

(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2008-532521

(P2008-532521A)

(43) 公表日 平成20年8月21日(2008.8.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z	2 G 0 5 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 8 8
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-500944 (P2008-500944)
 (86) (22) 出願日 平成18年3月9日 (2006.3.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年11月1日 (2007.11.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/008502
 (87) 国際公開番号 W02006/096815
 (87) 国際公開日 平成18年9月14日 (2006.9.14)
 (31) 優先権主張番号 60/659, 935
 (32) 優先日 平成17年3月9日 (2005.3.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591217403
 ボード オブ リージェンツ, ザ ユニ
 バーシティ オブ テキサス システム
 BOARD OF REGENTS, TH
 E UNIVERSITY OF TEX
 AS SYSTEM
 アメリカ合衆国 78701 テキサス
 オースティン ダブリュー. セブンス
 ストリート 201
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌治療遺伝子の腫瘍選択的および高効率の発現のための、新規な h TMC プロモーターおよびベクター

(57) 【要約】

組織 - 選択的プロモーター配列、および組織 - 選択的プロモーター配列に操作可能にカップリングされた第二のプロモーター配列であって、最小ウイルスプロモーター配列を含む第二のプロモーター配列を含むプロモーターが開示される。これらのプロモーター配列を含む核酸および組成物も開示される。また、組織 - 選択的プロモーター配列を、最小ウイルスプロモーター配列を含む第二のプロモーター配列と操作可能にカップリングさせることを含む、組織 - 選択的プロモーターの機能を改良する方法も開示される。また、遺伝子を細胞に送達する方法、過剰増殖性疾患を持つ被験体を治療する方法、および本明細書中に記載された新規なプロモーター配列の使用を含む細胞をイメージングする方法も開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 組織 - 選択的プロモーター配列 ; および

b) 該組織 - 選択的プロモーター配列に操作可能にカップリングされた第二のプロモーター配列であって、最小ウイルスプロモーター配列を含む第二のプロモーター配列 ; を含み、該組織 - 選択的プロモーター配列の該第二のプロモーター配列への操作可能なカップリングの結果、該組織 - 選択的プロモーター配列の改良されたプロモーター機能がもたらされる、プロモーター。

【請求項 2】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列、C E A プロモーター配列、P S A プロモーター配列、プロバシンプロモーター配列、A R R 2 P B プロモーター配列、または A F P プロモーター配列ヒト - ラクトアルブミンプロモーター配列、ヒツジ - ラクトグロブリンプロモーター配列、U 6 プロモーター配列、H 1 プロモーター配列、7 S L プロモーター配列、ヒト Y プロモーター配列、ヒト M R P - 7 - 2 プロモーター配列、アデノウイルス V A 1 プロモーター配列、ヒト t R N A プロモーター配列、5 S リボソーム R N A プロモーター配列、またはこれらのプロモーター配列のいずれかの機能的ハイブリッドまたは組合せである、請求項 1 記載のプロモーター。

10

【請求項 3】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が腫瘍 - 選択的プロモーター配列としてさらに定義される、請求項 1 記載のプロモーター。

20

【請求項 4】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が低酸素症 - 特異的プロモーター配列である、請求項 1 記載のプロモーター。

【請求項 5】

前記低酸素症 - 特異的プロモーター配列が低酸素応答エレメント (H R E) または低酸素症誘導因子である、請求項 4 記載のプロモーター。

【請求項 6】

前記低酸素症誘導因子が H I F - 1 、 H I F - 2 、または H I F - 3 である、請求項 5 記載のプロモーター。

【請求項 7】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列である、請求項 1 記載のプロモーター。

30

【請求項 8】

前記 h T E R T プロモーター配列が配列番号 1 である、請求項 7 記載のプロモーター。

【請求項 9】

前記最小ウイルスプロモーター配列がアデノウイルスプロモーター配列、バキュロウイルスプロモーター配列、C M V プロモーター配列、パルボウイルスプロモーター配列、ヘルペスウイルスプロモーター配列、ボックスウイルスプロモーター配列、アデノ - 関連ウイルスプロモーター配列、セミリキフォレストウイルスプロモーター配列、S V 4 0 プロモーター配列、ワクシニアウイルスプロモーター配列、またはレトロウイルスプロモーター配列である、請求項 1 記載のプロモーター。

40

【請求項 10】

前記最小ウイルスプロモーター配列がミニ - C M V プロモーター配列である、請求項 9 記載のプロモーター。

【請求項 11】

前記ミニ - C M V 配列が配列番号 2 である、請求項 10 記載のプロモーター。

【請求項 12】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列であり、前記第二のプロモーター配列がミニ - C M V プロモーター配列である、請求項 1 記載のプロモーター。

50

【請求項 13】

前記プロモーターが配列番号3を含む、請求項12記載のプロモーター。

【請求項 14】

プロモーターを含む核酸であって、該プロモーターは：

- a) 組織 - 選択的プロモーター配列；および
 - b) 第一のプロモーター配列に操作可能にカップリングされた第二のプロモーター配列であって、最小ウイルスプロモーター配列を含む第二のプロモーター配列；
- を含み、該組織 - 選択的プロモーター配列の該第二のプロモーター配列への操作可能なカップリングの結果、該第一のプロモーター配列の改良されたプロモーター機能がもたらされる、核酸。

10

【請求項 15】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列、C E A プロモーター配列、P S A プロモーター配列、プロバシンプロモーター配列、A R R 2 P B プロモーター配列、A F P プロモーター配列、ヒト - ラクトアルブミンプロモーター配列、ヒツジ - ラクトグロブリンプロモーター配列、U 6 プロモーター配列、H 1 プロモーター配列、7 S L プロモーター配列、ヒト Y プロモーター配列、ヒト M R P - 7 - 2 プロモーター配列、アデノウイルス V A 1 プロモーター配列、ヒト t R N A プロモーター配列、5 S リボソーム R N A プロモーター配列、またはこれらのプロモーター配列のいずれかの機能的ハイブリッドまたは組合せである、請求項 14 記載の核酸。

【請求項 16】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が腫瘍 - 選択的プロモーター配列としてさらに定義される、請求項 14 記載の核酸。

20

【請求項 17】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が低酸素症 - 特異的プロモーター配列である、請求項 14 記載の核酸。

【請求項 18】

前記低酸素症 - 特異的プロモーター配列が低酸素応答エレメント (H R E) または低酸素症誘導因子である、請求項 17 記載の核酸。

【請求項 19】

前記低酸素症誘導因子が H I F - 1 、 H I F - 2 、または H I F - 3 である、請求項 18 記載のプロモーター。

30

【請求項 20】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列である、請求項 15 記載の核酸。

【請求項 21】

前記 h T E R T プロモーター配列が配列番号 1 である、請求項 20 記載の核酸。

【請求項 22】

前記最小ウイルスプロモーター配列がアデノウイルスプロモーター配列、バキュロウイルスプロモーター配列、C M V プロモーター配列、パルボウイルスプロモーター配列、ヘルペスプロモーター配列、ボックスウイルスプロモーター配列、アデノ関連ウイルスプロモーター配列、セミリキフォレストウイルスプロモーター配列、S V 4 0 プロモーター配列、ワクシニアウイルスプロモーター配列、またはレトロウイルスプロモーター配列である、請求項 14 記載の核酸。

40

【請求項 23】

前記最小ウイルスプロモーター配列がミニ - C M V プロモーター配列である、請求項 22 記載の核酸。

【請求項 24】

前記ミニ - C M V 配列が配列番号 2 である、請求項 23 記載の核酸。

【請求項 25】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列であって、前記第二

50

のプロモーター配列がミニ-CMVプロモーター配列である、請求項14記載の核酸。

【請求項26】

前記プロモーターが配列番号3を含む、請求項25記載の核酸。

【請求項27】

前記プロモーターに操作可能にカップリングされた遺伝子を含むとしてさらに定義される、請求項14記載の核酸。

【請求項28】

前記遺伝子が治療遺伝子または選択可能マーカである、請求項27記載の核酸。

【請求項29】

前記治療遺伝子が腫瘍サプレッサー遺伝子、アポトーシスを誘導する遺伝子、酵素をコードする遺伝子、抗体をコードする遺伝子、またはホルモンをコードする遺伝子である、請求項28記載の核酸。

10

【請求項30】

前記治療遺伝子がRb、CFTR、p16、p21、p27、p57、p73、C-CAM、APC、CTS-1、zac1、scFV ras、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、BRCA1、VHL、MMAC1、FCC、MCC、BRCA2、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、GM-CSF、G-CSF、チミジンキナーゼ、mda7、FUS1、インターフェロン、インターフェロン、ADP、p53、ABLI、BLC1、BLC6、CBFA1、CBL、CSFIR、ERBA、ERBB、EBRB2、ETS1、ETS2、ETV6、FGR、FOX、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3、YES、MADH4、RB1、TP53、WT1、TNF、BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、NT3、NT5、ApoAI、ApoAIV、ApoE、Rap1A、シトシンデアミンナーゼ、Fab、ScFv、BRCA2、zac1、ATM、HIC-1、DPC-4、FHIT、PTEN、ING1、NOEY1、NOEY2、OVCA1、MADR2、53BP2、IRF-1、zac1、DBCCR-1、rks-3、COX-1、TFPI、PGS、Dp、E2F、ras、myc、neu、raf、erb、fms、trk、ret、gsp、hst、abl、E1A、p300、VEGF、FGF、トロンボスポンジン、BAI-1、GDAIF、Gene26(CACNA2D2)、PL6、*(BLU)、LUCA-1(HYAL1)、LUCA-2(HYAL2)、123F2(RASSF1)、101F6、Gene21(NPRL2)、SEM A3またはMCCである、請求項29記載の核酸。

20

30

【請求項31】

前記治療遺伝子がFUS1である、請求項30記載の核酸。

【請求項32】

前記選択可能マーカが薬物選択マーカ、酵素、または免疫学的マーカである、請求項28記載の核酸。

40

【請求項33】

プラスミドに含まれるものとしてさらに定義される、請求項14記載の核酸。

【請求項34】

前記プロモーター配列に操作可能にカップリングされたレポーター配列を含むものとしてさらに定義される、請求項14記載の核酸。

【請求項35】

前記レポーター配列がソマトスタチン受容体アミノ酸配列、ヨウ化ナトリウムシンポーターアミノ酸配列、真核生物緑色蛍光蛋白質アミノ酸配列、赤色蛍光蛋白質アミノ酸配列、ルシフェラーゼアミノ酸配列、-ガラクトシダーゼアミノ酸配列、またはチミジンキナーゼアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドである、請求項34記載の核酸。

50

【請求項 3 6】

前記ソマトスタチン受容体アミノ酸配列が組換えソマトスタチン受容体アミノ酸配列、ソマトスタチンタイプ 2 受容体アミノ酸配列、または突然変異したソマトスタチンタイプ 2 受容体アミノ酸配列である、請求項 3 5 記載の核酸。

【請求項 3 7】

前記ソマトスタチンタイプ 2 受容体アミノ酸配列がソマトスタチン受容体タイプ 2 A アミノ酸配列である、請求項 3 6 記載の核酸。

【請求項 3 8】

前記レポーター配列が I R E S および第二の遺伝子と操作可能にカップリングされた、請求項 3 4 記載の核酸。

10

【請求項 3 9】

前記第二の遺伝子が第二のレポーターに操作可能にカップリングされた、請求項 3 8 記載の核酸。

【請求項 4 0】

前記第二のレポーターがソマトスタチン受容体アミノ酸配列、ヨウ化ナトリウムシンボーターアミノ酸配列、ルシフェラーゼアミノ酸配列、真核生物緑色蛍光蛋白質アミノ酸配列、またはチミジンキナーゼアミノ酸配列である、請求項 3 9 記載の核酸。

【請求項 4 1】

前記第二の遺伝子が選択可能マーカーまたは治療遺伝子を含む、請求項 3 8 記載の核酸。

20

【請求項 4 2】

前記第二の遺伝子が、腫瘍サプレッサー遺伝子である治療遺伝子、アポトーシスを誘導する遺伝子、酵素をコードする遺伝子、抗体をコードする遺伝子、またはホルモンをコードする遺伝子である、請求項 4 1 記載の核酸。

【請求項 4 3】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列であり、前記第二のプロモーター配列がミニ - C M V プロモーター配列であり、該プロモーターは F U S 1 をコードする遺伝子に操作可能にカップリングされ、そして、前記核酸はプラスミドに含まれる、請求項 4 1 記載の核酸。

【請求項 4 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載のプロモーターを含む組成物。

30

【請求項 4 5】

被験体における細胞への前記プロモーターの送達用の送達ビヒクルを含むものとしてさらに定義される、請求項 4 4 記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記送達ビヒクルが核酸、プラスミド、ウイルスベクター、原核生物細胞、真核生物細胞、または脂質である、請求項 4 5 記載の組成物。

【請求項 4 7】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ - 関連ウイルスベクター、またはボックスウイルスベクターである、請求項 4 6 記載の組成物。

40

【請求項 4 8】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスである、請求項 4 7 記載の組成物。

【請求項 4 9】

前記脂質がリポソームに含まれる、請求項 4 6 記載の組成物。

【請求項 5 0】

前記リポソームがカチオン性脂質を含む、請求項 4 9 記載の組成物。

【請求項 5 1】

前記カチオン性脂質が D O T A P : C h o l である、請求項 5 0 記載の組成物。

【請求項 5 2】

50

前記 D O T A P : C h o l がさらにナノ粒子を含む、請求項 5 1 記載の組成物。

【請求項 5 3】

請求項 1 4 ~ 4 3 のいずれかに記載の核酸を含む組成物。

【請求項 5 4】

被験体における細胞への前記核酸の送達用の送達ビヒクルを含むものとしてさらに定義される、請求項 5 3 記載の組成物。

【請求項 5 5】

前記送達ビヒクルがウイルスベクターまたは脂質である、請求項 5 4 記載の組成物。

【請求項 5 6】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ-関連ウイルスベクター、またはポックスウイルスベクターである、請求項 5 5 記載の組成物。

10

【請求項 5 7】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、請求項 5 6 記載の組成物。

【請求項 5 8】

前記ビヒクルがリポソームを含む、請求項 5 5 記載の組成物。

【請求項 5 9】

前記リポソームがカチオン性脂質を含む、請求項 5 8 記載の組成物。

【請求項 6 0】

前記カチオン性脂質が D O T A P : C h o l である、請求項 5 9 記載の組成物。

20

【請求項 6 1】

前記 D O T A P : C h o l がさらにナノ粒子を含む、請求項 6 0 記載の組成物。

【請求項 6 2】

a) 組織 - 選択的プロモーター配列を選択し；

b) 第二のプロモーター配列を選択し、第二のプロモーター配列は最小ウイルスプロモーター配列を含み；次いで、

c) 該組織 - 選択的プロモーター配列を該第二のプロモーター配列に操作可能にカップリングさせる；

ことを含み、該組織 - 選択的プロモーター配列の該第二のプロモーター配列への操作可能なカップリングの結果、該組織 - 選択的プロモーター配列の改良された機能をもたらす、組織 - 選択的プロモーターの機能を改良する方法。

30

【請求項 6 3】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列、C E A プロモーター配列、P S A プロモーター配列、プロバシンプロモーター配列、A R R 2 P B プロモーター配列、A F P プロモーター配列、ヒト - ラクトアルブミンプロモーター配列、ヒツジ - ラクトグロブリンプロモーター配列、U 6 プロモーター配列、H 1 プロモーター配列、7 S L プロモーター配列、ヒト Y プロモーター配列、ヒト M R P - 7 - 2 プロモーター配列、アデノウイルス V A 1 プロモーター配列、ヒト t R N A プロモーター配列、5 S リポソーム R N A プロモーター配列、またはこれらのプロモーター配列のいずれかの機能的ハイブリッドまたは組合せである、請求項 6 2 記載の方法。

40

【請求項 6 4】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が低酸素症 - 特異的プロモーター配列である、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 5】

前記低酸素症 - 特異的プロモーター配列が低酸素応答エレメント (H R E) または低酸素症誘導因子である、請求項 6 4 記載の方法。

【請求項 6 6】

前記低酸素症誘導因子が H I F - 1 、 H I F - 2 、または H I F - 3 である、請求項 6 5 記載の方法。

【請求項 6 7】

50

前記組織 - 選択的配列が h T E R T プロモーター配列である、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 8】

前記 h T E R T プロモーター配列が配列番号 1 である、請求項 6 7 記載の方法。

【請求項 6 9】

前記最小ウイルスプロモーター配列がアデノウイルスプロモーター配列、バキュロウイルスプロモーター配列、C M V プロモーター配列、パルボウイルスプロモーター配列、ヘルペスウイルスプロモーター配列、ボックスウイルスプロモーター配列、アデノ - 関連ウイルスプロモーター配列、セミリキフォレストウイルスプロモーター配列、ワクシニアウイルスプロモーター配列、またはレトロウイルスプロモーター配列である、請求項 6 2 記載の方法。

10

【請求項 7 0】

前記最小ウイルスプロモーター配列がミニ - C M V プロモーター配列である、請求項 6 9 記載の方法。

【請求項 7 1】

前記ミニ - C M V 配列が配列番号 2 である、請求項 7 0 記載の方法。

【請求項 7 2】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列であって、前記第二のプロモーター配列がミニ - C M V プロモーター配列である、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 7 3】

前記プロモーターが配列番号 3 を含む、請求項 7 2 記載の方法。

20

【請求項 7 4】

a) 請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載のプロモーターに操作可能にカップリングされた遺伝子を含む組成物を調製し；次いで、

b) 該組成物を細胞と接触させ、該接触の結果、該遺伝子の該細胞への送達をもたらす

；

ことを含む、遺伝子を細胞に送達する方法。

【請求項 7 5】

前記組成物が、さらに、送達ビヒクルを含む、請求項 7 4 記載の方法。

【請求項 7 6】

前記送達ビヒクルがウイルスベクターまたは脂質である、請求項 7 4 記載の方法。

30

【請求項 7 7】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ - 関連ウイルスベクター、またはボックスウイルスベクターである、請求項 7 6 記載の方法。

【請求項 7 8】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、請求項 7 7 記載の方法。

【請求項 7 9】

前記ウイルスベクターがプロタミン - 複合体化ウイルスベクターとしてさらに定義される、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 8 0】

前記プロタミン - 複合体化ウイルスベクターがプロタミン - 複合体化アデノウイルスベクターである、請求項 7 9 記載の方法。

40

【請求項 8 1】

前記送達ビヒクルがカチオン性脂質を含む、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 8 2】

前記カチオン性脂質が D O T A P : c h o l である、請求項 8 1 記載の方法。

【請求項 8 3】

前記 D O T A P : c h o l が D O T A P : c h o l ナノ粒子としてさらに定義される、請求項 8 2 記載の方法。

【請求項 8 4】

50

前記細胞が癌細胞である、請求項 7 4 記載の方法。

【請求項 8 5】

前記癌細胞が被験体におけるものである、請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 8 6】

a) 請求項 1 4 ~ 4 3 のいずれかに記載の核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む医薬組成物を入手し；次いで、

b) 医薬上有効量の該組成物を被験体に投与する；

ことを含む、過剰増殖性疾患を持つ被験体を治療する方法。

【請求項 8 7】

前記被験体が癌を持つ患者である、請求項 8 6 記載の方法。

10

【請求項 8 8】

前記癌が乳癌、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、脳癌、肝臓癌、子宮頸癌、結腸癌、腎臓癌、皮膚癌、頭部および頸部の癌、骨癌、食道癌、膀胱癌、子宮癌、リンパ系癌、胃癌、膵臓癌、精巣癌、リンパ腫、または白血病である、請求項 8 7 記載の方法。

【請求項 8 9】

前記癌が肺癌である、請求項 8 8 記載の方法。

【請求項 9 0】

前記被験体が二次的抗 - 癌療法を受けている、請求項 8 9 記載の方法。

【請求項 9 1】

a) 細胞を、前記プロモーターがレポーターアミノ酸配列に操作可能にカップリングされた請求項 1 4 ~ 4 3 のいずれかに記載の核酸を含む組成物と接触させ；次いで、

b) 該レポーターに由来するシグナルを測定することによって該レポーター配列の細胞発現を検出する；

ことを含む、細胞をイメージングする方法。

20

【請求項 9 2】

前記細胞が被験体におけるものであって、前記細胞をイメージングする方法が被験体における組織をイメージングする方法としてさらに定義される、請求項 9 1 記載の方法。

【請求項 9 3】

前記細胞が癌細胞であって、前記細胞をイメージングする方法が癌を持つ患者における腫瘍をイメージングする方法としてさらに定義される、請求項 9 2 記載の方法。

30

【請求項 9 4】

前記レポーターが酵素アミノ酸配列、レポーターアミノ酸配列、またはリボザイム RNA 配列である、請求項 9 1 記載の方法。

【請求項 9 5】

前記レポーターアミノ酸配列が組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体アミノ酸配列、チミジンキナーゼアミノ酸配列、ドーパミン受容体アミノ酸配列、内皮成長因子受容体 (EGFR) アミノ酸配列、プラスミノーゲンアミノ酸配列、ウロキナーゼ - タイプのプラスミノーゲンアクチベーター受容体 (uPAR) アミノ酸配列、ホルモン受容体アミノ酸配列、またはヨウ化ナトリウムシンポーターアミノ酸配列である、請求項 9 4 記載の方法。

40

【請求項 9 6】

前記レポーターアミノ酸配列が組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体アミノ酸配列である、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 9 7】

前記組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体アミノ酸配列が組換えソマトスタチン受容体アミノ酸配列、組換えソマトスタチンタイプ 2 受容体アミノ酸配列、または突然変異したソマトスタチンタイプ 2 受容体アミノ酸配列である、請求項 9 6 記載の方法。

【請求項 9 8】

前記組換えソマトスタチンタイプ 2 受容体アミノ酸配列は組換えソマトスタチンタイプ 2 A 受容体アミノ酸配列である、請求項 9 7 記載の方法。

50

【請求項 99】

前記組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体アミノ酸配列をコードする核酸が、切形された組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体をコードする核酸を含む、請求項 98 記載の方法。

【請求項 100】

前記切形された組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体をコードする核酸がカルボキシ末端切形を含む、請求項 99 記載の方法。

【請求項 101】

前記切形の結果、前記組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体アミノ酸配列の内部化および/またはシグナリングの改変をもたらす、請求項 100 記載の方法。

10

【請求項 102】

前記レポーターアミノ酸配列をコードする核酸が該レポーターアミノ酸配列の N - 末端または C - 末端の異種リーダー配列を含み、該リーダー配列はレポーターアミノ酸配列を特定の非細胞性位置へ誘導する、請求項 91 記載の方法。

【請求項 103】

前記レポーターアミノ酸配列をコードする核酸が、さらに、前記レポーターアミノ酸配列の N - 末端または C - 末端に融合した蛋白質タグを含む、請求項 91 記載の方法。

【請求項 104】

前記蛋白質タグが酵素活性を有する、請求項 103 記載の方法。

【請求項 105】

前記蛋白質タグがヘマグルチニン A、 α -ガラクトシダーゼ、チミジンキナーゼ、トランスフェリン、myc - タグ、VP16、(His)₆ - タグ、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である、請求項 104 記載の方法。

20

【請求項 106】

前記イメージングを、腫瘍の外科的切除を受けている患者に対して手術内で行う、請求項 93 記載の方法。

【請求項 107】

遺伝子が前記プロモーターに操作可能にカップリングされており、前記細胞をイメージングする方法が遺伝子を細胞に送達する方法としてさらに定義される、請求項 91 記載の方法。

30

【請求項 108】

前記遺伝子が治療遺伝子であって、前記細胞をイメージングする方法が治療遺伝子を細胞に送達する方法としてさらに定義される、請求項 92 記載の方法。

【請求項 109】

前記治療遺伝子が腫瘍サプレッサー遺伝子、アポトーシスを誘導する遺伝子、酵素をコードする遺伝子、抗体をコードする遺伝子、またはホルモンをコードする遺伝子である、請求項 108 記載の方法。

【請求項 110】

前記治療遺伝子が Rb、CFTR、p16、p21、p27、p57、p73、C - CAM、APC、CTS - 1、zac1、scFV ras、DCC、NF - 1、NF - 2、WT - 1、MEN - I、MEN - II、BRCA1、VHL、MMAC1、FCC、MCC、BRCA2、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12、GM - CSF、G - CSF、チミジンキナーゼ、mda7、FUS1、インターフェロン α 、インターフェロン β 、ADP、p53、ABL1、BLC1、BLC6、CBFA1、CBL、CSFIR、ERBA、ERBB、EBRB2、ETS1、ETS2、ETV6、FGR、FOX、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3、YES、MADH4、RB1、TP53、WT1、TNF、BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF

40

50

、NT3、NT5、ApoA1、ApoAIV、ApoE、Rap1A、シトシンデアミンナーゼ、Fab、ScFv、BRCA2、zac1、ATM、HIC-1、DPC-4、FHIT、PTEN、ING1、NOEY1、NOEY2、OVCA1、MADR2、53BP2、IRF-1、zac1、DBCCR-1、rks-3、COX-1、TFPI、PGS、Dp、E2F、ras、myc、neu、raf、erb、fms、trk、ret、gsp、hst、abl、E1A、p300、VEGF、FGF、トロンボスポンジン、BAI-1、GDAIF、Gene26(CACNA2D2)、PL6、*(BLU)、LUCA-1(HYAL1)、LUCA-2(HYAL2)、123F2(RASSF1)、101F6、Gene21(NPRL2)、SEM A3またはMCCである、請求項109記載の方法。

10

【請求項111】

前記治療遺伝子がFUS1である、請求項110記載の方法。

【請求項112】

さらに、被験体への遺伝子の投与後に、該被験体において該遺伝子の生体内分布を測定する方法としてさらに定義される、請求項92記載の方法。

【請求項113】

さらに、被験体における治療遺伝子の投与に対する応答を測定する方法としてさらに定義される、請求項91記載の方法。

【請求項114】

シグナルの測定が、蛍光イメージング分析、免疫組織化学分析、化学発光イメージング、光学イメージング、磁気共鳴イメージング、または放射性イメージングを行うものとしてさらに定義される、請求項91記載の方法。

20

【請求項115】

放射性イメージングがカメライメージングとしてさらに定義される、請求項114記載の方法。

【請求項116】

シグナルの測定が¹¹¹In-オクトレオチド-SSRT2Aレポーター系でのカメライメージングとしてさらに定義される、請求項115記載の方法。

【請求項117】

シグナルの測定が超常磁性酸化鉄(SPIO)オクトレオチド-SSTR2Aレポーターおよびコントラスト増強系を用いる磁気共鳴イメージングとしてさらに定義される、請求項114記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2005年3月9日に出願された、米国仮特許出願第60/659,935号(この全体が、参考として本明細書に援用される)に関する。米国政府は、National Institutes of Healthからの補助金CA71618および米国国防省からの補助金DAMD17-02-1-0706にしたがって、本発明に権利を有する。

40

【0002】

(発明の分野)

本発明は、概して、分子生物学、癌生物学、および遺伝子治療の分野に関する。さらに詳しくは、本発明は、組織-選択的プロモーター配列、および組織-選択的プロモーター配列に操作可能にカップリングされた第二プロモーター配列を含む新規なプロモーターを含む組成物、および新規なプロモーターを利用する方法に関し、第二のプロモーター配列は最小プロモーター配列、好ましくは最小ウイルスプロモーター配列を含む。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

50

(関連分野の説明)

成功する遺伝子治療に対する主な妨げの1つは、注目する組織に標的化することができる効果的な送達系の欠如である。例えば、癌患者における腫瘍に対して癌のための遺伝子治療を標的化することができるのは有利であろう。腫瘍-標的化導入遺伝子発現のための1つの手段は、腫瘍に対して選択的であるプロモーターの使用を介して遺伝子発現を制御することである。

【0004】

1つのそのようなプロモーターはヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)プロモーターである。hTERTはテロメラーゼの触媒サブユニットである。テロメラーゼは、染色体末端の完全な複製を担うリボヌクレオ蛋白質複合体である(非特許文献1)。多くの研究は、悪性腫瘍の大部分がテロメラーゼ活性を発現し(Kimら、1996)、他方、ほとんどの正常な細胞は発現しない(Shay and Wright, 1996)ことを示している。ヒトにおけるテロメラーゼ活性に関する3つの主な成分が同定されている:(a)RNA成分[hTER(Fengら、1995)];(b)テロメラーゼ-関連蛋白質[hTEP1(Harringtonら、1997)];(c)テロメラーゼ触媒ユニットまたはヒトテロメラーゼ逆転写酵素[hTERT(Meyersonら、1997; Nakamuraら、1997)]。しかしながら、イン・ビトロでのテロメラーゼ活性の復元のためにはhTERおよびhTERTのみが必要とされ(Nakayamaら、1998)、従って、ヒトにおけるテロメラーゼの最小触媒コアを表す(Beattieら、1998)。

10

20

【0005】

hTERTのプロモーター領域は従前にクローン化され、特徴付けられている(非特許文献2)。hTERTプロモーターによるジフテリアトキシンA-鎖、FADD、カスパーゼおよびBax等の細胞傷害性またはアポトーシス遺伝子のテロメラーゼ-特異的発現は、プラスミドおよびアデノウイルス等の種々の遺伝子導入系において首尾よく達成され、報告されている(例えば、Abdul-Ghaniら、2000; and Komataら、2001)。

【0006】

しかしながら、ほとんどの他の固有の哺乳動物プロモーターのようなhTERTプロモーターの転写促進強度は、通常、CMVプロモーターおよびSV40初期プロモーター等の通常に使用されるウイルスプロモーターよりもかなり弱い。その結果、遺伝子治療のための使用は低い導入遺伝子発現の問題によって妨げられている。

30

【0007】

イン・ビトロおよびイン・ビボにおける哺乳動物細胞での修飾されていないhTERTプロモーターの弱い転写増強能力を克服するために、幾人かの研究者は、二元アデノウイルスベクター系を開発しており、hTERTプロモーターおよび導入遺伝子は第一ベクター中のGal4遺伝子またはテトラサイクリン応答性エレメント(TRE)の制御下に置かれる(非特許文献3; 非特許文献4Guら、2000; Guら、2002)。第二ベクターは、VP16蛋白質またはTet-On/Tet-Offトランスアクチベーター等のエンハンサーを発現して、hTERTからの導入遺伝子発現を増加させる。しかしながら、系は、2つの別々のベクターの使用に関連した欠陥のため、臨床的適用のためには余りにも複雑で非現実的である。特に、デュアルベクター系はランダムであって制御できない。なぜならば、双方のベクターにとって、同時に同一細胞に入るのは困難だからである。さらに、それは潜在的には、多数のベクターおよび多数の治療的に無関係な成分、ならびに系に関連する遺伝子産物の使用のため、増大した毒性をもたらし得る。

40

【非特許文献1】Blackburnら、J. Lipid. Res. (1991) 32(12): 1911-1918

【非特許文献2】Takakuraら、Cancer Res. (1999) 59(3): 551-557

【非特許文献3】Guら、Cancer Res. (2000) 60: 5359-536

50

4

【非特許文献4】Guら、Oncogene(2002)21:4757-4764

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従って、増強された組織-選択的導入遺伝子の発現を可能にする、より効果的な組織-選択的プロモーター、またはプロモーター機能を容易にする改良された方法が必要とされている。この領域におけるプロモーター技術は、遺伝子治療で用いるベクター、ならびにレポーターベースのイメージング様式等の高い導入遺伝子発現を必要とする他の技術の臨床的適用および開発を容易にするであろう。この技術を単一ベクターに組み合わせると、デュアルまたは多数ベクターに関連する毒性を減少させるのを助けるであろう。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の要旨)

本発明者らは、組織-選択的であってイン・ビトロおよびイン・ビボにて導入遺伝子の高度に有効な発現を促進するある種の新規なキメラプロモーターを開発した。特に、本発明者らは、最小ウイルスプロモーター配列に融合した組織-特異的プロモーター配列から構成されるある種の新規なキメラプロモーター、およびこれらの新規なプロモーターを利用する方法を開発した。例えば、必須のhTERTプロモーター配列をミニ-CMVプロモーター配列と最適に融合させることによって作成された、ミニCMV(hTMC)プロモーター配列に融合したhTERT配列を含む新規なキメラプロモーターが開発された。本発明者らは、また、組織-選択的プロモーターの機能を改良する方法を開発した。これらのプロモーターを用い、本発明者らは、イン・ビトロおよびイン・ビボにて高い腫瘍特異性および高い導入遺伝子発現を共に達成することができた。本明細書中に記載されるように、これらのプロモーターは、被験体において過剰増殖性病を治療する目的で、または細胞においてレポーター配列をイメージングするためなどの、遺伝子を細胞に導入する方法において広い適用を有する。

