(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2008-519596
(P2008-519596A)
(43)公表日　平成20年6月12日(2008.6.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B	4B065
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4C084
A61K 35/76	(2006.01)	A61K	35/76		4C087
A61P 9/00	(2006.01)	A61P	9/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 145 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-540833 (P2007-540833)
(86)(22)出願日　平成17年11月14日 (2005.11.14)
(85)翻訳文提出日　平成19年7月13日 (2007.7.13)
(86)国際出願番号　PCT/IL2005/001195
(87)国際公開番号　WO2006/051545
(87)国際公開日　平成18年5月18日 (2006.5.18)
(31)優先権主張番号　10/988,487
(32)優先日　平成16年11月14日 (2004.11.14)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　503179263
ヴァスキュラー　バイオジェニックス　リミテッド
イスラエル，　６０　３７６　オル　イェフダ，　ジョナサン　ネタンヤフ　ストリート　６
(74)代理人　100103816
弁理士　風早　信昭
(74)代理人　100120927
弁理士　浅野　典子
(72)発明者　ハラッツ，　ドゥロール
イスラエル，　５２６４８　ラマト　ガン，　シガリト　ストリート　１０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】内皮細胞特異性を示すプロモーター及びそのプロモーターを使って血管形成を制御する方法

(57)【要約】
内皮細胞特異的プロモーター活性を示す単離されたポリヌクレオチド配列、新規のシス調節因子、及び異常な血管新生または細胞増殖によって特徴付けられる弛緩の治療を可能にするそれらの使用方法が開示される。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合された配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部を含むシス調節因子を含む単離されたポリヌクレオチドであって、それに転写的に連結されたポリヌクレオチド配列の真核生物における転写を指向させることができる、単離されたポリヌクレオチド。
【請求項２】
前記配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部は、前記シス調節因子中の前記配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部の上流に配置される、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項３】
前記配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部は、前記シス調節因子中の前記配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部の上流に配置される、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項４】
前記シス調節因子は、配列番号：６に記載の配列の少なくとも一つのコピーをさらに含む、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項５】
前記配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部は、リンカーポリヌクレオチドの配列を介して前記配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合される、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項６】
前記リンカーポリヌクレオチドの配列は、プロモーター及び／又はエンハンサー因子である、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項７】
前記シス調節因子は、配列番号：６に記載の配列の少なくとも二つのコピーをさらに含む、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項８】
前記配列番号：６に記載の配列の少なくとも二つのコピーは、隣接している、請求項７に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項９】
配列番号：１に記載の配列の少なくとも一つのコピーをさらに含む、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１０】
低酸素応答因子をさらに含む、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１１】
前記低酸素応答因子は、配列番号：５に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含む、請求項１０に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１２】
前記シス調節因子は、配列番号：７に記載される、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１３】
請求項１～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、核酸構築物。
【請求項１４】
前記シス調節因子の調節制御下で配置された核酸配列をさらに含む、請求項１３に記載の核酸構築物。
【請求項１５】
前記核酸配列は、血管形成調節因子をコードする、請求項１４に記載の核酸構築物。
【請求項１６】
前記核酸配列は、ＶＥＧＦ、ｐ５５、アンギオポエチン－１、ｂＦＧＦ、及びＰＤＧＦ

－ＢＢからなる群から選択される、請求項１４に記載の核酸構築物。
【請求項１７】
条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項１３に記載の核酸構築物。
【請求項１８】
請求項１３に記載の核酸構築物を含む、細胞。
【請求項１９】
請求項１８に記載の細胞で接種される、スカフォルド。
【請求項２０】
前記スカフォルドは、合成ポリマー、細胞接着分子、又は細胞外マトリックスタンパク質で構成されている、請求項１９に記載のスカフォルド。
【請求項２１】
前記合成ポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ヒドロキシアパタイト（ＨＡ）、ポリグリコール酸（ＰＧＡ）、ポリ－１－ラクチドで強化されたε－カプロラクトンと１－乳酸の編物（ＫＮ－ＰＣＬＡ）、同織布（ＷＶ－ＰＣＬＡ）、相互に結合された多孔質カルシウムヒドロキシアパタイトセラミックス（ＩＰ－ＣＨＡ）、ポリＤ，Ｌ－乳酸－ポリエチレングリコール（ＰＬＡ－ＰＥＧ）、不飽和ポリエステルポリ（プロピレングリコール－コ－フマル酸）（ＰＰＦ）、ポリラクチド－コ－グリコリド（ＰＬＡＧＡ）、ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）、ポリ－４－ヒドロキシブチレート（Ｐ４ＨＢ）及びポリフォスファゼンからなる群から選択される、請求項２０に記載のスカフォルド。
【請求項２２】
前記細胞接着分子は、インテグリン、細胞間接着分子（ＩＣＡＭ）１、Ｎ－ＣＡＭ、カドヘリン、テネイシン、ギセリン、及び神経損傷誘発タンパク質２（ニンジュリン２）からなる群から選択される、請求項２０に記載のスカフォルド。
【請求項２３】
前記細胞外マトリックスタンパク質は、フィブリノーゲン、コラーゲン、フィブロネクチン、ビメンチン、微小管結合タンパク質１Ｄ、神経突起生成因子（ＮＯＦ）、細菌セルロース（ＢＣ）、ラミニン、及びゼラチンからなる群から選択される、請求項２０に記載のスカフォルド。
【請求項２４】
医薬としての請求項１～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドの使用。
【請求項２５】
真核細胞において対象の核酸配列を発現させる方法であって、請求項１～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドの転写制御下に配置された対象の核酸配列を含む核酸構築物を前記細胞において発現させることを含む、方法。
【請求項２６】
前記対象の核酸配列は、細胞傷害性因子、血管形成因子、レポータータンパク質、増殖因子、およびプロアポトーシス因子からなる群から選択される、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
請求項１３～１７のいずれかに記載の核酸構築物を組織において発現させることを含む、組織において血管形成を調節する方法。
【請求項２８】
必要とする被験者の組織において血管形成を調節するための医薬の製造のための、請求項１３～１７のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項２９】
前記核酸構築物は請求項１４～１７のいずれかに記載のものであり、前記核酸配列はプロ血管形成因子をコードし、前記血管形成を調節することは血管形成をアップレギュレートすることである、請求項２８に記載の使用。
【請求項３０】

前記核酸構築物は請求項１４～１７のいずれかに記載のものであり、前記核酸配列は血管形成の阻害剤をコードし、前記血管形成を調節することは血管形成をダウンレギュレートすることである、請求項２８に記載の使用。

【請求項３１】

前記核酸構築物は、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項２８～３０のいずれかに記載の使用。

【請求項３２】

（ａ）内皮細胞特異的プロモーター；

（ｂ）配列番号：５に記載の低酸素応答因子の少なくとも一つのコピー；及び

（ｃ）血管形成調節因子をコードしかつ前記プロモーター及び前記低酸素応答因子の調節制御下にある核酸配列

を含む核酸構築物を、組織において発現させることを含む、組織において血管形成を調節する方法。

【請求項３３】

前記組織は、自然の組織又は遺伝子工学的に処置された組織である、請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

前記内皮細胞特異的プロモーターは、配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合された配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部をさらに含む、請求項３２に記載の方法。

【請求項３５】

前記内皮細胞特異的プロモーターは、配列番号：７に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含む、請求項３２に記載の方法。

【請求項３６】

前記核酸構築物は、配列番号：６に記載の配列の少なくとも一つのコピーをさらに含む、請求項３２に記載の方法。

【請求項３７】

前記配列番号：６に記載の配列の少なくとも一つのコピーは、二つの隣接するコピーを含む、請求項３６に記載の方法。

【請求項３８】

前記内皮細胞特異的プロモーターは、配列番号：１に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含む、請求項３２に記載の方法。

【請求項３９】

前記血管形成調節因子をコードする核酸配列は、ＶＥＧＦ、ｐ５５、アンギオポエチン－１、ｂＦＧＦ、及びＰＤＧＦ－ＢＢからなる群から選択される、請求項３２に記載の方法。

【請求項４０】

前記核酸構築物は、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項３２に記載の方法。

【請求項４１】

（ａ）細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合されたリガンド結合ドメインを含むキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域；及び

（ｂ）特定の組織又は細胞における前記キメラポリペプチドの発現を指向させることができるシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域

を含む核酸構築物であって、前記リガンド結合ドメインは前記特定の組織又は細胞に存在するリガンドに結合できるように選択され、前記リガンド結合ドメインへの前記リガンドの結合は前記細胞傷害性分子の前記エフェクタードメインを活性化する、核酸構築物。

【請求項４２】

前記（ｂ）のシス調節因子は、血管形成細胞の部分集団における発現を特異的に指向させることができる、請求項４１に記載の核酸構築物。

【請求項４３】
前記（ｂ）のシス調節因子は、請求項１～５および７～９のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、請求項４１に記載の核酸構築物。
【請求項４４】
前記シス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター、及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的プロモーターである、請求項４１～４３のいずれかに記載の核酸構築物。
【請求項４５】
前記リガンド結合ドメインは、細胞表面受容体のリガンド結合ドメインである、請求項４１に記載の核酸構築物。
【請求項４６】
前記細胞表面受容体は、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリンキナーゼ、受容体トレオニンキナーゼ、細胞接着分子、及びホスファターゼ受容体からなる群から選択される、請求項４５に記載の核酸構築物。
【請求項４７】
前記細胞傷害性分子は、Ｆａｓ、ＴＮＦＲ、及びＴＲＡＩＬからなる群から選択される、請求項４１に記載の核酸構築物。
【請求項４８】
条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項４１に記載の核酸構築物。
【請求項４９】
低酸素応答因子をさらに含む、請求項４１に記載の核酸構築物。
【請求項５０】
前記低酸素応答因子は、配列番号：５に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含む、請求項４９に記載の核酸分子構築物。
【請求項５１】
請求項４１～５０のいずれかに記載の核酸構築物で形質転換された、真核細胞。
【請求項５２】
請求項４１～５０のいずれかに記載の核酸構築物を組織において発現させることを含む、組織において血管形成をダウンレギュレートする方法。
【請求項５３】
前記リガンド結合ドメインのリガンドを組織に提供する工程をさらに含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
相乗作用方式で前記細胞傷害分子の細胞傷害効果をさらに高めることができるように選択される、少なくとも一つの化学療法及び／又は放射線療法化合物を併用して組織に提供することをさらに含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５５】
有効成分として請求項４１～５０のいずれかに記載の核酸構築物を含む、組織において血管形成をダウンレギュレートするための医薬組成物。
【請求項５６】
少なくとも一つの化学療法化合物をさらに含む、請求項５５に記載の医薬組成物。
【請求項５７】
前記核酸構築物は、少なくとも1×10^{8}個のアデノウイルス粒子を含む、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項５５に記載の医薬組成物。
【請求項５８】
過剰の血管新生に関連する疾患又は症状を治療するための医薬の製造のための、請求項

４１～５０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項５９】
医薬としての、請求項４１～５０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項６０】
（ａ）細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合されたリガンド結合ドメインを含むキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域；及び
（ｂ）腫瘍の細胞における前記キメラポリペプチドの発現を指向させるためのシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域
を含む核酸構築物の、腫瘍を治療するための医薬の製造のための使用であって、前記リガンド結合ドメインは前記腫瘍の細胞中に存在するか又はそれに提供されるリガンドに結合できるように選択され、前記リガンド結合ドメインへの前記リガンドの結合は前記細胞傷害性分子の前記エフェクタードメインを活性化し、それにより前記腫瘍の細胞において細胞傷害性を指向させる、使用。
【請求項６１】
前記（ｂ）のシス調節因子は、請求項１～８および１０～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、請求項６０に記載の使用。
【請求項６２】
少なくとも一つの追加の化学療法及び／又は放射線療法を併用して前記組織に提供することをさらに含み、前記追加の療法は相乗作用方式で前記細胞傷害性をさらに高めることができるように選択される、請求項６０に記載の使用。
【請求項６３】
前記シス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター、及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的プロモーターを含む、請求項６０に記載の使用。
【請求項６４】
前記リガンド結合ドメインは、細胞表面受容体のリガンド結合ドメインである、請求項６０に記載の使用。
【請求項６５】
前記細胞表面受容体は、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリンキナーゼ、受容体トレオニンキナーゼ、細胞接着分子、及びホスファターゼ受容体からなる群から選択される、請求項６４に記載の使用。
【請求項６６】
前記細胞傷害性分子は、Ｆａｓ、ＴＮＦＲ、及びＴＲＡＩＬからなる群から選択される、請求項６０に記載の使用。
【請求項６７】
前記核酸構築物は、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項６０に記載の使用。
【請求項６８】
有効成分として核酸構築物及び医薬的に許容できる担体を含む、被験者の組織において血管形成をダウンレギュレートするための医薬組成物であって、前記核酸構築物は、
（ａ）細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合されたリガンド結合ドメインを含むキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域；及び
（ｂ）血管形成細胞の部分集団における前記キメラポリペプチドの発現を指向させるためのシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域
を含み、前記リガンド結合ドメインは、前記特定の組織又は細胞中に存在するリガンドに結合できるように選択され、前記リガンド結合ドメインへの前記リガンドの結合は前記細

胞傷害性分子の前記エフェクタードメインを活性化する、医薬組成物。
【請求項６９】
前記（ｂ）のシス調節因子は、請求項１～８および１０～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７０】
少なくとも一つの追加の化学療法及び／又は放射線療法を併用して前記組織に提供することをさらに含み、前記追加の療法は相乗作用方式で前記細胞傷害性分子の細胞傷害効果をさらに高めることができるように選択される、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７１】
前記シス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター、及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的プロモーターを含む、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７２】
前記リガンド結合ドメインは、細胞表面受容体のリガンド結合ドメインである、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７３】
前記細胞表面受容体は、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリンキナーゼ、受容体トレオニンキナーゼ、細胞接着分子、及びホスファターゼ受容体からなる群から選択される、請求項７２に記載の医薬組成物。
【請求項７４】
前記細胞傷害性分子は、Ｆａｓ、ＴＮＦＲ、及びＴＲＡＩＬからなる群から選択される、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７５】
前記核酸構築物は、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７６】
少なくとも一つの化学療法化合物をさらに含む、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７７】
少なくとも1×10^{8}のアデノウイルス粒子を含む、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７８】
（ａ）プロ血管形成因子をコードする第一ポリヌクレオチド領域；及び
（ｂ）血管形成細胞の部分集団におけるプロ血管形成因子の発現を指向させるためのシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域
を含む核酸構築物の、虚血に関連する疾患又は症状の治療のための医薬の製造のための使用。
【請求項７９】
前記（ｂ）のシス調節因子は、請求項１～８および１０～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、請求項７８に記載の使用。
【請求項８０】
前記核酸構築物は、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項７８に記載の使用。
【請求項８１】
前記核酸構築物の治療有効量は、約10^{3}～約10^{16}個のウイルス粒子である、請求項８０に記載の使用。
【請求項８２】
前記核酸構築物の治療有効量は、約10^{5}～約10^{13}個のウイルス粒子である、請求

項８１に記載の使用。
【請求項８３】
前記核酸構築物の治療有効量は、約10^{7}～約10^{12}個のウイルス粒子である、請求項８２に記載の使用。
【請求項８４】
前記シス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター、及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的プロモーターである、請求項７８～８３のいずれかに記載の使用。
【請求項８５】
前記虚血に関連する疾患又は症状は、創傷の治癒、虚血性発作、虚血性心臓疾患、及び胃腸の損傷からなる群から選択される、請求項７８に記載の使用。
【請求項８６】
（ａ）プロドラッグを毒性化合物に変換できる自殺遺伝子をコードする第一ポリヌクレオチド領域；及び
（ｂ）血管形成細胞における前記自殺遺伝子の発現を指向させることができるシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域
を含む核酸構築物。
【請求項８７】
前記自殺遺伝子は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ、水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼ、及び細菌のシトシンデアミナーゼからなる群から選択される、請求項８６に記載の核酸構築物。
【請求項８８】
前記（ｂ）のシス調節因子は、請求項１～８および１０～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、請求項８６に記載の核酸構築物。
【請求項８９】
前記（ｂ）のシス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター、及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的プロモーターである、請求項８６に記載の核酸構築物。
【請求項９０】
前記プロドラッグは、ガンシクロビル、アシクロビル、１－５－ヨードウラシル、ＦＩＡＵ、５－フルオロシトシン、６－メトキシプリンアラビノシド、及びそれらの誘導体からなる群から選択される、請求項８６に記載の核酸構築物。
【請求項９１】
必要とする被験者において血管形成をダウンレギュレートするための医薬の製造のための、請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項９２】
前記プロドラッグが前記自殺遺伝子によって毒性化合物に変換されるときに、細胞においてアポトーシスを起こすのに十分な治療有効量の前記プロドラッグを提供することをさらに含む、請求項９１に記載の使用。
【請求項９３】
前記自殺遺伝子は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼであり、前記プロドラッグはガンシクロビル、アシクロビル、ＦＩＡＵ、またはそれらの誘導体である、請求項９１

に記載の使用。
【請求項９４】
前記自殺遺伝子は細菌のシトシンデアミナーゼであり、前記プロドラッグは５－フルオロシトシン、またはその誘導体である、請求項９１に記載の使用。
【請求項９５】
前記自殺遺伝子は水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼであり、前記プロドラッグは６－メトキシプリンアラビノシド、またはその誘導体である、請求項９１に記載の使用。
【請求項９６】
有効成分として請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物、及び医薬的に許容できる担体を含む、被験者の組織において血管形成をダウンレギュレートするための医薬組成物。
【請求項９７】
医薬としての、請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項９８】
過剰の血管新生に関連する症状を予防又は治療するための医薬の製造のための、請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項９９】
少なくとも一つの追加の化学療法及び／又は放射線療法を伴い、前記追加の療法は相乗作用方式で細胞傷害性をさらに高めることができる、請求項９８に記載の使用。
【請求項１００】
癌を予防または治療するための医薬の製造のための、請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項１０１】
腫瘍を予防または治療するための医薬の製造のための、請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項１０２】
少なくとも一つの追加の化学療法及び／又は放射線療法を伴い、前記追加の療法は相乗作用方式で細胞傷害性をさらに高めることができる、請求項１００に記載の使用。
【請求項１０３】
請求項８６～８９のいずれかに記載の核酸構築物を組織において発現させることを含む、組織において血管形成をダウンレギュレートする方法。
【請求項１０４】
前記プロドラッグが前記自殺遺伝子によって毒性化合物に変換されるときに、細胞においてアポトーシスを起こすのに十分な治療有効量の前記プロドラッグを提供することをさらに含む、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０５】
前記自殺遺伝子は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼであり、前記プロドラッグはガンシクロビル、アシクロビル、ＦＩＡＵ、またはそれらの誘導体である、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０６】
前記自殺遺伝子は細菌のシトシンデアミナーゼであり、前記プロドラッグは５－フルオロシトシン、またはその誘導体である、請求項１０３に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、被験者の特定の細胞領域の血管形成を制御するために使用できる核酸構築物、医薬組成物及び方法に関する。より詳しく述べると、本発明は、内皮細胞特異的プロモーターの活性を示す、単離されたポリヌクレオチド配列及びその使用方法に関し、並びにさらによりくわしく述べると、内皮細胞にて増大した活性及び特異性を示す修正プレプロ

エンドセリン－１（ＰＰＥ－１）プロモーター及び特定の細胞サブセットの細胞傷害性を活性化するのに使用して迷入血管の新生もしくは細胞の増殖が特徴である疾患を治療することができるか又は新生血管の増殖を誘発するのに使用して虚血性疾患を治療できる核酸構築物に関する。本発明はさらに、低酸素症及び血管形成などの生理的症状に応答してＰＰＥプロモーターの発現を高めるＰＰＥプロモーターの修正並びに新規な血管形成内皮特異的併用療法に関する。

【背景技術】

【０００２】

血管形成

血管形成は、新しい血管の成長、すなわち、毛細管内皮細胞による移動、増殖及び管形成に主に依存するプロセスである。血管形成のとき、内皮細胞はその静止期から抜け出し、迅速に増殖する。血管形成性表現型への細胞の移行に関わる分子機構は明らかにされていないが、新しい血管の形成をもたらす一連の事象が詳しく報告されている［Ｈａｎａｈａｎ，Ｄ．、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２７７、４８～５０（１９９７）］。血管の成長には、内皮の出芽［Ｒｉｓａｕ，Ｗ．、Ｎａｔｕｒｅ、３８６、６７１～６７４（１９９７）］又は挿入成長［Ｐａｔａｎ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．、Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．、５１、２６０～２７２（１９９６）］のいずれかが伴う。最初の経路では、下記の事象列が生じ得る：（ａ）血管の基底部（通常は後毛細管小静脈）及び間質基質の溶解；（ｂ）刺激に向かう内皮細胞の遊走；（ｃ）先導する内皮細胞の後について行く内皮細胞の増殖；（ｄ）内皮の列／芽における内腔の形成（管形成）；（ｅ）血液の流れを可能にするための芽の交会吻合による枝分れ及びループの形成；（ｆ）周皮細胞（すなわち、内皮周囲細胞及び平滑筋細胞）による血管の外皮化；及び（ｇ）未成熟な血管の周りでの基底膜の形成。新しい血管はまた、二次的な経路によっても、すなわち、既に存在する血管の内腔への間質組織柱の挿入によっても形成され得る。これらの柱のその後の成長及びそれらの安定化は、血管内腔の区画化及び局所的な血管網の再構成をもたらす。

【０００３】

血管形成は低酸素濃度の条件下（虚血及び腫瘍の転移等）で起こり、従って新生血管形成における重要な環境要因であることができる。エリスロポイエチン、トランスフェリン及びその受容体、グルコース移送及び解糖経路の大部分の遺伝子、ＬＤＨ、ＰＤＧＦ－ＢＢ、エンドセリン－１（ＥＴ－１）、ＶＥＧＦ及びＶＥＧＦ受容体を含むいくつかの遺伝子の発現は、これらの遺伝子の転写を制御する低酸素状態応答因子（Ｈｙｐｏｘｉｃ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｅｌｅｍｅｎｔ （ＨＲＥ））に対する低酸素症誘導性因子（Ｈｙｐｏｘｉａ Ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ Ｆａｃｔｏｒ（ＨＩＦ－１））の特異的結合によって低酸素条件下で誘導される。低酸素条件に対する応答におけるこれらの遺伝子の発現は細胞が低酸素条件下で機能することを可能にする。

【０００４】

血管形成プロセスは、腫瘍又は正常細胞並びに細胞外マトリックスの組成物によって分泌される血管形成増殖因子によって、及び内皮酵素の活性によって制御される（Ｎｉｃｏｓｉａ ａｎｄ Ｏｔｔｉｎｅｔｔｉ，１９９０，Ｌａｂ．Ｉｎｖｅｓｔ．，６３，１１５）。血管形成の初期段階の間、内皮細胞芽は、既に存在する血管の基底膜の間隙を通って出現する（Ｎｉｃｏｓｉａ ａｎｄ Ｏｔｔｉｎｅｔｔｉ，１９９０，ｓｕｐｒａ；Ｓｃｈｏｅｆｌ，１９６３，Ｖｉｒｅｈｏｕｓ Ａｒｃｈ，Ｐａｔｈｏｌ．Ａｎａｔ．３３７，９７－１４１；Ａｕｓｐｒｕｎｋ ａｎｄ Ｆｏｌｋｍａｎ，１９７７，Ｍｉｃｒｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．１４，５３－６５；Ｐａｋｕ ａｎｄ Ｐａｗｅｌｅｔｚ，１９９１，Ｌａｂ．Ｉｎｖｅｓｔ．６３，３３４－３４６）。新しい血管が形成されるにつれ、それらの基底膜は、血管形成応答に影響を与えると考えられている複雑な構造上及び組成上の変化を受ける（Ｎｉｃｏｓｉａ，ｅｔ．ａｌ．，１９９４，Ｅｘｐ Ｂｉｏｌｏｇｙ．１６４，１９７－２０６）。

【０００５】

血管形成と病理

各種の血管形成の因子が血管形成の過程を支配している。異常状態の間、プロ血管形成因子と抗血管形成因子の間の微妙なバランスが破壊されて、非自己制限性の内皮細胞及び内皮周囲細胞の増殖が誘発されると解される。血管形成は、正常状態の下では高度に制御されたプロセスであるが、血管形成の制御されていない状態が続くことによって多くの疾患（「血管形成病」として特徴付けられている）が起こる。このような病状では、制御されていない血管形成によって、特定の疾患が直接起こるか又は既存の病状を悪化させることがある。例えば、眼の血管新生は、失明の最も一般的な原因として関与し、眼のほぼ２０種の疾患の病状の原因になっている。関節炎などのいくつかの既存の症状の場合、新しく生成した毛細血管は関節に侵入して軟骨を破壊する。糖尿病の場合、網膜に新たに生成した毛細血管は、硝子体液に侵入して出血と失明を起こす。最近まで、眼の血管新生による諸疾患、関節炎、皮膚病及び腫瘍に起こる血管形成は治療によって阻止することが困難であった。

【０００６】

不均衡な血管形成は様々な病気の状態の象徴であり、しばしば病気の状態の進行を支援する。例えば、固形腫瘍においては、血管内皮細胞は正常な組織より約３５倍も迅速に分裂する（Ｄｅｎｅｋａｍｐ ａｎｄ Ｈｏｂｓｏｎ，１９８２ Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ４６：７１１－２０）。かかる異常な増殖は腫瘍の増殖及び転移のために必要である（Ｆｏｌｋｍａｎ，１９８６ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４６：４６７－７３）。

【０００７】

血管内皮細胞増殖はリューマチ性関節炎、乾癬及び滑膜炎の如き慢性炎症疾患においても重要であり、そこではこれらの細胞は炎症部位内に放出された増殖因子に応答して増殖する（Ｂｒｏｗｎ ＆ Ｗｅｉｓｓ，１９８８，Ａｎｎ．Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．４７：８８１－５）。

【０００８】

アテローム症においては、アテローム性斑の形成は血管中の内皮細胞のモノクローナル拡大によって引き起こされる（Ａｌｐｅｒｎ－Ｅｌｒａｎ １９８９，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．７０：９４２－５）。さらに、糖尿病性網膜症においては、失明は、非制御の血管形成及び網膜の消耗を刺激する眼の基底膜の変化によって生ずると考えられている（Ｗｅｓｔ ａｎｄ Ｋｕｍａｒ，１９８８，Ｌａｎｃｅｔ １：７１５－６）。

【０００９】

内皮細胞は移植片拒絶にも関与している。同種移植片拒絶の過程においては、内皮細胞は接着性決定基を発現し、これが白血球を移植片の部位に指向させる。移植片の内皮細胞上への白血球接着分子の誘導は、炎症性損傷で生ずることが知られているような局所的に放出されたサイトカインによって誘導されることがあり得る。

【００１０】

他方、排除された血管形成は、アテローム症が誘導する冠状動脈閉塞（例えば、狭心症）におけるような、不慮の損傷又は手術による壊死傷害におけるような、加齢性黄斑変性症におけるような、又は潰瘍の如き胃腸の損傷におけるような疾患の発展における主要な因子でもある。

【００１１】

従って、血管形成プロセスを制御又は修飾することは、根底にある病気の状態の進行に対するこのプロセスの寄与を制限することにおいて、並びにそれらの病因論を研究するための価値ある手段を提供することにおいて重要な治療的役割を有しうる。

【００１２】

最近、阻害的なものであれ刺激的なものであれ内皮制御剤の開発における有意義な進展があった。例えば、βＦＧＦタンパク質を成体ラットの腹膜腔に位置するコラーゲンで被覆されたマトリックス内に投与すると、良く血管形成された正常に灌流された構造が生じた（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ８６：７９２８－７９３２，１９８９）。成体イヌの冠状閉塞を起こしている冠状動脈中にβＦＧＦタンパク質を注入すると、減少した心筋不完、小さい心筋梗塞及び増大した血気がもたらされたことが報告されてい

る（Ｙａｎａｇｉｓａｗａ－Ｍｉｗａ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５７：１４０１－１４０３，１９９２）。同様の結果はβＦＧＦタンパク質を用いた心筋虚血の動物モデルにおいても報告されている（Ｈａｒａｄａ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ９４：６２３－６３０，１９９４，Ｕｎｇｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ ２６６：Ｈ１５８８－Ｈ１５９５，１９９４）。

【００１３】

しかしながら、長く持続する機能的な血管の多量形成のためには、上述のタンパク質因子の繰返しの又は長期間の送達が必要であり、従って臨床設定におけるそれらの使用を制限する。さらに、血管形成を制御する因子の生産に関連する高い費用に加えて、これらの因子の効果的な送達は冠状動脈中に配置されるカテーテルの使用を必要とし、これは治療の費用及び困難性をさらに増大させる。

【００１４】

従って、すべての抗血管形成治療の基本的な目標は、増殖中の微小血管の病巣をその正常な休止期に戻すこと、及びその再成長を防止することである［Ｃａｎｃｅｒ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ＆Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（第５版、編者：Ｖｉｎｃｅｎｔ Ｔ．ＤｅＶｉｔａ，Ｊｒ．、Ｓａｍｕｅｌ Ｈｅｌｌｍａｎ、Ｓｔｅｖｅｎ Ａ．Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ）、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ（１９９７年）］。同様に、プロ血管形成治療は、必要とされる血管形成因子を回復することのみならず、それらの適当な均衡を再建することに向けられている（Ｄｏｒ，ｅｔ ａｌ．Ａｎｎ ＮＹ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ２００３；９９５；２０８－１６）（プロ血管形成治療及び抗血管形成治療の広範な総説については、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ Ａｃｔａ Ｂｉｏｃｈ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｃｉｎｉｃａ，２００３：３５：８７３－８８０、及びＭａｒｉａｎｉ ｅｔ ａｌ．ＭｅｄＧｅｎＭｅｄ ２００３，５：２２；及びＦｏｌｋｍａｎ，Ｓｅｍｉｎ．Ｏｎｃ ２００２，２９：１５－１８を参照のこと）。

【００１５】

抗血管形成治療

抗血管形成治療は、腫瘍成長（例えば、網膜症、良性及び悪性の血管形成腫瘍）の進行を遅らせることができるので、確固たる臨床的方法である。

【００１６】

一般に、毛細血管の制御されない成長によって引き起こされる疾患（糖尿病網膜症、乾癬、関節炎、血管腫、腫瘍の成長及び転移など）はどれも、抗血管形成治療の標的である。

【００１７】

例えば、臨床的に確認できないサイズ（例えば、数ｍｍ^3）を越えての固形腫瘍の進行性成長には、新しい血管が継続して形成されること（腫瘍血管形成として知られているプロセス）が要求される。腫瘍の成長及び転移は血管形成依存的である。腫瘍は、腫瘍自身が成長するために栄養分及び酸素を送達するための新しい毛細血管の成長を継続して刺激しなければならない。従って、腫瘍血管形成の防止又は腫瘍の存在する血管の選択的な破壊（血管標的化治療）のいずれかが抗血管形成腫瘍治療の基礎である。

【００１８】

近年、多数の抗血管形成作用剤が、悪性疾患を処置するために開発されており、そのうちのいくつかが既に臨床試験中である（総説については、Ｈｅｒｂｓｔ ｅｔ ａｌ．（２００２）、Ｓｅｍｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．、２９：６６～７７、及びＭａｒｉａｎｉ ｅｔ ａｌ，ＭｅｄＧｅｎＭｅｄ ２００３；５：２２を参照のこと）。

【００１９】

腫瘍抗血管形成処置のための最も研究されている標的は、ヒトにおける血管形成を調節する支配的なプロセス、すなわち、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）のその受容体（ＶＥＧＦＲ）との相互作用である。ＶＥＧＦＲの血管形成作用を調節する作用剤には、（ｉ）ＶＥＧＦタンパク質自体又は受容体に向けられた抗体（例えば、ｒｈｕＭＡｂ ＶＥＧＦ，

Ａｖａｓｔｉｎ）；（ｉｉ）ＶＥＧＦＲチロシンキナーゼに対する小分子化合物（例えば、ＺＤ６４７４及びＳＵ５４１６）；（ｉｉｉ）ＶＥＧＦＲにより標的化されるリボザイムが含まれる。

【００２０】

他の新規な血管形成阻害剤には、２－メトキシエストラジオール（２－ＭＥ２）（他にない特徴的な抗腫瘍性及び抗血管形成性を有する、エストラジオールの天然の代謝産物）、ならびにアンギオスタチン及びエンドスタチン（それぞれプラスミノーゲン及びコラーゲンＸＶＩＩＩのタンパク質分解切断フラグメント）が含まれる。

【００２１】

前臨床モデルでは有望であるが、今日まで、臨床試験で試験されたすべての抗血管形成作用剤の全身投与では、成功率が限られていること、そして、血小板減少症、白血球減少症及び喀血を含む相当の毒性が明らかにされている。これらの結果は、進行した悪性腫瘍に対する治療として現在の腫瘍血管形成作用剤を使用することには限界があり得ることを示唆している。Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙ ｅｔ ａｌ．は、抗血管形成治療の開始と抗腫瘍効果との間での時間のずれにより、治療に対する応答の前に初期の腫瘍成長が生じ得ることを示している［Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙ Ｓ ｅｔ ａｌ．（１９９８）、Ｐｒｏｃ Ａｍ Ｓｏｃ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ、１７：２１７ａ］。さらに、最近の研究では、血管形成の調節が毛細血管床の間で異なり得ることが示唆され、このことは、抗血管形成治療は器官／組織特異的に最適化する必要があり得ることを示唆している［Ａｒａｐ ｅｔ ａｌ．（１９９８）、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２７９：３７７～３８０］。

【００２２】

興味深いことに、良好でない結果もまた、平滑筋細胞増殖に向けられた抗血管形成治療（例えば、ヘパリン、ヘパリンペプチドによる処置）が冠状動脈疾患患者における心筋虚血に対して行われたときに得られている［Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ、７９：１３７４～１３８７（１９８９）；Ｇｏｌｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．、Ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ、６５：２１５～２２５（１９８７）；Ｗｏｌｉｎｓｋｙ ｅｔ ａｌ．、ＪＡＣＣ、１５（２）：４７５～４８１（１９９０）］。心臓血管疾患を処置するためのそのような作用剤の使用に関連する様々な制限には、（ｉ）心臓血管疾患患者に対して許容できないレベルの危険性をもたらす全身毒性；（ｉｉ）手術後の血管創傷治癒の妨害；（ｉｉｉ）周囲の内皮及び／又は他の内側平滑筋細胞に対して生じ得る損傷が含まれた。

【００２３】

したがって、抗血管形成因子の全身投与に伴うこれら及びその他の障害（すなわち生体外で不安定であることによる製造上の制限及び高い投与量が必要であること並びにボーラス投与の最高動態（ｐｅａｋ ｋｉｎｅｔｉｃｓ）の効果が最適でないこと）によって、血管形成に関連する疾患を治療する際の血管形成因子の有効利用が制限されている。

【００２４】

癌に対する抗血管形成遺伝子治療

原発腫瘍及び転移腫瘍における腫瘍細胞の増殖は、栄養素の供給が制限されると、アポトーシスの速度が増大することによって相殺される。休眠中の原発性又は転移性の腫瘍は、「血管形成のスイッチ」が生じて栄養素の供給がその腫瘍の大きさに対して十分であればいつでも転移を起こし始める。

【００２５】

血管形成のスイッチは下記のいくつかの機構によって起こる。

１．ＶＥＧＦとｂＦＧＦなどのプロ血管形成遺伝子の、癌遺伝子によるアップレギュレーション又はトロンボスポンジンなどの血管サプレッサーのダウンレギュレーション

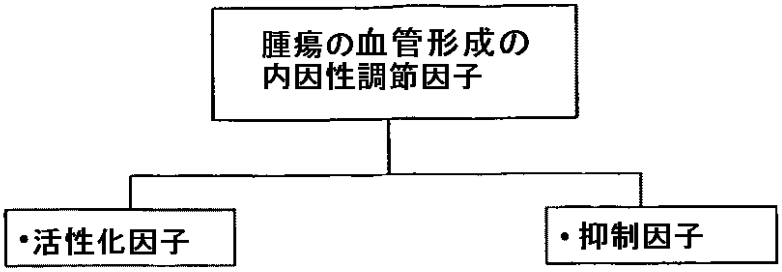
２．低酸素誘発因子－１（ＨＩＦ－１）の、腫瘍関連低酸素状態による活性化

３．腫瘍細胞が誘発する腫瘍床繊維芽細胞によるプロ血管形成タンパク質の分泌

４．骨髄内皮前駆細胞の腫瘍への移行

【表１】

表１：腫瘍の脈管新生の内因性調節因子



- 血管内皮増殖因子 (VEGF)
- 繊維芽細胞増殖因子１ (FGF1)
- 繊維芽細胞増殖因子２ (FGF2)
- 血小板由来増殖因子 (PDGF)
- アンギオポイエチン 2*
- アンギオポイエチン 1**
- 形質転換増殖因子 -β* (TGF-β)
- 腫瘍壊死因子 -α*(TNF-α)
- インターロイキン８ (IL-8)
- 血小板由来内皮細胞
- 増殖因子 (PD-ECGF)
- 肝細胞増殖因子 (HGF)

- P53
- トロンボスポンジン -1*
- トロンボスポンジン -2
- メタロプロティナーゼの組織阻害剤 (TIMPs)
- アンギオスタチン
- エンドスタチン
- アンチ脈管新生アンチトロンビン III
- アンギオスタティック C-X-C ケモカイン (PF4, IP-10, MIG)
- 色素内皮由来因子 (PEDF)
- インターロイキン -12 (IL-12)
- インターフェロン (INF)-αβγ

* 投与量依存性
** 弱い脈管新生活性化因子

【００２６】

血管形成の活性化因子と抑制因子の間の相対的バランス（上記表１参照）は、腫瘍を静止状態に維持するのに重要である。抑制因子のレベルが減少するか又は活性化因子のレベルが増大すると上記バランスが変化して腫瘍の血管形成が起こり腫瘍が増殖する。

【００２７】

腫瘍組織の、直近の血管に対する厚さが１５０－２００μｍを超えると、腫瘍組織に対する酸素の拡散が不十分である。その結果、当然のことながら、このような寸法を超える細胞はすべて、すでに血管形成のスイッチがオンになっている。その腫瘍組織の増殖速度は、その血管による供給に依存している。しかし、血管形成のスイッチが生じるとすぐに、アポトーシスの速度は１／３－１／４まで低下する（２４）。さらに、栄養素の供給と異化代謝産物の放出は、腫瘍のアポトーシスを低下させる新生血管の唯一の作用ではない。微小血管系の内皮細胞は、抗アポトーシス因子類、マイトジェン類並びに腫瘍細胞のアポトーシスをさらに抑制するｂ－ＦＧＦ、ＨＢ－ＥＧＦ、ＩＬ－６、Ｇ－ＣＳＦ、ＩＧＦ－１及びＰＤＧＦなどの生存因子も分泌する。

【００２８】

腫瘍細胞は、突然変異速度が高いため遺伝子が不安定であるから天然細胞より有利である。例えば、ｐ５３遺伝子が突然変異するとアポトーシス速度は抑制される。さらに、腫瘍遺伝子の、プロ血管形成又は血管形成のサプレッサー制御の癌遺伝子が変化すると（ｒａｓ癌遺伝子など）、血管形成のスイッチを誘発する。しかし、高い突然変異速度は、癌遺伝子の不安定さの唯一の機構ではない。腫瘍細胞が「アポトーシス体（ａｐｏｐｔｏｔｉｃ　ｂｏｄｙ）」を取り込みその結果非正倍数性になりさらに遺伝子の不安定性が増大する証拠がある。一般に、癌は血管形成に依存している。癌は、遺伝子が不安定であるので、そのアポトーシス速度を抑制して転移腫瘍の播種を可能にするプロ血管形成サイトカインのバランスをとることができる。

【００２９】
ヒトの血管系は１０兆個以上の内皮細胞を含んでいる。正常な静止内皮細胞の寿命は１０００日を超えている。腫瘍の進行に関与している血管形成内皮細胞は、迅速に増殖するが、そのゲノム安定性が腫瘍細胞と異なるので、薬物耐性が小さく突然変異のクローン発生の可能性が少ない。さらに、腫瘍進行の律速因子は血管形成であるから、血管形成内皮細胞に対する治療によって、非常に効率の高い治療法が得られる。実際、いくつかの抗血管形成物質が全身治療の可能性のある候補として役立つであろう。しかし、これらの薬剤は、タンパク質なので静脈投与する場合が多いから、製造が難しくなりかつ維持が困難になる。抗血管形成遺伝子を送達することは、タンパク質を連続的に分泌する可能性がある一解決策である。

【００３０】
血管形成プロセスを調節する新しい遺伝子の同定とともに、体細胞遺伝子治療が、これらの制限を克服するために試みられている。多大の努力が、癌、心臓血管疾患及び末梢血管疾患の遺伝子治療法を開発することに向けられているが、効果的かつ特異的な遺伝子送達に対する大きな障害が依然として存在する［総説については、Ｆｅｌｄｍａｎ　ＡＬ（２０００）、Ｃａｎｃｅｒ、８９（６）：１１８１～９４を参照のこと］。一般に、組換えウイルスベクターを運搬体として使用する、目的とする遺伝子による遺伝子治療の主要な制限因子は、目的とする遺伝子を標的組織に特異的に指向させる能力である。

【００３１】
これらの制限を克服するための試みには、細胞傷害性遺伝子にコンジュゲート化された組織特異的なプロモーターの使用が含まれていた。例えば、内皮特異的なプロモーターの制御下で発現する細胞傷害性遺伝子の内皮細胞標的化が、ＴＮＦαを内皮細胞において特異的に発現させるためにＫＤＲプロモーター又はＥ－セレクチンプロモーターを使用したＪａｇｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．により記載されている［Ｊａｇｇａｒ　ＲＴ　ｅｔ　ａｌ．、Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ（１９９７）、８（１８）：２２３９～４７］。Ｏｚａｋｉ　ｅｔ　ａｌ．は、ヘルペス単純ウイルスのチミジンキナーゼ（ＨＳＶ－ｔｋ）をＨＵＶＥＣに送達するためにフォンヴィレブランド因子（ｖＷＦ）プロモーターを使用した［Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ（１９９６）、７（１３）：１４８３～９０］。しかしながら、これらのプロモーターは、弱い活性を示しただけであり、高レベルの発現をもたらさなかった。

【００３２】
いくつかの内皮細胞特異的なプロモーターが先行技術に記載されている。例えば、Ａｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，［Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（１９９５）９２：７５６７－５７１］は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの組織特異的発現をもたらしうるヒトのフォンヴィレブランド因子遺伝子の５′及び３′制御配列を単離している。しかし、これらの配列は不均一なパターンのレポータートランスジーン発現のみを媒介することができる。トランスジェニックマウス中でフォンヴィレブランド制御因子の制御下に配置された細菌のＬａｃＺレポーター遺伝子は、卵黄嚢及び成体の脳における内皮細胞の部分集団でのトランスジーンの発現を示した。しかし、脾臓、肺、肝臓、腎臓、心臓、精巣及び大動脈の血管床並びにトロンボモジュリン部位では発現は検出されなかった。

【００３３】
Ｋｏｒｈｏｎｅｎ　Ｊ．ｅｔ　ａｌ［Ｂｌｏｏｄ（１９９５）９６：１８２８－３５］は、マウス胚の血管系全体でのトランスジーンの均一な発現に寄与するヒト及びマウスのＴＩＥ遺伝子プロモーターを単離した。しかし、成体での発現は肺及び腎臓の血管に限定されており、心臓、脳及び肝臓では発現は検出されなかった。同様の結果がＳｃｈｌａｅｇｅｒ　Ｍ．ｅｔ　ａｌ．によって得られている。彼らはＴＩＥ－２プロモーターの１．２ｋｂの５′フランキング領域を単離し、胚性マウスの内皮細胞に制限されたトランスジーンの発現を示した［Ｓｃｈｌａｅｇｅｒ　ＴＭ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１２１：１０８９－１０９８］。

【００３４】

従って、これらの配列のいずれも成体動物において又はすべての発達段階のすべての内皮細胞において均一に作用するものではない。さらに、これらの配列のいくつかは内皮に制限されていなかった。

【００３５】

Ｋｏｎｇ及びＣｒｙｓｔａｌにより提示された代わりの方法では、抗血管形成因子の腫瘍特異的な発現が含まれた。しかしながら、今日まで、内因性抗血管形成作用剤の組換え形態の毒性は明らかにされていない。だが、いくつかの合成された抗血管形成作用剤は前臨床モデルにおいて毒性を伴っている［Ｋｏｎｇ及びＣｒｙｓｔａｌ（１９９８）、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．、９０：２７３～７６］。

【００３６】

アンギオスタチンもまた可能な抗血管形成作用として使用されている［Ｆａｌｋｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｃｅｌｌ、１９９７（1月２４日）、８８（２）：２７７～８５］。しかしながら、腫瘍における血管形成の調節に関与する因子の重複性のために、アンギオスタチン治療は単独では効果的であるとはほとんど考えられていない。

【００３７】

今日まで、有望な臨床試験が、Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）又はＢａｙ－４３９０６（登録商標）のような抗血管形成治療法は、腫瘍を囲む血管の新たな発生を制限することによって腫瘍転移の進行を遅らせることができることを示している。しかし、新しい血管の生成を阻害し及び／又は新生血管を部分的に破壊することは、既存の新生血管の大部分又はすべてを破壊する劇的な抗血管形成作用が必要な癌症状にとっては不十分である。

【００３８】

プレプロエンドセリン－１（ＰＰＥ－１）プロモーター

エンドセリン類（ＥＴ）は、１９８８年にＭａｓａｋｉらによって発見されたが、３種の遺伝子：ＥＴ－１、ＥＴ－２及びＥＴ－３からなっている。エンドセリン－１（ＥＴ－１）すなわち２１アミノ酸のペプチドは、最初、内皮細胞が合成する強力な血管収縮薬かつ平滑筋マイトジェンとして記述された。ＥＴ－１は血管上皮細胞で発現されるが、平滑筋細胞、気道や胃腸の上皮細胞、ニューロン及び糸球体血管間膜細胞などの他の細胞でもいくらか発現される。その発現は、低酸素症、心臓血管疾患、炎症、喘息、糖尿病及び癌などの各種の病態生理学的症状の下で誘発される。エンドセリン－１は産生をトリガーし、ＶＥＧＦやＰＤＧＦなどの血管形成因子と相互に作用して血管形成の過程で役割を演じる。

【００３９】

Ｈｕらは、エンドセリン－１のプロモーターのアンチセンスストランドに位置する低酸素応答因子（ＨＲＥ）を同定した。この配列は、エンドセリン－１プロモーター（ヒト、ラット及びマウスの遺伝子）を低酸素症によって正の調節を行なうために必要な低酸素症誘発因子－１の結合部位である。低酸素症は強力な生体信号であり、エリスロポエチン（Ｅｐｏ）、ＶＥＧＦ及び各種解糖酵素などのいくつかの遺伝子の発現を誘発する。コア配列（８塩基対）が低酸素状態に応答するすべての遺伝子に保持され、そして隣接する領域は他の遺伝子と異なる。ＥＴ－１低酸素応答因子は、ＧＡＴＡ－２結合部位とＡＰ－１結合部位の間に位置している。

【００４０】

Ｂｕらは、内皮細胞特異的転写活性を与えて、制限されているタンパク質又はタンパク質複合体を内皮細胞に結合するように見えるマウスＰＰＥ－１プロモーター（ｍＥＴ－１）中に、複合調節領域を同定した。この領域は、内皮特異的陽性転写配列と呼称されるが、少なくとも三つの機能配列で構成され、マウスＰＰＥ－１プロモーターの－３６４ｂｐと－３２０ｂｐの間に位置している。この三つの配列すべてが完全な活動のために必要である。一つ又は三つのコピーが、最小ｍＥＴ－１プロモーター中に構築されると、生体外での内皮細胞のレポーター遺伝子の発現は、配列無しの最小プロモーターと比べて２－１０倍に増大する。

【００４１】

米国特許第５７４７３４０号は、マウスＰＰＥ－１プロモーター及びその一部の使用を教示している。しかしながら、この特許は、内皮特異性を保存しつつ、ＰＰＥプロモーターにより達成される発現レベルを増加させるために、内皮特異的エンハンサーが利用されうることを暗示も示唆もしていない。さらに、この特許は、ＰＰＥ－１プロモーターが、低酸素条件下で、より高い転写レベルへと誘導されることを教示していない。

【００４２】

遺伝子によって指向された酵素プロドラッグ治療（ＧＤＥＡＰ）

この戦略は「自殺遺伝子治療」とも呼称される。この戦略では、癌細胞内の活性細胞傷害作用因中に不活性のプロドラッグが保持される。ＧＤＥＰＴで最も広く使用される２種の遺伝子は、ガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与と併用した単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶ）及び５－フルオロシトシン（５ＦＣ）の投与と併用したイー・コリ（Ｅ．Ｃｏｌｉ）シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）の遺伝子である。このＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶ系は、詳細な前臨床医学的評価及び臨床試験を受けている。今日まで、ＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶ系は、発熱、ＧＣＶの全身毒性、骨髄抑制及び軽度－中度の肝毒性などの有意でない作用を示している。

【００４３】

このＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶ系は、Ｋｒａｉｓｅｌｂｕｒｄらが１９７６年に初めて報告した。ＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶ含有プラスミドをトランスフェクトされた細胞又はＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶ含有ベクターを形質導入された細胞は、アクシロビル、ガンシクロビル（ＧＣＶ）、バルシクロビル及びファムシクロビルなどの薬剤のスーパーファミリーに対して敏感になっている。グアノシン類似体のＧＣＶは遺伝子治療の成分の中で最も活性の高い薬剤である。ＨＳＶ－ＴＫ陽性細胞は、ウイルスＴＫを産生し、このウイルスＴＫはＧＣＶをリン酸化して一リン酸ＧＣＶ（ＧＣＶ－ＭＰ）にする際、ヒトＴＫより１０００倍有効である。ＧＣＶ－ＭＰは、未変性のチミジンキナーゼによってリン酸化されて二リン酸ＧＣＶになり最終的に三リン酸ＧＣＶ（ＧＣＶ－ＴＰ）になる。

【００４４】

ＧＣＶ－ＴＰは、強力なＤＮＡポリメラーゼ阻害剤であり、新生ストランドに取り込まれＤＮＡの伸長を止めて結局細胞死を起こすことによってＤＮＡの合成を止める。ＧＣＶは、ＨＳＶ－ＴＫ陽性細胞に対して圧倒的に作用するので、その有害作用は、小さいか又はまれであり、そしてその作用として主なものは血小板減少症、好中球減少症及び腎毒性がある。さらに、ＧＣＶの毒性は、ＤＮＡ合成に基づいているので、主に増殖中の細胞に作用する。ＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶ系は、最近、癌の遺伝子治療の臨床試験に広く利用されている。それにも拘わらず、試験結果は期待はずれであり、形質導入率が低いため、大部分が生体内に限定されている。

【００４５】

最近の研究で、ＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶの細胞傷害性の機構の特徴が明らかになった。その研究は、Ｇ２－Ｍ　ＤＮＡの損傷チェックポイントの活性化による後期Ｓ又はＧ２相における細胞周期の中断を明らかにした。これらの事象が、不可逆性の細胞死及び細胞死に関連する巻添え作用をもたらすことが分かった。強い細胞の拡大は、ＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶ系を投与された細胞の公知の形状変化である。このような形状変化は、特定の細胞骨格の再配列が原因である。ストレスアクチンファイバー及び太い中間フィラメントのネットが、細胞周期の中断に続いて現れる。

【００４６】

ＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶ系は「巻添え作用」と呼称される増幅ポテンシャルを利用する。この巻添え作用は、ＨＳＶ－ＴＫ陽性細胞がＨＳＶ－ＴＫ陰性細胞のキリング（ｋｉｌｌｉｎｇ）を誘発する現象を支持している。

【００４７】

巻添え作用：この巻添え作用は、ＨＳＶ－ＴＫ陽性細胞とＨＳＶ－ＴＫ陰性細胞それぞれの１：９混合物が、ＧＣＶを添加した後、完全に細胞を殺すようになることを発見したＭｏｏｌｔｅｎらが初めて報告した。巻添え作用のいくつかの特徴が記述されている：

１．巻添え作用は、細胞－細胞の接触に強く依存していることが分かった。
２．その程度は、細胞型が異なると異なる。
３．巻添え作用は、同種の細胞型に限定されず異なる細胞型の混合物にも限定されない。
４．より高レベルのＨＳＶ－ＴＫ発現が、より高い巻添え作用と相互に関連していることが分かった。

【００４８】
Ｃｕｌｖｅｒらは、生体内モデルでの巻添え作用を初めて証明した。彼らは、ＨＳＶ－ＴＫ陽性腫瘍細胞を異なる比率で移植すると腫瘍が退縮することを証明した。生体外のモデルと異なり、細胞－細胞の接触が生体内の巻添え作用に不可欠であることは分かっていなかった。Ｋｉａｎｍａｎｅｓｈらは、異なる肝臓葉（そのいくつかだけがＨＳＶ－ＴＫ陽性であった）に腫瘍細胞を移植することによって遠隔巻添え作用を証明した。ＨＳＶ－ＴＫ陽性とＨＳＶ－ＴＫ陰生の病巣の両者が退縮した。巻添え作用は、生体内で異なる起源由来の細胞間にも証明された。全体的にみて、ＨＳＶ－ＴＫとその巻添え作用は、遺伝子送達系で実現すると腫瘍抑圧に有効な手段になる。しかし、今日まで臨床試験は限定された結果しか示さなかった。

【００４９】
したがって、毒性副作用及び従来技術の抗血管形成法の特徴である限定的な成功を避けながら被験者の特定の組織の領域における血管形成を有効に調節する新規な方法を提供する高度に特異的で信頼性が高い血管形成特異的なプロモーター及び核酸構築物が必要なことは広く知られており、それを得れば非常に有利であろう。

【発明の開示】

【００５０】
本発明の一側面によって、配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合された配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部を有するシス調節因子を含む単離されたポリヌクレオチドが提供され、その単離されたポリヌクレオチドは、それに転写的に連結されたポリヌクレオチド配列の真核生物における転写を指向させることができる。また、前記単離されたポリヌクレオチドを含む核酸構築物、本発明の核酸構築物を含む細胞及び細胞で接種されるスカフォルドも提供される。この単離されたポリヌクレオチドは、各種の疾患と症状を治療及び予防するための医薬として使用することができ、このような医薬を製造するのに使用できる。

【００５１】
記載された好ましい実施態様のさらなる特徴によって、前記核酸構築物はさらに、前記シス調節因子の調節制御下で配置された核酸配列を含有している。その核酸配列はさらに、血管形成調節因子をコードしていてもよい。その核酸構築物は、各種の疾患と症状を治療及び予防するための（例えば、組織中の血管形成を調節するための）医薬として使用することができ、このような医薬を製造するのに使用できる。

【００５２】
記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、前記核酸配列は、ＶＥＧＦ、ｐ５５、アンギオポエチン－１、ｂＦＧＦ及びＰＤＧＦ－ＢＢからなる群から選択される。

【００５３】
記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、前記スカフォルドは、合成ポリマー、細胞接着分子又は細胞外マトリックスタンパク質で構成されている。

【００５４】
記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、前記合成ポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ヒドロキシアパタイト（ＨＡ）、ポリグリコール酸（ＰＧＡ）、ポリ－１－ラクチドで強化されたε－カプロラクトンと１－乳酸の編物（ＫＮ－ＰＣＬＡ）、同織布（ＷＶ－ＰＣＬＡ）、相互に結合された多孔質カルシウムヒドロキシアパタイトセラミックス（ＩＰ－ＣＨＡ）、ポリＤ，Ｌ－乳酸－ポリエチレングリコール（

ＰＬＡ－ＰＥＧ）、不飽和ポリエステルポリ（プロピレングリコール－コ－フマル酸）（ＰＰＦ）、ポリラクチド－コ－グリコリド（ＰＬＡＧＡ）、ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）、ポリ－４－ヒドロキシブチレート（Ｐ４ＨＢ）及びポリフォスファゼンからなる群から選択される。

【００５５】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、細胞接着分子は、インテグリン、細胞間接着分子（ＩＣＡＭ）１、Ｎ－ＣＡＭ、カドヘリン、テネイシン、ギセリン及び神経損傷誘発タンパク質２（ニンジュリン２）からなる群から選択される。

【００５６】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、細胞外マトリックスタンパク質は、フィブリノーゲン、コラーゲン、フィブロネクチン、ビメンチン、微小管結合タンパク質１Ｄ、神経突起生成因子（ＮＯＦ）、細菌セルロース（ＢＣ）、ラミニン及びゼラチンからなる群から選択される。

【００５７】

本発明のさらに別の側面によって、配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合された配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部を含むシス調節因子の転写制御下に配置された対象の核酸配列を含有する核酸構築物を、被験者に投与することによって実施される、真核細胞に対象の核酸配列を発現させる方法が提供される。さらに、その核酸構築物は、組織中に対象の核酸配列を発現させるために組織に提供できる。

【００５８】

本発明のさらに別の側面によって、（ａ）内皮細胞特異的プロモーター、（ｂ）配列番号：５に記載の低酸素応答因子の少なくとも一つのコピー及び（ｃ）血管形成調節因子をコードしかつプロモーターと低酸素応答因子の調節制御下にある核酸配列を含む核酸構築物を、組織中に発現させることによって行なう組織の血管形成を調節する方法が提供される。

【００５９】

本発明のさらに別の側面によって、血管形成調節因子をコードしかつ配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合された配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部を含むシス調節因子の調節制御下にある核酸配列を含む核酸構築物を組織中に発現させて、組織中の血管形成を調節することによって行なう組織中の血管形成を調節する方法が提供される。

【００６０】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、投与は、全身生体内投与；被験者の身体から取り出した細胞にエクスビボ投与し次いでその細胞を被験者の身体中に再導入する方法及び局所生体内投与からなる群から選択される方法で実施される。

【００６１】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、組織は自然の又は遺伝子工学的に処置された組織である。

【００６２】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、前記核酸配列はプロ血管形成因子をコードし、血管形成を調節することは血管形成をアップレギュレートすることである。

【００６３】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、前記核酸配列は、血管形成の阻害剤又は抗血管形成因子をコードし、血管形成を調節することは血管形成をダウンレギュレートすることである。

【００６４】

本発明のさらに別の側面によって、（ａ）細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合されたリガンド結合ドメインを含むキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域及び（ｂ）特定の組織又は細胞における前記キメラポリペプチドの発現を指向さ

せることができるシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含有する核酸構築物が提供される。前記リガンド結合ドメインは、特定の組織又は細胞に存在するリガンドに結合できるように選択され、そして前記リガンドがリガンド結合ドメインに結合すると、細胞傷害性分子のエフェクタードメインが活性化される。本発明の核酸構築物で形質転換された真核細胞も提供される。本発明の核酸構築物は、組織の血管形成を調節する必要がある被験者の組織の血管形成を調節して、血管形成と血管新生に関連する腫瘍及び症状と疾患を治療し予防するための医薬として及びその医薬を製造するのに使用できる。

【００６５】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、前記シス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的のプロモーターである。

【００６６】

記載された好ましい実施態様の別の特徴によって、リガンド結合ドメインは、細胞表面の受容体のリガンド結合ドメインである。その細胞表面の受容体は、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリンキナーゼ、受容体トレオニンキナーゼ、細胞接着分子及びホスファターゼ受容体からなる群から選択できる。

【００６７】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、細胞傷害性分子は、Ｆａｓ、ＴＮＦＲ及びＴＲＡＩＬからなる群から選択される。

【００６８】

本発明のさらに別の側面によって、前記核酸構築物を組織中に発現させ次いでさらに組織にリガンド結合ドメインのリガンドを提供することによって実施される、組織中の血管形成をダウンレギュレートする方法が提供される。

【００６９】

本発明のさらに別の側面によって、血管形成細胞の部分集団に細胞傷害性を生成するように設計され配置構成された核酸構築物を、組織に提供することによって実施される組織の血管形成をダウンレギュレートする方法が提供される。その核酸構築物は、（ａ）細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合されたリガンド結合ドメインを含むキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域及び（ｂ）血管形成細胞の部分集団におけるキメラポリペプチドの発現を指向させるためのシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含有している。前記リガンド結合ドメインは、血管形成細胞の部分集団中に存在するリガンドに結合できるか又はその部分集団に提供されるように選択され、そしてリガンドがリガンド結合領域に結合すると、前記細胞傷害性分子のエフェクタードメインを活性化させて組織の血管形成をダウンレギュレートする。

【００７０】

本発明のさらに別の側面によって、（ａ）血管形成細胞の部分集団に細胞傷害性を発生するように設計され配置構成された核酸構築物であって、（ｉ）リガンドがリガンド結合ドメインに結合すると続いて活性化されるように選択された、細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合されたリガンド結合ドメインを含有するキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域及び（ｉｉ）血管形成細胞の部分集団中におけるキメラポリペプチドの発現を指向させるシス活動調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含有する核酸構築物を、組織中に発現させ；次いで（ｂ）組織にリガンドを提供して組織の血管形成をダウンレギュレートすることによって実施される組織の血管形成をダウンレギュレートする方法が提供される。

【００７１】

本発明のさらに別の側面によって、有効成分として、血管形成細胞の部分集団に細胞傷

害性を発生するように設計され配置構成された核酸構築物及び医薬的に許容できる担体を含有する、組織の血管形成をダウンレギュレートする医薬組成物が提供される。その核酸構築物は、（ａ）細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合されたリガンド結合ドメインを含有するキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域、及び（ｂ）血管形成細胞の部分集団中における前記キメラポリペプチドの発現を指向させるシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含有し、そのリガンド結合ドメインは、特定の組織又は細胞中に存在するリガンドに結合できるように選択され、その結果リガンドがリガンド結合領域に結合すると細胞傷害性分子のエフェクタードメインが活性化される。

【００７２】

本発明のさらに別の側面によって、過剰の血管新生に関連する疾患又は症状を治療する方法が提供される。この方法は、血管形成細胞の部分集団に細胞傷害性を発生するように設計され配置構成された核酸構築物であって、（ｉ）細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合されたリガンド結合ドメインを含有するキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域及び（ｉｉ）血管形成細胞の部分集団中における前記キメラポリペプチドの発現を指向させるシス活動調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含有する核酸構築物の治療有効量を、投与することによって実施され、そしてそのリガンド結合ドメインは血管形成細胞の部分集団中に存在するリガンドに結合するように選択されるか又はその部分集団に提供され、その結果リガンドがリガンド結合領域に結合すると、細胞傷害性分子のエフェクタードメインが活性化されて組織の血管形成がダウンレギュレートされ、過剰の血管新生に関連する疾患又は症状が治療される。また、腫瘍の細胞に細胞傷害性を発生させるように設計され配置構成された核酸構築物の治療有効量を治療のため投与することによって行われる被験者の腫瘍を治療する方法も提供される。

【００７３】

本発明のさらに別の側面によって、血管形成細胞の部分集団に血管形成を発生するように設計され配置構成された核酸構築物の治療有効量を治療のために投与し、その結果、組織の血管形成をアップレギュレートして虚血に関連する疾患又は症状を治療することによって行なわれる虚血に関連する疾患又は症状を治療する方法が提供される。その核酸構築物は、（ｉ）プロ血管形成因子をコードする第一ポリヌクレオチド領域及び（ｉｉ）血管形成細胞の部分集団におけるプロ血管形成因子の発現を指向させるためのシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含有している。

【００７４】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、虚血に関連する疾患又は症状は、創傷の治癒、虚血性発作、虚血性心臓疾患及び胃腸の損傷からなる群から選択される。

【００７５】

本発明のさらに別の側面によって、（ａ）血管形成細胞に細胞傷害性を発生するように設計され配置構成された核酸構築物であって、（ｉ）自殺遺伝子をコードする第一ポリヌクレオチド領域及び（ｉｉ）血管形成細胞内における自殺遺伝子の発現を指向させることができるシス活動調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含有する核酸構築物を組織中に発現させ、次いで（ｂ）組織に、プロドラッグが自殺遺伝子によって毒性化合物に変換されると組織のアポトーシスを起こすのに十分な量のプロドラッグを組織に提供して、組織の血管形成をダウンレギュレートすることによって行なわれる組織の血管形成をダウンレギュレートする方法が提供される。

