55k及びタンパク質IXは、ベクターXvir05/01、例えばRSVプロモーターの場合には、ウイルスの非アデノウイルスプロモーターによりコントロールされる。発現カセットE2-後期-E1A12S-ires-YB-1は、E4領域中に存在する。このように、特定の治療用トランスジーンは、E3領域内にクローニングすることができる。E3欠失は、アデノウイルスADPタンパク質「アデノウイルス死亡タンパク質」が依然として発現されうるようなものである。加えて、E1A12S及びE1B19kの発現は、結果としてタンパク質IXの発現となる。

【0251】

ベクターXvir05/02はさらに、より良好な感染率を提供するために、ファイバーノブのHループ中のRGDモチーフを含む。

【0252】

ウイルスの調製は、以下の通りである：

【0253】

レスキュープラスミドpAdEASY (Qbiogene) の改変

E3E4シャトルベクターの調製用シャトルベクター pShuttle-AdEASY  
Yの使用

最初に、CMVプロモーターを、利用可能なベクターpShuttle-AdEASYに導入し、次いでウシ成長ホルモン・ポリアデニル化シグナルをその中にクローニングした。この目的のために、プラスミドをEcoRIにより消化し、末端をT4ポリメラーゼ及びdNTPsで装填して平滑末端にし、骨格を脱リン酸化し、結果として生じる2個の切断生成物を再結合した。この手順により、EcoRIのための制限認識配列を破壊した。こうして得られたプラスミドをpShuttle(-EcoRI)-AdEASYと称した。

【0254】

その後、カセットCMV-MCS-polyAをClontechのpShuttleからMfeI及びEcoRIを用いて切除し、末端を平滑末端にして、XbaIで線形にされたベクターpShuttle(-EcoRI)-AdEASY内にクローニングし、平滑末端にし、このような目的のために脱リン酸化した。プラスミドCMV-MCS-PolyA-pShuttle-AdEASYは、このようにして作成した。

【0255】

E3及びE4領域の操作のために、プラスミドpAdEASYのE3E4領域を、SphI及びPacIでプラスミドCMV-MCS-PolyA-pShuttle-AdEASY内にクローニングし、こうしてプラスミドE3E4-pShuttle-AdEASYを調製した。NdeIでの制限及び再結合により、2つのNdeI切断部位のうちの1つ、及びプラスミドからの多重クローニング部位も欠失した。この手順によりプラスミドE3E4-pShuttle(-NdeI)-AdEASYが得られた。

【0256】

E4操作

ポテンシャル治療用トランスジーンのためのスペースを供給し、望ましくない相同組み

10

20

30

40

50

換えを回避するために、プラスミド E 3 E 4 - p Shuttle ( - NdeI ) - Ad E A S Y 中の E 4 領域を特に欠失させた。この目的のために、E 4 o r f 6 領域は、PstI での切断及び再結合により、約 634 bp でトランケートされた = E 3 E 4 OR F 6 - p Shuttle ( - NdeI ) - Ad E A S Y。それぞれの欠失は、当業者により組換えアデノウイルスの作成のための他のシステムでなされうる。

【 0 2 5 7 】

E 3 E 4 OR F 6 - p Shuttle ( - NdeI ) - Ad E A S Y 中の R G D モチーフのクローニング

改良された感染性のために、Dmitrievら 1998 (An Adenovirus Vector with Genetically Modified Fibers Demonstrates Expanded Tropism via Utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Independent Cell Entry Mechanism) を参照し、ファイバーノブドメインの H IL-2R を改変した：それぞれの領域を、プライマー R G D - H p a f w ( 5' - G A G g t t a a c C T A A G C A C T G C C A A G - 3' )、R G D - E c o R V r e v ( 5' - C A T A G A G T A T G C A G A T A T C G T T A G T G T T A C A G G T T A G T T T G - 3' )、同様に R G D - E c o R V f w ( 5' - G T A A C A C T A A C G A T A T C T G C A T A C T C T A T G T C A T T T C A T G G - 3' ) 及び R G D - B f r I r e v ( 5' - C A G C G A C A T G A A c t t a a g T G A G G C T G C - 3' ) を使用して增幅し、これにより E c o R V 切断部位を作成した。この切断部位に、A r g - G l y - A s p ( R G D ) ペプチドをコードする一对のオリゴヌクレオチドを、クローニングした：R G D - オリゴ 1 ( 5' - C A C A C T A A A C G G T A C A C A G G A A A C A G G A G A C A C A A C T T G T G A C T G C C G C G G A G A C T G T T C T G C C C - 3' )、及び R G D - オリゴ 2 ( 5' - G G G C A G A A A C A G T C T C C G C G G C A G T C A C A A G T T G T G T C T C C T G T T C C T G T G T A C C G T T A G T G T G - 3' )。E 3 E 4 OR F 6 - p Shuttle ( - NdeI ) - Ad E A S Y 内の切断部位内の H p a I 及び B f r I へのクローニングにより、E 3 - R G D - E 4 OR F 6 - p Shuttle ( - NdeI ) - Ad E A S Y を作成した。R G D モチーフは、ファイバーノブドメインの H IL-2R に存在する。

【 0 2 5 8 】

E 3 R G D - E 4 OR F 6 - p Shuttle ( - NdeI ) - Ad E A S Y の E 3 領域内への E 3 a 領域のクローニング

この目的のために、インビトロゲンのベクター p c D N A 3 . 1 ( + ) を、B g l I I 及び B a m H I により消化し、これにより C M V プロモーターを取り除き、ベクターを再結合した ( C M V のない p c D N A 3 . 1 ( + ) = o C M V )。p c D N A 3 . 1 ( + ) o C M V ベクターの S p e I 、及び、X h o I 制限部位に、野生型ウイルス D N A からの S p e I ( 2 7 0 8 3 b p ) 及び X h o I ( 2 9 7 9 2 b p ) により切開された 2 7 0 9 b p 断片を、( p c D N A 3 . 1 ( + ) o C M V / E 3 a X h o I ) にクローニングした。あるいは、X h o I よりむしろ H p a I ( 3 0 5 7 0 b p ) で 3' 端末で切ることができる。この目的のために、ベクター p c D N A 3 . 1 ( + ) o C M V を、次に S p e I 及び E c o R V により消化し、アデノウイルス S p e I - H p a I - 断片を、( p c D N A 3 . 1 ( + ) o C M V / E 3 a H p a I ) にクローニングした。さらなるオプションは、E c o R I を使用して開いた p c D N A 3 . 1 ( + ) o C M V にクローニングされたアデノウイルス野生型 D N A ( 位置 2 7 3 3 2 b p 及び 3 0 0 5 0 b p ) からの 2 7 1 8 b p E c o R I 断片により提供される ( p c D N A 3 . 1 ( + ) o C M V / E 3 a E c o R I )。

【 0 2 5 9 】

p c D N A 3 . 1 ( + ) o C M V / E 3 a を使用して、E 3 a 領域をベクター E 3 R G D - E 4 OR F 6 - p Shuttle ( - NdeI ) - Ad E A S Y にクローニングすることができた：シャトルベクター E 3 R G D - E 4 OR F 6 - p Shuttle ( - NdeI ) - Ad E A S Y を、この目的のために N h e I により消化し、末端を平滑

10

20

20

30

40

50

末端とし、S p e Iによりさらに消化された。p c D N A 3 . 1 (+) o C M V / E 3 a X h o Iからのインサートを、この部位にクローニングした：このプラスミドをこのような目的のためにX h o Iにより消化し、末端を平滑末端とし、S p e Iによりさらに消化した。こうして切り出された断片を、あらかじめ切開したプラスミド E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p S h u t t l e (- N d e I ) - A d E A S Yにクローニングした。

【0260】

断片S p e I - H p a I (位置3 0 5 7 0 b p ~ 2 7 0 8 3 b p)及びE c o R I (位置3 0 0 5 0 b p ~ 2 7 3 3 2 b p)を、それぞれのp c D N A 3 . 1 (+) o C M V / E 3 a構築物から同様の方法で調製し、クローニングすることができる。