20

【0010】

本発明のある実施形態は、概して、組織-選択的プロモーター配列、および組織選択的プロモーター配列に操作可能にカップリングされた第二のプロモーター配列を含むプロモーターに関し、第二のプロモーター配列は最小ウイルスプロモーター配列を含み、組織-選択的プロモーター配列を第二のプロモーター配列に操作可能にカップリングさせる結果、組織-選択的プロモーター配列の改良されたプロモーター機能がもたらされる。「プロモーター配列」は、そこで転写開始および転写速度が制御される核酸配列の領域である制御配列である。プロモーター配列は後に明細書中でより詳細に議論される。

30

【0011】

「組織-選択的プロモーター配列」は、本明細書中においては、他の組織タイプにおいてはかなり「サイレント」であるか、あるいは比較的低いレベルで発現させつつ、1つの組織において遺伝子の転写を駆動することができるプロモーター配列を言うことと定義される。組織-特異的プロモーター配列は後に明細書中にてより詳細に議論する。当業者に知られたいづれの組織-選択的プロモーター配列も、本発明のプロモーター配列に含めることが考えられる。例示的な組織-選択的プロモーターはhTERTプロモーター配列、CEAプロモーター配列、PSAプロモーター配列、プロバシンプロモーター配列、ARR2PBプロモーター配列、またはAFPプロモーター配列ヒトラクトラルブミンプロモーター配列、ヒッジラクトグロブリンプロモーター配列、U6プロモーター配列、H1プロモーター配列、7SLプロモーター配列、ヒトYプロモーター配列、ヒトMRP-7-2プロモーター配列、アデノウイルスVA1プロモーター配列、ヒトtRNAプロモーター配列、5SリボソームRNAプロモーター配列、またはこれらのプロモーター配列のいずれかの機能的ハイブリッド、または組合せを含む。

40

【0012】

50

組織 - 選択的プロモーター配列は、ヒトまたは他の哺乳動物であるかを問わず、被験体のいずれかの組織タイプにおいて活性であり得る。例えば、組織 - 選択的プロモーターは心臓、肺、食道、筋肉、腸、乳房、前立腺、胃、膀胱、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、ニューロン、筋肉細胞、白血球、不滅化細胞、新形成細胞、腫瘍細胞、癌細胞、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、唾液腺、胆嚢、泌尿器系膀胱、気管、咽頭、喉頭、大動脈、動脈、毛細血管、静脈、胸腺、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、骨髄、下垂体、甲状腺、副甲状腺、副腎、脳、大脳、小脳、髄質、橋、脊髄、坐骨神経、骨格筋、平滑筋、骨、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、陰茎、卵巣、子宮、乳腺、膺、皮膚、眼、または視神経において活性であり得る。

【0013】

ある実施形態において、組織選択的プロモーター配列は、腫瘍 - 選択的プロモーター配列である。組織 - 選択的プロモーター配列は、本明細書中においては、他の組織タイプにおいてはかなり「サイレント」であるか、あるいは比較的低いレベルで発現しつつ、腫瘍細胞において遺伝子の転写を駆動することができるプロモーター配列と定義される。例えば、腫瘍 - 選択的プロモーター配列はhTRプロモーター配列、hTERTプロモーター配列、CEAプロモーター配列、PSAプロモーター配列、プロバシンプロモーター配列、ARR2PBプロモーター配列、またはAFPプロモーター配列、MUC-1ムチン様糖蛋白質、CerbB2/neu癌遺伝子、シクロ - オキシゲナーゼ、E2F転写因子1、チロシナーゼ関連蛋白質、チロシナーゼ、またはスルビピンであり得る。

【0014】

ある実施形態においては、組織 - 特異的プロモーター配列は、低酸素症 - 特異的プロモーター配列である。低酸素症 - 特異的プロモーター配列は、本明細書中においては、細胞が低酸素状態に暴露された場合に、非 - 低酸素状態での他の組織タイプにおいてはかなり「サイレント」であるか、あるいは比較的低いレベルで発現されつつ、遺伝子の転写を駆動することができるプロモーター配列と定義される。当業者に知られたいずれの低酸素症 - 特異的プロモーター配列も、本発明で含めるのに考えられる。例えば、低酸素症 - 特異的プロモーター配列は低酸素応答エレメント(HRE)または低酸素症誘導因子であり得る。例えば、低酸素症誘導因子はHIF-1、HIF-2、またはHIF-3であり得る。

【0015】

本発明のある特定の実施形態において、組織 - 選択的プロモーター配列はhTERTプロモーター配列である。例えば、hTERTプロモーター配列は配列番号1であり得る。

【0016】

最小ウイルスプロモーター配列またはコアプロモーター配列は、本明細書中においては、トランスアクチベーターまたは転写複合体の成分を核酸中の特定の位置に結合させ、そこに位置させる能力を維持するヌクレオチド配列を含むプロモーターの部分と言うと定義される。不活性であるか、あるいは上流活性化の不在下でかなり低下したプロモーター活性を有するプロモーターエレメント、特にTATAエレメントは、最小又はコアプロモーターと言う。適当な転写因子の存在下で、最小プロモーターは転写を行うように機能する。最小またはコアプロモーターは、かくして、転写開始に必要な全ての基本的なエレメント、例えば、TATAボックスおよび/またはイニシエーターのみからなる。当業者に知られたいずれの最小ウイルスプロモーター配列も、本発明のプロモーター配列に含めることが考えられる。最小ウイルスプロモーター配列は、例えば、アデノウイルスプロモーター配列、バキュロウイルスプロモーター配列、CMVプロモーター配列、パルボウイルスプロモーター配列、ヘルペスウイルスプロモーター配列、ボックスウイルスプロモーター配列、アデノ関連ウイルスプロモーター配列、セミリキフォレストウイルスプロモーター配列、SV40プロモーター配列、ワクシニアウイルスプロモーター配列、またはレトロウイルスプロモーター配列であり得る。

【0017】

ある特定の実施形態において、プロモーター配列はミニ - CMVプロモーター配列であ

10

20

30

40

50

る。例えば、ミニ-CMVは配列番号2であり得る。いくつかの実施形態において、組織-選択的プロモーター配列はhTERTプロモーター配列であり、および第二のプロモーター配列はミニ-CMVプロモーター配列である。例えば、プロモーター配列は、ミニ-CMV配列に操作可能にカップリングしたhTERTプロモーター配列を含む配列番号3を含むことができる。

【0018】

本発明のある他の実施形態は、概して、プロモーターを含む核酸に関し、プロモーターは組織-選択的プロモーター配列、および組織-選択的プロモーター配列に操作可能にカップリングされた第二のプロモーター配列を含み、第二のプロモーター配列は最小ウイルスプロモーター配列を含み、組織-選択的プロモーター配列を第二のプロモーター配列に操作可能にカップリングさせると、第一のプロモーター配列の改良されたプロモーター機能がもたらされる。本明細書中で用いるとき、「核酸」は、概して、ヌクレオベースを含む、DNA、RNA、またはその誘導体もしくはアナログの分子、すなわち、「ストランド」を言う。核酸は後に明細書中でより詳細議論する。前記した組織-選択的プロモーター配列および最小ウイルスプロモーター配列のいずれも、本発明の核酸配列に取り込むことができる。先に議論したように、組織-選択的プロモーター配列は、ある実施形態においては、組織-選択的プロモーター配列、または低酸素症-特異的プロモーター配列をさらに定義することができる。ある特定の実施形態において、組織-選択的プロモーター配列は、例えば、配列番号1に記載された配列等のhTERTプロモーター配列である。さらに、いくつかの実施形態において、核酸は、組織-選択的プロモーター配列に操作可能にカップリングしていてもしていなくてもよい、1以上のさらなるプロモーター配列を含む。

10

20

【0019】

本発明のいくつかの実施形態において、核酸はプロモーターに操作可能にカップリングされた1以上の遺伝子を含む。当業者に知られたいずれの遺伝子も、遺伝子を細胞に送達する方法において含めることが考えられる。用語「遺伝子」は、簡明さのために機能的蛋白質、ポリペプチドまたはペプチド-コーディングユニットを言うように用いられる。遺伝子は、後に明細書中においてより詳細に議論する。いずれの遺伝子も、本発明の核酸配列で考えられる。例えば、遺伝子は、治療遺伝子または選択マーカーであり得る。治療遺伝子は、本明細書中においては、病気を治療または予防する目的で被験体に投与することができる遺伝子を言う。例えば、治療遺伝子は、過剰増殖性疾患の治療または予防のために被験体に投与される遺伝子であり得る。ある特定の実施形態において、過剰増殖性疾患は癌である。治療遺伝子は、例えば、腫瘍サプレッサー遺伝子、アポトーシスを誘導する遺伝子、酵素をコードする遺伝子、抗体をコードする遺伝子、またはホルモンをコードする遺伝子であり得る。例示的な治療遺伝子はRb、CFTF、p16、p21、p27、p57、p73、C-CAM、APC、CTS-1、zac1、scFV ras、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、BRCA1、VHL、MMAC1、FCC、MCC、BRCA2、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、GM-CSF、G-CSF、チミジンキナーゼ、mda7、FUS1、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、ADP、p53、ABLI、BLC1、BLC6、CBFA1、CBL、CSFIR、ERBA、ERBB、EBRB2、ETS1、ETS2、ETV6、FGR、FOX、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3、YES、MADH4、RB1、TP53、WT1、TNF、BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、NT3、NT5、ApoAI、ApoAIV、ApoE、Rap1A、シトシンデアミナーゼ、Fab、ScFv、BRCA2、zac1、ATM、HIC-1、DPC-4、FHIT、PTEN、ING1、NOEY1、NOEY2、OVCA1、MADR2、53BP2、IRF-1、zac1、DBCCR-1、rks-3

30

40

50

、COX-1、TFPI、PGS、Dp、E2F、ras、myc、neu、raf、erb、fms、trk、ret、gsp、hst、abl、E1A、p300、VEGF、FGF、トロンボスポンジン、BAI-1、GDAIF、Gene26(CACNA2D2)、PL6、*(BLU)、LUCA-1(HYAL1)、LUCA-2(HYAL2)、123F2(RASSF1)、101F6、Gene21(NPRL2)、SEM A3またはMCCを含む。ある特定の実施形態において、治療遺伝子はFUS1である。

【0020】

選択可能マーカーは、本明細書中においては、発現された場合に、細胞に同定可能な特徴を付与し、選択可能マーカーなしの細胞から選択可能マーカーを含有する細胞の容易な同定、単離および/または選択を可能にする核酸配列を言うように定義される。当業者に公知のいずれの選択可能マーカーも、本発明の核酸において選択可能マーカーとして含めることが考えられる。例えば、選択可能マーカーは薬物選択マーカー、酵素、または免疫学的マーカーであり得る。いくつかの実施形態において、本発明の核酸はプラスミドに含まれる。

10

【0021】

本発明の核酸配列のいくつかの実施形態は、プロモーター配列に操作可能にカップリングされた1以上のレポーター配列を含む。本明細書中で用いるとき、「レポーター」、「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」とは、細胞に存在する他の遺伝子配列またはコードされたポリペプチドから検出可能であって、かつ識別できるいずれの遺伝子配列またはコードされたポリペプチド配列も言う。例示的なレポーター配列は、スマートスタチン受容体アミノ酸配列、ヨウ化ナトリウムシンポーターアミノ酸配列、真核生物緑色蛍光蛋白質アミノ酸配列、赤色蛍光蛋白質アミノ酸配列、ルシフェラーゼアミノ酸配列、 β -ガラクトシラーゼアミノ酸配列、またはチミジンキナーゼアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む。スマートスタチンレポーターアミノ酸配列は、例えば、組換えスマートスタチン受容体アミノ酸配列、スマートスタチンタイプ2受容体アミノ酸配列、または突然変異したスマートスタチンタイプ2受容体アミノ酸配列であり得る。ある実施形態において、スマートスタチンタイプ2受容体アミノ酸配列は、スマートスタチン受容体タイプ2 Aアミノ酸配列である。

20

【0022】

レポーター配列は第二の遺伝子にIRESでカップリングさせることができる。IRESは本明細書中で他の箇所でも議論する。第二の遺伝子は、先に議論した遺伝子のいずれも含めた、当業者に知られたいずれの遺伝子でもあり得る。遺伝子は第二のレポーターに操作可能にカップリングされていてもしなくてもよい。第二のレポーターは、先に議論したレポーターを含めた、当業者に知られたいずれのレポーターでもあり得る。例えば、第二のレポーターはスマートスタチン受容体アミノ酸配列、ヨウ化ナトリウムシンポーターアミノ酸配列、ルシフェラーゼアミノ酸配列、真核生物緑色蛍光蛋白質アミノ酸配列、またはチミジンキナーゼアミノ酸配列であり得る。いくつかの実施形態において、第二の遺伝子は選択マーカーまたは治療遺伝子を含む。治療遺伝子は先に議論し、本明細書中の他の箇所でも議論する。本発明の核酸のある実施形態においては、組織-選択的プロモーター配列はhTERTプロモーター配列であり、第二のプロモーター配列はミニ-CMVプロモーター配列であり、およびプロモーターはFUS1をコードする遺伝子に操作可能にカップリングされている。これらの実施形態において、核酸配列はプラスミドに含まれていても含まれていなくてもよい。

30

40

【0023】

本発明はまた、概して、プロモーターを含む組成物にも関し、プロモーターは前記した本発明のプロモーターのいずれかを含む。本発明の組成物は、被験体における細胞へのプロモーターの送達用の送達ビヒクルを含んでも含まなくてもよい。送達ビヒクルは、本明細書中においては、核酸の細胞への送達を容易にすることができるいずれの剤も言うように定義される。細胞は被験体のいずれの細胞でもあり得る。被験体は哺乳動物等のいずれ

50

の被験体でもあり得る。ある特定の実施形態において、被験体はヒトである。当業者であれば、被験体における細胞への核酸配列の送達を容易にするのに用いられる送達ビヒクルに精通しているであろう。例えば、送達ビヒクルは核酸、プラスミド、ウイルスベクター、原核生物細胞、真核生物細胞、または脂質であり得る。いずれのウイルスベクターも本発明の組成物に含めることが考えられる。例えば、ウイルスベクターはアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ-関連ウイルスベクター、またはポックスウイルスベクターであり得る。本発明のある特定の実施形態において、ウイルスベクターはアデノウイルスである。さらに、送達ビヒクルとして用いられる当業者に知られたいずれの脂質も考えられる。いくつかの実施形態において、脂質はリポソームに含まれる。リポソームは、送達ビヒクルとして用いられるのに適した当業者に知られたいずれのリポソームでもあり得る。例えば、リポソームはDOTAP:Chol等のカチオン性脂質を含むことができる。リポソームはDOTAP:Cholナノ粒子等のナノ粒子に含めることができる。ナノ粒子は、本明細書中においては直径が1マイクロメートル未満の直径を有する粒子をいうと定義される。

10

20

30

40

50

【0024】

本発明のあるさらなる実施形態は、概して、前記した核酸のいずれかを含む組成物に関する。前記した核酸のいずれかを含む組成物は、さらに送達ビヒクルを含むことができ、被験体における細胞への核酸の送達用の送達ビヒクル。前記した送達ビヒクルのいずれも、本発明のこれらの実施形態に含めるのに適している。例えば、いくつかの実施形態において、送達ビヒクルは先に議論したウイルスベクターまたは脂質である。

【0025】

本発明の他の実施形態は、概して、(1)組織-選択的プロモーター配列を選択し；(2)第二のプロモーター配列は配列を選択し、第二のプロモーター配列は最小ウイルスプロモーター配列を含み；次いで、(3)組織-選択的プロモーター配列を第二のプロモーター配列に操作可能にカップリングさせ、組織-特異的プロモーター配列を第二のプロモーター配列へ操作可能にカップリングさせる結果、組織-選択的プロモーター配列の改良された機能がもたらされる；ことを含む、組織-選択的プロモーターの機能を改良する方法に関する。先に議論した組織-選択的プロモーター配列のいずれも、本発明のこれらの実施形態で用いられるのに適している。例えば、先に議論したように、組織-選択的プロモーター配列はhTERTプロモーター配列、CEAプロモーター配列、PSAプロモーター配列、プロバシンプロモーター配列、ARR2PBプロモーター配列、AFPプロモーター配列、ヒトラクトアルブミンプロモーター配列、ヒツジラクトグロブリンプロモーター配列、U6プロモーター配列、H1プロモーター配列、7SLプロモーター配列、ヒトYプロモーター配列、ヒトMRP-7-2プロモーター配列、アデノウイルスVA1プロモーター配列、ヒトtRNAプロモーター配列、5SリポソームRNAプロモーター配列、またはこれらのプロモーター配列のいずれかの機能ハイブリットまたは組合せであり得る。組織-選択的プロモーター配列は、先に議論したように、いずれの低酸素症-特異的プロモーター配列であってもよい。本発明の方法のある特定の実施形態において、組織-選択的配列は配列番号1等のhTERTプロモーター配列である。本発明の方法の最小ウイルスプロモーター配列は、先に議論した最小ウイルスプロモーター配列のいずれかを含むことができる。例えば、本発明の方法のある特定の実施形態において、最小ウイルスプロモーター配列はミニ-CMVプロモーター配列である。例えば、ミニ-CMV配列は配列番号2であり得る。

【0026】

いくつかの実施形態において、組織-選択的プロモーター配列はhTERTプロモーター配列であり、第二のプロモーター配列はミニ-CMVプロモーター配列である。例えば、プロモーターは配列番号3を含むことができる。

【0027】

本発明のなおさらなる実施形態は、概して、(1)プロモーターに操作可能にカップリングされた遺伝子を含む組成物を調製し、プロモーターは前記した本発明の新規なプロモ

ーターのいずれかであり；次いで、(2)組成物を細胞に接触させ、接触の結果、遺伝子が細胞に送達される；ことを含む遺伝子を細胞に送達する方法に関する。細胞は被験体のいずれの細胞でもあり得る。さらに、先に議論したように、被験体は哺乳動物等のいずれの被験体でもあり得る。ある特定の実施形態において、被験体はヒトである。例えば、ヒトは過剰増殖性疾患等の病気を持つ患者であり得る。例えば、過剰増殖性疾患は癌であってよい。癌等の過剰増殖性疾患は、後に明細書中においてより詳細に議論する。

【0028】

組成物は、いくつかの実施形態において、遺伝子の細胞への送達を容易にするのに用いられる送達ビヒクルを含む。先に議論した送達ビヒクルのいずれも、本発明のこれらの実施形態で用いるのに適している。例えば、送達ビヒクルは、前記したウイルスベクターまたは脂質のいずれかであり得る。ウイルスベクターおよび脂質もまた、明細書中で後により詳細に議論する。ある特定の実施形態において、ウイルスベクターはアデノウイルスベクターである。例えば、ベクターはプロタミン-複合体化ウイルスベクターであり得る。

10

【0029】

本発明のなおさらなる実施形態は、概して、(1)前記した新規な核酸配列のいずれかを含むポリヌクレオチドの医薬組成物を得；次いで、(2)医薬上有効量の組成物を被験体に投与することを含む、過剰増殖性疾患を持つ被験体を治療する方法に関する。先に議論したように、被験体は哺乳動物等のいずれの被験体でもあり得る。哺乳動物は病気を持つ患者等のヒトであってよい。病気は、被験体に悪影響し得るいずれの病気でもあり得る。ある特定の実施形態において、被験体はヒトであって、病気は癌等の過剰増殖性疾患である。癌は、乳癌、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、脳癌、肝臓癌、子宮頸癌、結腸癌、腎臓癌、皮膚癌、頭部および首癌、骨癌、食道癌、膀胱癌、子宮癌、リンパ系癌、胃癌、膵臓癌、精巣癌、リンパ腫または白血病等のいずれの癌でもあり得る。ある特定の実施形態において、癌は肺癌である。いくつかの実施形態において、被験体は二次的抗癌療法を受けているものである。化学療法、外科的療法、放射線療法、免疫療法、またはさらなる遺伝子治療等の当業者に知られたいずれの二次的抗癌療法も考えられる。二次的抗癌療法は、後に明細書中で詳細に議論する。

20

【0030】

また、本発明は、概して、(1)細胞を、前記した核酸のいずれかを含む組成物と接触させ、プロモーターはレポーターアミノ酸配列に操作可能にカップリングされており；次いで、(2)レポーターから由来するシグナルを測定することによって、レポーター配列の細胞発現を検出することを含む、細胞をイメージングする方法に関する。本明細書中で用いるとき、用語「レポーター」、「レポーター遺伝子」、または「レポーター配列」とは、細胞に存在する他の遺伝子配列、またはコードされたポリペプチドから検出可能であって、識別できるいずれの遺伝子配列またはコードされたポリペプチド配列も言う。レポーターは後に明細書中においてより詳細に議論する。細胞はいずれの細胞でもあり得る。ある実施形態において、細胞は哺乳動物等の被験体における細胞である。哺乳動物はヒトであってよい。ヒトは過剰増殖性疾患等の病気を持つ患者であってよい。例えば、過剰増殖性疾患は癌であり得る。いくつかの実施形態において、例えば、細胞は被験体におけるものであり、細胞をイメージングする方法は、被験体における組織をイメージングする方法とさらに定義される。「組織」とは、本明細書中においては、形態学的に同様な細胞、および身体中で具体的な機能を一緒に行う会合した細胞内物質の集合体を言う。例えば、組織は肺組織、腎臓組織、乳房組織などであってよい。組織は癌性腫瘍におけるような新形成細胞を含むものであってもよい。本発明のイメージング方法のある実施形態においては、細胞は癌細胞であり、細胞をイメージングする方法は、癌を持つ患者において腫瘍をイメージングする方法とさらに定義される。

30

40

【0031】

レポーターは当業者に知られたいずれのレポーターでもあり得る。例えば、レポーターは酵素アミノ酸配列、受容体アミノ酸配列、またはリボザイムRNA配列であってよい。例えば、レポーターアミノ酸配列は組換え7回膜貫通G-プロテイン関連受容体アミノ酸

50

配列、チミジンキナーゼアミノ酸配列、ドーパミン受容体アミノ酸配列、内皮成長因子受容体 (EGFR) アミノ酸配列、プラスミノゲンアミノ酸配列、ウロキナーゼタイプのプラスミノゲンアクチベーター受容体 (uPAR) アミノ酸配列、ホルモン受容体アミノ酸配列、またはナトリウム/ヨウ化物シンポーターアミノ酸配列であり得る。本発明のある特定の実施形態において、レポーターアミノ酸配列は組換え7回膜貫通G-プロテイン関連受容体 (GPCR) アミノ酸配列である。当業者に知られたいずれの組換えGPCRアミノ酸配列も、レポーターとして用いることが考えられる。例えば、GPCRはアセチルコリン受容体：M1、M2、M3、M4、またはM5；アデノシン受容体：A1；A2A；A2B；またはA3；アドレノセプター：1A、1B、1D、2A、2B、2C、1、2、または3；アンジオテンシン受容体：AT1、またはAT2；ボンペニン受容体：BB1、BB2、またはBB3；ブセジキニン受容体：B1、B2、カルシトニン、エイニリン、CGRP、またはアドレノメジュリン受容体；カンナビノイド受容体：CB1、またはCB2；ケモカイン受容体：CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CX3CR1、またはXCR1；化学走性受容体：C3a、C5a、またはfMLP；コレシストキニンおよびガストリン受容体：CKK1、またはCKK2；コルチコトロピン-放出因子受容体：CRF1、またはCRF2；ドーパミン受容体：D1、D2、D3、D4、またはD5；エンドセリン受容体：ET(A)またはET(B)；ガラニン受容体：GAL1、GAL2、またはGAL3；グルタメート受容体：mg11、mg12、mg13、mg14、mg15、mg16、mg17、またはmg18；糖蛋白質ホルモン受容体：FSH、LSH、またはTSH；ヒスタミン受容体：H1、H2、H3、またはH4；5-HT受容体：5-HT1A、5-HT1B、5-HT1D、5-HT1B、5-HT1F、5-HT2A、5-HT2F、5-HT2C、5-HT3、5-HT4、5-HT5A、5-HT5B、5-HT6、または5-HT7；ロイコトリエン受容体：BLT、CysLT1、またはCysLT2；リソリン脂質受容体：edg1、edg2、edg3、またはedg4；メラニコリン受容体：MC1；MC2；MC3；MC4、またはMC5；メラトニン受容体：MT1、MT2、またはMT3；ニューロペプチドY受容体：Y1、Y2、Y4、Y5、またはY6；ニューロテンション受容体：NTS1、またはNTS2；オピオイド：DOP、KOP、MOP、またはNOP；P2Y受容体：P2Y1、P2Y2、P2Y4、P2Y6、P2Y11、またはP2Y12)；ペルオキシソームプロリフェレーター：PPAR-、PPAR-、またはPPAR-；プロスタノイド受容体：DP、FP、IP、TP、EP1、EP2、EP3、またはEP4；プロテアーゼ-活性化受容体：PAR1、PAR2、PAR3、またはPAR4；スマトスタチン受容体：SSTR1、SSTR2、SSTR2A、SSTR3、SSTR4、またはSSTR5；タキキニン受容体：NK1、NK2、またはNK3；チロトロピン-放出ホルモン受容体：TRH1、またはTRH2；ウロテンシン-II受容体；血管活性化腸ペプチドまたは下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ペプチド受容体：VPAC1、VPAC2、またはPAC1；またはバソプレッシンまたはオキシトシン受容体：V1a、V1b、V2、またはOTである。

【0032】

本発明のイメージングの方法のある特定の実施形態において、組換えGPCRアミノ酸配列は組換えソマトスタチン受容体アミノ酸配列、組換えソマトスタチンタイプ2受容体アミノ酸配列、または突然変異したソマトスタチンタイプ2受容体アミノ酸配列である。例えば、組換えソマトスタチンタイプ2受容体アミノ酸配列は組換えソマトスタチンタイプ2A受容体アミノ酸配列であってよい。

【0033】

本発明のある特定の実施形態において、組換えGPCRアミノ酸配列は切形された組換えGPCRをコードする核酸を含む。切形はN-末端またはC-末端いずれかにおける切形であり得る。いくつかの実施形態において、切形はカルボキシ末端の切形である。切形

10

20

30

40

50

の結果、GPCRとしてのGPCRの機能の改変をもたらしてももたらさなくてもよい。例えば、いくつかの実施形態において、切形の結果、組換えGPCRアミノ酸配列の内部化および/またはシグナリングの改変をもたらす。

【0034】

本発明のいくつかの実施形態において、レポーターアミノ酸配列をコードする核酸はレポーターアミノ酸配列のN-末端またはC-末端において異種リーダー配列を含み、リーダー配列はレポーターアミノ酸配列を特定の非細胞性位置に誘導する。本発明のさらなる実施形態において、レポーターアミノ酸配列をコードする核酸は、さらに、レポーターアミノ酸配列のN-末端またはC-末端に融合した蛋白質タグを含む。用語「タグ」、「タグ配列」または「蛋白質タグ」とは、化学的部分、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドもしくはアミノ酸、ペプチドまたは蛋白質または他の化学物質いずれかをいい、これは、別の配列に付加された場合に、さらなる利用性を供するか、またはその配列の特に検出または単離において有用な特性を付与する。かくして、例えば、ホモポリマー核酸配列、または捕獲オリゴヌクレオチドに対して相補的な核酸配列をプライマーまたはプローブ配列に加えて、延長産物またはハイブリダイズした産物の引き続いての単離を容易にすることができる。蛋白質タグの場合には、ヒスチジン残基（例えば、4～8連続ヒスチジン残基）を蛋白質のアミノ-またはカルボキシ-末端いずれかに付加して、キレート金属クロマトグラフィーによる蛋白質単離を容易にすることができる。別法として、特異的抗体分子または他の分子（例えば、フラグエピトープ、c-mycエピトープ、インフルエンザAウイルスヘマグルチニン蛋白質の膜貫通エピトープ、蛋白質A、セルロース結合ドメイン、カルモジュリン結合蛋白質、マルトース結合蛋白質、キチン結合ドメイン、グルタチオンS-トランスフェラーゼなど）に対して反応性であるアミノ酸配列、ペプチド、蛋白質またはエピトープもしくは結合決定基を表す融合パートナーを蛋白質に付加して、アフエニティーまたは免疫アフエニティークロマトグラフィー、免疫組織化学、または本明細書中に記載された非-侵入性検出方法等の手法による蛋白質の単離、局所化および/または同定を容易にすることができる。化学タグ部位は、核酸または蛋白質いずれかに付加して、アビジン試薬との相互作用による単離または検出を容易にすることができるビオチンなどの分子を含む。多数の他のタグ部位が当業者に知られており、また、当業者によって考えることができ、この定義の範囲内にあると考えられる。蛋白質タグは、いくつかの実施形態において、酵素活性を有することができる。本発明のいくつかの実施形態において、蛋白質タグは酵素活性を有する。そのような蛋白質タグの例はヘマグルチニンA、ガラクトシダーゼ、チミジンキナーゼ、トランスフェリン、myc-タグ、VP16、(His)₆-タグ、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を含む。

10

20

30

【0035】

本発明のある特別な実施形態において、イメージングは被験体に対して操作内で行われる。被験体は、病気の組織の除去等のいずれかの理由で外科的処置を受けているものであり得る。例えば、腫瘍の外科的切除を受けている患者に対する本発明のいくつかの実施形態において。

【0036】

本発明のイメージングの方法のさらなる実施形態において、遺伝子をプロモーターに操作可能にカップリングさせ、細胞をイメージングする方法は、遺伝子を細胞に送達する方法とさらに定義される。かくして、例えば、細胞のイメージング、および細胞への遺伝子送達は、本発明のある実施形態においては、同時に行うことができる。

40

【0037】

例えば、遺伝子は、本発明の他の実施形態との関係で先に議論した遺伝子のいずれかであってよい。例えば、遺伝子は治療遺伝子であってよい。先に議論したように、治療遺伝子の例は腫瘍サプレッサー遺伝子、アポトーシスを誘導する遺伝子、酵素をコードする遺伝子、抗体をコードする遺伝子、ホルモンをコードする遺伝子を含む。例えば、治療遺伝子はRb、CFTR、p16、p21、p27、p57、p73、C-CAM、APC、

50

CTS - 1、zac1、scFV ras、DCC、NF - 1、NF - 2、WT - 1、MEN - I、MEN - II、BRCA1、VHL、MMAC1、FCC、MCC、BRCA2、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12、GM - CSF、G - CSF、チミンキナーゼ、mda7、FUS1、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、ADP、p53、ABLI、BLC1、BLC6、CBFA1、CBL、CSFIR、ERBA、ERBB、EBRB2、ETS1、ETS2、ETV6、FGR、FOX、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3、YES、MADH4、RB1、TP53、WT1、TNF、BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、NT3、NT5、ApoAI、ApoAIV、ApoE、Rap1A、シトシンデアミナーゼ、Fab、ScFv、BRCA2、zac1、ATM、HIC - 1、DPC - 4、FHIT、PTEN、ING1、NOEY1、NOEY2、OVCA1、MADR2、53BP2、IRF - 1、zac1、DBCCR - 1、rks - 3、COX - 1、TFPI、PGS、Dp、E2F、ras、myc、neu、raf、erb、fms、trk、ret、gsp、hst、abl、E1A、p300、VEGF、FGF、トロンボスポンジン、BAI - 1、GDAIF、Gene26 (CACNA2D2)、PL6、* (BLU)、LUCA - 1 (HYAL1)、LUCA - 2 (HYAL2)、123F2 (RASSF1)、101F6、Gene21 (NPRL2)、SEM A3またはMCCであり得る。本発明のある特別な実施形態において、治療遺伝子はFUS1である。

【0038】

先に議論したように、イメージングの方法は、さらに、遺伝子を細胞に送達する方法を含むことができる。本発明のある実施形態においては、レポーターをイメージして、被験体の病気の組織への遺伝子送達等の細胞への遺伝子送達を追跡する。かくして、本発明のある実施形態においては、イメージングの方法は、遺伝子の被験体への投与に続いて、被験体における遺伝子の生体内分布を測定する方法と定義される。いくつかの実施形態において、イメージングの方法は、さらに、被験体において治療遺伝子の投与に対する応答を測定する方法と定義される。

