

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4652325号  
(P4652325)

(45) 発行日 平成23年3月16日 (2011. 3. 16)

(24) 登録日 平成22年12月24日 (2010. 12. 24)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 9/10 (2006. 01)

A 6 1 P 9/10

請求項の数 14 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2006-503825 (P2006-503825)  
 (86) (22) 出願日 平成16年2月23日 (2004. 2. 23)  
 (65) 公表番号 特表2006-518604 (P2006-518604A)  
 (43) 公表日 平成18年8月17日 (2006. 8. 17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/005372  
 (87) 国際公開番号 W02004/076633  
 (87) 国際公開日 平成16年9月10日 (2004. 9. 10)  
 審査請求日 平成19年2月13日 (2007. 2. 13)  
 (31) 優先権主張番号 60/448, 961  
 (32) 優先日 平成15年2月21日 (2003. 2. 21)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 592133391  
 ユニバーシティ オブ ユタ リサーチ  
 ファウンデーション  
 アメリカ合衆国ユタ州84112, ソルト  
 ・レイク・シティー, パーク・ビルディン  
 グ 210  
 (74) 代理人 100089705  
 弁理士 社本 一夫  
 (74) 代理人 100076691  
 弁理士 増井 忠武  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100080137  
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 虚血性疾患用の低酸素状態誘導可能 VEGF プラスミド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血管内皮成長因子のコード配列の隣に作用可能に配列される、Sp-1結合要素を含むRTP-801翻訳開始コドンの上流の495～455の範囲のヌクレオチドを含むヒトRTP-801ヌクレオチド配列由来の短縮型プロモータ要素を含む、プラスミド。

【請求項 2】

血管内皮成長因子をコードする発現カセットの隣に作用可能に配列され、それにより適切な哺乳動物細胞中にプラスミドを送達した後、酸素正常状態よりも低酸素状態でより高い血管内皮成長因子の発現が得られる、低酸素状態で制御される短縮型ヒトRTP-801プロモータ要素であってSp1-結合要素を含むRTP-801翻訳開始コドンの上流の495～455の範囲のヌクレオチドを含むものを含むプラスミド。

【請求項 3】

(1) 血管内皮成長因子のコード配列の隣に作用可能に配列される、Sp-1結合要素を含むRTP-801翻訳開始コドンの上流の495～455の範囲のヌクレオチドを含むヒトRTP-801ヌクレオチド配列由来の短縮型プロモータ要素を含むプラスミド、および(2) 薬剤的に許容可能な遺伝子送達キャリアの混合物を含む、組成物。

【請求項 4】

pRTP801-VEGF (SEQ ID NO: 13) と薬剤的に許容可能な遺伝子送達キャリアとの混合物を含む、pRTP801-VEGFを標的細胞中に送達してそして血管内皮成長因子をその様な細胞中で発現させることにより、虚血性疾患を治療するための医薬組成物。

## 【請求項 5】

前記虚血性疾患が、虚血性心疾患であり、そして前記標的細胞が心筋細胞を含む、請求項4に記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

pRTP801-VEGF (SEQ ID NO: 13) と薬剤的に許容可能な遺伝子送達キャリアとの混合物を含む、pRTP801-VEGFを心筋細胞中に送達し、そして血管内皮成長因子をそのような細胞中で発現させることにより、虚血性心疾患を治療するための医薬組成物。

## 【請求項 7】

(a) 血管内皮成長因子をコードする発現カセットの隣に作用可能に配列される、低酸素状態制御されるRTP-801プロモータ要素であってRTP-801翻訳開始コドンの上流の495～455の範囲のヌクレオチドを含むものを含むプラスミド、および (b) 薬剤的に許容可能な遺伝子送達キャリア、の混合物を含む、プラスミドを標的細胞中に送達してそして酸素正常状態よりも低酸素状態で血管内皮成長因子をそのような細胞中で発現させることにより、虚血性疾患を治療するための医薬組成物。

10

## 【請求項 8】

プラスミドがpRTP801-VEGF (SEQ ID NO: 13) である、請求項7に記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

虚血性疾患が虚血性心疾患であり、そして標的細胞が心筋細胞を含む、請求項7に記載の医薬組成物。

## 【請求項 10】

20

SEQ ID NO: 1においてそのヌクレオチド42～244がSEQ ID NO: 13のヌクレオチド42～76により置換されたSEQ ID NO: 1の配列からなるpRTP801-725、

SEQ ID NO: 1においてそのヌクレオチド42～244がSEQ ID NO: 13のヌクレオチド122～766により置換されたSEQ ID NO: 1の配列からなるpRTP801-645、

SEQ ID NO: 1においてそのヌクレオチド42～244がSEQ ID NO: 13のヌクレオチド222～766により置換されたSEQ ID NO: 1の配列からなるpRTP801-545、および

SEQ ID NO: 1においてそのヌクレオチド42～244がSEQ ID NO: 13のヌクレオチド272～766により置換されたSEQ ID NO: 1の配列からなるpRTP801-495、からなる群から選択されるプラスミドを含む組成物。

## 【請求項 11】

30

プラスミドがpRTP801-725である、請求項10に記載の組成物。

## 【請求項 12】

プラスミドがpRTP801-645である、請求項10に記載の組成物。

## 【請求項 13】

プラスミドがpRTP801-545である、請求項10に記載の組成物。

## 【請求項 14】

プラスミドがpRTP801-495である、請求項10に記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

40

## 発明の背景

本発明は、遺伝子療法に関する。より具体的には、本発明は、低酸素状態条件下にて血管内皮成長因子 (VEGF) の発現を増加させるためのプラスミドシステムに関する。このプラスミドシステムを、虚血性心疾患のための治療を必要としているヒトなど、虚血性疾患の治療を必要としているヒトにおいて虚血性心疾患を治療するために使用することができる。

