

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4709471号
(P4709471)

(45) 発行日 平成23年6月22日(2011.6.22)

(24) 登録日 平成23年3月25日(2011.3.25)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 7/00	(2006.01)	C 12 N 7/00	Z N A
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	A
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 2

請求項の数 19 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2002-530023 (P2002-530023)
 (86) (22) 出願日 平成13年9月26日 (2001.9.26)
 (65) 公表番号 特表2004-509635 (P2004-509635A)
 (43) 公表日 平成16年4月2日 (2004.4.2)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2001/030236
 (87) 國際公開番号 WO2002/026192
 (87) 國際公開日 平成14年4月4日 (2002.4.4)
 審査請求日 平成19年11月5日 (2007.11.5)
 (31) 優先権主張番号 60/235,283
 (32) 優先日 平成12年9月26日 (2000.9.26)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 504391260
 エモリー ユニバーシティー
 アメリカ合衆国 ジョージア 30322
 , アトランタ, クリ夫トン ロード
 1599, エヌイー, 4ティーエイ
 チ フロア
 (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】低酸素の細胞および組織を標的としたウイルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換えウイルスであって、該ウイルスは、
 両側で最小プロモーターに連結された、V E G F または E P O 由来の二方向性の低酸素
 および / または H I F 応答性エレメント
 を含み、ここで、一方の最小プロモーターは、該ウイルスの複製を調節する遺伝子の発現
 を制御し、ここで、該ウイルスは、該ウイルスの複製が低酸素の組織および細胞の細胞溶解、
 または活性な H I F 経路を含む細胞および組織の細胞溶解を引き起こすという結果を
 伴って低酸素依存性の様式で選択的に複製する、
 組換えウイルス。

10

【請求項 2】

前記ウイルスが、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ヘルペス様ウイルス、レトロウ
 イルス、およびピコルナウイルスである、請求項 1 に記載の組換えウイルス。

【請求項 3】

抗脈管形成性活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をさらに含み、ここで、該遺
 伝子は、最小プロモーターに連結された前記低酸素および / または H I F 応答性エレメン
 トの調節制御下にある、請求項 1 に記載の組換えウイルス。

【請求項 4】

低酸素依存性の様式で、低酸素腫瘍細胞において選択的に複製して細胞溶解を引き起こ
 す、請求項 1 に記載の組換えウイルス。

20

【請求項 5】

抗脈管形成性活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をさらに含み、ここで、該遺伝子は、最小プロモーターに連結された前記低酸素および／またはHIF応答性エレメントの調節制御下にある、請求項4に記載の組換えウイルス。

【請求項 6】

前記遺伝子が、アンジオスタチン、トロンボスpongin - 1、トロンボスpongin - 2、エンドスタチン、P F 4、B A I 1、I L 4、A D A M T S、P E D F、またはそれらのフラグメントをコードする、請求項5に記載の組換えウイルス。

【請求項 7】

前記ウイルスの複製を調節する遺伝子がE 1 A遺伝子である、請求項2に記載の組換えウイルス。 10

【請求項 8】

前記低酸素および／またはHIF応答性エレメントが、酸素正常状態未満で、少なくとも1つの遺伝子の発現を誘導する、請求項1に記載の組換えウイルス。

【請求項 9】

レポーター遺伝子に作動可能に連結された少なくとも1つの低酸素および／またはHIF応答性エレメントを含む、ベクターであって、ここで、該低酸素および／またはHIF応答性エレメントは、両側で最小プロモーターに連結された、V E G FまたはE P O由来の二方向性の低酸素および／またはHIF応答性エレメントである、ベクター。 20

【請求項 10】

前記V E G FまたはE P O由来の二方向性の低酸素および／またはHIF応答性エレメントが、2つの遺伝子の発現を二方向に駆動する、請求項9に記載のベクター。

【請求項 11】

前記レポーター遺伝子が、比色アッセイによって検出可能である、請求項9に記載のベクター。

【請求項 12】

前記ベクターが、哺乳動物細胞株または非哺乳動物細胞株に、安定にかもしくは一過的にトランスフェクトされている、請求項9に記載のベクター。

【請求項 13】

前記ベクターが、哺乳動物腫瘍細胞株または非哺乳動物腫瘍細胞株に、安定にかもしくは一過的にトランスフェクトされている、請求項9に記載のベクター。 30

【請求項 14】

前記レポーター遺伝子が、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、または緑色蛍光タンパク質である、請求項9に記載のベクター。

【請求項 15】

レポーター遺伝子に作動可能に連結された少なくとも1つの低酸素またはHIF応答性エレメントから構成されるベクターを含む、哺乳動物腫瘍細胞株であって、ここで、該低酸素またはHIF応答性エレメントは、両側で最小プロモーターに連結された、V E G FまたはE P O由来の二方向性の低酸素および／またはHIF応答性エレメントである、哺乳動物腫瘍細胞株。 40

【請求項 16】

前記レポーター遺伝子が比色アッセイによって検出可能である、請求項15に記載の哺乳動物腫瘍細胞株。

【請求項 17】

前記ベクターが、安定に形質転換されている、請求項15に記載の哺乳動物腫瘍細胞株。

【請求項 18】

前記レポーター遺伝子がアルカリホスファターゼをコードする、請求項15に記載の哺乳動物腫瘍細胞株。

【請求項 19】

50

脳腫瘍細胞株に由来する、請求項 1 5 に記載の哺乳動物腫瘍細胞株。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の援用)

本出願は、米国仮出願第 60 / 235, 283 号(2000 年 9 月 26 日出願)に対して優先権を主張する。この米国仮出願は、本明細書と矛盾しない範囲までその全体が本願明細書において援用される。

【0002】

(政府による資金提供の承認)

本発明は、少なくとも部分的には、助成金番号 NS 41403 の下での国立衛生研究所からの資金提供により、なされた。

10

【0003】

(発明の分野)

本発明は、一般には、酸素分圧が、その特定の組織型において通常見出されるよりも少ない細胞または活性化 HIF (低酸素誘導因子) 経路を有する細胞を選択的に標的とする、新規な組換えウイルスに関する。本発明はさらに、低酸素であるかまたは活性化 HIF 経路を有する細胞および組織において、選択的に複製しかつ細胞溶解性である、ウイルスに関する。低酸素である細胞または組織を本発明の新規な組成物で処理する方法もまた、提供される。本発明はさらに、上記の低酸素誘導性経路を調節する合成物を同定するためのスクリーニングアッセイに関する。

20

【0004】

(発明の背景)

ガンは、先進工業国的主要な死因のうちの 1 つである。米国において、ガンは全ての死亡の第 2 の主要な原因であって、毎年何十万もの死亡を計上する。ガンは、多くのレベルにおいて破壊的な疾患である。例えば、神経膠腫は脳腫瘍患者の主要な死因である。神経膠芽細胞腫患者は、12 カ月未満の平均生存時間有する、そして、この予後は、ガンを治療するための方法における印象的な発達にもかかわらず、1959 年(10 カ月)および 1932 年(6 ヶ月~9 カ月)以降、大して変わっていない。

【0005】

ガンは、手術、放射線療法、化学療法および免疫治療を含む様々な方法によって、治療され得る。これらの治療方法が一般に、ガン犠牲者の生存率を改善したが、ガンと戦うための改良された治療技術が明確に必要であるという事実は、そのままである。

30

【0006】

ガンを治療するための再び甦った方法は、ウイルス療法(virotherapy)と称する。ウイルス療法(virotherapy)は、一部の癌患者の腫瘍が、それらの患者がウイルス感染または予防接種を経験した後に退縮したということが発見されたときに、科学者の関心を初めて得た(Sinkovics, J. および Horvarth, J. のレビュー[1993]Intervirology 36: 193-214、ならびに Allemann らのレビュー[2000]Nat. Biotech. 18: 723-727 を参照のこと)。残念なことに、研究者がウイルス療法(virotherapy)と関連する毒性課題を発見したときには、この方法の最初の見込みは減弱し、そして、さらに、その治療は、制限された効力しか有さなかった。

40

【0007】

現代の分子生物学の出現は、科学者に、ウイルス療法(virotherapy)の実現可能性を再評価させた。特に、ウイルス媒介性遺伝子治療は、現在、ウイルス療法(virotherapy)における再興された関心の中心焦点である。ウイルス媒介性遺伝子治療システムの設計の基礎をなしている分子ストラテジーは、腫瘍細胞成長を阻害する遺伝子(例えば、細胞周期またはアポトーシスの制御)、細胞を殺す遺伝子(自殺遺伝子)、または免疫応答を誘導する遺伝子(免疫治療)を送達することである。

【0008】

50

2つの一般的なアプローチが、利用できる。1つの方法は、複製欠損性ウイルスベクターの使用を中心としている。ウイルス療法剤(virotherapeutic agent)としての複製欠損性ベクターの使用は、2つの重大な課題に遭遇した：(1)低いインビオ形質導入効率(乏しい遺伝子送達しかもたらさない)および(2)正常組織に対して腫瘍を特異的に標的とすることができないこと。

【0009】

ウイルス療法(virotherapy)に対する他のアプローチは、複製コンピテントウイルスの使用を必要とする。細胞溶解サイクルを有する複製コンピテントウイルスの使用は、腫瘍細胞を直接殺す(腫瘍崩壊)ためならびに遺伝子移入を増強し腫瘍細胞を特異的に標的とするための、実行可能なストラテジーとして出現した。様々な改変型神経弱毒化単純ヘルペスウイルス(HSV)(神経毒性遺伝子(134.5)およびリボヌクレオチドレダクターゼ遺伝子(UL39)が欠失している)が、インビトロにおいてヒト腫瘍細胞のための腫瘍崩壊因子として、そして、インビオにおいてヒト脳腫瘍のマウスモデルにおける腫瘍崩壊因子として、機能する。例えば、Parkerら、2000 PNAS 97: 2208 - 2213; 米国特許第5,728,379号を参照のこと。フェーズ1臨床試験において、悪性神経膠腫の21人の患者が、HSV G207の頭蓋内注射を受け、脳炎のいかなる徴候も CNS変化のいかなる徴候もなかった(Markertら、2000 Gene Ther. 10: 867 - 874)。

【0010】

異なるストラテジーが、55kDa E1Bタンパク質の生成停止をもたらす欠失を有する腫瘍崩壊性複製コンピテントアデノウイルス(d11520/ONYX-015)を利用する(Bischoffら、1996 Science 274: 373 - 376)(例えば、本願明細書に参考として援用される米国特許第6,080,578号および同第5,677,178号を参照のこと)。予備データは、このウイルスの複製が、欠損性p53腫瘍サプレッサー遺伝子を有する腫瘍細胞に制限されることを示唆した。しかし、より最近の所見は、p53遺伝子状態に関して野生型である細胞もまたこのウイルスの複製を支持し得ることを確立した(Rothmannら、1998 J. Virol. 72: 9470 - 9478; GoodrunおよびOrnелles 1998 J. Virol. 72: 9479 - 9490)。このウイルスは、肝臓に転移した卵巣癌および胃腸癌についてフェーズ1臨床試験において現在使用されており、かつ再発性かつ治療抵抗性の頭部・頸部癌についてフェーズ2臨床試験およびフェーズ3臨床試験において現在使われている。これまでの結果は、複製コンピテントアデノウイルスd11520の注射が安全であり、この注射は、その病訴が主に軽微な等級1~2であるインフルエンザ様症状である患者によって、充分に許容されることを明らかにした。(Kim[2000] Oncogene 19: 6660 - 6669)。ヒトにおけるこれらの2つのウイルスシステムの低い毒性は、複製コンピテントウイルスが、腫瘍を有する患者を処置するための有望なアプローチであることを示唆する。近年、その複製が特定の腫瘍型に制限される腫瘍崩壊性ウイルスの設計が、現実になった。インビトロで、およびマウス前立腺癌モデルにおいてインビオで、前立腺特異的抗原(PSA)陽性癌細胞に対して選択的細胞毒性を示すアデノウイルス(CN706)が、作製された(Rodriguezら、1997 Cancer Res. 57: 2559 - 2563)。(例えば、本願明細書中に参考として援用される米国特許第5,871,726号および同第6,197,293号を参照のこと)。

【0011】

複製コンピテントウイルスを利用するこの種のアプローチは有望であるが、それらは：(1)複数のウイルスが、腫瘍の遺伝子異質性に起因して、種々の腫瘍型について、そしておそらく個々の腫瘍について、作製されなければならない；(2)それらは、広範囲の組織に由来する腫瘍の選択的標的化を提供しない；(3)それらは、治療完了後にウイルスを除去するために厳格な抗ウイルス処置を必要とする可能性がある。

【0012】

10

20

30

40

50

多数の米国特許が、低酸素誘導因子1、ウイルス媒介性遺伝子送達、組織特異的構築物、および関連する主題に関して発行されている。

【0013】

Semenzaに対するいくつかの特許およびSemenzaらに対するいくつかの特許は、低酸素誘導因子1に関する。Semenzaに対する米国特許第6,222,018号は、HIF-1結合部位を含む遺伝子における遺伝子発現を活性化可能であると特徴付けられた、実質的に精製された低酸素誘導因子(HIF-1)を開示する。Semenzaに対する米国特許第6,124,131号は、実質的に精製された安定なヒト低酸素誘導因子1、およびそれをコードするヌクレオチドを開示する。Semenzaに対する米国特許第5,882,914号は、低酸素誘導因子1をコードする核酸、ならびにその発現されたタンパク質の精製および特徴付けを開示する。10

【0014】

Semenzaに対する特許およびSemenzaらに対する特許は、精製HIF-1、HIF-1をコードする核酸、HIF-1に結合する抗体、HIF-1の変異体、およびこれらの生物学的分子すべての使用方法に言及する。これらの特許は、低酸素組織において選択的に複製してその低酸素組織を細胞溶解し抗血管新生因子を送達する能力を有する、組換えウイルスを記載していない。

