

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-521398
(P2005-521398A)

(43) 公表日 平成17年7月21日(2005.7.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B 0 6 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	B
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 101 頁)		

(21) 出願番号 特願2003-579743 (P2003-579743)
 (86) (22) 出願日 平成15年3月26日 (2003. 3. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年11月22日 (2004. 11. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/009287
 (87) 国際公開番号 W02003/082200
 (87) 国際公開日 平成15年10月9日 (2003. 10. 9)
 (31) 優先権主張番号 60/367, 788
 (32) 優先日 平成14年3月27日 (2002. 3. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/410, 024
 (32) 優先日 平成14年9月11日 (2002. 9. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

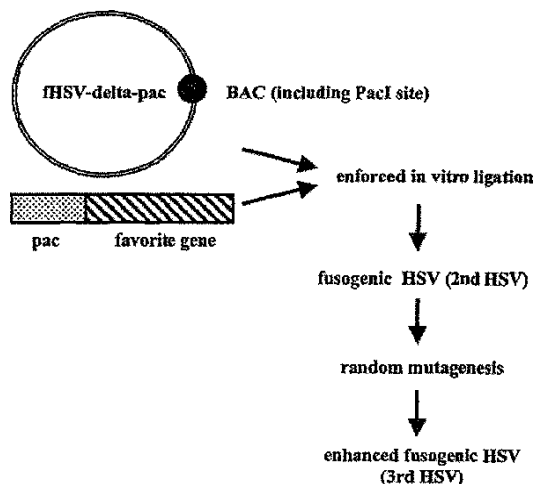
(71) 出願人 391058060
 ベイラー カレッジ オブ メディシン
 BAYLOR COLLEGE OF M
 EDICINE
 アメリカ合衆国, テキサス 77030,
 ヒューストン, ワン ベイラー プラザ
 (番地なし)
 (74) 代理人 100092266
 弁理士 鈴木 崇生
 (74) 代理人 100104422
 弁理士 梶崎 弘一
 (74) 代理人 100105717
 弁理士 尾崎 雄三
 (74) 代理人 100104101
 弁理士 谷口 俊彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌治療用の強力な腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス

(57) 【要約】

本発明の対象は、複数の細胞膜融合機構を持ち、好ましくは例えば悪性細胞などでの効果的な条件付き複製用に絶対後期ウイルスプロモーターを含んでいる、腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスである。具体的な実施形態では、前記細胞膜融合機構は、ランダム突然変異誘発によって作製された突然変異型ウイルスまたは膜融合性膜糖タンパク質の挿入によって作製された突然変異型ウイルスに由来するものであり、またさらなる具体的実施形態では、前記絶対後期ウイルスプロモーターUL38pが前記糖タンパク質の発現を調節する。



- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
第1細胞膜融合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性とを持つベクターを含む組成物。
- 【請求項 2】
上記ベクターが単純ヘルペスウイルスベクターである、請求項1の組成物。
- 【請求項 3】
上記HSVベクターが条件付き複製可能型である、請求項2の組成物。
- 【請求項 4】
条件付き複製可能型が、絶対後期ウイルスプロモーターを含むベクターと定義される、請求項3の組成物。 10
- 【請求項 5】
上記第1細胞膜融合惹起活性、上記第2細胞膜融合惹起活性、またはその両方が突然変異を含み、前記突然変異が、上記ベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に、前記細胞膜融合惹起活性を付与する、請求項1の組成物。
- 【請求項 6】
上記第1細胞膜融合惹起活性、上記第2細胞膜融合惹起活性、またはその両方が、膜融合性ポリペプチドをコードする核酸配列を含む、請求項1の組成物。
- 【請求項 7】
上記膜融合性ポリペプチドがさらに膜糖タンパク質と定義される、請求項6の組成物。
- 【請求項 8】
上記膜糖タンパク質が、パラミクソウイルスFタンパク質、HIV gp160タンパク質、SIV gp160タンパク質、レトロウイルスEnvタンパク質、エボラウイルスGp、またはインフルエンザウイルス赤血球凝集素である、請求項7の組成物。 20
- 【請求項 9】
上記糖タンパク質が、テナガザル白血病ウイルス（GALV）由来の膜糖タンパク質である、請求項7の組成物。
- 【請求項 10】
上記糖タンパク質が、C末端切断型のテナガザル白血病ウイルスエンベロープ糖タンパク質（GALV.fus）である、請求項7の組成物。
- 【請求項 11】
上記核酸配列の発現が、絶対後期ウイルスプロモーターによって制御される、請求項6の組成物。 30
- 【請求項 12】
上記絶対後期ウイルスプロモーターが、HSVのUL38またはUs11のプロモーターである、請求項11の組成物。
- 【請求項 13】
医薬的に許容できる賦形剤をさらに含む、請求項1の組成物。
- 【請求項 14】
第1細胞と第2細胞との融合を惹起する方法であって、第1細胞膜融合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性とを持つベクターを前記第1細胞に導入することによって、第2細胞膜を第1細胞膜と融合させるステップを含む方法。 40
- 【請求項 15】
上記第1細胞、上記第2細胞、または上記第1細胞と上記第2細胞の両方が、悪性細胞である、請求項14の方法。
- 【請求項 16】
上記悪性細胞が固形腫瘍内にある、請求項15の方法。
- 【請求項 17】
上記悪性細胞がヒトの体内にある、請求項15の方法。
- 【請求項 18】
上記導入ステップが、さらに、上記ベクターを上記ヒトに送達することと定義される、 50

請求項17の方法。

【請求項19】

上記送達ステップが、さらに、上記ベクターを上記ヒトに全身送達することと定義される、請求項18の方法。

【請求項20】

上記ヒトへの上記全身送達が、さらに、上記ベクターを上記ヒトに静脈内送達することと定義される、請求項19の方法。

【請求項21】

上記ステップが複数の細胞で繰り返される、請求項14の方法。

【請求項22】

上記ベクターが条件付き複製可能型単純ヘルペスウイルスベクターである、請求項14の方法。

【請求項23】

上記第1細胞膜融合惹起活性、上記第2細胞膜融合惹起活性、またはその両方が突然変異を含み、前記突然変異が、上記ベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に、前記細胞膜融合惹起活性を付与する、請求項14の方法。

【請求項24】

上記第1細胞膜融合惹起活性、上記第2細胞膜融合惹起活性、またはその両方が、膜融合性ポリペプチドをコードする核酸配列を含む、請求項14の方法。

【請求項25】

上記核酸配列の発現が、絶対後期ウイルスプロモーターによって調節される、請求項24の方法。

【請求項26】

上記絶対後期ウイルスプロモーターが、HSVのUL38またはUs11のプロモーターである、請求項25の方法。

【請求項27】

上記方法が、上記ベクターが存在しない場合と比較して腫瘍抗原提示を強化するステップをさらに含む、請求項17の方法。

【請求項28】

上記腫瘍抗原提示の強化が、上記腫瘍抗原提示の強化が存在しない場合と比較して、抗腫瘍免疫を向上させる、請求項27の方法。

【請求項29】

悪性細胞を破壊する方法であって、第1細胞膜融合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性とを持つベクターを上記細胞に導入するステップを含み、前記導入後に、前記悪性細胞の膜が別の細胞膜と融合する方法。

【請求項30】

上記悪性細胞がヒトの体内にある、請求項27の方法。

【請求項31】

上記導入ステップが、さらに、少なくとも約 1×10^9 プラーク形成単位(pfu)の上記ベクターを上記ヒトに投与することと定義される、請求項28の方法。

【請求項32】

上記方法が、上記ヒトに付加的癌治療を施すことをさらに含む、請求項28の方法。

【請求項33】

上記付加的癌治療が、化学治療、放射線、外科手術、免疫治療、遺伝子治療、またはそれらの組合せである、請求項30の方法。

【請求項34】

上記方法が、上記ベクターが存在しない場合と比較して、腫瘍抗原提示を強化するステップをさらに含む、請求項30の方法。

【請求項35】

上記腫瘍抗原提示の強化が、上記腫瘍抗原提示の強化が存在しない場合と比較して、抗

10

20

30

40

50

腫瘍免疫を向上させる、請求項34の方法。

【請求項36】

腫瘍溶解性ウイルスを含む組成物であって、前記ウイルスが絶対後期ウイルスプロモーターを含む組成物。

【請求項37】

上記ウイルスが、さらに、腫瘍特異的であると定義される、請求項32の組成物。

【請求項38】

細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターの作製方法であって、非細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターに突然変異（この突然変異は前記ベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に細胞膜融合惹起活性を付与する）を導入するステップ、および

細胞膜融合惹起ポリペプチドをコードする核酸配列を上記ベクターに組み込むステップ、を含む方法。

【請求項39】

ベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に細胞膜融合惹起活性を付与する突然変異と、

GALV.fusをコードする核酸配列、とを持っている単純ヘルペスウイルスベクターを含む組成物。

【請求項40】

悪性細胞を破壊する方法であって、腫瘍溶解性ウイルスを含む組成物を前記細胞に導入することを含み、前記ウイルスが絶対後期ウイルスプロモーターを含んでいる方法。

【請求項41】

請求項1の組成物を含む哺乳類細胞。

【請求項42】

請求項35の組成物を含む哺乳類細胞。

【請求項43】

第1細胞膜融合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性とを持つベクターであって、前記ベクターの核酸配列中に突然変異（この突然変異は前記ベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に前記細胞膜融合惹起活性を付与する）を生成させるステップ、細胞膜融合惹起活性を持つ遺伝子産物をコードする核酸配列を前記ベクター中に組み込むステップ、またはその両ステップのうち、少なくとも1つを含む方法によって得ることができるベクター。

【請求項44】

上記組み込みステップが、さらに、単純ヘルペスウイルスゲノム（この単純ヘルペスウイルスは非感染性である）を含む第1ポリヌクレオチドを用意すること、細胞膜融合惹起活性を持つ少なくとも1つの遺伝子産物をコードする核酸配列と、機能的なパッケージングシグナルを含む遺伝子産物をコードする少なくとも1つの核酸配列とを含む第2ポリヌクレオチドを用意すること、および細胞膜融合惹起活性を持つ遺伝子産物をコードする上記核酸配列と、機能的パッケージングシグナルを含む遺伝子産物をコードする上記核酸配列とを、上記第1ポリヌクレオチドに組み込むことと定義され、この組み込みステップにより、感染性単純ヘルペスウイルスが生成する、請求項39のベクター。

【請求項45】

細胞膜融合惹起活性を持つ遺伝子産物をコードする上記核酸配列と、機能的パッケージングシグナルを含む遺伝子産物をコードする上記核酸配列とを、上記第1ポリヌクレオチドに組み込む上記のステップが、さらに、上記第1ポリヌクレオチドと上記第2ポリヌクレオチドを一つに混合して混合物を形成させ、その混合物を細胞に導入し、そして上記細胞の溶解をアッセイすることと定義される、請求項40のベクター。

【請求項46】

上記第1ポリヌクレオチドが細菌人工染色体上に用意される、請求項40のベクター。

【請求項47】

10

20

30

40

50

上記第1ポリヌクレオチドの単純ヘルペスウイルスが、34.5の欠失、1コピー以上のp acの欠失、またはその組合せを含む、請求項40のベクター。

【請求項48】

上記感染性単純ヘルペスウイルスが複製選択的である、請求項40のベクター。

【請求項49】

上記第2ポリヌクレオチドがプラスミド上に用意される、請求項40のベクター。

【請求項50】

細胞膜融合惹起活性を持つ少なくとも1つの遺伝子産物をコードする上記核酸配列の発現が、CMV前初期プロモーターによって調節される、請求項40のベクター。

【請求項51】

第1細胞膜融合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性とを持つベクターを作製する方法であって、前記ベクターの核酸配列中に突然変異（この突然変異は前記ベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に前記細胞膜融合惹起活性を付与する）を生成させるステップ、細胞膜融合惹起活性を持つ遺伝子産物をコードする核酸配列を前記ベクター中に組み込むステップ、またはその両ステップのうち、少なくとも1つを含む方法。

【請求項52】

前記組み込みステップが、さらに、単純ヘルペスウイルスゲノム（この単純ヘルペスウイルスは非感染性である）を含む第1ポリヌクレオチドを用意すること、細胞膜融合惹起活性を持つ少なくとも1つの遺伝子産物をコードする核酸配列と、機能的なパッケージングシグナルを含む遺伝子産物をコードする少なくとも1つの核酸配列とを含む第2ポリヌクレオチドを用意すること、および細胞膜融合惹起活性を持つ遺伝子産物をコードする前記核酸配列と、機能的パッケージングシグナルを含む遺伝子産物をコードする前記核酸配列とを、前記第1ポリヌクレオチドに組み込むことと定義され、この組み込みステップにより、感染性単純ヘルペスウイルスが生成する、請求項47の方法。

【請求項53】

請求項47の方法によって得られるベクター。

【請求項54】

悪性細胞を持っている個体における腫瘍抗原提示を増加させる方法であって、第1細胞膜融合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性とを持つベクターを前記個体に与えるステップを含む方法。

【請求項55】

上記腫瘍抗原提示の増加が、上記腫瘍抗原提示の増加が存在しない場合と比較して、上記個体における抗腫瘍免疫を向上させる、請求項54の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、米国仮特許出願第60/367,788号（2002年3月27日出願）および第60/410,024号（2002年9月11日出願）に基づく優先権を主張し、これらの仮特許出願は参照により本明細書にそのまま組み込まれるものとする。

【0002】

本発明の少なくとも一部は、NIH助成金番号CA58204として米国政府から提供された資金を使って開発された。米国政府は本発明に一定の権利をもちうる。

【0003】

本発明はウイルス学、癌生物学および医学の分野を対象とする。具体的に述べると、本発明は、ウイルス感染および細胞膜融合機構を利用した腫瘍溶解性ベクターに関わる組成物および方法に関する。より具体的に述べると、複数の膜融合機構を持つ単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターを利用し、一部の実施形態では、前記ベクターがさらに絶対後期（strict late）ウイルスプロモーターを含んでいる。

【背景技術】

【0004】

10

20

30

40

50

複製選択的腫瘍溶解性ウイルスは固形腫瘍用の抗腫瘍剤として大いに有望視されている。これらのウイルスは、遺伝的に、腫瘍細胞内で優先的に複製することができ、正常細胞ではその複製能が制限されるように構築されている。腫瘍溶解性ウイルスの基本的抗腫瘍機序は、それらが増殖して最初に感染した腫瘍細胞から周囲の腫瘍細胞に拡大することで、より大きな分布容積および抗癌効果をもたらす際の、直接的な細胞変性効果によるものである。腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス (HSV) は、最初は脳腫瘍を処置するために設計され構築された (Andreanskyら, 1996)。その後、これらのウイルスは、乳癌 (Todaら, 1998)、前立腺癌 (Walkerら, 1999)、肺癌 (Toyoizumiら, 1999)、卵巣癌 (Coukosら, 1999)、大腸癌および肝癌 (Carrollら, 1996、Pawlikら, 2000) を含む様々な他のヒト固形癌にも有効であることが見いだされた。腫瘍溶解性HSVの安全性も、HSV感染を極めて起こしやすい (Todoら, 2000) マウス (Sundaresanら, 2000) および霊長類 (ヨザル) で、詳細に調べられている。これらの研究により、腫瘍溶解性HSVはインビボ投与に関して極めて安全であることが確認されている。

【0005】

これらの有望な前臨床研究にもかかわらず、初期の臨床試験で得られた結果からは、現行の腫瘍溶解性ウイルスは安全ではあるものの、単独では限られた抗腫瘍活性しか持ちえないことが示唆されている (Markertら, 2000、Ramplingら, 2000、Nemunaitisら, 2001)。腫瘍溶解有効性が最大にならない主な理由の1つは、おそらく、腫瘍選択性を付与するウイルス遺伝子欠失が腫瘍におけるウイルスの効力も低下させてしまうからだろう。例えば、HSVから内在性 34.5 を完全に除去することは、腫瘍溶解性HSVを構築する際の一般 20 的アプローチの一つであるが、これを行うとウイルスの複製能が著しく低下するので、標的腫瘍内で拡大するというウイルスの能力が損なわれうる (Krammら, 1997)。したがって、現行の腫瘍溶解性ウイルスの効力をさらに強化しようとする戦略は、腫瘍溶解性ウイルスが臨床的に成功する見込みを、おそらく増加させるだろう。

【0006】

最近、ある種のウイルスに由来するエンベロープ膜融合性膜糖タンパク質 (FMG) は、極めて強力に腫瘍細胞を死滅させることが報告された (Batemanら, 2000)。そのようなFMGの一例は、C末端切断型のテナガザル白血病ウイルスエンベロープ糖タンパク質 (GALV.fus) である (Batemanら, 2000、Fieldingら, 2000)。この切断型FMGは野生型タンパク質の16アミノ酸Rペプチドを欠いている。このRペプチドは、通常、それがウイルス感染中 30 に切断されるまでは、エンベロープの融合を制限する役割を果たしている (Januszeskiら, 1997)。このFMGの改変により、このタンパク質は、GALVのPit-1受容体を発現させるヒト細胞への膜融合性が構成的に高くなる。様々なヒト腫瘍細胞にGALV.fusを形質導入すると、シンシチウム形成の過程を経て、細胞が効率よく死滅する (Higuchiら, 2000)。また、GALV.fusを使用すると、自殺遺伝子HSVtkまたはシトシンデアミナーゼを使用した場合と比較して、バイスタンダー殺滅効果が少なくとも1logは高い (Diazら, 2000、Higuchiら, 2000)。しかし、この遺伝子は、その潜在的な治療上の利益を実現させることができるように、制御された形で腫瘍細胞中に効率よく送達する必要があると考えられる。

【0007】

GALV.fusなどの治療遺伝子を臨床的に応用するには、それらの腫瘍選択的発現が必要である。これを達成する方法の一つは、腫瘍特異的または組織特異的転写調節要素を使って、関心の治療遺伝子の発現を制御することである。同じ組織に由来する腫瘍細胞中で選択的 40 な遺伝子発現を指示することが示されている組織特異的プロモーターはいくつかあるが (Huberら, 1991、VileおよびHart, 1993、Lathamら, 2000、Tanakaら, 2000)、普通、それらの活性は、サイトメガロウイルス前初期プロモーター (CMV-P) やレトロウイルスの末端反復配列 (LTR) (Schuurら, 19996、Kogaら, 2000、Lathamら, 2000) などの構成的ウイルスプロモーターよりもはるかに弱いため、抗腫瘍有効性に乏しい。CMVエンハンサー配列を組織特異的プロモーターの上流に付加するなどの戦略によって、プロモーター活性をかなり増加させることができる (Lathamら, 2000)。しかしこの作用は、元のプロモーターがその組織特異性を失う原因にもなる。これらの組織特異的プロモーターに関す 50

るもう一つの潜在的懸念は、ひとたびウイルスベクター中にクローニングすると、これらの組織特異的プロモーターがやはりその組織特異性を失おうとすることである (Babissら, 1987)。

【0008】

多くのDNAウイルスと同様にHSV-1の転写プログラムも、遺伝子発現がウイルスDNA合成によって初期相と後期相とに分けられる調節されたカスケードである (Wagnerら, 1995)。初期遺伝子はウイルスDNA複製に先立って転写されるが、後期遺伝子はウイルスDNA複製が起こってからでないと高レベルには発現されない。後期転写物はさらに、ウイルスゲノム複製の開始前にも容易に検出できる漏出性後期 (leaky-late) か、ウイルスDNA複製の開始後でないと確実に検出できない絶対後期 (strict late) に分類することができる (Hollandら, 1980、JohnsonおよびEverett, 1986、Flanaganら, 1991)。

10

【0009】

本発明は、一部の実施形態で、治療核酸配列 (例えばGALV.fus) を腫瘍組織中で選択的に発現させるために、絶対後期ウイルスプロモーター (例えばHSVのUL38遺伝子のプロモーター) を使用する。これは、腫瘍溶解性HSVの下で、そのような絶対後期ウイルスプロモーターは、腫瘍溶解性ウイルスが完全に複製できる腫瘍組織では極めて活性であるが、正常細胞では、それらが非分裂細胞または分裂終了細胞であるならウイルス複製が制限されるので、サイレントだからである。

【0010】

WO 01/45737は、UL44をコードする機能的に活性な野生型糖タンパク質Cポリペプチドを欠き、好ましくは新生物に対して腫瘍溶解性を持つ、突然変異型ヒト単純ヘルペスウイルスを対象としている。このウイルスは、好ましい実施形態として、その作用を受けやすい細胞へのウイルス粒子の結合または受容体を介した細胞表面への結合に欠陥を持っている。

20

【0011】

WO 98/40492は悪性疾患治療用の核酸ベクターを扱っており、このベクターは真核細胞表面でのシンシチウム誘発ポリペプチドの発現を指示する。具体的な実施形態では、シンシチウム誘発ポリペプチドがウイルス膜糖タンパク質であり、別の具体的実施形態では、核酸ベクターが欠損HSVである。

【0012】

本発明は、異なる膜融合機構を持つ条件付き複製可能型 (腫瘍溶解性) HSVを提供することにより、技術上の欠陥に対処するものである。これらには、ウイルスのランダム突然変異による膜融合性腫瘍溶解性HSVの選択、および腫瘍溶解性ウイルスへの膜融合性糖タンパク質の挿入が含まれる。ベクターが欠損性であるWO 98/40492に記載の技術とは異なり、本発明での抗腫瘍活性は、全く異なるが相補的である2つの機構 (条件付き複製可能型ウイルスベクターによる直接的なウイルス腫瘍溶解および細胞膜融合) の結果として生じ、ベクターは非欠損性であることが好ましい。WO 98/40492に記載の実施形態と比較すると、このような複合的アプローチにより、悪性疾患の処置に際して、多くの利点を得ることができる。例えば、膜融合によるシンシチウム形成は腫瘍組織における腫瘍溶解性ウイルスの拡大を促進しうるので、膜融合活性を条件付き複製可能型ウイルスベクターと組み合わせることで、相乗的抗腫瘍効果が生じる。これはウイルス抵抗性腫瘍細胞の出現も減少させるはずである。なぜなら、一方の機構 (例えばウイルス感染/複製) に対して抵抗性を生じる細胞も、他方の腫瘍破壊機構 (例えばシンシチウム形成) によって間接的に破壊されうるのである。さらに重要なことに、細胞膜融合能をもたらす機構を2つ以上用意することにより、その組成物は、例えばウイルス結合受容体のタイプが異なる細胞集団など、異なる細胞集団に対して有効になる。最後に本発明は、腫瘍細胞中で融合タンパク質を選択的に発現させ、よってその治療アプローチの臨床安全性を直接向上させる方法も提供する。WO 98/40492に例示されている融合ペプチドの無制御発現は、患者の正常組織に広範囲に及ぶ損傷をもたらす可能性がある。

30

40

【発明の開示】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、望ましくない細胞、例えば悪性細胞の治療用として、強力な腫瘍溶解性HSVを提供することにより、要望されていながら長年の間解決されていなかった技術上の課題に対処するものである。好ましい実施形態では、培養物、組織または生物から少なくとも一部の望ましくない細胞を取り除くために、または少なくとも一部の望ましくない細胞の増殖を阻害するために、または少なくとも一部の望ましい細胞の増殖を防止するために、またはそれらの組合せを達成するために、条件付き複製可能型HSVが、細胞膜融合を惹起する機構を少なくとも2つは持っている。

【0014】

腫瘍溶解性HSVに細胞膜融合能力を組み込むことにより、ウイルスの抗腫瘍効力は著しく増加しうる (FuおよびZhang, 2002、Fuら, 2002)。本発明で利用する膜融合性腫瘍溶解性HSVは、それらが細胞膜融合活性を持つ限り、どのような手段で作製してもよい。具体的な実施形態として、以下の手法の一つによってベクターを作製する：1) 確立された腫瘍溶解性HSVなどの任意のベクターから、ランダム突然変異誘発後に、シンシチウム表現型をスクリーニングする手法 (例えばFu-10などの作出に用いられた手法 (FuおよびZhang, 2002))、2) 膜融合特性を持つ遺伝子産物をコードする核酸配列をベクター中に挿入する手法 (例えばテナガザル白血病ウイルスの超膜融合性膜糖タンパク質 (GALV.fus) をコードする核酸配列を腫瘍溶解性HSVのゲノムに挿入する) (例えばSynco-2などの作出に用いられた手法 (Fuら, 2002))、および3) これら2つの膜融合機構の両方を1つの腫瘍溶解性HSVに組み込む手法 (例えばSynco-2Dなどの作出に用いられた手法)。いずれの場合も、膜融合性腫瘍溶解性HSVは、非膜融合性ウイルスと比較して、抗腫瘍活性の劇的な増加を示した。

【0015】

ある態様では、膜融合機能が得られるように突然変異を生じさせるか他のウイルス操作を行うことにより、HSVを膜融合性にする。ウイルスの抗腫瘍効力をさらに強化するには、GALV.fusなどの膜融合性ポリペプチドをコードする核酸配列を含むようにこれを操作し、かつ/または膜融合特性を付与する突然変異などの特徴を導入する。また、具体的な実施形態として、GALV.fusなどの核酸配列の腫瘍特異的な発現も有用である。ある実施形態では、腫瘍細胞における腫瘍溶解性ウイルスの複製能力に依存する活性を持つ絶対後期ウイルスプロモーターによって、腫瘍特異的な発現が起こる。これにより、GALV.fus発現は腫瘍組織だけに制限される。また、本発明の核酸配列はいずれも、絶対後期ウイルスプロモーターによって調節することができる。ある実施形態では、強制的ライゲーション法によって、そのような腫瘍溶解性HSVを構築する。これらのウイルスのインビトロでの特性解析および異種移植したヒト腫瘍でのインビボ評価について説明する。

【0016】

本発明のいくつかの実施形態では、腫瘍溶解性HSVと一緒に利用することにより、絶対後期遺伝子の転写調節要素が、強力かつ腫瘍特異的なプロモーターとして役立つ。そのような絶対後期ウイルスプロモーターは、腫瘍溶解性ウイルスが完全に複製できる腫瘍組織では極めて活性であるが、非分裂細胞または分裂終了細胞ではウイルス複製が制限されるのでサイレントである。

【0017】

詳しく特徴づけられたHSVの絶対後期遺伝子UL38のプロモーターによって駆動される分泌型アルカリホスファターゼ遺伝子 (SEAP) を持つ腫瘍溶解性HSVがある (Goodartら, 1992、GuzowskiおよびWagner, 1993、Guzowskiら, 1994)。このプロモーターは非分裂細胞では極めて低い活性を持っている。しかし、細胞周期を進行中の細胞では、溶解性HSV感染下で、その活性はCMV-Pに匹敵するレベルにまで劇的に増加する。このプロモーターカセットを含有する腫瘍溶解性HSVのインビボ投与は、強い腫瘍選択的発現特性も示した。したがって、腫瘍溶解性HSV中の絶対後期ウイルスプロモーターは、強い腫瘍選択的プロモーターとして機能することができる。

10

20

30

40

50

【0018】

本発明の別の実施形態では、絶対後期ウイルスプロモーターを、腫瘍溶解性ウイルスと共に、腫瘍特異的プロモーターとして使用する。腫瘍溶解用に開発することができるウイルスならレトロウイルス、アデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスを含めてどの種類のウイルスでも構わないことは、当業者にはわかる。

【0019】

本発明の目的の一つとして、少なくとも1つの付加的細胞膜融合惹起機構を持つ細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターを含む組成物が挙げられる。具体的な一実施形態では、前記HSVベクターが条件付き複製可能型である。もう一つの具体的実施形態では、前記条件付き複製可能型が、絶対後期ウイルスプロモーターを含んでいるベクターと定義される。具体的な一実施形態では、前記細胞膜融合惹起ベクターが、非細胞膜融合惹起ベクターの突然変異によって作製される。具体的な一実施形態では、前記付加的細胞膜融合機構が、膜融合性ポリペプチドをコードするHSVベクター中の核酸配列を含む。具体的な一実施形態では、前記膜融合性ポリペプチドがさらに、膜糖タンパク質と定義される。具体的な一実施形態では、前記膜糖タンパク質がパラミクソウイルスFタンパク質、HIV gp160タンパク質、SIV gp160タンパク質、レトロウイルスEnvタンパク質、エボラウイルスGp、またはインフルエンザウイルス赤血球凝集素である。具体的な一実施形態では、前記糖タンパク質がテナガザル白血病ウイルス (GALV) 由来の膜糖タンパク質である。

10

【0020】

具体的な一実施形態では、前記糖タンパク質が、C末端切断型のテナガザル白血病ウイルスエンベロープ糖タンパク質 (GALV.fus) である。具体的な一実施形態では、前記核酸配列の発現が、絶対後期ウイルスプロモーターによって制御される。具体的な一実施形態では、前記絶対後期ウイルスプロモーターがHSVのUL38またはUs11のプロモーターである。具体的な一実施形態では、医薬的に許容できる賦形剤をさらに含む。

20

【0021】

本発明のもう一つの目的として、第1細胞と第2細胞との融合を惹起する方法であって、少なくとも1つの付加的細胞膜融合惹起機構を持つ細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターを第1細胞に導入するステップを含み、前記導入ステップ後に第1細胞の細胞膜が第2細胞の細胞膜と融合する方法が挙げられる。具体的な一実施形態では、第1細胞、第2細胞、または第1細胞と第2細胞の両方が悪性細胞である。具体的な一実施形態では、前記のステップが多数の細胞で繰り返される。具体的な一実施形態では、前記HSVベクターが条件付き複製可能型である。具体的な一実施形態では、前記付加的細胞膜融合機構が、膜融合性ポリペプチドをコードする核酸配列を含む。具体的な一実施形態では、前記核酸配列の発現が、絶対後期ウイルスプロモーターによって調節される。具体的な一実施形態では、前記絶対後期ウイルスプロモーターがHSVのUL38またはUs11のプロモーターである。

30

【0022】

本発明のもう一つの目的として、悪性細胞を破壊する方法であって、少なくとも1つの付加的細胞膜融合惹起機構を持つ細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターを前記細胞に導入するステップを含み、前記導入後に前記悪性細胞の膜が別の細胞膜と融合する方法が挙げられる。具体的な一実施形態では、前記悪性細胞がヒト由来の細胞である。具体的な一実施形態では、前記導入ステップがさらに、約 1×10^9 プラーク形成単位 (pfu) の前記ベクターをヒトに投与することと定義される。具体的な一実施形態では、前記方法が、前記ヒトに付加的癌治療を施すことをさらに含む。具体的な一実施形態では、前記付加的癌治療が、化学治療、放射線、外科手術、免疫治療、遺伝子治療、またはそれらの組合せである。

40

【0023】

本発明のもう一つの目的として、腫瘍溶解性ウイルスを含む組成物であって、前記ウイルスが絶対後期ウイルスプロモーターを含んでいる組成物が挙げられる。具体的な一実施形態では、ウイルスがさらに、腫瘍特異的であると定義される。

50

【0024】

本発明の一実施形態として、細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターを含む組成物であって、前記ベクターが少なくとも1つの付加的細胞膜融合惹起成分を含んでいる組成物が挙げられる。本発明の一態様として、例えば前記ベクターが絶対後期ウイルスプロモーターを含んでいる場合などは、前記HSVベクターは条件付き複製可能型である。前記細胞膜融合惹起ベクターは、突然変異を含んでいる非細胞膜融合惹起ベクターであることができる。本発明の一実施形態では、前記付加的細胞膜融合成分が、膜融合性ポリペプチドをコードするHSVベクター中の核酸配列を含み、前記膜融合性ポリペプチドは、一部の態様ではさらに、膜糖タンパク質と定義される。前記膜糖タンパク質は、パラミクソウイルスFタンパク質、HIV gp160タンパク質、SIV gp160タンパク質、レトロウイルスEnvタンパク質、エボラウイルスGp、またはインフルエンザウイルス赤血球凝集素であることができる。具体的な一実施形態では、前記糖タンパク質がテナガザル白血病ウイルス(GALV)由来の膜糖タンパク質であるか、またはC末端切断型のテナガザル白血病ウイルスエンペロープ糖タンパク質(GALV.fus)である。

10

【0025】

核酸配列の発現は、絶対後期ウイルスプロモーターによって、例えばHSVのUL38またはUs11のプロモーターなどによって、制御することができる。

【0026】

本発明の一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物が医薬的に許容できる賦形剤をさらに含む。

20

【0027】

本発明のもう一つの実施形態として、第1細胞と第2細胞との融合を惹起する方法であって、少なくとも1つの付加的細胞膜融合惹起成分を持つ細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターを第1細胞に導入することによって、第2細胞膜を第1細胞膜と融合させるステップを含む方法が挙げられる。具体的な実施形態では、前記第1細胞、第2細胞、または第1細胞と第2細胞の両方が、例えば肝癌悪性細胞、乳癌悪性細胞、卵巣癌悪性細胞、前立腺癌悪性細胞および/または肺癌悪性細胞などの悪性細胞である。具体的な実施形態では、前記方法のステップが多数の細胞で繰り返される。

【0028】

前記HSVベクターは条件付き複製可能型であることができる。さらに、前記付加的細胞膜融合機構は、膜融合性ポリペプチドをコードする核酸配列を含むことができる。具体的な一実施形態では、前記核酸配列の発現が絶対後期ウイルスプロモーター、例えばHSVのUL38またはUs11のプロモーターなどによって調節される。

30

【0029】

本発明のもう一つの実施形態として、悪性細胞を破壊する方法であって、少なくとも1つの付加的細胞膜融合惹起機構を持つ細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターを前記細胞に導入するステップを含み、前記導入後に前記悪性細胞の膜が別の細胞膜と融合する方法が挙げられる。具体的な一実施形態では、前記悪性細胞がヒト由来の細胞である。前記導入ステップはさらに、約 1×10^9 プラーク形成単位(pfu)の前記ベクターをヒトに投与することと定義され、一部の実施形態では、前記方法が、前記ヒトに付加的癌治療を施すことをさらに含む。この場合、前記付加的癌治療は、化学治療、放射線、外科手術、免疫治療、遺伝子治療、またはそれらの組合せである。

40

【0030】

本発明のもう一つの実施形態として、腫瘍溶解性ウイルスを含む組成物であって、前記ウイルスが絶対後期ウイルスプロモーターを含んでいる組成物が挙げられる。前記ウイルスはさらに、腫瘍特異的であると定義することができる。

【0031】

本発明のもう一つの実施形態として、細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターの作製方法であって、非細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターに突然変異を導入するステップ、および細胞膜融合惹起ポリペプチドをコードする核酸配列を前記ベクタ

50

ーに組み込むステップを含む方法が挙げられる。

【0032】

本発明のもう一つの実施形態として、ベクターを細胞膜融合惹起ベクターにする突然変異とGALV.fusをコードする核酸配列とを持っている単純ヘルペスウイルスベクターを含む組成物が挙げられる。

【0033】

本発明のもう一つの実施形態として、悪性細胞を破壊する方法であって、腫瘍溶解性ウイルスを含む組成物を前記細胞に導入することを含み、前記ウイルスが絶対後期ウイルスプロモーターを含んでいる方法が挙げられる。

【0034】

本発明の一実施形態として、第1細胞膜融合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性とを持つベクターを含む組成物が挙げられる。前記ベクターは単純ヘルペスウイルスベクターであることができる。また前記ベクターは条件付き複製可能型であることができ、例えばこれはさらに、絶対後期ウイルスプロモーターを含んでいるベクターと定義される。具体的な一実施形態では、前記第1細胞膜融合惹起活性、前記第2細胞膜融合惹起活性、またはその両方が突然変異を含み、その突然変異が、前記ベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に、前記細胞膜融合惹起活性を付与する。もう一つの具体的実施形態では、前記第1細胞膜融合惹起活性、前記第2細胞膜融合惹起活性、またはその両方が、膜融合性ポリペプチドをコードする核酸配列を含む。例えば、前記膜融合性ポリペプチドはさらに、パラミクソウイルスFタンパク質、HIV gp160タンパク質、SIV gp160タンパク質、レトロウイルスEnvタンパク質、エボラウイルスGpまたはインフルエンザウイルス赤血球凝集素などの膜糖タンパク質と定義される。前記糖タンパク質はテナガザル白血病ウイルス(GALV)由来の膜糖タンパク質またはC末端切断型のテナガザル白血病ウイルスエンペロープ糖タンパク質(GALV.fus)であることができる。前記核酸配列の発現は絶対後期ウイルスプロモーターによって制御される。例えば、一部の実施形態では、前記絶対後期ウイルスプロモーターがHSVのUL38またはUs11のプロモーターである。具体的な一実施形態では、前記組成物が医薬的に許容できる賦形剤をさらに含む。

【0035】

本発明のもう一つの実施形態として、第1細胞と第2細胞との融合を惹起する方法であって、第1細胞膜融合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性とを持つベクターを前記第1細胞に導入することによって、第2細胞膜を第1細胞膜と融合させるステップを含む方法が挙げられる。前記第1細胞、第2細胞、または第1細胞と第2細胞の両方は、例えば固形腫瘍中のそして/または例えばヒトの体内の、悪性細胞であることができる。前記導入ステップはさらに、前記ベクターを前記ヒトに送達すること、例えば前記ベクターを前記ヒトに全身送達すること、例えば前記ベクターを前記ヒトに静脈内送達することと定義することができる。前記ステップは多数の細胞で繰り返すことができる。前記ベクターは条件付き複製可能型単純ヘルペスウイルスベクターであることができる。

【0036】

具体的な一実施形態では、前記第1細胞膜融合惹起活性、前記第2細胞膜融合惹起活性、またはその両方が突然変異を含み、その突然変異が、前記ベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に、前記細胞膜融合惹起活性を付与する。もう一つの実施形態では、前記第1細胞膜融合惹起活性、前記第2細胞膜融合惹起活性、またはその両方が、膜融合性ポリペプチドをコードする核酸配列を含む。前記核酸配列の発現は絶対後期ウイルスプロモーター、例えばHSVのUL38またはUs11のプロモーターなどによって調節することができる。

【0037】

具体的な一実施形態では、前記方法は、前記ベクターが存在しない場合と比較して腫瘍抗原提示を強化するステップをさらに含み、前記腫瘍抗原提示の強化は、前記腫瘍抗原提示の強化が存在しない場合と比較して、抗腫瘍免疫を向上させる。

【0038】

本発明のもう一つの実施形態として、悪性細胞を破壊する方法であって、第1細胞膜融

10

20

30

40

50

合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性とを持つベクターを前記細胞に導入するステップを含み、前記導入後に、悪性細胞の膜が別の細胞膜と融合する方法が挙げられる。具体的な実施形態では、前記悪性細胞がヒトの体内にあり、かつ/または前記導入ステップがさらに、約 1×10^9 プラーク形成単位 (pfu) の前記ベクターを前記ヒトに投与することと定義される。本方法は、例えば化学治療、放射線、外科手術、免疫治療、遺伝子治療、またはそれらの組合せなどの付加的癌治療を前記ヒトに施すことをさらに含んでもよい。本方法は、前記ベクターが存在しない場合と比較して腫瘍抗原提示を強化するステップをさらに含んでもよく、例えばその場合、前記腫瘍抗原提示の強化は、前記腫瘍抗原提示の強化が存在しない場合と比較して、抗腫瘍免疫を向上させる。

【0039】

10

本発明の一実施形態として、腫瘍溶解性ウイルスを含む組成物であって、前記ウイルスが絶対後期ウイルスプロモーターを含んでいる組成物が挙げられる。また、前記ウイルスはさらに、腫瘍特異的であると定義することもできる。

【0040】

本発明のもう一つの実施形態として、細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターの作製方法であって、非細胞膜融合惹起型単純ヘルペスウイルスベクターに突然変異(この突然変異はベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に細胞膜融合惹起活性を付与する)を導入するステップ、および細胞膜融合惹起ポリペプチドをコードする核酸配列を前記ベクターに組み込むステップを含む方法が挙げられる。

【0041】

20

本発明のもう一つの実施形態として、ベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に細胞膜融合惹起活性を付与する突然変異と、GALV.fusをコードする核酸配列とを持っている単純ヘルペスウイルスベクターを含む組成物が挙げられる。

【0042】

本発明のさらにもう一つの実施形態として、悪性細胞を破壊する方法であって、腫瘍溶解性ウイルスを含む組成物を前記細胞に導入することを含み、前記ウイルスが絶対後期ウイルスプロモーターを含んでいる方法が挙げられる。

【0043】

本発明のさらにもう一つの実施形態として、本明細書に記載する組成物を含む哺乳類細胞が挙げられる。

30

【0044】

本発明のもう一つの実施形態として、第1細胞膜融合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性とを持つベクターであって、前記ベクターの核酸配列中に突然変異(この突然変異は前記ベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に前記細胞膜融合惹起活性を付与する)を生成させるステップ、細胞膜融合惹起活性を持つ遺伝子産物をコードする核酸配列を前記ベクター中に組み込むステップ、またはその両ステップのうち、少なくとも1つを含む方法によって得ることができるベクターが挙げられる。

【0045】

前記組み込みステップはさらに、単純ヘルペスウイルスゲノム(この単純ヘルペスウイルスは非感染性である)を含む第1ポリヌクレオチドを用意すること、細胞膜融合惹起活性を持つ少なくとも1つの遺伝子産物をコードする核酸配列と機能的なパッケージングシグナルを含む遺伝子産物をコードする少なくとも1つの核酸配列とを含む第2ポリヌクレオチドを用意すること、および細胞膜融合惹起活性を持つ遺伝子産物をコードする前記核酸配列と、機能的パッケージングシグナルを含む遺伝子産物をコードする前記核酸配列とを、前記第1ポリヌクレオチドに組み込むことと定義することができ、この場合は、前記組み込みステップにより、感染性単純ヘルペスウイルスが生成する。

40

【0046】

細胞膜融合惹起活性を持つ遺伝子産物をコードする前記核酸配列と、機能的パッケージングシグナルを含む遺伝子産物をコードする前記核酸配列とを、第1ポリヌクレオチドに組み込む上記のステップはさらに、第1ポリヌクレオチドと第2ポリヌクレオチドを一つに

50

混合して混合物を形成させ、その混合物を細胞に導入し、前記細胞の溶解をアッセイすることと定義することができる。

【0047】

前記第1ポリヌクレオチドは細菌人工染色体上に用意することができる。前記第1ポリヌクレオチドの単純ヘルペスウイルスは、34.5の欠失、1コピー以上のpacの欠失、またはその組合せを含んでいてもよい。前記感染性単純ヘルペスウイルスは複製選択的であることができる。前記第2ポリヌクレオチドはプラスミド上に用意することができる。細胞膜融合惹起活性を持つ少なくとも1つの遺伝子産物をコードする前記核酸配列の発現は、CMV前初期プロモーターによって調節することができる。

【0048】

本発明のもう一つの実施形態として、第1細胞膜融合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性を持つベクターを作製する方法であって、前記ベクターの核酸配列中に突然変異（この突然変異は前記ベクターまたはそれがコードする遺伝子産物に前記細胞膜融合惹起活性を付与する）を生成させるステップ、細胞膜融合惹起活性を持つ遺伝子産物をコードする核酸配列を前記ベクター中に組み込むステップ、またはその両ステップのうち、少なくとも1つを含む方法が挙げられる。前記組み込みステップはさらに、単純ヘルペスウイルスゲノム（この単純ヘルペスウイルスは非感染性である）を含む第1ポリヌクレオチドを用意すること、細胞膜融合惹起活性を持つ少なくとも1つの遺伝子産物をコードする核酸配列と機能的なパッケージングシグナルを含む遺伝子産物をコードする少なくとも1つの核酸配列とを含む第2ポリヌクレオチドを用意すること、および細胞膜融合惹起活性を持つ遺

10

20

【0049】

本発明のもう一つの態様として、悪性細胞を持っている個体における腫瘍抗原提示を増加させる方法であって、第1細胞膜融合惹起活性と第2細胞膜融合惹起活性を持つベクターを前記個体に与えるステップを含む方法が挙げられる。一部の実施形態では、前記腫瘍抗原提示の増加が、前記腫瘍抗原提示の増加が存在しない場合と比較して、その個体にお

30

【0050】

本発明のもう一つの目的として、悪性細胞を破壊する方法であって、腫瘍溶解性ウイルスを含む組成物を前記細胞に導入することを含み、前記ウイルスが絶対後期ウイルスプロモーターを含んでいる方法が挙げられる。

【0051】

本発明をより一層完全に理解するには、添付の図面を、後述する図面の説明と共に参照されたい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0052】

1. 定義

本明細書で使用する用語「ある/1つの/一（aまたはan）」は、1つ以上の（one or more）という意味を持ちうる。請求項において「を含む（comprising）」という単語と一緒に使用される単語「ある/1つの/一（aまたはan）」は、1つ以上の（one or more）という意味を持ちうる。本明細書で使用する「もう一つの/別の（another）」という用語は、少なくとも2つ目以上の（a second or more）という意味を持ちうる。

【0053】

本明細書で使用する「細胞膜融合」という用語は、少なくとも2つの細胞、例えば隣り合った2つの細胞の外膜の融合を指す。

【0054】

50

本明細書で使用する「条件付き複製可能型 (conditionally replicating)」という用語は、あるウイルスが、例えば分裂細胞 (腫瘍細胞など) でのみ複製することができ、例えば正常な肝細胞やニューロンなどの分裂終了細胞または非分裂細胞では複製することができないという特性を指す。

【0055】

本明細書で使用する「腫瘍抗原提示の強化」または「腫瘍抗原提示の増加」という用語は、免疫系に対する腫瘍抗原提示の強化、増加、増強、拡大、増幅、増殖、増倍、またはそれらの組合せを指す。具体的な一実施形態として、提示には腫瘍抗原の放出が含まれる。具体的な一実施形態として、腫瘍抗原提示の強化は、固形腫瘍、非固形腫瘍および/または転移癌には特に有用である。具体的な一実施形態として、代表的な腫瘍抗原には、例えばgp100や癌胎児性抗原 (CEA) などがある。

10

【0056】

本明細書で使用する「抗腫瘍免疫の改善」という用語は、膜融合が生じている状態 (融合はシンシチウム形成と腫瘍抗原提示の強化につながる) で起こる、膜融合が生じていない場合よりも優れた抗腫瘍免疫の生成を指す。具体的な一実施形態では、抗腫瘍免疫の改善は細胞性抗腫瘍免疫に向けられる。

