

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4796299号  
(P4796299)

(45) 発行日 平成23年10月19日(2011.10.19)

(24) 登録日 平成23年8月5日(2011.8.5)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/04
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 13 (全 86 頁)

(21) 出願番号	特願2004-528045 (P2004-528045)	(73) 特許権者	507160001
(86) (22) 出願日	平成15年8月11日 (2003.8.11)		ジェンネレックス インコーポレイティッド
(65) 公表番号	特表2006-506974 (P2006-506974A)		ド
(43) 公表日	平成18年3月2日 (2006.3.2)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/025141		フランシスコ ワン マーケット ストリ
(87) 国際公開番号	W02004/014314		ート スピア タワー スイート 226
(87) 国際公開日	平成16年2月19日 (2004.2.19)		0
審査請求日	平成18年6月26日 (2006.6.26)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/402,857		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成14年8月12日 (2002.8.12)	(74) 代理人	100128048
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新見 浩一
		(72) 発明者	キルン デイビッド
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ミル
			バレー ラ ベルヌ アベニュー 44
			4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ボックスウイルスおよび癌に関する方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A34Rポリペプチドをコードする遺伝子における変異を含むワクシニアウイルスを含む、癌を治療するために用いる薬学的組成物であって、該変異が、A34Rポリペプチドのアミノ酸位置K151の変異を引き起こし、かつ、ワクシニアウイルスの感染性EEV型の産生の増加を引き起こす、薬学的組成物。

【請求項 2】

癌が微小残留癌である、請求項 1 記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

変異がA34RポリペプチドにおけるK151Eアミノ酸置換を引き起こす、請求項 1 記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

ワクシニアウイルスが、コペンハーゲン株またはウェスタンリザーブ株である、請求項 1 または 3 記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

ワクシニアウイルスが弱毒化されている、請求項 1 記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

ワクシニアウイルスが、B8R遺伝子またはB18R遺伝子における機能を消失させる変異を含む、請求項 5 記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

10

20

ウイルスが、腫瘍内注射または静脈内注射のために製剤化される、請求項 1 記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

ウイルスが、固形腫瘍への注射のために製剤化される、請求項 7 記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

癌が、膀胱癌、血液癌、骨癌、骨髄癌、脳癌、乳癌、結腸直腸癌、食道癌、消化管癌、頭部癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、鼻咽頭癌、頸部癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、皮膚癌、胃癌、精巣癌、舌癌、または子宮癌である、請求項 5 記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

弱毒化ワクシニアウイルスが、異種治療ポリペプチドをコードする核酸配列をさらに含む、請求項 9 記載の薬学的組成物。

10

【請求項 11】

異種治療ポリペプチドが、腫瘍抑制剤、免疫調節剤、血管新生阻害剤、抗血管ポリペプチド、細胞障害性ポリペプチド、アポトーシス誘発物質、プロドラッグ活性化酵素、または細胞増殖抑制性ポリペプチドである、請求項 10 記載の薬学的組成物。

【請求項 12】

第二の薬学的組成物と併用して投与されるためにさらに製剤化され、第二の薬学的組成物が化学療法剤、放射線療法剤、または免疫療法剤を含む、請求項 1 記載の薬学的組成物。

【請求項 13】

免疫療法剤が GM-CSF である、請求項 12 記載の薬学的組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は全体的に、腫瘍学およびウイルス学の分野に関する。より詳しく述べると、本発明は、それによって特に癌の治療に適するようになる一つまたはそれ以上の変異を含む、特にワクシニアウイルスを含むポックスウイルスに関する。

【背景技術】

30

【0002】

2. 関連技術に関する説明

正常組織の恒常性は、細胞増殖および細胞死の高度に調節されたプロセスである。細胞増殖または細胞死のいずれかの不均衡は、癌状態に発展しうる (Solyanikら、1995; Stokkeら、1997; Mumby and Walter、1991; Natoliら、1998; Magi-Galluzziら、1998)。例えば、子宮頸癌、腎臓癌、肺癌、膵臓癌、結腸直腸癌、および脳癌は、起こりうる多くの癌のごく少数の例である (Erlandsson、1998; Kolmel、1998; Mangray and King、1998; Gertig and Hunter、1997; Mougira、1998)。実際に、癌の発生は非常に高く、米国だけでも毎年500,000人以上の死亡は癌が原因である。

【0003】

40

細胞増殖および細胞死の維持は、癌原遺伝子および腫瘍抑制因子によって少なくとも部分的に調節される。癌原遺伝子または腫瘍抑制因子は、細胞増殖を誘導するタンパク質 (例えば、sis、erbB、src、ras、およびmyc)、細胞増殖を阻害するタンパク質 (例えば、Rb、p16、p19、p21、p53、NF1、およびWT1)、またはプログラムされた細胞死を調節するタンパク質 (例えば、bcl-2) (Ochiら、1998; Johnson and Hamdy、1998; Liebermannら、1998) をコードしうる。しかし、これらの癌原遺伝子および腫瘍抑制因子の遺伝子再配列または変異によって、強力な癌を引き起こす腫瘍遺伝子への癌原遺伝子の転換、または腫瘍抑制因子の不活性なポリペプチドへの転換が起こる。形質転換を得るためにはしばしば、一点の突然変異で十分である。例えば、p53腫瘍抑制タンパク質における点突然変異によって、野生型p53機能の完全な喪失が起こる (Vogelstein and Kinzler、1992)。

50

## 【 0 0 0 4 】

現在、多くの共通の癌タイプの治療にとって有効な選択肢はほとんどない。所定の個体に対する治療経過は、診断、疾患が進行した段階、ならびに患者の年齢、性別、および全身健康のような要因に依存する。癌治療の最も通常の実施法は、手術、放射線療法、および化学療法である。手術は、癌の診断および治療において中心的な役割を果たす。典型的に、手術のアプローチは、生検のため、および癌様増殖を切除するために必要である。しかし、癌が転移して広がっている場合、手術によって治癒が得られる可能性は低く、代替アプローチを講じなければならない。放射線療法、化学療法、および免疫療法は、癌の外科治療の代替法である (Mayer, 1998 ; Ohara, 1998 ; Hoら, 1998)。放射線療法は、癌細胞を破壊するために高エネルギー放射線照射を正確に照準することを含み、手術と同様に、転移していない局在癌細胞の治療において主に有効である。放射線療法の副作用には、皮膚の刺激、嚥下困難、口の渇き、悪心、下痢、脱毛、および脱力が含まれる (Curran, 1998 ; Brizel, 1998)。

10

## 【 0 0 0 5 】

化学療法、すなわち抗癌剤による癌の治療は、もう一つの癌治療様式である。所定の抗癌剤治療の有効性はしばしば、固形腫瘍全体に薬物を輸送することが難しいために制限される (el-Kareh and Secomb, 1997)。化学療法の戦略は、腫瘍組織の増殖に基づき、抗癌剤は急速に分裂しつつある癌細胞にターゲティングされる。ほとんどの化学療法アプローチには、広く多様な癌の反応率を増加させることが証明されている一つより多い抗癌剤の併用が含まれる (参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,824,348号 ; 米国特許第5,633,016号、および米国特許第5,798,339号)。化学療法剤の主な副作用は、それらが正常組織の細胞にも影響を及ぼす点であり、影響を受ける可能性が最も高い細胞は場合によっては急速に分裂する細胞 (例えば、骨髄、消化管、生殖器官および毛嚢) である。化学療法剤の他の毒性作用には、口のただれ、嚥下困難、口の渇き、悪心、下痢、嘔吐、疲労、出血、脱毛、および感染症が含まれる。

20

## 【 0 0 0 6 】

免疫療法は、特定のタイプの癌の治療にとってのもう一つの選択肢である。理論的には、免疫系が刺激されて、腫瘍細胞を異物であると同定して、それらを破壊の標的とする。残念なことに、反応は典型的にほとんどの腫瘍の増殖を予防するためには不十分である。しかし、近年、免疫系の本来の防御メカニズムを増強または補足する方法を開発するために、免疫治療の領域に注目が集まっている。現在試験中または用いられている免疫治療の例は、免疫アジュバント (例えば、ウシ結核菌 (*Mycobacterium bovis*)、熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*)、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物) (米国特許第5,801,005号 ; 米国特許第5,739,169号 ; Hui and Hashimoto, 1998 ; Christodoulidesら, 1998)、サイトカイン治療 (例えば、インターフェロン (IL-1, GM-CSF、およびTNF)) (Bukowskiら, 1998 ; Davidsonら, 1998 ; Hellstrandら, 1998)、および遺伝子治療 (例えば、TNF、IL-1、IL-2、p53) (Qinら, 1998 ; Austin-Ward and Villaseca, 1998 ; 米国特許第5,830,880号および米国特許第5,846,945号) およびモノクローナル抗体 (例えば、抗ガングリオシドGM2、抗HER-2、抗p185) (Pietrasら, 1998 ; Hanibuchiら, 1998 ; 米国特許第5,824,311号) である。そのような方法はある程度有望であるが、成功は限定的であることが示された。

30

40

## 【 0 0 0 7 】

複製選択的腫瘍細胞破壊性ウイルスは、癌の治療にとって有望である (Kirnら, 2001)。これらのウイルスは、直接的な複製依存性および/またはウイルス遺伝子発現依存性腫瘍細胞破壊作用を通して腫瘍細胞死を引き起こしうる (Kirnら, 2001)。さらに、ウイルスは、宿主における細胞媒介抗腫瘍免疫の誘導を増強することができる (Todoら, 2001 ; Sinkovicsら, 2000)。これらのウイルスはまた、抗腫瘍有効性を増強するために腫瘍内で治療的トランスジーンを発現するように操作することができる (Hermiston, 2000)。

## 【 0 0 0 8 】

しかし、この治療アプローチには大きい制限が存在する。いくつかのウイルス種に関し

50

て、ある程度の天然の腫瘍選択性の程度を証明することができるが、安全性を最大限にするためには、腫瘍細胞破壊性ウイルスの腫瘍選択性を操作および/または増強するための新しいアプローチがなお必要である。この選択性は、静脈内投与を用いる場合、および抗腫瘍有効性を増強するために毒性の可能性がある治療遺伝子をこれらのウイルスに加える場合には特に重要となるであろう；遺伝子発現は、正常組織において厳密に制限される必要があるであろう。さらに、抗腫瘍免疫の誘導または腫瘍関連血管のターゲティングのようなさらなるメカニズムによる抗腫瘍有効性の増加は非常に望ましい。

【0009】

したがって、癌の治療にとってより有効でより毒性の低い治療法が必要である。腫瘍細胞破壊性ウイルスを用いることは、開発されうる領域であるが、先に述べた制限を克服する必要はある。このように、本発明はそれらの制限に取り組む。

10

【発明の開示】

【0010】

発明の概要

本発明は、1)異なる細胞集団または組織タイプに異なるように影響を及ぼす物質を作製するため、および/または2)感染細胞からの放出の改善によって、より感染性が高く他の細胞に感染することができる型のボックスウイルスを作製するために、ボックスウイルスを改変することができるという発見に基づいている。本発明のボックスウイルス、例えばワクシニアウイルスのコペンハーゲン株は、他の治療(例えば、化学療法)と相乗的に作用して、TNFおよび/またはINF経路に反対するまたは阻害することなく、腫瘍血管をターゲティングすることによって有用な作用を提供する可能性がある。任意の株のワクシニアウイルスを用いてもよいと特に企図される。特定の態様において、ワクシニアウイルスのコペンハーゲン株またはその誘導体も同様に企図される。

20

【0011】

いくつかの態様において、ボックスウイルスは、標的とされた細胞に関してより毒性であるか、または治療的に有効である可能性があるが、抗ウイルス反応によってそれが非標的細胞から消失されることから、他の非標的細胞に対しては比較的無害である。このウイルスは、標的細胞においてボックスウイルスまたは異種ペプチドもしくはポリペプチドを発現させるために、および/またはそのような細胞に致死的に感染するために用いてもよい。ボックスウイルスは、非標的細胞または組織に関して「弱毒化」されている、すなわち宿主の内因性の抗ウイルス反応の調節能を含む、減少、低下、弱化、阻害、または消失したビルレンスをウイルスが有することを意味すると特に企図される。このように、本発明は、抗ウイルス反応を行うための能力が減少している細胞または組織を治療するために有用となるように、しかし有効な抗ウイルス反応を誘導することができる正常細胞または組織に関しては無効となるように改変されているワクシニアウイルスを含む組成物および方法に関する。本発明の方法は、癌細胞または腫瘍を治療するためにそのようなワクシニアウイルスを用いることを特に企図する。

30

【0012】

それによって本発明のウイルスが腫瘍細胞破壊性であると見なされうる、そして安全性の増強および/または正常組織からの消失の増加を有するメカニズムは、非正常細胞(癌細胞または組織のような)に対して正常細胞が抗ウイルス反応(例えば、免疫応答を開始、反応および/または誘導する)を示すことができる程度が関係している。正常細胞または組織はそのような能力を有するが、癌細胞または組織はしばしば、抗ウイルス反応を誘導するまたは抗ウイルス反応に関係する細胞タンパク質を発現しないまたはそのレベルが減少している。そのような細胞タンパク質には、インターフェロン、TNF、ケモカイン、サイトカイン、および他の因子が含まれる。正常細胞または組織では、弱毒化されて抗ウイルス免疫応答にあまり対抗することができないウイルスは容易に排泄される；しかし、非正常細胞および/または組織では、抗ウイルス反応は低下して、このように、弱毒ウイルスでさえも有効に消失されない。本発明のいくつかの態様の基礎は、本明細書において考察したウイルスが、非正常細胞とは対照的に正常細胞に対する作用がより弱いことから

40

50

、正常細胞に対する安全性の増強および毒性の減少による改善型の治療であるという点である。このように、弱毒化ウイルスは、インターフェロンの誘導またはインターフェロンに対する反応が、例えば減少するまたは存在しない癌細胞において、遺伝子を選択的に複製および発現するであろう。

【0013】

本発明の組成物および方法は、ポックスウイルスに関する。下記に考察するウイルスは、本発明の組成物および方法に含まれてもよい。多くの態様はワクシニアウイルスを含むが、他のポックスウイルスを、同じように作製または実行してもよく、このように、ワクシニアウイルスに関する態様を、類似の遺伝子を有する任意の他のポックスウイルスまたは他のウイルスに応用することができることと企図される。

10

【0014】

本発明は、そのウイルスゲノムにおいて一つまたはそれ以上の変異を含む改変ワクシニアウイルスに関する。変異は、組換え操作によって、ランダム変異誘発によって、またはウイルスを繰り返し継代することによってウイルスに導入してもよい。そのウイルスゲノムが組換え操作によって操作されているウイルス（または任意の前者のウイルスゲノム）は、「組換え型」ウイルスであると呼ばれる。変異は、一つまたはそれ以上の核酸残基の欠失、挿入、または置換であってもよい。変異は、遺伝子（コード配列または転写制御配列のような非コード配列が含まれる）に存在してもよく、または他所に存在してもよい。コード領域における変異によって、欠失、挿入、または置換がその中に導入された同源のペプチドまたはポリペプチドが得られる可能性がある。核酸の変異によってもまた、切断型ペプチドもしくはポリペプチド、または改変されたアミノ酸配列を有するペプチドもしくはポリペプチドを生じるフレームシフト変異が起こる可能性がある。

20

【0015】

本発明のいくつかの態様において、ワクシニアウイルスは弱毒化されており、これにはウイルスの弱毒化が起こるようにウイルスゲノムが改変されている必要がある。変異は、機能に従って分類される異なるポリペプチドに影響を及ぼす可能性がある。変異は、以下のクラスのポリペプチドの一つまたはそれ以上に存在してもよい：1) インターフェロン調節ポリペプチド；2) 補体制御ポリペプチド；3) TNFまたはケモカイン調節ポリペプチド；4) セリンプロテアーゼ阻害剤；5) IL-1 調節ポリペプチド；6) 非感染性EEV型ポリペプチド；および7) 細胞から感染性ウイルスの放出を阻害するように作用するウイルスポリペプチド（抗感染性ウイルス型ポリペプチド）。さらに、ワクシニアウイルス（または他のポックスウイルスにおける対応するポリペプチド）のA41LまたはC11Rに変異が存在してもよい。それぞれのクラスのポリペプチドは、直接または間接的にその特定の機能を有するポリペプチドを同定する。一つのポリペプチドが一つより多い同定された機能を有する可能性があるため、クラスは相互に排他的ではない。

30

【0016】

インターフェロン調節ポリペプチドは、細胞のインターフェロン誘導または活性化経路に影響を及ぼす活性を有するポックスウイルスポリペプチドを指す。インターフェロンは、いくつかの細胞および生物の抗ウイルスメカニズムに関与している。ポックスウイルスは、このメカニズムを阻害しようとするインターフェロン調節ポリペプチドを発現する。これらのポリペプチドは、この特定の抗ウイルス反応を抑制、減少、または消失する可能性があることと特に企図される。これらのポリペプチドは、インターフェロンの活性または機能を直接または間接的に調節、影響を及ぼす、妨害、阻害、減少、変化、または消失させる。インターフェロン、および は、インターフェロン調節ポリペプチドの標的である。インターフェロン調節ポリペプチドはさらに、インターフェロンに対して特異的に結合するポリペプチドに細分してもよい；そのようなポリペプチドは、インターフェロン結合ポリペプチドと呼んでもよい。B18Rは、それがIFN / に特異的に結合することからインターフェロン結合ポリペプチドである可溶性のワクシニアウイルスポリペプチドである。B8Rは、インターフェロン に特異的に結合するもう一つのワクシニアウイルスポリペプチドである。インターフェロン調節ポリペプチドには、ワクシニアウイルスのコペ

40

50

ンハーゲン株のような、他のウイルス株においてB19Rと呼ばれることがあるB18R、ワクシニアウイルスのB8R、B13R、vC12L、A53R、およびE3L、ならびに類似の活性または特性を有する他のウイルスポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。IFN調節ポリペプチドはまた、IFN および/またはIFN 経路を選択的に調節するポリペプチド（ワクシニアウイルスのB18R、B8R、B13R、およびvC12Lを含む）とIFN 経路を調節するポリペプチド（ワクシニアウイルスのB8R、B13R、およびvC12Lを含む）という非排他的分類に分類してもよい。免疫抑制機能を有する他の任意のポリペプチドも同様に含まれる。

【 0 0 1 7 】

補体制御ポリペプチドは、補体媒介殺細胞および/またはウイルス不活化の予防において役割を有するポックスウイルスポリペプチドを指す。ウイルス病原体の排泄メカニズムは、補体依存のメカニズムによって宿主内で感染細胞を殺すことまたはピリオンの不活化である。これらのポリペプチドは、この特定の抗ウイルス反応を抑制、減少、または消失させる可能性があるると特に企図される。これらの補体制御ポリペプチドは、このメカニズムの活性または機能を直接または間接的に調節、影響を及ぼす、干渉する、阻害する、減少させる、変化させる、または消失させる。補体制御ポリペプチドには、C3LまたはC21Lとしても知られるワクシニアウイルスのVCPおよびこの特性または機能（「機能」および「活性」という用語は互換的に用いられる）を有する他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

10

【 0 0 1 8 】

TNF調節ポリペプチドは、TNF受容体を通して活性化される細胞の免疫および炎症反応に影響を及ぼす活性を有するポックスウイルスポリペプチドを指す。この反応は、アポトーシス細胞死を誘導することを含む可能性がある。ポックスウイルスは、ウイルスおよび/またはウイルス感染細胞のTNF媒介排泄を相殺する方法として、これらのTNF調節ポリペプチドを発現する。これらのポリペプチドは、それらが細胞外TNFに対して特異的に結合してそれを分離して、それによってウイルス排泄の阻害が起こるという機能を有する。これらのポリペプチドは、この特定の抗ウイルス反応を抑制、減少、または消失させる可能性があるると特に企図される。これらのTNF調節ポリペプチドは、このメカニズムの活性または機能を直接または間接的に調節、影響を及ぼす、干渉する、阻害する、減少させる、改変する、または消失させる。このようにしてウイルス感染症を進行させてウイルスのビルレンスを増加させる。TNF調節ポリペプチドには、ワクシニアウイルスのA53RおよびB28R、ならびに類似の活性または特性を有する他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

20

30

【 0 0 1 9 】

セリンプロテアーゼ阻害剤（SPI）は、セリンプロテアーゼを阻害することができるポックスウイルスポリペプチドを指す。そのようなポリペプチドは、セルピンと呼ばれる。これらのポリペプチドは、そのSPI活性を通してアポトーシス誘導分子によるアポトーシスを防止して、このように抗ウイルスアポトーシス誘導サイトカイン、fas、グランザイム、またはアポトーシスの他の刺激因子の存在にもかかわらずウイルス複製を進行させる。SPIには、ワクシニアウイルスのB13RおよびB22R、ならびに類似の活性または特性を有する他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

40

【 0 0 2 0 】

IL-1 調節因子は、改変させるべきIL-1によって誘発される抗ウイルス反応に直接または間接的に影響を及ぼす活性を有するポックスウイルスポリペプチドを指す。IL-1は、B細胞に直接作用して、その増殖および免疫グロブリンの合成を促進する。IL-1はまた、B細胞をIL-5に反応させるプライミング因子の一つとしても機能する。IL-1は、NK細胞、線維芽細胞、胸腺細胞、神経膠芽腫細胞の増殖および活性化を刺激する。IL-18調節因子は、改変すべきIL-18によって誘発される抗ウイルス反応に直接または間接的に影響を及ぼす活性を有するポックスウイルスポリペプチドを指す。IL-18は、IFN を誘導するおよび/または細胞障害性T細胞およびNK細胞の活性化を誘導することによって作用する。これらのIL-1 またはIL-18調節因子ポリペプチドは、このメカニズムの活性または機能を直

50

接または間接的に調節する、影響を及ぼす、干渉する、阻害する、減少する、改変させる、または消失させる。これらの調節因子ポリペプチドは、この特定の抗ウイルス反応を抑制、減少、または消失させる可能性があるとして企図される。IL-1 調節因子ポリペプチドには、ワクシニアウイルスのB13RおよびB15R、ならびに類似の活性または特性を有する他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。他のIL-1調節因子を、本発明の一部として変異させてもよいと企図される。IL-18調節因子ポリペプチドには、vC12Lおよび他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0021】

細胞からの感染性ウイルスの放出を阻害するように作用するウイルスポリペプチド、抗感染性EEV型ポリペプチドは、感染性のEEV型のワクシニアウイルスが存在しないことに直接関与する機能を有するウイルスポリペプチドを指す。例えば、細胞膜からのEEV型の放出を拘束するまたは妨害するポリペプチドは、抗感染性EEV型ポリペプチドである。ウイルスのEEV型の調節に関与するポリペプチドには、ワクシニアウイルスのA34RおよびB5R、ならびにボックスウイルスのEEV型の産生に影響を及ぼす様々な他のタンパク質が含まれるがこれらに限定されない。A34Rのコドン151でのリジンからグルタミン酸への変異（K151E変異）によって、A34Rタンパク質は、EEV型を細胞膜に拘束する力が弱くなる。

#### 【0022】

本発明のボックスウイルスに含まれる可能性がある他の変異は、ウイルスEGF様タンパク質であるC11Rをコードする遺伝子における変異、そしてケモカイン結合活性を有する可能性があるA41L、B7R、N1L、および/またはvCKBPをコードする遺伝子における変異である（そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,871,740号およびSeetら、2001）。vCKBPに関する例としての説明に関しては、そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,871,740号およびSeetら、2001を参照されたい。さらに、本発明のウイルスはまた、異種核酸配列を適合させるための欠失をウイルスゲノムに有してもよいと企図される。そのような欠失は、非必須領域における欠失であってもよく、またはヘルパーウイルスもしくは宿主細胞のいずれかによって相補される本質的な領域における欠失であってもよい。

#### 【0023】

いくつかの態様において、ボックスウイルス、特にワクシニアウイルスは、それによって少なくとも第一のインターフェロン調節機能を欠損するウイルスが得られるインターフェロン調節因子ポリペプチドをコードする第一の遺伝子において少なくとも一つの変異を有する。さらなる態様において、変異は、インターフェロンに直接結合するインターフェロン調節因子ポリペプチドをコードする遺伝子に存在する。インターフェロン結合ポリペプチドはB8Rおよび/またはB18Rであってもよいと企図される。

#### 【0024】

他のより一般的な分類も同様に応用してもよい。変異はまた、以下のクラスのポリペプチドの一つまたはそれ以上を特徴としてもよい：1) 免疫応答成分（例えば、TNFおよび他のサイトカイン；ケモカイン、補体カスケード；インターフェロン / および ; IL-1 および IL-18のようなインターロイキン；A41L；N1L；vC12L；およびC11R）を阻害する分泌型ウイルス因子；アポトーシス（例えば、セリンプロテアーゼ阻害剤）および/または免疫活性化（例えば、B13R、B22R、およびB7R）を遮断するように作用する細胞内ウイルス因子；および3) 細胞からの感染性ウイルスの放出を阻害するように作用するウイルスポリペプチド。一つのポリペプチドは、一つより多い同定された機能を有してもよいことから、クラスは相互に排他的ではない。

#### 【0025】

本出願を通して、「ウイルスは機能的Xを欠損する」という句は、タンパク質Xの少なくとも一つの機能を欠損するウイルスを指す。タンパク質Xが通常二つの機能を有する場合、機能的Xを欠損するウイルスとは、ポリペプチドXのこれらの機能の少なくとも一つを欠損するウイルスを指す。機能の欠損は、ポリペプチドXをコードする核酸またはその発現に関与する核酸領域が機能的ポリペプチドXを有するウイルスと比較して変異している場

10

20

30

40

50

合を含む、多様なメカニズムによって得てもよい。さらに、「少なくともX機能を欠損するウイルス」とは、X機能を有する少なくとも一つのポリペプチドのX機能または活性が欠落または欠損しているウイルスを指す。さらに、この句は、ウイルスが任意のしかも全てのX機能を欠損することを意味するのではなく、そのX機能を有するポリペプチドを、1) もはや発現されない、または2) 機能Xのみに関してもはや機能的でない(ポリペプチドは他の機能が無傷であってもよい)ようにする変異をそのウイルスゲノムに有することを意味する。

【0026】

本発明のワクシニアウイルス(または他のボックスウイルス)は、以下の7クラスの一つまたはそれ以上において改変または変異を有してもよい: 1) 少なくともインターフェロン調節機能を欠損するウイルスが得られるインターフェロン調節ポリペプチド(B8R、B18R、B13R、E3L、および/またはvC12Lが含まれるがこれらに限定されない)をコードする遺伝子; 2) 少なくとも一つの補体制御機能を欠損するウイルスが得られる補体制御ポリペプチド(VCPが含まれるがこれらに限定されない)をコードする遺伝子; 3) 少なくとも一つのTNF調節機能を欠損するウイルスが得られるTNF調節ポリペプチド(A53R、およびB28Rが含まれるがこれらに限定されない)をコードする遺伝子; 4) 少なくとも一つのセリンプロテアーゼ阻害剤機能を欠損するウイルスが得られるセリンプロテアーゼ阻害剤(B13R、B22R、および/またはK2Lが含まれるがこれらに限定されない)をコードする遺伝子; 5) 少なくとも一つのIL-1調節因子機能を欠損するウイルスが得られるIL-1調節因子ポリペプチド(B15Rが含まれるがこれらに限定されない)をコードする遺伝子; 6) ワクシニアウイルスの感染性EEV型の増加が得られるポリペプチド(B5Rおよび/またはA34Rが含まれるがこれらに限定されない)をコードする遺伝子; または7) C11R、vCKBP、B7R、N1L、および/またはA41L。

【0027】

本発明の他のワクシニアウイルスは、vC12L IL-18調節機能を欠損するウイルスが得られる変異を有してもよい。さらに、そのようなウイルスは、上記の7クラスのいずれかにおいてさらに変異を含んでもよい。

【0028】

本発明のウイルスは、一つのクラスのポリペプチドからの一つより多い遺伝子において変異を有してもよい。このように、ウイルスゲノムは、それによって同じクラスの1、2、3、4、5個またはそれ以上のポリペプチドが、クラスの特徴を示す機能を喪失するようになる変異を有してもよい。さらに、本発明のウイルスは、一つより多いポリペプチドにおいて変異を有してもよいと企図される。したがって、ウイルスゲノムは、ウイルスの、コードされるポリペプチドの対応する機能を欠損させるために、8クラスのポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、または8クラスをコードする遺伝子において変異を有してもよい。その上、本発明のウイルスは、同じクラスのポリペプチドおよび異なるクラスのポリペプチドからの多数の遺伝子において変異を有してもよい。上記の本出願において考察した遺伝子およびその同源のポリペプチドは、本発明のワクシニアウイルスをそれらの特定のポリペプチドおよびそれぞれの機能を欠損させるための変異の標的として特に企図される。同様に、ワクシニアウイルスに関して先に考察した如何なる変異も、不適当な実験を行うことなく他のボックスウイルスに関して実行してもよい。

【0029】

変異させてもよい、または少なくとも一つの機能に関して非機能的にしてもよい特定のボックスウイルスポリペプチドには、A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、およびvCKBPが含まれるがこれらに限定されない。このように、本発明のボックスウイルスは、これらの対応するワクシニアウイルスポリペプチドをコードするこれらの遺伝子の一つまたはそれ以上において変異を有してもよい。

【0030】

本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、A34Rにおける少なくと

10

20

30

40

50

も一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせ有してもよい：A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

【0031】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、A41Lにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせ有してもよい：A34R、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、A53Rにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせ有してもよい：A34R、A41L、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

10

【0032】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、B5Rにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせ有してもよい：A34R、A41L、A53R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

20

【0033】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、B7Rにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせ有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

【0034】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、B8Rにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせ有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

30

【0035】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、B13Rにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせ有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

【0036】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、B15Rにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせ有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

40

【0037】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、B18Rにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせ有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B22R、B

50

28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

【0038】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、B22Rにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせて有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

【0039】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、B28Rにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせて有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

10

【0040】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、B29R（C23Lとしても知られる）における少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせて有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

20

【0041】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、C11Rにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせて有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、E3L、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

【0042】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、E3Lにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせて有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、K2L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

30

【0043】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、K2Lにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせて有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、N1L、vC12L、および/またはvCKBP。

【0044】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、N1Lにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせて有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、vC12L、および/またはvCKBP。

40

【0045】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、vC12Lにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせて有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、および/またはvCKBP。

50

## 【 0 0 4 6 】

他の本発明のワクシニアウイルスにおいて、ワクシニアウイルスは、vCKBPにおける少なくとも一つの機能を消失させる変異を、以下のポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の少なくとも一つの機能を消失させる変異と組み合わせて有してもよい：A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、および/またはvC12L。

## 【 0 0 4 7 】

本発明のいくつかの態様において、コペンハーゲンまたはウェスタンリザーブ株を変異させて、本発明のワクシニアウイルスを作製する。これらの株は上記のポリペプチドの7クラスの一つまたはそれ以上においてさらに変異させてもよい。

