

(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2004-532213

(P2004-532213A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 33/24	A 6 1 K 33/24	4 B O 6 5
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 4
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	4 C O 8 6
// C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00 B	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 139 頁)		

(21) 出願番号	特願2002-578888 (P2002-578888)	(71) 出願人	503365763
(86) (22) 出願日	平成14年4月5日 (2002.4.5)		ザ ユニヴァーシティ オヴ シカゴ
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月6日 (2003.10.6)		アメリカ合衆国 イリノイ州 60637
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/010733		シカゴ サウス エリス アベニュー
(87) 国際公開番号	W02002/080849		5640
(87) 国際公開日	平成14年10月17日 (2002.10.17)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	60/282,040		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成13年4月6日 (2001.4.6)	(74) 代理人	100084009
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100114007
			弁理士 平山 孝二
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 EGR-1プロモーター活性の化学療法誘導

(57) 【要約】

本発明は、良性過剰増殖性疾患やがんを治療するための改善された治療法を提供する。放射線応答性であることが長く知られたEgr-1は、ここで、その多くがそれ自体治療に用いられているDNA損傷化学剤に誘導性であることがわかった。従って、本発明は、DNA損傷化学剤と、Egr-1プロモーター由来の治療的遺伝子を含む発現ベクターとの有利な組み合わせを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象のタンパク質を発現させる方法であって、

(a) 対象の前記タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、前記核酸セグメントが Egr-1 プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、

(b) 前記発現構築物を細胞へ移入するステップと、

(c) 前記細胞を少なくとも 1 種のフリーラジカル誘導 DNA 損傷化合物と接触させるステップと

を含み、これにより前記 DNA 損傷化合物が前記 Egr-1 プロモーターから対象の前記タンパク質の発現を誘導する、前記方法。 10

【請求項 2】

前記フリーラジカル誘導 DNA 損傷化合物がシスプラチン、ナイトロジェンマスタード、サイトキサン、シクロホスファミド、マイトマイシン c、アドリアマイシン、イホスファミド、ブレオマイシン、ドキソルビシン、プロカルバジン、アクチノマイシン、クロラムブシル、カルボプラチナム、プスルファン、bcnu、ccnu、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、エピルビシン、ダウノルビシン、カンプトテシン、及びミトキサントロンからなる群より選ばれる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記フリーラジカル誘導化合物がシスプラチンである、請求項 1 記載の方法。 20

【請求項 4】

ステップ (c) が、前記細胞を少なくとも第二フリーラジカル誘導 DNA 損傷化合物と接触させるステップを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞をがんの化学療法化合物又は電離放射線と接触させるステップを更に含んでいる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞ががん細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記がん細胞が肺がん細胞、前立腺がん細胞、卵巣がん細胞、精巣がん細胞、脳悪性腫瘍細胞、皮膚がん細胞、結腸がん細胞、胃がん細胞、食道がん細胞、気管がん細胞、頭頸部がん細胞、膵がん細胞、肝がん細胞、乳がん細胞、卵巣がん細胞、リンパがん細胞、白血病細胞、子宮がん細胞、又は膣がん細胞である、請求項 6 記載の方法。 30

【請求項 8】

前記発現ベクターが複製起点を更に含んでいる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

前記発現ベクターが選択可能マーカーを更に含んでいる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

前記発現ベクターが前記核酸セグメントに作用可能に結合したポリアデニル化シグナルを更に含んでいる、請求項 1 記載の方法。 40

【請求項 11】

前記発現ベクターがプラスミドである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

前記発現ベクターがウイルスベクターである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、又はヘルペスウイルスベクターである、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

前記ウイルスベクターが 1 つ以上のウイルス遺伝子を欠いており、これにより前記ウイル 50

スペクターを非複製にする、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 5】

対象の前記タンパク質が腫瘍サプレッサー、アポトーシスインデューサー、酵素、サイトカイン、又は毒素である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記腫瘍サプレッサーが Rb、p16、p53、PTEN、MDA7、BRCA1又はBRCA2である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 7】

前記アポトーシスインデューサーが Bax、Bad、Bik、AdE1B、Bim、Bcl-X_s、Bak、TRAIL、Harakiri又はBidである、請求項 1 5 記載の方法。

10

【請求項 1 8】

前記酵素がチミジンキナーゼ、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である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 9】

前記サイトカインがTNF-である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 0】

前記毒素がシュドモナスエキソトキシン、ジフテリア毒素、コレラ毒素、百日ぜき毒素Aサブユニット、エンテロトキシンA、又はリシンA鎖である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 2 1】

前記細胞が生物体内に位置している、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 2 2】

前記生物体がヒトである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

患者においてがんを治療する方法であって、

(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、前記核酸セグメントがEgr-1プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、

(b) 前記発現構築物をフリーラジカル誘導DNA損傷化合物と組合わせて該患者に投与するステップと

を含み、これにより前記DNA損傷化合物が前記Egr-1プロモーターから前記がん治療タンパク質の発現を誘導し、よって前記患者において前記がんを治療する、前記方法。

30

【請求項 2 4】

前記発現構築物が、前記患者の中に位置する腫瘍に局所的又は局部的に送達される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

前記発現構築物が全身的に送達される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 6】

前記発現構築物が腫瘍内注射によって又は腫瘍血管系へ直接注射することにより送達される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 7】

前記発現ベクターを投与する前に、前記DNA損傷化合物が投与される、請求項 2 3 記載の方法。

40

【請求項 2 8】

前記発現ベクターを投与した後に、前記DNA損傷化合物が投与される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 9】

前記発現ベクターと同時に前記DNA損傷化合物が投与される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 3 0】

前記発現ベクターが少なくとも2回投与される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 3 1】

50

前記DNA損傷化合物が少なくとも2回投与される、請求項23記載の方法。

【請求項32】

前記がん治療タンパク質が腫瘍サプレッサー、アポトーシスインデューサー、酵素、又は毒素である、請求項23記載の方法。

【請求項33】

患者において腫瘍細胞増殖を阻止する方法であって、

(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、該核酸セグメントがEgr-1プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、

(b) 前記発現構築物をフリーラジカル誘導DNA損傷化合物と組合わせて前記患者に投与するステップと

を含み、これにより前記DNA損傷化合物が前記Egr-1プロモーターから前記がん治療タンパク質の発現を誘導し、よって前記患者において腫瘍細胞増殖を阻止する、前記方法。

【請求項34】

該がん治療タンパク質がTNF-である、請求項33記載の方法。

【請求項35】

該フリーラジカル誘導DNA損傷化合物がシスプラチンである、請求項33記載の方法。

【請求項36】

患者において腫瘍細胞を死滅させる方法であって、

(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、該核酸セグメントがEgr-1プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、

(b) 前記発現構築物をフリーラジカル誘導DNA損傷化合物と組合わせて前記患者に投与するステップと

を含み、これにより前記DNA損傷化合物が前記Egr-1プロモーターから前記がん治療タンパク質の発現を誘導し、よって前記患者において腫瘍細胞を死滅させる、前記方法。

【請求項37】

患者において腫瘍細胞転移を阻止する方法であって、

(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、前記核酸セグメントがEgr-1プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、

(b) 前記発現構築物をフリーラジカル誘導DNA損傷化合物と組合わせて前記患者に投与するステップと

を含み、これにより前記DNA損傷化合物が前記Egr-1プロモーターから前記がん治療タンパク質の発現を誘導し、よって前記患者において腫瘍細胞転移を阻止する、前記方法。

【請求項38】

患者において腫瘍の負担を軽減させる方法であって、

(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、前記核酸セグメントがEgr-1プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、

(b) 前記発現構築物をフリーラジカル誘導DNA損傷化合物と組合わせて該患者に投与するステップと

を含み、これにより前記DNA損傷化合物が前記Egr-1プロモーターから前記がん治療タンパク質の発現を誘導し、よって前記患者において腫瘍の負担を軽減させる、前記方法。

【請求項39】

手術不可能な腫瘍を手術可能にする方法であって、

(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、前記核酸セグメントがEgr-1プロモーターの制御下に位置しているステップと、

(b) 前記発現構築物をフリーラジカル誘導DNA損傷化合物と組合わせて前記患者に投

10

20

30

40

50

与するステップと

を含み、これにより前記DNA損傷化合物が前記Egr-1プロモーターから前記がん治療タンパク質の発現を誘導し、前記腫瘍の大きさ又は形を小さくするとともに切除可能にする、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

本出願は、2001年4月6日出願の同時係属米国特許出願第60/282,040号の優先権を主張する。特に、上記で引用した開示の全文は放棄せずに本願明細書に含まれるものとする。

1. 発明の分野

本発明は、一般的には、分子生物学やがん治療の分野に関する。更に詳細には、Egr-1プロモーターの発現を誘導するDNA損傷化学剤の使用に関する。これにより治療遺伝子の組織特異的発現が可能になり、DNA損傷化学剤と合わせてがん罹っている患者を治療する。

2. 関連技術の説明

放射線治療や化学療法を含むある種のがん治療法には、がん細胞のDNAを損傷させることが必要である。正常DNA損傷に対する細胞応答には、DNA修復、細胞周期抑制及び致死性の活性化が含まれる(Hall, 1988)。例えば、DNA二本鎖切断の誘導により、欠失、二動原体、環、後期架橋を含む致死染色体異常が生じる(Hall, 1994)。

がんを治療する他の方法は、遺伝子治療である。これには、遺伝子の発現に適した条件下で、外来遺伝子をがん細胞へ移入すること、しばしば腫瘍サプレッサー又はアポトーシスインドューサーが必要である。発現するとすぐに、遺伝子産物は、腫瘍細胞の増殖を遅くし、転移の可能性を阻害し、或いは完全に死滅させることにより、腫瘍細胞に対して有益な作用を与える。

1つ以上のこれらの方法を組み合わせることは、多くの腫瘍における異質性によって一治療が組み合わせよりはるかに効果的でなくなるので強力な手段である。しかしながら、放射線治療、化学療法、遺伝子治療はすべて毒性作用の可能性がある。従って、例えば、投与される放射線/薬剤/ベクター量を減少させることにより、毒性を減少させることは非常に有利である。

【0002】

例えば、抗腫瘍特性を有する腫瘍壊死因子-(TNF-)は、第1相試験におけるがんの遺伝子治療の全身系治療として研究されてきたが、毒性がこのサイトカインの治療指数を制限している(Spriggs et al., 1988; Demetri et al., 1989)。また、全身系TNF-と化学療法の組み合わせが若干の臨床試験において限られた成功で研究されている(Nakamoto et al., 2000)。

一方、シスプラチンや他の白金類似体のような化学療法剤は、頭頸部のがん、食道がん、肺がん、精巣がん、卵巣がん、膀胱がんを含むいくつかのがんの治療に現在用いられている。更に、シスプラチンは、放射線増感剤としての照射(IR)と同時に用いられる。シスプラチンの相対効力にもかかわらず、腫瘍耐性が治療的がん化学療法におけるシスプラチンの役割を制限している(Johnson & Stevenson, 2001)。腫瘍由来のシスプラチン耐性メカニズムには、腫瘍細胞におけるシスプラチン付加物のDNA修復の増加、フリーラジカルの形成、続いてDNA損傷を阻害するグルタチオンの増加、耐性細胞によるシスプラチン取込みの相対減少が含まれる(Kartalou & Essigmann, 2001)。シスプラチンと他の化学療法剤の組み合わせ、特に5-FUとVP-16は、いくつかのヒト腫瘍において両薬剤の治療指数を高めた(Kucuk et al., 2000)が、シスプラチンの効力を高める他のストラテジーが求められている。

従って、当該技術において遺伝子治療と化学療法の治療法の双方を改善することが求められている。異なる治療法の利点を組み合わせると同時に付随する副作用を減少させる治療が求められている。

【0003】

発明の要約

本発明は、当該技術における欠点を克服し、遺伝子治療と化学療法の治療の効用を高める方法を提供する。治療遺伝子をコードする誘導性発現ベクターが化学療法剤によって誘導される転写ターゲティングストラテジーが開発された。化学療法剤は、特に発現ベクターの誘導性プロモーターを標的にして標的治療を与える。提供される治療法は、腫瘍を標的にするのに特に有効である。

それ故、本発明によれば、対象のタンパク質を発現させる方法であって、(a) 対象の該タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、該核酸セグメントが E g r -1プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、(b) 該発現構築物を細胞に移入するステップと、(c) 該細胞を少なくとも1種のフリーラジカル誘導DNA損傷化合物と接触させるステップとを含み、これにより該DNA損傷化合物が E g r -1プロモーターから対象の該タンパク質の発現を誘導する、前記方法が提供される。

フリーラジカル誘導DNA損傷化合物は、シスプラチン、ナイトロジェンマスタード、サイトキサン、シクロホスファミド、マイトマイシンc、アドリアマイシン、イホスファミド、プレオマイシン、ドキソルピシン、プロカルバジン、アクチノマイシン、クロラムブシル、カルボプラチナム、ブスルファン、b c n u、c c n u、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、エピルピシン、ダウノルピシン、カンプトテシン又はミトキサントロンのような白金化合物であってもよい。ステップ(c)は、細胞を少なくとも第二フリーラジカル誘導DNA損傷化合物と接触させるステップを含んでもよい。本方法は、細胞をがん化学療法化合物又は電離放射線と接触させるステップを更に含んでもよい。細胞は、がん細胞、例えば、肺がん細胞、前立腺がん細胞、卵巣がん細胞、精巣がん細胞、脳悪性腫瘍細胞、皮膚がん細胞、結腸がん細胞、胃がん細胞、食道がん細胞、気管がん細胞、頭頸部がん細胞、脾がん細胞、肝がん細胞、乳がん細胞、卵巣がん細胞、リンパがん細胞、白血球細胞、子宮がん細胞、又は膣がん細胞であってもよい。

発現ベクターは、複製起点、選択可能マーカー、又は核酸セグメントに作用可能に結合したポリアデニル化シグナルを更に含むことができる。発現ベクターは、プラスミド又はウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、又はヘルペスウイルスベクターであってもよい。ウイルスベクターは、1つ以上のウイルス遺伝子を欠いてもよいので、ウイルスベクターを非複製にする。細胞は、生物、例えば、ヒトに位置することができる。

【0004】

対象のタンパク質は、腫瘍サプレッサー、アポトーシスインデューサー、酵素、毒素、サイトカイン、又は抗腫瘍活性を有する他のタンパク質であってもよい。腫瘍サプレッサーの例は、R b、p16、p53、P T E N、M D A 7又はB R C A 1又はB R C A 2である。アポトーシスインデューサーの例は、B a x、B a d、B i k、A d E 1 B、B i m、B c l - X s、B a k、T R A I L、H a r a k i r i又はB i dである。酵素の例は、チミジン、キナーゼ、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である。毒素の例は、シュドモナスエキソトキシン、ジフテリア毒素、コレラ毒素、百日ぜき毒素Aサブユニット、エンテロトキシンA、又はリシンA鎖である。抗腫瘍活性を有する他の分子としては、インターロイキン(IL)やサイトカインが含まれ、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、 γ -インターフェロン、アンギオスタチン、トロンプスポンジン、エンドスタチン、M E T H -1、M E T H -2、G M - C S F、G - C S F、M - C S F又は腫瘍壊死因子(T N F)、例えば、T N F - α やT N F - β によって例示される。当業者は、本発明が抗腫瘍作用を有する限り上で開示されたような対象の具体的なタンパク質によって制限されないことを認識する。

他の実施態様においては、本発明は、患者においてがんを治療する方法であって、(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステッ

10

20

30

40

50

ブであって、該核酸セグメントが Egr-1プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、(b) 該発現構築物をフリーラジカル誘導 DNA 損傷化合物と組合わせて該患者に投与するステップとを含み、これにより DNA 損傷化合物が該 Egr-1プロモーターから該がん治療タンパク質の発現を誘導し、よって該患者において該がんを治療する、前記方法を提供する。発現構築物は、患者に位置する腫瘍の局部に又は局所的に送達することができ、全身的に送達することもでき、腫瘍内注射によって又は腫瘍血管系へ直接注射することにより送達することもできる。

DNA 損傷化合物は、発現ベクターを投与する前に、発現ベクターを投与した後に、又は発現ベクターと同時に投与することができる。発現ベクター及び/又は DNA 損傷剤は、少なくとも 2 回投与することができる。がん治療タンパク質は、腫瘍サプレッサー、アポトーシスインデューサー、酵素、毒素、サイトカイン、又は抗腫瘍活性を有するタンパク質であってもよい。

10

【0005】

他の実施態様においては、更に、患者において腫瘍細胞増殖を阻止する方法であって、(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、該核酸セグメントが Egr-1プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、(b) 該発現構築物を該患者にフリーラジカル誘導 DNA 損傷化合物と組合わせて投与するステップとを含み、これにより該 DNA 損傷化合物が該 Egr-1プロモーターから該がん治療タンパク質の発現を誘導し、よって該患者において腫瘍細胞増殖を阻止する、前記方法が提供される。そのような一実施態様においては、がん治療タンパク質は TNF- α である。そのような他の実施態様においては、フリーラジカル誘導 DNA 損傷化合物はシスプラチンである。

20

他の実施態様においては、更に、患者において腫瘍細胞を死滅させる方法であって、(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、該核酸セグメントが Egr-1プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、(b) 該発現構築物を該患者にフリーラジカル誘導 DNA 損傷化合物と組合わせて投与するステップとを含み、これにより該 DNA 損傷化合物が該 Egr-1プロモーターから該がん治療タンパク質の発現を誘導し、よって該患者において腫瘍細胞を死滅させる、前記方法が提供される。

他の実施態様においては、更に、患者において腫瘍細胞転移を阻止する方法であって、(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、該核酸セグメントが Egr-1プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、(b) 該発現構築物を該患者にフリーラジカル誘導 DNA 損傷化合物と組合わせて投与するステップとを含み、これにより該 DNA 損傷化合物が該 Egr-1プロモーターから該がん治療タンパク質の発現を誘導し、よって該患者において腫瘍細胞転移を阻止する、前記方法が提供される。

30

【0006】

他の実施態様においては、更に、患者において腫瘍の負担を軽減させる方法であって、(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、該核酸セグメントが Egr-1プロモーターの制御下に位置している、前記ステップと、(b) 該発現構築物を該患者にフリーラジカル誘導 DNA 損傷化合物と組合わせて投与するステップとを含み、これにより該 DNA 損傷化合物が該 Egr-1プロモーターから該がん治療タンパク質の発現を誘導し、よって該患者において腫瘍の負担を軽減させる、前記方法が提供される。

40

他の実施態様においては、更に、手術不可能な腫瘍を手術可能にする方法であって、(a) がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備するステップであって、該核酸セグメントが Egr-1プロモーターの制御下に位置しているステップと、(b) 該発現構築物を該患者にフリーラジカル誘導 DNA 損傷化合物と組合わせて投与するステップとを含み、これにより該 DNA 損傷化合物が該 Egr-1プロモーターから該がん治療タンパク質の発現を誘導し、よって該腫瘍の大きさ又は形を小さくするとともに切

50

除可能にする、前記方法が提供される。

本明細書に用いられる“名詞”は、1以上を意味するものである。特許請求の範囲に用いられる“含む”という言葉とともに用いられる場合、“名詞”の言葉は1つ又は1つを超えることを意味するものである。本明細書中に用いられる“他の”は、少なくとも2つ目以上を意味するものである。

本発明の他の目的、特徴及び利点は、次の詳細な説明から明らかになる。しかしながら、詳細な説明と個々の実施例は、本発明の好適実施態様を示すものであるが、本発明の真意と範囲内の種々の変更や修正がこの詳細な説明から当業者に明らかになるので、例示によってのみ示されるものであることは理解すべきである。

下記図面は本明細書の一部をなし、本発明のある種の態様を更に示すように含まれる。本明細書に示される個々の実施態様の詳細な説明と組合わせてこれらの図面の1つ以上によって本発明をより良く理解することができる。

【0007】

例示的实施態様の説明

本発明は、放射線応答要素を含むことが長く知られたEgr-1プロモーターがDNA損傷化学剤によって誘導することができる本発明者らの所見から一部生じている。この驚くべき所見は、腫瘍壊死因子(TNF)のような抗腫瘍剤をコードしているEgr-1プロモーターを含む発現構築物をDNA損傷化学剤とともに用いて、がんのような過剰増殖性疾患の以前には試みられていない併用治療を与える。

がん細胞においてDNA損傷剤と治療遺伝子の誘導発現の併用治療の効果によって、いずれの物質の単独の使用より優れた結果が得られ、各物質の用量が少量であることが可能になる。投与される放射線及び/又は薬剤及び/又はベクターの量を減少させることにより、全身的毒性を減少させることができることは非常に有利である。次の開示は、上記実施態様の詳細な説明と、その態様を示すものである。

転写ターゲティングストラテジーは、抗腫瘍作用をもつ遺伝子をコードしている誘導性発現ベクターとともに化学療法剤が腫瘍を効果的に治療するために用いることができ、該ベクターが該化学療法剤によって誘導されることにより得られる。従って、誘導性Egr-1プロモーターを含み抗腫瘍遺伝子をコードしている発現構築物はEgr-1プロモーターを誘導し活性化し得る化学療法剤とともに、DNA損傷又はROI産生により得られる。

選択的腫瘍ターゲティングベクターにおいては、化学療法剤によって誘導できる抗腫瘍遺伝子を発現させる遺伝子構築物は、化学療法剤と抗腫瘍物質の効果を増強する。化学療法剤と抗腫瘍遺伝子共に、一般的には、異なる腫瘍細胞死滅メカニズムを有するので、一方の物質に対して抵抗する細胞はもう一方に対して感受性であるものである。また、そのような組み合わせは化学放射線併用治療又は他の補助剤がん治療の局所作用を増強することができることも企図される。

【0008】

A. Egr-1プロモーター

Egr-1プロモーターは、作用可能に結合した下流配列のDNA損傷剤誘導転写を制御するのに必要な5'調節配列として定義される。Egr-1プロモーターは、放射線やH₂O₂誘導遺伝子発現に関連して以前に分析された複雑な構造を有する。複数のETS結合部位(ETSは転写調節タンパク質である)を含み、その3つは2つの血清応答要素(SRE)、SREIとSREIIの一部として存在する。CARGモチーフとして知られるSREは、多くの増殖因子応答遺伝子の発現を調節するシス要素である。全部で6つのSREがあり、各々CC(A+Tリッチ)6GGコンセンサス配列を含んでいる。

本発明者らは、TNF- α cDNAに結合した5' Egr-1CARG要素からなるキメラ遺伝子構築物がこの構築物を導入した細胞をIRに曝した後に高レベルの腫瘍内TNF- α を発現させることを以前に証明した。キメラEgr-TNF構築物を導入するとともにIRで処理した腫瘍は、いずれの物質単独で処理した腫瘍と比較して退縮/治癒が高められ、IRによるTNF- α 産生の腫瘍内誘導と、腫瘍細胞と腫瘍血管系に対するTNF- α とIRの細胞毒性相互作用によるとと思われる(Weichselbaum et al., 2001; Staba et al., 1998)。本

発明においては、本発明者らは、Egr-1プロモーターのDNA損傷/ROI誘導性CARG要素の制御下にTNF- α を誘導するために、細胞内ラジカル酸素形成を変化させるとともにDNAを損傷させるシスプラチン、一般に用いられる化学療法剤を用いた。それ故、本発明は、DNA損傷を引き起こし及び/又はROIを産生してEgr-1を誘導し、よって発現ベクター中Egr-1の制御下に遺伝子を発現させるための物質の使用を提供する。

【0009】

B. DNA損傷化学剤

“DNA損傷化学剤”という用語は、DNA分子に損傷を直接又は間接に誘導する薬剤を意味する。本発明においてはフリーラジカルを生成する薬剤が特に興味深い。次の部類の化学剤が1以上の経路によってDNA損傷を与えられとされる。

I. アルキル化剤

アルキル化剤は、がん細胞が増殖することを防止するためにゲノムDNAと直接相互作用する薬剤である。この部類の化学療法剤は、細胞周期のすべの相に影響する物質である。即ち、相特異的ではない。アルキル化剤は、例えば、慢性白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、多発性骨髄腫、乳がん、肺がん、卵巣がんの具体的ながんを治療するためのものであり得る。アルキル化剤は、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン、メチルメラミン、アルキルスルホネート、ニトロソウレア又はトリアジンを含めることができるがこれらに限定されない。

ブスルファン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド(シトキサン)、ダカルバジン、イフォスファミド、メクロールエタミン(マスタージェン)、メルファランが含まれるがこれらに限定されない。個々の態様においては、トログリタザオンは、これらのアルキル化剤の1種以上と合わせてがんを治療するために使用し得る。その一部を次に述べる。

i. ナイトロジェンマスタード

ナイトロジェンマスタードは、ホジキン病や非ホジキンリンパ腫に用いられるメクロールエタミン(HN_2)；急性又は慢性リンパ球性白血病、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳がん、卵巣がん、肺がん、ウィルムス腫瘍、頸部精巣がん、軟組織肉腫のようながんを治療するのに用いられるシクロホスファミド及び/又はイフォスファミド；多発性骨髄腫、乳がん、卵巣がんのようながんを治療するために用いられるメルファラン(L-サルコリシン)；慢性リンパ管性(リンパ球性)白血病、悪性リンパ腫、例えば、リンパ肉腫、巨大濾胞性リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫のような疾患を治療するために用いられてきたクロラムブシルであってもよいが、これらに限定されない。

【0010】

a. クロラムブシル

クロラムブシル(ロイケランとしても知られる)は、選択されたヒト新生物性疾患に対する活性がわかったナイトロジェンマスタード型の二官能性アルキル化剤である。クロラムブシルは、化学的に4-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]ベンゼンブタン酸として知られる。クロラムブシルは、経口投与用錠剤形で入手できる。胃腸管から急速かつ完全に吸収される。例えば、約0.6 mg/kg～約1.2 mg/kgを1回経口投与した後、1時間以内にピーク血漿クロラムブシルレベルに達し、親薬剤の最終半減期は約1.5時間である。約0.1 mg/kg/日～約0.2 mg/kg/日又は約3 mg/m²/日～約6 mg/m²/日或いは約0.4 mg/kgが抗新生物性治療に用いることができる。クロラムブシルは、それ自体では治癒しないが臨床的に有効な軽減を生じることができる。

b. シクロホスファミド

シクロホスファミドは、2H-1,3,2-オキサザホスホリン-2-アミン、N,N-ビス(2-クロロエチル)テトラヒドロ-、2-オキシド、1水和物であり、CytosanとしてMead Johnsonから入手でき、NeosarとしてAdriaから入手できる。シクロホスファミドは、3-アミノ-1-プロパノールとN,N-ビス(2-クロロエチル)ホスホルアミドジクロリド[(ClCH_2CH_2)₂NPOCl₂]とをジオキサン溶液中トリエチルアミンの触媒影響下に縮合することにより調

10

20

30

40

50

製される。縮合は2段であり、ヒドロキシル基とアミノ基双方を含むので、環化が行われる。

他の -クロロエチルアミノアルキル化剤と異なり、肝酵素によって活性化されるまで活性なエチレンイモニウム形に容易に環化しない。従って、この物質は胃腸管内で安定であり、経口経路と非経口経路によって十分かつ効果的に許容され、局所発疹、壊死、静脈炎又は疼痛までも引き起こさない。

成人に適した経口用量としては、例えば、胃腸の許容量によっては約1 mg/kg/日～約5 mg/kg/日(通常は組合わせて)；又は約1 mg/kg/日～約2 mg/kg/日が含まれ；静脈内用量は、例えば、はじめに約2日～約5日間分割用量で約40 mg/kg～約50 mg/kg又は約7日毎に約10 mg/kg～約15 mg/kg又は1週間に2回約3 mg/kg～約5 mg/kg又は約1.5 mg/kg/日～約3 mg/kg/日が含まれる。ある態様においては、抗新生物剤として約250 mg/kg/日の用量を投与することができる。胃腸作用が相反することから、静脈内経路が負荷に好ましい。維持中、約3000/mm³～4000/mm³の白血球数が通常は望ましい。薬剤は、筋肉内に、浸潤によって又は体腔へしばしば投与される。約100 mg、約200 mg、約500 mgの注射用、約25mgと約50 mgの錠剤用の投薬剤形で利用できる。

10

【0011】

c. メルファラン

アルケラン、L-フェニルアラニンマスタード、フェニルアラニンマスタード、L-PAM、又はL-サルコリシンとしても知られるメルファランは、ナイトロジェンマスタードのフェニルアラニン誘導体である。メルファランは、選択的ヒト新生物性疾患に対して活性な二官能性アルキル化剤である。化学的には4-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]-L-フェニルアラニンとして知られる。

20

メルファランはその化合物の活性なL-異性体であり、1953年にBergel & Stockにより最初に合成された。メドファランとして知られるD-異性体は、ある種の動物腫瘍に対して活性が低く、染色体に対する作用を生じるのに必要とされる用量は、L-異性体で必要とされる量より大きい。ラセミ(DL-)体はメルファラン又はサルコリシンとして知られる。メルファランは水に不溶であり、pK_{a1}は約2.1である。メルファランは、経口投与に錠剤形で入手でき、多発性骨髄腫を治療するために用いられている。有効な証拠から、多発性骨髄腫をもつ患者の約1/3～1/2が薬剤の経口投与に対して好ましい応答を示すことが明らかである。

30

メルファランは、上皮性卵巣がんの治療に用いられている。卵巣がんの治療に一般に用いられている一用法は、1回の治療単位として5日間1日約0.2 mg/kgの用量でメルファランを投与している。血液学的許容量によっては4～5週間毎に治療単位が繰り返される(Smith & Rutledge, 1975; Young et al., 1978)。また、ある種の実施態様においては、用いられるメルファランの用量は、約0.05 mg/kg/日ほど又は約3 mg/kg/日以上ほどであり得る。

【0012】

ii. エチレニメンとメチルメラミン

エチレニメン及び/又はメチルメラミンには、卵巣がんを治療するために用いられるヘキサメチルメラミンと、膀胱がん、乳がん、卵巣がんを治療するために用いられているチオテーパが含まれるがこれらに限定されない。

40

iii. アルキルスルホネート

アルキルスルホネートには、慢性顆粒球白血病を治療するために用いられているブスルファンのような薬剤が含まれるがこれに限定されない。ブスルファン(ミレランとしても知られる)は、二官能性アルキル化剤である。ブスルファンは、1,4-ブタンジオールジメタンスルホネートとして知られる。ブスルファンは、経口投与用錠剤形で入手でき、例えば、それぞれの切り込み付き錠剤は約2 mgのブスルファンと不活性成分のステアリン酸マグネシウムと塩化ナトリウムを含有している。

ブスルファンは、慢性骨髄性(骨髄性、骨髄球性、顆粒球性)白血病の対症療法に必要である。治癒的ではないが、ブスルファンは全顆粒球質量を減少させ、疾患の症状を改善し、

50

患者の臨床状態を改善する。慢性骨髄性白血病が以前に治療されていない成人の約90%が、ブスルファンの使用後に臓器巨大の退行又は安定化による血液学的寛解傾向を得る。ブスルファンは、ヘモグロビンレベルの生存時間と維持については脾臓照射より優れ、脾腫制御の照射と同等であることがわかった。

【0013】

iv. ニトロソウレア

アルキル化剤のようなニトロソウレアは、DNA修復タンパク質を阻害する。脳腫瘍のほか非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、悪性メラノーマを治療するのに用いられる。ニトロソウレアとしては、カルムスチン(BCNU)、ロムスチン(CCNU)、セムスチン(メチル-CCNU)又はストレプトゾシンが含まれるがこれらに限定されない。セムスチンは、原発性脳腫瘍、胃がん又は結腸がんのようながん用いられている。ストレプトゾシンは、悪性脾臓細胞腫又は悪性カルチノイドのような疾患を治療するのに用いられている。ストレプトゾシンは、悪性メラノーマ、ホジキン病、軟組織肉腫のようながんを治療するために用いられている。

10

a. カルムスチン

カルムスチン(滅菌カルムスチン)は、ある種の新生物性疾患の治療に用いられるニトロソウレアの1種である。1,3-ビス(2-クロロエチル)-1-ニトロソウレアである。薄黄色フレーク状物を凍結乾燥するか分子量が214.06の物質を凍結させる。アルコールや脂質に非常に可溶性であり、水に難溶性である。カルムスチンは、推奨されるように再構成した後に静脈内注射により投与される。

20

カルムスチンはDNAやRNAをアルキル化することが一般的に承知されているが、他のアルキル化剤と交差抵抗しない。他のニトロソウレアとのように、タンパク質中のアミノ酸のカルバモイル化によっていくつかの鍵となる酵素過程を阻害することができる。

カルムスチンは、単一物質としての対症療法として又は他の承認された化学療法剤との確立された併用治療においてグリア芽細胞腫、脳幹神経膠腫、髄芽腫、星状細胞腫、上皮細胞腫、転移脳腫瘍のような脳腫瘍において必要である。また、多発性骨髄腫を治療するためにプレドニゾンと組合わせて用いられている。カルムスチンは、多発性骨髄腫又は悪性骨髄腫のようながんを治療するのに用いられている。カルムスチンは、ホジキン病や非ホジキンリンパ腫の治療に、一次治療で治療したが再発した患者、又は一次治療に应答しない患者に他の承認された薬剤と組合わせて二次治療として有効である。

30

滅菌カルムスチンは、一般に凍結乾燥物質の100 mgの1回投与のバイアルとして用いられる。以前に治療されていない患者での単一薬剤としてカルムスチンの推奨された用量は、約150 mg/m² ~ 約200 mg/m² 静脈内に6週毎である。これは、1回として投与することができる、2日連続して約75 mg/m² ~ 約100 mg/m² のように毎日の注射に分けることもできる。カルムスチンが他の骨髄抑制剤と組合わせて又は骨髄予備が減損した患者に用いられる場合、用量は適切に調整しなければならない。初回に続く用量は、前の用量に対する患者の血液学的応答に従って調整しなければならない。他の用量、例えば、約10 mg/m²、約20 mg/m²、約30 mg/m²、約40 mg/m²、約50 mg/m²、約60 mg/m²、約70 mg/m²、約80 mg/m²、約90 mg/m² ~ 約100 mg/m² を本発明に用いることができることが理解されることは当然のことである。

40

【0014】

b. ロムスチン

ロムスチンは、ある種の新生物性疾患の治療に用いられるニトロソウレアの1種である。1-(2-クロロエチル)-3-シクロヘキシル-1ニトロソウレアである。実験式がC₉H₁₆ClN₃O₂で分子量が233.71の黄色粉末である。ロムスチンは10%エタノール(約0.05 mg/ml)や無水アルコール(約70 mg/ml)に可溶性である。ロムスチンは水(約0.05 mg/ml)に比較的不溶である。生理的pHに比較的イオン化しない。ロムスチンカプセル中の不活性成分はステアリン酸マグネシウムとマンニトールである。

ロムスチンはDNAやRNAをアルキル化することは一般に承知されているが、他のアルキル化剤と交差抵抗しない。他のニトロソウレアとのように、タンパク質中のアミノ酸の

50

カルバモイル化によっていくつかの鍵となる重要な酵素過程を阻害することができる。ロムスタチンは、経口投与することができる。約 30 mg/m^2 ~ 約 100 mg/m^2 の範囲にある用量で放射性ロムスタチンを経口投与した後、投与した放射能の約半分が24時間以内に分解生成物の形で排泄される。代謝物質の血清半減期は、約16時間 ~ 約2日の範囲にある。組織レベルは、静脈内投与の15分後に血漿レベルに匹敵する。

ロムスタチンは、他の治療法のほかに単一薬剤として、又は他の承認された化学療法剤との確立された併用治療において原発性と転移双方の脳腫瘍に既に適切な手術及び/又は放射線治療を受けた患者に有効であることがわかった。ロムスタチンは、小細胞肺がんのようながんを治療するのに用いられている。また、ホジキン病に対して一次治療で治療されたが再発した患者、又は一次治療に応答しない患者に他の承認された薬剤と組合わせて二次治療として有効である。

10

以前に治療されていない患者における単一薬剤として成人や子供におけるロムスタチンの推奨される用量は、6週毎に1回の経口投与として約 130 mg/m^2 である。骨髄機能が妥協された個体においては、6週毎に約 100 mg/m^2 に減少させなければならない。ロムスタチンが他の骨髄抑制剤と組合わせて用いられる場合、用量は適切に調整されなければならない。他の用量は、例えば、約 20 mg/m^2 、約 30 mg/m^2 、約 40 mg/m^2 、約 50 mg/m^2 、約 60 mg/m^2 、約 70 mg/m^2 、約 80 mg/m^2 、約 90 mg/m^2 、約 100 mg/m^2 ~ 約 120 mg/m^2 を用いることができることが理解される。

c. トリアジン

トリアジンは、悪性メラノーマ、ホジキン病又は軟組織肉腫のようながんの治療に用いられるダカバジン(D T I C ; ジメチルトリアゼノイミダゾールカルボキサミド)のような薬剤を含んでいるがこれに限定されない。

20

【0015】

II. 代謝拮抗物質

代謝拮抗物質は、DNAとRNAの合成を破壊する。アルキル化剤と異なり、S相中の細胞周期に特に影響する。乳房、卵巣、胃腸管の腫瘍のほかに慢性白血病と闘うために用いられている。代謝拮抗物質は、種々の部類、例えば、葉酸類似体、ピリミジン類似体又はプリン類似体又は関連阻害化合物に分けることができる。代謝拮抗物質としては、5-フルオロウラシル(5-FU)、シタラビン(Ara-C)、フルダラビン、ゲンシタビン、又はメトレトレキセートが含まれるがこれらに限定されない。

30

i. 葉酸類似体

葉酸類似体としては、急性リンパ球性白血病、絨毛がん、菌状息肉症、乳房、頭頸部、肺、骨形成の肉腫のようながんの治療に用いられているメトレトレキセート(アメトプテリン)のような化合物を含むがこれに限定されない。

ii. ピリミジン類似体

ピリミジン類似体は、シタラビン(シトシンアラビノシド)、5-フルオロウラシル(フルオウラシル; 5-FU)やフロキシウリジン(フルオロデオキシウリジン; FudR)のような化合物が含まれる。シタラビンは、急性顆粒球性白血病や急性リンパ球性白血病のようながんの治療に用いられている。フロキシウリジンや5-フルオロウラシルは、乳房、結腸、胃、膵、卵巣、頭頸部、膀胱又は局所前がん性皮膚の病変のようながんの治療に用いられている。

40

5-フルオロウラシル(5-FU)は、5-フルオロ-2,4(1H,3H)ピリミジンジオンの化学名を有する。作用機序は、デオキシウリジル酸のチミジル酸へのメチル化反応を阻止することによると考えられる。従って、5-FUは、デオキシリボ核酸(DNA)の合成を妨害し、多少はリボ核酸(RNA)の形成を阻止する。DNAとRNAは細胞分裂や増殖に不可欠であるので、5-FUの作用はチミジン欠乏を生じ、細胞死に至るものであると考えられる。従って、5-FUの作用は、転移がんの特徴の急速に分裂する細胞に見られる。

iii. プリン類似体と関連阻害剤

プリン類似体と関連化合物としては、メルカプトプリン(6-メルカプトプリン; 6-MP)、チオグアニン(6-チオグアニン; TG)又はペントスタチン(2-デオキシコホルマイシン)が

50

含まれ、これらに限定されない。メルカプトプリンは、急性リンパ球性、急性顆粒球性、慢性顆粒球性白血病に用いられている。トリオグアニンは、急性顆粒球白血病、急性リンパ球性白血病又はリンパ急性白血病のようながんの治療に用いられている。ペントスタチンは、ヘアリーセル白血病、菌状息肉症又は慢性リンパ球性白血病のようながん用いられている。

【0016】

III. 天然産物

天然酸物は、一般的には、天然源から最初に分離され薬理活性をもつことが確認された化合物を意味する。そのような化合物、その類似体、誘導体は、当業者に既知の手法で天然源から分離されてもよく、化学的に合成されてもよく、組換え生産されてもよい。天然産物としては、分裂インヒビター、抗腫瘍抗体、酵素又は生物応答修飾因子のような部類が含まれる。

10

i. 分裂インヒビター

分裂インヒビターとしては、細胞分裂や有糸分裂に必要とされるタンパク質合成を阻止し得る植物アルカロイドや他の天然物質が含まれる。分裂インヒビターとしては、例えば、ドセタキセル、エトポシド(VP16)、テニポシド、パクリタキセル、タキソール、ビンブラスチン、ビンクリスチン、又はビノレルビンが挙げられる。

a. エピドフィロトキシン

エピドフィロトキシンには、テニポシドやVP16のような化合物が含まれる。VP16はエトポシドとしても知られ、主として精巣腫瘍の治療にブレオマイシンとシスプラチンと組合わせて、肺の小細胞がん、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性顆粒球性白血病、急性非リンパ球性白血病、乳がん、又は後天性免疫不全症候群(AIDS)に伴うカポジ肉腫のようながんに対しても活性である。

20

VP16は、静脈内投与の溶液(例えば、20 mg/ml)として、経口使用の液体充填カプセル、50 mgとして用いる。肺の小細胞がんの場合、静脈内用量(併用治療において)は約100 mg/m²程度か又は約2 mg/m²程度であり得る。通常は、約35 mg/m²を毎日約4日間～約50 mg/m²を毎日約5日間までが用いられている。経口投与した場合、用量は2倍でなければならない。つまり、小細胞肺がんの用量は約200 mg/m²～250 mg/m²ほどであってもよい。精巣がんの静脈内用量(併用治療において)は、約50 mg/m²～約100 mg/m²を毎日約5日間、又は約100 mg/m²を1日置きに3回である。治療の周期は、通常は、約3～4週間毎に繰り返される。薬剤は、製剤中に用いられる溶媒によると思われる低血圧と気管支痙攣を避けるために注入として徐々に投与すべきである(例えば、約30分～60分)。

30

【0017】

b. タキソイド

タキソイドは、トリネコの木、タキサス・ブレビホリア(*Taxus brevifolia*)の樹皮から単離した関連化合物の一種である。タキソイドは、ドセタキセルやパクリタキセルのような化合物が含まれるがこれらに限定されない。

パクリタキセルは、チューブリンに(ピンカアルカロイドにより用いられるものと異なる部位に)結合し、微小管のアセンブリを促進する。パクリタキセルは、臨床的に評価されている。卵巣の悪性メラノーマやがんに対して活性を有する。ある種の態様においては、最大用量は約30 mg/m²を毎日約5日間又は約210 mg/m²～約250 mg/m²を約3週間毎に1回投与される。

40

c. ピンカアルカロイド

ピンカアルカロイドは、薬剤活性を有することが確認された植物アルカロイドの一種である。ビンブラスチン(VLB)やビンクリスチンのような化合物が含まれる。

1. ビンブラスチン

ビンブラスチンは、がんや前がんの治療に使用し得る植物アルカロイドの一例である。細胞をビンブラスチンとインキュベートする場合、微小管の溶解が生じる。

ビンブラスチン又はビンクリスチンの経口投与後に予想できない吸収が報告されている。

50

通常の臨床用量で血漿中の各薬剤のピーク濃度は約0.4 mMである。ビンブラスチンやビンクリスチンは、血漿タンパク質に結合する。血小板では広範囲に濃縮され、白血球や赤血球中では多少しか濃縮されない。