【００７６】

本発明のさらに別の側面によって、有効成分として、血管形成細胞に細胞傷害性を発生するように設計され配置構成された核酸構築物及び医薬的に許容できる担体を含有する、組織の血管形成をダウンレギュレートする医薬組成物が提供される。その核酸構築物は、（ａ）プロドラッグを毒性化合物に変換できる自殺遺伝子をコードする第一ポリヌクレオチド領域及び（ｂ）血管形成細胞における自殺遺伝子の発現を指向させることができるシ

ス活動調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含有している。

【００７７】

本発明のさらに別の側面によって、（ａ）プロドラッグを毒性化合物に変換できる自殺遺伝子をコードする第一ポリヌクレオチド領域及び（ｂ）血管形成細胞における自殺遺伝子の発現を指向させることができるシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含有する核酸構築物が提供される。また、本発明の核酸構築物で形質転換された真核細胞も提供される。

【００７８】

本発明のさらに別の側面によって、血管形成細胞に細胞傷害性を発生するように設計され配置構成された核酸構築物を被験者に投与することによって実施される、被験者の組織の血管形成をダウンレギュレートする方法が提供される。その核酸構築物は、（ａ）自殺遺伝子をコードする第一ポリヌクレオチド領域及び（ｂ）血管形成細胞中における自殺遺伝子の発現を指向させることができるシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含有し、その自殺遺伝子としては、プロドラッグを、細胞障害性を起こすことができる毒性化合物に変換できるものが選択され、その結果、組織の血管形成がダウンレギュレートされる。本発明のさらに別の実施態様によって、血管形成細胞に細胞傷害性を発生するように設計され配置構成された本発明の核酸構築物の治療有効量を投与して、組織の血管形成をダウンレギュレートし、過剰血管新生に関連する疾患又は症状を治療することによって行われる過剰血管新生に関連する疾患又は症状を治療する方法が提供される。

【００７９】

本発明のさらに別の側面によって、腫瘍の細胞に細胞傷害性を発生するように設計され配置構成された核酸構築物であって、（ｉ）自殺遺伝子をコードする第一ポリヌクレオチド領域及び（ｉｉ）腫瘍の細胞における自殺遺伝子の発現を指向させることができるシス活動調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含有し、その自殺遺伝子としては、プロドラッグを、腫瘍細胞に細胞傷害性を生じさせることができる毒性化合物に変換できるものが選択されている核酸構築物の治療有効量を投与することによって実施される被験者の腫瘍を治療する方法が提供される。

【００８０】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、自殺遺伝子は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ、水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼ及び細菌のシトシンデアミナーゼの遺伝子からなる群から選択される。

【００８１】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、プロドラッグは、ガンシクロビル、アシクロビル、１－５－ヨードウラシル、ＦＩＡＵ、５－フルオロシトシン、６－メトキシプリンアラビノシド及びそれらの誘導体からなる群から選択される。

【００８２】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、自殺遺伝子は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼの遺伝子であり、そしてプロドラッグはガンシクロビル、アシクロビル、ＦＩＡＵ又はそれらの誘導体である。

【００８３】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、自殺遺伝子は細菌のシトシンデアミダーゼの遺伝子であり、そして前記プロドラッグは５－フルオロシトシン又はその誘導体である。

【００８４】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、自殺遺伝子は水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼの遺伝子であり、そして前記プロドラッグは６－メトキシプリンアラビノシド又はその誘導体である。

【００８５】

記載された好ましい実施態様のさらなる特徴によって、前記治療法には、相乗作用方式で前記細胞傷害性をさらに高めることができる少なくとも一つの追加の治療法を選択し、

併用して提供することが含まれている。その少なくとも一つの追加の治療法は、化学療法、放射線療法、放射線療法と光力学療法、外科療法、栄養療法、切除療法、放射線療法と化学療法を併用した方法、小線源療法（ｂｒａｃｈｉｏｔｈｅｒａｐｙ）、陽子線療法、免疫療法、細胞療法及び陽子線放射線外科療法を含む群から選択できる。

【００８６】

下記の本発明の好ましい実施態様のさらなる特徴によって、核酸配列は、配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合された配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部を含むシス調節因子を含有する単離されたポリヌクレオチドを含有し、その単離されたポリヌクレオチドは、それに転写的に連結されたポリヌクレオチド配列の真核細胞における転写を指向させることができる。配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部は、前記シス調節因子中の配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部の上流に配置してもよく又は配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部は配列番号：１５に記載の配列の前記少なくとも一部の上流に配置してもよい。

【００８７】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、シス調節因子はさらに、配列番号：６に記載の配列の少なくとも一つのコピー又は配列番号：６の少なくとも二つのコピーを含有している。その配列番号：６の少なくとも二つのコピーは隣接していてもよい。

【００８８】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部が配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部にリンカーポリペプチドの配列を介して共有結合されている。そのリンカーポリペプチドの配列はプロモーター及び／又はエンハンサーの配列でもよい。

【００８９】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号：１に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含んでいる。

【００９０】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、単離されたポリヌクレオチドはさらに低酸素応答因子を含んでいるが、その低酸素応答因子は好ましくは配列番号：５に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含んでいる。

【００９１】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、シス調節因子は配列番号：７に記載の配列である。

【００９２】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、核酸構築物はさらに、条件付で複製するアデノウイルスを含んでいる。

【００９３】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、このウイルスの治療有効量は、約10^{3}－約10^{16}、好ましくは10^{5}－10^{13}そしてより好ましくは10^{7}－約10^{12}個のウイルス粒子である。

【００９４】

さらに別の特徴によって、医薬組成物は少なくとも10^{8}個のウイルス粒子を含有している。

【００９５】

記載された好ましい実施態様のさらに別の特徴によって、前記シス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択

される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的プロモーターである。

【００９６】

本発明は、新規のエンハンサー配列付きシス調節因子を含む単離されたポリヌクレオチド配列及びその使用法を提供することによって、現在知られている配置構成の欠点を成功裡に処理できる。この新規のエンハンサー配列は、導入遺伝子の発現を組織特異的に調節し並びに各種の障害、疾患及び症状を遺伝子治療で治療するのに使う核酸構築物及び医薬組成物を製造するのに使用できる。具体的に述べると、本発明のシス調節因子、単離されたポリヌクレオチド及び医薬組成物を、選択された導入遺伝子とともに使用して、内皮細胞の血管形成を特異的にアップレギュレート及び／又はダウンレギュレートして、腫瘍、転移腫瘍性疾患及び虚血性疾患を治療できる。

【００９７】

図面の簡単な記述

【００９８】

本発明は、例のみとして、添付された図面を参照してここに記載される。次に図面を詳細に特に参照することにより、示される特定の事項は、例としてであり、かつ本発明の好ましい実施形態の例示的な議論のためだけであり、そして本発明の原理及び概念的局面の最も有用かつ容易に理解される記載であると考えられるものを提供するために示されることに重点が置かれている。この点に関して、本発明の基本的な理解のために必要とされるよりも詳しく本発明の構造的詳細を示すことはなされていないが、図面とともに理解される説明により、本発明のいくつかの形態がいかにして実際に具体化され得るかが当業者には明らかになる。

【００９９】

図１ａ～ｂはＴＮＦＲ１の細胞外領域ならびにＦａｓの膜貫通領域及び細胞内領域から構築され、ｐｃＤＮＡ３プラスミドにクローン化されたＦａｓキメラ遺伝子（ａ）又はアデノウイルスベクターにクローン化されたＦａｓキメラ遺伝子（ｂ）の概略図である。

【０１００】

図２ａ～ｂはプロアポトーシス遺伝子（Ｆａｓキメラ及びＴＮＦＲ１）のアポトーシス活性を例示する。図２ａには、ｐｃＤＮＡ－３－ＴＮＦＲ１（下段パネル）又は対照空ベクター（上段パネル）のいずれか、及びＧＦＰをコードする発現ベクターでトランスフェクションされたウシ大動脈内皮細胞（ＢＡＥＣ）が例示される。図２ｂには、ｐｃＤＮＡ－３－Ｆａｓ－ｃ（下段パネル）又は対照空ベクター（上段パネル）のいずれか、及びＧＦＰをコードする発現ベクターでトランスフェクションされた２９３細胞が例示される。トランスフェクション細胞は、蛍光顕微鏡観察を使用して可視化され、アポトーシス活性が形態学的に決定された。

【０１０１】

図３ａ～ｆはプロアポトーシス遺伝子でトランスフェクションされたＢＡＥＣ細胞の電子顕微鏡観察像である。トランスフェクションの２４時間後、ＢＡＥＣ細胞を２．５％グルタルアルデヒドで固定処置し、加工した。アポトーシス過程の連続した段階にある細胞が示される。

【０１０２】

図４はトランスフェクションされたＢＡＥＣ細胞及び２９３細胞における示されたプロアポトーシス遺伝子のアポトーシス活性を定量するヒストグラムである。

【０１０３】

図５ａはＡｄＰＰＥ－Ｆａｓ－ｃのＰＣＲ分析を示す。レーン１～２－ＰＰＥ－１プロモーター及びＦａｓ－ｃ遺伝子を包含するプロモーターを使用して得られたＰＣＲ産物。レーン３～４－Ｆａｓ－ｃプライマーを使用して得られたＰＣＲ産物。レーン５～６－テンプレートＤＮＡの非存在下で得られたＰＣＲ産物。

【０１０４】

図５ｂは、ＡｄＰＰＥ－Ｆａｓ－ｃでトランスフェクションされたＢＡＥＣ細胞のウエスタンブロット分析である。タンパク質サンプルをＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離し、ニ

トロセルロースメンブランに転写し、そしてＴＮＦＲ１の細胞外部分に対して指向されたポリクローナル抗体でプローブした。レーン１～２－ｐｃＤＮＡ３－Ｆａｓ－ｃのＢＡＥＣトランスフェクション細胞（陽性対照）。レーン３～４－ＡｄＰＰＥ－Ｆａｓ－ｃウイルスの示されたＭＯＩでトランスフェクションされたＢＡＥＣ細胞。レーン５－非トランスフェクション細胞。レーン６～７－ＡｄＰＰＥ－Ｌｕｃの示されたＭＯＩでトランスフェクションされたＢＡＥＣ細胞。

【０１０５】

図６ａ～ｄは内皮細胞のアポトーシスに対するＦａｓ－キメラの過剰発現の影響を例示する顕微鏡写真である。ＢＡＥＣ細胞に、Ａｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－キメラ（図６ａ）；Ａｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－ルシフェラーゼ（図６ｂ）；Ａｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－キメラ及びＡｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－ＧＦＰ（図６ｃ）；Ａｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－ルシフェラーゼ及びＡｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－ＧＦＰ（図６ｄ）を、それぞれ１０００のＭＯＩで感染させた。顕微鏡写真は、感染の７２時間後、ｘ１０の倍率で撮影された。

【０１０６】

図７は内皮細胞に対するＡｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－キメラのアポトーシス特異的作用を例示するヒストグラムである。内皮細胞（ＢＡＥＣ、ＨＵＶＥＣ）及び非内皮細胞（正常な皮膚繊維芽細胞－ＮＳＦ）の生存率を、Ａｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－キメラウイルス又は対照（ルシフェラーゼ）ウイルスのいずれかによる感染の７２時間後にクリタルバイオレット染色によって定量した。

【０１０７】

図８はＦａｓ－キメラにより媒介されるアポトーシスに対するＴＮＦα投与の用量応答作用を示す。ＢＡＥＣにＡｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－ｃを感染させた。感染の４８時間後、ＴＮＦを増殖培地に（示された用量で）加えた。生存率を、その２４時間後にクリタルバイオレットアッセイによって測定した。

【０１０８】

図９ａ～ｅはＴＮＦαリガンド及びＦａｓ－ｃ受容体の共同作用により媒介される内皮細胞特異的なアポトーシスを例示する顕微鏡写真である。示された細胞は、Ａｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－ｃによる感染後４８時間、ＴＮＦα（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下又は非存在下でインキュベーションされた。クリタルバイオレット染色が感染の７２時間後に行われた。

【０１０９】

図１０ａは、内皮細胞に対するＡｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－ｃのＴＮＦα依存的アポトーシス作用を例示する用量応答曲線である。Ａｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－キメラの示されたＭＯＩを感染させたＢＡＥＣ細胞の生存率をＴＮＦαとのインキュベーション後に測定した。

【０１１０】

図１０ｂ～図１０ｄは、非内皮細胞ＮＳＦに対する、ＴＮＦαリガンド及びＡｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－キメラのアポトーシス作用を例示する。図１０ｂ－対照ウイルスを感染させたＮＳＦ。図１０ｃ－Ａｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－キメラを感染させたＮＳＦ。図１０ｄ－Ａｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－キメラを感染させ、ＴＮＦ（１０ｎｇ／ｍｌ）とインキュベーションされたＮＳＦ。

【０１１１】

図１１ａ～ｃはＡｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－ｃのインビボ抗腫瘍作用を例示する。Ｂ１６メラノーマ細胞を接種したマウスに対して、腫瘍が触診可能となったときに、Ａｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－ｃ、Ａｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－キメラ、対照ウイルス又は生理食塩水を静脈内注射した。

【０１１２】

図１１ａ－処置期間中に測定された腫瘍面積。図１１ｂ－処置期間が終了した時の腫瘍重量。図１１ｃ－Ａｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－ｃ処置マウス及び対照マウスにおける腫瘍の状態を表す画像。

【０１１３】
図１２は、対照としてＢ２Ｂ細胞系（エンドセリンを発現する気管支の細胞系）を使用した、ウシ及びヒト両方の内皮細胞系におけるルシフェラーゼ発現に対する、本発明のエンハンサー因子の効果を例示するヒストグラムである。
【０１１４】
図１３は、様々な細胞系におけるルシフェラーゼ発現に対する、アデノウイルスベクター内の本発明のプロモーターの内皮特異性を例示するヒストグラムである。
【０１１５】
図１４Ａ及び１４Ｂは、ＢＡＥＣ細胞系における、本発明のＡｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘ（１４Ａ）及びＡｄ５ＣＭＶ（１４Ｂ）対照構築物の調節下でのＧＦＰ発現を例示する光学顕微鏡写真である。
【０１１６】
図１５は、内皮細胞及び非内皮細胞におけるｐＡＣＰＰＥ－１－３Ｘｐ５５、ｐＡＣＰＰＥ－１－３Ｘルシフェラーゼ、及びｐＣＣＭＶｐ５５により誘導されたアポトーシス率（％）のヒストグラムである。
【０１１７】
図１６は、本発明に係るエンハンサー因子のプロモーター構築物への導入の、低酸素応答に対する効果を例示するヒストグラムである。
【０１１８】
図１７は、本発明に係るエンハンサー因子の、アデノベクター構築物のプロモーターへの導入の、低酸素応答に対する効果を例示するヒストグラムである。
【０１１９】
図１８は、本発明に係るエンハンサー因子のプロモーターへの導入の、ウシ及びヒトの内皮のエンドセリン発現細胞系における発現レベルに対する効果を例示するヒストグラムである。
【０１２０】
図１９は、内皮プロモーター（ＰＰＥ－１）又は対照（ＣＭＶ）プロモーターいずれかを含有しているアデノウイルス構築物の注射後に、様々な器官において観察されたレポーター遺伝子の発現レベルを例示するヒストグラムである。
【０１２１】
図２０Ａ～Ｂは、構築物を注射されたマウスの肝組織におけるＡｄ５ＣＭＶＧＦＰ構築物（図２０Ａ）及びＡｄ５ＰＰＥ－１－ＧＦＰ構築物（図２０Ｂ）の細胞発現を例示する二つの光学顕微鏡写真である。
【０１２２】
図２１は、本発明に係るエンハンサー因子のプロモーターへの導入の、内皮細胞系及び非内皮細胞系における発現レベルに対する効果を例示するヒストグラムである。
【０１２３】
図２２は、本発明に係るエンハンサー因子のプロモーターへの導入の、内皮細胞系及び非内皮細胞系における発現レベルに対する効果を例示するヒストグラムである。
【０１２４】
図２３Ａ～Ｃは、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰにより形質導入された細胞、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰにより形質導入された細胞、及びＡｄ５ＣＭＶＧＦＰにより形質導入された細胞におけるＧＦＰ発現を例示する顕微鏡写真である。
【０１２５】
図２４Ａ～Ｂは、ｍｏｉ－１のＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰ及びＡｄ５ＣＭＶＧＦＰによりそれぞれ形質導入されたＳＭＣにおけるＧＦＰ発現を例示する。
【０１２６】
図２５Ａ～Ｂは、ＨｅＬａ細胞において行われた図２４Ａ～Ｂの実験と類似の実験の結果を示す。
【０１２７】

図２６Ａ～Ｂは、ＨｅｐＧ２細胞において行われた図２４Ａ～Ｂの実験と類似の実験の結果を示す。

【０１２８】

図２７Ａ～Ｂは、ＮＳＦ細胞において行われた図２４Ａ～Ｂの実験と類似の実験の結果を示す。

【０１２９】

図２８Ａ～Ｂはそれぞれ、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰ及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰを注射されたマウスの血管を裏打ちしている内皮細胞におけるＧＦＰ発現を例示する顕微鏡写真である。

【０１３０】

図２９Ａ～Ｃは、注射されたマウスの腎組織からの結果を例示する顕微鏡写真である。Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰを注射されたマウス（図２９Ａ）、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰ（図２９Ｂ；わずかに高度のＧＦＰ発現が血管壁に可視である；矢印によって示されている）、及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰ（図２９Ｃ）。

【０１３１】

図３０Ａ～Ｃは、脾組織切片に対して行われた、図２９Ａ～Ｃに図示された実験と類似の実験を例示する。

【０１３２】

図３１Ａ～Ｄ及び図３１Ｃ’～Ｄ’は、生理食塩水を注射された対照マウス（図３１Ａ）、Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰを注射されたマウス（図３１Ｂ）、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰを注射されたマウス（図３１Ｃ）、及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰを注射されたマウス（図３１Ｄ）の転移肺におけるＧＦＰ発現を例示する。抗Ｃｄ３１免疫染色（図３１Ｃ’～３１Ｄ’）は、各転移組織におけるＧＦＰ発現及びＣＤ３１発現の共局在を確証している。

【０１３３】

図３２は、マウスＰＰＥ－１プロモーターを含有しているプラスミドによりトランスフェクトされたＢＡＥＣにおけるルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）が、トランスフェクトされた細胞を低酸素条件下でインキュベートした場合に、有意に高くなることを例示するヒストグラムである。

【０１３４】

図３３は、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ及びＡｄ５ＣＭＶＬｕｃが利用されたことを除き、図３２と同様のヒストグラムである。

【０１３５】

図３４は、種々の細胞系における低酸素の効果を示す、図３３と同様のヒストグラムである。

【０１３６】

図３５は、本発明の３Ｘ配列の、ＢＡＥＣ細胞におけるＰＰＥ－１低酸素応答に対する効果を例示するヒストグラムである。細胞は、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃにより形質導入された。

【０１３７】

図３６は、大腿動脈結紮後のＰＰＥ－１－Ｌｕｃトランスジェニックマウスの様々な組織におけるルシフェラーゼ発現のレベルを示すヒストグラムである。

【０１３８】

図３７Ａ～Ｂは、本発明と併せて利用された構築物のプラスミド地図である。

【０１３９】

図３８Ａ～Ｆはマウスの虚血肢における血液灌流及び血管形成に対するＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ及びＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦの効果を示す。図３８Ａ～Ｄは結紮の２１日後に捕らえられた様々な処置群からのマウスの虚血肢における灌流の代表的な超音波（ＵＳ）血管造影画像である。黄色のシグナルは強い灌流を表す。画像の右側は肢の遠位末端を表す。図３８Ａ：Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ処置マウス；図３８Ｂ：Ａｄ５ＣＭ

ＶＶＥＧＦ処置マウス；図３８Ｃ：対照の生理食塩水処置マウス；図３８Ｄ：対照の正常な肢。図３８Ｅ～Ｆは様々な処置群のＵＳ画像におけるシグナルの平均強度を示すヒストグラム（３８Ｅ）；様々な処置群におけるＣＤ３１＋細胞／ｍｍ^{2}の数として測定された平均毛管密度を示すヒストグラム（図３８Ｆ）である。

【０１４０】

図３９は、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（白バー）及びＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（黒バー）により形質導入された増殖期及び休止期のウシ大動脈内皮細胞（ＢＡＥＣ）におけるルシフェラーゼ活性を例示するヒストグラムである。

【０１４１】

図４０は、ＶＥＧＦ添加後の正常増殖中、休止状態、及び急速増殖中のＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃにより形質導入されたＢＡＥＣにおけるルシフェラーゼ活性を例示するヒストグラムである。

【０１４２】

図４１Ａ～Ｂは、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ及びＡｄ５ＣＭＶＬｕｃを注射された正常Ｃ５７ＢＬ／６マウスの大動脈（図４１Ａ）及び肝臓（図４１Ｂ）におけるルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。活性は、注射後１日目（ｎ＝１３）、５日目（ｎ＝３４）、１４日目（ｎ＝３２）、３０日目（ｎ＝２０）、及び９０日目（ｎ＝１１）に決定された。

【０１４３】

図４２Ａ～Ｂは、注射された正常なＢＡＬＢ／Ｃマウスにおける、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（白バー）又はＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（黒バー）の注射後５日目（図４２Ａ）及び１４日目（図４２Ｂ）（各時点についてｎ＝１０）に検出された相対ルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。活性は、各動物の全身ルシフェラーゼ発現に対する比率（％）として表されている。

【０１４４】

図４３は、スーダン－ＩＶにより着色されたＡｐｏＥ欠損マウスから解剖された大動脈を図示する先行技術の画像である。胸大動脈は、比較的少ない赤色に染色されたアテローム性動脈硬化巣を含有しており、腹領域は、多くの赤色に染色されたアテローム性動脈硬化巣を含んでいる。（^{125}Ｉ－ＨＤＬ及び、^{125}Ｉ－ＢＳＡによる大動脈アテローム性動脈硬化巣の画像法（Ａ．Ｓｈａｉｓｈ ｅｔ ａｌ、Ｐａｔｈｏｂｉｏｌｏｇｙ ２００１；６９：２２５－２９）より編集した）。

【０１４５】

図４４は、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（白バー；ｎ＝１２）又はＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（黒バー；ｎ＝１２）のＡｐｏＥ欠損マウスへの全身注射後５日目に検出された絶対ルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。高い病巣レベルを含有している腹大動脈から、及び、胸区域（低い病巣レベル）から、ルシフェラーゼ活性が観察された。

【０１４６】

図４５は、創傷治癒中のＣ５７ＢＬ／６誘導マウスへのＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（黒バー）又はＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（白バー）の全身注射後５日目の絶対ルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。

【０１４７】

図４６は、ルイス肺癌誘導マウスの正常肺、転移肺、及び原発腫瘍におけるルシフェラーゼ活性を例示するヒストグラムである。ルイス肺癌は、原発腫瘍モデルについては背部へ、転移モデルについては足蹠へ、Ｄ１２２－９６細胞を注射することによって誘導された。ルシフェラーゼ活性は、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（ｎ＝９；白バー）又はＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（ｎ＝１２；黒バー）の全身注射後５日目に測定された。活性は光単位／μｇタンパク質として表されている。

【０１４８】

図４７Ａ～Ｄは、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰの腫瘍内注射後のＬＬＣ保持マウスの肺及び

腫瘍におけるＧＦＰ発現及び組織形態学を例示する顕微鏡写真である。組織は、ＯＣＴ中で凍結させられ、低温槽によって１０μｍに切片化された。写真は全て、２５×の倍率で撮影された。図４７Ａ－肺転移の血管形成性血管におけるＧＦＰ；図４７Ｂ－図４７Ａに描写された切片のＣＤ３１抗体免疫染色；図４７Ｃ－原発腫瘍の血管におけるＧＦＰ発現；図４７Ｄ－血管を例示するＣの切片の位相差。

【０１４９】

図４８は、Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃ、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ、及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘ－Ｌｕｃを注射されたルイス肺癌誘導マウスの正常肺及び転移肺におけるルシフェラーゼ発現を例示するヒストグラムである。ルイス肺癌は、転移モデルについては足蹠に注射されたＤ１２２－９６細胞によって誘導された。ルシフェラーゼ活性は、Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃ（ｎ＝７；黒バー）、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（ｎ＝６；灰色バー）、又はＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃ（ｎ＝１３；茶色バー）の全身注射後５日目に測定された。活性は光単位／μｇタンパク質として表されている。

【０１５０】

図４９は、Ａｄ５ＣＭＶ、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ、及びＡｄ５ＰＰＥ－１（３Ｘ）を注射されたルイス肺癌誘導マウスの正常肺及び肺転移における肝臓活性に対する比率（％）（肝臓を１００％とした場合）としてのルシフェラーゼ活性を例示するヒストグラムである。

【０１５１】

図５０Ａ～Ｂは、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘ－ＧＦＰを注射されたＬＬＣ肺転移を有するマウスにおけるＧＦＰ発現（図５０Ａ）及びＣｄ３１免疫染色（図５０Ｂ）の共局在を例示する顕微鏡写真である。

【０１５２】

図５１は、大腿結紮後２日目、５日目、１０日目、及び１８日目のＰＰＥ－１ルシフェラーゼトランスジェニックマウスの筋肉（虚血及び正常）、並びに対照（非結紮動物－０日目；各群ｎ＝８）におけるルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。

【０１５３】

図５２は、大腿結紮後５日目（ｎ＝６）、１０日目（ｎ＝６）、及び１８日目（ｎ＝８）のＰＰＥ－１ルシフェラーゼトランスジェニックマウスの肝臓、肺、及び筋肉内（虚血及び正常）大動脈、並びに対照（非結紮動物－０日目）におけるルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。

【０１５４】

図５３は、Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃ（黒バー）又はＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（白バー）を原発腫瘍内に注射されたＬＬＣマウスの肝臓、肺、及び原発腫瘍において検出されたルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。

【０１５５】

図５４Ａ～Ｈは様々なトランスジーンの組織特異的又は構成的発現の組織分布を示すインサイチュー（ｉｎ－ｓｉｔｕ）ハイブリダイゼーション画像である。図５４Ａ～Ｃはそれぞれ以下のマウスからの代表的な虚血筋肉におけるＶＥＧＦ特異的アンチセンスプローブを用いたインサイチューハイブリダイゼーションを示す：図５４ＡはＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ処置マウス；図５４ＢはＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦ処置マウス；図５４Ｃは生理食塩水処置マウス；図５４ＤはＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦ処置マウスからの肝臓切片。矢印は正に染色された細胞を示す。図５４Ｅ～Ｇはそれぞれ以下のマウスからの代表的な虚血筋肉のＰＤＧＦ－Ｂ特異的アンチセンスプローブを用いたインサイチューハイブリダイゼーションを示す：図５４ＥはＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂ処置マウス；図５４ＦはＡｄ５ＣＭＶＰＤＧＦ－Ｂ処置マウス；図５４Ｇは生理食塩水処置マウス；図５４ＨはＡｄ５ＣＭＶＰＤＧＦ－Ｂ処置マウスからの肝臓切片。

【０１５６】

図５５Ａ～Ｂはマウスの虚血肢における血液灌流及び血管形成に対するＡｄ５ＰＰＥ－

１－３ＸＶＥＧＦ又はＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦの長期間の効果を示すヒストグラムである。図５５Ａは大腿動脈結紮後５０日目の様々な処置群のＵＳ画像におけるシグナルの平均強度を示すヒストグラムであり、図５５Ｂは大腿動脈結紮後７０日目の様々な処置群におけるＣＤ３１＋細胞／ｍｍ^{2}の数として測定された平均毛管密度を示すヒストグラムである。

【０１５７】

図５６Ａ～Ｄはマウスの虚血肢における新生血管形成に対するＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂの初期及び長期間の効果を示すヒストグラムである。図５６Ａ～ＢはＵＳ画像形成によって測定された平均灌流強度（図５６Ａは大腿動脈結紮後３０日目のものであり；図５６Ｂは大腿動脈結紮後８０日目のものである）を示す。図５６Ｃ～Ｄは様々な処置群におけるＣＤ３１＋細胞／ｍｍ^{2}の数として測定された平均毛管密度（図５６Ｃは大腿動脈結紮後３５日目のものであり；図５６Ｄは大腿動脈結紮後９０日目のものである）を示す。

【０１５８】

図５７Ａ～Ｇはマウス虚血肢における新生血管形成及び血液の流れに対する内皮特異的又は構成的プロモーターの制御下での、ＰＤＧＦ－Ｂ及びＶＥＧＦを単独で又は組合せて用いた血管形成治療の長期間の効果を示す。

図５７Ａは大腿動脈結紮後８０日目の様々な処置群のＵＳ画像におけるシグナルの平均強度を示し、図５７Ｂは大腿動脈結紮後９０日目の様々な処置群におけるＣＤ３１＋細胞／ｍｍ^{2}の数として測定された平均毛管密度を示す。図５７Ｃ～Ｇは大腿動脈結紮後９０日目の虚血肢筋肉における成熟した血管に対する平滑筋細胞の増加を示す。平滑筋は抗α－ＳＭアクチン抗体を用いて免疫染色される（赤色で、Ｘ２０）。図５７ＣはＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂ処置マウス；図５７Ｄは組合せ治療で処置されたマウス；図５７ＥはＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ処置マウス；図５７Ｆは対照のＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰ処置マウス；図５７Ｇは正常な反対側の肢を示す（大きな血管のみが染色されていることに注意すること）。

【０１５９】

図５８は動脈結紮後５０日目のマウス虚血肢における血液灌流に対するＰＤＧＦ－Ｂ単独での又は血管形成因子ＶＥＧＦとの組合せでの効果を示す。

【０１６０】

図５９は遺伝子によって指向された酸素プロドラッグ治療（ＧＤＥＰＴ）の基本原理を示す模式図である。

【０１６１】

図６０Ａ－ＢはプラスミドｐＥＬ８（３ｘ）－ＴＫの構造を示す模式マップである。図６０ＡはプラスミドｐＥＬ８（３ｘ）－ＴＫの構造を示す模式マップである。図６０ＢはプラスミドｐＡＣＰＰＥ－１（３ｘ）－１－ＴＫのマップである。

【０１６２】

図６１は、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫベクターのＰＣＲ産物をアガロースゲルで分離しＵＶ蛍光で可視化したものを示す図である。二種のプライマーすなわち前進プライマーの５’－ｃｔｃｔｔｇａｔｔｃｔｔｇａａｃｔｃｔｇ－３’（プレープロエンドセリンプロモーターの配列中の４５５－４７４ｂｐ）（配列番号：９）及び逆進プライマーの５’－ｔａａｇｇｃａｔｇｃｃｃａｔｔｇｔｔａｔ－３’（ＨＳＶ－ＴＫ遺伝子の配列中の１０６５－１０８４ｂｐ）（配列番号：１０）を使用した。他のベクターに特異的なプライマーはＰＣＲ産物を提供しなかった。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫウイルスにおけるＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーター及びＨＳＶ－ＴＫ遺伝子の存在を証明する１ｋｂのバンドに注目されたい。レーン１：１００ｂｐの大きさのマーカーラダー。レーン２：　ｐＡＣＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫプラスミド。レーン３：ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫウイルス。レーン４：ＤＮＡなし。

【０１６３】

図６２Ａ－Ｃは、ベクターのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ（図６２Ａ）、ＡｄＰＰＥ

－１（３ｘ）－Ｌｕｃ（図６２Ｂ）及びＡｄＣＭＶ－ＴＫ（図６２Ｃ）の線状模式マップである。

【０１６４】

図６３は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの上部内皮細胞の細胞傷害性を示す一連の顕微鏡写真である。ウシ大動脈の内皮細胞（ＢＡＥＣ）に、０．１、１、１０、１００及び１０００の感染多重度（ｍ．ｏ．ｉ．）でＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ、ＡｄＣＭＶ－ＴＫ及びＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃを形質導入した。形質導入してから４時間後にＧＣＶ（１μｇ／ｍｌ）を添加した。対照は、ベクターを形質導入してＧＣＶ無し又はこの形質導入なしでＧＶＣを添加された細胞である。試験は、９６ウエルプレートを使ってグループごとに１２ウエルずつ二回行なった。両対照ともに細胞死を誘発しなかった（データ記載せず）。ＡｄＣＭＶ－ＴＫより有意に低いｍ．ｏ．ｉ．にてＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）＋ＧＣＶで処置した細胞に明らかな細胞傷害性に特徴的な形状の変化（細胞の拡大、伸長及び膨張）及び細胞傷害性（集密状態の喪失）に注目されたい。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃを形質導入された細胞は健康のままであった（大きさが小さく、丸くて集密状態）。

【０１６５】

図６４は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの内皮細胞の細胞傷害性を示すグラフである。ＢＡＥＣを９６ウエルのプレート内に調製し、次いで図１３に示したようにして形質導入を行い、形質導入を行なってから４時間後に１μｇ／ｍｌのＧＣＶを添加し、ベクターを添加してから１０日後に、クリスタルバイオレットで染色して細胞の生存能力を測定した。ｍ．ｏ．ｉ．が高い場合、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）＋ＧＶＣの細胞傷害性が高いことに注目されたい。

【０１６６】

図６５は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫ及びガンシクロビルの投与の内皮細胞の細胞傷害性の優れた相乗作用を示す一連の顕微鏡写真である。ウシ大動脈の内皮細胞（ＢＡＥＣ）に、１０の感染多重度（ｍ．ｏ．ｉ．）で上記のようにしてＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ、ＡｄＣＭＶ－ＴＫ及びＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃを形質導入し、形質導入してから４時間後に、順次濃度を上げたＧＣＶ（表示したように、０．００１－１０μｇ／ｍｌの濃度）を添加した。対照は、ＧＣＶ無しのベクターの形質導入又はベクター無しのＧＣＶの添加の細胞であった。試験は、９６ウエルプレートを使ってグループごとに１２ウエルずつ二回行なった。両対照ともに細胞死を誘発しなかった（データ記載せず）。ＡｄＣＭＶ－ＴＫに暴露した細胞より有意に低い濃度のＧＣＶにてＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）＋ＧＣＶで処置した細胞に明らかな細胞傷害性に特徴的な形状の変化（細胞の拡大、伸長及び膨張）及び細胞傷害性（集密状態の喪失）に注目されたい。

【０１６７】

図６６は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫ及びガンシクロビル投与の内皮細胞の細胞傷害性の相乗作用を示すグラフである。ＢＡＥＣを９６ウエルのプレートで調製し、次いで図６５に示したようにして形質導入を行い、形質導入を行なってから４時間後に、順次濃度を上げたＧＣＶ（０．０００１－１０μｇ／ｍｌの濃度）を添加した。ベクターを添加してから１０日後に、クリスタルバイオレットで染色して細胞の生存能力を測定した。ＡｄＣＭＶ－ＴＫの構成ＴＫの強い発現と比較して、０．０１μｇ／ｍｌより高いＧＣＶの濃度におけるＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）＋ＧＣＶの高い細胞傷害性に注目されたい。

【０１６８】

図６７は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫ及びガンシクロビル投与の内皮細胞の細胞傷害性の特異的相乗作用を示す一連の顕微鏡写真である。内皮細胞［ウシ大動脈の内皮細胞（ＢＡＥＣ）、ヒトの臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）］及び非内皮細胞［ヒトの肝臓癌細胞（ＨｅｐＧ－２）、ヒトの正常な皮膚繊維芽細胞（ＮＳＦ）］に、１０の　ｍ．ｏ．ｉ．でＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃ又はＡｄＣＭＶ－ＴＫを形質導入し、形質導入してから４時間後に、１μｇ／ｍｌのＧ

ＣＶを添加した。試験は、９６ウエルプレートを使って、グループごとに１２ウエルずつ二回行なった。細胞傷害性と細胞の形状変化は、形質導入してから４日後に、顕微鏡で検出した。ＢＡＥＣ及びＨＵＶＥＣの培養物中のＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの高い細胞傷害作用［細胞傷害性に特徴的な形状の変化（細胞の拡大、伸長及び膨張）及び細胞傷害性（集密状態の喪失）］並びにＨｅｐＧ－２とＮＳＦにはこの作用がないこと（細胞が小さく、丸くかつ集密状態のままである）に注目されたい。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃ＋ＧＣＶはすべての細胞型に対して非毒性であった。

【０１６９】

図６８は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫ及びガンシクロビル投与の内皮細胞の細胞傷害性の特異的相乗作用を示すヒストグラムである。内皮細胞（ＢＡＥＣとＨＵＢＥＣ）及び非内皮細胞（ＨｅｐＧ－２とＮＳＦ）を９６ウエルのプレートに調製し、図６７に示したようにして形質導入し、形質導入を行なってから４時間後に、ＧＣＶ（１μｇ／ｍｌ）を添加した。ベクターを添加してから１０日後に、クリスタルバイオレットで染色して細胞の生存能力を測定した。ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶの非特異的細胞傷害性と比較して、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）＋ＧＣＶの高い特異的細胞傷害性に注目されたい。

【０１７０】

図６９は、極端に高い感染多重度におけるＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫ及びガンシクロビル投与の内皮細胞傷害性の選択的相乗作用を示す一連の顕微鏡写真である。非内皮細胞（ＮＳＦ）に、図６６に示したようにして１００という高い　ｍ．ｏ．ｉ．にてＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃ　又はＡｄＣＭＶ－ＴＫを形質導入し、形質導入してから４時間後に、１μｇ／ｍｌのＧＣＶを投与した。試験は、９６ウエルプレートを使って、グループごとに１２ウエルずつ二回行なった。細胞傷害性と細胞の形状変化は、形質導入してから４日後に、顕微鏡で検出した。ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶの非特異的細胞傷害性と比較して、ＮＳＦ細胞の形状に対してＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの作用がないことに注目されたい。

【０１７１】

図７０は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による転移腫瘍増殖の相乗抑制効果を示す一連の写真である。１４週齢の雄のＣ５７ＢＬ／６マウス（ｎ＝７７）の左足蹠に、ルイス肺癌（ＬＬＣ）の腫瘍細胞を接種してルイス肺癌の肺転移腫瘍を誘発させ、原發腫瘍の大きさが７ｍｍに到達したとき直ちにその足を切断した。５日後に、10^{11}ＰＦＵのアデノウイルスベクター［ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ；ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ；ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ］を尾の静脈に注射し、続いて１４日目に１００ｍｇ／ｋｇのＧＣＶを注射した。これらマウスを、ベクター注射後２４日目に殺し次いで肺を取り出して検査と分析を行った。対照のマウスには生理食塩水とＧＣＶを注射した。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスの肺の転移腫瘍の拡大の程度が、ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ；ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１及びアデノウイルス無しのＧＣＶで処置したマウスと比べて有意に低下していることに注目されたい。

【０１７２】

図７１は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による転移腫瘍増殖の相乗抑制効果を示すヒストグラムである。肺転移腫瘍をＣ５７ＢＬ／６マウスに誘発させ、次いでそのマウスを、上記のようにして10^{11}ＰＦＵのアデノウイルスベクター［ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ；ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ；ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ］及びＧＣＶ（１００ｍｇ／ｋｇ）で処置した。ベクターを注射してから２４日目に、これらマウスを殺し次いで肺を取り出して肺への転移腫瘍を評価した。対照のマウスには生理食塩水とＧＣＶを投与した。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスの転移腫瘍塊は、ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ（８５％より大きい）並びにＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ及び生理食塩水とＧＣＶの対照（７５％より大きい）の転移腫瘍塊と比べて

有意に抑制されていることに注目されたい。

【０１７３】

図７２ａ－７２ｃは、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による転移腫瘍病状の相乗抑制効果を示す肺への転移腫瘍塊の代表的な組織病理学的切片を示す。肺転移腫瘍をＣ５７ＢＬ／６マウスに誘発させ、次いでそのマウスを、上記のようにして１０^{11}ＰＦＵのアデノウイルスベクター［ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ；ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ；ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ］及びＧＣＶ（１００ｍｇ／ｋｇ）で処置した。ベクターを注射してから２４日目に、これらマウスを殺し次いで肺の転移腫瘍組織（図７２ａ及び７２ｂ）又は肺の組織（図７２ｃ）の切片を作り次いでヘマトキシリンとエオシンで染色した。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ投与による、中心部の塊状壊死及び肺から転移腫瘍への単核性浸潤の多数のクラスター（図７２ａ及び７２ｂ）に注目されたい。

【０１７４】

図７３ａ－７３ｂは、誘発させたＬＬＣの肺転移腫瘍をＴＵＮＥＬと抗カスパーゼ－３で染色したものの代表的な組織病理学的切片であり、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による腫瘍アポトーシスの相乗促進を示している。図７１ａ－７２ｂに記載されているようにして誘発させて調製したＬＬＣの肺転移腫瘍由来の切片を固定しパラフィン中に包埋し、次いでＫｌｅｎｏｗ－ＦｒａｇＥ１（米国マチューセッツ州ケンブリッジ所在のＯｎｃｏｇｅｎｅ）（図７３ａ）及び抗カスパーゼ－３特異的免疫病理組織（７３ｂ）を使ってｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ａＵＴＰ－ｎｉｃｋ ｅｎｄ－ｌａｂｅｌｉｎｇ（ＴＵＮＥＬ）検定法によってアポトーシスの指標を検定した。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶを静脈注射して処置したマウス由来の肺の転移腫瘍の増大したアポトーシスに注目されたい。

【０１７５】

図７４ａと７４ｂは、肺転移腫瘍をＴＵＮＥＬ及び抗カスパーゼ－３で染色した、誘発させたＬＬＣの肺転移腫瘍の代表的な病理組織の切片であり、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による内皮特異的の腫瘍アポトーシスの相乗促進を示している。図７３ａ－７３ｂに記載されているようにして誘発させて調製したＬＬＣの肺転移腫瘍の切片を固定しパラフィン中に包埋し、次いでＫｌｅｎｏｗ－ＦｒａｇＥ１（米国マチューセッツ州ケンブリッジ所在のＯｎｃｏｇｅｎｅ）（図７４ａ）及び抗カスパーゼ－３特異的免疫病理組織（７４ｂ）を使ってｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ａＵＴＰ－ｎｉｃｋ ｅｎｄ－ｌａｂｅｌｉｎｇ（ＴＵＮＥＬ）検定法によってアポトーシスの指標を検定した。黒色の矢印は赤血球を示し、赤色の矢印はアポトーシスの内皮細胞を示しそして白色の矢印はアポトーシスの腫瘍細胞を示す。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶを静脈注射して処置したマウス由来の肺の転移腫瘍の血管内皮領域の増大したアポトーシスに注目されたい。

【０１７６】

図７５ａ－７５ｄは、マウスの肺癌由来の代表的な免疫病理組織の切片であり、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による、血管形成の内皮特異的相乗阻害を示している。図７３ａ－７３ｂに記載されているようにして誘発させて調製したＬＬＣの肺転移腫瘍（図７５ａ）、肝臓（図７５ｃ）及び正常の肺組織（図７５ｂ）の切片を固定し、パラフィン中に包埋して、抗ＣＤ－３１免疫蛍光法によって血管形成の指標を検定した。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウス由来の肺転移腫瘍の短くて不明瞭な血管及びその連続性と分枝が無いことに注目されたい。図７５ｄは、肺転移腫瘍の血管新生（血管形成）のコンピュータを利用して行った血管密度の評価結果を示すヒストグラムである（Ｉｍａｇｅ Ｐｒｏ－Ｐｌｕｓ，Ｍｅｄｉａ Ｃｙｂｅｒｎｅｔｉｃｓ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ）。左のバー：ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ；右のバー：ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１

（３ｘ）－ＴＫ。

【０１７７】

図７６は、マウスの肝臓の組織の代表的な病理組織の切片であり、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与に肝毒性がないことを示している。図７３ａ－７３ｂに記載されているようにして誘発させて調製したＬＬＣの肺転移腫瘍を有するマウスの肝臓由来の切片を固定し、パラフィン中に包埋し、次いでヘマトキシリンとエオシンで染色した。構成的に発現されたＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウス由来の肝臓の強い細胞傷害性（右側パネル）と比べて、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ（３ｘ）で処置したマウス由来の肝臓には細胞傷害性の指標が無い（左側パネル）ことに注目されたい。

【０１７８】

図７７は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現の器官特異的発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与を説明するＲＴ－ＰＣＲ分析の結果を示す。ＬＬＣの肺転移腫瘍を、図７３ａ－７３ｂに記載されているようにして、９頭の１５週齢の雄のＣ５７ＢＬ／６マウスに誘発させて調製した。アデノウイルスベクター［ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ及びＡｄＣＭＶ－ＴＫ］及び生理食塩水の対照を、原発腫瘍を除いてから１４日後に静脈注射した。ベクターを注射してから６日後に、マウスを殺し、器官を収穫した。異なる器官のＲＮＡを下記のようにして抽出し、次いでＰＰＥ－１（３ｘ）とＨＳＶ－ＴＫの転写物を、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーター及びＨＳＶ－ＴＫ遺伝子のプライマーを使ってＲＴ－ＰＣＲ　ＰＣＲで増幅した。ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの内皮特異的発現（中心部下のパネル）に注目されたい。

【０１７９】

図７８ａと７８ｂは、Ｂａｌｂ／ｃマウスの結腸癌の腫瘍モデルの治療量以下で非毒性の照射の範囲を示すグラフである。８週齢の雄のＢａｌｂ／ｃマウス２０頭の左大腿部にＣＴ－２６結腸癌の細胞を接種し、次いで腫瘍の直径が４－６ｍｍになったときに、全身麻酔下で、０、５、１０又は１５Ｇｙで局所照射を行なった。腫瘍容積を利用して（７６ａ）、腫瘍軸を、式Ｖ＝π／６ｘα^{2}ｘβ（αは短軸でありβは長軸である）に従って計算した。５Ｇｙの線量によって、腫瘍の進行のごく部分的な統計的に有意でない遅延（図７８ａ）及び統計的に有意でない体重減少（図７８ｂ）が起こった。

【０１８０】

図７９ａ－７９ｇは、治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、マウス結腸癌の腫瘍増殖の相乗抑制効果を示す。８週齢の雄のＢａｌｂ／Ｃマウス１００頭に、ＣＴ－２６結腸癌の腫瘍細胞を接種した。腫瘍軸が４－６ｍｍになったとき直ちに、１０^{11}ＰＦＵのウイルスベクター［ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ又はＡｄＣＭＶ－ＴＫ］を、尾の静脈に静脈注射し、続いて、指定の場所に、１４日間、毎日ＧＣＶを腹腔内注射した（１００ｍｇ／ｋｇ体重）。ベクター投与後３日目、マウスに５Ｇｙの線量で局所照射した。腫瘍の容積を、式Ｖ＝π／６ｘα^{2}ｘβ（αは短軸でありβは長軸である）に従って評価した。図７９ａはベクターを注射後１４日目の平均腫瘍容積±Ｓ．Ｅ．を示す。図７９ｂは、放射線療法で処置したグループの平均腫瘍容積の経時変化を示す。図７９ｃは、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスの平均腫瘍容積の経時変化を示す。図７９ｄは、ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスの平均腫瘍容積の経時変化を示す。図７９ｅは、対照の生理食塩水＋ＧＣＶで処置したマウスの平均腫瘍容積の経時変化を示す。図７９ｆは、ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置したマウスの平均腫瘍容積の経時変化を示す。図７９ｇは、殺した日のＢａｌｂ／ＣマウスのＣＴ－２６原発腫瘍の肉眼で見た病状の代表的例である。放射線療法は、非標的ベクターのＡｄＣＭＶ－ＴＫに比べて、血管形成内皮細胞転写標的ベクターのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫだけを有意に強化した（ｐ＝０．０４）（図７９ｃ－７９ｆ）。ウイルスベクター類による処置法はすべて、放射線療法無しでは無効であった。

【０１８１】

図８０ａ－８０ｂは、治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、マウスの結腸癌の腫瘍壊死の相乗誘発を示す原発ＣＴ－２６腫瘍の代表的な病理組織の切片である。図７９ａ－７９ｇに記載したようにして誘発させて調製したＣＴ－２６結腸癌腫瘍の切片を固定し、パラフィン中に包埋し、次いでヘマトキシリンとエオシンで染色した。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶと低線量放射線療法の併用による壊死の領域（図８０ａ）及び粒状化組織の領域（図８０ｂ）に注目されたい。

【０１８２】

図８１ａ－８１ｂは、誘発された原発結腸癌腫瘍をＴＵＮＥＬと抗カスパーゼ－３で染色したものの代表的な病理組織切片であり、放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、内皮細胞と腫瘍のアポトーシスの相乗促進を示している。図７７ａ－７７ｇに記載したようにして誘発させ調製したＣＴ－２６原発結腸癌腫瘍の切片を固定し、パラフィン中に包埋し、次いでＫｌｅｎｏｗ－ＦｒａｇＥ１（米国マチューセッツ州ケンブリッジ所在のＯｎｃｏｇｅｎｅ）（図８１ａ）及び抗カスパーゼ－３特異的免疫病理組織（８１ｂ）を使ってｄｅｏｘｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ａＵＴＰ－ｎｉｃｋ ｅｎｄ－ｌａｂｅｌｉｎｇ（ＴＵＮＥＬ）検定法によってアポトーシスの指標を検定した。放射線療法及び静脈投与のＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの併用で処置したマウス由来の腫瘍の塊状アポトーシス（図８１ａ）及びカスパーゼ－３陽性内皮細胞（８１ｂ）に注目されたい。

【０１８３】

図８２は、抗カスパーゼ－３で染色された誘発原発結腸癌腫瘍の代表的な病理組織の切片であり、放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、内皮細胞と腫瘍のアポトーシスの相乗促進効力を示している。図７９ａ－７９ｇに記載したようにして誘発させ調製したＣＴ－２６原発結腸癌腫瘍の切片を固定し、パラフィン中に包埋し、次いで抗カスパーゼ－３特異的免疫病理組織によってアポトーシスの指標を検定した。黒色の矢印は赤血球を示し、赤色の矢印はアポトーシスの内皮細胞を示しそして白色の矢印はアポトーシスの腫瘍細胞を示す。ＧＣＶ依存性のアポトーシス作用に注目されたい。

【０１８４】

図８３ａと８３ｂは、抗ＣＤ－３１で染色した肝臓組織及び誘発された原発結腸癌腫瘍の代表的な病理組織の切片であり、放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用によって、腫瘍の血管新生の阻害が相乗的に促進されたことを示している。図７９ａ－７９ｇに記載したようにして誘発させ調製した肝臓組織（８３ｂ）及びＣＴ－２６原発結腸癌腫瘍（８３ａ）の切片を固定し、パラフィン中に包埋し、免疫組織病理学的試験のために内皮特異的抗ＣＤ－３１と反応させた。黒色の矢印は赤血球を示し、赤色の矢印はアポトーシスの内皮細胞を示しそして白色の矢印はアポトーシスの腫瘍細胞を示す。肝臓細胞の正常な血管系（８３ｂ）と比べて、放射線療法及び静脈投与のＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの併用で処置したマウス由来の腫瘍の広範囲にわたる血管の破壊（８３ａ）に注目されたい。

【０１８５】

図８４は、放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の組織特異的細胞傷害性を示すマウス肝臓組織の代表的な病理組織の切片である。ベクター（ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ及びＡｄＣＭＶ－ＴＫ）とＧＣＶそれぞれ単独に及びその併用に暴露したマウスの肝臓由来の切片を固定し、パラフィン中に包埋し、次いでヘマトキシリンとエオシンで染色した。ＡｄＣＭＶ－ＴＫとガンシクロビルによる典型的にゆるやか肝毒性（左のパネル）及びＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置した肝臓に血管異常の無いこと（右パネル）に注目されたい。

【０１８６】

図８５ａと８５ｂは、Ｃ５７Ｂ１／６肺癌転移腫瘍モデルにおける治療線量以下の非毒

性照射の範囲を示すグラフである。８週齢で雄のＣ５７Ｂ１６マウス３５頭の左足蹠にルイス肺癌（ＬＬＣ）細胞を接種し、次いで全身麻酔下にて、胸壁に０、５、１０又は１５Ｇｙで放射線照射を行い、８日目に原発腫瘍を除いた。マウスは、腫瘍を除いた後２８日目に殺した。体重の減少が転移腫瘍疾患を示した。５Ｇｙの線量は治療線量（図８５ａ）でも毒性線量（図８５ｂ）でもなかった。

【０１８７】

図８６ａ－８６ｄは、治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、マウス肺癌の転移腫瘍疾患の相乗抑制効果を示している。８週齢で雄のＢａｌｂ／Ｃマウス１８０頭の左の足蹠にＬＬＣ細胞を接種した。原発腫瘍が発生したとき直ちに、全身麻酔下でその足を切断した。切断後５日目に、10^{10}ＰＦＵのベクター［ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ又はＡｄＣＭＶ－ＴＫ］を尾の静脈に注射し、続いて１４日間、毎日、ＧＣＶ（１００ｍｇ／ｋｇ）の腹腔内注射を行った。ベクター注射後３日目に、マウスの胸壁に対して５Ｇｙの線量の放射線治療を一回、全身麻酔下で行なった。図８６ａは放射線を照射しベクター無しで５５日間にわたって処置したマウスの生存率を示す。図８６ｂはＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置したマウスの生存率を示す。図８６ｃはＡｄＣＭＶ－ＴＫで処置したマウスの生存率を示す。図８６ｄは生理食塩水で処置した対照マウスの生存率を示す。放射線療法は、非標的化ベクターＡｄＣＭＶ－ＴＫに比べて、血管形成内皮細胞転写標的化ベクターＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫだけを有意に強化したこと（図８６ｂ－８６ｄ）に注目されたい。ウイルスベクターによる処置法はすべて、放射線療法なしでは無効であった。

【０１８８】

図８７ａ－８７ｃは、ＣＭＶプロモーターの制御下のＦａｓ－ｃの内皮細胞の細胞傷害性を示す一連のヒストグラムである。ウシ大動脈内皮細胞（ＢＡＥＣ）に、１００ｍｏｉ（左）、１０００ｍｏｉ（右）及び１００００ｍｏｉ（左下）のＣＭＶ－ＦＡＳ（ダーク）又はＣＭＶ－ＬＵＣ（グレイ、負の対照）を形質導入してから７２時間後に及び各種濃度のヒトＴＮＦ－αリガンドを添加して２４時間後、クリスタルバイオレットで染色した。高いｍｏｉとＴＮＦ－α濃度によって、ＢＡＣ細胞の生存率が低下することに注目されたい。

【０１８９】

図８８は、ＣＭＶ－ＬＵＣ（赤色正方形）に比べて、ＣＭＶ－ＦＡＳ（青色菱形）による２９３細胞におけるウイルスの複製の増大した拡張を示すプラーク発生のグラフである。ＣＭＶ－ＦＡＳとＣＭＶ－ＬＵＣのＣｓＣｌバンドストックの力価を、下記のようにして、ＰＦＵ検定法で測定した。データは、プラーク検定の２－３日ごとに見つけたプラークの数を、ｌｏｇのスケールでプロットした。

【０１９０】

図８９ａと８９ｂは、ＣＭＶ－ルシフェラーゼと比べて、ＣＭＶ－Ｆａｓ－ｃによるウイルス感染の細胞間の拡張（プラーキング）の高い比率を示す２９３細胞培養物の一連の写真である。感染させた後４日目に、同じ希釈率のＣＭＶ－ＦＡＳ（左）及びＣＭＶ－ＬＵＣ（右）由来のプラークの写真を撮った。ＣＭＶ－ＦＡＳ由来のプラークはＣＭＶ－ＬＵＣ由来のプラークより明らかに大きく、これは、アポトーシスによって恐らく誘発される細胞間の拡張の比率の高いことを示している。

【０１９１】

図９０は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＦａｓ－ｃ及びドキソルビシンの投与の特異的相乗内皮細胞傷害性を示すヒストグラムである。ＢＡＥ細胞に、ベクター（ＰＰＥ－１（３ｘ）－ＦＡＳを形質導入（10^{3}ｍｏｉ）してから４８時間後に、その細胞を１００ｎＭのドキソルビシンに暴露した（Ｄｏｘ＋ＰＰＥ－Ｆａｓ＝ドキソルビシン＋ＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃ（オレンジ色）；Ｄｏｘ＝ドキソルビシンのみ（緑色）；ＰＰＥ－Ｆａｓ＝ＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ（赤色）；処置せず＝黒色）。細胞にベクターを形質導入してから９６時間後に、その細胞をクリスタルバイオレットで染色

して、細胞生存率を顕微鏡で評価した。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－１とドキソルビシンの間の内皮細胞傷害性の有意な相乗作用に注目されたい。

【０１９２】

図９１ａ－９１ｂは、エンドセリン（ＰＰＥ－１　３ｘ）の制御下のＶＥＧＦによる、遺伝子工学的に処置された組織構築物における血管形成の高い誘発を示すグラフである。遺伝子工学的に処置された組織構築物（その手順は開示せず）を、培地にＶＥＧＦの補助あり又は無しで（５０ｎｇ／ｍｌ）で増殖させた。平行構築物を、Ａｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘ　ＶＥＧＦウイルス又は対照のＡｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘ　ＧＦＰアデノウイルス（対照ウイルス）（４時間）に感染させた。その構築物を、２週間培養した後、固定し、包埋し、切片を作り染色した。血管新生を、１ｍｍ^{2}当たりの血管の数及び血管が新生した切片の面積の百分率で示した。図９１ａは、細胞にＡｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘ　ＶＥＧＦが感染すると、遺伝子工学的に加工された前記構築物に形成される血管様構造物の数と大きさに対して誘導効果があることを示している。ＶＥＧＦ～培地（ＶＥＧＦ培地）に暴露された構築物に比べて、Ａｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘ　ＶＥＧＦを形質導入された組織構築物（ＶＥＧＦウイルス）の血管新生の両パラメータが劇的に増大する（４－５倍）ことに注目されたい。図９１ｂは、Ａｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘ　ＧＦＰの対照と比べて、Ａｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘ　ＶＥＧＦが感染した細胞とともに増殖させた移植組織構築物の生存率と血管新生の程度が高いことを示すＬＵＣルミネッセンスの強度のヒストグラムである。

【０１９３】

図９２は野生型のマウスＰＰＥ－１プロモーターのＤＮＡ配列である。このプロモーターは、内因性内皮特異的陽性転写配列（黒色イタリック体）、ＮＦ－１応答配列（ピンク色イタリック体）、ＧＡＴＡ－２配列（赤色イタリック体）、ＨＩＦ－１応答配列（青色イタリック体）、ＡＰ－１サイト（緑色イタリック体）、ＣＡＡＴ信号（オレンジ色イタリック体）及びＴＡＴＡボックス（紫色イタリック体）を含んでいる。

【０１９４】

図９３は、マウスの修飾されたプレプロエンドセリンプロモーターの３ｘフラグメントの配列である。そのフラグメントは、二つの完全な内皮細胞特異的陽性転写配列（赤色）及び原配列の逆転された１／２として配置されている二つの部分（青色）すなわち配列番号：１５（転写配列の配列番号：６の３’部分由来のヌクレオチド）及び配列番号：１６（転写配列の配列番号：６の５’部分由来のヌクレオチド）を含んでいる。

【０１９５】

図９４は、トランスジェニックマウスのＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＬＵＣ遺伝子の発現が細胞特異的にＢｏｓｅｎｔａｎによって誘発されて増大することを示すヒストグラムである。

【０１９６】

図９５ａと９５ｂは、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下で発現される導入遺伝子に対する宿主の免疫応答が無いこと（ＥＬＩＳＡ法で測定）を示すヒストグラムである。ＰＰＥ－１（３ｘ）Ｆａｓ－ｃで処置されたマウスに引起こされる小さい抗ＴＮＦ－Ｒ１応答（図９５ａ）と比べて非特異的な抗アデノベクター応答（図９５ｂ）に注目されたい。

【０１９７】

図９６は、Ａｄ５デリバリー系におけるＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下でのＦａｓ－ｃキメラの発現によって、転移腫瘍肺癌の治療を行なう際の投与量の効果を示すヒストグラムである。肺の転移腫瘍は、ルイス肺癌細胞を注射し次いで原発腫瘍を切除することによって誘発させた。実験動物に、指定投与量のウイルス又はプラセボ（生理食塩水）を、原発腫瘍を切除した後５日目に一回静脈注射した。治療の効果は、全身腫瘍組織量（肺の重量で測定）の変化で評価した。対照と比べて、１ｘ１０^{8}－１ｘ１０^{12}の投与量で転移腫瘍の増殖が有意に減少したことに注目されたい。

【０１９８】

図９７は、Ａｄ５送達系におけるＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下でのＦａｓ－ｃキメラの発現による、転移腫瘍肺癌の治療に対する投与量と治療頻度の効果を示すヒストグラムである。肺の転移腫瘍は、ルイス肺癌細胞を注射し次いで原発腫瘍を切除することによって誘発させた。実験動物に、指定量のウイルス又はプラセボを、一回（灰色コラム）又は二回（黒色コラム）静脈注射した。第一注射は前記切除を行なってから５日目に行い、第二注射は（指示された場合）前記切除後９日目に行なった。処置の効力は、肺の重量で測定した全身腫瘍組織量によって評価した。すべての試験投与量において、一回の投与による転移腫瘍の増殖を阻害する効力が、二回の投与と同様であることに注目されたい。

【発明を実施するための最良の形態】

【０１９９】

本発明は、内皮細胞特異的プロモーターの活性を示すポリヌクレオチド配列及びその使用法の発明である。さらに詳しく述べると、本発明は、内皮細胞において増大した活性と特異性を示す修飾プレプロエンドセリン－１（ＰＰＥ－１）プロモーター、及び特定の細胞のサブセットのアポトーシスを活性化するのに使用することができ、その結果、異常な血管新生又は細胞増殖を特徴とする疾患を治療できる核酸構築物に関する。さらに本発明は、低酸素症及び血管形成などの生理学的症状に応答してその発現を高めるＰＰＥプロモーターの修飾、及び新規の血管形成内皮特異的な併用療法に関する。

【０２００】

本発明の少なくとも一つの実施態様を詳細に説明する前に、本発明は、以下の記載において示された又は実施例に例示された詳細に、その適用が制限されないことを理解されたい。本発明は、他の実施態様も可能であり、又は様々な方式で実行もしくは実施されうる。又、本明細書において利用された語法及び術語は、記載の目的のためのものであり、制限的なものと見なすべきではないことも理解されたい。

【０２０１】

不均衡な血管形成は各種症状の特徴であり、その異常状態を進行させ続けることが多い。例えば、固形腫瘍の血管内皮細胞は、正常組織の血管内皮細胞の約３５倍の速さで分裂する（Ｄｅｎｅｋａｍｐ ａｎｄ Ｈｏｂｓｏｎ，１９８２ Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ４６：７１１－２０）。このような異常な増殖は、腫瘍が増殖し転移腫瘍するのに必要である（Ｆｏｌｋｍａｎ，１９８６ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４６：４６７－７３）。また血管内皮細胞の増殖は、リウマチ様関節炎、乾癬及び滑膜炎などの慢性炎症疾患の場合にも重要であり、これらの疾患では、これらの細胞がその炎症部位内に放出される増殖因子に応答して増殖する（Ｂｒｏｗｎ ＆ Ｗｅｉｓｓ，１９８８ Ａｎｎ．Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．４７：８８１－５）。また一方では、心臓虚血、末梢血管の疾病、創傷の治癒、火傷の瘢痕などの虚血症状の場合、血管形成が誘発されると治癒作用がある（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ８６：７９２８－７９３２，１９９８）ので、有利である。

【０２０２】

したがって、血管形成の過程を調節又は修飾することは、根底にある疾病状態の病状の進行に対するこの過程の寄与を制限するのに重要な治療面での役割を有し、かつこのような疾患の病因を研究する価値ある手段を提供する。最近、阻害するか又は刺激するように設計された内皮調節薬剤の開発が有意に進展した（最新の総説については、Ｍａｒｉａｎｉ ｅｔ ａｌ GenMedGen ２００３，５：２２参照）。しかし、プロ血管形成及び長く連続した機能性血管の塊状形成の用途では、上記タンパク質因子を繰り返し長期間送達する必要があるので、臨床に使用するには制限がある。さらに、血管形成調節因子の製造に伴う高コストに加えて、これら因子を有効に送達するには、カテーテルを使って冠状動脈に入れる必要があるので、さらに費用が増大しかつ治療が困難になる。

