

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-509197

(P2014-509197A)

(43) 公表日 平成26年4月17日(2014.4.17)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N	7/00	(2006.01)	C 1 2 N	7/00	Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	4 B 0 6 5
A 6 1 K	35/76	(2006.01)	A 6 1 K	35/76		4 C 0 8 7
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2013-555736 (P2013-555736)	(71) 出願人	513221329 北京▲錘▼特生物科技有限公司 中華人民共和国北京市昌平区生命▲園▼路 29号1号楼2▲層▼A215
(86) (22) 出願日	平成24年2月29日 (2012.2.29)	(74) 代理人	100103207 弁理士 尾崎 隆弘
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月2日 (2013.9.2)	(72) 発明者	王▲堯▼河 中華人民共和国河南省▲鄭▼州市科学大道 100号
(86) 国際出願番号	PCT/CN2012/071754	(72) 発明者	姜国忠 中華人民共和国河南省▲鄭▼州市科学大道 100号
(87) 国際公開番号	W02012/116636	(72) 発明者	王▲鵬▼ 中華人民共和国河南省▲鄭▼州市科学大道 100号
(87) 国際公開日	平成24年9月7日 (2012.9.7)		
(31) 優先権主張番号	201110050046.0		
(32) 優先日	平成23年3月2日 (2011.3.2)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的性治療人腫瘍治療の腫瘍溶解性アデノウイルス及びその応用

(57) 【要約】

【課題】 ウィルス担体は標的性遺伝子工学薬物として各種の実体腫瘍を治療でき、腫瘍内の注射に運用でき、腹腔と胸腔内の注射にも適用でき、明らかな副作用を引き起こさず、良い治療効果と安全性を有する。

【解決手段】 Ad-TD-hIL12は標的性人腫瘍治療の腫瘍溶解性アデノウイルスで中国典型培養物保存センターで保存され保存番号はCCTCC NO: V201031である。ウィルス担体はサブクラスCの5型アデノウイルスで、E1A-CR2、E1B19KとE3gp-19Kの三つの遺伝子を削除し、E3gp-19Kプロモーター遺伝子を利用し、人IL12を表現するp35とp40サブユニット遺伝子配列を制御する。ウィルスは腫瘍細胞の感染を通じて腫瘍細胞で複製し腫瘍細胞を溶解すると同時に、腫瘍組織でハイレベルの多種抗腫瘍作用があるhIL12を生成できる。hIL12は抗腫瘍血管形成作用を有し人体免疫力を調節し人体に抗腫瘍特異免疫能力を形成させ、遠端転移腫瘍細胞を殺し、腫瘍の再発を防止できる。

【選択図】 図1

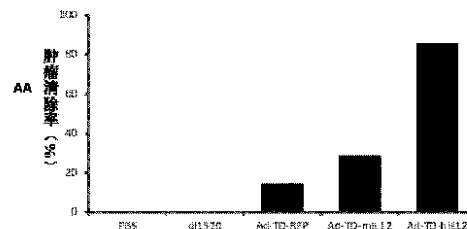


図2 / FIG. 2

AA Tumor clearance rate

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

中国典型培養物保存センターで保存され、その保存番号がCCTCC NO: V201031であることを特徴とする一種の標的性治療人腫瘍治療の腫瘍溶解性アデノウイルス (oncolytic adenovirus) Ad-TD-hIL12。

【請求項 2】

当該ウイルス担体がサブクラスCの5型アデノウイルスAd5で、E1A-CR2、E1B19KとE3gp-19Kの三つの遺伝子を削除し、それにE3gp-19Kプロモーター遺伝子で人IL12を表現するp35とp40サブユニット遺伝子配列を制御することを特徴とする請求項1に記載の標的性治療人腫瘍治療の腫瘍溶解性アデノウイルスAd-TD-hIL12。

10

【請求項 3】

前記の2p35とp40サブユニット遺伝子に対応するアミノ酸配列がそれぞれSEQ NO: 1とSEQ NO: 2で、相応なヌクレオチド配列がそれぞれSEQ NO: 3とSEQ NO: 4であることを特徴とする請求項2に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスAd-TD-hIL12。

【請求項 4】

前記の2p35とp40サブユニット配列が人IL12 DNA配列の増加、削除又は点突然変異で得られる配列及び5'及び/又は3'端欠陥による配列だけでなく、配列SEQ NO: 5を含むが、これに限らないことを特徴とする請求項2に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスAd-TD-hIL12。

【請求項 5】

前記の2p35とp40サブユニット配列が前記の人IL12 DNA配列と異なり、抗腫瘍効果を表し、又は腫瘍の減退を引き起こす相同配列又は番号のポリペプチドだけでなく、SEQ NO: 6を含むが、これに限らないことを特徴とする請求項2に記載の腫瘍溶解性アデノウイルスAd-TD-hIL12。

