(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4057644号
(P4057644)
(45)発行日　平成20年3月5日(2008.3.5)　(24)登録日　平成19年12月21日(2007.12.21)

(51)Int.Cl.　F I
C12N 15/09 (2006.01)　C12N 15/00 ZNAA

請求項の数 12 (全 31 頁)

(21)出願番号　特願平7-519235
(86)(22)出願日　平成7年1月12日(1995.1.12)
(65)公表番号　特表平9-509049
(43)公表日　平成9年9月16日(1997.9.16)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/000845
(87)国際公開番号　WO1995/019434
(87)国際公開日　平成7年7月20日(1995.7.20)
審査請求日　平成14年1月11日(2002.1.11)
(31)優先権主張番号　08/182,247
(32)優先日　平成6年1月13日(1994.1.13)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　597078983
セル　ジェネシス　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，カリフォルニア　９４０８０，サウス　サンフランシスコ，フォーブス　ブールバード　５００
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100122389
弁理士　新井　栄一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】前立腺で活性な組織－特異的エンハンサー

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ポリヌクレオチドであって、構造遺伝子配列に作用可能に結合した前立腺－特異的転写調節配列を含み、
前記前立腺－特異的転写調節配列は、配列番号１のヌクレオチド502～5836として表される配列を含み、前立腺特異的抗原（PSA）を発現している細胞において、前記作用可能に結合した構造遺伝子配列の転写を活性化する、前記ポリヌクレオチド。
【請求項２】
ポリヌクレオチドであって、構造遺伝子配列に作用可能に結合した前立腺－特異的転写調節配列を含み、
前記前立腺－特異的転写調節配列は、配列番号１のヌクレオチド1～5831として表される配列を含み、前立腺特異的抗原（PSA）を発現している細胞において、前記作用可能に結合した構造遺伝子配列の転写を活性化する、前記ポリヌクレオチド。
【請求項３】
ポリヌクレオチドであって、構造遺伝子配列に作用可能に結合した前立腺－特異的転写調節配列を含み、
前記前立腺－特異的転写調節配列は、配列番号１のヌクレオチド502～5831して表される配列を含み、前立腺特異的抗原（PSA）を発現している細胞において、前記作用可能に結合した構造遺伝子配列の転写を活性化する、前記ポリヌクレオチド。
【請求項４】

単離されたポリヌクレオチドであって、構造遺伝子配列に作用可能に結合した前立腺－特異的転写調節配列を含み、
前記前立腺－特異的転写調節配列は、配列番号１のヌクレオチド502～5836として表される配列を含み、前立腺特異的抗原（PSA）を発現している細胞において、前記作用可能に結合した構造遺伝子配列の転写を活性化する、前記ポリヌクレオチド。
【請求項５】
単離されたポリヌクレオチドであって、構造遺伝子配列に作用可能に結合した前立腺－特異的転写調節配列を含み、
前記前立腺－特異的転写調節配列は、配列番号１のヌクレオチド1～5831として表される配列を含み、前立腺特異的抗原（PSA）を発現している細胞において、前記作用可能に結合した構造遺伝子配列の転写を活性化する、前記ポリヌクレオチド。
【請求項６】
単離されたポリヌクレオチドであって、構造遺伝子配列に作用可能に結合した前立腺－特異的転写調節配列を含み、
前記前立腺－特異的転写調節配列は、配列番号１のヌクレオチド502～5831として表される配列を含み、前立腺特異的抗原（PSA）を発現している細胞において、前記作用可能に結合した構造遺伝子配列の転写を活性化する、前記ポリヌクレオチド。
【請求項７】
請求項1から3いずれか1項記載のポリヌクレオチドを含むウイルスベクター。
【請求項８】
請求項4から6いずれか1項記載の項記載のポリヌクレオチドを含むウイルスベクター。
【請求項９】
前記ベクターがアデノウイルスベクターである、請求項８記載のウイルスベクター。
【請求項１０】
前記構造遺伝子配列が、毒性遺伝子、抗原遺伝子、リンホカイン遺伝子及びウイルス遺伝子からなる群より選択される分子をコードする、請求項９記載のウイルスベクター。
【請求項１１】
ヒト前立腺の細胞において構造遺伝子を発現させるための組成物であって、前記細胞は前立腺－特異的抗原（PSA）を発現しており、請求項４記載のポリヌクレオチドに作用可能に結合した前記構造遺伝子を含む構造物を含む、前記組成物。
【請求項１２】
ヒト前立腺の細胞において構造遺伝子を発現させるための組成物であって、前記細胞は前立腺－特異的抗原（PSA）を発現しており、請求項5又は6記載のポリヌクレオチドに作用可能に結合した前記構造遺伝子を含む構造物を含む、前記組成物。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は、前立腺組織におけるシス結合転写ユニットの基本的な（net）転写を選択的に増強する、新規な転写調節要素（エンハンサー）を提供する。本発明の組織－特異的前立腺エンハンサーは、他の組織と比較すると前立腺細胞において選択的に活性である。本発明は前立腺の増殖及び新形成の遺伝子療法に適当な組成物及び該新規な組成物を用いる前記の病状の治療のための方法も提供し、該組成物は、トランスジーン及び／または遺伝子標的組成物として使用するのに適当なポリヌクレオチドを含む。
背　景
BPH.前立腺新形成及び治療法（Modality）
前立腺の三つの重要な病気がある：すなわち、良性前立腺増殖（benign prostate hyperplasia, BPH）、前立腺がん及び前立腺炎である。これらの三つの病気のコストは莫大である。1985年には、米国では前立腺の病気の年間治療は440万人の医師の往診、836,000の入院及び30億ドル以上のコストを要した。1985年には、BPH、前立腺がん及び前立腺炎のコストはそれぞれ18億2000万ドル、９億7000万ドル及び２億9000万ドルであった。明らかにこれらの病気は、米国の健康管理費に相当なパーセントを示している。それに加え、前立

腺がんは39,215の死の原因となった。BPH及び前立腺がんは50才以上の男性の病気である。米国の老齢化人口により、BPH及び前立腺がんの発生は15年後には50％増加するだろう。

BPHは尿の失禁をもたらす尿障害の原因となる。それは、80才までには男性の約80％に発生する。調節されてないジヒドロテストステロンが老化する男性において増殖性の前立腺の成長の原因となると信じられている。BPHの治療のための薬物療法は現在では前立腺平滑筋を緩め（α遮断）、前立腺の大きさを減少させる（アンドロゲン抑制）ことをめざしている。フェーズIIIの臨床的試験は、BPHの治療のために選択的α_1遮断剤、アンチ－アンドロゲン及び５－α－還元酵素阻害剤を評価している最中である。これらの内で最も将来有望なのはフィナステリド（finasteride）である。それは大多数の患者に増殖性の前立腺の退化を引き起こす能力を示した（モセリニ他「前立腺（Prostate）22：P.291（1993年））。

BPHを外科的に前立腺の経尿道の切除で治療する（TURP）。この手順は最も一般的である：すなわち500,000のTURPが米国で毎年行なわれ、25％の男性は、尿の障害を緩和するために生涯のいずれかの時期に手術を必要とするだろう。これはBPHを白内障の手術に次ぐ第２の最も一般的な男性の手術の原因としている。TURP手順は数日の入院及び手術そのものを要する。平均的なTURPの医療の払い戻し（reimbursement）コストは1987年には8,000ドルで、1993年には14,000ドルであった。不幸なことに、TURPの副作用は、患者の90％の性交不能の原因となる射精管の除去である。前立腺の拡大が良性であるか、またはがん性であるかを決定するための外来の患者の生検手順がTURPに先行する。

前立腺がんは、米国の男性のがんによる死の第２の最も普通の原因であって、肺がんだけがそれよりも多い。前立腺がんは潜伏性の病気である：すなわち、多くの男性が、明白な病気の徴候はないが、前立腺がんの細胞を持っている。他の原因で死んだ個体の検死では50才の男性の30％に前立腺がんの細胞を示し、80才までにはその罹患率は前立腺の60％である。さらに、前立腺がんは最初の診断後患者が死ぬまでに10年もかかることがある。米国では毎年100,000人をわずかに越える男性が新たに前立腺がんと診断され、その内40,000人以上がその病気で死ぬだろう。病的状態も高い。がんの骨への転移（末期段階）も普通であって、しばしば制御できない痛みを伴う。転移はリンパ節にも起こる（初期段階）。

該病気の進行は、前立腺内の輪郭のはっきりとした塊から崩壊及び前立腺の側縁への侵入、リンパ節領域への転移及び骨髄への転移である。前立腺腫瘍の攻撃性は広く変化する。ある腫瘍は比較的に攻撃的で、６ケ月毎に２倍になるが、他のものでは、非常に成長が遅く、５年毎に２倍になる。成長速度の遅い結果、いつでも活発に分裂しているがん細胞はほとんどない。結果として、前立腺がんは一般的に照射及び化学療法に抵抗力があるけれども、両治療法は広く用いられている。外科手術は治療の頼みの綱であるが、あまりにもその大部分は効果がなく、また、射精管を除去するので性交不能をもたらす。

不幸なことに、80％の場合に前立腺がんの診断は、その病気がすでに骨に転移したときに立証される。前立腺がんは、しばしば前立腺自身、すなわち初期のがんの位置でよりは、転移の位置でより急速に成長するという観察に特に関心がある。

前立腺がんの診断及び取り扱いは、前立腺－特異的抗原の血清レベルの測定を用いることにより容易になった。前立腺－特異的抗原（PSA）は射精凝塊の分解物（breakdown）に含まれるプロテアーゼである。PSAの血清レベルは２～４ng／mlに変化し、通常は個体のPSAレベルの一回の測定は無意味である。最もしばしば、PSAレベルは前立腺がん及びBPHの両方で上昇する。４ng／mlを越える血清PSAレベルはさらなる調査への十分な根拠となる。進行中の前立腺がんを示す、血清PSAレベルの急激な増加はさらに有効である。PSAレベルの２～４ng／mlから10ng／ml以上への急激な上昇は進行中の病気を示す（Hamdy, F.C.他「Br.J.Urol.」69：P.392）。末期段階の転移病では、PSAレベルは200ng／mlに達することがある。PSAは240AAの一本鎖アミノ酸鎖であって、クローン化された（Lundwall A.及びLilja H.「FEBS Lett」214：P.317（1987年），Lundwall A「Biochem.Biophys.Res.Comm.」161，P.1151（1989年），Riegman他「Biochem.Biophys.Res.Comm.」159，P.95

（1989年））。
前立腺がんの治療のために、経口エストロゲン及び黄体を形成する放出性ホルモン類似物は、アンドロゲンを生産する腺の外科的な除去（精巣除去または副腎摘出）と同様に用いられている1966年にチャールズ　クギンス（Charles Kuggins）は前立腺がんの治療に去勢術を利用することでノーベル賞を授与された。多くの患者は去勢術後著るしい改善を示したが、これは一時的な救済にすぎない。ほとんどのこれらのがんは、すぐに逆戻りして、結局は死をもたらす治療上の耐性の型を示した。現在の治療技術は、睾丸におけるアンドロゲン生産を差し止めるか、または直接的に前立腺におけるアンドロゲンの生産を遮断するかによる、医療的な去勢の化学的な型を用いる。
エストロゲンは、重い、さらに致命的な心臓血管の合併症のためにもはや治療には勧められない。黄体を形成するホルモン放出性ホルモン（LHRH）類似物がその代りに用いられる。LHRH類似物は、エストロゲンまたは去勢術に比較して同等な効力がある。LHRH治療は可逆的であって、手術を含まないし、患者に心理的に衝撃を与えない。したがって、この治療はアンドロゲンの欠乏を生じさせるために好ましい。LHRH類似物は、最初に脳下垂体LHの分泌を増加させ、続いて血清テストステロンを増加させる。これは、「発赤（flare）」病をもたらし、この病気は下垂体LHRH受容体の過剰な刺激がその機能の停止、結果的なLHの分泌の低下、したがって精巣のテストステロン生産の低下をもたらす時に、最初のLHRH仲介のLH分泌が逆転するにつれ、急速に静まる（レディング他「Proc.Natl.Acad.Sci.」79：P.1273（1982年））。しかしながら、ホルモン療法はホルモン耐性腫瘍細胞の増殖により、時間ともに常に失敗する。これらの細胞が、最初のホルモン感受性細胞の変異としてか、または細胞の独立したクラスとして増殖するのかどうかは分からない。しかしながら、20％の患者がホルモン療法に好ましい反応を示すのに失敗しているので、ホルモン耐性細胞は療法の始めに存在していると思う。
エストラムスチン、すなわち、ステロイドナイトロジェンマスタード誘導体は、進行した段階の前立腺がんについての臨床試験を受けている。エストラムスチンは当初は、エストロゲンと毒性のナイトロジェンマスタードの複合体を経て、標的薬物供給に適当と考えられた。しかしながら、驚くべきことに、エストラムスチンは、アルキル化またはホルモン作用を持っていない。むしろ、エストラムスチンは、細胞分裂を阻害する微小管を分解する。過去15年以上のフェーズII及びフェーズIIIの臨床実験は、生存をその終点としたとき、がっかりさせるものであった。
フィナステリド、すなわち、４－アザステロイド（メルク & Co.からのProscar（商標））は、前立腺の支質においてテストステロンからジヒドロテストステロンへの分子内転換に責任を果す酵素である５α－還元酵素を阻害する。ジヒドロテストステロンは前立腺中で最も効能のあるアンドロゲンであるから、その除去は、前立腺がんの容積で40％の復帰をもたらす。カソデキシン（Casodexthin（商標））は、核中のアンドロゲン受容体を封鎖することにより、テストステロンの細胞内取り込みを阻害すると考えられている。しかしながら、ほとんどすべての進行したがん前立腺細胞はアンドロゲンの欠乏へ好ましい反応を示すのに失敗している。この段階で前立腺がんについて効果的な細胞障害化学療法はない。
がん治療に対して、主要な、本当に圧倒的な障害は選択性の問題である：すなわち、正常な細胞の機能に影響させないで、腫瘍細胞の増殖を阻害する能力である。したがって、治療比、すなわち、腫瘍細胞の殺害の伝統的な腫瘍の化学療法の殺害に対する比は1.5：１にすぎない。したがって、前立腺の増殖及び新形成のもっと効果的な治療方法並びに治療及び予防のための医薬組成物が必要である。
転写調節要素
前立腺細胞特異的転写、特に前立腺特異的抗原である腺のカリクレインを含んでいるヒト前立腺細胞についての方法及び組成物を提供する。約－2850から約－5350の約2.5Kbpの断片が、前立腺特異的エンハンサー（「PSE」）として、プロモーターと合同して前立腺細胞で転写を開始するために機能する。PSEと合同して転写を調節し、新形成前立腺細胞を遺伝子的に修飾して増殖を阻害するための転写成分を有する細胞を同定するための構成物

を提供する。該構成物はPSEと合同して、プロモーター、特に前立腺－特異的抗原の541bpプロモーター領域、及び前立腺細胞、特に新形成前立腺細胞の選択的切除を可能とするタンパク質をコードする遺伝子を用いる。新形成細胞の治療は新形成細胞の特異的切除のため該構成物の新形成細胞への導入を含む。

新形成細胞及び増殖細胞における特異の遺伝子の発現を利用することは、このような正常でない細胞を選択的に殺害するための一つの手段を示す。種々の細胞型における、新形成に普通に含まれる遺伝子発現の調節が研究された。