【０２０３】

今日まで、有望な臨床試験は、Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）又はＢａｙ－４３９０６（登録商標）のような抗血管形成治療法が、腫瘍を囲む血管の新たな生成を制限することに

よって、転移腫瘍の進行を弱めることができることを示している。しかし、新血管の形成を阻害し及び／又は新血管を部分的に破壊することでは、既存の新生血管のほとんど又はすべてを破壊して腫瘍の壊死を誘発する劇的な抗血管形成作用が必要な癌症状には不十分であることがある。さらに、臨床試験で試験されたすべての抗血管形成薬剤の全身投与は、今日まで病状発現前のモデルでは有望であるが、成功率に限度があり、かつ血小板減少、白血球減少及び喀血などの注目すべき毒性があることが分かっている。したがって、治療薬剤の内皮特異的ターゲッティングは、プロ血管形成療法及び抗血管形成療法に不可欠である。内皮特異的プロモーターは当該技術分野で報告されており、その例としては、ｆｌｋ－１、Ｆｌｔ－１、Ｔｉｅ－２　ＶＷ因子及びエンドセリン－１がある（Ｇｕ　ｅｔ　ａｌ．の米国特許第６，２００，７５１号、Ｗｉｌｌｉａｍｓ　ｅｔ　ａｌ．の米国特許第５，９１６，７６３号及びＨａｒａｔｓ　ｅｔ　ａｌ．の米国特許第５，７４７，３４０号参照。なおこれらの特許は本願に援用するものである）。内皮特異的プロモーターの制御下で発現される治療遺伝子の内皮細胞ターゲッティングも当該技術分野で報告されている。例えば、Ｊａｇｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．は、ＫＤＲ又はＥ－選択プロモーターを使って、内皮細胞内に特異的にＴＮＦαを発現させたが［Ｊａｇｇｅｒ　ＲＴ　ｅｔ　ａｌ．Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ（１９９７）８（１８）：２２３９－４７］、一方Ｏｚａｋｉ　ｅｔ　ａｌ．はフォンヴィレブランド因子（ｖＷＦ）プロモーターを使って、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ＨＳＶ－ｔｋ）をＨＵＶＥＣに送達した［Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ（１９９６）７（１３）：１４８３－９０］。これらのプロモーターは内皮細胞特異的と考えられるが、研究結果は、これらプロモーターのうち多くのものが、内皮細胞に発現を指向させるのに非効率的であり、必要とする完全な特異性を欠いており、弱い活性しか示さず高レベルの発現をさせることができなかった。

【０２０４】

治療に使う、より有効でかつ特異的な内皮プロモーターを構築する一方法は、組織特異的エンハンサーの配列を同定して含有させる方法である。内皮細胞に特異的なエンハンサーの配列は、例えばＢｕ　ｅｔ　ａｌ．（Ｊ．Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．（１９９７）２７２（１９）：３２６１３－３２６２２）がすでに報告しており、彼等は、ＰＰＥ－１のエンハンサーの配列の３コピー（配列ＥＴＥ－Ｃ、ＥＴＥ－Ｄ及びＥＴＥ－Ｅを含む）が、生体外で内皮細胞特異性を有するプロモーター配列を提供することを証明した。しかし、そのエンハンサーの配列の生体内での有用性は全く証明できなかった。

【０２０５】

下記実施例の項で明確に例示するように、本発明の発明者らは、そのエンハンサーの配列が生体内での治療用途に適していることを証明した。さらに、独特の修飾された３回繰返し（３ｘ）エンハンサーの配列の一部（配列番号：７）を創製し次いで生体外及び生体内で内皮特異的遺伝子の発現を指向させるその配列の活性を評価することによって、本発明の発明者らは、新規の再配列された配向の３ｘエンハンサーの部分を含有する高い活性のエンハンサー配列を構築した。この修飾されたエンハンサー配列は、血管形成にかかわる増殖性内皮細胞に対して増大した特異性及び生体内の正常な内皮細胞において無視できる程度の活性を示す。したがって、本発明の発明者らは、最初に、再配置構成されたときに、隣接するプロモーターの配列に高い活性を与えるエンハンサー配列の部分を同定した。

【０２０６】

したがって、本発明の一側面によって、シス調節因子を含む単離されたポリヌクレチドが提供され、このシス調節因子は、それに転写的に連結されるポリヌクレオチドの真核細胞内における転写を指向させることができる。この単離されたポリヌクレオチドは、配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合された配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部を含有している。好ましい一実施態様では、配列番号：１５に記載の配列の前記少なくとも一部は、前記シス調節因子において、配列番号：１６に記載の配列の前記少なくとも一部の上流に位置している。さらに別の好ましい実施態様では、配列番号：１６に記載の配列の前記少なくとも一部は、前記シス調節因子において、配列番号：１

５に記載の配列の前記少なくとも一部の上流に位置している。

【０２０７】

配列番号：１５は、３’末端に追加のグアニルヌクレオチドが連結されているマウスの内皮特異的エンハンサー配列（配列番号：６）のヌクレオチドの２７－４４位を表すポリヌクレオチド配列であり、そして配列番号：１６は、マウスの内皮特異的エンハンサー配列（配列番号：６）のヌクレオチドの１－１９位を表すポリヌクレオチド配列である。

【０２０８】

本明細書及び前掲の特許請求の範囲の用語「エンハンサー」は、好ましくは限定されないが細胞特異的な方式でプロモーターの転写活性を増大するいかなるポリヌクレオチド配列も意味する。用語「組織特異的エンハンサー」は、本願で使用する場合、組織依存性又はコンテキスト依存性の方式でプロモーターの転写活性を増大するエンハンサーを意味する。このような「組織特異的なエンハンサー」は、非適合の組織又は環境の中でプロモーターの転写活性を低下させ、阻害し又は封じ込めることさえあることは分かるであろう。

【０２０９】

本発明のいくつかの実施態様によって、前記単離されたポリヌクレオチドは、配列番号：１５と１６の少なくとも一部の隣接コピーを含んでいる。このような配列は、好ましくは頭－尾配向で配置されているが、当該技術分野で公知の他の配向例えば逆配向（尾－尾配向又は頭－頭配向）、相補配向（「ａ」の「ｔ」による置換、「ｔ」の「ａ」による置換、「ｇ」の「ｃ」による置換、及び「ｃ」の「ｇ」による置換）、逆相補配向などを構築できる。配列番号：１５に記載の配列の前記少なくとも一部は、配列番号：１６に記載の前記少なくとも一部に直接、共有結合させることができ、又は好ましい実施態様では、これら二つの配列は、リンカーのポリヌクレオチド配列によって連結できる。用語「リンカーのポリヌクレオチド」は本願で使用する場合、二つ以上の隣接するポリヌクレオチド（例えば配列番号：１５と１６）の間に連結されるポリヌクレオチド配列を意味する。このような好ましいリンカー配列の一つは、例えば、配列番号：７の５５－５７位のヌクレオチドに記載のリンカー配列であるトリヌクレオチド配列「ｃｃａ」である。他の適切なリンカー配列は、全追加エンハンサー配列、未変性又は人工の、例えば配列番号：１５、配列番号：１６の複数のコピー、ＰＰＥ－１の１ｘエンハンサー配列、追加の全プロモーター、低酸素応答因子（例えば配列番号：５）などを含んでいてもよい。

【０２１０】

用語「配列番号：１５．．．に記載の配列の一部」又は「配列番号：１６．．．に記載の配列の一部」は、本願で使用する場合、その指定配列中の５’末端、３’末端又はこれら末端の間の少なくとも８個の隣接ヌクレオチドを表す配列であると定義する。したがって、例えば配列番号：１５の１－１７位までの１ヌクレオチドのインクレメントにおける、１－８位、１－９位、１－１０位、１－１１位…のヌクレオチドを表す配列は、すべて、本発明の配列番号：１５の一部を構成し、同様に、配列番号：１５の２－１７位までの２－９位、２－１０位、２－１１位…のヌクレオチドを表すすべての配列；配列番号：１５の３－１７位までの３－１０位、３－１１位、３－１２位…のヌクレオチドを表すすべての配列は、配列番号：１５の１０－１７位のヌクレオチドを表す配列までを含めて本発明の配列番号：１５の一部を構成している。同様に、配列番号：１６の１－１９位までのヌクレオチドの１ヌクレオチドのインクレメントにおける、１－８位、１－９位、１－１０位、１－１１位…のヌクレオチドを表す配列は、すべて、本発明の配列番号：１６の一部を構成し、２－９位、２－１０位．．．のヌクレオチドを表す配列は上記のとおりである。

【０２１１】

本発明を実施する間に、前記修飾されたエンハンサーＰＰＥ－１（３ｘ）が、配列番号：１６に記載の配列に連結された配列番号：１５に記載の配列を含有し、この配列にはマウス内皮特異的エンハンサー配列（１ｘ）（配列番号：７参照）のコピーがすぐ上流とすぐ下流に隣接していることが明らかになった。したがって、好ましい一実施態様では、本発明のシス調節因子はさらに、配列番号：６に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含

んでいる。さらに好ましい実施態様では、シス調節因子は、配列番号：６に記載の配列の少なくとも二つのコピーを含んでいる。最も好ましい実施態様では、本発明のシス調節因子は配列番号：７に記載の配列である。

【０２１２】

好ましくは、単離されたポリヌクレオチドは、内皮細胞特異的プロモーター配列因子をさらに含む。この明細書及び添付の特許請求の範囲の目的のため、「プロモーター」という用語は、下流の目的の配列のＲＮＡ転写を媒介することができる任意のポリヌクレオチド配列をさす。内皮特異的プロモーター因子は、例えば、ＰＰＥ－１プロモーターの少なくとも１コピーを含むことができる。本発明の核酸構築物により利用され得る好適なプロモーター／エンハンサーの例には、内皮特異的なプロモーター、例えば、プレプロエンドセリン－１（ＰＰＥ－１）プロモーター（Ｈａｒａｔｓ Ｄ、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ、１９９５（3月）、９５（３）：１３３５～４４）、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター［ＰＣＴ／ＩＬ０１／０１０５９；Ｖａｒｄａ－Ｂｌｏｏｍ Ｎ、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ、２００１（6月）、８（１１）：８１９～２７］、ＴＩＥ－１プロモーター（Ｓ７９３４７、Ｓ７９３４６）及びＴＩＥ－２プロモーター（Ｕ５３６０３）［Ｓａｔｏ ＴＮ、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ、１９９３（１０月１５日）、９０（２０）：９３５５～８］、エンドグリンプロモーター［Ｙ１１６５３；Ｒｉｕｓ Ｃ、Ｂｌｏｏｄ、１９９８（１２月１５日）、９２（１２）：４６７７～９０］、フォンヴィレブランド因子［ＡＦ１５２４１７；Ｃｏｌｌｉｎｓ ＣＪ、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ、１９８７（7月）、８４（１３）：４３９３～７］、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター［Ｘ８９７７７、Ｘ８９７７６；Ｒｏｎｉｃｋｅ Ｖ、Ｃｉｒｃ Ｒｅｓ、１９９６（8月）、７９（２）：２７７～８５］、ＦＬＴ－１プロモーター［Ｄ６４０１６、ＡＪ２２４８６３；Ｍｏｒｉｓｈｉｔａ Ｋ、：Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ、１９９５（１１月１７日）、２７０（４６）：２７９４８～５３］、Ｅｇｒ－１プロモーター［ＡＪ２４５９２６；Ｓｕｋｈａｔｍｅ ＶＰ、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ Ｒｅｓ、１９８７（9月／１０月）、１（４）：３４３～５５］、Ｅ－セレクチンプロモーター［Ｙ１２４６２；Ｃｏｌｌｉｎｓ Ｔ、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ、１９９１（2月5日）、２６６（４）：２４６６～７３］、内皮接着分子プロモーター、例えば、ＩＣＡＭ－１［Ｘ８４７３７；Ｈｏｒｌｅｙ ＫＪ、ＥＭＢＯ Ｊ、１９８９（１０月）、８（１０）：２８８９～９６］、ＶＣＡＭ－１［Ｍ９２４３１；Ｉａｄｅｍａｒｃｏ ＭＦ、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ、１９９２（8月１５日）、２６７（２３）：１６３２３～９］、ＰＥＣＡＭ－１［ＡＪ３１３３３０、Ｘ９６８４９；ＣＤ３１、Ｎｅｗｍａｎ ＰＪ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、１９９０（3月9日）、２４７（４９４７）：１２１９～２２］、血管平滑筋特異的因子、例えば、ＣＡｒＧボックス Ｘ５３１５４及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーター［ＡＦ３３２５９６；Ｌａｙｎｅ ＭＤ、Ｃｉｒｃ Ｒｅｓ、２００２、９０：７２８～７３６］、そして大動脈優先的発現遺伝子－１［Ｙｅｎ－Ｈｓｕ Ｃｈｅｎ、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、第２７６巻第５０号、４７６５８～４７６６３、２００１年１２月１４日］が含まれる。例えばＥＰＣＲプロモーター（Ｇｕ ｅｔ ａｌに対する米国特許第６２００７５１号）及びＶＥＧＦプロモーター（Ｗｉｌｌｉａｍｓ ｅｔ ａｌに対する米国特許出願第５９１６７６３号）のような他の好適な内皮特異的プロモーターは、当該分野において周知である。

【０２１３】

所望の核酸配列の各種組織中での発現を指向させるために、他の非内皮プロモーターも上記単離されたポリヌクレオチド中に組み込むことができることは分かるであろう．本発明の構築物とともに使用するのに適したプロモーターは当該技術分野で公知である。これらのプロモーターとしては、限定されないが、ウイルスのプロモーター（例えば、レトロウイルスＩＴＲ類、ＬＴＲ類、極初期ウイルスのプロモーター（ＩＥｐ）（例えばヘルペスウイルスＩＥｐ（例えばＩＣＰ４－ＩＥｐ及びＩＣＰ０－ＩＥｐ）及びサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）ＩＥｐ）並びにその外のウイルスプロモーター（例えば後発ウイルスプロモーター、潜伏活性プロモーター（ＬＡＰ類）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモ

ーター及びマウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）プロモーター）がある。他の適切なプロモーターは、エンハンサー配列類（例えばウサギβ－グロビン調節因子）、構成的に活性のプロモーター類（例えばβ－アクチンプロモーターなど）、信号特異的及び／又は組織特異的なプロモーター類（例えば誘導プロモーター及び／又は抑制プロモーター例えばＴＮＦもしくはＲＵ４８６に応答するプロモーター、メタロチオニンプロモーター、ＰＳＡプロモーターなど）並びに腫瘍特異的プロモーター例えばテロメラーゼ、プラスチン及びヘキソナーゼのプロモーターを含む真核プロモーターである。

【０２１４】

好ましくは、前記単離されたポリヌクレオチドは、さらに低酸素応答因子、例えば配列番号：５に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含有している。

【０２１５】

本発明の単離された核酸配列は、真核組織、特に増殖性内皮細胞、例えば血管形成にかかわる内皮細胞における遺伝子の発現を調節するのに又は休止中の内皮細胞における遺伝子発現を沈黙させる（阻害する）のに使用できる。

【０２１６】

したがって、本発明の単離されたポリヌクレオチド配列は、場合によっては、その単離されたポリヌクレオチドの調節制御下に配置されている核酸構築物をさらに含む核酸配列の一部として提供される。本発明の核酸構築物は、さらに、追加のポリヌクレオチド配列、例えば選択マーカーもしくはレポーターポリペプチドをコードする配列；細菌の複製起点をコードする配列；単一ｍＲＮＡからいくつものタンパク質を翻訳できる配列（ＩＲＥＳ）；プロモーター－キメラポリペプチドをコードする領域及び／又は哺乳類の発現ベクターに一般に含まれている配列をゲノム統合する配列、例えばＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから入手できるｐｃＤＮＡ３、ｐｃＤＮＡ３．１（＋／－）、ｐＺｅｏＳＶ２（＋／－）、ｐＳｅｃＴａｇ２、ｐＤｉｓｐｌａｙ、ｐＥＦ／ｍｙｅ／ｃｙｔｏ、ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＲ３．１；Ｐｒｏｍｅｇａから入手できるｐＣＩ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅから入手できるｐＢＫ－ＲＳＶとｐＢＫ－ＣＭＶ；Ｃｌｏｎｔｅｃｈから入手できるｐＴＲＥＳ及びこれらの誘導体などを含有していてもよい。このような核酸構築物は、好ましくは、哺乳類の細胞の発現のために配置構成され、ウイルス起源のものでもよい。哺乳類の発現に適切な核酸構築物の多数の例は当該技術分野ではよく知られており、以下の実施例の章で、いくつかのこのような構築物について詳細に述べる。

【０２１７】

本明細書及び前掲の特許請求の範囲では、用語「調節制御下で配置された核酸配列…」は、ＲＮＡポリメラーゼによって転写される能力を有するポリヌクレオチド配列であって、その転写は本発明のシス調節因子のようなシス調節因子によって指向されることができるポリヌクレオチドを意味する。この定義には、ポリペプチドに翻訳可能なコーディング配列、並びに翻訳されるように定められていないアンチセンスＲＮＡ、ＤＮＡに結合するＲＮＡ、リボザイム類及び他の分子部分が含まれている。本発明の構築物が使用できる核酸配列の例は、例えば、ＶＥＧＦ、ＦＧＦ－１、ＦＧＦ－２、ＰＤＧＦ、アンギオポエチン－１とアンギオポエチン－２、ＴＧＦ－β、ＩＬ－８（血管形成の調節因子の広範囲のリストについては上記表１参照）、細胞傷害性薬剤、レポーター遺伝子などの血管形成の正と負の調節因子である。好ましい実施態様では、核酸配列は、血管形成調節因子のＶＥＧＦ、ｐ５５、アンギオポエチン－１、ｂＦＧＦ及びＰＤＧＦ－ＢＢから選択される。本発明のシス調節因子による制御に適している追加の転写可能な核酸配列は、以下に及び続く実施例の章で提供する。

【０２１８】

下記実施例は、本発明の新規のシス調節因子が、生体内の全身投与により、虚血性及び／又は血管形成性の（増殖性の）内皮組織において優先的に、レポーター遺伝子（ＧＦＰ及びＬＵＣ）を内皮組織に、高い信頼性で発現を指向させることができることを証明している。さらに具体的に述べると、これら実施例はさらに、本発明の単離されたポリヌクレオチドを使って、腫瘍、転移腫瘍、虚血性及び／又は血管形成性の組織中に治療遺伝子を

優先的に発現させることができることを示し、したがって本発明のシス調節因子とその誘導体が治療の用途で重要である直接的な証拠を提供している。

【０２１９】

一実施態様では、本発明の核酸構築物を使用して、組織中の血管形成をアップレギュレートして虚血に関連する疾患又は症状を治療又は予防する。このような疾患と症状は、血管形成が促進されることによって利益を得るが、当該技術分野でよく知られており、例えば創傷の治癒、虚血性発作、虚血性心臓病及び胃腸損傷がある。

【０２２０】

用語「血管形成をダウンレギュレートする」は、本願で使用する場合、新血管を形成する血管形成のプロセスを減速又は停止することを意味する。用語「血管形成をアップレギュレートする」は、休止しているか又はわずかに機能している内皮細胞血管形成活性化因子の発現を促進することを意味する。

【０２２１】

したがって、本発明は遺伝子治療に利用できる。用語「遺伝子治療」は、本願で使用する場合、対象の遺伝物質（例えばＤＮＡ又はＲＮＡ）を宿主中に移送して、遺伝的又は後天的な病気又は症状又は表現型を治療又は予防することを意味する。その対象の遺伝物質は、生体内で産生されることが要望されている産物（例えばタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、機能性ＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ）をコードしている。例えば、対象の遺伝物質は、治療のために価値のあるホルモン、受容体、酵素、ポリペプチド又はペプチドをコードできる。総説については、一般にテキストの「Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ」（Ａｄｖａｎｃｅｄ　ｉｎ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　４０，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，１９９７）を参照されたい。

【０２２２】

遺伝子治療は、二つの基本的な方法：（１）エクスビボ及び（２）生体内の遺伝子治療が発達してきた。エクスビボ遺伝子治療では、細胞を患者から取り出し、培養しながら生体外で処置する。一般に、機能性置換遺伝子が、遺伝子を送達する適切なベクター／方法（トランスフェクション、形質導入、相同組換えなど）及び必要な発現系によって細胞中に導入され、次いでその修飾された細胞を培養で増殖させて宿主／患者に戻す。これらの遺伝的に再移植された細胞は、そのトランスフェクトされた遺伝物質をその場で発現することが分かったのである。

【０２２３】

生体内の遺伝子治療では、標的細胞は被験者から取り出すことなく、移送すべき遺伝物質が患者内にある患者の器官の細胞に、その場で導入される。別の実施態様では、宿主の遺伝子に欠陥がある場合、その遺伝子は、その場で修復される（Ｃｕｌｖｅｒ，１９９８．（Ａｂｓｔｒａｃｔ）Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　ＤＮＡ　＆　ＲＮＡ　ｂａｓｅｄ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｆｅｂｒｕａｒｙ　１９９８，Ｃｏｒｏｎａｄｏ，ＣＡ）。

【０２２４】

これらの遺伝学的に変化させた細胞は、トランスフェクトされた遺伝物質をその場で発現することが分かった。

【０２２５】

その発現ベクターは、当該技術分野で知られているような細胞選択的方式で核酸のターゲッティング、発現及び転写を制御する配列を含んでいてもよい。遺伝子の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを、発現ベクターの５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲで置換することが多いことに注目すべきである。したがって、本発明で使用する場合、その発現ベクターは、必要な場合、移送すべき実際の遺伝子の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含有せず特定のアミノ酸をコードする領域だけを含有している。

【０２２６】

上記発現ベクターは、異種の物質の転写を制御するプロモーターを含有していてもよく、選択転写を行なえる構成的又は誘導可能なプロモーターであってもよい。必要な転写レベルを得るために必要なことがあるエンハンサーが随意選択的に含まれていてもよい。エ

ンハンサーは、一般に、コーディング配列と隣接（シス型）して作用しプロモーターが命令する基本転写レベルを変える翻訳されないＤＮＡ配列である。その発現ベクターは、以下に述べるように選択遺伝子を含有していてもよい。

【０２２７】

ベクターは、当該技術分野で公知の各種方法のいずれか一つによって細胞又は組織に導入できる。このような方法は広く知られていて、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ １９８９，１９９２，ｉｎ Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ ｓｏｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ １９８９；Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｏｍａｔｉｃ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，ＭＩ １９９５；Ｖｅｇａ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，ＭＩ １９９５，Ｖｅｃｔｏｒ：Ａ Ｓｕｒｖｅｙ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｖｅｃｔｏｒｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｕｓｅｓ，Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，Ｂｏｓｔｏｎ ＭＡ １９８８；及びＧｉｌｂｏａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４（６）：５０４－５１２，１９８６に記載されており、例えば、組み換えウイルスベクターの安定した又は一時的なトランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション及び感染がある。さらに、中枢神経系に関連するベクターに関する米国特許第４，８６６，０４２号及び正－負の選択法に関する米国特許第５，４６４，７６４号及び同第５，４８７，９９２号を参照されたい。

【０２２８】

感染によって核酸を導入する方法は、列挙した他の方法を超えていくつかの利点がある。その感染性質によって高い効率を達成できる。さらに、ウイルスは、非常に特殊化されているので、一般に特定の細胞型内で感染し増殖する。したがって、それらの天然の特異性を利用して、生体内又は組織もしくは細胞の混合培養物内で、ベクターに特定の細胞型をターゲットにさせることができる。またウイルスベクターは、特定の受容体又はリガンドで修飾して、受容体依存性事象によって標的特異性を変えることもできる。

【０２２９】

組換え配列を導入し発現するＤＮＡウイルスのベクターの具体例は、アデノウイルス由来のベクターＡｄｅｎｏｐｐ５３ＴＫである。このベクターは、正もしくは負の選択を行なうためのヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ＴＫ）の遺伝子及び所望の組換え配列の発現カセットを発現する。このベクターはアデノウイルスの受容体を有する細胞に感染させるために使うことができ、内皮などを起源とする大部分の癌が含有している。同様の所望の機能を示すこのベクターなどは、細胞の混合集団を治療するのに使うことができ、例えば、ヒト被験者の細胞、組織の生体外もしくはエクスビボ培養物を含んでいてもよい。好ましい一実施態様では、核酸構築物を含有するベクターは、アデノウイルスであり、少なくとも1×10^{8}個のウイルス粒子の投与量で提供される。

【０２３０】

発現を特定の細胞型に限定する特徴があってもよい。このような特徴としては、例えば所望の細胞型に対して特異的なプロモーター及び調節因子がある。

【０２３１】

さらに、組換えウイルスのベクターは、水平感染（ｌａｔｅｒａｌ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ）及びターゲッティングの特異性などの利点を付与するので、所望の核酸を生体内で発現させるのに有用である。水平感染は、例えばレトロウイルスのライフサイクルに固有なものであり、感染した単一の細胞が多数の子孫のビリオンを産生しそのビリオンが発芽分離して近傍の細胞に感染するプロセスである。その結果、大きな領域が迅速に感染されるようになるが、その領域の大部分は当初、原ウイルス粒子に感染していなかった。これは、感染因子が娘の子孫を通じてのみ広がる垂直型の感染と対照的である。水平方向に広が

ることができないウイルスベクターも産生できる。この特徴は、所望の目的が、限定数の標的細胞にのみ指定の遺伝子を導入することである場合に有用である。

【０２３２】

上記のように、ウイルスは、多くの場合、宿主の防衛機序を逃れるために進化してきた非常に特殊化された感染因子である。典型的に、ウイルスは、特定の細胞型に感染してその中で増殖する。ウイルスベクターのターゲッティング特異性は、その天然の特異性を利用して、予め定められた細胞型を特異的に標的にして、組換え遺伝子を、感染した細胞に導入する。本発明の方法で使用されるベクターは、標的とされる所望の細胞型によって決まり、当業者にはよく知られている。例えば、乳癌を治療すべき場合は、このような上皮細胞に特異的なベクターが利用される。同様に、造血系の疾患又は症状を治療すべき場合は、血球及びその前駆体に、好ましくは特定のタイプの造血細胞に、特異的なウイルスベクターが使用される。

【０２３３】

レトロウイルスベクターは、感染粒子として機能するように又は最初の一回だけ感染を行うように構築できる。前者の場合、ウイルスのゲノムは、新しいウイルスタンパク質とＲＮＡを合成するため必要なすべての遺伝子、調節配列及びパッケージングシグナルを維持するように修飾される。これらの分子が合成されると、宿主細胞は、さらに感染を行うことができる新しいウイルス粒子中にＲＮＡをパッケージする。またそのベクターのゲノムは、所望の組換え遺伝子をコードして発現するように遺伝子工学的に処置される。非感染性ウイルスベクターの場合、そのベクターゲノムは、通常、ＲＮＡをウイルス粒子内に被包するのに必要なウイルスのパッケージングシグナルを破壊するように変異させる。このようなシグナル無しでは、形成されるどの粒子もゲノムを含有していないので、次の感染段階に進めない。特定のタイプのベクターが、目的とする用途によって決まる。また、実際のベクターは、公知であるので当該技術分野で容易に入手可能であるか又は当業者が公知の方法を使って構築できる。

【０２３４】

前記組換えベクターはいくつもの方法で投与できる。例えばウイルスベクターを使う場合、その手順は、該ベクターの標的特異性を利用することができ、その結果、疾患部位に局所的に投与しなくてもよい。しかし局所投与はより迅速でより効果的な治療を行なうことができ、投与は例えば被験者に静脈又は皮下の注射を行なうことによって実施することもできる。ウイルスベクターの髄液中への注射も、特に神経変性疾患の場合、一投与方法として利用できる。注射した後、そのウイルスベクターは、感染に適した標的特異性を有する宿主細胞を認識するまで循環する。

【０２３５】

従来技術の遺伝子治療のプロトコルが遭遇する最も一般的な問題は、プロトコルの効力及び宿主のベクターに対する免疫応答が不十分であることである。効力が不十分なのは、送られた物質が細胞中に入らない、そのゲノムに組み込まれない又は適切なレベルで発現されないことが原因である。その上、時間の推移にわたる応答が劣っていることが多い。これは、再投与が有利であるかもしれないが上記免疫応答によって問題になることが多いことを意味する。

【０２３６】

このような治療の用途としては、標的組織における血管形成の促進と阻害の両方の用途がある。本発明のシス調節因子によって指向される核酸配列の優先的発現に対する細胞応答によって、血管形成を促進する内皮細胞の増殖又は血管形成の低下と虚血をもたらす内皮細胞の増殖の阻害が起こりうる。

【０２３７】

したがって、本発明の核酸構築物中に、発現すると細胞傷害性である核酸配列を含有させることによって、例えば腫瘍の新生血管の迅速に増殖する内皮細胞の細胞死を目的とする方法が提供される。このようなベクターは、全身に投与できるので、転移腫瘍巣の拡張を同定し突き止める現在利用できる能力より先んじて、発達中の転移腫瘍巣の細胞死を有

効に誘発するのに利用できる。

【０２３８】

本発明の構築物とともに、癌の遺伝子治療に利用できるこのような治療用核酸配列は、変異遺伝子の活性と制御の修復を目的とする修正遺伝子治療、癌細胞に対する免疫系の感作を目的とする免疫調節遺伝子治療，及びプロドラッグもしくは毒性薬剤（自殺遺伝子治療）、プローアポトーシス遺伝子、抗血管形成遺伝子又は化学療法もしくは放射線療法を促進することによって癌細胞を殺すことを目的とする細胞減少遺伝子治療に分類されることが多い。本発明のシス調節因子による修正遺伝子治療に適した核酸配列としては、限定されないが、ｐ５３遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋ、アクセッション番号ＢＣ０１８８１９）すなわち癌細胞中で発現が抑制される抗腫瘍性のＤＮＡ安定化遺伝子；Ｃｉｐ／Ｋｉｐ（ｐ２１、ＧｅｎＢａｎｋ、アクセッション番号ＮＭ０００３８９及びｐ２７、ＧｅｎＢａｎｋ、アクセッション番号ＮＭ００４０６４）並びにＩｎｋ４（ｐ１４、ＧｅｎＢａｎｋ、アクセッション番号ＮＭ０５８１９７）すなわちサイクリン依存性キナーゼ阻害剤がある。本発明のシス調節因子によって腫瘍遺伝子の機能を抑制するのに適切な核酸配列としては、限定されないが、ｒａｓ、ｍｙｃ、ｅｒｂＢ２及びｂｃｌ－２などの腫瘍遺伝子の転写と翻訳を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド及びこれら腫瘍遺伝子の翻訳を阻害する触媒リボザイムがある。抗腫瘍性のアンチセンスポリヌクレオチド及びリボザイムのポリヌクレオチドの合成方法と使用法は当該技術分野ではよく知られており、例えば、Ｒｏｔｈらの米国特許第６，６２７，１８９号、Ｂｅｎｎｅｔらの米国特許第６，２６５，２１６号及びＣａｌｌａｂｒｅｔｔａらの米国特許第５，７３４，０３９号に詳細に記述されている。なお、これらの文献は全体を本願に援用するものである。抗腫瘍性の触媒リボザイムの製造法及び使用法は、例えばＬｅｏｐｏｌｄらの米国特許第５，６３５，３８５号に記述されており、この文献は全体を本願に援用するものである。

【０２３９】

本発明の別の実施態様では、本発明のシス調節因子の制御下で発現される核酸配列は、免疫調節遺伝子治療に利用され、腫瘍細胞と転移腫瘍細胞による、免疫監視の回避を防止するように設計されている。本発明のシス調節因子とともに使用するのに適切な免疫調節因子をコードする核酸配列は、サイトカインの遺伝子、すなわち細胞傷害性Ｔ細胞が腫瘍抗原及び外因性の外来免疫源を認識することを促進する細胞内分子の遺伝子（非特異的な局所免疫反応を誘発させるため）である。適切な免疫刺激因子としては、限定されないが、ヒトＩＬ－２；ヒトα－、β－又はγ－インターフェロンなどのインターフェロン類；ヒトＴ細胞顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）；ヒト腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）；及びリンホトキシン（ＴＮＦ－ｂ）がある。ヒトＩＬ－２遺伝子は、クローン化されて配列決定されているので、例えば、ｐＢＣ１２／ＨＩＶ／ＩＬ－２（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（「ＡＴＴＣ」）からアクセッション番号６７６１８で入手できる）から０．６８ｋＢのＢａｍＨＩ－ＨｉｎＤＩＩＩフラグメントとして得ることができる。さらに、ヒトβインターフェロン、ヒトＧＭ－ＣＳＦ、ヒトＴＮＦ及びヒトリンホトキシンの配列は知られており入手できる。特に、ヒトγインターフェロンの配列は知られており（Ｆｉｅｒｓ ｅｔ ａｌ．（１９８２）Ｐｈｉｌｏｓ．Ｔｒａｎｓ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｌｏｎｄ．，Ｂ，Ｂｉｏｌ．Ｓｃｉ．２９９：２９－３８）、アクセッション番号Ｍ２５４６０でＧｅｎＢａｎｋに寄託されている。ヒトＧＭ－ＣＳＦの配列は知られており（Ｗｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８：８１０－８１５）、アクセッション番号Ｍ１０６６３でＧｅｎＢａｎｋに寄託されている。ヒトＴＮＦの配列は記述されており（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９８５） Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２８：１４９－１５４）、ＧｅｎＢａｎｋにアクセッション番号Ｍ１０９８８で寄託されている。ヒトリンホトキシン（ＴＮＦ－ｂ）の配列も刊行されており（Ｉｒｉｓ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．３：１３７－１４５）、アクセッション番号Ｚ１５０２６でＧｅｎＢａｎｋに寄託されている。

【０２４０】

さらに別の実施態様では、本発明のシス調節因子の制御下で発現される核酸配列は、細

胞減少遺伝子治療又は直接もしくは間接に遺伝子を送達することによって標的細胞を殺す方法に利用される。好ましい一実施態様では、核酸配列は細胞傷害性遺伝子でありその遺伝子としては限定されないが、ｐ５３及びｅｇｒ－１－ＴＮＦ－αなどの自殺遺伝子；ガンシクロビル／チミジンキナーゼ及び５－フルオロシトシン／シトシンデアミナーゼなどの薬物感受性療法用の細胞傷害性プロードラッグ／酵素並びに５　Ｅ１Ａなどの抗転移腫瘍遺伝子がある。特異的な細胞傷害性構造物の例は、後記実施例の章で、詳細に説明する。

【０２４１】

さらに別の実施態様では、本発明のシス調節因子の制御下で発現された核酸配列が、遺伝子ラジオアイソトープ療法に利用できる。ノルアドレナリン受容体（ＮＡＴ）を発現する細胞に放射能標識カテコールアミンＩ１３１－メタヨードベンジルグアニジンを摂取させる方法は、クロム親和性細胞腫、神経芽細胞腫、カルチノイド腫瘍及び髄様甲状腺癌に対する完成された治療法である。あるいは、ヨウ化ナトリウムのシンポーター（ｓｙｍｐｏｒｔｅｒ）（ＮＩＳ）が、正常及び悪性の甲状腺細胞へのヨウ素の摂取を仲介する。ＮＩＳ遺伝子が、導入遺伝子として、生体外及び生体内のモデルで前立腺癌を抑制することが報告されている。

【０２４２】

反対のアプローチは、例えば、アテローム性動脈硬化患者において、又は糖尿病のような疾患もしくは外傷の結果として末梢循環系の有意な障害を被った患者において、組織の血管を再生させるために使用されうる。この場合、ＡｄＰＰＥ－１－３Ｘ－ＧＦ型（ここで、ＧＦは増殖因子（例えば、サイトカイン）である）の構築物、又はその修飾型（例えば、ＡｄＰＰＥ－１－配列番号：７－ＧＦ）が、利用されうる。このような情況において使用するのに適した増殖因子には、ＶＥＧＦ（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｍ９５２００）及びラットＰＤＧＦ－ＢＢ（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号；ｍｕｓ－ＡＦ１６２７８４と９９％同一）、及びＥＧＲ－１（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｍ２２３２６）、ＦＧＦ（これらに制限はされないが、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＸＭ００３３０６を含む）、並びにそれらの組み合わせが含まれるが、これらに制限されない。

【０２４３】

本発明のこの側面によれば、血管の未成熟及び血管の退行の問題（これらはＶＥＧＦの単独投与と関連していることが示されている。更なる詳細については実施例セクションの実施例２７及び３１を参照されたい）を回避するために一以上の血管形成因子の使用が好ましいことが認識されよう。組合せ治療は内皮チャネル出芽及びこれに続く発生期の血管を安定化させるための平滑筋細胞の増加の第一段階を模倣することができる［Ｒｉｃｈａｒｄｓｏｎ　ＤＭ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：１０２９～１０３４］。本発明のこの側面による組合せ治療は、それぞれが本発明の単離された核酸の制御下にある同一の核酸構築物上で目的のポリヌクレオチドをクローニングすることによって実施されることができる。代わりに、又は好ましくは、目的のポリヌクレオチドのそれぞれは本発明の核酸構築物中に個別にクローニングされることができ、これにより、誘導された血管形成プロセスに対する緻密な制御を可能とする。

【０２４４】

さらに虚血組織への発現選択性を増強し、それにより選択された組織の血管を再生させるため、本発明のプロモーター配列への低酸素応答因子（例えば、配列番号：５）の組み込みも本発明と共に使用されうる。血液供給が改良されるにつれ、虚血が軽減され、低酸素応答因子が誘導されないようになり、ＧＦレベルが低下し、そして血管再生過程が停止する。

【０２４５】

本発明の核酸構築物を使って行なう内皮組織の遺伝子治療によって、血管形成内皮細胞を標的にできない他の方法では達成できない一時的整合（ｔｅｍｐｏｒａｌ　ｃｏｏｒｄｉｎａｔｉｏｎ）が行われることは分かるであろう。後記実施例の章で例示されているよ

うに、本発明の新規なエンハンサー配列を含むシス調節因子（例えばＰＰＥ－１（３ｘ））は、特に、血管が増殖している組織における組換え遺伝子の増大された発現を指向させながら、他の非血管形成組織中の組換え遺伝子の発現を防止する（実施例１２、１４、１６、１９、２０、２３、２７、２９、３４及び３５参照）。本発明のシス調節因子と構築物による転写制御下での治療用遺伝子の発現は、遺伝子産物が指向される細胞プロセス（新生脈管増殖プロセス）の活性化と一致して、その有効性がより大きくなりかつ治療に必要な有効投与量を有意に減らすことができる。

【０２４６】

したがって、本発明のシス調節因子を含む構築物を遺伝子治療に使うと、周りの正常組織に対する毒性作用を最小限にしながら、腫瘍に対する送達を最大にすることが期待できる。このことは、後記実施例の章に例示するように、周りの組織が内皮のコンポーネントを含んでいる場合でも有意に当てはまる。これは、実施例１６で証明されているように、本発明のシス調節因子が、ＰＰＥ－１プロモーターである場合でも、迅速に増殖中の内皮組織中での発現レベルを大きく増大するからである。

【０２４７】

後記諸実施例は、特に、本発明のシス調節因子をＰＰＥ－１プロモーターに関連して使用する場合を扱っているが、本発明のエンハンサーの配列も、他の真核プロモーター配列とともに使用するとその細胞特異的作用を発揮すると予想される。

【０２４８】

このような予想は、エンハンサーの配列が移動可能であることが多く、すなわち一プロモーターの配列からもう一つの非類縁のプロモーターに移転してしかも活性を維持できることを示す従来技術の知見に基づいている（例えば、Ｄ．Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．（１９９５）１７１（１）：６０－７２；Ｎ．Ｓ．Ｙｅｗ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．（２００１）４：７５－８２０及びＬ．Ｗｕ． ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．（２００１）８：１４１６－２６参照）。実際に、Ｂｕ ｅｔ ａｌ．の初期の研究（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（１９９７）２７２（１９）：３２６１３－３２６２２）は、本発明のエンハンサー配列に類縁のエンハンサー配列、例えば配列番号：１５と１６又は配列番号：６を含むエンハンサーが、構成プロモーター、例えばＳＶ－４０プロモーターとともに使用できることを強く示唆している。したがって、本発明のエンハンサー配列を含有するように修飾された真核プロモーターを含む構築物、そのプロモーターを使用する方法及びそのプロモーターを含む単離されたポリヌクレオチドは、本発明の範囲内に十分入っている。

【０２４９】

したがって本発明のエンハンサー配列の最小の配置構成は、配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合された配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部を含む単離されたポリヌクレオチドであると推定される。このエンハンサーは、限定されないが内皮特異的プロモーター（例えばＰＰＥ－１；配列番号：１）及び構成プロモーター例えばＣＭＶやＳＶ－４０由来のプロモーターのようなウイルスプロモーターを含む広範囲のプロモーターとともに機能すると予想される。このエンハンサーは、広範囲のプロモーターに内皮特異性を付与できなければならない。このエンハンサー配列は、例えば、配列番号：６に記載の配列の一つ以上のコピーを付加することによって、増大させることができる。これら追加の配列は、配列番号：８の配列に隣接して又は隣接せずに付加することができる。

【０２５０】

さらに、本発明には、配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合された配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部を少なくとも含有するエンハンサー配列及び対象の配列を内皮細胞に特異的に高いレベルで発現させるプロモーターに依存している構築物を利用して、対象の核酸配列の内皮細胞中での高レベルの発現を指向させる方法が含まれている。

【０２５１】

用語「被験者の身体から取り出した細胞にエクスビボ投与し次いでその細胞を被験者の身体に再導入する」は、本願で使う場合、特に、Ｌｙｄｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　７：１１９４－１２０１に記載されているような幹細胞を使うことを含んでいる。

【０２５２】

アデノウイルスが後記諸実施例に記載の実験に使われる場合、当業者は、本発明の構築物を他のウイルス送達系に容易に適応させることができる。

【０２５３】

内皮細胞特異的プロモーターを含有するウイルスベクターも、他の方法と組み合わせて使用してウイルスベクターのターゲッティングを促進できる。このような方法には、短いペプチドリガンド及び／又は二重特異性もしくは二価性の分子もしくはジアボディー（ｄｉａｂｏｄｙ）が含まれている（Ｎｅｔｔｅｌｂｅｃｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　３：８８２；２００１）。

【０２５４】

遺伝子治療によって組織に発現された治療用導入遺伝子に対する宿主の免疫応答は、有効な遺伝子治療のプロトコルを開発設計する際の重要問題であることは分かるであろう。組換え導入遺伝子の産物に対する逆の免疫応答は、薬物送達の効力を妨げかつ炎症、細胞障害及び疾患をもたらすことがある。したがって、発現された治療用組換え分子の抗原ポテンシャルは、遺伝子治療にとって非常に重要である。

【０２５５】

本発明を実施している間に、予想外のことであったが、Ａｄ５ＰＰＥ－１（３ｘ）核酸構築物の一部として発現されたヒトポリペプチド（ＴＮＦ－Ｒ１）　（実施例４１、図９５ｂ）が、マウス内で抗原性を欠いており、ＣＭＶプロモーターの制御下でのＦａｓ－ｃキメラ遺伝子の投与に対して明確な抗ＴＮＦ－Ｒ１応答があるにもかかわらず、宿主に有意な免疫応答を誘発しないこと（図９５）が明らかになったのである。したがって、本発明の単離されたポリペプチドは、本発明のシス調節因子の転写制御下、組換え導入遺伝子（又は遺伝子）を細胞内で発現させることによって行なわれる、内因的に発現された組換え導入遺伝子の単一又は複数の産物に対する宿主の免疫応答を、低下させるか又は除くのに使用される。そのシス調節因子は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターが好ましい。

【０２５６】

本発明を実施している間に、驚くべきことには、血管形成内皮特異的プロモーターＰＰＥ－１（３ｘ）が、抗血管形成療法による追加の相乗作用に応答することが分かったのである。図９４は、ＰＰＥ－１（３ｘ）の制御下のＬＵＣ受容体導入遺伝子を含む核酸構築物を有するトランスジェニックマウスの高度に血管が新生した器官（大動脈、心臓、肺、気管及び脳）においてルシフェラーゼの発現が二重エンドセリンレポーター（ＥＴＡ及びＥＴＢ）アンタゴニストＢｏｓｅｎｔａｎの投与に応答して優先的に促進されることを示している。本発明のシス調節因子の制御下で、治療用組換え遺伝子をトランスジェニック発現させることと組み合わせた抗血管形成療法のこの相乗作用は、薬物ターゲッティングと抗血管形成療法の必要投与量の減少という従来開示されたことのない可能性を示している。一つの仮説に限定したくないが、抗血管形成療法に対する内因性組織の応答は、エンドセリンプロモーターの誘発因子を、オートクリンループを介して活性化する際、実際に、本発明の核酸構築物のエンドセリンプロモーター配列を強化すると考えられる。したがって、一実施態様では、本発明のシス調節因子を含む構築物は、内皮特異的プロモーターの活性の内因性エンハンサーを誘発できるように選択された補助的な抗血管形成療法と併用して投与される。当該技術分野でよく知られている抗血管形成療法としては、限定されないが、Ｂｏｓｅｎｔａｎなどのエンドセリン受容体のアンタゴニスト類、ＶＥＧＦ－受容体のアンタゴニスト類のアンギオスタチンとエンドステチン、及びＢｅｖａｃｉｚｕｍａｂとＮｏｖａｓｔなどの抗血管形成抗体がある。

【０２５７】

本発明の構築物と方法は、組織工学に使用するのに特に適している。ＶＥＧＦとＰＤＧ

Ｆは、通常血管新生を誘発するために使用されるが、これらの因子を有効に投与する方法は、まだ最適な方法になっていない。生体外の場合は、増殖因子は増殖培地に添加される。この方法では、比較的高い濃度が必要である。生体内の場合は、遺伝子工学的に処置された組織構築物は迅速に血管を新生させて移植部位に血管形成を誘発する必要がある。本発明のシス調節因子と核酸構築物を使って、生体内及びエクスビボで組織に血管を新生させて、例えば、組織工学すなわち創傷治癒、加齢性黄斑変性などの治療に使用できる。本発明を実施すると第一に、血管形成因子がＰＰＥ－１（３ｘ）の調節制御下で、生体外で遺伝子工学的に処置されて血管が新生した組織中に優先的に発現されて、生体外及び生体内で遺伝子工学的に処置された組織に高度に血管が新生される。

【０２５８】

細胞がＡｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦに感染すると、遺伝子工学的に処置された構築物に形成される血管様構造の数と大きさに対して誘起効果があり、Ａｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦウイルスで処置した試料の血管の数と血管面積の百分率は、ＶＥＧＦを培地に加えた場合と比べて４－５倍になる（図９１ａ）。移植したスカフォルドベースの（ｓｃａｆｆｏｌｄ－ｂａｓｅｄ）組織構築物の生存、分化、統合及び血管新生について、生体内試験で分析した。Ａｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦウイルスに感染した構築物は、対照の構築物に比べて、血管構造が増大することを示している。

【０２５９】

したがって、好ましい一実施態様では、本発明の核酸構築物は、組織が天然のもの又は遺伝子工学的に処置されたものであろうとも、その組織の血管形成を調節するのに使用される。

【０２６０】

本発明の発明者らは、ルシフェラーゼベースのイメージングシステムを使用して、Ａｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦに感染させ移植された構築物が、ＡＡＶ－ルシフェラーゼだけに感染させた対照の構築物より強い信号を有し、生体外でＡｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦに感染させると、遺伝子工学的に処置して移植された組織構築物の生存と血管新生を改善できることを示すことを明らかにした（図９１ｂ）。さらに、本発明のアデノウイルス構築物を形質導入された細胞を含有するこのような遺伝子工学的に処置された組織構築物は、周りの組織を細胞崩壊によって治療する組換えウイルス粒子源を構成することができる。

【０２６１】

したがって、本発明の一側面によって、本発明の核酸構築物を含有する細胞が提供される。本発明のさらに別の側面によって、これらの細胞は、例えば組織を遺伝子工学的に処置するため、使用されるスカフォルドを接種するのに使用される。スカフォルドを使用して組織を遺伝子工学的に処置する方法は当該技術分野でよく知られている（例えば、米国特許第６，７５３，１８１号、同第６，６５２，５８３号、同第６，４９７，７２５号、同第６，４７９，０６４号、同第６，４３８，８０２号、同第６，３７６，２４４号、同第６，２０６，９１７号、同第６，７８３，７７６号、同第６，５７６，２６５号、同第６，５２１，７５０号、同第６，４４４，８０３号、同第６，３００，１２７号、同第６，１８３，７３７号、同第６，１１０，４８０号、同第６，０２７，７４３号及び同第５，９０６，８２７号、並びに米国特許願第００４００４４４０３号、同第００３０２１５９４５号、同第００３０１９４８０２号、同第００３０１８０２６８号、同第００３０１２４０９９号、同第００２０１６０５１０号、同第００２０１０２７２７号を参照。なおこれらの特許文献は本願に援用するものであり、すべて、組織のスカフォルド上に遺伝子工学的に処置した組織を生成させることを教示している）。適切なスカフォルドは、合成ポリマー、細胞接着分子又は細胞外マトリックスタンパク質からなることができる。

【０２６２】

本発明で使用される細胞接着／ＥＣＭタンパク質は、どのような細胞接着及び／又は細胞外マトリックスタンパク質でもよい。このようなタンパク質としては、限定されないが、フィブリノーゲン、コラーゲン、インテグリン（Ｓｔｅｆａｎｉｄａｋｉｓ Ｍ．ｅｔ

ａｌ．，２００３；Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７８：３４６７４－８４）、細胞間接着分子（ＩＣＡＭ）（ｖａｎ ｄｅ Ｓｔｏｌｐｅ Ａ．ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｓａａｇ ＰＴ．１９９６；Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．７４：１３－３３）、テネイシン、フィブリネクチン（Ｊｏｓｈｉ Ｐ．ｅｔ ａｌ．，１９９３；Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｓｃｉ．１０６：３８９－４００）；ビメンチン、微小管結合タンパク質１Ｄ（Ｔｈｅｏｄｏｓｉｓ ＤＴ．２００２；Ｆｒｏｎｔ Ｎｅｕｒｏｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２３：１０１－３５）、ギセリン、神経突起伸展因子（ＮＯＦ）（Ｔｓｕｋａｍｏｔｏ Ｙ．ｅｔ ａｌ．，２００１；Ｈｉｓｔｏｌ．Ｈｉｓｔｏｐａｔｈｏｌ．１６：５６３－７１）、ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）、細菌セルロース（ＢＣ）、ゼラチン及び／又は神経損傷誘発タンパク質２（ニンジュリン２（ｎｉｎｊｕｒｉｎ２））（Ａｒａｋｉ Ｔ．ａｎｄ Ｍｉｌｂｒａｎｄｔ Ｊ．２０００；Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２０：１８７－９５）がある。

【０２６３】

本発明によって使用される合成ポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ヒドロキシアパタイト（ＨＡ）、ポリグリコール酸（ＰＧＡ）（Ｆｒｅｅｄ ＬＥ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ），１９９４ Ｊｕｌ；１２（７）：６８９－９３）、ポリ１－ラクチドで強化されたε－カプロラクトンと１－乳酸の編物［ＫＮ－ＰＣＬＡ］（Ｏｚａｗａ Ｔ．ｅｔ ａｌ．，２００２；Ｊ．Ｔｈｏｒａｃ．Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｓｕｒｇ．１２４：１１５７－６４）、同織布（ＷＶ－ＰＣＬＡ）［Ｏｚａｗａ，２００２（前掲文献）］、連続気泡カルシウムヒドロキシアパタイトセラミックス類（ＩＰ－ＣＨＡ）、ポリＤ，Ｌ，－乳酸－ポリエチレングリコール（ＰＬＡ－ＰＥＧ）（Ｋａｉｔｏ Ｔ．ｅｔ ａｌ．，２００５；Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ．２６：７３－９）、不飽和ポリエステルポリ（プロピレングリコール－コ－フマル酸）（ＰＰＦ）（Ｔｒａｎｔｏｒｏ ＤＪ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｒａｌ Ｍａｘｉｌｌｏｆａｃ，Ｉｍｐｌａｎｔｓ．１８：１８２－８）、ポリラクチド－コ－グリコリド（ＰＬＡＧＡ）（Ｌｕ ＨＨ，ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．６４Ａ（３）：４６５－７４）、ポリ－４－ヒドロキシブチレート（Ｐ４ＨＢ）、及び／又はポリフォスファゼン（Ｃｏｈｅｎ Ｓ．ｅｔ ａｌ．，１９９３；Ｃｌｉｎ．Ｍａｔｅｒ．１３（１－４）：３－１０）であることができる。

【０２６４】

本発明を実施する間に、本発明の発明者らは、プローアポトーシス剤の組織特異的な発現と活性化を組み合わせると、非標的の組織又は細胞をこれら薬剤に暴露することなく、血管形成に関与する細胞の選択的アポトーシスを実施できるので、従来技術の治療法の特徴である毒性作用と冗長性を避けることができる。

【０２６５】

したがって、本発明の一側面によって、被験者の組織の血管形成をダウンレギュレートする方法が提供される。用語「血管形成をダウンレギュレートする」は本願で使用する場合、新しい血管を形成する血管形成のプロセスを遅らせるか又は停止させることを意味する。

【０２６６】

本発明のこの側面による方法は、血管形成細胞の部分母集団に細胞傷害性を生じるように設計され配置構成された核酸構築物を被験者に投与することによって行なわれる。用語「血管形成細胞」は、本願で使用する場合、血管形成のプロセスに参加し関与するどのような細胞も意味する。したがって、血管形成細胞としては、限定されないが、内皮細胞、平滑筋細胞がある。

【０２６７】

用語「細胞傷害性」は、本願で使用する場合、潜在的に不可逆に細胞死をもたらすことが最も多く、細胞の正常な代謝、機能及び／又は構造を破壊する化合物又はプロセスの能力を意味する。本願では、「細胞傷害性分子」は、定義された条件下で、細胞傷害を起こす能力を有するか又は細胞内に細胞傷害のプロセスもしくは経路を誘発する分子と定義す

る。このような細胞傷害性分子としては、限定されないが、メトトレキサート、ヌクレオシド類似体、ナイトロジェンマスタード化合物類、アントラサイクリン類などの抗代謝物；カスパーゼなどのアポトーシス誘発剤；並びに細胞傷害性薬剤をコードする遺伝子及びＦａｓ－ｃキメラ遺伝子などの細胞傷害プロセスの他の誘発剤がある。細胞傷害性の薬剤と分子は、抗代謝薬剤などの他の因子とは無関係に完全に細胞傷害性であるか又は他の細胞傷害性又は非細胞傷害性の因子の相互作用によって、条件付きで細胞傷害性になることがある。細胞傷害性生成ドメインは、細胞傷害性遺伝子のコーディング配列などの細胞傷害性を誘発又は開始できる細胞傷害性分子の部分と定義する。細胞傷害性経路としては、特に、アポトーシスと壊死がある。

【０２６８】

本発明の好ましい一実施態様では、細胞傷害性因子の発現は血管形成細胞の部分母集団に対して指向される。細胞傷害性因子の特異的発現を血管形成細胞の部分母集団に対して指向させるために、本発明の核酸構築物は、例えばＦａｓ、ＴＮＦＲ及びＴＲＡＩＬなどの細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合された受容体チロシンキナーゼ、受容体セリンキナーゼ、受容体トレオニンキナーゼ、細胞接着分子又はホスファターゼ受容体の細胞表面受容体ドメインであることができるリガンド結合ドメインを含むキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域を含んでいる。

【０２６９】

このようなキメラポリペプチドは、そのリガンド結合ドメインの活性化（すなわちリガンドの結合による）が、細胞傷害性分子のエフェクタードメインを通じて細胞傷害性をトリガーする限り、任意の細胞傷害性ドメインに融合した任意のリガンド結合ドメインを含むことができる。

【０２７０】

リガンド結合ドメイン及びこれに融合される細胞傷害発生ドメインは、アポトーシスを起こすため標的とされる血管形成細胞のタイプに影響される。例えば、内皮細胞の特定のサブセット（例えば増殖中の内皮細胞又は腫瘍状表現型を示す内皮細胞）を標的とする場合、前記キメラポリペプチドは、このような内皮細胞の環境内に自然に存在し、好ましくは他の非標的の組織の内皮細胞には存在しないリガンド（ＴＮＦ、ＶＥＧＦ）に結合できるリガンド結合ドメインを含んでいる。このようなリガンドは、内皮細胞によって分泌され（オートクリン〕、近傍の腫瘍細胞によって分泌され（パラクリン）又はこれらの内皮細胞を特異的に標的にする。

【０２７１】

適切なキメラポリペプチドの例は先に述べているが、続く実施例の章の実施例７及び３３－３６に記載されている。キメラポリペプチドは、好ましくは、後記実施例の章の実施例７－９に詳細に記載されているＦａｓ－ｃキメラ又は実施例３３－３６に記載のＨＳＶ－ＴＫ遺伝子である。Ｆａｓ－ｃキメラの発現は、Ｆａｓ－デス経路のＦＡＤＤ媒介活性化によってアポトーシスを誘発することが分かった。ＨＳＶ－ＴＫ導入遺伝子が発現すると、ガンシクロビル及びアシクロビルなどの薬剤に対する形質導入された細胞の感受性が亢進して、アポトーシス及び壊死による細胞死を起こす。

【０２７２】

後記実施例の章で示されているように、このようなキメラポリペプチドは、特定のサブセットの血管形成細胞の細胞障害性を有効かつ強く活性化しながら、細胞死を目的としない他のサブセットの細胞の細胞障害性の活性化を回避できるので、これらポリペプチドを使用することは特に有利である。

【０２７３】

後記実施例の章の実施例３３－３８に例示したように、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーター配列の転写制御下のＨＳＶ－ＴＫ遺伝子を含む本発明の核酸構築物の生体外及び生体内の投与はともに、高いガンシクロビル依存性の内皮細胞の細胞傷害を起こした。細胞傷害は、血管形成内皮細胞に限定されて、腫瘍及び転移腫瘍に選択的なアポトーシス細胞死と細胞壊死を起こした。

【０２７４】
したがって、本発明の核酸構築物は、プロドラッグを毒性化合物に変換できる自殺遺伝子を送達するのに使用できる。好ましい一実施態様では、核酸構築物は、このような自殺遺伝子をコードする第一ポリヌクレオチド領域及び血管形成細胞中に自殺遺伝子の発現を指向させることのできるシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域を含んでいる。

【０２７５】
本発明の構築物及び方法において、治療用の核酸配列すなわち「自殺遺伝子」は、それ自体で又は他の化合物の存在下で細胞死を起こす産物をコードする核酸である。上記構築物は、自殺構築物の一例だけを示しているに過ぎないことは分かるであろう。追加の例は、水痘帯状疱疹ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ、及び５－フルオロシトシンを高毒性化合物の５－フルオロウラシルに変換できる細菌遺伝子シトシンデアミナーゼである。

【０２７６】
用語「プロドラッグ」は、本願で使用する場合、毒性産物すなわち腫瘍細胞に対して毒性の産物に変換できる、本発明の方法に有用な化合物を意味する。このプロドラッグは、本発明の方法に有用なベクター中の治療用核酸配列（自殺遺伝子）の遺伝子産物によって毒性産物に変換される。このようなプロドラッグの代表的な例は、生体内で、ＨＳＶ－チミジンキナーゼによって毒性化合物に変換されるガンシクロビルである。ガンシクロビルの誘導体も腫瘍細胞に対して毒性である。プロドラッグのその他の代表的な例としては、アシクロビル、ＦＩＡＵ［１－（２－デオキシ－２－フルオロ－β－Ｄ－アラビノフラノシル）－５－ヨードウラシル］、ＶＺＶ－ＴＫ向け６－メトキシプリンアラビノシド及びシトシンデアミナーゼ向け５－フルオロシトシンがある。好ましい自殺遺伝子／プロドラッグの併用は、細菌シトシンデアミナーゼと５－フルオロシトシンもしくはその誘導体との併用並びにＨＳＶ－ＴＫとガンシクロビル、アシクロビル、ＦＩＡＵもしくはその誘導体との併用である。自殺遺伝子／プロドラッグ構築物の製造法と使用法は、Ｗｏｏ ｅｔ ａｌ．の米国特許第６，０６６，６２４号と後記実施例の章に詳細に記載されている。

【０２７７】
好ましい一実施態様では、シス調節因子は、内皮又は外皮に特異的なプロモーターである。条件付きでアデノウイルスのベクターを複製することによる細胞の形質導入は、標的細胞の崩壊及びウイルス感染の拡大を行なうのに有意に一層有効であるので、核酸構築物は、好ましくは、条件付きで複製するアデノウイルスを含んでいる。本発明のこのようなＣＲＡＤ構築物は、後記実施例の章に詳細に記載されている。

【０２７８】
好ましくは、本発明の核酸構築物は、例えば、全身投与経路又は経口、直腸経由、粘膜経由（特に鼻腔経由）、腸経由もしくは非経口経路によって、被験者に投与される。全身投与法としては、筋肉内、皮下及び髄内の注射並びに髄腔内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、眼内の注射又は腫瘍内注射がある。

【０２７９】
被験者は、好ましくは哺乳類であり、より好ましくはヒトであり、最も好ましくは特徴的な腫瘍増殖、増殖性糖尿病網膜症、関節炎などの過剰な又は異常な血管新生を特徴とする疾患に冒されているヒトである。

【０２８０】
本発明の核酸構築物は、それ自体又は医薬組成物の一部（有効成分）として投与できる。

【０２８１】
従来技術は、裸の又は担体を加えたポリヌクレオチドを多種類の細胞型に効率的に送達するのに使用できる多種類の送達戦略を教示している（例えば、Ｌｕｆｔ（１９９８）Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ ７６（２）：７５－６；Ｋｒｏｎｅｎｗｅｔｔ ｅｔ ａｌ．（１９９８） Ｂｌｏｏｄ ９１（３）：８５２－６２；Ｒａｊｕｒ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ Ｃｈｅｍ ８（６）：９３５－４０；Ｌａｖｉｇｎｅ ｅｔ ａ

ｌ．（１９９７）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ２３７（３）：５６６－７１及びＡｏｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ２３１（３）：５４０－５参照）。

【０２８２】

本明細書において使用されるように、「医薬組成物（薬学的組成物）」とは、本明細書に記載された活性成分１個以上の、生理学的に適当な担体及び賦形剤のような他の化学成分との調製物をさす。医薬組成物の目的は、化合物の生物への投与を容易にすることである。

【０２８３】

以後、交換可能に使用されうる「生理学的に許容できる担体」及び「医薬的（薬学的）に許容できる担体」という語句は、生物に対する有意な刺激を引き起こさず、かつ投与された化合物の生物学的活性及び特性を消滅させない担体又は希釈剤をさす。補助剤は、これらの語句に含まれる。

【０２８４】

本明細書において、「賦形剤」という用語は、活性成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質をさす。賦形剤の例には、これらに制限はされないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖及び型のデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、並びにポリエチレングリコールが含まれる。

【０２８５】

薬物の製剤化及び投与のための技術は、参照により本明細書に組み込まれる“Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，”Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ペンシルベニア州、の最新版に見出されうる。

【０２８６】

好適な投与経路には、例えば、経口送達、直腸送達、経粘膜送達（特に経鼻送達）、経腸送達又は非経口送達（筋肉内注射、皮下注射及び髄質内注射、ならびにくも膜下注射、直接的な心室（脳室）内注射、静脈内注射、腹腔内注射、鼻内注射、眼内注射を含む）が含まれ得る。

【０２８７】

あるいは、医薬組成物は、全身的な様式ではなく、局所的な様式で、例えば、医薬組成物を患者の組織領域内に直接的に注射することによって投与することができる。本発明に関連して、腫瘍組織内への直接的な投与は、局所的な投与の関連する一例である。