20

【請求項 6】

前記の人腫瘍が各種の実体腫瘍を含むことを特徴とする請求項1又は2に記載の標的性人腫瘍治療の腫瘍溶解性アデノウイルスAd-TD-hIL12。

【請求項 7】

請求項1又は請求項2に記載の標的性人腫瘍治療の腫瘍溶解性アデノウイルスAd-TD-hIL12の腫瘍治療薬物製作での応用。

30

【請求項 8】

(1) 健康人の末梢血を取り、リンパ球を分離し、植物性凝集素の刺激の下で培養し、RNAを抽出し、cDNAになるよう逆転写反応を行い、制限酵素切断部位を含むプライマーで人インターロイキンhIL12のp35とp40サブユニット遺伝子をクローンし、p35とp40サブユニット遺伝子区切りをhIL12の完全な遺伝子区切りに接続して、クローン担体T担体に接続し、pORF-hIL-12に命名し、これからNco IとNhe Iダブル制限酵素切断pORF-hIL-12プラスミドを使用してから、T4 DNAポリメラーゼで切断されたhIL12遺伝子の区切りを平らにして、使用に備えること、

(2) 平ら末端切断酵素で単一にアデノウイルス担体pAd-TDのE3gp-19K欠陥区を切断し、前記のhIL12遺伝子をゲノム一致性順序によってウイルス担体pAd-TDの制限酵素切断部位に挿入し、PCR方法で挿入方向の正しい再構成担体を鑑定・選別すること、及び、

40

(3) 前記の再構成担体を293細胞にトランスフェクションを行い、前記の担体Ad-TD-hIL12を構築すること、

上記手順を含む標的性人腫瘍治療の腫瘍溶解性アデノウイルスの担体Ad-TD-hIL12の構築方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、遺伝子工学生物技術分野にかかり、特に一種の標的性人腫瘍治療の腫瘍溶解性アデノウイルス及びその応用に係る。

50

【背景技術】

【0002】

遺伝子工学アデノウイルス担体Ad-TDは、一種の腫瘍標的性担体で、E1A-CR2、E1B19KとE3gp-19Kという三つの遺伝子を削除し、それにE3gp-19Kプロモーター遺伝子配列の5型アデノウイルスを保留し、良い抗腫瘍効果を持っている。インターロイキン12(IL12)は、自然殺傷細胞刺激因子又は細胞毒性リンパ球成熟因子と称され、ジスルフィド結合により接続されるヘテロ二量体細胞因子で、二つのサブユニットは、p35及びp40と称される。p35は、T細胞、B細胞、NK細胞及び単球等により生まれ、p40は主に活性化された単球及びB細胞により生まれる。人とマウスのp35とp40遺伝子は、配列がすでに測定され、それに体内外でNK細胞とT細胞の成長因子の機能を表す。更なる研究は、IL12が有効にマウスの腫瘍に減退させ、それに完全に失わせることを表明した。但し、IL12は、体内で短い半減期があり、持続に注射してからこそ、治療効果を達成することができ、IL12の需要量が相対に大きく(1-10 µg/日)、それに、再構成されたIL12蛋白はしばしば重度な毒性を致す。現在、逆転写ウイルス担体を利用するIL12遺伝子治療は、一部分の実験室で実行していて、その抗腫瘍効果はすでに証明されたが、直接IL12を運用する遺伝子治療は、まだ確立された腫瘍病巣と腫瘍自発転移病巣の減退を引き起こさない。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

一種の人腫瘍標的性治療アデノウイルス腺病毒Ad-TD-hIL12を提供し、当該ウイルスは、腫瘍治療の遺伝子工学薬物としてもよく、当該ウイルス担体は、標的性、安全と高効率の特徴を持っている。

20

【課題を解決するための手段】

【0004】

5型アデノウイルス担体は、コード人IL12のp35とp40サブユニット遺伝子を含むする複製選択型アデノウイルスであり、当該ウイルスは、腫瘍細胞で選択的に複製し、それに、腫瘍に入った後、機能のある人IL12を表現する。これらの腫瘍は、裸眼で見える又は顕微鏡で見える実体腫瘍、転移腫瘍と拡散腫瘍を含む。当該ウイルス担体は、人体に入った後、選択的に腫瘍細胞で複製し、それに腫瘍細胞を溶解し、大量な腫瘍関連抗原を釈放し、表現する細胞因子人IL12と協同に作用することによって、人体に高効率の且つ特異な抗腫瘍反応を発生させ、ウイルスにより感染されていない遠端腫瘍細胞を殺傷し、その中で、転移した微小腫瘍細胞病巣も含まれる。腫瘍細胞で高い表現があるIL12は抗腫瘍血管形成等の多種の作用も有する。

30

【0005】

前記問題を解決する為に、本発明は一種の腫瘍標的性アデノウイルス担体Ad-TD-hIL12を構築した。当該ウイルス担体は、サブクラスCの5型アデノウイルスAd5で、当該アデノウイルスのE1A-CR2、E1B19KとE3gp-19Kの三つの内在遺伝子(Triple DeletionとTD)を削除し、それにウイルス遺伝子の表現に役立ち、ウイルスの体内持続時間を強化するE3B遺伝子を保留し、これと同時に、E3gp-19Kプロモーター遺伝子表現外部治療遺伝子、即ち、人インターロイキン12を保留する。