最近、高度に特異的なエンハンサー／プロモーターが同定された：すなわち、特定の型の細胞にのみ存在しているタンパク質（たとえば転写因子）が結合しているDNA配列であって、シス結合したDNA配列の転写活性を調整するDNA配列である。これらのエンハンサー結合タンパク質は転写の活性化物質であって、したがって、これらの細胞でのみ発現され、および／または、特定の条件のもとで（たとえば、特異的ホルモンに結合し、次いでリン酸化するとき、特定の他のタンパク質が存在するとき）、転写に活性となる。多数の転写に活性なエンハンサー要素が報告されている。ステロイド－調節されたエンハンサー要素が同定され一般にリガンド－結合ステロイド受容体に結合している（Nawaz他「遺伝子発現（Gene Expr.）」２：P.39（1992年）、Allan他３「生化学（Biol.Chem.）」266：P.5905（1991年）、Ozono他「生化学雑誌（Biol.Chem.）」265：P.21881（1991年）、Meyer他「細胞（Cell）」57：P.443（1989年）、Bagchi他「分子内分泌学（Mol.Endocrinol.）」P.1221（1988年）、Bradshaw他の「分子内分泌学」２（12）：P.1286（1988年）、Weinberger他「臨床生理生化学（Chin.Physiol.Biochem.）」５：P.179（1987年））。位置－175から－155の抗原応答要素が前立腺特異的抗原の発現と関係する。種々の組織特異的エンハンサー及びプロモーターも多数の組織、中でも、肝臓（Rouet他「生化学雑誌（J.Biol.Chem.）」267：P.20765（1992年）、Lemaigne他の「生化学雑誌」268：P.19896（1993年）、Nitsch他「分子細胞生化学（Mol.Cell.Biol.）」13：P.4494（1993年））、胃（Kovarik他「生化学雑誌」268：P.9917（1993年））及び下垂体（Rhodes他「Genes Dev.」７：P.913（1993年））を含む、組織で同定された。パルミター（Palmiter）他は「細胞」50：P.435（1987年）で、ジフテリア毒素遺伝子に結合した膵臓－特異的エラスターゼＩプロモータ／エンハンサーを用いて、キメラトランスジーンを生成させ、それは、マイクロインジェクションにより受精したマウスの卵に導入した時にトランスジェニックマウスを産生するのに用いることができ、正常にエラスターゼＩ遺伝子を発現する細胞はトランスジーンによりコードされているジフテリア毒素の発現の結果として選択的に除去されるという方法を報告する。同様な方法は、成長ホルモン発現細胞を欠くトランスジェニックマウス（Behringer他「Genes Dev.」２：P.453（1988年））及びシュワン細胞が欠乏しているトランスジェニックマウス（Messing他「ニューロン（Neuron）」８：P.507（1992年））を産生するのにも用いられた。

前立腺－特異的抗原（PSA）遺伝子は前立腺細胞で優先的に発現し、クローン化された（Lundwall A及び Lilja H「FEBS Lett」214：P.317（1987年）、Lundwall A「生化学生物理学研究通信（Biochem.Biophys.Res.Commun.）」161：P.1151（1989年）、Riegmann他「分子内分泌学（Molec.Endocrinol）」５：P.1921（1991年））。

しかしながら、前立腺細胞及び特に新形成または増殖前立腺細胞で活性である組織－特異的エンハンサー並びにプロモーターは、前立腺組織、特に新形成前立腺上皮の治療上の切除のために適当な構成物がそうであるように、この技術に有用であろう。細胞－特異的転写調節要素に基づく治療法は、細胞－型特異的でありそうな治療法を提供するだろう。BPH及び／または前立腺がんを治療するために用いられるこのようなアプローチのためには、前立腺の腺房細胞で優先的に活性であって、それからほとんどすべての転移前立腺がんが発生する、転写調節要素を持つのが好都合であろう（Ghadzizadel他「Urol.Int.」39：P.9（1984年））。標的腺房細胞は前立腺ストローマ細胞を相対的に影響を受けていない状態にしておき、射精管とそれを通る尿道を維持すべきである。これは、現在の外科手術的なアプローチに相当にまさるであろう。本発明はこれらの及び他のニーズを満たす。

本明細書で述べた参考文献は本出願の出願日の前の開示を示すためだけに提供したもので

ある。ここに記載したいかなる事項も、発明者がそれらの開示よりも先発明であることを主張する権利を有しないことを承認するものとして解すべきではない。すべての引用した刊行物は引用により本明細書に組み入れられる。

発明の概要

前述のように、本発明の一面は転写調節要素、たとえば、エンハンサー及びプロモーターであって、組織－特異的方法で前立腺細胞中でシス結合配列の転写を活性化する要素を提供することである。このような要素は一般に前立腺細胞で優先的に発現するが、実質的に他の細胞型では発現しない遺伝子中にまたは遺伝子に隣接して存在する。

一態様では、転写調節要素は、前立腺－特異的抗原（PSA）遺伝子の隣接する領域の上流に存在する要素を含み、該エンハンサーは前立腺細胞（たとえば前立腺上皮）でシス－結合配列の転写を活性化する。他の変型では、転写調節要素はヒトPSA遺伝子のすぐ上流の領域の約5.3Kbの断片を含む：すなわち、この5.3Kbの断片はしばしばXba Ⅰ－HindIII断片として単離されるが、制限部位多型性が存在し得る。他の変型では、約5.3Kp断片の中で内部で2.5Kpか、それよりも多くを削除し得る。

本発明の一面では、前立腺細胞、たとえば新形成または増殖前立腺細胞中のシス－結合配列の転写を活性化する転写調節要素を含むポリヌクレオチドを提供することである。一般に、このようなポリヌクレオチドはさらに構造遺伝子（たとえばcDNAまたはゲノム遺伝子またはミニ遺伝子）または転写ユニットを生成する転写調節要素に作用可能に結合したアンチセンス配列を含む。このような転写ユニットは一般的にプロモーターに及び所望により前立腺－特異的エンハンサー（すなわち、エンハンサー要素は前立腺細胞では機能するが他の細胞型では不活性である）に作用可能に結合した構造遺伝子を含む。最も普通には、本発明のポリヌクレオチドは、トランスジーン及び／または相同標的構成物として用いられ、一般にはdsDNA構成物である。

一つの変型では、ポリヌクレオチドは、前立腺細胞で（好ましくは新形成及び／または増殖前立腺細胞中で）優先的に発現し、作用可能に結合した、細胞障害遺伝子のまたは細胞静止性の遺伝子生産物をコードする、毒性遺伝子を発現せしめるために用いられる、転写調節要素を含む。毒性遺伝子はポリヌクレオチドを取り込んだ前立腺細胞中で発現し、それにより該前立腺細胞を切除する。そのようなポリヌクレオチドの新形成または増殖前立腺細胞への輸送は、良性前立腺肥大、前立腺新形成及びその他類似物の治療または予防のための所望しない前立腺細胞の特異的切除をもたらす。

他の態様では、本発明は良性前立腺増殖及び前立腺がんを治療するまたは予防する方法を提供する。該方法は前立腺－特異的転写調節要素（すなわちプロモーター及び／またはエンハンサー）、新形成または増殖前立腺細胞で優先的に転写に活性な要素に作用可能に結合した毒素から本質的になるポリヌクレオチドを輸送する方法を含む。好ましい転写要素は、PSAを発現する細胞中にトランスフェクトされた時シス結合した遺伝子配列の前立腺－特異的発現を授ける前立腺－特異的抗原（PSA）遺伝子の上流のセグメントである。問題のセグメントは転写開始部位から約10Kbp小さい上流のセグメント中に包囲されている。一般的に、上流セグメントは、＋16で、特に０で始まる主要なPSA転写開始部位から、すぐ上流の約6.0、特に5.3Kbのセグメントを含む：しばしば、5.3KbのセグメントはXba Ⅰ－HindIII断片として適宜単離される。本方法では、ポリヌクレオチドは、一般に前立腺組織（たとえば前立腺腫瘍塊）にdsDNAとして、ウイルス輸送により裸のDNAとしてまたはDNA－脂質複合体または同様なもののいずれかとして輸送される。

本発明の変型として、前立腺－特異的転写調節要素は免疫システムに高度に可視の免疫原性抗原をコードする遺伝子に作用可能に結合している（すなわち、それにより容易に同定され、細胞障害免疫細胞に対して反応する）。抗原を発現する細胞をこれによって、たとえばナチュラルキラー（NK）細胞及びその他同種類のものによる切除に対して感受性にする。しばしば、抗原はヒト免疫グロブリンkV領域、SV40　大　T抗原または外皮に包まれたウイルスのスパイク糖タンパク質（ヒトのシトメガロウイルス（hCMV）の糖タンパク質H）である。このようなポリヌクレオチドは、シス－結合抗原遺伝子を取り込み、そして発現する腫瘍細胞に対して免疫応答を引き出すことによって前立腺肥大及び／または前立

腺形成不全を治療するのに都合よく用いることができる。本発明は抗原遺伝子（たとえば免疫グロブリンkV領域、SV40　大　T）に作用可能に結合したPSA遺伝子転写調節要素を含むポリヌクレオチドを投与することによって前立腺肥大及び前立腺新形成を治療する方法も提供する。

本発明の他の面は、抗腫瘍免疫応答（たとえば、増加したNH活性）を活性化するリンホカインをコードする遺伝子に作用可能に結合した前立腺－特異的遺伝子転写調節要素を含むポリヌクレオチドも提供する。一般に、このような活性化するインホカインは次のものを含むがそれに限定されない：すなわち、IL1，IL-2，IL-12，GM-CSF，IFNα，IFNβ，IFNγ及びその他同種のもの。しばしば、転写調節要素はPSA遺伝子プロモーター／エンハンサーである。活性化リンホカイン遺伝子に作用可能に結合した前立腺－特異的遺伝子転写調節要素を含むポリヌクレオチド構成物は肥大した前立腺細胞または新形成前立腺細胞に取り込まれ、そうすると前立腺細胞はリンホカインを発現し、それにより、肥大したまたは新形成前立腺細胞に対し免疫反応を増強する。本発明は前立腺肥大及び前立腺新形成を治療するための方法も提供し、該方法は、前立腺細胞（たとえばPSAを発現する細胞）中で活性化リンホカインを発現する、このようなポリヌクレオチド構成物を提供することを含むものである。一般にポリヌクレオチド構成物を輸送する段階は、裸のDNA、脂質－DNA複合体、ポリカチオンにより及び所望により前立腺細胞受容体（たとえばFGF受容体）へのリガンドにもより結合された濃縮DNAとして、またはウイルス詰込みDNAとしての形で該構成物を直接に投与することにより達成される。その代りに、肥大したまたは新形成前立腺細胞を患者から体外培養し、前記ポリヌクレオチド構成物をトランスフェクトし、患者に再び導入して（一般に外植片の部位で）患者自身の前立腺腫瘍に対して患者に免疫応答を引き出す。

本発明は構造遺伝子に作用可能に結合した前立腺－特異的転写調節要素を含む非－ヒト動物も提供する。前記トランスジェニック動物は前立腺細胞中に構造遺伝子を発現する。しばしば、前立腺－特異的転写調節要素は5.3KbのヒトPSA遺伝子のすぐ上流領域またはそれらの部分を含み、構造遺伝子は内因性PSA遺伝子を発現する細胞中で発現する。トランスジーン中で前立腺－特異的プロモーター／エンハンサーに作用可能な結合のために種々の構造遺伝子を選択し得る。有利には、構造遺伝子として活性化がん遺伝子または大－T抗原遺伝子を選択でき、そうするとトランスジェニック動物は前立腺新形成を増殖させるための増加した性質を持ち、BPHのための病気のモデル及び前立腺がん腫として役立つことができる。

本発明は前立腺－特異的転写因子を精製する方法も提供し、該方法は前立腺細胞（たとえば前立腺腫瘍細胞系）からの細胞抽出物（一般には核抽出物）を前立腺－特異的転写調節要素（たとえばヒトPSA遺伝子のすぐ上流の5.3Kbセグメント）を含むDNAと接触させることを含むものである。接触の段階は一般には、転写因子のDNA上の認識部位への選択的結合のために適当な条件下に行なわれ、そうしてすぐに結合しない物質を洗浄により除去し、転写因子を含有する留まった物質を回収する。前立腺組織に存在し、他の組織に存在しない転写因子は前立腺－特異的転写因子と同定される。

【図面の簡単な説明】

図１はヒト前立腺特異的抗原の－5824bp．への５′－隣接領域の配列を示す。（配列番号１）。断片は－5824bpのHindIII部位から＋７bpのHindIII部位に向う。番号付けシステムはPSA mRNAの転写開始部位が＋１である（Lundwall，A.，前立腺－特異的抗原、ヒト腺のカリクレインのための遺伝子の特徴づけ「Biochim.Biophys.Res.Commun．」161：p.1151～1159（1989年））。PSAのコード領域は＋42で始まる．；

図２は、PSAエンハンサーの制限マップであって、５′HindIII部位から３′HindIII部位に伸びる。

図３は、指示された制限酵素についての切断部位の数字で表わした塩基の位置を示す。

図４は、発現構成物を示し、ヒトPSA遺伝子の種々の長さの上流領域がレポーター遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）に作用可能に結合している。これらの構成物を、トランスフェクトされたヒト前立腺LNCaP細胞中で転写活性につい

て評価した。
図５は、図４に示された発現構成物を用いてトランスフェクトされた前立腺細胞からの抽出物のCATアッセイのオートラジオグラムを示す。
図６は、増加量のメチルトリエノラン（R1881）の存在で正常な血清及びストリップした血清を用いてルシフェラーゼ遺伝子を駆動するPSA遺伝子の５′－隣接領域の全－5824bp断片を用いるLNCaP細胞のトランスフェクションの結果を示す。
図７は、CATを駆動する５′隣接前立腺特異的エンハンサー（PSE）のいくつかの構成物を用いたストリップした血清中でのR1881の濃度が増加する影響を示す。
図８は、必要とされるPSE配列の５′量を画定するように設計された小さな欠失部分の影響を示す。構成体を、BSKSII主鎖中のCAT遺伝子を駆動するXba Ｉ ５′（－5322）からHind III３′（＋７）末端を含有する構成物である、CN42中のエキソヌクレアーゼを用いて調製し、配列した。図８から分るように、Xba Ｉ部位から小さな欠失３′（108bp）ですら、PSEを不活性化する。
図９は、Xba Ｉ－Cla Ｉ断片（配列番号２）をプロモーター及びコード領域に関連して種々の位置に動かして、断片の位置の調節活性に関する影響を決定するための発現構成物を示す。1196bpのXba Ｉ－Cla Ｉ断片を開始部位の近くにプロモーター領域を持つか持たずに（＋）及び（－）の方向に動かし、CAT遺伝子の５′末端に（＋）及び（－）の両方向に動かした。これらのいずれの構成物もLNCaP細胞のトランスフェクションで活性を示さなかった。結果は、Xba Ｉ（－5322bp）からCla Ｉ（－4135）内のエンハンサー領域が必要であるが、エンハンサーとしての機能では十分でない。むしろ、Cla Ｉ（－4135）とHindIII（＋７）の間の他の配列が必要である。
図10はCAT遺伝子を駆動するPSEを用いる内部欠失の効果の棒グラフである。結果はApa Ｉ（－2851）からBglII（－541）の2310bpは欠失し得ることを示している。したがって、増強に必要とされる追加の配列は、Cla Ｉ部位からApa Ｉ部位の間に位置している。したがって、全PSAエンハンサーはXba Ｉ（－5322）とApa Ｉ（－2851）の間の2471bp断片に位置している。エンハンサーは、BglII（－541）部位から転写の開始に伸長するプロモーター領域と協力して作用する。
図11はLNCaP細胞中のCN45構成物の試験管内毒性を示す棒グラフである。原トランスフェクション中の15μｇのCN45DNAで、９コロニーが増殖した。比較で、BKSKII＋で19コロニーが増殖し、CN47で29コロニーが増殖した。したがって、細胞中にネオ発現プラスミドと共トランフェクトした機能的ジフテリア毒素－Ａ鎖の存在は２～３倍に回復されたコロニーの数を減少させた。
図12は、ヒトPSEの転写調節のもとにCATをコードするポリヌクレオチドを投与されたヒト前立腺腫瘍を持つヌードマウスからの組織抽出物におけるCAT活性の分析結果を示す。腎臓、心臓、前立腺、肝臓、膵臓、脾臓、脳、肺、骨髄、膀胱及びヒト前立腺腫瘍塊が示されている。