静脈内注射後、ビンブラスチンの血漿からのクリアランスは多相パターンである。分配後、薬剤は約1時間や20時間の半減期で血漿から消える。ビンブラスチンは、肝臓で代謝されて誘導体デスアセチルビンブラスチンを生物学的に活性化する。約15%の投与量が尿中にそのまま検出され、胆汁排泄後に約10%が便に回収される。用量は、肝機能障害をもつ患者には減少しなければならない。血漿中のビリルビンの濃度が3 mg/dl (約50 mM)より高い場合には投薬の少なくとも50%減少させることが必要である。

硫酸ビンブラスチンは、注射用製剤に用いる。薬剤を静脈内で投与する場合、疼痛刺激や潰瘍を生じることがあるので、皮下出血に対して特別に注意しなければならない。薬剤は、循環が損傷した体肢に注射してはならない。0.3 mg/kg体重の1回後、約7日～約10日で骨髓抑制が最大に達する。中程度の白血球減少症(約3000細胞/mm³)が得られない場合には、毎週の用量を約0.05 mg/kg体重の増加分によって徐々に増加することができる。精巣がんを治療するように設計された用法においては、ビンブラスチンは血液細胞数又は毒性に無関係に約0.3 mg/kgの用量で約3週毎に用いられる。

ビンブラスチンの重要な臨床使用は、転移精巣腫瘍の治療的治療でのブレオマイシンとシスプラチンにおいてである。有益な応答は種々のリンパ腫、特にホジキン病において報告され、症例の50～90%に重要な改善を認めることができる。高割合のリンパ腫におけるビンブラスチンの有効性は、疾患がアルキル化剤に不応である場合に減少しない。カボジ肉腫、精巣がん、神経芽細胞腫、レットレルシヴェ病(組織球症X)、女性における乳房や絨毛のがんに活性である。

約0.1 mg/kg～約0.3 mg/kgの用量を投与することができ、約1.5 mg/m²～約2 mg/m²も投与することができる。また、約0.1 mg/m²、約0.12 mg/m²、約0.14 mg/m²、約0.15 mg/m²、約0.2 mg/m²、約0.25 mg/m²、約0.5 mg/m²、約1.0 mg/m²、約1.2 mg/m²、約1.4 mg/m²、約1.5 mg/m²、約2.0 mg/m²、約2.5 mg/m²、約5.0 mg/m²、約6 mg/m²、約8 mg/m²、約9 mg/m²、約10 mg/m²、～約20 mg/m²を投与することができる。

【0018】

2. ビンクリスチン

ビンクリスチンは、有糸分裂を阻止し、中期停止を生じる。この薬剤のほとんどの生物活性はチューブリンに特異的に結合するとともに微小管に重合するタンパク質の能力を阻止する能力によって説明できると思われる。分裂装置の微小管の破壊によって、細胞分裂が中期に停止する。分裂中に正しく染色体を分離できないことが細胞死に至ると思われる。

正常な骨髓細胞や上皮細胞に対するビンクリスチンの比較的低い毒性がこの薬剤を抗新生物薬剤の中で特異にし、他の骨髓抑制剤と組合わせてしばしば含まれる。ビンブラスチン又はビンクリスチンの経口投与後に予想できない吸収が報告されている。通常の臨床用量での血漿中の各薬剤のピーク濃度は約0.4 mMである。

ビンブラスチンとビンクリスチンは、血漿タンパク質に結合する。血小板では広範囲に濃縮され、白血球と赤血球では多少しか濃縮されない。ビンクリスチンの血漿からのクリアランスは多相パターンであり、最終半減期は約24時間である。薬剤は肝臓で代謝されるが、生物活性誘導体は確認されていない。肝機能障害をもつ患者においては用量を減少しなければならない。血漿中のビリルビン濃度が約3 mg/dl(約50 mM)より高い場合には、投薬の少なくとも50%の減少が必要である。

硫酸ビンクリスチンは、静脈注射用溶液(例えば、1 mg/ml)として用いる。コルチコステロイドと共に用いられるビンクリスチンは、現在小児白血病の寛解傾向を誘導するために選択される治療であり、これらの薬剤に最適な投薬はビンクリスチン、静脈内に約2 mg/m²体表面積、毎週と、プレドニゾン、経口で約40 mg/m²、毎日であると思われる。ホジキン病又は非ホジキンリンパ腫をもつ成人患者は、通常複合プロトコルの一部としてビンクリスチンを投与する。MOPP用法で用いられる場合、ビンクリスチンの推奨される用

10

20

30

40

50

量は約1.4 mg/m²である。高用量のピンクリスチンは、重い神経毒性を受けてしまう成人より子供によって良好に許容されると思われる。薬剤を7日毎よりも頻繁に又は高用量で投与すると応答速度の改善が比例せず毒性発現を増強すると思われる。ピンクリスチンの静脈内投与中出血を避けるために注意しなければならない。ピンクリスチン(及びピンブラスチン)は、静脈内に投与し得るものより大きい用量で数回腫瘍の動脈血供給部に同じような毒性で注入することができる。

ピンクリスチンは、ホジキン病と他のリンパ腫に効果的である。ホジキン病で単独に用いる場合にピンブラスチンより幾分有益でなくなると思われるが、メクロルエタミン、プレドニゾン、プロカルパジン(いわゆるMOPP用法)と用いる場合、この疾患の進行ステージ(IIIとIV)に好ましい治療である。非ホジキンリンパ腫においては、特にシクロホスファミド、プレオマイシン、ドキシソルピシン、プレドニゾンと用いる場合、ピンクリスチンは重要な薬剤である。ピンクリスチンは、リンパ球性白血病においてピンブラスチンより有効である。種々の他の新生物、特にウィルムス腫瘍、神経芽細胞腫、脳腫瘍、黄紋筋腫、小細胞肺、乳がん、膀胱がん、男性と女性の生殖系をもつ患者において有益が応答が報告されている。

ピンクリスチンの用量としては、約0.01 mg/kg～約0.03 mg/kgが含まれ、約0.4 mg/m²～約1.4 mg/m²を投与することもでき、約1.5 mg/m²～約2 mg/m²を投与することもできる。また、ある実施態様においては、約0.02 mg/m²、約0.05 mg/m²、約0.06 mg/m²、約0.07 mg/m²、約0.08 mg/m²、約0.1 mg/m²、約0.12 mg/m²、約0.14 mg/m²、約0.15 mg/m²、約0.2 mg/m²、約0.25 mg/m²を一定の静脈内注射として投与することができる。

【0019】

d. 抗腫瘍抗体

抗腫瘍抗体は、抗菌活性と細胞毒性活性双方を有する。これらの薬剤は、酵素や有糸分裂を化学的に阻害するか又は細胞膜を変化させることによりDNAを妨害する。これらの物質は、相特異的ではないので細胞周期のすべての相に働く。従って、種々のがんによく用いられている。抗腫瘍抗体の例としては、プレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン(アドリアマイシン)、プリカマイシン(ミトラマイシン)又はイダルピシンが挙げられるがこれらに限定されない。新生物の治療の臨床において広く用いられるこれらの化合物は、一般的には静脈内ボラス注射又は経口で投与される。

1. ドキシソルピシン

ドキシソルピシン塩酸塩、5,12-ナフタセンジオン、(8s-cis)-10[(3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ-a-L-リキソヘキソピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキ塩酸塩(ヒドロキシダウノルピシン塩酸塩、アドリアマイシン)を抗新生物の広範囲スペクトルに用いられる。DNAに結合し、核酸合成を阻害し、有糸分裂を阻害し、染色体異常を促進させる。

単独で投与されるように、甲状腺腫や原発性肝細胞がんの治療に第一選択される薬剤である。卵巣腫瘍、子宮内膜腫瘍、乳房腫瘍、気管支原性燕麦細胞がん、非小細胞肺がん、胃がん、性尿器がん、甲状腺がん、胃腺がん、網膜芽腫、神経芽細胞腫、菌状息肉症、膀胱がん、前立腺がん、膀胱がん、骨髄腫、びまん性組織球リンパ腫、ウィルムス腫瘍、ヒジキン病、副腎腫瘍、骨肉腫、軟組織肉腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫又は急性リンパ球性白血病を含む疾患の治療の第一選択組み合わせの成分である。島細胞がん、頸部がん、精巣がん又は副腎皮質がんのような他の疾患の治療用代替的薬剤である。免疫抑制剤でもある。

ドキシソルピシンは、吸収が悪く、静脈内投与することが好ましい。薬物動態学は多区画である。分布相の半減期は12分と3.3時間である。排除半減期は約30時間であり、約40%～約50%が胆汁に分泌する。ほとんどの残部は肝臓で部分的には代謝産物(ドキシソルピシノール)に代謝されるが、数%は尿に排泄される。肝臓障害があるときは用量を減らさなければならない。

ある実施態様においては、適切な静脈内用量は、成人、約60 mg/m²～約75 mg/m²を約21日置きに又は約25 mg/m²～約30 mg/m²を連続2又は3日の各日を約3週～約4週置きに繰り返す。

返し又は約20 mg/m²を毎週1回である。以前の化学療法又は新生物骨髄侵入により予め骨髄抑制がある場合、又は薬剤が他の造血抑制剤と組合わせた場合、高齢の患者には最少量を用いなければならない。血清ビリルビンが約1.2 mg/dl～約3 mg/dlである場合には用量を約50%だけ、約3 mg/dlより大きい場合には約75%だけ減らさなければならない。生存期間全体の用量は正常な心機能をもつ患者においては約550 mg/m²を、縦隔照射を受けた人においては約400 mg/m²を超えてはならない。ある実施態様においては、代替的用量用法は、約30 mg/m²を3日間連続の各日に約4週毎に繰り返すを含むことができる。例示的な用量は、約10 mg/m²、約20 mg/m²、約30 mg/m²、約50 mg/m²、約100 mg/m²、約150 mg/m²、約175 mg/m²、約200 mg/m²、約225 mg/m²、約250 mg/m²、約275 mg/m²、約300 mg/m²、約350 mg/m²、約400 mg/m²、約425 mg/m²、約450 mg/m²、約475 mg/m²、～約500 mg/m²であってもよい。 10

【0020】

2. ダウノルピシン

ダウノルピシン塩酸塩、5,12-ナフタセンジオン、(8*S*-*cis*)-8-アセチル-10-[(3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ- α -L-リキソヘキサノピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-10-メトキシ-、塩酸塩はセルピジンとも呼ばれ、Wyethから入手できる。ダウノルピシン(ダウノマイシン；ルビドマイシン)は、DNAにインターカレートし、DNA特異RNAポリメラーゼを遮断し、DNA合成を阻害する。核酸合成を妨害しない用量で細胞分裂を阻止することができる。

他の薬剤との組合わせにおいては、例えば、急性顆粒球性白血病、成人の急性骨髄性白血病(寛解傾向の誘導)、急性リンパ球性白血病又は慢性骨髄性白血病のような疾患の第一選択化学療法にしばしば含まれる。経口吸収は悪く、他の方法によって投与されることが好ましい(例えば、静脈内)。分布半減期は45分であり、排除半減期は約19時間である。活性代謝産物、ダウノルピシンの半減期は約27時間である。ダウノルピシンは、肝臓で最も代謝され、胆汁(約40%)に分泌される。肝不全又は腎不全においては用量を少なくしなければならない。 20

一般的には、適切な静脈内用量(塩基当量)は、60歳より若い成人、約45 mg/m²(60歳より高齢の患者には約30 mg/m²)を約1日、約2日間又は約3日間約3週又は4週毎に又は約0.8 mg/kg/日を約3日間、約4日間、約5日間～約6日間約3週又は約4週毎にであり、胸部照射を受けた場合の約450 mg/m²だけを除いて生存期間に約550 mg/m²を超えて投与してはならない。年齢が2歳未満、又は体表面が約0.5 m²未満でない限り、子供は約25 mg/m²を毎週1回である。この場合、重量に基づく成人の予定が用いられる。約20 mg(約21.4 mgの塩酸塩に等価な塩基として)の注射用剤形で用いる。例示的な用量は、約10 mg/m²、約20 mg/m²、約30 mg/m²、約50 mg/m²、約100 mg/m²、約150 mg/m²、約175 mg/m²、約200 mg/m²、約225 mg/m²、約250 mg/m²、約275 mg/m²、約300 mg/m²、約350 mg/m²、約400 mg/m²、約425 mg/m²、約450 mg/m²、約475 mg/m²、～約500 mg/m²であってもよい。 30

【0021】

3. マイトマイシン

マイトマイシン(ムタマイシン及び/又はマイトマイシン-Cとしても知られる)は、抗腫瘍活性を有することがわかったストレプトマイセス・ケスピトサス(*Streptomyces caespitosus*)のブイヨンから分離した抗生物質である。化合物は熱安定であり、高融点であり、有機溶媒に自由に可溶性である。 40

マイトマイシンは、デオキシリボ核酸(DNA)の合成を選択的に阻害する。グアニンとシトシン含量は、マイトマイシン誘導架橋度と相関する。高濃度の薬剤では細胞RNAとタンパク質合成が抑制される。マイトマイシンは、胃、頸部、結腸、乳房、脾、膀胱、頭頸部のような腫瘍に用いられている。

ヒトにおいては、マイトマイシンは静脈内投与後に血清から急速に清浄される。30 mgボーラス注射後に約50%だけ血清濃度を低下させるのに要する時間は17分間である。30 mg、20 mg、又は10 mg I.Vの注射後、最大血清濃度はそれぞれ2.4 mg/ml、1.7 mg/ml、0.52 mg/mlであった。クリアランスは、主として肝臓での代謝によって行われるが、代謝は他 50

の組織でも生じる。クリアランスは、分解経路の飽和のためと考えられることから最大血清濃度に反比例する。マイトマイシン用量の約10%は、尿に変化せずに排泄される。代謝経路が比較的少量で飽和されるので、尿中に排泄される用量%は、用量が増加するにつれて高くなる。子供でも静脈内投与されたマイトマイシンの排出は同じである。

【0022】

4. アクチノマイシンD

アクチノマイシンD(ダクチノマイシン)[50-76-0]; $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$ (1255.43)はDNA依存性RNAポリメラーゼを阻害する抗新生物剤である。しばしば、例えば、絨毛がん、胎児性横紋菌肉腫、精巣腫瘍、カポジ肉腫又はウィルムス腫瘍のような疾患の治療の第一選択組み合わせの成分である。全身的治療に应答しない腫瘍は、局所灌流にしばしば应答する。ダクチノマイシンは、放射線治療を増強する。二次(遠心性)免疫抑制剤である。ある種の個々の態様においては、アクチノマイシンDは、例えば、主手術、放射線治療、又は他の薬剤、特にビンクリスチンやシクロホスファミドのような物質と組合わせて用いられる。抗新生物活性は、ユーイング腫瘍、カポジ肉腫、軟組織肉腫に認められている。ダクチノマイシンは、絨毛がんが進行した症例をもつ女性に効果的であり得る。転移性精巣肉腫をもつ患者にクロラムブシルやメトトレキセートと組合わせて一貫した应答を生じる。应答は、ホジキン病や非ホジキンリンパ腫をもつ患者にもしばしば見ることができる。ダクチノマイシンは、免疫学的应答、特に腎移植片の拒絶を阻止するのに用いられている。

用量の半量が胆汁にそのまま排出され、10%が尿に排泄される。半減期は約36時間である。薬剤は、血液-脳関門を通過しない。アクチノマイシンDは凍結乾燥末として供給される(各バイアル中0/5 mg)。1日の通常量は、約10 mg/kg~約15 mg/kgである。これは静脈内に約5日間投与される。毒性症状が現れない場合には、追加治療単位が約3週~約4週おきに投与することができる。1日約100 mg~約400 mgの注射が子供に約10日~約14日間投与されている。他の用法では、約3 mg/kg~約6 mg/kgが全量約125 mg/kgとして毎週約7.5 mg/kgの維持量が用いられている。静脈内注入管に薬剤を投与することが安全であるが、直接静脈内に注射され、皮下反応を避けるためにバイアルから薬剤を引き抜くために用いられる針を捨てることが注意される。例示的用量は、約100 mg/m²、約150 mg/m²、約175 mg/m²、約200 mg/m²、約225 mg/m²、約250 mg/m²、約275 mg/m²、約300 mg/m²、約350 mg/m²、約400 mg/m²、約425 mg/m²、約450 mg/m²、約475 mg/m²、~約500 mg/m²であって

【0023】

5. プレオマイシン

プレオマイシンは、ストレプトマイセス・ベルティシラス(*Streptomyces verticillius*)株から分離した細胞毒性糖ペプチド抗生物質の混合物である。プレオマイシンの正確な作用機序は不明であるが、利用できる証拠は主な作用機序がDNA合成阻害を示すと思われることであり、RNAやタンパク質合成阻害が少ないという証拠がある。

マウスにおいて、高濃度のプレオマイシンは皮膚、肺、腎、腹膜、リンパ管に見られる。皮膚と肺の腫瘍細胞は、造血組織に見られる低濃度と対照的に高濃度のプレオマイシンを有することがわかった。骨髓に見られる低濃度のプレオマイシンは、その組織に見られる高レベルのプレオマイシン分解酵素に関係があるものである。

クレアチニークリアランスが約35 ml/minより多い患者においては、プレオマイシンの血清又は血漿最終除去半減期は約115分である。クレアチニークリアランスが約35 ml/minより少ない患者においては、血清又は血漿最終除去半減期はクレアチニークリアランスが低下するにつれて指数関数的に増加する。ヒトにおいては、投与量の約60%~約70%が活性プレオマイシンとして尿中に回収される。個々の実施態様においては、プレオマイシンは筋肉内、静脈内、又は皮下経路で投与することができる。水に自由に可溶性である。アナフィラキシー様反応の可能性があることから、リンパ腫の患者は最初の2回は2単位以下で治療しなければならない。急性反応が生じない場合には、規則的な投薬予定が行われてもよい。

10

20

30

40

50

好適態様においては、ブレオマイシンは、姑息的治療とみなさなければならない。次の新生物の対応に単一薬剤として又は他の承認された化学療法剤と証明された組合わせで頭頸部(口、舌、扁桃腺、鼻咽腔、口腔咽頭、副鼻腔、口蓋、唇、口粘膜、はにく歯肉、喉頭蓋、喉頭を含む)、食道、肺又は性尿器管、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、皮膚、陰茎、頸部、又は女性外陰部のような扁平上皮細胞がんの有効であることがわかった。また、リンパ腫や精巣がんの治療に用いられている。

ホジキン病や精巣腫瘍の改善は速く、2週間以内に認められる。このときまでに改善が見られない場合には、改善はありそうもない。扁平上皮がんは、徐々に応答し、改善が認められる前に3週間程度はしばしば必要である。

【0024】

10

IV. その他の物質

いくつかの化学療法剤は活性に基づく以前の部類に認定されない。白金配位錯体、アントラセンジオン、置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、アムサクリン、L-アスパラギナーゼ、又はトレチノインが含まれるがこれらに限定されない。併用治療に用いられる本発明の組成物と方法に含まれることが企図される。

i. 白金配位錯体

白金配位錯体は、カルボプラチンやシスプラチンのような化合物を含んでいる(cis-DDP)。シスプラチンは、例えば、転移精巣又は卵巣がん、進行性膀胱がん、頭頸部がん、子宮頸部がん、肺がん又は他の腫瘍のがんを治療するのに広く用いられている。シスプラチンは、経口吸収されないので、他の経路、例えば、静脈内、皮下、腫瘍内又は腹腔内注射によって送達されなければならない。シスプラチンは、単独で又は他の薬剤と組合わせて用いることができ、ある実施態様においては臨床適用に用いられる効力のある用量は約 15 mg/m^2 ~ 約 20 mg/m^2 が5日間3週毎に合計3過程として企図されている。用量は、例えば、約 0.50 mg/m^2 、約 1.0 mg/m^2 、約 1.50 mg/m^2 、約 1.75 mg/m^2 、約 2.0 mg/m^2 、約 3.0 mg/m^2 、約 4.0 mg/m^2 、約 5.0 mg/m^2 、~ 約 10 mg/m^2 であってもよい。

20

本発明は、ROI産生を刺激するシスプラチンがEgr-1プロモーターのCARG要素を誘導することがわかった。例えば、Egr-1プロモーターのCARG要素をコードしているアデノウイルスベクターに感染したヒトやげっ歯類のがん細胞においてTNF- α の産生を誘導するシスプラチンは、TNF- α をコードしているcDNAの上流に結合した。従って、本発明は、シスプラチンのようなROI又はDNA損傷を生じる化学療法剤の使用と、抗腫瘍遺伝子を用いた遺伝子治療の一時的制御や空間的制御とを組合わせる新規な方法を提供する。

30

ii. 他の薬剤

ミトキサントロンのようなアントラセネジオンは、急性顆粒球性白血病や乳がんを治療するのに用いられている。ヒドロキシ尿素のような置換尿素は、慢性顆粒球性白血病、真性赤血球増加症、本態性血小板増加症又は悪性メラノーマを治療するのに用いられている。プロカルバジン(N-メチルヒドラジン、MIH)のようなメチルヒドラジン誘導体は、ホジキン病の治療に用いられている。マイトテインのような副腎皮質抑制剤は、副腎皮質がんを治療するのに用いられ、アミノグルテチミドはホジキン病を治療するのに用いられている。

40

【0025】

V. 用量

DNA損傷剤の用量は、当業者に周知であり(例えば、“Physicians Desk Reference”、Goodman & Gilman's “The Pharmacological Basis of Therapeutics”、“Remington's Pharmaceutical Sciences”、“The Merck Index, 11th Edit.”を参照のこと。これらの記載は適切な部分で本願明細書に含まれている)、その中の開示を考えて本発明と組合わせることができる。治療される患者の症状によって投薬の変更は必ず生じる。いずれにせよ、投与に責任のある人が個々の患者に適切な用量を決定する。個々の化学療法剤と用量の用法の例は本明細書に記載されている。本明細書に記載されるこれらの用量と薬剤のすべては限定するものでなく例示であり、個々の患者又は適用に対して当業者が他の用量又

50

は薬剤を用いることができる。これらの点の中間の用量、又は誘導できる範囲も本発明に用いられると考えられる。

【0026】

C. 治療的遺伝子

I. 腫瘍サプレッサー

p53は、現在、腫瘍サプレッサー遺伝子として認められている。高レベルの変異体p53は、化学発がん、紫外線照射、いくつかのウイルスによってがん化した多くの細胞に見られる。p53遺伝子は、種々のヒト腫瘍における変異性不活性化のしばしば標的であり、一般のヒトがんにおいて最も頻繁に変異した遺伝子であることが既に証明されている。50%を超えるヒトNSCLC (Hollstein et al., 1991)や広範囲スペクトルの他の腫瘍において変異する。

p53遺伝子は、SV40大T抗原やアデノウイルスE1Bのようなホストタンパク質と複合体を形成し得る393アミノ酸リンタンパク質をコードする。タンパク質は、正常組織や細胞に見られるががん化細胞又は腫瘍細胞と比べて濃度が極めて低い。おもしろいことに、野生型p53は細胞増殖や分裂を調節するのに重要であると思われる。野生型p53の過剰発現は、ヒト腫瘍細胞系において抗増殖性であることがいくつかの例でわかった。従って、p53は細胞増殖の負の調節剤として働くことができ、制御されない細胞増殖を直接抑制することができ、この増殖を抑制する遺伝子を間接に活性化することもできる。従って、野生型p53の不在又は不活性化はがん化に寄与することができる。しかしながら、いくつかの研究は、変異体p53の存在が遺伝子のがん化可能性の十分な発現に必要なことを示している。

野生型p53は、多くの細胞型において重要な増殖調整剤として認められている。ミスセンス変異はp53遺伝子に共通であり、がん遺伝子のがん化能力に不可欠である。点変異により促進される単一遺伝子変化は、p53内の変異が野生型p53の腫瘍サプレッサー機能を排除することが知られる程度に発がん性p53を生成し得る。しかしながら、他のがん遺伝子と異なり、p53点変異は少なくとも30の異なるコドンで起こることが知られ、同形接合性に減少せずに細胞表現型に移動させる優性対立遺伝子をしばしば生成する。更に、これらの負の優性対立遺伝子の多くは、生物体に許容されると考えられ、生殖系を通過する。種々の変異対立遺伝子は、最少の機能異常から強い浸透までの負の優性対立遺伝子であることがわかってきた(Weinberg, 1991)。

【0027】

野生型p53をコードしているDNAを2つのヒト乳がん細胞系にトランスフェクトするとその細胞系での増殖抑制制御が回復することがCasey & Colleaguesによって報告された(Casey et al., 1991)。変異体でない野生型p53をヒト肺がん細胞系にトランスフェクトすることにより同様の効果が示された(Takahashi et al., 1992)。p53は変異遺伝子より優性であると思われ、変異遺伝子を細胞にトランスフェクトする場合に増殖に対して選択する。トランスフェクトしたp53の正常な発現は、内在性p53をもつ正常細胞又は非悪性細胞の増殖に影響しない。従って、そのような構築物は、逆作用せずに正常細胞によって吸収されるのである。従って、p53随伴がんを野生型p53で治療すると悪性腫瘍細胞数又は増殖速度が減少することが提唱される。

真核細胞周期の主な転移は、サイクリン依存性キナーゼ、又はCDKが引き金になる。1種のCDK, サイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4)によって、G₁による進行が調節される。この酵素活性は、後期G₁でRbをリン酸化することができる。CDK4の活性は、活性化サブユニット、D型サイクリンや阻害サブユニットp16^{INK4}によって制御される。p16^{INK4}は、CDK4に特異的に結合し阻害するのでRbリン酸化を調節することができるタンパク質として生化学的に確認されている(Serrano et al., 1993; Serrano et al., 1995)。p16^{INK4}タンパク質がCDK4阻害剤である(Serrano, 1993)ので、この遺伝子の欠失によってCDK4の活性が高められ、Rbタンパク質の高リン酸化が生じる。p16は、CDK6機能を調節することも知られる。

p16^{INK4}は、p15^{INK4B}、p21^{WAF1}、又はp27^{KIP1}を含むCDK阻害タンパク質の新た

に記載された種類に属する。p16^{INK4}遺伝子は、9p21の多くの腫瘍型にしばしば欠失している染色体領域まで地図を形成する。p16^{INK4}遺伝子の同型接合欠失と変異は、ヒト腫瘍細胞系に多い。この証拠からp16^{INK4}遺伝子が腫瘍サプレッサー遺伝子であることが示される。しかしながら、この解釈は、p16^{INK4}遺伝子変化の頻度が培養細胞系より培養されていない一次腫瘍において非常に少ないという所見によって挑戦されている(Caldas et al., 1994; Cheng et al., 1994; Hussussian et al., 1994; Kamb et al., 1994; Kamb et al., 1994; Mori et al., 1994; Okamoto et al., 1994; Nobori et al., 1995; Orloff et al., 1994; Arap et al., 1995)。しかしながら、多くの一次腫瘍においてはp16遺伝子は無傷であるが、高割合のある腫瘍タイプではp16タンパク質発現を阻止する他のメカニズムがあることが後にわかった(Merlo et al., 1995; Herman, 1995; Gonzalez-Zulueta, 1995)。プラスミド発現ベクターでトランスフェクトすることにより野生型p16^{INK4}機能が回復するとあるヒトがん細胞系によるコロニー形成が減少した(Okamoto, 1994; Arap, 1995)。p16をアデノウイルスと送達させると、あるヒトがん系の増殖が阻止され、ヒト腫瘍異種移植片の増殖が阻止される。

10

20

30

【0028】

C-CAMは、ほとんどすべての上皮細胞で発現する(Odim & Obrink, 1987)。見掛け上の分子量が105 kDのC-CAMは、細胞凝集を中和する特異抗体との反応によりラット肝細胞の血漿膜からはじめに分離された(Obrink, 1991)。最近の研究は、構造上C-CAMは免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーに属し、その配列はがん胎児性抗原(CEA)に高度に類似していることを示している(Lin & Guidotti, 1989)。バキュロウイルス発現系を用いて、Cheung et al.(1993)はC-CAMの最初のIgドメインが細胞接着活性に重要であることを証明した。

細胞接着分子、又はCAMが、臓器発生や細胞分化を調節する分子相互作用の複雑なネットワークに関係していることは既知である(Edelman, 1985)。最近のデータは、CAMの異常発現がいくつかの新生物の腫瘍発生に関係があることを示している。例えば、上皮細胞で主に発現するE-カドヘリンの発現の減少は、数種類の新生物の進行を伴っている(Edelman & Crossin, 1991; Frixen et al., 1991; Bussemakers et al., 1992; Matsura et al., 1992; Umbas et al., 1992)。また、Gianocotti & Ruoslahti(1990)は、遺伝子移入による $\alpha_5\beta_1$ インテグリンが増加するとチャイニーズハムスター卵巣細胞の生体内腫瘍発生が減少し得ることを証明した。ここで、C-CAMは、試験管内と生体内で腫瘍増殖を抑制することがわかった。

本発明に使うことができる他の腫瘍サプレッサーとしては、p21、p15、BRCA1、BRCA2、IRF-1、PTEN、RB、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、zac1、p73、VHL、FCC、MCC、DBCCR1、DCP4又はp57が含まれる。

【0029】

II. アポトーシスインデューサー

アポトーシスインデューサー、例えば、Bax、Bak、Bcl-X_s、Bad、Bim、Bik、Bid、Harakiri、AdE1B、Bad、ICE-CED3プロテアーゼ、TRAIL、SARP-2又はアポブチンは、同様に本発明に従って用いることができる。更に、細胞毒性遺伝子の送達と調節発現は、1999年3月11日出願の“Induction of Apoptotic or Cytotoxic Gene Expression by Adenoviral Mediated Gene Codelivery”と称する米国特許出願に記載されている(特にこの明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする)。

40

III. 酵素

種々の酵素遺伝子は、本発明によれば興味深い。そのような酵素としては、シトシンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、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、又はヒトチミジンキナーゼが含まれる。

IV. サイトカイン、ホルモン、増殖因子

本発明のベクターに挿入されるように企図される他の種類の遺伝子としては、インターロイキンやサイトカイン：インターロイキン1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、

50

IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、 γ -インターフェロン、 β -インターフェロン、 α -インターフェロン、アンジオテンシン、トロンボスポンジン、エンドスタチン、METH-1、METH-2、GM-CSF、G-CSF、M-CSF又は腫瘍壊死因子(TNF)が含まれる。

TNF- α は、動物実験において抗腫瘍活性を有するマクロファージや他の造血細胞によって分泌されるサイトカインである(Old, 1985; Fiers, 1991)。TNF- α は、多くの悪性腫瘍細胞の細胞毒性であり、ウイルス、細菌、寄生虫の感染症に対する防御や自己免疫応答に重要な役割を果たす(Fiers, 1991)。腫瘍細胞に対する直接毒性作用や腫瘍血管系に対する細胞毒性作用や血栓作用は、TNF- α の抗腫瘍作用を仲介する(Watanabe et al., 1988; Tartaglia et al., 1993; Robaye et al., 1991; Havell et al., 1988; Obrador et al., 2001; Slungaard et al., 1990; Mauceri et al., 2002)。DNAを損傷するTNF- α と化学療法剤、例えば、シスプラチンやアドリアマイシンとの組み合わせにより、実験モデルにおいて相乗作用が証明された(Duan et al., 2001; Bonavida et al., 1990)。最近、メルファラン、二官能性アルキル化剤、TNF- α による分離肢灌注が筋肉腫やメラノーマの治療戦略に成功したことが報告された(Thom et al., 1995)。しかしながら、全身的毒性によって、ヒトがん治療にはTNF- α の使用が制限されている(Spriggs et al., 1988)。

本発明は、ROI、損傷DNA、IR、化学療法剤によって誘導し得る誘導性Egr-1プロモーターの制御下でTNF- α の化学誘導を提供する。がんやヒトがん細胞のマウスモデルにおける実験から、TNF- α 自体の化学誘導が毒性を引き起こさなかったことがわかる。

【0030】

V. 毒素

種々の毒素は、本発明の発現ベクターの一部として用いられるように企図され、これらの毒素には、リシンA鎖(Burbage, 1997)、ジフテリア毒素A(Massuda et al., 1997; Lidor, 1997)、百日咳毒素Aサブユニット、大腸菌(E. coli)エンテロトキシン毒素Aサブユニット、コレラ毒素Aサブユニット又はシュードモナス毒素c末端のような細菌毒素が含まれている。最近、融合タンパク質調節可能ジフテリア毒素A鎖遺伝子を含むプラスミドのトランスフェクションががん細胞の細胞毒性であることが証明された。従って、調節した毒素遺伝子の遺伝子移入をがんの治療に適用することができる(Massuda et al., 1997)。

VI. アンチセンス構築物

アンチセンス方法は、核酸が“相補的”配列と対合する傾向があるという事実が有利である。相補的とは、ポリヌクレオチドが標準ワトソン・クリック相補性の法則に従って塩基対合できるものであることを意味する。即ち、大きなプリンは小さなピリミジンと塩基対合してシトシンと対合したグアニン(G:C)と、DNAの場合にはチミンと対合したアデニン(A:T)、又はRNAの場合にはウラシルと対合したアデニン(A:U)の組み合わせを形成する。配列をハイブリダイズするのにイノシン、5-メチルシトシン、6-メチルアデニン、ヒポキサチン等のような一般的でない塩基が介在しても対合を妨害しない。

二本鎖(ds)DNAをポリヌクレオチドでターゲティングすると三重らせんの形成になり、RNAをターゲティングすると二重らせんの形成になる。アンチセンスポリヌクレオチドが標的細胞に導入される場合、標的ポリヌクレオチドに特異的に結合し、転写、RNAプロセッシング、輸送、翻訳及び/又は安定性を妨害する。アンチセンスRNA構築物、又はそのようなアンチセンスRNAをコードしているDNAは、ホスト細胞、試験管内か生体内、例えば、ヒト患者を含むホスト動物内で遺伝子転写又は翻訳又は双方を阻害するために使うことができる。

【0031】

アンチセンス構築物は、遺伝子のプロモーターと他の制御領域、エキソン、イントロン又はエキソン-イントロン境界にさえ結合するように設計することができる。最も効果的なアンチセンス構築物はイントロン/エキソンスプライス結合部に相補的な領域を含むこと

が企図される。即ち、好適実施態様にはイントロン-エキソンスプライス結合部の50～200塩基内の領域に相補性を有するアンチセンス構築物が含まれていることが提唱されている。いくつかのエキソン配列が標的選択性に重大な影響を及ぼさずに構築物中に含むことができることを見出された。含まれるエキソン物質の量は、用いられる具体的なエキソンとイントロンの配列によって変動する。多すぎるエキソンドナが含まれているかは単に試験管内構築物を試験して正常な細胞機能が働いているか或いは相補的配列を有する関連遺伝子の発現が働いているかを求めることにより容易に試験することができる。

上述した“相補的”又は“アンチセンス”は、全体の長さにわたって実質的に相補的でありかつ塩基不適合がほとんどないポリヌクレオチド配列を意味する。例えば、長さが15塩基の配列は、13位又は14位に相補的配列をもつ場合には相補的と呼ぶことができる。完全に相補的な配列が全長全体に相補的でありかつ塩基不適合がない配列である。相同度の低い他の配列も企図される。例えば、高相同領域が限定されるが非相同領域を含むアンチセンス構築物(例えば、リボザイム; 下記を参照のこと)を設計することができる。これらの分子は、相同が50%未満であるが適切な条件下で配列を標的にするように結合する。

特異的構築物を作成するためにゲノムDNAの部分とcDNA又は合成配列とを組み合わせることができることは有利である。例えば、最後の構築物にイントロンが所望される場合、ゲノムクローンをを用いることが必要である。cDNA又は合成ポリヌクレオチドは、構築物の残りの部分に便利な制限部位を与えることができるので、配列の残りに用いられる。

アンチセンス構築物の標的である具体的ながん遺伝子は、ras、myc、neu、raf、erb、src、fms、jun、trk、ret、hst、gsp、bcl-2、ablである。抗アポトーシス遺伝子と血管形成プロモーターに有効であるように企図される。

【0032】

VII. リボザイム

タンパク質は伝統的に核酸の触媒に用いられてきたが、他の種類の高分子はこの努力に用いられるものとして出てきた。リボザイムは、部位特異的方法で核酸を切断するRNA-タンパク質複合体である。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を有する特異的触媒ドメインを有する(Kim & Cook, 1987; Gerlach et al., 1987; Foster & Symons, 1987)。例えば、多数のリボザイムは、高度の特異性をもつホスホエステル転移反応を促進させ、オリゴヌクレオチド基質中のいくつかのホスホエステルの1つだけを切断する(Michel & Westhof, 1990; Reinhold-Hurek & Shub, 1992)。この特異性は、化学反応の前にリボザイムの内部ガイド配列(“IGS”)に特異的な塩基対合相互作用によって結合する要求によるものである。

リボザイム触媒は、主として核酸を含む配列特異的切断/結合反応の一部として見られている(Joyce, 1989; Cook et al., 1981)。例えば、米国特許第5,354,855号には、ある種のリボザイムが既知のリボヌクレアーゼより大きくDNA制限酵素に近い配列特異性をもつエンドヌクレアーゼとして作用し得ることが報告されている。従って、遺伝子発現の配列特異的リボザイム仲介阻害は治療用に特に適しているものである(Scanlon et al., 1991; Sarver et al., 1990)。最近、適用したいいくつかの細胞系においてリボザイムが遺伝子変化を誘発することが報告され、変化した遺伝子にはがん遺伝子H-ras、c-fos、HIVの遺伝子が含まれた。ほとんどのこの研究には、特異的リボザイムによって切断される特異的変異コドンに基づいて標的mRNAの修飾が含まれた。この実施態様の標的は、VEGFやアングリオポエチンのような血管形成遺伝子やがん遺伝子(例えば、ras、myc、neu、raf、erb、src、fms、jun、trk、ret、hst、gsp、bcl-2、EGFR、grb2、abl)が含まれる。

【0033】

VIII. 単鎖抗体

他の実施態様においては、一遺伝子は単鎖抗体を含むことができる。単鎖抗体の生産方法は当業者に周知である。当業者は、そのような方法の米国特許第5,359,046号(この明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする)を参照する。単鎖抗体は、短いペプチドリン

10

20

30

40

50

カーを用いて重鎖と軽鎖の可変ドメインを共に融合することにより生成され、よって単分子上に抗原結合部位が再構成される。

一方の可変ドメインのC末端が15～25アミノ酸ペプチド又はリンカーによってもう一方のN末端につながれている単鎖抗体可変断片(scFv)は、抗原結合又は結合の特異性を有意に破壊せずに生じた(Bedzyk et al., 1990; Chaudhary et al., 1990)。これらのFvは、未変性抗体の重鎖と軽鎖に存在する一定の領域(Fc)を欠いている。

種々の分子、例えば、がん遺伝子、増殖因子、ホルモン、酵素、転写因子又は受容体に対する抗体が企図される。血管形成因子(VEGF/VSP; FGF; FGF)や血管形成に必要な内皮抗原(即ち、V3インテグリン)に対する血清の標的となる分泌抗体が企図される。トランスフォーミング成長因子や血小板由来増殖因子のような増殖因子が特に企

10

IX. 細胞周期調節剤

細胞周期調節剤は、他の遺伝子と組合わせた場合に有利であり得る。そのような細胞周期調節剤としては、p27、p21、p57、p18、p73、p19、p15、E2F-1、E2F-2、E2F-3、p107、p130、E2F-4が含まれる。他の細胞周期調節剤としては、抗血管形成タンパク質、例えば、可溶性Flt1(主な負の可溶性VEGF受容体)、可溶性Wnt受容体、可溶性Tie2/Tek受容体、メタロプロテアーゼ2の可溶性凝血酵素ドメイン又は他の血管形成サイトカインの可溶性受容体(例えば、VEGFR1/KDR、VEGFR3/Flt4、共にVEGF受容体)が含まれる。

X. ケモカイン

ケモカインをコードする遺伝子は、本発明に用いることができる。ケモカインは、一般的には、ケモカイン発現の部位に免疫エフェクター細胞を補充するために走化性因子として働く。治療部位に他の免疫系成分の補充を強化するために、例えば、サイトカイン遺伝子と組合わせて具体的なケモカイン遺伝子を発現することができることは有利である。そのようなケモカインとしては、RANTES、MCAF、MIP1-、MIP1-又はIP-10が含まれる。当業者は、ある種のサイトカインが走化性因子作用をもつことが既知であるとともにケモカインという言葉によって分類することができることを認識する。

20

【0034】

D. 発現構築物

I. ベクター

“ベクター”という用語は、複製することができる細胞に導入するために核酸配列を挿入することができるキャリア核酸分子を示すために用いられる。核酸配列は、ベクターが導入される細胞に外来性であること又は配列がふつうは見られない宿主細胞核酸内の位置を除く細胞内配列に相同であることを意味する。ベクターとしては、プラスミド、コスミド、ウイルス(バクテリオファージ、動物ウイルス、植物ウイルス)、人工染色体(例えば、YAC)が含まれる。当業者は、標準組換え技術によってベクターを構築するように十分身につけられる(例えば、Goodboun & Maniatis et al., 1988; Ausubel et al., 1994、これらの文献の記載は共に本願明細書に含まれるものとする)。

“発現ベクター”という用語は、転写されることができるRNAをコードする核酸を含む遺伝子構築物の種類を意味する。ときには、RNA分子はタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドに翻訳される。ときには、これらの配列は、例えば、アンチセンス分子又はリボザイムの生産に翻訳されない。発現ベクターは、種々の“制御配列”を含むことができ、具体的な宿主細胞において作用可能に結合したコーディング配列の転写やおそらく翻訳に必要な核酸配列を意味する。本発明によれば、ベクターは化学誘導性を与えるEgr-1プロモーターの十分な部分を含んでいる。転写と翻訳を支配する制御配列のほかに、ベクターと発現ベクターは他の機能も働き後に記載される核酸配列を含むことができる。

30

40

i. 開始シグナルと内部リボソーム結合部位

コード配列の効率のよい翻訳に特定の開始シグナルが必要とすることもできる。これらのシグナルには、ATG開始コドン又は隣接配列が含まれる。ATG開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルを与える必要があってもよい。当業者は、容易にこれを決定し必要な

50

シグナルを与えることができる。開始コドンは全挿入部の翻訳を確実にするために所望のコード配列のリーディングフレームと“インフレーム”でなければならないことは周知である。外因性翻訳制御シグナルと開始コドンは、天然又は合成であり得る。発現効率は、適切な転写エンハンサー要素の介在によって増強することができる。

本発明のある種の実施態様においては、多重遺伝子、又は多シストロンメッセージを生じるように内部リボソームエントリー部位(IRES)要素の使用が用いられる。IRES要素は、5'メチル化Cap依存性翻訳のリボソーム走査を迂回し、内部部位で翻訳を始めることができる(Pelletier & Sonenberg, 1988)。ピコルナウイルスファミリー(ポリオや脳心筋炎)の2種からIRES要素(Pelletier & Sonenberg, 1988)と哺乳動物メッセージからIRES(Macejak & Sarnow, 1991)が記載されている。IRES要素は、異種オープンリーディングフレームに結合することができる。多重オープンリーディングフレームは共に転写されることもでき、各々がIRESによって分けられ、多シストロンメッセージを生じる。IRES要素によって、各オープンリーディングフレームは効率のよい翻訳のためにリボソームに近づくことができる。多重遺伝子は単一プロモーター/エンハンサーを用いて効率よく発現させることができ、単一メッセージを転写する(米国特許第5,925,565号及び同第5,935,819号を参照のこと、各々の明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする)。