【0261】

あるいは、E 3 a領域をプライマー-E 3 aフォワード(S p e I)5'-C T T A A G G A C T A G T T C G C G C - 3' 及びE 3 aリバース(X h o I、N h e I)5'-C A A G C T A G C T C G A G G A A T C A T G - 3' を使用して、アデノウイルス5型野生型D N Aをテンプレートとして使用して、P C Rにより増幅することができる。E 3 aリバースプライマーでN h e I切断部位を作成する。この増幅物をS p e I及びN h e Iにより制限し、S p e I及びN h e Iにより消化したベクター E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p S h u t t l e (- N d e I ) - A d E A S Yにクローニングする。

【0262】

S p e I - H p a I断片について

あるいは、E 3 a領域はプライマー-E 3 aフォワード(S p e I)5'-C T T A A G G A C T A G T T C G C G C - 3' 及びE 3 aリバース(H p a I、N h e I)5'-C A C G C T A G C A A G T T A A C C A T G T C T T G G - 3' を使用して、アデノウイルス5型野生型D N Aをテンプレートとして使用して、P C Rにより増幅することができる。E 3 aリバースプライマーを使用して、N h e I切断部位をこうして作成する。この増幅物を、S p e I及びN h e Iにより制限し、S p e I及びN h e Iにより開かれベクター E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p S h u t t l e (- N d e I ) - A d E A S Yにクローニングする。

【0263】

E c o R I断片について

あるいは、E 3 a領域をプライマー-E 3 aフォワード(E c o R I)5'-G A A A C C G A A T T C T C T T G G A A C - 3' 及びE 3 aリバース(N h e I、E c o R I)5'-G A A T T C T A G C T A G C T C A G C T A T A G - 3' を使用して、アデノウイルス5型野生型D N Aをテンプレートとして使用して、P C Rにより増幅することができる。E 3 aリバースプライマーを使用して、N h e I切断部位をこのように作成する。この増幅物を、E c o R I及びN h e Iにより制限し、E c o R I及びN h e Iにより切開したベクター E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p S h u t t l e (- N d e I ) - A d E A S Yにクローニングする。

【0264】

E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p S h u t t l e (- N d e I ) - A d E A S Y中のp c D N A 3 . 1 (+) o C M V / E 3 aからのE 3 a領域のクローニングで、E 3 a E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p S h u t t l e (- N d e I ) - A d E A S Yを作成した。

【0265】

こうしてクローニングした領域は、E 3 A D P (位置2 9 7 7 2 b p)のための読み取り枠の後までE 3領域、このようなE 3プロモーター、ポリアデニル化シグナルを有する完全なE 3 A領域、転写開始、1 2 . 5 K、6 . 7 K E 3、E 3 g p 1 9 K及びE 3 A D Pの読み取り枠を含む。

【0266】

アデノウイルス5型D N A配列と比較して、E 3領域はS p e I - X h o Iクローニングの場合には位置2 9 7 9 6 ~ 3 1 5 0 9 b p (= 1 7 1 3 b p)から欠失する。

10

20

30

40

50

## 【0267】

E3プロモーター及びADPのための読み取り枠との間のさらなる欠失は、プラスミドp c DNA 3.1 (+) o CMV / E3aにより可能である：位置27596bp及び29355bpとの間のさらなる制限により、例えばEcoRII、BsiWI、DraI、MunIで、6.7Kの読み取り枠及び中間にあるgp19Kを取り除くことができ、こうしてさらなるトランスジーン取り込みのための最大1.8kbの追加スペースを提供する。それぞれの制限により上記のE3aの増幅物をトランケートすることができ、前述したようにクローニングすることができる。

## 【0268】

E2後期プロモーターのコントロール下における第2の発現カセットE1a 12Sのクローニング。 10

第一に、E2後期プロモーターを、一対のオリゴヌクレオチドとしてPromega(pGL3-E2Late)のpGL3-エンハンサープラスミドのHindIII及びBgIII切断部位にクローニングした。上流プライマー5'-TCGAGCTCCGCA TTTGGCGGGCGGGATTGGTCTTCGTAGAACCTAATCTCGT GGGCGTGGTAGTCCTCAGGTACAAAT-3' 及び下流プライマー5'-AGCTTATTGTACCTGAGGACTACCCACGCCACGAGATT AGGTTCTACGAAGACCAATCCCCGCCAACATGCGGAGC-3'。

## 【0269】

20

その後、ルシフェラーゼ遺伝子を、NcoI及びXbaIにより切除し、末端を平滑末端とし、T末端を加えた。このように開かれた部位で、プライマーE1a 12Sフォワード5'-ATGGCCGCCAGTCTTTG-3' 及びE1a 12Sリバース5'-TTATGGCCCTGGGGCGTTTAC-3' を使用してRT-PCRにより増幅されたトランスジーンE1A 12Sを、TAクローニングにより導入した。

## 【0270】

こうすることにより、カセットは、ベクターpGL3のE2後期プロモーター、読み取り枠E1a-12S及びSV-40後期のポリアデニル化シグナルを含む。

## 【0271】

このカセットをPvuI及びClaIにより切除し、末端を平滑末端とし、ここあるいは、EcoRII、BsiWI、DraI、MunIにより欠失したE3a領域にクローニングでき（上記のようにE3 6、7 K及びgp19 Kの読み取り枠の除去後）、あるいは、たとえば平滑末端のリン酸化BfrI切断部位のE4ORF6の欠失部分にクローニングすることができる。 30

## 【0272】

こうして作られた構築物は、E3a / E2Late - E1a - 12S / E3RGD - E4 ORF6 - pShuttle (-NdeI) - AdEASYまたはE3a E3RGD - E4 ORF6 / E2Late - E1a - 12S - pShuttle (-NdeI) - AdEASYである。

## 【0273】

40

E2後期プロモーターのコントロール下でYB-1を有する12S第2の発現カセットE1aのクローニング

この増幅物E1a 12S（上記）及びIRES要素（テンプレートとしてのNovagenのpCITE-4a（+）、IRESフォワード=5'-TCCGGTTATTTCCACCATATTGC-3' 及びIRESリバース=5'-TTATCATCGTGTGTTTTCAAGG-3'）を、p c DNA 3.1 (+)ベクター（インビトロゲン）の多重クローニング部位に連続してクローニングした。この目的のために、E1a-12S増幅物を、TAクローニングにより平滑末端とされたBamHI切断部位に導入した。その後、プラスミドE1a-12Sを、EcoRVでp c DNA 3.1 (+)に線形にし、T末端を加え、IRES要素の増幅物をクローニングにより導入した。こうして得ら 50

れた構築物 E 1 a - 1 2 S - I R E S - p c D N A 3 . 1 ( + )を、N o t I により線形にし、末端を平滑末端とした。また、プラスミド p H V a d 2 c C M V / S 4 0 + Y B - 1 s (ステファン・バーグマン)からのY B - 1 - E c o R I 切断生成物を平滑末端とし、脱リン酸化されたベクター E 1 A - 1 2 S - I R E S - p c D N A 3 . 1 ( + )に導入した。あるいは、タンパク質 I X の読み取り枠のためのP C R 増幅物を、T 末端の添加後にベクター E 1 a - 1 2 S - I R E S - p c D N A 3 . 1 ( + )の平滑末端としたN o t I 切断部位に導入し、より詳細にはプライマー I X フォワード 5 ' - A T G A G C A C C A A C T C G T T T G - 3 ' 及び I X リバース 5 ' - G T T T T A A A C C G C A T T G G G A G G - 3 ' を使用した。

## 【0274】

10

カセット E 1 A - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 または E 1 A - 1 2 S - I R E S タンパク質 I X を P m e I により切り出し、N c o I 及び X b a I を有するルシフェラーゼ遺伝子の除去後、上記のプラスミド p G L 3 - E 2 L a t e にクローニングし、平滑末端とし、脱リン酸化した。

