

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5213075号
(P5213075)

(45) 発行日 平成25年6月19日(2013.6.19)

(24) 登録日 平成25年3月8日(2013.3.8)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	7/00	(2006.01)	C 1 2 N	7/00	
C 1 2 Q	1/70	(2006.01)	C 1 2 Q	1/70	
A 6 1 B	5/055	(2006.01)	A 6 1 B	5/05	3 8 3
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	

請求項の数 22 (全 110 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-512192 (P2010-512192)	(73) 特許権者	504448184
(86) (22) 出願日	平成20年6月13日(2008.6.13)		ジェネラックス・コーポレーション
(65) 公表番号	特表2010-530745 (P2010-530745A)		Genelux Corporation
(43) 公表日	平成22年9月16日(2010.9.16)		アメリカ合衆国92109カリフォルニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/007377		州サンディエゴ、バンカー・ヒル・ストリ
(87) 国際公開番号	W02008/156655		ート3030番、スウィート310
(87) 国際公開日	平成20年12月24日(2008.12.24)	(73) 特許権者	593079070
審査請求日	平成22年4月8日(2010.4.8)		スローン・ケッタリング・インスティテュ
(31) 優先権主張番号	60/934,768		ート・フォー・キャンサー・リサーチ
(32) 優先日	平成19年6月15日(2007.6.15)		SLOAN-KETTERING INS
(33) 優先権主張国	米国 (US)		TITUTE FOR CANCER R
			ESEARCH
			アメリカ合衆国10021ニューヨーク州
			ニューヨーク、ヨーク・アベニュー127
			5番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍の画像化および/または処置のための微生物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ナトリウム依存性トランスポータータンパク質をコードするLister株である組み換えワクシニアウイルスを含む、対象内の腫瘍、創傷もしくは炎症組織の検出用、または腫瘍、創傷もしくは炎症組織の処置および検出用組成物であって、トランスポータータンパク質が、ナトリウム-ヨウ素共輸送体(NIS)である、組成物。

【請求項2】

トランスポータータンパク質が、ヒトナトリウム-ヨウ素共輸送体(hNIS)であるナトリウム-ヨウ素共輸送体である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

ウイルスがまた、治療剤をコードする、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

ウイルスによりコードされる治療剤が、抗癌剤および/または血管新生剤である、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

ワクシニアウイルスが、LIVP株ウイルスである、請求項1から4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】

トランスポータータンパク質をコードする核酸が、ヘマグルチニン(HA)、チミジンキナーゼ(TK)またはF14.5遺伝子もしくは遺伝座に挿入される、請求項1から5のいずれか1項に

10

20

記載の組成物。

【請求項 7】

ウイルスが、GLV-1h151、GLV-1h152およびGLV-1h153からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 8】

治療剤をコードする核酸が、トランスポーター遺伝子とは異なる遺伝子もしくは遺伝子座に挿入されており、ヘマグルチニン(HA)、チミジンキナーゼ(TK)またはF14.5遺伝子もしくは遺伝子座に挿入されている、請求項4に記載の組成物。

【請求項 9】

治療剤が、サイトカイン、ケモカイン、免疫調節分子、抗原、抗体もしくはその断片、アンチセンスRNA、プロドラッグ変換酵素、siRNA、血管新生阻害剤、毒素、抗腫瘍オリゴペプチド、細胞分裂阻害剤タンパク質、細胞分裂阻害オリゴペプチド、抗腫瘍性ポリペプチド抗生物質および組織因子から選択される、請求項8に記載の組成物。

10

【請求項 10】

治療剤が、一本鎖抗体(scFv)の抗体もしくはその断片である、請求項9に記載の組成物。

【請求項 11】

治療剤が、抗VEGF一本鎖抗体、プラスミノゲンK5ドメイン、ヒト組織因子- α 3-インテグリンRGD融合タンパク質、インターロイキン-24またはIL-6-IL-6受容体融合タンパク質である、請求項9に記載の組成物。

20

【請求項 12】

対象内の腫瘍、創傷もしくは炎症組織の検出用、または腫瘍、創傷もしくは炎症組織の処置および検出用組成物の製造のための、ナトリウム依存性トランスポータータンパク質をコードする組み換えワクシニアウイルスLister株の使用あって、トランスポータータンパク質が、ナトリウム-ヨウ素共輸送体(NIS)である、使用。

【請求項 13】

トランスポータータンパク質が、ヒトナトリウム-ヨウ素共輸送体(hNIS)であるナトリウム-ヨウ素共輸送体である、請求項12に記載の使用。

【請求項 14】

ウイルスがまた、治療剤をコードする、請求項12または13に記載の使用。

30

【請求項 15】

ウイルスによりコードされる治療剤が、抗癌剤および/または血管新生剤である、請求項14に記載の使用。

【請求項 16】

ワクシニアウイルスが、L1VP株ウイルスである、請求項12から15のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 17】

トランスポータータンパク質をコードする核酸が、ヘマグルチニン(HA)、チミジンキナーゼ(TK)またはF14.5遺伝子もしくは遺伝子座に挿入される、請求項12から16のいずれか1項に記載の使用。

40

【請求項 18】

ウイルスが、GLV-1h151、GLV-1h152およびGLV-1h153からなる群から選択される、請求項12に記載の使用。

【請求項 19】

治療剤をコードする核酸が、トランスポーター遺伝子とは異なる遺伝子もしくは遺伝子座に挿入されており、ヘマグルチニン(HA)、チミジンキナーゼ(TK)またはF14.5遺伝子もしくは遺伝子座に挿入されている、請求項15に記載の使用。

【請求項 20】

治療剤が、サイトカイン、ケモカイン、免疫調節分子、抗原、抗体もしくはその断片、アンチセンスRNA、プロドラッグ変換酵素、siRNA、血管新生阻害剤、毒素、抗腫瘍オリゴ

50

ペプチド、細胞分裂阻害剤タンパク質、細胞分裂阻害オリゴペプチド、抗腫瘍性ポリペプチド抗生物質および組織因子から選択される、請求項19に記載の使用。

【請求項21】

治療剤が、一本鎖抗体(scFv)の抗体もしくはその断片である、請求項20に記載の使用。

【請求項22】

治療剤が、抗VEGF一本鎖抗体、プラスミノゲンK5ドメイン、ヒト組織因子- α 3-インテグリンRGD融合タンパク質、インターロイキン-24またはIL-6-IL-6受容体融合タンパク質である、請求項20に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願

優先権の利益は、2007年6月15日に提出された米国仮出願番号60/934,768(Nanhai Chen, Yuman Fong, Aladar A. Szalay, Yong A. Yu and Qian Zhang、表題“MICROORGANISMS FOR IMAGING および/または TREATMENT OF TUMORS”)に対して主張されている。可能であれば、本出願の対象は、その全体を引用により本明細書の一部とする。

【0002】

本出願は、2008年6月13日に提出された米国出願番号12/157,960 (Nanhai Chen, Aladar A. Szalay, Yong A. Yu, Qian Zhang and Yuman Fong、表題“MICROORGANISMS FOR IMAGING および/または TREATMENT OF TUMORS”)に関連するものであり、それはまた、米国仮出願番号60/934,768に対する優先権を主張している。可能であれば、本出願の対象は、その全体を引用により本明細書の一部とする。

20

【0003】

発明の分野

本発明は、診断および治療のための修飾組み換えウイルスを提供する。修飾組み換えウイルスを用いた診断および治療法をまた提供する。

【背景技術】

【0004】

膵臓癌および悪性胸膜中皮腫のような癌は、非常に攻撃的な疾患である。米国での年間発生率は、2004年に、膵臓癌について~40,000症例および悪性中皮腫について~4,000症例であると概算されており、中皮腫については、アスベスト曝露がこの疾患の原因であるため、世界中で、特に、先進国で増加の傾向にある(Bianchi and Bianchi (2007) *Ind Health* 45: 379-87)。これらの腫瘍の両方は、標準的な治療に対して非常に耐性であり、5年生存率は、膵臓癌についてわずか5%、中皮腫について9%である。外科手術、化学療法および放射線を組み合わせたとしても、長期間無病状態になるのは、わずかな患者のみである(Adusumilli et al. (2006) *J Gene Med* 8:603-15)。

30

【0005】

腫瘍溶解性ウイルス療法が、過去一世紀にわたって研究および試験されており、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ニューカッスル病ウイルス、粘液腫ウイルス、ワクシニアウイルスおよび水疱性口内炎ウイルスを含む多くのウイルス型が、ヒト癌の処置のための新規薬剤として調べられている(Woo et al. (2006) *Curr Opin Investig Drugs* 7:549-59)。したがって、腫瘍に対して非常に高い選択性を有する有効な腫瘍診断および治療ウイルス剤が必要とされている。さらに、腫瘍溶解性ウイルス療法において、非侵襲的な画像化により、ウイルス分布、腫瘍標的化、増殖および持続性を追跡ならびにモニタリングするための試薬および方法を提供する必要性が存在し、それは、重要な安全性、効果および毒性データを提供する。そのようなリアルタイムモニタリングはまた、治療の最適化のための有用なウイルス用量および投与スケジュール情報を提供し、複数回にわたる繰り返しの組織生検の必要性を解消するであろう。

40

【発明の概要】

【0006】

50

要約

本発明は、腫瘍もしくは他の免疫特権組織、例えば、創傷および炎症組織に蓄積するが、他の組織には毒性レベルで蓄積しない、組み換えウイルス、特に、ワクシニアウイルス、例えば、LIVPを提供する。これらのウイルスは、例えば、非光学的画像法により検出可能なシグナルを放出する化合物の取り込みもしくは保持を促進するタンパク質をコードしている。取り込みもしくは保持を促進するタンパク質は、トランスポータータンパク質を含む。これらのウイルスはまた、対象内の腫瘍、創傷組織および炎症の処置のために使用することができる。取り込みもしくは保持される化合物は、治療化合物であり得るか、または、例えば、治療化合物と結合させることにより、治療活性を有するように修飾され得る。ウイルスは、検出、検出および処置、処置の検出およびモニタリングのために使用し得る。検出、検出および処置、処置の検出およびモニタリングのための方法が提供され、検出、検出および処置、処置の検出およびモニタリングのために組み換えウイルス、例えば、ワクシニアウイルスが使用される。

10

【0007】

本発明は、ナトリウム依存性トランスポータータンパク質をコードする組み換えワクシニアウイルスを提供する。ナトリウム依存性トランスポータータンパク質は、溶質輸送体5および溶質輸送体6トランスポータータンパク質ファミリーのタンパク質、例えば、ノルエピネフリントランスポーター(NET)およびナトリウム-ヨウ素共輸送体(NIS) (ヒトノルエピネフリントランスポーター(hNET)およびヒトナトリウム-ヨウ素共輸送体(hNIS)を含む)ならびにそのアレルおよび種変異型および他の変異型(本明細書で開示したものと少なくとも約、もしくは少なくとも60、65、70、75、80、85、88、90、91、92、93、94、95、96、97、98および99%の割合もしくはより多くの配列同一性を有する任意のものを含む)を含む。これらは、本明細書で提供される方法のために十分なトランスポーター活性を保持する修飾型を含む。

20

【0008】

組み換えワクシニアウイルスは、請求項1-5のいずれか1項に記載のものを含み、それは、Lister株ウイルス、例えば、LIVP株である。トランスポータータンパク質をコードする核酸は、ウイルス内の任意の場所に挿入することができ、その結果、該ウイルスは、対象内でそれを発現し、複製する。例示的な態様において、トランスポータータンパク質をコードする核酸は、非本質的な遺伝子座もしくは遺伝子、例えば、ヘマグルチニン(HA)、チミジンキナーゼ(TK)またはF14.5遺伝子もしくは遺伝座に挿入される。そのようなウイルスの例は、本明細書で提供されるものであり、GLV-1h99、GLV-1h100、GLV-1h101、GLV-1h139、GLV-1h146、GLV-1h150、GLV-1h151、GLV-1h152およびGLV-1h153を含む。これらのウイルスはさらに、治療タンパク質をコードするように修飾され得る。一般に、該コード核酸は、トランスポータータンパク質をコードする核酸とは異なる遺伝子座に挿入される。治療剤の例は、抗癌剤および抗血管新生剤を含むが、これらに限定されない。治療剤は、サイトカイン、ケモカイン、免疫調節分子、抗原、抗体もしくはその断片、アンチセンスRNA、プロドラッグ変換酵素、siRNA、血管新生阻害剤、毒素、抗腫瘍オリゴペプチド、細胞分裂阻害剤タンパク質、細胞分裂阻害オリゴペプチド、抗腫瘍性ポリペプチド抗生物質および組織因子、例えば、一本鎖抗体(scFv)(抗VEGF一本鎖抗体、プラスミノゲンK5ドメイン、ヒト組織因子- α 3-インテグリンRGD融合タンパク質、インターロイキン-24またはIL-6-IL-6受容体融合タンパク質を含む)、およびトランスポータータンパク質のための基質の融合タンパク質、ならびに治療剤、例えば、化学療法化合物もしくは毒素を含むが、これらに限定されない。ウイルスは、複数の治療剤および/またはトランスポータータンパク質をコードし得る。

30

40

【0009】

本発明はまた、本明細書で提供される1種またはそれ以上の組み換えウイルス、特に、ワクシニアウイルス、およびトランスポーターを発現する細胞に輸送される基質および/または抗腫瘍性化合物を含む組み合わせ物を提供する。基質は、検出可能であるか、または検出可能シグナルを誘導するか、または検出可能であるか、もしくは検出可能シグナル

50

、例えば、電磁放射を誘導するように修飾され得る。基質は、放射性標識され得て、それは、細胞毒性剤、例えば、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、光増感剤、毒素、抗腫瘍性抗生物質、化学療法化合物、放射性核種、血管新生阻害剤、シグナル伝達モジュレーター、代謝拮抗剤、抗腫瘍性ワクチン、抗腫瘍性オリゴペプチド、細胞分裂阻害剤タンパク質、細胞分裂阻害オリゴペプチド、抗腫瘍性抗体、抗腫瘍性抗生物質、免疫治療剤、細菌およびそれらの任意の組み合わせと結合し得る。

【0010】

結合は、化学的であり得るか、または基質および細胞毒性剤がタンパク質であるとき、融合タンパク質であり得る。結合は、直接もしくはリンカーによるものであり得る。細胞毒性剤の例は、放射性標識物、細胞毒素および化学療法剤ならびに細胞毒性剤を含むが、これらに限定されない。細胞毒性剤の例は、二本鎖リシン、リシンA鎖、アプリン、アプリンA鎖、サボリン、モデシン、モデシンA鎖、緑濃菌エンドトキシン、コレラ毒素、赤痢菌毒素、大腸菌熱不安定毒素およびジフテリア毒素、ドキシソルピシン、ダウノマイシン、5-フルオロウラシル、メトトレキサート、タキソール、リシンA、コルヒチン、サイトカラシン、モネンシン、ウアバイン、ミトキサントロン、ビンデシン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、エンテロトキシン、シスプラチン、カルボプラチン、ゲムシタピン、イリノテカン、抗EGFR抗体および抗VEGF抗体を含むが、これらに限定されない。結合に加えて、基質および細胞毒性剤は、分離することができ、別々に投与し得る。タンパク質性細胞毒性剤および抱合体はまた、ウイルスにより発現させることができる。組み合わせにおいて、基質およびウイルスは、単一組成物として、または2つの組成物中に別々に製剤化され得る。また、組み合わせ物および所望による試薬および組み合わせ物の使用のための他の構成成分およびその使用のための指示書を含むキットが提供される。

【0011】

また、本明細書に記載した組み換えウイルスおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。それらは、局所もしくは全身投与を含む任意の投与型について、製剤化され得る。

【0012】

本明細書に記載した組み換えウイルスはまた、天然痘ワクチンを含むワクチンであり得る。

【0013】

また、本発明は、本明細書に記載した任意のウイルスを腫瘍および/または内部創傷または炎症を患うことが疑われる対象に投与することにより実施される、対象内の腫瘍、炎症または創傷を画像化もしくは検出する方法を提供する。本発明の方法の実施に際して、ウイルスは、ウイルスによりコードされたトランスポーターを発現する細胞に輸送される基質と共に、もしくは連続して、もしくは間欠的に投与される。基質またはその蓄積を検出することができ、それにより、腫瘍、創傷および/または炎症を検出もしくは画像化し得る。検出および画像化は、蛍光画像、磁気共鳴画像法(MRI)、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法(SPECT)、ポジトロン断層法(PET)、シンチグラフィ、カメラ、+ 検出器、線検出器およびその組み合わせにより行われ得る。

【0014】

本発明は、処置方法を提供する。該方法は、本明細書に記載した任意のウイルスを処置が有効な対象に投与することにより実施される。処置は、ウイルス、特に、ワクシニアウイルスの投与が有効である任意の疾患もしくは障害について実施され得る。そのような疾患および障害は、腫瘍および癌および/または転移部を含む。該方法はさらに、ウイルスによりコードされたトランスポーターを発現する細胞に輸送される基質を投与することを含む。基質自身は、治療的であるか、またはそれは、治療剤と結合しており、その結果、処置が有効であり得る。基質は、ウイルスの前に、後に、もしくはそれと同時に投与され得るか、またはそれは、投与される核酸により、例えば、それをコードする他のウイルスもしくは他のベクターによりコードされることが可能である。基質は、上記したとおり、細胞毒性剤と結合し得る。

【0015】

処置の方法のために、ウイルスは、全身的、静脈内、動脈内、腫瘍内、内視鏡的、外傷内、筋肉内、皮内、腹腔内、小胞内、関節内、胸腔内、経皮的に、皮下、経口、非経腸、粘膜、鼻腔内、気管内、吸入、頭蓋内、前立腺内、硝子体内、局所的、眼内、腔内および直腸内を含む任意の適当な経路により投与され得る。ウイルスまたはウイルスおよび基質は、抗癌剤または処置剤と共に投与され得る。抗癌剤または処置剤は、ウイルスまたはウイルスおよび基質と共に、その前に、もしくは後に、もしくは同時に、もしくは間欠的に投与され得る。抗癌剤は、上記した任意のものを含み、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、光増感剤、毒素、抗腫瘍性抗生物質、化学療法化合物、放射性核種、血管新生阻害剤、シグナル伝達モジュレーター、代謝拮抗剤、抗腫瘍性ワクチン、抗腫瘍性オリゴペプチド、細胞分裂阻害剤タンパク質、細胞分裂阻害オリゴペプチド、抗腫瘍性抗体、抗腫瘍性抗生物質、免疫治療剤、異常高熱もしくは温熱療法、細菌、放射線療法およびそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない。

10

【0016】

抗癌剤の例は、シスプラチン、カルボプラチン、ゲムシタピン、イリノテカン、抗EGFR抗体および抗VEGF抗体を含む。抗癌治療の例は、放射線を含む。抗癌剤もしくは治療での処置は、任意の順序で、ウイルスまたはウイルスおよび/または基質と共に、同時にもしくは間欠的に投与され得る。ウイルスおよび基質および抗癌剤は、別々に投与され得るか、または1もしくは2つの組成物で組み合わせ得る。したがって、ウイルスおよび抗癌剤は、単一組成物として、または2つの組成物として投与されるか、またはウイルス、基質および抗癌剤が、単一組成物で、または基質、ウイルスおよび抗癌剤のうちの2つを含む2つの組成物で、または3つの組成物で投与され得る。

20

【0017】

ウイルス、もしくはウイルスおよび基質、もしくはウイルス、基質および抗癌剤の投与、または治療により処置され得る腫瘍は、膀胱癌、乳癌、前立腺癌、癌腫、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨肉腫、脳腫瘍、CNS癌、神経膠腫、子宮頸癌、絨毛腫、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌、上皮内腫瘍、腎臓癌、咽頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、腎癌、呼吸器系の癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌および泌尿器系の癌、例えば、リンパ肉腫、骨肉腫、乳癌、肥満細胞腫、脳腫瘍、黒色腫、腺扁平上皮癌、カルチノイド肺癌、気管支腺腫瘍、細気管支腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、線維腫、粘液軟骨腫、肺肉腫、神経肉腫、骨腫、乳頭腫、網膜芽細胞腫、ユーイング肉腫、ウィルムス腫瘍、パーキットリンパ腫、小膠細胞腫、神経芽細胞腫、骨巨細胞腫、口腔腫瘍、線維肉腫、骨肉腫および横紋筋肉腫、性器扁平上皮癌、可移植性性器腫瘍、精巣癌、精上皮腫、セルトリ細胞腫、血管周囲細胞腫、組織球腫、緑色腫、顆粒球性肉腫、角膜乳頭腫、角膜扁平上皮癌、血管肉腫、胸膜中皮腫、基底細胞腫、胸腺腫、胃癌、副腎腫瘍、口腔乳頭腫症、血管内皮腫炎、嚢胞腺腫、濾胞性リンパ腫、腸管リンパ肉腫、線維肉腫、および肺扁平上皮癌、白血病、血管周囲細胞腫、眼癌、包皮線維肉腫、潰瘍性扁平上皮癌、包皮癌、結合組織新生物、肥満細胞腫、肝細胞癌、リンパ腫、肺腺腫症、肺肉腫、ラウス肉腫、細網内皮症、線維肉腫、腎芽細胞腫、B細胞リンパ腫、リンパ性白血病、網膜芽細胞腫、肝臓腫瘍、リンパ肉腫、形質細胞性白血病、うきぶくろ肉腫(サカナでの)、乾酪性リンパ節炎、肺癌、インスリノーマ、リンパ腫、肉腫、神経腫、膵島細胞腫瘍、胃MALTリンパ腫ならびに胃腺癌を含むが、これらに限定されない。

30

40

【0018】

抗ウイルス剤は、上記の処置のいずれかと共に、同時に、もしくは連続して投与され得る。抗ウイルス剤は、シドフォビル、シドフォビルのアルコキシアルキルエステル、グリベック、ガンシクロビル、アシクロビルおよびST-26を含むが、これらに限定されない。

【0019】

本発明は、処置および検出法を提供する。ウイルスまたはウイルスおよび抗癌剤または

50

治療は、ウイルスによりコードされたトランスポーターを発現する細胞に輸送される検出可能基質もしくはシグナルを誘導する基質を、連続して、もしくは同時に投与され、次いで、基質または基質の蓄積を検出することができる。したがって、処置および検出は、有効であり得る。画像化を含む検出は、特に、検出が、基質蓄積のパターン変化をモニターするのに長時間有効であるとき、処置をモニターするために使用し得る。効果的な処置は、より少ない基質の蓄積を生じるか、またはより多くの局在化蓄積もしくは他のパターンは、腫瘍サイズもしくは転移もしくは腫瘍処置の他の指標の減少と相関するであろう。

【0020】

処置または処置および検出法の実施において、ウイルスは、治療剤、例えば、抗癌治療剤をコードすることが可能である。本明細書に記載したウイルス、特に、ワクシニアウイルスが、さらなる治療剤の非存在下で処置を有効にするので、そのような薬剤の包含は任意である。

10

【0021】

また、細胞、特に、単離細胞(本明細書に記載した任意のウイルスを包含する腫瘍細胞を含む)が提供される。細胞は、処置用医薬組成物で提供され得る。対象の癌の処置または癌の処置もしくは癌、腫瘍、転移、創傷および/または炎症の検出用医薬組成物の製造のための本明細書に記載したウイルスの使用を提供する。そのような使用のためのウイルスを含む組成物がまた、提供される。組成物および使用は、基質またはウイルスによりコードされたトランスポータータンパク質を発現する細胞に輸送され得る基質を含む抱合体を含み得る。組成物は、所望により、本明細書に記載したウイルスおよび/または基質または抱合体に加えて、抗腫瘍性化合物を含み得る。抗腫瘍性化合物は、本明細書に記載したすべてのものを含み、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、光増感剤、毒素、抗腫瘍性抗生物質、化学療法化合物、放射性核種、血管新生阻害剤、シグナル伝達モジュレーター、代謝拮抗剤、抗腫瘍性ワクチン、抗腫瘍性オリゴペプチド、細胞分裂阻害剤タンパク質、細胞分裂阻害オリゴペプチド、抗腫瘍性抗体、抗腫瘍性抗生物質、免疫治療剤、異常高熱もしくは温熱療法、細菌およびそれらの組み合わせ、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、ゲムシタピン、イリノテカン、抗EGFR抗体および抗VEGF抗体を含むが、これらに限定されない。

20

【0022】

詳細な説明

30

概略

A. 定義

B. 処置および診断のためのウイルス

C. トランスポータータンパク質

1. ナトリウムおよび塩素依存性神経伝達物質トランスポーターファミリー

a. ノルエピネフリントランスポーター

i. 構造

ii. 機能

2. ナトリウム-グルコース共輸送体ファミリー

a. ナトリウム-ヨウ素共輸送体

i. 構造

ii. 機能

40

D. トランスポーターをコードする修飾化ウイルスを評価する方法

1. インビトロ評価

2. インビボ評価

3. 基質の選択

E. 提供されるウイルスのさらなる修飾

1. ウイルス遺伝子の修飾

2. さらなる異種遺伝子の発現

a. 検出可能遺伝子産物

50

b. 治療的遺伝子産物	
c. スーパー抗原	
d. 収集される遺伝子産物	
e. 異種遺伝子発現の制御	
F. 修飾化ウイルスの製造法	
1. 遺伝学的修飾	
2. 修飾化ウイルスのスクリーニング	
【 0 0 2 3 】	
G. 提供されるウイルスの例示的特性	
1. 弱毒化	10
a. 弱毒化された毒性	
b. 実質的に他の器官ではなく、腫瘍への蓄積	
c. 腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導するか、または促進する能力	
d. 病原性と腫瘍抗原の放出とのバランス	
2. 免疫原性	
3. 複製能	
4. 遺伝学的変異型	
H. 医薬組成物、組み合わせおよびキット	
1. 医薬組成物	
2. 宿主細胞	20
3. 組み合わせ	
4. キット	
I. 診断および治療法	
1. 投与	
a. ウイルスを投与する前の工程	
b. 投与形態	
c. 用量	
d. 投与回数	
e. 共投与	
i. 複数のウイルスの投与	30
ii. 治療化合物	
iii. 免疫学的治療および生物学的治療	
f. 対象の状態	
2. モニタリング	
a. ウイルス遺伝子発現のモニタリング	
b. 腫瘍サイズのモニタリング	
c. 抗体力価のモニタリング	
d. 一般的な健康診断のモニタリング	
e. 処置と関連するモニタリング	
K. 他の微生物および細胞	40
L. 実施例	
【 0 0 2 4 】	
A. 定義	
他に記載がなければ、本明細書で使用されるすべての技術および科学用語は、本願の発明者らが属する分野の当業者により通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書の全体の開示を通して記載されたすべての特許、特許出願、出願公開および公開物、ウェブサイトならびに他の公開物は、他に記載がなければ、それらの全体を引用により本明細書の一部とする。本明細書の用語について複数の定義が存在する場合には、この節に記載したものが優先される。URLまたは他のそのような識別子またはアドレスを参照する場合に、該識別子は変化し得て、インターネット上の特定の情報は定まっていなくても、同等の情	50

報は既知であり、例えば、インターネットおよび/または適当なデータベースを探索することにより、容易にアクセス可能であり得ることが理解される。その参照は、そのような情報の利用性および公の普及を証明する。

【 0 0 2 5 】

本明細書で使用される“トランスポーター”は、膜輸送タンパク質である。トランスポーターは、生体膜を超えて、イオン、小分子、または巨大分子、例えば、他のタンパク質の移動に関与する。トランスポーターは、細胞外膜または膜結合細胞内コンパートメント、例えば、核、小胞体およびミトコンドリアに局在し得る。トランスポーターは、一般に、1種もしくはそれ以上の基質について相対的に高い特異性を示し、それらの化学もしくは電気化学ポテンシャル勾配に対して溶質を輸送することができる。それらは、温度ムーブメントを超えたエネルギーの入力なしに機能するか(促進もしくは媒介拡散)、もしくは H^+ および Na^+ の電気化学ポテンシャル勾配により誘導されるか、もしくはさまざまな発エルゴニックな化学および光化学反応により誘導され得る。トランスポーターについての参照は、Transport Classification (TC)系(Saier et al., (2006) Nucleic Acids Research 34(Database Issue):D181-D186)を用いて分類され得る、任意のタンパク質、そのアレルおよび種変異型、ならびにその他の任意の変異型を含む。そのようなタンパク質は、例えば、公のデータベース、例えば、Transport Classification Database (TCDB; www.tcdb.org)を用いて、容易に同定される。

10

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用される“共輸送体”は、2種の化学種を同じ方向に移動させ、それらのうちの少なくとも一方は、イオン性であり、その電気化学ポテンシャル勾配により駆動されるトランスポーターである。

20

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用されるノルエピネフリントランスポーターまたはNETは、シナプス前末端への高親和性再取り込みにより、細胞外間隙からノルエピネフリン(NE)を除去する、トリウムおよび塩素依存性神経伝達物質共輸送体を意味する。NETはまた、“ナトリウム依存性ノルアドレナリントランスポーター”、“ノルアドレナリン: Na^+ 共輸送体”、“SLC6A2”、“TC 2.A.22.1.2”および“溶質輸送体ファミリー6(神経伝達物質トランスポーター、ノルアドレナリン)メンバー2”と呼ばれる。NETは、ナトリウムおよび塩素依存性神経伝達物質トランスポーターファミリー(溶質輸送体ファミリー6; SLC6)(また、ナトリウム/神経伝達物質共輸送体ファミリー(SNF)または神経伝達物質/ナトリウム共輸送体ファミリー(NSS)として既知である)のメンバーであり、それは、TC系を用いて、TC 2.A.22に相当する。ノルエピネフリントランスポーターは、ヒト起源のもの(hNET)および非ヒト起源のものを含む。非ヒトノルエピネフリントランスポーターの例は、ウシ(配列番号27)、マウス(配列番号28)、ラット(配列番号29)、アカゲザル(配列番号30)、ニワトリ(配列番号31)、ヒツジ(断片)(配列番号32)および日本ウズラ(断片)(配列番号33)のノルエピネフリントランスポーターを含むが、これらに限定されない。

30

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用されるhNETは、ヒトノルエピネフリントランスポーターを意味する。例えば、hNETは、配列番号26で示される野生型hNET、C末端変異型(配列番号61および62)、アレル変異型(配列番号45-60)およびその他の任意の変異型(当分野で既知のすべての変異型を含む)を含み、それは、配列番号26で示されるポリペプチドと少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

40

【 0 0 2 9 】

ノルエピネフリントランスポーターまたはNETについての参照は、野生型ポリペプチド、活性を有するその切断型を含み、そしてアレル変異型および種変異型、スプライシング変異型によりコードされる変異型、ならびに他の変異型を含み、それは、配列番号26で示されるポリペプチドもしくはその成熟型と少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するポリ

50

ペプチドを含む。ノルエピネフリントランスポーターはまた、化学的もしくは翻訳後修飾を含むものおよび化学的もしくは翻訳後修飾を含まないものを含む。そのような修飾は、ペグ化、アルブミン化、グリコシル化、ファルネシル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化、リン酸化、および当分野で既知の他のポリペプチド修飾を含むが、これらに限定されない。ノルエピネフリントランスポーターについての参照はまた、ノルエピネフリントランスポーターまたは活性を保持するその部分を含む融合タンパク質を含み得る。

【0030】

本明細書で使用されるナトリウム-ヨウ素共輸送体もしくはNISは、側底細胞膜を介して、甲状腺上皮細胞および他の選択細胞にヨウ素(I^-)を輸送するイオンポンプである。NISはまた、“ナトリウム/ヨウ素共輸送体”、“ $Na(+)/I(-)$ 共輸送体”、“SLC5A5”、“TC 2.A.21.5.1”および“溶質輸送体ファミリー-5メンバー-5”と呼ばれる。NISは、ナトリウム/グルコース共輸送体ファミリー(溶質輸送体ファミリー-5; SLC5)のメンバーであり、また、ナトリウム/溶質共輸送体ファミリー(SSSF)またはTC系を用いて、TC 2.A.21として既知である。ナトリウム-ヨウ素共輸送体は、ヒト起源のもの(hNIS)および非ヒト起源のものを含む。非ヒトナトリウム-ヨウ素共輸送体の例は、マウス(配列番号65)、ラット(配列番号66)、ゼブラフィッシュ(配列番号67)、およびアフリカツメガエル(配列番号68)のナトリウム-ヨウ素共輸送体を含むが、これらに限定されない。

10

【0031】

本明細書で使用されるhNISは、ヒトナトリウム-ヨウ素共輸送体を意味する。例えば、hNISは、配列番号63で示される野生型hNET、アレル変異型(配列番号87-94)およびその他の任意の変異型(当分野で既知のすべての変異型(例えば、国際公開WO2004000236を参照)を含む)を含み、それは、配列番号63で示されるポリペプチドと少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

20

【0032】

ナトリウム-ヨウ素共輸送体またはNISについての参照は、野生型ポリペプチド、活性を有するその切断型を含み、そしてアレル変異型および種変異型、スプライシング変異型によりコードされる変異型、ならびに他の変異型を含み、それは、配列番号63で示されるポリペプチドもしくはその成熟型と少なくとも40%、45%、50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。ナトリウム-ヨウ素共輸送体はまた、化学的もしくは翻訳後修飾を含むものおよび化学的もしくは翻訳後修飾を含まないものを含む。そのような修飾は、ペグ化、アルブミン化、グリコシル化、ファルネシル化、カルボキシル化、ヒドロキシル化、リン酸化、および当分野で既知の他のポリペプチド修飾を含むが、これらに限定されない。ナトリウム-ヨウ素共輸送体についての参照はまた、ナトリウム-ヨウ素共輸送体または活性を保持するその部分を含む融合タンパク質を含む。

30

【0033】

本明細書で使用される“ウイルス”は、ウイルスとして示される巨大な集団の実体のいずれかを意味する。ウイルスは、一般に、遺伝学的材料のRNAもしくはDNAコアを取り巻くタンパク質被覆(半透性の膜ではない)を含み、生細胞でのみ成長および増殖することができる。本明細書で提供される方法での使用のためのウイルスは、ポックスウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ニューカッスル病ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ムンプスウイルス、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、レオウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ハンタウイルス、粘液腫ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、レンチウイルス、およびすべての植物もしくは昆虫ウイルスを含むが、これらに限定されない。

40

【0034】

本明細書で使用される“ウイルスベクター”なる用語は、その分野で認識される意味にしたがって使用される。それは、ウイルス起源の少なくとも1種のエレメントを含み、ウイルスベクター粒子にパッケージされ得る、核酸ベクター構築体を意味する。ウイルスベ

50

クター粒子は、インビトロまたはインビボで、DNA、RNAもしくは他の核酸を細胞へ導入する目的で使用され得る。ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター(例えば、HSV)、バキュロウイルスベクター、サイトメガロウイルス(CMV)ベクター、パピローマウイルスベクター、シミアンウイルス(SV40)ベクター、セムリキ森林熱ウイルスベクター、ファージベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを含むが、これらに限定されない。

【0035】

本明細書で使用される、遺伝子に関して“修飾”なる用語は、欠失遺伝子、1種もしくはそれ以上の切断、突然変異、挿入もしくは欠失を含む遺伝子産物をコードする遺伝子、または挿入される(染色体もしくはプラスミド、ファージミド、コスミド、およびファージ中に)遺伝子産物をコードする遺伝子であり、一般には、修飾化遺伝子産物もしくはウイルスの機能において少なくとも1つの変化を伴うものを意味する。

10

【0036】

本明細書で使用される“修飾化ウイルス”なる用語は、ウイルスの親株に関して改変されているウイルスを意味する。典型的な修飾化ウイルスは、ウイルスのゲノム中に、1種またはそれ以上の切断、突然変異、挿入または欠失を有する。修飾化ウイルスは、1種またはそれ以上の修飾された内在性ウイルス遺伝子および/または1種またはそれ以上の修飾された遺伝子間領域を有し得る。例えば、修飾化ウイルスは、ウイルスゲノム中に挿入された1種またはそれ以上の異種核酸配列を有し得る。修飾化ウイルスは、異種遺伝子の発

20

【0037】

本明細書で使用される、異種核酸分子を含むウイルスに関して異種核酸分子の修飾は、核酸分子の切断、突然変異、挿入または欠失を含む、異種核酸分子の任意の改変を意味する。異種核酸分子における欠失は、異種核酸分子の全部または一部を含み得る。例えば、異種核酸分子が5000塩基対長の二本鎖DNA分子であるとき、異種核酸分子の欠失は、異種核酸分子の1、2、3、4、5またはそれ以上、10またはそれ以上、50またはそれ以上、100またはそれ以上、500またはそれ以上、1,000またはそれ以上、または5,000塩基対の欠失を含み得る。核酸分子の全部または一部の欠失はまた、異種核酸分子の他の核酸分子での置換を含み得る。異種核酸分子の修飾はまた、ウイルスゲノムの改変を含み得る。例えば、ウイルスゲノムからの異種核酸の全部または一部の欠失(例えば、相同組み換えによる)はまた、ウイルスゲノムの一部である欠失部位を取り巻く核酸の欠失を含み得る。同様に、相同組み換えによるさらなる異種核酸分子のウイルスゲノムへの挿入は、例えば、ウイルス遺伝子の全部または一部の欠失を含み得る。異種核酸分子の修飾が、挿入であるとき、さらなる核酸分子は、異種核酸分子中に、または核酸分子に隣接して挿入され得る。一般には、相同組み換えによる挿入は、異種核酸分子の全部または一部の他の核酸分子での置換を含む。

30

【0038】

本明細書で使用される“治療ウイルス”なる用語は、疾患または障害、例えば、癌、腫瘍および/もしくは転移もしくは炎症もしくは創傷の処置またはその診断およびその両方のために投与されるウイルスを意味する。治療ウイルスは、典型的には、例えば、それを弱毒化するように修飾される。他の修飾は、ウイルスゲノム中の1種またはそれ以上の挿入、欠失または突然変異を含む。治療ウイルスのすべては、ウイルスの毒性を弱毒化するような1種もしくはそれ以上の内因性ウイルス遺伝子の修飾、または1種もしくはそれ以上の遺伝子間領域の修飾を含み得て、それは、所望により、異種治療的遺伝子産物および/または検出可能タンパク質を発現し得る。治療ウイルスは、治療的遺伝子産物および/または検出可能タンパク質の発現のための1種もしくはそれ以上の遺伝子発現カセットを含む、異種核酸分子を含み得る。治療ウイルスは、複製能を有するウイルス(例えば、腫瘍溶解性ウイルス)または複製欠損ウイルスであり得る。

40

50

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用される、診断のために検出および使用され、治療的であり得るウイルスは、治療診断ウイルスである。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用される“治療的遺伝子産物”または“治療的ポリペプチド”は、疾患もしくは障害の症状を軽減するか、または疾患もしくは障害を軽減する、治療ウイルスにより発現される任意の異種タンパク質を意味する。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用される“免疫特権細胞および組織”なる句は、免疫系から隔離された細胞および組織、例えば、固形腫瘍および創傷組織を意味する。

10

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用される選択的蓄積は、第2の位置における蓄積よりも、より高いレベルでの第1の位置におけるウイルスの蓄積を意味する。したがって、正常組織もしくは器官と比較して、免疫特権組織、例えば、腫瘍に選択的に蓄積するウイルスは、ウイルスが正常組織もしくは器官に蓄積するよりも、免疫特権組織、例えば、腫瘍に、高レベルまたは高濃度で蓄積するウイルスを意味する。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される、ウイルスの毒性を弱毒化することは、非弱毒化ウイルスと比較して、ウイルス投与時の宿主に対する有害もしくは毒性効果を減少もしくは除去することを意味する。本明細書で使用される低い毒性を有するウイルスは、ウイルスを投与したときに、器官に対する損傷もしくは害を生じる程には、宿主の器官および組織に蓄積しないウイルス、または処置される疾患よりも、大きな程度で宿主の生存に影響を与えるウイルスを意味する。本明細書での目的のために、毒性の弱毒化は、毒素の弱毒化および病原性の弱毒化と交換可能に使用される。

20

【 0 0 4 4 】

ウイルスに関連して、本明細書で使用される“毒性”なる用語は、ウイルスが投与された対象に害を及ぼすウイルスの能力を意味する。

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される、ウイルスに関する毒性および病原性は、ウイルスが投与された対象において、疾患を生じるか、もしくは該対象に害を与える能力を意味する。したがって、本明細書の目的のために、ウイルスに関する毒性、毒素および病原性なる用語は、交換可能に使用される。

30

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される、腫瘍もしくは他の免疫特権部位で産生される化合物は、1種もしくはそれ以上の遺伝子産物を発現する導入ウイルス、一般には、組み換えウイルスの存在により腫瘍もしくは腫瘍環境で産生される任意の化合物を意味する。例えば、腫瘍で産生される化合物は、例えば、コード化ポリペプチド、例えば、組み換えポリペプチド(例えば、トランスポーター、細胞表面受容体、サイトカイン、ケモカイン、アポトーシスタンパク質、細胞分裂阻害剤タンパク質、細胞分裂阻害オリゴペプチド、抗血管新生因子、一本鎖抗体、毒素、腫瘍抗原、プロドラッグ変換酵素)、RNA(例えば、リボザイム、RNAi、siRNA)、またはコード化ポリペプチドにより、およびある例では、腫瘍または免疫特権組織もしくは細胞の細胞機構により産生される化合物(例えば、代謝産物、変換されたプロドラッグ)であり得る。

40

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用される、投与用送達ビヒクルは、リピドに基づくか、もしくは他のポリマーに基づく組成物、例えば、リポソーム、ミセルもしくは逆ミセルを意味し、それは、薬剤と、例えば、宿主動物への送達のために本明細書に記載したウイルスと結合している。

【 0 0 4 8 】

本明細書で使用される疾患または障害は、例えば、感染もしくは遺伝学的欠損から生じ

50

、特定可能な症状により特徴づけられる生物の病的状態を意味する。

【0049】

本明細書で使用される処置は、状態、障害または疾患の症状が軽減されるか、または有効に改変されるすべての方法を意味する。処置はまた、本明細書に記載したウイルスのすべての医薬的使用を包含する。

【0050】

本明細書で使用される、例えば、特定の医薬組成物の投与による特定の障害の症状の改善もしくは軽減は、永久もしくは一時的、持続的もしくは一過的であるかにかかわらず、組成物の投与に起因するか、もしくはそれと関連し得るすべての緩和を意味する。

【0051】

本明細書で使用される、特定の疾患を処置するためのウイルスもしくは化合物の有効量は、疾患と関連する症状を軽減させるか、またはある方法においては、それらを減少させるのに十分な量である。そのような量は、単一用量として投与されるか、またはレジメンにしたがって投与され得て、それにより、それは有効となる。該量は、疾患を治癒し得るが、一般には、疾患の症状を軽減する目的で投与される。繰り返し投与は、症状の望まれる軽減を達成するために必要とされ得る。

【0052】

本明細書で使用されるインビボ法は、対象の生体内で行われる方法を意味する。

【0053】

本明細書で使用される対象は、診断、スクリーニング、モニタリングまたは処置が意図されるすべての動物を含む。動物は、哺乳類、例えば、霊長類および家畜動物を含む。例えば、霊長類は、ヒトである。患者は、疾患状態を患う哺乳類、霊長類、ヒト、または家畜対象のような対象、または疾患状態が決定される対象、または疾患状態のリスクが決定される対象を意味する。

【0054】

本明細書で使用される、“腫瘍”または“新生物”なる用語は、異常な新規増殖を意味し、したがって、腫瘍を同様のものを意味し、良性または悪性であり得る。過形成とは異なり、腫瘍増殖は、元の刺激がないときでさえ生じる。

【0055】

本明細書で使用される腫瘍性疾患は、腫瘍発生、成長、転移および進行を含む、癌に關与するすべての障害を意味する。

【0056】

本明細書で使用される癌は、あらゆる型の悪性腫瘍により引き起こされる疾患、またはそれらにより特徴づけられる疾患についての用語であり、転移性癌、リンパ性腫瘍、および血液癌を含む。癌は、白血病、リンパ腫、膵臓癌、肺癌、卵巣癌、乳癌、子宮頸癌、膀胱癌、前立腺癌、神経膠腫、腺癌、肝臓癌および皮膚癌を含むが、これらに限定されない。ヒトでの癌は、例えば、膀胱癌、乳癌、前立腺癌、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨肉腫、脳およびCNS癌(例えば、神経膠腫)、子宮頸癌、絨毛腫、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系の癌；子宮内膜癌、食道癌；眼癌；頭頸部癌；胃癌；上皮内腫瘍；腎臓癌；咽頭癌；白血病；肝臓癌；肺癌(例えば、小細胞および非小細胞)；ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫；黒色腫；骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌(例えば、唇、下、口、および咽頭)；卵巣癌；膵臓癌、網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸癌、腎臓癌、呼吸器系の癌；肉腫、皮膚癌；胃癌、精巣癌、甲状腺癌；子宮癌、泌尿器系の癌、ならびに他の癌腫および肉腫を含む。イヌ、ネコ、および他のペットで通常診断される悪性疾患は、リンパ肉腫、骨肉腫、乳癌、肥満細胞腫、脳腫瘍、黒色腫、腺扁平上皮癌、カルチノイド肺癌、気管支腺腫瘍、細気管支腺癌、線維腫、粘液軟骨腫、肺肉腫、神経肉腫、骨腫、乳頭腫、網膜芽細胞腫、ユーイング肉腫、ウィルムス腫瘍、パーキットリンパ腫、小膠細胞腫、神経芽細胞腫、骨巨細胞腫、口腔腫瘍、線維肉腫、骨肉腫および横紋筋肉腫、性器扁平上皮癌、可移植性性器腫瘍、精巣癌、精上皮腫、セルトリ細胞腫、血管周囲細胞腫、組織球腫、緑色腫(例えば、顆粒球性肉腫)、角膜乳頭腫、角膜扁平上皮癌、血管肉腫、胸膜中

10

20

30

40

50

皮腫、基底細胞腫、胸腺腫、胃癌、副腎腫瘍、口腔乳頭腫症、血管内皮腫炎および嚢胞腺腫、濾胞性リンパ腫、腸管リンパ肉腫、線維肉腫ならびに肺扁平上皮癌を含むが、これらに限定されない。齧歯類、例えば、フェレットでは、例えば、癌は、インスリノーマ、リンパ腫、肉腫、神経腫、脾島細胞腫瘍、胃MALTリンパ腫および胃腺癌を含む。農業家畜に影響を与える癌は、白血病、血管周囲細胞腫およびウシ眼癌(ウシで)；包皮線維肉腫、潰瘍性扁平上皮癌、包皮癌、結合組織新生物および肥満細胞腫(ウマで)；肝細胞癌(ブタで)；リンパ腫および肺腺腫症(ヒツジで)；肺肉腫、リンパ腫、ラウス肉腫、細網内皮症、線維肉腫、腎芽細胞腫、B細胞リンパ腫およびリンパ性白血病(鳥類で)；網膜芽細胞腫、肝臓腫瘍、リンパ肉腫(リンパ芽球性リンパ腫)、形質細胞性白血病およびうきぶくる肉腫(サカナで)、乾酪性リンパ節炎(CLA)：ヒツジ偽結核菌により引き起こされるヒツジおよびヤギの慢性感染性伝染疾患、およびヤークジークテにより引き起こされるヒツジの伝染性肺癌を含む。

10

【0057】

本明細書で使用される“悪性”なる用語は、それが腫瘍に適用されるとき、成長制御および位置制御の欠失と共に、転移能を有する原発性腫瘍を意味する。

【0058】

本明細書で使用される“悪性”なる用語は、病的過程に含まれる、原発性部位から遠くに離れた位置での異常なもしくは腫瘍性の細胞の成長を意味する。

【0059】

本明細書で使用される増殖性障害は、細胞の異常増殖が関与するすべての障害、例えば、腫瘍性疾患を含むが、これら限定されない。

20

【0060】

本明細書で使用される腫瘍性疾患を処置もしくは予防するための方法は、腫瘍、その転移、腫瘍の血管新生または疾患が特徴づけられる他のパラメーターのような症状のいずれかが、緩和、改善、予防されるか、寛解の状態に置かれるか、または寛解の状態で維持されることを意味する。それはまた、腫瘍性疾患および転移の指標が、該処置により除去、減少もしくは予防されることを意味する。例えば、指標は、基底膜および隣接細胞外マトリクスの制御不能な分解、遊走、分裂、および内皮細胞の新規機能毛細血管への組織化、ならびにそのような機能毛細血管の維持を含むが、これらに限定されない。

【0061】

本明細書で使用される“血管新生”なる用語は、直接または間接的に新規血管の確立および維持(新血管形成)に関与する過程の全体を含むことを意図し、腫瘍と関連する新血管形成および創傷と関連する新血管形成を含むが、これらに限定されない。

30

【0062】

本明細書で使用される治療剤は、疾患もしくは障害の症状を改善するか、または疾患もしくは障害を改善する薬剤である。治療剤、治療化合物、治療レジメン、または化学治療は、当業者に既知であり、本明細書の他の場所に記載されている、慣用的な薬剤および薬剤治療(ワクチンを含む)を含む。治療剤は、細胞成長を阻害するか、もしくは細胞死を促進する部分、細胞成長を阻害するか、もしくは細胞死を促進するために活性化され得る部分、または細胞成長を阻害するか、もしくは細胞死を促進するために他の薬剤を活性化する部分を含むが、これらに限定されない。所望により、治療剤は、さらなる特性、例えば、本明細書の他の場所で提供されたとおり、造影剤としてのその使用を可能にする特性を示すか、もしくはそれを明示し得る。本明細書で提供される組成物、方法および使用のための治療剤は、例えば、抗癌剤であり得る。例えば、治療剤は、サイトカイン、成長因子、光増感剤、放射性核種、毒素、代謝拮抗剤、シグナル伝達モジュレーター、抗腫瘍性抗生物質、抗癌抗体、血管新生阻害剤、放射線治療、化学治療化合物またはそれらの組み合わせを含む。

40

【0063】

本明細書で使用される抗癌剤(“抗腫瘍もしくは抗新生物”剤と交換可能に使用される)は、すべての抗癌治療、例えば、放射線治療、外科手術、加温もしくは温熱療法、または

50

癌の処置において有用な抗腫瘍性化合物を含む。これらは、単独で、もしくは他の薬剤と組み合わせて使用されるとき、臨床症状もしくは腫瘍性疾患、腫瘍および癌に関連する診断マーカーを緩和、改善、予防するか、または寛解の状態に置くか、もしくはその状態で維持し得るすべての薬剤を含み、本明細書で提供される方法、組み合わせおよび組成物で使用され得る。例えば、抗癌剤は、単独で、もしくは組み合わせで、および/または他の抗癌剤と組み合わせて、本明細書で提供されるウイルスを含むが、これらに限定されない。例えば、抗腫瘍性化合物は、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、光増感剤、毒素、抗腫瘍性抗生物質、化学療法化合物、放射性核種、血管新生阻害剤、シグナル伝達モジュレーター、代謝拮抗剤、抗腫瘍性ワクチン、抗腫瘍性オリゴペプチド、細胞分裂阻害剤タンパク質、細胞分裂阻害オリゴペプチド、抗腫瘍性抗体(例えば、一本鎖抗体)、抗腫瘍性抗生物質、免疫治療剤、細菌およびそれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0064】

サイトカインおよび成長因子は、インターロイキン、例えば、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-6およびインターロイキン-12、腫瘍壊死因子、例えば、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン、例えば、インターフェロン (IFN- γ)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、血管新生因子、および組織因子を含むが、これらに限定されない。

【0065】

例えば、光増感剤は、インドシアニングリーン、トルイジンブルー、アミノレブリン酸、テキサフィリン、ベンゾポルフィリン、フェノチアジン、フタロシアニン、ポルフィリン、例えば、ポルフィマーナトリウム、クロリン、例えば、テトラ(m-ヒドロキシフェニル)クロリンもしくはスズ(IV)クロリンe6、プルプリン、例えば、エチルエチプルプリンスズ、プルプリンイミド、パクテリオクロリン、フェオフォルピド、ピロフェオフォルピドまたはカチオン染料を含むが、これらに限定されない。

20

【0066】

その放射性核種、量および適用に応じて、放射性核種は、診断および/または処置のために使用され得る。それらは、例えば、¹¹炭素、¹¹フッ素、¹³炭素、¹⁵窒素、¹⁸フッ素、¹⁹フッ素、³²ホスフェート、⁶⁰コバルト、⁹⁰イットリウム、⁹⁹テクニシウム、¹⁰³パラジウム、¹⁰⁶ルテニウム、¹¹¹インジウム、¹¹⁷ルテチウム、¹²⁵ヨウ素、¹³¹ヨウ素、¹³⁷セシウム、¹⁵³サマリウム、¹⁸⁶レニウム、¹⁸⁸レニウム、¹⁹²イリジウム、¹⁹⁸金、²¹¹アスタチン、²¹²ビスマスもしくは²¹³ビスマスを含む化合物もしくは分子を含むが、これらに限定されない。