【0057】

本明細書で使用する「腫瘍溶解性 (oncolytic)」という用語は、悪性細胞を破壊することができる作用因子を指す。具体的な一実施形態では、破壊には、悪性細胞膜と別の膜との融合が含まれる。別の実施形態では、破壊には細胞の溶解が含まれ、一部の実施形態では、破壊には膜融合と溶解の両方が含まれる。

20

【0058】

本明細書で使用する「複製選択的」または「複製条件付き」という用語は、腫瘍溶解性ウイルスが一定の組織 (例えば腫瘍) 内で選択的に増殖できることを指す。

【0059】

本明細書で使用する「絶対後期 (strict late) ウイルスプロモーター」という用語は、まさしく後期段階でのみ活性化プロモーター、すなわちウイルスDNA複製の開始後のみ活性化プロモーターに関する用語である。

【0060】

本明細書で使用する「シンシチウム」という用語が、かなり多数の融合細胞が関わる多核巨細胞形成を指すことは、当業者には理解されるだろう。

30

【0061】

11. 本発明

本発明は、関連技術のものとは異なり、2つ以上の細胞膜融合惹起機構を持つ条件付き複製可能型 (腫瘍溶解性) HSVベクターに関する。具体的な実施形態では、例えば本明細書に記載するランダム突然変異誘発などの方法によって作製される膜融合性腫瘍溶解性HSVが、さらに、GALV.fusなどの細胞膜融合惹起ポリペプチドをコードする核酸を含む。具体的な一実施形態では、前記GALV.fus配列が配列番号5である。

【0062】

腫瘍溶解性ウイルスは固形腫瘍用の抗腫瘍剤として大いに有望視されている。しかし、その投与によって明瞭な臨床上の利益を得ることができるようにするには、その抗腫瘍効力をさらに向上させなければならない。本発明では、具体的実施形態として、強制的ライゲーション法によって腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスに組み込まれた切断型のテナガザル白血病ウイルスエンベロープ膜融合性膜糖タンパク質 (GALV.fus) をコードする遺伝子を利用する。腫瘍溶解性ウイルスの下でGALV.fusを発現させるとウイルスの抗腫瘍効果は著しく増加することが、インビボ研究からわかる。さらに、ウイルスDNA複製の開始に完全に依存する活性を持つ絶対後期ウイルスプロモーターによってGALV.fus発現を制御すると、腫瘍組織だけで強いGALV.fus発現が起こった。これらの結果は、腫瘍溶解性HSVの下で強い膜融合性遺伝子を機能的に発現させることにより、元のウイルスの安全性を犠牲にすることなく、ウイルスの抗腫瘍活性を強化できることを証明している。

40

50

【0063】

また、導入遺伝子の発現を腫瘍細胞に制限することは、悪性疾患の遺伝子治療にとって特に望ましい。現在用いられている腫瘍への転写ターゲティング法では、主に、組織特異的プロモーターを使って遺伝子発現を制御する。しかし、これらのプロモーターは一般に構成的ウイルスプロモーターよりもはるかに低い活性を持ち、いったんウイルスベクターにクローニングされるとその組織特異性を失う場合もある。これに代わるアプローチとして、本発明は、一部の実施形態で、ウイルスDNA複製の開始に依存する活性を持つ絶対後期ウイルスプロモーター（UL38p）を利用する。このプロモーターを腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス（HSV）に導入した。インビトロおよびインビボでの特性解析により、腫瘍溶解性HSVの複製能が制限される正常非分裂細胞では、UL38pはごくわずかな活性しか持たないことがわかった。ウイルスが完全に複製することができる腫瘍細胞または細胞周期を進行中の細胞では、UL38pからの導入遺伝子の発現が、サイトメガロウイルス前初期プロモーターからの発現とほとんど同じくらい高い。これらの結果から、腫瘍溶解性ウイルスを遺伝子送達媒体にすれば、UL38pなどの絶対後期ウイルスプロモーターにより、その腫瘍溶解性ウイルスが条件付きで複製できる腫瘍で治療遺伝子を強くかつ特異的に発現させることが示唆される。

10

【0064】

したがって、本発明の一態様として、悪性疾患処置用の組換え核酸ベクターであって、真核細胞表面での細胞膜融合誘発ポリペプチドの発現を指示する配列を含んでいるベクターが挙げられる。別の実施形態では、UL38pを利用して、細胞膜融合誘発ポリペプチドの発現を指示する。

20

【0065】

一部の実施形態では、ベクターに細胞膜融合特性を付与する突然変異を上記HSVが含んでいる。突然変異はランダムに生成させることができる。次に、細胞膜融合特性を持つ可能性のある候補のプールを、本明細書に記載する手段および/または当技術分野で知られている手段により、その機能についてアッセイする。突然変異を持つHSVを自然界から取得して、対応するHSVを分離することもできる。具体的な実施形態では、細胞膜融合特性および/またはシンシチウム形成特性をHSVに持たせる突然変異を、糖タンパク質B（gB）遺伝子領域、gK遺伝子領域、もしくはその両方に、またはそれらの近傍に置く。この突然変異は点突然変異、フレームシフト突然変異、逆位、欠失、スプライシングエラー突然変異、転写後プロセッシング突然変異、またはそれらの組合せなどであることができる。突然変異は、特定の腫瘍溶解性HSV、例えばSynco-2Dなどを配列決定し、それを既知の野生型配列と比較することによって、同定することができる。

30

【0066】

具体的な実施形態として、本発明の方法および組成物は、例えば悪性細胞の拡大を阻害すること、悪性細胞の複製を減少させもしくは阻害すること、悪性細胞を根絶すること、悪性細胞の生成と増殖を防止すること、またはそれらの組合せなどを目的とする悪性細胞の処置に有用である。悪性細胞はどの形態の癌に由来してもよく、それらは固形腫瘍由来のものでありうるが、他の形態も本発明の方法および組成物で処置することができる。本発明の一特定態様では、本方法および組成物を利用して、肺、肝臓、前立腺、卵巣、乳房、脳、膵臓、精巣、大腸、頭頸部、メラノーマ、および他のタイプの悪性細胞を処置する。本発明は、どの病期の癌疾患でも、その悪性細胞を処置するのに役立つが、ある特定実施形態では、本発明を転移期の癌疾患に使用する。本発明は、悪性細胞を持つ個体を治療するための他の手段と一緒に使用することができる。

40

【0067】

また、従来の放射線治療および外科手術はどちらも、前立腺癌などの臓器限局性癌には潜在的に治療的処置様式であるが、転移性疾患（例えば特に前立腺癌でアンドロゲン抑制療法が失敗に終わった場合など）に有効な処置はほとんどない。2種類以上の細胞膜融合能力を持つ本発明の複製条件付き（腫瘍溶解性）ウイルスは、前立腺癌などの固形腫瘍の処置に役立ち、腫瘍溶解性HSVに細胞膜融合能力を組み込むとそのウイルスの抗腫瘍効力

50

が著しく増加することを、本発明は実証する。

【0068】

2種類以上の細胞膜融合能力がベクター上に存在する限り、膜融合性腫瘍溶解性HSVはこの手段によって構築してもよいが、特定の実施形態では、膜融合性腫瘍溶解性HSVの能力を、次に挙げる3種類の戦略のうちの1つによって生成させた：1) 確立された腫瘍溶解性HSVなどのベクターから、ランダム突然変異誘発後に、シンシチウム表現型をスクリーニングする戦略（例えばFu-10の作製に使用）、2) 膜融合性遺伝子産物（例えばテナガザル白血病ウイルスの超膜融合性膜糖タンパク質（GALV.fus））をコードする遺伝子を腫瘍溶解性HSVのゲノム中に挿入する戦略（例えばSynco-2の作製に使用）、および3) これら2つの膜融合機構の両方を1つの腫瘍溶解性HSVに組み込む戦略（例えばSynco-2Dの作製に使用）。

10

【0069】

本明細書に記載する特定の実施例では、ヒト前立腺癌異種移植片の原発腫瘍と肺転移の両方を持つマウスモデルを、本明細書に記載する組成物で全身的に処置した。その結果から、Synco-2Dはこの腫瘍モデルでは強力に有効な治療剤であることと、このウイルスの静脈内投与によって、原発腫瘍の有意な退縮と肺の腫瘍結節の劇的な減少が起こったことがわかる。これらの結果から、この強力な膜融合性腫瘍溶解性HSVの全身投与は転移性癌、特にヒト前立腺癌の有効な処置であることが示唆される。

III. 細胞膜融合ポリペプチド

一部の実施形態では、本発明は、ウイルスFMGなどの細胞膜融合誘発ポリペプチドの少なくとも膜融合性部分を含む。一部の態様では、前記FMGまたはその機能的断片が、FMGポリペプチドまたはその機能的断片ポリペプチドをコードする核酸としてHSV組成物上に存在する。本ポリペプチドは、好ましくは、実質的に中性pH（例えば約pH6~8）で細胞膜融合を誘発する能力を持つ。

20

【0070】

特定の態様では、前記FMGが、例えばMLV（一例として配列番号7）やGALV（一例として配列番号5）などのC型レトロウイルスエンベロプタンパク質の少なくとも膜融合ドメインを含む。細胞質ドメインの一部、大半または全てが欠失しているレトロウイルスエンベロプタンパク質は有用である。なぜなら、そのような操作によってヒト細胞に対する超膜融合活性が生じるからである。一部の実施形態では、ウイルス膜糖タンパク質に、それらの細胞膜融合誘発機能が強化されるように、特定の修飾を加える。例えば、多くのレトロウイルス糖タンパク質およびヘルペスウイルス糖タンパク質は、その細胞質ドメインを切断すると、融合活性が増加し、時にはそれと同時にウイルス粒子への組み込み効率も低下することが示されている（Reinら、1994、Brodyら、1994、Mulliganら、1992、Piqueら、1993、Baghianら、1993、Gageら、1993）。

30

【0071】

一部の実施形態では、例えば新しい結合特異性またはプロテアーゼ依存性などの機能をFMGポリペプチドに導入することにより、それらの膜融合活性を、その標的受容体を発現させる特定の細胞タイプに誘導することが望ましいことは、当業者には理解される。

【0072】

細胞膜融合ポリペプチドの例には、麻疹ウイルス融合タンパク質（配列番号8）、HIV gp160タンパク質（配列番号9）およびSIV gp160タンパク質（配列番号10）、レトロウイルスEnvタンパク質（配列番号11）、エボラウイルスGp（配列番号12）、ならびにインフルエンザウイルス赤血球凝集素（配列番号13）などがある。

40

【0073】

IV. 核酸に基づく発現系

本発明は2つ以上の膜融合機構を持つHSVベクターに関する。具体的な実施形態では、本ベクターが、以下の成分の一部または全部を含む。

【0074】

A. ベクター

50

「ベクター」という用語は担体核酸分子であって、その中に核酸配列を挿入することができ、それを細胞内に導入してその中で複製させることができるような分子を指すために用いられる。核酸配列は「外来性」であることができる。この「外来性」という用語は、その核酸配列が、ベクターを導入しようとしている細胞にとって外来であること、またはその配列は細胞内の配列と相同であるが、その配列が通常は見いだされないような宿主細胞核酸内の位置に存在することを意味する。ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルス）、ならびに人工染色体（例えばYAC）が含まれる。当業者であれば、標準的な組換え技術を使ってベクターを構築する能力を十分に持っているだろう（例えば、Maniatisら，1988およびAusubelら，1994を参照されたい。これらの文献はどちらも参照により本明細書に組み込まれる）。 10

【0075】

「発現ベクター」という用語は、転写されうるRNAをコードする核酸を含んでいる任意のタイプの遺伝子コンストラクトを指す。ある場合には、RNA分子は、転写に続いてタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。また、例えばアンチセンス分子やリボザイムの産生など、これらの配列が翻訳されない場合もある。発現ベクターは様々な「制御配列」を含みうる。「制御配列」とは、特定の宿主細胞中で、特定の宿主細胞における作動可能に連結されたコード配列の転写に必要であり、場合によっては翻訳にも必要な核酸配列を指す。転写および翻訳を支配する制御配列の他に、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能も同様に果たす後述の核酸配列を含んでもよい。 20

【0076】

1. プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は制御配列の一つで、転写の開始および速度を制御する核酸の一領域である。これは、ある核酸配列の特異的転写を開始させるためにRNAポリメラーゼや他の転写因子などの調節タンパク質および調節分子が結合することのできる遺伝要素を含みうる。「作動的な位置にある」「作動的に連結された」「制御下」および「転写制御下」という表現は、あるプロモーターがある核酸配列に対して、その配列の転写開始および/または発現を制御するのに適正な機能的な位置および/または向きを持つことを意味する。 30

【0077】

本発明の具体的実施形態では、絶対後期ウイルスプロモーターを利用することにより、腫瘍細胞などの複製細胞でのみ発現を指示する。絶対後期ウイルスプロモーターの例には、UL38（配列番号3）およびUs11（配列番号4）などがある。配列番号3はGTGGGTTGCGGACTTCTGCGGGGCGGCCAAATGGCCCTTTAAACGTGTGTATACGGACGCGCCGGGCCAGTCGGCCAACACAACCCACCGGAGCGGTAGCCGCGTTTGGCTGTGGGGTGGGTGGTTCCGCTTGCCTである。配列番号4はCTTTTAAGTAAACATCTGGGTCGCCCCGCCAACTGGGGCCGGGGTTGGGTCTGGCTCATCTCGAGAGCCACGGGGGGAACCACCCTCCGCCAGAGACTCGGGTGATGGTTCGTACCCGGGACTCAACGGGTTACCGGATTACGGGGACTGTGGTACGGTCCC GCCGGTTCTTCGATGTGCCACACCCAAGGATGCGTTGGGGCGATTTCCGGCAGCAGCCCGGGAGAGCGCAGCAGGGGACGCTCCGGGTCGTGCACGGCGGTTCTGGCCGCTCCCGGTCTCACGCCCTTTTATTGである。 30

【0078】

プロモーターは一般に、RNA合成の開始部位を定める機能を果たす配列を含んでいる。その最もよく知られた例はTATAボックスであるが、例えば哺乳類ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターや、SV40後期遺伝子のプロモーターなど、一部のプロモーターにはTATAボックスが無く、開始部位そのものに重なる別個の要素が開始場所を決定するのに役立っている。別のプロモーター要素が転写開始の頻度を調節する。典型的にはこれらは開始部位の30~110bp上流の領域に位置するが、多くのプロモーターは開始部位の下流にも機能的な要素を含むことが示されている。あるコード配列のあるプロモーターの「制御下」に置くには、選択したプロモーターの「下流」（すなわち3'側）に、転写読み枠の転写開始部位の5'末端を置く。「上流」プロモーターは、DNAの転写を刺激し、コードされているRNAの発現を促す。 40

【0079】

プロモーター要素間の間隔には融通がきくことが多く、要素を逆転させたり相対的に移 50

動させたりしても、プロモーター機能は保たれる。tkプロモーターの場合、50bpまでの距離であれば、プロモーター要素間の間隔を増やしても、活性の低下は始まらない。プロモーターに依存して、個々の要素は共同的に、または独立して、転写を活性化する機能を果たすことができるようである。プロモーターは「エンハンサー」と一緒に使用してもよいし、「エンハンサー」と一緒に使用しなくてもよい。「エンハンサー」とは、核酸配列の転写活性化に關与するシス作用性調節配列を指す。

【0080】

プロモーターは、ある核酸配列に元々付随しているもの、例えばコードセグメントおよび/またはエクソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得ることができるようなものであってもよい。そのようなプロモーターは「内在性」と呼ぶことができる。同様にエンハンサーも、ある核酸配列に元々付随していて、その配列の下流または上流に位置するものであってよい。もう一つの選択肢として、コード核酸セグメントを組換えプロモーターまたは異種プロモーターの制御下に置けば、ある種の利益が得られるだろう。組換えプロモーターまたは異種プロモーターという用語は、ある核酸配列にその自然環境では通常は付随していないプロモーターを指す。組換えエンハンサーまたは異種エンハンサーという用語も、ある核酸配列にその自然環境では通常は付随していないエンハンサーを指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーとして、例えば他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、他の任意のウイルスまたは原核細胞もしくは真核細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、ならびに「天然」でないプロモーターまたはエンハンサー（すなわち、異なる転写調節領域の異なる要素および/または発現を変化させる突然変異を含むもの）を挙げるができる。例えば、組換えDNA構築に最もよく使用されるプロモーターには、*-ラクタマーゼ*（ペニシリナーゼ）、*ラクトース*および*トリプトファン*（*trp*）プロモーター系などがある。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成的に製造することの他に、組換えクローニングおよび/またはPCR（商標）などの核酸増幅技術を本明細書に開示する組成物と共に使って、配列を製造することもできる（米国特許第4,683,202号および第5,928,906号を参照されたい。これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる）。さらに、ミトコンドリア、クロロプラストなどの非核細胞小器官での配列の転写および/または発現を指示する制御配列も同様に使用することができると考えられる。

【0081】

当然、発現用に選択した細胞小器官、細胞タイプ、組織、器官または生物内でDNAセグメントの発現を効果的に指示するプロモーターおよび/またはエンハンサーを使用することが重要だろう。分子生物学分野の当業者は、プロモーター、エンハンサーおよび細胞タイプの組合せを使ったタンパク質発現を一般に知っている（例えばSambrookら、1989を参照されたい。この文献は参照により本明細書に組み込まれる）。使用するプロモーターは構成的、組織特異的、誘導性であることができ、そして/または、例えば組換えタンパク質および/またはペプチドの大規模生産に有利であるように、適当な条件下で、導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指示するのに役立つ。プロモーターは異種プロモーターでも内在性プロモーターでもよい。

【0082】

また、発現の指示には（例えばEukaryotic Promoter Data Base EPDB, <http://www.epd.isb-sib.ch/>に従って）どのプロモーター/エンハンサーの組合せでも使用することができる。T3、T7またはSP6細胞質発現系はもう一つの考えうる実施形態である。真核細胞は、適当な細菌ポリメラーゼを送達複合体の一部としてまたは付加的な遺伝子発現コンストラクトとして与えれば、一定の細菌プロモーターからの細胞質転写を支持することができる。

【0083】

本発明の方法および組成物では好ましくは絶対後期ウイルスプロモーターを利用するが、これに代わる実施形態として、RNAの発現を調節するために本発明で使用することができる要素/プロモーター例の一部を、表1および表2に示す。表2には、特異的な刺激に応答

10

20

30

40

50

して活性化されうる核酸配列の領域である誘導性要素の例の一部を挙げる。

【 0 0 8 4 】

【 表 1 A 】

表1 プロモーターおよび/またはエンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	参考文献
免疫グロブリン重鎖	Banerjiら, 1983、Gillesら, 1983、Grosschedlら, 1985、Atchinsonら, 1986、1987、Imlerら, 1987、Weinbergerら, 1984、Kiledjianら, 1988、Portonら, 1990
免疫グロブリン軽鎖	Queenら, 1983、Picardら, 1984
T細胞受容体	Luriaら, 1987、Winotoら, 1989、Redondoら, 1990
HLA DQ aおよびDQβ	Sullivanら, 1987
β-インターフェロン	Goodbournら, 1986、Fujitaら, 1987、Goodbournら, 1988
インターロイキン-2	Greeneら, 1989
インターロイキン-2受容体	Greeneら, 1989、Linら, 1990
MHCクラスII5	Kochら, 1989
MHCクラスII HLA-Dra	Shermanら, 1989
β-アクチン	Kawamotoら, 1988、Ngら, 1989
筋クレアチンキナーゼ (MCK)	Jaynesら, 1988、Horlickら, 1989、Johnsonら, 1989
プレアルブミン (トランスチレチン)	Costaら, 1988
エラスターゼI	Ornitzら, 1987
メタロチオネイン (MTII)	Karinら, 1987、Culottaら, 1989
コラゲナーゼ	Pinkertら, 1987、Angelら, 1987
アルブミン	Pinkertら, 1987、Troncheら, 1989、1990
α-フェトプロテイン	Godboutら, 1988、Campereら, 1989
γ-グロビン	Bodineら, 1987、Perez-Stableら, 1990
β-グロビン	Trudelら, 1987
c-fos	Cohenら, 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986、Deschampsら, 1985

10

20

30

40

【 0 0 8 5 】

【表 1 B】

表1 プロモーターおよび/またはエンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	参考文献
インスリン	Edlundら, 1985
神経細胞接着分子 (NCAM)	Hirschら, 1990
α_1 -アンチトリプシン	Latimerら, 1990
H2B (TH2B) ヒストン	Hwangら, 1990
マウスおよび/またはI型コラーゲン	Ripeら, 1989
グルコース調節タンパク質 (GRP94およびGRP78)	Changら, 1989
ラット成長ホルモン	Larsenら, 1986
ヒト血清アミロイドA (SAA)	Edbrookeら, 1989
トロポニンI (TN I)	Yutzeyら, 1989
血小板由来成長因子 (PDGF)	Pechら, 1989
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	Klamutら, 1990
SV40	Banerji ら, 1981、Moreau ら, 1981、Sleigh ら, 1985、Firak ら, 1986、Herr ら, 1986、Imbra ら, 1986、Kadesch ら, 1986、Wang ら, 1986、Ondek ら, 1987、Kuhl ら, 1987、Schaffner ら, 1988
ポリオーマ	Swartzendruber ら, 1975、Vasseur ら, 1980、Katinka ら, 1980、1981、Tyndell ら, 1981、Dandolo ら, 1983、de Villiers ら, 1984、Hen ら, 1986、Satake ら, 1988、Campbell および / または Villarreal, 1988
レトロウイルス	Kriegler ら, 1982、1983、Levinson ら, 1982、Kriegler ら, 1983、1984a、b、1988、Bosze ら, 1986、Miksicek ら, 1986、Celander ら, 1987、Thiesen ら, 1988、Celander ら, 1988、Choi ら, 1988、Reisman ら, 1989
パピローマウイルス	Campo ら, 1983、Lusky ら, 1983、Spandidos および / または Willie, 1983、Spalholz ら, 1985、Lusky ら, 1986、Cripe ら, 1987、Gloss ら, 1987、Hirochika ら, 1987、Stephens ら, 1987
B型肝炎ウイルス	Bulla ら, 1986、Jameel ら, 1986、Shaul ら, 1987、Spandau ら, 1988、Vannice ら, 1988
ヒト免疫不全ウイルス	Muesing ら, 1987、Hauber ら, 1988、Jakobovits ら, 1988、Feng ら, 1988、Takebe ら, 1988、Rosen ら, 1988、Berkhout ら, 1989、Laspia ら, 1989、Sharp ら, 1989、Braddock ら, 1989

10

20

30

40

【表 1 C】

表1 プロモーターおよび/またはエンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	参考文献
サイトメガロウイルス (CMV)	Weberら, 1984、Boshartら, 1985、Foeckingら, 1986
テナガザル白血病ウイルス	Holbrookら, 1987、Quinnら, 1989

10

【 0 0 8 7 】

【表 2 A】

表2 誘導性要素		
要素	誘導剤	参考文献
MT II	ホルボールエステル (TFA) 重金属	Palmiterら, 1982、 Haslingerら, 1985、Searle ら, 1985、Stuartら, 1985、 Imagawaら, 1987、Karinら, 1987、Angel ら, 1987b、 McNeallら, 1989
MMTV (マウス乳癌ウイルス)	糖質コルチコイド	Huangら, 1981、Leeら, 1981、Majors ら, 1983、 Chandlerら, 1983、Leeら, 1984、Ponta ら, 1985、 Sakaiら, 1988
β -インターフェロン	ポリ (rI) x ポリ (rc)	Tavernierら, 1983
アデノウイルス5 E2	E1A	Imperialeら, 1984
コラゲナーゼ	ホルボールエステル (TPA)	Angelら, 1987a
ストロメライシン	ホルボールエステル (TPA)	Angelら, 1987b
SV40	ホルボールエステル (TPA)	Angelら, 1987b
ネズミMX遺伝子	インターフェロン、ニューカッ スル病ウイルス	Hugら, 1988
GRP78遺伝子	A23187	Resendezら, 1988
α -2-マクログロブリン	IL-6	Kunzら, 1989
ビメンチン	血清	Rittlingら, 1989
MHCクラスI遺伝子H-2kb	インターフェロン	Blanarら, 1989
HSP70	E1A、SV40ラージT抗原	Taylorら, 1989, 1990a, 1990b

20

30

40

【 0 0 8 8 】

【表 2 B】

表2 誘導性要素		
要素	誘導剤	参考文献
プロリフェリン	ホルボールエステル-TPA	Mordacqら, 1989
腫瘍壊死因子 α	PMA	Henselら, 1989
甲状腺刺激ホルモン α 遺伝子	甲状腺ホルモン	Chatterjeeら, 1989

10

組織特異的プロモーターまたは組織特異的要素の素性、ならびにそれらの活性を特徴づけるためのアッセイは、当業者にはよく知られている。そのような領域の例には、ヒトL1MK2遺伝子 (Nomotoら, 1999)、ソマトスタチン受容体2遺伝子 (Krausら, 1998)、ネズミ精巣上体レチノイン酸結合遺伝子 (Lareyreら, 1999)、ヒトCD4 (Zhao-Emonetら, 1998)、マウス 2(X1)コラーゲン (Tsumakiら, 1998)、D1Aドーパミン受容体遺伝子 (Leeら, 1997)、インスリン様成長因子II (Wuら, 1997) およびヒト血小板内皮細胞接着分子-1 (Almendroら, 1996) などがあるが、これらに限るわけではない。

【0089】

2. 開始シグナルおよび内部リボソーム結合部位

20

コード配列の効率のよい翻訳には、特異的な開始シグナルも必要になりうる。これらのシグナルにはATG開始コドンまたは隣接配列が含まれる。ATG開始コドンを含む外来翻訳制御シグナルを用意する必要がある場合もある。これを決定して、必要なシグナルを用意することは、当業者によっては容易だろう。確実にインサート全体を翻訳するには、開始コドンが所望のコード配列の読み枠と「同じ読み枠 (in-frame)」になればならないことは、よく知られている。外来の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは天然物であっても、合成物であってもよい。適当な転写エンハンサー要素を含めることによって発現の効率を向上させることもできる。

【0090】

本発明の一定の実施形態では、内部リボソームエントリー部位 (internal ribosome entry site; IRES) 要素を使って、多重遺伝子またはポリシストロン性メッセージを生成させる。IRES要素は5'メチル化キャップ依存的翻訳のリボソームスキヤニングモデルを迂回して、内部部位で翻訳を開始させることができる (PelletierおよびSonenberg, 1988)。ピコルナウイルス科の2つのメンバー (ポリオウイルスと脳心筋炎ウイルス) 由来のIRES要素 (PelletierおよびSonenberg, 1988) ならびに哺乳類メッセージ由来のIRES (MacejakおよびSarnow, 1991) が記載されている。IRES要素は異種オープンリーディングフレームに連結することができる。それぞれがIRESで区分されている複数のオープンリーディングフレームを一緒に転写して、ポリシストロン性メッセージを生成させることができる。IRES要素のおかげで、各オープンリーディングフレームはリボソームに接触することができ、効率よく翻訳される。単一のプロモーター/エンハンサーを使って複数の遺伝子を効

30

40

【0091】

3. マルチクローニングサイト

ベクターはマルチクローニングサイト (multiple cloning site; MCS) を含むことができる。これは、複数の制限酵素部位を含む核酸領域であり、ベクターを消化するには、標準的な組換え技術と共に、それらの制限酵素部位をどれでも使用することができる (例えばCarbonelliら, 1999、Levensonら, 1998、およびCocea, 1997を参照されたい。これらの文献は参照により本明細書に組み込まれる)。「制限酵素消化」とは、核酸分子中の特

50

定の位置でしか機能しない酵素による核酸分子の触媒的切断を指す。これらの制限酵素の多くは市販されている。そのような酵素の使用法は当業者には広く理解されている。多くの場合、MCS内を切断する制限酵素を使ってベクターを線状化または断片化することにより、そのベクターに外来配列をライゲートできるようにする。「ライゲーション」とは、2つの核酸断片間にリン酸ジエステル結合を形成させる過程を指し、それら2つの核酸断片は互いに接触していても接触していなくてもよい。制限酵素およびライゲーション反応を伴う技術は、組換え技術分野の当業者にはよく知られている。

【0092】

4. スプライシング部位

転写された真核RNA分子は、その大半が、RNAスプライシングを受けて、一次転写物からイントロンが除去される。真核生物のゲノム配列を含むベクターは、タンパク質発現に向けて転写物が適正にプロセシングされることを保証するために、供与スプライシング部位および/または受容スプライシング部位を必要としうる（例えばChandlerら、1997を参照されたい。この文献は参照により本明細書に組み込まれる）。

10

【0093】

5. 終結シグナル

本発明のベクターまたはコンストラクトは一般に少なくとも1つの終結シグナルを含むだろう。「終結シグナル」または「終結因子」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写物の特異的終結に關与するDNA配列から構成される。したがって、一部の実施形態では、RNA転写物の産生を終了させる終結シグナルが考えられる。終結因子は望ましいメッセージレベルを達成するためにインピボで必要な場合がある。

20

【0094】

真核生物系の場合、終結領域は、ポリアデニル化部位が露出するように、新しい転写物の部位特異的切断を可能にする特殊なDNA配列も含みうる。これは、特殊化した内在性ポリメラーゼに、約200個のA残基（ポリA）からなるストレッチを転写物の3'末端に付加するシグナルを送る。このポリAテールで修飾されたRNA分子は安定性が増すらしく、より効率よく翻訳される。したがって、真核生物が関わる別の実施形態として、終結因子はRNAを切断するシグナルを含むことが好ましく、その終結因子シグナルはメッセージのポリアデニル化を促進することが、より好ましい。終結因子および/またはポリアデニル化部位要素は、メッセージレベルを増加させ、そのカセットから他の配列へのリードスルーを最小限に抑えるのにも役立つ。

30

【0095】

本発明での使用が考えられる終結因子には、本明細書に記載の既知終結因子または当業者に知られている既知終結因子がいずれも包含され、例えば遺伝子の終結配列、例えばウシ成長ホルモン終結因子またはウイルス終結配列（例えばSV40終結因子など）などが挙げられるが、これらに限るわけではない。一定の実施形態では、終結シグナルが、例えば配列切断などによる転写可能配列または翻訳可能配列の欠如であってもよい。

【0096】

6. ポリアデニル化部位

発現、特に真核生物発現の場合、転写物の適正なポリアデニル化を達成するために、通例、ポリアデニル化シグナルを含めるだろう。ポリアデニル化シグナルの性質は本発明の実施の成功にとって決定的ではないと考えられ、そのような配列はどれでも使用することができる。好ましい実施形態には、様々な標的細胞中でよく機能することが知られている便利なSV40ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルなどがある。ポリアデニル化により、転写物の安定性の向上または細胞質輸送の促進が起こりうる。

40

【0097】

7. 複製起点

宿主細胞中でベクターを増殖させるために、ベクターは1つ以上の複製起点（「ori」と呼ばれることが多い）を含みうる。複製起点はそこから複製が開始される特殊な核酸配列

50

である。もう一つの選択肢として、宿主細胞が酵母である場合は、自律複製配列 (ARS) を使用することもできる。

【0098】

8. 選択可能および選別可能マーカー

本発明の一定の実施形態では、発現ベクター中にマーカーを含めることにより、本発明の核酸コンストラクトを含む細胞を、インビトロまたはインビボで同定することができる。そのようなマーカーは、細胞に同定可能な変化を与え、その発現ベクターを含む細胞の同定を容易にする。一般に選択可能マーカーは選択を可能にする特性を付与するマーカーである。陽性選択可能マーカーはそのマーカーの存在がその選択を可能にするマーカーであり、陰性選択可能マーカーはその存在がその選択を妨げるマーカーである。陽性選択可能マーカーの例は薬剤耐性マーカーである。

【0099】

通常は、薬剤選択マーカーを含めると、形質転換体のクローニングおよび同定が容易になる。例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシンおよびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は有用な選択可能マーカーである。条件負荷に基づく形質転換体の識別が可能になるような表現型を付与するマーカーの他に、他のタイプのマーカー、例えば比色分析を根拠とするGFPなどの選別可能マーカーなども考えられる。もう一つの選択肢として、単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ (tk) やクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT) などの選別可能酵素を利用してよい。免疫学的マーカーを、場合によってはFACS解析と一緒に使用方法も、当業者には知られているだろう。遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現させることが可能な限り、どのマーカーを使用するかは重要でないと考えられる。選択可能および選別可能マーカーの例は、この他にも当業者にはよく知られている。

【0100】

B. ベクター送達および細胞形質転換

本発明の具体的実施形態では、第一感染細胞から周囲の細胞へと、ベクターを増殖させる。

【0101】

ベクターは適当な方法によって第一感染細胞に導入される。本発明で使用する細胞小器官、細胞、組織または生物の形質転換を目的とするそのような核酸送達方法には、例えば本明細書に記載する方法または当業者に知られているであろう方法など、核酸 (例えばHSVベクター) を細胞小器官、細胞、組織または生物に導入することができる方法であれば、基本的にどの方法でも包含されると考えられる。そのような方法には、例えば、エクスピトランスフェクション (Wilsonら, 1989、Nabelら, 1989)、マイクロインジェクション (HarlanおよびWeintraub, 1985、米国特許第5,789,215号、これらの文献は参照により本明細書に組み込まれる) を含む注入 (米国特許第5,994,624号、第5,981,274号、第5,945,100号、第5,780,448号、第5,736,524号、第5,702,932号、第5,656,610号、第5,589,466号および第5,580,859号。各文献は参照により本明細書に組み込まれる)、エレクトロポレーション (米国特許第5,384,253号 (参照により本明細書に組み込まれる)、Tur-Kaspaら, 1986、Potterら, 1984)、リン酸カルシウム沈殿法 (GrahamおよびVan Der Eb, 1973、ChenおよびOkayama, 1987、Rippeら, 1990)、DEAE-デキストランの使用後にポリエチレングリコールを使用する方法 (Gopal, 1985)、超音波照射による直接導入 (Fechheimerら, 1987)、リポソームによるトランスフェクション (NicolauおよびSene, 1982、Fraleyら, 1979、Nicolauら, 1987、Wongら, 1980、Kanedaら, 1989、Katoら, 1991) および受容体を介したトランスフェクション (WuおよびWu, 1987、WuおよびWu, 1988)、マイクロプロジェクトイルボンバードメント (PCT出願公開W0 94/09699号および95/06128、米国特許第5,610,042号、第5,322,783号、第5,563,055号、第5,550,318号、第5,538,877号および第5,538,880号。各文献は参照により本明細書に組み込まれる)、炭化ケイ素繊維と共に攪拌する方法 (Kaepplerら, 1990、参照によりそれぞれ本明細書に組み込まれる米国特許第5,302,523号および第5,464,765号)、アグロバクテリウムによる形質転換 (参照

によりそれぞれ本明細書に組み込まれる米国特許第5,591,616号および5,563,055号)、PEGによるプロトプラストの形質転換(Omirullehら, 1993、参照によりそれぞれ本明細書に組み込まれる米国特許第4,684,611号および第4,952,500号)、乾燥/阻害による(desiccation/inhibition-mediated)DNA取り込み(Potrykusら, 1985)、ならびにこのような方法の任意の組合せなどがあるが、これらに限るわけではない。これらのような技術を応用することにより、細胞小器官、細胞、組織または生物を安定にまたは一過性に形質転換することができる。本組成物は、医薬的に許容できる賦形剤を使って、ある細胞を含む哺乳動物にそれを全身投与(例えば静脈内投与)することによって、その細胞に送達することもできる。

【0102】

1. エクスビボ形質転換

ある生物から取り出した血管細胞および組織をエクスピボでトランスフェクトする方法は、当業者に知られている。例えば、イヌ内皮細胞をレトロウイルス遺伝子導入によってインビトロで遺伝的に改変したものが、イヌに移植されている(Wilsonら, 1989)。もう一つの例では、ユカタンミニブタ内皮細胞がレトロウイルスによってインビトロでトランスフェクトされ、二重バルーンカテーテルを使って動脈内に移植された(Nabelら, 1989)。したがって、細胞または組織を取り出し、本発明の核酸を使ってエクスピボでトランスフェクトできると考えられる。特定の態様では、移植された細胞または組織を生物内に置くことができる。好ましい態様では、移植された細胞または組織中で核酸が発現される。

【0103】

2. 注入

一定の実施形態では、核酸を細胞内小器官、細胞、組織または生物に、1回以上の注入(すなわち針注入)によって、例えば皮下、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内などに送達することができる。ワクチン注射の方法は当業者にはよく知られている(例えば食塩溶液を含む組成物の注射)。本発明のさらなる実施形態として、直接マイクロインジェクションによる核酸の導入も挙げられる。直接マイクロインジェクションは、アフリカツメガエル卵母細胞に核酸コンストラクトを導入するために使用されている(HarlandおよびWeintraub, 1985)。細胞膜融合惹起型HSVの使用量は、対象とする細胞、組織または生物の性質によって変化する。

【0104】

3. エレクトロポレーション

本発明の一定の実施形態では、エレクトロポレーションによって、細胞内小器官、細胞、組織または生物に核酸を導入する。エレクトロポレーションでは細胞とDNAの懸濁液を高電圧放電にさらす。この方法のいくつかの変法では、ある種の細胞壁分解酵素、例えばペクチン分解酵素などを使って、標的受容細胞が無処理の細胞よりもエレクトロポレーションによる形質転換を受けやすくなるようにする(参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,384,253号)。もう一つの選択肢として、機械的損傷によって受容細胞が形質転換を受けやすくなるようにすることもできる。

【0105】

エレクトロポレーションを使った真核細胞のトランスフェクションは極めてうまくいっている。この方法により、マウスプレBリンパ球がヒトカップ免疫グロブリン遺伝子でトランスフェクトされ(Potterら, 1984)、ラット肝細胞がクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子でトランスフェクトされている(Tur-Kaspaら, 1986)。

【0106】

4. リン酸カルシウム

本発明の別の実施形態では、リン酸カルシウム沈殿法を使って核酸が細胞に導入される。この技術を使ってヒトKB細胞がアデノウイルス5 DNAでトランスフェクトされている(GrahamおよびVan Der Eb, 1973)。また、この方法により、マウスL(A9)、マウスC127、CH0、CV-1、BHK、NIH3T3およびHeLa細胞がネオマイシンマーカージェン遺伝子でトランスフェクト

10

20

30

40

50

され (ChenおよびOkayama, 1987)、ラット肝細胞が様々なマーカー遺伝子でトランスフェクトされている (Rippeら, 1990)。

【0107】

5. DEAE-デキストラン

もう一つの実施形態では、DEAE-デキストランの使用後にポリエチレングリコールを使用することによって、核酸が細胞に送達される。この方法により、マウス骨髄腫細胞および赤白血症細胞にレポータープラスミドが導入された (Gopal, 1985)。

【0108】

6. 超音波照射による導入

本発明のもう一つの実施形態として、超音波照射による直接導入法での核酸の導入が挙げられる。超音波照射による導入法で、LTK⁻線維芽細胞がチミジンキナーゼ遺伝子でトランスフェクトされている (Fechheimerら, 1987)。

【0109】

7. リポソームによるトランスフェクション

本発明のさらにもう一つの実施形態として、腫瘍溶解性HSVなどの核酸を、例えばリポソームなどの脂質複合体に封入することができる。リポソームはリン脂質二重層膜と内部の水性媒質とを特徴とする小胞構造である。マルチラメラリポソームは水性媒質で隔てられた複数の脂質層を持つ。これらは、リン脂質を過剰量の水性溶液に懸濁すると自発的に形成される。脂質成分は自己再配列を起こした後、閉鎖構造を形成し、水と溶解した溶質とを脂質二重層の間に閉じこめる (GhoshおよびBachhawat, 1991)。また、リポフェクトアミン (Lipofectamine; Gibco BRL) またはスーパーフェクト (Superfect; Qiagen) と複合体を形成した核酸も考えられる。

【0110】

インビトロでのリポソームによる核酸送達および外来DNAの発現は極めてうまくいっている (NicolauおよびSene, 1982、Fraleyら, 1979、Nicolauら, 1987)。培養ニワトリ胚細胞、HeLa細胞および肝臓癌細胞でも外来DNAのリポソームによる送達および発現が実施可能であることが実証されている (Wongら, 1980)。

【0111】

本発明の一定の実施形態では、リポソームを血球凝集性ウイルス (HVJ) と複合体化させることができる。これは、細胞膜との融合を容易にし、リポソームに封入されたDNAの細胞侵入を促進することが示されている (Kanedaら, 1989)。別の実施形態では、リポソームを核非ヒストン染色体タンパク質 (HMG-1) と複合体化または併用することができる (Katoら, 1991)。さらに別の実施形態では、リポソームをHVJおよびHMG-1の両方と複合体化または併用することができる。別の態様では、送達媒体はリガンドおよびリポソームを含むことができる。

【0112】

8. 受容体を介したトランスフェクション

さらにまた、核酸は受容体を介する送達媒体によって標的細胞に送達することもできる。これらは、標的細胞で起こる受容体を介したエンドサイトーシスによる高分子の選択的な取り込みを利用するものである。様々な受容体が細胞タイプ特異的に分布していることから、この送達法は本発明に特異性を追加するものである。

【0113】

一部の受容体媒介遺伝子ターゲティング媒体は、細胞受容体特異的リガンドと核酸結合剤とを含む。また別の媒体は、送達すべき核酸が作動的に取り付けられている細胞受容体特異的リガンドを含む。受容体を介した遺伝子導入にはいくつかのリガンドが使用されており (WuおよびWu, 1987、Wagnerら, 1990、Peralesら, 1994、Myers, EP0 0273085)、この技術の実施可能性はこれによって立証されている。別の哺乳類細胞タイプでの特異的送達も記載されている (WuおよびWu, 1993。この文献は参照により本明細書に組み込まれる)。本発明の一部の態様では、標的細胞集団上に特異的に発現される受容体に対応するようにリガンドが選択される。

【0114】

別の実施形態では、細胞特異的核酸ターゲティング媒体の核酸送達媒体成分が、リポソームと組み合わせられた特異的結合リガンドを含みうる。送達すべき核酸はリポソーム内に収容され、特異的結合リガンドはリポソーム膜に機能的に組み込まれる。したがってこのリポソームは標的細胞の受容体に特異的に結合し、その内容物を細胞に送達するだろう。このような系は、例えばEGF受容体のアップレギュレーションを示す細胞への核酸の受容体媒介送達に上皮成長因子(EGF)を使用する系などを使って、機能的であることが示されている。

【0115】

さらなる実施形態として、標的送達媒体の核酸送達媒体成分は、リポソームそのもの(好ましくは細胞特異的な結合を指示する1つ以上の脂質または糖タンパク質を含むもの)であってもよい。例えば、ガラクトース末端アシアロ糖タンパク質であるラクトシルセラミドがリポソームに組み込まれ、肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込み量の増加が観察されている(Nicolauら, 1987)。本発明の組織特異的形質転換コンストラクトも同様の方法で標的細胞に特異的に送達できると考えられる。

【0116】

9. マイクロプロジェクティルボンバードメント

マイクロプロジェクティルボンバードメント技術を使って、少なくとも1つの細胞小器官、細胞、組織または生物に核酸を導入することができる(米国特許第5,550,318号、米国特許第5,538,880号、米国特許第5,610,042号、およびPCT出願公開W0 94/09699。各文献は参照により本明細書に組み込まれる)。この方法は、DNA被覆マイクロプロジェクティルを高速に加速することができ、それによって、DNA被覆マイクロプロジェクティルが細胞膜を突き抜けて、細胞を殺すことなく細胞内に侵入できるようになるということに依存している(Kleinら, 1987)。当技術分野では多種多様なマイクロプロジェクティルボンバードメント技術が知られており、その多くは本発明にも応用することができる。

【0117】

このマイクロプロジェクティルボンバードメントでは、1つ以上の粒子を少なくとも1つの核酸でコーティングし、それを推進力によって細胞内に送達することができる。小粒子を加速するための装置はいくつか開発されている。そのような装置の一つは、高電圧放電によって電流を発生させ、それが原動力となるものである(Yangら, 1990)。使用されてきたマイクロプロジェクティルは、生物学的に不活性な物質、例えばタングステンまたは金の粒子またはビーズなどからなる。代表的な粒子には、タングステン、白金、好ましくは金からなるものがある。場合によっては、金属粒子上へのDNA析出はマイクロプロジェクティルボンバードメント法による受容細胞へのDNA送達には必要でないことも考えられる。粒子をDNAで被覆するのではなく、粒子がDNAを含んでいてもよいと考えられる。DNA被覆粒子によって、粒子ボンバードメントによるDNAの送達レベルは向上しうるが、それ自体は必要なわけではない。

【0118】

ボンバードメント法を行うには、懸濁状態の細胞をフィルター上または固形培養培地上で濃縮する。もう一つの選択肢として、未成熟な胚または他の標的細胞を、固形培養培地上に配置してもよい。ボンバードメントの対象とする細胞をマイクロプロジェクティル遮断プレート下の適当な距離に置く。

【0119】

加速によって細胞(例えば植物細胞)にDNAを送達する方法の説明に役立つ一例は、バイオリスティック粒子送達システム(Biolistics Particle Delivery System)である。このシステムは使用して、細胞またはDNAで被覆した粒子を、ステンレス鋼またはナイテックス(Nytex)スクリーンなどのスクリーン越しに、細胞(例えば懸濁培養された単子葉植物細胞)で覆われたフィルター表面へと推進することができる。スクリーンは、粒子が塊になって受容細胞に送達されないように、粒子を分散させる。プロジェクティル装置とボンバードメントの対象である細胞との間にスクリーンを介在させると、プロジェク

10

20

30

40

50

タイル凝集体のサイズが減少すると共に、大きすぎるプロジェクトイルが受容細胞に与える損傷が減少することにより、形質転換効率の向上の一因になりうると考えられる。

C. 宿主細胞

本明細書で使用する「細胞」「細胞株」および「細胞培養」という用語は可換的に使用することができる。これらの用語はいずれもその子孫を含む。子孫とは、それ以降のありとあらゆる世代である。意図的な突然変異または故意でない突然変異が起こるために全ての子孫が同一なわけではない場合もあることは言うまでもない。異種核酸配列の発現に関して「宿主細胞」とは原核細胞または真核細胞を指し、ベクターを複製させる能力および/またはベクターがコードする異種遺伝子を発現させる能力を持つ形質転換可能な任意の生物を包含する。宿主細胞はベクターの受容細胞として使用することができ、実際、そのように使用されている。宿主細胞は「トランスフェクト」または「形質転換」することができる。これは、外来核酸が宿主細胞中に移入または導入される過程を指す。形質転換細胞には、一次対象細胞とその子孫が含まれる。本明細書で使用する「改変」または「組換え」細胞または宿主細胞という用語は、例えばベクターなどの外来核酸配列が導入されている細胞を指すものとする。したがって組換え細胞は、組換え的に導入された核酸を持たない天然の細胞とは区別することができる。