## 【0002】

VEGFを用いた遺伝子療法は、虚血性心疾患などの虚血性疾患の新しい治療法である。虚血心に対するVEGF遺伝子の送達は、むき出しのDNAの注射、ポリマー製キャリア、およびレトロウィルスキャリア、アデノウィルスキャリア、またはアデノ随伴ウィルスキャリア

50

、を使用することにより達成された (M. Azrin, Angiogenesis, protein and gene delivery, 59 Br. Med. Bull. 211-215 (2001); J. M. Isner, Myocardial gene therapy, 415 Nature 234-239 (2002); J. Kastrup et al., Vascular growth factor and gene therapy to induce new vessels in the ischemic myocardium. Therapeutic angiogenesis, 35 Scand. Cardiovasc. J. 291-296 (2001))。むき出しのDNAの注射は、安全である。というのも、細胞傷害性や重度の免疫応答を引き起こすことがないからである。以前の報告では、VEGF遺伝子のむき出しプラスミドの送達、虚血性心筋の治療に有効であることが示された (J. F. Symes et al., Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease, 68 Ann. Thorac. Surg. 830-836, discussion 836-837 (1999); P. R. Vale et al., Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF (165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia, 102 Circulation 965-974 (2000); C. Sylven et al., Myocardial Doppler tissue velocity improves following myocardial gene therapy with VEGF-A165 plasmid in patients with inoperable angina pectoris, 12 Coron. Artery Dis. 239-243 (2001))。しかしながら、むき出しのプラスミドを注射すると、遺伝子発現の効率が低くなった (J. M. Isner、上掲.)。

#### 【0003】

プラスミド送達の効率を向上させるため、ポリマー性遺伝子キャリアが開発された。これらのポリマー性遺伝子キャリアには、TerplexDNAおよび水溶性リボポリマー (WSLP) が含まれる (D. G. Affleck et al., Augmentation of myocardial transfection using TerplexDNA: a novel gene delivery system, 8 Gene Ther. 349-353 (2001); M. Lee et al., Hypoxia-inducible VEGF gene delivery to ischemic myocardium using water-soluble lipopolymer, 10 Gene Ther. 1535-1542 (2003))。これらのポリマー性遺伝子キャリアは、心筋へのトランスフェクション効率を10倍まで上昇させた。さらに、遺伝子発現の期間をむき出しのDNAと比較して長期化させた。ポリマー性キャリアによる遺伝子発現の期間の長期化は、ヌクレアーゼからDNAを保護するというキャリアの能力による可能性がある。しかしながら、これらのポリマー性キャリアは細胞にとって細胞傷害性である可能性があり、そしてウィルス性キャリアよりもトランスフェクション効率がずっと低い。

#### 【0004】

遺伝子送達のための別のアプローチは、レトロウィルス、アデノウィルスまたはアデノ随伴ウィルスを遺伝子送達ベクターとして使用することである。ウィルス媒介性遺伝子輸送は、高い遺伝子輸送および発現活性を示した。ウィルス性キャリアは、治療用遺伝子の輸送のための最も効率的な方法であると一般には許容されている。しかしながら、ウィルス媒介性遺伝子輸送は、免疫原性または宿主染色体組込みを引き起こす可能性があり、変異原性の可能性を示唆する (M. Azrin、上掲)。さらに、DNAをカプセル化するためのウィルス性粒子の産生は、むき出しのDNAまたはポリマー性キャリアの産生ほどはコスト効率がよくない。

#### 【0005】

したがって、それぞれの送達方法は、それぞれ独自の利点と欠点とを有しており、そして遺伝子キャリアの選択は、その利用性と標的疾患に大きく依存している。

VEGFを用いた遺伝子療法に関する別の関心事は、遺伝子制御システムである。現在のところ、VEGFは、血管新生に対する最も効果的な治療用遺伝子である (J. M. Isner、上掲)。以前に、VEGFおよびその受容体の両方ともが、虚血性組織において亢進制御されていると報告された (E. Brogi et al., Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression, 97 J. Clin. Invest. 469-476 (1996))。従って、VEGFがその作用を発揮するために、虚血が必要であることが示唆された (J. S. Lee & A. M. Feldman, Gene therapy for therapeutic myocardial angiogenesis: a promising synthesis of two emerging technologies, 4 Nature Med. 739-742 (1998))。しかしながら、Springerらにより、外来性に送達されたVEGFは、正常な非虚血性組織において生理学的作用を発揮することができることが証明された (M. L. Springer e

t al., VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults, 2 Mol. Cell 549-558 (1998) )。さらに、VEGFの非制御的連続的発現は、内皮細胞由来壁内血管腫瘍の形成に関連する(R. J. Lee et al., VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression, 102 Circulation 898-901 (2000) )。このことから、VEGF発現は制御されなければならないことが示唆された。したがって、エリスロポエチン(Epo)エンハンサを使用して、虚血性組織における局所的なVEGF遺伝子発現を亢進させた。EpoエンハンサおよびSV40プロモータが、in vitroにおけるヒト胚性腎臓293細胞での低酸素状態条件下およびin vivoにおけるウサギ虚血性心筋での低酸素状態条件下において、VEGF遺伝子発現を亢進することが示された(M. Lee et al., 上掲)。さらに、Suらは、アデノ随伴ウィルスを遺伝子キャリアとして使用して、低酸素状態-応答要素(HRE)が、虚血性心筋におけるVEGF発現を媒介することを証明した(H. Su et al., Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia response element-regulated gene expression in mouse ischemic heart model, 99 Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 9480-9485 (2002) )。この試験においては、VEGF遺伝子は、低酸素状態応答要素(HRE)およびSV40プロモータにより制御された。この制御されたVEGF発現システムは、より安全なVEGF遺伝子療法のために有用であり、望まれない副作用を最小にする。

#### 【0006】

上述の観点から、虚血性疾患の遺伝子療法のためのプラスミドを提供することは、プラスミドが制御的調節下にてVEGFを発現させそしてポリマー性キャリアを用いて送達されるが、当該技術分野において顕著な進歩であることが理解されるだろう。