【０２８８】

本発明の医薬組成物は、この分野で十分に知られている様々なプロセスによって、例えば、混合、溶解、造粒、糖衣剤作製、研和、乳化、カプセル化、包括化又は凍結乾燥の従来のプロセスによって製造することができる。

【０２８９】

本発明に従って使用される医薬組成物は、従って、医薬的に使用され得る調製物への有効成分の加工を容易にする、賦形剤及び補助剤を含む１つ以上の生理学的に許容できる担体を使用して従来の様式で配合することができる。適正な配合は、選ばれた投与経路に依存する。

【０２９０】

注射の場合、医薬組成物の有効成分は、水溶液中に、好ましくは、ハンクス溶液、リンゲル溶液又は生理食塩水などの生理学的に適合し得る緩衝液中に配合することができる。経粘膜投与の場合、透過させられるバリアに対して適切な浸透剤が配合において使用される。そのような浸透剤はこの分野では一般に知られている。

【０２９１】

経口投与の場合、医薬組成物は、活性な化合物をこの分野で広く知られている医薬的に許容できる担体と組み合わせることによって容易に配合することができる。そのような担体は、医薬組成物を、患者によって経口摂取される錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤

、ゲル、シロップ、スラリー剤、懸濁物などとして配合することを可能にする。経口使用される薬理学的調製物は、固体の賦形剤を使用し、得られた混合物を場合により粉砕し、そして錠剤又は糖衣錠コアを得るために、所望する場合には好適な補助剤を添加した後、顆粒の混合物を加工して作製することができる。好適な賦形剤には、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール又はソルビトールを含む糖などの充填剤；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボメチルセルロースなど；及び／又はポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）などの生理学的に許容できるポリマーがある。所望する場合には、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、又はアルギン酸もしくはその塩（アルギン酸ナトリウムなど）などの崩壊剤を加えることができる。

【０２９２】

糖衣錠コアには、様々な好適なコーティングが施される。この目的のために、高濃度の糖溶液を使用することができ、この場合、糖溶液は、場合により、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液及び好適な有機溶媒又は溶媒混合物を含有し得る。色素又は顔料が、活性な化合物の量を明らかにするために、又は活性な化合物の量の種々の組合せを特徴づけるために、錠剤又は糖衣錠コーティングに添加され得る。

【０２９３】

経口使用され得る医薬組成物には、ゼラチンから作製されたプッシュ・フィット型カプセル、ならびにゼラチン及び可塑剤（グリセロール又はソルビトールなど）から作製された軟いシールされたカプセルが含まれる。プッシュ・フィット型カプセルは、充填剤（ラクトースなど）、結合剤（デンプンなど）、滑剤（タルク又はステアリン酸マグネシウムなど）及び場合により安定化剤と混合された有効成分を含有し得る。軟カプセルでは、有効成分を好適な液体（脂肪油、流動パラフィン又は液状のポリエチレングリコールなど）に溶解又は懸濁させることができる。さらに、安定化剤を加えることができる。経口投与される配合物はすべて、選ばれた投与経路について好適な投薬形態でなければならない。

【０２９４】

口内投与の場合、組成物は、従来の様式で配合された錠剤又はトローチの形態を取ることができる。

【０２９５】

鼻腔吸入による投与の場合、本発明に従って使用される有効成分は、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン又は二酸化炭素）の使用により加圧パック又はネブライザーからのエアロゾルスプレー提示物の形態で都合よく送達される。加圧されたエアロゾルの場合、投薬量単位は、計量された量を送達するためのバルブを備えることによって決定することができる。ディスペンサーにおいて使用される、例えば、ゼラチン製のカプセル及びカートリッジであって、化合物と好適な粉末基剤（ラクトース又はデンプンなど）との粉末混合物を含有するカプセル及びカートリッジを配合することができる。

【０２９６】

本明細書中に記載される医薬組成物は、例えば、ボーラス注射又は連続注入による非経口投与のために配合することができる。注射用配合物は、場合により保存剤が添加された、例えば、アンプル又は多回用量容器における単位投薬形態で提供され得る。組成物は、油性ビヒクル又は水性ビヒクルにおける懸濁物又は溶液剤又はエマルションにすることができ、そして懸濁化剤、安定化剤及び／又は分散化剤などの配合剤を含有することができる。

【０２９７】

非経口投与される医薬組成物には、水溶性形態での活性な調製物の水溶液が含まれる。さらに、有効成分の懸濁物は適切な油性注射用懸濁物又は水性注射用懸濁物として調製することができる。好適な親油性の溶媒又はビヒクルには、脂肪油（ゴマ油など）、又は合

成脂肪酸エステル（オレイン酸エチルなど）、トリグリセリド又はリポソームが含まれる。水性の注射用懸濁物は、懸濁物の粘度を増大させる物質、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール又はデキストランなどを含有することができる。場合により、懸濁物はまた、高濃度溶液の調製を可能にするために有効成分の溶解性を増大させる好適な安定化剤又は作用剤を含有することができる。

【０２９８】

あるいは、有効成分は、使用前に好適なビヒクル（例えば、パイロジェン非含有水に基づく滅菌された溶液）を用いて構成される粉末形態にすることができる。

【０２９９】

本発明の医薬組成物はまた、例えば、カカオバター又は他のグリセリドなどの従来の坐薬基剤を使用して、坐薬又は停留浣腸剤などの直腸用組成物に配合することができる。

【０３００】

本発明に関連して使用される好適な医薬組成物には、有効成分が、意図された目的を達成するために効果的な量で含有される組成物が含まれる。より詳細には、治療効果的な量は、処置されている被験者の障害の症状（例えば、骨量の進行性喪失）を防止もしくは緩和もしくは改善するために、又は処置されている被験者の生存を延ばすために効果的な有効成分（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）の量を意味する。

【０３０１】

治療効果的な量の決定は、特に、本明細書中に示される詳しい開示に照らして、十分に当業者の能力の範囲内である。

【０３０２】

本発明の方法において使用される任意の調製物について、治療効果的な量又は用量はインビトロアッセイ及び細胞培養アッセイから最初に推定することができる。例えば、用量は、所望される濃度又は力価を達成するために、骨化石症のネズミＳｒｃ欠損モデル（Ｂｏｙｃｅ ｅｔ ａｌ．（１９９２）、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．、９０、１６２２～１６２７；Ｌｏｗｅ ｅｔ ａｌ．（１９９３）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０、４４８５～４４８９；Ｓｏｒｉａｎｏ ｅｔ ａｌ．（１９９１）、Ｃｅｌｌ、６４、６９３～７０２）などの動物モデルにおいて定めることができる。そのような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。

【０３０３】

本明細書中に記載される有効成分の毒性、細胞傷害性、及び治療効力は、細胞培養又は実験動物におけるインビトロでの標準的な薬学的手法によって決定することができる。これらのインビトロアッセイ及び細胞培養アッセイならびに動物研究から得られたデータは、ヒトにおいて使用される投薬量範囲を決定する際に使用することができる。投薬量は、用いられる投薬物形態及び使用される投与経路に依存して変化し得る。正確な配合、投与経路及び投薬量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選ぶことができる（例えば、Ｆｉｎｇｌ ｅｔ ａｌ．、１９７５年、Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、第１章、１頁を参照のこと）。

【０３０４】

投薬量及び投薬間隔は、腫瘍の進行を遅らせるために十分である有効成分のレベル（最小有効濃度、ＭＥＣ）に合わせて個々に調節することができる。ＭＥＣはそれぞれの調製物について変化するが、インビトロでのデータから推定することができる。ＭＥＣを達成するために必要な投薬量は個体の特性及び投与経路に依存する。検出アッセイを使用して、血漿中濃度を測定することができる。

【０３０５】

処置される状態の重篤度及び応答性に依存して、投薬は単回又は多数回の投与で行うことができ、この場合、処置クールは、数日から、数週間まで、又は疾患状態の縮小が達成されるまで続く。

【０３０６】

投与される組成物の量は、当然のことではあるが、処置されている被験者、苦痛の重篤度、投与様式、処方医の判断などに依存する。

【０３０７】

本発明を実施する間に、アデノウイルスのベクター中の、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの転写制御下でのＦａｓ－ｃキメラの抗転移作用は、ある範囲の投与量及び治療法の条件にわたって有意であることが観察された。後記実施例の章の実施例４２に詳細に記載されているように、一回静脈注射を受けたマウスと二回静脈注射を受けたマウスの転移肺癌のルイス肺癌モデルの結果を比較したところ、全身腫瘍組織量を減らす効果は（殺して肺の重量を測定することによって評価した）、一回の注射（転移腫瘍の拡大が始まってから５日目）が二回の注射と同じであることが明らかになった。さらなる試験によって、一回の投与当たり10^8個という少ないウイルスの一回の静脈注射が、10^9個以上のウイルスの投与量からの４５％以上の減少で、（殺した時の肺重量で測定されるように）転移腫瘍の増殖を減らすのに有効であることが明らかになった。

【０３０８】

したがって、本発明の一実施態様では、核酸構築物は、生体内で一回用量で投与される。別の実施態様では、核酸構築物は、二回以上すなわち二回、三回など投与される。さらに別の実施態様では、核酸構築物はＡｄ５－ＰＰＥ－１（３ｘ）などのアデノウイルス構築物であり、一回用量当り少なくとも1×10^8個のウイルスの投与量で投与される。

【０３０９】

本発明の組成物は、所望する場合には、有効成分を含有する１つ以上の単位投薬形態物を含有し得る、ＦＤＡ承認キットなどのパック又はディスペンサーデバイスで提供されることができる。パッケージ物は、例えば、金属箔又はプラスチック箔を含むことができる（ブリスターパッケージ物など）。パッケージ物又はディスペンサーデバイスには、投与に関する説明書が伴い得る。パッケージ物又はディスペンサーにはまた、医薬品の製造又は使用又は販売を規制する政府当局により定められた形式で容器に付けられた通知が伴い得る。この場合、そのような通知は、組成物の形態又はヒトもしくは動物への投与の当局による承認を反映する。そのような通知は、例えば、処方薬物に対する米国食品医薬品局により承認されたラベル書きであり得るか、又は承認された製品添付文書であり得る。適合し得る薬学的担体に配合された本発明の調製物を含む組成物はまた、上記にさらに詳しく記載されているかのように、示された状態を処置するために、調製され、適切な容器に入れられ、表示され得る。

【０３１０】

本発明の医薬組成物は、細胞による核酸構築物の取り込み、核酸構築物によりコードされるキメラなポリペプチド又は自殺遺伝子の細胞における発現、又は発現したキメラなポリペプチド又は自殺遺伝子産物の活性を改善し得る任意のさらなる成分をさらに含むことができる。

【０３１１】

例えば、ＥＣ細胞内へのアデノウイルスベクターの取り込みを、操作された抗体又は小ペプチドでベクターを処置することによって高めることができる。そのような「アデノボディー（ａｄｅｎｏｂｏｄｙ）処置は、アデノウイルス構築物を細胞表面のＥＧＦ受容体に指向させることにおいて効果的であることが示されていた（Ｗａｔｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．、１９９７、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ、４：１００４～１０１２）。さらに、Ｎｉｃｋｌｉｎ ｅｔ ａｌ．は、ファージディスプレーにより単離された小ペプチドが、内皮細胞におけるベクターの特異性及び効率を増大させ、そして培養において肝臓細胞における発現を低下させたことを示している（Ｎｉｃｋｌｉｎ ｅｔ ａｌ．、２０００、Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ、１０２：２３１～２３７）。最近の研究では、ＦＧＦ再標的化アデノウイルスベクターはマウスにおいてｔｋの毒性を低下させた（Ｐｒｉｎｔｚ ｅｔ ａｌ．、２０００、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ、１１：１９１～２０４）。

【０３１２】

低線量の放射線は、主としてＧ２／Ｍ相のＤＮＡストランドを切断し、細胞膜の損傷が

巻添え作用を促進するので、放射線療法を併用すると、他の細胞傷害性－抗血管新生療法の効果を高めることができる。低線量の放射線は、毛細血管の内皮細胞のアポトーシス系を特異的に標的とすることが実証されているので（Ｋｏｌｅｓｎｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ２００３；２２：５８９７－９０６）、血管の内皮細胞はこのような併用療法に特に適しているであろう。アンギオスタチンは、低線量放射線の治療効果を高めることが示されている（Ｇｏｒｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎ Ｒｅｓ１９９８；５８：５６８６－８９）。しかし、放射線照射は、プロ血管形成性の「組織修復因子」を増大することも示されているので（Ｉｔａｓａｋａ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ａｓｓｏｃ Ｃａｎｃ Ｒｅｓ，２００３；ａｂｓｔｒａｃｔ １１５）、放射線の作用はまだ十分に分かっていない。同様に、特定の化学療法剤が特定の細胞傷害性及びアポトーシスの経路を活性化することが分かっている［ドキソルビシン、シスプラチン及びマイトマイシンＣは、Ｆａｓ受容体、ＦＡＤＤ及び他のプロ血管形成のシグナルのＦＡＤＤ／ＭＯＲＴ－１経路への蓄積を誘発する（Ｍｉｃｈｅａｕ ｅｔ ａｌ．，ＢＢＲＣ １９９９ ２５６：６０３－０７）］。本発明を実施している間、予想外のことであったが、低線量放射線による治療が、ＰＰＥ－１（３ｘ）の制御下にあるＴＫを含む核酸構築物及びガンシクロビルの投与の抗腫瘍及び抗転移腫瘍の効果に対して明確な相乗作用があることが明らかになったのである（実施例３５と３６、図７９－８６）。このような低線量の放射線照射がＴＫの発現と治療効果を活性化することができ、ドキソルビシンの化学療法の効果を特異的に高めることができることが実証され、かつＦＡＤＤ／ＭＯＲＴ－１アポトーシス経路を活性化すること（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．ＪＢＣ ２００２；２７７：３８８５５－６２）が知られているので、上記のことは、本発明にとって特に重要である。

【０３１３】

このような併用療法の効力のさらなる証拠は実施例３７に記載されており、その実施例は、内皮細胞（ＢＡＥＣ）におけるドキソルビシンとＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃキメラ構築物の投与の併用の相乗効果を示している（図９１）。したがって、本発明の核酸構築物及びこれを含有する医薬組成物は、迷入性の血管形成に関連する疾患又は症状を、単独で又はこれら障害の確立された又は実験的な治療法の１種以上と組み合わせて使用して治療することができる。本発明の核酸構築物又はこれをコードするポリヌクレオチドを併用することに適した癌治療法としては、限定されないが、化学療法、放射線療法、光線療法と光力学療法、外科療法、栄養療法、切除療法、放射線療法と化学療法の併用療法、小線源療法、陽子線療法、免疫療法、細胞療法及び光子線放射線手術法がある。

【０３１４】

本発明の化合物と同時に投与できる抗癌薬剤としては限定されないが以下のものがある。すなわち、Ａｃｉｖｉｃｉｎ；アクラルビシン；Ａｃｏｄａｚｏｌｅ ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ；Ａｃｒｏｎｉｎｅ；アドリアマイシン；Ａｄｏｚｅｌｅｓｉｎ；Ａｌｄｅｓｌｅｕｋｉｎ；Ａｌｔｒｅｔａｍｉｎｅ；Ａｍｂｏｍｙｃｉｎ；Ａｍｅｔａｎｔｒｏｎｅ Ａｃｅｔａｔｅ；アミノグルテチミド；Ａｍｓａｃｒｉｎｅ；Ａｎａｓｔｒｏｚｏｌｅ；Ａｎｔｈｒａｍｙｃｉｎ；アスパラギナーゼ；Ａｓｐｅｒｌｉｎ；Ａｚａｃｉｔｉｄｉｎｅ；Ａｚｅｔｅｐａ；Ａｚｏｔｏｍｙｃｉｎ；Ｂａｔｉｍａｓｔａｔ；Ｂｅｎｚｏｄｅｐａ；Ｂｉｃａｌｕｔａｍｉｄｅ；Ｂｉｓａｎｔｒｅｎｅ Ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ；Ｂｉｓａｎｆｉｄｅ Ｄｉｍｅｓｙｌａｔｅ；Ｂｉｚｅｌｅｓｉｎ；硫酸ブレオマイシン；Ｂｒｅｑｕｉｎａｒ Ｓｏｄｉｕｍ；Ｂｒｏｐｉｒｉｍｉｎｅ；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；Ｃａｒａｃｅｍｉｄｅ；Ｃａｒｂｅｔｉｍｅｒ；カルボプラチン；カルムスチン；Ｃａｒｕｂｉｃｉｎ Ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ；Ｃａｒｚｅｌｅｓｉｎ；Ｃｅｄｅｆｉｎｇｏｌ；Ｃｈｌｏｒａｍｂｕｃｉｌ；Ｃｉｒｏｌｅｍｙｃｉｎ；シスプラチン；Ｃｌａｄｒｉｂｉｎｅ；Ｃｒｉｓｎａｔｏｌ Ｍｅｔｈｙｌａｔｅ；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；塩酸ダウノルビシン；Ｄｅｃｉｔａｂｉｎｅ；Ｄｅｘｏｒｍａｐｌａｔｉｎ；Ｄｅｚａｇｕａｎｉｎｅ；Ｄｅｚａｇｕａｎｉｎｅ Ｍｅｓｙｌａｔｅ；Ｄｉａｚｉｑｕｏｎｅ；Ｄｏｃｅｔａｘｅｌ；ドキソルビシン；塩酸ドキソルビシン；Ｄｒｏｌｏｘｉｆｅｎｅ；Ｄｒｏｌｏｘｉ

fene Citrate；プロピオン酸ドロモスタノロン；Duazomycin；Edatrexate；塩酸エフロルニチン；Elsamitrucin；Enloplatin；Enpromate；Epipropidine；Epirubicin Hydrochloride；Erbulozole；Esorubicin Hydrochloride；エストラムスチン；エストラムスチンリン酸ナトリウム；Etanidazole；エトポシド；リン酸エトポシド；Etoprine；Fadrozole Hydrochloride；Fazarabine；Fenretinide；フロクスウリジン；リン酸フルダラビン；フルオロウラシル；Flurocitabine；Fosquidone；Fostriecin Sodium；ゲムシタビン；塩酸ゲムシタビン；ヒドロキシ尿素；塩酸イダルビシン；Ifosfamide；Ilmofosine；インターフェロンα－2a； インターフェロンα－2b、インターフェロンα－n1； インターフェロンα－n3； インターフェロンβ－Ia； インターフェロンγ－Ib；Iproplatin；Irinotecan Hydrochloride；Lanreotide Acetate；Letrozole；酢酸ロイプロリド；Liarozole Hydrochloride；Lometrexol Sodium；ロムスチン；Losoxantrone Hydrochloride；Masoprocol；Maytansine；塩酸メクロールエタミン；酢酸メゲストロール；酢酸メレンゲストール；メルファラン；Menogaril；メルカプトプリン；メトトレキサート；メトトレキサートナトリウム；Metoprine；Meturedepa；Mitindomide；Mitocarcin；Mitocromin；Mitogillin；Mitomalcin；マイトマイシン；Mitosper；マイトテイン；塩酸ミトザントロン；Mycophenolic Acid；Nocodazole；Nogalamycin；Ormaplatin；Oxisuran；パクリタキセル；Pegaspargase；peliomycin；Pentamustine；硫酸ペプロマイシン；Perfosfamide；ピポブロマン；ピポスルファン；Piroxantrone Hydrochloride；Plicamycin；Plomestane；Porfimer Sodium；Porfiromycin；prednimustine；塩酸プロカルバジン；ピューロマイシン；塩酸ピューロマイシン；Pyrazofurin；Riboprine；Rogletimide；Safingol； Safingol Hydrochloride；セムスチン；Simtrazene；Sparfosate Sodium；Sparsomycin；Spirogermanium Hydrochloride；Spiromustine；Spiroplatin；Streptonigrin；ストレプトゾシン；Sulofenur；Talisomycin；タキソール；Tecogalan Sodium；テガフール；Teloxantrone Hydrochloride；Temoporfin；Teniposide；Teroxirone；テストラクトン；Thiamiprine；チオグアニン；チオテパ；Tiazofuirin；Tirapazamine；塩酸トポテカン；Toremifene Citrate；Trestolone Acetate；Triciribine Phosphate；トリメトレキサート；グルクロン酸トリメトレキサート；Triptorelin；Tubulozole hydrochloride；ウラシルマスタード；Uredepa；Vapreotide；Vertepofin；硫酸ビンブラスチン；硫酸ビンクリスチン；ビンデシン；硫酸ビンデシン；Vinepidine Sulfate；Vinglycinate Sulfate；Vinleurosine Sulfate；Vinorelbine Tartrate；Vinrosidine Sulfate；Vinzolidine Sulfate；Vorozole；Zeniplatin；ジノスタチン；塩酸ゾルビシンがある。

追加の抗新生物の薬剤としては、Goodman and Gilman’s「The Pharmacological Basis of Therapeutics」，Eighth Edition，1990，McGraw－Hill，Inc.（Health Professions Division）の1202－1263頁のChap

ｔｅｒ ５２，Ａｎｔｉｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ（Ｐａｕｌ Ｃａｌａｂｒｅｓｉ ａｎｄ Ｂｒｕｃｅ Ａ．Ｃｈａｂｎｅｒ）及びその緒言に開示されている薬剤がある。

【０３１５】

リガンド又は細胞傷害性プロドラッグにさらされている細胞の標的化が好ましいが、本発明では、リガンド又は細胞傷害性プロドラッグにさらされていない細胞又はリガンドによる影響を生来的に受けない細胞における本発明の核酸構築物の発現もまた考えられることが理解される。そのような場合、本発明の方法は、形質転換された細胞にそのようなリガンド又はプロドラッグを投与する工程を含む。そのような投与は、上記に記載された投与方法のいずれかを使用して行うことができる。好ましくは、細胞傷害性の活性化が非常に特異的であるように、リガンド又はプロドラッグは、例えば、抗体のコンジュゲートされた標的化を使用して、細胞が標的化される様式で投与される。細胞傷害性又はアポトーシス活性化のこの方法は、より詳しくは下記の実施例の節に記載される。

【０３１６】

従って、本発明は、過度又は異常な血管形成を特徴とする組織領域における血管形成をダウンレギュレーションするための核酸構築物、そのような構築物を含む医薬組成物、及びそのような構築物の利用方法を提供する。

【０３１７】

本発明は特定の細胞サブセットにおける標的化された発現を可能にするので、本発明はまた、様々な腫瘍を処置するために改変し、使用することができる。

【０３１８】

従って、本発明の別の局面により、腫瘍の処置方法が提供される。

【０３１９】

本発明のこの局面による方法は、上記に記載されたキメラなポリペプチド又は自殺遺伝子を腫瘍細胞において発現させることによって行われる。

【０３２０】

従って、本発明のこの局面により、ポリペプチドキメラ又は自殺遺伝子の発現が、ガストリン放出ペプチド（ＧＲＰ）プロモーター［ＡＦ２９３３２１Ｓ３；Ｍｏｒｉｍｏｔｏ Ｅ、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ、２００１（１月／２月）、２１（１Ａ）：３２９～３１］、ｈＴＥＲＴプロモーター［ＡＨ００７６９９；Ｇｕ Ｊ、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ、２００２（１月）、９（１）：３０～７］、ＩＩ型ヘキソキナーゼプロモーター［ＡＦ１４８５１２；Ｋａｔａｂｉ ＭＭ、Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ、１９９９（１月２０日）、１０（２）：１５５～６４］、又はＬ－プラスチンプロモーター［Ｌ０５４９０、ＡＨ００２８７０、ＭＭＵ８２６１１；Ｐｅｎｇ ＸＹ、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ、２００１（６月１日）、６１（１１）：４４０５～１３］（これらに限定されない）などの腫瘍特異的な因子によって指向される。

【０３２１】

腫瘍細胞におけるポリペプチドキメラ（例えば、Ｆａｓ－ｃ）又は自殺遺伝子の発現は、これらの細胞における細胞傷害性及び／又はアポトーシスを活性化し、従って、細胞死を生じさせ、これにより、その後、腫瘍増殖の鈍化又は停止、そしておそらくは腫瘍の収縮がもたらされる。

【０３２２】

本発明のさらなる目的、利点、及び新規な特徴は、制限を目的とするものではない以下の実施例を検討することにより、当業者に明らかになるであろう。さらに、上記において概説され、下記の特許請求の範囲のセクションに記載されたような本発明の様々な実施態様及び面は、各々、以下の実施例において実験的に支持される。

【実施例】

【０３２３】

以下、前記の記載と共に非制限的に本発明を例示する実施例が、参照される。

【０３２４】

一般的に、本明細書において使用された命名法、及び本発明において活用された実験手法には、分子的技術、生化学的技術、微生物学的技術、及び組換えＤＮＡ技術が含まれる。そのような技術は、文献に徹底的に説明されている。例えば、“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ、（１９８９）；“Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ” 第Ｉ～ＩＩＩ巻 Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｒ．Ｍ．編（１９９４）；Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ、“Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ（１９８９）；Ｐｅｒｂａｌ，“Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ”，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８８）；Ｗａｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ、“Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ”，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｂｏｏｋｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｂｉｒｒｅｎら編 “Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｓｅｒｉｅｓ”，第１～４巻，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９８）；米国特許第４６６６８２８号；第４６８３２０２号；第４８０１５３１号；第５１９２６５９号、及び第５２７２０５７号に示された方法論；“Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ”，第Ｉ～ＩＩＩ巻 Ｃｅｌｌｉｓ，Ｊ．Ｅ．編（１９９４）；“Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ”第Ｉ～ＩＩＩ巻 Ｃｏｌｉｇａｎ Ｊ．Ｅ．編（１９９４）；Ｓｔｉｔｅｓら（編），“Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ”（第８版），Ａｐｐｌｅｔｏｎ ＆ Ｌａｎｇｅ，Ｎｏｒｗａｌｋ，コネチカット州（１９９４）；Ｍｉｓｈｅｌｌ及びＳｈｉｉｇｉ（編），“Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ”，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８０）を参照のこと。利用可能なイムノアッセイは、特許及び科学文献に広範に記載されており、例えば、米国特許第３７９１９３２号；第３８３９１５３号；第３８５０７５２号；第３８５０５７８号；第３８５３９８７号；第３８６７５１７号；第３８７９２６２号；第３９０１６５４号；第３９３５０７４号；第３９８４５３３号；第３９９６３４５号；第４０３４０７４号；第４０９８８７６号；第４８７９２１９号；第５０１１７７１号、及び第５２８１５２１号；“Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ”Ｇａｉｔ，Ｍ．Ｊ．編（１９８４）；“Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ”Ｈａｍｅｓ，Ｂ．Ｄ．及びＨｉｇｇｉｎｓ Ｓ．Ｊ．編（１９８５）；“Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ”Ｈａｍｅｓ，Ｂ．Ｄ．及びＨｉｇｇｉｎｓ Ｓ．Ｊ．編（１９８４）；“Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ”Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，Ｒ．Ｉ．編（１９８６）；“Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌｓ ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅｓ”ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，（１９８６）；“Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ”Ｐｅｒｂａｌ，Ｂ．，（１９８４）及び“Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ”第１～３１７巻，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；“ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ”，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ（１９９０）；Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ、“Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ”ＣＳＨＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）を参照のこと（これらは全て、本明細書に完全に示されているかのごとく参照により組み込まれる）。その他の一般的な参照が、この書類のいたるところに提供されている。それらに含まれる手法は、当分野において周知であると考えられ、読者の便利のために提供されている。それらに含まれている情報は全て、参照により本明細書に組み込まれる。

【０３２５】

特に、下記の実施例と併せて行われた実験は、以下の方法及び材料を利用した。

【０３２６】
材料及び方法
細胞培養
ルイス肺癌（Ｄ１２２－９６）細胞、ヒト胎児腎細胞（２９３）、及びＨｅＬａ細胞は、１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）、５０Ｕ／ｍｌペニシリン、５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン、及び２ｍＭグルタミンが補足された４．５ｇｒ／ｌ　ＤＭＥＭ（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，Ｂｅｉｔ－Ｈａｅｍｅｋ，Ｉｓｒａｅｌ）の中で増殖させた。ウシ大動脈内皮細胞ＢＡＥＣ、正常皮膚繊維芽細胞ＮＳＦ、ＨｅｐＧ２、及びヒト内皮臍内皮細胞ＨＵＶＥＣ－３０４（ＡＴＣＣ，ＵＳＡ）は、５％ＦＣＳ、５０Ｕ／ｍｌペニシリン、５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン、及び２ｍＭグルタミンが補足された１．０ｇｒ／ｌ　ＤＭＥＭ（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，Ｂｅｉｔ－Ｈａｅｍｅｋ、イスラエル）の中で増殖させた。ＢＡＥＣ細胞には、完全繊維芽細胞増殖因子（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ．ミズーリ州）を補足した。ＲＩＮｒ１０４６－３８（ＲＩＮ－３８）は、５％ＦＣＳ（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，Ｂｅｉｔ－Ｈａｅｍｅｋ，Ｉｓｒａｅｌ）、５０Ｕ／ｍｌペニシリン、５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン、及び２ｍＭグルタミンが補足された１９９アール（Ｅａｒｌｅ’ｓ）塩（５．５ｍＭグルコース）培地の中で増殖させた。
【０３２７】
「ＨｅｐＧ２」とは、本明細書において使用されるように、ＡＴＣＣ－ＨＢ－８０６５をさす。
【０３２８】
「ＨｅＬａ」とは、本明細書において使用されるように、ＡＴＣＣ－ＣＣＬ－２をさす。
【０３２９】
「ヒト気管支上皮細胞」及び「Ｂ２Ｂ」とは、本明細書において使用されるように、ＡＴＣＣ－ＣＲＬ－９６０９をさす。
【０３３０】
「ＨＵＶＥＣ」及び「ヒト臍静脈内皮細胞」とは、本明細書において使用されるように、ＡＴＣＣ－ＣＲＬ－１７３０をさす。
【０３３１】
「ＣＨＯ」及び「チャイニーズハムスター卵巣」とは、本明細書において使用されるように、ＡＴＣＣ－６１をさす。
【０３３２】
低酸素誘導
トランスフェクション又は形質導入の後２６時間目に、０．５％O_2、５％CO_2、残部はN_2、を含有している気流により３０分間洗浄された隔離されたチャンバーの中で、細胞をインキュベートした。隔離されたチャンバーを、５％CO_2、３７℃の湿潤インキュベーター内に置いた。
【０３３３】
細胞及び組織におけるルシフェラーゼ活性
インビトロ及びインビボで定量的にＰＰＥ－１プロモーター活性をアッセイするため、ルシフェラーゼ遺伝子発現系キットを利用した（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐ．，Ｍａｄｉｓｏｎ、ウィスコンシン州）。トランスフェクション又は形質導入の後４８時間目に、細胞を洗浄し、２００μｌの溶解緩衝液を１５分間添加した。細胞溶解物を収集し、４℃で１５分間（１４，０００ｒｐｍ）遠心分離した。その後、上清１０μｌを、５０μｌのルシフェラーゼアッセイ緩衝液に添加した。活性は、２０秒間、照度計で測定した。
【０３３４】
固形組織におけるルシフェラーゼ活性をアッセイするためには、２０ｍｇの試料を切除し、ホモジナイゼーション溶液１ｍｌでホモジナイズし、４℃で１５分間（１４，０００ｒｐｍ）遠心分離し、上清１０ｍｌを、前記と同様に、ルシフェラーゼ活性に関してアッ

セイした。結果は、タンパク質１μｇ当たりのルシフェラーゼ光単位として表される。タンパク質は、標準としてウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を用いたブラッドフォード（Ｂｒａｄｆｏｒｄ）アッセイを使用して測定した。

【０３３５】

インビトロ及びインビボのＧＦＰ活性

インビトロでＧＦＰ発現を試験するため、細胞をＰＢＳで２回洗浄し、新鮮に作成された４％パラホルムアルデヒドを含むＰＢＳで３０分間固定した。固定後、蛍光顕微鏡検による調査を達成した。

【０３３６】

インビボ送達された遺伝子の細胞内分布を試験するため、新鮮に作成された４％パラホルムアルデヒドを含む０．１Ｍリン酸緩衝液で、４℃で６時間、組織を固定し、４℃で３０％ショ糖に一夜浸漬し、そしてＯＣＴ化合物（Ｓａｋｕｒａ，ＵＳＡ）で凍結させた。低温槽により組織ブロックを１０μｍの厚さに切断し、蛍光顕微鏡検（ＦＩＴＣフィルタ）の下で直接観察した。

【０３３７】

増殖細胞及び休止細胞

増殖ＢＡＥＣ及び休止ＢＡＥＣにおけるＰＰＥ－１プロモーター活性を比較するため、１．１０％ＦＣＳ培地中で増殖させ感染させる増殖細胞と、２．形質導入前７２時間以内に開始した無血清培地中で増殖させ感染させる休止細胞という二つの群に、細胞を分割した。

【０３３８】

細胞は、全て、５％CO_2、３７℃の湿潤インキュベーター内で増殖させた。

【０３３９】

接着性のＰＥＲ．Ｃ６（登録商標）細胞

アデノウイルス粒子を、ＰＥＲ．Ｃ６（登録商標）（オランダのライデン所在のＣｒｕｃｅｌｌ）ヒト培養細胞内にて大規模培養で調製した。ＰＥＲ．Ｃ６（登録商標）（オランダのライデン所在のＣｒｕｃｅｌｌ）細胞はＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ＋１０ｍＭＭｇCl_2内で培養した。ＰＥＲ．Ｃ６（登録商標）細胞は、異種遺伝子をアデノウイルス血清型－５骨格中に容易に挿入することを可能にするプラスミド系とともに使用できる。治療用遺伝子のｐＡｄＡｐｔ（商標）　（オランダのライデン所在のＣｒｕｃｅｌｌ）を挿入するためＰＥＲ．Ｃ６（登録商標）の技術とともに使用されるシャトルベクターは、相同的組換えのためＲＣＡを含有しない組換えアデノウイルスベクターを生成できる。

【０３４０】

組換え複製欠損アデノウイルスの調製

いくつかの組換え複製欠損アデノウイルス（５型）を構築した。ルシフェラーゼ遺伝子（ｐＧＬ２－ｂａｓｉｃ　ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｘ６５３２３に由来）及びＳＶ４０ポリＡ部位（ｐＧＬ２－ｂａｓｉｃ　ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｘ６５３２３に由来）の上流に置かれたマウスプレプロエンドセリン－１（ＰＰＥ－１）プロモーター（配列番号：１）を含む発現カセットを、ｐＰＡＣ．ｐｌｐＡ（プロモーターを含まない構築物）のＢａｍＨＩ制限部位へとライゲートさせた。ＧＦＰ遺伝子（ｐＥＧＦＰ，ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＢ０２５７２に由来）は、ＮｏｔＩ制限部位でＰＰＥ－１プロモーターとライゲートさせた。Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ又はＡｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰと名付けられた複製欠損組換えアデノウイルスは、ベッカー（Ｂｅｃｋｅｒ），Ｔ．Ｃ．ら（Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｅｌｌ　ｂｉｏｌ．４３，Ｒｏｔｈ　Ｍ．（編）．Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ．Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，１９９４，１６１～１８９頁）によって記載されたようにして、ｐＰＡＣＰＰＥ－１Ｌｕｃ又はＡｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰをアデノウイルスプラスミドｐＪＭ１７と共トランスフェクトした後、組換えビリオンを採集することによって調製した。

【０３４１】

ウイルスを、大規模作製のために調製した。ウイルスストックは、10^9～10^{12}プ

ラーク形成単位／ｍｌ（ｐｆｕ／ｍｌ）という濃度で４℃で保存した。サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）前初期プロモーター（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｕ４７１１９）を含有しているウイルスＡｄ５ＣＭＶ－Ｌｕｃ及びＡｄ５ＣＭＶ－ＧＦＰ（Ｑｕａｎｔｕｍ　ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，カナダ）を、ＰＰＥ－１ウイルスベクターに関して記載されたようにして大規模調製のため調製し、非組織特異的対照として使用した。

【０３４２】

ＰＰＥプロモーターの修飾

修飾型マウスＰＰＥ－１プロモーターは、Ｂｕら（Ｊ．Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．（１９９７）２７２（１９）：３２６１３－３２６２２）によって発見された正の転写因子３コピーを、４３塩基対の内因性の正の因子（－３６４～－３２０ｂｐ）の下流（－２８６ｂｐ）に置かれたＮｈｅＩ制限酵素部位へ挿入することにより開発した。

【０３４３】

本明細書において「３Ｘ」と名付けられたエンハンサー断片は、マウスＰＰＥ－１プロモーター内に存在する内因性配列因子（ヌクレオチドは、配列番号：１の４０７～４５２に相当）のトリプリケートコピーである。血管内皮細胞におけるＰＰＥ－１プロモーター活性の誘導は、この因子の存在に依存することが以前に示された［Ｂｕら（Ｊ．Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．（１９９７）２７２（１９）：３２６１３－３２６２２）］。３Ｘ断片は、９６塩基対長の２個の相補的な一本鎖ＤＮＡ（ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ；Ｎｅｓ　Ｔｚｉｏｎａ，イスラエル）（配列番号：２及び３）を使用することにより合成した。２個の一本鎖ＤＮＡ断片をアニーリングさせ、クレノウフラグメント（ＮＥＢ）を使用して隙間を埋めた。得られた二本鎖ＤＮＡは、１４５塩基対長であり、Ｎｈｅ－１制限部位（配列番号：４）を含んでいた。

【０３４４】

３Ｘ断片を、Ｔ４リガーゼを使用して、内因性Ｎｈｅ－１部位の下流のマウスＰＰＥ－１プロモーターへとライゲートさせた。得られた構築物をＤＨ５αコンピテント細胞において繁殖させ、大規模なプラスミド調製物をマキシプレップキアゲン（ｍａｘｉ－ｐｒｅｐ　Ｑｉａｇｅｎｅ）キットを使用して作製した。

【０３４５】

付加的なプラスミド

野生型ＰＰＥ－１プロモーター

１．４ｋｂのマウスプレプロエンドセリン－１（ＰＰＥ－１）プロモーター、ＳＶ４０ポリＡシグナル（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｘ６５３２３）部位を含むルシフェラーゼ遺伝子、及びマウスＥＴ－１遺伝子の第１イントロンを含有しているＰＰＥ－１－ルシフェラーゼカセット（５２４９ｂｐ）は、ハラッツ（Ｈａｒａｔｓ）ら（Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖ．（１９９５）９５：１３３５－１３４４）により使用されたｐＥＬ８プラスミド（８８４８ｂｐ）に由来する。ＰＰＥ－１－ルシフェラーゼカセットは、ＢａｍＨＩ制限酵素を用いてｐＥＬ８プラスミドから抽出し、引き続き、抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｈｉｌｄｅｎ、ドイツ）を使用して１％アガロースゲルからＤＮＡ断片の抽出をした。

【０３４６】

プロモーターを含まないｐＰＡＣ．ｐｌｐＡプラスミド

アデノウイルス５型の配列を含有しているプロモーターを含まないｐＰＡＣ．ｐｌｐＡプラスミド（７５９４ｂｐ）は、ｐＰＡＣＣＭＶ．ｐＬｐＡ（８８００ｂｐ）に由来した。ＣＭＶプロモーター、マルチプルクローニング部位、及びＳＶ４０ポリアデニル化部位（１２０６ｂｐ）を、ＮｏｔＩ制限酵素によって排除し、断片化されたＤＮＡを、１％アガロースゲルから抽出した。直鎖状プラスミド（７５９４ｂｐ）を、クレノウ断片によって平滑末端化し、ラピッドＤＮＡライゲーションキットによってＢａｍＨＩリンカーを両付着末端へとライゲートさせた。直鎖状プラスミドを、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼによって再ライゲートさせ、ＢａｍＨ１制限部位を含むｐＰＡＣ．ｐｌｐＡを増幅するため、ＤＨ５αコンピテント細胞へと形質転換した。プラスミドを大規模調製のため調製し、マキシプ

レップＤＮＡ精製キットによって精製した。

【０３４７】

ｐＰＡＣＰＰＥ－１ルシフェラーゼプラスミド

ｐＰＡＣＰＰＥ－１ルシフェラーゼプラスミドは、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼを使用することにより、ｐＰＡＣ．ｐｌｐＡプラスミドのＢａｍＨＩ制限部位に、ＰＰＥ－１－ルシフェラーゼカセットを挿入することにより構築した。その後、プラスミドを、ＤＨ５αコンピテント細胞を形質転換するために使用した。プラスミド（１２８４３ｂｐ）を大規模調製のため調製し、マキシプレップＤＮＡ精製キットによって精製した。

【０３４８】

ｐＰＡＣＰＰＥ－１ＧＦＰプラスミド

ｐＰＡＣＰＰＥ－１ＧＦＰプラスミドは、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼによって、ＰＰＥ－１プロモーターの下流のＧＦＰ遺伝子（ｐＥＧＦＰ、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＢ０２５７２）を、ＮｏｔＩ制限部位へサブクローニングすることにより構築した。

【０３４９】

その後、プラスミドを、ＤＨ５αコンピテント細胞を形質転換するために使用した。プラスミド（１１，８０１ｂｐ）を大規模調製のために調製し、マキシプレップＤＮＡ精製キットによって精製した。

【０３５０】

ｐＡＣＰＰＥ－１３Ｘルシフェラーゼプラスミド及びｐＡＣＰＰＥ－１３ＸＧＦＰプラスミド

ｐＰＡＣＰＰＥ－１－３Ｘルシフェラーゼ及びｐＰＡＣＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰは、ｐＰＡＣ．ｐｌｐＡプラスミドのＢａｍＨＩ制限部位に、Ｌｕｃ又はＧＦＰを含有しているｐＥＬ８－３Ｘ（図２６Ｂ）からＢａｍＨＩ制限酵素によって消化されたＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃカセット又はＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰカセットを挿入することにより構築した。ｐＥＬ８－３Ｘは、２個のＮｈｅＩ部位間に置かれた（配列番号：７に示されているような）トリプリケート内皮特異的エンハンサー３Ｘを含有している、ＢａｍＨＩとＮｏｔＩとの間に置かれた修飾型マウスＰＰＥ－１プロモーター（１．５５ｋｂ）（赤）を含有している。プロモーター、ルシフェラーゼ遺伝子又はＧＦＰ遺伝子、ＳＶ４０ポリＡ部位、及びエンドセリン－１遺伝子の第１イントロン（全部でＰＰＥ－１修飾型プロモーターカセットと名付けた）を、材料及び方法に記載されたようにして、ＢａｍＨＩ制限酵素によって消化し抽出した。プラスミド（１２８４３ｂｐ）を大規模調製のために調製し、マキシプレップＤＮＡ精製キットによって精製した。

【０３５１】

インビトロ実験、ＤＮＡ形質導入

形質導入の２４時間前に、細胞を２４又は９６ウエルディッシュに播いた。亜集密的な細胞はサンプルウエル中で計数された。その後、増殖培地は各ウエルから吸引され、指示されたウイルスベクターが指示された感染多重度（ＭＯＩ）で感染培地（ＤＭＥＭ又はＲＰＭＩ　１６４０、２％ＦＢＳ）中に希釈され、単層に加えられた。細胞は室温で４時間インキュベートされた。続いて、完全培地が加えられ、細胞は３７℃、５％CO_2で７２時間インキュベートされた。

【０３５２】

動物

動物手法は、全て、Ｓｈｅｂａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｔｅｌ－Ｈａｓｈｏｍｅｒの「Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ」によって承認された。

【０３５３】

異なるマウス系統を使用した：

（ｉ）雄３ヶ月齢野生型Ｃ５７ＢＬ／６マウス（Ｈａｒｌａｎ　ｆａｒｍｓ，Ｊｅｒｕｓａｌｅｍ、イスラエル）

（ｉｉ）雄３ヶ月齢ＢＡＬＢ／Ｃマウス（Ｈａｒｌａｎ　ｆａｒｍｓ，Ｊｅｒｕｓａｌｅ

ｍ、イスラエル）
（ｉｉｉ）雄及び雌の６ヶ月齢のＣ５７ＢＬ／６ｘＳＪ１２９マウスのＡｐｏＥ遺伝子欠損マウスハイブリッド（Ｐｌｕｍｐ　ＡＳ．　ｅｔ　ａｌ、Ｃｅｌｌ（１９９１）７１：３４３－３５３）
（ｉｖ）ハラッツ（Ｈａｒａｔｓ）ら（Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖ．（１９９５）９５：１３３５－１３４４）によって作成された、マウスＰＰＥ－１プロモーター（５．９Ｋｂ）の調節下でルシフェラーゼ遺伝子を過剰発現している雄及び雌の３ヶ月齢。

【０３５４】
マウスは、全て、Ｌｉｐｉｄｓ　ａｎｄ　Ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅにおいて飼育した。

【０３５５】
正常マウスにおける組織遺伝子発現
効率及び組織特異性をアッセイするため、10^{10}ｐｆｕ／ｍｌのＡｄ５ＰＰＥ１Ｌｕｃ又はＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（非組織特異的対照として）を、１００μｌの生理食塩水に懸濁させ、前記のようなマウスの尾静脈へと注射した。ルシフェラーゼ活性は、注射後１日目、５日目、１４日目、３０日目、及び９０日目にアッセイした。発現されたレポーター遺伝子の細胞分布を決定するため、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰ又はＡｄ５ＣＭＶＧＦＰ（10^{10}ｐｆｕ／ｍｌを含む１００μｌ生理食塩水）を、正常な３ヶ月齢雄Ｃ５７ＢＬ／６マウスの尾静脈へと注射した。ＧＦＰ発現を、注射後５日目に検出した。マウスは、全て、外見上健康であり、毒性又は炎症は、肝臓又はその他の組織において認められなかった。

【０３５６】
組織におけるＧＦＰ活性
インビボ送達された遺伝子の細胞分布を試験するため、注射されたマウスからの組織試料を、４℃で６時間、新鮮に作成された４％パラホルムアルデヒドを含む０．１Ｍリン酸緩衝液で固定し、４℃で３０％ショ糖に一夜浸漬し、そしてＯＣＴ化合物（Ｓａｋｕｒａ、カルフォルニア州、ＵＳＡ）で凍結させた。組織ブロックを１０μｍの厚さに切断し、蛍光顕微鏡検（ＦＩＴＣフィルタ）の下で直接観察した。

【０３５７】
腫瘍移植
ルイス肺癌細胞（ＬＬＣ）を、トリプシン／ＥＤＴＡで採集し、ＰＢＳで３回洗浄し、そして生存率を評価するために０．１％トリパンブルー（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，Ｂｅｉｔ－Ｈａｅｍｅｋ、イスラエル）で計数した。マウスにおける腫瘍血管形成におけるＰＰＥ－１プロモーター活性の活性レベルを試験するため、２つの異なる腫瘍モデルを使用した。

【０３５８】
原発腫瘍モデルにおいて、細胞（１ｍｌ生理食塩水において1×10^{6}個／ｍｌ）をマウスの背部に皮下注射した（ｎ＝１７）。注射後２１日目に、Ａｄ５ＰＰＥ－１、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰ、Ａｄ５ＣＭＶ、又はＡｄ５ＣＭＶＧＦＰ（10^{10}ｐｆｕ／ｍｌ）を腫瘍組織（ＩＴ）に注射するか、又は静脈注射し、前記のようにして、それらの活性を検出した。

【０３５９】
転移腫瘍モデルにおいて、細胞（０．５ｍｌ生理食塩水において5×10^{5}個／ｍｌ）をマウス足蹠に注射した（ｎ＝１２）。腫瘍組織が直径０．７ｍｍのサイズに達した時点で、（原発腫瘍を有する）足蹠を麻酔及び無菌の条件下で摘除した。術後１４日目に、ウイルス（Ａｄ５ＰＰＥ－１、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰ、Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃ、又はＡｄ５ＣＭＶＧＦＰ）をマウス尾静脈へと注射した。

【０３６０】
いずれの腫瘍実験モデルにおいても、ウイルス注射後５日目にマウスを屠殺し、組織を切除し、ルシフェラーゼ又はＧＦＰの活性に関して試験した。

【０３６１】
創傷治癒モデル
雄３ヶ月齢Ｃ５７ＢＬ／６マウスに、ナトリウムペントバルビタール（６ｍｇ／ｋｇ）の皮下注射によって麻酔を施した。それらの背部の毛をそり、直線的に５ｃｍ切開した。その切開を、４／０無菌絹糸によって即座に縫合した。治癒中の創傷における血管形成過程を、２日毎に、Ｈ＆Ｅ染色及び抗フォン－ヴィレブランド（ｖｏｎ－Ｗｉｌｌｉｂｒａｎｄ）抗体免疫組織化学的染色によって調査した。
【０３６２】
切開後１０日目に、10^{10}ｐｆｕ／ｍｌのＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ又はＡｄ５ＣＭＶＬｕｃを尾静脈へと全身注射した。注射後５日目に、マウスを屠殺し、切開部位の皮膚、及び対照としての正常な対側部位において、前記のようにしてルシフェラーゼ活性をアッセイした。
【０３６３】
組織学的調査
腫瘍及び転移組織における血管形成の程度を評価するため、組織を５μｍの切片へと切断し、ヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色した。抗ＣＤ３１（ラット抗マウスＣＤ３１モノクローナルＡｂ、Ｐｈａｒｍｉｎｏｇｅｎ，ニュージャージー州、ＵＳＡ）抗体を、腫瘍モデルにおける血管再生の分析のために使用した。
【０３６４】
ＶＥＧＦ及びＰＤＧＦ－Ｂトランスジェニック発現のためのプラスミド及びアデノウイルスベクター
組換え置換欠失アデノウイルス血清型５は（Ｖａｒｄｅ－Ｂｌｏｏｍ，Ｎ．ｅｔ ａｌ．［Ｔｉｓｓｕｅ－ｓｐｅｃｆｉｃ ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｔｏ ｔｕｍｏｒ ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ．（２００１）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ８，８１９－２７］）に記載のようにして構築された。簡潔に述べると、ｐＡＣＣＭＶ．ｐＬｐＡプラスミドは、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）極初期プロモーターの制御下でマウスの$VEGF_{165}$（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ ｎｕｍｂｅｒ Ｍ９５２００）又はラットのＰＤＧＦ－Ｂ（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ ｎｕｍｂｅｒ ＡＦ１６２７８４）のｃＤＮＡを含めるように修飾された。ＣＭＶプロモーターが修飾マウスプレプロエンドセリン－１（ＰＰＥ－１－３Ｘ）プロモーターによって置換されたｐＡＣＰＰＥ－１－３Ｘプラスミドは同じｃＤＮＡ配列を用いて構築された。それぞれのプラスミドはＨＥＫ２９３細胞中にｐＪＭ１７プラスミドを用いてコトランスフェクトされ、様々な組換えアデノウイルスを生成した。ウイルスはＨＥＫ２９３細胞中で増殖させられ、10^{10}ＰＦＵｓ/ｍｌの濃度に減少させられた。対照のベクターは同様に生成された。
【０３６５】
後肢虚血及び遺伝子治療のマウスモデル
少なくとも１２週齢の雄及び雌のＣ５７Ｂ１６マウス（Ｈａｒｌａｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｌｔｄ．，Ｉｓｒａｅｌ）はＡｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｆ Ｓｈｅｂａ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒのガイドラインに従って維持された。後肢虚血は以前に記述されたプロトコル［Ｃｏｕｆｆｉｎｈａｌ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．Ｍｏｕｓｅ ｍｏｄｅｌ ｏｆ ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ．Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌ １５２，１６６７－７９．（１９９８）］に基づいて誘導された。簡潔に述べると、動物はナトリウムペントバルビタール（４０ｍｇ／ｋｇ、ＩＰ）で麻酔された。肢の毛をそった後、右大腿動脈は伏在動脈と膝窩部の動脈との分岐点の近くで結紮された。結紮の５日後、10^{9}ＰＦＵｓの様々なアデノウイルスベクターはＩ．Ｖ．投与された。
【０３６６】
超音波画像形成
超音波画像形成は結紮後７日目にＳｙｎｅｒｇｙ超音波システム（Ｇｅｎｅｒａｌ Ｅ

ｌｅｃｔｒｉｃ，ＵＳＡ）を用いて７．５ＭＨｚで血管造影モードで行なわれた。動物は目覚めており、画像形成中拘束されていた。動物は従来の条件下で９０日まで収容された。

【０３６７】

免疫組織化学

屠殺された虚血マウスの後肢及び肝臓組織の両方からの骨格筋肉はＯＣＴ化合物中で凍結され、凍結切断された。内皮細胞はラットのモノクローナル抗ＣＤ３１抗体（Ｐｈａｒ Ｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いて免疫染色された。平滑筋細胞はマウスのポリクローナル抗α－ＳＭアクチン抗体（ＳＩＧＭＡ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を用いて免疫染色された。背景はヘマトキシリンを用いて染色された。

【０３６８】

インサイチューハイブリダイゼーション

５μｍの骨格筋肉断片は虚血動物の両方の後肢から調製された。ＶＥＧＦ$_{165}$又はＰＤＧＦ－Ｂに対するセンス又はアンチセンスＤＩＧラベルプローブを用いたインサイチューハイブリダイゼーションが行なわれ、ジゴキシゲニン（ＤＩＧ）は抗ＤＩＧ－ＡＰコンジュゲート（Ｒｏｃｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｍａｎｎｈｅｉｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ）によって検出された。背景はメチルグリーンで染色された。

【０３６９】

画像処理

超音波画像はＩｍａｇｅ－Ｐｒｏ Ｐｌｕｓ ソフトウェアツール（Ｍｅｄｉａ Ｃｙｂｅｒｎｅｔｉｃｓ，Ｓｉｌｖｅｒ Ｓｐｒｉｎｇ，ＭＤ）を用いて処理された。最も強い灌流を示す着色された画素の数が各画像について計算された。

【０３７０】

統計分析

統計的有意差に関する群間の分析は、ｔ検定ＡＮＯＶＡ又はマン－ホイトニー（Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ）順位検定の使用により達成した。データは、平均＋ＳＥとして示される。

【０３７１】

実験結果

実施例１

内皮細胞（ＢＡＥＣ）及び２９３細胞におけるプロアポトーシス遺伝子活性に対するインビトロアッセイ

癌の処置において、抗血管形成治療は、成長中の腫瘍に栄養を与える発達中の脈管構造を標的とする［Ｆｏｌｋｍａｎ Ｊ、Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ（１９９５）、３３３（２６）：１７５７～６３］。アポトーシス（すなわち、プログラム化された細胞死）の研究が進行しているので、選択的かつ効率的な細胞死調節因子をコードする多数の遺伝子がこれまでに同定されている［Ｓｔｒａｓｓｅｒ ｅｔ ａｌ．、Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ（２０００）、６９：２１７～４５］。

【０３７２】

本研究により、抗血管形成治療のために最も好適な作用剤を同定するために、プロアポトーシス遺伝子がいくつかスクリーニングされた。ＭＯＲＴ１（ＦＡＤＤ－Ｆａｓ関連デスドメインタンパク質、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿００３８２４）、ＲＩＰ（受容体相互作用タンパク質、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｕ２５９９５）、ＣＡＳＨ（ｃ－ＦＬＩＰ、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＦ０１０１２７）、ＭＡＣＨ（カスパーゼ８、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｘ９８１７２）、ＣＰＰ３２（カスパーゼ３、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｕ１３７３７）、カスパーゼ９（Ｕ６０５２１）、及びＦａｓ－キメラ（Ｆａｓ－ｃ）（すなわち、ＴＮＦＲ１の細胞外領域と、Ｆａｓの膜貫通領域及び細胞内領域とから構築された、２つの「デス受容体」の以前に記載された融合体）［Ｂｏｌｄｉｎ ＭＰ ｅｔ ａｌ．、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ（１９９５）、２７０（１４）：７７９５～８、図１ａを参照のこと］を含むいくつかのプロア

ポトーシス遺伝子がＰＣＲ増幅され、そして、広く知られている先行技術のクローン化技術を使用してｐｃＤＮＡ３（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｉｎｃ．）哺乳動物発現ベクターにクローン化された。

【０３７３】

これらのプロアポトーシス遺伝子構築物をＢＡＥＣ細胞（ウシ大動脈内皮細胞）及び２９３細胞（これは対照の非内皮細胞として使用された）においてｐＧＦＰと一緒に同時に発現させた。トランスフェクションの２４時間後、細胞を、蛍光顕微鏡観察を使用して分析した。アポトーシス細胞が、蛍光顕微鏡観察を使用して、典型的な形態学（すなわち、小さい丸い形状）に基づいて同定された（図２ａ～ｂ）。アポトーシス表現型のさらなる評価を、電子顕微鏡観察を使用して行った（図３ａ～ｆ）。アポトーシス作用の定量により、ＭＯＲＴ１、ＴＮＦＲ１及びＦａｓ－キメラがＢＡＥＣ細胞及び２９３細胞において最も大きいアポトーシス活性を誘導したことが明らかにされた（図４ａ～ｂ）。カスパーゼ３及びカスパーゼ９はこれに関してあまり強くなかった。これは、おそらくは、それらが不活性なチモーゲン形態であったためである。これらの結果に基づき、Ｆａｓ－キメラ（Ｆａｓ－ｃ）遺伝子を、抗血管形成治療において使用されるアデノウイルスベクターを作製するために選択した。

【０３７４】

実施例２

改変されたＰＰＥ－１プロモーター（ＰＰＥ－１（３ｘ））の制御下にあるＦａｓ－キメラをコードする組換えアデノウイルスの作製

全長のＦａｓ－キメラをコードするｃＤＮＡを、改変されたプレプロエンドセリン１プロモーターを含有するプラスミドｐＡＣＰＰＥ１－３ｘにサブクローン化した（図１ｂを参照のこと）。組換えアデノウイルスを、ヒト胚腎臓２９３細胞にこのプラスミドをｐＪＭ１７プラスミドと同時トランスフェクションすることによって作製した。ウイルスのクローン化の成功をＰＣＲ増幅によって確認した（図５ａ）。

【０３７５】

標的細胞におけるＦａｓ－ｃの発現を明らかにするために、内皮ＢＡＥＣ細胞を、示された力価のＡｄ－ＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃで形質導入した。形質導入の７２時間後、細胞を溶解し、細胞タンパク質を、非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを使用して分離した、ウエスタンブロット分析を、抗ＴＮＦＲ１抗体（Ｓｃ－７８９５、Ｓａｎｔａ－Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して行った。図５ｂに明らかにされるように、４５ｋＤで移動する顕著なバンドが明瞭に認められ、その発現は用量依存的であった。このことは、キメラタンパク質の正しい折り畳み及び発現を示唆している。対照的に、形質導入されていない内皮細胞、又は対照の空ウイルスベクターで形質導入された細胞では、対応するバンドが認められなかった。従って、これらの結果により、Ｆａｓ－ｃのアデノウイルス媒介による遺伝子移入は標的細胞における導入遺伝子の発現をもたらすことが確認された。

【０３７６】

実施例３

Ａｄ－ＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃの発現は内皮細胞においてアポトーシスを誘導する

内皮細胞のアポトーシスを誘導するＡｄ－ＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓキメラの能力を測定した。図６ａ～ｂに示されるように、プレプロエンドセリンにより指向される内皮細胞のアデノウイルス媒介による形質導入は明白かつ甚だしい細胞死をもたらした；Ａｄ－ＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃ（10^3のＭＯＩ）を感染させたＨＵＶＥＣ及びＢＡＥＣは、膜の突起形成、円形化及び収縮、そして培養ディッシュからの剥離を含む、アポトーシスを受けている接着性細胞の形態学的特徴を有した。対照的に、対照ウイルスを同じＭＯＩで感染させた細胞は正常な外見及び成長速度を維持した。１００のＭＯＩで形質導入された細胞は最少程度の細胞死を示しただけであった（データは示されず）。

【０３７７】

Ａｄ－ＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃの細胞傷害的性質のさらなる評価を、レポータ

ー遺伝子ＧＦＰをＰＰＥ－１プロモーターの制御下で発現する細胞においてこのウイルスを発現させることによって行った。図６ｃ～ｄから明らかであるように、形質導入された細胞のほとんどが、典型的なアポトーシスの外見を形質導入の７２時間後には獲得し、これに対して、対照ウイルス及びＡｄ－ＰＰＥ－ＧＦＰで同時形質導入された細胞は正常に見えた。

【０３７８】

Ｆａｓ－ｃの細胞傷害的作用を、クリスタルバイオレット染色を使用して定量した。図７に示されるように、Ａｄ－ＰＰＥ－Ｆａｓ－ｃによるＢＡＥＣ及びＨＵＶＥＣへの感染はそれぞれ５７％及び６５％の致死率をもたらし、一方、対照ウイルスは細胞生存率に影響を及ぼさなかった。

【０３７９】

プロアポトーシスベクターＡｄ－ＰＰＥ－Ｆａｓ－ｃの内皮細胞特異性を、ＮＳＦ（正常な皮膚繊維芽細胞）にこのベクターを感染させることによって明らかにした。これらの細胞は、低レベルのＰＰＥ－１を発現する［Ｖａｒｄａ－Ｂｌｏｏｍ，Ｎ．ｅｔａｌ．、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ、８、８１９～２７（２００１）］が、Ａｄ－ＰＰＥ－Ｆａｓ－ｃによる感染によって影響を受けなかった。対照的に、組換えベクターＡｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－ｃはこれらの細胞においてアポトーシスを誘導した。

【０３８０】

実施例４

Ａｄ－ＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃ受容体及びＴＮＦαリガンドの同時投与は選択的な様式でプロアポトーシス作用を増強する

Ｆａｓ－ｃ発現細胞におけるアポトーシス作用を増強するＴＮＦαの能力を調べた。ヒトＴＮＦαを、Ａｄ－ＰＰＥ－Ｆａｓ－ｃ（１００のＭＯＩ）によるウイルス感染の４８時間後、内皮細胞培養物に加えた。細胞生存率を２４時間後にアッセイした。図８に示されるように、ＴＮＦα（１０ｎｇ／ｍｌ）は、Ａｄ－ＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃ感染細胞の生存率における７３％の減少を誘導し、これに対して、著しい死は、ＴＮＦα単独によって、又は対照ウイルス（Ａｄ－Ｌｕｃ）を感染させた細胞では起こらなかった。

【０３８１】

ＴＮＦαの作用を裏付けるために、細胞特異性を検討した。ＮＳＦ細胞（正常な皮膚繊維芽細胞）、ＤＡ３細胞（マウス乳腺癌）、Ｄ１２２細胞（ルイス肺癌）及びＢ１６メラノーマ細胞にＡｄ－ＰＰＥ－Ｆａｓ－ｃ又は対照ウイルスを感染させた。４８時間後、培養にＴＮＦαを加え、細胞の形態学をクリスタルバイオレットによる染色の後に評価した。図９ａ～ｅに示されるように、Ａｄ－ＰＰＥ－Ｆａｓ－ｃを感染させた非内皮細胞は正常な外観を示し、ＴＮＦによる影響を受けなかった。他方、Ｆａｓ－ｃによるＢＡＥＣへのアデノウイルス媒介による感染は、ＴＮＦが加えられたとき、細胞生存率の顕著な低下をもたらした。ＣＭＶプロモーターによってもたらされるＦａｓ－ｃの非選択的なアポトーシス活性が、内皮細胞に対するＡｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－ｃのＴＮＦ依存的なアポトーシス作用を例示する図１０ａにおいて明らかにされる。示されたＭＯＩのＡｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－キメラを感染させたＢＡＥＣ細胞の生存率をＴＮＦとのインキュベーションの後に測定した。

【０３８２】

注目すべきことに、内皮細胞非特異的ベクターのＡｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－ｃは内皮細胞及び非内皮細胞の両方のＴＮＦα依存的なアポトーシスを生じさせた（図１０ｂ～ｄ）。

【０３８３】

実施例５

Ａｄ－ＰＰＥ１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃはマウスにおけるＢ１６メラノーマのインビボでの成長阻害を誘導する

Ｂ１６メラノーママウスモデルを、ＰＰＥ１－３ｘプロモーターから発現されるＦａｓ－ｃの抗腫瘍作用を調べるために使用した。Ｂ１６メラノーマ細胞（8×10^5）を４０匹のＣ５７ｂｌ／６マウスの脇腹領域に皮下注射した。腫瘍が触診可能になったとき（約