## 【0275】

このカセット E 2 l a t e - E 1 A - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 は P v u I 及び C l a I により切り出し、末端を平滑末端とし、ここであるいは、E c o R I I 、B s i W I 、D r a I 、M u n I 欠失 E 3 a 領域にクローニングし ( E 3 6 、7 K 及び g p 1 9 K のための読み取り枠の除去後、上記参照) 、あるいは E 4 O R F 6 の欠失部分、たとえば平滑末端とし脱リン酸化した B f r I 切断部位にクローニングした。

20

## 【0276】

こうして得られた構築物は、E 3 a / E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 / E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p S h u t t l e ( - N d e I ) - A d E A S Y または E 3 a E 3 R G D - E 4 O R F 6 / E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 - p S h u t t l e ( - N d e I ) - A d E A S Y である。

## 【0277】

レスキュープラスミド E 3 a / E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S / E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p A d E A S Y または E 3 a E 3 R G D - E 4 O R F 6 / E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S - p A d E A S Y または E 3 a / E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 / E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p A d E A S Y または E 3 a E 3 R G D - E 4 O R F 6 / E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 - p A d E A S Y それぞれの作成

30

E 3 a または E 4 O R F 6 内の第2の発現カセット E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S または E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 を有する E 3 a E 3 R G D - E 4 O R F 6 領域を、対応する p S h u t t l e プラスミド E 3 a E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p S h u t t l e ( - N d e I ) - A d E A S Y から S p e I 及び P a c I で切り出し、対応する開かれたベクター p A d E A S Y にクローニングし、これにより、新規なレスキュー・ベクター E 3 a / E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S / E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p A d E A S Y または E 3 a E 3 R G D - E 4 O R F 6 / E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S - p A d E A S Y または E 3 a / E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 / E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p A d E A S Y または E 3 a E 3 R G D - E 4 O R F 6 / E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 - p A d E A S Y をそれぞれ作成した。

40

## 【0278】

E 3 a E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p A d E A S Y は E 3 a 領域、R G D モチーフ及び欠失 E 4 O R F 6 を含み、第2の発現カセットとして、E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S あるいは E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S - I R E S - Y B - 1 が E 3 a または E 4 O R F 6 中に存在する。この構築物は、シャトルのプラスミドによりさらなるトランスジョンを E 1 領域に導入するためのレスキュー・プラスミドである。

## 【0279】

50

E 1 領域のためのトランスジーンカセットの調製E 1 B 領域のクローニング

E 1 B 領域のために、アデノウイルス・ゲノムを Xba I (位置 1340 bp) 及び Msp I (位置 3925 bp) で制限し、2585 bp 断片をこうして完全な E 1 B 範囲 (pShuttle/E 1 B) を含む Xba I 及び Msp I クローニング部位の AdEAS Y の pShuttle にクローニングした。

## 【0280】

あるいは、E 1 B 領域を、テンプレートとしてアデノウイルス 5 型野生型 DNA を使用してプライマー E 1 B フォワード 5'-GTGTC TAGAGAATGCAATAGTA G-3' 及び E 1 B リバース 5'-GTC AAGAATCCAATTGTCG-3' を有する PCR により増幅し、Xba I 及び Msp I により制限し、AdEAS Y の pShuttle の Xba I 及び Msp I 切断部位にクローニングすることができる。

## 【0281】

こうして、pShuttle/E 1 B は、E 1 B プロモーター、E 1 B 19K、E 1 B 55K 及びタンパク質 IX のための読み取り枠及び自然のポリ A パートを含む。E 1 B プロモーターを Xba I 及び Hpa I により取り除き、ベクターの末端を平滑末端とし、Mlu I 及び Xho I により切断されたインビトロゲンの pCDNA3.1 (+) からの CMV プロモーターにより置き換え、これも末端を平滑末端とした。あるいは、CMV プロモーターよりむしろ RSV プロモーターまたは腫瘍 - 特異的及び、ウイルスプロモーター、例えば特許中に言及されたプロモーターがそれぞれ、E 1 B 領域の発現をコントロールすることができる。

## 【0282】

## カセット RSV - E 4 ORF 6 - poly A の調製用 RSV プラスミドの調製

インビトロゲンのプラスミド pRC/RSV を、Xho I、Spe I 及び Xba I により切断した。こうして得られた 2810 bp 及び 278 bp 断片を再結合し、こうすることにより F1 開始点及びネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を取り除いた。

## 【0283】

こうして得られたベクター pRC/RSV (neo) は、Dobbelstein からのプラスミド CGN からの E 4 ORF 6 のための読み取り枠がクローニングした 1 つの BamHI 切断部位のみを含む。あるいは、プライマー E 4 ORF 6 - フォワード 5'-ATGAC TACGTCCGGCGTTCC-3' 及び E 4 ORF 6 リバース 5'-CTACATGGGGTAGAGTC-3' を使用する PCR の増幅物を、T 末端 (TA クローニング) を加えた後に、ベクター pRC/RSV (neo) の EcoRV 切断部位に導入することができる。あるいは、RSV プロモーター (M1iI 及び HindIII) を使用する切除によるではなく、むしろ、CMV プロモーター (MluI 及び HindIII) を使用する切除により pCDNA3.1 (+) から得る) または、腫瘍特異的及びウイルス・プロモーター、例えば特許中に記載されたプロモーターも、それぞれ、E 4 orf 6 の発現をコントロールすることができる。

## 【0284】

カセット RSV - E 4 ORF 6 - poly A (ウシ成長ホルモン・ポリアデニル化シグナルはプラスミド pRC/RSV に由来する) を、Msp I で切断され、末端を平滑末端とし、さらにプラスミドから Xho I により切り出した。この発現カセットを、その後 Not I により切断されたベクター pShuttle/E 1 B にクローニングし、平滑末端とし、その後 Xho I により切断した。このベクターから、RSV - E 4 ORF 6 - poly A / E 1 B - pShuttle - AdEAS Y を得た。

## 【0285】

## トランスジーンのカセットのレスキュー・ベクターへの導入

E 1 - Bereich のためのベクター RSV - E 4 ORF 6 - poly A / E 1 B - pShuttle - AdEAS Y を、Bst 1107 I 及び Mro I を使用して線形にし、レスキュー・プラスミド (上記参照) と共にエレクトロポレーションにより BJ518

10

20

30

40

50

3 ( E C ) バクテリアに導入した。アデノウイルス・プラスミド R S V - E 4 O R F 6 - p o l y A / E 1 B - E 3 a / E 2 L a t e - E 1 a - 1 2 S / E 3 R G D - E 4 O R F 6 - p A d E A S Y を、相同組み換えにより（または他の上述したレスキュー・ベクター変種を有する対応する方法により）作成し、結果として H E K 2 9 3 細胞中にトランスフェクションした後にウイルスを產生した。

【 0 2 8 6 】

他のシステム、例えば、Clontech/BD BiosciencesのpAdenoX-SystemまたはMicrobixのシステムが本発明（特に個々におよび／またはいかなる組合せにおける上記の発現力セットを含む）によりアデノウイルス（好ましくは組換えアデノウイルス）の製造のために使用されることが本発明中及び当業者により明らかである。

10

【 0 2 8 7 】

前記の特徴、請求項及び図は、その各種実施態様において、本発明を実行するためには個々にあるいはいかなる組合せにおいても重要である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 8 8 】

以下に、本発明を、新たな機能、実施態様、及び効果を取りうる図及び実施例を参照することによりさらに例示する。

【 図 1 】 E 2 F 及び Y B - 1 による E 2 後期及び E 2 初期プロモーターによるアデノウイルスの E 2 領域レギュレーションの概略図である。

【 図 2 】 野生型のアデノウイルスの設計の概略図である。

20

【 図 3 】 E 2 後期プロモーターのコントロール下でタンパク質 I X を発現する本発明のアデノウイルス X v i r 0 5 / プロモーターの概略図である。

【 図 4 】 E 1 A 1 2 S のコントロール下で E 1 B 5 5 K 読み枠の一部としてタンパク質 I X を発現する本発明のアデノウイルス X v i r 0 5 / E 1 A 1 2 S の概略図である。

【 図 5 】 E 1 B 1 9 K のコントロール下でタンパク質 I X を発現する本発明のアデノウイルス X v i r 0 5 / E 1 B 1 9 K の概略図である。