定　義

特に定義されていなければ、本明細書で用いられているすべての技術的及び科学的用語は本発明の属する当業者により普通に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で記載されたのと同様なまたは同等な任意の方法及び物質を、本発明の実施または試験に用い得るが、好ましい方法及び物質を記載する。本発明の目的のために次の用語を下記に定義する。
本明細書で用いられるとき、用語「突質的に対応する」、「実質的に相同」または「実質的に一致」は核酸配列の特徴づけを意味し、核酸配列は対照標準配列と比較して少くとも約70％の配列一致、一般的には少くとも約85％配列一致及び好ましくは対照標準配列に比較して少くとも約95％一致、しばしば少くとも99％同一である。配列一致のパーセントは、全体で対照標準配列の25％より少ない小さな欠失または付加を除外して計算する。対照標準配列は、より大きな配列のサブセット、たとえば遺伝子もしくは隣接配列の部分、または染色体の反復部分であってもよい。しかしながら、対照標準配列は少くとも18ヌクレオチド長さ、一般には少くとも30ヌクレオチド長さ、そして好ましくは少くとも約50～10

0ヌクレオチド長さである。望ましくは、二つの配列の間の類似の量はFASTAプログラム分析により少くとも約80％、好ましくは少くとも約90％である。（Pearson及びLipman「Proc.Natl.Acad.Sci. USA」85：P.2444～8（1988年））
本明細書で用いられる用語「天然の」は、対象が自然界に見い出し得るという事実に関する対象に適用される。たとえば、天然源から単離できる生物（ウイルスを含む）に存在し、人間により実験室で意図的に修飾されていないポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は天然である。本明細書に用いる時、古典的な遺伝学にしたがって選択的に繁殖させたものであってもよいげっ歯類の実験室の系統は、天然の動物と考えられる。
本明細書に用いる時、「異種性の（heterologous）」は、前もって決定した対照標準遺伝子配列に関して定義される。たとえば、構造遺伝子配列に関して、異種性のプロモーターは、対照標準構造遺伝子に隣接して自然に発生しないが、実験室の操作によって位置するプロモーターとして定義される。説明のために、SV40　大　Ｔ抗原プロモーターは、大Ｔ抗原のいかなる遺伝子に関しても異種性である。
用語「転写増強」は、本明細書では、機能的なプロモーターを含有している配列に結合した転写の割合の増加を生産する機能的な性質に関する。
本明細書で用いる時、用語「転写調節要素」は、転写を活性化するDNA配列のみかまたはそれと１つまたはそれよりも多い他のDNAとの組み合せに関する。転写調節要素は、たとえば、プロモーター、応答要素、負の調節要素及び／またはエンハンサーを含むことがある。
本明細書で用いる時、「転写因子認識部位」及び「転写因子結合部位」は、１つまたはそれよりも多い転写因子の配列－特異的相互作用のための部位であって、しばしば直接的なタンパク質－DNA結合の形をとるものと同定されるポリヌクレオチド配列または配列テーマに関する。一般に、転写因子結合部位は、DNAフットプリント法、ゲル移動性シフトアッセイ及びその他同種類のものにより同定でき、及び／または、既知のコンセンサス配列テーマに基づいて、もしくは、当業者に知られた他の方法により予測し得る。たとえば、本発明を限定するものではないが、真核の転写因子は、限定するわけではないが、NFAT, AP1, AP-2, Sp1, OCT-1, OCT-2, OAP, NFKB, CREB, CTF, TFIIA, TFIIB, TFIID, Pit-1, C1EBP, SRFを含む（Mitchell PJ及びTijan R「科学」245：P.371（1989年））。本発明の目的のために、配列－特異的方法でDNAと相互作用し、転写調節因子を働かせる、ステロイド受容体、RNAポリメラーゼ及び他のタンパク質は、転写因子と考えられている。本発明の文脈上、前立腺－特異的転写因子（または前立腺－特異的転写複合体）は、しばしば前立腺－特異的転写調節要素に含まれる。
本明細書に用いる時、用語「作用可能に結合した」は機能的な関係にあるポリヌクレオチド要素の結合に関する。核酸が他の核酸配列と機能的な関係に置かれたとき、それは「作用可能に結合」している。たとえば、プロモーターまたはエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響するなら、コード配列に作用可能に結合している。DNA配列が結合されている作用可能に結合した手段は一般に隣接しており、二つのタンパク質コード領域を結合する必要があるときは隣接していて、リーディングフレームにある。しかしながら、エンハンサーは一般にプロモーターから数キロベース離れている時に機能し、イントロン配列は変化し得る長さであるから、あるポリヌクレオチド要素は作用可能に結合するかもしれないが隣接していない。
本明細書に用いられる時、用語「転写ユニット」または「転写複合体」は、構造遺伝子（エキソン）、シス－行動結合プロモーター及び構造配列の効率的な転写に必要な他のシス－行動配列、適当な組織特異的及び構造配列の進行中の転写に必要な末端調節要素並びに効率的な転写と翻訳のために重要な付加的なシス配列（たとえばポリアデニル化部位、mRNA安定性調節配列）を含むポリヌクレオチド配列に関する。
他に特定しないなら、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左手末端は５′末端である。二本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向は５′方向に関する。発生期の転写の５′から３′付加の方向は転写方向に関する。RNAと同じ配列を持つDNA鎖上の配列領域であってRNA転写の５′末端の５′であるものは、「上流配列」に関する。RNAと同じ配列を持つDNA鎖上の配

列領域であってRNA転写の３′末端への３′であるものは「下流配列」に関する。
本明細書で用いる時、用語「毒性遺伝子」は、真核細胞、一般に哺乳類の細胞で発現した時、細胞を殺すか、細胞に細胞消滅、細胞静止、老化または細胞－型特異的タンパク質の発現のような特異の機能の発現の阻止を表わすようにさせるか、またはこれらの内の１つまたはそれよりも多い方法で細胞の細区分を切除するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に関する。本発明の好ましい毒性遺伝子は：ジフテリア毒Ａ－鎖遺伝子（DTA）、リシンＡ鎖遺伝子（Ric）、ヘルペスウイルス　チミジンキナーゼ遺伝子（tk）及びプソイドモナス　エキソトキシン遺伝子（PE）である。他の適当な遺伝子は、当業者に明らかであろう；たとえば細胞質（gytoplasmic）タンパク質として細胞内に発現された時細胞に死をもたらす適当なヌクレアーゼ及びプロテアーゼ。代りに、必須細胞タンパク質の欠失ムテインをコードする毒性遺伝子（たとえばGAPDHのようなハウスキーピング遺伝子）はコグネート正常タンパク質の競合的又は非競合的阻害剤として作用することによって細胞を殺すかもしれない。最も好ましくは、毒性遺伝子はDTA遺伝子である。
本明細書で用いられる時、用語「ムテイン」は、親類似体の活性を保持しているが、親類似体の配列に比較して原（primasy）アミノ酸配列に少くとも一つの逸脱を含む突然変異により変えられた生物学的に活性なタンパク質に関する（「遺伝学及び細胞遺伝学の小辞典第４版」P.381，Springer-Verlag（1976年）、引により本明細書に組み入れられる）。たとえば、限定ではないが、DTAムテインは、アミノ酸置換（一般には控えめな）がなされた残余の位置で以外は天然のDNAポリペプチドと一致する配列を有する原アミノ酸配列を含んでもよく、DNAムテインは、たとえ天然のDNAと同じ特異的活性のDNAが必要でなかったとしても細胞毒を有している。
詳細な記載
この後で用いられる専門語及び細胞培養、分子遺伝学、及び核酸化学の実験室の手順並びに下記ハイブリダイズは、当業界で良く知られ、普通に用いられるものである。組み換え核酸法、ポリヌクレオチド合成、細胞培養及びトランスジーン取り込みのために標準技術が用いられる（たとえば、エレクトロポーレーション、ミクロインジェクション、リポフェクション）。一般に酵素反応、オリゴヌクレオチド合成及び精製段階は製造者の仕様書に従って実施される。技術及び手順は当業界で慣用の及びこの文書中に提供されている種々の一般的な参考文献に従って実施される。その手順は当業界でよく知られているものと信じられ、読者の便利のために提供されるものである。本明細書に含まれているすべての情報は引用によって本明細書に組み入れられる。
キメラ標的マウスは、ホーガン（Hogan）他「マウスの胚の操作：実験マニュアル（Manipulating the Mouse Embryo：A Laboratory Manual）」（Cold Spring Harbor Laboratory（1988年））及び「奇形がん腫及び胚基部細胞：実践的アプローチ（Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells：A Practical Approach）」（E.J.Robertson編、IRL Press，Washington，D.C.，（1987））（これらは引用により本明細書に組み入れられる）に従って誘導される。
胚基部細胞は公表された手順（「奇形がん腫及び胚基部細胞：実践的アプローチ」E.J.Rovertson編、IRL Press，Washington，D.C.（1987年）；Zjilstra他「Nature」342：P.435～438（1989年）及びSchwartzberg他「Science」246：P.799～803（1989年）、これらの各々は引用により本明細書に組み入れられる）に従って操作する。
オリゴヌクレオチドは、製造者によって提供された仕様書に従ってApplied Bio Systemsのオリゴヌクレオチド合成機で合成することができる。
PCR複製法は当業界で記載されている（「PCR技術：DNA複製のための原理と応用（PCR Technology：Principles and Application for DNA Amplification）」HA Erlich，Freeman Press，New York，NY（1992年）、「PCRプロトコル：方法と応用への手引（PCR Protocols：A Guide to Methods and Applications）」Innis，Gelfland，Snisky及びWhite編、Academic Press，San Diego，Ca（1990年）；Mattila他「核酸研究（Nucleic Acids Res.）」19：P.4967（1991年）；Eckert，K.A及びKunkel，T.A.「PCR法及び応用（PCR Methods and Applications）」１：P.17（1991年）；「PCR」McPherson，Quirkes及びTeylor編IRL

Press, Oxford；及び米国特許第4,683,202号、これらは引用により本明細書に組み入れられる）。

組織／器官－特異的転写調節要素、たとえばエンハンサー／プロモーターの存在は、がんが発生した特定の器官を抗－がん剤の標的とする機会を提供する。これは、（ａ）その細胞の内で生産物が転写される細胞の切除をもたらす生産物の転写を準備する遺伝子、たとえば高度に毒性のタンパク質をコードする遺伝子を細胞に導入し、（ｂ）高度に特異的なエンハンサー／プロモーターを備えた前記遺伝子の発現を調節することによって行う。したがって、がんが発生した、１つの特定の部位を持つ細胞のみを殺すだろう。治療比は1.5：１から10：１またはそれ以上に改善できるだろう。

前立腺－特異的転写調節要素の同定

前立腺細胞中で優先的に発現する遺伝子の中の又はそれに隣接するDNA配列は、前立腺細胞中でシス結合の転写を増強するか、転写させるように機能するDNA配列テーマを含有する。これらの配列を前立腺－特異的転写調節配列と呼ぶ。このような前立腺細胞にあって、他の細胞型には本質的にない配列を単離し、作用可能に結合したレポーター遺伝子（たとえばCAT）の転写を増強または転写させる能力を評価する。最小限の機能的配列を欠失分析及び／またはリンカー走査変異誘発及びそのた同種類のものにより明らかにし、次いで、最小限のレポーター構成物もトランスフェクトされた、トランスフェクトされた他の細胞型ではなく、前立腺細胞における転写を示す転写活性のアッセイをする。

好ましい前立腺－特異的転写調節要素は、ヒトPSA遺伝子の約5.3Kb上流フランキング領域に接して含有される。この5.3Kbのセグメントは一般に、PSA－特異的ヌクレオチドプローブ（たとえばPSA cDNA配列）により探査されたヒトゲノムクローンライブラリーから単離されたXba Ｉ－HindIII断片で表わされる。この断片の中で特に興味があるものは、約－5300～－2800、特に－5322～－2851の領域自体または－541～０の領域と結合した前記領域、及びそれらの機能的断片、たとえば、それらの中に独立してまたは結合して包含されている転写因子結合配列及び応答要素である。

前立腺－特異的転写調節要素は、プロモーター及び／またはエンハンサーを含むことができる。たとえばPSAエンハンサーは、－5.3Kb及び－2.8Kb（下の）の間のPSA上流領域の欠失分析により同定され、一般にヒトゲノムからXba Ｉ－Apa Ｉ2.5Kb断片として単離できる。このエンハンサーを「上流PSAエンハンサー」と呼ぶ。所望により、ヒトPSA遺伝子の約－541～＋７、特に－320～＋７にわたる天然のPSAプロモーターは、上流PSAエンハンサーと作用可能に結合して、包含されることがある。代りに、異種性のプロモーターがPSA上流エンハンサーと作用可能に結合し、作用可能に結合した構造遺伝子配列（たとえば毒性遺伝子、レポーター遺伝子または他のコード配列）の発現をさせるのに用いられる。種々の欠失及び点変異（point mutation）をPSA遺伝子の上流配列に作り、各変異体を新形成前立腺細胞（たとえばLNCaP）中でレポーター遺伝子（たとえばCAT）の転写をさせるまたは増強させる能力について及び非前立腺細胞型（たとえばNIH3T3, HBL100, HT1149, NIH OVCAR-3, 293またはDU145、すなわち、PSAを合成することができないヒト前立腺がん細胞系）において実質的に不足する発現について評価することができる。

抗－増殖構成物

毒性遺伝子構成物

毒素分子をコードするポリヌクレオチド配列は前立腺－特異的遺伝子（たとえば、PSA）のシス－行動転写調節配列（たとえばプロモーター、エンハンサー）と作用可能に結合し、そのため毒性タンパク質は天然の前立腺細胞、好ましくは新形成前立腺細胞中の内因性の前立腺－特異的遺伝子の発現と同様な方法で前立腺細胞中で発現する。したがって、毒素－コード配列が、前立腺－特異的遺伝子（たとえばPSA遺伝子）の中または近くに天然にある転写調節要素に作用可能に結合することが通常好ましい。

作用可能な結合は内因性の前立腺－特異的遺伝子の転写調節配列（すなわち、プロモーター及び特異的細胞型発現を与える付加的要素）の下流の（すなわち、翻訳リーディングフレーム方向でコードされた天然ポリペプチドのカルボキシ末端に向って）毒性遺伝子を相同配列標的により置換することによって形成できる。