【0039】

当業者に知られたシグナルを測定するいずれの方法も、本発明のイメージングの方法に含まれると考えられる。イメージングの例示的な方法は蛍光イメージング分析、免疫組織化学分析、化学発光イメージング、光学イメージング、磁気共鳴イメージング、または放射線イメージングを行うことを含む。シグナルを測定する方法は、本明細書中の他の箇所において詳細に議論する。他の例はCTイメージングおよび超音波を含む。当業者に知られた放射線イメージングのいずれの方法も、本発明の関係で使用されるシグナルを測定する方法として考えられる。例えば、いくつかの実施形態において、放射線イメージングはカメライメージングとさらに定義される。当業者であれば、カメライメージングに非常に精通しているであろう。ある特定の実施形態において、シグナルの測定は、 ^{111}In -オクトレオチド-ソマトスタチン受容体タイプ2A (SSRT2A) レポーター系でのカメライメージングとさらに定義される。さらに、当業者であれば、磁気共鳴イメージングに精通しているであろう。ある特定の実施形態において、シグナルの測定は、超常磁性酸化鉄 (SPIO) - オクトレオチド - SSTR2A 受容体およびコントラスト促進剤系を用いる磁気共鳴イメージングとさらに定義される。SPIOはMRIのためのコントラスト剤であり、それを用いて、正常な組織バックグラウンドに対するコントラストを増強させることによって腫瘍組織の分解能を増強させる (その各々をここに具体的に引用して援用する Artemovら、2003; Zhaoら、2002; Gupta and Curtis, 2004を参照)。当業者であれば、磁気共鳴イメージングにおけるようなイメージングでのコントラスト剤の使用に精通しているであろう。イメージングでのコントラスト剤および例示的なコントラスト剤の使用が、後に明細書中でさらに詳細に議

論する。

【0040】

本発明のある態様は、組織 - 選択的プロモーター機能を増強させて、注目する組織に向けられたイメージング等の他の技術の開発を容易にする方法を含む。Umeokaら、2004年にレビューされている。種々のイメージング技術が腫瘍をイメージするのに利用できる。これらのイメージング技術は癌の検出、診断、および治療モニタリングで適用することができる。コンピュータ断層撮影、磁気共鳴イメージング、および超音波技術等の外部イメージングの方法の改良は、腫瘍および転移を可視化するための感度を増大させた (Tearneyら、1997; MacDonald and Hansell, 2003)。しかしながら、構造的および解剖学的イメージングにおける制限因子は、悪性組織を具体的に同定できない。組織病理学的調査は、依然として、新形成病巣の検出のための最も効果的な方法である。かくして、腫瘍 - 選択的イメージングは、ヒト癌の治療においてかなり価値があるであろう。なぜならば、それは顕微鏡的分析なくして腫瘍の場所をつきとめることを可能にするからである。特に、直接的視覚による検出のためにはあまりにも小さな腫瘍をイン・サイチュでイメージできる場合、外科医は適当な外科的マージンをもって腫瘍を正確に切除できるであろう。イメージングのこれらの形態は腫瘍 - 選択的である適当なマーカーを必要とする。先に議論した組織 - 選択的プロモーターの有用性を改良する方法は、組織 - 選択的イメージングの改良された方法の開発に適用することができる。

10

【0041】

本明細書中において用いるように、「ある」は1以上を意味することができる。特許請求の範囲で用いるように、用語「含む」と組み合わせて用いる場合、用語「ある」は1、または1を超えることを意味することができる。本明細書中で用いるとき、「もう1つの」は、少なくとも第二のまたはそれ以上を意味することができる。

20

【0042】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な記載から明らかとなるであろう。しかしながら、詳細な記載および具体例は本発明の好ましい実施形態を示しつつ、説明のためだけに掲げることが理解されるべきである。というのは、本発明の精神および範囲内にある種々の変形および修飾は、この詳細な記載から当業者に明らかとなるだろうからである。

30

【0043】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明のある態様をさらに示すために含める。本発明は、本明細書中に示された特定の実施形態の詳細な記載と組み合わせてこれらの図面の1以上を参照することによって良好に理解できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0044】

(例示的な実施形態の説明)

成功した癌遺伝子治療に対する主な妨げの1つは、腫瘍に特異的に標的化できる効果的な送達系の欠如である。腫瘍 - 標的化導入遺伝子発現のための1つの手段は、腫瘍 - 特異的プロモーターを介して導入遺伝子発現を制御することである。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) はテロメラーゼの触媒サブユニットであり、これは不滅化細胞および > 85% のヒト癌においてかなり活性であるが、ほとんどの正常な体細胞においては休止している。hTERTプロモーターはクローン化されており、正常な細胞ではそうではないが、腫瘍細胞においては導入遺伝子の発現を標的化することができることが示されている。しかしながら、ほとんどの他の固有の哺乳動物プロモーターのように、hTERTプロモーターの転写 - 促進強度は、CMVおよびSV40初期プロモーター等の通常に使用されるウイルスプロモーターよりもかなり弱い。その結果、癌遺伝子治療のためのその使用は、低い導入遺伝子発現の問題によって妨げられている。これらの問題を回避するために、本発明者らは、組織 - 選択的プロモーター配列、および組織 - 選択的プロモーター配列に操作可能にカップリングされた第二のプロモーター配列を含むある種の新規なキメラ

40

50

またはハイブリッドプロモーターを開発し、第二のプロモーター配列は最小ウイルスプロモーター配列を含む。本発明者らは、また、組織選択的プロモーター配列を第二のプロモーター配列に操作可能にカップリングさせることを含む組織プロモーターの機能を改良するある種の新規な方法も開発し、第二のプロモーター配列は最小ウイルスプロモーター配列を含む。本明細書中に記載される新規なプロモーターは、被験体における過剰増殖性疾患の治療のため、または被験体における細胞等の細胞をイメージングする目的などのための、遺伝子を細胞に導入する方法に適用することができる。本明細書中に記載された新規なプロモーターは、改良された導入遺伝子発現が有益であるいずれの方法にも適用することができる。

【0045】

A. プロモーターおよびプロモーターを含む核酸

本発明の核酸は、組織-選択性プロモーター配列、および組織-選択的プロモーター配列に操作可能にカップリングされた第二のプロモーター配列を含むキメラまたはハイブリッドプロモーターを含み、第二のプロモーター配列は最小プロモーター配列、好ましくは最小ウイルスプロモーター配列を含む。キメラプロモーター配列は、本発明の他の核酸エレメントと組み合わせて用いて、本明細書中に記載される種々の核酸ベクターおよび核酸ベクター系を構築することができる。

【0046】

1. 核酸

用語「核酸」は当該分野でよく知られている。本明細書中で用いるとき、「核酸」は、一般には、ヌクレオベースを含む、DNA、RNAまたはその誘導体もしくはアナログの分子（すなわち、ストランド）をいう。ヌクレオベースは、例えば、DNAで見出される天然に生じるプリンまたはピリミジン塩基（例えば、アデニン「A」、グアミン「G」、チミン「T」またはシトシン「C」）、またはRNAで見出される天然に生じるプリンまたはピリミジン塩基（例えば、A、G、ウラシル「U」または「C」）を含む。用語「核酸」は、各々が用語「核酸」の下位概念としての用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」を含む。用語「オリゴヌクレオチド」とは、長さが約3～約100ヌクレオベースの間の分子をいう。用語「ポリヌクレオチド」とは、長さが約100ヌクレオベースを超える少なくとも1つの分子をいう。

【0047】

これらの定義は、一般には、一本鎖分子をいうが、特定の実施形態においては、一本鎖分子に対して部分的に、実質的にまたは十分に相補的なさらなるストランドも含む。かくして、核酸は、特定の配列を含む分子の1以上の相補的ストランドまたは「相補体」を含む二本鎖分子または三本鎖分子を含むことができる。

【0048】

用語「ベクター」は、そこでそれが複製できる細胞への導入のために核酸配列を挿入することができるキャリアをいうために用いる。用語「発現ベクター」または「核酸ベクター」とは、核酸配列または転写できる遺伝子産物の少なくとも一部をコードする「カセット」、および特定の宿主細胞において操作可能に連結されたコーディング配列の転写および、恐らくは、翻訳に必要な核酸配列をいう、「調節」または「制御」配列を含有するベクターをいう。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、発現ベクターは同様に他の機能を発揮する核酸配列を含有することができる。

【0049】

2. プロモーター配列

「プロモーター配列」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制御配列である。それは、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子等の、そこに調節蛋白質および分子が結合することができる遺伝子エレメントを含有することができる。フレーズ「操作可能に位置した」、「操作可能に連結した」、「制御下」、および「転写制御した」は、プロモーターが、その配列の転写開始および発現を制御するために、核酸配列に対して正しい機能的な位置および向きにあることを意味する。プロモーターは、核酸配

10

20

30

40

50

列の転写活性化に關与するシス - 作用性調節配列をいう「エンハンサー」と組み合わせられて用いても用いなくてもよい。一緒にすると、適当なプロモーターまたはプロモーター/エンハンサー組み合わせ、および注目する遺伝子は、発現カセットを含む。1以上の発現カセットを所与の核酸ベクターまたは発現ベクターに存在させてもよい。ある態様においては、ひとつの発現カセットは、第二の発現カセットのプロモーターに相互作用するトランスアクチベーターをコードすることができる。1以上の発現カセットを、同一および/または異なる発現ベクターに存在させることができる。

【0050】

プロモーターは、コーディングセグメントまたはエクソンの上流に位置する5'非コーディング配列の一部を単離することによって得ることができるように、遺伝子または配列と天然で会合しているものであり得る。そのようなプロモーターは「内因性」ということができる。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流いずれかに位置した、核酸配列と天然で会合したものであり得る。別法として、コーディング核酸セグメントを、その天然の環境においては核酸配列と通常は会合していないプロモーターといわれる組換えまたは異種プロモーターの制御下に置くことによって、ある種の利点が見られるであろう。本発明のある態様においては、異種プロモーターはキメラプロモーターであってよく、2以上の内因性の、異種または合成プロモーター配列のエレメントが操作可能にカップリングされて、組換えプロモーターを生じる。

【0051】

組換えまたは異種エンハンサーは、その天然の環境において、核酸配列と通常は会合していないエンハンサーもいう。そのようなプロモーターまたはエンハンサーは、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーおよびいずれかの他の原核生物、ウイルスまたは真核生物細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、および「天然に生じない」、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、および/または発現を改変する突然変異を含有するプロモーターまたはエンハンサーを含むことができる。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り生産することに加えて、配列は、本明細書中に開示された組成物と組み合わせて、PCR(商標)を含めた、組換えクロニングおよび/または核酸増幅技術を用いて生産することができる(各々をここに引用して援用する米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照)。そのようなプロモーターを用いて、レポーター発現、例えば、少数の名称を挙げればガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼを駆動することができる。さらに、ミトコンドリア、葉緑体などの非核オルガネラ内の配列の転写および/または発現を指令する制御配列を同様に使用することができると思われる。

【0052】

発現用に選択された細胞型、オルガネラおよび生物においてDNAセグメントの発現を効果的に指令するプロモーターおよび/またはエンハンサーが典型的には用いられるであろう。分子生物学の分野における当業者であれば、一般には、蛋白質発現のためのプロモーター、エンハンサー、および細胞型の組合せの使用を知っている。例えば、ここに引用して援用するSambrookら、(1989)を参照。使用されるプロモーターは、例えば、組換え蛋白質および/またはペプチドの生産で有利な、導入されたDNAセグメントの発現を指令する適当な条件下で、構成的、組織 - 特異的、誘導性、および/または有用であろう。プロモーターは異種、または内因性、またはその組合せであってよい。

【0053】

a. 組織 - 選択的プロモーター配列

プロモーターは、種々の組織タイプにおいて、およびいくつかの異なる生物の種において機能的であり、あるいはその機能は特定の種および/または特定の組織または細胞型に制限され得る。さらに、プロモーターは構成的に活性であり得、あるいはそれは、ある種の条件下(例えば、低酸素症、あるいはプロモーターを含有する発現カセット中のエンハンサーエレメントの存在)、あるいは生物のある種の発生段階の間に(例えば、胎児においては活性、成人においてはサイレント)、ある物質(例えば、組織 - 特異的因子)によ

10

20

30

40

50

って選択的に活性化され得る。

【0054】

本発明の実施において有用なプロモーターは好ましくは組織 - 特異的であり、すなわち、それらは、他の組織タイプにおいてはかなり「サイレント」であり、あるいは比較的低レベルで発現されつつ、1つの組織において遺伝子の転写を駆動することができる。しかしながら、組織 - 特異的または組織 - 選択的プロモーターは、それらがサイレントである組織において検出可能な量の「バックグラウンド」または「基礎」活性を有することができる。プロモーターが標的組織において選択的に活性化される程度は、選択性比率（標的組織における活性 / 対照組織における活性）として表すことができる。この点に関して、本発明の実施で有用な組織特異的プロモーターは、典型的には、約2、3、4、または5

10

【0055】

あるプロモーターは、単一組織タイプに活性が制限されないが、それにも拘わらず、それらが組織の1つの群において活性であり、もう1つの群において活性が低く、あるいはサイレントであり得る点で選択性を示すことができることがさらに理解されるであろう。そのようなプロモーターは「組織特異的」または「組織選択的」とも言われ、本発明で用いられることが考えられる。例えば、種々の腫瘍細胞で活性なプロモーターは、癌の治療で有用であり得、これは、身体の多数の異なる領域のいずれかで行うことができる。

【0056】

組織 - 特異的プロモーターは、例えば、異なった組織において、あるいは成長の異なる段階において、あるいは過形成である細胞において異なって発現される遺伝子のプロモーター領域から誘導することができる。

20

【0057】

特定のプロモーターの制御下にある遺伝子の発現のレベルは、プロモーター領域を操作することによって変調することができる。例えば、プロモーター領域内の異なるドメインは異なる遺伝子 - 調節活性を保有することができる。これらの異なる領域の役割は、典型的には、特異的領域が欠失されたプロモーターの異なる変種を有するベクター構築体を用いて評価される（すなわち、欠失分析）。そのような実験で用いるベクターは、典型的には、異なる条件下で各プロモーター変種の活性を測定するのに用いられるレポーター配列を含有する。そのような欠失分析の適用は、望ましい活性を含有するプロモーター配列の同定を可能とし、かくして、コアプロモーターエレメントを含めた特定のプロモータードメインを同定する。このアプローチを用いて、例えば、組織特異性を付与することができる最小領域、または限定されないが、コアCMVプロモーター、ミニCMV等の他のプロモーターエレメントと組み合わせた場合に、頑強な転写応答を付与する最小領域を同定することができる。

30

【0058】

本明細書中に記載された多数の組織特異的プロモーターは、本発明を実施するのに特に有利であろう。ほとんどの場合に、これらのプロモーターは、選択されたベクターへのクローニングに適した便宜な制限消化断片として単離することができる。ある態様においては、本発明は、限定されないが、hTERTプロモーターを含む。別法として、プロモーター断片は、ポリメラーゼ鎖反応を用いて、あるいはオリゴヌクレオチド合成によって単離することができる。これらのプロモーター断片のクローニングは、制限部位をプライマーの5'末端に取り込むことによって容易にすることができる。

40

【0059】

当業者であれば、本発明との関係で含めることができる種々のタイプの組織 - 選択的プロモーター配列に精通しているであろう。これらのプロモーターの例示的なりリストを表1に含める。

【0060】

表1は本発明に関連して、組織 - 選択的プロモーター配列の源として使用することがで

50

きるエレメント/プロモーターの非限定的例をリストする。

【 0 0 6 1 】

【 表 1 - 1 】

表 1 - プロモーターおよび/またはエンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	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 α および/または DQ β	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β -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-Dra	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β -アクチン	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> ; 1989
筋肉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 (トランスチレチン)	Costa <i>et al.</i> , 1988
エラスターゼ I	Ornitz <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
α -フェトпротеイン	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
γ -グロビン	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
β -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
中性細胞接着分子 (NCAM)	Hirsch <i>et al.</i> , 1990

10

20

30

40

【 0 0 6 2 】

【表 1 - 2】

表 1 - プロモーターおよび/またはエンハンサー	
プロモーター/エンハンサー	文献
α_1 -抗トリプシン	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-調節蛋白質 (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-由来成長因子 (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
デュシェーヌ筋ジストロフィー	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleigh <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 and/or Villarreal, 1988
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; Miksicek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Choi <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989
パピローマウイルス	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and/or 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

b . プロモーター配列を操作可能にカップリングさせる方法

用語「プロモーター」は「プロモーターエレメント」および「プロモーター配列」と交換可能に用いられる。同様に、用語「エンハンサー」は、「エンハンサーエレメント」および「エンハンサー配列」と交換可能に用いられる。プロモーターは、適当な細胞内調節因子に結合した場合に、プロモーター-依存性転写を増強し（「エンハンサー」）または抑制する（「レプレッサー」）他のプロモーター、プロモーターエレメント、および/または調節配列/エレメントとカップリングすることができる。プロモーター、エンハンサー、またはレプレッサーは、そのようなエレメントが導入遺伝子の転写速度または効率を制御し、またはそれに影響する場合に、導入遺伝子に「操作可能に連結している」といわれる。例えば、導入遺伝子コーディング配列の5'末端の近位側に位置するプロモーター配列は、通常、導入遺伝子に操作可能に連結されている。本明細書中で用いるとき、用語「調節エレメント」は「調節配列」と交換可能に用いられ、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント、またはそのようなエレメントのいずれかの組合せをいう。

10

20

30

40

50

【0063】

プロモーターはそれらが制御する遺伝子に対して5'側（上流）に位置する。多くの真核生物プロモーターは2つのタイプの認識配列：TATAボックスおよび上流プロモーターエレメントを含有する。転写開始部位から25-30bp上流に位置したTATAボックスは、RNAポリメラーゼIIを指令して、正しい部位としてRNA合成を開始するのに関与すると考えられる。対照的に、上流プロモーターエレメントは転写が開始する速度を決定する。これらのエレメントはそれらの向きに拘わらず作用することができるが、それらはTATAボックスから100~200bp上流内に位置しなければならない。

【0064】

エンハンサーエレメントは、連結された相同または異種プロモーターから1000倍まで転写を刺激することができる。それらの向きが逆であっても、エンハンサーエレメントはしばしば活性なままである（Lira, J. Bio. Chem. 1990, 266: 6562-6570）。さらに、プロモーターエレメントとは異なり、転写開始部位から下流に、例えば、イントロン内に、あるいはプロモーターからかなりの距離にさえ置かれた場合に、エンハンサーは活性であり得る（Yutzeyら, Mol. and Cell. Bio. 1989, 9: 1397-1405）。

【0065】

当該分野で知られているように、この距離におけるある程度の変動はプロモーターの機能の喪失なくして収容することができる。同様に、導入遺伝子に対して調節遺伝子の位置決定は、機能の喪失なくしてかなり変動させることができる。調節エレメントの多数のコピーは共働して作用することができる。典型的には、発現ベクターは、1以上のエンハンサー配列、続いて、5'から3'の向きに、全て導入遺伝子に操作可能に連結されたプロモーター配列、続いて、ポリアデニル化配列を含む。

【0066】

3. 遺伝子

本発明のある実施形態は、注目する1以上の遺伝子に操作可能にカップリングされた、本明細書中に記載された新規なプロモーター配列の1つを含む核酸配列に関する。本発明のある他の実施形態は細胞をイメージングする方法に関し、方法は遺伝子を細胞に送達する方法とさらに定義される。これらの実施形態において、遺伝子はプロモーターに操作可能にカップリングされている。当業者に知られたいずれの遺伝子も、遺伝子を細胞に送達する方法で含ませることが考えられる。用語「遺伝子」は、簡単のために、機能的蛋白質、ポリペプチド、またはペプチド-コーディングユニットをいうのに用いられる。

【0067】

本発明のある実施形態において、遺伝子は治療遺伝子である。「治療遺伝子」は、病気を治療または予防する目的のために被験体に投与できる遺伝子である。例えば、治療遺伝子は癌の治療または予防のために被験体に投与される遺伝子であり得る。治療遺伝子の例は、限定されないが、Rb、CFTR、p16、p21、p27、p57、p73、C

- CAM、APC、CTS-1、zac1、scFV ras、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、BRCA1、VHL、MMAC1、FCC、MCC、BRCA2、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、GM-CSF、G-CSF、チミジンキナーゼ、mda7、fus、インターフェロン、インターフェロン、ADP、p53、ABLI、BLC1、BLC6、CBFA1、CBL、CSFIR、ERBA、ERBB、EBRB2、ETS1、ETS2、ETV6、FGR、FOX、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3、YES、MADH4、RB1、TP53、WT1、TNF、BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、NT3、NT5、ApoAI、ApoAIV、ApoE、Rap1A、シトシンデアミナーゼ、Fab、ScFv、BRCA2、zac1、ATM、HTC-1、DPC-4、FHIT、PTEN、ING1、NOEY1、NOEY2、OVCA1、MADR2、53BP2、IRF-1、Rb、zac1、DBCCR-1、rks-3、COX-1、TEPI、PGS、Dp、E2F、ras、myc、neu、raf、erb、fms、trk、ret、gsp、hst、abl、E1A、p300、VEGF、FGF、トロンボスポンジン、BAI-1、GDAIF、またはMCCを含む。

10

【0068】

本発明のある実施形態において、治療遺伝子は腫瘍サプレッサー遺伝子である。腫瘍サプレッサー遺伝子は、細胞に存在する場合に、細胞の腫瘍形成性、悪性、または過剰増殖表現型を低下させる遺伝子である。この定義は腫瘍サプレッサー遺伝子の全長核酸配列、ならびに全長配列に由来するいずれかの長さの非-全長配列双方を含む。配列は、特異的宿主細胞においてコドン優先性を提供するために導入することができる天然の配列または複数配列の縮重コドンを含むことがさらに理解される。

20

【0069】

この定義内の腫瘍サプレッサー核酸の例は、限定されないが、APC、CYLD、HIN-1、KRAS2b、p16、p19、p21、p27、p27mt、p53、p57、p73、PTEN、Rb、ウテログロビン、Skp2、BRCA-1、BRCA-2、CHK2、CDKN2A、DCC、DPC4、MADR2/JV18、MEN1、MEN2、MTS1、NF1、NF2、VHL、WRN、WT1、CFTR、C-CAM、CTS-1、zac1、scFV、ras、MMAC1、FCC、MCC、Gene26(CACNA2D2)、PL6、*(BLU)、Luca-1(HYAL1)、Luca-2(HYAL2)、123F2(RASSF1)、101F6、Gene21(NPRL2)、またはSEMA3ポリペプチドをコードする遺伝子、およびFUS1を含む。FUS1等の染色体3p21.3遺伝子は、ここに具体的に引用してその全部を援用する、米国特許出願公開NO.20020164715にかなり詳細に議論されている。

30

【0070】

他の例示的腫瘍サプレッサー遺伝子は、www.cise.ufl.edu/~yy1/HTML-TSGDB/Homepage.htmlにおける腫瘍サプレッサー遺伝子のデータベースに記載されている。このデータベースを、具体的にここに引用して、本出願のこのおよび全ての他のセクションに援用する。先に議論した腫瘍サプレッサー遺伝子をコードする核酸は、腫瘍サプレッサー遺伝子、またはそれに由来する核酸(例えば、各腫瘍サプレッサーアミノ酸配列の活性な断片をコードするcDNA、cRNA、mRNA、およびそのサブ配列)、ならびにこれの配列を含むベクターを含む。当業者であれば、本発明に適用することができる腫瘍サプレッサー遺伝子に精通しているであろう。

40

【0071】

本発明のある実施形態において、治療遺伝子は、アポトーシスを誘導する遺伝子(すなわち、プロ-アポトーシス遺伝子)である。「プロ-アポトーシス遺伝子アミノ酸配列」とは、細胞に存在する場合に、アポトーシスを誘導し、または促進するポリペプチドをい

50

う。本発明では、当業者に知られたいずれのプロ アポトーシス遺伝子も含めることが考えられる。例示的なプロ - アポトーシス遺伝子は CD 9 5、カスパーゼ - 3、B a x、B a g - 1、C R A D D、T S S C 3、b a x、h i d、B a k、M K P - 7、P E R P、b a d、b c l - 2、M S T 1、b b c 3、S a x、B I K、B I D、および m d a 7 を含む。m D A 7 に関する情報は、その各々をここに具体的に引用してその全体を援用する、米国特許出願公開 No. 2 0 0 5 0 2 5 0 1 2 7、2 0 0 4 0 0 0 9 9 3 9、2 0 0 3 0 2 2 5 0 2 5、および 2 0 0 2 0 1 8 3 2 7 1 に例えば見出すことができる。当業者であれば、本発明の方法および組成物で適用することができる、本明細書中に具体的に記載されていないプロ - アポトーシス遺伝子および他のそのような遺伝子に精通しているであろう。

10

【 0 0 7 2 】

治療遺伝子はサイトカインをコードする遺伝子でもあり得る。用語「サイトカイン」は、細胞間メディエーターとして別の細胞に作用する 1 つの細胞集団によって放出される蛋白質についての一般的用語である。「サイトカイン」とは、細胞に存在する場合に、サイトカインの機能のいくらかまたは全てを維持するポリペプチドをいう。この定義は、全長配列、ならびに全長配列に由来するいずれかの長さの非 - 全長配列を含む。先に議論したように、配列は、特異的宿主細胞においてコドン優先性を提供するために導入することができる天然配列または複数配列の縮重コドンを含むことがさらに理解される。

【 0 0 7 3 】

そのようなサイトカインの例はリンフォカイン、モノカイン、成長因子および伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、ヒト成長ホルモン、N - メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモン等の成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；卵胞刺激ホルモン (F S H)、甲状腺刺激ホルモン (T S H)、および黄体ホルモン (L H) 等の糖蛋白質ホルモン；肝臓成長因子；プロスタグランジン、線維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン、O B 蛋白質；腫瘍壊死因子 - および ; ムレリアン - 刺激物質；マウスゴナドトロピン - 関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン (T P O)；N G F - 等の神経成長因子；血小板 - 成長因；T G F - および T G F - 等のトランスフォーミング成長因子 (T G F)；インスリン - 様成長因子 - I および - I I；エリスロポエチン (E P O)；骨誘導因子；インターフェロン - 、 - 、および - のようなインターフェロン；マクロファージ - C S F (M - C S F) 等のコロニー刺激因子 (C S F)；顆粒球 - マクロファージ - C S F (G M - C S F)；および顆粒球 - C S F (G - C S F)；I L - 1、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 1 1、I L - 1 2、I L - 1 3、I L - 1 4、I L - 1 5、I L - 1 6、I L - 1 7、I L - 1 8、L I F、G - G S F、G M - C S F、M - C S F、E P O、k i t - リガンドまたは F L T - 3 等のインターフェロン (I L) である。

20

30

【 0 0 7 4 】

サイトカインの別の例は I L - 1 0 である。I L - 1 0 は免疫系細胞ならびにいくつかの腫瘍細胞によって生産される多能性ホモダイマーサイトカインである (E k m e k c i o g l u ら、1 9 9 9)。その免疫抑制機能は、I F N、T N F、および I L - 6 のそれを含めた、プロ炎症性サイトカイン合成の優れた阻害を含む (D e W a a l M a l e f y t ら、1 9 9 1)。I L - 1 0 - 様サイトカインのファミリーは染色体 1 q 3 2 上の小さな 1 9 5 k b 遺伝子クラスターにコードされ、I L - 1 0 に対して構造的および配列相同性を持つ多数の細胞蛋白質 (I L - 1 0、I L - 1 9、I L - 2 0、M D A - 7) からなる (K o t e n k o ら、2 0 0 0；G a l l a g h e r ら、2 0 0 0；B l u m b e r g ら、2 0 0 1；D u m o u t i e r ら、2 0 0 0；K n a p p ら、2 0 0 0；J i a n g ら、1 9 9 5 a；J i a n g ら、1 9 9 6)。

40

【 0 0 7 5 】

サイトカインファミリーの最近発見された推定メンバーは M D A - 7 である。M D A -

50

7はIL-10ファミリーメンバーとして特徴付けられており、IL-24としても知られている。染色体の位置転写調節、ネズミおよびラット相同発現、および推定蛋白質構造は、全て、サイトカインであるMDA-7に帰属される(Knappら、2000; Schaeferら、2000; Soorら、1999; Zhangら、2000)。その全てが迅速な分解のためにmRNAを標的化するそれらの3'UTRにおいてAU-リッチなエレメントを含有するGM-CSF、TNF、およびIFN転写体と同様に、MDA-7はその3'UTRにおいて3つのAREを有する¹⁷。mda-7 mRNAはヒトPBMCで同定されており(Ekmeckiogluら、2001)、ヒトMDA-7蛋白質のサイトカイン機能は従前には報告されていないが、MDA-7は遺伝子および蛋白質配列特徴に基づいてIL-24として命名されている。(NCBIデータベースアクセス番号XM_001405)。

10

【0076】

治療遺伝子の他の例は酵素をコードする遺伝子を含む。その例は、限定されないが、ACPデサチュラーゼ、ACPヒドロキシラーゼ、ADP-グルコースピロホスホリラーゼ、ATPase、アルコールデヒドロゲナーゼ、アミラーゼ、アミログルコシダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、シクロオキシゲナーゼ、デカルボキシラーゼ、デキストリナーゼ、エステラーゼ、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、ヒアルロンシンターゼ、ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ、グルコースオキシダーゼ、GTPase、ヘリカーゼ、ヘミセルラーゼ、ヒアルロニダーゼ、インテグララーゼ、インベルターゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、ラクターゼ、リパーゼ、リボキシゲナーゼ、リアーゼ、リゾチウム、ペクチン

20

【0077】

治療遺伝子のさらなる例は、カルバモイルシンテターゼI、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギノスクシネートシンテターゼ、アルギノスクシネートリアーゼ、アルギナーゼ、フマリルアセトアセテートヒドロラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、
-1抗トリプシン、グルコース-6-ホスファターゼ、低密度-リボ蛋白質受容体、ポルフォピリノーゲンデアミナーゼ、第VII因子、第IX因子、シスタチオン
-シンターゼ、分岐鎖ケト酸デカルボキシラーゼ、アルブミン、イソバレリル-CoA、デヒドロゲナーゼ、プロピオリルCoAカルボキシラーゼ、メチルマロニルCoAムターゼ、グルタリルCoAデヒドロゲナーゼ、インスリン、
-グルコシダーゼ、ビルビン酸カルボキシラーゼ、肝臓ホスホリラーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、グリシンデカルボキシラーゼ、H-プロテイン、T-プロテイン、メンケス病銅-輸送ATPase、ウィルソン病銅-輸送ATPase、シトシンデアミナーゼ、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、グルコセルブロシダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、
-L-イズロニダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、HSVチミジンキナーゼ、またはヒトチミジンキナーゼをコードする遺伝子を含む。

30

40

【0078】

治療遺伝子はホルモンをコードする遺伝子も含む。その例は、限定されないが、成長ホルモン、プロラクチン、胎盤ラクタゲン、黄体ホルモン、卵胞-刺激ホルモン、絨毛ゴナドトロピン、甲状腺-刺激ホルモン、レプチン、アドレノコルチコトロピン、アンジオテンシンI、アンジオテンシンII、
-エンドルフィン、
-メラノサイト刺激ホルモン、コレシストキニン、エンドセリンI、ゲラニン、胃障害ペプチド、グルカゴン、インスリン、リポトロピン、ニューロフィジン、スマトスタチン、カルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、
-カルシトニン遺伝子関連ペプチド、悪性因子の高カルシウム血症、副甲状腺ホルモン-関連蛋白質、副甲状腺ホルモン-関連蛋白質、グルカゴン-様ペプチド、パンクレアスタチン、パンクレアチックペプチド、ペプチドYY、PHM、セク

50

レチン、血管活性腸ペプチド、オキシトシン、バズプレッシン、バソトシン、エンケファリンアミド、メトルフィナンアミド、メラノサイト刺激ホルモン、心房ナトリウム利尿性因子、アミリン、アミロイドP成分、コルチコトロピン放出ホルモン、成長ホルモン放出因子、黄体ホルモン-放出ホルモン、ニューロペプチドY、サブスタンスK、サブスタンスP、またはチロトロピン放出ホルモンをコードする遺伝子を含む。

【0079】

当業者に理解されるように、用語「治療遺伝子」はゲノム配列、cDNA配列、および蛋白質、ポリペプチド、ドメイン、ペプチド、融合蛋白質および突然変異体を発現し、または発現するように適合させることができるより小さな作成された遺伝子セグメントを含む。治療遺伝子をコードする核酸分子は、約5～約12000またはそれ以上のヌクレオチド、ヌクレオシド、または塩基対の連続核酸配列を含むことができる。