40

【0006】

インターロイキン12はヘテロ二量体で、p35とp40サブユニットを含み、各サブユニットが自分の遺伝子コードを有し、IL12のp35とp40サブユニットのコードDNA配列が人を含む組織から得られる。本発明での人IL12配列は、人組織源、体外合成又は再構成の完全な及び変更された抗腫瘍効果があるコード配列を含む。これらの配列は、人IL12 DNA配列の増加、削除と点突然変異及び5'及び/又は3'端の欠陥を含むが、これには限らない。本発明の人IL12配列と異なる相同DNA配列又は番号のポリペプチドが抗腫瘍の効果を表す場合、それに腫瘍減退を引き起こす配列である場合もこれに含まれる。

【0007】

前記p35とp40サブユニット遺伝子に対応するアミノ酸配列はそれぞれSEQ NO:1とSEQ N

50

0:2で、相応なヌクレオチド配列はそれぞれSEQ NO:3とSEQ NO:4である。

【0008】

前記の人腫瘍は、人の各種の実体腫瘍である。

【0009】

前記の標的性人腫瘍治療の腫瘍溶解性アデノウイルスAd-TD-hIL12の腫瘍治療薬物製作での応用である。

【0010】

標的性人腫瘍治療の腫瘍溶解性アデノウイルスの担体Ad-TD-hIL12の構築方法は、下記手順を含む。

【0011】

(1)健康人の末梢血を取り、リンパ球を分離し、植物性凝集素の刺激の下で培養し、RNAを抽出し、cDNAになるよう逆転写反応を行い、制限酵素切断部位を含むプライマーで人インターロイキン12のp35とp40サブユニット遺伝子をクローンし、p35とp40サブユニット遺伝子区切りをhIL12完全な遺伝子区切りに連続して、クローン担体T担体に接続し、pORF-hIL12に命名する。これからNco IとNhe Iダブル制限酵素切断pORF-hIL-12プラスミドを使用してから、T4 DNAポリメラーゼで切断されたhIL12遺伝子の区切りを平らにして、使用に備える。

【0012】

(2)平ら末端切断酵素で単一にアデノウイルス担体pAd-TDのE3gp-19K欠陥区を切断し、前記のhIL12遺伝子をゲノム一致性順序によってウイルス担体pAd-TDの制限酵素切断部位に挿入し、PCR方法で挿入方向の正しい再構成担体を鑑定・選別する。

【0013】

(3)前記の再構成担体を293細胞にトランスフェクションを行い、前記のウイルス担体Ad-TD-hIL12を構築する。

【0014】

本発明の腫瘍標的性アデノウイルスAd-TD-hIL12は、中国典型培養物培養センターで保存されていて、保存コード:CCTCC NO:V201031、保存日付:2010年12月1日となっている。

【発明の効果】

【0015】

(1)本発明の腫瘍標的性アデノウイルスAd-TD-hIL12は、ウイルスの内在遺伝子のプロモーター遺伝子を利用して、E1A-CR2、E1B19KとE3gp-19Kの三つのアデノウイルスの内在遺伝子を削除し、E3区の一部の遺伝子を保留し、E3gp-19K遺伝子のプロモーター遺伝子を利用して、人のIL12遺伝子を治療遺伝子とすることを表現する。当該ウイルスは、特定標的腫瘍細胞で良く見えるRb遺伝子と抗アポトーシス遺伝子の異常によって、選択的に腫瘍細胞で複製することができ、正常細胞で複製するのではなくて、特異性と安全性を増加し、複製するウイルスは腫瘍細胞を溶解できると同時に、腫瘍組織にハイレベルの多種の抗腫瘍作用があるIL12を生成できる。

【0016】

(2)本発明のAd-TD-hIL12が表現するhIL12は、抗腫瘍血管形成の作用を有し、一層重要なこととしては、人体免疫力を調節でき、それに、腫瘍細胞で複製するAd-TD-hIL12と協同作用を生成し、人体に抗腫瘍特異免疫力を持たせ、これによって、遠端転移した腫瘍細胞を殺し、それに腫瘍の再発を防止できる。細胞学実験と動物試験によって、当該ウイルスは、選択的に腫瘍細胞を殺し、一部分の免疫欠陥と免疫無し欠陥マウス類の移植腫瘍を除去でき、良い治療効果と安全性を有する。

【0017】

(3)本発明の腫瘍標的性アデノウイルスAd-TD-hIL12は、腫瘍標的性と抗腫瘍効果を有し、一種の標的性遺伝子工学薬物としても良く、治療できる腫瘍は、裸眼で見える又は顕微鏡で見える実体腫瘍、転移腫瘍と拡散腫瘍を含み、それに晩期のびまん性拡散腫瘍も治療される。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

(4) 本発明の腫瘍溶解性アデノウイルスAd-TD-hIL12は、腫瘍内注射だけでなく、腹腔、胸腔内注射にも運用でき、それに、明らかな副作用を引き起こさない。

【 0 0 1 9 】

(5) 本発明の標的性人腫瘍治療の腫瘍溶解性アデノウイルスAd-TD-IL12は、安全で且つ高効率を持ち、一種の腫瘍標的性遺伝子工学薬物として、臨床応用への推進に基礎を造り、腫瘍患者に一種の有効的な治療方法を提供し、良い社会と経済効果・利益を出す。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 0 】