10

【0035】

ii. 多重クローニング部位

ベクターは、ベクターを消化するために標準組換え技術とともに使用し得る多重制限酵素部位を含む核酸である多重クローニング部位(MCS)を含むことができる(例えば、Carbognelli et al., 1999, Levenson et al., 1998, Cocea, 1997、これらの文献の記載は本願明細書に含まれるものとする)。“制限酵素消化”は、核酸分子内の特定の場所でのみ機能する酵素により核酸分子を触媒切断することを意味する。これらの制限酵素の多くは、市販されている。そのような酵素の使用は、当業者によって広く理解されている。しばしば、外因性配列をベクターに結合することを可能にするMCS内で切断する制限酵素を用いてベクターを線状又は断片にする。“結合”は、相互に相接してもしなくてもよい2つの核酸断片間のホスホジエステル結合を形成する方法を意味する。制限酵素と結合反応を含む手法は、組換え技術の当業者には周知である。

20

iii. スプライシング部位

ほとんど転写された真核RNA分子は、一次転写物からイントロンを除去するためにRNAスプライシングを受ける。ゲノム真核配列を含むベクターは、タンパク質発現用転写物の適切な処理を確実にするために供与体及び/又は受容体スプライシング部位を必要とすることができる(例えば、Chandler et al., 1997、この文献の記載は本願明細書に含まれるものとする)。

30

iv. 終結シグナル

本発明のベクター又は構築物は、一般的には、少なくとも1つの終結シグナルを含んでいる。“終結シグナル”又は“ターミネーター”は、RNAポリメラーゼによるRNA転写物の特定の終結に関係するDNA配列を含んでいる。従って、ある実施態様においては、RNA転写物の生産を終了する終結シグナルが企図される。ターミネーターは、所望のメッ

40

ッセージレベルを得るために生体内に必要なものである。真核系においては、ターミネーター領域は、ポリアデニル化部位を暴露するように新しい転写物の部位特異的切断を可能にする特定のDNA配列を含むことができる。これにより、約200 A 残基(ポリA)の伸長部を転写物の3'端に付加するように特殊化した内在性ポリメラーゼの信号が送られる。このポリAテールで修飾されたRNA分子は、安定であるようであり、効率よく転写される。従って、真核生物を含む他の実施態様においては、ターミネーターはRNAの切断用シグナルを含むことが好ましく、ターミネーターがメッセージのポリアデニル化を促進することが更に好ましい。ターミネーター及び/又はポリアデニル化部位要素は、メッセージ要素を高めるとともにカセットから他の配列への読み過ぎしをできるだけ少なくするために働くことができる。

50

本発明に用いられるように企図されたターミネーターは、遺伝子の終止配列、例えば、ウシ増殖ホルモンターミネーター又はウイルス終止配列、例えば、SV40ターミネーターを含むがこれらに限定されない本明細書に記載され当業者に既知でもある既知の転写ターミネーターを含む。ある実施態様においては、終結シグナルは配列切断のためのように転写可能配列又は翻訳可能配列がなくてもよい。

【0036】

v. ポリアデニル化シグナル

発現、特に真核発現においては、典型的には、転写物の適切なポリアデニル化を行うためにポリアデニル化シグナルを含む。ポリアデニル化シグナルは、本発明の成功した実施にほとんど重要でないと思われるが、そのような配列を使うことができる。好適実施態様としては、便利で種々の標的細胞でよく機能することが知られるSV40ポリアデニル化シグナル又はウシ増殖ホルモンポリアデニル化シグナルを含んでいる。ポリアデニル化は、転写物の安定性を高めることができ、細胞質輸送を容易にすることができる。

vi. 複製起点

宿主細胞内のベクターを増殖させるために、複製が開始する特定の核酸配列である1以上の複製部位起点を含むことができる。また、宿主細胞が酵母である場合には、自己複製配列(ARS)を使うこともできる。

vii. 選択可能で篩い分け可能なマーカー

本発明のある種の実施態様においては、発現ベクター内にマーカーを含むことにより本発明の核酸構築物を含む細胞を試験管内又は生体内で同定することができる。そのようなマーカーは、発現ベクターを含む細胞の簡単な同定を可能にする細胞に同定可能な変化を与える。一般的には、選択可能なマーカーは、選択を可能にする性質を与えるものである。正の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、負の選択可能マーカーはその存在がその選択を阻止するものである。

通常、薬剤選択マーカーの介在は形質転換体のクローニングと同定を援助し、例えば、ネオマイシン、プロマイシン、ヒグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン又はヒスチジノールに対する耐性を与える遺伝子が有効な選択可能マーカーである。条件の実施形態に基づいて形質転換体の識別を可能にする表現型を与えるマーカーのほかに、基準が比色分析であるGFPのようなスクリーニング可能なマーカーを含む他の種類のマーカーも企図される。また、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(tk)又はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)のようなスクリーニング可能な酵素を使うことができる。当業者は、免疫学的マーカーをおそらくFACS分析とともにどのように使うかを知っている。用いられるマーカーは、遺伝子産物をコードしている核酸により同時に発現することができる限り、重要ではないと考えられる。選択可能で篩い分け可能なマーカーの他の例も当業者に周知である。

【0037】

viii. プラスミドベクター

ある種の実施態様においては、プラスミドベクターは宿主細胞を形質転換するために用いられるように企図される。一般的には、宿主細胞と適合する種由来のレプリコン配列と制御配列を含むプラスミドベクターはこれらの宿主と関連して用いられる。ベクターは、ふつうは複製部位と、形質転換細胞において表現型選択を与えることができる標識配列を保有する。制限されない例においては、大腸菌は、大腸菌種由来のプラスミド、pBR322の誘導体を用いてしばしば形質転換される。pBR322はアンピシリンとテトラサイクリン耐性の遺伝子を含むので、形質転換細胞を同定するために簡単な手段を与える。pBRプラスミド、又は他の微生物プラスミド又はファージは、例えば、微生物生物体によってそれ自体のタンパク質の発現に使用し得るプロモーターを含まなければならない。更に、宿主微生物と適合するレプリコン配列と制御配列を含むファージベクターは、これらの宿主と関連した形質転換ベクターとして使用し得る。例えば、ファージ GEM (登録商標)-11は、例えば、E. coli LE 392のような宿主細胞を形質転換するように使

50

用し得る組換えファージベクターをつくるのに用いることができる。

他の有効なプラスミドベクターとしては、pINベクター(Inouye et al., 1985)や精製と分離又は切断のためにグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)可溶性融合タンパク質を作成するのに用いられるpGEXベクターが含まれる。他の適切な融合タンパク質は、
-ガラクトシダーゼ、ユビキチン等とのものである。

発現ベクターを含む細菌宿主細胞、例えば、大腸菌は、多くの適切な培養液のいずれか、例えば、LB中で増殖する。ある種のベクターにおける組換えタンパク質の発現は、当業者に理解されるように、宿主細胞とある種のプロモーターに特異的な物質を接触させることにより、例えば、IPTGを培養液に添加することにより又はインキュベーションを高温に切り換えることにより誘導することができる。細菌を更にある期間、通常は2~24時間培養した後、細胞を遠心分離により集め、洗浄して残留培養液を除去する。 10

【0038】

ix. ウイルスベクター

受容体仲介エンドサイトーシスによって細胞に感染させるか又は細胞に入れるとともに宿主細胞ゲノムに組み込みかつウイルス遺伝子を安定に効率よく発現させるある種ウイルスの能力は、異種核酸の細胞(例えば、哺乳動物細胞)への移入のための魅力のある候補物質になっている。本発明の核酸を送達するための用いることができるウイルスベクターの限定されない例を次に述べる。

a. アデノウイルスベクター

核酸を送達するための具体的な方法には、アデノウイルスベクターの使用が必要である。 20
アデノウイルスベクターはゲノムDNAに組み込むための能力が低いことが既知であるが、この特徴はこれらのベクターによって得られる遺伝子移入の効率が高いことにより相殺される。“アデノウイルス発現ベクター”は、(a)構築物のパッケージングを援助するとともに(b)クローン化された組織又は細胞特異的構築物を最後には発現させるのに十分なアデノウイルス配列を含む構築物を含むことを意味する。遺伝体制又はアデノウイルスの知識、36 kb、線状、二本鎖DNAウイルスは、大きなアデノウイルスDNA片を7 kbまでの異種配列で置換することを可能にする(Grunhaus & Horwitz, 1992)。

b. AAVベクター

核酸は、アデノウイルス援助トランスフェクションを用いて細胞に導入することができる。アデノウイルス結合系を用いた細胞系において高トランスフェクション効率が報告されている(Kelleher & Vos, 1994; Cotten et al., 1992; Curiel, 1994)。アデノ随伴ウイルス(AAV)は、組み込み頻度が高くかつ非分裂細胞に感染させる本発明に従って用いられる魅力的なベクター系であるので、哺乳動物細胞、例えば、組織培養物(Muzyczka, 1992)又は生体内に遺伝子を送達するのに用いる。AAVの感染能宿主範囲は広い(Tratschin et al., 1984; Laughlin et al., 1986; Lebkowski et al., 1988; McLaughlin et al., 1988)。 30

【0039】

c. レトロウイルスベクター

レトロウイルスは、宿主ゲノムに遺伝子を組み込む能力のために遺伝子送達ベクターとして有望であり、多量の異種遺伝物質を移入し、広範囲スペクトルの種と細胞型、特別の細胞系にパッケージングされているものに感染させる(Miller, 1992)。 40
レトロウイルスベクターを構築するために、ある種のウイルス配列の代りにウイルスゲノムへ核酸を挿入して複製欠損のあるウイルスを生じる。ビリオンを生じるように、gag、pol、env遺伝子を含むがLTRを含まないパッケージング細胞系とパッケージング成分を構築する(Mann et al., 1983)。cDNAをレトロウイルスLTRとパッケージング配列と共に含む組換えプラスミドが特別な細胞系に導入される(例えば、リン酸カルシウム沈殿により)場合、パッケージング配列は組換えプラスミドのRNA転写物がウイルス粒子にパッケージングされることを可能にし、培養液に分泌される(Nicolas & Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983)。次に組換えレトロウイルスを含む培養液を集め、濃縮してもよく、遺伝子移入に用いられる。レトロウイルスベクターは、広範囲の細胞型 50

に感染させることができる。しかしながら、組込みと安定な発現にはホスト細胞の分裂が必要である(Paskind et al., 1975)。

レンチウイルスは、一般のレトロウイルス遺伝子gag、pol、envのほかに調節又は構造機能をもつ他の遺伝子を含む複合レトロウイルスである。レンチウイルスベクターは当該技術において周知である(例えば、Naldini et al., 1996; Zuffery et al., 1997; Blomer et al., 1997; 米国特許第6,013,516号; 同第5,994,136号)。レンチウイルスの例としては、ヒト免疫不全ウイルス: HIV-1、HIV-2又はサル免疫不全ウイルス: SIVが挙げられる。レンチウイルスは、HIVビルレント遺伝子を多重弱毒させることにより作成する。例えば、遺伝子env、vif、vpr、vpu、nefを欠失させ、ベクターを生物学的に安全にする。

組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染させることができ、生体内と生体外双方の遺伝子移入と核酸配列の発現に使用し得る。例えば、適切なホスト細胞がパッケージ機能を保有する2つ以上のベクター、即ち、gag、pol、env、また、rev、tatでトランスフェクトした非分裂細胞に感染させることができ組換えレンチウイルスは、米国特許第5,994,136号に記載され、この明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする。具体的な細胞型の受容体にターゲティング用抗体又は具体的なりガンドを含むエンベロープタンパク質を結合することにより組換えウイルスを標的にすることができる。ウイルスベクターに対象の配列(調節領域を含む)を、特定の標的細胞上の受容体に対するリガンドをコードしている他の遺伝子と共に挿入することにより、ベクターはここでは標的的特異的である。

10

20

【0040】

d. 他のウイルスベクター

他のウイルスベクターは、本発明においてはワクチン構築物として用いることができる。ワクシニアウイルス(Ridgeway, 1988; Baichwal & Sugden, 1986; Coupar et al., 1988)、シンドビスウイルス、サイトメガロウイルス又は単純ヘルペスウイルスのようなウイルス由来のベクターを用いることができる。種々の哺乳動物細胞にいくつかの魅力的な特徴を与える(Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal & Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwich et al., 1990)。

e. 修飾ウイルスを用いた送達

送達すべき核酸は、特定の結合リガンドを発現するように操作された感染ウイルス内に収容することができる。従って、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、細胞に内容物を送達する。レトロウイルスベクターの特定のターゲティングを可能にするように設計された新規な方法は、ラクトース残基をウイルスエンベロープに化学付加することによるレトロウイルスの化学修飾に基づいて開発された。この修飾は、シアロ糖タンパク質受容体によって肝細胞の特定の感染を可能にすることができる。

30

レトロウイルスエンベロープタンパク質や特定の細胞受容体に対してビオチニル化抗体を用いる組換えレトロウイルスのターゲティングに対する他の方法を設計した。抗体は、ストレプトアビジンを用いることによりビオチン成分によって結合した(Roux et al., 1989)。主要組織適合性遺伝子複合体クラスIとクラスII抗原に対する抗体を用いて、エクトロピックウイルスによる表面抗原をもつ種々のヒト細胞の試験管内感染が証明された(Roux et al., 1989)。

40

【0041】

II. ベクター送達と細胞トランスフォーメーション

本発明と共に用いられるオルガネラ、細胞、組織又は生物体のトランスフォーメーションに適切な核酸送達法は、本明細書に記載されるように又は当業者に既知であるように、核酸(例えば、DNA)をオルガネラ、細胞、組織又は生物体に導入することができる。そのような方法としては、生体外トランスフェクション(Wilson et al., 1989, Nabel et al., 1989)、微量注射(Harlan & Weintraub, 1985; 米国特許第5,789,215号、この明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする)を含む注入; エレクトロポレーション(米国特許第5,384,253号、この明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする; Tur-Kaspa et al

50

., 1986; Potter et al., 1984); リン酸カルシウム沈降 (Graham & Van Der Eb, 1973; Chen & Okayama, 1987; Rippe et al., 1990); D E A E -デキストランの次にポリエチレングリコールを用いる (Gopal, 1985); 直接ソニックローディング (Fechheimer et al., 1987); リポソーム仲介トランスフェクション (Nicolau & Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991) や受容体仲介トランスフェクション (Wu & Wu, 1987; Wu & Wu, 1988); 微粒子銃 (PCT 国際出願第 94/09699 号、同第 95/06128 号; 米国特許第 5,610,042 号; 同第 5,322,783 号、同第 5,563,055 号、同第 5,550,318 号、同第 5,538,877 号、同第 5,538,880 号、各明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする); 炭化ケイ素繊維によるかきまぜ (Kaeppler et al., 1990; 米国特許第 5,302,523 号、同第 5,464,765 号、各明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする); アグロバクテリウム仲介トランスフォーメーション (米国特許第 5,591,616 号、同第 5,563,055 号、各明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする); プロトプラストの P E G 仲介トランスフォーメーション (Omirulלה et al., 1993; 米国特許第 4,684,611 号、同第 4,952,500 号、各明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする); 乾燥/阻害仲介 D N A 取込み (Potrykus et al., 1985)、又はそのような方法の組合わせによる D N A の直接送達が含まれるがそれらに限定されない。これらの手法を用いることによって、オルガネラ、細胞、組織又は生物体は安定に又は一時的に形質転換することができる。

10

【 0 0 4 2 】

i . 生体外トランスフォーメーション

20

生体外の設定において生物体から取り出した血管細胞や組織をトランスフェクトする方法は既知である。例えば、イヌ内皮細胞は、試験管内でレトロウイルス遺伝子移入によって遺伝的に変化させ、イヌに移植している (Wilson et al., 1989)。他の例においては、ユカタンミニプタ内皮細胞をレトロウイルスにより試験管内でトランスフェクトし、二重バルーンカテーテルを用いて動脈に移植した (Nabel et al., 1989)。このように、細胞又は組織を取り出し、本発明の核酸を用いて生体外でトランスフェクトすることができることが企図される。具体的な態様においては、移植細胞又は組織は、生物体内に置かれてもよい。好適態様においては、核酸は、移植細胞又は組織内で発現する。

ii . 注入

ある種の実施態様においては、核酸は、オルガネラ、細胞、組織又は生物体に 1 種以上の注射 (即ち、針注射)、例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内等によって送達することができる。ワクチンの注射方法は、当業者に周知である (例えば、生理食塩水を含む組成物の注射)。本発明の他の実施態様としては、直接微量注射による核酸の導入が含まれる。直接微量注射は、核酸構築物をアフリカツメガエル卵母細胞を導入するために用いられている (Harland & Weintraub, 1985)。

30

iii . エレクトロポレーション

本発明のある種の実施態様においては、核酸はエレクトロポレーションによりオルガネラ、細胞、組織又は生物体に導入される。エレクトロポレーションには、細胞と D N A の浮遊液を高電圧放電に暴露することが必要である。本方法の変法においては、ペクチン分解酵素のようなある種の細胞壁分解酵素が使われて標的受容細胞を未処理よりもエレクトロポレーションによる形質転換に感受性にする (米国特許第 5,384,253 号、この明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする)。また、受容細胞は、機械的創傷によって形質転換に感受性にすることもできる。

40

エレクトロポレーションを用いる真核細胞のトランスフェクションは多くが成功している。この方法でマウスプレ B リンパ球はヒト 免疫グロブリン遺伝子でトランスフェクトされ (Potter et al., 1984)、ラット肝細胞はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子でトランスフェクトされている (Tur-Kaspa et al., 1986)

【 0 0 4 3 】

iv . リン酸カルシウム

本発明の他の実施態様においては、核酸はリン酸カルシウム沈降を用いて細胞に導入され

50

る。ヒトK B細胞は、この手法を用いてアデノウイルス5 DNA (Graham & Van Der Eb, 1973)でトランスフェクトされている。またこの方法では、マウスL (A9)、マウスC127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3、ヒーラー細胞がネオマイシンマーカ遺伝子でトランスフェクトされ(Chen & Okayama, 1987)、ラット肝細胞が種々のマーカー遺伝子でトランスフェクトされた(Rippe et al., 1990)。

v. DEAE-デキストラン

他の実施態様においては、核酸はDEAE-デキストランに続いてポリエチレングリコールを用いて細胞に送達される。この方法では、リポータープラスミドがマウス骨髄腫や赤白血病細胞に導入された(Gopal, 1985)。

vi. 音波処理ローディング

本発明の他の実施態様には、直接ソニックローディングによる核酸の導入が含まれる。LTK⁺線維芽細胞はソニックローディングによりチミジンキナーゼ遺伝子でトランスフェクトされている(Fechheimer et al., 1987)。

vii. リポソーム仲介トランスフェクション

本発明の他の実施態様においては、核酸は、例えば、リポソームのような脂質複合体にからみつけることができる。リポソームは、リン脂質二分子膜と内部水性媒体を特徴とする小胞構造である。多重膜リポソームは水性媒体で分かれた多重脂質層を有する。リン脂質が過剰量の水溶液に懸濁した場合に自然に形成する。脂質成分は、閉鎖構造を形成する前に自己転位を受け、水と、脂質二分子膜間の溶解した溶質をからみつける(Ghosh & Bachhawat, 1991)。リポフェクタミン(Gibco BRL)又はスーパーフェクト(Qiagen)と複合した核酸も企図される。

リポソーム仲介核酸送達と異種DNAの試験管内発現は、かなり成功している(Nicolau & Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987)。培養したニワトリ胚、ヒーラー、肝がんの細胞における異種DNAのリポソーム仲介送達と発現の可能性も証明されている(Wong et al., 1980)。

本発明のある種の実施態様においては、リポソームを血球凝集ウイルス(HVJ)と複合させることができる。これにより、細胞膜との融合を容易にするとともにリポソーム封入DNAの細胞侵入を促進させることがわかった(Kaneda et al., 1989)。他の実施態様においては、リポソームを核非ヒストン染色体タンパク質(HMG-1)と共に複合又は使用することができる(Kato et al., 1991)。他の実施態様においては、リポソームはHVJとHMG-1双方と共に複合又は使用することができる。他の実施態様においては、送達伝達体はリガンドとリポソームを含むことができる。

【0044】

viii. 受容体仲介トランスフェクション

更にまた、核酸は、受容体仲介送達伝達体によって標的細胞に送達することができる。これらは、標的細胞に生じる受容体仲介エンドサイトーシスによって高分子の選択的取込みを利用するものである。種々の受容体の細胞型特異的分配の観点から、この送達法は本発明の他の特異性の程度を加える。

ある受容体仲介遺伝子ターゲティング伝達体は、細胞受容体特異的リガンドと核酸結合剤を含んでいる。あるものは、送達すべき核酸が作用的に結合した細胞受容体特異的リガンドを含んでいる。いくつかのリガンドは受容体仲介遺伝子移入に用いられ(Wu & Wu, 1987; Wagner et al., 1990; Perales et al., 1994; Myers, 欧州公開明細書第0273085号)、手法の作用可能性が確立している。他の哺乳動物細胞型に関する特異的送達も記載されている(Wu & Wu, 1993; この文献の記載は本願明細書に含まれるものとする)。本発明のある種の態様においては、リガンドは標的細胞集団上で特異的に発現した受容体に対応するように選ばれる。

他の実施態様においては、細胞特異的核酸ターゲティング伝達体の核酸送達伝達成分は、特定の結合リガンドをリポソームと組合わせて含むことができる。送達すべき核酸はリポソーム内に収容され、特異的結合リガンドはリポソーム膜に機能的に取込まれる。従って、リポソームは、標的細胞の受容体に特異的に結合し、内容物を細胞に送達する。そのよ

10

20

30

40

50

うなシステムは、例えば、表皮増殖因子(E G F)がE G F受容体のアップレギュレーションを示す細胞に核酸を受容体仲介送達するのに用いられるシステムを用いて作用することがわかった。

他の実施態様においては、更に、標的送達伝達体の核酸送達伝達体がりポソーム自体であってもよく、好ましくは、細胞特異的結合を指示する1種以上の脂質又は糖タンパク質を含む。例えば、ラクトシル-セラミド、ガラクトース末端アシアロガングリオシドがりポソームに取込まれ、肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込み増加が見られた(Nicolau et al., 1987)。本発明の組織特異的トランスフォーミング構築物は、同様の方法で標的細胞に特異的に送達することができる。

【0045】

10

E. 治療遺伝子とDNA損傷剤の併用投与

I. 投与

本発明で治療し得る腫瘍としては、脳(グリア芽細胞腫、髄芽腫、星状細胞腫、希突起グリオーマ、上衣腫)、肺、肝、脾、腎、リンパ節、小腸、膵、血液細胞、結腸、胃、乳房、子宮内膜、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭頸部、食道、骨髄、血液又は他の組織の腫瘍を含むがこれらに限定されない。腫瘍は、転移と非転移として区別することができる。種々の実施態様としては、皮膚、筋肉、顔、脳、前立腺、乳房、子宮内膜、肺、頭頸部、膵、小腸、血液細胞、肝、精巣、卵巣、結腸、皮膚、胃、食道、脾、リンパ節、骨髄又は腎の腫瘍細胞が含まれる。他の実施態様としては、末梢血、リンパ液、腹水、漿液、胸水、喀痰、脳脊髄液、涙液、便又は尿のような流体試料が含まれる。

20

本発明によれば、Egr-1推進発現ベクターとDNA損傷剤の送達を提供される。この組合わせは、例えば、1以上の標的細胞の死滅、1以上の標的細胞におけるアポトーシスの誘導、1以上の標的細胞の増殖速度の低減、転移頻度又は数の減少、腫瘍の大きさの縮小、腫瘍の増殖の阻止、腫瘍又は1以上の標的細胞への血液供給の減少、1以上の標的細胞又は腫瘍に対する免疫応答の促進、がんの進行の防止又は阻止し、又はがんをもつ患者の寿命の延長により、患者において過剰増殖性疾患(例えば、がん)に影響を及ぼすことができる。

更に一般的には、これらの薬剤は、がん細胞の増殖を死滅又は阻止するのに有効な用量による合計量で与えられる。この方法は、細胞と薬剤を同時に又は薬剤の細胞への別個の投与が所望される治療効果を与える時間内に接触させることを含んでもよい。これは、細胞、組織又は生物体と両薬剤を含む単一組成物又は薬理学的製剤とを接触させることにより、又は細胞と2種以上の異なる組成物又は製剤とを接触させることにより達成することができる。

30

【0046】

細胞、組織又は生物体に適用する場合の“接触”や“暴露”という用語は、治療構築物とDNA損傷剤が標的細胞、組織又は生物体に送達される方法、又は標的細胞、組織又は生物体と直接並べて置かれる方法を記載するように本明細書に用いられる。細胞死滅又は静止を得るために、これらの薬剤は、細胞を死滅させるか又は分裂することを阻止するのに有効な合計量で1以上の細胞に送達される。

発現構築物は、数分～数週の間隔でDNA損傷剤の前でも、同時でも、後でもよい。これらの薬剤が細胞、組織又は生物体に個別に適用される実施態様においては、DNA損傷剤が細胞、組織又は生物体においてEgr-1プロモーターからの発現を誘導することがなできるように、各送達時間の間にほとんど時間が切れないことを通常は確実にする。例えば、そのような場合、細胞、組織又は生物体と薬剤とをほとんど同時(即ち、約1分未満)に接触させることができることが企図される。他の態様においては、これらの薬剤は、約1分間、約5分間、約10分間、約20分間、約30分間、約45分間、約60分間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約25時間、約26時間、約27時間、約28時間、約29時

40

50

間、約 30 時間、約 31 時間、約 32 時間、約 33 時間、約 34 時間、約 35 時間、約 36 時間、約 37 時間、約 38 時間、約 39 時間、約 40 時間、約 41 時間、約 42 時間、約 43 時間、約 44 時間、約 45 時間、約 46 時間、約 47 時間、約 48 時間、約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 10 日、約 11 日、約 12 日、約 13 日、約 14 日、約 15 日、約 16 日、約 17 日、約 18 日、約 19 日、約 20 日、約 21 日、約 1 週、約 3 週、約 4 週、約 5 週、約 6 週、約 7 週又は約 8 週以上離して、又はその中の得られる範囲に投与することができる。

種々の組合わせを用いることができる。そのような組合わせの非限定例を次に示す。Egr-1 は “A” であり、DNA 損傷剤は “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 10
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

他の組合わせも企図される。

【0047】

本発明の薬剤の投与は、化学療法又は遺伝子治療の投与用一般プロトコルに従ってもよいが、いずれにせよ毒性が考慮される。治療周期は必要のように繰り返されることが予想される。具体的な実施態様においては、種々の追加薬剤を本発明と組合わせて適用することができることが企図される。

“有効な量” は、がん細胞の増殖を減少、低減、阻害或いは阻止する薬剤、アポトーシスを誘導する薬剤、転移を阻止する薬剤、細胞を死滅させる薬剤、細胞内の細胞毒性を誘導する薬剤の量として定義される。 20

薬剤は、一般的には、静脈内、動脈内、腫瘍内、非経口又は腹腔内投与することができる。特に、すべてのがんをもつ患者に Egr-1 と DNA 損傷剤の局所的、局部的、全身的送達に適した方法が考えられる。局所投与が有効であり、腫瘍塊の直接注射、周辺部注射、又は切除した腫瘍床の注射又は浸潤が含まれる。局部的送達には、腫瘍血管系又は局部血液供給部への投与を含むことができる。また、DNA 損傷剤と Egr-1 ベクターのいずれか又は双方の全身的送達は、ある場合には、例えば、広範囲の転移が生じた場合に適切である。

【0048】

II. 製剤

薬剤の医薬剤形は、一般的には、注射用溶液又は分散液としての使用に調製される。すべての場合において、剤形は無菌でなければならず、簡単な注入能が存在する程度まで流体でなければならない。製造や保存の条件下で安定でなければならず、細菌や真菌のような微生物の混入作用に対して保護しなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、又は液体ポリエチレングリコール等)、その適切な混合液、又は植物油を含む溶媒又は分散培養液であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用、分散液の場合に必要なとされる粒子径又は界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤や抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたらされ得る。多くの場合、等張物質、例えば、糖又は塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の長時間の吸収は、吸収を送らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムやゼラチンの組成物中での使用によりもたらされ得る。 40

滅菌注射用溶液は、必要量の活性化化合物を上で挙げた種々の他の成分と混合することにより調製され、必要な場合、続いて過滅菌される。一般的には、分散液は、種々の滅菌有効成分を分散基本培養液と上記で挙げたものから必要とされる他の成分を含む無菌伝達体に混合することにより調製される。無菌注射用溶液の調製用無菌粉末の場合には、好ましい調製方法は、有効成分と以前に無菌ろ過した溶液からの所望の追加成分の粉末を得る真空乾燥法や凍結乾燥法である。

本明細書に用いられる“薬学的に許容しうる担体”は、溶媒、分散培養液、コーティング 50

、抗菌剤や抗真菌剤、等張剤や吸収遅延剤等のいずれか又はすべてを含んでいる。医薬活性物質用の培養液や薬剤の使用は、当該技術において周知である。慣用の培養液又は薬剤が有効成分と適合しない限りを除いて治療組成物の使用が企図される。補助的有効成分を組成物に混合することもできる。

【0049】

F．補助治療

I．放射線治療物質

放射線治療物質と要素は、例えば、照射、X線、UV照射、マイクロ波、電子放出、ラジオアイソトープ等のDNA損傷を誘導する放射線や波が含まれる。治療は、局所的な腫瘍部位を上記の形の放射線で照射することにより達成することができる。おそらくこれらの要素のすべてがDNAの前駆物質、DNAの複製と修復、染色体の集合と維持に対して広範囲の損傷DNAを行う。

X線の投与量範囲は、一日線量50～200レントゲン、長期間(3～4週)から1回線量2000～6000レントゲンまでの範囲である。ラジオアイソトープの投与量範囲は広く変動し、同位元素の半減期、放出された放射線の強さとタイプ、新生物細胞による取込みに左右される。

II．手術

がん増殖を除去するための外科治療は、一般的には、腫瘍とがんの治療の標準的方法である。これは、残っている新生物細胞又は悪性腫瘍細胞の破壊を確実にするために他の治療、例えば、化学療法及び/又は放射線療法を組合わせた治療を更に効果的にするためにがん増殖全体を除去するか又は減退させる試みである。従って、手術は、本発明と組合わせて用いることができる。

がんをもつ人の約60%は、例えば、予防的手術、診断又は進展度診断手術、治癒的手術又は姑息的手術を含むある種の手術を受ける。手術、特に治癒的手術は、他の治療、例えば、本発明や1種以上の他の薬剤とともに用いることができる。

治癒的手術としては、がん組織の全部又は一部が物理的に除去、切除及び/又は破壊される切除術が含まれる。手術が表在性がん、前がん、又は正常組織の偶然量を除去、切除又は破壊することも更に企図される。手術による治療としては、例えば、腫瘍切除、レーザ手術、凍結手術、電気手術、顕微鏡的制御手術(モース術)が挙げられる。腫瘍切除は、腫瘍の少なくとも一部を物理的に除去することを意味する。がん細胞、組織、又は腫瘍の一部又は全部を切除したときに、体内に空洞が生じてよい。

腫瘍又は手術域の治療は、抗がん治療とともに患者又は手術域の治療を達成することができる。そのような治療は、例えば、約1日毎、約2日毎、約3日毎、約4日毎、約5日毎、約6日毎、約7日毎、又は約1週毎、約2週毎、約3週毎、約4週ごと、約5週毎又は約1ヶ月毎、約2ヶ月毎、約3ヶ月毎、約4ヶ月毎、約5ヶ月毎、約6ヶ月毎、約7ヶ月毎、約8ヶ月毎、約9ヶ月毎、約10ヶ月毎、約11ヶ月毎、又は約12ヶ月毎に繰り返すことができる。これらの治療は、用量が異なってもよい。

【0050】

III．免疫療法

免疫療法剤は、一般的には、免疫エフェクター細胞やがん細胞を標的にし破壊する分子の使用によるものである。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上のあるマーカーに特異的な抗体であってもよい。抗体単独で治療のエフェクターとして働き、細胞死滅を実際に行う他の細胞を強化することもできる。抗体は、薬剤又は毒素(例えば、化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素等)に結合することもでき、単にターゲティング剤として働く。そのような抗体結合体は、免疫毒素と呼ばれ、当該技術において周知である(米国特許第5,686,072号、同第5,578,706号、同第4,792,447号、同第5,045,451号、同第4,664,911号、同第5,767,072号を参照のこと、各明細書の記載は本願明細書に含まれるものとする)。また、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接又は間接に相互作用する表面分子をもつリンパ球であってもよい。種々のエフェクター細胞としては、細胞毒性T細胞又はNK細胞が含まれる。

10

20

30

40

50

免疫療法の一態様においては、腫瘍細胞はターゲティングに従うマーカー、即ち、大部分の他の細胞には存在しないあるマーカーをもたなければならない。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらのいずれもが本発明に関連したターゲティングに適するものである。一般的な腫瘍マーカーには、がん胎児性抗原、前立腺特異抗原、泌尿器腫瘍随伴抗原、胎児抗原、チロシナーゼ(p97)、gp68、TAG-72、HMGF、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又はp155が含まれる。

i. 免疫刺激剤

免疫療法の個々の態様においては、免疫刺激分子を一つの物質として、更に好ましくは他の物質、例えば、サイトカイン、例えば、IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、腫瘍壊死因子；インターフェロン、 α 、 β 、 γ ；F42K又は他のサイトカイン類似体；ケモカイン、例えば、MIP-1、MIP-1 β 、MCP-1、RANTES、IL-8；又は増殖因子、例えば、FLT3リガンドとともに用いることである。

本発明に用いられる企図された具体的なサイトカインは腫瘍壊死因子である。腫瘍壊死因子(TNF；カケクチン)は、ある種のがん細胞を死滅させ、サイトカイン産生を活性化し、マクロファージや内皮細胞を活性化し、コラーゲンやコラゲナーゼの生産を促進させ、炎症性伝達物質や敗血症の伝達物質であり、異化作用、熱、睡眠を促進させる糖タンパク質である。ある病原体は、TNF産生の刺激によって腫瘍退縮を引き起こす。TNFが有効投与量で単独で用いられる場合は極めて毒性であり得るので、おそらく最適用法は他の薬剤と組合わせて少量で用いるものである。その免疫抑制作用はインターフェロンによって増強されるので、その併用は潜在的に危険である。TNFとインターフェロンのハイブリッドは、抗がん活性を有することがわかった。

特に企図される他のサイトカインは、インターフェロンである。インターフェロンは、ヘアリー細胞白血病、カポジ肉腫、メラノーマ、カルチノイド、腎細胞がん、卵巣がん、膀胱がん、非ホジキンリンパ腫、菌状息肉症、多発性硬化症、慢性顆粒球性白血病の治療に用いられている。

【0051】

ii. 受動免疫療法

がんの受動免疫療法には多くの異なる方法が存在する。次の：抗体のみの注射；毒素又は化学療法剤に結合した抗体の注射；放射性同位体に結合した抗体の注射；抗イディオタイプ抗体の注射；更に骨髓における腫瘍細胞の瀉下に広く分類することができる。

好ましくは、ヒトモノクローナル抗体は、患者における副作用がほとんど又は全く生じないので受動免疫療法に使われる。しかしながら、それらの適用は、不足により幾分制限され、これまで病巣内にのみに投与されてきた。例えば、ガングリオシド抗原に対するヒトモノクローナル抗体は、皮膚再発メラノーマに罹患している患者に病巣内に投与されている(Irie & Morton, 1986)。毎日又は毎週病巣内注射した後、6～10人の患者に退縮が見られた。他の実験では、2種のヒトモノクローナル抗体の病巣内注射から中程度の成功が得られた(Irie et al., 1989)。

2種の異なる抗原に対して1を超えるモノクローナル抗体又は複数の抗原特異性をもつ抗体さえも投与することは好ましい。治療プロトコルには、リンホカイン又は他の免疫増強剤の投与が含まれてもよい(Bajorin et al., 1988)。

iii. 能動免疫療法

能動免疫療法においては、抗原ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質、又は自己又は同種間腫瘍細胞組成物又は“ワクチン”を、一般的には異なる細菌アジュバントと投与する(Ravindranath & Morton, 1991; Morton & Ravindranath, 1996; Morton et al., 1992; Mitchell et al., 1990; Mitchell et al., 1993)。メラノーマ免疫療法においては、高IgM応答を誘起する患者は、IgM抗体を誘起しないか又は低IgM抗体を誘起する患者よりしばしば生存する(Morton et al., 1992)。IgM抗体は、しばしば一時的抗体であり、その法則の例外は抗ガングリオシド抗体又は抗炭水化物抗体であると思われる。

iv. 養子免疫

養子免疫においては、患者の循環しているリンパ球、又は腫瘍浸潤リンパ球を試験管内で分離し、IL-2のようなリンホカインで活性化するか又は腫瘍壊死因子を導入し、再投与する(Rosenberg et al., 1988; 1989)。これを達成するために、免疫学的有効量の活性リンパ球を本明細書に記載されるアジュバント取込み抗原ペプチド組成物と組合わせて動物、又はヒト患者に投与する。活性化リンパ球は、血液又は腫瘍試料から初期に分離するとともに試験管内で活性化(又は“増殖”)した患者自体の細胞であることが最も好ましい。この形の免疫療法は、メラノーマや腎がんの退縮のいくつかの症例を生じているが、応答者の割合は応答しないものに比べてほとんどない。

【0052】

G. 治療の有効性のスクリーニングとモニタリング

本発明に関連して治療の進行をモニターするか又は治療の一部としてモニターするために個体から腫瘍細胞、正常細胞又は腫瘍細胞と正常細胞の双方を除去することができることが企図される。そのような細胞を取り出しDAPI染色で処理してクロマチンの縮合レベルを求め、アポトーシスレベルを測定し、中性スフィンゴミエリナーゼ産生レベル又は次のような他の方法を測定することにより治療の有効性をモニターすることができることが予想される。

アポトーシスの誘導を求める具体的な一方法は、DNAの多能性を測定する末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ仲介dUTPピオチニック末端標識(TUNEL)分析である(Gorczyca, 1993)。この分析は、酵素末端トランスフェラーゼによる標識UTPの破壊DNA鎖への取込みをモニターすることによりDNAの断片化を測定するものである。取込みは、エレクトロスコーピー又は細胞選別法(例えば、FACS)によってモニターすることができる。

【0053】

H. 生体外送達

本発明においては、生体外遺伝子治療-動物又は患者から細胞を分離し、細胞を試験管内で処理し、次に修飾細胞を動物又は個体へ戻す-を使うことができる。この方法は、高用量の治療、また、生体内設定では起こり得ない他の要因の追加を可能にする。特に、自己骨髓細胞(BMC)移植は、血液又は骨髓を採取し放射線又は化学療法の強化前に保存されるサルベージ法として用いられる。がん細胞の再導入を防止するそのような細胞の処理は非常に有益である。

ヒト単核細胞(MNC)を調製する際に、骨髓のアリコートを遠心分離管のような容器に加層する。最初に、MNCは、骨髓源、例えば、脛骨、大腿骨、脊柱、肋骨、股、胸骨、上腕骨、橈骨、尺骨、脛骨、腓骨から得ることができる。更に、これらの細胞は、臍帯血、末梢血、又はサイトカイン可動末梢血から得ることもできる。ヒト造血幹細胞の他の供給源には、胎児性卵黄嚢、胎児肝、胎児と成人の脾臓、又は血液が含まれる。骨髓層を遠心分離して管の底に赤血球の沈降物を生じ、培養液の透明な層の界面層はMNCと上に血漿培養液層を含んでいる。次に、界面層を、例えば、吸引を用いて除去することができる。この層を1000gで遠心分離して最後にMNC沈降物を得る。次に、この沈降物をFACSによる細胞選別用に適した緩衝液に再懸濁することができる。分離したMNCを試験管内でクローン化して免疫学的に活性な細胞を増殖させる。次に、増殖した治療的に活性な細胞を患者に与えて治療効果を得る。

I. 臨床試験

本例は、a)がん治療タンパク質をコードしている核酸セグメントを含む発現構築物を準備し、該核酸セグメントがEgr-1プロモーターの制御下に位置しているステップと、b)フリーラジカルを誘発し得るDNA損傷化合物と組合わせてヒト患者に該発現構築物を投与するステップとを含む方法によってヒト治療プロトコルの開発に関する。本方法は、他のがん治療化合物、電離放射線及び/又は他の補助がん治療を患者に投与するステップを更に含むことができる。これらの方法は、種々のがん/腫瘍や悪性転換細胞又はがん細胞が役割を果たす疾患の臨床治療に用いられる。そのような治療は、抗腫瘍治療、例えば、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、精巣がん、脳腫瘍、皮膚がん、結腸がん、胃がん、食道

10

20

30

40

50

がん、気管がん、頭頸部がん、膵がん、肝がん、乳がん、卵巣がん、リンパがん、白血病、子宮がん、又は膣がんをもつ患者の治療に特に有効な手段である。

フリーラジカル誘導DNA損傷化合物は、シスプラチン、ナイトロジェンマスタード、シトキサン、シクロホスファミド、マイトマイシンc、アドリアマイシン、イホスファミド、ブレオマイシン、ドキシウルピシン、プロカルバジン、アクチノマイシン、クロラムブシル、カルボプラチナム、ブスルファン、bcnu、ccnu、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、エビルピシン、ダウノルピシン、カンプトテシン、又はミトキサントロンのようなプラチナム化合物であってもよい。抗がん特性をもつタンパク質を用いることができ、そのような化合物の例は明細書の他の所に記載される。

患者の治療とモニタリングを含む臨床試験を行う種々の要素は、本開示を考慮して当業者に既知である。次の情報は、本発明の方法を用いた臨床試験を確立するのに用いられる一般ガイドラインとして示されている。

【0054】

第I相臨床試験の候補者は、従来のすべての治療が失敗した患者である。本発明の治療製剤は、暫定的に毎週ペースで投与される。治療と病気の過程の有効性は、腫瘍の大きさ、腫瘍マーカーの存在、及び/又はがん細胞の骨髓浸潤のようなモニタリングパラメータによる定期的なペースで評価することができる。患者の進行と治療の有効性をモニターするために用いられる試験には、身体検査、X線、血液結果又は他の臨床試験法が含まれる。更に、ベクターによって発現された抗がんタンパク質の発現を評価するために末梢血と骨髓の試料が取り出される。第I相試験に投与される用量は、標準的な第I相臨床試験に行われるように増大する。即ち、許容できる最大範囲に達するまで用量が増大する。