【 図 5 a 】 E 3 プロモーターのコントロール下でタンパク質 I X を発現する本発明のアデノウイルス X v i r 0 5 / E 3 - I X の概略図である。

【 図 6 】 野生型アデノウイルス及びウイルス X v i r 0 5 / E 1 B 1 9 K の実施態様である本発明のアデノウイルス X v i r 0 5 の概略図である。

30

【 図 7 】 野生型アデノウイルス及びウイルス X v i r 0 5 / E 1 A 1 2 S の実施態様である本発明のアデノウイルス X v i r 0 5 / タンパク質 I X の概略図である。

【 図 8 】 野生型アデノウイルス及びウイルス X v i r 0 5 / タンパク質 I X の実施態様である本発明のアデノウイルス X v i r 0 5 / 0 1 の概略図である。

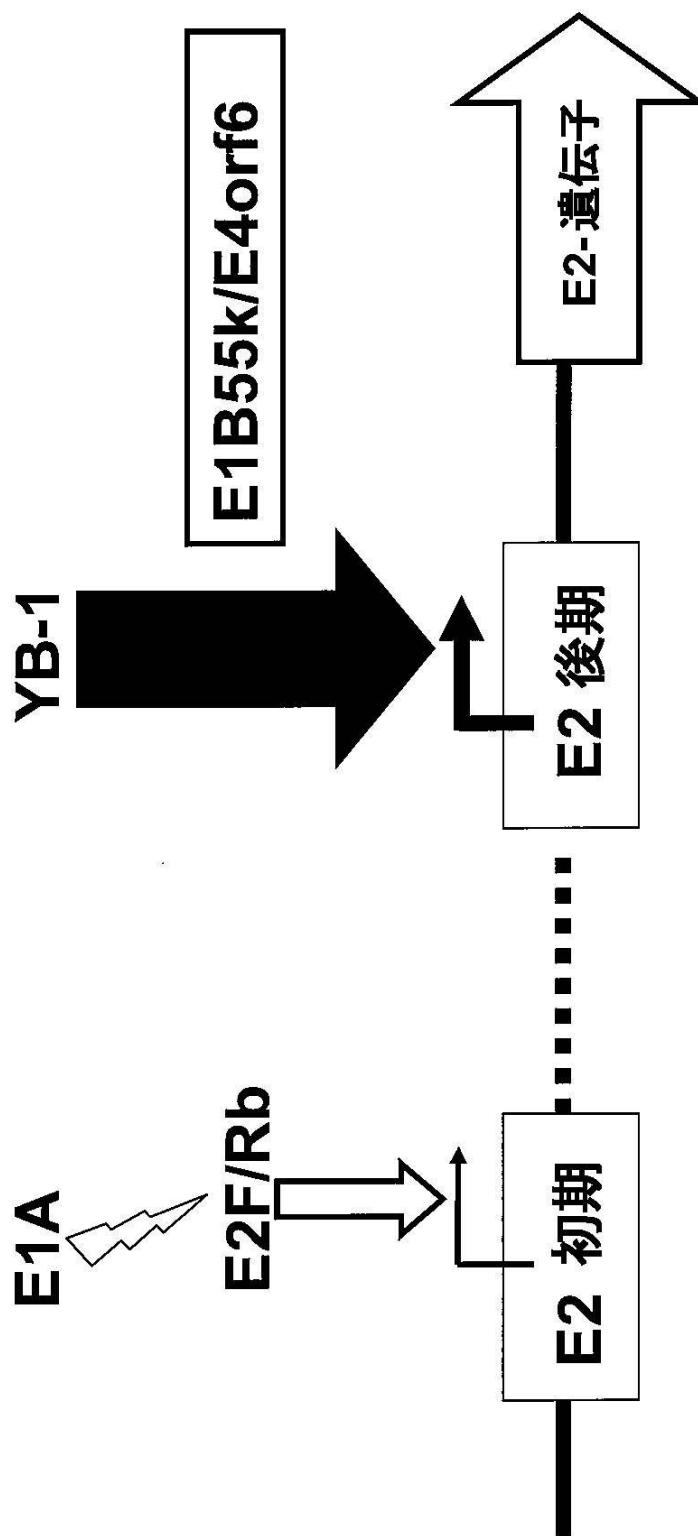
【 図 9 】 野生型アデノウイルス及びウイルス X v i r 0 5 / タンパク質 I X のさらなる実施態様である本発明のアデノウイルス X v i r 0 5 / 0 2 の概略図である。

【 図 1 0 】 タンパク質 I X の検出のためのノーザンプロット分析の結果である。

【 図 1 1 】 腫瘍溶解アデノウイルス X v i r 0 3 - 3 U T R のデザインの概略図である

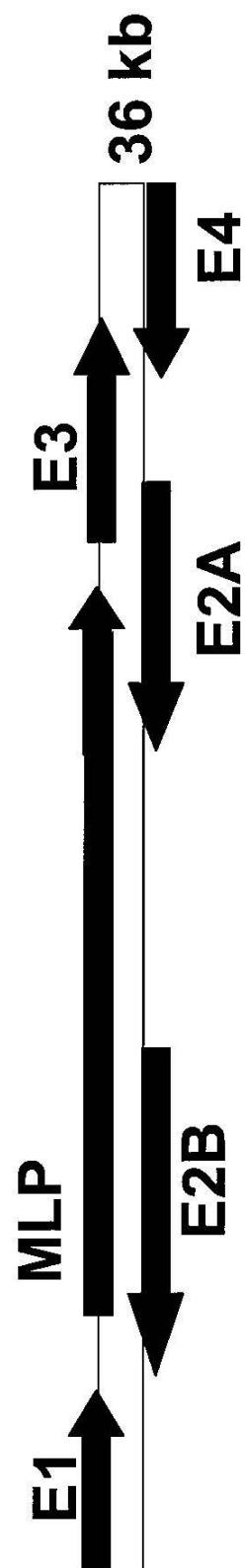
。

【図1】



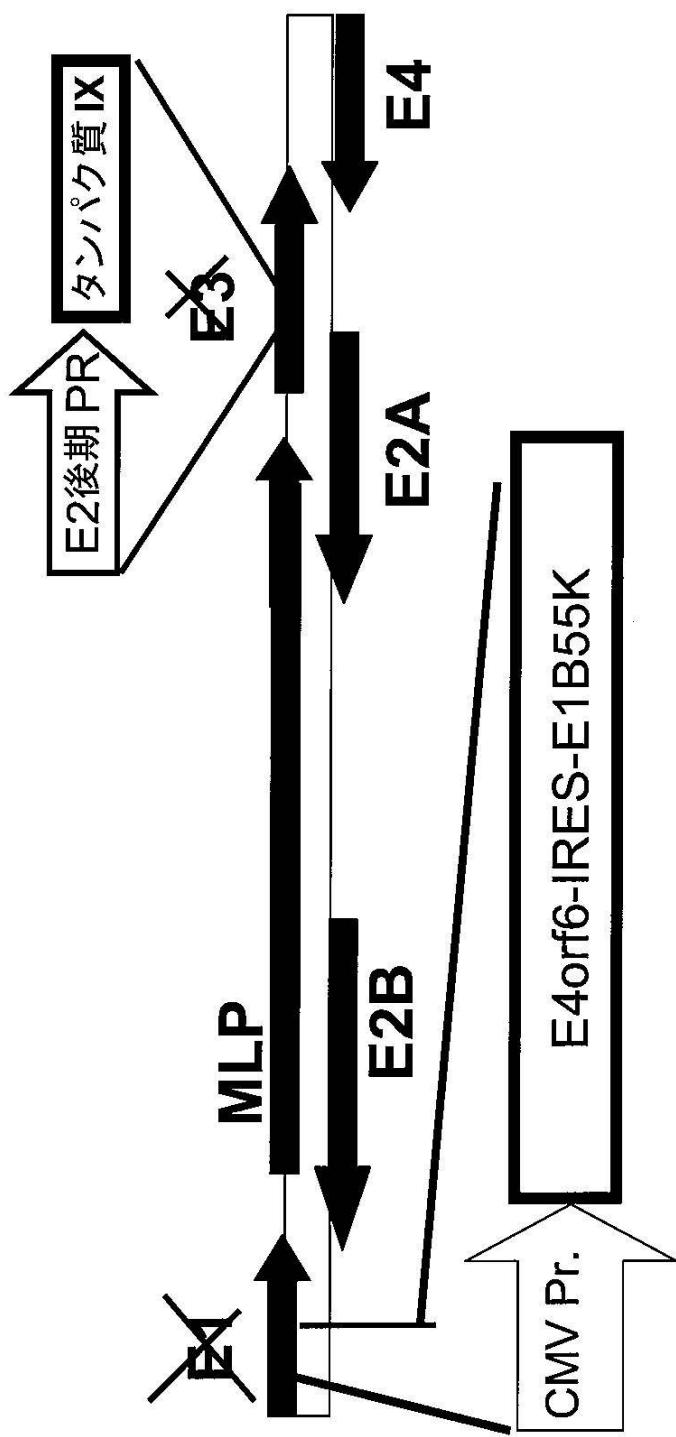
1. E2-初期プロモーターはE2F依存性である。
2. E2-後期プロモーターはYB-1依存性である。