10

【0080】

「他のコーディング配列から実質的に単離された」は、注目する遺伝子が拡散セグメントのコーディング領域の一部を形成し、およびセグメントは、大きな染色体断片または他の機能的遺伝子またはcDNAコーディング領域等の、天然に生じるコーディング核酸の大きな部分を含有しないことを意味する。もちろん、これは元来単離された核酸セグメントをいい、ヒトの操作によってのちにセグメントに加えられた遺伝子またはコーディング領域を排除しない。

【0081】

「治療遺伝子」の定義の中には、「生物学的に機能的に同等な」治療遺伝子が含まれる。従って、治療遺伝子のアミノ酸と同一または機能的に同等なアミノ酸に対して約70%～約99%相同性を有する配列は、生物学的に機能的に同等な配列であり、但し、蛋白質の生物学的活性は維持されているものとする。

20

【0082】

4. 選択マーカー

本発明のある実施形態において、本発明の核酸構築体は、マーカーを発現ベクターに含めることによってイン・ビトロまたはイン・ビボで同定することができる。そのようなマーカーは、同定可能な変化を細胞に付与し、発現ベクターを含有する細胞の同定を容易にする。一般に、選択可能マーカーは、選択を可能にする特性を付与するものである。陽性選択可能マーカーは、マーカーの存在がその選択を可能にするものであり、他方、陰性選択可能マーカーは、その存在がその選択を妨げるものである。陽性選択可能マーカーの例は薬物抵抗性マーカーである。選択可能およびスクリーニング可能なマーカーの例は当業者によく知られている。

30

【0083】

5. レポーター

本明細書中で用いるように、用語「レポーター」、「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」等は、細胞に存在する他の遺伝子配列またはコードされたポリペプチドから検出可能であって、識別可能であるいずれの遺伝子配列またはコードされたポリペプチド配列もいう。好ましくは、レポーター配列は、その存在によって、または検出可能なシグナルの発生をもたらすその活性によって、容易に検出可能な蛋白質をコードする。ある態様において、検出可能な部位はフルオロフォア、ルミノフォア、マイクロスフェア、酵素、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、および/またはナノスフェアを含むことができ、それらのすべては、受容体を認識し、および/またはそれと相互反応する抗体またはリガンドにカップリングさせることができる。種々の実施形態において、本発明の核酸配列はレポーター核酸配列を含み、あるいは検出可能なポリペプチドを生起させる産物をコードする。レポーターは、検出可能なシグナルを直接的にまたは間接的に生じさせることができるレポーター分子であるか、あるいはそれをコードする。一般には、必ずしも必要はないが、レポーター遺伝子は、そうでなければ細胞によって生産されないRNAおよび/または検出可能な蛋白質をコードする。多くのレポーター遺伝子が記載されており、いくつかは遺伝子調節の実験のために市販されている。例えば、その開示をここに引用して援用す

40

50

る Alam and Cook, 1990, Anal. Biochem. 188: 245-254 を参照。検出することができるシグナルは、限定されないが、色、蛍光、ルミネセンス、同位体または放射性同位体シグナル、細胞表面タグ、細胞生存率、細胞栄養要求性の救済、細胞成長および薬物抵抗性を含む。レポーター配列は限定されないが、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ (LacZ)、アルカリ性ホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光蛋白質 (GFP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、例えば、G-プロテイン結合受容体、ソマトスタチン受容体を含めた膜結合蛋白質、CD2、CD4、CD8、インフルエンザヘマグルチニン蛋白質、シンポーター (NIS 等)、およびそれに対して向けられた高アフィニティー抗体またはリガンドが存在するか、あるいは慣用的な手段によって生産することができる当該分野でよく知られた他のもの、およびとりわけ、ヘマグルチミンまたは Myc からの抗原タグドメインに適切に融合された膜結合蛋白質を含む融合蛋白質をコードする DNA 配列を含む。

【0084】

ある実施形態において、レポーターアミノ酸配列は G-プロテイン結合受容体アミノ酸配列である。例示的な G-プロテイン結合受容体はアセチルコリン受容体：M1、M2、M3、M4、または M5；アデノシン受容体：A1；A2A；A2B；または A3；アドレノセプター：1A、1B、1D、2A、2B、2C、1、2、または 3；アンジオテンシン受容体：AT1、または AT2；ボンベシン受容体：BB1、BB2、または BB3；ブラジキニン受容体：B1、B2、カルシトニン、アイニリン、CGRP、またはアドレノメジュリン受容体；カンナビノイド受容体：CB1、または CB2；ケモカイン受容体：CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CX3CR1、または XCR1；化学走性受容体：C3a、C5a、または fMLP；コレシストキニンおよびガストリン受容体：CKK1、または CKK2；コルチコトロピン-放出因子受容体：CRF1 または CRF2；ドーパミン受容体：D1、D2、D3、D4 または D5；エンドセリン受容体：ET(A) または ET(B)；ガラニン受容体：GAL1、GAL2、または GAL3；グルタメート受容体：mg11、mg12、mg13、mg14、mg15、mg16、mg17、または mg18；糖蛋白質ホルモン受容体：FSH、LSH、または TSH；ヒスタミン受容体：H1、H2、H3、または H4；5-HT 受容体：5-HT1A、5-HT1B、5-HT1D、5-HT1E、5-HT1F、5-HT2A、5-HT2B、5-HT2C、5-HT2D、5-HT3、5-HT4、5-HT5A、5-HT5B、5-HT6、または 5-HT7；ロイコトリエン受容体：BLT、CysLT1、または CysLT2；リソリン脂質受容体：edg1、edg2、edg3、または edg4；メラノコルリン受容体：MC1；MC2；MC3；MC4、または MC5；メラトニン受容体：MT1、MT2、または MT3；ニューロペプチド Y 受容体：Y1、Y2、Y4、Y5、または Y6；ニューロテンション受容体：NTS1、または NTS2；オピオイド：DOP、KOP、MOP、または NOP；P2Y 受容体：P2Y1、P2Y2、P2Y4、P2Y6、P2Y11、または P2Y12；ペルオキシソームプロリフェレーター：PPAR α 、PPAR β 、または PPAR γ ；プロスタノイド受容体：DP、FP、IP、TP、EP1、EP2、EP3、または EP4；プロテアーゼ-活性化受容体：PAR1、PAR2、PAR3、または PAR4；ソマトスタチン受容体：SSTR1、SSTR2、SSTR2A、SSTR3、SSTR4、または SSTR5；タキキニン受容体：NK1、NK2、または NK3；チロトロピン-放出ホルモン受容体：TRH1、または TRH2；ウロテンシン-1 受容体、血管活性腸ペプチドまたは下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ペプチド受容体：VPAC1、VPAC2、または PAC1；またはバソプレッシンまたは オキシトシン受容体：V1a、V1b、V2、または OT を含む。レポーターとしてのソマトスタチン受容体の使用は、明細書の本セクションおよび明細書のすべての他のセクションについて、ここに具体的に引用してその全体を援用する、米国特許出願公開 No. 2002017

10

20

30

40

50

3626にかなり詳細に議論されている。

【0085】

ある実施形態において、レポーター核酸またはポリペプチドの発現は成長の利点を付与し、成長利点の程度は、宿主細胞の成長条件を変化させることによって制御可能である。

【0086】

他の実施形態において、レポーター配列は蛍光蛋白質をコードする。本発明に従って用いることができる蛍光蛋白質の例は緑色蛍光蛋白質 (GFP)、増強された緑色蛍光蛋白質 (EGFP)、Renilla reniformis 緑色蛍光蛋白質、GFPmut2、GFPuv4、増強された黄色蛍光蛋白質 (EYFP)、増強されたシアン蛍光蛋白質 (ECFP)、増強された青色蛍光蛋白質 (EBFP)、ディスコソーマ (discosoma) からのレモン色および赤色蛍光蛋白質 (dsRED) を含む。

10

【0087】

他の実施形態において、レポーター遺伝子は細胞表面タグをコードすることができる。この実施形態との関係において、方法は、さらに、宿主細胞を、細胞表面タグに対して特異的な蛍光標識抗体と接触させ、それにより、FACSまたは他のソーティング、または単離方法によって単離することができる宿主細胞を標識する工程を含むことができる。

【0088】

種々の実施形態において、レポーター配列の少なくとも1つの発現の所望のレベルは、レポーター配列の基礎転写レベルと比較した、レポーター配列の発現のレベルの増大、減少、または変化無しである。特定の実施形態において、レポーター配列の1つの発現の所望のレベルは、レポーター配列の基礎転写レベルと比較したレポーター配列の発現のレベルの増加である。

20

【0089】

種々の実施形態において、レポーター配列は、独立して、同時に、または独立してかつ同時に分析することができるユニークな検出可能蛋白質類をコードする。ある実施形態においては、レポーター配列の少なくとも1つは蛍光蛋白質をコードする。別の実施形態において、レポーター配列の少なくとも1つの発現レベルはFACSによって分析することができる。

【0090】

他の実施形態において、宿主細胞は真核生物細胞または原核生物細胞であってよい。例示的な真核生物細胞は酵母および哺乳動物細胞を含む。哺乳動物細胞はヒト細胞、および癌細胞等の病理学的表現型を呈する種々の細胞を含む。

30

【0091】

本発明のある実施形態において、レポーターはリボザイムRNA配列である。蛋白質は伝統的には核酸の触媒のために用いられてきたが、別のクラスのマクロ分子がこの努力において有用なものとして出現した。リボザイムは、核酸を部位特異的に切断するRNA-蛋白質複合体である。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を保有する特異的な触媒ドメインを有する (Kim and Cook, 1987; Gerlachら、1987; Forster and Symons, 1987)。例えば、非常に多数のリボザイムは、ホスホエステル導入反応を非常に高い程度の特異性をもって加速し、しばしば、オリゴヌクレオチド基質においていくつかのホスホエステルのただ1つを切断する (Cookら、1981; Michel and Westhof, 1990; Reinhold-Hurek and Shub, 1992)。この特異性は、基質が特異的塩基-対合相互作用を介して化学反応に先立ってリボザイムの内部ガイド配列 (「IGS」) に結合する要求に帰せられてきた。

40

【0092】

6. スプライシング部位

ほとんどの転写された真核生物RNA分子は、RNAスプライシングを受けて、初代転写体からイントロンを除去する。ゲノム真核生物配列を含有するベクターは、蛋白質発現のための転写体の適切なプロセッシングを確保するためにドナーおよび/またはアクセプ

50

タースプライシング部位を必要とするであろう (Chandlerら、1997)。

【0093】

7. ポリアデニル化シグナル

転写体の適切なポリアデニル化を行うためには、発現構築体にポリアデニル化シグナルが含まれ得る。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の成功裡の実施に対して非常に重要であるとは考えられず、および/またはいずれのそのような配列も使用してよい。特定の実施形態は、種々の標的細胞において便宜であり、および/またはよく機能することが知られている、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を含む。また、発現カセットのエレメントは転写終止部位であると考えられる。これらのエレメントはメッセージレベルを増強し、および/またはカセットから他の配列へのリードスルーを最小化するように働くことができる。

10

【0094】

8. 終止シグナル

本発明のベクターまたは構築体は、少なくとも1つの終止シグナルを含むことができる。「終止シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写体の特異的終止に關与するDNA配列から構成される。かくして、ある実施形態においては、RNA転写体の生産を終える終止シグナルが考えられる。ターミネーターは、望ましいメッセージレベルを達成するのにイン・ピボで必要であり得る。

【0095】

真核生物系において、ターミネーター領域は、新しい転写体の部位特異的切断を行って、ポリアデニル化部位を露出させる特異的DNA配列を含むこともできる。これは、特殊化された内因性ポリメラーゼにシグナルを与えて、約200A残基のストレッチ(ポリA)を転写体の3'末端に加える。このポリAテイルで修飾されたRNA分子は、より安定なように見え、より効率的に翻訳される。かくして、真核生物に關係する他の実施形態において、ターミネーターはRNAの切断についてのシグナルを含むのが好ましく、ターミネーターシグナルはメッセージのポリアデニル化を促進するのがより好ましい。ターミネーターおよび/またはポリアデニル化部位エレメントは、メッセージレベルを増強させ、カセットから他の配列へのリードスルーを最小化するように働くことができる。

20

【0096】

本発明で用いることが考えられるターミネーターは、限定されないが、例えば、ウシ成長ホルモンターミネーター等の遺伝子の終止配列、または例えばSV40ターミネーター等のウィルスターミネーター配列を含めた、本明細書中に記載されたまたは当業者に知られたいずれの公知の転写のターミネーターも含む。ある実施形態において、終止シグナルは、配列切形のためなどにより、転写可能または翻訳可能配列の欠如であり得る。

30

【0097】

9. 複製起点

宿主細胞においてベクターを増殖させるためには、それは、そこで複製が開始する特異的核酸配列である1以上の複製起点部位(しばしば、「オリ(ori)」という)を含有することができる。別法として、宿主細胞が酵母であるとき、自律複製配列(ARS)を使用することができる。

40

【0098】

10. IRES

本発明のある実施形態においては、内部リボソームエンタリー部位(IRES)エレメントを用いて、マルチジーン、またはポリシストロニックメッセージを作製する。IRESエレメントは、5'メチル化Cap依存性翻訳のリボソームスキニングモデルを回避することができ、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2つのメンバー(ポリオおよび脳心筋炎)からのIRESエレメント(Pelletier and Sonenberg, 1988)、ならびに哺乳動物メッセージからのIRES(Macejak and Sarnow, 1991)が記載されている。IRESエレメントは異種オープン

50

リーディングフレームに連結することができる。多数のオープンリーディングフレームと一緒に転写することができ、各々はIRESによって分離され、ポリシストロニックメッセージを生じる。IRESエレメントによって、各オープンリーディングフレームは効果的な翻訳のためにリボソームに接近可能である。多数の遺伝子が、単一プロモーター/エンハンサーを用いて効果的に発現されて、単一のメッセージを転写することができる(米国特許第5,925,565号および第5,935,819号;PCT/US99/05781)。

【0099】

B.細胞をイメージングする方法

本発明のある実施形態は、細胞を、本明細書中に記載された新規なプロモーターの1以上を含む核酸を含む組成物と接触させ、プロモーターはレポーターアミノ酸配列に操作可能にカップリングされており、次いで、レポーターに由来するシグナルを測定することによってレポーター配列の細胞発現を検出することを含む細胞をイメージングする方法に関する。細胞は単離された細胞であってよく、あるいはそれは被験体における組織等の組織の一部であってよい。ある実施形態において、細胞は、癌を持つ被験体における腫瘍に含まれる腫瘍細胞である。

10

【0100】

1.シグナルを測定する方法

測定すべきシグナルは、単離されたイメージング手法の一部として、あるいは(後により詳細に議論する)1を超えるイメージング様式を用いるイメージング手法の一部として測定することができる。例えば、イメージング手法は後に議論するCT、MRI、またはPETであってよい。しかしながら、ある態様においては、イメージングは、被験体に対する外科的手法の間に手術内で行われる。ある実施形態においては、例えば、レポーターを用いて、外科医が切除を望む特定の組織タイプを選択的に標識することができる。例えば、ある実施形態においては、切除すべき組織は腫瘍組織であって、手術内イメージングは腫瘍組織のイメージングである。操作内で行われるイメージングを用いて切除すべき細胞の検出を誘導する。操作内イメージングは、治療遺伝子の投与と同時に進めても進めなくてもよく、治療遺伝子はレポーター配列に操作可能にカップリングされている。

20

【0101】

ある実施形態において、イメージングは被験体への治療遺伝子の投与と同時に進められる。例えば、レポーターアミノ酸配列に操作可能にカップリングされるに加えて、プロモーターを治療遺伝子に操作可能にカップリングすることもできる。治療遺伝子は、当業者に知られたいずれのタイプの治療遺伝子であってもよい。例えば、治療遺伝子は腫瘍抑制因子遺伝子、アポトーシスを誘導する遺伝子、酵素をコードする遺伝子、抗体をコードする遺伝子、またはホルモンをコードする遺伝子であってよい。当業者に知られたいずれの治療遺伝子も、本発明の方法によって考えられる。治療遺伝子では、本明細書中において、他の箇所により詳細に議論する。

30

【0102】

治療遺伝子に操作可能にカップリングされたレポーターアミノ酸配列の同時投与は、被験体における遺伝子の生体内分布の測定に適用することもできる。かくして、本明細書中に記載された細胞をイメージングする方法を適用して、癌を持つ被験体における腫瘍中の治療遺伝子の生体内分布等の、組織中の治療遺伝子の生体内分布を測定することができる。

40

【0103】

レポーターアミノ酸配列のイメージングは、当業者に知られたいずれの方法によって行うこともできる。例えば、レポーターは、被験体への標識リガンドの投与によってイメージングことができ、標識されたリガンドはレポーターアミノ酸配列に向けられる。他の実施形態において、リガンドは、¹¹¹In-オストロチドのような放射性標識プローブである。さらなる実施形態において、リガンドは、レポーターアミノ酸配列に対して向けられた蛍光プローブ、またはレポーターアミノ酸配列に対して向けられた抗体である。

50

【 0 1 0 4 】

レポーターに由来するシグナルを測定するための当業者に知られたいずれの方法も、本発明に含めることが考えられる。検出の例示的方法を以下に示す。

【 0 1 0 5 】

a . カメライメージング

イメージングのための種々の核医薬技術が当業者に知られている。これらの技術のいずれも、本発明のイメージング方法に関係して適用し、レポーターからのシグナルを測定することができる。例えば、カメライメージングは、レポーターに由来するシグナルを測定するのに利用できるイメージングの方法として考えられる。当業者であれば、カメライメージングの適用のための技術に精通しているであろう（例えば、ここに具体的に引用して援用する K u n d r a ら、2002を参照）。1つの実施形態において、シグナルの測定は、111 - I n - オクトレオチド - S S R T 2 A レポーター系のカメライメージングの使用を含むことができる。

10

【 0 1 0 6 】

b . コンピュータ断層撮影 (C T)

コンピュータ断層撮影 (C T) が、本発明に関係するイメージング様式として考えられる。種々の角度から、時々は千を超える一連の X 線を取り、次いで、それをコンピュータと合わせることによって、C T は身体の内側の部分の三次元イメージを形成することを可能にする。コンピュータは、いずれかの角度から、かついずれかの深さにおける二次元スライスを表示するようにプログラムされる。

20

【 0 1 0 7 】

C T においては、放射線不透明コントラスト剤の静脈内注射は、最初の C T スキャンが診断的でない場合には、柔軟組織塊の同定および表示を助けることができる。同様に、コントラスト剤は、柔軟組織または骨病巣の血管系を評価するのを助ける。例えば、コントラスト剤の使用は、腫瘍と隣接する血管構造との関係の表示を助けることができる。

【 0 1 0 8 】

C T コントラスト剤は、例えば、ヨウ素化コントラスト媒体を含む。これらの剤の例はイオタラメート、イオヘキソール、ジアトリゾエート、イオパミドール、エチオドール、およびイオパノエートを含む。ガドリウム剤も C T コントラスト剤として使用できることが報告されている（例えば、H e n s o n ら、2004を参照）。例えば、ガドペンテート剤は (S t r u n k a n d S c h i l d , 2004に議論された) C T コントラスト剤として用いられてきた。

30

【 0 1 0 9 】

本発明の実施形態において、例えば、レポーター、またはレポーターに融合されたタグに対して向けられたリガンドを C T コントラスト剤で標識することができる。次いで、C T イメージングの実行を用いて、レポーターに由来するシグナルを測定することができる。

【 0 1 1 0 】

c . 磁気共鳴イメージング (M R I)

磁気共鳴イメージング (M R I) は、イメージを生じさせるのに高強度磁石およびラジオ周波数シグナルを用いる C T よりも新しいイメージング様式である。生物学的組織における最も豊富な分子種は水である。最終的に、イメージング実験においてシグナルを生じさせるのは水プロトン核の量子力学 (スピン) である。M R I においては、イメージすべき試料を強力な静磁場 (1 ~ 12 テスラ) に入れ、スピンをラジオ周波数 (R F) 放射のパルスで励起して、試料中に正味の磁化を生じさせる。次いで、種々の磁場勾配および他の R F パルスをスピんに作用させて、空間的情報を記録されたシグナルに暗号化する。これらのシグナルを収集し、分析することによって、C T イメージのように、二次元スライスで通常は示される三次元イメージを計算するのが可能である。

40

【 0 1 1 1 】

M R イメージングで用いるコントラスト剤は、他のイメージング技術で用いるのとは異

50

なる。それらの目的は、同一のシグナル特徴を持つ組織成分の間を区別するのを助け、(T 1 - 重み付けスピン - エコー M R イメージ上により強力なシグナル、および T 2 - 重み付けイメージ上により強度の低いシグナルを生じさせる) 緩和時間を短縮させることである。M R I コントラスト剤の例は、ガドリニウムキレート、マンガンキレート、クロムキレート、および鉄粒子を含む。

【 0 1 1 2 】

C T および M R I は共に、組織境界および血管構造を区別するのを助ける解剖学的情報を提供する。C T と比較して、M R I の不利点はより低い患者許容性、ペースメーカーおよびある種の他の移植された金属デバイスの禁忌、および多数の原因に関連する人工物を含み、その少なからずは動きである (A l b e r i c o ら、2004)。他方、C T は迅速で、よく許容され、かつ容易に利用できるが、M R I よりも低いコントラスト分解能を有し、ヨウ素化コントラストおよび電離放射線を必要とする (A l b e r i c o ら、2004)。C T および M R I 双方の不利点は、いずれのイメージング様式も細胞レベルで機能的な情報を提供しないことである。例えば、いずれの様式も細胞生存率に関する情報も提供しない。

10

【 0 1 1 3 】

C T イメージングについて前記したように、リガンドが受容体、または受容体に融合したタグに向けられる M R I コントラスト剤で標識されたリガンドは、レポーターに由来するシグナルの存在を決定するために M R I を用いて測定することができる。

20

【 0 1 1 4 】

d . P E T および S P E C T

細胞生存率等の細胞レベルの情報に関する情報を提供するイメージング様式は、陽電子射出断層撮影法 (P E T) および単光子放射型コンピュータ断層撮影法 (S P E C T) を含む。P E T においては、患者は、身体を通して移動する物質としてモニターできる陽電子を発するわずかな放射性物質を摂取し、またはそれが注射される。1つの普通の適用では、例えば、患者に、陽電子エミッターを付着させたグルコースを与え、彼らの脳を彼らが種々の仕事を行うときにモニターする。脳は働くにつれグルコースを使用するので、P E T イメージはどこで脳の活動が高いのかを示す。

【 0 1 1 5 】

P E T に密接に関連するのは、単光子放射型コンピュータ断層撮影法、または S P E C T である。2つの間の主な差は、陽電子を発する物質の代わりに S P E C T は高エネルギーフォトンを発する放射性トレーサーを用いることである。S P E C T は冠動脈病を診断するのに価値があり、既に約 250 万の S P E C T 心臓研究が毎年合衆国において行われている。

30

【 0 1 1 6 】

イメージングのための P E T 放射性医薬は、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{82}Rb 、 ^{62}Cu 、および ^{68}Ga 等の陽電子 - エミッターで通常は標識される。S P E C T 放射性医薬は、通常、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{201}Tl 、および ^{67}Ga 等の陽電子エミッターで標識する。脳イメージングに関しては、P E T および S P E C T 放射性医薬は、血液 - 脳 - 関門透過性、脳灌流および代謝受容体 - 結合および抗原 - 抗体結合に従って分類される (S a h a ら、1994)。 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4\text{-DTPA}$ 、 ^{201}Tl 、および $[^{67}\text{Ga}]$ シトレート等の血液 - 脳 - 関門 S P E C T 剤は通常は脳細胞によって排除されるが、改変された B B B により腫瘍細胞に侵入する。 $[^{123}\text{I}]$ I M P、 $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ H M P A O、 $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ E C D 等の S P E C T 灌流剤は親油性剤であり、従って、正常な脳に拡散する。重要な受容体 - 結合 S P E C T 放射性医薬は $[^{123}\text{I}]$ Q N E、 $[^{123}\text{I}]$ I B Z M、および $[^{123}\text{I}]$ イオマゼニルを含む。これらのトレーサーは特異的受容体に結合し、受容体関連病の評価において重要なものである。

40

【 0 1 1 7 】

e . 光学イメージング

光学イメージングは、医薬の特別な領域において広く普及した許容性を獲得した別のイ

50

メージング様式である。その例は蛍光イメージング分析、免疫組織化学イメージング分析、および化学発光イメージング分析を含む。当業者であれば、イメージング様式のこれらの形態に非常に精通しているであろう。さらなる例は、細胞成分の光学標識、およびフルオレセインアンジオグラフィーおよびヨードシアニン緑色アンジオグラフィー等のアンジオグラフィーを含む。光学イメージング剤の例は、例えば、フルオレセイン、フルオレセイン誘導体、ヨードシアニングリーン、オレゴングリーン、オレゴングリーン誘導体、ローダミンググリーン、ローダミンググリーンの誘導体、エオシン、エリスロシン、テキサスレッド、テキサスレッドの誘導体、マラカイトグリーン、ナノ金スルホスクシンイミジルエステル、カスケードブルー、クマリン誘導体、ナフタレン、ピリジルオキサゾール誘導体、カスケードイエロー色素、ダボキシル色素を含む。

10

【0118】

f. 超音波

広く普及した許容性を獲得した別の生物医学イメージング様式は超音波である。超音波イメージングは、柔軟組織構造のリアルタイム断面および三次元イメージさえ、および身体中の血液流動情報を提供するのに非侵的に用いられてきた。血管、組織および器官のイメージを作成するための高周波音波およびコンピュータ。

【0119】

血流の超音波イメージングは、血管のサイズおよび深さ等の多数の因子によって制限され得る。超音波コントラスト剤（比較的最近の開発）はペルフルオリン、およびペルフルオリンアナログを含み、これらは、灰色 - スケールイメージおよびドップラーシグナルを増強させるのを助けることによってこれらの制限を克服するように設計される。

20

【0120】

2. マルチ様式イメージング

本発明のいくつかの実施形態においては、1を超えるイメージング様式を用いるイメージングを用いて、レポーターに由来するシグナルを測定することができる。当業者に知られたいずれの2以上のイメージングの様式も本発明で適用して、レポーターに由来するシグナルを測定することができる。

【0121】

イメージング様式は、2つのイメージング様式にコンジュゲートされたオリゴ糖を含む診断的に有効な量の化合物を含む組成物の投与の間または後のいずれかの時点に行われる。例えば、イメージング実験は、本発明のデュアルイメージング化合物投与の間にあるいはその後いずれかの時点において行うことができる。いくつかの実施形態において、第一のイメージング様式は、デュアルイメージング剤の投与と同時に、またはデュアルイメージング剤の投与から約1秒、1時間、1日、またはいずれかの期間の後に、あるいはこれらの述べられた時間のいずれかの間におけるいずれかの時点に開始して行われる。本発明のいくつかの実施形態において、第二のイメージング様式は、第一のイメージング様式と同時に、または第一のイメージング様式後のいずれかの時点で行うことができる。例えば、第二のイメージング様式は、第一のイメージング様式の完了から約1秒、約1時間、約1日、またはそれ以上の期間後に、あるいはこれらの述べられた時間のいずれかの間におけるいずれかの時点に行うことができる。当業者であれば、本発明によって考えられる種々のイメージング様式の実行に精通しているであろう。さらに、当業者であれば、1を超えるイメージング様式を用いるイメージングを利用するイメージング機器およびイメージング技術に精通しているであろう。

30

40

【0122】

その例は、限定されないが、CTおよびMRI、CTおよびPET、CTおよびSPECT、CTおよび超音波、CTおよび光学イメージングなどを含む。

【0123】

3. リガンド

リガンドは、本明細書中においては、別の化学的構成要素に結合してより大きな複合体を形成するイオン、分子または分子群をいうように定義される。本発明との関係において

50

、リガンドは、レポーター、または（例えば、レポーターアミノ酸配列のN - 末端またはC - 末端に融合した蛋白質タグ等）レポーター配列に結合したアミノ酸配列に結合して、より大きな複合体を形成できるイオン、分子または分子群である。当業者に知られたいずれのリガンドも、本発明との関係ではリガンドとして用いることが考えられる。本発明のいくつかの実施形態において、リガンドをイメージすべき細胞と接触させることができる。リガンドは細胞によって内部化されてもされなくてもよい。レポーターが細胞表面に局所化されると、リガンドは、これらの実施形態においては、レポーターに結合し、またはレポーターと会合することができる。リガンドをレポーターに結合させるいずれの方法も本発明によって考えられる。ある他の実施形態において、リガンドは細胞によって内部化でき、細胞内のレポーターに結合し、または会合することができる。

10

【0124】

リガンドは、検出することができるシグナルを発生することができるような特性を有する分子または分子の部分であってよい。当業者に知られたいずれのイメージング様式もリガンドをイメージするのに適用することができる。いくつかの実施形態において、リガンドは、イメージすることができる分子または分子の部分に結合することができる。例えば、リガンドは放射性核種に結合することができ、放射性核種は当業者に知られた核医薬技術を用いてイメージすることができる。例えば、リガンドは ^{111}In -オクトレオチドであってよい。他の実施形態において、例えば、リガンドは、当業者によく知られているイメージング技術を用いて検出することができるコントラスト剤に結合することができる。例えば、リガンドは、CTコントラスト剤またはMRIコントラスト剤に結合することができ

20

【0125】

本発明のある実施形態において、リガンドはレポーターに結合することができ、リガンドは、今度は、当業者に知られたイメージング様式を用いて測定することができるシグナルを発生する。他の実施形態において、リガンドは、レポーターに融合された蛋白質タグに結合することができる。かくして、例えば、イメージングはリガンドからのシグナルを測定することを含み、これは、今度は、細胞内または被験体内のレポーター配列の局所化をもたらすであろう。

【0126】

4. イメージングで用いるための放射性イメージングおよび放射性核種

「放射性イメージング」は、本明細書中においては、シグナルの測定における放射性核種または価金属イオンの適用を含むいずれのイメージングもいように定義される。種々の価金属イオンまたは放射性核種が放射性イメージングで有用であることが知られている。その例は、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{169}Yb 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{201}Tl 、 ^{72}As 、および ^{157}Gd を含む。

30

【0127】

多数の因子がヒトにおける最適な放射性イメージングで考えられなければならない。検出の効率を最大化するためには、 $100 \sim 200 \text{ keV}$ 範囲のエネルギーを発する価金属イオンが好ましい。「エミッター」は、本明細書中においては、いずれかの範囲のエネルギーを発する剤と定義される。当業者であれば、エミッターである種々の価金属イオンに精通しているであろう。患者に対する吸収された放射性用量を最小化するためには、放射性核種の物理的半減期はイメージング手法が許容する限り短くなければならない。いずれかの日に、かつ該日のいずれかの時点に行うべき調査を可能にするためには、臨床的サイトで常に入手可能な放射性核種の源を有するのが有利である。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ は好ましい放射性各種である。なぜならば、それは 140 keV の線を発し、それは6時間の物理的半減期を有し、およびそれはモリブデン-99/テクネチウム-99m発生器を用いて容易に現場で利用できるからである。当業者であれば、ヒトにおいて最適な放射性イメージングを決定する方法に精通しているであろう。

40

【0128】

50

本発明の組成物のいくつかの実施形態において、エミッターまたはエミッターではない治療金属イオンである価金属イオンはリガンドまたはレポーターアミノ酸配列に結合することができる。例えば、治療金属イオンは白金、コバルト、銅、ヒ素、セリンおよびタリウムであってよい。これらの治療金属イオンを含む化合物は、癌の治療等の過剰増殖性疾患の治療に向けられた本発明の方法で適用することができる。

【0129】

本発明のある実施形態において、本発明のイメージング方法で用いられる核酸は、放射性標識することができるアミノ酸配列をコードする。コードされたレポーター配列の放射性標識は直接的とすることができ、あるいはそれは、蛋白質タグまたはレポーター配列に結合することができるリガンドの放射性標識によるように間接的とすることができる。本発明によって提供される放射性標識剤、化合物および組成物は、適量の放射能を有するものが提供される。例えば、 ^{99m}Tc 放射性複合体の形成において、一般には、mL当たり約0.01ミリキュリー(mCi)~約300mCiの濃度の放射能を含有する溶液中で放射性複合体を形成するのが好ましい。

10

【0130】

一旦コードされた配列が放射性標識されれば、それは、哺乳動物身体中の腫瘍等の部位を可視化するためにイメージすることができる。本発明によると、放射性標識は、当業者に知られたいずれの方法によっても投与される。例えば、投与は、放射性標識リガンドとして投与される単一単位注射用量であってよい。滅菌生理食塩水または血漿等の当業者に知られた通常の担体もいずれも利用することができる。一般に、投与すべき単位用量は約0.01mCi~約300mCi、好ましくは10mCi~約200mCiの放射能を有する。単位用量で注射すべき溶液は約0.01mL~約10mLである。