【0120】

一定の態様では、RNAまたはタンパク質配列を、選択した他のRNAまたはタンパク質配列と共に、同じ宿主細胞中で同時発現させることができると考えられる。同時発現は、宿主細胞を、2つ以上の異なる組換えベクターで同時トランスフェクトすることによって達成できる。もう一つの選択肢として、複数の異なるRNAコード領域を含むように単一の組換えベクターを構築し、それらのRNAをその単一ベクターでトランスフェクトした宿主細胞で発現させることもできる。

【0121】

組織は、細胞膜融合惹起HSVで形質転換しようとする1つまたは複数の宿主細胞を含みうる。組織はある生物の一部であってもよいし、その生物からは分離されていてもよい。一定の態様では、組織は、例えば脂肪細胞、肺胞細胞、エナメル芽細胞、軸索、基底細胞、血液（例えばリンパ球）、血管、骨、骨髄、脳、乳房、軟骨、頸部、大腸、角膜、胚、子宮内膜、内皮、上皮、食道、筋膜、線維芽細胞、濾胞細胞、神経節細胞、神経膠細胞、杯細胞、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、筋、ニューロン、卵巣、膵臓、末梢血、前立腺、皮膚、皮膚、小腸、脾臓、幹細胞、胃、精巣、およびそれらのあらゆる癌などを含みうるが、これらに限るわけではない。

【0122】

一定の実施形態では、宿主細胞または宿主組織が、少なくとも一つの生物中に含まれていてもよい。一定の実施形態では、当業者には知られているとおり、生物として、例えば原核生物（例、真正細菌、古細菌）または真核生物などを挙げるができるが、これらに限るわけではない。

【0123】

宿主細胞として使用することができる細胞株および細胞培養は数多く、それらは、生きている培養物および遺伝物質の保管所としての役割を果たす機関であるアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection; ATCC）から入手することができる。当業者は、ベクター骨格および所望する結果に基づいて、適当な宿主を決定することができる。例えばプラスミドまたはコスミドを原核宿主細胞に導入して、多くのベクターを複製させることができる。ベクターの複製および/または発現に利用できる細胞タイプとして、細菌、例えば大腸菌（例：大腸菌RR1株、大腸菌LE392、大腸菌B、大腸菌X1776（ATCC番号31537）ならびに大腸菌W3110（F⁻、⁻、原栄養株、ATCC番号273325）、DH5⁺、JM109およびKC8）、枯草菌などの桿菌、および他の腸内細菌、例えばネズミチフス菌、霊菌、シュードモナス属の様々な種、ならびに数多くの市販細菌宿主、例えばSURE（登録商標）コンピテントセルおよびSolopack（商標）ゴールドセル（Stratagene、ラホーヤ）などが挙げられるが、これらに限るわけではない。一定の実施形態では、フ

10

20

30

40

50

ァージウイルス用の宿主細胞として大腸菌LE392などの細菌細胞が特に考えられる。

【0124】

ベクターを複製および/または発現させるための真核宿主細胞の例には、HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos、およびPC12などがあるが、これらに限るわけではない。様々な細胞タイプおよび生物に由来する多くの宿主細胞を利用することができ、それらは当業者に知られている。同様に、ウイルスベクターも、真核宿主細胞または原核宿主細胞と共に、特にそのベクターの複製または発現を許容するものと共に、使用することができる。

【0125】

一部のベクターには、それを原核細胞と真核細胞の両方で複製および/または発現させることを可能にする制御配列を使用することができる。上述の宿主細胞を維持するためおよびベクターを複製させるための培養条件も、当業者には知られているだろう。ベクターの大規模製造ならびにベクターがコードする核酸およびそのコグネイトポリペプチド、タンパク質またはペプチドの製造を可能にする技術および条件も理解され、知られている。

【0126】

D. 発現系

本発明の組成物の製造には発現系は使用することができる。上述した組成物の少なくとも一部または全部を含む発現系は数多く存在する。核酸配列またはそのコグネイトポリペプチド、タンパク質およびペプチドを製造するには、本発明と共に、原核生物および/または真核生物に基づく系を使用することができる。そのような系は数多く市販されており、広く入手することができる。

【0127】

参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,871,986号および同第4,879,236号に記載されているような昆虫細胞/バキュロウイルス系は、異種核酸セグメントのタンパク質発現を高レベルに達成することができ、例えばMaxBac(登録商標)2.0という名称でInvitrogen(登録商標)から、またBacPack(商標)バキュロウイルス・エクスプレッション・システムという名称でClontech(登録商標)から購入することができる。

【0128】

発現系の他の例には、合成エクジソン誘導性受容体を含むStratagene(登録商標)コンプリート・コントロール(商標)インデュシブル・マンマリアン・エクスプレッション・システム、またはそのpET発現系、大腸菌発現系などがある。誘導性発現系のもう一つの例は、Invitrogen(登録商標)から入手できるもので、これは完全長CMVプロモーターを利用する誘導性哺乳類発現系であるT-Rex(商標)(テトラサイクリン調節発現)システムを含んでいる。Invitrogen(登録商標)からは、メチロトローフ酵母ピチア・メタノリカにおける組換えタンパク質の高レベル発現を意図したピチア・メタノリカ(*Pichia methanolica*)エクスプレッション・システムと呼ばれる酵素発現系も提供されている。発現コンストラクトなどのベクターを発現させて、核酸配列またはそのコグネイトポリペプチド、タンパク質またはペプチドを製造する方法は、当業者にはわかるだろう。

【0129】

本発明の方法によって製造されるタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドは「過剰発現」させること(すなわち細胞での自然な発現よりも高レベルに発現させること)ができる。そのような過剰発現は、放射標識および/またはタンパク質精製を含む様々な方法で評価することができる。しかし、簡単で直接的な方法、例えばSDS/PAGEおよびタンパク質染色またはウェスタンブロット後の定量分析、例えば得られたゲルまたはブロットの濃度測定スキャンなどが好ましい。組換えタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドのレベルが天然細胞におけるレベルと比較して特異的に増加していることや、その宿主細胞が産生する他のタンパク質であって例えばゲル上で目視できるものと比較してその特異的タンパク質が相対的に豊富であることが、過剰発現のしるしになる。

【0130】

一部の実施形態では、発現させたタンパク質配列が宿主細胞中で封入体を形成するので

10

20

30

40

50

、細胞ホモジナイザーで破壊することによって宿主細胞を溶解し、洗浄し、そして/または遠心分離して、高密度の封入体および細胞膜を可溶性細胞成分から分離する。この遠心分離は、ショ糖などの糖類を緩衝液に組み込み、選択的な速度で遠心分離することにより、高密度の封入体が選択的に濃縮されるような条件下で行うことができる。当業者には知られているように、封入体は、 β -メルカプトエタノールまたはDTT（ジチオスレイトール）などの還元剤の存在下で、高濃度の尿素（例えば8M）または塩酸グアニジンなどのカオトロピック剤を含む溶液に可溶化し、より望ましいコンフォメーションに再フォールディングさせることができる。

【0131】

V. 突然変異誘発

本発明の具体的実施形態では、非膜融合性条件付き複製可能型腫瘍溶解性HSVなどのベクターを突然変異させて、膜融合性HSVベクターを作製することができる。これを行う場合、突然変異誘発は、様々な標準的突然変異誘発法によって達成される。突然変異とは、ある生物の量または構造に変化が起こる過程である。突然変異は、単一遺伝子、遺伝子ブロックまたは染色体全体のヌクレオチド配列の改変を伴う。単一遺伝子中の変化は、DNA配列内の1ヌクレオチド塩基の除去、付加または置換を伴う点変異の結果であってもよいし、多数のヌクレオチドの挿入または欠失を伴う変化の結果であってもよい。

【0132】

突然変異は、DNA複製の忠実性のエラーや、転移遺伝因子（トランスポゾン）のゲノム内での移動などといった事象の結果として、自然発生的に起こりうる。突然変異は、化学的または物理的突然変異原へのばく露後にも誘発される。そのような突然変異誘発因子には、電離放射線、紫外線、ならびに多種多様な化学物質、例えばアルキル化剤および多環式芳香族炭化水素など、いずれも（一般的には何らかの代謝的生体内変換後に）核酸と直接または間接的に相互作用することができるものがある。そのような環境因子によって誘発されるDNA損傷は、傷ついたDNAが複製または修復される時に塩基配列の変化をもたらす、それが突然変異をもたらす。突然変異は、特定のターゲティング方法を使って、部位特異的に行うこともできる。

【0133】

A. ランダム突然変異誘発

1. 挿入突然変異

挿入突然変異は既知DNA断片の挿入による遺伝子の不活化に基づいている。これは何らかのタイプのDNA断片の挿入を伴うので、生成する突然変異は一般に機能獲得突然変異ではなく機能喪失突然変異である。しかし挿入によって機能獲得突然変異が生じる例もいくつかある（Oppenheimerら，1991）。挿入突然変異誘発は細菌およびショウジョウバエで大いに成功を収めており（Cooleyら，1988）、最近ではトウモロコシ（Schmidtら，1987）、シロイヌナズナ（Marksら，1991、Konczら，1990）、およびキンギョソウ（Sommerら，1990）でも強力なツールになっている。

【0134】

転移遺伝因子は、細胞のゲノム内で、ある位置から別の位置に移動（転位）することができるDNA配列である。初めて確認された転移因子は、トウモロコシ（*Zea mays*）のアクチベーター/ディソシエーション（Activator/Dissociation）要素だった（McClintock，1957）。それ以来、原核生物でも真核生物でも多種多様な生物に見いだされてきた。

【0135】

ゲノム中の転移因子は、転位に際して重複した標的部重複と呼ばれる短いDNA配列の直接反復を両端に持つことを特徴とする。事実上全ての転移因子が、そのタイプおよび転位機序にかかわらず、その挿入部位にそのような重複を生じる。重複する塩基数は一定の場合もあるし、転位事象ごとに変動しうる場合もある。大半の転移因子はその末端に逆方向反復配列を持つ。これらの末端逆方向反復配列は、数塩基長から数百塩基長までどんなものでもよく、多くの場合、転位に必要であることがわかっている。

【0136】

10

20

30

40

50

原核生物転移因子は大腸菌およびグラム陰性細菌でもっともよく研究されてきたが、グラム陽性細菌にも存在する。これらは一般に、約2kBよりも短ければ挿入配列と呼ばれ、それよりも長ければトランスポゾンと呼ばれる。転位によって複製する μ やD108などのバクテリオファージは、第3タイプの転移因子を構成する。各タイプの因子は、その転位に必要なポリペプチド、すなわちトランスポザーゼを少なくとも1つはコードしている。トランスポゾンは、転位とは無関係な機能をコードする遺伝子、例えば抗生物質耐性遺伝子なども含んでいることが多い。

【0137】

トランスポゾンはその構造に従って2種類に分類することができる。まず、混成トランスポゾンまたは複合トランスポゾンは、挿入配列因子のコピーを各末端に、通常は逆向きに持っている。これらのトランスポゾンはその末端IS因子の一方がコードするトランスポザーゼを必要とする。もう一つの種類のトランスポゾンは約30塩基対の末端反復を持ち、IS因子由来の配列を持たない。

10

【0138】

転位は通常は保存的であるか、または複製的であるが、その両方の形をとりうる場合もある。複製的転位では、1コピーの転移因子がドナー部位に残り、別のコピーがターゲット部位に挿入される。保存的転位では、転移因子がある部位から切り出されて別の部位に挿入される。

【0139】

真核生物因子もその構造および転位機序に従って分類することができる。主な違いは、RNA中間体を経て転位する因子と、DNAからDNAに直接転位する因子との違いである。

20

【0140】

RNA中間体を経て転位する因子はしばしばレトロトランスポゾンと呼ばれ、その最も特徴的な点は、それらが、逆転写酵素活性を持つと考えられるポリペプチドをコードしていることである。レトロトランスポゾンには2つのタイプがある。あるものは、各末端に長い直列反復配列、すなわち末端反復配列(LTR)を持つ点で、レトロウイルスの組み込まれたプロウイルスDNAに似ている。これらのレトロトランスポゾンとプロウイルスとの類似性は、そのコード能力にも及んでいる。これらは、レトロウイルスのgag遺伝子およびpol遺伝子に関連する配列を持つことから、レトロウイルスの生活環に関連する機構によって転位することが示唆される。もう一つのタイプのレトロトランスポゾンは末端反復配列を持たない。これらもgag様ポリペプチドおよびpol様ポリペプチドをコードしており、RNA中間体の逆転写によって転位するが、その機構はレトロウイルス様因子とは異なっている。逆転写による転位は複製的過程であり、ドナー部位からの因子の切り出しは必要ない。

30

【0141】

転移因子は自然発生的突然変異の重要な原因であり、遺伝子とゲノムの進化の仕方に影響を及ぼしてきた。これらは、遺伝子内に挿入することによってその遺伝子を不活化することができる。また、そのトランスポザーゼ活性によって直接的に、またはゲノム中に散在した因子のコピー間の組換えの結果として間接的に、大幅な染色体再配列を引き起こすこともできる。切り出しを行う転移因子は、その切り出しを不正確に行うことが多く、付加または削除される塩基の数が3の倍数である場合には改変された遺伝子産物をコードする対立遺伝子をもたらす。

40

【0142】

転移因子自体は普通ではない方法で進化しうる。転移因子が他のDNA配列と同様に遺伝するとすれば、ある種におけるある因子のコピーは、遠縁種におけるコピーよりも近縁種におけるコピーの方に似ているだろう。これが必ずしも当てはまらないことから、転移因子は時にはある種から別の種に水平的に伝播することが示唆される。

【0143】

2. 化学的突然変異誘発

化学的突然変異誘発には、例えば表現型上様々な重大さを持つあらゆる突然変異型対立

50

遺伝子を見いだすことができるなど、一定の利点があり、実行が容易で費用があまりかからない。化学発癌性物質の大半はDNA中に突然変異を生じさせる。ベンゾ[a]ピレン、N-アセトキシ-2-アセチルアミノフルオレンおよびアフラトキシンB1は細菌細胞および哺乳類細胞でGC TAトランスバージョンを引き起こす。ベンゾ[a]ピレンはAT TAなどの塩基置換も引き起こすことができる。N-ニトロソ化合物はGC ATトランジションを引き起こす。n-ニトロソ尿素へのばく露によって誘発されるチミンの04位のアルキル化は、TA CGトランジションをもたらす。

【0144】

突然変異原性と発癌性の高い相関関係は、エIMUMズ試験 (McCann, 1975) の背後にあって基礎をなしている前提である。この試験では、必要に応じて突然変異原の代謝的活性化が起こるように、ミクロソームシトクロムP450を含むラット肝ホモジネートを添加して、細菌系での突然変異体を迅速にアッセイする。

10

【0145】

脊椎動物では、いくつかの発癌物質がras原腫瘍遺伝子中に突然変異を生じさせることが見いだされている。N-ニトロソ-N-メチル尿素はラットでは乳癌、前立腺癌および他の癌を誘発し、その腫瘍の大半はHa-ras腫瘍遺伝子のコドン12の第2位にG Aトランジションを示す。ベンゾ[a]ピレン誘発性皮膚腫瘍はHa-ras遺伝子の第2コドン中にA Tトランスフォーメーションを持つ。

【0146】

3. 放射線突然変異誘発

20

生物学的分子の完全性は電離放射線によって損なわれる。入射エネルギーの吸収はイオンおよびフリーラジカルの生成ならびにいくつかの共有結合の破壊につながる。放射線損傷に対する感受性は分子間で著しく異なるようであり、同じ分子でも結晶型が異なると著しく異なるらしい。これは総蓄積線量に依存し、線量率にも依存する(いったんフリーラジカルが生じると、それらが引き起こす分子損傷はその自然拡散速度に依存し、したがって実時間に依存する)。損傷は、試料をできるだけ冷たくすることによって軽減および抑制することができる。

【0147】

電離放射線は、一般的には線量率に比例するDNA損傷および細胞殺滅を引き起こす。電離放射線は、DNAと直接相互作用することによって、またはDNA損傷につながるフリーラジカル種の生成を介して、複数の生物学的効果を誘発すると推論されきた (Hall, 1988)。これらの効果には、遺伝子突然変異、悪性腫瘍トランスフォーメーション、および細胞殺滅などが含まれる。電離放射線は、一部の原核細胞および低級真核細胞で、ある種のDNA修復遺伝子の発現を誘導することは証明されているが、哺乳類遺伝子発現の調節に対する電離放射線の影響についてはほとんどわかっていない (Borek, 1985)。いくつかの研究が、哺乳類細胞の放射線照射後に観察されるタンパク質合成パターンの変化を記載している。例えば、ヒト悪性メラノーマ細胞の電離放射線処理は、いくつかの未同定タンパク質の誘導を伴う (Boothmanら, 1989)。サイクリンおよび同時調節ポリペプチドの合成は、ラットREF52細胞では電離放射線によって抑制されるが、腫瘍遺伝子形質転換REF52細胞株では抑制されない (LambertおよびBorek, 1988)。他の研究では、ある種の成長因子またはサイトカインがx線誘発DNA損傷に関与しうることが証明されている。これに関連して、放射線照射後は、内皮細胞から血小板由来成長因子が放出される (Witteら, 1989)。

30

40

【0148】

本発明において「電離放射線」という用語は、イオン化(電子の獲得または喪失)を引き起こすのに十分なエネルギーを持つか、または核相互作用によって十分なエネルギーを生成させることができる粒子または光子を含む放射線を意味する。代表的で好ましい電離放射線はx線である。ある細胞に必要な電離放射線の量は一般にその細胞の性質に依存する。通例、有効発現誘導線量は、細胞損傷または細胞死を直接引き起こす電離放射線量よりも少ない。放射線の有効量を決定する手段は当技術分野ではよく知られている。

【0149】

50

ある実施形態では、有効発現誘導量が約2～約30グレイ (Gy) で、これが約0.5～約2グレイ (Gy) /分の線量率で投与される。さらに好ましくは、有効発現誘導量の電離放射線は約5～約15Gyである。別の実施形態では、1回の投与に2～9Gyの線量を使用する。電離放射線の有効線量は10～100Gyであることができ、15～75Gyが好ましく、20～50Gyはさらに好ましい。

【0150】

本発明では、体外手段だけでなく、組織に放射線を送達するのに適当な手段はどれでも使用してよい。例えば、放射線は、腫瘍の抗原と免疫反応する放射標識抗体をまず用意した後、その放射標識抗体の有効量を腫瘍に送達することによって、送達することができる。また、放射性同位体を使って、組織または細胞に電離放射線を送達することもできる。

10

【0151】

4. インビトロスキヤニング突然変異誘発

ランダム突然変異はエラープローンPCRを使って導入することもできる (CadwellおよびJoyce, 1992)。テンプレートの希釈液が入った複数のチューブでPCRを行うことによって突然変異誘発率を増加させることができる。

【0152】

特に有用な突然変異誘発技術の一つは、アラニンスキヤニング突然変異誘発法である。この方法では、タンパク質コンフォメーションを大規模に混乱させるリスクを最小限に抑えつつ、側鎖相互作用を失った場合の影響を決定することができるように、多くの残基をアミノ酸アラニンで個別に置換する (Cunninghamら, 1989)。

20

【0153】

近年、極めて微量なタンパク質を使ってリガンド結合に関する平衡定数を見積もる技術が開発された (Blackburnら, 1991、米国特許第5,221,605号および同第5,238,808号)。少量の材料を使って機能アッセイを実施できることを利用して、抗体の飽和突然変異誘発を行うための極めて効率のよいインビトロ法を開発することができる。本発明者らは、PCR突然変異誘発法と共役インビトロ転写/翻訳とを併用してタンパク質突然変異体のハイスループット作製を行うことにより、クローニングステップを回避した。この場合は、突然変異型一本鎖抗体のインビトロ転写/翻訳用テンプレートとして、PCR産物を直接使用する。この方法では19種類のアミノ酸置換体の全てを極めて効率よく作製し解析することができるので、関心ある数多くの残基に対する飽和突然変異誘発を行うことが可能になり、この過程をインビトロスキヤニング飽和突然変異誘発法として記載することができる (Burksら, 1997)。

30

【0154】

インビトロスキヤニング飽和突然変異誘発法は、(i) リガンド結合特異性を調整する残基の同定、(ii) 与えられた位置で活性を保つアミノ酸と活性を消失させるアミノ酸の同定に基づくリガンド結合のよりよい理解、(iii) 活性部位またはタンパク質サブドメインの総合的可塑性の評価、(iv) 結合の増加をもたらすアミノ酸置換の同定を含む、多くの構造機能情報を取得する迅速な方法になる。

【0155】

5. 断片化と再構築によるランダム突然変異誘発

ディスプレイされたポリペプチドのライブラリーを作製する方法が米国特許第5,380,721号に記載されている。この方法では、ポリヌクレオチドライブラリーメンバーを取得し、そのポリヌクレオチドをプールして断片化し、そこから断片を再編成させて、PCR増幅を行うことによって断片を相同組換えさせて、シャッフルされた組換えポリペヌクレオチドのプールを形成させる。

40

【0156】

B. 部位特異的突然変異誘発

構造に基づく部位特異的突然変異誘発法は、タンパク質-リガンド相互作用を詳細に分析し操作するための強力なツールになる (Wells, 1996、Braistedら, 1996)。この技術では、選択したDNA中に1つ以上のヌクレオチド配列変化を導入することにより、配列変異

50

体を調製し、試験することが可能である。

【0157】

部位特異的突然変異誘発法では、所望する突然変異のDNA配列と、それに隣接する十分な数の未改変ヌクレオチドとをコードする特異的オリゴヌクレオチド配列を使用する。このようにして、欠失接合部の両側に欠失接合部を横切って安定な二重鎖を形成させるのに十分なサイズと複雑度とを持つプライマー配列が得られる。長さが約17~25ヌクレオチド長であって、改変しようとする配列の接合部の両側に約5~10残基を持つプライマーが好ましい。

【0158】

この技術では通例、一本鎖型と二本鎖型の両方で存在するバクテリオファージベクターを使用する。部位特異的突然変異誘発法に役立つベクターには、M13ファージなどのベクターがある。これらのファージベクターは市販されており、それらの使用法は当業者には一般によく知られている。部位特異的突然変異誘発法では二本鎖プラスミドも日常的に使用され、この場合は目的の遺伝子をファージからプラスミドに移すステップは必要ない。

【0159】

一般的には、まず、所望のタンパク質または遺伝要素をコードするDNA配列をその配列内に含んでいる一本鎖ベクターを取得するか、またはそのような二本鎖ベクターの二本の鎖を融解する。次に、ハイブリダイゼーション条件を選択する際にミスマッチの度合いを考慮して、所望する突然変異配列を持つ合成オリゴヌクレオチドプライマーを一本鎖DNA調製物にアニールさせる。突然変異保有鎖の合成を完了させるために、ハイブリダイズした産物に、例えば大腸菌ポリメラーゼI(クレノウフラグメント)などのDNA重合酵素を作用させる。このようにして、一本の鎖が元の非突然変異配列をコードし、もう一本の鎖が所望の突然変異を保有しているヘテロ二重鎖が形成される。次に、このヘテロ二重鎖ベクターを使って適当な宿主細胞、例えば大腸菌細胞などを形質転換し、突然変異型の配列構成を持つ組換えベクターを含んでいるクローンを選択する。

【0160】

タンパク質のある残基の機能的な重要性および情報量に関する包括的な情報は、19種類のアミノ酸置換体の全てを検討する飽和突然変異誘発法によって、最もよく取得することができる。このアプローチの欠点は、多残基飽和突然変異の計画実行が非常に困難だという点である(Warrenら, 1996、Brownら, 1996、Zengら, 1996、BurtonおよびBarbas, 1994、Yeltonら, 1995、Jacksonら, 1995、Shortら, 1995、Wongら, 1996、Hiltonら, 1996)。何百もの、場合によっては何千もの、特異的突然変異体を調べなければならない。しかし、改良された技術により、突然変異体の製造と迅速スクリーニングは、はるかに簡単になる。「ウォークスルー(walk-through)」突然変異誘発法の説明については、米国特許第5,798,208号および第5,830,650号も参照されたい。

【0161】

他の部位特異的突然変異誘発法が米国特許第5,220,007号、第5,284,760号、第5,354,670号、第5,366,878号、第5,389,514号、第5,635,377号、および第5,789,166号に開示されている。

【0162】

VI. 併用処置

本発明の方法および組成物の有効性を増加させるために、これらの組成物を、過剰増殖性疾患の処置に有効な他の薬剤、例えば抗癌剤と併用することが望ましい場合がある。「抗癌」剤は、例えば癌細胞を殺したり、癌細胞のアポトーシスを誘発したり、癌細胞の成長速度を低下させたり、転移の発生または数を減らしたり、腫瘍サイズを減少させたり、腫瘍成長を阻害したり、腫瘍または癌細胞への血液供給量を減少させたり、癌細胞または腫瘍に対する免疫応答を促進したり、癌の進行を防止もしくは阻害したり、癌患者の寿命を延ばしたりすることによって、患者の癌に不利な影響を及ぼすことができる。より一般的には、これら他の組成物は、細胞を殺すか、細胞の増殖を阻害するのに有効な併用量で与えられる。この過程には、細胞を発現コンストラクトおよび薬剤または複数の因子と同

10

20

30

40

50

時に接触させることが含まれる。これは、細胞を、両方の薬剤を含む単一の組成物または医薬製剤と接触させるか、細胞を2種類の組成物または製剤（一方の組成物は発現コンストラクトを含み、他方の組成物は第2の薬剤を含む）と同時に接触させることによって達成しうる。

【0163】

化学療法剤および放射線療法剤に対する腫瘍細胞の抵抗性は、臨床腫瘍学における大きな課題である。現在の癌研究の目標の一つは、化学療法および放射線療法を遺伝子治療と併用することによってその有効性を向上させる方法を見つけることである。例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ（HS-tK）遺伝子をレトロウイルスベクター系によって脳腫瘍に送達したところ、抗ウイルス剤ガンシクロビルに対する感受性がうまく誘発された（Culliverら, 1992）。本発明では、同様に遺伝子治療も、化学療法、放射線療法または免疫療法による介入、ならびに他のアポトーシス誘発剤または細胞周期調節剤と一緒に使用することができると考えられる。

10

【0164】

もう一つの選択肢として、遺伝子治療は、他の薬剤による処置に先立って、またはそのような処置の後に、数分～数週間の間隔をあけて行うこともできる。他の薬剤および発現コンストラクトを別々に細胞に適用する実施形態では、薬剤と発現コンストラクトとが細胞に対して有利な複合効果をまだ発揮することができるように、一般に、各送達時点の間に有効な期間が終わってしまわないようにする。そのような例では、細胞を両方の処置様式と互いに約12～24時間以内に、より好ましくは互いに約6～12時間以内に接触させることが考えられる。しかし場合によっては、処置期間をかなり延長して、各投与間に数日（2、3、4、5、6または7）～数週間（1、2、3、4、5、6、7または8）が経過することが望ましいこともありうる。

20

【0165】

遺伝子治療を「A」とし、第2剤、例えば放射線療法または化学療法が「B」とすると、次に示すように様々な組合せを使用することができる：

A/B/A、B/A/B、B/B/A、A/A/B、A/B/B、B/A/A、A/B/B/B、B/A/B/B、B/B/B/A、B/B/A/B、A/A/B/B、A/B/A/B、A/B/B/A、B/B/A/A、B/A/B/A、B/A/A/B、A/A/A/B、B/A/A/A、A/B/A/A、A/A/B/A。

【0166】

患者への本発明の治療用発現コンストラクトの投与は、そのベクターにもし毒性があればその毒性を考慮した上で、化学療法剤の一般的投与プロトコールに従って行われるだろう。処置サイクルは必要なだけ繰り返されると考えられる。また、様々な標準的治療法ならびに外科的介入を、本明細書に記載の過剰増殖細胞治療法と組み合わせて適用することもできると考えられる。

30

【0167】

A. 化学療法

癌治療には、化学物質に基づく処置および放射線に基づく処置の両方との様々な併用療法も含まれる。併用化学療法には、例えばシスプラチン（CDDP）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロルエタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソ尿素、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、プレオマイシン、プリカマイシン、マイトマイシン、エトポシド（VP16）、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合剤、タキソール、ゲムシタピン、ナベルピン、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチン、5-フルオロウラシル、ピンクリスチン、ピンブラスチンおよびメトトレキセート、または上記薬剤の任意の類似体または誘導体などがある。

40

【0168】

B. 放射線療法

DNA損傷を引き起こす因子であって、広範囲に使用されてきた他の因子には、一般に線、X線と呼ばれているもの、および/または腫瘍細胞への放射性同位体の誘導的送達など

50

がある。マイクロ波およびUV照射など、他の形態のDNA損傷因子も考えられる。これらの因子はいずれも、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製および修復、ならびに染色体の集合および維持に対して、広範な損傷をもたらすと考えられる。X線の線量範囲は、長期間（3～4週間）にわたる50～200レントゲンの1日線量から、2000～6000レントゲンの1回線量までに及ぶ。放射性同位体の投与量範囲は広範囲にわたり、その同位体の半減期、放出される放射線の強さおよびタイプ、新生物細胞による取り込みに依存する。

【0169】

細胞に関して「接触」または「ばく露」という用語を使用する場合、これらの用語は、本明細書では、治療用コンストラクトおよび化学療法剤または放射線療法剤を標的細胞に送達するか、または標的細胞のすぐ近傍に並置する過程を表すものとする。細胞の殺滅または静止を達成するには、細胞を殺すか細胞分裂を防ぐのに有効な併用量で、両剤を細胞に送達する。

10

【0170】

C. 免疫療法

免疫療法剤は一般に、免疫エフェクター細胞の使用、および癌細胞を標的としてそれを破壊する分子の使用に依拠している。免疫エフェクターとして、例えば、腫瘍細胞表面上の何らかのマーカースに特異的な抗体を挙げることができる。抗体だけでエフェクターとして治療に役立つ場合もあるし、細胞を実際に殺すために抗体が他の細胞を動員する場合もある。抗体には薬物または毒素（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）を結合して、単なるターゲティング剤として利用することもできる。あるいは、エフェクターとして、腫瘍細胞標的と直接的または間接的に相互作用する表面分子を持つリンパ球を挙げることができる。様々なエフェクター細胞には、例えば細胞傷害性T細胞およびNK細胞などがある。

20

【0171】

したがって免疫療法は、併用療法の一部として、本発明と一緒に使用することができる。併用療法の一般的なアプローチは以下に述べる。一般に、腫瘍細胞は、ターゲティングの対象となりやすい（すなわち他の細胞の大半には存在しない）何らかのマーカースを持っていないなければならない。腫瘍マーカースは数多く存在し、それらはいずれも、本発明でのターゲティングに適する。一般的な腫瘍マーカースには、癌胎児性抗原、前立腺特異抗原、尿腫瘍関連抗原、胎児性抗原、チロシナーゼ（p97）、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、エストロゲン受容体、ラミニン受容体、erbBおよびp155などがある。

30

【0172】

D. 遺伝子

さらにもう一つの実施形態では、第2処置が、治療ポリペプチドの全部または一部をコードする第1の治療用ポリヌクレオチドの前、後または同時に、第2の治療用ポリヌクレオチドを投与する第2の遺伝子治療である。完全長または切断型治療ポリペプチドをコードするベクターを、以下の遺伝子産物の一つをコードする第2のベクターと共に送達することにより、標的組織に対する複合的な抗増殖効果が得られるだろう。もう一つの選択肢として、両方の遺伝子をコードする単一のベクターを使用することもできる。本発明には様々なタンパク質が包含されるが、その一部を以下に説明する。

40

【0173】

1. 細胞増殖の誘導因子

細胞増殖を誘導するタンパク質は、その機能に基づいて様々なカテゴリーに細分される。これらのタンパク質の全てに共通する属性は、それらが細胞増殖を調節できるということである。例えば、PDGFの一形態、sis腫瘍遺伝子は、分泌型成長因子である。腫瘍遺伝子が成長因子をコードする遺伝子から生じることは稀で、現時点では、sisが唯一知られている天然の腫瘍原性成長因子である。本発明の一実施形態として、特定の細胞増殖誘導因子に対するアンチセンスmRNAを使って、その細胞増殖誘導因子の発現を妨げることが考えられる。

50

【0174】

タンパク質FMS、ErbA、ErbBおよびneuは成長因子受容体である。これらの受容体に突然変異が起こると調節機能が失われる。例えば、Neu受容体タンパク質の膜貫通ドメインを冒す点突然変異はneu腫瘍遺伝子をもたらす。erbA腫瘍遺伝子は甲状腺ホルモンの細胞内受容体に由来する。改変された腫瘍原性ErbA受容体は、内在性甲状腺ホルモン受容体と競合して、無制御な増殖を引き起こすと考えられている。

【0175】

最も大きい腫瘍遺伝子クラスには、シグナル伝達タンパク質（例えばSrc、AblおよびRas）が含まれる。タンパク質Srcは細胞質タンパク質チロシンキナーゼであるが、ある場合には、チロシン残基527の突然変異により、これが原腫瘍遺伝子から腫瘍遺伝子に変換される。これに対して、GTPアーゼタンパク質rasの原腫瘍遺伝子から腫瘍遺伝子への変換は、一例として、配列中のアミノ酸12がバリンからグリシンに突然変異してras GTPアーゼ活性を低下させることによって起こる。

【0176】

タンパク質Jun、FosおよびMycは、核の機能に対するその効果を、転写因子として直接発揮するタンパク質である。

【0177】

2. 細胞増殖の阻害因子

腫瘍抑制遺伝子は過剰な細胞増殖を阻害する機能を果たす。これらの遺伝子が不活化すると、その阻害活性が破壊され、無秩序な増殖が起こる。腫瘍抑制因子p53、p16およびC-CAMについて以下に説明する。

【0178】

化学発癌、紫外線照射およびいくつかのウイルスによってトランスフォームされた多くの細胞に、高レベルの突然変異型p53が見いだされている。p53遺伝子は、多種多様なヒト腫瘍における突然変異による不活化の標的であることが多く、一般的なヒト癌では最もよく突然変異を起こす遺伝子であることは既の実証されている。p53遺伝子はヒトNSCLC (Hollsteinら, 1991) の50%以上および多種多様な他の腫瘍で突然変異している。

【0179】

p53遺伝子は、ラージT抗原およびE1Bなどの宿主タンパク質と複合体を形成することができる393アミノ酸のリントタンパク質をコードしている。このタンパク質は正常な組織および細胞に見いだされるが、その濃度は、トランスフォームした細胞または腫瘍組織と比較するとわずかである。

【0180】

野生型p53は多くの細胞タイプでは重要な成長調節因子であると認められている。p53遺伝子ではミスセンス突然変異がよく起こり、この腫瘍遺伝子のトランスフォーム能には、このミスセンス突然変異が不可欠である。点突然変異によって誘発されるただ一つの遺伝子変化によって発癌性p53は生じうる。しかし、他の腫瘍遺伝子とは異なり、p53点突然変異は、少なくとも30個の異なるコドンで起こり、それがしばしば、ホモ接合性への退縮が起こらなくても細胞表現型のシフトをもたらすドミナント対立遺伝子を生み出すことが知られている。また、これらのドミナントネガティブ対立遺伝子の多くは、その生物中で許容され、生殖系列でも伝達されるようである。突然変異型対立遺伝子は、ごくわずかな機能不全から浸透性の強いドミナントネガティブ対立遺伝子まで、広い範囲に及ぶようである (Weinberg, 1991)。

【0181】

もう一つの細胞増殖阻害因子はp16である。真核細胞周期の主な移行は、サイクリン依存性キナーゼまたはCDKによって誘発される。CDKの1つ、サイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4) は、G₁期の進行を調節する。この酵素の活性はG₁後期でRbをリン酸化することだと思われる。CDK4の活性は、活性化サブユニットD型サイクリンおよび阻害サブユニットp16^{INK4}によって制御される。p16^{INK4}は、CDK4に特異的に結合してそれを阻害するタンパク質であり、それゆえにRbリン酸化を調節しうるタンパク質であると生化学的に特徴づけられ

10

20

30

40

50

ている (Serranoら, 1993, Serranoら, 1995)。p16^{INK4}タンパク質はCDK4阻害因子であるので (Serrano, 1993)、この遺伝子の欠失はCDK4の活性を増加させ、結果としてRbタンパク質の過剰リン酸化をもたらさう。p16はCDK6の機能を調節することも知られている。

【0182】

p16^{INK4}は、新しく記載されたCDK阻害タンパク質クラスに属し、このクラスには、p16^B、p19、p21^{WAF1}、およびp27^{KIP1}も含まれる。p16^{INK4}遺伝子は、多くの腫瘍タイプでしばしば欠失している染色体領域9p21にマッピングされる。ヒト腫瘍細胞株には、p16^{INK4}遺伝子のホモ接合性の欠失および突然変異がしばしば見いだされる。この証拠はp16^{INK4}遺伝子が腫瘍抑制遺伝子であることを示唆している。しかしこの解釈には、原発非培養腫瘍では培養細胞株よりもp16^{INK4}遺伝子の改変頻度をはるかに低いという観察事実との食い違いがある (Caldasら, 1994, Chengら, 1994, Hussussianら, 1994, Kambら, 1994, Kambら, 1994, Moriら, 1994, Okamotoら, 1994, Noboriら, 1995, Orlowら, 1994, Arapら, 1995)。プラスミド発現ベクターをトランスフェクトすることによって野生型p16^{INK4}機能を回復させると、一部のヒト癌細胞株によるコロニー形成が減少した (Okamoto, 1994, Arap, 1995)。

10

【0183】

本発明で使用することができる他の遺伝子には、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-1、MEN-11、zac1、p73、VHL、MMAC1/PEN、DBCCR-1、FCC、rsk-3、p27、p27/p16融合物、p21/p27融合物、抗血栓性遺伝子 (例えばCOX-1、TFPI)、PGS、Dp、E2F、ras、myc、ne

20

【0184】

3. プログラム細胞死の調節因子

アポトーシス、すなわちプログラム細胞死は、正常な胚発生、成体組織における恒常性の維持、および発癌の抑制にとって不可欠な過程である (Kerrら, 1972)。Bcl-2タンパク質ファミリーおよびICE様プロテアーゼは、他の系で、アポトーシスの重要な調節因子およびエフェクターであることが実証されている。濾胞性リンパ腫に関連して発見されたBcl-2タンパク質は、多様なアポトーシス刺激に応答して起こるアポトーシスの制御および細胞生存の増進に、顕著な役割を果たす (Bakhshira, 1985, ClearyおよびSklar, 1985, Clearyら, 1986, Tsujimotoら, 1985, TsujimotoおよびCroce, 1986)。進化的に保存されたBcl-2タンパク質は、現在、デスアゴニスト (death agonist) またはデスアンタゴニスト (death antagonist) と分類することができる類縁タンパク質ファミリーの1メンバーであると認識されている。

30

【0185】

Bcl-2は、その発見に続いて、様々な刺激によって誘発される細胞死を抑制するように作用することが示された。また、共通する構造ホモロジーおよび配列ホモロジーを持つBcl-2細胞死調節タンパク質のファミリーが存在することも、現在では明白である。これら様々なファミリーメンバーは、Bcl-2に似た機能を持つか (例えばBcl_{XL}、Bcl_W、Bcl_S、Mc

40

【0186】

本発明で利用することができる治療遺伝子の例を表3に挙げる。

【0187】

【表 3 A】

表 3 : 腫瘍遺伝子

遺伝子	由来	ヒト疾患	機能
増殖因子 ¹			FGFファミリー メンバー
HST/KS	トランスフェクション		FGFファミリー メンバー
INT-2 INT1/WNT1 SIS	MMTVプロモーター挿入 MMTVプロモーター挿入 サル肉腫ウイルス		因子様 PDGF B
受容体型チロシンキナーゼ ^{1,2} ERBB/HER	トリ赤芽球症ウイルス 挿入、増幅ヒト腫瘍	増幅、欠失扁平上皮 癌；膠芽腫	EGF/TGF- α /アンフィ レグリン/ペータセルリ ン受容体

10

【 0 1 8 8 】

【表 3 B】

遺伝子	由来	ヒト疾患	機能
ERBB-2/NEU/HER-2	ラット膠芽腫からトランスフェクト	増幅乳癌、卵巣癌、胃 癌	NDF/ヘレグリンおよび EGF関連因子によって 調節される
FMS KIT	SMネコ肉腫ウイルス HZネコ肉腫ウイルス		CSF-1受容体 MGF/スティール (Steel) 受容体、造 血
TRK	ヒト大腸癌からトランス フェクション		NGF (神経成長因子) 受容体
MET	ヒト骨肉腫からトランス フェクション		スキッター (Scatter) 因子/HGF 受容体
RET	転座および点突然変異	散発性甲状腺癌、家族 性甲状腺髄様癌、多発 性内分泌腺腫2Aおよび 2B	オーファン受容体 Tyr キナーゼ
ROS	URIIトリ肉腫ウイルス		オーファン受容体 Tyr キナーゼ
PDGF受容体	転座	慢性骨髄単球性白血病	TEL(ETS 様 転 写 因 子)/PDGF受容体遺伝子 融合
TGF- β 受容体		大腸癌 mismatch 突然 変異ターゲット	
非受容体型チロシンキナーゼ ¹ ABI	アベルソンMu1.v	慢性骨髄性白血病 BCR と転座	RB、RNAポリメラー ゼ、CRK、CBLと相互作用

20

30

【 0 1 8 9 】

【表 3 C】

遺伝子	由来	ヒト疾患	機能
<i>FPS/FES</i>	トリ藤浪SV、GaFeSV		
<i>LCK</i>	Mu1.V (ネズミ白血病ウイルス) プロモーター挿入		Srcファミリー、T細胞シグナル伝達、CD4/CD8と相互作用
<i>SRC</i>	トリラウス肉腫ウイルス		シグナル伝達機能を持つ膜関連Tyrキナーゼ、受容体キナーゼによる活性化
<i>YES</i>	トリY73ウイルス		Srcファミリー、シグナル伝達
SER/THRプロテインキナーゼ¹			
<i>AKT</i>	AKT8ネズミレトロウイルス		PI(3)Kによって調節? 70-kd S6 kを調節?
<i>MOS</i>	モロニーネズミSV		GVBD、細胞分裂停止因子、MAPキナーゼキナーゼ
<i>PIM-1</i>	プロモーター挿入マウス		
<i>RAF/MIL</i>	3611ネズミSV、MH2トリSV		RAS経路でシグナル伝達
その他の細胞表面¹			
<i>APC</i>	腫瘍抑制因子	大腸癌	カテニンと相互作用
<i>DCC</i>	腫瘍抑制因子	大腸癌	CAMドメイン
<i>E-カドヘリン</i>	腫瘍抑制因子候補	乳癌	細胞外同型結合、カテニンと細胞内相互作用

10

20

【 0 1 9 0 】

【表 3 D】

遺伝子	由来	ヒト疾患	機能
<i>PTC/NBCCS</i>	腫瘍抑制因子およびショウジョウバエ相同性	基底細胞母斑症候群 (ゴーリン症候群)	12膜貫通ドメイン、GliホモログCIによるシグナルでヘッジホッグ経路を拮抗シグナル伝達?
<i>TAN-1ノッチ (Notch) ホモログ</i>	転座	T-ALL	
その他のシグナル伝達^{1,3}			
<i>BCL-2</i>	転座	B細胞性リンパ腫	アポトーシス
<i>CBL</i>	Mu Cas NS-1 V		チロシンリン酸化RINGフィンガーがAb1と相互作用
<i>CRK</i>	CT1010 ASV		アダプターSH2/SH3がAb1と相互作用
<i>DPC4</i>	腫瘍抑制因子	膵臓癌	TGF-β関連シグナル伝達系路
<i>MAS</i>	トランスフェクション		おそらくアンジオテンシン受容体
<i>NCK</i>	および腫瘍原性		アダプターSH2/SH3
グアニンヌクレオチド交換因子および結合タンパク質^{3,4}			
<i>BCR</i>		CMLでABLと転座	交換因子、プロテインキナーゼ
<i>DBL</i>	トランスフェクション		交換因子
<i>GSP</i>			
<i>NF-1</i>	遺伝性腫瘍抑制因子	腫瘍抑制因子神経線維腫症	RAS GAP
<i>OST</i>	トランスフェクション		交換因子
ハーベイ (Hervey) - カーステン	HaRat SV、Ki RasV、	多くのヒト腫瘍で点突然変異	シグナルカスケード

30

40

【 0 1 9 1 】

【表 3 E】

遺伝子	由来	ヒト疾患	機能
(Kirsten), N-RAS	Balb-MoMuSV、 トランスフェクション		
VAV	トランスフェクション		S112/S113、交換因子
核タンパク質および転写因子 ^{1,5-9}			
BRCA1	遺伝性抑制因子	乳癌/卵巣癌	局在化不安定
BRCA2	遺伝子抑制因子	乳癌	機能未知
ERBA	トリ赤芽球症ウイルス		甲状腺ホルモン受容体 (転写)
ETS	トリE26ウイルス		DNA結合
EVII	MuLVプロモーター挿入	AML	転写因子
FOS	FBI/FBRネズミ骨肉腫 ウイルス		c-JUNと共に1転写因子
GLI	増幅神経膠腫	神経膠腫	ジンクフィンガー、 キュビタスインターラ プタスホモログはヘッ ジホッグシグナル伝達 系路内にある。PTCと ヘッジホッグの阻害的 リンク
HMGG/LIM	転座 t(3:12)t(12: 15)	脂肪腫	遺伝子融合高移動度群 HMGI-C (XT-フック) および転写因子 LIMま たは酸性ドメイン