【 図 1 】 本発明の腫瘍標的性アデノウイルスAd-TD-hIL12、Ad-TD-gene、dl1520と対照ウイルスAd-TD-RFPの構造図。 10

【 図 2 】 本発明のウイルスAd-TD-hIL12と対照ウイルスの大負荷腫瘍に対する治療効果。

【 図 3 】 異なる投薬量Ad-TD-hIL12、対照ウイルスとdl1520で腫瘍移植ハムスターを処理する際の腫瘍成長曲線。

【 図 4 】 異なる投薬量Ad-TD-hIL12、対照ウイルスとdl1520で腫瘍移植ハムスターを処理する際の腫瘍進展停止率。

【 図 5 】 異なる投薬量Ad-TD-hIL12、対照ウイルスとdl1520で腫瘍移植ハムスターを処理する際の腫瘍清掃率。

【 図 6 】 低投薬量Ad-TD-hIL12、対照ウイルスとdl1520で腫瘍移植ハムスターを処理する際の腫瘍成長曲線。 20

【 図 7 】 低投薬量Ad-TD-hIL12、対照ウイルスとdl1520で腫瘍移植ハムスターを処理する際の腫瘍進展停止率。

【 図 8 】 低投薬量Ad-TD-hIL12、対照ウイルスとdl1520で腫瘍移植ハムスターを処理する際の腫瘍清掃率。

【 図 9 】 Ad-TD-m/hIL12で、免疫力を有する腫瘍移植動物を治療した後、発生した腫瘍特異免疫能力。

【 図 1 0 】 異なる投薬量Ad-TD-hIL12の膵臓癌腹腔拡散に対する治療作用(その中で、1 : PBS、2 : Ad-TD-hIL12 1×10^9 pt/回、3 : Ad-TD-hIL12 2.5×10^9 pt/回、4 : Ad-TD-hIL12 5×10^9 pt/回となる)。

【 0 0 2 1 】

その中で、図3、図4、図6と図7での記号表示は下記の通りである。 30

● : PBS、⊖ : dl1520、▲ : Ad-TD-RFP、⊕ : Ad-TD-hIL12

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 2 】

以下は、実例を通じて本発明を更に説明し、本発明の保護範囲を限定することなく、本分野の技術者は、説明書に基づいて、これらの実施案を修正でき、本発明の精神と範囲から外れない限り、類似する又は同じ結果を得られ、皆本発明の保護範囲に属する。

【 0 0 2 3 】

実例1：腫瘍標的性アデノウイルス担体Ad-TD- hIL12の相応なマウスIL12遺伝子ウイルス担体Ad-TD-mIL12の構築方法について、図1を参照して下さい。手順は下記の通りである。 40

【 0 0 2 4 】

(1) まずPCR方法で改造する配列E1A-CR2遺伝子の両側のDNA区切りを取得し、上流配列は、左アームと称され、下流は右アームと称され、遺伝子工学の方法で左アームと右アームをウイルス遺伝子一致性配列によって、プラスミド担体pSuperShuttleに接続し、E1A-CR2シャトル担体を構築する。

【 0 0 2 5 】

アデノウイルス担体Ad5とE1A-CR2シャトル担体を1:2~10の比例でBJ5183細菌に転換し、相同再構成を行う。これからPCR方法陽性再構成細菌を鑑定し、再構成プラスミドを抽 50

出し、293細胞にトランスフェクションして、E1A-CR2欠陥のAd5R-CR2ウイルス担体を得る。

【0026】

(2) E1A-CR2シャトル担体の構築と同じ方法でE1B19Kシャトル担体を構築してから、Ad5R-CR2ウイルス担体と相同再構成を行い、CR2とE1B19K両方欠陥のAd5R-CR2-E1B19Kウイルス担体を得る。

【0027】

(3) PCR方法でE3gp-19K遺伝子蛋白コード区両側配列を拡張し、左アームの範囲が-1087bp~0bpで、その中でE3gp-19K遺伝子のプロモーター遺伝子を含み、右アームがE3gp-19K遺伝子の終止パスワードから後1146bpとなり、両アームは制限酵素切断部位で接続され、シャトル担体を構築して、Ad5R-CR2-E1B19Kウイルス担体と相同再構成を行い、E1A-CR2、E1B19KとE3gp-19Kの三つのコード遺伝子が皆欠陥となるアデノウイルス担体pAd-TDを取得し、この上、pAd-TDを293細胞にトランスフェクションして、腫瘍標的性アデノウイルス担体Ad-TD-gene (Ad-TD)を生産する。

【0028】

(4) 健康マウスの末梢血を取り、リンパ球を分離し、植物性凝集素 (PHA) の刺激の下で培養し、RNAを抽出し、cDNAになるよう逆転写反応を行い、制限酵素切断部位を用むプライマーでマウスのインターロイキン12のp35とp40サブユニット遺伝子をPCRクローンし、p35とp40サブユニット遺伝子区切りをhIL-12完全な遺伝子区切りにして、クローン担体T担体に接続し、pORF-mIL-12に命名する。これからNco IとNhe Iダブル制限酵素切断pORF-hIL-12プラスミドを使用して、T4 DNAポリメラーゼで切断されたmIL12遺伝子の区切りを平らにして、使用に備える。