#### 【0007】

##### 発明の概要

本発明の説明的な態様は、プラスミドpRTP801-VEGF (SEQ ID NO: 13) に関し、低酸素状態条件下で亢進制御されるRTP801プロモータの調節のもとでVEGFを発現する。

#### 【0008】

本発明のその他の説明的な態様には、以下のプラスミド: pRTP801-725、pRTP801-645、pRTP801-545、pRTP801-495、pRTP801-445、pRTP801-395、およびpRTP801-SP1 (-) が含まれる。

#### 【0009】

本発明の別の側面は、血管内皮成長因子(VEGF)をコードする発現カセットの隣に作用可能に配列された低酸素状態-制御されるプロモータ要素を含むプラスミドに関し、それにより適切な細胞における血管内皮成長因子の発現は、酸素正常状態と比較して、低酸素状態のもとでより高い。本発明の説明的な態様において、低酸素状態-制御されるプロモータ要素は、RTP-801プロモータを含む。

#### 【0010】

本発明の別の側面は、pRTP801-VEGF (SEQ ID NO: 13) および薬剂的に許容可能な遺伝子送達キャリアの混合物を含む組成物に関する。

本発明のさらに別の側面は、虚血性疾患の治療を必要としている患者に対して、pRTP801-VEGF (SEQ ID NO: 13) と薬剂的に許容可能な遺伝子送達キャリアとの混合物を含む組成物を投与することを含む、虚血性疾患を治療する方法に関する。

#### 【0011】

##### 詳細な説明

低酸素状態誘導性遺伝子発現システムおよび方法が開示されそして記載される前は、本発明が、本明細書中に開示される特定の外形、方法工程、および材料には限定されないことは、理解されるべきである。というのも、そのような外形、方法工程、および材料は、いくらか変化してもよいからである。本発明の範囲は添付する請求項およびその等価物によってのみ限定されるものであるため、本明細書中で使用される用語は、特定の態様を記載するという目的のためにのみ使用され、限定することを意図するものではないこともまた、理解される。

#### 【0012】

本発明の背景を記載しそしてその実施に関してさらに詳細を提示するために本明細書中で引用された刊行物およびその他の参考文献は、それにより参考文献として援用される。本明細書中で検討した参考資料を、本件出願の出願日以前の開示についてのみ提示する。本明細書中の何も、本発明の発明者が以前の発明のためにそのような開示に先行する資格を受けられないということを許容するものと解釈すべきではない。

【0013】

本明細書中および添附の請求の範囲中において使用する場合、単数形には、文脈上明らかにそうではないと解釈される場合以外は、複数の対象が含まれる。たとえば、“プラスミド”を投与することを含む疾患の治療方法という言い方には、2またはそれ以上のそのようなプラスミドについての言及が含まれ、“発現カセット”を含むプラスミドという言い方には、2またはそれ以上のそのような発現カセットについての言及が含まれ、そして“薬剤的に許容可能な遺伝子送達キャリア”という言い方には、2またはそれ以上のそのような遺伝子送達キャリアについての言及が含まれる。

10

【0014】

本発明を説明しそして請求の範囲に記載する際に、以下の用語を以下に説明する定義にしたがって使用する。

本明細書中で使用する場合、“含む”、“含まれる”、“含有する”、“特徴とする”、および文法的に同等なものは、追加的な記載されていない要素または方法工程を除外しない包括的または制限のない用語である。“含む”は、“からなる”および“本質的に～からなる”という、より限定的な用語を含むものとして定義すべきものである。

20

【0015】

本明細書中で使用する場合、“からなる”およびその文法的な同等物は、請求項に特定されないいずれの要素、工程、または有効成分を排除する。

本明細書中で使用する場合、“本質的に～からなる”およびその文法的な同等物は、請求項の範囲を特定の物質または工程に限定し、そして請求項に記載した発明の基本的なそして新規な1または複数の特徴に具体的に影響を与えないものに限定する。

【0016】

本明細書中で使用する場合、“低酸素状態”は、血液により組織の適切な灌流が起こっているにもかかわらず、組織に対する酸素供給が生理学的レベル以下に減少することを意味する。言い換えると、低酸素状態は、体組織における酸素欠乏に関する。in vitro実験に関して、“低酸素状態”は、培養細胞に供給された酸素量が、たとえば、空気中での約20%の $O_2$ と比較して約1%の $O_2$ のように、空気の酸素量よりも顕著に下回っていたことを意味する。

30

【0017】

本明細書中で使用する場合、“酸素正常状態”は、体組織に対する正常レベルのまたは生理学的レベルの酸素供給を意味する。in vitro実験に関して、“酸素正常状態”は、培養細胞に供給される酸素量が、空気の酸素量と同様であることを意味する（約20%の酸素）。

【0018】

本明細書中で使用する場合、“投与する”および同様の用語は、プラスミドとキャリアとの混合物などの組成物を、治療すべき個体に送達し、それによりプラスミドが身体の部分へとその組成物が送達され、そこで標的細胞にトランスフェクトすることができることを意味する。このように、組成物は、事例的には、全身性投与により個体に対して、典型的には皮下投与、筋肉内投与または静脈投与により投与される。しかしながら、心筋の遺伝子輸送を実行するための送達の選択肢には、心外膜経路、心内膜経路、冠状血管内経路、逆行性灌流（retroperfusion）、および心膜内経路の投与が含まれることは、当業者においては周知である（J. M. Isner、上掲）。すべての型のベクターを、心外膜経路および心内膜経路の投与を介して心筋内注射することにより、そして心膜内注射することにより、送達することができる。冠状血管内送達および逆行性灌流送達は、ウィルスベクターまたはその他のベクターにより保護されていないプラスミドDNAの血流内分解のため、非-