【図2】

野生型アランギナルス

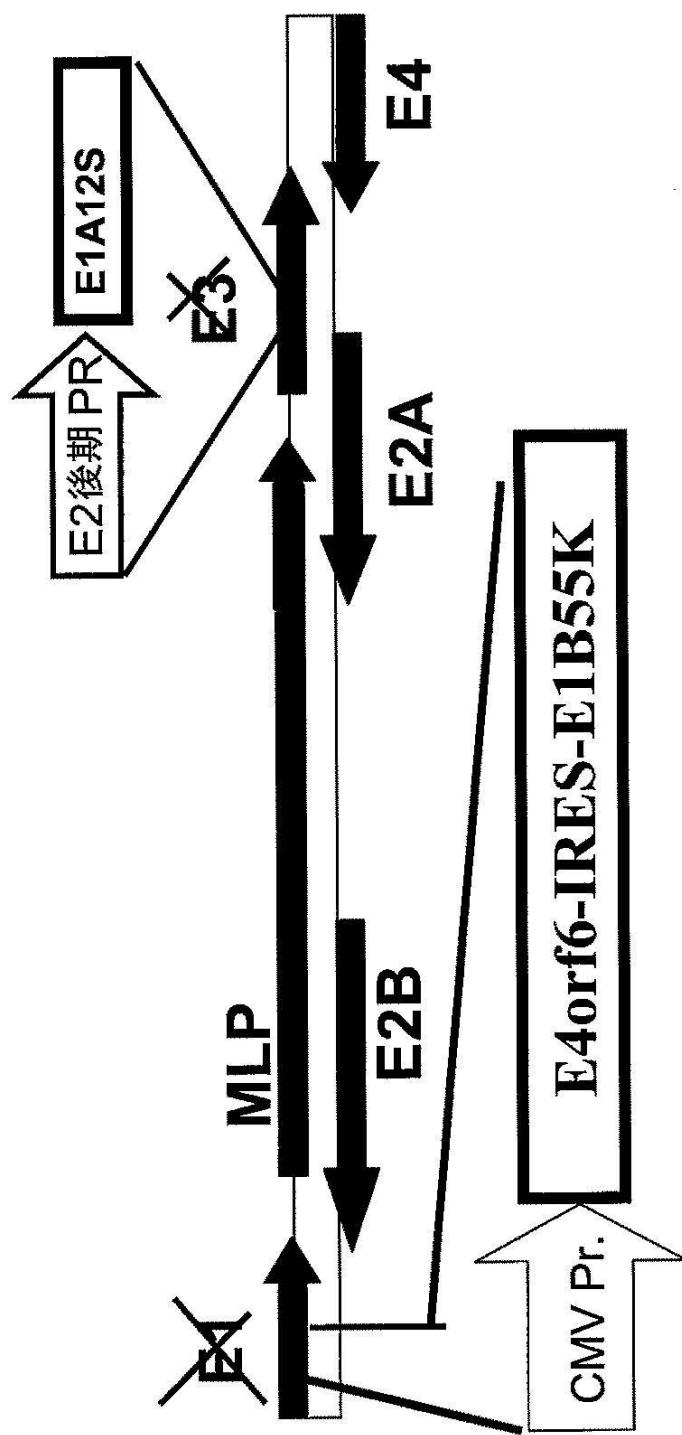
【図3】

## Xvir05/プロモーター



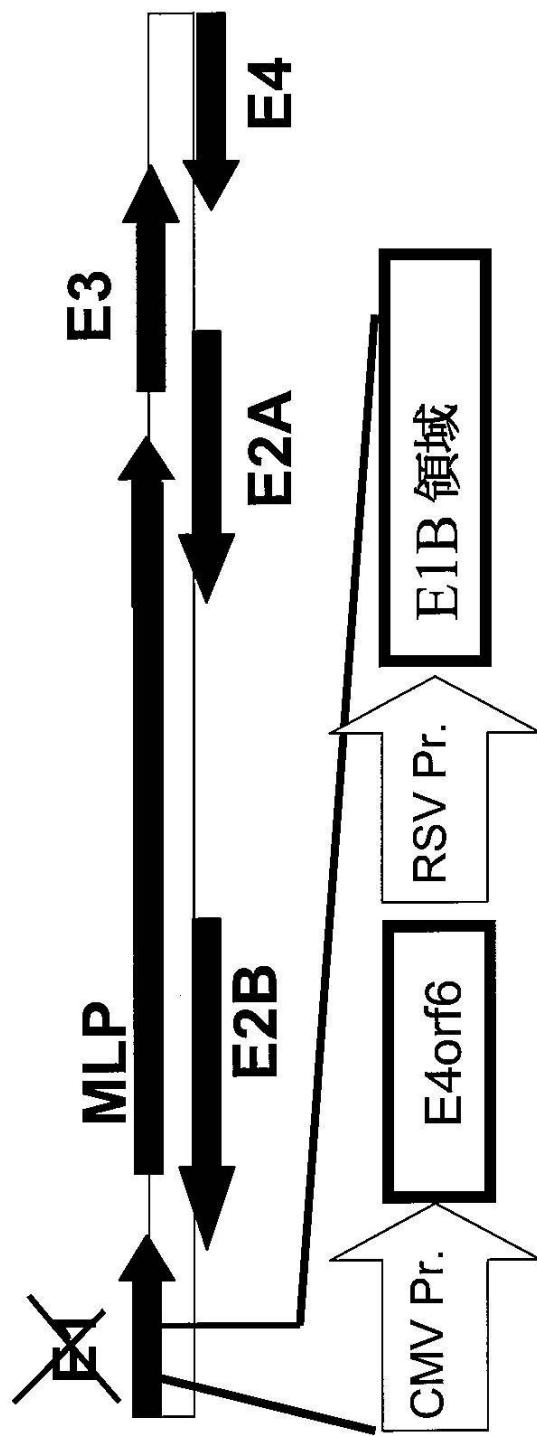
【図4】

## Xvir05/E1A12S



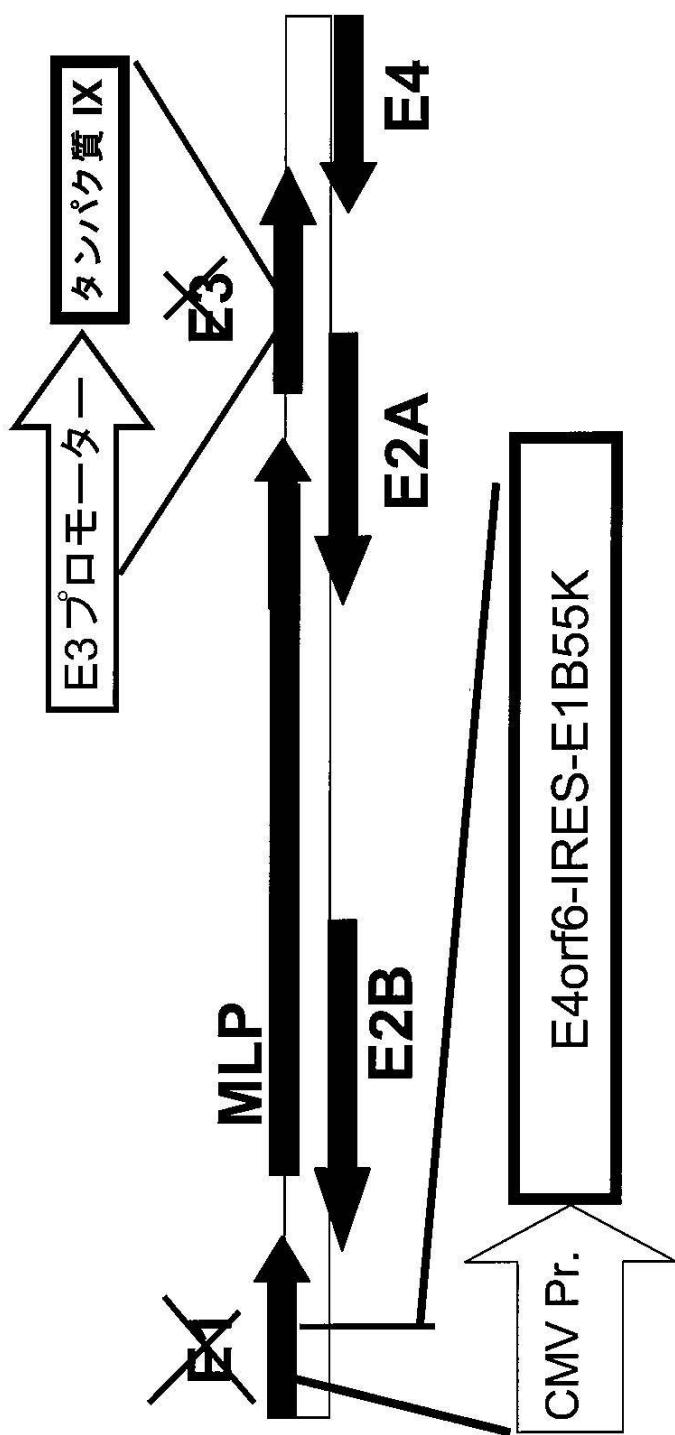
【図5】

## Xvir05/E1B19k

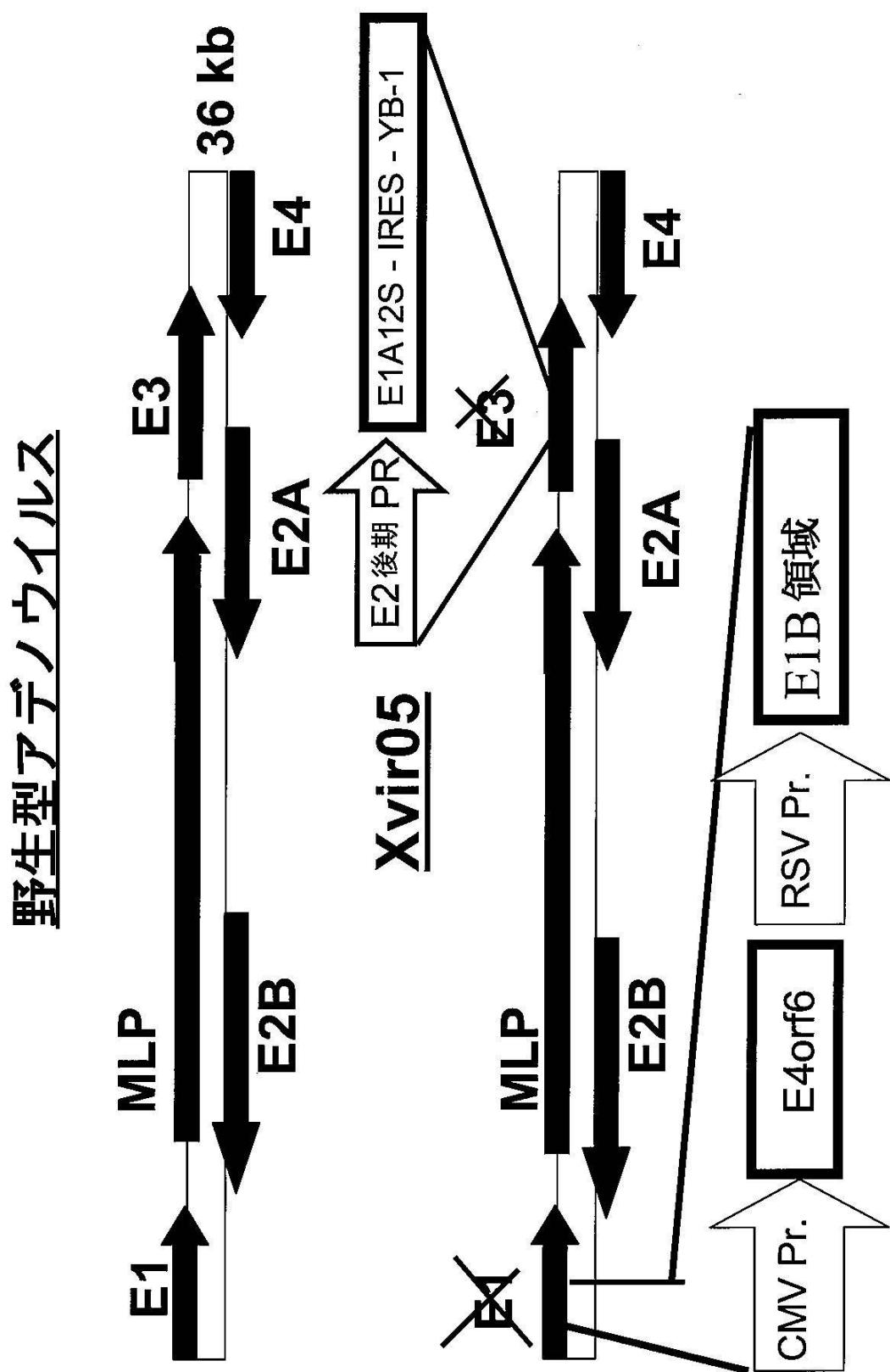


【図 5 a】

## Xvir05/E3-IX

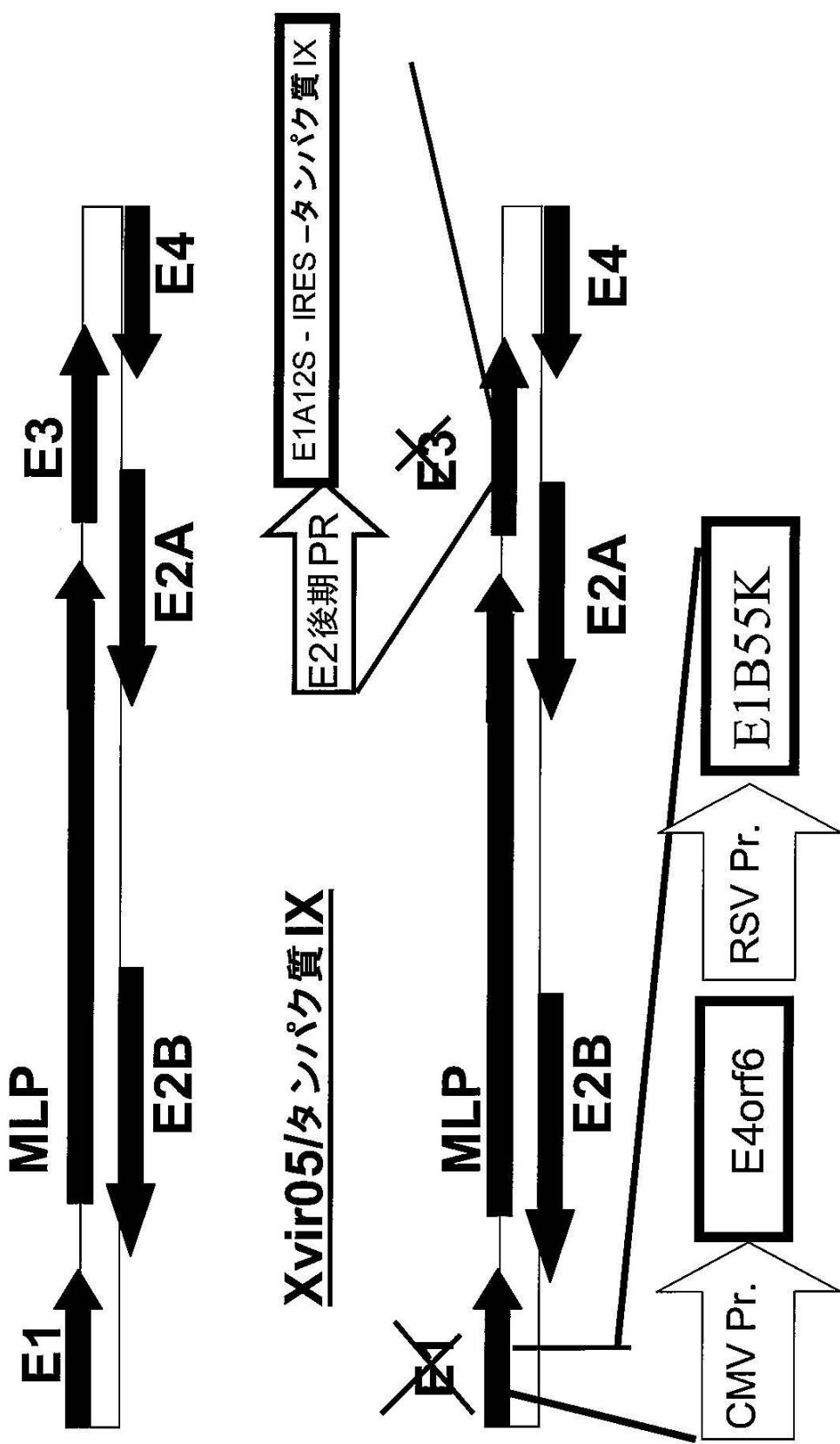


【図6】

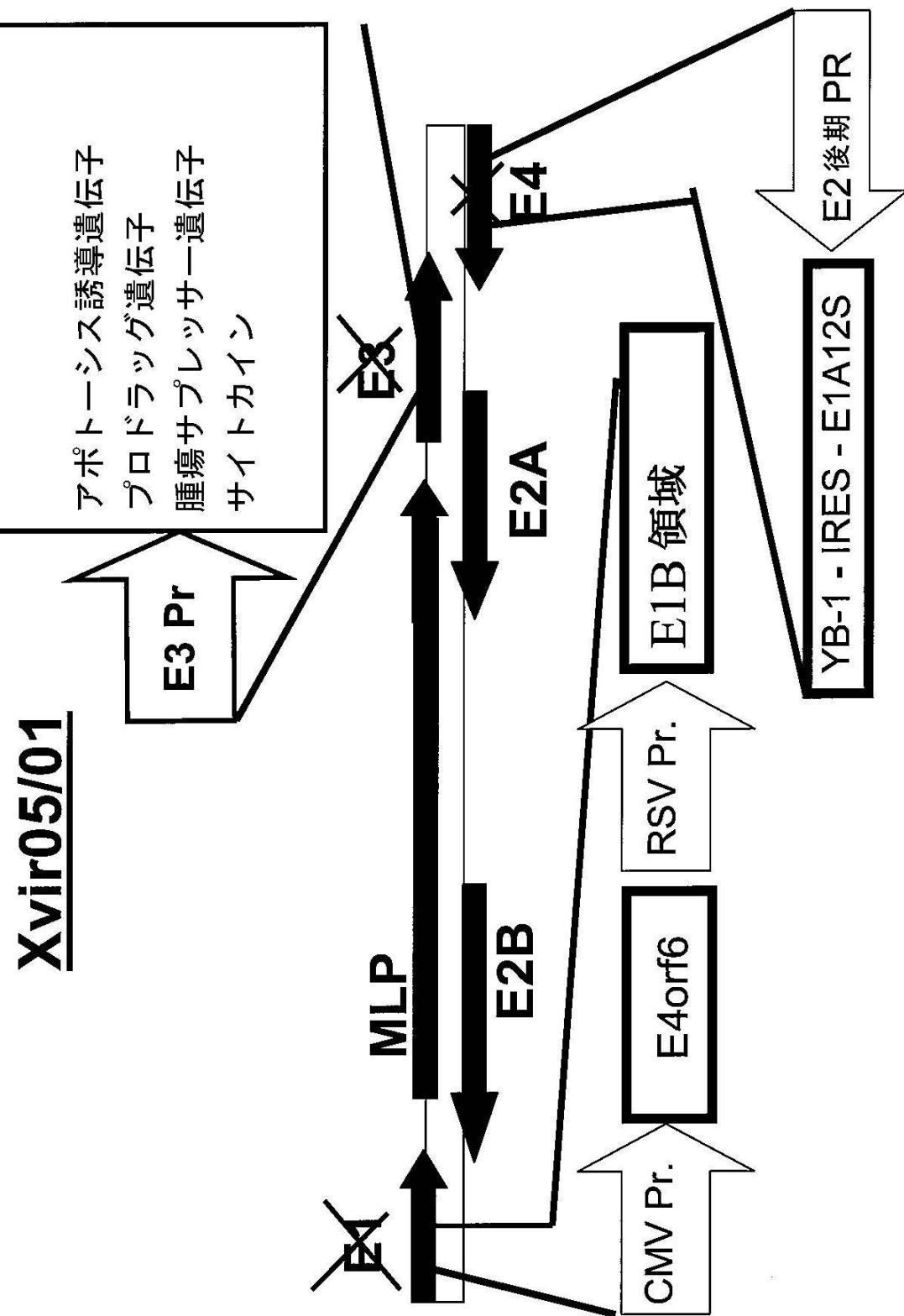


【図7】

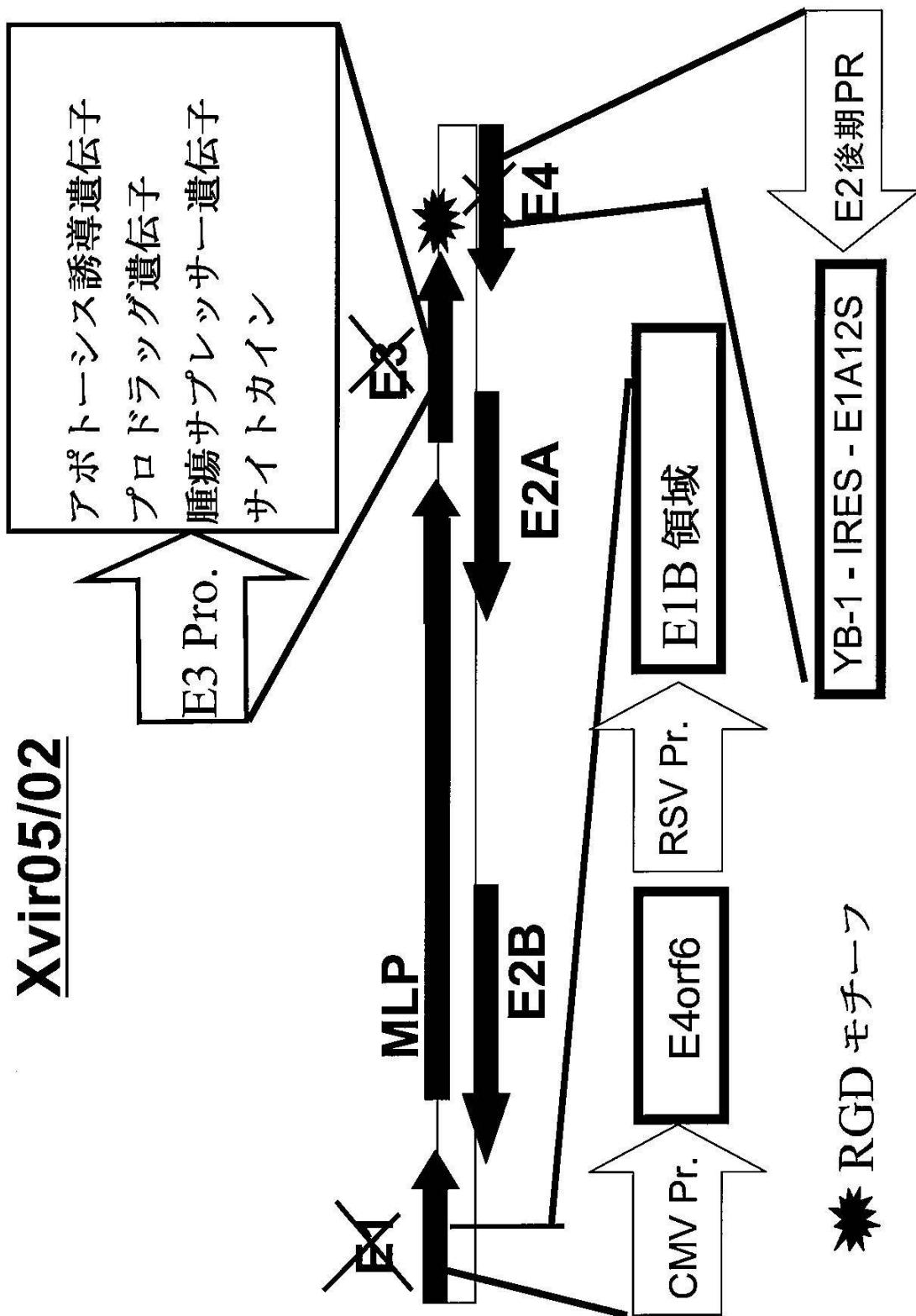
## 野生型アデノウイルス



【図 8】