【0015】

Websterらに対する米国特許第6,218,179号は、組織特異的低酸素調節性構築物を開示する。Websterらは、低酸素状態に曝露された細胞に対する虚血性損傷を減少するための方法を記載する。Websterにおいて記載される虚血性損傷を減少するための構築物は、低酸素応答性エレメントと、治療遺伝子と、組織特異的プロモーターとを含む、キメラ遺伝子を含む。この治療遺伝子は、上記細胞に対する虚血性損傷を減少させるのにその治療遺伝子の発現が有効であるように、選択される。治療遺伝子の例は、一酸化窒素シンターゼ遺伝子、Bcl-2遺伝子、スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子、およびカタラーゼ遺伝子である。Websterに対する米国特許第5,834,306号は、キメラ遺伝子を含む方法および組成物を開示する。上記キメラ遺伝子は、組織特異的プロモーターおよび低酸素応答性エンハンサー要素(これらは両方とも、選択された遺伝子に対して、作動可能に連結されている)を含む。20

【0016】

組換えアデノ随伴ビリオンおよびその使用方法が、Podsakoffらに対する一連の特許に記載されている。Podsakoffらに対する米国特許第6,211,163号は、組換えアデノ随伴ウイルスベクターを使用してDNAを血流へと送達するための方法を開示する。本発明は、組換えアデノ随伴ビリオンが、種々の筋肉細胞型へと効率的に送達され、治療タンパク質の持続的産生を提供するという、発見に基づく。Podsakoffらに対する米国特許第5,858,351号は、DNA分子を筋肉細胞および筋肉組織へと送達するためのアデノ随伴ウイルスビリオンの使用を開示する。Podsakoffらに対する米国特許第5,846,528号は、貧血の処置においてDNA分子を筋肉細胞および筋肉組織へと送達するための組換えアデノ随伴ウイルスビリオンを開示する。上記のPodsakoffらの特許は、低酸素組織を腫瘍崩壊しかつ抗血管新生因子を提供する、組換えウイルスを記載しない。3040

【0017】

低酸素誘導性因子1経路に関連する米国特許は、多くのストラテジーを記載する。Cseteらに対する米国特許第6,184,035号は、低酸素条件を使用することによって、骨格筋幹細胞もしくは骨格筋前駆細胞を、単離する方法、活性化させる方法、およびそれらの細胞からの分化を制御する方法を開示する。Cseteらに対する特許は、低酸素条件下で培養された成体骨格筋線維が、正常酸素レベル下で増殖された筋線維と比較して多い数の前駆細胞を生じるという、発見に関する。Alitaloらに対する米国特許第6,130,071号は、精製され単離された脈管内皮増殖因子-Cシステイン欠失改変体を開示する。Aebischlerらに対する米国特許第5,952,226号は、連

続的に E P O を放出する移植型デバイスを使用して、患者に対して E P O を送達するためのデバイスおよび方法を開示する。A e b i s c h e r らの特許に記載されている発明は、低酸素条件下で高レベルの E P O を発現するように操作された細胞を有する被験体に対して、E P O を提供することに関する。A n d e r s o n らに対する米国特許第 5 , 6 8 1 , 7 0 6 号は、酸素欠乏に曝された哺乳動物細胞における D N A 分子の酸素欠乏誘導をもたらす遺伝子調節エレメントを開示する。R a t c l i f f e らに対する米国特許第 5 , 9 4 2 , 4 3 4 号は、プロドラッグ活性化システム遺伝子またはサイトカイン遺伝子などのコード配列に作動可能に連結された低酸素応答性エレメントを含む、核酸構築物を開示する。これらの特許から理解されるように、低酸素誘導性経路が、一部の特定の状況において使用するために利用されたが、本出願人が知る限り、低酸素組織または活性化 H I F 経路を有する組織において選択的に複製しかつその組織を細胞溶解しかつ補助治療をさらに送達する、組換えウイルスは、先行技術において記載されていない。

【 0 0 1 8 】

以下の米国特許は、それらが本明細書と矛盾していない程度まで、参考として本願明細書において明示的に援用される：米国特許第 6 , 2 2 2 , 0 1 8 号；米国特許第 6 , 2 1 8 , 1 7 9 号；米国特許第 6 , 2 1 1 , 1 6 3 号；米国特許第 6 , 1 8 4 , 0 3 5 号；米国特許第 6 , 1 3 0 , 0 7 1 号；米国特許第 6 , 1 2 4 , 1 3 1 号；米国特許第 5 , 9 5 2 , 2 2 6 号；米国特許第 5 , 9 4 2 , 4 3 4 号；米国特許第 5 , 8 8 2 , 9 1 4 号；米国特許第 5 , 8 5 8 , 3 5 1 号；米国特許第 5 , 8 4 6 , 5 2 8 号；米国特許第 5 , 8 3 4 , 3 0 6 号および米国特許第 5 , 6 8 1 , 7 0 6 号。

【 0 0 1 9 】

従って、広範な腫瘍の選択的標的化のための、治療的遺伝子送達アプローチと腫瘍崩壊機構とを組合わせるウイルス治療 (virotherapeutic) システムに関する必要性が存在する。

【 0 0 2 0 】

様々な特定の課題に、本発明の開発の間に遭遇した。ウイルスによる細胞の感染は、複雑な生化学プロセスである。腫瘍細胞が組換えアデノウイルスによって感染され得ることを示すことが、まず必要であった。次に、トランスフェクトされた腫瘍細胞株における構築物の低酸素誘導性発現が、実証されなければならなかつた。この H I F 活性化発現はまた、発現レベルプロフィールに対して適切な O₂ 濃度を有さなければならなかつた。遺伝子産物を二方向発現する低酸素誘導性構築物が、設計され、かつ補助治療の送達を含む本発明の実施形態について試験されなければならなかつた。これらの初期の設計段階および試験段階の後、上記構築物を含む組換えウイルスが、トランスフェクトされた腫瘍細胞株において、E 1 A 遺伝子産物および E 1 B 遺伝子産物の発現について試験された。これらの発現研究は、一過性レポーター遺伝子アッセイにおいて観察される低酸素依存性調節が、ウイルスゲノムに関して維持されることを実証した。本発明における次の段階は、この組換えウイルスが低酸素依存性様式で腫瘍細胞を細胞溶解したことの実証を含んだ。最後に、本発明者らは、上記組換えウイルスが、モデル系において脳腫瘍へと送達されることを示した。最後に、これらの研究は、本発明の組換えウイルスをもたらした。

【 0 0 2 1 】

(発明の要旨)

本発明は、新規な組換えウイルスを含む組成物を提供し、この組換えウイルスは、低酸素細胞もしくは低酸素組織または活性化 H I F 経路を有する細胞もしくは活性化 H I F 経路を有する組織において選択的に複製する。本発明の新規な組成物は、1つまたは複数の低酸素応答性エレメントを有するように遺伝子操作された組換えウイルスを含み、その低酸素応答性エレメントは、そのウイルスの複製を調節もしくは調整する遺伝子または治療分子をコードする遺伝子に作動可能に連結された、プロモーターに作動可能に連結されている。低酸素誘導性経路におけるタンパク質または遺伝子と相互作用する因子についてスクリーニングするために有用な構築物もまた、本発明に包含される。

【 0 0 2 2 】

10

20

30

40

50

本発明の第一の実施形態は、低酸素細胞もしくは低酸素組織または活性化HIF経路を有する細胞もしくは活性化HIF経路を有する組織において選択的に複製する、組換え細胞溶解ウイルスを含む組成物に関する。本実施形態の新規組成物は、1つまたは複数の低酸素応答性エレメントを有するように遺伝子操作された組換えウイルスを含み、その低酸素応答性エレメントは、そのウイルスの複製を調節もしくは調整する遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターに作動可能に連結されており、そのウイルスは、細胞溶解サイクルを有する。本実施形態の新規な組換えウイルスは、低酸素細胞もしくは低酸素組織または活性化HIF経路を有する細胞もしくは組織において、選択的に複製してそれらの細胞もしくは組織を細胞溶解する。細胞溶解サイクルを有するウイルスの例としては、細胞溶解性アデノウイルス（特に、アデノウイルス血清型5）；細胞溶解性ピコルナウイルス（例えば、ポリオウイルス）；ならびに細胞溶解性ヘルペスウイルスおよび細胞溶解性ヘルペス様ウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0023】

本発明の第2の実施形態は、低酸素である細胞または活性化HIF経路を有する細胞に対して遺伝子を選択的に送達する、低酸素HIF依存性複製ウイルスを含む組成物に関する。本実施形態の組換えウイルスを含む組成物は、1つまたは複数の低酸素応答性エレメントを、そのウイルスの複製を調節もしくは調整する少なくとも1つの遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターに作動可能に連結された状態で有するように遺伝子操作されている。本実施形態の新規な組換えウイルスは、低酸素組織もしくは低酸素細胞（腫瘍を含む）を標的とし、この組織もしくは細胞において、このウイルスは選択的に複製して遺伝子を送達する。本実施形態に従って、抗新脈管形成活性を提供するさらなる遺伝子、またはレポーター遺伝子として作用するさらなる遺伝子、さもなければ低酸素組織もしくは低酸素細胞を調節するさらなる遺伝子が、本発明の新規な組換えウイルス中に含まれる。本発明の新規な組成物により送達され得る好ましい遺伝子の例は、新脈管形成阻害遺伝子（例えば、アンジオスタチン）である。

【0024】

本発明の第3の実施形態は、低酸素細胞または活性化HIF経路を有する細胞へと遺伝子を送達する、低酸素依存性の複製腫瘍崩壊ウイルスを含む組成物に関する。本実施形態の組換え細胞溶解ウイルスを含む組成物は、1つまたは複数の低酸素応答性エレメントを、そのウイルスの複製を調節もしくは調整する遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターに作動可能に連結された状態で有するように遺伝子操作されており、そのウイルスは、細胞溶解サイクルを有する。本実施形態の新規な組換えウイルスは、低酸素組織もしくは低酸素細胞（腫瘍を含む）を標的とし、この組織もしくは細胞において、このウイルスは選択的に複製して遺伝子を送達し、細胞溶解を引き起こす。本実施形態に従って、抗新脈管形成活性を提供するさらなる遺伝子、またはレポーター遺伝子として作用するさらなる遺伝子、さもなければ低酸素組織を調節するさらなる遺伝子が、本実施形態の新規な組換え細胞溶解ウイルス中に含まれ得る。本実施形態の組成物により送達され得る好ましい遺伝子の例は、新脈管形成阻害遺伝子（例えば、アンジオスタチン）である。

【0025】

本発明の第4の実施形態は、低酸素により特徴付けられる状態もしくは疾患を処置するための方法に関する。本実施形態の好ましい局面は、癌を有する個体を処置するための方法に関し、この方法は、腫瘍細胞特異的溶解（腫瘍崩壊）を示しかつ補助治療を（抗血管新生因子の形態で）腫瘍微小環境へと送達する、組換え複製コンピテントアデノウイルスの投与を包含する。これは、低酸素条件下で抗血管新生因子（HYPR-A-d）を発現する低酸素/HIF依存性複製アデノウイルス（HYPR-A-d）を含むウイルス構築物の投与を介して達成される。この方法において、本発明の新規な組成物は、ウイルス細胞溶解および抗血管新生因子発現の効果に起因して、低酸素腫瘍組織の破壊において相乗作用効果を有する。

【0026】

10

20

30

40

50

本発明のこの実施形態の別の局面は、組織における低酸素 / HIF 経路の活性化の誘導と、その後の本発明の組換えウイルスによる処置とに関する。特に、望ましくない組織（すなわち、脂肪または瘢痕）は、その望ましくない組織において HIF 経路を特異的に誘導する因子を用いて処置され得る。この因子による処置の後、その望ましくない組織は、本発明の組換えウイルスによる破壊に対して感受性である。

【0027】

第5の実施形態において、本発明は、低酸素およびHIF経路を調節する化合物を同定するために有用な、組成物および方法に関する。レポーター遺伝子に作動可能に連結された低酸素 / HIF 誘導性プロモーターを含むベクターを含む、安定にトランスフェクトされた細胞もしくは一過性トランスフェクトされた細胞が、試験化合物と接触させられ、そのレポーター遺伝子の発現についてアッセイされる。好ましい実施形態において、このHIF薬物開発アッセイは、多数の試験化合物について適切な高スループットアッセイである（すなわち、化合物ライブラリーを使用することによる）。化合物ライブラリーは、市販されているか、または当業者によって公知の手順を使用して合成され得る。本発明の薬物開発アッセイはまた、生物学的組織（すなわち、植物、真菌、細菌、および動物）の抽出物を試験するために使用され得る。

10

【0028】

第6の実施形態において、本発明は、薬物開発アッセイに関する。レポーター遺伝子に作動可能に連結された低酸素誘導性プロモーターまたはHIF誘導体プロモーターを含むベクターが、そのベクターを含む腫瘍を生成するために使用される。そのベクターを含む腫瘍は、低酸素組織を破壊するために特異的に標的とするかまたは低酸素誘導性経路をインピボで破壊する、化学的因素もしくは生物学的因素の効力を評価するために使用される。

20

【0029】

本発明のある局面においては、上記組換えウイルスは、非細胞溶解性である。

【0030】

本発明はまた、低酸素以外の刺激（光（UV光、可視光）、放射線（X線）、pH、音（電波）、酸化還元状態、代謝状態、ホルモン応答、およびテロメア短縮など）に応答する遺伝子エレメントの使用も企図する。