40

50

ウィルス性遺伝子輸送またはその他の遺伝子輸送の方法には適していない可能性がある。

【 0 0 1 9 】

用語“薬剂的に許容可能な”は、生理学的に寛容される分子成分および組成物のことをいい、そしてヒトに投与した場合に典型的にはアレルギー性反応の他に、急性胃蠕動、眩暈などの同様の望ましくない反応を生成しない。事例的には、用語“薬剂的に許容可能な”とは、連邦政府または州政府の監督官庁により認可されたもの、またはU. S. 薬局方またはその他の一般的に認識されている動物において使用するための薬局方、そしてより具体的にはヒトにおいて使用するための薬局方に列挙されているものを意味する。

【 0 0 2 0 】

用語“遺伝子送達キャリア”および同様の用語は、核酸を送達するための、ウィルス性ベクターおよび非ウィルス性ベクターの両方ともを意味する。上述したとおり、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス、レトロウィルス、およびレンチウィルスを含むウィルス性ベクターは、一般的には、治療用遺伝子を輸送するためには最も効率的な手段である。むき出しのDNAは、典型的には、水、バッファーなどの水性キャリア中で送達される。治療用核酸を送達するために使用されたポリマー性キャリアには、カチオン性リボソーム (H. M. Temin, Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus ベクターs, 1 Human Gene Therapy 111-123 (1990)) ; 疎水性カチオン性ポリマーおよびリボタンパク質の混合物 (“Terplex DNA”) (U. S. 特許No. 5,679, 559) ; 水溶性リボポリマー (WSLP) (D. G. Affleck et al., 上掲) などが含まれる。

【 0 0 2 1 】

血管内皮成長因子 (VEGF) を使用した血管形成遺伝子療法は、虚血性疾患の新しい治療である。安全でそして効果的であるため、VEGFを用いた遺伝子療法は制御されなければならない、そしてVEGF発現は虚血性組織中で局所的に亢進されるべきである。本研究において、RTP801プロモータの低酸素状態誘導に関与するcis-制御要素を同定した。cis-制御要素を同定するため、RTP801プロモータを様々な方法により解析した。ルシフェラーゼアッセイにおいて、-495 ~ -445の領域は、低酸素状態誘導性転写に関与することが示された。この領域には、可能性のあるSp1結合要素が存在した。Sp1部位の変異により、RTP801プロモータの低酸素状態誘導性転写が低下した。更に、アンチセンスSp1オリゴヌクレオチドとの共トランスフェクトにより、プロモータ活性が減少した。これらの結果から、RTP801プロモータの低酸素状態誘導がSP1により媒介されることが示唆される。

【 0 0 2 2 】

更に、RTP801-VEGF (SEQ ID NO: 13) プラスミドを、治療用プラスミドとして評価した。RTP801プロモータは、様々な細胞株において低酸素状態条件下で誘導可能であることが示され、これは、遺伝子療法応用において使用されるプロモータの望ましい特徴である。これらの結果から、RTP801プロモータは、293 (ヒト胚性腎臓) 細胞、NIH3T3 (マウス線維芽) 細胞、HepG2 (ヒト幹細胞) 細胞、A7R5 (ラット平滑筋) 細胞、およびHUVEC (ヒト臍帯血管内皮) 細胞において活性でありそして誘導可能であることが示された。このプラスミド、pRTP801-VEGFを、VEGFをコードするプラスミド中にRTP801プロモータを挿入することにより構築した。得られたpRTP801-VEGFプラスミドは、Epo (エリスロポエチン) エンハンサおよびSV40プロモータシステムを含有したpEpo-SV-VEGFと比較して、強力なVEGF発現の基底レベルおよび誘導レベルを示した。更に、pRTP801-VEGFによるVEGF発現は、低酸素状態条件下で誘導された。従って、低酸素状態条件下での強力な基礎プロモータ活性および誘導を用いて、pRTP801-VEGFを、虚血性疾患のVEGF遺伝子療法のために使用することができる。

【 0 0 2 3 】

虚血性疾患を、pRTP801-VEGFをそのような治療が必要なヒトに対して投与することにより治療することができる。pRTP801-VEGFプラスミドを、典型的には、薬剂的に許容可能な遺伝子送達キャリアと混合する。むき出しのDNAの送達の場合、プラスミドは水、バッファーなどと混合する。ポリマー性キャリアを用いた送達の場合、プラスミドを、選択したポリマー性キャリアと混合する。リボソームを使用した送達の場合、プラスミドを、リボ

ソームと混合し、それによりDNAをリボソーム中に取り込む。次いで、プラスミド含有性混合物を患者に対して投与する。事例的には、虚血性心疾患についてヒトを治療する場合、プラスミド含有性混合物を、当該技術分野において公知の心筋内注射方法により注射する。プラスミドに曝露されたある割合の細胞は、プラスミドを取り込み、そしてVEGFを発現する。細胞内に残存して生物学的作用を発揮しなければならないタンパク質をコードする遺伝子を、内在する病原性欠如を補正するために相対的に多数の割合の標的細胞に送達しなければならないが、天然に分泌されるタンパク質をコードする遺伝子は、限定数の細胞をトランスフェクトした場合、ただし、トランスフェクトされた細胞が実質的な量の遺伝子生成物を分泌するならば、好ましい作用をもたらすことができる。細胞中で発現される場合、VEGFはシグナル配列を含有しており、そして従って、トランスフェクトされた細胞から積極的に分泌される。分泌されたVEGFは、そのパラクライン作用を発揮して、いくつかの標的細胞の生物活性を修飾する。