【0029】

(5) 平ら末端切断酵素で単一にアデノウイルス担体pAd-TDのE3gp-19K欠陥区を切断し、これから、前記mIL12遺伝子をゲノム一貫性順致によってウイルス担体の制限酵素切断部位に挿入し、PCR方法で挿入方向の正しい再構成担体を鑑定・選別する。

【0030】

(6) 挿入方向の正しい再構成担体を293細胞にトランスフェクションし、ウイルス担体Ad-TD-mIL12を生産する。

【0031】

実例2：腫瘍標的性アデノウイルスAd-TD-hIL12の抗腫瘍応用である。

【0032】

5-6週間年齢のハムスターの背部右上側に 1×10^6 的HPD1-nr細胞 (金黄地鼠膵臓腺癌細胞) を接種し、腫瘍体積が 160mm^3 である時、それぞれPBS、dl1520、Ad-TD-RFP、Ad-TD-mIL12とAd-TD-hIL12で腫瘍内注射 $5 \times 10^9\text{pt/回}$ を行い、三回に分けて治療した後、治療効果を観察する。

【0033】

結果として、図2は、単独にAd-TD-hIL12を使用すると、大負荷腫瘍動物に対する全快率が85.71%で、dl1520組の動物の全快率が0%であることを示す。

【0034】

実例3：異なる投薬量Ad-TD-hIL12、対照ウイルスとdl1520の体内抗腫瘍効果の比較である。

【0035】

5-6週間年齢のハムスターの背部右上側で 1×10^6 のHPD1-nr細胞を接種し、腫瘍が大きな接種腫瘍 (160mm^3) になる時、腫瘍内にそれぞれPBS、dl1520、Ad-TD-RFP、Ad-TD-mIL12とAd-TD-hIL12を注射し、 $5 \times 10^9\text{pt/回}$ 、毎日一回、合計五回 (発売したアデノウイルス薬物H101の臨床応用案と一致するが、投薬量が20倍低い) となり、これから、腫瘍の大きさと腫瘍の清掃率を観察する。

【0036】

結果は、図3、図4と図5を参照して下さい。図3は、Ad-TD-hIL12がdl1520と対照ウイル

10

20

30

40

50

スAd-TD-RFPと比べると、より強い抗腫瘍効果を示すことを表す。図4は、Ad-TD-hIL12治療組動物の腫瘍成長プロセスが一番遅いのを説明する。図5は、Ad-TD-hIL12治療組動物の腫瘍清掃率が一番高く、100%に達し、但し、dI1520組、Ad-TD-RFP組の動物の腫瘍清掃率が、皆33.33%であることを説明する。

【0037】

実例4：低投薬量Ad-TD-hIL12、対照ウイルスとdI1520の体内抗腫瘍効果の比較である。

【0038】

ハムスターの腎臓癌モデルを使用し、5-6週間年齢のハムスターの背部右上側で 5×10^6 のHAK細胞を接種し、腫瘍が大きな体積(230 mm³)に成長する時、より低い投薬量の異なるウイルス(1×10^9 pt/回、五回治療)で腫瘍内にそれぞれPBS、dI1520とAd-TD-hIL12を注射してから、腫瘍の大きさと腫瘍の清掃率を観察した結果は図6、図7と図8である。図6は、低投薬量dI1520、対照ウイルスAd-TD-RFPとPBSが皆明らかな抗腫瘍能力を持っていないが、Ad-TD-hIL12が強い抗腫瘍能力を示すことを説明する。図7は、Ad-TD-hIL12治療組で動物の腫瘍成長プロセスが一番遅いのを説明する。図8は、Ad-TD-hIL12治療組動物の腫瘍清掃率が一番高く、71.43%に達し、但し、dI1520組とAd-TD-RFP組動物の腫瘍清掃率が皆0であることを説明する。

10

【0039】

実例5：Ad-TD-m/hIL12で、免疫力を有する腫瘍移植動物を治療した後、発生した腫瘍特異免疫能力である。

【0040】

実例3でm/hIL12治療組で、腫瘍が失ったハムスターは、腫瘍失ってから60日後、もともと腫瘍接種の反対側皮下でその他の腫瘍腎臓癌細胞を(ハムスター癌細胞HAK、 5×10^6 個)又は細胞数が元の2倍であるHPD1-nr細胞(2×10^6)を接種し、7日後、皆腫瘍組織は成長した。第13日、7個の再度HPD1-nr接種動物の中で、5個の腫瘍は失った。第103日で、依然として7個の中で5個の腫瘍は失った。発生した腫瘍の特異免疫能力比率が71.43%であり、但し、HAK接種の5個のハムスターは、ずっと皆接種腫瘍があり、腫瘍特異免疫能力比率が0である(図9参照)。

20

【0041】

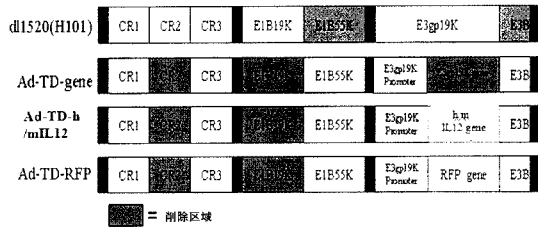
実例6：異なる投薬量Ad-TD-hIL12の膵臓癌腹腔拡散に対する治療作用である。