30

【0031】

（発明の詳細な説明）
本発明は、低酸素応答性および / またはHIF応答性のエレメント / プロモーター構築物の制御下にウイルス複製にとって必須であるタンパク質を有するように遺伝子操作されたウイルスが、低酸素組織を選択的に標的としてその低酸素組織を細胞溶解するという、本発明者らの発見に基づいた。本発明者らは、その新規の組換えウイルスが、低酸素組織もしくは低酸素細胞に対して診断目的もしくは治療目的のために遺伝子を選択的に送達するようにさらに操作され得ることを、さらに発見した。

【0032】

本発明は、低酸素細胞において選択的に複製する組換えウイルスを含む組成物を提供する。本発明の新規な組成物は、低酸素応答性エレメントを有するように遺伝子操作された組換えウイルスを含み、この低酸素応答性エレメントは、このウイルスの複製を調節もしくは調整する遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターに作動可能に連結されている。この組成物は、細胞溶解サイクルを有していても有していないてもよい、組換えウイルスを含む。細胞溶解サイクルを有するウイルスが、好ましい。本発明の新規な組換えウイルスは、低酸素であるかまたはHIF経路が活性化している、任意の低酸素組織もしくは低酸素細胞を選択的に標的とする。低酸素である腫瘍または低酸素領域を有する腫瘍が、本発明の組成物にとっての好ましい標的である。

40

【0033】

本発明の好ましい実施形態は、腫瘍細胞特異的溶解（腫瘍崩壊）を示しかつ補助治療を抗血管新生因子の形態で腫瘍微小環境へと送達する、組換え複製コンピテントアデノウイ

50

ルスに関する。これは、低酸素条件下で抗血管新生因子（HYPRA - Ad）を発現する低酸素依存性複製アデノウイルス（HYPR - Ad）を含むウイルス構築物の投与を介して達成される。

【0034】

本発明の別の好ましい実施形態は、低酸素である腫瘍を有する癌患者、活性化HIF経路を有する腫瘍を有する癌患者、または低酸素領域／HIF活性領域を有する腫瘍を有する癌患者を、本発明の組成物を投与することによって処置するための方法に関する。本発明の方法によって、種々の腫瘍を有する患者（ヒトおよび動物を含む）は、その腫瘍が低酸素であるかまたは低酸素領域を有する限りにおいては処置することが可能である。本実施形態の具体的方法は、化学療法技術もしくは放射線療法技術を用いて以前に処置されてそのような処置に対して抵抗性になった腫瘍を有する、癌患者に対する。そのような化学療法技術もしくは放射線療法技術は、非低酸素腫瘍組織を死滅もしくは破壊することによって、低酸素腫瘍組織の生存を許容することが公知である。従って、本発明の方法は、化学療法処置もしくは放射線療法処置を以前に受けたかまたは現在受けている患者を処置するために適している。10

【0035】

本明細書において使用される場合、用語「酸素正常状態」または「酸素正常状態の」とは、細胞または組織における正常な酸素レベルまたは正常な酸素圧レベルを指す。

【0036】

本明細書において使用される場合、用語「低酸素（状態）」または「低酸素（状態）の」とは、細胞もしくは組織における通常見出されるものと比較して低い、酸素レベルまたは酸素圧レベルを指す。細胞または組織は、そのO₂濃度がこれらの特定の細胞もしくは組織における正常酸素レベルよりも低い場合に、低酸素状態である。20

【0037】

本明細書において使用される場合、用語「腫瘍低酸素（状態）」または「低酸素腫瘍細胞」とは、正常組織と腫瘍組織との間における酸素レベルの生理学的差を指し、その酸素分圧は、その腫瘍組織においてその正常組織に対して低減している。

【0038】

本明細書において使用される場合、用語「活性化HIFを有する細胞または活性化HIFを有する組織」とは、HIF転写因子経路が構成的に活性である細胞もしくは組織、または外因性刺激もしくは外因性処理によってHIF転写経路が活性化された細胞もしくは組織を指す。多数の因子が、HIF経路を活性化することについて当業者にとって公知であり、その因子としては、鉄キレート剤、コバルト、プロテオソームインヒビター、およびガルダナマイシン（galanamycin）が挙げられるが、これらに限定はされない。30

【0039】

本明細書において使用される場合、用語「腫瘍崩壊性」または「腫瘍崩壊」とは、癌細胞もしくは腫瘍細胞を溶解もしくは破壊する能力を指す。

【0040】

本明細書において使用される場合、用語「細胞溶解性」または「細胞溶解」または「細胞溶解する」とは、細胞を溶解もしくは破壊する能力を指す。40

【0041】

本明細書において使用される場合、用語「抗脈管形成性（抗血管新生性）」または「抗新脈管形成（抗血管新生）」とは、新脈管形成を阻害する能力を指す。新脈管形成のインヒビターは、新脈管形成を調節するように直接的もしくは間接的に作用する、遺伝子であってもタンパク質であってもよい。新脈管形成のインヒビターとしては、アンジオスタチン、抗脈管形成ペプチド、抗脈管形成アンチセンスDNA、および当業者にとって公知である他の抗血管新生因子が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0042】

本明細書において使用される場合、用語「抗腫瘍」または「抗癌」とは、腫瘍を破壊す50

るかまたは腫瘍サイズもしくは癌増殖を低減させる能力を指す。

【0043】

(薬物開発アッセイ)

一実施形態において、本発明は、タンパク質発現および／または遺伝子発現の低酸素誘導性経路媒介性誘導を調節する化合物を同定するための方法に関する。この方法において、レポーター遺伝子に作動可能に連結された低酸素誘導性プロモーターを含むベクターで安定にかもしくは一過的にトランスフェクトされた細胞株が、低酸素および／またはHIFによって調節される遺伝子もしくは任意タンパク質の発現を調節する化合物を検出するために使用される。この方法の一局面において、レポーター遺伝子に作動可能に連結された低酸素誘導性プロモーターを含む細胞株が、そのレポーター遺伝子の発現を阻害する化合物を検出するために使用され得る。そのレポーター遺伝子の発現は、容易に（例えば、単純な比色アッセイによって）検出され得ることが、好ましい。他の技術（例えば、酵素アッセイまたは蛍光アッセイ）によって検出され得る他の遺伝子は、上記レポーター遺伝子として使用され得る。

【0044】

本発明の薬物開発アッセイにおいて陽性であると試験で評価される化合物は、上記レポーター遺伝子の発現を調節する化合物である。例えば、細胞は、特定条件下で試験化合物とともにインキュベートされ、その化合物が存在しないこと以外は同じ条件下でインキュベートされた細胞と比較される。その試験化合物を伴うレポーター遺伝子の発現と、化合物なしのアッセイからのレポーター遺伝子発現との間での比較によって、その試験化合物が陽性であるか否かを決定可能である。化合物なし（または他の適切なコントロール）と比較してレポーター遺伝子発現レベルを変化させる試験化合物は、「陽性」であると試験で評価される。

【0045】

本発明の薬物開発アッセイにおいて陽性であると試験で評価される材料は、種々の顕著な臨床状態（すなわち、癌、虚血など）に関連する低酸素／HIF経路を調節するために有用である。

【0046】

この実施形態の特定の局面において、その細胞株は、試験化合物と接触させられる前に、溶解されるかまたはさらに処理される。いずれの場合においても、その試験化合物が上記細胞もしくはその部分とともに、選択された期間インキュベートされた後に、その反応混合物が、レポーター遺伝子発現レベルについてアッセイされる。この実施形態の特に有用な局面において、そのレポーター遺伝子は、容易に検出可能であるタンパク質（例えば、単純な比色アッセイまたは他の手段（例えば、モノクローナル抗体検出）によって検出される反応を触媒する酵素）を発現する。本発明において有用なレポーター遺伝子の例としては、ルシフェラーゼ、-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、緑色蛍光タンパク質などが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0047】

具体例において、アルカリホスファターゼ遺伝子に作動可能に連結された低酸素および／またはHIF誘導性プロモーターを含むベクターが、細胞株中に安定にかまたは一過的にトランスフェクトされる。このベクターを含む細胞株は、低酸素誘導性因子経路を活性化させる条件に供され、試験化合物と接触させられる。一般的には、試験化合物がアルカリホスファターゼ活性の発現を減少または増加させる場合に、その試験化合物は、低酸素誘導性経路および／またはHIF誘導性経路の調節因子として同定される。アルカリホスファターゼ活性の発現を調節する試験化合物は、「陽性」であると試験で評価され、さらに調査される。

【0048】

本発明はまた、本発明の薬物開発アッセイにおいて陽性であると試験評価される化合物、およびその化合物を含む組成物に関する。

【0049】

10

20

30

40

50

(ウイルス)

一般に、任意のウイルスが、本発明において使用され得る。適切なウイルスの選択は、種々の要因（例えば、処置される宿主）に依存する。例えば、ヒトの処置には、*Homo sapiens*に感染し得かつ*Homo sapiens*において複製し得る、ウイルスが必要である。非ヒト被験体（例えば、他の哺乳動物）を処置するために使用され得るウイルスもまた、本発明の範囲内に包含される。好ましいウイルスは、細胞溶解サイクル（すなわち、細胞を溶解する能力）を有する。好ましい細胞溶解性ウイルスは、アデノウイルス科のウイルスである。アデノウイルス科に由来するウイルスの例としては、the Catalogue of Animal Viruses & Antisera, Chlamydias & Rickettsias, 6th edition, 1990, the American Type Culture Collection (ATCC) 10に記載されるような、アデノウイルス1型～アデノウイルス41型が挙げられるが、これらに限定はされない。本発明における使用のために適する他のウイルスとしては、パピローマウイルス、レトロウイルス、ピコルナウイルス（例えば、ポリオウイルス）；ヘルペスウイルスおよびヘルペス様ウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）；the Catalogue of Animal Viruses & Antisera, Chlamydias & Rickettsias, 6th edition, 1990, the American Type Culture Collection 20に記載される他のウイルスが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0050】

（組換えウイルス）

一般に、本発明の組換えウイルスは、低酸素条件下で選択的に複製するように遺伝子操作される。本発明の組換えウイルスは、酸素分圧に応答する遺伝子（すなわち、低酸素応答性エレメントを含む遺伝子、または低酸素誘導性エンハンサー・モチーフ（HRE）を含む遺伝子）を同定することによって、構築され得る。標準的な遺伝子操作方法を使用して、任意の適切なプロモーターがHREに連結され得、その後、これらは、ウイルス複製を調節もしくは調整する特定ウイルスの遺伝子に連結される。ウイルス複製を調節もしくは調整する種々の遺伝子および／またはその産物が、当業者にとって公知である。例えば、E1A遺伝子産物は、アデノウイルス複製の開始のために必須である初期ウイルスタンパク質をコードすることが公知である。従って、アデノウイルスのこのE1A遺伝子（または任意の構造的ホモログもしくは機能的ホモログ）が、低酸素応答性エレメント／プロモーターの制御下に配置されるように操作され得、それにより、低酸素条件下で選択的に複製する生物が生成され得る。 30

【0051】

低酸素条件は、生理応答力スケードを開始して、解糖に関与する遺伝子、赤血球生成に関する遺伝子、および新脈管形成に関する遺伝子の誘導をもたらすことが公知である。HIF-1タンパク質複合体（これは、2つの塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックスタンパク質であるHIF-1およびHIF-1から構成されるヘテロダイマーである）は、標的遺伝子中に存在するシス作用性低酸素誘導性エンハンサー・モチーフ（HRE）に結合することによって、低酸素に対する転写応答を媒介する。HIF-1に加えて、低酸素-1誘導性経路の他のメンバーとしては、HIF-2およびHIF-3が挙げられる。エリスロポエチン（EPO）遺伝子の3'隣接領域内に存在するHREおよびVEGF遺伝子の5'隣接領域内に存在するHREは、長さが50bp未満である。これらのHREは、高度に保存されたHIF-1結合部位と、低酸素誘導のために機能的に必須である他の遺伝子特異的シス作用性配列とを含む。EPOは、腎臓および肝臓において産生される低酸素応答性糖タンパク質ホルモンであり、EPOは、赤血球前駆（progenitor；precursor）細胞上に発現されるそのレセプターに結合することによって、赤血球生成を刺激する。EPOおよびそのレセプターはまた、中枢神経系において、それぞれ、神経膠星状細胞およびニューロンによって発現される。この場合、EPOおよびそのレセプターは、パラクライン様式で作用し、かつ低酸素誘導性損傷に対してニューロ 40

ンを保護するように機能すると、現在考えられている。VEGFは、種々の細胞型において低酸素により誘導され、多数の腫瘍細胞型（神経膠腫を含む）によってもまた発現される。VEGFは、新脈管形成の主要調節因子である。VEGFは、脈管内皮細胞に特異的なマイトジエン活性を有する。この情報に基づいて、EPOおよびVEGFのHREが、低酸素応答性プロモーターの設計および試験のために選択された。

【0052】

(遺伝子制御複製)

アデノウイルスは、分裂中の細胞および休止細胞の両方に感染するDNAウイルスである。感染した休止細胞が細胞周期に再び入ることが、ウイルスDNA複製のため、最終的にはウイルスの子孫産生のために必要である。E1A遺伝子産物の発現は、これらのウイルス機能のために必須であり、E1A遺伝子領域を欠くアデノウイルスは、複製欠損性である。アデノウイルスE1A遺伝子は、構成的に活性なプロモーター領域から発現される最初の転写単位である。E1A遺伝子産物は、広範な生物学的活性（細胞性転写およびウイルス転写の調節（E1B遺伝子転写誘導を含む）ならびに休止細胞におけるDNA合成の誘導が挙げられる）を示す。しかし、E1Aによる細胞増殖制御の調節不全は、p53依存性機構およびp53非依存性機構を介してアポトーシスを誘導し、最終的には、ウイルスの子孫産生を妨害する。野生型アデノウイルス感染の間におけるアポトーシスの防止は、アデノウイルスE1B遺伝子産物の発現により媒介される。E1B遺伝子は、2つのタンパク質（21Kおよび55K）をコードする。これらのタンパク質は、E1A誘導性アポトーシスを阻害するよう独立して機能する。E1B 21Kタンパク質は、Bcl-2ファミリーのアポトーシス調節因子と配列および機能が相同性であり、E1A誘導性アポトーシスおよび他の多くのアポトーシス刺激をブロックする。E1B 21K機能を欠くアデノウイルスによる細胞感染は、甚大な核DNAおよびウイルスDNAの分解の出現（deg表現型）および細胞変性効果の増大（cyt表現型）をもたらす。E1B 55Kは、アデノウイルスE4-orf6遺伝子産物と組み合わせて、ウイルス産生の間の2つの機能（p53と直接相互作用してp53を不活化すること；その後、ウイルス産生の間にウイルス後期mRNAの輸送を促進する一方で、ほとんどの細胞mRNAの輸送を阻害すること）を有する。