10

20

【 0 1 9 2 】

【表 3 F】

遺伝子	由来	ヒト疾患	機能
JUN	ASV-17		FOSと共に転写因子AP- 1
MLL/VHRX+ELI/MEN	ELLとMLLの転座/融合 トリソラックス (Trithorax) 様遺伝子	急性骨髄性白血病	DNA結合およびメチル トランスフェラーゼ MLLとELI RNA pol II延長因子との遺伝子 融合
MYB	トリ骨芽球症ウイルス		DNA結合
MYC	トリMC29、転座B細胞 リンパ腫、プロモー ター挿入トリ白血病ウ イルス	バーキットリンパ腫	MAXパートナーとのDNA 結合、サイクリン調 節、RBと相互作用？、 アポトーシスを調節？
N-MYC	増幅	神経芽細胞腫	
L-MYC		肺癌	
REL	トリ網膜内皮症 ウイルス		NF-κBファミリー転写 因子
SKI	トリSKV770レトロ ウイルス		転写因子
VHL	遺伝性抑制因子	フォン・ヒッペル-リン ドウ症候群	負の調節因子またはエ ロンギン、転写延長複 合体
WT-1		ウィルムス腫瘍	転写因子
細胞周期/DNA損傷応答 ¹⁰⁻²¹			
ATM	遺伝性障害	毛細管拡張失調症	タンパク質/脂質キナー ゼ相同性、P53経路の 上流でDNA損傷応答 アポトーシス
BCL-2	転座	濾胞性リンパ腫	
FACC	点変異	ファンconi貧血c群(白 血病の素因)	
FHIT	脆弱部位3p14.2	肺癌	ヒスチジントライアド 関連ジアデノシン 5',3'-ppp-p ¹ ,p ⁴ テト ラリン酸非対称ヒドロ

30

40

【 0 1 9 3 】

【表 3 G】

遺伝子	由来	ヒト疾患	機能
<i>hMLI/MutL</i>		HNPCC	ラーゼ ミスマッチ修復、MutL ホモログ
<i>hMSH2/MutS</i>		HNPCC	ミスマッチ修復、MutS ホモログ
<i>hPMS1</i>		HNPCC	ミスマッチ修復、MutL ホモログ
<i>hPMS2</i>		HNPCC	ミスマッチ修復、MutL ホモログ
<i>INK4/MTS1</i>	9p21 で INK-4B に 隣 接、CDK複合体	候補MTS1抑制因子およ びMLMメラノーマ遺伝 子	p16 CDK阻害剤
<i>INK4B/MTS2</i>		候補抑制因子	p15 CDK阻害剤
<i>MDM-2</i>	増幅	肉腫	p53の負の調節因子

10

【 0 1 9 4 】

【表 3 H】

遺伝子	由来	ヒト疾患	機能
<i>p53</i>	SV40 T抗原と結合	遺伝性リー-フラウメニ 症候群を含むヒト腫瘍 の50%以上で突然変異	転写因子、チェックポ イント制御、アポトー シス
<i>PRAD1/BCL1</i>	副甲状腺ホルモンまた はIgGと転座	副甲状腺腺腫、B-CLL	サイクリンD
<i>RB</i>	遺伝性網膜芽腫、多く のDNAウイルス腫瘍抗 原と結合	網膜芽腫、骨肉腫、乳 癌、他の散発性癌	サイクリン/cdkと相互 作用、E2F転写因子を 調節
<i>XPA</i>		色素性乾皮症、皮膚癌 の素因	切り出し修復、光産物 認識、ジंकフィン ガー

20

治療のために取得すべき治療配列や、それらの素性は、例えば米国国立バイオテクノロジー情報センターのGenBankデータベースなどのデータベースからわかるだろうが、代表的な癌処置用の配列として、例えばp53 (M14695; 配列番号6) を挙げることができる。

【 0 1 9 5 】

E. 外科手術

30

癌を持つヒトの約60%は、予防的手術、診断的手術または病期分類手術、治癒手術および姑息手術を含む何らかのタイプの外科手術を受けることになる。治癒手術は、他の治療法、例えば本発明の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子治療、免疫療法および/または代替療法などと一緒に使用することができる癌処置である。

【 0 1 9 6 】

治癒手術には、癌性組織の全部または一部を物理的に除去、切除および/または破壊する切除術が含まれる。腫瘍切除とは、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去を指す。腫瘍切除の他に、外科手術による処置には、レーザー手術、凍結手術、電気外科、顕微鏡を使った手術(モース氏手術)などがある。さらに、本発明は表層癌、前癌、または付随的な量の正常組織の除去と共に使用することもできると考えられる。

40

【 0 1 9 7 】

癌性細胞、組織または腫瘍の一部または全部を切除すると、体内に空洞が形成されうる。処置は、付加的な抗癌治療法を用いるその領域のかん流、直接注入または局所適用によって行うことができる。そのような処置は、例えば1、2、3、4、5、6または7日ごと、または1、2、3、4および5週間ごと、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12ヶ月ごとに繰り返すことができる。これらの処置は投与量も様々であることができる。

【 0 1 9 8 】

F. 他の薬剤

処置の治療有効性を向上させるために、他の薬剤を本発明と組み合わせることもできると考えられる。これらの付加的薬剤としては、例えば免疫調節剤、細胞表面受容

50

体およびギャップ結合のアップレギュレーションに影響を及ぼす薬剤、細胞分裂抑制剤および分化誘導剤、細胞接着阻害剤、またはアポトーシス誘導剤に対する過剰増殖細胞の感受性を増加させる薬剤などが挙げられる。免疫調節剤には、例えば腫瘍壊死因子、インターフェロン、および、IL-2および他のサイトカイン類、F42Kおよび他のサイトカイン類似体、またはMIP-1、MIP-1、MCP-1、RANTESおよび他のケモカイン類などがある。さらに、細胞表面受容体またはそのリガンド、例えばFas/Fasリガンド、DR4またはDR5/TRAILなどのアップレギュレーションは、過剰増殖細胞に対するオートクリンまたはパラクリン効果の樹立によって、本発明のアポトーシス誘導能を増強することも考えられる。ギャップ結合数の上昇による細胞間シグナル伝達の増加は、近傍の過剰増殖細胞集団に対する抗過剰増殖効果を増加させるだろう。別の実施形態では、処置の抗過剰増殖有効性を向上させるために、細胞分裂抑制剤または分化誘導剤を本発明と組み合わせて使用することができる。細胞接着の阻害剤は本発明の有効性を向上させると考えられる。細胞接着阻害剤の例は接着斑キナーゼ (focal adhesion kinase; FAK) 阻害剤およびロバスタチンである。さらに、処置の有効性を向上させるために、アポトーシスに対する過剰増殖細胞の感受性を増加させる他の薬剤、例えば抗体c225などを、本発明と組み合わせて使用することもできると考えられる。

10

【0199】

ホルモン療法も本発明と組み合わせて、または上述した他の任意の癌治療法と組み合わせて使用することができる。ホルモンの使用は、乳癌、前立腺癌、卵巣癌または子宮頸癌などの一定の癌の処置に、テストステロンまたはエストロゲンなどの一定のホルモンのレベルを低下させたり、その効果を遮断したりする目的で利用することができる。この処置は、1つの処置選択肢として、または転移の危険を減少させる目的で、しばしば少なくとも1つの他の癌治療法と組み合わせて使用される。

20

VII. 医薬組成物および投与経路

本発明の組成物は、治療的に投与されるヌクレオチド配列の有効量を含み、一部の実施形態では、それぞれ適当な疾患状態または医学的状态の治療に役立つ化合物(第2剤)の有効量と組み合わされる。そのような組成物は一般に医薬的に許容できる担体または水性媒質に溶解または分散されるだろう。本明細書で使用する「有効」または「治療(的に)有効」という用語は、例えば症状の悪化を阻害すること、疾患の発症を防止すること、少なくとも1つの症状の改善、またはそれらの組合せなどを指す。

30

【0200】

「医薬的または薬理的に許容できる」という表現は、動物またはヒトに適宜投与したときに、有害反応、アレルギー反応、または他の不都合な反応を引き起こさない分子種および組成物を指す。本明細書にいう「医薬的に許容できる担体」には、ありとあらゆる溶媒、分散媒、剤皮、抗細菌および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などが含まれる。医薬活性物質へのそのような媒質および薬剤の使用は当技術分野ではよく知られている。都合のよい媒質または薬剤が活性成分と適合しない場合を除き、治療組成物にはその使用が見込まれる。他の抗疾患剤などの補助活性成分も、本組成物に組み込むことができる。

【0201】

非経口投与用、例えば静脈内注射用または筋肉内注射用に製剤化された化合物に加えて、医薬的に許容できる他の形態には、例えば錠剤または経口投与用の他の固形剤、徐放性カプセル、および現在使用されている他の任意の形態(クリーム剤、ローション剤、洗口剤、吸入剤など)がある。

40

【0202】

本発明の組成物は古典的な医薬調製物を含みうる。本発明によれば、これらの本発明組成物の投与は、その経路が標的組織に対して有効である限り、任意の一般的な経路で行われるだろう。これには、経口経路、鼻腔経路、口腔粘膜経路、直腸経路、膣経路または局所経路などが含まれる。もう一つの選択肢として、同所性注射、皮内注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射または静脈内注射によって投与を行ってもよい。そのような組成物は、通常は、上述の医薬的に許容できる組成物として投与されるだろう。

50

【0203】

本発明の組成物は溶液または懸濁液として注射可能な組成物の形態で有利に投与しうる。注射に先立って溶液または懸濁液を調製するのに適した固形剤を調製することもできる。これらの調製物は乳化することもできる。そのような目的を持つ典型的組成物は、リン酸緩衝食塩水1mlにつき50mgのまたは100mgまでのヒト血清アルブミンを含む。他の医薬的に許容できる担体には、水性溶液、無毒性賦形剤、例えば塩類、保存剤、緩衝剤などがある。非水性溶媒の例はプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油および注射可能な有機エステル（オレイン酸エチルなど）である。水性担体には、水、アルコール/水溶液、食塩溶液、非経口賦形剤、例えば塩化ナトリウム、リンゲルデキストロスなどがある。静脈内賦形剤には水分および栄養補充剤がある。保存剤には抗微生物剤、酸化防止剤、キレート剤および不活性ガスなどがある。pHおよび医薬品中の様々な成分の正確な濃度は、周知のパラメーターに従って調節される。

10

【0204】

経口投与に適した製剤もある。経口製剤は、医薬用のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどといった典型的賦形剤を含む。本組成物は、溶液剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性製剤または散剤の形態をとる。投与経路が局所経路である場合、剤形はクリーム剤、軟膏、膏薬またはスプレー剤などでありうる。

【0205】

治療剤の有効量は意図する目標に基づいて決定される。「1回量」という用語は、対象に使用するのに適した物理的に不連続な単位を指し、各単位は、その投与（すなわち適切な経路および処置計画）に付随して所望の応答が生じるように計算された所定の量の治療組成物を含有する。投与すべき量は、処置回数も1回量も、処置すべき対象、その対象の状態、および所望する保護作用に依存する。治療組成物の正確な量は医師の判断にも依存し、各個人に特有の量になる。

20

【0206】

治療に必要な必須の物質および試薬の全てを1つのキットにまとめることができる。キットの成分を1つ以上の溶液として提供する場合は、その溶液は好ましくは水溶液であり、滅菌水溶液は特に好ましい。

【0207】

インピボ用途には、薬剤を、注射器の利用が可能な医薬的に許容できる単一のまたは個別の組成物に製剤化することができる。この場合、容器手段はそれ自体が、そこから薬剤を身体の患部領域（例えば肺）に適用したり、動物に注射したり、さらにはキットの他の成分に適用またはキットの他の成分と混合したりすることができる吸入器、注射器、ピペット、点眼器、または他の同様の装置であることができる。

30

【0208】

キットの成分は乾燥状態または凍結乾燥状態で提供することもできる。試薬または成分を乾燥状態で提供する場合、一般的には適切な溶媒の添加によって復元が行われる。溶媒も別の容器手段に入れて提供できると考えられる。本発明のキットには、遺伝子治療および/または化学療法剤の投与を説明した指示書も同梱することができる。

40

【0209】

通例、本発明のキットには、市販用にバイアルを厳重に封じ込めておくための手段、例えば射出成形または吹込み成形されたプラスチック容器であってその中に所望のバイアルを保持しておくものなども含まれるだろう。容器の数またはタイプには関わりなく、本発明キットには、最終的な複合組成物を動物の体内に注射/投与または設置するのを助ける器具を含めるか、またはそのような器具を同梱することができる。そのような器具として、例えば吸入器、注射器、ピペット、ピンセット、計量スプーン、点眼器、または医学的に承認された同様の送達媒体を挙げることができる。

【0210】

本発明の活性化合物は、多くの場合、非経口投与用に製剤化すること（例えば静脈内経

50

路、筋肉内経路、皮下経路、さらには腹腔内経路による注射用に製剤化すること)ができるだろう。活性成分として第2剤を含む水性組成物の調製は、本明細書を考慮すれば、当業者にはわかるだろう。通例、そのような組成物は、溶液または懸濁液として注射剤の形で調製することができる。注射に先立って液体を添加して溶液または懸濁液を調製するために使用するのに適した固形剤も調製することができる。また、それらの調製物を乳化することもできる。

【0211】

遊離塩基または薬理的に許容できる塩である活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適宜混合した水中に調製することができる。分散液はグリセロール、液状ポリエチレングリコールおよびそれらの混合物や油中に調製することができる。通常貯蔵条件および使用条件では、これらの調製物は、微生物の成長を防ぐために、保存剤を含んでいる。

10

【0212】

注射用に適した医薬剤形には、滅菌水性溶液または滅菌水性分散液、ゴマ油、ラッカセイ油または水性プロピレングリコールを含む製剤、滅菌注射可能溶液または滅菌注射可能分散液を即時調製するための滅菌粉末などがある。いずれの場合も剤形は滅菌されていなければならない、注射器で容易に扱える程度に流動性でなければならない。また、製造条件下および貯蔵条件下で安定でなければならない、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に抗して保存されなければならない。

【0213】

活性化合物は中性型または塩型として組成物中に製剤化することができる。医薬的に許容できる塩には、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸を使って形成される酸付加塩(タンパク質の遊離アミノ基を使って形成されるもの)が含まれる。遊離のカルボキシル基を使って形成される塩も、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化第二鉄などの無機塩基や、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から得ることができる。

20

【0214】

担体は、例えば水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、液状ポリエチレングリコールなど)、その適当な混合物、および植物油などを含む溶媒または分散媒であることもできる。適正な流動性は、例えばレクチンなどの剤皮を使用したり、分散系の場合には必要な粒径を維持したり、界面活性剤を使用したりすることによって維持できる。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、例えば糖類または塩化ナトリウムなどの等張化剤を含めることが好ましいだろう。注射用組成物の持続性吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムやゼラチンなどを使用することによって達成できる。

30

【0215】

滅菌注射溶液剤は、必要量の活性化合物を、必要に応じて上述した様々な他の成分と共に、適当な溶媒に投入した後、ろ過滅菌することによって調製される。一般に分散液は、基礎分散媒と上述した成分から選択される他の必要な成分とを含む滅菌賦形剤に、様々な滅菌活性成分を投入することによって調製される。滅菌注射溶液剤を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥および凍結乾燥技術である。この方法では、活性成分と所望する任意の追加成分との粉末が、前もって滅菌ろ過されたその溶液から得られる。

40

【0216】

場合によって、本発明の治療製剤は、クリーム剤やローション剤など、局所投与に適した剤形に調製することもできるだろう。これらの剤形は皮膚関連疾患、例えば種々の肉腫などを処置するために使用することができる。

50

【0217】

溶液剤を製剤化したら、それを、その投与製剤に適合する方法により、治療的に有効であるような量で、投与することができる。製剤は、上述したタイプの注射用溶液剤など様々な剤形で容易に投与ことができ、さらには薬物放出カプセルなども使用することができる。

【0218】

例えば水溶液として非経口投与する場合は、必要ならその溶液を適切に緩衝化し、十分な食塩水またはグルコースを使って液体希釈剤をまず等張化すべきである。これら特別な水溶液は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与および腹腔内投与には特に適している。この点に関して、使用することができる滅菌水性媒質は、本明細書を考慮すれば、当業者にはわかるだろう。例えば、1投薬量を等張NaCl溶液1mLに溶解し、それを1000mLの皮下注入液に加えるか、予定した注入部位に注射することができるだろう（例えば「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版，1035～1038頁および1570～1580頁を参照されたい）。処置対象の状態に依存して投薬量の多少の変動は必然的に起こるだろう。投与責任者は、いずれにせよ、個々の対象に適した投与量を決定することになる。

【0219】

癌を持つ個体に対して治療が行われる典型的な方法の一つでは、癌性組織のターゲティングを、様々な方法のいずれかによって達成することができる。例えば、本発明の組成物（例えば適当な相同的交換可能片を持つAE-DNA）とリポソームとの複合体を形成させ、それを癌患者に注射することができる。遺伝子を全ての細胞に向かわせるには静脈内注射を使用することができる。一部の癌では、リポソーム複合体を癌の近傍に直接注射することで、複合体のターゲティングを行うこともできる。例えば、卵巣癌は、卵巣癌患者の腹腔腔にリポソーム混合物を直接注射することによって、ターゲティングすることができる。もちろん、リポソームには癌性細胞集団に選択的に取り込まれる可能性も存在し、そのようなリポソームも遺伝子のターゲティングには役立つだろう。

【0220】

本発明の組成物を使って治療を行うための最善の処置計画を簡単に決定できることは、当業者には理解されるだろう。これは、実験の問題ではなく、むしろ医学では日常的に行われている最適化の問題である。例えば、ヌードマウスでのインビボ研究によって出発点を得て、その出発点から投薬量および送達計画の最適化を始める。注射頻度は、一部のマウス研究で行われたように、最初は1週間に1回になるだろう。しかしこの頻度は、初期の臨床試験で得られる結果と特定患者の要求に依存して、1日から2週間ごと～1ヶ月ごとまで、最適に調節される可能性がある。ヒト投薬量は、最初は、マウスで使用された組成物量から外挿することによって決定することができる。一定の実施形態では、投薬量が約1mg組成物DNA/Kg体重から約5000mg組成物DNA/Kg体重まで、または約5mg/Kg体重から約4000mg/Kg体重まで、または約10mg/Kg体重から約3000mg/Kg体重まで、または約50mg/Kg体重から約2000mg/Kg体重まで、または約100mg/Kg体重から約1000mg/Kg体重まで、または約150mg/Kg体重から約500mg/Kg体重まで変動しうると考えられる。別の実施形態では、この用量が約1、5、10、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000mg/Kg体重でありうる。別の実施形態では、さらに高用量を使用することができると考えられ、そのような用量は約5mg組成物DNA/Kg体重～約20mg組成物DNA/Kg体重の範囲をとりうる。別の実施形態では、用量は約8、10、12、14、16または18mg/Kg体重でありうる。もちろんこの投薬量は、そのような処置プロトコールでは日常的に行われているように、初期臨床試験の結果と特定患者の要求に依存して、増減することができる。

【0221】

VIII. 核酸分子の送達

本発明のポリヌクレオチドを哺乳類細胞中に導入するための非ウイルス遺伝子送達ベクターも、本発明ではいくつか考えられる。これらには、リン酸カルシウム沈殿法（Graham

10

20

30

40

50

およびVan Der Eb, 1973、ChenおよびOkayama, 1987、Rippeら, 1990)、DEAE-デキストラン法(Gopal, 1985)、エレクトロポレーション(Tur-Kaspaら, 1986、Potterら, 1984)、直接マイクロインジェクション(HarlandおよびWeintraub, 1985)、DNA負荷リポソーム(NicolauおよびSene, 1982、Fraleyら, 1979)およびリポフェクトアミン-DNA複合体、細胞超音波処理(Fechheimerら, 1987)、高速マイクロプロジェクティルを使った遺伝子バンパードメント(Yangら, 1990)、ならびに受容体を介したトランスフェクション(WuおよびWu, 1987、WuおよびWu, 1988)などがある。これらの技術の一部は、インビボ用途またはエクスピボ用途にうまく適合させることができる。

【0222】

ポリヌクレオチドが細胞中に送達されると、標的DNAに相同なAE-DNAの配列は、それに
10 応じた位置に配置される。ある実施形態では、本明細書に記載する方法により、ポリヌクレオチドを細胞のゲノム中に安定に組み込むことができる。ポリヌクレオチドを細胞に送達する方法および細胞内で核酸がとどまる位置は、当技術分野で知られている数多くの要因に依存する。

【0223】

本発明のさらにもう一つの実施形態では、発現ベクターは、単に、ポリヌクレオチドを含む裸の組換えDNAまたは組換えプラスミドからなってもよい。コンストラクトの導入は、細胞膜の透過性を物理的または化学的に上げる上述の方法のいずれかによって行うことができる。これはインビトロ導入には特に当てはまるが、インビボ用途にも同様に適用することができる。Dubenskyら(1984)は、リン酸カルシウム沈殿物の形で、ポリオーマウ
20 ウイルスDNAを成体マウスおよび新生仔マウスの肝臓と脾臓に注入することに成功し、活発なウイルス複製と急性感染が起こることを示した。BenvenistyおよびNeshif(1986)も、リン酸カルシウム沈殿プラスミドの直接腹腔内注射が、トランスフェクトされた遺伝子の発現をもたらすことを実証した。関心ある遺伝子をコードするDNAも同じようにしてインビボで導入し、その遺伝子産物を発現させることができると考えられる。

【0224】

本発明のさらにもう一つの実施形態として、細胞への裸のDNAの導入には、粒子バンパードメントを利用することができる。この方法は、DNA被覆マイクロプロジェクティルを高速に加速することができ、それによって、DNA被覆マイクロプロジェクティルが細胞膜を突き抜けて、細胞を殺すことなく細胞内に侵入できるようになるということに依存して
30 いる(Kleinら, 1987)。小粒子を加速するための装置はいくつか開発されている。そのような装置の一つは、高電圧放電によって電流を発生させ、それが原動力となるものである(Yangら, 1990)。使用されてきたマイクロプロジェクティルは、生物学的に不活性な物質、例えばタングステンまたは金のビーズなどからなる。

【0225】

ラットおよびマウスの肝臓、皮膚および筋組織を含む選択された器官には、インビボでバンパードメントが行われている(Yangら, 1990、Zeleninら, 1991)。これには、銃と標的器官との間に介在する組織を取り除くために、組織または細胞の外科的露出が必要になる場合がある。すなわちエクスピボ処置である。この場合も、特定遺伝子をコードするDNAをこの方法で送達することができ、本発明に組み込むことができる。
40

【0226】

本発明のさらにもう一つの実施形態として、もう一つの非ウイルス遺伝子送達ベクターであるリポソームに、ポリヌクレオチドを封入することができる。リポソームはリン脂質二重層膜と内部の水性媒質とを特徴とする小胞構造である。マルチラメラリポソームは水性媒質で隔てられた複数の脂質層を持つ。これらは、リン脂質を過剰量の水性溶液に懸濁すると自発的に形成される。脂質成分は自己再配列を起こした後、閉鎖構造を形成し、水と溶解した溶質とを脂質二重層の間に閉じこめる(GhoshおよびBachhawat, 1991)。また、リポフェクトアミン-DNA複合体も考えられる。

【0227】

インビトロでのリポソームによる核酸送達および外来DNAの発現は極めてうまくいって
50

いる。Wongら(1980)は、培養ニワトリ胚細胞、HeLa細胞および肝臓癌細胞で、外来DNAのリポソームによる送達および発現が実施可能であることを実証した。Nicolauら(1987)は、ラットで静脈内注射後のリポソームによる遺伝子伝達を成功させた。

【0228】

本発明の一定の実施形態では、リポソームを血球凝集性ウイルス(HVJ)と複合体化させることができる。これは、細胞膜との融合を容易にし、リポソームに封入されたDNAの細胞侵入を促進することが示されている(Kanedaら, 1989)。別の実施形態では、リポソームを核非ヒストン染色体タンパク質(HMG-1)と複合体化または併用することができる(Katoら, 1991)。さらに別の実施形態では、リポソームをHVJおよびHMG-1の両方と複合体化または併用することができる。そのような発現コンストラクトはインビトロおよびインビボで核酸の導入および発現に使用されて成功を収めているので、これらは本発明にも応用できる。DNAコンストラクト中に細菌プロモーターを使用する場合は、リポソーム内に適当な細菌ポリメラーゼを含むことも望ましいだろう。

10

【0229】

細胞に特定遺伝子をコードする核酸を送達するために使用することができる他のポリヌクレオチドは、受容体媒介送達媒体である。これらは、ほとんど全ての真核細胞で起こる受容体を介したエンドサイトーシスによる高分子の選択的な取り込みを利用するものである。様々な受容体が細胞タイプ特異的に分布していることから、この送達方法は著しく特異的であることができる(WuおよびWu, 1993)。

【0230】

受容体媒介遺伝子ターゲティング媒体は、一般に2つの成分、すなわち細胞受容体特異的リガンドとDNA結合剤からなっている。受容体を介した遺伝子導入にはいくつかのリガンドが使用されている。最も詳しく特徴づけられているリガンドはアシアロオロソムコイド(ASOR)(WuおよびWu, 1987)およびトランスフェリン(Wagnerら, 1990)である。最近、ASORと同じ受容体を認識する合成ネオグリコプロテインが遺伝子送達媒体として使用された(Ferkolら, 1993、Peralesら, 1994)。また、表皮成長因子(EGF)も扁平上皮癌細胞に遺伝子を送達するために用いられている(Myers, EP0 0 273 085)。

20

【0231】

別の実施形態では、送達媒体がリガンドとリポソームとを含みうる。例えば、Nicolauら(1987)は、ガラクトース末端アシアロガングリオシドであるラクトシルセラミドを使用し、これをリポソームに組み込んで、肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込み量の増加を観察した。このように、特定遺伝子をコードする核酸は、リポソームを含むまたはリポソームを含まない多くの受容体-リガンド系によって、ある細胞タイプに特異的に送達することもできる。例えば、表皮成長因子(EGF)は、EGF受容体のアップレギュレーションを示す細胞への核酸の受容体媒介送達に、使用することができる。マンノースは、肝細胞上のマンノース受容体を標的にするために使用することができる。

30

【0232】

一定の実施形態では、DNA導入を、エクスビボ条件下で、さらに容易に行うことができる。エクスビボ遺伝子治療とは、動物から細胞を単離し、その細胞にインビトロで核酸を送達した後、改変された細胞を動物内に戻すことを指す。これには、動物からの組織/器官の外科的除去、または細胞および組織の初代培養が必要な場合がある。

40

【実施例】

【0233】

< IX . 実施例 >

本発明の好ましい態様を実証するために、以下の実施例を記載する。以下の実施例に開示する技術は、本発明の実施に際してうまく機能することを本発明者らが発見した技術に相当し、したがって本発明の好ましい実施形態を構成すると見なしうることは、当業者には理解されるはずである。しかし、本明細書に開示する具体的実施形態には多くの改変を加えることができ、それでもなお本発明の精神と範囲から逸脱することなく同様の結果が得られることは、本明細書に照らして、当業者には理解されるはずである。

50

【 0 2 3 4 】

< 実施例 1 >

実施例 2~5 に関する典型的な材料と方法

細胞株

アフリカミドリザル腎臓 (Vero) 細胞、ヒト胎児線維芽細胞 (HF333.We)、ヒト腫瘍細胞株 U-87MG (膠芽腫)、Hep3B (肝細胞癌) およびヒト前立腺癌細胞株 DU145 は、アメリカン・ティシュー・カルチャー・コレクション (メリーランド州ロックビル) から入手した。全ての細胞を 10% ウシ胎仔血清 (FBS) を含む DMEM で培養した。

膜融合性腫瘍溶解性 HSV の作製

腫瘍溶解性 HSV はいずれも、突然変異型の HSV-1 ゲノム (34.5 遺伝子と HSV パッケージングシグナルが欠失しているもの) を含む細菌人工染色体 (BAC) コンストラクト fHSV-delta-pac から誘導した (Saeki ら, 1998)。感染性 HSV は fHSV-delta-pac から 2 段階で作製した (図 1)。まず、強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) および GALV fus を含む遺伝子カセットを、1 コピーの HSVpac (典型的な配列は配列番号 14 である) と サイトメガロウイルス前初期プロモーターとを含んでいる pSZ-pac に クローニングした。pEGFP-N1 (Clontech) から AseI および AflIII によって EGFP 遺伝子カセットを切り出し、それを pSZ-pac に クローニングして、pSZ-EGFP を生成させた。pCR3.1-GALV から NheI および NotI によって GALV.fus 遺伝子を切り出し、pSZ-pac 中に クローニングして、pSZ-GALV を作製した。UL38 のプロモーターおよびエンハンサー領域 (das) は明確に定義されている (Guzowski および Wagner, 1993)。プロモーターは、次のオリゴヌクレオチド対を使って、HSV-1 ゲノムから増幅した (das 配列を含む) : フォワードプライマー 5'GTGGGTTGCGGACTTTCTGC3' (配列番号 1) および リバースプライマー 5'ACACTCACGCAAGGCGGAAC3' (配列番号 2)。その PCR 産物を pSZ-pac に クローニングして CMV プロモーターを置き換え、plox-UL38P を作製した。NheI および NotI 消化によって得た GALV.fus 遺伝子を、その遺伝子が UL38 プロモーターによって駆動されるように、plox-UL38P に クローニングして、pSZ-38P-GALV を作製した。

【 0 2 3 5 】

感染性 HSV は、fHSV-delta-pac、GALV.fus または EGFP と HSVpac とから、pSZ-EGFP 系 プラスミド (pSZ-EGFP、pSZ-GALV、pSZ-38P-GALV) からの切り出しと、fHSV-delta-pac の ユニーク PacI 部位への直接ライゲーションによって取得した。その DNA ライゲーション混合物を リポフェクトアミン (Gibco-BRL) を使って Vero 細胞に トランスフェクトし、感染性ウイルスを生成させるために 3~5 日間培養した。次に、Baco-1 (EGFP の DNA 断片と pac を含む)、Synco-1 (CMV-GALV.fus の DNA 断片と pac を含む) および Synco-2 (UL38P-GALV.fus と pac を含む) と名付けたウイルスを プラーク精製した。Vero 細胞を 1 細胞あたり 0.01 プラーク形成単位 (pfu) のウイルスに感染させることによってウイルスストックを調製し、2 日後に収集して、-80 で保存した。

膜融合性腫瘍溶解性 HSV の表現型特性解析

細胞を 6 穴プレートに接種し、その翌日に 0.1~0.0001 pfu/細胞の用量で各ウイルスに感染させた。細胞を維持培地 (1% FBS を含む) で培養し、最高 2 日間放置して、融合パターンと プラークを 発達させた。HSV 複製を遮断するために、アシクロビルを培養培地に 100 μM の最終濃度で加えた。分裂を減速させるか胎児線維芽細胞を停止させるために、細胞を 48 時間にわたって FBS 飢餓状態に置くか、24 時間にわたって FBS 飢餓状態に置き、それと同時に 20 μM ロバスタチンと共に培養した後、細胞をウイルスに感染させた。ロバスタチンは細胞周期停止を誘発するが HSV 複製を妨害しない化学物質である (Schangら, 1998)。

インビトロ細胞殺滅アッセイ

3 つのヒト腫瘍細胞株のそれぞれを 48 穴プレートに接種し、0.1 および 0.01 pfu/細胞の各ウイルスに感染させるか、非感染のままにしておいた。24 時間後および 48 時間後に細胞をトリプシン処理によって収集した。生き残った細胞の数をトリパンブルー染色後に血球計数器で数えた。感染ウェルでの生細胞数を非感染ウェルでの総細胞数で割ることによって、細胞生存百分率を計算した。実験は 3 重に行い、最終計算には平均した数を使用した。

動物実験

10

20

30

40

50

6週齢の雄Hsd胸腺欠損 (nu/nu) マウスをHarlan (インディアナ州インディアナポリス) から購入した。Hep3B細胞を標準的条件で培養し、0.05%トリプシン-EDTAを使って対数期に収集した。細胞を無血清培地で2回洗浄した後、 5×10^7 細胞/mlの濃度でPBSに再懸濁した。 5×10^6 細胞を含む合計100 μ lの細胞懸濁液をマウスの右脇腹に皮下注射した。腫瘍が直径約5~8mmに到達した時に、 1×10^7 pfuの各ウイルスを100 μ lの体積で腫瘍内に単回注射した ($n=10$)。対照腫瘍には同じ量のPBSだけを投与した。腫瘍サイズを4週間にわたって毎週測定し、式：腫瘍体積[mm]³ = 0.5 × (長さ[mm]) × (幅[mm])² を使って、腫瘍体積を計算した。

【0236】

腫瘍組織の病理検査のために、ウイルス注射またはPBS注射の5日後にマウスを屠殺した。腫瘍を摘出し、固定し、ヘマトキシリンとエオシンで染色した。 10

【0237】

統計値を平均 ± 平均の標準偏差として表す。比較はスチューデントのt検定を使って行った。統計的有意性は $p < 0.05$ と定義した。

【0238】

< 実施例 2 >

腫瘍溶解性HSVへのGALV.fus遺伝子の強制的ライゲーションおよび新しいウイルスのインビトロ特性解析

GALV.fus遺伝子を腫瘍溶解性アデノウイルスにクローニングしようとする初期の試みは成功しなかった (Diazら, 2000)。この失敗は2つの理由によって起こったのだろう。第1に、GALV.fus遺伝子トランスフェクション後に起こる激しく迅速なシンシチウム形成が、組換えウイルス生成に必要なその後の相同組換えを妨害したのかもしれない。第2に、アデノウイルスの場合、GALV.fusの発現は、このウイルスの感染過程を妨害するのだろう。エンベロープを持たないアデノウイルスとは異なり、HSVはエンベロープを持つウイルスであり、その感染には必然的に膜融合が関与する。したがって、HSVはGALV.fusなどの遺伝子による膜融合効果に耐えて増殖を続けることができる可能性があるかと予想した。GALV.fus遺伝子トランスフェクションの初期膜融合による潜在的な妨害を避けるために、腫瘍溶解性HSVのゲノムへのGALV.fus遺伝子の挿入には、強制的直接ライゲーション法を使用した (図1)。fHSV-delta-pacは、34.5をコードするディプロイド遺伝子が部分的に欠失しており、HSVパッケージングシグナル (pac) の両コピーが完全に欠失している突然変異型HSVゲノムを含む細菌人工染色体 (BAC) 系コンストラクトである (Saekiら, 1998)。したがって、完全なHSVpacをシスに用意しない限り、感染性HSVはこのコンストラクトからは生成することができない。また、34.5遺伝子が部分的に欠失しているため、このコンストラクトから最終的に生成するウイルスはいずれも複製選択的になる。GALV.fus遺伝子カセット (CMV前初期プロモーターによって駆動されるもの) をプラスミド中で完全なHSVpacに連結させた。次に、そのGALV.fus-pac配列を、fHSV-delta-pacのBAC配列中にあるユニークPacI部位に直接ライゲートした。そのライゲーション混合物をVero細胞に直接トランスフェクトし、その細胞から増殖したウイルスを集めてプラーク精製した。プラーク精製したウイルスの一つをSynco-1と名付け、それ以降の研究に使用した。 30

【0239】

Synco-1の表現型を特徴づけた。様々な組織に由来するヒト癌細胞を低い感染多重度 (MOI) でこのウイルスに感染させた。感染後36時間の時点で、明瞭なシンシチウム表現型が、試験した3つの腫瘍細胞の全てに観察された (図2、下側)。平均すると、各シンシチウムは約1,000細胞の面積を覆っていることから、それぞれのシンシチウムには多数の腫瘍細胞が関わっていることがわかった。一方、Baco-1 (これはやはりfHSV-delta-pacに由来するがGALV.fusの代わりにEGFP遺伝子を含んでいる) に感染させた同じ腫瘍細胞では明白なシンシチウムは観察されなかった (図2、上側)。Baco-1による個々のプラークが覆っている面積はSynco-1によるシンシチウムよりかなり小さかった。 40

【0240】

腫瘍溶解性HSVの場合、FMGによるシンシチウム形成は、腫瘍細胞殺滅を増加させること 50

がわかった。投入ウイルスが持つ固有の細胞毒性とこれらの細胞におけるウイルスの複製および拡大能力との両方を評価することができるように、細胞を比較的低いMOI (0.1および0.01pfu/細胞)でBaco-1またはSynco-1に感染させた後で、細胞生存性を比較した。腫瘍細胞に対するウイルス感染の細胞毒性は、ウイルス感染後の異なる時点で生き残っている細胞の百分率を計算することによって定量化した。一般に、どちらの時点でも、またどちらのウイルス量でも、これらの腫瘍細胞を殺滅する能力は、Synco-1の方がBaco-1よりも有意に強かった(図3Aおよび3B)。

【0241】

<実施例3>

異種移植ヒト癌におけるSynco-1の強化された抗腫瘍効果

Synco-1のシンシチウム表現型および強化された腫瘍細胞殺滅能力は、インビボでは強化された抗腫瘍効果に変換された。5mm~8mmの範囲の腫瘍直径を持つ定着したHep3B異種移植体に、ウイルスを直接注射した。1回の腫瘍内注射で 1×10^7 pfuの用量を投与した。これは、通常はこれよりかなり多いウイルス量が複数回の注射で投与されている文献とは対照的である(Minetaら, 1995、Pawlikら, 2000)。腫瘍サイズを4週間にわたって毎週測定した。PBS対照と比較すると、Baco-1の注射とSynco-1の注射はどちらも腫瘍成長に即効性を持っていた(図4)。ウイルス注射の1週間後から、Baco-1とSynco-1を投与したマウスの腫瘍サイズはどちらも、PBSを注射した腫瘍より有意に小さかった($p < 0.001$)。一方、2週間後からは、Synco-1がBaco-1よりも有意に強化された抗腫瘍効果を示した($p < 0.001$)。半数の動物(10匹中5匹)では、Synco-1投与の3週間後に、腫瘍が見られなくなり、残りの半数でも、腫瘍サイズが著しく減少していた。これに対して、Baco-1注射群の場合は、腫瘍が認められなくなったのは1匹だけだった。残り9匹では腫瘍が最初は萎縮し、その後、ウイルス注射の3週間後までには再成長を始めた。ウイルス投与の4週間後(すなわち実験終了時)まで、Synco-1注射群では腫瘍サイズが小さいままか無腫瘍のままだったが、Baco-1注射群では平均腫瘍サイズがウイルス投与前の腫瘍サイズよりもかなり大きくなる。

【0242】

<実施例4>

絶対後期ウイルスプロモーターによるGALV.fusの条件付き発現

GALV.fusの無秩序な発現は、腫瘍溶解性ウイルスの下でも、間違いなく、このウイルスの使用に安全上の懸念を生じさせることになる。これは、例えば播種性転移腫瘍のように全身投与が必要な場合には、特にそうであると言える。この潜在的課題を克服するための論理的な方法は、GALV.fus発現を制御するために、腫瘍特異的または組織特異的プロモーターを使用することである。組織特異的なプロモーターの報告例はかなりあるが、それらは一般にウイルスプロモーターよりもはるかに活性が低く、またいったんウイルスベクター中にクローニングされると、その組織特異性を失おうとする。HSVゲノム転写は、遺伝子発現の初期相と後期相とがウイルスDNA複製によって分けられている調節されたカスケードである。特に、後期転写物の一部は絶対後期に分類することができ、それらの発現はウイルスDNA複製の開始に厳密に依存している。腫瘍溶解性HSVに関して、そのような絶対後期ウイルスプロモーターを使ってGALV.fus発現を指示すれば、高レベルな選択的GALV.fus遺伝子発現が腫瘍組織で起こると考えた。

【0243】

UL38プロモーターは詳しく特徴づけられた絶対後期ウイルス遺伝子であり、そのプロモーター領域は明確に定義されている(GuzowskiおよびWagner, 1993)。GALV.fus遺伝子をUL38プロモーターに連結した後、図1に記載の方法により、遺伝子カセットとしてfHSV-del_{ta}-pac中に挿入して、Synco-2を作製した。様々なヒト腫瘍細胞をSynco-2に感染させたところ、このウイルスもこれらの細胞でシンシチウム表現型を持ち(図5A、5B、5C)、細胞融合の程度はSynco-1の場合(図2に記載)と同等であることがわかった。

【0244】

Synco-2でのGALV.fusによるシンシチウム形成が本当にウイルスDNA複製に依存している

かどうかを決定するために、2つの実験を行った。まず、HSV DNA複製の強い阻害剤であるアシクロビル (ACV) の存在下または非存在下で、ヒト腫瘍細胞をSynco-1またはSynco-2に感染させた。Synco-1によるシンシチウム形成はACVの存在による影響をほとんど受けないが (図5D)、Synco-2による細胞膜融合はこの薬物によって完全に遮断された (図5E)。次に、正常非分裂ヒト細胞においてSynco-2がそのシンシチウム形成誘発能力を失うかどうかを直接調べた。静止状態のまたは細胞周期進行中の初代ヒト線維芽細胞をSynco-1 (図5G~I) またはSynco-2 (図5J~L) に感染させた。細胞を分裂状態に保った場合は、どちらのウイルスによる感染も、この正常ヒト細胞のシンシチウム形成を引き起こし、Synco-1感染によるシンシチウム形成 (図5G) の方が、Synco-2感染によるもの (図5J) よりもわずかに強かった。Synco-1による細胞融合は、細胞周期が減速している (図5H) かまたは完全に停止している (図5I) 細胞でも、わずかな影響しか受けなかった。これに対して、Synco-2による細胞融合は、細胞周期が減速している (図5K) かまたは完全に停止している (図5L) 細胞では、完全に遮断された。感染細胞は非感染細胞 (図5F) とほとんど同じに見えた。これらの結果は全体として、UL38プロモーターが腫瘍溶解性HSVの下で強力かつ腫瘍特異的なプロモーターであることと、腫瘍溶解性HSV中でこのプロモーターを使ってGALV.fus遺伝子を駆動すれば、このウイルスを投与しても余分な副作用の生成が最小限に抑えられることを証明している。

10

【0245】

< 実施例 5 >

Synco-2およびSynco-1の等価な抗腫瘍効力

20

上述したものと同一治療スキームでヌードマウスの異種移植ヒト肝臓癌にウイルスを注射することにより、Synco-1とSynco-2の抗腫瘍効力を比較した。その結果、Synco-1とSynco-2はどちらも、ウイルス投与の2週間後から、Baco-1よりも有意に優れた抗腫瘍効果を持つことがわかった ($p < 0.001$)。一方、Synco-1とSynco-2の抗腫瘍効果には有意差はなかった (図6A)。また、Synco-1またはSynco-2の投与によって得られた無腫瘍マウスの数も同じだった (5/10)。これらの結果は、たとえウイルス中のGALV.fus発現が条件付きウイルスプロモーターで駆動されていても、Synco-2は、Synco-1と等価な抗腫瘍効力を持つことを証明している。

【0246】

シンシチウム形成は、実際、Synco-1およびSynco-2による抗腫瘍治療の腫瘍溶解過程の一部である。定着したHep3B腫瘍に腫瘍溶解性HSVまたはPBSを注射し、その腫瘍を5日後に切除した。染色した腫瘍切片を調べたところ、様々な数の細胞核を含むシンシチウムが、Synco-1またはSynco-2ウイルスを注射した腫瘍の組織切片じゅうに頻りに認められることがわかった (図6B)。そのようなシンシチウムは、Baco-1またはPBSを注射した腫瘍の組織切片には見られない。

30

【0247】

< 実施例 6 >

実施例 7~9に関する典型的な材料と方法

細胞

Vero (アフリカミドリザル腎臓線維芽細胞) 細胞、ヒト胎児線維芽細胞 (HF333.We) およびHep3B (ヒト肝臓癌細胞) はいずれもアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手した。これらは、10%ウシ胎仔血清 (FBS) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。

40

プラスミド構築

詳しく定義されているUL38のプロモーターおよびエンハンサー領域 (das) (Guzowski およびWagner, 1993) を、次のプライマー対を使って、HSV-1 DNAから増幅した: フォワード5'-GTGGGTTGCGGACTTTCTGC-3' (配列番号1) およびリバーズ5'-ACACTCACGCAAGGCGGAAC-3' (配列番号2)。増幅したプロモーター配列を、制限酵素PacIの認識部位が隣接する1コピーのHSVパッケージングシグナルの隣に位置するplox-3HのユニークNcoI部位にクローニングして、plox-UL38pを作製した。分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) をコードす

50

る遺伝子をpSEAP-control (CLONTECH Laboratories, Inc., カリフォルニア州パロアルト) からHpaIおよびHindIIIで切り出し、plox-UL38pのユニークBglII部位に、平滑末端ライゲーションによってクローニングした。したがって、pLox-APと名付けた新しいプラスミドでは、SEAP遺伝子がUL38プロモーターによって駆動される。同じAP遺伝子 (pSEAP-controlのHpaI-HindIII断片) を、PacI認識部位が隣接する1コピーのHSVpacの隣に位置するpIMJ-pacに含まれているCMV-Pの下流に挿入することによって、PIMJ-pac-APを構築した。純粋なプラスミドDNAを細菌培養物のアルカリ溶解によって取得し、QIAGEN-チップ500カラム (QIAGEN, カリフォルニア州バレンシア) で精製した。

【0248】

AP遺伝子カセットを含む腫瘍溶解性HSVの作製

10

AP遺伝子カセットをpac配列と一緒にpLox-APまたはpIMJ-pac-APからPacIで切り出し、ゲル精製した。次に、強制的ライゲーション法によって感染性腫瘍溶解性HSVを作製するために、それらをfHSV-delta-pacにクローニングした。図7に図示するように、fHSV-delta-pacは、細菌人工染色体 (BAC) に基づくHSVコンストラクトである。34.5をコードするディプロイド遺伝子とHSVパッケージングシグナル (pac) の両コピーとが、fHSV-delta-pacに含まれるHSV配列からは削除されているので (Saekiら, 1998)、完全なHSVpacをシスに用意しない限り、このコンストラクトからは感染性HSVは生成することができず、生成したウイルスは34.5遺伝子が両コピーとも欠失しているため複製が条件付きになる。ライゲーション混合物をリポフェクトアミン (Gibco-BRL) を使ってVero細胞中に直接トランスフェクトし、感染性ウイルスを生成させるために3~5日間培養した。次に、Baco-A P1 (CMV-P-APカセットを含んでいるもの) およびBaco-AP2 (UL38p-APカセットを含んでいるもの) と名付けたウイルスをブランク精製した。ウイルス中にAP遺伝子が存在することを、AP発現の検出によって確認した。大きいウイルスストックを調製するために、Vero細胞を1細胞あたり0.01ブランク形成単位 (pfu) の各ウイルスに感染させた。2日後にウイルスを収集し、3サイクルの凍結融解にかけた後、1サイクルの超音波処理を行った。細胞片を低速遠心分離 (4, 2000gで10分) によって除去し、ウイルスストックを-80 で保存した。