臨床応答は、許容できる基準によって区切ることができる。例えば、完全な応答は、少なくとも2ヶ月間がん細胞の証拠の完全な消失によって定義することができる。一方、部分的応答は、少なくとも2ヶ月間がん細胞の50%減少によって定義することができる。典型的な治療経過は、個々の患者や当業者に既知の方法で治療される疾患によって異なる。典型的な治療経過は、7~21日間にわたって送達した約6回の投与を含むことができる。医師による選択の際に、用法は3週毎に又はより少ない頻度(1ヶ月毎、2ヶ月毎、3ヶ月毎等)ペースで6回の投与を続けるものである。例えば、肺がんをもつ患者は、8週周期で治療されるが、患者に副作用が見られない場合には長期間用いることができ、患者が希望される治療を許容しない場合には短期間になってもよい。各周期は、等しい間隔をとって20~35回の個々の投与からなるが、これも臨床状態によって異なってもよい。これらは単に例示的な治療回数であり、他の多くの時間経過が可能であることを当業者が容易に認識することは当然のことである。

患者は、予め又は同時に外科治療、化学療法、放射線療法又は遺伝子治療を受けていてもよいが必要ではない。最適には、患者は十分な骨髓機能(末梢絶対顆粒球数 $>2,000/\text{mm}^3$ 、血小板数 $100,000/\text{mm}^3$ として定義される)、十分な肝機能(ビリルビン 1.5 mg/dl 、十分な腎機能(クレアチニン 1.5 mg/dl)を示す。

本発明の治療組成物は、典型的には、所望されるように標準的な周知の非毒性の生理的に許容し得る担体、アジュバント、又は伝達体を含む投薬単位製剤で非経口的に投与される。本明細書に用いられる非経口という用語には、静脈内、腫瘍内、皮下、筋肉内、内部又は注入法が含まれる。これらの組成物は、細胞の増殖を死滅又は阻止するのに有効な量で与えられる。

組成物の局部送達は、臨床疾患を妨げるのに治療的に有効な用量を送達する効率のよい方法である。また、全身的送達も適するものである。本発明の治療組成物は、腫瘍の部位に直接患者に投与することができる。組成物の容量は、腫瘍の全面が治療組成物によって接触することを確実にするのに通常は十分でなければならない。一実施態様においては、投与は簡単には腫瘍への治療組成物の注入を必要としている。他の実施態様においては、カテーテルが腫瘍部位に挿入され、空洞に所望時間連続して灌流することができる。

上記治療法は前臨床試験から得られた知識に従って変えることができることは当然のことである。当業者は、本明細書に開示された情報を用いるとともに治療法を最適化すること

ができる。

【0055】

J. 実施例

本発明の好適実施態様を示すために次の実施例が含まれる。次の実施例に開示された方法が本発明の実施に十分機能するように本発明者によって発見された方法であるので、その実施の好ましい方法を構成するとみなされ得ることは当業者によって理解されなければならない。しかしながら、当業者は、本開示を考慮して多くの変更が開示された個々の実施態様において行うことができかつ本発明の真意と範囲から逸脱することなく類似の又は同様の結果を得ることができることを理解すべきである。

【実施例1】

10

【0056】

方法

細胞及び細胞培養物 細胞系 Seg-1、ヒトの食道腺がん (David Beer博士、ミシガン大学、アナーバー、ミシガン州) および DHD / K12 / RTb (PROb)、1,2-ジメチルヒドラジン誘導により同系 BD-IX ラットから得られたラット結腸腺がん (Francois Martin博士、ディジョン大学、フランス) を、ウシ胎仔血清 (FBS、10% v/v) (Intergen、パーチェス、ニューヨーク州)、ペニシリン (100 IU/ml)、ストレプトマイシン (100 µg/ml) (GibcoBRL) で補足したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (GibcoBRL、グラントアイランド、ニューヨーク州) 中に、37 °C、7.5% CO₂ で維持した。

動物 胸腺欠損ヌードマウス (Frederick Cancer Research Institute、フレデリック、メリーランド州) に食事と水を自由に与えた。実験は、シカゴ大学のガイドラインに従った。

20

ウイルスベクター ウイルスベクター Ad.Egr.TNF.11D と Ad.Null.3511.11D (GenVec、ゲイザースバーグ、メリーランド州) を -80 °C で保管し、配合緩衝液中で適当な濃度に希釈した。

TNF-α 蛋白の試験管内測定 Seg-1 と PROb 細胞を、10⁵ 細胞 / ウェルの割合で 12 ウェルプレート (Becton Dickinson、ベッドフォード、マサチューセッツ州) に播種し、一夜増殖し、無血清培養液中で感染多重度 (MOI) 100 にて 2 ~ 3 時間 Ad.Null.3511.11D 又は Ad.Egr.TNF.11D に感染させた。完全培地中の IR 処理細胞は、Pantak PCM100x 線発生装置を用いて細胞に 5 Gy を照射した。シスプラチン群中の細胞は、完全培地中で 5 µM のシスプラチンに接触させた。24、48、72 時間後に細胞と上清を擦り取って回収し、ヒト TNF-α の産生物を ELISA (R&D Systems、ミネアポリス、ミネソタ州)、次に 3 サイクルの凍結-融解溶解により定量した。分析は、3 回行なった。2 回処理したプレートを用いて IR とシスプラチンの細胞毒性を調整した。細胞をベルセン (HBS 中の 0.02% EDTA) とトリプシン-EDTA (0.25% トリプシン、1mM EDTA・4Na) (GibcoBRL) を用いて回収し、トリパンブルー (0.4%) を除外した血球計 (GibcoBRL) を用いて計数した。タンパク質分析は、タンパク質濃度を規格化するために行った (Bio-Rad、ハーキュレス、カリフォルニア州)。

30

【0057】

試験管内シフェラーゼリポーター分析 Egr-1 構築物 pE425 (全ての CArG 要素を含む 596 塩基対、AP-1 部位は含まない) と pE660 (最小 Egr-1 プロモーター、CArG 要素を含まない 115 塩基対) (Datta et al., 1993) を配列確認と、酵素制限とライゲーションによる PCR 産物の pGL3 基本ホタルルシフェラーゼリポータープラスミド構築物 (Promega、マディソン、ウィスコンシン州) への挿入により評価した。JM109 コンピテント細胞 (Stratagene、ラ・ホーヤ、カリフォルニア州) をこれらのプラスミドで形質変換し、エンドトキシンを含まないマキシプレップ (Qiagen、ヴァレンシア、カリフォルニア州) を調製し、産物確認を PCR、シーケンシング、酵素制限、電気泳動法により行なった。Seg-1 と PROb 細胞を 10⁵ 細胞 / ウェルの割合で 12 ウェルプレートに播種し、トランスファストトランスフェクション試薬 (Promega) を用いて、pGL3 基本 (プロモーターのない負の対照)、pGL3 660 (最小 Egr-1 プロモーター)、又は pGL3 425 (全ての CArG 要素を含

40

50

む Egr-1プロモーター)のホタルルシフェラーゼリポータープラスミド構築物でトランスフェクトした。全てのグループをpRL-TK(HSVチミジンキナーゼプロモーター)のレニラルシフェラーゼリポータープラスミド構築物で同時トランスフェクションしてトランスフェクション効果を平均化した。48時間後に、細胞をIR(20 Gy)又はシスプラチン(5 μ M)に接触させた。6時間後に細胞を回収し、デュアル-ルシフェラーゼリポーター分析システム(Promega)によりルシフェラーゼ活性を計測した。

TNF-タンパク質の生体内測定 Seg-1又はPROb細胞(5×10^6 / 0.1 ml)をヌードマウスの右後肢に注入した。腫瘍保有マウスを次の4グループ：腫瘍内(IT)Ad.Null.3511.11D(2×10^8 p.u./10 μ l)と生理食塩水(NS)又はシスプラチン(8 mg/kg)による腹腔内(IP)と、IT Ad.Egr.TNF.11D(2×10^8 p.u./10 μ l)とIP NS又はシスプラチンの1つに無作為化した。IP NS又はシスプラチン処理物をITベクター後に投与した。2つの連続したITとIP注入を行なった。動物を安楽死させ、2度目のIP注入の48時間後に異種移植片を回収した。異種移植片を液体窒素中で急速冷凍し、RIPA緩衝液(NaCl 15 mM、トリス10 mM、pH 7.5、EDTA 5 mM、pH 7.5、PMSEF 100 mM、ロイペプチン 1 μ g/ml、アプロチニン 2 μ g/ml)中でブリンクマンポリトロンホモジナイザー(Kinematica AG、ルツェルン、スイス)を用いてホモジナイズした。3サイクルの凍結-融解溶解後、ホモジェネートを10,000 rpm(Sorvall RC5C SS34ローター)で10分間、4で遠心分離した。上清中のTNF-レベルをELISAを用いて測定し、タンパク質分析を行なった(Bio-Rad、ハーキュリーズ、カリフォルニア州)。

生体内増殖実験 Seg-1又はPROb細胞(5×10^6 / 0.1 ml)をヌードマウスの右後肢に注入した。腫瘍保有マウスを次の4グループ：腫瘍内(IT)Ad.Null.3511.11D(2×10^8 p.u./10 μ l)と腹腔内(IP)生理食塩水(NS)又はシスプラチン(3 mg/kg)と、IT Ad.Egr.TNF.11D(2×10^8 p.u./10 μ l)とIP NS又はシスプラチンの1つに割り当てた。IP NS又はシスプラチン注入をITベクター注入後に行ない、4日連続して毎日ITとIP注入を行なった。異種移植片をカリパスを用いて2日毎に測定し、腫瘍体積を(長さ \times 幅 \times 厚さ)/2で計算した。分数の腫瘍体積(V/V_0 、 $V_0=0$ 日目の体積)を計算し、プロットした。

統計分析 統計的有意性は、2端部スチューデントのt検定により求めた。

【実施例2】

【0058】

Ad.Egr.TNF.11D注入とシスプラチン暴露後のヒトとラットの腫瘍細胞におけるTNF-の試験管内誘導

Egr-1はROI及び/又はDNA損傷によりそのプロモーターのCArG要素によって誘導されるために、CArG要素がTNF-cDNA(Ad.Egr.TNF.11D)の上流にあるアデノウイルスベクターを感染させた腫瘍細胞によるTNF-産生を細胞のレドックス状態を変化させるDNA損傷剤であるシスプラチン接触の後に分析した(Davis et al., 2001)。TNF-産生は、5 μ Mシスプラチン暴露の後に、ヒトの食道Seg-1細胞とラットの結腸直腸PROb細胞中で試験した。TNF-濃度は、ヒトのTNF-に特異的なELISAを用いて求めた。Seg-1細胞沈降物又はヌルベクター(Ad.Null.3511.11D)で感染させ、IR又はシスプラチンで処理した培養物からの上清からはTNF-タンパク質は検出されなかった。一方、Ad.Egr.TNF.11Dベクターを感染させ、IR(5 Gy)に24、48、72時間に暴露したSeg-1細胞の培養物からは、有意水準のTNF-タンパク質が検出された(それぞれ 768.8 ± 32.6 、 593.0 ± 27.6 、 746.0 ± 18.5)。ベクターのみを感染させた比較細胞は(269.3 ± 1.9 、 167.8 ± 8.4 、 260.6 ± 14.9 ; $P < 0.001$)であった。Ad.Egr.TNF.11D + IRの併用処理の場合は、TNF産生が2.9、3.5、2.9倍に増加した。TNF-

タンパク質の同様の誘導について、Ad.Egr.TNF.11Dベクターを感染させ、5 μ Mシスプラチンに接触させたSeg-1細胞を調べたところ、ベクター感染のみの場合と比較して、24時間(885.3 ± 28.7)、48時間(892.6 ± 21.3)、72時間(901.7 ± 21.7 ; $P < 0.001$ 、図5A)であった。Ad.Egr.TNF.11D + シスプラチンの併用処理では、このように3.3、5.3となり、TNF産生は、3.5倍に増加した。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

P R O b細胞培養物を用いて比較実験を行なった。再び、P R O b細胞沈降物又はヌルベクター (A d . N u l l . 3 5 1 1 . 1 1 D) を感染させ、I R 又はシスプラチン処理した培養物の上清からはT N F - タンパク質は検出されなかった。A d . E g r . T N F . 1 1 D ベクターを感染させ、I R (5 G y) に24、48、72時間暴露したP R O b細胞の培養物から有意水準のT N F - タンパク質が検出された(それぞれ 55.1 ± 4.6 、 440.5 ± 7.0 、 812.7 ± 8.9)。ベクター感染のみの細胞を比較すると(17.9 ± 1.7 、 169.7 ± 5.2 、 522.5 ± 11.3 ; $P < 0.001$)であった。A d . E g r . T N F . 1 1 D + I R との併用処理の場合、3.1、2.6、1.6倍のT N F 産生の増加が見られた。同様のT N F - タンパク質の誘導について、A d . E g r . T N F . 1 1 D ベクターを感染させ、24、48、72時間5 μ Mシスプラチン暴露を行ったS e g - 1細胞においてベクター

10

感染のみと比較して調べた(52.4 ± 0.6 、 318.6 ± 30.6 、 812.2 ± 11.0 ; $P < 0.001$ 、図5 B)。A d . E g r . T N F . 1 1 D + シスプラチンの併用処理では、2.9、1.9、1.6倍のT N F 産生が増加した。これらのS e g - 1とP R O b細胞系からの知見は、I R とシスプラチンが、E g r - 1プロモーターを活性化することにより、T N F の発現を誘導していることを示している。

選択的腫瘍ターゲティングベクターにおいては、今回の場合はT N F によりシスプラチン誘導性遺伝子構築物がシスプラチンの効果を増強する。シスプラチンとT N F - は、細胞死滅について異なるメカニズムを持ち、それ故、細胞のシスプラチン耐性はT N F - に感受性であり、その逆でもある。また、高腫瘍内濃度のT N F - によって微小血管系の腫瘍が損傷されて壊死が誘導される。これは、T N F - とシスプラチン抵抗性腫瘍の治療に有効である可能性がある。シスプラチン/A d . E g r . T N F . 1 1 D ストラテジーは、従って、放射線治療又は外科治療によっては効果的治療ができない局所的な腫瘍に対して効果的な治療である。また、A d . E g r . T N F . 1 1 D は、化学-放射線治療の併用治療において局所的な効果を高めることもできる。

20

【 実施例 3 】

【 0 0 6 0 】

E g r - 1プロモーターのC A r G 要素はシスプラチンによるT N F - の誘導を仲介する

E g r - 1プロモーターのC A r G 要素がシスプラチンにより誘導性を有するか調べるために、p G L 3 基本(負の対照)、p G L 3 660(最小のE g r - 1プロモーターだけからなり、C A r G 要素を含まない)、又はp G L 3 425(全てのC A r G 要素からなり、A P - 1部位を含まない)のホタルルシフェラーゼリポータープラスミド構築物とp R L - T K のレニラルシフェラーゼリポータープラスミド構築物で同時トランスフェクトしたS e g - 1とP R O b細胞中のルシフェラーゼリポーター遺伝子の活性化を測定することによりE g r - 1プロモーターの活性を評価した。最小ルシフェラーゼ活性(L A)は、p G L 3 基本プラスミド構築物でトランスフェクトしたS e g - 1細胞(L A = 0.01 - 0.02)又はp G L 3 660プラスミド構築物でトランスフェクトしたS e g - 1細胞(L A = 0.10 - 0.18)で検出された。しかしながら、p G L 3 425プラスミド構築物でトランスフェクトしたS e g - 1細胞は、I R (20 G y)暴露の後、未処理の対照細胞(L A = 6.37)と比較して、相対ルシフェラーゼ活性(L A = 15.07)が2.4倍の増加を示し($P = 0.005$)、未処理の対照細胞と比較して、シスプラチン(50 μ M)暴露の後、2.0倍のルシフェラーゼ活性(L A = 2.89)の増加が見られた($P = 0.005$)(図6 A)。

30

40

P R O b細胞系において、同様の結果が得られた。最小ルシフェラーゼ活性は、p G L 3 基本プラスミド構築物でトランスフェクトしたP R O b細胞(L A = 0.21 - 0.30)、又はp G L 3 660プラスミド構築物でトランスフェクトしたP R O b細胞(L A = 0.76 - 1.84)において検出された。p G L 3 425プラスミド構築物でトランスフェクトしたP R O b細胞は、未処理の対照細胞(L A = 13.69)と比較して、I R (20 G y)照射の後、ルシフェラーゼ活性(L A = 57.75)が4.2倍の増加を示した($P = 0.004$)。また、未処理の対照細胞と比較して、シスプラチン(50 μ M)の暴露の後、ルシフェラーゼ活性(L A = 49.40)は3.6倍の増加($P = 0.01$)を示した(図6 B)。これらのデータは、E g r - 1プロモーターのC A r G 要素がシスプラチンによる誘導能力を持ち、キメラE g r - 1 . T N F - 遺伝子の転写活性を仲介していることを示している。

50

【実施例 4】

【0061】

Ad.Egr.TNF.11D とシスプラチン処理後のヒトとラットの腫瘍異種移植片における TNF- の誘導

ヒトと齧歯動物の腫瘍に Ad.Egr.TNF.11D ベクターを感染させた後に、シスプラチンによる TNF- 誘導を分析した。胸腺欠損ヌードマウスの後肢を成長させる Seg-1 又は P R O b 細胞の異種移植片に Ad.Null.3511.11D 又は Ad.Egr.TNF.11D を腫瘍内 (IT) 注射した。腫瘍保有マウスは、生理食塩水 (NS) 又はシスプラチン (3 mg/kg) を IP 注射した。腫瘍ホモジェネート中の TNF- 濃度を E L I S A を用いて定量した。

Ad.Null.3511.11D ベクター注射と NS 又はシスプラチンによる全身的処理後の Seg-1 腫瘍ホモジェネート中からは、TNF- タンパク質は検出されなかった。Ad.Egr.TNF.11D + シスプラチン (1294.0 ± 438.5 pg/mg) の併用処理後、腫瘍内 TNF- タンパク質の顕著な増加 (3.5 倍) が観測された。ベクターのみの処理と比較すると (366.5 ± 52.6 pg/mg、 $P < 0.05$ 、図 7 A) であった。

Ad.Null.3511.11D ベクター注射と NS 又はシスプラチンによる全身的処理後の P R O b 腫瘍ホモジェネートからは TNF- タンパク質は検出されなかった。しかしながら、ベクターのみの処理の場合 (321.4 ± 27.7 pg/mg、 $P < 0.001$ 、図 7 B) と比較して、Ad.Egr.TNF.11D + シスプラチン (878.6 ± 61.9 pg/mg) による併用処理後には、腫瘍内 TNF- タンパク質の顕著な増加 (2.7 倍) が見られた。これらの知見は、シスプラチンによる TNF- タンパク質の生体内誘導を示し、TNF- タンパク質が腫瘍組織よりも Ad.Egr.TNF.11D ベクターの産物であるということを実証している。

【実施例 5】

【0062】

シスプラチン誘導性 Ad.Egr.TNF.11D はヒトとラットの異種移植片の処理を増強する化学誘導性 Ad.Egr.TNF.11D とシスプラチンの潜在的な抗腫瘍細胞用について、Seg-1 と P R O b 異種移植片中で調べた。Seg-1 の実験において、0 日目 (処理の開始日) の平均腫瘍体積は、 381.3 ± 10.8 mm³ ($n=48$ 、12 マウス/処理グループ) であった。異種移植片に Ad.Null.3511.11D 又は Ad.Egr.TNF.11D を IT に注射した。マウスには、NS 又はシスプラチンを IP 注射した。対照腫瘍 (Ad.Null.3511.11D + NS) は、4 日で 2 倍のサイズになり、14 日で平均腫瘍体積は 4.7 倍の増加を示した。Ad.Egr.TNF.11D ベクター + NS 処理の腫瘍で同様の増殖パターンが観察された (4 日目に 2 倍の増加、14 日目に平均体積が 3.8 倍の増加)。ヌルベクター + シスプラチン処理腫瘍と比較して、Ad.Egr.TNF.11D + シスプラチンの併用処理が施された腫瘍において顕著な腫瘍の減少が見られ、4 日目 ($P=0.045$)、6 日目 ($P < 0.005$)、8 日目 ($P < 0.002$)、10 日目 ($P < 0.001$)、12 日目 ($P < 0.004$)、および 14 日目 ($P < 0.021$) であった (図 8 A)。

P R O b 実験においては、0 日目の平均的な腫瘍体積は、 244.2 ± 6.2 mm³ ($n=40$ 、10 マウス/処理グループ) であった。対照腫瘍 (Ad.Null.3511.11D + NS) は、4 日間で徐々に 2 倍のサイズに増殖し、14 日で平均腫瘍体積は 4.4 倍の増加を示した。Ad.Egr.TNF.11D ベクター + NS で処理した腫瘍で同様の増殖パターンが観察された (4 日目で 1.6 倍の増加、14 日目で平均体積が 3.6 倍に増加)。ヌルベクター + シスプラチンにより処理した腫瘍と比較して、Ad.Egr.TNF.11D + シスプラチンの併用処理を施された腫瘍において、顕著な腫瘍の減少が見られ、4 日目 ($P=0.045$)、6 日目 ($P < 0.001$)、8 日目 ($P=0.048$)、10 日目 ($P < 0.001$)、12 日目 ($P < 0.001$)、14 日目 ($P=0.002$) であった (図 8 B)。総合すれば、これらのデータは、ヒトと齧歯動物由来の異種移植片におけるシスプラチンと Ad.Egr.TNF.11D 間の抗腫瘍相互作用を支持している。これらの知見は、試験管内と生体内実験において観察されたシスプラチンによる TNF- 誘導の結果と一致し、また、それらの結果により支持されるものである。シスプラチンによる処理後、毒性が観察されたが、シスプラチンと Ad.Egr.TNF.11D による併用処理後に追加毒性は見られなかった。

【0063】

従って、ROI 産生を刺激する一般的に化学療法剤として用いられるシスプラチンは、T

N F - をコードしているcD N Aの上流にライゲートされたE g r - 1プロモーターのC A r G要素をコードしたアデノウイルスベクターを感染させたヒトと齧歯動物のがん細胞においてT N F - 産生を誘導する。T N F - とシスプラチン両方の顕著な抗腫瘍効果は、両方の実験的な腫瘍系において観察された。従って、本発明は、シスプラチンのような化学療法剤の使用と、抗腫瘍遺伝子を用いた遺伝子治療の一時的で空間的な制御とを組み合わせた新規な方法を提供する。

最も一般的なヒト新生物において、肉眼で見える腫瘍は、最も標準的な化学療法剤によっては効果的に治療することができない。E g r 1 - T N F - とシスプラチンのような転写ターゲティングストラテジーは、肉眼的腫瘍に注入又は直接注射することが可能なときは、微小転移巣が存在するときでさえ有効である。ベクター/シスプラチンの組み合わせは、肉眼的腫瘍に効果を示し、シスプラチンは、微小転移性疾患に効果を示すからである。腫瘍への直接注射は、例えば、C T画像再現と組み合わせたP E Tスキャンなどの腫瘍のX線画像分析の最近の進歩によって向上しているにちがいない。更に、ウイルスベクターのターゲティングの最近の開発により、転移性がんの化学誘導性遺伝子治療の付加的な特異性が出てくる可能性がある。

本明細書に開示され特許請求請求した組成物と方法の全ては、本開示を考慮すれば過度に実験せずに実施し得る。本発明の組成物と方法は、好適実施態様によって記載されているが、本組成物と方法と、本明細書に記載される方法のステップ又はステップの順序に、本発明の概念、真意、範囲から逸脱せずに当業者により変更されてもよいことは明らかである。更に詳しくは、同様の又は類似した効果が得られるかぎり、化学的と生理学的の双方に関連した物質であれば、本明細書に記載された物質の代替として用いることができることも明らかである。このような当業者にとって明らかな全ての同様の代替や変更は、添付された特許請求の範囲によって定義されるように、本発明の真意、範囲、概念に含まれているものである。

【 0 0 6 4 】

J . 文献

以下の文献は、典型的な手順又はここで示したものに補充して他の詳細を提供する範囲で、参照によってここに具体的に組み込まれる。

10

20

U. S. Patent 4,664,911	
U. S. Patent 4,684,611	
U. S. Patent 4,792,447	
U.S. Patent 4,797,368	
U. S. Patent 4,952,500	
U. S. Patent 5,045,451	
U. S. Patent 5,139,941	10
U. S. Patent 5,302,523	
U. S. Patent 5,322,783	
U. S. Patent 5,354,855	
U. S. Patent 5,359,046	
U. S. Patent 5,384,253	
U. S. Patent 5,464,765	
U. S. Patent 5,538,877	
U. S. Patent 5,538,880	20
U. S. Patent 5,550,318	
U. S. Patent 5,563,055	
U. S. Patent 5,578,706	
U. S. Patent 5,580,859	
U. S. Patent 5,589,466	
U. S. Patent 5,591,616	
U. S. Patent 5,610,042	30
U. S. Patent 5,656,610	
U. S. Patent 5,686,072	
U. S. Patent 5,702,932	
U. S. Patent 5,736,524	
U. S. Patent 5,767,072	
U. S. Patent 5,780,448	
U. S. Patent 5,925,565	
U. S. Patent 5,935,819	40

U. S. Patent 5,945,100,
 U. S. Patent 5,981,274
 U. S. Patent 5,994,136
 U. S. Patent 5,994,624
 U. S. Patent 6,013,516

Arap *et al.*, *Cancer Res.*, 55:1351-1354, 1995.

Ausubel *et al.*, In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley and Sons, Inc., 1994:

10

Baichwal and Sugden, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117-148, 1986.

Bajorin *et al.*, *Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 7:A967, 1988.

Bedzyk *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265:18615, 1990

Blomer *et al.*, *J Virol.* 71(9): 6641-6649, 1997

Bonavida *et al.*, *Gynecol Oncol*, 38:333-9, 1990.

Burbage *et al.*, *Leuk Res*, 21(7):681-690, 1997.

Bussemakers *et al.*, *Cancer Res.*, 52:2916-2922, 1992.

20

Caldas *et al.*, *Nat. Genet.*, 8:27-32, 1994.

Carbonelli *et al.* *FEMS Microbiol Lett.* 177(1):75-82, 1999.

Casey *et al.*, *Oncogene*, 6:1791-1797, 1991.

Chandler *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(8):3596-3601, 1997.

Chaudhary *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9491, 1990

Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.

Cheng *et al.*, *Cancer Res.*, 54:5547-5551, 1994.

Cheung *et al.*, *Arch Biochem Biophys*, 305(2):563-569, 1993.

30

Coccea, *Biotechniques*, 23:814-816, 1997.

Cotten *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(13):6094-6098, 1992.

Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.

Curiel, In: *Viruses in Human Gene Therapy*, J.-M.H. Vos (Ed.), Carolina Academic Press, Durham, NC, pp 179-212, 1994.

Datta *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:2419-22, 1993.

Davis *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther*, 296:1-6, 2001.

Demetri *et al.*, *J Clin Oncol*, 7:1545-53, 1989.

40

Duan *et al.*, *J Neurooncol*, 52:23-36, 2001.

Edelman and Crossin, *Annu. Rev. Biochem.*, 60:155-190, 1991.

- Edelman, *Annu. Rev. Biochem.*, 54:135-169, 1985.
- Fechheimer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Fiers, *FEBS Letters*, 285(2):199-212, 1991.
- Forster and Symons, *Cell*, 49:211-220, 1987.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Frixen *et al.*, *J. Cell Biol.*, 113:173-185, 1991. 10
- Gerlach *et al.*, *Nature (London)*, 328:802-805, 1987
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, (Wu G, Wu C ed.), New York: Marcel Dekker, pp. 87-104, 1991.
- Giancotti and Ruoslahti, *Cell*, 60:849-859, 1990.
- Gonzalez-Zulueta *et al.*, *Cancer Research*, 55(20):4531-4535, 1995.
- Goodbourn and Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Gorczyca *et al.*, *Cancer Res.*, 53:1945-1951, 1993. 20
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Hall, *Radiobiology for the Radiologist*, Harper and Row, 1988.
- Hall, *Radiobiology for the Radiologist*, Harper and Row, 1994.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Havell *et al.*, *J Exp Med*, 167:1067-85, 1988.
- Herman *et al.*, *Cancer Research*, 55(20):4525-4530, 1995.
- Hollstein *et al.*, *Science*, 253:49-53, 1991. 30
- Horwich *et al.* *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- Hussussian *et al.*, *Nature Genetics*, 15-21, 1994.
- Inouye *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985.
- Irie and Morton, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:8694-8698, 1986
- Johnson and Stevenson, In: *Cancer.Principles and Practice of Oncology* (ed. DeVita, V.T., Hellman and Rosenberg,) 376-88, 2001.
- Joyce, *Nature*, 338:217-244, 1989. 40
- Kamb *et al.*, *Nature Genetics*, 8:22-26, 1994.
- Kamb *et al.*, *Science*, 2674:436-440, 1994.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Kartalou and Essigmann, *Mutat Res*, 478:23-43, 2001.

- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-1117, 1994.
- Kim and Cook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8788-8792, 1987.
- Kucuk *et al.*, *Am J Clin Oncol*, 23:371-5, 2000.
- Levenson *et al.*, *Human Gene Therapy*, 9:1233-1236, 1998.
- Lebkowski *et al.*, *Mol Cell Biol*, 8(10):3988-3996, 1988.
- Lidor *et al.*, *Am J Obstet Gynecol*;177(3):579-585, 1997.
- Lin and Guidotti, *J. Biol. Chem.*, 264:14408-14414, 1989; 10
- Laughlin *et al.*, *J. Virol.*, 60(2):515-524, 1986.
- McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62(6):1963-1973, 1988.
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Massuda *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26):14701-14706, 1997.
- Matsura *et al.*, *Brit. J. Cancer*, 66:1122-1130, 1992.
- Mauceri *et al.*, *Int J Cancer*, 97:410-5, 2002.
- Merlo *et al.*, *Nat Med.*, (7):633-4, 1995. 20
- Michel and Westhof, *J. Mol. Biol.*, 216:585-610, 1990.
- Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986.
- Mizukami *et al.*, *Virology*, 217:124-130, 1996.
- Mori *et al.*, *Cancer Res.*, 54:3396-3397, 1994.
- Morton and Ravindranath, In *Tumor Immunology*, Dalglish (ed.), London: Cambridge University Press, 1-55, 1996.
- Morton *et al.*, *Ann. Surg.*, 216:463-482, 1992.
- Muzyczka, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:97-129, 1992. 30
- Myers, EPO 0273085.
- Nabel *et al.*, *Science*, 244:1342-1344, 1989.
- Nakamoto *et al.*, *Anticancer Res*, 20:4087-96, 2000.
- Naldini *et al.*, *Science*, 272(5259):195, 1996
- Nicolas and Rubenstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, pp. 493-513, 1988.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987. 40
- Nobri *et al.*, *Nature*, 368:753-756, 1995.
- Obrador *et al.*, *Curr Pharm Biotechnol*, 2:119-30, 2001.

- Obrink, *BioEssays*, 13:227-233, 1991.
- Odin and Obrink, *Exp. Cell Res.*, 171:1-15, 1987.
- Okamoto *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 91:11045-11049, 1994.
- Old, *Science*, 230:630-2, 1985.
- Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21:415-28, 1993.
- Orlow *et al.*, *Cancer Res.*, 54:2848-2851, 1994.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- PCT 94/09699 10
- PCT 95/06128
- Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334:320-325, 1988.
- Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:4086-4090, 1994.
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- Potter *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Ravindranath and Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303-329, 1991.
- Reinhold-Hurek and Shub, *Nature*, 357:173-176, 1992.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580. 20
- Ridgeway, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez RL, Denhardt DT, ed., Stoneham:Butterworth, pp. 467-492, 1988.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Robaye *et al.*, *Am J Pathol*, 138:447-53, 1991.
- Rosenberg, P., *Autotransfusion (editorial)" Duodecim.*, 106 (14) p1027-9, 1990.
- Roux *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Sarver *et al.*, *Science*, 247:1222-1225, 1990.
- Scanlon *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:10591-10595, 1991. 30
- Serrano *et al.*, *Nature*, 366:704-707, 1993.
- Serrano *et al.*, *Science*, 267:249-252, 1995.
- Slungaard *et al.*, *J Exp Med*, 171:2025-41, 1990.
- Smith and Rutledge, *Natl Cancer Inst Monogr*, 42:169-172, 1975.
- Spriggs *et al.*, *J Natl Cancer Inst*, 80:1039-44, 1988.
- Staba *et al.*, *Gene Therapy*, 5:293-300, 1998.
- Takahashi *et al.*, *Cancer Res.*, 52:734-736, 1992.
- Tartaglia *et al.*, *Cell*, 74:845-53, 1993. 40
- Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986.
- Thom *et al.*, *J Clin Oncol*, 13:264-73, 1995.

Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081, 1984.

Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.

Umbas *et al.*, *Cancer Res.*, 52:5104-5109, 1992.

Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87(9):3410-3414, 1990.

Watanabe *et al.*, *Cancer Res.*, 48:2179-83, 1988.

Weichselbaum *et al.*, *Acta Oncol* 40, 735-8, 2001.

Weichselbaum *et al.*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 30:229-34, 1994.

Weinberg, *Science*, 254:1138-1145, 1991.

Wilson *et al.*, *Science*, 244:1344-1346, 1989.

Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.

Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.

Wu and Wu, *Biochem.*, 27:887-892, 1988.

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

Young *et al.*, *N Engl J Med.* 7:299(23):1261-1266, 1978.

Zufferey *et al.*, *Biotechnol*, 15(9):871-875, 1997

10

20

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1】Seg-1における化学誘導。時間と処理 (Seg-1 = 食道がん細胞系; UTC = 未処理対照; Ad.Egr.TNF = Egr-1プロモーターの制御下の腫瘍壊死因子をコードしたアデノウイルス; platnm = シスプラチナム; TNF/Pltm = Ad.TNF + Pltm) の関数として分数の腫瘍体積を測定する。

30

【図2】化学誘導によるTNF発現。時間 (5日間又は10日間) と処理 (utc = 未処理対照; Ad.TNF = Egr-1プロモーターの制御下の腫瘍壊死因子をコードしたアデノウイルス; Pltm = シスプラチナム; TNF/Pltm = Ad.TNF + Pltm) の関数としてのTNF産生/ピコグラム/ml。

【図3】4 mg/kg白金によるTNF誘導。時間 (5日間又は10日間) と処理 (Ad.TNF = Egr-1プロモーターの制御下の腫瘍壊死因子をコードしたアデノウイルス; TNF/Pltm = Ad.TNF + シスプラチナム) TNF産生/ピコグラム/mgタンパク質。

【図4】Ad.Egr.TNF処理Seg-1における白金の用量応答。時間と処理 (Seg-1 = 食道がん細胞系; pbs = リン酸緩衝生理食塩水; Ad.TNF = Egr-1プロモーターの制御下の腫瘍壊死因子をコードしたアデノウイルス; Plat1 = シスプラチナム 1 mg/kg; Plat3 = シスプラチナム 3 mg/kg; Plat6 = シスプラチナム 6 mg/kg; Plat1/TNF = シスプラチナム 1 mg/kg + Ad.TNF; Plat3/TNF = シスプラチナム 3 mg/kg + Ad.TNF; Plat6/TNF = シスプラチナム 6 mg/kg + Ad.TNF) の関数として分数の腫瘍体積を測定する。

40

【図5】TNF-タンパク質の試験管内測定。IR (5 Gy) 又はシスプラチン (5 μ M) に曝したAd.Egr.TNF.11D感染細胞によるTNF-産生をELISAを用いて測定した。Ad.Egr.TNF.11D + IR ($P < 0.001$) と Ad.Egr.TNF.11D + シスプラチン ($P < 0.001$) に曝した24、48、72時間後に有意レベルのTNF-タンパク質を検出し、Seg-1培養物 (図5A) とPROb培養物 (図5B) のみのベクターと比較した。データは平均 \pm SEMとして示されている。

【図6】試験管内リポーター分析。ルシフェラーゼリポーター構築物を用いてIR又はシ

50

スプラチンによる Egr-1 の誘導を評価した。最少ルシフェラーゼ活性が検出可能であった後に pGL3 (負の対照) 又は pGL3 660 プラスミド (最少 Egr-1 プロモーター) 構築物でトランスフェクトした。図 6 A。Seg-1 細胞においては、IR (20 Gy) に曝した後にルシフェラーゼ比活性の 2.4 倍の増加 ($P = 0.005$) が見られ、シスプラチン (50 μ M) に曝した後に 4.2 倍の増加 ($P = 0.004$) が見られた。PROb 細胞においては、IR (20 Gy) に曝した後にルシフェラーゼ比活性の 4.2 倍の増加 ($P = 0.004$) が見られ、シスプラチン (50 μ M) に曝した後に 3.6 倍の増加 ($P = 0.01$) が見られた。データは平均 \pm SEM として示されている。

【図 7】TNF- α タンパク質の生体内測定。Ad.Egr.TNF.11D 注入異種移植片による TNF- α 産生を ELISA により測定した。Ad.Egr.TNF.11D + シスプラチンと併用処理した後に Seg-1 (図 7 A) 移植片 (3.5 倍増加; $P < 0.05$) と PROb (図 7 B) 異種移植片 (2.7 倍; $P < 0.001$) において Ad.Egr.TNF.11D ベクターのみによる処理と比較して腫瘍内 TNF- α タンパク質濃度の著しい増加が見られた。データは平均 \pm SEM として示されている。

【図 8】生体内再増殖実験。シスプラチンを含む又は含まない Ad.Null.3511.11D 又は Ad.Egr.TNF.11D を注入した異種移植片の体積を測定することにより Ad.Egr.TNF.11D とシスプラチンによる併用処理の効果を評価した。図 8 A。Seg-1 異種移植片においては、Ad.Egr.TNF.11D + シスプラチンによる併用処理により、4 日目 ($P = 0.045$)、6 日目 ($P < 0.005$)、8 日目 ($P < 0.002$)、10 日目 ($P < 0.001$)、12 日目 ($P < 0.004$)、14 日目 ($P < 0.021$) の日に Ad.Null + シスプラチンで処理した腫瘍と比較して腫瘍の著しい退縮が生じた。PROb 異種移植片においては、Ad.Egr.TNF.11D + シスプラチンによる併用処理を受けた腫瘍が 4 日目 ($P = 0.045$)、6 日目 ($P < 0.001$)、8 日目 ($P < 0.048$)、10 日目 ($P < 0.001$)、12 日目 ($P < 0.001$)、14 日目 ($P < 0.002$) の日に Ad.Null + シスプラチンで処理した腫瘍と比較して腫瘍の著しい退縮が見られた。データは平均 \pm SEM として示されている。

【図 1】

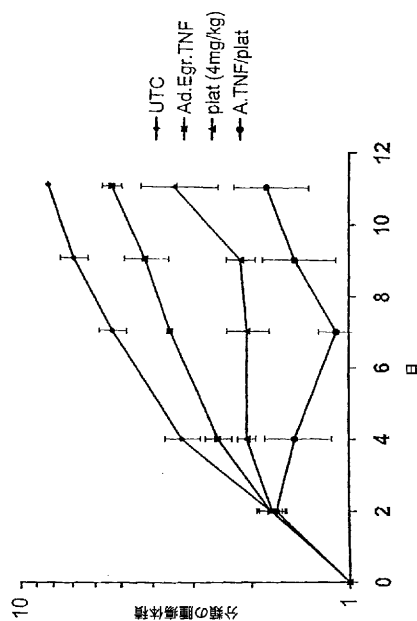


FIG. 1

【図 2】

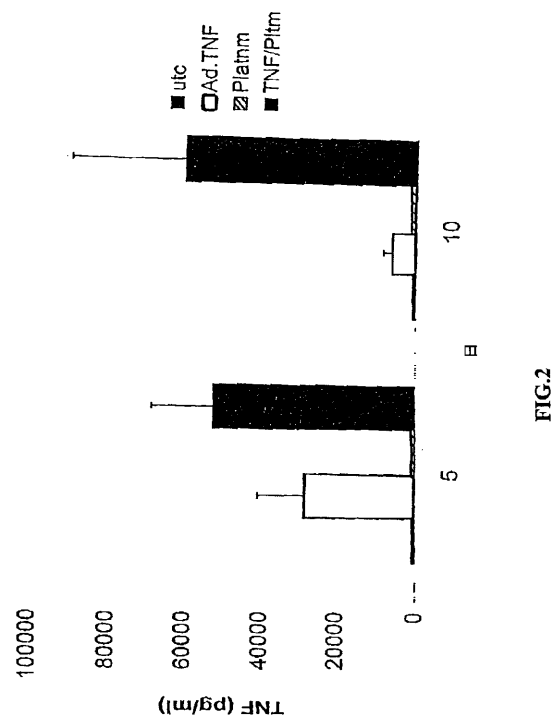


FIG. 2

【 図 3 】

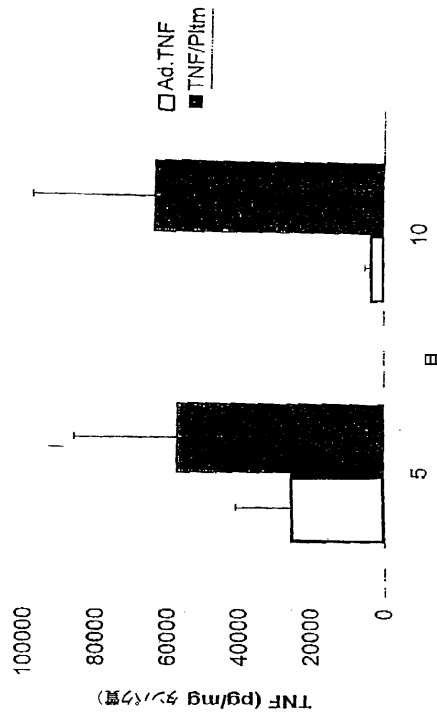


FIG. 3

【 図 4 】

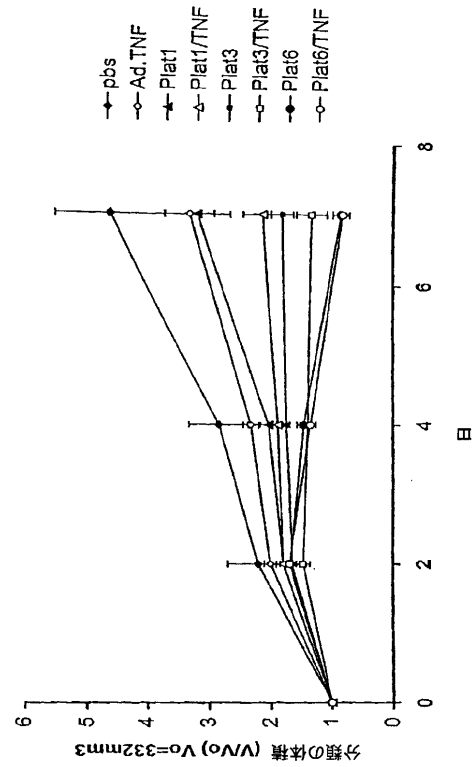


FIG. 4

【 図 5 A 】

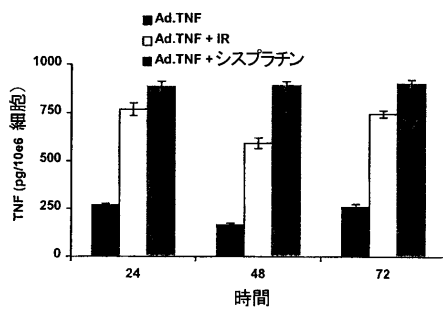


FIG. 5A

【 図 5 B 】

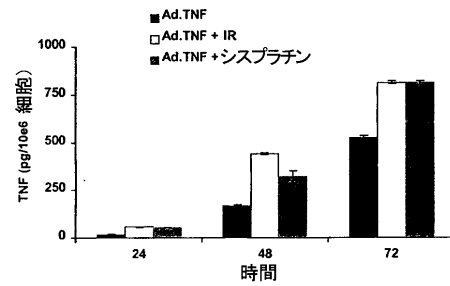


FIG. 5B

【 図 6 A 】

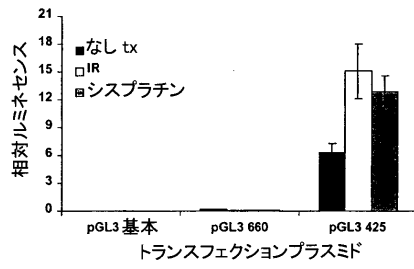


FIG. 6A

【 図 6 B 】

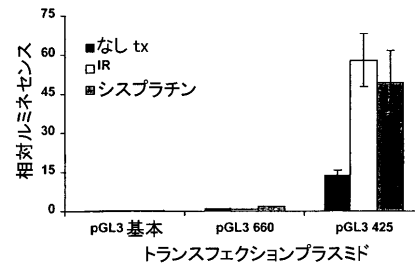


FIG. 6B

【 図 7 A 】

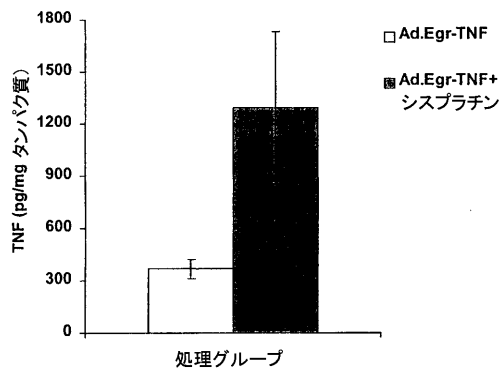


FIG. 7A

【 図 7 B 】

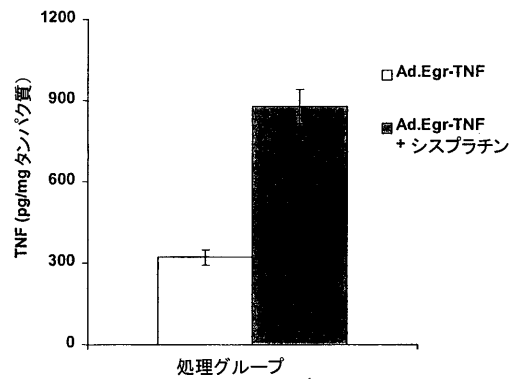


FIG. 7B

【図 8 A】

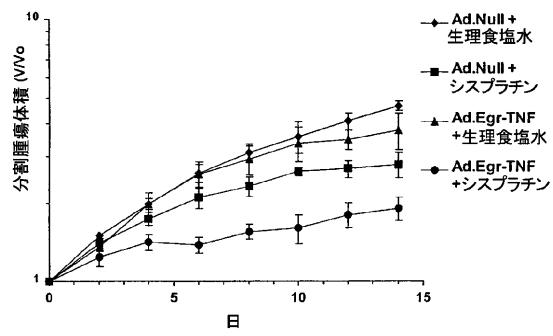


FIG. 8A

【図 8 B】

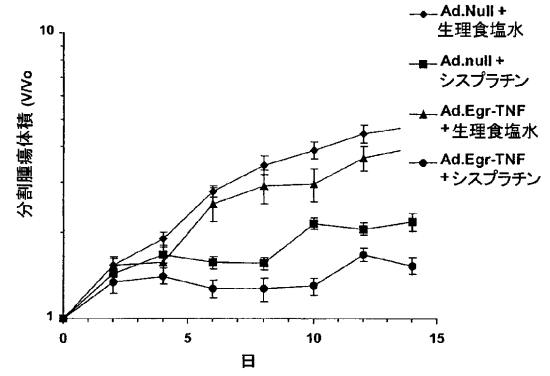


FIG. 8B

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/080849 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K** Mitchell [US/US]; 442 W. Wellington # 6W, Chicago, IL 60657 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/10733
- (22) International Filing Date: 5 April 2002 (05.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/282,040 6 April 2001 (06.04.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 60/282,040 (CON) filed on 6 April 2001 (06.04.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): **UNIVERSITY OF CHICAGO** [US/US]; 5640 South Ellis Avenue, Chicago, IL 60637 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **WEICHSELBAUM, Ralph, R.** [US/US]; 1909 North Burling, Chicago, IL 60614 (US); **KUFE, Donald, W.** [US/US]; 179 Grove Street, Wellesley, MA 02181 (US); **GUPTA, Vinay** [US/US]; 1637 West Altgeld, Chicago, IL 60637 (US); **MAUCERI, Helen** [US/US]; 2046 Barnham Place, Wheaton, IL 60187 (US); **PARK, James** [US/US]; 526 N. 32nd St. Unit # E, Chicago, IL 60616 (US); **POSNER,**
- (74) Agent: **HIGHLANDER, Steven, L.**; Fulbright & Jaworski L.L.P., Suite 2400, 600 Congress Avenue, Austin, TX 78701 (US).
- (81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/080849 A2

(54) Title: CHEMOTHERAPEUTIC INDUCTION OF EGR-1 PROMOTER ACTIVITY

(57) Abstract: The present invention provides for improved therapeutic regimens for treating benign hyperproliferative diseases and cancers. The Egr-1 promoter, long known to be radiation-responsive, has now been shown to be inducible for DNA damaging chemical agents, many of which themselves are used in therapies. Thus, the present invention provides for the advantages combination of a DNA damaging chemical and an expression vector containing a therapeutic gene driven by the Egr-1 promoter.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

DESCRIPTION**CHEMOTHERAPEUTIC INDUCTION OF EGR-1 PROMOTER ACTIVITY**

5

BACKGROUND OF THE INVENTION

The present application claims priority to co-pending U.S. Patent Application Serial No. 60/282,040, filed April 6, 2001. The entire text of the above-referenced disclosures is specifically incorporated by reference herein without disclaimer.