代りに、作用可能結合をトランスジーンとして、外因性で形成することができ、そこで毒性遺伝子は内因性の前立腺－特異的遺伝子から分離した転写調節配列と、一般にゲノムDNAクローン化によって作用可能に結合している。このようなトランスジーンでは転写調節配列は、効率的な細胞型特異的発現に必要な少くとも最小限の配列であって、一般に少くともプロモーターとプロモーターの少くとも約0.2キロベース（Kb）上流、好ましくはプロモーターの少くとも約１～３Kb上流、さらに好ましくはプロモーターの少くとも約５Kb上流そして、しばしばプロモーターの少くとも約８またはそれよりも多いKb上流である。PSA遺伝子の場合、少くとも機能的プロモーターとPSA上流エンハンサーとが結合して、作用可能に結合した構造遺伝子（毒性遺伝子）配列の前立腺－特異的発現をさせる。しばしばプロモーターの下流の配列、特にイントロン配列は、トランスジーン構成物に含まれる（Brinster他31人「Proc.Natl.Acad.Sci（U.S.A.）85：P.836（1988年）、引用により本明細書に組み込まれる）。通常プロモーターの上流の配列は連続して用いられるが、種々の欠失と再配列も用い得る。いくつかの所望の調節要素（たとえば、エンハンサー、サイレンサー）は相対的に位置不感受性であってもよい。そのため調節要素は、たとえ対応する原基系（germline）遺伝子とトランスジーンとで異なって位置したとしても正しく機能するだろう。たとえば、エンハンサーは、プロモーターから異なった距離で、異なった方向に及び／または異なった線状順序で位置するかもしれない。たとえば、原基系形状において、プロモーターに対し３′に位置するエンハンサーはトランスジーンにおいてプロモーターに対して５′に位置するかもしれない。都合がよければ、前立腺－特異的遺伝子に及び、都合のよいだけの上流隣接（flanking）配列を含有する隣接する（contiguous）セグメント（一般に１～10Kb）を、遺伝子の少くとも最初のイントロンと交換または移すために及びプロモーターと作用可能に結合するために挿入された毒性遺伝子とともにトランスジーンまたは標的構成物中で用いるのが好ましい。

前立腺－特異的遺伝子は、独立して細胞型－特異的であり得る多数のプロモーターを含むことができ、前立腺（特に新形成前立腺）細胞で転写をさせる少くとも１つのプロモーター（または他の転写要素）に毒性遺伝子を作用可能に結合することが必要であることをさらに認識した。非－前立腺細胞で転写をさせ、前立腺細胞での効率的な転写のために必要でない転写要素は、トランスジーンまたは標的構成物から有利に欠失して、前立腺細胞を切除し、他の細胞型の切除を最小限化するための付加的な細胞－型特異性を提供することができる。

もし、選択された転写調節配列が毒性遺伝子を転写するのに相対的に非効率であるなら、トランスジーンの増強された遺伝子量を補償するために、トランスジーンまたは標的構成物の多数のコピーを導入することが望ましいかもしれない。

毒性遺伝子

毒性遺伝子は、いかなる補助剤とも独立して毒であるか、補助剤と関連してのみ毒であり得る。最小限の細胞内濃度に達すると細胞列をもたらす多数の天然毒素がある。他の毒性剤は第２剤と関連して細胞列を誘導するが、そうでなければ寛容である。この後者のタンパク質の例はチミジンキナーゼである。

いくつかのポリヌクレオチド配列は本発明のトランスジーン及び標的構成物として用いるのに適当である。好ましい毒性遺伝子は、ジフテリア毒素Ａ鎖遺伝子（Palmiter他の著作参照（1987年）及び誤植「細胞（Cell）」62：P.608の次（1990年）；Marwell他「分子細胞生物学（Mol.Cell.Biol）」７：P.1576（1987年）；Behringer他の著作参照（1988年）；Messing他の著作参照（1992年）；これらは引用により、本明細書に組み入れられる）、リシンＡ鎖遺伝子（Piatak他「生物化学雑誌（J.Biol.Chem.）263：P.4837（1988年）；Lamb他「ヨーロッパ生物化学雑誌（Eur.J.Biochem）」148：P.265（1985年）；Frankel他「分子細胞生物学」９：P.415（1989年）は引用により本明細書に組み入れられる）、少くとも領域IIIまたはアミノ酸400～600を含んでなるプソイドモナス　エキソトキシン遺伝子（Hwang他「細胞」48：P.129（1987年）、Siegall他「生物化学雑誌」264：P.14256（1989年）；Chaudhary他「Proc.Natl.Acad.Sci.（U.S.A.）」87：P.308（1990年）は、引用により本明細書に組み入れられる）及びHSV tk遺伝子（Zjilstra他「Nature」342：P

.435（1989年）；Mansour他「Nature」336：P.348（1988年）；Johnson他「Science」245：P.1234（1989年）；Adair他「Proc.Natl.Acad.Sci.（U.S.A.）」86：P.4574（1989年）；Capecchi，M.「Science」244：P.1288（1989年）は引用により本明細書に組み入れられる）である。

DTA，Ric及びPEはそれらが発現される細胞を直接に殺すように作用する。HSV tk遺伝子は生体内で毒性をもたらすのにgancyclovirのような負の選択剤を必要とする。一般にgancyclovirの用量は標準用量－応答曲線を描き、所望のレベルの前立腺細胞の切除が観察される用量レベルを決定することにより調整する。動物に対するgancyclovir（GANC）の投与に関する情報は、パッケージ挿入物（package inserts）からのヒト処方指示を含む、当業界の種々の源から入手できる。細胞培養に用いる時、gancyclovirの選択的濃度は一般に約１μM、試験管内応用に用いられる場合約0.2μM及び生体内応用に投与されるとき約１～５μMである（一般には、水溶液中に125mg／mlのgancyclovirを負荷した浸透ポンプから約24時間以上継続注入によって投与する）。

種々の他の毒性遺伝子を実行者の裁量で用いることができ、それは競合的または非競合的に天然型の正常な機能を阻害し、それにより細胞を殺す、天然のタンパク質の変異させたまたは端を切り取った型を含み得る。代りに、毒性遺伝子は、細胞の細胞質中に酵素的に活性なポリペプチドとして発現されたとき細胞の死を引き起こす（たとえば、Trypan Blue dyeの排除で決定するとき）、効力のあるヌクレアーゼ（たとえばRNアーゼＡ）またはプロテアーゼ（たとえば、トリプシン、キモトリプシン、プロテイナーゼＫ．等）の工学的に作り出された細胞質変異体をコードするポリヌクレオチドを含み得る。代りに、毒性遺伝子は、細胞毒性細胞型で発現された時、その細胞型の細胞消滅（計画された細胞死）を生じさせる遺伝子を含み得る。

抗原及びリンホカイン遺伝子

毒性遺伝子を用いない態様について、本発明の一つの変型は、リンホカインまたは抗原を発現する細胞を指示する免疫応答を増強または引き出す、リンホカインまたは抗原をコードする構造遺伝子を持つ前立腺特異的調節要素と作用可能に結合することにより、発現ポリヌクレオチドを生成することを含む。一般には、PSAの上流エンハンサー及びプロモーターを含むDNAセグメントが、構造遺伝子と作用可能に結合して、発現構成物を生成する。一般的リンホカイン遺伝子を次に例示するが、限定するわけではない：すなわち、IL-I，IL-2，IL-12，GM-CSF，IFNα及びIFNγである。一般的抗原遺伝子は免疫原性があって、たとえば免疫グロビン（Immunoglobin）kV領域及びSV40　大　T抗原である（Watanabe他「免疫雑誌（J.Immunol.）」151：P.2871、引用により本明細書に組み入れられる。一つの態様では、前立腺特異的エンハンサーがヒト　IgGまたはSV T抗原の免疫グロビンkV領域のような高度に可視の抗原を駆り立てる、DNA－仲介腫瘍ワクチンが前立腺新形成を治療するのに用いられる。この性質の腫瘍ワクチンは、ナチュラルキラー細胞を引き出していかなる残存する腫瘍細胞をも切除することができる。PSAを発現する前立腺細胞は今や免疫原性があって免疫系に対して可視となるだろう。これらの療法は、経直腸細針生検（下記）に記載するようにしても供給することができる。

アンチセンス配列

タンパク質をコードする遺伝子を持つ代りに、標的として宿主の増殖または生育力のために必須の遺伝子のコード領域を有する少くとも約30bp、通常少くとも約50のアンチセンス配列を持ってもよい。転写、翻訳、代謝経路、細胞構造遺伝子またはその他同種類のものに関連する多数のタンパク質はアンチセンスの標的であってもよい。望ましくは、標的は必須で、相対的に低レベルで存在し、特に新形成細胞と関連すべきである。特に興味があるのは、増殖に関連する転写因子、たとえばがん遺伝子又は細胞骨格遺伝子たとえばβ－アクチン及びチューブリン、その他であろう。

通常の文脈では、アンチセンス遺伝子は慣用の方法に従って、手で合成するか、または自動合成機で合成することができる。PCEの文脈では、PSEは、アンチセンスの転写がPSEが活性である細胞の内でのみ起こるようにアンチセンス構成物をコードするように作用可能に結合されるだろう。

転写調節配列

本発明のトランスジーン及び発現ポリヌクレオチドは、毒性遺伝子または他の構造遺伝子に作用可能に結合した前立腺特異的遺伝子の転写調節配列を含み（たとえばリンホカインまたは免疫原性抗原を活性化する）、本発明の標的構成物はこのような転写調節配列を含むことができる。適当な転写調節配列は、結合した毒性遺伝子の前立腺－特異的転写をさせるものであるけれども、低レベルの転写は、非前立腺細胞の発現が、トランスジーン／発現ポリヌクレオチドで治療した患者の健康と予後に実質的に支障をきたさないかぎりにおいては、他の細胞型に生じてもよい。

本発明の適用な転写調節配列は、新形成前立腺細胞集団中で優先的に発現した遺伝子の内に、または隣接するポリヌクレオチド配列から誘導されるか、それと一致する。種々の前立腺－特異的遺伝子が適当であり、特異的遺伝子は、実行者の裁量で選択することができる。たとえば、前立腺－特異的転写調節配列を有する遺伝子は、前立腺酸（prostatic acid）ホスファターゼ（PAP）、及びモノクローナル抗体TURP-27, Leu7, 7E 11-C5及びPD41によって検出される抗体をコードする遺伝子を含む（Wright他「前立腺（The Prostate）」17：P.301（1990年））。多くの意図する目的のために、ヒトPSA遺伝子は前立腺－特異的転写調節配列を得るための好ましい適当な源である。

ヒトPSA遺伝子をクローン化し、配列決定により特徴づけた（Lundwall Aの著書参照（1989年）；Riegman他「分子内分泌学（Molec.Endocrinol.）」５：P.1921（1991年）は引用により本明細書に組み込まれる）。毒性遺伝子または他の構造遺伝子は、好ましくはPSA遺伝子上流エンハンサー（及び所望によりPSAプロモーターを含む）との作用可能な結合で挿入される。毒性遺伝子（または他の構造遺伝子）を、当業界で標準のクローン化方法に従って正しい転写及び翻訳を保証するように配置する。標的構成物は、選択された挿入部位に隣接する配列に一致する毒性遺伝子（または他の構造遺伝子）に隣接する組み換え体と相同の領域（recombinogenlc homology regions）を持って生産され、それは転写開始部位の下流であろう。PSA上流エンハンサーとして本明細書に同定される調節配列を含むトランスジーンも生産されるが、それはPSA上流エンハンサーの上流または下流の付加的な配列を含むことが望ましい；すなわち、そのような配列は、ヒトゲノムライブラリーの慣用の「染色体歩行」スクリーニングにより容易に単離し得る。

おとり

PSE領域もおとりとして用いるのに役立ち、ds DNAを前記の任意の慣用の手段で標的細胞に導入する。ds DNAは、ds DNAが標的転写因子に結合する限りは天然のヌクレオチドまたは非天然のヌクレオチドから合成し得る。おとりを前立腺細胞に導入することによって、PSEに結合している転写因子はおとりと転換されるであろう、それでPSAとPSAを調節する転写因子を必要とする他の遺伝子は転換されるであろう。これは、PSAと同等に調節される遺伝子を同定するのに役立ち、前立腺の生存能力と成長を調節するのにも役立つことができる。

DNA供給方法

DNA供給のための多数の方法が開発され、新しいものの開発も続いている。現在利用できる方法は三つ主要なグループに分けられるであろう：すなわち、ウイルスのベクターを用いるトランスフェクション、脂質を用いる融合及びカチオン的に支持されたDNA導入である。これらの技術の各々に利点と不利な点がある。そこでどの技術を用いるかの選択は特定の状況とその要求に依存するだろう。

前立腺細胞及び前立腺がん腫へのDNA供給

本発明のポリヌクレオチド構成物の前立腺細胞、特に新形成前立腺細胞への輸送は、任意の適当な既知の技術の方法によって達成し得る。

本発明は、前記発現構成物、トランスジーン及び相同的組み換え構成物を細胞に、特に前立腺の病気の治療のために生体に運ぶための方法及び組成物を提供する。

前記病気の遺伝子治療を実行可能とするために、次の目的を達成するDNA移動方法を用いるのが望ましい：すなわち、（１）治療上のポリヌクレオチドを特異的標的細胞型（たとえば、新形成細胞、前立腺細胞）に指示することができる、（２）治療上のポリヌクレオ

チドを標的細胞集団への取り込みを仲介するのに高度に効率的であること及び（３）治療上の応用のために生体内で用いるのに適していることである。
これまで、米国で承認された遺伝子輸送の試みの多くは、レトロウイルスのゲノムの部分として治療上のポリヌクレオチド配列を持つ複製欠損レトロウイルスベクターに頼る（Miller他「分子細胞生物学」10：P.4239（1990年）；Kolberg R「J.NIH Res.」４：P.43（1992年）；Cornetta他「Hum.Gene Ther.」２：P.215（1991年））。遺伝子治療のためのレトロウイルスベクターの主な利点は：複製細胞への遺伝子輸送の高効率性、細胞DNAへの輸送された遺伝子の正確な組み込み及び遺伝子取り込み後の配列のさらなる広がりを欠くことである。主な不利な点は、レトロベクターの分裂しない細胞に感染する能力がないこと、レトロウイルスベクターは合成的に作ることができず感染した培養細胞により生産しなければならないから、遺伝子取り込みのために用いられるレトロウイルスベクターを完全に特徴づける能力が本来ないこと、明確な細胞型選択的に標的とする能力がないこと及び他の問題の中でも、宿主細胞ゲノムの所望しない挿入的変異の可能性である。
アデノウイルスベクターも、ヒトの遺伝子治療において用いる可能性について記載されている（Rosenfeld他「細胞」68：P.143（1992年））。アデノウイルスベクターの主な利点はそのレトロウイルスよりも大きい挿入ポリヌクレオチド配列を担う能力、非常に高いウイルス力価、非複製細胞に感染する能力及び組織、特に肺で生体内原位置で感染するための適合性である。主な不利益は、免疫原性であるか、または他の不利な影響（たとえば、細胞変性ペントンタンパク質）を有するウイルス性のタンパク質をコードするベクター中の多くのアデノウイルス遺伝子封入体及び、ウイルスは染色体のDNAに安定に組み込まれないという理由で遺伝子発現の潜在的な不安定性である。
さらに、それらの固有の抗原性のため、ウイルスベクターを用いるほとんどの遺伝子治療法は、たとえばがんのような慢性病の治療に必要とされるかもしれない、多数の投与には不適当である。
ヒトに用いるために承認された他の遺伝子輸送方法はリポソーム中のプラスミドDNAの生体内原位置のがん細胞への直接的な物理的輸送である。培養細胞中で増殖しなければならないウイルス性のベクターと違って、プラスミドDNAは精製して均質にでき、したがって病原性の汚染の可能性を減ずることができる。ある状況（たとえば、がん細胞）では、一過性の発現ががん細胞を殺すのに十分であるかもしれないので、外因性DNAを導入された細胞中に安定に組み込む必要がないかもしれない。リポソーム仲介のDNAの導入は、多くの研究者により記載されている（Wang及びHuang「Biochem.Biophys.Res.Commun.」147：P.980（1987年）、Wang及びHuangの「生化学」28：P.9508（1989年）、Litzinger及びHuang「Biochem.Biophys.Acta」1113：P.201（1992年）、Gao及びHuang「Biochem.Biophys.Res.Commun.」179：P.280（1991年）、Felgner WO 91／17424号、WO 91／16024号）。不運にも、リポソーム組成物は通常外因性のDNAを前もって決定した細胞型へ輸送するための特異性を持っていない；すなわちリポソームは一般に広範囲の種の細胞型との融合に等しい頻度で、無差別であり、しばしば効率的な融合に非生理的なPH条件を必要とする。
免疫リポソームも、外因性ポリヌクレオチドの担体として記載されている（Wang及びHuang「Proc.Natl.Acad.Sci.（U.S.A.）」84：P.7851（1987年）、Trubetskoy他「「Biochem.Biophys.Acta」1131：P.311（1992年））。免疫リポソームは、多分特定の細胞型の表面の抗原に結合する特定の抗体の封入体のせいでリポソームに比較して改良された細胞型特異性を持つことが仮説として期待されるだろう。不運なことに、抗体はしばしば交差反応性であって、交差反応性エピトープを担う種々のタンパク質と結合する。これは、抗体が保存された遺伝子家系のメンバーである細胞表面抗原または、多くの他の細胞表面タンパク質に存在する保存された配列を含有する細胞表面抗原に対して生じる時に特別な問題を提起することが予期されるだろう。さらに細胞表面タンパク質に結合する免疫グロブリンは、能率の悪いエンドサイトーシスをするか、または抗原と結合して融合の前に免疫リポソームから外来性DNAの不所望の放出をさせる免疫リポソームの時期尚早の崩壊を生じさせるかもしれない（Ho及びHuang「免疫雑誌（J.Immunol.）」134：P.4035）。さらに、免疫リポソーム－DNA調製はトランスフェクションについて比較的能率が悪い。

