

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-521648
(P2005-521648A)

(43) 公表日 平成17年7月21日(2005.7.21)

(51) Int.Cl.⁷

A61K 49/00
A61B 1/00
A61P 35/00
A61P 43/00
C12Q 1/37

F 1

A 61 K 49/00
A 61 B 1/00
A 61 P 35/00
A 61 P 43/00
C 12 Q 1/37

テーマコード (参考)

4 B 0 6 3
4 C 0 6 1
4 C 0 8 4
4 C 0 8 5
4 C 2 0 6

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-557375 (P2003-557375)	(71) 出願人	502326772 アンチキャンサー インコーポレーテッド アメリカ合衆国 92111 カリフォルニア州, サンディエゴ, オストロウ ストリート 7917
(86) (22) 出願日	平成14年12月31日 (2002.12.31)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月26日 (2004.8.26)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/041822	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 國際公開番号	W02003/057007	(74) 代理人	100077425 弁理士 大屋 憲一
(87) 國際公開日	平成15年7月17日 (2003.7.17)		
(31) 優先権主張番号	60/345,699		
(32) 優先日	平成13年12月31日 (2001.12.31)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細菌による腫瘍治療をモニターするシステム

(57) 【要約】

被験体において腫瘍治療の経過を追跡する方法は、蛍光タンパク質を発現するように改変された細菌を利用する。本方法はまた、場合によっては腫瘍それ自体によって生じる蛍光を背景として、治療の過程で治療薬を産生する細菌に関連した遺伝子の発現をモニターすることも可能である。本方法によって、生きた被験体において治療の経過を可視化することが可能となり、治療の有効性に応じて治療を修正することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

固体腫瘍を有する被験体において腫瘍治療のプロセスをモニターする方法であって、時間の関数として前記被験体の固体腫瘍において蛍光の存在、非存在、もしくは強度を観察することを含んでなり、ここで前記被験体は第1の色を持つ第1の蛍光タンパク質を発現する細菌による治療を受けており、ここにおいて、前記腫瘍における前記第1蛍光タンパク質の蛍光の時間経過に伴う拡散が前記治療の前進を示す、前記方法。

【請求項 2】

前記観察が、無損傷の被験体における全身の蛍光光学的腫瘍画像によるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記観察が内視鏡検査による、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記被験体において腫瘍の退縮もしくは転移を観察することをさらに含んでなり、前記腫瘍が、第1の色とは異なる第2の色を持つ第2の蛍光タンパク質で標識される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

被験体が、マウス、ラットもしくはウサギであって、これらは第2の蛍光タンパク質を発現する腫瘍細胞を含有するように改変されている、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記被験体がヒトであって、ここにおいて前記被験体は前記第2蛍光タンパク質発現のためのウイルスベクターを投与されている、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記細菌が、治療用タンパク質の発現系を含有するように改変されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記治療用タンパク質が、前記第1蛍光タンパク質とは異なる色を持つ蛍光タンパク質との融合タンパク質として產生される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記細菌が、治療用タンパク質の発現系を含有するように改変されている、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 11】

前記治療用タンパク質が、第1および第2の色とは異なる第3の色を持つ第3の蛍光タンパク質との融合タンパク質として產生される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

被験体において腫瘍治療のためのプロトコルをモニターする方法であって、治療用タンパク質と融合した第1の色を持つ第1の蛍光タンパク質を発現するように改変された、細菌を用いて治療を受けた被験体の固体腫瘍において、蛍光の存在、非存在もしくは強度を時間の経過とともにモニターすることを含んでなり；そのために、前記腫瘍における前記第1蛍光タンパク質の存在および強度が時間経過に伴って維持されることは、治療用タンパク質が腫瘍を治療する場に存在することを確認することとなる、前記方法。

【請求項 13】

前記モニタリングが、無損傷の被験体における全身の蛍光光学的腫瘍画像によるものである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記モニタリングが内視鏡検査による、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

腫瘍の退縮もしくは転移を観察することをさらに含んでなり、前記腫瘍が、第1の色と

10

20

30

40

50

は異なる第2の色を持つ第2の蛍光タンパク質で標識される、請求項12に記載の方法。

【請求項16】

被験体が、マウス、ラットもしくはウサギであって、これらは、第2の蛍光タンパク質を発現する腫瘍細胞を含有するように改変されている、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記被験体がヒトであって、ここにおいて前記被験体は前記第2蛍光タンパク質発現のためのウイルスベクターを投与されている、請求項15に記載の方法。

【請求項18】

前記治療用タンパク質が酵素であって、ここにおいて方法が前記酵素によって切断可能なプロドラッグをさらに包含する、請求項12に記載の方法。

【請求項19】

前記治療用タンパク質がメチオニナーゼである、請求項12に記載の方法。

【請求項20】

前記治療用タンパク質がメチオニナーゼであって、前記プロドラッグがセレノメチオニンである、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記細菌が、前記第1の色と異なる色を持つ蛍光タンパク質を発現するようにさらに改変されている、請求項12に記載の方法。

【請求項22】

前記細菌が、前記第1および第2の色と異なる第3の色を持つ第3の蛍光タンパク質を発現するように改変されている、請求項15に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、米国特許法第119条(e)項に基づき、2001年12月31日提出の仮出願第60/345,699号からの利益を請求する。この出願の内容は、参考として本明細書に含めるものとする。

【技術分野】

【0002】

本発明は、腫瘍治療を行うためのベクターとして、ならびに所在および有効性をモニターする方法として、細菌を利用するにに関する。より詳細には、本発明は、抗腫瘍薬の送達および有効性をモニターするために、細菌において送達される蛍光タンパク質の利用に関する。