10

1. Field of the Invention

The present invention relates generally to the fields of molecular biology and cancer therapy. More particularly, it concerns use of the DNA damaging chemicals to induce expression of the Egr-1 promoter. This permits tissue specific expression of therapeutic genes which, in combination with the DNA damaging chemicals, provide therapy to patients suffering from cancer.

15

2. Description of Related Art

Certain cancer treatment methods, including radiotherapy and chemotherapy, involve damaging the DNA of the cancer cell. The cellular response to normal DNA damage includes activation of DNA repair, cell cycle arrest and lethality (Hall, 1988). For example, the induction of DNA double-strand breaks results in lethal chromosomal aberrations that include deletions, dicentric, rings, and anaphase bridges (Hall, 1994).

20

Another approach to treating cancers is gene therapy. This involves the transfer of a foreign gene into a cancer cell, often a tumor suppressor or inducer of apoptosis, under conditions suitable for expression of the gene. Once expressed, the gene product confers a beneficial effect on the tumor cell by either slowing its growth, inhibiting its metastatic potential, or killing it outright.

25

Combining one or more of these methods is a powerful tool as heterogeneity in many tumors makes mono-therapies far less effective than combinations. However, radio-, chemo- and gene therapy all have the potential for toxic effects. Thus, being able to reduce toxicity, for example, by reducing the amount of radiation/drug/vector administered, is highly advantageous.

30

WO 02/080849

PCT/US02/10733

For example, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), which has antitumor properties, has been studied as a systemic gene-therapy treatment for cancer in phase 1 studies, but toxicity has limited the therapeutic index of this cytokine (Spriggs *et al.*, 1988; Demetri *et al.*, 1989). Also, combinations of systemic TNF- α and chemotherapy have been investigated in a few clinical trials with limited success (Nakamoto *et al.*, 2000).

On the other hand, chemotherapeutic agents such as cisplatin and other platinum analogues are currently employed in the treatment of several cancers including head and neck, esophageal, lung, testis, ovarian, and bladder cancers. Additionally, cisplatin is used concurrently with irradiation (IR) as a radiosensitizer. In spite of the relative efficacy of cisplatin, tumor-resistance has limited the role of cisplatin in curative cancer chemotherapy (Johnson and Stevenson, 2001). Tumor-derived mechanisms of cisplatin-resistance include an increase in DNA repair of cisplatin adducts in tumor cells, an increase in glutathione, which inhibits free-radical formation and subsequent DNA damage, and a relative decrease in uptake of cisplatin by resistant cells (Kartalou and Essigmann, 2001). The combination of cisplatin with other chemotherapeutic agents, especially 5-FU and VP-16, has increased the therapeutic index of both agents in some human tumors (Kucuk *et al.*, 2000), but other strategies are needed to increase the efficacy of cisplatin.

Thus, there is a need in the art to improve both gene-therapeutic as well as chemotherapeutic treatment regimens. Therapies that combine the benefits of different treatment regimens, at the same time reducing the associated side-effects, are desired.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention overcomes the deficiencies in the art and provides methods that enhance the therapeutic utility of gene-therapy as well chemotherapy. A transcriptional targeting strategy has been developed wherein inducible expression vectors that encode for therapeutic genes are induced by chemotherapeutic agents. The chemotherapeutic agents specifically target inducible promoters of the expression vector to provide targeted therapy. The therapeutic methods provided are especially effective in treating tumors.

Therefore, in accordance with the present invention, there are provided methods for expressing a protein of interest comprising (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding the protein of interest, the nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; (b) transferring the expression construct into a cell; (c)

WO 02/080849

PCT/US02/10733

contacting the cell with at least one free radical-inducing DNA damaging compound, whereby the DNA damaging compound induces expression of the protein of interest from the Egr-1 promoter.

The free radical-inducing DNA damaging compound may be a platinum compound such as cisplatin, a nitrogen mustard, cytoxan, cyclophosphamide, mitomycin c, adriamycin, iphosphamide, bleomycin, doxorubicin, procarbazine, actinomycin, chlorambucil, carboplatinum, busulfan, benu, ccnu, hexamethylmelamineoxaliplatin, epirubicin, daunorubicin, camptothecin, or mitoxantrone. Step (c) may comprise contacting the cell with at least a second free-radical inducing DNA damaging compound. The method may further comprise contacting the cell with a cancer chemotherapeutic compound or ionizing radiation. The cell may be a cancer cell, for example, a lung cancer cell, prostate cancer cell, ovarian cancer cell, testicular cancer cell, brain cancer cell, skin cancer cell, colon cancer cell, gastric cancer cell, esophageal cancer cell, tracheal cancer cell, head & neck cancer cell, pancreatic cancer cell, liver cancer cell, breast cancer cell, ovarian cancer cell, lymphoid cancer cell, leukemia cell, cervical cancer cell, or vulvar cancer cell.

The expression vector may further comprise an origin of replication, a selectable marker, or a polyadenylation signal operable linked to the nucleic segment. The expression vector may be plasmid or a viral vector, for example, an adenoviral vector, an adeno-associated viral vector, a retroviral vector, a lentiviral vector, a vaccinia viral vector, or a herpesviral vector. The viral vector may lack one or more viral genes, thus rendering the viral vector non-replicative. The cell may be located in an organism, for example, a human.

The protein of interest may be a tumor suppressor, an inducer of apoptosis, an enzyme, a toxin, a cytokine, or any other protein with antitumor activity. Examples of tumor suppressors are Rb, p16, p53, PTEN, MDA7 or BRCA1 or BRCA2. Examples of inducers of apoptosis are Bax, Bad, Bik, Ade1B, Bim, Bcl-X_s, Bak, TRAIL, Harakiri or Bid. Examples of enzymes are thymidine kinase, cytosine deaminase, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase. Examples of toxin are pseudomonas exotoxin, diphtheria toxin, cholera toxin, pertussis toxin A subunit, enterotoxin A, or ricin A chain. Other molecules with antitumor activity include interleukins (IL) and cytokines exemplified by, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, β -interferon, α -interferon, γ -interferon, angiostatin, thrombospondin, endostatin, METH-1, METH-2, GM-CSF, G-CSF, M-CSF and tumor necrosis factor (TNF) such as TNF- α and TNF- β . The skilled artisan will recognize that the invention is

WO 02/080849

PCT/US02/10733

not limited by any particular protein of interest, such as those disclosed above, as long as the protein has an antitumor effect.

In another embodiment, the invention provides methods for treating cancer in a subject comprising (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, the nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and (b) administering the expression construct to the subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound, whereby the DNA damaging compound induces expression of the cancer therapeutic protein from the Egr-1 promoter, thereby treating the cancer in the subject. The expression construct may be delivered local or regional to a tumor located in the subject, delivered systemically, or delivered via intratumoral injection or by direct injection into tumor vasculature.

The DNA damaging compound may be administered prior to administering the expression vector, after administering the expression vector, or at the same time as the expression vector. The expression vector and or DNA damaging agent may be administered at least twice. The cancer therapeutic protein may be a tumor suppressor, an inducer of apoptosis, an enzyme, a toxin, a cytokine, or any protein with anti-tumor activity.

In yet another embodiment, there are provided methods for inhibiting tumor cell growth in a subject comprising (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, the nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and (b) administering the expression construct to the subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound, whereby the DNA damaging compound induces expression of the cancer therapeutic protein from the Egr-1 promoter, thereby inhibiting tumor cell growth in the subject. In one such embodiment, the cancer therapeutic protein is TNF- α . In another such embodiment, the free radical-inducing DNA damaging compound is cisplatin.

In still yet another embodiment, there are provided methods for killing a tumor cell in a subject comprising (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, the nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and (b) administering the expression construct to the subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound, whereby the DNA damaging compound induces expression of the cancer therapeutic protein from the Egr-1 promoter, thereby killing the tumor cell in the subject.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

In still a further embodiment, there are provided methods for inhibiting tumor cell metastasis in a subject comprising (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, the nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and (b) administering the expression construct to the
5 subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound, whereby the DNA damaging compound induces expression of the cancer therapeutic protein from the Egr-1 promoter, thereby inhibiting tumor cell metastasis in the subject.

In even a further embodiment, there are provided methods for reducing tumor burden in a subject comprising (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment
10 encoding a cancer therapeutic protein, the nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and (b) administering the expression construct to the subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound, whereby the DNA damaging compound induces expression of the cancer therapeutic protein from the Egr-1 promoter, thereby reducing tumor burden in the subject.

In an additional embodiment, there are provided methods for rendering an inoperable tumor operable comprising (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, the nucleic acid segment being positioned under
15 the control of an Egr-1 promoter; and (b) administering the expression construct to the subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound, whereby the DNA
20 damaging compound induces expression of the cancer therapeutic protein from the Egr-1 promoter, thereby reducing the size or shape of the tumor and rendering susceptible to resection.

As used herein the specification, "a" or "an" may mean one or more. As used herein in the claim(s), when used in conjunction with the word "comprising", the words "a" or "an" may mean one or more than one. As used herein "another" may mean at least a second or more.

25 Other objects, features and advantages of the present invention will become apparent from the following detailed description. It should be understood, however, that the detailed description and the specific examples, while indicating preferred embodiments of the invention, are given by way of illustration only, since various changes and modifications within the spirit
30 and scope of the invention will become apparent to those skilled in the art from this detailed description.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The following drawings form part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to one or more of these drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

FIG. 1. Chemoinduction in Seg-1. Fractional tumor volume is measured as a function of time and treatment (Seg-1 = esophageal carcinoma cell line; UTC = untreated control; Ad.Egr.TNF = adenovirus encoded tumor necrosis factor under control of the Egr-1 promoter; plat = cisplatin at 4 mg/kg; A.TNF/plat = Ad.Egr.TNF + plat).

FIG. 2. TNF expression with chemoinduction. TNF production in picograms per ml as a function of time (5 days or 10 days) and treatment (utc = untreated control; Ad.TNF = adenovirus encoded tumor necrosis factor under control of the Egr-1 promoter; Platnm = cisplatin; TNF/Pltm = Ad.TNF + Platnm).

FIG. 3. TNF induction with 4 mg/kg platinum. TNF production in picograms per mg protein as a function of time (5 days or 10 days) and treatment (Ad.TNF = adenovirus encoded tumor necrosis factor under control of the Egr-1 promoter; TNF/Pltm = Ad.TNF + cisplatin).

FIG. 4. Dose response of platinum in Ad.Egr.TNF-treated Seg-1. Fractional tumor volume is measured as a function of time and treatment (Seg-1 = esophageal carcinoma cell line; pbs = phosphate buffered saline; Ad.TNF = adenovirus encoded tumor necrosis factor under control of the Egr-1 promoter; Plat1 = cisplatin at 1 mg/kg; Plat3 = cisplatin at 3 mg/kg; Plat6 = cisplatin at 6 mg/kg; Plat1/TNF = cisplatin at 1 mg/kg + Ad.TNF; Plat3/TNF = cisplatin at 3 mg/kg + Ad.TNF; Plat6/TNF = cisplatin at 6 mg/kg + Ad.TNF).

FIGS. 5A & 5B. *In vitro* measurement of TNF- α protein. TNF- α production by Ad.Egr.TNF.11D-infected cells exposed to IR (5 Gy) or cisplatin (5 μ M) was measured using ELISA. Significant levels of TNF- α protein were detected at 24, 48 and 72 hrs following exposure to Ad.Egr.TNF.11D + IR ($P < 0.001$) and Ad.Egr.TNF.11D + cisplatin ($P < 0.001$) compared with vector alone in Seg-1 cultures (FIG. 5A) and PROb cultures (FIG. 5B). Data are reported as mean \pm SEM.

FIGS. 6A & 6B. *In vitro* reporter assays. Luciferase reporter constructs were used to evaluate induction of the Egr-1 promoter by IR or cisplatin. Minimal luciferase activity was detectable following transfection with either the pGL3 (negative control) or the pGL3 660

WO 02/080849

PCT/US02/10733

plasmid (minimal Egr-1 promoter) constructs. FIG. 6A. In Seg-1 cells, a 2.4-fold increase ($P=0.005$) in relative luciferase activity was observed following exposure to IR (20 Gy) and a 2.0-fold increase ($P=0.005$) following exposure to cisplatin (50 μ M). FIG. 6B. In PROb cells, a 4.2-fold increase ($P=0.004$) in relative luciferase activity was observed following exposure to IR (20 Gy) and a 3.6-fold increase ($P=0.01$) following exposure to cisplatin (50 μ M). Data are reported as mean \pm SEM.

FIGS. 7A & 7B. *In vivo* measurement of TNF- α protein. TNF- α production by Ad.Egr.TNF.11D-injected xenografts was measured by ELISA. A significant increase in intratumoral TNF- α protein concentration was observed following combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D + cisplatin compared with treatment with Ad.Egr.TNF.11D vector alone in Seg-1 (FIG. 7A) (3.5-fold increase; $P<0.05$) and PROb (FIG. 7B) xenografts (2.7-fold; $P<0.001$). Data are reported as mean \pm SEM.

FIGS. 8A & 8B. *In vivo* regrowth studies. The effect of combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D and cisplatin was evaluated by measuring the volume of xenografts injected with Ad.Null.3511.11D or Ad.Egr.TNF.11D with or without cisplatin. FIG. 8A. In Seg-1 xenografts combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D + cisplatin produced significant tumor regression compared with tumors treated with the Ad.Null + cisplatin at days 4 ($P=0.045$), 6 ($P<0.005$), 8 ($P<0.002$), 10 ($P<0.001$), 12 ($P<0.004$), and 14 ($P<0.021$). FIG. 8B. In PROb xenografts significant tumor regression was observed in the tumors receiving combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D + cisplatin compared with tumors treated Ad.Null + cisplatin at days on days 4 ($P=0.045$), 6 ($P<0.001$), 8 ($P=0.048$), 10 ($P<0.001$), 12 ($P<0.001$), and 14 ($P=0.002$). Data are reported as mean \pm SEM.

DESCRIPTION OF ILLUSTRATIVE EMBODIMENTS

The present invention stems in part from the inventors' observation that the Egr-1 promoter, long known to contain radiation-responsive elements, also may be induced by DNA damaging chemicals. This surprising observation provides for a previously unattempted combination therapy for hyperproliferative diseases such as cancer - using an expression construct containing the Egr-1 promoter encoding an antitumor gene such as a tumor necrosis factor (TNF) in conjunction with a DNA damaging chemical.

The combined therapeutic effect of the DNA damaging agent and induced expression of the therapeutic gene in cancer cells provides a superior result to use of either agent alone and also allows for using reduced doses of each agent. Being able to reduce any systemic toxicity,

WO 02/080849

PCT/US02/10733

by reducing the amount of radiation and/or drug and/or vector administered, is highly advantageous. The following disclosure provides a detailed description of the foregoing embodiments, as well as variations thereof.

A transcriptional targeting strategy is provided whereby chemotherapeutic agents in conjunction with inducible expression vectors that encode for genes with antitumor effects may be used to effectively treat tumors, where the vectors are induced by the chemotherapeutic agent. Thus, expression constructs comprising the inducible Egr-1 promoter and encoding for any antitumor gene in conjunction with a chemotherapeutic agent that can induce and activate the Egr-1 promoter, via DNA damage or production of ROI's, are provided.

With a selective tumor-targeting vector, a genetic construct that expresses an antitumor gene that is inducible by a chemotherapeutic enhances the effects of the chemotherapeutic as well as the antitumor agent. As both the chemotherapeutic agent and the antitumor gene will generally have different mechanisms of tumor cell killing therefore, cells resistant to one agent may be sensitive to the other. It is also contemplated that such combinations may enhance the local effects of combination chemo-radiation therapy or other adjunct cancer therapies.

A. Egr-1 Promoter

The Egr-1 promoter is defined herein as those 5' regulatory sequences necessary to control the DNA damaging agent-induced transcription of downstream sequences operably connected thereto. The Egr-1 promoter has complex structure which has previously been analyzed in the context of radiation- and H₂O₂-induced gene expression. It contains multiple ETS binding sites (ETS are transcriptional regulatory proteins), three of which exist as parts of two serum response elements (SRE's), SREI and SREII. The SRE's, also known as CArG motifs, are cis-elements that regulate the expression of many growth factor responsive genes.

There are a total of six SRE's, each comprising the consensus CC(A+T-rich)GG sequence.

The present inventors have previously demonstrated that a chimeric genetic construct consisting of the 5' Egr-1 CArG elements ligated to the TNF- α cDNA express high levels of intratumoral TNF- α following IR exposure of cells transduced with this construct. Tumors transduced with the chimeric Egr-TNF construct and treated with IR exhibited increased regression/cures compared with tumors treated with either agent alone, likely due to the intratumoral induction of TNF- α production by IR, and the cytotoxic interaction of TNF- α and IR on the tumor cells and the tumor vasculature (Weichselbaum *et al.*, 2001; Staba *et al.*, 1998). In the present invention, the inventors used cisplatin, a commonly used chemotherapeutic agent that alters intracellular radical oxygen formation and damages DNA, to induce the TNF- α gene

WO 02/080849

PCT/US02/10733

under control of the DNA damage / ROI inducible CARG elements of the Egr-1 promoter. The invention therefore provides the use of agents that cause DNA damage and/or produce ROI to induce Egr-1 and therefore to drive the expression of genes under the control of Egr-1 in expression vectors.

B. DNA Damaging Chemicals

The term "DNA damaging chemical" refers to the any drug that induces, either directly or indirectly, damage to a DNA molecule. Of particular interest in the present invention are those drugs that generate free radicals. The following categories of chemicals are believed to effect DNA damage through one or more pathways.

I. Alkylating Agents

Alkylating agents are drugs that directly interact with genomic DNA to prevent the cancer cell from proliferating. This category of chemotherapeutic drugs represents agents that affect all phases of the cell cycle, that is, they are not phase-specific. Alkylating agents can be implemented to treat, for example, chronic leukemia, non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease, multiple myeloma, and particular cancers of the breast, lung, and ovary. An alkylating agent, may include, but is not limited to, a nitrogen mustard, an ethylenimine, a methylmelamine, an alkyl sulfonate, a nitrosourea or a triazines.

They include but are not limited to: busulfan, chlorambucil, cisplatin, cyclophosphamide (cytoxan), dacarbazine, ifosfamide, mechlorethamine (mustargen), and melphalan. In specific aspects, troglitazone can be used to treat cancer in combination with any one or more of these alkylating agents, some of which are discussed below.

i. Nitrogen Mustards

A nitrogen mustard may be, but is not limited to, mechlorethamine (HN_2), which is used for Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas; cyclophosphamide and/or ifosfamide, which are used in treating such cancers as acute or chronic lymphocytic leukemias, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphomas, multiple myeloma, neuroblastoma, breast, ovary, lung, Wilm's tumor, cervix testis and soft tissue sarcomas; melphalan (L-sarcosylsin), which has been used to treat such cancers as multiple myeloma, breast and ovary; and chlorambucil, which has been used to treat diseases such as, for example, chronic lymphatic (lymphocytic) leukemia, malignant lymphomas including lymphosarcoma, giant follicular lymphoma, Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

a. Chlorambucil

Chlorambucil (also known as leukeran) is a bifunctional alkylating agent of the nitrogen mustard type that has been found active against selected human neoplastic diseases.

5 Chlorambucil is known chemically as 4-[bis(2-chlorethyl)amino] benzenebutanoic acid.

Chlorambucil is available in tablet form for oral administration. It is rapidly and completely absorbed from the gastrointestinal tract. For example, after a single oral doses of about 0.6 mg/kg to about 1.2 mg/kg, peak plasma chlorambucil levels are reached within one hour and the terminal half-life of the parent drug is estimated at about 1.5 hours. About
10 0.1 mg/kg/day to about 0.2 mg/kg/day or about 3 6 mg/m²/day to about 6 mg/m²/day or alternatively about 0.4 mg/kg may be used for antineoplastic treatment. Chlorambucil is not curative by itself but may produce clinically useful palliation.

b. Cyclophosphamide

15 Cyclophosphamide is 2*H*-1,3,2-Oxazaphosphorin-2-amine, *N,N*-bis(2-chloroethyl)tetrahydro-, 2-oxide, monohydrate; termed Cytoxan available from Mead Johnson; and Neosar available from Adria. Cyclophosphamide is prepared by condensing 3-amino-1-propanol with *N,N*-bis(2-chlorethyl) phosphoramidic dichloride [(ClCH₂CH₂)₂N-POCl₂] in dioxane solution under the catalytic influence of triethylamine. The condensation is double,
20 involving both the hydroxyl and the amino groups, thus effecting the cyclization.

Unlike other β-chloroethylamino alkylators, it does not cyclize readily to the active ethyleneimmonium form until activated by hepatic enzymes. Thus, the substance is stable in the gastrointestinal tract, tolerated well and effective by the oral and parental routes and does not cause local vesication, necrosis, phlebitis or even pain.

25 Suitable oral doses for adults include, for example, about 1 mg/kg/day to about 5 mg/kg/day (usually in combination), depending upon gastrointestinal tolerance; or about 1 mg/kg/day to about 2 mg/kg/day; intravenous doses include, for example, initially about 40 mg/kg to about 50 mg/kg in divided doses over a period of about 2 days to about 5 days or about 10 mg/kg to about 15 mg/kg about every 7 days to about 10 days or about 3 mg/kg to
30 about 5 mg/kg twice a week or about 1.5 mg/kg/day to about 3 mg/kg/day. In some aspects, a dose of about 250 mg/kg/day may be administered as an antineoplastic. Because of gastrointestinal adverse effects, the intravenous route is preferred for loading. During maintenance, a leukocyte count of about 3000/mm³ to 4000/mm³ usually is desired. The drug also sometimes is administered intramuscularly, by infiltration or into body cavities. It is

WO 02/080849

PCT/US02/10733

available in dosage forms for injection of about 100 mg, about 200 mg and about 500 mg, and tablets of about 25 mg and about 50 mg.

c. Melphalan

Melphalan, also known as alkeran, L-phenylalanine mustard, phenylalanine mustard, L-PAM, or L-sarcosylsin, is a phenylalanine derivative of nitrogen mustard. Melphalan is a bifunctional alkylating agent which is active against selective human neoplastic diseases. It is known chemically as 4-[bis(2-chloroethyl)amino]-L-phenylalanine.

Melphalan is the active L-isomer of the compound and was first synthesized in 1953 by Bergel and Stock; the D-isomer, known as medphalan, is less active against certain animal tumors, and the dose needed to produce effects on chromosomes is larger than that required with the L-isomer. The racemic (DL-) form is known as merphalan or sarcosylsin. Melphalan is insoluble in water and has a pK_{a1} of about 2.1. Melphalan is available in tablet form for oral administration and has been used to treat multiple myeloma. Available evidence suggests that about one third to one half of the patients with multiple myeloma show a favorable response to oral administration of the drug.

Melphalan has been used in the treatment of epithelial ovarian carcinoma. One commonly employed regimen for the treatment of ovarian carcinoma has been to administer melphalan at a dose of about 0.2 mg/kg daily for five days as a single course. Courses are repeated about every four to five weeks depending upon hematologic tolerance (Smith and Rutledge, 1975; Young *et al.*, 1978). Alternatively, in certain embodiments, the dose of melphalan used could be as low as about 0.05 mg/kg/day or as high as about 3 mg/kg/day or greater.

ii. Ethylenimines and Methylenamines

An ethylenimine and/or a methylenamine include, but are not limited to, hexamethylenimine, used to treat ovary cancer; and thiotepa, which has been used to treat bladder, breast and ovary cancer.

iii. Alkyl Sulfonates

An alkyl sulfonate includes but is not limited to such drugs as busulfan, which has been used to treat chronic granulocytic leukemia. Busulfan (also known as myleran) is a bifunctional alkylating agent. Busulfan is known chemically as 1,4-butanediol dimethanesulfonate. Busulfan is available in tablet form for oral administration, wherein for example, each scored tablet

WO 02/080849

PCT/US02/10733

contains about 2 mg busulfan and the inactive ingredients magnesium stearate and sodium chloride.

Busulfan is indicated for the palliative treatment of chronic myelogenous (myeloid, myelocytic, granulocytic) leukemia. Although not curative, busulfan reduces the total granulocyte mass, relieves symptoms of the disease, and improves the clinical state of the patient. Approximately 90% of adults with previously untreated chronic myelogenous leukemia will obtain hematologic remission with regression or stabilization of organomegaly following the use of busulfan. Busulfan has been shown to be superior to splenic irradiation with respect to survival times and maintenance of hemoglobin levels, and to be equivalent to irradiation at controlling splenomegaly.

iv. Nitrosoureas

Nitrosoureas, like alkylating agents, inhibit DNA repair proteins. They are used to treat non-Hodgkin's lymphomas, multiple myeloma, malignant melanoma, in addition to brain tumors. A nitrosourea include but is not limited to a carmustine (BCNU), a lomustine (CCNU), a semustine (methyl-CCNU) or a streptozocin. Semustine has been used in such cancers as a primary brain tumor, a stomach or a colon cancer. Streptozocin has been used to treat diseases such as a malignant pancreatic insulinoma or a malignant carcinoid. Streptozocin has been used to treat such cancers as a malignant melanoma, Hodgkin's disease and soft tissue sarcomas.

a. Carmustine

Carmustine (sterile carmustine) is one of the nitrosoureas used in the treatment of certain neoplastic diseases. It is 1,3 bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. It is lyophilized pale yellow flakes or congealed mass with a molecular weight of 214.06. It is highly soluble in alcohol and lipids, and poorly soluble in water. Carmustine is administered by intravenous infusion after reconstitution as recommended.

Although it is generally agreed that carmustine alkylates DNA and RNA, it is not cross resistant with other alkylators. As with other nitrosoureas, it may also inhibit several key enzymatic processes by carbamoylation of amino acids in proteins.

Carmustine is indicated as palliative therapy as a single agent or in established combination therapy with other approved chemotherapeutic agents in brain tumors such as glioblastoma, brainstem glioma, medulloblastoma, astrocytoma, ependymoma, and metastatic brain tumors. Also it has been used in combination with prednisone to treat multiple myeloma. Carmustine has been used in treating such cancers as a multiple myeloma or a malignant

WO 02/080849

PCT/US02/10733

melanoma. Carmustine has proved useful, in the treatment of Hodgkin's Disease and in non-Hodgkin's lymphomas, as secondary therapy in combination with other approved drugs in patients who relapse while being treated with primary therapy, or who fail to respond to primary therapy.

5 Sterile carmustine is commonly available in 100 mg single dose vials of lyophilized material. The recommended dose of carmustine as a single agent in previously untreated patients is about 150 mg/m² to about 200 mg/m² intravenously every 6 weeks. This may be given as a single dose or divided into daily injections such as about 75 mg/m² to about 100 mg/m² on 10 2 successive days. When carmustine is used in combination with other myelosuppressive drugs or in patients in whom bone marrow reserve is depleted, the doses should be adjusted accordingly. Doses subsequent to the initial dose should be adjusted according to the hematologic response of the patient to the preceding dose. It is of course understood that other doses may be used in the present invention, for example about 10 mg/m², about 20 mg/m², about 30 mg/m², about 40 mg/m², about 50 mg/m², about 60 mg/m², about 70 mg/m², about 80 mg/m², 15 about 90 mg/m² to about 100 mg/m².

b. Lomustine

Lomustine is one of the nitrosoureas used in the treatment of certain neoplastic diseases. It is 1-(2-chloro-ethyl)-3-cyclohexyl-1 nitrosourea. It is a yellow powder with the empirical 20 formula of C₉H₁₆ClN₃O₂ and a molecular weight of 233.71. Lomustine is soluble in 10% ethanol (about 0.05 mg/mL) and in absolute alcohol (about 70 mg/mL). Lomustine is relatively insoluble in water (less than about 0.05 mg/mL). It is relatively unionized at a physiological pH. Inactive ingredients in lomustine capsules are: magnesium stearate and mannitol.

Although it is generally agreed that lomustine alkylates DNA and RNA, it is not cross 25 resistant with other alkylators. As with other nitrosoureas, it may also inhibit several key enzymatic processes by carbamylation of amino acids in proteins.

Lomustine may be given orally. Following oral administration of radioactive lomustine at doses ranging from about 30 mg/m² to 100 mg/m², about half of the radioactivity given was excreted in the form of degradation products within 24 hours. The serum half-life of the 30 metabolites ranges from about 16 hours to about 2 days. Tissue levels are comparable to plasma levels at 15 minutes after intravenous administration.

Lomustine has been shown to be useful as a single agent in addition to other treatment modalities, or in established combination therapy with other approved chemotherapeutic agents in both primary and metastatic brain tumors, in patients who have already received appropriate

WO 02/080849

PCT/US02/10733

surgical and/or radiotherapeutic procedures. Lomustine has been used to treat such cancers as small-cell lung cancer. It has also proved effective in secondary therapy against Hodgkin's Disease in combination with other approved drugs in patients who relapse while being treated with primary therapy, or who fail to respond to primary therapy.

5 The recommended dose of lomustine in adults and children as a single agent in previously untreated patients is about 130 mg/m^2 as a single oral dose every 6 weeks. In individuals with compromised bone marrow function, the dose should be reduced to about 100 mg/m^2 every 6 weeks. When lomustine is used in combination with other myelosuppressive drugs, the doses should be adjusted accordingly. It is understood that other doses may be used
10 for example, about 20 mg/m^2 , about 30 mg/m^2 , about 40 mg/m^2 , about 50 mg/m^2 , about 60 mg/m^2 , about 70 mg/m^2 , about 80 mg/m^2 , about 90 mg/m^2 , about 100 mg/m^2 to about 120 mg/m^2 .

c. Triazine

15 A triazine include but is not limited to such drugs as a dacabazine (DTIC; dimethyltriazenoimidazolecarboxamide), used in the treatment of such cancers as a malignant melanoma, Hodgkin's disease and a soft-tissue sarcoma.

II. Antimetabolites

20 Antimetabolites disrupt DNA and RNA synthesis. Unlike alkylating agents, they specifically influence the cell cycle during S phase. They have used to combat chronic leukemias in addition to tumors of breast, ovary and the gastrointestinal tract. Antimetabolites can be differentiated into various categories, such as folic acid analogs, pyrimidine analogs and purine analogs and related inhibitory compounds. Antimetabolites include but are not limited to,
25 5-fluorouracil (5-FU), cytarabine (Ara-C), fludarabine, gemcitabine, and methotrexate.

i. Folic Acid Analogs

Folic acid analogs include but are not limited to compounds such as methotrexate (amethopterin), which has been used in the treatment of cancers such as acute lymphocytic
30 leukemia, choriocarcinoma, mycosis fungoides, breast, head and neck, lung and osteogenic sarcoma.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

ii. Pyrimidine Analogs

Pyrimidine analogs include such compounds as cytarabine (cytosine arabinoside), 5-fluorouracil (fluorouracil; 5-FU) and floxuridine (fluorode-oxyuridine; FudR). Cytarabine has been used in the treatment of cancers such as acute granulocytic leukemia and acute lymphocytic leukemias. Floxuridine and 5-fluorouracil have been used in the treatment of cancers such as breast, colon, stomach, pancreas, ovary, head and neck, urinary bladder and topical premalignant skin lesions.

5-Fluorouracil (5-FU) has the chemical name of 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pyrimidin-6-one. Its mechanism of action is thought to be by blocking the methylation reaction of deoxyuridylic acid to thymidylic acid. Thus, 5-FU interferes with the synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA) and to a lesser extent inhibits the formation of ribonucleic acid (RNA). Since DNA and RNA are essential for cell division and proliferation, it is thought that the effect of 5-FU is to create a thymidine deficiency leading to cell death. Thus, the effect of 5-FU is found in cells that rapidly divide, a characteristic of metastatic cancers.

iii. Purine Analogs and Related Inhibitors

Purine analogs and related compounds include, but are not limited to, mercaptopurine (6-mercaptopurine; 6-MP), thioguanine (6-thioguanine; TG) and pentostatin (2-deoxycoformycin). Mercaptopurine has been used in acute lymphocytic, acute granulocytic and chronic granulocytic leukemias. Thioguanine has been used in the treatment of such cancers as acute granulocytic leukemia, acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. Pentostatin has been used in such cancers as hairy cell leukemias, mycosis fungoides and chronic lymphocytic leukemia.

III. Natural Products

Natural products generally refer to compounds originally isolated from a natural source, and identified as having a pharmacological activity. Such compounds, analogs and derivatives thereof may be isolated from a natural source, chemically synthesized or recombinantly produced by any technique known to those of skill in the art. Natural products include such categories as mitotic inhibitors, antitumor antibiotics, enzymes and biological response modifiers.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

i. Mitotic Inhibitors

Mitotic inhibitors include plant alkaloids and other natural agents that can inhibit either protein synthesis required for cell division or mitosis. They operate during a specific phase during the cell cycle. Mitotic inhibitors include, for example, docetaxel, etoposide (VP16), teniposide, paclitaxel, taxol, vinblastine, vincristine, and vinorelbine.

a. Epipodophyllotoxins

Epipodophyllotoxins include such compounds as teniposide and VP16. VP16 is also known as etoposide and is used primarily for treatment of testicular tumors, in combination with bleomycin and cisplatin, and in combination with cisplatin for small-cell carcinoma of the lung. Teniposide and VP16 are also active against cancers such as testis, other lung cancer, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphomas, acute granulocytic leukemia, acute nonlymphocytic leukemia, carcinoma of the breast, and Kaposi's sarcoma associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

VP16 is available as a solution (*e.g.*, 20 mg/ml) for intravenous administration and as 50 mg, liquid-filled capsules for oral use. For small-cell carcinoma of the lung, the intravenous dose (in combination therapy) is can be as much as about 100 mg/m² or as little as about 2 mg/m², routinely about 35 mg/m², daily for about 4 days, to about 50 mg/m², daily for about 5 days have also been used. When given orally, the dose should be doubled. Hence the doses for small cell lung carcinoma may be as high as about 200 mg/m² to about 250 mg/m². The intravenous dose for testicular cancer (in combination therapy) is about 50 mg/m² to about 100 mg/m² daily for about 5 days, or about 100 mg/m² on alternate days, for three doses. Cycles of therapy are usually repeated about every 3 to 4 weeks. The drug should be administered slowly (*e.g.*, about 30 minutes to about 60 minutes) as an infusion in order to avoid hypotension and bronchospasm, which are probably due to the solvents used in the formulation.

b. Taxoids

Taxoids are a class of related compounds isolated from the bark of the ash tree, *Taxus brevifolia*. Taxoids include but are not limited to compounds such as docetaxel and paclitaxel.

Paclitaxel binds to tubulin (at a site distinct from that used by the vinca alkaloids) and promotes the assembly of microtubules. Paclitaxel is being evaluated clinically; it has activity against malignant melanoma and carcinoma of the ovary. In certain aspects, maximal doses are about 30 mg/m² per day for about 5 days or about 210 mg/m² to about 250 mg/m² given once about every 3 weeks.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

c. Vinca Alkaloids

Vinca alkaloids are a type of plant alkaloid identified to have pharmaceutical activity. They include such compounds as vinblastine (VLB) and vincristine.

5

1. Vinblastine

Vinblastine is an example of a plant alkaloid that can be used for the treatment of cancer and precancer. When cells are incubated with vinblastine, dissolution of the microtubules occurs.

10 Unpredictable absorption has been reported after oral administration of vinblastine or vincristine. At the usual clinical doses the peak concentration of each drug in plasma is approximately 0.4 mM. Vinblastine and vincristine bind to plasma proteins. They are extensively concentrated in platelets and to a lesser extent in leukocytes and erythrocytes.

After intravenous injection, vinblastine has a multiphasic pattern of clearance from the plasma; after distribution, drug disappears from plasma with half-lives of approximately 1 and 20 hours. Vinblastine is metabolized in the liver to biologically inactive derivative desacetylvinblastine. Approximately 15% of an administered dose is detected intact in the urine, and about 10% is recovered in the feces after biliary excretion. Doses should be reduced in patients with hepatic dysfunction. At least a 50% reduction in dosage is indicated if the concentration of bilirubin in plasma is greater than 3 mg/dl (about 50 mM).

Vinblastine sulfate is available in preparations for injection. When the drug is given intravenously, special precautions must be taken against subcutaneous extravasation, since this may cause painful irritation and ulceration. The drug should not be injected into an extremity with impaired circulation. After a single dose of 0.3 mg/kg of body weight, myelosuppression reaches its maximum in about 7 days to about 10 days. If a moderate level of leukopenia (approximately 3000 cells/mm³) is not attained, the weekly dose may be increased gradually by increments of about 0.05 mg/kg of body weight. In regimens designed to cure testicular cancer, vinblastine is used in doses of about 0.3 mg/kg about every 3 weeks irrespective of blood cell counts or toxicity.

30 An important clinical use of vinblastine is with bleomycin and cisplatin in the curative therapy of metastatic testicular tumors. Beneficial responses have been reported in various lymphomas, particularly Hodgkin's disease, where significant improvement may be noted in 50 to 90% of cases. The effectiveness of vinblastine in a high proportion of lymphomas is not diminished when the disease is refractory to alkylating agents. It is also active in Kaposi's

WO 02/080849

PCT/US02/10733

sarcoma, testis cancer, neuroblastoma, and Letterer-Siwe disease (histiocytosis X), as well as in carcinoma of the breast and choriocarcinoma in women.