20

【0131】

放射性標識試薬の静脈内投与後に、器官または腫瘍のイン・ビボでのイメージングを、所望ならば、放射性標識試薬を患者に導入した後に数時間またはそれ以上以内に行うことができる。ほとんどの場合、十分な量の投与された用量が、1時間の約0.1以内にイメージすべき領域に蓄積するであろう。

【0132】

前記したように、イメージングは、当業者に知られたいずれの方法を用いても行うことができる。その例はPET、SPECT、およびシンチグラフィを含む。シンチグラフィにおいては、放射性標識は放射線放出放射性核種であり、放射性トレーサーは放射線検出カメラを用いて位置させる(このプロセスは、しばしば、シンチグラフィといわれる)。イメージされた部位は検出可能である。なぜならば、放射性トレーサーは病理学的部位(陽性対照といわれる)に位置するように選択されるが、別法として、放射性トレーサーは(陰性対照といわれる)そのような病理学的部位に位置しないように特異的に選択されるからである。

30

【0133】

5. イメージングと共に遺伝子を送達する方法

本発明のある実施形態は、遺伝子を同時投与することを含み、遺伝子は、レポーターアミノ酸配列をコードする核酸に操作可能にカップリングされている。例えば、遺伝子は治療遺伝子であってよい。治療遺伝子は本明細書中において他の箇所で詳細に議論される。治療遺伝子は、酵素障害の治療、ホルモン欠乏の治療、または癌の治療等のいずれかの目的で投与することができる。

40

【0134】

かくして、例えば、本発明のイメージング方法は、遺伝子の被験体への投与に続いて、治療遺伝子等の遺伝子の生体内分布を同時に測定するのに適用することができる。さらに、イメージングの方法を、被験体における治療遺伝子の投与に対する応答を測定する方法と同時に適用することもできる。前記したイメージング方法を用いて腫瘍内の位置等の被験体の組織内での遺伝子の存在の場所をつきとめることができる。かくして、イメージング方法を用いて、腫瘍内での腫瘍細胞生存率を測定することができ、治療遺伝子の投与に

50

続いての療法に対する応答に続いて適用することができる。

【0135】

C. 細胞への核酸の送達のための送達ビヒクル

本発明のある実施形態は、一般には、本明細書中に記載された1以上の新規なプロモーター、および被験体における細胞へのプロモーター配列の送達用の送達ビヒクルを含む組成物に関する。当業者であれば、これらの実験方法は当該分野でよく知られているので、核酸の送達用の送達ビヒクルの使用を理解するであろう。

【0136】

当業者に公知のいずれの送達ビヒクルも、本発明で用いられる送達ビヒクルとして考えられる。例えば、送達ビヒクルはプラスミド、ウイルスベクター、脂質、原核生物細胞、または真核生物細胞を含むことができる。

10

【0137】

1. ウイルスベクター

本発明のいくつかの実施形態において、送達ビヒクルはウイルスベクターである。「ウイルスベクター」を用いる細胞への核酸送達の技術は当該分野でよく知られている。ウイルスベクターは、(a)発現カセットのパッケージングを支持し、および(b)最終的に、そこにクローン化された組換え遺伝子構築体を発現するのに十分なウイルス配列を含有する構築体を含むことを意図する。

【0138】

当業者に知られたいずれのウイルスベクターも、本発明における送達ビヒクルとして考えられる。例えば、ウイルスベクターはアデノウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、パルボウイルスベクター、セミリキフォレストウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ-関連ウイルスベクター、またはボックスウイルスベクターであってよい。

20

【0139】

ある実施形態において、送達ビヒクルはアデノウイルスベクターである。アデノウイルスベクターはゲノムDNAへの組込みについて低い能力を有することが知られているが、この特徴は、これらのベクターによってもたらされる遺伝子導入の高い効率によって相殺される。

30

【0140】

アデノウイルスは、臨床的状況において遺伝子導入用で現在最も普通に使用されるベクターである。これらのベクターの利点の中には、それらは分裂しないおよび分裂する細胞双方への遺伝子送達において効率的であり、多量に生産することができることがある。ベクターは、アデノウイルスの遺伝子工学により作製された形態を含む。遺伝子組織化またはアデノウイルス、36kbの線状二本鎖DNAウイルスの知識は、アデノウイルスDNAの大きな片の、7kbまでの外来性配列での置換を可能にする(Grunhausら、1992)。レトロウイルスとは対照的に、宿主細胞のアデノウイルス感染は染色体取り込みをもたらさない。なぜならば、アデノウイルスDNAは潜在的な遺伝子毒性なくしてエピソーム様式で複製できるからである。また、アデノウイルスは構造的に安定しており、広範な増幅後にゲノム再編成は検出されていない。

40

【0141】

アデノウイルスは、その中程度のサイズのゲノム、操作の容易性、高い力価、広い標的-細胞範囲および高い感染性のため遺伝子導入ベクターとして用いるには特に適している。当業者であれば、アデノウイルスベクターを用いる実験方法に精通しているであろう。

【0142】

アデノウイルスベクターは複製欠陥であってよく、あるいは少なくとも条件付で欠陥であってよく、およびアデノウイルスベクターの性質は、本発明の成功した実施に対して臨界的であるとは考えられない。アデノウイルスは42の異なる公知の血清型またはサブグループA-Fのいずれかであってよい。サブグループCのアデノウイルスタイプ5は、本

50

発明で用いる条件付複製 - 欠陥アデノウイルスベクターを得るのに好ましい出発物質である。これは、アデノウイルスタイプ5は、それについて非常に多くの生化学的および遺伝子的情報が知られているヒトアデノウイルスであって、それは、歴史的には、ベクターとしてアデノウイルスを使用する殆どの構築で用いられてきたからである。

【0143】

アデノウイルスの成長および操作は当業者に知られており、イン・ビトロおよびイン・ビボで広い宿主範囲を呈する。この群のウイルスは高い力価、例えば、 10^9 - 10^{11} プラーク - 形成単位で得ることができ、それらはかなり感染性である。アデノウイルスのライフサイクルは、宿主細胞ゲノムへの組み込みを必要としない。アデノウイルスベクターによって送達される外来性遺伝子はエピソームであって、従って、宿主細胞に対して低い遺伝子毒性を有する。野生型アデノウイルスでのワクチン接種の研究において副作用は報告されておらず (Couchら、1963; Topら、1971)、イン・ビボ遺伝子導入ベクターとしてのそれらの安全性および治療能力を示す。

10

【0144】

レトロウイルスは、逆 - 転写のプロセスによって、感染された細胞においてそれらのRNAを二本鎖DNAへ変換する能力によって特徴付けられる一本鎖RNAウイルスの群である (Coffin, 1990)。次いで、得られたDNAはプロウイルスとして細胞染色体に安定に組み込まれ、ウイルス蛋白質の合成を指令する。組み込みの結果、受容体細胞およびその子孫においてウイルス遺伝子配列の保持がもたらされる。レトロウイルスゲノムは、各々、キャプシド蛋白質、ポリメラーゼ酵素、およびエンベロープ成分をコードする3つの遺伝子 *gag*、*pol* および *env* を含有する。*gag* 遺伝子から上流に見出される配列は、ゲノムのピリオンへのパッキングのためのシグナルを含有する。2つの長いターミナルリピート (LTR) 配列がウイルスゲノムの5' および3' 末端に存在する。これらは強力なプロモーターおよびエンハンサー配列を含み、宿主細胞ゲノムへの組み込みでも必要である (Coffin, 1990)。

20

【0145】

レトロウイルスベクターを構築するためには、注目する遺伝子をコードする核酸を、ある種のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製 - 欠陥であるウイルスを生じる。当業者であれば、レトロウイルスベクターを構築するために利用できるよく知られた技術に精通しているであろう。

30

【0146】

アデノ - 関連ウイルス (AAV) は本発明で用いられる魅力的なベクター系である。というのは、それは高い組み込み頻度を有し、それは分裂していない細胞に感染することができ、かくして、それを、組織培養中の哺乳動物細胞への遺伝子の送達で有用とするからである (Muzyczka, 1992)。AAVは感染性に対して広い宿主範囲を有し (Tratschinら、1984; Laughlinら、1986; Lebkowskiら、1988; McLaughlinら、1988)、これは、本発明で用いるために適用可能であることを意味する。*rAAV* ベクターの生成および使用に関する詳細は、各々、ここに引用して援用する、米国特許第5,139,941号および米国特許第4,797,368号に記載されている。

40

【0147】

AAVは、それが、培養された細胞における生産的感染を受けるには、もう1つのウイルス (アデノウイルス、またはヘルペスウイルス科のメンバーいずれか) との共感染を必要とする点で依存的パルボウイルスである (Muzyczka, 1992)。ヘルペスウイルスとの共感染の不在下では、野生型 AAVゲノムはその末端を通じてヒト染色体19に取り込まれ、それはプロウイルスとして潜伏状態で存在する (Kotinら、1990; Samulskiら、1991)。しかしながら、*rAAV* は、AAV *Reb* 蛋白質もまた発現されるのでなければ、組込用の染色体19に制限されない (Shelling and Smith, 1994)。AAVプロウイルスを運ぶ細胞がヘルパーウイルスによって過剰感染されると、AAVゲノムは染色体から、または組換えプラスミドから「

50

救済」され、通常の生産的感染が確立される (Samulskiら、1989; McLaughlinら、1988; Kotinら、1990; Muzyczka, 1992)。

【0148】

典型的には、組換えAAV (rAAV) ウイルスは、2つのAAVターミナルリピートが近接する注目する遺伝子を含むプラスミド (各々、ここに引用して援用するMcLaughlinら、1988; Samulskiら、1989)、およびターミナルリピート、例えば、pIM45なくして野生型AAVコーディング配列を含む発現プラスミド (ここに引用して援用するMcCartyら、1991) を共トランスフェクトすることによって作成される。当業者であれば、AAVウイルスを用いてベクターを生じさせるのに利用できる技術に精通しているであろう。

10

【0149】

単純疱疹ウイルス (HSV) は、ニューロン細胞に対するその向性のため神経系の障害を治療するのにかなりの興味を生じさせたが、このベクターもまたその広い宿主範囲を仮定して他の組織のために開発することができる。HSVを魅力的なベクターとする別の因子は、ゲノムのサイズおよび組織化である。HSVは大きいので、複数遺伝子または発現カセットの取り込みは他のより小さなウイルス系におけるよりも問題は少ない。加えて、変化する性能 (時間的、強度等) を持つ異なるウイルス制御配列の利用性は、他の系におけるよりも大きな程度での発現の制御を可能にする。ウイルスが比較的少数のスプライスされたメッセージを有し、遺伝子操作をさらに容易にすることも利点である。

【0150】

HSVもまた操作するのが比較的容易であり、高い力価まで成長させることができる。かくして、十分なMOIを達成するのに必要な容量の観点から、および反復投与の低い必要性において、送達は問題が少ない。遺伝子治療ベクターとしてのHSVのレビューについては、Gloriosoら (1995) を参照。当業者であれば、ベクターとしてHSVを使用するためのよく知られた技術に精通しているであろう。

20

【0151】

ワクシニアウイルスベクターは、それらの構築の容易性、得られる発現の比較的高いレベル、広い宿主範囲、およびDNAを運ぶ大きな能力のため広範に用いられてきた。ワクシニアは、顕著な「A-T」優先性を呈する約186kbの線状二本鎖DNAゲノムを含む。約10.5kbのインパーテッドターミナルリピートはゲノムに近接する。必須の遺伝子の大部分は、ボックスウイルスの中で最も高度に保存された中心領域内にマップされるようである。ワクシニアウイルスにおける見積もられたオープンリーディングフレームは150~200の数である。双方のストランドはコードしているが、リーディングフレームの広範な重複は普通ではない。

30

【0152】

他のウイルスベクターを本発明における構築体として使用してよい。例えば、ボックスウイルス等のウイルスに由来するベクターを使用してよい。ベネズエラウマ脳炎 (VEE) ウイルスの分子的にクローン化された株は、異種ウイルス蛋白質の発現のための複製コンピテントワクシニアベクターとして遺伝子的に精錬されている (Davisら、1996)。研究は、VEE感染が優れたCTL応答を刺激することを示しており、VEEが免疫化のための極端に有用なベクターであり得ることを示唆している (Caleyら、1997)。本発明においては、VEEウイルスは樹状細胞を標的化するのに有用であり得ると考えられる。

40

【0153】

ポリヌクレオチドは、特異的結合リガンドを発現するように作成されたウイルスベクター内に収容することができる。かくして、ウイルス粒子は標的細胞の同族受容体に特異的に結合し、内容物を細胞に送達する。レトロウイルスベクターの特異的標的化を可能にするように設計された新規なアプローチは、ウイルスエンベロープへのラクトース残基の化学的付加によるレトロウイルスの化学的修飾に基づいて開発された。この修飾は、シアロ糖蛋白質受容体を介する肝細胞の特異的感染を可能にすることができる。

50

【0154】

組換えレトロウイルスの標的化のための別のアプローチが設計されており、そこでは、レトロウイルスエンベロープ蛋白質に対する、および特異的細胞レポーターに対するビオチニル化抗体を用いた。抗体は、ストレプトアビジンを用いることによってビオチン成分を介してカップリングされた(Rouxら、1989)。主要組織適合性複合体クラスIおよびクラスII抗原に対する抗体を用い、それらは、イン・ビトロにおいて異所性ウイルスでの、表面抗原を保有する種々のヒト細胞の感染を示した(Rouxら、1989)。

【0155】

腫瘍溶解ウイルスもまた本発明におけるベクターとして考えられる。腫瘍溶解ウイルスは、本明細書中においては、それらが正常な細胞を殺すよりもしばしば腫瘍または癌細胞を殺すウイルスを一般にはいうように定義される。例示的な腫瘍溶解ウイルスは、ADPを過剰発現するアデノウイルスを含む。ADPの過剰発現は、野生型レベルのADPを発現するウイルスからのADPの発現と比較した、ADP発現のいずれかの増加と定義することができる。これらのウイルスは、具体的に引用して、その全体が出願の本セクションおよび出願の全ての他のセクションにその各々が援用される、米国特許出願公開No. 20040213764、米国特許出願公開No. 20020028785、および米国特許出願第09/351,778号において詳細に議論されている。

【0156】

本発明においてベクターとして使用することができる他のウイルスベクターは、ワクチン、またはデュアルワクチンおよび免疫療法適用において適用することができるウイルスベクターを含む。ウイルスベクター、およびウイルスベクターを用いるワクチン接種および免疫療法についての技術は、その各々を、具体的に引用して、その全体が出願の本セクションおよび本出願の全ての他のセクションに一体化されるPCT出願WO0333029、WO0208436、WO0231168、およびWO0295287により詳細に記載されている。ワクチン接種およびデュアル免疫療法/ワクチン接種のための技術に適用することができるさらなるベクターは前記した腫瘍溶解ウイルスを含む。

【0157】

他のウイルスベクターはバキュロウイルスベクター、バルボウイルスベクター、ピコルナウイルスベクター、 ウイルスベクター、セミリキフォレストウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、レンチウイルスベクター、およびレトロウイルスベクターも含む。ポックスウイルス等のウイルスに由来するベクターを使用することができる。ベネズエラウマ脳炎(VEE)ウイルスの分子的にクローン化された株は、異種ウイルス蛋白質の発現のための複製コンピテントワクチンベクターとして遺伝子的に精錬されてきた(Davisら、1996)。研究は、VEE感染が優れたCTL応答を刺激することを示し、VEEが免疫化のための極端に有用なベクターであろうことを示唆している(Caleyら、1997)。本発明においては、VEEウイルスは樹状細胞を標的化するのに有用であり得ると考えられる。

【0158】

2. 非ウイルスベクター

細胞へのプロモーター等の核酸の導入に適用することができるいずれの非-ウイルス送達ビヒクルもまた本発明によって考えられる。当業者であれば、入手可能な非ウイルス送達ビヒクルの範囲に精通しているであろう。

【0159】

ある実施形態において、細胞に送達される核酸はプラスミドに含まれる。当業者であれば、細胞へ注目する拡散配列を送達するのに用いることができる剤としてのプラスミドに精通しているであろう。

【0160】

ある他の実施形態において、細胞へ送達すべき核酸は細胞に含まれる。当業者に知られたいずれの細胞タイプも核酸についての送達として考えられる。例えば、細胞は原核生物

10

20

30

40

50

細胞または真核生物細胞であってよい。

【0161】

核酸の細胞への送達のためのいずれの方法も、本発明によって考えられる。これらの方法はリン酸カルシウム沈殿 (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippeら、1990) DEAE-デキストラン (Gopal, 1985)、エレクトロポレーション (Tur-Kaspala、1986; Potterら、1984)、直接的マイクロインジェクション (Harland and Weintraub, 1985)、DNA-負荷リボソーム (Nicolaou and Sene, 1982; Fraleyら、1979) およびリポフェクタミン-DNA複合体、細胞音波処理 (Fechheimerら、1987)、高速マイクロインジェクションを用いる遺伝子衝撃 (Yangら、1990)、ポリカチオン (Boussisら、1995) および受容体-媒介トランスフェクション (Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988) を含む。これらの技術のいくつかはイン・ビボまたはイクス・ビボ使用について首尾よく適合させることができよう。当業者であれば、非ウイルスベクターの使用に関する技術に精通しており、本明細書中に開示されたものよりも他のタイプの非ウイルスベクターが本発明によって考えられることを理解するであろう。

10

【0162】

本発明のさらなる実施形態において、発現カセットはリボソームまたは脂質処方物において捕獲することができる。リボソームは、リン脂質二層膜および内部水性媒体によって特徴付けられる小胞構造である。マルチメラリボソームは水性媒体によって分離された多数の脂質層を有する。リン脂質を過剰の水性溶液に懸濁させた場合、それらは自然に形成される。脂質成分は、閉じた構造の形成の前に自己-再編成を受け、水を捕獲し、脂質二層の間に溶質を溶解させる (Ghosh and Bachhawat, 1991)。また、リポフェクタミン (Gibco BRL) と複合体化された遺伝子構築体も考えられる。当業者であれば、リボソームおよび脂質形成を利用する技術に精通しているであろう。

20

【0163】

脂質ベースの非-ウイルス処方物は、アデノウイルス遺伝子治療に対する代替法を提供する。多くの細胞培養研究は脂質ベースの非-ウイルス遺伝子導入を記載してきたが、脂質ベースの処方を介する系統的遺伝子送達は制限されてきた。非-ウイルス脂質ベースの遺伝子送達の主な制限は、非-ウイルス送達ビヒクルを含むカチオン性脂質の毒性である。リボソームのイン・ビボ毒性は、イン・ビトロおよびイン・ビボ遺伝子導入の結果の間の矛盾を部分的に説明する。この矛盾するデータに寄与する別の因子は、血清蛋白質の存在下および不在下におけるリボソーム安定性の差である。リボソームおよび血清蛋白質の間の相互作用は、リボソームの安定性特徴に対して劇的なインパクトを有する (Yang and Huang, 1997)。カチオン性リボソームは負に帯電した血清蛋白質を引き付け、それに結合する。血清蛋白質によって被覆されたリボソームはマクロファージによって溶解され、または摂取され、循環からのそれらの除去に至る。現在のイン・ビボリボソーム送達方法は皮下、皮内、腫瘍内または頭蓋内注射を用いて、循環におけるカチオン性脂質に関連する毒性および安定性の問題を回避する。リボソームおよび血漿蛋白質の相互作用は、イン・ビトロ (Felgnerら、1987) およびイン・ビボ遺伝子導入 (Zhuら、1993; Solodinaら、1995; Thierryら、1995; Tsukamotoら、1995; Aksentijevichら、1996) の効率の間の矛盾を担う。

30

40

【0164】

脂質処方物の生産は、しばしば、(1) 逆相蒸発、(II) 脱水-再水和、(III) 洗剤透析および(IV) 薄いフィルム水和後のリボソーム混合物の音波処理または系列的押出によって達成される。一旦製造されれば、脂質構造を用いて、循環にある場合には、毒性(化学療法剤)または不安定(核酸)である化合物をカプセル化することができる。

50

リポソームカプセル化の結果、そのような化合物についてのより低い毒性およびより長い血清半減期がもたらされた (Gabizonら、1990)。多数の病気治療は、慣用的な療法を増強させ、または新規な療法、特に過剰増殖性疾患を治療するための療法を確立するために脂質ベースの遺伝子導入戦略を用いる。

【0165】

本発明のある実施形態においては、送達ビヒクルはDOTAP：コレステロールナノ粒子を含む。DOTAP：コレステロールナノ粒子は、ここに具体的に引用して援用するTempletonら、1997により詳細に議論されている。

【0166】

D．過剰増殖性疾患の治療および予防

10

1．過剰増殖性疾患

本発明では、医薬上有効量の本明細書中に記載されたプロモーター配列のいずれかを含む組成物を投与することによって被験体において過剰増殖性疾患を予防し、阻害し、または治療する方法が考えられる。病気を予防し、阻害し、または治療する目的で被験体に適用し、または投与することができる本明細書中に記載されたいずれかのプロモーター配列を含むいずれの核酸配列も、本明細書中に記載された医薬組成物に含めることが考えられる。

【0167】

病気は、核酸配列の被験体への投与を介する治療または予防に使用することができる被験体に影響し得るいずれの病気でもあり得る。例えば、病気は過剰増殖性疾患であってよい。過剰増殖性疾患は、細胞の異常な成長または増殖に関連する病気である。過剰増殖性疾患は、被験体における病巣として発現される病気であってよい。例示的な過剰増殖性疾患は、プレ-悪性病巣、癌および腫瘍を含む。

20

【0168】

治療すべき病気の他の例は、自己免疫疾患等の感染症および炎症病を含む。本発明の方法および組成物は、病気の免疫療法または免疫予防に適用することができる抗原を送達することができる。当業者であれば、本明細書中に記載された医薬組成物および方法を用いる予防または治療に使用できるであろう多くの疾病に精通しているであろう。

【0169】

2．定義される成長阻害

30

本明細書中に記載される方法のある実施形態は、被験体における過剰増殖性疾患の成長を阻害する方法に関する。過剰増殖性疾患の「成長を阻害する」は広く定義され、例えば、病巣の成長を遅らせること、または停止させることを含む。病巣の成長の阻害は、病巣のサイズの低下、または病巣の細胞のアポトーシスの誘導を含むこともできる。アポトーシスの誘導とは、薬物、トキシン、化合物、組成物または生物学的要素がアポトーシス、またはプログラムされた細胞の死滅を細胞に与える状況をいう。特定の実施形態において、細胞は腫瘍細胞である。病巣の成長は、病巣の細胞に対する免疫応答の誘導によって阻害できる。

【0170】

E．医薬組成物

40

本発明の医薬組成物は、本明細書中に記載された新規なプロモーター配列の1以上を含む、治療上または診断上有効量の核酸を含む。フレーズ「医薬上または薬理学上許容される」、または「治療上有効な」、または「診断的に有効な」とは、例えば、適切には、ヒト等の動物に投与される場合、有害な、アレルギー性または他の厄介な反応を生じない分子要素および組成物をいう。治療上有効なまたは診断上有効な組成物の調製は、ここに引用して援用するRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990によって例示されるように、本開示に徴して当業者に知られているであろう。さらに、動物(例えば、ヒト)投与では、調製物は、FDA Office of Biological Standardsによって要求される滅菌性、パイロジェン性、一般的安全および純

50

度標準を満足すべきであろうことは理解されるであろう。

【0171】

本明細書中で用いるとき、「治療上有効量を含む組成物」または「診断上有効量を含む組成物」は、当業者に知られているように、いずれかのおよび全ての溶媒、分散媒体、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、保存剤（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、吸収遅延剤、塩、保存剤、薬物、薬物安定化剤、ゲル、バインダー、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、フレーバー剤、染料、同様な物質およびその組合せを含む。いずれの慣用的な担体も有効成分と適合しない限り、本発明の組成物でのその使用が考えられる。

【0172】

本発明の組成物は、固体、液体またはエアロゾル形態で投与されるか否か、注射としてのそのような投与経路について滅菌していることが要求されるか否かに応じて、異なるタイプの担体を含むことができる。本発明のデュアルイメージング剤およびデュアル治療剤は、当業者に知られているように、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、病巣内、頭蓋内、関節内、前立腺内、胸膜内、気管内、鼻内、硝子体内、腔内、直腸内、局所、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、皮下、結膜下、小胞内、粘膜内、心臓周囲内、臍帯内、眼内、経口、局所、局所的、注射、注入、連続的注入、局所化された灌流浴標的細胞へ直接的に、カテーテルを介して、洗浄を介して、脂質組成物（例えば、リポソーム）中にて、または他の方法によって、または前記のいずれかの組合せによって投与することができる。

10

【0173】

患者に投与される本発明の組成物の現実に要求される量は、体重、疾患の重症度、治療すべき病気のタイプ、従前のまたは同時治療的介入、患者の原発性、および投与経路等の身体的および生理学的因子によって決定することができる。投与に責任がある実行者は、いずれにせよ、組成物中の有効成分の濃度、および個々の被験体についての適切な用量を決定するであろう。

20

【0174】

ある実施形態において、医薬組成物は、例えば、デュアルイメージング剤またはデュアル治療剤の少なくとも約0.1%を含むことができる。他の実施形態において、有効成分は単位の重量の約2%~約75%の間、または約25%~約60%の間、例えば、その中で誘導されるいずれかの範囲を含むことができる。他の非限定的例において、用量は約0.1mg/kg/体重~約1000mg/kg/体重、あるいはこの範囲内のいずれかの量、または投与当たり1000mg/kg/体重よりも大くないいずれかの量を含むこともできる。

30

【0175】

いずれの場合においても、組成物は、1以上の成分の酸化を遅らせるために種々の抗酸化剤を含むことができる。加えて、微生物の作用の防止は、限定されないが、パラベン（例えば、メチルパラベン、プロペルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロザールまたはその組合せを含めた、種々の抗菌剤および抗真菌剤等の保存剤によって実現することができる。

【0176】

本発明の組成物は遊離塩基、中性または塩形態で処方することができる。医薬上許容される塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化第二鉄等の無機塩基；またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、またはプロカイン等の有機塩基に由来する遊離カルボキシル基を用いて形成される塩を含む。

40

【0177】

組成物が液体形態である実施形態において、担体は、限定されないが、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、脂質（例えば、トリグリセリド、植物油、リポソーム）およびその組合せを含む溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用によって；例えば、液体ポリオールまたは脂質等の担体中の分散液による必要な粒子サイズの維持によって；例えば、ヒドロキシプロピルセルロース等の界面活性剤；また

50

はそのような方法の組合せの使用によって維持することができる。多くの場合において、例えば、糖、塩化ナトリウムまたはその組合せ等の等張剤を含むのが好ましい。

【0178】

滅菌注射溶液は、前記した種々の量の他の成分と共に必要な量の適当な溶媒中に放射性標識エチレンジシステイン誘導体を配合し、必要であれば、続いて濾過滅菌によって調製される。一般には、分散液は、基本的な分散媒体および/または他の成分を含有する滅菌ビヒクルに種々の滅菌された有効成分を配合することによって調製される。滅菌注射溶液、懸濁液もしくはエマルジョンの調製用の滅菌粉末の場合には、調製の好ましい方法は、その従前に滅菌濾過された液体媒体から有効成分+いずれか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。液体媒体は、もし必要であれば、適切に緩衝化すべきであり、液体希釈剤は十分な生理食塩水またはグルコースでの注射に先立ってまず等張とすべきである。直接的注射のための高度に濃縮された組成物の調製も考えられ、溶媒としてのDMSOの使用は、極端に迅速な浸透をもたらすと考えられ、高濃度の活性化剤を小さな領域に送達する。

10

【0179】

組成物は製造および貯蔵条件下で安定でなければならず、細菌および真菌等の微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。エンドトキシン汚染は安全なレベル、例えば、0.5 ng/mg蛋白質未満において最小に維持すべきことは認識されるであろう。

【0180】

特定の実施形態において、注射組成物の延長された吸収は、例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン、またはその組合せ等の吸収を遅延させる剤の組成物における使用によって実現することができる。

20

【0181】

F. 細胞および細胞タイプ

本発明のある実施形態は、一般には、本明細書中に記載された新規なプロモーターの1つに操作可能にカップリングされた遺伝子を含む組成物を調製し、次いで、組成物を細胞と接触させることを含む、遺伝子を細胞に送達する方法に関し、接触は遺伝子の細胞への送達をもたらす。本発明の他の態様は、一般には、細胞を、本明細書中に記載された新規なプロモーターの1以上を含む組成物と接触させ、プロモーターはレポーターアミノ酸配列に操作可能にカップリングされ、次いで、レポーターから由来するシグナルを測定することによりレポーター配列の細胞発現を検出することを含む、細胞をイメージする方法に関する。

30

【0182】

当業者に知られたいずれの細胞タイプも、本発明の方法で含めるための細胞として考えられる。例えば、細胞は正常な健康な細胞であり得る。別法として、細胞は病気の細胞であり得る。例えば、病気は癌等の過剰増殖性疾患であってよい。細胞はいずれの組織タイプのものであってもよい。例えば、細胞は乳癌細胞、肺癌細胞、前立腺癌細胞、卵巣癌細胞、脳癌細胞、肝臓癌細胞、子宮頸癌細胞、結腸癌細胞、腎臓癌細胞、皮膚癌細胞、頭部および頸部の癌細胞、骨癌細胞、食道癌細胞、膀胱癌細胞、子宮癌細胞、リンパ系癌細胞、胃癌細胞、すい臓癌細胞、精巣癌細胞、リンパ腫細胞、または白血病細胞であってよい。

40

【0183】

G. 二次的抗-癌療法

本発明の態様において、過剰増殖性疾患を治療するための特許請求される方法を、別の剤または治療方法、好ましくは、別の癌治療と組み合わせて用いることができる。特許請求されるデュアル治療剤での治療は、数分~数週間の範囲の間隔だけ、他の治療方法に先行し、またはそれに遅れてもよい。別の剤を投与する実施形態において、一般には、剤が依然として細胞に対して有利には組合せ効果を発揮できるように、各送達の時間の間にかなりの時間が経過しないように保障する。例えば、本発明のデュアル治療剤を実質的に同時に(すなわち、約1分未満内に)1つの剤の2、3、4以上の用量を投与してもよい。

50

他の態様において、治療剤または方法は、本発明のデュアル治療剤または複数剤の投与から約1分～約48時間以上先立って、および/または後にあるいは本明細書中に記載されていない量の時間先立って、および/または後に投与してもよい。ある他の実施形態において、本発明のデュアル治療剤は、外科的処置または遺伝子治療等の別の治療様式の投与から約1日～約21日先立って、および/または後に投与してもよい。いくつかの状況においては、しかしながら、治療のための時間をかなり延長するのが望ましく、各投与の間には数週間（例えば、約1～8週間以上）経過させる。

【0184】

種々の組合せを使用することができ、デュアル化学療法および放射線療法のための特許請求された剤は、誘導体が「A」であり、いずれかの他の治療剤または方法であり得る第二の剤は「B」である：

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

【0185】

本発明のデュアル治療剤の患者への投与は、もしあれば、これらの剤の毒性を考慮して、化学治療剤の投与のための一般的なプロトコルに従うであろう。治療サイクルは必要であれば反復されるであろうと予測される。また、種々の標準的な療法、ならびに外科的介入を記載されたヒ素剤と組み合わせて投与することができると考えられる。これらの療法は、限定されないが、さらなる化学療法、さらなる放射線療法、免疫療法、遺伝子治療および外科的処置を含む。

【0186】

a. 化学療法

癌療法は、化学および放射線ベースの治療での種々の組合せ療法も含む。組合せ療法は、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、ニトロソ尿素、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、ブレオマイシン、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、ファルメシル-蛋白質トランスフェラーゼ阻害剤、トランス白金、5-フルオロウラシル、ピンクリスチン、ピンブラスチンおよびメトトレキセートまたは前記のいずれかのアナログまたは誘導体変種を含む。