20

【0249】

AP放出量を定量するためのインビトロでの哺乳類細胞のトランスフェクションと感染

インビトロプラスミドDNAトランスフェクションのために、前日にVero細胞を 2×10^5 細胞/ウェルの密度で6穴プレートに接種し、5% CO₂ 雰囲気中、37 で培養した。pLox-APまたはpIMJ-pac-APのプラスミドDNA (2 µg) を、製造者の指示に従って、5 µlのリポフェクトアミン (GibcoBRL) と混合した。細胞に適用する前に、そのリポソーム製剤化DNAを1mlの無血清DMEMに加えた。細胞 (約70% コンフルエント) をDNAリポソーム複合体に37 で3時間ばく露した後、そのトランスフェクション混合物を、10% FBSを含む2mlのDMEMで置き換えた。トランスフェクションの16時間後に、細胞を0.1pfu/細胞のBaco-1 (Baco-AP1またはBaco-AP2と同じ方法で構築したものであるが、EGFP遺伝子カセットを代わりに持っている腫瘍溶解性HSV) に感染させるか、または疑似感染 (培地のみ) させた。24時間後にAP放出量を測定するために培地を集めた。

30

【0250】

Baco-AP1およびBaco-AP2のインビトロ特性解析のために、胎児線維芽細胞を、10% FBSを含む培地で成長させることによって細胞周期相に保つか、または無血清培地中、30時間の20 µMロバスタチンで停止させた。ロバスタチンは細胞周期停止を誘発するが、HSV複製を妨害しない化学物質である (Schangら, 1998)。次に、細胞を0.1pfu/細胞のBaco-AP1またはBaco-AP2に感染させ、AP放出量を定量するために感染の24時間後に培地を集めた。

40

【0251】

化学発光APアッセイ

培養培地中または血清中のAP活性は、CLONTECH Laboratories, Inc. (カリフォルニア州パロアルト) から販売されている検出キットを使って定量した。このアッセイは製造者の説明書に従って行った。簡単に述べると、25 µlの試料を75 µlの1×希釈緩衝液に加え

50

た。穏やかに混合した後、希釈した試料を65℃で30分間インキュベートした。その試料を室温まで冷却し、100μlのアッセイ緩衝液を各試料に加えた後、室温で5分間インキュベートした。最後に、試料を、化学発光基質Cおよびエンハンサーを含む溶液と1:20の比で混合し、室温で30分間インキュベートした。照度計(Turner Designs Instruments, カリフォルニア州サニーベール)を使って化学発光を検出した。

動物試験

6週齢の雌Hsd胸腺欠損(nu/nu)マウスをHarlan(インディアナ州インディアナポリス)から入手した。肝臓癌を定着させるために、Hep3B細胞を標準的条件下で培養し、対数期に0.05%トリプシン-EDTAを使って収集した。細胞を無血清培地で2回洗浄した後、PBSに 5×10^7 細胞/mlの濃度で再懸濁した。合計 5×10^6 個の細胞(懸濁液100μl中)を各マウスの右脇腹に皮下注射した。腫瘍内注射の場合は、腫瘍が直径約8mmに達した時に、それらにウイルス(体積100μl中 5×10^6 pfu)を注射した。静脈内(尾静脈)注射または筋肉内(右後肢)注射の場合は、腫瘍が定着していないマウスに同じ量のウイルスを注射した。ウイルス接種後の1日、2日、3日、4日、5日および7日後に、AP放出量を定量する目的で、マウスから採血した。

【0252】

<実施例7>

ベクターの構築と特性解析

遺伝子発現のインビトロおよびインビボ解析を容易にするために、SEAP遺伝子をUL38プロモーター(UL38p)に連結した。対照として同じSEAP遺伝子をCMV-Pにも連結した。腫瘍溶解性HSV中に遺伝子をクローニングするために、強制的ライゲーション法を使用した。この方法は、HSVゲノムへの外来遺伝子のクローニングに関して、伝統的な相同組換えよりも信頼性が高く効率もよい。図7に示すように、fHSV-delta-pacは、34.5をコードするディプロイド遺伝子が部分的に欠失しており、HSVパッケージングシグナル(pac)の両コピーが完全に欠失している突然変異型HSVゲノムを含む細菌人工染色体(BAC)系コンストラクトである(Saekiら, 1998)。したがって、完全なHSVpacをシスに用意しない限り、感染性HSVはこのコンストラクトからは生成することができない。また、34.5遺伝子の両コピーが部分的に欠失しているため、このコンストラクトから生成するウイルスはいずれも複製選択的になる。まず、SEAP遺伝子カセットを中間プラスミドにクローニングして、遺伝子カセットの両脇に制限エンドヌクレアーゼPacIの認識部位を持つpIMJ-pac-APおよびpLox-APを作製した。次に、そのDNA断片をPacIで切り出し、fHSV-delta-pacのBAC配列中にあるユニークPacI部位にライゲートした。そのライゲーション混合物をVero細胞に直接トランスフェクトし、その細胞から増殖したウイルスを集めて、プラーク精製することにより、それぞれBaco-AP1(CMV-P-SEAPカセットを含む)およびBaco-AP2(UL38p-SEAPカセットを含む)を作製した(図7)。

【0253】

次に、これら2つのウイルス(Baco-AP1およびBaco-AP2)を、インビトロでの増殖特性について、直接比較した。3種類の感染多重度、すなわち1細胞あたり0.1、1および5プラーク形成単位(pfu)のウイルスにVero細胞を感染させた。感染の24時間後および48時間後にウイルスを収集し、プラークアッセイによって力価を測定した。これら2つのウイルスの複製に有意差はなかった(表4)。

【0254】

【表 4】

表4. Baco-AP1およびBaco-AP2の増殖特性の比較

	24時間		48時間		
	MOI	Baco-AP1	Baco-AP2	Baco-AP1	Baco-AP2
0.1		5.1×10^5	4.2×10^5	8.6×10^6	7.9×10^6
1		4.4×10^6	5.3×10^6	3.7×10^6	3.4×10^6
5		2.8×10^6	3.5×10^6	2.2×10^6	2.7×10^6

10

【0255】

< 実施例 8 >

UL38プロモーター活性のインビトロ特性解析

UL38p活性のバックグラウンドレベルを決定し、プロモーターのトランス活性化に対するHSV複製の影響を調べた。pIMJ-pac-AP (CMV-P APカセットを含む) DNAおよびpLox-AP (UL38p APカセットを含む) DNAを、Vero細胞に一つずつトランスフェクトした。トランスフェクションの16時間後に、一組のトランスフェクト細胞を、SEAPの代わりに強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子カセットを含んでいる点以外はBaco-AP1またはBaco-AP2と同じ方法で構築した腫瘍溶解性HSV (Baco-1) に感染させた。もう一組のトランスフェクト細胞は疑似感染 (培地のみ) させた。24時間後に、どちらの組の細胞からも培地を集め、培地中に放出されたAPを定量した。その結果、HSV感染がない場合、pLox-APでトランスフェクトした細胞の培地中のAPは、ほとんど検出できないことがわかった (図8)。しかし、腫瘍溶解性HSV感染を起こした場合は、AP発現量が70倍増加して、pIMJ-pac-APトランスフェクト細胞から放出されるAPのレベルのほぼ半分に達した。HSV感染はCMV-PからのAP発現レベルもかなり増加させた。これはおそらく、HSV感染がCMV-P活性をトランス活性化するからだと思われる (Herrlingerら, 2000)。これらのデータは、UL38pが極めて低い基礎活性を持ち、溶解性HSV感染が起こるとその活性が著しく増加することを証明している。

20

30

【0256】

腫瘍溶解性HSVにおけるUL38pのインビトロでの活性を特徴付けた。静止状態または進行状態の正常ヒト細胞でプロモーター活性を比較した。初代ヒト線維芽細胞を12穴プレートに一つずつ接種した。一組を20 μMのロバスタチン (細胞周期停止を誘発するがHSV複製を妨害しない薬物) で処理した (Schangら, 1998)。次に、停止細胞と無処理 (すなわち細胞周期進行中) の細胞をどちらも、0.1pfu/細胞のBaco-AP1またはBaco-AP2に感染させた。感染の24時間後に培養培地を集め、培地中のAPを定量した。その結果、細胞周期進行中の細胞では、UL38p (Baco-AP2感染細胞) からのAP発現の方が、CMV-P (Baco-AP1) からの発現よりも、実際にわずかに高かった (図9)。しかし、細胞周期を停止させると、UL38p活性は低下して低レベルになった。細胞停止は腫瘍溶解性HSVの複製および拡大に対して阻害効果を持つので、CMV-PからのAP発現もかなり減少するが、UL38p含有ウイルス (Baco-AP2) における阻害度の方がはるかに大きい (2倍未満対40倍)。

40

【0257】

< 実施例 9 >

腫瘍溶解性HSVの下でのUL38プロモーター活性のインビボ特性解析

インビボで、腫瘍溶解性HSVの下でのUL38pの腫瘍選択的遺伝子発現を実証した。ヒト異種移植肝腫瘍 (Hep3B) を胸腺欠損ヌードマウスの右脇腹の皮下に定着させた。腫瘍サイズが直径8mmに到達したら、ウイルス (Baco-AP1またはBaco-AP2) を 5×10^6 pfuの用量で腫

50

瘍内注射した。同時に、腫瘍接種を受けなかったマウスにも、同量のウイルスを静脈内 (i.v.) 注射または筋肉内 (i.m.) 注射によって注射した。ウイルス注射後の様々な時点で採血し、AP放出量を定量した。どちらかのウイルスを腫瘍内注射したマウスにおけるAP濃度は、ウイルス投与後2日目までに増加し始め、3日目までにピークレベルに達した。AP放出量はその後、下降し始めたが、実験中は比較的高いレベルを保った (図10)。Baco-AP1からのAP放出量は、実験全体にわたって、Baco-AP2の放出量よりかろうじて高かったが、最終時点 (7日目) は例外で、この時点では前者の方が後者よりもわずかに低かった ($P > 0.05$)。これに対し、ウイルスを静脈内注射した場合は、2日目、3日目および4日目に、AP放出量に関して有意差があった ($P < 0.01$)。Baco-AP2の静脈内注射は、2日目と3日目に動物の血中のAPをわずかに増加させただけだった。ウイルス投与後4日目までに、APはバックグラウンドレベルに戻り、その後、実験中は低レベルのままだった。しかし、同じ量のBaco-AP1をi.v.注射すると、ウイルス接種後5日目に達する前に血清中のAP放出量ははるかに高くなった。どちらかのウイルスを筋肉内投与したマウスの血中APは、実験期間中ずっと基礎レベルのままだった。これはおそらく、成体マウスではHSVベクターによる筋芽細胞の形質導入が起こりにくいからだろう。これらの結果は、全体として、腫瘍溶解性HSVの下で、UL38pは、そのインビボ投与中に、強い腫瘍選択的遺伝子発現を指示できることを証明している。

10

【0258】

< 実施例 10 >

実施例11~13に関する典型的な材料と方法

20

細胞株・マウス

アフリカミドリザル腎臓 (Vero) 細胞はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (メリーランド州ロックビル) から購入した。ヒト細胞株HEYおよびSKOV3はRobert Bast博士 (MD Anderson Cancer Center, テキサス州ヒューストン) から譲り受けた。Hey細胞は、中分化型乳頭状卵巣嚢胞腺癌の腹膜付着物から樹立されたもので、化学療法剤に対して中等度の抵抗性を持つと報告されている (Selbyら, 1980、Buickら, 1985)。全ての細胞を、10% ウシ胎仔血清 (FBS) と抗生物質とを含むDMEM中、湿潤5% CO₂ 雰囲気下で培養した。雌Hsd胸腺欠損 (nu/nu) マウス (Harlan (インディアナ州インディアナポリス) から入手したものを)、特定病原体フリー状態で飼育し、7~8週齢で実験に使用した。

30

【0259】

膜融合性HSVベクターの構築

腫瘍溶解性HSVはいずれも、突然変異型のHSVゲノム (34.5をコードするディプロイド遺伝子とHSVパッケージングシグナル (pac) の両コピーとが欠失しているもの) を含む細菌人工染色体 (BAC) 系コンストラクト fHSV-delta-pac から誘導した (Saekiら, 1998)。完全なHSVpacをシスに用意にしない限り、感染性HSVはこのコンストラクトからは生成することができない。外来遺伝子から挿入し、fHSV-delta-pacから感染性ウイルスを生成させるために、本発明者らは強制的ライゲーション法 (図11) を用いた。まず、2つの遺伝子カセット (UL38プロモーターによって駆動されるGALV.fusと、CMVプロモーターによって駆動される緑色蛍光タンパク質遺伝子) をpSZ-pac中に、それぞれがHSVpacを含むHSV配列と連結されるようにクローニングした。EGFP遺伝子カセットをAseIおよびAflIIIでpEGFP-N1 (Clontech, カリフォルニア州パロアルト) から切り出した。GALV.fus遺伝子はpCR3.1-GALVから切り出し、明確に定義づけられているUL38のプロモーターおよびエンハンサー領域 (DAS) に連結した (McGuireら, 1996)。次に、HSVpacに連結されたGALV.fusまたはEGFP遺伝子カセットをプラスミドから切り出し、fHSV-delta-pacのユニークPacI部位に直接ライゲートした。そのライゲーション混合物をリポフェクトアミン (Gibco-BRL) を使ってVero細胞に直接トランスフェクトし、感染性ウイルスを生成させるために、3~5日間培養した。次に、ウイルスをブランク精製し、Baco-1 (EGFPのDNA断片とpacを含む) およびSynco-2 (UL38-GALV.fusとpacを含む) と名付けた。次に、膜融合性が強化された強力なHSVを生成させるために、Synco-2のランダム突然変異誘発を、先に公表された手法 (FuおよびZhang, 2002、Schafferら, 1973) に従って行った。Vero細胞を1細胞あたり0.01

40

50

ブランク形成単位 (pfu) のウイルスに感染させることによってウイルスストックを調製し、2日後に収集し、-80 で保存した。

【0260】

まず、従来の腫瘍溶解性HSV、すなわちBaco-1(2)に、Vero細胞におけるウイルス複製時のチミジン類似体BrdU取り込みのランダム突然変異誘発によって、膜融合能力を導入した(FuおよびZhang, 2002)。このウイルスの表現型を同定し、均一に精製した。次に、UL38遺伝子の絶対後期プロモーターによって駆動される超膜融合性GALV.fusを、BACに基づくウイルスゲノム中に強制的ライゲーション法によってクローニングして、Baco-1の強化緑色蛍光タンパク質遺伝子を置き換えた。ブランク精製したウイルスの1つ(Synco-2Dと命名)を選択して、さらなる特性解析を行った。

10

【0261】

Synco-2Dの特性解析およびインビトロ細胞殺滅アッセイ

HeyまたはSKOV3卵巣癌細胞を6穴プレートに接種し、翌日、0.01pfu/細胞の用量でBaco-1またはSynco-2Dに感染させた。細胞を維持培地(1%FBSを含む)で培養し、最高2日間放置して、融合パターンとブランクを発達させた。ウイルスのインビトロ殺滅効果を測定するために、HeyまたはSKOV3腫瘍細胞株を24穴プレートに接種し、0.1および0.01pfu/細胞のBaco-1またはSynco-2Dに感染させるか、非感染のままにしておいた。24時間後および48時間後に細胞をトリプシン処理によって収集した。生細胞の数をトリパンブルー染色後に血球計数器で数えた。感染ウェルでの生細胞数を非感染のままにしておいたウェルでの細胞数で割ることによって、細胞生存百分率を計算した。実験は3重に行い、最終計算には平均した数を使用した。

20

【0262】

同所性卵巣癌モデルでのインビボウイルス療法の実験計画

腫瘍を生じさせるために、0.25%トリプシンおよび0.05%EDTAに短時間ばく露することによって、Hey細胞をサブコンフルエント培養物から収集した。トリプシン処理を10%FBSを含む培地で停止させ、細胞を無血清培地で1回洗浄し、PBSに再懸濁した。インビボ注射には、生存率が>95%の単細胞懸濁液だけを使用した。簡単に述べると、0日目に、 3×10^5 個の生Hey細胞を8週齢雌ヌードマウスの腹腔に接種した。腫瘍接種後14日目および28日目に、HSVベクター(2×10^7 pfu/200 μ l)の腹腔内投与を、接種した腫瘍細胞とは異なる部位に開始した。客観的な盲検データを得るために、マウスにHey腫瘍を移植し、8匹ずつ3つの群に無作為に割り当てた。これらの群には(a)リン酸緩衝食塩水(PBS)を投与した対照群、(b)14日目および28日目にBaco-1で処置したマウス群、および(c)14日目および28日目にSynco-2Dで処置したマウス群が含まれる。腫瘍細胞接種後42日目に、マウスをCO₂ばく露によって安楽死させ、盲検的に肉眼(腫瘍結節数、腫瘍体積)分析を行った。

30

【0263】

統計解析

定量的結果を平均 \pm 平均の標準偏差として表す。統計解析は、Statview 5.0ソフトウェア(Abacus Concepts, カリフォルニア州バークレー)を使用して、スチューデントのt検定または一元配置ANOVAによって行ったが、生存データは例外で、これについては、 Kaplan-Meierプロットおよびログランク(マンテル-コックス)検定によって解析した。この研究では0.01未満のP値を有意であるとみなした。

40

【0264】

<実施例11>

新しい膜融合性HSVベクターの作製および特性解析

本発明の具体的実施形態として、本発明者らは、技術上の課題、例えばウイルス複製選択性を付与する欠失ゆえに腫瘍ではウイルスの効力が低下することや、他の治療戦略(プロドラッグ酵素送達など)とは異なり、腫瘍溶解性HSVの抗腫瘍活性は有意なバイスタンダー効果を増強しないことなどを克服しようと試みた。バイスタンダー効果は進行癌、特に卵巣癌の有効な抗腫瘍治療には極めて重要であると考えられる。なぜなら、これにより

50

、例えば腹腔内でのベクターの送達効率および拡大効率の制限が補償されるからである。したがって、癌の処置、特に卵巣癌の処置に関して明瞭な臨床上の利益を得るには、これらの腫瘍溶解性ウイルスの効力と殺滅能力の両方について、さらなる改善が不可欠であると思われる。

【0265】

これらの課題を克服するために、ウイルス膜融合性膜糖タンパク質 (FMG) の天然細胞膜融合活性を利用することは、ウイルスの分散を達成するために考えられる付加的な方法である。歴史的には、FMGはインフルエンザウイルス、麻疹ウイルスおよび水胞性口内炎ウイルスなどの天然ウイルスから発現された。これらの膜融合ウイルスは、腫瘍溶解を誘導するために治療的に用いられた (Batemanら, 2000)。最近になって、組換えDNA型のFMGがプラスミドおよび異種ウイルスベクターから発現されるようになった (Higuchiら, 2000、Diazら, 2000)。重要なことに、これらのベクターからの組換えタンパク質の発現は、抗腫瘍剤としてのFMGの生物学的活性を保っていることがわかった。さらに、このタンパク質からのバスタンダー殺滅効果は、HSV-TK/GCVまたはCD/5-FCなどの自殺遺伝子/プロドラッグ系によって得られる効果よりも少なくとも10倍は高い (Higuchiら, 2000)。

【0266】

そこで本発明者らは腫瘍溶解性HSVの膜融合能力を改変した。具体的実施形態として、ランダム突然変異誘発とGALV.fusの挿入とを組み合わせることにより、本発明者らは、新しいタイプの膜融合性HSVベクターを作製した。卵巣腫瘍細胞に関してウイルスが広く殺滅するかどうかを決定するために、HSV感染によって誘発されるシンシチウム形成の程度をインビトロで調べた。その後、卵巣癌の腹腔内治療用の新しい薬剤を提供する目的で、このウイルスの抗腫瘍有効性を、胸腺欠損マウスにおける進行卵巣癌の同所性モデルで評価した。

【0267】

Synco-2を、Vero細胞でのその複製時にチミジン類似体BrdUrdを組み込ませることにより、ランダム突然変異誘発にかけた。次に、突然変異誘発処理したウイルスストックを、Vero細胞の感染にシンシチウム表現型を付与する能力について選別した。主としてシンシチウム形成から形成されているプラークを集めた。Synco-2Dと名付けた1分離株は数継代後に強いシンシチウム表現型を一貫して示した。その後、このウイルスを複数回のプラーク精製によって均一に精製した。プラークの100%がシンシチウム表現型を示した。新しく分離された腫瘍溶解性ウイルスの表現型を特徴づけるために、HeyおよびSKOV3卵巣腫瘍細胞を0.01pfu/細胞のBaco-1またはSynco-2Dに感染させた。図12Eおよび12Fに示すように、Synco-2D感染後のプラークのシンシチウム表現型は、Baco-1の感染によって得られる通常のプラークとは著しく異なっていた。実際、感染後24時間までは、Baco-1の感染巣は比較的小さく、主に、標準的なHSV感染の特徴である円形の細胞からなっていた。これに対して、Synco-2D感染によって生じるプラークは、もっぱら、互いに融合した細胞だけから構成されていて、個々の細胞の境界はほとんど見えなかった。Synco-2D感染によって生じた各プラークは数百細胞に相当する面積を覆っていた。これは、もっと少ない細胞しか含まれていないBaco-1感染で生じるものとは著しく対照的だった。48時間までに、Baco-1感染によって生じる感染巣も大きくなったが、72時間後でもまだ、単層は100% CPEに達していなかった。しかし、Synco-2Dに感染した細胞は著しく異なる表現型を示した。48時間後までに、培養皿全体の細胞が一つに融合し(「漁網」のように見えた)、72時間後には細胞は収縮したようだった(「大きな湖」に似ている)。これらの現象から、Synco-2Dは親のBaco-1ウイルスとは表現型が異なり、追加されたその細胞膜融合特性ゆえに、Baco-1よりもはるかに強い細胞殺滅能を持つことが示された。

【0268】

< 実施例 12 >

インビトロ腫瘍細胞殺滅の比較

Synco-2Dの腫瘍細胞破壊能力をさらに特徴づけた。細胞をBaco-1またはSynco-2Dに比較

的低い感染多重度（0.1および0.01pfu/細胞）で感染させた。これにより、投入ウイルスが持つ固有の細胞毒性と、これらの細胞におけるウイルスの複製および拡大能力が、どちらも評価される。腫瘍細胞に対するウイルス感染の細胞毒性効果は、ウイルス感染後に生き残った細胞の百分率を計算することによって定量化した。Hey細胞株およびSKOV3細胞株において、Synco-2Dは、これらの腫瘍細胞を殺す能力が、Baco-1よりも有意に強かった（ $p < 0.01$ ）。0.01pfu/細胞の感染用量では、Synco-2Dは24時間以内に細胞の生存率を50%未満に抑制した（図13A）。またこれは、0.1pfu/細胞の感染用量では特に顕著だった（図13B）。

【0269】

<実施例13>

同所性卵巣癌モデルに関する新たに改変した膜融合性HSVベクターの治療有効性

卵巣癌の同所性モデルでは、 3×10^5 個の生HEY細胞を、ヌードマウスの腹腔内に接種した。このモデルの場合、先に記載されているように、Hey細胞の腹腔内接種の2日後または7日後に屠殺した対照マウスでは、腫瘍を示す肉眼的または組織病理学的証拠が観察されなかった（Auzenneら，2002）。しかし、HSVベクターを腹腔内投与した腫瘍接種14日後には、腫瘍は充分定着した状態になっていた。実際、Hey腫瘍を移植した場合、腫瘍成長の最初の徴候は、腹壁筋の針跡であり、最終的には、腫瘍接種の14日後に、腹壁じゅうに触知可能な腹腔内腫瘍が明らかになる（腫瘍直径は約3mmである）。後者の状態が進行するにつれて、悪液質が、特にPBS処置マウスでは、次第に顕著になった。これらの病的症状により、ついには人道的屠殺が必要になった。これらのモデルは腹水による顕著な腹部膨張は示さなかった。時には、腫瘍を持つマウスが、日々の観察の間に、屠殺する機会を得ずに、斃死することもあった。この場合、死亡日は、それらを発見した日の前日であるとみなした。PBS処置マウスはすべて、悪液質または腹腔内播種により、40日以内（ 36.5 ± 0.7 日）に死亡した（図14A）。また、PBS処置マウスだけに腹腔内播種（ 2.5 ± 0.9 個）および腹膜肥厚が現れた（図5、図14A）。

【0270】

【表5】

表5. 腹膜内の卵巣癌の膜融合性腫瘍溶解性HSV療法

処置	N	発生	結節	腫瘍重量 (g)	死亡	無腫瘍
PBS (対照)	8	8/8	2.5 ± 0.9	1.0 ± 0.6	8/8	0/8
Baco-1	8	8/8	1.0 ± 0.0^b	1.5 ± 0.7	3/8 ^b	0/8
Synco-2D	8	2/8 ^a	0.25 ± 0.4^a	0.1 ± 0.3^a	0/8 ^a	6/8 ^a

Hey卵巣癌細胞（ 3×10^5 個）をヌードマウスの腹腔内に接種した。

【0271】

Hey細胞接種の14日後、マウス群を2週間に1回処置した。

【0272】

PBSまたはBaco-1またはSynco-2Dの腹腔内投与により、

^a 他の群と比較して $p < 0.01$ 。 ^b 対照と比較して $p < 0.01$ 。

【0273】

一方、Baco-1処置マウスのうち3匹は安楽死の日までに死亡し、残りの5匹は、安楽死の日に、1つだけだがPBS処置マウスと同じくらい大きい腫瘍を持っていた。驚いたことに、2匹だけのはるかに小さい腫瘍を生じた。腫瘍の数または重量には、他の2群との間に統計的有意差があった（ $p < 0.01$ ）（表5）。さらに、Synco-2D投与の有益な治療効果は、癌状態からの完全寛解と延命にも反映された（表5、図15）。他の群との間に統計的有意差もあった（ $p < 0.01$ ）。

【0274】

<実施例14>

実施例15~17に関する典型的な材料と方法

細胞株およびウイルス

アフリカミドリザル腎臓 (Vero) 細胞はアメリカン・ティシュー・カルチャー・コレクション (メリーランド州ロックビル) から購入した。Vero細胞は、10%ウシ胎仔血清 (FBS) と抗生物質を含むDMEM中、湿潤5%CO₂雰囲気中で培養した。PC-3M-Pro4細胞は高転移性前立腺癌細胞株である (pettawayら, 1996)。この細胞株は、10%FBSを添加したRPMI1640で成長させた。インビボ接種のために、短いトリプシン処理後に細胞を培養フラスコから収集した。接種には生存率が > 95% (トリパンプルー排除法) の単細胞懸濁液だけを使用した。

10

【0275】

腫瘍溶解性HSVは、細菌人工染色体 (BAC) に基づくHSVコンストラクト fHSV-delta-pac から誘導し、その構築の詳細については他に記載した (Fuら, 印刷中, Molecular Therapy, Nakamoriら, 印刷中, Clinical Cancer Research)。簡単に述べると、Baco-1およびSynco-2を作製するために、強化緑色蛍光タンパク質遺伝子 (EGFP, Baco-1用) またはGALV.fus (Synco-2用) を、HSVパッケージングシグナル配列と共に、fHSV-delta-pac中のユニークPacI部位にライゲートした。次に、そのライゲーション混合物を、ウイルス産生用のVero細胞にトランスフェクトした。Synco-2D、Baco-1を作製するために、まず、Baco-1をランダム突然変異誘発にかけた後、FuおよびZhang (2002) に記載のとおり、シンシウム表現型に関するスクリーニングを行った。次に、ウイルス感染のすぐ後 (1時間) に既述の方法 (Zhangら, 1994) によってVero細胞からウイルス粒子DNAを抽出することにより、環状のウイルスDNAを得た。次に、そのウイルスDNAを、エレクトロポレーションにより、コンピテント大腸菌細胞DH-10Bに形質転換した。次に、Baco-1ウイルスゲノム中の緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする遺伝子カセットをPacIで切り出し、Fuら (印刷中) Molecular Therapyに記載の強制的ライゲーション法によって、GALV.fus (HSVの条件的UL38プロモーターによって駆動されるもの) で置き換えた。そのライゲーション混合物を、リポフェクトアミン (GIBCO-BRL) を使ってVero細胞に直接形質転換し、感染性ウイルスを生成させるために3~5日間培養した。次に、ウイルスをブランク精製した。Vero細胞を1細胞あたり0.01ブランク形成単位 (pfu) のウイルスに感染させることによってウイルスストックを調製し、2日後に収集し、-80 で保存した。ウイルス力価をブランクアッセイによって定量し、ブランク形成単位 (pfu) で表した。

20

30

【0276】

インビトロ表現型特性解析および細胞殺滅アッセイ

膜融合性腫瘍溶解性HSVのインビトロ表現型特性解析のために、PC-3M-Pro4癌細胞を6穴プレートに接種した。翌日、細胞を、段階希釈したウイルス (Baco-1、Synco-2またはSynco-2D) に感染させ、維持DMEM培地 (1%FBSを含む) で最長3日間培養して、融合パターンとブランクを発達させた。各ウイルスの細胞毒性をインビトロで評価するために、PC-3M-Pro4細胞を5×10⁴細胞/ウェルの濃度で12穴プレートに接種した。細胞を、それぞれ0.01および0.1pfu/細胞のBaco-1、Synco-2またはSynco-2Dに感染させた。細胞を24時間間隔で収集し、トリパンプルー染色法で細胞の生存度を決定した。感染ウェルでの生細胞数を非感染のままにしておいたウェルでの細胞数で割ることによって、細胞生存率を計算した。実験は3重に行い、最終計算には平均した数を使った。

40

【0277】

動物試験

BALB/cByJ1crSmnHsd-scidマウス (7~8週齢) をHarlan (インディアナ州インディアナポリス) から入手し、4匹以下の群に分けて、特定病原体フリー条件で飼育した。全ての動物試験はベイラー医科大学動物実験分科委員会 (Baylor College of Medicine Animal Care and Use Subcommittee) によって承認され、その方針に従って行われた。外科手術の場合は、2.5%2,2,2-トリプロモエタノールとtert-アミルアルコールとを含む混合液 (

50

1:1)の腹腔内注射によって、全てのマウスを麻酔した。同所性接種は文献に記載の方法に従って行った(Stephensonら, 1992)。簡単に述べると、下腹部に横切開を施した。腹壁筋を開裂した後、膀胱および精嚢を露出させ、前側に押し込んで、背側前立腺を露出させた。次に、10 μ lのPBSに懸濁した 2×10^5 個のPC-3M-Pro4細胞を、30ゲージ針とガラス製ハミルトン注射器(Hamilton Syringe Co., ネバダ州リノ)を使って、前立腺皮膜の下に注意深く注射した。水泡の形成は申し分ない注射を示した。切開部を1層の外科用クリップ(Autoclip; Clay Adama, ニュージャージー州パーシパニー)で閉じた。同所性腫瘍接種の翌日に、PC-3M-Pro4(1×10^5 個/100 μ l)の尾静脈注射により、前立腺癌の肺転移巣を樹立させた(Hullら, 2000)。次に、マウスを無作為に4群($n=8$)に分割し、PBS(対照)または 2×10^7 pfuのウイルス(Baco-1、Synco-2またはSynco-2D、体積は100 μ l)を、腫瘍接種の7日後と14日後に2回、尾静脈から注射した。同所性腫瘍接種の40日後に、マウスをCO₂吸入によって安楽死させた。原発腫瘍を摘出し、重量を測定した。同時に、動物の肺を切除し、食塩水で洗浄し、ブアン固定液に入れた。既述のように(Shevrinら, 1989)、24時間後に、解剖顕微鏡を使って、肺転移を数えた。

10

【0278】

統計解析

定量結果を平均 \pm 標準偏差として表した。統計解析は、Statview 5.0ソフトウェア(Abacus Concepts, カリフォルニア州パークレー)を使って一元配置ANOVAによって行った。この研究では0.05未満のP値を有意であるとみなした。

【0279】

20

<実施例15>

PC-3M-Pro4前立腺癌細胞における膜融合性腫瘍溶解性HSVのシンシチウム形成

以下の実施例では、ヒト前立腺癌細胞株PC-3M-Pro4の同所性および全身性同時注射によって樹立させたヒト前立腺癌異種移植片の原発腫瘍と肺転移の両方を持つネズミモデルで、様々な型の腫瘍溶解性HSVの抗腫瘍有効性を評価した。そのデータから、例えばSynco-2Dなどの腫瘍溶解性HSVはこの典型的腫瘍モデルに対して強力な治療剤であることと、このウイルスの静脈内投与によって原発腫瘍の有意な収縮と、肺での腫瘍結節の劇的な減少とが起こることを、ここに実証する。これらの結果は、この強力な膜融合性腫瘍溶解性HSVの全身投与が、転移性ヒト前立腺癌の有効な処置であることを示している。

【0280】

30

インビトロ実験にもインビボ実験にも、典型的なヒト前立腺癌細胞株PC-3M-Pro4を選択した。この細胞株は胸腺欠損マウスにおける同所性接種/収集サイクルを繰り返すことによってPC-3Mから選択されたもので、免疫不全マウスに静脈内注射すると肺転移が効率よく樹立されることが示されている(Pettawayら, 1996)。ヒト前立腺癌株PC-3M-Pro4でSynco-2Dの表現型を特徴づけるために、段階希釈したウイルス(Baco-1、Synco-2またはSynco-2D)に細胞を感染させた。感染後の様々な時点で、ウイルス感染によって形成された典型的なプラークの写真を撮影した。図16に示すように、Baco-1の感染は円形の細胞から形成される典型的なプラークをもたらしたが、Synco-2またはSynco-2D感染によって生じたプラークは表現型が異なり、もっぱら一つに融合した細胞からなっていた。Synco-2D感染によって生じたプラークは、Synco-2またはBaco-1によって生じたものよりもかなり大きかった。プラークサイズは、感染24時間後で、Synco-2の感染48時間後とほぼ同等だった。感染48時間後には、プラークサイズが大きくなりすぎて、1つの顕微鏡視野では把握できなくなった。この結果は、Synco-2Dは、その二重融合能力ゆえに、単独膜融合性腫瘍溶解性HSV Synco-2よりも強い腫瘍細胞殺滅能力を持ちうることを示している。

40

【0281】

<実施例16>

前立腺癌細胞の殺滅に関する単独膜融合性腫瘍溶解性HSVと二重膜融合性腫瘍溶解性HSVとの直接比較

Synco-2Dの強化されたシンシチウム形成誘発能力が、腫瘍細胞破壊能力の増加と相関していることを証明するために、PC-3M-Pro4細胞を、比較的低い感染多重度(0.1および0.0

50

1pfu/細胞)のBaco-1、Synco-2またはSynco-2Dに感染させた。これにより、投入ウイルスが持つ固有の細胞毒性と、これらの細胞におけるウイルスの複製および拡大能力が、どちらも評価される。腫瘍細胞に対するウイルス感染の細胞毒性効果は、ウイルス感染を受けていないウエル中の細胞に対して、ウイルス感染後に生き残った細胞の百分率を計算することによって定量化した。その結果、Baco-1と比較すると、どちらの膜融合性腫瘍溶解性HSVも、両方の用量および収集時点で、この腫瘍細胞株において有意に高い細胞傷害活性を持つことがわかった。ただし、速い方の時点(24時間)かつ低い方のウイルス用量(0.01pfu/細胞)は唯一の例外である(図17)。Synco-2とSynco-2Dとを直接比較したところ、二重膜融合性HSVは、どちらのウイルス用量のどの時点でも、単独膜融合性ウイルスよりも有意に強い細胞傷害能力を持つことがわかった($P < 0.01$)。わずか0.01pfu/細胞のM 10
01でも、Synco-2D感染により、細胞生存率は24時間以内に50%未満まで低下した。ウイルスによる細胞毒性は、高用量側のウイルス感染(0.1pfu/細胞)では、さらに明白だった。最初に0.1pfu/細胞で細胞を叩いた場合、Synco-2D感染は、感染の72時間後には腫瘍細胞の完全な破壊をもたらした。これらの結果は、単独膜融合性腫瘍溶解性HSVに付加的な細胞膜融合機構を組み込むことによって、インビトロで腫瘍細胞を破壊するウイルスの能力をさらに強化できることを示している。

【0282】

<実施例17>

全身送達後の原発腫瘍に対する治療有効性

ヒト前立腺癌に対するこれらの膜融合性腫瘍溶解性HSVの効力を評価するために、PC-3M 20
-Pro4の同所性および全身性注射により、SCIDマウスに、原発異種移植物と転移性異種移植物の両方を定着させた。腫瘍細胞移植の8日後に、5匹のマウスを外科的にチェックしたところ、それらは全て、直径2mm程度のサイズの原発腫瘍形成を起こしていることがわかった。この時点で、いずれかの腫瘍溶解性ウイルス(Baco-1、Synco-2またはSynco-2D)を 2×10^7 の用量で、または対照として同じ体積(00 μ l)のPBSを、マウスに静脈内注射(尾静脈から)した(1回目)。1週間後に、同じ用量のウイルスを反復注射した。PC-3M-Pro4細胞の最初の接種から40日後に同所性腫瘍を外植し、重量を測定した。解剖顕微鏡を使って顕微鏡的に、局所リンパ節転移および肺転移を同定し、計数した。PBS処置群の3匹は、実験が終了する前(それぞれ最初の腫瘍接種後33日、35日および36日目)に死亡した。これら3匹における腫瘍体積および転移結節を、記載の方法と同じ方法で決定し、そのデ 30
ータを、実験の終了時まで屠殺した残りのマウスから得たデータと合わせた。

【0283】

その結果から、腫瘍溶解性HSVの全身送達は、原発部位に定着した前立腺癌の成長に顕著な治療効果を持つことがわかった。動物を屠殺した時点(または動物が腫瘍の過剰成長により死亡した時点)までに、PBS処置マウス中の同所性腫瘍は非常に大きい体積に達し、平均重量は 2.17 ± 0.59 mgだった(図18)。従来型の腫瘍溶解性HSV Baco-1の全身投与は、同所性腫瘍の成長に顕著な抑制をもたらした。この群のマウスにおける同所性腫瘍の平均重量は 1.57 ± 0.36 mgで、これはPBS対照群に対してほとんど30%の腫瘍サイズの減少に相当する。膜融合性腫瘍溶解性HSVがもたらす同所性腫瘍に対する治療効果はさらに著しく、Synco-2またはSynco-2Dで処置したマウスにおける平均腫瘍重量は、Baco処置マウス 40
の場合の半分未満である。Synco-2D処置マウスにおける腫瘍体積は、Synco-2で処置したマウスよりもさらに小さいが(0.45 ± 0.21 mg対 0.64 ± 0.22 mg)、この相違は統計的に有意でなかった($p = 0.287$)。これらの結果から、Synco-2とSynco-2Dはどちらも、全身投与後に同所性腫瘍負荷量を減少させることに関して、Baco-1よりも有意に有効であることと、定着した同所性腫瘍に対してSynco-2DはSynco-2よりもわずかに優れているに過ぎないことが明らかになった。

【0284】

腫瘍溶解性HSVの全身投与は、前立腺癌の肺転移にも、劇的な治療効果をもたらした(表6)。

【0285】

【表 6】

表 6. PC-3M-Pro4 の肺転移に対する腫瘍溶解性HSVの治療効果

処置	PBS (対照)	Baco-1	Synco-2	Synco-2D
肺転移	25.4±12.2	12.5±3.1 ^a	6.8±2.2 ^{a,b}	1.1±1.6 ^{a,b,c}
LN転移	1.6±0.9	ND	ND	ND

肺転移は、同所性腫瘍接種の翌日に、PC-3M-Pro4 ($1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$) の尾静脈注射を行うことによって樹立させた。治療スキームは図18に示した通りである。同所性接種の40日後にマウスをCO₂吸入によって安楽死させ、肺を摘出し、食塩水で洗浄し、ブアン固定液に入れた。次に、24時間後に、解剖顕微鏡を使って、肺転移を計数した。

10

【0286】

ND: 検出されない、^a 対照と比較して $p < 0.01$ 、^b Baco-1と比較して $p < 0.01$ 、^c Synco-2と比較して $p < 0.05$ 。

【0287】

PBSで処置したマウス(肺あたりの腫瘍結節数は平均 25.4 ± 12.2 を記録した)と比較すると、Baco-1を与えたマウスは肺中の転移性結節が半分しかなかった。最も劇的な結果は、マウスにSynco-2Dを投与した群で得られた。この群の動物では、平均すると肺あたり 1.1 ± 1.6 個の腫瘍結節しか見つからず、これは、Synco-2で処置した動物で記録された肺転移結節数 (6.8 ± 2.2) よりも有意に少なかった ($p = 0.0424$)。一方、Synco-2とSynco-2Dはどちらも、肺転移に対する治療効果が、Baco-1よりも有意に優れていた ($p < 0.01$)。局所流入領域リンパ節への腫瘍転移も処置の終了時に評価した。その結果から、局所リンパ節への腫瘍転移はPBS対照群でしか検出されなかったため、Baco-1または膜融合性腫瘍溶解性HSVを投与すると、同所性腫瘍のリンパ節浸潤が効果的に防止されたことがわかる。これらの結果は全体として、増加した培養腫瘍細胞殺滅能力を持つことと関連して、二重膜融合性腫瘍溶解性HSVは、全身投与による前立腺癌肺転移の処置に関して、単独膜融合性腫瘍溶解性HSVよりも強力であることを証明している。

20

【0288】

< 実施例 18 >

膜融合性腫瘍溶解性HSVによる腫瘍破壊は強い抗腫瘍免疫を誘導する

30

免疫療法は、従来の遺伝子治療または他の遺伝子治療法では管理することが難しかった残存腫瘍を根絶する能力を持つので、潜在的に極めて有効な癌の処置様式である。しかし、いくつかの腫瘍関連抗原が最近同定されているにも関わらず (Boonおよびvan der Bruggen, 1996)、これらの抗原をワクチンとして用いて臨床的に成功した例はまだない。そのため、理論的には単一のワクチン調製物で腫瘍抗原の全レパートリーを網羅する全腫瘍細胞由来の癌ワクチンが、広く活用されている (Dranoffら, 1993; Schadendorfら, 2000)。エクスピボ操作またはインピボ操作によるこの全細胞ワクチン法の成功は、インピボで腫瘍抗原提示を刺激するための簡単で効率のよい戦略の開発に大きく依存するだろう。

【0289】

最近、癌細胞の破壊に用いられる生化学機序は、その後の腫瘍の免疫原性にとってかなり重要であることが報告された (Melcherら, 1998)。効率のよい提示が起こるには、免疫系が生理学的に危険なシグナル (例えば無秩序な組織破壊または壊死性細胞死を誘発しうる細胞殺滅機序による細胞死など) の下で腫瘍抗原と反応するような形で、腫瘍抗原が放出される必要があると考えられている (Matzinger, 2002; Melcherら, 1999)。特に、腫瘍細胞へのウイルスFMGの導入は、ストレス関連タンパク質の誘導によって抗腫瘍免疫応答を強化しうる非アポトーシス的な自己食様の機序による腫瘍細胞殺滅をもたらしていることが示されている (Batemanら, 2000; Melcherら, 1998; Basuら, 2000)。シンチウム形成による局所的腫瘍破壊は、エキソソーム (exosome) によく似た小胞 (シンチオソーム (syncytiosome)) の放出を伴うことも示されている。この小胞は、他の機序で死につつある細胞に由来するエキソソームよりも効果的に樹状細胞 (DC) に抗原負荷する

40

50

ことができるので、腫瘍抗原の交差提示を促進する (Batemanら, 2002)。

【0290】

本発明の具体的実施形態では、膜融合性腫瘍溶解性HSVによる効率のよい腫瘍破壊が多量の腫瘍抗原を放出し、シンシチウム形成によるユニークな腫瘍破壊機序が腫瘍抗原提示を容易にして、強力な抗腫瘍免疫の生成をもたらす。膜融合性腫瘍溶解性HSV (その直接腫瘍溶解により、例えば定着した乳癌を減量することができる) と、残存腫瘍を取り除くことができる誘導抗腫瘍免疫との複合作用は、定着した癌 (例えば乳癌など) の完全な根絶をもたらすだろう。

【0291】

二重膜融合性腫瘍溶解性HSVによる非免疫原性ネズミ乳腫瘍の破壊は、実際に、高レベルの細胞性抗腫瘍免疫を誘発したが、非融合性のものではそうならなかった。

10

【0292】

ネズミ腫瘍細胞の大半はHSV感染に対して非許容性である。腫瘍溶解性HSV感染に対して中等度の許容性を示す数少ないネズミ腫瘍細胞株は、N18 (神経芽細胞腫)、MC26 (大腸癌) およびEJ-6-2-Bam-6a Ras形質転換線維芽細胞である (Chahlaviら, 1999、Yoonら, 2000、Lambrightら, 2000)。同系免疫適格マウスで腫瘍を定着させるのに適したネズミ乳腫瘍細胞を同定するために、一群のネズミ乳腫瘍細胞株を収集し、選別した。それらのうち、4T1 (これはBALB/c自然発生乳癌由来の6-チオグアニン耐性細胞株であって、Fred Miller博士 (ミシガン癌財団 (Michigan Cancer Foundation) ミシガン州デトロイト) から譲り受けたものである) (Aslaksonら, 1992) は、腫瘍溶解性HSV感染に対して中等度に感受性であることがわかった。しかし、この細胞株で膜融合性腫瘍溶解性HSVの表現型特性解析を行ったところ、二重膜融合性Synco-2Dの感染だけがシンシチウム形成を誘発できることが明らかになった。