Doses of about 0.1 mg/kg to about 0.3 mg/kg can be administered or about 1.5 mg/m² to about 2 mg/m² can also be administered. Alternatively, about 0.1 mg/m², about 0.12 mg/m², about 0.14 mg/m², about 0.15 mg/m², about 0.2 mg/m², about 0.25 mg/m², about 0.5 mg/m², about 1.0 mg/m², about 1.2 mg/m², about 1.4 mg/m², about 1.5 mg/m², about 2.0 mg/m², about 2.5 mg/m², about 5.0 mg/m², about 6 mg/m², about 8 mg/m², about 9 mg/m², about 10 mg/m², to about 20 mg/m², can be given.

10 2. Vincristine

Vincristine blocks mitosis and produces metaphase arrest. It seems likely that most of the biological activities of this drug can be explained by its ability to bind specifically to tubulin and to block the ability of protein to polymerize into microtubules. Through disruption of the microtubules of the mitotic apparatus, cell division is arrested in metaphase. The inability to segregate chromosomes correctly during mitosis presumably leads to cell death.

The relatively low toxicity of vincristine for normal marrow cells and epithelial cells make this agent unusual among anti-neoplastic drugs, and it is often included in combination with other myelosuppressive agents. Unpredictable absorption has been reported after oral administration of vinblastine or vincristine. At the usual clinical doses the peak concentration of each drug in plasma is about 0.4 mM.

Vinblastine and vincristine bind to plasma proteins. They are extensively concentrated in platelets and to a lesser extent in leukocytes and erythrocytes. Vincristine has a multiphasic pattern of clearance from the plasma; the terminal half-life is about 24 hours. The drug is metabolized in the liver, but no biologically active derivatives have been identified. Doses should be reduced in patients with hepatic dysfunction. At least a 50% reduction in dosage is indicated if the concentration of bilirubin in plasma is greater than about 3 mg/dl (about 50 mM).

Vincristine sulfate is available as a solution (*e.g.*, 1 mg/ml) for intravenous injection. Vincristine used together with corticosteroids is presently the treatment of choice to induce remissions in childhood leukemia; the optimal dosages for these drugs appear to be vincristine, intravenously, about 2 mg/m² of body-surface area, weekly; and prednisone, orally, about 40 mg/m², daily. Adult patients with Hodgkin's disease or non-Hodgkin's lymphomas usually receive vincristine as a part of a complex protocol. When used in the MOPP regimen, the recommended dose of vincristine is about 1.4 mg/m². High doses of vincristine seem to be tolerated better by children with leukemia than by adults, who may experience sever

WO 02/080849

PCT/US02/10733

neurological toxicity. Administration of the drug more frequently than every 7 days or at higher doses seems to increase the toxic manifestations without proportional improvement in the response rate. Precautions should also be used to avoid extravasation during intravenous administration of vincristine. Vincristine (and vinblastine) can be infused into the arterial blood supply of tumors in doses several times larger than those that can be administered intravenously with comparable toxicity.

Vincristine has been effective in Hodgkin's disease and other lymphomas. Although it appears to be somewhat less beneficial than vinblastine when used alone in Hodgkin's disease, when used with mechlorethamine, prednisone, and procarbazine (the so-called MOPP regimen), it is the preferred treatment for the advanced stages (III and IV) of this disease. In non-Hodgkin's lymphomas, vincristine is an important agent, particularly when used with cyclophosphamide, bleomycin, doxorubicin, and prednisone. Vincristine is more useful than vinblastine in lymphocytic leukemia. Beneficial response have been reported in patients with a variety of other neoplasms, particularly Wilms' tumor, neuroblastoma, brain tumors, rhabdomyosarcoma, small cell lung, and carcinomas of the breast, bladder, and the male and female reproductive systems.

Doses of vincristine include about 0.01 mg/kg to about 0.03 mg/kg or about 0.4 mg/m² to about 1.4 mg/m² can be administered or about 1.5 mg/m² to about 2 mg/m² can also be administered. Alternatively, in certain embodiments, about 0.02 mg/m², about 0.05 mg/m², about 0.06 mg/m², about 0.07 mg/m², about 0.08 mg/m², about 0.1 mg/m², about 0.12 mg/m², about 0.14 mg/m², about 0.15 mg/m², about 0.2 mg/m², about 0.25 mg/m² can be given as a constant intravenous infusion.

d. Antitumor Antibiotics

Antitumor antibiotics have both antimicrobial and cytotoxic activity. These drugs also interfere with DNA by chemically inhibiting enzymes and mitosis or altering cellular membranes. These agents are not phase specific so they work in all phases of the cell cycle. Thus, they are widely used for a variety of cancers. Examples of antitumor antibiotics include, but are not limited to, bleomycin, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin (Adriamycin), plicamycin (mithramycin) and idarubicin. Widely used in clinical setting for the treatment of neoplasms these compounds generally are administered through intravenous bolus injections or orally.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

1. Doxorubicin

Doxorubicin hydrochloride, 5,12-Naphthacenedione, (8*s-cis*)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-hydrochloride (hydroxydaunorubicin hydrochloride, Adriamycin) is used in a wide antineoplastic spectrum. It binds to DNA and inhibits nucleic acid synthesis, inhibits mitosis and promotes chromosomal aberrations.

Administered alone, it is the drug of first choice for the treatment of thyroid adenoma and primary hepatocellular carcinoma. It is a component of 31 first-choice combinations for the treatment of diseases including ovarian, endometrial and breast tumors, bronchogenic oat-cell carcinoma, non-small cell lung carcinoma, stomach, genitourinary, thyroid, gastric adenocarcinoma, retinoblastoma, neuroblastoma, mycosis fungoides, pancreatic carcinoma, prostatic carcinoma, bladder carcinoma, myeloma, diffuse histiocytic lymphoma, Wilms' tumor, Hodgkin's disease, adrenal tumors, osteogenic sarcoma, soft tissue sarcoma, Ewing's sarcoma, rhabdomyosarcoma and acute lymphocytic leukemia. It is an alternative drug for the treatment of other diseases such as islet cell, cervical, testicular and adrenocortical cancers. It is also an immunosuppressant.

Doxorubicin is absorbed poorly and is preferably administered intravenously. The pharmacokinetics are multicompartmental. Distribution phases have half-lives of 12 minutes and 3.3 hours. The elimination half-life is about 30 hours, with about 40% to about 50% secreted into the bile. Most of the remainder is metabolized in the liver, partly to an active metabolite (doxorubicinol), but a few percent is excreted into the urine. In the presence of liver impairment, the dose should be reduced.

In certain embodiments, appropriate intravenous doses are, adult, about 60 mg/m² to about 75 mg/m² at about 21-day intervals or about 25 mg/m² to about 30 mg/m² on each of 2 or 3 successive days repeated at about 3 week to about 4 week intervals or about 20 mg/m² once a week. The lowest dose should be used in elderly patients, when there is prior bone-marrow depression caused by prior chemotherapy or neoplastic marrow invasion, or when the drug is combined with other myelopoietic suppressant drugs. The dose should be reduced by about 50% if the serum bilirubin lies between about 1.2 mg/dL and about 3 mg/dL and by about 75% if above about 3 mg/dL. The lifetime total dose should not exceed about 550 mg/m² in patients with normal heart function and about 400 mg/m² in persons having received mediastinal irradiation. In certain embodiments, and alternative dose regimen may comprise about 30 mg/m² on each of 3 consecutive days, repeated about every 4 week. Exemplary doses may be about 10 mg/m², about 20 mg/m², about 30 mg/m², about 50 mg/m², about 100 mg/m², about

WO 02/080849

PCT/US02/10733

150 mg/m², about 175 mg/m², about 200 mg/m², about 225 mg/m², about 250 mg/m², about 275 mg/m², about 300 mg/m², about 350 mg/m², about 400 mg/m², about 425 mg/m², about 450 mg/m², about 475 mg/m², to about 500 mg/m².

5

2. Daunorubicin

Daunorubicin hydrochloride, 5,12-Naphthacenedione, (8*S*-*cis*)-8-acetyl-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexanopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-10-methoxy-, hydrochloride; also termed cerubidine and available from Wyeth. Daunorubicin (daunomycin; rubidomycin) intercalates into DNA, blocks DAN-directed RNA polymerase and inhibits DNA synthesis. It can prevent cell division in doses that do not interfere with nucleic acid synthesis.

In combination with other drugs it is often included in the first-choice chemotherapy of diseases such as, for example, acute granulocytic leukemia, acute myelocytic leukemia in adults (for induction of remission), acute lymphocytic leukemia and the acute phase of chronic myelocytic leukemia. Oral absorption is poor, and it preferably given by other methods (*e.g.*, intravenously). The half-life of distribution is 45 minutes and of elimination, about 19 hours. The half-life of its active metabolite, daunorubicinol, is about 27 hours. Daunorubicin is metabolized mostly in the liver and also secreted into the bile (about 40%). Dosage must be reduced in liver or renal insufficiencies.

Generally, suitable intravenous doses are (base equivalent): adult, younger than 60 years, about 45 mg/m²/day (about 30 mg/m² for patients older than 60 year.) for about 1 day, about 2 days or about 3 days about every 3 weeks or 4 weeks or about 0.8 mg/kg/day for about 3 days, about 4 days, about 5 days to about 6 days about every 3 weeks or about 4 weeks; no more than about 550 mg/m² should be given in a lifetime, except only about 450 mg/m² if there has been chest irradiation; children, about 25 mg/m² once a week unless the age is less than 2 years. or the body surface less than about 0.5 m², in which case the weight-based adult schedule is used. It is available in injectable dosage forms (base equivalent) of about 20 mg (as the base equivalent to about 21.4 mg of the hydrochloride). Exemplary doses may be about 10 mg/m², about 20 mg/m², about 30 mg/m², about 50 mg/m², about 100 mg/m², about 150 mg/m², about 175 mg/m², about 200 mg/m², about 225 mg/m², about 250 mg/m², about 275 mg/m², about 300 mg/m², about 350 mg/m², about 400 mg/m², about 425 mg/m², about 450 mg/m², about 475 mg/m², to about 500 mg/m².

WO 02/080849

PCT/US02/10733

3. Mitomycin

Mitomycin (also known as mutamycin and/or mitomycin-C) is an antibiotic isolated from the broth of *Streptomyces caespitosus* which has been shown to have antitumor activity. The compound is heat stable, has a high melting point, and is freely soluble in organic solvents.

Mitomycin selectively inhibits the synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA). The guanine and cytosine content correlates with the degree of mitomycin-induced cross-linking. At high concentrations of the drug, cellular RNA and protein synthesis are also suppressed. Mitomycin has been used in tumors such as stomach, cervix, colon, breast, pancreas, bladder and head and neck.

In humans, mitomycin is rapidly cleared from the serum after intravenous administration. Time required to reduce the serum concentration by about 50% after a 30 mg. bolus injection is 17 minutes. After injection of 30 mg, 20 mg, or 10 mg I.V., the maximal serum concentrations were 2.4 mg/mL, 1.7 mg/mL, and 0.52 mg/mL, respectively. Clearance is effected primarily by metabolism in the liver, but metabolism occurs in other tissues as well. The rate of clearance is inversely proportional to the maximal serum concentration because, it is thought, of saturation of the degradative pathways. Approximately 10% of a dose of mitomycin is excreted unchanged in the urine. Since metabolic pathways are saturated at relatively low doses, the percent of a dose excreted in urine increases with increasing dose. In children, excretion of intravenously administered mitomycin is similar.

4. Actinomycin D

Actinomycin D (Dactinomycin) [50-76-0]; $C_{26}H_{36}N_{12}O_{16}$ (1255.43) is an antineoplastic drug that inhibits DNA-dependent RNA polymerase. It is often a component of first-choice combinations for treatment of diseases such as, for example, choriocarcinoma, embryonal rhabdomyosarcoma, testicular tumor, Kaposi's sarcoma and Wilms' tumor. Tumors that fail to respond to systemic treatment sometimes respond to local perfusion. Dactinomycin potentiates radiotherapy. It is a secondary (efferent) immunosuppressive.

In certain specific aspects, actinomycin D is used in combination with agents such as, for example, primary surgery, radiotherapy, and other drugs, particularly vincristine and cyclophosphamide. Antineoplastic activity has also been noted in Ewing's tumor, Kaposi's sarcoma, and soft-tissue sarcomas. Dactinomycin can be effective in women with advanced cases of choriocarcinoma. It also produces consistent responses in combination with chlorambucil and methotrexate in patients with metastatic testicular carcinomas. A response may sometimes be observed in patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

Dactinomycin has also been used to inhibit immunological responses, particularly the rejection of renal transplants.

Half of the dose is excreted intact into the bile and 10% into the urine; the half-life is about 36 hours. The drug does not pass the blood-brain barrier. Actinomycin D is supplied as a lyophilized powder (0/5 mg in each vial). The usual daily dose is about 10 mg/kg to about 15 mg/kg; this is given intravenously for about 5 days; if no manifestations of toxicity are encountered, additional courses may be given at intervals of about 3 weeks to about 4 weeks. Daily injections of about 100 mg to about 400 mg have been given to children for about 10 days to about 14 days; in other regimens, about 3 mg/kg to about 6 mg/kg, for a total of about 125 mg/kg, and weekly maintenance doses of about 7.5 mg/kg have been used. Although it is safer to administer the drug into the tubing of an intravenous infusion, direct intravenous injections have been given, with the precaution of discarding the needle used to withdraw the drug from the vial in order to avoid subcutaneous reaction. Exemplary doses may be about 100 mg/m², about 150 mg/m², about 175 mg/m², about 200 mg/m², about 225 mg/m², about 250 mg/m², about 275 mg/m², about 300 mg/m², about 350 mg/m², about 400 mg/m², about 425 mg/m², about 450 mg/m², about 475 mg/m², to about 500 mg/m².

5. Bleomycin

Bleomycin is a mixture of cytotoxic glycopeptide antibiotics isolated from a strain of *Streptomyces verticillus*. Although the exact mechanism of action of bleomycin is unknown, available evidence would seem to indicate that the main mode of action is the inhibition of DNA synthesis with some evidence of lesser inhibition of RNA and protein synthesis.

In mice, high concentrations of bleomycin are found in the skin, lungs, kidneys, peritoneum, and lymphatics. Tumor cells of the skin and lungs have been found to have high concentrations of bleomycin in contrast to the low concentrations found in hematopoietic tissue. The low concentrations of bleomycin found in bone marrow may be related to high levels of bleomycin degradative enzymes found in that tissue.

In patients with a creatinine clearance of greater than about 35 mL per minute, the serum or plasma terminal elimination half-life of bleomycin is approximately 115 minutes. In patients with a creatinine clearance of less than about 35 mL per minute, the plasma or serum terminal elimination half-life increases exponentially as the creatinine clearance decreases. In humans, about 60% to about 70% of an administered dose is recovered in the urine as active bleomycin. In specific embodiments, bleomycin may be given by the intramuscular, intravenous, or subcutaneous routes. It is freely soluble in water. Because of the possibility of an anaphylactoid

WO 02/080849

PCT/US02/10733

reaction, lymphoma patients should be treated with two units or less for the first two doses. If no acute reaction occurs, then the regular dosage schedule may be followed.

In preferred aspects, bleomycin should be considered a palliative treatment. It has been shown to be useful in the management of the following neoplasms either as a single agent or in proven combinations with other approved chemotherapeutic agents in squamous cell carcinoma such as head and neck (including mouth, tongue, tonsil, nasopharynx, oropharynx, sinus, palate, lip, buccal mucosa, gingiva, epiglottis, larynx), esophagus, lung and genitourinary tract, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma, skin, penis, cervix, and vulva. It has also been used in the treatment of lymphomas and testicular carcinoma.

Improvement of Hodgkin's Disease and testicular tumors is prompt and noted within 2 weeks. If no improvement is seen by this time, improvement is unlikely. Squamous cell cancers respond more slowly, sometimes requiring as long as 3 weeks before any improvement is noted.

IV. Miscellaneous Agents

Some chemotherapy agents do not qualify into the previous categories based on their activities. They include, but are not limited to, platinum coordination complexes, anthracenedione, substituted urea, methyl hydrazine derivative, adrenalcortical suppressant, amsacrine, L-asparaginase, and tretinoin. It is contemplated that they are included within the compositions and methods of the present invention for use in combination therapies.

i. Platinum Coordination Complexes

Platinum coordination complexes include such compounds as carboplatin and cisplatin (*cis*-DDP). Cisplatin has been widely used to treat cancers such as, for example, metastatic testicular or ovarian carcinoma, advanced bladder cancer, head or neck cancer, cervical cancer, lung cancer or other tumors. Cisplatin is not absorbed orally and must therefore be delivered *via* other routes, such as for example, intravenous, subcutaneous, intratumoral or intraperitoneal injection. Cisplatin can be used alone or in combination with other agents, with efficacious doses used in clinical applications of about 15 mg/m² to about 20 mg/m² for 5 days every three weeks for a total of three courses being contemplated in certain embodiments. Doses may be, for example, about 0.50 mg/m², about 1.0 mg/m², about 1.50 mg/m², about 1.75 mg/m², about 2.0 mg/m², about 3.0 mg/m², about 4.0 mg/m², about 5.0 mg/m², to about 10 mg/m².

The present inventors have found that cisplatin, which stimulates ROI production, induces the CArG elements of the Egr-1 promoter. For example, cisplatin induced the production of TNF- α in human and rodent cancer cells infected with an adenoviral vector

WO 02/080849

PCT/US02/10733

encoding the CARG elements of the Egr-1 promoter ligated upstream to a cDNA encoding TNF- α . Thus, the present invention provides a new approach that combines the use of chemotherapeutic agents that can produce ROI or DNA damage, such as cisplatin, with the temporal and spatial control of gene therapy using antitumor genes.

5

ii. Other Agents

Anthracenediones, such as mitoxantrone, have been used for treating acute granulocytic leukemia and breast cancer. A substituted urea such as hydroxyurea has been used in treating chronic granulocytic leukemia, polycythemia vera, essential thrombocytosis and malignant melanoma. A methyl hydrazine derivative such as procarbazine (N-methylhydrazine, MIH) has been used in the treatment of Hodgkin's disease. An adrenocortical suppressant such as mitotane has been used to treat adrenal cortex cancer, while aminoglutethimide has been used to treat Hodgkin's disease.

15

V. Doses

Doses for DNA damaging agents are well known to those of skill in the art (see for example, the "Physicians Desk Reference", Goodman & Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", "Remington's Pharmaceutical Sciences", and "The Merck Index, Eleventh Edition," incorporated herein by reference in relevant parts), and may be combined with the invention in light of the disclosures herein. Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. Examples of specific chemotherapeutic agents and dose regimes are also described herein. Of course, all of these dosages and agents described herein are exemplary rather than limiting, and other doses or agents may be used by a skilled artisan for a specific patient or application. Any dosage in-between these points, or range derivable therein is also expected to be of use in the invention.

20

25

C. Therapeutic Genes

30

I. Tumor Suppressors

p53 currently is recognized as a tumor suppressor gene. High levels of mutant p53 have been found in many cells transformed by chemical carcinogenesis, ultraviolet radiation, and several viruses. The p53 gene is a frequent target of mutational inactivation in a wide variety of human tumors and is already documented to be the most frequently-mutated gene in common

WO 02/080849

PCT/US02/10733

human cancers. It is mutated in over 50% of human NSCLC (Hollstein *et al.*, 1991) and in a wide spectrum of other tumors.

The p53 gene encodes a 393-amino acid phosphoprotein that can form complexes with host proteins such as SV40 large-T antigen and adenoviral E1B. The protein is found in normal tissues and cells, but at concentrations which are minute by comparison with transformed cells or tumor tissue. Interestingly, wild-type p53 appears to be important in regulating cell growth and division. Overexpression of wild-type p53 has been shown in some cases to be anti-proliferative in human tumor cell lines. Thus, p53 can act as a negative regulator of cell growth (Weinberg, 1991) and may directly suppress uncontrolled cell growth or indirectly activate genes that suppress this growth. Thus, absence or inactivation of wild-type p53 may contribute to transformation. However, some studies indicate that the presence of mutant p53 may be necessary for full expression of the transforming potential of the gene.

Wild-type p53 is recognized as an important growth regulator in many cell types. Missense mutations are common for the p53 gene and are essential for the transforming ability of the oncogene. A single genetic change prompted by point mutations can create carcinogenic p53, in as much as mutations in p53 are known to abrogate the tumor suppressor capability of wild-type p53. Unlike other oncogenes, however, p53 point mutations are known to occur in at least 30 distinct codons, often creating dominant alleles that produce shifts in cell phenotype without a reduction to homozygosity. Additionally, many of these dominant negative alleles appear to be tolerated in the organism and passed on in the germ line. Various mutant alleles appear to range from minimally dysfunctional to strongly penetrant, dominant negative alleles (Weinberg, 1991).

Casey and colleagues have reported that transfection of DNA encoding wild-type p53 into two human breast cancer cell lines restores growth suppression control in such cells (Casey *et al.*, 1991). A similar effect also has been demonstrated on transfection of wild-type, but not mutant, p53 into human lung cancer cell lines (Takahasi *et al.*, 1992). p53 appears dominant over the mutant gene and will select against proliferation when transfected into cells with the mutant gene. Normal expression of the transfected p53 does not affect the growth of normal or non-malignant cells with endogenous p53. Thus, such constructs might be taken up by normal cells without adverse effects. It is thus proposed that the treatment of p53-associated cancers with wild-type p53 will reduce the number of malignant cells or their growth rate.

The major transitions of the eukaryotic cell cycle are triggered by cyclin-dependent kinases, or CDK's. One CDK, cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), regulates progression through the G₁. The activity of this enzyme may be to phosphorylate Rb at late G₁. The activity

WO 02/080849

PCT/US02/10733

of CDK4 is controlled by an activating subunit, D-type cyclin, and by an inhibitory subunit p16^{INK4}. The p16^{INK4} has been biochemically characterized as a protein that specifically binds to and inhibits CDK4, and thus may regulate Rb phosphorylation (Serrano *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 1995). Since the p16^{INK4} protein is a CDK4 inhibitor (Serrano, 1993), deletion of this gene may increase the activity of CDK4, resulting in hyperphosphorylation of the Rb protein. p16 also is known to regulate the function of CDK6.

p16^{INK4} belongs to a newly described class of CDK-inhibitory proteins that also includes p15^{INK4B}, p21^{WAF1}, and p27^{KIP1}. The p16^{INK4} gene maps to 9p21, a chromosome region frequently deleted in many tumor types. Homozygous deletions and mutations of the p16^{INK4} gene are frequent in human tumor cell lines. This evidence suggests that the p16^{INK4} gene is a tumor suppressor gene. This interpretation has been challenged, however, by the observation that the frequency of the p16^{INK4} gene alterations is much lower in primary uncultured tumors than in cultured cell lines (Caldas *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Hussussian *et al.*, 1994; Kamb *et al.*, 1994; Kamb *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 1994; Nobori *et al.*, 1995; Orlow *et al.*, 1994; Arap *et al.*, 1995). However, it was later shown that while the p16 gene was intact in many primary tumors, there were other mechanisms that prevented p16 protein expression in a large percentage of some tumor types. p16 promoter hypermethylation is one of these mechanisms (Merlo *et al.*, 1995; Herman, 1995; Gonzalez-Zulueta, 1995). Restoration of wild-type p16^{INK4} function by transfection with a plasmid expression vector reduced colony formation by some human cancer cell lines (Okamoto, 1994; Arap, 1995). Delivery of p16 with adenovirus vectors inhibits proliferation of some human cancer lines and reduces the growth of human tumor xenografts.

C-CAM is expressed in virtually all epithelial cells (Odin and Obrink, 1987). C-CAM, with an apparent molecular weight of 105 kD, was originally isolated from the plasma membrane of the rat hepatocyte by its reaction with specific antibodies that neutralize cell aggregation (Obrink, 1991). Recent studies indicate that, structurally, C-CAM belongs to the immunoglobulin (Ig) superfamily and its sequence is highly homologous to carcinoembryonic antigen (CEA) (Lin and Guidotti, 1989). Using a baculovirus expression system, Cheung *et al.* (1993) demonstrated that the first Ig domain of C-CAM is critical for cell adhesive activity.

Cell adhesion molecules, or CAM's are known to be involved in a complex network of molecular interactions that regulate organ development and cell differentiation (Edelman, 1985). Recent data indicate that aberrant expression of CAM's maybe involved in the tumorigenesis of several neoplasms; for example, decreased expression of E-cadherin, which is predominantly expressed in epithelial cells, is associated with the progression of several kinds of neoplasms

WO 02/080849

PCT/US02/10733

(Edelman and Crossin, 1991; Frixen *et al.*, 1991; Bussemakers *et al.*, 1992; Matsura *et al.*, 1992; Umbas *et al.*, 1992). Also, Giancotti and Ruoslahti (1990) demonstrated that increasing expression of $\alpha_5\beta_1$ integrin by gene transfer can reduce tumorigenicity of Chinese hamster ovary cells *in vivo*. C-CAM now has been shown to suppress tumor growth *in vitro* and *in vivo*.

- 5 Other tumor suppressors that may be employed according to the present invention include p21, p15, BRCA1, BRCA2, IRF-1, PTEN, RB, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zac1, p73, VHL, FCC, MCC, DBCCR1, DCP4 and p57.

II. Inducers of Apoptosis

- 10 Inducers of apoptosis, such as Bax, Bak, Bcl-X_s, Bad, Bim, Bik, Bid, Harakiri, Ad E1B, Bad, ICE-CED3 proteases, TRAIL, SARP-2 and apoptin, similarly could find use according to the present invention. In addition, the delivery and regulated expression of cytotoxic genes have been described in the U.S. Patent Application entitled, "Induction of Apoptotic or Cytotoxic Gene Expression by Adenoviral Mediated Gene Codelivery," filed March 11, 1999 (specifically
- 15 incorporated herein by reference).

III. Enzymes

- Various enzyme genes are of interest according to the present invention. Such enzymes include cytosine deaminase, adenosine deaminase, hypoxanthine-guanine
- 20 phosphoribosyltransferase, and human thymidine kinase.

IV. Cytokines, Hormones and Growth Factors

- Another class of genes that is contemplated to be inserted into the vectors of the present invention include interleukins and cytokines: Interleukin 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7,
- 25 IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, β -interferon, α -interferon, γ -interferon, angiostatin, thrombospondin, endostatin, METH-1, METH-2, GM-CSF, G-CSF, M-CSF and tumor necrosis factor (TNF).

- TNF- α is a cytokine secreted by macrophages and other hematopoietic cells that has antitumor activity in animal studies (Old, 1985; Fiers, 1991). TNF- α is cytotoxic for many
- 30 malignant cells and also plays an important role in the defense against viral, bacterial and parasitic infections and in autoimmune responses (Fiers, 1991). A direct toxic effect on tumor cells, as well as cytotoxic and thrombotic effects on the tumor vasculature, mediate the antitumor effects of TNF- α (Watanabe *et al.*, 1988; Tartaglia *et al.*, 1993; Robaye *et al.*, 1991; Havell *et al.*, 1988; Obrador *et al.*, 2001; Slungaard *et al.*, 1990; Mauceri *et al.*, 2002). The combination

WO 02/080849

PCT/US02/10733

of TNF- α with chemotherapeutic agents, such as cisplatin and adriamycin, that damage DNA has demonstrated synergistic effects in experimental models (Duan *et al.*, 2001; Bonavida *et al.*, 1990). Recently, isolated limb perfusion with melphalan, a bi-functional alkylating agent, and TNF- α has been reported to be a successful therapeutic strategy for limb sarcomas and melanomas (Thom *et al.*, 1995). However, systemic toxicities have limited the use of TNF- α in human cancer therapy (Spriggs *et al.*, 1988).

The present invention provides the chemo-induction of TNF- α under the control of the inducible Egr-1 promoter, which can be induced by ROI's, damaged DNA and IR, by a chemotherapeutic agent. Studies in mice models of cancer and human cancer cells show that the chemo-induction of TNF- α in itself did not cause any toxicity.

V. Toxins

Various toxins are also contemplated to be useful as part of the expression vectors of the present invention, these toxins include bacterial toxins such as ricin A-chain (Burbage, 1997), diphtheria toxin A (Massuda *et al.*, 1997; Lidor, 1997), pertussis toxin A subunit, *E. coli* enterotoxin toxin A subunit, cholera toxin A subunit and pseudomonas toxin c-terminal. Recently, it was demonstrated that transfection of a plasmid containing the fusion protein regulatable diphtheria toxin A chain gene was cytotoxic for cancer cells. Thus, gene transfer of regulated toxin genes might also be applied to the treatment of cancers (Massuda *et al.*, 1997).

VI. Antisense Constructs

Antisense methodology takes advantage of the fact that nucleic acids tend to pair with "complementary" sequences. By complementary, it is meant that polynucleotides are those which are capable of base-pairing according to the standard Watson-Crick complementarity rules. That is, the larger purines will base pair with the smaller pyrimidines to form combinations of guanine paired with cytosine (G:C) and adenine paired with either thymine (A:T) in the case of DNA, or adenine paired with uracil (A:U) in the case of RNA. Inclusion of less common bases such as inosine, 5-methylcytosine, 6-methyladenine, hypoxanthine and others in hybridizing sequences does not interfere with pairing.

Targeting double-stranded (ds) DNA with polynucleotides leads to triple-helix formation; targeting RNA will lead to double-helix formation. Antisense polynucleotides, when introduced into a target cell, specifically bind to their target polynucleotide and interfere with transcription, RNA processing, transport, translation and/or stability. Antisense RNA constructs, or DNA encoding such antisense RNA's, may be employed to inhibit gene transcription or translation or

WO 02/080849

PCT/US02/10733

both within a host cell, either *in vitro* or *in vivo*, such as within a host animal, including a human subject.

Antisense constructs may be designed to bind to the promoter and other control regions, exons, introns or even exon-intron boundaries of a gene. It is contemplated that the most effective antisense constructs will include regions complementary to intron/exon splice junctions. Thus, it is proposed that a preferred embodiment includes an antisense construct with complementarity to regions within 50-200 bases of an intron-exon splice junction. It has been observed that some exon sequences can be included in the construct without seriously affecting the target selectivity thereof. The amount of exonic material included will vary depending on the particular exon and intron sequences used. One can readily test whether too much exon DNA is included simply by testing the constructs *in vitro* to determine whether normal cellular function is affected or whether the expression of related genes having complementary sequences is affected.

As stated above, "complementary" or "antisense" means polynucleotide sequences that are substantially complementary over their entire length and have very few base mismatches. For example, sequences of fifteen bases in length may be termed complementary when they have complementary nucleotides at thirteen or fourteen positions. Naturally, sequences which are completely complementary will be sequences which are entirely complementary throughout their entire length and have no base mismatches. Other sequences with lower degrees of homology also are contemplated. For example, an antisense construct which has limited regions of high homology, but also contains a non-homologous region (*e.g.*, ribozyme; see below) could be designed. These molecules, though having less than 50% homology, would bind to target sequences under appropriate conditions.

It may be advantageous to combine portions of genomic DNA with cDNA or synthetic sequences to generate specific constructs. For example, where an intron is desired in the ultimate construct, a genomic clone will need to be used. The cDNA or a synthesized polynucleotide may provide more convenient restriction sites for the remaining portion of the construct and, therefore, would be used for the rest of the sequence.

Particular oncogenes that are targets for antisense constructs are *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *src*, *fms*, *jun*, *trk*, *ret*, *hst*, *gsp*, *bcl-2* and *abl*. Also contemplated to be useful will be anti-apoptotic genes and angiogenesis promoters.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

VII. Ribozymes

Although proteins traditionally have been used for catalysis of nucleic acids, another class of macromolecules has emerged as useful in this endeavor. Ribozymes are RNA-protein complexes that cleave nucleic acids in a site-specific fashion. Ribozymes have specific catalytic domains that possess endonuclease activity (Kim and Cook, 1987; Gerlach *et al.*, 1987; Forster and Symons, 1987). For example, a large number of ribozymes accelerate phosphoester transfer reactions with a high degree of specificity, often cleaving only one of several phosphoesters in an oligonucleotide substrate (Michel and Westhof, 1990; Reinhold-Hurek and Shub, 1992). This specificity has been attributed to the requirement that the substrate bind *via* specific base-pairing interactions to the internal guide sequence ("IGS") of the ribozyme prior to chemical reaction.

Ribozyme catalysis has primarily been observed as part of sequence-specific cleavage/ligation reactions involving nucleic acids (Joyce, 1989; Cook *et al.*, 1981). For example, U.S. Patent 5,354,855 reports that certain ribozymes can act as endonucleases with a sequence specificity greater than that of known ribonucleases and approaching that of the DNA restriction enzymes. Thus, sequence-specific ribozyme-mediated inhibition of gene expression may be particularly suited to therapeutic applications (Scanlon *et al.*, 1991; Sarver *et al.*, 1990). Recently, it was reported that ribozymes elicited genetic changes in some cells lines to which they were applied; the altered genes included the oncogenes H-ras, c-fos and genes of HIV. Most of this work involved the modification of a target mRNA, based on a specific mutant codon that is cleaved by a specific ribozyme. Targets for this embodiment will include angiogenic genes such as VEGFs and angiopoietins as well as the oncogenes (*e.g.*, *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *src*, *fms*, *jun*, *trk*, *ret*, *hst*, *gsp*, *bcl-2*, *EGFR*, *grb2* and *abl*).

VIII. Single Chain Antibodies

In yet another embodiment, one gene may comprise a single-chain antibody. Methods for the production of single-chain antibodies are well known to those of skill in the art. The skilled artisan is referred to U.S. Patent 5,359,046, (incorporated herein by reference) for such methods. A single chain antibody is created by fusing together the variable domains of the heavy and light chains using a short peptide linker, thereby reconstituting an antigen binding site on a single molecule.

Single-chain antibody variable fragments (scFvs) in which the C-terminus of one variable domain is tethered to the N-terminus of the other *via* a 15 to 25 amino acid peptide or linker, have been developed without significantly disrupting antigen binding or specificity of the

WO 02/080849

PCT/US02/10733

binding (Bedzyk *et al.*, 1990; Chaudhary *et al.*, 1990). These Fvs lack the constant regions (Fc) present in the heavy and light chains of the native antibody.

Antibodies to a wide variety of molecules are contemplated, such as oncogenes, growth factors, hormones, enzymes, transcription factors or receptors. Also contemplated are secreted antibodies, targeted to serum, against angiogenic factors (VEGF/VSP; bFGF; aFGF) and endothelial antigens necessary for angiogenesis (*i.e.*, V3 integrin). Specifically contemplated are growth factors such as transforming growth factor and platelet derived growth factor.

IX. Cell Cycle Regulators

Cell cycle regulators provide possible advantages, when combined with other genes. Such cell cycle regulators include p27, p21, p57, p18, p73, p19, p15, E2F-1, E2F-2, E2F-3, p107, p130 and E2F-4. Other cell cycle regulators include anti-angiogenic proteins, such as soluble Flt1 (dominant negative soluble VEGF receptor), soluble Wnt receptors, soluble Tie2/Tek receptor, soluble hemopexin domain of matrix metalloprotease 2 and soluble receptors of other angiogenic cytokines (*e.g.* VEGFR1/KDR, VEGFR3/Flt4, both VEGF receptors).

X. Chemokines

Genes that code for chemokines also may be used in the present invention. Chemokines generally act as chemoattractants to recruit immune effector cells to the site of chemokine expression. It may be advantageous to express a particular chemokine gene in combination with, for example, a cytokine gene, to enhance the recruitment of other immune system components to the site of treatment. Such chemokines include RANTES, MCAF, MIP1- α , MIP1- β and IP-10. The skilled artisan will recognize that certain cytokines are also known to have chemoattractant effects and could also be classified under the term chemokines.

D. Expression Constructs

I. Vectors

The term "vector" is used to refer to a carrier nucleic acid molecule into which a nucleic acid sequence can be inserted for introduction into a cell where it can be replicated. A nucleic acid sequence can be "exogenous," which means that it is foreign to the cell into which the vector is being introduced or that the sequence is homologous to a sequence in the cell but in a position within the host cell nucleic acid in which the sequence is ordinarily not found. Vectors include plasmids, cosmids, viruses (bacteriophage, animal viruses, and plant viruses), and artificial chromosomes (*e.g.*, YACs). One of skill in the art would be well equipped to construct

WO 02/080849

PCT/US02/10733

a vector through standard recombinant techniques (see, for example, Goodbourn and Maniatis *et al.*, 1988 and Ausubel *et al.*, 1994, both incorporated herein by reference).

The term "expression vector" refers to any type of genetic construct comprising a nucleic acid coding for a RNA capable of being transcribed. In some cases, RNA molecules are then translated into a protein, polypeptide, or peptide. In other cases, these sequences are not translated, for example, in the production of antisense molecules or ribozymes. Expression vectors can contain a variety of "control sequences," which refer to nucleic acid sequences necessary for the transcription and possibly translation of an operably linked coding sequence in a particular host cell. According to the present invention, the vectors will contain sufficient portions of the Egr-1 promoter to confer chemical inducibility. In addition to control sequences that govern transcription and translation, vectors and expression vectors may contain nucleic acid sequences that serve other functions as well and are described *infra*.

i. Initiation Signals and Internal Ribosome Binding Sites

A specific initiation signal also may be required for efficient translation of coding sequences. These signals include the ATG initiation codon or adjacent sequences. Exogenous translational control signals, including the ATG initiation codon, may need to be provided. One of ordinary skill in the art would readily be capable of determining this and providing the necessary signals. It is well known that the initiation codon must be "in-frame" with the reading frame of the desired coding sequence to ensure translation of the entire insert. The exogenous translational control signals and initiation codons can be either natural or synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of appropriate transcription enhancer elements.

In certain embodiments of the invention, the use of internal ribosome entry sites (IRES) elements are used to create multigene, or polycistronic, messages. IRES elements are able to bypass the ribosome scanning model of 5' methylated Cap dependent translation and begin translation at internal sites (Pelletier and Sonenberg, 1988). IRES elements from two members of the picornavirus family (polio and encephalomyocarditis) have been described (Pelletier and Sonenberg, 1988), as well an IRES from a mammalian message (Macejak and Sarnow, 1991). IRES elements can be linked to heterologous open reading frames. Multiple open reading frames can be transcribed together, each separated by an IRES, creating polycistronic messages. By virtue of the IRES element, each open reading frame is accessible to ribosomes for efficient translation. Multiple genes can be efficiently expressed using a single promoter/enhancer to

WO 02/080849

PCT/US02/10733

transcribe a single message (see U.S. Patent Nos. 5,925,565 and 5,935,819, each herein incorporated by reference).

ii. Multiple Cloning Sites

5 Vectors can include a multiple cloning site (MCS), which is a nucleic acid region that contains multiple restriction enzyme sites, any of which can be used in conjunction with standard recombinant technology to digest the vector (see, for example, Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, and Cocea, 1997, incorporated herein by reference.) "Restriction enzyme digestion" refers to catalytic cleavage of a nucleic acid molecule with an enzyme that functions only at
10 specific locations in a nucleic acid molecule. Many of these restriction enzymes are commercially available. Use of such enzymes is widely understood by those of skill in the art. Frequently, a vector is linearized or fragmented using a restriction enzyme that cuts within the MCS to enable exogenous sequences to be ligated to the vector. "Ligation" refers to the process of forming phosphodiester bonds between two nucleic acid fragments, which may or may not be
15 contiguous with each other. Techniques involving restriction enzymes and ligation reactions are well known to those of skill in the art of recombinant technology.

iii. Splicing Sites

Most transcribed eukaryotic RNA molecules will undergo RNA splicing to remove
20 introns from the primary transcripts. Vectors containing genomic eukaryotic sequences may require donor and/or acceptor splicing sites to ensure proper processing of the transcript for protein expression (see, for example, Chandler *et al.*, 1997, herein incorporated by reference.)

iv. Termination Signals

25 The vectors or constructs of the present invention will generally comprise at least one termination signal. A "termination signal" or "terminator" is comprised of the DNA sequences involved in specific termination of an RNA transcript by an RNA polymerase. Thus, in certain embodiments a termination signal that ends the production of an RNA transcript is contemplated. A terminator may be necessary *in vivo* to achieve desirable message levels.

30 In eukaryotic systems, the terminator region may also comprise specific DNA sequences that permit site-specific cleavage of the new transcript so as to expose a polyadenylation site. This signals a specialized endogenous polymerase to add a stretch of about 200 A residues (polyA) to the 3' end of the transcript. RNA molecules modified with this polyA tail appear to more stable and are translated more efficiently. Thus, in other embodiments involving

WO 02/080849

PCT/US02/10733

eukaryotes, it is preferred that that terminator comprises a signal for the cleavage of the RNA, and it is more preferred that the terminator signal promotes polyadenylation of the message. The terminator and/or polyadenylation site elements can serve to enhance message levels and to minimize read through from the cassette into other sequences.

5 Terminators contemplated for use in the invention include any known terminator of transcription described herein or known to one of ordinary skill in the art, including but not limited to, for example, the termination sequences of genes, such as for example the bovine growth hormone terminator or viral termination sequences, such as for example the SV40 terminator. In certain embodiments, the termination signal may be a lack of transcribable or
10 translatable sequence, such as due to a sequence truncation.

v. Polyadenylation Signals

In expression, particularly eukaryotic expression, one will typically include a polyadenylation signal to effect proper polyadenylation of the transcript. The nature of the
15 polyadenylation signal is not believed to be crucial to the successful practice of the invention, and any such sequence may be employed. Preferred embodiments include the SV40 polyadenylation signal or the bovine growth hormone polyadenylation signal, convenient and known to function well in various target cells. Polyadenylation may increase the stability of the transcript or may facilitate cytoplasmic transport.

20

vi. Origins of Replication

In order to propagate a vector in a host cell, it may contain one or more origins of replication sites (often termed "ori"), which is a specific nucleic acid sequence at which replication is initiated. Alternatively an autonomously replicating sequence (ARS) can be
25 employed if the host cell is yeast.

vii. Selectable and Screenable Markers

In certain embodiments of the invention, cells containing a nucleic acid construct of the present invention may be identified *in vitro* or *in vivo* by including a marker in the expression
30 vector. Such markers would confer an identifiable change to the cell permitting easy identification of cells containing the expression vector. Generally, a selectable marker is one that confers a property that allows for selection. A positive selectable marker is one in which the presence of the marker allows for its selection, while a negative selectable marker is one in

WO 02/080849

PCT/US02/10733

which its presence prevents its selection. An example of a positive selectable marker is a drug resistance marker.

Usually the inclusion of a drug selection marker aids in the cloning and identification of transformants, for example, genes that confer resistance to neomycin, puromycin, hygromycin, DHFR, GPT, zeocin and histidinol are useful selectable markers. In addition to markers conferring a phenotype that allows for the discrimination of transformants based on the implementation of conditions, other types of markers including screenable markers such as GFP, whose basis is colorimetric analysis, are also contemplated. Alternatively, screenable enzymes such as herpes simplex virus thymidine kinase (*tk*) or chloramphenicol acetyltransferase (CAT) may be utilized. One of skill in the art would also know how to employ immunologic markers, possibly in conjunction with FACS analysis. The marker used is not believed to be important, so long as it is capable of being expressed simultaneously with the nucleic acid encoding a gene product. Further examples of selectable and screenable markers are well known to one of skill in the art.

viii. Plasmid Vectors

In certain embodiments, a plasmid vector is contemplated for use to transform a host cell. In general, plasmid vectors containing replicon and control sequences which are derived from species compatible with the host cell are used in connection with these hosts. The vector ordinarily carries a replication site, as well as marking sequences which are capable of providing phenotypic selection in transformed cells. In a non-limiting example, *E. coli* is often transformed using derivatives of pBR322, a plasmid derived from an *E. coli* species. pBR322 contains genes for ampicillin and tetracycline resistance and thus provides easy means for identifying transformed cells. The pBR plasmid, or other microbial plasmid or phage must also contain, or be modified to contain, for example, promoters which can be used by the microbial organism for expression of its own proteins.