５ｘ５ｍｍ）、マウスを下記のように４つの群に無作為に分けた：（ｉ）対照－生理食塩水の注射；（ｉｉ）対照ウイルス（ＰＰＥプロモーターにより制御されるルシフェラーゼを含有するアデノウイルス）；（ｉｉｉ）プレプロエンドセリン（ＰＰＥ）プロモーターにより制御されるＦａｓ－ＴＮＦ受容体キメラ遺伝子を含有するＡｄ－ＰＰＥ１－３ｘ－Ｆａｓ－ｃウイルス；及び（ｉｖ）内皮細胞非特異的なＣＭＶプロモーターにより制御されるＦａｓ－ＴＮＦ受容体キメラ遺伝子を含有するＡｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－ウイルス。

【０３８４】

腫瘍サイズ（長さ及び幅）を、ハンドカリパスを使用して測定した。図１１ａに示されるように、腫瘍サイズは、対照のマウスと比較した場合、Ａｄ－ＰＰＥ１－３ｘ－Ｆａｓ－ｃ又はＡｄ－ＣＭＶ－３ｘ－Ｆａｓ－ｃで処置されたマウスについてはより低かった。処置期間を終了した時の腫瘍重量もまた、Ａｄ－ＰＰＥ１－３ｘ－Ｆａｓ－ｃ処置マウスの方が低かった（図１１ｂ）。Ａｄ－ＰＰＥ１－３ｘ－Ｆａｓ－ｃが注射されたマウスはその腫瘍の顕著な壊死を示した（図１１ｃ）。

【０３８５】

転移性疾患の阻害：ルイス肺癌モデル：ＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃキメラによる腫瘍増殖阻害の発現と効力の特異性を、転移ルイス肺癌のモデルでさらに試験した。肺ＬＬＣの転移腫瘍は、以下に詳細に記載したようにして、雄のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウスに誘発させ、次いで、これらのマウスに９日の間隔を置いて二回、ウイルスベクターＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）ＬＵＣ、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃ及びＡｄＣＭＶ－Ｆａｓ－ｃを注射した（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ２００４；１１３：１０１７－１０２４）。

【０３８６】

ウイルスを投与した後６日目に器官を収穫し、次いでＰＣＲによってＦａｓ－ｃの発現について検定した。ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターによるＦａｓ－ｃの転写の制御で、発現は腫瘍を有する肺に限定されていたが（結果は提示せず）、これは、ＣＭＶ－Ｆａｓ－ｃで処置したマウスにおけるＦａｓ－ｃの発現が広く分布しているのと著しく対照的であった（データは提示せず。Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ２００４；１１３：１０１７－１０２４参照）。

【０３８７】

さらに、処置群及び対照群由来の肺を肉眼で病状を検査した結果、転移腫瘍を有するマウスにＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃを投与すると、腫瘍の増殖が阻害されて肺表面の増殖中の腫瘍の大きさが減少し、一方、対照動物の肺は、ほとんど完全に腫瘍組織で置き換えられたことが明らかになった（データは提示せず。Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ２００４；１１３：１０１７－１０２４参照）。

【０３８８】

さらに、処置マウス及び対照マウス由来の肺の切片について、組織病理学的試験とＴＵＮＥＬと内皮特異的ＣＤ３１染色を行なった結果、転移腫瘍を有するマウスにＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃを投与すると、腫瘍組織に塊状アポトーシスと壊死が起こり、腫瘍の血管内皮が広範囲に損傷していたことが明らかになった。対照的に、対照処置のマウスの血管は影響を受けなかった（データは提示せず。Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ２００４；１１３：１０１７－１０２４参照）。

【０３８９】

実施例６

インビトロの３Ｘ－ＰＰＥ－１プラスミド活性の分析

ＰＰＥ－１－３Ｘの活性を分析するため、ＰＰＥ－１－３Ｘプロモータープラスミド及び未修飾ＰＰＥ－１プロモータープラスミドにおけるレポーター遺伝子発現の比較を行った。ＰＰＥ－１－３Ｘ断片又は未修飾ＰＰＥ－１断片のいずれかと、レポーター遺伝子ルシフェラーゼとを含有しているレポーター遺伝子プラスミドを、内皮細胞系及び非内皮細胞系、並びにＰＰＥ－１プロモーターを発現している気管支上皮細胞系（Ｂ２Ｂ）へとト

ランスフェクトした（前記の材料及び方法を参照のこと）。Ｂ２Ｂ細胞系は、ＰＰＥ－１プロモーターと比較して非内皮細胞系における発現を低下させる３Ｘ因子の能力の指標を提供するために選択された。トランスフェクションは、リポフェクタミン（Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐ．，Ｍａｄｉｓｏｎ、ウィスコンシン州）を使用して達成した。容認された分子生物学実務に従い、β－ｇａｌ－ｎｅｏプラスミドを、それぞれの場合におけるトランスフェクション効率の指標として利用した。

【０３９０】

トランスフェクション後４８時間目に、細胞を溶解緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ウィスコンシン州）を使用して採集し、ルシフェラーゼ活性を、照度計（ＴＤ－２０ｅ－Ｔｕｒｎｅｒ Ｄｅｓｉｇｎｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）によって分析した。異なる形質転換効率を規準化するため、平行してβｇａｌ活性を分析した。結果は、図１２及び表２に要約されている。ＰＰＥ－３Ｘの調節下でのルシフェラーゼ活性は、未修飾ＰＰＥ－１の調節下でのルシフェラーゼ活性より１５～２０倍高い。非内皮細胞系においては、ＰＰＥ－１を使用した場合にも、ＰＰＥ－１－３Ｘを使用した場合にも、最小の発現が検出された。これは、ＰＰＥ－３Ｘが、インビボでの内皮細胞への特異的な遺伝子送達のための有望な候補であることを証明している。

【表２】

表２　PPE-１ルシフェラーゼ構築物及びPPE-1-3Ｘルシフェラーゼ構築物でトランスフェクトされた細胞におけるルシフェラーゼ活性

プラスミド	内皮細胞系におけるルシフェラーゼ活性		非内皮細胞系におけるルシフェラーゼ活性
	HUVAC	BAEC	RIN
PPE-1	135.12	1121.3	0.73
PPE-1-3X	768	18331.7	0.32

【０３９１】

実施例７

インビトロのＡｄ５ＰＰＥ－１／ルシフェラーゼの活性及び特異性

ＰＰＥ－１／ルシフェラーゼ、ＰＰＥ－１－３Ｘ／ルシフェラーゼ、ＰＰＥ－１／ＧＦＰ、及びＰＰＥ－１－３Ｘ／ＧＦＰも、Ａｄ５プラスミドとライゲートさせ、Ａｄ５ＰＰＥ－１／Ｌｕｃ及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘ／Ｌｕｃ、Ａｄ５ＰＰＥ－１／ＧＦＰ及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘ／ＧＦＰを作製した（Ｖａｒｄａ－Ｂｌｏｏｍ ｅｔ ａｌ、（２００１）Ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ ８：８１９－８２７）。これらの構築物を、以下に詳述されるようにして別々にアッセイした。

【０３９２】

Ａｄ５ＰＰＥ－１／Ｌｕｃの活性を試験するため、Ｂ２Ｂ（ヒト気管支上皮）、ＢＡＥＣ（ウシ大動脈内皮細胞）、及びＨＵＶＥＣ（ヒト臍静脈内皮細胞）のトランスフェクションを行った。これらの３個の細胞系は、エンドセリン遺伝子を発現しており、試験された構築物の内皮細胞における発現のレベルを示すために選択された。エンドセリン遺伝子を発現していないＲＩＮ（ラット膵島細胞腺腫）細胞系を、陰性対照として利用し、同じ構築物によりトランスフェクトした。Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃ（ＣＭＶプロモーターの調節下のルシフェラーゼ）を、全ての細胞系において非内皮特異的対照として使用した。

【０３９３】

図１３は、内皮細胞系ＢＡＥＣ及びＨＵＶＥＣにおいて、ＣＭＶプロモーターより高いルシフェラーゼ発現が、ＰＰＥ－１プロモーターによって達成されたことを明白に例示している。内皮由来でないＲＩＮ細胞において、ＣＭＶプロモーターの方がＰＰＥ－１プロモーターより多くのルシフェラーゼ活性を生成させた。これらの結果は、未修飾ＰＰＥ－１プロモーターの内皮特異性を証明している。

【０３９４】

実施例８
Ａｄ５ＰＰＥ－３ＸＬｕｃ及びＡｄ５ＰＰＥ－３ＸＧＦＰの活性及び特異性
特異性及び発現レベルに対する３Ｘ因子の影響を確認するため、Ａｄ５ＰＰＥ－３Ｘ／ルシフェラーゼ構築物及びＡｄ５ＰＰＥ－３Ｘ／ＧＦＰ構築物を、前記実施例７に記載された細胞系をトランスフェクトするために使用した。実施例７と同様に、Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃを非内皮特異的対照として使用した。ＣＭＶプロモーターと比較して、より高いＢＡＥＣ細胞系及びＨＵＶＥＣ細胞系におけるルシフェラーゼ発現が、ＰＰＥ－３Ｘプロモーターの調節下で検出された。
【０３９５】
図１４Ａは、ＢＡＥＣ細胞系におけるＡｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘの調節下でのＧＦＰ発現を例示する顕微鏡写真である。図１４Ｂは、ＢＡＥＣ系におけるＡｄ５ＣＭＶのＧＦＰ発現を例示する顕微鏡写真である。これらの図面によって明白に示されるように、ＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターの方が、内皮細胞において、より活性が高い。これらの結果は、３Ｘ因子が、ＰＰＥ－１プロモーターの内皮特異性を損なわないことを明白に示している。細胞培養物におけるＰＰＥ－１プロモーター及びＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターの相対活性は、下記実施例１１において提示される。
【０３９６】
実施例９
ｐ５５遺伝子のアポトーシス促進活性のインビトロアッセイ
Ｐ５５（ＴＮＦＲ１、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｍ７５８６６）のＰＡＣＰＰＥ３Ｘ（ＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターを含有）及びＰＡＣＣＭＶへのサブクローニングの後、これらのプラスミド及びＧＦＰ（ｐＥＧＦＰ－Ｃ１ベクター；ＣＬＯＮＴＥＣＨ，Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，カリフォルニア州）の共トランスフェクションを、前記と同様にして実施した。簡単に説明すると、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼによって、ＰＰＥ－１プロモーターの下流（ルシフェラーゼ遺伝子の代わり）のＮｏｔＩ制限部位へと遺伝子をサブクローニングした後、それをＤＨ５αコンピテント細胞に形質転換した。トランスフェクション後２４時間目、小さく丸形のアポトーシス細胞が、視覚的に正常細胞から識別可能であった。アポトーシス促進性プラスミドによりトランスフェクトされた細胞の電子顕微鏡検は、典型的なアポトーシスの様相を示し、それにより視覚的評価が確証された。
【０３９７】
ＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターの調節下では、内皮細胞においてのみｐ５５によってアポトーシスが誘導されたが（図１５）、ＣＭＶプロモーターは細胞特異的活性を示さなかった。ＰＰＥ－１－３Ｘの調節下のルシフェラーゼは、試験された細胞系においてアポトーシスを誘導しなかった。これらの結果は、ＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターを利用することによって、内皮細胞において特異的にアポトーシスを誘導することが実行可能であることを示している。
【０３９８】
実施例１０
低酸素応答因子（ＨＲＥ）は低酸素感受性内皮細胞における標的遺伝子発現を増強しうる
低酸素は、血管の緊張度及び構造の重要な制御因子である。低酸素は、虚血性心疾患及び癌の両方における血管形成の強力な刺激であることも示されている（Ｓｅｍｅｎｚａ，Ｇ．Ｌ．　ｅｔ　ａｌ、（２０００）Ａｄｖ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ　Ｂｉｏｌ．；４７５：１２３－３０；Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｋ．Ｊ．（２００１）Ｂｒｅａｓｔ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２００１：３；３２８－３１、及びＳｈｉｍｏ，Ｔ．（２００１）Ｃａｎｃｅｒ　Ｌｅｔｔ．１７４；５７－６４）。さらに、低酸素は、エリスロポエチン、ＶＥＧＦ、解糖酵素、及びＥＴ－１を含む多くの遺伝子の発現を制御することが報告されている。これらの遺伝子は、共通の酸素感知経路、低酸素誘導因子（ｈｙｐｏｘｉａ　ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ　ｆａｃｔｏｒ）－１（ＨＩＦ－１）と名付けられた誘導可能転写複合体によって調節される。ＨＩＦ－１複合体は、標的遺伝子のシス作用性低酸素応答因子（ｈｙｐｏｘｉａ　ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ　ｅｌｅｍｅｎｔ）（ＨＲＥ）と結合することにより、低酸素

に対する転写応答を媒介する。ＨＲＥとは、ＶＥＧＦ、一酸化窒素シンターゼ－２、エリスロポエチン、及びエンドセリン－１、ＥＴ－１を含むその他を含む、低酸素に応答する少数の遺伝子のプロモーター内に位置している保存された配列である。ＥＴ－１プロモーターは、転写開始部位の１１８ｂｐ上流の位置に逆位の低酸素応答因子を含有しており、その因子は、７塩基対を含有しており、かつ、ＧＡＴＡ－２と、５’ＧＣＡＣＧＴＴ３’－５０塩基対に位置するＡＰ１部位との間に置かれている。（配列番号：５）。

【０３９９】

プレプロエンドセリン－１（ＰＰＥ－１）プロモーターは、腫瘍組織又は虚血組織の低酸素微小環境において発現を増加させる能力を有する低酸素応答因子（ＨＲＥ）を含有しており、従って「腫瘍組織特異的」かつ／又は「虚血組織特異的」である。このＨＲＥの実際の機能を評価するため、ルシフェラーゼ又はＧＦＰレポーター遺伝子と関連し、かつ、アデノウイルスベクターによって送達されるＰＰＥ－１プロモーター及びＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターのアッセイに着手した。

【０４００】

正常酸素条件及び低酸素条件（０．５％O_2、１６ｈ）の下での、ＰＰＥ－１プロモーター又はＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターの調節下でのルシフェラーゼ活性を、ＢＡＥＣ細胞において比較した。ＰＰＥ－１プロモーターの調節下でのルシフェラーゼ活性は、低酸素（図１６及び１７）に暴露された場合、５倍高くなった。さらに、ＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターの調節下でのルシフェラーゼ活性は、低酸素条件下で２．５倍高くなった。要約すると、正常酸素でのＰＰＥ－１－３Ｘ遺伝子による発現レベルは、未修飾ＰＰＥ－１プロモーターで観察されるより高いにも関わらず、ＰＰＥ－１プロモーターへの３Ｘ因子の導入は、低酸素に応答して下流遺伝子の発現レベルをさらに増加させることができる。

【０４０１】

実施例１１

内皮細胞系におけるＰＰＥ－１－３Ｘプロモーター及びＰＰＥ－１プロモーターの活性のさらなる評価

図１８は、ｐＰＰＥ－１／ルシフェラーゼ及びｐＰＰＥ－１－３Ｘ／ルシフェラーゼを使用したＢ２Ｂ、ＨＵＶＥＣ、及びＢＡＥＣのトランスフェクション実験からの結果を要約したものである。ＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターの調節下では、ＰＰＥ－１プロモーターより高いルシフェラーゼ発現（３０倍、８．５倍、及び１．５倍）が、Ｂ２Ｂ、ＨＵＶＥＣ、及びＢＡＥＣにおいてそれぞれ観察された。これらの結果は、前記の結果を確証しており、ＰＰＥ－１－３Ｘが、高レベル発現を内皮細胞へと特異的に指向させるために極めて好適であることを確立するために役立つ。将来のインビボ送達の情況において、ＰＰＥ－１－３Ｘ構築物により達成されるより高い発現レベルは、より少量のＤＮＡの投与と同義である。これは、次に、特異性をさらに増加させるために役立つであろう。

【０４０２】

実施例１２

インビボのＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃの効率、特異性、及び安定性

実施例７～１０において観察された発現の内皮特異性が、細胞培養物のアーティファクトではなかったことを確証するため、前記の「正常マウスにおける組織遺伝子発現」に記載されたようにして、Ａｄ５ＰＰＥ－１／ルシフェラーゼ構築物をＣ５７ＢＬ／６マウスへと注射した。インビトロ研究の場合と同様に、Ａｄ５ＣＭＶ／ルシフェラーゼを陰性対照として利用した。

【０４０３】

アデノウイルスベクターの注射後、血管新生組織及び非血管新生組織におけるルシフェラーゼの特異的活性及び安定性をアッセイした。結果は、図１９（肝臓における発現と比したルシフェラーゼ発現）及び表３（全身発現に対する比率（％）としてのルシフェラーゼ発現）に要約されている。予想通り、Ａｄ５ＣＭＶ／ルシフェラーゼで処置されたマウスにおいては、ルシフェラーゼ活性の大部分（全身発現の８０％以上）が、肝臓に見出された。ＰＰＥ－１プロモーターによって調節されたルシフェラーゼ活性は、肝臓において

比較的低かった（全身発現の３７～５４％）。大動脈におけるＰＰＥ－１に由来する発現（注射後５日目及び１４日目にそれぞれ全身発現の２３～３３％）は、Ａｄ５ＣＭＶ／ルシフェラーゼで処置されたマウス（最大で全身発現の１．８％以下；表２）と比較してはるかに高かった。これらの結果は、細胞培養物において観察された内皮特異性を確証している。肝臓が高度に血管新生性の器官であることを想起すべきである。従って、以下に詳述されるように、器官内の細胞発現の調査を行った。

【表３】

表３　PPE-1及びCMVに基づく構築物の注射後５日目及び１４日目のルシフェラーゼ発現

注射後日数	5		14	
	光単位/μｇタンパク質		光単位/μｇタンパク質	
器官	PPE-1	CMV	PPE-1	CMV
大動脈	13.0±2.9 (32.7%)	1.4±0.5 (0.56%)	10.6±2.4 (12.6%)	1.3±0.3 (1.1%)
心臓	0.2±0.1 (0.5%)	1±0.6 (0.4%)	1.5±0.3 (1.7%)	1.8±0.6 (1.6%)
肝臓	22.7±4.5 (57%)	219±111.5 (88.6%)	34.9±7.8 (41.6%)	52.8±10.6 (46.8%)
肺	0.2±0.1 (0.5%)	2.3±1.0 (0.9%)	3.6±0.8 (4.3%)	2.0±0.9 (1.8%)
筋肉	0.3±0.1 (0.7%)	0.8±0.2 (0.3%)	1.2±0.3 (1.4%)	1.5±0.5 (1.3%)
脾臓	1.3±0.8 (3.2%)	1.6±0.9 (0.6%)	2.0±0.4 (2.4%)	2.3±0.9 (2.0%)
膵臓	2±0.6 (5.0%)	20.1±6.8 (8.1%)	26.4±5.9 (31.5%)	45.2±24.5 (40.1%)
腎臓	0.1±0 (0.25%)	0.9±0.6 (0.4%)	0.6±0.1 (0.71%)	0.8±0.3 (0.7%)

【０４０４】

図４１Ａ及び４１Ｂは、１１０匹の注射されたマウスの大動脈（Ａ）及び肝臓（Ｂ）における絶対ルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を示している。ルシフェラーゼ活性は、注射後１日目（ｎ＝１３）、５日目（ｎ＝３４）、１４日目（ｎ＝３２）、３０日目（ｎ＝２０）、及び９０日目（ｎ＝１１）に測定した。大動脈における結果は、主として内皮細胞におけるプロモーター（ＰＰＥ－１又はＣＭＶ）活性を表しており、肝臓における結果は、主として肝細胞における活性を表している。

【０４０５】

実施例１３

ＢＡＬＢ／ＣマウスにおけるインビボのＡｄ５ＰＰＥ－１の効率、特異性、及び安定性のアッセイ

観察された結果が動物の特定の系統のアーティファクトではなかったことを証明するため、実施例１２の実験を、１２週齢ＢＡＬＢ／Ｃマウス（各群ｎ＝１０）において繰り返した。

【０４０６】

ＢＡＬＢ／Ｃマウスにおいて、アデノウイルスベクターによる絶対的な結果が、Ｃ５７ＢＬ／６マウスより低かったため、ルシフェラーゼ発現は、全組織における全ルシフェラーゼ活性に対する比率（％）として表される。

【０４０７】

注射後５日目の最も高い相対ルシフェラーゼ発現は、Ａｄ５ＰＰＥ－１を注射されたマウスの脾臓（９０．９％）、及びＡｄ５ＣＭＶを注射されたマウスの肝臓（８６．２％）において観察された。注射後５日目の活性（１．７５％）と比較して、注射後１４日目のＡｄ５ＰＰＥ－１を注射されたマウスの大動脈における相対ルシフェラーゼ活性の有意な増加（３２．９％）も観察された（図４２Ａ及び４２Ｂ；Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃが白バー；Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃが黒バー）。

【０４０８】

これらの結果は、マウスの系統に関わらず、注射されたＤＮＡの肝細胞による優先的な取り込みにも関わらず、ＰＰＥ－１プロモーターの組織特異性が、肝細胞発現を効率的に排除するのに充分に強力であることを確認している。

【０４０９】

実施例１４

インビボのＡｄ５ＰＰＥ－１により送達された遺伝子の細胞局在

インビボでＰＰＥ－１によって発現された遺伝子の細胞発現部位を確認するため、アデノウイルスベクターＡｄ５ＰＰＥ－１－ＧＦＰによって送達された緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を使用した。Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰ（Ｑｕａｎｔｕｍ，カナダ）を、非内皮細胞特異的陰性対照として使用した。静脈注射後５日目、マウスを屠殺し、組織を蛍光顕微鏡検によって分析した。

【０４１０】

Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰベクターを注射されたマウスにおいて、肝臓における発現の大部分が肝細胞に検出され、内皮細胞には発現が検出されなかった（図２０Ａ）。極めて対照的に、Ａｄ５ＰＰＥ－１－ＧＦＰを注射されたマウス（図２０Ｂ）は、肝細胞における発現を示さず、肝臓の血管内の内皮細胞における有意な発現を示した。同様の結果が、他の組織でも得られ、ＰＰＥ－１に由来する発現は、事実上全て、内皮に検出され、ＣＭＶに由来する発現は内皮には存在しなかった。これらの結果は、内皮細胞及び非内皮細胞を含有している器官においてすら内皮特異性が保存されていることを示している。この所見は、増殖中の腫瘍における血管形成の予防にとって重要な意義を有している。

【０４１１】

実施例１５

インビトロのＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃ及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰの効率及び内皮特異性のアッセイ

細胞におけるレポーター遺伝子ルシフェラーゼ及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）の発現の駆動におけるＡｄ５ＰＰＥ－１及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘの相対効率を決定するため、内皮細胞における特異的活性を、前記の細胞系を使用してインビトロで試験した。Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃ及びＡｄ５ＣＭＶＧＦＰを、非組織特異的対照として利用した。Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ及びＡｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰを、３Ｘ配列の付加によって引き起こされた発現レベルの相対変化を確認するために利用した。

【０４１２】

図２１及び２２に要約されている結果は、ＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターの調節下でのルシフェラーゼ活性が、非内皮細胞であるラット膵島細胞腺腫ＲＩＮ、ＨｅＬＡ、ＨｅＰＧ２、及び正常皮膚繊維芽細胞（ＮＳＦ）における活性と比較して、ＥＣ系（ウシ大動脈内皮細胞ＢＡＥＣ）において５～１０倍高かったことを示している（図２１及び２２）。

【０４１３】

図２１は、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃ、及びＡｄ５ＣＭＶＬｕｃにより形質導入されたＢ２Ｂ細胞、ＢＡＥＣ細胞、及びＲＩＮ細胞におけるルシフェラーゼ活性を、光単位／μｇタンパク質として示している。最も高いルシフェラーゼ発現は、Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃにより形質導入されたＲＩＮ細胞において観察されたが、この構築物のＢＡＥＣ細胞及びＢ２Ｂ細胞における発現は少なかった。二番目に高いレベルのルシフェラーゼ発現は、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃにより形質導入されたＢＡＥＣ細胞において観察された。Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃは、ＢＡＥＣ細胞において、より低い

レベルで発現された。Ｂ２Ｂ細胞系においては、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃが、ほぼ同一のレベルで発現された。

【０４１４】

全体として、ＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターの調節下での内皮細胞系におけるルシフェラーゼ活性は、同一感染条件（ｍｏｉ＝１０）で、ＰＰＥ－１プロモーターの調節下よりも２３倍高く、ＣＭＶプロモーターの調節下よりも２３～４７倍高かった。これは、非内皮ＲＩＮ細胞におけるルシフェラーゼ発現は、ＣＭＶプロモーターの調節下の方が３０００倍高かった（図２１）という事実にも関わらずである。

【０４１５】

ＰＰＥ－１及びＰＰＥ－１－３Ｘが、他の非内皮細胞系列において不活性であることを確立するため、ＨｅＬＡ細胞系、ＨｅｐＧ２細胞系、ＮＳＦ細胞系を形質導入した。ＢＡＥＣを、内皮対照として利用した。図２２は、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃ、及びＡｄ５ＣＭＶＬｕｃにより形質導入されたＨｅＬＡ細胞系、ＨｅｐＧ２細胞系、ＮＳＦ細胞系、及びＢＡＥＣ細胞系におけるルシフェラーゼ活性を光単位／μｇタンパク質として示している。Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃによる形質導入は、ＨｅＬＡ細胞、ＨｅｐＧ２細胞、及びＮＳＦ細胞において、高レベルのルシフェラーゼ発現を引き起こした。これらの細胞系は、ＰＰＥ－１の調節下ではルシフェラーゼを発現せず、ＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターでは低レベルでルシフェラーゼを発現した。予想通り、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ又はＡｄＳＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃにより形質導入されたＢＡＥＣ細胞は、高いルシフェラーゼ発現を示した。

【０４１６】

これらの結果は、総合すると、ＰＰＥ－１プロモーターへの３Ｘ配列の導入が、非内皮細胞における不要な発現を防止しつつ、内皮細胞系における発現レベルを増加させたことを示している。

【０４１７】

ＰＰＥ－１プロモーターへの３Ｘ配列の付加は、ｍｏｉ＝１により形質導入されたＢＡＥＣにおけるＧＦＰ発現を図示している図２３Ａ～Ｃに示されるように、ＥＣ系（ウシ大動脈内皮細胞ＢＡＥＣ）における緑色蛍光タンパク質発現のレベルも増加させた。この実験において、ＣＭＶプロモーターを使用した場合には、ＧＦＰの発現は観察されなかった。

【０４１８】

図２３中、パネルＡは、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰにより形質導入された細胞を示し、パネルＢはＡｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰにより形質導入された細胞を示し、パネルＣはＡｄ５ＣＭＶＧＦＰを示している。ここでも、ＰＰＥ－１プロモーターへの３Ｘ配列の導入は、レポーター遺伝子の発現を有意に増加させた。この結果は、内皮特異的エンハンサーとして機能する３Ｘ配列の能力が、転写される下流遺伝子の機能ではないことを示している。

【０４１９】

さらに、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘ－ＧＦＰ及びＡｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰによる形質導入は、図２４～２７に要約されるように、ＣＭＶプロモーターの下での高い発現と比較して、非内皮細胞ＳＭＣ、ＨｅｌＡ、ＨｅＰＧ２、及び正常皮膚繊維芽細胞（ＮＳＦ）においてＧＦＰ発現をもたらさなかった。

【０４２０】

図２４は、ｍｏｉ＝１のＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰ（パネルＡ）又はＡｄ５ＣＭＶＧＦＰ（パネルＢ）のいずれかにより形質導入されたＳＭＣにおけるＧＦＰ発現を示している。高レベルのＧＦＰ発現が、Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰ形質導入から生じたが、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰ形質導入による形質導入からは、ＧＦＰ発現が生じなかった。

【０４２１】

図２５は、ＨｅＬａ細胞において行われた同様の実験の結果を示している。先の図と同様に、パネルＡはＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰにより形質導入された細胞を示し、パネ

ルＢはＡｄ５ＣＭＶＧＦＰにより形質導入された細胞を示している。ここでも、高レベルのＧＦＰ発現が、Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰ形質導入から生じたが、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰ形質導入による形質導入からは、ＧＦＰ発現が生じなかった。

【０４２２】

図２６は、ＨｅｐＧ２細胞において行われた同様の実験の結果を示している。先の図と同様に、パネルＡはＡｄ５ＰＰＥ－１（３Ｘ）ＧＦＰにより形質導入された細胞を示し、パネルＢはＡｄ５ＣＭＶＧＦＰにより形質導入された細胞を示している。ここでも、高レベルのＧＦＰ発現が、Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰ形質導入から生じたが、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰ形質導入からは、ＧＦＰ発現が生じなかった。

【０４２３】

図２７は、ＮＳＦ細胞において行われた同様の実験の結果を示している。先の図と同様に、パネルＡはＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰにより形質導入された細胞を示し、パネルＢはＡｄ５ＣＭＶＧＦＰにより形質導入された細胞を示している。ここでも、高レベルのＧＦＰ発現がＡｄ５ＣＭＶＧＦＰ形質導入によって生じたが、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰによる形質導入からは、非常に低いＧＦＰ発現が生じた。

【０４２４】

これらの結果は、総合すると、配列番号：７の３Ｘ配列を含有している修飾型ＰＰＥ－１プロモーターを使用することにより、高レベルの内皮特異性及び高レベルの内皮発現が得られることを示している。

【０４２５】

実施例１６

インビボでＡｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘによって送達されたレポーター遺伝子の細胞局在

インビボでＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターの調節下で発現されたレポーター遺伝子の細胞局在パターンを決定するため、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰ及びＡｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰを、前記のようなマウスに注射した。静脈注射後５日目、マウスを屠殺し、組織を蛍光顕微鏡検によって分析した。

【０４２６】

Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰを注射されたマウスの肝臓、腎臓、及び脾臓の血管の内皮細胞には、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰを注射されたマウスと比較して有意に高いＧＦＰ活性が観察された。図２８Ａ及びＢは、代表的な結果を示している。

【０４２７】

図２８Ａは、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰを注射されたマウスの血管を裏打ちしている内皮細胞における低レベルのＧＦＰ発現を示している。図２８Ｂは、構築物への３Ｘ配列の付加によって、はるかに高いレベルのＧＦＰ発現が生じたことを示している。

【０４２８】

血管の裏打ちにおける高発現にもかかわらず、肝細胞、糸球体、上皮細胞、及び脾細胞には発現が検出されなかった（図２９及び３０）。

【０４２９】

図２９は、注射されたマウスの腎組織からの代表的な結果を示している。Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰを注射されたマウス（図２９Ａ）、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰを注射されたマウス（図２９Ｂ）、及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰを注射されたマウス（図２９Ｃ）は、全て、腎細胞における低いＧＦＰ活性を示した。図２９Ｂにおいては、わずかに高いＧＦＰ発現が、血管壁に可視である（矢印によって示されている）。

【０４３０】

図３０は、注射されたマウスの脾組織からの代表的な結果を示している。Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰを注射されたマウス（図３０Ａ）、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰを注射されたマウス（図３０Ｂ）、及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰを注射されたマウス（図３０Ｃ）は、全て、脾臓の細胞における低レベルのＧＦＰ活性を示した。Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰを注射されたマウスの血管には、比較的高いＧＦＰ活性が可視である（矢印によって示されている）。

【０４３１】
これらの結果は、ＰＰＥ－１プロモーター及びＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターが、いずれも、インビボで内皮細胞特異的であることを確証した。さらに、両プロモーターの活性が、非増殖内皮組織、即ち、健康な器官の血管に限定されていたことも示唆している。従って、腫瘍血管形成モデルにおけるアッセイを行った。
【０４３２】
実施例１７
インビボの腫瘍新血管新生におけるＡｄ５ＰＰＥ－１構築物のアッセイ
レポーター遺伝子の発現を腫瘍内の血管形成性血管へと特異的に指向させるＡｄ５ＰＰＥの能力を確認するため、（材料及び方法に既に記載された）マウスＬＬＣモデルを利用した。一つの実験において、腫瘍新血管新生中のルシフェラーゼ発現を、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ又はＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（各10^{10}ｐｆｕ／ｍｌ）の全身注射後５日目に試験した。
【０４３３】
この実験においては、原発腫瘍モデル及び転移腫瘍モデルの両方へのＡｄ５ＣＭＶＬｕｃの全身注射が、原発腫瘍又は転移肺における最小の発現をもたらした。この発現レベルは、未処置の正常肺においてＣＭＶによって指向された最小のルシフェラーゼ発現と類似していた（図３５；黒バー；ｎ＝１２）。極めて対照的に、ＰＰＥ－１プロモーター（図３５；白バー；ｎ＝９）の調節下では、高度に血管形成性の肺転移が、低血管新生性の原発腫瘍及び未処置肺におけるルシフェラーゼ活性より約２００倍高かったルシフェラーゼ活性と関連していた。
【０４３４】
肝臓、腎臓、心臓、及び膵臓のような非転移組織におけるルシフェラーゼ発現は最小であった。大動脈における発現レベルは、転移肺におけるレベルの約３０％であった。
【０４３５】
ＬＬＣモデルにおける付加的な実験においては、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰ及びＡｄ５ＣＭＶＧＦＰ構築物を、原発腫瘍及び転移肺におけるレポーター遺伝子発現の局在位置を決定するために利用した。
【０４３６】
腫瘍細胞自体には発現が検出されなかったが、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰを注射されたマウスは、原発腫瘍の血管における高レベルのＧＦＰ特異的発現を示した（図４７Ｃ）。この観察は、実施例２０に提示されたＬＬＣ細胞培養モデルの結果と一致している。肺転移において、高レベルのＧＦＰ発現が、転移巣の大きな動脈及び小さな血管形成性血管の両方に検出された（図４７Ａ）。正常肺組織には、発現が検出されなかった。内皮細胞局在は、ＧＦＰ発現（図４７Ａ）及びＣＤ３１抗体免疫染色（図４７Ｂ）の共局在によって証明された。著しく対照的に、Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰを注射されたマウスにおいては、原発腫瘍にも肺転移にもＧＦＰ活性が検出不可であった。
【０４３７】
図４７Ｃは、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰの腫瘍内注射の後の原発腫瘍の血管におけるＧＦＰ発現を例示している。図４７Ｄは、腫瘍及びその血管を例示するパネルＣと同一物の位相差画像である。
【０４３８】
これらの結果は、ＰＰＥ－１が腫瘍細胞自体においては高レベルの発現を駆動せず、このプロモーターが、腫瘍内の血管内皮、特に急速に増殖中の血管形成性血管において高レベルの発現を駆動することを示している。
【０４３９】
原発皮下腫瘍モデルへのＡｄ５ＣＭＶの腫瘍内注射は、腫瘍組織において高いルシフェラーゼ発現をもたらし、肝臓において中レベルの発現をもたらした（腫瘍において発現された量の１０％；図５３）。転移肺には、発現が検出されなかった。他方、腫瘍内注射した場合、ＰＰＥ－１プロモーターの調節下でのルシフェラーゼ発現は、原発腫瘍及び転移

肺において類似したルシフェラーゼ発現レベルをもたらし、肝臓には発現が検出されなかった。

【０４４０】

実施例１８

癌細胞培養系におけるＡｄ５ＰＰＥ－１構築物のアッセイ

癌細胞においてルシフェラーゼ発現を駆動するＡｄ５ＰＰＥ－１及びＡｄ５ＣＭＶの効率をアッセイするため、Ｄ１２２－９６ルイス肺癌細胞系を利用した。

【０４４１】

様々な感染多重度（ｍｏｉ）におけるインビトロ形質導入を達成した。結果は、両方のアデノウイルスベクターが、ルシフェラーゼ遺伝子をこれらの細胞へと形質導入しうることを示している（表４）。それにも関わらず、ＬＬＣ細胞においてＰＰＥ－１プロモーターによって指向されたルシフェラーゼ活性は、内皮細胞において検出された活性よりはるかに低く、それぞれ５０光単位／μｇタンパク質対１０００～２５００光単位／μｇタンパク質であった。

【表４】

表４　Ad5PPE-1－１Luc及びAd5CMVLucによるルイス肺がん細胞系(D122-96)のインビトロ形質導入

	MOI = 1	***MOI = 5***	***MOI = 10***
AdPPE-1	8.1 ±0.06	33.95 ± 7.0	50.7 ± 5.0
Ad5CMV	9.3 ± 1.1	47.3 ± 4.0	88.13 ± 10.1

【０４４２】

実施例１９

インビボの腫瘍血管形成性血管における３Ｘ配列の効果のアッセイ

血管形成性血管におけるＰＰＥ－１プロモーターに対する３Ｘ配列の効果を確認するため、（材料及び方法に既に記載された）ルイス肺癌（ＬＬＣ）転移モデルを利用した。10^{10}感染単位のＡｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰ、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰ、又はＡｄ５ＣＭＶＧＦＰのＩＶ注射後５日目、マウスを屠殺し、材料及び方法に記載されたようにして組織を分析した。

【０４４３】

図３１Ａ～Ｄは、生理食塩水を注射された対照マウス（図３１Ａ）、Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰを注射されたマウス（図３１Ｂ）、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰを注射されたマウス（図３１Ｃ）、及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰを注射されたマウス（図３１Ｄ）の転移肺におけるＧＦＰ発現を要約している。抗ＣＤ３１免疫染色（図３１Ｃ’～３１Ｄ’）は、各転移組織内のＧＦＰ発現の位置を確証している。結果は、対照の生理食塩水を注射されたマウスにはＧＦＰ発現が検出されず（図３１Ａ）、ＣＭＶを注射されたマウスの上皮気管支の周囲にはわずかな発現が存在したが、これらのマウスの転移肺の血管形成性血管には存在しなかったことを示している（図３１Ｂ）。低いＧＦＰ発現が、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰを注射されたマウスの転移肺に観察され（図３１Ｃ及び３１Ｃ’）、高度かつ特異的な発現が、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰを注射されたマウスの新血管に観察された（図３１Ｄ及び３１Ｄ’）。

【０４４４】

これらの結果は、実施例１５のインビボの結果と、実施例７、８、及び１１のインビトロの結果との間の見かけの矛盾を説明する。ＰＰＥ－１プロモーター及びＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターは、いずれも内皮特異的である。しかしながら、３Ｘ配列は、増殖中の腫瘍内の新たに形成されつつある血管のような、急速に増殖中の内皮組織における発現レベ

ルを大きく増加させる。

【０４４５】

実施例２０

腫瘍血管形成性血管におけるＰＰＥ－１プロモーターに対する３Ｘ因子の効果

腫瘍血管形成性血管におけるＰＰＥ－１プロモーターの効力及び特異的活性に対する本発明の３Ｘ因子の効果を研究するため、ＬＬＣ転移モデルを利用した。10^{10}ｐｆｕ／ｍｌのＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃ、Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃ、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰ、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘ－ＧＦＰ、又はＡｄ５ＣＭＶＧＦＰのｉ．ｖ．注射後５日目に、マウスを屠殺し、前記のようにして、組織をルシフェラーゼ又はＧＦＰの発現に関して分析した。

【０４４６】

図４８は、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃ、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ、又はＡｄ５ＣＭＶＬｕｃの全身注射の後の、正常肺におけるルシフェラーゼ発現と、転移肺におけるルシフェラーゼ発現とを比較したヒストグラムである。実験群は、Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃ（ｎ＝７；黒バー）、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（ｎ＝６；灰色バー）、及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃ（ｎ＝１３；茶色バー）であった。活性は、光単位／μｇタンパク質として表されている。

【０４４７】

ＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターの調節下でのルシフェラーゼ発現は、正常肺における活性と比較して転移肺においては３５倍大きく、３Ｘ因子を含まないＰＰＥ－１プロモーターによって駆動された発現より３．５倍高かった（ｐ＜０．００１）。Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＬｕｃを注射されたマウスのその他の組織には、極めて低いルシフェラーゼ活性が検出された。注射された各動物の肝臓に対する比率（％）として肺におけるルシフェラーゼ発現を計算すると、転移肺における活性が、正常肺における活性と比較して１０倍増加していることが明らかとなった（図４９）。

【０４４８】

特定の細胞型へのレポーター遺伝子発現の局在を決定するため、ＧＦＰ構築物を利用した。図５０は、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰを注射されたマウスの転移肺におけるＧＦＰ発現を示している（図５０Ａ）。ＣＤ３１抗体による免疫染色（図５０Ｂ）は、新血管におけるＧＦＰ発現の位置を確証している。ＧＦＰ発現は、対照の生理食塩水を注射されたマウスには検出されなかった。ＣＭＶを注射されたマウスの上皮気管支の周囲には低レベルの発現が検出されたが、転移肺の血管形成性血管には検出されなかった。要約すると、これらの結果は、発現レベルの大きな増加が、Ａｄ５ＰＰＥ－１構築物への３Ｘ因子の導入に起因したこと、及びこの増加した発現が、腫瘍の血管形成性血管に特異的であったことを示している。可能性として、目的の配列の発現レベルをさらに強化するため、観察された効果を、前記の低酸素応答と共役させることができるかもしれない。

【０４４９】

実施例２１

ＰＰＥ－１低酸素応答のさらなる特徴決定

マウスＰＰＥプロモーター活性に対する低酸素の効果をさらに特徴決定するため、ウシ大動脈内皮細胞（ＢＡＥＣ）を、ＤＮＡプラスミド（ｐＥＬ８；図３７Ａ）によってトランスフェクトした。ｐＥＬ８プラスミドは、マウスＰＰＥ－１プロモーター（１．４ｋｂ）（赤）、ルシフェラーゼ遺伝子（１８４２ｂｐ）、ＳＶ４０ポリＡ部位、及びエンドセリン－１遺伝子の第１イントロンを含有している。全部でＰＰＥ－１プロモーターカセットと名付けられたこれらは、材料及び方法に記載されたようにして、ＢａｍＨＩ制限酵素によって消化され、抽出された。トランスフェクション後、細胞を低酸素条件に曝した。

【０４５０】

１８時間の低酸素（０．５％O_2）に曝されたトランスフェクトされたＢＡＥＣにおけるルシフェラーゼ発現は、正常酸素環境において増殖させられた細胞におけるルシフェラーゼ発現より８倍高かった（図３２）。図３２は、マウスＰＰＥ－１プロモーターを含有

するプラスミドによってトランスフェクトされたＢＡＥＣにおけるルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）が、トランスフェクトされた細胞を低酸素環境においてインキュベートした場合、有意に高くなったことを示している。β－ガラクトシダーゼレポーターベクターとの共トランスフェクション、及びＬａｃＺ活性のアッセイにより、等しいトランスフェクション効率が確証された。

【０４５１】

アデノウイルスベクターによって送達されたマウスＰＰＥ－１プロモーターも低酸素によってアップレギュレートされるか否かを決定するため、ＢＡＥＣをＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃにより形質導入した。この実験において、Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃを非特異的対照として使用した。結果は、図３３に要約されているように、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃにより形質導入されたＢＡＥＣにおける低酸素時のルシフェラーゼ活性についてである。全く対照的に、Ａｄ５ＣＭＶにより形質導入された細胞において、正常酸素と低酸素との間で有意な差が検出されなかった（図３３）。

【０４５２】

ＰＰＥ－１プロモーター活性の増強が内皮細胞に特異的であるか否かを理解するため、種々の細胞系（ＢＡＥＣ、Ｂ２Ｂ、ＣＨＯ、ＲＩＮ、及び心筋細胞）を、Ａｄ５ＰＰＥ－１によって形質導入し（ｍｏｉ＝１０）、低酸素環境（０．５％$Ｏ_2$）又は正常酸素環境に曝した。結果は、図３４に要約されている。ルシフェラーゼ発現は、低酸素環境において培養されたＢ２Ｂ細胞においてわずかに増加し、ＢＡＥＣ細胞において有意に増加した。その他の細胞系におけるルシフェラーゼ発現は、正常酸素と比較して、低酸素環境によって減少した。これらの結果は、ＰＰＥ－１プロモーターの低酸素誘導が、主に、内皮細胞系列において起こることを確証している。

【０４５３】

実施例２２

ＰＰＥ－１低酸素応答に対する３Ｘ配列の効果

ＰＰＥ－１低酸素応答に対する３Ｘ配列の効果を確認するため、ＢＡＥＣをＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ及びＡｄ５ＰＰＥ－１（３Ｘ）Ｌｕｃによって形質導入した。形質導入後、ＢＡＥＣ細胞を、既に詳述されたようにして、低酸素環境又は正常酸素環境のいずれかでインキュベートした。結果は、図３５に要約されている。Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ構築物を使用した場合のルシフェラーゼ発現は、低酸素に応答して有意に増加した（７倍）（低酸素において２５７８、正常酸素において３２２．１）。対照的に、Ａｄ５ＰＰＥ－１（３Ｘ）Ｌｕｃ構築物は、低酸素に応答してわずか１．５倍の増加を示した（正常酸素条件における２８７４．５から低酸素条件における４３１５まで）。これらの結果は、３Ｘ配列がＰＰＥ－１プロモーターに付加された場合に観察された、正常酸素時の高い発現レベルが、ある程度、低酸素応答を隠蔽するよう働いていることを示している。

【０４５４】

実施例２３

トランスジェニックマウスモデルにおける低酸素に対するＰＰＥ－１プロモーターの応答のアッセイ

局部的な低酸素／虚血に供された組織におけるマウスＰＰＥ－１プロモーター活性を調査するため、材料及び方法に既に記載されたｍＰＰＥ－１－Ｌｕｃトランスジェニックマウスを利用した。以前に記載されたようにして（Ｃｏｕｆｆｉｎｈａｌ Ｔ．ｅｔ ａｌ、（１９９８）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１５２；１６６７－１６７９）、マウスを局部的な後肢虚血へと誘導した。簡単に説明すると、ペントバルビタールナトリウム（４０ｍｇ／ｋｇ、ＩＰ）で動物に麻酔を施した。後肢の一側性虚血を、伏在動脈及び膝窩動脈の分岐からおよそ２ｍｍ近位の右大腿動脈の結紮によって誘導した。灌流の機能変化の誘導を確かめるため、７．５ＭＨｚトランスデューサー及び血管造影ソフトウェアを装備したシナジー（Ｓｙｎｅｒｇｙ）超音波システム（ＧＥ）によって、超音波画像法を４日目及び１４日目に実施した。動物は、最大１８日間、従来の条件の下で収容した。

【０４５５】

結紮後２日目、５日目、１０日目、及び１８日目に、虚血筋肉、正常非結紮筋肉、肝臓、肺、及び大動脈におけるルシフェラーゼ発現をアッセイした。

【０４５６】

図３６に要約された結果は、結紮後数日間、肝臓、肺、及び大動脈において有意な差が検出されなかったが、正常非結紮筋肉及び虚血筋肉の両方において、ルシフェラーゼ遺伝子発現が大腿結紮の後に増加したことを示している。虚血筋肉における最高ルシフェラーゼ発現は、結紮後５日目に検出され、非結紮筋肉における最高ルシフェラーゼ発現は、大腿動脈結紮後１０日目に検出された。これは、ＰＰＥ－１プロモーターの低酸素応答が、インビボ系において機能的であることを示している。非虚血筋肉におけるルシフェラーゼ発現は、対照の非施術組織（０日目）における発現と比較して、試験された数日間、変化しなかった。対照的に、虚血筋肉におけるルシフェラーゼ発現は、５日目に、他の時点よりも有意に高くなった。

【０４５７】

５日目、ＰＰＥ－１により駆動されたルシフェラーゼ発現は、対照の非施術マウスより、そして１０日目及び１８日目の虚血筋肉と比較して、２．５倍高かった（図５１）。

【０４５８】

局部虚血に曝されたトランスジェニックマウスの肝臓、肺、及び大動脈を含む他の非虚血組織におけるルシフェラーゼ発現は、虚血誘導後１８日以内に、これらの組織におけるルシフェラーゼ発現の有意な変化を明らかにしなかった（図５２）。

【０４５９】

さらに、これらの結果は、内皮組織を高い比率（％）で含有している組織（肺及び大動脈）におけるルシフェラーゼ発現が、内皮組織を低い比率（％）で含有している組織（肝臓及び非虚血筋肉）より高かったことを確証している。

【０４６０】

実施例２４

内皮細胞におけるＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ活性に対する細胞増殖レベルの効果

Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃの効率及び特異的活性に対する細胞増殖レベルの効果を確認するため、内皮細胞（ＢＡＥＣ）の血管形成モデルをインビトロで試験した。形質導入されたＢＡＥＣを、血清枯渇によって休止状態へと誘導するか、又は正常な増殖のため１０％ＦＣＳで増殖させた。簡単に説明すると、細胞を、血清枯渇後７２時間目の休止細胞として、又は正常培地（１０％ＦＣＳ）中の増殖細胞として、４８時間、形質導入した。ルシフェラーゼ活性は、細胞量の差について規準化するため、光単位／μｇタンパク質として表される。提示された結果は、４回の代表的な独立した実験からのトリプリケート試験の平均値である。

【０４６１】

ＰＰＥ－１プロモーター（白バー；図３９）の調節下での正常増殖ＢＡＥＣにおけるルシフェラーゼ発現は、休止細胞より４倍高く、ＣＭＶプロモーター（黒バー；図３９）の調節下でのルシフェラーゼ発現より２５倍高かった。さらに、増殖細胞では、ＰＰＥ－１プロモーターの調節下での活性が、ＣＭＶプロモーター調節下での活性より１０倍高かった。

【０４６２】

血管形成条件をインビトロで模倣するため、４０ｎｇ／ｍｌ血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）の添加によって急速な増殖へと誘導されたＢＡＥＣにおいて、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ活性を試験した。これらの条件下での活性を、前記のような正常増殖細胞及び休止細胞における活性と比較した。ＶＥＧＦにより細胞増殖へと誘導されたＢＡＥＣにおけるルシフェラーゼ発現は、正常増殖細胞よりも４４倍高く、休止細胞よりも８３倍高かった（図４０）。

【０４６３】

総合すると、これらの実験は、ＰＰＥ－１プロモーターの転写調節下での目的の配列の活性レベルが、細胞増殖レベルの関数であり、急速な増殖は、より高い発現レベルを引き

起こすことを示している。

【０４６４】

実施例２５

アテローム性動脈硬化誘導マウスにおけるＰＰＥ－１プロモーターのアッセイ

アテローム性動脈硬化血管におけるＡｄ５ＰＰＥ－１ベクターの効率及び特異性を試験するため、10^{10}ｐｆｕ／ｍｌのウイルスベクターを、６ヶ月齢ＡｐｏＥ欠損マウス（Ｐｌｕｍｐ，Ａ．Ｓ．　ｅｔ　ａｌ、Ｃｅｌｌ；１９９１；７１：３４３－３５３）へと全身注射した。

【０４６５】

ＡｐｏＥ欠損マウスは、加齢するにつれ、脂質範囲食への誘導なしに、高コレステロール値、及び広範なアテローム生成斑を発症する。図４３は、スーダン（Ｓｕｄａｎ）－ＩＶによって着色された、ＡｐｏＥ欠損マウスから解剖された大動脈の写真である。胸大動脈は比較的少ない赤色に染色されたアテローム性動脈硬化巣を含有しており、腹領域は高度にアテローム性動脈硬化性であることに注意されたい。（図４３は、^{125}Ｉ－ＨＤＬ及び^{125}Ｉ－ＢＳＡによる大動脈アテローム性動脈硬化巣の画像法（Ａ．Ｓｈａｉｓｈ　ｅｔ　ａｌ、Ｐａｔｈｏｂｉｏｌｏｇｙ－Ｐａｔｈｏｂｉｏｌ　２００１；６９：２２５－９）より編集した）。

【０４６６】

図４４は、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（白バー；ｎ＝１２）及びＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（黒バー；ｎ＝１２）のＡｐｏＥ欠損マウスへの注射後５日目に観察されたルシフェラーゼ発現を要約している。結果は、比較的少ないアテローム性動脈硬化巣を含有している胸部、及びアテローム性動脈硬化巣に富む腹大動脈における絶対ルシフェラーゼ発現として提示されている。

【０４６７】

ＰＰＥ－１プロモーターにより調節されたルシフェラーゼ発現は、ＣＭＶプロモーターの調節下での発現と比較して、高度にアテローム性動脈硬化性の腹動脈においては６倍高く、わずかにアテローム性動脈硬化性の胸大動脈においては１．６倍高かった。

【０４６８】

Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃを注射されたマウスにおいては二つの大動脈領域間に有意差が観察されなかったが、Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃを注射された群の胸大動脈においては、病巣を含有している腹大動脈における低い発現と比較して、より高いルシフェラーゼ発現が観察された。

【０４６９】

これらの結果は、構成性プロモーター（ＣＭＶ）はアテローム性動脈硬化が最も重度である区域において機能を停止する傾向を有しており、ＰＰＥ－１プロモーターは、疾患進行によって比較的影響を受けないことを示している。

【０４７０】

実施例２６

創傷治癒モデルにおけるＰＰＥ－１プロモーターのアッセイ

Ａｄ５ＰＰＥ－１構築物の、治癒中の創傷血管へルシフェラーゼ発現を指向させる効率及び特異性を試験するため、材料及び方法に既に記載されたようなマウス創傷治癒を利用した。

【０４７１】

他の実験と同様に、Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃを、非組織特異的対照として使用した。ＰＰＥ－１プロモーター（図４５；白バー）の調節下でのルシフェラーゼ活性は、ＣＭＶ調節下（図４５；黒バー）で観察された活性と比較して、正常領域（６．８±３．２）においても、治癒中の創傷領域（５±１．６）においても高かった。

【０４７２】

ＣＭＶプロモーター及びＰＰＥ－１プロモーターの両方が、治癒中の創傷における減少した発現レベルを示したため、これらの結果は、解釈が困難である。この予想外の観察に

関わらず、ＰＰＥ－１プロモーターが、正常組織においても治癒中の組織においてもＣＭＶプロモーターより高い発現レベルを駆動することは明らかである。壊死瘢痕組織の存在が、治癒中の創傷における両プロモーターにより観察された減少した発現レベルの原因であるかもしれない。

【０４７３】

実施例２７

虚血マウス血管へのＶＥＧＦ及びＰＤＧＦ－Ｂの標的化された発現

血管形成のインビボ誘導は内皮細胞からなる原始的な血管ネットワークをしばしば生ずる。これらの未熟な血管は容易に崩壊し、退行しやすく、漏れやすく貧弱な灌流しか行なえない。これらの制限を克服するため、内皮細胞並びに内皮の周囲の細胞（即ち、小さな血管の周皮細胞又は大きな血管の平滑筋細胞）を増加させることができる様々な血管形成因子の局所化され時間及び用量を制御された送達が望ましい。

【０４７４】

修飾されたプレプロエンドセリン－１プロモーターＰＰＥ－１－３Ｘが虚血肢筋肉においてＶＥＧＦ又はＰＤＧＦ－Ｂ（平滑筋細胞を分泌源の方に向かって増加させ、これにより新規に形成された血管の透過性過多を防止する内皮分泌因子）を発現させるために用いられた。

【０４７５】

虚血組織におけるＶＥＧＦ及びＰＤＧＦ－Ｂの発現を決定するため、インサイチューハイブリダイゼーションが行なわれた。図５４Ａ～Ｃに示される通り、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ処置マウスからの虚血筋肉切片ではＶＥＧＦ　ｍＲＮＡの有意な発現が検出できたが、Ａｄ５ＣＭＶＶＥＧＦ又は生理食塩水で処置されたマウスの筋肉切片には本質的にいかなるシグナルも見られなかった。同様に、ＰＤＧＦ－ＢのｍＲＮＡの存在はＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＥＧＦ－Ｂで処置されたマウスの虚血肢筋肉では検出されたが、Ａｄ５ＣＭＶＰＤＧＦ－Ｂ又は生理食塩水で処置されたマウスでは検出されなかった（図５４Ｅ～Ｇ）。興味深いことに、図１２Ａ及び１２Ｅにおけるシグナルのパターンは血管構造に似ていた。特に、様々な処置群からの代表的な肝臓切片はＡｄ５ＣＭＶ処置マウスでのＶＥＧＦ又はＰＤＧＦ－Ｂの多大な発現を証明したが（図５４Ｄ及び５４Ｈ）、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘベクターで処置されたマウスの肝臓では発現は検出されなかった（データは示さず）。

【０４７６】

総合すると、このアッセイはＡｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘベクターが標的器官での血管形成因子の測定可能な発現を媒介するが、構成的なＡｄ５ＣＭＶベクターはほとんどもっぱら肝組織でそれらのトランスジーンを発現したことを示す。

【０４７７】

実施例２８

ＰＰＥによって媒介されるＶＥＧＦ発現による増大された血管形成

Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦの治療効果が以前に報告されているＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦの治療効果と比較された。10^9 ＰＦＵｓの治療ベクター並びにレポーターベクターＡｄ５ＣＭＵルシフェラーゼ及び等体積の対照としての生理食塩水が大腿動脈結紮後５日目のマウスに全身投与された。両肢の医療的観点の超音波（ＵＳ）画像が血管造影モードで撮影された。図３８Ａ～Ｄに示される通り、結紮後２１日目には対照の動物では灌流のシグナルは減少し、短くなった；しかし、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ及びＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦの両方で処置されたマウスのＵＳ画像においては連続的な増大されたシグナルが見られた。二つのＶＥＧＦ処置群における２１日目の灌流の平均強度は対照群のそれより３倍以上高く（ｐ＜０．０１）、動物の正常な反対側の肢から記録された値と同様であった（図３８Ｅ）。大腿動脈結紮後２１日目に抗ＣＤ－３１（内皮特異的マーカー）を用いて行なわれた免疫組織化学分析は、それぞれＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦ及び対照群での５８５及び４８５　ＣＤ３１＋細胞／mm^2と比較してＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ処置マウスの虚血筋肉切片では５４６　ＣＤ３１＋細胞／mm^2の平均を示した（図３８Ｆ

）。このデータは、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦを用いた短期間の処置はＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦの強力なＣＭＶプロモーターを用いた処置と同じほど有効であるということを示す。さらに、Ｈ＆Ｅで染色されたマウスの肝臓切片は肝炎又は他の病気による慢性変化の徴候を示さず（データは示さず）、従って肝細胞に対するアデノウイルスの局所効果を妨げた。

【０４７８】

実施例２９

ＰＰＥによって制御される発現によるＶＥＧＦ遺伝子治療の延長された効果

血管形成因子の構成的発現に対する対組織特異的発現が血管形成の誘導に関して指向された。灌流及び血管形成に対するＰＰＥによって制御される及びＣＭＶによって制御されるＶＥＧＦ発現の効果が７０日の長期間にわたる実験で試された。虚血肢を有するマウスは上述のようにして処置された（実施例２８参照）。ＵＳ画像形成はウイルス投与の１～２週間後に始まる両処置群における灌流の有意な改善を示したが、対照群では変化はほとんど検出されなかった（データは示さず）。Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦの長期間の効果は大腿動脈結紮後５０日目及び６０日目に検出された。Ａｄ５ＣＭＶＶＥＧＦ又は生理食塩水処置マウスと比べてＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ処置マウスでは灌流が有意に増大した。Ａｄ５ＣＭＶＶＥＧＦ処置マウスと対照の処置マウスとの間の灌流の差はこの時点にわたって減少した。５０日目、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ処置群における灌流の平均強度はＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦ又は生理食塩水処置マウスより約５０％高く、対照の正常な肢のそれと同様であった（ｐ＜０．０１、図５５Ａ）。７０日目の動物の屠殺時、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ処置マウスの筋肉切片における毛管密度は７４７　ＣＤ３１＋細胞／ｍｍ^{2}であり、これはＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦ群（４７４　ＣＤ３１＋細胞／ｍｍ^{2}）より５７％高く、対照群（３４２　ＣＤ３１＋細胞／ｍｍ^{2}）より１１７％高かった（ｐ＜０．０１、図５５Ｂ）。

【０４７９】

実施例３０

ＰＰＥプロモーターの内皮特異的ＰＤＧＦ－Ｂ発現による増大された血管形成

ＰＤＧＦ－Ｂはパラクリン内皮分泌因子であり、平滑筋細胞の増加による血管成熟に及びたぶん血管形成にも関与していることが示されている［Ｅｄｅｌｂｅｒｇ，Ｊ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ　１０５，６０８－１３．（２００２）；Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　１６５，２３９－４５．（１９９５）；Ｋｏｙａｍａ，Ｎ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　１５８，１－６．（１９９４）］。ＰＤＧＦ－Ｂは内膜の肥厚に関与していること［Ｓａｎｏ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ　１０３，２９５５－６０．（２００１）；Ｋａｉｓｅｒ，Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｈｅｕｍ　４１，６２３－３３．（１９９８）］及び繊維芽細胞の増殖に関与していること［Ｎｅｓｂｉｔ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｌａｂ　Ｉｎｖｅｓｔ　８１，１２６３－７４．（２００１）；Ｋｉｍ，Ｗ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｉｎｖｅｓｔ　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ　Ｖｉｓ　Ｓｃｉ　４０，１３６４－７２．（１９９９）．］も示されている。内皮特異的制御下で血管形成を誘導するＰＤＧＦ－Ｂの能力がインビトロ及びインビボで試された。

【０４８０】

Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－ＢベクターはＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦと同様にインビトロで内皮細胞に血管形成性変化を誘導した（データは示さず）。フィブリン被覆された培養器で培養された内皮細胞の１０　ＭＯＩのＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂでのトランスダクションは二次元円形構造の形成及びフィブリン分解を生じた。

【０４８１】

インビボでの効果については、マウスは大腿動脈結紮後５日目に１０^{9}ＰＦＵｓのＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂで全身処置された。結紮後３０日目にＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂ処置マウスにおける灌流の平均強度は対照群のそれより約９０％高かった（図５６Ａ）。結紮後８０日目にはＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂ処置群にお

ける灌流の強度は対照群より６０％高かった（図５６Ｂ）。

【０４８２】

毛管密度は結紮後３５日目及び９０日目に測定された。短期間ではＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂ処置マウスの虚血筋肉切片における平均毛管密度は５１６　ＣＤ３１＋細胞／ｍｍ^{2}であり、生理食塩水処置群ではそれは４３９であった（図５６Ｃ）。結紮後９０日目ではＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂ処置マウスにおける平均毛管密度はわずかに増大して５６６　ＣＤ３１＋細胞／ｍｍ^{2}であったが、対照群ではそこそこの減少が検出された（３７８　ＣＤ３１＋細胞／ｍｍ^{2}、図５６Ｄ）。

【０４８３】

これらの結果は、Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂベクターはそれ自体が強い血管形成処置であり、これは投与後の短期間で血管形成を誘導するのみならず、長期間にわたり治療効果を維持することができることを示す。Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂで処置されたマウスの肝臓では慢性的な変化は検出されていない。

【０４８４】

実施例３１

内皮細胞でのＰＤＧＦ－Ｂ発現による血管成熟

ＶＥＧＦ及びＰＤＧＦ－Ｂの両方を組合せ治療で用いることによって血管形成及び血管構造の成熟のさらなる増加が達成されるという仮定が次の二つの治療モダリティーを用いて試された：（ｉ）１０^{9}ＰＦＵｓのＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ及び１０^{9}ＰＦＵｓのＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂの単回投与；（ｉｉ）Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦの投与後５日目の同様の容量のＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂの投与。両方のモダリティーは同一の結果を生じ、それ故一体として言及される。結紮後９０日目に、組合せ治療及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ処置マウスの両方は対照のＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰ処置マウスと比べて有意に高い毛管密度を示したが、様々な治療群の間には有意差は見られなかった（図５７Ｂ）。しかし、組合せ治療群のＵＳ画像形成における灌流の平均強度はＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ処置群より４２％高かった（図５７Ａ）。これは組合せ治療群及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂ処置マウスの虚血筋肉における小さな血管の成熟によって説明することができる。血管平滑筋細胞に対する有意な染色が、組合せ治療又はＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂで処置されたマウスからの、α－ＳＭアクチンについて免疫染色された筋肉切片で見られた（図５７Ｃ～Ｄ）。まばらな染色が対照及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ処置マウスで見られることができる（図５７Ｅ～Ｆ）。正常な肢の筋肉では、大きな細動脈及び細静脈のまわりに顕著な染色が見られた（図５７Ｇ）。同様の結果はＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂで処置されたマウスにおいて早くも結紮後３５日目に得られた（データは示さず）。結紮後３５日目に処置マウスの肝臓切片には慢性の変化は見られなかった。