## 【 0 0 4 8 】

本発明のワクシニアウイルスは、B8R、B18R、B13R、またはvC12Lインターフェロン調節機能を欠損するウイルス；B8Rインターフェロン調節機能を欠損するウイルス；B13Rインターフェロン調節機能を欠損するウイルス；B8RおよびB13Rインターフェロン調節機能を欠損するウイルス；B8R、B13R、およびvC12Lインターフェロン調節機能を欠損して、さらにB28RもしくはA53Rまたはその双方のインターフェロン調節機能を欠損してもよいウイルス；B8R、B13R、およびvC12Lインターフェロン調節機能を欠損して、B18Rインターフェロン調節機能をさらに欠損してもよいウイルス；B8R、B13R、B18R、およびvC12Lインターフェロン調節機能を欠損して、B28Rおよび/またはA53Rインターフェロン調節機能をさらに欠損してもよいウイルス；少なくとも一つのインターフェロン調節機能およびVCP補体制御機能を欠損するウイルス；少なくとも一つのインターフェロン調節機能およびA53R、B28R、および/またはvCKBP TNF調節機能を欠損するウイルス；少なくとも一つのインターフェロン調節機能およびB13R、B22R、および/またはK2Lセリンプロテアーゼ機能を欠損するウイルス；少なくとも一つのインターフェロン調節機能およびB13Rおよび/またはB15R IL-1 調節機能を欠損するウイルス；それによってワクシニアウイルスの感染性EEV型の産生の増加が得られる、少なくとも一つのインターフェロン調節機能を欠損し、A34RまたはB5Rにおいて変異を含むウイルス；C11R、vCKBP、B7R、N1L、および/またはA41Lの機能を欠損するウイルス；または上記の機能の任意の組み合わせを欠損するウイルスを含んでもよい。

## 【 0 0 4 9 】

他のワクシニアウイルスは、vC12Lインターフェロン調節機能を欠損するウイルスが得られる変異を有する。そのようなウイルスには、上記の7クラスの一つまたはそれ以上においてさらに変異が含まれてもよい。いくつかの態様において、ウイルスはB8R、B13R、および/またはB18R機能を欠損する、一方でウイルスはB15R、IL-1 調節機能、および/またはvCKBPおよび/またはB13R機能および/またはB29R TNF調節機能のような上記の任意の他の機能も同様に欠損する。

## 【 0 0 5 0 】

本発明のいくつかの態様において、ボックスウイルスは、被験体に投与するために用いられ、その場合ウイルスは薬学的組成物に含まれる。本発明の組成物にはまた、インターフェロン（ 、 、 および/または ）および/または抗体、化学療法剤、または治療的癌ポリペプチドをコードする核酸のような抗癌剤が含まれてもよい。

## 【 0 0 5 1 】

本発明の方法は、本明細書において考察した如何なるボックスウイルスも用いることを含む。多くの態様は、ワクシニアウイルスの有効量を癌細胞または患者に投与することによって、癌細胞または癌患者を治療することに関する。いくつかの態様において、ワクシニアウイルスは、以下の少なくとも一つを発現することができない：

- a) 機能的な第一のインターフェロン調節ポリペプチド；
- b) 機能的補体制御ポリペプチド；
- c) 機能的TNF調節ポリペプチド；
- d) 機能的セリンプロテアーゼ阻害剤；

10

20

30

40

50

- e) 機能的IL-1 調節ポリペプチド；  
 f) 機能的な非感染性EEV型ポリペプチド；  
 g) 機能的なA41L、B7R、N1L、もしくはvCKBPケモカイン結合ポリペプチドまたはC11R EGF様ポリペプチド。

## 【0052】

ウイルスは、一つより多いa)~g)の機能的ポリペプチドを欠損すると特に企図される。「機能的ポリペプチド」は、同定された機能を含むポリペプチドを指す；例えば、機能的インターフェロン調節ポリペプチドを欠損するウイルスは、そのゲノムが変異しているウイルスを指し、その結果ウイルスは、インターフェロン調節機能を欠損する（全てのインターフェロン調節ポリペプチドの全てのインターフェロン調節機能を欠損する場合に対して）。ウイルスは、変異ポリペプチドを発現させる変異を有してもよいが、得られたポリペプチドは、それがもはや同定された機能を有しないように変異させてもよい。

10

## 【0053】

本発明のいくつかの方法において、癌細胞は腫瘍細胞である。さらに、細胞に、インビトロ、インビボ、またはエクスピボで本発明の組成物を投与してもよい。このように、癌細胞は患者に存在してもよい。患者は固形腫瘍を有してもよい。そのような場合、態様は、腫瘍の全てまたは一部を切除することによるような、患者に手術を行うことをさらに含んでもよい。ウイルス組成物は、手術の前、後、または同時に患者に投与してもよい。さらなる態様において、患者にはまた、直接、内視鏡によって、気管内、腫瘍内、静脈内、病変内、筋肉内、腹腔内、領域内、経皮、局所、動脈内、嚢内、または皮下投与してもよい。ウイルス組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20回またはそれ以上投与してもよく、そしてそれらは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間毎に投与してもよく、1、2、3、4、5、6、7日毎、1、2、3、4、5週間毎、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月毎に投与してもよい。

20

## 【0054】

癌を治療する方法にはさらに、化学療法または放射線療法を患者に投与することが含まれてもよく、これは1回より多く投与してもよい。化学療法には、シスプラチン（CDDP）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イフォスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ビスルファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキソルピシン、プレオマイシン、プリコマイシン、マイトマイシン、エトポシド（VP16）、タモキシフェン、タキソテール、タキソール、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、メトトレキセート、ゲムシタピン、オキサリプラチン、イリノテカン、トポテカン、またはその任意の類似体もしくは誘導体が含まれるがこれらに限定されない。放射線療法には、X線照射、UV照射、 $\gamma$ 線照射、電子線照射、またはマイクロ波が含まれるがこれらに限定されない。さらに、細胞または患者には、細胞からのウイルスの感染性EEV型の産生を増強するために、プロテアーゼまたはペプチダーゼを投与してもよい。ペプチダーゼまたはプロテアーゼは、同様にウイルスを含む薬学的組成物に含まれてもよい。その上、細胞または患者には、本発明の方法の一部として、タキサンが含まれるがこれらに限定されない微小管安定化剤を投与してもよい。ウェスタンリザーブおよびコペンハーゲンワクシニアウイルス株（と共にその誘導体）を含む、本明細書において考察した任意のボックスウイルスまたは改変ボックスウイルスを、これらの併用治療と共に用いることができると特に企図される。例えば、コペンハーゲンワクシニアウイルス株は、癌細胞または癌患者において治療効果を得るために、タキソールと併用して用いることができる。

30

40

## 【0055】

いくつかの態様において、ウイルス組成物を投与される癌細胞は、膀胱、血液、骨、骨髓、脳、乳腺、結腸直腸、食道、消化管、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、脾臓、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、または子宮細胞であってもよい。

## 【0056】

50

本発明の他の態様において、弱毒化ワクシニアウイルスにはさらに、異種治療ポリペプチドをコードする核酸配列が含まれる。異種治療ポリペプチドは、本発明の異なる態様において、腫瘍抑制因子、免疫調節因子、血管新生阻害剤、抗血管ポリペプチド、細胞障害性ポリペプチド、アポトーシス誘導因子、プロドラッグ活性化酵素、または細胞増殖抑制性ポリペプチドである。

【 0 0 5 7 】

本発明の方法は、IHD-J株であるか、またはA34RにおいてK151E変異を含む弱毒化ウイルスを用いることを含んでもよい。または、補体または補体系路による破壊に対してより抵抗性であるワクシニアウイルスを作製するために、ウイルスを、少なくとも一つのヒト補体阻害タンパク質を過剰発現する細胞株から産生してもよい。補体阻害タンパク質は、CD 10

【 0 0 5 8 】

特定の態様において、B8R、B18R、またはvC12Lをコードする遺伝子において変異を含み、その結果B8R、B18R、またはvC12Lインターフェロン調節機能を欠損するウイルスが得られる、組換え型ワクシニアウイルスを含む薬学的に許容される組成物の有効量を患者に投与することを含む、患者における癌を治療する方法が存在する。薬学的組成物の「有効量」は、一般的に癌のような疾患またはその症状の程度を検出可能に繰り返し改善、減少、最小にする、または制限するために十分な量として定義される。ウイルス粒子またはpfus  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、 $10^{25}$ 個またはそれ以上を含む組成物を患者に1、2、3、4、5 20

【 0 0 5 9 】

弱毒化ウイルスは、B8R、B18R、およびvC12Lインターフェロン調節機能を欠損してB13Rをコードする遺伝子において変異をさらに有し、その結果B13Rインターフェロン調節機能を欠損するウイルスが得られるであろうとさらに企図される。なおさらなる態様において、弱毒化ワクシニアウイルスは、B8R、vC12L、およびB13Rインターフェロン調節機能を欠損するが、その他においてはB8R、B18R、およびvC12Lインターフェロン調節機能の少なくとも二つを欠損する。弱毒化ワクシニアウイルスは、B8R、B18R、およびvC12Lインターフェロン調節機能を欠損すると特に企図される。さらに、B8R、B18R、およびvC12Lインターフェロン調節機能を欠損する組換え型ワクシニアウイルスは、以下の少なくとも一つをさら 30

- a) 補体制御ポリペプチド機能；
- b) TNF調節機能；
- c) セリンプロテアーゼ阻害剤機能；
- d) IL-1 調節機能；
- e) 抗感染性EEV型機能；または
- f) A41L、B7R、N1Lおよび/またはvCKBPケモカイン調節機能またはC11R EGF様機能。

【 0 0 6 0 】

本発明の他の態様には、インターフェロン、ケモカイン、サイトカイン、補体、または中和抗体によって媒介される抗ウイルス反応をウイルスが阻害する能力を減少させる変異を含む弱毒化ワクシニアウイルスを癌細胞に接触させることによって、癌細胞を殺す方法が含まれる。そのような態様は、B8R、B13R、B18R、またはvC12Lをコードする核酸配列において変異を有する弱毒化ワクシニアウイルスを含む。これらのウイルスは、先の段落において考察したa) ~ f) の一つまたはそれ以上を欠損してもよいとさらに企図される。 40

【 0 0 6 1 】

本発明のなおさらなる態様において、癌の治療を行うために、弱毒化ワクシニアウイルスと弱毒化ワクシニアウイルスの抗腫瘍効果を増加させる物質とを含む組成物の治療的有效量を腫瘍部位に接触させることを含む、癌患者における癌を治療する方法が存在する。弱毒化ワクシニアウイルスの抗腫瘍有効性を増加させる物質は、インターフェロン、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、微小管安定化剤、化学療法、放射線療法、遺伝子治療、免疫療 50

法、または免疫調節治療となりうる。

【0062】

治療法他に、本発明は、以下を含むワクシニアウイルスの強化EEV型を産生する方法に関する：a) 補体阻害タンパク質を過剰発現するヒト細胞株をワクシニアウイルスに感染させる段階；およびb) 感染細胞からワクシニアウイルスのEEV型を単離する段階。「ワクシニアウイルスの強化EEV型」は、野生型ワクシニアウイルスから産生されたEEV型より生物のウイルス分解メカニズムに対して強いまたは抵抗性であるワクシニアウイルスのEEV型を指す。

【0063】

いくつかの方法において、ワクシニアウイルスは、A34Rタンパク質をコードする遺伝子における変異を含む。場合によっては変異によってK151E変異が起こる。他の態様は、CD55、CD46、またはCD59である補体阻害タンパク質を含む。なおさらなる態様において、ヒト細胞株は、一つより多い補体阻害タンパク質を過剰発現する。

【0064】

方法他に、ワクシニアウイルスの強化EEV型を産生する方法に起因する組成物が本発明の一部として含まれる。組成物がワクシニアウイルスの強化EEV型の少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%であるワクシニアウイルスを含む組成物が特に含まれる。

【0065】

同様に、本発明は、ワクシニアウイルスの強化EEV型を産生するためのヒト細胞株に関する。そのような細胞株は、ワクシニアウイルスに感染可能であり、ワクシニアウイルスまたはワクシニアウイルス発現構築物を有し、それらは、少なくとも一つの補体阻害ポリペプチドを過剰発現する。補体阻害ポリペプチドは、CD55、CD46、またはCD59であってもよい。宿主細胞に、以下の少なくとも一つを欠損するワクシニアウイルスを感染させてもよい：

- a) インターフェロン調節機能；
- b) 補体制御ポリペプチド機能；
- c) TNF調節機能；
- d) セリンプロテアーゼ阻害機能；
- e) IL-1 調節機能；
- f) 機能的抗感染性EEV型ポリペプチド；または
- g) 機能的A41L、B7R、N1L、もしくはvCCKBPケモカイン結合ポリペプチドまたはC11R EGF様ポリペプチド。

【0066】

本発明の他の方法には、以下を含む、微小残留癌を治療する方法が含まれる：(i) 切除可能な腫瘍を有する患者を同定する段階；(ii) 腫瘍を切除する段階、および(iii) A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、またはvCCKBPをコードする遺伝子において少なくとも一つの変異を有するワクシニアウイルスを腫瘍床に接触させる段階。

【0067】

他の方法には、以下を含む腫瘍を有する被験体を治療することが含まれる：(i) 腫瘍を外科的に露出させる段階；および(ii) A34R、A41L、A53R、B5R、B7R、B8R、B13R、B15R、B18R、B22R、B28R、B29R、C11R、E3L、K2L、N1L、vC12L、またはvCCKBP機能を欠損する弱毒化ワクシニアウイルスを腫瘍に接触させる段階。

【0068】

さらなる態様において、腫瘍を有する被験体を治療する方法には、弱毒化ワクシニアウイルスによって長期間にわたって腫瘍を灌流することが含まれる。他の態様において、弱毒化ワクシニアウイルスを被験体に投与して、それによって被験体に治療利益を付与することを含む、癌を有する被験体における転移性疾患を阻害する方法が存在する。本出願を通して用いられる「治療利益」という用語は、前癌および癌の治療を含む患者の病態の医

10

20

30

40

50

学的治療に関して被験体の幸福を促進または増強する如何なるものも指す。この非排他的な例の一覧には、被験体の生命の任意の期間の延長、疾患の新生物発生の減少または遅延、過剰増殖の減少、腫瘍増殖の減少、転移の遅延、癌細胞または腫瘍細胞増殖速度の減少、および被験体の病態に帰因しうる被験体の疼痛の減少が含まれる。

【0069】

本発明のさらなる局面において、以下を含む患者における多剤耐性腫瘍を治療する方法が存在する：i) 弱毒化ワクシニアウイルスを患者に投与する段階；およびii) 化学療法または放射線療法を患者に投与して、それによって被験体に治療利益を付与する段階。さらに、弱毒化ワクシニアウイルスの有効量を患者に投与すること、および腫瘍の全てまたは一部を切除することを含む、患者における切除不可能な腫瘍を切除可能にする方法が存在する。または、本発明は、患者に弱毒化ワクシニアウイルスを投与して、化学療法または放射線療法を患者に投与することを含む、その癌が化学療法または放射線療法に対して耐性である癌患者を治療することを含む。

10

【0070】

特定の方法または組成物に関して考察した任意の態様は、本発明の他の方法および組成物に関して実行してもよいと特に企図される。

【0071】

請求の範囲および/または明細書において「含む」という用語と共に用いられる「一つの(a)」または「一つの(an)」という用語の使用は、「1個」を意味してもよいが、同様に「一つまたはそれ以上」、「少なくとも一つ」、および「一つまたは一つより多く」という意味と一貫する。

20

【0072】

本発明の他の目的、特徴、および長所は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかし、詳細な説明および特定の例は、本発明の特定の態様を示しているが、説明するために提供され、この詳細な説明から当業者には様々な変更および改変が明らかとなるであろうが、それらも本発明の趣旨および範囲に含まれると理解しなければならない。

【0073】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明の特定の局面をさらに証明するために含まれる。本発明は、本明細書において示した特定の態様の詳細な説明と共にこれらの図面の一つまたはそれ以上を参照してよりよく理解されるであろう。

30

【0074】

実例となる態様の説明

本発明は、癌の治療のための腫瘍細胞破壊性ポックスウイルスに関する。ポックスウイルスは、癌細胞を殺すためにより有効またはより効率的となるように、および/または非癌細胞に対してより毒性が低く、または損傷が少なくなるように操作することができる。より詳しく述べると、ポックスウイルスは、改変によってウイルスが宿主によりよく感染することができるように、または癌細胞によりよく感染することができるように、遺伝子産物を改変するように変異させてもよい。

【0075】

I. ポックスウイルス

40

ウイルスは、しばしばインターフェロン(-、-、-)および腫瘍壊死因子-(TNF)(Mossら、1996)のような免疫調節分子によって不活化、阻害、または排泄される。宿主組織および炎症免疫細胞はしばしば、ウイルス感染に反応してこれらの分子を分泌する。これらの分子は、直接の抗ウイルス作用を有しうる、および/または炎症細胞およびリンパ球の動員および/または活性化を通して間接的な作用を有しうる。これらの免疫学的排泄メカニズムの重要性を考慮すると、ウイルスは、これらのサイトカイン/ケモカインおよびインターフェロンの誘導および/または機能を阻害する遺伝子産物の発現に関与する。例えば、ワクシニアウイルス(VV；およびいくつかの他のポックスウイルス)は、CCケモカイン(例えば、RANTES、エオタキシン、MIP-1-)に結合して阻害する分泌型タンパク質vCKBP(B29R)をコードする(Alcamiら、1998)。いくつかのVV株も同様に、TNF

50

に結合して不活化する分泌型ウイルスタンパク質（例えば、リスター-A53R）を発現する（Alcamiら、1999）。ほとんどのポックスウイルス株は、インターフェロン- $\beta$ （例えば、B18R）またはインターフェロン- $\gamma$ （B8R）に結合してその機能を阻害する分泌型蛋白質をコードする遺伝子を有する。vC12Lは、IL-18によるIFN- $\gamma$  およびNK細胞/細胞障害性T細胞活性化の誘導を妨害するIL-18結合タンパク質である。

#### 【0076】

ほとんどのポックスウイルスのビルレンスに関する研究はマウスにおいて行われている。多くのしかし全てではないこれらのタンパク質がマウスにおいて活性である（例えば、B18Rは活性ではない）。これらのタンパク質が、標的サイトカインのマウス版に対して活性である状況において、これらの遺伝子の欠失によってビルレンスの減少が起こり、これらの遺伝子が欠失しているまたは機能的変異を有するVV変異体では安全性が増加する。さらに、これらの変異体に対する炎症/免疫応答およびウイルス排泄はしばしば、阻害タンパク質を発現する親ウイルス株と比較して増加する。例えば、ポックスウイルス分泌タンパク質のT1/35 kDaファミリー（ケモカイン結合/阻害タンパク質）の欠失によって、ウイルス感染組織への白血球浸潤の顕著な増加が起こりうる（Grahamら、1997）。VVにおけるvC12L遺伝子の欠失によって、マウスにおける鼻腔内投与後のウイルス力価/毒性の減少が起こる；さらに、NK細胞および細胞障害性Tリンパ球活性は、IFN- $\gamma$  の誘導と共に増加する（Smithら、2000）。粘液腫ウイルスT7遺伝子（IFN- $\gamma$  および広範囲のケモカインに結合することができる）の欠失によって、毒性モデルにおいてビルレンスの減少および有意に増加した組織炎症/浸潤が起こる（Uptonら、1992；Mossmanら、1996）。粘液腫ウイルスではM-T2遺伝子の欠失によっても、ウサギモデルにおいてビルレンスの減少が起こった（Uptonら、1991）。B18R抗インターフェロン- $\beta$  遺伝子産物の欠失によっても、IFN媒介排泄に対するウイルス感受性の増強が起こり、正常組織における力価は減少し、ビルレンスは減少する（Symonsら、1995；Colamoniciら、1995；Alcamiら、2000）。要約すると、これらのウイルス遺伝子産物は、抗ウイルス免疫応答およびウイルス感染組織への炎症細胞浸潤を減少させるように機能する。欠失/変異によるタンパク質機能の喪失によって、宿主組織におけるビルレンスの減少および/またはウイルスの前炎症特性の増加が起こる。

#### 【0077】

サイトカインおよびケモカインは、強力な抗腫瘍効果を有しうる（Vicariら、2002；Homeyら、2002）。これらの作用は、腫瘍細胞自身に直接作用しうる（例えば、TNF）、またはそれらは非癌様細胞に対する作用によって間接的となりうる。後者の例はTNFであり、これは腫瘍関連血管に対して毒性を引き起こすことによって抗腫瘍効果を発揮しうる；これによって腫瘍への血流が失われた後腫瘍の壊死が起こる。さらに、ケモカインは、好中球、好酸球、マクロファージおよび/またはリンパ球のような免疫エフェクター細胞を動員するように（場合によっては活性化するように）作用しうる。これらの免疫エフェクター細胞は、多くのメカニズムによって腫瘍の破壊を引き起こしうる。これらのメカニズムには、抗腫瘍サイトカイン（例えば、TNF）の発現、fasリガンドの発現、パーフォリンおよびグランザイムの発現、ナチュラルキラー細胞の動員等が含まれる。炎症反応によって、最終的に全身性の腫瘍特異的免疫の誘導が起こりうる。最後に、これらのサイトカイン（例えば、TNF）またはケモカインの多くが、化学療法および/または放射線療法と相乗作用して腫瘍を破壊することができる。

#### 【0078】

これらの免疫刺激タンパク質の組換え型版の臨床的に有効な全身投与は、1) 全身投与により重度の毒性が誘導されるため；および2) 局所浸潤および抗腫瘍効果を刺激するためには腫瘍内での局所発現が必要であるために、現実的ではない。全身循環におけるレベルを最小限にしながら、腫瘍塊の内部でこれらの分子の高い局所濃度を得るアプローチが必要である。ウイルスは、その有効性を増強する試みでサイトカインまたはケモカイン遺伝子を発現するように操作することができる。複製選択的ベクターからのこれらの遺伝子の発現は、非複製ベクターからの発現に対して長所を有する可能性がある。複製ウイルス

からの発現によって、腫瘍塊内でより高い局所濃度が得られうる；さらに複製するウイルスは、前炎症環境において腫瘍細胞の破壊 / 腫瘍細胞溶解および腫瘍抗原の放出を通して抗腫瘍免疫を誘導するために役立つ。しかし、このアプローチにはいくつかの制限がある。高い局所濃度で発現されれば毒性となりうる遺伝子を有する複製コンピテントウイルス（腫瘍選択的であるにもかかわらず）が環境に放出される可能性から、重篤な安全性の懸念が生じている。したがって、そのゲノムから強力な前炎症性遺伝子を発現するウイルスは、治療患者および一般大衆に対して安全性のリスクを提起する。腫瘍のターゲティング、これらの遺伝子を発現する複製選択的ウイルスを用いても、遺伝子発現が正常組織に起こりえて毒性が生じる。さらに、大きさの制限から、アデノウイルスのようなウイルスからの多数および / または大きい遺伝子の発現が阻害される；これらの分子は併用すると明確により有効に作用するであろう。最後に、用いられている腫瘍細胞溶解性ウイルスの多くは、抗炎症性タンパク質を発現し、したがって、これらのウイルスは、感染した腫瘍塊における前炎症環境の誘導と拮抗するであろう。その結果、抗腫瘍免疫の誘導、抗血管作用および化学療法 / 放射線療法感作を阻害するであろう。

【 0 0 7 9 】

#### A. ワクシニアウイルス

##### 1. インターフェロン調節ポリペプチド

インターフェロン- $\alpha$  /  $\beta$  は、いくつかのメカニズムを通してウイルス複製を遮断する。インターフェロン- $\alpha$  は、直接のウイルス阻害作用はより弱い、いくつかのメカニズムを通して細胞媒介免疫の強力な誘導物質である。ウイルスは、インターフェロンの抗ウイルス作用に拮抗できる分泌型遺伝子産物を発現するように進化した。例えば、ワクシニアウイルス（および他のポックスウイルス）は、インターフェロン- $\alpha$  および  $\beta$  にそれぞれ結合する分泌型蛋白質B8RおよびB18Rをコードする（Smithら、1997；Symonsら、1995；Alcamiら、2000）。インターフェロン誘導を減少させるワクシニア遺伝子産物のさらなる例は、インターフェロン- $\alpha$  誘導因子であるIL-18の活性化を阻害するカスパーゼ-1阻害剤B13Rである。インターフェロン調節ポリペプチドには、ワクシニアウイルスのコペンハーゲン株のような、他のウイルス株ではB19Rと呼ばれることもあるB18R；B8R；B13R；vC12L；A53R；E3Lおよび類似の活性または特性を有する他のウイルスポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。IFN調節ポリペプチドは、選択的にIFN  $\alpha$  および  $\beta$  / または経路を調節するポリペプチド（B18R、B8R、B13R、またはvC12Lのような）、およびIFN  $\gamma$  経路を調節するポリペプチド（例えば、B8R、B13R、またはvC12L）の非排他的分類に分類してもよい。

【 0 0 8 0 】

癌細胞はしばしば、インターフェロンの作用に対して抵抗性である。多くのメカニズムが関係している。これらには、癌細胞の共通の特徴であるrasシグナル伝達経路の活性化（例えば、ras変異、上流の増殖因子受容体の過剰発現 / 変異等）によってPKR阻害が起こるといった事実が含まれる。さらに、リンパ球はしばしば腫瘍塊において、IL-10産生および腫瘍細胞によるfas-L発現を含む多様なメカニズムによって阻害される。リンパ球は、主なインターフェロン- $\gamma$  産生源であることから、リンパ球の阻害によって、腫瘍におけるインターフェロン- $\gamma$  産生の減少が起こる。したがって、腫瘍塊は、インターフェロンの作用が届かない聖域となる傾向がある。例えば、IFN- $\gamma$  は、MHCクラスI関連抗原の提示を増加させうる；これによって、腫瘍細胞のより効率的なCTL媒介殺細胞が可能となるであろう。例えば、IFN- $\gamma$  /  $\alpha$  は、腫瘍塊内の血管新生を遮断して、それによって腫瘍の増殖を遮断することができる。

【 0 0 8 1 】

##### 2. 補体制御ポリペプチド

ウイルス病原体の排泄に関する主なメカニズムは、補体依存的メカニズムによって宿主細胞内の感染細胞または生物内のピリオンを殺すことである。感染細胞は死滅するため、感染ウイルスを産生し続けることは不可能である。さらに、アポトーシスの際に、DNAを分解する細胞内酵素が放出される。これらの酵素によってウイルスDNAの分解およびウイ

10

20

30

40

50

ルスの不活化が起こりうる。アポトーシスは、活性化された補体の結合および補体膜攻撃複合体を含む多数のメカニズムによって誘導することができる。ワクシニアのようなポックスウイルスは、ウイルスおよび/またはウイルス感染細胞の補体媒介排泄に拮抗することができる遺伝子産物を発現するように進化した。これらの遺伝子はそれによってアポトーシスを阻害して、補体依存的メカニズムによってウイルス排泄を阻害し、このように、ウイルス感染を進行させて、ウイルスのビルレンスを増加させることができる。例えば、ワクシニアウイルス補体制御タンパク質 (VCP; 例えばC21L) は、補体媒介殺細胞および/またはウイルス不活化の防止において役割を有する (Isaacsら、1992)。VCPはまた、その発現によってウイルス感染組織への白血球の浸潤が減少することから、抗炎症作用も有する。補体制御ポリペプチドには、C3LまたはC21Lとしても知られるVCPが含まれるがこれらに限定されない。

10

#### 【0082】

癌細胞はしばしば、細胞の抗補体タンパク質を過剰発現する; これによって癌細胞は補体の攻撃±腫瘍特異的抗体から生き延びることができる (Caragineら、2002; Durrantら、2001; Andohら、2002)。したがって、補体媒介殺細胞に対するその固有の抵抗性のために腫瘍細胞を選択的に標的とする物質は、広範なヒト癌において選択性およびおそらく有効性を有するであろう (Durrantら、2001)。さらに、癌細胞の顕著な特徴の一つまたはそれ以上は、正常なアポトーシスメカニズムの喪失である (Grossら、1999)。アポトーシスに対する抵抗性は、発癌を促進するのみならず、免疫療法、化学療法、および放射線療法剤を含む抗腫瘍物質に対する抵抗性を促進する (Eliopoulosら、1995)。アポトーシスの阻害はプロアポトーシス分子機能 (例えば、bax) の喪失、抗アポトーシス分子 (例えば、bcl-2) のレベル/機能の増加、および最終的に補体感受性の喪失によって媒介されうる。

20

#### 【0083】

### 3. TNF調節ポリペプチド

ウイルス病原体の排泄に関する様々なメカニズムの一つは、上記のようにアポトーシスの誘導によって宿主内で感染細胞を殺すことである。アポトーシスは、細胞内シグナル伝達カスケードの誘因となる細胞TNF受容体に対するTNFおよびリンフォトキシン- (LT) の結合を含む、多数のメカニズムによって誘導することができる。TNF受容体の活性化は、免疫および炎症反応の調節と共にアポトーシス細胞死の誘導において機能する (Wallachら、1999)。

30

#### 【0084】

いくつかのワクシニアウイルス株を含む様々な株のポックスウイルスは、ウイルスおよび/またはウイルス感染細胞のTNF媒介排泄に拮抗することができる遺伝子産物を発現するように進化した。これらの遺伝子によってコードされるタンパク質は、細胞外TNFに結合してこれを分離することによってTNFの前炎症性およびアポトーシス誘導活性を迂回し、その結果ウイルス排泄の阻害が起こる。ウイルスが排泄されないために、ウイルス感染症が進行し、このようにウイルスのビルレンスは増加する。ポックスウイルス科の様々なメンバーが分泌型ウイルスTNF受容体 (vTNFR) を発現する。例えば、粘液腫 (T2タンパク質)、牛痘、およびリスターのようなワクシニアウイルス株のような、vTNFRをコードするいくつかのポックスウイルスは、一つまたはそれ以上のCrmB、CrmC (A53R)、CrmD、CrmE、B28Rタンパク質および/またはその同等物をコードする可能性がある。これらのvTNFRは、TNF媒介殺細胞および/またはウイルスの不活化の防止において役割を有する (Saraiva and Alcamí, 2001)。TNF調節ポリペプチドには、A53R、B28R (このタンパク質は存在するが、ワクシニアウイルスのコペンハーゲン株では不活性である可能性がある) および類似の活性または特性を有する他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

40

#### 【0085】

癌細胞の顕著な特徴の一つは、それによってTNFの抗癌活性に対する感受性のような、増殖調節に関する多くの分子メカニズムに対する感受性の喪失が起こる可能性がある異常な遺伝子発現である。このように、ウイルスの免疫調節メカニズムは、腫瘍の微小環境に

50

おけるウイルスの増殖にとって必要でない可能性がある。

【 0 0 8 6 】

#### 4. セリンプロテアーゼ阻害剤

ウイルス病原体の排泄に関する主なメカニズムは、宿主における感染細胞のアポトーシスの誘導である。感染細胞は死滅するため、感染ウイルスを産生し続けることは不可能である。さらに、アポトーシスの際に、DNAを分解する細胞内酵素が放出される。これらの酵素はウイルスDNAの分解およびウイルスの不活化を引き起こしうる。アポトーシスは、サイトカイン（例えば、腫瘍壊死因子）の結合、細胞障害性Tリンパ球によるグランザイム産生、またはfas-リガンド結合を含む多数のメカニズムによって誘導することができる；カスパーゼ活性化は、最終的に一般的なアポトーシス経路の重要な部分である。ウイルスは、fasリガンドまたは腫瘍壊死因子（TNF）/TNF関連分子（例えば、アデノウイルスのE3 10.4/14.5、14.7遺伝子（Woldら、1994）；アデノウイルスのE1B-19 kD（Boydら、1994）；牛痘ウイルスからのcrmA；ワクシニアウイルスからのB13R）を含むそのような分子によって誘導される細胞内シグナル伝達カスケードに拮抗することができる遺伝子産物を発現するように進化した（Dobbelsteinら、1996；Kettleら、1997）。これらの遺伝子産物は、アポトーシス誘導分子によるアポトーシスを阻害して、このように抗ウイルス性のアポトーシス誘導サイトカイン、fas、グランザイム、または他のアポトーシス刺激物質の存在にもかかわらず、ウイルス複製を進行させる。