10

#### 【 0 0 2 4 】

プラスミドpRTP801-725、pRTP801-645、pRTP801-545、pRTP801-495、pRTP801-445、pRTP801-395、およびpRTP801-SP1(-)は、低酸素状態により誘導される遺伝子生成物または低酸素状態により誘導されない遺伝子生成物の発現のためのプラスミド構築物を作製するために有用である。たとえば、プラスミドpRTP801-725、pRTP801-645、pRTP801-545、およびpRTP801-495は、様々な長さのRTP801プロモータ領域を含有し、そしてすべてのこれらのプラスミドが、低酸素状態での誘導性を示す。これらのプロモータ領域のいずれも、選択した遺伝子生成物の発現のために有効であるプラスミドを構築する際に使用することができ、その発現は低酸素状態下で誘導された。たとえば、これらのプロモータ領域のいずれも、実施例10の方法に従って、VEGFの低酸素状態誘導性発現を示す可能性があるプラスミドを調製する際に使用することができる。さらなる例示として、プラスミドpRTP801-445およびpRTP801-395は、切除された結果遺伝子生成物の低酸素状態誘導性発現が指向されない様々な長さのRTP801プロモータ領域を含有する。従って、これらのプロモータ領域のいずれかは、実施例10の方法に従って、相対的に低いレベルでVEGFを発現し、その発現が低酸素状態で誘導されないプラスミドを調製する際に使用することができる。同様に、プラスミドpRTP801-SP1(-)は、遺伝子生成物の低酸素状態誘導性発現を指向しない変異RTP801プロモータ領域を含有する。従って、このプロモータ領域を、実施例10に従って、相対的に低いレベルでVEGFを発現し、その発現が低酸素状態で誘導されないプラスミドを調製する際に使用することができる。

20

30

#### 【 実施例 】

#### 【 0 0 2 5 】

##### 実施例1 pRTP801-725の構築

RTP801プロモータを、HepG2(ヒト肝臓)細胞由来のゲノムDNAを、当該技術分野において周知の方法に従って使用して、PCRによりクローニングした。HepG2細胞は、ATCC(Mannassas, Virginia)から入手し、そして10%ウシ胎児血清(FBS)を添加したDulbecco改変Eagle培地(DMEM)中で、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で維持した。ゲノムDNAを、Qiagen DNeasy Tissueシステム(Qiagen, Valencia, California)を使用して、HepG2細胞から抽出した。RTP801プロモータを増幅するためのフォワードプライマーおよびリバースプライマーの配列は、それぞれ、SEQ ID NO: 2およびSEQ ID NO: 3であった。BglIIIおよびHindIII制限エンドヌクレアーゼ部位は、クローニングの容易化のため、それぞれフォワードプライマーおよびリバースプライマー中に作り出した。PCRで増幅されたRTP801(725塩基)断片を、BglIIIおよびHindIII制限エンドヌクレアーゼを用いて消化し、そしてゲル電気泳動および溶出により精製した。pGL3-プロモータプラスミド(SEQ ID NO: 1)は、Promega(Madison, Wisconsin)から購入した。SV40プロモータを、BglIIIおよびHindIII制限エンドヌクレアーゼを用いた消化によりpGL3-プロモータプラスミドから除去し、そしてプラスミド骨格を、ゲル電気泳動および溶出により精製した。RTP801プロモータ断片をBglIII-およびHindIII-消化したpGL3-プロモータプラスミド中にライゲーションし、結果としてpRTP801-725の構造を得た。クローニングしたRTP801プロモータの完全性は、当該技術分野に

40

50

において周知な方法に従ってDNA配列決定することにより確認した。

【0026】

実施例2 pRTP801-645の構造

RTP801プロモータの5'-領域における欠失は、PCRにより作製した。リバープライマー (SEQ ID NO: 3) は、実施例1のものと同一であった。フォワードプライマーは、SEQ ID NO: 4であり、これはBglII制限エンドヌクレアーゼ部位を含有した。PCR断片を、実施例1の方法を使用して、pGL3-プロモータベクター中にサブクローニングした。得られたプラスミドを、pRTP801-645と命名した。というのも、ヌクレオチド-645のDNA上流を欠失したためであった。プロモータ断片の完全性は、DNA配列決定することにより確認した。

【0027】

実施例3 pRTP801-545の構造

RTP801プロモータの5'-領域における別の欠失を、PCRにより作製した。リバープライマー (SEQ ID NO: 3) は、実施例1のものと同一であった。フォワードプライマーはSEQ ID NO: 5であり、これはBglII制限エンドヌクレアーゼ部位を含有した。PCR断片を、実施例1の方法を使用して、pGL3-プロモータベクター中にサブクローニングした。得られたプラスミドを、pRTP801-545と命名した。というのも、ヌクレオチド-545のDNA上流を欠失したためであった。プロモータ断片の完全性は、DNA配列決定することにより確認した。

【0028】

実施例4 pRTP801-495の構造

RTP801プロモータの5'-領域における別の欠失を、PCRにより作製した。リバープライマー (SEQ ID NO: 3) は、実施例1のものと同一であった。フォワードプライマーはSEQ ID NO: 6であり、これはBglII制限エンドヌクレアーゼ部位を含有した。PCR断片を、実施例1の方法を使用して、pGL3-プロモータベクター中にサブクローニングした。得られたプラスミドを、pRTP801-495と命名した。というのも、ヌクレオチド-495のDNA上流を欠失したためであった。プロモータ断片の完全性は、DNA配列決定することにより確認した。

【0029】

実施例5 pRTP801-445の構造

RTP801プロモータの5'-領域における別の欠失を、PCRにより作製した。リバープライマー (SEQ ID NO: 3) は、実施例1のものと同一であった。フォワードプライマーはSEQ ID NO: 7であり、これはBglII制限エンドヌクレアーゼ部位を含有した。PCR断片を、実施例1の方法を使用して、pGL3-プロモータベクター中にサブクローニングした。得られたプラスミドを、pRTP801-445と命名した。というのも、ヌクレオチド-445のDNA上流を欠失したためであった。プロモータ断片の完全性は、DNA配列決定することにより確認した。

【0030】

実施例6 pRTP801-395の構造

RTP801プロモータの5'-領域における別の欠失を、PCRにより作製した。リバープライマー (SEQ ID NO: 3) は、実施例1のものと同一であった。フォワードプライマーはSEQ ID NO: 8であり、これはBglII制限エンドヌクレアーゼ部位を含有した。PCR断片を、実施例1の方法を使用して、pGL3-プロモータベクター中にサブクローニングした。得られたプラスミドを、pRTP801-395と命名した。というのも、ヌクレオチド-395のDNA上流を欠失したためであった。プロモータ断片の完全性は、DNA配列決定することにより確認した。