【0187】

b. 放射線療法

DNA損傷を引き起こし、かつ広く用いられてきた他の因子は、通常は γ -線、X-線、または腫瘍細胞に対する放射性同位体の向けられた送達として知られるものを含む。マイクロ波およびUV-照射等の、DNA損傷因子の他の形態も考えられる。これらの因子のすべては、DNAに対して、DNAの前駆体に対して、DNAの複製および修復に対して、および染色体の組立および維持に対して、広い範囲の損傷の影響を最も及ぼすようである。X-線についての用量範囲は、長時間（3～4週間）についての50～200レントゲンの日用量から、2000～6000レントゲンの単一用量の範囲である。放射性同位体についての用量範囲は広く変化し、同位体の半減期、発せられる放射線の強度およびタイプ、および新形成細胞による摂取に依存する。用語「接触された」および「曝露された」は、細胞に適用される場合、本明細書中においては、それにより治療構築体および化学療法もしくは放射線療法剤が標的細胞に送達され、標的細胞に直接隣接して置かれるプロセスを記載するのに用いられる。細胞の殺傷または静止を達成するためには、双方の剤は、細胞を殺傷し、またはそれが分裂するのを妨げるのに有効な組合せ量にて細胞に送達

10

20

30

40

50

される。

【0188】

c. 免疫療法

免疫治療剤は、一般には、癌細胞を標的化し、それを破壊するための免疫エフェクター細胞および分子の使用に依拠する。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面のいくつかのマーカ―に対して特異的な抗体であってよい。抗体単独は治療のエフェクターとして働くことができ、あるいはそれは他の細胞を動員して、現実に細胞殺傷を行わせることができる。抗体は薬物またはトキシン（化学治療剤、放射性ヌクレオチド、リシンA鎖、コレラトキシン、百日咳トキシンなど）に対してコンジュゲートすることもでき、標的化剤として単に働かせることができる。別法として、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接的または間接的に相互作用する表面分子を運ぶリンパ球であってよい。種々のエフェクター細胞は細胞傷害性T細胞およびNK細胞を含む。

10

【0189】

免疫療法は、かくして、遺伝子療法と組み合わせた、組合せ療法の一部として使用できよう。組合せ療法のための一般的アプローチを以下に議論する。一般には、腫瘍細胞は、標的化に使用できる、すなわち、他の細胞の大部分に存在しないいくつかのマーカ―を担持しなければならない。多くの腫瘍マーカ―が存在し、これらのいずれかは本発明の関係で標的化に適しているであろう。通常腫瘍マーカ―は癌性胚抗原、前立腺特異的抗原、泌尿器系腫瘍関連抗原、胎児抗原、チロシナーゼ（p97）、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、エストロゲン受容体、ラミニン受容体、erbBおよびp155を含む。

20

【0190】

d. 遺伝子

なお別の実施形態において、二次的治療は第二の遺伝子治療であり、そこでは、本発明の核酸組成物の前に、後に、または同時に治療ポリヌクレオチドを投与する。遺伝子産物をコードするベクターと組み合わせたデュアル治療剤の送達は、標的組織に対して組合せ抗-過剰増殖効果を有するであろう。

【0191】

e. 外科的処置

癌を持つ個人のほぼ60%は、予防剤、診断またはステージング、治癒的および緩和的外科的処置を含むいくつかのタイプの外科的処置を受けるであろう。治癒的外科的処置は、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/または別の療法等の、他の療法と組み合わせて用いてもよい癌治療である。治癒的外科的処置は、癌性組織の全てまたは一部を物理的に除去し、切り出し、および/または破壊する切除を含む。腫瘍切除とは、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去をいう。腫瘍切除に加えて、外科的処置による治療はレーザー外科的処置、低温外科的処置、電子外科的処置、および顕微鏡で制御された外科的処置（モー（Mohs）の外科的処置）を含む。本発明は、表層癌、プレ癌、または偶然の量の正常な組織の除去と組み合わせて用いることができるとさらに考えられる。

30

【実施例】

40

【0192】

H. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すために含める。以下の実施例に開示された技術は本発明の実施においてよく機能する本発明者らによって発見された技術を表し、かくして、その実施のための好ましい態様を構成すると考えることができることは当業者に認識されるべきである。しかしながら、当業者は、本開示を踏まえて、開示される特別な実施形態において多くの変化をなすことができ、依然として、本発明の精神および範囲を逸脱することなく同様なまたは類似の結果を得ることができるのを認識すべきである。

【0193】

50

実施例 1

分子癌療法についてのレポーターおよび腫瘍サプレッサー遺伝子の新規な h T E R T - ミニ - C M V (h T M C) プロモーター - 媒介腫瘍 - 選択的および高効率発現

1. h T M C プロモーターの構築

h T E R T - ミニ - C M V (h T M C) プロモーターを含めたある種の新規なキメラプロモーターは、必須の h T E R T プロモーター配列と最小 C M V プロモーターエレメントとを最適に融合させることによって作製した。P C R を用いて、463 bp の h T E R T 調節領域および 147 bp の最小 T A T A ボックス、および C M V プロモーターからの転写開始領域を増幅した。ハイブリッド h T E R T および C M V プロモーターは、種々の組合せ、および腫瘍 - 選択性ならびに正常および腫瘍細胞トランスフェクタントにおける転写促進の強さの点におけるそれらの性能をテストすることによって最適化した。この最適化された新規な h T M C プロモーターを用い、高い腫瘍 - 特異性および高い導入遺伝子発現の双方を、イン・ピボでの h T M C - E G F P レポーター系を用いてここに示されるように、イン・ピボおよびイン・ピボで達成した。

10

【0194】

2. h T M C - 含有プラスミドベクターの構築

a. p L J 143 / K G B 2 / F U S 1。この p L J 143 / K G B 2 / F U S 1 プラスミドベクター (図 1) は、イン・ピボでの導入遺伝子の効率的な発現を確実にするための 3' 末端における E 1 エンハンサー、および 5' 末端における B G H - ポリ A シグナル配列と共に C M V 最小プロモーターによって駆動される哺乳動物遺伝子 - 発現カセットからなる。カナマイシン - 抵抗性遺伝子を選択可能マーカーとして選択して、患者における抗生物質 - 体制の発生を回避した。最小の p M B 1 複製起点 (O R I) 配列を用いて、細菌宿主株 D H 5 a におけるプラスミドの高 - コピー複製および生産を駆動する。プラスミド骨格は、プラスミド D N A 生産のより高い収率、およびプラスミド D N A 調製当たりのより高い濃度の組換えプラスミド D N A を保障するための最小のものである。p L J 143 / K G B 2 / F U S 1 ベクターの D N A 配列は自動 D N A 配列決定によって確認され、F D A によって相 I 臨床試験 (ヒト遺伝子導入プロトコル # 0201 - 513) に対して認可されている。このプラスミドは、前臨床および臨床適用における分子癌療法および非 - 侵入性イメージングのための、レポーター遺伝子および腫瘍サプレッサー遺伝子を腫瘍 - 選択的に発現するための一連の h T M C - 含有プラスミドベクターの構築用の骨格として用いる。

20

30

【0195】

b. p L J 280 / K G B 2 / E V。p L J 280 / K G B 2 / E V プラスミドベクター (図 2) は、F U S 1 遺伝子インサートを除いて全ての元の配列エレメントを含有する p L J 143 / K G B 2 / F U S 1 ベクターに由来する空の (E V) プラスミドベクターである。p L J 143 プラスミドベクター中の 413 bp F U S 1 断片は、P s t I での制限消化によって除去し、残りのプラスミド配列は再度連結して、空のベクターを形成した。

【0196】

c. p L J 331 / d C p G - K G B 2 / F U S 1。p L J 331 / d C p G - K G B 2 / F U S 1 ベクター (図 3) は、カナマイシン抵抗性遺伝子が、99 コドン用法 (G または C) が (A または T) に改変されている合成カナマイシン遺伝子によって置き換えられた以外は、同一のプラスミド D N A 骨格を含有する。この合成カナマイシン遺伝子は、もとの D N A 配列に形成された潜在的 C p G 島を完全に減少させることができるが、依然として、細菌培養における組換えプラスミドベクターを選択するカナマイシン抗生物質を用いる能力を依然として残す。脱 C p G 化プラスミドはイン・ピボにおいて免疫原性が低いと仮定されており、かくして、プラスミド : D O T A P : コレステロールナノ粒子の全身投与による前臨床および臨床適用において毒性は低いと推定される。

40

【0197】

d. p L J 336 / d C P G - K G B 2 / h T M C - F U S 1。p L J 331 / d C p

50

G - KGB2 / hTMC - FUS1 ベクター (図4) は、慣用的な CMV プロモーターが hTMC プロモーターによって置き換えられた pLJ331 に由来する。このベクターは、前臨床モデルおよび臨床試験における分子癌療法のための新規な 3p21.3 腫瘍抑制遺伝子 FUS1 の腫瘍 - 選択的かつ高 - 効率発現を可能にする。

【0198】

e . pLJ284 / pKGB2 / hTMC - EV。 pLJ284 / pKGB2 / hTMC - EV プラスミドベクター (図5) は、CMV プロモーターが hTMC プロモーターによって置き換えられた pLJ280 に由来する。このベクターはイン・ビトロおよびイン・ビボにて陰性対照として用いられる。

【0199】

f . pLJ286 / pKGB2 / hTMC - EGFP。 pLJ286 / pKGB2 / hTMC - EGFP プラスミドベクター (図6) は、真核生物緑色蛍光蛋白質 (EGFP) 発現カセットを駆動する hTMC プロモーターを含有する。この EGFP は、蛍光イメージング分析によって、あるいはイン・ビトロおよびイン・ビボでの細胞溶解物および組織セクション中の抗 - EGFP 抗体を用いる免疫組織化学分析によって、EGFP の hTMC プロモーター - 駆動腫瘍 - 選択的発現、ベクタートランスフェクション効率、および EGFP の生体内分布を評価するためのレポーター遺伝子として用いられる。

【0200】

g . pLJ293 / pKGB2 / EGFP。 pLJ293 / pKGB2 / EGFP プラスミドベクター (図7) は、元の非 - 選択的 CMV プロモーターを含有し、EGFP の腫瘍 - 選択的発現と hTMC - EGFP ベクターとのイン・ビトロおよびイン・ビボでの比較のために対照ベクターとして用いられる。

【0201】

h . pLJ287 / pKGB2 / hTERT - EGFP。 pLJ287 / pKGB2 / hTERT - EGFP プラスミドベクター (図8) は、(哺乳動物細胞において非常に弱い転写促進強度を持つが、腫瘍 - 選択的発現を持つ) 元の hTERT プロモーターを含有し、EGFP の高 - 効率発現と、hTERT - ミニ - CMV ハイブリッド、hTMC - EGFP ベクターとのイン・ビトロおよびイン・ビボでの比較のための対照ベクターとして用いる。

【0202】

i . pLJ296 / KGB2 / SSRT2A。 pLJ296 / KGB2 / SSRT2A プラスミドベクター (図9) は、pLJ143 プラスミドベクター中に導入遺伝子 FUS1 を含有する 413bp 断片が、SSRT2A cDNA インサート (1110bp) + さらなる DNA 断片 (224bp) (SSRT2A の効果的な発現および検出に必要な T7 プロモーター配列、VJ2C - SP、および HA N - 末端融合タグを含有する) によって置き換えられた以外は、pLJ143 と正確に同一の DNA 骨格配列を有する。ベクターは、動物モデルおよびヒト臨床試験における全身イメージングのための ¹¹¹In - オクトレオチドでの γ - カメライメージング (GCI) による非 - 侵入性分子イメージングのためのベクターとして用いることができる。

【0203】

j . pLJ346 / KGB2 / hTMC - SSRT2A。 pLJ346 / KGB2 / hTMC - SSRT2A プラスミド (図10) は、CMV プロモーターが、イン・ビボにて SSRT2A レポーター遺伝子の腫瘍 - 特異的発現を駆動するための hTMC プロモーターで置き換えられた pLJ296 に由来する。このベクターは、SSRT2A の腫瘍 - 特異的イメージングを可能とし、GCI によるイン・ビボイメージのバックグラウンドを有意に低下させる。

【0204】

k . pLJ294 / hTMC - FUS1 - IRES - SSTR2A。 hTERT プロモーターの制限を克服し、導入遺伝子発現を増大させるために、および ¹¹¹In - オクトレオチド - SSRT2A 系での γ - カメライメージングによるイン・ビボでの導入遺伝子

10

20

30

40

50

発現の腫瘍 - 特異的イメージングを増強するために、新規なベクターである pLJ294 / hTMC - SSRT2A - IRES - FUS1 ベクター (図11) を開発し、そこでは、hTMCプロモーターは腫瘍細胞のみにおける高レベルの遺伝子発現を選択的に駆動し、他方、IRESエレメントは2つの個々の遺伝子、レポーターSSRT2Aおよび治療遺伝子FUS1の同等レベルでの同時発現を可能とし、これは、かくして、FUS1の正常な機能および発現の定量に干渉することなく、レポーターSSRT2A遺伝子でのイン・ビボでの治療FUS1遺伝子発現の測定を可能にする。このベクターは、FUS1等の癌治療遺伝子の生体内分布、導入遺伝子の発現およびクリアランス、および前臨床および臨床試験での¹¹¹In - オクトレオチド - SSRT2Aレポーター系とのGCIによる組換えプラスミドDNA : DOTAP : コレステロールナノ粒子の全身投与による腫瘍における治療効果の非 - 侵入性モニタリングを可能にする。

10

【0205】

1. pLJ290 / pKGB2 / FUS1 - IRES - SSTR2A。pLJ290 / pKGB2 / SSTR2Aプラスミドベクター (図12) は、pLJ294ベクターにおけるように、プロモーターがhTMCプロモーターではなく慣用的なCMV以外は、同様のプラスミドDNA骨格およびFUS1 - IRES - SSTR2A成分を含有する。このベクターは、イン・ビボでのhTMC - 含有pLJ294ベクターとの比較のための対照ベクターとして用いることができる。

【0206】

m. pLJ340 / pKGB2 / hTMC - Luc。pLJ340 / pKGB2 / hTMC - Lucプラスミドベクター (図13) は、hTMC - プロモーター - 駆動ホタルルシフェラーゼ (Luc) 発現カセットを含有する。この新規なベクターは、小動物モデルにおいてケミルミナスカメラによって腫瘍 - 特異的導入遺伝子発現および生体内分布をモニターするための非 - 侵入性イメージングを行うための便利なレポーターとしてのLucの使用を可能にする。

20

【0207】

n. pLJ341 / pKGB2 / hTMC / FU1 - IRES - Luc。pLJ341 / pKGB2 / hTMC / FU1 - IRES - Lucベクター (図14) は、SSTR2Aレポーター遺伝子がLucレポーター遺伝子で置き換えられたpLJ294 / hTMC - FUS1 - IRES - SSTR2Aに由来する。hTMCプロモーターは腫瘍細胞においてのみ高レベルの遺伝子発現を選択的に駆動し、他方、IRESエレメントは2つの個々の遺伝子であるレポーターLucおよび治療遺伝子FUS1の等しいレベルでの同時発現を可能とし、かくして、ケミルミナスカメラを用いる前臨床モデルにおいてFUS1の正常な機能および発現の定量に干渉することなく、レポーターLuc遺伝子と共にイン・ビボでの治療FUS1遺伝子発現の測定を可能にする。このベクターは、前臨床試験において、FUS1等の癌治療遺伝子の生体内分布、導入遺伝子の発現およびクリアランスおよび組換えプラスミドDNA : DOTAP : コレステロールナノ粒子の全身投与による腫瘍における治療効率の非 - 侵入性モニタリングを可能にする。このベクターは放射性物質の使用を必要とせず、前臨床小動物モデルにおける癌治療遺伝子の非 - 侵入的かつ腫瘍 - 特異的な分子イメージングのための高感度の、便利かつ安全なツールであろう。

30

40

【0208】

3. イン・ビトロにおけるhTMVプロモーターによって駆動される腫瘍 - 特異的導入遺伝子発現

イン・ビトロにおけるhTMCプロモーターによって駆動される導入遺伝子発現の腫瘍 - 特異性および効率を評価するために、プラスミドpLJ286 / hTMC - EGFPを用いて、(本研究所で調製された) DOTPイン・ビトロトランスフェクティング試薬を用いて種々の正常なおよび癌細胞系をトランスフェクトした。pLJ287 / hTERT - EGFPおよびpLJ293 / CMV - EGFPベクターを対照として用い、PBS治療単独をモックとして用いた。これらのプロモーターによって媒介されるEGFP発現の活性を、FACSによるトランスフェクションから48時間後にGFPの発現レベルを分

50

析することによって、種々の培養されたヒト癌系細胞（H1299、A549、HeLa および293F）、NHFB細胞、正常な線維芽細胞（WI-38）およびVA-13において評価した。全てのテストした癌細胞系において、高レベルのEGFPの発現がCMV-およびhTMC-プロモーター含有ベクター双方によってトランスフェクトされた細胞で観察されたが、hTERT-EGFP-トランスフェクト癌細胞においては痕跡レベルのEGFP発現が検出されたに過ぎなかった（図15A、パネル293F、A549、H1299、HeLa；図15Bおよび図15C）。対照的に、もしEGFPの発現がCMV-EGFPベクターによってトランスフェクトされた細胞で依然として普遍的に検出できたとしても、EGFPの発現は、hTMC-EGFPまたはhTERT-EGFPベクターいずれかでトランスフェクトされた正常な細胞HBEC、WI-38およびVA-13細胞で検出できなかった（図15A、パネルHBEC、WI-38、VA-13、および図15Bおよび図15C）。これらの結果は、hTERT-ミニ-CMVハイブリッドhTMCプロモーターによって媒介される導入遺伝子の腫瘍-特異的かつ高効率の発現を示す。

【0209】

4. イン・ピボでのhTMCプロモーターの転写活性

イン・ピボにてhTMCプロモーターによって誘導された導入遺伝子発現のレベルを調べるために、まず、 1×10^6 細胞/マウスのヒトN417 SCLC細胞の胸スペースへの注射によって、ヒトSCLC腫瘍をマウスの肺において確立した。腫瘍細胞注射から3週間後に、（直径が2~5mmの平均サイズの）固体腫瘍をマウスの肺および内側胸膜中で確立した。ヒトN417 SCLC腫瘍担持動物に種々のEGFP-リポプレックスを静脈内注射し、EGFP発現を、元のCMVおよびhTERTプロモーターまたはhTMCプロモーターいずれかによって駆動する。注射から48時間後に、動物を殺し、器官を収集し、直ちに凍結した。新鮮な凍結組織セクションをEGFP発現のために蛍光顕微鏡下で調べた。この新規なプロモーターを用い、イン・ピボでのhTMC-EGFPレポーター系を用いてここに示されるように、高い腫瘍-特異性および高い導入遺伝子発現双方をイン・ピボおよびイン・ピボで達成した（図16）。高レベルのEGFP発現は、いずれかの他の正常な組織ではなく、hTMC-EGFPで処理された動物における腫瘍細胞でのみ検出された（図16A、パネルhTMC）。対照的に、非常に弱い腫瘍-特異的EGFP発現がTERT-EGFPで処理された動物で検出され、非-選択的発現がCMV-EGFP構築体によって処理された動物において腫瘍および正常な細胞のあらゆる箇所で見出された。これらの結果は、高レベルの腫瘍-特異的導入遺伝子発現が、イン・ピボにてhTMCプロモーター-駆動遺伝子転写によって達成できることを示す。加えて、これらの結果は、このベクターが、例えばDNA:DOTAP:コレステロールナノ粒子による、組換えhTMC-プロモーター含有プラスミドベクターの全身投与によるヒト原発性および転移性癌についての腫瘍-標的化分子療法で用いることができることを示す。

【0210】

5. ^{111}In -オクトレオチド-SSTR2Aレポーター系での - カメライメージングによって治療遺伝子発現を評価するための腫瘍-標的化非-侵入的分子イメージング遺伝子導入をモニターするための多くのイン・ピボ分子イメージング方法は、導入された遺伝子の産物に局在化した、静脈内注射された放射性標識化合物の検出のためのガンマカメラ、SPECT、またはPETイメージングの感度に依拠するが、それらのほとんどは注目する遺伝子を直接的に検出せず、また全身使用についてFDA認可された放射性医薬を開発しない。 ^{111}In -オクトレオチドを臨床的に用いて、主としてスマトスタチン受容体タイプ2（SSTR2A）を過剰発現する腫瘍の場所を突き止める。HA-SSTR2A-発現プラスミド（pHA-SSTA2A）でトランスフェクトされたHT1080細胞におけるSSTR2A産物の細胞表面膜局所化は、抗-HA抗体での免疫蛍光分析によって首尾よく検出されている。pHA-SSTR2A-トランスフェクタントによって生産されたHT1080腫瘍を担持するマウスに、 - カメラによる生体内分布お

10

20

30

40

50

よびイメージング実験のために ^{111}In -オクトレオチドを注射した(図17B)。SSTR2A発現は、受容体結合および腫瘍による ^{111}In -オクトレオチド放射性トレーサー取り込み双方に有意に相関することも示された(図17C)。このアプローチは臨床的な使用可能性を示した。なぜならば、 ^{111}In -オクトレオチドでの腫瘍-担持動物への検出された遺伝子導入はヒトで既に用いられていると同様な用量におけるものであり、また、注目する遺伝子の導入を直接的かつ非侵的にモニターするのが可能であることを示したからである。

【0211】

hTERTプロモーターの制限を克服し、導入遺伝子発現を増加させるため、および ^{111}In -オクトレオチドSSRT2A系での - カメライメージングによるイン・ビボでの導入遺伝子発現の腫瘍-特異的イメージングを増強するために、新規なプラスミドベクターであるpLJ294/hTMC-SSRT2A-IRES-FUS1ベクターはhTMCプロモーターによって選択的に駆動されて、腫瘍細胞においてのみ高レベルの遺伝子発現を提供し、他方、IRESエレメントは2つの個々の遺伝子であるレポーターSSTR2Aおよび治療遺伝子FUS1の同等レベルでの同時発現を可能とするであろう。これは、FUS1の正常な機能および発現の定量に干渉することなく、レポーターSSTR2A遺伝子でのイン・ビボにおける治療FUS1遺伝子発現の測定を可能とするであろう。SSTR2A遺伝子(図17C、緑色、細胞表面膜)およびFUS1遺伝子(図17Cおよび図17D、赤色、ミトコンドリア、ER、および核膜周囲の位置)双方の共発現および区別される細胞下局所化は、免疫蛍光イメージング分析によって明らかに示される(図17D)。放射性-医薬 ^{111}In -オクトレオチドでの非侵的かつ感受性の - カメライメージングと組み合わせたこれらの新規な治療ベクターは、マウスにおけるSSTR2A-FUS1-リポプレックス-媒介遺伝子導入の分布、クリアランス、発現および効率の効果的なモニタリングを可能とするであろう。

【0212】

6.ヌードマウスにおける、p h T M C - F U S 1 DNA DOTAP: コレステロールナノ粒子の全身投与での腫瘍-標的化分子によるSCLC腫瘍成長の阻害、および非-侵的磁気共鳴イメージング(MRI)

容量定量的情報入手し、および水の局所的環境における変異に基づく組織の間のイメージ強度を区別するための検出に対する非-侵的アプローチ、および能力は、磁気共鳴イメージング(MRI)を、広い範囲の実験的癌研究のための強力なツールとする。p h T M C - F U S 1 DNA: DOTAP: コレステロールナノ粒子の全身投与によるヒト肺原発性および転移癌に対する腫瘍-標的化分子療法の効率を評価し、およびイン・ビボにてhTMC-媒介FUS1遺伝子発現および抗-腫瘍効果を非侵的にモニターするために、実験を行って、種々のMRパラメーターを用いて腫瘍の外観を特徴付け、および胸内スペースおよび肺においてヒトSCLC腫瘍異種移植片を担うヌードマウスにおける、腫瘍成長、およびhTMC-FUS1ナノ粒子での全身治療の治療効果をモニターした(図18)。腫瘍細胞(100PBS中、 1×10^6)の胸スペースへの直接的注射によって、ヌードマウスをヒトN417SCLCによって接種した。固体腫瘍異種移植片は、肺において10~15日以内に確立され、あるいは骨または脳に転移した。MRIは、尾静脈注射を介するDOTAP: コレステロール複合体化p h T M C - F U S 1 プラスミドDNA(hTMC-FUS1ナノ粒子)の全身投与による処置の前および後に行った。腫瘍細胞接種から約2週間後であって、処置の前に、MRI分析を行い、これは、肺において腫瘍の存在を明瞭に検出した(矢印によって示される図18のa、b、iおよびj)。これらの予備的結果は、腫瘍成長および治療効果を追跡するためにMRIを用いる利点も明瞭に示す。対照hTMC-EGFPナノ粒子で処理された動物における腫瘍は、処置前のもの(図18のaおよびb)と比較して、MRIによって検出される増大した腫瘍容量(図18のcおよびd)によって示されるように成長し続けたが、腫瘍成長は、hTMC-FUS1ナノ粒子での処置によって有意に抑制された(図18、kおよびl-対-図18、iおよびj)。MRIイメージは、また、MRI分析直後に殺された凍結された全マウス

の肺ブロック - 面 (L B F) セクションからの無傷イメージで組織学的によって確認された (図 1 8、g、h、o および p)。腫瘍の位置およびサイズは M R I および L B F 双方のイメージにおいて完全にマッチした。これらの実験において、M R I を、同一動物における C T スキャニング (図 1 8、e、f、m および n) によって生じたイメージと比較した。腫瘍は動物のいくつかにおいて検出できたが、腫瘍と隣接する正常な組織との境界、または腫瘍の容量は C T によっては区別できず、かつ測定できなかった。これらのデータは、小動物モデルにおける、および臨床的实施における、腫瘍スクリーニング、検出、定量において非侵人的 M R I を用いる接近性および利点、および h T M C - 媒介抗 - 腫瘍遺伝子の治療効果の評価を示す。

【 0 2 1 3 】

材料および方法

1 . 細胞系および細胞培養。ヒト N S C L C 細胞系 N C I - H 1 2 9 9 および A 5 4 9、S C L C 細胞系 N 4 1 7、および頸部細胞系 H e l a、不滅の腎臓細胞 2 9 3 F は、元来、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n から入手し、我々の研究所 (M . D . A n d e r s o n C a n c e r C e n t e r) で維持した。正常なヒト気管支上皮細胞系、H B E C、正常な肺線維芽細胞の細胞系 W I - 3 8 および V A - 1 3 は C l o n e t i c s (C l o n e t i c s I n c . , W a l k e r s v i l l e , M D) から購入し、製造業者によって推奨される培地中にて、かつ製造業者の指令に従って培養した。全ての細胞を、3 7 °C にて、5 % C O ₂ を含有する湿潤化雰囲気中で培養した。

【 0 2 1 4 】

2 . トランスフェクション、およびイン・ビトロ遺伝子発現の分析。F u G e n e 6 試薬 (R o c h e I n c . ,) または (我々の研究所において生じさせた) を、D O T A P プラスミドベクターでのイン・ビトロトランスフェクションで用いた。P B S をモックトランスフェクションとして用いた。全てのトランスフェクション効率は、トランスフェクションの 4 8 時間後に、レポーター E G F P 発現のパーセンテージによって検出した。簡単に述べれば、細胞を 6 - ウェルプレートにおけるプロモータートランスフェクションに 1 日先立って平板培養し、トランスフェクションの時点において 6 0 ~ 8 0 % 密集であった。4 8 時間のトランスフェクションの後に、浮遊するおよび接着性の双方の細胞をトリプシン処理によって収穫し、P B S によって洗浄し、E G F P のパーセンテージを F A C S 分析によって定量した。

【 0 2 1 5 】

3 . 動物実験。4 ~ 6 週齢の雌 N u / N u マウスは C h a r l e s R i v e r (C a m b r i d g e , M A) から入手した。全ての動物を維持し、全ての動物実験は、M . D . A n d e r s o n C a n c e r C e n t e r における動物コア施設で確立された制度的ガイドラインに従って行った。マウスを 1 0 0 μ l の P B S 中の 1×10^6 N 4 1 7 細胞 / マウスで胸内スペースに注射した。腫瘍接種から 3 週間後に、マウスを、1 0 0 μ l D O T A P / コレステロール中の 2 5 μ g プラスミド D N A での尾静脈を介する全身投与によってレポーターまたは治療遺伝子 - 発現プラスミド D N A ナノ粒子で注射した。注射から 2 日後に、全てのマウスを犠牲にし、腫瘍、肺、肝臓、脾臓、腎臓および脳を収集し、さらなる E G F P 発現分析のために冷凍して貯蔵した。

【 0 2 1 6 】

4 . ヒト N S C L C 皮下腫瘍異種移植片マウスモデル。n u / n u マウスにおける N S C L C A 5 4 9 および H 1 2 9 9 皮下腫瘍接種のための手法は従前に記載されている (その各々をここに具体的に引用して援用する J i ら、2 0 0 2 および U n o ら、2 0 0 4 を参照)。簡単に述べれば、注射の丁度 1 日前に、マウスに 3 5 0 R d 1 3 7 C s にて照射した。1 0 0 m l の P B S 中に懸濁させた 1×10^7 腫瘍細胞を動物に皮下注射した。約 1 0 ~ 1 4 日後に、固体腫瘍が形成し始めるであろう。イン・ビボイメージングのために、動物に、各々、1 0 0 m l の D 5 W (水中 5 % デキストロース) 中の 2 5 m g プラスミド D N A : 1 0 ナノモルナノ粒子 / 腫瘍の容量にて、D O T A P - コレステロール - 複

10

20

30

40

50

合体化 p L J 2 9 6 / S S R T 2 A プラスミドベクター (S S R T 2 A - リポプレックス) で腫瘍内注射した。 P B S および空のベクターを、各々、モックおよび陰性対照として用いる。イン・ビボイメージングは注射から 2 4 ~ 4 8 時間後に行う。比較のために、注射から 2 4 時間 ~ 4 8 時間後に腫瘍を動物から取り出し、固定し、 H A - S S R T 2 A 融合蛋白質についての H A 抗体でのさらなる病理学的免疫組織学的分析のためにセクション化する。

【 0 2 1 7 】

5 . ヒト N S C L C 実験肺転移マウスモデル。簡単に述べれば、注射から丁度一日前に 3 5 0 R d 1 3 7 C s にてマウスを照射した。尾静脈注射を介して 2 0 0 μ l P B S 中の A 5 4 9 細胞 (1 ~ 2 × 1 0 ⁶) で n u / n u マウスを接種した。肺実験的転移腫瘍コロニーは接種から 7 ~ 2 0 日後に形成された。イン・ビボイメージングのために、各々、 1 0 0 m l の D 5 W (水中 5 % デキストロース) 中の 2 5 m g プラスミド DNA : 1 0 ナノモルのリポソーム / 腫瘍の容量にて、マウスを D O T A P - コレステロール - 複合体化 p L J 2 9 6 / S S R T 2 A プラスミドベクター (S S R T 2 A - リポプレックス) で静脈注射した。 P B S および空のベクターを、各々、モックおよび陰性対照として用いる。イン・ビボイメージングは、注射から 2 4 ~ 4 8 時間後に行った。イン・ビボイメージングと比較するために、注射から 2 4 ~ 4 8 時間後に肺を収獲し、肺表面の転移性コロニーをインディアンインクで染色した。肺表面の腫瘍コロニーを、処理群の知識なくして解剖顕微鏡下でカウントし、 H A - S S R T 2 A 融合蛋白質についての H A 抗体でのさらなる病理学的免疫組織化学的分析のために肺組織をセクション化した。

【 0 2 1 8 】

6 . ヒト N S C L C H 4 6 0 胸内腫瘍異種移植片マウスモデル。注射の丁度 1 日前に、 3 5 0 R d 1 3 7 C s にてマウスを照射した。動物を麻酔しつつ、胸内注射を介して、 1 0 0 μ l P B S 中の H 4 6 0 細胞 (5 × 1 0 ⁶) で n u / n u マウスを接種する。胸スペース内部の原発性腫瘍、および骨、リンパ節、または脳における転移性腫瘍は、接種から 7 ~ 1 0 日後に形成される。イン・ビボイメージングのために、各々、 1 0 0 m l の D 5 W (水中 5 % デキストロース) 中の 2 5 m g プラスミド DNA : 1 0 ナノモルのリポソーム / 腫瘍の容量にて、動物を D O T A P コレステロール - 複合体化 p L J 2 9 6 / S S R T 2 A プラスミドベクター (S S R T 2 A ナノ粒子) で静脈内注射した。 P B S および空のベクターを、各々、モックおよび陰性対照として用いた。注射から 2 4 時間 ~ 4 8 時間後にイン・ビボイメージングを行った。イン・ビボイメージングと比較するために、注射から 2 4 時間 ~ 4 8 時間後に腫瘍を収獲し、 H A - S S R T 2 A 融合蛋白質についての H A 抗体でのさらなる病理学的免疫組織化学的分析のためにセクション化した。全動物断面化を行って、イン・ビボイメージングを確認した。