【 0 0 8 7 】

VV SPI-2/B13Rは、牛痘CrmAと非常に相同である；SPI-1（VV）は、CrmAと弱く相同である（Dobbelsteinら、1996）。これらのタンパク質はセルピン（セリンプロテアーゼ阻害剤）であり、CrmAおよびSPI-2はいずれも、様々な型のアポトーシスの防止において役割を有する。インターロイキン-1 変換酵素（ICE）およびグランザイムの阻害は、例えば感染細胞のアポトーシスを妨害しうる。これらの遺伝子産物はまた、抗炎症作用も有する。それらは、IL-18の活性化を阻害することができ、これは次にIFN- $\gamma$  のIL-18媒介誘導を減少させるであろう。細胞媒介免疫に及ぼすIFN- $\gamma$  の免疫刺激作用はそれによって阻害される（Kettleら、1997）。SPIには、B13R、B22R、および類似の活性または特性を有する他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 8 8 】

癌細胞の顕著な特徴の一つは、正常なアポトーシスメカニズムの喪失である（Grossら、1999）。アポトーシスに対する抵抗性は、発癌を促進するのみならず、免疫療法、化学療法、および放射線療法剤を含む抗腫瘍物質に対する抵抗性を促進する（Eliopoulosら、1995）。アポトーシスの阻害は、プロアポトーシス分子機能（例えば、bax）の喪失、または抗アポトーシス分子（例えば、bcl-2）のレベル/機能の増加によって媒介されうる。

【 0 0 8 9 】

#### 5. IL-1 調節ポリペプチド

IL-1 は、局所そして全身性に作用する生物活性因子である。IL-1 $\alpha$  とIL-1 $\beta$  とのあいだの機能的な差はごくわずかであることが記述されている。IL-1 の多数の生物活性の例は、IL-1を記述する際の多くの異なる頭字語によって示されている。IL-1は、ブタ細胞において不活性であるヒトIL-1 $\beta$  を例外として種特異性を示さない。IL-1の生物活性のいくつかは、ACTH（コルチコトロピン）、PGE2（プロスタグランジンE2）、PF4（血小板因子-4）、CSF（コロニー刺激因子）、IL-6、およびIL-8を含む他のメディエータの合成の誘導によって間接的に媒介される。IL-1の合成は、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  およびIFN- $\gamma$  を含む他のサイトカインによって誘導される可能性があり、同様に細菌エンドトキシン、ウイルス、マイトゲンおよび抗原によって誘導される可能性がある。IL-1の主な生物活性は、T-ヘルパー細胞の刺激であり、これはIL-2を分泌して、IL-2受容体を発現するように誘導される。ウイルス感染マクロファージは、大量のIL-1阻害剤を産生し、これはT細胞成熟欠損患者における日和見感染および細胞のトランスフォーメーションを支持する可能性がある。IL-1は、B細胞に直接作用して、その増殖および免疫グロブリンの合成を促進する

。IL-1はまた、B細胞をIL-5に対して反応性にするプライミング因子の一つとしても機能する。IL-1は、NK細胞および線維芽細胞、胸腺細胞、神経膠芽細胞の増殖および活性化を刺激する。

#### 【0090】

ウイルスタンパク質によるIL-1の合成の遮断は、IL-1によって誘発される全身性の抗ウイルス反応を抑制または減少させるウイルスの戦略であると見なされる。B15Rと類似の活性を有するIL-1の機能を有効に遮断する結合タンパク質もまた、牛痘ウイルスの遺伝子によってコードされることが判明した。ワクシニアウイルスはまた、サイトカインの受容体のような挙動を示すB8Rと呼ばれるもう一つのタンパク質をコードする(Alcami and Smith, 1992; Spriggsら、1992)。IL-1調節ポリペプチドには、B13R、B15R、および類似の活性または特性を有する他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

10

#### 【0091】

癌細胞の顕著な特徴の一つは、異常な遺伝子発現であり、これによって、IL-1の抗癌活性に対する感受性のような増殖調節に関する多くの分子メカニズムに対する感受性の喪失が起こる可能性がある。このように、ウイルスの免疫調節メカニズムは、腫瘍の微小環境においてウイルスの増殖にとって必要ではない可能性がある。

#### 【0092】

### 6. EEV型

ウイルスは伝播して腫瘍部位に転移し、さらに感染した固形腫瘍塊内でも伝播するが、一般的に非効率的である(Heiseら、1999)。静脈内投与では典型的に、抗体(例えば、アデノウイルス)(Kayら、1997)および/または補体系(例えば、HSV)(Ikedaら、1999)によるウイルスの排泄または不活化が起こる。これらの免疫媒介メカニズムの他に、これらのウイルスの生体内分泌によって、腫瘍塊よりむしろ正常組織内で静脈内ウイルスの大多数が沈着する。例えば、静脈内のアデノウイルスは、主に肝臓および脾臓にたどり着く;免疫欠損マウスにおいても、腫瘍内に沈着するのは投与されたウイルスの0.1%未満である(Heiseら、1999)。したがって、免疫欠損マウスの腫瘍モデルにおいて、極端に高い相対量によって何らかの控えめな抗腫瘍有効性が証明されうるものの、静脈内輸送は極めて非効率的であり、有効性を有意に制限する。

20

#### 【0093】

ワクシニアウイルスは、固形腫瘍内で複製能を有し壊死を引き起こす。さらに、チミジンキナーゼ欠失変異体は、腫瘍塊および卵巣組織に感染して、マウス腫瘍モデル系において選択的にマーカー遺伝子を発現する(Gnantら、1999)。しかし、これらの研究は一般的に、5日以上後でのマーカー遺伝子発現に基づいて腫瘍のターゲティングを決定したため、ウイルスが腫瘍/卵巣組織に選択的に沈着する、そこで遺伝子を発現する、または複製するか否かは不明である(Puhlmannら、2000)。メカニズムにかかわらず、さらなるトランスジーンを有しないこのウイルスの抗腫瘍有効性は、統計学的に有意ではなかった(Gnantら、1999)。対照的に、腫瘍内ウイルス注射は、有意な抗腫瘍有効性を示した(McCartら、2000)。したがって、静脈内注射の有効性は、腫瘍への静脈内輸送が改善されれば改善することができるであろう。

30

#### 【0094】

ワクシニアウイルスは、細胞において複製して、細胞内ウイルス(IMV、細胞内成熟ウイルス; IEV、細胞内エンベロープウイルス)および細胞外ウイルス(EEV、細胞外エンベロープウイルス; CEV、細胞関連細胞外ウイルス)(Smithら、1998)の双方を産生する。IMVは、野生型ワクシニアウイルス株による複製後のウイルス量の約99%を占める。このウイルス型は環境において比較的安定であり、したがって個体間での伝播に主に関与している;対照的にこのウイルスは、細胞からの放出が非効率的であることおよび補体および/または抗体による中和に対する感受性のために、感染宿主内では効率的に伝播しない。これとは対照に、EEVは細胞外環境に放出されて、典型的にウイルス量の約1%を占めるに過ぎない(Smithら、1998)。EEVは、感染宿主内でのウイルス伝播に関与して、宿主外では比較的容易に分解される。重要なことは、EEVは、血流内でその中和を阻害するいくつ

40

50

かのメカニズムを開発した点である。第一に、EEVは、補体に対して比較的抵抗性である (Vanderplasschenら、1998) ; この特徴は、その外膜への補体の宿主細胞阻害剤の組み入れ、プラスワクシニアウイルス補体制御タンパク質 (VCP) の局所細胞外環境への分泌による。第二に、EEVは、IMVと比較して中和抗体の作用に対して比較的抵抗性である (Smithら、1997)。EEVはまた、IMV (細胞死の際 / 後に限って放出される) より感染後早期の時点 (例えば、4~6時間) に放出され、したがって、EEV型の伝播はより速い (Blascoら、1993)。

#### 【0095】

しかし、残念なことに、野生型ワクシニア株は、比較のごく少量のEEVを産生するに過ぎない。さらに、ワクシニアウイルスによる治療 (すなわちウイルスの投与量) は、今日まで細胞内ウイルス型に限定されていた。標準的なワクシニアウイルス (VV) の製造および精製技法によってEEVの不活化が起こり (Smithら、1998)、そしてウイルスを作製するために、ヒト以外の細胞株がしばしば用いられている ; ヒト以外の細胞からのEEVは、補体媒介排泄から保護されないであろう (EEVによって細胞から獲得された補体阻害タンパク質は、種に限定された作用を有する)。したがって、ワクシニアウイルスの有効性は、中和に対するIMV型の相対的感受性によって、および固形腫瘍塊内でのその非効率的な伝播によって限定されている ; この伝播は典型的に、細胞から隣接する細胞へと起こる。血流またはリンパ管のいずれかを通しての遠位腫瘍塊へのIMVの伝播も同様に非効率的である。

#### 【0096】

したがって、ワクシニアウイルスのまれなEEV型は、本来獲得した特徴を有し、そのために今日まで患者に用いられるワクシニアウイルス型 (IMV) より優れている ; EEVは、固形腫瘍の内部を限局的に、そして局所または遠位腫瘍部位に迅速かつ効率的に伝播するように最適にされている。EEVは、補体の作用に対して比較的抵抗性であることから、同じ種からの細胞タイプにおいて増殖させた場合に、このウイルス型は安定性の増強を有し、血管内投与後の血液においてワクシニアウイルスの標準的な調製物 (ほぼ専らIMVを含む) より長く活性を保持するであろう (Smithら、1998)。EEVは、抗体媒介中和に対して抵抗性であることから、このウイルス型は、ワクシニアウイルスの標準的な調製物 (ほぼ専らIMVを含む) より静脈内投与後の血液において長く活性を保持するであろう (Vanderplasschenら、1998)。この特徴は、中和抗体レベルが増加した後の反復投与の場合には特に重要であろう ; 承認された全ての抗癌治療は反復投与を必要とする。したがって、ワクシニアおよび他のポックスウイルスのEEV型によって、血流を通して治療ウイルスおよびその遺伝子積載物の腫瘍への優れた輸送が得られるであろう。これによって、標準的なポックスウイルス調製物と比較して全身有効性の増強が得られるであろう。最後に、一般大衆の個人に対する伝播のリスクは、EEVが体外では極めて不安定であることから有意に減少するはずである。ウイルスのEEV型の調節に關与するポリペプチドには、A34R、B5R、およびポックスウイルスのEEV型の産生に影響を及ぼす様々な他のタンパク質が含まれるがこれらに限定されない。A34Rのコドン151でのリジンからグルタミン酸への変異 (K151E変異) により、A34Rタンパク質はEEV型を細胞膜に束縛する能力が低下する。B5Rは、補体に結合する可能性があるEEV膜結合ポリペプチドである。A43Rを全て欠失させることによって、EEV放出の増加が起こる可能性があるが、ウイルスの感染性は顕著に減少し、一方K151E変異は放出されたウイルスの感染性を維持しながらEEV放出を増加させる。B5Rは、VCP (抗補体) と配列相同性を有するが、補体の阻害はまだ証明されていない。

#### 【0097】

簡単に説明すると、強化EEV型を同定する一つの方法は以下の通りである。EEVを氷冷MEMにおいて希釈して、氷冷MEMにおいて希釈した (血清の最終希釈、10倍、20倍、または30倍) 活性型または熱不活化 (56、30分、対照) 血清と混合する (容積比1:1)。7で75分間インキュベートした後、試料を氷中で冷却して、mAb 5B4/2F2を新鮮なEEV試料に加えて如何なる混入物 (IMVおよび破壊されたEEV) も中和する。次に、ピリオンをRK13細胞に氷中で1時間結合させて、補体および未結合のピリオンを洗浄して、2日後にブランク数

10

20

30

40

50

を係数する。プラーク数がより多ければ、補体に対する抵抗性はより大きくなる。参照として本明細書に組み入れられる、Vanderplasschenら、PNAS 1998、95(13) : 7544 ~ 7549。ワクシニアウイルスのEEV型の単離を記述する例としての方法は、Blascoら、1992 (参照として本明細書に組み入れられる) に認められうる。

【0098】

#### 7. 他のポリペプチド

他のウイルス免疫調節ポリペプチドには、免疫応答の他のメディエータに結合しておよび/または免疫応答に関連した分子経路を調節するポリペプチドが含まれてもよい。例えば、B29R (このタンパク質は存在するが、ワクシニアウイルスのコペンハーゲン株では不活性である可能性がある)、C23L、vCKBP、A41Lおよび類似の活性または特性を有するポリペプチドのようなケモカイン結合ポリペプチド。ウイルスEGF様増殖因子であるワクシニアウイルス増殖因子 (例えば、C11L) のような他のワクシニアウイルスタンパク質も同様に、本発明のいくつかの態様において改変の標的となる可能性がある。ウイルス調節因子として分類されてもよい他のポリペプチドには、B7R、N1L、またはその活性もしくは特性がポックスウイルスのビルレンスを増加させる他のポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。

【0099】

#### 8. ワクシニアウイルス誘導細胞融合

本発明の特定の態様において、A56RまたはK2Lコード核酸遺伝子の改変、欠失、または変異によって、VV感染症によって誘導される細胞細胞融合または融合体形成が起こる可能性がある。ワクシニアウイルス誘導細胞融合は典型的に、腫瘍内ウイルス伝播によりVVの抗腫瘍効率を増加させるであろう。細胞融合による腫瘍内のウイルス伝播によって、典型的に、ウイルスは中和抗体および免疫応答を回避することができるであろう。隣接する非感染細胞 (すなわち、「傍観者作用」) の殺細胞および感染は、これらの遺伝子の一つまたは双方において変異を有するVVではより効率的となる可能性があり、それによって改善された局所抗腫瘍効果が得られる可能性がある。

【0100】

#### B. 他のポックスウイルス

ワクシニアウイルスは、ポックスウイルス科、チョルドポックスウイルス亜科およびオルトポックスウイルス属のメンバーである。オルトポックスウイルス属は、チョルドポックスウイルス亜科の他のメンバーより比較的均一であり、これには、ワクシニアウイルス、痘瘡ウイルス (天然痘の原因物質)、牛痘ウイルス、バッファロー痘ウイルス、サル痘ウイルス、マウス痘ウイルス、およびウマ痘ウイルス種と共にその他が含まれる、異なるが近縁の11種が含まれる (Moss、1996を参照されたい)。本明細書において記述されるように本発明の特定の態様は、オルトポックスウイルス属の他のメンバーのみならず、パラポックスウイルス、アビポックスウイルス、カブリポックスウイルス、レポリポックスウイルス、スイポックスウイルス、モルシポックスウイルス、およびヤタポックスウイルス属に拡大してもよい。ポックスウイルス科の属は、一般的に、実験動物における中和および交叉反応性を含む血清学的手段によって定義される。オルトポックスウイルス属の様々なメンバーと共にチョルドポックスウイルス亜科の他のメンバーは、宿主生物の免疫応答に拮抗するために免疫調節分子を利用し、その例を本明細書において提供する。このように、本明細書に記述の本発明は、ワクシニアウイルスに限定されないが、多くのウイルスに応用可能である可能性がある。

【0101】

#### C. ウイルスの増殖

ワクシニアウイルスは、参照として本明細書に組み入れられる、Ausbelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、16.15.1 ~ 16.18.10頁においてEarlおよびMossによって記述された方法を用いて増殖させてもよい。

【0102】

#### II. タンパク質様および核酸組成物

本発明は、患者における癌細胞および癌の試験および治療において都合がよいボックスウイルスに関する。これは、ウイルスが癌細胞に対して用いるために所望の特性を有するが、非癌細胞に対しては毒性が低い、または非毒性となるように、野生型と比較して一つまたはそれ以上の変異を有するように構築されたボックスウイルス、特にワクシニアウイルスに関する。下記の教示は、例として、本発明の方法および組成物を実行するための様々なプロトコールを提供する。それらは、組換えDNA技術を用いて変異ウイルスを作製するためのバックグラウンドを提供する。

【0103】

A. タンパク質様組成物

特定の態様において、本発明は、一つまたはそれ以上の機能的ポリペプチドまたはタンパク質を欠損するボックスウイルスを作製すること、および/または感染性のEEV型のようなウイルスの特定の型をより多く放出する能力を有するボックスウイルスを産生することに関する。他の態様において、本発明は、ボックスウイルスに関し、および薬学的に許容される製剤の一部としての蛋白質様組成物と併用してそれらを利用することに関する。

【0104】

本明細書において用いられるように、「タンパク質」または「ポリペプチド」とは、少なくとも一つのアミノ酸残基を含む分子を指す。いくつかの態様において、タンパク質またはポリペプチドの野生型版が用いられるが、本発明の多くの態様においてウイルスタンパク質またはポリペプチドは、存在しないかまたはウイルスが患者における癌細胞または癌の治療にとってより有用となるように改変されている。上記の用語は本明細書において互換的に用いられる可能性がある。「改変蛋白質」または「改変ポリペプチド」は、野生型蛋白質またはポリペプチドに関してその化学構造が改変されているタンパク質またはポリペプチドを指す。いくつかの態様において、改変タンパク質またはポリペプチドは、少なくとも一つの改変活性または機能（タンパク質またはポリペプチドは、多数の活性または機能を有する可能性があることを認識する）を有する。改変された活性または機能は、野生型蛋白質またはポリペプチドにおける活性または機能に関して何らかの他の方法で（特異性のような）低下、減少、消失、増強、改善、または変化させてもよい。改変タンパク質またはポリペプチドは、一つの活性または機能に関して改変されるが、他の局面において野生型活性または機能を保持するように改変されてもよいと特に企図される。または、改変タンパク質は、完全に非機能的であってもよく、またはその同源の核酸配列は、ポリペプチドがもはや全く発現されないように、切断されるように、またはフレームシフトの結果として異なるアミノ酸配列を発現するように改変されていてもよい。

【0105】

特定の態様において、変異タンパク質またはポリペプチドの大きさは、アミノ酸残基5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1750、2000、2250、2500個またはそれ以上、およびそこから誘導可能な任意の範囲を含んでもよいがこれらに限定されない。ポリペプチドは、切断によってそれらに対応する野生型より短くすることによって変異させてもよいと企図される。

【0106】

本明細書において用いられるように、「アミノ分子」は、当業者に既知である任意のアミノ酸、アミノ酸誘導体、またはアミノ酸模倣体を指す。特定の態様において、タンパク質様分子の残基は連続的であり、アミノ分子残基の配列のあいだには如何なる非アミノ分子も存在しない。他の態様において、配列は一つまたはそれ以上の非アミノ分子部分を含

10

20

30

40

50

んでもよい。特定の態様において、タンパク質様分子の残基の配列は、一つまたはそれ以上の非アミノ分子部分によって中断されてもよい。

【0107】

したがって、「タンパク質様組成物」という用語は、天然に合成されたタンパク質において一般的なアミノ酸20個の少なくとも一つまたは少なくとも一つの改変もしくは珍しいアミノ酸を含むアミノ酸配列を含む。

【0108】

蛋白質様組成物は、標準的な分子生物学技術を通してのタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの発現、天然起源からのタンパク質様化合物の単離、またはタンパク質様材料の化学合成を含む、当業者に既知の任意の技術によって作製してもよい。様々な遺伝子に関するヌクレオチドおよびタンパク質、ポリペプチド、およびペプチド配列が、既に開示されており、当業者に既知のコンピューターデータベースにおいて認められる可能性がある。そのような一つのデータベースは国立バイオテクノロジー情報センターのGenbankおよびGenPeptデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) である。これらの既知の遺伝子のコード領域は、本明細書に開示の技術を用いて、または当業者に既知であるように、増幅または発現してもよい。

【0109】

1. 機能的局面

本出願がウイルスタンパク質またはポリペプチドの機能または活性に言及する場合、特に明記していない限り、生理的条件下のウイルスタンパク質またはポリペプチドの活性または機能を指すと意味する。例えば、インターフェロン調節ポリペプチドは、少なくとも一つのインターフェロンおよびその活性に直接または間接的に影響を及ぼすポリペプチドを指す。ポリペプチドは、インターフェロンの活性を直接または間接的に誘導、増強、上昇、増加、減少、弱化、低下、阻害、または隠す可能性がある。インターフェロンに直接影響を及ぼす例は、いくつかの態様において、インターフェロンに特異的に結合するインターフェロン調節ポリペプチドを含む。どの分子がこの活性を有するかを決定することは、当業者に周知のアッセイを用いて行ってもよい。例えば、インターフェロンまたはその変種を調節する産物をコードする遺伝子を、そのような遺伝子の移入を有する細胞と比較してインターフェロン活性が誘導されている細胞に移入して、インターフェロン反応の異なるレベルによって、インターフェロン調節機能を有するそれらの分子を同定してもよい。

【0110】

調節物質は、インターフェロンコード転写物に結合することによるような、標的分子経路に関与するタンパク質様組成物の発現に影響を及ぼす分子であってもよい。どの分子がインターフェロン、IL-1、TNF、または治療利益を有する他の分子の適した調節物質であるかを決定することは、そのいくつかは本明細書に開示される当業者に周知のアッセイを用いて行ってもよく、例えば、天然のおよび/または組換え型ウイルスタンパク質を用いることが含まれてもよい。

【0111】

2. ウイルスポリペプチドの変種

本発明のポリペプチドのアミノ酸配列変種は、置換、挿入、または欠失変種となりうる。ウイルスタンパク質をコードする遺伝子における変異は、野生型と比較して、ポリペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500個またはそれ以上の非隣接または隣接アミノ酸に影響を及ぼしてもよい。ワクシニアウイルスによってコードされる様々なポリペ

10

20

30

40

50

チドは、そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、Roselら、1986、Goebelら、1990、およびGenbankアクセッション番号NC\_001559号を参照して同定される可能性がある。

【0112】

欠失変種は、天然または野生型蛋白質の一つまたはそれ以上の残基を欠損する。個々の残基を欠失させることができ、またはドメインの全てもしくは一部（触媒または結合ドメインのような）を欠失させることができる。終止コドンにコード核酸配列に導入して（置換または挿入によって）切断型蛋白質を作製してもよい。挿入変異体は典型的に、ポリペプチドにおいて末端でない点での材料の付加を含む。これには、免疫反応性エピトープまたは単なる一つもしくはそれ以上の残基の挿入が含まれてもよい。融合タンパク質と呼ばれる末端の付加も同様に作製してもよい。

10

【0113】

置換変種は典型的に、タンパク質内での一つまたはそれ以上の部位で一つのアミノ酸をもう一つのアミノ酸に交換することを含み、他の機能または特性を喪失して、または喪失せずに、ポリペプチドの一つまたはそれ以上の特性を調節するように設計してもよい。置換は保存的であってもよく、すなわち一つのアミノ酸が類似の形状および電荷を有するアミノ酸に置換されてもよい。保存的置換は当技術分野で周知であり、例えば、以下の変化が含まれる：アラニンからセリン；アルギニンからリジン；アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジン；アスパラギン酸からグルタミン酸；システインからセリン；グルタミンからアスパラギン；グルタミン酸からアスパラギン酸；グリシンからプロリン；ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミン；イソロイシンからロイシンまたはバリン；ロイシンからバリンまたはイソロイシン；リジンからアルギニン；メチオニンからロイシンまたはイソロイシン；フェニルアラニンからチロシン、ロイシンまたはメチオニン；セリンからトレオニン；トレオニンからセリン；トリプトファンからチロシン；チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニン；およびバリンからイソロイシンまたはロイシン。または、置換は、ポリペプチドの機能または活性が影響を受けるように非保存的であってもよい。非保存的置換は典型的に、極性または荷電アミノ酸を非極性または非荷電アミノ酸に置換することおよびその逆のような、一つ残基を化学的に異なる残基に置換することを含む。

20

【0114】

「機能的に同等なコドン」という用語は、本明細書において、アルギニンまたはセリンに関して6個のコドンのような同じアミノ酸をコードするコドンを目指すために用いられ、同様に生物学的に同等のアミノ酸をコードするコドンを目指す（下記の表1を参照されたい）。

30

【0115】

（表1）コドン表

アミノ酸			コドン					
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
システイン	Cys	C	UGC	UGU				
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU				
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG				
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU				
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU				
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
リジン	Lys	K	AAA	AAG				
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
メチオニン	Met	M	AUG					
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU				
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG				
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
トリプトファン	Trp	W	UGG					
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU				

## 【 0 1 1 6 】

同様に、アミノ酸および核酸配列には、さらなるN-もしくはC-末端アミノ酸または5'もしくは3'配列のような、さらなる残基が含まれてもよいと理解され、配列が、タンパク質発現が関係する生物タンパク質活性の維持を含む上記の基準を満たす限り、本明細書に開示の配列の一つであると本質的に記載されるであろう。末端配列の付加は、特にコード領域の5'もしくは3'部分のいずれかに隣接する様々な非コード配列が含まれてもよい、または様々な内部配列、すなわち遺伝子内で起こることがわかっているイントロンが含まれてもよい核酸配列に適用される。

## 【 0 1 1 7 】

以下は、同等の、または改善された第二世代分子を作製するためにタンパク質のアミノ酸を変化させることに基づく考察である。例えば、特定のアミノ酸は、例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位のような構造との相互作用的結合能を認識可能に喪失することなく、タンパク質構造における他のアミノ酸に置換してもよい。タンパク質の生物機能活性を定義するのはタンパク質の相互作用能および特性であることから、特定のアミノ酸置換をタンパク質配列、およびその基礎となるDNAコード配列に行ってもよく、それにもかかわらず、類似の特性を有するタンパク質を産生することができる。このように、下記のようにその生物学的利用率または活性を認識可能に喪失することなく、様々な変更をDNA配列に行ってもよいことは本発明者らによって企図される。表1は、特定のアミノ酸をコードするコドンを示す。

## 【 0 1 1 8 】

そのような変化を作製する場合、アミノ酸のハイドロパシー指数を検討してもよい。相互作用的生物機能をタンパク質に付与する際のハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当技術分野において一般的に理解されている (Kyte and Doolittle, 1982)。アミノ酸の相対的ハイドロパシー特徴は、得られたタンパク質の二次構造に關与して、次に、他の分子、例えば酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原等とのタンパク質の相互作用を定義することは容認されている。

## 【 0 1 1 9 】

同様に、親水性に基づいて、類似のアミノ酸の置換を有効に行うことができることは、当技術分野において理解されている。参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第

10

20

30

40

50

4,554,101号は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるように、タンパク質の最大の局所平均親水性がタンパク質の生物学的特性に相関することを述べている。米国特許第4,554,101号に詳細に記述しているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割付されている：アルギニン(+3.0)；リジン(+3.0)；アスパラギン酸(+3.0±1)；グルタミン酸(+3.0±1)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；トレオニン(-0.4)；プロリン(-0.5±1)；アラニン(-0.5)；ヒスチジン(-0.5)；システイン(-1.0)；メチオニン(-1.3)；バリン(-1.5)；ロイシン(-1.8)；イソロイシン(-1.8)；チロシン(-2.3)；フェニルアラニン(-2.5)；トリプトファン(-3.4)。

#### 【0120】

アミノ酸は、類似の親水性値を有するもう一つのアミノ酸に置換することができ、それでもなお生物学的に同等で免疫学的に同等のタンパク質を産生すると理解される。そのような変化において、その親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、および±0.5以内であるアミノ酸の置換がより特に好ましい。

#### 【0121】

先に概要したように、アミノ酸の置換は一般的に、アミノ酸側鎖の置換の相対的類似性、例えばその疎水性、親水性、電荷、大きさ等に基づいている。前述の様々な特徴を考慮に入れる例としての置換は、当業者に周知であり、これには：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシンが含まれる。

#### 【0122】

### III. 核酸分子

#### A. 天然のタンパク質または改変タンパク質をコードするポリヌクレオチド

本発明は、タンパク質またはポリペプチドの全てまたは一部を発現することができる、細胞から単離可能なポリヌクレオチドに関する。本発明のいくつかの態様において、これは、特定の機能的ウイルスポリペプチドを欠損するウイルスを作製するように特異的に変異させたウイルスゲノムに関する。ポリヌクレオチドは、ウイルスアミノ酸配列の全てもしくは一部を含むペプチドもしくはポリペプチドをコードしてもよく、またはそれらがそのようなウイルスポリペプチドをコードしないように、もしくは少なくとも一つの機能もしくは活性が低下、減少もしくは存在しないウイルスポリペプチドをコードするように操作してもよい。組換え型蛋白質は、活性なタンパク質を生じるように発現細胞から精製することができる。ゲノムは、ワクシニアウイルスのコード領域に関する定義と同様に、そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、Roselら、1986、Goebelら、1990、および/またはGenbankアクセッション番号NC\_00159号において認められる可能性がある。

#### 【0123】

本明細書において用いられるように、「DNAセグメント」という用語は、特定の種の全ゲノムDNAを含まずに単離されているDNA分子を指す。したがって、ポリペプチドをコードするDNAセグメントは、野生型、多形、または変異体ポリペプチドコード配列を含むが、なおも全哺乳類またはヒトゲノムDNAから単離された、またはそれらを含まずに精製されたDNAセグメントを指す。「DNAセグメント」という用語に含まれるのは、ポリペプチドまたはポリペプチド、ポリペプチドより小さいDNAセグメント、および例えばプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス等を含む組換え型ベクターである。

#### 【0124】

本出願において用いられるように、「ボックスウイルスポリヌクレオチド」という用語は、全ゲノム核酸を含まずに単離されているボックスウイルスポリペプチドをコードする核酸分子を指す。同様に、「ワクシニアウイルスポリヌクレオチド」は、全ゲノム核酸を含まずに単離されているワクシニアウイルスポリペプチドをコードする核酸を指す。「ボックスウイルスゲノム」または「ワクシニアウイルスゲノム」は、ヘルパーウイルスの存

10

20

30

40

50

在下または非存在下でウイルス粒子を生じるために宿主細胞に提供されうる核酸分子を指す。ゲノムは、野生型ウイルスと比較して組換えによって変異していてもしていなくてもよい。

【 0 1 2 5 】

「cDNA」という用語は、鋳型としてメッセンジャーRNA (mRNA) を用いて調製されたDNAを指すと意図される。ゲノムDNA、またはゲノム、非プロセッシングもしくは部分的プロセッシングRNA鋳型から重合化されたDNAとは対照的に、cDNAを用いる長所は、cDNAが主に対応するタンパク質のコード配列を含む点である。非コード領域が最適な発現にとって必要である場合、またはイントロンのような非コード領域がアンチセンス戦略において標的とされる場合のように、完全または部分的ゲノム配列が好ましい場合があってもよい。

10

【 0 1 2 6 】

同様に、所定の種からの特定のポリペプチドは、わずかに異なる核酸配列を有するが、それにもかかわらず同じタンパク質をコードする天然の変種によって表される可能性がある」と企図される(上記表1を参照されたい)。