【0053】

本発明の組換えウイルスは、外因性因子（例えば、チミジンキナーゼ：これは、ウイルスをガンシクロビルに対して感受性にする）によるウイルス増殖終結を可能にする遺伝子を含むようにさらに操作され得る。さらに、組換えウイルスは、転写単位1つにつき2つの遺伝子を発現させるために内部リボソーム侵入部位（IREs）が使用される場合には、発現される遺伝子の数が4つにまで増加するように、さらに操作され得る。本実施形態に従って、複数の遺伝子が、低酸素に応答して発現され得るか、またはHIF-1経路を活性化する条件下で発現され得る。

【0054】

(腫瘍および低酸素)

腫瘍（固形腫瘍を含む）は、周囲の正常組織およびその腫瘍が由来する組織とは、生理学的に異なる（BrownおよびGiaccia, 1998, Cancer Res. 58: 1408~1426）。正常組織と癌腫瘍との間の組織脈管構造の基礎的差異は、腫瘍における乏しい酸素供給（すなわち、低酸素）という独特の生理学的特徴をもたらす。腫瘍血管は、（1）正常な脈管構造を含む組織に対する腫瘍細胞の浸潤プロセス、および（2）その腫瘍による脈管形成因子の放出の結果として、非常に異常である。固形腫瘍における血流は、しばしば遅く、正常な組織において観察されるよりも漏出しやすく、これは、腫瘍血管が異常で折れ曲がった性質であることに起因する。腫瘍血管新生についてのこれらの異常な特徴は、腫瘍組織の低酸素生理状態をもたらすと考えられる。大量の証拠によって、低酸素腫瘍は、放射線療法処置および化学療法処置に対して比較的抵抗性であることが示唆されている（例えば、Grayら、1953, Br. J. Radiol. 26: 638~648; Teicherら、1990, Cancer Res. 50: 33

10

20

30

40

50

39~3344; GrauおよびOvergaard, 1998, Radiother. Oncol. 13:301~309を参照のこと)。

【0055】

腫瘍における低酸素領域は、多くの固体腫瘍モデル系において生じることが示されている。例えば、Gullino, P. M. ら、Adv. Exp. Med. Biol. 75: 521~536 (1975); Hasegawa, T. ら、Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 13: 569~574 (1987); Jain, R. ら、Cancer Res. 48: 2641~2658 (1988); Siemann, D. ら、Br. J. Cancer 58: 296~300 (1988); Song, C. ら、Cancer Res. 47: 442~446 (1987); Vaupel, P. ら、Cancer Res. 47: 3496~3503 (1987); Vaupel., P. ら、Cancer Res. 41: 2008~2013 (1981)を参照のこと。腫瘍はまた、低酸素とは無関係に活性化HIF経路を有し得る。ファン・ヒッペル-リンダウ症候群に関連する腫瘍(血液多形性神経膠芽細胞腫(haemangioblastoma)を包含する)、腎臓明細胞、胰臓癌腫、および内耳腫瘍が、例である。10

【0056】

低酸素組織を検出するための種々の方法が、当業者にとって利用可能であり、かつ公知である。例えば、Chapman, J. D. 「The Detection and Measurement of Hypoxic Cells in Solid Tumors」Cancer, vol. 54, No. 11, pp. 2441~2449 (1984); Chapman, J. D. 「Measurement of Tumor Hypoxia by Invasive and Non-Invasive Procedures: A Review of Recent Clinical Studies」Radiother. Oncol. 20. pp. 13~19 (1991); 「Development of F-18-labeled fluorouracil-triimidazole as a PET agent for imaging tumor hypoxia」Yang DJ, Wallace S, Cherif A, Li C, Gretzer MB, Kim EE, Podoloff DA, Radiology 194: 795~800, 1995を参照のこと。米国特許第5,410,490号および米国特許第5,843,404号は、低酸素または低酸素組織を検出するための方法を開示し、本明細書により参考として援用される。これらの技術または当業者にとって公知である他の技術はいずれも、低酸素組織を同定するために使用され得る。2030

【0057】

(新脈管形成)

腫瘍増殖の必須要素は、新脈管形成(既存の血管からの新規な血液供給の確立)である。腫瘍は、新生血管形成を開始するためには、止血に対する生理学的制御を破壊する必要がある。これは、腫瘍が直径約0.4mmに到達した場合にその腫瘍による低酸素誘導性脈管形成因子の放出に誘発されるプロセスである。新脈管形成は、神経膠星状細胞腫および他の癌の悪性進行の間の段階的プロセスである。神経膠腫の発症において、新規な血管が、低悪性度の神経膠星状細胞腫において出現し、その後、未分化神経膠星状細胞腫において密度が増加する。未分化神経膠星状細胞腫から多形性神経膠芽細胞腫への移行の間に、広範囲の微小血管増殖が生じ、異常な血管をもたらす。低酸素は、神経膠星状細胞腫の進行の必須要素であり、その最終段階においては、壊死が生じる。血管分布および微小血管細胞増殖は、悪性神経膠星状細胞腫を、それよりも悪性度の低い神経膠星状細胞腫から診断するために使用される形態学的特徴であり、これらの特徴は、予後判定と相関する。40

【0058】

ヒト腫瘍(神経膠腫を含む)の脈管成分を標的とすると、特に有効な癌治療を提供する。なぜなら、i) 約100個の腫瘍細胞が、各々の内皮細胞の死滅によって影響を受けると推測され; ii) 内皮細胞は、腫瘍細胞の遺伝的不安定性を共有しないのでその処置に対して抵抗性になる可能性が低く; iii) 肿瘍脈管構造に干渉するストラテジーが、動50

物モデルにおいて成功裡に使用されているからである。

【0059】

種々の抗血管新生因子が、本発明の組換えウイルスの効果を増強するために使用され得る。これらのインヒビターのうちの1つであるアンジオスタチン（例えば、本明細書により全体が参考として援用される米国特許第6,024,688号およびO'Reillyら「Angiostatin: A Circulating Endothelial Cell Inhibitor That Suppresses Angiogenesis and Tumor Growth」Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. LIX, pp. 471~482(1994)を参照のこと）が、種々のマウスおよびヒトの異種移植腫瘍（神経膠腫、乳癌、前立腺癌、および肺癌が挙げられる）に対して有効に使用された。さらに、アンジオスタチンは、組み合わされる、内皮細胞に対する細胞傷害性効果によって、電離放射線の抗腫瘍効果を増強する。局所的補助治療として使用するためのアンジオスタチンの強力な抗腫瘍特性は、本発明の低酸素依存性腫瘍崩壊アデノウイルスによって送達され得る。10

【0060】

他の新脈管形成阻害分子としては、トロンボスポンジン（TSP）ファミリーのタンパク質のメンバーが挙げられる（例えば、de Fraipontら、2001、Trends. Mol. Med. 7(9): 401~467を参照のこと）。このファミリーのいくつかのメンバー（TSP1およびTSP2）は、抗新脈管形成活性を有することが公知である。TSPの抗新脈管形成活性は、そのプロコラーゲンドメインおよび1型反復（TSR）ドメインに局在化する。これは、このファミリーの他のメンバーは有さない特徴である。従って、本発明の組換えウイルスは、低酸素応答性エレメントの制御下にTSP遺伝子またはその部分を有するように操作され得る。その抗新脈管形成活性は、そのタンパク質のうちの小さな部分に局在化しているので、この抗新脈管形成活性をコードする核酸は、本発明において使用され得る。20

【0061】

本発明において使用され得るTSRドメインを含有する他の新脈管形成阻害因子は、GD-A1F（例えば、その全体が本明細書により参考として援用されるPCT/US95/02634を参照のこと）、BAI1、BAI2、およびBAI3、ならびにADAMTSファミリーのメンバー（ADAMTS-1、ADAMTS-4、およびADAMTS-8が挙げられるが、これらに限定はされない（例えば、その全体が本明細書により参考として援用される米国特許第6,046,031号を参照のこと））である。抗新脈管形成遺伝子の数は、増加しており、これらのうちのいずれもが、本発明において使用され得る。30

【0062】

本発明において使用され得る他の遺伝子としては、エンドスタチン（例えば、米国特許第6,174,861号および米国特許第5,854,205号を参照のこと）、血小板因子4（PF4）（例えば、米国特許第5,482,923号を参照のこと）、インターロイキン4（IL-4）（例えば、米国特許第5,382,427号および米国特許第4,958,007号を参照のこと）、および色素上皮由来因子（PEDF）（例えば、米国特許第6,288,024号および米国特許第5,840,686号を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定はされない。上記の米国特許は、本明細書と矛盾しない程度まで、その全体が本明細書中に援用される。脳新脈管形成インヒビター（1、2、3）をコードする遺伝子、インターロイキン12をコードする遺伝子、メタロプロテイナーゼの組織インヒビターをコードする遺伝子、プロラクチン（10kDフラグメント）をコードする遺伝子、bFGF可溶性レセプターをコードする遺伝子、トランスフォーミング増殖因子_αをコードする遺伝子、インターフェロン_γをコードする遺伝子、胎盤プロリフェリン関連タンパク質をコードする遺伝子、脈管内皮増殖因子レセプターのドミナントネガティブフラグメントをコードする遺伝子、またはそれらのフラグメントもまた、本発明にお4050

いて使用され得る。

【0063】

(抗腫瘍因子)

抗腫瘍活性を示す種々の遺伝子、またはウイルスの抗腫瘍活性を増強する種々の遺伝子、または腫瘍に対する免疫応答を調節する種々の遺伝子が、本発明の新規なウイルス構築物中に組み込まれ得る。これらの抗腫瘍因子は、種々の機構により作動する。例えば、*Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* は、オンコトキシン(*oncotoxin*)という名前のタンパク質を有する。このタンパク質は、抗腫瘍活性を有する(本明細書により参考として援用される米国特許第5,977,058号)。このタンパク質などのタンパク質の遺伝子は、本発明の新規な組換えウイルス中に遺伝子操作され得、そのウイルスの抗腫瘍活性を増強し得る。抗腫瘍因子の他の例としては、当業者にとって公知である種々の腫瘍サプレッサー遺伝子が挙げられるが、これらに限定はされない。10

【0064】

(他の因子)

他の因子が、治療目的のために本発明の組換えウイルスにより送達され得、それには、細胞増殖モジュレーター、細胞周期モジュレーター、細胞成長モジュレーター、細胞遊走モジュレーター、アポトーシスモジュレーター、免疫応答モジュレーター、転移モジュレーターが挙げられるが、これらに限定はされない。これらの因子もまた、当業者にとって公知である。20

【0065】

(他の障害)

低酸素性調節不全(*deregulation*)またはHIF調節不全(*deregulation*)は、多数の哺乳動物疾患と関連があり、その悪性疾患としては、関節炎、糖尿病性網膜症、虚血性心不全、発作、腫瘍、および妊娠障害(子癪前症および胎内発育遅延)が挙げられるが、これらに限定はされない。本発明は、そのような状態において治療遺伝子を送達するために利用され得る。さらに、本発明は、上記の状態を処置するための種々の治療因子を試験するためのレポーター系を含む、トランスジェニック動物を產生するために使用され得る。30

【0066】

(投与経路および投与量)

本発明の新規な組成物は、種々の経路(皮下経路、腹腔内経路、静脈内経路、異所性経路、エアロゾルを介する経路、および脳内経路が挙げられるが、これらに限定はされない)を介して投与され得る。投与経路は、当業者にとって公知である。

【0067】

本発明の新規な組換えウイルスは、単回投与または複数回投与で投与され得、処置を必要とする個体における1つよりも多くの腫瘍が、同時に処置され得る。

【0068】

詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい実施形態を示すが、例示としてのみ提供されていることが、理解されるべきである。なぜなら、本発明の趣旨および範囲内にある種々の変更および改変が、詳細な説明および具体例から当業者にとって明らかになるからである。40

【0069】

(実施例)

(実施例1：アデノウイルスによる腫瘍細胞株の感染)

本実施例は、脳腫瘍細胞株が、アデノウイルスにより効率的に感染されることを示す。脳腫瘍の遺伝子治療処置のためのアデノウイルスの利用は、ウイルスの侵入に依存する。アデノウイルスによるヒト細胞の感染は、少なくとも2つのウイルスタンパク質とそれらの個々の細胞レセプターとの特異的相互作用を含む、多工程プロセスである。脳腫瘍は、組織学的および遺伝学的に不均質であり、従って、これらの腫瘍のほんの小さな部分集合50

だけがアデノウイルスにより感染され得ることが、可能である。このことを試験するためには、8つのヒト神経膠腫細胞株（D247MG、U251MG、LN-229、LN-464、U87MG、LN-Z308、T98G、U138MG）がアデノウイルスにより感染される能力を、構成的に活性な内因性LacZレポーター遺伝子を含む複製欠損性アデノウイルス（AdLacZ、UNC-Virus Vector Core Facility、Chapel Hill、NC）を使用して試験した。未感染神経膠腫細胞およびAdLacZ感染293ヒト胚性腎臓細胞を、それぞれ、ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールとして使用した。