20

【0293】

本発明者らは、4T1腫瘍におけるSynco-2Dの強化された抗腫瘍効果が、上昇した腫瘍特異的CTL活性を伴うことも明らかにした。4T1は、同系BALB/cマウスでは非免疫原性で、悪性度が高く、転移性である (Aslaksonら, 1992、PulaskiおよびOstrand-Rosenberg, 1998)。原発腫瘍を樹立させるために、細胞 (1×10^5 個の4T1細胞) を、免疫適格BALB/cマウスの乳房脂肪塊に同所性に注射し、そのマウスを2週間放置して肺転移を発症させた。次に、腫瘍を持つマウスを3群 ($n = 10$) に分割し、 2×10^7 pfuのSynco-2D、Synco-2またはBaco-1を腫瘍内注射するか、または対照としてPBSを腫瘍内注射した。同所性部位の腫瘍塊を4週間にわたって毎週測定した。各群のうち3匹をウイルス注射の2週間後に屠殺し、 ^{51}Cr 放出アッセイにより腫瘍特異的CTL活性を (4T1を標的細胞として) 測定するために、脾臓を収集した。残りのマウスは4週目の最後に屠殺し、肺転移腫瘍結節を解剖顕微鏡で数えた。その結果から、Synco-2Dの腫瘍内投与は、原発腫瘍 (図19A) だけでなく、遠隔肺転移 (図19B) にも、単独膜融合性または非膜融合性腫瘍溶解性HSVよりも有意に優れた治療効果をもたらすことが明らかになった。平均すると、Synco-2Dで処置した動物の肺では腫瘍結節が5個未満である。これは、PBS、Baco-1、Fu-10およびSynco-2で処置したマウスに、それぞれ42個、38個、34個および35個の腫瘍結節がみとめられるのとは対照的である。Synco-2D処置マウスにおける強化された抗腫瘍効果は、高レベルの腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 活性の存在を伴う。これは、他のウイルスで処置されたマウスでは、腫瘍特異的CTL活性がほとんど検出されないのとは対照的である (図19)。非膜融合性腫瘍溶解性HSV G207は初期の研究で腫瘍内接種後に腫瘍特異的免疫を誘導することが明らかにされているが (Walkerら, 1999、Todoら, 1999)、これらの研究で使用された腫瘍細胞株の大半は免疫原性である。非免疫原性4T1の場合、腫瘍破壊そのものは抗腫瘍免疫を誘導しない。抗腫瘍免疫はGM-CSFおよびIL-2が同時に送達された場合にのみ誘導された (Brockstedtら, 2002)。したがって、これらの結果は、二重膜融合性腫瘍溶解性HSVによるユニークな腫瘍破壊機序が腫瘍抗原提示を強化し、それが、より良い腫瘍免疫をもたらし、さらには強化された抗腫瘍活性 (とりわけ遠隔転移腫瘍に対する抗腫瘍活性) の直接的な一因になったと考えられることを示している。

30

40

50

【0294】

<実施例19>

本発明の意義

本実施例では、強力なFMG(例えばGALV)を腫瘍溶解性HSVに組み込むことによって、その抗腫瘍効力を劇的に増加させることを実証する。具体的な実施形態では、これは、アデノウイルスなどの他のウイルスとは異なり、細胞膜融合が元々、HSV感染過程の一部であるからである。したがって、そのウイルス感染サイクルは、ゲノムへのGALV.fus遺伝子のクローニングによる影響を受けない。これにより、ウイルスが腫瘍部位に到達した場合には、シンシウム形成とウイルス複製とが相乗的に働いて腫瘍細胞を破壊することが可能になる。また、これら2つの全く異なる抗腫瘍機序の複合作用からは、他の相乗作用も生じうる。第1に、比較的均一なインビトロ培養腫瘍細胞とは異なり、多くの腫瘍は異なる系譜の細胞を含み、その中には、例えば細胞表面にウイルス受容体がないなどの理由でHSV感染に対して耐性を示すものもありうる。2つの完全に異なる機序(直接ウイルス細胞溶解と細胞膜融合)による複合的抗腫瘍作用は、ウイルス耐性腫瘍細胞の発生を著しく減少させる。なぜなら、腫瘍溶解性ウイルス感染/複製に対して耐性になった細胞は、シンシウム形成によって間接的に破壊されるだろうからである。したがって、一部の実施形態では、やはりウイルスの腫瘍溶解性効力を強化する目的で腫瘍溶解性アデノウイルスに最近クローニングされた1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)由来のFMG(Liら, 2001)よりも、GALV.fusの方が好ましい。HIV-1由来のFMGはCD4⁺標的細胞の存在下でのみシンシウムを誘導することができるのに対して、GALV.fus受容体Pit-1はヒト細胞表面に広く分布しているため、GALV.fusははるかに広範囲にわたる腫瘍細胞を標的にすることができる。第2に、腫瘍溶解性ウイルスは培養腫瘍細胞中で迅速に拡大できるが、固形腫瘍塊でのウイルス拡大はしばしば制限される(Heiseら, 1999)。ウイルス粒子のサイズが大きいことは、インビボでのウイルス拡大の非効率性の一因になっているかもしれない。GALV.fusが媒介する細胞膜融合は、腫瘍塊での腫瘍溶解性HSVの拡大を容易にしうるため、影響を受ける腫瘍の面積が大きくなる。

10

20

【0295】

腫瘍溶解性HSVの下でGALV.fusが発現するとそのウイルスに付加的な抗腫瘍効果が生じるが、この遺伝子が無秩序に発現すると、安全性に関する懸念が、間違いなく生じるだろう。これは、ウイルスを全身投与するか、局所注射ではあるが血流にかなり漏出する場合には、特にそうであると言える。この課題を克服するために考えられる方法の一つは、GALV FMG遺伝子を腫瘍特異的または組織特異的プロモーターの制御下に置くことである。数多くの組織および/または腫瘍特異的プロモーターが特定され特徴づけられているが、これらのプロモーターに共通する課題は、それらが厳密には腫瘍特異的でないことか、またはウイルスプロモーターと比較すると強い活性を欠いていることである。したがって、腫瘍溶解性HSVの下では、絶対後期ウイルスプロモーターは、強い腫瘍特異的プロモーターである。

30

【0296】

溶解感染中のHSV遺伝子発現のプログラムは初期相と後期相とに容易に分割することができる。初期遺伝子はウイルスDNA複製に先立って転写され、一方、後期遺伝子はウイルスDNA複製が起こってからでないと高レベルには発現されない。それぞれの相はさらに細分される。UL38を含む後期遺伝子のいくつかは絶対後期に分類され、これらはウイルスDNA複製の開始後でなければ確実に検出されない。分泌型アルカリホスファターゼに関する初期の特性解析により、増殖的HSV複製がない場合には、UL38プロモーター活性は極めて低いことが明らかになった。しかし、ウイルスが溶解感染を起こしている時は、UL38プロモーターの活性はCMV IEプロモーターとほぼ同等である。Synco-2中でUL38プロモーターによって駆動されるGALV.fus遺伝子の発現も、腫瘍細胞におけるウイルスの完全な複製サイクルに厳密に合わせて調節される。鎮静期の正常胎児繊維芽細胞では、Synco-2による細胞融合は完全に小さくなっている。これは、正常細胞に対するSynco-2の有害性が、前臨床研究でも第I相臨床試験でもその安全記録が十分に立証されている第1世代の腫瘍溶

40

50

解性HSVを超えることはおそくないということを示している。

【0297】

HSVから開発された腫瘍溶解性ウイルスは固形腫瘍の処置に大いに役立ち、現在は脳腫瘍を持つ患者で臨床試験が行われている (Markertら, 2000、Ramplingら, 2000)。また、癌処置用の治療遺伝子を送達するためのベクターとしても適している。従来の欠損ウイルスベクターと比較して、条件付き複製可能型ベクターにはいくつかの利点がある。第1に、単に送達媒体として機能するだけの欠損ベクターとは異なり、腫瘍溶解性HSVはそれ自体が腫瘍に対して極めて高い治療指数を持つ。送達される治療遺伝子をもたらす抗腫瘍効果はいずれも付加的であり、より高い総治療効果をもたらすはずである。第2に、腫瘍溶解性ウイルスは腫瘍組織中で拡大する能力を持っているので、欠損ウイルスベクターより10
10よりも広い腫瘍塊面積に、治療遺伝子を送達することができる。第3に、このウイルスは腫瘍中で複製する能力を持つので、より長期間にわたる遺伝子発現が起こりうる。その裏付けとして、腫瘍溶解性HSVの腫瘍内送達後には、AP発現が1週間にわたって比較的高レベルに維持されることが、実施例によって明らかになった。これは、通常は腫瘍内注射後24時間～48時間しか持続しない欠損性HSVベクターからの遺伝子発現とは対照的である (Todrykら, 1999)。

【0298】

腫瘍治療に用いられる治療遺伝子の大半は正常細胞に対して潜在的に毒性でもあるので、これらの遺伝子の無秩序な発現は、腫瘍に制限された腫瘍溶解性ウイルスという背景があってもなお、安全上の懸念が生じる。これは、全身投与が必要な場合 (例えば転移性疾患の場合) には特にそうであると言える。この懸念を最小限に抑える方法の一つは、腫瘍特異的または組織特異的なプロモーターを使って遺伝子発現を制御することである。腫瘍特異的な遺伝子発現に関して、いくつかの組織特異的なプロモーターが記載されているが、それらは一般にウイルスプロモーターよりもはるかに活性が低い。本明細書に記載する実施例から、絶対後期ウイルスプロモーターは、腫瘍溶解性HSVの下では、強力な腫瘍特異的なプロモーターであることが明らかになった。これは、HSVの絶対後期遺伝子UL38のプロモーターをインビトロでもインビボでも特徴づけることによって実証された。UL38pは極めて低い基礎活性を持ち、UL38pカセットを持つ腫瘍溶解性HSVに感染した非分裂細胞中ではこの低い基礎活性が維持される。しかし、腫瘍溶解性ウイルスが複製できる細胞周期進行中の細胞では、UL38pがCMV-Pと同等レベルの活性を示した。UL38pの細胞周期依存性をインビボでも実証した。Baco-AP1およびBaco-AP2の腫瘍内注射はどちらも高レベルのAP発現をもたらした。一方、Baco-PA2の静脈内注射では一過性で低レベルのAP発現しか検出されなかった。これは、Baco-AP1の静脈内投与によって起こる豊富なAP放出とは対照的である。Baco-AP2の静脈内注射後に起こる一過性で低レベルのAP放出は、おそらく、ウイルスの全身送達後にウイルスと接触して感染した可能性のある線維芽細胞などの一定の分裂細胞から起こったのだろう。しかし、全身送達後はウイルス粒子の大半が肝臓に分布するので (Schellingerhoutら, 1998、Woodら, 1999)、この低レベルで一過性のAP発現から、腫瘍溶解性HSVの下ではUL38pが正常な肝細胞中のごくわずかな活性しか持たないことが示唆される。ほとんどが分裂を終了している筋芽細胞を標的とするために、両ウイルスを筋肉内にも送達した。しかしどちらのウイルスも、この経路での注射後に、感知できるほどのAPを放出しなかった。これはおそらく、どちらのウイルスでも十分な筋芽細胞が形質導入されなかったからだろう。というのも、成体マウスの筋肉の成熟した基底膜はHSVが筋繊維に効率よく感染するのを防ぐことができると報告されているからである (Huardら, 1995、Huardら, 1996)。

【0299】

UL38pなどの絶対後期ウイルスプロモーターを腫瘍溶解性HSVと組み合わせることには、従来どおり欠損ウイルスベクター中で腫瘍特異的なプロモーターを使用する場合と比べて、遺伝子発現がかなり強くなること以外にも利点がある。所定の組織に由来する腫瘍にしか応用することができない組織特異的なプロモーターとは異なり、これらの後期ウイルスプロモーターは、ウイルスが条件付きで複製できる様々な腫瘍に応用することができる。これ
40
50

は、腫瘍特異的プロモーターがまだ特定されていない腫瘍には特に有用である。さらに、腫瘍細胞での溶解性HSV感染の開始に依存するUL38プロモーターの条件付き活性化は、このウイルスの腫瘍溶解と送達される遺伝子の治療効果との同期的作用をもたらさしめる。そのような同期的作用は、例えば免疫療法との併用（この場合は、ウイルスの腫瘍溶解による腫瘍抗原放出が、ウイルス中に挿入された遺伝子からの免疫刺激分子の放出と並行して起こるだろう）など、一定の状況では特に重要でありうる。

【0300】

さらなる実施形態では、従来のHSVでランダム突然変異誘発とGALV.fus遺伝子の挿入とを組み合わせることにより、例えば卵巣癌細胞または前立腺癌細胞などの癌細胞に対して、従来のHSVよりも高い腫瘍溶解効率を得られる。本明細書に記載する一部の実施例では、腫瘍接種の14日後に、腫瘍が動物モデル中で十分に定着した状態になってから、腫瘍溶解性HSVを腹腔内投与する。実際、Hey腫瘍を移植したマウスは、最終的には腹壁を通して触知可能になり、腫瘍直径は約3mmになった。この腫瘍保有状態は進行卵巣癌状態を模倣している。その後、Hey細胞の腹膜播種を持つマウスにSynco-2Dを2回注射（総用量 4×10^7 pfu/400 μ l）したところ、完全寛解（75%）と、Baco-1およびPBS処置マウスとの比較で延命とが起った。用量 4×10^7 pfuのSynco-2Dはほとんど100%の生存をもたらした。サイズの相違（約3000倍）を考慮すると、この用量はヒトでは 1.2×10^{11} pfuのウイルスに相当するが、この用量は悪性神経膠腫の第I相試験で投与されたG207の最高用量に匹敵する（Markertら，2000）。これらの結果から、初期段階での内皮卵巣癌の処置、または外科的「減量」手術による肉眼的病巣の除去を伴う内皮卵巣癌の処置は、ヒトでのSynco-2D遺伝子治療にとって、安全で好結果を生む戦略になりうることを示唆される。

10

20

【0301】

潜在的な安全性の問題を最小限に抑えるために、ウイルス中のGALV.fus遺伝子の発現は、絶対後期ウイルスプロモーターによって指示される。これは、この遺伝子の強い組織選択的発現をもたらす。実際、卵巣癌の約10%で過剰発現され、予後の悪さと相関関係を持ちうる、HER-2/neuなどの従来の組織特異的プロモーターと比較して、UL38プロモーターはいくつかの利点を持っているようである。例えばこのプロモーターは、おそらく、ほとんどの組織特異的プロモーターよりもかなり強いだろう。また、具体的実施形態では、腫瘍細胞において溶解性HSV感染が開始した時のUL38プロモーターの活性化が、これらの2つの抗腫瘍機序の同期的作用をもたらす。

30

【0302】

さらに、腫瘍溶解性ウイルス投与の成功にとって大きな妨げになっているのが、抗ウイルス免疫の存在である。既存の抗ウイルス免疫は、最初のウイルス侵入と、それに続く腫瘍内での拡大とを阻止することができる。したがって、ほとんどの癌患者は、このウイルスの治療有効性を損ないかねない抗ヘルペス抗体を持つだろう。しかし、中和抗体は、全身治療では、卵巣癌などの癌の腹腔内治療よりも、さらに重大な問題になるかもしれない。先の研究では、複製能を持つウイルスに対する抗体の存在は、治療の有効性を打ち消したり、腫瘍部位でのウイルス複製を妨げたりしないことが、明らかにされている（Lambrightら，2000、Nemunaitisら，2000、Chahlaviら，1999）。実際、アデノウイルスの注射を複数回受けたマウスの血清中には高レベルの循環抗体が存在するにもかかわらず、腹腔では中和抗体の力価は検出不可能だった（Al-Hendyら，2000）。また、腹水中に中和抗体が存在したとしても、その体液は治療前に腹腔から容易に吸引することができる。さらに、BAC系腫瘍溶解性HSV DNAまたはウイルスキャプシドのリポソーム形成によって腫瘍溶解性ウイルスを送達することで、宿主の抗ウイルス免疫応答を回避できることも、最近実証されている（FuおよびZhang，2000）。したがって、ウイルス/腫瘍細胞相互作用および感染を最大限にするために、腹腔内治療は、このウイルスの魅力的な送達系路である。

40

【0303】

詳しく特徴づけられた腫瘍溶解性HSV G207からランダム突然変異誘発を経て選択されたシンシウム突然変異体（Fu-10）は、従来の非膜融合性ウイルスと比較して、乳癌の肺転移に対して劇的に強化された抗腫瘍効果を持つことが、最近実証された（FuおよびZhan

50

g, 2002)。従来の腫瘍溶解性HSV中に超膜融合性糖タンパク質を挿入することによって構築された膜融合性腫瘍溶解性HSVも、そのウイルスの抗腫瘍効果を有意に増加させることができる。ごく最近になって、両方の融合機構が1つのウイルスに組み込まれている新しい型の膜融合性腫瘍溶解性HSV (Synco-2D) が構築された。このウイルスを散在性卵巣癌への腹腔内投与によって評価したところ、75%のマウスが無腫瘍になった。

【0304】

本明細書に示すデータでは、単独膜融合性HSVと二重膜融合性HSVとを、インビトロでヒト前立腺癌細胞株を破壊する能力について、またこの細胞株から樹立された腫瘍をインビトロで破壊する能力について、直接比較した。インビトロでの結果から、Synco-2Dは、PC-3M-Pro4に対してSynco-2よりも有意に高い殺滅能力を持つことがわかる。これは、二重膜融合性ウイルスに含まれる付加的な細胞膜融合機構が、ウイルスの腫瘍破壊力を増加させていることを示している。この考えはインビボデータによって裏付けられた。このインビボデータでは、Synco-2Dの投与により、前立腺癌の肺転移に対して最も劇的な治療効果が生じ、その結果は、Synco-2投与による結果よりも有意に良好であることがわかる。しかし、ウイルスを全身投与した場合、Synco-2Dによって得られる同所性腫瘍に対する治療効果は、Synco-2の治療効果よりもわずかに良好であるに過ぎない。原発部位にある腫瘍に対する効果と転移腫瘍に対する効果のこの相違は、おそらくは、腫瘍サイズと全身送達後のウイルス分配量との不一致によるのだろう。ウイルスを投与するまでに、同所性腫瘍体積は既に大きくなっており、おそらく肺転移結節よりはかなり大きかっただろう。また、腫瘍溶解性HSVの全身投与では、腫瘍塊に限られた量のウイルスしか分配することができない。したがって、かさ高い腫瘍に分配される限られた量のウイルスだけでは、さらに有効なウイルスでも、Synco-2より目に見えて良好な治療効果をもたらすことはないだろう。したがって、かさ高い固形腫瘍を処置する実施形態では、そのかさ高い腫瘍の少なくとも一部を外科的に除去することが好ましい。

10

20

【0305】

同所性腫瘍とは対照的に、実験の終了時でさえ肺での腫瘍サイズは比較的小さいことから判断して、腫瘍溶解性HSV投与時までは、肺転移腫瘍結節は、おそらくまだ極めて小さかっただろう。また、血液供給量が多く、ろ過能力も高いので、肺中の腫瘍塊は、ウイルスの全身投与後は、同所性腫瘍よりも良好なウイルス分配を受けうる。この考察にあたって、Fu-10を投与した場合にも乳癌の肺転移に対して劇的な治療効果が得られることを、本発明者らの初期の研究が実証したことに注目することは興味深い (FUおよびZhang, 2002)。肺への優先的なウイルス分配を確認することにより、これらの腫瘍溶解剤を使ったこの器官における原発腫瘍または転移腫瘍の処置に、さらなる指針が得られるだろう。

30

【0306】

膜融合性糖タンパク質によって媒介されるシンシチウム形成は、膜融合性糖タンパク質と標的細胞上の特異的受容体との初期結合に依っている。この初期結合は、膜脂質二重層の規則正しい構造の変化を誘発し、それが結果として、脂質混合およびウイルスと細胞膜との膜融合または細胞膜同士の膜融合をもたらす (Lentzら, 2000)。GALV.fusの細胞受容体は、III型ナトリウム依存性リン酸輸送体PiT1として同定されている (Johannら, 1993、Kavanaughら, 1994)。しかし、HSVによって誘導される膜融合はもっと複雑であり、複数のウイルス糖タンパク質と、細胞表面上の少なくとも2つの特異的細胞受容体との関与が要求される。HSVの場合は、いくつかのウイルスタンパク質とおそらくは2つ以上の細胞受容体とが、細胞-細胞融合の誘発に必要であり、これにはgB、gD、gHおよびgL (Spear, 1993、Turnerら, 1998) と、おそらく2つ以上の細胞受容体 (Terry-Allisonら, 2001、1998) とが含まれる。したがって、Synco-2Dの治療的投与は、単独膜融合性腫瘍溶解性HSVよりも量的に有利であることに加えて、治療抵抗性腫瘍細胞の出現を減少させうると考えることができる。ある膜融合機構によって媒介されるシンシチウム形成に対して、受容体のダウンレギュレーションまたは突然変異によって耐性になった腫瘍細胞でも、もう一つの機構に起因するシンシチウム形成によって破壊されるだろう。Synco-2D感染が、いくつかのネズミ腫瘍細胞株と1つのヒト腫瘍細胞株でシンシチウム形成を引き起こすことが

40

50

でき、Fu-10またはSynco-2ではそれができないという最近の発見は、この可能性を裏付けるものである。

【0307】

腫瘍溶解性HSVが前立腺腫瘍成長をインビトロでもインビボでも阻害できることは、いくつかの既刊行物で実証されている (Walkerら, 1999、Tanejaら, 2001、Cozziら, 2002、Jorgensenら, 2001)。しかし、これらの研究はそのほとんどが、皮下に定着させた前立腺癌異種移植片で、ウイルスの腫瘍内注射によって行われている。癌のウイルス療法などの新しい治療戦略は、本発明がそうであるように、多巣的散在性疾患に対して有効であることが決定的に重要である。本明細書では、穏当な用量のSynco-2Dを静脈内投与すると、前立腺癌の肺転移に対して顕著な治療効果が得られることを示したが、これは、この二重膜融合性腫瘍溶解性HSVが、定着したヒト前立腺腫瘍転移の破壊に有効な治療剤であることを示している。

10

【0308】

本プロトコールは臨床的な前立腺癌骨格転移の処置に応用可能であるだろうが、いくつかの注意が必要である。腫瘍溶解性HSVは腫瘍細胞内だけで複製するように制限されているが、これらの膜融合性腫瘍溶解性HSVによるシンシチウム形成は、正常細胞にとって潜在的に毒性であり、もし制御されなければ、安全上の懸念が生じることになる。これは、この実験計画のように全身投与が必要な場合には、特にそうであると言える。Synco-2Dを構築する際には、シンシチウム形成を腫瘍組織に制限するために、いくつかの戦略を使用した。第1に、GALV.fus遺伝子発現を指示するために絶対後期ウイルスプロモーターを使用した。この絶対後期プロモーターUL38pの活性は、腫瘍溶解性HSVと共に全身投与した後も、腫瘍組織に拘束されつづけることが、明らかにされている (Fuら, 2002)。したがって、GALV.fusによるシンシチウム形成は、腫瘍細胞中で条件的に複製するウイルスに関連づけられた。第2に、突然変異誘発処理を施したHSVによるシンシチウム形成は、主として、いくつかのウイルス糖タンパク質、例えばgBおよびgKなどの異常発現によるものである (Readら, 1980、Bondら, 1982、Pogue-GEileら, 1984、Personら, 1982)。これらの糖タンパク質は、その発現がウイルスDNA複製に依存する後期遺伝子によってコードされているので、この機序による細胞膜融合は腫瘍細胞 (ここではウイルスは完全な感染サイクルを起こすことができる) でしか起こらず、正常非分裂細胞 (ここではウイルス複製が制限され、極めて低レベルの糖タンパク質しか発現されない) では起こらないだろう。ウイルスDNA複製を阻止するとFu-10 (G207由来の選択されたシンシチウム突然変異体) (FuおよびZhang, 2002) のシンシチウム形成能力が完全に消失することと、Synco-2 (UL38pによって駆動されるGALV.fusを持っている) が非分裂細胞ではシンシチウム形成を誘導できないこと (Fuら, 2002) は、先の研究で実証されているが、これは、Synco-2Dが従来の腫瘍溶解性HSVの安全性プロファイルを保っていることを、強く示唆している。これらの膜融合性腫瘍溶解性HSVに関する毒性試験を、感受性動物でさらに包括的に行うことにより、臨床応用時のその潜在能力がさらに強化されるだろう。

20

30

【0309】

要約すると、ここでは、強化型膜融合性HSVが、(1) ウイルス粒子の細胞間拡大を容易にすること、(2) 腹腔内での分散を補助すること、および(3) 卵巣癌や前立腺癌などの進行癌を処置するための複製可能なHSV系に適合すること、を示す。

40

【0310】

(参考文献)

以下の参考文献と、ここには列挙しないが本明細書で言及した他の参考文献は、それらが本明細書の記載を補足する典型的な手続上の詳細または他の詳細を提供する限りにおいて、参照により明確に本発明に組み込まれるものとする。

【0311】

(刊行物)

Advani, S.J., Sibley, G.S., Song, P.Y., Hallahan, D.E., Kataoka, Y., Roizman, B. および Weichselbaum, R.R. (1998) *Gene Ther* 5, 160-165.

50

Alemaný, R., Gomez-Manzano, C., Balague, C., Yung, W.K., Curiel, D.T., Kyritsis, A.P. および Fueyo, J. (1999) Exp Cell Res 252, 1-12.

Al-Hendy A., Magliocco A.M., Al-Tweigeri T., Braileanu G., Crellin N., Li H., Strong T., Curiel D. および Chedrese P.J. (2000) 「卵巣癌遺伝子治療: アデノウイルスベクター中のチミジンキナーゼおよびガンシクロビルによる反復処置は新しい免疫適格ネズミモデルにおける生存率を向上させる (Ovarian cancer gene therapy: repeated treatment with thymidine kinase in an adenovirus vector and ganciclovir improves survival in a novel immunocompetent murine model)」 Am. J. Obstet. Gynecol. 182:553-559

Almendo N, Bellon T, Rius C, Lastres Pら 「ヒト血小板内皮細胞接着分子-1プロモーターのクローニングおよびその組織特異的発現. 構造的および機能的特性解析 (Cloning of the human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter and its tissue-specific expression. Structural and functional characterization)」 J Immunol 1996 Dec 15;157(12):5411-21. 10

Andreansky, S.S., He, B., Gillespie, G.Y., Soroceanu, L., Markert, J., Chou, B., Roizman および R.J. Whitley (1996) 「遺伝子操作単純ヘルペスウイルスの実験的脳腫瘍の処置への応用 (The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors)」 Proc Natl Acad Sci USA. 93(21):11313-8.

Andreansky, S., He, B., van Cott, J., McGhee, J., Markert, J.M., Gillespie, G.Y., Roizman, B. および Whitley, R.J. (1998) Gene Ther 5, 121. 20

Angelis, Cell, 49:729, 1987b.

Angelis, Mol. Cell. Biol., 7:2256, 1987a.

Atchison および Perry, Cell, 46:253, 1986.

Atchison および Perry, Cell, 48:121, 1987.

Auzenne, E., Donato, N.J., Li, C., Leroux, E., Price, R.E., Farquhar, D. および Kloostergaard, J. (2002) 「ヒト卵巣癌の異種コンパートメントモデルにおけるタキソールと比較したポリ-L-グルタミン酸-パクリタキセルコポリマーの優れた治療プロファイル (Superior therapeutic profile of poly-L-glutamic acid-paclitaxel copolymer compared with taxol in xenogeneic compartmental models of human ovarian carcinoma)」 Clin. Cancer Res. 8:573-581 30

Babiss, L.E., Friedman, J.M. および Darnell, J.E. (1987) 「アデノウイルスゲノムに組み込まれた細胞性プロモーター. 内在性および外来性遺伝子転写に対するウイルスDNA複製の効果 (Cellular promoters incorporated into the adenovirus genome. Effect of viral DNA replication on endogenous and exogenous gene transcription)」 J Mol Biol. 193:643-650.

Banerjiら, Cell, 27:299, 1981.

Banerjiら, Cell, 35:729, 1983.

Basu, S., R.J. Binder, R. Suto, K.M. Anderson および P.K. Srivastava (2000) 「樹状細胞に部分成熟シグナルを送り、NF- κ B経路を活性化する熱ショックタンパク質は、壊死性細胞死では放出されるが、アポトーシス細胞死では放出されない (Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway)」 Int Immunol. 12(11):1539-46. 40

Bateman, A., F. Bullough, S. Murphy, L. Emiliusen, D. Lavillette, F.L. Cosset, R. Cattaneo, S.J. Russell および R.G. Vile (2000) 「腫瘍成長の局所的および免疫媒介的制御のための新しい種類の遺伝子である膜融合性膜糖タンパク質 (Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth)」 Cancer Res. 60(6):1492-7.

Bateman, A.R., K.J. Harrington, T. Kottke, A. Ahmed, A.A. Melcher, M.J. Gough, E. Li 50

nardakis, D.Riddle, A.Dietz, C.M.Lohse, S.Strome, T.Peterson, R.SimariおよびR.G.Vile (2002) 「ウイルス膜融合性膜糖タンパク質は、樹状細胞による腫瘍抗原の交差提示を促進する非アポトーシス機序によって固形腫瘍細胞を殺す (Viral fusogenic membrane glycoproteins kill solid tumor cells by nonapoptotic mechanisms that promote cross presentation of tumor antigens by dendritic cells)」 *Cancer Res.* 62(22):6566-78.

Berkhoutら, *Cell*, 59:273, 1989.

Bischoff, J.R.ら (1996) 「p53欠損ヒト腫瘍細胞中で選択的に複製するアデノウイルス突然変異株 (An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells)」 *Science*. 274:373-376.

Blanarら, *EMBO J.*, 8:1139, 1989.

Blank, S.V., Rubin, S.C., Coukos, G., Amin, K.M., Albelda, S.M.およびMolnar-Kimber, K.L. (2002) *Hum Gene Ther* 13, 627-639.

BodineおよびLey, *EMBO J*, 6:2997, 1987.

Bond, V.C., Person, S.およびWarner, S.C. (1982) *J Gen Virol* 61, 245.

Bookman M.A. (1998) 「卵巣癌の生物学的治療：最新の動向 (Biological therapy of ovarian cancer: current directions)」 *Semin. Oncol.* 25:381-396

Boon, T.およびP.van der Bruggen (1996) 「Tリンパ球が認識するヒト腫瘍抗原 (Human tumor antigens recognized by T lymphocytes)」 *J Exp Med.* 183(3):725-9.

Boshartら, *Cell*, 41:521, 1985.

Boszeら, *EMBO J.*, 5:1615, 1986.

Braddockら, *Cell*, 58:269, 1989.

Buick, R.N., Pullano, R.およびTrent, J.M. (1985) 「5つのヒト卵巣腺癌細胞株の相対的特性 (Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines)」 *Cancer Res.* 45:3668-3676

BullaおよびSiddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.

CampbellおよびVillarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.

CampereおよびTilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.

Campoら, *Nature*, 303:77, 1983.

Carroll, N.M., E.A.Chiocca, K.TakahashiおよびK.K.Tanabe (1996) 「組換え単純ヘルペスウイルスによる散在性大腸癌肝転移に対する遺伝子治療特異性の強化 (Enhancement of gene therapy specificity for diffuse colon carcinoma liver metastases with recombinant herpes simplex virus)」 *Ann Surg.* 224(3):323-9; discussion 329-30.

CelanderおよびHaseltine, *J Virology*, 61:269, 1987.

Celanderら, *J. Virology*, 62:1314, 1988.

Chahlavi A., Rabkin S., Todo T., Sundaresan P.およびMartuza R. (1999) 「免疫適格マウスにおいて単純ヘルペスウイルス1への事前ばく露がウイルスベクターによる腫瘍治療に及ぼす効果 (Effect of prior exposure to herpes simplex virus 1 on viral vector-mediated tumor therapy in immunocompetent mice)」 *Gene Ther.* 6:1751-1758.

Chahlavi, A., Todo, T., Martuza, R.L.およびRabkin, S.D. (1999) *Neoplasia* 1, 162.

Chahlavi, A., S.Rabkin, T.Todo, P.SundaresanおよびR.Martuza (1999) 「免疫適格マウスにおいて単純ヘルペスウイルス1への事前ばく露がウイルスベクターによる腫瘍治療に及ぼす効果 (Effect of prior exposure to herpes simplex virus 1 on viral vector-mediated tumor therapy in immunocompetent mice)」 *Gene Ther.* 6(10):1751-8.

Chandlerら, *Cell*, 33:489, 1983.

Changら, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.

Chase, M., Chung, R.Y.およびChiocca, E.A. (1998) *Nat Biotechnol* 16, 444-448.

Chatterjeeら, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.*, 86:9114, 1989.

Choiら, *Cell*, 53:519, 1988.

10

20

30

40

50

Cohenら「ヒトc-Ha-ras1遺伝子Hasエンハンサー活性の反復配列要素3' (A Repetitive Sequence Element 3' of the human c-Ha-ras1 Gene Has Enhancer Activity)」J. Cell Physiol., 5:75, 1987.

Cookson, M.M. (2001) Cancer Control 8, 133-140.

Costaら, Mol. Cell. Biol., 8:81, 1988.

Coukos, G., A.Makrigiannakis, E.H.Kang, D.Caparelli, I.Benjamin, L.R.Kaiser, S.C.Rubin, S.M.AlbeldaおよびK.L.Molnar-Kimber (1999)「上皮卵巣癌の腹腔内治療を目的とする、キャリア細胞を使った複製選択的単純ヘルペスウイルス1突然変異体の送達 (Use of carrier cells to deliver a replication-selective herpes simplex virus-1 mutant for the intraperitoneal therapy of epithelial ovarian cancer)」Clin Cancer Res. 5(6):1523-37. 10

Coukos, G., Makrigiannakis, A., Montas, S., Kaiser, L.R., Toyozumi, T., Benjamin, I., Albelda, S.M., Rubin, S.C.およびMolnar-Kimber, K.L. (2000)「多重弱毒単純ヘルペスウイルス1突然変異株G207は上皮卵巣癌に対して細胞毒性を発揮するが、正常中皮には細胞毒性を発揮せず、腹腔内腫瘍溶解治療に適している (Multi-attenuated herpes simplex virus-1 mutant G207 exerts cytotoxicity against epithelial ovarian cancer but not normal mesothelium and is suitable for intraperitoneal oncolytic therapy)」Cancer Gene Ther. 7:275-28

Cozzi, P.J., Burke, P.B., Bhargava, A., Heston, W.D., Huryk, B., Scardino, P.T.およびFong, Y. (2002) Prostate 53, 95. 20

Cripeら, EMBO J., 6:3745, 1987.

CulottaおよびHamer, Mol. Cell. Biol., 9:1376, 1989.

Dandoloら, J. Virology, 47:55, 1983.

De Villiersら, Nature, 312:242, 1984.

Deschampsら, Science, 230:1174, 1985.

Diaz, R.M., A.Bateman, L.Emiliusen, A.Fielding, D.Trono, S.J.RussellおよびR.G.Vile (2000)「膜融合性糖タンパク質を発現させる癌遺伝子治療用レンチウイルスベクター (A lentiviral vector expressing a fusogenic glycoprotein for cancer gene therapy)」Gene Ther. 7(19):1656-63.

Diaz, R.M., Bateman, A., Emiliusen, L., Fielding, A., Trono, D., Russell, S.J.およびVile, R.G. (2000)「膜融合性糖タンパク質を発現させる癌遺伝子治療用レンチウイルスベクター (A lentiviral vector expressing a fusogenic glycoprotein for cancer gene therapy)」Gene Ther. 7:1656-1663 30

Dranoff, G., E.Jaffee, A.Lazenby, P.Golumbek, H.Levitsky, K.Brose, V.Jackson, H.Hamada, D.PardollおよびR.C.Mulligan (1993)「ネズミ顆粒球マクローファージコロニー刺激因子を分泌するように操作した照射腫瘍細胞は強力の特異的で長期間持続する抗腫瘍免疫を刺激する (Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity)」Proc Natl Acad Sci USA. 90(8):3539-43. 40

Edbrookeら, Mol. Cell. Biol., 9:1908, 1989.

Edlundら, Science, 230:912, 1985.

FengおよびHolland, Nature, 334:6178, 1988.

Fielding, A.K., Chapel-Fernandes, S., Chadwick, M.P., Bullough, F.J., Cosset, F.L.およびRussell, S.J. (2000)「超膜融合性テナガザル白血病エンベロープ糖タンパク質: リガンドディスプレイによる細胞毒性遺伝子のターゲティング (A hyperfusogenic gibbon ape leukemia envelope glycoprotein: targeting of a cytotoxic gene by ligand display)」Hum. Gene Ther. 11:817-826

Fielding, A.K., S.Chapel-Fernandes, M.P.Chadwick, F.J.Bullough, F.L.CossetおよびS.J.Russell (2000)「超膜融合性テナガザル白血病エンベロープ糖タンパク質: リガ 50

ンドディスプレイによる細胞毒性遺伝子のターゲティング (A hyperfusogenic gibbon ap e leukemia envelope glycoprotein: targeting of a cytotoxic gene by ligand display) 」 Hum Gene Ther. 11(6):817-26.

FirakおよびSubramanian, Mol. Cell. Biol., 6:3667, 1986.

Flanagan, W.M.ら (1991) 「UL38の発現を制御する単純ヘルペスウイルス1型プロモーターの解析 . キャプシドの集合に關与する真の後期遺伝子 (Analysis of the herpes simplex virus type 1 promoter controlling the expression of UL38, a true late gene involved in capsid assembly) 」 J Virol. 65:769-786.

FoeckingおよびHofstetter 「 [哺乳類、植物、真菌、細菌?] 発現ベクター用の強力なかつ/または汎用性のあるエンハンサー-プロモーターユニット (Powerful and/or Versatile Enhancer-Promoter Unit for [mammalian, plant, fungus, bacteria?] Expression Vectors) 」 Gene, 45:101, 1986. 10

Fu, X.およびZhang, X. (2002) 「シンシチウム表現型の腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスに由来する強力な全身抗腫瘍活性 (Potent systemic antitumor activity from an oncolytic herpes simplex virus of syncytial phenotype) 」 Cancer Res. 62:2306-2312

Fu, X.およびZhang, X. (2002) 「シンシチウム表現型の腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスに由来する強力な全身抗腫瘍活性 (Potent systemic antitumor activity from an oncolytic herpes simplex virus of syncytial phenotype) 」 Cancer Res. 62:2306-2312

Fu, X., Tao, L., Jin, A., Vile, R.G., Brenner, M.K.およびZhang, X (2002) 「腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルスによる膜融合性膜糖タンパク質の発現はウイルスの抗腫瘍効果を強化する (Expression of a fusogenic membrane glycoprotein by an oncolytic herpes simplex virus potentiates the viral antitumor effect) 」 Cancer Res. 62:印刷中 20

Fu, X., Zhang, X. (2000) 「リポソーム製剤による単純ヘルペスウイルスベクターの送達 (Delivery of herpes simplex virus vectors through liposome formulation) 」 Mol. Ther. 4:447-453

Fu, X., Tao, L., Jin, A., Vile, R., Brenner, M.およびZhang, X. (2002) Nat. Med., 印刷中

Fu, X., Meng, F., Tao, L., Jin, A.およびZhang, X. (2002) Hum. Gene Ther., 印刷中 30

Fujitaら, Cell, 49:357, 1987.

Gillesら, Cell, 33:717, 1983.

Glossら, EMBO J., 6:3735, 1987.

Godboutら, Mol. Cell. Biol., 8:1169, 1988.

Goodart, S.A., Guzowski, J.F., Rice, M.K.およびWagner, E.K. (1992) 「単純ヘルペスウイルス1型UL38プロモーターによって制御される -ガラクトシダーゼmRNAの発現に対するゲノム位置の影響 (Effect of genomic location on expression of beta-galactosidase mRNA controlled by the herpes simplex virus type 1 UL38 promoter) 」 J Virol. 66:2973-2981. 40

GoodbournおよびManiatis, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 85:1447, 1988.

Goodbournら, Cell, 45:601, 1986.

Greeneら, Immunology Today, 10:272, 1989.

Greenlee, R.T., Hill-Harmon, M.B., Murray, T., Thun M. (2001) 「癌統計2001 (Cancer statistics, 2001) 」 CA Cancer J. Clin. 51:15-36

GrosschedlおよびBaltimore, Cell, 41:885, 1985.

Guzowski, J.F.およびWagner, E.K. (1993) 「単純ヘルペスウイルス1型絶対後期UL38プロモーター/リーダーの突然変異解析により、転写調節に重要な2つの領域が明らかになる (Mutational analysis of the herpes simplex virus type 1 strict late UL38 promoter/leader reveals two regions critical in transcriptional regulation) 」 J Viro 50

l. 67:5098-5108.

Guzowski, J.F.およびWagner, E.K. (1993) 「単純ヘルペスウイルス1型絶対後期UL38プロモーター/リーダーの突然変異解析により、転写調節に重要な2つの領域が明らかになる (Mutational analysis of the herpes simplex virus type 1 strict late UL38 promoter/leader reveals two regions critical in transcriptional regulation)」 J. Virol. 67:5098-5108

Guzowski, J.F., Singh, J.およびWagner, E.K. (1994) 「シス作用性下流活性化配列によって与えられる単純ヘルペスウイルス1型UL38プロモーターの転写活性化は細胞転写因子によって媒介される (Transcriptional activation of the herpes simplex virus type 1 UL38 promoter conferred by the cis-acting downstream activation sequence is mediated by a cellular transcription factor)」 J. Virol. 68:7774-7789. 10

HaslingerおよびKarin, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA., 82:8572, 1985.

HauberおよびCullen, J. Virology, 62:673, 1988.

Heise, C.C., A.Williams, J.OleschおよびD.H.Kirn (1999) 「複製能を持つアデノウイルス (ONYX-015) の腫瘍内注射後の有効性：腫瘍内拡大および分布効果 (Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects)」 Cancer Gene Ther. 6(6):499-504.

Heise, C., Ganly, I., Kim, Y.T., Sampson-Johannes, A., Brown, R.およびKirn, D. (2000) 「卵巣癌腫症に対する複製選択的アデノウイルスの有効性は腫瘍負荷量、ウイルス複製およびp53状態に依存する (Efficacy of a replication-selective adenovirus against ovarian carcinomatosis is dependent on tumor burden, viral replication and p53 status)」 Gene Ther. 7:1925-1929 20

Henら, Nature, 321:249, 1986.

Henslerら, Lymphokine Res., 8:347, 1989.

Hermiston, T. (2000) J Clin Invest 105, 1169-1172.

HerrおよびClarke, Cell, 45:461, 1986.

Herrlinger, U.ら (2000) 「HSV-1感染細胞タンパク質はテトラサイクリンが調節する導入遺伝子発現に影響を及ぼす (HSV-1 infected cell proteins influence tetracycline-regulated transgene expression)」 J Gene Med. 2:379-389.

Higuchi, H., Bronk, S.F., Bateman, A., Harrington, K., Vile, R.G., Gores, G.J. (2000) 「ウイルス膜融合性膜糖タンパク質発現は、生体エネルギー型細胞死を伴うシンシチウム形成を引き起こす：遺伝子治療との関係 (Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: implications for gene therapy)」 Cancer Res. 60:6396-6402 30

Higuchi, H., S.F.Bronk, A.Bateman, K.Harrington, R.G.VileおよびG.J.Gores (2000) 「ウイルス膜融合性糖タンパク質発現は、生体エネルギー型細胞死を伴うシンシチウム形成を引き起こす：遺伝子治療との関係 (Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: implications for gene therapy)」 Cancer Res. 60(22):6396-402.

Hirasawa, K., Nishikawa, S.G., Norman, K.L., Alain, T., Kossakowska, A.およびLee P.W. (2002) 「卵巣癌および大腸癌に対する腫瘍溶解性レオウイルス (Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer)」 Cancer Res. 62:1696-1701 40

Hirochikara, J. Virol., 61:2599, 1987.

Hirschら, Mol. Cell. Biol., 10:1959, 1990.

Holbrookら, Virology, 157:211, 1987.

Holland, L.E., Anderson, K.P., Shipman, C., Jr.およびWagner, E.K. (1980) 「一定の単純ヘルペスウイルス1型mRNA種の効率のよい発現にはウイルスDNA合成が必要である (Viral DNA synthesis is required for the efficient expression of specific herpes simplex virus type 1 mRNA species)」 Virology. 101:10-24.

HorlickおよびBenfield, Mol. Cell. Biol., 9:2396, 1989. 50

Huangら, Cell, 27:245, 1981.

Huard, J.ら (1996) 「成熟筋繊維への単純ヘルペスウイルスによる遺伝子送達によって基底膜は物理的障壁である (The basal lamina is a physical barrier to herpes simplex virus-mediated gene delivery to mature muscle fibers)」 J Virol. 70:8117-8123.

Huber, B.E., Richards, C.A.およびKrenitsky, T.A. (1991) 「肝細胞癌の処置を目的とするレトロウイルスによる遺伝子治療: 癌治療の革新的アプローチ (Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy)」 Proc Natl Acad Sci USA. 88:8039-8043.

Huard, J., Goins, W.F.およびGlorioso, J.C. (1995) 「単純ヘルペスウイルス1型ベクターによる筋への遺伝子導入 (Herpes simplex virus type 1 vector mediated gene transfer to muscle)」 Gene Ther. 2:385-392. 10

Hug H, Costas M, Staeheli P, Aebi Mら 「ネズミMx遺伝子の構成ならびにそのインターフェロン誘導性およびウイルス誘導性プロモーターの特性解析 (Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and virus-inducible promoter)」 Mol Cell Biol 1988 Aug;8(8):3065-79.

Hull, G.W., McCurdy, M.A., Nasu, Y., Bangma, C.H., Yang, G., Shimura, S., Lee, H.M., Wang, J., Albani, J., Ebara, S., Sato, T., Timme, T.L.およびThompson, T.C. (2000) Clin Cancer Res 6, 4101-4109.

Hwangら, Mol. Cell. Biol., 10:585, 1990. 20

Hwu, P., Freedman, R.S. (2002) 「卵巣癌患者の免疫治療 (The immunotherapy of patients with ovarian cancer)」 J. Immunother. 25:189-201

Imagawaら, Cell, 51:251, 1987.

ImbraおよびKarin, Nature, 323:555, 1986.

Imlerら, Mol. Cell. Biol., 7:2558, 1987.

Jakobovitsら, Mol. Cell. Biol., 8:2555, 1988.

JameelおよびSiddiqui, Mol. Cell. Biol., 6:710, 1986.

Januszski, M.M., P.M.Cannon, D.Chen, Y.RozenbergおよびW.F.Anderson (1997) 「モロニーネズミ白血病ウイルスエンベロープタンパク質の細胞質テールの機能解析 (Functional analysis of the cytoplasmic tail of Moloney murine leukemia virus envelope protein)」 J Virol. 71(5):3613-9. 30

Jaynesら, Mol. Cell. Biol., 8:62, 1988.

Johann, S.V., van Zeijl, M., Cekleniak, J.およびO'Hara, B. (1993) J Virol 67, 6733.