【0031】

実施例7 RTP801プロモータの低酸素状態に対する反応性の欠失解析

RTP801プロモータにおいて低酸素状態誘導に対して必要な領域を同定するため、RTP801プロモータの5'-隣接領域の、ATG翻訳開始コドンから725 bp上流までの様々な断片を、ルシフェラーゼレポーター遺伝子プラスミド中にクローニングした (図1、実施例1~6)。

【0032】

これらの構造物を、ポリエチレンイミン (PEI; 25,000 Da) を遺伝子キャリアとして使用して、ヒト胚性腎臓293細胞中にトランスフェクトした。293細胞を、10% FBSを添加したDMEM中で、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で維持した。トランスフェクトアッセイのため、

10

20

30

40

50



5.0×10<sup>5</sup>細胞/ウェルの密度で、35-mm細胞培養ディッシュ（Falcon Co., Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey）中、トランスフェクションまでの24時間、細胞を撒いた。プラスミド/PEI複合体を5/1のN/P比で調製し、そして室温にて30分間インキュベートした。細胞を血清不含培地を用いて2回洗浄し、その後2 mlの新鮮な血清不含培地を添加した。プラスミド/PEI複合体をそれぞれのディッシュに添加した。次いで、細胞を、37℃にて4時間、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中でインキュベートした。4時間後、トランスフェクション混合物を取り除き、そしてFBSを含有する2 mlの新鮮な培地を添加した。

#### 【0033】

トランスフェクションされた細胞を、低酸素状態条件下（1%O<sub>2</sub>）または酸素正常状態条件下（20%O<sub>2</sub>）にて、20時間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞をリン酸緩衝塩類溶液（PBS）を用いて2回洗浄し、そして150 μlのレポーター溶解バッファー（Promega, Madison, Wisconsin）をそれぞれのディッシュに添加した。室温で15分間インキュベーションした後、細胞を回収し、微小遠心チューブに移した。15秒間ボルテックスにかけた後、細胞を、11,000 rpmにて3分間、遠心にかけた。抽出物を新しいチューブに移し、そして使用時まで-70℃にて保存した。抽出物のタンパク質濃度を、BCAタンパク質アッセイキット（Pierce, Iselin, New Jersey）を使用して測定した。ルシフェラーゼ活性は、96-ウェルプレートLuminometer（Dynex Technologies Inc, Chantilly, Virginia）を使用して、相対光単位（relative light units ; RLU）の観点で測定した。ルシフェラーゼ活性をモニターし、そして60秒間にわたってまとめた。最終容量のルシフェラーゼを、RLU/mg全タンパク質の観点で報告した。

#### 【0034】

結果として、pRTP801-725、pRTP801-645、pRTP801-545、およびpRTP801-495の活性は、低酸素状態条件下で増大した。しかしながら、pRTP801-445の活性は、増大しなかった（図1）。これらの結果から、低酸素状態に反応するcis-制御性要素がヌクレオチド-495から-445の間に存在することが示唆される。この領域の配列は、SEQ ID NO: 11である。

#### 【0035】

実施例8 RTP801プロモータの誘導におけるSP1の役割

配列解析の結果、-495～-445の領域において潜在的なSP1コンセンサス結合部位が存在することが示された。このSP1結合部位の変異の作用を評価するため、部位特異的変異生成をおこなった。配列GGCG（-459～-462）を配列TTATに置換し、結果としてpRTP801-SP1（-）の構造物を得た（図2A；SEQ ID NO: 12）。QuickChange部位特異的変異生成キット（Stratagene, La Jolla, California）を使用して、pRTP801-725構造物を鋳型として使用して、SP1変異体構造物を作製した。使用した変異SP1オリゴヌクレオチドの配列は、SEQ ID NO: 9（SP1変異体、上側鎖）およびSEQ ID NO: 10（下側鎖）であった。

#### 【0036】

プラスミドpRTP801-725（野生型）およびpRTP801-SP1（-）を、293細胞中にトランスフェクションし、そしてトランスフェクションされた細胞を、実施例7の方法に従って、低酸素状態条件下または酸素正常状態条件下でインキュベートした。インキュベーションの後、同様に実施例7の方法に従って、ルシフェラーゼ活性を測定した。pRTP801-SP1（-）を用いてトランスフェクトした細胞において、RTP801プロモータの低酸素状態誘導は、pRTP801-725でトランスフェクトした細胞と比較して、減少した（図2B）。従って、この結果から、RTP801プロモータ中のSP1要素は、RTP801プロモータの低酸素状態誘導において重要な役割を果たしていることが示唆される。

#### 【0037】

SP1がRTP801プロモータの低酸素状態誘導のために重要であることを示す別のアプローチは、SP1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することであった（図3）。アンチセンスSP1オリゴヌクレオチドを、pRTP801-725とともに、293細胞中に共トランスフェクトした。対照として、センスSP1オリゴヌクレオチドを、pRTP801-725とともに、共トランスフェクトした。アンチセンスHIF-1またはセンスHIF-1オリゴヌクレオチドを、pRTP801-725とともに共トランスフェクトして、HIF-1の作用を評価した。トランスフェクトし

た細胞を、低酸素状態条件下にて、20時間インキュベートした。細胞抽出物を、細胞から調製し、そしてルシフェラーゼ活性を測定した。結果として、アンチセンスSP1オリゴヌクレオチドをトランスフェクトした細胞においては、RTP801プロモータの活性が、センスSP1オリゴヌクレオチドをトランスフェクトした細胞と比較して、減少した(図3)。この結果から、SP1は、RTP801プロモータの低酸素状態誘導を媒介することが示唆される。