【0070】

同数の各々の細胞株を、感染の24時間前に播種した。それらの細胞に、0.1～500の範囲の感染多重度（MOI）でAdLacZを感染させたか、またはモック感染させた。感染の24時間後に、細胞を、X-gal基質を使用して-ガラクトシダーゼ（-gal）活性について組織学的に染色し、各MOIにおける感染（青色）細胞の数を、視覚的に定量した。その結果を、図1にまとめる。上記の8つの細胞株のうちの5つが、100～500の範囲のMOIにて75%～100%の感染度を達成し、一方、残りの3つの細胞株（LN-Z308、T98G、U138MG）は、MOI=500においてでさえ、より低い効率でしか（<30%）感染しなかった。AdLacZウイルスに非常に高効率で感染した293細胞は、MOI=1にて50%感染を達成し、MOI=5にて95%よりも高い感染を達成した。

【0071】

これらの結果は、脳腫瘍細胞株の大部分集団（約60%よりも多く）が、アデノウイルスにより高頻度で感染され得ることを確証する。アデノウイルス感染に対するヒト癌細胞株の差次的な感受性は、他の細胞型（ヒト膀胱癌細胞株およびヒト結腸癌細胞株が挙げられる）における差次的な感受性と類似する。

【0072】

（実施例2：腫瘍細胞株のアデノウイルス感染に対する低酸素の影響）
本実施例は、脳腫瘍細胞株のアデノウイルス感染が、低酸素により影響を受けないことを示す。HYPRアデノウイルスの治療効力は、そのHYPRアデノウイルスが低酸素腫瘍細胞に効率的に感染する能力に依存する。2つの遺伝的および生物学的に異なる神経膠腫細胞株（D247MGおよびLN-229）における、酸素正常状態条件下と低酸素条件下とのアデノウイルス感染レベルを、比較した。これらの細胞を、酸素正常状態（20.8%O₂）条件下または低酸素（1%O₂）条件下で72時間インキュベートし、その後、上記のような数種のMOIにて複製欠損性AdLacZウイルスに感染させた。それらの細胞を、感染の24時間後に-gal活性について組織学的に染色し、感染した（青色の）細胞の割合を、視覚的に定量した（表1）。感染細胞の割合は、飽和未満のMOIでは低酸素条件下でわずかに低減した（D247MGにおいて9%低減、LN-229において28%低減）。これは、LN-229についてはMOIを250にまで増加させることによって克服され、酸素正常状態下および低酸素下において100%感染した細胞が得られた。これらの実験は、細胞培養における低酸素条件下でのアデノウイルス感染は、酸素正常状態条件下と同様のレベルで生じることを実証する。従って、この効率によって、ウイルスの増加および増殖が可能になる。なぜなら、感染細胞各々は、103個～104個までの新たなウイルス粒子を生じると推測されるからである。

【0073】

表1：一視野当たりの青色細胞のパーセント

【0074】

【化1】

	D247MG 細胞	LN-229 細胞
酸素正常状態	35 (+/- 6)	78 (+/- 6)
低酸素	32 (+/- 4)	56 (+/- 8)

(実施例3：低酸素条件下でのアデノウイルスの複製および子孫產生)

本実施例は、AdLacZ複製および子孫產生が、低酸素条件下で効率的であることを示す。低酸素細胞が高効率でのアデノウイルスの複製および子孫產生を許容しない可能性を、AdLacZを使用して293細胞において試験した。上記293細胞は、ヒト胚性腎臓細胞株であり、複製欠損性AdLacZにおいて欠失しているウイルス機能をトランスで相補し、ウイルス產生を可能にする。ウイルスを、酸素正常状態条件(20.8%O₂)下および低酸素条件(1%O₂)下で増殖させたAdLacZ感染293細胞から収集した。その後、それらのウイルスを使用して、酸素正常状態下にて数種の異なるMOIにてD247MG神経膠腫細胞株およびLN-229神経膠腫細胞腫に感染させた。これらの細胞を、感染後24時間目に -galについて組織化学染色し、感染(青色)細胞のパーセンテージを視覚的に定量してウイルス力価の推定値として使用した。これらの結果を、表2にまとめる。感染(青色)細胞のパーセンテージは、ウイルスを低酸素293細胞において產生させた場合には約20%減少したことが、見出された。これらの結果は、ウイルス產生が、低酸素293細胞においてほんのわずかにしか低減しないことを示唆する。

【0075】

(表2)

【0076】

【化2】

表2

	D247MG 細胞		LN-229 細胞	
	1視野あたりの青色細胞の%	推定ウイルス力価(10 ⁸ pfu/ml)	1視野あたりの青色細胞の%	推定ウイルス力価(10 ⁸ pfu/ml)
酸素正常状態	61 (+/- 8)	1.1	62 (+/- 3)	2.9
低酸素	49 (+/- 5)	0.9	56 (+/- 8)	2.6

まとめると、実施例1～3に記載される実験は、大多数の神経膠腫細胞株を高効率でアデノウイルス感染させ得ること、およびアデノウイルスの感染、複製、および子孫產生は、低酸素条件によって劇的には変化しないことを、実証した。

【0077】

(実施例4：低酸素応答性プロモーターの構築)

実施例4は、低酸素依存性および/またはHIF依存性の複製アデノウイルス(HYP-R-Ad's)の生成のために使用される、低酸素応答性プロモーターの設計および試験を記載する。このHYPR(低酸素および/またはHIF調節性)シリーズの組換えアデノウイルスの構築には、

【0078】

【化3】

抗新脈管形成 遺伝子	最小 プロモーター	低酸素応答性 エレメント（要素）	最小 プロモーター	E1 遺伝子
---------------	--------------	---------------------	--------------	-----------

の低酸素 / HIF 依存性調節が必要である。

市販の哺乳動物発現ベクター (pBI , Clontech , Palo Alto , CA , 図 2) を、二方向性低酸素 / HIF 応答性プロモーターの生成および試験のための基礎として使用した。この pBI プラスミドは、テトラサイクリン応答性エレメントを含む。このテトラサイクリン応答性エレメントにより、2つの異種遺伝子の条件付き二方向性発現が可能になる。低酸素応答性エレメントを、いくつかの遺伝子において同定した。それらの低酸素応答性エレメントは、古典的エンハンサー要素として機能するようであった。従って、これらのエレメントを、これらの構築物が2つの遺伝子の発現を同時調節するように二方向的に機能するように、選択した。
10

【 0079 】

上記 HYP R ウィルスの構築の第一段階は、低酸素 / HIF 応答性プロモーターの選択であった。低酸素条件は、生理学的応答のカスケードを開始して、解糖に関する遺伝子、赤血球生成に関する遺伝子、および新脈管形成に関する遺伝子の誘導をもたらすことが公知である。HIF - 1 タンパク質複合体（これは、2つの塩基性ヘリックス - ループ - ヘリックスタンパク質である HIF - 1 および HIF - 1 から構成される、ヘテロダイマーである）は、標的遺伝子中に存在するシス作用性低酸素 / HIF 誘導性エンハンサーモチーフ (HRE) への結合によって、低酸素に対する転写応答を媒介する。低酸素活性化転写因子のファミリーの一部として、HIF 2 および HIF 3 もまた同定されており、これらは、HIF 1 と機能的に類似することが見出されている。エリスロポエチン (EPO) 遺伝子の 3' 隣接領域中に存在する HRE および VEGF 遺伝子の 5' 隣接領域中に存在する HRE は、長さが 50 bp 未満である。これらの HRE は、高度に保存された HIF - 1 結合部位と、低酸素 / HIF 誘導のために機能的に必須である他の遺伝子特異的シス作用性配列とを含む。EPO は、低酸素に応答して腎臓および肝臓において産生される糖タンパク質ホルモンである。EPO は、赤血球前駆 (progenitor) 細胞および赤血球前駆 (precursor) 細胞において発現されるそのレセプターに結合することにより、赤血球生成を刺激する。EPO およびそのレセプターはまた、それぞれ神経膠星状細胞およびニューロンによって中枢神経系において発現され、それらは、パラクリン様式で作用して低酸素誘導性損傷からニューロンを保護するように機能すると、現在考えられている。VEGF は、種々の細胞型において低酸素により誘導される。VEGF はまた、多数の腫瘍細胞型（神経膠腫を含む）により発現される。VEGF は、新脈管形成の主要な調節因子であり、脈管内皮細胞に特異的なマイトジエン活性を有する。この情報に基づいて、EPO の HRE および VEGF の HRE (これらの配列は、公知である (Semenza , 1998 , Chest 114 : 40S ~ 45S)) を、低酸素 / HIF 応答性プロモーターの設計および試験のために選択した。
20

【 0080 】

EPO HRE 配列 (配列番号 1 : G C C C T A C G T G C T G T C T C A C A C A G C C T G T C T G A C) および VEGF 配列 (配列番号 2 : C C A C A G T G C A T A C G T G G G C T C C A A C A G G T C C T C T T) を、 pBI ベクター中へのクローニングを容易にするためのさらなる配列とともに、標準的なオリゴヌクレオチド合成手順によって合成した。その後、これらの HRE を使用して、実施例 5 においてベクターを構築した。
40

【 0081 】

(実施例 5 : 低酸素誘導性発現ベクターの生成)

現在利用可能なアデノウイルスベクターのサイズが大きなことおよびその独特のクローニング部位が限定されることによって、 HYP R ウィルスおよび HYP R A ウィルス
50

の構築のために必要な複数のサブクローニング工程におけるそれらのベクターの有用性は制限される。従って、低酸素 / HIF 依存性プロモーターの構築および試験と、その後の E1 および抗脈管形成アンジオスタチン遺伝子のサブクローニングとは、改変型 pBI 哺乳動物発現ベクターおよび改変型 pBI - GL 哺乳動物発現ベクター (Clontech, Palo Alto, CA, 図 2) を使用して実施した。その後、この改変型 pBI プラスミド中に生じた遺伝子カセットを、組換え HPV18 アデノウイルスおよび組換え HPV16 アデノウイルスの構築のために使用する。

【0082】

pBI ベクターを使用して、二方向性テトラサイクリン (tet) 応答性プロモーターから目的の 2 つの遺伝子を発現させ得る。このプロモーターは、2 つの最小 CMV により挟まれた 7 コピーの tet 応答性エレメントを含む。上記 pBI - GL ベクターは、ルシフェラーゼと、ルシフェラーゼの調節下にある LacZ / - gal レポーター遺伝子とを含む。上記の pBI 哺乳動物発現ベクターおよび pBI - GL 哺乳動物発現ベクターを改変して、その tet 応答性エレメントを低酸素 / HIF 応答性エレメント (HRE) で置換した。XhoI 認識部位を、部位特異的誘発 (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA) によって、pBI プラスミドおよび pBI - GL プラスミドの tet 応答性エレメントの 5' 側および 3' 側に導入した。その後、その tet 応答性エレメントを、XhoI 消化によって除去した。VEGF 遺伝子の 5' 隣接領域中の HRE に広がるオリゴヌクレオチド、および EPO 遺伝子の 3' 隣接領域中の HRE に広がるオリゴヌクレオチドを、合成し (実施例 4 を参照のこと)、コンカテマー化し、その後、改変型 pBI - TET ベクターおよび改変型 pBI - GL - TET ベクターの XhoI 部位中にタンデムに (ヘッド - テール方向に) クローニングした。5' 方向および 3' 方向の両方に 1 ~ 6 個のタンデムコピーの VEGF HRE または EPO HRE を含む、pBI - HRE と名づけた構築物および pBI - GL - HRE と名づけた構築物を、作製した。

【0083】

(実施例 6 : 二方向性低酸素 / HIF 誘導性レポーター遺伝子発現の試験)

上記の pBI - GL - HRE 構築物を、それらが低酸素および / または HIF に応答してルシフェラーゼレポーター遺伝子および - gal レポーター遺伝子を二方向発現する能力について試験した。さらに、それらのレポーター遺伝子の基礎活性および低酸素特異的誘導に対する、コピー数および方向の影響についてもまた、試験した。最後に、EPO HRE に対して、VEGF HRE の基礎活性および誘導能力を比較して、神経膠腫細胞株における最適な調節を付与する応答エレメントを決定した。

【0084】

まず、低酸素条件に対して酸素正常状態条件下において、LN-229 神経膠腫細胞株における 24 種の pBIGL - HRE 構築物のレポーター遺伝子活性を試験した。上記の構築物を、GenePorter トランスフェクション試薬 (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) を使用して、LN-229 細胞中に一過性トランスフェクトした。それらの細胞を、トランスフェクション手順から一晩で取り出し、その後、酸素正常状態条件 (20.8% CO₂) 下または低酸素条件 (1% CO₂) 下において 48 時間インキュベートした。元の pBI プラスミドおよび pBI - GL プラスミドを、これらの実験についてのネガティブコントロールとして使用した。ルシフェラーゼ酵素活性および - gal 酵素活性を、比色アッセイ (Tropix Dual-Light 化学発光レポーター遺伝子アッセイシステム, Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用して測定した。その後、酵素活性を、改変型 Bradford タンパク質アッセイ (Bio-Rad, Hercules, CA) を使用して、細胞抽出物中の総タンパク質に対して正規化した。

【0085】

LN-229 細胞において得られたデータに基づいて、上記の 24 種の構築物のうちの 8 種 (pBI - GL VEGF - 5L, pBI - GL VEGF - 6L, pBI - GL