30

【0067】

毒素は、化学療法化合物、例えば、5-フルオロウリジン、カリチアマイシン、メイタシン、二本鎖リシン、リシンA鎖、アプリン、アプリンA鎖、サポリン、モデシン、モデシンA鎖、緑濃菌エンドトキシン、コレラ毒素、赤痢菌毒素、大腸菌熱不安定毒素およびジフテリア毒素、ドキシソルピシン、ダウノマイシン、5-フルオロウラシル、メトトレキサート、タキソール、リシンA、コルヒチン、サイトカラシン、モネンシン、ウアバイン、ミトキサントロン、ピンデシン、ピンブラスチン、ピンクリスチンまたはエンテロトキシンを含むが、これらに限定されない。

40

【0068】

代謝拮抗剤は、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、シトシンアラビノシド、ヒドロキシウレアおよび20-クロロデオキシアデノシンを含むが、これらに限定されない。

【0069】

シグナル伝達モジュレーターは、例えば、マクロファージ阻害性因子の阻害剤、toll様受容体アゴニストおよびstat3阻害剤を含むが、これらに限定されない。

【0070】

抗腫瘍性抗生物質は、アントラサイクリン、例えば、塩酸ドキシソルピシン(アドリアマイシン)、塩酸イダルビシン、塩酸ダウノルピシン、塩酸アクリラルピシン、塩酸エピルビ

50

シンおよび塩酸プラルピシン、エノマイシン、フェノマイシン、プレオマイシン、例えば、プレオマイシンおよび硫酸ペプロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンC、アクチノマイシン、例えば、アクチノマイシンD、ジノスタチン スチマラマーならびにポリペプチド、例えば、ネオカルチノスタチンを含むが、これらに限定されない。

【0071】

抗腫瘍性抗体は、ADEPT、Trastuzumab (Herceptin)、Tositumomab (Bexxar)、Cetuximab (Erbix)、Ibritumomab (Zevalin)、Alemtuzumab (Campath-1H)、Epratuzumab (Lymphocide)、Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)、Bevacimab (Avastin)、Edrecolomab (Panorex)、およびRituximab (RITUXAN)を含むが、これらに限定されない。

【0072】

血管新生因子阻害剤は、コラゲナーゼ阻害剤、例えば、メタロプロテイナーゼおよびトトラサイクリン、例えば、ミノサイクリン、自然に生じるペプチド、例えば、エンドスタチンおよびアンジオスタチン、真菌および細菌誘導体、例えば、TNP-470のようなフマギリン誘導体、VEGFのアプタマーアンタゴニスト、バチマスタット、カプトプリル、軟骨由来阻害剤(CDI)、ゲニステイン、インターロイキン12、ラベンダスチンA、メドロキシプロゲステロン酢酸エステル、組み換えヒト血小板因子4(rPF4)、タキソール、D-グルコ-D-硫酸ガラクトン(Tecogalan(=SP-PG, DS-4152))、サリドマイド、トロンボスポンジンを含むが、これらに限定されない。

【0073】

放射線治療は、光学的治療、放射性核種、放射免疫治療および陽子ビーム処置を含むが、これらに限定されない。

【0074】

化学治療化合物は、白金；白金類似体(例えば、白金配位複合体)、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、DWA2114R、NK121、IS 3 295および254-S；アントラセンジオン；ピンブラスチン；アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド；スルホン酸アルキル、例えば、ブルスファン、インプロスルファンおよびピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパおよびウレドーパ；エチレニミンおよびメチラメラミン、例えば、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロロメラミンナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロルエタミン、メクロルエタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベムピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソ尿素、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えば、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸類似体、例えば、デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタノール、テストラクトン；抗副腎類、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充薬、例えば、フロリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アム

10

20

30

40

50

サクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォルニチン；エリプチニウムアセテート；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモル；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリニン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；ポリサッカライド-K；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2"-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；シトシンアラビノシド；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル；クロラムブシル；ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；プラチナム類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン；ピンブラスチン；プラチナム；エトボシド(VP-16)；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトロキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニボシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセロダ；イバンドロネート；CPT11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)；レチノイン酸；エスペラマイシン；カペシタピン；リンゴ酸スニチニブ(SUTENT)；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸もしくは誘導体を含むが、これらに限定されない。また、腫瘍におけるホルモン作用を制御するか、もしくは阻害するように作用する抗ホルモン剤(例えば、抗エストロゲン)が本明細書に含まれ、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストンおよびトレミフェン(Fareston)；および抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸もしくは誘導体を含む。本明細書で使用され得るそのような化学治療化合物は、毒性のために、一般の全身的化学治療法での化合物の使用が不可能である化合物を含む。

【0075】

本明細書で使用される抗癌オリゴペプチドまたは抗腫瘍オリゴペプチドは、腫瘍成長および/または転移を遅延させるか、もしくは阻害する能力を有する短いオリゴペプチドである。抗腫瘍オリゴペプチドは、典型的には、腫瘍への高い親和性および特異性を有し、それらが腫瘍を標的化するのを可能にする。そのようなオリゴペプチドは、受容体相互作用化合物、タンパク質-タンパク質相互作用の阻害剤、酵素阻害剤、および核酸相互作用化合物を含む。本明細書で使用される細胞分裂阻害オリゴペプチドは、細胞分裂を阻害するオリゴペプチドである。例えば、細胞分裂阻害オリゴペプチドは、抗癌オリゴペプチドである。例えば、細胞分裂阻害オリゴペプチドは、ツブリシン、ホモプシン、ヘミアステルリン、タルトプリン(HTI-286, 3)およびクリプトフィシンを含むが、これらに限定されない。

【0076】

本明細書で使用されるプロドラッグは、インビボで投与されると、代謝されるか、または生物学的、薬学的、もしくは治療上活性な該化合物の形態に変換される化合物である。プロドラッグを製造するために、薬学的に活性な化合物は、該活性化化合物が代謝過程で再生されるように修飾される。プロドラッグは、薬剤の代謝安定性もしくは輸送特性を変えようとして設計することができ、その結果、副作用または毒性を回避するか、薬剤の風味を改善するか、または薬剤の他の特徴もしくは特性を変え得る。インビボでの薬理学的過程および薬剤代謝の観点で、薬学的に活性な化合物がいったん既知になると、当業者は、該化合物のプロドラッグを設計することが可能である(例えば、Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388-392を参照のこと)。プロドラッグは、5-フルオロシトシン、ガンシクロビル、6-メチルプリンデオキシリボシド、セファロsporin-ドキシソルピシン、4-[(2-クロロエチル)(2-メスロキシエチル)アミノ]ベンゾイル-L-グルタミン酸、インドール-3-酢酸、7-エチル-10-[4-(1-ピペリジノ)-1-ピペリジノ]カルボニルオキシカンポトテシン、ビス-(2-クロロエ

10

20

30

40

50

チル)アミノ-4-ヒドロキシフェニルアミノメタノン 28、1-クロロメチル-5-ヒドロキシ-1,2-ジヒロ-3H-ベンズ[e]インドール、エピルピシングルクロニド、5'-デオキシ5-フルオロウリジン、シトシンアラビノシド、およびリナマリンを含むが、これらに限定されない。

【0077】

本明細書で使用される部分に結合する化合物は、部分に結合した化合物を含む複合体を意味し、ここで、化合物と該部分の結合は、1つもしくはそれ以上の共有結合もしくは非共有結合相互作用、例えば、水素結合、または静電気相互作用から生じ得る。抱合体はまた、化合物を該部分に結合させるリンカーを含み得る。例えば、化合物は、ナノ粒子および親鉄剤を含むが、これらに限定されない。例えば、化合物は、検出可能部分および治療剤を含むが、これらに限定されない。

10

【0078】

本明細書で使用されるナノ粒子は、サイズがナノメートルで測定される微細粒子を意味する。しばしば、ナノスケールでのそのような粒子は、薬剤担体または造影剤として機能する生物医学的適用で使用される。ナノ粒子は、他の薬剤(検出可能/診断剤もしくは治療剤を含むが、これらに限定されない)と結合させることができる。

【0079】

本明細書で使用される、検出可能標識または検出可能部分または診断部分(また、造影標識、造影剤、または造影部分)は、原子、分子または組成物を意味し、ここで、原子、分子または組成物の存在は、直接もしくは間接的に測定され得る。

20

【0080】

本明細書で使用される、検出可能部分または造影部分は、本明細書に記載した方法のいずれかにおいて、ウイルスを画像化するために使用される部分を意味する。造影(検出可能)部分は、例えば、化学発光部分、生物発光部分、蛍光部分、放射性核種および金属を含む。

【0081】

本明細書で使用される、検出剤または造影剤は、本明細書に記載した方法のいずれかにおいて、ウイルスを画像化するために使用される分子、化合物またはポリペプチドを意味する。検出剤または造影剤は、例えば、検出可能部分を含むか、または化学修飾、例えば、ルシフェラーゼによる化学修飾による修飾後、検出可能シグナルを産生する基質、例えば、ルシフェリンを含み得る。

30

【0082】

本明細書で使用される、“検出”、“検出された”、および“検出する”なる用語は、一般に、シグナルの存在を検出もしくは決定するすべての方法を意味し、例えば、視検査、蛍光分光法、吸収、反射率測定、フローサイトメトリー、磁気共鳴法、例えば、磁気共鳴画像法(MRI)および核磁気共鳴画像法(MRS)、超音波、X線、 γ 線(PETスキャンで、陽電子および電子の対消滅後)、断層撮影法、例えば、コンピュータ断層撮影法(CT)、コンピュータ体軸断層撮影(CAT)、電子ビームコンピューター断層撮影法(EBCT)、高解像コンピュータ断層撮影(HRCT)、下環状断層撮影、ポジトロン断層法(PET)、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法(SPECT)、スパイラル断層撮影および超音波断層法を含む。検出可能標識の直接的な検出は、例えば、物理的現象、例えば、エネルギーもしくは粒子放出もしくはそれ自身の部分の吸収の、例えば、X線もしくはMRIによる測定を意味する。間接的な検出は、直接もしくは間接的に検出可能部分に結合する原子、分子、もしくは組成物の物理的現象、例えば、エネルギーもしくは粒子放出もしくは吸収の測定を意味する。例えば、間接的な検出において、検出可能標識は、ビオチンであり得て、それは、アビジンに結合することにより検出され得る。非標識化アビジンは、非特異的結合を妨害するために全身的に投与され得て、その後、標識化アビジンが全身的に投与され得る。したがって、原子、分子もしくは組成物を意味する結合可能標識または結合可能部分は、検出可能標識または検出可能部分の範囲内に含まれ、ここで、原子、分子もしくは組成物の存在は、標識もしくは部分の他の原子、分子もしくは組成物との結合の結果として、検出され得る。例

40

50

示的な診断剤は、例えば、金属、例えば、コロイド金、鉄、ガドリニウム、およびガリウム-67、蛍光部分ならびに放射性核種を含む。例えば、蛍光部分および放射性核種は、本明細書の他の場所で提供される。

【0083】

本明細書で使用される、磁気共鳴画像法(MRI)は、固形物、とりわけ、ヒト細胞、組織および器官における特定の原子および分子構造の電子画像を得るための核磁気共鳴分光計の使用を意味する。MRIは、非侵襲的な技術であり、器官および他の内部体構造の断面画像を得るために、核磁気共鳴を用いる。対象は、強力な電磁気を含む巨大な中空シリンダー内に入り、それは、体内の特定の原子(例えば、 ^1H 、 ^{13}C および ^{19}F)の核を磁気により配列させる。次いで、対象は、電波にかけられ、それにより、配列した核が反転し(flip); 電波が止められると、核は、それらの元の位置に戻り、電波を放出し、その後、受像器により検出され、コンピューターにより二次元画像に変換される。あるMRI手順のために、ガドリニウムのような造影剤が使用され、画像の正確性を高める。

10

【0084】

本明細書で使用されるX線は、約0.01から10ナノメートルの範囲の波長を有する、相対的に高エネルギーの光子、またはそのような光子の流れを意味する。X線はまた、X線で撮影された写真を意味する。

【0085】

本明細書で使用される“光学的画像”は、興味のある領域からの少なくともいくつかのシグナルが、可視光範囲内の電磁気放射の形態である、シグナルの画像化を意味する。光学的画像は、蛍光および発光シグナルの検出を含むが、これらに限定されない。そのようなシグナルは、光学装置、例えば、カメラにより捕捉され得る。

20

【0086】

本明細書で使用される“非光学的画像”は、興味のある領域からの少なくともいくつかのシグナルが、可視光範囲外での電磁気放射の形態である、シグナルの画像化を意味し、粒子、およびエネルギーの他の伝播を含み得る。非光学的画像は、線(例えば、SPECT)、X線、RFシグナル(例えば、MRI)、粒子、例えば、電子もしくは陽電子(例えば、PET)、およびエネルギー伝搬の他の形態(例えば、超音波)の検出を含むが、これらに限定されない。

【0087】

本明細書で使用される核酸は、DNA、RNAおよびその類似体(ペプチド核酸(PNA)およびその混合物を含む)を含む。核酸は、一本鎖または二本鎖であり得る。核酸は、例えば、遺伝子産物、例えば、ポリペプチド、制御性RNA、siRNAおよび機能性RNAをコードし得る。

30

【0088】

本明細書で使用されるプライマーは、2個またはそれ以上の、典型的には、4個以上のデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを意味し、プライマー伸長の合成は、そこから開始され得る。典型的には、プライマーは、遊離3'ヒドロキシ部分を含む。遺伝子産物の合成に資する実験的条件は、ヌクレオシド三リン酸ならびに重合化および伸長のための薬剤、例えば、DNAポリメラーゼ、ならびに適当なバッファー、温度、およびpHの存在を含む。プローブまたはプライマーについて言及するとき、所望により、例えば、検出可能標識、例えば、蛍光もしくは放射性標識で標識された一本鎖分子が提供される。そのような分子は、一般に、ライブラリーを探索するか、もしくはプライミングするために、それらの標的が統計学的に特異的な長さであるか、または少ないコピー数(典型的には、5未満、一般には、3未満)である。一般に、プローブまたはプライマーは、興味のある遺伝子と相補的であるか、または同一である配列の少なくとも14、16もしくは30個の連続したヌクレオチドを含む。プローブおよびプライマーは、5、6、7、8、9、10またはそれ以上、20またはそれ以上、30またはそれ以上、50またはそれ以上、100またはそれ以上の核酸長であり得る。

40

【0089】

アンチセンスオリゴヌクレオチドに関して、本明細書で使用される少なくとも一部のRN

50

Aと相補的な配列は、一般に、中程度もしくは高いストリンジェンシー条件下で、RNAとハイブリダイズして、二本鎖を形成することができる程十分な相補性を有しているヌクレオチド配列を意味し；二本鎖アンチセンス核酸の場合には、したがって、二本鎖DNAの一本鎖(すなわち、dsRNA)が試験されるか、または三本鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さに依存する。一般に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、それは、コードするRNAとの塩基ミスマッチをより多く含み、なお安定した二本鎖(または、ある場合には三本鎖)を形成する。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融点を決定するために、標準的な手順の使用により、許容可能なミスマッチの程度を確認することができる。

【0090】

本明細書で使用される異種核酸(また、外因性核酸もしくは外来性核酸と呼ばれる)は、通常、それが発現する生物もしくはウイルスによりインビボで産生されない核酸、または生物もしくはウイルスにより産生されるが、異なる遺伝子座に存在し、特異的に発現する核酸、または転写、翻訳、または制御可能な生化学的過程に影響を与えることにより、内因性核酸、例えば、DNAの発現を改変するメディエーターを仲介するか、もしくはコードする核酸を意味する。異種核酸は、しばしば、それが導入される細胞もしくはウイルスに内因的ではないが、他の細胞もしくはウイルスから得られるか、もしくは合成的に製造され得る。異種核酸は、同じ生物の他の細胞由来、もしくは他の生物(同じ種または他の種を含む)由来の核酸分子を意味し得る。しかしながら、異種核酸は、内因的であり得るが、異なる遺伝子座から発現するか、またはその発現もしくは配列が改変された核酸(例えば、プラスミド)であり得る。したがって、異種核酸は、対応する核酸分子、例えば、DNAがゲノム中に見出されるとき、正確な方向もしくは位置に存在しない核酸分子を含む。一般に、必ずしも必要ではないが、そのような核酸は、それが発現する細胞内で、通常、細胞もしくはウイルスにより産生されないか、もしくは同様の方法で産生されないRNAおよびタンパク質をコードする。当業者が、核酸が発現する細胞に対して、異種、外因性もしくは外来性として認識するか、またはそのように考えるすべての核酸、例えば、DNAは、本明細書の異種核酸に包含される。

【0091】

本明細書で使用される、異種タンパク質または異種ポリペプチド(また、外因性タンパク質、外因性ポリペプチド、外来性タンパク質または外来性ポリペプチドと呼ばれる)は、通常、生物によりインビボで産生されないタンパク質を意味する。

【0092】

本明細書で使用される異種核酸のヌクレオチドの制御およびエフェクター配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、転写および翻訳停止部位、ならびに他のシグナル配列への操作可能な結合は、該核酸、例えば、DNAと該ヌクレオチド配列の結合を意味する。例えば、異種DNAのプロモーターへの操作可能な結合は、DNAとプロモーター間の物理的結合を意味し、その結果、該DNAの転写が、DNAを特異的に認識し、結合し、転写させるRNAポリメラーゼにより、プロモーターから開始される。したがって、操作可能に結合する、または操作的に結合するなる用語は、核酸、例えば、DNAとヌクレオチドの制御およびエフェクター配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、転写および翻訳停止部位、ならびに他のシグナル配列の機能的な結合を意味する。例えば、DNAのプロモーターへの操作可能な結合は、DNAとプロモーター間の物理的および機能的な結合を意味し、その結果、該DNAの転写が、DNAを特異的に認識し、結合し、転写させるRNAポリメラーゼにより、プロモーターから開始される。発現および/または転写を最適化するために、クローンの5'非翻訳部分を除去、付加もしくは改変し、余分であり潜在的に不適当な二者択一の翻訳開始(すなわち、スタート)コドン、または転写もしくは翻訳のレベルで、発現を妨害するか、もしくは減少させる他の配列を除去することが必要である。さらに、コンセンサスリボソーム結合部位は、5'開始コドンの直前に挿入することができ、発現を促進し得る(例えば、Kozak J. Biol. Chem. 266: 19867-19870 (1991); Shine and Delgarno Nature 254(5495): 34-38 (1975)を参照のこと)。そのような修飾の望ましさ(または必要性)は、経験的

10

20

30

40

50

に決定され得る。

【0093】

本明細書で使用される、プロモーター、プロモーター領域またはプロモーターエレメントまたは制御領域または制御エレメントは、操作可能に結合したDNAもしくはRNAの転写を制御するDNAもしくはRNAの部分を意味する。プロモーター領域は、RNAポリメラーゼの認識、結合および転写開始に關与する特異的配列を含む。さらに、プロモーターは、RNAポリメラーゼの認識、結合および転写開始活性を調節する配列(すなわち、1種またはそれ以上の転写因子の結合配列)を含む。これらの配列は、シスで作用するか、またはトランス作用因子に対して応答性があり得る。制御の性質に依存して、プロモーターは、構成的であるか、または制御的であり得る。制御的プロモーターは、誘導的であるか、または環境応答的であり得る(例えば、pH、嫌気的条件、浸透圧、温度、光または細胞密度のような刺激に対して応答する)。多くのそのようなプロモーター配列は、当業者に既知である。例えば、米国特許第4,980,285号; 第5,631,150号; 第5,707,928号; 第5,759,828号; 第5,888,783号; 第5,919,670号、およびSambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press (1989)を参照のこと。

10

【0094】

本明細書で使用される天然プロモーターは、生物またはウイルスに内在的であり、野生型生物もしくはウイルスと比較して、ウイルスゲノム中のそのヌクレオチド配列およびその位置に関して修飾されていないプロモーターである。

【0095】

本明細書で使用される異種プロモーターは、野生型生物もしくはウイルスで通常見出されないか、または野生型生物もしくはウイルスと比較して、異なる遺伝子座に位置するプロモーターを意味する。異種プロモーターは、しばしば、それが導入される細胞もしくはウイルスに内在的ではなく、他の細胞もしくはウイルスから入手されるか、または合成的に製造される。異種プロモーターは、同じ生物または他の生物(同じ種もしくは他の種を含む)内の他の細胞由来のプロモーターを意味し得る。しかしながら、異種プロモーターは、内在的であり得るが、その配列が改変されているか、または異なる遺伝子座で(例えば、ゲノム中の、もしくはプラスミド上の異なる位置で)生じるプロモーターである。したがって、異種プロモーターは、対応するプロモーターがゲノム中に見出されるとき、正確な方向もしくは位置で存在しないプロモーターを含む。

20

30

【0096】

合成プロモーターは、天然で見出されないヌクレオチド配列を有する異種プロモーターである。合成プロモーターは、合成配列または天然プロモーター由来の配列またはその部分を有する核酸分子であり得る。合成プロモーターはまた、異なる天然プロモーター由来の異なるエレメントから構成されるハイブリッドプロモーターであり得る。

【0097】

本明細書で使用される、“遺伝子発現カセット”または“発現カセット”は、宿主内で、そのような配列と適合した遺伝子発現を誘導することができる核酸エレメントを含む核酸構築体である。発現カセットは、少なくとも、プロモーター、所望により、転写終結シグナルを含む。典型的には、発現カセットは、プロモーターと操作可能に結合して転写されるべき核酸を含む。さらに、発現を誘導するのを助ける因子がまた、本明細書に記載したとおり、使用され得る。発現カセットは、例えば、治療的遺伝子産物または検出可能タンパク質または選択可能マーカー遺伝子をコードする遺伝子を含み得る。

40

【0098】

本明細書で使用される、プロモーターのより強力なプロモーターでの置換は、ゲノムからプロモーターを除去し、置換されるプロモーターと比較して、増加したレベルの転写開始を誘導するプロモーターで該プロモーターを置換することを意味する。典型的には、より強力なプロモーターは、置換されるプロモーターと比較して、改善されたポリメラーゼ複合体結合能を有する。結果として、より強力なプロモーターと操作可能に結合したオープンリーディングフレームは、より高いレベルの遺伝子発現を示す。同様に、プロモータ

50

ーのより弱いプロモーターでの置換は、ゲノムからプロモーターを除去し、置換されるプロモーターと比較して、減少したレベルの転写開始を誘導するプロモーターで該プロモーターを置換することを意味する。典型的には、より弱いプロモーターは、置換されるプロモーターと比較して、より弱いポリメラーゼ複合体結合能を有する。結果として、より弱いプロモーターと操作可能に結合したオープンリーディングフレームは、より低いレベルの遺伝子発現を示す。

【 0 0 9 9 】

本明細書で使用される、組み換えDNA法を用いた組み換え法による産生は、クローン化DNAによりコードされたタンパク質を発現させるために、分子生物学の分野で既知の方法の使用を意味する。

【 0 1 0 0 】

本明細書で使用されるベクター(またはプラスミド)は、発現またはその複製のために、細胞内へ異種核酸を導入するために使用される個別エレメントを意味する。ベクターは、典型的には、エピソーム性であるが、ゲノムの染色体中に遺伝子またはその部分を組み込むように設計することができる。そのようなベクターの選択および使用は、当業者に既知である。発現ベクターは、制御配列、例えば、DNA断片の発現を誘導することが可能なプロモーター領域と操作可能に結合したDNAを発現することができるベクターを含む。したがって、発現ベクターは、組み換えDNAもしくはRNA構築体、例えば、適当な宿主細胞に導入されると、クローン化されたDNAの発現を生じるプラスミド、ファージ、組み換えウイルスもしくは他のベクターを意味する。適当な発現ベクターは、当業者に既知であり、真核生物細胞および/または原核生物細胞で複製可能なものを含み、エピソーム性であるか、または宿主細胞ゲノムに組み込まれたものを含む。ベクターは、組み込み、または相同組み換えによる組み換えゲノムの産生で、例えば、本明細書のいずれかの場所で記載した組み換えウイルスの産生で使用され得る。

【 0 1 0 1 】

本明細書で使用される、遺伝学的治療または遺伝子治療は、異種核酸、例えば、DNAもしくはRNAの、治療が必要な障害もしくは状態を有する哺乳類、とりわけ、ヒトの特定の細胞、すなわち標的細胞への運搬を含む。本明細書で使用される、遺伝学的治療または遺伝子治療は、異種核酸、例えば、DNAのウイルスへの移転を含み得て、それは、該治療の標的となる障害もしくは状態を患う哺乳類、とりわけ、ヒトに運搬され得る。核酸、例えば、DNAは、異種核酸、例えば、DNAが発現し、それにより、コードされた治療産物が産生される方法で、選択された標的細胞に、例えば、直接もしくは間接的に導入される。あるいは、異種核酸、例えば、DNAは、ある場合には、治療産物をコードするDNAの発現を仲介するか、またはある場合には、それは、治療産物であるか、または直接もしくは間接的に治療産物の発現を仲介するペプチドもしくはRNAのような産物をコードし得る。遺伝学的治療はまた、欠損遺伝子を置換するか、または哺乳類もしくはそれが導入される細胞により産生される遺伝子産物を補う、遺伝子産物をコードする核酸を送達するために使用され得る。導入された核酸は、治療化合物をコードし得る。治療産物をコードする異種核酸、例えば、DNAは、罹患宿主の細胞内に導入される前に修飾され、産物もしくはその発現を促進するか、またはそれらを改変し得る。遺伝学的治療はまた、遺伝子発現の阻害剤もしくはリプレッサーもしくは他のモジュレーターを含み得る。

【 0 1 0 2 】

本明細書で使用される遺伝子治療のための治療上有効な産物は、異種核酸、典型的には、DNA、またはRNA産物、例えば、dsRNA、RNAi(siRNAを含む)によりコードされる産物であり、それは、宿主内で核酸の誘導が行われると、遺伝的もしくは後天的な疾患の症状、兆候を改善もしくは除去するか、または該疾患を治癒する産物が発現する。また、生物学的に活性な核酸分子、例えば、RNAiおよびアンチセンス核酸が含まれる。

【 0 1 0 3 】

本明細書で使用される、タンパク質の活性または遺伝子もしくは核酸の発現を調節する薬剤もしくは化合物は、タンパク質の活性を減少、増加もしくは改変させるか、または、

10

20

30

40

50

ある場合には、細胞内の核酸の発現をアップレギュレート、ダウンレギュレートもしくは改変させる。

【0104】

本明細書で使用される、ポリペプチドのアミノ酸が、開示された配列、例えば、配列表に記載されたアミノ酸“に対応する”なる記載は、標準的なアライメントアルゴリズム、例えば、GAPアルゴリズムを用いて、同一性または相同性を最大化するポリペプチドと開示された配列のアライメントで同定されたアミノ酸を意味する(ここでは、保存的アミノ酸が配列されている)。ポリペプチドの配列を並べることにより、当業者は、手引きとして保存的および同一アミノ酸残基を用いて、対応する残基を同定することができる。

【0105】

本明細書で使用される“アミノ酸”は、それらのフルネームで、またはそれらの既知の三文字もしくは一文字表記で示される(表1)。さまざまな核酸断片で生じるヌクレオチドは、当分野で通常使用される標準的な一文字表記で示される。

【0106】

表1-対応表

【表1】

記号		
1文字	3文字	アミノ酸
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	スレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リシン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
Z	Glx	Gluおよび/またはGln
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
B	Asx	Asnおよび/またはAsp
C	Cys	システイン
X	Xaa	未知またはその他

【0107】

本明細書で使用される、“相同性”および“同一性”なる用語は、交換可能に使用されるが、タンパク質についての相同性は、保存的アミノ酸変化を含み得る。一般に、対応する位置を同定するために、アミノ酸配列が並べられ、その結果、最も高い順序一致が得られる(例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University

10

20

30

40

50

Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073を参照のこと)。

【 0 1 0 8 】

本明細書で使用される“配列同一性”は、試験および参照ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド間の比較における同一のアミノ酸(または、ヌクレオチド塩基)の数を意味する。相異なるポリペプチドは、既定の数の同一もしくは相異なるアミノ酸残基を意味する。相同性は、保存的アミノ酸置換および同一残基を含む。配列同一性は、各提供者により確立されたデフォルトギャップペナルティ(default gap penalties)で使用される、標準アライメントアルゴリズムプログラムにより決定され得る。相異なる核酸分子は、既定の数の同一もしくは相異なるヌクレオチドを意味する。相同性は、コードされたアミノ酸を変化させない置換(すなわち、“サイレント置換”)および同一の残基を含む。実質的に相異なる核酸分子は、一般に、中程度のストリンジェンシーまたは高ストリンジェンシー条件下で、核酸の全長に沿って、または興味のある全長核酸分子の少なくとも約70%、80%または90%とハイブリダイズする。また、ハイブリダイズ核酸分子でのコドンの置換において、縮重コドンを含む核酸分子が意図される(タンパク質に関しては、相同性の決定のため、同一のアミノ酸だけでなく保存的アミノ酸を並べることができ、この場合には、同一性%と相同性%は異なる)。任意の2つの核酸分子が、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%“同一”であるヌクレオチド配列(またはアミノ酸配列を有する任意の2つのポリペプチド)を有するかどうかは、例えばPearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 85:2444のようなデフォルトパラメーターを用いる“FAST A”プログラム(他のプログラムとしては、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984))が含まれる)、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S.F., et al., J Molec Biol 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Mrtin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994,およびCarillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073)のような既知のコンピュータアルゴリズムを用いて決定することができる。例えば、National Center for Biotechnology InformationデータベースのBLAST関数を、同一性を決定するために使用することができる。他の市販のもしくは公の利用可能なプログラムは、DNASTarの“MegAlign”プログラム(Madison, WI)およびUniversity of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG)の“Gap”プログラム(Madison WI))を含む。タンパク質および/または核酸分子の%相同性もしくは同一性は、例えば、GAPコンピュータープログラム(例えば、Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981))により改訂された、Needleman et al. J. Mol. Biol. 48: 443 (1970))を用いて、配列情報を比較することにより決定され得る。簡潔には、GAPプログラムは、類似性を、並べられた同じ記号(すなわち、ヌクレオチドまたはアミノ酸)の数をその2つの配列のうち短い方の記号の総数で割ったものとして定義する。GAPプログラムのデフォルトパラメーターとしては、(1)一元比較マトリックス(同一の1と同一でない0の値を含む)およびSchwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353 - 358 (1979)が記載しているような、Gribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:6745の荷重比較マトリックス; (2)各ギャップのペナルティーは3.0、および各ギャップの各記号のペナルティーは0.10を追加;および(3)末端ギャップにはペナルティーなしを含み得る。したがって、本明細書で使用される“同一性”なる用語は、試験ポリペプチドと参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとの間の比較を示す。例えば、“少なくとも90%同一”なる用語は、参照ポリペプチドと比較して、90から100%の同一性%を意味する。90%またはそれ以上のレベルの同一性は、例として示すと、100アミノ酸長の試験ポリヌクレオチドと参照ポリヌクレオチドを比較するとして、試験ポリペプチドの10%(すなわち100

10

20

30

40

50

のうち10)のアミノ酸だけが参照ポリペプチドのアミノ酸と異なっていることを示す。同様の比較は、試験および参照ポリヌクレオチド間でなされ得る。そのような差異は、アミノ酸配列の全長にわたってランダムに分布している点突然変異として表すことができるか、または最大許容、例えば、10/100アミノ酸差異(約90%同一)までの可変長の1以上の遺伝子座にクラスター化することができる。差異は、核酸またはアミノ酸置換、挿入もしくは欠失と定義される。約85-90%を超える相同性または同一性のレベルでは、結果はプログラムやギャップパラメーターセットによって異なることはなく、このような高いレベルの同一性は、多くの場合ソフトウェアに頼らなくとも容易に評価することができる。

【0109】

実質的に同一または相同または類似なる用語は、関連する分野の当業者に理解されているとおり、文脈により変わり、一般に、少なくとも60%または70%を意味し、好ましくは、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を意味する。本明細書で使用される、産物に対して実質的に同一なる用語は、興味のある特性が変化していないほど十分に類似していること意味し、その結果、実質的に同一な産物は、該産物と置換して使用することができる。

【0110】

本明細書で使用される、実質的に純粋は、該純度を評価するために当業者により使用される標準的な解析方法、例えば、薄層クロマトグラフィー(TLC)、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により決定されたとおり、容易に検出可能な不純物が存在しないように思われる十分に均質であること、またはさらなる精製が、物質の物理的および化学的特性、例えば、酵素学および生物学的活性を検出可能に改変しないほど十分に純粋であることを意味する。実質的に化学的に純粋な化合物を製造するための化合物の精製法は、当業者に既知である。しかしながら、実質的に化学的に純粋な化合物は、立体異性体または異性体の混合物であり得る。そのような例では、さらなる精製により、化合物の特定の活性を増加させ得る。

【0111】

2つの核酸配列について参照されるとき、本明細書で使用される同等は、問題となる2つの配列が同じアミノ酸配列もしくは同等なタンパク質をコードすることを意味する。同等が、2つのタンパク質もしくはペプチドもしくは他の分子について使用されるとき、それは、2つのタンパク質もしくはペプチドが、アミノ酸置換のみを有する(例えば、保存的変化であるがこれに限定されない)実質的に同じアミノ酸配列または構造を有し、すべての変化は、実質的に該タンパク質もしくはペプチドの活性もしくは機能を改変しないことを意味する。同等が特性を意味するとき、該特性は、同じ程度で存在する(例えば、2つのペプチドが同じ型の酵素活性の異なる速度を示し得る)ことを必要としないが、活性は、通常、実質的に同じである。相補性は、2つのヌクレオチド配列について参照されるとき、2つのヌクレオチド配列は、一般に、対応するヌクレオチド間で、25%、15%もしくは5%未満のミスマッチでハイブリダイズすることができることを意味する。所望により、相補性割合が特定され得る。典型的には、2つの分子は、それらが高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするように選択される。

【0112】

本明細書で使用される受容体は、リガンドに対する親和性を有する分子を意味する。受容体は、自然に生じるか、もしくは合成分子であり得る。受容体はまた、当分野において、抗リガンドとして示され得る。本明細書で使用される受容体および抗リガンドは、交換可能である。受容体は、それらの不変の状態、もしくは他のポリペプチドと結合させて(ホモダイマーを含む)使用し得る。受容体は、特定の結合物質またはリンカーにより、直接もしくは間接的に、結合メンバーと、共有的もしくは非共有的に、または物理的に接触させて、結合させ得る。例えば、受容体は、抗体、細胞膜受容体表面受容体および内在化受容体、モノクローナル抗体および特定の抗原決定基と反応する抗血清(例えば、ウイルス、細胞、もしくは他の物質)、薬剤、ポリヌクレオチド、核酸、ペプチド、コファクタ

10

20

30

40

50

一、レクチン、糖、ポリサッカライド、細胞、細胞膜、ならびにオルガネラを含むが、これらに限定されない。

【0113】

本明細書で使用される“結合”、“結合した”および“結合する”は、 10^{-2} から 10^{-15} mole/L、一般には、 10^{-6} から 10^{-15} 、 10^{-7} から 10^{-15} および典型的には 10^{-8} から 10^{-15} の範囲内の K_d (および/または 10^5 - 10^{12} 、 10^7 - 10^{12} 、 10^8 - 10^{12} L/moleの K_a)での原子または分子間の結合を意味する。

【0114】

本明細書で使用される発光は、発エルゴン化学工程の励起生成物が発光して、その基底状態に戻ったときに産生される、検出可能電磁気(EM)放射、一般に、紫外線(UV)、赤外線(IR)または可視的EM放射を意味する。化学発光は、化学反応から生じる発光である。生物発光は、基質および/または酵素として、生物学的分子(または合成型もしくはその類似体)を用いた化学反応から生じる化学発光である。蛍光は、可視光が、刺激もしくは励起下で、発光または他の形態の放射、例えば、紫外線(UV)、赤外線(IR)または可視的EM放射により、物質から放出される発光である。

10

【0115】

本明細書で使用される化学発光は、エネルギーが分子に特異的に誘導され、それが電気的な励起を生じ、次いで、光子を放出し、それにより、可視光を放出する化学反応を意味する。温度は、このチャネルエネルギー(channeled energy)に関与しない。したがって、化学発光は、化学エネルギーの光エネルギーへの直接変換を含む。

20

【0116】

本明細書で使用される、化学発光のタイプである生物発光は、生物学的分子、特に、タンパク質による発光を意味する。生物発光の重要な条件は、オキシゲナーゼであるルシフェラーゼの存在下で、結合もしくは遊離している酸素分子であり、それは、基質であるルシフェリンに作用する。生物発光は、酸素分子の存在下で、基質ルシフェリン(生物発光基質)に作用し、基質を励起状態に変換し、低エネルギーレベルに戻るときに発光の形態でエネルギーを放出するオキシゲナーゼである酵素もしくは他のタンパク質(ルシフェラーゼ)により産生される。

【0117】

本明細書で使用される基質および生物発光を産生するための酵素は、一般に、各々、ルシフェリンおよびルシフェラーゼと呼ばれる。その特定の種について参照されるとき、明確化のために、各々の一般名は、それが由来する生物の名称と共に使用される(例えば、コメツキムシルシフェラーゼもしくはホタルルシフェラーゼ)。

30

【0118】

本明細書で使用されるルシフェラーゼは、発光反応を触媒するオキシゲナーゼを意味する。例えば、細菌ルシフェラーゼは、フラビンモノヌクレオチド(FMN)および脂肪族アルデヒドの酸化を触媒し、それにより発光する。海洋節足動物間で見出される他のクラスのルシフェラーゼは、Cypridina (Vargula)ルシフェリンの酸化を触媒し、他のクラスのルシフェラーゼは、Coleopteraルシフェリンの酸化を触媒する。

【0119】

したがって、ルシフェラーゼは、生物発光反応(生物発光を産生する反応)を触媒する酵素または発光タンパク質を意味する。ルシフェラーゼ、例えば、fireflyおよびGaussiaおよびRenillaルシフェラーゼは、触媒的に作用し、生物発光産生反応の間に変化しない酵素である。ルシフェラーゼ発光タンパク質、例えば、ルシフェリンが非共有結合的に結合するイクオリン発光タンパク質は、生物発光産生反応の間に、例えば、ルシフェリンの遊離により変化する。ルシフェラーゼは、タンパク質、またはタンパク質の混合物(例えば、細菌ルシフェラーゼ)であり、それは、生物内で天然に生じるか、またはその変異型もしくは突然変異体であり、例えば、突然変異誘発により産生され、1個もしくはそれ以上の特性、例えば、熱安定性を有する変異型(それは、自然に生じるタンパク質とは異なる)である。ルシフェラーゼおよび修飾突然変異体もしくはその変異型は、当分野で既知であ

40

50

る。本明細書での目的のために、ルシフェラーゼに関する参照は、発光タンパク質またはルシフェラーゼを意味する。

【0120】

したがって、例えば、Renillaルシフェラーゼに対する参照は、Renilla属のメンバーから単離された酵素、もしくは任意の他の起源、例えば、他の関連するカイアシ類から取得された同等分子、または合成的に製造されたものを意味する。それは、保存的アミノ酸置換を有し、実質的に活性を改変しないRenillaルシフェラーゼを包含することを意図する。アミノ酸の保存的置換は、当業者に既知であり、一般に、生じた分子の生物学的活性を変えなく作製され得る。当業者は、一般に、ポリペプチドの非本質的な領域における単一アミノ酸置換は、実質的に生物学的活性を改変しないと認識している(例えば、Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224を参照のこと)。

10

【0121】

本明細書で使用される生物発光基質は、ルシフェラーゼおよび任意の必要とされるアクチベーターの存在下で酸化され、発光する化合物を意味する。これらの基質は、本明細書ではルシフェリンとして示され、生物発光反応において酸化を受ける基質である。これらの生物発光基質は、すべてのルシフェリンまたはその類似体またはルシフェラーゼが相互作用し、発光するすべての合成化合物を含む。典型的な基質は、発光反応において、ルシフェラーゼまたはタンパク質の存在下で酸化される基質を含む。したがって、生物発光基質は、当業者がルシフェリンとして認識する化合物を含む。例えば、ルシフェリンは、ホタルルシフェリン、ウミホタル(また、Vargulaとして既知である)ルシフェリン(セレンテラジン)、細菌ルシフェリンおよびこれらの基質の合成類似体、または生物発光を産生する反応において、ルシフェラーゼの存在下で酸化される他の化合物を含む。

20

【0122】

本明細書で使用される“生物発光基質に変換可能である”とは、化学反応、例えば、酸化および還元感受性があり、その結果、生物発光基質を産生することを意味する。例えば、生物発光細菌の発光産生反応は、フラビンレダクターゼ酵素による、フラビンモノヌクレオチド基(FMN)の還元フラビンモノヌクレオチド(FMNH₂)への還元を含む。還元フラビンモノヌクレオチド(基質)を、次いで、酸素(アクチベーター)および細菌ルシフェラーゼと反応させ、長鎖アルデヒドの存在下でさらなる反応を受け、発光する中間体ペルオキシフラビンを形成する。この反応に関して、還元フラビンおよび長鎖アルデヒドは、生物発光基質である。

30

【0123】

本明細書で使用される、生物発光産生系は、生物発光反応を行うために必要とされる一組の試薬を意味する。したがって、特定のルシフェラーゼ、ルシフェリンおよび他の基質、溶媒ならびに他の試薬が、生物発光系から生物発光反応を完了するために必要とされ得る。したがって、生物発光産生系は、適当な反応条件下で生物発光を産生する、任意の一組の試薬を意味する。適当な反応条件は、生物発光反応が生じるのに必要な条件、例えば、pH、塩濃度および温度を意味する。一般に、生物発光系は、生物発光基質、ルシフェリン、ルシフェラーゼを含み、それは、酵素ルシフェラーゼおよび発光タンパク質および1種もしくはそれ以上のアクチベーターを含む。特定の生物発光系は、ルシフェラーゼが由来する特定の生物に関して同定され得る; 例えば、Renilla生物発光系は、Renillaルシフェラーゼ、例えば、Renillaから単離されるか、もしくは組み換え法を用いて産生されたルシフェラーゼ、またはこれらのルシフェラーゼの修飾物を含む。この系はまた、生物発光反応を完成するのに必要な特定のアクチベーター、例えば、ルシフェラーゼが酸素の存在下で反応し、発光を生じる酸素および基質を含む。

40

【0124】

本明細書で使用される蛍光タンパク質(FP)は、蛍光を発する(すなわち、ある波長のエネルギーを吸収し、他の波長でそれを放出する)能力を有するタンパク質を意味する。例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)は、510 nmまたは約510 nmで放出スペクトルのピークを

50

有するポリペプチドを意味する。種々の波長を放出するさまざまなFPが、当分野で既知である。例えば、FPは、緑色蛍光タンパク質(GFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、橙色蛍光タンパク質(OPF)、青緑色蛍光タンパク質(CFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)、赤色蛍光タンパク質(RFP)、遠赤外赤色蛍光タンパク質、または近赤外赤色蛍光タンパク質を含むが、これらに限定されない。利用可能な蛍光タンパク質の色のスペクトルの拡大(青色、青緑色、橙色、黄色および赤色変異型)は、融合タンパク質の複数色を追跡する方法を提供する。

【 0 1 2 5 】

本明細書で使用されるAequoreaGFPは、Aequorea属由来のGFPおよびその突然変異体もしくはその変異型を意味する。他の種、例えば、Anthozoa reef coral、Anemonia sea anemone、Renilla sea pansy、Galaxea coral、Acropora brown coral、TrachyphylliaおよびPectiniidae stony coralならびに他の種由来のそのような変異型およびGFPは、当業者に既知であり、利用可能である。例えば、GFP変異型は、BFP、CFP、YFPおよびOPFを含むが、これらに限定されない。蛍光タンパク質およびそれらの変異型の例は、GFPタンパク質、例えば、Emerald (Invitrogen, Carlsbad, CA)、EGFP (Clontech, Palo Alto, Calif.)、Azami-Green (MBL International, Woburn, MA)、Kaede (MBL International, Woburn, MA)、ZsGreen1 (Clontech, Palo Alto, Calif.)およびCopGFP (Evrogen/Axxora, LLC, San Diego, CA); CFPタンパク質、例えば、Cerulean (Rizzo, Nat Biotechnol. 22(4):445-9 (2004))、mCFP (Wang et al., PNAS U S A.101(48):16745-9 (2004))、AmCyan1 (Clontech, Palo Alto, Calif.)、MiCy (MBL International, Woburn, MA)、およびCyPet (Nguyen and Daugherty, Nat Biotechnol. 23(3):355-60 (2005)); BFPタンパク質、例えば、EBFP (Clontech, Palo Alto, Calif.); YFPタンパク質、例えば、EYFP (Clontech, Palo Alto, Calif.)、YPet (Nguyen and Daugherty, Nat Biotechnol. 23(3):355-60 (2005))、Venus (Nagai et al., Nat. Biotechnol. 20(1):87-90 (2002))、ZsYellow (Clontech, Palo Alto, Calif.)、およびmCitrine (Wang et al., PNAS U S A.101(48):16745-9 (2004)); OPFタンパク質、例えば、cOPF (Stratagene, La Jolla, CA)、mKO (MBL International, Woburn, MA)、およびmOrange; ならびに他のもの(Shaner NC, Steinbach PA, and Tsien RY., Nat Methods. 2(12):905-9 (2005))を含む。

【 0 1 2 6 】

本明細書で使用される赤色蛍光タンパク質またはRFPは、corallimorph Discosomaから単離されたDiscosoma RFP (DsRed) (Matz et al., Nature Biotechnology 17: 969-973 (1999))、および他の種、例えば、Heteractis reef coralおよびActiniaもしくはEntacmaea sea anemone由来の赤色もしくは遠赤色蛍光タンパク質、ならびにそれらの変異型を意味する。RFPは、例えば、Discosoma変異型、例えば、mRFP1、mCherry、tdTomato、mStrawberry、mTangerine (Wang et al., PNAS U S A.101(48):16745-9 (2004))、DsRed2 (Clontech, Palo Alto, CA)、およびDsRed-T1 (Bevis and Glick, Nat. Biotechnol., 20: 83-87 (2002))、Anthomedusa J-Red (Evrogen)ならびにAnemonia AsRed2 (Clontech, Palo Alto, CA)を含む。遠赤色蛍光タンパク質は、例えば、Actinia AQ143 (Shkrob et al., Biochem J. 392(Pt 3):649-54 (2005))、Entacmaea eqFP611 (Wiedenmann et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(18):11646-51 (2002))、Discosoma変異型、例えば、mPlumおよびmRaspberry (Wang et al., PNAS U S A.101(48):16745-9 (2004))、ならびにHeteractis HcRed1およびt-HcRed (Clontech, Palo Alto, CA)を含む。

【 0 1 2 7 】

本明細書で使用される、評価することまたは決定することとなる用語は、産物の活性についての絶対値を取得するという意味で、または活性レベルを示す指標、比率、割合、視覚的もしくは他の値を取得するという意味で、量的および定性的決定を含むことを意図する。評価は、直接もしくは間接的であり得る。

【 0 1 2 8 】

本明細書で使用される活性は、試験化合物またはウイルス(または組成物または他の混合物)のインビボ投与後に生じる、生理学的応答におけるそのインビボ活性を意味する。

10

20

30

40

50

したがって、活性は、そのような化合物、組成物および混合物の、生じた治療効果および医薬的活性を包含する。活性は、そのような活性を試験するか、もしくは使用するよう設計された、インビトロおよび/またはインビボ系で観察され得る。

【0129】

本明細書で使用されるワクチンは、対象に投与されると、それを投与された対象に免疫応答を誘導し、免疫剤または免疫学的交差反応剤による次のチャレンジに対して、免疫化対象を保護する組成物を意味する。ワクチンは、病原体、例えば、免疫学的薬剤を発現し、および/またはすでに対象に感染したウイルスに対する免疫応答を促進するために使用され得る。保護は、完全であるか、もしくは部分的であり得る(すなわち、非ワクチン対象と比較して、症状もしくは感染の減少)。典型的には、ワクチンは、哺乳類である対象に投与される。免疫学的交差反応剤は、例えば、免疫原として使用されたサブユニットペプチドが由来する全タンパク質(例えば、腫瘍抗原)であり得る。あるいは、免疫学的交差反応剤は、免疫剤により誘導される抗体により、全体または一部が認識される異なるタンパク質であり得る。例えば、ワクチンは、免疫学的交差反応剤を発現する修飾ワクシニアウイルスであり得る。

10

【0130】

本明細書で使用される“薬学的に許容される担体”は、医薬組成物での使用のために適当であり、好ましくは、非毒性のすべての担体、希釈剤、賦形剤、湿潤剤、緩衝剤、懸濁剤、滑剤、アジュバント、固体結合剤、ビヒクル、送達系、乳化剤、崩壊剤、吸収剤、保存剤、界面活性剤、着色剤、芳香剤、または甘味剤を意味する。

20

【0131】

本明細書で使用される複合体は、一般に、種間の相互作用の性質(すなわち、イオン性、共有結合、または静電的)に関わらず、2種またはそれ以上の種間の結合を意味する。

【0132】

本明細書で使用される“組み合わせ”は、2種もしくはそれ以上の項目または要素の任意の組み合わせを意味する。例えば、組み合わせは、2種もしくはそれ以上の医薬組成物、2種もしくはそれ以上の有効成分、例えば、2種のウイルス、またはウイルスおよび化学治療化合物、2種もしくはそれ以上のウイルス、ウイルスおよび治療剤、ウイルスおよび造影剤、ウイルスおよび複数の治療および/または造影剤を含む組成物、またはそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない。そのような組み合わせは、キットとしてパッケージされ得る。

30

【0133】

本明細書で使用される組成物は、任意の混合物を意味する。それは、溶液、懸濁液、エマルジョン、液体、粉末、ペースト、含水物、非含水物または該成分の任意の組み合わせであり得る。

【0134】

本明細書で使用される液体は、流動可能な任意の組成物を意味する。したがって、液体は、半固体、ペースト、溶液、水性混合物、ゲル、ローション、クリームおよび他の該組成物の形態での組成物を包含する。

【0135】

本明細書で使用されるキットは、所望により、組み合わせ物および/または他の反応の使用のための指示書ならびに該使用のための構成要素を含む、パッケージ化された組み合わせ物である。

40

【0136】

限定のためではなく開示を明確にするために、詳細な説明は、下記で小区分に分類される。

【0137】

B. 処置および診断のためのウイルス

本明細書は、治療および診断的使用のためのウイルスを提供する。また、本明細書の他の場所で、治療および診断的使用のためのウイルスを製造および使用する方法を提供する

50

。本明細書で提供されるウイルスは、診断および/治療目的のために有用な化合物の取り込みもしくは保持を促進し得る遺伝子産物をコードする。そのようなウイルスの例は、トランスポータータンパク質をコードするウイルスである。本明細書で提供されるトランスポータータンパク質をコードするウイルスは、標的細胞、例えば、腫瘍細胞に局在および感染し、その結果、感染細胞でトランスポータータンパク質の発現を生じる。感染細胞で発現したトランスポータータンパク質は、細胞膜を通過して、診断および治療的部分の取り込みの増加を生じ得る。診断的部分は、光学的もしくは非光学的画像方法により検出可能なシグナルを放出し得るものを含む。画像化法、例えば、ポジトロン断層法(PET)によるシグナルの検出により、感染組織、例えば、腫瘍もしくは炎症の視覚化が可能となる。

【0138】

10

例えば、診断的部分は、本明細書の他の部分で提供され、対象内で画像化し得る放射性標識化合物を含む。発現したトランスポータータンパク質による該化合物の取り込みは、感染細胞での標識化合物の増加した蓄積のために、化合物により放出されるシグナルの増幅を可能にする。したがって、本明細書で提供されるウイルスを用いたトランスポーターに基づく画像法は、1つの部分の1つの受容体との限定された結合と比較して、より多くの診断的部分が感染細胞に取り込まれ得るので、受容体に基づく画像法と比較して、標的組織でのより高いシグナル強度を生じ得る。したがって、感染対非感染組織について、インピボで、高いシグナル対ノイズ比を提供することができる。