【 0 1 2 7 】

同様に、単離または精製野生型または変異体ポリペプチド遺伝子を含むポリヌクレオチドは、野生型または変異体ポリペプチドコード配列および特定の局面において、他の天然に存在する遺伝子またはタンパク質コード配列から実質的に単離されている調節配列を含むDNAセグメントを指す。この局面において、「遺伝子」という用語は、機能的タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドコード単位(適切な転写、翻訳後改変、または局在にとって必要な任意の配列を含む)を指すために単純に用いられる。当業者に理解されるように、この機能的用語には、ゲノム配列、cDNA配列、ならびにタンパク質、ポリペプチド、ドメイン、ペプチド、融合タンパク質、および変異体を発現するまたは発現するように改変されてもよいより小さい遺伝子操作された遺伝子セグメントが含まれる。天然または改変ポリペプチドの全てまたは一部をコードする核酸は、以下の長さのそのようなポリペプチドの全てまたは一部をコードする隣接する核酸配列を含んでもよい: 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1095、1100、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、9000、10000個またはそれ以上のヌクレオチド、ヌクレオシドまたは塩基対。

20

30

【 0 1 2 8 】

特定の態様において、本発明は、そのアミノ酸配列において天然のポリペプチドに従う、または本質的に対応する隣接アミノ酸配列を含む野生型または変異体ポックスウイルスポリペプチドまたはペプチドをコードするDNA配列を組み入れる、単離されたDNAセグメントおよび組換え型ベクターに関する。このように、単離されたDNAセグメントまたはDNAセグメントを含むベクターは、例えば、TNF調節物質、またはTNF活性を阻害もしくは減少させるTNF調節ポリペプチドをコードしてもよい。「組換え型」という用語は、ポリペプチドまたは特定のポリペプチドの名称に関連して用いてもよく、これは一般的に、インビトロで操作されている、またはそのような分子の複製産物である核酸分子から産生されたポリペプチドを指す。

40

【 0 1 2 9 】

他の態様において、本発明は、そのアミノ酸配列においてポリペプチドに従うまたは本質的に対応する隣接アミノ酸配列を含むポリペプチドまたはペプチドをコードするDNA配列を組み入れた単離DNAセグメントおよび組換え型ベクターに関する。

【 0 1 3 0 】

50

本発明において用いられる核酸セグメントは、自身のコード配列の長さにかかわらず、その全長がかなり変化してもよいように、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、多クローニング部位、他のコードセグメント等のような他の核酸配列と組み合わせてもよい。したがって、ほぼ如何なる長さの核酸断片も用いてもよいが、全長は好ましくは調製の容易さおよび意図する組換えDNAセグメントプロトコールにおける用途によって制限されると企図される。

【0131】

本発明の核酸構築物は、任意の起源からの完全長ポリペプチドをコードしてもよく、またはコード領域の転写物が切断型を表すように、ポリペプチドの切断型、例えば切断型ワクシニアウイルスポリペプチドをコードしてもよいと企図される。次に、切断型転写物を切断型蛋白質に翻訳してもよい。または、核酸配列は、例えばポリペプチドの精製、輸送、分泌、翻訳後改変を行うために、またはターゲティングもしくは有効性のような治療利益を得るために、さらなる異種コード配列を有する完全長のポリペプチド配列をコードしてもよい。先に考察したように、「異種」が改変ポリペプチドと同じでなくてもよいポリペプチドを指す、タグまたは他の異種ポリペプチドを改変ポリペプチドコード配列に加えてもよい。

10

【0132】

非制限的な例において、B18R遺伝子のような特定の遺伝子と同一または相補的である隣接ヌクレオチド鎖を含む一つまたはそれ以上の核酸構築物を調製してもよい。核酸構築物は、酵母の人工染色体のような核酸構築物の到来が当業者に既知であることを考慮すると、長さが少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、15,000、20,000、30,000、50,000、100,000、250,000、500,000、750,000、少なくとも1,000,000ヌクレオチドであってもよいと共に、染色体の大きさまでおよび染色体の大きさを含む（中間の長さおよび中間の範囲の全てを含む）大きさがより大きい構築物であってもよい。本明細書において用いられるように「中間の長さ」および「中間の範囲」は、引用された値を含むまたはそのあいだの任意の長さまたは範囲（すなわち、そのような値を含むそのあいだの全ての整数）を意味する。

20

【0133】

本発明において用いられるDNAセグメントは、生物学的に機能的に同等の改変ポリペプチドおよびペプチドを含み、例えば改変ゲロニン毒素を含む。そのような配列は、核酸配列およびこのようにコードされるタンパク質内で天然に存在することが知られているコドン重複性および機能的同等性の結果として生じる可能性がある。または、置換されるアミノ酸の特性に関する検討に基づいてタンパク質構造の変化が操作される組換えDNA技術を応用することによって、機能的に同等のタンパク質またはペプチドを作製してもよい。ヒトによって設計された変化は、部位特異的変異誘発技術の応用によって、例えばタンパク質の抗原性を改善するために、タンパク質を投与される被験体にインビボでタンパク質の毒性効果を減少させるために、またはタンパク質を含む任意の治療の有効性を増加させるために、導入してもよい。

30

40

【0134】

特定の他の態様において、本発明は、その配列内に、本明細書において同定された（および/または参照として組み入れられた）配列において示されるものからの隣接核酸配列を含む単離DNAセグメントおよび組換え型ベクターに関する。しかし、そのような配列は、その活性が野生型に関して変化しているタンパク質産物を生じるように変異させてもよい。

【0135】

同様に、本発明は、これらの同定された配列の特定の核酸およびアミノ酸配列に限定されないと理解されるであろう。したがって、組換え型ベクターおよび単離DNAセグメントには、ポックスウイルスコード領域そのもの、基礎コード領域において選択された変更ま

50

たは改変を有するコード領域が多様に含まれてもよく、またはそれらはそれにもかかわらずボックスウイルスコード領域を含むより大きいポリペプチドをコードしてもよく、もしくは変種アミノ酸配列を有する生物学的機能的同等のタンパク質もしくはペプチドをコードしてもよい。

【0136】

本発明のDNAセグメントは、生物学的に機能的に同等のボックスウイルスタンパク質およびペプチドを含む。そのような配列は、核酸配列およびこのようにコードされたタンパク質において、天然に存在することが知られているコドン重複性および機能的同等性の結果として生じてもよい。または、機能的に同等のタンパク質またはペプチドは、置換されるアミノ酸の特性に関する検討に基づいて、タンパク質構造における変化を操作する組換えDNA技術の応用によって作製してもよい。例えば、タンパク質の抗原性を改善するために、人為的に設計された改変を部位特異的変異誘発技術の応用によって導入してもよい。

【0137】

B. ボックスウイルスポリヌクレオチドの変異誘発

様々な態様において、ボックスウイルスポリヌクレオチドを改変してもよくまたは変異誘発してもよい。改変または変異には、挿入、欠失、点突然変異、逆位等が含まれてもよく、それによって特定の経路または分子メカニズムの調節、活性化、および/または不活化と共に、特に遺伝子産物を非機能的にするような、遺伝子産物の機能、位置、または発現の変化が起こってもよい。用いられる場合、ボックスウイルスの全てまたは一部をコードするポリヌクレオチドの変異誘発は、多様な標準的な変異誘発技法によって行ってもよい (Sambrookら、1989)。変異は、それによって生物の量または構造に変化が起こるプロセスである。変異は、単一の遺伝子、遺伝子の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含みうる。単一の遺伝子における変化は、DNA配列内の一つのヌクレオチド塩基の除去、付加、もしくは置換を含む点突然変異の結果であってもよく、またはそれらは多数のヌクレオチドの挿入もしくは欠失を含む変化の結果であってもよい。

【0138】

変異は、化学的または物理的変異原物質に暴露後に誘発してもよい。そのような変異誘発物質には、電離放射線、紫外線、ならびにその全てが核酸と直接または間接的に(一般的に、いくつかの代謝性の生体返還後)相互作用することができるアルキル化剤および多環式芳香族炭化水素のような多様な化学物質が含まれる。そのような物質によって誘導されたDNA損傷によって、改変されたDNAが複製または修復される場合に塩基配列の改変が起こり、このように変異が起こる可能性がある。変異はまた、特定のターゲティング法を用いて部位特異的にすることができる。

【0139】

1. ランダム変異誘発

a) 挿入変異誘発

挿入変異誘発は、既知のDNA断片の挿入による遺伝子の不活化に基づく。これはいくつかのタイプのDNA断片の挿入を含むことから、生成された変異は一般的に、機能獲得変異よりはむしろ機能喪失変異である。しかし、機能獲得変異を生じる挿入にはいくつかの例がある。挿入的変異は細菌およびショウジョウバエ (Cooleyら、1988) において非常に成功しており、近年トウモロコシ (シロイヌナズナ (Arabidopsis; (Marksら、1991; Konczら、1990); およびキンギョソウ (Sommerら、1990) において強力なツールとなった。挿入変異誘発は、標準的な分子生物学技術を用いて行ってもよい。

【0140】

b) 化学的変異誘発

化学的変異誘発は、表現型の重症度が異なる広範な変異を発見する能力のような特定の長所を提供し、実施が容易で安価である。多数の化学的発癌物質がDNAにおいて変異を生じる。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ロトキシンB1は、細菌および哺乳類細胞においてGCからTAのトランスバージョンを引き起こす。ベンゾ[a]ピレンはまた、ATからTAのような塩基置換を生じうる。N-ニトロソ化合物は、GC

10

20

30

40

50

からATの転移を生じる。n-ニトロソウレアへの暴露によるチミンのO4位置でのアルキル化によって、TAからCGの転移が起こる。

【0141】

c) 放射線変異誘発

生体分子は電離放射線によって分解される。入射エネルギーの吸着によって、イオンおよびフリーラジカルの形成が起こり、いくつかの共有結合の切断が起こる。放射線障害に対する感受性は、分子間で、そして同じ分子であっても異なる結晶構造間で非常に多様であるように思われる。これは、総蓄積線量に依存し、同様に線量率にも依存する（フリーラジカルが存在する場合、それらが引き起こす分子の損傷はその本来の拡散速度およびこのようにリアルタイムに依存する）。損傷は、試料を可能な限り低温にすることによって減少および制御される。電離放射線は、一般的に線量率に比例してDNA損傷を引き起こす。

10

【0142】

本発明において、「電離放射線」という用語は、電離（電子の獲得または喪失）を生じるために十分なエネルギーを有するまたは十分なエネルギーを産生す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。例としてのそして好ましい電離放射線はx線である。所定の細胞または特定の分子にとって必要な電離放射線の量は、一般的にその細胞または分子の特性および変異標的の特性に依存する。放射線の有効線量を決定する手段は当技術分野で周知である。

【0143】

20

d) インビトロスキヤニング変異誘発

ランダム変異誘発はまた、誤りがちなPCRを用いて導入してもよい。変異誘発率は、鋳型の希釈液を含む多数の試験管においてPCRを行うことによって増加させてもよい。

【0144】

一つの特に有用な変異誘発技術は、タンパク質のコンフォメーションにおける大規模な混乱のリスクを最小限にして、側鎖の相互作用を失う効果を決定することができるように、多数の残基がアミノ酸アラニンに個々に置換されるアラニンスキヤン変異誘発である（Cunninghamら、1989）。

【0145】

インビトロスキヤニング飽和変異誘発は、以下を含む大量の構造機能情報を得る迅速な方法を提供する：(i) リガンド結合特異性を調節する残基の同定；(ii) 活性を保持するアミノ酸および所定の位置で活性を消失す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全体的な可塑性の評価；(iv) 結合の増加が得られるアミノ酸置換の同定。

30

【0146】

2. 部位特異的変異誘発

構造に従う部位特異的変異誘発は、タンパク質-リガンド相互作用を解剖して操作するための強力なツールである（Wells、1996；Braistedら、1996）。この技術は、選択されたDNAに一つまたはそれ以上のヌクレオチド配列を導入することによって配列変種の調製および試験を提供する。

40

【0147】

部位特異的変異誘発は、所望の変異のDNA配列をコードする特異的オリゴヌクレオチド配列のみならず、十分数の隣接する非改変ヌクレオチドを用いる。このようにして、プライマー配列に十分な大きさおよび複雑度が提供されて、横断される欠失接合部に安定な二本鎖を形成する。配列の接合部の両側の約5~10残基が改変されている長さが約17~25ヌクレオチドのプライマーが好ましい。

【0148】

技術は典型的に、一本鎖および二本鎖型の双方で存在するバクテリオファージベクターを用いる。部位特異的変異誘発において有用なベクターには、M13ファージのようなベクターが含まれる。これらのベクターは市販されており、その用途は一般的に当業者に周知

50

である。二本鎖プラスミドも同様に部位特異的変異誘発において日常的に用いられており、これらは対象遺伝子をファージからプラスミドに移入する段階を省略する。

【0149】

一般的に、まずその配列内に、所望のタンパク質もしくは遺伝子要素をコードするDNA配列を含む一本鎖ベクターを得て、または二本鎖ベクターの二つの鎖を融解する。次に、合成によって調製された所望の変異配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを、ハイブリダイゼーション条件を選択した場合のミスマッチの程度を考慮して、一本鎖DNA調製物とアニールする。ハイブリダイズした産物を、変異を有する鎖の合成を終結させるために、大腸菌ポリメラーゼIのようなDNAポリメラーゼ酵素に供する(クレノウ断片)。このように、一つの鎖が当初の非変異配列をコードして、第二の鎖が所望の変異を有するヘテロ二本鎖が形成される。このヘテロ二本鎖ベクターを用いて大腸菌細胞のような適当な宿主細胞を形質転換して、変異配列の配置を有する組換え型ベクターを含むクローンを選択する。

10

【0150】

タンパク質の所定の残基の機能的な重要性および情報内容量に関する包括的な情報は、その中で19個全てのアミノ酸置換を調べる飽和変異誘発によって最もよく得られうる。このアプローチの短所は、多残基飽和変異誘発のロジスティクスが圧倒的である点である(Warrenら、1996; Zengら、1996; Burton and Barbas、1994; Yeltonら、1995; Hiltonら、1996)。何百もの、そしておそらく何千もの部位特異的変異体を調べなければならない。しかし、改善された技術によって、変異体の産生および迅速なスクリーニングがはるかにより簡単となっている。同様に、「ウォークスルー」変異誘発に関する記述については、米国特許第5,798,208号および第5,830,650号を参照されたい。部位特異的変異誘発の他の方法は、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。

20

【0151】

C. ベクター

ポックスウイルスゲノムにおいて変異を作製するために、本来のそして改変されたポリペプチドは、ベクターに含まれる核酸分子によってコードされてもよい。「ベクター」という用語は、外因性の核酸配列が、それが複製されうる細胞に導入するために挿入される担体核酸分子を指すために用いられる。核酸配列は、ベクターが導入される細胞に対して異物であること、または配列は細胞における配列と相同であるが、配列が本来認められない宿主細胞内での位置に存在することを意味する「外因性」となりうる。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)、および人工染色体(例えば、YAC)が含まれる。当業者は、いずれも参照として本明細書に組み入れられる、Sambrookら(1989)およびAusubelら、1994に記述される標準的な組換え技術によってベクターを構築するために必要なものを十分に有するであろう。改変ゲノムのような改変されたポリペプチドをコードする他に、ベクターは、タグまたはターゲティング分子のような非改変ポリペプチド配列をコードしてもよい。そのような融合タンパク質をコードする有用なベクターには、pINベクター(Inouyeら、1985)、ヒスチジン鎖をコードするベクター、および後に精製および分離または切断するためのグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)可溶性融合タンパク質を作製するために用いられるpGEXベクターが含まれる。ターゲティング分子は、改変ポリペプチドを被験体の体における特定の臓器、組織、細胞、または他の位置に向ける分子である。

30

40

【0152】

「発現ベクター」という用語は、転写されうる遺伝子産物の少なくとも一部をコードする核酸配列を含むベクターを指す。場合によっては、次にRNA分子をタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳する。他の場合、これらの配列は、アンチセンス分子またはリボザイムの産生の際に翻訳されない。発現ベクターは、特定の宿主生物において機能的に結合したコード配列の転写およびおそらく翻訳にとって必要な核酸配列を指す多様な「制御配列」を含みうる。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

50

現ベクターは、他の機能も同様に供給し、下記の核酸配列を含んでもよい。

【0153】

1. プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は、そこで転写の開始および速度が制御される核酸配列の領域である。これは、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子のような、調節タンパク質および分子が結合する可能性がある遺伝子要素を含んでもよい。「機能的に配置された」、「機能的に結合した」、「制御下である」、および「転写制御下である」という句は、その配列の転写開始および/または発現を制御するために核酸配列に関してプロモーターが正確な機能的な位置および/または方向に存在することを意味する。プロモーターは、核酸配列の転写活性化に参与するシス作用調節配列を指す、「エンハンサー」と共に用いてもよく用いなくともよい。

10

【0154】

プロモーターは、コードセグメントおよび/またはエキソンの上流に存在する5'非コード配列を単離することによって得てもよいように、遺伝子または配列に天然に会合したプロモーターであってもよい。そのようなプロモーターは、「内因性」と呼ぶことができる。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに存在する核酸配列に天然に会合したエンハンサーであってもよい。または、特定の長所はその天然の環境において核酸配列に通常関連しないプロモーターを指す組換え型または異種プロモーターの制御下にコード核酸セグメントを配置することによって得られるであろう。組換え型または異種エンハンサーはまた、その天然の環境において核酸配列に通常関連しないエンハンサーも指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、および「天然に存在」しない、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変異を含むプロモーターまたはエンハンサーが含まれてもよい。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成によって産生する他に、配列は、本明細書に開示される組成物に関連してPCR(商標)を含む組み換えクローニングおよび/または核酸増幅技術を用いて産生してもよい(そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照されたい)。さらに、ミトコンドリア、葉緑素等のような核以外のオルガネラ内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用いることができると企図される。

20

30

【0155】

本来、発現のために選択された細胞タイプ、オルガネラ、および生物においてDNAセグメントの発現を有効に指示するプロモーターおよび/またはエンハンサーを用いることは重要であるかも知れない。分子生物学の当業者は、タンパク質を発現させるためにプロモーター、エンハンサー、および細胞タイプの組み合わせを用いることを一般的に承知しており、例えば、参照として本明細書に組み入れられる、Sambrookら(1989)を参照されたい。用いられるプロモーターは、組換え型蛋白質および/またはペプチドの大規模産生において都合がよいように、構成的、組織特異的、誘導型および/または導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指示するための適当な条件下で有用であってもよい。プロモーターは異種または内因性であってもよい。

40

【0156】

表2は、遺伝子の発現を調節するために本発明の状況において用いてもよいいくつかの要素/プロモーターを記載する。この一覧は、発現の促進に参与する起こりうる全ての要素を網羅することを意図しておらず、単なる例に過ぎない。表3は、特異的刺激に反応して活性化することができる核酸配列の領域である誘導型要素の例を提供する。

【0157】

(表2)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 <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> ; 1990
免疫グロブリン軽鎖	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T細胞受容体	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> ; 1990
HLA DQ $\alpha$ および / または DQ $\beta$	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
$\beta$ -インターフェロン	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
インターロイキン-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
インターロイキン-2 受容体	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHC クラス II 5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHC クラス II HLA-DR $\alpha$	Sherman <i>et al.</i> , 1989
$\beta$ -アクチン	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> ; 1989
筋クレアチンキナーゼ (MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
プレアルブミン (トランスチレティン)	Costa <i>et al.</i> , 1988

10

20

プロモーター/エンハンサー	参考文献
エラスターゼI	Omitz <i>et al.</i> , 1987
メタロチオネイン(MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
コラゲナーゼ	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987
アルブミン	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
$\alpha$ -フェトプロテイン	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
$\gamma$ -グロビン	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
$\beta$ -グロビン	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
インスリン	Edlund <i>et al.</i> , 1985
神経細胞接着分子 (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990
$\alpha_1$ -アンチトリペイン	Latimer <i>et al.</i> , 1990
H2B (TH2B) ヒストン	Hwang <i>et al.</i> , 1990
マウスおよび/またはタイプIコラーゲン	Ripe <i>et al.</i> , 1989
グルコース調節タンパク質 (GRP94 および GRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
ラット成長ホルモン	Larsen <i>et al.</i> , 1986
ヒト血清アミロイドA (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
トロポニン I (TN I)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989
血小板由来増殖因子 (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleight <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
ポリオーマ	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell <i>et al.</i> , 1988

10

20

30

プロモーター/ エンハンサー	参考文献
レトロウイルス	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicsek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Chol <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989
乳頭腫ウイルス	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusky <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987
B型肝炎ウイルス	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
ヒト免疫不全ウイルス	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspia <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
サイトメガロウイルス (CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foecking <i>et al.</i> , 1986
テナガザル白血病ウイルス	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

10

20

【 0 1 5 8 】

( 表 3 ) 誘導型要素

要素	誘導物質	参考文献
MT II	ホルボルエステル (TFA) 重金属	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987, Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeill <i>et al.</i> , 1989
MMTV (マウス乳腺腫瘍ウイルス)	グルココルチコイド	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
$\beta$ -インターフェロン	ポリ(rI)x ポリ(rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
アデノウイルス 5 E2	E1A	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
コラゲナーゼ	ホルボルエステル (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
ストロメリン	ホルボルエステル (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
SV40	ホルボルエステル (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
マウス 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 <i>et al.</i> , 1988
GRP78 遺伝子	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
$\alpha$ -2-マクログロブリン	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
ビメンチン	血清	Rittling <i>et al.</i> , 1989
MHC クラス I 遺伝子 H-2 $\kappa$ b	インターフェロン	Blonar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	E1A, SV40 ラージ T 抗原	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
プロリフェリン	ホルボルエステル -TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
腫瘍壊死因子	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
甲状腺刺激ホルモン $\alpha$ 遺伝子	甲状腺ホルモン	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

## 【 0 1 5 9 】

組織特異的プロモーターまたは要素の同一性は、その活性の特徴を調べるアッセイと共に、当業者に周知である。そのような領域の例には、ヒトLIMK2遺伝子 (Nomotoら、1999)、ソマトスタチン受容体2遺伝子 (Krausら、1998)、マウス精巢上体レチン酸結合遺伝子 (Lareyreら、1999)、ヒトCD4 (Zhao-Emonetら、1998)、マウス 2 (XI) コラーゲン (Tsumakiら、1998)、D1Aドーパミン受容体遺伝子 (Leeら、1997)、インスリン様増殖因子II (Wuら、1997)、ヒト血小板内皮細胞接着分子-1 (Almendroら、1996)、およびSM 22 プロモーターが含まれる。

## 【 0 1 6 0 】

デクチン-1およびデクチン-2プロモーターも同様に、本発明において有用であると企図される。本発明と共に用いることができるさらなるウイルスプロモーター、細胞プロモーター/エンハンサーおよび誘導型プロモーター/エンハンサーを、表2および3に記載する。さらに、任意のプロモーター/エンハンサーの組み合わせ (真核細胞プロモーターデータベースEPDBによる) も同様に、オリゴ糖プロセッシング酵素、タンパク質折りたたみ補助タンパク質、選択マーカータンパク質、または対象異種タンパク質をコードする構造遺伝

子の発現を促進するために用いることができるであろう。または、癌の遺伝子治療のため（表4）および腫瘍のターゲティングのため（表5）の組織特異的プロモーターを、本発明の核酸分子と共に用いてもよい。

## 【0161】

（表4）癌の遺伝子治療の候補となる組織特異的プロモーター

組織特異的プロモーター	プロモーターが活性である癌	プロモーターが活性である正常細胞
癌胎児抗原 (CEA)*	ほとんどの結腸直腸癌； 肺癌の 50%；胃癌の 40-50%； ほとんどの膵臓癌；多くの乳癌	結腸粘膜；胃粘膜；肺上皮； エクリン汗腺； 精巣の細胞
前立腺特異抗原 (PSA)	ほとんどの前立腺癌	前立腺上皮
血管活性腸管ペプチド (VIP)	大多数の肺非小細胞癌	ニューロン；リンパ球；肥満細胞； 好酸球
界面活性プロテイン A (SP-A)	多くの肺線癌細胞	Ⅱ型肺細胞；クララ細胞
ヒトアカエテ-スキュート相同体 (hASH)	ほとんどの肺小細胞癌	肺における神経内分泌細胞
ムチン-1 (MUC1)**	ほとんどの腺癌 (任意の組織由来)	乳房および呼吸器、消化管、 および尿生殖器官の線上皮細胞
α-フェトプロテイン	ほとんどの肝細胞癌； おそらく多くの精巣癌	肝細胞 (特定の条件下)；精巣
アルブミン	ほとんどの肝細胞癌	肝細胞
チロシナーゼ	ほとんどの黒色腫	メラニン細胞；星状細胞；シュワン細胞；いくつかのニューロン
チロシン結合タンパク質 (TRP)	ほとんどの黒色腫	メラニン細胞；星状細胞；シュワン細胞；いくつかのニューロン
ケラチン 14	おそらく多くの扁平上皮癌 (例えば頭頸部癌)	ケラチノサイト
EBV LD-2	多くの頭頸部扁平上皮癌	上部消化管のケラチノサイト
神経膠線維酸性タンパク質 (GFAP)	多くの星状細胞腫	星状細胞
ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)	多くの神経膠腫	乏突起神経膠細胞
精巣特異的アンジオテンシン変換酵素 (精巣特異的 ACE)	おそらく多くの精巣癌	精子
オステオカルシン	おそらく多くの骨肉腫	骨芽細胞

10

20

30

## 【0162】

（表5）腫瘍の組織特異的ターゲティングに用いられる候補プロモーター

プロモーター	プロモーターが活性である癌	プロモーターが活性である正常細胞
E2F 調節プロモーター	ほとんど全ての癌	増殖しつつある細胞
HLA-G	多くの結腸直腸癌； 多くの黒色腫； おそらく多くの他の癌	リンパ球；単球；精母細胞； トロホプラスト
FasL	ほとんどの黒色腫； 多くの膵臓癌； ほとんどの星状細胞腫； おそらく多くの他の癌	活性化白血球；ニューロン； 内皮細胞；ケラチノサイト； 免疫特権組織の細胞； 肺、卵巣、肝臓、および 前立腺におけるいくつかの細胞
Myc 調節プロモーター	ほとんどの肺癌（小細胞癌および 非小細胞の双方）； ほとんどの結腸直腸癌	増殖しつつある細胞（いくつかの 細胞タイプのみ）； 乳腺上皮細胞（非増殖を含む）
MAGE-1	多くの黒色腫；いくつかの肺の 非小細胞癌；いくつかの乳癌	精巣
VEGF	全ての癌の <b>70%</b> (多くの癌において構成的に 過剰発現)	血管新生部位での細胞 (しかし、腫瘍とは異なり、 発現は一過性で、強くなく、 決して構成的ではない)
bFGF	<b>bFGF</b> 発現は虚血状態で 誘導されることから、おそらく 多くの異なる癌	虚血部位での細胞（しかし 腫瘍とは異なり、発現は一過性で、 強くなく、決して構成的ではない）
COX-2	ほとんどの結腸直腸癌； 多くの肺癌；おそらく多くの 他の癌	炎症部位での細胞
IL-10	ほとんどの結腸直腸癌； 多くの肺癌； 多くの頭頸部扁平上皮癌； おそらく多くの他の癌	白血球
GRP78/BiP	<b>GRP7S</b> の発現は腫瘍特異的条件 によって誘導されることから、 おそらく多くの異なる癌	虚血部位での細胞
Egr-1 からの CarG 要素	電離放射線によって誘導される ので、放射線照射による ほとんどの腫瘍が考えられる	電離放射線に曝露された細胞； 白血球

10

20

30

## 【 0 1 6 3 】

## 2. 開始シグナルおよびリボソーム内部認識部位

特異的開始シグナルも同様に、コード配列の効率的な翻訳にとって必要であるかも知れない。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因性の翻訳制御シグナルを提供する必要があるかも知れない。当業者は、容易にこれを決定して、必要なシグナルを提供することができるであろう。開始コドンは、インサート全体の翻訳を確実にするために所望のコード配列の読み取り枠と「フレームが一致して」いなければならない。外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは天然または合成のいずれかとなりうる。発現効率は、適当な転写エンハンサー要素を含めることによって増強してもよい。

## 【 0 1 6 4 】

本発明の特定の態様において、リボソーム内部認識配列（IRES）要素を用いることは、

40

50

多遺伝子の、または多シストロン性のメッセージを作製するために用いられる。IRES要素は、5'-メチル化Cap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することができる (Pelletier and Sonenberg, 1988)。ピコルナウイルス科の二つのメンバー (ポリオおよび脳心筋炎ウイルス) からのIRES要素 (Pelletier and Sonenberg, 1988) と共に、哺乳類のメッセージからのIRES (Macejak and Sarnow, 1991) が記述されている。IRES要素は、異種オープンリーディングフレームに結合させることができる。それぞれがIRESによって隔てられた多数のオープンリーディングフレームを共に転写することができ、多シストロン性メッセージを作製することができる。IRES要素によって、それぞれのオープンリーディングフレームは、効率的な翻訳のためにリボソームにアクセス可能である。単一のプロモーター/エンハンサーを用いて、単一のメッセージを転写するために、多数の遺伝子を効率よく発現させることができる (参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,925,565号および第5,935,819号を参照されたい)。

10

【0165】

### 3. 多クローニング部位

ベクターには、多数の制限酵素部位を含む核酸領域であって、そのいずれもがベクターを消化するために標準的な組換え技術と共に用いることができる多クローニング部位 (MCS) が含まれる。(参照として本明細書に組み入れられる、Carbonelliら、1999、Levensonら、1998、およびCocea、1997を参照されたい)。「制限酵素消化」は、核酸分子における特定の位置に限って機能する酵素によって核酸分子を触媒的に切断することを指す。これらの制限酵素の多くは市販されている。そのような酵素を用いることは当業者に広く理解されている。しばしば、ベクターは、外因性の配列をベクターにライゲーションできるように、MCS内で切断する制限酵素を用いて直線または断片にする。「ライゲーション」とは、互いに隣接してもしなくてもよい二つの核酸断片のあいだのホスホジエステル結合を形成するプロセスを指す。制限酵素およびライゲーション反応を含む技術は、組換え技術の当業者に周知である。

20

【0166】

### 4. スプライシング部位

ほとんどの転写された真核細胞RNA分子は、一次転写物からイントロンを除去するためにRNAスプライシングを受けるであろう。ゲノム真核細胞配列を含むベクターは、タンパク質発現のために転写物の適切なプロセッシングを確実にするためにドナーおよび/またはアクセプタースプライシング部位を必要とする可能性がある (参照として本明細書に組み入れられる、Chandlerら、1997を参照されたい)。

30

【0167】

### 5. 終結シグナル

本発明のベクターまたは構築物は一般的に、少なくとも一つの終結シグナルを含むであろう。「終結シグナル」または「ターミネータ」は、RNAポリメラーゼによってRNA転写物の特異的終結に関係するDNA配列を含む。このように、特定の態様において、RNA転写物の産生で終結する終結シグナルが企図される。ターミネータは、所望のメッセージレベルを得るためにインピボが必要となる可能性がある。

【0168】

40

真核細胞系において、ターミネータ領域はまた、ポリアデニル化部位を曝露するために、新しい転写物の部位特異的切断を可能にする特異的DNA配列を含んでもよい。これは、転写物の3'末端に約200 A残基 (ポリA) の枝を付加するように専門的な内因性ポリメラーゼにシグナルを送る。このポリAテールによって改変されたRNA分子は、より安定でより効率的に翻訳されるように思われる。このように、真核細胞を含む他の態様において、ターミネータは、RNAの切断のためのシグナルを含むことが好ましく、ターミネータシグナルは、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。ターミネータおよび/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強して、および/または他の配列へのカセットから読み過ぎしを最小限にするように作用しうる。