【0042】

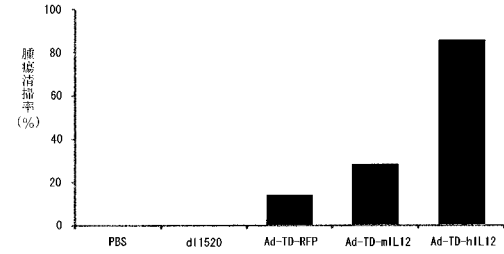
5-6週間年齢のハムスターに腹腔に 5×10^6 HPD1-nr細胞を注射し、7日後、治療を始め、毎日腹腔に異なる製剤を一回注射し、合わせて5日持続し、これから動物の生存状態と生存率を観察する。製剤注射は、PBS組の下で、それぞれAd-TD-hIL12 1×10^9 pt/回治療、Ad-TD-hIL12 2.5×10^9 pt/回治療とAd-TD-hIL12 5×10^9 pt/回治療である。PBS組とAd-TD-hIL12低投薬量(1×10^9 pt/回と 2.5×10^9 pt/回)の下で、動物は、腫瘍注射37日後全部悪質病、大量腹水と腹腔多発癌転移病巣に罹るが、Ad-TD-hIL12 5×10^9 pt/回治療組の動物は、生存が良好で、肝臓機能衰弱のような如何なる副作用がない。図10を参照して下さい。