【背景技術】

【0003】

癌の進行および転移を可視化するための緑色蛍光タンパク質の利用は、これまでに十分確立されている。たとえば、Hoffman, R. M., *Methods in Enzymology*(1999) 302:20-31(P. Michael Conn編、Academic Press, San Diego)を参照されたい。リアルタイムの進行を図に示し、腫瘍の治療計画案の有効性を評価するための全身画像の利用は、米国特許第6,251,384号で開示されており、その内容は参考として本明細書に含めるものとする。

【0004】

緑色蛍光タンパク質の利点に含められる特徴は、それが蛍光を発するために基質もコファクターも何も必要としないこと、および生きた細胞でのその発現が明らかな生物学的損傷を何ら引き起こさないことである。加えて、発せられる蛍光のレベルは、これを、特に高感度の技術とする。全身画像は、簡単な設備、たとえば、キセノンもしくは水銀ランプからの490 nm励起によって、直接観察は言うまでもなく、CCDカラービデオカメラによる画像キャプチャに伴って得られる。こうしたことは、腫瘍の増殖および転移のリアルタイムでの検討を可能にする。たとえば、Yang, M.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(2000) 97:1206-1211を参照されたい。

【0005】

10

30

40

50

2001年6月9日提出の米国仮出願第60/304,223号は、その内容を参考として本明細書に含めることとするが、これは、感染をモニターし、そのための治療を評価することを目的として蛍光タンパク質を用いた大腸菌(*E. coli*)および他の細菌の標識化を記載する。この仮出願に記載された害のない方法で細菌を標識することが可能であることにより、最近発表された、腫瘍治療を目的とした細菌性溶解併用療法のためのプロトコルに、この技術を適合させることができるとなる。細菌を標識する技法は、Zhao, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001) 98:9814-9818、およびYang, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97:12278-12282にも記載されており、参考として本明細書に含めるものとする。

【0006】

細菌およびその産物を蛍光タンパク質で標識することができることは、Dang, L. H.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001) 98:15155-15160に記載された、新たに開発された、固体腫瘍の治療に向けたアプローチに劇的な改善をもたらす。腫瘍治療へのこのようなアプローチは、その開発者によって「細菌性溶解併用療法(combination bacteriolytic therapy)」もしくは“COBALT”と呼ばれるが、このアプローチは、ある種の嫌気性細菌の、固体腫瘍の内部の嫌気的環境において優先的に増殖する特性を利用するものである。この論文は、ビフィズス菌属(*Bifidobacterium*)、乳酸桿菌属(*Lactobacillus*)、およびクロストリジウム属(*Clostridium*)に属する多数の菌株の増殖特性を概説したが(そのすべてが腫瘍の低酸素領域で増殖する)、その事実を確証する非常に多数の論文を引用している。細菌それ自体を、腫瘍内に注入することも可能であろうが、より使いやすい投与法を提供するために、上記著者らは、やはり当技術分野で確立されている事実、すなわち、生きた細菌をそのまま静脈内に注入する場合には毒性があるが、こうした細菌の芽胞は、即時の副作用を引き起こすことなく正常なマウス静脈内に注入可能であるという事実を利用した。これは完全に正しいわけではなかった;細菌が毒素を分泌する能力を失わない限り、芽胞の静脈内投与は最終的には致命的であった。著者らは、単一の毒素遺伝子がファージエピソーム内に位置づけられるため、熱処理した細菌はファージを失うことを利用して、*Clostridium novyi*においてこの能力を奪うことに成功した。このようにして、芽胞が静脈内に投与されたときに毒性のない菌株が開発された。

【0007】

もう一つの直面する問題は、嫌気性細菌菌株の多くが腫瘍の低酸素環境において密集してごく少数のコロニーを形成しがちなことであった。*Clostridium novyi*および*C. Sordelli*が腫瘍の低酸素領域で分散して増殖できることが明らかになった。このように、無毒型の*C. novyi*(*C. novyi*-NT)を作り出すことによって、Dangらは、腫瘍へ向かう芽胞を静脈内に導入することができ、壊死領域におけるその独自の増殖によって、周囲の生存腫瘍細胞を破壊することができた。このような、細菌が低酸素の壊死領域(こうした領域が、>1 cm³の生検試料において、腫瘍体積の25%-75%を占めることが明らかになった)に到達する能力はきわめて重大である。壊死領域(酸素欠乏のために壊死する)は通常、生存細胞に囲まれている。こうした細胞には化学療法剤が到達しない、なぜなら、化学療法剤を運ぶ血液循環がないためである。さらにこうした細胞は比較的放射線の影響を受けないが、これは、放射線が致死的影響を及ぼすには酸素が必要であるためである。したがって、嫌気性細菌が腫瘍の低酸素環境において特によく増殖する能力によって、こうした細菌は、治療のための貴重な送達システムとなる。Dangらによって示されたように、細菌の増殖それ自体が、実際、腫瘍の退縮を引き起こすことができる。Yazawa, K.ら、Cancer Gene Therapy (2000) 17:269-274; Yazawa, K.ら、Breast Cancer Res. & Dev. (2001) 66:6665-170も参照されたい。

【0008】

これに先立って、同様のアプローチがLow, K. B.ら、Nature Biotechnology (1999) 17:34-41によって記載された。この場合、サルモネラ菌(*Salmonella*)菌株が嫌気的環境で生存することが可能で、腫瘍の低酸素領域で優先的に増殖することができるため、抗癌剤として開発された。また、このサルモネラ菌株は、Pawelek, J.ら、Cancer Res. (1997) 57:4537-4544により、腫瘍治療に有用なタンパク質、たとえばプロドラッグ変換酵素チミ