【0139】

本明細書で提供されるウイルスによりコードされ得る、例示的なトランスポータータンパク質は、本明細書の他の場所に記載されており、例えば、ヒトノルエピネフリントランスポーター(hNET)およびヒトナトリウム-ヨウ素共輸送体(hNIS)を含む。本明細書で提供されるヒトノルエピネフリントランスポーター(hNET)をコードするウイルスは、例えば、GLV-1h99、GLV-1h100、GLV-1h101、GLV-1h139、GLV-1h146およびGLV-1h150を含むが、これらに限定されない。本明細書で提供されるナトリウム-ヨウ素共輸送体(hNIS)をコードするウイルスは、例えば、GLV-1h151、GLV-1h152およびGLV-1h153を含むが、これらに限定されない。

20

【0140】

本明細書で提供されるトランスポータータンパク質をコードするウイルスは、典型的には、弱毒化されている。弱毒化ウイルスは、宿主内で疾患を引き起こす能力が減少している。減少した能力は、病原性のあるウイルスの能力に対する、さまざまな異なる修飾のいずれかから生じ得る。例えば、ウイルスは、その非弱毒化型と比較して、減少した毒性、非腫瘍器官もしくは組織に蓄積する減少した能力、細胞溶解もしくは細胞死を生じる減少した能力、または減少した複製能を有し得る。しかしながら、本明細書で提供される弱毒化ウイルスは、複製し、免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍細胞の溶菌または溶解を引き起こし、細胞死を受けるか、または免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍細胞に対する免疫応答を生じるか、もしくは促進する、少なくともいくつかの能力を保持する。本明細書で提供されるそのようなウイルスの特性は、本明細書の他の場所に詳述されている。

30

【0141】

40

本明細書で提供されるトランスポータータンパク質をコードするウイルスは、腫瘍および/または転移部を含む、免疫特権細胞もしくは免疫特権組織(また、炎症もしくは創傷組織および細胞を含む)に蓄積し、感染し得る。本明細書で提供されるウイルスは、一般に、対象の免疫系により、ウイルスが投与される対象から除去されるが、該免疫特権領域が宿主免疫系から隔離されているために、免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍に蓄積し、生存し、増殖することができる。したがって、腫瘍および/または転移部に適用される本明細書で提供される方法、ならびにそれに関連する診断および治療法は、容易に、炎症および創傷細胞および組織を含む他の免疫特権細胞および組織に適用することができる。

【0142】

本明細書で提供されるトランスポータータンパク質をコードするウイルスの中には、ウ

50

ウイルス生活環の間、宿主細胞の核にウイルス核酸分子を侵入させる必要がない細胞質ウイルスが存在する。例えば、本明細書で提供される細胞質ウイルスは、オルトボックスウイルスを含むボックスウイルスファミリーのウイルスである。例えば、本明細書で提供されるボックスウイルスは、ワクシニアウイルスである。ワクシニアウイルスは、癌遺伝子治療およびワクチン接種での使用のためのさまざまな特徴を有しており、該特徴は、広い宿主および細胞型範囲、外来性遺伝子の巨大な輸送能力および他の株で修飾化ウイルスを設計および作製するための異なる株間の高い配列相同性を含む。遺伝子工学的手法により修飾ワクシニア株を作製するための技術は、十分に確立されている(Moss (1993) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 86-90; Broder and Earl (1999) *Mol. Biotechnol.* 13: 223-245; Timiryasova et al. (2001) *Biotechniques* 31: 534-540)。Western Reserve (WR)、Copenhagen、Tashkent、Tian Tan、Lister、Wyeth、IHD-J、およびIHD-W、Brighton、Ankara、MVA、Dairen I、LIPV、LC16M8、LC16MO、LIVP、WR 65-16、Connaught、New York City Board of Healthを含む、さまざまなワクシニアウイルス株が利用可能である。例えば、本明細書で提供されるワクシニアウイルスは、Lister株もしくはLIVPワクシニアウイルスである。

10

【 0 1 4 3 】

本明細書で提供されるLister株の修飾はまた、他のワクシニアウイルス(例えば、Western Reserve (WR)、Copenhagen、Tashkent、Tian Tan、Lister、Wyeth、IHD-J、and IHD-W、Brighton、Ankara、MVA、Dairen I、LIPV、LC16M8、LC16MO、LIVP、WR 65-16、Connaught、New York City Board of Health)に適合させることができる。本明細書で提供されるLister株の修飾はまた、ボックスウイルスファミリーのウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスおよびレトロウイルスを含むが、これらに限定されない他のウイルスに適合させることができる。

20

【 0 1 4 4 】

一般には、トランスポータータンパク質をコードするDNAは、ウイルス複製および標的組織への感染に重大な影響を与えない、ウイルスゲノム中の非本質的な遺伝子に挿入される。例えば、ワクシニアウイルスにおいて、非本質的な遺伝子座は、TK、HA、F14.5L、E2L/E3L、K1L/K2L、スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子座、7.5K、C7-K1L、J2R、B13R+B14R、A56R、A26LまたはI4L遺伝子座を含むが、これらに限定されない。トランスポーターをコードする異種核酸は、一般に、感染細胞でのトランスポータータンパク質の発現のためのプロモーターに操作可能に結合している。適当なプロモーターは、ウイルスプロモーター、例えば、ワクシニアウイルス天然および合成プロモーターを含む。例えば、ワクシニアウイルスプロモーターは、P11k、P7.5k早期/後期、P7.5k早期、P28後期、合成早期 P_{SE} 、合成早期/後期 P_{SEL} および合成後期 P_{SL} プロモーターを含むが、これらに限定されない。

30

【 0 1 4 5 】

例えば、本明細書で提供されるトランスポータータンパク質をコードするワクシニアウイルスは、ワクシニアウイルス株GLV-1h68(また、RVGL21と呼ばれる、配列番号1)に由来したものである。米国特許出願公開番号2005-0031643に記載されているGLV-1h68は、ワクシニアウイルスLIVP株(もともと、Lister株(ATCC Catalog No. VR-1549)をウシ皮膚に適合させたものに由来するワクシニアウイルス株(Institute of Viral Preparations, Moscow, Russia, Al' tshtein et al., (1983) *Dokl. Akad. Nauk USSR* 285:696 - 699))のDNA挿入遺伝子座を含む。GLV-1h68は、F14.5L(また、LIVPでF3と呼ばれる)遺伝子座、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子座、およびヘマグルチニン(HA)遺伝子座内に、検出可能マーカータンパク質をコードする発現カセットを含む。ワクシニアウイルス合成早期/後期プロモーター P_{SEL} ((P_{SEL})Ruc-GFP)の制御下で、Ruc-GFP cDNA分子(RenillaルシフェラーゼをコードするDNAとGFPをコードするDNAの融合)を含む発現カセットは、F14.5L遺伝子座に挿入され; ワクシニアウイルス合成早期/後期プロモーター $P_{7.5k}$ (($P_{7.5k}$)LacZ)の制御下で、ガラクトシダーゼをコードするDNA分子およびワクシニアウイルス合成早期/後期プロモーター P_{SEL} ((P_{SEL})rTrfR)に対して、転写のために逆方向に位置するラットトランスフ

40

50

エリン受容体をコードするDNAを含む発現カセットは、TK遺伝子座に挿入され(生じたウイルスは、トランスフェリン受容体タンパク質をコードするDNA分子が、カセット内で、プロモーターに対して、転写のために逆方向に位置するので、該タンパク質を発現しない);そして、ワクシニアウイルス後期プロモーター P_{11k} ($(P_{11k})gusA$)の制御下で、 β -グルクロニダーゼをコードするDNA分子を含む発現カセットは、HA遺伝子座に挿入された。GLV-1h68ウイルスは、腫瘍保有対象に対するウイルスの全身投与後、非腫瘍性組織と比較して、腫瘍組織における蓄積についての強力な選択性を示した。これは、他のワクシニアウイルス株、例えば、WRの腫瘍選択的蓄積よりもかなり高い選択性である(例えば、米国特許出願公開番号2005-0031643およびZhang et al. (2007) Cancer Res. 67(20):10038-46を参照のこと)。トランスポータータンパク質をコードする本明細書で提供されるウイルスは、トランスポータータンパク質をコードする異種DNAを用いたGLV-1h68株の1種もしくはそれ以上の発現カセットの置換により作製された。

10

【 0 1 4 6 】

ある例において、トランスポータータンパク質をコードする核酸は、1種もしくはそれ以上のさらなる異種遺伝子を含むウイルスゲノム中に導入され得るか、またはウイルスを弱毒化するために、1種もしくはそれ以上のウイルス遺伝子の除去もしくは置換により修飾され得る。異種遺伝子は、本明細書の他の場所に記載されたとおり、さらなる診断的もしくは治療的タンパク質をコードし得る。例えば、トランスポータータンパク質をコードする核酸の挿入により修飾され得るウイルスは、弱毒化Lister株 L1VPウイルスを含み、それは、米国特許出願公開番号2005/0031643、2004/0234455および2004/0213741ならびに米国特許出願番号11/975,088に記載されたL1VPウイルスを含むが、これらに限定されない。例えば、本明細書に記載されたとおり修飾され得る、本明細書に含まれるウイルスは、GLV-1h68から除去され、異種非コードDNA分子で置換された、1種もしくはそれ以上の発現カセットを有するウイルスを含む(例えば、GLV-1h70、GLV-1h71、GLV-1h72、GLV-1h73、GLV-1h74、GLV-1h85、およびGLV-1h86)。GLV-1h70は、F14.5L遺伝子座に挿入された(P_{SEL})Ruc-GFP、TK遺伝子座に挿入された(P_{SEL})rTrfRおよび($P_{7.5k}$)LacZ、および(P_{11k})gusAの代わりにHA遺伝子座に挿入された非コードDNA分子を含む。GLV-1h71は、(P_{SEL})Ruc-GFPの代わりにF14.5L遺伝子座に挿入された非コードDNA分子、TK遺伝子座に挿入された(P_{SEL})rTrfRおよび($P_{7.5k}$)LacZ、およびHA遺伝子座に挿入された(P_{11k})gusAを含む。GLV-1h72は、F14.5L遺伝子座に挿入された(P_{SEL})Ruc-GFP、(P_{SEL})rTrfRおよび($P_{7.5k}$)LacZの代わりにTK遺伝子座に挿入された非コードDNA分子、およびHA遺伝子座に挿入された(P_{11k})gusAを含む。GLV-1h73は、(P_{SEL})Ruc-GFPの代わりにF14.5L遺伝子座に挿入された非コードDNA分子、TK遺伝子座に挿入された(P_{SEL})rTrfRおよび($P_{7.5k}$)LacZ、および(P_{11k})gusAの代わりにHA遺伝子座に挿入された非コードDNA分子を含む。GLV-1h74は、(P_{SEL})Ruc-GFPの代わりにF14.5L遺伝子座に挿入された非コードDNA分子、(P_{SEL})rTrfRおよび($P_{7.5k}$)LacZの代わりにTK遺伝子座に挿入された非コードDNA分子、および(P_{11k})gusAの代わりにHA遺伝子座に挿入された非コードDNA分子を含む。GLV-1h85は、(P_{SEL})Ruc-GFPの代わりにF14.5L遺伝子座に挿入された非コードDNA分子、(P_{SEL})rTrfRおよび($P_{7.5k}$)LacZの代わりにTK遺伝子座に挿入された非コードDNA分子、およびHA遺伝子座に挿入された(P_{11k})gusAを含む。GLV-1h86は、F14.5L遺伝子座に挿入された(P_{SEL})Ruc-GFP、(P_{SEL})rTrfRおよび($P_{7.5k}$)LacZの代わりにTK遺伝子座に挿入された非コードDNA分子、および(P_{11k})gusAの代わりにHA遺伝子座に挿入された非コードDNA分子を含む。他の例において、ウイルスは、1種もしくはそれ以上の治療的遺伝子産物、例えば、血管新生阻害剤を発現するL1VPウイルス(例えば、GLV-1h68において、gusA発現カセットの代わりに、ワクシニアウイルス合成早期/後期プロモーターの制御下で、プラスミノーゲンK5ドメインをコードするDNA(配列番号109)を含む、GLV-1h81; GLV-1h68のTK遺伝子座において、LacZ/rTFr発現カセットの代わりに、ワクシニアウイルス合成早期プロモーター、ワクシニアウイルス合成早期/後期プロモーターまたはワクシニアウイルス合成後期プロモーター各々の制御下で、 ν_3 -インテグリンRGD結合モチーフ(tTF-RGD)と融合した切断ヒト組織因子をコードするDNA(配列番号105)を含む、GLV-1h104、GLV-1h105およびGLV-1h106; GLV-1h68のTK遺伝子座において、Lac

20

30

40

50

Z/rTFR発現カセットの代わりに、ワクシニアウイルス合成早期プロモーター、ワクシニアウイルス合成早期/後期プロモーターまたはワクシニアウイルス合成後期プロモーター各々の制御下で、抗VEGF一本鎖抗体G6(配列番号106)をコードするDNA(配列番号106)を含む、GLV-1h107、GLV-1h108およびGLV-1h109)および腫瘍抑制タンパク質(例えば、GLV-1h68において、gusA発現カセットの代わりに、ワクシニアウイルス合成早期プロモーター、ワクシニアウイルス合成早期/後期プロモーターまたはワクシニアウイルス合成後期プロモーター各々の制御下で、IL-6受容体と融合したIL-6を含む融合タンパク質(sIL-6R/IL-6)(配列番号108)を発現する、GLV-1h90、GLV-1h91およびGLV-1h92; ならびにGLV-1h68のF14.5L遺伝子座において、Ruc-GFP融合遺伝子発現カセットの代わりに、ワクシニアウイルス合成早期プロモーター、ワクシニアウイルス合成早期/後期プロモーターまたはワクシニアウイルス合成後期プロモーター各々の制御下で、IL-24 (黒色腫分化遺伝子、mda-7; 配列番号107)を発現する、GLV-1h96、GLV-1h97およびGLV-1h98)を含むが、これらに限定されない。本明細書で提供されるウイルス内で改変され得るさらなる治療的遺伝子産物は、本明細書の他の場所に記載されている。

【0147】

C. トランスポータータンパク質

膜輸送タンパク質(また、トランスポーターとして既知である)は、イオン、小分子、または巨大分子、例えば、他のタンパク質の膜を通じた移動に関与するタンパク質である。輸送タンパク質は、それらが物質を輸送する膜にまたがる膜内在性タンパク質である。これらのタンパク質は、促進された拡散または能動輸送により、物質の移動を補助することができる。トランスポーターは、細胞外膜、ミトコンドリアまたは他の細胞内オルガネラに位置し得る。本明細書で提供される方法を用いてウイルスで発現させると、これらのトランスポーターは、検出可能および/または治療物質を、細胞、例えば、腫瘍細胞に輸送および蓄積するように機能し得る。例えば、トランスポーターは、トランスポーターにより仲介される、画像化での使用のための放射性標識物質の濃縮された細胞内蓄積により、シグナルの増幅を提供することができ、治療物質をウイルス標的化腫瘍に送達する手段を提供することができる。

【0148】

トランスポーターは、当業者に既知のさまざまな系およびデータベースを用いて、分類および同定され得る。そのような系は、本明細書に記載された方法を用いてウイルスで発現され得るトランスポーターを同定するのを助け、各トランスポーターについての基質を同定するために使用され得る。例えば、Transporter Classificationデータベース(TCDB; www.tcdb.org/)は、イオンチャネルを含む膜輸送タンパク質についてのIUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)承認分類系である(Saier et al., (2006) Nucl. Acids. Res. 34: D181-D186)。これは、酵素を分類するために、ECナンバース系と同様に設計されているが、それはまた、系統発生的な情報を使用している。TC系は、およそ3000個のタンパク質を、550個以上のトランスポーターファミリーに分類する。他の系は、溶質輸送体(SLC)遺伝子命名系であり、それは、この群のトランスポーターをコードするHuman Genome Organization (HUGO)の遺伝子名に基づき、47個のファミリーに分類された300個以上のメンバーを含む。個々のSLCファミリー内のメンバーは、互いに20%以上の配列相同性を有する。SLC群のファミリーに包含されるための基準は、進化的なものよりもむしろ機能的なもの(すなわち、溶質を輸送する膜内在性タンパク質)である。SLC群は、促進トランスポーター(溶質が電気化学的勾配により下り坂輸送されるのを可能にする)および二次的活性トランスポーター(該勾配により下り坂輸送された第2担体の輸送と結合することにより、溶質が、それらの電気化学的勾配に対して上り坂輸送を可能にし、その結果、全体の遊離エネルギーは、なお有効である)であるトランスポーターを含む。SLC群は、ATP駆動トランスポーター、イオンチャネルまたはアクアポリンを含まない。SLC群の多くのメンバーは、細胞外膜に位置するが、いくつかのメンバーは、ミトコンドリア(最も注目すべきSLCファミリー-25)または細胞内オルガネラに局在する。表2は、SLCファミリー(例えば、SLC1)、サブファミリー(例えば、SLC1A)およびファミリーのメンバ

10

20

30

40

50

ー(例えば、“溶質輸送体ファミリー-1、メンバー-1”に対応するSLC1A1)を提供する。

【0149】

表2. 溶質輸送体(SLC)トランスポーターファミリー

【表2】

ファミリー	メンバー
SLC1: 高親和性グルタミン酸・中性アミノ酸トランスポーターファミリー	SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A4, SLC1A5, SLC1A6, SLC1A7
SLC2: 促進型GLUTトランスポーターファミリー	SLC2A1, SLC2A2, SLC2A3, SLC2A4, SLC2A5, SLC2A6, SLC2A7, SLC2A8, SLC2A9, SLC2A10, SLC2A11, SLC2A12, SLC2A13, SLC2A14
SLC3: ヘテロマーアミノ酸の重サブユニットトランスポーター	SLC3A1, SLC3A2
SLC4: 重炭酸トランスポーターファミリー	SLC4A1, SLC4A2, SLC4A3, SLC4A4, SLC4A5, SLC4A6, SLC4A7, SLC4A8, SLC4A9, SLC4A10, SLC4A11
SLC5: ナトリウム/グルコース共輸送体ファミリー	SLC5A1, SLC5A2, SLC5A3, SLC5A4, SLC5A5, SLC5A6, SLC5A7, SLC5A8, SLC5A9, SLC5A10, SLC5A11, SLC5A12
SLC6: ナトリウムおよび塩素依存性神経伝達物質トランスポーターファミリー	SLC6A1, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, SLC6A5, SLC6A6, SLC6A7, SLC6A8, SLC6A9, SLC6A10, SLC6A11, SLC6A12, SLC6A13, SLC6A14, SLC6A15, SLC6A16, SLC6A17, SLC6A18, SLC6A19, SLC6A20
SLC7: カチオン性アミノ酸トランスポーター/糖タンパク質関連ファミリー	SLC7A1, SLC7A2, SLC7A3, SLC7A4, SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8, SLC7A9, SLC7A10, SLC7A11, SLC7A13, SLC7A14
SLC8: Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換輸送体ファミリー	SLC8A1, SLC8A2, SLC8A3
SLC9: Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体ファミリー	SLC9A1, SLC9A2, SLC9A3, SLC9A4, SLC9A5, SLC9A6, SLC9A7, SLC9A8, SLC9A9, SLC9A10, SLC9A11
SLC10: ナトリウム胆汁塩共輸送体ファミリー	SLC10A1, SLC10A2, SLC10A3, SLC10A4, SLC10A5, SLC10A6, SLC10A7

10

20

30

【0150】

【表3】

ファミリー	メンバー
SLC11: プロトン結合金属イオントランスポーターファミリー	SLC11A1, SLC11A2
SLC12: 電気的中性カチオン-C1共輸送体ファミリー	SLC12A1, SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3, SLC12A4, SLC12A5, SLC12A6, SLC12A7, SLC12A8, SLC12A9
SLC13: ヒトNa ⁺ -硫酸塩/カルボン酸共輸送体ファミリー	SLC13A1, SLC13A2, SLC13A3, SLC13A4, SLC13A5
SLC14: 尿素トランスポーターファミリー	SLC14A1, SLC14A2
SLC15: プロトンオリゴペプチド共輸送体ファミリー	SLC15A1, SLC15A2, SLC15A3, SLC15A4
SLC16: モノカルボン酸トランスポーターファミリー	SLC16A1, SLC16A2, SLC16A3, SLC16A4, SLC16A5, SLC16A6, SLC16A7, SLC16A8, SLC16A9, SLC16A10, SLC16A11, SLC16A12, SLC16A13, SLC16A14
SLC17: 小胞性グルタミン酸トランスポーターファミリー	SLC17A1, SLC17A2, SLC17A3, SLC17A4, SLC17A5, SLC17A6, SLC17A7, SLC17A8
SLC18: 小胞性アミノトランスポーターファミリー	SLC18A1, SLC18A2, SLC18A3
SLC19: 葉酸/チアミノトランスポーターファミリー	SLC19A1, SLC19A2, SLC19A3
SLC20: III型Na ⁺ -リン酸塩共輸送体ファミリー	SLC20A1, SLC20A2

10

20

【0151】

【表4】

ファミリー	メンバー
SLC21/SLCO: 有機アニオン輸送体ファミリー	サブファミリー 1; SLCO1A2, SLCO1B1, SLCO1B3, SLCO1B4, SLCO1C1 サブファミリー 2; SLCO2A1, SLCO2B1 サブファミリー 3; SLCO3A1 サブファミリー 4; SLCO4A1, SLCO4C1 サブファミリー 5; SLCO5A1
SLC22: 有機カチオン/アニオン/両性イオントランスポーターファミリー	SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC22A4, SLC22A5, SLC22A6, SLC22A7, SLC22A8, SLC22A9, SLC22A10, SLC22A11, SLC22A12, SLC22A13, SLC22A14, SLC22A15, SLC22A16, SLC22A17, SLC22A18, SLC22A19, SLC22A20
SLC23: Na ⁺ 依存性アスコルビン酸トランスポーターファミリー	SLC23A1, SLC23A2, SLC23A3, SLC23A4
SLC24: Na ⁺ /(Ca ²⁺ -K ⁺)交換輸送体ファミリー	SLC24A1, SLC24A2, SLC24A3, SLC24A4, SLC24A5, SLC24A6
SLC25: ミトコンドリア輸送体ファミリー	SLC25A1, SLC25A2, SLC25A3, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, SLC25A7, SLC25A8, SLC25A9, SLC25A10, SLC25A11, SLC25A12, SLC25A13, SLC25A14, SLC25A15, SLC25A16, SLC25A17, SLC25A18, SLC25A19, SLC25A20, SLC25A21, SLC25A22, SLC25A23, SLC25A24, SLC25A25, SLC25A26, SLC25A27, SLC25A28, SLC25A29, SLC25A30, SLC25A31, SLC25A32, SLC25A33, SLC25A34, SLC25A35, SLC25A36, SLC25A37, SLC25A38, SLC25A39, SLC25A40, SLC25A41, SLC25A42, SLC25A43, SLC25A44, SLC25A45, SLC25A46
SLC26: 多機能性アニオン交換体ファミリー	SLC26A1, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A4, SLC26A5, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8, SLC26A9, SLC26A10, SLC26A11
SLC27: 脂肪酸および輸送体タンパク質ファミリー	SLC27A1, SLC27A2, SLC27A3, SLC27A4, SLC27A5, SLC27A6
SLC28: Na ⁺ 結合ヌクレオシド輸送体ファミリー	SLC28A1, SLC28A2, SLC28A3
SLC29: 促進ヌクレオシドトランスポーターファミリー	SLC29A1, SLC29A2, SLC29A3, SLC29A4
SLC30: 亜鉛流出ファミリー	SLC30A1, SLC30A2, SLC30A3, SLC30A4, SLC30A5, SLC30A6, SLC30A7, SLC30A8, SLC30A9, SLC30A10

10

20

30

40

【表5】

ファミリー	メンバー
SLC31: 銅トランスポーターファミリー	SLC31A1
SLC32: 小胞阻害剤アミノ酸トランスポーターファミリー	SLC32A1
SLC33: アセチル-CoAトランスポーターファミリー	SLC33A1
SLC34: II型Na ⁺ -リン酸塩共輸送体ファミリー	SLC34A1, SLC34A2, SLC34A3
SLC35: ヌクレオシド-糖トランスポーターファミリー	サブファミリー A; SLC35A1, SLC35A2, SLC35A3, SLC35A4, SLC35A5 サブファミリー B; SLC35B1, SLC35B2, SLC35B3, SLC35B4 サブファミリー C; SLC35C1, SLC35C2 サブファミリー D; SLC35D1, SLC35D2, SLC35D3 サブファミリー E; SLC35E1, SLC35E2, SLC35E3, SLC35E4
SLC36: プロトン結合アミノ酸トランスポーターファミリー	SLC36A1, SLC36A2, SLC36A3, SLC36A4
SLC37: 糖-リン酸塩/リン酸塩交換体ファミリー	SLC37A1, SLC37A2, SLC37A3, SLC37A4
SLC38: A & Nの系、ナトリウム結合中性アミノ酸トランスポーターファミリー	SLC38A1, SLC38A2, SLC38A3, SLC38A4, SLC38A5, SLC38A6
SLC39: 金属イオントランスポーターファミリー	SLC39A1, SLC39A2, SLC39A3, SLC39A4, SLC39A5, SLC39A6, SLC39A7, SLC39A8, SLC39A9, SLC39A10, SLC39A11, SLC39A12, SLC39A13, SLC39A14
SLC40: 側底イオン(iron)トランスポーターファミリー	SLC40A1

10

20

30

【0153】

【表6】

ファミリー	メンバー
SLC41: MgtE様マグネシウムトランスポーターファミリー	SLC41A1, SLC41A2, SLC41A3
SLC42: Rhアンモニウムトランスポーターファミリー(未定)	RHAG, RhBG, RhCG
SLC43: Na ⁺ 依存性、L系様アミノ酸トランスポーターファミリー	SLC43A1, SLC43A2, SLC43A3
SLC44: コリン様トランスポーターファミリー	SLC44A1, SLC44A2, SLC44A3, SLC44A4, SLC44A5
SLC45: 推定上の糖トランスポーターファミリー	SLC45A1, SLC45A2, SLC54A3, SLC45A4
SLC46: ヘムトランスポーターファミリー	SLC46A1, SLC46A2
SLC47: 多剤および毒素排出	SLC47A1, SLC47A2

40

【0154】

50

1. ナトリウムおよび塩素依存性神経伝達物質トランスポーターファミリー

例えば、本明細書に記載されたウイルスおよび方法での使用のためのトランスポーターは、ナトリウムおよび塩素依存性神経伝達物質トランスポーターファミリー(溶質輸送体ファミリー6; SLC6)のメンバーであり、それはまた、神経伝達物質トランスポーターのナトリウム/神経伝達物質共輸送体ファミリー(SNF)もしくは神経伝達物質/ナトリウム共輸送体ファミリー(NSS)として既知であり、TCDB系を用いると、TC 2.A.22に対応する。このファミリーのトランスポーターは、濃度勾配に対して神経伝達物質を細胞内に輸送するのに、 Na^+ および Cl^- の共輸送からエネルギーを誘導する。該ファミリーは、通常12個の保存された膜貫通らせんを有しており、 γ -アミノ酪酸(GABA)、ノルアドレナリン/アドレナリン、ドーパミン、セロトニン、プロリン、グリシン、コリン、ベタインおよびタウリンについてのトランスポーターを含む。 Na^+/Cl^- 神経伝達物質スーパーファミリーの配列解析は、それが4個のサブファミリーに分類され得ることを示し、これらは、モノアミン、アミノ酸プロリンおよびグリシン、GABAについてのトランスポーター、ならびに一群のオーファントランスポーターである(Nelson et al. (1998) *Methods Enzymol.* 296:425-436)。表3は、このファミリーの例示的なメンバーの遺伝子名、対応するタンパク質名および対応するヒトタンパク質の配列識別子を示す。

10

【 0 1 5 5 】

表3. SLC6ファミリーメンバー

【表7】

SLC6遺伝子	タンパク質名	配列番号
SLC6A1	ナトリウムおよび塩素依存性GABAトランスポーター1	配列番号36
SLC6A2	ノルエピネフリントランスポーター(ナトリウム依存性ノルアドレナリントランスポーター)	配列番号26
SLC6A3	ナトリウム依存性ドーパミントランスポーター	配列番号35
SLC6A4	ナトリウム依存性セロトニントランスポーター	配列番号34
SLC6A5	ナトリウムおよび塩素依存性グリシントランスポーター1	配列番号40
SLC6A6	ナトリウムおよび塩素依存性タウリントランスポーター	配列番号42
SLC6A7	ナトリウム依存性プロリントランスポーター	配列番号41
SLC6A8	ナトリウムおよび塩素依存性クレアチントランスポーター	配列番号44
SLC6A9	ナトリウムおよび塩素依存性グリシントランスポーター1、アイソフォーム1	配列番号40
	ナトリウムおよび塩素依存性グリシントランスポーター1、アイソフォーム2	配列番号95
	ナトリウムおよび塩素依存性グリシントランスポーター1、アイソフォーム3	配列番号96
SLC6A10	ナトリウムおよび塩素依存性クレアチントランスポーター2	配列番号97

10

20

30

【0156】

【表 8】

SLC6遺伝子	タンパク質名	配列番号
SLC6A11	ナトリウムおよび塩素依存性GABAトランスポーター3	配列番号38
SLC6A12	ナトリウムおよび塩素依存性ベタイントランスポーター	配列番号43
SLC6A13	ナトリウムおよび塩素依存性GABAトランスポーター2	配列番号37
SLC6A14	ナトリウムおよび塩素依存性中性および塩基性アミノ酸トランスポーターB(0+)	配列番号98
SLC6A15	オーファンナトリウムおよび塩素依存性神経伝達物質トランスポーターNTT73	配列番号99
SLC6A16	オーファンナトリウムおよび塩素依存性神経伝達物質トランスポーターNTT5	配列番号100
SLC6A17	オーファンナトリウムおよび塩素依存性神経伝達物質トランスポーターNTT4	配列番号101
SLC6A18	ナトリウムおよび塩素依存性トランスポーターXTRP2	配列番号102
SLC6A19	ナトリウム依存性中性アミノ酸トランスポーターB(0)	配列番号103
SLC6A20	ナトリウムおよび塩素依存性トランスポーターXTRP3	配列番号104

10

20

30

【0157】

a. ノルエピネフリントランスポーター

ノルエピネフリントランスポーター(NET)は、主に、ノルアドレナリン神経の細胞膜に局在するナトリウム塩素依存性神経伝達物質共輸送体であり、それは、高親和性再取り込みにより、ノルエピネフリン(NE)を細胞外間隙からシナプス前末端に移送する。NETはまた、“ナトリウム依存性ノルアドレナリントランスポーター”、“ノルアドレナリン:Na⁺共輸送体”、“SLC6A2”、“TC 2.A.22.1.2”および“溶質輸送体ファミリー6(神経伝達物質トランスポーター、ノルアドレナリン)、メンバー2”と呼ばれる。NETは、シナプスにおけるノルエピネフリンの持続性を制御するだけでなく、シナプス前およびシナプス後の恒常性においても重要な役割を果たす。NETに属するノルエピネフリントランスポーターは、モノアミントランスポーターであり、それは、他のモノアミントランスポーター、例えば、ドーパミントランスポーター(DAT)およびセロトニントランスポーター(SAT)と同様に、モノアミン神経伝達物質を細胞内外に移動させる。

40

50

【0158】

i. 構造

ノルエピネフリントランスポーター(NET)は、SLC6A2遺伝子によりコードされる。クローン化ヒトNET cDNA (Pacholcnyk et al. (1991) Nature 350:350-354)は、12個の膜貫通ドメインを有し、617個のアミノ酸ポリペプチド(配列番号26)をコードする1857塩基対のオープンリーディングフレーム(配列番号25)である。ヒトNETは、ウシ(配列番号27)、マウス(配列番号28)、ラット(配列番号29)、アカゲザル(配列番号30)、ニワトリ(配列番号31)、ヒツジ(断片)(配列番号32)およびニホンウズラ(配列番号33)を含むがこれらに限定されない他の種由来のノルエピネフリントランスポーターと、配列および構造的類似性を示す。配列番号45-60で示されたような複数の単一アミノ酸変異型に加えて、オルタナティブスプライシングから生じる、ヒトNETの3つの既知のC末端アイソフォームが存在する。一般には、ヒトNETの第14エクソンは、617個のアミノ酸ポリペプチド(配列番号26)のうち最後の7個のアミノ酸をコードする。2つのさらなる変異型では、オルタナティブスプライシングにより、第13エクソンに新規第15エクソンが加わる(第14エクソンをスキッピングする)。オルタナティブスプライシング第15エクソンは、3または18個のアミノ酸をコードし、その結果、各々、配列番号61および62で示されたポリペプチドを生じる(Distelmaier et al., (2004) J. Neurochem. 91: 537-546)。これらのアイソフォームの結合能力に差異はないが、長いC末端NETスプライス変異型(配列番号62)の発現が、野生型617アミノ酸NETの細胞表面発現におけるドミナントネガティブ効果を及ぼしたことが観察されている。したがって、このアイソフォームは、ノルアドレナリン神経伝達物質を制御するためのメカニズムに関与し得ることが予測されている(Distelmaier et al., (2004) J. Neurochem. 91: 537-546)。

10

20

【0159】

他のナトリウム/神経伝達物質共輸送体ファミリーメンバーと同様に、ヒトNETタンパク質は、12個の疎水性断片を含み、その各々は、18-25個のアミノ酸長であり、膜貫通ドメインを形成する(TM1からTM12)。アミノ末端およびカルボキシ末端は、細胞質空間に位置する。TM3およびTM4間の細胞外ループに位置する配列番号26のアミノ酸184、192および198位において、3つの考えられるNグリコシル化部位が存在する。NETのN結合グリコシル化は、トランスポーターの増加した細胞内発現を生じる(Nguyen et al., (1996) J. Neurochem. 67:645-655, Melikian et al., (1996) Mol Pharmacol. 50:266-276)。

30

【0160】

ii. 機能

ヒトNETは、ほとんど、中枢および末梢交感神経系内のノルアドレナリン神経の細胞膜上に発現しており、そこで、それは、シナプスによって放出されたノルエピネフリンを取り込む機能を果たしている。NET mRNA発現は、神経末端よりもむしろモノアミン作動性細胞体に局在しており、一般に、対応するNEを合成する細胞に限定される。そのようなものとして、脳でのNET mRNA発現は、主に、脳幹、および橋背部の青斑核複合体、特に、青斑核(nucleus locus coeruleus proper)に局在する細胞体でのノルアドレナリン経路の指標である。NET mRNAはまた、髄質および橋の外側被蓋野で発現している。これらのすべての領域は、CNS内の多くのノルアドレナリン作動性細胞体を含む。末梢において、NET mRNAは、交感神経節、副腎髄質および胎盤で発現している(Boenisch H and Bruess M. (2006) Handb Exp Pharmacol. 175:485-524)。

40

【0161】

NETは、ノルアドレナリンシグナル伝達の不活性化についての主要なメカニズムとして作用する。ノルエピネフリン(また、ノルアドレナリンとして既知である)は、交感神経系で見出される神経伝達物質であり、中枢神経系における重要な神経化学的メッセンジャーであり、生理学および病理学で重要な役割を果たす。NEは、気分制御、睡眠制御、行動の発現、記憶および覚醒の程度に関与する。NEはまた、内分泌系および自律神経系における制御に影響を及ぼし、心拍および血圧の制御に関与する。NETによるNEの再取り込みは、シナプスにおいてNEの生物学効果が終結する主要なメカニズムである。したがって、NET

50

は、シナプス間隙でのNEの過剰な増加を妨害するのに重要であり、それは、脳でのアドレナリン作動性神経伝達を制御し、心臓および他の末梢器官からNEを除去する(Tellioglu et al. (2001) Expert Rev. Mol. Med. 19 November)。シナプスに放出されたNEの約70-90%は、このメカニズムにより除去され、残りの10-30%は、循環もしくは神経外組織に漏出する(Esler et al. (1990) Physiol. Rev. 70:963-985)。

【 0 1 6 2 】

NEの輸送に加えて、ノルエピネフリントランスポーターはまた、ヒトNET導入細胞を用いて、インビボにおいて、他の基質を輸送することが示されており、ここで、他の基質は、ドーパミン、エピネフリン、メタラミノール、チラミン、フェニルエチルアミン、d-アンフェタミン、エフェドリンおよびセロトニンを含み、さらに他の物質、例えば、薬剤トラニルシプロミン、セレギリンおよびアメジニウム、アドレナリン作動性ニューロン遮断薬プレチリウムおよびグアナネチジン、メタ-ヨードベニルグアナジン(MIBG)、共有結合NET自殺基質およびノルアドレナリン作動性神経毒キシラミン、およびDSP-4、ドーパミン作動性神経毒1-メチル-4-テトラヒドロピリジニウム) MPP⁺および蛍光モデル基質ASP⁺を含むが、これらに限定されない(Boenisch H and Bruess M. (2006) Handb Exp Pharmacol. 175:485-524)。結合基質に加えて、NETはまた、阻害剤として作用するさまざまな分子に結合し、それは、抗鬱剤、例えば、デシプラミン、ノルトリプチリン、レボキセチン、マプロチリンおよびノミフェンシン、ならびに他の物質、例えば、ニソキセチン、シブトラミン、アトモキセチン、RTI-55およびコカイン(Boenisch H and Bruess M. (2006) Handb Exp Pharmacol. 175:485-524)を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 6 3 】

NETによる基質輸送は、Na⁺およびCl⁻イオンに依存し、細胞膜を介したNa⁺勾配が、基質の細胞内蓄積を駆動する。試験は、Na⁺、次いでCl⁻の連続した結合がトランスポーターへの基質結合のために必要とされることを示す(Boenisch H and Bruess M. (1994) Ann. N. Y. Acad. Sci. 733:193-202)。基質の結合後、Na⁺およびCl⁻は、基質と共に、細胞室内に共輸送される。イオンポンプNa⁺/K⁺-ATPaseが、細胞膜を介してNa⁺濃度を維持することによるこの輸送のための駆動力である。NEおよび他の基質の細胞質へのNa⁺およびCl⁻依存性輸送はまた、細胞膜を介したK⁺イオンの平衡を必要とする。

【 0 1 6 4 】

2. ナトリウム/グルコース共輸送体ファミリー

例えば、本明細書に記載されたウイルスおよび方法での使用のためのトランスポーターは、ナトリウム/グルコース共輸送体ファミリー(溶質輸送体ファミリー 5; SLC5)のメンバーであり、また、ナトリウム/溶質共輸送体ファミリー(SSSF)またはTC 2.A.21として既知である。このファミリーは、原核生物および真核生物起源の100以上のメンバーを有する。ファミリーのメンバーは、一般には、ヘリックス立体配座で、11から15個の膜貫通ドメイン(TM)を有する。このファミリーのタンパク質は、ナトリウム駆動力(内部に向けられた電気化学的ナトリウム勾配に貯蔵されたエネルギー)を利用し、基質、例えば、糖、アミノ酸、ビタミン、イオン、myo-イノシトール、酢酸フェニル、尿素、および水の山送り坂輸送(uphill transport)を誘導する。多くのトランスポーターは、異化経路の一部であり、対応する基質を獲得するために使用される。SSSFの中で最も特徴づけられているメンバーは、ヒトナトリウム/グルコーストランスポーター(SGLT1)、ナトリウム/ヨウ素トランスポーター(NIS)、および大腸菌のPutPである。表4は、SLC5ファミリーの例示的なメンバーの遺伝子名、対応するタンパク質名および対応するヒトタンパク質の配列識別子を示す。

【 0 1 6 5 】

表4. SLC5ファミリーメンバー

【表9】

SLC5遺伝子	タンパク質名	配列番号
SLC5A1	ナトリウム/グルコース共輸送体1	配列番号69
SLC5A2	ナトリウム/グルコース共輸送体2	配列番号70
SLC5A3	ナトリウム/ミオイノシトール共輸送体	配列番号71
SLC5A4	低親和性ナトリウム/グルコース共輸送体	配列番号72
SLC5A5	ナトリウム/ヨウ素共輸送体	配列番号63
SLC5A6	ナトリウム依存性マルチビタミントランスポーター	配列番号73
SLC5A7	高親和性コリントランスポーター1	配列番号74
SLC5A8	ナトリウム結合モノカルボン酸トランスポーター1	配列番号75
SLC5A9	ナトリウム/グルコース共輸送体4	配列番号76
SLC5A10	ナトリウム/グルコース共輸送体5、アイソフォーム1	配列番号77
	ナトリウム/グルコース共輸送体5、アイソフォーム2	配列番号78
	ナトリウム/グルコース共輸送体5、アイソフォーム3	配列番号79
	ナトリウム/グルコース共輸送体5、アイソフォーム4	配列番号80

10

20

30

【0166】

【表10】

SLC5遺伝子	タンパク質名	配列番号
SLC5A11	ナトリウム/ミオイノシトール共輸送体2、アイソフォーム1	配列番号81
	ナトリウム/ミオイノシトール共輸送体2、アイソフォーム2	配列番号82
	ナトリウム/ミオイノシトール共輸送体2、アイソフォーム3	配列番号83
	ナトリウム/ミオイノシトール共輸送体2、アイソフォーム4	配列番号84
SLC5A12	ナトリウム結合モノカルボン酸トランスポーター2、アイソフォーム1	配列番号85
	ナトリウム結合モノカルボン酸トランスポーター2、アイソフォーム2	配列番号86

10

20

【0167】

a. ナトリウム-ヨウ素共輸送体

ナトリウム-ヨウ素共輸送体(NIS)は、側底細胞膜を介してヨウ素(I^-)を甲状腺上皮細胞に輸送するイオンポンプであり、それは、ヨウ素の有機化ならびにトリヨードチロニン(T_3)およびチロキシン(T_4)の形成過程における重要な工程である。NISはまた、“ナトリウム/ヨウ素共輸送体”、“ $Na(+)/I(-)$ 共輸送体”、“SLC5A5”、“TC 2.A.21.5.1”および“溶質輸送体ファミリー5、メンバー5”と呼ばれる。

【0168】

i. 構造

ヒトナトリウム-ヨウ素共輸送体遺伝子(SLC5A5)は、約70 - 90 kDaの分子量を有する643個のアミノ酸の糖タンパク質をコードする(配列番号63)。該遺伝子は、15個のエクソンを有し、1929ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを有する(配列番号64)。NISは、13回膜貫通分節パターンを有し、N末端は、細胞外環境に面し、COOH末端は、細胞質ゾルに面することが予測されている(Levy et al. (1997) Proc. Nat. Acad. Sci. 94: 5568-5573.)。ヒトNISは、マウス(配列番号65)、ラット(配列番号66)、ゼブラフィッシュ(配列番号67)、およびアフリカツメガエル(配列番号68)由来のNISを含むがこれらに限定されない、他の種由来のNISタンパク質と配列および構造類似性を共有する。複数のヒトNIS天然変異型がまた存在し、配列番号87-94で示されたものを含むが、これらに限定されない。hNISの合成変異型がまた利用可能であり、タンパク質のC末端に挿入された複数のリジン残基を有するhNISトランスポーター(例えば、PCT国際公開2004/000236を参照のこと)を含み、それは、該タンパク質の正味の正電荷を増加させ、NIS基質の増加した輸送を可能にする。

30

40

【0169】

ヒトNISには、少なくとも2つの潜在的なグリコシル化部位が存在し、それは、配列番号63のアミノ酸489位、502位である。しかしながら、ラットNISを用いた研究は、グリコシル化が共輸送体の安定化、活性化、もしくは膜への標的化において重要な役割を果たしていないことを示している(Levy et al., (1998) J. Biol. Chem. 273: 22657-22663)。NISはまた、リンタンパク質である(Riedel et al. (2001) J. Biol. Chem. 276: 21458-21463)。配列番号63で示されたヒトNISポリペプチドのアミノ酸556位は、ホスホキナーゼA (

50

PKA)によるリン酸化のための潜在的な部位である。

【0170】

ii. 機能

NISは、甲状腺濾胞細胞の基底細胞膜に発現する内因性の膜貫通タンパク質であり、甲状腺ホルモン合成のための最初の重要な工程として、血流から甲状腺濾胞にヨウ素の蓄積を仲介する。甲状腺ホルモン T_3 および T_4 は、脊椎動物で唯一のヨウ素含有ホルモンである。 I^- は、 T_3 および T_4 の重要な構成要素であるので、甲状腺機能は、 I^- の腺への十分な供給に依存する。正常な甲状腺組織において、NISは、 Na^+/K^+ ATPaseの活性から生じた Na^+ イオン勾配の下り坂方向に、2:1の化学量論的に Na^+ I^- イオンを輸送する。NIS活性は、甲状腺細胞から細胞外液へ、30:1以上のヨウ素濃度勾配を生じるように、ヨウ素を輸送する。この過程は、チロトロピン(TSH)により刺激され、競合的阻害剤であるチオシアン酸(SCN^-)および過塩素酸(ClO_4^-)により阻害され得る。次いで、 I^- は、 I^- 流出と呼ばれる過程で、細胞質からコロイドに対する頂端部細胞膜に沿って、輸送される。 I^- は、酸化され、チログロブリン(Tg)分子内のチロシル残基に組み込まれ、細胞-コロイドインターフェースにおいて、ヨードチロシン残基の次の結合を生じる。この過程は、 I^- の有機化と呼ばれる。ヨウ素化Tgは、コロイドで細胞外に貯蔵される。甲状腺ホルモンの要求に対する応答で、取り込まれたヨウ素化Tgのファゴリソソーム加水分解が達成される。 T_3 および T_4 は、血流に分泌され、非分泌ヨウ素チロシンは、チロシンおよび I^- に代謝される(Dohan et al. (2003) *Endocrine Reviews* 24:48-77)。

10

【0171】

ヒトNISはまた、唾液腺、胃粘膜、乳腺、眼の毛様体、および脈絡叢を含む甲状腺以外の組織に発現する。したがって、NISはまた、唾液腺、胃粘膜、および授乳期乳腺を含む他の組織への I^- 能動輸送を仲介するが、この過程は、これらの組織において、TSHにより刺激されない(Dohan et al. (2003) *Endocrine Reviews* 24:48-77)。胃粘膜および唾液腺におけるNISの機能的意義は未知であるが、授乳期乳腺において、NISは、 I^- のミルクへの取り込みを仲介し、育児新生児は、この陰イオンを用いて、彼/彼女自身の甲状腺ホルモンを合成できるようになる。放射性ヨウ素を用いて画像化した全身での試験は、NIS発現の刺激による結果として、授乳期乳房組織においてかなりの量のヨウ素が濃縮していることを示す。捕捉されたヨウ素は、ミルク中に分泌され、発育中の乳児に対して、甲状腺ホルモン合成のためのヨウ素を提供する(Kogai et al., (2006) *Endocrine-Related Cancer* 13:797-826)。

20

30

【0172】

NISにより I^- を蓄積する甲状腺の能力は、放射性ヨウ素を用いた甲状腺の診断的シンチグラフィ画像化を可能にし、過剰機能甲状腺組織(例えば、グレーブス病ならびに I^- 輸送甲状腺癌およびその転移部において)を標的化および破壊するために、放射性ヨウ素の治療用量についての有効な手段として役立つ。さまざまな甲状腺腫瘍におけるNISの発現は、異なり得る。例えば、ある試験において、NIS mRNAおよびタンパク質の減少した発現が、乳頭および濾胞甲状腺癌で観察されており、一方で、他の試験は、乳頭での増加したNIS発現を示している(Kogai et al., (2006) *Endocrine-Related Cancer* 13:797-826)。甲状腺腫瘍での発現に加えて、NIS発現は、80%以上の乳癌組織で証明されている(Wapnir et al. (2003) *J. Clin. End. Met.* 88: 1880-1888)。結果として、乳癌細胞でNIS発現を刺激し、放射性ヨウ素を十分に濃縮する薬剤は、いくつかの分化した乳癌のための潜在的な治療の起源として考えられている(Boelaert et al. (2003) *Lancet* 361: 796-797)。

40

【0173】

I^- イオンを輸送することに加えて、試験は、NISがまた、 ClO_3^- 、 SCN^- 、 $SeCN^-$ 、 NO_3^- 、 BR^- 、 BF_4^- 、 IO_4^- および BrO_3^- 、 ClO_3^- 、 ReO_4^- 、 At^- 、 TcO_4^- を含むがこれらに限定されない、さらなる陰イオンを輸送し得ることを示した(Van Sande et al., (2003) *Endocrinology* 144:10、国際公開WO2004000236)。そのような基質は、治療もしくは画像化目的のために、当業者に既知の化学的形態で患者に投与され得る。例えば、 I^- は、 NaI として投与され、 TcO_4^- は、 $Na^+(TcO_4^-)$ として投与され得る。ある例において、画像化治療のために

50

本明細書に記載された方法および他の方法で使用されるNIS基質は、同位体であり、放射性核種を含む。例えば、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I および ^{131}I は、放射性同位体ヨウ素の形態であり、 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ は、過テクネートの同位体の形態であり、 $^{188}\text{ReO}_4$ は、過レニウム酸の同位体の形態であり、 ^{211}At は、アスタタイトの同位体の形態である。

【0174】

D. トランスポーターをコードする修飾化ウイルスを評価する方法

本明細書で提供されるウイルスおよび方法で使用されるトランスポーターの活性、ならびにこれらのトランスポーターを昆虫細胞に送達し、発現させる、修飾化ウイルスの能力は、当業者に既知の方法を用いてアッセイされ得る。1種もしくはそれ以上の基質を輸送するトランスポーターの能力は、修飾化ウイルスでの発現前に評価され得て、例えば、興味のあるトランスポーターをコードする核酸での細胞株のトランスフェクションにより評価され、それは、修飾化ウイルスに包含されるのに適当なトランスポーターを決定するのを助ける。トランスポーターの活性はまた、修飾化ウイルス、例えば、本明細書で提供されるウイルスいずれかの文脈において、評価され得る。トランスポーターは、例えば、トランスポーターを発現する修飾化ウイルスで感染させた後、細胞上で、細胞局在および発現レベルを含む発現プロファイルを決定するのに評価され得る。さらに、腫瘍組織でのトランスポーターの高レベルな発現を産生するウイルスの能力は、発現されたトランスポーターが腫瘍組織でトランスポーター基質により放出されるシグナルを濃縮可能であるか否かを決定するために評価され得る。トランスポーターの特異性、例えば、1種もしくはそれ以上の基質を輸送するトランスポーターの能力について、および活性レベル、例えば、どのくらい多くの基質が輸送されるかについて、評価され得る。そのようなアッセイは利用可能であり、当業者に既知である。例えば、該アッセイは、本明細書に提供されている。

【0175】

1. インビトロ評価

トランスポーターを有する修飾化ウイルス、例えば、本明細書に記載されたウイルスにより感染された細胞上でのトランスポーターの発現は、当分野で既知のアッセイを用いて評価され得る。ある例において、イムノアッセイは、修飾化ウイルスでの感染後、細胞上でのトランスポーターの発現を評価するために使用され得る。例えば、トランスポーターをコードする修飾化ウイルスは、細胞に感染させるために使用され得て、発現レベルは、細胞溶解後のトランスポーター特異的抗体でのイムノプロットにより決定される(例えば、下記の実施例2.Cを参照のこと)。あるいは、細胞ライセートは、トランスポーター発現を評価するために、酵素結合免疫吸着法(ELISA)により解析され得る。他の例において、感染細胞は、例えば、免疫組織化学、フローサイトメトリー解析またはトランスポーター特異的抗体を用いた免疫沈降法により解析される。

【0176】

トランスポーターをコードする修飾化ウイルスでの感染後、トランスポーターの細胞局在を決定するためのアッセイは、また、当分野で既知であり、本明細書で使用され得る。例えば、免疫細胞化学および細胞表面ビオチン化のような技術は、トランスポーター、例えば、NET、NISおよびGABAトランスポーターの局在を決定するために使用され得る(Gu et al., (2001) Mol. Cell Biol. 12:3797-3807, Ahn et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 6917-6924, Gu et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 18100-18106, Dayem et al., (2008) J. Endocrinol. 197:95-109)。

【0177】

膜に結合し、膜を通して基質を輸送するトランスポーターの能力は、当分野で既知の任意の1種もしくはそれ以上のアッセイを用いて、インビトロで評価され得る。ある例において、放射性トレーサーアッセイは、トランスポーター活性を評価するために使用される(例えば、下記の実施例2.Dに記載されたもの)。そのようなアッセイは、トランスポーターをコードする核酸を修飾化ウイルスに導入する前に行われ得る。これは、例えば、基質特異性についてトランスポーターをスクリーニングするために行われ得て、それは、どの