#### 【0038】

一方、アンチセンスHIF-1オリゴヌクレオチドをトランスフェクトした細胞においては、RTP801プロモータの活性がわずかに減少し、HIF-1の役割が示唆された。

#### 実施例9 様々な細胞株におけるRTP801プロモータ転写誘導

RTP801プロモータを様々な臓器における遺伝子療法に適用するため、RTP801プロモータが遺伝子発現における細胞型特異性を有しないことを確認することが重要であった。RTP801プロモータを様々な型の細胞において誘導することができるかどうかを試験するため、HUVEC細胞(ヒト臍帯血管内皮細胞)、A7R5細胞(ラット平滑筋細胞)、NIH3T3細胞(マウス線維芽細胞)、そしてHepG2細胞(ヒト肝細胞)を、pRTP801-725でトランスフェクトした。A7R5細胞、NIH3T3細胞、およびHUVEC細胞は、ATCCから購入した。A7R5細胞、NIH3T3細胞、およびHepG2細胞は、10%FBSを添加したDMEM中で、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で維持した。HUVEC細胞は、10%FBS、2 mM L-グルタミン、1.5 mg/ml重炭酸ナトリウム、0.1 mg/mlヘパリン、および0.04 mg/ml内皮細胞増殖サプリメント(EGCS)を添加したF-12K培地中で、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で維持した。

#### 【0039】

ルシフェラーゼアッセイは、実施例7の方法に従って行ったが、その結果、RTP801プロモータは、低酸素状態条件下で、約2~4倍まで遺伝子発現を誘導することが示された(図4)。従って、RTP801プロモータを、様々な細胞型において低酸素状態により誘導することができる。

#### 【0040】

#### 実施例10 VEGF発現はRTP801プロモータを媒介した

RTP801プロモータをVEGF遺伝子療法へ適用するため、プラスミドpRTP801-VEGF(SEQ ID NO: 13)をVEGF cDNAの上流にRTP801プロモータを挿入することにより構築した(図5)。pEpo-SV-VEGFプラスミドは、以前に構築したものであったが、これを陽性対照プラスミドとして使用した(M. Lee et al., 上掲)。以前の報告では、pEpo-SV-VEGFプラスミドが、低酸素細胞において、24時間の低酸素状態インキュベーションの後、VEGF遺伝子発現を誘導したことが示された。プラスミドpRTP801-VEGFおよびpEpo-SV-VEGFを、PEIを遺伝子キャリアとして使用して、実施例7の方法に従って、ヒト胚性腎臓293細胞中にトランスフェクトした。

#### 【0041】

プラスミドpCMV-Luc(Stratagene, La Jolla, California)を、陰性対照としてトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、低酸素状態で20時間インキュベートした。細胞培養液を回収し、VEGF遺伝子の発現レベルをELISAにより測定した。

#### 【0042】

ELISAを、ChemiKineヒト血管内皮成長因子サンドイッチELISAキット(Chemicon, Temecula, California)を使用して行った。100 µlのサンプルを、マイクロタイタープレート上の指定されたウェルに添加した。25 µlのビオチン化ウサギ抗-ヒトVEGFポリクローナル抗体を各ウェルに添加し、そしてプレートを室温にて3時間インキュベートした。インキュベーションの後、プレートをバッファーを用いて7回洗浄した。50 µlのストレプトアビジン-アルカリホスファターゼを、各ウェルに添加し、そしてプレートを室温にて45分間インキュベートした。インキュベーションの後、プレートを洗浄バッファーを用いて7回洗浄した。次いで、基質をウェルに添加し、そして吸光度を490 nmで測定した。VEGF濃度の比較を、Studentのt-テストにより行った。0.05未満のP値は、実質的に有意であると見なした。

#### 【0043】

結果として、VEGF発現レベルは、pRTP801-VEGFトランスフェクト細胞およびpEpo-SV-VEGFトランスフェクト細胞の両方ともにおいて誘導された(図6)。しかしながら、RTP801プロモータの調節下でのVEGF発現の基底レベルまたは誘導レベルは、Epoエンハンサ-SV40プロモータの調節下での基底レベルまたは誘導レベルよりも高かった。

#### 【 0 0 4 4 】

##### 配列表の説明

SEQ ID NO: 1、数値識別子223：pGL3-プロモータベクター；  
 SEQ ID NO: 2、数値識別子223：RTP801フォワードプライマー；  
 SEQ ID NO: 3、数値識別子223：RTP801リバースプライマー；  
 SEQ ID NO: 4、数値識別子223：RTP801-645フォワードプライマー；  
 SEQ ID NO: 5、数値識別子223：RTP801-545フォワードプライマー；  
 SEQ ID NO: 6、数値識別子223：RTP801-495フォワードプライマー；  
 SEQ ID NO: 7、数値識別子223：RTP801-445フォワードプライマー；  
 SEQ ID NO: 8、数値識別子223：RTP801-395フォワードプライマー；  
 SEQ ID NO: 9、数値識別子223：SP1変異体上側鎖プライマー；  
 SEQ ID NO: 10、数値識別子223：SP1下側鎖プライマー；  
 SEQ ID NO: 13、数値識別子223：プラスミドpRTP801-VEGF。

10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【 0 0 4 5 】

【図1】図1Aは、ヒトRTP801プロモータの様々な長さの5'-隣接領域を含有するpRTP801ルシフェラーゼレポーターベクターの構造の概略図を示す。図1Bは、RTP801プロモータの5'-隣接領域の低酸素状態反応性を示す：レポーター構造物は、ヒト胚性腎臓293細胞中に一過的にトランスフェクトされ、そして細胞を、酸素正常状態条件(白棒)または低酸素状態条件(黒棒)のもと、24時間インキュベートし、そしてルシフェラーゼ活性を測定した。