【図9】



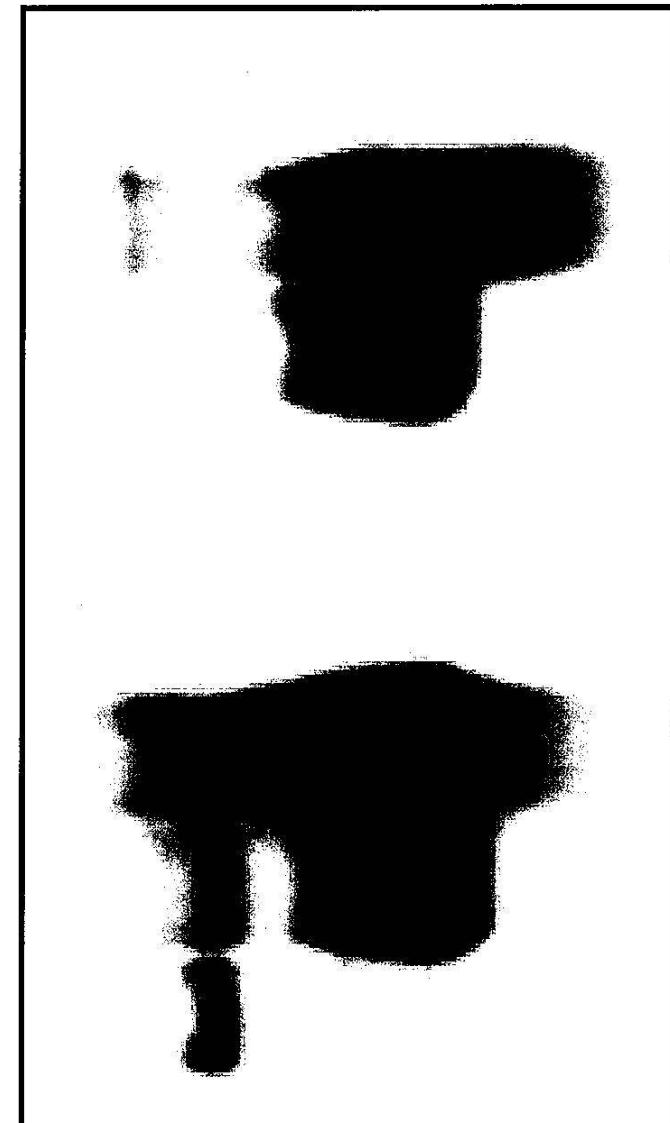
【図10】

293細胞

K AD-WT Xvir03

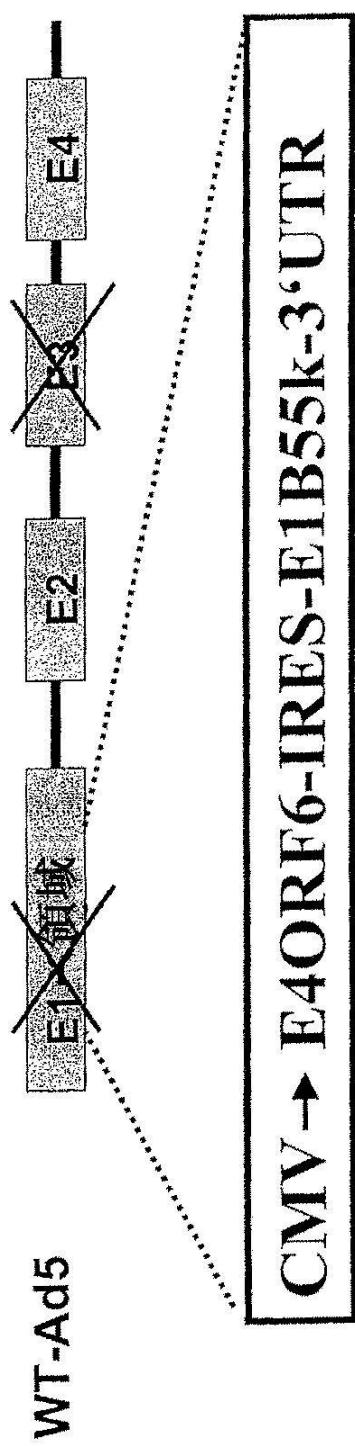
257RDB細胞

K AD-WT Xvir03



ノーザンプロット分析

【図 1 1】



【配列表】

0005435871000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.CI.		F I
A 6 1 P	35/00	(2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01) A 6 1 P 43/00 1 0 5
A 6 1 K	31/165	(2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K	31/4745	(2006.01) A 6 1 K 31/165