10

20

30

40

50

ジンキナーゼ、を産生するように改変された。しかしながら、腫瘍の治療におけるサルモネラ菌の利用は、リピドAによって刺激される腫瘍壞死因子 の誘導が原因で敗血症の発生によって止められた。Lowらは、敗血症を引き起こす細菌の能力を無効にするために、サルモネラ菌のmsb遺伝子を破壊してTNF の誘導を低下させることができたが、その一方で、抗腫瘍活性は維持された。上記著者らは、この変異させた細菌をメラノーマに罹ったマウスに投与した結果、18日後に腫瘍は非処理対照の腫瘍の<8%の大きさとなった。

【0009】

このように、当技術分野において、通性嫌気性菌を含めた嫌気性細菌が腫瘍の低酸素領域に選択的に到達することができる、およびこのような細菌に通常付随する毒作用を欠いた、その変異型は、治療において安全に使用することが可能であることが示されている。

【0010】

蛍光タンパク質の適当な発現を得るための材料および方法は、容易に利用できる。多様な色を生じるように様々なに改変された形のGFPを含有するベクターがClontechから市販されている。哺乳動物細胞発現に向けたClontechベクターは、GFPを、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの制御下においている;こうした発現系を用いてウイルス性病原体を標識することもできる。GFP発現細菌は、すでに数多くの研究で用いられているが、その研究は無損傷の生きた動物においてではなかった(Wu, H.ら、Microbiol. (2000) 146:2481-2493; Ling, S. H. M.ら、Microbiol. (2000) 146:4-19; Badger, J. L.ら、Mol. Microbiol. (2000) 36(1):174-182; Kohler, R.ら、Mol. Gen. Genet. (2000) 262: 106 20 0-1069; Valdivia, R. H.ら、Gene (1996) 173:47-52; Valdivia, R. H.ら、Science (1997) 277:2007-2011; Scott, K. P.ら、FEMS Microbiol. Ltrs. (2000) 182:23-27; Prachaiyo, P.ら、J. Food Protect. (2000) 63:427-433; Geoffroy, M-C.ら、Applied & Env. Microbiol. (2000) 66:383-391)。このような研究の一例は、筋肉組織の、病原性大腸菌O157H GFP(Prachaiyo, P.ら、上記)によるin vitro感染の可視化であった。別のアプローチは、胃腸組織の除去および固定によって、胃管栄養法による感染後のマウスの胃腸管を検査した(Geffroy, M-C.、上記)。GFPを形質導入されたEdwardsiella tardaに感染した魚は、その臓器を除去した後、感染について画像化された(Ling, S. H. M.ら、上記)。ビルレンスに関連する遺伝子および他の感染プロセスがGFP発現と関連づけて評価された(Ling, S. H. M.ら、上記; Badger, J. L.ら、上記; Kohler, R. ら、上記; Valdivia, R. H.ら、上記(1996))。

【発明の開示】

【0011】

本発明は、低酸素の腫瘍領域で増殖可能な細菌のターゲティングおよび増殖をモニタし、こうした細菌によって与えられる抗腫瘍活性の良好な産生を評価する手段を提供する。同時に、腫瘍細胞それ自体を標識して観察することによって治療の有効性を評価することができる。このように、本発明は、こうした細菌によって仲介される腫瘍治療をモニタし、必要があれば修正する手段を与えるものである。

【0012】

したがって、ある態様において、本発明は、低酸素の腫瘍塊に限局されて、その中に分散する細菌増殖の分布を検証する方法に関するが、ここでその方法は、生きた被験体において非侵襲的に、前記被験体に投与された細菌内に含まれる蛍光タンパク質によって発せられる蛍光を検出することを含んでなる。

【0013】

別の態様において、本発明は、細菌によって産生される抗腫瘍薬の産生(前記の産生は被験体の腫瘍の低酸素性塊の中に限局される)を、生きた被験体において非侵襲的に、被験体に投与された細菌によって産生される治療薬と融合したタンパク質の蛍光を検出することによって、モニターする方法に関する。

【0014】

第3の態様において、本発明は、治療薬として、および/または治療薬のための、固形

10

20

30

40

50

腫瘍の低酸素塊への送達システムとして細菌を使用する、腫瘍治療の有効性をモニターする方法に関するが、ここでこの方法は、腫瘍の増殖もしくは非増殖、およびその転移の様態を、蛍光タンパク質で標識された腫瘍によって発せられる蛍光を評価することによって検出することを含んでなる。蛍光発光の様々な波長を使用することによって、上記の治療的アプローチをモニターすることと併せて、このような進行を追跡することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明は、固体腫瘍の低酸素部分の、細菌による感染の進行をモニターするためのシステムを提供する。この細菌は、このような腫瘍内の嫌気的な、もしくは基本的に嫌気的な低酸素領域で生存できる細菌でなければならない。したがって、この細菌は、通性嫌気性菌または偏性嫌気性菌のいずれかでなければならない。大腸菌のような通性嫌気性菌は、ほとんどの偏性嫌気性菌よりも、細菌に曝された被験体に対する毒性が低いため、そういう菌が好ましい。固体腫瘍において細菌の移動および定着を追跡できるように、また、これらの細菌による治療薬の局所的な産生を制御して評価できるように、可視化マーカーである蛍光タンパク質を利用して細菌を標識する。