トランスポーターが本明細書で提供されるウイルスおよび方法での使用のために適当であるかを決定するのを助ける。例えば、トランスポーターをコードする核酸は、適当な細胞株に、安定的にもしくは一過的に導入されるか、もしくはウイルスベクターを用いて導入され(例えば、Moroz et al., (2007) J Nucl. Med. 48:827-836を参照のこと)、放射性トレーサーアッセイが行われ得る。あるいは、トランスポーターを発現する修飾化ウイルスは、適当な細胞株、例えば、腫瘍細胞株に感染するように使用され得る(例えば、実施例2.Dを参照のこと)。次いで、細胞に輸送される放射性標識基質の量を、例えば、ガンマ計数器により測定して、トランスポーターが基質に特異的であるか否かを決定し、もしそうであるなら、トランスポーターがどれくらいの効率で基質を輸送しているのかを決定する。多くの放射性標識基質は、容易に利用可能であり、基質を放射性標識する方法はまた、当分野で既知であり、放射性トレーサーアッセイでの使用のために望まれる基質を標識すべく、本明細書に記載された方法で使用され得る。同位体標識は、化合物の特定の位置に組み込まれ得て、ペプチドおよびポリペプチドおよび他の物質に組み込まれ得る(例えば、米国特許第5,102,651号、第5,277,893号、米国特許出願公開番号20070280883, Sandell et al., (2002) Bior. Med. Clin. Lett. 14:3611-3613を参照のこと)。そのようなアッセイは、トランスポーターをコードする修飾化ウイルスで感染させた細胞、およびトランスポーターをコードしていない修飾化ウイルスで感染させた細胞を用いて行われ得る。次いで、トランスポーターが発現したとき、基質取り込みが増加するレベルが、決定され得る。

10

【0178】

20

基質の輸送を検出する他のアッセイが当分野で既知であり、本明細書で使用され得る。ある例において、これらのアッセイは、蛍光基質を利用する。例えば、蛍光基質4-(4-ジメチルアミノステリル)-N-メチルピリジニウム(ASP⁺)が、NETの輸送活性を検出するために使用され得る(例えば、米国特許出願公開番号2004115703、国際公開番号WO2008043851, Hauns (2007) J. Biomol. Screen. 12:378-384を参照のこと)。他の蛍光基質は、活性または神経伝達物質トランスポーターを検出するために使用され得る(国際公開番号WO2008021870)。蛍光に基づくアッセイはまた、NISを含むがこれらに限定されない、他のトランスポーターについて既知である(例えば、Rhoden et al., (2007) Am. J. Physiol. 61:C814-C823を参照のこと)。トランスポーターに特異的な基質を同定するための他の方法は、当分野で既知であり、本明細書で使用され得る(例えば、米国特許第7309576号、欧州特許第EP1212616号を参照のこと)。

30

【0179】

2. インビボ評価

トランスポーターをコードする修飾化ウイルスはまた、インビボ(ヒトおよび動物モデル)で評価され得る。ヒトおよび非ヒト動物癌の異なる型の動物モデル、例えば、マウスモデルは、修飾化ウイルスでの感染により与えられたトランスポーター活性を評価するために使用され得る。腫瘍は、異なる腫瘍細胞型の移植により確立され得る。例えば、マウス、例えば、ヌードもしくはSCIDマウスでのヒト腫瘍異種移植片モデルは、ヒト肺癌(A549細胞, ATCC No. CCL-185); ヒト乳癌(GI-101A細胞, Rathinavelu et al., Cancer Biochem. Biophys., 17:133-146 (1999)); ヒト卵巣癌腫(OVCAR-3細胞, ATCC No. HTB-161); ヒト膵臓癌腫(PANC-1細胞, ATCC No. CRL-1469およびMIA PaCa-2細胞, ATCC No. CRL-1420); DU145細胞(ヒト前立腺癌細胞, ATCC No. HTB-81); ヒト前立腺癌(PC-3細胞, ATCC# CRL-1435); 大腸癌腫(HT-29細胞); ヒト黒色腫(888-MEL細胞, 1858-MEL細胞もしくは1936-MEL細胞; 例えば、Wang et al., (2006) J. Invest. Dermatol. 126:1372-1377を参照のこと); ならびにヒト線維肉腫(HT-1080細胞, ATCC No. CCL-121,)およびヒト中皮腫(MSTO-211H細胞)を含むが、これらに限定されない。

40

【0180】

トランスポーターを腫瘍に送達するウイルスの能力、および次のトランスポーターが発現し、活性化される能力は、そのようなモデルを用いて評価され得る(例えば、下記の実施例3を参照のこと)。例えば、トランスポーター発現は、トランスポーター特異的抗体を

50

用いて、腫瘍および非腫瘍組織の免疫組織化学、イムノプロットおよびフローサイトメトリー解析のような方法を用いて検出され得る。トランスポーターの活性はまた、例えば、放射性標識もしくは蛍光標識化基質を用いて評価され得る。次いで、動物全体画像化、例えば、PETもしくはガンマ画像化が行われ(例えば、下記の実施例3.BおよびCを参照のこと)、腫瘍細胞における標識化基質の輸送および蓄積が検出され得る。他の例において、マウス由来の組織が抽出され、放射性標識もしくは蛍光標識化基質が、例えば、画像化、フローサイトメトリー、ガンマ計数もしくは蛍光顕微鏡により検出され得る。

【0181】

ある例において、放射性標識基質はまた、化学治療剤であり得るか、または治療剤と結合し得る。したがって、薬剤の腫瘍細胞への輸送の治療効果はまた、動物モデルで評価され得る。例えば、腫瘍成長の変化は、トランスポーター/化学治療剤をコードする修飾化ウイルスでの感染後に評価され得て、トランスポーターをコードしない修飾化ウイルスでの感染後の腫瘍成長と比較され得る。

【0182】

3. 基質の選択

特定のトランスポータータンパク質により細胞に輸送され得る基質は、当分野で既知であり、画像化および/または治療剤としての使用のために選択され得る。基質は、PETおよびSPECT画像化ならびに本明細書の他の場所に記載された他の画像化を含む画像化による、インビボでの検出のために放射性標識され得る。放射性標識基質は、画像化および腫瘍の治療のために使用され得る。例えば、対応するトランスポータータンパク質を発現する感染腫瘍細胞内での放射性基質の蓄積は、腫瘍の放射線治療処置を提供し得る。

【0183】

例えば、ノルエピネフリン、ドーパミンおよびセロトニントランスポーターにより輸送されるために選択され得る検出可能基質は、放射性標識メタヨードベンジルグアニジン(MIBG)、例えば、 ^{124}I -MIBGおよび ^{123}I -MIBG、 ^{131}I -MIBGおよび ^{11}C -標識化ヒドロキシフェドリン(HED)を含むが、これらに限定されない(Shulkin et al. (1986) J Nucl Med 27:1138-42 and Glowniak et al. (1993) J Nucl Med 34:1140-6)。例えば、hNISにより輸送されるために選択され得る検出可能基質は、放射性ヨウ素($^{123}\text{I}^-$ 、 $^{124}\text{I}^-$ および $^{131}\text{I}^-$)、他の放射性標識化アニオン($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (pertechnetate), $^{76}\text{Br}^-$)、 $^-$ 放射性 $^{188}\text{レニウム}$ ($^{188}\text{ReO}_4^-$)および $^-$ 放射性 $^{211}\text{アスタチン}$ ($^{211}\text{At}^-$)を含むが、これらに限定されない(Van Sande et al. (2003) Endocrinology 144:247-52; Barton et al. (2003) Mol Ther 8:508-18; Kang et al. (2004) J Nucl Med 45:1571-6; Cho et al. (2002) Gene Ther 9:1139-45; Groot-Wassink et al. (2004) Mol Ther 9:436-42; Niu et al. (2004) J Nucl Med 45:445-9; Groot-Wassink et al. (2002) Hum Gene Ther 13:1723-35; Shimura et al. (1997) Endocrinology 138:4493-6; Mandell et al. (1999) Cancer Res 59:661-8; Boland et al. (2000) Cancer Res 60:3484-92; Carlin et al. (2002) Nucl Med Biol 29:729-39; Haberkorn et al. (2003) Gene Ther 10:774-80)。hNISはまた、当分野で既知の方法に基づいて標識され得るアニオン、例えば、 ClO_3^- 、 SCN^- 、 SeCN^- 、 NO_3^- 、 Br^- 、 BF_4^- 、 IO_4^- および BrO_3^- を輸送し得る(Van Sande et al. (2003) Endocrinology 144:247-52)。

【0184】

選択された基質はまた、腫瘍を治療するための細胞毒性剤と結合させ得る。したがって、トランスポーター基質の取り込みは、トランスポーターを発現する感染腫瘍での細胞毒性剤の蓄積を可能にする。蓄積はまた、周囲の腫瘍組織での高レベルの細胞毒性剤を生じ、その結果、周囲の腫瘍細胞による細胞毒性剤の取り込みを促進する。そのような腫瘍治療のための細胞毒性剤は、当分野で既知であり、二本鎖リシン、リシンA鎖、アプリン、アプリンA鎖、サポリン、モデシン、モデシンA鎖、緑濃菌エンドトキシン、コレラ毒素、赤痢菌毒素、大腸菌熱不安定毒素およびジフテリア毒素、ドキシソルピシン、ダウノマイシン、5-フルオロウラシル、メトトレキサート、タキソール、リシンA、コルヒチン、サイトカラシン、モネンシン、ウアバイン、ミトキサントロン、ピンデシン、ピンブラスチン

10

20

30

40

50

、ピクリスチンまたはエンテロトキシンを含むが、これらに限定されない。

【0185】

E. 提供されるウイルスのさらなる修飾

本明細書で提供されるトランスポータータンパク質をコードするウイルスは、さらなる修飾を含み得る。そのような修飾は、ウイルスを修飾するための任意の既知の方法を用いてなされ得る。ウイルスのさらなる修飾は、トランスポータータンパク質をコードするDNAを導入するウイルスゲノムの修飾より前に、同時に、もしくは後に、導入され得る。さらに、本明細書で提供されるウイルスは、またさらに、ウイルスを弱毒化するように修飾され得る。したがって、本明細書で提供される方法は、ウイルスを修飾するための任意の既知の方法と組み合わせ得る。さらに、本明細書で提供される方法は、ウイルスの弱毒化を調節するための任意の既知の方法と組み合わせ得る。例えば、該方法は、例えば、ウイルス遺伝子プロモーターもしくはエンハンサー領域の点突然変異、欠失突然変異、挿入による中断、置換もしくは突然変異による、1種もしくはそれ以上のウイルス遺伝子の修飾を含む。

10

【0186】

本明細書で提供されるウイルスは、ウイルスゲノム中に挿入された、1種もしくはそれ以上のさらなる異種核酸分子を含み得る。異種核酸分子は、オープンリーディングフレームを含み得るか、または非コード配列であり得る。ある場合には、異種核酸は、ウイルス遺伝子の全部もしくは一部と置換される。

【0187】

本明細書で提供されるウイルスのさらなる修飾は、1種もしくはそれ以上のウイルスの特性を高めることができる。そのような特性は、弱毒化された病原性、減少した毒性、腫瘍への選択的蓄積、腫瘍細胞に対する免疫応答を活性化する増加した能力、増加した免疫原性、増加もしくは減少した複製能、およびさらなる外因性タンパク質を発現する能力、ならびにそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。ある例において、修飾化ウイルスは、腫瘍細胞を攻撃的に殺傷することなく、腫瘍細胞に対する免疫応答を活性化する能力を有する。他の例において、ウイルスは、画像化のために使用され得るさらなる遺伝子産物を含む、1種もしくはそれ以上の検出可能遺伝子産物を発現するように修飾され得る。他の例において、ウイルスは、腫瘍または炎症もしくは創傷組織の治療のために、1種もしくはそれ以上の遺伝子を発現するように修飾され得る。他の例において、ウイルスは、遺伝子産物を収集し、および/または遺伝子産物に対する抗体を収集するために、1種もしくはそれ以上の遺伝子を発現するように修飾され得る。

20

30

【0188】

1. ウイルス遺伝子の修飾

ウイルスを修飾する方法は、1種もしくはそれ以上のウイルス遺伝子の修飾を含む。修飾は、ウイルス遺伝子を不活性化させるか、またはウイルス遺伝子産物の活性を停止させるか、もしくは減少させるものを含み得る。ある例において、ウイルス遺伝子は、非コード核酸で置換される。ウイルス遺伝子のそのような修飾は、ウイルス過程、例えば、ウイルス感染力、ウイルスDNA複製、ウイルスタンパク質合成、ウイルス粒子集合および成熟化、ならびにウイルス粒子放出を改変し得る。修飾のためのウイルス遺伝子は、例えば、ウイルス表面抗原(例えば、宿主細胞受容体へのウイルス接着を仲介するタンパク質)、ウイルスプロテアーゼ、ならびにウイルス複製およびウイルス遺伝子の転写に参与するウイルス酵素(例えば、ポリメラーゼ、レプリカーゼおよびヘリカーゼ)を含むが、これらに限定されない。そのような遺伝子の修飾は、ウイルスの全体的な複製およびウイルス粒子の産生を減少させ、その結果、より弱毒化したウイルスを生じ得る。

40

【0189】

ある例において、ウイルス遺伝子は、他のウイルス由来のホモログ遺伝子または異なる遺伝子で置換され得る。例えば、本明細書で提供されるワクシニアウイルスは、ウイルスのEEV型を増加させるために、A34R遺伝子を異なる株に由来する他のA34R遺伝子で置換することにより修飾され得る。ある例において、ワクシニアのLister株に由来するA34R遺伝

50

子は、ワクシニアウイルスのIHD-J株由来のA34R遺伝で置換され得る。

【0190】

他の態様において、ウイルス表面抗原遺伝子は、キメラタンパク質を産生するように修飾され得て、その結果、異種エピトープがウイルスの表面に発現する。したがって、そのようなキメラタンパク質を発現するウイルスは、ワクチンとして、宿主対象内で免疫応答を産生させるための使用で有用である。エピトープは、例えば、腫瘍抗原、ウイルスおよび細菌抗原を含むが、これらに限定されない。多くの例示的な抗原が、当分野において既知であり、例えば、Novellino et al. (2005) *Cancer Immunol Immunother.* 54(3):187-207; Eisenberger et al. (2006) *Hematol Oncol Clin North Am.* 20(3):661-87に開示されたか、および/または記載されたものを含む。ある態様において、ウイルス遺伝子への異種エピトープの挿入は、ウイルスの弱毒化のレベルに影響を与え得る。他の態様において、ウイルスの弱毒化のレベルは、ウイルス遺伝子への異種エピトープの挿入により影響を受けない。

10

【0191】

2. さらなる異種遺伝子の発現

本明細書で提供されるウイルスおよび本明細書で提供される方法を用いて作製されたウイルスは、さらに、1種もしくはそれ以上のさらなる異種遺伝子が発現するように修飾され得る。遺伝子発現は、遺伝子によりコードされたタンパク質の発現および/または遺伝子によりコードされたRNA分子の発現を含み得る。ある態様において、ウイルスは、腫瘍からの異種遺伝子産物の収集を可能にするのに十分なほどの高いレベルで、異種遺伝子が発現し得る。

20

【0192】

異種核酸は、異種タンパク質をコードするオープンリーディングフレームの発現のために、プロモーターに操作可能に結合させ得る。異種遺伝子の発現は、構成的プロモーターにより、または誘導可能プロモーターにより制御され得る。発現はまた、ウイルスにより発現される1種もしくはそれ以上のタンパク質またはRNAにより影響され得る。遺伝子制御エレメント、例えば、プロモーターおよびエンハンサーは、細胞型特異的活性を有し、応答配列での特定の誘導因子(例えば、ホルモン、成長因子、サイトカイン、細胞増殖抑制剤、照射、熱ショック)により活性化され得る。これらの遺伝子の制御のおよび制限的発現は、ウイルスベクター構築体で、治療遺伝子の発現を誘導する内部プロモーターのような制御エレメントを用いて達成され得る。発現した異種遺伝子は、治療的遺伝子産物をコードする遺伝子、検出可能遺伝子産物、例えば、画像化のために使用可能な遺伝子産物をコードする遺伝子、収集される遺伝子産物をコードする遺伝子、収集されるか、もしくは免疫応答を誘導する抗体の抗原をコードする遺伝子を含み得る。本明細書で提供されるウイルスは、インビボおよびインビトロで、遺伝子が発現するために使用され得る。例えば、タンパク質は、受容体タンパク質(大腸菌 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ)、検出促進タンパク質、例えば、検出可能タンパク質もしくは検出可能シグナルを誘導可能なタンパク質(例えば、ルシフェラーゼ、蛍光タンパク質、トランスフェリン受容体)、腫瘍治療のために有用な遺伝子産物(すなわち、タンパク質およびRNA)(例えば、トランスポーター、細胞表面受容体、サイトカイン、ケモカイン、アポトーシスタンパク質、細胞分裂阻害剤タンパク質、細胞分裂阻害オリゴペプチド、抗血管新生因子、抗癌抗体、例えば、一本鎖抗体、毒素、腫瘍抗原、プロドラッグ変換酵素、リボザイム、RNAi、siRNA、緑膿菌Aエンドトキシン、ジフテリア毒素、p53、Arf、Bax、腫瘍壊死因子- α 、HSV TK、大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、アンジオスタチンおよびエンドスタチン)ならびに他の抗癌剤または治療的遺伝子産物を含む。

30

40

【0193】

a. 検出可能遺伝子産物

本明細書で提供されるウイルスおよび本明細書で提供される方法を用いて作製されたウイルスは、遺伝子産物が検出可能であるか、または遺伝子産物が検出可能シグナルを提供

50

することができる、1種もしくはそれ以上の遺伝子を発現し得る。さまざまな検出可能遺伝子産物、例えば、検出可能タンパク質は、当分野で既知であり、本明細書で提供されるウイルスで使用され得る。検出可能タンパク質は、検出可能化合物に特異的に結合することができる受容体もしくは他のタンパク質、検出可能シグナル、例えば、蛍光シグナルを放出可能なタンパク質、および検出可能反応を触媒することができるか、もしくは検出可能産物の形成を触媒することができる酵素を含む。

【0194】

ある態様において、ウイルスは、検出可能シグナルを放出することができるか、もしくは検出可能反応を触媒することができるタンパク質をコードする遺伝子を発現する。検出可能シグナルを放出することができるか、もしくは検出可能反応を触媒することができるタンパク質、例えば、発光もしくは蛍光タンパク質をコードするさまざまなDNA配列が既知であり、本明細書で提供されるウイルスおよび方法において使用され得る。例えば、発光タンパク質をコードする遺伝子は、*Vibrio harveyi*由来の細菌ルシフェラーゼ(Belas et al., Science 218 (1982), 791-793)、*Vibrio fischerii*由来の細菌ルシフェラーゼ(Foran and Brown, Nucleic acids Res. 16 (1988), 177)、ホタルルシフェラーゼ(de Wet et al., Mol. Cell. Biol. 7 (1987), 725-737)、*Aequorea victoria*由来のイクオリン(Prasher et al., Biochem. 26 (1987), 1326-1332)、*Renilla reniformis*由来の*Renilla*ルシフェラーゼ(Lorenz et al., PNAS USA 88 (1991), 4438-4442)および*Aequorea victoria*由来の緑色蛍光タンパク質(Prasher et al., Gene 111: 229-233 (1987))からの遺伝子を含む。細菌ルシフェラーゼの*luxA*および*luxB*遺伝子は、融合遺伝子(*Fab₂*)を産生するように融合させ得て、それは、完全に機能的なルシフェラーゼタンパク質を産生するように発現させ得る(Escher et al., PNAS 86: 6528-6532 (1989))。ウイルスでのこれらの遺伝子の形質転換および発現により、ウイルス感染の検出が、例えば、高感度および/または蛍光画像カメラを用いることで可能となる。ある態様において、ウイルスにより発現されたルシフェラーゼは、発光のために、外因的に加えられた基質、例えば、デカナルもしくはセレンテラジンを必要とし得る。他の態様において、ウイルスは、完全*lux*オペロンを発現し得て、それは、デカナルのようなルシフェラーゼ基質を提供すること可能なタンパク質を含み得る。例えば、完全*lux*オペロン配列を含むウイルスは、腹腔内、筋肉内、または静脈内に注入されると、生きたマウスでの微生物の視覚化および局在化を可能にし、これは、ルシフェラーゼ発光が組織を透過し得て、外部から検出可能であることを示す(Contag et al. (1995) Mol. Microbiol. 18: 593-603)。

【0195】

他の態様において、ウイルスは、検出可能化合物と結合し得る遺伝子、または検出可能化合物と結合し得る産物を形成し得る遺伝子を発現し得る。検出可能化合物と特異的に結合し得るさまざまな遺伝子産物、例えば、タンパク質は、当分野で既知であり、受容体、金属結合タンパク質(例えば、親鉄剤、フェリチン、トランスフェリン受容体)、リガンド結合タンパク質、および抗体を含む。さまざまな検出可能化合物のいずれかを使用し得て、さまざまな既知の画像法のいずれかにより画像化され得る。例えば、化合物は、受容体リガンドおよび抗体のための抗原を含む。リガンドは、使用される画像法により標識され得る。例えば、画像法は、X線、さまざまな磁気共鳴法、例えば、磁気共鳴画像法(MRI)および核磁気共鳴画像法(MRS)のすべてを含み、またコンピュータ断層撮影法(CT)、コンピュータ体軸断層撮影(CAT)、電子ビームコンピュータ断層撮影法(EBCT)、高解像コンピュータ断層撮影(HRCT)、下環状断層撮影、ポジトロン断層法(PET)、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法(SPECT)、スパイラル断層撮影および超音波断層法を含む、断層撮影法のすべてを含む。

【0196】

X線画像化のために適当な標識は、当分野で既知であり、例えば、ビスマス(III)、金(III)、ランタン(III)または鉛(II); 放射性イオン、例えば、⁶⁷銅、⁶⁷ガリウム、⁶⁸ガリウム、¹¹¹インジウム、¹¹³インジウム、¹²³ヨウ素、¹²⁵ヨウ素、¹³¹ヨウ素、¹⁹⁷水銀、²⁰³水銀、¹⁸⁶レニウム、¹⁸⁸レニウム、⁹⁷ルビジウム、¹⁰³ルビジウム、⁹⁹テクネチウムもし

10

20

30

40

50

くは⁹⁰イットリウム；核磁気スピン共鳴同位体、例えば、コバルト(II)、銅(II)、クロム(III)、ジスプロシウム(III)、エルビウム(III)、ガドリニウム(III)、ホルミウム(III)、鉄(II)、鉄(III)、マンガン(II)、ネオジム(III)、ニッケル(II)、サマリウム(III)、テルビウム(III)、バナジウム(II)もしくはイッテルビウム(III)；またはローダミンもしくはフルオレセインを含む。

【 0 1 9 7 】

磁気共鳴画像のために適当な標識は、当分野で既知であり、例えば、ガドリニウムキレートおよび酸化鉄を含む。造影剤でのキレートの使用は、当分野で既知である。断層撮影法のために適当な標識は、当分野で既知であり、例えば、 β -放射物、例えば、¹¹C、¹³N、¹⁵Oもしくは⁶⁴Cuまたは(b) α -放射物、例えば、¹²³Iを含む。例えば、PETのためのトレーサーとして使用され得る放射性核種の他の例は、⁵⁵Co、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁶⁰Cu(II)、⁶⁷Cu(II)、⁵⁷Ni、⁵²Feおよび¹⁸F (例えば、¹⁸F-フルオロデオキシグルコース(FDG))を含む。有用な放射性核種標識化剤の例は、⁶⁴Cu-標識化改変抗体断片(Wu et al. (2002) PNAS USA 97: 8495-8500)、⁶⁴Cu-標識化ソマトスタチン(Lewis et al. (1999) J. Med. Chem. 42: 1341-1347)、⁶⁴Cu-ピルブアルデヒド-ビス(N4メチルチオセミカルバゾン)(⁶⁴Cu-PTSM)(Adonai et al. (2002) PNAS USA 99: 3030-3035)、⁵²Fe-シトレート(Leenders et al. (1994) J. Neural. Transm. Suppl. 43: 123-132)、⁵²Fe/^{52m}Mn-シトレート(Calonder et al. (1999) J. Neurochem. 73: 2047-2055)および⁵²Fe-標識化水酸化鉄(III)-スクロース抱合体(Beshara et al. (1999) Br. J. Haematol. 104: 288-295,296-302)である。

【 0 1 9 8 】

ある例において、インビトロおよび/またはインビボでの二重画像化法は、2種もしくはそれ以上の検出可能遺伝子産物、検出可能シグナルを産生する遺伝子産物、検出可能化合物に結合し得る遺伝子産物、または他の分子と結合し、検出可能産物を形成し得る遺伝子産物を検出するために使用され得る。ある例において、2種もしくはそれ以上の遺伝子産物は、異なるウイルスにより発現されるが、他の例において、2種もしくはそれ以上の遺伝子産物は、同じウイルスにより発現される。例えば、ウイルスは、検出可能シグナルを放出する遺伝子産物を発現し、また検出可能反応を触媒する遺伝子産物を発現することができる。他の例において、ウイルスは、検出可能シグナルを放出する1種もしくはそれ以上の遺伝子産物、検出可能反応を触媒する1種もしくはそれ以上の遺伝子産物、検出可能化合物と結合するか、もしくは検出可能産物を形成可能な1種もしくはそれ以上の遺伝子産物、またはそれらの任意の組み合わせを発現することができる。そのような遺伝子産物の任意の組み合わせは、本明細書で提供されるウイルスにより発現され得て、本明細書で提供される方法のいずれかと組み合わせで使用され得る。そのような遺伝子産物の画像化は、例えば、本明細書に記載されているか、当分野で既知のさまざまな画像法(例えば、とりわけ、蛍光画像、MRI、PET)により行われ得る。遺伝子産物の画像化はまた、同じ方法を用いて行われ得て、その結果、遺伝子産物は、それらの特性により、例えば、放出される光の波長の差異により区別される。例えば、ウイルスは、放出される光の波長が異なる2種以上の蛍光タンパク質(例えば、GFPおよびRFP)を発現し得る。他の例において、RFPは、ルシフェラーゼと共に発現し得るが、これらに限定されない。また他の例において、蛍光遺伝子産物は、遺伝子産物、例えば、磁気共鳴画像のために使用されるフェリチンもしくはトランスフェリン受容体と共に発現し得るが、これらに限定されない。2種もしくはそれ以上の検出可能遺伝子産物を発現するウイルス、または2種もしくはそれ以上の検出可能遺伝子産物を発現する2種もしくはそれ以上のウイルスは、該方法を用いて、インビトロまたはインビボで、画像化され得る。ある態様において、2種もしくはそれ以上の遺伝子産物は、単一ポリペプチド、例えば、融合タンパク質として発現する。例えば、蛍光タンパク質は、ルシフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として発現され得る。

【 0 1 9 9 】

b. 治療的遺伝子産物

本明細書で提供されるウイルスは、遺伝子産物が細胞死を引き起こすか、もしくは遺伝子産物が抗腫瘍免疫応答を引き起こす、1種もしくはそれ以上の遺伝子(該遺伝子は、治療

10

20

30

40

50

遺伝子と考えられ得る)を発現するように修飾され得る。さまざまな治療的遺伝子産物、例えば、毒性もしくはアポトーシスタンパク質またはsiRNAが、当分野で既知であり、本明細書で提供されるウイルスで使用され得る。治療遺伝子は、宿主細胞を直接殺傷することにより(例えば、チャネル形成もしくは他の溶解タンパク質として)、またはアポトーシスを誘導することにより、または重要な細胞過程を阻害することにより、または細胞に対する免疫応答を誘発することにより、または類似の効果を有する化合物と相互作用することにより(例えば、弱い活性の化合物を細胞毒性化合物に変換することにより)作用し得る。腫瘍処置のために発現し得る多くの治療タンパク質が当分野で既知であり、トランスポーター、細胞表面受容体、サイトカイン、ケモカイン、アポトーシスタンパク質、細胞分裂阻害剤タンパク質、細胞分裂阻害オリゴペプチド、抗血管新生因子(例えば、hk5)、抗癌抗体、例えば、一本鎖抗体(例えば、抗VEGF)、毒素、腫瘍抗原、プロドラッグ変換酵素、リボザイム、RNAi、およびsiRNAを含むが、これらに限定されない。本明細書で提供される方法のための共刺激分子は、インビトロおよび/またはインビボで、抗原/病原体に対する免疫応答を促進することができるすべての分子を含む。共刺激分子はまた、免疫応答のために重要であるか、もしくは本質的である機能を有するリンパ球および/または他の細胞の活性化、増殖、分化、成熟もしくは維持を促進するすべての分子を包含する。例えば、治療タンパク質の一覧表は、IL-24、WT1、p53、緑膿菌Aエンドトキシン、ジフテリア毒素、Arf、Bax、HSV TK、大腸菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、アンジオスタチンおよびエンドスタチン、p16、Rb、BRCA1、嚢胞性線維症膜貫通制御因子(CFTR)、VIIII因子、低比重リポタンパク質受容体、ガラクトシダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、インスリン、副甲状腺ホルモン、 α -1-抗トリプシン、rsCD40L、Fas-リガンド、TRAIL、TNF、抗体、ミクロシンE492、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素、大腸菌志賀毒素、大腸菌ベロ毒素1、およびハイパフォリンを含むが、これらに限定されない。例えば、サイトカインは、ケモカインおよび古典的サイトカイン、例えば、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-6およびインターロイキン-12を含むインターロイキン、腫瘍壊死因子、例えば、腫瘍壊死因子(TNF- α)、インターフェロン、例えば、インターフェロン(IFN- α)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、ならびにCXCケモカイン、例えば、IL-8 GRO α 、GRO β 、GRO γ 、ENA-78、LDGF-PBP、GCP-2、PF4、Mig、IP-10、SDF-1 α 、BUNZO/STRC33、I-TAC、BLC/BCA-1; CCケモカイン、例えば、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MDC、TECK、TARC、RANTES、HCC-1、HCC-4、DC-CK1、MIP-3 α 、MIP-3 β 、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、エオタキシン、エオタキシン-2/MPIF-2、I-309、MIP-5/HCC-2、MPIF-1、6CKine、CTACK、MEC; リンホタクチン; およびフラクタルカインを含むケモカインを含むが、これらに限定されない。例えば、他の共刺激分子は、サイトカインの免疫グロブリンスーパーファミリー、例えば、B7.1、B7.2を含む。ウイルスにより発現され得る他の治療タンパク質は、抗VEGF一本鎖抗体(例えば、配列番号106)、プラスミノゲンK5ドメイン(例えば、配列番号109)、ヒト組織因子-v α 3-インテグリンRGD融合タンパク質(例えば、配列番号105)、インターロイキン-24(例えば、配列番号107)またはIL-6-IL-6受容体融合タンパク質(例えば、配列番号108)を含むが、これらに限定されない。例えば、トランスポータータンパク質、例えば、hNET、および治療タンパク質、IL-24をコードするウイルスが、本明細書で提供される(下記の実施例で提供されるGLV-1h146およびGLV-1h150の記載を参照のこと)。

【 0 2 0 0 】

他の態様において、ウイルスは、あまり活性ではない化合物を、腫瘍細胞死を引き起こす化合物に変換するタンパク質を発現し得る。例えば、そのようなプロドラッグの変換法は、酵素学的変換および光分解変換を含む。さまざまなタンパク質/化合物対が当分野で既知であり、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ/ガンシクロビル、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ/(E)-5-(2-プロモビニル)-2'-デオキシウリジン(BVDU)、水痘帯状疱疹チミジンキナーゼ/ガンシクロビル、水痘帯状疱疹チミジンキナーゼ/BVDU、水痘帯状疱疹チミジンキナーゼ/(E)-5-(2-プロモビニル)-1- β -D-アラビノフラノシルウラシル(BVaraU)、シトシンデアミナーゼ/5-フルオロウラシル、シトシンデアミナーゼ/5-フルオ

10

20

30

40

50

ロシトシン、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ/6-メチルプリンデオキシリボシド、ラクタマーゼ/セファロsporin-ドキシソルピシン、カルボキシペプチターゼG2/4-[(2-クロロエチル)(2-メソキシエチル)アミノ]ベンゾイル-L-グルタミン酸(CMDA)、カルボキシペプチダーゼA/メトトレキサート-フェニルアミン、シトクロームP450/アセトアミノフェン、シトクロームP450-2B1/シクロホスファミド、シトクロームP450-4B1/2-アミノアントラセン、4-イポメアノール、セイヨウワサビペルオキシダーゼ/インドール-3-酢酸、ニトロ還元酵素/CB1954、ウサギカルボキシレステラーゼ/7-エチル-10-[4-(1-ピペリジノ)-1-ピペリジノ]カルボニルオキシカンポトテシン(CPT-11)、マッシュルームチロシナーゼ/ビス-(2-クロロエチル)アミノ-4-ヒドロキシフェニルアミノメタノン 28、ガラクトシダーゼ/1-クロロメチル-5-ヒドロキシ-1,2-ジヒロ-3H-ベンゾ[e]インドール、グルクロニダーゼ/エピルピシグルクロニド、チミジンホスホリラーゼ/5'-デオキシ5-フルオロウリジン、デオキシシチジンキナーゼ/シトシンアラビノシド、ならびにリナマラーゼ/リナマリンを含むが、これらに限定されない。

10

【0201】

他の態様において、治療的遺伝子産物は、siRNA分子であり得る。siRNA分子は、腫瘍促進遺伝子、例えば、癌遺伝子、成長因子、血管新生促進遺伝子、または受容体の発現に対して向けられ得る。siRNA分子はまた、細胞増殖、細胞複製もしくは細胞生存のために重要な任意の遺伝子の発現に対して向けられ得る。siRNA分子はまた、細胞膜を安定化するか、もしくは腫瘍細胞から放出される腫瘍細胞抗原の数を制限する任意の遺伝子の発現に対して向けられ得る。siRNAの設計は、選択されたsiRNAの標的に基づいて容易に決定され得て、siRNAの設計および遺伝子のダウンレギュレーション法は当分野で既知であり、例えば、米国特許出願公開番号2003-0198627に記載されている。

20

【0202】

他の態様において、治療的遺伝子産物は、ウイルス弱毒化因子であり得る。抗ウイルスタンパク質もしくはペプチドは、本明細書で提供されるウイルスにより発現され得る。抗ウイルスタンパク質もしくはペプチドの発現は、ウイルスの病原性を制御し得る。ウイルス弱毒化因子は、例えば、ウイルス特異的抗体、ムチン、トロンボスポンジン、およびサイトカインのような可溶性タンパク質(TNF、インターフェロン(例えば、IFN、IFN、IFN)もしくはIFN)およびインターロイキン(例えば、IL-1、IL-12もしくはIL-18)を含むが、これらに限定されない)を含むが、これらに限定されない。

30

【0203】

他の態様において、治療的遺伝子産物は、タンパク質リガンド、例えば、抗腫瘍オリゴペプチドであり得る。抗腫瘍オリゴペプチドは、腫瘍に対する高い親和性および特異性を有する短いタンパク質ペプチドである。そのようなオリゴペプチドは、腫瘍関連ファージライブラリーを用いて、濃縮され、同定され得る(Akita et al.(2006) Cancer Sci. 97(10):1075-1081)。これらのオリゴペプチドは、化学療法の効果が高めることが示されている(米国特許第4,912,199号)。オリゴペプチドは、本明細書で提供されるウイルスにより発現され得る。オリゴペプチドの発現は、それら自身で、もしくは他の化学治療剤と組み合わせ、抗腫瘍活性を誘導し得る。抗腫瘍オリゴペプチド群の例は、ツブリシン(Khalil et al. (2006) Chembiochem. 7(4):678-683)、ホモプシン、ヘミアステルリン、タルトブリン(HTI-286, 3)およびクリプトフィシンを含むが、これらに限定されない、細胞分裂抑制ペプチドである。ツブリシンは、粘液細菌由来であり、細胞微小管の欠失を引き起こし、アポトーシス過程を誘導することができる。細胞分裂抑制ペプチドは、本明細書で提供されるウイルスにより発現され得て、それら自身で、もしくは他の化学治療剤と組み合わせ、抗腫瘍活性を誘導し得る。

40

【0204】

他の態様において、治療的遺伝子産物は、腫瘍成長のために必要な分子もしくは栄養物を隔離するタンパク質であり得る。例えば、ウイルスは、鉄に結合するか、鉄を輸送するか、もしくは鉄を貯蔵するか、またはそれらの組み合わせである、1種もしくはそれ以上のタンパク質を発現し得る。そのようなタンパク質の発現による増加した鉄取り込みおよ

50

び/または貯蔵は、ウイルスが蓄積する腫瘍もしくは組織の視覚化および検出のためのコントラストを増加させるだけでなく、腫瘍環境から鉄を枯渇させる。腫瘍環境からの鉄枯渇は、腫瘍から必要不可欠な栄養素を除去し、それにより、腫瘍細胞での鉄恒常性が無秩序化し、腫瘍進行を遅らせ、および/または腫瘍を殺傷する。

【 0 2 0 5 】

さらに、鉄、または他の標識金属は、腫瘍保有対象に、単独で、もしくは抱合型で投与され得る。鉄抱合体は、例えば造影部分もしくは治療剤と結合した鉄を含み得る。ある場合において、造影部分および治療剤は、同じであり、例えば、放射性核種である。腫瘍、創傷、炎症もしくは感染領域での鉄の内在化は、鉄単独、補助的造影部分、または治療剤の内在化を可能にする(腫瘍特異的に細胞毒性を送達することができるか、または創傷、炎症もしくは感染領域の処置のために、治療剤を送達することが可能である)。これらの方法は、本明細書で提供される他の任意の方法と結合させ得る。

10

【 0 2 0 6 】

c. スーパー抗原

本明細書で提供されるウイルスは、1種もしくはそれ以上のスーパー抗原を発現するように修飾され得る。スーパー抗原は、しばしば、T細胞の大規模な応答により引き起こされる、多くの免疫応答を活性化し得る抗原である。さまざまなスーパー抗原が当分野で既知であり、ジフテリア毒素、ブドウ球菌エンテロトキシン(SEA、SEB、SEC1、SEC2、SED、SEEおよびSEH)、毒素性ショック症候群毒素1型、黄色ブドウ球菌産生毒素(EXft)、連鎖球菌性発熱性外毒素A、BおよびC (SPE A、BおよびC)、マウス乳癌ウイルスタンパク質(MMTV

20

【 0 2 0 7 】

毒性の減少したウイルスの発現が望まれるとき、多くのスーパー抗原はまた、毒素であるので、該スーパー抗原は、少なくともいくつかのそのスーパー抗原性保持するが、その毒性減少させるように修飾され得て、その結果、類毒素のような化合物を生じる。さまざまな組み換えスーパー抗原およびスーパー抗原の類毒素が当分野で既知であり、本明細書で提供されるウイルスで容易に発現させ得る。例えば、類毒素は、ジフテリア毒素の類毒素(米国特許第6,455,673号)およびブドウ球菌エンテロトキシンの類毒素(米国特許出願公開番号20030009015)を含む。

30

【 0 2 0 8 】

d. 収集される遺伝子産物

例えば、収集目的のために、本明細書で提供されるウイルスにより発現可能な遺伝子は、ヒト遺伝子を含む。例えば、遺伝子の一覧表は、Johns Hopkins Universityおよび他の場所の、Dr. Victor A. McKusickおよび彼の同僚により著わされ、編集されたヒト遺伝子および遺伝学的障害の一覧表、ならびにNCBI, the National Center for Biotechnology Informationにより、World Wide Webのために開発されたものを含む。Online Mendelian Inheritance in Man(OMIM^(商標))、Center for Medical Genetics, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.)およびNational Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.)、ならびに公のデータベースで利用可能なもの、例えば、PubMedおよびGenBank (例えば、ウェブサイトncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIMで提供される遺伝子を参照のこと)。

40

【 0 2 0 9 】

e. 異種遺伝子発現の制御

ある態様において、治療化合物の発現は、制御配列により制御され得る。例えば、哺乳類宿主細胞で機能的である適当な制御配列は、当分野で既知である。ある例において、制御配列は、ボックスウイルスプロモーターを含む。他の態様において、制御配列は、天然および合成ワクシニアウイルスプロモーターを含み得る。強力な後期プロモーターは、外来性遺伝子の高発現レベルを達成するために使用され得る。早期および中期段階プロモーターはまた、使用され得る。ある態様において、プロモーターは、早期および後期プロモ

50

ーターエレメント、例えば、ワクシニアウイルス早期/後期プロモーターP7.5k、ワクシニア後期プロモーターP11k、合成早期/後期ワクシニアPSELプロモーター(Patel et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9431 9435; Davison and Moss, (1989) J Mol Biol 210: 749 769; Davison et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 4285 4286; Chakrabarti et al. (1997), BioTechniques 23: 1094 1097)を含む。本明細書の実施例および他の場所に記載されたとおり、本明細書で提供されるウイルスは、強力なプロモーター対より弱いプロモーターを用いた結果として、特性、例えば、弱毒化において差異を示すことができる。例えば、ワクシニアにおいて、合成早期/後期および後期プロモーターは、相対的に強力なプロモーターであり、一方で、ワクシニア合成早期、P7.5k早期/後期、P7.5k早期、およびP28後期プロモーターは、相対的に弱いプロモーターである(例えば、Chakrabarti et al. (1997) BioTechniques 23(6) 1094-1097を参照のこと)。異なるプロモーターの組合せは、同じウイルスで、もしくは2つの異なるウイルスで、異なる遺伝子産物を発現するために使用され得る。ある態様において、異なる治療的もしくは検出可能遺伝子産物は、異なるプロモーター、例えば、2つの異なるワクシニア合成プロモーターから発現される。

【0210】

F. 修飾化ウイルスの製造法

本明細書で提供されるウイルスは、ウイルスを修飾するために、当分野で既知の標準的な方法論により形成され得る。簡潔には、該方法は、ウイルスに1種もしくはそれ以上の遺伝学的修飾を導入し、その後、修飾を反映する特性について、または他の望まれる特性について、ウイルスをスクリーニングすることを含む。

【0211】

1. 遺伝学的修飾

分子生物学における標準的な技術は、本明細書で提供される修飾化ウイルスを作製するために使用され得る。そのような技術は、さまざまな核酸操作技術、核酸導入プロトコール、核酸増幅プロトコール、および当分野で既知の他の分子生物学的技術を含む。例えば、点突然変異は、オリゴヌクレオチド伸介部位特異的突然変異誘発により、興味のある遺伝子に導入され得る。あるいは、相同組み換えは、突然変異もしくは外因性配列を興味のある標的配列に導入するために使用され得る。他の突然変異誘発プロトコールにおいて、特定の遺伝子における点突然変異はまた、ポジティブ選択法を用いて選択され得る。例えば、Current Techniques in Molecular Biology, (Ed. Ausubel, et al.)を参照のこと。核酸増幅プロトコールは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含むが、これらに限定されない。さまざまなウイルスおよび細胞性生物のためのプラスミド、ベクター、プロモーターおよび他の制御配列のような核酸ツールの使用は、当分野で既知である。核酸導入プロトコールは、塩化カルシウム形質転換/トランスフェクション、エレクトロポレーション、リポソーム伸介核酸導入、N-[1-(2,3-ジオロイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチル硫酸塩伸介形質転換などを含む。さらに、さまざまな核酸ツールが、ATCCを含む多くの異なる起源、およびさまざまな商業的起源から入手可能である。当業者は、当分野における常識および設計上の選択に基づき、容易に、任意の特定のウイルスの遺伝学的修飾のために適当なツールおよび方法を選択することが可能である。

【0212】

さまざまな修飾のすべては、当分野で既知の標準的な分子生物学的方法を用いて、容易に達成され得る。修飾は、典型的には、ウイルスゲノムの1種もしくはそれ以上の切断、欠失、突然変異または挿入であり得る。ある態様において、修飾は、特定の配列に対して特異的に行われ得る。修飾は、制御配列、遺伝子コード配列、または既知の機能のない配列を含むがこれらに限定されない、ウイルスゲノムのさまざまな領域のいずれかに対して行われ得る。修飾のために利用可能なウイルスゲノムのさまざまな領域のすべては、当分野において、特に本明細書に記載されたウイルスを含む多くのウイルスについて、容易に知ることができる。例えば、本明細書および他の場所で提供されるさまざまなワクシニア遺伝子の遺伝子座は、本明細書で提供されるウイルスにおいて、修飾のための標的とする

ことが可能な異なる領域の数を例示する。他の態様において、修飾は、完全にもしくは部分的に無作為であり得て、任意の特定の修飾化ウイルスの選択は、修飾化ウイルスの望まれる特性に基づいて決定され得る。これらの方法は、例えば、インビトロ組み換え技術、合成法およびインビボ組み換え法を含み、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold Spring Harbor NY (1989)および本明細書に開示された実施例に記載されている。

【0213】

ある態様において、ウイルスは、外因性遺伝子を発現するように修飾され得る。例えば、外因性遺伝子産物は、タンパク質およびRNA分子を含む。修飾化ウイルスは、検出可能遺伝子産物、治療的遺伝子産物、製造もしくは収集のための遺伝子産物、または抗体収集のための抗原性遺伝子産物を発現し得る。そのような遺伝子産物の特性は、本明細書および他の場所に記載されている。外因性遺伝子を発現する生物を修飾するある態様において、修飾はまた、外因性遺伝子の発現を制御する1種もしくはそれ以上の制御配列を含み得る。当分野で既知のとおり、制御配列は、外因性遺伝子の構成的発現を可能にするか、または外因性遺伝子の誘導可能な発現を可能にし得る。さらに、制御配列は、外因性遺伝子の発現レベルの制御を可能にし得る。ある例において、誘導可能な発現は、細胞性因子または腫瘍細胞に存在するか、もしくはウイルス感染腫瘍細胞に存在する他の因子の制御下であり得る。他の例において、誘導可能な発現は、IPTG、RU486または他の既知の誘導化合物を含む、管理可能物質の制御下であり得る。さまざまな制御配列のいずれかを、既知の因子および設計選択に基づいて、当業者は利用可能である。遺伝子産物製造および収集のようなある態様において、制御配列は、構成的に高いレベルの遺伝子発現を生じ得る。抗-(遺伝子産物)抗体収集のようなある態様において、制御配列は、構成的に低いレベルの遺伝子発現を生じ得る。腫瘍治療の態様において、治療タンパク質は、内部誘導可能プロモーターまたは外部誘導可能プロモーターの制御下であり得る。

【0214】

他の態様において、器官もしくは組織特異的発現は、制御配列により制御され得る。標的器官、例えば、処置される腫瘍においてのみの発現を達成するために、外来性ヌクレオチド配列は、組織特異的プロモーターに結合され、遺伝子治療のために使用され得る。そのようなプロモーターは、当業者に既知である(例えば、Zimmermann et al., *Neuron* 12: 11-24 (1994); Vidal et al., *EMBO J.* 9: 833-840 (1990); Mayford et al., *Cell* 81: 891-904 (1995); およびPinkert et al., *Genes & Dev.* 1: 268-76 (1987)を参照のこと)。

【0215】

ある態様において、ウイルスは、2種もしくはそれ以上のタンパク質を発現するように修飾され得て、ここで、2種もしくはそれ以上のタンパク質の任意の組み合わせは、1種もしくはそれ以上の検出可能遺伝子産物、治療的遺伝子産物、製造もしくは収集のための遺伝子産物、または抗体収集のための抗原性遺伝子産物であり得る。ある態様において、ウイルスは、検出可能タンパク質および治療タンパク質を発現するように修飾され得る。他の態様において、ウイルスは、検出のための2種もしくはそれ以上の遺伝子産物または2種もしくはそれ以上の治療的遺伝子産物を発現するように修飾され得る。例えば、ルシフェラーゼ基質の生合成に参与する1種もしくはそれ以上のタンパク質は、ルシフェラーゼと共に発現させ得る。2種もしくはそれ以上の外因性遺伝子が導入されるとき、該遺伝子は、同じかもしくは異なる制御配列下で制御され得て、該遺伝子は、同じかもしくは異なるウイルスゲノムの領域に挿入され得る(単独もしくは複数の遺伝学的操作工程で)。ある態様において、第1遺伝子、例えば、検出可能遺伝子産物をコードする遺伝子は、構成的プロモーターの制御下であり得て、一方で、第2遺伝子、例えば、治療的遺伝子産物をコードする遺伝子は、誘導可能プロモーターの制御下であり得る。ウイルス中に2種もしくはそれ以上の遺伝子を挿入する方法は、当分野で既知であり、さまざまな外因性遺伝子、制御配列、および/または他の核酸配列を用いて、さまざまなウイルスについて容易に実施することができる。

10

20

30

40

50

【0216】

組み換えウイルスを製造する方法は、当分野で既知である。組み換えワクシニアウイルスを製造する方法が、例示的な目的のために、本明細書で提供される。F14.5L遺伝子(LIV PのNotI部位)内に挿入を有する組み換えワクシニアウイルスは、下記の工程で作製される: (a) (i)制限酵素部位Xに挿入された修飾化F14.5L遺伝子を含むワクシニアウイルスシャトルプラスミドおよび(ii) 制限酵素部位で消化された脱リン酸化wt VV (VGL) DNAを作製すること; (b) PUV-不活性化ヘルパーVV (VGL)で感染させた宿主細胞に、工程(i)および(ii)の構築体の混合物を導入すること; ならびに(c) 形質導入体から組み換えワクシニアウイルスを単離すること。そのような方法を実施する方法は、当業者に既知であり、例えば、同時係属の米国特許出願番号10/872,156および11/238,025で提供される指示に従うものである(また、Timiryasova et al. (Biotechniques 31: 534-540 (2001)を参照のこと)。ある態様において、制限部位Xは、特有の制限部位である。さまざまな適当な宿主細胞はまた、当業者に既知であり、多くの哺乳類、鳥類および昆虫細胞ならびにワクシニアウイルス感染について感受性のある組織(ニワトリ胚、ウサギ、ハムスターおよびサル腎臓細胞、例えば、HeLa細胞、RK₁₃、CV-1、Vero、BSC40およびBSC-1サル腎臓細胞を含む)を含む。

10

【0217】

2. 修飾化ウイルスのスクリーニング

修飾化ウイルスは、本明細書に記載された特性、例えば、弱毒化した病原性、減少した毒性、腫瘍での選択的蓄積、腫瘍細胞に対する免疫応答を活性化する増加した能力、増加した免疫原性、増加もしくは減少した複製能、および外因性タンパク質を発現できる能力、ならびにそれらの組み合わせを含む、任意の望まれる特性についてスクリーニングされ得る。例えば、修飾化ウイルスは、攻撃的に腫瘍細胞を殺傷することなく、腫瘍細胞に対する免疫応答を活性化する能力についてスクリーニングされ得る。他の例において、ウイルスは、画像化のために使用可能な遺伝子を含む1種もしくはそれ以上の検出可能遺伝子の発現について、または遺伝子産物の製造もしくは収集のための1種もしくはそれ以上の遺伝子の発現について、および/または遺伝子産物に対する抗体の収集についてスクリーニングされ得る。

20

【0218】

そのような特性についてスクリーニングするためのさまざまな既知の方法のすべては、本明細書で提供される実施例において証明されたとおり、実施することができる。望まれる特性についてスクリーニングするための方法の1つの例は、細胞培養物もしくは他のインビトロ培地中の増殖、複製および/または遺伝子発現(外因性遺伝子の発現を含む)をモニタリングすることを含むが、これらに限定されない。細胞培養物は、任意の生物由来のもの、および任意の組織由来のものであり得て、腫瘍組織を含み得る。望まれる特性についてスクリーニングするための方法の他の例は、ウイルスを、非ヒト動物、例えば、マウス、サルもしくは類人猿、および所望によりまた、ヒトを含む動物に投与し、ウイルス、腫瘍および/または動物をモニタリングすることを含むが、これらに限定されない。ここで、モニタリングは、ウイルスおよび/または腫瘍のインビボ画像化(例えば、ウイルス遺伝子発現の高感度画像化もしくは超音波腫瘍画像化)、腫瘍の外部モニタリング(例えば、腫瘍サイズの外部測定)、および動物のモニタリング(例えば、動物体重、血液パネル、抗体力価、脾臓サイズもしくは肝臓サイズのモニタリング)により行われ得る。望まれる特性についてスクリーニングするための方法の他の例は、器官もしくは腫瘍におけるウイルスの存在および/またはウイルスによる遺伝子発現を決定するために、腫瘍を含むさまざまな器官を収集するような方法、免疫応答またはウイルス排除と関連する器官、例えば、脾臓もしくは肝臓を収集するような方法、腫瘍サイズおよび腫瘍細胞の生存能力を決定するために腫瘍を収集するような方法、抗体もしくは抗体産生細胞を収集するような方法を含む、ウイルスの効果および局在ならびにウイルスによる発現について非ヒト動物を収集することを含むが、これらに限定されない。そのようなスクリーニングおよびモニタリング法は、当分野で既知のとおり、さまざまな組み合わせのいずれかで使用され得る。ある