A 6 1 P	9/00	(2006.01) A 6 1 K 31/4745
		A 6 1 P 9/00

(72)発明者 ホルム,ペル・ゾンネ  
ドイツ国、82256 フェルステンフェルトブルック、マイゼンシュトラーセ 27

審査官 鶴 剛史

(56)参考文献 特表2005-523730 (JP, A)  
 特表2007-511211 (JP, A)  
 特表2007-511212 (JP, A)  
 特表2006-512284 (JP, A)  
 国際公開第2004/083404 (WO, A1)  
 特表2008-526188 (JP, A)  
 国際公開第2004/001032 (WO, A1)  
 特表平11-506311 (JP, A)  
 米国特許出願公開第2004/0081637 (US, A1)  
 国際公開第2004/035616 (WO, A1)  
 特表2006-518589 (JP, A)  
 Cancer Res., 61[17](2001) p.6328-6330  
 Clin. Cancer Res., 8[3](2002) p.718-728  
 Clin. Cancer Res., 9[14](2003 Nov 1) p.5394-5401

## (58)調査した分野(Int.CI., DB名)

C 1 2 N 7 / 0 0  
 A 6 1 K 3 1 / 1 6 5  
 A 6 1 K 3 1 / 4 7 4 5  
 A 6 1 K 3 5 / 7 6  
 A 6 1 K 3 8 / 0 0  
 A 6 1 K 4 8 / 0 0  
 A 6 1 P 3 5 / 0 0  
 A 6 1 P 4 3 / 0 0  
 C 1 2 N 1 5 / 0 9  
 A 6 1 P 9 / 0 0  
 C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 W P I