【0016】

蛍光タンパク質の使用によって、無損傷の動物において蛍光細胞の移動、およびタンパク質の産生を観察するのに十分な強度を達成することができるので、上記の態様を判定することに加えて、腫瘍の退縮および転移の進行、もしくはそれらの抑制を、無損傷の被験体において観察することができる。これは腫瘍細胞それ自体を、異なる波長で蛍光を発するタンパク質によって標識することができるためである。

【0017】

本発明の様々な態様で使用される標識は蛍光タンパク質、すなわち、適当な波長で照射されたときに可視光を発するタンパク質である。このクラスの有力タンパク質である緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする天然遺伝子が生物発光性オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) からクローニングされた (Morin, J.ら、J. Cell Physiol (1972) 77:313-318)。この遺伝子が利用できることによって、GFPを遺伝子発現のマーカーとして使用することが可能となった。本来のGFP、それ自体は、27 kDの分子量を持つ283アミノ酸のタンパク質である。GFPは、天然起源に由来する追加のタンパク質も、蛍光を発するために天然起源においてのみ利用可能な基質もしくはコファクターも必要としない。(Prasher, D. C.ら、Gene (1992) 111:229-233; Yang, F.ら、Nature Biotechnol (1996) 14:1252-1256; Cody, C. W.ら、Biochemistry (1993) 32:1212-1218) 本来のGFP遺伝子の変異が、発現を増強し、その産物の励起および蛍光を変更するのに有用であることが判明し、赤、黄、および青も含めてさまざまな色の "GFP" が得られた。GFP-S65T (ここにおいて、65位のセリンはトレオニンで置換されている) は、本発明の方法において特に有用であって、490 nmに単一励起ピークを有する (Heim, R.ら、Nature (1995) 373:663-664; 英国特許第5,625,048号)。他の変異体も、Delagrade, S.ら、Biotechnology (1995) 13: 151-154; Cormack, B.ら、Gene (1996) 173:33-38およびCramer, A.ら、Nature Biotechnol (1996) 14:315-319によって開示された。また、さらに別の変異体が米国特許第5,625,048号で開示されている。

【0018】

適当な修飾によって、GFPにより発せられる光のスペクトルを変化させることができる。したがって「GFP」という用語は、歴史的な慣習から本明細書でしばしば使用されるが、上記定義に含められるタンパク質は、外観上必ずしも緑色でなく、単に蛍光タンパク質と称されるべきである。さまざまな「GFP」が緑色以外の色を示し、これらもまた、「GFP」という慣用語法に含まれるが、本発明の方法および材料として有用である。さらに、本明細書で「GFP」の定義に含まれる緑色蛍光タンパク質が、ウミシイタケ、*Renilla reniformis*といった他の生物から単離されたことに言及しておく。あらゆる色の、適当で使いやすいあらゆる「GFP」を用いて、本発明に役立つ感染菌を、天然型も変異型もいずれも改変することができる。

10

20

30

40

50

【0019】

混乱を避けるために、単に「蛍光タンパク質」という用語もしばしば使用される；一般に、これは、ウミシイタケ (*Renilla*) およびオワンクラゲ (*Aequorea*) といったさまざまな生物が產生する蛍光タンパク質、ならびに、さまざまな色の蛍光を発することができる、これらの天然型蛍光タンパク質の修飾型も指すと理解される。一般的に、「蛍光タンパク質」および「GFP」という用語は、置き換え可能であるように使用されることがある；しかしながら、時として、特定の異なる色を意味することもある。たとえば、RFPは赤色蛍光タンパク質を表し、YFPは黄色蛍光タンパク質を、BFPは青色蛍光タンパク質を表す、などといったシステムは厳密な記憶を助ける。施された特定の修飾に応じて、広範な波長の可視光が、これらのタンパク質によって放射される。

10

【0020】

多様な色の蛍光タンパク質を利用できるので、2色以上の色について同時に画像化することができる。たとえば、それぞれが特徴的な蛍光を発現する、2つの異なる細菌性作因もしくは3つの異なる細菌を、被験体に投与することができる。あるいは単一の細菌を、単一色で構成的に標識し、別の色を、遺伝子産物との融合物を生じるために使用することもできるであろう。細菌それ自体を標識するために使用したのとは異なる色を示す、蛍光タンパク質をコードするヌクレオチド配列を、產生されるべきタンパク質の遺伝子座に、または產生されるべき治療用タンパク質との融合タンパク質としてベクター内に挿入することができる。

20

【0021】

色の多様性は、本発明に照らしてとりわけ有利である。たとえば、腫瘍それ自体をある色の蛍光タンパク質で標識することができるが、別の色の構造タンパク質もしくは細胞内タンパク質で標識された細菌を投与して、その細菌の位置を確認することができる。さらに、その細菌のタンパク質産物を第3の色で標識して、このタンパク質の產生レベルをモニターすることができる。このように、生きた動物の全身を観察することによって、投与された細菌の位置を決定し、その細菌による治療用タンパク質の產生レベルをモニターし、腫瘍への影響をモニターすることをすべて同時に行うことができる。

20

【0022】

生きた動物において上記事象のリアルタイム観察が利用できるように、本発明で使用される蛍光タンパク質は十分な強度を持つ。このことは、先行技術において記載されている、細菌送達に向けた手探りのアプローチに大きな前進をもたらす。動物は生きているので、このような観察によって指示されたときに、治療の有効性を高めるような治療プロトコルの修正を行うことは好都合である。