30

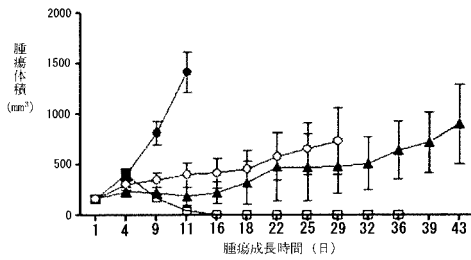
【 図 1 】



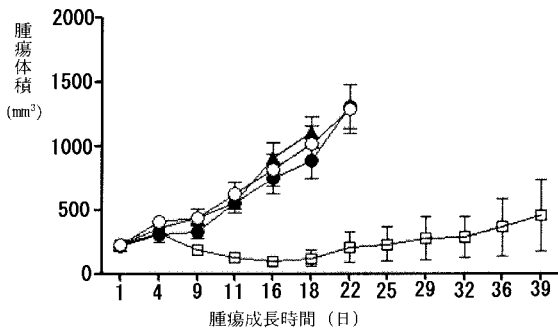
【 図 2 】



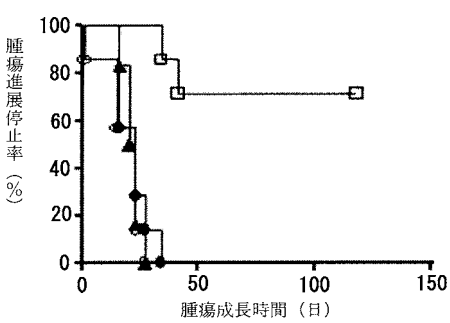
【 図 3 】



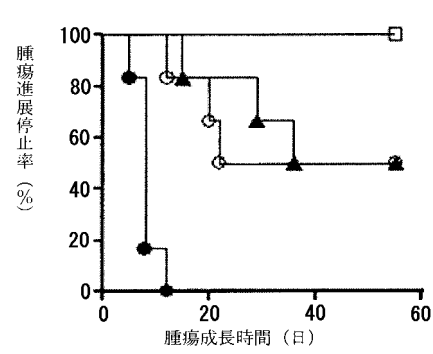
【 図 6 】



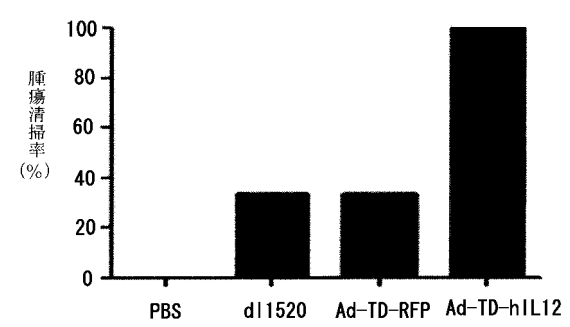
【 図 7 】



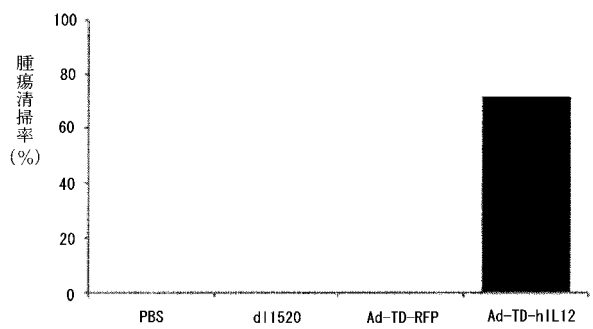
【 図 4 】



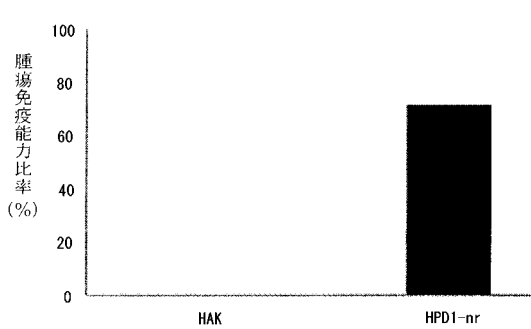
【 図 5 】



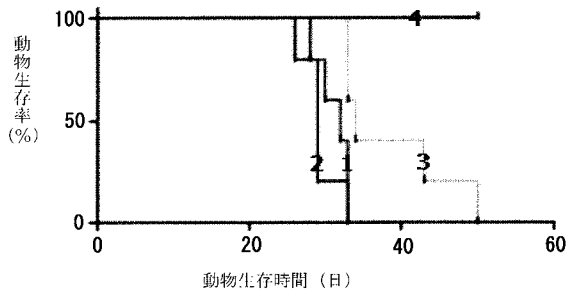
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2012/071754
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See the extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C12N, A61K, A61P, C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
DATABASES: CNABS, CPRSABS, CNTXT, CJFD, CNKI, DWPI, SIPOABS, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, EMBASE, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ+PDB		
SEARCH TERMS: CCTCC 2w V201031, Ad-TD-hIL12, oncolytic adenovirus??, adenovirus??, Ad5, interleukin 12, interleukin-12, IL12, IL-12, hIL12, hIL-12, rIL12, rhIL12, rhIL-12, p35, p40, E1A-CR2, E1ACR2, E1A 2w CR2, E1B19K, E1B-19K, E1B 2w 19K, E1B 2w 19KD, E1B 2w 19KDa, E3gp-19K, E3gp19K, E3gp 2w 19K, E3gp 2w 19KD, E3gp 2w 19KDa; sequence search on SEQ ID NOs: 1-4		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN102174479A (ZHENGZHOU UNIVERSITY), 7 September 2011 (07.09.2011), see claims 1-7, example 1	1-3,6-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date		“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		“&”document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 24 April 2012 (24.04.2012)	Date of mailing of the international search report 03 May 2012 (03.05.2012)	
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer ZHAO, Shuo Telephone No. (86-10) 62411070	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/071754

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN1258740A (SHANGHAI HUACHEN BIOLOGICAL TECHNOLOGY INST), 5 July 2000 (05.07.2000), see claims 1-9	1-3,6-8
A	CN1706955A (CHENGDU KANGHONG SCITECH INDU), 14 December 2005 (14.12.2005), see the whole document	1-3,6-8
A	CN1509764A (SHANGHAI LIFE SCI ACAD CHINESE ACAD SCI), 7 July 2004 (07.07.2004), see the whole document	1-3,6-8
A	WO2005086922A2 (BOARD OF REGENTS, UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM), 22 September 2005 (22.09.2005), see the whole document	1-3,6-8
A	ZHANG, Weiping et al. The construction and application of adenovirus vector coexpressing the heterodimer of human IL-12. Natl. Med. J. China, 31 January 1998 (31.01.1998), Vol. 78, No. 1, pages 33-36, ISSN 0376-2491, see the whole document	1-3,6-8
A	BORTOLANZA, Sergia et al. Treatment of pancreatic cancer with an oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 in Syrian hamsters. Molecular Therapy, 17 February 2009 (17.02.2009), Vol. 17, No. 4, pages 614-622, ISSN 1525-0016, see the whole document	1-3,6-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/071754

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
The international search was carried out on the basis of a sequence listing substitute sheet on paper filed on 12 April 2012 (12.04.2012).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/071754

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 4,5
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The oncolytic adenovirus of claim 2 is a specific viral vector, but the subunits p35 and p40 defined in claims 4 and 5 which refer to claim 2 are unspecific, therefore, claims 4 and 5 are unclear and do not meet the criteria set out in Article 6 PCT. Furthermore, the description does not provide sufficient evidence that said mutated p35 and p40 are able to archive the technical effect of the present invention, thus the subject matters to which the claims 4 and 5 might reasonably be expected to be directed after they had been amended can not be determined.
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

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

- Remark on protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/071754

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN102174479 A	07.09.2011	NONE	
CN1258740 A	05.07.2000	CN1094974 C	27.11.2002
CN1706955 A	14.12.2005	EP1767642 A1	28.03.2007
		JP2008501349 A	24.01.2008
		CN100361710 C	16.01.2008
		RU2361611 C2	20.07.2009
		US7951585 B2	31.05.2011
		JP4874247 B2	15.02.2012
		IN200607442 P1	24.08.2007
		IN241856 B	06.08.2010
		US2010047208 A1	25.02.2010
		CA2568995 C	21.02.2012
		WO2005121343 A1	22.12.2005
		BR200418805 A	16.10.2007
CN1509764 A	07.07.2004	CN1259106 C	14.06.2006
WO2005086922 A2	22.09.2005	US2009175830 A1	09.07.2009
		WO2005086922 A3	26.01.2006
		US2006147420 A1	06.07.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/071754

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

- C12N 7/01 (2006.01)i
- C12N 15/861 (2006.01)i
- C12N 15/24 (2006.01)i
- A61K 48/00 (2006.01)i
- A61P 35/00 (2006.01)i
- C12R 1/93 (2006.01)n