30

40

50

態様において、ウイルスは、ウイルスを、動物、例えば、非ヒト動物もしくはヒトに投与し、その後、インピボ画像化によりモニタリングすることでスクリーニングされ得る。他の態様において、ウイルスは、ウイルスを、動物、例えば、非ヒト動物に投与し、インピボ画像化によりモニタリングし、その後、動物を収集することでスクリーニングされ得る。したがって、ウイルスを、動物、例えば、腫瘍を有する動物に投与し、1種もしくはそれ以上の特性について、動物、腫瘍(存在する場合)、および/または動物内のウイルスをモニタリングすることによる、望まれる特性についてウイルスをスクリーニングするための方法が本明細書で提供される。また、ウイルスを、非ヒト動物、例えば、腫瘍を有する非ヒト動物に投与し、動物を収集し、1種もしくはそれ以上の特性について、動物の器官、抗体力価、および/または腫瘍(存在する場合)をアッセイすることによる、望まれる特性についてウイルスをスクリーニングするための方法が本明細書で提供される。

10

【0219】

弱毒化した病原性または減少した毒性についてウイルスをスクリーニングするための方法が本明細書で提供され、ここで、病原性または毒性は、対象の健康状態を評価すること、対象の体重、対象の血液もしくは尿検査を測定すること、および対象内のウイルスの組織分布をモニタリングすることを含むがこれらに限定されない、さまざまな技術により決定され得て、そのような技術は、生体でインピボで行われ得るか、または死後に行われ得る。方法はまた、細胞を溶解させるか、もしくは細胞死を引き起こすウイルスの能力を含み得て、それは、インピボまたはインピトロで決定され得る。

【0220】

対象が閾値体重よりも減少すると、ウイルスは、対象に対して病原性があると考えられ得る。例えば、閾値は、参照と比較して、体重の約5%もしくはそれ以上の減少、約10%もしくはそれ以上の減少、または約15%もしくはそれ以上の減少であり得る。体重参照は、当分野で使用されるさまざまな参照のいずれかから選択され得て、例えば、体重参照は、ウイルスの投与前の対象の体重であり得るか、または体重参照は、試験対象(例えば、正常もしくは腫瘍を注入した対象)と同じ条件を有するコントロール対象であり得て、ここで、コントロールの体重変化が、ウイルスの投与後の期間、試験対象の体重変化と比較される。

20

【0221】

対象の血液もしくは尿検査は、対象の免疫応答のレベル、対象の毒素のレベル、または対象の細胞、組織もしくは器官、例えば、腎臓、膵臓、肝臓および脾臓に対するストレスのレベルを示し得る。確立された閾値レベルを超えたレベルは、ウイルスの対象に対する病原性を示し得る。ウイルス病原性を示すための血液もしくは尿の構成成分の閾値レベルは、当分野で既知であり、任意のそのような閾値は、ウイルスの病原性もしくは毒性に対する望まれる耐用性に基づいて、本明細書で選択され得る。

30

【0222】

対象内でのウイルスの組織分布は、ウイルスの病原性もしくは毒性を示し得る。ある態様において、非病原性もしくは非毒性であるウイルスの組織分布は、他の組織もしくは器官と比較して、主に、腫瘍であり得る。主に腫瘍に局在する微生物は、他の任意の特定の器官もしくは組織に蓄積するウイルスよりも、例えば、少なくとも約2倍以上、少なくとも約5倍以上、少なくとも約10倍以上、少なくとも約100倍以上、少なくとも約1,000倍以上、少なくとも約10,000倍以上、少なくとも約100,000倍以上、または少なくとも約1,000,000倍以上で蓄積し得る。

40

【0223】

組織分布もしくは蓄積についてウイルスをスクリーニングするための方法が本明細書で提供され、ここで、組織分布は、非ヒト対象を収集し、インピボで、対象内の検出可能遺伝子産物を画像化することを含むがこれらに限定されない、さまざまな技術により決定され得る。収集は、非ヒト対象を安楽死させ、腫瘍でのウイルスの蓄積、および所望により、1種もしくはそれ以上のさらなる組織もしくは器官での蓄積を決定することにより達成され得る。蓄積は、検出可能遺伝子産物のような遺伝子産物(例えば、GFPもしくはガラ

50

クトシダーゼ)を検出すること、組織、器官もしくは腫瘍サンプルの組織学的もしくは顕微鏡的評価、または組織、器官もしくは腫瘍サンプルに存在するプラークもしくはコロニー形成ユニットの数を測定することを含むがこれらに限定されない、さまざまな方法のいずれかにより決定され得る。ある態様において、望まれる量のウイルス組織分布は、他の組織もしくは器官と比較して、主に、腫瘍であり得る。主に腫瘍に局在する微生物は、他の任意の特定の器官もしくは組織に蓄積するウイルスよりも、例えば、少なくとも約2倍以上、少なくとも約5倍以上、少なくとも約10倍以上、少なくとも約100倍以上、少なくとも約1,000倍以上、少なくとも約10,000倍以上、少なくとも約100,000倍以上、または少なくとも約1,000,000倍以上で蓄積し得る。

【0224】

免疫応答を誘導できるウイルスについてスクリーニングするための方法が本明細書で提供され、ここで、免疫応答は、腫瘍細胞もしくはウイルスに対するものであり得る。免疫応答を誘導する能力を測定するためのさまざまな方法は、当分野で既知であり、対象内における免疫活性の全体的な増加を測定すること、対象内での抗ウイルスもしくは抗腫瘍抗体の増加を測定すること、後の感染/腫瘍形成を妨害するか、またはウイルスもしくは腫瘍細胞を素早く除去する、ウイルスにより処理された対象(一般には、非ヒト対象)の能力を試験することを含む。方法はまた、細胞を溶解させるか、もしくは細胞死を引き起こすウイルスの能力を含み、それは、インピボもしくはインピトロで決定され得る。

【0225】

また、ウイルスの複製速度をモニタリングすることにより、増加もしくは減少した複製能を決定するための方法が本明細書で提供される。そのような測定は、インピボもしくはインピトロで行われ得る。例えば、培養細胞での複製速度は、ウイルスの複製能を決定するために使用され得る。他の例において、対象内の組織、器官もしくは腫瘍での複製速度は、複製能を測定するために使用され得る。ある態様において、非腫瘍組織および器官での減少した複製能は、スクリーニングにおいて選択されるべき特性であり得る。他の態様において、腫瘍での増加した複製能は、スクリーニングにおいて選択されるべき特性であり得る。

【0226】

また、遺伝子、例えば、外因性遺伝子を発現するウイルスの能力を決定するための方法が本明細書で提供される。そのような方法は、インピボもしくはインピトロで行われ得る。例えば、ウイルスは、ウイルスの生存を可能にするか、もしくはウイルスが検出可能シグナル、例えば、X-gal青色への変換を提供するのを可能にする遺伝子を発現する能力について、選択プレートでスクリーニングされ得る。そのような方法はまた、インピボで行われ得て、そこでは、発現は、例えば、非ヒト対象の組織、器官もしくは腫瘍を収集することにより、または対象のインピボ画像化により決定され得る。

【0227】

また、対象が抗体を産生し得る外来性遺伝子を含む、対象が抗体を産生し得る遺伝子を発現するウイルスの能力を決定するための方法が本明細書で提供される。該方法は、さまざまな非ヒト対象のいずれかを用いて、インピボで行われ得る。例えば、遺伝子発現は、例えば、ウイルスが投与された非ヒト対象から採血し、ウイルス発現遺伝子に対する抗体の存在について、血液(または、血清)をアッセイすることにより、またはポリクローナル抗体収集のために一般に使用される任意の他の方法(例えば、作製採血(production bleeds)および最終採血(terminal bleeds))で、決定され得る。

【0228】

本明細書で提供される2種もしくはそれ以上の特性を有するウイルスをスクリーニングするための方法が本明細書で提供され、それは、弱毒化した病原性、減少した毒性、腫瘍での選択的蓄積、腫瘍細胞に対する免疫応答を活性化する増加した能力、増加した免疫原性、増加もしくは減少した複製能、外因性タンパク質を発現する能力、およびウイルス発現遺伝子産物に対する抗体産生を誘導する能力についてのスクリーニングを含む。インピボ画像化のような単独モニタリング技術が、2種もしくはそれ以上の特性を検証するため

10

20

30

40

50

に使用され得るか、またはさまざまな異なるモニタリング技術が使用され得て、それらは、選択された特性および使用されるモニタリング技術に基づいて、当業者により決定され得る。

【 0 2 2 9 】

ヒトおよび非ヒト癌の異なる型のマウスモデルは、修飾化ウイルスの特性を評価するために使用され得る。腫瘍は、異なる腫瘍細胞型の移植により確立され得る。マウスでのヒト腫瘍異種移植片モデルの例は、ヒト肺癌(A549細胞、ATCC No. CCL-185); ヒト乳癌(GI-101A細胞、Rathinavelu et al., Cancer Biochem. Biophys., 17:133-146 (1999)); ヒト卵巣癌腫(OVCAR-3細胞、ATCC No. HTB-161); ヒト膵臓癌腫(PANC-1細胞、ATCC No. CRL-1469およびMIA PaCa-2細胞、ATCC No. CRL-1420); DU145細胞(ヒト前立腺癌細胞、ATCC No. HTB-81); ヒト前立腺癌(PC-3細胞、ATCC# CRL-1435); 大腸癌腫(HT-29細胞); ヒト黒色腫(888-MEL細胞、1858-MEL細胞または1936-MEL細胞; 例えば、Wang et al., (2006) J. Invest. Dermatol. 126:1372-1377を参照のこと); およびヒト線維肉腫(HT-1080細胞、ATCC No. CCL-121)を含むが、これらに限定されない。マウスでのラット腫瘍異種移植片モデルの例は、神経膠腫(C6細胞; ATCC No. CCL-107)を含むが、これらに限定されない。マウスで腫瘍同種移植片モデルの例は、マウス黒色腫(B16-F10細胞; ATCC No. CRL-6475)を含むが、これらに限定されない。マウスでのネコ腫瘍異種移植片モデルの例は、ネコ線維肉腫(FC77.T細胞; ATCC No. CRL-6105)を含むが、これらに限定されない。マウスでのイヌ腫瘍異種移植片モデルの例は、イヌ骨肉腫(D17細胞; ATCC No. CCL-183)を含むが、これらに限定されない。

【 0 2 3 0 】

G. 提供されるウイルスの例示的特性

本明細書で提供されるウイルスは、腫瘍および/または転移部、ならびにまた、創傷組織および細胞を含む免疫特権細胞または免疫特権組織に蓄積し得る。本明細書で提供されるウイルスは、一般には、対象の免疫系の活性により、ウイルスが投与される対象から除去され得るが、免疫特権領域は、宿主免疫系から隔離されているため、ウイルスは、そのような免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍に蓄積し、生存し、増殖することが可能である。したがって、腫瘍および/または転移部に適用される本明細書で提供される方法、ならびにそれに関連する治療法は、創傷細胞および組織を含む他の免疫特権細胞および組織に容易に適用可能である。

【 0 2 3 1 】

1. 弱毒化

本明細書で提供されるウイルスおよび方法での使用のために提供されるウイルスは、一般に、弱毒化されている。弱毒化ウイルスは、宿主内で疾患を引き起こす減少した能力を有する。減少した能力は、ウイルスの病原性に対する能力のさまざまな異なる修飾のいずれかから生じ得る。例えば、ウイルスは、その非弱毒化型と比較して、減少した毒性、非腫瘍性器官もしくは組織に蓄積する能力の減少、細胞溶解もしくは細胞死を引き起こす能力の減少または複製能の減少を有し得る。しかしながら、本明細書で提供される弱毒化ウイルスは、複製し、免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍細胞の溶菌または溶解を引き起こし、細胞死させるか、または免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍細胞に対する免疫応答を生じるか、もしくは促進する、少なくともいくつかの能力を保持する。

【 0 2 3 2 】

a. 減少した毒性

ウイルスは、宿主の健康状態を悪化させる1種もしくはそれ以上の化合物を製造することにより、それらの宿主に対して毒性であり得る。宿主に対する毒性は、敗血性ショック、神経学的影響または筋肉に対する影響を含む、さまざまな方法のいずれかで顕在化し得る。本明細書で提供されるウイルスは、宿主に対する減少した毒性を有し得る。本発明の方法および組成物のウイルスの減少した毒性は、宿主が毒性効果を受けない毒性から、宿主が一般に微生物の毒性効果により死なない毒性の範囲であり得る。ある態様において、ウイルスは、減少した毒性であり、その結果、宿主は一般に、宿主内でのウイルスの存在

から、腫瘍、転移部もしくは壊死器官もしくは組織における任意の効果を超えたかなり長期間の効果をもたない。例えば、減少した毒性は、約1ヶ月未満の間続く微熱もしくは軽度の感染であり得て、熱もしくは感染の後、宿主は、熱もしくは感染から生じる副作用を受けない。他の例において、減少した毒性は、微生物の投与後、宿主の体重について、意図しない約5%もしくはそれ未満の減少として測定され得る。他の例において、ウイルスは、宿主に対する毒性をもたない。

【0233】

b. 実質的に他の器官ではなく、腫瘍への蓄積

ウイルスは、宿主のさまざまな組織および器官のいずれかに蓄積し得る。蓄積は、宿主生物全体にわたって均一に分布し得るか、または1種もしくは数種の器官もしくは組織に濃縮し得る。本明細書で提供されるウイルスは、標的化組織、例えば、免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍およびまた転移部に蓄積し得る。ある態様において、本明細書で提供されるウイルスは、正常な器官もしくは組織と比較して、野生型ウイルスで生じる蓄積と等しいか、またはそれよりも大きい、免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍細胞への蓄積を示す。他の態様において、本明細書で提供されるウイルスは、他の任意の特定の器官もしくは組織での蓄積と等しいか、またはそれよりも大きい、免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍細胞への蓄積を示す。例えば、本明細書で提供されるウイルスは、他の任意の特定の器官もしくは組織に蓄積するよりも、少なくとも約2倍以上、少なくとも約5倍以上、少なくとも約10倍以上、少なくとも約100倍以上、少なくとも約1,000倍以上、少なくとも約10,000倍以上、少なくとも約100,000倍以上、または少なくとも約1,000,000倍以上で、免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍細胞に蓄積することが証明され得る。

10

20

【0234】

ある態様において、ウイルスは、1種もしくはそれ以上の選択された組織もしくは器官に蓄積することなく、標的化組織および細胞、例えば、免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍細胞に蓄積し得る。例えば、ウイルスは、脳に蓄積することなく、腫瘍細胞に蓄積し得る。他の例において、ウイルスは、神経細胞に蓄積することなく、腫瘍細胞に蓄積し得る。他の例において、ウイルスは、卵巣に蓄積することなく、腫瘍細胞に蓄積し得る。他の例において、ウイルスは、血液に蓄積することなく、腫瘍細胞に蓄積し得る。他の例において、ウイルスは、心臓に蓄積することなく、腫瘍細胞に蓄積し得る。他の例において、ウイルスは、膀胱に蓄積することなく、腫瘍細胞に蓄積し得る。他の例において、ウイルスは、精巣に蓄積することなく、腫瘍細胞に蓄積し得る。他の例において、ウイルスは、脾臓に蓄積することなく、腫瘍細胞に蓄積し得る。他の例において、ウイルスは、肺に蓄積することなく、腫瘍細胞に蓄積し得る。

30

【0235】

当業者は、ウイルスの毒性、用量、処置される腫瘍、宿主の免疫能力、および宿主の疾患状態を含むがこれらに限定されない、当分野で既知のさまざまな要因に基づいて、ウイルスが、非標的器官もしくは組織ではなく、選択的に、標的化組織もしくは細胞、例えば、免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍に蓄積する、望まれる能力を決定することができる。

【0236】

c. 腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導するか、または促進する能力

本明細書で提供されるウイルスは、標的化組織もしくは細胞、例えば、免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍細胞での抗原に対する免疫応答を誘導するか、もしくは促進し得る。免疫応答は、免疫刺激サイトカインの存在もしくは発現および免疫応答を引き起こし得る抗原性化合物の発現もしくは放出を含む、さまざまなメカニズムのいずれかにより引き起こされ得る。

40

【0237】

感染、例えば、ウイルス感染に対する応答で、細胞は、細胞に対して免疫応答を刺激するシグナルを送り出し得る。そのような細胞から送り出されるシグナルは、例えば、抗原、サイトカインならびにケモカイン、例えば、インターフェロン- およびインターロイ

50

キン-15を含む。本明細書で提供されるウイルスは、微生物による感染に対する応答で、標的化細胞にそのようなシグナルを送り出させることができ、その結果、標的化細胞もしくは組織、例えば、腫瘍細胞に対する宿主免疫系の刺激を生じる。

【0238】

他の態様において、標的化細胞もしくは組織、例えば、腫瘍細胞は、腫瘍に対する免疫応答の開始で、宿主の免疫系により認識され得る1種もしくはそれ以上の化合物を含み得る。そのような抗原性化合物は、細胞表面もしくは腫瘍細胞上での化合物であり得て、タンパク質、糖質、脂質、核酸またはその組み合わせであり得る。抗原性化合物のウイルス仲介放出は、腫瘍に対する免疫応答を誘導するために、宿主の免疫系を誘発し得る。腫瘍細胞により放出される抗原性化合物の量は、対象での免疫応答を誘導するのに十分な任意の量であり、例えば、1種もしくはそれ以上の腫瘍細胞から放出される抗原性化合物は、白血球に感受性があることが既知の生物における宿主免疫応答を誘発し得る。

10

【0239】

抗原放出の持続時間は、宿主が1種もしくはそれ以上の腫瘍抗原に対する免疫応答を確立するのに十分な時間である。ある態様において、持続時間は、宿主が1種もしくはそれ以上の腫瘍抗原に対する持続した免疫応答を確立するのに十分な時間である。当業者は、対象が免疫応答を誘導する持続時間に影響を与えるさまざまな要因に基づいて、そのような持続時間を決定することができ、該要因は、対象内での腫瘍抗原のレベル、異なる腫瘍抗原の数、抗原の抗原性、宿主の免疫能力、および抗原物質の宿主の血管系への接近を含む。一般には、抗原放出の持続は、少なくとも約1週間、少なくとも約10日間、少なくとも約2週間または少なくとも約1ヶ月であり得る。

20

【0240】

本明細書で提供されるウイルスは、標的細胞および組織、例えば、腫瘍細胞が抗原性化合物を放出し得る、さまざまな特性のいずれかを有し得る。例えば、特性は、腫瘍細胞で、細胞を溶解させる能力およびアポトーシスを誘導する能力である。しかしながら、細胞を溶解させることができないか、もしくは腫瘍細胞死を引き起こすことができないウイルスは、該ウイルスが腫瘍細胞からの抗原性化合物のいくらかの放出もしくは提示を引き起こし得るとき、本明細書で提供される方法で使用され得る。細胞溶解もしくは細胞死なしに、抗原性放出もしくは提示を行うためのさまざまなメカニズムが当分野で既知であり、任意のそのようなメカニズムは、本明細書で提供されるウイルスにより使用され得て、腫瘍細胞が宿主免疫系に接近可能であるとき、該メカニズムは、腫瘍性細胞での抗原性化合物の分泌、高められた細胞膜透過性、免疫刺激タンパク質の発現もしくは改変された細胞表面発現もしくは改変されたMHC提示を含むが、これらに限定されない。宿主免疫系が活性化されるメカニズムにかかわらず、腫瘍内のウイルスの存在の結果、腫瘍細胞に対して、少なくとも部分的に宿主免疫系を刺激する。ある態様において、ウイルスは、ウイルスに感染していない腫瘍細胞に対して、免疫応答を生じ得る。

30

【0241】

ある態様において、本明細書で提供されるウイルスは、腫瘍細胞に、腫瘍細胞表面上に存在しない抗原を放出させ得る。腫瘍細胞は、免疫応答を引き起こし得る化合物、例えば、タンパク質を産生し得るが、抗原性化合物が腫瘍細胞表面上に存在しない状況下では、腫瘍は、抗原性化合物が免疫応答を生じることなく、増殖およびさらには転移することができる。本発明の方法の範囲内において、本明細書で提供されるウイルスは、細胞内の抗原性化合物を、細胞から離れて、および腫瘍から離れて放出させ得て、その結果、該抗原に対する免疫応答を誘発し得る。腫瘍細胞のすべてが抗原を放出しているわけではないとしても、免疫応答は、最初に、“溶菌”腫瘍細胞に向けて標的化され得て、免疫応答のバスタンダー効果が、さらに、“溶菌”腫瘍細胞周辺の腫瘍細胞死を生じ得る。

40

【0242】

d. 病原性と腫瘍抗原の放出とのバランス

標的化細胞および組織、例えば、免疫特権細胞および組織、例えば、腫瘍の処置に関する典型的な方法は、迅速かつ完全なそれらの除去を引き起こすように設計される。例え

50

ば、多くのウイルスは、腫瘍細胞を含むさまざまな細胞で、溶解および/またはアポトーシスを引き起こし得る。積極的に溶解させるか、もしくは細胞死を引き起こし得るウイルスは、高い病原性があり得て、宿主を殺傷することさえあり得る。さらに、そのような迅速かつ完全な溶解に基づく治療法は、一般に、治療的に有効ではない。

【0243】

対照的に、本明細書で提供されるウイルスは、細胞死を引き起こすか、もしくは溶解させることに関して、攻撃的ではない。それらは、それらが標的細胞もしくは組織に蓄積し、細胞膜の変化を生じ、抗原の漏出を生じ、それに対して免疫応答が誘導されるかぎり、細胞死を引き起こす能力が限定されているか、もしくはそのような能力を有さないものであり得る。それらのアポトーシスもしくは溶解効果が、宿主が標的組織に対する有効な免疫応答を誘導するのに十分な時間の間、十分な抗原漏出を可能にするのに十分に遅いか、もしくは有効ではないことが好ましい。そのような免疫応答単独で、もしくはウイルスの溶解/アポトーシス効果との組み合わせは、標的組織の除去およびまた、そのような組織もしくは細胞の将来の発展、例えば、転移および再発の除去を生じる。本明細書で提供されるウイルスは、細胞死を引き起こす限定された能力を有し得るが、該ウイルスは、腫瘍細胞を攻撃する宿主の免疫系を刺激し得る。結果として、該ウイルスはまた、一般に、宿主に対する実質的な毒性は有さない傾向がある。

【0244】

ある態様において、ウイルスは、腫瘍細胞死を引き起こす能力が限定されているか、もしくはそのような能力を有しないが、なお、腫瘍細胞に対する免疫応答を生じるか、もしくは促進し得る。ある態様において、ウイルス仲介腫瘍細胞死の速度は、腫瘍細胞増殖もしくは複製の速度未満である。他の例において、ウイルス仲介腫瘍細胞死の速度は、宿主が、1種もしくはそれ以上の腫瘍抗原に対する持続した免疫応答を確立するのに十分な程遅い。典型的には、細胞死の時間は、抗腫瘍免疫応答を確立するのに十分であり、宿主および標的化細胞もしくは組織に依存して、少なくとも約1週間、少なくとも約10日間、少なくとも約2週間、または少なくとも約1ヶ月であり得る。

【0245】

他の態様において、本明細書で提供されるウイルスは、非腫瘍細胞で実質的に細胞死を引き起こすことなく、腫瘍細胞で細胞死を引き起こし得る。そのような態様において、ウイルスは、非腫瘍細胞で実質的に細胞死を引き起こさないかぎりにおいて、および所望により、宿主が腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導する十分な能力を有するかぎりにおいて、腫瘍細胞を攻撃的に殺傷し得る。

【0246】

ある態様において、ウイルスが細胞死を引き起こす能力は、ウイルスに対する宿主の免疫応答よりも遅い。宿主がウイルスによる感染を制御する能力は、ウイルス抗原に対する免疫応答(例えば、抗体力価)により決定され得る。典型的には、宿主がウイルスに対する免疫応答を誘導した後、ウイルスは、宿主内で減少した病原性を有し得る。したがって、細胞死を引き起こすウイルスの能力が微生物に対する宿主の免疫応答よりも遅いとき、ウイルス仲介細胞死は、宿主に対する重篤な疾患もしくは死のリスクなく、生じ得る。ある態様において、細胞死を引き起こすウイルスの能力は、微生物に対する宿主の免疫応答よりも遅い。

【0247】

2. 免疫原性

本明細書で提供されるウイルスはまた、免疫原性である。免疫原性ウイルスは、ウイルスに対する宿主免疫応答を誘導し得る。ある態様において、ウイルスは、大きな抗ウイルス抗体力価を生じるのに十分な程、免疫原性である。本明細書で提供されるウイルスは、免疫応答を誘導する能力を有し得る。免疫応答は、ウイルス抗原に対する応答で活性化されるか、もしくはウイルス感染誘導サイトカインもしくはケモカイン産生の結果として活性化され得る。ウイルスに対する免疫応答は、宿主生物に対する病原性の可能性を減少させ得る。

10

20

30

40

50

【0248】

ウイルスに対する免疫応答はまた、標的組織もしくは細胞、例えば、腫瘍細胞殺傷を生じ得る。ある態様において、ウイルス感染に対する免疫応答は、腫瘍抗原に対する抗体の産生を含む、腫瘍細胞に対する免疫応答を生じ得る。ある態様において、ウイルスに対して誘導された免疫応答は、“バースタンダー効果”により腫瘍細胞殺傷を生じ得て、ここで、感染腫瘍細胞周辺の非感染腫瘍細胞は、感染細胞と同時に殺傷されるか、または細胞外ウイルス周辺の非感染腫瘍細胞は、ウイルスと同時に殺傷される。バースタンダー効果腫瘍細胞死の結果として、腫瘍細胞抗原は、細胞から放出され、宿主生物の免疫系は、腫瘍細胞抗原に対する免疫応答を誘導し、その結果、腫瘍自身に対する免疫応答を生じ得る。

10

【0249】

ある態様において、ウイルスは、スーパー抗原性化合物を含む、1種もしくはそれ以上の抗原性化合物を発現するように選択されるか、もしくは修飾され得る。スーパー抗原のような抗原性化合物は、内因性遺伝子産物であり得るか、もしくは外因性遺伝子産物であり得る。トキシイドを含むスーパー抗原は、当分野で既知であり、本明細書の他の場所に記載されている。

【0250】

3. 複製能

本明細書で提供されるウイルスは、複製能を有し得る。さまざまなウイルス系において、投与されるウイルスは、宿主に対する病原性を限定するために複製能を有さない。複製不能は、ウイルスから宿主を保護し得るが、それはまた、腫瘍細胞に感染し、殺傷するウイルスの能力を限定し、典型的には、短命効果のみを生じる。対照的に、本明細書で提供されるウイルスは、弱毒化されているが、複製能を有しており、その結果、宿主に対する低い毒性、および主にまたは唯一の腫瘍における蓄積を生じる。したがって、本明細書で提供されるウイルスは、宿主に対する病原性リスクを生じることなく、複製能を有し得る。

20

【0251】

本明細書で提供されるウイルスの弱毒化は、ウイルスの複製能を減少させることを含むが、これらに限定されない。例えば、ウイルスは、複製関連活性、例えば、ウイルスでの複製を制御する転写アクチベーターを減少させるか、もしくは除去するように修飾され得る。ある例において、ウイルスは、ウイルスチミジンキナーゼ(TK)遺伝子が修飾されており、その結果、ウイルスの複製は減少し得る。

30

【0252】

4. 遺伝学的変異型

本明細書で提供されるウイルスは、野生型から修飾され得る。修飾は、さまざまな変化のいずれかを含み得て、典型的には、ウイルスのゲノムもしくは核酸分子における変化を含む。例えば、核酸分子修飾は、切断、挿入、欠失および突然変異を含む。修飾の1つの例において、ウイルス遺伝子は、切断、挿入、欠失または突然変異により修飾され得る。挿入の1つの例において、外因性遺伝子が、ウイルスゲノム中に挿入され得る。

【0253】

本明細書で提供されるウイルスの修飾は、病原性、毒性、選択的に腫瘍に蓄積する能力、細胞を溶解させるか、もしくは細胞死を引き起こす能力、腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導する能力、免疫原性および複製能のような本明細書で提供されるものを含む、ウイルス特性の修飾を生じ得る。変異型は、当分野で既知のとおり、一般的な方法、例えば、突然変異誘発および細胞もしくは組織の継代ならびに望まれる特性の選択により取得され得て、例えば、呼吸器合胞体ウイルスについて、Murphy et al., *Virus Res.* 1994, 32:13-26に記載されている。

40

【0254】

変異型はまた、ウイルスの核酸残基が、野生型と比較して、添加、除去もしくは修飾される突然変異誘発法により取得され得る。組み換えに基づく方法、制限エンドヌクレアー

50

ぜに基づく方法、およびPCRに基づく方法を含む、さまざまな既知の突然変異誘発法のいずれかが使用され得る。突然変異誘発法は、特定のヌクレオチド配列、例えば、遺伝子に対して向けられるか、もしくは無作為であり得て、ここで、望まれる特性に基づく選択法は、突然変異ウイルスを選択するために使用され得る。さまざまなウイルス修飾のいずれかが、選択されたウイルスおよび選択されたウイルスの特定の既知の修飾に基づいて、実施され得る。

【0255】

H. 医薬組成物、組み合わせおよびキット

本明細書で提供されるトランスポータータンパク質をコードするウイルスおよび1種もしくはそれ以上の構成要素を含む、医薬組成物、組み合わせおよびキットが本明細書で提供される。医薬組成物は、本明細書で提供されるウイルスおよび医薬的担体を含み得る。組み合わせは、2種もしくはそれ以上のウイルス、ウイルスおよびウイルスによりコードされたトランスポーターを発現する細胞に輸送される検出可能基質、ウイルスおよび検出可能化合物、ウイルスおよびウイルス発現調節化合物、ウイルスおよび治療化合物、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。キットは、本明細書で提供される医薬組成物および/または組み合わせ、ならびに1種もしくはそれ以上の構成要素、例えば、使用のための指示書、対象内でウイルスを検出するためのデバイスおよび対象に化合物を投与するためのデバイスを含み得る。

【0256】

1. 医薬組成物

本明細書で提供されるウイルスおよび適当な医薬的担体を含む医薬組成物が本明細書で提供される。本明細書で提供される医薬組成物は、さまざまな形態、例えば、固体、液体、粉末、水性、もしくは凍結乾燥形であり得る。適当な医薬的担体の例は、当分野で既知であり、とりわけ、水、バッファー、生理食塩水溶液、リン酸緩衝生理食塩水溶液、さまざまな型の湿潤剤、滅菌溶液、アルコール、アラビアガム、植物油、ベンジルアルコール、ゼラチン、グリセリン、炭水化物、例えば、ラクトース、スクロース、アミロースもしくはスターチ、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリドおよびジグリセリド、ペンタエリスリトール脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、粉末を含むが、これらに限定されない。本明細書で提供される医薬組成物は、例えば、とりわけ、抗酸化剤および保存剤、鎮痛薬、結合剤、崩壊剤、着色剤、希釈剤、賦形剤、増量剤、流動促進剤、溶解剤、安定化剤、等張化剤、ベシクル、増粘剤、香味剤、エマルジョン、例えば、油/水エマルジョン、乳化剤および懸濁剤、例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、ペントナイト、カルボマー、カラギーナン、カルボキシメチルセルロース、セルロース、コレステロール、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、オクトキシノール9、オレイルアルコール、ポビドン、プロピレングリコールモノステアラート、ラウリル硫酸ナトリウム、ソルビタンエステル、ステアリルアルコール、トラガカント、キサンタンガム、およびそれらの誘導體、溶剤、ならびに各種成分、例えば、結晶性セルロース、微結晶性セルロース、クエン酸、デキストリン、デキストロース、液体グルコース、乳酸、ラクトース、塩化マグネシウム、メタリン酸カリウム、スターチを含む、他の添加剤を含み得る。そのような担体および/または添加剤は、慣用的な方法により製剤化され得て、適当な用量で対象に投与され得る。安定化剤、例えば、脂質、ヌクレアーゼ阻害剤、ポリマーおよびキレート剤は、体内での分解から該組成物を保護し得る。

【0257】

ウイルスの送達のために使用され得るコロイド分散系は、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ピーズおよび脂質に基づく系(水中油型エマルジョン(混合)、ミセル、リポソームおよびリポプレックスを含む)を含む。器官特異的もしくは細胞特異的リポソームは、望まれる組織に対してのみの送達を達成するために使用され得る。リポソームの標的化は、既知である通常の方法を適用して、当業者により実施され得る。この標的

10

20

30

40

50

化は、受動的標的化(洞様毛細血管を含む器官において、RESが細胞に分布するリポソームの自然の傾向を利用すること)または能動的標的化(例えば、当業者に既知の方法により、リポソームを特定のリガンド、例えば、抗体、受容体、糖鎖、糖脂質およびタンパク質に結合させることによる)を含む。本発明の方法において、モノクローナル抗体は、特定の細胞表面リガンドにより、リポソームを特定の組織、例えば、腫瘍組織に標的化するために使用され得る。

【0258】

2. 宿主細胞

また、本明細書で提供されるウイルス、例えば、修飾化ワクシニアウイルスを含む宿主細胞が本明細書で提供される。そのような細胞は、単一の細胞型の集団または異なる細胞型の混合であり得る。宿主細胞は、培養細胞株、初代培養細胞および増殖細胞を含み得る。これらの宿主細胞は、さまざまな動物細胞、例えば、哺乳類、鳥類および昆虫細胞、ならびにウイルス、例えば、ワクシニアウイルス感染に感受性のある組織のすべてを含み得る(ニワトリ胚、ウサギ、ハムスターおよびサル腎臓細胞を含む)。適当な宿主細胞は、造血細胞(分化全能性細胞、幹細胞、白血球、リンパ球、単球、マクロファージ、APC、樹状細胞、非ヒト細胞など)、肺細胞、気管細胞、肝細胞、上皮細胞、内皮細胞、筋細胞(例えば、骨格筋、心筋または平滑筋)、線維芽細胞、および例えば、CV-1、BSC40、Vero、BSC40およびBSC-1、ならびにヒトHeLa細胞を含む細胞株を含むが、これらに限定されない。これらの宿主細胞を形質転換する方法、表現型で形質転換体を選択する方法、およびそのような他の方法は、当分野で既知である。

【0259】

3. 組み合わせ

本明細書で提供されるウイルスおよび第2薬剤、例えば、第2ウイルスまたは他の治療もしくは診断剤、例えば、トランスポーター基質タンパク質の組み合わせが提供される。組み合わせは、本明細書で提供される方法にしたがって、その弱毒化に影響を与えるための、すべてのウイルスもしくは試薬を含み得る。組み合わせは、本明細書で提供されるウイルスを1種もしくはそれ以上のさらなるウイルスと共に含み得る。本明細書で提供されるウイルスの組み合わせはまた、ウイルスを含む医薬組成物または本明細書に記載された宿主細胞を含み得る。

【0260】

ある態様において、組み合わせでのウイルスは、弱毒化ウイルス、例えば、トランスポータータンパク質をコードする弱毒化ワクシニアウイルスである。例えば、弱毒化ウイルスは、本明細書で提供されるワクシニアウイルス、例えば、実施例に記載されたワクシニアウイルス(例えば、GLV-1h99、GLV-1h100、GLV-1h101、GLV-1h139、GLV-1h146およびGLV-1h150、GLV-1h151、GLV-1h152およびGLV-1h153)を含むが、これらに限定されない。

【0261】

本明細書で提供される組み合わせは、ウイルスおよび治療化合物を含み得る。本明細書で提供される組成物のための治療化合物は、例えば、抗癌もしくは化学治療化合物であり得る。治療化合物は、例えば、サイトカイン、成長因子、光増感剤、放射性核種、毒素、siRNA分子、酵素/プロドラッグ対、代謝拮抗剤、シグナル伝達モジュレーター、抗腫瘍性抗生物質、抗腫瘍抗体、血管新生阻害剤、化学治療化合物またはそれらの組み合わせを含む。本明細書で提供されるウイルスは、抗腫瘍性化合物、例えば、白金配位複合体と組み合わせ得る。白金配位複合体は、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、DWA2114R、NK121、IS 3 295および254-Sを含む。医薬組成物組み合わせでの使用のためのさらなる治療化合物の例は、本明細書の他の場所で見出され得る(例えば、第1節の、例えば、サイトカイン、成長因子、光増感剤、放射性核種、毒素、siRNA分子、酵素/プロドラッグ対、代謝拮抗剤、シグナル伝達モジュレーター、抗腫瘍性抗生物質、抗腫瘍抗体、血管新生阻害剤、および化学治療化合物を参照のこと)。化学治療剤は、例えば、メトトレキサート、ピンクリスチン、アドリアマイシン、糖を含まないクロロエチルニトロソウレア、5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、プレオマイシン、ドキシソルピシン、

ダカルバジン、タキソール、フラジリン、メグラミンGLA、バルルピシン、カルムスチン
 およびポリフェルポサン、MM1270、BAY 12-9566、RASファルネシルトランスフェラーゼイ
 ンヒビター、ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター、MMP、MTA/LY231514、LY264
 618/ロメテキソール、グラモレク、CI-994、TNP-470、Hycamtin/トポテカン、PKC412、Va
 lspodar/PSC833、ノバントロン/ミトキサトロン、Metaret/スラミン、バチマスタット、E
 7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG3340、AG3433、インセル/VX-710、VX-853、ZD0101、I
 S1641、ODN 698、TA 2516/マーミスタット、BB2516/マーミスタット、CDP 845、D2163、P
 D183805、DX8951f、レモナルDP 2202、FK 317、ピシバニール/OK-432、AD 32/バルルピ
 シン、Metastron/ストロンチウム誘導体、Temodal/テモゾロミド、Evacet/リポソームド
 キソルピシン、Yewtaxan/パクリタキセル、タキソール/パクリタキセル、Xeoad/カペシ
 タピン、Furtulon/ドキシフルリジン、シクロパックス/経口パクリタキセル、経口タキソ
 イド、SPU-077/シスプラチン、HMR 1275/フラボピリドール、CP-358 (774)/EGFR、CP-609
 (754)/RAS癌遺伝子阻害剤、BMS-182751/経口プラチナ、UFT(テガフル/ウラシル)、Erg
 amisol/レバミゾール、Eniluracil/776C85/5FUエンハンサー、Campto/レバミゾール、Cam
 ptosar/イリノテカン、Tumodex/ラリトレキセド、Leustatin/クラドリピン、Paxex/パク
 リタキセル、Doxil/リポソームドキシソルピシン、Caelyx/リポソームドキシソルピシン、Flu
 dara/フルダラピン、Pharmarubicin/エピルピシン、DepoCyt、ZD1839、LU 79553/ビス-ナ
 フタルイミド、LU 103793/ドラスタチン、Caetyx/リポソームドキシソルピシン、Gemzar/ゲ
 ムシタピン、ZD 0473/アノーメド、YM 116、ヨウ素種、CDK4およびCDK2阻害剤、PARP阻害
 剤、D4809/デキシフォサミド、Ifes/Mesnex/イホスファミド、Vumon/テニボシド、Parapl
 atin/カルボプラチン、Plantinol/シスプラチン、Vepeside/エトボシド、ZD 9331、タキ
 ソテール/ドセタキセル、グアニンアラビノシドのプロドラッグ、タキサンのアナログ、
 ニトロソウレア、アルキル化剤(例えば、メルファランおよびシクロホスファミド)、アミ
 ノグルテチミド、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、クロランブシル、
 シタラピンHCl、ダクチノマイシン、ダウノルピシンHCl、エストラムスチンリン酸塩ナト
 リウム、エトボシド(VP16-213)、フロクスウリジン、フルオロウラシル(5-FU)、フルタミ
 ド、ヒドロキシウレア(ヒドロキシカルバミド)、イフォスファミド、インターフェロン
 -2a、インターフェロン -2b、酢酸ロイプロリド(LHRH-放出因子アナログ)、ロムスチン(
 CCNU)、メクロレタミンHCl(ナイトロジェンマスタード)、メルカプトプリン、メスナ、ミ
 トタン(o.p'-DDD)、ミトキサントロンHCl、オクトレオチド、プリカマイシン、プロカル
 バジンHCl、ストレプトゾシン、クエン酸タモキシフェン、チオグアニン、チオテパ、硫
 酸ピン brasチン、アムサクリン(m-AMSA)、アザシチジン、エリスロポエチン、ヘキサ
 メチルメラミン(HMM)、インターロイキン2、ミトグアゾン(メチル-GAG;メチルグリオキサ
 ールビス-グアニルヒドラゾン; MGBG)、ペントスタチン(2'デオキシコフォマイシン)、セ
 ムスチン(メチル-CCNU)、テニボシド(VM-26)、ならびに硫酸ピンデシンを含む。

【 0 2 6 2 】

さらなる態様において、組み合わせは、さらなる治療化合物、例えば、ウイルスにより
 コードされ、発現される酵素のための基質である化合物、または本明細書で提供されるか
 、もしくはウイルスとの関連で作用することが既知である他の治療化合物を含み得る。例
 えば、ウイルスは、プロドラッグを、癌細胞を殺傷するための活性化学治療剤に変換する
 酵素を発現し得る。したがって、本明細書で提供される組み合わせは、治療化合物、例え
 ば、プロドラッグを含み得る。例えば、ウイルス/治療化合物の組み合わせは、単純ヘル
 ペスウイルス チミジンキナーゼをコードするウイルスをプロドラッグガンシクロビルと
 共に含み得る。本明細書で提供される組み合わせでの使用のための、さらなる酵素/プロ
 ドラッグ対は、例えば、水痘帯状疱疹チミジンキナーゼ/ガンシクロビル、シトシンデア
 ミナーゼ/5-フルオロウラシル、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ/6-メチルプリンデオ
 キシリボシド、ラクタマーゼ/セファロsporin-ドキシソルピシン、カルボキシペプチタ
 ーゼG2/4-[(2-クロロエチル)(2-メスロキシエチル)アミノ]ベンゾイル-L-グルタミン酸、
 シトクロームP450/アセトアミノフェン、セイヨウワサビペルオキシダーゼ/インドール-3
 -酢酸、ニトロ還元酵素/CB1954、ウサギカルボキシレステラーゼ/7-エチル-10-[4-(1-ピ

10

20

30

40

50

ペリジノ)-1-ピペリジノ]カルボニルオキシカンボトテシン、マッシュルームチロシナーゼ/ビス-(2-クロロエチル)アミノ-4-ヒドロキシフェニルアミノメタノン 28、ガラクトシダーゼ/1-クロロメチル-5-ヒドロキシ-1,2-ジヒロ-3H-ベンゾ[e]インドール、グルクロニダーゼ/エピルビシングルクロニド、チミジンホスホリラーゼ/5'-デオキシ5-フルオロウリジン、デオキシシチジンキナーゼ/シトシンアラビノシド、ラクタマーゼおよびリナマーゼ/リナマリンを含むが、これらに限定されない。組み合わせでの使用のためのさらなるプロドラッグの例は、また、本明細書の他の場所で見出され得る(例えば、第1節を参照のこと)。本明細書で提供されるか、もしくは当分野で既知のさまざまな既知組み合わせのすべてが、本明細書で提供される組み合わせに含まれ得る。

【0263】

さらなる態様において、組み合わせは、ウイルスを殺傷し得るか、またはウイルスの増殖もしくは毒性を阻害し得る化合物を含み得る。本明細書で提供される組み合わせは、感染の処置のための抗生、抗真菌、抗寄生虫もしくは抗ウイルス化合物を含み得る。本明細書で提供されるウイルスとの組み合わせで含まれ得る抗生物質の例は、セフトジジム、セフェピム、イミペネム、アミノグリコシド、バンコマイシンおよび抗緑膿菌 -ラクタムを含むが、これらに限定されない。本明細書で提供されるウイルスとの組み合わせで含まれ得る抗真菌剤の例は、アンフォテリシンB、ダブソン、フルコナゾール、フルシトシン、グリセオフルビン、イントラコナゾール、ケトコナゾール、ミコナゾール、クロトリマゾール、ナスタチン、およびそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。本明細書で提供されるウイルスとの組み合わせで含まれ得る抗ウイルス剤の例は、シドフォビル、シドフォビル(CDV)のアルコキシアルキル、環状CDV、および(S)-9-(3-ヒドロキシ-2-ホスホニルメトキシプロピル)アデニン、5-(ジメトキシメチル)-2'-デオキシウリジン、イサチン、-チオセミカルバゾン、N-メタノカルバチミジン、プリブジン、7-デアザネブラノシンA、ST-246、グリベック、2'-フルオロ-2', 3'-ジデオキシアデノシン、インジナビル、ネルフィナビル、リトナビル、ネビラピン、AZT、ddI、ddC、およびそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。一般には、抗ウイルス剤との組み合わせは、組み合わせのウイルスに対して有効であることが既知の抗ウイルス剤を含む。例えば、組み合わせは、ワクシニアウイルスを、抗ウイルス化合物、例えば、シドフォビル、シドフォビルのアルコキシアルキルエステル、ガンシクロビル、アシクロビル、ST-246、およびグリベックと共に含み得る。

【0264】

他の態様において、組み合わせはさらに、検出可能化合物を含み得る。検出可能化合物は、ウイルス発現タンパク質もしくはRNA分子と相互作用し得るか、および/またはそれらに特異的に結合し得て、検出可能シグナル、例えば、断層撮影、分光学的方法、磁気共鳴法、または他の既知の技術により検出可能なシグナルを提供し得る、リガンドもしくは基質もしくは他の化合物を含み得る。検出可能化合物は、例えば、造影剤、例えば、放射性核種を含む、磁気共鳴、超音波もしくは断層撮影造影剤であり得るか、またはそれらを含み得る。検出可能化合物は、本明細書の他の場所で提供されるか、もしくは当分野で既知のさまざまな化合物のすべてを含み得る。典型的には、本明細書で提供される組み合わせにおいて、ウイルスと共に含まれる検出可能化合物は、基質、リガンドである化合物、またはウイルスによりコードされたタンパク質もしくはRNAと特異的に相互作用し得る化合物であり得て、ある例において、タンパク質またはRNAは、外因性タンパク質もしくはRNAである。例えば、ウイルス/検出可能化合物は、ルシフェラーゼ/ルシフェリン、-ガラクトシダーゼ/(4,7,10-トリ(酢酸)-1-(2'-ガラクトピラノシルエトキシ)-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン)ガドリニウム(Egad)をコードするウイルス、および当分野で既知の他の組み合わせを含む。

【0265】

他の態様において、組み合わせはさらに、ウイルス遺伝子発現調節化合物を含み得る。遺伝子発現を調節する化合物は、当分野で既知であり、転写アクチベーター、インデューサー、転写サプレッサー、RNAポリメラーゼ阻害剤およびRNA結合化合物、例えば、siRNA

10

20

30

40

50

もしくはリボザイムを含むが、これらに限定されない。当分野で既知のさまざまな遺伝子発現調節化合物のいずれかが、本明細書で提供される組み合わせに含まれ得る。典型的には、本明細書で提供される組み合わせにおいて、ウイルスと共に含まれる遺伝子発現調節化合物は、組み合わせのウイルスの転写因子もしくはRNAのような、遺伝子発現で活性化する1種もしくはそれ以上の化合物と結合するか、阻害するか、または反応し得る化合物であり得る。例えば、ウイルス/発現モジュレーターは、キメラ転写因子複合体をコードするウイルスであり得て、それは、酵母GAL4 DNA結合ドメインと融合した突然変異体ヒトプロゲステロン受容体および単純ヘルペスウイルスタンパク質VP16の活性化ドメインを有し、それはまた、アデノウイルス主要後期E1B TATA boxの上流に一連のGAL4認識配列を含む合成プロモーターを含む(ここで、化合物は、RU486であり得る)(例えば、Yu et al., (2002) Mol Genet Genomics 268:169-178を参照のこと)。当分野で既知のさまざまな他のウイルス/発現モジュレーターの組み合わせが、また、本明細書で提供される組み合わせに含まれ得る。

10

【0266】

さらなる態様において、組み合わせはさらに、ナノ粒子を含み得る。ナノ粒子は、それらが本明細書で提供される1種もしくはそれ以上の治療剤を含むように設計され得る。さらに、ナノ粒子は、ナノ粒子を腫瘍細胞に標的化する分子を含むように設計され得る。ある例において、ナノ粒子は、放射性核種、および所望により、腫瘍結合抗原と免疫反応性である抗体で被覆され得る。

【0267】

20

4. キット

本明細書で提供されるウイルス、細胞、医薬組成物もしくは組み合わせは、キットとしてパッケージ化され得る。キットは、所望により、1種もしくはそれ以上の構成要素、例えば、使用のための指示書、デバイスおよびさらなる試薬、ならびに該方法の実施のための試験管、容器および注射器のような構成要素を含み得る。キットは、例えば、本明細書で提供されるウイルスを含み得て、所望により、使用のための指示書、対象内のウイルスを検出するためのデバイス、対象にウイルスを投与するためのデバイス、および対象に化合物を投与するためのデバイスを含み得る。

【0268】

ある例において、キットは、指示書を含み得る。指示書は、一般に、ウイルス、および所望によりキットに含まれる他の構成要素、ならびに投与方法について記載した具体的な表現を含み、それらは、ウイルスを投与することについて、対象の適当な状態を決定する方法、適当な投与量、および適当な投与方法を含む。指示書はまた、処置期間の間、対象をモニタリングするための手引きを含み得る。

30

【0269】

他の例において、キットは、対象内のウイルスを検出するためのデバイスを含み得る。対象内のウイルスを検出するためのデバイスは、発光、例えば、ルシフェラーゼから放出される発光、もしくは蛍光タンパク質、例えば、緑色もしくは赤色蛍光タンパク質からの蛍光を検出するための高感度画像化デバイス、磁気共鳴測定デバイス、例えば、MRIもしくはNMRデバイス、断層撮影スキャナー、例えば、PET、CT、CAT、SPECTもしくは他の関連するスキャナー、超音波デバイス、または対象内でウイルスにより発現されるタンパク質を検出するために使用され得る他のデバイスを含み得る。典型的には、キットのデバイスは、キット中のウイルスにより発現される1種もしくはそれ以上のタンパク質を検出することが可能である。ウイルスおよび検出デバイスを含むさまざまなキットのいずれかは、本明細書で提供されるキットに含まれ得て、例えば、ルシフェラーゼを発現するウイルスおよび高感度撮像装置、または蛍光タンパク質、例えば、緑色もしくは赤色蛍光タンパク質を発現するウイルスおよび高感度撮像装置が含まれ得る。

40

【0270】

本明細書で提供されるキットはまた、ウイルスを対象に投与するためのデバイスを含み得る。医薬またはワクチンを対象に投与するために当分野で既知のさまざまなデバイスの

50

すべては、本明細書で提供されるキットに含まれ得る。例えば、デバイスは、皮下注射針、静脈注射用針、カテーテル、無針注射デバイス、吸入器および液体ディスペンサー、例えば、点眼器を含むが、これらに限定されない。典型的には、キットのウイルスを投与するためのデバイスは、キットのウイルスと適合させ得て、例えば、無針注射デバイス、例えば、高圧注入デバイスは、高圧注入により損傷を受けないウイルスと共にキット内に含まれ得るが、典型的には、高圧注入により損傷を受けるウイルスと共にキット内に含まれ得ない。

【0271】

本明細書で提供されるキットは、化合物を対象に投与するためのデバイスを含み得る。医薬を対象に投与するために当分野で既知のさまざまなデバイスのすべては、本明細書で提供されるキットに含まれ得る。例えば、デバイスは、皮下注射針、静脈注射用針、カテーテル、無針注射を含み、皮下注射針、静脈注射用針、カテーテル、無針注射デバイス、吸入器および液体ディスペンサー、例えば、点眼器に限定されない。典型的には、キットの化合物を投与するためのデバイスは、望まれる化合物の投与方法に適合させ得る。例えば、皮下に送達される化合物は、皮下注射針および注射器と共にキット内に含まれ得る。