Johnsonら, Mol. Cell. Biol., 9:3393, 1989.

Johnson, P.A.およびEverett, R.D. (1986) 「単純ヘルペスウイルス1型のプラスミド上の後期US11遺伝子の豊富な発現にはDNA複製が必要である (DNA replication is required for abundant expression of a plasmid-borne late US11 gene of herpes simplex virus type 1)」 Nucleic Acids Res. 14:3609-3625.

Jorgensen, T.J., Katz, S., Wittmack, E.K., Varghese, S., Todo, T., Rabkin, S.D.およびMartuza, R.L. (2001) Neoplasia 3, 451. 40

KadeschおよびBerg, Mol. Cell. Biol., 6:2593, 1986.

Karinら, Mol. Cell. Biol., 7:606, 1987.

Katinkaら, Cell, 20:393, 1980.

Katinkaら, Nature, 290:720, 1981.

Kavanaugh, M.P., Miller, D.G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S.L., Kabat, D.およびMiller, A.D. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91, 7071.

Kawamotoら, Mol. Cell. Biol., 8:267, 1988.

Kaye, S.B., Eisenhauer, E.A.およびHamilton, T.C. (1999) 「卵巣癌に対する新しい非細胞毒アプローチ (New non-cytotoxic approaches to ovarian cancer)」 Ann. Oncol 50

10:65-68

Kiledjianら, Mol. Cell. Biol., 8:145, 1988.

Kin1, D. (2001) Expert Opin Biol Ther 1, 525-538.

Klamutら, Mol. Cell. Biol., 10:193, 1990.

Kochら, Mol. Cell. Biol., 9:303, 1989.

Koga, S.ら (2000) 「新しいテロメラーゼ特異的遺伝子治療: ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子プロモーターを利用したカスパーゼ8の遺伝子導入 (A novel telomerase-specific gene therapy: gene transfer of caspase-8 utilizing the human telomerase catalytic subunit gene promoter)」 Hum Gene Ther. 11:1397-1406.

Kramm, C.M., Chase, M., Herrlinger, U., Jacobs, A., Pechan, P.A., Rainov, N.G., Sena-Esteves, M., Aghi, M., Barnett, F.H., Chiocca, E.A.およびBreakefield X.O. (1997) 「脳腫瘍遺伝子治療用の第2世代複製条件付きHSV1ベクターの治療有効性および安全性 (Therapeutic efficiency and safety of a second-generation replication-conditional HSV1 vector for brain tumor gene therapy)」 Hum. Gene Ther. 8:2057-2068 10

Kramm, C.M., M.Chase, U.Herrlinger, A.Jacobs, P.A.Pechan, N.G.Rainov, M.Sena-Esteves, M.Aghi, F.H.Barnett, E.A.ChioccaおよびX.O.Breakefield (1997) 「脳腫瘍遺伝子治療用の第2世代複製条件付きHSV1ベクターの治療有効性および安全性 (Therapeutic efficiency and safety of a second-generation replication-conditional HSV1 vector for brain tumor gene therapy)」 Hum Gene Ther. 8(17):2057-68.

Kraus J, Woltje M, Schonwetter N, Holtt V 「選択的プロモーター使用およびマウスソマトスタチン受容体2遺伝子の組織特異的発現 (Alternative promoter usage and tissue specific expression of the mouse somatostatin receptor 2 gene)」 FEBS Lett 1998 May 29;428(3):165-70. 20

KrieglerおよびBotchan, Y.Gluzman編 「Eukaryotic Viral Vectors」 ニューヨーク州コールドスプリングハーバー, コールドスプリングハーバー研究所, 1982

KrieglerおよびBotchan, Mol. Cell. Biol., 3:325, 1983.

Krieglerら, Cell, 38:483, 1984a.

Krieglerら, Cell, 53:45, 1988.

Krieglerら, Van de Woudeら編 「Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes」 コールドスプリングハーバー, コールドスプリングハーバー研究所, 1984b 30

Krieglerら, D.HamerおよびM.Rosenberg編 「Gene Expression」 ニューヨーク, Alan R. Liss, 1983

Kuhlら, Cell, 50:1057, 1987.

Kunzら, Nucl. Acids Res., 17:1121, 1989.

Lambricht E.S., Kang E.H., Force S., Lanuti M., Caparrelli D., Kaiser L.R., Al belda S.M.およびMolnar-Kimber K.L. (2000) 「ネズミ腹腔内腫瘍モデルにおける単純ヘルペスウイルス療法の有効性に対する既存の抗ヘルペス免疫の影響 (Effect of preexisting anti-herpes immunity on the efficacy of herpes simplex viral therapy in a murine intraperitoneal tumor model)」 Mol. Ther. 2:387-393

Lareyre JJ, Thomas TZ, Zheng WL, Kasper Sら 「ネズミ精巣上体レチノイン酸結合タンパク質遺伝子の5キロ塩基対プロモーター断片は、トランスジェニックマウスの精巣上体における外来遺伝子の組織特異的、細胞特異的およびアンドロゲン調節的発現を駆動する (A 5-kilobase pair promoter fragment of the murine epididymal retinoic acid-binding protein gene drives the tissue-specific, cell-specific and androgen-regulated expression of a foreign gene in the epididymis of transgenic mice)」 J Biol Chem 1999 Mar 19;274(12):8282-90. 40

Larsenら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA., 83:8283, 1986.

Laspiaら, Cell, 59:283, 1989.

Latham, J.P., Searle, P.F., Mautner, V.およびJames, N.D. (2000) 「前立腺特異抗原プロモーター/エンハンサーを使った前立腺癌の遺伝子治療: 組織特異的アデノウイルス 50

スペクターの構築と試験 (Prostate-specific antigen promoter/enhancer driven gene therapy for prostate cancer: construction and testing of a tissue-specific adenovirus vector) 」 *Cancer Res.* 60:334-341.

Latimerら, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.

Leeら, *Mol. Endocrinol.*, 2:404-411, 1988.

Leeら, *Nature*, 294:228, 1981.

Lee SH, Wang W, Yajima S, Jose PAら 「脳および腎臓におけるD1Aドーパミン受容体遺伝子での組織特異的プロモーターの使用 (Tissue-specific promoter usage in the D1A dopamine receptor gene in brain and kidney) 」 *DNA Cell Biol* 1997 Nov;16(11):1267-75.

10

Lentz, B.R., Malinin, V., Haque, M.E.およびEvans, K. (2000) *Curr Opin Struct Biol* 10, 607./Levinsonら, *Nature*, 295:79, 1982.

Li, H., Y.S.Haviv, C.A.Derdeyn, J.Lam, C.Coolidge, E.Hunter, D.T.CurielおよびJ.L.Blackwell (2001) 「ヒト免疫不全ウイルス1型によるシンシチウム形成はアデノウイルス複製と適合し、ウイルス遺伝子産物およびデノボ合成されたウイルス粒子の効率のよい分散を促進する (Human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation is compatible with adenovirus replication and facilitates efficient dispersion of viral gene products and de novo-synthesized virus particles) 」 *Hum Gene Ther.* 12(18):2155-65.

Linら, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.

20

Luriaら, *EMBO J.*, 6:3307, 1987.

LuskyおよびBotchan, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.*, 83:3609, 1986.

Luskyら, *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983.

Mabjeesh, N.J., Zhong, H.およびSimons, J.W. (2002) *Endocr Relat Cancer* 9, 115-139.

MacKie, R.M., Stewart, B.およびBrown, S.M. (2001) *Lancet* 357, 525-526.

MajorsおよびVarmus, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.*, 80:5866, 1983.

Markert, J.M., M.D.Medlock, S.D.Rabkin, G.Y.Gillespie, T.TODO, W.D.Hunter, C.A.Palmer, F.Feigenbaum, C.Tornatore, F.TufaroおよびR.L.Martuza (2000) 「悪性神経膠腫処置用の条件付き複製可能型単純ヘルペスウイルス突然変異株G207: 第I相試験の結果 (Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial) 」 *Gene Ther.* 7(10):867-74.

30

Markert, J.M., Medlock, M.D., Rabkin, S.D., Gillespie, G.Y., TODO, T., Hunter, W.D., Palmer, C.A., Feigenbaum, F., Tornatore, C., Tufaro, F.およびMartuza, R.L. (2000) 「悪性神経膠腫処置用の条件付き複製可能型単純ヘルペスウイルス突然変異株G207: 第I相試験の結果 (Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial) 」 *Gene Ther.* 7:867-874

Martuza, R.L., Malick, A., Markert, J.M., Ruffner, K.L.およびCoen, D.M. (1991) 「遺伝子操作したウイルス突然変異株を利用するヒト神経膠腫の実験的治療法 (Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant) 」 *Science.* 252:854-856.

40

Martuza, R.L. (1997) *Nat Med* 3, 1323.

Matzinger, P. (2002) 「危険モデル: 新たな自己観 (The danger model: a renewed sense of self) 」 *Science.* 296 (5566):301-5.

McGuire, W.P., Hoskins, W.J., Brady, M.F., Kucera, P.R., Partridge, E.E., Look, K.Y., Clarke-Pearson, D.L.およびDavidson, M. (1996) 「ステージIIIおよびステージIVの卵巣癌を持つ患者におけるパクリタキセルおよびシスプラチンと比較したシクロホスファミドおよびシスプラチン (Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer) 」 *N.*

50

Engl. J. Med. 334:1-6

McNeallら, Gene, 76:81, 1989.

Melcher, A., Tordryk, S., Hardwick, N., Ford, M., Jacobson, M.およびVile, R.G. (1998) 「腫瘍免疫原性は、熱ショックタンパク質発現の誘導を介して、細胞死の機序によって決まる (Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression)」Nat. Med. 4:581-587

Melcher, A., M.Gough, S.TodrykおよびR.Vile (1999) 「腫瘍免疫治療のためのアポトーシスとネクローシス: 名前の意味するところ (Apoptosis or necrosis for tumor immunotherapy: what's in a name?)」J Mol Med. 77(12):824-33.

Miksicekら, Cell, 46:203, 1986.

Mineta, T., S.D.Rabkin, T.Yazaki, W.D.HunterおよびR.L.Martuza (1995) 「悪性神経膠腫処置用の弱毒多重突然変異単純ヘルペスウイルス1 (Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas)」Nat Med. 1(9):938-43.

MordacqおよびLinzer, Genes and Dev., 3:760, 1989.

Moreauら, Nucl. Acids Res., 9:6047, 1981.

Muesingら, Cell, 48:691, 1987.

Nemunaitis J., Ganly I., Khuri F., Arseneau J., Kuhn J., McCarty T., Landers S., Maples P., Romel L., Randlev B., Reid T., Kaye S.およびKirn D. (2000) 「進行頭頸部癌患者におけるE1B-55kD遺伝子欠失アデノウイルスONYX-015を使ったp53突然変異腫瘍での選択的複製および腫瘍溶解: 第II相試験 (Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a Phase II trial)」Cancer Res. 60:6359-6366

Nemunaitis, J., F.Khuri, I.Ganly, J.Arseneau, M.Posner, E.Vokes, J.Kuhn, T.McCarty, S.Landers, A.Blackburn, L.Romel, B.Randlev, S.KayeおよびD.Kim (2001) 「難治性頭頸部癌患者における複製選択的アデノウイルスONYX-015の腫瘍内投与の第II相試験 (Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer)」J Clin Oncol. 19(2):289-98.

Ngら, Nuc. Acids Res., 17:601, 1989.

NIHコンセンサス会議 (NIH Consensus Conference) 「卵巣癌. スクリーニング、処置および経過観察. 卵巣癌に関するNIHコンセンサス開発パネル (Ovarian cancer. Screening, treatment and follow-up. NIH Consensus Development Panel on Ovarian Cancer)」 (1995) J. Am. Med. Assoc. 273:491-497

Nomoto S, Tatematsu Y, Takahashi T, Osada H. 「組織選択的に発現する選択的転写物の原因であるヒトLIMK2遺伝子の選択的プロモーター領域のクローニングおよび特性解析 (Cloning and characterization of the alternative promoter regions of the human LIMK2 gene responsible for alternative transcripts with tissue-specific expression)」Gene 1999 Aug 20;236(2):259-71.

Ondekら, EMBO J., 6:1017, 1987.

Ornitzら, Mol. Cell. Biol., 7:3466, 1987.

Ozols, R.F. (2000) 「進行卵巣癌の管理コンセンサスサマリー (Management of advanced ovarian cancer consensus summary)」Semin. Oncol. 27:47-49

Palmiterら, Nature, 300:611, 1982.

Pawlik, T.M., H.Nakamura, S.S.Yoon, J.T.Mullen, S.Chandrasekhar, E.A.ChioccaおよびK.K.Tanabe (2000) 「複製能を持つ遺伝子操作ヘルペスウイルスの静脈内投与による散在性肝細胞癌の腫瘍溶解 (Oncolysis of diffuse hepatocellular carcinoma by intravascular administration of a replication-competent, genetically engineered herpesvirus)」Cancer Res. 60(11):2790-5.

10

20

30

40

50

- Parker, J.N., Gillespie, G.Y., Love, C.E., Randall, S., Whitley, R.J.およびMarkert, J.M. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97, 2208.
- Pechら, Mol. Cell. Biol., 9:396, 1989.
- Peng, K-W., TenEyck, C.J., Galanis, E., Kalli, K.R., Hartmann, L.C.およびRussell, S.J. (2002) 「操作した麻疹ウイルスを用いる卵巣癌の腹腔内治療 (Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus)」 Cancer Res. 62:4 656-4662
- Pennisi, E. (1996) Science 274, 342-343.
- Perez-StableおよびConstantini, Mol. Cell. Biol., 10:1116, 1990.
- Person, S., Kousoulas, K.G., Knowles, R.W., Read, G.S., Holland, T.C., Keller, P.M.およびWarner, S.C. (1982) Virology 117, 293. 10
- Pettaway, C.A., Pathak, S., Greene, G., Ramirez, E., Wilson, M.R., Million, J. J.およびFidler, I.J. (1996) Clin Cancer Res 2, 1627-1636.
- PicardおよびSchaffner, Nature, 307:83, 1984.
- Pillkertら, Genes and Dev., 1:268, 1987.
- Pogue-Geile, K.L., Lee, G.T., Shapira, S.K.およびSpear, P.G. (1984) Virology 136, 100-109.
- Pontaら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA., 82:1020, 1985.
- Portonら, Mol. Cell. Biol., 10:1076, 1990.
- QueenおよびBaltimore, Cell, 35:741, 1983. 20
- Quinnら, Mol. Cell. Biol., 9:4713, 1989.
- Rampling, R., G.Cruickshank, V.Papanastassiou, J.Nicoll, D.Hadley, D.Brennan, R.Petty, A.MacLean, J.Harland, E.McKie, R.MabbsおよびM.Brown (2000) 「複製能を持つ単純ヘルペスウイルス (ICP34.5ヌル突然変異株1716) の再発性悪性神経膠腫患者における毒性評価 (Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma)」 Gene Ther. 7(10):859-66.
- Read, G.S., Person, S.およびKeller, P.M. (1980) J Virol 35, 105.
- Redondoら, Science, 247:1225, 1990.
- ReismanおよびRotter, Mol. Cell. Biol., 9:3571, 1989. 30
- Resendez Jr.ら, Mol. Cell. Biol., 8:4579, 1988.
- Ripeら, Mol. Cell. Biol., 9:2224, 1989.
- Rittlingら, Nucl. Acids Res., 17:1619, 1989.
- Robertson, M.W., III, Barnes, M.N., Rancourt, C., Wang, M., Grim, J., Alvarez, R.D., Siegal, G.P.およびCuriel, D.T. (1998) 「卵巣癌の遺伝子治療 (Gene therapy for ovarian carcinoma)」 Semin. Oncol. 25:397-406
- Rosenら, Cell, 41:813, 1988.
- Rubin, S.C., Randall, T.C., Armstrong, K.A., Chi, D.S.およびHoskins, W.J. (1999) 「セカンドルック開腹術で陰性所見を示した後の卵巣患者の10年経過観察 (Ten-year follow-up of ovarian patients after second-look laparotomy with negative findings)」 Obstet. Gynecol. 93:21-24 40
- Saeki, Y., Ichikawa, T., Saeki, A., Chiocca, E.A., Tobler, K., Ackermann, M., Breakefield, X.O.およびFraefel, C. (1998) 「大腸菌中で細菌人工染色体として増幅する単純ヘルペスウイルス1型DNA:複製能を持つウイルス子孫のレスキューとアンプリコンベクターのパッケージング (Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: rescue of replication-competent virus progeny and packing of amplicon vectors)」 Hum. Gene Ther. 9:2787-2794
- Saeki, Y., T.Ichikawa, A.Saeki, E.A.Chiocca, K.Tobler, M.Ackermann, X.O.BreakefieldおよびC.Fraefel (1998) 「大腸菌中で細菌人工染色体として増幅する単純ヘルペスウイルス1型DNA:複製能を持つウイルス子孫のレスキューとアンプリコンベクターのパッ 50

ケーシング (Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors) 」 Hum Gene Ther. 9(18):2787-94.

Satakeら「ポリオーマウイルスDNAのエンハンサー領域内のF9点突然変異をまたぐオリゴヌクレオチドの生物学的活性 (Biological Activities of Oligonucleotides Spanning the F9 Point Mutation Within the Enhancer Region of Polyoma Virus DNA) 」 J Virology , 62:970 , 1988.

Schaffer , P.A. , Aron , G.M. , Biswal , N.およびBenyesh-Melnick M. (1973) 「単純ヘルペスウイルス1型の温度感受性突然変異株：分離、相補性および部分的特性解析 (Temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus type 1: isolation, complementation and partial characterization) 」 Virology. 52:57-71 10

Schaffnerら , J. Mol. Biol. , 201:81 , 1988.

Schadendorf , D. , A.PaschenおよびY.Sun (2000) 「メラノーマに対する癌ワクチンとしての自己、同種異系腫瘍細胞または遺伝子操作細胞 (Autologous , allogeneic tumor cells or genetically engineered cells as cancer vaccine against melanoma) 」 Immunol Lett. 74(1):67-74.

Schang , L.M. , J.PhillipsおよびP.A.Schaffer (1998) 「単純ヘルペスウイルスの複製および転写における細胞性サイクリン依存性キナーゼの要件 (Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription) 」 J Virol. 72(7):5626-37. 20

Schellingerhout , D.ら (1998) 「単純ヘルペスウイルス粒子のインビボ分布のマッピング (Mapping the in vivo distribution of herpes simplex virions) 」 Hum Gene Ther. 9:1543-1549.

Schuur , E.R.ら (1996) 「前立腺特異抗原発現は上流エンハンサーによって調節される (Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer) 」 J Biol Chem. 271:7043-7051.

Searleら , Mol. Cell. Biol. , 5:1480 , 1985.

Selby , P.J. , Thomas , J.M. , Monaghan , P. , Sloane , J.およびPeckman , M.J. (1980) 「胸腺切除、シトシンアラビノシドおよび全身照射によって免疫学的に誘導したマウスで樹立させ累代移植したヒト腫瘍異種移植片 (Human tumor xenografts established and serially transplanted in mice immunologically derived by thymectomy, cytosine arabinoside and whole-body irradiation) 」 Br. J. Cancer. 41:52-61 30

SharpおよびMarciniak , Cell , 59:229 , 1989.

ShaulおよびBen-Levy , EMBO J. , 6:1913 , 1987.

Shermanら , Mol. Cell. Biol. , 9:50 , 1989.

Shevrin , D.H. , Gorny , K.I.およびKukreja , S.C. (1989) Prostate 15 , 187-194.

SleighおよびLockett , J. EMBO , 4:3831 , 1985.

Spalholzら , Cell , 42:183 , 1985.

SpandauおよびLee , J. Virology , 62:427 , 1988.

SpandidosおよびWilkie , EMBO J , 2:1193 , 1983. 40

Spear , P.G. (1993) , J.Bentz編「Membrane fusion induced by herpes simplex viruses」 (CRC Press : ボカラトン) の201頁

Spear , M.A. , Sun , F. , Eling , D.J. , Gilpin , E. , Kipps , T.J. , Chiocca , E.A.およびBouvet , M. (2000) Cancer Gene Ther 7 , 1051

StephensおよびHentschel , Biochem. J. , 248:1 , 1987.

Stephenson , R.A. , Dinney , C.P. , Gohji , K. , Ordenez , N.G. , Killion , J.J.およびFidler , I.J. (1992) J Natl Cancer Inst 84 , 951-957.

Stuartら , Nature , 317:828 , 1985.

SullivanおよびPeterlin , Mol. Cell. Biol. , 7:3315 , 1987.

Sundaresan , P. , W.D.Hunter , R.L.MartuzaおよびS.D.Rabkin (2000) 「複製能を持つ 50

弱毒単純ヘルペスウイルス1型突然変異株G207: マウスにおける安全性評価 (Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation in mice) 」 *J Virol.* 74 (8):3832-41.

SwartzendruberおよびLehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.

Takebeら, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.

Tamura, Y., Peng, P., Liu, K., Daou, M.およびSrivastava, P.K. (1997) 「自己腫瘍由来熱ショックタンパク質調製物による腫瘍の免疫治療 (Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations)」 *Science*. 278:117-120

Tanaka, S.ら (2000) 「CEAプロモーターを持つエプスタイン-バーウイルス (EBV) 系プラスミドベクターのポリアミドアミン dendrimer-媒介導入による癌胎児性抗原 (CEA) 産生胆管癌細胞の標的殺滅 (Targeted killing of carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cholangiocarcinoma cells by polyamidoamine dendrimer-mediated transfer of an Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vector carrying the CEA promoter)」 *Cancer Gene Ther.* 7:1241-1250.

Taneja, S., MacGregor, J., Markus, S., Ha, S.およびMohr, I. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 8804.

Tavernierら, *Nature*, 301:634, 1983.

TaylorおよびKingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.

TaylorおよびKingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.

Taylorら, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.

Terry-Allison, T., Montgomery, R.I., Warner, M.S., Geraghty, R.J.およびSpear, P.G. (2001) *Virus Res* 74, 39-45.

Terry-Allison, T., Montgomery, R.I., Whitbeck, J.C., Xu, R., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J.およびSpear, P.G. (1998) *J Virol* 72, 5802-5810.

Thiesenら, *J. Virology*, 62:614, 1988.

Toda, M., S.D.RabkinおよびR.L.Martuza (1998) 「複製能を持つ多重突然変異単純ヘルペスウイルス1であるG207による脳転移モデルにおけるヒト乳癌の処置 (Treatment of human breast cancer in a brain metastatic model by G207, a replication-competent multmutated herpes simplex virus 1)」 *Hum Gene Ther.* 9(15):2177-85.

Todo, T., F.Feigenbaum, S.D.Rabkin, F.Lakeman, J.T.Newsome, P.A.Johnson, E.Mitchell, D.Belliveau, J.M.OstroveおよびR.L.Martuza (2000) 「ヨザルにおける脳内接種後の多重突然変異条件付き複製可能型単純ヘルペスウイルス1型G207のウイルス排出および生体内分布 (Viral shedding and biodistribution of G207, a multmutated, conditionally replicating herpes simplex virus type 1, after intracerebral inoculation in aotus)」 *Mol Ther.* 2(6):588-95.

Todo, T., Martuza, R.L., Dallman, M.J.およびRabkin, S.D. (2001) *Cancer Res* 61, 153.

Todo, T., S.D.RabkinおよびR.L.Martuza (2000) 「脳腫瘍の腫瘍溶解性多重突然変異単純ヘルペスウイルス1型 (G207) 療法におけるガンシクロビルによる抗腫瘍効果の強化の評価 (Evaluation of ganciclovir-mediated enhancement of the antitumoral effect in oncolytic, multmutated herpes simplex virus type 1 (G207) therapy of brain tumors)」 *Cancer Gene Ther.* 7(6):939-46.

Todryk, S.ら (1999) 「大腸直腸癌の免疫治療用の腫瘍溶解性ベクターとしての機能障害感染性単サイクル単純ヘルペスウイルス (Disabled infectious single-cycle herpes simplex virus as an oncolytic vector for immunotherapy of colorectal cancer)」 *Hum Gene Ther.* 10:2757-2768.

Toyoizumi, T., R.Mick, A.E.Abbas, E.H.Kang, L.R.KaiserおよびK.L.Molnar-Kimber (1999) 「ヒト非小細胞肺癌における化学療法剤と単純ヘルペスウイルス1型ICP34.5突然変異株 (HSV-1716) とによる併用療法 (Combined therapy with chemotherapeutic agent

10

20

30

40

50

- s and herpes simplex virus type 1 ICP34.5 mutant (HSV-1716) in human non-small cell lung cancer) 」Hum Gene Ther. 10(18):3013-29.
- Treisman, Cell, 42:889, 1985.
- Troncheら, Mol. Biol. Med., 7:173, 1990.
- Troncheら, Mol. Cell. Biol., 9:4759, 1989.
- TrudelおよびConstantini, Genes and Dev., 6:954, 1987.
- Tsumaki N, Kimura T, Tanaka K, Kimura JHら「マウス 2(XI) コラーゲンプロモーター中の軟骨および神経細胞特異的シス要素のモジュール的配置 (Modular arrangement of cartilage- and neural tissue-specific cis-elements in the mouse alpha2 (XI) collagen promoter)」J Biol Chem 1998 Sep 4;273(36):22861-4. 10
- Turner, A., Bruun, B., Minson, T.およびBrowne, H. (1998) J Virol 72, 873.
- Tyndallら, Nuc. Acids. Res., 9:6231, 1981.
- VanniceおよびLevinson, J. Virology, 62:1305, 1988.
- Vasseurら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA., 77:1068, 1980.
- Vile, R.G.およびHart, I.R. (1993) 「DNAの腫瘍内直接注射後の、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子の組織特異的発現を利用することによる、定着したネズミメラノーマの成長の阻害 (Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA)」Cancer Res. 53:3860-3864.
- Wagner, E.K., Guzowski, J.F.およびSingh, J. (1995) 「産生性感染中および潜伏感染中の単純ヘルペスウイルスゲノムの転写 (Transcription of the herpes simplex virus genome during productive and latent infection)」Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 51:123-165. 20
- Walker, J.R., K.G.McGeagh, P.Sundaresan, T.J.Jorgensen, S.D.RabkinおよびR.L.Martuza (1999) 「条件付き複製可能型単純ヘルペスウイルスベクターG207によるヒト前立腺腺癌の局所的および全身的治療 (Local and systemic therapy of human prostate adenocarcinoma with the conditionally replicating herpes simplex virus vector G207)」Hum Gene Ther. 10(13):2237-43.
- WangおよびCalame, Cell, 47:241, 1986.
- Weberら, Cell, 36:983, 1984. 30
- Weinbergerら, Mol. Cell. Biol., 8:988, 1984.
- WinotoおよびBaltimore, Cell, 59:649, 1989.
- Wood, M.ら (1999) 「ルシフェラーゼレポーター遺伝子を持つアデノウイルスベクターの、マウスへの嚢内投与後または静脈内投与後の生体内分布 (Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse)」Cancer Gene Ther. 6:367-372.
- Wu HK, Squire JA, Song Q, Weksberg R. 「ヒト組織におけるインプリンティング遺伝子インスリン様成長因子IIのプロモーター依存性組織特異的発現性 (Promoter-dependent tissue-specific expressive nature of imprinting gene, insulin-like growth factor II, in human tissues)」Biochem Biophys Res Commun 1997 Apr 7;233(1):221-6. 40
- Yoon, S.S., Carroll, N.M., Chiocca, E.A.およびTanabe, K.K. (1998) Ann Surg 228, 366.
- Yoon, S.S., H.Nakamura, N.M.Carroll, B.P.Bode, E.A.ChioccaおよびK.K.Tanabe (2000) 「腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス1型は大腸癌からの散在性肝転移を選択的に破壊する (An oncolytic herpes simplex virus type 1 selectively destroys diffuse liver metastases from colon carcinoma)」Faseb J. 14(2):301-11
- Yutzeyら「内部調節要素がトロポニンI遺伝子発現を制御する (An Internal Regulator Element Controls Troponin I Gene Expression)」Mol. Cell. Biol., 9:1397, 1989.
- Yutzeyら, Mol. Cell. Biol., 9:1397, 1989.
- Zhang, X., Efsthathiou, S.およびSimmons, A. (1994) Virology 202, 530-539. 50

Zhao-Emonet JC, Boyer O, Cohen JL, Klatzmann D. 「ヒトCD4遺伝子プロモーターの欠失および突然変異解析：最小組織特異的プロモーターの特性解析 (Deletional and mutational analyses of the human CD4 gene promoter: characterization of a minimal tissue-specific promoter)」Biochim Biophys Acta 1998 Nov 8;1442(2-3):109-19.

本発明とその利点を詳細に説明し終えたが、本願特許請求の範囲によって特定される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、ここに様々な変更、置換および改変を加えることができると理解すべきである。また、本発明の範囲は、本明細書に記載したプロセス、機械、製造、組成物、手段、方法およびステップの特定の実施形態に限定されないものとする。本発明の開示から当業者には容易に理解であろうように、本明細書に記載した対応する実施形態と実質的に同じ機能を果たすまたは実質的に同じ結果をもたらすプロセス、機械、製造、組成物、手段、方法またはステップであって、現存するものまたは後に開発されるものは、本発明で使用することができる。したがって、本願特許請求の範囲は、そのようなプロセス、機械、製造、組成物、手段、方法またはステップも、その範囲に包含するものとする。

10

【図面の簡単な説明】

【0312】

【図1】腫瘍溶解性HSVにGALV.fus遺伝子を挿入するための強制的戦略を示す概略図である。fHSV-delta-pacでは、突然変異型HSV DNA配列を網点付きの灰色の棒で表し、BAC配列を黒い棒で表す。シャトルプラスミド由来のpacおよび遺伝子カセットには名前を付記する。遺伝子挿入をインビトロで行った後、感染性ウイルスを生成させるために、そのライ

20

【図2】腫瘍細胞でのSynco-1の表現型特性解析を示す図である。上側はBaco-1に感染させた腫瘍細胞を表す。各写真には1つの感染巣が写っている。下側はSynco-1に感染させた細胞を表す。各写真は1つのシンシチウムを表している（撮影時の倍率は200倍）。

【図3】図3Aおよび図3Bは、Synco-1感染による腫瘍細胞殺滅能力の増加を表す図である。感染ウェルでの生細胞数を非感染ウェル中の総細胞数で割ることによって細胞生存百分率を計算した。各ウイルス量および各収集時点で、Baco-1またはSynco-1に感染させた細胞間の統計的比較を行った。* $P < 0.001$ 。

【図4】ヌードマウス-ヒト腫瘍異種移植片におけるSynco-1の強化された腫瘍溶解効力を表す図である。処置群にはSynco-1、Baco-1またはPBSが含まれる。表示した週に測定した腫瘍体積を注射開始時の腫瘍体積で割ることによって、腫瘍成長比を決定した。図は平均値 ± 標準偏差（1群あたり $n = 10$ ）を表す。PBS対照群と比較する場合、 $P < 0.001$ 。

30

【図5】図5A~5Lは、Synco-2の表現型特性解析およびウイルスからの選択的GALV.fus発現を表す図である。図5A~5Cは、Synco-2に感染させた様々な腫瘍細胞を表す（図5A、U87MG；図5B、DU145；および図5C、Hep3B）。図5Dおよび5Eは、培地中にACVが存在する状態でSynco-1（図5D）およびSynco-2（図5E）に感染させたHep3B細胞を表す。図5Fは、非感染ヒト胎児線維芽細胞HF333.Weを表す。図5G~5Iは、Synco-1に感染させたHF333.Weの様々な状態を表す（図5Gは成長培地で維持した細胞を表し、図5Hは24時間血清飢餓状態の細胞を表し、図5Iはロバスタチンと共に培養した24時間血清飢餓状態の細胞を表す）。図5J~5Lは、Synco-2に感染させたHF333.Weの様々な状態を表す（図5Jは成長培地で維持した

40

【図6】図6A~6Bは、Synco-1とSynco-2の抗腫瘍効力を比較した図、およびそれらのインビボシンシチウム形成を例示する図である。図6Aは、異種移植したヒト腫瘍に対する腫瘍溶解効力の比較である。処置群には、Baco-1、Synco-1、Synco-2およびPBSが含まれる。図6Bは、ウイルス注射またはPBS注射後の腫瘍組織の顕微鏡検査を表す。Synco-1またはSynco-2感染腫瘍組織のシンシチウム形成を矢印で示す。

【図7】AP遺伝子を含む腫瘍溶解性HSVを構築するための強制的ライゲーション法を表す典型的概略図である。塗りつぶした領域はプラスミドDNA配列を表し、陰影線付きの領域はfHSV-delta-pac中のHSV DNA配列を表す。BAC配列、HSVパッケージングシグナル（p

50

ac)、2つの異なるプロモーター要素、およびAP遺伝子をそれぞれ個別に表示している。各コンストラクト上の制限酵素PacIの位置も示してある。AP遺伝子を含む遺伝子カセットをPacIで切り出し、やはりPacIで線状化しておいたfHSV-delta-pac中にライゲートした。感染性ウイルスを生成させるために、そのライゲーション混合物をVero細胞に直接トランスフェクトした。

【図8】プラスミドにクローニングされたUL38pのインビトロ特性解析を示す図である。pLox-APとpIMJ-pac-APをVero細胞にトランスフェクトした後、その細胞を0.1pfu/細胞の腫瘍溶解性HSV(Baco-1)に感染させるか、模擬感染(培地のみ)させた。ウイルス感染の24時間後(すなわちDNAトランスフェクションの48時間後)に培地を収集し、AP分泌量を定量した。図に示す結果は、3回の独立した実験の平均を表す。

【図9】腫瘍溶解性HSVの下でのUL38pのインビトロ特性解析を示す図である。ヒト胎児線維芽細胞(HF333.We)を 1×10^5 細胞/ウェルの密度で12穴プレートに1対ずつ接種した。一組の細胞を無血清培地中の20 μ Mロバスタチンで30時間処理した。次に、無処理細胞(完全培地中)とロバスタチン停止細胞の両方を、0.1pfu/細胞のBaco-AP1またはBaco-AP2に感染させた。感染の24時間後に上清を集め、培地中のAPを定量した。図は、2回の独立した実験の平均を表す。

【図10】腫瘍溶解性HSVの下でのUL38pのインビボ特性解析を示す図である。右脇腹に肝臓腫瘍が定着しているマウスに、 5×10^6 pfuのBaco-AP-1またはBaco-AP2を腫瘍内注射(i.t.)した。腫瘍を持たないマウスには同じ量のウイルスを筋肉内注射(i.m.)または静脈内注射(i.v.)した。ウイルス接種後の表示の日に採血し、血中に分泌されたAPを定量した。データを平均 \pm SE($n=5$)として表す。

【図11】膜融合性腫瘍溶解性HSVを得るための戦略を要約した図。大きい円形領域は、fHSV-delta-pac中のHSV DNA配列を表し、黒丸で示すBAC配列を含む。シャトルプラスミド由来のpacおよび遺伝子カセットには名前を付記する。遺伝子カセットをインビトロでBAC-HSVコンストラクトにライゲートした後、感染性ウイルスを生成させるために、そのライゲーション混合物をVero細胞にトランスフェクトした。その後、強化された膜融合性を持つ強力なHSVを生成させるために、ランダム突然変異誘発を行った。

【図12】図12A~12Fは、卵巣癌細胞株におけるSynco-2Dのインビトロ表現型特性解析を示す。HeyまたはSKOV3卵巣癌細胞をBaco-1またはSynco-2Dに感染させた。写真は最初のウイルス感染の48時間後に撮影した(撮影時の倍率は200倍)。黒い矢印は1つのシンシウム形成を示す(図12E、図12F)

【図13】図13Aおよび13Bは、卵巣癌細胞に対するBaco-1とSynco-2Dのインビトロ細胞毒性を比較した図である。HeyまたはSKOV3卵巣癌細胞を24穴プレートに接種し、Baco-1もしくはSynco-2Dに感染させるか、未感染のまま(この図には示していない)にしておいた。感染の24時間後または48時間後に細胞を集め、トリパンブルー染色後に生細胞を数えた。生きている感染細胞の数を非感染細胞の数で割ることによって細胞生存百分率を決定した。データを平均 \pm 平均の標準偏差として表す。図13Aは0.01pfu/細胞を表し、図13Bは0.1pfu/細胞を表す。

【図14】図14A~14Cは、同所性卵巣癌モデルに関する膜融合性腫瘍溶解性HSVの治療効果を示す図である。Hey腫瘍細胞の同所性移植を行った14日後および28日後に、 2×10^7 pfu/200 μ lの腫瘍溶解性HSVを、注射した腫瘍の異なる部位から、マウスに腹腔内投与した。処置群は次のとおりとした；(図14A)：対照としてPBS；(図14B)：Baco-1；(図14C)：Synco-2D。同所性腫瘍接種の42日後に、生きているマウスを安楽死させ、それらが腫瘍を発達させているかどうか、そして腹膜播種を起こしているかどうかを調べた。黒い矢印は腹膜肥厚または腹膜播種の形成を示す。

【図15】腫瘍溶解性HSVで進行卵巣癌を処置したマウスの生存を示す図である(Kaplan-Meierプロット)。Hey卵巣癌細胞の腹腔内播種を持つマウスを、腫瘍溶解性HSVの腹腔内投与によって、以下のように処置した：PBS($n=8$ 、)、Baco-1($n=8$ 、) およびSynco-2d($n=8$ 、)。*：PBSまたはBaco-1と比較してSynco-2Dの腹腔内投与後には有意な生存期間の延長が認められる($p < 0.01$)。

10

20

30

40

50

【図16】前立腺癌細胞株PC-3M-Pro4における膜融合性腫瘍溶解性HSVの表現型特性解析を示す図である。PC-3M-Pro4細胞を非膜融合性(Baco-1)または膜融合性(Synco-2またはSynco-2D)腫瘍溶解性HSVに感染させた。各写真は最初のウイルス感染の24時間後または48時間後に撮影した(撮影時の倍率は200倍)。黒い矢印はシンシチウムの境界を示す。

【図17】図17Aおよび図17Bは、前立腺癌細胞に対するBaco-1、Synco-2およびSynco-2Dのインビトロ細胞毒性を比較した図である。PC-3M-Pro4前立腺癌細胞を24穴プレートに接種し、0.01pfu/細胞(図17A)または0.1pfu/細胞(図17B)のBaco-1、Synco-2またはSynco-2Dに感染させるか、未感染のままにしておいた。感染の24時間後、48時間後または72時間後に細胞を集め、トリパンブルー染色後に生細胞を数えた。感染ウェルの生細胞数を非感染ウェル中の細胞数で割ることによって細胞生存百分率を決定した。データを平均±平均の標準偏差として表す。+ , Baco-1と比較して $P < 0.05$; * , Synco-2との比較で $P < 0.01$ 。

10

【図18】図18Aおよび図18Bは、同所性前立腺腫瘍に対する膜融合性腫瘍溶解性HSVの治療効果を表す図である。PC-3M-Pro4細胞の同所性接種により、ヒト前立腺癌異種移植片を、原発部位に定着させた。腫瘍細胞接種の8日後および15日後に、腫瘍溶解性HSVを 2×10^7 pfuの用量で、体積を100 μ lとして、尾静脈から静脈内投与した。同所性腫瘍接種の40日後に、まだ生きているマウスを安楽死させ、元の注射部位に腫瘍塊が存在するかどうか、およびリンパ節転移巣が存在するかどうかを調べた。図18Aは、各群から平均的な腫瘍および局所リンパ節転移(PBS処置群のみ)を示すマウスを1匹選択して撮影した写真である。同所性腫瘍を線付きの三角形で示し、リンパ節転移を塗りつぶした三角形で示す。図18Bは、外植して重量測定した同所性腫瘍を表す。グラフは平均重量±標準偏差を表す。

20

【図19】図19A~19Cは、4T1腫瘍に対するSynco-2Dの強化された腫瘍溶解効果が、腫瘍特異的CTL活性の上昇を伴うことを実証している図である。図19Aは、局所腫瘍に対する腫瘍溶解性HSVの抗腫瘍活性を表す。腫瘍体積は式： $(L \times W^2)/2$ [式中、Lは腫瘍の長さ、Wは腫瘍の幅である]によって決定した。図19Bは、肺転移巣に対する腫瘍溶解性HSVの治療効果を示す。この図は各群から選択した代表的マウスにおける肉眼的病理学所見を示している。図19Cには、腫瘍溶解性HSVによる腫瘍破壊後の腫瘍特異的CTL活性を図示する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ZHANG, XIAOLIU
FU, XUPING

<120> POTENT ONCOLYTIC HERPES SIMPLEX VIRUS FOR CANCER
THERAPY

<130> P02410WO

<140> UNKNOWN

<141> 2003-03-26

<150> 60/367,788

<151> 2002-03-27

10

<150> 60/410,024

<151> 2002-09-11

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Primer

20

<400> 1

gtggggttgcg gactttctgc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Primer

<400> 2

acaactcacgc aaggcgggaac

20

30

<210> 3

<211> 139

<212> DNA

<213> Herpes Simplex Virus

<400> 3

gtggggttgcg gactttctgc ggggcccggcc aaatggccct ttaaactgtgt gtatacggac 60
gcgccggggcc agtcggccaa cacaaccac cggagcggta gccgcgtttg gctgtgggggt 120
gggtgggttcc gacttgcgt 139

<210> 4
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> Herpes Simplex Virus

<400> 4
 cttttaagta aacatctggg tgcgccggcc caactggggc cgggggttgg gtctggctca 60
 tctcgagagc cacggggggg aaccaccctc cgcccagaga ctcggggtgat ggtcgtacc 120
 gggactcaac gggttaccgg attacgggga ctgtcgggtca cggccccgcc ggttcttcga 180
 tgtgccacac ccaaggatgc gttggggggc atttcgggca gcagcccggg agagcgcagc 240
 aggggacgct ccgggtcgtg cacggcggtt ctggccgctt cccggctctc acgccccctt 300
 ttattg 306

<210> 5
 <211> 2224
 <212> DNA
 <213> Gibbon leukemia virus

<400> 5
 ttaagcctgg taccgtaaca atccctcacc cgttccaggt cggggatcaa gtgcttgtca 60
 gacgccatcg acccagcagc cttgagcctc ggtggaaagg cccatacctg gtggttctga 120
 ctaccocgac cgcggtaaaa gtcgatggta ttgctgctg ggtccatgct tctcacctca 180
 aacctgcacc accttcggca ccagatgagt cctgggagct ggaaaagact gatcatctc 240
 ttaagctgcg tattcggcgg cggcgggacg agtctgcaaa ataagaacct ccaccagccc 300
 atgacctca cttggcaggc actgtcccaa actggagacg ttgtctggga taaaaaggca 360
 gtccagcccc cttggacttg gtggcccaca cttaaacctg atgtatgtgc cttggcggct 420
 agtcttgagt cctgggatat cccgggaacc gatgtctcgt cctctaaacg agtcagacct 480
 cggactcag actatactgc cgttataaag caaatcacct ggggagccat aggggtgcagc 540
 taccctcggg ctaggactag aatggcaagc tetacctctc acgtatgtcc cgggatggc 600
 cggacccttt cagaagctag aaggtgcggg gggctagaat cctatactg taaagaatgg 660
 gattgtgaga ccacggggac cgtttattgg ctatctaaat cctcaaaaga cctcataact 720
 gtaaaatggg accaaaatag cgaatggact caaaaatttc aacagtggtca ccagaccggc 780
 tgggttaacc cctttaaact agatttcaca gacaaaggaa aattatccaa ggactggata 840
 acgggaaaaa cctgggggatt aagattctat gtgtctggac atccaggcgt acagttcacc 900
 attcgcttaa aaatcaccaa catgccagct gtggcagtag gtccctgacct cgtccttctg 960
 gaacaaggac ctctagAAC gtccctcgtc ctcccacctc ctctccccc aagggaaagcg 1020
 ccaccgccat ctctcccgca ctctaactcc acagccctgg cgactagtgc aaaaactccc 1080
 acggtgagaa aacaattgt tacttaaac actccgcctc ccaccacagg cgacagactt 1140
 tttgatcttg tgcagggggc cttcctaacc ttaaatgcta ccaaccagg ggccactgag 1200
 tottgctggc ttgttttggc catgggcccc ccttattatg aagcaatagc ctcatcagga 1260
 gaggtcgcct actccaccga ccttgaccgg tgcgcctggg ggaccacaagg aaagctcacc 1320
 ctccactgagg tctcaggaca cgggttctgc ataggaaagg tgccctttac ccatoagcat 1380
 ctctgcaatc agaccctatc catcaattcc tccggagacc atcagtatct gctccccctc 1440
 aaccatagct ggtgggcttg cagcactggc ctccaccctt gctctccac ctcagttttt 1500
 aatcagacta gagatttctg tatccaggtc cagctgattc ctogcatcta ttactatcct 1560
 gaagaagttt tgttacaggc ctatgacaat tctcacccca ggactaaaag agaggtctgc 1620
 tcaactacc tagctgtttt actgggggtg ggaatcacgg cgggaatagg tactggttca 1680
 actgccttaa ttaaaggacc tatagacctc cagcaaggcc tgacaagcct ccagatcgcc 1740
 atagatgctg acctccgggc cctccaagac tcagtcagca agtttagagga ctccactgact 1800
 tccctgtccg aggtagtgtc ccaaaatagg agaggccttg acttgctgtt tctaaaagaa 1860
 ggtggcctct gtgcggcctt aaaggaaagag tgctgttttt acatagacca ctcaggtgca 1920
 gtacgggact ccatgaaaaa actcaaagaa aaactggata aaagacagt agagcggccag 1980
 aaaagccaaa actcggtatga aggatggttc aataactccc cttggttcac taccctgcta 2040
 tcaaccatcg ctgggcccc attactctc cttctgttgc tcatcctcgg gccctgcatc 2100
 atcaataagt tagttcaatt catcaatgat aggataagt catgttaagg cgcctagtgt 2160
 tgacaattaa tcatcggcat agtatacggc atagtataat acgactcact ataggagggc 2220
 cacc 2224