【０４８５】

これらの結果は個別の実験でさらに強固にされた。この実験は結紮後５０日目の血液灌流に対するＰＤＧＦ－Ｂ単独及び組合せ治療の効果に指向されていた。図５８に示される通り、結紮後５０日目に組合せ治療における血液の灌流強度は正常な肢のそれに完全に似ていた。この効果はＰＰＥ－３Ｘ依存性であった。何故なら両方の増殖因子の構成的発現（ＣＭＶプロモーター）は半分の灌流能力しか生じなかったからである。興味深いことに、ＰＤＧＦ－Ｂ単独のＰＰＥ－３Ｘ依存性発現は組合せ治療によって誘導されるのとほぼ同レベルの灌流（即ち７７％）を媒介することができた。しかし、かかる結果は構成的プロモーターを用いた場合は明らかではなかった。

【０４８６】

これらの結果は、ＰＰＥ－１－３Ｘプロモーターは全身的な投与にもかかわらず、血管形成性内皮細胞における優先的な発現に妥協することなく治療遺伝子の十分強力な活性化をもたらすことができるという証拠になる。さらに、これらの結果は、ＶＥＧＦの如き良く確立された血管形成増殖因子のさらなる添加なしにその血管形成作用を媒介することができる血管形成因子としてのＰＤＧＦ－Ｂの能力を強固にする。

【０４８７】
実施例３２
ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫベクターの構築と特性決定
ＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶは、最も広く研究され実行されている腫瘍細胞を減少させる遺伝子－薬剤の併用である。ＨＳＶ－ＴＫ含有プラスミドでトランスフェクトされた細胞又はＨＳＶ－ＴＫ含有ベクターを形質導入された細胞は、アシクロビル、ガンシクロビル（ＧＣＶ）、バルシクロビル及びファムシクロビルを含む薬剤スーパーファミリーに感受性になっている。グアノシンの類似体のＧＣＶは、ＴＫと組み合わせると最も活性の薬剤である。ＨＳＶ－ＴＫ陽性細胞はウイルスＴＫを産生し、このウイルスＴＫは、ＧＣＶをリン酸化して一リン酸ＧＣＶ（ＧＣＶ－ＭＰ）にする際、ヒトＴＫより１０００倍有効である。ＧＣＶ－ＭＰは、次いで天然のチミジンキナーゼによってリン酸化されて二リン酸ＧＣＶになり最終的に三リン酸ＧＣＶ（ＧＣＶ－ＴＰ）になる。
【０４８８】
最初、２種のプラスミドを調製した。一方のプラスミドは、修飾されたマウスプレプロエンドセリン－１（ＰＰＥ－１（３ｘ））プロモーターによって制御されたＨＳＶ－ＴＫ遺伝子を含有し、生体外でＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターによって制御された遺伝子の効力を試験するために調製した。アデノウイルスの配列のみならずＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターによって制御されたＨＳＶ－ＴＫ遺伝子を含有するより大きいプラスミドを、相同的組換えによってウイルスベクターを調製するために調製した。４３４８　ｂｐのプラスミドｐＯＲＦ－ＨＳＶ１ＴＫを２種の制限酵素によって消化して、ＨＳＶ－ＴＫ遺伝子（１１９０　ｂｐ）を得た。ＳａｌＩ制限部位はＨＳＶ－ＴＫ遺伝子の５’末端に位置し、そしてＥｃｏＲＩ部位は３’末端に位置していた。そのＨＳＶ－ＴＫ遺伝子を、挿入された遺伝子（ＨＳＶ－ＴＫ遺伝子の３’末端に）の上流にＮｏｔＩ制限部位を含有する３４００　ｂｐのプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ－ＳＫのマルチプルクローニング部位に連結した。そのＳａｌＩ部位にクレノウ処理を行い、次いでＮｏｔリンカーをＨＳＶ－ＴＫ遺伝子の５’末端に連結した。そのＨＳＶ－ＴＫ遺伝子（現在、二つのＮｏｔＩ制限部位がアウトフランク（ｏｕｔｆｌａｎｋ）している）を、上記二つのプラスミド：ｐＥＬ８（３ｘ）－Ｌｕｃ及びｐＡＣＰＰＥ－１（３ｘ）－ＧＦＰのＮｏｔＩ制限部位に連結した。
１．　１８４２　ｂｐのルシフェラーゼ遺伝子の代わりに二つのＮｏｔＩ制限部位が隣接している８６００　ｂｐのプラスミドｐＥＬ８（３ｘ）－Ｌｕｃ。そのｐＥＬ８（３ｘ）－ＴＫプラスミドは、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーター、ＨＳＶ－ＴＫ遺伝子、ＳＶ－４０ポリアデニル化部位及びマウスのエンドセリン－１遺伝子の第一イントロンを含有している（図６０ａ）。
２．　１２４２　ｂｐのグリーン蛍光タンパク質（ＧＦＰ）の代わりに、二つのＮｏｔＩ制限部位がアウトフランクしている１１９４６　ｂｐのプラスミドｐＡＣＰＰＥ－１（３ｘ）－ＧＦＰ（図６０ｂ）。
【０４８９】
修飾されたマウスプレプロエンドセリン－１プロモーターで制御されるＨＳＶ－ＴＫ遺伝子でアーム（ａｒｍ）されたアデノウイルス－５ベクターの構築：ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫと呼称される複製不全ベクターを、第一世代（Ｅ１遺伝子欠失、Ｅ３遺伝子不完全）のアデノウイルス－５ベクターに基づいて構築した。その組換えベクターは、広く知られた従来のクローン化法を利用して、プラスミドｐＡＣＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫとｐＪＭ－１７（４０．３　ｋｂ）を、ヒト胎生腎臓－２９３（ＨＥＫ－２９３）中にコトランスフェクトすることによって調製した。ｐＪＭ－１７プラスミドは、Ｅ１遺伝子を除くアデノウイルス－５の全ゲノムを含有している。ＨＥＫ－２９３細胞系は、Ｅ１遺伝子をトランス位置に含有しているので、Ｅ１の欠失を補っている。４０個の相同組換え体のうち一つが、ベクターＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫを誘導した。
【０４９０】
ベクターＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫの特性決定：組換えアデノウイルス中にＴＫ導

入遺伝子とプロモーターが存在していることを証明するため、ウイルスＤＮＡについてＰＣＲ分析を行なった。２種のプライマーすなわち、前進プライマーの５’－ｃｔｃｔｔｇａｔｔｃｔｔｇａａｃｔｃｔｇ－３’（プレプロエンドセリンプロモーター配列の４５５－４７４　ｂｐ）（配列番号：９）及び逆進プライマーの５’－ｔａａｇｇｃａｔｇｃｃｃａｔｔｇｔｔａｔ－３’（ＨＳＶ－ＴＫ遺伝子配列の１０６５－１０８４　ｂｐ）（配列番号：１０）を使用した。ベクターの純度を証明するために、本発明の発明者らの研究室で製造したベクターの他のプロモーターを使用した。約１ｋｂのバンドが、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫウイルス中に、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターとＨＳＶ－ＴＫ遺伝子が存在することを証明した（図６１）。しかし、構築されたアデノウイルスベクターの他のプライマーは何も産生しなかった。したがって、これらベクターは純粋なコロニーであった。

【０４９１】

そのウイルスは、単一のウイルスクローンを単離するために、ＨＥＫ－２９３細胞内でさらに精製した。

【０４９２】

ＵＶ光下で蛍光発光するように化学的に修飾されたジデオキシヌクレオチドの存在下、サイクル配列決定反応によって、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫのウイルスＤＮＡの配列を決定した。全導入遺伝子の存在を証明するため下記４種のプライマーを使用した。

１．「３ｘ」配列に先行する　前進プライマーの５’－ｃｔｃｔｔｇａｔｔｃｔｔｇａａｃｔｃｔｇ－３’（プレプロエンドセリンプロモーターの４５５－４７４　ｂｐ）（配列番号：９）。

２．　逆進プライマーの５’－ｇｃａｇｇｇｃｔａａｇａａａａａｇａａａ－３’（プレプロエンドセリンプロモーターの５５１－５７０　ｂｐ）（配列番号：１１）。

３．　前進プライマーの５’－ｔｔｔｃｔｔｔｔｔｃｔｔａｇｃｃｃｔｇｃ－３’（プレプロエンドセリンプロモーターの５５１－５７０　ｂｐ）（配列番号：１２）

４．　逆進プライマーの５’－ｔａａｇｇｃａｔｇｃｃｃａｔｔｇｔｔａｔ－３’（ＨＳＶ－ＴＫ遺伝子の１０６５－１０８４　ｂｐ）（配列番号：１０）

【０４９３】

上記プライマーの１（配列番号：９）と３（配列番号：１０）単独では産物が全く得られなかったので、上記プライマーの２（配列番号：１１）と３（配列番号：１２）を使用した。その結果、Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ　Ｂａｌｂ／ｃプレプロエンドセリン－１遺伝子のプロモーター領域：ｇｉ｜５６０５４２｜ｇｂ｜Ｕ０７９８２．１｜ＭＭＵ０７９８２［５６０５４２］（配列番号：１）に対して９９％の同一性、及び単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子：ｇｉ｜５９９７４｜ｅｍｂ｜Ｖ００４７０．１｜ＨＥＲＰＥＳ［５９９７４］に対して９９．４％の同一性を示した。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）の配列は図９２に詳細に記載してある。

【０４９４】

３ｘ配列（図９３）は、内皮特異的陽性転写配列の追加のトリプリケートリピート（ｔｒｉｐｌｉｃａｔｅ　ｒｅｐｅａｔ）を含有している。この１４５　ｂｐの配列中には、上述したように、二つの完全な内皮特異的陽性転写配列及び逆の順序に２フラグメントに切断された一つの配列が存在している。

【０４９５】

対照のベクター：２種のアデノウイルスベクターすなわち、ＰＰＥ－１（３ｘ）を欠いた第一ベクター及びＬｕｃ遺伝子を欠いた第二ベクターを、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）ベクターの対照として構築した。ベクターＡｄＣＭＶ－ＴＫ（非組織特異的プロモーターの対照として使用）は、初期サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターによって制御されるＨＳＶ－ＴＫ遺伝子を含有している（図６２ｃ）。ベクターＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃは、修飾されたマウスプレプロエンドセリン－１プロモーターによって制御されるルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）遺伝子を含有している（図６２ｂ）。これらウイルスは、スケールアップしたバッチで増殖させて、10^{9}－10^{12}粒子／ｍｌの濃度で、－２０℃に

て貯蔵した。

【０４９６】

実施例３３

ガンシクロビル及びＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫプロモーターの制御下にあるＴＫの細胞傷害性：

生体外のＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの高い内皮細胞傷害性

ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫの特異的な内皮細胞を標的とする細胞傷害性を、生体外にて内皮細胞系中で、対照のベクターのＡｄＣＭＶ－ＴＫ及びＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃと比較して評価した。

【０４９７】

ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶは低い感染多重度（ｍ．ｏ．ｉ．）で細胞傷害性である：ウシ大動脈内皮細胞（ＢＡＥＣ）に、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ、ＡｄＣＭＶ－ＴＫ及びＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃを、感染多重度（ｍ．ｏ．ｉ．）０．１、１、１０、１００及び１０００で形質導入した。形質導入してから４時間後に ＧＣＶ（μｇ／ｍｌ）を添加した。対照は、ＧＣＶ無しのベクターを形質導入された細胞又はベクター無しのＧＣＶを投与された細胞である。これら両対照は細胞死を誘発しなかった（データ提示せず）。ＡｄＣＭＶ－ＴＫより有意に低いｍ．ｏ．ｉ．にてＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置された細胞に明らかな細胞傷害に特徴的な形状変化（細胞の拡大、伸長及び膨張）並びに集密性の欠損に注目されたい。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃを形質導入された細胞は健康なままであった（大きさが小さく丸くかつ集密した状態、図６３）。クリスタルバイオレットで染色することによって確認した細胞の生存率を評価した結果、ＧＣＶの投与と併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫベクターは、ＢＡＥ細胞において、強力な構成ＣＭＶプロモーターで制御されたＴＫ遺伝子より低いｍ．ｏ．ｉ．で、大きい細胞傷害性を示したことが確認された（図６４）。

【０４９８】

ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶは低濃度のＧＣＶで細胞傷害性である：ウシ大動脈内皮細胞（ＢＡＥＣ）に、上記のようにして、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ、ＡｄＣＭＶ－ＴＫ及びＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃを、感染多重度（ｍ．ｏ．ｉ．）１０で形質導入し、次いで形質導入してから４時間後に、濃度を順次上げたＧＣＶ（指定どおりに０．００１－１０μｇ／ｍｌ）に暴露した。対照細胞のＧＣＶ無しでベクターを形質導入されたもの及びベクター無しでＧＣＶに暴露されたものは、どのような濃度でも細胞死の徴候を全く示さない（データは記載せず）。ＡｄＣＭＶ－ＴＫに暴露された細胞（中央のシリーズ）より有意に低い濃度のＧＣＶにおいてＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置された細胞（図６５）に明らかな細胞傷害に特徴的な形状の変化（細胞の拡大、伸長及び膨張）並びに集密性の欠損に注目されたい。クリスタルバイオレットで染色することによって確認した細胞の生存率を評価した結果（図６６）、ＧＣＶの投与と併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫベクターは、ＢＡＥ細胞において、強力な構成ＣＭＶプロモーターで制御されたＴＫ遺伝子より低い濃度のＧＣＶでより大きい細胞傷害性を示したことが確認された。

【０４９９】

ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの細胞傷害性は内皮細胞に対して特異的である：内皮細胞に対するベクターＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫの特異性と効力を評価するために、内皮細胞［ウシ大動脈内皮細胞（ＢＡＥＣ）、ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）］及び非内皮細胞［ヒト肝臓癌細胞（ＨｅｐＧ－２）、ヒトの正常皮膚繊維芽細胞（ＮＳＦ）］に、ｍ．ｏ．ｉ．１０で、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ、ＡｄＰＥＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃ又はＡｄＣＭＶ－ＴＫを形質導入し、形質導入してから４時間後に１μｇ／ｍｌのＧＣＶを投与した。細胞傷害性及び細胞形状の変化を、形質導入を行なった後４日目に検出した。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶは、細胞傷害性を、特異的にＢＡＥＣとＨＵＶＥＣに誘発したが、ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶは、ＨｅｐＧ－２にのみ細胞傷害性を誘発した。ＮＳＦは、ｍ．ｏ．ｉ．＝１０においてすべてのベクターに対して抵抗

性であった。ＡｄＰＥＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃ＋ＧＣＶはすべての細胞型に対して非毒性であった（図６７）。クリスタルバイオレットで染色することによって確認した細胞の生存率を評価した結果（図６８）、ＧＣＶの投与と併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫベクターは、　強力な構成ＣＭＶプロモーターで制御されたＴＫ遺伝子（ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ）の非特異的細胞傷害性と比べて、相乗内皮細胞特異的細胞傷害性を示した。

【０５００】

非内皮ＮＳＦ細胞は、１００という高いｍ．ｏ．ｉ．でＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ、ＡｄＰＥＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃ又はＡｄＣＭＶ－ＴＫを形質導入され、形質導入されてから４時間後に１μｇ／ｍｌのＧＣＶを投与されたとき、細胞の形状に対するＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの影響は、全く見られなかった（図６９）。対照的に、強力な構成ＣＭＶプロモーターの制御下のＴＫで処置した細胞（ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ）は強力な非特異的細胞傷害性を示したが、これは、極端な感染多重度の場合でもＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫとガンシクロビルの投与が、内皮に対する選択的な細胞傷害性を有することを証明している。

【０５０１】

これらの結果を総合すると、第一に、ベクターＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫは、ヒト内皮細胞などの内皮細胞のキリングを特異的に誘発できることを示している。さらに、ベクターＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫは、プロドラッグＧＣＶによって十分制御されているので、比較的低い濃度のＧＣＶで非常に活性である。最終的に、アデノウイルスベクターの内皮細胞形質導入の効力は比較的低いが、内皮細胞のキリングの効果は高い。

【０５０２】

実施例３４

ガンシクロビル及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの投与の治療効果：生体内でのＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの高い内皮細胞傷害性

ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫの特異的な内皮細胞標的細胞傷害性の治療効力を、癌性の腫瘍発生と転移発生の動物モデルで、ＧＣＶ及び対照ベクターのＡｄＣＭＶ－ＴＫとＡｄＰＰＥ（３ｘ）－Ｌｕｃの全身投与と比較することによって生体内で評価した。

【０５０３】

ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下でのＴＫの生体内発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与によるルイス肺癌腫瘍（ＬＬＣ）の転移腫瘍の発生の相乗抑制作用：ルイス肺癌腫瘍は、転移性の高い重篤な侵襲性で悪性の癌の十分に特性が決定されている動物モデルである。内皮プロモーターＴｉｅ／Ｔｅｋ及びＧＣＶ（ｄｅＰａｌｍａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｍｅｄ　２００３；９：７８９－７９５）並びにＶＥＧＦプロモーター及びＧＣＶ生体外（Ｋｏｓｈｉｋｏｗａ　ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃ　Ｒｅｓ　２０００；６０：２９３６－４１）とＨＳＶ－ＴＫとの併用治療をサイトカインＩＬ－２を使って試みた（Ｋｗｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｓｔ　１１９；１１２：１３３２－３７）。転移腫瘍疾患に対するＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）とＧＣＶの全身投与の効果を試験するため、左足に腫瘍細胞を接種し原発腫瘍が発生すると直ちに足を切断することによって、ＬＬＣ肺転移腫瘍を誘発させた。アデノウイルスベクター［ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ；　ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ；ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ］を、前記原発腫瘍を除去した後５日目に投与し続いて１４日間毎日、ＧＣＶを腹腔内に投与した。

【０５０４】

マウスを次のように排除した。原発腫瘍を発生しなかったので２２頭のマウスを排除し、ベクターの注射を失敗したので１頭のマウスを排除し、８頭のマウスは肺転移腫瘍の痕跡無しで死んだ。排除したマウスのうち１８頭は登録する前に排除し、６頭はグループ１（ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ）から排除し、２頭はグループ２（ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ）から排除し、３頭はグループ３（ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ）から排除し、そして２頭はグループ４（生理食塩水＋ＧＣＶ）から排除した。これらマウスを、ベクターを注射した後２４日目に殺した。この２４日目に、対照グループ（生理食塩水＋ＧＣＶ及びＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ）の２５％は、肺

の転移腫瘍の拡張によってすでに死んでいた。図７０は、処置グループ及び対照グループ由来の代表的肺組織を示しているが、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスの肺の転移腫瘍の拡張度が、ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ、ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ及びアデノウイルス無しのＧＣＶで処置したマウス由来の肺に比べて有意に低かったことを示している。

【０５０５】

殺したときの、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置した転移腫瘍の平均重量（転移腫瘍疾患の程度の指標）は、ＧＣＶ無しでＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置したマウスのそれより３．３倍低かった（平均値±ＳＥはそれぞれ：０．３ｇ±０．０４と０．８ｇ±０．２でｐ＜０．０５である）。ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ又は生理食塩水＋ＧＣＶで処置したマウスの転移腫瘍の平均重量は、他のグループのそれと統計的な差はなかった（図７１）。

【０５０６】

ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の転移腫瘍肺組織に対する細胞傷害性作用：ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）及びＧＣＶの投与のＬＬＣ転移腫瘍増殖に対する作用の機構を確認するために、ヘマトキシリンとエオシンによる染色を転移腫瘍の肺由来の肺組織に実施した（図７２ａ－７２ｃ）。ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ又は生理食塩水＋ＧＣＶで処置したマウスから採取した転移腫瘍に軽度の辺縁壊死が検出された（図７２ａ）。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスから採取した肺組織は、肺胞及び気管支周辺に単核浸潤を示したが、ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ又は生理食塩水＋ＧＣＶで処置したマウスから採取した転移腫瘍には浸潤は全く検出されなかった。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスから採取した肺転移腫瘍は、ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ又は生理食塩水＋ＧＣＶで処置したマウスから採取した転移腫瘍に比べて、単核浸潤のクラスターを示した（図７２ｂ，ｃ）。ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスから採取した検体にも、小さい壊死と単核浸潤が検出された。この結果は、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶが、肺転移腫瘍に中心部壊死及び単核浸潤を増大することを示唆している。

【０５０７】

ＬＬＣ肺転移腫瘍に対するＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの阻害作用の原因である細胞死の特徴を確認するため、ＴＵＮＥＬと抗カスパーゼ－３の染色を肺組織に実施してアポトーシスを評価した。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウス由来の肺の転移腫瘍は、ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ又は生理食塩水＋ＧＣＶで処置したマウスに比べて、多数のアポトーシス腫瘍細胞を示した（図７３ａと７３ｂ）。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスの肺から採取した検体の組織病理切片は、腫瘍細胞のアポトーシスを示すＤＮＡの損傷の程度（ＴＵＮＥＬ，図７３ａ）とカスパーゼ－３（図７３ｂ）が両方とも、ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウス由来の検体より有意に高いことを示した。さらに具体的に述べると、転移腫瘍の肺由来の組織病理切片をＴＵＮＥＬ及びカスパーゼ３で染色したところ、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶを静脈注射して処置したマウス由来の肺転移腫瘍の血管（内皮）領域に促進されたアポトーシスが見られ（図７４）、これは、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下でのＴＫの生体内発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与によって転移腫瘍細胞のアポトーシスが相乗的に促進されたことを示している。これらの結果は、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの全身投与が、腫瘍細胞の広大なアポトーシスを誘発することを示唆している。さらに、血管形成内皮細胞のアポトーシスが、中心部塊状転移腫瘍の壊死及びアポトーシスの機構であろう。

【０５０８】

ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現及びガンシクロビルの投与は、生体内で転移腫瘍疾患に抗血管形成作用を有している：ＣＤ－３１は、血管形成の特徴的な内皮細胞マーカーである。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの全身投与の抗腫瘍

転移作用に対する内皮細胞の関与を確認するため、抗ＣＤ－３１染色を実施した。図７５ａ－７５ｄは、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウス由来の肺の転移腫瘍の新生血管が、短く、連続性又は分枝が無くかつ境界が不明瞭であったことを示している（７５ａ－７５ｃ）。ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ又は生理食塩水＋ＧＣＶで処置したマウス由来の肺の転移腫瘍の新生血管は、多数の分枝及び明確な境界を有する長い血管を示した（図７５ａ）。また異常の程度が微小な血管系が、ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスの肺転移腫瘍にも検出されたが、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置したマウスのそれに比べてその程度ははるかに小さかった（図示せず）。増殖中の内皮組織に対するこの抗血管形成作用の特異性は、肝臓血管に対する作用が無いことによって示されている（図７５ｃ）。コンピュータベースで血管密度を測定した結果（Ｉｍａｇｅ Ｐｒｏ－Ｐｌｕｓ，Ｍｅｄｉａ Ｃｙｂｅｒｎｅｔｉｃｓ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ）、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶグループの肺転移腫瘍の血管密度は、ＧＣＶなしＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置したグループより１．５倍小さいことを示した（それぞれ、４０１０７．７μｍ^{2}及び６１６２２．６μｍ^2）（図７５ｄ）。

【０５０９】

これらの結果を総合すると、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶを全身投与すると、血管形成内皮細胞のアポトーシスの高度に選択的な誘発によって中心部転移腫瘍の壊死及びアポトーシスを誘発することを示している。

【０５１０】

ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶを全身投与すると、ＬＬＣ肺転移腫瘍を有するマウスに肝毒性を誘発する：アデノウイルスベクターの全身投与の主要な副作用の一つは肝毒性であるから、ＬＬＣ腫瘍を誘発させたＣ５７Ｂｌ／６マウスの肝臓の形状を検定した。処置した肝臓組織と対照の肝臓組織のヘマトキシリンとエオシンで染色した切片を分析した結果、構成プロモーターの制御下のＴＫ（ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ）で処置したマウス由来の肝臓は、門脈及び門脈周囲の単核浸潤及び小さい集密壊死領域を示したが、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウス及び対照グループのマウス由来の肝臓は、ごく小さい単核浸潤及び肝細胞の核の拡大しか示さなかった（図７６）。これらの結果は、ＣＭＶプロモーターの制御下でのＴＫの構成性発現は明らかに肝細胞毒性であるが、血管形成特異的なＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ処置により肝臓の形状に対する悪性副作用は全く見られなかったことを示している。

【０５１１】

生体内でのＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下ＴＫの発現の明確な器官特異性：ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下ＨＳＶ－ＴＫの発現の抗転移腫瘍作用の器官及び組織特異性の程度を評価するため、ＨＳＶ－ＴＫとβ－アクチンプライマーを使うＰＣＲ分析を、アデノウイルスベクターで処置したＬＬＣ肺転移腫瘍を有するマウスの各種器官由来の各種組織に対して実施した。

【０５１２】

１５週齢の雄のＣ５７ＢＬ／６マウス９頭を登録した。ＬＬＣ肺転移腫瘍は、左足に腫瘍細胞を接種して原発腫瘍が発生したとき直ちに切断することによって誘発させた。アデノウイルスベクター（ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ及びＡｄＣＭＶ－ＴＫ）又は生理食塩水を、原発腫瘍を除いた後１４日目に静脈注射した。そのマウスは、ベクターを注射した後６日目に殺し、次いで記載されているように収穫した器官からＲＮＡを抽出した。逆転写酵素ＰＣＲをＲＮＡに対して実施し、続いてＨＳＶ－ＴＫとβ－アクチンプライマーを使ってＰＣＲを実施した。陽性ＨＳＶ－ＴＫの発現が、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置したマウスの肺に検出されたが、その肝臓に、ＨＳＶ－ＴＫの発現は全く検出されなかった。対照的に、高度に陽性のＨＳＶ－ＴＫ発現がＡｄＣＭＶ－ＴＫで処置されたマウスの肝臓に検出されたが、その肺には発現が全く検出されなかった（図７７）。β－アクチンについて修正したコンピュータベースの密度計測（Ｏｐｔｉｑｕａｎｔ，Ｐａｃｋａｒｄ－Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を実施したところ、肝臓／肺発現比が、ＡｄＣＭＶ－

ＴＫで処置したマウスの場合５．８であるのに比べてＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置したマウスでは１１．３であることを示した。これらの結果は、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置したマウスは、ＨＳＶ－ＴＫ遺伝子を、血管形成の多い器官すなわち転移腫瘍の肺に優先的に発現するが、ＣＭＶプロモーターの制御下でのＴＫの発現は（ＡｄＣＭＶ－ＴＫで処置したマウス）、肝臓のような、コクサッキーアデノウイルス受容体の豊富な器官に顕著であったことを示している（図７７）。また、強い陽性のＨＳＶ－ＴＫの発現が、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置されたマウスの睾丸に検出された。一つだけの仮説に限定されたくないが、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置されたマウスにおける陽性の発現は、性腺におけるエンドセリンプロモーターの高い発現によって恐らく説明されることは分かるであろう。ＡｄＣＭＶ－ＴＫで処置されたマウスにおける陽性発現は、高い陽性のβ－アクチンのバンドによって反映されるように、比較的高いＲＮＡのエリューション（ｅｌｕｔｉｏｎ）によって説明される。

【０５１３】

総合すると、これらの結果は、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶを全身投与すると、中心部転移腫瘍の壊死の誘発及び血管形成内皮細胞のアポトーシスの選択的誘発によって、癌の高侵襲性の転移腫瘍の拡大さえも、安全にかつ組織特異的に有効に阻害できることを示している。

【０５１４】

実施例３５

放射線療法を併用した、ガンシクロビル及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下でのＴＫの投与：生体内での内皮細胞に対する相乗細胞傷害性

複合様式（ｍｕｌｔｉｐｌｅ　ｍｏｄａｌｉｔｙ）抗癌療法は、必要な投与量の減少と治療期間の短縮及びそれらによってもたらされる有害な副作用の低下、並びに異なる治療機序の相乗集中から生まれるより大きな治療効力によって、個々の治療法を超える有意な利点を提供する（最近の総説については、Ｆａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ　Ｏｐｉｎ　Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　２００３；５：４７５－８２を参照）。複合様式療法におけるＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ投与の効力を試験するため、Ｂａｌｂ／Ｃマウスのゆっくり増殖する原発ＣＴ－２６結腸癌及びＣ５７Ｂｌ／６マウスのルイス肺癌の転移腫瘍に対する、単一線量の放射線療法を併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの全身投与の効果を評価した。

【０５１５】

単一線量５Ｇｙの局所放射線療法は原発ＣＴ－２６結腸癌を有するＢａｌｂ／Ｃマウスに対して非毒性で治療量以下である：治療量以下でかつ非毒性の放射線線量を見つけるため、８週齢の雄のＢａｌｂ／Ｃマウス２０頭の左大腿部にＣＴ－２６結腸癌を接種した。腫瘍の直径が４－６ｍｍに到達したとき直ちにそのマウスを、局所の単一線量放射線で処置した。４種の放射線量すなわち、０　Ｇｙ（黒丸）、５　Ｇｙ（白丸）、１０　Ｇｙ（黒三角）又は１５　Ｇｙ（白三角）を試験した。腫瘍の容積［式Ｖ＝π／６ｘα^{2}ｘβ（αは短軸でありβは長軸である）に従って計算した］は、長軸と短軸を測定することによって、毎日算定した。マウスの良好な生活状態を観察と体重測定で毎日監視した。１０Ｇｙと１５Ｇｙの線量は、腫瘍の進行の発展を、未処置のマウスと比べて抑制した（それぞれｐ＝０．０３９、ｐ＝０．０２９）。しかし、５Ｇｙの線量は、ごく部分的な統計的に有意でない腫瘍の進行の遅延（図７８ａ）を誘導したに過ぎずかつ有意でない体重減（図７８ｂ）を示し、又は５Ｇｙで処置されたマウスには異常行動は全く検出されなかった。これらの結果に基づいて、一回の５Ｇｙ線量の放射線療法を、併用治療実験に使用した。

【０５１６】

５Ｇｙの局所放射線療法を併用した、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による原発結腸癌腫瘍の進行の抑制：８週齢の雄のＢａｌｂ／Ｃマウス１００頭にＣＴ－２６結腸癌腫瘍細胞を接種した。腫瘍の軸が４－６ｍｍに到達したとき直ちに、１０^{11}ＰＦＵのウイルスベクター［ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ又はＡｄＣＭＶ－ＴＫ］を尾静脈に注射し、次いで指示された場合、

１４日目まで、毎日ＧＣＶを腹腔内注射した（１００ｍｇ／ｋｇ体重）。ベクターを投与した後３日目に、そのマウスは５Ｇｙ線量を局所照射された。腫瘍の容積は式Ｖ＝π／６ｘα^{2}ｘβ（αは短軸でありβは長軸である）に従って算定した。殺したとき、マウスの写真を撮り、腫瘍と肝臓の検体を収穫して組織学的分析を行なった。

【０５１７】

ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ＋放射線療法によって、腫瘍の進行が、他の治療法に比べて抑制された。平均の腫瘍抑制期間は約２週間であったが、これはアデノウイルスの活性期間と一致している。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ＋放射線療法で処置されたグループの腫瘍容積の平均進行度は、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置されたグループ（ｐ＝０．０４）及びＡｄＣＭＶ－ＴＫで処置されたグループ（ｐ＝０．００８）のそれより小さかった。さらに、このグループ（ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ＋放射線療法）の平均腫瘍容積の進行は、他のすべてのグループの平均累積腫瘍容積の進行（ｐ＝０．００２５）、すべての非照射グループ（Ａｄ５ＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ、Ａｄ５ＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ、ＧＣＶなしのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ及び生理食塩水＋ＧＣＶ）の平均累積腫瘍容積の進行（ｐ＝０．０００５）並びに他の照射グループ（Ａｄ５ＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ＋放射線療法、ＧＣＶなしのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋放射線療法及び生理食塩水＋ＧＣＶ＋放射線療法）　の平均累積腫瘍容積の進行（ｐ＝０．０４１）より小さかった（図７９ａ，ｂ）。放射線療法は、非標的化ベクターＡｄＣＭＶ－ＴＫに比べて、血管形成内皮細胞転写標的化ベクターＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫだけを有意に強化した（ｐ＝０．０４）（図７９ｃ－ｆ）。全ウイルスベクターによる処置法は、放射線無しでは無効であった。

【０５１８】

これらの結果は、総合すると、生体内でのＣＴ－２６結腸癌腫瘍増殖に対するＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫと放射線療法の併用の著しい相乗腫瘍抑制作用を示している。

【０５１９】

放射線療法を併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶは塊状腫瘍壊死を誘発する：ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶと放射線療法の併用の抗腫瘍形成作用の機序を確認するため、腫瘍組織に対してヘマトキシリンとエオシンの染色を行った。腫瘍組織は、細胞過多で凝縮した組織であり分裂指数が高かった。全グループに二つの要素すなわち壊死及び壊死領域中の肉芽組織が検出された。放射線療法を含む方法で処置したマウスから採取した腫瘍は、非照射マウスから採取した腫瘍より大きい壊死領域と肉芽組織を示した。これらのグループでは、壊死（図８０ａ）及び肉芽組織（図８０ｂ）はほとんど中心部のものであった。放射線療法を併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスは、最も広い壊死と肉芽組織を示し（図８０ａと８０ｂ）、検体の面積の約５５％－８０％と推定される（図８０）。放射線療法無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスから採取した腫瘍は、他の非照射グループより比較的大きい壊死面積を示した（データは提示せず）。これらの結果は、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ＋放射線療法が、部分的に肉芽組織で置換されている塊状の中心部腫瘍壊死を誘発することを示唆している。

【０５２０】

放射線療法を併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶは内皮細胞と塊状腫瘍のアポトーシスを誘発する：結腸癌腫瘍に対するＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶと放射線療法の阻害作用に関与する細胞死の特徴を決定するために、ＴＵＮＥＬと抗カスパーゼ－３の染色を腫瘍細胞に実施してアポトーシス細胞を示した。ＴＵＮＥＬ染色は、照射グループの中心部壊死領域の周りのアポトーシス腫瘍細胞を示した。放射線療法を併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスから採取した腫瘍に、他のどのグループより多いアポトーシス腫瘍細胞を検出した（図８１ａ）。その腫瘍の切片を抗カスパーゼ－３で染色することによって、同じアポトーシス細胞のパターンを検出した。さらに、アポトーシス腫瘍細胞に囲まれている壊死領域（白矢印）は、蛇行形であり、血管密度が増大していることが特徴であった（図８１ｂ）。アポトーシス領域内の血管の

内皮細胞は、陽性の抗カスパーゼ－３染色性を示した（図８２）。

【０５２１】

これらの結果を総合すると、放射線療法を併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶは、結腸癌腫瘍の壊死領域を囲む塊状腫瘍細胞アポトーシスを誘発することを示唆している。さらに、腫瘍アポトーシス領域内の増大した新生血管密度、壊死領域とアポトーシス領域の形状及び内皮細胞アポトーシスの存在は、血管形成組織の損傷に派生する血管周囲の壊死を示している。

【０５２２】

放射線療法を併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶは、生体内での腫瘍の発達を抑制する抗血管形成作用を有する：ＣＤ－３１は、血管形成の特徴的な内皮細胞のマーカーである。この併用療法の内皮細胞に対する直接効果を証明するため、抗ＣＤ－３１免疫染色法を実施した。放射線照射だけを含む方法で処置したマウスから採取した腫瘍の切片の新生血管は、短く、連続性又は分枝が無くかつ境界が不明確であった。ＧＣＶ無しでベクターのみ投与したときは異常を起こさなかったが（図８３ｂ）、放射線療法を併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶは、最も広範な血管の異常を示した（図８３ａ）。肝臓の血管は影響を受けなかった（図８３ｂ）。これらの結果は、放射線療法を併用したＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの投与は新生血管の広範な血管破壊を誘発することを示している。

【０５２３】

ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶを全身投与するがＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫを投与しないと、ＣＴ－２６結腸癌腫瘍を有するマウスに肝毒性を誘発する：アデノウイルスベクターの全身投与の主な副作用の一つは肝毒性であるから、ベクターで処置したマウス、併用療法を実施したマウス及び対照マウスに、ヘマトキシリンとエオシンの染色を実施した。あらゆる処置グループの肝臓検体は、拡大した肝細胞の核及びクッパー細胞の過形成を示した。最も特徴的な変化は、放射線療法あり又は無しのＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスに見られた（図８４）。肝機能の血漿マーカー（肝臓酵素のＳＧＯＴ、ＳＧＰＴ）又は腎機能の血漿マーカー（尿素、クレアチニン）の差はグループ間に見られなかった。肝臓内皮細胞は、放射線療法を併用したベクターＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶによる影響を受けなかった（図８４の右パネル）ことに注意すべきである。これらの結果は、ＣＭＶプロモーターによって制御されてＨＳＶ－ＴＫを発現するアデノウイルスベクターが比較的肝毒性であることを示している。

【０５２４】

これらの結果を総合すると、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶは静脈投与するのに安全であることを示唆している。さらに、このベクターは、非毒性であり局所的に送達される放射線療法を併用するときのみ、ゆっくり増殖する原発腫瘍の進行を有効に抑制する。単一の仮説に限定されたくないが、腫瘍の血管形成のアポトーシスによる特異的抑制は、腫瘍抑制の機構のようである。さらに、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫベクターの細胞傷害活性は、ＧＣＶの投与と放射線療法に依存している。

【０５２５】

実施例３６

放射線療法を併用した、ガンシクロビル及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの投与：生体内で転移中の癌における生存の相乗的促進

ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶの抗血管形成活性及び単一線量の放射線療法の、癌における長期間の生存に対する併用効果を評価するため、迅速に転移中のルイス肺癌モデルへのベクターとＧＣＶの全身投与及び放射線療法を選択した。

【０５２６】

単一線量５Ｇｙの局所放射線療法は、ルイス肺癌転移腫瘍を有するＣ５７ＢＬ／６マウスに対して非毒性でかつ治療量以下である：８週齢の雄のＣ５７ＢＬ／６マウス３５頭の左足足蹠にＬＬＣ細胞を接種した。原発腫瘍が発生したとき直ちに、その足を全身麻酔下で切断した。足を切断した後８日目に、そのマウスの胸壁に対して単一線量の放射線療法

を、全身麻酔下で実施した。５種類の放射線量すなわち０、２、５、１０及び１５Ｇｙを試験した。原発腫瘍を除去した後３－４週目に、非照射マウスは体重が減少し始めたが、これは転移疾患の症状である。したがって、マウスを殺す日は、原発腫瘍を除いた後２８日目にした。マウスの健康状態は、観察と体重測定で毎日監視した。１５Ｇｙで処置した６頭のマウスのうち５頭が、肺転移腫瘍の症状無しで、照射した後５日目以内に死んだ。以下のようにマウスを除外した。１頭のマウスを他のグループに比べて原発腫瘍の発生が２週間遅れたため除外した。３頭のマウスが継続管理中に死んだが検死は行なわなかった。除外したマウスのうち３頭、すなわち、非処置グループ由来の１頭、２Ｇｙグループ由来の１頭及び５Ｇｙグループ由来の１頭は登録する前に除外した。１０Ｇｙで処置したマウスの転移腫瘍の平均重量は、他のグループのそれより低かったが、５Ｇｙで処置したグループとだけ統計的に差があった（ｐ＝０．００１）（図８５ａ）。先に述べたように、１５Ｇｙの放射線で処置したマウスは、転移腫瘍の痕跡を全く残すことなく５日目以内に死んだ。１０Ｇｙで処置したマウスは、放射線照射後４日目に、有意でない一時的な体重減少を示した（図８５ｂ）。放射線療法の単一線量５Ｇｙは治療量ではなく（図８５ａ）又は毒性でなかった（図８５ｂ）ので併用処置実験に使用した。

【０５２７】

治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーター制御下のＴＫの発現とガンシクロビルの投与の併用によるマウス肺癌の転移疾患の相乗抑制効果：８週齢の雄のＢａｌｂ／Ｃマウス１８０頭の左足足蹠にＬＬＣ細胞を接種した。原発腫瘍が発生したとき直ちに、その足を全身麻酔下で切断した。足を切断した後５日目に、10^{10}ＰＦＵのベクター［ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ又はＡｄＣＭＶ－ＴＫ］を尾の静脈に注射し続いて１４日目まで毎日ＧＣＶ（１００ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内に注射した。ベクターを注射した後３日目に、マウスの胸壁に単一線量５Ｇｙの放射線照射を、全身麻酔下で実施した。

【０５２８】

マウスを６グループに分割した。すなわち１．Ａｄ５ＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ、２．Ａｄ５ＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ、３．生理食塩水＋ＧＣＶ、４．Ａｄ５ＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ＋放射線療法、５．Ａｄ５ＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶ＋放射線療法及び６．生理食塩水＋ＧＣＶ＋放射線療法に分割した。マウスの除外：４頭のマウスは足を切断してからまもなく死に、４頭のマウスは原発腫瘍が登録するには大きすぎるため除外し、７頭のマウスは原発腫瘍の発生が遅いため除外し、１２頭のマウスは肺転移腫瘍の痕跡が全く無しに死に、１頭のマウスは両眼のディスチャージのため除外した。除外されたマウスのうち１４頭、すなわち、グループ１由来の２頭、グループ２由来の２頭、グループ３由来の２頭、グループ４由来の４頭グループ５由来の３頭及びグループ６由来の１頭は登録する前に除外した。

【０５２９】

ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶ＋放射線療法で処置したマウスは、他のどの処置グループのマウスより有意に永い期間生存した（ｐ＝０．０５）（図８６ａ）。さらに、放射線療法は、非標的化ベクターＡｄＣＭＶ－ＴＫに比べて、血管形成内皮細胞転写標的化ベクターＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫだけを有意に強化した（ｐ＝０．０４）（図８６ｂ－ｄ）。これらの結果は、全身投与のＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫベクター＋ＧＣＶ及び単一線量の放射線療法を併用した処置によって、転移腫瘍疾患の場合の生存が相乗的に延長されることを示している。

【０５３０】

実施例３７

ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＦａｓ及びＴＮＦＲのキメラ遺伝子による二重療法：ドキソルビシンを用いた、生体外での内皮細胞特異性の相乗的促進

化学療法とＨＳＶ／ＴＫ以外の「自殺遺伝子」の血管形成内皮特異的発現との併用の効力を試験するため、Ｆａｓ－キメラ（Ｆａｓ－ｃ、上記の詳細な説明参照）とともにＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターを有するＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃを、ＢＡＥ細

胞に投与し次いでアントラサイクリン系グリコシドのドキソルビシン（ＤＯＸ）をともに投与した。

【０５３１】

ＢＡＥ細胞の細胞生存（生存率％、クリスタルバイオレット染色で評価）で測定したときのアポトーシスは、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃ＋ＤＯＸで処置したマウスの方が、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ｃ又はＤＯＸだけで処置したマウスより有意に大きかった（図９０）。

【０５３２】

これらの結果は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターを使って、追加の治療用遺伝子構築物の有効な内皮特異的発現を指向させることができ、そしてＰＰＥ－１（３ｘ）に依存するアポトーシス誘発Ｆａｓ－ｃの発現及び化学療法の併用によって、非常に有効な相乗的内皮アポトーシスが起こることを示している。

【０５３３】

実施例３８

条件付きで複製するアデノウイルスベクター

材料と実験方法

細胞培養：ウシ大動脈内皮細胞（ＢＡＥＣ）及びヒトの正常な皮膚の繊維芽細胞－ＮＳＦ細胞系を、１０％の熱不活性化ＦＣＳ、１００μｇ／ｍｌのペニシリン及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを含有する低グルコースＤＭＥＭ中で培養した。ＨｅＬａ（ヒト子宮頸上皮腺癌）、ルイス肺癌細胞（Ｄ１２２－９６）及び２９３（ヒト胎生腎）細胞系を、１０％の熱不活性化ＦＣＳ、１００μｇ／ｍｌのペニシリン及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを含有する高グルコースＤＭＥＭ中で培養した。ヒト臍内皮細胞－ＨＵＶＥＣ（Ｃａｍｂｒｅｘ ，Ｂｉｏ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，Ｉｎｃ．）を、ＥＧＭ－２ Ｂｕｌｌｅｔ ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ，Ｂｉｏ－Ｗｈｉｔｔａｋｅｒ，Ｉｎｃ．，米国メリーランド州所在）で培養した。ヒト肺癌細胞系（Ａ５４９）を、１０％の熱不活性化ＦＣＳ、１００μｇ／ｍｌのペニシリン及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを含有するＭＥＭ中で培養した。細胞はすべて、３７℃、５％CO_2の湿潤大気中で増殖させた。

【０５３４】

プラスミドとウイルスベクターの構築：

プラスミドのクローン化：ホタルのルシフェラーゼのｃＤＮＡを、ｐｃＤＮＡＩＩＩ発現プラスミド（ＣＭＶプロモーター領域を含有している。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）のマルチプルクローニングサイト中及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターとアデノウイルス－５のＤＮＡ配列の一部とを含有するｐＰＡＣＰＰＥ－１．ｐｌｐＡ中にサブクローン化した。第三のプラスミドを、ｐＰＡＣＰＰＥ－１．ｐｌｐＡプラスミドからＰＰＥ－１プロモーターの第一イントロンを除くことによってクローン化した。これら３種のプラスミドは、本発明の発明者らの研究室で以前にクローン化されて細胞培養トランスフェクションに利用されていた。

【０５３５】

複製不全ベクターのクローン化：ＦＡＳ－キメラのｃＤＮＡを、ｐＰＡＣＰＰＥ－１．ｐｌｐＡプラスミドとｐＰＡＣＣＭＶ．ｐｌｐＡプラスミド中にサブクローン化した。これらのプラスミドをアデノウイルス－５のゲノムの大部分を含有するｐＪＭ１７でコトランスフェクトし、次いでリン酸カルシウム法によって、２９３ヒト胎生腎細胞系（ＡＴＣＣ）中にコトランスフェクトした。この細胞系は、ウイルスを複製するのに必要であるがｐＰＡＣ．ｐｌｐＡプラスミド又はｐＪＭ１７プラスミドには含まれていないＥ１遺伝子を含有するように設計された。これらのプラスミドは、これら細胞中で相同的組換えを起こし、約２週間後、組換えウイルスが形成され次いで複製を開始して最終的に細胞崩壊を起こす。ウイルスのコロニーを分離して増殖させ次いでそれらの正確な挿入配向をＰＣＲで証明した。この複製不全ベクターは、以前に、従来技術のクローン化法で製造されていた。

【０５３６】
条件付きで複製するアデノウイルス（ＣＲＡＤ）の構築：ＣＲＡＤを、ＡｄＥａｓｙｍｅｔｈｏｄ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，米国カリフォルニア州ラホーヤ所在）を使って構築した。ｐＳｈｕｔｔｌｅ－ＭＫ（アデノウイルス－５のＤＮＡ配列の一部を含有するプラスミド）を以下のようにして修飾した。すなわち、ｐＳｈｕｔｔｌｅ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，米国カリフォルニア州ラホーヤ所在）のマルチプルクローニングサイトと右アームを、Ｍｉｄｋｉｎｅ（ｍｋ）プロモーター及び構成的アデノウイルスＥ１領域で置換した。次いで、そのＭＫプロモーターを、イントロン無しのＰＰＥ１－３ｘで置換した。ＩＲＥＳ配列（ｐＩＲＥＳ－ＥＹＦＰプラスミド由来、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）とＦＡＳ－キメラのｃＤＮＡを、前記プロモーターとＥ１の間にサブクローン化することによって、第二のプラスミドを構築した。ＩＲＥＳは、同じ転写産物から２種類のタンパク質を翻訳できる。得られた２種のｓｈｕｔｔｌｅを、ＰｍｅＩで消化することによって線状化し、続いてこれでエシェリキア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）ＢＪ５１８３ＡＤＥＡＳＹ－１（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を形質転換した。この種の細菌は、Ｅ１及びＥ３の遺伝子領域を除くアデノウイルス－５の配列の大部分を含有するｐＡＤＥＡＳＹ－１プラスミドで、すでに形質転換されている。これらのプラスミドは、前記細菌中で、相同的組換え（ｐＳｈｕｔｔｌｅとｐＡＤＥＡＳＹ－１の間）を起こし、完全なベクターゲノムを生成する。次にその組換え体をＰａｃＩで消化し、次いでリン酸カルシウム法で、２９３ヒト胎生腎細胞系（ＡＴＣＣ）中にトランスフェクトした。残りの手順は、複製不全ベクターについて述べたのと同じである。

【０５３７】
Ｅ１遺伝子の前にジェネラルプロモーターＣＭＶ（サイトメガロウイルス）をサブクローン化することによって陽性対照のウイルスＣＭＶ－Ｅ１を構築した。ＣＭＶ－Ｅ１ウイルスは遍在しておりかつ内皮細胞に対する特異性は全く持っていない。

【０５３８】
下記の複製不全ベクターとＣＲＡＤを上記方法で構築した。

複製不全ベクター：

ＰＰＥ－１（３ｘ）－ＦＡＳ、ＣＭＶ－ＦＡＳ、ＣＭＶ－ＬＵＣ（ＬＵＣ－ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子の略語）、ＰＰＥ－１（３ｘ）－ＬＵＣ。

ＣＲＡＤ：

ＰＰＥ－１（３ｘ）－ＣＲＡＤ、ＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｆａｓ－ＣＲＡＤ、ＣＭＶ－Ｅ１。

【０５３９】
トランスフェクションの実験：ＢＡＥＣとＨｅＬａ細胞を、２４ウエルのプレート中で６０－７０％の集密度になるまで培養した。０．４μｇ／ウエルの発現構築物及びトランスフェクションの効率を知るための対照としてのｐＥＧＦＰ－Ｃ１ベクター０．０４μｇ／ウエル（米国カリフォルニア州パロアルト所在のＣＬＯＮＴＥＣＨ）を使って、コトランスフェクションを実施した。リポフェクタミン（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ）及びリポフェクタミンプラス（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ｐｌｕｓ）（米国カリフォルニア州カールズバッド所在のＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）をトランスフェクションに使用した。３７℃で３時間インキュベートした後、トランスフェクション混合物を増殖培地で置換した。

【０５４０】
形質導入の実験：感染多重度（ｍｏｉ）を１０、１００、１０００、１００００に到達させるため、ベクター（ＰＰＥ－ＦＡＳ、ＣＭＶ－ＦＡＳ、ＣＭＶ－ＬＵＣ、ＰＰＥ－ＬＵＣ）を、感染増殖培地（通常の増殖培地の１０％ではなくて２％のＦＣＳを含有している）で希釈した。その感染多重度は、ウイルスの数／標的細胞として計算した。標的細胞（ＢＡＥＣ及び２９３）は、形質導入を実施する２４時間前に接種した。形質導入を行なう日に、細胞の増殖培地を、９６ウエルのプレート又は６０ｍｍのプレートそれぞれに使用する０．１又は２ｍｌの感染培地に混合した所望のｍｏｉのウイルスを含有する溶液で

置換した。これらの細胞を４時間インキュベートし、続いて新しい培地を、形質導入された細胞に添加した。

【０５４１】

ベクターの複製とアポトーシスの誘発はそれぞれ、ＰＦＵ滴定法（下記参照）及び（ＡｐｏＰｅｒｃｅｎｔａｇｅ ｋｉｔ（Ａｃｃｕｒａｔｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ，米国ニューヨーク州ウエストバリー所在）によって評価した。またクリスタルバイオレット染色法を利用して、プレートの表面に付着した細胞の量を、細胞生存率の指標として評価した。

【０５４２】

ウイルスの力価の検査－プラーク形成単位の検定（ＰＦＵ）：ウイルス株を滴定し－８０℃で貯蔵した。準集密度（８０％）の２９３細胞の培養物に、感染培地で段階希釈された（10^{-2}－10^{-13}）ウイルスベクターを、２時間感染させた。２時間後、培地をＰＢＳで洗浄し次いで寒天の上層で置換した。プラークが約２週間後に明らかになる最高の希釈度は、ＰＦＵ／ｍｌの単位（ＰＦＵ－プラーク形成単位）における濃度と考えられる。

【０５４３】

試験結果

細胞傷害性遺伝子の発現によって、アデノウイルスの複製が促進される：アポトーシス誘発の、ウイルス複製に対する影響を検査するため、２９３（ヒト胎生腎）細胞系におけるＣＭＶ－ＦＡＳの複製を検査した。この細胞系内で、このウイルスは、その複製の結果としてのＦＡＳ－ｃの又は細胞の崩壊によって、アポトーシスを誘発できる。早期（ウイルスが感染してから数時間後）アポトーシスは、ウイルスの複製を妨げることができるが、遅発アポトーシス（ウイルスが感染してから数日後）はウイルスの拡張を促進するかもしれない。

【０５４４】

アポトーシスを誘発するＣＭＶ－ＦＡＳの能力を検査するため、ＢＡＥＣに形質導入を行い次いで細胞のアポトーシスを、生存率をＥＬＩＳＡ－クリスタルバイオレット法で検定することによって評価した（図８９）。より高い濃度（１００００ｍｏｉ）のＣＭＶ－ＦＡＳが活性化リガンド（ＴＮＦ－α）無しでアポトーシスを誘発したが、より低濃度の場合は、アポトーシスを誘発するためリガンドを添加する必要があった。

【０５４５】

細胞から細胞へのＣＭＶ－ＦＡＳの広がりは２９３細胞におけるプラークの増殖によって検定した。プラークは、プラークの増殖速度とプラークの大きさによって観察されるように（図８８と８９）、非アポトーシス誘発ベクターのＣＭＶ－ＬＵＣと比べて、ＣＭＶ－ＦＡＳベクターによってより高速度で増殖する。

【０５４６】

イントロンあり及び無しのＰＰＥ１－３ｘプロモーターの、ＲＮＡ転写を誘発する能力は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子で評価した（提示せず）。有意差は見られなかった。

【０５４７】

これらの結果は、ＦＡＳなどのアポトーシス誘発「キラー」遺伝子を有する上記のような血管形成内皮特異的ウイルス構築物ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）のようなアデノウイルスの複製は、宿主細胞の追加のアポトーシス崩壊によって促進できることを示している。

【０５４８】

実施例３９

ＰＰＥ－１（３ｘ）の制御下でのＶＥＧＦの発現は遺伝子工学的に処置された組織の血管新生と生存率を高める

遺伝子工学的に処置された組織構築物の生体外及び生体内での血管新生に対する、エンドセリンプロモーターの制御下でのＶＥＧＦの発現の効果を試験するため、細胞を、Ａｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦに感染させ、構築物を分析して、血管新生に対する効果を調べた。

【０５４９】
図９１ａは、細胞に対するＡｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦの感染が、その遺伝子工学的に処置された構築物に形成された血管様構築物の数と大きさに対して誘導効果があることを示している。構築物は、培地にＶＥＧＦの補充（５０ｎｇ／ｍｌ）あり又は無しで増殖させた。平行構築物にＡｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦウイルス又は対照のＧＦＰアデノウイルスを感染させた（４時間）。２週間培養した後、構築物を固定し、包埋し、切片をつくって染色した。
【０５５０】
培地に対するＶＥＧＦの添加と細胞に対するＡｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦの感染とを比較すると、Ａｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦウイルスで処置した試料の血管の数及び血管領域の百分率は４－５倍増大することが分かった（図９１ａ）。
【０５５１】
生体内の試験で、３種のモデルを使って、生体内移植体の生存、分化、統合及び血管新生を分析した。これらのモデルとしては、（ｉ）ＳＣＩＤマウスの背中の皮下移植、（ｉｉ）ヌードラットの四頭筋中への移植及び（ｉｉｉ）ヌードマウスの前腹筋部分の前記構築物による置換がある。
【０５５２】
その構築物には、宿主の血管が侵入していた。Ａｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦウイルスが感染した構築物は、血管構造が対照の構築物と比べて増大していることを示した。
【０５５３】
組織を遺伝子工学的に処置した構築物の生体内での生存と統合を評価するため、本発明の発明者らはルシフェラーゼベースのイメージングシステムを利用した。その生体内イメージングシステム（ＩＶＩＳ）は、全身投与されたルシフェリンと局所で産生されたルシフェラーゼとの相互作用によって生成した光を検出することによって作動する。移植する前に、構築物に、ルシフェラーゼをコードするアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を４８時間感染させた。次にその構築物を、その場で、ヌードマウスの前腹筋壁中に入れた。ＡＡＶ－ルシフェラーゼを、正の対照として働くように各マウスの左下肢に手術時に注射した。手術してから３－４週間後、マウスにルシフェリンを投与して、組織を遺伝子工学的に処置した構築物への灌流を評価した。
【０５５４】
Ａｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦに感染させた構築物（その後ＡＡＶ－ルシフェラーゼに感染させた）は、ＡＶＶ－ルシフェラーゼのみに感染させた対照構築物より高いシグナルを示していた（結果は提示せず）。これらの結果は、総合すると、生体外でのＡｄ５ＰＰＥＣ－１－３ｘＶＥＧＦの感染は、移植された、遺伝子工学的に処置された組織構築物の生存と血管新生を改善できることを示唆している。
【０５５５】
実施例４０
血管形成処置による、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの生体内での活性化
血管形成の退行に対する多くの組織の通常の応答は、血管のホメオスタシスを支配する自己調節オートクリンフィードバックループによって生成する複雑なシグナリングに応答する内因性血管形成経路のアップレギュレーションである（Ｈａｈｎ ｅｔ ａｌ，Ａｍ Ｊ Ｍｅｄ １９９３，９４：１３Ｓ－１９Ｓ及びＳｃｈｒａｍｅｋ ｅｔ ａｌ，Ｓｅｎｉｍ Ｎｅｐｈｒｏｌ １９９５；１５：１９５－２０４参照）。このような機構が、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下での核酸配列の発現にどのように影響するかを確認するため、ＰＰＥ－１（３ｘ）制御下のルシフェラーゼ（ＬＵＣ）遺伝子を含む本発明の核酸構築物で形質転換されたトランスジェニックマウスの組織中のルミネッセンスの生体内レベルを、強力な抗血管形成薬剤のＢｏｓｅｎｔａｎの投与有り及び無しで測定した。Ｂｏｓｅｎｔａｎ（Ｔｒａｃｌｅｅｒ（商標））は、各種の徴候（最も重要なものは肺動脈高血圧及び肺線維症）について臨床で認可されている二重エンドセリン受容体（ＥＴＡ及びＥＴＢ）アンタゴニストである。

【０５５６】
本発明のＰＰＥ－１（３ｘ）－１－ＬＵＣ構築物を有するトランスジェニックマウスを、先に詳述したように、当該技術分野で周知のクローン化法でつくった。１０週齢のＰＰＥ－１（３ｘ）－１－ＬＵＣトランスジェニックマウス（各グループｎ＝５）に、固形飼料又は１００ｍｇ／ｋｇ／ｄａｙのＢｏｓｅｎｔａｎを含有する固形飼料を３０日間経口給餌した。処置の最終日にマウスを殺し、次いでマウスの器官を取り出し、上記方法の章で述べたようにしてルミネッセンスの強度を測定した。
【０５５７】
図９４は、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターが、トランスジェニックマウスに組換え遺伝子の組織特異的過剰発現を提供することを示している。心臓及び大動脈などの通常高いエンドセリン活性を有する器官並びに比較的低いエンドセリン活性を有する脳、気管及び肺は、肝臓又は腎臓に比べて、高いルミネッセンス強度を示した。しかし、大部分の気管のルミネッセンス強度は、Ｂｏｓｅｎｔａｎの投与によって著しく増大した（心臓組織の場合４０％まで）（図９４）ので、特にエンドセリン受容体のアンタゴニスト及び血管形成の阻害剤は、一般に本発明の内皮特異的プロモーターを活性化して、ＰＰＥ－１（３ｘ）による転写の制御下での導入遺伝子の発現を、組織特異的方式で一層高めることができることを示している。
【０５５８】
実施例４１
ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下にて生体内で発現された導入遺伝子は免疫性ではない：
上記のように、遺伝子治療は、他の長期間の治療方法と同様に、発現されたトランスジェニックタンパク質に連続的に暴露されたために起こる宿主の内因性免疫反応によって複雑になることが多い。トランスジェニックタンパク質による免疫刺激は、減少された処置の効力、炎症及び時には重篤な副作用を生じることがある。本発明のシス反応調節因子を使って、発現された導入遺伝子に対する宿主の免疫応答を試験するため、アデノウイルスのヘキソンとＴＮＦ－Ｒ１に対する抗体の力価を、ＬＬＣ微小転移腫瘍を有しかつＦａｓ－ＴＮＦ－Ｒ１キメラ（Ａｄ５ＰＰＥ－１（３ｘ）Ｆａｓ－ｃ及びＡｄ５ＣＭＶＦａｓ－ｃ）又はＬＵＣレポーター遺伝子（Ａｄ５ＰＰＥ－１（３ｘ）Ｌｕｃ）を有するベクターで処置したマウスで検定した（１グループ当り６頭のマウス）。対照のマウスは生理食塩水で処置した。
【０５５９】
ベクターは、５日間の間隔を置いて３回注射した。最後のベクター注射を行なってから１０日目にマウスを殺して、アデノウイルスに対する抗体、ヒトＴＮＦ－Ｒ１に対する抗体、挿入された導入遺伝子によって発現されたタンパク質それぞれのレベルを、ＥＬＩＳＡ検定法を使って測定した。
【０５６０】
予想外であったが、ヒトＴＮＦ－Ｒ１に対する抗体のレベルは、Ａｄ５ＰＰＥ－１（３ｘ）Ｆａｓ－ｃで処置したマウスに検出されたレベルより低いことが分かったが、これらのレベルは、非特異的なＡｄ５ＣＭＶＦａｓベクターで処置したマウスでは比較的高かった（図９５ｂ）。アデノウイルスのヘキソン抗原に対する抗体の力価は、異なるウイルスを注射したグループ間では類似していた（図９５ａ）。これらの結果は、本発明のＰＰＥ－１（３ｘ）構築物を使って発現された導入遺伝子は、系統の近接性のいかんにかかわらず宿主の免疫系によって良好に許容されることを示している。

【０５６１】
実施例４２
ＰＰＥ－１（３Ｘ）プロモーターの制御下で、Ｆａｓ－ｃを生体内で発現させることによる、ルイス肺癌（ＬＬＣ）の転移腫瘍の増殖の効果的な抑制：投与量に対する応答及び処置法

臨床のプロトコルの単純化と標準化が、診療にとって非常に重要である。転移腫瘍疾患にＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）Ｆａｓ－ｃキメラを全身投与する投与法及び処置法の効力を試験するため、左足に腫瘍細胞を移植しその原発腫瘍が直径７ｍｍに到達したとき直ちにその足を切断することによってＬＬＣ肺転移腫瘍を誘発させた。$1x10^{7}$－$1x10^{12}$の投与量のＡｄ５ＰＰＥ－１（３ｘ）Ｆａｓ－ｃベクター［もしくは比較するためのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）Ｌｕｃ］又は対照として役立つ生理食塩水を静脈注射した。第一投与量は、原発腫瘍を取り除いた後５日目に投与し、第二投与量は、指示されている場合、腫瘍を切除後９日目に投与した。これらマウスは、処置中の処置の安全性を、体重、外観及び活動によって評価した。肝臓の重量、外観及び機能（酵素活性）を、殺したときに評価した。

【０５６２】

これらマウスは、ベクターを注射した後２０日目に殺し、次いで転移腫瘍の拡張の程度を、切取った肺の重量によって全身腫瘍組織量で評価した。図９６は、$1x10^{7}$－$1x10^{12}$のＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）Ｆａｓ－ｃベクター又は生理食塩水を一回ずつ注射されたマウス由来の肺の重量を比較しているヒストグラムであり、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）Ｆａｓ－ｃ構築物のベクターを発現するマウスの肺の転移腫瘍の拡張（全身腫瘍組織量）が有意に減少していることを示している。最も有意な効果は、最高の投与量で観察された。すなわち、$1x10^{12}$のＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）Ｆａｓ－ｃを投与されたマウスの全身腫瘍組織量は、対照の生理食塩水を投与されたマウスのそれより３．５倍以上小さかった（それぞれ０．３１ｇと１．１６ｇであった）。