【0169】

50

本発明において用いることが企図されるターミネータは、例えばウシ成長ホルモンターミネータまたはウイルス終結配列、例えばSV40ターミネータのような遺伝子の終結配列が含まれるがこれらに限定されない、本明細書に記述のまたは当業者に既知の任意の既知の転写ターミネータが含まれる。特定の態様において、終結シグナルは、配列の切断によるような、転写可能なまたは翻訳可能な配列の欠如であってもよい。

【0170】

#### 6. ポリアデニル化シグナル

発現において、特に真核細胞発現において、典型的に、転写物の適当なポリアデニル化を行うためにポリアデニル化シグナルを含めるであろう。ポリアデニル化シグナルの特性は、本発明の実践の成功にとって重要ではないと考えられ、および/またはそのような如何なる配列を用いてもよい。好ましい態様には、様々な標的細胞において都合がよく、および/または十分に機能することがわかっている、SV40ポリアデニル化シグナルおよび/またはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルが含まれる。ポリアデニル化は、転写物の安定性を増加させる可能性があり、または細胞質輸送を促進する可能性がある。

【0171】

#### 7. 複製開始点

宿主細胞においてベクターを増殖させるために、ベクターは、複製が開始される特異的核酸配列である一つまたはそれ以上の複製開始部位（しばしば「ori」と呼ばれる）を含んでもよい。または、宿主細胞が酵母である場合、自律的に複製する配列（ARS）を用いることができる。

【0172】

#### 8. 選択およびスクリーニング可能なマーカー

本発明の特定の態様において、本発明の核酸構築物を含む細胞は、発現ベクターにマーカーを含めることによってインピトロまたはインピボで同定してもよい。そのようなマーカーは、細胞に対して同定可能な変更を付与して、発現ベクターを含む細胞の容易な同定を可能にするであろう。一般的に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するマーカーである。陽性選択マーカーは、マーカーが存在することによって選択が可能となるマーカーであり、陰性選択マーカーは、マーカーが存在することによってその選択が妨害されるマーカーである。陽性選択マーカーの例は、薬物耐性マーカーである。

【0173】

通常、薬物選択マーカー、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ヒグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する抵抗性を付与する遺伝子を含めることは、形質転換体のクローニングおよび同定に役立つ。条件の実行に基づいて形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーの他に、その基礎が比色分析であるGFPのようなスクリーニング可能なマーカーを含む他のタイプのマーカーも同様に企図される。または、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（tk）またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）のようなスクリーニング可能な酵素を用いてもよい。当業者は同様に、おそらくFACS分析に関連して免疫学的マーカーを用いる方法を承知しているであろう。用いられるマーカーは、それが遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現されうる限り、重要ではないと考えられる。選択およびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

【0174】

#### D. 宿主細胞

本明細書において用いられるように、「細胞」、「細胞株」および「細胞培養物」という用語は、互換的に用いてもよい。これらの用語には全て、任意のそして全てのその後の世代であるその子孫が含まれる。全ての子孫は、故意のまたは偶発的な変異により同一ではない可能性があるとして理解される。異種核酸配列を発現する状況において、「宿主細胞」は、原核細胞または真核細胞を指し、これにはベクターを複製することができる、および/またはベクターによってコードされる異種遺伝子を発現することができる任意の形質転換可能な生物が含まれる。宿主細胞は、ベクターまたはウイルスのレシピエントとして用

10

20

30

40

50

いられうる、または用いられている（それが外因性のポリペプチドを発現しなければベクターとしての資格を与えない）。宿主細胞は、改変タンパク質コード配列のような外因性の核酸が宿主細胞に移入または導入されるプロセスを指す、「トランスフェクト」、または「形質転換」されてもよい。形質転換された細胞には、第一義的被験細胞およびその子孫が含まれる。

【0175】

宿主細胞は、所望の結果がベクターの複製であるか、またはベクターコード核酸配列の一部もしくは全ての発現であるかに応じて、酵母細胞、昆虫細胞、および哺乳類細胞を含む原核細胞または真核細胞に由来してもよい。多数の細胞株および培養物が、宿主細胞として用いるために利用可能であり、それらは、生きている培養物および遺伝子材料の保管庫としての役割を有する機構であるアメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）（[www.atcc.org](http://www.atcc.org)）を通して得ることができる。適当な宿主細胞は、ベクター骨格および所望の結果に基づいて当業者が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多くのベクターの複製のために原核宿主細胞に導入することができる。ベクター複製および/または発現のための宿主細胞として用いられる細菌細胞には、DH5<sup>+</sup>、JM109、およびKC8と共に、SURE（登録商標）コンピテント細胞およびSOLOPACK（商標）ゴールド細胞（STRATAGENE（登録商標）、ラホヤ、カリフォルニア州）のような多くの市販の細菌宿主が含まれる。または、大腸菌LE392のような細菌細胞を、ファージウイルスの宿主細胞として用いることができるであろう。適当な酵母細胞には、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、サッカロミセス・ポンベ（*Saccharomyces pombe*）、およびピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）が含まれる。

【0176】

ベクターの複製および/または発現のための真核宿主細胞の例には、HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos、およびPC12が含まれる。様々な細胞タイプおよび生物からの多くの宿主細胞が利用可能であり、当業者に既知であろう。同様に、特にベクターの複製または発現にとって許容されるウイルスベクターを真核または原核宿主細胞のいずれかと共に用いてもよい。

【0177】

いくつかのベクターは、原核細胞および真核細胞の双方において複製および/または発現されることを可能にする制御配列を用いてもよい。当業者はさらに、それらを維持してベクターの複製を可能にするために上記の宿主細胞の全てをインキュベートする条件をさらに理解するであろう。同様に、ベクターの大規模産生のみならず、ベクターによってコードされる核酸およびその同源のポリペプチド、タンパク質、またはペプチドの産生を可能にする技術および条件も理解され、知られている。

【0178】

E. 発現系

上記の組成物の少なくとも一部または全てを含む多数の発現系が存在する。原核細胞および/または真核細胞に基づく系を、核酸配列またはその同源のポリペプチド、タンパク質、およびペプチドを産生するために本発明と共に用いることができる。多くのそのような系は市販され、広く利用されている。

【0179】

昆虫細胞/バキュロウイルス系は、いずれも参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,871,986号、第4,879,236号に記述されるように、異種核酸セグメントのタンパク質発現の高レベルを産生することができ、それらは例えばINVITROGEN（登録商標）社のMAXBAC（登録商標）2.0、およびCLONTECH（登録商標）社のBACPACK（商標）バキュロウイルス発現系の商標で購入することができる。

【0180】

本発明の開示された発現系の他に、他の発現系の例には、合成エクジソン誘導受容体を含むSTRATAGENE（登録商標）社のCOMPLETE CONTROL（商標）誘導型哺乳類発現系、またはそのpET発現系、大腸菌発現系が含まれる。誘導型発現系のもう一つの例は、完全長のCMV

10

20

30

40

50

プロモーターを利用する誘導型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)システムを有するINVITROGEN(登録商標)社から入手可能である。INVITROGEN(登録商標)社はまた、メチロトロフィック酵母であるピチア・メタノリカ(*Pichia methanolica*)における組換え型蛋白質の高レベル産生のために設計されたピチア・メタノリカ発現系と呼ばれる酵母発現系も提供する。当業者は、核酸配列、またはその同源のポリペプチド、タンパク質、もしくはペプチドを産生するために、発現構築物のようなベクターを発現させる方法を承知しているであろう。

#### 【0181】

##### F. 核酸の検出

ボックスウイルスタンパク質、ポリペプチド、および/またはペプチドの発現を指示するために用いられる他に、本明細書に開示の核酸配列は、多様な他の用途を有する。例えば、それらは、核酸ハイブリダイゼーションを含む態様に関してプローブまたはプライマーとして有用性を有する。それらは、本発明の診断またはスクリーニング法において用いてもよい。ボックスウイルスまたはボックスウイルスポリペプチド調節物質をコードする核酸の検出は本発明に含まれる。

#### 【0182】

##### 1. ハイブリダイゼーション

長さが13~100ヌクレオチド、好ましくは17~100ヌクレオチド、または本発明のいくつかの局面において長さが1~2キロベースもしくはそれ以上のプローブまたはプライマーを用いることによって、安定かつ選択的な二本鎖分子が形成される。長さが20塩基より大きい隣接する枝に対して相補的配列を有する分子は、得られたハイブリッド分子の安定性および/または選択性を増加させるために一般的に好ましい。一般的に20~30ヌクレオチド、または望ましい場合にはそれより長い一つまたはそれ以上の相補的配列を有する核酸分子をハイブリダイゼーションのために設計することが好まれるであろう。そのような断片は、例えば化学的手段によって断片を直接合成することによって、または選択した配列を組換え産生のために組換えベクターに導入することによって、容易に調製されるであろう。

#### 【0183】

したがって、本発明のヌクレオチド配列は、DNAおよび/またはRNAの相補鎖による二本鎖分子の選択的形成能のために、または試料からDNAもしくはRNAの増幅のためのプライマーを提供するために用いてもよい。想像される応用に応じて、標的配列に関するプローブまたはプライマーの多様な程度の選択性を得るために、多様なハイブリダイゼーション条件を用いることが望まれるであろう。

#### 【0184】

高い選択性を必要とする応用の場合、典型的に比較的高いストリンジェンシー条件を用いてハイブリッドを形成することが望まれるであろう。例えば、温度約50~約70で約0.02M~約0.10M NaClによって提供されるように、比較的低い塩濃度および/または高い温度条件。そのような高ストリンジェンシー条件は、あるとしてもプローブまたはプライマーと鋳型または標的鎖とのミスマッチをほとんど認容せず、特異的遺伝子を単離するために、または特異的mRNA転写物を検出するために特に適しているであろう。一般的に、条件は、ホルムアミドの増加量を加えることによってよりストリンジェントにすることができる。

#### 【0185】

特定の応用に関して、例えば部位特異的変位誘発の場合、より低いストリンジェンシー条件が好ましいことが認識されている。これらの条件では、ハイブリダイズする鎖が完全には相補的でないが、一つまたはそれ以上の位置でミスマッチを有する場合でも、ハイブリダイゼーションが起こる可能性がある。塩濃度を増加させることによって、および/または温度を低下させることによって条件をよりストリンジェントでないようにしてもよい。例えば、中間のストリンジェンシー条件は、温度約37~約55で約0.1~0.25M NaClによって提供されうるが、低ストリンジェンシー条件は、温度範囲約20~約55で約0.

10

20

30

40

50

15M ~ 約0.9Mの塩濃度によって提供されうるであろう。ハイブリダイゼーション条件は、所望の結果に応じて容易に操作することができる。

【0186】

他の態様において、ハイブリダイゼーションは、例えば、温度約20 ~ 約37 で50mM トリス塩酸 (pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、1.0mMジチオスレイトールの条件で行ってもよい。利用される他のハイブリダイゼーション条件には、温度範囲が約40 ~ 約72 で約10mM トリス塩酸 (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>が含まれうるであろう。

【0187】

特定の態様において、ハイブリダイゼーションを決定するための標識のような適当な手段と組み合わせて本発明の既定の配列の核酸を用いることが都合がよいであろう。蛍光、放射活性、酵素、またはアビジン/ビオチンのような他のリガンドを含む、検出されうる広範な適当な指標手段が当技術分野で既知である。好ましい態様において、放射活性または他の環境的に望ましくない試薬の代わりに、蛍光標識またはウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、もしくはペルオキシダーゼのような酵素タグを用いることが望まれるかも知れない。酵素タグの場合、相補的核酸含有試料との特異的ハイブリダイゼーションを同定するために肉眼的または分光光度法によって検出可能である検出手段を提供するために用いることができる、比色指標基質が知られている。

【0188】

一般的に、本明細書に記述のプローブまたはプライマーは、PCR (商標) の場合のように対応する遺伝子の発現を検出するための溶液ハイブリダイゼーションにおける試薬としてのみならず、固相を用いる態様においても有用であろう。固相を含む態様において、試験DNA (またはRNA) を、選択されたマトリクスまたは表面上に吸着またはそうでなければ固定する。次に、この固定された一本鎖核酸を、所望の条件で、選択したプローブとハイブリダイズさせる。選択する条件は、特定の状況に依存するであろう (例えば、G+C含量、標的核酸のタイプ、核酸の起源、ハイブリダイゼーションプローブの大きさ等に応じて)。対象となる特定の応用に関するハイブリダイゼーション条件の最適化は当業者に周知である。非特異的結合プローブ分子を除去するためにハイブリダイズした分子を洗浄後、結合標識量を決定することによって、ハイブリダイゼーションを検出、および/または定量する。代表的な固相ハイブリダイゼーション法は、米国特許第5,843,663号、第5,900,481号、および第5,919,626号に開示される。本発明の実践において用いてもよい他のハイブリダイゼーション法は、米国特許第5,849,481号、第5,849,486号、および第5,851,772号に開示される。明細書の本章において同定されたこれらおよび他の参考文献の関連する部分は、参照として本明細書に組み入れられる。

【0189】

## 2. 核酸の増幅

増幅の鋳型として用いられる核酸は、標準的な方法論に従って (Sambrookら、1989) 細胞、組織、または他の試料から単離してもよい。特定の態様において、鋳型核酸を実質的に精製することなく、細胞全体もしくは組織ホモジネート、または生体液試料について分析を行う。核酸は、ゲノムDNAまたは分画もしくは全細胞RNAであってもよい。RNAを用いる場合、まずRNAを相補的DNAに変換することが望ましいかも知れない。

【0190】

本明細書において用いられる「プライマー」という用語は、鋳型依存的プロセスにおいて新生核酸の合成をプライミングすることができる任意の核酸を含むことを意味する。典型的に、プライマーは、長さが10 ~ 20および/または30塩基対のオリゴヌクレオチドであるが、より長い配列を用いることができる。プライマーは二本鎖および/または一本鎖型で提供してもよいが、一本鎖型が好ましい。

【0191】

本明細書において同定された遺伝子の配列に対応する核酸と選択的にハイブリダイズするように設計されたプライマー対を、選択的ハイブリダイゼーションを許容する条件で鋳型核酸に接触させる。所望の応用に応じて、プライマーと完全に相補的である配列とのハ

10

20

30

40

50

イブリダイゼーションに限って可能にする高ストリンジェンシー条件を選択してもよい。他の態様において、ハイブリダイゼーションは、プライマー配列と一つまたはそれ以上のミスマッチを含む核酸の増幅を可能にするためにより低いストリンジェンシー条件で行ってもよい。ハイブリダイズした後、鋳型プライマー複合体を、鋳型依存的核酸合成を促進するために一つまたはそれ以上の酵素に接触させる。増幅産物の十分量が産生されるまで、「サイクル」とも呼ばれる多数回の増幅ラウンドを行う。

【0192】

増幅産物は、検出または定量してもよい。特定の応用において、検出は視覚的手段によって行ってもよい。または検出は、化学発光、組み入れた放射標識の放射活性シンチグラフィもしくは蛍光標識、または電気および/または熱衝撃シグナルを用いる系による産物の間接的な同定を含んでもよい (Bellus、1994)。

10

【0193】

所定の鋳型試料に存在するオリゴヌクレオチド配列を増幅するために、多くの鋳型依存的プロセスが利用できる。最もよく知られている増幅法の一つは、そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、および第4,800,159号ならびにInnisら、1988に詳細に記載されるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR (商標) と呼ばれる) である。

【0194】

逆転写酵素PCR (商標) 増幅技法は、増幅されたmRNAの量を定量するために行ってもよい。RNAをcDNAに逆転写する方法は周知である (Sambrookら、1989を参照されたい)。逆転写酵素に関するもう一つの方法は、熱安定DNAポリメラーゼを利用する。これらの方法は、国際公開公報第90/07641号に記載されている。ポリメラーゼ連鎖反応方法論は、当技術分野で周知である。代表的なRT-PCR法は米国特許第5,882,864号に記載されている。

20

【0195】

もう一つの増幅法は、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、欧州特許出願第320 308号に開示されるリガーゼ連鎖反応 (「LCR」) である。米国特許第4,883,750号は、標的配列にプローブ対を結合させるためにLCRと類似の方法を記述している。米国特許第5,912,148号に開示されるPCR (商標) およびオリゴヌクレオチドリガーゼアッセイ (OLA) に基づく方法も同様に用いてもよい。

【0196】

本発明の実践において用いてもよい標的核酸配列を増幅するもう一つの方法は、そのそれぞれの全文が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,843,650号、第5,846,709号、第5,846,783号、第5,849,546号、第5,849,497号、第5,849,547号、第5,858,652号、第5,866,366号、第5,916,776号、第5,922,574号、第5,928,905号、第5,928,906号、第5,932,451号、第5,935,825号、第5,939,291号、および第5,942,391号、英国特許出願第2 202 328号、ならびにPCT出願番号PCT/US89/01025号に開示されている。

30

【0197】

PCT出願PCT/US87/00880号に記載されるQ レプリカーゼも同様に、本発明における増幅法として用いてもよい。この方法において、標的の領域と相補的である領域を有するRNAの複製配列を、RNAポリメラーゼの存在下で試料に加える。ポリメラーゼは複製配列をコピーして、次にこれを検出してもよい。

40

【0198】

制限部位の一つの鎖にヌクレオチド5'-[ -チオ]-三リン酸を含む標的分子の増幅を得るために制限酵素とリガーゼとを用いる等温増幅法もまた、本発明において核酸を増幅するために有用となる可能性がある (Walkerら、1992)。米国特許第5,916,779号に開示される鎖置換増幅 (SDA) は、鎖の置換および合成のラウンド、すなわちニックトランスレーションを多数回含む核酸の等温増幅を行うためのもう一つの方法である。

【0199】

他の核酸増幅法には、核酸配列に基づく増幅 (NASBA) および3SR (その全文が参照として本明細書に組み入れられる、Kwohら、1989; PCT出願国際公開公報第88/10315号) を含

50

む、転写に基づく増幅システム（TAS）が含まれる。欧州特許出願第329 822号は、本発明に従って用いてもよい一本鎖RNA（「ssRNA」）、ssDNA、および二本鎖DNA（dsDNA）を繰り返し合成することを含む核酸増幅プロセスを開示している。

【0200】

PCT出願国際公開公報第89/06700号（その全文が参照として本明細書に組み入れられる）は、標的一本鎖DNA（「ssDNA」）に対するプロモーター領域/プライマー配列のハイブリダイゼーション後に配列の多くのRNAコピーの転写を行うことに基づく核酸増幅スキームを開示している。このスキームは繰り返しではなく、すなわち得られたRNA転写物から新しい鋳型が産生されるのではない。他の増幅法には、「RACE」および「片側PCR」（Frohman、1990；Oharaら、1989）が含まれる。

10

【0201】

### 3. 核酸の検出

任意の増幅の後、鋳型および/または過剰のプライマーから増幅産物を分離することが望ましいかも知れない。一つの態様において、増幅産物は、標準的な方法（Sambrookら、1989）を用いてアガロース、アガロース-アクリルアミド、またはポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離される。分離された増幅産物を、さらに操作するためにゲルから切断して溶出させてもよい。低融点アガロースゲルを用いて、ゲルを加熱することによって、分離したバンドを採取してその後核酸の抽出を行う。

【0202】

核酸の分離はまた、当技術分野で既知のクロマトグラフィー技術によって行ってもよい。吸着、分配、イオン交換、ヒドロキシルアパタイト、分子ふるい、逆相、カラム、ペーパー、薄層、およびガスクロマトグラフィーと共にHPLCを含む本発明の実践において用いてもよい多くの種類のクロマトグラフィーが存在する。

20

【0203】

特定の態様において、増幅産物を可視化する。典型的な可視化法は、エチジウムブロマイドによってゲルを染色して、UV光の下でバンドを可視化することを含む。または、増幅産物が放射、または蛍光標識ヌクレオチドによって完全に標識されている場合、分離された増幅産物をx線フィルムに曝露して、適当な励起波長の下で可視化することができる。

【0204】

一つの態様において、増幅産物の分離後、標識された核酸プローブを増幅されたマーカ配列に接触させる。プローブは好ましくは発色団に結合させるが、放射標識してもよい。もう一つの態様において、プローブは、抗体またはビオチンのような結合パートナー、または検出部分を有するもう一つの結合パートナーに結合させる。

30

【0205】

特定の態様において、検出は、標識プローブによるサザンブロットングおよびハイブリダイゼーションによって行う。サザンブロットングに含まれる技術は当業者に周知である（Sambrookら、1989を参照されたい）。前述の一例は、核酸の自動電気泳動および転写のための装置および方法を開示する、参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,279,721号に記述される。装置は、ゲルを外部から操作することなく、電気泳動およびブロットングを可能にし、本発明に従う方法を行うために理想的に適している。

40

【0206】

本発明の実践において用いてもよい他の核酸検出法は、そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,840,873号、第5,843,640号、第5,843,651号、第5,846,708号、第5,846,717号、第5,846,726号、第5,846,729号、第5,849,487号、第5,853,990号、第5,853,992号、第5,853,993号、第5,856,092号、第5,861,244号、第5,863,732号、第5,863,753号、第5,866,331号、第5,905,024号、第5,910,407号、第5,912,124号、第5,912,145号、第5,919,630号、第5,925,517号、第5,928,862号、第5,928,869号、第5,929,227号、第5,932,413号、および第5,935,791号に開示されている。

【0207】

### 4. 他のアッセイ

50

遺伝子スクリーニングのための他のアッセイは、例えばゲノムDNA、cDNAおよび/またはRNA試料における変異を検出するために、本発明の範囲において用いてもよい。点突然変異を検出するために用いられる方法には、変性勾配ゲル電気泳動（「DGGE」）、制限断片長多形分析（「RFLP」）、化学または酵素切断法、PCR（商標）によって増幅された標的領域の直接シーケンシング（上記を参照されたい）、一本鎖構造多形分析（「SSCP」）、および当技術分野で周知の他の方法が含まれる。

#### 【0208】

点突然変異をスクリーニングする一つの方法は、RNA/DNAまたはRNA/RNAヘテロ二本鎖における塩基対ミスマッチのRNアーゼによる切断に基づく。本明細書において用いられるように、「ミスマッチ」という用語は、二本鎖RNA/RNA、RNA/DNA、またはDNA/DNA分子における一つまたはそれ以上の、対を形成していないまたは誤って対を形成した領域として定義される。このように、この定義は、挿入/欠失変異のみならず単一または多数の塩基の点突然変異によるミスマッチが含まれる。

10

#### 【0209】

米国特許第4,946,773号は、一本鎖DNAまたはRNA試験試料をRNAプローブにアニールさせて、その後RNアーゼAによって核酸二本鎖を処理することを含む、RNアーゼミスマッチ切断アッセイを記述する。ミスマッチを検出する場合、大きさに従って電気泳動によって分離されたRNアーゼA処置の一本鎖産物を、同様に処置した対照二本鎖と比較する。対照二本鎖において認められないより小さい断片（切断産物）を含む試料は、陽性であると採点される。

20

#### 【0210】

他の研究者らは、ミスマッチアッセイにおいてRNアーゼIを用いることを記述している。ミスマッチ検出のためにRNアーゼIを用いることは、プロメガバイオテック（Promega Biotech）の文献に記述されている。プロメガ社は既知のミスマッチ4個のうち3個を切断すると報告されているRNアーゼIを含むキットを販売している。他の研究者は、一塩基ミスマッチを検出するためにMutSタンパク質または他のDNA修復酵素を用いることを記述している。

#### 【0211】

本発明の実践において用いてもよい欠失、挿入、または置換変異を検出するもう一つの方法は、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,849,483号、第5,851,770号、第5,866,337号、第5,925,525号、および第5,928,870号に開示されている。

30

#### 【0212】

### G. 遺伝子移入法

本発明の組成物の発現を行うために核酸輸送の適した方法は、本明細書に記述されるように、または当業者に既知であるように、それによって核酸（例えば、ウイルスおよび非ウイルスベクターを含むDNA）がオルガネラ、細胞、組織、または生物に導入されうる実質的に如何なる方法も含まれると考えられる。そのような方法には、マイクロインジェクション（Harlan and Weintraub、1985；参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,789,215号）を含む注入（参照として本明細書に組み入れられる、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）；エレクトロポレーション（参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,384,253号）；磷酸カルシウム沈殿（Graham and Van Der Eb、1973；Chen and Okayama、1987；Rippeら、1990）；DEAE-デキストランの後にポリエチレングリコールを用いることによって（Gopal、1985）；直接超音波負荷（Fechheimerら、1987）；リポソーム媒介トランスフェクション（Nicolau and Sene、1982；Fraleyら、1979；Nicolauら、1987；Wongら、1980；Kanedaら、1989；Katoら、1991）；微小発射物の衝突（そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、PCT出願国際公開公報第94/09699号および第95/06128号；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）；炭化ケイ素繊維との攪拌（Kaepplerら、1990；それぞれが参照として本明細書に組み入れ

40

50

られる、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 (Agrobacterium) 媒介形質転換 (そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,591,616号および第5,563,055号)；またはプロトプラストのPEG媒介形質転換 (Omirllehら、1993；そのそれぞれが参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第4,684,611号および第4,952,500号)；乾燥/阻害媒介DNA取り込み (Potrykusら、1985) のような方法によるDNAの直接輸送が含まれるがこれらに限定されない。これらのような技術の応用によって、オルガネラ、細胞、組織、または生物は、安定または一過性に形質転換される可能性がある。

### 【0213】

#### H. 脂質成分と部分

特定の態様において、本発明は、核酸、ペプチドのようなアミノ酸分子、またはもう一つの低分子化合物に関連した一つまたはそれ以上の脂質を含む組成物に関する。本明細書において考察した任意の態様において、分子は、ボックスウイルスポリペプチドまたはボックスウイルスポリペプチド調節物質、例えばボックスウイルスポリペプチドの全てもしくは一部をコードする核酸、またはボックスウイルスポリペプチド調節物質の全てもしくは一部をコードするアミノ酸分子であってもよい。脂質は、特徴的に水に不溶性で、有機溶媒によって抽出可能な物質である。本明細書において特に記述した化合物以外の化合物は、当業者によって脂質であると理解され、それらも本発明の組成物および方法に含まれる。脂質成分および非脂質は、共有結合または非共有結合によって互いに結合させてもよい。

### 【0214】

脂質は天然に存在してもよく、または合成 (すなわち、ヒトの手によって設計または産生された) であってもよい。しかし、脂質は通常、生体物質である。生体脂質は当技術分野で周知であり、これには例えば、中性脂肪、磷脂質、ホスホグリセリド、ステロイド、テルペン、リゾ脂質、グリコスフィンゴリピッド、グルコリピッド、スルファチド、エーテルおよびエーテル結合脂肪酸を有する脂質、および重合化脂質、ならびにその組み合わせが含まれる。

### 【0215】

脂質に会合した核酸分子またはペプチドのようなアミノ酸分子は、脂質を含む溶液中で分散させる、脂質によって溶解する、脂質によって乳化させる、脂質と混合する、脂質と配合する、脂質に共有結合させる、脂質中の懸濁液として含む、またはそうでなければ脂質に会合させてもよい。本発明の脂質または脂質/ボックスウイルス会合組成物は、如何なる特定の構造に限定されない。例えば、それらは、おそらく大きさまたは形状の点で均一ではない凝集体を形成して、溶液中に単に散在させてもよい。もう一つの例において、それらは、ミセルのような二層構造で存在してもよく、「崩壊した」構造を有してもよい。もう一つの非制限的な例において、リポフェクタミン (Gibco BRL) -ボックスウイルスまたはスーパーフェクト (Qiagen) -ボックスウイルス複合体も同様に企図される。

### 【0216】

特定の態様において、脂質組成物は、特定の脂質、脂質タイプ、または薬物、タンパク質、糖、核酸または本明細書に開示のもしくは当業者に既知の他の材料のような非脂質成分の約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約11%、約12%、約13%、約14%、約15%、約16%、約17%、約18%、約19%、約20%、約21%、約22%、約23%、約24%、約25%、約26%、約27%、約28%、約29%、約30%、約31%、約32%、約33%、約34%、約35%、約36%、約37%、約38%、約39%、約40%、約41%、約42%、約43%、約44%、約45%、約46%、約47%、約48%、約49%、約50%、約51%、約52%、約53%、約54%、約55%、約56%、約57%、約58%、約59%、約60%、約61%、約62%、約63%、約64%、約65%、約66%、約67%、約68%、約69%、約70%、約71%、約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、ま

10

20

30

40

50

たはそこから誘導される任意の範囲を含む。非制限的な例において、脂質組成物は、約10%～約20%中性脂質、約33%～約34%セレプロシド、および約1%コレステロールを含んでもよい。もう一つの非制限的な例において、リポソームは、ミセルの約1%が特にリコペンである約4%～約12%テルペンを含んでもよく、リポソームの約3%～約11%は他のテルペンを含み、および約10%～約35%ホスファチジルコリン、および約1%の薬物を含んでもよい。このように、本発明の脂質組成物は、任意の組み合わせまたは百分率の範囲の任意の脂質、脂質タイプ、または他の成分を含んでもよいと企図される。

【0217】

#### IV. 薬学的製剤、輸送、および治療レジメ

本発明の一つの態様において、ワクシニアウイルスのような改変ポックスウイルスの輸送によって、癌のような過増殖性疾患を治療するための方法が企図される。治療に企図される癌の例には、肺癌、頭頸部癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎臓癌、骨癌、精巣癌、子宮頸癌、消化器癌、リンパ腫、肺の前新生物病変、結腸癌、黒色腫、膀胱癌、および処置しうる任意の他の癌または腫瘍が含まれる。

10

【0218】

薬学的組成物の有効量は一般的に、疾患またはその症状の程度を改善、減少、最小限、または制限するために検出可能におよび繰り返すために十分な量であると定義される。疾患の消失、根治、または治癒を含むより厳密な定義を当てはめてもよい。

【0219】

好ましくは、患者は、適当な骨髄機能（末梢の顆粒球の絶対数 $>2,000$ 個/mm<sup>3</sup>および血小板数 $100,000$ 個/mm<sup>3</sup>として定義される）、適当な肝機能（ビリルビン $<1.5$ mg/dl）および適当な腎機能（クレアチニン $<1.5$ mg/dl）を有するであろう。

20

【0220】

#### A. 投与

本発明の方法および組成物を用いて、細胞を殺すため、細胞増殖を阻害するため、転移を阻害するため、腫瘍または組織の大きさを減少させるため、およびそうでなければ腫瘍細胞の悪性の表現型を逆転または減少させるために、一般的に、ポリペプチドまたはポリペプチドをコードする発現構築物のような治療化合物を、過増殖細胞に接触させるであろう。投与経路は当然、病変の位置および特性によって変化して、これには例えば、皮内、経皮、非経口、静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮下、局所、経皮、気管内、腹腔内、動脈内、小胞内、腫瘍内、吸入、灌流、洗浄、直接注射、および経口投与ならびに製剤が含まれるであろう。

30

【0221】

血管の病態または疾患に関して治療利益を得るために、血管細胞を治療化合物に接触させるであろう。癌の治療または診断に関して考察した任意の製剤および投与経路は、血管疾患および病態に関して用いてもよい。

【0222】

腫瘍内注射または腫瘍血管への注入は、異なる、固体の、近づきやすい腫瘍に関して特に企図される。局所、限局または全身投与も同様に、適当であろう。4cmより大きい腫瘍に関して、投与容量は約4～10ml（好ましくは10ml）であるが、4cmより小さい腫瘍に関しては、容量約1～3ml（好ましくは3ml）が用いられるであろう。1回投与として輸送される多数回注射は、容量約0.1～約0.5mlを含む。ウイルス粒子は、約1cmの間隔をあけて腫瘍に多数回注射を投与することによって都合よく接触される可能性がある。