【0272】

1. 診断および治療法

癌性細胞、腫瘍および転移部を含む免疫特権細胞もしくは組織を検出、画像化、処置および/または予防する方法を含む診断および治療法が、本明細書で提供される。そのような部位、疾患および障害は、細胞増殖の部位、増殖性状態、新生物、腫瘍、腫瘍性疾患、創傷および炎症を含む。本明細書で提供される診断および治療法は、本明細書で提供されるトランスポータータンパク質をコードするウイルスを腫瘍および/または転移部を含む対象に投与することを含むが、これらに限定されない。本明細書で提供されるウイルスは、本明細書で提供される方法を用いて、トランスポータータンパク質をコードするウイルスを産生するように修飾されたウイルスを含む。そのようなウイルスで感染した標的細胞は、トランスポータータンパク質を発現し、その結果、対応するトランスポーター基質の取り込みを可能にし、ここで、対応するトランスポーター基質は、診断および/もしくは治療剤、または診断もしくは治療剤との共役体であり得る。該トランスポーター基質の選択および修飾は、本明細書の他の場所に記載されている。ウイルス感染腫瘍細胞による標識化基質の取り込みにより、腫瘍組織の視覚化が可能となり、それは、腫瘍治療をモニタリングするために使用され得る。

【0273】

投与されるウイルスはまた、弱毒化した病原性、低毒性、腫瘍への選択的蓄積、腫瘍細胞に対する免疫応答を活性化する能力、免疫原性、複製能、さらなる外因性診断および/または治療遺伝子を発現する能力、発現遺伝子産物に対する抗体産生を誘発する能力を含む、1種もしくはそれ以上の特性を有し得る。ウイルスは、対象(例えば、齧歯類、イヌ、ネコ、霊長類、もしくは家畜を含む、ヒトおよび他の哺乳類であるが、これらに限定されない)の診断および/または治療のために投与され得る。

【0274】

本明細書で提供されるウイルスは、腫瘍もしくは転移部に蓄積し得る。ある例において、本明細書で提供されるウイルスの投与は、腫瘍成長の遅延を生じる。他の例において、本明細書で提供されるウイルスの投与は、腫瘍容積の減少を生じる。しかしながら、本明細書で提供される治療法は、投与されたウイルスが腫瘍細胞を殺傷するか、もしくは腫瘍サイズを減少させることを必要としない。代わりに、本明細書で提供される方法は、本明細書で提供される対象内の抗腫瘍免疫応答を引き起こすか、もしくは促進するウイルスを対象に投与することを含む。ある例において、本明細書で提供されるウイルスは、対象にウイルス誘導疾患を引き起こすことなく、対象に投与され得る。ある例において、ウイルスは、対象内で抗腫瘍免疫応答を誘発することができ、ここで、典型的には、ウイルス仲介抗腫瘍免疫応答は、例えば、数日で、1週間もしくはそれ以上で、10日もしくはそれ以上で、2週間もしくはそれ以上で、または1ヶ月もしくはそれ以上で誘発され得る。例えば

、ある方法において、ウイルスは、腫瘍に存在し得て、ウイルス自身が腫瘍成長を妨害するのに十分な腫瘍細胞死を引き起こすことなく、抗腫瘍免疫応答を誘発し得る。ある例において、腫瘍は、単剤治療腫瘍または単剤治療癌であり、ここで、腫瘍または癌は、ウイルスもしくは治療剤単独で処置されたとき、容積が減少しない。

【0275】

ある例において、対象内で、選択された抗原もしくは選択された抗原型に対する抗体産生を誘導するか、もしくは促進するための方法が本明細書で提供され、ここで、該方法は、腫瘍および/または転移部に蓄積し、腫瘍から選択された抗原もしくは選択された抗原型の放出を生じ、その結果、選択された抗原もしくは選択された抗原型に対する抗体産生を生じ得るウイルスを、対象に投与することを含む。さまざまな抗原のいずれかを本明細書で提供される方法で標的化することができ、それは、ウイルスにより発現される外因性遺伝子産物のような選択された抗原、または腫瘍のウイルス感染の結果として腫瘍から放出される(例えば、溶解、アポトーシス、分泌または腫瘍からの抗原放出を引き起こす他のメカニズムによる)1種もしくはそれ以上の腫瘍抗原のような選択された抗原型を含む。

10

【0276】

ある態様において、選択された抗原もしくは選択された抗原型の放出を、数日にわたり、例えば、少なくとも1週間、少なくとも10日間、少なくとも2週間、または少なくとも1ヶ月間、維持することが望ましくあり得る。対象内で持続した抗原放出を提供する方法が本明細書で提供され、ここで、該方法は、腫瘍および/または転移部に蓄積し、抗原の持続した放出を生じ、その結果、抗原に対する抗体産生を生じ得るウイルスを、対象に投与することを含む。抗原の持続した放出は、ウイルス感染宿主による免疫応答を生じ得て、ここで、宿主は、抗原に対する抗体を産生し得るか、および/または宿主は、抗原を発現する細胞に対する免疫応答(腫瘍細胞に対する免疫応答を含む)を誘発し得る。したがって、抗原の持続した放出は、腫瘍細胞に対する免疫を生じ得る。ある態様において、腫瘍細胞に対するウイルス仲介持続抗原放出誘導免疫応答は、すべての腫瘍細胞の完全な除去もしくは殺傷を生じ得る。

20

【0277】

ある態様において、本明細書で提供される治療法は、対象内での腫瘍成長を阻害し、ここで、該方法は、腫瘍および/または転移部に蓄積し、抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進し得るウイルスを対象に投与することを含む。腫瘍もしくは転移部に蓄積したウイルスの結果として誘導される抗腫瘍免疫応答は、腫瘍成長の阻害を生じ得る。

30

【0278】

ある態様において、本明細書で提供される治療法は、対象内での転移部の成長もしくは形成を阻害し、ここで、該方法は、腫瘍および/または転移部に蓄積し、抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進し得るウイルスを対象に投与することを含む。腫瘍もしくは転移部に蓄積したウイルスの結果として誘導される抗腫瘍免疫応答は、転移部の成長もしくは形成の阻害を生じ得る。

【0279】

他の態様において、本明細書で提供される治療法は、対象内での腫瘍および/または転移部のサイズを減少させ、ここで、該方法は、腫瘍および/または転移部に蓄積し、抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進し得る本明細書で提供されるウイルスを対象に投与することを含む。腫瘍もしくは転移部に蓄積したウイルスの結果として誘導される抗腫瘍免疫応答は、腫瘍および/または転移のサイズの減少を生じ得る。

40

【0280】

ある態様において、本明細書で提供される治療法は、対象内から腫瘍および/または転移部を除去し、ここで、該方法は、腫瘍および/または転移部に蓄積し、抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進し得る本明細書で提供されるウイルスを対象に投与することを含む。腫瘍もしくは転移部に蓄積したウイルスの結果として誘導される抗腫瘍免疫応答は、対象内からの腫瘍および/または転移部の除去を生じ得る。

【0281】

50

腫瘍成長を減少させるか、もしくは阻害し、転移部の成長および/または形成を阻害し、腫瘍もしくは転移部のサイズを減少させ、腫瘍もしくは転移部を除去する方法、または本明細書で提供される他の腫瘍治療法は、宿主内で抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進することを含む。もともと抗腫瘍性である宿主の免疫応答は、ウイルスが蓄積した腫瘍および/または転移部に対して誘導されるだけでなく、ウイルスが蓄積していない腫瘍および/または転移部(ウイルスの対象への投与後に形成される腫瘍および/または転移部を含む)に対しても誘導され得る。したがって、成長もしくは形成が阻害されるか、またはサイズが減少するか、または除去される腫瘍および/または転移部は、ウイルスが蓄積した腫瘍および/または転移部であるか、またウイルスが蓄積していない腫瘍および/または転移部であり得る。したがって、腫瘍成長を減少させるか、もしくは阻害し、転移部の成長および/または形成を阻害し、腫瘍もしくは転移部のサイズを減少させ、腫瘍もしくは転移部を除去する方法、または他の腫瘍治療法が本明細書で提供され、該方法は、本明細書で提供されるウイルスを対象に投与することを含み、ここで、ウイルスは、少なくとも1種の腫瘍もしくは転移部に蓄積し、対象内で抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進し、免疫応答はまた、ウイルスが蓄積していない腫瘍および/または転移部に対して誘導される。他の態様において、腫瘍性疾患の再発を阻害するか、もしくは予防し、または新規腫瘍成長を阻害するか、もしくは予防する方法が提供され、ここで、該方法は、腫瘍および/または転移部に蓄積し、抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進し得る本明細書で提供されるウイルスを対象に投与することを含み、抗腫瘍免疫応答は、腫瘍性疾患の再発を阻害するか、もしくは予防し、または新規腫瘍成長を阻害するか、もしくは

10

20

【0282】

本明細書で提供される腫瘍もしくは新生物性疾患の治療法、例えば、腫瘍成長を減少させるか、もしくは阻害し、転移部の成長および/または形成を阻害し、腫瘍もしくは転移部のサイズを減少させ、腫瘍もしくは転移部を除去する方法、または他の腫瘍治療法はまた、本明細書で提供される腫瘍細胞溶解もしくは腫瘍細胞死を引き起こし得るウイルスを対象に投与することを含み得る。そのようなウイルスは、対象内で抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進し得るウイルスと同じウイルスであり得る。ウイルス、例えば、本明細書で提供されるウイルスは、内因性もしくは外因性遺伝子の発現の結果として、細胞溶解もしくは腫瘍細胞死を引き起こし得る。内因性もしくは外因性遺伝子は、当分野で既知の直接もしくは間接的な作用(細胞溶解チャンネル形成またはアポトーシス経路の活性化を含む)の結果として、腫瘍細胞溶解を引き起こし得るか、または細胞成長を阻害し得る。遺伝子産物、例えば、外因性遺伝子産物は、プロドラッグを活性細胞毒性型に活性化するように機能し得て、その結果、そのような遺伝子が発現した場所において細胞死を生じる。

30

【0283】

抗原産生または腫瘍および/もしくは転移部の処置のそのような方法は、治療、例えば、遺伝子治療、癌遺伝子治療、またはワクチン療法のための、本明細書で提供されるウイルスの投与を含み得る。該ウイルスは、体液性および/または細胞性免疫応答を刺激し、そのような応答から利益を受け得る対象で、強力な細胞毒性Tリンパ球応答を誘導するために使用され得る。例えば、ウイルスは、免疫反応性抗原(Earl et al., *Science* 234: 728-831 (1986); Lathe et al., *Nature (London)* 32: 878-880 (1987))、細胞腫瘍関連抗原(Bernards et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6854-6858 (1987); Estin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1052-1056 (1988); Kantor et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 1084-1091 (1992); Roth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4781-4786 (1996))および/またはサイトカイン(例えば、IL-2、IL-12)、共刺激分子(B7-1、B7-2) (Rao et al., *J. Immunol.* 156: 3357-3365 (1996); Chamberlain et al., *Cancer Res.* 56: 2832-2836 (1996); Oertli et al., *J. Gen. Virol.* 77: 3121-3125 (1996); Qin and Chatterjee, *Human Gene Ther.* 7: 1853-1860 (1996); McAneny et al., *Ann. Surg. Oncol.* 3: 495-500 (1996))、または他の治療タンパク質を発現するウイルスを用いて、

40

50

腫瘍もしくは病変部由来の細胞の拒絶により、ウイルスが感染した腫瘍または他の感染性疾患に対する予防的もしくは治療的效果を提供し得る。

【0284】

上記したとおり、固形腫瘍は、ウイルス、例えば、ワクシニアウイルスで処置され得て、膨大な腫瘍特異的ウイルス複製を生じ、その結果、腫瘍において、腫瘍タンパク質抗原およびウイルスタンパク質産生を生じ得る(米国特許出願公開番号2005/0031643)。マウスへのワクシニアウイルス投与は、感染腫瘍細胞の溶解およびその結果生じる腫瘍細胞特異的抗原の放出を生じた。持続的なこれらの抗原の体内への漏出は、マウス内で、腫瘍タンパク質、ウイルスタンパク質、およびウイルスコード改変タンパク質に対する非常に高いレベルの抗体力価を生じた(約7-14日で)。新規合成抗腫瘍抗体および促進されたマクロファージ、好中球数は、血管により持続的に腫瘍に送達され、それにより、腫瘍に対する活性化免疫系の集合を提供した。次いで、活性化免疫系は、ウイルス粒子を含む腫瘍の外來性化合物を除去した。この相互接続した外來性抗原の放出は、抗体産生および腫瘍タンパク質に対する抗体の持続的な応答を促進し、これは、ワクシニアウイルス感染および複製により開始され、その後、細胞溶解、タンパク質漏出および促進された抗体産生が生じる自己免疫ワクチン接種系のように機能した。したがって、本明細書で提供されるウイルスおよび本明細書で提供される方法を用いて作製されたウイルスは、免疫特権ウイルス増殖の部位として、免疫特権腫瘍部位を有するすべての腫瘍系に適用することができる完全な工程で投与され得て、その結果、宿主自身の免疫系による腫瘍の除去を生じ得る。

【0285】

他の態様において、対象を免疫化するための方法が本明細書で提供され、該方法は、1種もしくはそれ以上の抗原を発現するウイルスを対象に投与することを含み、対象は、該抗原に対して免疫応答を誘発することができる。免疫化抗原は、ウイルスに内在的であり得て、例えば、ワクシニアウイルス上のワクシニア抗原であり得て、天然痘、麻疹、ムンプスために使用され得るか、または免疫化抗原は、ウイルスにより発現される外因性抗原、例えば、ウイルスカプシド表面上に発現するインフルエンザもしくはHIV抗原であり得る。天然痘の場合には、例えば、腫瘍特異的タンパク質抗原は、天然痘ワクチンのための弱毒化ワクシニアウイルス(ウイルスゲノムによりコードされている)により送達され得る。したがって、修飾化ワクシニアウイルスを含む本明細書で提供されるウイルスは、ワクチンとして使用され得る。

【0286】

ある態様において、処置される腫瘍は、癌、例えば、膵臓癌、非小細胞肺癌、多発性骨髄腫もしくは白血病であるが、これらに限定されず、他の転移性疾患は、本明細書で提供される組み合わせにより処置され得る。例えば、処置される腫瘍は、固形腫瘍、例えば、肺および気管支、乳房、大腸および直腸、腎臓、胃、食道、肝臓および肝内胆管、膀胱、脳および他の神経系、頭頸部、口腔および咽頭、頸部、子宮体部、甲状腺、卵巣、精巣、前立腺、悪性黒色腫、胆管癌腫、胸腺腫、非黒色腫皮膚癌の固形腫瘍、および血液学的腫瘍および/または悪性腫瘍、例えば、小児白血病およびリンパ腫、多発性骨髄腫、ホジキン病、リンパ球および皮膚起源のリンパ腫、急性および慢性白血病、例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性もしくは慢性骨髄性白血病、形質細胞腫、リンパ腫およびAIDSに付随する癌であり得る。例えば、腫瘍は、膵臓癌、卵巣癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、頸部腫瘍および乳癌を含む。ある態様において、腫瘍は、癌腫、例えば、卵巣癌もしくは膵臓癌である。

【0287】

1. 投与

本明細書で提供される治療法の実施において、本明細書で提供されるトランスポータータンパク質をコードするウイルスは、腫瘍を患うか、もしくは腫瘍性細胞を有する対象を含む対象、または免疫化されるべき対象に投与され得る。投与されるウイルスは、本明細書で提供されるウイルス、または本明細書で提供される方法を用いて作製された任意の他のウイルスであり得る。ある態様において、投与されるウイルスは、弱毒化された病原性

10

20

30

40

50

、低い毒性、腫瘍への選択的蓄積、腫瘍細胞に対する免疫応答を活性化する能力、高い免疫原性、複製能および外因性タンパク質を発現する能力、ならびにそれらの組み合わせのような特性を含むウイルスである。トランスポータータンパク質により輸送される基質は、検出、画像化もしくは処置のためのウイルスの投与と同時に、もしくは連続して投与され得る。

【0288】

a. ウイルスを投与する前の工程

ある態様において、1つまたはそれ以上の工程がウイルスの対象への投与前に行われ得る。さまざまな上記工程のいずれかが実施され得て、それは、ウイルス投与のために適当な状態を有する対象を診断すること、対象の免疫能力を決定すること、対象を免疫化すること、化学治療剤で対象を処置すること、放射線で対象を処置すること、または対象を外科手術で処置することを含むが、これらに限定されない。

【0289】

治療目的のために、ウイルスを腫瘍保有対象に投与することを含む態様では、対象は、一般に、あらかじめ腫瘍性状態であることが診断されている。診断法はまた、腫瘍性状態の型を決定するか、腫瘍性状態の段階を決定するか、対象内での1種もしくはそれ以上の腫瘍のサイズを決定するか、対象のリンパ節での転移性もしくは腫瘍性細胞の存在もしくは非存在を決定するか、または対象内の転移部の存在を決定することを含み得る。ウイルスを対象に投与するための治療法のある態様は、原発性腫瘍のサイズまたは腫瘍性疾患の段階を決定し、原発性腫瘍のサイズが閾値容積と等しいか、もしくはそれを超えるとき、または腫瘍性疾患の段階が閾値段階と等しいか、もしくはそれを超えるとき、ウイルスが態様に投与されることを含む。同様の態様において、原発性腫瘍のサイズが閾値容積以下であるとき、または腫瘍性疾患の段階が閾値段階もしくはそれ以下であるとき、ウイルスは、まだ対象に投与されず、該方法は、腫瘍サイズもしくは腫瘍性疾患の段階が閾値量に到達するまで対象をモニタリングし、次いで、ウイルスを対象に投与することを含み得る。閾値サイズは、腫瘍の成長速度、腫瘍に感染するウイルスの能力、および対象の免疫能力を含むいくつかの因子に基づいて変わり得る。一般に、閾値サイズは、ウイルスが、宿主の免疫系により完全に除去されることなく、腫瘍内またはその周辺に蓄積し、複製するのに十分なサイズであり、一般にはまた、宿主が腫瘍細胞に対する免疫応答を誘発するのに十分な時間、典型的には、約1週間もしくはそれ以上、約10日もしくはそれ以上、または約2週間もしくはそれ以上の期間、ウイルス感染を持続させるために十分なサイズであり得る。ウイルス、例えば、ワクシニアウイルスのための閾値腫瘍サイズは、例えば、少なくとも約100 mm³、少なくとも約200 mm³、少なくとも約300 mm³、少なくとも約400 mm³、少なくとも約500 mm³、少なくとも約750 mm³、少なくとも約1000 mm³、もしくは少なくとも約1500 mm³である。閾値腫瘍性疾患段階はまた、特定の腫瘍性疾患を病期分類するための特定の必要性、腫瘍性疾患の成長の攻撃性、腫瘍もしくは転移部に感染するウイルスの能力、および対象の免疫能力を含むいくつかの因子に基づいて変わり得る。一般に、閾値段階は、ウイルスが、宿主の免疫系により完全に除去されることなく、腫瘍内またはその周辺に蓄積し、複製するのに十分な段階であり、一般にはまた、宿主が腫瘍細胞に対する免疫応答を誘発するのに十分な時間、典型的には、約1週間もしくはそれ以上、約10日もしくはそれ以上、または約2週間もしくはそれ以上の期間、ウイルス感染を持続させるために十分な段階であり得る。例えば、閾値段階は、最も低い段階(例えば、第1段階またはそれと同等の段階)を超えた任意の段階、または原発性腫瘍が閾値サイズよりも大きい任意の段階、または転移性細胞が検出される任意の段階である。

【0290】

他の態様において、ウイルスを対象に投与する前に、対象の免疫能力が決定され得る。本明細書で提供されるウイルスを対象に投与する方法は、対象内で免疫応答を誘導するか、もしくは促進することを含み得る。したがって、ウイルスを対象に投与する前に、免疫応答を誘導する対象の能力が決定され得る。当分野で既知の免疫能力のさまざまな試験のすべては、本明細書で提供される方法において実施され得る。例えば、免疫能力試験は、

ABO赤血球凝集力価(IgM)、白血球接着不全症(LAD)、顆粒球機能(NBT)、TおよびB細胞定量、テタヌス抗体力価、唾液IgA、皮膚試験、扁桃腺試験、補体C3レベル、およびB因子レベル、ならびにリンパ球数を調べ得る。当業者は、対象の免疫能力のレベルに基づいて、ウイルスの免疫原性に基づいて、および所望により、処置される腫瘍性疾患の免疫原性に基づいて、ウイルスを対象に投与することの望ましさを決定することができる。一般には、当業者が、対象がウイルスに対する免疫応答を誘導するのに十分な能力を有すると判断すれば、対象は、免疫能力を有すると考えられ得る。

【0291】

ある態様において、対象は、本明細書で提供される方法に基づいてウイルスを対象に投与する前に、免疫化され得る。免疫化は、ウイルスに対する免疫応答を誘導する対象の能力を増大させるか、または対象がウイルスに対する免疫応答を誘導する誘導し得る速度を早めるために役立ち得る。免疫化はまた、対象に対するウイルスの病原性のリスクを減少させるために役立ち得る。ある態様において、免疫化は、投与される治療ウイルスに類似した免疫化ウイルスで行われ得る。例えば、免疫化ウイルスは、治療ウイルスの複製不能変異型であり得る。他の態様において、免疫化物質は、投与される治療ウイルスの消化物であり得る。既知のウイルスに対して対象を免疫化するためのさまざまな方法のすべては、当分野で既知であり、本明細書で使用され得る。ある例において、例えば、1 μgのソラレンおよび4分間、365 nmでの紫外線で処理されたワクシニアウイルスは、複製が不能になり得る。他の態様において、ウイルスは、対象が以前に、例えば、小児期ワクチン接種で免疫化されたウイルスと同じであるか、もしくは類似するものとして選択され得る。

【0292】

他の態様において、対象は、あらかじめ行われる癌処置、例えば、腫瘍および/または転移部の化学療法治療、放射線治療もしくは外科的除去のいずれの工程も行うことなく、ウイルスを投与され得る。本明細書で提供される方法は、腫瘍に入り込むか、または腫瘍の周辺に局在するウイルスの能力について利点を有し、ここで、腫瘍細胞は、対象の免疫系から保護され得て；次いで、ウイルスは、そのような免疫保護領域で増殖し得て、また、腫瘍から、対象の免疫系が腫瘍抗原を認識し、免疫応答を誘導し得る位置に、腫瘍抗原の放出(一般には、持続的放出)を引き起こし得る。そのような方法において、十分なサイズの腫瘍もしくは十分に開発された免疫保護状態の存在は、ウイルスの腫瘍への成功した投与のために、および十分な腫瘍抗原産生のために有利であり得る。腫瘍が外科手術により除去されると、他の腫瘍性細胞(例えば、小転移部)は、ウイルスが生存し、増殖し得るのに十分に成熟した免疫保護環境を作り出していないため、ウイルスがそのような細胞に局在することはできず、またウイルスが腫瘍性細胞に局在できたとしても、細胞の数または塊のサイズがあまりにも小さく、宿主が抗腫瘍免疫応答を誘導するために、ウイルスが腫瘍抗原の持続した放出を引き起こすことができないものであり得る。したがって、例えば、腫瘍もしくは腫瘍性疾患を処置するための方法が本明細書で提供され、ここで、ウイルスは、原発性腫瘍を除去することなく、腫瘍もしくは腫瘍性疾患を有する対象に、または少なくともいくつかの腫瘍もしくは腫瘍性細胞が意図的に対象内に残されている、腫瘍もしくは腫瘍性疾患を有する対象に投与される。他の典型的な癌処置法、例えば、化学療法または放射線治療において、そのような方法は、一般に、対象の免疫系を弱める副作用を有する。化学療法または放射線治療による対象のこの処置は、抗腫瘍免疫応答を誘導する対象の能力を減少させ得る。したがって、例えば、腫瘍もしくは腫瘍性疾患を処置するための方法が本明細書で提供され、ここで、ウイルスは、免疫系を弱める治療、例えば、化学療法もしくは放射線治療で対象を処置することなく、腫瘍もしくは腫瘍性疾患を患う対象に投与される。

【0293】

他の態様において、ウイルスを対象に投与する前に、対象は、原発性腫瘍を除去しないか、もしくは対象の免疫系を弱めない、1種もしくはそれ以上の癌処置工程で処置され得る。より最新のさまざまな癌処置法が開発されており、ここで、腫瘍は、外科的除去または免疫系を弱める治療を行うことなく処置され得る。例えば、該方法は、免疫系を弱める

10

20

30

40

50

ことなく(例えば、腫瘍抑制化合物を投与するか、または腫瘍細胞特異的化合物を投与することにより)、腫瘍もしくは腫瘍性細胞の増殖速度を減少させる化合物を投与するか、または血管新生阻害化合物を投与することを含む。したがって、ウイルスを対象に投与することを含む組み合わせ法は、さらに、癌治療を改善し得る。したがって、例えば、対象の免疫系を弱めることなく腫瘍成長を遅延させる化合物、または腫瘍の血管新生を阻害する化合物を投与する前に、もしくはその後、該投与と共に、ウイルスを対象に投与する方法が本明細書で提供される。

【0294】

b. 投与形態

ウイルスを対象に投与する任意の形態が、ウイルスが腫瘍もしくは転移部に入り込むのを可能にするかぎり、使用され得る。投与形態は、全身的、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、経皮、皮内、動脈内(例えば、肝動脈注入)、膀胱内注入、胸膜内、関節内、局所、腫瘍内、病巣内、マルチ穿刺(例えば、天然痘ワクチンで使用されるとおり)、吸入、経皮、皮下、経鼻、気管内、経口、腔内(例えば、カテーテルにより膀胱に投与される、坐薬または浣腸により腸管に投与される)、腔内、直腸、頭蓋内、前立腺、硝子体内、耳、または他の眼内投与を含むが、これらに限定されない。トランスポーター基質はまた、同様に投与され得る。ある例において、ウイルスおよびトランスポーター基質は、腫瘍の検出、画像化および/または処置のために、全身的に投与される。

【0295】

当業者は、対象およびウイルスに適合した任意の投与形態を選択することができ、その結果、また、ウイルスが腫瘍および/または転移部に到達しやすくなる。投与経路は、疾患の性質、腫瘍の種類、および医薬組成物の中に含まれる特定のウイルスを含むさまざまな因子のいずれかに基づいて、当業者により選択され得る。標的部位への投与は、例えば、コロイド分散系として弾道送達により行われ得るか、または全身投与は、動脈への注入により行われ得る。

【0296】

c. 用量

投与レジメンは、さまざまな方法および量のいずれかであり得て、既知の臨床因子に基づいて、当業者により決定され得る。医療分野で既知のとおり、任意のある患者への投与量は、対象の種類、サイズ、体表面積、年齢、性別、免疫能力、および一般的な健康状態、投与される特定のウイルス、投与の持続および経路、疾患の種類および段階、例えば、腫瘍サイズ、ならびに共投与される他の処置もしくは化合物、例えば、化学治療剤を含む、多くの因子に依存し得る。上記の因子に加えて、そのようなレベルは、当業者により決定され得るとおり、ウイルスの感染性およびウイルスの性質により影響され得る。本発明の方法において、適当な最小限のウイルスの投与量レベルは、ウイルスが腫瘍もしくは転移部において生存し、増殖し、および複製するのに十分なレベルであり得る。例えば、65 kgのヒトに対してウイルスを投与するための最小レベルは、少なくとも約 1×10^5 プラーク形成単位(PFU)、少なくとも約 5×10^5 PFU、少なくとも約 1×10^6 PFU、少なくとも約 5×10^6 PFU、少なくとも約 1×10^7 PFU、少なくとも約 1×10^8 PFU、少なくとも約 1×10^9 PFU、または少なくとも約 1×10^{10} PFUを含み得る。本発明の方法において、適当な最大限のウイルスの投与量レベルは、宿主に対して非毒性であるレベル、3回もしくはそれ以上の脾腫を引き起こさないレベル、約1日後または約3日後または約7日後に、正常組織もしくは器官においてコロニーもしくはプラークを生じないレベルであり得て、例えば、65 kgのヒトに対してウイルスを投与するための最大レベルは、約 1×10^{11} PFU以下、約 5×10^{10} PFU以下、約 1×10^{10} PFU以下、約 5×10^9 PFU以下、約 1×10^9 PFU以下、または約 1×10^8 PFU以下を含み得る。

【0297】

化学治療化合物との組み合わせ治療について、そのような化合物の投与用量は、当分野で既知であり、既知の臨床因子(例えば、対象の種類、サイズ、体表面積、年齢、性別、免疫能力、および一般的な健康状態、投与される特定のウイルス、投与の持続および経路

10

20

30

40

50

、疾患の種類および段階、例えば、腫瘍サイズ、ならびに共投与される他のウイルス、処置もしくは化合物、例えば、他の化学治療剤)に基づいて、当業者により決定され得る。上記の因子に加えて、そのようなレベルは、当業者により決定され得るとおり、ウイルスの感染性およびウイルスの性質により影響され得る。例えば、シスプラチン(また、シス白金、プラチノール; シス-ジアンミンジクロロ白金; およびcDDPと呼ばれる)は、精巣癌、卵巣癌およびさまざまな他の癌の治療において高頻度で使用される、水溶性白金配位化合物の広範なクラスを代表する(例えば、Blumenreich et al. *Cancer* 55(5): 1118-1122 (1985); Forastiere et al. *J. Clin. Oncol.* 19(4): 1088-1095 (2001)を参照のこと)。臨床的にシスプラチンを使用する方法は、当分野で既知である。例えば、シスプラチンは、遅い静脈内点滴により、1ヶ月に1回、1日に6時間以上、投与される。局所病変について、シスプラチンは、局所注入により投与され得る。腹腔内注入はまた、使用され得る。シスプラチンは、多剤レジメンの一部であるとき、または患者がより多い投与量に対して副作用を示すとき、処置あたり10 mg/m²ほどの低い用量で投与され得る。一般に、臨床投与量は、処置あたり約30から約120もしくは150 mg/m²である。

10

【0298】

一般に、白金含有化学治療剤は、非経腸で、例えば、上記したとおり、遅い静脈内点滴によるか、または局所注入により、投与される。シスプラチンの病巣内(腫瘍内)およびIP投与の効果は、(Nagase et al. *Cancer Treat. Rep.* 71(9): 825-829 (1987); and Theon et al. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202(2): 261-7. (1993))に記載されている。

【0299】

20

ある態様において、突然変異体ワクシニアウイルスは、0-60日間で別々に1回もしくは2-4回投与され、その後、1-30日間は、抗癌処置が行われず、次いで、シスプラチンが1-5日間毎日投与され、その後、1-30日間は、抗癌処置が行われない。治療の各構成要素、すなわち、ウイルスもしくはシスプラチン処置、またはウイルスおよびシスプラチンの組み合わせ治療が繰り返され得る。他の態様において、シスプラチンは、1-5日間毎日投与され、その後、1-10日間は、抗癌処置が行われず、次いで、突然変異体ワクシニアウイルスが0-60日間で別々に1回もしくは2-4回投与される。そのような処置スキームは、繰り返され得る。他の態様において、シスプラチンは、1-5日間毎日投与され、その後、1-10日間は、抗癌処置が行われず、次いで、突然変異体ワクシニアウイルスが0-60日間で別々に1回もしくは2-4回投与される。その後、5-60日間は、抗癌処置が行われず、次いで、再び、シスプラチンが1-5日間投与される。そのような処置スキームは、繰り返され得る。

30

【0300】

ゲムシタピン(GEMZAR(登録商標))は、乳癌、非小細胞肺癌、および膵臓癌の治療で使用される他の化合物である。ゲムシタピンは、抗腫瘍活性を示すヌクレオシド類似体である。ゲムシタピンを臨床的に使用する方法は、当分野で既知である。例えば、ゲムシタピンは、1000 mg/m²を30分かけて静脈内点滴により投与され、週1回投与を7週(または、毒性により投与量を減少させるか、もしくは維持することが必要になるまで)連続し、その後、1週間は、膵臓癌の処置を休薬する。次のサイクルは、週1回点滴投与を3週連続し、4週目は休薬することからなり得る。ゲムシタピンはまた、癌治療において、シスプラチンと組み合わせて使用され得る。

40

【0301】

ある態様において、突然変異体ワクシニアウイルスは、0-60日間で別々に1回もしくは2-4回投与され、その後、1-30日間は、抗癌処置が行われず、次いで、ゲムシタピンが0-30日間で別々に1-7回投与され、その後、1-30日間は、抗癌処置が行われない。そのような処置スキームは、繰り返され得る。他の態様において、ゲムシタピンは、0-30日間で別々に1-7回投与され、その後、1-10日間は、抗癌処置が行われず、次いで、突然変異体ワクシニアウイルスが0-60日間で別々に1回もしくは2-4回投与される。その後、5-60日間は、抗癌処置が行われない。そのような処置スキームは、繰り返され得る。他の態様において、ゲムシタピンは、0-30日間で別々に1-7回投与され、その後、1-10日間は、抗癌処置が行われず、次いで、突然変異体ワクシニアウイルスが0-60日間で別々に1回もしくは2-4

50

回投与される。その後、5-60日間は、抗癌処置が行われず、次いで、再び、ゲムシタピンが0-30日間で別々に1-7回投与される。そのような処置スキームは、繰り返され得る。

【0302】

当業者により理解されているとおり、最適な処置レジメンは変わり得て、最適な治療的組み合わせを決定する目的で、組み合わせ治療の前に、および1回もしくはそれ以上の組み合わせ治療のサイクルの後に、患者の処置下にある疾患の状態および一般的健康状態を評価することは、処置法の範囲内である。

【0303】

d. 投与回数

本明細書で提供される方法は、ウイルスの対象への単回投与またはウイルスの対象への複数回投与を含み得る。ある態様において、単回投与は、腫瘍内でウイルスを確立するために十分であり、そこでは、ウイルスが増殖し、対象内での抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進することが可能であり；該方法は、対象内での抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進するために、さらなるウイルスの投与を必要とせず、その結果、例えば、腫瘍成長の阻害、転移部の成長もしくは形成の阻害、腫瘍もしくはサイズの減少、腫瘍もしくは転移部の除去、腫瘍性疾患もしくは新規腫瘍形成の再発の阻害もしくは予防、または他の癌治療効果を生じ得る。他の態様において、ウイルスは、異なる機会に投与され得て、一般には、少なくとも1日に数回別々に投与され得る。別々の投与は、ウイルスを腫瘍もしくは転移部に送達する可能性を増加させ得て、そこでは、以前の投与は、ウイルスを腫瘍もしくは転移部に送達するのに有効ではない。別々の投与は、腫瘍もしくは転移部における局在を増加させ、そこでのウイルス増殖を生じさせ得るか、または腫瘍に蓄積したウイルスの力価を増加させ、腫瘍からの抗原もしくは他の化合物の大規模な放出を増加させ、宿主の抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進し得るか、およびまた所望により、ウイルスに基づく腫瘍溶解もしくは腫瘍細胞死のレベルを増加させ得る。ウイルスの別々の投与はさらに、ウイルスが蓄積した腫瘍もしくは転移部に対する宿主の免疫応答を誘導することが可能なウイルス抗原に対する対象の免疫応答を提供し、抗腫瘍免疫応答を誘導する宿主の可能性を増加させ得る。

【0304】

別々の投与が実施されるとき、各投与は、他の投与量と比較して、同じであるか、もしくは異なる投与量であり得る。ある態様において、すべての投与量は、同じである。他の態様において、最初の投与量は、1回もしくはそれ以上の次の投与量よりも大きいものであり得て、例えば、次の投与量よりも、少なくとも10x、少なくとも100x、もしくは少なくとも1000x大きいものであり得る。最初の投与量が1回もしくはそれ以上の次の投与量よりも大きいものである、別々の投与方法のある例において、すべての次の投与量は、最初の投与量と比較して、同じであるか、より少量であり得る。

【0305】

別々の投与は、2、3、4、5もしくは6回投与を含む、2回またはそれ以上の投与の任意の数を含み得る。当業者は、治療法をモニタリングするための当分野で既知の方法および本明細書で提供される他のモニタリング法に基づいて、実施される投与回数または1回もしくはそれ以上のさらなる投与を行うことの望ましさを容易に決定することができる。したがって、本明細書で提供される方法は、1回もしくはそれ以上のウイルスの投与を対象に提供する方法を含み、ここで、投与回数は、対象をモニタリングすることにより決定され得て、モニタリングの結果に基づき、1回もしくはそれ以上のさらなる投与が提供されるか否かが決定され得る。1回もしくはそれ以上のさらなる投与が提供されるか否かの決定は、腫瘍成長もしくは腫瘍成長阻害の指標、新規転移の出現もしくは転移の阻害、対象の抗ウイルス抗体力価、対象の抗腫瘍抗体力価、対象の全体的な健康状態、対象の体重、腫瘍および/または転移部のみにおけるウイルスの存在、正常組織もしくは器官におけるウイルスの存在を含むが、これらに限定されないさまざまなモニタリング結果に基づき得る。

【0306】

10

20

30

40

50

投与期間は、さまざまな期間のいずれかであり得る。投与期間は、投与回数に関連して記載されたモニタリング工程、対象が免疫応答を誘発する期間、対象が正常組織からウイルスを除去する期間、または腫瘍もしくは転移部におけるウイルス増殖のための期間を含む、さまざまな因子のいずれかの関数(function)であり得る。ある例において、期間は、対象が免疫応答を誘発する期間の関数であり得て、例えば、期間は、対象が免疫応答を誘発する期間以上、例えば、約1週間以上、約10日間以上、約2週間以上、もしくは約1ヶ月以上であり得て；他の例において、期間は、対象が免疫応答を誘発する期間未満、例えば、約1週間未満、約10日間未満、約2週間未満、もしくは約1ヶ月未満であり得る。他の例において、期間は、対象が正常組織からウイルスを除去する期間の関数であり得て、例えば、期間は、対象が正常組織からウイルスを除去する期間以上、例えば、約1日以上、約2日以上、約3日以上、約5日以上、もしくは約1週間以上であり得る。他の例において、期間は、腫瘍もしくは転移部におけるウイルス増殖のための期間の関数であり得て、例えば、期間は、検出可能マーカーを発現するウイルスの投与後、検出可能なシグナルが腫瘍もしくは転移部で生じる期間以上、例えば、約3日、約5日、約1週間、約10日、約2週間、もしくは約1ヶ月であり得る。

【0307】

e. 共投与

さらなる治療物質、例えば、異なる治療ウイルスもしくは治療化合物が投与される方法がまた、本明細書で提供される。これらは、最初のウイルスと同時に、連続して、または間欠的に投与され得る。さらなる治療物質は、ウイルスまたはその遺伝子産物と相互作用し得るか、またはさらなる治療物質は、ウイルスから独立して作用し得る。

【0308】

組み合わせ治療は、下記の点で利点を有する：1) それは、単一薬剤耐性を避け；2) 異種腫瘍集団において、異なるメカニズムで細胞を殺傷することができ；そして3) 重複しない毒性を有する薬剤を選択することにより、各々の薬剤は、最大効果および相乗効果を誘導するのに十分な用量で使用することができる。組み合わせ治療は、診断/治療ウイルスを、1種もしくはそれ以上の抗癌剤、すなわち、化学治療剤、治療抗体、siRNA、毒素、酵素-プロドラッグ対または放射線と組み合わせることで実施することができる。

【0309】

i. 複数のウイルスの投与

2種もしくはそれ以上のウイルスを対象に投与するための方法が、本明細書で提供される。投与は、同時に、連続して、または間欠的になされ得る。複数のウイルスは、単一組成物として、または2つもしくはそれ以上の組成物として投与され得る。2種もしくはそれ以上のウイルスは、少なくとも2種のウイルスを含み得る。2種のウイルスが存在する特定の態様において、両方のウイルスは、ワクシニアウイルスである。他の態様において、第1のウイルスは、ワクシニアウイルスであり、第2のウイルスは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、単純ヘルペスウイルス、レオウイルス、ムンプスウイルス、泡沫状ウイルス、インフルエンザウイルス、粘液腫ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、または本明細書に記載されているか、もしくは当分野で既知の他の任意のウイルスのいずれか1つである。ウイルスは、それらが作用する経路に基づいて選択され得る。例えば、活性化Ras経路を標的とするウイルスは、p53発現を欠損した腫瘍細胞を標的とするウイルスと組み合わせ得る。

【0310】

複数のウイルスは、ウイルス含有組成物の組み合わせとして提供され得て、投与のためにパッケージ化されたウイルスおよび所望によりその指示書を含むキットを含むか、および/またはそのキットとして提供され得る。組成物は、単回投与のために(すなわち、直接投与のために)製剤化されたウイルスを含み得て、希釈または他の追加を必要とし得る。

【0311】

ある態様において、少なくとも1つのウイルスは、修飾化ウイルス、例えば、本明細書で提供されるウイルスであり、低い病原性、低い毒性、腫瘍への選択的蓄積、腫瘍細胞に

10

20

30

40

50

に対する免疫応答を活性化する能力、免疫原性、複製能、外因性タンパク質を発現する能力、およびそれらの組み合わせのような特性を有する。ウイルスは、ほぼ同時に投与されるか、または異なる時点で投与され得る。ウイルスは、同じ組成物で、もしくは同じ投与方法で投与され得るか、または別々の組成物で、もしくは異なる投与方法で投与され得る。

【0312】

投与期間は、当業者により決定され得るとおり、望まれる効果を達成する任意の期間であり得る。異なるウイルスの投与期間の選択は、同じウイルスの投与期間の選択と同様のパラメーターに基づいて決定され得て、モニタリング工程の結果、対象が免疫応答を誘発する期間、対象が正常組織からウイルスを除去する期間、または腫瘍もしくは転移部におけるウイルス増殖のための期間を含む。ある例において、期間は、対象が免疫応答を誘発する期間の関数であり得て、例えば、期間は、対象が免疫応答を誘発する期間以上、例えば、約1週間以上、約10日間以上、約2週間以上、もしくは約1ヶ月以上であり得て；他の例において、期間は、対象が免疫応答を誘発する期間未満、例えば、約1週間未満、約10日間未満、約2週間未満、もしくは約1ヶ月未満であり得る。他の例において、期間は、対象が正常組織からウイルスを除去する期間の関数であり得て、例えば、期間は、対象が正常組織からウイルスを除去する期間以上、例えば、約1日以上、約2日以上、約3日以上、約5日以上、もしくは約1週間以上であり得る。他の例において、期間は、腫瘍もしくは転移部におけるウイルス増殖のための期間の関数であり得て、例えば、期間は、検出可能マーカーを発現するウイルスの投与後、検出可能なシグナルが腫瘍もしくは転移部で生じる期間以上、例えば、約3日、約5日、約1週間、約10日、約2週間、もしくは約1ヶ月であり得る。

【0313】

ii. 治療化合物

任意の治療もしくは抗癌剤は、本明細書で提供される組み合わせ癌処置法において、第2の治療もしくは抗癌剤として使用され得る。該方法は、1種のウイルスもしくは複数のウイルスを対象に投与することに加えて、1種もしくはそれ以上の治療化合物を対象に投与することを含み得る。治療化合物は、腫瘍治療効果について、独立して、またはウイルスと組み合わせて作用し得る。

【0314】

独立して作用し得る治療化合物は、腫瘍に蓄積し、腫瘍内で複製するウイルスの能力を減少させることなく、対象内で抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進し、腫瘍成長を阻害し、転移部の成長および/または形成を阻害し、腫瘍もしくは転移部のサイズを減少させ、腫瘍もしくは転移部を除去し得るさまざまな既知の化学治療化合物のすべてを含む。

【0315】

ウイルスと組み合わせて作用する治療化合物は、例えば、ウイルスの発現を改変する化合物もしくはウイルス発現遺伝子と相互作用し得る化合物、またはウイルス増殖を阻害し得る化合物(ウイルスに対して毒性のある化合物を含む)を含む。ウイルスと組み合わせて作用し得る治療化合物は、例えば、ウイルスの増殖、毒性、腫瘍細胞殺傷もしくは免疫応答誘導特性を増加させる治療化合物を含み得て、また例えば、ウイルスの増殖、毒性もしくは細胞殺傷特性を減少させる治療化合物を含み得る。所望により、治療剤は、さらなる特性、例えば、本明細書の他の場所に記載されたとおり、造影剤としてのその使用を可能にする特性を示すか、もしくは明示し得る。

【0316】

治療化合物はまた、化学治療剤、ナノ粒子、放射線治療、siRNA分子、酵素/プロドラッグ対、光増感剤、毒素、マイクロ波、放射性核種、血管新生阻害剤、細胞分裂阻害剤タンパク質(例えば、cdc6)、抗腫瘍オリゴペプチド(例えば、細胞分裂阻害オリゴペプチド、高親和性腫瘍選択結合ペプチド)、シグナル伝達モジュレーター、抗腫瘍性抗生物質、またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0317】

例えば、光増感剤は、インドシアニングリーン、トルイジンブルー、アミノレブリン酸、テキサフィリン、ベンゾポルフィリン、フェノチアジン、フタロシアニン、ポルフィリン、例えば、ポルフィマーナトリウム、クロリン、例えば、テトラ(m-ヒドロキシフェニル)クロリンもしくはスズ(IV)クロリンe6、プルプリン、例えば、エチルエチプルプリンスズ、プルプリンイミド、バクテリオクロリン、フェオフォルピド、ピロフェオフォルピドまたはカチオン染料を含むが、これらに限定されない。ある態様において、ワクシニアウイルス、例えば、本明細書で提供されるワクシニアウイルスは、光増感剤と共に、腫瘍、癌もしくは転移部を患う対象に投与される。

【0318】

その放射性核種、量および適用に応じて、放射性核種は、診断および/または処置のために使用され得る。それらは、例えば、³²ホスフェート、⁶⁰コバルト、⁹⁰イットリウム、⁹⁹テクニシウム、¹⁰³パラジウム、¹⁰⁶ルテニウム、¹¹¹インジウム、¹¹⁷ルテチウム、¹²⁵ヨウ素、¹³¹ヨウ素、¹³⁷セシウム、¹⁵³サマリウム、¹⁸⁶レニウム、¹⁸⁸レニウム、¹⁹²イリジウム、¹⁹⁸金、²¹¹アスタチン、²¹²ピスマスもしくは²¹³ピスマスを含む化合物もしくは分子を含むが、これらに限定されない。ある態様において、ワクシニアウイルス、例えば、本明細書で提供されるワクシニアウイルスは、放射性核種と共に、腫瘍、癌もしくは転移部を患う対象に投与される。

10

【0319】

毒素は、化学治療化合物、例えば、5-フルオロウリジン、カリチアマイシンおよびメイタシンを含むが、これらに限定されない。シグナル伝達モジュレーターは、例えば、マクロファージ阻害性因子の阻害剤、toll様受容体アゴニストおよびstat3阻害剤を含むが、これらに限定されない。ある態様において、ワクシニアウイルス、例えば、本明細書で提供されるワクシニアウイルスは、毒素またはシグナル伝達モジュレーターと共に、腫瘍、癌もしくは転移部を患う対象に投与される。

20

【0320】

化学治療剤および治療ウイルス間の組み合わせ治療は、単剤処置が有効でない状況において、有効/治療的であり得る。化学治療化合物は、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド；スルホン酸アルキル、例えば、ブルスファン、インプロスルファンおよびピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパおよびウレドーパ；エチレニミンおよびメチラメラミン、例えば、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロロメラミンナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロルエタミン、メクロルエタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベムピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソ尿素、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えば、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸類似体、例えば、デノブテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、

30

40

50

テストラクトン；抗副腎類、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充薬、例えば、フロリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォルニチン；エリプチニウムアセテート；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモル；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリニン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；ポリサッカライド-K；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2"-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；シトシンアラビノシド；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル；クロラムブシル；ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；プラチナム類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン；ピンブラスチン；プラチナム；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトロキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセロダ；イバンドロネート；CPT11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)；レチノイン酸；エスペラマイシン；カペシタピン；リンゴ酸スニチニブ(SUTENT)；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸もしくは誘導体を含むが、これらに限定されない。また、腫瘍におけるホルモン作用を制御するか、もしくは阻害するように作用する抗ホルモン剤(例えば、抗エストロゲン)が本明細書に含まれ、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストンおよびトレミフェン(Fareston)；および抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸もしくは誘導体を含む。本明細書で使用され得るそのような化学治療化合物は、毒性のために、一般の全身的化学治療法での化合物の使用が不可能である化合物を含む。化学治療剤はまた、新規クラスの標的化化学治療剤、例えば、イマチニブ(米国において商標名グリベックとして、Novartisにより販売されている)、ゲフィチニブ(商標名Iressaとして、Astra Zenecaにより開発された)およびエルロチニブを含む。特定の化学治療剤は、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、DWA2114R、NK121、IS 3 295、および254-Sピンクリスチン、ブレドニゾン、ドキシソルピシンおよびL-アスパラギナーゼ；メクロロエタミン、ピンクリスチン、プロカルバジンおよびブレドニゾン(MOPP)、シクロホスファミド、ピンクリスチン、プロカルバジンおよびブレドニゾン(C-MOPP)、プレオマイシン、ピンブラスチン、ゲムシタピンおよび5-フルオロウラシルを含むが、これらに限定されない。例えば、化学治療剤は、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、DWA2114R、NK121、IS 3 295、および254-Sである。例えば、ある態様において、ワクシニアウイルス、例えば、本明細書で提供されるワクシニアウイルスは、白金配位複合体、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、DWA2114R、NK121、IS 3 295、および254-Sと組み合わせて、腫瘍、癌もしくは転移部を患う対象に投与される。腫瘍、癌および転移部は、本明細書で適用されるいずれかであり得て、特に、膵臓癌、卵巣癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、頸部腫瘍または乳癌であり得て；例えば、腫瘍は、膵臓癌および卵巣癌である。腫瘍、癌および転移部は、単剤耐性腫瘍、例えば、ウイルス単独もしくは抗癌剤単独での治療に回答しないが、ウイルスおよび抗癌剤の組み合わせでの治療に回答するものであり得る。一般には、治療上有効量のウイルスは、対象に全身投与され、ウイルスは、腫瘍に局在および蓄積する。ウイルスの投与に続いて、対象は、治療上有効量の抗癌剤、例えば、シスプラチンを投与される。ある例において、シスプラチンは、5日間連続して1日に1回投与される。当業者は、例えば、インビボ動物モデルを用いて、ウイルスに続いて抗癌剤を投与する時期を決定し得る。本明細書で提供される方法を用いたウイルスおよび抗癌剤、例えば、シスプラチンの投与は、腫瘍容積の減少を引き起こし得て、腫瘍成長を停止させるか、

10

20

30

40

50

もしくは遅れさせ得て、または腫瘍を対象から除去させ得る。処置の後の腫瘍、癌および転移の状態は、本明細書で提供される方法および当分野で既知の方法のいずれかを用いてモニタリングされ得る。

【0321】

例えば、抗腫瘍性抗生物質は、アントラサイクリン、例えば、塩酸ドキソルピシン(アドリアマイシン)、塩酸イダルピシン、塩酸ダウノルピシン、塩酸アクラルピシン、塩酸エピルピシンおよび塩酸プラルピシン、プレオマイシン、例えば、プレオマイシンおよび硫酸ペプロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンC、アクチノマイシン、例えば、アクチノマイシンD、ジノスタチンスチマラマーならびにポリペプチド、例えば、ネオカルチノスタチンを含むが、これらに限定されない。ある態様において、ワクシニアウイルス、例えば、本明細書で提供されるワクシニアウイルスは、抗腫瘍性抗生物質と組み合わせて、腫瘍、癌もしくは転移部を患う対象に投与される。

10

【0322】

ある態様において、ナノ粒子は、それらが本明細書で提供される1種もしくはそれ以上の治療剤を含むように設計され得る。さらに、ナノ粒子は、ナノ粒子を腫瘍細胞に標的化する分子を含むように設計され得る。例えば、ある例において、ナノ粒子は、放射性核種で、および所望により、腫瘍関連抗原と免疫反応性のある抗体で被覆され得る。ある態様において、ワクシニアウイルス、例えば、本明細書で提供されるワクシニアウイルスは、本明細書で提供される治療剤のいずれかを含むナノ粒子と組み合わせて、腫瘍、癌もしくは転移部を患う対象に投与される。

20

【0323】

放射線治療は、多くの癌患者の処置の最先の選択になっている。放射線処置の広範な使用は、正常な組織機能を保護しつつ、標的細胞に不可逆的な損傷を誘導する線照射の能力に基づくものである。電離放射線は、癌細胞において、内因性の細胞死機構であるアポトーシスを誘導し、アポトーシスの活性化は、癌細胞が電離放射線に曝露した後に死ぬ、重要な様式であると考えられる。ある態様において、ワクシニアウイルス、例えば、本明細書で提供されるワクシニアウイルスは、放射線治療と組み合わせて、腫瘍、癌もしくは転移部を患う対象に投与される。