【０５６３】

図９７は、$1x10^{9}$－$1x10^{12}$のＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）Ｆａｓ－ｃベクター、対照のＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）Ｌｕｃベクター又は生理食塩水を一回又は二回投与したマウスの肺の重量で測定した全身腫瘍組織量を比較しているヒストグラムであり、$1x10^{9}$－$1x10^{12}$のＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）Ｆａｓ－ｃベクターを一回又は二回投与されたマウスの肺の全身腫瘍組織量が有意に小さいことを示している。対照のベクター（ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）Ｌｕｃ）又は生理食塩水の注射の抗転移腫瘍効果は全く観察されなかった。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）Ｆａｓ－ｃの一回と二回の投与の間に、すべての試験投与量で、抗転移腫瘍効果（肺の平均重量）のごく小さい差が観察された。

【０５６４】

これらの試験結果は、比較的低い投与量のアデノウイルスベクターを一回投与した後のＰＰＥ１（３ｘ）プロモーターの制御下でのＦａｓ－ｃキメラの生体内発現は、Ｄ１２２ルイス肺癌モデルの転移腫瘍の増殖を有効に阻害できることを示している。

【０５６５】

本発明のいくつかの特徴は、分かりやすくするため別個の実施態様で記載してあるが、組み合わせて単一の実施態様で提供できることも分かるであろう。逆に、本発明の各種特徴は、簡潔にするため単一の実施態様で記載してあるが、別個に又は適切なサブコンビネーションで提供することもできる。

【０５６６】

本発明を、特定の実施態様と併せて記載してきたが、多くの代替物、修飾、及び変形が、当業者には明白になるだろう。従って、そのような代替物、修飾、及び変形は、添付の特許請求の範囲の精神及び広い範囲に含まれるものとする。この明細書において言及された出版物、特許、及び特許出願は、全て、個々の出版物、特許又は特許出願が、各々、参照により本明細書に組み込まれると特別に個々に示されたかのごとく、参照により、完全に、本明細書に組み込まれる。さらに、本願における任意の参照の引用又は同定は、そのような参照が、本発明に対する先行技術として利用可能であることの承認として解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【０５６７】

【図１】ＴＮＦＲ１の細胞外領域ならびにＦａｓの膜貫通領域及び細胞内領域から構築さ

れ、ｐｃＤＮＡ３プラスミドにクローン化されたＦａｓキメラ遺伝子（ａ）又はアデノウイルスベクターにクローン化されたＦａｓキメラ遺伝子（ｂ）の概略図である。
【図２】プロアポトーシス遺伝子（Ｆａｓキメラ及びＴＮＦＲ１）のアポトーシス活性を例示する。
【図３】プロアポトーシス遺伝子でトランスフェクションされたＢＡＥＣ細胞の電子顕微鏡観察像である。
【図４】トランスフェクションされたＢＡＥＣ細胞及び２９３細胞における示されたプロアポトーシス遺伝子のアポトーシス活性を定量するヒストグラムである。
【図５】図５ａは、ＡｄＰＰＥ－Ｆａｓ－ｃのＰＣＲ分析を示す。図５ｂは、ＡｄＰＰＥ－Ｆａｓ－ｃでトランスフェクションされたＢＡＥＣ細胞のウエスタンブロット分析である。
【図６ａ－ｂ】内皮細胞のアポトーシスに対するＦａｓ－キメラの過剰発現の影響を例示する顕微鏡写真である。
【図６ｃ－ｄ】内皮細胞のアポトーシスに対するＦａｓ－キメラの過剰発現の影響を例示する顕微鏡写真である。
【図７】内皮細胞に対するＡｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－キメラのアポトーシス特異的作用を例示するヒストグラムである。
【図８】Ｆａｓ－キメラにより媒介されるアポトーシスに対するＴＮＦα投与の用量応答作用を示す。
【図９ａ－ｂ】ＴＮＦαリガンド及びＦａｓ－ｃ受容体の共同作用により媒介される内皮細胞特異的なアポトーシスを例示する顕微鏡写真である。
【図９ｃ－ｅ】ＴＮＦαリガンド及びＦａｓ－ｃ受容体の共同作用により媒介される内皮細胞特異的なアポトーシスを例示する顕微鏡写真である。
【図１０】図１０ａは、内皮細胞に対するＡｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－ｃのＴＮＦα依存的アポトーシス作用を例示する用量応答曲線である。図１０ｂ～図１０ｄは、非内皮細胞ＮＳＦに対する、ＴＮＦαリガンド及びＡｄ－ＣＭＶ－Ｆａｓ－キメラのアポトーシス作用を例示する。
【図１１】Ａｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－ｃのインビボ抗腫瘍作用を例示する。図１１ａ－処置期間中に測定された腫瘍面積。図１１ｂ－処置期間が終了した時の腫瘍重量。図１１ｃ－Ａｄ－ＰＰＥ－１－３ｘ－Ｆａｓ－ｃ処置マウス及び対照マウスにおける腫瘍の状態を表す画像。
【図１２】対照としてＢ２Ｂ細胞系（エンドセリンを発現する気管支の細胞系）を使用した、ウシ及びヒト両方の内皮細胞系におけるルシフェラーゼ発現に対する、本発明のエンハンサー因子の効果を例示するヒストグラムである。
【図１３】様々な細胞系におけるルシフェラーゼ発現に対する、アデノウイルスベクター内の本発明のプロモーターの内皮特異性を例示するヒストグラムである。
【図１４】ＢＡＥＣ細胞系における、本発明のＡｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘ（１４Ａ）及びＡｄ５ＣＭＶ（１４Ｂ）対照構築物の調節下でのＧＦＰ発現を例示する光学顕微鏡写真である。
【図１５】内皮細胞及び非内皮細胞におけるｐＡＣＰＰＥ－１－３Ｘｐ５５、ｐＡＣＰＰＥ－１－３Ｘルシフェラーゼ、及びｐＣＣＭＶｐ５５により誘導されたアポトーシス率（％）のヒストグラムである。
【図１６】本発明に係るエンハンサー因子のプロモーター構築物への導入の、低酸素応答に対する効果を例示するヒストグラムである。
【図１７】本発明に係るエンハンサー因子の、アデノベクター構築物のプロモーターへの導入の、低酸素応答に対する効果を例示するヒストグラムである。
【図１８】本発明に係るエンハンサー因子のプロモーターへの導入の、ウシ及びヒトの内皮のエンドセリン発現細胞系における発現レベルに対する効果を例示するヒストグラムである。
【図１９】内皮プロモーター（ＰＰＥ－１）又は対照（ＣＭＶ）プロモーターいずれかを

含有しているアデノウイルス構築物の注射後に、様々な器官において観察されたレポーター遺伝子の発現レベルを例示するヒストグラムである。
【図２０】構築物を注射されたマウスの肝組織におけるＡｄ５ＣＭＶＧＦＰ構築物（図２０Ａ）及びＡｄ５ＰＰＥ－１－ＧＦＰ構築物（図２０Ｂ）の細胞発現を例示する二つの光学顕微鏡写真である。
【図２１】本発明に係るエンハンサー因子のプロモーターへの導入の、内皮細胞系及び非内皮細胞系における発現レベルに対する効果を例示するヒストグラムである。
【図２２】本発明に係るエンハンサー因子のプロモーターへの導入の、内皮細胞系及び非内皮細胞系における発現レベルに対する効果を例示するヒストグラムである。
【図２３】Ａｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰにより形質導入された細胞、Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰにより形質導入された細胞、及びＡｄ５ＣＭＶＧＦＰにより形質導入された細胞におけるＧＦＰ発現を例示する顕微鏡写真である。
【図２４】ｍｏｉ－１のＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰ及びＡｄ５ＣＭＶＧＦＰによりそれぞれ形質導入されたＳＭＣにおけるＧＦＰ発現を例示する。
【図２５】ＨｅＬａ細胞において行われた図２４Ａ～Ｂの実験と類似の実験の結果を示す。
【図２６】ＨｅｐＧ２細胞において行われた図２４Ａ～Ｂの実験と類似の実験の結果を示す。
【図２７】ＮＳＦ細胞において行われた図２４Ａ～Ｂの実験と類似の実験の結果を示す。
【図２８】Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰ及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰを注射されたマウスの血管を裏打ちしている内皮細胞におけるＧＦＰ発現を例示する顕微鏡写真である。
【図２９】注射されたマウスの腎組織からの結果を例示する顕微鏡写真である。
【図３０】脾組織切片に対して行われた、図２９Ａ～Ｃに図示された実験と類似の実験を例示する。
【図３１ａ－ｂ】生理食塩水を注射された対照マウス（図３１Ａ）、Ａｄ５ＣＭＶＧＦＰを注射されたマウス（図３１Ｂ）の転移肺におけるＧＦＰ発現を例示する。
【図３１ｃ－ｄ】Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰを注射されたマウス（図３１Ｃ）、及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＧＦＰを注射されたマウス（図３１Ｄ）の転移肺におけるＧＦＰ発現を例示する。
【図３２】マウスＰＰＥ－１プロモーターを含有しているプラスミドによりトランスフェクトされたＢＡＥＣにおけるルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）が、トランスフェクトされた細胞を低酸素条件下でインキュベートした場合に、有意に高くなることを例示するヒストグラムである。
【図３３】Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ及びＡｄ５ＣＭＶＬｕｃが利用されたことを除き、図３２と同様のヒストグラムである。
【図３４】種々の細胞系における低酸素の効果を示す、図３３と同様のヒストグラムである。
【図３５】本発明の３Ｘ配列の、ＢＡＥＣ細胞におけるＰＰＥ－１低酸素応答に対する効果を例示するヒストグラムである。
【図３６】大腿動脈結紮後のＰＰＥ－１－Ｌｕｃトランスジェニックマウスの様々な組織におけるルシフェラーゼ発現のレベルを示すヒストグラムである。
【図３７ａ】本発明と併せて利用された構築物のプラスミド地図である。
【図３７ｂ】本発明と併せて利用された構築物のプラスミド地図である。
【図３８ａ－ｂ】マウスの虚血肢における血液灌流及び血管形成に対するＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ及びＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦの効果を示す。
【図３８ｃ－ｄ】マウスの虚血肢における血液灌流及び血管形成に対するＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ及びＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦの効果を示す。
【図３８ｅ】マウスの虚血肢における血液灌流及び血管形成に対するＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ及びＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦの効果を示す。
【図３８ｆ】マウスの虚血肢における血液灌流及び血管形成に対するＡｄ５ＰＰＥ－１－

３ＸＶＥＧＦ及びＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦの効果を示す。
【図３９】Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（白バー）及びＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（黒バー）により形質導入された増殖期及び休止期のウシ大動脈内皮細胞（ＢＡＥＣ）におけるルシフェラーゼ活性を例示するヒストグラムである。
【図４０】ＶＥＧＦ添加後の正常増殖中、休止状態、及び急速増殖中のＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃにより形質導入されたＢＡＥＣにおけるルシフェラーゼ活性を例示するヒストグラムである。
【図４１】Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ及びＡｄ５ＣＭＶＬｕｃを注射された正常Ｃ５７ＢＬ／６マウスの大動脈（図４１Ａ）及び肝臓（図４１Ｂ）におけるルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。
【図４２】注射された正常なＢＡＬＢ／Ｃマウスにおける、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（白バー）又はＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（黒バー）の注射後５日目（図４２Ａ）及び１４日目（図４２Ｂ）（各時点についてｎ＝１０）に検出された相対ルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。
【図４３】スーダン－ＩＶにより着色されたＡｐｏＥ欠損マウスから解剖された大動脈を図示する先行技術の画像である。
【図４４】Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（白バー；ｎ＝１２）又はＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（黒バー；ｎ＝１２）のＡｐｏＥ欠損マウスへの全身注射後５日目に検出された絶対ルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。
【図４５】創傷治癒中のＣ５７ＢＬ／６誘導マウスへのＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（黒バー）又はＡｄ５ＣＭＶＬｕｃ（白バー）の全身注射後５日目の絶対ルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。
【図４６】ルイス肺癌誘導マウスの正常肺、転移肺、及び原発腫瘍におけるルシフェラーゼ活性を例示するヒストグラムである。
【図４７ａ－ｂ】Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰの腫瘍内注射後のＬＬＣ保持マウスの肺及び腫瘍におけるＧＦＰ発現及び組織形態学を例示する顕微鏡写真である。
【図４７ｃ－ｄ】Ａｄ５ＰＰＥ－１ＧＦＰの腫瘍内注射後のＬＬＣ保持マウスの肺及び腫瘍におけるＧＦＰ発現及び組織形態学を例示する顕微鏡写真である。
【図４８】Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃ、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ、及びＡｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘ－Ｌｕｃを注射されたルイス肺癌誘導マウスの正常肺及び転移肺におけるルシフェラーゼ発現を例示するヒストグラムである。
【図４９】Ａｄ５ＣＭＶ、Ａｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ、及びＡｄ５ＰＰＥ－１（３Ｘ）を注射されたルイス肺癌誘導マウスの正常肺及び肺転移における肝臓活性に対する比率（％）（肝臓を１００％とした場合）としてのルシフェラーゼ活性を例示するヒストグラムである。
【図５０】Ａｄ５ＰＰＥ－１－３Ｘ－ＧＦＰを注射されたＬＬＣ肺転移を有するマウスにおけるＧＦＰ発現（図５０Ａ）及びＣｄ３１免疫染色（図５０Ｂ）の共局在を例示する顕微鏡写真である。
【図５１】大腿結紮後２日目、５日目、１０日目、及び１８日目のＰＰＥ－１ルシフェラーゼトランスジェニックマウスの筋肉（虚血及び正常）、並びに対照（非結紮動物－０日目；各群ｎ＝８）におけるルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。
【図５２】大腿結紮後５日目（ｎ＝６）、１０日目（ｎ＝６）、及び１８日目（ｎ＝８）のＰＰＥ－１ルシフェラーゼトランスジェニックマウスの肝臓、肺、及び筋肉内（虚血及び正常）大動脈、並びに対照（非結紮動物－０日目）におけるルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。
【図５３】Ａｄ５ＣＭＶＬｕｃ（黒バー）又はＡｄ５ＰＰＥ－１Ｌｕｃ（白バー）を原発腫瘍内に注射されたＬＬＣマウスの肝臓、肺、及び原発腫瘍において検出されたルシフェラーゼ活性（光単位／μｇタンパク質）を例示するヒストグラムである。
【図５４ａ－ｃ】様々なトランスジーンの組織特異的又は構成的発現の組織分布を示すイ

ンサイチュー（ｉｎ－ｓｉｔｕ）ハイブリダイゼーション画像である。
【図５４ｄ－ｈ】様々なトランスジーンの組織特異的又は構成的発現の組織分布を示すインサイチュー（ｉｎ－ｓｉｔｕ）ハイブリダイゼーション画像である。
【図５５】マウスの虚血肢における血液灌流及び血管形成に対するＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＶＥＧＦ又はＡｄ５ＣＭＶＶＥＧＦの長期間の効果を示すヒストグラムである。
【図５６ａ－ｂ】マウスの虚血肢における新生血管形成に対するＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂの初期及び長期間の効果を示すヒストグラムである。
【図５６ｃ】マウスの虚血肢における新生血管形成に対するＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂの初期及び長期間の効果を示すヒストグラムである。
【図５６ｄ】マウスの虚血肢における新生血管形成に対するＡｄ５ＰＰＥ－１－３ＸＰＤＧＦ－Ｂの初期及び長期間の効果を示すヒストグラムである。
【図５７ａ－ｂ】マウス虚血肢における新生血管形成及び血液の流れに対する内皮特異的又は構成的プロモーターの制御下での、ＰＤＧＦ－Ｂ及びＶＥＧＦを単独で又は組合せて用いた血管形成治療の長期間の効果を示す。
【図５７ｃ－ｇ】マウス虚血肢における新生血管形成及び血液の流れに対する内皮特異的又は構成的プロモーターの制御下での、ＰＤＧＦ－Ｂ及びＶＥＧＦを単独で又は組合せて用いた血管形成治療の長期間の効果を示す。
【図５８】動脈結紮後５０日目のマウス虚血肢における血液灌流に対するＰＤＧＦ－Ｂ単独での又は血管形成因子ＶＥＧＦとの組合せでの効果を示す。
【図５９】遺伝子によって指向された酵素プロドラッグ治療（ＧＤＥＰＴ）の基本原理を示す模式図である。
【図６０】プラスミドｐＥＬ８（３ｘ）－ＴＫの構造を示す模式マップである。
【図６１】ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫベクターのＰＣＲ産物をアガロースゲルで分離しＵＶ蛍光で可視化したものを示す図である。
【図６２】ベクターのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ（図６２Ａ）、ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－Ｌｕｃ（図６２Ｂ）及びＡｄＣＭＶ－ＴＫ（図６２Ｃ）の線状模式マップである。
【図６３】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの上部内皮細胞の細胞傷害性を示す一連の顕微鏡写真である。
【図６４】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの内皮細胞の細胞傷害性を示すグラフである。
【図６５】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫ及びガンシクロビルの投与の内皮細胞の細胞傷害性の優れた相乗作用を示す一連の顕微鏡写真である。
【図６６】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫ及びガンシクロビル投与の内皮細胞の細胞傷害性の相乗作用を示すグラフである。
【図６７】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫ及びガンシクロビル投与の内皮細胞の細胞傷害性の特異的相乗作用を示す一連の顕微鏡写真である。
【図６８】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫ及びガンシクロビル投与の内皮細胞の細胞傷害性の特異的相乗作用を示すヒストグラムである。
【図６９】極端に高い感染多重度におけるＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫ及びガンシクロビル投与の内皮細胞傷害性の選択的相乗作用を示す一連の顕微鏡写真である。
【図７０】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による転移腫瘍増殖の相乗抑制効果を示す一連の写真である。
【図７１】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による転移腫瘍増殖の相乗抑制効果を示すヒストグラムである。
【図７２ａ－ｂ】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による転移腫瘍病状の相乗抑制効果を示す肺への転移腫瘍塊の代表的な組織病理学的切片を示す。
【図７２ｃ】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による転移腫瘍病状の相乗抑制効果を示す肺への転移腫瘍塊の

代表的な組織病理学的切片を示す。
【図７３】誘発させたＬＬＣの肺転移腫瘍をＴＵＮＥＬと抗カスパーゼ－３で染色したものの代表的な組織病理学的切片であり、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による腫瘍アポトーシスの相乗促進を示している。
【図７４】肺転移腫瘍をＴＵＮＥＬ及び抗カスパーゼ－３で染色した、誘発させたＬＬＣの肺転移腫瘍の代表的な病理組織の切片であり、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による内皮特異的の腫瘍アポトーシスの相乗促進を示している。
【図７５ａ】マウスの肺癌由来の代表的な免疫病理組織の切片であり、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による、血管形成の内皮特異的相乗阻害を示している。
【図７５ｂ－ｃ】マウスの肺癌由来の代表的な免疫病理組織の切片であり、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による、血管形成の内皮特異的相乗阻害を示している。
【図７５ｄ】マウスの肺癌由来の代表的な免疫病理組織の切片であり、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与による、血管形成の内皮特異的相乗阻害を示している。肺転移腫瘍の血管新生（血管形成）のコンピュータを利用して行った血管密度の評価結果を示すヒストグラムである。
【図７６】マウスの肝臓の組織の代表的な病理組織の切片であり、ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内の発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与に肝毒性がないことを示している。
【図７７】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現の器官特異的発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与を説明するＲＴ－ＰＣＲ分析の結果を示す。
【図７８】Ｂａｌｂ／ｃマウスの結腸癌の腫瘍モデルの治療量以下で非毒性の照射の範囲を示すグラフである。
【図７９ａ】治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、マウス結腸癌の腫瘍増殖の相乗抑制効果を示す。ベクターを注射後１４日目の平均腫瘍容積±Ｓ．Ｅ．を示す。
【図７９ｂ】治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、マウス結腸癌の腫瘍増殖の相乗抑制効果を示す。放射線療法で処置したグループの平均腫瘍容積の経時変化を示す。
【図７９ｃ】治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、マウス結腸癌の腫瘍増殖の相乗抑制効果を示す。ＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスの平均腫瘍容積の経時変化を示す。
【図７９ｄ－ｅ】治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、マウス結腸癌の腫瘍増殖の相乗抑制効果を示す。図７９ｄは、ＡｄＣＭＶ－ＴＫ＋ＧＣＶで処置したマウスの平均腫瘍容積の経時変化を示す。図７９ｅは、対照の生理食塩水＋ＧＣＶで処置したマウスの平均腫瘍容積の経時変化を示す。
【図７９ｆ－ｇ】治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、マウス結腸癌の腫瘍増殖の相乗抑制効果を示す。図７９ｆは、ＧＣＶ無しのＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置したマウスの平均腫瘍容積の経時変化を示す。図７９ｇは、殺した日のＢａｌｂ／ＣマウスのＣＴ－２６原発腫瘍の肉眼で見た病状の代表的例である。
【図８０】治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、マウスの結腸癌の腫瘍壊死の相乗誘発を示す原発ＣＴ－２６腫瘍の代表的な病理組織の切片である。
【図８１】誘発された原発結腸癌腫瘍をＴＵＮＥＬと抗カスパーゼ－３で染色したものの

代表的な病理組織切片であり、放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、内皮細胞と腫瘍のアポトーシスの相乗促進を示している。

【図８２】抗カスパーゼ－３で染色された誘発原発結腸癌腫瘍の代表的な病理組織の切片であり、放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、内皮細胞と腫瘍のアポトーシスの相乗促進効力を示している。

【図８３】抗ＣＤ－３１で染色した肝臓組織及び誘発された原発結腸癌腫瘍の代表的な病理組織の切片であり、放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの生体内発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用によって、腫瘍の血管新生の阻害が相乗的に促進されたことを示している。

【図８４】放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現及びガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の組織特異的細胞傷害性を示すマウス肝臓組織の代表的な病理組織の切片である。

【図８５】Ｃ５７Ｂ１／６肺癌転移腫瘍モデルにおける治療線量以下の非毒性照射の範囲を示すグラフである。

【図８６ａ－ｂ】治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、マウス肺癌の転移腫瘍疾患の相乗抑制効果を示している。図８６ａは放射線を照射しベクター無しで５５日間にわたって処置したマウスの生存率を示す。図８６ｂはＡｄＰＰＥ－１（３ｘ）－ＴＫで処置したマウスの生存率を示す。

【図８６ｃ－ｄ】治療線量以下の放射線療法及びＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＴＫの発現とガンシクロビル（ＧＣＶ）の投与の併用による、マウス肺癌の転移腫瘍疾患の相乗抑制効果を示している。図８６ｃはＡｄＣＭＶ－ＴＫで処置したマウスの生存率を示す。図８６ｄは生理食塩水で処置した対照マウスの生存率を示す。

【図８７】ＣＭＶプロモーターの制御下のＦａｓ－ｃの内皮細胞の細胞傷害性を示す一連のヒストグラムである。

【図８８】ＣＭＶ－ＬＵＣ（赤色正方形）に比べて、ＣＭＶ－ＦＡＳ（青色菱形）による２９３細胞におけるウイルスの複製の増大した拡張を示すプラーク発生のグラフである。

【図８９】ＣＭＶ－ルシフェラーゼと比べて、ＣＭＶ－Ｆａｓ－ｃによるウイルス感染の細胞間の拡張（プラーキング）の高い比率を示す２９３細胞培養物の一連の写真である。

【図９０】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＦａｓ－ｃ及びドキソルビシンの投与の特異的相乗内皮細胞傷害性を示すヒストグラムである。

【図９１】エンドセリン（ＰＰＥ－１　３ｘ）の制御下のＶＥＧＦによる、遺伝子工学的に処置された組織構築物における血管形成の高い誘発を示すグラフである。

【図９２】野生型のマウスＰＰＥ－１プロモーターのＤＮＡ配列である。

【図９３】マウスの修飾されたプレプロエンドセリンプロモーターの３ｘフラグメントの配列である。

【図９４】トランスジェニックマウスのＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下のＬＵＣ遺伝子の発現が細胞特異的にＢｏｓｅｎｔａｎによって誘発されて増大することを示すヒストグラムである。

【図９５】ＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下で発現される導入遺伝子に対する宿主の免疫応答が無いこと（ＥＬＩＳＡ法で測定）を示すヒストグラムである。

【図９６】Ａｄ５デリバリー系におけるＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下でのＦａｓ－ｃキメラの発現によって、転移腫瘍肺癌の治療を行なう際の投与量の効果を示すヒストグラムである。

【図９７】Ａｄ５送達系におけるＰＰＥ－１（３ｘ）プロモーターの制御下でのＦａｓ－ｃキメラの発現による、転移腫瘍肺癌の治療に対する投与量と治療頻度の効果を示すヒストグラムである。

【配列表フリーテキスト】

【０５６８】

配列番号２、３及び９～１２は、一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号４は、Ｎｈｅ－１制限部位の配列である。

配列番号５は、低酸素応答因子Ｅ－ｂｏｘの配列である。

配列番号６は、マウス内皮特異的エンハンサー因子の配列である。

配列番号７は、ＰＰＥ－１プロモーター由来のマウスエンハンサー配列のトリプリケートコピーの配列である。

配列番号８は、ＥＤＣフラグメントの配列である。

配列番号１５及び１６は、内皮転写因子の配列の一部である。

【図１】

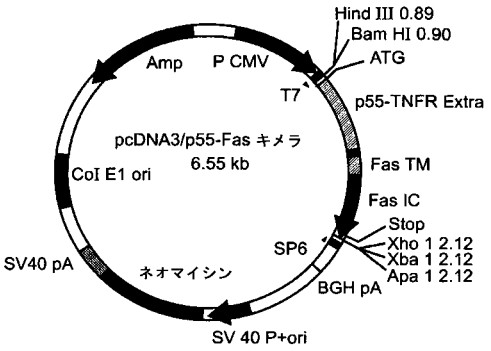


Fig. 1a

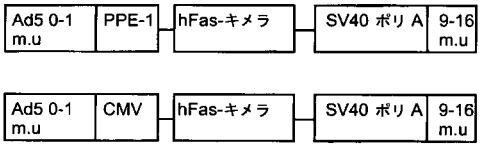


Fig. 1b

【図２】

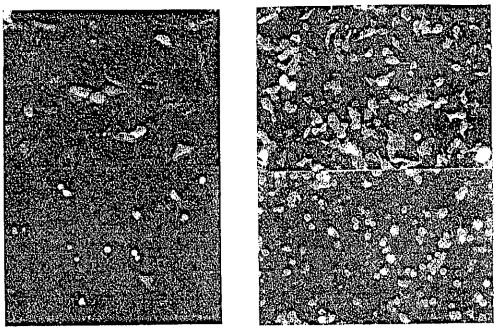


Fig. 2a Fig. 2b

【図３】

Fig. 3a

Fig. 3d

Fig. 3b

Fig. 3e

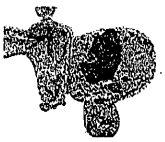


Fig. 3c

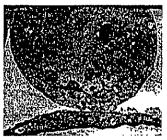
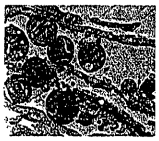


Fig. 3f



【図４】

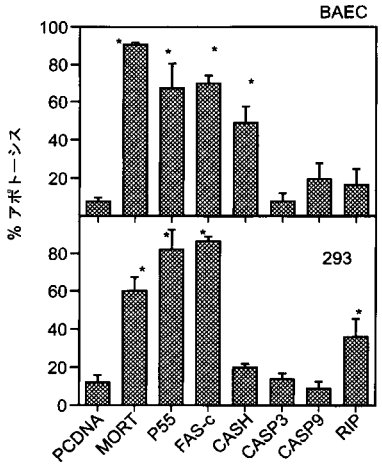


Fig. 4

【図５】

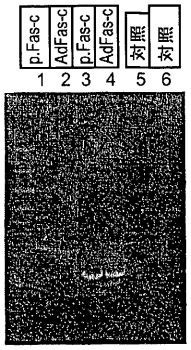


Fig. 5a

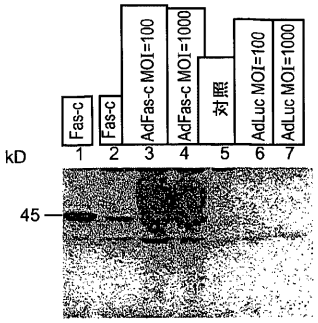


Fig. 5b

【図６ａ－ｂ】

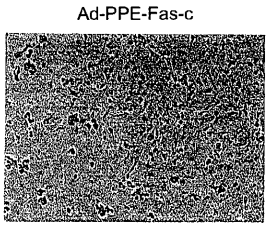


Fig. 6a

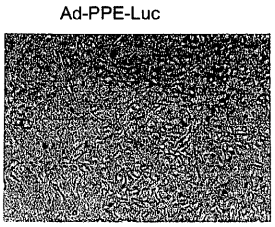


Fig. 6b

【図６ｃ－ｄ】

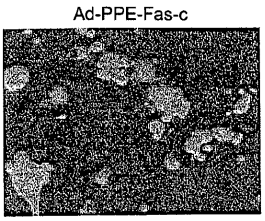


Fig. 6c

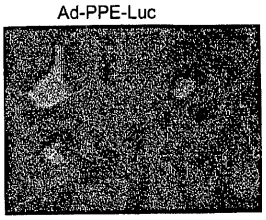


Fig. 6d

【図８】

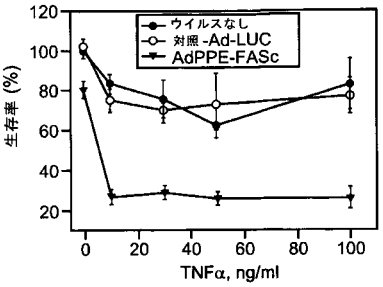


Fig. 8

【図７】

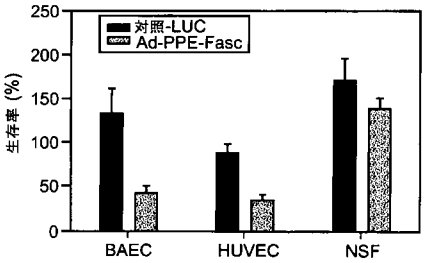


Fig. 7

【図９ａ－ｂ】

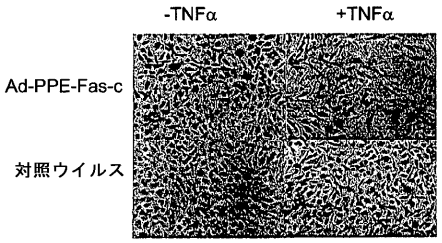


Fig. 9a

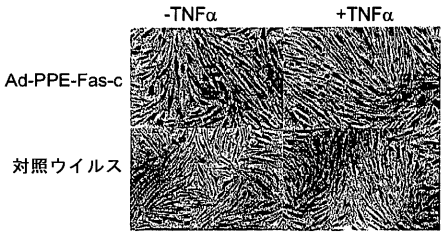


Fig. 9b

【図９ｃ－ｅ】

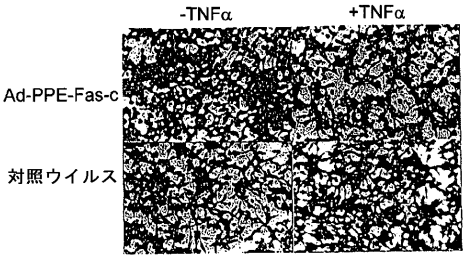


Fig. 9c

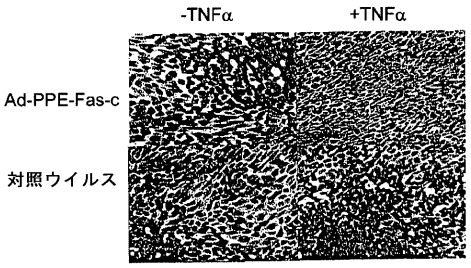


Fig. 9d

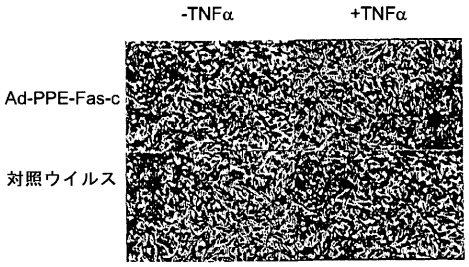


Fig. 9e

【図１０】

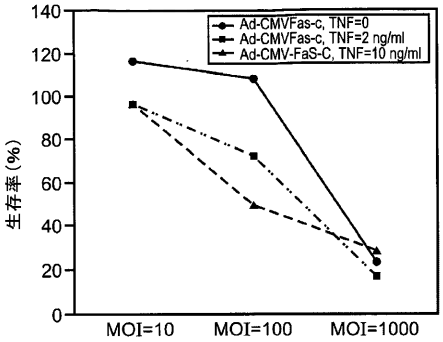


Fig. 10a

Fig. 10b

Fig. 10c

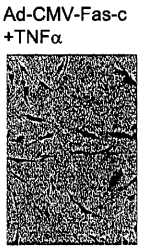


Fig. 10d

【図１１】

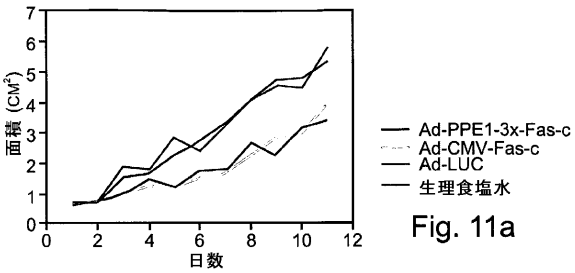


Fig. 11a

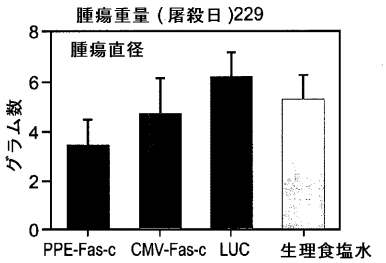


Fig. 11b

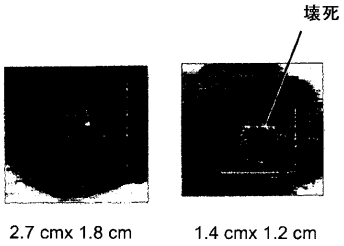


Fig. 11c

【図１２】

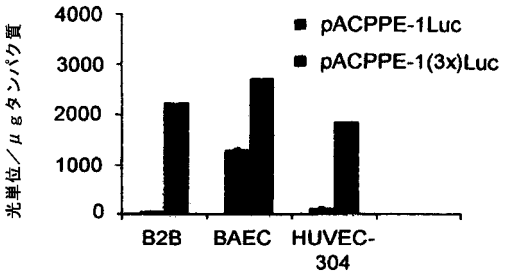


Fig. 12

【図１３】

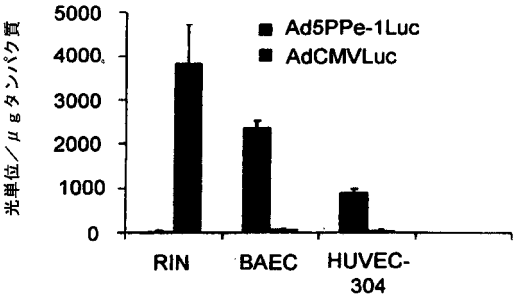


Fig. 13

【図１４】

Fig. 14a

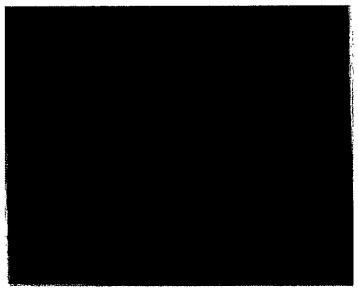


Fig. 14b

【図１５】

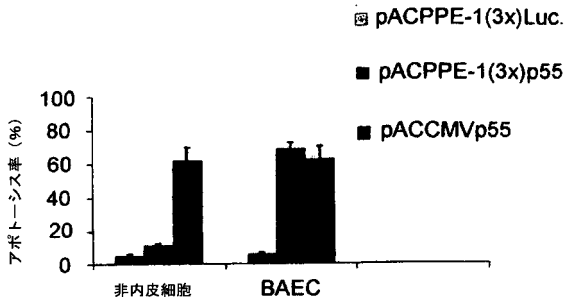


Fig. 15

【図１６】

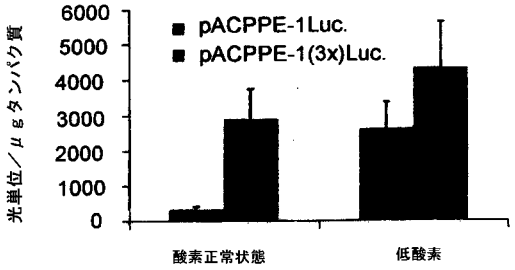


Fig. 16

【図１７】

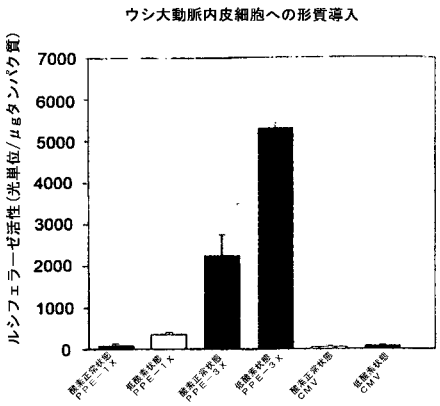


Fig. 17

【図１８】

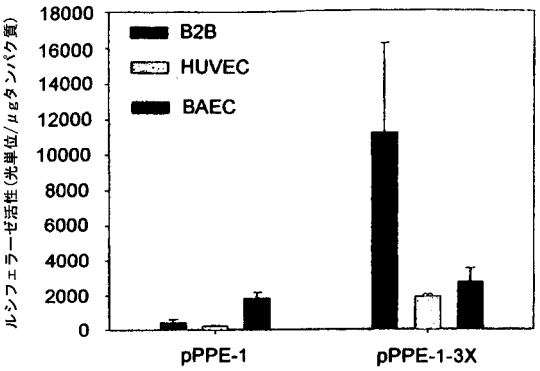


Fig. 18

【図１９】

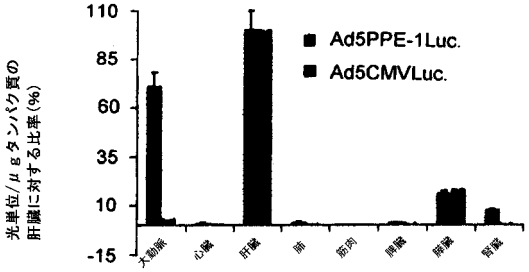


Fig. 19

【図２０】

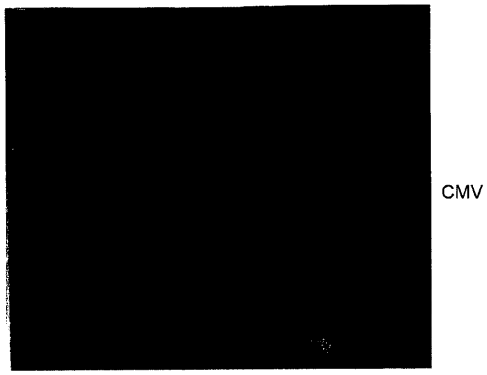


Fig. 20a

Fig. 20b

【図２１】

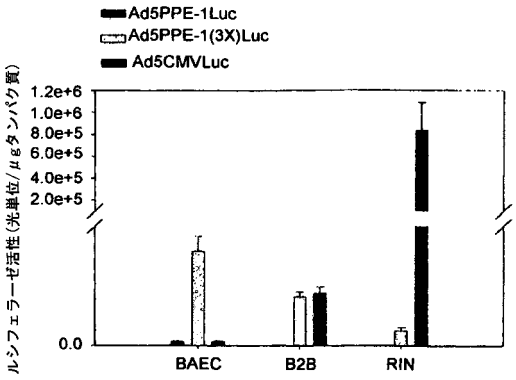


Fig. 21

【図２２】

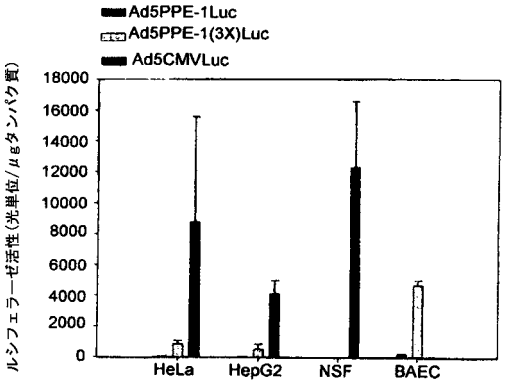


Fig. 22

【図２３】

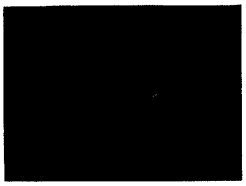


Fig. 23a

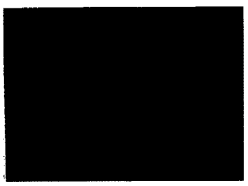


Fig. 23b

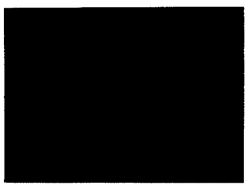


Fig. 23c

【図２４】

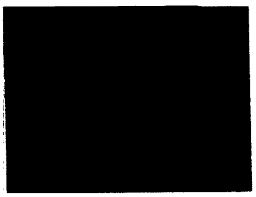


Fig. 24a

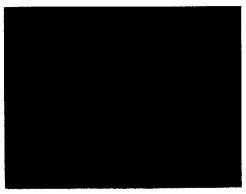


Fig. 24b

【図２５】

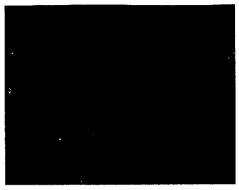


Fig. 25a

Fig. 25b

【図２６】

Fig. 26a

Fig. 26b

【図２７】

Fig. 27a

Fig. 27b

【図２８】

Fig. 28a

Fig. 28b

【図２９】

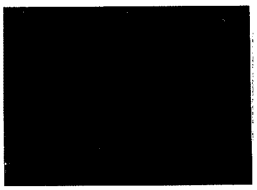


Fig. 29a

Fig. 29b

Fig. 29c

【図３０】

Fig. 30a

Fig. 30b

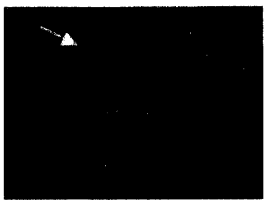


Fig. 30c

【図３１ａ－ｂ】

Fig. 31a

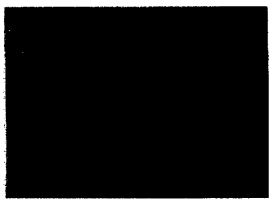


Fig. 31b

【図３１ｃ－ｄ】

Fig. 31c

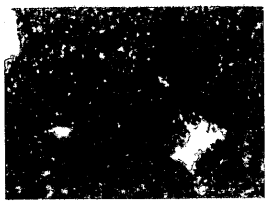


Fig. 31c'

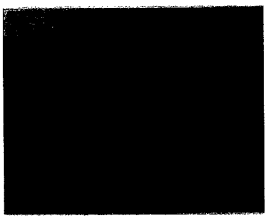


Fig. 31d

Fig. 31d'

【図３２】

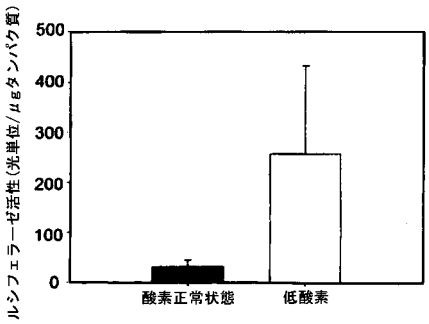


Fig. 32

【図３３】

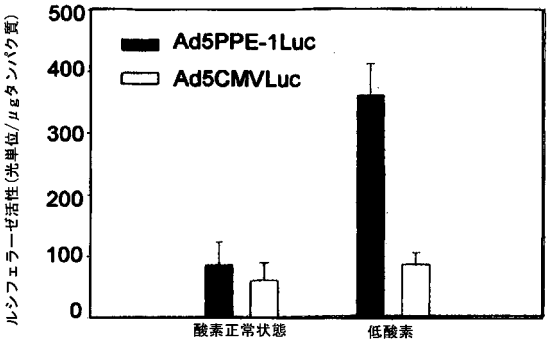


Fig. 33

【図３４】

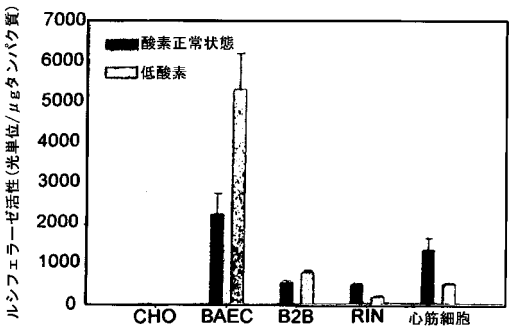


Fig. 34

【図３５】

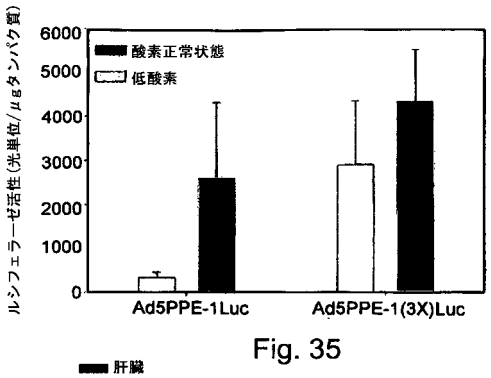


Fig. 35

【図３６】

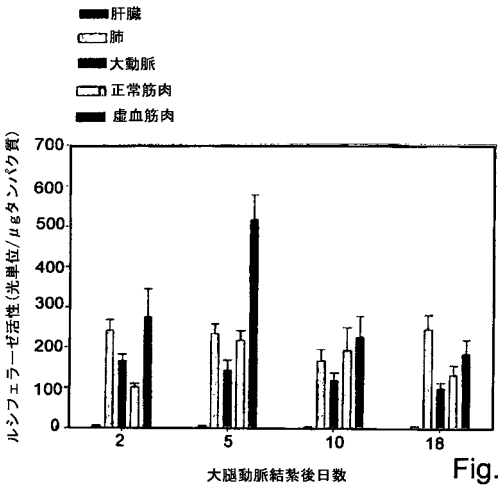


Fig. 36

【図３７ａ】

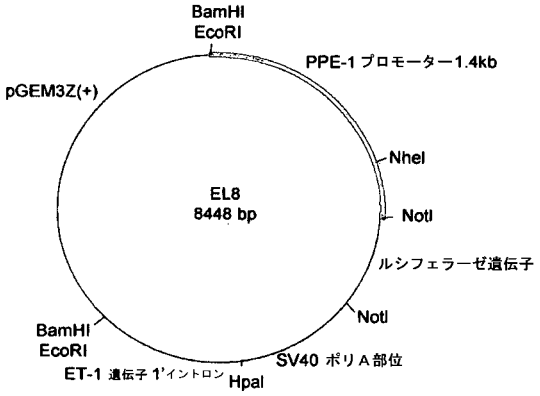


Fig. 37a

【図３７ｂ】

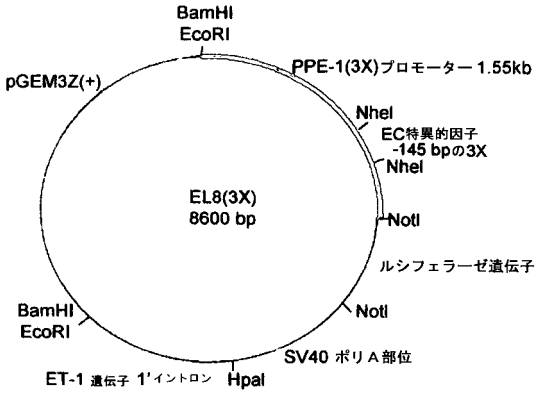


Fig. 37b

【図３８ａ－ｂ】

Fig. 38a

Fig. 38b

【図３８ｃ－ｄ】

Fig. 38c

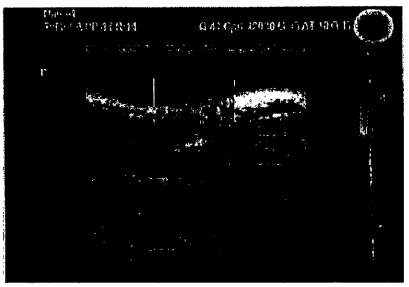


Fig. 38d

【図３８ｅ】

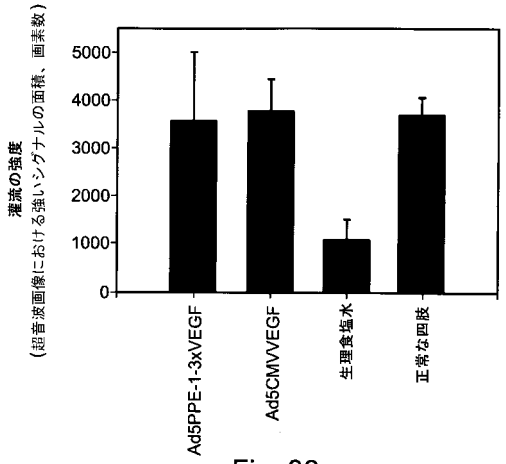


Fig. 38e

【図３８ｆ】

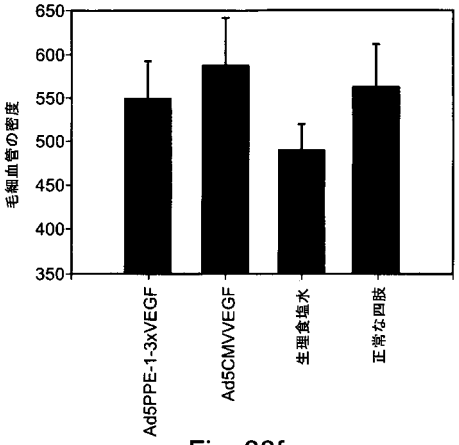


Fig. 38f

【図３９】

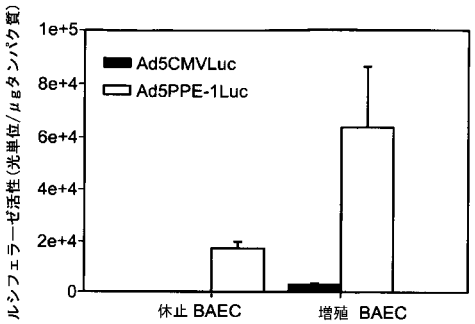


Fig. 39

【図４０】

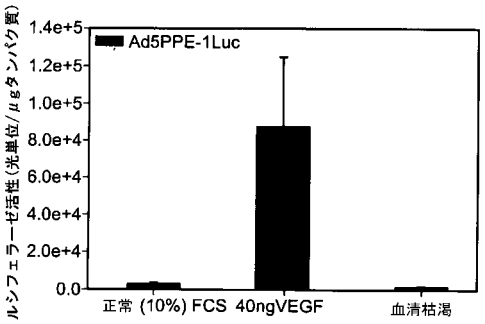


Fig. 40

【図４１】

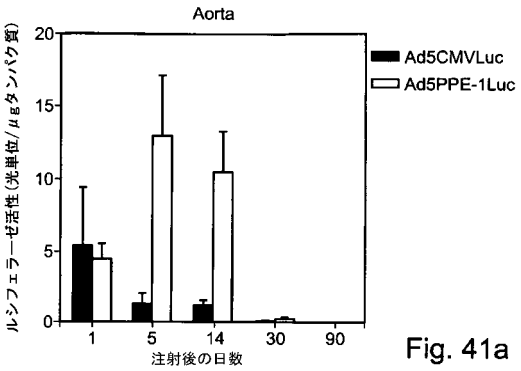


Fig. 41a

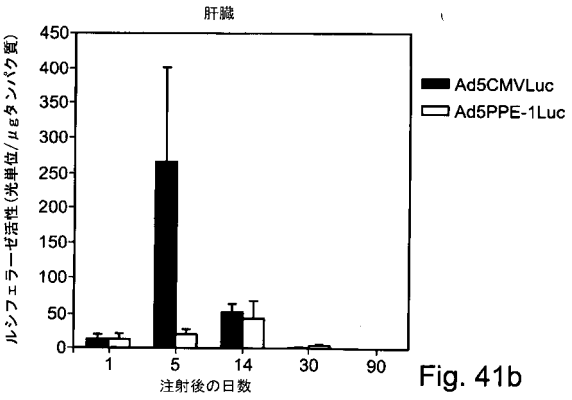


Fig. 41b

【図４２】

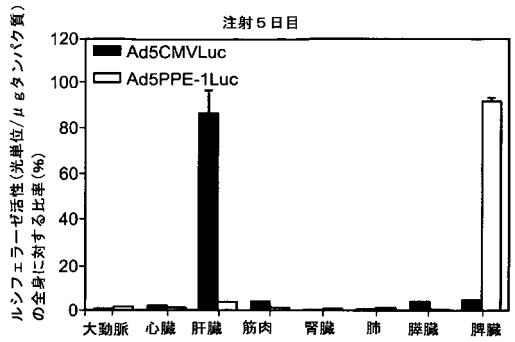


Fig. 42a

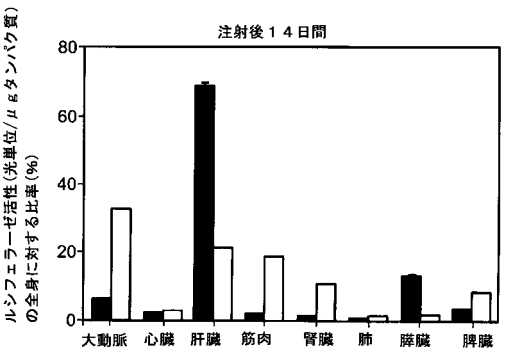


Fig. 42b

【図４３】

Fig. 43

【図４４】

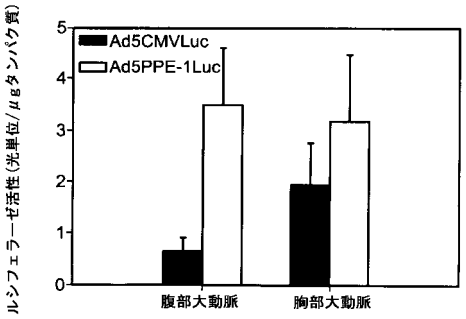


Fig. 44

【図４５】

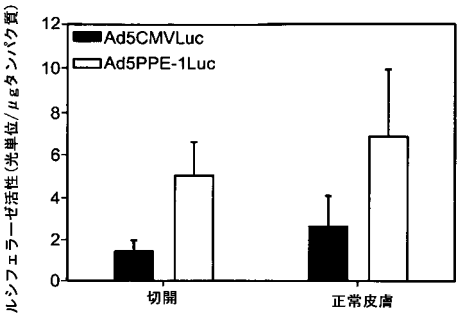


Fig. 45

【図４６】

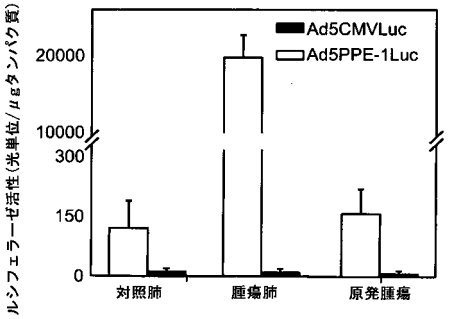


Fig. 46

【図４７ａ－ｂ】

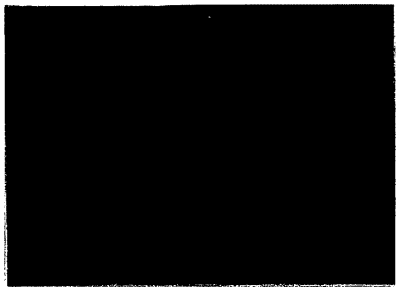


Fig. 47a

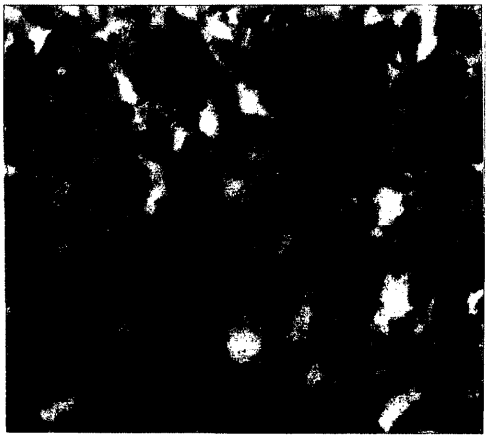


Fig. 47b

【図４７ｃ－ｄ】

Fig. 47c

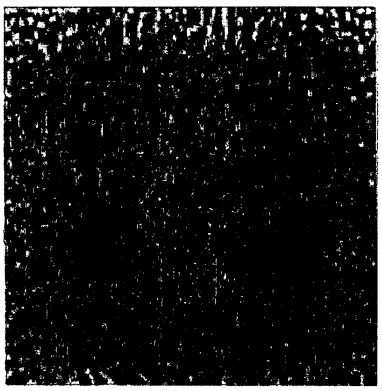


Fig. 47d

【図４８】

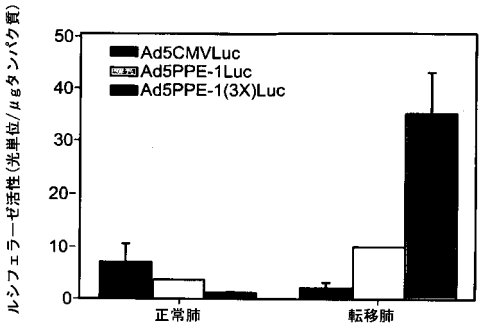


Fig. 48

【図４９】

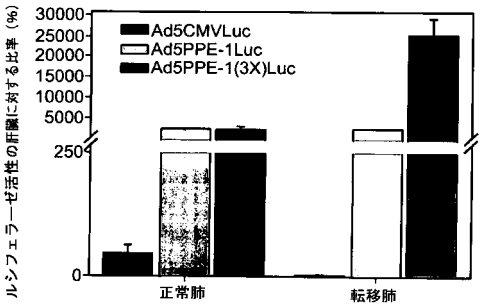


Fig. 49

【図５０】

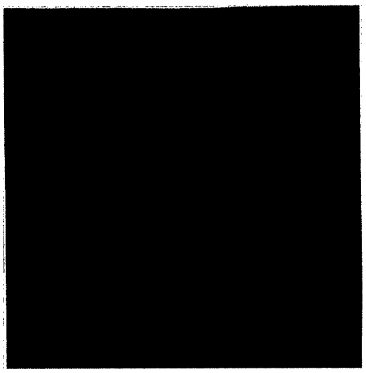


Fig. 50a

Fig. 50b

【図５１】

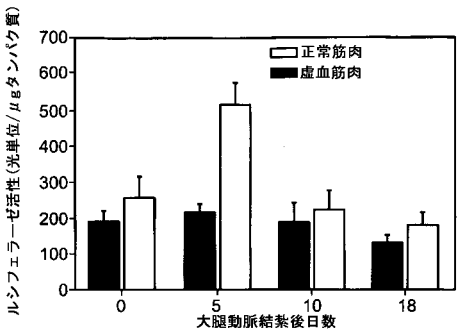


Fig. 51

【図５２】

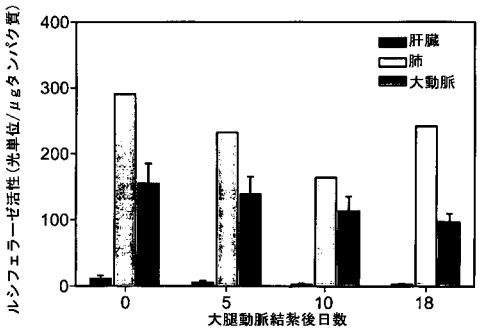


Fig. 52

【図５３】

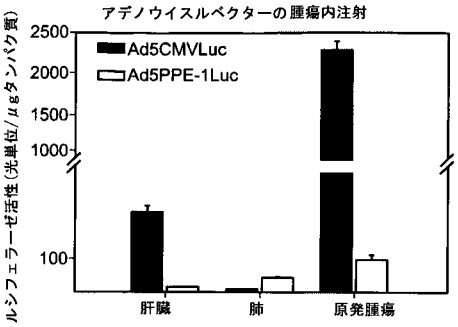


Fig. 53

【図５４ａ－ｃ】

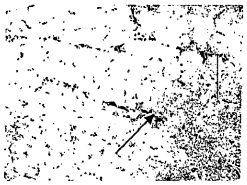


Fig. 54a

Fig. 54c

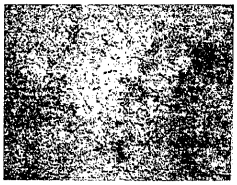


Fig. 54b

【図５４ｄ－ｈ】

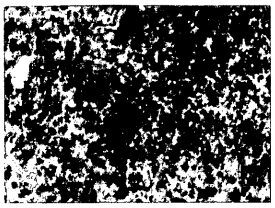


Fig. 54d

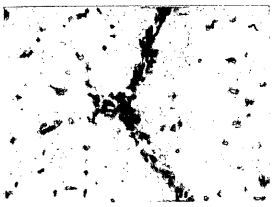


Fig. 54e

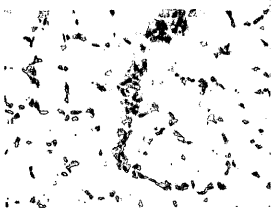


Fig. 54f

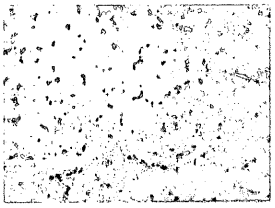


Fig. 54g

Fig. 54h

【図５５】

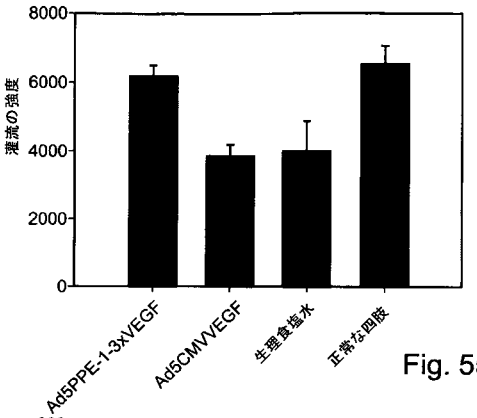


Fig. 55a

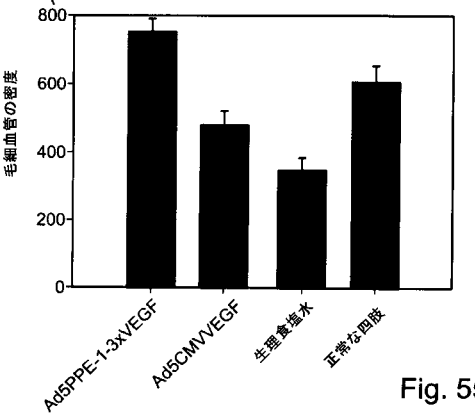


Fig. 55b

【図５６ａ－ｂ】

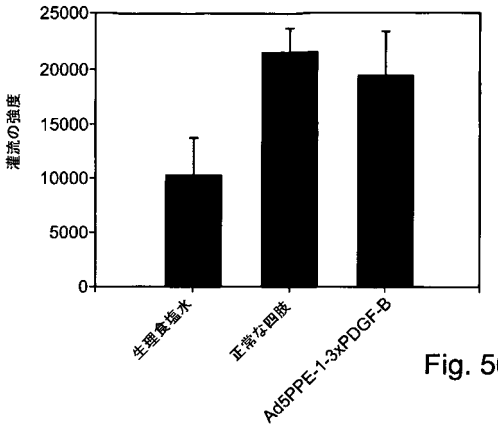


Fig. 56a

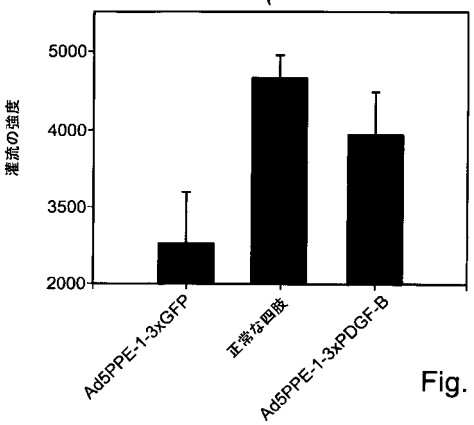


Fig. 56b

【図５６ｃ】

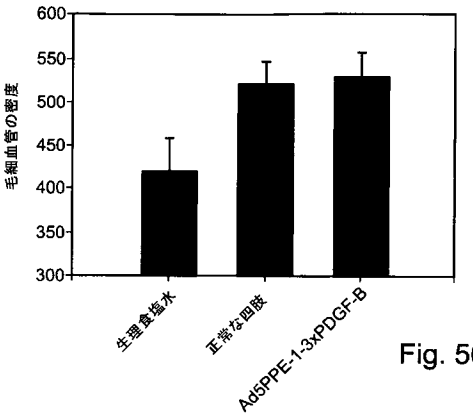


Fig. 56c

【図５６ｄ】

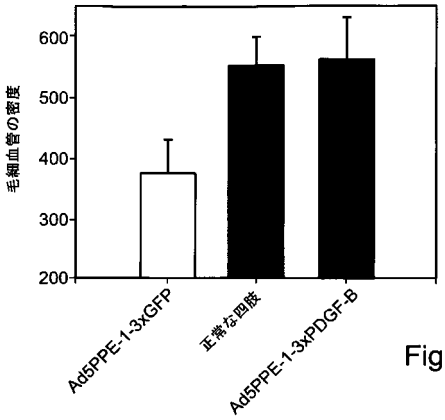


Fig. 56d

【図５７ａ－ｂ】

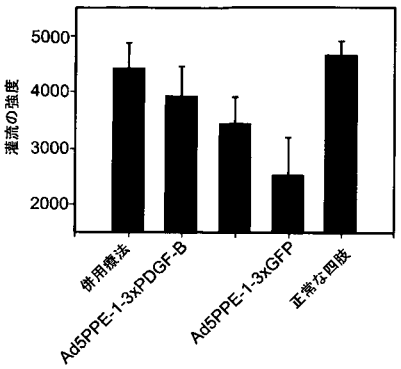


Fig. 57a

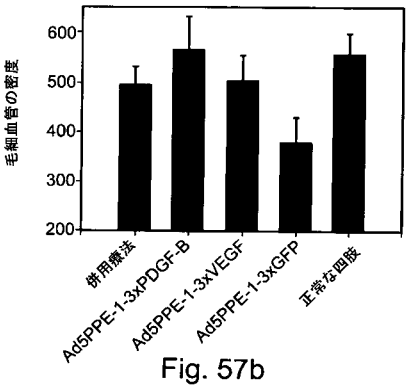


Fig. 57b

【図５７ｃ－ｇ】

Fig. 57c

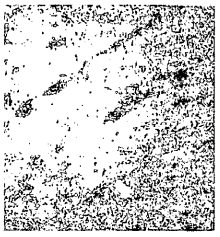


Fig. 57d

Fig. 57e

Fig. 57f

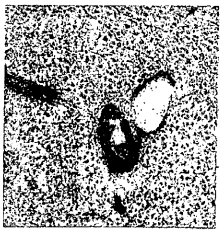


Fig. 57g

【図５８】

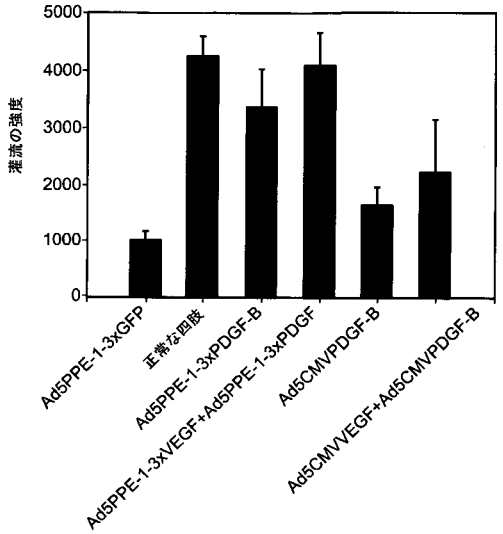


Fig. 58

【図５９】

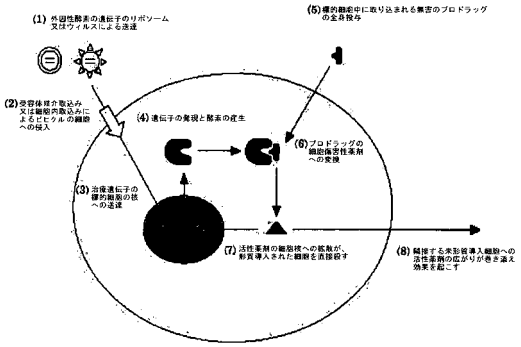


Fig. 59

【図６０】

Fig. 60A

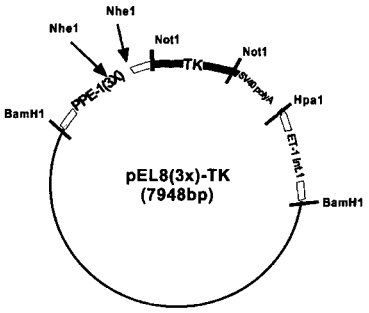
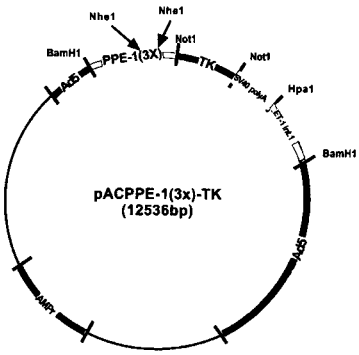


Fig. 60B



【図６１】

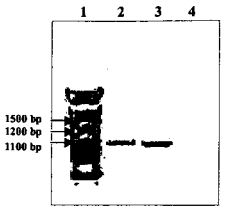


Fig. 61

【図６２】

Fig. 62a

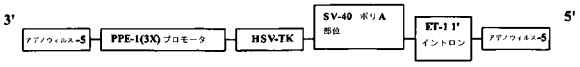


Fig. 62b.