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2012/071754
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C12N, A61K, A61P, C12R		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
数据库: CNABS, CPRASBS, CNTXT, CJFD, CNKI, DWPI, SIPOABS, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, EMBASE, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ+PDB, 中国专利生物序列检索系统		
检索词: 溶肿瘤腺病毒, 溶瘤腺病毒, 腺病毒, 白细胞介素 12, 白细胞介素-12, 白介素 12, 白介素-12, CCTCC 2w V201031, Ad-TD-hIL12, oncolytic adenovirus??, adenovirus??, Ad5, interleukin 12, interleukin-12, IL12, IL-12, hIL12, hIL-12, rIL-12, rIL12, rhIL12, rhIL-12, p35, p40, E1A-CR2, E1ACR2, E1A 2w CR2, E1B19K, E1B-19K, E1B 2w 19K, E1B 2w 19KD, E1B 2w 19KDa, E3gp-19K, E3gp19K, E3gp 2w 19K, E3gp 2w 19KD, E3gp 2w 19KDa; 对 SEQ ID NOs: 1-4 的序列检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN102174479A (郑州大学), 7.9 月 2011 (07.09.2011), 参见权利要求 1-7, 实例 1	1-3,6-8
A	CN1258740A (上海华辰生物技术研究所), 5.7 月 2000 (05.07.2000), 参见权利要求 1-9	1-3,6-8
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 24.4 月 2012 (24.04.2012)		国际检索报告邮寄日期 03.5 月 2012 (03.05.2012)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 赵硕 电话号码: (86-10) 62411070

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/071754

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1、关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是在下列基础上进行的:

a. 序列表的提交或提供

 纸件形式 电子形式

b. 提交或提供时间

 包含在申请提交时的国际申请中 以电子形式与国际申请一起提交 为检索之用随后提交本单位

2、 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见

以 12.4 月 2012 (12.04.2012)提交的序列表纸件形式替换页作为检索基础。

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/071754**第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)**

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求:

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:

2. 权利要求: 4,5

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,

具体地说:

权利要求2的溶肿瘤腺病毒是一种特定的病毒载体, 而引用权利要求2的权利要求4和5限定的p35和p40亚基序列却是非特定的, 导致权利要求4和5的保护范围模糊不清, 不符合PCT第6条的规定。此外, 说明书没有提供足以证明所述变体p35和p40能够实现本发明技术效果的证据, 因此也无法确定出在对权利要求4和5进行修改后可能合理预期的保护主题。

3. 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何附加费。

3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。

申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间内缴纳异议费。

缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2012/071754

C(续). 相关文件		
类型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN1706955A (成都康弘科技实业集团有限公司), 14.12 月 2005 (14.12.2005), 参见全文	1-3,6-8
A	CN1509764A (中国科学院上海生命科学研究院), 7.7 月 2004 (07.07.2004), 参见全文	1-3,6-8
A	WO2005086922A2 (BOARD OF REGENTS, UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM), 22.9 月 2005 (22.09.2005), 参见全文	1-3,6-8
A	章卫平等, 双亚基共表达人白细胞介素 12 重组腺病毒载体的构建与应用. 中华医学杂志, 31.1 月 1998 (31.01.1998), 第 78 卷, 第 1 期, 第 33-36 页, ISSN 0376-2491, 参见全文	1-3,6-8
A	BORTOLANZA, Sergia 等, Treatment of pancreatic cancer with an oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 in Syrian hamsters. Molecular Therapy, 17.2 月 2009 (17.02.2009), 第 17 卷, 第 4 期, 第 614-622 页, ISSN 1525-0016, 参见全文	1-3,6-8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/071754

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102174479 A	07.09.2011	无	
CN1258740 A	05.07.2000	CN1094974 C	27.11.2002
CN1706955 A	14.12.2005	EP1767642 A1	28.03.2007
		JP2008501349 A	24.01.2008
		CN100361710 C	16.01.2008
		RU2361611 C2	20.07.2009
		US7951585 B2	31.05.2011
		JP4874247 B2	15.02.2012
		IN200607442 P1	24.08.2007
		IN241856 B	06.08.2010
		US2010047208 A1	25.02.2010
		CA2568995 C	21.02.2012
		WO2005121343 A1	22.12.2005
		BR200418805 A	16.10.2007
CN1509764 A	07.07.2004	CN1259106 C	14.06.2006
WO2005086922 A2	22.09.2005	US2009175830 A1	09.07.2009
		WO2005086922 A3	26.01.2006
		US2006147420 A1	06.07.2006

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/071754

A. 主题的分类

- C12N 7/01 (2006.01)i
- C12N 15/861 (2006.01)i
- C12N 15/24 (2006.01)i
- A61K 48/00 (2006.01)i
- A61P 35/00 (2006.01)i
- C12R 1/93 (2006.01)n

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 高冬玲

中華人民共和国河南省 鄭州市科学大道100号

(72)発明者 莱蒙・尼克

英国 倫敦市嘉德院廣場、瑪麗女王 - 倫敦大學、巴茲和 倫敦醫學和牙科學學院、癌
症研究所和英国癌症研究 臨床中心

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA26 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA03 EA04 GA11

HA01 HA08 HA09 HA11

4B065 AA95X AB01 AC20 BA02 CA44 CA60

4C087 AA01 AA03 BC83 NA14 ZB26