10

20

30

40

50

V E G F - 3 R、p B I - G L V E G F - 4 R、p B I - G L V E G F - 5 R、および p B I - G L V E G F - 6 R、ならびに p B I - G L E P O - 3 L および p B I - G L E P O - 6 L) を、さらなる分析用に選択した。これらの 8 種の構築物は、酸素正常状態条件下で最低レベルのレポーター遺伝子活性を示し、低酸素に応答してレポーター遺伝子活性の最高の二方向性誘導を示した。L N - 2 2 9 細胞において得られた二方向性レポーター遺伝子活性のデータを確認して拡張するために、これらの 8 種の構築物を、酸素正常状態および低酸素 (1% C O 2) において、他の 2 つの神経膠腫細胞株 (U 2 5 1 M G、U 1 3 8 M G) においても試験した (図 3)。

【 0 0 8 6 】

これらの結果は、上記の V E G F H R E および E P O H R E が、上記のプラスミドにおいて低酸素条件下で二方向性遺伝子発現を誘導することを実証した。重要なことには、タンデムコピーが 5' 方向に向かっている場合または 3' 方向に向かっている場合 (構築物の名前において L 対 R) の両方において、高い誘導が示された。このことは、上記のレポーター遺伝子の二方向性誘導が、タンデムコピーの方向に依存しなかったことを示唆した。最後に、酸素正常状態条件下におけるこれらの構築物のバックグラウンド発現は、最小限であり、p B I - G L ベクターに関して観察された発現よりも顕著には大きくなかった。

【 0 0 8 7 】

(実施例 7 : 低酸素および / または H I F 応答性ウイルス)

組換えアデノウイルスを生成するために一般的に使用される 2 種類の方法は、哺乳動物細胞における相同組換えまたはアデノウイルスゲノム中への D N A フラグメントの直接連結のうちのいずれかを含む。最近、p A d E a s y (S t r a t a g e n e , L a J o l l a , C A) と呼ばれる新たな系 (H e , T . C . ら [1 9 9 8] P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 9 5 : 2 5 0 9 ~ 1 4) は、細菌において組換え手順が実施されることを可能にした。上記の p A d E a s y 系において、目的の遺伝子を、まず、ポリリンカーニングアデノウイルス配列に挟まれているシャトルプラスミド中にクローニングする。これらの隣接アデノウイルス配列によって、E 1 ウィルス領域および E 3 ウィルス領域以外のアデノウイルスゲノムをすべて含むアデノウイルスプラスミドとの相同組換えが可能である。その後、その組換え生成物を、2 9 3 パッケージング細胞株 (A T C C , R o c k v i l l e , M D) 中にトランスフェクトして、組換えアデノウイルスを生成する。本発明の状況において p A d E a s y 系を確立するために、緑色蛍光タンパク質 (G F P) を発現する複製欠損性アデノウイルスを作製し、感染した L N - 2 2 9 脳腫瘍細胞において G F P 発現を確認した。

【 0 0 8 8 】

(実施例 8 : p A d E a s y 系を用いる複製コンピテント組換えアデノウイルス H Y P R - A d の生成)

実施例 8 は、低酸素条件下および / または H I F 活性化条件下で選択的に複製する条件付き減弱化アデノウイルスの生成を記載する。この生成は、外因性低酸素 / H I F 依存性プロモーター (最小 C M V プロモーターに連結された H R E) 下にあるアデノウイルス E 1 A 遺伝子を含む組換えアデノウイルスの構築による。

【 0 0 8 9 】

アデノウイルスは、分裂中の細胞および静止細胞の両方に感染する、D N A ウィルスである。感染した静止細胞が細胞周期に再び入ることが、ウイルス D N A の複製のために、そして最終的にはウイルスの子孫産生のために、必要である。E 1 A 遺伝子産物の発現は、これらのウイルス機能のために必須であり、E 1 A 遺伝子領域を欠くアデノウイルスは、複製欠損性である。アデノウイルス E 1 A 遺伝子は、構成的に活性なプロモーター領域から発現される最初の転写単位である。E 1 A 遺伝子の生成物は、広範囲の生物学的活性 (細胞転写およびウイルス転写の調節 (E 1 B 遺伝子転写の誘導を含む) および静止細胞における D N A 合成の誘導が挙げられる) を示す。しかし、E 1 A による細胞増殖制御の調節不全は、p 5 3 依存性機構および p 5 3 非依存性機構を介してアポトーシスを誘導し

10

20

30

40

50

、最終的には、ウイルスの子孫産生を妨害する。野生型アデノウイルス感染の間のアポトーシスの防止は、アデノウイルスE 1 B遺伝子生成物の発現により媒介される。E 1 B遺伝子は、2つのタンパク質(21Kおよび55K)をコードする。これらのタンパク質は、独立して、E 1 A誘導性アポトーシスを阻止するように機能する。E 1 B 21Kタンパク質は、Bcl-2ファミリーのアポトーシス調節因子と配列および機能が相同であり、E 1 A誘導性アポトーシスおよび他の多くのアポトーシス刺激をブロックする。E 1 B 21K機能を欠くアデノウイルスによる細胞感染は、多大な核DNAおよびウイルスDNAの分解の出現(deg表現型)および細胞変性効果(cyt表現型)の増強をもたらす。E 1 B 55Kは、アデノウイルスE 4-orf6遺伝子生成物と組み合わせて、ウイルス生成の間に2つの機能(p53と直接相互作用してp53を不活化すること;その後、ウイルス生成において、ほとんどの細胞mRNAの輸送を阻害しながらウイルス後期mRNAの輸送を促進すること)を有する。

【0090】

E 1 B 55K機能を欠くアデノウイルス(例えば、ONYX-015)は、p53の機能的状態とは無関係に多くのヒト細胞において効率的にウイルス子孫を産生可能である。しかし、これらの変異体ウイルスは、ヒト細胞株部分集合において、劇的に減少したウイルス収量を示す。この変異体表現型は、E 1 B 55Kの後期mRNA輸送機能が存在しないことから主に生じ、その変異体ウイルスが利用し得る補償的経路を有し得る細胞株もあると、現在考えられている。ウイルス子孫の産生の間でのE 1 B遺伝子生成物の重要な役割に基づいて、この遺伝子を含む、HYPR-Ad'sおよびAd-CMV-E 1を生成し得る。このことは、E 1欠失型アデノウイルスペクター中に、E 1 A遺伝子が外因性低酸素誘導性プロモーターにより調節されるアデノウイルスE 1ゲノム領域(E 1 A遺伝子、E 1 B遺伝子およびIX遺伝子)を含むDNAカセットを導入することにより、達成し得る(図6)。

【0091】

アデノウイルス5型のゲノムE 1領域のヌクレオチド501~4105(E 1 A遺伝子領域ならびにE 1 B転写単位およびIX転写単位を含む)を、d1309ウイルス(E 1遺伝子領域について野生型であるが、E 3遺伝子領域中に置換を有して実験室用に安全にされている。これは、Massachusetts General Hospital, Boston, MAのE. Harlow博士から得た)から抽出したDNAを使用して、Pfu Turbo DNAポリメラーゼ(Stratagene)により増幅した。得られた3.6kbの増幅DNA生成物を、最小CMVプロモーターに結合した6つのVEGF-HREを含む低酸素/HIF誘導性プロモーター(pBI-VEGF-6Rに由来する)の下流にクローニングした。その後、そのHRE-CMV-E 1カセットを、アデノウイルスシャトルベクター(pShuttle)中にサブクローニングした(図5)。組換え体を、カナマイシン耐性について選択し、組み換えを、複数の制限エンドヌクレアーゼ分析によって確認した。最終段階において、その組換えアデノウイルスプラスミドを、Pac Iで線状化して逆方向末端反復を露出させ、その後、リポフェクトアミン試薬(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)を使用して293パッケージング細胞株中にトランسفェクトした。得られたウイルス(HYPR-Ad1)を、標準的プロトコルを使用して収集し、下記のように特徴付けた。比較のために、本発明者らはまた、構成的に活性なCMVプロモーターによりE 1領域が調節されるアデノウイルス(Ad-CMV-E 1)を生成した。

【0092】

(実施例9:低酸素条件下および酸素正常状態条件下での、トランسفェクト細胞における組換えウイルス遺伝子生成物の発現)

E 1 Aウイルスタンパク質およびE 1 Bウイルスタンパク質は、293細胞ゲノムにおけるこれらの遺伝子の安定な組込みの結果として、ヒト293細胞において構成的に発現される。従って、293細胞は、これらのウイルスタンパク質の発現を確認するためには使用し得ない。組換えアデノウイルスからのこれらのタンパク質の発現を確認するために

、U251MG細胞およびLN-299細胞に、Ad-CMV-E1およびHYPR-Ad1を感染させた。タンパク質発現は、モノクローナル抗アデノウイルス5型E1A抗体、モノクローナル抗アデノウイルス5型E1B 55Kd抗体、およびモノクローナル抗アデノウイルス5型E1B 21Kd抗体を使用して、感染細胞のウェスタンブロッティングにより試験した。非感染細胞が、ネガティブコントロールの役割を果たした（図7A～図7B）。E1Aが、HYRP-Ad1において低酸素により活性化される。E1Aは、他のウイルスプロモーター（初期E1B遺伝子調節を含む）の発現を活性化することが公知である。このことは、低酸素下でのE1B遺伝子生成物の発現増加を説明する。後期E1B遺伝子調節は、他の因子に関与し、感染後2日目～3日目に酸素正常状態下でのE1B 21Kの発現増加を説明し得る。

10

【0093】

これらの実験は、組換えアデノウイルスは、E1A遺伝子生成物およびE1B遺伝子生成物を構成的に発現可能であった（Ad-CMV-E1）かまたは条件付きで発現可能であった（HYPR-Ad1）ことを実証する。このことは、一過性レポーター遺伝子アッセイにおいて観察される低酸素依存性調節が、アデノウイルスゲノムに関して維持されることを実証する。

【0094】

（実施例10：低酸素依存性様式での腫瘍細胞の細胞溶解）

HYPR-Ad1およびAd-CMV-E1がLN-229神経膠腫細胞株において細胞溶解を誘導する能力を、漸増体積のこの2種のウイルスの感染によって決定した（図8A～図8D）。一方の細胞セットを、酸素正常状態条件（20.8% O₂）下でインキュベートし、もう一方の細胞セットを、低酸素条件（1% O₂）下でインキュベートした。ネガティブコントロールとして、非感染LN229神経膠腫細胞を使用した。それらの細胞を、細胞変性効果（CPE）の証拠について毎日一回試験した。感染のために飽和未満のウイルス濃度を使用することにより、経時的にCPEの進行を追跡することが可能であった。これらの予備データは、6日間の酸素正常状態の後（示さない）または低酸素の後（図8A）、モック感染したLN-229細胞がコンフルエンスであることを示す。少数の細胞が集合し、白色ハロに囲まれた黒い点のように見える。これらの細胞には、分裂中のものもあり、単層から剥離するものもある。これは、この細胞株がコンフルエンスに至った後の代表的な挙動である。Ad-CMV-E1に感染した細胞（図8B）は、CPEの明らかな徵候を示し、多くの細胞が集合して单層から剥離する。HYPR-Ad1に感染して酸素正常状態下で維持された細胞の形態は、非感染細胞と類似しており、おそらく、集合した細胞がわずかに増加する（図8C）。対照的に、HYPR-Ad1に感染して低酸素下で維持された細胞はほとんど（図8D）、Ad-CMV-E1感染細胞と同様に細胞溶解した。HYPR-Ad1は、低酸素条件下でCPEを誘導するので、条件付き複製コンピテントであることを、これらの結果は示唆する。

20

【0095】

（実施例11：脳腫瘍への組換えウイルスの送達）

この節において記載される実験は、定位的技術によってヌードマウスに腫瘍細胞およびアデノウイルスを脳内注射することに關与する。9Lラット神経膠腫細胞（5×10⁴細胞、5μl体積）を、同系Fisher 344ラットの脳に定位移植した。11日間後、LacZを発現する複製欠損性アデノウイルス（1.8×10¹⁰粒子、24μl体積）を、腫瘍細胞注射と同じ定位座標を使用して、不活性コロイド状炭素粒子（0.5μl）とともに腫瘍中に同時注射した。このラットを、ウイルス注射の24時間後に屠殺し、脳を抽出し、連続切片化により分析した。その切片を処理して-gal発現を検出した。ウイルスによりコードされる酵素を発現する細胞が、青色領域において目に見える。黒色の粒は、針跡に沿って沈着したコロイド状炭素粒子である。この切片により、針跡に沿っている腫瘍細胞のうちの60%～80%が感染しており、LacZタンパク質を発現することが、明らかになった。結果については、図9を参照のこと。

40

【0096】

50

(実施例 12 : 低酸素誘導性アルカリホスファターゼ発現)

低酸素誘導性プロモーターの制御下にあるアルカリホスファターゼ遺伝子から構成されるプラスミド構築物を、LN229神経膠腫細胞中にトランスフェクトさせた。クローンを、48ウェルプレートの個々のウェル中に配置し、酸素正常状態条件または低酸素条件のいずれかに暴露した。低酸素条件下でアルカリホスファターゼ発現について陽性であるとアッセイされかつ酸素正常状態条件下でアルカリホスファターゼ発現について陰性であるとアッセイされたクローンを、保持してさらに試験した。酸素正常状態条件および低酸素条件の両方で陽性であると試験評価されたクローンは、廃棄した。

【0097】

(実施例 13 : 低酸素誘導性経路を調整する化合物の同定)

10

アルカリホスファターゼ遺伝子に作動可能に連結された低酸素 / HIF 応答性プロモーターを含む発現可能なプラスミド構築物で形質転換されたLN229神経膠腫細胞のクローンに由来する同数の細胞を、96ウェルマイクロタイープレートのウェルに添加する。細胞を、37度で一晩インキュベートして接着させる。そのマイクロタイープレートと、上記のレポーター構築物を含む細胞とを、望ましいO₂濃度（すなわち、低酸素濃度または酸素正常状態濃度）に同時に平衡化させるか、または低酸素 / HIF 応答性プロモーターにより駆動される遺伝子の転写を誘導することが既知である化合物で処理する。