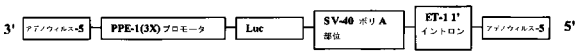
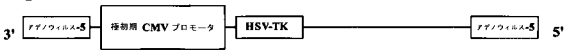


Fig. 62c.



【図６３】

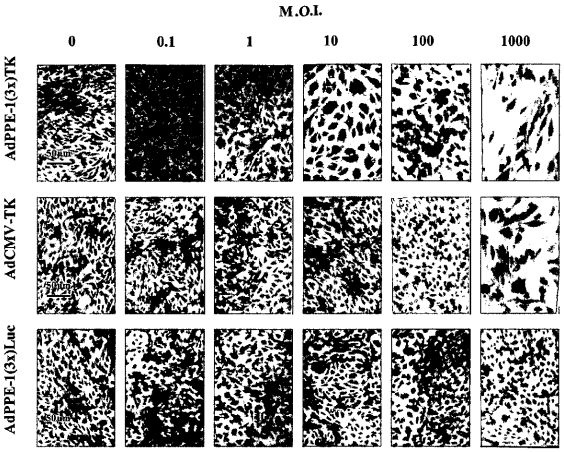


Fig. 63

【図６４】

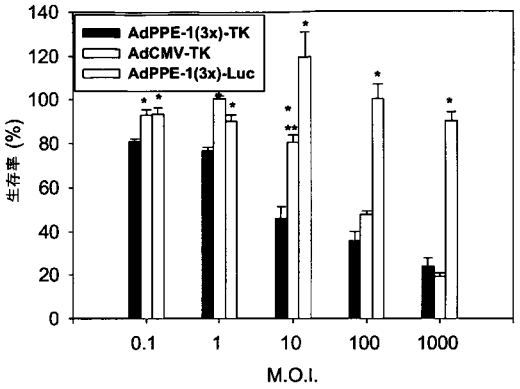


Fig. 64

【図６５】

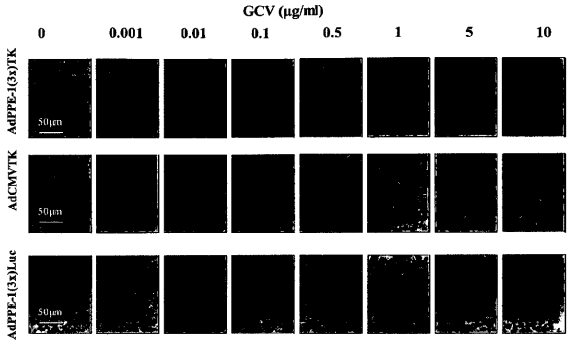


Fig. 65

【図６６】

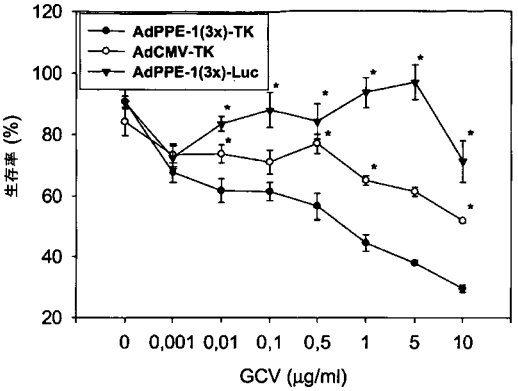


Fig. 66

【図６７】

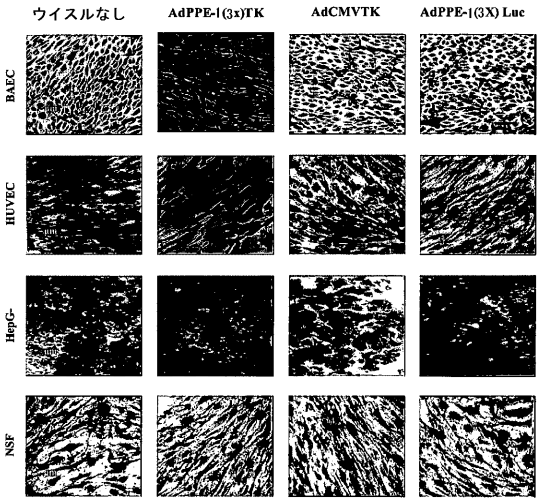


Fig. 67

【図６８】

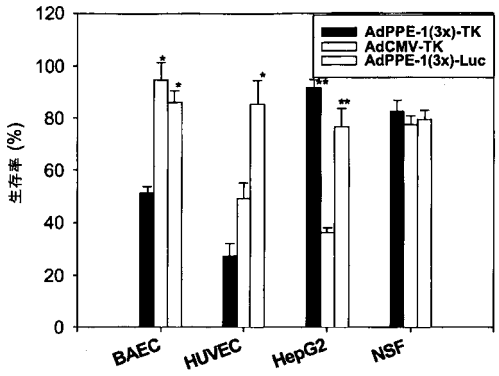


Fig. 68

【図７０】

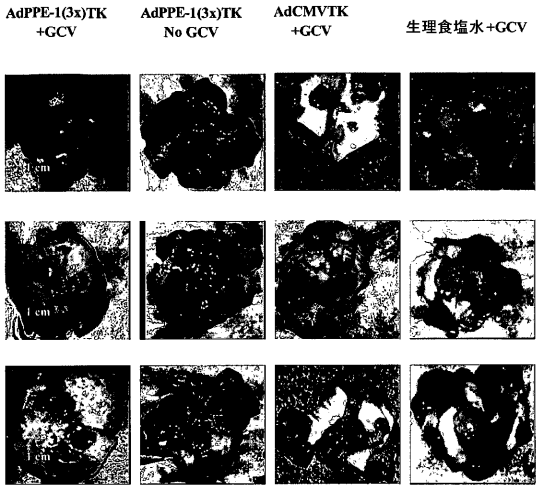


Fig. 70

【図６９】

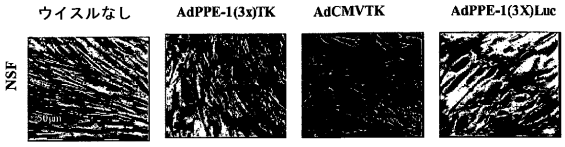


Fig. 69

【図７１】

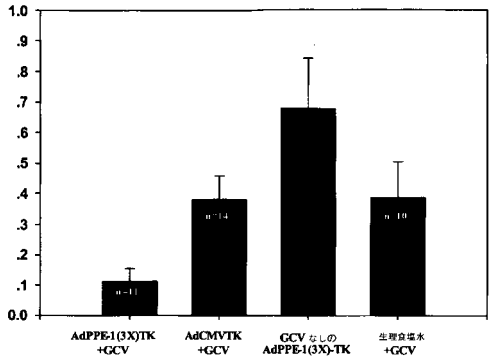


Fig. 71

【図７２ａ－ｂ】

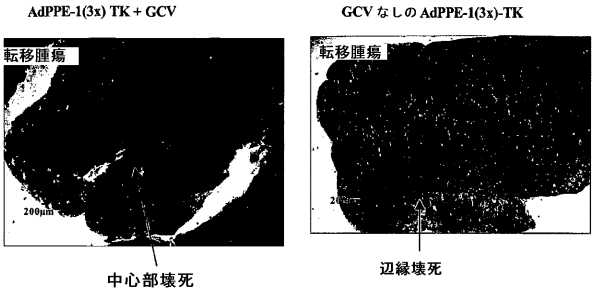


Fig. 72a

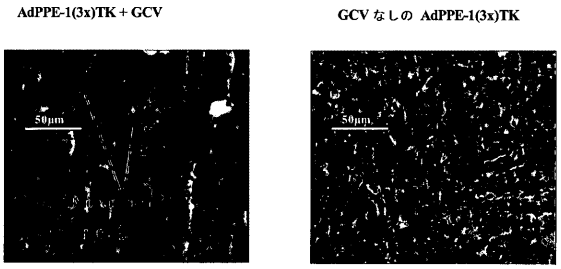


Fig. 72b

【図７２ｃ】

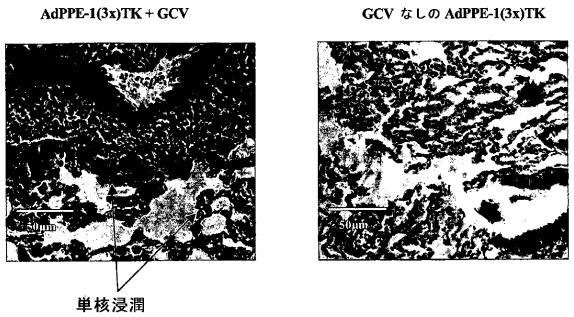


Fig. 72c

【図７３】

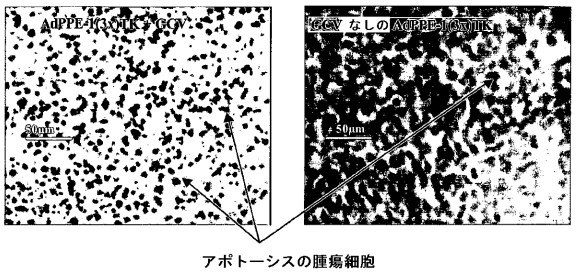


Fig. 73a

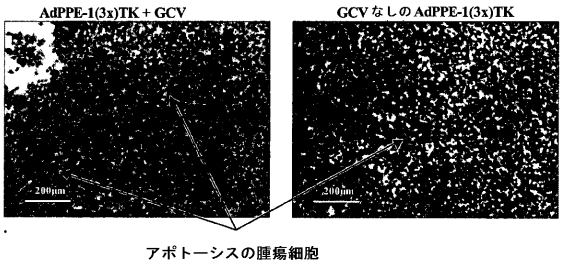


Fig. 73b

【図７４】

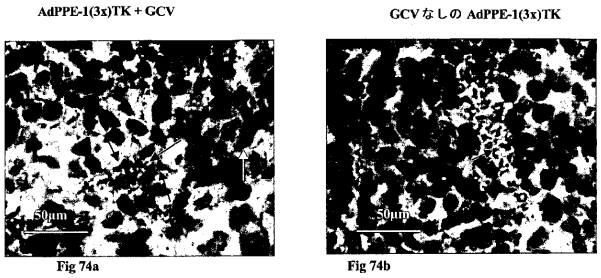


Fig 74a

Fig 74b

【図７５ａ】

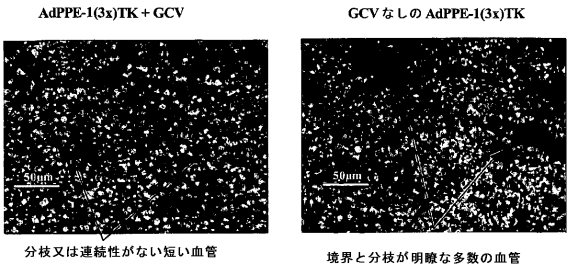


Fig. 75a

【図７５ｂ－ｃ】

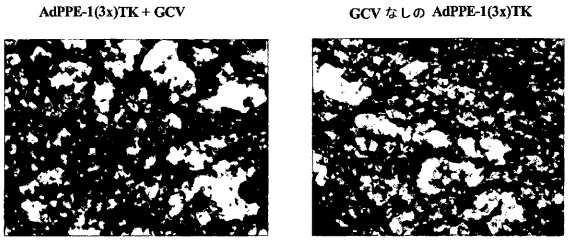


Fig. 75b

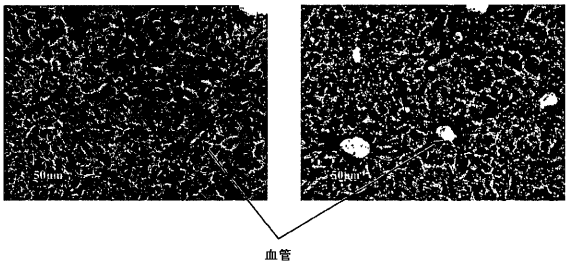


Fig. 75c

【図７５ｄ】

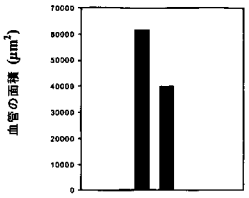


Fig. 75d

【図７６】

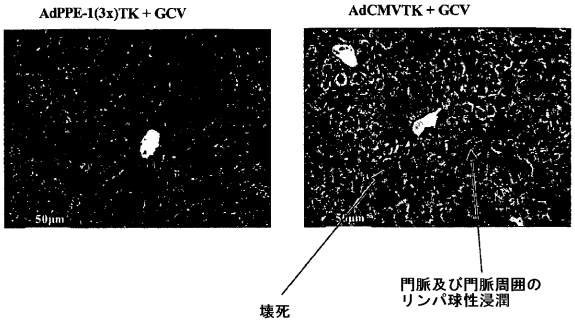


Fig. 76

【図７７】

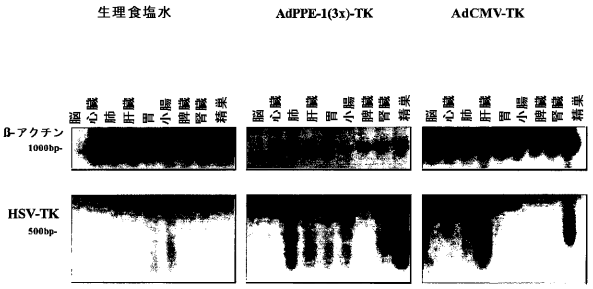


Fig. 77

【図７８】

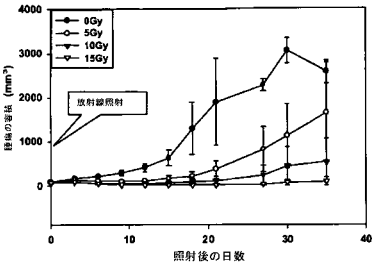


Fig. 78a

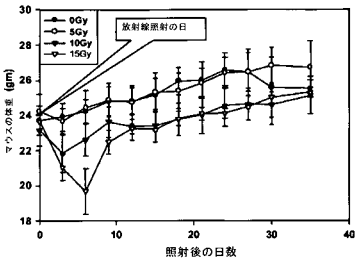


Fig. 78b

【図７９ａ】

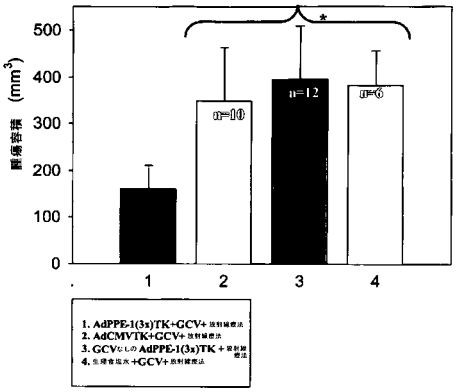


Fig. 79a

【図７９ｂ】

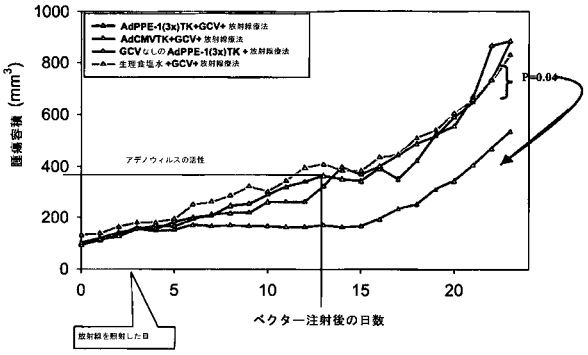


Fig. 79b

【図７９ｃ】

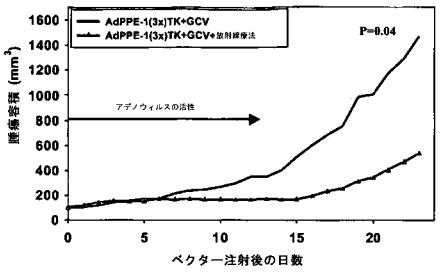


Fig. 79c

【図７９ｄ－ｅ】

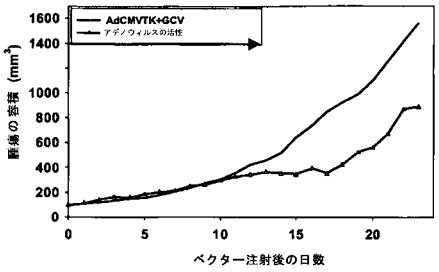


Fig. 79d

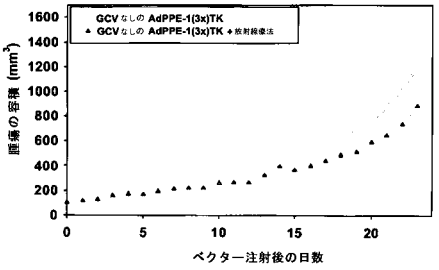


Fig. 79e

【図７９ｆ－ｇ】

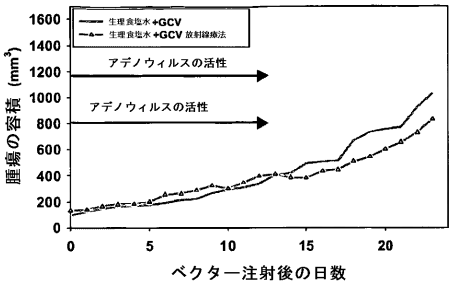


Fig. 79f

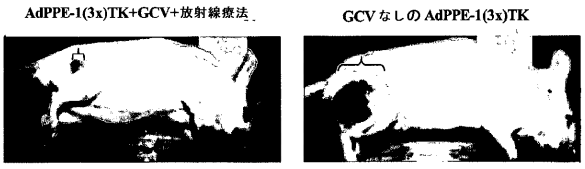


Fig. 79g

【図８０】

Fig 80a.

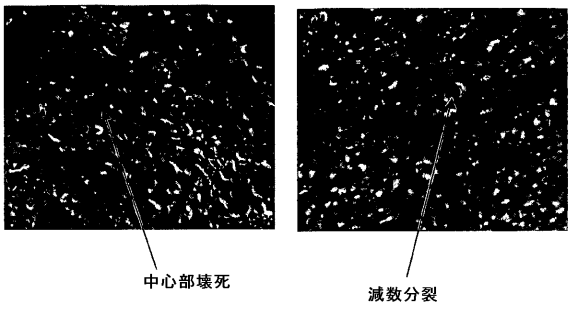
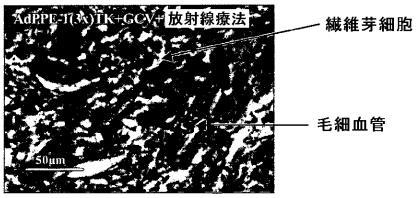


Fig 80b.



【図８１】

AdPPE-1(3x)TK+GCV+放射線療法　GCV なしの AdPPE-1(3x)TK

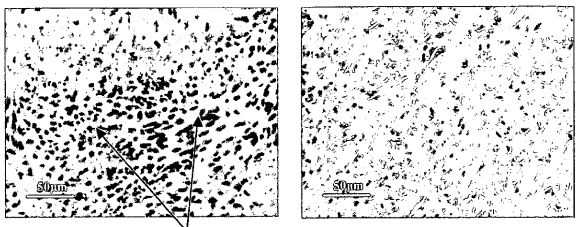


Fig. 81a

アポトーシス腫瘍細胞

AdPPE-1(3x)TK+GCV+放射線療法　GCV なしのAdPPE-1(3x)TK

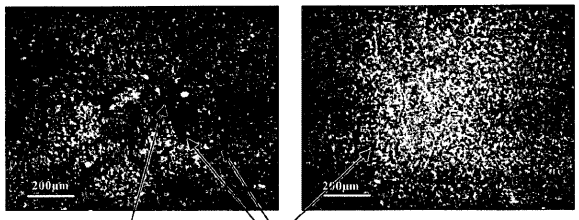


Fig. 81b

蛇行様中心部

アポトーシス腫瘍細胞

【図８２】

AdPPE-1(3x)TK+GCV+放射線療法　GCV なしの AdPPE-1(3x)TK

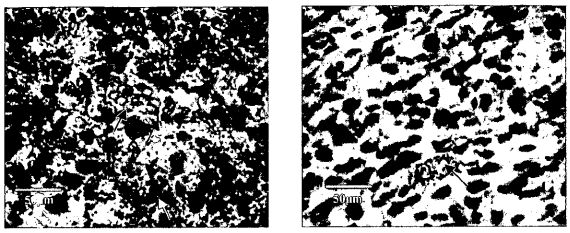


Fig. 82

【図８３】

AdPPE-1(3x)TK+GCV+放射線療法　GCVなしのAdPPE-1(3x)TK

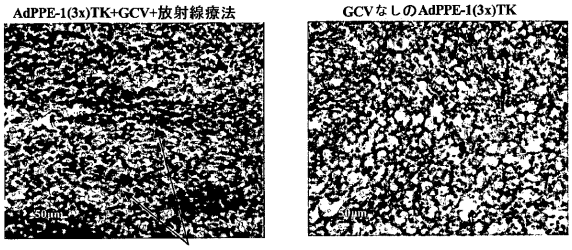


Fig. 83a

連続性なしの短い血管

AdPPE-1(3x)TK+GCV+放射線療法　GCV なしの AdPPE-1(3x)TK

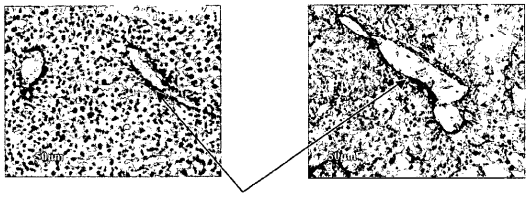


Fig. 83b

血管

【図８４】

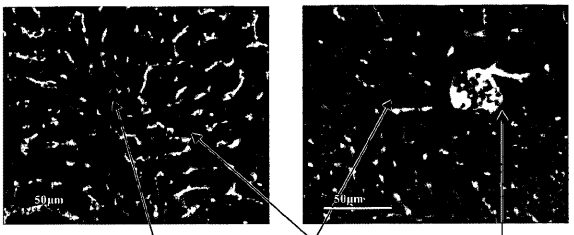


Fig. 84

クッパー細胞の過形成

拡大した肝細胞の核

内皮細胞

【図８５】

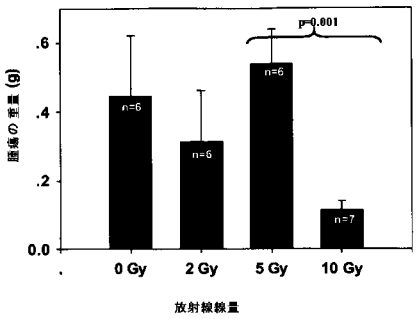
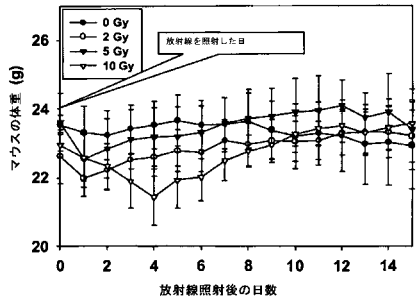


Fig 85b.



【図８６ａ－ｂ】

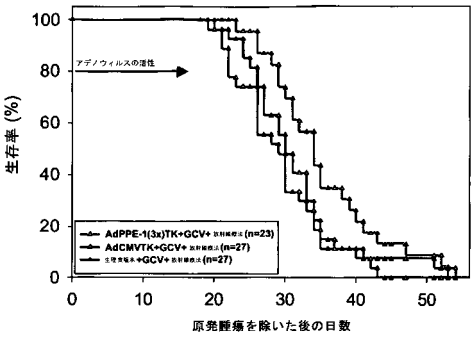
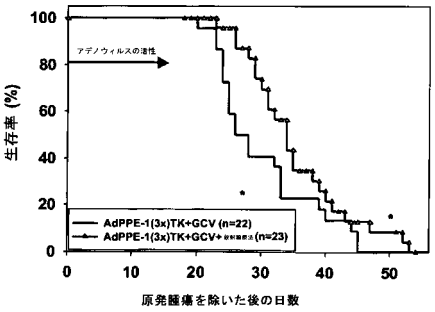


Fig. 86b.



【図８６ｃ－ｄ】

Fig. 86c.

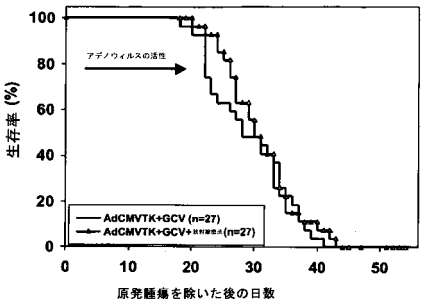
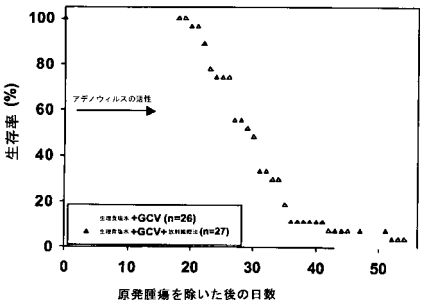


Fig. 86d.



【図８７】

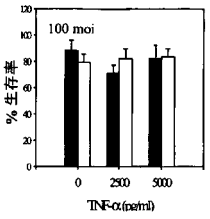


Fig. 87a

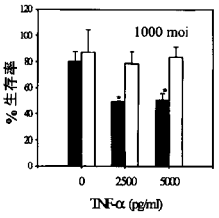


Fig. 87b

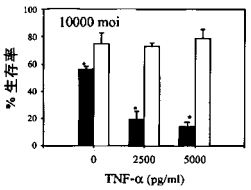


Fig. 87c

【図８８】

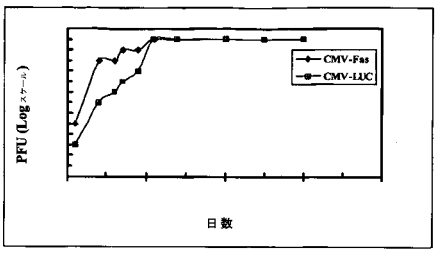


Fig. 88

【図８９】

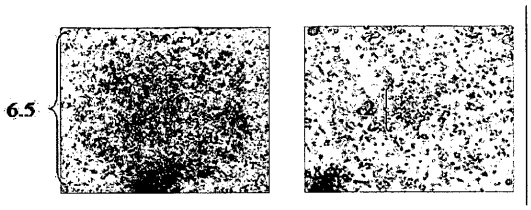


Fig. 89a Fig. 89b

【図９０】

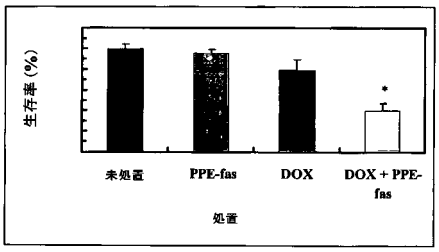


Fig. 90

【図９１】

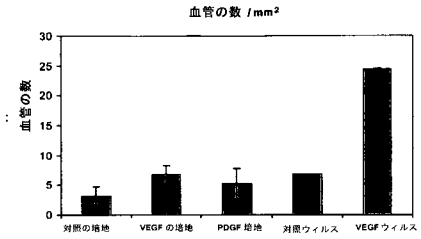


Figure 91a

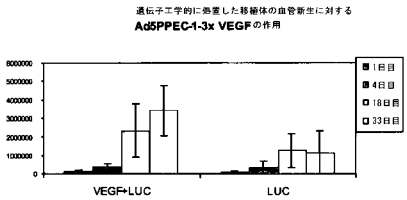


Figure 91b

【図９２】

gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtagtgta ctctgatcg gcgatactag ggagataagg atgtacctga caaaaccaca ttgttgtgt tatcattatt atttagtttt ccttccttgc taactcctga cggaatcttt ctcacctcaa atgcgaagta ctttagttta gaaaagactt ggtggaaggg gtggtggtgg aaaagtaggg tgatcttcca aactaatctg gttccccgcc cgccccagta gctgggattc aagagcgaag agtggggatc gtccccttgt ttgatcagaa agacataaaa ggaaaatcaa gtgaacaatg atcagcccca cctccacccc acccccctgc gcgcgcacaa tacaatctat ttaatt ***gtacttcatacttttcattccaatggggtgactttgcttctggag*** aaactcttg attcttgaac tctggggc***tg gcagctagca aaa***ggggaag cgggctgctg ctctctgcag gttctgcagc ggtctctgtc tagtgggtgt tttcttttc ttagccctgc ccctggattg tcagacggcg ggcgtctgcc tctgaagtta gccgtgattt cctctagagc cgggtct***tat ctctggctgc acgt***gcctg tggg***tgacta atcacacaat*** aacattgttt agggctggaa taaagtcaga gctgtttacc cccactctat aggggttcaa ***tataaaaagg*** cggcggagaa ctgtccgagt cagacgcgtt cctgcaccgg cgctgagagc ctgacccggt ctgctccgct gtccttgcgc gctgcctccc ggctgcccgc gacgctttcg ccccagtgga agggccactt gctgaggacc gcgctgagat ctaaaaaaaa aacaaaaaac aaaaaacaaa aaaacccaga ggcgatcaga gcgaccagac accgtcctct tcgttttgca ttgagttcca tttgcaaccg agttttcttt ttttcctttt tccccactct tctgacccct ttgcagaatg gattattttc ccgtgatctt ctctctgctg ttcgtgactt tccaaggagc tccagaaaca ggtaggcgcc acttgcgaat ctttctactt cagcgcagca gttatcgctt ctgttttcca cttttcttc ttctttttct ttcattcttt ccttttttatt tattttttta attactgaag ctccagcagc aagtgccttt caattaatta acttctgtgt gaagcgaaag aaataaaacc cctgtttgaa tacagctgac tacaaccgag tatcgcatag cttc-1334

Fig. 92

【図９３】

5'- gtacttcatacttttcattccaatggggtgactttgcttctggag ggtgactttgcttctggag cca gtacttcatacttttcatt gtacttcatacttttcattccaatggggtgactttgcttnctggag gctagctgccag -3'

Fig. 93

【図９４】

PPE-Luc トランスジェニックマウスに対する **Bosentan** の効果

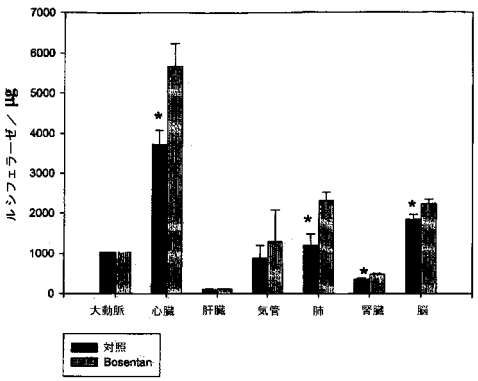


FIG. 94

【図９５】

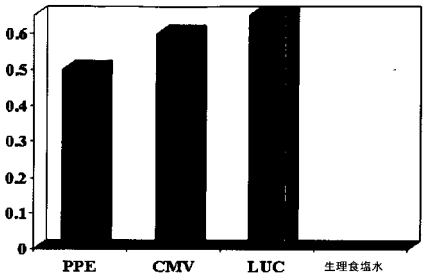


Fig. 95a

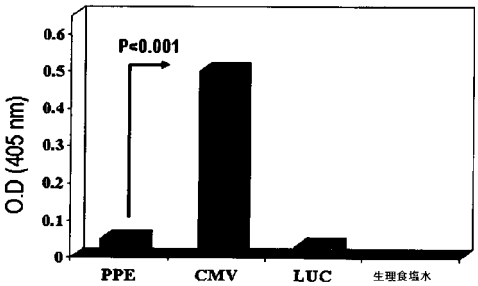


Fig. 95b

【図９６】

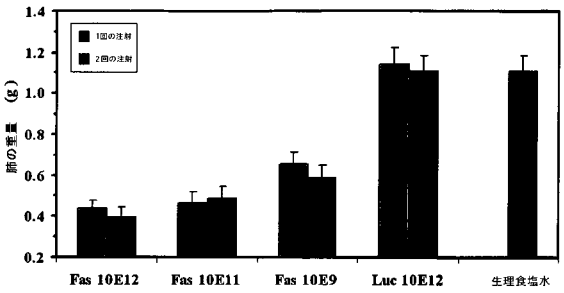


Fig. 96

【図９７】

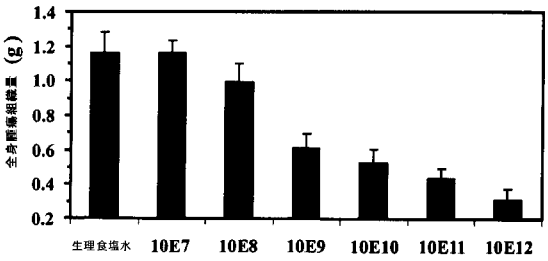


Fig. 97

【配列表】
2008519596000001.xml
【手続補正書】
【提出日】平成19年7月18日(2007.7.18)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合された配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部を含むシス調節因子を含む単離されたポリヌクレオチドであって、前記単離されたポリヌクレオチドは、真核細胞において機能的なプロモーターに転写的に連結された場合に、それに転写的に連結されたポリヌクレオチド配列の真核細胞における転写を増大させることができる、単離されたポリヌクレオチド。
【請求項２】
前記配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部は、前記シス調節因子中の前記配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部の上流に配置される、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項３】
前記配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部は、前記シス調節因子中の前記配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部の上流に配置される、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項４】

前記シス調節因子は、配列番号：６に記載の配列の少なくとも一つのコピーをさらに含む、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項５】
前記配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部は、リンカーポリヌクレオチドの配列を介して前記配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合される、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項６】
前記リンカーポリヌクレオチドの配列は、プロモーター及び／又はエンハンサー因子である、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項７】
前記シス調節因子は、配列番号：６に記載の配列の少なくとも二つのコピーをさらに含む、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項８】
前記配列番号：６に記載の配列の少なくとも二つのコピーは、隣接している、請求項７に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項９】
配列番号：１に記載の配列の少なくとも一つのコピーをさらに含む、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１０】
低酸素応答因子をさらに含む、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１１】
前記低酸素応答因子は、配列番号：５に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含む、請求項１０に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１２】
前記シス調節因子は、配列番号：７に記載される、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１３】
請求項１～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、核酸構築物。
【請求項１４】
前記シス調節因子の調節制御下で配置された核酸配列をさらに含む、請求項１３に記載の核酸構築物。
【請求項１５】
前記核酸配列は、血管形成調節因子をコードする、請求項１４に記載の核酸構築物。
【請求項１６】
前記核酸配列は、ＶＥＧＦ、ｐ５５、アンギオポエチン－１、ｂＦＧＦ、及びＰＤＧＦ－ＢＢからなる群から選択される、請求項１４に記載の核酸構築物。
【請求項１７】
条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項１３に記載の核酸構築物。
【請求項１８】
請求項１３に記載の核酸構築物を含む、細胞。
【請求項１９】
請求項１８に記載の細胞で接種される、スカフォルド。
【請求項２０】
前記スカフォルドは、合成ポリマー、細胞接着分子、又は細胞外マトリックスタンパク質で構成されている、請求項１９に記載のスカフォルド。
【請求項２１】
前記合成ポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ヒドロキシアパタイト（ＨＡ）、ポリグリコール酸（ＰＧＡ）、ポリ－１－ラクチドで強化されたε－カプロラクトンと１－乳酸の編物（ＫＮ－ＰＣＬＡ）、同織布（ＷＶ－ＰＣＬＡ）、相互に結合された多孔質カルシウムヒドロキシアパタイトセラミックス（ＩＰ－ＣＨＡ）、ポリＤ，Ｌ－乳

酸－ポリエチレングリコール（ＰＬＡ－ＰＥＧ）、不飽和ポリエステルポリ（プロピレングリコール－コ－フマル酸）（ＰＰＦ）、ポリラクチド－コ－グリコリド（ＰＬＡＧＡ）、ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）、ポリ－４－ヒドロキシブチレート（Ｐ４ＨＢ）及びポリフォスファゼンからなる群から選択される、請求項２０に記載のスカフォルド。

【請求項２２】

前記細胞接着分子は、インテグリン、細胞間接着分子（ＩＣＡＭ）１、Ｎ－ＣＡＭ、カドヘリン、テネイシン、ギセリン、及び神経損傷誘発タンパク質２（ニンジュリン２）からなる群から選択される、請求項２０に記載のスカフォルド。

【請求項２３】

前記細胞外マトリックスタンパク質は、フィブリノーゲン、コラーゲン、フィブロネクチン、ビメンチン、微小管結合タンパク質１Ｄ、神経突起生成因子（ＮＯＦ）、細菌セルロース（ＢＣ）、ラミニン、及びゼラチンからなる群から選択される、請求項２０に記載のスカフォルド。

【請求項２４】

医薬としての請求項１～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドの使用。

【請求項２５】

真核細胞において対象の核酸配列を発現させる方法であって、請求項１～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドの転写制御下に配置された対象の核酸配列を含む核酸構築物を前記細胞において発現させることを含む、方法。

【請求項２６】

前記対象の核酸配列は、細胞傷害性因子、血管形成因子、レポータータンパク質、増殖因子、およびプロアポトーシス因子からなる群から選択される、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

請求項１３～１７のいずれかに記載の核酸構築物を組織において発現させることを含む、組織において血管形成を調節する方法。

【請求項２８】

必要とする被験者の組織において血管形成を調節するための医薬の製造のための、請求項１３～１７のいずれかに記載の核酸構築物の使用。

【請求項２９】

前記核酸構築物は請求項１４～１７のいずれかに記載のものであり、前記核酸配列はプロ血管形成因子をコードし、前記血管形成を調節することは血管形成をアップレギュレートすることである、請求項２８に記載の使用。

【請求項３０】

前記核酸構築物は請求項１４～１７のいずれかに記載のものであり、前記核酸配列は血管形成の阻害剤をコードし、前記血管形成を調節することは血管形成をダウンレギュレートすることである、請求項２８に記載の使用。

【請求項３１】

前記核酸構築物は、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項２８～３０のいずれかに記載の使用。

【請求項３２】

（ａ）内皮細胞特異的プロモーター；

（ｂ）配列番号：５に記載の低酸素応答因子の少なくとも一つのコピー；及び

（ｃ）血管形成調節因子をコードしかつ前記プロモーター及び前記低酸素応答因子の調節制御下にある核酸配列

を含む核酸構築物を、組織において発現させることを含む、組織において血管形成を調節する方法。

【請求項３３】

前記組織は、自然の組織又は遺伝子工学的に処置された組織である、請求項３２に記載

の方法。
【請求項３４】
前記内皮細胞特異的プロモーターは、配列番号：１６に記載の配列の少なくとも一部に共有結合された配列番号：１５に記載の配列の少なくとも一部をさらに含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３５】
前記内皮細胞特異的プロモーターは、配列番号：７に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３６】
前記核酸構築物は、配列番号：６に記載の配列の少なくとも一つのコピーをさらに含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３７】
前記配列番号：６に記載の配列の少なくとも一つのコピーは、二つの隣接するコピーを含む、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記内皮細胞特異的プロモーターは、配列番号：１に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３９】
前記血管形成調節因子をコードする核酸配列は、ＶＥＧＦ、ｐ５５、アンギオポエチン－１、ｂＦＧＦ、及びＰＤＧＦ－ＢＢからなる群から選択される、請求項３２に記載の方法。
【請求項４０】
前記核酸構築物は、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項４１】
（ａ）細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合されたリガンド結合ドメインを含むキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域；及び
（ｂ）特定の組織又は細胞における前記キメラポリペプチドの発現を指向させることができるシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域
を含む核酸構築物であって、前記リガンド結合ドメインは前記特定の組織又は細胞に存在するリガンドに結合できるように選択され、前記リガンド結合ドメインへの前記リガンドの結合は前記細胞傷害性分子の前記エフェクタードメインを活性化する、核酸構築物。
【請求項４２】
前記（ｂ）のシス調節因子は、血管形成細胞の部分集団における発現を特異的に指向させることができる、請求項４１に記載の核酸構築物。
【請求項４３】
前記（ｂ）のシス調節因子は、請求項１～５および７～９のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、請求項４１に記載の核酸構築物。
【請求項４４】
前記シス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター、及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的プロモーターである、請求項４１～４３のいずれかに記載の核酸構築物。
【請求項４５】
前記リガンド結合ドメインは、細胞表面受容体のリガンド結合ドメインである、請求項４１に記載の核酸構築物。
【請求項４６】

前記細胞表面受容体は、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリンキナーゼ、受容体トレオニンキナーゼ、細胞接着分子、及びホスファターゼ受容体からなる群から選択される、請求項４５に記載の核酸構築物。
【請求項４７】
前記細胞傷害性分子は、Ｆａｓ、ＴＮＦＲ、及びＴＲＡＩＬからなる群から選択される、請求項４１に記載の核酸構築物。
【請求項４８】
条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項４１に記載の核酸構築物。
【請求項４９】
低酸素応答因子をさらに含む、請求項４１に記載の核酸構築物。
【請求項５０】
前記低酸素応答因子は、配列番号：５に記載の配列の少なくとも一つのコピーを含む、請求項４９に記載の核酸分子構築物。
【請求項５１】
請求項４１～５０のいずれかに記載の核酸構築物で形質転換された、真核細胞。
【請求項５２】
請求項４１～５０のいずれかに記載の核酸構築物を組織において発現させることを含む、組織において血管形成をダウンレギュレートする方法。
【請求項５３】
前記リガンド結合ドメインのリガンドを組織に提供する工程をさらに含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
相乗作用方式で前記細胞傷害分子の細胞傷害効果をさらに高めることができるように選択される、少なくとも一つの化学療法及び／又は放射線療法化合物を併用して組織に提供することをさらに含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５５】
有効成分として請求項４１～５０のいずれかに記載の核酸構築物を含む、組織において血管形成をダウンレギュレートするための医薬組成物。
【請求項５６】
少なくとも一つの化学療法化合物をさらに含む、請求項５５に記載の医薬組成物。
【請求項５７】
前記核酸構築物は、少なくとも1×10^{8}個のアデノウイルス粒子を含む、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項５５に記載の医薬組成物。
【請求項５８】
過剰の血管新生に関連する疾患又は症状を治療するための医薬の製造のための、請求項４１～５０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項５９】
医薬としての、請求項４１～５０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項６０】
（ａ）細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合されたリガンド結合ドメインを含むキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域；及び
（ｂ）腫瘍の細胞における前記キメラポリペプチドの発現を指向させるためのシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域
を含む核酸構築物の、腫瘍を治療するための医薬の製造のための使用であって、前記リガンド結合ドメインは前記腫瘍の細胞中に存在するか又はそれに提供されるリガンドに結合できるように選択され、前記リガンド結合ドメインへの前記リガンドの結合は前記細胞傷害性分子の前記エフェクタードメインを活性化し、それにより前記腫瘍の細胞において細胞傷害性を指向させる、使用。
【請求項６１】
前記（ｂ）のシス調節因子は、請求項１～８および１０～１２のいずれかに記載の単離

されたポリヌクレオチドを含む、請求項６０に記載の使用。
【請求項６２】
少なくとも一つの追加の化学療法及び／又は放射線療法を併用して前記組織に提供することをさらに含み、前記追加の療法は相乗作用方式で前記細胞傷害性をさらに高めることができるように選択される、請求項６０に記載の使用。
【請求項６３】
前記シス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター、及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的プロモーターを含む、請求項６０に記載の使用。
【請求項６４】
前記リガンド結合ドメインは、細胞表面受容体のリガンド結合ドメインである、請求項６０に記載の使用。
【請求項６５】
前記細胞表面受容体は、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリンキナーゼ、受容体トレオニンキナーゼ、細胞接着分子、及びホスファターゼ受容体からなる群から選択される、請求項６４に記載の使用。
【請求項６６】
前記細胞傷害性分子は、Ｆａｓ、ＴＮＦＲ、及びＴＲＡＩＬからなる群から選択される、請求項６０に記載の使用。
【請求項６７】
前記核酸構築物は、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項６０に記載の使用。
【請求項６８】
有効成分として核酸構築物及び医薬的に許容できる担体を含む、被験者の組織において血管形成をダウンレギュレートするための医薬組成物であって、前記核酸構築物は、
（ａ）細胞傷害性分子のエフェクタードメインに融合されたリガンド結合ドメインを含むキメラポリペプチドをコードする第一ポリヌクレオチド領域；及び
（ｂ）血管形成細胞の部分集団における前記キメラポリペプチドの発現を指向させるためのシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域
を含み、前記リガンド結合ドメインは、前記特定の組織又は細胞中に存在するリガンドに結合できるように選択され、前記リガンド結合ドメインへの前記リガンドの結合は前記細胞傷害性分子の前記エフェクタードメインを活性化する、医薬組成物。
【請求項６９】
前記（ｂ）のシス調節因子は、請求項１～８および１０～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７０】
少なくとも一つの追加の化学療法及び／又は放射線療法を併用して前記組織に提供することをさらに含み、前記追加の療法は相乗作用方式で前記細胞傷害性分子の細胞傷害効果をさらに高めることができるように選択される、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７１】
前記シス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター、及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的プロモー

ターを含む、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７２】
前記リガンド結合ドメインは、細胞表面受容体のリガンド結合ドメインである、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７３】
前記細胞表面受容体は、受容体チロシンキナーゼ、受容体セリンキナーゼ、受容体トレオニンキナーゼ、細胞接着分子、及びホスファターゼ受容体からなる群から選択される、請求項７２に記載の医薬組成物。
【請求項７４】
前記細胞傷害性分子は、Ｆａｓ、ＴＮＦＲ、及びＴＲＡＩＬからなる群から選択される、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７５】
前記核酸構築物は、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７６】
少なくとも一つの化学療法化合物をさらに含む、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７７】
少なくとも1×10^{8}のアデノウイルス粒子を含む、請求項６８に記載の医薬組成物。
【請求項７８】
（ａ）プロ血管形成因子をコードする第一ポリヌクレオチド領域；及び
（ｂ）血管形成細胞の部分集団におけるプロ血管形成因子の発現を指向させるためのシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域
を含む核酸構築物の、虚血に関連する疾患又は症状の治療のための医薬の製造のための使用。
【請求項７９】
前記（ｂ）のシス調節因子は、請求項１～８および１０～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、請求項７８に記載の使用。
【請求項８０】
前記核酸構築物は、条件付で複製するアデノウイルスをさらに含む、請求項７８に記載の使用。
【請求項８１】
前記核酸構築物の治療有効量は、約10^{3}～約10^{16}個のウイルス粒子である、請求項８０に記載の使用。
【請求項８２】
前記核酸構築物の治療有効量は、約10^{5}～約10^{13}個のウイルス粒子である、請求項８１に記載の使用。
【請求項８３】
前記核酸構築物の治療有効量は、約10^{7}～約10^{12}個のウイルス粒子である、請求項８２に記載の使用。
【請求項８４】
前記シス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター、及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的プロモーターである、請求項７８～８３のいずれかに記載の使用。
【請求項８５】
前記虚血に関連する疾患又は症状は、創傷の治癒、虚血性発作、虚血性心臓疾患、及び胃腸の損傷からなる群から選択される、請求項７８に記載の使用。

【請求項８６】
（ａ）プロドラッグを毒性化合物に変換できる自殺遺伝子をコードする第一ポリヌクレオチド領域；及び
（ｂ）血管形成細胞における前記自殺遺伝子の発現を指向させることができるシス調節因子をコードする第二ポリヌクレオチド領域
を含む核酸構築物。
【請求項８７】
前記自殺遺伝子は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ、水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼ、及び細菌のシトシンデアミナーゼからなる群から選択される、請求項８６に記載の核酸構築物。
【請求項８８】
前記（ｂ）のシス調節因子は、請求項１～８および１０～１２のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、請求項８６に記載の核酸構築物。
【請求項８９】
前記（ｂ）のシス調節因子は、ＰＰＥ－１プロモーター、ＰＰＥ－１－３ｘプロモーター、ＴＩＥ－１プロモーター、ＴＩＥ－２プロモーター、エンドグリンプロモーター、フォンヴィレブランドプロモーター、ＫＤＲ／ｆｌｋ－１プロモーター、ＦＬＴ－１プロモーター、Ｅｇｒ－１プロモーター、ＩＣＡＭ－１プロモーター、ＶＣＡＭ－１プロモーター、ＰＥＣＡＭ－１プロモーター、及び大動脈カルボキシペプチダーゼ様タンパク質（ＡＣＬＰ）プロモーターからなる群から選択される内皮細胞特異的又は内皮周囲細胞特異的プロモーターである、請求項８６に記載の核酸構築物。
【請求項９０】
前記プロドラッグは、ガンシクロビル、アシクロビル、１－５－ヨードウラシル、ＦＩＡＵ、５－フルオロシトシン、６－メトキシプリンアラビノシド、及びそれらの誘導体からなる群から選択される、請求項８６に記載の核酸構築物。
【請求項９１】
必要とする被験者において血管形成をダウンレギュレートするための医薬の製造のための、請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項９２】
前記プロドラッグが前記自殺遺伝子によって毒性化合物に変換されるときに、細胞においてアポトーシスを起こすのに十分な治療有効量の前記プロドラッグを提供することをさらに含む、請求項９１に記載の使用。
【請求項９３】
前記自殺遺伝子は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼであり、前記プロドラッグはガンシクロビル、アシクロビル、ＦＩＡＵ、またはそれらの誘導体である、請求項９１に記載の使用。
【請求項９４】
前記自殺遺伝子は細菌のシトシンデアミナーゼであり、前記プロドラッグは５－フルオロシトシン、またはその誘導体である、請求項９１に記載の使用。
【請求項９５】
前記自殺遺伝子は水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼであり、前記プロドラッグは６－メトキシプリンアラビノシド、またはその誘導体である、請求項９１に記載の使用。
【請求項９６】
有効成分として請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物、及び医薬的に許容できる担体を含む、被験者の組織において血管形成をダウンレギュレートするための医薬組成物。
【請求項９７】
医薬としての、請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。
【請求項９８】

過剰の血管新生に関連する症状を予防又は治療するための医薬の製造のための、請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。

【請求項９９】

少なくとも一つの追加の化学療法及び／又は放射線療法を伴い、前記追加の療法は相乗作用方式で細胞傷害性をさらに高めることができる、請求項９８に記載の使用。

【請求項１００】

癌を予防または治療するための医薬の製造のための、請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。

【請求項１０１】

腫瘍を予防または治療するための医薬の製造のための、請求項８６～９０のいずれかに記載の核酸構築物の使用。

【請求項１０２】

少なくとも一つの追加の化学療法及び／又は放射線療法を伴い、前記追加の療法は相乗作用方式で細胞傷害性をさらに高めることができる、請求項１００に記載の使用。

【請求項１０３】

請求項８６～８９のいずれかに記載の核酸構築物を組織において発現させることを含む、組織において血管形成をダウンレギュレートする方法。

【請求項１０４】

前記プロドラッグが前記自殺遺伝子によって毒性化合物に変換されるときに、細胞においてアポトーシスを起こすのに十分な治療有効量の前記プロドラッグを提供することをさらに含む、請求項１０３に記載の方法。

【請求項１０５】

前記自殺遺伝子は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼであり、前記プロドラッグはガンシクロビル、アシクロビル、ＦＩＡＵ、またはそれらの誘導体である、請求項１０３に記載の方法。

【請求項１０６】

前記自殺遺伝子は細菌のシトシンデアミナーゼであり、前記プロドラッグは５－フルオロシトシン、またはその誘導体である、請求項１０３に記載の方法。

【請求項１０７】

前記自殺遺伝子は水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼであり、前記プロドラッグは６－メトキシプリンアラビノシド、またはその誘導体である、請求項１０３に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL05/01195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: C07H 21/04(2006.01);C12N 5/00(2006.01),7/01(2006.01),15/00(2006.01);C12P 21/00(2006.01)

USPC: 435/325,320.1,69.1;536/24.1
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. : 435/325,320.1,69.1;536/24.1

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARATS, D. et al. Targeting Gene Expression to the Vascular Wall in Transgenic Mice Using the Murine Preproendothelin-1 Promoter. J. Clin. Invest. March 1995, Vol. 95, pages 1335-1344, especially page 1336, Figure 1.	1, 3, 5-6, 13-15 and 24
X	US 2003/0124100 A1 (HARATS, D.) 03 July 2003 (03.07.2003), see entire document, especially pages 21-23, SEQ ID NOS: 1, 2 and 6-8).	1-3, 5-6, 13-18 and 24-26

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 July 2006 (09.07.2006)	04 AUG 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer Walter Sonnenkohl Telephone No. (571) 272-0500

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL05/01195

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3,5,6 and 13-26

Remark on Protest
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL05/01195

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I-VI, claim(s) 1-26, drawn to a nucleic acid sequence comprising a cis regulatory element comprising one or one combination of SEQ IDs selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 1, 5 and 7; such a nucleic acid sequence further comprising a conditionally replicating adenovirus; a cell comprising said nucleic acid sequence; a scaffold seeded with said cell; and a method of expressing a sequence of interest in a eukaryotic cell wherein the sequence of interest is an angiogenic factor.

Groups VII-XII, claim(s) 1-26, drawn to a nucleic acid sequence comprising a cis regulatory element comprising one or one combination of SEQ IDs selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 1, 5 and 7; such a nucleic acid sequence further comprising a conditionally replicating adenovirus; a cell comprising said nucleic acid sequence; a scaffold seeded with said cell; and a method of expressing a sequence of interest in a eukaryotic cell wherein the sequence of interest is a reporter protein.

Groups XIII-XVIII, claim(s) 1-26, drawn to a nucleic acid sequence comprising a cis regulatory element comprising one or one combination of SEQ IDs selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 1, 5 and 7; such a nucleic acid sequence further comprising a conditionally replicating adenovirus; a cell comprising said nucleic acid sequence; a scaffold seeded with said cell; and a method of expressing a sequence of interest in a eukaryotic cell wherein the sequence of interest is a growth factor.

Groups XIX-XXIV, claim(s) 1-26, drawn to a nucleic acid sequence comprising a cis regulatory element comprising one or one combination of SEQ IDs selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 1, 5 and 7; such a nucleic acid sequence further comprising a conditionally replicating adenovirus; a cell comprising said nucleic acid sequence; a scaffold seeded with said cell; and a method of expressing a sequence of interest in a eukaryotic cell wherein the sequence of interest is a pro-apoptotic factor.

Groups XXV-XXX, claim(s) 32-40, drawn to a method of regulating angiogenesis in a tissue as the claims read on one or one combination of nucleic acid sequences selected from SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 1, 5 and 7, and wherein the angiogenesis regulator is VEGF.

Groups XXXI-XXXVI, claim(s) 32-40, drawn to a method of regulating angiogenesis in a tissue as the claims read on one or one combination of nucleic acid sequences selected from SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 1, 5, and 7, and wherein the angiogenesis regulator is p55.

Groups XXXVII-XLII, claim(s) 32-40, drawn to a method of regulating angiogenesis in a tissue as the claims read on one or one combination of nucleic acid sequences selected from SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 1, 5 and 7, and wherein the angiogenesis regulator is angiopoietin-1.

Groups XLIII-XLVIII, claim(s) 32-40, drawn to a method of regulating angiogenesis in a tissue as the claims read on one or one combination of nucleic acid sequences selected from SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 1, 5 and 7, and wherein the angiogenesis regulator is bFGF.

Groups XLIX-LIV, claim(s) 32-40, drawn to a method of regulating angiogenesis in a tissue as the claims read on one or one combination of nucleic acid sequences selected from SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 1, 5 and 7, and wherein the angiogenesis regulator is PDGF-BB.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL05/01195

Groups LV-LX, claim(s) 41-43, 45-50, 60-77, drawn to a nucleic acid construct comprising: (a) a first polynucleotide region encoding a chimeric polypeptide; and (b) a second polynucleotide region encoding a cis regulatory element being capable of directing expression of said chimeric polypeptide in a specific tissue or cells, a eukaryotic cell with such a construct, and a method of using such a nucleic acid in downregulating angiogenesis in a tissue as the claims read on one or one combination of nucleic acid sequences selected from SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 1, 5 and 7.

Group LXI-LXV, claim(s) 78-83 and 85, drawn to a nucleic acid construct comprising (a) a first polynucleotide region encoding a proangiogenic factor; and (b) a second polynucleotide region encoding a cis regulatory element for directing expression of a proangiogenic factor in a sub-population of angiogenic cells as the claims read on one or one combination of nucleic acid sequences selected from SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 5 and 7.

Groups LXVI-LXX, claim(s) 86-90, drawn to a nucleic acid construct comprising (a) a first polynucleotide region encoding a suicide gene, said suicide gene being capable of converting a prodrug to a toxic compound and (b) a second polynucleotide region encoding a cis regulatory element capable of directing expression of said suicide gene in angiogenic cells as the claims read on one or one combination of nucleic acid sequences selected from SEQ ID NOs: 15, 16, 6, 5 and 7.

The inventions listed as Groups I-XXIII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: PCT rule 13.2 requires that unity of invention exists only when the shared same or corresponding technical feature is a contribution over the prior art. The putative special technical feature of Groups I-XXIII is an isolated polynucleotide comprising a cis regulatory element including at least a portion of the sequence set forth in SEQ ID NO: 15 covalently linked to at least a portion of the sequence set fort in SEQ ID NO: 16, the isolated polynucleotide being capable of directing transcription of a polynucleotide sequence transcriptionally linked thereto in eukaryotic cells. This putative special technical feature is shown by Harats, et al, J. Clin. Invest. 95:1335-1344, 1995, to lack novelty and therefore does not make a contribution over the prior art. Specifically, the sequence found in Figure 1 on page 1336 shows all of SEQ ID NO: 15 covalently linked to all of SEQ ID NO: 16 in the top sequence from base -364 to -320.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST: USPGPUB, USPAT, DERWENT, JPO, EPO
MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CAPLUS

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI	テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 35/00	
Ａ６１Ｋ 48/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ 48/00	

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

(72)発明者 グリーンベルガー, ショシャナ
イスラエル, ７１７００ モディイン, ビンヤミン ストリート ３８

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 CA04 DA02 EA02 FA02 GA11
4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 BA02 CA44
4C084 AA02 AA13 BA01 BA22 NA14 ZA36 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA36 ZB26