40

【0223】

外科的介入の場合、本発明は、手術不能の腫瘍を切除されるようにするために、術前に用いてもよい。または、本発明は、残留または転移疾患を治療するために手術時、および/または手術後に用いてもよい。例えば、切除された腫瘍床に、ポックスウイルスを癌または癌細胞の治療にとって都合がよいようにする変異を含むポックスウイルスポリペプチドまたはポックスウイルスを含む製剤を注射または灌流してもよい。灌流は、カテーテルを手術部位に留置することによって切除後も継続してもよい。周期的な術後治療も同様に

50

想像される。

【0224】

持続的投与はまた、適当であれば、腫瘍を切除して、残留の微小疾患を消失させるために腫瘍床を治療する場合に、応用してもよい。シリンジまたはカテーテル挿管による輸送が好ましい。そのような連続灌流は、治療開始後約1~2時間、約2~6時間、約6~12時間、約12~24時間、約1~2日、約1~2週間、またはそれ以上までの期間行ってもよい。一般的に、持続的灌流による治療的組成物の用量は、1回または、灌流を行う期間にわたって補正された多数回注射によって投与された用量と同等であろう。脚の灌流を用いて、特に黒色腫および肉腫の治療において、本発明の治療組成物を投与してもよいとさらに企図される。

10

【0225】

治療レジメも同様に変わり得、しばしば腫瘍のタイプ、腫瘍の位置、疾患の進行、ならびに患者の健康および年齢に依存する。明らかなことであるが、特定のタイプの腫瘍は、より積極的な治療を必要とするが、同時に特定の患者はより負担の多いプロトコルに認容できない。臨床医は、治療剤の既知の有効性および毒性（もしあれば）に基づいてそのような決定を行うために最も適しているであろう。

【0226】

特定の態様において、治療すべき腫瘍は、少なくとも最初切除可能でなくてもよい。治療的ウイルス構築物による治療は、周辺部の収縮による、または特定の特に侵襲性の部分の消失によって、腫瘍の切除可能性を増加させる可能性がある。治療後、切除が可能となる可能性がある。切除後のさらなる治療は、腫瘍部位での微小残留疾患を消失させるために役立つであろう。

20

【0227】

原発腫瘍または切除後の腫瘍床に関して典型的な治療経過は、多数回投与を含むであろう。典型的な原発腫瘍の治療は、2週間のあいだに6回投与を含む。2週間レジメは、1、2、3、4、5、6回またはそれ以上繰り返してもよい。治療経過において、計画された投与を完了する必要があるか否かを再評価してもよい。

【0228】

治療には、様々な「単位用量」が含まれてもよい。単位用量は、治療組成物の既定量を含むと定義される。投与すべき量、および特定の経路および製剤は、臨床分野の当業者の技術範囲である。単位用量は、1回注射として投与される必要はないが、一定期間にわたって連続的注入を含んでもよい。本発明の単位用量は、ウイルス構築物に関してプラーク形成単位 (pfu) に関して記述することが都合がよいかも知れない。単位用量は $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$  pfuおよびそれ以上の範囲である。またはウイルスおよび達成可能な力価の種類に応じて、患者または患者の細胞に感染性ウイルス粒子 (vp) 1~100個、10~50個、100~1000個、または約 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{14}$ 、または $1 \times 10^{15}$ 個またはそれ以上を輸送するのである。

30

【0229】

B. 注射可能な組成物および製剤

40

本発明において、ポックスウイルスゲノムの全てまたは一部をコードする発現構築物またはウイルスを癌または腫瘍細胞に輸送するための好ましい方法は、腫瘍内注射である。しかし、または本明細書に開示の薬学的組成物は、米国特許第5,543,158号、米国特許第5,641,515号、および米国特許第5,399,363号（そのそれぞれの全文が参照として本明細書に組み入れられる）に記述されるように、非経口、静脈内、皮内、筋肉内、経皮、または腹腔内投与してもよい。

【0230】

核酸構築物の注入は、発現構築物が注射のために必要な特定のゲージの針の中を通過することができる限り、溶液の注射のために用いられるシリンジまたは他の任意の方法によって輸送してもよい。溶液を保持するためのアンプル室を定めるノズルと、輸送部位にノ

50

ズルから溶液を押し出すためのエネルギー装置とを有する、新しい針のない注射システムが最近記述されている（米国特許第5,846,233号）。正確に任意の深さに溶液の規定量を多数回注射することができるシリンジシステムもまた、遺伝子治療において用いるために記述されている（米国特許第5,846,225号）。

【0231】

遊離の塩基または薬学的に許容される塩としての活性化化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルメチロースのような界面活性剤と適切に混合される水において調製してもよい。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびその混合物ならびに油において調製してもよい。通常の保存および使用条件において、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するための保存剤を含む。注射での使用に適した薬学剤形には、滅菌注射用溶液または分散液の即時調製物のための滅菌水溶液または分散液と滅菌粉末とが含まれる（その全文が特に参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,466,468号）。全ての場合において、製剤は滅菌でなければならず、容易な注入操作性が存在する程度に流動性でなければならない。製剤は、製造および保存条件で安定でなければならず、細菌および真菌のような微生物の混入作用に対して保護されなければならない。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、および液体ポリエチレングリコール等）、その適した混合物および/または植物油を含む溶媒または分散媒体となりうる。適当な流動性は、例えばレシチンのようなコーティングを用いることによって、分散剤の場合には必要な粒子径を維持することによって、および界面活性剤を用いることによって維持してもよい。微生物の作用の保護は、様々な抗菌および抗真菌剤、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、チメロサル等によって得ることができる。多くの場合において、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましいであろう。注射用組成物の持続的な吸収は、吸収を遅らせる物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物において用いることによって得ることができる。

10

20

【0232】

水溶液中での非経口投与の場合、溶液は、必要であれば適当に緩衝作用を有しなければならない、例えば、液体の希釈液は十分な生理食塩液またはグルコースによってまず等張にしなければならない。これらの特定の水溶液は静脈内、筋肉内、皮下、腫瘍内、および腹腔内投与に特に適している。これに関連して、用いることができる滅菌水性媒体は、本開示に照らして当業者に既知であろう。例えば、1用量を等張NaCl溶液1mlに溶解して、これを皮下注入液1000mlに加えるか、または提案される注入部位で注入してもよい（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第15版、1035~1038頁および1570~1580頁）。何らかの用量の変更は、治療される被験体の病態に応じて必ず起こるのである。投与責任者は、いずれにせよ、個々の被験体の適当な用量を決定するのである。その上、ヒトでの投与に関して、調製物は、FDA生物標準局によって要求される滅菌性、発熱性、全身安全性および純度標準を満たさなければならない。

30

【0233】

滅菌注射用溶液は、必要であれば濾過滅菌後、先に列挙した様々な他の成分と共に適当な溶媒に必要な量の活性化化合物を組み入れることによって調製される。一般的に、分散液は、基礎分散媒体と先に列挙した媒体からの必要な他の成分とを含む滅菌媒体に様々な滅菌活性成分を組み入れることによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、予め濾過滅菌されたその溶液から活性成分プラス任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥または凍結乾燥技術である。

40

【0234】

本明細書に開示の組成物は、中性または塩の形で製剤化してもよい。薬学的に許容される塩には、酸付加塩（タンパク質の遊離のアミノ基によって形成される）が含まれ、これらは例えば塩酸またはリン酸のような無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等のような有機酸から形成される。遊離のカルボキシル基によって形成された塩も同様に、例えば、水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または第2鉄のよ

50

うな無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等のような有機塩基に由来しうる。製剤化した後、溶液は、投与製剤と適合するように、治療的に有効である量で投与されるであろう。製剤は、注射用溶液、薬物放出カプセル等のような多様な投与剤形で容易に投与される。

【0235】

本明細書において用いられるように、「担体」には、任意の全ての溶媒、分散培地、媒体、コーティング、希釈剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁剤、コロイド等が含まれる。薬学的に活性な物質に関してそのような媒体および物質を用いることは、当技術分野で周知である。如何なる通常の媒体または物質も活性成分と非適合性である場合を除き、治療組成物におけるその使用が企図される。補助活性成分も同様に組成物に組み入れることができる。

10

【0236】

「薬学的に許容される」または「薬理学的に許容される」という句は、ヒトに投与した場合にアレルギーまたは類似の望ましくない反応を生じない分子実体および組成物を指す。活性成分としてタンパク質を含む水性組成物の調製は当技術分野で十分に理解されている。典型的に、そのような組成物は、液体溶液または懸濁剤のいずれかとして注射剤として調製される；注射の前に液体において溶液または懸濁液として適した固体剤形も同様に調製することができる。

【0237】

C. 併用治療

20

本発明の化合物および方法は、癌およびアテローム性動脈硬化症を含む過増殖性疾患/病態の状況において用いてもよい。弱毒化ワクシニアウイルスのような本発明の組成物による治療の有効性を増加させるために、それらの疾患および病態の治療において有効な他の物質とこれらの組成物とを併用することが望ましいかも知れない。例えば、癌の治療は、本発明の治療化合物と、抗癌物質または手術のような他の抗癌治療とによって行ってもよい。

【0238】

例えばワクシニアウイルスのような弱毒化ボックスウイルスを「A」として第二の抗癌治療を「B」とするような、様々な併用を用いてもよい。

30

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

【0239】

本発明の治療的発現構築物の患者への投与は、もしあればボックスウイルス治療の毒性を考慮に入れて、特定の二次治療の投与のための一般的プロトコールに従うであろう。治療サイクルは必要に応じて繰り返されるであろうと予想される。同様に、記述の癌または腫瘍細胞治療と併用して、様々な標準的な治療と共に外科的介入を応用してもよいと企図される。

40

【0240】

1. 抗癌治療

「抗癌」物質は、例えば、癌細胞を殺す、癌細胞においてアポトーシスを誘導する、癌細胞の増殖速度を減少させる、転移の発生または数を減少させる、腫瘍の大きさを減少させる、腫瘍の増殖を阻害する、腫瘍または癌細胞への血液供給を減少させる、癌細胞または腫瘍に対する免疫応答を促進させる、癌の進行を予防または阻害する、または癌を有する被験体の生命を延長させることによって被験体における癌に負の影響を及ぼすことがで

50

きる。抗癌剤には、生体物質（生物治療）、化学療法剤、および放射線療法が含まれる。より一般的に、これらの他の組成物は、細胞を殺すまたは増殖を阻害するために有効な併用量で提供されるであろう。このプロセスは、発現構築物および物質または多数の因子を細胞に同時に接触させることを含んでもよい。これは、単一の組成物もしくは双方の物質を含む薬理的製剤を細胞に接触させることによって、または一つの組成物に発現構築物が含まれ、他の組成物に第二の物質が含まれる、二つの異なる組成物もしくは製剤を細胞に同時に接触させることによって行ってもよい。

#### 【0241】

化学療法および放射線療法剤に対する腫瘍細胞の耐性は、臨床腫瘍学において大きい問題である。現在の癌治療の一つの目標は、これを遺伝子治療と組み合わせることによって化学療法および放射線療法の有効性を改善する方法を見いだすことである。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輸送すると、抗ウイルス剤であるガンシクロビルに対する感受性の誘導に成功した（Culverら、1992）。本発明の状況において、ボックスウイルス治療は、同様に他のプロアポトーシスまたは細胞周期調節物質の他に、化学療法、放射線療法、免疫療法、または他の生物学的介入と共に用いることができるであろうと企図される。

#### 【0242】

または、遺伝子治療は、数分から数週間の間隔で他の物質治療の前後に行ってもよい。他の物質および発現構築物が細胞に個別に適用される態様において、一般的に、物質と発現構築物がなおも細胞に対して有利な併用効果を発揮できるように、それぞれの輸送時間のあいだに有意な期間が経過しないことを確実にするであろう。そのような場合、細胞を双方の療法に互いに約12~24時間以内、より好ましくは互いに約6~12時間以内に接触させてもよいと企図される。状況によっては、それぞれの投与のあいだに数日（2、3、4、5、6または7日）から数週間（1、2、3、4、5、6、7、8週間）が経過する場合には、治療期間を有意に延長することが望ましいかも知れない。

#### 【0243】

##### a. 化学療法

癌の療法にはまた、化学および放射線に基づく治療との多様な併用治療が含まれる。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、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イフォスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、プレオマイシン、プリコマイシン、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、ピンプラスチン、およびメトトレキセート、テマゾロミド（DTICの水溶型）、または前述の任意の誘導體もしくは類似体が含まれる。化学療法と生物療法との併用は生化学療法として知られている。

#### 【0244】

##### b. 放射線療法

DNA損傷を引き起こし、広範に用いられている他の物質には、一般的に線、X線として一般的に知られている放射線、および/または放射性同位元素の腫瘍細胞への直接輸送が含まれる。マイクロ波およびUV照射のような他の型のDNA損傷剤も同様に企図される。これらの因子は全て、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製および修復、ならびに染色体の構築および維持に対して広範囲の損傷を与える可能性が最も高い。X線の線量範囲は、1日量50~200レントゲンを長期間（3~4週間）から、2000~6000レントゲンの1回線量に及ぶ。放射性同位元素の用量範囲は広く異なり、同位元素の半減期、放出される放射線の強度およびタイプ、ならびに新生物細胞による取り込みに依存する。

#### 【0245】

細胞に適用した場合に「接触される」および「曝露される」という用語は、本明細書において、治療構築物と化学療法または放射線療法剤とが標的細胞に輸送される、または標

10

20

30

40

50

的細胞の直接近位に置かれるプロセスを記述するために用いられる。殺細胞または細胞抑制を得るために、双方の物質は、細胞を殺すために、または分裂を防止するために有効な併用量で細胞に輸送される。

【0246】

c. 免疫療法

免疫療法は一般的に、癌細胞を標的として破壊するために免疫エフェクター細胞および分子を用いることに依存する。免疫エフェクターは、例えば腫瘍細胞の表面上のいくつかのマーカに対して特異的な抗体であってもよい。抗体単独は、治療のエフェクターとして役立つのもよく、または殺細胞を実際に行うために他の細胞を動員してもよい。抗体はまた、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、百日咳毒素等）に結合させてもよく、単にターゲティング剤として作用してもよい。または、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接または間接的に相互作用する表面分子を有するリンパ球であってもよい。様々なエフェクター細胞には、細胞障害性T細胞およびNK細胞が含まれる。治療様相の併用、すなわち直接細胞障害活性と特定のポックスウイルスポリペプチドの阻害または減少との併用は、癌の治療において治療利益を提供するであろう。

【0247】

免疫療法もまた、併用治療の一部として用いることができるであろう。併用治療の一般的なアプローチを下記に示す。免疫治療の一つの局面において、腫瘍細胞は、ターゲティングに対して感受性がある、すなわち他の大多数の細胞には存在しないいくつかのマーカを有しなければならない。多くの腫瘍マーカが存在し、これらのいずれも本発明の状況においてターゲティングのために適している可能性がある。一般的な腫瘍マーカには、癌胎児抗原、前立腺特異抗原、尿中腫瘍関連抗原、胎児抗原、チロシナーゼ（p97）、g p68、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が含まれる。もう一つの局面の免疫治療は、免疫刺激効果を有する抗癌作用である。IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、IFN のようなサイトカイン、MIP-1、MCP-1、IL-8のようなケモカイン、およびFLT3リガンドのような増殖因子を含む免疫刺激分子も同様に存在する。免疫刺激分子をタンパク質としてまたは遺伝子輸送を用いてmda-7のような腫瘍抑制物質と併用すると、抗腫瘍効果を増強することが示されている（Juら、2000）。

【0248】

先に考察したように、現在試験中または用いられている免疫療法の例は、免疫アジュバント（例えば、ウシ型結核菌（*Mycobacterium bovis*）、プラスモジウム・ファルシパルム（*Plasmodium falciparum*）、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物）（米国特許第5,801,005号；米国特許第5,739,169号；Hui and Hashimoto、1998；Christodoulidesら、1998）、サイトカイン療法（例えば、インターフェロン、および、IL-1、GM-CSF、ならびにTNF）（Bukowskiら、1998；Davidsonら、1998；Hellstrandら、1998）、遺伝子治療（例えば、TNF、IL-1、IL-2、p53）（Qinら、1998；Austin-Ward and Villaseca、1998；米国特許第5,830,880号および米国特許第5,846,945号）およびモノクローナル抗体（例えば、抗ガングリオシドGM2、抗HER-2、抗-p185）（Pietrasら、1998；Hanibuchiら、1998；米国特許第5,824,311号）である。ハーセプチン（トラツズマブ）は、HER2-neu受容体を阻害するキメラ（マウス-ヒト）モノクローナル抗体である。これは抗腫瘍活性を有し、悪性腫瘍の治療に用いることが承認されている（Dillman、1999）。癌とハーセプチンおよび化学療法との併用治療は、個々の治療より有効であることが示されている。このように、一つまたはそれ以上の抗癌治療を本明細書に記述のポックスウイルス関連治療と共に用いてもよいと企図される。

【0249】

i) 受動免疫療法

癌の受動免疫療法には多くの異なるアプローチが存在する。それらは、以下の分類に広く分類される可能性がある：抗体単独の注射、毒素または化学療法剤に共役させた抗体の注射、放射活性同位元素に共役させた抗体の注射、抗イディオタイプ抗体の注射、および

10

20

30

40

50

最後に、骨髄における腫瘍細胞の追放。

【0250】

好ましくは、ヒトモノクローナル抗体は患者においてほとんどまたは全く副作用を生じないことから、ヒトモノクローナル抗体は受動免疫療法において用いられる。しかし、それらが稀少であることからその応用は幾分制限され、これまで病変内に投与されてきたに過ぎない。ガングリオシド抗原に対するヒトモノクローナル抗体は、皮膚再発性黒色腫を有する患者に病変内に投与されている (Irie and Morton, 1986)。病変内注射を毎日または毎週行った後に、患者10人中6人において退縮を認めた。もう一つの試験において、二つのヒトモノクローナル抗体の病変内注射によって中等度の成功を認めた (Irieら、1989)。

10

【0251】

二つの異なる抗原に対する一つより多いモノクローナル抗体、または多数の抗原特異性を有する抗体を投与することが好ましいかも知れない。治療プロトコールにはまた、Bajorinら (1988) によって記述されるようにリンフォカインまたは他の免疫エンハンサーの投与が含まれてもよい。ヒトモノクローナル抗体の作製は、本明細書の他所でさらに詳しく記述される。

【0252】

ii) 能動的免疫治療

能動的免疫治療において、抗原性ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質、または自己もしくは同種異系腫瘍細胞組成物または「ワクチン」は、一般的に異なる細菌アジュバント (Ravindranath and Morton, 1991; Mortonら、1992; Mitchellら、1990; Mitchellら、1993) と共に投与される。黒色腫の免疫療法において、高いIgM反応を誘発する患者はしばしば、全くIgM抗体を誘発しないまたは低いIgM抗体を誘発する患者より長く生存する (Mortonら、1992)。IgM抗体はしばしば一過性の抗体であるが、この規則の例外は、抗ガングリオシドまたは抗炭化水素抗体であるように思われる。

20

【0253】

iii) 養子免疫療法

養子免疫療法において、患者の循環中のリンパ球または腫瘍浸潤リンパ球をインビトロで単離して、IL-2のようなリンフォカインによって活性化して、腫瘍壊死に関する遺伝子を形質導入して再投与する (Rosenbergら、1988; 1989)。これを行うために、動物またはヒト患者に、本明細書に記述のアジュバントを組み入れた抗原ペプチド組成物と併用して活性化リンパ球の免疫学的有効量が投与されるであろう。活性化リンパ球は最も好ましくは、血液または腫瘍試料から予め単離されてインビトロで活性化された (または「増殖させた」) 患者自身の細胞であろう。この型の免疫治療によって、黒色腫および腎癌の数例の退縮が引き起こされたが、反応者の割合は反応しなかった人と比較すると少数であった。

30

【0254】

d. 遺伝子

さらにもう一つの態様において、二次治療は、弱毒化ポックスウイルスが投与される前、後、または同時に治療ポリヌクレオチドが投与される遺伝子治療である。以下の遺伝子産物の一つをコードするベクターと共にポックスウイルスを輸送すれば、標的組織に対して併用抗癌作用を有するであろう。または、ポックスウイルスは、ウイルスベクターとして治療ポリヌクレオチドを含めるように操作してもよい。多様なタンパク質が本発明に含まれ、そのいくつかを下記に記す。表7は、本発明と共にいくつかの型の遺伝子治療のために標的とされる可能性がある様々な遺伝子を一覧にする。

40

【0255】

i) 細胞増殖の誘導物質

細胞増殖を誘導するタンパク質はさらに、機能に応じて様々な分類に分けられる。これらのタンパク質の全ての一般性は、細胞増殖の調節能である。例えば、PDGFの一つの型であるsis腫瘍遺伝子は、分泌型増殖因子である。腫瘍遺伝子はまれに増殖因子をコードす

50

る遺伝子から生じるが、現在のところ、sisは、既知の唯一の天然に存在する腫瘍遺伝子増殖因子である。本発明の一つの態様において、細胞増殖の特定の誘導物質に向けられるアンチセンスmRNAを用いて、細胞増殖の誘導物質の発現を阻害することが企図される。

【0256】

タンパク質FMS、ErbA、ErbBおよびneuは、増殖因子受容体である。これらの受容体の変異によって、調節可能な機能の喪失が起こる。例えば、Neu受容体タンパク質の膜貫通ドメインに影響を及ぼす点突然変異によってneu腫瘍遺伝子が得られる。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。改変型腫瘍遺伝子ErbA受容体は、内因性の甲状腺ホルモン受容体と競合して、制御されない増殖を引き起こすと考えられる。

【0257】

最も大きいクラスの腫瘍遺伝子には、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り、場合によっては癌原遺伝子から癌遺伝子へのその形質転換は、チロシン残基527位での変異によって起こる。対照的に、GTPアーゼタンパク質rasの癌原遺伝子から癌遺伝子への形質転換は一例において、配列におけるアミノ酸12位でのバリンからグリシンへの変異が原因で起こり、ras GTPアーゼ活性を減少させる。

【0258】

タンパク質Jun、Fos、およびMycは、転写因子として核機能にその影響を直接発揮するタンパク質である。

【0259】

ii) 細胞増殖の阻害剤

腫瘍抑制癌遺伝子は、過度の細胞増殖を阻害するように機能する。これらの遺伝子の不活化は、その阻害活性を破壊して調節されない増殖を生じる。腫瘍抑制因子p53、p16およびC-CAMを下記に記述する。

【0260】

先に記述されているp53の他に、細胞増殖のもう一つの阻害剤はp16である。真核細胞周期の主な移動は、サイクリン依存的キナーゼまたはCDKによって誘発される。一つのCDKであるサイクリン依存的キナーゼ4 (CDK4) は、 $G_1$ を通しての進行を調節する。この酵素の活性は、 $G_1$ 後期でRbをリン酸化することである可能性がある。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によって制御され、p16<sup>INK4</sup>は、CDK4に特異的に結合して阻害するタンパク質であると生化学的に特徴が調べられており、このようにRbリン酸化を調節する可能性がある (Serranoら、1993; Serranoら、1995)。p16<sup>INK4</sup>タンパク質はCDK4阻害剤であることから (Serrano、1993)、この遺伝子の欠失はCDK4の活性を増加させて、その結果Rbタンパク質の過リン酸化が起こる可能性がある。p16はまた、CDK6の機能を調節することが知られている。

【0261】

p16<sup>INK4</sup>は、p16<sup>B</sup>、p19、p21<sup>WAF1</sup>、およびp27<sup>KIP1</sup>が含まれるCDK阻害タンパク質の新たに記述されたクラスに属する。p16<sup>INK4</sup>遺伝子は、多くの腫瘍タイプにおいてしばしば欠失している9p21にマッピングされる。p16<sup>INK4</sup>遺伝子のホモ接合欠失および変異は、ヒト腫瘍細胞株において頻繁である。この証拠は、p16<sup>INK4</sup>遺伝子が腫瘍抑制遺伝子であることを示唆する。しかし、p16<sup>INK4</sup>遺伝子の変化の頻度は培養細胞株より原発性非培養腫瘍においてかなり低いという知見から、この解釈は疑われている (Caldasら、1994; Chengら、1994; Hussussianら、1994; Kambら、1994; Kambら、1994; Moriら、1994; Okamotoら、1994; Noboriら、1994; Orlowら、1994; Arapら、1995)。プラスミド発現ベクターのトランスフェクションによる野生型p16<sup>INK4</sup>機能の回復によって、いくつかのヒト癌細胞株によるコロニー形成は減少した (Okamoto、1994; Arap、1995)。

【0262】

本発明に従って用いてもよい他の遺伝子には、Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-1、MEN-11、zac1、p73、VHL、MMAC1/PTEN、DBCCR-1、FCC、rsk-3、p27、p27/p16融合体、p21/p27融合体、抗血栓遺伝子（例えば、COX-1、TFPI）、PGS、Dp、E2F、ras、myc、neu

10

20

30

40

50

、raf、erb、fms、trk、ret、gsp、hst、abl、E1A、p300、血管新生に關与する遺伝子（例えば、VEGF、FGF、トロンボスポンジン、BAI-1、GDAIF、またはその受容体）およびMCCが含まれる。

【0263】

iii) プログラムされた細胞死の調節因子

アポトーシスまたはプログラムされた細胞死は、正常な胎児発達の本質的なプロセスであり、成体組織における恒常性を維持し、発癌を抑制する（Kerrら、1972）。Bcl-2ファミリータンパク質およびICE-様プロテアーゼは、他の系におけるアポトーシスの重要な調節物質およびエフェクターであることが証明されている。濾胞性リンパ腫に關連して発見されたBcl-2タンパク質は、アポトーシスの制御および多様なアポトーシス刺激に反応した細胞生存の増強に顕著な役割を有する（Bakhshiら、1985；Cleary and Sklar、1985；Clearyら、1986；Tsujiimotoら、1985；Tsujiimoto and Croce、1986）。進化的に保存されたBcl-2タンパク質は現在では、デスアゴニストまたはデスアンタゴニストとして分類することができる関連タンパク質ファミリーのメンバーであると認識されている。

10

【0264】

その発見後、Bcl-2は、多様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。同様に、共通の構造および配列相同性を有するBcl-2細胞死調節タンパク質ファミリーが存在することは今では明らかである。これらの異なるファミリーメンバーは、Bcl-2と類似の機能を有する（例えば、Bcl<sub>xL</sub>、Bcl<sub>w</sub>、Bcl<sub>s</sub>、Mcl-1、A1、Bfl-1）、またはBcl-2機能に拮抗して細胞死を促進する（例えば、Bax、Bak、Bik、Bim、Bid、Badd、Harakiri）ことが示されている。

20

【0265】

e. 手術

癌患者の約60%が何らかのタイプの手術を受け、その中には、予防的、診断的または進行期決定、治癒的および待期的手術が含まれる。治癒的手術は、本発明の治療、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/またはもう一つの治療のような他の治療と共に用いてもよい癌治療である。

【0266】

治癒的手術には、癌組織の全てまたは一部が物理的に除去、切除、および/または破壊される切除が含まれる。腫瘍の切除は、腫瘍の少なくとも一部の物理的切除を指す。腫瘍の切除の他に、手術による治療には、レーザー手術、凍結手術、電気手術、および顕微鏡による手術（Moh's手術）が含まれる。本発明は、表層部癌、前癌、および正常組織の偶発的量の除去と共に用いてもよいとさらに企図される。

30

【0267】

癌様細胞、組織、または腫瘍の一部または全てを切除した場合、体内に腔が形成される可能性がある。治療は、さらなる抗癌治療によるその領域の灌流、直接注入または局所適用によって行ってもよい。そのような治療は、例えば1、2、3、4、5、6、もしくは7日毎、1、2、3、4、および5週間毎、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12ヶ月毎に繰り返してもよい。これらの治療は、同様に用量を変化させた治療であってもよい。

40

【0268】

f. 他の物質

治療の治療的有効性を改善するために、他の物質を本発明と併用して用いてもよいと企図される。これらのさらなる物質には、免疫調節剤、細胞表面受容体のアップレギュレーションおよびGAP接合部に影響を及ぼす物質、細胞増殖抑制および分化物質、細胞接着阻害剤、アポトーシス誘導物質に対する過増殖細胞の感受性を増加させる物質、または他の生体物質が含まれる。免疫調節剤には、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；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が含まれる。Fas/Fasリガンド、DR4またはDR5/TRAIL（Apo-2リガンド）のような細胞表面受容体またはそのリガンドのアップレギ

50

ュレーションは、過増殖細胞に対するオートクラインまたはパラクライン効果を確立することによって本発明のアポトーシス誘導能を増強するであろう。GAP接合部の数を増加させることによる細胞内シグナル伝達の増加は、隣接する過増殖細胞集団に対する抗過増殖効果を増加するであろう。他の態様において、細胞増殖抑制または分化因子を、治療の抗過増殖有効性を改善するために本発明と併用して用いることができる。細胞接着阻害剤は、本発明の有効性を改善すると企図される。細胞接着阻害剤の例は、局所接着キナーゼ（FAK）阻害剤およびロバスタチンである。抗体c225のようなアポトーシスに対する過増殖細胞の感受性を増加させる他の物質を、治療の有効性を改善するために本発明と併用して用いることができるであろう。

【0269】

Apo2リガンド（Apo2L、TRAILとも呼ばれる）は、腫瘍壊死因子（TNF）サイトカインファミリーのメンバーである。TRAILは、多くのタイプの癌細胞において急速なアポトーシスを活性化するが、正常細胞に対しては毒性ではない。TRAIL mRNAは、広範な組織に起こる。ほとんどの正常細胞は、TRAILの細胞障害作用に対して抵抗性であるように思われ、TRAILによるアポトーシス誘導に対して保護することができるメカニズムの存在を示唆している。TRAILに関して記述された第一の受容体は、デス受容体4（DR4）と呼ばれ、細胞質の「デスドメイン」を含む；DR4は、TRAILによって運ばれるアポトーシスシグナルを伝搬する。TRAILに結合するさらなる受容体が同定されている。DR5と呼ばれる一つの受容体は、DR4と同様に細胞質デスドメインを含み、アポトーシスのシグナルを送る。DR4およびDR5 mRNAは、多くの正常組織および腫瘍細胞株において発現されている。最近、TRAILによるDR4およびDR5を通してのアポトーシスの誘導を防止するDcR1およびDcR2のようなおとり受容体が同定されている。このように、これらのおとり受容体は、細胞表面で直接、プロアポトーシスサイトカインに対する感受性を調節するための新規メカニズムを表す。正常組織におけるこれらの阻害受容体の選択的発現は、TRAILが、正常細胞を容赦しながら、癌細胞においてアポトーシスを誘導する抗癌剤として有用となる可能性があることを示唆している（Marstersら、1999）。

【0270】

細胞障害性化学療法剤の導入後、癌の治療は大きく進歩した。しかし、化学療法の結果の一つは、薬剤耐性表現型の発生/獲得と、多剤耐性の発生である。薬剤耐性の発生は、そのような腫瘍の治療において依然として主な障害であり、したがって、遺伝子治療のようなもう一つのアプローチが明らかに必要である。

【0271】

化学療法、放射線治療または生物治療と共に用いられるもう一つの治療型には、患者の組織を高温（106°Fまで）に曝露する技法である温熱療法が含まれる。外部または内部加熱装置は、局所、限局、または全身温熱療法の適用に関与する可能性がある。局所温熱療法は、腫瘍のような小さい領域に対する熱の適用を含む。熱は、体外の装置から腫瘍を標的とする高周波によって外部から産生されてもよい。内部の熱は、薄い、加熱したワイヤまたは温水を満たした中空管を含む滅菌プローブ、埋め込み型マイクロ波アンテナ、または高周波電極を含んでもよい。