In addition, phage vectors containing replicon and control sequences that are compatible with the host microorganism can be used as transforming vectors in connection with these hosts. For example, the phage lambda GEMTM-11 may be utilized in making a recombinant phage vector which can be used to transform host cells, such as, for example, *E. coli* LE392.

Further useful plasmid vectors include pIN vectors (Inouye *et al.*, 1985); and pGEX vectors, for use in generating glutathione S-transferase (GST) soluble fusion proteins for later purification and separation or cleavage. Other suitable fusion proteins are those with β -galactosidase, ubiquitin, and the like.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

Bacterial host cells, for example, *E. coli*, comprising the expression vector, are grown in any of a number of suitable media, for example, LB. The expression of the recombinant protein in certain vectors may be induced, as would be understood by those of skill in the art, by contacting a host cell with an agent specific for certain promoters, *e.g.*, by adding IPTG to the media or by switching incubation to a higher temperature. After culturing the bacteria for a further period, generally of between 2 and 24 h, the cells are collected by centrifugation and washed to remove residual media.

ix. Viral Vectors

The ability of certain viruses to infect cells or enter cells *via* receptor-mediated endocytosis, and to integrate into host cell genome and express viral genes stably and efficiently have made them attractive candidates for the transfer of foreign nucleic acids into cells (*e.g.*, mammalian cells). Non-limiting examples of virus vectors that may be used to deliver a nucleic acid of the present invention are described below.

a. Adenoviral Vectors

A particular method for delivery of the nucleic acid involves the use of an adenovirus expression vector. Although adenovirus vectors are known to have a low capacity for integration into genomic DNA, this feature is counterbalanced by the high efficiency of gene transfer afforded by these vectors. "Adenovirus expression vector" is meant to include those constructs containing adenovirus sequences sufficient to (a) support packaging of the construct and (b) to ultimately express a tissue or cell-specific construct that has been cloned therein. Knowledge of the genetic organization of adenovirus, a 36 kb, linear, double-stranded DNA virus, allows substitution of large pieces of adenoviral DNA with foreign sequences up to 7 kb (Grunhaus and Horwitz, 1992).

b. AAV Vectors

The nucleic acid may be introduced into the cell using adenovirus assisted transfection. Increased transfection efficiencies have been reported in cell systems using adenovirus coupled systems (Kelleher and Vos, 1994; Cotten *et al.*, 1992; Curiel, 1994). Adeno-associated virus (AAV) is an attractive vector system for use according to the present invention as it has a high frequency of integration and it can infect nondividing cells, thus making it useful for delivery of genes into mammalian cells, for example, in tissue culture (Muzyczka, 1992) or *in vivo*. AAV has a broad host range for infectivity (Tratschin *et al.*, 1984; Laughlin *et al.*, 1986; Lebkowski *et*

WO 02/080849

PCT/US02/10733

al., 1988; McLaughlin *et al.*, 1988). Details concerning the generation and use of rAAV vectors are described in U.S. Patents 5,139,941 and 4,797,368, each incorporated herein by reference.

c. Retroviral Vectors

5 Retroviruses have promise as gene delivery vectors due to their ability to integrate their genes into the host genome, transferring a large amount of foreign genetic material, infecting a broad spectrum of species and cell types and of being packaged in special cell-lines (Miller, 1992).

10 In order to construct a retroviral vector, a nucleic acid is inserted into the viral genome in the place of certain viral sequences to produce a virus that is replication-defective. In order to produce virions, a packaging cell line containing the *gag*, *pol*, and *env* genes but without the LTR and packaging components is constructed (Mann *et al.*, 1983). When a recombinant plasmid containing a cDNA, together with the retroviral LTR and packaging sequences is introduced into a special cell line (*e.g.*, by calcium phosphate precipitation for example), the
15 packaging sequence allows the RNA transcript of the recombinant plasmid to be packaged into viral particles, which are then secreted into the culture media (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). The media containing the recombinant retroviruses is then collected, optionally concentrated, and used for gene transfer. Retroviral vectors are able to infect a broad variety of cell types. However, integration and stable expression require the
20 division of host cells (Paskind *et al.*, 1975).

Lentiviruses are complex retroviruses, which, in addition to the common retroviral genes *gag*, *pol*, and *env*, contain other genes with regulatory or structural function. Lentiviral vectors are well known in the art (see, for example, Naldini *et al.*, 1996; Zufferey *et al.*, 1997; Blomer *et al.*, 1997; U.S. Patents 6,013,516 and 5,994,136). Some examples of lentivirus include the
25 Human Immunodeficiency Viruses: HIV-1, HIV-2 and the Simian Immunodeficiency Virus: SIV. Lentiviral vectors have been generated by multiply attenuating the HIV virulence genes, for example, the genes *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* and *nef* are deleted making the vector biologically safe.

Recombinant lentiviral vectors are capable of infecting non-dividing cells and can be used for both *in vivo* and *ex vivo* gene transfer and expression of nucleic acid sequences. For
30 example, recombinant lentivirus capable of infecting a non-dividing cell wherein a suitable host cell is transfected with two or more vectors carrying the packaging functions, namely *gag*, *pol* and *env*, as well as *rev* and *tat* is described in U.S. Patent No. 5,994,136, incorporated herein by reference. One may target the recombinant virus by linkage of the envelope protein with an antibody or a particular ligand for targeting to a receptor of a particular cell-type. By inserting a

WO 02/080849

PCT/US02/10733

sequence (including a regulatory region) of interest into the viral vector, along with another gene which encodes the ligand for a receptor on a specific target cell, for example, the vector is now target-specific.

d. Other Viral Vectors

Other viral vectors may be employed as vaccine constructs in the present invention. Vectors derived from viruses such as vaccinia virus (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), sindbis virus, cytomegalovirus and herpes simplex virus may be employed. They offer several attractive features for various mammalian cells (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

e. Delivery Using Modified Viruses

A nucleic acid to be delivered may be housed within an infective virus that has been engineered to express a specific binding ligand. The virus particle will thus bind specifically to the cognate receptors of the target cell and deliver the contents to the cell. A novel approach designed to allow specific targeting of retrovirus vectors was developed based on the chemical modification of a retrovirus by the chemical addition of lactose residues to the viral envelope. This modification can permit the specific infection of hepatocytes *via* sialoglycoprotein receptors.

Another approach to targeting of recombinant retroviruses was designed in which biotinylated antibodies against a retroviral envelope protein and against a specific cell receptor were used. The antibodies were coupled *via* the biotin components by using streptavidin (Roux *et al.*, 1989). Using antibodies against major histocompatibility complex class I and class II antigens, they demonstrated the infection of a variety of human cells that bore those surface antigens with an ecotropic virus *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).

II. Vector Delivery and Cell Transformation

Suitable methods for nucleic acid delivery for transformation of an organelle, a cell, a tissue or an organism for use with the current invention are believed to include virtually any method by which a nucleic acid (*e.g.*, DNA) can be introduced into an organelle, a cell, a tissue or an organism, as described herein or as would be known to one of ordinary skill in the art. Such methods include, but are not limited to, direct delivery of DNA such as by *ex vivo* transfection (Wilson *et al.*, 1989; Nabel *et al.*, 1989), by injection (U.S. Patents 5,994,624, 5,981,274, 5,945,100, 5,780,448, 5,736,524, 5,702,932, 5,656,610, 5,589,466 and 5,580,859,

WO 02/080849

PCT/US02/10733

each incorporated herein by reference), including microinjection (Harlan and Weintraub, 1985; U.S. Patent No. 5,789,215, incorporated herein by reference); by electroporation (U.S. Patent No. 5,384,253, incorporated herein by reference; Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984); by calcium phosphate precipitation (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); by using DEAE-dextran followed by polyethylene glycol (Gopal, 1985); by direct sonic loading (Fechheimer *et al.*, 1987); by liposome mediated transfection (Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991) and receptor-mediated transfection (Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988); by microprojectile bombardment (PCT Application Nos. WO 94/09699 and 95/06128; U.S. Patents 5,610,042; 5,322,783 5,563,055, 5,550,318, 5,538,877 and 5,538,880, and each incorporated herein by reference); by agitation with silicon carbide fibers (Kaeppeler *et al.*, 1990; U.S. Patents 5,302,523 and 5,464,765, each incorporated herein by reference); by *Agrobacterium*-mediated transformation (U.S. Patents 5,591,616 and 5,563,055, each incorporated herein by reference); by PEG-mediated transformation of protoplasts (Omirulleh *et al.*, 1993; U.S. Patents 4,684,611 and 4,952,500, each incorporated herein by reference); by desiccation/inhibition-mediated DNA uptake (Potrykus *et al.*, 1985), and any combination of such methods. Through the application of techniques such as these, organelle(s), cell(s), tissue(s) or organism(s) may be stably or transiently transformed.

20 i. Ex Vivo Transformation

Methods for transfecting vascular cells and tissues removed from an organism in an ex vivo setting are known to those of skill in the art. For example, canine endothelial cells have been genetically altered by retroviral gene transfer in vitro and transplanted into a canine (Wilson *et al.*, 1989). In another example, yucatan minipig endothelial cells were transfected by retrovirus in vitro and transplanted into an artery using a double-balloon catheter (Nabel *et al.*, 1989). Thus, it is contemplated that cells or tissues may be removed and transfected ex vivo using the nucleic acids of the present invention. In particular aspects, the transplanted cells or tissues may be placed into an organism. In preferred facets, a nucleic acid is expressed in the transplanted cells or tissues.

30

ii. Injection

In certain embodiments, a nucleic acid may be delivered to an organelle, a cell, a tissue or an organism via one or more injections (*i.e.*, a needle injection), such as, for example, subcutaneously, intradermally, intramuscularly, intravenously, intraperitoneally, etc. Methods

WO 02/080849

PCT/US02/10733

of injection of vaccines are well known to those of ordinary skill in the art (e.g., injection of a composition comprising a saline solution). Further embodiments of the present invention include the introduction of a nucleic acid by direct microinjection. Direct microinjection has been used to introduce nucleic acid constructs into *Xenopus* oocytes (Harland and Weintraub, 1985).

iii. Electroporation

In certain embodiments of the present invention, a nucleic acid is introduced into an organelle, a cell, a tissue or an organism *via* electroporation. Electroporation involves the exposure of a suspension of cells and DNA to a high-voltage electric discharge. In some variants of this method, certain cell wall-degrading enzymes, such as pectin-degrading enzymes, are employed to render the target recipient cells more susceptible to transformation by electroporation than untreated cells (U.S. Patent No. 5,384,253, incorporated herein by reference). Alternatively, recipient cells can be made more susceptible to transformation by mechanical wounding.

Transfection of eukaryotic cells using electroporation has been quite successful. Mouse pre-B lymphocytes have been transfected with human kappa-immunoglobulin genes (Potter *et al.*, 1984), and rat hepatocytes have been transfected with the chloramphenicol acetyltransferase gene (Tur-Kaspa *et al.*, 1986) in this manner.

iv. Calcium Phosphate

In other embodiments of the present invention, a nucleic acid is introduced to the cells using calcium phosphate precipitation. Human KB cells have been transfected with adenovirus 5 DNA (Graham and Van Der Eb, 1973) using this technique. Also in this manner, mouse L(A9), mouse C127, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 and HeLa cells were transfected with a neomycin marker gene (Chen and Okayama, 1987), and rat hepatocytes were transfected with a variety of marker genes (Rippe *et al.*, 1990).

v. DEAE-Dextran

In another embodiment, a nucleic acid is delivered into a cell using DEAE-dextran followed by polyethylene glycol. In this manner, reporter plasmids were introduced into mouse myeloma and erythroleukemia cells (Gopal, 1985).

WO 02/080849

PCT/US02/10733

vi. Sonication Loading

Additional embodiments of the present invention include the introduction of a nucleic acid by direct sonic loading. LTK⁻ fibroblasts have been transfected with the thymidine kinase gene by sonication loading (Fechheimer *et al.*, 1987).

5

vii. Liposome-Mediated Transfection

In a further embodiment of the invention, a nucleic acid may be entrapped in a lipid complex such as, for example, a liposome. Liposomes are vesicular structures characterized by a phospholipid bilayer membrane and an inner aqueous medium. Multilamellar liposomes have multiple lipid layers separated by aqueous medium. They form spontaneously when phospholipids are suspended in an excess of aqueous solution. The lipid components undergo self-rearrangement before the formation of closed structures and entrap water and dissolved solutes between the lipid bilayers (Ghosh and Bachhawat, 1991). Also contemplated is an nucleic acid complexed with Lipofectamine (Gibco BRL) or Superfect (Qiagen).

Liposome-mediated nucleic acid delivery and expression of foreign DNA *in vitro* has been very successful (Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987). The feasibility of liposome-mediated delivery and expression of foreign DNA in cultured chick embryo, HeLa and hepatoma cells has also been demonstrated (Wong *et al.*, 1980).

In certain embodiments of the invention, a liposome may be complexed with a hemagglutinating virus (HVJ). This has been shown to facilitate fusion with the cell membrane and promote cell entry of liposome-encapsulated DNA (Kaneda *et al.*, 1989). In other embodiments, a liposome may be complexed or employed in conjunction with nuclear non-histone chromosomal proteins (HMG-1) (Kato *et al.*, 1991). In yet further embodiments, a liposome may be complexed or employed in conjunction with both HVJ and HMG-1. In other

embodiments, a delivery vehicle may comprise a ligand and a liposome.

viii. Receptor Mediated Transfection

Still further, a nucleic acid may be delivered to a target cell via receptor-mediated delivery vehicles. These take advantage of the selective uptake of macromolecules by receptor-mediated endocytosis that will be occurring in a target cell. In view of the cell type-specific distribution of various receptors, this delivery method adds another degree of specificity to the present invention.

30

Certain receptor-mediated gene targeting vehicles comprise a cell receptor-specific ligand and a nucleic acid-binding agent. Others comprise a cell receptor-specific ligand to which the

WO 02/080849

PCT/US02/10733

nucleic acid to be delivered has been operatively attached. Several ligands have been used for receptor-mediated gene transfer (Wu and Wu, 1987; Wagner *et al.*, 1990; Perales *et al.*, 1994; Myers, EPO 0273085), which establishes the operability of the technique. Specific delivery in the context of another mammalian cell type has been described (Wu and Wu, 1993; incorporated
5 herein by reference). In certain aspects of the present invention, a ligand will be chosen to correspond to a receptor specifically expressed on the target cell population.

In other embodiments, a nucleic acid delivery vehicle component of a cell-specific nucleic acid targeting vehicle may comprise a specific binding ligand in combination with a liposome. The nucleic acid(s) to be delivered are housed within the liposome and the specific
10 binding ligand is functionally incorporated into the liposome membrane. The liposome will thus specifically bind to the receptor(s) of a target cell and deliver the contents to a cell. Such systems have been shown to be functional using systems in which, for example, epidermal growth factor (EGF) is used in the receptor-mediated delivery of a nucleic acid to cells that exhibit upregulation of the EGF receptor.

In still further embodiments, the nucleic acid delivery vehicle component of a targeted delivery vehicle may be a liposome itself, which will preferably comprise one or more lipids or glycoproteins that direct cell-specific binding. For example, lactosyl-ceramide, a galactose-terminal asialganglioside, have been incorporated into liposomes and observed an increase in the uptake of the insulin gene by hepatocytes (Nicolau *et al.*, 1987). It is
20 contemplated that the tissue-specific transforming constructs of the present invention can be specifically delivered into a target cell in a similar manner.

E. Combined Administration of Therapeutic Genes and DNA Damaging Agents

I. Administration

Tumors that can be treated with the present invention include, but are not limited to, tumors of the brain (glioblastomas, medulloblastoma, astrocytoma, oligodendroglioma, ependymomas), lung, liver, spleen, kidney, lymph node, small intestine, pancreas, blood cells, colon, stomach, breast, endometrium, prostate, testicle, ovary, skin, head and neck, esophagus, bone marrow, blood or other tissue. The tumor may be distinguished as metastatic and
30 non-metastatic. Various embodiments include tumor cells of the skin, muscle, fascia, brain, prostate, breast, endometrium, lung, head & neck, pancreas, small intestine, blood cells, liver, testes, ovaries, colon, skin, stomach, esophagus, spleen, lymph node, bone marrow or kidney. Other embodiments include fluid samples such as peripheral blood, lymph fluid, ascites, serous fluid, pleural effusion, sputum, cerebrospinal fluid, lacrimal fluid, stool or urine.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

In accordance with the present invention, delivery of an Egr-1-driven expression vector and a DNA damaging agent is provided. This combination is capable of affecting a hyperproliferative disease (*e.g.*, cancer) in a subject, for example, by killing one or more target cells, inducing apoptosis in one or more target cells, reducing the growth rate of one or more target cells, reducing the incidence or number of metastases, reducing a tumor's size, inhibiting a tumor's growth, reducing the blood supply to a tumor or one or more target cells, promoting an immune response against one or more target cells or a tumor, preventing or inhibiting the progression of a cancer, or increasing the lifespan of a subject with a cancer.

More generally, the agents are provided in a combined amount with an effective dose to kill or inhibit proliferation of a cancer cell. This process may involve contacting the cell(s) with the agents at the same time or within a period of time wherein separate administration of the agents to a cell, tissue or organism produces a desired therapeutic benefit. This may be achieved by contacting the cell, tissue or organism with a single composition or pharmacological formulation that includes both agents, or by contacting the cell with two or more distinct compositions or formulations.

The terms "contacted" and "exposed," when applied to a cell, tissue or organism, are used herein to describe the process by which a therapeutic construct and DNA damaging agent are delivered to a target cell, tissue or organism or are placed in direct juxtaposition with the target cell, tissue or organism. To achieve cell killing or stasis, the agents are delivered to one or more cells in a combined amount effective to kill the cells or prevent them from dividing.

The expression construct may precede, be concurrent with and/or follow the DNA-damaging agent by intervals ranging from minutes to weeks. In embodiments where the agents are applied separately to a cell, tissue or organism, one would generally ensure that a significant period of time did not expire between the time of each delivery, such that the DNA damaging agent would still be able to induce expression from the the Egr-1 promoter in the cell, tissue or organism. For example, in such instances, it is contemplated that one may contact the cell, tissue or organism with the agents substantially simultaneously (*i.e.*, within less than about a minute). In other aspects, the agents may be administered about 1 minute, about 5 minutes, about 10 minutes, about 20 minutes about 30 minutes, about 45 minutes, about 60 minutes, about 2 hours, about 3 hours, about 4 hours, about 5 hours, about 6 hours, about 7 hours about 8 hours, about 9 hours, about 10 hours, about 11 hours, about 12 hours, about 13 hours, about 14 hours, about 15 hours, about 16 hours, about 17 hours, about 18 hours, about 19 hours, about 20 hours, about 21 hours, about 22 hours, about 22 hours, about 23 hours, about 24 hours, about 25 hours, about 26 hours, about 27 hours, about 28 hours, about 29 hours, about 30 hours, about 31 hours, about 32

WO 02/080849

PCT/US02/10733

hours, about 33 hours, about 34 hours, about 35 hours, about 36 hours, about 37 hours, about 38 hours, about 39 hours, about 40 hours, about 41 hours, about 42 hours, about 43 hours, about 44 hours, about 45 hours, about 46 hours, about 47 hours, about 48 hours, about 1 day, about 2 days, about 3 days, about 4 days, about 5 days, about 6 days, about 7 days, about 8 days, about 9 days, about 10 days, about 11 days, about 12 days, about 13 days, about 14 days, about 15 days, about 16 days, about 17 days, about 18 days, about 19 days, about 20 days, about 21 days, about 1, about 2, about 3, about 4, about 5, about 6, about 7 or about 8 weeks or more apart, and any range derivable therein.

Various combination may be employed. Non-limiting examples of such combinations are shown below, wherein an Egr-1 vector is "A" and a DNA damaging agent is "B":

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		

15

Other combinations are also contemplated.

Administration of the agents of the present invention may follow general protocols for the administration of chemo- or gene therapeutics, taking into account the toxicity, if any. It is expected that the treatment cycles would be repeated as necessary. In particular embodiments, it is contemplated that various additional agents may be applied in any combination with the present invention.

"Effective amount" is defined as an amount of the agent that will decrease, reduce, inhibit or otherwise abrogate the growth of a cancer cell, induce apoptosis, inhibit metastasis, kill cells or induce cytotoxicity in cells.

The agents may, in general, be administered intravenously, intraarterially, intratumorally, parenterally or intraperitoneally. In particular, it is envisioned that local, regional and systemic delivery of the Egr-1 vector and DNA damaging agents to patients with cancers all will be suitable methods. A local administration also is useful, and includes direct injection of tumor mass, circumferential injection, and injections or bathing of a resected tumor bed. Regional delivery may include administration into the tumor vasculature or regional blood supply. Alternatively, systemic delivery of either or both DNA damaging agents and Egr-1 vector is appropriate in certain circumstances, for example, where extensive metastasis has occurred.

30

WO 02/080849

PCT/US02/10733

II. Formulations

The pharmaceutical forms of the agents are generally prepared for use as injectable solutions or dispersions. In all cases, the form should be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It also should be stable under the conditions of manufacture and storage, and be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

F. Adjunct Therapies**I. Radiotherapeutic Agents**

Radiotherapeutic agents and factors include radiation and waves that induce DNA damage for example, γ -irradiation, X-rays, UV-irradiation, microwaves, electronic emissions, radioisotopes, and the like. Therapy may be achieved by irradiating the localized tumor site with the above described forms of radiations. It is most likely that all of these factors effect a broad range of damage DNA, on the precursors of DNA, the replication and repair of DNA, and the assembly and maintenance of chromosomes.

Dosage ranges for X-rays range from daily doses of 50 to 200 roentgens for prolonged periods of time (3 to 4 weeks), to single doses of 2000 to 6000 roentgens. Dosage ranges for radioisotopes vary widely, and depend on the half-life of the isotope, the strength and type of radiation emitted, and the uptake by the neoplastic cells.

II. Surgery

Surgical treatment for removal of the cancerous growth is generally a standard procedure for the treatment of tumors and cancers. This attempts to remove the entire cancerous growth or to reduce it in order to make another therapy more effective, *e.g.*, combined with chemotherapy and/or radiotherapy to ensure the destruction of any remaining neoplastic or malignant cells. Thus, surgery may be used in combination with the present invention.

Approximately 60% of persons with cancer will undergo surgery of some type, which includes, for example, preventative, diagnostic or staging, curative and palliative surgery. Surgery, and in particular a curative surgery, may be used in conjunction with other therapies, such as the present invention and one or more other agents.

Curative surgery includes resection in which all or part of cancerous tissue is physically removed, excised and/or destroyed. It is further contemplated that surgery may remove, excise or destroy superficial cancers, precancers, or incidental amounts of normal tissue. Treatment by surgery includes for example, tumor resection, laser surgery, cryosurgery, electrosurgery, and microscopically controlled surgery (Mohs' surgery). Tumor resection refers to physical removal of at least part of a tumor. Upon excision of part of all of cancerous cells, tissue, or tumor, a cavity may be formed in the body.

Further treatment of the tumor or area of surgery may be accomplished treatment of the patient or surgical field with an additional anti-cancer therapy. Such treatment may be repeated, for example, about every 1, about every 2, about every 3, about every 4, about every 5, about every 6, or about every 7 days, or about every 1, about every 2, about every 3, about every 4, or

WO 02/080849

PCT/US02/10733

about every 5 weeks or about every 1, about every 2, about every 3, about every 4, about every 5, about every 6, about every 7, about every 8, about every 9, about every 10, about every 11, or about every 12 months. These treatments may be of varying dosages as well.

5 III. Immune Therapy

An immunotherapeutic agent generally relies on the use of immune effector cells and molecules to target and destroy cancer cells. The immune effector may be, for example, an antibody specific for some marker on the surface of a tumor cell. The antibody alone may serve as an effector of therapy or it may recruit other cells to actually effect cell killing. The antibody
10 also may be conjugated to a drug or toxin (*e.g.*, a chemotherapeutic, a radionuclide, a ricin A chain, a cholera toxin, a pertussis toxin, *etc.*) and serve merely as a targeting agent. Such antibody conjugates are called immunotoxins, and are well known in the art (see U.S. Patent 5,686,072, U.S. Patent 5,578,706, U.S. Patent 4,792,447, U.S. Patent 5,045,451, U.S. Patent 4,664,911, and U.S. Patent 5,767,072, each incorporated herein by reference). Alternatively, the
15 effector may be a lymphocyte carrying a surface molecule that interacts, either directly or indirectly, with a tumor cell target. Various effector cells include cytotoxic T cells and NK cells.

In one aspect of immunotherapy, the tumor cell must bear some marker that is amenable to targeting, *i.e.*, is not present on the majority of other cells. Many tumor markers exist and any of these may be suitable for targeting in the context of the present invention. Common tumor
20 markers include carcinoembryonic antigen, prostate specific antigen, urinary tumor associated antigen, fetal antigen, tyrosinase (p97), gp68, TAG-72, HMFG, Sialyl Lewis Antigen, MucA, MucB, PLAP, estrogen receptor, laminin receptor, *erb B* and p155.

i. Immune Stimulators

25 In a specific aspect of immunotherapy is to use an immune stimulating molecule as an agent, or more preferably in conjunction with another agent, such as for example, a cytokines such as for example IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, tumor necrosis factor; interferons alpha, beta, and gamma; F42K and other cytokine analogs; a chemokine such as for example MIP-1, MIP-1β, MCP-1, RANTES, IL-8; or a growth factor such as for example FLT3 ligand.

30 One particular cytokine contemplated for use in the present invention is tumor necrosis factor. Tumor necrosis factor (TNF; Cachectin) is a glycoprotein that kills some kinds of cancer cells, activates cytokine production, activates macrophages and endothelial cells, promotes the production of collagen and collagenases, is an inflammatory mediator and also a mediator of septic shock, and promotes catabolism, fever and sleep. Some infectious agents cause tumor

WO 02/080849

PCT/US02/10733

regression through the stimulation of TNF production. TNF can be quite toxic when used alone in effective doses, so that the optimal regimens probably will use it in lower doses in combination with other drugs. Its immunosuppressive actions are potentiated by gamma-interferon, so that the combination potentially is dangerous. A hybrid of TNF and interferon- α also has been found to possess anti-cancer activity.

Another cytokine specifically contemplated is interferon alpha. Interferon alpha has been used in treatment of hairy cell leukemia, Kaposi's sarcoma, melanoma, carcinoid, renal cell cancer, ovary cancer, bladder cancer, non-Hodgkin's lymphomas, mycosis fungoides, multiple myeloma, and chronic granulocytic leukemia.

ii. Passive Immunotherapy

A number of different approaches for passive immunotherapy of cancer exist. They may be broadly categorized into the following: injection of antibodies alone; injection of antibodies coupled to toxins or chemotherapeutic agents; injection of antibodies coupled to radioactive isotopes; injection of anti-idiotypic antibodies; and finally, purging of tumor cells in bone marrow.

Preferably, human monoclonal antibodies are employed in passive immunotherapy, as they produce few or no side effects in the patient. However, their application is somewhat limited by their scarcity and have so far only been administered intralesionally. For example, human monoclonal antibodies to ganglioside antigens have been administered intralesionally to patients suffering from cutaneous recurrent melanoma (Irie & Morton, 1986). Regression was observed in six out of ten patients, following, daily or weekly, intralesional injections. In another study, moderate success was achieved from intralesional injections of two human monoclonal antibodies (Irie *et al.*, 1989).

It may be favorable to administer more than one monoclonal antibody directed against two different antigens or even antibodies with multiple antigen specificity. Treatment protocols also may include administration of lymphokines or other immune enhancers (Bajorin *et al.* 1988).

iii. Active Immunotherapy

In active immunotherapy, an antigenic peptide, polypeptide or protein, or an autologous or allogenic tumor cell composition or "vaccine" is administered, generally with a distinct bacterial adjuvant (Ravindranath & Morton, 1991; Morton & Ravindranath, 1996; Morton *et al.*, 1992; Mitchell *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1993). In melanoma immunotherapy, those patients

WO 02/080849

PCT/US02/10733

who elicit high IgM response often survive better than those who elicit no or low IgM antibodies (Morton *et al.*, 1992). IgM antibodies are often transient antibodies and the exception to the rule appears to be anti-ganglioside or anticarbohydrate antibodies.

5 **iv. Adoptive Immunotherapy**

In adoptive immunotherapy, the patient's circulating lymphocytes, or tumor infiltrated lymphocytes, are isolated *in vitro*, activated by lymphokines such as IL-2 or transduced with genes for tumor necrosis, and readministered (Rosenberg *et al.*, 1988; 1989). To achieve this, one would administer to an animal, or human patient, an immunologically effective amount of
10 activated lymphocytes in combination with an adjuvant-incorporated antigenic peptide composition as described herein. The activated lymphocytes will most preferably be the patient's own cells that were earlier isolated from a blood or tumor sample and activated (or "expanded") *in vitro*. This form of immunotherapy has produced several cases of regression of melanoma and renal carcinoma, but the percentage of responders were few compared to those who did not
15 respond.

G. Screening and Monitoring Effectiveness of Therapy

It is contemplated that in the context of the present invention one may remove cells, either tumor, normal or both tumor and normal cells, from an individual in order to either
20 monitor the progress of treatment or as a part of the treatment. It is expected that one may monitor the effectiveness of treatment by removing such cells and treating such cells with DAPI staining to determine the level of chromatin condensation, measuring the level of apoptosis, measuring the level of neutral sphingomyelinase production or other methods such as the following.

25 One particular method for determining induction of apoptosis is terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assays, which measure the integrity of DNA (Gorczyca, 1993). This assay measures the fragmentation of DNA by monitoring the incorporation of labeled UTP into broken DNA strands by the enzyme terminal transferase. The incorporation can be monitored by electroscopy or by cell sorting
30 methodologies (*e.g.*, FACS).

H. Ex vivo Delivery

In the present invention, it is contemplated that *ex vivo* gene therapy – isolation of cells from an animal or patient, treatment of the cells *in vitro*, and then the return of the modified cells

WO 02/080849

PCT/US02/10733

back into an animal or individual – may be employed. This approach permits higher doses of therapy, and the addition of other factors that are may not be possible in an *in vivo* setting. In particular, autologous bone marrow cell (BMC) transplantation is used as a salvage procedure in which blood or bone marrow is taken and stored prior to an intensification of radiation or chemotherapy. Treatment of such cells to prevent reintroduction of cancer cells is highly beneficial.

In preparing human mononuclear cells (MNC), an aliquot of marrow is layered into a receptacle such as a centrifuge tube. Initially, MNC may be obtained from a source of bone marrow, *e.g.*, tibiae, femora, spine, ribs, hips, sternum, as well as the humeri, radi, ulna, tibiae, and fibulae. Additionally, these cells also can be obtained from cord blood, peripheral blood, or cytokine-mobilized peripheral blood. Other sources of human hematopoietic stem cells include embryonic yolk sac, fetal liver, fetal and adult spleen, and blood. The marrow layer is centrifuged to produce a pellet of red cells at the bottom of the tube, a clear layer of media, an interface layer which contains the MNC and a plasma medium layer on top. The interface layer may then be removed using, for example, suction. Centrifugation of this layer at 1000g ultimately yields a MNC pellet. This pellet may then be resuspended in a suitable buffer for cell sorting by FACS. The isolated MNC are cloned *in vitro* to expand the of immunologically active cells. The expanded, therapeutically active cells are then provided to the patient to obtain a therapeutic effect.

I. Clinical Trials

This example is concerned with the development of human treatment protocols by methods comprising: a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, the nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and b) administering the expression construct to a human subject in combination with a DNA damaging compound that can induce free radicals. The methods may further comprise administering to the patient other cancer therapeutic compounds, ionizing radiation and/or any other adjunct cancer therapy. These methods will be of use in the clinical treatment of various cancers/tumors and diseases in which transformed or cancerous cells play a role. Such treatment will be particularly useful tools in anti-tumor therapy, for example, in treating patients with lung cancer, prostate cancer, ovarian cancer, testicular cancer, brain cancer, skin cancer, colon cancer, gastric cancer, esophageal cancer, tracheal cancer, head & neck cancer, pancreatic cancer, liver cancer, breast cancer, ovarian cancer, lymphoid cancer, leukemia, cervical cancer, or vulvar cancer.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

The free radical-inducing DNA damaging compound may be a platinum compound such as cisplatin, a nitrogen mustard, cytoxan, cyclophosphamide, mitomycin c, adriamycin, iphosphamide, bleomycin, doxourbicin, procarbazine, actinomycin, chlorambucil, carboplatinum, busulfan, benu, ccnu, hexamethylmelamineoxaliplatin, epirubicin, daunorubicin, 5 camptothecin, or mitoxantrone. Any protein with anti-cancer properties may be used and examples of such compounds are described elsewhere in the specification.

The various elements of conducting a clinical trial, including patient treatment and monitoring, are known to those of skill in the art in light of the present disclosure. The following information is being presented as a general guideline for use in establishing clinical trials using 10 the methods of the invention.

Candidates for the phase 1 clinical trial will be patients on which all conventional therapies have failed. The therapeutic formulations of the invention will be administered on a tentative weekly basis. Effectiveness of the therapy and disease course can be assessed by monitoring parameters such as tumor size, presence of tumor markers, and/or bone marrow 15 infiltration of cancer cells on a periodic basis. Tests that will be used to monitor the progress of the patients and the effectiveness of the treatments include: physical exam, X-ray, blood work and other clinical laboratory methodologies. In addition, peripheral blood and bone marrow samples will be drawn to assess the expression of the anticancer protein expressed by the vector. The doses given in the phase 1 study will be escalated as is done in standard phase 1 clinical 20 phase trials, *i.e.*, doses will be escalated until maximal tolerable ranges are reached.

Clinical responses may be defined by acceptable measure. For example, a complete response may be defined by complete disappearance of evidence of cancer cells for at least 2 months. Whereas a partial response may be defined by a 50% reduction of cancer cells for at least 2 months.

25 The typical course of treatment will vary depending upon the individual patient and disease being treated in ways known to those of skill in the art. A typical treatment course may comprise about six doses delivered over a 7 to 21 day period. Upon election by the clinician the regimen may be continued with six doses every three weeks or on a less frequent (monthly, bimonthly, quarterly etc.) basis. For example, a patient with lung cancer might be treated in 30 eight week cycles, although longer duration may be used if no adverse effects are observed with the patient, and shorter terms of treatment may result if the patient does not tolerate the treatment as hoped. Each cycle will consist of between 20 and 35 individual doses spaced equally, although this too may be varied depending on the clinical situation. Of course, these are only

WO 02/080849

PCT/US02/10733

exemplary times for treatment, and the skilled practitioner will readily recognize that many other time-courses are possible.

Patients may, but need not, have received previous or concurrent surgical, chemo-, radio- or gene therapeutic treatments. Optimally the patient will exhibit adequate bone marrow function (defined as peripheral absolute granulocyte count of $> 2,000/\text{mm}^3$ and platelet count of $100,000/\text{mm}^3$, adequate liver function (bilirubin 1.5mg/dl) and adequate renal function (creatinine 1.5mg/dl).

The therapeutic compositions of the present invention will typically be administered parenterally in dosage unit formulations containing standard, well known non-toxic physiologically acceptable carriers, adjuvants, and vehicles as desired. The term parenteral as used herein includes intravenous, intratumoral, subcutaneous, intramuscular, intra, or infusion techniques. These compositions will be provided in an amount effective to kill or inhibit the proliferation of the cell.

Regional delivery of the compositions are an efficient method for delivering a therapeutically effective dose to counteract the clinical disease. Alternatively, systemic delivery may be appropriate. The therapeutic compositions of the present invention may be administered to the patient directly at the site of the tumor. The volume of the composition should usually be sufficient to ensure that the entire surface of the tumor is contacted by the therapeutic composition. In one embodiment, administration simply entails injection of the therapeutic composition into the tumor. In another embodiment, a catheter is inserted into the site of the tumor and the cavity may be continuously perfused for a desired period of time.

Of course, the above-described treatment regimes may be altered in accordance with the knowledge gained from pre-clinical trials. Those of skill in the art will be able to take the information disclosed in this specification and optimize treatment regimes.

J. Examples

The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventor to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

EXAMPLE 1

Methods

Cells and cell culture. Cell lines Seg-1, a human esophageal adenocarcinoma (Dr. David Beer, University of Michigan, Ann Arbor, MI) and DHD/K12/TRb (PROb), a rat colon adenocarcinoma established in syngeneic BD-IX rats by 1,2-dimethylhydrazine induction (Dr. Francois Martin, University of Dijon, France) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GibcoBRL, Grand Island, NY) supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS, 10% v/v) (Intergen, Purchase, NY), penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (100 µg/ml) (GibcoBRL), at 37°C and 7.5% CO₂.

Animals. Athymic nude mice (Frederick Cancer Research Institute, Frederick, MD) received food and water *ad libitum*. Experiments were in accordance with the guidelines of the University of Chicago.

Viral vectors. The viral vectors Ad.Egr.TNF.11D and Ad.Null.3511.11D (GenVec, Gaithersburg, MD) were stored at -80°C, and diluted to the appropriate concentration in formulation buffer.

In vitro measurement of TNF-α protein. Seg-1 and PROb cells were plated at 10⁵ cells/well in 12-well plates (Becton Dickinson, Bedford, MA), grown overnight, and infected with either Ad.Null.3511.11D or Ad.Egr.TNF.11D at 100 multiplicities of infection (MOI) in serum-free medium for 2-3 hours. IR treated cells in complete medium were exposed to 5 Gy using a Pantak PCM 1000 x-ray generator. Cells in the cisplatin group were exposed to 5 µM cisplatin in complete medium. Cells and supernatants were harvested by scraping at 24, 48, and 72 hours, and production of human TNF-α was quantified by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) following three cycles of freeze-thaw lysis. Assays were performed in triplicate. Duplicate treatment plates were used to adjust for the cytotoxicity of IR and cisplatin. Cells were harvested using versene (0.02% EDTA in HBSS) and trypsin-EDTA (0.25% trypsin, 1 mM EDTA-4Na) (GibcoBRL) and cells were counted using the hemocytometer with trypan blue (0.4%) exclusion (GibcoBRL). Protein assays were performed to normalize for protein concentration (Bio-Rad, Hercules, CA).

In vitro luciferase reporter assay. The Egr-1 constructs pE425 (596 base pairs containing all CArG elements, no AP-1 sites) and pE660 (the minimal Egr-1 promoter, 115 base pairs no CArG elements) (Datta *et al.*, 1993) were evaluated following sequence confirmation and insertion of the PCR product into the pGL3 basic firefly luciferase reporter plasmid construct (Promega, Madison, WI) by enzyme restriction and ligation. JM109 competent cells

WO 02/080849

PCT/US02/10733

(Stratagene, La Jolla, CA) were transformed with these plasmids, endotoxin-free maxipreps (Qiagen, Valencia, CA) were prepared, and product confirmation was performed by PCR, sequencing, enzyme restriction, and gel electrophoresis. Seg-1 and PROb cells were plated at 10^5 cells/well in 12-well plates and transfected with the firefly luciferase reporter plasmid constructs, pGL3 basic (promoterless, negative control), pGL3 660 (minimal Egr-1 promoter), or pGL3 425 (Egr-1 promoter containing all CArG elements) using the TransFast transfection reagent (Promega). All groups were co-transfected with the Renilla luciferase reporter plasmid construct pRL-TK (HSV thymidine kinase promoter) to normalize for transfection efficiency. 48 hr later, cells were exposed to IR (20Gy) or cisplatin (5 μ M). Cells were harvested 6 hr later, and luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega).

In vivo measurement of TNF- α protein. Seg-1 or PROb cells ($5 \times 10^6/0.1$ ml) were injected in the right hind limb of nude mice. Tumor bearing mice were randomized to one of 4 groups: intratumoral (IT) Ad.Null.3511.11D (2×10^8 p.u./10 μ l) with intraperitoneal (IP) with normal saline (NS) or cisplatin (8 mg/kg) and IT Ad.Egr.TNF.11D (2×10^8 p.u./10 μ l) with IP NS or cisplatin. IP NS or cisplatin treatments were administered after IT vector. Two consecutive IT and IP injections were given. Animals were euthanized, and xenografts were harvested 48 hours following the second IP injection. Xenografts were snap frozen in liquid nitrogen, and homogenized in RIPA buffer (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7.5, EDTA 5 mM, pH 7.5, PMSF 100 mM, Leupeptin 1 μ g/ml, Aprotinin 2 μ g/ml) using a Brinkman Polytron Homogenizer (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland). Following three freeze-thaw lysis cycles, the homogenate was centrifuged at 10,000 rpm (Sorvall RC5C SS34 rotor) for 10 minutes, 4°C. TNF- α levels in the supernatants were measured using ELISA and protein assays were performed (Bio-Rad, Hercules, CA).

In vivo regrowth studies. Seg-1 or PROb cells ($5 \times 10^6/0.1$ ml) were injected in the right hind limb of nude mice. Tumor bearing mice were assigned to one of 4 groups: intratumoral (IT) Ad.Null.3511.11D (2×10^8 p.u./10 μ l) with intraperitoneal (IP) normal saline (NS) or cisplatin (3 mg/kg) and IT Ad.Egr.TNF.11D (2×10^8 p.u./10 μ l) with IP NS or cisplatin. IP NS or cisplatin injections were given following the IT vector injection, and 4 consecutive daily IT and IP injections were given. Xenografts were measured every 2 days using calipers and tumor volume was calculated (length x width x thickness)/2. Fractional tumor volumes (V/V_0 , V_0 = day 0 volume) were calculated and plotted.

Statistical analysis. Statistical significance was determined using two-tail student's *t*-test.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

EXAMPLE 2

***In vitro* Induction of TNF- α in Human and Rat Tumor Cells Following Infection with Ad.Egr.TNF.11D and Exposure to Cisplatin**

5

Because Egr-1 is induced through the CArG elements of its promoter by ROIs and/or DNA damage, TNF- α production by tumor cells infected with an adenoviral vector in which CArG elements are upstream to a TNF- α cDNA (Ad.Egr.TNF.11D) was analyzed after exposure to cisplatin, a DNA damaging agent that alters cellular redox status (Davis *et al.*, 2001). TNF- α production was tested in human esophageal Seg-1 cells and rat colorectal PROb cells following exposure to 5 μ M cisplatin. TNF- α concentrations were determined using an ELISA that is specific for human TNF- α . No TNF- α protein was detectable in Seg-1 cell pellets or supernatants from cultures infected with the null vector (Ad.Null.3511.11D), and treated with IR or cisplatin. In contrast, significant levels of TNF- α protein were detected in cultures of Seg-1 cells infected with the Ad.Egr.TNF.11D vector and exposed to IR (5 Gy) at 24, 48 and 72 hrs (768.8 \pm 32.6, 593.0 \pm 27.6, 746.0 \pm 18.5, respectively) compared cells infected with vector alone (269.3 \pm 1.9, 167.8 \pm 8.4, 260.6 \pm 14.9; P < 0.001). Combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D + IR resulted in a 2.9, 3.5 and 2.9-fold increase in TNF production. A similar induction of TNF- α protein was detected in Seg-1 cells infected with the Ad.Egr.TNF.11D vector and exposed to 5 μ M cisplatin compared with vector alone at 24 hrs (885.3 \pm 28.7), 48 hrs (892.6 \pm 21.3) and 72 hrs (901.7 \pm 21.7; P < 0.001, FIG. 5A). Combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D + cisplatin thus resulted in a 3.3, 5.3 and 3.5-fold increase in TNF production.