ベアー（Behr）他は「Proc.Natl.Acad.Sci.（U.S.A.）」86：P.6982に、いかなる付加的なリン脂質も必要とせずにトランスフェクション自身を仲介するための試薬としてリポ多価アミンを用いてリポソームを生成させることを報告している。しかしながら、リポ多価アミンは外因性のDNAに前もって決めた標的特異性を与えない；すなわち、大体は細胞は無差別的にトランスフェクトされる。

低分子量ポリリシン（“PL”）及び他のポリカチオンも培養哺乳動物細胞へのDNA－仲介トランスフェクションを促進するための担体として記載されている。Zhou他「Biochem.Biophys.Acta」1065：P.８（1991）は、ポリリシン－リン脂質複合体：すなわち、Ｎ－グルタリルホスフェチジルエタノールアミンに結合したPLを含むリポポリリシンの合成を報告しており、それは、伝えられるところによれば商業的にトランスフェクション試薬として用いられるリポフェクチンに比較してDNAのトランスフェクション効率を増加させる。不運にも、リポポリリシンは十分な細胞型特異性をもたらさないし、懸濁液中での細胞を形質転換するには全く効率的ではないことが著者により報告された。

アシアロオロソムコイド（Wu GY及びWu CH「生物化学雑誌（J.Biol.Chem.）」262：P.4429（1987）；Wu GY及びWu CH「生化学（Biochemistry）」27：P.887（1987）；Wu GY及びWu CH「生物化学雑誌」263：P.14621（1988）；Wu GY及びWu CH「３生物化学（Biol.Chem.）」267：P.12436（1992）；Wu他「生物化学雑誌」266：P.14338（1991）及びWilson他「生物化学雑誌」267：P.963, WO 92／06180；WO 92／05250及びWO 91／17761）またはトランスフェリン（Wagner他「Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.）」87：P.3410（1990）；Zenke他「Proc.Natl.Acad.Sci.（U.S.A.）」87：P.3655（1990）；Birnstiel WO 92／13570）と複合したポリリシン分子が記載された；このような複合体は、適切な受容体（すなわち、それぞれアシアロオロソムコイド受容体またはトランスフェリン受容体）を発現する細胞に会合したDNAの標的－特異的供給を与えると予想された。WO 91／14696は、短いアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞膜を通って細胞に輸送するための輸送を促進する標的試薬へジスルフィド結合しているオリゴヌクレオチドを含有する共有結合した複合体を記載している。バーンスチール（Birnstiel）はWO 91／17773において、CD４＋Ｔ細胞に標的特異性を与えるためにアンチ－CD４抗体またはHIV gp120断片を含むポリカチオン複合体を記載している。同様の方法は、リガンドまたは受容体と反応性の特異的抗体で標的とされる細胞表面受容体を発現する前立腺細胞へDNAを特異的に供給するのに用いることができる。このような方法は特定の細胞型に外因性のポリヌクレオチドを供給するという特異性を増加するけれども、これらの方法はしばしばポリフェクチン法に比較して低トランスフェクション効率を有している。

リポソーム仲介トランスフェクションは高度に効率的で、一般には細肪型特異的ではなく、そして、脂質とDNAの複合体は網状内皮系の細胞と急速に会合する（Mannino及びGould-Fogerite「BioTech」６：P.682（1988））。受容体－仲介トランスフェクションは理論的には、どのようなサイズのDNAまたはRNAのトランスフェクトも可能とするはずであるが、その効率は核酸のリソソーム分解により影響を受ける。これはリソソーム分解の阻害剤（リソソーム向性剤という）の使用を必要とし、それは通常トランスフェクションと同時発生的に（すなわち、約１～６時間前または続いて）細胞に投与される。不運にも、クロロキンのような、ほとんどのこれらの試薬の細胞毒性は、受容体仲介トランスフェクションの一般的な使用を制限する（Dean他「Biochem.J.」217：P.27（1984））。

本質的にいかなる適当なDNA供給法も用い得るけれども、発現構成体／トランスジーンを含む裸のDNAの標的細胞集団（たとえば前立腺腫瘍塊）への直接物理的適用が多くの場合好ましいと信じられていると一般に信じられている。

前立腺肥大及び新形成のための治療方法

前立腺がん及び良性前立腺増殖は、遺伝子治療を用いて治療、阻止または予防することができ、そこで、前立腺－特異的転写調節要素を遺伝子の標的発現のために前立腺に供給し得る。核酸は殺菌した生理的に受容性の担体に入れて貯蔵及び投与でき、そして核酸組成物はDNAの細胞への導入に助けとなる任意の試薬と合同して分散されている。

水、PBS、エタノール、脂質等を含む、種々の殺菌した溶液を液組成物の投与に用い得る

。DNAの濃度は治療上の投与量を供給するのに充分であろう。そして該投与量は細胞への輸送効率に依存するだろう。投与は、注射針、トロカール、カニューレ、カテーテル等により、大きい丸薬、多数投薬量、延長した点滴としてであり得る。投薬量は、病巣内に脈管内にまたは他の適当な部位に投与される。

ジフテリアＡ毒性遺伝子は前立腺－特異的エンハンサー、たとえばPSA上流エンハンサーの３′に置かれる。このDNAは、裸のDNAとして、リポソームとしてまたは他のリポフェクション複合体及びフランツェン（Franzen）針を用いる、前立腺の経直腸細針生検に類似する外来患者の手順で、前立腺腫瘍細胞塊に直接的に入れるようなものとして、DNAを直接注入により供給される。細針生検は一般にBPH及び前立腺がん及び前立腺がんの段階の差別的な診断に用いられる。治療法としてのDNAの細針注入は、小結節の人さし指による触診、超音波または直腸内視鏡によって管理される。この方法でDNAを繰り返し、治療的に注入することも可能である。しばしば供給は静脈注入によって達成するのが好ましい。毒またはワクチンタンパク質をコードする本発明の前立腺－特異的ポリヌクレオチドを含有する組成物を、予防及びまたは治療医療のために投与することができる。治療上の適用では、組成物をすでに特定の新形成／肥大前立腺病に冒された患者に、なおすのにまたは少くとも状態及びその合併症を阻止するのに十分な量で投与する。これを達成するのに適当な量は「治療上有効投薬量」または「有効投薬量」と定義される。この使用に有効な量は、病状のひどさ、患者の一般的な状態及び投与の経路に依存するだろう。

実験例

組織－特異的PSA上流エンハンサーの同定

前立腺－特異的抗原のプロモーターが報告された（Riegman他の著作（1991）参照、引用により本明細書に組み込まれる）。－320から＋７のプロモーターは、TATAボックス、GC－ボックス及び－170～－156のホルモン応答要素を含有する。しかしながら、－1600～＋７のCAT構成物のヒト前立腺LNCaP細胞へのトランスフェクションは伝えられているように不成功であった。実際にその記載された機能的ドメインは、アンドロゲン受容体発現プラスチドをもったさるの腎臓のCOS細胞にCAT構成物を共トランスフェクトすることによって見い出された。LNCaP細胞におけるCAT構成物の活性の欠乏は、トランスフェクション効率のなさによるのかまたは適当な組織－特異的エンハンサー要素の欠乏によるのか、この研究からは明らかではない（Reigman他の著書（1991）参照）。ヒトゲノムライブラリーから単離された前立腺特異的抗原（PSA）遺伝子の５′隣接領域を表わす、ファージベクターCharon 4A中の６Kb断片は親切にもLundwall（著書（1989）参照）により提供された。これはpUC18主鎖中の６Kb断片はHindIII断片であることを表わす。６KbのPSAの５′隣接領域の制限消化分析は図２に示された独特な部位の地図を提供した。この６Kb DNA断片のCAT活性を駆動する能力をヒト前立腺LNCaP細胞（ATCC）のトランスフェクションにより試験した。LNCaPを10％のウシ胎児血清、ペニシリン及びストレプトマイシン各100Ｕを補足したRPMI1640の５ml中で、密度７×10～細胞／６cm皿に薄くかぶせた。24時間後、細胞を２mlのリン酸塩緩衝塩類液で２回洗浄し、カチオン性リポソームで静かにトランスフェクトした。30μｇのリポフェクチン（Gibco BRL）を混合した15μｇのDNAを３mlの血清のない培養液／皿に加えた。24時間後、培養液を除去し、５mlのRPMI1640、10FCSで置換した。細胞を48時間の追加のインキュベーション後収集した。抽出物を調製するために、細胞をPBSで二回洗浄し、１mlの150mM NaCl、50mMのTris-HCl pH7.4、1mMのEDTAで除去した。細胞を遠心分離によって収集し、100μｌの0.25M Tris-HCl pH7.4中で３回の凍結－融解により溶解した。14,000RPM、４℃、５分の遠心分離に続いて、上清を除去し、－20℃で貯蔵した。CAT分析を細胞抽出物の50μｇのプロテインで行った。図４に示されたクローンは、PSA遺伝子の6Kb ５′隣接領域の種々のサイズの欠失を含有して構成された。構成物はpCAT Basic（Promega）中かまたはpBS KSII＋（Stratagene）中のいずれかであった。いずれのプラスチド主鎖中の構成物も実質的に等しく働いた。

これらの構成物を試験するためにLNCaP細胞を６cmの皿中の15μｇのDNA／７×10～細胞で、リポフェクチンでトランスフェクトした。レーン１はDNAを含まず、レーン２はプロモーターのないCAT、レーン３は－5824bp ５′PSA CAT、レーン４は-5322 ５′PSA CAT、

レーン５は－4135bp　５′PSA CAT、レーン６は－3167bp　５′PSA CAT、レーン６は－1509bp　５′PSA CAT、レーン７は－633bp　５′PSA CATを含有していた。
これらの構成物の内、完全な－5824bp　HindIII構成物及び－5322bp XbaＩ構成物だけが、ヒト前立腺LNCaP細胞中でCATを駆動することができることが分かった。－4135bp（非反復（unique）ClaＩ部位）の構成物またはそれより小さいのは、これらの細胞中でCATを駆動することができなかった。したがって、推定のPSAエンハンサーは－5322bpと－4135bpの間にある；すなわち、非反復XbaＩ及びClaＩ部位の間にある。約1.2KbのXbaＩ－ClaＩ断片（配列番号：02）をpBS KSII＋に運搬し、多数のクローン化部位からのプライマーを用いて配列させ、次いでプライマーを合成した。DNAの両鎖をSangerのジデオキシ法を用いて配列した。この領域の配列は図１の全配列に示した（配列番号：01）。この領域は他の方法の中で、実行者の裁量で、都合よく、ヒトゲノムDNAライブラリーからクローン化できるかまたはヒトゲノムDNAからPCRによって複製できる。
ジーンバンク（GenBank）のコンピュータ調査は、図１の配列（配列番号：01）の配列と実質的に関係する配列を示さなかった。
前立腺特異的抗原は血清マーカーとして前立腺の良性肥大及びがんについて広く行きわたった受容性を持っていた。PSAの正常な領域は０～4.0mg／mlであるとしても、血清PSAレベルの一回の測定は病気の状態の前兆ではない。しかしながら、繰り返しの測定でPSAの上昇レベルが10mg／mlを超え、数ヶ月以内の急速な上昇を示すことは深刻な心配をもたらす。このような兆候に続いて上昇PSAレベルが良性肥大によるものか、前立腺がんによるものかを生検で決定する。PSAは、前立腺組織または新形成の前立腺組織の転移でもっぱら合成されることが分かった。興味深いことに、現在まですべての前立腺がんの転移及び前立腺組織の初期（primary）の培養はPSAを合成する（Ghazizadeh他「Urol.Int」39：P.9（1984））。この推定のPSAエンハンサーが組織－特異的であるかどうかの疑問は非常に興味深い。具体的に言うと、該エンハンサーは、他の組織ではなく、前立腺組織でのみで、CATの発現を指令するのか？　表Ｉは、CATを駆動する－6.0Kb　５′PSA隣接配列を用いての種々の細胞系の試験管内トランスフェクションのデータを示す。LnCaP細胞はリポフェクチンを用いてトランスフェクトされた。他のすべての細胞はDEAE－デキストラン法によりトランスフェクトされた。

表Ｉ．　PSAエンハンサーの組織特異性

細　胞　系		ＣＡＴ活　性
ヒトがん前立腺	LNCaP	＋
マウス繊維芽細胞	NIH3T3	－
ラット膵臓	AR42J	－
ヒト腎臓	293	－
ヒトがん卵巣	NIH OVCAR-3	－
ヒト胸がん	HBL100	－
ヒトがん前立腺	DU145	－
ヒト膀胱がん	HT1149	－

すべてのトランスフェクションはCATより少ないプロモーターには陰性であり、SVCATにも陰性であったLNCaPを除いて、SV40初期プロモーター（SVCAT）によって駆動されたCATには陽性であった。表Ｉのデータは、推定のPSAエンハンサーが、活性に前立腺特異的抗原を発現している前立腺組織に、組織－特異的であることを示している。DU145、すなわち、PSAを発現しないヒト前立腺腫瘍系が、PSAエンハンサーからCATを駆り立てるにも失敗することに気づくのは興味深い。しかしながら、PSAに陰性の細胞系の前立腺の病気の研

究の価値を問題にしながら、PSAの組織特異的発現が、BPH及び前立腺がんの特有症候である。発生学的に膀胱は前立腺に最も近い関係があるので膀胱細肪を選択した。
前立腺の細胞毒性治療のために、前立腺の腫瘍ワクチンのために並びにリンパ管及び骨に発生する標的腫瘍転移への遺伝子供給媒体の注入のために、PSA上流前立腺－特異的エンハンサーを毒性遺伝子発現ポリヌクレオチドを生成するのに用いることができる。