【 0 2 1 9 】

7 . イン・ビボ遺伝子発現の分析。異なるプロモーターでの凍結されたセクション化正常組織および腫瘍における E G F P の発現を、備え付けたデジタルカメラで記録した。簡単に述べれば、凍結された腫瘍を 5 ~ 1 0 μ m セクションに切断し、氷上の 4 % パラホルムアルデヒド中で 1 0 分間固定し、 P B S 中ですすいだ。風乾後に、組織試料を蛍光増強カバー培地 (V e c t o r L a b , B u r l i n g a m e , C A) およびカバーガラスで被覆し、デジタルカメラおよびイメージング分析ソフトウェアを備えた蛍光顕微鏡下で調べた。

【 0 2 2 0 】

8 . T U N E L - 反応でのイン・サイチュ細胞死滅分析による、 h T M C - または C M V - F U S 1 ナノ粒子処理マウスにおけるアポトーシスの誘導。アポトーシスの誘導は、 h T M C - F U S 1 - ナノ粒子によって処理されたヒト肺癌腫瘍 - 担持マウスにおける腫瘍で検出されるが、正常な肺および他の組織においては検出されない (図 1 9) 。比較により、凍結されたマウス組織セクションにおける T U N E L 染色でのイン・サイチュアポトーシス分析による蛍光イメージによって示されるように、慣用的な C M V - F U S 1 - ナノ粒子によって処理されたマウスでは選択性は観察されない (図 1 9) 。

10

20

30

40

50

【0221】

実施例2

全身癌遺伝子治療のための導入遺伝子の新規な合成HTERT-ミニ-CMVキメラプロモーター-駆動腫瘍-特異的および高-効率発現

首尾よい癌遺伝子治療に対する主な妨げの1つは、原発性および転移性腫瘍に特異的に標的化することができる効果的な全身送達系の欠如である。hTERTプロモーターはクローン化されており、腫瘍における導入遺伝子発現を標的化することができるが、正常な細胞においてはできないことが示されている。しかしながら、ほとんどの他の固有の哺乳動物プロモーターのように、hTERTプロモーターの弱い転写-促進強度は、癌遺伝子治療についてのその直接的な使用を妨げてきた。これらの問題を回避するために、新規なキメラhTERT-ミニ-CMV(hTMC)プロモーターが開発されており、これは、必須のhTERT調節配列を最小CMVプロモーターエレメントと最適に融合させることによって作製された。種々のヒト癌および正常な細胞を種々のEGFP-構築体でトランスフェクトし、そこでは、EGFP発現は、元のCMVおよびhTERTプロモーターいずれかによって、またはhTMCプロモーターによってイン・ビトロにて駆動される。トランスフェクタントにおけるEGFPの発現は、蛍光顕微鏡下での蛍光イメージング(FI)によって可視化され、EGFP-陽性細胞の集団および蛍光強度はFACS分析によって定量された。hTMCプロモーターによって駆動された高レベルのEGFP発現は全ての腫瘍細胞で検出されたが、正常な細胞では検出されなかった。hTERTプロモーターによって駆動されるEGFP発現の同様な腫瘍-選択性は観察できるが、発現のレベルは、同一トランスフェクション効率下では、hTMCプロモーターによって駆動されるものよりも数100倍低かった。また、胸内ヒトN417肺腫瘍異種移植片を担うヌードマウスへのDOTAP:コレステロール-複合体化hTMC-EGFP-ナノ粒子の全身注射によって、hTMCプロモーターの効率もイン・ビボで評価した。それに合致して、高レベルのEGFP発現はhTMC-EGFPで処理された動物での腫瘍細胞においてのみ検出できたが、いずれの他の正常な組織においても検出されなかった。さらに、前記N417腫瘍マウスモデルを用いて、非-侵人的および定量的MRIイメージング分析によって、新規なhTMC-FUS1-ナノ粒子での全身処理の治療効率を評価した。腫瘍成長の有意な阻害($P < 0.001$)が、MRIイメージングおよび容量分析によって示されるように、未処理の、またはhTMC-EGFP-ナノ粒子によって処理されたものと比較して、2週間未満の処理においてhTMC-FUS1-ナノ粒子によって処理された動物で検出された。アポトーシスの誘導は、凍結された組織試料におけるTUNEL染色でのイン・サイチュ細胞死滅分析によって示されるように、腫瘍細胞においてはやはり検出されたが、hTMC-FUS1-ナノ粒子によって処理されたマウスにおいては周囲の正常な肺または他の正常な組織においては検出されなかった。これらの結果は、イン・ビトロおよびイン・ビボにおける高腫瘍特異性および高-効率治療遺伝子発現双方を達成するhTMCプロモーターを用いる能力を明瞭に示し、腫瘍-標的化分子癌療法のための治療hTMC-ナノ粒子の全身投与の使用の翻訳適用を示唆する。

【0222】

本明細書中で開示され特許請求される組成物および方法の全ては、本開示を踏まえて、過度な実験なくして行い、実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい実施形態にて記載してきたが、本発明の概念、精神および範囲を逸脱することなく、変形を本明細書中に記載された組成物および方法、および方法の工程または方法の配列に適用できることが当業者に明らかであろう。より具体的には、化学的および生理学的に関連するある種の剤は、同一または同様な効果を達成しつつ、本明細書中に記載された試薬を置き換えることができるのは明らかであろう。全てのそのような同様な置換および修飾は当業者に明らかであり、添付の請求の範囲によって規定される発明の精神、範囲および概念内にあるとみなされる。

【0223】

文献

10

20

30

40

50

以下の文献は、本明細書中に記載されたものを補充する例示的な手法または他の詳細を提供する程度に、ここに具体的に引用して援用する：

- 米国特許第4,683,202号明細書
 米国特許第4,797,368号明細書
 米国特許第5,139,941号明細書
 米国特許第5,925,565号明細書
 米国特許第5,928,906号明細書
 米国特許第5,935,819号明細書
 Abdul-Ghani \bar{c} , *Mol. Ther.*, 2: 539-544, 2000. 10
 Aksentijevich \bar{c} , *Hum. Gene Ther.*, 7(9):1111-1122, 1996.
 Alam and Cook, *Anal. Biochem.*, 188:245-254, 1990.
 Alberico \bar{c} , *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, 13(1):13-35, 2004.
 Angel \bar{c} , *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987.
 Artemov \bar{c} , *Mag. Reson. Med.*, 49:403-408, 2003.
 Atchison and Perry, *Cell*, 46:253, 1986. 20
 Atchison and Perry, *Cell*, 48:121, 1987.
 Banerji \bar{c} , *Cell*, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.
 Banerji \bar{c} , *Cell*, 33(3):729-740, 1983.
 Beattie \bar{c} , *Curr Biol.*, 8(3):177-180, 1998.
 Berkhout \bar{c} , *Cell*, 59:273-282, 1989.
 Blackburn \bar{c} , *J. Lipid. Res.*, 32(12):1911-1918, 1991.
 Blumberg \bar{c} , *Cell*, 104(1):9-19, 2001.
 Bodine and Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.
 Boshart \bar{c} , *Cell*, 41:521, 1985. 30
 Bosze \bar{c} , *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.
 Bouscif \bar{c} , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(16):7297-7301, 1995.
 Braddock \bar{c} , *Cell*, 58:269, 1989.
 Bulla and Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.
 Caley \bar{c} , *J. Virology*, 71(4):3031-3038, 1997.
 Campbell and Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988. 40
 Campere and Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.
 Campo \bar{c} , *Nature*, 303:77, 1983.
 Celander and Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.
 Celander \bar{c} , *J. Virology*, 62:1314, 1988.
 Chandler \bar{c} , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997.
 Chang \bar{c} , *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
 Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8): 50

- 2745 - 2752, 1987.
- Choi $\bar{\text{S}}$, *Cell*, 53:519, 1988.
- Coffin, In: *Virology, Fields* $\bar{\text{S}}$, (Eds.), Raven Press, NY, 1437-1500, 1990.
- Cohen $\bar{\text{S}}$, *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.
- Costa $\bar{\text{S}}$, *Mol. Cell. Biol.*, 8:81, 1988.
- Couch $\bar{\text{S}}$, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.
- Cripe $\bar{\text{S}}$, *EMBO J.*, 6:3745, 1987.
- Culotta and Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376, 1989. 10
- Dandolo $\bar{\text{S}}$, *J. Virology*, 47:55-64, 1983.
- Davis et al, *Curr. Biol.*, 6:146-148, 1996.
- De Villiers $\bar{\text{S}}$, *Nature*, 312(5991):242-246, 1984.
- de Waal $\bar{\text{S}}$, *J. Exp. Med.*, 174:1209-1220, 1991.
- Deschamps $\bar{\text{S}}$, *Science*, 230:1174-1177, 1985. 20
- Dumoutier $\bar{\text{S}}$, *J. Immunol.*, 164(4):1814-1819, 2000.
- Edbrooke $\bar{\text{S}}$, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989.
- Edlund $\bar{\text{S}}$, *Science*, 230:912-916, 1985.
- Ekmekciouglu $\bar{\text{S}}$, *Melanoma Res.*, 9(3):261-272, 1999.
- Fechheimer $\bar{\text{S}}$, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Felgner $\bar{\text{S}}$, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(21):7413-7417, 1987. 30
- Feng and Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.
- Feng $\bar{\text{S}}$, *Science*, 269(5228):1236-1241, 1995.
- Firak and Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.
- Foeking and Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986.
- Fraley $\bar{\text{S}}$, *Bio/Technology*, 3:629-635, 1985. 40
- Fujita $\bar{\text{S}}$, *Cell*, 49:357, 1987.
- Gabizon $\bar{\text{S}}$, *Cancer Res.*, 50(19):6371-6378, 1990.
- Gallagher $\bar{\text{S}}$, *Genes Immun.*, 1(7):442-450, 2000.
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu $\bar{\text{S}}$, (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- Gilles $\bar{\text{S}}$, *Cell*, 33:717, 1983. 50

- Glorioso Ā, Mol. Biotechnol., 4(1):87-99, 1995.
- Gloss Ā, EMBO J., 6:3735, 1987.
- Godbout Ā, Mol. Cell. Biol., 8:1169, 1988.
- Goodbourn and Maniatis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:1447, 1988.
- Goodbourn Ā, Cell, 45:601, 1986.
- Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190, 1985. 10
- Graham and Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.
- Greene Ā, Immunology Today, 10:272, 1989.
- Grosschedl and Baltimore, Cell, 41:885, 1985.
- Gu Ā, Cancer Res., 60:5359-5364, 2000.
- Gu Ā, Oncogene, 21:4757-4764, 2002.
- Gupta and Curtis, J. Mat. Sci. Mat. Med., 15:493-496, 2004.
- Harland and Weintraub, J. Cell Biol., 101(3):1094-1099, 1985. 20
- Harrington Ā, Gene Dev., 11:3109-3115, 1997.
- Hauber and Cullen, J. Virology, 62:673, 1988.
- Hen Ā, Nature, 321:249, 1986.
- Henson Ā, AJNR Am. J. Neuroradiol., 25(6):969-972, 2004.
- Herr and Clarke, Cell, 45:461, 1986.
- Hirochika Ā, J. Virol., 61:2599, 1987. 30
- Hirsch Ā, Mol. Cell. Biol., 10:1959, 1990.
- Holbrook Ā, Virology, 157:211, 1987.
- Horlick and Benfield, Mol. Cell. Biol., 9:2396, 1989.
- Hwang Ā, Mol. Cell. Biol., 10:585, 1990.
- Imbra and Karin, Nature, 323:555, 1986.
- Imler Ā, Mol. Cell. Biol., 7:2558, 1987.
- Jakobovits Ā, Mol. Cell. Biol., 8:2555, 1988. 40
- Jameel and Siddiqui, Mol. Cell. Biol., 6:710, 1986.
- Jaynes Ā, Mol. Cell. Biol., 8:62, 1988.
- Ji Ā, Cancer Res., 62:2715-2720, 2002.
- Jiang Ā, Oncogene, 11(12):2477-2486, 1995.
- Jiang Ā, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(17):9160-9165, 1996.
- Johnson Ā, Mol. Cell. Biol., 9:3393, 1989.
- Kadesch and Berg, Mol. Cell. Biol., 6:2593, 1986. 50

- Karin̄, Mol. Cell. Biol., 7:606, 1987.
- Katinkā, Cell, 20:393, 1980.
- Kawamotō, Mol. Cell. Biol., 8:267, 1988.
- Kiledjian̄, Mol. Cell. Biol., 8:145, 1988.
- Kim̄, Cell, 87:343-355, 1996.
- Klamut̄, Mol. Cell. Biol., 10:193, 1990.
- Knapp̄, Atherosclerosis, 152(1):217-227, 2000. 10
- Koch̄, Mol. Cell. Biol., 9:303, 1989.
- Komatā, Cancer Res., 61(15):5796-5802, 2001.
- Kotenkō, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(4):1695-1700, 2000.
- Kotin̄, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(6):2211-2215, 1990.
- Kriegler and Botchan, In: Eukaryotic Viral Vectors, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 20 NY, 1982.
- Kriegler and Botchan, Mol. Cell. Biol., 3:325, 1983.
- Kriegler̄, Cell, 38:483, 1984.
- Kriegler̄, Cell, 53:45, 1988.
- Kuhl̄, Cell, 50:1057, 1987.
- Kundrā, J. Nuc. Med., 43:406-412, 2002.
- Larsen̄, Proc Natl. Acad. Sci. USA., 83:8283, 1986.
- Laspiā, Cell, 59:283, 1989. 30
- Latimer̄, Mol. Cell. Biol., 10:760, 1990.
- Laughlin̄, J. Virol., 60(2):515-524, 1986.
- Lebkowskī, Mol. Cell. Biol., 8(10):3988-3996, 1988.
- Levinson̄, Nature, 295:79, 1982.
- Lī, J. Biol. Chem., 266:6562-6570, 1990.
- Lin̄, Mol. Cell. Biol., 10:850, 1990.
- Luriā, EMBO J., 6:3307, 1987. 40
- Lusky and Botchan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:3609, 1986.
- Luskȳ, Mol. Cell. Biol., 3:1108, 1983.
- Macejak and Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991.
- McCartȳ, J. Virol., 65(6):2936-2945, 1991.
- McLaughlin̄, J. Virol., 62(6):1963-1973, 1988.
- Meyerson̄, Cell, 90:785-795, 1997. 50

- Miksicek Ā, Cell, 46:203, 1986.
- Moreau Ā, Nucl. Acids Res., 9:6047, 1981.
- Muesing Ā, Cell, 48:691, 1987.
- Muzyczka, Curr. Topics Microbiol. Immunol., 158:97-129, 1992.
- Nakamura Ā, Science, 277:955-959, 1997.
- Nakayama Ā, Nature Genet., 18:65-68, 1998.
- Ng Ā, Nuc. Acids Res., 17:601, 1989.
- Nicolau and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982. 10
- Ondek Ā, EMBO J., 6:1017, 1987.
- Ornitz Ā, Mol. Cell. Biol., 7:3466, 1987.
- PCT Appln. PCT/US99/05781
- Pech Ā, 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. 20
- Pinkert Ā, Genes and Dev., 1:268, 1987.
- Porton Ā, Mol. Cell. Biol., 10:1076, 1990.
- Potter Ā, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7161-7165, 1984.
- Queen and Baltimore, Cell, 35:741, 1983.
- Quinn Ā, Mol. Cell. Biol., 9:4713, 1989.
- Redondo Ā, Science, 247:1225, 1990.
- Reisman and Rotter, Mol. Cell. Biol., 9:3571, 1989. 30
- Ripe Ā, Mol. Cell. Biol., 9:2224, 1989.
- Rippe Ā, Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990.
- Rosen Ā, Cell, 41:813, 1988.
- Roux Ā, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9079-9083, 1989.
- Sambrook Ā, In: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- Samulski Ā, EMBO J., 10:3941-3950, 1991. 40
- Samulski Ā, J. Virol., 63:3822-3828, 1989.
- Satake Ā, J. Virology, 62:970, 1988.
- Schaffner Ā, J. Mol. Biol., 201:81, 1988.
- Sharp and Marciniak, Cell, 59:229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy, EMBO J., 6:1913, 1987.
- Shay Ā, Leukemia, 10(8):1255-1261, 1996.
- Shelling and Smith, Gene Therapy, 1:165-169, 1994. 50

- Sherman Ā, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Sleigh and Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Solodin Ā, *Biochemistry*, 34(41):13537-13544, 1995.
- Soo Ā, *J. Cell. Biochem.*, 74(1):1-10, 1999.
- Soo Ā, *J. Cell. Biochem.*, 74(1):1-10, 1999.
- Spalholz Ā, *Cell*, 42:183, 1985. 10
- Spandau and Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos and Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Stephens and Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
- Strunk and Schild, *Eur. Radiol.*, 14(6):1055-1062, 2004.
- Sullivan and Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987. 20
- Swartzendruber and Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- Takakura Ā, *Cancer Res.*, 59(3):551-557, 1999.
- Takebe Ā, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- Tearney Ā, *J Urol.*, 157(5):1915-1919, 1997.
- Templeton Ā, *Nat. Biotechnol.*, 15:647-652, 1997.
- Thierry Ā, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(21):9742-9746, 1995. 30
- Thiesen Ā, *J. Virology*, 62:614, 1988.
- Top Ā, *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971.
- Tratschin Ā, *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081, 1984.
- Treisman, *Cell*, 42:889, 1985.
- Tronche Ā, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
- Trudel and Constantini, *Genes and Dev.*, 6:954, 1987.
- Tsukamoto Ā, *Nat. Genet.*, 9(3):243-248, 1995. 40
- Tur-Kaspa Ā, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- Tyndell Ā, *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
- Umeoka Ā, *Cancer Res.*, 64(17):6259-6265, 2004.
- Uno Ā, *Cancer Res.*, 64:2969-2976, 2004.
- Vannice and Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.
- Vasseur Ā, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1 50

- 068, 1980.
- Wang and Calame, Cell, 47:241, 1986.
- Weber ̄、Cell, 36:983, 1984.
- Weinberger ̄、Mol. Cell. Biol., 8:988, 1984.
- Winoto and Baltimore, Cell, 59:649, 1989.
- Wu and Wu, Biochemistry, 27: 887-892, 1988.
- Wu and Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987. 10
- Yang and Huang, Gene Therapy, 4 (9):950-960, 1997.
- Yang ̄、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9568-9572, 1990.
- Yutzey ̄、Mol. Cell. Biol., 9:1397, 1989.
- Yutzey ̄、Mol. Cell. Biol., 9:1397-1405, 1989.
- Zhang ̄、Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi., 23(6):358-360, 2000. 20
- Zhao ̄、Bioconj. Chem., 13:840-844, 2002.
- Zhu ̄、Science, 261(5118):209-211, 1993.
- 【図面の簡単な説明】
- 【0224】
- 【図1】プラスミドベクター-pLJ143/KGB2/FUS1の図。
- 【図2】プラスミドベクター-pLJ280/KGB2/EVの図。
- 【図3】プラスミドベクター-pLJ331/dCpG-KGB2/FUS1の図。
- 【図4】hTMC-含有プラスミドベクター-pLJ336/dCpG-KGB2/hTMC-FUS1の図。 30
- 【図5】hTMC-含有プラスミドベクター-pLJ284/pKGB2/hTMC-EVの図。
- 【図6】hTMC-含有プラスミドベクター-pLJ286/pKGB2/hTMC-EGFPの図。
- 【図7】プラスミドベクター-pLJ293/pKGB2/EGFPの図。
- 【図8】プラスミドベクター-pLJ287/pKGB2/hTERT-EGFPの図。
- 【図9】プラスミドベクター-pLJ296/KGB2/SSRT2Aの図。
- 【図10】hTMC-含有プラスミドベクター-pLJ346/KGB2/hTMC-SSRT2Aの図。
- 【図11】hTMC-含有プラスミドベクター-pLJ294/hTMC-FUS1-IRES-SSRT2Aの図。 40
- 【図12】プラスミドベクター-pLJ290/pKGB2/FUS1-IRES-SSRT2Aの図。
- 【図13】プラスミドベクター-pLJ340/pKGB2/hTMC-Lucの図。
- 【図14】プラスミドベクター-pLJ341/pKGB2/hTMC/FU1-IRES-Lucの図。
- 【図15】図15A、図15B、図15C。蛍光イメージング分析(図15A)およびFACSによる定量的分析(図15B、EGFP陽性細胞、および図15C、全蛍光強度/1000細胞)による正常および癌細胞トランスフェクタントにおけるEGFPの発現。
- 【図16】図16A、図16B。EGFP-リボプレックスの全身注射によるマウスの種 50

々の組織におけるEGFPの発現。図16A。肺H417腫瘍は、ヌードマウスにおける 1×10^6 N417細胞の気管内注射によって確立した。マウスを静脈内注射によって種々のEGFP-リポプレックス(20 μ g DNA:40nmol DOTAP:コレステロール/マウス)で処理した。動物を注射から48時間のちに殺し、腫瘍、腎臓、脾臓、肺および肝臓の新鮮な凍結された試料を直ちに調製した。凍結したセクションを4%パラホルムアルデヒド中で固定し、蛍光顕微鏡下で直ちにEGFPの発現を調べた。hTMC、ヒトTERT-ミニ-CMVプロモーター。図16B。FACS分析による腫瘍および正常なマウス組織におけるEGFP発現の定量。

【図17】図17A、図17B、図17C、図17D。図17A:HT1080トランスフェクタントにおけるSSRT2A発現の免疫蛍光イメージ分析。図17B:図17Aに示された対応するSSRT2A-発現(図17A)の(A、B、およびC)および非発現(図17D)細胞から接種した皮下腫瘍を担うヌードマウスのカメライメージ。動物を 1×10^6 In-オクトレオチド(13MBq)で静脈内注射し、24時間後にイメージした。図17C:pL290/FUS1-IRES-SSRT2AプラスミドトランスフェクトH1299細胞におけるSSRT2A(緑色)およびFUS1(赤色)の共発現。図17D:腫瘍によるラジオトレーサー取り込みの修正。%ID/g = グラム当たりの%注射用量。

10

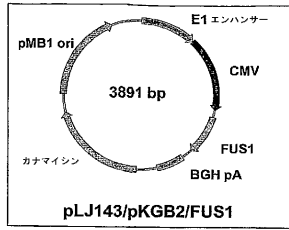
【図18】尾静脈注射を介するhTMC-EGFP-またはhTMC-FUS1ナノ粒子+Glevecの全身投与による処理前および後におけるN417 SCLC腫瘍 担持マウスのMRI、CT、およびLung Block Face(LBF)イメージング分析。気管内注射によるN417腫瘍細胞の接種から14日後に、動物をMRI(前記)によって腫瘍の発生についてスクリーニングした。処理から2週間後に、動物をMRまたはCTいずれかによってイメージし、次いで、殺し、全動物を直ちに凍結し、ブロックフーズセクションを調製し、無傷でイメージして、イン・ビボMRIおよびCTイメージにマッチさせた。

20

【図19】TUNEL-反応でのイン・サイチュ細胞死滅分析によるhTMC-またはCMV-FUS1ナノ粒子処理マウスにおけるアポトーシスの誘導。

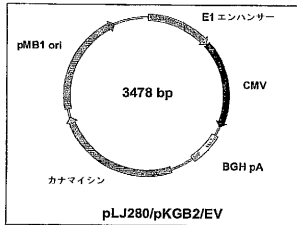
【 図 1 】

FIG. 1



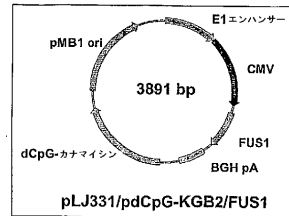
【 図 2 】

FIG. 2



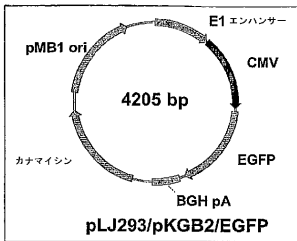
【 図 3 】

FIG. 3



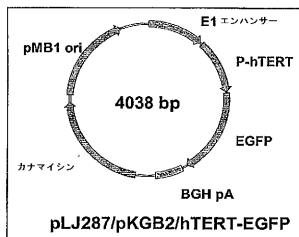
【 図 7 】

FIG. 7



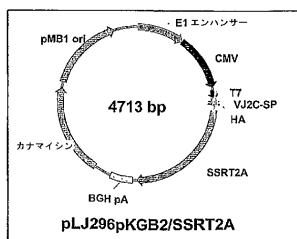
【 図 8 】

FIG. 8



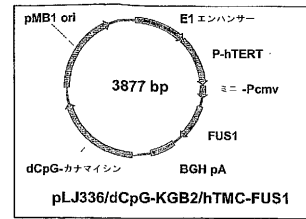
【 図 9 】

FIG. 9



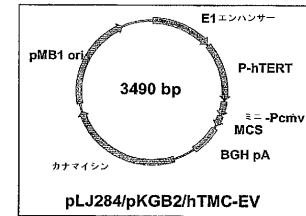
【 図 4 】

FIG. 4



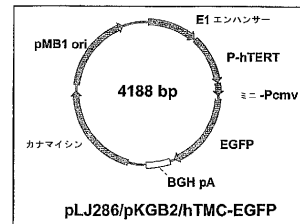
【 図 5 】

FIG. 5



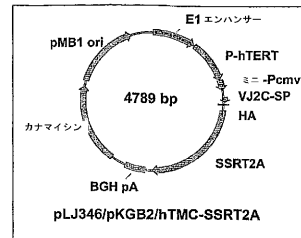
【 図 6 】

FIG. 6



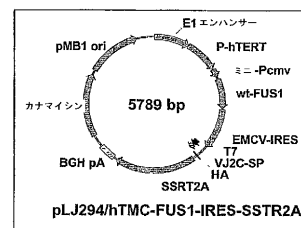
【 図 10 】

FIG. 10



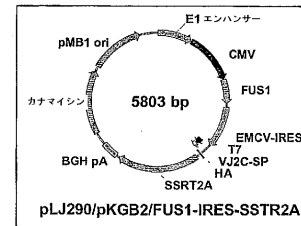
【 図 11 】

FIG. 11

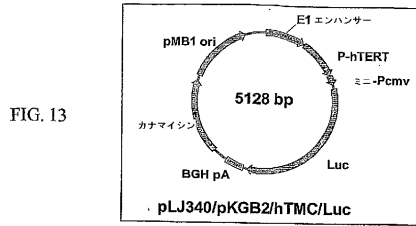


【 図 12 】

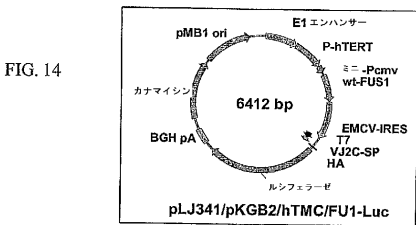
FIG. 12



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

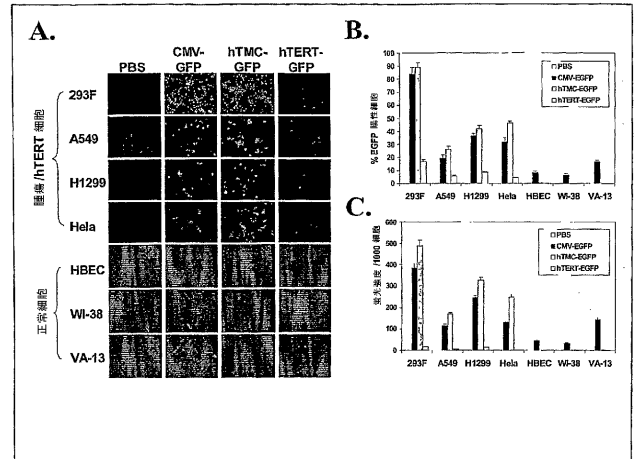


FIG. 15A-C

【 図 1 6 】

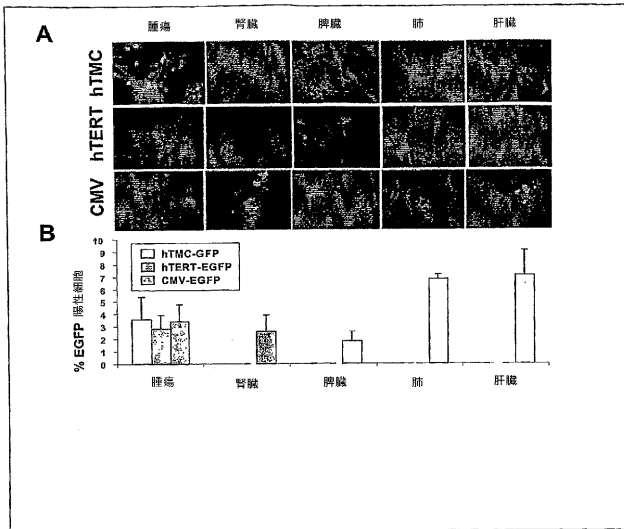


FIG. 16A-B

【 図 1 7 】

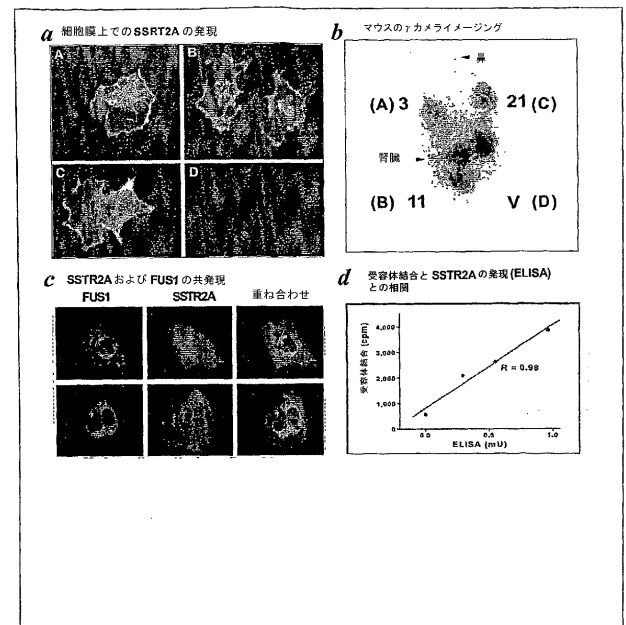


FIG. 17A-D

【 図 1 8 】

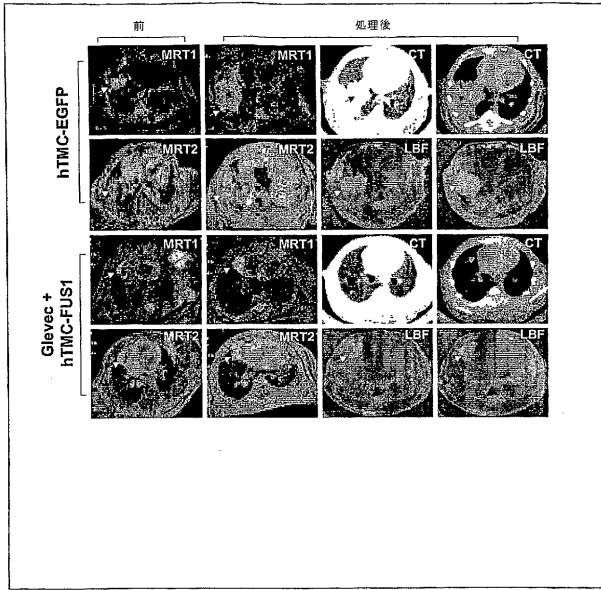


FIG. 18

【 図 1 9 】

TUNEL-反応でのイン・サイチュ核酸死産分析による
 hTMC-またはCMV-FUS1ナノ粒子処理マウス
 におけるアポトーシスの誘導

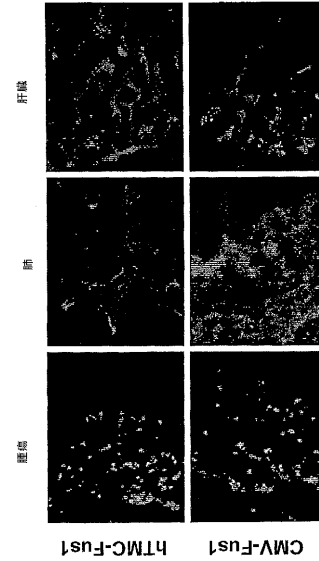


FIG. 19

【 配 列 表 】

2008532521000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 19 年 12 月 21 日 (2007.12.21)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

a) 組 織 - 選 択 的 プロモーター配列 ; および

b) 該 組 織 - 選 択 的 プロモーター配列に操作可能にカップリングされた第二のプロモーター配列であって、最小ウイルスプロモーター配列を含む第二のプロモーター配列 ;
 を 含 み、該 組 織 - 選 択 的 プロモーター配列の該第二のプロモーター配列への操作可能なカップリングの結果、該 組 織 - 選 択 的 プロモーター配列の改良されたプロモーター機能がもたらされる、プロモーター。