20

【図2】図2Aは、ヌクレオチド-495~-446のpRTP801-725の野生型RTP801プロモータのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 11；SP1コンセンサス配列に下線を付す)およびpRTP801-SP1(-)の対応する領域のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 12；変異位置は四角で囲む)を示す。図2Bは、RTP801プロモータのSP1要素中の変異の、プロモータ活性に対する作用を示す：プラスミドpRTP801-725およびpRTP801-SP1(-)は、ヒト胚性腎臓293細胞中に一過的にトランスフェクトし、トランスフェクト細胞を低酸素状態条件下(黒棒)または酸素正常状態条件下(白棒)にて24時間インキュベートし、その後ルシフェラーゼ活性を測定した。

30

【図3】図3は、RTP801プロモータの低酸素状態誘導性におけるSP1の役割を示す：プラスミドpRTP801-725を、SP1センスオリゴヌクレオチド、SP1アンチセンスオリゴヌクレオチド、HIF-1 センスオリゴヌクレオチド、またはHIF-1 アンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下で、ヒト胚性腎臓293細胞中にトランスフェクトし、トランスフェクトした細胞を、低酸素状態条件または酸素正常状態条件に24時間曝露し、その後ルシフェラーゼ活性を測定した。

【図4】図4は、様々な細胞株におけるRTP801プロモータの低酸素状態誘導性を示す：pRTP801-725プラスミドを、HUVEC細胞、A7R5細胞、NIH3T3細胞、およびHepG2細胞にトランスフェクトし、トランスフェクトした細胞を低酸素状態条件(黒棒)または酸素正常状態条件(白棒)に24時間曝露し、その後ルシフェラーゼ活性を測定した。

40

【図5】図5は、pEpo-SV-VEGFおよびpRTP801-VEGFの構造を示す：pEpo-SV-VEGFにおいて、2コピーのEpoエンハンサ(E)をSV40プロモータの上流に挿入し、そしてpRTP801-VEGFにおいて、RTP801プロモータをVEGF cDNAの上流に挿入した。

【図6】図6は、VEGF発現の誘導を示す：プラスミドpEpo-SV-VEGF、pRTP801-VEGF、およびpSV-Luc(陰性対照)を、ヒト胚性腎臓293細胞中にトランスフェクトし、その細胞を低酸素状態条件(黒棒)または酸素正常状態条件(白棒)に24時間曝露し、その後細胞培養液を回収して、そしてVEGF濃度をELISAにより測定した。

50

【図 1】

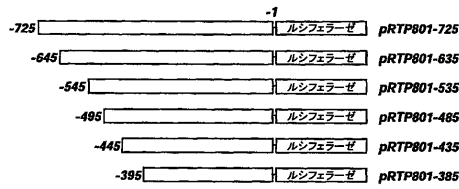


FIG. 1A

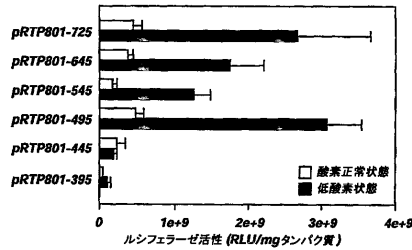


FIG. 1B

【図 2】

pRTP801-725 (WT)  
 -495 GGTTCGACTGCGAGCTTCTGGGGCTCAATGGAGCGGGGCCGCGCT -446

pRTP801-SP1(-)  
 -495 GGTTCGACTGCGAGCTTCTGGGGCTCAATGGATTATGGGGGCCGCGCT -446

FIG. 2A

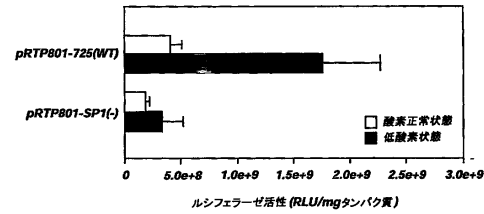
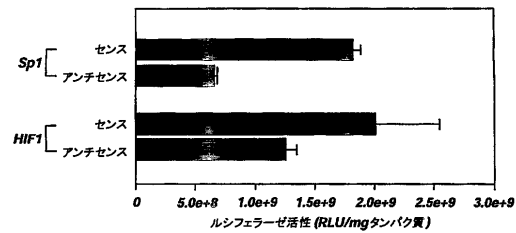
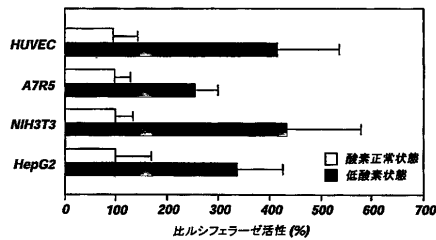


FIG. 2B

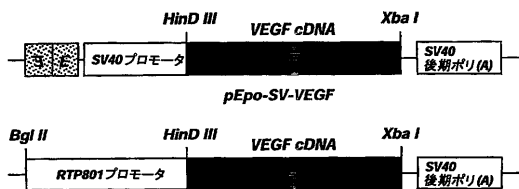
【図 3】



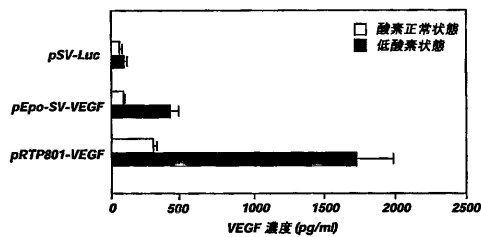
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

0004652325000001.xml

---

フロントページの続き

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100117813

弁理士 深澤 憲広

(72)発明者 リー, ミンフュン

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 0 3 , ソルト・レイク・シティ, イースト・サード・アヴェニュー  
3 8 5 , ナンバー 3

(72)発明者 キム, サン・ワン

アメリカ合衆国ユタ州 8 4 1 0 8 , ソルト・レイク・シティ, デヴォンシャー 1 7 1 1

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 Circulation, 1996, Vol.94, p.3281-3290

Mol. Cell. Biol., 2002, Vol.22, No.7, p.2283-2293

PNAS, 2002, Vol.99, No.14, p.9480-9485

Lancet., 2000, Vol.355, p.213-222

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

WPI