【0324】

したがって、ウイルスと組み合わせて作用し得て、ウイルスの増殖、毒性、腫瘍細胞殺傷、もしくは免疫応答誘導特性を増加させ得る、1種もしくはそれ以上の治療化合物を対象に投与する方法が、本明細書で提供される。また、ウイルスと組み合わせて作用し得て、ウイルスの増殖、毒性、もしくは腫瘍細胞殺傷特性を減少させ得る、1種もしくはそれ以上の治療化合物を対象に投与する方法が、本明細書で提供される。投与される治療化合物は、本明細書で提供されるか、もしくは当分野で既知の治療化合物のいずれかであり得る。

30

【0325】

ウイルスと組み合わせて作用し得て、ウイルスの増殖、毒性、腫瘍細胞殺傷、もしくは免疫応答誘導特性を増加させ得る治療化合物は、遺伝子発現を改変し得る化合物であり、ここで、改変された遺伝子発現は、対象内での増加した腫瘍細胞の殺傷もしくは増加した抗腫瘍免疫応答を生じ得る。遺伝子発現改变化合物は、例えば、内因性ウイルス遺伝子および/または外因性ウイルス遺伝子を含む、1種もしくはそれ以上のウイルス遺伝子の増加もしくは減少を引き起こし得る。例えば、遺伝子発現改变化合物は、ウイルス内の遺伝子、例えば、外因性遺伝子の転写を誘導するか、もしくは増加させ、その結果、細胞溶解もしくは細胞死を引き起こし得るか、免疫応答を誘発し得るか、プロドラッグ様化合物の変換を触媒し得るか、または腫瘍細胞遺伝子の発現を阻害し得る。IPTGおよびRU486を含む、遺伝子発現を改変し得る広範なさまざまな化合物のすべては、当分野で既知である。例えば、発現をアップレギュレートできる遺伝子は、毒素を含むタンパク質およびRNA分子、プロドラッグを抗腫瘍剤に変換し得る酵素、サイトカイン、転写制御タンパク質、siRNAおよびリボザイムを含む。他の例において、遺伝子発現改变化合物は、ウイルス内の遺

40

50

伝子、例えば、異種遺伝子の転写を阻害するか、もしくは減少させ、その結果、ウイルス毒性を減少させるか、もしくはウイルス増殖を減少させ得る。遺伝子発現を減少させるか、もしくは阻害し得るさまざまな化合物のすべては、本明細書で提供される方法において使用され得て、それは、siRNA化合物、転写阻害剤または転写アクチベーターの阻害剤を含む。例えば、発現をダウンレギュレートできる遺伝子は、溶解、ヌクレオチド合成もしくは増殖を抑制するウイルスタンパク質もしくはRNAを含むタンパク質およびRNA分子、ならびに細胞死、免疫反応性、溶解、もしくはウイルス複製を抑制する細胞タンパク質もしくはRNA分子を含む。

【0326】

ある態様において、ウイルスと組み合わせて作用し得て、ウイルスの増殖、毒性、腫瘍細胞殺傷、もしくは免疫応答誘導特性を増加させ得る治療化合物は、ウイルス発現遺伝子産物と相互作用し得る化合物であり、そのような相互作用は、対象内での増加した腫瘍細胞の殺傷もしくは増加した抗腫瘍免疫応答を生じ得る。ウイルス発現遺伝子産物と相互作用し得る治療化合物は、例えば、その対象投与型で、ほとんどもしくは全く毒性を示さないか、または他の生物学的活性を示さず、ウイルス発現遺伝子産物と相互作用した後に、該化合物が特性を発揮し、その結果、細胞毒性、アポトーシスを誘導する能力、または免疫応答を誘発する能力を含むがこれらに限定されない、腫瘍細胞死を生じるプロドラッグもしくは他の化合物を含み得る。例えば、ある例において、ウイルスは、酵素を癌細胞に送達し得る。酵素が癌細胞に導入されると、化学療法剤の不活性型(すなわち、プロドラッグ)が投与される。不活性プロドラッグが癌細胞に到達すると、酵素がプロドラッグを活性化化学療法剤に変換し、その結果、それは、癌細胞を殺傷し得る。したがって、処置は、癌細胞にのみ標的化され、正常細胞に影響を与えない。プロドラッグは、ウイルスと同時に、もしくは連続して投与され得る。さまざまなプロドラッグ様物質が当分野で既知であり、例えば、そのような化合物は、本明細書の他の場所に開示されており、ここで、該化合物は、ガンシクロビル、5-フルオロウラシル、6-メチルプリンデオキシリボシド、セファロsporin-ドキシソルピシン、4-[(2-クロロエチル)(2-メスロキシエチル)アミノ]ベンゾイル-L-グルタミン酸、アセトミノフェン、インドール-3-酢酸、CB1954、7-エチル-10-[4-(1-ピペリジノ)-1-ピペリジノ]カルボニルオキシカンプトテシン、ピス-(2-クロロエチル)アミノ-4-ヒドロキシフェニルアミノメタノン28、1-クロロメチル-5-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロ-3H-ベンズ[e]インドール、エピルピシン-グルクロニド、5'-デオキシ5-フルオロウリジン、シトシンアラビノシド、リナマリン、およびヌクレオシド類似体(例えば、フルオロウリジン、フルオロデオキシウリジン、フルオロウリジンアラビノシド、シトシンアラビノシド、アデニンアラビノシド、グアニンアラビノシド、ヒポキサンチンアラビノシド、6-メルカプトプリンリボシド、チオグアノシンリボシド、ネブラリン、5-ヨードウリジン、5-ヨードデオキシウリジン、5-プロモデオキシウリジン、5-ビニルデオキシウリジン、9-[(2-ヒドロキシ)エトキシ]メチルグアニン(アシクロビル)、9-[(2-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル)-エトキシ]メチルグアニン(DHPG)、アザウリジン、アザシチジン、アジドチミジン、ジデオキシアデノシン、ジデオキシシチジン、ジデオキシイノシン、ジデオキシグアノシン、ジデオキシチミジン、3'-デオキシアデノシン、3'-デオキシシチジン、3'-デオキシイノシン、3'-デオキシグアノシン、3'-デオキシチミジン)を含み得る。

【0327】

ある態様において、ウイルスと組み合わせて作用し得て、ウイルスの増殖、毒性、もしくは腫瘍細胞殺傷特性を減少させ得る治療化合物は、ウイルス複製を阻害し、ウイルス毒素を阻害し、またはウイルス死を引き起こし得る化合物である。ウイルス複製を阻害し、ウイルス毒素を阻害し、またはウイルス死を引き起こし得る治療化合物は、一般に、ウイルス生活環の1つもしくはそれ以上の過程を妨害し得る化合物を含み得て、それは、ウイルスDNA複製、ウイルスRNA転写、ウイルス被覆タンパク質集合、外膜もしくはポリサッカライド集合を阻害し得る化合物を含むが、これらに限定されない。ウイルス生活環の1つもしくはそれ以上の過程を妨害し得るさまざまな化合物のすべては、当分野で既知であり

10

20

30

40

50

、それは、すべての既知の抗ウイルス化合物(例えば、シドフォビル)、ウイルスDNAポリメラーゼ阻害剤、ウイルスRNAポリメラーゼ阻害剤、ウイルスDNA複製もしくはRNA転写を制御するタンパク質の阻害剤を含む。他の例において、ウイルスは、ウイルス生活環タンパク質、例えば、所望により宿主生物に対して非毒性である化合物により阻害され得るDNAポリメラーゼもしくはRNAポリメラーゼをコードする遺伝子を含み得る。

【0328】

化学治療剤および本明細書で提供されるウイルスの組み合わせ療法に加えて、他のより複雑な組み合わせ療法戦略がまた適用され得る。例えば、組み合わせ療法は、化学治療剤、治療抗体、および本明細書で提供されるウイルスを含み得る。あるいは、他の組み合わせ療法は、放射線、治療抗体、および本明細書で提供されるウイルスの組み合わせであり得る。したがって、組み合わせ療法の概念はまた、1種もしくはそれ以上の下記の治療法、すなわち、化学治療剤、放射線治療、治療抗体、高温もしくは低温療法、siRNA、診断/治療バクテリア、診断/治療哺乳類細胞、免疫治療、および/または標的化毒素(抗体、リポソームおよびナノ粒子により送達される)と共に、本明細書で提供されるウイルスの適用に基づき得る。

10

【0329】

組み合わせ療法の各構成要素の有効な送達は、本明細書で提供される方法の重要な局面である。ある局面において、下記の投与形態は、1つもしくはそれ以上の重要な特徴を利用する：(i) 最も高いウイルス力価および最も高い治療効果を達成するのに有効な投与形態による、本明細書で提供されるウイルスの腫瘍への送達；(ii) 最適な治療効果を達成するための投与形態による、言及された他の任意の治療法の腫瘍への送達。採用される組み合わせ療法の投与スキームは、2種もしくはそれ以上の治療法の組み合わせが治療上有効である。投与量は、例えば、患者の年齢、健康状態、性別、身長および体重、投与経路、薬剤の毒性、処置の頻度および治療法の各々に対する癌の相対的な感受性のような要因に基づいて変わり得る。

20

【0330】

iii. 免疫学的治療および生物学的治療

治療化合物はまた、免疫治療効果を及ぼす化合物、免疫系を刺激する化合物、治療化合物を含む化合物、またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。所望により、治療剤は、さらなる特性、例えば、本明細書の他の場所で記載されたとおり、造影剤としてのその使用を可能にする特性を示すか、もしくは明示し得る。そのような治療化合物は、抗癌抗体、放射線治療、siRNA分子および免疫系を抑制する化合物を含むが、これらに限定されない。免疫治療は、例えば、免疫刺激分子(タンパク質に基づくか、もしくはタンパク質に基づかない)、細胞および抗体を含む。免疫治療処置は、免疫細胞を刺激して、より効果的に作用させるか、または腫瘍細胞もしくは腫瘍関連抗原を免疫系に認識可能にすること(すなわち、寛容破壊(break tolerance))を含み得る。

30

【0331】

サイトカインおよび成長因子は、インターロイキン、例えば、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-6およびインターロイキン-12、腫瘍壊死因子、例えば、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン、例えば、インターフェロン (IFN- α)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、血管新生因子、および組織因子を含むが、これらに限定されない。

40

【0332】

抗癌抗体は、ADEPT、トラスツマブ(Herceptin)、トシツモマブ(Bexxar)、セツキシマブ(Erbiximab)、イブリツモマブ(Zevalin)、アレムツズマブ(Campath-1H)、エブラツズマブ(Lymfocytotoxic reagent with membrane protein)、ゲムツズマブオゾガマイシン(Mylotarg)、ベバシズマブ(Avastin)、エドレコロマブ(Panorex)、およびリツキシマブ(RITUXAN)を含むが、これらに限定されない。

【0333】

したがって、ウイルスと共に作用して、免疫系を刺激するか、もしくは促進して、それにより、ウイルスの効果を高める得る、1種もしくはそれ以上の治療化合物を対象に投与

50

する方法が、本明細書で提供される。そのような免疫治療は、別々の治療法として送達され得るか、または投与されるウイルスによりコードされ得る(免疫治療が、タンパク質に基づくとき)。

【0334】

生物学的治療は、天然の体内物質または天然の体内物質から作製される薬剤を用いた処置である。それらは、癌を処置し、他の癌処置、例えば、化学療法により引き起こされる副作用を制御するのを助け得る。生物学的治療はまた、それらが癌に対して生物学的(または天然)に応答するように身体を刺激するため、時折、生物学的反応修飾物質(BRM)、生物学的剤または単に“生物製剤”と呼ばれる。免疫治療は、身体が感染および疾患と闘うために使用する天然物質を用いた処置である。免疫治療は、天然物質を使用するため、それはまた、生物学的治療である。生物学的治療なる用語の範囲内に属するいくつかの型の薬剤が存在し：これらは、例えば、モノクローナル抗体(mAb)、癌ワクチン、血液細胞のための成長因子、癌成長阻害剤、抗血管新生因子、インターフェロン、インターロイキン-2 (IL-2)、遺伝子治療および膀胱癌のためのBCGワクチンを含む。

10

【0335】

モノクローナル抗体(mAb)は、特定の抗原に結合する特異性および大量流通のために、工場で大量生産可能な能力のために、癌処置について特に関心がある。モノクローナル抗体は、免疫系タンパク質と同様の方法で作用するように、すなわち、体内における外来物質、例えば、ウイルスを探し出し、殺傷するように改変され得る。モノクローナル抗体は、癌細胞の表面上のエピトープを認識するように設計され得る。抗体は、エピトープを特異的に標的化して結合し、癌細胞を殺傷するか、もしくは癌細胞に治療剤を送達し得る。治療剤を抗体に結合させる方法は、当分野で既知である。異なる抗体が、異なる型の癌のために作製されなければならない；例えば、リツキシマブは、非ホジキンリンパ腫細胞の外側のCD20タンパク質を認識し；ADEPTは、腸管(大腸)癌を認識する抗体を用いた処置であり；そしてトラスツマブ(Herceptin)は、HER2タンパク質を過剰発現する(“HER2ポジティブ”)乳癌細胞を認識する。他の抗体は、例えば、トシツモマブ(Bexxar)、セツキシマブ(Erbiximab)、イブリツモマブ(Zevalin)、アレムツズマブ(Camptothecin)、エプラツズマブ(Lymphocid)、ゲムツズマブオゾガマイシン(Mylotarg)およびペバシズマブ(Avastin)を含む。したがって、本明細書で提供されるウイルスは、癌の処置において、1種もしくはそれ以上のモノクローナル抗体と同時に、もしくは連続して投与され得る。ある態様において、抗体治療は、本明細書で提供される1種もしくはそれ以上の他の処置法のいずれかの形態で投与される。

20

30

【0336】

癌ワクチンは、例えば、インフルエンザウイルスの場合のように、感染を予防する試みであるよりはむしろ、癌がいったん発症したとき、それを処置するのを助ける。癌ワクチンの目的は、免疫応答を刺激することである。癌ワクチンは、例えば、抗原ワクチン、全細胞ワクチン、樹状細胞ワクチン、DNAワクチンおよび抗イディオタイプワクチンを含む。抗原ワクチンは、癌細胞に存在するか、もしくは癌細胞により産生される腫瘍関連抗原から作製されたワクチンである。抗原ワクチンは、対象の免疫系を刺激し、癌を攻撃させる。全細胞ワクチンは、ワクチンを作製するために、癌細胞の特定の抗原だけでなく、全癌細胞を使用するワクチンである。ワクチンは、対象自身の癌細胞、他の対象の癌細胞または実験室で培養された癌細胞から作製される。該細胞を、通常は放射線を用いて実験室で処理し、その結果、該細胞は、増殖できなくなり、それを、血流への注射もしくは点滴を介して対象に投与し、その結果、免疫系を刺激して、癌を攻撃し得る。全細胞ワクチンの1つの型は、樹状細胞ワクチンであり、それは、免疫系が異常な細胞、例えば、癌細胞を認識し、攻撃するのを助ける。樹状細胞ワクチンは、実験室で、癌細胞と共に樹状細胞を培養することにより作製される。該ワクチンが投与されると、免疫系を刺激し、癌を攻撃する。抗イディオタイプワクチンは、癌細胞に対する抗体を作製するように身体を刺激するワクチンである。癌細胞は、免疫系が外来性として認識するいくつかの腫瘍関連抗原を生じる。しかしながら、癌細胞は非癌細胞と類似しているため、免疫系の応答は弱いも

40

50

のであり得る。DNAワクチンは、免疫応答を促進する。DNAワクチンは、腫瘍関連抗原についての遺伝子を有する癌細胞由来のDNAから作製される。DNAワクチンが注射されると、免疫系の細胞が腫瘍関連抗原を認識することが可能となり、免疫系の細胞を活性化する(すなわち、寛容破壊)。DNAワクチンを用いた結果から最も有望なのは、黒色腫を処置することである。したがって、本明細書で提供されるウイルスは、癌の処置において、全細胞ワクチンと同時に、もしくは連続して投与され得る。ある態様において、さらなる治療は、本明細書で提供される1種もしくはそれ以上の他の処置法のいずれかの形態で投与される。

【0337】

成長因子は、骨髄を刺激して、血液細胞を産生する天然物質である。成長因子を作製するために組み換え技術が使用され得て、それは、対象に投与され、血液中の白血球、赤血球および幹細胞の数を増加させ得る。白血球細胞を増加させるために、癌処置において使用される成長因子は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)(また、フィルグラスチム(Neupogen)またはレノグラスチム(Granocyte)と呼ばれる)および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)(また、モルグラモスチムと呼ばれる)を含む。貧血の処置を助ける成長因子は、エリスロポエチン(EPO)である。EPOは、身体がより多くの赤血球細胞を産生するように促し、順に、体内組織におけるヘモグロビンレベルおよび酸素レベルを増加させる。他の成長因子が開発され、それは、血小板を増加させ得る。したがって、本明細書で提供されるウイルスは、癌の処置において、成長因子、例えば、GM-CSFと同時に、もしくは連続して投与され得る。ある態様において、さらなる治療は、本明細書で提供される1種もしくはそれ以上の他の処置法のいずれかの形態で投与される。

【0338】

癌成長阻害剤は、細胞、例えば、癌細胞の成長および増殖を制御する細胞シグナル伝達分子を使用する。これらのシグナル伝達分子を妨害する薬剤は、癌が成長および分裂するのを停止させ得る。癌成長因子は、チロシンキナーゼを含むが、これらに限定されない。したがって、チロシンキナーゼを妨害する薬剤は、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)である。例えば、TKIは、エルロチニブ(Tarceva, OSI - 774)、イレッサ(Gefitinib, ZD 1839)およびイマチニブ(Glivec, STI 571)を含むが、これらに限定されない。成長阻害剤の他の型は、多発性骨髄腫およびいくつかの他の癌のためのボルテゾミブ(Velcade)である。Velcadeは、プロテアソーム阻害剤である。プロテアソームは、すべての細胞で見出されており、細胞内でタンパク質を分解するのを助ける。プロテアソームの作用を妨害することにより、細胞内でのタンパク質を毒性のあるレベルまで増加させ、その結果、癌細胞を殺傷する。癌細胞は、正常細胞よりもVelcadeに対する感受性が高い。したがって、本明細書で提供されるウイルスは、癌の処置において、癌成長阻害剤、例えば、Velcadeと同時に、もしくは連続して投与され得る。ある態様において、さらなる治療は、本明細書で提供される1種もしくはそれ以上の他の処置法のいずれかの形態で投与される。

【0339】

癌は、それらがより拡大するとき、それら自身の血管を拡張させ、成長させるために、血液供給を必要とする。癌は、それ自身の血液供給がない場合、栄養物および酸素の欠如のために成長することができない。抗血管新生因子剤は、腫瘍がそれら自身の血管を成長させるのを停止する。これらの型の薬剤は、例えば、主に、骨髄腫を処置し、また他の癌の型についても試験されるThalidomide、ならびに腸管の癌について調べられているモノクローナル抗体型のベバシズマブ(Avastin)を含むが、これらに限定されない。したがって、本明細書で提供されるウイルスは、癌の処置において、抗血管新生因子剤と同時に、もしくは連続して投与され得る。ある態様において、さらなる治療は、本明細書で提供される1種もしくはそれ以上の他の処置法のいずれかの形態で投与される。

【0340】

インターフェロン- γ (IFN- γ)は、免疫応答の一部として、体内で非常に微量に産生される天然物質である。IFN- γ は、免疫系を促進するための処置として投与され得て、癌、例えば、腎細胞(腎臓)癌、悪性黒色腫、多発性骨髄腫およびある型の白血病と闘うのを助

10

20

30

40

50

ける。IFN- は、下記のいくつかの方法で作用する：それは、癌細胞が成長するのを停止させることができ、それはまた、免疫系を促進して、それが癌細胞を攻撃するのを助けることができ、そしてそれは、癌細胞への血液供給に影響を与えることができる。したがって、本明細書で提供されるウイルスは、癌の処置において、IFN- と同時に、もしくは連続して投与され得る。ある態様において、さらなる治療は、本明細書で提供される1種もしくはそれ以上の他の処置法のいずれかの形態で投与される。

【0341】

IL-2の投与は、それが免疫系により天然で産生されるので、生物学的治療剤である。したがって、それはまた、免疫治療である。インターロイキン2は、腎細胞(腎臓)癌の処置において使用されており、いくつかの他の癌型の臨床試験で試験されている。IL-2は、細胞成長および増殖を妨害することにより、癌細胞で直接作用し；それは、キラーT細胞および癌細胞を攻撃する他の細胞の成長を促進することにより免疫系を刺激し；そしてそれはまた、癌細胞を刺激し、免疫系細胞を引きつける化学誘因物質を分泌させる。IL-2は、一般に、皮膚の下に皮下投与として投与され、1日1回5日間投与され、その後、2日間休薬する。投与のサイクルは、4週間繰り返され、その後、1週間は、処置されない。処置レジメンおよび投与されるサイクルの回数は、癌の型および処置に対する応答の仕方に依存する。IL-2は、自己投与されるか、または医療従事者により投与され得る。あるいは、IL-2は、注射または点滴により、静脈内に投与され得る。したがって、本明細書で提供されるウイルスは、癌の処置において、IL-2と同時に、もしくは連続して投与され得る。ある態様において、さらなる治療は、本明細書で提供される1種もしくはそれ以上の他の処置法のいずれかの形態で投与される。

【0342】

遺伝子治療は、癌細胞内への処置活性化酵素含むウイルスを用いて、癌細胞での異常な遺伝子を妨害することにより、癌細胞での異常な遺伝子を修復するか、もしくは置換することにより、さらにより多くの遺伝子が癌細胞において異常になるようにすることにより、それらが死ぬか、もしくは処置に対して感受性がある状態にすること、またはその組み合わせにより、癌を処置することを含む。結果として、癌細胞は、細胞の損傷のために死ぬ。癌細胞は、それらの遺伝子のいくつかにおける、いくつかの型の突然変異の結果として生じる。標的遺伝子は、細胞を増殖させる遺伝子(すなわち、癌遺伝子)、細胞が増殖するのを抑制する遺伝子(すなわち、腫瘍抑制遺伝子)および他の損傷遺伝子を修復する遺伝子を含むが、これらに限定されない。遺伝子治療は、損傷した癌遺伝子の修復、または癌遺伝子が産生するタンパク質の妨害を含み得る。腫瘍抑制遺伝子であるp53は、多くのヒトの癌において損傷を受けている。ウイルスは、非損傷p53遺伝子を癌細胞に送達するために使用されており、現在、早期の臨床試験が、修飾化p53産生ウイルスを用いた癌処置を探索するために進行中である。遺伝子治療は、損傷DNA修復遺伝子を置換するために使用され得る。他の態様において、腫瘍細胞内のDNA損傷を増加させる方法は、腫瘍細胞の死を促進させるか、もしくは腫瘍細胞の他の癌処置、例えば、放射線治療もしくは化学療法に対する感受性を増加させ得る。したがって、本明細書で提供されるウイルスは、癌の処置において、本明細書で提供されるか、もしくは当分野で既知である遺伝子治療法のいずれかと同時に、もしくは連続して投与され得る。ある態様において、さらなる治療は、本明細書で提供される1種もしくはそれ以上の他の処置法のいずれかの形態で投与される。

【0343】

早期段階の膀胱癌の処置は、膀胱内処置と呼ばれ、それは、主に、高悪性度(悪性度3またはG3)であるT1段階膀胱癌、または膀胱のインサイチュ癌腫(また、TisもしくはCISとして既知である)を処置するために使用される。BCGは、結核(TB)のためのワクチンであり、それはまた、CISを処置し、膀胱癌の再発を防止するのに有効であることが見出されている。ある場合において、BCGワクチンは、悪性度2早期膀胱癌を処置するために使用されている。膀胱癌は、膀胱内膜の任意の場所で生じ得るので、乳頭状早期膀胱癌と同様の方法で除去することができない。むしろ、BCGワクチンは、膀胱内治療を用いて投与され；そ

れはすなわち、最初に、カテーテル(チューブ)が膀胱内に挿入され、その後、BCGワクチンおよび/または化学療法のカテーテルによる投与が行われる。BCG処置は、膀胱癌における効果に依存して、6週間またはそれ以上の間、毎週行われる。膀胱癌のBCG処置は、他の型の処置、例えば、化学療法(膀胱内)、IL-2、細胞が光に感受性がある状態にする薬剤での処置、ビタミン、および光力学的治療と組み合わせ得る。したがって、本明細書で提供されるウイルスは、癌の処置において、BCGワクチンと同時に、もしくは連続して投与され得る。ある態様において、さらなる治療は、本明細書で提供される1種もしくはそれ以上の他の処置法のいずれかの形態で投与される。

【0344】

f. 対象の状態

他の態様において、本明細書で提供されるウイルスを対象に投与するための方法は、麻酔された対象、意識がはっきりした対象、体温が高められた対象、体温が低くなった対象、またはウイルスの腫瘍への蓄積に影響を与えることが既知である対象の他の状態を含む、さまざまな状態のいずれかでの対象で行われ得る。本明細書で提供されるとおり、麻酔された対象は、麻酔されていない対象と比較して、減少した率のウイルスの腫瘍への蓄積を有し得ることが決定された。さらに本明細書で提供されるとおり、低下した体温を有する対象は、正常な体温の対象と比較して、減少した率のウイルスの腫瘍への蓄積を有し得ることが決定された。したがって、ウイルスを対象に投与する方法であって、ウイルスを対象に投与することを含み得て、対象が麻酔、例えば、一般的な麻酔下ではなく、例えば、対象が、局所麻酔下であり得るか、または麻酔されていない状態であり得る方法が、本明細書で提供される。また、ウイルスを対象に投与する方法であって、ウイルスを改変された体温を有する対象に投与することを含み得て、体温の改変が腫瘍に蓄積するウイルスの能力に影響を与え得る(典型的には、体温の低下は、腫瘍に蓄積するウイルスの能力を減少させ得る)方法が、本明細書で提供される。したがって、ある態様において、ウイルスを対象に投与する方法であって、対象の体温を正常な体温を超えて高めて、ウイルスを該対象に投与することを含み、ここで、ウイルスは、正常な体温を有する対象の腫瘍に蓄積するウイルスの能力と比較して、より高い体温を有する対象でより容易に腫瘍に蓄積し得る方法が、本明細書で提供される。他の態様において、腫瘍周辺の領域における温度の局所的高まりは、腫瘍内のウイルスの蓄積を増加させるように使用され得る。

【0345】

2. モニタリング

本明細書で提供される方法はさらに、対象をモニタリングし、腫瘍をモニタリングし、および/または対象に投与されるウイルスをモニタリングする1種もしくはそれ以上の工程を含み得る。さまざまなモニタリング工程のすべては、本明細書で提供される方法に含まれ得て、それは、腫瘍サイズをモニタリングすること、抗-(腫瘍抗原)抗体力価をモニタリングすること、転移部の存在および/またはサイズをモニタリングすること、対象のリンパ節をモニタリングすること、対象の体重もしくは他の健康指標(血液もしくは尿マーカーを含む)をモニタリングすること、抗-(ウイルス抗原)抗体力価をモニタリングすること、検出可能遺伝子産物のウイルス発現をモニタリングすること、および対象の腫瘍、組織もしくは器官におけるウイルス力価を直接モニタリングすることを含むが、これらに限定されない。

【0346】

モニタリングの目的は、単に、対象の健康状態もしくは対象の治療的処置の進行を評価するためであり得るか、または同じもしくは異なるウイルスのさらなる投与が正当であるか否かを決定するために、もしくは対象に化合物を投与する必要性もしくは投与時点を決定するためであり得て、ここで、化合物は、治療法の効果を増加させるように作用し得るか、または化合物は、対象に投与されるウイルスの病原性を減少させるように作用し得る。

【0347】

a. ウイルス遺伝子発現のモニタリング

ある態様において、本明細書で提供される方法は、1種もしくはそれ以上のウイルス発現遺伝子をモニタリングすることを含み得る。ウイルス、例えば、本明細書で提供されるトランスポータータンパク質もしくは当分野で既知の他のものをコードするウイルスは、検出可能タンパク質を含むがこれらに限定されない、1種もしくはそれ以上の検出可能遺伝子産物を発現し得る。したがって、感染細胞/組織は、1種もしくはそれ以上の画像法により画像化され得る。例えば、感染細胞は、発現したトランスポータータンパク質により感染細胞に輸送される、標識化トランスポーター基質を投与することにより画像化し得る。蓄積したトランスポータータンパク質の局在を検出し、それにより、感染組織を画像化することができる。ウイルスはまた、光学的もしくは非光学的画像法により画像化される、1種もしくはそれ以上のさらなる検出可能タンパク質をコードし得る。

10

【0348】

本明細書で提供されるとおり、ウイルスにより発現させられた検出可能遺伝子産物の測定は、対象内に存在するウイルスのレベルの正確な決定を提供し得る。さらに本明細書で提供されるとおり、例えば、磁気共鳴、蛍光、および断層撮影法を含むがこれらに限定されない、画像法による検出可能遺伝子産物の測定は、対象内のウイルスの局在を決定することができる。したがって、本明細書で提供される検出可能遺伝子産物をモニタリングすることを含む方法は、対象の1種もしくはそれ以上の器官もしくは組織におけるウイルスの存在もしくは非存在、および/または対象の腫瘍もしくは転移部におけるウイルスの存在もしくは非存在を決定するために使用され得る。さらに、本明細書で提供される検出可能遺伝子産物をモニタリングすることを含む方法は、1種もしくはそれ以上の器官、組織、腫瘍もしくは転移部に存在するウイルスの力価を決定するために使用され得る。対象内のウイルスの局在および/または力価をモニタリングすることを含む方法は、ウイルスの病原性を決定するために使用され得て、正常な組織および/または器官のウイルス感染、および特に感染レベルは、プローブの病原性を示し得るので、対象内のウイルスの局在および/または量をモニタリングする方法は、ウイルスの病原性を決定するために使用され得る。本明細書で提供される方法は、対象内の任意の特定の位置におけるウイルス量をモニタリングするために使用され得るので、対象内のウイルスの局在および/または力価をモニタリングすることを含む方法は、複数の時間点で行われ得て、したがって、対象内でのウイルス複製速度(対象の1種もしくはそれ以上の器官もしくは組織でのウイルス複製速度を含む)を決定することができ、したがって、ウイルス遺伝子産物をモニタリングする方法は、ウイルスの複製能を決定するために使用され得る。本明細書で提供される方法はまた、さまざまな器官もしくは組織、および腫瘍もしくは転移に存在するウイルス量を定量するために使用することができ、それにより、対象内のウイルスの選択的蓄積の程度を示し得て、したがって、本明細書で提供されるウイルス遺伝子産物モニタリング法は、正常な組織もしくは器官よりも腫瘍もしくは転移部に蓄積するウイルスの能力を決定する方法において使用され得る。本明細書で提供される方法で使用されるウイルスは、全腫瘍に蓄積し得るか、または腫瘍内の複数部位に蓄積し得るか、およびまた転移部に蓄積し得るので、本明細書で提供されるウイルス遺伝子産物をモニタリングする方法は、対象内に存在する腫瘍のサイズもしくは転移部の数を決定するために使用され得る。広範囲の時間にわたって、腫瘍もしくは転移部におけるウイルス遺伝子産物のそのような存在をモニタリングことは、腫瘍の成長もしくは縮小速度、または新規転移部の発生もしくは転移部の消失を含む、腫瘍もしくは転移部の変化を評価するために使用し得て、また腫瘍の成長もしくは縮小速度、または新規転移部の発生もしくは転移部の消失を決定するために使用し得るか、または腫瘍の成長もしくは縮小速度、または新規転移部の発生もしくは転移部の消失の変化を評価するために使用し得る。したがって、ウイルス遺伝子産物をモニタリングする方法は、腫瘍の成長もしくは縮小速度、または新規転移部の発生もしくは転移部の消失の速度、または腫瘍の成長もしくは縮小速度、または新規転移部の発生もしくは転移部の消失の速度の変化を決定することにより、対象内の腫瘍性疾患をモニタリングために、または腫瘍性疾患の処置の効果決定するために使用され得る。

20

30

40

【0349】

50

さまざまな検出可能タンパク質のすべてが、本明細書で提供されるモニタリング法で検出され得て、例えば、そのような検出可能タンパク質の一覧は、さまざまな蛍光タンパク質のすべて(例えば、緑色もしくは赤色蛍光タンパク質)、さまざまなルシフェラーゼ、トランスフェリンもしくは他の鉄結合タンパク質のすべて; または受容体、結合タンパク質、および抗体(ここで、受容体、結合タンパク質、または抗体に特異的に結合する化合物は、検出可能薬剤であるか、または検出可能物質で標識され得る(例えば、放射性核種または造影剤))を含むが、これらに限定されない。検出可能タンパク質を発現するウイルスは、本明細書で提供される方法および当分野で既知の方法の組み合わせにより検出され得る。2種以上の検出可能タンパク質を発現するウイルスまたはさまざまな検出可能タンパク質を発現する2種もしくはそれ以上のウイルスは、二重画像法により検出および識別可能である。例えば、蛍光タンパク質および鉄結合タンパク質を発現するウイルスは、インビトロもしくはインビボで、それぞれ高感度蛍光画像および磁気共鳴により検出され得る。他の態様において、2種もしくはそれ以上の蛍光タンパク質を発現するウイルスは、異なる波長での蛍光画像により検出され得る。インビボ二重画像法は、2種もしくはそれ以上の検出可能遺伝子産物を発現するウイルスまたは1種もしくはそれ以上の検出可能遺伝子産物を各々発現する2種もしくはそれ以上のウイルスを投与された対象で行われ得る。特定の例において、本明細書で提供されるhNETコードウイルスのようなウイルスは、hNETトランスポーターにより腫瘍細胞内に輸送される放射性標識MIBG基質の蓄積の検出により画像化され得る。そのようなウイルスはまた、光学的方法、例えば、蛍光画像によるGFP発現の検出により画像化され得る。

【0350】

b. 腫瘍サイズのモニタリング

腫瘍および/または転移サイズならびに局在をモニタリングする方法がまた、本明細書で提供される。腫瘍および/または転移部のサイズは、外部評価法または断層撮影もしくは磁気画像法を含む、当分野で既知のさまざまな方法のいずれかによりモニターされ得る。当分野で既知の方法に加えて、本明細書で提供される方法、例えば、ウイルス遺伝子発現をモニタリングすることは、腫瘍および/または転移部のサイズをモニタリングするために使用され得る。

【0351】

いくつかの時間点にわたってサイズをモニタリングすることは、腫瘍もしくは転移部のサイズにおける増減に関する情報を提供し得るか、または対象内のさらなる腫瘍および/または転移部の存在に関する情報を提供し得る。いくつかの時間点にわたって腫瘍サイズをモニタリングすることは、対象内の腫瘍性疾患の発症に関する情報を提供し得て、それは、対象内の腫瘍性疾患の処置の効果を含む。

【0352】

c. 抗体力価のモニタリング

本明細書で提供される方法は、ウイルスの対象への投与にตอบสนองして産生された抗体を含む、対象内の抗体力価をモニタリングすることを含み得る。本明細書で提供される方法で投与されるウイルスは、内在性ウイルス抗原に対する免疫応答を誘発し得る。本明細書で提供される方法で投与されるウイルスはまた、ウイルスにより発現された外因性遺伝子に対する免疫応答を誘発し得る。本明細書で提供される方法で投与されるウイルスはまた、腫瘍抗原に対する免疫応答を誘発し得る。ウイルス抗原に対する抗体力価、ウイルス発現外因性遺伝子産物、または腫瘍抗原をモニタリングすることは、ウイルスの毒性をモニタリングするか、処置法の効果をモニタリングするか、または作製および/または収集のために遺伝子産物もしくは抗体のレベルをモニタリングする方法で使用され得る。

【0353】

ある態様において、抗体力価をモニタリングすることは、ウイルスの毒性をモニタリングするために使用され得る。ウイルスに対する抗体力価は、ウイルスの対象への投与後の時間にわたって変化し得て、そこでは、ある特定の時間点において、低い抗-(ウイルス抗原)抗体力化が高い毒性を示し得て、一方で、他の時間点において、高い抗-(ウイルス抗

10

20

30

40

50

原)抗体はが高い毒性を示し得る。本明細書で提供される方法で使用されるウイルスは、免疫原性であり得て、したがって、ウイルスの対象への投与後すぐに、免疫応答を誘発し得る。一般に、対象の免疫系が強い免疫応答を素早く誘導することができるウイルスは、対象の免疫系がすべての正常な器官もしくは組織からウイルスを除去することが可能であるとき、低い毒性を有するウイルスであり得る。したがって、ある態様において、ウイルスの対象への投与後すぐに生じるウイルス抗原に対する高い抗体力価は、ウイルスの低い毒性を示し得る。対照に、高い免疫原性を有さないウイルスは、強い免疫応答を誘発することなく、宿主生物に感染することができ、その結果、ウイルスの宿主に対する高い毒性を生じ得る。したがって、ある態様において、ウイルスの対象への投与後すぐに生じるウイルス抗原に対する高い抗体力価は、ウイルスの低い毒性を示し得る。

10

【0354】

他の態様において、抗体力価をモニタリングすることは、処置法の効果をモニタリングするために使用され得る。本明細書で提供される方法において、抗体力価、例えば、抗-(腫瘍抗原)抗体力価は、治療法、例えば、腫瘍性疾患を処置する治療法の効果を示し得る。本明細書で提供される処置法は、腫瘍および/または転移部に対する免疫応答を引き起こすか、もしくは促進することを含み得る。したがって、抗-(腫瘍抗原)抗体力価をモニタリングにより、腫瘍および/または転移部に対する免疫応答を引き起こすか、もしくは促進する治療法の効果をモニタリングすることが可能である。本明細書で提供される治療法はまた、腫瘍に蓄積し得るか、抗腫瘍免疫応答を促進し得るウイルスを対象に投与することを含み得る。したがって、腫瘍もしくは転移に蓄積したウイルスに対する免疫応答を誘発する宿主の能力をモニタリングすることが可能であり、それは、対象がまた抗腫瘍免疫応答を誘導したことを示し得るか、または対象が抗腫瘍免疫応答を誘導する傾向があることを示し得るか、または対象が抗腫瘍免疫応答を誘導可能であることを示し得る。

20

【0355】

他の態様において、抗体をモニタリングすることは、産生および/または収集のために、遺伝子産物もしくは抗体のレベルをモニタリングするために使用され得る。本明細書で提供されるとおり、方法は、腫瘍に蓄積したウイルスに外因性遺伝子を発現させることにより、タンパク質、RNA分子もしくは他の化合物を産生させるために使用され得る。さらに、腫瘍に蓄積したウイルスに外因性遺伝子を発現させることにより、タンパク質、RNA分子もしくは他の化合物に対する抗体を産生させる方法が、本明細書で提供される。タンパク質、RNA分子もしくは他の化合物に対する抗体力価をモニタリングすることは、腫瘍蓄積ウイルスによるタンパク質、RNA分子もしくは他の化合物の産生レベルを示し得るか、またはそのようなタンパク質、RNA分子もしくは他の化合物に特異的な抗体のレベルを直接示し得る。

30

【0356】

d. 一般的な健康診断のモニタリング

本明細書で提供される方法はまた、対象の健康をモニタリングする方法を含み得る。本明細書で提供される方法のいくつかは、腫瘍性疾患治療法を含む治療法である。対象の健康をモニタリングすることは、当分野で既知のとおり、治療法の効果を決定するために使用され得る。本明細書で提供される方法はまた、ウイルスを対象に投与する工程を含み得る。対象の健康をモニタリングすることは、対象に投与されるウイルスの病原性を決定するために使用され得る。疾患、例えば、腫瘍性疾患、感染性疾患、もしくは免疫関連疾患をモニタリングするためのさまざまな健康診断法のすべてが、当分野で既知のとおり、モニタリングされ得る。例えば、対象の体重、血圧、脈拍、呼吸、顔色、体温もしくは他の観察可能な状態は、対象の健康を示し得る。さらに、対象由来のサンプル中の1種もしくはそれ以上の構成要素の存在もしくは非存在もしくはレベルは、対象の健康を示し得る。典型的なサンプルは、血液および尿サンプルを含み得て、ここで、1種もしくはそれ以上の構成要素の存在もしくは非存在もしくはレベルは、例えば、血液パネルもしくは尿パネル診断試験を行うことにより決定され得る。対象の健康を示す構成要素は、例えば、白血球数、ヘマトクリット、もしくは反応性タンパク質濃度を含むが、これらに限定されない

40

50

【0357】

e. 処置と関連するモニタリング

治療をモニタリングする方法であって、治療決定がモニタリングの結果に基づき得る方法がまた、本明細書で提供される。本明細書で提供される治療法は、ウイルスを対象に投与することを含み得て、ここで、ウイルスは、腫瘍および/または転移部に選択的に蓄積し、ウイルスは、抗腫瘍免疫応答を誘導するか、もしくは促進し得る。そのような治療法は、特定のウイルスの複数投与、第2ウイルスの投与、もしくは治療化合物の投与を含む、さまざまな工程を含み得る。対象に投与されるウイルスもしくは化合物の量、タイミングもしくは型の決定は、対象をモニタリングすることから生じる1種もしくはそれ以上の結果に基づき得る。例えば、対象内の抗体力価は、ウイルスもしくは化合物を投与すること、投与されるウイルスもしくは化合物の量、および投与されるウイルスもしくは化合物の型が望ましいか否かを決定するために使用され得て、ここで、例えば、低い抗体力価は、さらなるウイルス、異なるウイルス、もしくは治療化合物、例えば、ウイルス遺伝子発現を誘導する化合物を投与することの望ましさを示し得る。他の例において、対象内の全体の健康状態は、ウイルスもしくは化合物を投与すること、投与されるウイルスもしくは化合物の量、および投与されるウイルスもしくは化合物の型が望ましいか否かを決定するために使用され得て、ここで、例えば、対象が健康であることの決定は、さらなるウイルス、異なるウイルス、もしくは治療化合物、例えば、ウイルス遺伝子発現を誘導する化合物を投与することの望ましさを示し得る。他の例において、検出可能ウイルス発現遺伝子産物をモニタリングすることは、ウイルスもしくは化合物を投与すること、投与されるウイルスもしくは化合物の量、および投与されるウイルスもしくは化合物の型が望ましいか否かを決定するために使用され得る。そのようなモニタリング法は、治療法が有効であるか否か、治療法が対象に対する病原性を有するか否か、ウイルスが腫瘍もしくは転移に蓄積するか否か、およびウイルスが正常な組織もしくは器官に蓄積するか否かを決定するために使用され得る。そのような決定に基づいて、さらなる治療法の望ましさおよび形態が、誘導され得る。

【0358】

ある態様において、治療法が有効であるか否かの決定は、さらなる治療法を誘導するために使用され得る。さまざまなモニタリングのいずれかが、本明細書で提供されるか、もしくは当分野で既知のとおり、治療法が有効であるか否かを決定するために使用され得る。モニタリング法が、治療法が有効であることを示すとき、ウイルスもしくは化合物のさらなる投与を含み得る現在の治療を維持する決定がなされ得るか、またはさらなる投与が必要とされないという決定がなされ得る。モニタリング法が、治療法が有効でないことを示すとき、モニタリング結果は、処置が中断されるべきか否か(例えば、ウイルスが対象にする病原性を有するとき)、変化させるべきか否か(例えば、ウイルスが宿主生物に害を与えることなく、抗腫瘍免疫応答を誘導することなく、腫瘍に蓄積するとき)、または頻度もしくは量を増加させるべきか否か(例えば、腫瘍に、ほとんどもしくは全くウイルスが蓄積しないとき)を示し得る。

【0359】

ある例において、モニタリングは、ウイルスが対象に対する病原性を有することを示し得る。そのような例において、ウイルスの対象への投与を停止させるか、より低いレベルのウイルスを対象に投与するか、異なるウイルスを対象に投与するか、またはウイルスの病原性を減少させる化合物を対象に投与することについて決定がなされ得る。ある例において、病原性を有することが決定されたウイルスの投与は、停止され得る。他の例において、病原性を有することが決定されたウイルスの投与量は、次の投与で減少させ得て、さらに他の例において、対象は、病原性ウイルスが対象に再投与される前に、腫瘍に蓄積する病原性ウイルスの能力を増加させ得る他のウイルスで前処理され得る。他の例において、対象は、対象に対して病原性を有するウイルスを投与され得て、そのような病原性ウイルスの投与は、本明細書の他の場所で記載されたとおり、例えば、抗ウイルス化合物(例

えば、シドフォビル)、病原性弱毒化合物(例えば、溶解もしくはアポトーシス遺伝子産物の発現をダウンレギュレーションする化合物)、またはウイルスの増殖、毒性、もしくは細胞殺傷特性を減少させ得る他の化合物の投与を伴うものであり得る。他の例において、ウイルスの局在がモニタリングされ得て、ウイルスが腫瘍および/または転移部に蓄積するが、正常組織もしくは器官には蓄積しないとき、抗ウイルス化合物もしくは病原性弱毒化合物の投与は、停止され、ウイルスの病原性活性は、腫瘍および/または転移部に限定的に、活性化されるか、もしくは増加され得る。他の例において、抗ウイルス化合物もしくは病原性弱毒化合物の投与の停止後、ウイルスの存在および/またはウイルスの病原性はさらに、モニタリングされ得て、ウイルスが宿主に対して、例えば、正常な器官もしくは組織にまで広がるか、血管に毒素を放出するか、または腫瘍もしくは転移部を超えて作用する病原性効果を有することにより、脅威を与えることが決定されると、そのような化合物の投与は、再開され得る。

10

【0360】

他の例において、モニタリングは、ウイルスが対象の腫瘍もしくは転移部に蓄積するかどうかを決定し得る。そのような決定後、さらなるウイルス、異なるウイルス、もしくは化合物を対象にさらに投与する決定がなされ得る。他の例において、腫瘍内のウイルスの存在をモニタリングすることは、対象に化合物を投与することを決定するために使用され得て、ここで、化合物は、ウイルスの病原性、増殖、もしくは免疫原性を増加させ得るか、または化合物は、ウイルスと共に作用して、ウイルスの増殖、毒性、腫瘍細胞殺傷、もしくは免疫応答誘発特性を増加させ得て；他の例において、ウイルスは、例えば、そのような化合物の非存在下で、溶解もしくは細胞殺傷能力をほとんど有さないか、もしくは全く有さず；さらに他の例において、腫瘍もしくは転移部内のウイルスの存在のモニタリングは、正常組織もしくは器官におけるウイルスの非存在をモニタリングと組み合わせることができ、ここで、化合物は、ウイルスが腫瘍もしくは転移部に存在するが、正常組織もしくは器官には、全くもしくは実質的に存在しないとき、投与され；さらに他の例において、腫瘍もしくは転移部内のウイルスの量はモニターされ得て、ここで、化合物は、ウイルスが十分なレベルで腫瘍もしくは転移部に存在するとき、投与される。

20

【0361】

H. 他の微生物および細胞

ある態様において、単離細胞、例えば、哺乳類細胞は、本明細書で提供されるトランスポータータンパク質をコードするウイルスのいずれかを含み得る。例えば、単離細胞は、本明細書で提供されるウイルスで感染させ得る。該細胞の例は、腫瘍細胞、幹細胞、免疫細胞もしくは腫瘍組織に同在し得る他の細胞である。ウイルス感染細胞はまた、腫瘍の診断および/または処置のために、腫瘍を患う患者もしくは対象に投与することができる。

30

【実施例】

【0362】

I. 実施例

下記の実施例は、例示目的のためにのみ含まれるものであり、本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0363】

40

実施例1

組み換えウイルス作製

A. 修飾化ワクシニアウイルスの構築

いくつかの型のトランスポータータンパク質をコードするDNAを含む修飾化ワクシニアウイルスは、ワクシニアウイルスゲノム中のいくつかの遺伝子座(F14.5L (また、F3と呼ばれる；米国特許出願公開番号2005/0031643を参照のこと)、チミジンキナーゼ(TK; J2R)および/またはヘマグルチニン(HA; A56R)遺伝子座を含む)で、核酸を除去および挿入することにより作製された。ウイルスゲノム中に挿入された異種DNAは、ワクシニアウイルスプロモーターと操作可能に結合したタンパク質コードDNAを有する発現カセットを含んでいた。下記のトランスポータータンパク質をコードする修飾化ワクシニアウイルス株が作

50

製された：ヒトノルエピネフリントランスポーター (hNET) およびヒトナトリウム-ヨウ素共輸送体 (hNIS)。トランスポーター遺伝子、hNET、および抗癌治療遺伝子である IL-24 を含む修飾化ワクシニアウイルスがまた、作製された。

【 0 3 6 4 】

本明細書に記載された修飾化ワクシニアウイルスのための出発株は、ワクシニアウイルス (VV) 株 GLV-1h68 であった (また、RVGL21 と呼ばれる、配列番号 1)。米国特許出願公開番号 2005/0031643 に記載されているこの遺伝学的に改変された株は、F14.5L、チミジンキナーゼ (TK) およびヘマグルチニン (HA) 遺伝子での DNA 挿入を含む。GLV-1h68 は、LIVP (もともと、ワクシニアウイルス Lister 株 (ATCC Catalog No. VR-1549) をウシの皮膚に適合させることにより作製された (Research Institute of Viral Preparations, Moscow, Russia, A I'tshtein et al. (1983) Dokl. Akad. Nauk USSR 285:696-699) ワクシニアウイルス株) と呼ばれるワクシニアウイルス株から作製された。ゲノム配列が配列番号 2 で示され、GLV-1h68 が由来する LIVP 株は、TK 遺伝子のコード配列に突然変異を含み、ここで、グアニンヌクレオチドのチミジンヌクレオチドでの置換 (配列番号 2 のヌクレオチド 80207 位) は、コード配列内に中途 STOP コドンを導入した。

【 0 3 6 5 】

米国特許出願公開番号 2005/0031643 に記載されたとおり (特に、該出願の実施例 1 を参照のこと)、GLV-1h68 は、検出可能マーカーをコードする発現カセットを、ワクシニアウイルス LIVP 株の F14.5L (LIVP では、また、F3 と呼ばれる) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、およびヘマグルチニン (HA) 遺伝子座に挿入することにより作製された。特に、ワクシニアウイルス合成早期/後期プロモーター P_{SEL} の制御下で、Ruc-GFP cDNA (Renilla ルシフェラーゼをコードする DNA および GFP をコードする DNA の融合) を含む発現カセットが、F14.5L 遺伝子に挿入され; ワクシニアウイルス早期/後期プロモーター $P_{7.5k}$ の制御下で、ガラクトシダーゼをコードする DNA を含む発現カセット ($(P_{7.5k})$ LacZ と呼ばれる) およびワクチン合成早期/後期プロモーター P_{SEL} に対して、転写について逆方向に位置するラットトランスフェリン受容体をコードする DNA ((P_{SEL}) rTrfR と呼ばれる) が、TK 遺伝子に挿入され (生じたウイルスは、トランスフェリン受容体タンパク質をコードする DNA が、カセット内のプロモーターと比較して、転写について逆方向に位置するので、該タンパク質を発現しない); そして、ワクシニアウイルス後期プロモーター P_{11k} の制御下で、ガラクトシダーゼをコードする DNA を含む発現カセット ((P_{11k}) gusA と呼ばれる) が、HA 遺伝子に挿入された。発現カセットの LIVP ゲノムへの挿入による GLV-1h68 の作製は、F14.5L、TK および HA 遺伝子各々のコード配列の破壊を生じ; したがって、生じた株の 3 つすべての遺伝子は、それらが相当する完全長タンパク質をコードしないという意味において、機能していない。米国特許出願公開番号 2005/0031643 に記載されているとおり、これらの遺伝子の破壊は、ウイルスを弱毒化し、またその腫瘍特異的蓄積を促進する。以前の研究は、乳癌のマウスモデルにおける GLV-1h68 ウイルスの全身送達、ヌードマウスでの巨大な皮下 GI-101 A ヒト乳癌癌腫異種移植片腫瘍の完全な根絶を生じることを示した (米国特許出願公開番号 2005/0031643 を参照のこと)。

【 0 3 6 6 】

1. 修飾化ウイルス株

ワクシニアウイルスゲノムの 1 種もしくはそれ以上の遺伝子座に挿入された異種 DNA を含む修飾化組み換えワクシニアウイルスは、ゲノム中の DNA 配列、ならびに本明細書に記載された方法および当分野で既知の方法を用いた導入ベクターの間の相同組み換えにより作製された (例えば、Falkner and Moss (1990) J. Virol. 64:3108-2111; Chakrabarti et al. (1985) Mol. Cell Biol. 5:3403-3409; および米国特許第 4,722,848 号を参照のこと)。これらの方法において、出発ワクシニアウイルスゲノム中に存在する標的遺伝子は、2 つの交差イベントを介して、導入ベクターに含まれる遺伝子の中断コピーにより置換され: 最初の交差イベントは、ワクシニアウイルスゲノムおよび導入ベクター間の相同組み換えであり、第 2 の交差イベントは、標的遺伝子座内の重複配列間の相同組み換えである。導入ベクター内にある標的遺伝子の中断版は、標的遺伝子の左側および標的遺伝子の右側