【 請 求 項 2 】

前 記 組 織 - 選 択 的 プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列、 C E A プロモーター配列、 P S A プロモーター配列、プロバシンプロモーター配列、 A R R 2 P B プロモーター配列、または A F P プロモーター配列ヒト - ラクトアルブミンプロモーター配列、ヒツジ - ラクトグロブリンプロモーター配列、 U 6 プロモーター配列、 H 1 プロモーター配列、 7 S L プロモーター配列、ヒト Y プロモーター配列、ヒト M R P - 7 - 2 プロモーター配列、アデノウイルス V A 1 プロモーター配列、ヒト t R N A プロモーター配列、 5 S リボソーム R N A プロモーター配列、またはこれらのプロモーター配列のいずれかの

機能的ハイブリッドまたは組合せである、請求項 1 記載のプロモーター。

【請求項 3】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が腫瘍 - 選択的プロモーター配列としてさらに定義される、請求項 1 記載のプロモーター。

【請求項 4】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が低酸素症 - 特異的プロモーター配列である、請求項 1 記載のプロモーター。

【請求項 5】

前記低酸素症 - 特異的プロモーター配列が低酸素応答エレメント (HRE) または低酸素症誘導因子である、請求項 4 記載のプロモーター。

【請求項 6】

前記低酸素症誘導因子が HIF - 1、HIF - 2、または HIF - 3 である、請求項 5 記載のプロモーター。

【請求項 7】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が hTERT プロモーター配列である、請求項 1 記載のプロモーター。

【請求項 8】

前記 hTERT プロモーター配列が配列番号 1 である、請求項 7 記載のプロモーター。

【請求項 9】

前記最小ウイルスプロモーター配列がアデノウイルスプロモーター配列、バキュロウイルスプロモーター配列、CMV プロモーター配列、バルボウイルスプロモーター配列、ヘルペスウイルスプロモーター配列、ポックスウイルスプロモーター配列、アデノ - 関連ウイルスプロモーター配列、セミリキフォレストウイルスプロモーター配列、SV40 プロモーター配列、ワクシニアウイルスプロモーター配列、またはレトロウイルスプロモーター配列である、請求項 1 記載のプロモーター。

【請求項 10】

前記最小ウイルスプロモーター配列がミニ - CMV プロモーター配列である、請求項 9 記載のプロモーター。

【請求項 11】

前記ミニ - CMV 配列が配列番号 2 である、請求項 10 記載のプロモーター。

【請求項 12】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が hTERT プロモーター配列であり、前記第二のプロモーター配列がミニ - CMV プロモーター配列である、請求項 1 記載のプロモーター。

【請求項 13】

前記プロモーターが配列番号 3 を含む、請求項 12 記載のプロモーター。

【請求項 14】

プロモーターを含む核酸であって、該プロモーターは：

- a) 組織 - 選択的プロモーター配列；および
 - b) 第一のプロモーター配列に操作可能にカップリングされた第二のプロモーター配列であって、最小ウイルスプロモーター配列を含む第二のプロモーター配列；
- を含み、該組織 - 選択的プロモーター配列の該第二のプロモーター配列への操作可能なカップリングの結果、該第一のプロモーター配列の改良されたプロモーター機能がもたらされる、核酸。

【請求項 15】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が hTERT プロモーター配列、CEA プロモーター配列、PSA プロモーター配列、プロバシンプロモーター配列、ARR2PB プロモーター配列、AFP プロモーター配列、ヒト - ラクトアルブミンプロモーター配列、ヒツジ - ラクトグロブリンプロモーター配列、U6 プロモーター配列、H1 プロモーター配列、7SL プロモーター配列、ヒト Y プロモーター配列、ヒト MRP - 7 - 2 プロモーター

ー配列、アデノウイルスVA1プロモーター配列、ヒトtRNAプロモーター配列、5SリボソームRNAプロモーター配列、またはこれらのプロモーター配列のいずれかの機能的ハイブリッドまたは組合せである、請求項14記載の核酸。

【請求項16】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が腫瘍 - 選択的プロモーター配列としてさらに定義される、請求項14記載の核酸。

【請求項17】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が低酸素症 - 特異的プロモーター配列である、請求項14記載の核酸。

【請求項18】

前記低酸素症 - 特異的プロモーター配列が低酸素応答エレメント(HRE)または低酸素症誘導因子である、請求項17記載の核酸。

【請求項19】

前記低酸素症誘導因子がHIF-1、HIF-2、またはHIF-3である、請求項18記載のプロモーター。

【請求項20】

前記組織 - 選択的プロモーター配列がhTERTプロモーター配列である、請求項15記載の核酸。

【請求項21】

前記hTERTプロモーター配列が配列番号1である、請求項20記載の核酸。

【請求項22】

前記最小ウイルスプロモーター配列がアデノウイルスプロモーター配列、バキュロウイルスプロモーター配列、CMVプロモーター配列、パルボウイルスプロモーター配列、ヘルペスプロモーター配列、ボックスウイルスプロモーター配列、アデノ関連ウイルスプロモーター配列、セミリキフォレストウイルスプロモーター配列、SV40プロモーター配列、ワクシニアウイルスプロモーター配列、またはレトロウイルスプロモーター配列である、請求項14記載の核酸。

【請求項23】

前記最小ウイルスプロモーター配列がミニ-CMVプロモーター配列である、請求項22記載の核酸。

【請求項24】

前記ミニ-CMV配列が配列番号2である、請求項23記載の核酸。

【請求項25】

前記組織 - 選択的プロモーター配列がhTERTプロモーター配列であって、前記第二のプロモーター配列がミニ-CMVプロモーター配列である、請求項14記載の核酸。

【請求項26】

前記プロモーターが配列番号3を含む、請求項25記載の核酸。

【請求項27】

前記プロモーターに操作可能にカップリングされた遺伝子を含むとしてさらに定義される、請求項14記載の核酸。

【請求項28】

前記遺伝子が治療遺伝子または選択可能マーカーである、請求項27記載の核酸。

【請求項29】

前記治療遺伝子が腫瘍サプレッサー遺伝子、アポトーシスを誘導する遺伝子、酵素をコードする遺伝子、抗体をコードする遺伝子、またはホルモンをコードする遺伝子である、請求項28記載の核酸。

【請求項30】

前記治療遺伝子がRb、CFTR、p16、p21、p27、p57、p73、C-CAM、APC、CTS-1、zac1、scFV ras、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、BRCA1、VHL、MMAC1、FCC、M

CC、BRCA2、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、GM-CSF、GM-CSF、チミジンキナーゼ、mda7、FUS1、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、ADP、p53、ABLI、BLC1、BLC6、CBFA1、CBL、CSFIR、ERBA、ERBB、EBRB2、ETS1、ETS2、ETV6、FGR、FOX、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3、YES、MADH4、RB1、TP53、WT1、TNF、BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、NT3、NT5、ApoAI、ApoAIV、ApoE、Rap1A、シトシンデアミンナーゼ、Fab、ScFv、BRCA2、zac1、ATM、HIC-1、DPC-4、FHIT、PTEN、ING1、NOEY1、NOEY2、OVCA1、MADR2、53BP2、IRF-1、zac1、DBCCR-1、rks-3、COX-1、TFPI、PGS、Dp、E2F、ras、myc、neu、raf、erb、fms、trk、ret、gsp、hst、abl、E1A、p300、VEGF、FGF、トロンボスポンジン、BAI-1、GDAIF、Gene26(CACNA2D2)、PL6、*(BLU)、LUCA-1(HYAL1)、LUCA-2(HYAL2)、123F2(RASSF1)、101F6、Gene21(NPRL2)、SEM A3またはMCCである、請求項29記載の核酸。

【請求項31】

前記治療遺伝子がFUS1である、請求項30記載の核酸。

【請求項32】

前記選択可能マーカーが薬物選択マーカー、酵素、または免疫学的マーカーである、請求項28記載の核酸。

【請求項33】

プラスミドに含まれるものとしてさらに定義される、請求項14記載の核酸。

【請求項34】

前記プロモーター配列に操作可能にカップリングされたレポーター配列を含むものとしてさらに定義される、請求項14記載の核酸。

【請求項35】

前記レポーター配列がソマトスタチン受容体アミノ酸配列、ヨウ化ナトリウムシンボーターアミノ酸配列、真核生物緑色蛍光蛋白質アミノ酸配列、赤色蛍光蛋白質アミノ酸配列、ルシフェラーゼアミノ酸配列、 β -ガラクトシダーゼアミノ酸配列、またはチミジンキナーゼアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドである、請求項34記載の核酸。

【請求項36】

前記ソマトスタチン受容体アミノ酸配列が組換えソマトスタチン受容体アミノ酸配列、ソマトスタチンタイプ2受容体アミノ酸配列、または突然変異したソマトスタチンタイプ2受容体アミノ酸配列である、請求項35記載の核酸。

【請求項37】

前記ソマトスタチンタイプ2受容体アミノ酸配列がソマトスタチン受容体タイプ2Aアミノ酸配列である、請求項36記載の核酸。

【請求項38】

前記レポーター配列がIRESおよび第二の遺伝子と操作可能にカップリングされた、請求項34記載の核酸。

【請求項39】

前記第二の遺伝子が第二のレポーターに操作可能にカップリングされた、請求項38記載の核酸。

【請求項40】

前記第二のレポーターがソマトスタチン受容体アミノ酸配列、ヨウ化ナトリウムシンボーターアミノ酸配列、ルシフェラーゼアミノ酸配列、真核生物緑色蛍光蛋白質アミノ酸配

列、またはチミジンキナーゼアミノ酸配列である、請求項 39 記載の核酸。

【請求項 41】

前記第二の遺伝子が選択可能マーカーまたは治療遺伝子を含む、請求項 38 記載の核酸。

【請求項 42】

前記第二の遺伝子が、腫瘍サプレッサー遺伝子である治療遺伝子、アポトーシスを誘導する遺伝子、酵素をコードする遺伝子、抗体をコードする遺伝子、またはホルモンをコードする遺伝子である、請求項 41 記載の核酸。

【請求項 43】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列であり、前記第二のプロモーター配列がミニ - C M V プロモーター配列であり、該プロモーターは F U S 1 をコードする遺伝子に操作可能にカップリングされ、そして、前記核酸はプラスミドに含まれる、請求項 41 記載の核酸。

【請求項 44】

請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載のプロモーターを含む組成物。

【請求項 45】

被験体における細胞への前記プロモーターの送達用の送達ビヒクルを含むものとしてさらに定義される、請求項 44 記載の組成物。

【請求項 46】

前記送達ビヒクルが核酸、プラスミド、ウイルスベクター、原核生物細胞、真核生物細胞、または脂質である、請求項 45 記載の組成物。

【請求項 47】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ - 関連ウイルスベクター、またはボックスウイルスベクターである、請求項 46 記載の組成物。

【請求項 48】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスである、請求項 47 記載の組成物。

【請求項 49】

前記脂質がリポソームに含まれる、請求項 46 記載の組成物。

【請求項 50】

前記リポソームがカチオン性脂質を含む、請求項 49 記載の組成物。

【請求項 51】

前記カチオン性脂質が D O T A P : C h o l である、請求項 50 記載の組成物。

【請求項 52】

前記 D O T A P : C h o l がさらにナノ粒子を含む、請求項 51 記載の組成物。

【請求項 53】

請求項 14 ~ 43 のいずれかに記載の核酸を含む組成物。

【請求項 54】

被験体における細胞への前記核酸の送達用の送達ビヒクルを含むものとしてさらに定義される、請求項 53 記載の組成物。

【請求項 55】

前記送達ビヒクルがウイルスベクターまたは脂質である、請求項 54 記載の組成物。

【請求項 56】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ - 関連ウイルスベクター、またはボックスウイルスベクターである、請求項 55 記載の組成物。

【請求項 57】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、請求項 56 記載の組成物。

【請求項 58】

前記ビヒクルがリポソームを含む、請求項 55 記載の組成物。

【請求項 59】

前記リポソームがカチオン性脂質を含む、請求項 58 記載の組成物。

【請求項 60】

前記カチオン性脂質が DOTAP : Chol である、請求項 59 記載の組成物。

【請求項 61】

前記 DOTAP : Chol がさらにナノ粒子を含む、請求項 60 記載の組成物。

【請求項 62】

a) 組織 - 選択的プロモーター配列を選択し；

b) 第二のプロモーター配列を選択し、第二のプロモーター配列は最小ウイルスプロモーター配列を含み；次いで、

c) 該組織 - 選択的プロモーター配列を該第二のプロモーター配列に操作可能にカップリングさせる；

ことを含み、該組織 - 選択的プロモーター配列の該第二のプロモーター配列への操作可能なカップリングの結果、該組織 - 選択的プロモーター配列の改良された機能をもたらす、組織 - 選択的プロモーターの機能を改良する方法。

【請求項 63】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が hTERT プロモーター配列、CEA プロモーター配列、PSA プロモーター配列、プロバシンプロモーター配列、ARR2PB プロモーター配列、AFP プロモーター配列、ヒト - ラクトアルブミンプロモーター配列、ヒツジ - ラクトグロブリンプロモーター配列、U6 プロモーター配列、H1 プロモーター配列、7SL プロモーター配列、ヒトY プロモーター配列、ヒトMRP - 7 - 2 プロモーター配列、アデノウイルスVA1 プロモーター配列、ヒトtRNA プロモーター配列、5S リポソームRNA プロモーター配列、またはこれらのプロモーター配列のいずれかの機能的ハイブリッドまたは組合せである、請求項 62 記載の方法。

【請求項 64】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が低酸素症 - 特異的プロモーター配列である、請求項 62 記載の方法。

【請求項 65】

前記低酸素症 - 特異的プロモーター配列が低酸素応答エレメント (HRE) または低酸素症誘導因子である、請求項 64 記載の方法。

【請求項 66】

前記低酸素症誘導因子が HIF - 1、HIF - 2、または HIF - 3 である、請求項 65 記載の方法。

【請求項 67】

前記組織 - 選択的配列が hTERT プロモーター配列である、請求項 62 記載の方法。

【請求項 68】

前記 hTERT プロモーター配列が配列番号 1 である、請求項 67 記載の方法。

【請求項 69】

前記最小ウイルスプロモーター配列がアデノウイルスプロモーター配列、バキュロウイルスプロモーター配列、CMV プロモーター配列、バルボウイルスプロモーター配列、ヘルペスウイルスプロモーター配列、ボックスウイルスプロモーター配列、アデノ - 関連ウイルスプロモーター配列、セミリキフォレストウイルスプロモーター配列、ワクシニアウイルスプロモーター配列、またはレトロウイルスプロモーター配列である、請求項 62 記載の方法。

【請求項 70】

前記最小ウイルスプロモーター配列がミニ - CMV プロモーター配列である、請求項 69 記載の方法。

【請求項 71】

前記ミニ - CMV 配列が配列番号 2 である、請求項 70 記載の方法。

【請求項 72】

前記組織 - 選択的プロモーター配列が h T E R T プロモーター配列であって、前記第二のプロモーター配列がミニ - C M V プロモーター配列である、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 7 3】

前記プロモーターが配列番号 3 を含む、請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載のプロモーターに操作可能にカップリングされた遺伝子を含む、遺伝子を細胞に送達するための組成物であって、該細胞との接触に適し、該接触の結果、該遺伝子の該細胞への送達をもたらす、組成物。

【請求項 7 5】

前記組成物が、さらに、送達ビヒクルを含む、請求項 7 4 記載の組成物。

【請求項 7 6】

前記送達ビヒクルがウイルスベクターまたは脂質である、請求項 7 4 記載の組成物。

【請求項 7 7】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノ - 関連ウイルスベクター、またはボックスウイルスベクターである、請求項 7 6 記載の組成物。

【請求項 7 8】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、請求項 7 7 記載の組成物。

【請求項 7 9】

前記ウイルスベクターがプロタミン - 複合体化ウイルスベクターとしてさらに定義される、請求項 7 5 記載の組成物。

【請求項 8 0】

前記プロタミン - 複合体化ウイルスベクターがプロタミン - 複合体化アデノウイルスベクターである、請求項 7 9 記載の組成物。

【請求項 8 1】

前記送達ビヒクルがカチオン性脂質を含む、請求項 7 5 記載の組成物。

【請求項 8 2】

前記カチオン性脂質が D O T A P : c h o l である、請求項 8 1 記載の組成物。

【請求項 8 3】

前記 D O T A P : c h o l が D O T A P : c h o l ナノ粒子としてさらに定義される、請求項 8 2 記載の組成物。

【請求項 8 4】

前記細胞が癌細胞である、請求項 7 4 記載の組成物。

【請求項 8 5】

前記癌細胞が被験体におけるものである、請求項 8 4 記載の組成物。

【請求項 8 6】

過剰増殖性疾患を持つ被験体を治療するための組成物であって、請求項 1 4 ~ 4 3 のいずれかに記載の核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 8 7】

前記被験体が癌を持つ患者である、請求項 8 6 記載の組成物。

【請求項 8 8】

前記癌が乳癌、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、脳癌、肝臓癌、子宮頸癌、結腸癌、腎臓癌、皮膚癌、頭部および頸部の癌、骨癌、食道癌、膀胱癌、子宮癌、リンパ系癌、胃癌、膵臓癌、精巣癌、リンパ腫、または白血病である、請求項 8 7 記載の組成物。

【請求項 8 9】

前記癌が肺癌である、請求項 8 8 記載の組成物。

【請求項 9 0】

前記被験体が二次的抗 - 癌療法を受けている、請求項 8 9 記載の組成物。

【請求項 9 1】

細胞をイメージングするための組成物であって、プロモーターがレポーターアミノ酸配

列に操作可能にカップリングされた請求項 1 4 ~ 4 3 のいずれかに記載の核酸を含み、該組成物は、該細胞との接触に適し、該レポーター配列の細胞発現は、該レポーター由来のシグナルを測定することによる検出に適する、組成物。

【請求項 9 2】

前記細胞が被験体におけるものであって、前記細胞をイメージングするための組成物が被験体における組織をイメージングするための組成物としてさらに定義される、請求項 9 1 記載の組成物。

【請求項 9 3】

前記細胞が癌細胞であって、前記細胞をイメージングするための組成物が癌を持つ患者における腫瘍をイメージングするための組成物としてさらに定義される、請求項 9 2 記載の組成物。

【請求項 9 4】

前記レポーターが酵素アミノ酸配列、レポーターアミノ酸配列、またはリボザイム R N A 配列である、請求項 9 1 記載の組成物。

【請求項 9 5】

前記レポーターアミノ酸配列が組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体アミノ酸配列、チミジンキナーゼアミノ酸配列、ドーパミン受容体アミノ酸配列、内皮成長因子受容体 (E G F R) アミノ酸配列、プラスミノーゲンアミノ酸配列、ウロキナーゼ - タイプのプラスミノーゲンアクチベーター受容体 (u P A R) アミノ酸配列、ホルモン受容体アミノ酸配列、またはヨウ化ナトリウムシンポーターアミノ酸配列である、請求項 9 4 記載の組成物。

【請求項 9 6】

前記レポーターアミノ酸配列が組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体アミノ酸配列である、請求項 9 5 記載の組成物。

【請求項 9 7】

前記組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体アミノ酸配列が組換えソマトスタチン受容体アミノ酸配列、組換えソマトスタチンタイプ 2 受容体アミノ酸配列、または突然変異したソマトスタチンタイプ 2 受容体アミノ酸配列である、請求項 9 6 記載の組成物。

【請求項 9 8】

前記組換えソマトスタチンタイプ 2 受容体アミノ酸配列は組換えソマトスタチンタイプ 2 A 受容体アミノ酸配列である、請求項 9 7 記載の組成物。

【請求項 9 9】

前記組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体アミノ酸配列をコードする核酸が、切形された組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体をコードする核酸を含む、請求項 9 8 記載の組成物。

【請求項 1 0 0】

前記切形された組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体をコードする核酸がカルボキシ末端切形を含む、請求項 9 9 記載の組成物。

【請求項 1 0 1】

前記切形の結果、前記組換え 7 回膜貫通 G - プロテイン関連受容体アミノ酸配列の内部化および/またはシグナリングの改変をもたらす、請求項 1 0 0 記載の組成物。

【請求項 1 0 2】

前記レポーターアミノ酸配列をコードする核酸が該レポーターアミノ酸配列の N - 末端または C - 末端の異種リーダー配列を含み、該リーダー配列はレポーターアミノ酸配列を特定の非細胞性位置へ誘導する、請求項 9 1 記載の組成物。

【請求項 1 0 3】

前記レポーターアミノ酸配列をコードする核酸が、さらに、前記レポーターアミノ酸配列の N - 末端または C - 末端に融合した蛋白質タグを含む、請求項 9 1 記載の組成物。

【請求項 1 0 4】

前記蛋白質タグが酵素活性を有する、請求項 1 0 3 記載の組成物。

【請求項105】

前記蛋白質タグがヘマグルチニンA、 -ガラクトシダーゼ、チミジンキナーゼ、トランスフェリン、myc-タグ、VP16、(His)₆-タグ、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である、請求項104記載の組成物。

【請求項106】

前記イメージングを、腫瘍の外科的切除を受けている患者に対して手術内で行う、請求項93記載の組成物。

【請求項107】

遺伝子が前記プロモーターに操作可能にカップリングされており、前記細胞をイメージングするための組成物が遺伝子を細胞に送達するための組成物としてさらに定義される、請求項91記載の組成物。

【請求項108】

前記遺伝子が治療遺伝子であって、前記細胞をイメージングするための組成物が治療遺伝子を細胞に送達するための組成物としてさらに定義される、請求項92記載の組成物。

【請求項109】

前記治療遺伝子が腫瘍サプレッサー遺伝子、アポトーシスを誘導する遺伝子、酵素をコードする遺伝子、抗体をコードする遺伝子、またはホルモンをコードする遺伝子である、請求項108記載の組成物。

【請求項110】

前記治療遺伝子がRb、CFTR、p16、p21、p27、p57、p73、C-CAM、APC、CTS-1、zac1、scFV ras、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、BRCA1、VHL、MMAC1、FCC、MCC、BRCA2、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、GM-CSF、G-CSF、チミジンキナーゼ、mda7、FUS1、インターフェロン_α、インターフェロン_β、ADP、p53、ABL1、BLC1、BLC6、CBFA1、CBL、CSF1R、ERBA、ERBB、EBRB2、ETS1、ETS2、ETV6、FGR、FOX、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3、YES、MADH4、RB1、TP53、WT1、TNF、BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、NT3、NT5、ApoA1、ApoAIV、ApoE、Rap1A、シトシンデアミナーゼ、Fab、ScFv、BRCA2、zac1、ATM、HIC-1、DPC-4、FHIT、PTEN、ING1、NOEY1、NOEY2、OVCA1、MADR2、53BP2、IRF-1、zac1、DBCCR-1、rks-3、COX-1、TFPI、PGS、Dp、E2F、ras、myc、neu、raf、erb、fms、trk、ret、gsp、hst、abl、E1A、p300、VEGF、FGF、トロンボスポンジン、BAI-1、GDAIF、Gene26(CACNA2D2)、PL6、*(BLU)、LUCA-1(HYAL1)、LUCA-2(HYAL2)、123F2(RASSF1)、101F6、Gene21(NPRL2)、SEM A3またはMCCである、請求項109記載の組成物。

【請求項111】

前記治療遺伝子がFUS1である、請求項110記載の組成物。

【請求項112】

さらに、被験体への遺伝子の投与後に、該被験体において該遺伝子の生体内分布を測定するための組成物としてさらに定義される、請求項92記載の組成物。

【請求項113】

さらに、被験体における治療遺伝子の投与に対する応答を測定するための組成物として定義される、請求項91記載の組成物。

【請求項114】

シグナルの測定が、蛍光イメージング分析、免疫組織化学分析、化学発光イメージング、光学イメージング、磁気共鳴イメージング、または放射性イメージングとしてさらに定義される、請求項 9 1 記載の組成物。

【請求項 1 1 5】

放射性イメージングが カメライメージングとしてさらに定義される、請求項 1 1 4 記載の組成物。

【請求項 1 1 6】

シグナルの測定が ^{111}In -オクトレオチド-SSTR2Aレポーター系での - カメライメージングとしてさらに定義される、請求項 1 1 5 記載の組成物。

【請求項 1 1 7】

シグナルの測定が超常磁性酸化鉄(SPIO) オクトレオチド-SSTR2Aレポーターおよびコントラスト増強系を用いる磁気共鳴イメージングとしてさらに定義される、請求項 1 1 4 記載の組成物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2006/008502
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/67 A61K48/00		
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) C12N A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DAVIS JJ ET AL: "Oncolysis and suppression of tumor growth by a GFP-expressing oncolytic adenovirus controlled by an hTERT and CMV hybrid promoter" CANCER GENE THERAPY, 17 February 2006 (2006-02-17), pages 1-4, XP002406383 see the whole document ----- -/-	1-117
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "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 "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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 November 2006		Date of mailing of the international search report 13/12/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Grosskopf, Ruediger

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2006/008502

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>WU G. ET AL: "A novel synthetic hTERT-Mini_CMV chimera promoter-driven tumor-selective and high-efficiency expression of transgene for systemic cancer gene therapy" PROC. AMER. ASSOC. CANCER RES., vol. 46, 1 April 2005 (2005-04-01), page 3358, XP002406384 see the whole document</p>	1-117
X	<p>HAGSTROM J N ET AL: "Improved muscle-derived expression of human coagulation factor IX from a skeletal actin/CMV hybrid enhancer/promoter" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 95, no. 8, 15 April 2000 (2000-04-15), pages 2536-2542, XP002223433 ISSN: 0006-4971 see the whole document</p>	1,9,10
X	<p>OMRULLEH S ET AL: "ACTIVITY OF A CHIMERIC PROMOTER WITH THE DOUBLED CAMV 35S ENHANCER ELEMENT IN PROTOPLAST-DERIVED CELLS AND TRANSGENIC PLANTS IN MAIZE" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, SPRINGER, DORDRECHT, NL, vol. 21, no. 3, 1993, pages 415-428, XP001024601 ISSN: 0167-4412 see abstract</p>	1
X	<p>DIAZ R M ET AL: "Exchange of viral promoter/enhancer elements with heterologous regulatory sequences generates targeted hybrid long terminal repeat vectors for gene therapy of melanoma" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 789-795, XP002406385 ISSN: 0022-538X see abstract</p>	1
Y	<p>WANG J ET AL: "Enhanced suicide gene therapy by chimeric tumor-specific promoter based on HSF1 transcriptional regulation" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 546, no. 2-3, 10 July 2003 (2003-07-10), pages 315-320, XP004433665 ISSN: 0014-5793 see the whole document</p>	1-112

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/008502

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FUKAZAWA TAKUYA ET AL: "Development of a cancer-targeted tissue-specific promoter system." CANCER RESEARCH, vol. 64, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 363-369, XP002406386 ISSN: 0008-5472 see the whole document	1-112
A	AGHA-MOHAMMADI SIAMAK ET AL: "Regulatable systems: Applications in gene therapy and replicating viruses" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 105, no. 9, May 2000 (2000-05), pages 1177-1183, XP002406387 ISSN: 0021-9738	
A	MAJUMDAR A S ET AL: "The telomerase reverse transcriptase promoter drives efficacious tumor suicide gene therapy while preventing hepatotoxicity encountered with constitutive promoters" GENE THERAPY, vol. 8, no. 7, April 2001 (2001-04), pages 568-578, XP002406388 ISSN: 0969-7128	
A	HORIKAWA I ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE PROMOTER REGION OF HUMAN TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE GENE" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 59, 15 February 1999 (1999-02-15), pages 826-830, XP002905138 ISSN: 0008-5472	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/008502

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 74-90 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /008502

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 74-90 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claim 1 comprises a nearly uncountable number of possible combinations of promoter elements wherein each of said elements is very broadly defined (see especially the minimal viral promoter sequence). In view of the fact that the preliminary search revealed documents which were novelty destroying for said general construct, the further search had to be limited to the specific example of the application. Alternatively, an objection for lack of unity, especially but not exclusively with respect to Claim 2 must have been raised. This, however, has not been done since any experimental data in support of these embodiments are missing.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02		4 C 0 8 4
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	C	4 C 0 8 5
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02	A	4 C 0 8 6
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	P	4 C 0 9 6
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y	
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 21/78	C	
A 6 1 B 5/055 (2006.01)	A 6 1 B 5/05	3 8 3	
G 0 1 T 1/161 (2006.01)	G 0 1 T 1/161	D	

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

(72) 発明者 ファン, ビンリャン
 アメリカ合衆国 テキサス 7 7 5 8 4, ペアランド, サンダウン ドライブ 9 4 1 2

(72) 発明者 ロス, ジャック エー.
 アメリカ合衆国 テキサス 7 7 0 0 5, ヒューストン, ブロンプトン ロード 6 5 1 6

(72) 発明者 チ, リンエックス.
 アメリカ合衆国 テキサス 7 7 4 7 8, シュガー ランド, サイプレス ラン ドライブ
 2 3 2 3

F ターム(参考) 2G045 CB01 FA36 FB03 FB07 FB12 FB13
 2G054 AA08 EA01 EA03 GA04
 2G088 EE01 FF04 FF07
 4B024 AA01 AA11 AA12 AA20 BA80 CA02 CA20 DA02 DA03 EA02
 EA04 FA02 FA06 FA08 FA10 FA20 GA11 GA13 HA11 HA17
 HA20
 4B063 QA19 QA20 QQ02 QQ08 QR51 QR59 QR60 QR72 QR77 QS36
 QX01 QX02
 4C084 AA13 NA14 ZB261 ZB271
 4C085 HH03 HH07 HH11 KB92 LL18
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB27
 4C096 AA11 AB04 FC14

专利名称(译)	用于肿瘤选择性和高效表达癌症治疗基因的新型hTMC启动子和载体		
公开(公告)号	JP2008532521A	公开(公告)日	2008-08-21
申请号	JP2008500944	申请日	2006-03-09
申请(专利权)人(译)	校董局, 得克萨斯大学体系		
[标]发明人	ファンビンリヤン ロスジャックエー チリンエックス		
发明人	ファン, ビンリヤン ロス, ジャック エー. チ, リンエックス.		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 A61K31/7088 A61P35/00 A61K48/00 A61P35/02 A61K49/00 A61K51/00 G01N33/48 G01N33/53 G01N21/78 A61B5/055 G01T1/161		
CPC分类号	A61K48/0058 C12N15/85 C12N15/86 C12N2710/10343 C12N2830/008 C12N2830/15 C12N2830/60 C12N2830/85 C12N2840/20 C12N2840/203		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.Z A61K31/7088 A61P35/00 A61K48/00 A61P35/02 A61K49/00.C A61K49/02.A G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N21/78.C A61B5/05.383 G01T1/161.D		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/FA36 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB13 2G054/AA08 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/GA04 2G088/EE01 2G088/FF04 2G088/FF07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA06 4B024/FA08 4B024/FA10 4B024/FA20 4B024/GA11 4B024/GA13 4B024/HA11 4B024/HA17 4B024/HA20 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QR51 4B063/QR59 4B063/QR60 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/KB92 4C085/LL18 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C096/AA11 4C096/AB04 4C096/FC14		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/659935 2005-03-09 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了包含组织选择性启动子序列和可操作地偶联于组织选择性启动子序列的第二启动子序列的启动子, 所述启动子序列包含含有最小病毒启动子序列的第二启动子序列。还公开了包含这些启动子序列的核酸和组合物。还公开了一种改善组织选择性启动子功能的方法, 包括将组织选择性启动子序列可操作地偶联到包含最小病毒启动子序列的第二启动子序列。还公开了将基因递送至细胞的方法, 治疗具有过度增殖性疾病的受试者的方法, 以及使细胞成像的方法, 包括使用本文所述的新型启动子序列。

プロモーター/エンハンサー	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 α および/または DQ β	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β-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 S	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHC クラス II HLA-Dra	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β-アクトニン	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> , 1989
筋肉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 (トランスフェリン)	Costa <i>et al.</i> , 1988
エラスターゼ I	Ornitz <i>et al.</i> , 1987
メタロチオネイン (MTI)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Calotta <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
α-フェトプロテイン	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
γ-グロブリン	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
β-グロブリン	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-Fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-HA- <i>ras</i>	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
インスリン	Edlund <i>et al.</i> , 1985
中性細胞粘着分子 (NCAM)	Hirsch <i>et al.</i> , 1990