Comparable experiments were conducted with PROb cell cultures. Again no TNF- α protein was detectable in PROb cell pellets or supernatants from cultures infected with the null vector (Ad.Null.3511.11D) and treated with IR or cisplatin. Significant levels of TNF- α protein were detected in cultures of PROb cells infected with the Ad.Egr.TNF.11D vector and exposed to IR (5 Gy) at 24, 48 and 72 hrs (55.1 \pm 4.6, 440.5 \pm 7.0, 812.7 \pm 8.9, respectively) compared cells infected with vector alone (17.9 \pm 1.7, 169.7 \pm 5.2, 522.5 \pm 11.3; P < 0.001). Combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D + IR resulted in a 3.1, 2.6 and 1.6-fold increase in TNF production. A similar induction of TNF- α protein was detected in Seg-1 cells infected with the Ad.Egr.TNF.11D vector and exposed to 5 μ M cisplatin compared with vector alone at 24, 48 and 72 hrs (52.4 \pm 0.6, 318.6 \pm 30.6, 812.2 \pm 11.0; P < 0.001, FIG. 5B). Combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D + cisplatin resulted in a 2.9, 1.9 and 1.6-fold increase in TNF production.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

These findings from the Seg-1 and PROb cell lines demonstrate that IR and cisplatin induce TNF- α expression by activating the Egr-1 promoter.

With a selective tumor-targeting vector, a cisplatin inducible genetic construct enhances the effects of cisplatin, in this case by TNF- α . Cisplatin and TNF- α have different mechanisms of cell killing and therefore, cells resistant to cisplatin may be sensitive to TNF- α and vice versa. Also, necrosis is induced by high intratumoral concentrations of TNF- α by damage to the tumor microvasculature, which may be useful in treatment of TNF- α and cisplatin resistant tumors. The cisplatin/Ad.Egr.TNF .11D strategy thus is an effective therapy for localized tumors not effectively treated with radiotherapy or surgery. Also, Ad.Egr.TNF.11D may enhance the local effects of combination chemo-radiation therapy.

EXAMPLE 3

CAR_G Elements of the Egr-1 Promoter Mediate Induction of TNF- α by Cisplatin

To study whether the CAR_G elements of the Egr-1 promoter are inducible by cisplatin, Egr-1 promoter activity was assessed by measuring activation of the luciferase reporter gene in Seg-1 and PROb cells co-transfected with the firefly luciferase reporter plasmid constructs pGL3 basic (negative control), pGL3 660 (consisting only of the minimal Egr-1 promoter, no CAR_G elements), or pGL3 425 (consisting of all the CAR_G elements, no AP-1 sites), and the Renilla luciferase reporter plasmid construct pRL-TK. Minimal luciferase activity (LA) was detectable in Seg-1 cells transfected with the pGL3 basic plasmid construct (LA = 0.01 – 0.02) or with the pGL3 660 plasmid construct (LA = 0.10–0.18). However, Seg-1 cells transfected with the pGL3 425 plasmid construct exhibited a 2.4-fold increase ($P=0.005$) in relative luciferase activity (LA = 15.07) following exposure to IR (20 Gy) compared to untreated control (LA = 6.37) and a 2.0-fold increase ($P=0.005$) in luciferase activity (LA = 2.89) following exposure to cisplatin (50 μ M) compared with untreated control (FIG. 6A).

Similar results were obtained with the PROb cell line. Minimal luciferase activity was detectable in PROb cells transfected with the pGL3 basic plasmid construct (LA = 0.21 – 0.30) or with the pGL3 660 plasmid construct (LA = 0.76 – 1.84). PROb cells transfected with the pGL3 425 plasmid construct exhibited a 4.2-fold increase ($P=0.004$) in luciferase activity (LA = 57.75) following exposure to IR (20 Gy) compared to untreated control (LA = 13.69) and a 3.6-fold increase ($P=0.01$) in luciferase activity (LA = 49.40) following exposure to cisplatin (50 μ M) compared with untreated control (FIG. 6B). These data demonstrate that CAR_G elements of

WO 02/080849

PCT/US02/10733

the Egr-1 promoter are inducible by cisplatin and mediate the transcriptional activation of the chimeric Egr-1.TNF- α gene.

EXAMPLE 4

5 Induction of TNF- α in Human and Rat Tumor Xenografts Following Treatment With Ad.Egr.TNF.11D and Cisplatin

TNF- α induction by cisplatin was analyzed following infection of human and rodent tumors with the Ad.Egr.TNF.11D vector. Xenografts of Seg-1 or PROb cells growing the hind
10 limbs of athymic nude mice were injected intratumorally (IT) with Ad.Null.3511.11D or Ad.Egr.TNF.11D. Tumor bearing mice were injected IP with either normal saline (NS) or cisplatin (3 mg/kg). TNF- α concentration in tumor homogenates was quantified using ELISA.

No TNF- α protein was detected in Seg-1 tumor homogenates following injection of the Ad.Null.3511.11D vector and systemic treatment with either NS or cisplatin. A significant
15 increase (3.5-fold) in intratumoral TNF- α protein was observed following combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D + cisplatin (1294.0 ± 438.5 pg/mg) compared with treatment with vector alone (366.5 ± 52.6 pg/mg; $P < 0.05$, FIG. 7A).

No TNF- α protein was detected in PROb tumor homogenates following injection of Ad.Null.3511.11D vector and systemic treatment with either NS or cisplatin. However, a
20 significant increase (2.7-fold) in intratumoral TNF- α protein was observed following combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D + cisplatin (878.6 ± 61.9 pg/mg) compared to treatment with vector alone (321.4 ± 27.7 pg/mg; $P < 0.001$, FIG. 7B). These findings demonstrate *in vivo* induction of TNF- α protein by cisplatin and verify that the TNF- α protein is a product of the Ad.Egr.TNF.11D vector rather than the tumor tissue.

25

EXAMPLE 5

Cisplatin Inducible Ad.Egr.TNF.11D Enhances Treatment of Human and Rat Xenografts

Potential antitumor effects of chemo-inducible Ad.Egr.TNF.11D and cisplatin were
30 examined in Seg-1 and PROb xenografts. In the Seg-1 studies, mean tumor volume on day 0 (initiation of treatment) was 381.3 ± 10.8 mm³ ($n = 48$, 12 mice per treatment group). Xenografts were injected IT with either Ad.Null.3511.11D or Ad.Egr.TNF.11D. Mice were injected IP with either NS or cisplatin. Control tumors (Ad.Null.3511.11D + NS) doubled in size

WO 02/080849

PCT/US02/10733

by day 4 and exhibited a 4.7 fold increase in mean tumor volume by day 14. A similar growth pattern was observed in tumors treated with the Ad.Egr.TNF.11D vector + NS (2.0-fold increase at day 4 and 3.8-fold increase in mean volume at day 14). Significant tumor regression was observed in the tumors receiving combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D + cisplatin compared with tumors treated with the null vector + cisplatin on days 4 ($P=0.045$), 6 ($P<0.005$), 8 ($P<0.002$), 10 ($P<0.001$), 12 ($P<0.004$), and 14 ($P<0.021$), (FIG. 8A).

In the PROb studies, mean tumor volume on day 0 was $244.2 \pm 6.2 \text{ mm}^3$ ($n = 40$, 10 mice per treatment group). Control tumors (Ad.Null.3511.11D + NS) grew steadily doubling in size by day 4, exhibiting a 4.4 fold increase in mean tumor volume by day 14. A similar growth pattern was observed for tumors treated with the Ad.Egr.TNF.11D vector + NS (1.6-fold increase at day 4 and 3.6-fold increase in mean volume at day 14). Significant tumor regression was observed in the tumors receiving combined treatment with Ad.Egr.TNF.11D + cisplatin compared with tumors treated with the null vector + cisplatin on days 4 ($P=0.045$), 6 ($P<0.001$), 8 ($P=0.048$), 10 ($P<0.001$), 12 ($P<0.001$), and 14 ($P=0.002$), (FIG. 8B). Taken together, these data support an antitumor interaction between cisplatin and Ad.Egr.TNF.11D in xenografts of human and rodent origin. These findings are consistent with, and supported by, TNF- α induction by cisplatin observed in the *in vitro* and *in vivo* experiments. Although toxicity was observed following treatment with cisplatin, no additional toxicity was observed following combined treatment with cisplatin and Ad.Egr.TNF.11D.

Thus, cisplatin, a commonly employed chemotherapeutic agent which stimulates ROI production, induces the production of TNF- α in human and rodent cancer cells infected with an adenoviral vector encoding the CARG elements of the Egr-1 promoter ligated upstream to a cDNA encoding TNF- α . Significant antitumor effects of both TNF- α and cisplatin were observed in both experimental tumor systems. Thus, the present invention provides a new approach that combines the use of chemotherapeutic agents, such as cisplatin, with the temporal and spatial control of gene therapy using antitumor genes.

For most common human neoplasms, grossly visible tumors are not effectively treated with most standard chemotherapeutic agents. The transcriptional targeting strategy such as the Egr1-TNF- α and cisplatin is useful when it is possible to infuse or directly inject gross tumors, even in the presence of micrometastases, since the vector/cisplatin combination is effective against gross tumor and cisplatin against micrometastatic disease. The direct injection of tumors should be improved with the recent advances in radiographic imaging analysis of tumor, e.g. PET scans, combined with CT image reconstruction. Additionally, recent developments in the

WO 02/080849

PCT/US02/10733

targeting of viral vectors to tumors may provide additional specificity to chemoinducible gene therapy of metastatic cancer.

5 All of the compositions and methods disclosed and claimed herein can be made and
executed without undue experimentation in light of the present disclosure. While the
compositions and methods of this invention have been described in terms of preferred
embodiments, it will be apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the
compositions and methods and in the steps or in the sequence of steps of the method described
10 herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention. More specifically,
it will be apparent that certain agents which are both chemically and physiologically related may
be substituted for the agents described herein while the same or similar results would be
achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are
deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the appended
15 claims.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

J. References

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

- 5 U. S. Patent 4,664,911
- U. S. Patent 4,684,611
- U. S. Patent 4,792,447
- U.S. Patent 4,797,368
- U. S. Patent 4,952,500
- 10 U. S. Patent 5,045,451
- U. S. Patent 5,139,941
- U. S. Patent 5,302,523
- U. S. Patent 5,322,783
- U. S. Patent 5,354,855
- 15 U. S. Patent 5,359,046
- U. S. Patent 5,384,253
- U. S. Patent 5,464,765
- U. S. Patent 5,538,877
- U. S. Patent 5,538,880
- 20 U. S. Patent 5,550,318
- U. S. Patent 5,563,055
- U. S. Patent 5,578,706
- U. S. Patent 5,580,859
- U. S. Patent 5,589,466
- 25 U. S. Patent 5,591,616
- U. S. Patent 5,610,042
- U. S. Patent 5,656,610
- U. S. Patent 5,686,072
- U. S. Patent 5,702,932
- 30 U. S. Patent 5,736,524
- U. S. Patent 5,767,072
- U. S. Patent 5,780,448
- U. S. Patent 5,925,565
- U. S. Patent 5,935,819

WO 02/080849

PCT/US02/10733

U. S. Patent 5,945,100,

U. S. Patent 5,981,274

U. S. Patent 5,994,136

U. S. Patent 5,994,624

5 U. S. Patent 6,013,516

Arap *et al.*, *Cancer Res.*, 55:1351-1354, 1995.Ausubel *et al.*, In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley and Sons, Inc., 1994.Baichwal and Sugden, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp. 117-

10 148, 1986.

Bajorin *et al.*, *Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 7:A967, 1988.Bedzyk *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265:18615, 1990Blomer *et al.*, *J Virol.* 71(9): 6641-6649, 1997Bonavida *et al.*, *Gynecol Oncol.*, 38:333-9, 1990.15 Burbage *et al.*, *Leuk Res.*, 21(7):681-690, 1997.Bussemakers *et al.*, *Cancer Res.*, 52:2916-2922, 1992.Caldas *et al.*, *Nat. Genet.*, 8:27-32, 1994.Carbonelli *et al.* *FEMS Microbiol Lett.* 177(1):75-82, 1999.Casey *et al.*, *Oncogene*, 6:1791-1797, 1991.20 Chandler *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(8):3596-3601, 1997.Chaudhary *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9491, 1990Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.Cheng *et al.*, *Cancer Res.*, 54:5547-5551, 1994.Cheung *et al.*, *Arch Biochem Biophys*, 305(2):563-569, 1993.25 Cocea, *Biotechniques*, 23:814-816, 1997.Cotten *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(13):6094-6098, 1992.Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.Curiel, In: *Viruses in Human Gene Therapy*, J.-M.H. Vos (Ed.), Carolina Academic Press,

Durham, NC, pp 179-212, 1994.

30 Datta *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:2419-22, 1993.Davis *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther*, 296:1-6, 2001.Demetri *et al.*, *J Clin Oncol.*, 7:1545-53, 1989.Duan *et al.*, *J Neurooncol.*, 52:23-36, 2001.Edelman and Crossin, *Annu. Rev. Biochem.*, 60:155-190, 1991.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

- Edelman, *Annu. Rev. Biochem.*, 54:135-169, 1985.
- Fechheimer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Fiers, *FEBS Letters*, 285(2):199-212, 1991.
- Forster and Symons, *Cell*, 49:211-220, 1987.
- 5 Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Frixen *et al.*, *J. Cell Biol.*, 113:173-185, 1991.
- Gerlach *et al.*, *Nature (London)*, 328:802-805, 1987
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors*
- 10 *and ligands*, (Wu G, Wu C ed.), New York: Marcel Dekker, pp. 87-104, 1991.
- Giancotti and Ruoslahti, *Cell*, 60:849-859, 1990.
- Gonzalez-Zulueta *et al.*, *Cancer Research*, 55(20):4531-4535, 1995.
- Goodbourn and Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- 15 Gorczyca *et al.*, *Cancer Res.*, 53:1945-1951, 1993.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Hall, *Radiobiology for the Radiologist*, Harper and Row, 1988.
- Hall, *Radiobiology for the Radiologist*, Harper and Row, 1994.
- 20 Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Havell *et al.*, *J Exp Med*, 167:1067-85, 1988.
- Herman *et al.*, *Cancer Research*, 55(20):4525-4530, 1995.
- Hollstein *et al.*, *Science*, 253:49-53, 1991.
- Horwich *et al.*, *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- 25 Hussussian *et al.*, *Nature Genetics*, 15-21, 1994.
- Inouye *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985.
- Irie and Morton, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:8694-8698, 1986
- Johnson and Stevenson, In: *Cancer.Principles and Practice of Oncology* (ed. DeVita, V.T., Hellman and Rosenberg,) 376-88, 2001.
- 30 Joyce, *Nature*, 338:217-244, 1989.
- Kamb *et al.*, *Nature Genetics*, 8:22-26, 1994.
- Kamb *et al.*, *Science*, 267:436-440, 1994.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Kartalou and Essigmann, *Mutat Res*, 478:23-43, 2001.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-1117, 1994.
- Kim and Cook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8788-8792, 1987.
- Kucuk *et al.*, *Am J Clin Oncol*, 23:371-5, 2000.
- 5 Levenson *et al.*, *Human Gene Therapy*, 9:1233-1236, 1998.
- Lebkowski *et al.*, *Mol Cell Biol*, 8(10):3988-3996, 1988.
- Lidor *et al.*, *Am J Obstet Gynecol*, 177(3):579-585, 1997.
- Lin and Guidotti, *J. Biol. Chem.*, 264:14408-14414, 1989.
- Laughlin *et al.*, *J. Virol.*, 60(2):515-524, 1986.
- 10 McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62(6):1963-1973, 1988.
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Massuda *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26):14701-14706, 1997.
- Matsura *et al.*, *Brit. J. Cancer*, 66:1122-1130, 1992.
- 15 Mauceri *et al.*, *Int J Cancer*, 97:410-5, 2002.
- Merlo *et al.*, *Nat Med.*, (7):633-4, 1995.
- Michel and Westhof, *J. Mol. Biol.*, 216:585-610, 1990.
- Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986.
- Mizukami *et al.*, *Virology*, 217:124-130, 1996.
- 20 Mori *et al.*, *Cancer Res.*, 54:3396-3397, 1994.
- Morton and Ravindranath, In *Tumor Immunology*, Dalglish (ed.), London: Cambridge University Press, 1-55, 1996.
- Morton *et al.*, *Ann. Surg.*, 216:463-482, 1992.
- Muzyczka, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:97-129, 1992.
- 25 Myers, EPO 0273085.
- Nabel *et al.*, *Science*, 244:1342-1344, 1989.
- Nakamoto *et al.*, *Anticancer Res*, 20:4087-96, 2000.
- Naldini *et al.*, *Science*, 272(5259):195, 1996.
- Nicolas and Rubenstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, pp. 493-513, 1988.
- 30 Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nobri *et al.*, *Nature*, 368:753-756, 1995.
- Obrador *et al.*, *Curr Pharm Biotechnol*, 2:119-30, 2001.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

- Obrink, *BioEssays*, 13:227-233, 1991.
- Odin and Obrink, *Exp. Cell Res.*, 171:1-15, 1987.
- Okamoto *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 91:11045-11049, 1994.
- Old, *Science*, 230:630-2, 1985.
- 5 Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21:415-28, 1993.
- Orlow *et al.*, *Cancer Res.*, 54:2848-2851, 1994.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- PCT 94/09699
- PCT 95/06128
- 10 Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334:320-325, 1988.
- Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:4086-4090, 1994.
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- Potter *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Ravindranath and Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303-329, 1991.
- 15 Reinhold-Hurek and Shub, *Nature*, 357:173-176, 1992.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pp. 1035-1038 and 1570-1580.
- Ridgeway, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez RL, Denhardt DT, ed., Stoneham:Butterworth, pp. 467-492, 1988.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- 20 Robaye *et al.*, *Am J Pathol*, 138:447-53, 1991.
- Rosenberg, P., *Autotransfusion (editorial)" Duodecim.*, 106 (14) p1027-9, 1990.
- Roux *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Sarver *et al.*, *Science*, 247:1222-1225, 1990.
- Scanlon *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:10591-10595, 1991.
- 25 Serrano *et al.*, *Nature*, 366:704-707, 1993.
- Serrano *et al.*, *Science*, 267:249-252, 1995.
- Slungaard *et al.*, *J Exp Med*, 171:2025-41, 1990.
- Smith and Rutledge, *Natl Cancer Inst Monogr*, 42:169-172, 1975.
- Spriggs *et al.*, *J Natl Cancer Inst*, 80:1039-44, 1988.
- 30 Staba *et al.*, *Gene Therapy*, 5:293-300, 1998.
- Takahashi *et al.*, *Cancer Res.*, 52:734-736, 1992.
- Tartaglia *et al.*, *Cell*, 74:845-53, 1993.
- Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986.
- Thom *et al.*, *J Clin Oncol*, 13:264-73, 1995.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

- Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081, 1984.
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- Umbas *et al.*, *Cancer Res.*, 52:5104-5109, 1992.
- Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87(9):3410-3414, 1990.
- 5 Watanabe *et al.*, *Cancer Res.*, 48:2179-83, 1988.
- Weichselbaum *et al.*, *Acta Oncol* 40, 735-8, 2001.
- Weichselbaum *et al.*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 30:229-34, 1994.
- Weinberg, *Science*, 254:1138-1145, 1991.
- Wilson *et al.*, *Science*, 244:1344-1346, 1989.
- 10 Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Wu and Wu, *Biochem.*, 27:887-892, 1988.
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Young *et al.*, *N Engl J Med.* 7:299(23):1261-1266, 1978.
- 15 Zufferey *et al.*, *Biotechnol*, 15(9):871-875, 1997

WO 02/080849

PCT/US02/10733

CLAIMS

1. A method for expressing a protein of interest comprising:
 - (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding
 5 said protein of interest, said nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter;
 - (b) transferring said expression construct into a cell;
 - (c) contacting said cell with at least one free radical-inducing DNA damaging
 compound,
- 10 whereby said DNA damaging compound induces expression of said protein of interest from said Egr-1 promoter.
2. The method of claim 1, wherein said free radical-inducing DNA damaging compound is selected from the group consisting of cisplatin, nitrogen mustard, cytoxan, cyclophosphamide, mitomycin c, adriamycin, iphosphamide, bleomycin, doxorubicin,
 15 procarbazine, actinomycin, chlorambucil, carboplatinum, busulfan, bcnu, ccnu, hexamethylmelamineoxaliplatin, epirubicin, daunorubicin, camptothecin, and mitoxantrone.
3. The method of claim 1, wherein said free radical inducing compound is cisplatin.
4. The method of claim 1, wherein step (c) comprises contacting said cell with at least a
 20 second free-radical inducing DNA damaging compound.
5. The method of claim 1, further comprising contacting said cell with a cancer chemotherapeutic compound or ionizing radiation.
6. The method of claim 1, wherein said cell is a cancer cell.
7. The method of claim 6, wherein said cancer cell is a lung cancer cell, prostate cancer cell,
 25 ovarian cancer cell, testicular cancer cell, brain cancer cell, skin cancer cell, colon cancer cell, gastric cancer cell, esophageal cancer cell, tracheal cancer cell, head & neck cancer cell, pancreatic cancer cell, liver cancer cell, breast cancer cell, ovarian cancer cell, lymphoid cancer cell, leukemia cell, cervical cancer cell, or vulvar cancer cell.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

8. The method of claim 1, wherein said expression vector further comprises an origin of replication.
9. The method of claim 1, wherein said expression vector further comprises a selectable marker.
- 5 10. The method of claim 1, wherein said expression vector further comprises a polyadenylation signal operable linked to said nucleic segment.
11. The method of claim 1, wherein said expression vector is a plasmid.
12. The method of claim 1, wherein said expression vector is a viral vector.
13. The method of claim 12, wherein said viral vector is an adenoviral vector, an adeno-associated viral vector, a retroviral vector, a vaccinia viral vector, or a herpesviral vector.
- 10 14. The method of claim 12, wherein said viral vector is lacking one or more viral genes, thus rendering said viral vector non-replicative.
15. The method of claim 1, wherein said protein of interest is a tumor suppressor, an inducer of apoptosis, an enzyme, a cytokine, or a toxin.
- 15 16. The method of claim 15, wherein said tumor suppressor is Rb, p16, p53, PTEN, MDA7, BRCA1 or BRCA2.
17. The method of claim 15, wherein said inducer of apoptosis is Bax, Bad, Bik, AdE1B, Bim, Bcl-X_s, Bak, TRAIL, Harakiri or Bid.
18. The method of claim 15, wherein said enzyme is thymidine kinase, cytosine deaminase,
- 20 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase.
19. The method of claim 15, wherein said cytokine is TNF- α .
20. The method of claim 15, wherein said toxin is pseudomonas exotoxin, diphtheria toxin, cholera toxin, pertussis toxin A subunit, enterotoxin A, or ricin A chain.
21. The method of claim 1, wherein said cell is located in an organism.
- 25 22. The method of claim 1, wherein said organism is a human.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

23. A method for treating cancer in a subject comprising:
- (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, said nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and
 - 5 (b) administering said expression construct to said subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound,
- whereby said DNA damaging compound induces expression of said cancer therapeutic protein from said Egr-1 promoter, thereby treating said cancer in said subject.
24. The method of claim 23, wherein said expression construct is delivered local or regional to a tumor located in said subject.
25. The method of claim 23, wherein said expression construct is delivered systemically.
26. The method of claim 23, wherein said expression construct is delivered via intratumoral injection or by direct injection into tumor vasculature.
27. The method of claim 23, wherein said DNA damaging compound is administered prior to administering said expression vector.
28. The method of claim 23, wherein said DNA damaging compound is administered after administering said expression vector.
29. The method of claim 23, wherein said DNA damaging compound is administered at the same time as said expression vector.
30. The method of claim 23, wherein said expression vector is administered at least twice.
31. The method of claim 23, wherein said DNA damaging compound is administered at least twice.
32. The method of claim 23, wherein said cancer therapeutic protein is a tumor suppressor, an inducer of apoptosis, an enzyme, or a toxin.
33. A method for inhibiting tumor cell growth in a subject comprising:

WO 02/080849

PCT/US02/10733

- (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, said nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and
- (b) administering said expression construct to said subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound,
- whereby said DNA damaging compound induces expression of said cancer therapeutic protein from said Egr-1 promoter, thereby inhibiting tumor cell growth in said subject.
34. The method of claim 33, wherein the cancer therapeutic protein is TNF- α .
35. The method of claim 33, wherein the free radical-inducing DNA damaging compound is cisplatin.
36. A method for killing a tumor cell in a subject comprising:
- (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, said nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and
- (b) administering said expression construct to said subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound,
- whereby said DNA damaging compound induces expression of said cancer therapeutic protein from said Egr-1 promoter, thereby killing said tumor cell in said subject.
37. A method for inhibiting tumor cell metastasis in a subject comprising:
- (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, said nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and
- (b) administering said expression construct to said subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound,
- whereby said DNA damaging compound induces expression of said cancer therapeutic protein from said Egr-1 promoter, thereby inhibiting tumor cell metastasis in said subject.

WO 02/080849

PCT/US02/10733

38. A method for reducing tumor burden in a subject comprising:

- (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, said nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and

- 5 (b) administering said expression construct to said subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound,

whereby said DNA damaging compound induces expression of said cancer therapeutic protein from said Egr-1 promoter, thereby reducing tumor burden in said subject.

39. A method for rendering an inoperable tumor operable comprising:

- 10 (a) providing an expression construct comprising a nucleic acid segment encoding a cancer therapeutic protein, said nucleic acid segment being positioned under the control of an Egr-1 promoter; and

- (b) administering said expression construct to said subject in combination with a free radical-inducing DNA damaging compound,

- 15 whereby said DNA damaging compound induces expression of said cancer therapeutic protein from said Egr-1 promoter, thereby reducing the size or shape of said tumor and rendering susceptible to resection.

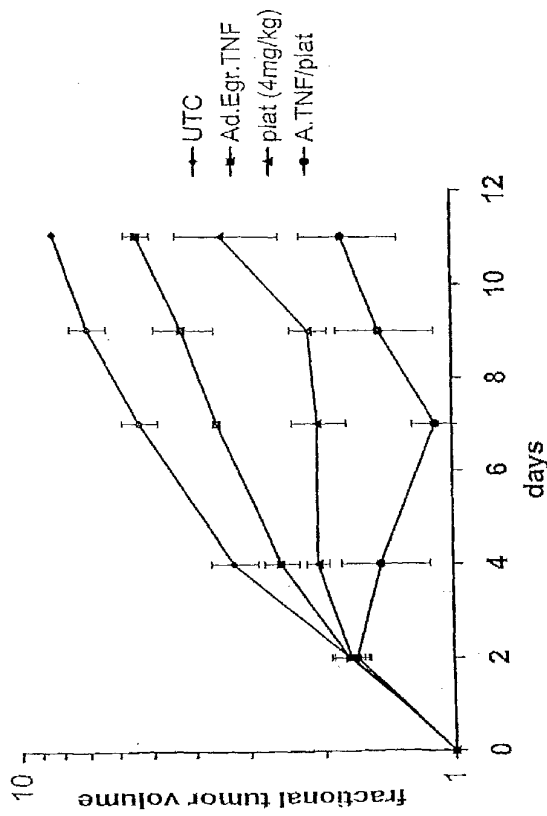


FIG. 1

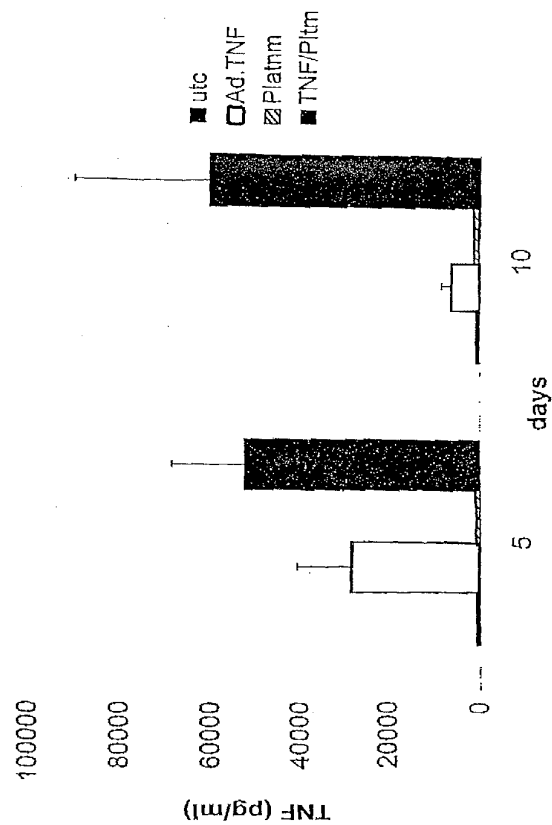


FIG.2

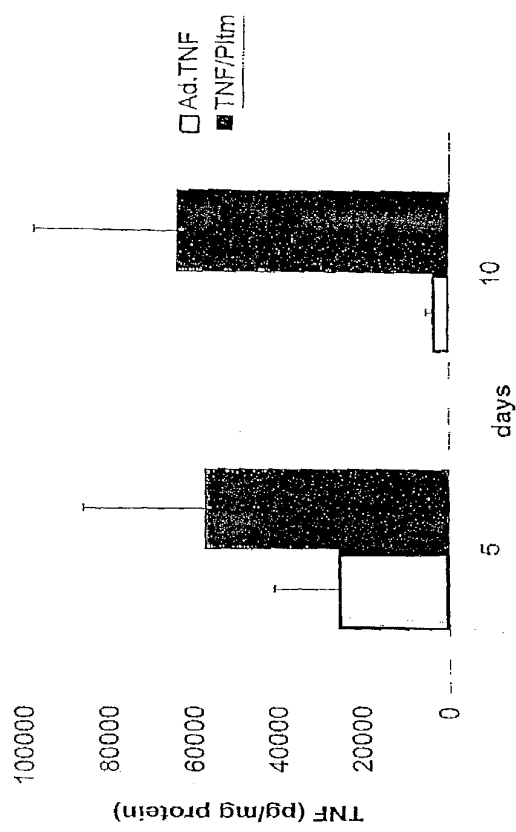


FIG. 3

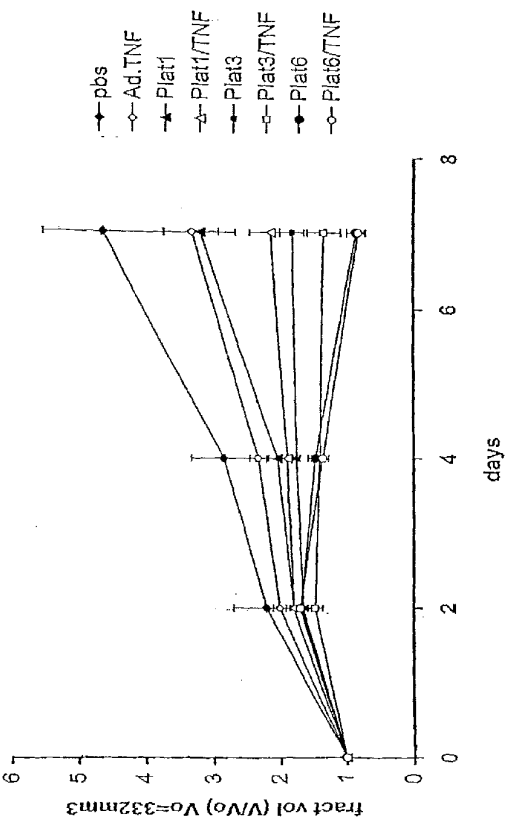


FIG. 4

WO 02/080849

5/12

PCT/US02/10733

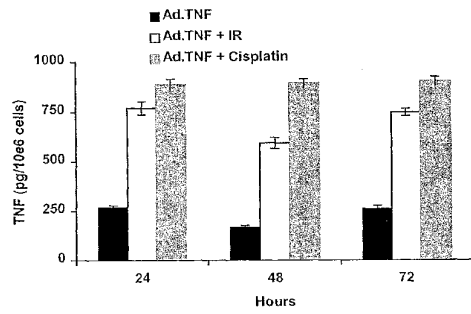


FIG. 5A

WO 02/080849

6/12

PCT/US02/10733

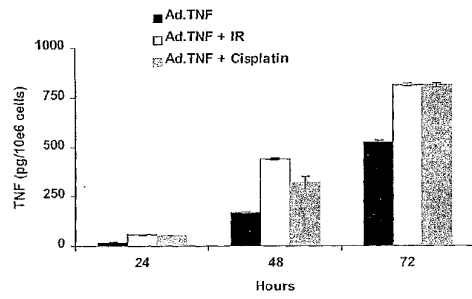
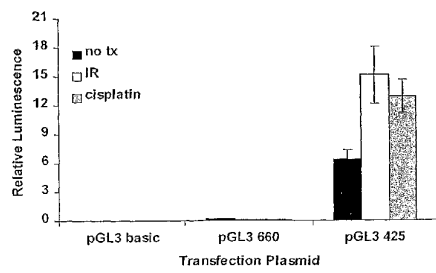


FIG. 5B

WO 02/080849

7/12

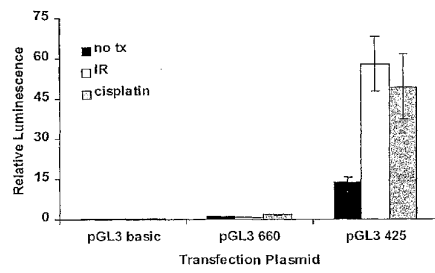
PCT/US02/10733

**FIG. 6A**

WO 02/080849

8/12

PCT/US02/10733

**FIG. 6B**

WO 02/080849

9/12

PCT/US02/10733

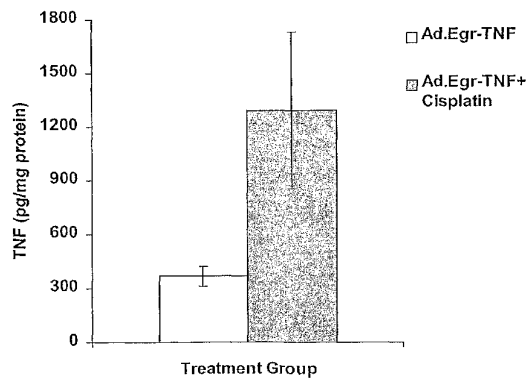


FIG. 7A

WO 02/080849

10/12

PCT/US02/10733

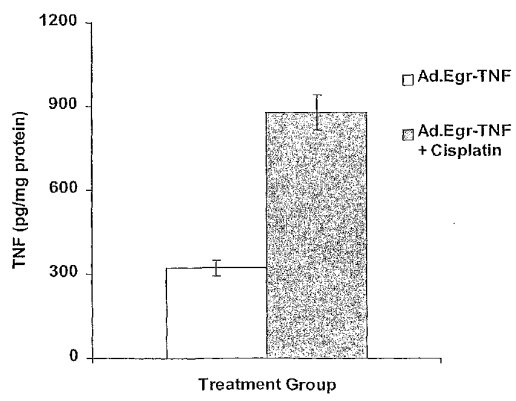


FIG. 7B

WO 02/080849

11/12

PCT/US02/10733

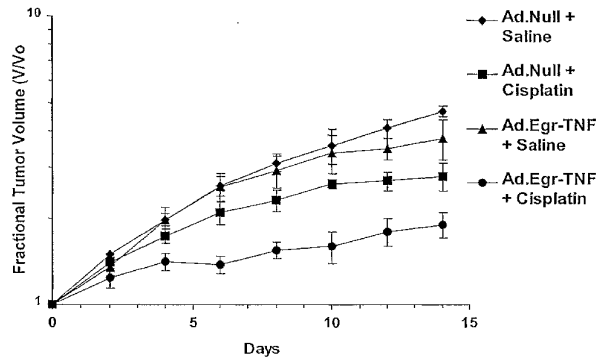


FIG. 8A

WO 02/080849

12/12

PCT/US02/10733

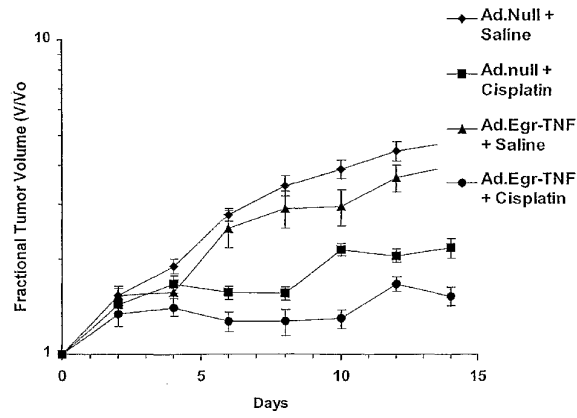


FIG. 8B

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/080849 A3(51) International Patent Classification: **A61K 48/00**,
C12N 15/00, 15/09, 15/63, 15/85, C07H 21/00 Mitchell [US/US]; 442 W. Wellington # 6W, Chicago, IL
60657 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/10733

(74) Agent: **HIGHLANDER, Stevea, L.**; Fulbright & Ja-
worski L.L.P., Suite 2400, 600 Congress Avenue, Austin,
TX 78701 (US).

(22) International Filing Date: 5 April 2002 (05.04.2002)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (*national*): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/282,040 6 April 2001 (06.04.2001) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 60/282,040 (CON)
Filed on 6 April 2001 (06.04.2001)(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (*for all designated States except US*): **UNIVER-
SITY OF CHICAGO** [US/US]; 5640 South Ellis Avenue,
Chicago, IL 60637 (US).

Published:

— with international search report

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **WEICHSEL-
BAUM, Ralph, R.** [US/US]; 1909 North Burling,
Chicago, IL 60614 (US). **KUFE, Donald, W.** [US/US];
179 Grove Street, Wellesley, MA 02181 (US). **GUPTA,
Vinay** [US/US]; 1637 West Allgeld, Chicago, IL 60637
(US). **MAUCERI, Helen** [US/US]; 2046 Burnham Place,
Wheaton, IL 60187 (US). **PARK, James** [US/US]; 526 E.
32nd St. Unit # E, Chicago, IL 60616 (US). **POSNER,**(88) Date of publication of the international search report:
13 February 2003*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 02/080849 A3

(54) Title: CHEMOTHERAPEUTIC INDUCTION OF EGR-1 PROMOTER ACTIVITY

(57) Abstract: The present invention provides for improved therapeutic regimens for treating benign hyperproliferative diseases and cancers. The Egr-1 promoter, long known to be radiation-responsive, has now been shown to be inducible for DNA damaging chemical agents, many of which themselves are used in therapies. Thus, the present invention provides for the advantages combination of a DNA damaging chemical and an expression vector containing a therapeutic gene driven by the Egr-1 promoter.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/10733
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPQ(Y) : A61K 48/00, C12N 16/00, 15/00, 15/65, 15/85; C07H 21/00 US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 556/52.1, 55.1, 54.1; 424/9.1, 9.2, 155.1; 435/520.1, 69.1, 440, 455 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, MEDLINE, DIALOG Search Terms: Egr-1, Egr-1 promoter, cancer therapy, vector, thymidine kinase, Bax, cisplatin, Bb, pseudomonas toxin		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEUNG et al. Genetic radiotherapy overcomes tumor resistance to cytotoxic agents. Cancer Research. 01 December 1995, Vol. 55, pages 5561-5565, especially pages 5562-5564.	1-39
X	WEICHSELBAUM et al. Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells. Cancer Research. 15 August 1994, Vol. 54, pages 4266-4269, especially pages 4267-4268.	1-39
X	STABA et al. Adenoviral TNF-alpha gene therapy and radiation damage tumor vasculature in a human malignant glioma xenograft. Gene Therapy. March 1998, Vol. 5, pages 293-300, especially pages 293-296.	1-39
<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 "B" earlier document published on or after the international filing date "I" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating 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, each combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 JULY 2002		Date of mailing of the international search report 03 OCT 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703) 305-8230		Authorized officer DAVID R. LAMBERTSON Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/10755

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAUCERI et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene therapy targeted by ionizing radiation selectively damages tumor vasculature. <i>Cancer Research</i> . 01 October 1996, Vol. 54, pages 4311-4314, especially page 4312.	1-39
A	CARUSO, M. Gene therapy against cancer and HIV infection using the gene encoding herpes simplex virus thymidine kinase. <i>Molecular Medicine Today</i> . May 1996, Vol. 1, pages 212-217.	18
A	HARBOUR et al. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. <i>Nature Cell Biology</i> . April 2000, Vol. 2, pages E65-67.	16
A	KREITMAN et al. Targeting Pseudomonas exotoxin to hematologic malignancies. <i>Cancer Biology</i> . 1995, Vol. 6, pages 297-306.	20
A	PEREZ, R.P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. <i>European Journal of Cancer</i> . 1998, Vol. 34, No. 10, pages 1535-1542.	2-5
A	SARTORIUS et al. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. <i>Chembiochem</i> . 2001, Vol. 2, pages 20-29.	17
A	GONZALEZ et al. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? <i>Molecular Pharmacology</i> . 2001, Vol. 59, pages 657-663.	2-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US02/10788
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:</p> <p>US CL. :</p> <p>556/92.1, 25.1, 24.1; 494/9.1, 9.2, 185.1; 455/920.1, 80.1, 440, 466</p>	

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1992)*

フロントページの続き

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

(72)発明者 ヴァイクセルバウム ラルフ アール

アメリカ合衆国 イリノイ州 60614 シカゴ ノース バーリング 1909

(72)発明者 クーフェ ドナルド ダブリュ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02181 ウェルズリー グローヴ ストリート 179

(72)発明者 ガブタ ヴィネイ

アメリカ合衆国 イリノイ州 60637 シカゴ ウェスト オルトゲルド 1637

(72)発明者 モーセリ ヘレン

アメリカ合衆国 イリノイ州 60187 ウィートン バーナム プレイス 2046

(72)発明者 パーク ジェイムズ

アメリカ合衆国 イリノイ州 60616 シカゴ イースト サーティーセカンド ストリート 526 ユニット #イー

(72)発明者 ポスナー ミッチェル

アメリカ合衆国 イリノイ州 60657 シカゴ ウェスト ウェリントン 442 #6ダブリュ

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA07 BA28 BA80 CA02 DA02 EA02 EA04 FA02 FA10

GA11 GA18 HA17

4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA24 CA27 CA44

4C084 AA17 MA55 MA56 MA66 NA14 ZB262 ZC412

4C086 AA01 AA02 HA12 MA01 MA55 MA56 MA66 NA14 ZB26 ZC41