前立腺－特異的トランスジーンを持つヌードマウス

伝統的には、エンハンサーの生体内組織－特異性をトランスジェニックマウスで示した。しかしながら、トランスジェニックマウスの構成（construction）は、マウスで機能するエンハンサーについてのみ決定的である。PSA上流エンハンサーの生体内組織特異性を試験するために、異種性のプロモーターによって駆動されたCAT遺伝子に作用可能に結合したヒトPSA上流エンハンサーを含むトランスジーンを、ヒト前立腺腫瘍LNCaPを担うヌードマウスに注射した。３～４週令の雄のマウスの首の後に、0.25mlのMatrigel（Collaborative Biomedical）及び0.25mlのウシ胎児血清または抗生物質を含まないダルベッコ（Dulbecco）のMEMを含有し、４℃で１×10^6LNCaP細胞を含有する、0.5mlを皮下注射した。４～５週のうちに約0.5から1.0ｇの大きな腫瘍が現われた。腫瘍を担うマウスの尾の静脈に、PSA上流エンハンサー及びCAT遺伝子を駆動するPSAプロモーター、0.5％のデキストロース及び800ngのDDAB／DOPE（臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム／ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン）（１：２）カチオン性リポソームを含む100μｇのDNA発現構成物を含有する100μｌを静脈注射した。
マウスは24時間後にCO_2で窒息させて犠牲とし、解剖した。収集した組織は、腎臓、心臓、前立腺、肝臓、膵臓、脾臓、脳、肺、骨髄、膀胱及び腫瘍塊であった。組織をドライアイスで凍結し、－70℃で貯蔵した。組織（0.025～0.25ｇ）を500～1000μｌの0.25MトリスpH7.4中に粉砕ガラス（ground glass）Dounceホモジナイザー中で砕き、３回凍結－融解させ、ミクロフュージ（microfuge）中、４℃、14000rpmで遠心分離した。上清を除去し、タンパク質を分析し、CAT分析のために50μｇのタンパク質を用いた。図12はCATアッセイの結果を示す。結果はLNCaP腫瘍中でのみCAT活性を示すが、他の組織では実質的に活性を示さない。結果はPSA上流エンハンサーがヒト前立腺組織に特異的であることと矛盾しない。LNCaP系はPSAを生産するヒト前立腺組織培養細胞系である。試験管内細胞培養の結果（前記）も、PSA上流エンハンサーがPSAを発現するヒト前立腺組織に特異的であることを示している。マウスの前立腺組織は、ヒトPSA上流エンハンサーを認識する能力がないかもしれない。マウスの前立腺及び発生学的に関連する膀胱は試験条件のもとではCATを合成することができなかった。試験管内及び生体内の結果は、ヒトPSA上流エンハンサーはPSAを発現するヒトの細胞でのみ遺伝子の発現を指令することができることで一致している。したがって、該エンハンサーは、本明細書に記載された遺伝子治療組成物及び方法（前記）を用いて、PSA－発現細胞を切除するのに用いることができる。

毒性構成物及び前立腺細胞への導入

BSKSII＋中にジフテリア毒素Ａサブユニット（DT-A）（540bp）５′からSV40 t抗原まで、スプライス部位及びポリＡシグナルを含む構成物を調製した。トリプル翻訳停止コドンをDT-A遺伝子の５′末端に配列した。このクローンはCN47という。次いでPSEのHindIII断片（－5815～＋16）をDT-A遺伝子の上流にクローン化し、これをCN45という。ジフテリア毒素に対するポリクローナル抗体のウェスタンブロットは、CN45からの発現について陽性であった。具体的に言うと、これらの構成体のDT-A部分をlacプロモーターによって駆動された原核発現ベクターに運搬した。IPTGを用いる導入、溶解物の調製、ゲルエレクトロポーレイシス及び抗体を用いるブロットに続いて、CN45は22,500のシグナルバンド、すなわち、DT-Aサブユニットの予想されたサイズを与えた。CN45及びCN47の構成物を両方共、ミクロ滴定皿（microtiter plate）中でプラスミドpcDNA3（Invitrogen）でLNCaP細胞を共トランスフェクトするのに用いた。pcDNA3はネオマイシン遺伝子neoを含有し、SV40初期プロモーターによって駆動されるものである。48時間の共トランスフェクションに続いて、該細胞をトリプシンを用いて除去し、10^5細胞／mlに希釈した。各100μｌの細胞懸濁液を96－ウェルのミクロ滴定皿の各ウェルに加え、24時間インキュベートした。媒体を除

去し、G418を含有する新しい媒体（500μｇ／ml）で置換した。正のクローンをXXTアッセイで同定した。結果は図11に報告されている。

５′PSA領域を位置決めするCAT及びLUC構成物

CAT及びLUC構成物を標準的な分子生物学の技術によってBluescript KS＋（Stratagene）中で調製した（Sambrook他「分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning：A laboratory manual）」Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989）。LNCaP細胞を10％ FCS及び抗生物質（100Uのペニシリン及び100Uのストレプトマイシン／ml）を補足したRPMI中で増殖させた。６cm皿に５～７×10^6を接種し、RPMI中、抗生物質及び10％のストリップした血清（Gemini）中で一晩増殖させた。細胞を各２mlのPBSで２回洗浄し、１mlのRPMI中で50μMのDOTMA：DOPE（１：１）で複合体化した25μMのDNAでトランスフェクトした。DOTMAはFelgner他の方法の少し修正したもので合成し、DOPEはAvant；Polar Lipids（Alabaster, AL）から入手した。細胞を３時間インキュベートし、トランスフェクション混合物を除去し、抗生物質、10％のストリップした血清及び指示された濃度の非－代謝性合成テストステロン類似体R1881（New England Nuclear）を有するRPMIで置換した。トランスフェクションの48時間後、細胞をPBSで２回洗浄し、１mlのTENで除去した。細胞の小球を0.25Mのトリス（pH7.8）100μｌ中に再溶解し、３回凍結－融解をさせ、破片をEppendorf Microfuge中で遠心分離（10,000RPMで５分）により除去した。細胞抽出物を染料結合（Bio-Rad, Richmond, CA）によりタンパク質について分析した。CATアッセイのために、50μｇのタンパク質を0.25Mのトリス（pH7.8）で50μｌとし、80μｌの標準CATアッセイ混合物に加えた。37℃で２時間後、混合物を200μｌのTMPDで抽出した；キシレン（２：１）を混合し、20秒渦を発生させ、10,000RPMで５分間遠心分離し、液体シンチレーションによってカウントするために180μｌを除去した。LUCアッセイのために50μｇのタンパク質を0.25Mのトリス（pH7.8）で50μｌにし、Monolight Luminometer 2010（Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, CA）でLUC活性を分析した。結果は図５～７で報告されている。

ポリヌクレオチドの供給

ポリヌクレオチド構成物供給媒体を前立腺がんの標的リンパ管及び骨転位への皮下注射に使用することができる。この型では、DNAは濃縮され、前立腺受容体、たとえばbFGFについての天然のリガンドが結合しているポリ－Ｌ－リシンで被覆されている。このような構造は膵臓細胞の中で差別的に遺伝子発現を誘発することが分った。さらに、βFGFに結合したポリ－Ｌ－リシンは、DNAの濃縮を引き出すには低すぎるレベルでDNAと混合することができ、所望により、カチオン性リポソームとDNAの濃縮及び細胞への取り込みに適当な濃度で混合することができる。このような細胞は細胞表面受容体に特異的に結合でき、DNAを標的細胞表面受容体を担う細胞に供給することができる。