【0272】

患者の臓器または肢は、限局治療のために加熱され、これは磁石のような高エネルギーを発生する装置を用いて行われる。または、患者の血液の一部を採取して、加熱してから、内部加熱される領域に灌流してもよい。全身加熱はまた、体全体に癌が伝播した症例において行ってもよい。温水ブランケット、ホットワックス、誘導コイル、および熱チャンパーをこの目的のために用いてもよい。

【0273】

ホルモン療法も同様に、本発明と併用して、または既に記述した任意の他の癌治療と併用して用いてもよい。ホルモンの使用は、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、または子宮頸癌のような特定の癌の治療において、またはテストステロンもしくはエストロゲンのような特定のホルモンのレベルを低下させるためもしくは作用を遮断するために用いてもよい。この

10

20

30

40

50

治療はしばしば、治療の選択肢として、または転移のリスクを減少させるために少なくとも一つの他の癌治療と併用して用いられる。

【0274】

(表6) 腫瘍遺伝子

遺伝子	起源	ヒト疾患	機能	
増殖因子			<b>FGF</b> ファミリーメンバー	
<i>HST/KS</i>	トランスフェクション			
<i>INT-2</i>	<b>MMTV</b> プロモーター挿入		<b>FGF</b> ファミリーメンバー	
<i>INT1/WNT1</i>	<b>MMTV</b> プロモーター挿入		因子様	10
<i>SIS</i>	シミアン肉腫ウイルス		<b>PDGF B</b>	
受容体チロシンキナーゼ				
<i>ERBB/HER</i>	トリ赤芽ウイルス; <b>ALV</b> プロモーター挿入; 増幅されたヒト腫瘍	増幅、欠失された 扁平上皮癌; 神経膠芽腫	<b>EGF/TGF-<math>\alpha</math>/</b> アンフィレグリン/ ヘタセルリン受容体	
<i>ERBB-2/NEU/HER-2</i>	ラット神経膠芽腫から トランスフェクト	増幅された乳癌、 卵巣癌、胃癌	<b>NDF/</b> ヘレグリンおよび <b>EGF</b> -関連因子によって 調節	
<i>FMS</i>	<b>SM</b> ネコ肉腫ウイルス		<b>CSF-1</b> 受容体	
<i>KIT</i>	<b>HZ</b> ネコ肉腫ウイルス		<b>MGF/スチール</b> 受容体 造血	20
<i>TRK</i>	ヒト結腸癌からの トランスフェクション		<b>NGF</b> (神経生長因子) 受容体	
<i>MET</i>	ヒト骨肉種からの トランスフェクション		スキャッター因子/ <b>HGF</b> 受容体	
<i>RET</i>	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 新生物 <b>2A</b> および <b>2B</b>	オーファン受容体 <b>Tyr</b> キナーゼ	
<i>ROS</i>	<b>URII</b> トリ肉腫ウイルス		オーファン受容体 <b>Tyr</b> キナーゼ	
<i>PDGF</i> 受容体	転座	慢性骨髄球性白血病	<b>TEL(ETS-様転写因子)/</b> <b>PDGF</b> 受容体遺伝子融合体	30

遺伝子	起源	ヒト疾患	機能	
<i>TGF-β</i> 受容体		結腸癌ミスマッチ 変異標的		
非受容体チロシンキナーゼ				
<i>ABI</i>	アベルソン <i>MuL.V</i>	<i>BCR</i> による 慢性骨髄性白血病転座	<i>RB, RNA</i> ポリメラーゼ、 <i>CRK, CBL</i> と相互作用	
<i>FPS/FES</i>	トリフジナミ <i>SV;GA</i> <i>FeSV</i>			10
<i>LCK</i>	<i>MuL.V</i> (マウス白血病ウイルス) プロモーター挿入		<i>Src</i> ファミリー; <i>T</i> 細胞 シグナル伝達; <i>CD4/CD8</i> <i>T</i> 細胞と相互作用	
<i>SRC</i>	トリラウス肉腫ウイルス		シグナル伝達機能を有する 膜会合型 <i>Tyr</i> キナーゼ; 受容体キナーゼによる活性化	
<i>YES</i>	トリ <i>Y73</i> ウイルス		<i>Src</i> ファミリー; シグナル伝達	
<i>SER/THR</i> タンパク質キナーゼ				
<i>AKT</i>	<i>AKT8</i> マウスレトロウイルス		<i>PI(3)K</i> によって調節? <i>70-kd S6 k</i> を調節? <i>GVBD</i> ; 胞抑制因子; <i>MAP</i> キナーゼキナーゼ	20
<i>MOS</i>	モロニーマウス <i>SV</i>			
<i>PIM-1</i>	プロモーター挿入 マウス			
<i>RAF/MIL</i>	<i>3611</i> マウス <i>SV; MH2</i> トリ <i>SV</i>		<i>RAS</i> 経路における シグナル伝達	
その他の細胞表面				
<i>APC</i>	腫瘍抑制因子	結腸癌	カテニンと相互作用	
<i>DCC</i>	腫瘍抑制因子	結腸癌	<i>CAM</i> ドメイン	
<i>E-カドヘリン</i>	候補腫瘍抑制因子	乳癌	細胞外同型結合; カテニンと 細胞内相互作用	30
<i>PTC/NBCCS</i>	腫瘍抑制因子および ショウジョウバエ相同性	母斑様基底細胞癌症候群 (ゴーリン症候群)	<i>12</i> 回膜貫通ドメイン; ヘッジホッグ経路に 拮抗するために <i>Gli</i> 相同体 <i>CI</i> を通しての シグナル伝達	
<i>TAN-1 Notch</i> 相同体	転座	<i>T-ALL</i>	シグナル伝達	
その他のシグナル伝達				
<i>BCL-2</i> <i>CBL</i>	転座 <i>Mu Cas NS-1 V</i>	<i>B</i> 細胞リンパ腫	アポトーシス チロシンリン酸化 <i>RING</i> フィンガー相互作用 <i>Abl</i>	40
<i>CRK</i>	<i>CT1010 ASV</i>		適合 <i>SH2/SH3</i> 相互作用 <i>Abl</i>	
<i>DPC4</i>	腫瘍抑制因子	膵臓癌	<i>TGF-β</i> 関連シグナル伝達経路	
<i>MAS</i>	トランスフェクション および腫瘍形成性		おそらくアンジオテンシン 受容体	

遺伝子	起源	ヒト疾患	機能	
<i>NCK</i>			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				
<i>BCR</i>		<b>CML</b> において <b>ABL</b> による転座	交換因子;タンパク質 キナーゼ	
<i>DBL</i> <i>GSP</i> <i>NF-1</i>	トランスフェクション 遺伝性腫瘍抑制因子	腫瘍抑制因子 神経線維腫症	交換因子 <b>RAS GAP</b>	10
<i>OST</i> ハーベイ-キルシュテン, <b>N-RAS</b>	トランスフェクション <b>HaRat SV; Ki RaSV;</b> トランスフェクション	多くのヒト腫瘍における 点突然変異	交換因子 シグナルカスケード	
<i>VAV</i>	トランスフェクション		<b>S112/S113;</b> 交換因子	
核タンパク質および転写因子				
<i>BRCA1</i>	遺伝性抑制因子	乳癌 / 卵巣癌	場所不安定	
<i>BRCA2</i> <i>ERBA</i>	遺伝性抑制因子 トリ赤芽球症ウイルス	乳癌	機能不明 甲状腺ホルモン 受容体 (転写)	
<i>ETS</i> <i>EVII</i>	トリ <b>E26</b> ウイルス <b>MuLV</b> プロモーター 挿入	<b>AML</b>	<b>DNA</b> 結合 転写因子	20
<i>FOS</i>	<b>FBI/FBR</b> マウス 骨肉腫ウイルス		<b>c-JUN</b> を有する 転写因子	
<i>GLI</i>	増幅された神経膠腫	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 相同体はヘッジホッグ シグナル伝達経路に存在する; <b>PTC</b> およびヘッジホッグに 阻害性に連鎖する 遺伝子融合体高移動基 <b>HMGI-C (XT-hook)</b> および転写因子 <b>LIM</b> または酸性ドメイン	30
<i>HMGI /LIM</i>	転座 $t(3:12)$ $t(12:15)$	脂肪腫		
<i>JUN</i>	<b>ASV-17</b>		<b>FOS</b> を有する転写因子 <b>AP-1</b>	
<i>MLL/VHRX+</i> <i>ELI/MEN</i>	<b>MLL</b> 三胸様遺伝子を 有する転座 / 融合体 <b>ELL</b>	急性骨髄性白血病	<b>ELI RNA pol II</b> 伸長因子と <b>DNA</b> 結合および メチルトランスフェラーゼ <b>MLL</b> の遺伝子融合体	
<i>MYB</i>	トリ骨髄芽球症ウイルス		<b>DNA</b> 結合	
<i>MYC</i>	トリ <b>MC29;</b> 転座 <b>B</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	<b>MAX</b> パートナーとの <b>DNA</b> 結合; サイクリン 調節; <b>RB</b> と相互作用?; アポトーシスを調節?	40
<i>N-MYC</i> <i>L-MYC</i> <i>REL</i>	増幅 トリ細網内皮症ウイルス	神経芽腫 肺癌	<b>NF-κB</b> ファミリー 転写因子	

遺伝子	起源	ヒト疾患	機能	
<i>SKI</i>	トリ SKV770 レトロウイルス		転写因子	
<i>VHL</i>	遺伝性抑制因子	フォンヒッペル- リンダウ症候群	負の調節因子または エロンギン; 転写伸長複合体	
<i>WT-1</i>		ウィルムス腫瘍	転写因子	
細胞周期/DNA 損傷反応				
<i>ATM</i>	遺伝性障害	運動失調 - 血管拡張	タンパク質/ 脂質キナーゼ 相同性; P53 経路の 上流での DNA 損傷反応	10
<i>BCL-2</i> <i>FACC</i>	転座 点突然変異	濾胞性リンパ腫 ファンコーニ貧血 C 群 (素因 白血病)	アポトーシス	
<i>FHIT</i>	脆弱部位 3p14.2	肺癌	ヒスチジン3 構造関連 ジアデノシン 5',3'''- P <sup>1</sup> ,p <sup>4</sup> テトラホスフェート 非対称ヒドロラーゼ	
<i>hMLI/MutL</i>		HNPCC	ミスマッチ修復; MutL 相同体	20
<i>HMSH2/MutS</i>		HNPCC	ミスマッチ修復; MutS 相同体	
<i>HPMS1</i>		HNPCC	ミスマッチ修復; MutL 相同体	
<i>hPMS2</i>		HNPCC	ミスマッチ修復; MutL 相同体	
<i>INK4/MTS1</i>	9p21での隣接 INK-4B ; CDK 複合体	候補 MTS1 抑制剤および MLM 黒色腫遺伝子	p16 CDK 阻害剤	
<i>INK4B/MTS2</i> <i>MDM-2</i> <i>p53</i>	増幅 SV40 T 抗原に関連	候補抑制因子 肉腫 遺伝性リ・フラウメニ症候群 を含む、>50% ヒト腫瘍 において変異	p15 CDK 阻害剤 負の調節因子 p53 転写因子; チェックポイント制御; アポトーシス	30
<i>PRAD1/BCL1</i>	副甲状腺ホルモンまたは IgG による転座	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 腫瘍抗原に関連	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; 皮膚癌素因	切除修復; 光化学反応生成物 認識; ジンクフィンガー	40

## 【 0 2 7 5 】

## 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を証明するために含まれる。下記の実施例に開示された技術は、本発明の実践にあたって十分に機能すると本発明者らによって発見された技術の代表的なものであり、このように、本発明の実践の好ましい様式を構成すると見なすことができると当業者によって認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、開示される特定の態様に多くの変更を行うことができ、それでも同様または類似の結果を得ることができるが、それらも本発明の趣旨および範囲に含まれることを認識しなければならない。

## 【0276】

## 実施例1

## 細胞株におけるワクシニアウイルス増殖

日常的に入手可能な異なるワクシニアウイルス研究所株/入手可能な変異体(およびウサギ痘および他のポックスウイルス)16個のパネルを評価した:コペンハーゲン、ダイレン、エバンス、USSR、タシケント、チャンタン、WR、IHD-J、IHD-W、リスター、NYCBOH、パトワダンガー、キング、ならびにWR変異体B8R、B18R、およびB13R。複製は癌細胞と正常細胞の双方において評価した。好ましいウイルスは、癌細胞において比較的高い複製を有し、正常細胞において低い複製を有するであろう(すなわち、腫瘍と正常細胞のあいだの治療比または指数がより大きい)。ヒト腫瘍細胞株2個を調べた:A2780結腸癌およびHCT116結腸癌(アメリカンタイプカルチャーコレクション)。正常細胞には、正常ヒト気管支上皮(NHBE)細胞が含まれた。増殖細胞を用いる細胞変性効果アッセイの場合、細胞を70%コンフルエンスまで増殖させて(2%FBSを含むDMEM)、その時点で細胞を感染多重度(MOI)0.001~10で感染させた。5~6日後、プレートをMTT(プロメガ(Promega))によって染色し、吸光度を定量した。正常細胞は、完全なコンフルエンスまで増殖させた後非増殖性となり、その後0.2%FBSを含むDMEMにおいて培養した。増殖の欠如は、細胞周期分析および細胞数によって確認した。各試料を1試料あたり4個ずつアッセイして、少なくとも2回繰り返した。ウイルス複製アッセイに関して、細胞を70%コンフルエンスまで増殖させて(Heiseら(2000)におけるように、NHBE細胞に関して37°C、5%CO<sub>2</sub>、2%FBSおよびさらなる増殖因子を添加したDMEM)、その時点で細胞を、各ウイルスに関して感染多重度(MOI、粒子/細胞比)1~10で感染させた。3時間インキュベートした後、培地を除去して、新しく添加した培地に交換した。48時間後(これまでのデータは、ワクシニアの複製がこの時点でピークに達したことを証明した)、ウイルス力価分析のために細胞と上清の双方を回収した。細胞溶解物は、凍結融解3サイクルを行い、超音波/水浴において30秒間パルスを行った。次に、ウイルスを蔗糖クッションを通して精製し、上清および溶解物の連続希釈液の力価をBSC-1細胞において測定した(Alcami and Smith(1995)に記述される精製および力価測定)。

## 【0277】

例としての結果を図1~4に示す。二つの癌細胞株におけるコペンハーゲンウイルスの複製は、アッセイにおける他の全てのウイルスと同等であるか、または優れていた(図1Aおよび1B;y軸はプラーク形成単位/ml±S.E.)。対照的に、正常ヒト細胞において、コペンハーゲン株は、他のウイルスと比較して弱毒化された(図2)。最後に、全てのウイルスに関して癌細胞対正常細胞におけるバーストの比を図3(A2780:NHBE)および図4(HCT116:NHBE)に示す。コペンハーゲンは、A2780(P<0.001)およびHCT116(p<0.001)の双方において有意に大きいバースト比を有した。バースト比はコペンハーゲン株に関してそれぞれ、約20,000および30,000であったが、他の全てのウイルスは、5000より低い比を有し、ほとんどは2000未満であった(例えば、リスターおよびワイス(Wyeth))。同様にA2780およびHCT116におけるインビトロ細胞変性効果においてコペンハーゲン株による腫瘍細胞障害は、リスターおよびNYCBOH株より大きいかまたは等しかった。

## 【0278】

## 実施例2

## パクリタキセルと併用したワクシニアウイルス

アデノウイルスおよびHSVのようなウイルスは、化学療法と併用して研究されているが、ワクシニアウイルス(コペンハーゲン株を含む)は研究されていない。VVは、プロドラッグ活性化酵素(例えば、チミジンキナーゼ)を発現するように操作されており、プロドラッグ活性化遺伝子産物による活性化後に毒性となる比較的非毒性のプロドラッグと併用して研究されている(Puhlmannら、2000)。

## 【0279】

癌患者の治療に承認された標準的な細胞障害性化学療法とワクシニアウイルスとの相乗作用は、ワクシニアおよび特にコペンハーゲン株を含むポックスウイルスの好ましい特徴

10

20

30

40

50

であろう。パクリタキセル（タキソールとしても知られる）は、米国およびヨーロッパにおいて癌患者に使用することが承認されている。VVコペンハーゲン株を、HCT116およびLN CaP癌細胞株の双方においてタキソールと併用して調べた。イソボログラムの作製および分析から、タキソールと併用したVVの相乗作用が示された（図5）。イソボログラムは、図6、7、8および9に示す細胞生存に及ぼすCellTiter96（登録商標）水性非放射活性細胞増殖アッセイ（カタログ番号G5421、プロメガ社、マジソン、ウィスコンシン州）のようなMTSアッセイに由来するデータを用いて作製した。図5に示す全てのデータは、相乗効果も拮抗も存在しない場合のデータ点の予想位置を表す線の下に存在する；したがって、これらのデータ点は、これらの癌細胞株を殺すために相乗的相互作用があることを支持する。

10

#### 【0280】

方法は、DMEMプラス10%FCSを含む96ウェル培養皿において5%CO<sub>2</sub>で37℃で増殖しつつある細胞株を含んだ。細胞が約50%コンフルエンスに達した後、培地をDMEMプラス2%FCSに交換して、それらをパクリタキセル（用量範囲 $3 \times 10^{-8} \sim 3 \times 10^4$  nM、対数増加）および/またはウイルス（VVコペンハーゲン株をMOI  $10^{-6} \sim 10^5$  粒子/細胞で）によって処置した。細胞に、1) 偽処置、2) ウイルス処置のみ、3) タキソール処置のみ、4) ウイルス処置後タキソール処置のいずれかを行った。細胞を全体で6日間感染させた後、MTSアッセイ（プロメガ、ウィスコンシン州、アメリカ、製造元の説明書を参照されたい）を行った。細胞をタキソールに全体で6日間曝露した後、MTSアッセイ（製造元の説明書を参照されたい）を行った。組み合わせて処置した細胞を、ウイルス単独処置群と同一のように感染させて、上記のようにその後直ちにタキソール（ウイルス：タキソールの固定比）を処置した。次に、細胞を上記のようにアッセイした。MTS細胞生存データは、図6、7、8および9に示すように対照細胞の生存の百分率として表現した。相乗効果の評価に関するデータ分析（イソボログラム作製および分析）は、Nielsenら（1997、1998）に記述されている。簡単に説明すると、用量反応曲線を作製して、各細胞株（すなわち、および全ての試験条件）について各細胞株（無処置細胞と比較して）EC<sub>50</sub>値を計算した。各物質について濃度9個（上記を参照されたい）を単独および併用して用いた。VV/パクリタキセルに関して異なる4個の希釈比を、各実験に含めた（3、33、333、3333）。イソボログラムを作製して、相乗効果または拮抗作用を決定した。それぞれのデータ点は、1試料あたり3個ずつを表した。

20

30

#### 【0281】

##### 実施例3

##### ワクシニアウイルス投与による腫瘍退縮結果

C57B/6マウスの脇腹に、PBS 100  $\mu$ lに懸濁させたCMT-64細胞 $5 \times 10^5$ 個またはCMT-93細胞（マウス直腸癌） $10^6$ 個を注入することによって、皮下マウス腫瘍異種移植片を形成した。第一の実験において、B8RおよびB18RにおけるVV WR株変異体を、40  $\mu$ lに懸濁させた粒子 $10^4 \sim 10^8$ 個/日の用量で、免疫コンピテントC57/B6マウスの脇腹のCMT-93腫瘍（推定される基準値の腫瘍の大きさ40~100  $\mu$ l）に1、3、および5日目に皮下注射した。腫瘍の中心部に針1本の穿刺を行い、各腫瘍の4分の1に針4本の通路を作製した。針を引き抜きながら溶液の約4分の1を各通路に注入した。対照には、ソラレン-UV不活化ウイルスまたはPBSを同一に処置した。二方向の腫瘍の測定を2週間に1回行い、腫瘍体積を以下の式によって確立した：（長さ）（幅）（幅）（3.14/6）。

40

#### 【0282】

溶媒または不活化ウイルス対照注入腫瘍と比較して、有意な抗腫瘍効果および生存の増加が示され、用量反応関係を認めた。B8R変異体-VV  $10^8$ または $10^{10}$ 個を処置したマウス10匹中8匹に、完全な腫瘍の退縮を認め、これらは追跡期間（全3ヶ月）を通して腫瘍が消失したままであった。同じ用量レベルのB18Rを投与したマウス10匹中9匹に、完全な退縮を認め、同じ追跡期間のあいだ腫瘍が消失したままであった。対照群では持続する完全な退縮を認めたのは1例に過ぎなかった。生存期間の中央値は2週間であり、マウスは全て治療開始後24日までに屠殺した。生存は、粒子 $10^8 \sim 10^{10}$ 個の処置群において有意に増加した

50

(KM生存分析、対数階級検定； $p < 0.01$ )。動物の外観（例えば、活動性、立毛）を肉眼で観察して、体重を1週間に2回測定した；有意な体重または外観の変化は報告されなかった。

#### 【0283】

同一の治療/注射レジメを、CMT-64マウス腫瘍異種移植片モデルにおいてB18Rおよび溶媒対照について行った。完全な反応は証明されなかったが、屠殺を必要とする腫瘍の進行までの時間の遅延は、PBSまたはソラレン-UV不活化ウイルスに対してB18R治療群に関して非常に有意であった。（中央値は約2週間対4週間； $p < 0.05$ 、対数階級検定、腫瘍の進行による屠殺までの時間の Kaplan-Meier 分析）。

#### 【0284】

##### 実施例4

##### マウス腫瘍異種移植片に関するEEV増強有効性

皮下マウス腫瘍異種移植片は、PBS 100  $\mu$ l に懸濁させたJCマウス乳癌細胞 $5 \times 10^5$ 個を、免疫コンピテントBALB/cマウスの脇腹に皮下注射することによって形成した。腫瘍が注射可能な大きさに達した後（基準値の腫瘍の大きさ40~100  $\mu$ l）、ウェスタンリザーブ（IHD-J変異を有しないWR）VV、WRのIHD-J変異体（A34R/K151E変異）ウイルス、またはPBSを、皮下のJC腫瘍内に注射した。ウイルスの用量は、1、3、および5日目にPBS 40  $\mu$ l に懸濁させた粒子 $10^{10}$ 個/日であった（マウス $n = 8$ /処置群）。PBS対照を類似のレジメで注射した。腫瘍の中心部に針1本の穿刺を行い、各腫瘍の4分の1に針4本の通路を作製した。針を引き抜きながら溶液の約4分の1を各通路に注入した。対照には、PBSを同一に処置した。二方向の腫瘍の測定を2週間に1回行い、腫瘍体積を以下の式によって見積もった：（長さ）（幅）（幅）（3.14/6）。

#### 【0285】

IHD-J処置群は、PBS処置またはウェスタンリザーブ処置群と比較して、有意な抗腫瘍効果（腫瘍の増殖遅延および腫瘍の退縮）を示し、屠殺を必要とする腫瘍進行までの期間（すなわち生存）が延長した。Kaplan-Meier生存分析に基づくと、IHD-J群の屠殺を必要とする腫瘍進行までの期間（生存）は、対数階級統計検定（生存曲線を比較するために用いられる）に基づき、PBS（ $p$ 値 $< 0.05$ ）およびWR（ $p$ 値 $< 0.05$ ）の両者より有意に優れていた。生存期間の中央値は二つの対照群に関して2週間であったのに対し、IHD-J群では4.5週間であった。処置群におけるマウスはいずれも如何なる有意な肉眼的毒性を示さず、動物の治療関連死は発生しなかった。IHD-J変異によって、毒性が増加することなく抗腫瘍有効性が有意に増加した（IHD-J変異を有しないWRウイルスと比較して）。腫瘍は皮下で増殖して、腫瘍が直径2~6mmに達した場合に治療を開始するであろう。

#### 【0286】

##### 実施例5

##### IFN耐性癌細胞対正常細胞に関するインターフェロン結合遺伝子の欠失と選択性の増加

インターフェロン（IFN）-結合遺伝子に欠失を有するポックスウイルスが、野生型対照ポックスウイルスと比較して、より大きい腫瘍選択性を有するか否か、および正常細胞において複製の減少を示すか否かを評価するために試験を行った。WR（ウェスタンリザーブ）およびB18R遺伝子に欠失を有するWR変異体（B18R）を、IFN-（1,000単位/mlをインビトロで感染後5時間に適用）の存在下または非存在下で複製に関して比較した（図10）。調べた細胞は、正常なヒト気管支上皮細胞（NHBE、クロナテイクス社（Clonetics Corp.）、アメリカ）、C33Aヒト子宮頸癌細胞（ATCC）およびHCT116ヒト結腸癌細胞（ATCC）であった。予備試験において、ウイルス複製に及ぼすインターフェロンの効果に対する感受性を決定するために、これらのウイルスに感染させる前の24時間、これらの細胞を、予めIFN（5,000単位/ml）によって前処置した。予想されたように、いずれのウイルスも、インターフェロン前処置による抑制に対して等しく感受性であった。NHBEおよびHCT116細胞は、ウイルス複製がIFN前処置を行った場合に有意に減少したことから、IFN感受性であることが証明された；C33A細胞は、IFN前処置がウイルス複製に対して有意な影響を及ぼさなかったことからIFN耐性であった。

10

20

30

40

50

## 【0287】

10%FCSを含むDMEMにおいて癌細胞を増殖させ；正常細胞を、供給元の説明書に記述されているように血清を添加したDMEMにおいて増殖させた。細胞が約70%コンフルエンスに達した後、細胞を、感染多重度(moi)10粒子/細胞で感染させた。感染の5時間後、IFNを培地に濃度1,000単位/mlで加え(IFN+細胞)、または加えなかった(IFN-細胞)。細胞および溶解物を感染の48時間後に回収して、標準的なVV単離およびウイルス力価測定(プラーク形成単位測定)を行った(参照として本明細書に組み入れられる、Tscharkeら、2002によって記述されたBS-C-1細胞での滴定)。図10に示すように、B18Rにおける変異を有するVVは、NHBEを含む二つのIFN感受性細胞タイプにおいてIFNの存在下で複製を有意に阻害した( $p < 0.01$ 、IFNの非存在下と比較したスチューデントt検定)。対照的に、この変異体ウイルスは、IFN耐性C33A癌細胞において阻害されない。予想されるように、野生型WRは、機能的B18R遺伝子産物の存在によりIFN処置によって影響を受けなかった( $P = 0.8$ )。他のIFN耐性癌細胞株について類似の結果が得られた。したがって、IFN結合遺伝子B18Rの欠失によって、野生型ウイルスと比較して治療指数の増加および正常細胞保護が起こった。

10

## 【0288】

B8RおよびB18RにおけるIFN結合変異体も同様に、マウス腫瘍異種移植片モデルにおいて抗腫瘍有効性を証明した。B18Rおよび/またはB8R欠失に起因する相対的安全性の増強は、標的IFN分子のマウス型が、有意に減少した親和性で結合することから、マウスでは過小評価されるであろう(Symonsら、2002)。Symonsらに記述される方法を用いてウサギまたはヒト以外の霊長類において行われる皮内注射試験を用いて、さらなる研究を行ってもよく、ウサギに関してそこで報告された結果と類似の結果が得られる可能性がある(B8R変異体VVは、野生型対照と比較して、炎症細胞の動員の増加およびその結果としての皮膚病変からのウイルス消失の加速を示した)。したがって、抗腫瘍有効性および正常細胞からのウイルス消失の加速は、インビトロで証明されており、インビボで証明される可能性がある(Symonsら)。

20

## 【0289】

## 実施例6

## TNF調節機能の喪失の影響を示すための予測的実施例

一つまたはそれ以上のサイトカインまたはケモカイン阻害遺伝子の欠失/不活化を有するおよび有しないマッチさせたウイルス(例えば、野生型WRワクシニアおよびB29R/vCKBPにおいて欠失を有する変異体)を用いて、免疫コンピテント(C57B/6またはBALB/c)マウスにおいてマウス腫瘍(例えば、CMT-93、CMT-64、またはJC)を感染させる。この比較は、ウイルス遺伝子産物がヒト型と類似の程度にマウスサイトカイン/ケモカインを阻害することができる場合に限って、有効となるであろう。ウイルス複製(経時的プラーク形成単位)、CCケモカインレベル(例えば、免疫組織化学染色またはELISAアッセイ)、サイトカインレベル(例えば、免疫組織化学(IHC)染色またはELISAアッセイ)、および炎症細胞浸潤(HおよびE、またはIHC染色)を、静脈内および/または腫瘍内投与後(ウイルス粒子 $10^5 \sim 10^{10}$ 個を1~6回投与)の腫瘍組織および正常組織において評価する。さらに、双方のウイルスの抗腫瘍有効性(カプランメイヤー腫瘍退縮/生存曲線)および毒性(体重減少；血液学；および血清化学試験)を評価するであろう。結果は、変異体ウイルスが、1)増強された有効性および腫瘍内の炎症の誘導(例えば、免疫エフェクター細胞動員の増加)；2)類似または減少した正常組織における複製および毒性(例えば、肝臓、脾臓、肺、および/または脳)；ならびに3)腫瘍特異的細胞媒介免疫の誘導の増強または維持。最後に、化学療法および/または放射線療法と併用した抗腫瘍有効性は、野生型ウイルスより変異体ウイルスに関してより大きいと予測される。毒性試験はまた、本発明のウイルスの特徴をさらに調べるために、ウサギおよびヒト以外の霊長類において実施してもよい(参照として本明細書に組み入れられる、Tscharkeら、2002)。

30

40

## 【0290】

## 実施例7：

50

### インターフェロン調節機能の喪失の影響を示すための予測的実施例

一つまたはそれ以上のインターフェロン結合ポリペプチドの欠失/不活化を有するおよび有しないマッチさせたウイルス（例えば、野生型WRワクシニアおよびB18Rにおいて欠失を有する変異体）を用いて、これまでの実施例において考察したように、その標的IFN分子がワクシニアウイルス遺伝子産物に有効に結合する免疫コンピテント動物において腫瘍に感染させる。注目すべきは、マウスインターフェロンはヒトインターフェロンと比較してVVポリペプチドに対して比較的耐性であることから、マウスにおける結果は、ヒトにおける結果よりはるかに有意ではないと予測される。ウイルス複製および腫瘍組織および正常組織における伝播を、上記のように静脈内および/または腫瘍内投与後に評価する。さらに、双方のウイルスの抗腫瘍有効性および毒性を、上記のように評価する。予想される結果は、変異体ウイルスが、正常組織（例えば、肝臓、脾臓、肺、および/または脳）において複製および毒性の減少を示すであろうこと、そして複製および壊死の誘導がなおも腫瘍において起こるのであるという点である。野生型ワクシニア（例えば、WR）は、正常および腫瘍組織における複製/壊死の誘導の差がより小さいことを証明するであろう。さらに、変異体ウイルスによって処置した腫瘍は、生理食塩液処置対照および野生型ウイルス処置対照腫瘍と比較して血管の減少を有するであろう（例えば、HおよびE染色、同等の血管マーカーに対してCD31に関してIHC）。最後に、免疫媒介抗腫瘍有効性および化学療法および/または放射線療法と併用した有効性は、野生型ウイルスより変異体ウイルスの場合により大きいと予想される。本発明のウイルスの特徴をさらに調べるために、ウサギまたはヒト以外の霊長類において毒性試験を同様に行ってもよい（参照として本明細書に組み入れられる、Tscharkeら、2002）。