各々に相当するDNAにより、各々の側に隣接した挿入DNAを含む。導入ベクターはまた、ワクシニアウイルス早期プロモーター(例えば、 $P_{7.5kE}$)の制御下で、優勢選択マーカー、例えば、大腸菌グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(gpt)遺伝子を含む。ベクター内にそのようなマーカーを含むことは、ゲノム内に導入ベクターを組み込んだ、選択圧下で成長する組み換えウイルスを同定するために、一過的な優勢選択工程を可能にする。マーカー遺伝子は、ゲノム内に安定的に統合されないため、それは、選択が解除されたとき生じる第2交差イベントで、ゲノムから除去される。したがって、最終組み換えウイルスは、標的遺伝子の破壊として、標的遺伝子の中断版を含むが、導入ベクターからの選択可能マーカーを保持しない。

【0367】

導入ベクターおよび出発ワクシニアウイルスゲノム間の相同組み換えは、導入ベクターの出発ワクシニアウイルスで感染させた細胞への導入により生じた。一連の導入ベクターが下記したとおり構築され、下記の修飾化ワクシニアウイルス株が構築された: GLV-1h99、GLV-1h100、GLV-1h101、GLV-1h139、GLV-1h146、GLV-1h150、GLV-1h151、GLV-1h152、GLV-1h153。これらの株の構築体は、下記の表で要約されており、それは、以前に記載されたGLV-1h68、それらの各々の遺伝子型、およびウイルスを改変するために使用された導入ベクターを含む修飾化ワクシニアウイルス株を示している。

【0368】

表6: 改変ワクシニアウイルスの作製

【表 1 1】

ウイルス名	親ウイルス	VV導入ベクター	遺伝子型
GLV-1h68	-	-	F14.5L: (P _{SEL})Ruc-GFP TK: (P _{SEL})rTrfR-(P _{7.5k})LacZ HA: (P _{11k})gusA
GLV-1h99	GLV-1h68	FSE-hNET	F14.5L: (P _{SE})hNET TK: (P _{SEL})rTrfR-(P _{7.5k})LacZ HA: (P _{11k})gusA
GLV-1h100	GLV-1h68	TK-SE-hNET3	F14.5L: (P _{SEL})Ruc-GFP TK: (P _{SE})hNET HA: (P _{11k})gusA
GLV-1h101	GLV-1h68	TK-SL-hNET3	F14.5L: (P _{SEL})Ruc-GFP TK: (P _{SL})hNET HA: (P _{11k})gusA
GLV-1h139	GLV-1h68	HA-SE-hNET-1	F14.5L: (P _{SEL})Ruc-GFP TK: (P _{SEL})rTrfR-(P _{7.5k})LacZ HA: (P _{SE})hNET
GLV-1h146	GLV-1h100	HA-SE-IL-24-1	F14.5L: (P _{SEL})Ruc-GFP TK: (P _{SE})hNET HA: (P _{SE})IL-24
GLV-1h150	GLV-1h101	HA-SE-IL-24-1	F14.5L: (P _{SEL})Ruc-GFP TK: (P _{SL})hNET HA: (P _{SE})IL-24
GLV-1h151	GLV-1h68	HA-SE-hNIS-1	F14.5L: (P _{SEL})Ruc-GFP TK: (P _{SEL})rTrfR-(P _{7.5k})LacZ HA: (P _{SE})hNIS
GLV-1h152	GLV-1h68	HA-SEL-hNIS-2	F14.5L: (P _{SEL})Ruc-GFP TK: (P _{SEL})rTrfR-(P _{7.5k})LacZ HA: (P _{SEL})hNIS
GLV-1h153	GLV-1h68	HA-SL-hNIS-1	F14.5L: (P _{SEL})Ruc-GFP TK: (P _{SEL})rTrfR-(P _{7.5k})LacZ HA: (P _{SL})hNIS

10

20

30

【 0 3 6 9 】

簡潔には、表6に示した株は、下記のとおり作製した(さらなる詳細は、下記で提供する)。

【 0 3 7 0 】

GLV-1h99は、ワクシニアウイルスP_{SE}プロモーターの制御下で、hNETをコードする発現カセットの出発株GLV-1h68のF14.5L遺伝子座への挿入により作製され、それにより、出発GLV-1h68のF14.5L遺伝子座におけるRuc-GFP融合遺伝子発現カセットを欠失した。したがって、GLV-1h99株において、ワクシニアウイルスF14.5L遺伝子は、ワクシニアウイルス合成早期プロモーターと操作可能に結合したhNETをコードするDNAを含むDNA断片により、コード配列内で中断されている。

40

【 0 3 7 1 】

GLV-1h100は、ワクシニアウイルスP_{SE}プロモーターの制御下で、hNETをコードする発現カセットの出発株GLV-1h68のTK遺伝子座への挿入により作製され、それにより、出発GLV-1h68のTK遺伝子座におけるLacZ/rTrfR発現カセットを欠失した。したがって、GLV-1h100株において、ワクシニアウイルスTK遺伝子は、ワクシニアウイルス合成早期プロモーターと

50

操作可能に結合したhNETをコードするDNAを含むDNA断片により、コード配列内で中断されている。

【0372】

GLV-1h101は、ワクシニアウイルスP_{SL}プロモーターの制御下で、hNETをコードする発現カセットの出発株GLV-1h68のTK遺伝子座への挿入により作製され、それにより、出発GLV-1h68のTK遺伝子座におけるLacZ/rTFR発現カセットを欠失した。したがって、GLV-1h101株において、ワクシニアウイルスTK遺伝子は、ワクシニアウイルス合成後期プロモーターと操作可能に結合したhNETをコードするDNAを含むDNA断片により、コード配列内で中断されている。

【0373】

GLV-1h139は、ワクシニアウイルスP_{SE}プロモーターの制御下で、hNETをコードする発現カセットの出発株GLV-1h68のHA遺伝子座への挿入により作製され、それにより、出発GLV-1h68のHA遺伝子座におけるgusA発現カセットを欠失した。したがって、GLV-1h139株において、ワクシニアウイルスHA遺伝子は、ワクシニアウイルス合成早期プロモーターと操作可能に結合したhNETをコードするDNAを含むDNA断片により、コード配列内で中断されている。

【0374】

GLV-1h146は、ワクシニアウイルスP_{SE}プロモーターの制御下で、IL-24をコードする発現カセットの出発株GLV-1h100のHA遺伝子座への挿入により作製され、それにより、出発GLV-1h100のHA遺伝子座におけるgusA発現カセットを欠失した。したがって、GLV-1h146株において、ワクシニアウイルスHA遺伝子は、ワクシニアウイルス合成早期プロモーターと操作可能に結合したIL-24をコードするDNAを含むDNA断片により、コード配列内で中断されており、ワクシニアウイルスTK遺伝子は、ワクシニアウイルス合成早期プロモーターと操作可能に結合したhNETをコードするDNAを含むDNA断片により、コード配列内で中断されている。

【0375】

GLV-1h150は、ワクシニアウイルスP_{SE}プロモーターの制御下で、IL-24をコードする発現カセットの出発株GLV-1h101のHA遺伝子座への挿入により作製され、それにより、出発GLV-1h101のHA遺伝子座におけるgusA発現カセットを欠失した。したがって、GLV-1h150株において、ワクシニアウイルスHA遺伝子は、ワクシニアウイルス合成早期プロモーターと操作可能に結合したIL-24をコードするDNAを含むDNA断片により、コード配列内で中断されており、ワクシニアウイルスTK遺伝子は、ワクシニアウイルス合成後期プロモーターと操作可能に結合したhNETをコードするDNAを含むDNA断片により、コード配列内で中断されている。

【0376】

GLV-1h151は、ワクシニアウイルスP_{SE}プロモーターの制御下で、hNISをコードする発現カセットの出発株GLV-1h68のHA遺伝子座への挿入により作製され、それにより、出発GLV-1h68のHA遺伝子座におけるgusA発現カセットを欠失した。したがって、GLV-1h151株において、ワクシニアウイルスHA遺伝子は、ワクシニアウイルス合成早期プロモーターと操作可能に結合したhNISをコードするDNAを含むDNA断片により、コード配列内で中断されている。

【0377】

GLV-1h152は、ワクシニアウイルスP_{SEL}プロモーターの制御下で、hNISをコードする発現カセットの出発株GLV-1h68のHA遺伝子座への挿入により作製され、それにより、出発GLV-1h68のHA遺伝子座におけるgusA発現カセットを欠失した。したがって、GLV-1h152株において、ワクシニアウイルスHA遺伝子は、ワクシニアウイルス合成早期プロモーターと操作可能に結合したhNISをコードするDNAを含むDNA断片により、コード配列内で中断されている。

【0378】

GLV-1h153は、ワクシニアウイルスP_{SL}プロモーターの制御下で、hNISをコードする発現

10

20

30

40

50

カセットの出発株GLV-1h68のHA遺伝子座への挿入により作製され、それにより、出発GLV-1h68のHA遺伝子座におけるgusA発現カセットを欠失した。したがって、GLV-1h153株において、ワクシニアウイルスHA遺伝子は、ワクシニアウイルス合成後期プロモーターと操作可能に結合したhNISをコードするDNAを含むDNA断片により、コード配列内で中断されている。

【0379】

2. 修飾化ワクシニアウイルスの作製のために使用されるVV導入ベクター

下記のベクターが構築され、組み換えワクシニアウイルス株を作製するために、下記のとおり使用される。

【0380】

a. FSE-hNET: ワクシニアウイルス P_{SE} プロモーターの制御下で、hNETをコードする発現カセットのワクシニアウイルスF14.5L遺伝子座への挿入のために

FSE-hNETベクター(配列番号3)は、下記の遺伝子型を有するワクシニアウイルス株GLV-1h99を作製するために使用され得る: F14.5L: (P_{SE})hNET、TK: (P_{SEL})rTrfR-($P_{7.5k}$)LacZ、HA: (P_{11k})gusA。FSE-hNETは、F14.5L遺伝子の配列に隣接して、ワクシニアウイルス P_{SE} プロモーターの制御下で、ヒトノルエピネフリントランスポーター(hNET)を含む。

【0381】

FSE-hNETベクターを作製するために、hNETをコードするDNAを、下記のプライマーを用いて、鋳型としてプラスミドpBluescript II KS+-hNETからPCR増幅した:

【表12】

hNET5 (5'-GTCGACGCCACCATGCTTCTGGCGCGGATGAA-3', 配列番号4)
(**SaI**制限酵素切断部位に下線が引かれている)

および

【表13】

hNET3 (5'-GATATCTCAGATGGCCAGCCAGTGTT-3', 配列番号5)
(**EcoRV**制限酵素切断部位に下線が引かれている)

。PCR産物をゲル精製し、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen)を用いて、pCR-Blunt II-TOPOベクター(配列番号6)にクローン化した。生じた構築体pCRII-hNET1は、シーケンシングにより確認された。hNET cDNAは、SaI IおよびEcoR V酵素消化でpCRII-hNET1から切り出され、SaI IおよびSmaIであらかじめ切断された中間ベクターpCR-SE1(配列番号7)にサブクローン化された。この工程は、ワクシニアウイルス合成早期プロモーター(P_{SE})についての配列の下流にhNET cDNA置く。ウイルスhNET発現カセット(SE-hNET)は、BamH IおよびHind III酵素消化でこの中間構築体から切り出され、同じ切断ウイルス導入ベクターpNCVVf14.5T(配列番号8)に挿入された。最終構築体FSE-hNET1は、シーケンシングにより確認され、SE-hNETの、GLV-1h68のF14.5L遺伝子座への挿入のために使用された。

【0382】

b. TK-SE-hNET3: ワクシニアウイルス P_{SE} プロモーターの制御下で、hNETをコードする発現カセットのワクシニアウイルスTK遺伝子座への挿入のために

TK-SE-hNET3ベクター(配列番号9)は、下記の遺伝子型を有するワクシニアウイルス株GLV-1h100を作製するために使用され得る: F14.5L: (P_{SEL})Ruc-GFP、TK: (P_{SE})hNET、HA: (P_{11k})gusA。TK-SE-hNET3は、TK遺伝子の配列に隣接して、ワクシニアウイルス P_{SE} プロモーターの制御下で、ヒトノルエピネフリントランスポーター(hNET)を含む。ベクターTK-SE-hNET3を作製するために、hNET cDNAは、SaI IおよびPac I酵素消化でFSE-hNET1から切り出され、同じ切断ベクターTK-SE-mIP10(配列番号10)に挿入された。生じた構築体TK-SE-hNET3は、シーケンシングにより確認された。

【0383】

c. TK-SL-hNET3: ワクシニアウイルス P_{SL} プロモーターの制御下で、hNETをコードする発

10

20

30

40

50

現カセットのワクシニアウイルスTK遺伝子座への挿入のために

TK-SL-hNET3ベクター(配列番号11)は、下記の遺伝子型を有するワクシニアウイルス株GLV-1h101を作製するために使用され得る: F14.5L: (P_{SEL})Ruc-GFP、TK: (P_{SL})hNET、HA: (P_{11k})gusA。TK-SE-hNET3は、TK遺伝子の配列に隣接して、ワクシニアウイルス P_{SL} プロモーターの制御下で、ヒトノルエピネフリントランスポーター(hNET)を含む。ベクターTK-SL-hNET3を作製するために、hNET cDNAは、Sal IおよびPac I酵素消化でFSE-hNET1から切り出され、同じ切断ベクターTK-SL-mIP10 (配列番号12)に挿入された。生じた構築体TK-SL-hNET3は、シーケンシングにより確認された。

【0384】

d. HA-SE-hNET-1: ワクシニアウイルス P_{SE} プロモーターの制御下で、hNETをコードする発現カセットのワクシニアウイルスHA遺伝子座への挿入のために

10

HA-SE-hNET-1ベクター(配列番号13)は、下記の遺伝子型を有するワクシニアウイルス株GLV-1h139を作製するために使用され得る: F14.5L: (P_{SEL})Ruc-GFP、TK: (P_{SEL})rTrfR- ($P_{7.5k}$)LacZ、HA: (P_{SE})hNET。HA-SE-hNET-1は、HA遺伝子の配列に隣接して、ワクシニアウイルス P_{SE} プロモーターの制御下で、ヒトノルエピネフリントランスポーター(hNET)を含む。ベクターHA-SE-hNET-1を作製するために、hNET cDNAは、Sal IおよびPac I酵素消化でTK-SL-hNET-3(配列番号11)から切り出され、同じ切断ベクターHA-SE-RLN-7(配列番号14)にサブクローン化され、それにより、RLN cDNAをhNET cDNAで置換した。生じた構築体HA-SE-hNET-1は、シーケンシングにより確認された。

【0385】

20

e. HA-SE-IL24-1: ワクシニアウイルス P_{SE} プロモーターの制御下で、IL-24をコードする発現カセットのワクシニアウイルスHA遺伝子座への挿入のために

HA-SE-IL24-1ベクター(配列番号15)は、下記の遺伝子型を有するワクシニアウイルス株GLV-1h146およびGLV-1h150を作製するために使用され得る: 各々、F14.5L: (P_{SEL})Ruc-GFP、TK: (P_{SE})hNET、HA: (P_{SE})IL-24およびF14.5L: (P_{SEL})Ruc-GFP、TK: (P_{SL})hNET、HA: (P_{SE})IL-24。HA-SE-IL24-1は、HA遺伝子の配列に隣接して、ワクシニアウイルス P_{SE} プロモーターの制御下で、ヒトIL-24遺伝子を含む。ベクターHA-SE-IL24-1を作製するために、ヒトIL24 cDNAを、下記のプライマーを用いて、鋳型としてOriGeneからのヒトインターロイキン-24、転写産物変異型1 (cDNA clone MGC:8926)を用いてPCR増幅した:

【表14】

30

mda-5 (5'-GTCGACCACCATGAATTTTCAACAGAGGCTGC-3', 配列番号16)

(SalI制限酵素切断部位に下線が引かれている)

および

【表15】

mda-3 (5'-CCCGGGTTATCAGAGCTTGTAGAATTTCTGCATC-3', 配列番号17)

(SmaI制限酵素切断部位に下線が引かれている)

。PCR産物をゲル精製し、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen)を用いて、pCR-Blunt II-TOPOベクター(配列番号6)にクローン化した。生じた構築体pCRII-IL24-3は、シーケンシングにより確認された。IL24 cDNAは、Sal IおよびSma I酵素消化でpCRII-IL24-3から切り出され、同じ切断ベクターpCR-SE1 (配列番号7)に挿入され、IL24をワクシニア合成プロモーター(P_{SE})の制御下に置いた。生じた構築体pCR-SE-IL24-2は、シーケンシングにより確認された。次いで、IL24は、Sal IおよびPac I酵素消化で切り出され、同じ切断ベクターHA-SE-RLN-7 (配列番号14)にサブクローン化され、それにより、RLN cDNAをIL-24 cDNAで置換した。生じた構築体HA-SE-IL24-1は、シーケンシングにより確認された。

40

【0386】

f. HA-SE-hNIS-1: ワクシニアウイルス P_{SE} プロモーターの制御下で、hNISをコードする発現カセットのワクシニアウイルスHA遺伝子座への挿入のために

50

HA-SE-hNIS-1ベクター(配列番号18)は、下記の遺伝子型を有するワクシニアウイルス株GLV-1h151を作製するために使用され得る: F14.5L: (P_{SEL})Ruc-GFP、TK: (P_{SEL})rTrfR-(P_{7.5k})LacZ、HA: (P_{SE})hNIS。HA-SE-hNIS-1は、HA遺伝子の配列に隣接して、ワクシニアウイルスP_{SE}プロモーターの制御下で、ヒトナトリウム-ヨウ素共輸送体(hNIS)を含む。

【0387】

ベクターHA-SE-hNIS-1を作製するために、hNIS cDNAを、下記のプライマーを用いて、鋳型としてOriGeneからのヒトcDNA clone TC124097 (SLC5A5)を用いてPCR増幅した:

【表16】

hNIS-5 (5'-GTCGACCACCATGGAGGCCGTGGAGACCGG-3', 配列番号19)

(SalI制限酵素切断部位に下線が引かれている)

および

【表17】

hNIS-3 (5'-TTAATTAATCAGAGGTTTGTCTCCTGCTGGTCTCGA-3', 配列番号20)

(PacI制限酵素切断部位に下線が引かれている)

。PCR産物をゲル精製し、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen)を用いて、pCR-Blunt II-TOPOベクター(配列番号6)にクローン化した。生じた構築体pCRII-hNIS-2は、シーケンシングにより確認された。hNIS cDNAは、Sal IおよびPac I酵素消化でpCRII-hNIS-2から切り出され、同じ切断ベクターHA-SE-RLN-7 (配列番号14)にサブクローン化され、それにより、RLN cDNAを置換した。生じた構築体HA-SE-hNIS-1は、シーケンシングにより確認された。

【0388】

g. HA-SEL-hNIS-2: ワクシニアウイルスP_{SEL}プロモーターの制御下で、hNISをコードする発現カセットのワクシニアウイルスHA遺伝子座への挿入のために

HA-SEL-hNIS-2ベクター(配列番号21)は、下記の遺伝子型を有するワクシニアウイルス株GLV-1h152を作製するために使用され得る: F14.5L: (P_{SEL})Ruc-GFP、TK: (P_{SEL})rTrfR-(P_{7.5k})LacZ、HA: (P_{SEL})hNIS。HA-SEL-hNIS-2は、HA遺伝子の配列に隣接して、ワクシニアウイルスP_{SEL}プロモーターの制御下で、ヒトナトリウム-ヨウ素共輸送体(hNIS)を含む。ベクターHA-SEL-hNIS-2を作製するために、hNIS cDNAは、Sal IおよびPac I酵素消化でpCRII-hNIS-2から切り出され、同じ切断ベクターHA-SEL-RLN-2 (配列番号22)にサブクローン化され、それにより、RLN cDNAを置換した。生じた構築体HA-SEL-hNIS-2は、シーケンシングにより確認された。

【0389】

h. HA-SL-hNIS-1: ワクシニアウイルスP_{SL}プロモーターの制御下で、hNISをコードする発現カセットのワクシニアウイルスHA遺伝子座への挿入のために

HA-SL-hNIS-1ベクター(配列番号23)は、下記の遺伝子型を有するワクシニアウイルス株GLV-1h153を作製するために使用され得る: F14.5L: (P_{SEL})Ruc-GFP、TK: (P_{SEL})rTrfR-(P_{7.5k})LacZ、HA: (P_{SL})hNIS。HA-SL-hNIS-1は、HA遺伝子の配列に隣接して、ワクシニアウイルスP_{SL}プロモーターの制御下で、ヒトナトリウム-ヨウ素共輸送体(hNIS)を含む。ベクターHA-SL-hNIS-1を作製するために、hNIS cDNAは、Sal IおよびPac I酵素消化でpCRII-hNIS-2から切り出され、同じ切断ベクターHA-SL-RLN-3(配列番号24)にサブクローン化され、それにより、RLN cDNA置換した。生じた構築体HA-SL-hNIS-1は、シーケンシングにより確認された。

【0390】

3. 組み換えワクシニアウイルスの作製

アフリカミドリザル腎臓線維芽細胞CV-1細胞(American Type Culture Collection (Manassas, VA); CCL 70)が、ウイルス作製および製造のために使用された。細胞を、5% CO₂下、37 °Cで、1% 抗生-抗真菌溶液(Mediatech, Inc., Herndon, VA)および10% ウシ胎児血清(FBS; Mediatech, Inc., Herndon, VA)を補充したダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM)

10

20

30

40

50

で培養した。組み換えウイルスのウイルス作製のために、CV-1細胞を、0.1のm.o.i.で、1時間、GLV-1h68（または指定された親ウイルス、表2を参照のこと）で感染させた。次いで、感染細胞に、Fugene (Roche, Indianapolis, IN)を用いて、指定された導入ベクター（表2および上記ウイルス導入ベクターの記載を参照のこと）を導入した。感染の2日後、感染/導入細胞を収集し、組み換えウイルスを選択し、ブランクを、以前に記載された標準的な方法を用いて精製した(Falkner and Moss (1990) J. Virol. 64:3108-3111)。

【0391】

4. ワクシニアウイルス株遺伝子型の検証

ワクシニアウイルスの遺伝子型は、PCRおよび制限酵素消化により検証された。ウイルスGLV-1h139、GLV-1h146、GLV-1h150、GLV-1h151、GLV-1h152およびGLV-1h153におけるgusA遺伝子の発現欠如は、感染細胞のX-GlcA (5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-グルクロン酸)染色により確認された。

【0392】

gusA発現を欠いたウイルスは、コントロール株(例えば、GLV-1h68)と比較して、該アッセイでの青色の発生の欠如により示されるとおり、X-GlcA基質を変換することができない。GLV-1h99でのGFP遺伝子の発現欠如は、コントロール株(例えば、GLV-1h68)と比較して、蛍光顕微鏡により確認された。ウイルスGLV-1h100、GLV-1h101、GLV-1h146およびGLV-1h150でのLacZ遺伝子の発現欠如は、感染細胞のX-gal (5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシド)により確認された。lacZ発現を欠いたウイルスは、コントロール株(例えば、GLV-1h68)と比較して、該アッセイでの青色の発生の欠如により示されるとおり、X-gal基質を変換することができない。X-GlcAおよびX-galウイルス染色および蛍光顕微鏡についての標準的な技術が使用され、当分野で既知である。

【0393】

B. ワクシニアウイルス精製

10個のT225フラスコのコンフルエントCV-1細胞(感染の前日に 2×10^7 細胞/フラスコで播種された)を、0.1のm.o.i.で、各ウイルスを用いて感染させた。感染細胞を感染の2日後に収集し、ガラス製Dounceホモジナイザーを用いて溶解した。細胞ライセートを、1,800gで5分間、遠心分離により精製し、次いで、36%スクロースのクッションで層を形成させ、HB-6ローター(Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge)で2時間、遠心分離した。ウイルスペレットを、1 mlの1 mM Tris、pH 9.0に再懸濁し、滅菌24%~40%連続スクロース勾配に載せ、26,000gで50分間、遠心分離した。ウイルスバンドを収集し、2倍量の1 mM Tris、pH 9.0で希釈し、次いで、HB-6ローターを用いて、13,000 rpmで60分間、遠心分離した。最終ウイルスペレットを、1 mlの1 mM Tris、pH 9.0に再懸濁し、力価を、CV-1細胞(ATCC No. CCL 70)で決定した。

【0394】

実施例2

GLV-1h99を用いた、インビトロウイルス感染試験

A. 組織培養でのワクシニアウイルス複製の解析

ワクシニアウイルス複製におけるhNET発現の任意の効果を評価するために、PANC-1細胞に、37°Cで1時間、0.01のmoiで、GLV-1h99またはその親ウイルスであるGLV-1h68を感染させた。次いで、接種物を吸引し、細胞単層を、2mlのDPBSで2回洗浄した(Mediatech, Inc., Herndon, VA)。2% FBSを含む2 mlの細胞培養培地を、マルチプルプレートの各ウェルに加えた。各々3つのウェルを、感染後、24、48、および72時間で収集した。収集した細胞を、3回の凍結融解のサイクルにかけ、全出力で、1分間を3回、超音波処理し、その後、タイトレーションを行った。各時間点でのウイルス力価を、標準的なブランクアッセイにより、CV-1細胞で決定した。

【0395】

GLV-1h99は、親ウイルスであるGLV-1h68と比較して、3回すべての時間点で、顕著に高いウイルス収量(約10倍)を生じた。GLV-1h99についての高められたウイルス複製は、ウイルス中のF14.5L遺伝子座におけるワクシニアウイルスプロモーターの強度の差異によるも

10

20

30

40

50

のであり得る。GLV-1h68は、強力なワクシニアウイルスP_{SEL}プロモーターを含んでおり、それは、P_{SE}プロモーターよりも100倍強力である(Chakrabarti et al. (1997) Biotechniques 23(6):1094-7)。細胞培養におけるウイルス複製は、ウイルスゲノムに挿入されたプロモーターの強度に反比例することが以前の研究で示されている。したがって、GLV-1h99 P_{SE}プロモーターの使用は、観察されたより高いウイルス力価を生じ得る。

【 0 3 9 6 】

(試験で使用されたPANC-1細胞は、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手され、5% CO₂下、37 °Cで、1% 抗生-抗真菌溶液(Mediatech, Inc., Herndon, VA) および10% ウシ胎児血清(FBS; Mediatech, Inc., Herndon, VA)を補充したダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM)で維持された)。

【 0 3 9 7 】

B. 細胞毒性アッセイ

中皮腫(MSTO-211H、2373、JMNおよびH2052)ならびに膵臓癌(PANC-1、MiaPaCa2、BxPC3 およびHS766T)細胞株を、ウェルあたり1 mlの培地で、12ウェルプレートに、2 x 10⁴/ウェルで播種した。インキュベーションの6時間後、細胞に、1.0、0.10、および0.01ならびに0 (コントロールウェル)のMOI(感染多重度)で、GLV-1h99もしくはGLV-1h68を感染させた。ウイルス細胞毒性は、7日間毎日測定された。細胞を、PBSで洗浄し、200 μl/ウェルの1.5% Triton X (Sigma, St. Louis, MO)で溶解し、細胞内乳酸デヒドロゲナーゼを放出させ、それを、分光光度計(EL321e, Bio-Tek Instruments)を用いて、490 nmで、Cytotox 96キット(Promega, Madison, WI)で定量した。結果は、生存細胞の割合として測定された。この割合は、各感染サンプルの測定された乳酸デヒドロゲナーゼを、非感染コントロール細胞のそれと比較することにより決定された。すべてのサンプルは、トリPLICATEで解析された。4種の中皮腫および4種の膵臓癌細胞株は、GLV-1h99 (hNET発現ウイルス) およびGLV-1h68 (hNET非含有ウイルス)に曝露した後の溶解性細胞毒性を証明した。同様の細胞毒性は、1.0のMOIでのGLV-1h99およびGLV-1h68で観察され、用量依存的溶解効果がまた、0.01から1.00の範囲のm.o.i.について証明された。0.1のMOIで、MSTO-211HおよびH2052中皮腫細胞のすべて、ならびにPANC1膵臓癌細胞の80%が7日目に死んだ。腫瘍崩壊は、MSTO-211H細胞における、よりS字状である溶解時間プロファイルと比較して、PANC1で、経時的に徐々に現れた。中皮腫細胞株JMNおよび膵臓癌細胞株HS766Tは、細胞死に対してより耐性であった(1.0のMOIで、7日目までに80%の細胞死)。MiaPaCa2およびBxPC3 (膵臓癌細胞株)およびH2373 (中皮腫細胞株)は、より高い10のMOIで、ウイルスに対して感受性があった。

【 0 3 9 8 】

C. hNET発現のイムノプロット解析

細胞でのhNETタンパク質発現のレベルを評価するために、60 mmディッシュ中のCV-1細胞に、約10のm.o.iでGLV-1h68またはGLV-1h99を感染させた。感染の約2日後、細胞を収集し、RIPAバッファー(10 mM Tris、pH 7.4、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% SDS、1% Triton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウムおよびプロテイナーゼ阻害剤カクテル)で可溶化した。細胞ライセートを4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen)で分離し、タンパク質をPVD F膜(Amersham Biosciences)にトランスファーした。膜を、約1:500に希釈した抗hNETモノクローナル抗体(NET17-1, Mab Technologies, Stone Mountain, CA)と共にインキュベートし、WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit (Invitrogen)を用いて検出した。GLV-1h99感染細胞は、hNETタンパク質を発現したが、偽感染もしくはGLV-1h68で感染させた細胞は、発現しなかった。5つの主要なバンド(35、47、50、65、73 k Da)がGLV-1h99感染CV-1細胞で検出された。

【 0 3 9 9 】

分離実験において、細胞毒性アッセイに基づき最も感受性のある2種の中皮腫細胞株(MSTO-211HおよびH2052)ならびに最も感受性のある膵臓癌細胞株(PANC1)を、イムノプロット解析のために選択し、内因性hNET発現神経芽細胞腫細胞株であるSK-N-SHと比較した。hNETタンパク質発現は、1.0のMOIで、GLV-1h99またはGLV-1h68ウイルスで感染させた細胞に

10

20

30

40

50

において、感染の12、24、48および72時間後に評価された。hNETに対する精製マウス抗体(N ET17-1, Mab Tech Inc. GA, USA)を、1:500の最終希釈で使用し、4 で12時間、インキュベートした。二次抗体(ペルオキシダーゼ共役抗マウスIgG (Vector labs Inc., CA, USA)曝露は、1:2000希釈で1時間、行われた。ペルオキシダーゼ結合タンパク質バンドは、ECL法(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)を用いて視覚化した。

【 0 4 0 0 】

~ 80-kD hNETバンドに加えて、2つの低分子量免疫反応性バンド(各々、~ 50-55 kDおよび~ 37-40 kD)が、GLV-1h99感染細胞のプロットで見られ; これらのバンドは、SK-N-SH神経芽細胞腫細胞のプロットでは、ほとんど見られない。細胞毒性アッセイと同様に、異なるMOI(0.1、1.0、5および10)でのhNETのウイルス用量依存的発現が存在した。強いhNET発現は、3つの細胞株すべてで、GLV-1h99ウイルス感染の12時間後に見出され、24時間でピークになり、その後、72時間にわたって徐々に減少した。hNET発現の同様のパターンは、他の細胞株でも観察されたが、hNETイムノプロットバンドは、あまり強くなかった。内因性hNETを発現する神経芽細胞腫細胞株(SK-N-SH)は、イムノプロット解析および放射性トレーサー取り込み試験についてポジティブコントロールとして使用され; hNET発現を示さないGLV-1h68ウイルス感染(hNET非含有ウイルス)および非感染中皮腫および膵臓癌細胞株は、ネガティブコントロールとして使用された。

【 0 4 0 1 】

D. インビトロ放射性トレーサー取り込みアッセイ

[¹²³I]MIBG 放射性トレーサー取り込み試験は、以前に記載された方法(Che J et al. (2005) Mol Imaging 4:128-36)を用いて、1.0のMOIでのウイルス(GLV-1h99またはGLV-1h68)で、および神経芽細胞腫細胞株であるSK-N-SHで感染させた後のMSTO-211hおよびPANC1細胞で行われた。これらの試験のために、臨床グレード[¹²³I]MIBGを、MDS Nordion (Canada)から入手した。平均的な放射化学的純度は、製造供給元によると、97%超であり(Sep Pakカートリッジ法を用いて、MDS Nordionにより決定された)、~ 320 MBq/μmol (8.7 mCi/μmol)の特異的活性であった。[¹²⁴I]MIBGは、報告された求核性同位体置換法(Eersels J et al. (2005) J Labelled Compds Radiopharm 48:241-57)をわずかに修飾したもの、およびその後、以前に報告された手順(Moroz MA, et al. (2007) J Nucl Med 48:827-36)を用いて製造した。放射化学的純度は、>80%の全収量で>95%であり、18.5 ± 5.2 MBq/μmol (0.5 ± 0.14 mCi/μmol)の特異的活性であった。[¹²³I]-および[¹²⁴I]-標識化合物についての最大特異的活性(担体無添加合成)は、2つの同位体の崩壊速度が7.4倍異なるために、各々8.9および1.2 TBq/μmol (241および33 Ci/μmol)であった。

【 0 4 0 2 】

取り込みアッセイのために、細胞を、6ウェルプレートに、2 ml/ウェルの培地中、1 × 10⁶/ウェルで播種した。6時間のインキュベーション後、細胞に、1.0および0 (コントロールウェル)のMOIで、GLV-1h68またはGLV1h99を感染させた。37 °Cおよび5% CO₂で、ウイルスと共に12、24、48および72時間インキュベーションさせた後、培地を吸引し、細胞をPBS (pH 7.4)で洗浄した。[¹²³I]MIBG取り込みは、0.0185 MBq/ml (0.5 μCi/ml)の無担体[¹²³I]MIBGを含む2 mlのDMEの添加により開始した。細胞を60分間のインキュベーション後に収集し、細胞ペレット対培地活性比(cpm/gm /ペレット/cpm/ml /培地)を、計数器(Packard, United Technologies)でアッセイした放射能測定から計算した。すべての試験は、トリプリケートで行われた。対応のない両側t検定(two-tailed unpaired t-test)を、MS Office 2003 Excel 11.0統計パッケージ(Microsoft, Redmond, Washington, USA)を用いて、値間の差異の有意差を決定するために適用した。

【 0 4 0 3 】

非感染MSTO-211HおよびPANC1細胞での[¹²³I]MIBG蓄積は、低かった。GLV-1h68 (hNET非含有ウイルス、ネガティブコントロール)で感染させた細胞の24時間後の放射性トレーサー取り込みにおいて、有意な増加は見られなかった。対照的に、GLV-1h99で感染させた場合、すべての時間点(12、24、48および72時間)において、癌細胞株の両方で、[¹²³I]MIBG蓄積の有意な増加(p < 0.01)が見られた。ピークの放射性トレーサー取り込みは、両細胞

株で、ウイルス感染の48時間後に観察された。天然のhNET発現神経芽細胞腫細胞株(SK-N-SH)を、ポジティブコントロールとして使用した。 $[^{123}\text{I}]$ MIBG取り込みアッセイでの全細胞タンパク質は、非感染細胞と比較して、GLV-1h99感染の最初の24時間では変化が見られなかった。ウイルス感染の48および72時間後、測定した細胞タンパク質の減少が見られた。

【0404】

実施例3

GLV-1h99感染腫瘍細胞による $[^{123}\text{I}]$ MIBG 取り込みのインビボ動物モデル試験

A. 悪性胸膜中皮腫異種移植片モデル

無胸腺nu/nu雌マウスを、National Cancer Institute (NCI, MD)から購入し、5匹/ケージで飼育し、腫瘍細胞移植前1週間の間、MSKCC Vivariumで、餌および水を自由に与えた。すべての動物試験は、the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), the Research Animal Resource Center (RARC) of MSKCCおよびthe National Institutes of Health (NIH) "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" の適用され得るすべての政策、手順および規則の必要性を順守して行われた。すべての動物手順は、2%イソフルレンの吸入により誘導される麻酔下で行われた。試験の後、すべての動物は、 CO_2 窒息により安楽死させた。

10

【0405】

長さ3から5 mmの切開を、右胸の第4から第5肋骨部にかけて行った。それにより、内在する膨張および収縮を行う肺が、薄い筋膜を介して容易に視覚化された。ゆっくりと、100 μL のMSTO-211H 悪性中皮腫細胞懸濁液(5×10^6 細胞)を注入した。注入後、外科用ステープルで皮膚を閉じ、マウスをケージに戻した。

20

【0406】

胸腔内への腫瘍細胞注入の10日後、ウイルスを用いた胸膜内処理が、上記したとおり、同様の方法で行われた。GLV-1h99またはGLV-1h68 (1×10^7 pfu)を、100 μL のPBSで投与し、動物を、穏やかに左右に揺らし、胸腔内でウイルスを分布させるのを補助した。コントロール動物(非ウイルス)には、100 μL のPBSのみを投与した。

【0407】

B. $[^{123}\text{I}]$ MIBG ガンマカメラインビボ画像化

各動物を、GLV-1h99胸膜内投与の48もしくは72時間後、 ~ 18.5 MBq (500 μCi)の $[^{123}\text{I}]$ MIBGで静脈内投与した。連続PET画像化は、X-SPECT (商標)専用の小動物ガンマカメラSPECT-CTスキャナー (Gamma Medica, Northridge, CA)を用いて、放射性トレーサー投与の1から48時間後に行われた。143-175 keVの光ピークエネルギーウィンドウおよび低エネルギー高解像度(LEHR)平行ホール照準器を、 $[^{123}\text{I}]$ MIBG投与の2時間後、10分間の $[^{123}\text{I}]$ 画像を得るために使用した。

30

【0408】

X-SPECT (商標)ガンマカメラ系は、126-154 keVの光ピークエネルギーウィンドウおよびLEHR照準器を用いて、独立して測定される濃度(MBq/ml)のテクニチウム-99mで充たされたマウスサイズ(30-ml)シリンダーを画像化することにより較正された。生じた $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 画像をIntefileにエクスポートし、次いで、ASIPro (商標) (Siemens Pre-clinical Solutions, Knoxville, TN)画像加工ソフトウェア環境にインポートした。関心領域(ROI)解析により、系較正係数(cpm/pixel/MBq/ml)が誘導された。動物画像を、同様に、Intefileにエクスポートし、次いで、ASIPro (商標)にインポートし、上記の較正係数、投与活性、画像化の投与後の時間、および画像化の持続に基づき、グラムあたり注入された用量の減衰補正割合(%ID/gm)の観点でパラメーター化した。上記解析から暗示されることは、 $[^{123}\text{I}]$ および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ について、X-SPECT (商標)ガンマカメラ系の感受性が比較可能であることの合理的な想定である。

40

【0409】

C. $[^{124}\text{I}]$ MIBG microPETインビボ画像化

5個体の動物群(胸腔内へのMSTO-211H腫瘍細胞点滴の10日後)において、各動物を、9.25

50

MBq (250 μ Ci)の ^{18}F FDGで、尾静脈投与により注入した。臨床グレード ^{18}F FDGは、IBA Molecular (Somerset, NJ)から入手し、 >41 MBq/ μ mol (>11 mCi/ μ mol)の特異的活性および $>98\%$ の放射化学的純度であった。 ^{18}F FDG PETスキューニングは、10分間のリストモード収集を用いて、トレーサーの投与の1時間後に行われた。動物を、トレーサー投与の12時間前に絶食させ、FDG注入および画像化の間、麻酔を維持した。

【0410】

16個体の動物群において、各々3-5個体の動物の4つのサブグループを試験した(サブグループ1および2には5個体; サブグループ3および4には3個体)。各動物を、9.25 MBq (250 μ Ci)の ^{124}I MIBGで尾静脈投与により注入したサブグループ1および2の動物に、 ^{124}I MIBG投与の48および72時間前に、GLV-1h99 48を注入した。サブグループ3の動物に、放射性トレーサー投与の48時間前に、GLV-1h68を投与し、サブグループ4の動物には、ウイルスを投与せず、100 μ lのPBSのみを投与した。ヨウ化カリウムを、甲状腺による放射性ヨウ素の取り込みを妨害するために使用した。 ^{124}I MIBG PETは、トレーサー投与の1、2、および4時間後に10分間、12時間後に15分間、24時間後に30分間、および48時間後に60分間、行われた。トレーサー投与の後、画像化時間点の間、動物を起きている状態にし、通常の管理を維持した。

【0411】

画像化は、Focus 120 microPET^(商標)専用の小動物PETスキャナー(Concorde Microsystems Inc, Knoxville, TN)を用いて行われた。三次元(3D)リストモードデータを、 ^{18}F について350-700 keVおよび ^{124}I について410-580 keVのエネルギーウィンドウ、ならびに6 nsの同時計時ウィンドウ(coincidence timing window)を用いて得た。次いで、これらのデータを、Fourier re-binningにより、二次元(2D)ヒストグラムに分類した。画像化データは、(a) 統一シリンダー起源に基づく標準化を用いた、スキャナー応答の非統一性、(b) 単一計測速度(singles count rate)に基づく全補正を用いた、不感時間計測ロス、(c) 投与時間に対する物理的減衰、および(d) ^{124}I 分岐比について補正された。再構築画像における計測速度は、 ^{18}F の統一水溶液で充たされたマウスサイズファントムの画像化に由来する較正係数系(MBq/ml / cps/voxel)を用いて、活性濃度(注入量%/組織(g)、%ID/g)に変換された。

【0412】

画像解析は、ASIPro^(商標)(Siemens Pre-clinical Solutions, Knoxville, TN)を用いて行われた。ROIは、腫瘍、肺、肝臓および骨格筋に関して、手動で導かれた。各組織および投与後の時間点について、測定された放射能を、%ID/gとして示した。最大値を各組織について記録し、次いで、肺、肝臓および骨格筋についての腫瘍対器官比を計算した。対応のない両側t検定を、MS Office 2003 Excel 11.0統計パッケージ(Microsoft, Redmond, Washington, USA)を用いて、値間の差異の有意差を決定するために適用した。

【0413】

D. インビボ画像化結果

腫瘍放射能値(%ID/g)を測定し、腫瘍対器官比を計算した。胸膜腫瘍での最大レベルの放射能は、GLV-1h99 (hNET発現ウイルス)の投与の48時間後、次いで、 ^{124}I MIBG投与の72時間前にGLV-1h99 72hを投与した腫瘍で見出された。低いレベルの放射能は、GLV-1h68 (hNET非含有ウイルス)を投与した腫瘍およびウイルスを投与していない腫瘍で観察された。胸膜腫瘍および遠位の器官(バックグラウンド)での最大活性は、最初の測定時間点である放射性トレーサーの投与後1時間で観察された。腫瘍および遠位の器官での活性は、動物の4群すべてで、時間と共に(1から72時間)減少した。腫瘍活性の減少は、2つのコントロール群、すなわち、GLV-1h68 (hNET非含有ウイルス)もしくは非ウイルスを投与した腫瘍で、 ^{124}I MIBG投与の最初の12時間でより迅速であった。

【0414】

腫瘍対器官(肺、肝臓、筋肉)比を、PET画像データから計算し、最大の値は、放射性トレーサー投与の48時間前にGLV-1h99 (hNET発現ウイルス)を投与した動物群で得られた。 ^{124}I MIBG投与の48時間前にGLV-1h99で処理した動物とウイルスを投与していない動物を

比較すると、比率の差異は、2時間の画像時間点でかなりの有意差があり($p < 0.01$)、1時間の画像時間点で有意であった($p < 0.05$)。ほぼ同じ腫瘍対器官比が動物の2つのコントロール群について見出され、腫瘍対器官比は、時間と共に減少した。

【0415】

腫瘍への局在化および臨床的に使用される画像化技術との比較について、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ PET画像化がまた、行われた。 $[^{124}\text{I}]\text{MIBG}$ PETおよび $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ PET画像化を比較した。胸膜腫瘍は、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ PET画像化により視覚化されたが、GLV-1h99ウイルス(hNET発現ウイルス)投与の48および72時間後での画像コントラストは、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ PETと比較して、 $[^{124}\text{I}]\text{MIBG}$ PETでより鮮明であった。コントロール動物での $[^{124}\text{I}]\text{MIBG}$ および $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 腫瘍対肺、腫瘍対肝臓および腫瘍対筋肉比は同様であった。

10

【0416】

GLV-1h99 (hNET-expressing)ウイルス投与後の胸膜腫瘍におけるインビボhNET発現はまた、上記したとおりの $[^{123}\text{I}]\text{MIBG}$ 平面シンチグラフィにより画像化された。すべてのGLV-1h99投与動物は、ウイルスを投与されていないコントロール動物と比較して、ウイルス投与胸膜腫瘍への $[^{123}\text{I}]\text{MIBG}$ 放射能の局在的蓄積を示した。GLV-1h99感染動物について、腫瘍対バックグラウンド比(2.4 ± 0.2)は、ウイルスを投与されていない群(1.5 ± 0.1)と比較して、有意に高かった($p < 0.01$)。

【0417】

E. 免疫組織化学

各々の最終画像が取得された後、動物を安楽死させ、腫瘍を収集し、Tissue-Tek Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) Compound (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA)で凍結した。組織を、5- μm の分厚い切片に切断し、スライドグラスに載せた。以前記載されたとおり(Kelly K, et al. (2008) FASEB J 22:1839-48)、低温切開片を固定し、5 mmol/l $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、5 mmol/l $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、および2 mmol/l MgCl_2 の鉄溶液中、ヘマトキシリンおよびエオシン(H & E)ならびに5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-B-D-ガラクトピラノシド(X-gal; 1 mg/ml)で染色し、ウイルス仲介lacZ発現を同定した。

20

【0418】

すべての胸膜病変は、H & Eにおいて悪性胸膜中皮腫であることが示された。さらに、ワクシニアウイルスが感染したすべての腫瘍は、lacZについてポジティブに染色され、このことは、腫瘍内におけるウイルスの存在を確認し、 $[^{124}\text{I}]\text{MIBG}$ PETまたは $[^{123}\text{I}]\text{MIBG}$ シンチグラフィにより視覚化されたすべての腫瘍が機能的hNETトランスポータータンパク質のGLV-1h99発現を反映することを示す。

30

【0419】

実施例4

インビボでの腫瘍成長におけるhNET発現ウイルスの効果

hNET発現ウイルスであるGLV-1h99は、親ウイルス株GLV-1h68に由来し、それは、単一静脈内投与(i.v.)を用いて、ヌードマウスの固形ヒト乳癌を根絶し得る(米国特許出願公開2005/0031643を参照のこと)。GLV-1h68のF14.5L遺伝子におけるRuc-GFP発現カセットを、ウイルスの抗腫瘍特性に関するhNET発現カセットで置換することの効果調べた。ヒト膵臓癌のマウス異種移植片を、試験のために使用した。

40

【0420】

PANC-1異種移植片は、 5×10^6 PANC-1細胞を、右後肢に皮下移植することにより、6-8週齢のヌードマウス(NCI:Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}, Harlan)で開発された。腫瘍成長を、デジタルキャリパー(digital caliper)を用いて、三次元で、1週間に1回、記録した。腫瘍容積を、 $[(長さ \times 幅 \times 高さ)/2]$ として計算し、 mm^3 で示した。腫瘍移植の27日後、8個体のマウスの集団に、100 μl のPBS中、GLV-1h68またはGLV-1h99を、 5×10^6 pfuの用量で、単一静脈内投与で注入した。上記したとおり、GLV-1h68で処理した腫瘍の成長は、3つの段階に分類され得る：成長、阻害、および退行(Zhang et al. (2007) Cancer Res. 67(20):10038-46)。GLV-1h99で処理した腫瘍は、GLV-1h68腫瘍と同様の成長パターンを示したが、腫瘍は、GLV-1h68処理腫瘍と比較して、GLV-1h99注入マウスについて1週間

50

早く退行し始めた。腫瘍は、GLV-1h99マウスについて、ウイルスの投与の13日後に退行し始めたが、GLV-1h68マウスは、ウイルス投与の21日後まで、腫瘍退行を示さなかった。最初の腫瘍退行の程度はまた、GLV-199注入マウスでわずかに早かった(faste)。腫瘍のほとんど完全な根絶は、ウイルス投与の約53-57日後で観察された。hNETの発現は、ワクシニアウイルスウイルス療法において、ネガティブな効果を全く示さなかった。GLV-1h99による加速した腫瘍退行は、GLV-1h68と比較して、組織培養での促進されたウイルス複製と一致する。同様の結果はまた、GLV-1h68およびGLV-1h99で処理されたヒト乳癌(GI-101A)異種移植片ヌードマウスモデルで観察された。マウスで、皮下投与(s.c)乳癌を開発するために、 5×10^6 cells/0.1 ml/マウスの用量で、ヒト乳癌GI-101A細胞(Rumbaugh-Goodwin Institute for Cancer Research Inc. Plantation, FL; 米国特許第5,693,533号)を、6-8週齢の雌無胸腺マウスの右後肢に皮下投与した。GI-101A細胞移植の31日後に、平均腫瘍サイズが約500 mm³になったとき、 10^7 PFU/マウスの用量で、GLV-1h68およびGLV-1h99ウイルスを、大腿静脈に静脈内投与した。GLV-1h99ウイルスについての腫瘍退行は、約24日で観察されたが、GLV-1h68は、この実験で30日後まで、腫瘍退行を示さなかった。GLV-1h68ウイルスについて以前に公開された結果は、ウイルスの尾静脈もしくは大腿静脈投与により、GLV-1h68がより早い(約25日)GI101A腫瘍の腫瘍退行を生じることを示したが(Zhang et al. (2007) Cancer Res. 67(20):10038-46を参照のこと)、特定の実験において、GLV-1h99ウイルスとの比較はなされていなかった。GLV-1h68と比較して、すべてのGLV-1h99は、両異種移植片モデルにおいて、より早い腫瘍退行を示した。

10

【0421】

20

実施例5

GLV-1h99ウイルスにおける毒性試験

GLV-1h99ウイルスの静脈内投与後の体重変化の割合が、免疫応答性動物動物で調べられた。C57BL/6雌マウスが、 1×10^7 pfuもしくは 1×10^8 pfuのGLV-1h68もしくはGLV-1h99ウイルスで静脈内投与された。体重が1週間に1回モニタリングされ、時間にわたる体重割合として計算された。GLV-1h68もしくはGLV-1h99ウイルスは、試験されるウイルスの用量について、試験の間に体重の減少を全く生じなかった。すべてのマウスは、60日間にわたって、同等の体重の増加を示し、GLV-1h68感染マウスは、わずかに高い体重の増加を示し、これは、ウイルスのより遅い複製速度を反映しているものと考えられる。

【0422】

30

修飾は当業者にとって明らかであるので、本発明は、添付の特許請求の範囲によるのみ限定されることを意図する。

【配列表】

0005213075000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 51/00	(2006.01)	A 6 1 K 49/02	A
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100101454

弁理士 山田 卓二

(74)代理人 100067035

弁理士 岩崎 光隆

(74)代理人 100144923

弁理士 中川 将之

(74)代理人 100156144

弁理士 落合 康

(72)発明者 アラダル・エイ・サライ

アメリカ合衆国 9 2 3 4 6 カリフォルニア州ハイランド、ノース・フォーク・ロード 7 7 0 4 番

(72)発明者 ユマン・フォン

アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州ニューヨーク、アパートメント・ナンバー 4 ビー、イースト・シックスティエイイス・ストリート 3 4 5 番

(72)発明者 チェン・ナンハイ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州サンディエゴ、バックウィート・ストリート 9 1 6 7 番

(72)発明者 ジャン・キアン

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州サンディエゴ、ユニット・ビー、イースト・カミノ・レアル 1 2 6 0 1 番

(72)発明者 ユ・ヨン・エイ

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州サンディエゴ、ユニット 4 2 2、エリジャー・コート 3 8 3 0 番

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 4 7 4 5 8 (W O , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 9 3 8 3 2 (U S , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 0 4 1 9 1 (U S , A 1)

The Journal of Nuclear Medicine , 2 0 0 7 年 5 月 , Vol.48, No.5 , p.827-836

Hepatology , 2 0 0 6 年 , Vol.44, No.6 , p.1465-1477

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 6 8

C A / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

J S T P l u s (J D r e a m I I)

P u b M e d