【0098】

その後、アッセイ緩衝液中に希釈した適量の試験化合物を、各ウェルに配置する。初期スクリーニングの間に、各ウェルは、コントロールウェル（化合物を含まないかまたは不活性化合物を含むかのいずれかである）以外は異なる試験化合物を有する。選択した時間のあと、その反応物を、アルカリホスファターゼ活性についてアッセイする。アルカリホスファターゼ活性は、眼で、または分光光度計により、検出し得る。低酸素応答性遺伝子を誘導する条件下でアルカリホスファターゼの発現レベルを減少または増加させる化合物を、低酸素 / HIF 誘導性経路のモジュレーターとして分類する。

20

【0099】

初期スクリーニングアッセイにおいて陽性であると試験評価された化合物を、アルカリホスファターゼ活性の発現レベルの50%を阻害する化合物濃度（IC50）を決定するために試験化合物の濃度を変化させること以外は上記と同じアッセイを実施することにより、さらに試験する。これらのアッセイにおいて500μm未満のIC50を有する化合物が、好み。100μm未満のIC50を有する化合物が、より好み。10μm未満のIC50を有する化合物が、非常に好み。

30

【0100】

(実施例 14 : 低酸素応答性遺伝子の発現を調整する化合物のインピボ評価)

実験腫瘍を、アルカリホスファターゼ遺伝子に作動可能に連結された低酸素応答性プロモーターを含む発現可能なプラスミド構築物で形質転換されたLN229神経膠腫細胞のクローンに由来する細胞を配置することによって、免疫無防備状態のマウスにおいて増殖させる。腫瘍が特定サイズに達したときに、低酸素応答性遺伝子の誘導を調整することが示された化合物を、そのマウスに投与する。不活性化合物を、実験群の他のマウスにネガティブコントロールとして投与するか、またはネガティブコントロールとして、化合物を投与しない。

40

【0101】

所定の時間の後、その実験腫瘍をマウスから取り除く。これらの腫瘍の切片を、アルカリホスファターゼの発現についてアッセイする。コントロール腫瘍は、アルカリホスファターゼ発現の谷（pocket）を示すが、上記腫瘍中の細胞の大部分は、ここでアルカリホスファターゼ発現を示す。低酸素応答性遺伝子の発現を調整する化合物で処理した実験腫瘍における、コントロール腫瘍において観察されるよりも高い割合の細胞によるアルカリホスファターゼ発現は、その化合物が、腫瘍細胞に到達可能であり、かつ低酸素応答性遺伝子転写を刺激するようにインピボで活性であることを、確認する。しかし、コントロール腫瘍において観察されるよりも低い割合の細胞によるアルカリホスファターゼ発現

50

は、その化合物が、腫瘍細胞に到達可能であり、かつ低酸素応答性遺伝子転写を阻害するようにインビポで活性であることを、確認する。

【0102】

(実施例15：免疫無防備状態のマウスにおける異種移植神経膠腫細胞増殖の減少)
 LN229細胞を、nu/nuマウスの左脇腹に皮下移植した。平均腫瘍体積〔体積 = (長さ × 幅 2) / 2〕が 75 mm³ に達したとき(矢印)に、マウスを 3 つの群に分け、0.66 × 10⁸ p.f.u のアデノウイルス(HYPR-Ad1もしくはd1309)またはPBS(ビヒクル)を、毎日 1 回 5 日間注射した。この注射プロトコルの 49 日間後、(PBS 注射腫瘍のサイズが大きいので)マウスを屠殺し、腫瘍を得た。ビヒクルマウスのうちの一匹は、未知の原因によって注射プロトコル終了直後に死亡した。d1309マウスのうちの一匹は、眼の感染症に関連して過度に体重が減少したので、57 日目に屠殺した。本発明者らは、PBS を注射した LN229 腫瘍の増殖が、注射をしていないものと差がないことを見出した(データは示さない)。

【0103】

収集時点で、HYPR-Ad1 注射腫瘍(円形)の平均サイズは、PBS 注射腫瘍(四角形)の 5.3 分の 1 であった。d1309 注射腫瘍(菱形)は、PBS 注射腫瘍の 3.4 分の 1 であった。d13-9 注射腫瘍は、HYPR-Ad1 注射腫瘍の 6.4 分の 1 であった。

【図面の簡単な説明】

【0104】

【図1】図1は、組換えアデノウイルスによる腫瘍細胞の感染を示す。パネルの上に示される種々の細胞株は、LacZレポーターを含む組換えアデノウイルスに感染させられて、-Gal活性について染色された。さらなる説明および実験の詳細については、実施例1を参照のこと。

【図2】図2は、本発明の新規な組換えウイルスを構築するために使用されるプラスミドの概略図を示す。MCSとは、マルチクローニング部位を指す; TETとは、テトラサイクリン応答性エレメントを指す; HREとは、低酸素および/またはHIF応答性エレメントを指す; 1~6は、HREの直列(タンデム)コピーの数を指す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例4および5を参照のこと。

【図3A】図3A~図3Dは、トランسفェクトされた腫瘍細胞株における構築物の低酸素誘導性発現を示す。VEGF-3、VEGF-4、VEGF-5、VEGF-6またはEPO-3、EPO-4、EPO-5、EPO-6とは、上記構築物における直列(タンデム)反復の数を指す(5'方向についてはL、3'方向についてはR)。図3Aおよび図3Cは、構築物が低酸素に応答してルシフェラーゼを二方向発現する能力を示す;図3Bおよび図3Dは、構築物が低酸素に応答して-Galを二方向発現する能力を示す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例5を参照のこと。

【図3B】図3A~図3Dは、トランسفェクトされた腫瘍細胞株における構築物の低酸素誘導性発現を示す。VEGF-3、VEGF-4、VEGF-5、VEGF-6またはEPO-3、EPO-4、EPO-5、EPO-6とは、上記構築物における直列(タンデム)反復の数を指す(5'方向についてはL、3'方向についてはR)。図3Aおよび図3Cは、構築物が低酸素に応答してルシフェラーゼを二方向発現する能力を示す;図3Bおよび図3Dは、構築物が低酸素に応答して-Galを二方向発現する能力を示す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例5を参照のこと。

【図3C】図3A~図3Dは、トランسفェクトされた腫瘍細胞株における構築物の低酸素誘導性発現を示す。VEGF-3、VEGF-4、VEGF-5、VEGF-6またはEPO-3、EPO-4、EPO-5、EPO-6とは、上記構築物における直列(タンデム)反復の数を指す(5'方向についてはL、3'方向についてはR)。図3Aおよび図3Cは、構築物が低酸素に応答してルシフェラーゼを二方向発現する能力を示す;図3Bおよび図3Dは、構築物が低酸素に応答して-Galを二方向発現する能力を示す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例5を参照のこと。

10

20

30

40

50

【図3D】 図3A～図3Dは、トランスフェクトされた腫瘍細胞株における構築物の低酸素誘導性発現を示す。VEGF-3、VEGF-4、VEGF-5、VEGF-6またはEPO-3、EPO-4、EPO-5、EPO-6とは、上記構築物における直列(タンデム)反復の数を指す(5'方向についてはL、3'方向についてはR)。図3Aおよび図3Cは、構築物が低酸素に応答してルシフェラーゼを二方向発現する能力を示す；図3Bおよび図3Dは、構築物が低酸素に応答して-Ga1を二方向発現する能力を示す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例5を参照のこと。

【図4A】 図4A～Bは、可変酸素分圧の下でのトランスフェクトされた腫瘍細胞株における構築物の低酸素誘導性発現を示す。VEGF-3、VEGF-4、VEGF-5、VEGF-6またはEPO-3、EPO-4、EPO-5、EPO-6とは、上記構築物における直列(タンデム)反復の数を指す(Lは5'方向について、Rは3'方向について)。図4Aは、構築物が可変酸素分圧に応答してルシフェラーゼを二方向発現する能力を示す；図4Bは、構築物が可変酸素分圧に応答して-Ga1を二方向発現する能力を示す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例5を参照のこと。

【図4B】 図4A～Bは、可変酸素分圧の下でのトランスフェクトされた腫瘍細胞株における構築物の低酸素誘導性発現を示す。VEGF-3、VEGF-4、VEGF-5、VEGF-6またはEPO-3、EPO-4、EPO-5、EPO-6とは、上記構築物における直列(タンデム)反復の数を指す(Lは5'方向について、Rは3'方向について)。図4Aは、構築物が可変酸素分圧に応答してルシフェラーゼを二方向発現する能力を示す；図4Bは、構築物が可変酸素分圧に応答して-Ga1を二方向発現する能力を示す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例5を参照のこと。

【図5】 図5は、組換えウイルスの構築についての模式的な概略を示す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例6～8を参照のこと。

【図6】 図6は、pAdEasyアデノウイルスベクター中にE1遺伝子カセットをサブクローニングする概略図を示す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例6～8を参照のこと。

【図7】 図7A～図7Bは、トランスフェクトされた腫瘍細胞株(神経膠腫LN229)における組換えウイルス遺伝子産物の発現を、ウェスタンプロット分析によって示す。図7Aにおいて、Uninf.とは、非感染細胞株であり；d1309は、E1領域が野生型でありますE3領域に変異を有するアデノウイルスに感染した、細胞株であり；CMV-E1は、CMV最小プロモーターとE1遺伝子とを含む、構築物である。図7Bにおいて、Uとは、非感染細胞を指し；Hとは、低酸素条件を指し、Nとは、酸素正常状態条件を指す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例9を参照のこと。

【図8】 図8A～図8Dは、低酸素依存性様式での腫瘍細胞の細胞溶解を示す。図8Aは、低酸素下における非感染細胞であり、図8Bは、酸素正常状態条件下におけるAd-CMV-E1感染細胞であり、図8Cは、酸素正常状態条件下でのHYPR-Ad1であり、図8Dは、低酸素下におけるHYPR-Ad1である。さらなる説明および実験の詳細については、実施例10を参照のこと。

【図9】 図9は、脳腫瘍への組換えウイルスの送達を示す。移植されたラット神経膠腫細胞由来の神経膠腫切片が、LaCZ発現性複製欠損アデノウイルスに感染させられ、-ga1発現について染色される。さらなる説明および実験の詳細については、実施例11を参照のこと。

【図10】 図10A～図10Bは、レポーター遺伝子であるアルカリホスファターゼに作動可能に連結されたプロモーターに作動可能に連結された低酸素応答性エレメントを有する構築物で安定にトランスフェクトされたヒト神経膠腫細胞株に由来するクローンにおける、アルカリホスファターゼ酵素活性についてのアッセイからの結果を示す。図10Aは、酸素正常状態条件下に曝露された細胞を示し、図10Bは、低酸素条件下に曝露された細胞を示す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例12を参照のこと。

【図11A】 図11Aは、HYPR-Ad1で処理された免疫無防備状態マウスにおける神経膠腫細胞の平均腫瘍体積を示すグラフである。図11Bは、種々の処理に関する腫

10

20

30

40

50

瘍のサイズおよび重量を示す。示される結果は、H Y P R - A d 1が、感染した低酸素腫瘍細胞の細胞溶解を特異的に引き起こすことによって腫瘍増殖を低減させることを示唆する。さらなる説明および実験の詳細については、実施例15を参照のこと。

【図11B】 図11Aは、H Y P R - A d 1で処理された免疫無防備状態マウスにおける神経膠腫細胞の平均腫瘍体積を示すグラフである。図11Bは、種々の処理に関する腫瘍のサイズおよび重量を示す。示される結果は、H Y P R - A d 1が、感染した低酸素腫瘍細胞の細胞溶解を特異的に引き起こすことによって腫瘍増殖を低減させることを示唆する。さらなる説明および実験の詳細については、実施例15を参照のこと。