10

20

【0291】

#### 実施例8：

##### セリンプロテアーゼ阻害剤機能の喪失の影響を示すための予測的実施例

上記のように、抗アポトーシス遺伝子の欠失/不活化を有するおよび有しないマッチさせたウイルスを、免疫コンピテントマウスにおいて腫瘍に感染させるために用いることができるであろう。ウイルスには、B13R（SPI-2）の発現を有するまたは有しないワクシニアウイルスが含まれるがこれらに限定されない。上記のように静脈内投与後に、腫瘍組織および正常組織におけるウイルス複製および伝播を評価する。さらに、変異体ウイルスの抗腫瘍有効性および毒性は、上記のように腫瘍内および/または静脈内投与後に評価されるであろう。予想される結果は、変異体ウイルスが、正常組織における複製の減少および毒性を示すであろうこと、および/または腫瘍組織と比較して正常組織からより速やかに排泄されるであろうということである。野生型ウイルスは、腫瘍組織と比較して正常組織において、複製と毒性とのあいだにより小さい差（もしあれば）を示すであろう。腫瘍内、腹腔内、静脈内または他の投与経路後の変異体ウイルスの抗腫瘍有効性は、野生型ウイルスの場合の有効性と同等であるかまたは優れていると予想される。併用化学療法試験は、同じモデル系を用いるであろう。マウスは、溶媒（プラセボ）、化学療法単独、ウイルス単独（野生型または変異体）、またはウイルスプラス化学療法を受けるであろう。変異体ウイルスプラス化学療法の有効性は、化学療法単独および野生型ウイルスプラス化学療法より優れていると予想される。類似の知見は、放射線療法と併用した場合にも予想される。

30

40

【0292】

#### 実施例9：

##### 補体制御機能の喪失の影響を示すための予測的実施例

上記のように、VCP遺伝子の欠失/不活化を有するおよび有しないマッチさせたウイルスを、免疫コンピテントマウスにおいて腫瘍に感染させるために用いることができるであろう。腫瘍組織および正常組織におけるウイルス複製および伝播は、上記のように静脈内投与または他の投与経路による投与後に評価する。さらに、変異体ウイルスの抗腫瘍効果および毒性は、上記のように、腫瘍内投与および/または静脈内投与後に評価されるであろう。予想される結果は、変異体ウイルスが正常組織において複製の減少および毒性を示

50

すであろうこと、および/または腫瘍組織と比較して正常組織からより有効に排泄されるであろうという点であろう。野生型ウイルスは、腫瘍組織の場合と比較して正常組織において複製と毒性のあいだにより小さい差(もしあれば)を示すであろう。腫瘍内、腹腔内、静脈内投与または他の投与経路による投与後の変異体ウイルスの抗腫瘍有効性は、野生型ウイルスの場合の有効性と同等であるかまたは優れていると予想される。併用化学療法試験は、同じモデル系を用いるであろう。例えば、マウスに、溶媒(プラセボ)、化学療法単独、ウイルス単独(野生型または変異体)、またはウイルスプラス化学療法を行う。変異体ウイルスプラス化学療法の有効性は、化学療法単独および野生型ウイルスプラス化学療法より優れていると予想される。類似の結果は、これらのウイルスと併用した腫瘍標的モノクローナル抗体についても示されるであろう。

10

**【0293】**

本明細書に開示および請求される組成物および方法は全て、本開示に照らして不適当な実験を行うことなく作製および実行されうる。本発明の組成物および方法を、好ましい態様に関して記述してきたが、本明細書に記述の組成物および/または方法、ならびに方法の段階または段階の順序を変化させてもよく、それらも本発明の概念、趣旨、および範囲に含まれることは当業者に明らかであろう。より詳しく述べると、化学および生理的に関連する特定の物質を、本明細書に記述の物質に置換してもよく、それでも同じまたは類似の結果が得られるであろうことは明らかであろう。当業者に明らかであるそのような類似の置換および改変は全て、添付の請求の範囲によって定義される本発明の趣旨、範囲、および概念に含まれると思われる。

20

**【0294】**

## 参考文献

以下の参考文献は特に参照として本明細書に組み入れられる。

U. S. Patent 4,554,101	
U. S. Patent 4,683,195	
U. S. Patent 4,683,202	
U. S. Patent 4,684,611	
U. S. Patent 4,800,159	
U. S. Patent 4,879,236	
U. S. Patent 4,883,750	10
U. S. Patent 4,946,773	
U. S. Patent 4,952,500	
U. S. Patent 5,220,007	
U. S. Patent 5,279,721	
U. S. Patent 5,284,760	
U. S. Patent 5,302,523	
U. S. Patent 5,322,783	
U. S. Patent 5,354,670	20
U. S. Patent 5,366,878	
U. S. Patent 5,384,253	
U. S. Patent 5,389,514	
U. S. Patent 5,399,363	
U. S. Patent 5,464,765	
U. S. Patent 5,466,468	
U. S. Patent 5,538,877	30
U. S. Patent 5,538,880	
U. S. Patent 5,543,158	
U. S. Patent 5,550,318	
U. S. Patent 5,563,055	
U. S. Patent 5,580,859	
U. S. Patent 5,589,466	
U. S. Patent 5,591,616	40
U. S. Patent 5,610,042	

U. S. Patent 5,633,016	
U. S. Patent 5,635,377	
U. S. Patent 5,641,515	
U. S. Patent 5,656,610	
U. S. Patent 5,702,932	
U. S. Patent 5,736,524	
U. S. Patent 5,739,169	10
U. S. Patent 5,780,448	
U. S. Patent 5,789,166	
U. S. Patent 5,789,215	
U. S. Patent 5,798,208	
U. S. Patent 5,798,339	
U. S. Patent 5,801,005	
U. S. Patent 5,824,311	20
U. S. Patent 5,824,348	
U. S. Patent 5,830,650	
U. S. Patent 5,830,880	
U. S. Patent 5,840,873	
U. S. Patent 5,843,640	
U. S. Patent 5,843,650	
U. S. Patent 5,843,651	
U. S. Patent 5,843,663	30
U. S. Patent 5,846,225	
U. S. Patent 5,846,233	
U. S. Patent 5,846,708	
U. S. Patent 5,846,709	
U. S. Patent 5,846,717	
U. S. Patent 5,846,726	
U. S. Patent 5,846,729	40
U. S. Patent 5,846,783	
U. S. Patent 5,846,945	
U. S. Patent 5,849,481	
U. S. Patent 5,849,483	

U. S. Patent 5,849,486	
U. S. Patent 5,849,487	
U. S. Patent 5,849,497	
U. S. Patent 5,849,546	
U. S. Patent 5,849,547	
U. S. Patent 5,851,770	
U. S. Patent 5,851,772	10
U. S. Patent 5,853,990	
U. S. Patent 5,853,992	
U. S. Patent 5,853,993	
U. S. Patent 5,856,092	
U. S. Patent 5,858,652	
U. S. Patent 5,861,244	
U. S. Patent 5,863,732	20
U. S. Patent 5,863,753	
U. S. Patent 5,866,331	
U. S. Patent 5,866,337	
U. S. Patent 5,866,366	
U. S. Patent 5,871,740	
U. S. Patent 5,871,986	
U. S. Patent 5,882,864	
U. S. Patent 5,900,481	30
U. S. Patent 5,905,024	
U. S. Patent 5,910,407	
U. S. Patent 5,912,124	
U. S. Patent 5,912,145	
U. S. Patent 5,912,148	
U. S. Patent 5,916,776	
U. S. Patent 5,916,779	40
U. S. Patent 5,919,626	
U. S. Patent 5,919,630	
U. S. Patent 5,922,574	
U. S. Patent 5,925,517	

- U. S. Patent 5,925,525
- U. S. Patent 5,925,565
- U. S. Patent 5,928,862
- U. S. Patent 5,928,869
- U. S. Patent 5,928,870
- U. S. Patent 5,928,905
- U. S. Patent 5,928,906
- U. S. Patent 5,928,906 10
- U. S. Patent 5,929,227
- U. S. Patent 5,932,413
- U. S. Patent 5,932,451
- U. S. Patent 5,935,791
- U. S. Patent 5,935,819
- U. S. Patent 5,935,825
- U. S. Patent 5,939,291 20
- U. S. Patent 5,942,391
- U. S. Patent 5,945,100
- U. S. Patent 5,981,274
- U. S. Patent 5,994,624
- Alcami and Smith, *Cell.*, 71(1):153-67, 1992.
- Alcami *et al.*, *Sem. Virol.*, 5:419-427, 1998.
- Alcami *et al.*, *Virology*, 74(23):11230-9, 2000.
- Almendro *et al.*, *J. Immunol.*, 157(12):5411-5421, 1996. 30
- Andoh *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 50(12):663-72, 2002.
- Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987.
- Angel *et al.*, *Cell*, 49:729, 1987b.
- Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987a.
- Arap *et al.*, *Cancer Res.*, 55(6):1351-1354, 1995.
- Atchison and Perry, *Cell*, 46:253, 1986.
- Atchison and Perry, *Cell*, 48:121, 1987.
- Austin-Ward and Villaseca, *Rev. Med. Chil.*, 126(7):838-45, 1998. 40
- Ausubel *et al.*, *In: Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, New York, 1994.

- Bajorin *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 6(5):786-92, 1988.
- Bakhshi *et al.*, *Cell*, 41(3):899-906, 1985.
- Banerji *et al.*, *Cell*, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.
- Banerji *et al.*, *Cell*, 33(3):729-740, 1983.
- Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31(1): 1355-1376, 1994.
- Berkhout *et al.*, *Cell*, 59:273-282, 1989.
- Blanar *et al.*, *EMBO J.*, 8:1139, 1989. 10
- Blasco and Moss, *J. Virology*, 66(7): 4170-4179, 1992.
- Blasco *et al.*, *J. Virology*, 67(6):3319-3325, 1993.
- Bodine and Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.
- Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521, 1985.
- Bosze *et al.*, *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.
- Boyd *et al.*, *Cell*, 79:341-351, 1994.
- Braddock *et al.*, *Cell*, 58:269, 1989. 20
- Braisted and Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(12):5688-5692, 1996.
- Brizel, *Semin. Radiat. Oncol.*, 8(4):237-246, 1998.
- Bukowski *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 4(10):2337-47, 1998.
- Bulla and Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.
- Burton and Barbas, *Adv. Immunol.*, 57:191-280, 1994.
- Caldas *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):27-32, 1994.
- Campbell and Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.
- Campere and Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989. 30
- Campo *et al.*, *Nature*, 303:77, 1983.
- Caragine *et al.*, *Cancer Res.*, 62(4):1110-5, 2002.
- Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.
- Celander and Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.
- Celander *et al.*, *J. Virology*, 62:1314, 1988.
- Chandler *et al.*, *Cell*, 33:489, 1983.
- Chandler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997. 40
- Chang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
- Chatterjee *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:9114, 1989.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Cheng *et al.*, *Cancer Res.*, 54(21):5547-5551, 1994.

- Choi *et al.*, *Cell*, 53:519, 1988.
- Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-37, 1998.
- Cleary and Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (21):7439-7443, 1985.
- Cleary *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164(1):315-320, 1986.
- Cocea, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Cohen *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.
- Colamonici *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:15974-15978, 1995. 10
- Cooley *et al.*, *Science*, 239(4844):1121-1128, 1988.
- Costa *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:81, 1988.
- Cripe *et al.*, *EMBO J.*, 6:3745, 1987.
- Culotta and Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376, 1989.
- Culver *et al.*, *Science*, 256(5063):1550-1552, 1992.
- Cunningham and Wells, *Science*, 244(4908):1081-1085, 1989
- Curran, *Semin. Radiat. Oncol.*, 8(4 Suppl 1):2-4, 1998. 20
- Dandolo *et al.*, *J. Virology*, 47:55-64, 1983.
- Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-98, 1998.
- De Villiers *et al.*, *Nature*, 312(5991):242-246, 1984.
- Deschamps *et al.*, *Science*, 230:1174-1177, 1985.
- Dillman, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14(1):5-10, 1999.
- Dobbelstein and Shenk, *J. Virology*, 70:6479-6485, 1996.
- Durrant and Spendlove, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2(7):959-66, 2001.
- Edbrooke *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989. 30
- Edlund *et al.*, *Science*, 230:912-916, 1985.
- Eliopoulos *et al.*, *Oncogene*, 11(7):1217-28, 1995.
- el-Kareh and Secomb, *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 25(6):503-571, 1997.
- Erlandsson, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 104(1):1-18, 1998.
- European Appl. 320 308
- European Appl. 329 822
- Feng and Holland, *Nature*, 334:6178, 1988. 40
- Firak and Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.
- Foecking and Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.

- Frohman, In: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1990.
- Fujita *et al.*, *Cell*, 49:357, 1987.
- GB Application 2 202 328
- Genbank Accession Number NC\_001559
- Gertig *et al.*, *Semin. Cancer Biol.*, 8(4): 285-98, 1998.
- Gilles *et al.*, *Cell*, 33:717, 1983. 10
- Gloss *et al.*, *EMBO J.*, 6:3735, 1987.
- Gnant *et al.*, *Cancer Res.*, 59(14):3396-403, 1999.
- Godbout *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.
- Goebel *et al.*, *Virology*, 179(1): 247-66 and 517-63, 1990.
- Goodbourn and Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.
- Goodbourn *et al.*, *Cell*, 45:601, 1986.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973. 20
- Graham *et al.*, *Virology*, 229(1):12-24, 1997.
- Greene *et al.*, *Immunology Today*, 10:272, 1989
- Gross *et al.*, *Genes Dev.*, 13(15):1899-911, 1999.
- Grosschedl and Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.
- Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-5, 1998.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Haslinger and Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985.
- Hauber and Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988. 30
- Heise *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 6(6):499-504, 1999.
- Hellstrand *et al.*, *Acta Oncol.*, 37(4):347-353, 1998.
- Hen *et al.*, *Nature*, 321:249, 1986.
- Hensel *et al.*, *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
- Hermiston, *J. Clin. Invest.*, 105:1169-1172, 2000.
- Herr and Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
- Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271(9):4699-4708, 1996. 40
- Hirochika *et al.*, *J. Virology*, 61:2599, 1987.
- Hirsch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.
- Ho *et al.*, *Environ Health Perspect*, 106(5):1219-1228, 1998.

- Holbrook *et al.*, *Virology*, 157:211, 1987.
- Homey *et al.*, *Nature. Rev. Immunol.*, 2:175-184, 2002.
- Horlick and Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Huang *et al.*, *Cell.*, 27:245, 1981.
- Hug *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065, 1988.
- Hui and Hashimoto, *Infect. Immun.*, 66(11):5329-36, 1998.
- Hussussian *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):15-21, 1994. 10
- Hwang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Ikeda *et al.*, *Nat. Med.*, 5(8):881-7, 1999.
- Imagawa *et al.*, *Cell*, 51:251, 1987.
- Imbra and Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
- Imler *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
- Imperiale and Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- Innis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(24):9436-9440, 1988. 20
- Inouye and Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985.
- Irie and Morton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(22):8694-8698, 1986.
- Irie *et al.*, *Lancet.*, 1(8641):786-787, 1989.
- Isaacs *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(2):628-32, 1992.
- Jakobovits *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988.
- Jameel and Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- Jaynes *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
- Johnson and Hamdy, *Oncol. Rep.*, 5(3):553-7, 1998. 30
- Johnson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393, 1989.
- Ju *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59(3):241-50, 2000.
- Kadesch and Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.
- Kaeppeler *et al.*, *Plant Cell Reports*, 9: 415-418, 1990.
- Kamb *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):23-2, 1994.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987. 40
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Katinka *et al.*, *Cell*, 20:393, 1980.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kawamoto *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988.

- Kay *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(9):4686-91, 1997.
- Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer*, 26(4):239-257, 1972.
- Kettle *et al.*, *J. Gen. Virology*, 78:677-685, 1997.
- Kiledjian *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.
- Kirn *et al.*, *Nat. Med.*, 7(7):781-787, 2001.
- Klamut *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.
- Koch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
- Kolmel, *J. Neurooncol.*, 38(2-3):121-5, 1998. 10
- Koncz *et al.*, *EMBO J.*, 9(5):1337-1346, 1990.
- Kraus *et al.*, *FEBS Lett.*, 428(3):165-170, 1998.
- Kriegler and Botchan, *In: Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman (ed), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Kriegler and Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983.
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 38:483, 1984.
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 53:45, 1988. 20
- Kuhl *et al.*, *Cell*, 50:1057, 1987.
- Kunz *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
- Kwoh *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 1173, 1989.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 57(1):105-32, 1982.
- Lareyre *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274(12):8282-8290, 1999.
- Larsen *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:8283, 1986.
- Laspia *et al.*, *Cell*, 59:283, 1989.
- Latimer *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990. 30
- Lee *et al.*, *DNA Cell. Biol.*, 16(11):1267-75, 1997.
- Lee *et al.*, *Nature*, 294:228, 1981.
- Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.
- Levenson *et al.*, *Hum Gene Ther.* 20;9(8):1233-1236, 1998.
- Levinson *et al.*, *Nature*, 295:79, 1982.
- Liebermann, *Oncogene*, 17(10):1189-94, 1998.
- Lin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
- Luria *et al.*, *EMBO J.*, 6:3307, 1987. 40
- Lusky and Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986.
- Lusky *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3:1108, 1983.

- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Magi-Galluzzi *et al.*, *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 20(5):343-50, 1998.
- Majors and Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983.
- Mangray and King, *Front Biosci.*, 3:D1148-60, 1998.
- Marks *et al.*, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 45:77-87, 1991.
- Marsters *et al.*, *Recent Prog Horm Res*, 54:225-234, 1999.
- Mayer *et al.*, *Radiat. Oncol. Investig.*, 6(6):281-288, 1998. 10
- McCart *et al.*, *Gene Ther.*, 7(14):1217-23, 2000.
- McNeall *et al.*, *Gene*, 76:81, 1989.
- Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986.
- Mitchell *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, 690:153-166, 1993.
- Mitchell *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 8(5):856-869, 1990.
- Mordacq and Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- Moreau *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981. 20
- Mori *et al.*, *Cancer Res.*, 54(13):3396-3397, 1994.
- Morton *et al.*, *Arch. Surg.*, 127:392-399, 1992.
- Moss, In: *Fields Virology*, Fields (ed.), Lippincott-Raven Publ, Phila., 3:3637,2672, 1996.
- Moss, In: *Fields Virology*, Fields (ed.), Lippincott-Raven Publ, Phila., 3:3637-2672, 1996.
- Mossman *et al.*, *Virology*, 215(1):17-30, 1996.
- Mougin *et al.*, *Ann. Biol. Clin.*, (Paris) 56(1): 21-8, 1998.
- Muesing *et al.*, *Cell*, 48:691, 1987.
- Mumby and Walter, *Cell Regul.*, 2(8):589-98, 1991. 30
- Natoli *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 56(8):915-20, 1998.
- Ng *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nielsen *et al.*, *Cancer Gene Therapy*, 4(6):S12, 1997.
- Nielsen *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 4(4):835-846, 1998.
- Nobori *et al.*, *Nature*, 368(6473):753-6, 1994. 40
- Nomoto *et al.*, *Gene*, 236(2):259-71, 1999.
- Ochi *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 93(8): 1366-8, 1998.
- Ochi *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 93(8):1366-1368, 1998.
- Ohara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5673-5677, 1989.

- Ohara, *Gan To Kagaku Ryoho*, 25(6): 823-8, 1998.
- Okamoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1(23):11045-11049, 1994.
- Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-428, 1993.
- Ondek *et al.*, *EMBO J.*, 6:1017, 1987.
- Orlow *et al.*, *Cancer Res.*, 54(11):2848-2851, 1994.
- Ornitz *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987.
- Palmiter *et al.*, *Nature*, 300:611, 1982. 10
- PCT Appl. PCT/US87/00880
- PCT Appl. PCT/US89/01025
- PCT Appl. WO 88/10315
- PCT Appl. WO 89/06700
- PCT Appl. WO 90/07641
- PCT Appl. WO 94/09699
- PCT Appl. WO 95/06128 20
- Pech *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.
- Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.
- Perez-Stable and Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.
- Picard and Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.
- Pietras *et al.*, *Oncogene*, 17(17):2235-49, 1998.
- Pietras *et al.*, *Oncogene*, 17(17):2235-49, 1998.
- Pinkert *et al.*, *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.
- Ponta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985. 30
- Porton *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- Puhlmann, *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 7(1):66-73, 2000.
- Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- Queen and Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.
- Quinn *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.
- Ravindranath and Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303-329, 1991. 40
- Redondo *et al.*, *Science*, 247:1225, 1990.
- Reisman and Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.
- Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580
- Resendez Jr. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.

- Ripe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rittling *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:1619, 1989.
- Rosel *et al.*, *J. Virology*, 60(2):436-449, 1986.
- Rosen *et al.*, *Cell*, 41:813, 1988.
- Rosenberg *et al.*, *Ann. Surg.* 210(4):474-548, 1989.
- Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988. 10
- Sakai *et al.*, *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.
- Sambrook *et al.*, *In Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Saraiva and Alcamí, *J. Virology*, 75(1):226-33, 2001.
- Satake *et al.*, *J. Virology*, 62:970, 1988.
- Schaffner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.
- Searle *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.
- Seet *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(16):9008-13, 2001. 20
- Serrano *et al.*, *Nature*, 366:704-707, 1993.
- Serrano *et al.*, *Science*, 267(5195):249-252, 1995.
- Sharp and Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
- Sherman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Sinkovics and Horvath, *J. Clin. Viro.*, 16:1-15, 2000.
- Sleigh and Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Smith and Vanderplassen, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 440:395-414, 1998. 30
- Smith *et al.*, *Immunol. Rev.*, 159:137-154, 1997.
- Solyanik *et al.*, *Cell. Prolif.*, 28(5):263-78, 1995.
- Sommer *et al.* *EMBO J.*, 9(3):605-613, 1990.
- Spalholz *et al.*, *Cell*, 42:183, 1985.
- Spandau and Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos and Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Spriggs *et al.*, *Cell*, 71(1):145-52, 1992.
- Stephens and Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987. 40
- Stokke *et al.*, *Cell. Prolif.*, 30(5):197-218, 1997.
- Stuart *et al.*, *Nature*, 317:828, 1985.

- Sullivan and Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.
- Swartzendruber and Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- Symons *et al.*, *Cell*, 81:551-560, 1995.
- Takebe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- Tavernier *et al.*, *Nature*, 301:634, 1983.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b. 10
- Taylor *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
- Thiesen *et al.*, *J. Virology*, 62:614, 1988.
- Todo *et al.*, *Cancer Res.*, 61:153-161, 2001.
- Treisman, *Cell*, 42:889, 1985.
- Tronche *et al.*, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
- Trudel and Constantini, *Genes and Dev.* 6:954, 1987.
- Tsujimoto and Croce, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14):5214-5218, 1986.
- Tsujimoto *et al.*, *Science*, 228(4706):1440-1443, 1985. 20
- Tsumaki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273(36):22861-4, 1998.
- Tyndell *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
- Upton *et al.*, *Virology*, 184(1):370-82, 1991.
- Vanderplasschen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(13):7544-9, 1998.
- Vannice and Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.
- Vasseur *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1068, 1980.
- Vicari and Caus, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13:143-154, 2002.
- Vogelstein and Kinzler, *Cell*, 70(4):523-6, 1992. 30
- Walker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392-396 1992.
- Wallach *et al.*, In: *The cytokine network and immune functions*, Theze (ed.), Oxford Univ. Press, Oxford, UK, 51-84, 1999.
- Wang and Calame, *Cell*, 47:241, 1986.
- Warren *et al.*, *Biochemistry*, 35(27):8855-8862, 1996.
- Weber *et al.*, *Cell*, 36:983, 1984.
- Weinberger *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 8:988, 1984. 40
- Winoto and Baltimore, *Cell* 59:649, 1989.
- Wold *et al.*, *Trends Microbiol.*, 2:437-443, 1994.
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.

Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.

Yelton *et al.*, *J. Immunol.*, 155(4):1994-2004, 1995.

Yutzey *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 9:1397, 1989.

Zeng *et al.*, *Biochemistry*, 35(40):13157-13164, 1996.

Zhao-Emonet *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1442(2-3):109-119, 1998.

【図面の簡単な説明】

【 0 2 9 5 】

10

【図 1】図1Aおよび1Bは、(図1A) A2780ヒト卵巣癌細胞株および(図1B) HCT116ヒト結腸癌細胞株におけるワクシニアウイルス株複製の例を示す。(x軸は株を表し、y軸はプラーク形成単位/ml ± S.E.である)。

【図 2】正常ヒト気管支上皮細胞 (NHBE) におけるワクシニアウイルス株複製の例を示す。(x軸は株を表し、y軸はプラーク形成単位/ml ± S.E.である)。

【図 3】ワクシニアウイルス株に関して正常細胞 (NHBE) に対する癌細胞 (A2780) におけるバーストの比率 (バースト比) の例を示す。(x軸は株を表し、y軸はバースト比である)。

【図 4】ワクシニアウイルス株に関して正常細胞 (NHBE) に対する癌細胞 (HCT116) におけるバーストの比率 (バースト比) の例を示す。(x軸は株を表し、y軸はバースト比である)。バースト比は、正常または非腫瘍細胞に関するPFUと比較した腫瘍細胞に関するPFUの比である。

20

【図 5】図5Aおよび5Bは、HCT116 (図5B) およびLNCaP (図5A) 細胞株におけるワクシニアウイルス (コペンハーゲン株) とパクリタキセルとの相乗効果を示す図6、7、8、および9に示したデータに由来する例としてのイソボログラム分析を示す。

【図 6】パクリタキセルとワクシニアウイルスの併用を用いて、例としてのMTSアッセイに由来する例としてのHCT116細胞増殖データを示す。

【図 7】パクリタキセルとワクシニアウイルスの併用を用いて、例としてのMTSアッセイに由来する例としてのHCT116細胞増殖データを示す。

【図 8】パクリタキセルとワクシニアウイルスの併用を用いて、例としてのMTSアッセイに由来する例としてのLNCaP細胞増殖データを示す。

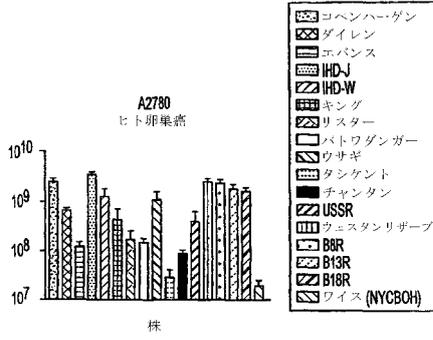
30

【図 9】パクリタキセルとワクシニアウイルスの併用を用いて、例としてのMTSアッセイに由来する例としてのLNCaP細胞増殖データを示す。

【図 10】IFN抵抗性およびIFN感受性細胞をWRまたはWR-B18R(-)に感染させてIFN治療を行った (感染5時間後にIFN-による処置) または行わない場合の例としての試験を示す。

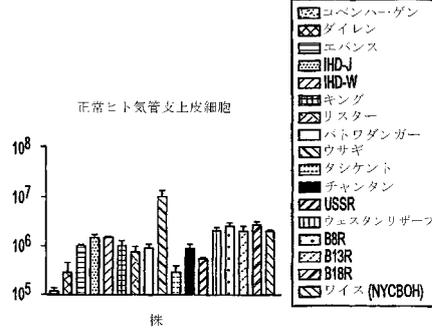
。

【 図 1 】

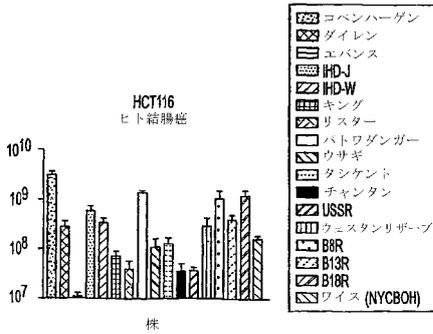


A

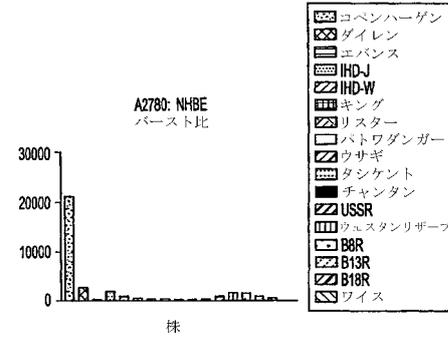
【 図 2 】



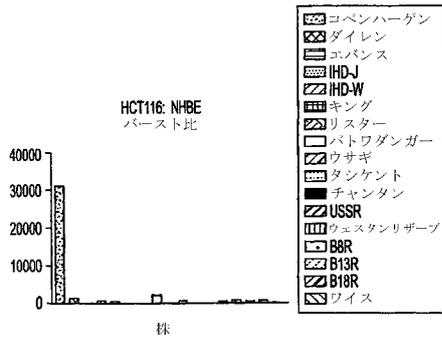
【 図 3 】



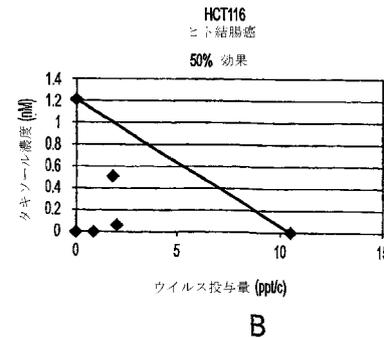
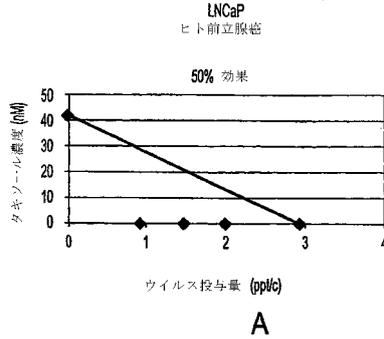
B



【 図 4 】



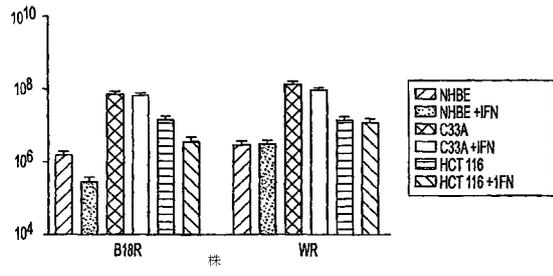
【 図 5 】





【 図 10 】

感染5時間後に1000U/ml IFNを  
処置した細胞



---

フロントページの続き

(72)発明者 ソーン スティーブ エイチ .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ アルト ウェブスター ストリート 257

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 国際公開第00/062735 (WO, A1)

PNAS, 1998年, Vol.95, pp.7544-7549

J. Virol., 1993年, Vol.67, No.6, pp.3319-3325

J. Virol., 1996年, Vol.70, No.1, pp.272-281

J. Virol., 1997年, Vol.71, No.5, pp.4032-4041

J. Gen. Virol., 1998年, Vol.79, pp.877-887

J. Virol., 1992年, Vol.66, No.7, p.4170-4179

J. Gen. Virol., 2001年, Vol.82, pp.1199-1213

Cell, 1995年, Vol.81, pp.551-560

Cell, 1992年, Vol.71, pp.153-167

Sem. Virol., 1998年, Vol.5, pp.419-427

J. Gen. Virol., 1997年, Vol.78, pp.677-685

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 7/00-7/08

A61K 35/76

A61K 37/02

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE(STN)

PubMed

Science Direct

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)