30

【0023】

本発明から恩恵を受ける動物被験体は、固形腫瘍に罹患した動物の全範囲に属するが、典型的には、たとえば魚類、鳥類および哺乳類といった脊椎動物であり、もっとも典型的には哺乳類である。ヒトの治療は特に興味深いが、たとえば、ブタ、ウシ、ヒツジおよびヤギ、ニワトリ、シチメンチョウなどといった家畜の治療も、イヌおよびネコといった愛玩動物の治療と同様に、明らかに有益である。本発明の方法は、使用する蛍光タンパク質によって放射される蛍光強度が強いことにより、これらの動物被験体のいずれについても侵襲性の技法を用いることなくリアルタイムの観察を提供するものである。

40

【0024】

腫瘍の標識化が求められる場合、腫瘍細胞での蛍光タンパク質の生成が、本出願人らによって、米国特許第6,251,384号および第6,235,968号に記載されており、これらはいずれも参考として本明細書に含めるものとする。手短に述べると、ウイルスベクター、好ましくはレトロウイルスベクターを、蛍光タンパク質の発現のために、すでに固形腫瘍を有する被験体に投与することができる。あるいはまた、固形腫瘍の場合には腫瘍内に発現ベクターを注入することができる。蛍光タンパク質の発現系を含有するよう改変された細胞から生じた腫瘍を、免疫無防備状態の、もしくは同系の動物に移植することによってモデル系を得ることができる。腫瘍それ自体の標識化を結果としてもたらす様々な方法が記載さ

50

れている。

【0025】

細菌の標識化に関しては、蛍光タンパク質をコードしたスクレオチド配列を、直接変異、たとえばゲノムの変異によって細菌に導入して、細菌に内在する制御配列下の適当な位置に蛍光タンパク質コード配列を配置することができ、もしくは適当な発現ベクターを用いて導入することができる。選定される細菌は、固体腫瘍の低酸素領域内で、完全に特異的ではなくても、できれば選択的に生存し増殖する細菌であって、たとえその細菌が全身性に投与されても、むしろホスト動物の残りの部分は実質的に菌が定着しないままの状態である。細菌の培養は、小コロニーの中に集中するのではなく、低酸素の腫瘍塊の中に分散することが望ましい。

10

【0026】

本発明は、*in situ*での直接観察によって最も好ましい細菌宿主を決定する直接的な方法を提供する。このようにして、選定された菌株を、ゲノムへの挿入によって、もしくは発現ベクターの供給によって標識し、動物に投与する。そこで、他の組織と対照した、腫瘍における増殖パターンを直接観察することができるが、所望のパターンを示す菌株を選択することができる。大腸菌、サルモネラ属、クロストリジウム属、乳酸桿菌属、ビフィズス菌属などを含めて、低酸素の腫瘍塊の中で増殖することができる、非常に多様な候補が、当業界で知られている。このような系での発現に適した制御配列は、これまでにも当業界で広く知られており、あるいは内在性制御配列を使用することができる。

20

【0027】

多くの場合、毒作用を生み出すいかなる能力も無効とするとように、細菌をさらに改変することが望ましいと考えられる。これは、偏性嫌気性菌についてはかなりよくあることである。もし細菌が毒素を分泌するならば、毒素を产生する遺伝子の欠失もしくは不活性化が必要となる；細菌が望ましくない副作用を引き起こす物質を产生するならば、こうした物質をコードする遺伝子を不活性化もしくは除去することができる。細胞増殖および再生産の不变の特性として、構成的なプロモーターの制御下で蛍光タンパク質を発現するように細菌を改変する、あるいはそのコード配列を、内在する配列を置き換えて、ゲノム内の特に望ましい位置に入れることができる。

【0028】

細菌自体が本来持っている抗腫瘍性の影響を及ぼすことに加えて、IL2もしくはメチオニナーゼといった治療用物質を产生するように細菌を改変することもできる。ある実施形態において、治療用タンパク質は、蛍光タンパク質との融合タンパク質として生成されることもある。腫瘍および/または細菌が標識されると、融合物における蛍光タンパク質の色は、融合物以外の2つの場合に選択されたいずれとも異なる色とすべきである。蛍光タンパク質との融合物の構築は、上記のようにマーカーとしてよく知られている。治療用タンパク質のための発現系は、単独で、もしくは蛍光タンパク質との融合物として、ベクターに載せ、または細菌のゲノムに入れることができるが、制御配列は構成的、あるいは多くの場合、誘導性であって、*in situ*の因子もしくは外部から供給される転写因子のいずれかに依存すると考えられる。

30

【0029】

治療用タンパク質の、ある特定の好ましい実施例はメチオニナーゼであって、これは、PCT公報WO 00/29589号に開示されたように細胞内に供給された時に、または米国特許第5,690,929号およびWO 94/11535号に記載のように薬物として供給された時に、抗腫瘍効果を発揮する。上記文献はいずれも参考として本明細書に含めるものとする。メチオニナーゼの組換え技術による生産も上記文書に開示される。

40

【0030】

酵素である治療用タンパク質は、それ自体の腫瘍への本来の影響に加えて、プロドラッグから毒性物質を遊離するために用いることができる。たとえば、Miki, K.ら、*Cancer Research* (2001) 61:6805-6810はメチルセレノールの毒性を利用する研究を記載する。この化合物は、メチオニナーゼの作用によってセレノメチオニンから生じるものである。こ

50

の論文は、遺伝子組換えによって生じたメチオニナーゼによるセレノメチオニンからのメチルセレノールの生成が、この酵素の発現系で形質転換された癌細胞を死滅させるという実験を記載する。このように、セレノメチオニンの存在下でのメチオニナーゼの組換え技術による生成を癌の治療に用いることができる。