【図12】 図12Aおよび図12Bは、低酸素の発現を調整する化合物のインピボ評価を示す。さらなる説明および実験の詳細については、実施例14を参照のこと。

10

【図1】

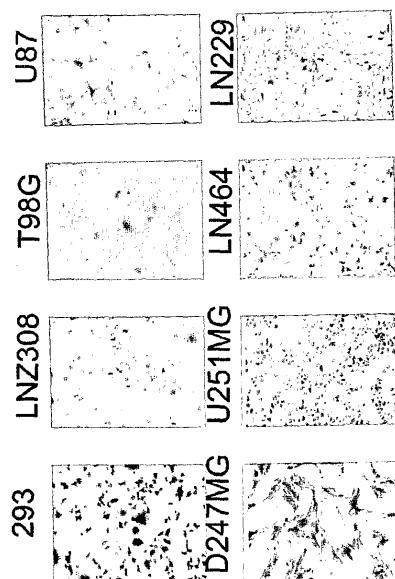


FIG. 1

【図2】

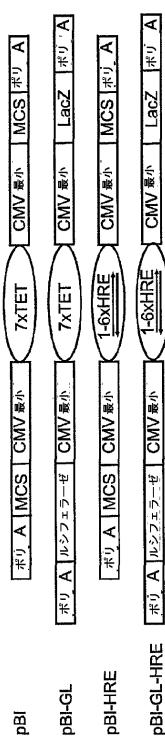


FIG. 2

【図 3 A】

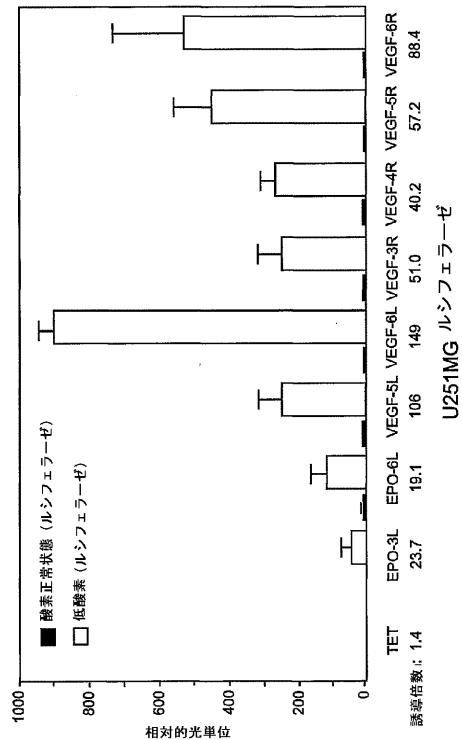


FIG. 3A

【図 3 B】

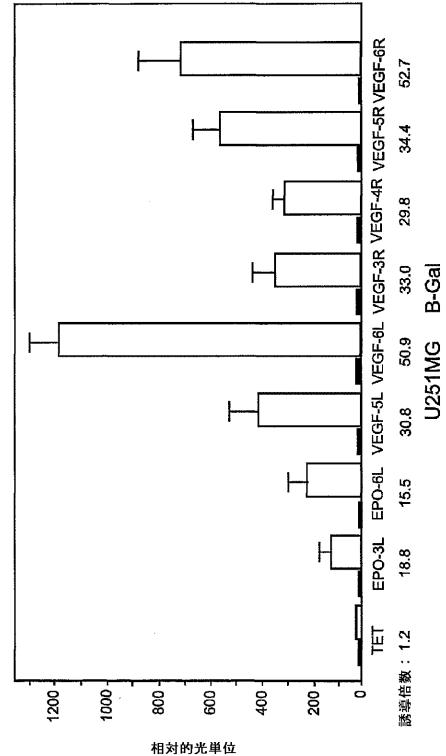


FIG. 3B

【図 3 C】

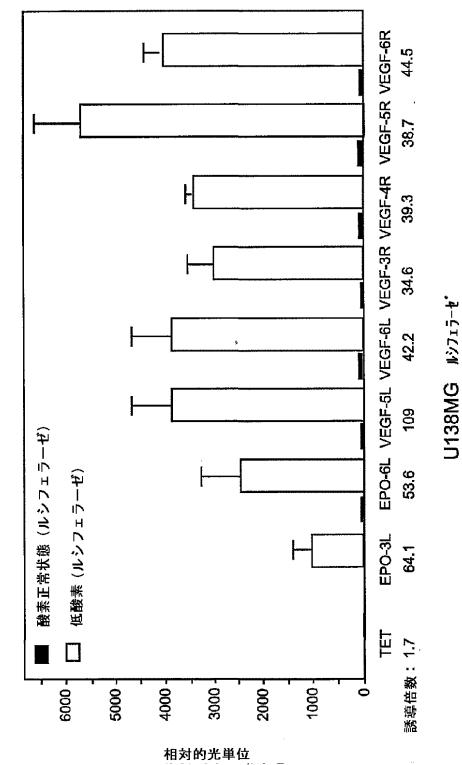


FIG. 3C

【図 3 D】

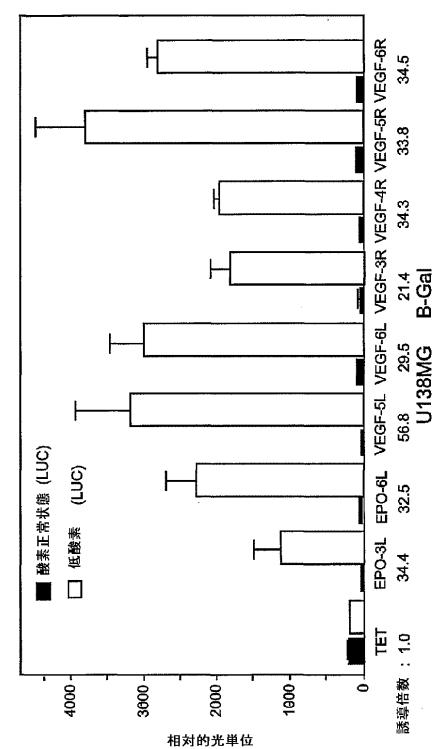


FIG. 3D

【図4A】

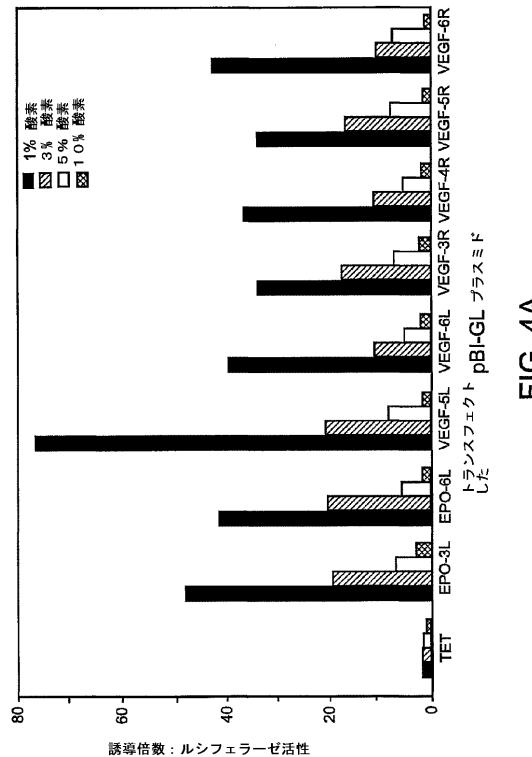


FIG. 4A

【図4B】

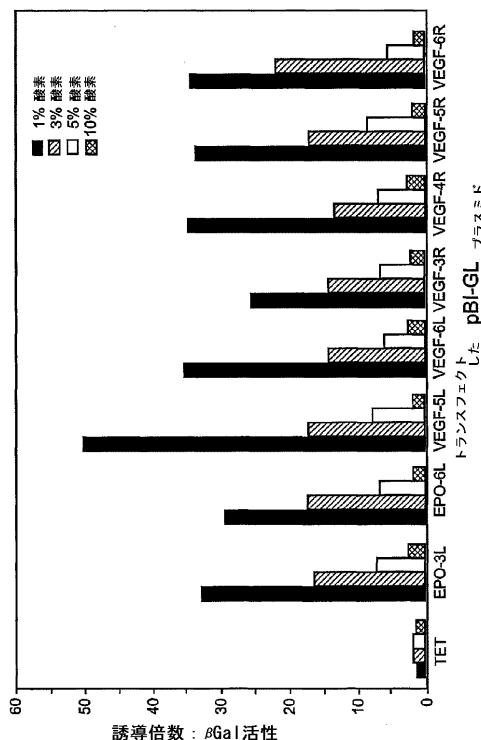


FIG. 4B

【図5】

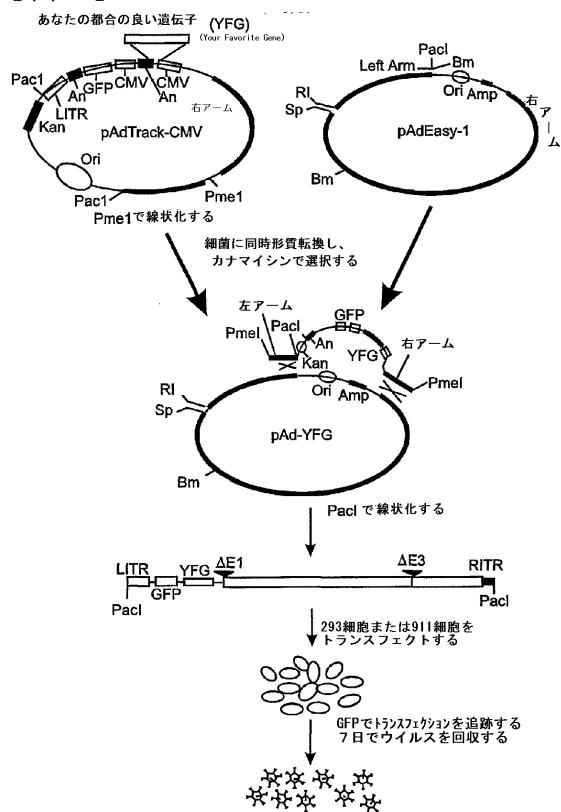


FIG. 5

【図6】

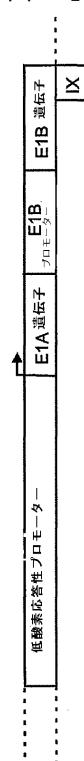


FIG. 6

【図7】

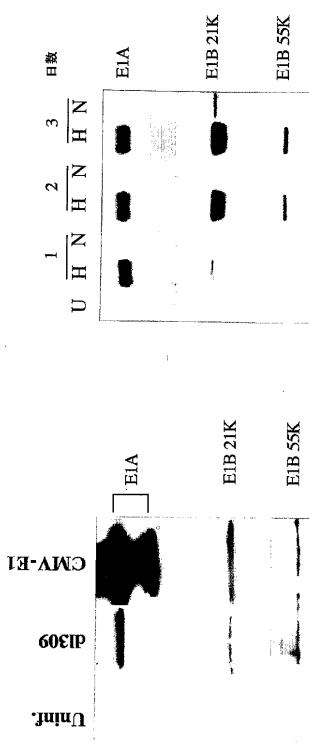
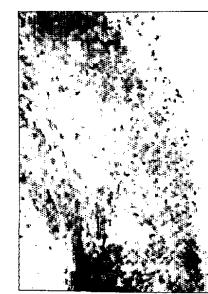


FIG. 7A FIG. 7B

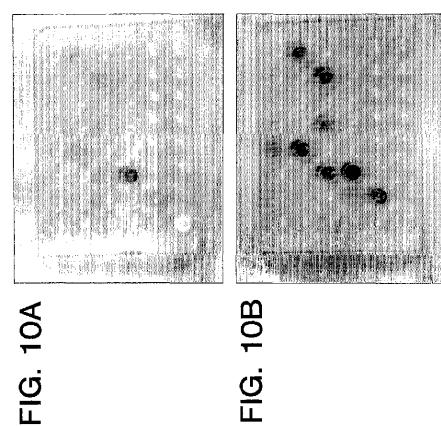
【図8】



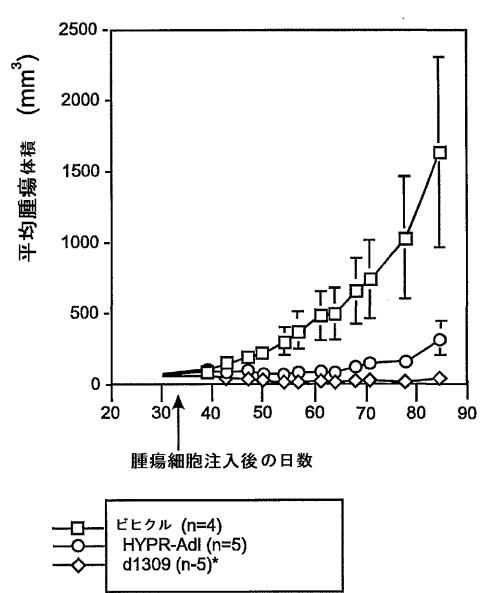
【図9】



【図10】



【図 11A】



【図 11B】

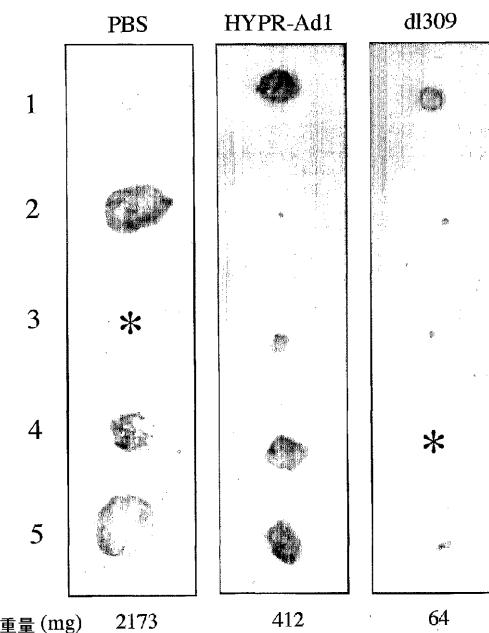
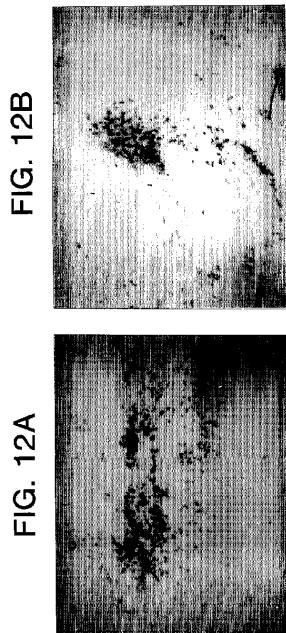


FIG. 11B

FIG. 11A

【図 12】



フロントページの続き

(72)発明者 ヴァン メイアー , アーウィン
アメリカ合衆国 ジョージア 30084 , タッカー , オークヴェイル ブレイス 2525
(72)発明者 ニコルソン , アインスレー シー .
アメリカ合衆国 ジョージア 30084 , タッcker , ジャスパー コート 6360
(72)発明者 ポスト , ドーン イー .
アメリカ合衆国 ジョージア 30096 , ドゥルース , ハンプトン アイヴス コート 3
127

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 国際公開第00/015820 (WO , A1)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97[9](2000 Apr.) p.4802-4807
Cancer Res., 60[8](2000 Apr.) p.2169-2177
Cancer Res., 60[6](2000 Mar.) p.1503-1506

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/09
C12N 5/10
C12N 7/00
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)