本発明を理解を明確にする目的で実例としてある程度詳細に記載したけれども、請求の範囲の内で一定の変更や修正がなされることは明らかであろう。

配列表

（１）一般情報

（iii）配列の数：２

（２）配列番号１についての情報

（ｉ）配列の特徴

（Ａ）長さ：5836塩基対

（Ｂ）型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直線状

（ii）分子の型：DNA（ゲノム）

（xi）配列の記載：配列番号：１

AAGCTTCTAG TTTTCTTTTC GCGGTGACAT CGTGGAAAGC ACTAGCATCT CTAAGCAATG 60

ATCTGTGACA ATATTCACAG TGTAATGCCA TCCAGGGAAC TCAACTGAGC CTTGATGTCC 120

AGAGATTTTT GTGTTTTTTT CTGAGACTGA GTCTCGCTCT GTGCCAGGCT GGAGTGCAGT 180

GGTGCAACCT TGGCTCACTG CAAGCTCCGC CTCCTGGGTT CACGCCATTC TCCTGCCTCA 240

GCCTCCTGAG TAGCTGGGAC TACAGGCACC CGCCACCACG CCTGGCTAAT TTTTTTGTAT 300

TTTTAGTAGA GATGGGGTTT CACTGTGTTA GCCAGGATGG TCTCAGTCTC CTGACCTCGT 360

GATCTGCCCA CCTTGGCCTC CCAAAGTGCT GGGATGACAG GCGTGAGCCA CCGCGCCTGG 420

CCGATATCCA GAGATTTTTT GGGGGGCTCC ATCACACAGA CATGTTGACT GTCTTCATGG 480

TTGACTTTTA GTATCCAGCC CCTCTAGAAA TCTAGCTGAT ATAGTGTGGC TCAAAACCTT 540

CAGCACAAAT CACACCGTTA GACTATCTGG TGTGGCCCAA ACCTTCAGGT GAACAAAGGG 600

ACTCTAATCT GGCAGGATAT TCCAAAGCAT TAGAGATGAC CTCTTGCAAA GAAAAAGAAA 660

TGGAAAAGAA AAAGAAAGAA AGGAAAAAAA AAAAAAAAAA GAGATGACCT CTCAGGCTCT 720

GAGGGGAAAC GCCTGAGGTC TTTGAGCAAG GTCAGTCCTC TGTTGCACAG TCTCCCTCAC 780

AGGGTCATTG TGACGATCAA ATGTGGTCAC GTGTATGAGG CACCAGCACA TGCCTGGCTC 840

TGGGGAGTGC CGTGTAAGTG TATGCTTGCA CTGCTGAATG CTTGGGATGT GTCAGGGATT 900

ATCTTCAGCA CTTACAGATG CTCATCTCAT CCTCACAGCA TCACTATGGG ATGGGTATTA 960

CTGGCCTCAT TTGATGGAGA AAGTGGCTGT GGCTCAGAAA GGGGGGACCA CTAGACCAGG 1020

GACACTCTGG ATGCTGGGGA CTCCAGAGAC CATGACCACT CACCAACTGC AGAGAAATTA 1080

ATTGTGGCCT GATGTCCCTG TCCTGGAGAG GGTGGAGGTG GACCTTCACT AACCTCCTAC 1140

CTTGACCCTC TCTTTTAGGG CTCTTTCTGA CCTCCACCAT GGTACTAGGA CCCCATTGTA 1200

TTCTGTACCC TCTTGACTCT ATGACCCCCA CTGCCCACTG CATCCAGCTG GGTCCCCTCC 1260

TATCTCTATT CCCAGCTGGC CAGTGCAGTC TCAGTGCCCA CCTGTTTGTC AGTAACTCTG 1320

AAGGGGCTGA CATTTTACTG ACTTGCAAAC AAATAAGCTA ACTTTCCAGA GTTTTGTGAA 1380

TGCTGGCAGA GTCCATGAGA CTCCTGAGTC AGAGGCAAAG GCTTTTACTG CTCACAGCTT 1440

AGCAGACAGC ATGAGGTTCA TGTTCACATT AGTACACCTT GCCCCCCCCA AATCTTGTAG 1500

GGTGACCAGA GCAGTCTAGG TGGATGCTGT GCAGAAGGGG TTTGTGCCAC TGGTGAGAAA 1560

CCTGAGATTA GGAATCCTCA ATCTTATACT GGGACAACTT GCAAACCTGC TCAGCCTTTG 1620

TCTCTGATGA AGATATTATC TTCATGATCT TGGATTGAAA ACAGACCTAC TCTGGAGGAA 1680

CATATTGTAT CGATTGTCCT TGACAGTAAA CAAATCTGTT GTAAGAGACA TTATCTTTAT 1740

TATCTAGGAC AGTAAGCAAG CCTGGATCTG AGAGAGATAT CATCTTGCAA GGATGCCTGC 1800

TTTACAAACA TCCTTGAAAC AACAATCCAG AAAAAAAAAG GTGTTGCTGT CTTTGCTCAG 1860

AAGACACACA GATACGTGAC AGAACCATGG AGAATTGCCT CCCAACGCTG TTCAGCCAGA 1920

GCCTTCCACC CTTGTCTGCA GGACAGTCTC AACGTTCCAC CATTAAATAC TTCTTCTATC 1980

ACATCCTGCT TCTTTATGCC TAACCAAGGT TCTAGGTCCC GATCGACTGT GTCTGGCAGC 2040

ACTCCACTGC CAAACCCAGA ATAAGGCAGC GCTCAGGATC CCGAAGGGGC ATGGCTGGGG 2100

ATCAGAACTT CTGGGTTTGA GTGAGGAGTG GGTCCACCCT CTTGAATTTC AAAGGAGGAA 2160

GAGGCTGGAT GTGAAGGTAC TGGGGGAGGG AAAGTGTCAG TTCCGAACTC TTAGGTCAAT 2220

GAGGGAGGAG ACTGGTAAGG TCCCAGCTCC CGAGGTACTG ATGTGGGAAT GGCCTAAGAA 2280

TCTCATATCC TCAGGAAGAA GGTGCTGGAA TCCTGAGGGG TAGAGTTCTG GGTATATTTG 2340

TGGCTTAAGG CTCTTTGGCC CCTGAAGGCA GAGGCTGGAA CCATTAGGTC CAGGGTTTGG 2400

GGTGATAGTA ATGGGATCTC TTGATTCCTC AAGAGTCTGA GGATCGAGGG TTGCCCATTC 2460

TTCCATCTTG CCACCTAATC CTTACTCCAC TTGAGGGTAT CACCAGCCCT TCTAGCTCCA 2520

TGAAGGTCCC CTGGGCAAGC ACAATCTGAG CATGAAAGAT GCCCCAGAGG CCTTGGGTGT 2580

CATCCACTCA TCATCCAGCA TCACACTCTG AGGGTGTGGC CAGCACCATG ACGTCATGTT 2640

GCTGTGACTA TCCCTGCAGC GTGCCTCTCC AGCCACCTGC CAACCGTAGA GCTGCCCATC 2700

CTCCTCTGGT GGGAGTGGCC TGCATGGTGC CAGGCTGAGG CCTAGTGTCA GACAGGGAGC 2760

CTGGAATCAT AGGGATCCAG GACTCAAAAG TGCTAGAGAA TGGCCATATG TCACCATCCA 2820

TGAAATCTCA AGGGCTTCTG GGTGGAGGGC ACAGGGACCT GAACTTATGG TTTCCCAAGT 2880

CTATTGCTCT CCCAAGTGAG TCTCCCAGAT ACGAGGCACT GTGCCAGCAT CAGCCTTATC 2940

TCCACCACAT CTTGTAAAAG GACTACCCAG GGCCCTGATG AACACCATGG TGTGTACAGG 3000

AGTAGGGGGT GGAGGCACGG ACTCCTGTGA GGTCACAGCC AAGGGAGCAT CATCATGGGT 3060

GGGGAGGAGG CAATGGACAG GCTTGAGAAC GGGGATGTGG TTGTATTTGG TTTTCTTTGG 3120

TTAGATAAAG TGCTGGGTAT AGGATTGAGA GTGGAGTATG AAGACCAGTT AGGATGGAGG 3180

ATCAGATTGG AGTTGGGTTA GATAAAGTGC TGGGTATAGG ATTGAGAGTG GAGTATGAAG 3240

ACCAGTTAGG ATGGAGGATC AGATTGGAGT TGGGTTAGAG ATGGGGTAAA ATTGTGCTCC 3300

GGATGAGTTT GGGATTGACA CTGTGGAGGT GGTTTGGGAT GGCATGGCTT TGGGATGGAA 3360

ATAGATTTGT TTTGATGTTG GCTCAGACAT CCTTGGGGAT TGAACTGGGG ATGAAGCTGG 3420

GTTTGATTTT GGAGGTAGAA GACGTGGAAG TAGCTGTCAG ATTTGACAGT GGCCATGAGT 3480

TTTGTTTGAT GGGGAATCAA ACAATGGGGG AAGACATAAG GGTTGGCTTG TTAGGTTAAG 3540

TTGCGTTGGG TTGATGGGGT CGGGGCTGTG TATAATGCAG TTGGATTGGT TTGTATTAAA 3600

TTGGGTTGGG TCAGGTTTTG GTTGAGGATG AGTTGAGGAT ATGCTTGGGG ACACCGGATC 3660

CATGAGGTTC TCACTGGAGT GGAGACAAAC TTCCTTTCCA GGATGAATCC AGGGAAGCCT 3720

TAATTCACGT GTAGGGGAGG TCAGGCCACT GGCTAAGTAT ATCCTTCCAC TCCAGCTCTA 3780

AGATGGTCTT AAATTGTGAT TATCTATATC CACTTCTGTC TCCCTCACTG TGCTTGGAGT 3840

TTACCTGATC ACTCAACTAG AAACAGGGGA AGATTTTATC AAATTCTTTT TTTTTTTTTT 3900

TTTTTTTTGA GACAGAGTCT CACTCTGTTG CCCAGGCTGG AGTGCAGTGG CGCAGTCTCG 3960

GCTCACTGCA ACCTCTGCCT CCCAGGTTCA AGTGATTCTC CTGCCTCAGC CTCCTGAGTT 4020

GCTGGGATTA CAGGCATGCA GCACCATGCC CAGCTAATTT TTGTATTTTT AGTAGAGATG 4080

GGGTTTCACC AATGTTTGCC AGGCTGGCCT CGAACTCCTG ACCTGGTGAT CCACCTGCCT 4140

CAGCCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGCG TCAGCCACCG CGCCCAGCCA CTTTTGTCAA 4200

ATTCTTGAGA CACAGCTCGG GCTGGATCAA GTGAGCTACT CTGGTTTTAT TGAACAGCTG 4260

AAATAACCAA CTTTTTGGAA ATTGATGAAA TCTTACGGAG TTAACAGTGG AGGTACCAGG 4320

GCTCTTAAGA GTTCCCGATT CTCTTCTGAG ACTACAAATT GTGATTTTGC ATGCCACCTT 4380

AATCTTTTTT TTTTTTTTTT TAAATCGAGG TTTCAGTCTC ATTCTATTTC CCAGGCTGGA 4440

GTTCAATAGC GTGATCACAG CTCACTGTAG CCTTGAACTC CTGGCCTTAA GAGATTCTCC 4500

TGCTTCGGTC TCCCAATAGC TAAGACTACA GTAGTCCACC ACCATATCCA GATAATTTTT 4560

AAATTTTTTG GGGGGCCGGG CACAGTGGCT CACGCCTGTA ATCCCAACAC CATGGGAGGC 4620

TGAGATGGGT GGATCACGAG GTCAGGAGTT TGAGACCAGC CTGACCAACA TGGTGAAACT 4680

CTGTCTCTAC TAAAAAAAAA AAAAATAGAA AAATTAGCCG GGCGTGGTGG CACACGGCAC 4740

CTGTAATCCC AGCTACTGAG GAGGCTGAGG CAGGAGAATC ACTTGAACCC AGAAGGCAGA 4800

GGTTGCAATG AGCCGAGATT GCGCCACTGC ACTCCAGCCT GGGTGACAGA GTGAGACTCT 4860

GTCTCAAAAA AAAAAAATTT TTTTTTTTTT TTTGTAGAGA TGGATCTTGC TTTGTTTCTC 4920

TGGTTGGCCT TGAACTCCTG GCTTCAAGTG ATCCTCCTAC CTTGGCCTCG GAAAGTGTTG 4980

GGATTACAGG CGTGAGCCAC CATGACTGAC CTGTCGTTAA TCTTGAGGTA CATAAACCTG 5040

GCTCCTAAAG GCTAAAGGCT AAATATTTGT TGGAGAAGGG GCATTGGATT TTGCATGAGG 5100

```
ATGATTCTGA CCTGGGAGGG CAGGTCAGCA GGCATCTCTG TTGCACAGAT AGAGTGTACA    5160
GGTCTGGAGA ACAAGGAGTG GGGGGTTATT GGAATTCCAC ATTGTTTGCT GCACGTTGGA    5220
TTTTGAAATG CTAGGGAACT TTGGGAGACT CATATTTCTG GGCTAGAGGA TCTGTGGACC    5280
ACAAGATCTT TTTATGATGA CAGTAGCAAT GTATCTGTGG AGCTGGATTC TGGGTTGGGA    5340
GTGCAAGGAA AAGAATGTAC TAAATGCCAA GACATCTATT TCAGGAGCAT GAGGAATAAA    5400
AGTTCTAGTT TCTGGTCTCA GAGTGGTGCA GGGATCAGGG AGTCTCACAA TCTCCTGAGT    5460
GCTGGTGTCT TAGGGCACAC TGGGTCTTGG AGTGCAAAGG ATCTAGGCAC GTGAGGCTTT    5520
GTATGAAGAA TCGGGGATCG TACCCACCCC CTGTTTCTGT TTCATCCTGG GCATGTCTCC    5580
TCTGCCTTTG TCCCCTAGAT GAAGTCTCCA TGAGCTACAA GGGCCTGGTG CATCCAGGGT    5640
GATCTAGTAA TTGCAGAACA GCAAGTGCTA GCTCTCCCTC CCCTTCCACA GCTCTGGGTG    5700
TGGGAGGGGG TTGTCCAGCC TCCAGCAGCA TGGGGAGGGC CTTGGTCAGC CTCTGGGTGC    5760
CAGCAGGGCA GGGGCGGAGT CCTGGGGAAT GAAGGTTTTA TAGGGCTCCT GGGGGAGGCT    5820
CCCCAGCCCC AAGCTT                                                    5836
```

（２）配列番号２についての情報
（ｉ）配列の特徴
（Ａ）長さ：1192塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直線状
（ii）分子の型：DNA（ゲノム）
（xi）配列の記載：配列番号：２