【0031】

本発明のある実施形態において、これは説明のためにのみ提示されるのであるが、*B. longum*もしくは*C. novyi*といった細菌を改変して、毒素をまったく産生できないようにする。蛍光タンパク質と融合したメチオニナーゼの発現系を含有するように、毒素を除去した細菌を改変する。それに加えて、必要ならば、細菌それ自体を標識する蛍光タンパク質の発現系を含有するように、この細菌を改変する。メチオニナーゼ遺伝子が構成的に発現されるならば、メチオニナーゼの生成、それ自体が細菌の存在を示すシグナルとなるため、上記は不要となる。このようにして改変された細菌を、次に、たとえばヒトMDA-MB-435乳癌細胞から形成された腫瘍のような、腫瘍を有する実験モデル被験体に投与する。ここで、この癌細胞はすでに、融合タンパク質に用いられたのとは異なる色の蛍光標識で、それ自体標識されている。あるいはまた、腫瘍は固有のものであって、上記の米国特許第6,251,384号および第6,235,968号に記載のウイルス発現ベクターによって標識される。

【0032】

細菌細胞を使用する場合、細胞は、乳癌腫瘍に直接注入される；芽胞を使用する場合、静脈注射も使用できる。芽胞の腫瘍内直接注入も可能である。適切に改変された細菌はいかなる実施法によっても被験体に投与される。実験腫瘍モデルの場合、そのモデルを与るために被験体は免疫無防備状態、もしくは腫瘍と同系のいずれかである必要があると考えられるが、細菌の投与それ自体は、被験体が免疫無防備状態であることを要しない。したがって、固有の腫瘍を有する被験体の場合、免疫抑制は不必要である。低酸素の腫瘍内の感染は、損なわれていない免疫系を持つ動物で容易に生じる。しかしながら、腫瘍が人為的に導入される状況の経過を研究するのに、免疫無防備状態の被験体も有用であると考えられる。

【0033】

ある実施形態において、メチオニナーゼ生成の標識は、赤色蛍光(RFP)を発し、細菌を特徴づける標識は青色蛍光(BFP)を発し、さらに腫瘍に特有な標識は緑色蛍光(GFP)を発する。

【0034】

その上、必要ならば、セレノメチオニンが腫瘍に注入され、もしくは全身に供給される。メチオニナーゼの生成それ自体、および/または細菌の存在それ自体が、腫瘍に対して有毒である。放出されるメチルセレノールは、細菌が存在するその場にすぐ隣接する領域に毒性を示すのみならず、生きた腫瘍組織にまで、より広範に拡散もする。この治療の経過を、RFP, GFPおよびBFPの同時画像化によって直接モニターすることができる。

【0035】

被験体の全身の蛍光光学的腫瘍画像(FOTI)は、モデル系において、または固有の腫瘍を有する被験体において、感染経過の継続的なリアルタイム観察およびモニタリングを外部から行えるようにし、さらにプロトコルの評価を可能にする。治療を受ける被験体において、FOTIが利用できることによって、治療プロトコルを案出する者が、プロトコルを変更する、もしくは変更しないことの適否について、ずっと継続して情報を受けることが可能になる。モデル系は、当初の治療計画に役立つ。外部からの画像(FOTI)に加えて、非侵襲性の内視鏡による方法も用いることができる。

【0036】

モデルとして使用するのに適した被験体は、好ましくは哺乳類の被験体であるが、最も好ましいのは、使いやすい実験動物、たとえばウサギ、ラット、マウスなどである。ヒト被験体により密接に類似しているため、靈長類の動物を使用することもできる。あらゆる適当な被験体を使用することができるが、その選択は主として、利便性、および最終的な興味の対象である系への類似性によって決定される。

【0037】

以下の実施例は本発明の説明を目的とするが、これを限定するものではない。

【0038】

調製A. 嫌気性細菌の改変。 オワンクラゲ (*A. victoria*) 緑色蛍光タンパク質の変異体をpUC19派生pPD16.38(Clontech, Palo Alto, CA)のBamHIおよびNotI部位にクローニングしたが、GFPはLacプロモーターから発現される。このベクターをpAV-GFPと命名した。pAV-GFPを標準法によりネズミチフス菌 (*S. typhimurium*) コンピテント細胞にトランスフェクトし、形質転換細胞を寒天平板上でアンピシリン耐性によって選択した。高発現ネズミチフス菌-GFPクローンを蛍光顕微鏡検査によって選択した。

【実施例1】

10

【0039】

大腸菌を赤色蛍光タンパク質 (RFP) の発現ベクターでトランスフェクトし、緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識された腫瘍を含有するヌードマウスに注入した。この動物を、CDカメラおよびGFP-RFPフィルター付きのライトボックス内で青色光励起によって可視化した；腫瘍内の細菌の増殖を赤色光および緑色光によって可視化した。腫瘍がGFPで標識されているヌードマウス腫瘍モデルを、前立腺癌、黒色腫、肺癌、大腸癌、乳癌、腎臓癌、咽頭癌、脳腫瘍、膵癌を用いてテストした。

【実施例2】

20

【0040】

大腸菌を、GFPと結合したメチオニナーゼで構成される融合タンパク質の発現系でトランスフェクトした。標識された細菌を、あらかじめRFPで標識された、ヌードマウス内で増殖した腫瘍内に注入した。次にこのマウスに、腫瘍内注入によってセレノメチオニンを投与した。実施例1のような2色の画像化によって、細菌の腫瘍へのターゲティングを可視化し、治療効果の追跡ももちろん行った。

【実施例3】

【0041】

GFP標識サルモネラ菌を、ヌードマウスのRFP標識U-87ヒト神経膠腫内に注入した。 1×10^8 GFP標識サルモネラ菌を含有するPBS溶液 ($10 \mu l$) を、RFP標識U-87ヒト神経膠腫内に注入した。GFP標識サルモネラ菌を実施例1のように、RFP標識U-87ヒト神経膠腫において注入直後および注入1日後に画像化した。いずれの時点でもRFPを背景にGFPが見え、1日後には広がっていた。

30

【実施例4】

【0042】

GFP標識サルモネラ菌を、ヌードマウスのRFP標識DU-145ヒト前立腺腫瘍内に注入した。あるマウスにおいて、 1×10^8 GFP標識サルモネラ菌をRFP標識DU-145ヒト前立腺腫瘍内に注入し、注入直後に画像化した。別のマウスにおいて、 2×10^8 GFP標識サルモネラ菌をRFP標識DU-145ヒト前立腺腫瘍内に注入し、注入直後に実施例1のように画像化した。いずれの場合も、RFPを背景にGFPを見ることができた。

40

【実施例5】

【0043】

GFP標識サルモネラ菌を、ヌードマウスのRFP標識MDA MB-435ヒト乳房腫瘍内に注入した。 2×10^8 GFP標識サルモネラ菌を含有するバッファーをRFP標識MDA MB-435ヒト乳房腫瘍内に注入し、注入直後に実施例1のように画像化した。RFPを背景にGFPを見ることができた。

40

【実施例6】

【0044】

RFP標識サルモネラ菌は、ヌードマウスのGFP標識PC-3ヒト前立腺腫瘍内で増殖することができた。 3×10^8 RFP標識サルモネラ菌を含有するバッファーをGFP標識PC-3ヒト前立腺腫瘍内に注入し、注入直後、および注入1日後に、実施例1のように画像化した。すべての画像においてRFPを背景にGFPを見ることができ、時間がたつと広がる。

50

【実施例 7】

【0045】

もう一つの実験において、RFP標識サルモネラ菌は、ヌードマウスのGFP標識PC-3ヒト前立腺腫瘍内で増殖することができた。 2×10^8 RFP標識サルモネラ菌を含有するバッファーをGFP標識PC-3ヒト前立腺腫瘍内に注入し、注入直後、注入1日後、および注入4日後に、実施例1のように画像化した。すべての画像においてRFPを背景にGFPを見ることができた。

【実施例 8】

【0046】

ヌードマウス内で増殖したGFP標識PC-3ヒト前立腺腫瘍におけるRFP標識サルモネラ菌のターゲティングおよび漸進的増殖を組織学によっても立証した。注入4日後に、GFP標識PC-3ヒト前立腺腫瘍内で増殖したサルモネラ菌を含有するRFP標識組織が得られた。標準的な方法によって、この組織を10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン切片およびHE染色を目的として処理した。PC-3ヒト腫瘍組織内で徐々に増殖し、腫瘍細胞を標的とするRFP標識サルモネラ菌を見ることができた。

【実施例 9】

【0047】

二番目の実験において、ヌードマウス内で増殖したPC-3ヒト前立腺腫瘍上のRFP標識サルモネラ菌を、組織学によって立証した。実施例8のように切片が得られた。注入4日後にGFP標識PC-3ヒト前立腺腫瘍内で増殖したRFP標識サルモネラ菌を見ることができた。未処理対照において、良好に維持された腫瘍構造が存在した。RFP標識サルモネラ菌で処理した後、腫瘍組織の大半が破壊され、腫瘍の中に広範な壊死が存在した。

【実施例 10】

【0048】

RFPを発現する 10^9 大腸菌を含有するバッファーを、GFPで標識され、ヌードマウスの皮下で2週間増殖させたPC-3中に注入した。実施例1のように、画像が得られた。大腸菌-RFPはPC-3-GFP腫瘍において、少なくとも17日間見られた。

10

20

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/41822																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/00; G01N 33/48, 33/53, 33/00, 21/00, 21/75, 21/76, 33/574, 33/554, 33/569 US CL : 436/64, 86, 164, 166, 172; 435/4, 7.21, 7.23, 7.32 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/64, 86, 164, 166, 172; 435/4, 7.21, 7.23, 7.32																				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">E,Y</td> <td style="padding: 2px;">WO 03/006069 A1 (ANTICANCER, INC.) 23 January 2003 (23.01.03), see entire document and with particularity see last line of abstract, sections 0037, 0039-0044.</td> <td style="padding: 2px;">1-22</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	E,Y	WO 03/006069 A1 (ANTICANCER, INC.) 23 January 2003 (23.01.03), see entire document and with particularity see last line of abstract, sections 0037, 0039-0044.	1-22												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
E,Y	WO 03/006069 A1 (ANTICANCER, INC.) 23 January 2003 (23.01.03), see entire document and with particularity see last line of abstract, sections 0037, 0039-0044.	1-22																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.																		
<table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 2px;">* Special categories of cited documents:</td> <td style="width: 10%; text-align: center; padding: 2px;">"P"</td> <td style="width: 60%; padding: 2px;">later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"A" document defining a general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">"X"</td> <td style="padding: 2px;">document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">"Y"</td> <td style="padding: 2px;">document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">"&"</td> <td style="padding: 2px;">document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	"P"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining a general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
* Special categories of cited documents:	"P"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																		
"A" document defining a general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																		
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family																		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																				
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 18 July 2003 (18.07.2003)		Date of mailing of the international search report 19 AUG 2003																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Alana M. Harris, Ph.D. <i>Janice Ford</i> Telephone No. (703)308-0196 f01																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/41822

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
BIOSIS, SCISEARCH, DISSERTATION ABS ONLINE, ELSEVIER, EMBASE, JICST-EPLUS, PASCAL, DERWENT

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
// A 6 1 K 31/198	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/48	
A 6 1 K 38/43	A 6 1 K 31/198	

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

(72)発明者 ツァオ,ミン
アメリカ合衆国 92122 カリフォルニア州,サンディエゴ,アパートメント ナンバー 4
7,アヴェニダ ナヴィダッド 8020

(72)発明者 リ,シャオ-ミン
アメリカ合衆国 92117 カリフォルニア州,サンディエゴ,アパートメント ナンバー 1
09,クレアモント メサ ビルディング 4388

(72)発明者 ヤン,メン
アメリカ合衆国 92129 カリフォルニア州,サンディエゴ,トルーマン ストリート 9
115

(72)発明者 シュ,ミンシュ
アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州,ラホヤ,アパートメント ナンバー 1,ヴィ
ア アリカンテ 3203

(72)発明者 ジャン,ピン
アメリカ合衆国 92122 カリフォルニア州,サンディエゴ,カミノ フエルタ 8056

(72)発明者 リ,リンナ
アメリカ合衆国 92130 カリフォルニア州,サンディエゴ,ロングショア ウェイ 44
69

F ターム(参考) 4B063 QA11 QQ79 QR16 QR41 QR47 QR50 QR90 QS26 QS28 QS39
QX10
4C061 HH54 WW17
4C084 AA02 DC01 DC22 NA10
4C085 HH11 KA11 KA27 LL18
4C206 AA01 JA80 MA01 MA02 MA04 MA11 NA13 NA15 ZB26

专利名称(译)	监测细菌肿瘤治疗的系统		
公开(公告)号	JP2005521648A	公开(公告)日	2005-07-21
申请号	JP2003557375	申请日	2002-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	抗癌公司		
申请(专利权)人(译)	抗癌公司		
[标]发明人	ツアオミン リシャオミン ヤンメン シュミンシュ ジャンピン リリンナ		
发明人	ツアオ,ミン リ,シャオ-ミン ヤン,メン シュ,ミンシュ ジャン,ピン リ,リンナ		
IPC分类号	C12Q1/37 A61B A61B1/00 A61K31/198 A61K38/00 A61K38/43 A61K48/00 A61K49/00 A61P35/00 A61P43/00 C12Q1/00 G01N21/00 G01N21/75 G01N21/76 G01N33/00 G01N33/48 G01N33/53 G01N33 /554 G01N33/569 G01N33/574		
CPC分类号	A61K49/0045 A61K49/0008 A61K49/0047 A61K49/0097		
FI分类号	A61K49/00.Z A61B1/00.300.D A61P35/00 A61P43/00.123 C12Q1/37 A61K37/02 A61K37/48 A61K31 /198		
F-TERM分类号	4B063/QA11 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR41 4B063/QR47 4B063/QR50 4B063/QR90 4B063 /QS26 4B063/QS28 4B063/QS39 4B063/QX10 4C061/HH54 4C061/WW17 4C084/AA02 4C084/DC01 4C084/DC22 4C084/NA10 4C085/HH11 4C085/KA11 4C085/KA27 4C085/LL18 4C206/AA01 4C206 /JA80 4C206/MA01 4C206/MA02 4C206/MA04 4C206/MA11 4C206/NA13 4C206/NA15 4C206/ZB26		
优先权	60/345699 2001-12-31 US		
其他公开文献	JP4350519B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

跟踪受试者中肿瘤治疗过程的方法利用经过修饰以表达荧光蛋白的细菌。该方法还可以监测与在治疗过程中产生治疗剂的细菌相关的基因的表达，可能基于肿瘤本身产生的荧光。该方法使得可以可视化活体中的治疗过程并根据治疗的有效性来改变治疗。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/41832

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7): C12Q 1/00, C12N 1/31, 1/32, 1/33, 1/39, 21/00, 21/75, 21/76, 33/374, 33/384, 50/509

USPTO: 1001, 1002, 1003, 1004, 1005, 1006, 1007, 1008, 1009, 1010, 1011, 7,23, 7,32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

Minimum documentation searched classification system followed by classification symbols

U.S. : 4336614, 86, 161, 166, 172; 43574, 9,21, 7,23, 7,32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Please see Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Description of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
E.V.	WO 03/06039 A1 (ANTICANCER, INC.), 23 January 2003 (23.01.03), see entire document and with particularity see last line of abstract, sections 0037, 0059-0064	1-22

* Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

A Single copy of cited document. *B* Later documents published after the International filing date or priority date which are relevant to the invention. *C* Document of general interest, the claimed invention being not disclosed or clearly underlying the invention.

D Document of prior art, the claimed invention being not disclosed or clearly underlying the invention.

E Document which may derive claims on priority 03/06039 or which is used to support the claimed invention. *F* Document which may be used to support the claimed invention. *G* Document referring to an oral disclosure, an exhibition or other source. *H* Document published prior to the International filing date but later than the International filing date.

I Document of particular relevance the claimed invention cannot be considered without reference to which, and which document, shall contribute to the understanding of the claimed invention.

J Document number of the same prior art family.

Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report
18 July 2003 (18.07.2003)	19 AUG. 2003

Name and mailing address of the ISA/US
Continental Office of the United States Patent and
Trademark Office, Washington, D.C.
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Telephone No. (703)308-6196

Authorized officer: *Janice Ford*
Anna M. Horn, Ph.D.
Telephone No. (703)308-6196