10

20

30

40

<210> 6
 <211> 1303
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

```

<400> 6
gtccaggagc aggtagctgc tgggctccgg ggacaatttg cgttcgggct gggagcgtgc 60
tttccacgac ggtgacacgc ttccctggat tggcagccag actgccttcc gggcactgc 120
catggaggag ccgcagtcag atcctagcgt cgagccccct ctgagtcagg aaacattttc 180
agacctatgg aaactacttc ctgaaaacaa cgttctgtcc cccttgccgt cccaagcaat 240
ggatgatttg atgctgtccc cggacgatat tgaacaatgg ttcactgaag acccaggtcc 300
agatgaagct ccagaaatgc cagaggtctgc tccccccgtg gccctgcac cagcgactcc 360
tacaccggcg gccctgcac cagccccctc ctggccccctg tcactctctg tcccttccca 420
gaaaacctac cagggcagct acgggtttccg tctgggcttc ttgcattctg ggacagccaa 480
gtctgtgact tgcacgtact cccctgccct caacaagatg ttttgccaac tggccaagac 540
ctgccctgtg cagctgtggg ttgattccac acccccgccc ggcaccocgg tccggcccat 600
ggccatctac aagcagtcac agcacatgac ggaggtttgtg aggcgctgcc cccaccatga 650
gcgctgtctc acagcagtg gtctggcccc toctcagcat cttatecgag tggaaagaaa 720
tttgctgttg gagtatttgg atgacagaaa cacttttoga catagtgtgg tggtgcccta 780
tgagccgctt gaggttggct ctgactgtac caccatccac tacaactaca tgtgtaacag 840
ttcctgcatg ggcggcatga accggaggcc catcctcacc atcatcacac tggaaagactc 900
cagtggtaat ctactgggag ggaacagctt tgaggctcgt gtttgtgcct gtcctggggag 960
agaccggcgc acagaggaag agaatctccg caagaaaggg gagcctcacc acgagctgcc 1020
cccaggggagc actaagcgag cactgcccaa caacaccagc tctctcccc agccaaagaa 1080
gaaaccactg gatggagaat atttaccctc tcagatccgt gggcgtgagc gcttcgagat 1140
gttccgagag ctgaatgagg ccttggaaact caaggatgcc caggctggga aggagccagg 1200
ggggagcagg gctcactcca gccacctgaa gtccaaaaag ggtcagctta cctcccgcc 1260
taaaaaactc atgttcaaga cagaagggcc tgactcagac tga
  
```

10

20

<210> 7
 <211> 2890
 <212> DNA
 <213> Murine leukemia virus

```

<400> 7
acttgtggtc togctgttcc ttgggagggt ctctctgag tgattgacta ccgtcagcgg 60
gggtctttca tttgggggct cgtccgggat cgggagacc ctgcccaggg accaccgacc 120
caccaccggg agctcactta caggcccttc aagcagtaca acgagaggtc tggaaagccac 180
tggctgcccc ctatcaggac cagcaagacc agccagtgat accacacccc ttccgtgtcg 240
gcgacaccgt gtgggtaooc cggcaccaga ctaagaactt ggaacctcgt tggaaaggac 300
cctataccgt cctgctgacc acccccaccg ctctcaaaagt agacggcatc gctgctgtga 360
tccacgcgcg tcacgtaaaag gcggcgacaa cccctccggc cggaaacagca tcaggaccga 420
catggaaggt ccagcgttct caaaaaccct taaagataag attaacccgt ggggccccct 480
gatagtcctg gggatcttaa taagggcagg agtatcagta caacatgaca gccctcacca 540
ggctcttcaat gttacttggg gagttaccaa cttaatgaca ggacaaacag ctaacgcctac 600
ctccctcctg gggacaatga cagatgcctt tccctatgctg tacttcgact tgtgcgattt 660
aataggggac gattgggatg agactggact tgggtgtcgc actcccgggg gaagaaaaag 720
ggcaagaaca tttgacttct atgtttgcc cgggcataact gtaccaacag ggtgtggagg 780
cccgagagag ggctactgtg gcaaatgggg ctgtgagacc actggacagg catactggaa 840
gccatcatca tcatgggacc taatttccct taagcgagga aacaccctc ggaatcaggg 900
cccctgttat gattcctcag tggctccag tggcatccag ggtgccacac cgggggggtcg 960
atgcaatccc ctagtccctag aattcactga cgcgggtaaa aaggccagct gggatggccc 1020
aaaagtatgg ggactaagac tgtaccaatc cacagggatc gaccgggtga cccggttctc 1080
tttgaccgcg caggtcctca atatagggcc ccgcatccc attgggccta atcccgtgat 1140
cactggccaa ctacccccct cccgacccgt gcagatcagg ctcccaggc ctccctcagac 1200
tctcctaca ggcgcagcct ctatggctcc tgggactgcc ccaccgtctc aacaacctgg 1260
  
```

30

40


```

gacgggagac aggctgctaa acctggtaga tggagcatac caagcactca acctcaccag 1320
tcctgacaaa acccaagagt gctggttgtg tctggtatcg ggacccccct actacgaagg 1380
ggttgcccgtc ctaggtactt actccaacca tacctctgcc ccagctaact gctccgcggc 1440
ctcccaaacac aaactgaccc tgtccgaagt aaccggacag ggactctgcy taggagcagt 1500
tctggctgct cccgcccggga ccatttgggc ttgcaacacc gggctcactc cctgcctatc 1560
tactactgta ctcaatctaa ccacagatta ttgtgtatta gtggaactct ggcccagagt 1620
aatattaccac tcccccgatt atattgtatgg tcagcttgaa cagcgtacca aatataaaag 1740
agagccagta tcattgaccc tggcccttct actaggagga ttaacctggg gagggattgc 1800
agctggaata gggacgggga ccactgcctt aattaaaacc cagcagtttg agcagcttca 1860
tgccgctatc cagacagacc tcaacgaagt cgaaaagtca attaccaacc tagaaaagtc 1920
actgacctcg ttgtctgaag tagtcttaca gaaccgcaga ggcttagatt tcttattcct 1980
aaaggaggga ggtctctgcy cagccctaaa agaagaatgt tgtttttatg cagaccacac 2040
ggggctagtg agagacagca tggccaaatt aagagaaagg cttaatcaga gacaaaaact 2100
atattgagaca ggccaaggat ggttcgaagg gctgtttaat agatccccct ggtttaccac 2160
cttaatctcc accatcatgg gacctctaat agtactctta ctgatcttac tctttggacc 2220
ttgcattctc aatcgattag tccaatttgt taaagacagc atatcagtg tccaggctct 2280
agttttgact caacaatatt accagctgaa gcctatagag tacgagccat agataaaaata 2340
aaagatttta tttagtctcc agaaaaagg gggaatgaaa gaccccacct gtaggtttgg 2400
caagctagct taacgccatt ttgcaaggca tggaaaaata cataactgag aatagagaag 2460
ttcagatcaa ggtcaggaac agatggaaca gctgaatatg ggccaaacag gatattctgt 2520
gtaagcagtt cctgcccccg ctcagggcca agaacagatg gaacagctga atatgggcca 2580
aacaggatat ctgtggtaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggtecc 2640
cagatgcggt ccagccctca gcagtttcta gagaacctc agatgtttcc aggggtcccc 2700
aaggacctga aatgacctcg tgccttattt gaactaacca atcagttcgc ttctcgcttc 2760
tgttcgcygc cttctgctcc ccgagctcaa taaaagagcc cacaaccctc cactcggggc 2820
gccagtectc cgattgactg agtcgcccgg gtaccctgt atccaataaa cctctctgca 2880
gttgcatccg                                     2890

```

10

```

<210> 8
<211> 2384
<212> DNA
<213> Measles virus

```

20

```

<400> 8
tcgagggcca aggaacatac acacccaaca gaaccagac cccggcccaac ggcgcccgcg 60
ccccaaacccc cgacaaccag agggagcccc caaccaatcc gccggctccc ccggtgcccc 120
caggcagggga caccaacccc cgaacagacc cagcacccaa ccatcgacaa tccaagacgg 180
ggggggccccc ccaaaaaaaaa ggcccccagg ggccgacagc cagcaccgcy aggaagccca 240
cccaccccac acacgaccac ggcaacccaa ccagaaccca gaccacctg ggtcaccagc 300
tccagacctc ggtcatcacc ccgcagaaaag gaaaaggcaca accgcgcgac ccagccccga 360
tccggcgggg agccaccocaa cccgaaccag cacccaagag cgatccccga aggacccccg 420
aacccgaaaag gacatcagta tcccacagcc tctccaagtc ccccggcttc ctctcttct 480
cgaaggggacc aaaagatcaa tccaccacca cacaccgac gacactcaac tccccacccc 540
taaaggagac accgggaatc ccagaatcaa gactcatcca atgtccatca tgggtctcaa 600
ggtgaaagtc tctgccatat tcatggcagt actgttaact ctccaaacac ccaccgggtca 660
aatccattgg ggcaatctct ctaagatagg ggtggtagga ataggaagtg caagctacaa 720
agttatgact cgttccagcc atcaatcatt agtcataaaa ttaatgccc atataactct 780
cctcaataac tgcaagaggg tagagattgc agaatacagg agactactga gaacagtttt 840
ggaaccaatt agagatgcac ttaatgcaat gaccagaat ataagaccg ttcagagtgt 900
agcttcaagt aggagacaca agagatttgc gggagtagtc ctggcaggtg cggccctagg 960
cgttgcccaca gctgctcaga taacagccgg cattgcactt caccagtcga tctggaactc 1020
tcaagccatc gacaatctga gagcagacct ggaaactact aatcaggcaa ttgaggcaat 1080
cagacaagca gggcaggaga tgatattggc tgttcagggt gtccaagact acatcaataa 1140
tgagctgata ccgtctatga accaactatc ttgtgattta atcggccaga agctcgggct 1200
caaattgctc agatactata cagaaatcct gtcattattt ggccccagct tacgggacct 1260
catatctgcy gagatatcta tccaggcttt gagctatgcy cttggaggag acatcaataa 1320
ggtgttagaa aagctcgat acagtggagg tgatttactg ggcactctag agagcagagg 1380

```

30

40

```

aataaaggcc cggataaact acgtcgacac agagtcctac ttcattgtcc tcagtatagc 1440
ctatccgacg ctgtccgaga ttaagggggt gattgtccac cggctagagg gggctctgta 1500
caacataggg tctcaagagt ggtataccac tgtgccaag tatgttgcaa cccaagggtgta 1560
ccttatctcg aatthttgatg agtcatcgtg tactttcatg ccagagggga ctgtgtgcag 1620
ccaaaatgcc ttgtaccoga ttagtccctc gctccaagaa tgcctccggg ggtccacca 1680
gtcctgtgct cgtacactcg tatccgggtc ttttgggaac cggttcattt tatcacaagg 1740
gaacctaaata gccaatgtg catcaatcct ttgcaagtgt tacacaacag gaacgatcat 1800
taatcaagac cctgacaaga tctaacata cattgctgcc gatcactgcc cggtagtoga 1860
gggtgaacggc gtgaccatcc aagtccggag caggagggtat ccagacgctg tgtacttoga 1920
cagaattgac ctcggctcct ccataatcatt ggagaggttg gacgtaggga caaatctggg 1980
gaatgcaatt gctaagttgg aggatgccaa ggaattgttg gagtcatcgg accagatatt 2040
gaggagtatg aaaggtttat ctagcactag catagtctac atcctgattg cagtgtgtct 2100
tggagggttg atagggatcc ccgctttaat atgttgctgc agggggcgtt gtaacaaaa 2160
gggagaacaa gttggatgt caagaccagg cctaaagcct gatcttacgg gaacatcaaa 2220
atcctatgta agtccgctct gatcctctac aactcttgaa acacaaatgt tcccacaagt 2280
ctcctctcg tcatcaagca accaccgcac ccagcatcaa gccacctga accagctaaa 2340
ttatctccgg ctccctctg gccgaacaat atcggtagtt aatt 2384

```

10

```

<210> 9
<211> 2535
<212> DNA
<213> Human immunodeficiency virus

```

```

<400> 9
atgagagtga tggggataca gaggaattgg ccacaatggt ggatatgggg caccttaggc 60
ttttggatga taataattht taggggtggt gggaaactga acttgtgggt cacagtctat 120
tatggggtag ctgtgtggaa agaagcaaaa actactctat tctgtgcatc agatgctaaa 180
gcataatgata aagaagtaca taatgtctgg gctacacatg cctgtgtacc cacagacccc 240
aaccacagag aaatagthtt ggaaaatgta acagaaaatt ttaacatgtg gaaaaatgac 300
atgggtggatc agatgcatga ggatataatc agthttatggg atcaaaagcct aaaaccatgt 360
gtaaagttga cccactctg tgtcacttta aattgtacaa atgcacctgc ctacaataat 420
agcatgcatg gagaaatgaa aaattgctct tcaatacaaa ccacagagat aagagatagg 480
aaacagaaaag cgtatgcact tttttataaaa cctgatgtag tgccacttaa taggagagaa 540
gagaataatg ggacaggaga gtatatatta ataaattgca attcctcaac cataacacaa 600
gctgtgctaa aggtcacttt tgacccaatt cctatacatt attgtgtccc agctggttat 660
gcgattctaa agtghtaata taagacattc aatgggacag gaccatgcaa taatgtcagc 720
acagtacaat gtacacatgg aattatgcca gtggtatcaa ctcaattact gttaaatggt 780
agcctagcag aagaagagat aataattaga tctgaaaatc tgacaacaaa tatcaaaaaca 840
ataatagtcc accttaataa atctgtagaa atgtgtgta caagacccaa caataataga 900
agaaaaagta taaggatagg accaggacaa acattctatg caacaggtga aataatagga 960
aacataagag aagcacattg taacattagt aaaaagtaact ggaccagtac thtagaacag 1020
gtaaaagaaa aattaaaaga aactacaat aagacaatag aatttaacct accctcagga 1080
ggggatctag aagttacaac acatagcttt aattgtagag gagaatthtt ctattgcaat 1140
acaacaaaac tgtthttcaa caacagtgat tcaaacacag aaacctcac actcccatgc 1200
aagataaaaac aaatlataaa catgtggcag aaggtaggac gagcaatgta tgccctccc 1260
attgaaggaa acataacatg taaatcaaat atcacaggac tactattgac acgtgatgga 1320
ggaaagaata caacaaatga gatattcaga cggggaggag gaaatatgaa ggacaattgg 1380
agaagtgaat tatataaata taaagtggta gaaattgagc cattgggagt agcaccact 1440
aaatcaaaaa ggagagtggg ggagagagaa aaaagagcag tgggactagg agctgtactc 1500
cttgggttct tgggagcagc aggaagcact atgggcgagg cgtcaataac gctgacggta 1560
caggccagac aactgthtgc tggatagtg caacagcaaa gcaatthtgc gagagctata 1620
gaggcgcaac agcatatgth gcaactcacg gtctggggca ttaagcagct ccagacaaga 1680
gtcttggtc taagagagata cctaaaggat caacagctcc tagggctthg gggctgctct 1740
ggaaaaatca tctgcaaccat tgctgtgcct tggaaactcca gttggagtaa taaatctcaa 1800
gaagatattt gggataacat gacctggatg cagtgggata gagaaatag taattacaca 1860
ggcacaatat ataggttact tgaagactcg caaaaccagc aggagaaaaa tgaaaaagat 1920
ttattagcat tggacagthg gaaaaacttg tggaaatggt ttaacataac aaattggctg 1980
tggatataaa aaatattcat catgatagta ggaggcttga taggthtgag aataatthtt 2040

```

20

30

40

```

gggtgactcg ctatagtgaa aagagttagg cagggatact cacctttgtc gtttcagacc 2100
cttaccocaa gcccgagggg tcccgacagg ctccgaagaa tcgaagaaga aggtggagag 2160
caagacaaag acagatccat tcgattagtg agcggattct tagcacttgc ctgggacgat 2220
ctgcccagcc tgtgcctctt cagctaccac cacttgagag acttcatatt gattgcagcg 2280
agagcagcgg aacttctggg acgcagcagt ctcaggggac tgcagagagg gtgggaagcc 2340
cttaagtatc tgggaaatct tgtgcagtat gggggtctgg agctaaaaag aagtgtctatt 2400
aaactgtttg ataccatagc aatagcagta gctgaaggaa cagataggat tcttgaagta 2460
atacagagaa tttgtagagc tatccgccac atacctataa gaataagaca gggctttgaa 2520
gcagctttgc aataa 2535

```

```

<210> 10
<211> 2577
<212> DNA
<213> Simian immunodeficiency virus

```

10

```

<220>
<221> modified_base
<222> (295)..(2532)
<223> N = a, c, g or t/u

```

```

<400> 10
atgaggaagc cgatacatat tatttgggggt ctggctttgc taatccagtt tatagagaag 60
gggacgaatg aagactatgt aacagtattc tatggagtcc ctgtctggag aaatgcgaca 120
cctactctat tttgtgccac aaatgcctcc atgacaagta cagaggtgca caatgtatgg 180
gcaactacca gttgtgtgccc aatagatcca gatcctattg tagttaggct caatacctca 240
gtctggttta atgcttataa aaattatatt gtagaaagta tgacagaaga tatgntacaa 300
ttattccaac aaagccataa gccatgtgta aaactaacac ctatgtgtat aaaaatgaat 360
tgtacaggat acaatggaac acctacaaca ccaagtacaa caacaagtac agtaaaccca 420
aagacaacaa caccaatagt agatggcatg aagctacaag aatgtaactt taatcagagc 480
acaggattta aagataagaa acaaaaaatg aaagccatat ttataaaagg agatcttatg 540
aagtgtcagg acaacaatga gactaactgc tattacttat ggcactgcaa caccacaact 600
atcacacaat cctgtgaaaa gtctactttt gaaccaattc ctatacatta ttgtgtccca 660
gcaggatatt ctatattgag atgtgaagat gaggatttta caggagtagg gatgtgtaaa 720
aatgtctcag tagtacattg cactcatgga ataagcccaa tgggtggcaac atggttacta 780
ttaaatggaa cttaccaaac aaacacttca gtagtaatga atggtcgcaa aaatgaatct 840
gtgcttgtaa gatttggaaa agaattcgaa aacttaacaa ttacatgtat aagaccagga 900
aataggacag taagaaatct acaaatagga ccaggaatga ctttctataa cgtagaata 960
gcaacaggag acactaggaa agcgttctgt acagtcaata agacgctatg ggaacaagca 1020
cgtaacaaaa cagagcacgt tcttgcggag cattggaaaa aagtagacaa caaaaccaat 1080
gcgaaaacaa tatggacatt ccaagatgga gatcctgaag taaaagtgca ttggtttaat 1140
tgccaaggag aattctttta ttgtgatata acaccttggg tcaatgccac atacacggga 1200
aacctcatca caaacggagc cctcatagca cattgcagaa ttaagcagat agttaatcat 1260
tggggcatag tttcaaaagg cattedactta gcccttagga gagggaaatgt ttctgttact 1320
tccagcataa ctgggaattat gttggaaggt caaatatata atgaaaactgt taaagtgtca 1380
cctgctgcaa gagtgcagaa ccaatggaga gccggagtgt ccaggtagca ggtggtagag 1440
attgntccct tgtcagtagc cccaacaaca ggnaaaaggc cagaaataaa acaacactcc 1500
agacaaaaaa gaggcattgg aatagggctg ttcttctctg gtcttctcag tgcagctggc 1560
agtacaatgg gcgcagcgtc aatagcgtg acggcacaga ccaggaattt gntccatggt 1620
attgtacaac agcaggccaa tctgctgcaa gccatagaga cacagcaaca tctgctacag 1680
ctctcgggtct ggggagtaaa acaactccag gcaagaatgc ttgcagtcga gaagtacct 1740
agagatcaac aactattgag cctctggggg tgtgctgaca aggtgaactg tcacactacg 1800
gtgccttgga ataattcctg ggtaaaacttc acgcaaacat gtgcaaaaga cagcagtgat 1860
atacaatgta tttgggaaaa tatgacatgg caagaatggg acagattagt acagaattca 1920
acaggacaga tatataatat cttacaaata gcacatgagc aacaagagag aaataaaaag 1980
gaatttatatg aactagacaa atggagctca ttatggaatt ggtttgacat aacacaatgg 2040
ctatggtata taaaaatatt tattatgata gtaggagcta ttgtaggact aagaattttg 2100
cttgtattag ttagttycct aagaagggtt aggcagggat atcatcctct gtcatttcag 2160
atccctaccc aaaaccagca ggatccagag cagccagaag aaataagaga agaagggtgga 2220

```

20

30

40

```

agaaaagaca ggatcagggtg gagggccttg cagcaccgggt tcttcgcact cttgtgggtg 2280
gacctgacga gcataatcca gtggatctac cagatctgca gaacctgtct cttgaacctt 2340
tgggcagtc tccaacacct ctgcagaatt actttcagac tgtgcaacca tctggagaac 2400
aatctcagca cctctcggac aataatcaga actgagatca ttaagaacat tgacagactt 2460
gctatcttgg taggggaaaa aacagatagc attcctctag ctctccaaac tattgtcaga 2520
atcataaggg angtccctag gcgcacaga cargggttgg aaattgcatt waattaa 2577

```

```

<210> 11
<211> 262
<212> DNA
<213> Human immunodeficiency virus

```

```

<400> 11
ggatcaaagt ctaaagccat gtgtaaaatt aaccccactc tgtgttactt taagttgcga 60
taatgtgaat attactactg ccaatactac caataccact agtaggcatg ggaaactgat 120
ggagccagga gaaataaaaa actgctcttt caatatcacc acagacttga gagataagat 180
gaagaaagaa tatgcacttt tttataacct tgatgtagta caaataaatg atgataatac 240
tacctatagg ttgataagtt gt 262

```

10

```

<210> 12
<211> 2360
<212> DNA
<213> Ebola virus

```

```

<400> 12
atacgatgaa gattaaggcg acaacgagcc gaaacttcat ctctttttaa gatctaacad 60
tatctgttcc aaagtcatac aaggacacat tcaaatcagg gattgtaagc tgctatctct 120
tacctcccca aattacctat acaacatggg gtcaggatat caacttctcc aattgcctcg 180
ggaacgtttt cgtaaaaact cgttcttagt atgggtaatc atcctcttcc agcgagcaat 240
ctccatgccg cttgggtatag tgacaaaatag cactctcaaa gcaacagaaa ttgatcaatt 300
ggtttgcctg gacaaaactgt catcaaccag tcagctcaag tctgtggggc tgaatctgga 360
aggaatggga attgcaaccg atgtcccatc agcaacaaaa cgtgggggat ttcgttcagg 420
tgtgcctccc aagggtggtc gctatgaagc cgggagaatg gcagaaaaat gctacaatct 480
ggagatcaaa aagtcagacg gaagtgaatg cctccctctc cctcccagc gtgtacgagg 540
attccctaga tgtcgtatg tccacaaagt tcaaggaaac ggtccttgtc ccggtgactt 600
agctttccat aaaaatgggg ctttttcttt gtatgataga ttggcctcaa ctgtcatcta 660
ccgaggggaca acttttgcct aagggtgctg agotttttta attctgtcag agcccaagaa 720
gcatttttgg aaggctacac cagctcatga accgggtgaa acaacagatg attccacaag 780
ctactacatg acctgacac tcagctacga gatgtcaaat tttgggggca atgaaagtaa 840
cacccttttt aaggtagaca accacacata tgtgcaacta gatcgtccac acaactccga 900
gttccttgtt cagctcaatg aaacacttct aagaaataat cgccttagca acagtacagg 960
gagattgact tggacattgg atcctaaaat tgaaccagat gttgggtgag gggccttctg 1020
ggaaactaaa aaaacttttc ccaacaactt catggagaaa acttgcatth ccaaatctta 1080
tcaaccacac ccaacaactc ctcagatcag agcccggcgg gaactgtcca aggaaaaatt 1140
agctaccacc caccggccaa caactccgag ctggttccaa cggattcccc tccagtggtt 1200
tcagtgctca ctgcaggacg gacagaggaa atgtcgacc aaggtctaac caacggagag 1260
acaatcacag gtttcaccgc gaacccaatg acaaccacca ttgccccaa tccaacctatg 1320
acaagcgagg ttgataacaa tgtaccaagt gaacaaccga acaacacagc atccattgaa 1380
gactcccccc catcggcaag caacgagaca atttaccact ccgagatgga tccgatccaa 1440
ggctcgaaca actcggccca gagcccacag accaagacca cgcagcacc cacaacatcc 1500
ccgatgaccc aggaccgca agagacggcc aacagcagca aaccaggaac cagcccagga 1560
agcgcagccg gaccaagtca gccccgactc actataaata cagtaagtaa ggtagctgat 1620
tcaactgagtc ccaccaggaa acaaaagcga tcggttcgac aaaacaccgc taataaatgt 1680
aaccagatc tttactattg gacagctgtr gatgaggggg cagcagtagg attggcatgg 1740
attccatatt tcggacctgc agcagaaggc atctacattg aggggtgtaat gcataatcag 1800
aatgggctta tttgcgggct acgtcagcta gccaatgaaa ctaccaggc tcttcaatta 1860
tttctgcccc ccacaacaga actgaggact tactcacttc ttaacagaaa agctattgat 1920

```

20

30

40

```

ttttttttt aacgatgggg aggtacctgt cgaatcctag gaccatcttg ttgcattgag 1980
ccacatgatt ggacaaaaaa tattactgat gaaattaacc aaattaaaca tgactttatt 2040
gacaatcccc taccagacca cggagatgat cttaatctat ggacagggtg gagacaatgg 2100
atcccggtcg gaattgggat tattggagtt ataattgcta taatagccct actttgtata 2160
tgtaagabtt tgtgttgatt tattctgaga tctgagagag aaaaatctca gggttactct 2220
aaggagaaat attatbttta aaatttactt gaatgctgac cacttatctt aaatgagcaa 2280
ttaataatat gttttctgc ttctttgctt gatttacaat atgatatttc tcttaataat 2340
gattaatata ttaagaaaa 2360

```

```

<210> 13
<211> 1733
<212> DNA
<213> Influenza virus

```

10

```

<400> 13
agcaaaagca ggggataatc aatcaatcg agatggaagc aaaactatth gtactattct 60
gtacattcac tgtactgaaa gotgacacca tctgtgtggg ctaccatgca aacaactcta 120
cagacactgt tgacacagta ctggaaaaga atgtgaccgt gactcactca gtgaatttgc 180
tcgaagacag ccataatggg aaactctgca gctgaacgg gatagctccc ctacaactgg 240
gaaagtgcaa tgtggcggga tggctctgg gcaatccaga gtgtgatctt ctactcactg 300
caaaactcatg gtcctacata atagaaactt caaaactcaga aaacggaaca tgctaccccg 360
gtgaattcat agattatgaa gaattaagag agcagctaag tccaatttct tcatttgaaa 420
aatttgaaat tttcccgaag gcaagctcat ggccaaatca tgagacaact aaagggtgta 480
cagctgcatg ctcttactct ggagccagca gttttaccg gaatttgctg tggataacaa 540
agaaagggac ttcatatcca aaactcagca aatcatacac gaacaataag gggaaagaa 600
tgcttgtgct ctgggggggtg caccaccctc caagtgtcag tgagcaacaa agtctatacc 660
agaatgctga tgcatacgtt tcagttggat cgtcaaaata caaccgaaga ttcgctccgg 720
aaatagcagc tagacctgaa gttagaggac aggcaggcag aatgaactat tattggacac 780
tattagacca aggagacact ataacatttg aagccactgg gaatttgata gcaccatggt 840
atgctttcgc attgaaatag ggtctgact ctggaattat aacatcagat gctccagttc 900
acaattgtga cacaaggtgc caaacccctc atggggcttt gaacagcagc ctccctttc 960
agaatgtaca tctatcact attgggaat gtcccaataa cgtcaagagc accaaactaa 1020
gaatggcaac aggactaaga aatgtcccat ccattcagtc cagaggacta tttggagcaa 1080
ttgctggatt cattgaggga ggatggacag gcatgataga tggatggtac gggtatcacc 1140
atcagaatga gcaaggatca gbatatgctg ctgatcagaa aagcacacag aatgcatcag 1200
acgggatcac aagtaaggtg aattcggtaa ttgaaaagat gaacactcaa ttcactgcag 1260
tgggcaaaaga attcaataat ttgaaagga gaattgaaaa tttgaataaa aaggctgatg 1320
atggattcct ggatgttttg acatacaatg ccgaactgct cgtcctactt gaaaatgaaa 1380
gaactctaga ctttcatgac tccaatgtga gaaatttata tgagaaggtc aaatcgcaat 1440
tgaggaataa tgccaaagaa attgggaatg gttgttttga gttctaccac aagtgtgatg 1500
atgagtgcac ggaaaagtgt aagaacggca catacgacta ccccaagtat tcagaagagt 1560
ccaaattgaa tcgagaagaa atagacgggg tgaaactaga atcaatggga gtttatcaaa 1620
ttttggcgat ctattccaca gtcgcccagtt ctctagtctt gttagtctcc tggggggcaa 1680
tcagctctcg gatgtgctct aatgggtcat tgcaatgcag aatatgcatt taa 1733

```

20

30

```

<210> 14
<211> 100
<212> DNA
<213> Human Simian Virus

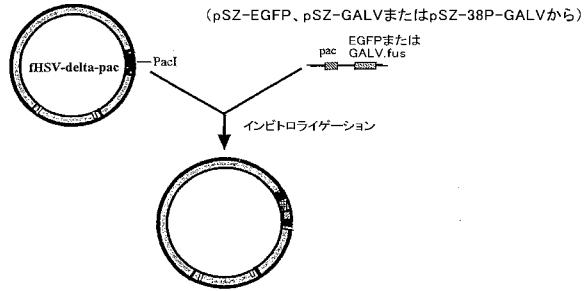
```

```

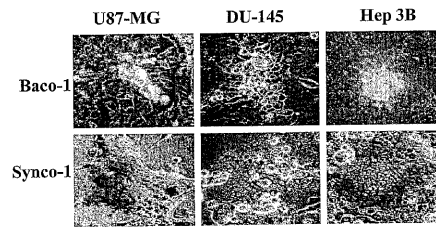
<400> 14
ccgcgcccc gcccccacg cccgcccgcg gcgcgcaagc cgcccggacc gccgcccgc 60
ttttttgcgc gccgcccgc cccggggggg cccgggtgc 100

```

【 図 1 】



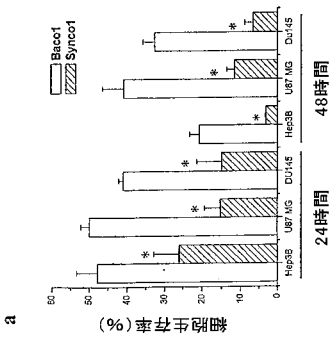
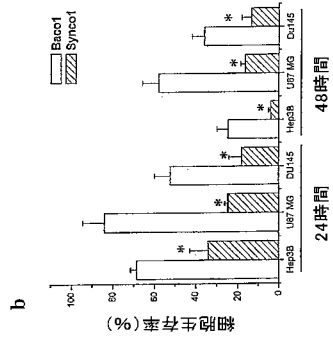
【 図 2 】



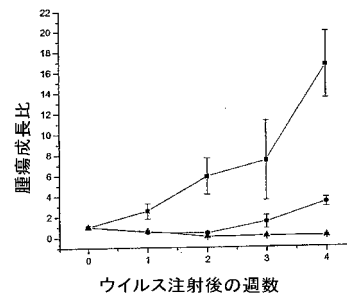
Baco-1, Synco-1またはSynco-2を複製するためにVero細胞にトランスフェクト

FIG. 2

【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

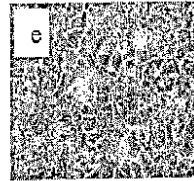
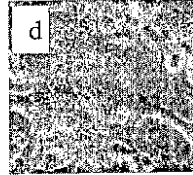
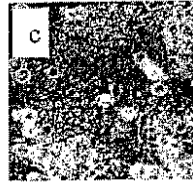
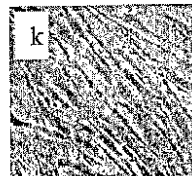
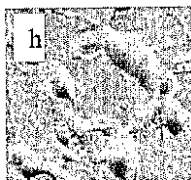
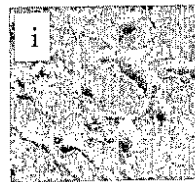
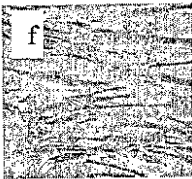
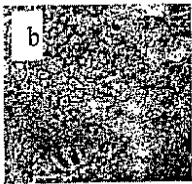
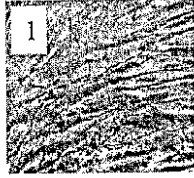


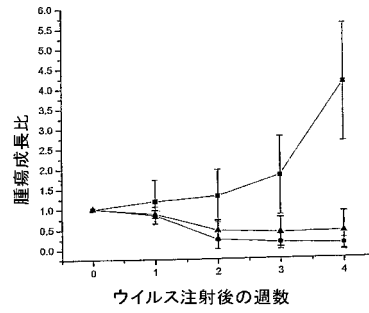
FIG. 5



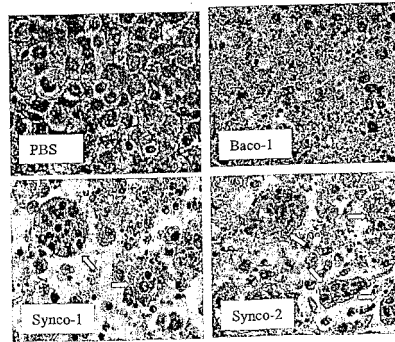


【 図 6 】

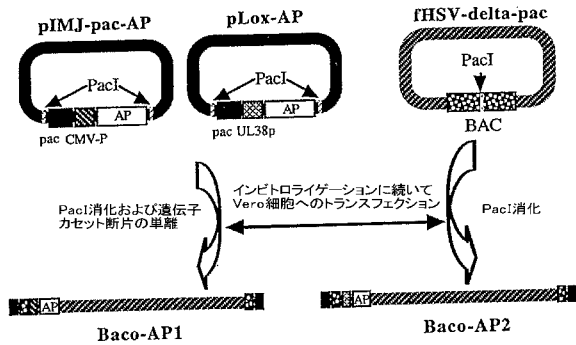
A



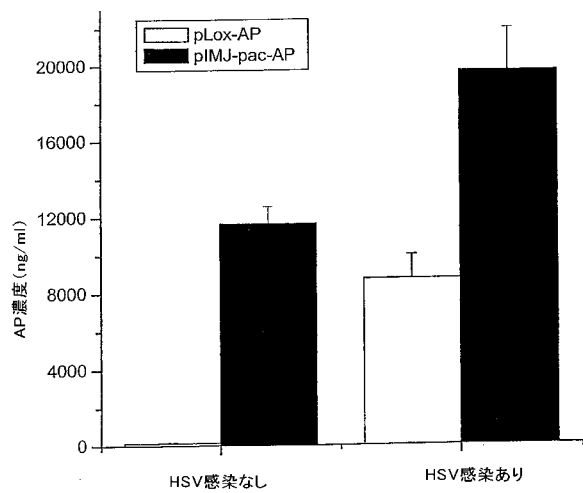
B



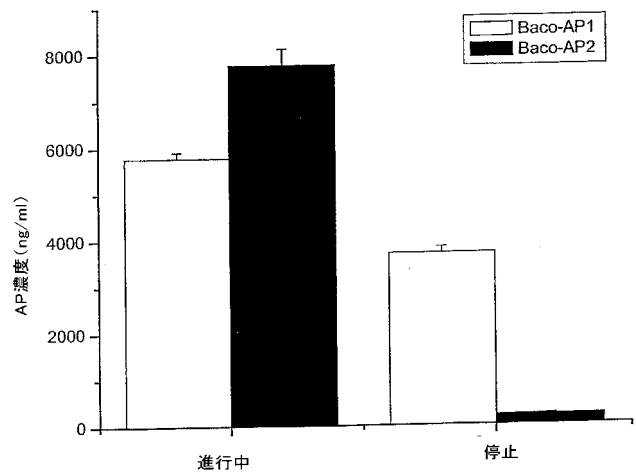
【 図 7 】



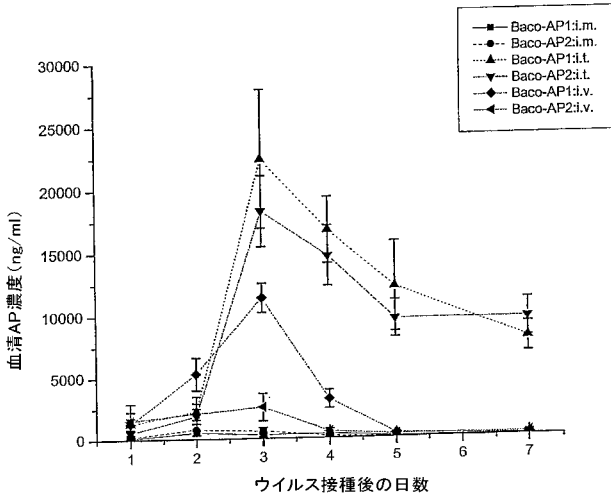
【 図 8 】



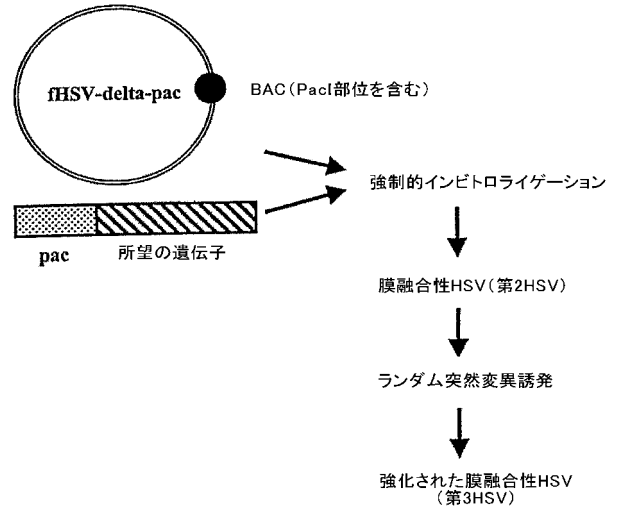
【 図 9 】



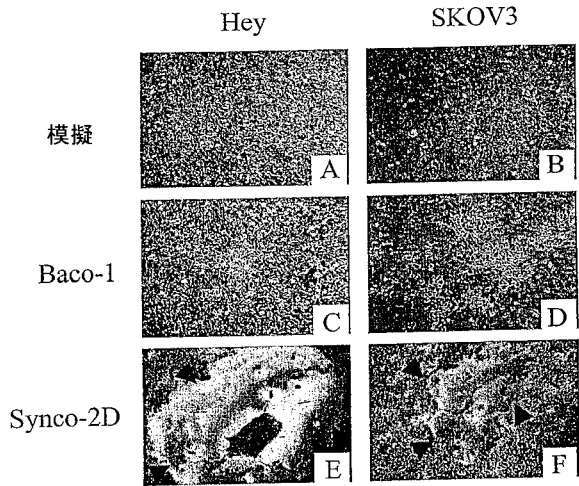
【 図 1 0 】



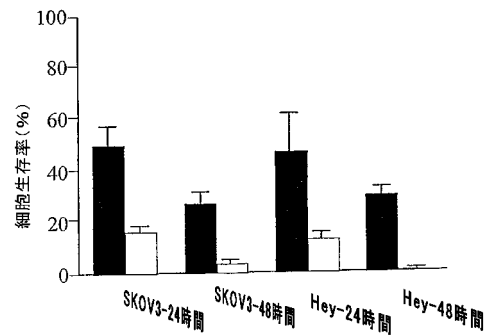
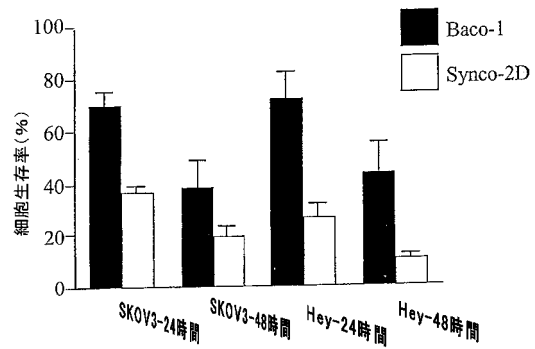
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



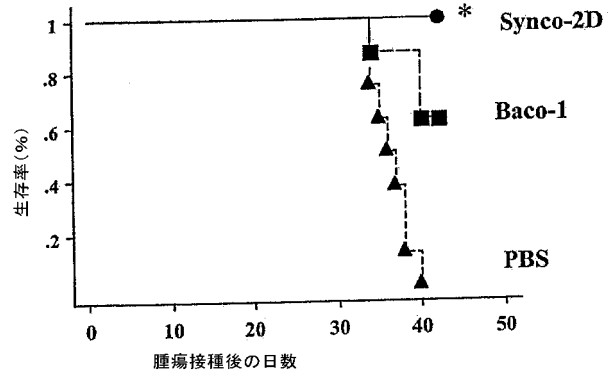
【 図 1 4 】



FIG. 14



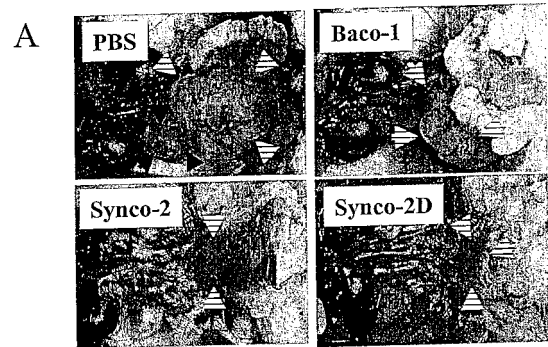
【 図 1 5 】



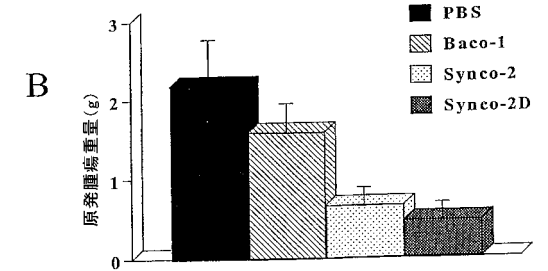
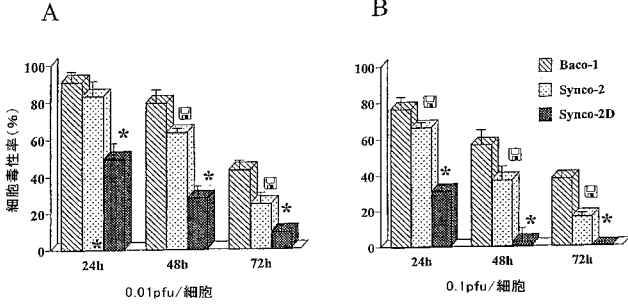
【 図 1 6 】



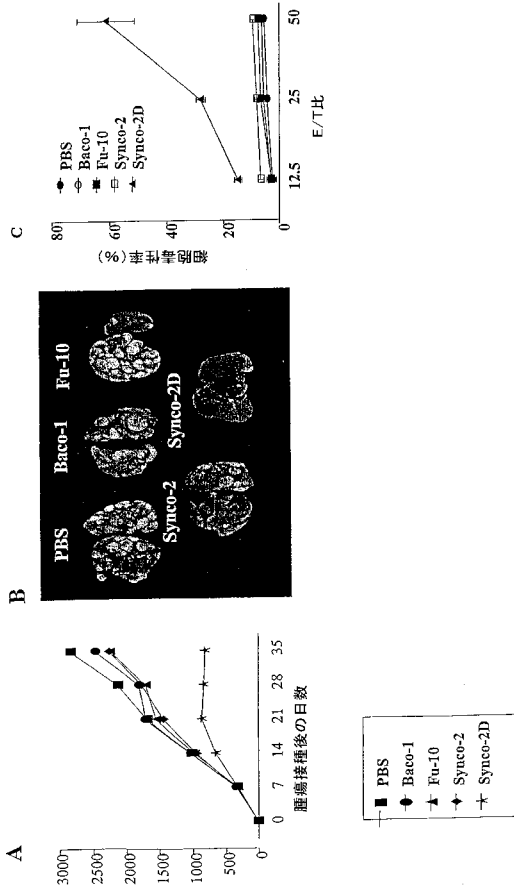
【 図 1 8 】



【 図 1 7 】



【 図 19 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/09287												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER														
IPC(7) : A61F 2/00, 13/00 US CL : 424/93.2, 93.21; 435/46.3														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED														
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.2, 93.21; 435/46.3; 514/44														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS, SCISEARCH, WPIDS														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	LI, H. et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1-Mediated Syncytium Formation Is Compatible with Adenovirus Replication and Facilitates Efficient Dispersion of Viral Gene Products and De Novo-Synthesized Virus Particles. Hum. Gene Ther. 10 December 2001, Vol. 12, No. 18, pages 2155-2165, especially page 2155.	36												
X	US 6,264,940 B1 (GROMEIER et al) 24 July 2001 (24.07.2001), column 15, line 16-column 17, line 64.	36												
X	DESMARIS, N. et al. Production and Neurotropism of Lentiviral Vectors Pseudotyped with Lyssavirus Envelope Glycoproteins. Mol. Ther. August 2001, Vol. 4, No. 2, pages 149-156, especially pages 154-156.	1, 5-8, 13-16, 22-24, 29, 36, 40-41, 43, 50-51												
---		-----												
Y		2-4, 11-12, 25-26, 38, 45, 47-49, 52-55												
X	YEUNG, S.N., et al. Replicating Herpes Simplex Virus Vectors for Cancer Gene Therapy. Exp. Opin. Pharmacol. May 2000, Vol. 1, No. 4, pages 623-631, especially pages 624-628.	36												
---		-----												
Y		2-4, 11-12, 25-26, 38, 45, 47-49, 52-55												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td colspan="2">* Special categories of cited documents:</td> <td>* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family	
* Special categories of cited documents:		* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention												
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone												
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art												
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family													
Date of the actual completion of the international search 27 July 2004 (27.07.2004)		Date of mailing of the international search report 19 AUG 2004												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Amy Nelson Telephone No. 571-272-1600												

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 チャン、シャオリウ

アメリカ合衆国 77025 テキサス州、ヒューストン、サウス ペムバートン サークル ド
ライブ 3231 ドライブ、9343

(72)発明者 フ、シンピン

アメリカ合衆国 77036 テキサス州、ヒューストン、ナンバー 192、ランチェスター
ドライブ 6300

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA32 BA80 CA02 CA06 DA02 DA03 EA02 EA04 FA02
GA11 HA17
4B065 AA90X AA93X AA95X AA95Y AB01 AC20 BD50 CA44
4C084 AA13 NA14 ZB262
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 NA14 ZB35