TCTAGAAATC TAGCTGATAT AGTGTGGCTC AAAACCTTCA GCACAAATCA CACCGTTAGA 60

CTATCTGGTG TGGCCCAAAC CTTCAGGTGA ACAAAGGGAC TCTAATCTGG CAGGATATTC 120

CAAAGCATTA GAGATGACCT CTTGCAAAGA AAAAGAAATG GAAAAGAAAA AGAAAGAAAG 180

GAAAAAAAAA AAAAAAAAGA GATGACCTCT CAGGCTCTGA GGGGAAACGC CTGAGGTCTT 240

TGAGCAAGGT CAGTCCTCTG TTGCACAGTC TCCCTCACAG GGTCATTGTG ACGATCAAAT 300

GTGGTCACGT GTATGAGGCA CCAGCACATG CCTGGCTCTG GGGAGTGCCG TGTAAGTGTA 360

TGCTTGCACT GCTGAATGCT TGGGATGTGT CAGGGATTAT CTTCAGCACT TACAGATGCT 420

CATCTCATCC TCACAGCATC ACTATGGGAT GGGTATTACT GGCCTCATTT GATGGAGAAA 480

GTGGCTGTGG CTCAGAAAGG GGGGACCACT AGACCAGGGA CACTCTGGAT GCTGGGGACT 540

CCAGAGACCA TGACCACTCA CCAACTGCAG AGAAATTAAT TGTGGCCTGA TGTCCCTGTC 600

CTGGAGAGGG TGGAGGTGGA CCTTCACTAA CCTCCTACCT TGACCCTCTC TTTTAGGGCT 660

CTTTCTGACC TCCACCATGG TACTAGGACC CCATTGTATT CTGTACCCTC TTGACTCTAT 720

GACCCCCACT GCCCACTGCA TCCAGCTGGG TCCCCTCCTA TCTCTATTCC CAGCTGGCCA 780

GTGCAGTCTC AGTGCCCACC TGTTTGTCAG TAACTCTGAA GGGGCTGACA TTTTACTGAC 840

TTGCAAACAA ATAAGCTAAC TTTCCAGAGT TTTGTGAATG CTGGCAGAGT CCATGAGACT 900

CCTGAGTCAG AGGCAAAGGC TTTTACTGCT CACAGCTTAG CAGACAGCAT GAGGTTCATG 960

TTCACATTAG TACACCTTGC CCCCCCCAAA TCTTGTAGGG TGACCAGAGC AGTCTAGGTG 1020

GATGCTGTGC AGAAGGGGTT TGTGCCACTG GTGAGAAACC TGAGATTAGG AATCCTCAAT 1080

CTTATACTGG GACAACTTGC AAACCTGCTC AGCCTTTGTC TCTGATGAAG ATATTATCTT 1140

CATGATCTTG GATTGAAAAC AGACCTACTC TGGAGGAACA TATTGTATCG AT 1192

【図１】

配列範囲：－5824から12

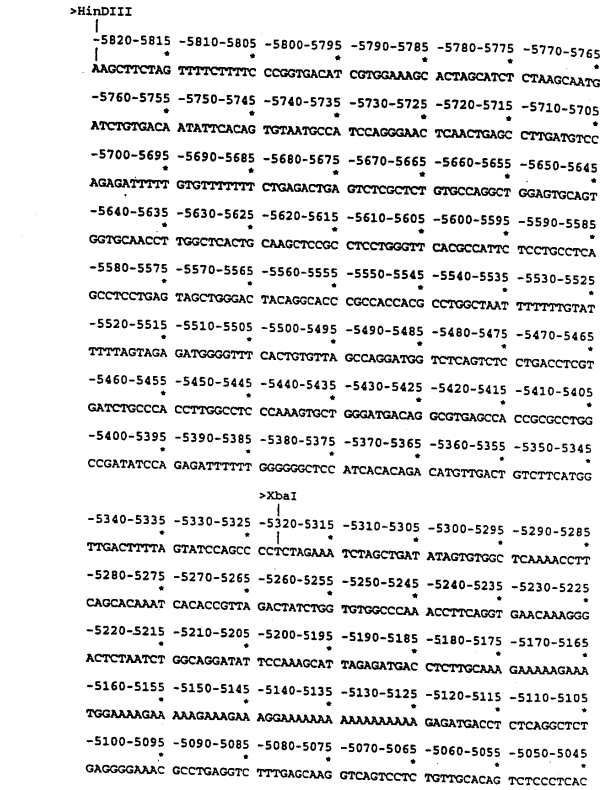


FIG. 1

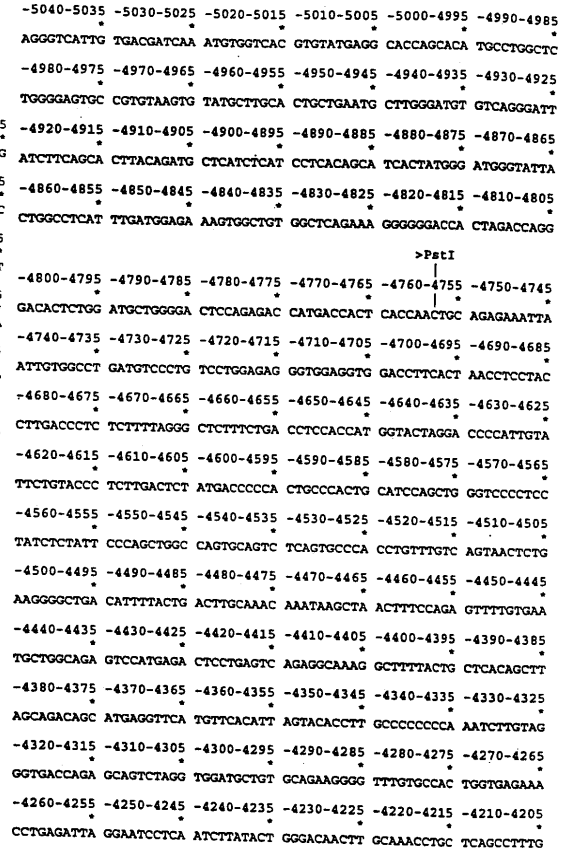


FIG.1（続き）

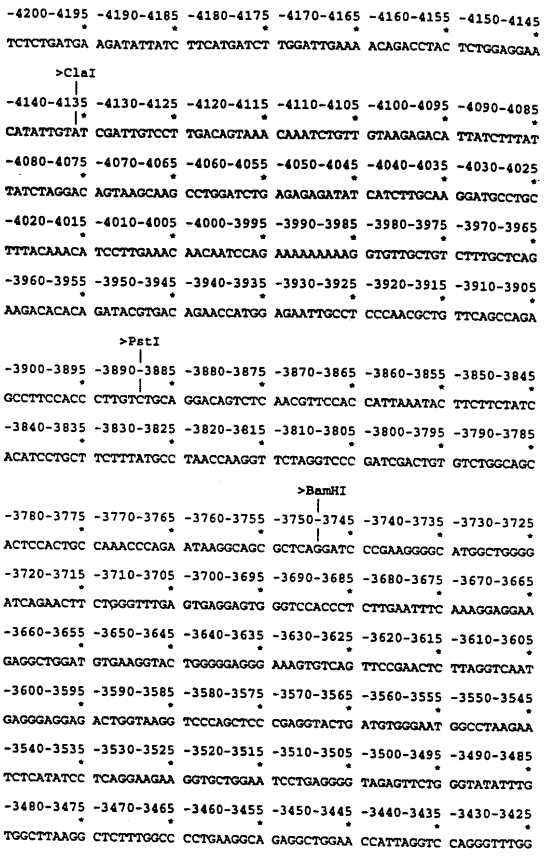


FIG.1（続き）

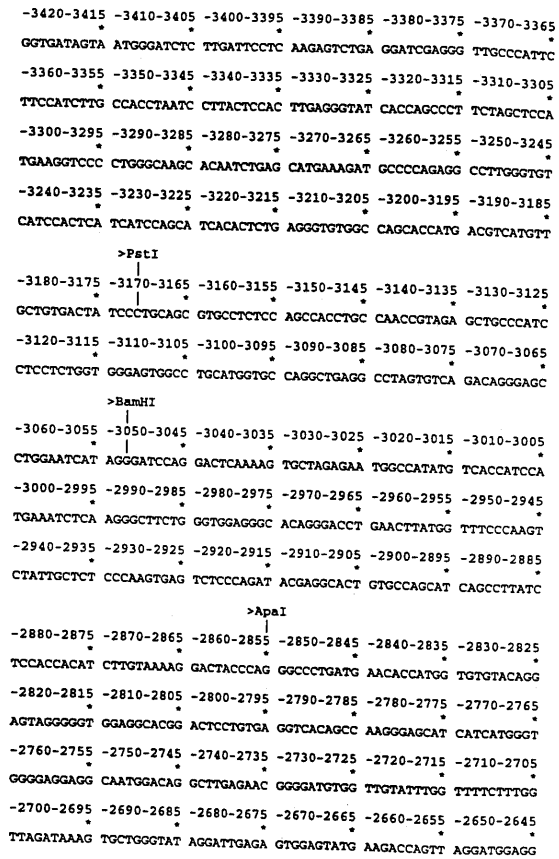


FIG.1（続き）

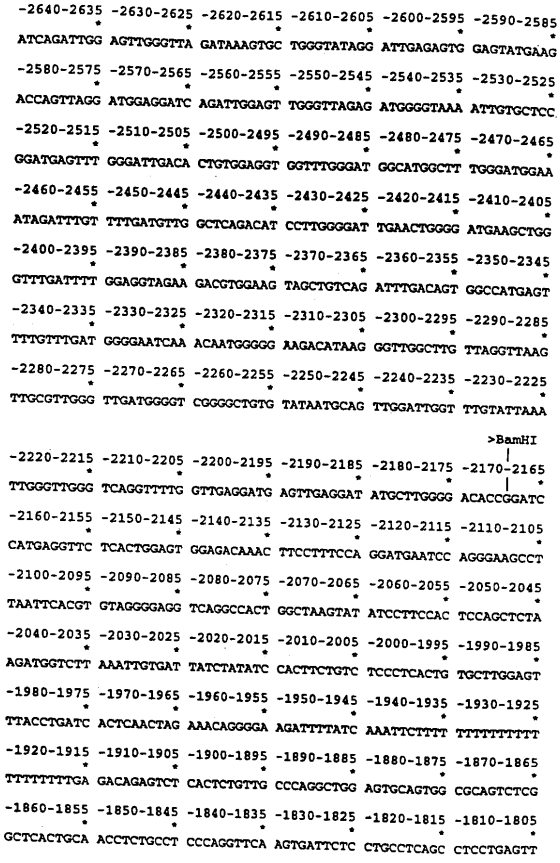


FIG.1（続き）

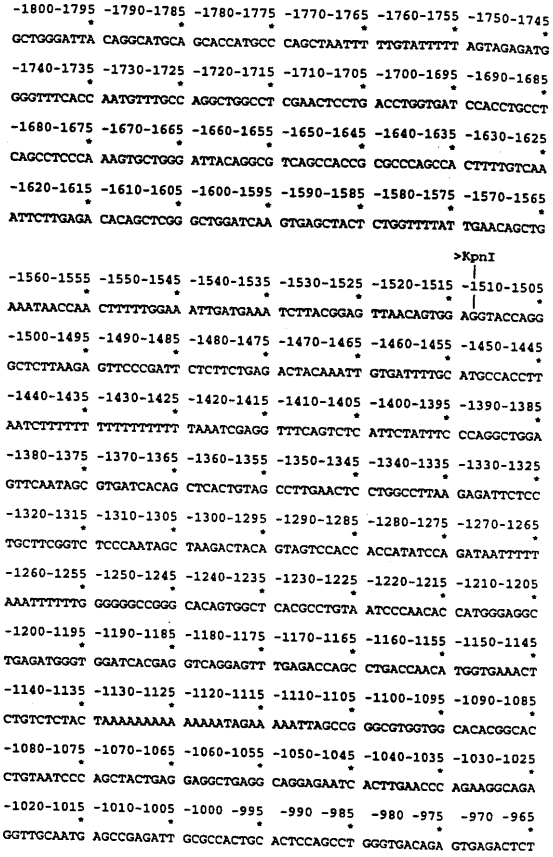


FIG.1（続き）

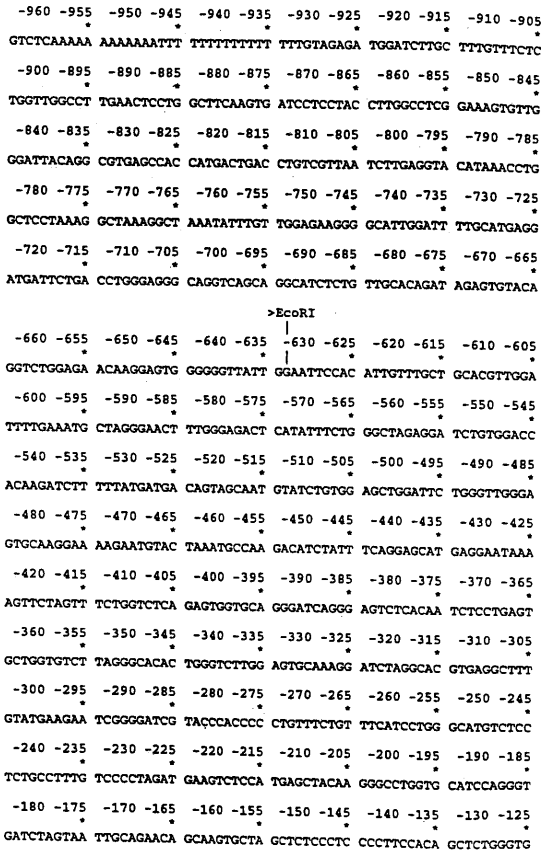
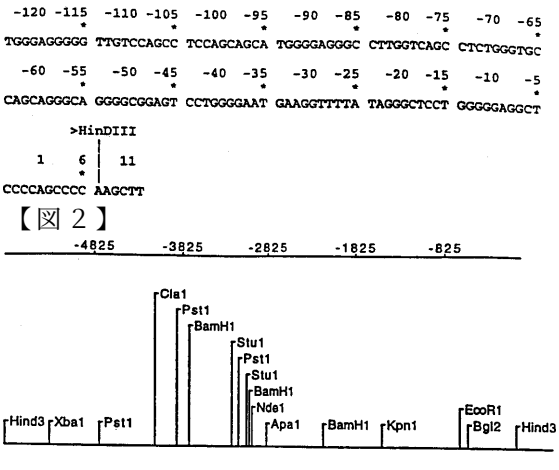


FIG.1（続き）



【図２】

FIG. 2

【図３】

配列範囲：－5824から12

酵素	切断数	位置		
Apa1	1	-2851		
BamH1	3	-3749	-3052	-2169
Bgl2	1	-541		
Cla1	1	-4135		
EcoR1	1	-633		
Hind3	2	-5824	7	
Kpn1	1	-1509		
Nde1	1	-3019		
Pst1	3	-4754	-3885	-3167
Stu1	2	-3255	-3085	
Xba1	1	-5322		

FIG. 3

【図４】

前立腺特異的抗原ＣＡＴ構成物

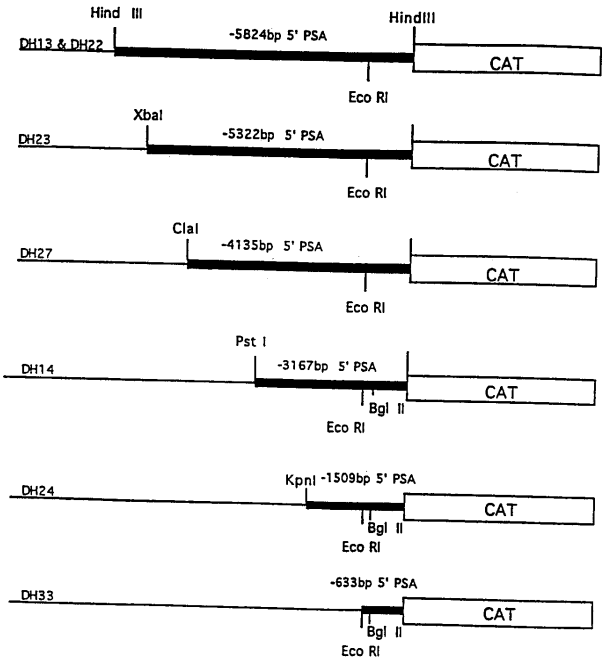


FIG. 4

【図５】

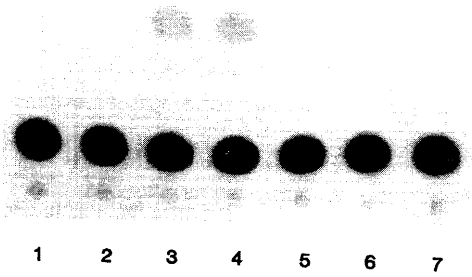


FIG. 5

【図６】

ＰＳＡの5′隣接の5824bpを用いるＬＮＣａＰのトランスフェクション

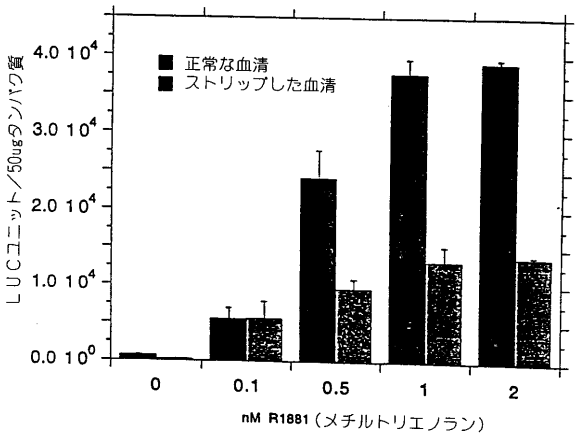


FIG. 6

【図７】

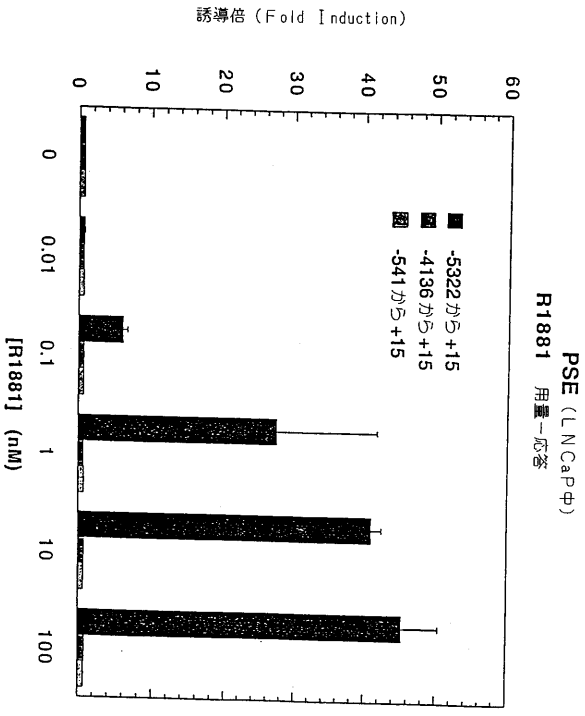


FIG. 7

【図８】

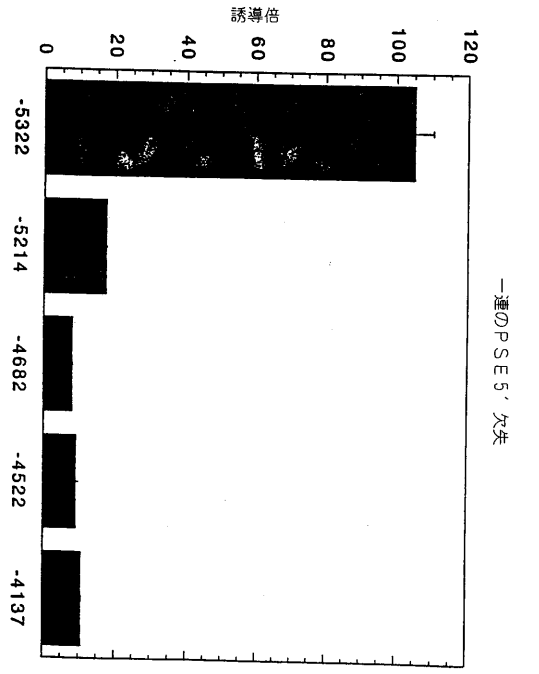


FIG. 8

【図９】

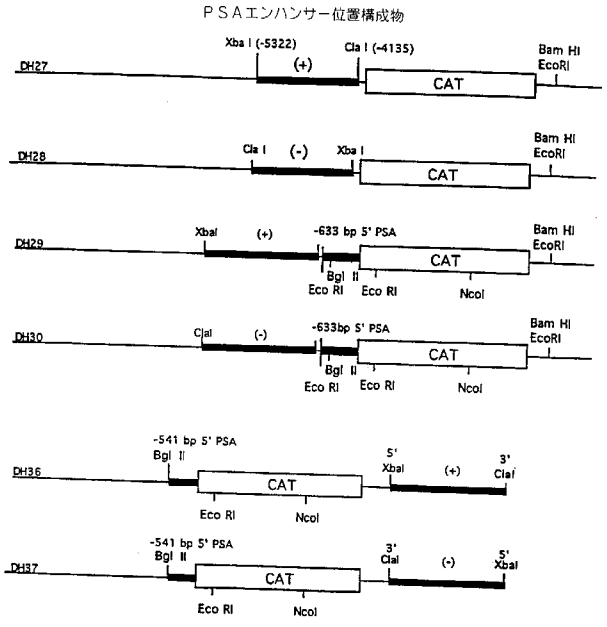


FIG. 9

【図１０】

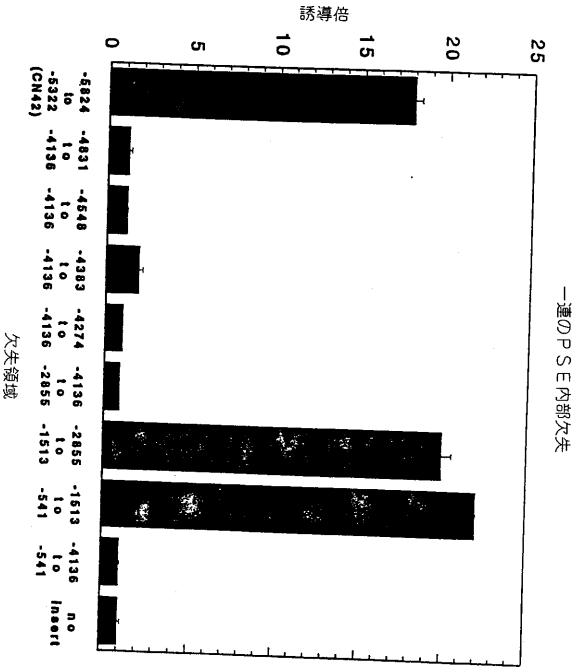


FIG. 10

【図１１】

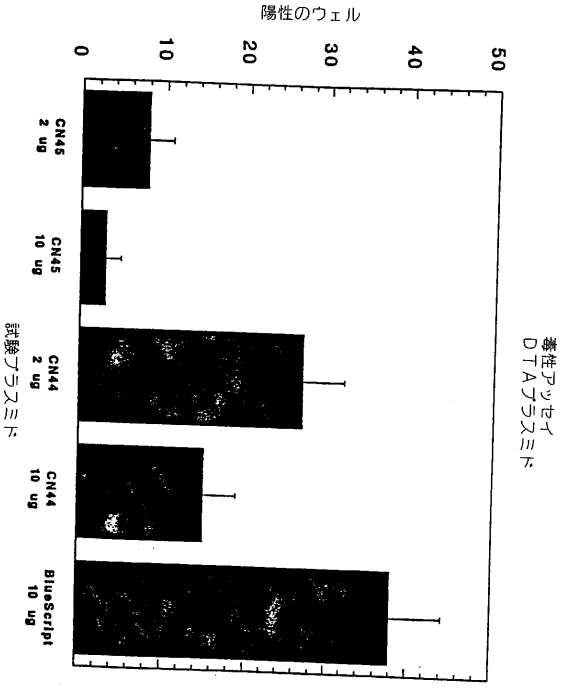


FIG. 11

【図１２】

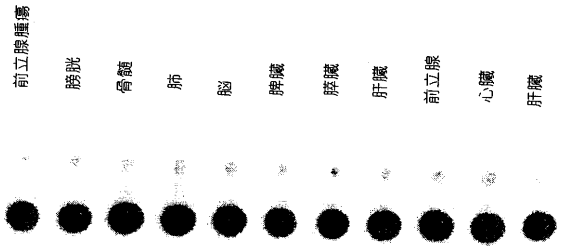


FIG. 12

フロントページの続き

(72)発明者　ヘンダーソン，ダニエル　アール.
アメリカ合衆国，カリフォルニア　９４３０３，パロアルト，ガーランド　ドライブ　７６９

審査官　渡邉　潤也

(56)参考文献　Mol.Endocrinol.,1991,5(12),p.1921-30

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
PubMed
BIOSIS/WPI(DIALOG)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq