(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4387059号
(P4387059)
(45)発行日　平成21年12月16日(2009.12.16)　(24)登録日　平成21年10月9日(2009.10.9)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
A61K 31/713	(2006.01)	A61K	31/713	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
C12N 9/02	(2006.01)	C12N	9/02	

請求項の数 21　(全 70 頁)

(21)出願番号	特願2000-504269 (P2000-504269)
(86)(22)出願日	平成10年7月23日 (1998.7.23)
(65)公表番号	特表2003-524367 (P2003-524367A)
(43)公表日	平成15年8月19日 (2003.8.19)
(86)国際出願番号	PCT/US1998/015302
(87)国際公開番号	WO1999/005299
(87)国際公開日	平成11年2月4日 (1999.2.4)
審査請求日	平成17年7月20日 (2005.7.20)
(31)優先権主張番号	60/053,677
(32)優先日	平成9年7月24日 (1997.7.24)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	09/118,179
(32)優先日	平成10年7月17日 (1998.7.17)
(33)優先権主張国	米国(US)

前置審査

(73)特許権者　301069856
トラスティーズ　オブ　ボストン　ユニバーシティ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２２１５，　ボストン，　ベイ　ステイト　ロード　５３
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｐ４５０に基づく抗癌遺伝子治療の増強のためのシトクロムＰ４５０レダクターゼを用いる方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

シトクロムＰ４５０遺伝子の産物によって活性化される化学療法剤で腫瘍性細胞を殺傷するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、遺伝子送達のためのベクターを含み、該ベクターは該シトクロムＰ４５０遺伝子およびＮＡＤＰＨ－Ｐ４５０レダクターゼ（ＲＥＤ）をコードする遺伝子を含む、薬学的組成物であって、ここで、該化学療法剤がシクロホスファミドであり、そして、該シトクロムＰ４５０遺伝子がＰ４５０　２Ｂ１、Ｐ４５０　２Ｂ６、または、Ｐ４５０　２Ｃ１８である、薬学的組成物。

【請求項２】

遺伝子送達のための前記ベクターがウイルス性ベクターである、請求項１に記載の薬学的組成物。

【請求項３】

前記ウイルス性ベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、パピローマウイルス、またはレンチウイルス由来である、請求項２に記載の薬学的組成物。

【請求項４】

遺伝子送達のための前記ベクターが非ウイルス性である、請求項１に記載の薬学的組成物。

【請求項５】

遺伝子送達のための前記非ウイルス性ベクターが、原核生物ベクター、カチオン性リポ

ソーム、融合誘導リポソーム、ＤＮＡ－アデノウイルス結合体、ＤＮＡ－タンパク質複合体、非ウイルス性Ｔ７オートジーンベクター、直接注入のために処方される核酸、粒子媒介性遺伝子移入のために処方される粒子、レセプター媒介性遺伝子移入のために処方される核酸、スターバーストポリアミドアミンデンドリマー、カチオン性ペプチド、哺乳動物人工染色体、内皮細胞、またはマクロファージである、請求項４に記載の薬学的組成物。

【請求項６】

生還元性薬物をさらに含む、請求項１に記載の薬学的組成物。

【請求項７】

前記生還元性薬物が、ニトロイミダゾール、芳香族ニトロ化合物、キノン、脂肪族、芳香族、または複素環式Ｎ－オキシド、あるいはシトクロムＰ４５０、ＮＡＤＰＨ－Ｐ４５０レダクターゼ（ＲＥＤ）、またはシトクロムＰ４５０およびＲＥＤの両方によって触媒される生還元性活性化を受け得る生還元可能ＤＮＡアルキル化剤である、請求項６に記載の薬学的組成物。

【請求項８】

前記生還元性薬物が、アドリアマイシン、ポルフィロマイシン、マイトマイシンＣ、チラパザミン、インドロキノンＥ０９、アジリジニルニトロイミダゾールＲＳＵ１０６９もしくはＲＢ６１４５、ジニトロフェニルアジリジン（ＣＢ１９５４）、２，３，５，６－テトラメチルベンゾキノン（ＴＭＱ）、ジアジキノン（ＡＺＱ）、インターカレーターアミンＮ－オキシドＡＱ４Ｎ、または生還元可能ＤＮＡアルキル化剤ＮＳＣ６４６３９４もしくはＮＳＣ６５８９２６である、請求項７に記載の薬学的組成物。

【請求項９】

シトクロムＰ４５０遺伝子の産物によって活性化される化学療法剤で腫瘍性細胞を殺傷するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、２つのベクターを含み；一方のベクターは該シトクロムＰ４５０遺伝子を含み、他方のベクターはＮＡＤＰＨ－Ｐ４５０レダクターゼ（ＲＥＤ）をコードする遺伝子を含む、薬学的組成物であって、ここで、該化学療法剤がシクロホスファミドであり、そして、該シトクロムＰ４５０遺伝子がＰ４５０　２Ｂ１、Ｐ４５０　２Ｂ６、または、Ｐ４５０　２Ｃ１８である、薬学的組成物。

【請求項１０】

生還元性薬物をさらに含む、請求項９に記載の薬学的組成物。

【請求項１１】

前記生還元性薬物が、ニトロイミダゾール、芳香族ニトロ化合物、キノン、脂肪族、芳香族、または複素環式Ｎ－オキシド、あるいはシトクロムＰ４５０、ＮＡＤＰＨ－Ｐ４５０レダクターゼ（ＲＥＤ）、またはシトクロムＰ４５０およびＲＥＤの両方によって触媒される生還元性活性化を受け得る生還元可能ＤＮＡアルキル化剤である、請求項１０に記載の薬学的組成物。

【請求項１２】

前記生還元性薬物が、アドリアマイシン、ポルフィロマイシン、マイトマイシンＣ、チラパザミン、インドロキノンＥ０９、アジリジニルニトロイミダゾールＲＳＵ１０６９もしくはＲＢ６１４５、ジニトロフェニルアジリジン（ＣＢ１９５４）、２，３，５，６－テトラメチルベンゾキノン（ＴＭＱ）、ジアジキノン（ＡＺＱ）、インターカレーターアミンＮ－オキシドＡＱ４Ｎ、または生還元可能ＤＮＡアルキル化剤ＮＳＣ６４６３９４もしくはＮＳＣ６５８９２６である、請求項１１に記載の薬学的組成物。

【請求項１３】

生還元性薬剤で腫瘍性細胞を殺傷するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、遺伝子送達のためのベクターを含み、該ベクターはシトクロムＰ４５０遺伝子およびＮＡＤＰＨ－Ｐ４５０レダクターゼ（ＲＥＤ）をコードする遺伝子を含む、薬学的組成物であって、ここで、該生還元性薬剤がチラパザミン、または、アドリアマイシンであり、そして、該シトクロムＰ４５０遺伝子が、Ｐ４５０　２Ｂ６である、薬学的組成物。

【請求項１４】

腫瘍性細胞を殺傷するためのキットであって、該キットは、以下：

（ａ）遺伝子送達のためのベクターであって、該ベクターはシトクロムＰ４５０遺伝子およびＮＡＤＰＨ－Ｐ４５０レダクターゼ（ＲＥＤ）をコードする遺伝子を含む、ベクター；および

（ｂ）該シトクロムＰ４５０遺伝子の産物によって活性化される化学療法剤を含む、キットであって、ここで、該化学療法剤がシクロホスファミドであり、そして、該シトクロムＰ４５０遺伝子がＰ４５０　２Ｂ１、Ｐ４５０　２Ｂ６、または、Ｐ４５０　２Ｃ１８である、キット。

【請求項１５】

遺伝子送達のための前記ベクターがウイルス性ベクターである、請求項１４に記載のキット。

【請求項１６】

前記ウイルス性ベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、パピローマウイルス、またはレンチウイルス由来である、請求項１５に記載のキット。

【請求項１７】

遺伝子送達のための前記ベクターが非ウイルス性である、請求項１４に記載のキット。

【請求項１８】

遺伝子送達のための前記非ウイルス性ベクターが、原核生物ベクター、カチオン性リポソーム、融合誘導リポソーム、ＤＮＡ－アデノウイルス結合体、ＤＮＡ－タンパク質複合体、非ウイルス性Ｔ７オートジーンベクター、直接注入のために処方される核酸、粒子媒介性遺伝子移入のために処方される粒子、レセプター媒介性遺伝子移入のために処方される核酸、スターバーストポリアミドアミンデンドリマー、カチオン性ペプチド、哺乳動物人工染色体、内皮細胞、またはマクロファージである、請求項１７に記載のキット。

【請求項１９】

生還元性薬物をさらに含む、請求項１４に記載のキット。

【請求項２０】

前記生還元性薬物が、ニトロイミダゾール、芳香族ニトロ化合物、キノン、脂肪族、芳香族、または複素環式Ｎ－オキシド、あるいはシトクロムＰ４５０、ＮＡＤＰＨ－Ｐ４５０レダクターゼ（ＲＥＤ）、またはシトクロムＰ４５０およびＲＥＤの両方によって触媒される生還元性活性化を受け得る生還元可能ＤＮＡアルキル化剤である、請求項１９記載のキット。

【請求項２１】

前記生還元性薬物が、アドリアマイシン、ポルフィロマイシン、マイトマイシンＣ、チラパザミン、インドロキノンＥ０９、アジリジニルニトロイミダゾールＲＳＵ１０６９もしくはＲＢ６１４５、ジニトロフェニルアジリジン（ＣＢ１９５４）、２，３，５，６－テトラメチルベンゾキノン（ＴＭＱ）、ジアジキノン（ＡＺＱ）、インターカレーターアミンＮ－オキシドＡＱ４Ｎ、または生還元可能ＤＮＡアルキル化剤ＮＳＣ６４６３９４もしくはＮＳＣ６５８９２６である、請求項２０に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

(連邦国家により後援された研究および開発の下でさなれた発明の権利に関する陳述)

合衆国政府は、本発明における支払い済みのライセンス、および国立衛生研究所により審査して与えられた認可番号ＣＡ４９２４８の条項により提供されたような合理的な条項に基づいて、限られた状況において他人にライセンスを与えることを特許所有者に要求する権利を有する。

【０００２】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、腫瘍性細胞の殺傷に関する。より詳細には、本発明は、シトクロムＰ４５０に基づく抗癌遺伝子治療を増強するためのＮＡＤＰＨシトクロムＰ４５０レダクターゼ(Ｒ

ＥＤ)の使用に関する。

【０００３】

(関連分野)

癌治療の伝統的方法は、手術、放射線照射、および細胞傷害性化学療法薬物の組み合わせに依存する。細胞傷害性化学薬品を用いる腫瘍細胞の処置は、当該分野で周知であるが、現在のところ、多くの細胞傷害性抗癌薬物の治療活性は、骨髄のような正常宿主組織に対する非特異的毒性に関連する適切な治療指標、および薬物耐性腫瘍細胞亜集団の出現によって制限される。癌化学療法剤の選択性を増強し、それによって処置の毒性を低減する１つの新規なアプローチは、癌治療への遺伝子治療技術の適用を含む。Ｒｏｔｈ，Ｊ．Ａ．およびＣｒｉｓｔｉａｎｏ，Ｒ．Ｊ．，Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．８９：２１－３９(１９９７)；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ．Ｍ．Ｅ．およびＣｕｒｉｅｌ，Ｄ．Ｔ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．８：７２－７７(１９６６)を参照のこと。

【０００４】

当該分野で公知の１つのこのような治療では、標的腫瘍細胞の表現型を遺伝的に改変し、腫瘍の薬物選択性および薬物応答性を増大させる。１つの有望なストラテジーは、そうでなければ無害な薬剤に対する感受性を賦与するために、プロドラッグ活性化酵素をコードする「化学的感作」または「自殺」遺伝子を悪性細胞に直接移入することを含む(Ｍｏｏｌｔｅｎ，Ｆ．Ｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：２７９－２８７(１９９４)；Ｆｒｅｅｍａｎ，Ｓ．Ｍ．，ら、Ｓｅｍｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２３：３１－４５(１９９６)；Ｄｅｏｎａｒａｉｎ，Ｍ．Ｐ．，ら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２：２３５－２４４(１９９５))。

【０００５】

いくつかのプロドラッグ活性化遺伝子が、癌遺伝子治療における適用のために研究されている。１つの例では、プロドラッグガンシクロビルと組み合わせた単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(ＨＳＶ－ＴＫ)が、癌遺伝子治療におけるその潜在的な適用に関して当該分野で公知のプロトタイププロドラッグ/酵素活性化系を代表する。ＨＳＶ－ＴＫは、プロドラッグガンシクロビルをリン酸化し、そして活発に分裂する細胞においてＤＮＡ鎖終結および細胞死を誘導するヌクレオシドアナログを生成する。ＨＳＶ－ＴＫで形質導入された腫瘍細胞は、当初は、ウイルス感染の処置に対して設計された臨床的に証明された薬剤であるガンシクロビルに対する感受性を獲得する。Ｍｏｏｌｔｅｎ，Ｆ．Ｌ．およびＷｅｌｌｓ，Ｊ．Ｍ．，Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．８２：２９７－３００(１９９０)；Ｅｚｚｅｄｄｉｎｅ，Ｚ．Ｄ．，ら、Ｎｅｗ Ｂｉｏｌ．３：６０８－６１４(１９９１)。

【０００６】

第２の例では、細菌遺伝子シトシンデアミナーゼ(ＣＤ)が、公知の癌化学的治療薬剤である５－フルオロウラシルに変換される抗カビ薬剤５－フルオロシトシンに対して腫瘍細胞を感作することが示されている、プロドラッグ/酵素活性化系である(Ｍｕｌｌｅｎ．Ｃ．Ａ．，ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：３３－３７(１９９２)；Ｈｕｂｅｒ，Ｂ．Ｅ．，ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５３：４６１９－４６２６(１９９３)；Ｍｕｌｌｅｎ，Ｃ．Ａ．，ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５４：１５０３－１５０６(１９９４))。これらの薬物感受性遺伝子を用いる最近の研究により、有望な結果が得られている。例えは、Ｃａｒｕｓｏ，Ｍ．，ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：７０２４－７０２８(１９９３)；Ｏｌｄｆｉｅｌｄ，Ｅ．ら、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ．Ｔｈｅｒ．４：３９(１９９３)；Ｃｕｌｖｅｒ，Ｋ．，Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ ４０；５１０(１９９４)；Ｏ’Ｍａｌｌｅｙ，Ｊｒ．Ｂ．Ｗ．，ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５６：１７３７－１７４１(１９９６)；Ｒａｉｎｏｖ，Ｎ．Ｇ．，ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：９９－１０６(１９９６)を参照のこと。

【０００７】

いくつかのその他のプロドラッグ活性化酵素系もまた調査されている(Ｔ．Ａ．Ｃｏｎｎｏｒｓ、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２：７０２－７０９(１９９５))。これらは、哺乳動物の同

族体を持たず、そしてグルタミン酸部分の切断により活性な細胞傷害性マスタード代謝物を放出する、ある種の合成マスタードプロドラッグを活性化するために用いられ得る、細菌酵素カルボキシペプチダーゼG2(Marais, R.，ら、Cancer Res. 56：4735－4742(1996))、ならびにプロドラッグCB1954および関連マスタードプロドラッグアナログを活性化し、そのうちのいくつかがCB1954より優れ得る(Friedlos, F.ら.，J Med Chem40：1270－1275(1997))、E. coliニトロレダクターゼ(Drabek, D.，ら、Gene Ther. 4：93－100(1997)；Green, N. K.，ら、Cancer Gene Ther. 4：229－238(1997))を含む。プロドラッグ活性化遺伝子治療に対するこれらのアプローチの基礎となる原理は、外来遺伝子を用いた腫瘍細胞集団の形質導入が、それに特有のプロドラッグ活性化能力、そしてそれ故この遺伝子を発現しない宿主細胞にない化学的感度を付与することである。

【0008】

現在の遺伝子治療技術は、100%の効率で腫瘍細胞の集団にプロドラッグ活性化遺伝子またはその他の治療的遺伝子を送達し得ない能力により制限されている。しかし、この癌遺伝子治療ストラテジーの有効性は、強い「バイスタンダー（bystander）効果」を示す薬物を用いることに多いに高められ得る(Pope, I. M.，ら、Eur J Cancer33：1005－1016(1997))。バイスタンダー細胞傷害性は、活性薬物代謝産物が拡散またはそうでなければ形質導入された腫瘍細胞内のそれらの発生部位から近隣の無傷の腫瘍細胞に移行されるときに生じる。理想的には、バイスタンダー効果は、少数の腫瘍細胞がプロドラッグ活性化遺伝子で形質導入されるときでさえ、顕著な腫瘍後退を導く(例えば、Chen, L.，ら、Hum Gene Ther. 6：1467－1476(1995)；Freeman, S.，ら、Cancer Res. 53：5274－5283(1993))。バイスタンダー細胞傷害性応答はまた、アポトーシスを行う腫瘍細胞により分泌されるインターロイキンおよびその他のサイトカインによるその刺激後に免疫系を通じて媒介され得る(Gagandeep, S.，ら、Cancer Gene Ther. 3：83－88(1996))。

【0009】

ガンシクロビル/HSV－TKおよび5－フルオロシトシン/CD系は、予備臨床研究では有望であることが示され、そして臨床試験が進行中であるが(Eck, S. L.，ら、Hum Gene Ther. 7：1465－1482(1996)；Link, C. J.ら、Hum Gene Ther. 7：1161－1179(1996)；Roth, J. A.，およびCristiano, R. J.，J Natl Cancer Inst. 89：21－39(1997))、いくつかの制約がそれらの効力を制限し、そして癌の化学的治療薬へのそれらの適用を制限している。これらは：(a)その遺伝子産物がプロドラッグ活性化を妨害する免疫応答を惹起し得るというHSV/TKおよびCD遺伝子の非哺乳動物性質；(b)初期には、抗ウイルス薬物(ガンシクロビル)または抗真菌薬物(5－フルオロシトシン)として開発され、そしてその癌化学的治療活性が不確かである薬物に対するそれらの信頼性；(c)進行中の腫瘍細胞DNA複製に対するこれら遺伝子治療ストラテジーの依存性；および（d）HSV－TKの場合には、有効なバイスタンダー細胞傷害性応答を惹起するために、直接の細胞－細胞接触の必要性(Mesnil, M.，ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93：1831－1835(1996))を含む。有効な、長く続く臨床応答を達成するための組み合わせ化学的治療の一般的要求とともに、これらの考慮は、自殺遺伝子に基づく(プロドラッグ活性化)遺伝子治療を用いて癌を治療するための代替えストラテジーの開発を必要にする。

【0010】

より最近、薬物活性化/遺伝子治療ストラテジーが、P450で触媒されるモノオキシゲナーゼ反応を通じて活性化される癌化学的治療薬剤と組み合わせたシトクロムP450遺伝子(「CYP」または「P450」)を基に開発された(Chen, L.およびWaxman, D. J.，Cancer Research 55：581－589(1995)；W

ｅｉ，Ｍ．Ｘ．，ら、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．５：９６９－９７８(１９９４)；１９９７年１１月１８日に発行された米国特許第５，６８８，７７３号)。上記のプロドラッグ活性化ストラテジーとは異なり、Ｐ４５０に基づく薬物活性化ストラテジーは、(細菌またはウイルス由来遺伝子よりむしろ)哺乳動物薬物活性化遺伝子を利用し、そしてまた癌治療で広く用いられる確立された化学的治療薬物を利用する。

【００１１】

多くの抗癌薬物は、シトクロムＰ４５０酵素により酸素添加され、腫瘍細胞に対して細胞傷害性または細胞増殖抑制性である代謝産物を生じることが知られている。これらは、シクロホスファミド(ＣＰＡ)、その異性体イホスファミド(ＩＦＡ)、ダカルバジン、プロカルバジン、チオ－ＴＥＰＡ、エトポシド、２－アミノアントラセン、４－イポメアノール（ｉｐｏｍｅａｎｏｌ）、およびタモキシフェン(ＬｅＢｌａｎｃ．Ｇ．Ａ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｄｒｕｇ Ｍｅｔａｂ．Ｒｅｖ．２０：３９５－４３９(１９８９))；Ｎｇ，Ｓ．Ｆ．およびＷａｘｍａｎ Ｄ．Ｊ．，Ｉｎｔｌ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ２：７３１－７３８(１９９３)；Ｇｏｅｐｔａｒ，Ａ．Ｒ．，ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５４：２４１１－２４１８(１９９４)；ｖａｎ Ｍａａｎｅｎ，Ｊ．Ｍ．，ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４７：４６５８－４６６２(１９８７)；Ｄｅｈａｌ，Ｓ．Ｓ．，ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５７：３４０２－３４０６(１９９７)；Ｒａｉｎｏｖ，Ｎ．Ｇ．，ら、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ９：１２６１－１２７３(１９９８)。薬物活性化を生じる生還元性（ｂｉｏｒｅｄｕｃｔｉｖｅ）代謝もまた、種々の抗癌薬物に対してシトクロムＰ４５０酵素により触媒される。このような薬物の例は、アドリアマイシン、マイトマイシンＣ、およびテトラメチルベンゾキノンを含む(Ｇｏｅｐｔａｒ，Ａ．Ｒ．，ら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．２５：２５－６５(１９９５)；Ｇｏｅｐｔａｒ，Ａ．Ｒ．，ら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４４：１２６７－１２７７(１９９３))。

【００１２】

ＣＰＡおよびＩＦＡは、肝臓シトクロムＰ４５０酵素により触媒される生体活性化を受ける(Ｓｌａｄｅｋ，Ｎ．Ｅ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．３７：３０１－３５５(１９８８))。ＩＦＡはＣＰＡの異性体であるが、齧歯類モデルにおいて、およびヒトにおける両方で、Ｐ４５０酵素の別のサブセットにより活性化される(Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．，ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５３：５６２９－５６３７(１９９３)；Ｗｅｂｅｒ，Ｇ．Ｆ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４５：１６８５－１６９４(１９９３))。初期の４－ヒドロキシ代謝物は肝臓中に高レベルで形成され、そして循環内および標的腫瘍細胞内の両方で自然に分解され、親の薬物とともに、ＤＮＡ架橋および細胞傷害性効果を示すアクロレインおよび電子親和性マスタードを生じる。しかし、ＣＰＡおよびＩＦＡおよびそれらのアルキル化代謝産物の全身分布は、心臓毒性、腎臓毒性、骨髄抑制、および神経傷害性(ｎｅｕｒｏｔｏｘｏｘｉｃｉｔｙ)を含むいくつかの顕著な副作用を必然的に生じる(Ｐｅｔｅｒｓ，Ｗ．Ｐ．ら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１１：１１３２－１１４３(１９９３)；Ａｙａｓｈ，Ｌ．Ｊ．，ら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１０：９９５－１０００(１９９２))；Ｇｏｒｅｎ．Ｍ．Ｐ．，ら、Ｌａｎｃｅｔ ２：１２１９－１２２０(１９８６)；Ｔｈｉｇｐｅｎ，Ｔ．，Ｇｙｎｅｃｏｌ Ｏｎｃｏｌ．４２：１９１－１９２(１９９１)。

【００１３】

これらの制限のいくつかは、Ｐ４５０に基づく薬物/酵素活性化系を用いて克服され得る。このアプローチの１つの例では、腫瘍細胞は、高い割合のＣＰＡおよびＩＦＡ活性化を示す肝臓Ｐ４５０酵素をコードするＣＹＰ２Ｂ１(Ｃｌａｒｋｅ，Ｌ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４９：２３４４－２３５０(１９８９)；Ｗｅｂｅｒ，Ｇ．Ｆ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４５：１６８５－１６９４(１９９３))の形質導入により、ＣＰＡまたはＩＦＡに対する高い感受性を与えられる。この高められた化学的感受性は、インビトロ、ならびにインビボの皮下齧歯類固形腫瘍モデルおよびヌードマウスで増殖させたヒト乳癌を用いる研究の両

方で示され、そしてこれらの動物における薬物活性化の本当の肝臓関連能力の存在にかかわらず顕著に効果的である(Ｃｈｅｎ，Ｌ．，ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５５：５８１－５８９(１９９５)；Ｃｈｅｎ，Ｌ，，ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５６：１３３１－１３４０(１９９６))。このＰ４５０に基づくアプローチはまた、脳腫瘍の処置において遺伝子治療適用のために顕著な有用性を示す(Ｗｅｉ，Ｍ．Ｘ．，ら、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．５：９６９－９７８(１９９４)；Ｍａｎｏｍｅ，Ｙ．，ら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：５１３－５２０(１９９６)；Ｃｈａｓｅ，Ｍ．，ら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：４４４－４４８(１９９８))。

【００１４】

このＰ４５０/薬物活性化系は、いくつかの腫瘍型に対して大きな見込みを示したが、この系の活性のさらなる増大が、癌患者における臨床的に有効な、長期間の応答を達成するために必要である。この要求は、Ｐ４５０酵素系に固有の２つの特性を必要とする：(１)Ｐ４５０酵素は、低速度、１分間あたり１０～３０のみの代表的なＰ４５０代謝回転数(形成代謝産物のモル数/Ｐ４５０酵素のモル数)で、癌の化学的治療薬物を含む薬物およびその他の外来化学品を代謝する；および(２)Ｐ４５０酵素は、多くの化学的治療薬物を、代表的には、ミリモル濃度範囲にある高いＫｍ値で代謝する。これは、ＣＰＡおよびＩＦＡのような薬物を含む多くの化学的治療薬物についてミリモル濃度範囲にあるのみである血漿薬物濃度に匹敵する。したがって、Ｐ４５０遺伝子治療に対する現在のアプローチは、低い絶対速度かつ薬物基質に関して飽和していない条件下の腫瘍内薬物活性化を生じ得る。さらに、Ｐ４５０は肝臓組織で非常に高いレベルで発現されるので、非常に小さな画分の投与された化学的治療薬物のみが、Ｐ４５０遺伝子治療に対する現在利用可能な方法を用いる腫瘍細胞Ｐ４５０遺伝子産物を経由して代謝される(Ｃｈｅｎ，Ｌ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５５：５８１－５８９(１９９５))。

【００１５】

したがって、先行する記載を考慮して、Ｐ４５０で活性化された化学的治療薬剤を用いた処理の後起こる腫瘍細胞破壊の程度および選択性の両方を増大するために、腫瘍細胞に送達されるＰ４５０遺伝子産物の活性を、腫瘍内薬物活性化反応を増大する様式で増大する方法に対する当該分野における必要性が存在する。さらに、多くのヒト腫瘍で見出される低酸素性腫瘍細胞を特徴付ける放射線照射耐性および化学的治療薬物非感受性(Ｂｒｏｗｎ，Ｊ．Ｍ．およびＧｉａｃｃｉａ，Ａ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５８：１４０８－１４１６(１９９８))を考慮すれば、当該分野において、腫瘍細胞に送達されたＰ４５０遺伝子産物が低酸素性腫瘍細胞(これは、そうでなければ古典的処置養生法による殺傷を逃れ得る)を殺傷する方法に対する必要性が存在する。

【００１６】

(発明の要旨)

本発明者らは、シトクロムＰ４５０遺伝子(そしてそれ故Ｐ４５０遺伝子産物)と組み合わせてシトクロムＰ４５０レダクターゼ(ＲＥＤ)遺伝子(そしてそれ故ＲＥＤ遺伝子産物)を、腫瘍性細胞中に導入することにより、Ｐ４５０で活性化された化学的治療薬物のその治療的に活性な代謝産物への酵素的変換が、腫瘍の細胞および解剖学的場所内で多いに高められ、それによって腫瘍性細胞が殺傷される選択性および効率の両方を増大することを発見した。同時に、正常宿主細胞に対する所望されない副作用が最小にされる。

【００１７】

したがって、本発明は、先行技術の欠点を、腫瘍性細胞を殺傷する方法を提供することにより克服し、この方法は：(ａ)腫瘍性細胞を、遺伝子送達のためのベクターで感染する工程であって、このベクターは、シトクロムＰ４５０遺伝子およびＲＥＤをコードする遺伝子を含む工程；(ｂ)該腫瘍性細胞を、シトクロムＰ４５０遺伝子の産物により活性化される化学的治療薬剤で処理する工程；および(ｃ)該腫瘍性細胞を殺傷する工程を包含する。

【００１８】

さらに、本発明は、腫瘍性細胞を殺傷する方法を提供し、この方法は：(ａ)腫瘍性細胞を２つのベクター；１つのベクターはシトクロムＰ４５０遺伝子を含み、他のベクターはＲ

ＥＤをコードする遺伝子を含む、で感染する工程；(ｂ)該腫瘍性細胞を、該シトクロムＰ４５０遺伝子の産物により活性化される化学的治療薬剤で処理する工程；および(ｃ)該腫瘍性細胞を殺傷する工程を包含する。

【００１９】

本発明はまた、先に記載の方法の好適な実施態様を提供し、ここで、上記シトクロムＰ４５０遺伝子は、Ｐ４５０ １Ａ１、１Ａ２、１Ｂ１、２Ｂ１、２Ｂ２、２Ｂ４、２Ｂ５、２Ｂ６、２Ｂ１１、２Ａ６、２Ｃ６、２Ｃ８、２Ｃ９、２Ｃ１１、２Ｃ１８、２Ｃ１９、２Ｄ６、２Ｅ１、３Ａ４、３Ａ５、３Ａ７、または４Ｂ１のような哺乳類遺伝子であり、それらのｃＤＮＡ配列は公知である(Ｎｅｌｓｏｎ，Ｄ．Ｒ．，ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ ６：１－４２(１９９６))。その他の種における対応するＰ４５０遺伝子ファミリーおよびサブファミリーのメンバー、およびそれらの対立遺伝子改変体、部位特異的変異体、およびキメラ構築物を含むその他のシトクロムＰ４５０遺伝子(例えば、Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．，ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ ７：２１１－２２１(１９９７)；Ｓｚｋｌａｒｚ，Ｇ．Ｄ．，ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３４：１４１３２－１４３２２(１９９５)；Ｈｅ，Ｙ．Ａ．，ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３６：８８３１－８８３９(１９９７))もまた、それらが癌治療に有用な化学的治療薬剤を活性化する限り、本発明の実施態様として提供される。ラットシトクロム遺伝子Ｐ４５０ ２Ｂ１、およびヒトシトクロム遺伝子Ｐ４５０ ２Ｂ６、Ｐ４５０ ２Ｃ１８、およびＰ４５０ ３Ａ４が特に好適である。

【００２０】

先に記載の方法の別の好適な実施態様では、Ｐ４５０で活性化される化学的治療薬剤は、シクロホスファミド(ＣＰＡ)、イホスファミド(ＩＦＡ)、ダカルバジン、プロカルバジン、チオ－ＴＥＰＡ、エトポシド(ＶＰ－１６)、タモキシフェン、４－イポメアノール、２－アミノアントラセン、または任意の他のＰ４５０で代謝される化学的治療薬物である。ＣＰＡおよびＩＦＡが特に好適である。

【００２１】

本発明はまた、先の方法の特に好適な実施態様を提供し、ここで上記シトクロムＰ４５０遺伝子は、Ｐ４５０ ２Ｂ１、Ｐ４５０ ２Ｂ６、またはＰ４５０ ２Ｃ１８であり、そして上記化学的治療薬剤は、シクロホスファミドである。別の特に好適な実施態様では、上記シトクロムＰ４５０遺伝子は、Ｐ４５０ ２Ｂ１またはＰ４５０ ３Ａ４であり、そして上記化学的治療薬剤は、イホスファミドである。

【００２２】

本発明はまた、先の方法の好適な実施態様を提供し、ここで、上記Ｐ４５０遺伝子および上記ＲＥＤ遺伝子は、１つ以上のウイルスベクター、好ましくは遺伝子治療のためのその使用が当業者に良く確立されているウイルスベクターを用いて送達される。このようなウイルスベクターの例は、レトロウイルス(レンチウイルスを含む)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルスＩおよびＩＩならびにエプスタイン・バールウイルスを含む)、ポリオウイルス、パピローマウイルス、または２つ以上のウイルスの属性をもつハイブリッドベクターを含む。レトロウイルスおよびアデノウイルスが特に好適なウイルスベクターである。

【００２３】

１つの実施態様では、単一のウイルスベクターを用いて上記Ｐ４５０およびＲＥＤ遺伝子を運搬する。単一のベクターを用いる場合、上記Ｐ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子は、Ｐ４５０－ＲＥＤ融合タンパク質をコードする融合遺伝子として送達され得る。あるいは、遺伝子送達のためのベクターは、内部リボソーム侵入部位(ＩＲＥＳ)配列を含み得、２シストロン性メッセージ上のＰ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子の協調性発現（ｃｏｏｒｄｉｎａｔｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）を達成する。別の代替は、ベクターが、別のプロモーターの制御下にある、Ｐ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子の両方を含むことである。別の実施態様では、２つのウイルスベクターが用いられる；１つはＰ４５０遺伝子を運搬し、そして他方はＲＥＤ遺伝子を運搬する。

【００２４】
先の方法の別の実施態様では、上記Ｐ４５０遺伝子および上記ＲＥＤ遺伝子は、任意の非ウイルスベクター、好ましくは遺伝子治療に対するその使用が当業者に良く確立されている非ウイルスベクターを用いて送達される。このような遺伝子送達のための非ウイルスベクターの例は、原核生物ベクター(腫瘍を標的とする細菌ベクターを含む)、カチオン性リポソーム、ＤＮＡ-タンパク質複合体、非ウイルスＴ７オートジーン(ａｕｔｏｇｅｎｅ)ベクター、融合誘導性リポソーム、核酸の直接注入(「裸のＤＮＡ」)、粒子またはレセプター媒介遺伝子移入、ＤＮＡ－アデノウイルス結合体または非ウイルスおよびウイルス成分を含むその他の分子結合体のようなハイブリッドベクター、スターバーストポリアミドアミンデンドリマー、カチオン性ペプチド、および哺乳動物人工染色体を含む。

【００２５】
さらに、本発明は、先の方法の実施態様を提供し、ここで上記Ｐ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子は、任意の細胞ベクター、好ましくは、遺伝子治療のためにその使用が当業者に良く確立されている細胞ベクターを用いて送達される。このような遺伝子治療のための細胞ベクターの例は、内皮細胞および腫瘍浸潤性マクロファージを含むマクロファージを含み、その各々は、ウイルスまたは非ウイルスベクターを用いて改変されてＰ４５０遺伝子および/またはＲＥＤ遺伝子を運搬し、そしてそれ故Ｐ４５０およびＲＥＤ遺伝子産物を発現し得る。

【００２６】
さらに、本発明は、先の方法の実施態様を提供し、ここで腫瘍性細胞はまた、生還元性(bioreductive)薬物で処理される(すなわち、生還元性薬物が、上記のＰ４５０で活性化された化学的治療薬剤を用いた処理に加えて投与される)。あるいは、生還元性薬物は、それ自身を基に(すなわち、Ｐ４５０で活性化される化学的治療薬剤の代わりに)用いられ得る。好適な実施態様では、この生還元性薬物は、ＲＥＤで触媒されるか、および/またはＰ４５０で触媒される生還元性活性化を行い得る、ニトロイミダゾール、芳香族ニトロ化合物、キノン、脂肪族、芳香族、または複素環式Ｎ－オキシド、または生還元可能ＤＮＡアルキル化剤である。このような生還元性薬物の代表的な例は、アドリアマイシン、ポルフィロマイシン（ｐｏｒｆｉｒｏｍｙｃｉｎ）、マイトマイシンＣ、チラパザミン（ｔｉｒａｐａｚａｍｉｎｅ）(ＳＲ４２３３またはＴＰＺとしても知られる)、インドロキノン（ｉｎｄｌｏｑｕｉｎｏｎｅ）Ｅ０９、アジリジニルニトロイミダゾールＲＳＵ１０６９またはＲＢ６１４５、ジニトロフェニルアジリジン(ＣＢ１９５４)、２，３，５，６－テトラメチルベンゾキノン(ＴＭＱ)、ジアジコン(ＡＺＱ)、インターカレーターアミンＮ－オキシドＡＱ４Ｎ、および生体還元可能ＤＮＡアルキル化剤ＮＳＣ ６４６３９４およびＮＳＣ ６５８９２６を含む。

【００２７】
さらに、本発明は、腫瘍性細胞を殺傷する方法を提供し、ここでシトクロムＰ４５０またはＲＥＤいずれかの内因性レベルが腫瘍性細胞中で増加し、そして遺伝子移入が、その産物が内因的に増加しない遺伝子を用いて実施される。

【００２８】
したがって、本発明のこの局面に従えば、腫瘍性細胞を殺傷する方法が提供され、この方法は：(ａ)腫瘍性細胞中の内因性ＲＥＤの活性または発現レベルを増大する薬剤を投与する工程；(ｂ)上記腫瘍性細胞をベクターで感染する工程であって、このベクターがシトクロムＰ４５０遺伝子を含む工程；(ｃ)上記腫瘍性細胞を、上記シトクロムＰ４５０遺伝子の遺伝子産物により活性化される化学的治療薬剤で処理する工程；および(ｄ)上記腫瘍性細胞を殺傷する工程を包含する。この方法の好適な実施態様では、上記シトクロムＰ４５０遺伝子は、Ｐ４５０ １Ａ１、１Ａ２、１Ｂ１、２Ｂ１、２Ｂ２、２Ｂ４、２Ｂ５、２Ｂ６、２Ｂ１１、２Ａ６、２Ｃ６、２Ｃ８、２Ｃ９、２Ｃ１１、２Ｃ１８、２Ｃ１９、２Ｄ６、２Ｅ１、３Ａ４、３Ａ５、３Ａ７、または４Ｂ１、ならびに他の種における対応するＰ４５０遺伝子サブファミリーのメンバーのような、哺乳動物遺伝子である。ラットシトクロム遺伝子Ｐ４５０ ２Ｂ１、およびヒトシトクロム遺伝子Ｐ４５０ ２Ｂ６、Ｐ４５

０２Ｃ１８、およびＰ４５０　３Ａ４が特に好適である。

【００２９】

また、本発明のこの局面に従って、腫瘍性細胞を殺傷する方法が提供され、この方法は：(ａ)腫瘍性細胞中の内因性シトクロムＰ４５０の活性または発現レベルを増大する薬剤を投与する工程；(ｂ)上記腫瘍性細胞をベクターで感染する工程であって、このベクターがＲＥＤ遺伝子を含む工程；(ｃ)上記腫瘍性細胞を、上記シトクロムＰ４５０遺伝子の産物により活性化される化学的治療薬剤で処理する工程；および(ｄ)上記腫瘍性細胞を殺傷する工程を包含する。

【００３０】

本発明はまた、先の方法の好適な実施態様を提供し、ここで腫瘍性細胞中の内因性ＲＥＤの活性または発現レベルを増大する上記薬剤は、甲状腺ホルモンまたはフェノバルビタールであり、そして腫瘍性細胞中の内因性Ｐ４５０の活性または発現レベルを増大する薬剤は、デキサメタゾン、リファンピン、１，４－ビス－２－(３，５－ジクロロピリジルオキシベンゼン)(ＴＣＰＯＢＯＰ)、またはフェノバルビタールである。

【００３１】

さらに、本発明はまた、先の方法の好適な実施態様を提供し、ここで、上記化学的治療薬剤は、シクルホスファミド、イホスファミド、ダカルバジン、プロカルバジン、チオ－ＴＥＰＡ、エトポシド(ＶＰ－１６)、タモキシフェン、４－イポミアノール、または２－アミノアントラセンである。

【００３２】

本発明はまた、先の方法の実施態様を提供し、ここで上記腫瘍性細胞はまた、生還元性薬物で処理される(すなわち、生還元性薬物が、上記のＰ４５０で活性化された化学的治療薬剤を用いた処理に加えて投与される)。あるいは、生還元性薬物は、それ自身を基に(すなわち、Ｐ４５０で活性化される化学的治療薬剤の代わりに)用いられ得る。好適な実施態様では、この生還元性薬物は、ＲＥＤで触媒されるか、および/またはＰ４５０で触媒される生還元活性化を行い得る、ニトロイミダゾール、芳香族ニトロ化合物、キノン、脂肪族、芳香族、または複素環式Ｎ－オキシド、または生体還元可能ＤＮＡアルキル化剤である。このような生還元性薬物の代表的な例は、アドリアマイシン、ポルフィロマイシン、マイトマイシンＣ、チラパザミン(ＴＰＺまたはＳＲ４２３３)、インドロキノン　Ｅ０９、アジリジニルニトロイミダゾールＲＳＵ１０６９またはＲＢ６１４５、ジニトロフェニルアジリジン(ＣＢ１９５４)、２，３，５，６－テトラメチルベンゾキノン(ＴＭＱ)、ジアジコン(ＡＺＱ)、インターカレーター(ｉｎｔｅｒｃａｌａｔｏｒ)アミンＮ－オキシドＡＱ４Ｎ、および生体還元可能ＤＮＡアルキル化剤ＮＳＣ　６４６３９４およびＮＳＣ　６５８９２６を含む。

【００３３】

本発明はまた、シトクロムＰ４５０およびＲＥＤに基づく薬物活性化系を、ガンシクロビル/ＨＳＶ－ＴＫおよび５－フルオロシトシン/ＣＤのような確立された遺伝子/プロドラッグ活性化系と組み合わせた実施態様を提供する。Ｐ４５０/ＲＥＤ遺伝子治療はまた、ｐ５３のような腫瘍抑制遺伝子；ｂａｘ、腫瘍壊死因子α、およびκのようなアポトーシス因子；およびインターロイキン２、インターロイキン４、およびインターロイキン１２のようなサイトカインを含む他の確立された癌治療遺伝子と組み合わせ得る。

【００３４】

本発明の別の実施態様では、Ｐ４５０およびＲＥＤ遺伝子送達の標的特異性は、腫瘍特異的または腫瘍選択的ＤＮＡエンハンサー配列の使用を含む「転写的標的化」により促進される。このような配列の例は、チロシナーゼ(黒色腫)、ＥＲＢＢ２(膵臓癌)、癌胎児性抗原(肺および胃腸管癌)、ＤＦ３/ＭＵＣ１(乳癌)、αフェトプロテイン(肝臓癌)、ならびにＰ４５０および/またはＲＥＤ遺伝子の調節発現転写制御および他の形態を可能にする合成遺伝子調節系をコードする遺伝子について記載される配列を含む。標的化はまた、低酸素により誘導される遺伝子の発現を制御する配列(低酸素応答エレメント)、またはその他の腫瘍特異的条件および因子を含む。

【００３５】
本発明のなお別の実施態様では、上記シトクロムＰ４５０およびＲＥＤに基づく薬物活性化系を、肝Ｐ４５０触媒プロドラッグ活性化の選択的インヒビターと組み合わせ腫瘍内薬物活性化の特異性を増大する。
【００３６】
本発明の別の詳細な実施態様は、対応する遺伝子の送達よりむしろ、上記シトクロムＰ４５０遺伝子産物および/またはＲＥＤ遺伝子産物が、腫瘍性細胞に送達される。この実施態様では、ストレプトアビジン－ビオチンに基づくタンパク質送達方法、およびその他の、当業者に周知のタンパク質送達方法が採用される。
【００３７】
本発明は本発明の別の実施態様を提供し、この実施態様により、内因性ＲＥＤおよび／またはシトクロムＰ４５０のレベルが、ＣＰＡおよびＩＦＡのようなＰ４５０活性化化学療法薬物またはチラパザミン（ＴＰＺ）のようなＲＥＤ活性化生還元性薬物に対する応答性を予測するために、所定のヒト腫瘍から調製された生検においてアッセイされる。
【００３８】
別の実施態様において、内因性ＲＥＤのレベルは、Ｐ４５０に基づく遺伝子治療（同時トランスフェクトしたＲＥＤの非存在下で）の有効性の予後指標として、そしてＲＥＤがＰ４５０に基づく遺伝子治療ストラテジーに取り込まれるのに特に有用である場合の決定を助けるために、所定のヒト腫瘍においてアッセイされる。すなわち、中程度のレベルまたは低いレベルのＲＥＤ活性を有する腫瘍細胞は、任意のＰ４５０に基づく遺伝子治療実例にＲＥＤ遺伝子を取り込むための候補体を刺激する。
【００３９】
Ｐ４５０／抗癌剤活性化系を用いる以前の研究は、ＲＥＤ遺伝子移入が不必要であるという仮定に基づいている。なぜなら、ＲＥＤは、標的腫瘍細胞において幅広く発現されるからである。実際は、ＣＰＡ処置と組み合わせた、Ｐ４５０に基づく癌遺伝子治療は、ＲＥＤの付随する移入を伴わずに、著しく効果的である（Ｃｈｅｎ，Ｌ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５５：５８１－５８９（１９９５）；Ｗｅｉ，Ｍ．Ｘ．ら、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ． ５：９６９－９７８（１９９４）；Ｃｈｅｎ，Ｌ．，ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ． ５６：１３３１－１３４０（１９９６）；Ｍａｎｏｍｅ，Ｙ．ら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：５１３－５２０（１９９６）；Ｃｈａｓｅ，Ｍ．ら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ． １６：４４４－４４８（１９９８））。肝臓細胞（これは、本発明者らの腫瘍内Ｐ４５０遺伝子発現研究において達成されたより約５０～１００倍高いレベルのＰ４５０を発現する）（Ｃｈｅｎ，Ｌ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５５：５８１－５８９（１９９５））において、ＲＥＤ成分は、特定の条件下で、Ｐ４５０に触媒された酵素反応に関して律速であり得る（Ｗａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．ら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ． ３５：５１９－５２５（１９８９））。しかし、滴定および再構築研究は、等モルレベルのＲＥＤおよびＰ４５０が、最大のＰ４５０モノオキシゲナーゼ活性を達成するのに必要であり（Ｙａｍａｎｏ，Ｓ．ら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ． ３６：８３－８８（１９８９））、そしてＲＥＤの律速性質が、より高いレベルのＰ４５０でのみ顕著であるべきである（Ｍｉｗａ，Ｇ．Ｔ．ら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ． ２５３：１９２１－１９２９（１９７８）；Ｃａｗｌｅｙ，Ｇ．Ｆ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３４：１２４４－１２４７（１９９５））ことを示す。
【００４０】
本発明において、本発明は、抗癌剤／Ｐ４５０に基づく腫瘍遺伝子治療の治療的活性は、ＲＥＤ遺伝子の同時移入により増強され得ることを、インビトロおよびインビボで発見および実証した。内因性ＲＥＤが、低いレベルのＰ４５０レベルを発現するように操作される場合に腫瘍細胞において制限されないという予想（Ｙａｍａｎｏ，Ｓ．ら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ． ３６：８３－８８（１９８９）；Ｗａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．ら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ． ３５：５１９－５２５（１９８９）；Ｍｉｗａ，Ｇ．Ｔ．ら

、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．　２５３：１９２１－１９２９（１９７８））にもかかわらず、ＲＥＤの過剰発現は、高レベルで発現するＰ４５０遺伝子で形質導入された細胞、および低レベルのＰ４５０発現を与えるように形質導入された細胞の両方において、Ｐ４５０媒介性抗癌剤化学感受性の実質的な増強を導く。これらの発見は、Ｐ４５０に基づく自殺遺伝子治療ストラテジーの効力を増強し、そして癌治療へのＰ４５０遺伝子治療の適用を促進する。

【００４１】

先の一般的な記載および以下の詳細な説明は、例示および説明であり、そして請求される本発明のさらなる説明を提供することが理解される。

【００４２】

（好ましい実施態様の詳細な説明）

本発明は、シトクロムP４５０レダクターゼ（ＲＥＤ）酵素の遺伝子導入と組み合わせた、シトクロムP４５０に基づく遺伝子治療を用いて腫瘍性細胞を死滅させることに関する。本発明はまた、シトクロムP４５０およびＲＥＤ遺伝子産物の腫瘍性細胞への導入に関する。

【００４３】

「腫瘍性細胞」は正常な増殖制御機構が（代表的には遺伝子変異の蓄積によって）崩壊し、その結果制御できない増殖の能力を提供する細胞を意図する。この用語は、中枢神経系および末梢における良性および悪性の腫瘍性細胞を含むことを意図する。本明細書中において使用されるように、「末梢」という用語は、脳または脊髄以外の体の部分全てを意味することを意図する。

【００４４】

本発明の目的に関しては、腫瘍性細胞は、腫瘍、新生物、癌腫、肉腫、乳頭腫、白血病、リンパ腫等を含む。特に、哺乳類の体の任意の臓器または組織に発生し得る固形腫瘍は重要である。

【００４５】

「シトクロムＰ４５０遺伝子」（あるいは「ＣＹＰ」または「Ｐ４５０」と呼ばれる）は、抗癌剤を活性化することができる（ＬｅＢｌａｎｃ，Ｇ．Ａ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．、Ｄｒｕｇ．Ｍｅｔａｂ．Ｒｅｖ．２０：３９５－４３９（１９８９）、Ｋｉｖｉｓｔｏ，Ｋ．Ｔ．ら、Ｂｒ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４０：５２３－５３０（１９９５））、シトクロムＰ４５０酵素スーパーファミリーの任意のメンバーをコードする遺伝子意図する（Ｎｅｌｓｏｎ，Ｄ．Ｒ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ　６：１－４２（１９９６））。「抗癌剤の活性化または生物活性化」は、細胞傷害性または細胞増殖抑制性の活性を増すか、またはそうでなければ抗癌剤の治療効力を増すか、またはその代謝反応無しにその薬剤が示す作用機構を超えるさらなる作用機構をその薬剤に与える任意の代謝反応を意図する。

【００４６】

例示的なＰ４５０遺伝子としては、哺乳類の遺伝子Ｐ４５０　１Ａ１、１Ａ２、１Ｂ１、２Ｂ１、２Ｂ２、２Ｂ４、２Ｂ５、２Ｂ６、２Ｂ１１、２Ａ６、２Ｃ６、２Ｃ８、２Ｃ９、２Ｃ１１、２Ｃ１８、２Ｃ１９、２Ｄ６、２Ｅ１、３Ａ４、３Ａ５、３Ａ７、または４Ｂ１ならびにそのｃＤＮＡ配列が公知である他の種における対応するＰ４５０遺伝子ファミリーおよびサブファミリー（Ｎｅｌｓｏｎ，Ｄ．Ｒ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ　６：１－４２（１９９６））、またはその対立遺伝子改変体、部位特異的変異体、およびキメラ構築体を含む他の任意のＰ４５０遺伝子を含む。（例えば、Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ　７：２１１－２２１（１９９７）、Ｓｚｋｌａｒｚ，Ｇ．Ｄ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３４：１４３１２－１４３２２（１９９５）、Ｈｅ，Ｙ．Ａ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３６：８８３１－８８３９（１９９７））。哺乳類のシトクロムＰ４５０遺伝子が好ましい。ラットシトクロムＰ４５０　２Ｂ１遺伝子ならびにヒトシトクロムＰ４５０　２Ｂ６、２Ｃ１８、および３Ａ４遺伝子が特に好ましい。

【００４７】
シトクロムＰ４５０の系は２つのタンパク質構成要素から構成される。すなわち、ヘムを含むＰ４５０タンパク質、およびフラビンタンパク質ＮＡＤＰＨ－シトクロムＰ４５０レダクターゼ（あるいは「ＲＥＤ」として知られる）である。どちらのタンパク質も小胞体のリン脂質二重膜に埋め込まれている。ＲＥＤは単一の遺伝子によってコードされるＦＡＤおよびＦＭＮを含むフラビン酵素であり（Ｐｏｒｔｅｒ，Ｔ．Ｄ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ２９：９８１４－９８１８（１９９０）、Ｏ’Ｌｅａｒｙ，Ｋ．Ａ．ら、Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．３１０：４５２－４５９（１９９４））、薬剤の活性化を含む全てのミクロソームＰ４５０依存性酵素反応に必要な電子伝達を触媒する（Ｐｏｒｔｅｒ，Ｔ．Ｄ．、Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １６：１５４－１５８（１９９１）；Ｓｔｒｏｂｅｌ，Ｈ．Ｗ．ら、「ＮＡＤＰＨシトクロムＰ４５０レダクターゼとその構造および機能ドメイン」ＣｙｔｏｃｈｒｏｍｅＰ４５０：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ，ａｎｄ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｐ．Ｒ．Ｏｒｔｉｚ ｄｅ Ｍｏｎｔｅｌｌａｎｏ編、Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、第２版、２２５－２４４頁（１９９５））。電子伝達機構に関する詳しい研究は、全体としてＮＡＤＰＨからの２つの電子が、Ｐ４５０ヘムタンパク質に１度に１つずつ伝達される前に、はじめにＦＡＤに、次にＦＭＮに伝達されることを立証した（Ｖｅｒｍｉｌｉｏｎ，Ｊ．Ｌ．ら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５６：２６６－２７７（１９８１））。次に、シトクロムＰ４５０はこれらの還元当量を、ＣＰＡおよび他の抗癌剤の活性化に関連する水酸化反応を含む、さまざまなモノオキシゲナーゼ反応に利用する。ある場合には、特に細胞内酸素濃度が低い低酸素状態下では、シトクロムＰ４５０酵素は、酸素よりむしろ薬剤および他の外来性の化学物質に直接電子を伝達する反応を触媒する。このシトクロムＰ４５０の生体異物を還元する活性は多くの抗癌剤の活性化を導き得る（Ｇｏｅｐｔａｒ，Ａ．Ｒ．ら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．２５：２５－６５（１９９５））。

【００４８】
「ＲＥＤをコードする遺伝子」は、酵素ＮＡＤＰＨ－シトクロムＰ４５０レダクターゼをコードする遺伝子を意図する。このＲＥＤ遺伝子は任意の種由来であり得る。多くの種由来のＲＥＤ ｃＤＮＡは当業者に公知であり、それらのヌクレオチド配列はＧｅｎＢａｎｋ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａｂａｓｅより入手し得る。ＧｅｎＢａｎｋからの代表的な例は受託番号Ｓ９０４６９（ヒト）、ＧＰＩＣＹＰＯＲ（モルモット）、ＲＡＴＣＹＰＲＭ（ラット）、およびＣＲＵＮＡＤＰＨ（ハムスター）を含む。

【００４９】
「遺伝子産物」または「特定遺伝子の産物」という用語は、広く、特定の遺伝子にコードされたポリペプチドまたはタンパク質を意図するが、特定の遺伝子の転写産物も含み得る。

【００５０】
「前述のシトクロムＰ４５０遺伝子産物によって活性化される化学療法剤」は新生物の処置に使用され得、そしてシトクロムＰ４５０によって活性化され得る薬学的薬剤を意味する。化学療法剤の「活性化」または「生物活性化」は細胞傷害性または細胞増殖抑制性の活性を増すような、またはそうでなければ薬剤の治療効果を増すような任意の代謝反応を意図する。またはその代謝反応無しにその薬剤が示す作用を超えて、さらなる作用機構をその薬剤に与えるような任意の代謝反応を意図する。「細胞傷害的」または「細胞増殖抑制的」は細胞死または腫瘍細胞増殖の遅延を引き起こし、またそれを導くことを意図する。Ｐ４５０によって活性化される化学療法剤の例は、シクロホスファミド、イホスファミド、ダカルバジン、プロカルバジン、チオＴＥＰＡ、エトポシド（ＶＰ－１６）、４－イポメアノール、２－アミノアントラセン、またはタモキシフェンである。当業者に公知の他のＰ４５０によって活性化される化学療法剤も、本発明において使用され得る。

【００５１】
「前述の腫瘍性細胞を化学療法剤によって治療する」は、例えば徐放性のペレットによる

腫瘍内、または腫瘍近傍部位へのプロドラッグの局所送達、ならびに腹腔内、静脈内、非経口または筋肉内経路による化学療法剤の全身投与の両方を含むことが意図される。薬剤の局所送達は腫瘍内で活性化される薬剤の画分を増し、それにより薬剤の効果を増すことが期待される。

【００５２】

特定の化学療法剤の用量は現在の標準的臨床実施に従って投与され得る。例えば、Ｈｕｂｂａｒｄ，Ｓ．Ｍ．およびＪｅｎｋｉｎｓ，Ｊ．Ｆ．、「化学療法の投与：実用的手引き」Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ、ＣｈａｂｎｅｒおよびＣｏｌｌｉｎｓ編、Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、ＰＡ（１９９０）、４４９－４６３頁を参照のこと。例えば、成人におけるＣＰＡの標準的臨床投薬量は約６００～１０００ｍｇ／ｍｅｔｅｒ^2（ｍ^2）に及び（Ｓｔｒｕｃｋ，Ｒ．Ｆ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４７：２７２３－２７２６（１９８７））；ＩＦＡの標準的１日投薬量は約１～３ｇ／ｍ^{2}に及ぶ（Ｋｕｒｏｗｓｋｉ，Ｖ．およびＷａｇｎｅｒ，Ｔ．、Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．３３：３６－４２（１９９３））。標準的臨床実施は、体表面面積（ＢＳＡ）に基づいた用量計算、ならびに血漿中の薬物および代謝産物の濃度を用いる薬物動態学的最適化に基づいた用量の個別的配慮に関係し得る（「治療薬物モニタリング」またはＴＤＭ）。そのような濃度は限られたサンプリングまたは他の薬物動態学的サンプリングおよびモデリング技術を用いて得ることができる（ｖａｎ Ｗａｒｍｅｒｄａｍ，Ｌ．Ｊ．ら、Ｎｅｔｈ Ｊ．Ｍｅｄ．５１：３０－３５（１９９７）；Ｄｅｓｏｉｚｅ，Ｂ．およびＲｏｂｅｒｔ，Ｊ．、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ３０Ａ：８４４－８５１（１９９４）、Ｇｕｒｎｅｙ，Ｈ．、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１４：２５９０－２６１１（１９９６））。患者の臨床状態や年齢のような当業者に公知の他の要因もまた投薬量の調節に寄与しうる。

【００５３】

本発明はまた、前述の方法の好ましい実施態様を提供し、ここでシトクロムＰ４５０遺伝子は、Ｐ４５０　２Ｂ１、Ｐ４５０　２Ｂ６、またはＰ４５０　２Ｃ１８であり、化学療法剤がＣＰＡである；およびここでシトクロムＰ４５０遺伝子は、Ｐ４５０　２Ｂ１またはＰ４５０　３Ａ４であり、化学療法剤がイホスファミドである。

【００５４】

本発明の別の実施態様は、さらにＰ４５０および／またはＲＥＤによって触媒される還元的代謝によって活性化される生還元性薬物と組み合わせて、Ｐ４５０によって活性化される化学療法剤（例えばＣＰＡ、ＩＦＡ）を利用した治療レジメを伴うシトクロムＰ４５０／ＲＥＤ遺伝子治療に関する。従って、本実施態様における代表的な例では、シトクロムＰ４５０／ＲＥＤ遺伝子治療に続いて、ＣＰＡのような化学療法剤が、チラパザミンのような生還元性薬物と共に投与される。２つの薬物の投与順は重要ではない。あるいは、生還元性薬物は単独で（すなわちＣＰＡ無しに）使用され得る。

【００５５】

本明細書中において使用されているように、「生還元性薬物」はＰ４５０レダクターゼ（「ＲＥＤ」）および／またはシトクロムＰ４５０によって触媒されて代謝的還元を受け、低酸素状態または酸素正常状態下のいずれかで細胞傷害的または細胞増殖抑制的代謝産物を生じる薬物である。生還元性薬物の例はアドリアマイシン、ポルフィロマイシン、マイトマイシンＣ、チラパザミン（ＴＰＺまたはＳＲ４２３３）、インドロキノンＥ０９、アジリジニルニトロイミダゾールＲＳＵ１０６９またはＲＢ６１４５（ＲＳＵ１０６９のプロドラッグ）、ジニトロフェニルアジリジン（ＣＢ１９５４）、２，３，５，６－テトラメチルベンゾキノン（ＴＭＱ）、ジアジクオン（ｄｉａｚｉｑｕｏｎｅ）（ＡＺＱ）、インターカレーターアミンＮ－オキシドＡＱ４Ｎ、生還元可能（ｂｉｏｒｅｄｕｃｉｂｌｅ）ＤＮＡアルキル化剤ＮＳＣ６４６３９４およびＮＳＣ６５８９２６、またはさまざまなニトロイミダゾール、芳香族ニトロ化合物、キノン化合物、脂肪族化合物、芳香族化合物または複素環式Ｎ－オキシド、および生還元可能ＤＮＡアルキル化剤を含む、ＲＥＤに触

媒されるおよび／またはＰ４５０に触媒される生還元性活性化をうける他の任意の薬剤を含む（Ｂｏｙｅｒら、Ｏｎｃｏｌ．Ｒｅｓ．９：３９１－３９５（１９９７）；Ｐａｔｔｅｒｓｏｎ，Ａ．Ｖ．ら、Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　７２：１１４４－１１５０（１９９５）；Ｗｏｒｋｍａｎ，Ｐ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ　Ｒｅｖ．１２：７３－８２（１９９３）；Ｂｅｌｉｎｓｋｙら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ　Ｒｅｖ．１２：１０３－１１７（Ｊｕｎｅ　１９９３）；Ｐａｔｔｅｒｓｏｎ，Ｌ．Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ　Ｒｅｖ．１２：１１９－１３４（１９９３）；Ｒａｕｔｈ，Ａ．Ｍ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ　Ｒｅｖ．１２：１５３－１６４（１９９３）；Ｂｒｅｍｎｅｒ，Ｊ．Ｃ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ　Ｒｅｖ．１２：１７７－１９３（１９９３）；Ｇｏｅｐｔａｒ，Ａ．Ｒ．ら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．２５：２５－６５（１９９５））。いくつかの生還元性薬物は、腫瘍の低酸素状態下で、増強されたシトクロムＰ４５０および／またはＲＥＤに触媒される活性化を受けるので、本発明における生還元性薬物の好ましい使用は、低酸素応答エレメントを用いたＰ４５０およびＲＥＤ遺伝子の低酸素状態の腫瘍領域に対する標的化と関係する（Ｄａｃｈｓ，Ｇ．Ｕ．ら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄ．３：５１５－５２０（１９９７）、Ｏ’Ｒｏｕｒｋｅ，Ｊ．Ｆ．ら、Ｏｎｃｏｌ．Ｒｅｓ．９：３２７－３３２（１９９７））。

【００５６】

「生還元性薬物を用いて前述の腫瘍性細胞を治療する」は生還元性薬物の腹腔内、静脈内、非経口または筋肉内経路による全身投与と同様に、腫瘍内、または腫瘍近傍部位への局所送達を含むことを意図する。特定の生還元性薬物の投薬量は現在の標準的臨床実施に従って投与され得る。例えば、Ｈｕｂｂａｒｄ，Ｓ．Ｍ．およびＪｅｎｋｉｎｓ，Ｊ．Ｆ．、「化学療法の投与：実用的手引き」Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ、ＣｈａｂｎｅｒおよびＣｏｌｌｉｎｓ編、Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ、ＰＡ（１９９０）、４４９－４６３頁；Ｇｒａｈａｍ，Ｍ．Ａ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４０：１－１０（１９９７）を参照のこと。標準的臨床実施は体表面面積（ＢＳＡ）に基づいた用量計算、ならびに血漿中の薬物および代謝産物の濃度を用いる薬物動態学的最適化に基づいた投薬量の個別的配慮も関係し得る（「治療薬物モニタリング」またはＴＤＭ）。そのような濃度は限られたサンプリングまたは他の薬物動態学的サンプリングおよびモデリング技術を用いて得ることができる（ｖａｎ　Ｗａｒｍｅｒｄａｍ，Ｌ．Ｊ．ら、Ｎｅｔｈ　Ｊ．Ｍｅｄ．５１：３０－３５（１９９７）；Ｄｅｓｏｉｚｅ，Ｂ．およびＲｏｂｅｒｔ，Ｊ．、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　３０Ａ：８４４－８５１（１９９４）；Ｇｕｒｎｅｙ，Ｈ．、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１４：２５９０－２６１１（１９９６））。患者の臨床状態や年齢のような当業者に公知の他の要因もまた、投薬量の調節に寄与する。

【００５７】

シトクロムＣ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子は、ウイルスベクター、好ましくは遺伝子治療のための使用が当該分野においてよく知られているウイルスベクターを用いて腫瘍性細胞へ送達され得る。ベクターまたはビリオンの形成に関する技術は「Ｗｏｒｋｉｎｇ　Ｔｏｗａｒｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ」２８章、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　ＤＮＡ、第２版、Ｗａｔｓｏｎ，Ｊ．Ｄ．ら編、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｂｏｏｋｓ、ｐｐ．５６７－５８１（１９９２）に一般的に述べられている。適切なウイルスベクターまたはビリオンの概観は、Ｗｉｌｓｏｎ，Ｊ．Ｍ．、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０７（Ｓｕｐｐｌ．１）：３１－３２（１９９７）；ならびにＮａｋａｎｉｓｈｉ，Ｍ．、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａｐｅｕ．Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　１２：２６３－３１０（１９９５）；Ｒｏｂｂｉｎｓ，Ｐ．Ｄ．ら、Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：３５－４０（１９９８）；Ｚｈａｎｇ，Ｊ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ　Ｒｅｖ．１５：３８５－４０１（１９９６）、およびＫｒａｍｍ，Ｃ．Ｍ．ら、Ｂｒａｉｎ　Ｐａｔｈ

ｏｌｏｇｙ ５：３４５－３８１（１９９５）に提供されている。そのようなベクターはＲＮＡ（Ｖｉｌｅ，Ｒ．Ｇ．ら、Ｂｒ．Ｍｅｄ Ｂｕｌｌ．５１：１２－３０（１９９５））またはＤＮＡ（Ａｌｉ Ｍ．ら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１：３６７－３８４（１９９４））を含むウイルスに由来し得る。

【００５８】

遺伝子治療技術分野において利用されるウイルスベクター系の例は次のものを含む。すなわち、レトロウイルス（Ｖｉｌｅ，Ｒ．Ｇ．前出、米国特許第５，７４１，４８６号および同第第５，７６３，２４２号）；アデノウイルス（Ｂｒｏｄｙ，Ｓ．Ｌ．ら、Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７１６：９０－１０１（１９９４）；Ｈｅｉｓｅ，Ｃ．ら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．３：６３９－６４５（１９９７））；アデノウイルス／レトロウイルスキメラ（Ｂｉｌｂａｏ，Ｇ．ら、ＦＡＳＥＢ Ｊ．１１：６２４－６３４（１９９７）；Ｆｅｎｇ，Ｍ．ら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５：８６６－８７０（１９９７））；アデノ随伴ウイルス（Ｆｌｏｔｔｅ，Ｔ．Ｒ．およびＣａｒｔｅｒ，Ｂ．Ｊ．、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２：３５７－３６２（１９９５）；米国特許第５，７５６，２８３号）；単純ヘルペスウイルスI型またはII型（Ｌａｔｃｈｍａｎ，Ｄ．Ｓ．、Ｍｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２：１７９－１９５（１９９４）；米国特許第５，７６３，２１７号；Ｃｈａｓｅ，Ｍ．ら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：４４４－４４８（１９９８））；パルボウイルス（Ｓｈａｕｇｈｎｅｓｓｙ，Ｅ．ら、Ｓｅｍｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２３：１５９－１７１（１９９６））；細網内皮症ウイルス（Ｄｏｎｂｕｒｇ，Ｒ．、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐ．２：３０１－３１０（１９９５））である。遺伝子治療のための染色体外複製ベクターの開発もまた当該分野において重要である（Ｃａｌｏｓ，Ｍ．Ｐ．、Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．１２：４６３－４６６（１９９６））。遺伝子送達のためのベクターとして使用され得る他のウイルスは、ポリオウイルス、パピローマウイルス、ワクシニアウイルス、レンチウイルス、および２つまたはそれ以上のウイルスの好ましい局面を組み込んだハイブリッドまたはキメラベクターを含む（Ｎａｋａｎｉｓｈｉ，Ｍ．、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａｐｅｕ． Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ １２：２６３－３１０（１９９５）；Ｚｈａｎｇ，Ｊ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ Ｒｅｖ．１５：３８５－４０１（１９９６）；Ｊａｃｏｂｙ，Ｄ．Ｒ．ら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ４：１２８１－１２８３（１９９７））。レトロウイルスおよびアデノウイルスは遺伝子の送達に好ましいウイルスベクターである。他の適切なウイルスベクターは、当業者に容易に明らかである。

【００５９】

そのベクターは１つまたはそれ以上のプロモーターまたはエンハンサーを含み、その選択は当業者に公知である。適切なプロモーターは、レトロウイルスの長末端反復配列（ＬＴＲ）、ＳＶ４０のプロモーター、ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のプロモーター、および当業者に公知の他のウイルスおよび真核生物細胞のプロモーターを含むが、この限りではない。エンハンサーの例は後に述べる腫瘍組織特異的エンハンサーを含む。

【００６０】

遺伝子治療ベクターの構築と、治療目的での罹患動物へのその導入に関するガイダンスは、前に述べた刊行物、および米国特許第５，６３１，２３６号、第５，６８８，７７３号、５，６９１，１７７号、５，６７０，４８８号、５，５２９，７７４号、５，６０１，８１８号および第ＷＯ９５／０６４８６号より得ることができる。

【００６１】

一般的に、目的の細胞にウイルスを感染させる方法が当該分野において公知である。ウイルスは新生物を有する患者に対し、新生物が増殖している部位へ、その部位の中へ、またはその部位の近くへのいずれかで注入され得る。好ましくは、治療は新生物内へ直接接種することにより行われる。脳の腫瘍に対しては、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）、コンピューター断層撮影法（ＣＴ）、または他の画像によって誘導される定位固定技術が、ベクターの直接接種に使用され得る。腫瘍はまた、本発明のベクターによる処置の前に切除され得る。

【００６２】
本発明の薬学的組成物は、注射可能な組成物の形態で有利に投与される。そのような目的の代表的な組成は、薬学的に許容できるビヒクルを含む。他の薬学的に許容できるキャリアは、水溶液、塩を含む非毒性の賦形剤、防腐剤、緩衝剤等を含む。Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（第１８版）、Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ.（１９９０）を参照のこと。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油およびエチロリエート（ｅｔｈｙｌｏｌｅａｔｅ）のような注射可能な有機エステルである。水性キャリアは、水、水溶液、生理食塩水、塩化ナトリウム、リンガーデキストロースのような非経口ビヒクルなどを含む。静脈内ビヒクルは流体および栄養補給液を含む。薬学的組成物のｐＨおよびさまざまな成分の正確な濃度は、当該分野における慣用技術によって調整される（Ｇｏｏｄｍａｎ ａｎｄ Ｇｉｌｍａｎ、Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｆｏｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（第８版）Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ（１９９０））。

【００６３】
代表的には、ベクターは液体溶液または懸濁液のいずれかとして注射可能なように調製される。注射の前の液体で水溶液または懸濁液にするのに適切な固形のものもまた調製され得る。調製物はまた、乳化され得る。活性な免疫原性の成分が、しばしば薬学的に許容でき、かつ活性成分と適合性である賦形剤と混合される。例えば、適切な賦形剤は水、生理的食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等およびそれらの組み合わせである。それに加えて、もし必要なら、調製物は少量の湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝剤、アジュバントまたは免疫賦活剤のような補助物質を含み得る。

【００６４】
一般的に、ウイルスは標的細胞に感染しそれを死滅させるのに治療上有効な量で提供される。処置の回数および量の両方による投与されるベクターの量は、処置される被験体の臨床状態、年齢、体重、抗体を合成する被験体の免疫系の能力、および利用可能な量のような因子にも依存する。投与に必要とされる正確な活性成分の量は、遺伝子治療専門家の判断に依存し、個々の患者それぞれに特有である。一般的に、ウイルスベクターは、１ｍｌあたり約1×10^{5}から約1×10^{9}コロニー形成単位（ｃｆｕ）の力価で投与されるが、その投与量の範囲は多様であり得る。好ましい力価は約1×10^{6}から約1×10^{8}ｃｆｕ／ｍｌの範囲である。

【００６５】
１つの実施態様において、パッケージング細胞株はＰ４５０および／またはＲＥＤ遺伝子を有するレトロウイルスベクターで形質導入され、プロデューサー細胞株を形成する。パッケージング細胞は、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム沈降、またはリポソームの使用を含む、当該分野において公知の任意の手段によって、形質導入され得る。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞の例は、ＢＯＳＣ２３、Ｂｉｎｇ、ＰＥ５０１、ＰＡ３１７、Ψ－２、Ψ－ＡＭ、ＰＡ１２、Ｔ１９－１４Ｘ、ＶＴ－１９－１７－Ｈ２、Ψ－ＣＲＥ、Ψ－ＣＲＩＰ、ＧＰ＋Ｅ８６、ＧＰ＋ｅｎｖＡｍ１２、およびＤＡＮの細胞株を含むが、この限りではない。レトロウイルスを産生するパッケージング細胞およびそれらの構築方法についてのガイダンスは、Ｓｈｏｒｔら、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｒｅｓ．２７：４２７－４３３（１９９０）、Ｍｉｌｌｅｒ，Ａ．Ｄ．、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１：５－１４（１９９０）；Ｄａｎｏｓ，Ｏ．、「レトロウイルスパッケージング細胞株の構築」Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｍ．Ｃｏｌｌｉｎｓ編）第８巻、Ｔｈｅ Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ.、Ｃｌｉｆｔｏｎ、ＮＪ、１７－２６（１９９１）；Ｍｕｒｄｏｃｈ，Ｂ．ら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ４：７４４－７４９（１９９７）、ならびに１９９６年６月２５日に発行された米国特許第５，５２９，７７４号、１９９７年１月７日に発行された米国特許第５，５９１，６２４号より見出され得る。

【００６６】
レトロウイルスベクターはまた、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）のエンベロープ糖タン

パク質Ｇを用いてパッケージングされ得る（「偽型化」（ｐｓｅｕｄｏｔｙｐｉｎｇ）。これらのベクターはより安定で、10^9ｃｆｕ／ｍｌまで濃縮でき、直接注射することができる（Ｂｕｒｎｓ，Ｊ．Ｃ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：８０３３－８０３７（１９９３））。

【００６７】

次いで、プロデューサー細胞は、腫瘍性細胞を阻害または死滅させるのに有効な量で、腫瘍の付近または腫瘍内に移植することができる。高力価のレトロウイルスプロデューサー細胞の直接注射（Ｍｕｒｄｏｃｈ，Ｂ．ら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．４：７４４－７４９（１９９７）は、Ｏｎｏｄｅｒａ，Ｍ．ら、Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．８：１１８９－１１９４（１９９７））、有効なインサイチュでのレトロウイルス配列の感染を可能にする（Ｒａｉｎｏｖ，Ｎ．Ｇ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．３：９９－１０６（１９９６）、Ｒａｍ，Ｚ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５３：８３－８８（１９９３））。腫瘍内に注射されたプロデューサー細胞は一般的には注射部位から拡散しない。さらに、それらは宿主によって拒絶され得るが、このことは５～１０日の間は起こらず、その時までには腫瘍細胞の近傍にレトロウイルス感染が生じる（Ｒａｍ，Ｚ．ら、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．７９：４００－４０７（１９９３））。一般的にはベクタープロデューサー細胞（ＶＰＣ）の用量は、約2.5×10^8ＶＰＣから約1×10^9ＶＰＣの範囲である。プロデューサー細胞の正確な量は、最終的には多くの要因に基づいて当業者によって決定される。その要因は、利用可能な注射の量、患者の臨床的状態、および腫瘍の型とサイズを含むがこの限りではない。

【００６８】

好ましくは、本発明において使用されるウイルスベクターのウイルスゲノムは、その複製能を取り除くかまたは制限するように改変されるべきである。しかし、条件付きで複製するウイルスもまた、ある細胞を標的化し得る複製ベクターと同様、本発明においては、有用である。例えば、Ｚｈａｎｇ，Ｊ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｍａｔａｓｔａｓｉｓ Ｒｅｖ．１５：３８５－４０１（１９９６）を参照のこと。Ｃｈａｓｅ，Ｍ．ら（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：４４４－４４８（１９９８））はウイルスリボヌクレオチドレダクターゼ遺伝子を不活性化したヘルペスウイルスであって、Ｐ４５０ ２Ｂ１を、この改変されたウイルスが複製するために必要な哺乳類リボヌクレオチドレダクターゼを過剰発現する腫瘍細胞に選択的に送達するウイルスを使用した。

【００６９】

１つの実施態様において、単一のウイルスベクターが、Ｐ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子の両方を運搬するために使用される。別の実施態様において、２つのウイルス性ベクターが使用される；一方はＰ４５０遺伝子を運搬し、そして他方はＲＥＤ遺伝子を運搬する。２つのウイルス性ベクターが使用される場合、それらは、同一の型または異なる型のウイルスに由来し得、そして同時に投与され得るか、または連続して投与され得る（すなわち、特定の順番を重要視しない）。

【００７０】

Ｐ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子はまた、遺伝子移入のための非ウイルス法、好ましくは遺伝子治療におけるその使用が当該分野で知られているものを使用して送達され得る（Ｎａｋａｎｉｓｈｉ，Ｍ，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａｐｅｕ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ １２：２６３－３１０（１９９５）；Ａｂｄａｌｌａｈ，Ｂ．ら、Ｂｉｏｌ．Ｃｅｌｌ ８５：１－７（１９９５）；Ｚｈａｎｇ，Ｊ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ Ｒｅｖ． １５：３８５－４０１（１９９６）；Ｐｈｉｌｉｐｓ，Ｓ．Ｃ．，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ ２３：１３－１６（１９９５）；Ｌｅｅ，Ｒ．Ｊ．およびＨｕａｎｇ，Ｌ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔ． １４：１７３－２０６（１９９７））。このような遺伝子送達のための非ウイルス性ベクターの例は、以下を含む：腫瘍標的化細菌ベクター（Ｐａｗｅｌｅｋ，Ｊ．Ｍ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５７：４５３７－４５４４（１９９７））のような原核生物ベクター、カチオン性リポソーム、ＤＮＡ－タンパク質複合体、非ウイルス

性Ｔ７オートジーンベクター（Ｃｈｅｎ，Ｘ．ら、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．　９：７２９－７３６（１９９８））、融合誘導性リポソーム、核酸の直接注入（「裸のＤＮＡ」）、粒子もしくはレセプター媒介性遺伝子移入、ＤＮＡ－アデノウイルス結合体または非ウイルス性成分およびウイルス性成分を含む他の分子結合体、スターバーストポリアミドアミンデンドリマー（Ｋｕｋｏｗｓｋａ－Ｌａｔａｌｌｏ，Ｊ．Ｆ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：４８９７－４９０２（１９９６）；Ｔａｎｇ，Ｍ．Ｘ．ら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．　７：７０３－７１４（１９９６）、カチオン性ペプチド（Ｗｙｍａｎ，Ｔ．Ｂ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３６：３００８－３０１７（１９９７））、ならびに哺乳動物人工染色体（Ａｓｃｅｎｚｉｏｎｉ，Ｆ．ら、Ｃｅｎｃｅｒ　Ｌｅｔｔ．　１１８：１３５－１４２（１９９７））のようなハイブリッドベクター。

【００７１】

さらに、本発明は、先の方法の実施態様を提供し、ここでＰ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子は、任意の細胞性ベクター、好ましくは遺伝子治療のためのその使用が当業者に十分確立されているものを使用して送達される。遺伝子治療のためのこのような細胞性ベクターの例は、内皮細胞（Ｒａｎｃｏｕｒｔ，Ｃ．ら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　４：２６５－２７０（１９９８）；Ｏｊｅｉｆｏ，Ｊ．Ｏ．ら、Ｃｙｔｏｌｋｉｎｅｓ　Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．　２：８９－１０１（１９９６）、および腫瘍浸潤マクロファージ（Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，Ｒ．ら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　１５：８７１－８７５（１９９７）；Ｎａｌｄｉｎｉ，Ｌ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７２：２６３－２６７（１９９６））を含むマクロファージを含み、これらの各々は、ウイルス性ベクターまたは非ウイルス性ベクターを用いて、Ｐ４５０遺伝子および／またはＲＥＤ遺伝子を運搬し、それゆえＰ４５０遺伝子産物およびＲＥＤ遺伝子産物を発現するように改変され得る。他の適切な非ウイル性スベクターは、当業者に容易に明らかである。

【００７２】

単一のベクターが使用される場合、Ｐ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子は、Ｐ４５０－ＲＥＤ融合タンパク質をコードする融合遺伝子として送達され得る。このような融合遺伝子の構築は、当業者に十分確立されており（Ｆｉｓｈｅｒ，Ｃ．Ｗ．ら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．　２７２：１５－２５（１９９６）；Ｓｈｅｔ，Ｍ．Ｓ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：１１７４８－１１７５２（１９９３）；Ｆｉｓｈｅｒ，Ｃ．Ｗ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：１０８１７－１０８２１（１９９２）；Ｙａｂｕｓａｋｉ，Ｙ．，　Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ　７７：５９４－６０３（１９９５））、そしてＰ４５０活性およびＲＥＤ活性の非常に効率的な発現を可能にし得る。

【００７３】

あるいは、遺伝子送達は、内部リボソーム侵入部位（ｉｎｔｅｒｎａｌ　ｒｉｂｏｓｏｍｅ　ｅｎｔｒｙ　ｓｉｔｅ）（ＩＲＥＳ）配列を含むことによって増強されて、二シストロン性（ｂｉｃｉｓｔｒｏｎｉｃ）メッセージにおいて、Ｐ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子の協調性発現を達成し得る。ＩＲＥＳは、ピコルナウイルス科のウイルス（ポリオウイルスおよび脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）を含む）の５’非形質導入領域の典型である５００～６００ｂｐを含む配列である。例えば、Ｇｈａｔｔａｓ，Ｉ．Ｒ．ら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１１：５８４８－５８５９（１９９１）；Ｍｏｒｇａｎ，Ｒ．Ａ．ら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０：１２９３－１２９９（１９９２）を参照のこと。このアプローチは、インターロイキン－１２の２つのサブユニットの効率的なレトロウイルス同時発現のために使用されている（Ｔａｈａｒａ，Ｈ．ら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１５４：６４６６－６４７４（１９９５））。別の代替物は、ベクターについて、個別のプロモーターの制御下で、Ｐ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子の両方を含むことである。

【００７４】

本発明の別の実施態様において、Ｐ４５０およびＲＥＤに基づいた薬物活性化系は、ガン

シクロビル／ＨＳＶ－ＴＫおよび５－フルオロシトシン／ＣＤ（Ｍｏｏｌｔｅｎ，Ｆ．Ｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：２７９－２８７（１９９４）を含む、確立された遺伝子／プロドラッグ活性化系と組み合わされる。これは、両方の自殺遺伝子の別々の移入（Ａｇｈｉ，Ｍ．ら、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ． ９０：３７０－３８０（１９９８）；Ｕｃｋｅｒｔ，Ｗ．ら、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ９：８５５－８６５（１９９８）、または両方の薬物活性化酵素をコードする融合遺伝子の移入（Ｒｏｇｕｌｓｋｉ，Ｋ．Ｒ．ら、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ８：７３－８５（１９９７））のいずれかにより達成され得る。Ｐ４５０／ＲＥＤ遺伝子治療はまた、他の確立されたガン治療遺伝子と組み合わせられ得、ガン治療遺伝子は以下を含む：ｐ５３（Ｒｏｔｈ，Ｊ．Ａ．ら、Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ． ２：９８５－９９１（１９９６）；Ｈａｒｒｉｓ，Ｍ．Ｐ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐ． ３：１２１－１３０（１９９６）のような腫瘍サプレッサー遺伝子；ｂａｘ（Ｂａｒｇｏｕ，Ｒ．Ｃ．ら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ． ９７：２６５１－２６５９（１９９６））、腫瘍壊死因子α（Ｇｉｌｌｉｏ，Ｔ．Ａ．ら、Ｂｌｏｏｄ ８７：２４８６－２４９５（１９９６）、およびカスパーゼ（Ｋｏｎｄｏ，Ｓ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５８：９６２－９６７（１９９８）；Ｙｕ，Ｊ．Ｓ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５６：５４２３－５４２７（１９９６））のようなアポトーシス因子；ならびに、インターロイキン２（Ｃｌａｒｙ，Ｂ．Ｍ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ． ４：９７－１０４（１９９７）；Ｏ’Ｍａｌｌｅｙ，Ｂ．Ｗ．ら、Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ． ８４２：１６３－１７０（１９８８）、インターロイキン４（Ｂｅｎｅｄｅｔｔｉ，Ｓ．ら、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ８：１３４５－１３５３（１９９７）、およびインターロイキン１２（Ｃｈｅｎ，Ｌ．ら、Ｉｍｍｕｎｏｌ． １５９：３５１－３５９（１９９７））のようなサイトカイン。

【００７５】

さらなる実施態様において、Ｐ４５０およびＲＥＤ遺伝子送達の標的化特異性は、標的化送達または標的化発現（「転写標的化」）によって促進され得、これは原発性腫瘍部位またはその転移のいずれかでの腫瘍細胞における形質導入遺伝子の発現を選択的に活性化するための、腫瘍特異的または腫瘍選択的ＤＮＡエンハンサー配列の使用を含む（Ｍｉｌｌｅｒ，Ｎ．およびＷｈｅｌａｎ，Ｊ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ． ８：８０３－８１５（１９９７）；Ｗａｌｔｈｅｒ．Ｗ．およびＳｔｅｉｎ，Ｕ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ． ７４：３７９－３９２（１９９６）；Ｓｃｈｎｉｅｒｌｅ，Ｂ．Ｓ．およびＧｒｏｎｅｒ．Ｂ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ３：１０６９－１０７３（１９９６）；Ｌａｎ，Ｋ－Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ． ５７：４２７９－４２８４（１９９７）；Ｄａｃｈｓ，Ｇ．Ｕ．ら、Ｏｎｃｏｌ．Ｒｅｓ． ９：３１３－３２５（１９９７））。このアプローチの例は、以下をコードする遺伝子に由来するＤＮＡエンハンサーを含む：チロシナーゼ（黒色腫に対する標的化を可能にする）、ＥＲＢＢ２（膵臓ガンを標的化する）、癌胎児性抗原（肺悪性疾患ならびに大腸癌、膵臓癌、および胃癌を含む胃腸悪性疾患を標的化する）、ＤＦ３／ＭＵＣ１（乳癌を標的化する）、およびα－フェトプロテイン（肝癌を標的化する）。合成遺伝子調節系（これは、Ｐ４５０および／またはＲＥＤ遺伝子の転写制御および他の形態の調節された発現を可能にする）の使用もまた、使用され得る（Ｍｉｌｌｅｒ，Ｎ．およびＷｈｅｌａｎ，Ｊ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ． ８：８０３－８１５（１９９７）；Ｖｉｌｅ，Ｒ．Ｇ．，Ｓｅｍｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌ． ５：４２９－４３６（１９９４）；Ｈｗａｎｇ，Ｊ．Ｊ．ら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ． ７０：８１３８－８１４１（１９９６）；Ｍａｓｓｉｅ，Ｂ．ら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ． ７２：２２８９－２２９６（１９９８））。

【００７６】

別の可能性は、腫瘍特異的条件および因子によって調節されるＤＮＡ調節エレメントの使用である。例えば、固形腫瘍の１つの独特の局面は、それらの局在化された低酸素性環境である（Ｂｒｏｗｎ，Ｊ．Ｍ．およびＧｉａｃｃｉａ，Ａ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５８：１４０８－１４１６（１９９８））。この特徴は、低酸素によって制御される

遺伝子（低酸素性応答エレメント、すなわち「ＨＲＥ」）の発現を誘導するために活用され得る（Ｄａｃｈｓ，Ｇ．Ｕ．ら、Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ． ３：５１５－５２０（１９９７）；Ｏ’Ｒｏｕｒｋｅ，Ｊ．Ｆ．ら、Ｏｎｃｏｌ．Ｒｅｓ． ９：３２７－３３２（１９９７））。従って、さらなる実施態様において、ＨＲＥ配列は、シトクロムＰ４５０および／またはＲＥＤ遺伝子の低酸素性腫瘍性細胞への転写標的化のために使用され得る。

【００７７】

肝臓Ｐ４５０に触媒される薬物の活性化は、腫瘍内で活性化される所定の化学療法用薬物の割合を増加させるアプローチを提供し得る。従って、本発明の別の実施態様において、Ｐ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子の腫瘍への送達は、腫瘍内薬物活性化の特異性を増加させるために、肝臓Ｐ４５０活性のインヒビターの全身性投与と組み合わされる。肝臓Ｐ４５０活性のこのようなインヒビターは、肝臓において薬物活性化を触媒する特定のＰ４５０酵素に指向される種々の化学物質および他の低分子Ｐ４５０インヒビターを含み、これは、以下を含む：Ｐ４５０ ２Ｃ９に触媒されるヒト肝臓ＣＰＡ活性化を阻害する（Ｒｅｎ，Ｓ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ． ５７：４２２９－４２３５（１９９７））Ｐ４５０ ２Ｃ９選択性インヒビターであるスルファフェナゾール（Ｂｏｕｒｒｉｅ，Ｍ．ら、Ｊ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｅｘｐ Ｔｈｅｒ． ２７７：３２１－３３２（１９９６）；Ｎｅｗｔｏｎ，Ｄ．Ｊ．ら、Ｄｒｕｇ Ｍｅｔａｂ Ｄｉｓｐｏｓ． ２３：１５４－１５８（１９９５）、ならびにＰ４５０ ３Ａ４に触媒されるヒト肝臓ＩＦＡ活性化に指向されるＰ４５０ ３Ａ４特異的インヒビターであるケトコナゾールおよびトロレアンドマイシン（ＴＡＯ）（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ． ５３：５６２９－５６３７（１９９３）；Ｗａｌｋｅｒ，Ｄ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ． ４７：１１５７－１１６３（１９９４））。他の有用なインヒビターは、シメチジン、クロラムフェニコール、およびアミノベンゾトリアゾールのような、肝臓Ｐ４５０代謝の一般的なインヒビターを含む（Ｈａｌｐｅｒｔ，Ｊ．Ｒ．ら、Ｔｏｘｉｃｏｌ Ａｐｐｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ． １２５：１６３－１７５（１９９４）；Ｍｅｓｃｈｔｅｒ，Ｃ．Ｌ．ら、Ｆｕｎｄａｍ Ａｐｐｌ Ｔｏｘｉｃｏｌ． ２２：３６９－３８１（１９９４）。これらのＰ４５０インヒビターの多くは、臨床的に有用な薬物であり、これらはヒトに安全に投与され得、そしていくつかの場合において、癌患者におけるＣＰＡ活性化を阻害することが示されている（Ｆａｂｅｒ，Ｏ．Ｋ．ら、Ｂｒ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ． ２：２８１－２８５（１９７５）；Ｇｒａｈａｍ，Ｍ．Ａ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ． ５１：２７５－２８９（１９９１））。あるいは、メチマゾールおよびプロピルチオウラシルのような抗甲状腺薬物が、肝臓Ｐ４５０レダクターゼの発現を選択的に減少させ、それにより肝臓Ｐ４５０活性を阻害するために使用され得る（Ｒａｍ，Ｐ．Ａ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ． ２６７：３２９４－３３０１（１９９２）；Ｗａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．ら、Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ． ３５：５１９－５２５（１９８９））。これは、メチマゾール誘導性甲状腺機能低下症が、肝臓ＲＥＤ活性がコントロールの約２５％まで減少される（３００±８０（コントロール肝臓）対７６±１９ｎｍｏｌ／分／ｍｇ（メチマゾール肝臓）（ｎ＝３肝臓／群））条件下で、ラットにおいて皮下で固形腫瘍として増殖した、９Ｌ神経膠肉腫におけるＲＥＤ活性に何の影響もおよぼさなかった（１９±４（コントロールラット）対２３±５ｎｍｏｌ／分／ｍｇ ９Ｌミクロソームタンパク質（メチマゾール処理ラット）（ｎ＝６腫瘍／群））という知見によって支持される。

【００７８】

別の実施態様において、Ｐ４５０遺伝子またはＲＥＤ遺伝子を送達することよりむしろ、Ｐ４５０遺伝子産物および／またはＲＥＤ遺伝子産物が、ストレプトアビジン－ビオチンに基づいた方法または当業者に十分確立されている他のタンパク質送達方法を使用して、送達され得る（Ｏｈｎｏ，Ｋ．およびＭｅｒｕｅｌｏ，Ｄ．，ＤＮＡ Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ． １５：４０１－４０６（１９９６）；Ｏｈｎｏ，Ｋ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ． ５８：２２７－２３３（１９９６））。

【００７９】
癌細胞における内因性ＲＥＤ活性および／または内因性Ｐ４５０活性のホルモンまたは薬物誘導因子によるアップレギュレーションは、腫瘍細胞を、抗癌性薬物活性化Ｐ４５０遺伝子に対して過敏性にするさらなるアプローチを提供する。従って、本発明は、腫瘍性細胞を殺傷するための方法を提供し、ここでシトクロムＰ４５０またはＲＥＤのいずれかの内因性レベルは、腫瘍性細胞において増加し、そして遺伝子移入は、その産物が内在的に増加しない遺伝子を用いて実施される。
【００８０】
１つのこのような実施態様において、本発明は、腫瘍性細胞を殺傷するための方法を提供し、この方法は以下の工程を包含する：（ａ）腫瘍性細胞において内因性ＲＥＤの活性または発現レベルを増加させる薬剤を投与する工程；（ｂ）この腫瘍性細胞にベクターを感染させる工程であって、このベクターがシトクロムＰ４５０遺伝子を含む、工程；（ｃ）この腫瘍性細胞を、上記のシトクロムＰ４５０遺伝子の遺伝子産物によって活性化される化学療法剤で処理する工程；および（ｄ）この腫瘍性細胞を殺傷する工程。本発明の好ましい実施態様において、このシトクロムＰ４５０遺伝子は、以下である：哺乳動物遺伝子（例えば、Ｐ４５０　１Ａ１、１Ａ２、１Ｂ１、２Ｂ１、２Ｂ２、２Ｂ４、２Ｂ５、２Ｂ６、２Ｂ１１、２Ａ６、２Ｃ６、２Ｃ８、２Ｃ９、２Ｃ１１、２Ｃ１８、２Ｃ１９、２Ｄ６、２Ｅ１、３Ａ４、３Ａ５、３Ａ７、または４Ｂ１）またはそのｃＤＮＡ配列が公知である他の種において対応するＰ４５０遺伝子ファミリーおよびサブファミリーのメンバー（Ｎｅｌｓｏｎ，Ｄ．Ｒ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ　６：１－４２（１９９６））、または任意の他のＰ４５０遺伝子（それらの対立遺伝子改変体、部位特異的変異体、およびキメラ構築物を含む）（例えば、Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ　７：２１１－２２１（１９９７）；Ｓｚｋｌａｒｚ，Ｇ．Ｄ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３４：１４３１２－１４３２２（１９９５）；Ｈｅ，Ｙ．Ａ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３６：８８３１－８８３９（１９９７））。ラットシトクロムＰ４５０遺伝子２Ｂ１およびヒトシトクロムＰ４５０遺伝子２Ｂ６、２Ｃ１８、および３Ａ４が特に好ましい。
【００８１】
別のこのような実施態様において、本発明は腫瘍性細胞を殺傷するための方法を提供し、この方法は以下の工程を含む：（ａ）腫瘍性細胞において内因性シトクロムＰ４５０の活性または発現レベルを増加させる薬剤を投与する工程；（ｂ）この腫瘍性細胞にベクターを感染させる工程であって、このベクターがＲＥＤ遺伝子を含む、工程；（ｃ）この腫瘍性細胞を、上記のシトクロムＰ４５０遺伝子の産物によって活性化される化学療法剤で処理する工程；および（ｄ）この腫瘍性細胞を殺傷する工程。
【００８２】
本発明はまた、先の方法の好ましい実施態様を提供し、ここで腫瘍性細胞において内因性ＲＥＤの活性または発現レベルを増加させる薬剤は、甲状腺ホルモンまたはフェノバルビタールであり、そして腫瘍性細胞において内因性Ｐ４５０の活性または発現レベルを増加させる薬剤は、デキサメタゾン、リファンピン、１，４－ビス－２－（３，５－ジクロロピリジルオキシベンゼン）（ＴＣＰＯＢＯＰ）、またはフェノバルビタールである。ＴＣＰＯＢＯＰは、結腸腫瘍および乳房腫瘤におけるヒトシトクロムＰ４５０の著しい誘発因子として同定されている（Ｓｍｉｔｈ，Ｇ．ら、Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　６８：５７－６３（１９９３）。
【００８３】
さらに、本発明はまた、先の方法の好ましい実施態様を提供し、ここで化学療法剤は、シクロホスファミド、イホスファミド、ダカルバジン、プロカルバジン、チオＴＥＰＡ、エトポシド（ＶＰ－１６）、４－イポメアノール、２－アミノアントラセン、またはタモキシフェンである。
【００８４】
本発明はまた、先の方法のさらなる実施態様を提供し、ここで腫瘍性細胞はまた、生還元

性薬物で処理される（すなわち、この生還元性薬物は、上記のＰ４５０活性化化学療法剤での処理に加えて投与される）。あるいは、この生還元性薬物は、独立して（すなわち、Ｐ４５０活性化化学療法剤の代わりに）使用される。好ましい実施態様において、この生還元性薬物は、ニトロイミダゾール、芳香族ニトロ化合物、キノン、脂肪族、芳香族、もしくは複素環式Ｎ－オキシド、またはＲＥＤに触媒されるかもしくはＰ４５０に触媒される生還元性活性化を受け得る生還元可能ＤＮＡアルキル化剤である。特に好ましい実施態様において、この生還元性薬物は、アドリアマイシン、ポルフィロマイシン、マイトマイシンＣ、チラパザミン（ＴＰＺまたはＳＲ４２３３）、インドロキノンＥ０９、アジリジニルニトロイミダゾールＲＳＵ１０６９もしくはＲＢ６１４５、ジニトロフェニルアジリジン（ＣＢ１９５４）、ジアジクオン（ｄｉａｚｉｑｕｏｎｅ）（ＡＺＱ）、インターカレーターアミンＮ－オキシドＡＱ４Ｎ、ならびに生還元可能ＤＮＡアルキル化剤ＮＳＣ６４６３９４およびＮＳＣ６５８９２６である。いくつかの生還元性薬物が、腫瘍性低酸素の条件下で、増強されたシトクロムＰ４５０および／またはＲＥＤに触媒される活性化を受けるので、本発明における生還元性薬物の好ましい使用は、低酸素性応答エレメントを用いる低酸素性腫瘍領域へのＰ４５０およびＲＥＤ遺伝子の標的化を含む（Ｄａｃｈｓ，Ｇ．Ｕ．ら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄ．　３：５１５－５２０（１９９７）；Ｏ’Ｒｏｕｒｋｅ，Ｊ．Ｆ．ら、Ｏｎｃｏｌ．Ｒｅｓ．　９：３２７－３３２（１９９７））。

【００８５】

本発明による処置のための例示的な候補は、新生物、および特に、固形悪性腫瘍に罹患するヒト、他の哺乳動物、または非哺乳動物を含むがこれらに限定されない。

【００８６】

本発明はまた、本発明の別の実施態様を提供し、この実施態様により、内因性ＲＥＤおよび／またはシトクロムＰ４５０のレベルは、例えば、ＣＰＡおよびＩＦＡのようなＰ４５０活性化化学療法剤、または例えば、アドリアマイシン、マイトマイシンＣ、またはチラパザミン（ＴＰＺ）のような、ＲＥＤおよび／またはＰ４５０により活性化され得る生還元性薬物に対する反応性を予測するために、所定の腫瘍から調製される生検においてアッセイされる。

【００８７】

「内因性シトクロムＰ４５０の発現レベルをアッセイする」によって、当業者に十分確立された分析方法（Ｐ４５０形態選択性抗体を用いる免疫組織化学およびウエスタンブロット分析、Ｐ４５０形態選択性基質を用いる酵素分析、ならびにＰ４５０遺伝子特異的ＤＮＡまたはＲＮＡプローブを用いるインサイチュハイブリダイゼーションを含む（Ｗａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　２０６：２４９－２６７（１９９１））））を用いて、腫瘍サンプルにおける個々のシトクロムＰ４５０のレベルまたは個々のシトクロムＰ４５０をコードするｍＲＮＡのレベルを定性的または定量的に測定または評価することが意図される。例えば、ウエスタンブロット分析によって決定される場合、１～２０ｐｍｏｌ／ｍｇミクロソームタンパク質の範囲の内因性シトクロムＰ４５０レベルは、ＣＰＡまたはイホスファミドのような薬物に対する応答性を示す（例えば、以下の実施例２の表２を参照のこと）。

【００８８】

哺乳動物中の特定の組織における腫瘍は、有意に改変されたレベルのＲＥＤを発現する。従って、別の実施態様において、内因性ＲＥＤのレベルは、Ｐ４５０に基づいた遺伝子治療の予後指標として（同時トランスフェクトされたＲＥＤの非存在下で）、および、ＲＥＤがＰ４５０に基づいた遺伝子治療ストラテジーに取り込まれるのに特に有用であるか否かの決定において、実施者を補助するために、所定のヒト腫瘍においてアッセイされる。すなわち、中程度のレベル（標準的な条件下でアッセイされた（実施例１を参照のこと）２０～６０ｎｍｏｌの還元されたシトクロムＣ／分／ｍｇミクロソームタンパク質）または低レベル（２０ｎｍｏｌ／分／ｍｇ未満）のＲＥＤ活性を有する腫瘍細胞は、Ｐ４５０に基づいた任意の遺伝子治療実例にＲＥＤ遺伝子を取り込むための主な候補である。高い内因性レベルのＲＥＤ活性を有する腫瘍細胞（６０ｎｍｏｌ／分／ｍｇを超える）は、Ｒ

ＥＤの同時移入を伴わずに、Ｐ４５０に基づいた有効な癌遺伝子治療の予兆であり得る。

【００８９】

「内因性ＲＥＤの発現レベルをアッセイする」によって、腫瘍サンプルにおけるＲＥＤのレベルまたはＲＥＤをコードするｍＲＮＡのレベルを定性的または定量的に測定または評価することが意図される。腫瘍サンプルにおけるＲＥＤレベルは、シトクロムＣ還元（Ｐｈｉｌｌｉｐｓ，Ａ．Ｈ．ら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．　２３７：２６５２－２６６０（１９６２））またはウエスタンブロットもしくは免疫組織化学（Ｇｒａｎｔ，Ｒ．およびＩｒｏｎｓｉｄｅ，Ｊ．Ｗ．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｏｎｃｏｌ．　２５：１－７（１９９５）；Ｆｏｓｔｅｒ，Ｊ．Ｒ．ら、Ｊ　Ｐａｔｈｏｌ．　１６９：４５７－４６３（１９９３））によってアッセイされ得る。ＲＥＤ　ｍＲＮＡは、インサイチュハイブリダイゼーションによって、またはＳｈｅｐｈａｒｄ，Ｅ．Ａ．ら、Ａｒｃｈｉｖｅｓ　ｏｆ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃｓ　２９４：１６８－１７２（１９９２）に記載されるＲＮａｓｅ保護アッセイを用いてアッセイされ得る。

【００９０】

本発明のさらなる実施態様は、活性化代謝産物の局在化生成が所望される場合、または患者において通常は高レベルでは発現しないＰ４５０遺伝子によってプロドラッグ活性化が効率的に触媒される場合、腫瘍性疾患以外の疾患の処置のためにＰ４５０／ＲＥＤに基づいたプロドラッグ活性化遺伝子治療を用いることに関する。

【００９１】

ＲＥＤ遺伝子が、薬物活性化Ｐ４５０遺伝子と組み合わせて腫瘍細胞に移入される場合に生じる、細胞傷害性薬物代謝産物の増強された産生の結果として、本発明の方法は、所定の薬物濃度で、局在化されたより大きな腫瘍毒性を可能にし、このことは増強された化学療法応答を導く。より低用量の薬物が与えられ、それにより、細胞傷害性代謝産物に対する正常細胞の曝露を減少させることによって、患者に対する毒性効果を減少させることも可能であり得る。

【００９２】

本発明を一般的に記載してきたが、本発明は、以下の実施例（これは、例示の目的によって提供され、そして本発明を限定することは意図されない）を参照することによって、より容易に理解される。

【００９３】

（実施例１）

（シトクロムＰ４５０遺伝子治療のＰ４５０レダクターゼ（ＲＥＤ）増強）

本実施例は、Ｐ４５０に基づいた薬物活性化癌遺伝子治療とＲＥＤ遺伝子移入を組み合わせる有用性を実証する。Ｐ４５０　２Ｂ１の存在下または非存在下で、基底レベルまたは上昇したレベル（１０倍増加まで）のいずれかのラットＲＥＤを安定に発現するラット９Ｌ神経膠肉腫細胞は、抗癌性薬物シクロホスファミド（ＣＰＡ）の細胞傷害性効果に対する実質的に増加した感受性を有することが示された。増強された細胞傷害性応答もまた、Ｐ４５０　２Ｂ１をコードする組換えアデノウイルスを使用して、Ｐ４５０遺伝子をＲＥＤ過剰発現腫瘍細胞に送達した場合に得られた。ＣＰＡ細胞傷害性は、ＲＥＤインヒビターであるジフェニレンヨードニウムクロライドまたはＰ４５０インヒビターであるメチラポンによって実質的に減少され、このことは、Ｐ４５０代謝経路の両方のタンパク質成分の触媒寄与に対するその依存性を明らかにした。ＣＰＡで処理したＰ４５０　２Ｂ１発現腫瘍細胞およびＲＥＤ過剰発現腫瘍細胞からの馴化培地は、Ｐ４５０　２Ｂ１および基底レベルのＲＥＤを含む腫瘍細胞と比較して、一次４－ヒドロキシ代謝産物のより増加した形成およびより大きな細胞接触非依存性バイスタンダー細胞傷害性潜在性を示した。皮下固形腫瘍モデル／腫瘍切除アッセイを用いる、Ｐ４５０＋ＲＥＤ組み合わせ遺伝子治療の影響の評価は、インビボでの腫瘍細胞殺傷において、肝臓薬物活性化単独によって提供される腫瘍細胞殺傷を超える、劇的な５０～１００倍の増加を明らかにした。これらの知見は、Ｐ４５０に基づいた遺伝子治療に対する腫瘍細胞の感受性決定因子としての内因性ＲＥＤレベルの重要性を証明し、そしてＰ４５０遺伝子とＲＥＤをコードする遺伝子との組

み合わせに基づいた抗癌プロドラッグ活性化ストラテジーの著しい治療有効性を実証する。

【００９４】

（材料および方法）

化学物質：ＣＰＡ、イホスファミド、および３－アミノピリジンアデニンジヌクレオチド（ＡＡＤＰ）を、Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から入手した。４－ヒドロペルオキシ－ＣＰＡを、Ｎｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ）から入手した。メチラポンおよびジフェニレンヨードニウムクロライド（ＤＰＩ）を、Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．（Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ）から購入した。

【００９５】

細胞株：ラット９Ｌ神経膠肉腫親細胞（Ｂａｒｋｅｒ，Ｍ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　３３：９７６－９８６（１９７３））、９Ｌトランスフェクタント３およびＰ１７（これらは、Ｐ４５０遺伝子ＣＹＰ２Ｂ１を安定に発現する）、および９Ｌトランスフェクタント９Ｌ－ｌａｃＺ（これは、Ｅ．ｃｏｌｉ　βガラクトシダーゼ遺伝子を安定に発現する）（Ｃｈｅｎ，Ｌ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５５：５８１－５８９（１９９５））を、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、５０ユニット／ｍｌペニシリン、５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン、および３．７９ｇ／Ｌ　ＮａＨＣＯ$_3$を含み、ｐＨを７．２に調整したＤＭＥＭで増殖させた。細胞を、５％ＣＯ$_2$／９５％空気の湿潤雰囲気下に維持した。親９ＬおよびＣＹＰ２Ｂ１発現細胞を、ラットＲＥＤ発現プラスミド（ｐ４５０－Ｒｅｄ－ＣＭＶ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　ＭａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓのＧｒｅｇｏｒｉｏ　Ｇｉｌ博士より親切に提供された）（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．　２９１（ｐｔ２）：４２９－４３３（１９９３））およびプラスミドｐＲＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ＣＡ）を、製造業者の説明書に従ってリポフェクチン（Ｌｉｐｏｆｅｃｔｉｎ）（ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬ，Ｉｎｃ．）を用いて１０：１のモル比で同時トランスフェクトした。このプラスミドｐＲＥＰ４は、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む。ハイグロマイシンＢ（３００μｇ／ｍｌ）に耐性である細胞クローンをクローニングし、増殖させ、そして評価した。

【００９６】

インビトロ細胞傷害性アッセイ：（Ａ）コロニー形成アッセイ－ウェルあたり２００～２０，０００の範囲の細胞を、３０ｍｍ組織培養プレートに二重にプレートし、そして示された薬物濃度でＣＰＡで処理した。７日後、プレートを、クリスタルバイオレットで染色し、５０より多い細胞を有するコロニーの数を計数した。生存割合を、未処理のコントロールと比較した各処理群におけるコロニーの数として表す。（Ｂ）増殖阻害アッセイ－９６ウェルプレートに播種した細胞（１０００／ウェル）を、示された濃度のＣＰＡで、４～５日間処理した。対応するコントロールは、薬物処理を受けなかった。細胞生存を、ＸＴＴ比色アッセイ（生存可能な細胞のミトコンドリアデヒドロゲナーゼ活性を測定する細胞増殖アッセイ）（Ｓｃｕｄｉｅｒｏ，Ｄ．Ａ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　４８：４８２７－４８３３（１９８８））によって決定する。

【００９７】

化学療法薬物処理した腫瘍細胞からの、培養培地における活性化ＣＰＡおよびイホスファミド代謝産物のアッセイ：細胞を、１．５×１０^{6}細胞／３０ｍｍ皿でプレートし、次いで５ｍＭセミカルバジド（培養培地中で調製したストック溶液（ｐＨ７．４））（セミカルバジドは、最初の４－ヒドロキシ代謝産物を捕捉しそして安定化する）の存在下で、２ｍＭ　ＣＰＡまたは２ｍＭイホスファミドとともに２４時間インキュベートした。コントロール実験において、この濃度のセミカルバジドは、４８時間まで細胞とともにインキュベートした場合、細胞生存率に対して検出可能な効果を有さなかった。各細胞株からの薬物馴化培地を２４時間で採取し、そして０．３ｍｌの培地を使用して、蛍光測定アッセイ（Ｃｈａｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　５３：５６２９－５６３７（１

９９３））によって、４－ヒドロキシ－ＣＰＡまたは４－ヒドロキシ－イホスファミドをアッセイした。

【００９８】

バイスタンダー殺傷効果を評価する限界希釈アッセイ：９Ｌ細胞を、６ウェルプレートに、１．５×１０^{6}細胞／ウェルで１２時間播種し、そして２ｍＭ　ＣＰＡで４８時間処理した。各ウェルからの馴化培地を回収し、各実験に示されるように新鮮な培地で５～５０％希釈し、そして親９Ｌ細胞（１０^{4}細胞／ウェル）で予め播種した第２セットの６ウェルプレートのウェルに添加した。培養物を５～７日間維持し、そしてコロニーを、クローン原性アッセイについて記載したように記録した。

【００９９】

インビボ細胞傷害性アッセイ：腫瘍細胞を、雌性Ｆｉｓｃｈｅｒ３４４ラット（１２０～１５０ｇ）において固形腫瘍として皮下に増殖させた。各ラットに、２×１０^{6}細胞／部位で、右大腿で１つの腫瘍細胞株および左大腿で第２の腫瘍細胞株を皮下注射によって接種する。ラットをランダム化し、そして３つの群に分割した。１つの群には、コントロールとして生理食塩水を注射した。他の２つの群は、腫瘍移植後２週間の単一の腹腔内注射として与えた、５０ｍｇ／ｋｇまたは１００ｍｇ／ｋｇ体重のＣＰＡで処置した。ＣＰＡ注射後２４時間で、このラットを屠殺し、そして７５％エタノールで軽く浸漬した。この腫瘍を切り出し、ＤＭＥＭに懸濁し、そして滅菌条件下で刻んだ。次いで、この腫瘍組織を、３７℃にて１５分間、０．２ｍｇ／ｍｌのＤＮａｓｅ（Ｓｉｇｍａ）を含む５００ユニット／ｍｌのコラゲナーゼ（Ｓｉｇｍａ）の溶液中で振盪しながらインキュベートした。このサンプルを、Ｃｅｌｌ　Ｓｔｒａｉｎｅｒ（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を通してろ過し、ＤＭＥＭで２回洗浄し、次いで１０％ウシ胎児血清を補充したＤＭＥＭに懸濁した。単一の細胞懸濁物を計数し、そして６ウェルプレートに２００、２×１０^{3}、および２×１０^{4}細胞／ウェルの密度で二連でプレートして、コロニー形成アッセイによって細胞生存率を決定した。細胞培養物を、一晩のインキュベーション後に、新鮮な培地と交換した。細胞を７日間増殖させ、次いでコロニー（５０を超える細胞）をクリスタルバイオレットで染色し、そして計数した。結果を、未処置のコントロールと比較して、薬物処置した群からの細胞の生存割合±ＳＥＭとして表す。未処置の腫瘍細胞懸濁物は、個々の実験において、３．０～１２．２％の範囲のプレーティング効率（コロニー形成活性）を有した。

【０１００】

アデノウイルス媒介性ＣＹＰ２Ｂ１遺伝子形質導入：ＣＹＰ２Ｂ１遺伝子を保有する組換えアデノウイルスＡｄ．ＣＭＶ－２３１を、Ｃｈｅｎ，Ｌ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．　５６：１３３１－１３４０（１９９６）に記載のように構築した。組換えアデノウイルスの大規模な産生を、２９３細胞における増殖、続いて二重セシウム勾配超遠心分離による精製によって行った（Ｇｒａｈａｍ，Ｆ．Ｌ．およびＰｒｅｖｅｃ，Ｌ．，「Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ　Ｖｅｃｔｏｒｓ」Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，第７巻、Ｅ．Ｊ．Ｍｕｒｒａｙ（編）、Ｔｈｅ　Ｈｕｍａｎ　Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．　Ｃｌｉｆｔｏｎ，ＮＪ，１０９－１２７頁（１９９１））。精製したアデノウイルスの力価を、分光光度計において２６０ｎｍで、およびプラークアッセイによって決定した。Ａｄ．ＣＭＶ－２Ｂ１を、３０ｍｍの直径の細胞培養プレートに図の説明文に示される感染多重度（ＭＯＩ）でプレートした細胞に添加した。ウイルス感染後２４時間で、感染した細胞をトリプシン処理し、そして９６ウェル組織培養プレートに５００細胞／ウェルで再プレートし、そしてＣＰＡで処理した。ＣＰＡ処理の４～７日後、生存する細胞の数を、上記のＸＴＴアッセイを用いて決定した。

【０１０１】

ウエスタンブロットおよびＲＥＤ酵素分析：差示的遠心分離によって培養細胞から調製したミクロソームタンパク質または細胞溶解物を、１０％ドデシル硫酸ナトリウム／ポリアクリルアミドゲル（２０μｇタンパク質／レーン）によって電気泳動し、ニトロセルロー

スに移し、次いでポリクローナルウサギ抗ＣＹＰ２Ｂ１抗体またはウサギ抗ラットＰ４５０レダクターゼ抗体（Ｗａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．およびＷａｌｓｈ，Ｃ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５７：１０４４６－１０４５７（１９８２）；Ｒａｍ，Ｐ．Ａ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：３２９４－３３０１（１９９２））でプローブした（Ｗａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２０６：２４９－２６７（１９９１））。フェノバルビタール誘導性ラット肝臓ミクロソーム（１μｇ）を、ＣＹＰ２Ｂ１のポジティブコントロールとして使用した。ＲＥＤ活性を、細胞ホモジネートにおいて、シトクロムＣのＮＡＤＰＨ依存性還元により、５５０ｎｍ（Ｅ＝２１ｍＭ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$）で、０．３Ｍ ＫＰｉ緩衝液（ｐＨ７．７）において、３０℃にてアッセイした（Ｗａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．およびＷａｌｓｈ，Ｃ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ，Ｃｈｅｍ．２５７：１０４４６－１０４５７（１９８２））。

【０１０２】

（結果）

ＲＥＤを過剰発現する腫瘍細胞株の樹立：親ラット９Ｌ神経膠肉腫細胞およびＣＹＰ２Ｂ１を発現する９Ｌ細胞を、ラットＲＥＤをコードする発現プラスミドおよびハイグロマイシン耐性遺伝子を含有するプラスミドで同時トランスフェクトした。ハイグロマイシンＢに対して耐性である細胞株を選択し、そしてクローン化した。ＲＥＤに対して特異的であるウサギのポリクローナル抗体を使用する細胞溶解物のウェスタンブロット分析は、クローン細胞株から調製したサンプルにおいて、精製されたＲＥＤの分子量に対応する約８０ｋＤの単一のタンパク質バンドの過剰発現を示した（図１Ａ）。細胞株９Ｌ－Ｒ（図１Ｂ）を、ＣＹＰ２Ｂ１$^{-}$親９Ｌ細胞から誘導した。株ＰＲ１１をＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞株Ｐ３から誘導し、そして株ＰＲ７を、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞株Ｐ１７から誘導し、これは、７～１０ｐｍｏｌのＣＹＰ２Ｂ１／ｍｇミクロソームタンパク質（Ｐ３およびＰＲ１１）および１５～２０ｐｍｏｌのＣＹＰ２Ｂ１／ｍｇ（Ｐ１７およびＰＲ７）のＣＹＰ２Ｂ１タンパク質含量を示した（図１Ａおよびデータは示さない）。ＲＥＤ酵素活性の分析によって、ＲＥＤ活性が、対応する親細胞株のコントロール中よりもＲＥＤ－トランスフェクタントにおいて４～１０倍高いことを示した（図１Ｂ）。ＲＥＤの過剰発現は、これらの細胞の増殖速度を有意には変化させなかった（データは示さない）。クローン細胞株９Ｌ、９Ｌ－Ｒ、Ｐ３、ＰＲ１１、Ｐ１７、およびＰＲ７を、さらなる研究のために使用した。

【０１０３】

ＣＹＰ２Ｂ１－陽性およびＣＹＰ２Ｂ１－陰性腫瘍細胞のＣＰＡ感受性に対するＲＥＤの過剰発現の影響：本発明者らは、ＲＥＤの過剰発現が、ＣＰＡに対して腫瘍細胞を感作するかどうかを試験した。ＣＹＰ２Ｂ１$^{-}$およびＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞株から誘導した複数のＲＥＤを過剰発現する細胞株を、それらのＣＰＡ細胞傷害性に対する感受性についてアッセイした。図２に示すように、ＲＥＤ単独の過剰発現ではＣＰＡに対して９Ｌ腫瘍細胞を感作しなかった（株９Ｌ－Ｒ）が、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞におけるＲＥＤの過剰発現は、細胞傷害性応答を有意に増強させた（株Ｐ３、Ｐ１７と比較して株ＰＲ１１、ＰＲ７）。この増強された細胞傷害性は、コロニー形成アッセイ（図２Ａ）および増殖阻害アッセイ（図２Ｂ）の両方において明らかであった。ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞（９Ｌ／２Ｂ１／ＲＥＤ）におけるＲＥＤの過剰発現もまた、Ｐ４５０によって触媒される薬物活性をもまた受けるＣＰＡのアイソマーであるイホスファミドに対する細胞の化学的感受性を増強した（図２Ｃ）。細胞株のそれぞれは、化学的に活性化された薬物が４－ヒドロペルオキシ－ＣＰＡの形態で細胞に対して提示された場合に、活性化されたＣＰＡに対して同様の内因性の感受性を示した。

【０１０４】

ＲＥＤを過剰発現する腫瘍細胞におけるＣＰＡの感受性に対するＰ４５０およびＲＥＤ酵素阻害の影響：以前の研究においては、ＣＹＰ２Ｂ１選択性酵素インヒビターであるメチラポンを、ＣＹＰ２Ｂ１の過剰発現それ自体がＣＰＡおよびイホスファミドに対してＣＹＰ２Ｂ１陽性腫瘍細胞の化学的感受性を担うことを確認するために使用した（Ｃｈｅｎ，Ｌ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５５：５８１－

５８９（１９９５））。これらの知見のさらなる支持において、１０μMおよびそれ以上の濃度でのメチラポンは、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞に対するＣＰＡの細胞傷害性の影響を有意にブロックした（図３；Ｐ３およびＰ１７細胞株）。対照的に、ＲＥＤを過剰発現するＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞においては、１０μMの濃度でのメチラポンは、ＣＰＡの細胞傷害性の影響を有意に阻害したにすぎなかった。ＣＰＡの細胞傷害性の有意なブロックは、コロニー形成アッセイ（図３Ａ）および増殖阻害アッセイ（図３Ｂ）の両方において、メチラポンのはるかに高い濃度を必要とした。ＲＥＤの過剰発現が、実際に、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞の増強した化学的感受性の原因であることを確認するために、本発明者らは、２つのＲＥＤインヒビター：ＡＡＤＰ（ＲＥＤの競合インヒビター（Ｌｅｍａｉｒｅ，Ｐ．およびＬｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ，Ｄ．Ｒ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｙ　９：８７－９５（１９９４））およびＲＥＤ活性の機構に基づくインヒビターであるＤＰＩ（Ｔｅｗ，Ｄ．Ｇ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３２：１０２０９－１０２１５（１９９３）；ＭｃＧｕｉｒｅ，Ｊ．Ｊ．ら、Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐｅｒ．Ｔｈｅｒａｐ．２７１：７０８－７１４（１９９４））の影響を試験した。ＣＰＡの非存在下で行ったコントロール実験においては、ＡＡＤＰは０．５ｍMでは細胞に対して毒性を示さなかったが、一方、ＤＰＩは５μMでは約２０％の増殖阻害を示した。ＡＡＤＰおよびＤＰＩは、ＣＰＡの毒性からＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$およびＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞を部分的にレスキューし、この防御の影響の程度は、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞の場合においてより顕著であった（図４）。全体的には、細胞の生存比は、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞においては、２～３倍（ＡＡＤＰ）および３～５倍（ＤＰＩ）増大した。従って、ＣＰＡに対するＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞の増強された化学的感受性は、ＲＥＤ酵素活性の過剰発現に依存する。

【０１０５】

ＲＥＤを過剰発現する腫瘍細胞のバイスタンダー（ｂｙｓｔａｎｄｅｒ）殺傷能力：ＣＰＡで処理したＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞は、直接的な細胞－細胞接触を必要とはしない、同時培養されたＣＹＰ２Ｂ１$^{-}$細胞のバイスタンダー殺傷を媒介する（Ｃｈｅｎ，Ｌ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５５：５８１－５８９（１９９５））。この観察に基づいて、限界希釈アッセイを、ＣＰＡとともにインキュベートした９Ｌ腫瘍細胞株のそれぞれから得られた馴化培地の細胞傷害性の効力を評価するために行った。ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞株ＰＲ１１およびＰＲ７に由来する馴化培地は、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞Ｐ３およびＰ１７から調製した馴化培地よりも実質的により細胞傷害性であった（図５）。ＲＥＤを過剰発現する細胞による細胞傷害性代謝物のこの増大した形成は、ＣＹＰ２Ｂ１を発現しない同時培養された９Ｌ細胞に対するこれらの細胞のより大きなバイスタンダー細胞傷害性を生じた。図６に示すように、ＣＰＡ処理は、ＣＹＰ２Ｂ１$^{-}$９Ｌ細胞に対するＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$９Ｌ細胞の不完全ではあるが実質的なバイスタンダー細胞傷害性を生じ、これは、ｌａｃＺ遺伝子を用いるこの実験において顕著であり、そしてＸ－ｇａｌ染色によって可視化された（図６Ｂ対図６Ａ）。しかし、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞との同時培養によって、９Ｌ／ｌａｃＺ細胞のほぼ完全な殺傷を生じた（図６Ｄ対図６Ｃ）。ＣＰＡ処理は、示す実験において、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞およびＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞の両方を本質的に排除した（未染色の細胞、図６Ｂおよび６Ｄ）。

【０１０６】

Ｐ４５０代謝活性の増強はＲＥＤの過剰発現のレベルに依存する：ＲＥＤの過剰発現の程度と腫瘍性細胞のＰ４５０の代謝活性との間に直接的な関係が存在するかどうかを決定するために、一連の独立したクローン９Ｌ／２Ｂ１／ＲＥＤ安定同時トランスフェクタントを選択し、次いで特徴付けた。ＲＥＤ酵素活性およびＰ４５０　２Ｂ１代謝活性を、単離したミクロソーム画分において測定した。表１は、Ｒ１～Ｒ１１と命名した一連の６個の別々の９Ｌ／２Ｂ１／ＲＥＤトランスフェクタントにおいて、ＲＥＤ酵素活性が、親９Ｌ／２Ｂ１細胞において測定したＲＥＤ活性よりも１．２から５．４倍高い範囲であったことを示す。これらの細胞株において測定したＰ４５０代謝活性は、各細胞株のＲＥＤレベルに対してほぼ比例する順位および様式で、増大した（表１、最後の列）。従って、ＲＥ

Ｄ遺伝子移入後の薬物の細胞傷害性に対する９Ｌ／２Ｂ１細胞株の増強された感受性は、ＲＥＤの発現における増大の程度に直接依存する、増大したＰ４５０代謝活性と関連する。さらに、親９Ｌおよび９Ｌ／２Ｂ１細胞が、細胞のＣＹＰ２Ｂ１タンパク質含量（Ｐ３およびＰＲ１１細胞について７～１０ｐｍｏｌの２Ｂ１／ｍｇ；Ｐ１７およびＰＲ７細胞について１５～２０ｐｍｏｌの２Ｂ１／ｍｇ、図１）よりも大きいかまたはそれと等モルである、ＲＥＤの発現のレベル（１８±３ｐｍｏｌのＲＥＤ／ｍｇ）をすでに示したという事実にもかかわらず、この影響が観察された（表１）。

【０１０７】

【表１】

Ｐ４５０レダクターゼを過剰発現する９Ｌ細胞株

（ＰＲ１～ＰＲ１１と命名した細胞株）

9L 細胞株	P450 レダクターゼ活性[a]	倍-増大	P450 活性[b]	相対的な P450 活性[c]
9L	57 ± 10[e]	= 1.0	<5	
9L/2B1	59 ± 9	1.0	29	= 1.0
9L/2B1/PR5[d]	70 ± 6	1.2	42	1.4
9L/2B1/PR4	83 ± 5	1.5	37	1.3
9L/2B1/PR1	130 ± 5	2.3	49	1.7
9L/2B1/PR6	248 ± 12	4.4	81	2.8
9L/2B1/PR11	295 ± 10	5.2	73	2.5
9L/2B1/PR7	309 ± 10	5.4	92	3.2

ａ－３０℃でアッセイしたｎｍｏｌシトクロムｃ還元／分／ｍｇミクロソームタンパク質。

ｂ－ｐｍｏｌ／分／ｍｇミクロソームタンパク質；基質として７－エトキシクマリンを使用して測定したＰ４５０活性。

ｃ－Ｐ４５０活性における倍増大は、各細胞株のＰ４５０レダクターゼ含量に匹敵する。

ｄ－「Ｒ」は、Ｐ４５０レダクターゼを過剰発現する細胞株を示す。

ｅ－活性は、１８±３ｐｍｏｌのＰ４５０レダクターゼタンパク質／ｍｇミクロソームに対応し、同じアッセイ条件下での４０μｍｏｌのシトクロムＣの還元／分／ｍｇ精製レダクターゼ（M_r＝７８，０００）の測定されたＰ４５０レダクターゼ比活性に基づく。

【０１０８】

ＲＥＤを過剰発現する腫瘍細胞による４－ヒドロキシ－ＣＰＡに対するＣＰＡの代謝：ＣＹＰ２Ｂ１-ＲＥＤ$^{+++}$細胞の増大したＣＰＡ感受性が、その活性化された代謝物へのＣＰＡの転換における増大と関連するかどうかを確認するために、培養培地を、５ｍＭのセミカルバジドの存在下でＣＰＡとともにインキュベーションして２４時間後に腫瘍細胞株から回収した。これによって、一次代謝物４－ヒドロキシ－ＣＰＡを安定化させる。３－アミノフェノールでの誘導体化後に得られた蛍光産物の分析によって、対応する親ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$コントロールと比較して、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞株によって形成された３倍高いレベルの４－ヒドロキシ－ＣＰＡを明らかにした（図７）。９Ｌ親細胞の場合において見られる明らかな４－ヒドロキシル化代謝物の低いレベルが、蛍光アッセイにおける検出の限界に対応する。

【０１０９】

ＲＥＤの過剰発現を伴うかまたは伴わない腫瘍細胞へのＣＹＰ２Ｂ１遺伝子のアデノウイルス媒介性移入：上記の研究を、単離したクローン細胞株において行った。ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$腫瘍細胞の増強された化学的感受性に対するＲＥＤの過剰発現の関係をさらに確立する

ために、ＣＹＰ２Ｂ１遺伝子を保有する複製欠損組換えアデノウイルス（Ａｄ．ＣＭＶ－２Ｂ１）を、５０から８００までの範囲の感染多重度で親９Ｌおよび９Ｌ－Ｒを感染させるために使用した。図８に示すように、Ａｄ．ＣＭＶ－２Ｂ１で感染させた細胞はＣＰＡ感受性を獲得し、ＲＥＤを過剰発現する腫瘍細胞の場合において最も著しい影響を有した（図８Ｂ）。コントロール実験においては、９Ｌ細胞のＬａｃＺ遺伝子（細菌のβ－ガラクトシダーゼをコードする）を有するアデノウイルスでの感染は、ＣＰＡに対して細胞を感作しなかった。

【０１１０】

インビボでＣＰＡで処理したＲＥＤを過剰発現する９Ｌ／２Ｂ１腫瘍の化学的感受性：ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$腫瘍細胞におけるＲＥＤの過剰発現が、インビボで治療的な利点に変換されるかどうかを決定するために、腫瘍切除アッセイを、ＣＰＡ処理後の２４時間の期間にわたってインビボで誘導される薬物の毒性を定量するために使用した。ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$およびＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{-/-}$９Ｌ腫瘍および親ＣＹＰ２Ｂ１$^{-}$９Ｌ腫瘍を、雌性のＦｉｓｃｈｅｒ３４４ラットの皮下で増殖させ、次いで、ＣＰＡで処置した。ＣＰＡ処置の２４時間後、腫瘍を動物から切除し、単一の細胞懸濁物を生じるように分散させ、次いで培養ディッシュにプレートした。次いで、コロニーを形成する生存している腫瘍細胞の数を決定した。図９に示すように、ＣＰＡは１００ｍｇ／ｋｇ体重の用量では、野生型９Ｌ腫瘍と比較してＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$腫瘍の１０倍大きい殺傷を誘導した。このインビボでの研究においては容易に明らかであるが、細胞培養物においては検出不可能である（図２、３、および８を参照のこと）、親９Ｌ腫瘍に対するＣＰＡの細胞傷害性は、肝臓で生じる薬物の活性化の反映である。しかし、最も顕著には、さらに約１０倍の腫瘍細胞の殺傷が、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+/+}$腫瘍において達成された。従って、ＲＥＤ遺伝子移入との腫瘍内ＣＹＰ２Ｂ１遺伝子の発現の組み合わせによって、肝性のＰ４５０によって触媒される薬物の活性化単独によって提供されるものを上回る、インビボでの腫瘍細胞の殺傷における５０から１００倍の劇的な全体的増大を生じた。

【０１１１】

ヒト腫瘍細胞におけるＲＥＤ酵素レベル：上記に記載する実験によって、ＲＥＤの過剰発現がインビトロおよびインビボの両方で９Ｌ神経膠肉腫細胞におけるＰ４５０依存性の薬物活性化の実質的な増強を導くこと、ならびにこの増強が、げっ歯類Ｐ４５０およびヒトＰ４５０の両方の場合において達成され得ることが確立される。さらに、表１に示すデータは、増強されたＰ４５０代謝活性が、少なくとも約３００ｎｍｏｌのシトクロムＣ還元／分／ｍｇミクロソームタンパク質に対応するＲＥＤ活性のレベルまで、ＲＥＤ酵素の発現の程度に対して直接的な関係で得られることをさらに確立する。これらの研究において使用した９Ｌ神経膠肉腫細胞中に存在する基底の内因性のＲＥＤ活性のレベルは、約５０～６０ｎｍｏｌのシトクロムＣ還元／分／ｍｇミクロソームタンパク質である（表１を参照のこと）。

【０１１２】

この活性がヒト腫瘍細胞において見られるものに匹敵するかどうかを確認するために、ＲＥＤ酵素活性を、９個の異なるヒトのガンのクラス（乳ガン、中枢神経系のガン、結腸ガン、白血病、肺ガン、黒色腫、卵巣ガン、前立腺ガン、および腎臓ガン）に属する６０個の別々のヒト腫瘍細胞株（Ｂｏｙｄ，Ｍ．Ｒ．およびＰａｕｌｌ，Ｋ．Ｄ．，Ｄｒｕｇ Ｄｅｖｅｌｏｐ Ｒｅｓ．３４：９１－１０９（１９９５））のパネルにおいて測定した。図１０は、９個のヒト腫瘍細胞型のそれぞれを提示するこのパネル中に存在する６０個のヒト腫瘍細胞株のうちの４０個において、ＲＥＤ酵素活性が、対応する細胞のミクロソーム画分をアッセイする場合に、９Ｌ腫瘍細胞中に存在するレベルと等しいかまたはそれよりも低いことを示す。同様の一般的な結論は、Ｆｉｔｚｓｉｍｍｏｎｓ，Ｓ．Ａ．ら、Ｊ Ｎａｔｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ ８８：２５９－２６９（１９９６）によって報告されたヒト腫瘍細胞株抽出物（「Ｓ９画分」）中のＲＥＤ活性に基づいて到達され得る。

【０１１３】

従って、これらの腫瘍細胞のそれぞれについて、Ｐ４５０遺伝子移入と組み合わせたＲＥＤ遺伝子移入が、化学療法薬物の増強されたＰ４５０依存性およびＲＥＤ依存性の活性化を導くことが予測される。さらに、より高いレベルのＲＥＤ活性を発現するのヒト腫瘍細胞株においてもなお、ＲＥＤ遺伝子移入はまた、薬物代謝活性を増大することが予測される。なぜなら、これらのヒト腫瘍細胞中に存在する最も高いＲＥＤ活性（卵巣細胞株の１つの場合では、２８５ｎｍｏｌのシトクロムＣ還元／分／ｍｇ）でもなお、増大したＲＥＤの発現がＰ４５０代謝活性におけるさらなる増大を導くからである（表１）。従って、腫瘍細胞へＰ４５０とともにＲＥＤを同時移入することによって、腫瘍内薬物代謝活性およびガンの化学療法活性を増大させるための本明細書中で記載される方法は、広範な範囲のヒト腫瘍細胞型に適用可能である。

【０１１４】

（考察）

げっ歯類またはヒトのいずれかの腫瘍細胞への哺乳動物のシトクロムＰ４５０遺伝子（例えば、ＣＹＰ２Ｂ１）の移入が、これらの細胞を抗ガン性の薬物（例えば、ＣＰＡおよびＩＦＡ）の細胞傷害性効果に対して高度に感受性にさせることが、当業者に知られている（Ｃｈｅｎ，Ｌ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５５：５８１－５８９（１９９５）；Ｗｅｉ，Ｍ．Ｘ．ら、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．５：９６９－９７８（１９９４）；Ｃｈｅｎ，Ｌ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６：１３３１－１３４０（１９９６））。この実施例は、この抗ガン性薬物／Ｐ４５０遺伝子治療システムの治療効率が、第２の遺伝子（すなわち、ＲＥＤをコードする遺伝子）の取り込みによって有意に増強され得ることを示す。ＲＥＤは、ＮＡＤＰＨからシトクロムＰ４５０への電子の移動を媒介し、そして全てのミクロソームＰ４５０によって触媒される酵素反応に関与する。ＲＥＤは、多くの細胞型（広範な腫瘍細胞を含む）において広範に発現され、そして腫瘍細胞におけるこの広範な内因性のＲＥＤの発現は、Ｐ４５０に基づくガン遺伝子治療の重要な根本的な基礎を確立する。腫瘍細胞においてＲＥＤがすでに発現されるＰ４５０タンパク質のレベルと少なくとも等しいレベルで、内因的に発現されるという事実にもかかわらず、この実施例は、ＲＥＤ遺伝子移入がＰ４５０で形質移入された標的腫瘍細胞の薬物感受性を実施的に増大させ、従って、より有効な抗ガン性薬物活性化システムを提供することを示す。このさらなる感作は、ＣＹＰ２Ｂ１、ラットのＰ４５０遺伝子でのみ見られるのではなく、実施例２において以下に示すように、２つのヒトＰ４５０遺伝子である、ＣＹＰ２Ｂ６およびＣＹＰ２Ｃ１８（これらの両方が、ＣＰＡおよびＩＦＡの活性化を触媒することが知られている（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５３：５６２９－５６３７（１９９３）；Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ　７：２１１－２２１（１９９７））でもまた見られる。さらに、実施例３において以下に示すように、これは、酸素正常状態の条件下および低酸素症（これは、多くの固形の腫瘍を特徴づける）の両方の条件下でヒトＲＥＤ遺伝子を使用する場合にもまた見られる。

【０１１５】

Ｐ４５０を過剰発現する腫瘍細胞のＲＥＤ遺伝子移入によるさらなる化学的感作は、Ｐ４５０に基づくガン遺伝子治療についてのいくつかの重要な暗示を有する。第１に、所定の腫瘍標的におけるＲＥＤ活性のレベルはおそらく、同時トランスフェクトされたＲＥＤの非存在下でのＰ４５０に基づく遺伝子治療の有効性の重要な決定因子である。第２に、中程度かまたは低いレベルのＲＥＤ活性（≦６０ｎｍｏｌのシトクロムＣ還元／分／ｍｇ）（図１０を参照のこと）を有する腫瘍細胞は、任意のＰ４５０に基づく遺伝子治療ストラテジーへのＲＥＤの取り込みのための最初の標的である。いくつかの治療的な増強作用もまた、表１に示すデータによって示されるように、より高いレベルの内因性のＲＥＤの発現を有する腫瘍細胞において予測され得る。特殊化された環境（例えば、甲状腺機能低下症を導く下垂体ホルモンの消失）下では、ＲＥＤは、ＲＥＤを上回る大量のモル過剰のＰ４５０の結果として、肝細胞におけるＰ４５０によって触媒される酸化型代謝を潜在的に律速し得るが（Ｗａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．ら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．３５：５１９

－５２５（１９８９））、本研究は、低いレベルのＰ４５０タンパク質の発現のみが達成されるＰ４５０でトランスフェクトされた腫瘍細胞において（Ｃｈｅｎ，Ｌ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５５：５８１－５８９（１９９５）；Ｃｈｅｎ，Ｌ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６：１３３１－１３４０（１９９６））、そしてＰ４５０に対するＲＥＤの比がすでに等モルまたは等モル以上であってもなお、それにもかかわらずＰ４５０代謝活性の有意な増強が、ＲＥＤの上昇した発現を介して達成され得ることを実証する。従って、細胞傷害性の薬物代謝物の産生は、４－ヒドロキシル化薬物代謝物の増大した形成によって、および同時培養された親９Ｌ腫瘍細胞の増強されたバイスタンダー殺傷によって明らかにされるように、ＲＥＤを過剰発現するＰ４５０を発現する腫瘍細胞において有意に上昇された。活性化された薬物代謝物における局在化された増大に関連するこのバイスタンダー効果は、腫瘍細胞の小さなサブセットのみがＰ４５０遺伝子で形質移入される場合でさえも、より有効な腫瘍細胞の殺傷を導き得る。ＲＥＤの過剰発現は、細胞性のＮＡＤＰＨからシトクロムＰ４５０への電子の移動を大幅に容易にし得る。このことは、ｐ４５０インヒビターであるメチラポンが、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞中よりもＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞において薬物の毒性をブロックすることにおいてあまり有効ではないという本発明者らの観察によって支持される。逆に、ＲＥＤのインヒビターであるＡＡＤＰおよびＤＰＩは、細胞に対するそれらの本来備わっている毒性にもかかわらず、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞中と比較してＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞におけるＣＰＡ細胞傷害性の大きな逆反応をもたらした。このことは、昆虫細胞システムにおいて、ＲＥＤインヒビターがＰ４５０遺伝子移入によって媒介される化学療法薬物の細胞傷害性から細胞を保護し得ることの最初の実証であり、そしてこれらまたは他のＲＥＤインヒビターが抗ガン性薬物活性化Ｐ４５０遺伝子で形質移入される宿主細胞の保護における使用を見出し得ることを示唆する。

【０１１６】

本発明者らは、Ｐ４５０と等モルのレベルのＲＥＤが最大のＰ４５０モノオキシゲナーゼ活性を達成するために十分であるという十分に確立された知見にもかかわらず、昆虫細胞（Ｙａｍａｎｏ，Ｓら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．３６：８３－８８（１９８９））およびインビトロで再構成されたシステム（Ｍｉｗａ、Ｇ．Ｔ．ら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５３：１９２１－１９２９（１９７８））の両方において、内因性の腫瘍細胞のＲＥＤレベルが、ウイルスまたは非ウイルス遺伝子移入法のいずれかによって達成され得るＰ４５０タンパク質の比較的低いレベルへの迅速な電子の移動を提供するために十分以上であるという期待を導き、化学療法薬物の活性化および腫瘍細胞の化学的感受性における実質的な増大が、実際にＰ４５０とのＲＥＤの同時移入によって達成され得ることを実証した。従って、細胞性のＲＥＤ活性のレベルは、Ｐ４５０によって媒介される抗ガン性の薬物の活性化の有効性に対して重要であり、そして基底のＲＥＤ活性のレベルは、Ｐ４５０への最大の電子の移動を触媒するために、多くの腫瘍の場合においては十分ではないかもしれない。実際、ＲＥＤ活性はヒトの腫瘍細胞において広範に発現されるが、酵素の発現レベルにおける多くのバリエーションが、個々の腫瘍細胞において見出されている。内因性のＲＥＤ活性の重要性は、親およびＲＥＤを過剰発現する９Ｌ細胞における漸増量のＡｄ．ＣＭＶ－２Ｂ１で９Ｌ腫瘍細胞を感染させる本発明者らの実験によって明白に示された。ＲＥＤを過剰発現する９Ｌ細胞は、同じ量のＡｄ．ＣＭＶ－２Ｂ１で感染させた場合に、親９Ｌ細胞よりもＣＰＡに対してより敏感であった。さらに、Ａｄ．ＣＭＶ－２Ｂ１に感染した親９Ｌ細胞における薬物の細胞傷害性は、２００を超える感染多重度ではさらに増強はされなかった。対照的に、ＲＥＤを過剰発現する９Ｌ細胞における薬物の細胞傷害性は、より高いウイルス多重度でさらに増強された。従って、ＲＥＤ遺伝子移入は、より高いレベルのＰ４５０遺伝子移入を提供するより効率的なベクターを使用する場合に、抗ガン活性においてなおさらに大きな増大を導く。

【０１１７】

Ｐ４５０依存性の化学療法薬物の活性化に対する腫瘍細胞の感受性を決定することにおける因子として、ＲＥＤ活性のレベルの重要性を仮定すると、本発明者らの知見から、ＲＥ

Ｄ酵素活性およびＲＥＤ遺伝子の発現の内因的なレベルを調節する因子が、Ｐ４５０媒介性の薬物活性化の重要な調節因子であることがまた、明らかである。これらには、甲状腺ホルモン（これは、いくつかの組織におけるＰ４５０レダクターゼの完全な発現に必須である）（Ｗａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．ら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．３５：５１９－５２５（１９８９）；Ｒａｍ，Ｐ．Ａ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：３２９４－３３０１（１９９２））、ならびに種々の薬物（例えば、フェノバルビタールおよびＲＥＤ酵素レベルを増大させる他の生体異物）（Ｇｏｎｚａｌｅｚ，Ｆ．Ｊ．およびＫａｓｐｅｒ，Ｃ．Ｂ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２０：２２９２－２２９８（１９８１）；Ｗａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２４：４４０９－４４１７（１９８５））を含む。目標が最少の全身的な毒性で最大の腫瘍内化学療法薬物の活性化を達成することである、Ｐ４５０に基づくガン遺伝子治療の適用の場合においては、本発明は、化学療法薬物の肝臓の生体活性をダウンレギュレートするためのさらなるアプローチを、ＲＥＤタンパク質レベルの調節およびＲＥＤ酵素活性を介して加える。

【０１１８】

（実施例２）

（Ｐ４５０／ＲＥＤに基づく遺伝子治療のためのヒトＰ４５０遺伝子の使用）

ＣＰＡおよびＩＦＡは、フラボ酵素ＮＡＤＰＨ Ｐ４５０レダクターゼ（ＲＥＤ）による電子の投入によって、特異的なシトクロムＰ４５０（ＣＹＰ）酵素により肝臓において生体活性化される、広範に使用される抗ガン性プロドラッグである。これらの抗ガン性薬剤の治療的活性は、活性化された薬物の代謝の全身的な分布に起因して、部分的に、低い治療指数によって損なわれ得る。

【０１１９】

この実施例においては、組換えレトロウイルスを、以下の６つの異なるＣＰＡ－またはＩＦＡ－代謝ヒトＣＹＰ遺伝子を９Ｌ神経膠肉腫細胞に送達するために使用した：２Ｂ６、２Ｃ８、２Ｃ９、２Ｃ１８（Ｍｅｔ^{385}およびＴｈｒ^{385}対立遺伝子）、２Ｃ１９、および３Ａ４。単独でおよびＰ４５０レダクターゼ遺伝子移入との組み合わせ（Ｃｈｅｎ，Ｌ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５７：４８３０－４８３７（１９９７））の両方での、オキサザホスホリン（ｏｘａｚａｐｈｏｓｐｈｏｒｉｎｅ）治療に対する応答性についてのヒトＣＹＰ遺伝子移入の効果を、インビトロおよびインビボの両方の腫瘍モデルシステムにおいて評価した。

【０１２０】

以下に考察するように、腫瘍内Ｐ４５０の発現は、ＣＰＡの細胞傷害性に対する実質的な感受性を付与し、ＣＹＰ２Ｂ６でもっとも劇的な影響が見られた。強力なＣＰＡの化学的感受性もまた、非常に低いレベルのＣＹＰタンパク質の発現（２Ｂ６よりも＞２０倍低い）にもかかわらず、ＣＹＰ２Ｃ１８－Ｍｅｔの形質移入後に見られた。

【０１２１】

ＣＰＡとは対照的に、ＩＦＡの細胞傷害性は、ＣＹＰ３Ａ４、続いてＣＹＰ ２Ｂ６、そしてＣＹＰ ２Ｃ１８－Ｍｅｔで形質移入した腫瘍細胞に対して最大であった。化学的感受性における実質的なさらなる増大が、Ｐ４５０レダクターゼでの２Ｂ６または２Ｃ１８－Ｍｅｔを発現する腫瘍細胞の形質移入の際に達成された。これは、低い薬物濃度でより有効な腫瘍内薬物活性化および細胞傷害性を提供する。２Ｂ６およびＲＥＤで形質移入された腫瘍細胞を用いて、ＩＦＡではなくＣＰＡが、Ｐ４５０を発現しない９Ｌ細胞に対して強力な細胞接触非依存性のバイスタンダー細胞傷害性効果を付与した。免疫欠損ｓｃｉｄマウスの皮下で増殖させた９Ｌ／２Ｂ６／ＲＥＤおよび９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／ＲＥＤ腫瘍のＣＰＡ処置は、コントロールの９Ｌ腫瘍で見られる肝臓のＰ４５０依存性抗腫瘍効果の大きな増強を生じ、宿主の毒性における増大は明らかではなかった（Ｐ４５０を含まない場合の約５～６日に対して、ＲＥＤ腫瘍中で＞２５～５０日遅れて増殖する）。従って、ＣＹＰ２Ｂ６およびＲＥＤまたはＣＹＰ２Ｃ１８－ＭｅｔおよびＲＥＤは、Ｐ４５０／化学療法薬物の活性化に基づくガン遺伝子治療においてＣＰＡをともなう使用のため

の優れた遺伝子の組み合わせである。

【０１２２】

（材料および方法）

使用する略語：９Ｌ／ｗｔ、野生型の９Ｌ神経膠肉腫細胞；９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞、ｐＢａｂｅ－ｐｕｒｏコントロールベクターレトロウイルスを感染させた９Ｌ細胞のプール；９Ｌ／Ｐ４５０、ヒトＰ４５０遺伝子を形質導入した９Ｌ細胞；９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼおよび９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ、示されたＰ４５０　ｃＤＮＡおよびＰ４５０レダクターゼを形質導入した９Ｌ細胞。

【０１２３】

薬品：ＣＰＡおよびＩＦＡを、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）のＤｒｕｇ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　および　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｂｒａｎｃｈから得た。ＣＰＡおよびＩＦＡの化学的に活性化された誘導体である４－ヒドロキシペルオキシ－ＣＰＡおよび４－ヒドロキシペルオキシ－ＩＦＡを、Ｎｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｃｏｒｐ．（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）から得た。塩酸ピューロマイシンをＳｉｇｍａから購入し、そしてハイグロマイシンをＡｌｄｒｉｃｈから購入した。

【０１２４】

組換えレトロウイルスの構築：３つのヒトＣＹＰ　２Ｃ遺伝子（Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ，Ｊ．Ａおよびｄｅ　Ｍｏｒａｉｓ，Ｓ．Ｍ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ　４：２８５－２９９（１９９４））、ＣＹＰ２Ｃ８（クローン７ｂ）、ＣＹＰ２Ｃ１８－Ｍｅｔ^{385}対立遺伝子（クローン６ｂ；ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭ２Ｃ１８）、ＣＹＰ２Ｃ１８－Ｔｈｒ^{385}対立遺伝子（クローン２９ｃ；ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭＣＹＰＣ１８）、およびＣＹＰ２Ｃ１９（クローン１１ａ；ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭＣＹＰ２Ｃ１９）をコードするｃＤＮＡ（ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ－ＳＫ$^{+/-}$のＥｃｏＲＩ部位にそれぞれクローニングされている）は、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ　Ｈｅａｌｔｈ　ＳｃｉｅｎｃｅｓのＪ．Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ博士により提供された。ヒトＣＹＰ　ｃＤＮＡ　２Ｃ９（プラスミド２１７；Ｃｙｓ１４４改変体、ｐＵＶ１のＥｃｏＲＩ部位にクローニングされている；ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭＣＹＰ２Ｃ９Ａ）、２Ｂ６（プラスミド３２８；ｐＵＣ９のＥｃｏＲＩ部位にクローニングされている；ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭＣＹＰ２ＢＢ）、および３Ａ４（プラスミド３５９；ｐＧＥＭ７ｚｆ＋のＥｃｏＲＩ部位にクローニングされている；ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭＣＹＰＮＯＡ）を、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　のＦ．Ｇｏｎｚａｌｅｚ博士から得た。ラットＰ４５０レダクターゼｃＤＮＡ（ＧｅｎＢａｎｋ　ＲＡＴＣＹＰＲＭ）は、Ｍａｓｓ．，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ大学のＧ．Ｇｉｌ博士により提供された（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２９１（第２節）：４２９－４３３（１９９３））。ピューロマイシン（ｐＢａｂｅ－ｐｕｒｏ）または（ｐＢａｂｅ－ｈｙｇｒｏ）のいずれかの耐性を付与し、そして内臓されたＳＶ４０初期プロモーターから転写される遺伝子をコードする、ｐＢａｂｅシリーズのレトロウイルスベクター（Ｍｏｒｇｅｎｓｔｅｒｎ，Ｊ．Ｐ．およびＬａｎｄ，Ｈ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１８：３５８７－３５９６（１９９０））を、Ｄａｎａ　Ｆａｒｂｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ　ＩｎｓｔｉｔｕｔｅのＢ．Ｓｐｅｉｇｅｌｍａｎ博士から得た。Ｐ４５０　ｃＤＮＡを、レトロウイルスＬＴＲプロモーターからのＰ４５０遺伝子の転写を提供する、ｐＢａｂｅ－ｐｕｒｏのマルチクローニングサイトにクローニングした。ラットのＰ４５０レダクターゼｃＤＮＡ（完全長ｃＤＮＡを含むＥｃｏＲＩ－ＸｈｏＩフラグメント）を、ＥｃｏＲＩ－ＳａｌＩで切断したｐＢａｂｅ－ｈｙｇｒｏにサブクローニングした。最終的なレトロウイルス構築物において、各々のヒトＣＹＰ　ｃＤＮＡは、以下の長さの５’および３’非翻訳領域（ＵＴＲ）配列を保持した：２Ｃ８、７８ｂｐおよび３５９ｂｐ；２Ｃ９、１１ｂｐおよび３６９ｂｐ；２Ｃ８－Ｍｅｔ^{385}、４３ｂｐおよび３４１ｂｐ；２Ｃ１８－Ｔｈｒ^{385}、２００ｂｐおよび３３３ｂｐ；２Ｃ１９、６ｂｐおよび２６８ｂｐ；３Ａ４、３０ｂｐおよび４５７ｂｐ；ならびに２Ｂ６、７ｂｐおよび１５６３ｂｐ。

【０１２５】
レトロウイルス感染による安定９Ｌ神経膠肉腫細胞株の構築：
Ｊ．Ａｓｔｅｒ博士（Ｂｒｉｇｈａｍ ａｎｄ Ｗｏｍａｎ’ｓ Ｈｏｓｐｉｔａｌ，Ｂｏｓｔｏｎ）から入手された同種指向性パッケージング細胞株ＢＯＳＣ２３（Ｐｅａｒ，Ｗ．Ｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９０：８３９２－８３９６（１９９３））（６０mmディッシュにおいて２．５×10^6個の細胞）を、１０％熱不活化ウシ胎仔血清、５８４ｇ／ＬのＬ-グルタミン、１００単位／ｍｌペニシリン、および１００μｇ／ｍｌストレプトマイシンを含むＤＭＥＭ ３ｍｌ中で培養した。トランスフェクション前に、細胞を、２５μＭクロロキンを含む新しい培地に変えた。３時間後、２４μｇのｐＢａｂｅベースのプラスミドをそれぞれ、リン酸カルシウムを用いて細胞にトランスフェクトした。プラスミドＤＮＡを０．５ｍｌの０．２５Ｍ $CaCl_2$に懸濁し、次いで０．５ｍｌの２×Ｈｅｐｅｓ緩衝化生理食塩水溶液（８４ｍＭ Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ７．１）、５４７ｍＭ ＮａＣｌ、１９．８ｍＭ ＫＣｌ、０．７ｍＭ Na_2PO_4・$2H_2O$、および５．５４ｍＭグルコース）を、それを含むＦａｌｃｏｎチューブ中で振盪しながら滴下した。混合物を細胞に直ぐに添加し、そして５時間放置し、その後に培地を変えた。４８時間後、放出されたウイルス粒子を含む全ての上清（３ｍｌ）を取り出し、そしてこれを用いて、９Ｌラット神経膠肉腫細胞（１００mmディッシュ中での０．５×10^6個の細胞）を４μｇ／ｍｌポリブレン存在下で感染させた。３時間後、培地を、新鮮なＤＭＥＭの添加により１０ｍｌに調節させた。４８時間後に細胞をトリプシン処理し、そして４枚の１００mmディッシュに分けた。ピューロマイシン耐性またはハイグロマイシン耐性９Ｌ細胞の選択を、２μｇ／ｍｌピューロマイシンおよび／または２５０μｇ／ｍｌハイグロマイシンを用いて２～３日間行った。薬物耐性細胞を増殖させ、次いで、ＣＹＰまたはＰ４５０レダクターゼ酵素活性およびタンパク質発現について評価した（以下を参照のこと）。Ｐ４５０酵素およびＰ４５０レダクターゼの同時発現を、Ｐ４５０遺伝子をコードするレトロウイルスを細胞に感染させること、特定のＰ４５０遺伝子を発現する９Ｌ細胞（９Ｌ／Ｐ４５０細胞）のプールのピューロマイシン選択、上昇したＰ４５０レベルによる細胞のクローン選択（以下を参照のこと）、それに続くＲＥＤコードレトロウイルスによるクローン９Ｌ／Ｐ４５０細胞細胞株への感染により達成した。次いで、２日間のハイグロマイシン選択を行い、ＲＥＤを過剰発現する９Ｌ／Ｐ４５０細胞のプールを得た。

【０１２６】
９Ｌ／Ｐ４５０細胞株のクローン選択：ピューロマイシン耐性の各プールに由来する細胞であるＰ４５０発現９Ｌ細胞をトリプシン処理し、そして約１細胞／５０μｌに希釈し、次いで、１、３、および５個細胞／ウェルの計算された密度で９６ウェル組織培養プレートにプレートした。単一コロニーを含むウェルを光学顕微鏡を用いてコンフルエンシー（約１５日後）で同定し、次いで、トリプシン処理し、そして４８ウェル組織培養プレートの２つのウェルに分けた。各々のクローンの一方のウェルは処理せず、そしてコントロールとしてとっておき、一方、第２のウェルを、９Ｌ／２Ｂ６、９Ｌ／２Ｃ８、９Ｌ／２Ｃ９、９Ｌ／２Ｃ１８、および９Ｌ／２Ｃ１９細胞については２ｍＭ ＣＰＡ、または９Ｌ／３Ａ４細胞については２ｍＭ ＩＦＡのいずれかで処理した。ＣＰＡ毒性またはＩＦＡ毒性に対する感受性の増強を示したクローンは、代表的に薬物処理の２日目または３日目までに検出され、これはその他の細胞について見られたものより約２日早く；次いで、これらのクローンを増殖させ、そしてさらにＰ４５０タンパク質レベルおよび酵素活性について評価した。薬物感受性の増強を示すクローンの収率は、９Ｌ／２Ｂ６については３６個の中から２７個、９Ｌ／３Ａ４については３４個の中から２０個、およびその他の細胞については３４個の中から４～５個であった。ＣＹＰ３Ａ４の場合、単離されたクローンの各々は、元々の９Ｌ／３Ａ４プールまたは９Ｌ／ｗｔもしくは９Ｌ／ｐＢａｂｅコントロールより、より緩徐に増殖した。緩徐に増殖するクローンは、９Ｌ／２Ｃ単離物のいくつかについて時折見られたが、これらは後の研究のために選択されなかった。

【０１２７】

ウェスタンブロット分析：ミクロソームを、各々のＰ４５０発現９Ｌ細胞株のほぼコンフルエントな１００mmディッシュから調製した。細胞を、氷冷５０mM ＫＰｉ、１mM ＥＤＴＡ（ｐＨ７．４）で洗浄し、次いで２ｍｌの同じ緩衝液にこそげ落し、そして１５ｍｌ Ｃｏｒｅｘチューブ中で細胞溶解に十分な時間で（約２０秒間）超音波処理した。ホモジネートを、１２，０００ｒｐmおよび４℃で２０分間、遠心分離し、次いで、得られた上清を、４５，０００ｒｐmおよび４℃で６０分間、超遠心分離した。ミクロソームペレットを、５０mM ＫＰｉ、１mM ＥＤＴＡ、２０％グリセロール（ｐＨ７．４）中での超音波処理により再懸濁した。ミクロソームタンパク質（６０μｇ／ウェル）を、１０％ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、次いで、ニトロセルロースに転移させ、そして短いＣＯＯＨ末端合成ペプチド（Ｅｄｗａｒｄｓ，Ｒ．Ｊ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４９：３９－４７（１９９５））に対して調製され、そしてＲ．Ｅｄｗａｒｄｓ博士（Ｒｏｙａｌ Ｐｏｓｔｇｒａｄｕａｔｅ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｃｈｏｏｌ，Ｌｏｎｄｏｎ）により提供されたウサギポリクローナル抗体である抗ＣＹＰ２Ｂ６抗体、抗ＣＹＰ３Ａ４抗体、および抗ＣＹＰ２Ｃ抗体を用いてさらにプローブした。リンパ芽球により発現されたＣＹＰ２Ｂ６およびＣＹＰ３Ａ４（Ｇｅｎｔｅｓｔ Ｃｏｒｐ．，Ｗｏｂｕｒｎ，ＭＡ）、および酵母より発現されたＣＹＰ２Ｃ８、２Ｃ９、２Ｃ１８、２Ｃ１９（ＮＩＥＨＳの、Ｊ．Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ博士により提供された）（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ ７：２１１－２２１（１９９７））を、０．３～１．２ｐｍｏｌ Ｐ４５０／ウェルで電気泳動し、そして９Ｌ細胞のＰ４５０レベルを定量するための標準として使用した。

【０１２８】

ＢＲＯＤおよびＰ４５０レダクターゼアッセイ：ＢＲＯＤ活性を、０．１M ＫＰｉ（ｐＨ７．４）、０．１mM ＥＤＴＡ、および４μM ＢＲＯＤ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｊｕｎｃｔｉｏｎ Ｃｉｔｙ，ＯＲ）を含む１ｍｌ中で７０μｇのミクロソームタンパク質を用いてアッセイした。反応を、１mM ＮＡＤＰＨ（最終濃度）の添加により開始し、そして蛍光代謝産物であるレゾルフィン（ｒｅｓｏｒｕｆｉｎ）放出を、島津ＲＦ－１５０１蛍光分光光度計を用いて２０～２５℃で８分間にわたって測定した。蛍光を、５５０ｎｍ（励起）および５８６ｎｍ（発光）で読み取った。活性値をレゾルフィン標準を用いて定量した。Ｐ４５０レダクターゼ活性を、０．３M ＫＰｉ緩衝液（ｐＨ７．７）中で２０μｇのミクロソームタンパク質を用いて、シトクロムＣのＮＡＤＰＨ依存性還元を５５０ｎｍ、３０℃（Ｅ＝２１$mM^{-1}cm^{-1}$）でモニターすることによりアッセイした。

【０１２９】

ＣＹＰ２Ｃ１８発現のＲＴ－ＰＣＲ分析：コンフルエントな１００ｎｍディッシュから調製された９Ｌ／Ｐ４５０細胞または９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞からの総ＲＮＡを、ＲＱ１ ＤＮＡＳＥ（ＤＮＡＳＥフリー）（Ｐｒｏｍｅｇａ）で処理した（Ｃｈｉｒｇｗｉｎ，Ｊ．Ｍ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １８：５２９４－５２９９（１９７９））。次いで、５μｇの処理ＲＮＡを、１０ｐｍｏｌの逆転写酵素（ＲＴ）プライマーを含む１１μｌのＤＥＰＣ処理H_2O中で７０℃で１０分間加熱した。次いで、２μｌの１０×ＲＴ緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ）、２μｌの０．１M ＤＴＴ、４０単位のＲＮａｓｉｎ、および１００単位のＭＭＬＶ逆転写酵素を、最終容量２０μｌで添加した。サンプルを、４５℃で１時間インキュベートし、続いて６０℃で２分間熱不活化を行った。ＲＴ－ＰＣＲを、１μｌの逆転写反応物を用いて行った。ＲＴ－ＰＣＲのネガティブコントロールは、逆転写酵素を除いて全成分を含む偽逆転写混合物からなっていた。

【０１３０】

細胞傷害性アッセイ：Ｐ４５０発現９Ｌ腫瘍細胞の化学感受性を評価するために、他に示されなければ、細胞を、薬物処理の１８～２４時間前に、５００～２０００個細胞／４８ウェルプレートウェルで３連にプレートした。代表的に、細胞を、０～２mMのＣＰＡまたはＩＦＡを用いて４日間連続して処理した。この時間の後に残存している細胞を、クリスタルバイオレット／アルコール抽出アッセイを用いて定量した。簡単には、培養ディッ

シュを、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）で１回洗浄し、クリスタルバイオレット（５０ｍｌの３７％ホルムアルデヒドおよび４５０ｍｌのエタノールを含む５００ｍｌに溶解した１．２５ｇのクリスタルバイオレット（Ｓｉｇｍａ））で１０分間染色し、次いで、ＰＢＳで２回（１回の洗浄あたり２０分間）洗浄した。吸光度値を、５９５ｎｍフィルターを用いてＳＬＴ　スペクトルマイクロタイタープレートリーダーにおいて測定した。培養培地のみを含むウェルから決定されたバックグラウンド吸光度を各値から引いた。データを他に示さなければ、薬物を含まないコントロールと比較した細胞数（３連のサンプルについての平均値±ＳＤ値）として示す。個々の図において誤差棒は、小さすぎて見えない。

【０１３１】

バイスタンダー細胞傷害性／同時培養実験：９Ｌ　ｐＢａｂｅ細胞を、６ウェルＦａｌｃｏｎ同時培養プレート（３０ｍｍ直径ウェル）（Ｆａｌｃｏｎ３０４６）の下段チャンバーに10^5個細胞／ウェルで２連にプレートした。９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ細胞を、下段チャンバーにプレートした９Ｌ　ｐＢａｂｅ細胞数の０．１～６倍の範囲に及ぶ希釈で、２５ｍｍ細胞培養インサート（０．４μｍ孔サイズ：Ｆａｌｃｏｎ３０９０）にプレートした。細胞をプレートした２４時間後に、培養培地を両方の区画から吸引し、次いで、下段ウェルにおいて２ｍｌの新鮮ＤＭＥＭ培地で交換し、そして上段細胞培養インサートにおいて１ｍｌの２ｍＭまたは３ｍＭ　ＣＰＡまたはＩＦＡを含むで交換した（各実験において示されるように、最終薬物濃度は０．６７ｍＭまたは１ｍＭ）。相対細胞数を、クリスタルバイオレット染色により４日後に定量した。

【０１３２】

４－ヒドロキシ代謝産物についてのセミカルバジドトラッピング／蛍光アッセイ：９Ｌ／Ｐ４５０細胞を、４８ウェルプレート上に、2×10^4個の細胞／ウェルで２連に播種した。２４時間後、２ｍＭ　ＣＰＡまたは２ｍＭ　ＩＦＡを、１ｍｌのＤＥＥＭ（ｐＨ７．４）中の５ｍＭセミカルバジド（最終濃度）と共に細胞に添加して、最初の４－ヒドロキシ代謝産物をトラップし、そして安定化させた。細胞を薬物添加の２４時間後に計数し、そして培養培地を、以下の通りにＣｈｅｎ，Ｌら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５７：４８３０－４８３７（１９９７）に従って、４－ヒドロキシ－ＣＰＡまたは４－ヒドロキシ－ＩＦＡについて分析した。４００μｌの培養培地を取り出し、次いで、１６０μｌの氷冷５．５％（ｗ／ｖ）$ZnSO_4$、１６０μｌの氷冷飽和$Ba(OH)_2$、および８０μｌの氷冷０．０１Ｍ　ＨＣｌで処理した。混合物をボルテックスし、次いで、１６，０００ｇで１５分間遠心分離した。３００μｌの上清を、減光ライト（ｄｉｍ　ｌｉｇｈｔ）の下で、５４０μｌの水および１６０μｌの新たに調製された蛍光試薬（１０ｍｌの１Ｍ　ＨＣｌあたり６０ｍｇの３－アミノフェノールおよび６０ｍｇのヒドロキシルアミン－ＨＣｌ）を含む清潔なチューブに移した。チューブをボルテックスし、そして９０℃で２０分間加熱した。蛍光の読み取りを、８００μｌの各サンプルを用いて３５０ｎｍ（励起）および５１５ｎｍ（発光）で得た。蛍光値を、４－ヒドロペルオキシ－ＣＰＡを用いて作製された標準曲線に基づいて、４－ヒドロキシ代謝産物（ｎｍｏｌ）／最初の培養培地（ｍｌ）に変換し、次いで、10^6個の細胞、２４時間あたりに形成された４－ヒドロキシ代謝産物ｎｍｏｌの単位に標準化した。

【０１３３】

腫瘍増殖遅延アッセイ：体重が２６～３１ｇの６週齢雄ＩＣＲ／Ｆｏｘ　Ｃｈａｓｅ／異系交配免疫不全ｓｃｉｄマウス（Ｐａｉｎｅ－Ｍｕｒｒｉｅｔａ，Ｇ．Ｄ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４０：２０９－２１４（１９９７））（Ｔａｃｏｎｉｃ　Ｆａｒｍｓ，Ｇｅｒｍａｎｔｏｗｎ，ＮＹ）に皮下腫瘍細胞注射をして、固形腫瘍を形成させた。腫瘍細胞を、培養で約７５％コンフルエンシーまで増殖させ、トリプシン消化により採集し、ＰＢＳで洗浄し、ウシ胎仔血清を含まないＤＭＥＭ中に8×10^6個の細胞／ｍｌの濃度で再懸濁し、そして氷上で放置した。マウスの両後腿外側の両方の毛を剃り、次いで、左腿外側に4×10^6個の９Ｌ／ｐＢａｂｅ腫瘍細胞を皮下注射し、そして右腿外側に4×10^6個の９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ腫瘍細胞または

９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ腫瘍細胞のいずれかを注射した（８匹マウス／群）。腫瘍細胞注射物は、１／２インチの２７ｇ針および１ｍｌ注射器を用いて、０．５ｍｌの無血清ＤＭＥＭの容量中にあった。腫瘍増殖を、週に２回、Ｖｅｒｎｉｅｒカリパス（Ｍａｎｏｓｔａｔ　Ｃｏｒｐ．，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いてモニターして、腫瘍面積を測定した。腫瘍細胞接種後２６日目および２７日目に、各群からの４匹の動物（４匹の９Ｌ／ｐＢａｂｅ：９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼマウスおよび４匹の９Ｌ／ｐＢａｂｅ：９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼマウス）は、０．３ｍｌの０．９％ＮａＣｌに溶解した１５０ｍｇ／ｋｇ　ＣＰＡの腹腔内注射を毎日受けた。残りの動物は、生理食塩水注射を受けた。平均腫瘍面積は、ＣＰＡ注射時で８０～１４５mm^2の範囲に及んだ。マウスに、各実験において示されるように、最初のＣＰＡ注射の２４～２９日後に始まる第２経過のＣＰＡ処置（１５０ｍｇ／ｋｇの毎日２回の注射）を与えた。

【０１３４】

（結果）

９Ｌ神経膠肉腫細胞におけるヒトＰ４５０のレトロウイルス発現：パッケージング細胞株ＢＯＳＣ２３において生成され、そして以下の６つのヒトＰ４５０遺伝子：ＣＹＰ２Ｂ６、２Ｃ８、２Ｃ９、２Ｃ１８、２Ｃ１９、および３Ａ４の各々をコードするように操作された、ｐＢａｂｅに基づくレトロウイルス粒子（Ｍｏｒｇｅｎｓｔｅｒｎ，Ｊ．Ｐ．およびＬａｎｄ，Ｈ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１８：３５８７－３５９６（１９９０））を、９Ｌ細胞に感染させた。これら６つのＰ４５０は、異種ｃＤＮＡ発現系においてＣＰＡまたはＩＦＡを活性化することがそれぞれ示されている（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ７：２１１－２２１（１９９７）；Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５３：５６２９－５６３７（１９９３））。これらの研究において、オキサズホスホリン（ｏｘａｚｐｈｏｓｐｈｏｒｉｎｅ）代謝活性において差異を示す２つのＣＹＰ２Ｃ１８対立遺伝子改変体である、２Ｃ１８－Met^{385}および２Ｃ１８－Thr^{385}が含まれる。安定なトランスフェクションへのこのレトロウイルスアプローチは迅速であり、そして何千もの多くの独立したクローン（これらの各々はランダムな組込み部位でＰ４５０遺伝子を発現する）を含む細胞のプールを生じる。ぞれぞれの場合、感染した９Ｌ腫瘍細胞の６０～７０％以上はピューロマイシン耐性を獲得し、これはレトロウイルス遺伝子送達の高い効率を示す。Ｐ４５０タンパク質発現は、単離された細胞ミクロソームのウェスタンブロット分析により示されるように（図１１Ａ）、ＣＹＰ２Ｂ６細胞および２Ｃ９細胞のプールにおいて容易に検出可能であった。他の場合、本発明者らの分析方法を用いて、ピューロマイシン耐性細胞のプールにおけるＰ４５０タンパク質発現レベルは、低いか（２Ｃ８、２Ｃ１９）または検出不可能であった（ＣＹＰ３Ａ４および両方のＣＹＰ２Ｃ１８対立遺伝子）。

【０１３５】

より高いレベルのＰ４５０発現を有する個々の９Ｌ／Ｐ４５０クローンを得るために、クローン選択を行った。ＣＰＡまたはＩＦＡに対する感受性の増強を示すクローン（方法を参照のこと）を増殖し、そしてウェスタンブロッティングにより分析した。各々の場合において、ＣＰＡまたはＩＦＡに対する感受性の増大に基づいて選択された９Ｌ／Ｐ４５０クローンは、より高い比（ｓｐｅｃｉｆｉｃ）Ｐ４５０タンパク質含有量（図１１）およびより高いＰ４５０酵素活性（図１２を参照のこと）を有した。標準としてリンパ芽球発現ヒトＰ４５０または酵母発現ヒトＰ４５０を用いて、ウェスタンブロッティングにより決定された選択クローンのミクロソームＰ４５０の含有量を表２に示す。最も高いレベルの発現は、９Ｌ／２Ｂ６（２０～２５ｐｍｏｌ　Ｐ４５０／ｍｇミクロソームタンパク質）および９Ｌ／２Ｃ９（１０～１５ｐｍｏｌ／ｍｇ）細胞で観察されたが、一方、２Ｃ１８－Ｍｅｔは最も低かった（０．３ｐｍｏｌ／ｍｇ以下）。９Ｌ／２Ｃ８、９Ｌ／２Ｃ１８－Ｔｈｒ、９Ｌ／２Ｃ１９、および９Ｌ／３Ａ４細胞は、中間レベルのＰ４５０発現を示した（０．５～３ｐｍｏｌ／ｍｇ）。２Ｃ１８転写物の両方の発現は、ＲＴ－ＰＣＲにより確認された。これらのＰ４５０タンパク質発現レベルは、９Ｌ細胞における内因性ＲＥＤタンパク質レベルである１８±３ｐｍｏｌ／ｍｇに匹敵し得る（実施例１の表１およ

び図１４を参照のこと）。
【０１３６】
【表２】

表２
９Ｌ／Ｐ４５０クローナル細胞株中のＰ４５０タンパク質含量

9L/P450クローナル細胞株	クローン数	特異的P450含有量 (pmol P450/mgミクロソームタンパク質)
2B6	1	20-25
2C8	2	0.5-1
2C9	1	10-15
2C18-Met	3	≦0.3
2C18-Thr	2	0.5-1
2C19	2	1.5-3
3A4	3	1-2

個々のP450クローンと、下記の方法に記載したように、CPAに対する（または9L/3A4の場合、IFAに対する）感受性の増強に基づいて、ピューロマイシン耐性9L/P450細胞のプールから選択した。示されたクローンから調製したミクロソームを、ウエスタンブロット（図11）において、リンパ球cDNA発現系（CYP2B6,3A4；Gentest Corp.（Woburn,MA））または酵母発現系（Chang,T.K.H.ら、Pharmacogenetics. 7:211-221（1997））のいずれかを用いて、0.2から1pmolの対応するcDNA発現P450タンパク質標準に基づく標準曲線と比較して、P450タンパク質含有量についてアッセイした。データを、2つまたは3つの別々の実験からの値の範囲として示す。

腫瘍細胞により発現されたＰ４５０遺伝子のＢＲＯＤ活性：多くのヒトＰ４５０酵素により種々の速度で触媒されるＰ４５０依存性ＢＲＯＤ活性を用いて、トランスフェクトされたＰ４５０遺伝子の酵素活性をモニターした。図１２は、Ｐ４５０発現細胞株の全てが、親（野生型）、９Ｌ細胞（９Ｌ／ｗｔ）、または９Ｌ／ｐＢａｂｅコントロールよりも高いＢＲＯＤ活性を示したことを示す。さらに、単離された各々の９Ｌ／Ｐ４５０クローンは、最初の９Ｌ／Ｐ４５０レトロウイルスプールよりも高いＢＲＯＤ活性を発現した。さらなる研究のために選択された９Ｌ／Ｐ４５０クローン細胞株（図１２において矢印により印を付けた）を、それらのＰ４５０発現レベル（ウェスタンブロッティングおよびＢＲＯＤ活性）ならびにそれらのＣＰＡまたはＩＦＡ感受性に基づいて選択した。
【０１３７】
Ｐ４５０発現９Ｌ腫瘍細胞に対するＣＰＡおよびＩＦＡの細胞傷害性：
増殖阻害アッセイ：９Ｌ化学感受性に対するレトロウイルスＰ４５０形質導入の影響を評価するために、細胞を、種々の濃度のＣＰＡまたはＩＦＡの存在下で培養し、そして細胞傷害性を、４日後に記録される増殖阻害アッセイにより評価した。Ｐ４５０ネガティブコントロールとして使用した９Ｌ／ｗｔおよび９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞株は、ミリモル濃度のＣＰＡ（図１３Ａ）およびＩＦＡ（図１３Ｃ）両方に非感受性であった。対称的に、Ｐ４５０発現９Ｌ細胞の全ては、ＣＰＡによる濃度依存性増殖阻害を示した。９Ｌ／２Ｂ６細胞は、ＣＹＰ２Ｂ６のＣＰＡ活性化についての高い触媒活性（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５３：５６２９－５６３７（１９９３）；Ｒｏｙら、１９９８，投稿準備中）、およびこのレトロウイルス発現系を用いて達成された比較的高いレベルのＣＹＰ２Ｂ６タンパク質発現（表２）と一致して、ＣＰＡ細胞傷害性に最も感受性であった（１ｍＭ　ＣＰＡで９５％以上の増殖阻害）。９Ｌ／２Ｃ８を除く他の各々の腫瘍細胞株もまた、有意に獲得された薬物感受性を示した：１ｍＭ　ＣＰＡで、９Ｌ／２Ｃ９および９Ｌ／２Ｃ１８－Ｔｈｒ細胞については約６０％の増殖阻害が観察され、９Ｌ／

２Ｃ１９および９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔについては７５～８５％の阻害が得られ（図１３Ｂ）、そして９Ｌ／３Ａ４については約９０％の増殖阻害が得られた（図１３Ａ）。９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ細胞に対するＣＰＡの細胞傷害性は、これらの腫瘍細胞における非常に低レベルのＣＹＰ２Ｃ１８－ＭｅｔタンパクＣ質発現がある場合、特に優れている（表２）。この効果は、ＣＹＰ２Ｃ１８－ＭｅｔのＣＰＡに対する低いＫｍおよび高い触媒効率のためであるらしい（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ７：２１１－２２１（１９９７））。

【０１３８】

多くの９Ｌ／Ｐ４５０細胞株のＣＰＡに対する中程度から高い感受性とは対称的に、１ｍＭまでの濃度で試験した場合、９Ｌ／Ｐ４５０細胞株のうち３つのみがＩＦＡに対して有意な感受性を示さなかった。９Ｌ／３Ａ４細胞は、ＩＦＡに対して断然感受性があったが、有意なＩＦＡ増殖阻害はまた、９Ｌ／２Ｂ６細胞および９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ細胞において達成された（図１３Ｃ、１３Ｄ）。他のＰ４５０発現細胞株はこれらの条件下ではＩＦＡ耐性であった（図１３Ｄ）。

【０１３９】

Ｐ４５０レダクターゼ形質導入は、細胞傷害応答をさらに増強する：次に、本発明者らは、９Ｌ腫瘍細胞における内因性レベルのＲＥＤが、形質導入ヒトＰ４５０遺伝子により触媒されるＣＰＡおよびＩＦＡ活性化を最も効果的に支持するのに十分か否かを調べた。９Ｌ／Ｐ４５０細胞株から調製したミクロソームにおいて測定したＲＥＤ活性は、９Ｌ／ｗｔおよび９Ｌ／ｐＢａｐｅコントロールと実質的に異ならなかった（図１４）。しかし、Ｐ４５０レダクターゼ活性の約５倍増加を、９Ｌ／２Ｂ６および９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ細胞へのＰ４５０レダクターゼによるレトロウイルス形質導入後に得た（図１４）。このＰ４５０レダクターゼの過剰発現は、ＣＰＡ（図１５Ａ）およびＩＦＡ（図１５Ｂ）両方の９Ｌ／２Ｂ６および９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ細胞に対する細胞傷害性を、特に低い薬物濃度で著しく増大させた。この効果は、これらの細胞における内因性ＲＥＤレベル（１８±３ｐｍｏｌ／ｍｇ）が、発現Ｐ４５０タンパク質レベルに匹敵するか（９Ｌ／２Ｂ６）、またはそれより非常に多くても（９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ）達成された（表２を参照のこと）。コントロール実験において、Ｐ４５０非存在下でのＲＥＤ形質導入単独もまた、Ｐ４５０レダクターゼ活性を約５倍増大させたが、ＣＰＡまたはＩＦＡの細胞傷害性を付与しなかった（図１５）。従って、ＲＥＤ遺伝子導入は、所定の薬物濃度での腫瘍細胞細胞傷害性を増大させるだけでなく、薬物投薬量を低減して有意な抗腫瘍活性を達成する機会をも提供し得る。ＣＹＰ２Ｂ６およびＣＹＰ２Ｃ１８－Ｍｅｔの両方について（図１５Ｂと１５Ａとの対比）、９Ｌ増殖阻害がＣＰＡより高い濃度のＩＦＡを必要としたこともまたこれらの研究から明らかである。これは、対応する化学的に活性化された４－ヒドロペルオキシ化合物を用いる細胞傷害性アッセイにおいて決定されたように、幾分かは、活性化ＩＦＡと比較して、活性化ＣＰＡに対する９Ｌ腫瘍細胞のより大きな内在感受性の反映である（図１６）。これを考慮して、ＣＰＡと比較して、ＩＦＡに対する実質的により大きな９Ｌ／３Ａ４細胞の感受性（図１３Ｃと１３Ａとの対比）は、ＣＰＡと比較して、ＩＦＡを用いたＣＹＰ３Ａ４触媒プロドラック活性化のより早い速度を確かに反映しているに違いない（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５３：５６２９－５６３７（１９９３）；Ｒｏｙら、１９９８，投稿準備中）。

【０１４０】

形質導入腫瘍細胞においてＲＥＤにより増強されるＣＰＡおよびＩＦＡ代謝活性化：９Ｌ／２Ｂ６および９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ腫瘍細胞に対するＲＥＤにより増強されたＣＰＡおよびＩＦＡの細胞傷害性は、プロドラック活性化の増大によるものであるか否かを調べるために、各細胞株からの培養上清中のＰ４５０により生成される４－ヒドロキシ代謝産物レベルを測定した（図１７）。ＣＹＰ２Ｂ６細胞および２Ｃ１８－Ｍｅｔ細胞の両方についてのＲＥＤ形質導入は、培養培地に蓄積する細胞傷害性代謝産物の有意な増加を刺激した。対称的に、９Ｌ親細胞におけるＲＥＤ形質導入は、薬物活性化を刺激しなかった。これらの研究はまた、９Ｌ／３Ａ４細胞において、それらのＩＦＡに対する優先的な感

受性と一致して、ＩＦＡ　４－ヒドロキシル化がＣＰＡ　４－ヒドロキシル化よりも大きいことを示したが（図１３、１５）、一方、９Ｌ／２Ｃ８細胞は、９Ｌ／ｐＢａｐｅバックグラウンドより少し大きなＩＦＡ代謝産物レベルを示した（図１７）。

【０１４１】

バイスタンダー殺傷効果に対するＲＥＤの影響：ラットＰ４５０遺伝子ＣＹＰ２Ｂ１が形質導入された腫瘍細胞のＣＰＡ処理は、有意なバイスタンダー細胞傷害効果と関連し、それによりＰ４５０薬物感受性遺伝子を発現しない隣接する腫瘍細胞もまたプロドラック感受性になる（Ｃｈｅｎ，Ｌ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ．５５：５８１－５８９（１９９５）；Ｃｈｅｎ，Ｌ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６：１３３１－１３４０（１９９６））。９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ細胞自身は、ＣＰＡおよびＩＦＡによって、９Ｌ／２Ｂ６細胞より容易に殺傷されたので（図１５）、本発明者らは、バイスタンダー腫瘍細胞もまた、Ｐ４５０レダクターゼ形質導入９Ｌ／２Ｂ６細胞と共に培養された場合に、より化学感受性になるか否かを調べた。バイスタンダー細胞傷害性を、細胞培養インサートを使用して、薬物活性化９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ（または９Ｌ／２Ｂ６）腫瘍細胞をＰ４５０欠損バイスタンダー９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞から物理的に分離することにより評価した。図１８Ａは、ＣＰＡに暴露された９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ細胞が、９Ｌ／２Ｂ６より約３倍強い９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞のバイスタンダー殺傷を付与することを証明し、これは、５０％バイスタンダー細胞傷害性をもたらすために必要とされる９Ｌ／Ｐ４５０細胞対９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞比から判断される。追跡実験は、ＩＦＡが、ＣＰＡで見られた強いバイスタンダー細胞傷害性を示さないことを証明した：９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ細胞のＣＰＡ処理は、Ｐ４５０：非Ｐ４５０細胞の比が約０．５～１である場合、非Ｐ４５０腫瘍細胞に対して約４０％のバイスタンダー毒性をもたらし、そしてその細胞比が３以上に増大した場合、非Ｐ４５０細胞に対して８０％以上の毒性をもたらす（図１８Ｂ）。対照に、ＩＦＡは、非Ｐ４５０発現ｐＢａｂｅコントロールに対して控えめなバイスタンダー細胞傷害性しか発揮しなかった（３：１までの細胞比で約２５％までのバイスタンダー細胞傷害性、および６：１の細胞比で最大約５０％のバイスタンダー細胞傷害性を参照のこと）（図１８Ｂ）。９Ｌ神経膠肉腫モデルにおける活性化ＩＦＡと比較してより大きな活性化ＣＰＡの内在効力と共に（図１６）、この観察は、ＣＰＡが、ＣＹＰ２Ｂ６およびＲＥＤ遺伝子治療に関する使用のための、ＩＦＡと比較してより上位の選択対象であることを証明する。

【０１４２】

ｓｃｉｄマウスモデルにおけるヒトＰ４５０／Ｐ４５０レダクターゼに基づく遺伝子治療の評価：９Ｌ神経膠肉腫化学感受性に対するヒトＰ４５０遺伝子導入の影響を、免疫不全ｓｃｉｄマウス固形腫瘍モデル（Ｐａｉｎｅ－Ｍｕｒｒｉｅｔａ，Ｇ．Ｄ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４０：２０９－２１４（１９９７））を用いてインビボで評価した。ｓｃｉｄマウスモデルは、ヒトＰ４５０遺伝子を発現する９Ｌ腫瘍に対する免疫原応答と関連する合併症がなく、そして免疫学的成分からのバイスタンダー細胞傷害性へのいずれの寄与も排除している（Ｇａｇａｎｄｅｅｐ，Ｓ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．３：８３－８８（１９９６））。

【０１４３】

ｓｃｉｄマウスの左後腿外側に９Ｌ／ｐＢａｂｅ腫瘍を皮下接種し、そして右腿外側に９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ腫瘍を接種した。この実験計画により、Ｐ４５０発現腫瘍が肝臓でのＰ４５０代謝に及ぼし得る任意の全身影響を制御し得る。薬物処理の非存在下で、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ腫瘍は、培養細胞について観察されたように、９Ｌ／ｐＢａｂｅ腫瘍よりいくらか遅い速度で増殖した（図１９Ｂ対１９Ａ）。マウスを、腫瘍移植後２６日目および２７日目に（この時、腫瘍は全マウスにおいて十分に定着している）、１５０ｍｇ／ｋｇ体重で１日２回腹腔内注射として与えられるＣＰＡで処置した。この最初の回での薬物処置は、生理食塩水処置コントロールと比較して、９Ｌ／ｐＢａｂｅ腫瘍の増殖遅延をもたらさなかった（図１９Ａ、－ＣＰＡ対＋ＣＰＡ）。対称的に、同じマウスにおける９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ腫瘍の増殖は、ＣＰＡ処置により完全にブロックさ

れた（図１９Ｂ）。第１サイクルから約３．５週間後の第２サイクルのＣＰＡ処置の投与（ｘ軸に沿った垂直の矢印により印を付けた；図１９）は、９Ｌ／ｐＢａｂｅコントロール腫瘍に対して控えめな増殖遅延効果をもたらしたが、一方、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ腫瘍の場合に見られた強い抗腫瘍効果を、少なくとも腫瘍接種後７５日目まで延長した。

【０１４４】

ＣＹＰ２Ｃ１８－Ｍｅｔ遺伝子治療の影響を評価するために設計された実験において、９Ｌ／ｐＢａｂｅコントロール腫瘍に対するＣＰＡ処置は、控えめな増殖遅延効果（約５～６日）をもたらし、これは、肝臓Ｐ４５０触媒薬物活性化の結果であるらしい（図１９Ｃ）。対称的に、不完全であったが、有意な９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ腫瘍の増殖阻害が観察された（少なくとも２５日の増殖遅延）（図１９Ｄ）。この効果は、９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ腫瘍細胞における非常に低レベルのＰ４５０タンパク質発現の情況を考慮すると、特に際立っている（表２）。

【０１４５】

（考察）

本実施例に示された研究の主な目的は、１）ラットＣＹＰ２Ｂ１遺伝子に基づく初期前臨床ガン遺伝子治療研究を進展すること；２）Ｐ４５０およびＲＥＤに基づくプロドラック活性化／ガン遺伝子治療に適した候補物として有用なヒトＰ４５０遺伝子を同定すること；３）ヒトＰ４５０により触媒される腫瘍内薬物活性化効率の改善が、ＲＥＤ遺伝子の同時導入により達成され得る程度を評価すること；ならびに４）ＣＰＡおよびＩＦＡ両方が、腫瘍細胞内でヒトＰ４５０酵素とＲＥＤとの組み合わせにより活性化される時に、バイスタンダー細胞傷害効果を示すか否かを決定することであった。

【０１４６】

ラット神経膠肉腫細胞株９Ｌへの、６つのヒトＰ４５０遺伝子をそれぞれコードする複製欠損レトロウイルス粒子による形質導入は、この腫瘍細胞を、異なるみかけの効率ではあるが（２Ｂ６＞２Ｃ１８－Ｍｅｔ～３Ａ４＞他）、ＣＰＡ細胞傷害効果を化学感受性にすることが見出された。ＩＦＡの場合では、ＣＹＰ３Ａ４は、標的腫瘍細胞を化学感受性にすることにおいて最も効果的であり、その後にＣＹＰ２Ｂ６および２Ｃ１８－Ｍｅｔが続く。ＣＰＡおよびＩＦＡに対する化学感受性の実質的なさらなる改善は、Ｐ４５０発現腫瘍細胞へのＰ４５０レダクターゼ遺伝子による形質導入により得られた。これは、ｓｃｉｄマウスにおいてインビボで増殖した２Ｂ６およびＰ４５０レダクターゼ形質導入腫瘍のＣＰＡ処置後の著しい増殖遅延（＞５０日）を導いた。このｓｃｉｄマウスにおいて、免役拒絶と関連する合併症（Ｔａｐｓｃｏｔｔ，Ｓ．Ｊ．ら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．９１：８１８５－８１８９（１９９４））およびバイスタンダー細胞傷害性への免疫学的寄与（Ｇａｇａｎｄｅｅｐ，Ｓら、Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．３：８３－８８（１９９６））は防止されている。あまり劇的ではないが有意なＣＰＡ増殖遅延（＞２５日）は、９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ腫瘍により、それらの非常に低いＰ４５０発現レベルにかかわらず見られた。従って、ヒトＣＹＰ遺伝子２Ｂ６および２Ｃ１８－Ｍｅｔは、ＣＰＡに基づくＰ４５０遺伝子治療における使用のための有力な候補物である。

【０１４７】

本研究において調べられた６つのヒトＣＹＰ遺伝子は、形質導入クローン９Ｌ腫瘍細胞株において、かなり異なるタンパク質レベル（０．３以下～２０～２５ｐｍｏｌ Ｐ４５０タンパク質／ｍｇミクロソームタンパク質）で発現された。Ｐ４５０タンパク質レベルおよびＣＰＡ細胞傷害性は、形質導入腫瘍細胞の対応する最初のプールにおいていくらかより低かったが、Ｐ４５０タンパク質発現レベルの順位は同様であった（２Ｂ６＞２Ｃ９＞２Ｃ８～２Ｃ１９＞２Ｃ１８、３Ａ４）。これは、単離されたクローン細胞株におけるＰ４５０タンパク質レベルの大きな差が、主としてレトロウイルス組込み部位の差を反映しないことを示す。むしろ、６つ全てのＰ４５０遺伝子は、同じ長末端反復（ＬＴＲ）レトロウイルスプロモーターから転写されたので、観察されたＰ４５０タンパク質発現レベル

の差は、個々のＰ４５０タンパク質およびそれらのｍＲＮＡの安定性の差が原因であるらしい。ＣＹＰ２Ｂ６は最も高いレベルで発現され、そして相応じて、ＣＹＰ２Ｂ６は、９Ｌ腫瘍細胞株に最も大きなＣＰＡ感受性を付与した。従って、ＣＹＰ２Ｂ６は、本研究により示唆されたそのより大きく明らかなタンパク質／ｍＲＮＡ安定性の点から、ならびにその高い内在のＣＰＡ　４－ヒドロキシル化触媒活性およびＮ－デクロロエチル化（Ｎ－ｄｅｃｈｌｏｒｏｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ）によるその低速のＣＰＡ不活性化（Ｒｏｙら、１９９８、投稿準備中）についての両方で、ＣＰＡに基づくガン遺伝子治療のための選抜きの遺伝子である。しかし、ＣＹＰ２Ｃ１８－Ｍｅｔ発現細胞において非常に低い発現Ｐ４５０タンパク質レベルの情況で高い化学感受性が達成された場合、ＣＹＰ２Ｃ１８－ＭｅｔもまたＣＰＡに基づくガン遺伝子治療に有用な候補物である。より高レベルのＣＹＰ２Ｃ１８タンパク質発現は、改善したレトロウイルスベクターまたは他のベクター（現在開発されている遺伝子送達のための非ウイルスベクター（Ｋｉｍ，Ｖ．Ｎ．ら、Ｊ　Ｖｉｒｏｌ．７２：８１１－８１６（１９９８）；Ｎａｋａｎｉｓｈｉ，Ｍ．，Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｒｅｖ　Ｔｈｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ．１２：２６３－３１０（１９９５）；Ｐａｗｅｌｅｋ，Ｊ．Ｍ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５７：４５３７－４５４４（１９９７）；Ｒｏｂｂｉｎｓ，Ｐ．Ｄ．ら、Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：３５－４０（１９９８））を含む）を用いて、達成可能であり得る。

【０１４８】

広範なＰ４５０によるＣＰＡの効果的な腫瘍内活性化とは対照に、腫瘍内ＩＦＡ活性化は、調べられたヒトＰ４５０遺伝子のより限られたサブセットにより触媒された。発現Ｐ４５０　ｃＤＮＡおよびヒト肝臓ミクロソームを用いた研究（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ７：２１１－２２１（１９９７）；Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５３：５６２９－５６３７（１９９３））から予想されるように、ＣＹＰ３Ａ４は、ＩＦＡの最も強いアクチベーターであり、その後にＣＹＰ２Ｂ６およびＣＹＰ２Ｃ１８－Ｍｅｔが続いた。ＣＹＰ３Ａ４により付与されるＩＦＡに対する化学感受性（図１３Ｃ）は、ＣＹＰ２Ｂ６と比較して非常に低レベルのこのＰ４５０遺伝子の発現（表２）および活性化ＣＰＡと比較してより低い内在の９Ｌ腫瘍細胞に対する活性化ＩＦＡの細胞傷害性（図１６）がある場合、すばらしいものである。ＣＹＰ３Ａ４の場合、より低レベルの腫瘍細胞Ｐ４５０タンパク質は、上記のように、レトロウイルスプールおよび個々のクローンの両方における、ＣＹＰ３Ａ４によるレトロウイルス形質導入の際に繰り返し得られたより遅い増殖速度により示唆されるように、９Ｌ細胞に対するＣＹＰ３Ａ４遺伝子の毒性をいくぶん反映し得る。ＣＹＰ３Ａ４のこの明らかな毒性は、それだけで化学療法効果の増強を導き得る。他方、この特性が望ましくない場合、これは、誘導性プロモーター（Ｈｏｆｍａｎｎ，Ａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９３：５１８５－５１９０（１９９６）；Ｍａｓｓｉｅ，Ｂ．ら、Ｊ　Ｖｉｒｏｌ．７２：２２８９－２２９６（１９８８））の使用により回避され、それによりＩＦＡに基づく遺伝子治療の状況においてＣＹＰ３Ａの腫瘍内発現を増大させ得る。しかし、ＣＹＰ３Ａ４は、より遅い細胞増殖が他の哺乳動物ＣＹＰ３Ａ４発現系（Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ，Ａ．ら、Ａｒｃｈ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ．３３２：２９５－３０４）において記載されていないので、全ての腫瘍細胞に対して毒性を示さないようである。

【０１４９】

４－ヒドロキシ－ＣＰＡおよび４－ヒドロキシ－ＩＦＡは、別個のＤＮＡ架橋（それぞれ、架橋において５原子対７原子）を生じるが、この２つの薬物は、アポトーシス誘発において同様の機構を介して作用する。それにもかかわらず、９Ｌ神経膠肉腫細胞は、活性化ＩＦＡと比較して、活性化ＣＰＡに対して約３倍感受性があることが見出された。この差別的な細胞傷害効果はより低い薬物濃度で最も明らかであり、この濃度は臨床状況に特に関係し得る。ＩＦＡは、ＣＰＡよりあまり効率的に肝臓Ｐ４５０で活性化されないことが知られており、そしてまたＮ－デクロロエチル化経路により、より大規模に不活性化される（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５３：５６２９－５６３７（

１９９３）；Ｆｌｅｍｉｎｇ，Ｒ．Ａ．Ｐｈａｒｍａｃｏｔｈｅｒａｐｙ１７：１４６Ｓ－１５４Ｓ（１９９７）；Ｋａｉｊｓｅｒ，Ｇ．Ｐ．ら、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１３：１３１１－１３２４（１９９３））。Ｎ－デクロロエチル化副産物であるクロロアセトアルデヒドは、一般的に、肝臓Ｐ４５０代謝により生成された場合、活性な化学療法代謝産物であるとみなされないが、それにもかかわらず、Ｐ４５０に基づくガン遺伝子療法の情況においてインサイチュで標的腫瘍細胞内に生成された場合、ＩＦＡ細胞傷害性に寄与し得る。この可能性はＣＹＰ２Ｂ６発現腫瘍細胞について示唆される。この細胞は、ＣＹＰ２Ｂ６が、４－ヒドロキシル化（ＣＰＡの主要ＣＹＰ２Ｂ６触媒代謝経路）よりむしろ主にＮ－デクロロエチル化経路を介してＩＦＡを代謝して、クロロアセトアルデヒドを生じるという事実にもかかわらず、ＣＰＡおよびＩＦＡ両方の細胞傷害性に感受性になった（Ｒｏｙら、１９９８、準備中の原稿）。

【０１５０】

ＣＹＰ２Ｂ６により触媒されるＣＰＡ代謝とＩＦＡ代謝との間の重要な差はまた、ＣＰＡがすばらしいバイスタンダー細胞傷害効果を媒介し得たが、ＩＦＡは媒介し得なかった同時培養実験から明らかであった。この興味をそそる発見は、ＣＹＰ２Ｂ６が主にクロロアセトアルデヒド（これは、これらの研究における９Ｌ／２Ｂ６細胞の化学感受性に寄与するようであるが、バイスタンダー細胞傷害性にほとんどまたは全く寄与し得ない）を生成するＮ－デクロロエチル化経路を介してＩＦＡを代謝するという事実と共に、この腫瘍細胞株における４－ヒドロキシ－ＣＰＡと比較して４－ヒドロキシ－ＩＦＡのより低い内在細胞傷害性に関連し得る。バイスタンダー効果は、１００％をずいぶん下回り得る遺伝子導入効率を補償することにより、プロドラック活性化に基づくガン遺伝子治療の有効性を増強する重要な機構を提供するので（Ｐｏｐｅ，Ｉ．Ｍ．ら、Ｅｕｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ３３：１００５－１０１６（１９９７））、ＩＦＡに基づくＰ４５０遺伝子治療は、ＣＹＰ２Ｂ６を用いて効果的であると思われず、そしてＩＦＡ ４－ヒドロキシル化のより活性な触媒（例えば、ＣＹＰ３Ａ４）を必要とする（図３Ｃ）。

【０１５１】

実施例１において上記に記載された研究は、ラットＲＥＤとラットＣＹＰ２Ｂ１との同時発現が化学療法応答の増強を導くことを示した（Ｃｈｅｎ，Ｌ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５７：４８３０－４８３７（１９９７））。９Ｌ神経膠肉腫細胞における内因性ＲＥＤレベルが発現Ｐ４５０タンパク質レベルと少なくとも等モルであり、従って、最大Ｐ４５０触媒活性を提供するはずであるという事実を考慮して、この発見は予期されていなかった（Ｙａｍａｎｏ，Ｓ．ら、Ｍｏｌｅｃ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．３５：８３－８８（１９８９））。ＣＰＡおよびＩＦＡに対する腫瘍細胞感受性のかなりの増大もまた、ＣＹＰ２Ｂ６発現腫瘍細胞だけでなく、極端に低い発現Ｐ４５０タンパク質レベルを有する９Ｌ／ＣＹＰ２Ｃ１８－Ｍｅｔ細胞（表２）でもまた、ＲＥＤのレトロウイルス形質導入後の本研究において見られた。従って、ＲＥＤとシトクロムＰ４５０との同時発現は、低いＰ４５０タンパク質発現条件下、および高い発現Ｐ４５０タンパク質レベルが得られた条件下の両方で有益であることが示された。ＲＥＤ遺伝子が形質導入された９Ｌ／Ｐ４５０細胞の化学感受性の増大は、ＣＰＡおよびＩＦＡ両方の活性代謝産物蓄積の増強（図１７）ならびにバイスタンダー細胞傷害性の実質的な増大（図１８Ａ）と平行した。Ｐ４５０発現非存在下でのＲＥＤ遺伝子導入は、ＣＰＡに対してもＩＦＡに対してもいずれの化学感受性も付与せず、これは、これらの細胞傷害応答増強のシトクロムＰ４５０依存性を認めた。

【０１５２】

４つのヒトＣＹＰ２Ｃ遺伝子のうちＣＹＰ２Ｃ１８は、ＣＰＡおよびＩＦＡ ４－ヒドロキシル化の最も活性な触媒であり（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ７：２１１－２２１（１９９７））、そして本実施例に記載された研究においてＣＹＰ２Ｃ１８は、９Ｌ神経膠肉腫細胞をＣＰＡおよびＩＦＡ両方に対して化学感受性にすることに最も活性であった。研究された２つのＣＹＰ２Ｃ１８対立遺伝子のうち、ＣＹＰ２Ｃ１８－Ｍｅｔは、上記のようにその非常に低い発現レベルにかかわらず特に活

性であった。実際に、ＣＹＰ２Ｃ１８－Ｍｅｔは、Ｐ４５０タンパク質発現レベルが数倍高いＣＹＰ３Ａ４発現腫瘍細胞において見られたものに匹敵する９Ｌ細胞殺傷効果を媒介した。この観察は、ＣＰＡに基づくガン遺伝子治療のためのＣＹＰ２Ｃ１８－Ｍｅｔの有用性について、およびヒト肝臓組織におけるＣＰＡおよびＩＦＡ活性化におけるその役割に関しての両方で重要な含みを有する。ＣＹＰ３Ａ４は、代表的なヒト肝臓サンプルにおいて最も豊富なＰ４５０であったが、ＣＹＰ２Ｃ１８の量はかなり少なかった（Ｆｕｒｕｙａ，Ｈ．ら、Ｍｏｌ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４０：３７５－３８２（１９９１）；Ｓｈｉｍａｄａ，Ｔ．ら、Ｊ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ　Ｅｘｐ　Ｔｈｅｒ．２７０：４１４－４２３（１９９４））。ＣＹＰ２Ｃ１８は、酵母ｃＤＮＡ発現系においてアッセイされた場合、活性なＣＰＡおよびＩＦＡ　４－ヒドロキシラーゼであったが（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ７：２１１－２２１（１９９７））、ヒト肝臓におけるその非常に低い量のためにヒト肝臓においてＣＰＡ活性にもＩＦＡ活性にも有意に寄与しないらしい。むしろ、より豊富なＣＹＰ２Ｃ９がヒト肝臓ＣＰＡ活性化の重要な触媒である（Ｒｅｎ，Ｓ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５７：４２２９－４２３５（１９９７））。その結果として、ＲＥＤと組み合せたＣＹＰ２Ｃ１８の腫瘍内送達は、肝臓触媒プロドラック活性化をブロックし、それにより腫瘍内で起こる化学療法薬物活性化を増大させるための、ＣＰＡおよびＩＦＡのヒト肝臓アクチベーター（ＣＰＡの場合、主にＰ４５０　２Ｂ６および２Ｃ９、ならびにＩＦＡの場合、Ｐ４５０　３Ａ４および２Ｃ９）に選択的に指向される肝臓Ｐ４５０インヒビターの利用を考慮に入れるべきである。

【０１５３】

ＣＹＰ２Ｃ９は、ヒト肝臓において発現される最も豊富なＣＹＰ２Ｃ酵素であり（Ｓｈｉｍａｄａ，Ｔ．ら、Ｊ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ　Ｅｘｐ　Ｔｈｅｒ．２７０：４１４－４２３（１９９４））、そして酵母発現系においてＣＰＡを活性化し、そして３倍低い触媒効率でＩＦＡを活性化し得る（ＣＹＰ２Ｃ９－Ｃｙｓ^{144}対立遺伝子（Ｃｈａｎｇ，Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら、Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ７：２１１－２２１（１９９７））。ＣＹＰ２Ｃ９選択的インヒビターであるスルファフェナゾールは、ガン患者のサブセットにおいてＣＰＡの排除を示し（Ｆａｂｅｒ，Ｏ．Ｋ．ら、Ｂｒ　Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２：２８１－２８５（１９７５））、これは、この薬物の肝臓代謝におけるＣＹＰ２Ｃ９の役割を示す。ＣＹＰ２Ｃ９が、ＣＹＰ２Ｃ１８およびＣＹＰ２Ｃ１９より低い効率であったが（これは９Ｌ　ＣＹＰ２Ｃ９タンパク質発現が数倍高いレベルであることを考慮した場合に明らかになる）、９Ｌ腫瘍細胞をＣＰＡに対して感受性にし得るという本発明者らの発見は、これらの観察と一致する。従って、ＣＹＰ２Ｃ９は、ＣＰＡまたはＩＦＡに基づくＰ４５０遺伝子治療のための選択のＰ４５０遺伝子ではないが、一方、ＣＹＰ２Ｃ９および他のＰ４５０遺伝子（Ｎｅｌｓｏｎ，Ｄ．Ｒ．ら、Ｐｈａｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ６：１－４２（１９９６））は、他のガン化学療法プロドラック（ＬｅＢｌａｎｃ，Ｇ．Ａ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｄｒｕｇ　Ｍｅｔａｂ　Ｒｅｖ．２０：３９５－４３９（１９８９）；Ｇｏｅｐｔａｒ，Ａ．Ｒ．ら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔａｘｉｃｏｌ．２５－６５（１９９５））と組み合せた場合に有用であることが証明された。

【０１５４】

治療遺伝子の腫瘍細胞への送達のためのレトロウイルスおよび他のウイルスベクターの使用は、ベクター設計の最近の改良により可能になってきた（Ｆｅｎｇ，Ｍ．ら、Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５：８６６－７０（１９９７）；Ｈｅｉｓｅ，Ｃ．ら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．３：６３９－６４５（１９９７）；Ｒｏｂｂｉｎｓ，Ｐ．Ｄ．ら、Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：３５－４０（１９８８））。非ウイルスベクター（カチオン性リポソーム、ＤＮＡ－タンパク質複合体、非ウイルスＴ７オートジーンベクター、および他のアプローチを含む（Ｃｈｅｎ，Ｘ．ら、Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．９：７２９－７３６（１９９８）；Ｎａｋａｎｉｓｈｉ，Ｍ．，Ｃｒｉｔｉｃａｌ　Ｒｅｖ　Ｔｈｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　１２：２６３－３１０（１９９５）；Ｐａｗｅｌｅｋ，Ｊ．Ｍ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５７：４５３７－４５４４

（１９９７））もまた、近年、かなりの開発および改良を受けており、そしてまたこの事について有用なはずである。Ｐ４５０／ＲＥＤ遺伝子送達のさらなる増強は、２シストロン（ｂｉｃｉｓｔｒｏｎｉｃ）メッセージ上でのそれらの協調性発現を達成するＩＲＥＳ（内部リボソーム侵入部位配列）（Ｍｏｒｇａｎ，Ｒ．Ａ．ら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０：１２９３－１２９９（１９９２））を用いてこれらの遺伝子を連結することにより達成されるはずである。あるいは、触媒的に活性なＰ４５０－ＲＥＤ融合タンパク質をコードする融合遺伝子の構築（Ｆｉｓｈｅｒ，Ｃ．Ｗ．ら、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２７２：１５－２５（１９９６））は、Ｐ４５０活性の非常に効率的な発現を可能にするはずである。

【０１５５】

比較的低いレトロウイルス力価に関連する制限は、強いバイスタンダー細胞傷害効果を示す薬物（例えば、ＣＰＡ）の使用と共に、高レベルの遺伝子発現を確実にするより強力なプロモーターの使用によりいくぶん克服され得る。改良されたレトロウイルスパッケージング細胞株（例えば、ＢＯＳＣ２３細胞）は、10^7ｃｆｕ／ｍｌ培養上清までのレトロウイルス力価を得るために使用され得る（Ｐｅａｒ，Ｗ．Ｓ．ら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．９０：８３９２－８３９６（１９９３））。ウイルス力価のさらなる増大は、細胞を３２℃で増殖させるか（Ｋａｐｔｅｉｎ，Ｌ．Ｃ．ら、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．４：１７２－１７６（１９９７）；Ｋｏｔａｎｉ，Ｈ．ら、Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．５：１９－２８（１９９４））、または標準的なレトロウイルスプロデューサー株のレセプター媒介アデノウイルス増加トランスフェクション（ｖｏｎ Ｒｕｄｅｎ，Ｙ．ら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ１８：４８４－４８９（１９９５））に従うことにより達成され得る。精製されたレトロウイルス（Ｓｍｉｌｅｙ，Ｗ．Ｒ．ら、Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．８：９６５－９７７（１９９７））は、ガン化学療法遺伝子の導入にかなり効果的であり得る方法である、直接的反復腫瘍内注射（Ｋｏｎｄｏ，Ｓ．ら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５８：９６２－９６７（１９９８）；Ｓｍｉｌｅｙ，Ｗ．Ｒ．ら、Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．８：９６５－９７７（１９９７））により投与され得る。必要であれば、レトロウイルス力価は、＞10^9ｃｆｕ／ｍｌまでのウイルス濃度を可能にし、そしてまたウイルス宿主範囲を広げるＶＳＶ糖タンパク質Ｇで偽型化（ｐｓｅｕｄｏｔｙｐｉｎｇ）することにより劇的に増大され得る（Ｂｕｒｎｓ，Ｊ．Ｃ．ら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．９０：８０３３－８０３７（１９９３））。腫瘍選択的遺伝子発現を達成するための革新的なストラテジー（プロドラックおよび治療遺伝子両方の転写標的化、細胞標的化、およびインサイチュ選択的送達を含む）もまた記載されている（Ｇｕｎｚｂｕｒｇ，Ｗ．Ｈ．ら、Ｒｅｃｅｎｔ Ｒｅｓｕｌｔｓ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１４４：１１６－１２６（１９９８）；Ｓｃｈｎｉｅｒｌｅ，Ｂ．Ｓ．およびＧｒｏｎｅｒ，Ｂ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．３：１０６９－１０７３（１９９６）；Ｗａｌｔｈｅｒ，Ｗ．およびＳｔｅｉｎ，Ｕ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．７４：３７９－３９２（１９９６））。

【０１５６】

（実施例３）

（生還元性薬物のＰ４５０／ＲＥＤに基づく遺伝子治療への組込み）

ＲＥＤが、多数の生還元性薬物の還元的活性化を触媒することが以前の報告により示され、これは、ＲＥＤが、いくつかの生還元性薬物（例えば、アドリアマイシン、マイトマイシンＣ、およびチラパザミン（ＴＰＺ）を含む）の細胞傷害効果に対する腫瘍細胞感受性の決定因子であり得ることを示唆する。ここに、本発明者らは、生還元性薬物が、放射線または従来の化学療法の細胞傷害効果を他の方法で免れ得る腫瘍細胞を殺傷するＰ４５０／ＲＥＤに基づく遺伝子治療ストラテジーに組込まれ得ることを証明する。さらにここに、本発明者らは、Ｐ４５０／ＲＥＤに基づく遺伝子治療の情況におけるＰ４５０活性化薬物とＲＥＤ活性化薬物との組み合わせが、抗腫瘍活性の増大を導き得ることを示す。

【０１５７】

多くの腫瘍（特に、固形腫瘍）は、低酸素領域を導く不十分な血管化により特徴付けられ

る（Ｂｒｏｗｎ，Ｊ．Ｍ．およびＧｉａｃｃｉａ，Ａ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５８：１４０８－１４１６（１９９８））。酸素の存在は、放射線および多くのガン化学療法薬物の細胞傷害効果に必要とされるので、腫瘍低酸素は、放射線抵抗性および化学療法抵抗性の両方と関連する。従って、低酸素腫瘍細胞は、従来のガン化学療法剤を用いて最も処置し難い腫瘍細胞の中の１つである。酸素は、全てのＰ４５０触媒モノオキシゲナーゼ反応に必要とされるＰ４５０補基質であるので、腫瘍低酸素に関連する低O_2濃度が、ガン化学療法薬物（例えば、シクロホスファミド（ＣＰＡ））のＰ４５０／ＲＥＤ触媒活性化をブロックするか否か決定することは重要である。

【０１５８】

本実施例において、組換えレトロウイルスを使用して、ヒトＰ４５０レダクターゼ（ｈＲＥＤ）遺伝子を、ヒトＰ４５０遺伝子２Ｂ６が形質導入された９Ｌ神経膠肉腫細胞に送達した。このＰ４５０およびＲＥＤ遺伝子導入組み合せの、腫瘍細胞のＣＰＡ化学感受性に対する影響を、低酸素（１％O_2）条件下および酸素正常条件下（約２０％O_2）の両方で評価した。さらに、Ｐ４５０遺伝子導入とＲＥＤ遺伝子導入との、生還元性薬物アドリアマイシンおよびチラパザミン（ＴＰＺ：３－アミノ－１，２，４－ベンゾトリアジン－１，４－ジ－Ｎ－オキシド；ＳＲ４２３３およびＷＩＮ５０９７５としても知られる）の細胞傷害性に対する影響を決定した。これらの後者の研究を行って、Ｐ４５０／ＲＥＤ遺伝子導入の、腫瘍細胞のＴＰＺ化学感受性に対する影響を（ＴＰＺ単独またはＰ４５０活性化化学療法薬物ＣＰＡとの組み合せの両方で）評価した。

【０１５９】

以下に証明されるように、Ｐ４５０／ＲＥＤ遺伝子導入の情況におけるＣＰＡの細胞傷害活性は低酸素条件下で減少されず、これは、低酸素腫瘍細胞および酸素正常腫瘍細胞の両方が、Ｐ４５０／ＲＥＤに基づく化学療法薬物活性化遺伝子治療法を用いて効率的に殺傷されることを示す。さらに、生還元性薬物であるＴＰＺおよびアドリアマイシンの細胞傷害性は、Ｐ４５０遺伝子導入およびＲＥＤ遺伝子導入により増強されることが示され、これは、Ｐ４５０／ＲＥＤに基づく遺伝子治療法が生還元性薬物と共に使用され得ることを証明する。最後に、Ｐ４５０活性化化学療法薬物ＣＰＡとＲＥＤ活性化生還元性薬物ＴＰＺとの組み合わせが、いずれかの薬物単独により付与される腫瘍細胞傷害性と比較して、腫瘍細胞傷害性の増大を導くことが示された。従って、Ｐ４５０／ＲＥＤ薬物活性化系を用いたガン遺伝子治療の効力は、Ｐ４５０活性化薬物とＲＥＤ活性化生還元性薬物とを組み合せることにより、実質的に増大され得る。

【０１６０】

（材料および方法）

化学薬品：ＣＰＡおよびＴＰＺを、Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から得た。塩酸ブラストサイジンＳをＩＣＮから得た。

【０１６１】

組換えレトロウイルスの構築：ｐＵＶ１（Ｙａｍａｎｏ，Ｓら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．３６：８３－８８（１９８９））のＥｃｏＲＩ部位にクローニングされたｈＲＥＤをコードするｃＤＮＡを、Ｆ．Ｇｏｎｚａｌｅｚ博士，ＮＣＩから得た。このｃＤＮＡを、ウイルス３’－ＬＴＲから転写されるブラストサイジン耐性遺伝子をコードする、ｐＢａｂｅシリーズに基づくレトロウイルスベクターｐＷＺＬ－Ｂｌａｓｔ（Ｍｏｒｇｅｎｓｔｅｒｎ，Ｊ．Ｐ．およびＬａｎｄ，Ｈ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１８：３５８７－３５９６（１９９６））のＥｃｏＲＩ部位にサブクローニングした。プラスミドｐＷＺＬ－Ｂｌａｓｔを、Ｊ．Ｐ．Ｍｏｒｇｅｎｓｔｅｒｎ博士，Ｍｉｌｌｅｎｉｕｍ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡから得た。

【０１６２】

レトロウイルス感染によりヒトＰ４５０レダクターゼｃＤＮＡを発現する９Ｌ神経膠肉腫細胞株の構築：同種指向性パッケージング細胞株ＢＯＳＣ２３（Ｐｅａｒ　Ｗ．Ｓ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ　Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：８３９２－８３９６（１９９３））のｈＲＥＤをコードするレトロウイルスプラスミドＤＮＡでのトランスフェクション

、レトロウイルス上清の採集、および９Ｌ神経膠肉腫細胞（９Ｌ／野生型細胞および９Ｌ／２Ｂ６細胞の両方）の感染を、実施例２に記載したように行った。ブラストサイジン耐性細胞のプールの選択を、３μｇｍｌの塩酸ブラストサイジンＳを２日間用いて達成した。細胞の薬物耐性プールを増殖させ、次いで、実施例２に記載したように単離ミクロソームにおけるＲＥＤ酵素活性について評価した。ＲＥＤ触媒シトクロムＣ還元の５～６倍の増加が、トランスフェクタントの９Ｌ／ｈＲＥＤプールおよび９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤプールの両方において得られた。

【０１６３】

ラットＰ４５０　２Ｂ１およびラットＲＥＤを安定に発現する９Ｌ神経膠肉腫細胞株：以下のラット９Ｌ神経膠肉腫トランスフェクタントは、実施例１に既に記載したものであった：Ｐ３およびＰ１７（Ｐ４５０遺伝子ＣＹＰ２Ｂ１を安定に発現する）；９Ｌ－ｌａｃＺ（Ｅ．ｃｏｌｉ　β－ガラクトシダーゼ遺伝子を安定に発現する）；Ｒ２６（ラットＲＥＤ遺伝子を安定に発現するが、Ｐ４５０を発現しない）；およびＰＲ１、ＰＲ７、ＰＲ１１（ラットＰ４５０　２Ｂ１およびラットＲＥＤを安定に発現する）。

【０１６４】

細胞傷害性アッセイ：Ｐ４５０およびＰ４５０／ＲＥＤを発現する９Ｌ腫瘍細胞の化学感受性を評価するために、細胞を、薬物処理の１８～２４時間前に、４８ウェルプレートの４００細胞／ウェルで３連にプレートした。次いで、細胞を、薬物（各実験において示されるように、０～１ｍＭ　ＣＰＡまたは０～５０μＭ　ＴＰＺ）で処理し、そして低酸素条件下（１％O_2、５％CO_2、９４％N_2）または酸素正常条件下（１９．６％O_2、５％CO_2、７５．４％N_2）に維持された組織培養インキュベーターに４日間入れた。空のレトロウイルスプラスミドｐＢａｂｅ－ｐｕｒｏ（実施例２を参照のこと）が形質導入された９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞は、コントロールとして提供した。この期間の後に残っている細胞を、実施例２に記載したようにクリスタルバイオレット／アルコール抽出アッセイを用いて定量した。他に示さなければ、データを、薬物を含まないコントロールと比較した細胞数（３連のサンプルについての平均±ＳＤ値）として示す。個々の図において見られない誤差棒は、小さすぎて見えない。

【０１６５】

（結果）

ヒトＲＥＤのレトロウイルス形質導入：ヒトＰ４５０遺伝子２Ｂ６（実施例２を参照のこと）が形質導入された９Ｌ神経膠肉腫細胞に、完全長ｈＲＥＤ　ｃＤＮＡ（Ｙａｍａｎｏ，Ｓ．ら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．３６：８３－８８（１９８９））を発現するように操作されたレトロウイルス粒子を感染させた。このｃＤＮＡを、ブラストサイジン耐性を付与するｐＢａｂｅに基づくレトロウイルスベクター（Ｍｏｒｇｅｎｓｔｅｒｎ，Ｊ．Ｐ．およびＬａｎｄ，Ｈ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１８：３５８７－３５９６（１９９０））にクローニングした。このブラストサイジン耐性は、Ｐ４５０　２Ｂ６およびｈＲＥＤの両方を発現するレトロウイルスにより形質導入された細胞（９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞と呼ぶ）のプールの選択を可能にする。同様に、Ｐ４５０同時発現の非存在下でｈＲＥＤが形質導入された９Ｌ細胞のプールを得た（９Ｌ／ｈＲＥＤ細胞）。９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞に対するＣＰＡの細胞傷害性の評価を、９Ｌ／２Ｂ６細胞と比較して行った。酸素正常条件下（約２０％O_2）で、ＣＰＡ細胞傷害性のかなりの増大が、ｈＲＥＤのレトロウイルス形質導入に応じて観察された（図２０Ａ；９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ対９Ｌ／２Ｂ６）。ＣＰＡ細胞傷害性は、９Ｌ／ｈＲＥＤ細胞においても９Ｌ／ｐＢｅｂｅコントロール細胞においても観察されなかった（図２０Ａ）。従って、ヒトＲＥＤ遺伝子導入は、ラットＲＥＤ遺伝子について実施例２に示したのとほぼ同じように、シトクロムＰ４５０遺伝子が形質導入された腫瘍細胞の化学感受性を大いに増大させる。ラットおよびヒトＲＥＤは、９２％のアミノ酸配列同一性を示す（Ｙａｍａｎｏら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．３６：８３－８８（１９８９））。同程度の配列保存は他の哺乳動物Ｐ４５０レダクターゼで見られ、他の哺乳動物Ｐ４５０レダクターゼは、この事について同様に挙動すると予想される。

【０１６６】
Ｐ４５０／ＲＥＤ依存性ＣＰＡ細胞傷害性に対する低酸素の影響：Ｐ４５０／ＲＥＤに基づく遺伝子治療の効力が、多くの固形腫瘍内で見出される低酸素条件により影響を及ぼされるか否か試験するために、９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞および９Ｌ／２Ｂ６細胞に対するＣＰＡの細胞傷害効果を、低酸素条件下（１％O_2）で薬物で処理された細胞において評価した。図２０Ｂは、低酸素が、９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞に対しても９Ｌ／２Ｂ６細胞に対してもＣＰＡの細胞傷害性を有意に変えないことを示す（図２０Ａを参照のこと）。発現Ｐ４５０タンパク質の細胞O_2に対する親和性は十分に高く、その結果、Ｐ４５０により触媒される化学療法薬物活性化は低酸素条件下で損われないことが結論づけられる。

【０１６７】
ＲＥＤおよびＰ４５０　２Ｂ６によるＴＰＺ活性化：ＴＰＺは、低酸素腫瘍細胞に対して高い特異性を有する新シリーズの生還元性薬物の中で先頭の（ｌｅａｄ）化合物である（Ｂｏｙｅｒ，Ｍ．Ｊ．，Ｏｎｃｏｌ，Ｒｅｓ．９：３９１－３９５（１９９７））。ＴＰＺは、ＲＥＤによる、ＴＰＺ窒素酸化物ラジカル（「ＴＰＺラジカル」）を生じる１電子還元により活性化される（Ｐａｔｔｅｒｓｏｎ，Ａ．Ｖ．ら、Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ７２：１１４４－１１５０（１９９５）；Ｐａｔｔｅｒｓｏｎ，Ａ．Ｖ．ら、Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ７６：１３３８－１３４７（１９９７））。このラジカルは、ＤＮＡの１本鎖および２本鎖切断を引き起こし、そして低酸素条件下でのＴＰＺの細胞傷害性に関係してきた（Ｊｏｎｅｓ，Ｇ．Ｄ．およびＷｅｉｎｆｅｌｄ，Ｍ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６：１５８４－１５９０（１９９６）；Ｓｉｉｍ，Ｂ．Ｇ．ら、Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ７３：９５２－９６０（１９９６））。ＴＰＺラジカルは、ラジカル不均化または第２の１電子還元のいずれかにより不活性な２電子還元産物ＳＲ４３１７（３－アミノ－１，２，４－ベンゾトリアジン－１－オキシド）にさらに変換され得る。好気性条件下でＴＰＺラジカルは、分子酸素の、好気性条件下でＴＰＺ細胞傷害効果を媒介するスーパーオキシドラジカルおよび他の反応性還元酸素種への変換と同時に迅速に再酸化される（Ｅｌｗｅｌｌ，Ｊ．Ｈ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．５４：２４９－２５７（１９９７））。マウス肝臓Ｐ４５０酵素はＴＰＺの還元代謝を触媒し得る（Ｒｉｅｌｙ，Ｒ．Ｊ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４５：１０６５－１０７７（１９９７））。しかし、このＰ４５０により触媒される代謝の重要性は、これらの初期の研究が不活性な２電子還元代謝産物であるＳＲ４３１７の形成のみを検討したので知られていない。さらに、Ｐ４５０により触媒されるＴＰＺ代謝が、ＴＰＺラジカル形成またはＴＰＺ細胞傷害性の任意の増強を導くか否か決定されていない。

【０１６８】
従って、本発明者らは、ＲＥＤを伴うまたは伴わないＰ４５０　２Ｂ６の腫瘍内発現が、９Ｌ腫瘍細胞に対するＴＰＺの細胞傷害性に任意の効果を生じるか否か調べた。図２１は、酸素正常条件下で培養された細胞において、Ｐ４５０　２Ｂ６発現単独が、コントロール９Ｌ腫瘍細胞に対するＴＰＺの細胞傷害性に効果を生じないことを示す（９Ｌ／ｐＢａｂｅ対９Ｌ／２Ｂ６）。対照に、Ｐ４５０　２Ｂ６遺伝子導入を伴うまたは伴わないＲＥＤ遺伝子導入は、ＴＰＺ細胞傷害性の増大を導いた（図２１）。低酸素培養条件下（ここでＴＰＺは、本質的に酸素正常条件下より細胞傷害性である（図２１に対して図２２のｘ軸の１０倍低い目盛りを参照のこと））で行われた同様のシリーズの実験において、ＲＥＤ遺伝子導入はまた、９Ｌ腫瘍細胞をＴＰＺに化学感受性にした（図２２；９Ｌ／ｈＲＥＤ対９Ｌ／ｐＢａｂｅ）。Ｐ４５０　２Ｂ６レトロウイルスを細胞に形質導入した場合に、腫瘍細胞に対するＴＰＺのいくらか増強した細胞傷害性もまた観察された（図２２；９Ｌ／２Ｂ６対９Ｌ／ｐＢａｂｅ）。しかし、Ｐ４５０　２Ｂ６およびＲＥＤ両方で形質導入された腫瘍細胞における細胞傷害性の実質的な増大が最もすばらしい（９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ対９Ｌ／ｐＢａｂｅ）。この発見は、１）ＴＰＺがＰ４５０依存性代謝反応により活性化され得ること；および２）Ｐ４５０　２Ｂ６が、低酸素条件下でのＴＰＺ活性化の活性な触媒であることを確立する。従って、Ｐ４５０／ＲＥＤ遺伝子の組み合せは、Ｔ

ＰＺの腫瘍細胞細胞傷害性を実質的に増強した。

【０１６９】

ＲＥＤとＰ４５０との９Ｌ腫瘍細胞への同時導入におけるアドリアマイシン細胞傷害性の増強：アドリアマイシン（ドキソルビシン）は、アンスラサイクリンクラスに属するガン化学療法薬物である。アドリアマイシンの細胞傷害性はいくつかの機構を含み、このうちの１つは生還元性活性化を含む。アドリアマイシンは、Ｐ４５０代謝を必要としない様式で９Ｌ細胞に毒性であり、これは、親９Ｌ腫瘍細胞または９Ｌ／ｌａｃＺマーカーコントロール細胞（９Ｌ－Ｚ）いずれかの１００ｎＭアドリアマイシンへの暴露から生じる細胞殺傷により示される（図２３）。ＲＥＤ過剰発現（９Ｌ細胞株Ｒ２６；９Ｌ野生型細胞と比較してＲＥＤ活性の約５倍の増大）は、アドリアマイシン細胞傷害性を増強しなかった。対照に、ＲＥＤとＰ４５０　２Ｂ１との同時発現によりアドリアマイシン細胞傷害性のかなりの増強が達成された。従って、アドリアマイシン細胞傷害性の実質的な増大は、Ｐ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子両方が腫瘍細胞に導入された場合に得られた。

【０１７０】

生還元性薬物とＰ４５０活性化プロドラックとの組み合わせによる腫瘍細胞細胞傷害性のさらなる増加：活性化ＣＰＡおよび活性化ＴＰＺは、別個の機構により腫瘍細胞を殺傷する。これらは、ＣＰＡに由来するホスホルアミドマスタード（ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｅ　ｍｕｓｔａｒｄ）により誘導されるＤＮＡ架橋、およびＴＰＺラジカルの場合、（低酸素条件下での）直接ＤＮＡ鎖切断または（好気性条件下での）反応性還元酸素種により引き起こされるＤＮＡ損傷のいずれかを含む。従って、これらの２つの薬物がＰ４５０およびＲＥＤを形質導入した腫瘍細胞の処置において組み合わされる場合に、細胞傷害活性の増大は予想され得るが、一方、代わりに、同じ対の酵素（すなわち、Ｐ４５０およびＲＥＤ）による代謝のＣＰＡとＴＰＺとの間の競合は細胞傷害性の増大をもたらさないか、または恐らく全減少さえもたらし得ることがあり得る。この問題に取り組むために、ＴＰＺと組み合せたＣＰＡの細胞傷害効果を、Ｐ４５０　２Ｂ６およびＲＥＤ両方が形質導入された腫瘍細胞においてアッセイした。この研究において使用するＴＰＺ濃度（酸素普通条件下で処理された腫瘍細胞については５～１０μＭ）は、９Ｌ／ｈＲＥＤ細胞および９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞に対して最小の細胞傷害性を生じるように選択された（図２１を参照のこと）。図２４Ａは、５μＭ　ＴＰＺと０．０５ｍＭ～０．５ｍＭの範囲に及ぶ濃度のＣＰＡとの組み合わせが、９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞の場合、抗腫瘍活性の実質的な増大を導くことを示す。この細胞傷害性はＣＰＡ単独より提供されるものより大きく、そしてＣＰＡ濃度の全範囲にわたって容易に明らかであった。コントロール実験において、この濃度でのＴＰＺはそれ自体で細胞傷害性を有さず、そしてＰ４５０　２Ｂ６を発現しない腫瘍細胞（すなわち、９Ｌ／ｈＲＥＤおよび９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞）をＣＰＡに化学感受性にしなかった（図２４Ｂ、２４Ｃ）。図２４Ａはまた、ＣＰＡ細胞傷害性に対するＴＰＺの付加的な効果が、いくらか高いＴＰＺ濃度（１０μＭ）に暴露された細胞において達成され得ることを示す。同様の効果が低酸素条件下で行われた実験から明らかであり、この実験において非常に低い濃度（０．５～１．５μＭ）のＴＰＺは、９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞のＣＰＡ感受性を増大させた（図２５Ａ）。また、ＴＰＺ処理腫瘍細胞のこの増大したＣＰＡ化学感受性は、Ｐ４５０　２Ｂ６遺伝子導入に依存した（図２５Ａ対図２５Ｂ、２５Ｃ）。従って、Ｐ４５０／ＲＥＤに基づくガン遺伝子治療の情況における抗腫瘍効果の有意な増大は、低酸素条件下および酸素正常条件下の両方で、生還元性薬物と組み合せたＰ４５０活性化化学療法薬物を用いた腫瘍細胞の処理により達成され得る。

【０１７１】

（考察）

本実施例に記載された実験は、１）Ｐ４５０／ＲＥＤに基づくガン遺伝子治療が、低酸素条件下および酸素正常条件下の両方で効果的であること；２）Ｐ４５０遺伝子導入とＲＥＤ遺伝子導入との組み合せが、ＴＰＺおよびアドリアマイシンの両方について例示されたように、Ｐ４５０遺伝子導入単独またはＲＥＤ遺伝導入単独により提供されるもの以上に生還元性薬物細胞傷害性の増強をもたらすこと；ならびに３）Ｐ４５０／ＲＥＤ抗腫瘍活

性の増大が、Ｐ４５０活性化化学療法薬物（例えば、ＣＰＡ）と生還元性薬物（例えば、ＴＰＺ）とを組み合せることにより達成され得ること、を確立する。

【０１７２】

酸素正常条件下でＰ４５０　２Ｂ６がＴＰＺ細胞傷害性に主に寄与しない（図２１；９Ｌ／２Ｂ６と９Ｌ／ｐＢａｂｅ、および９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤと９Ｌ／ｈＲＥＤを比較せよ）という発見は、薬物および他の関係のない化学薬品のシトクロムＰ４５０触媒還元が、好気性（酸素正常）条件下と比較して、低酸素条件下または嫌気性条件下で非常に速い速度で進行するという観察と一致する（Ｇｏｅｐｔａｒ，Ａ．Ｒ．ら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．２５：２５－６５（１９９５））。対照に、ＲＥＤは、低酸素条件下および好気性条件下の両方で、ＴＰＺおよび他の生還元性薬物の１電子還元を触媒する。シトクロムＰ４５０酵素により行われる生還元性代謝を受けることが知られている他のガン化学療法薬物は、種々のキノン含有分子（例えば、アドリアマイシン、マイトマイシンＣ、および２，３，５，６－テトラメチルベンゾキノン（ＴＭＱ）を含む（Ｇｏｅｐｔａｒ，Ａ．Ｒ．ら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．２５：２５－６５（１９９５）；Ｇｏｅｐｔａｒ，Ａ．Ｒ．ら、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４４：１２６７－１２７７（１９９３））。これらの同じ薬物はまた、ＲＥＤにより触媒される還元反応により生体活性化され得るので（Ｂｅｌｃｏｕｒｔ，Ｍ．Ｆ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：４５６－４６０（１９９６）；Ｓａｗａｍｕｒａ，Ａ．Ｏ．，Ｏｎｃｏｌｏｇｙ．５３：４０６－４１１（１９９６）；Ｂａｒｔｏｓｚｅｋ，ＡおよびＷｏｌｆ，Ｃ．Ｒ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４３：１４４９－１４５７（１９９２））、これらのおよび他の生還元性薬物についての細胞傷害応答の増強はまた、今や、Ｐ４５０遺伝子導入とＲＥＤ遺伝子導入との組み合わせから予想され得る。従って、生還元性薬物の細胞傷害性がＰ４５０遺伝子導入とＲＥＤ遺伝子導入とを組み合せることにより増強され得るという本発見は、Ｐ４５０に基づくガン遺伝子治療ストラテジーにおいて利用され得る薬物の範囲を、生還元性薬物を含むように広げる。

【０１７３】

生還元性薬物は、伝統的な放射線処置および化学療法処置にしばしば耐性である低酸素腫瘍細胞に対して特に強力な活性を有するガン化学療法剤のうちの重要なクラスを構成する。抗腫瘍効果の増大がＰ４５０活性化化学療法薬物ＣＰＡと生還元性薬物ＴＰＺとを組み合せることにより達成されたという本実施例における証明は、Ｐ４５０に基づく遺伝子治療の利用を、これらの２つの重要なクラスの抗ガン剤の組み合わせを含むようにさらに広げる。これは、順に、Ｐ４５０／ＲＥＤに基づく遺伝子治療を受けやすい腫瘍細胞の範囲を、低酸素腫瘍細胞を含むように広げる。

【０１７４】

このようなストラテジーにおいて有用な生還元性薬物の例は、アドリアマイシン、マイトマイシンＣ、チラパザミン（ＴＰＺ）、および種々の他のニトロイミダゾール、窒素芳香族化合物、キノン、脂肪族、芳香族、もしくは複素環式Ｎ－酸化物、または生還元性可能なＤＮＡアルキル化剤を含み、これらは、ＲＥＤにより触媒されるおよび／またはＰ４５０により触媒される生還元性活性化を受け得る（Ｐａｔｔｅｒｓｏｎ，Ａ．Ｖ．ら、Ｂｒ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ７２：１１４４－１１５０（１９９５）；Ｗｏｒｋｍａｎ，Ｐ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ　Ｒｅｖ．１２：７３－８２（１９９３）；Ｇｏｅｐｔａｒ，Ａ．Ｒ．ら、Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．２５：２５－６５（１９９５））。Ｐ４５０により触媒されるモノオキシゲナーゼ反応の酸素の必要がある場合、この低酸素腫瘍細胞ストラテジーは直観に反するように思われ得るが、本実施例における研究は、低酸素条件下で増殖されたＰ４５０形質導入腫瘍細胞において、４５０依存性プロドラック活性化の有意な喪失を示さなかった。結果として、低酸素応答エレメント（Ｏ’Ｒｏｕｒｋｅ，Ｊ．Ｆ．ら、Ｏｎｃｏｌ　Ｒｅｓ．９：３２７－３３２（１９９７））を使用して、Ｐ４５０遺伝子およびＲＥＤ遺伝子両方の、局在低酸素環境（ＢｒｏｗｎおよびＧｉａｃｃｉａ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５８：１４０８－１４１６（１９９８））により特徴付けられる腫瘍への転写標的化（Ｄａｃｈｓ，Ｇ．Ｕ．ら、Ｎａｔ　Ｍｅｄ．３

：５１５－５２０（１９９７））を達成し得る。

【０１７５】

ガン化学療法薬物の組み合わせは、ガン患者における効果的なおよび永続性のある臨床応答に常に必要とされる。ＴＰＺは、齧歯動物およびヒト両方の腫瘍異種移植片モデルにおいてＣＰＡおよび他のガン化学療法剤の活性を増強することが以前に示されているが、この効果は、骨髄毒性の対応する増大のために治療利益にならない（Ｌａｒｔｉｇａｕ，ＥおよびＧｕｉｃｈａｒｄ，Ｍ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ７３：１４８０－１４８５（１９９６）；Ｓｉｅｍａｎｎ，Ｄ．Ｗ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ７４　補遺２７：Ｓ６５－６９（１９９６））。このような薬物の組み合わせがＰ４５０／ＲＥＤに基づく腫瘍内遺伝子導入の情況において効果的であるという本証明により、当業者は、化学療法薬物と生還元性薬物との組み合わせの本質的な利益を利用し得る一方、同時に、宿主の毒性応答増強を伴わずに局在薬物活性化により所望でない副作用を最小にし得る。従って、ＲＥＤ活性化を受ける原型の生還元性薬物が、Ｐ４５０活性化化学療法薬物の細胞傷害活性を増強し得るという本証明は、Ｐ４５０／ＲＥＤに基づくガン化学療法レジメの臨床有効性を実質的に増大させるはずである。

【０１７６】

医学、遺伝学、分子生物学、遺伝子治療、免役学、薬理学、および／または関連分野の当業者に明らかな、本発明を行うための上記の態様の改変は、以下の請求の範囲の範囲内にあることが意図される。

【０１７７】

本明細書中に述べられた全ての刊行物および特許は、本発明が属する当業者の技術レベルを示す。全ての刊行物および特許は、各々の個々の刊行物または特許出願が詳細におよび個々に示されて参考として援用されるのと同程度に、本明細書中に参考として援用される。

【０１７８】

前述の発明は理解の明瞭の目的のための例示および例のためにいくらか詳細に記載されたが、本発明は開示された特定の実施態様に限定されない。しかし、本発明は、添付の請求の範囲により定義されるような本発明の精神および範囲内にある全ての変化および改変を含むことが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図１Ａ】　図１Ａは、本発明によるＰ４５０　２Ｂ１、ＲＥＤおよび／またはｌａｃＺマーカー遺伝子で形質導入した個々の９Ｌ腫瘍細胞株における、ＣＹＰ２Ｂ１タンパク質レベル（上部パネル）およびＰ４５０レダクターゼ（ＲＥＤ）タンパク質レベル（下部パネル）を示す免疫ブロットの写真である。個々のクローナル細胞株から調製したミクロソームタンパク質（２０μｇタンパク質／レーン）を、ポリクローナルウサギ抗ＣＹＰ２Ｂ１抗体（上部）または抗ＲＥＤ抗体（下部）でプローブしたウエスタンブロットで分析した。個々の安定な細胞株を、示したように、ＣＹＰ２Ｂ１および／またはＲＥＤの安定なトランスフェクションにより調製した。フェノバルビタール誘導したラット肝臓ミクロソーム（約０．９ｐｍｏｌのＣＹＰ２Ｂ１を含む１μｇ）を、ＣＹＰ２Ｂ１についてのポジティブコントロールとして使用した（上部パネルのレーン１１の二重バンドの低いほうのバンド）。レーン２のサンプルは、ｌａｃＺ遺伝子を発現するように安定にトランスフェクトされた９Ｌ細胞株であり、一方、９Ｌ／２Ｂ１／ｌａｃＺ株を、レーン３に示す（Ｃｈｅｎ，Ｌ．およびＷａｘｍａｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５５：５８１－５８９（１９９５））。ＰＲ６株（Ｐ３に由来する）は、ＰＲ１１と同様のレベルでＲＥＤを発現した（レーン６）。ＰＲ１、ＰＲ４、およびＰＲ５株（全てＰ１７に由来する）は、ＲＥＤタンパク質を発現し（レーン７～９）、そして９Ｌ野生型細胞より１．５～２倍高いレベルの酵素活性を示し（データは示さず）、そしてそれ以上は特徴付けられなかった。ＲＥＤタンパク質は、肝臓ミクロソームタンパク質の少ない充填（ｌｏｗ　ｌｏａｄｉｎｇ）のために、レーン１１では検出不可能であった。７～１０ｐｍｏｌ　Ｐ４５０　２Ｂ１／ｍｇミクロソーム（Ｐ３およびＰＲ１１）および１５～２０ｐｍｏ

ｌ　Ｐ４５０　２Ｂ１／ｍｇ（Ｐ１７およびＰＲ７）のＣＹＰ２Ｂ１特異的含量を、ＣＹＰ２Ｂ１標準に対する比較によって決定した。

【図１Ｂ】　図１Ｂは、９Ｌ腫瘍細胞株から調製した細胞ホモジネートにおけるＲＥＤ酵素活性（シトクロムＣ還元の速度）を示す棒グラフである。ＲＥＤを過剰発現する細胞株を、「Ｒ」（９Ｌ－Ｒ、ＰＲ－１１、ＰＲ－７）と称し、ＣＹＰ２Ｂ１を発現するものを「Ｐ」（Ｐ３、Ｐ１７）と称し、そしてＲＥＤおよびＣＹＰ２Ｂ１の両方を発現するものを「ＰＲ」（ＰＲ１１、ＰＲ７）と称した。株９Ｌ－Ｒ、Ｐ３およびＰ１７は親９Ｌ細胞に由来し、株ＰＲ１１はＰ３に由来し、そして株ＰＲ７はＰ１７に由来した。

【図２Ａ】　図２Ａ、２Ｂ、および２Ｃは、ＲＥＤ遺伝子の同時移入後のＰ４５０発現９Ｌ腫瘍細胞の生存度における、化学療法剤ＣＰＡおよびイホスファミド（ＩＦＡ）の増強された細胞傷害性効果を示すグラフである。ＣＰＡ（図２Ａおよび２Ｂ）またはＩＦＡ（図２Ｃ）に曝露した親９Ｌ、９Ｌ－Ｒ（Ｐ４５０レダクターゼまたはRED^{+++}を過剰発現する細胞）、Ｐ３、Ｐ７（$CYP2B1^{+}$細胞）、ＰＲ１１、およびＰＲ７（$CYP2B1^{+}RED^{+++}$）細胞の生存度を示す。

図２Ａおよび２Ｃは、コロニー形成細胞傷害性アッセイの結果を示す。細胞を、ウェルあたり２００、２０００、および２０，０００細胞で、３０ｍｍ組織培養プレートに二連でプレートし、そしてＣＰＡ（図２Ａ）またはＩＦＡ（図２Ｃ）で、示した薬物濃度にて処理した。７日後、プレートをクリスタルバイオレットで染色し、そしてコロニーの数を計数した。生存割合を、未処理のコントロールに対する、処理群におけるコロニーの数として表した。

【図２Ｂ】　図２Ａ、２Ｂ、および２Ｃは、ＲＥＤ遺伝子の同時移入後のＰ４５０発現９Ｌ腫瘍細胞の生存度における、化学療法剤ＣＰＡおよびイホスファミド（ＩＦＡ）の増強された細胞傷害性効果を示すグラフである。ＣＰＡ（図２Ａおよび２Ｂ）またはＩＦＡ（図２Ｃ）に曝露した親９Ｌ、９Ｌ－Ｒ（Ｐ４５０レダクターゼまたはRED^{+++}を過剰発現する細胞）、Ｐ３、Ｐ７（$CYP2B1^{+}$細胞）、ＰＲ１１、およびＰＲ７（$CYP2B1^{+}RED^{+++}$）細胞の生存度を示す。

図２Ｂは、増殖阻害アッセイからの結果を示す。９６ウェルプレートに播種した細胞（１０００／ウェル）を、示した濃度のＣＰＡで４日間処理した。対応するコントロールは、薬物処理を受けなかった。細胞生存度を、ＸＴＴ比色アッセイによって決定した。データ（三連のサンプルの平均）を、増殖比（％）（すなわち、対応する薬物なしのコントロールの割合として、薬物処理したプレートにおける細胞数（ＸＴＴ活性）として表す。

【図２Ｃ】　図２Ａ、２Ｂ、および２Ｃは、ＲＥＤ遺伝子の同時移入後のＰ４５０発現９Ｌ腫瘍細胞の生存度における、化学療法剤ＣＰＡおよびイホスファミド（ＩＦＡ）の増強された細胞傷害性効果を示すグラフである。ＣＰＡ（図２Ａおよび２Ｂ）またはＩＦＡ（図２Ｃ）に曝露した親９Ｌ、９Ｌ－Ｒ（Ｐ４５０レダクターゼまたはRED^{+++}を過剰発現する細胞）、Ｐ３、Ｐ７（$CYP2B1^{+}$細胞）、ＰＲ１１、およびＰＲ７（$CYP2B1^{+}RED^{+++}$）細胞の生存度を示す。

図２Ａおよび２Ｃは、コロニー形成細胞傷害性アッセイの結果を示す。細胞を、ウェルあたり２００、２０００、および２０，０００細胞で、３０ｍｍ組織培養プレートに二連でプレートし、そしてＣＰＡ（図２Ａ）またはＩＦＡ（図２Ｃ）で、示した薬物濃度にて処理した。７日後、プレートをクリスタルバイオレットで染色し、そしてコロニーの数を計数した。生存割合を、未処理のコントロールに対する、処理群におけるコロニーの数として表した。

【図３】　図３Ａおよび３Ｂは、Ｐ４５０形質導入腫瘍細胞（$CYP2B1^{+}$）における、Ｐ４５０酵素インヒビターメチラポン（ＭＴＰ）によるＣＰＡ細胞傷害性からの保護、およびＰ４５０およびＲＥＤを組み合わせて（$CYP2B1^{+}RED^{+++}$）形質導入した腫瘍細胞におけるＭＴＰによるより少ない有効保護を示すグラフである。

図３Ａは、コロニー形成細胞傷害性アッセイからの結果を示す。細胞（２００および２０００細胞／ウェル）を、３０ｍｍ組織培養プレートに二連でプレートし、そして示した濃度のＭＴＰの非存在下または存在下で、１ｍＭシクロホスファミドで処理した。処理の７

日後、プレートをクリスタルバイオレットで染色し、そしてコロニーの数を計数した。生存割合を、未処理のコントロールに対する、各処理群におけるコロニーの数として表す。図３Ｂは、増殖阻害アッセイからの結果を示す。９６ウェルプレートに播種した細胞（１０００／ウェル）を、示したように、ＭＴＰの非存在下または存在下で、１ｍＭシクロホスファミドで処理した。対応するコントロールは、薬物処理を受けなかった。細胞生存度を、ＸＴＴ比色アッセイによって決定した。データ（三連のサンプルの平均）を、増殖比（％）（すなわち、対応する薬物なしのコントロールの割合として、薬物処理したプレートにおける細胞数（ＸＴＴ活性）として表す。

【図４】　図４は、Ｐ４５０およびＲＥＤ形質導入腫瘍細胞における、ＲＥＤインヒビター３－アミノピリジンアデニンジヌクレオチド（ＡＡＤＰ）およびジフェニレンヨードニウム（ＤＰＩ）によって生じるＣＰＡ細胞傷害性からの保護を示す棒グラフである。９６ウェルプレートに播種した細胞（５００／ウェル）を、ＲＥＤインヒビターＡＡＤＰ（０．５ｍＭ）またはＤＰＩ（５μＭ）の非存在下または存在下で、１ｍＭシクロホスファミドで処理した。対応するコントロールは、薬物処理を受けなかった。細胞生存度を、ＸＴＴ比色アッセイによって決定した。データ（三連のサンプルの平均）を、増殖比（％）（すなわち、対応する薬物なしのコントロールの割合として、薬物処理したプレートにおける細胞数（ＸＴＴ活性）として表し、そして２～３の独立した実験を代表例する。ＡＡＤＰおよびＤＰＩを、ＣＰＡ処理の３０分前に細胞に添加した。

【図５】　図５は、野生型腫瘍細胞の生存度における、ＣＰＡとともにインキュベートしたＰ４５０およびＲＥＤ形質導入腫瘍細胞からの培養培地の効果を示すグラフである。このグラフは、ＣＰＡ処理ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$細胞が、ＣＹＰ２Ｂ１ネガティブ細胞に対する強力なバイスタンダー細胞傷害性効果を媒介することを示す。二連で３０ｍｍプレートに播種された親９Ｌ細胞（10^{4}細胞／ウェル）を、実施例１の「材料および方法」節において以下に記載するように、２ｍＭのＣＰＡとともに４８時間インキュベートした、示した細胞株（1.5×10^{6}）の各々から回収した馴化培地の５～５０％で培養した。処理の５日後、生存する親９Ｌ細胞の数を、トリパンブルー排除に基づいて、血球計を用いて決定した（２つの値の平均）。

【図６】　図６Ａ、６Ｂ、６Ｃ、および６Ｄは、ｌａｃＺ遺伝子でマークされ、そして暗染色によって明らかにされた野性型腫瘍細胞のすぐ隣に指向する、ＣＰＡ処理Ｐ４５０含有腫瘍細胞（図６Ａおよび６Ｂ）またはＰ４５０およびＲＥＤ含有腫瘍細胞（図６Ｃおよび６Ｄ）のバイスタンダー細胞傷害性効果を示す写真である。ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞（図６Ａ）およびＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{-}$細胞（図６Ｃ）を、等しい数のｌａｃＺマーク化９Ｌ細胞と混合し、そして１ｍＭ　ＣＰＡの非存在下（図６Ａおよび６Ｃ）または存在下（図６Ｂおよび６Ｄ）で培養した。薬物処理の開始５日後に、９Ｌ－ｌａｃＺ細胞を可視化するために４時間Ｘ－Ｇａｌで染色した（暗染色）、０．５％グルタルアルデヒド固定細胞を示す。

【図７】　図７は、Ｐ４５０単独を含有する腫瘍細胞と比較して、Ｐ４５０およびＲＥＤ含有腫瘍細胞によって、より高い４－ヒドロキシ－ＣＰＡレベルが産生されることを示す棒グラフである。親ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$細胞株Ｐ３およびＰ１７、ならびにそれらの対応するＲＥＤ過剰発現誘導体ＰＲ１１およびＰＲ７を、この細胞数が実験の過程の間に比較的定常に維持されるように、コンフルエントに（３０ｍｍ培養皿あたり1.5×10^{6}細胞）プレートした。細胞を、５ｍＭセミカルバジドの存在下で、２ｍＭ　ＣＰＡとともに２４時間インキュベートした。培地を回収し、次いで、実施例１の「材料および方法」節において以下に記載するように、蛍光定量アッセイを用いて、４－ヒドロキシ－ＣＰＡについてアッセイした。このアッセイにおける検出限界は、約１μＭ　４－ヒドロキシ－ＣＡＰであった。株Ｐ３と比較して株Ｐ１７のより高いＣＰＡ　４－ヒドロキシラーゼ活性は、Ｐ１７細胞からのＣＰＡ馴化培地のより高い細胞傷害性能力（図５）、ならびにインビトロ（図２、３）およびインビボ（図９、下）でＰ１７細胞に対するＣＰＡのより大きな細胞毒性の両方と一致する。

【図８】　図８Ａおよび８Ｂは、基底ＲＥＤ活性を発現する野生型９Ｌ細胞（図８Ａ）と

比較して、ＲＥＤを発現するように操作された９Ｌ腫瘍細胞（図８Ｂ）の場合における、ＣＰＡ処置と組み合わせたアデノウイルス媒介性Ｐ４５０遺伝子移入のより大きな細胞傷害性を示すグラフである。細胞を、各パネルの右側の括弧の値によって示されるように、５０～８００の範囲の感染多重度（ＭＯＩ）でＡｄ．ＣＭＶ－２Ｂ１に感染させた。未感染細胞（ＵＩ）を、コントロールとして使用した。感染後２４時間で、細胞を、ウェルあたり５００細胞で、９６ウェルプレートに二連で再プレートした。次いで、ＣＰＡを、２ｍＭまでの濃度で添加した。インキュベーションの５日後、細胞生存度をＸＴＴ比色アッセイによって決定した。データ（２つのサンプルについての平均±範囲）を、増殖比（％）（すなわち、対応する薬物なしのコントロールの割合として薬物処理したプレートにおける細胞数（ＸＴＴ活性））として表す。

【図９】　図９は、Ｐ４５０単独（ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$）またはＲＥＤと組み合わせたＰ４５０（ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$）を発現するように操作された９Ｌ腫瘍と比較して、インビボ腫瘍排除アッセイ（これは、９Ｌ腫瘍について、インビボで、ラットにおけるＣＰＡ誘導性腫瘍細胞殺傷の程度を定量する）の結果を示すグラフである。雌性Ｆｉｓｃｈｅｒ３４４ラットを、実施例１の「材料および方法」節において以下に記載するように、後脚における２×１０^{6}腫瘍細胞／０．２ｍｌの皮下注入によって、親９Ｌ、ＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$、およびＣＹＰ２Ｂ１$^{+}$ＲＥＤ$^{+++}$腫瘍細胞で接種した。腫瘍移植後２週間で、各動物は、ＣＰＡ（５０または１００ｍｇ／ｋｇ体重）またはコントロールとして生理食塩水の一回の注射を受けた。２４時間後、腫瘍を切除し、そして単一の細胞懸濁物を、コロニー形成活性のアッセイのために調製した。結果を、４または５回の決定について、コントロール群と比較して、平均生存割合として示す；棒、標準誤差（ＳＥ）。

【図１０】　図１０は、９個の異なる組織起源のヒト腫瘍に由来する６０の個々のヒト腫瘍細胞株のパネルにおいて測定した、ＲＥＤ酵素活性レベル（シトクロムＣ還元の割合）を示す棒グラフである。ＲＥＤ活性を、単離した細胞ミクロソームにおいてシトクロムＣ還元によって決定した。示したデータは、二回の決定についての平均±範囲である。ほとんどの場合において、誤差棒は平均値の５％未満であり、そしてこのグラフ例においては小さすぎて見られない。６０のヒト腫瘍細胞株は、９つの示したヒト腫瘍型に由来し、そしてインビトロ抗癌剤発見スクリーニングプログラム（Ｂｏｙｄ，Ｍ．Ｒ．およびＰａｕｌｌ，Ｋ．Ｄ．，Ｄｒｕｇ Ｄｅｖｅｌｏｐ Ｒｅｓ．３４：９１－１０９（１９９５））において米国国立癌研究所によって使用された細胞株のパネルに対応する。

【図１１】　図１１Ａおよび１１Ｂは、９Ｌ／Ｐ４５０細胞株におけるＣＹＰタンパク質レベルのウエスタンブロット分析を示す。Ｐ４５０　２Ｂ６（図１１Ａ）またはＰ４５０　２Ｃに対する抗体でプローブした野生型９Ｌ神経膠肉腫細胞（９Ｌ／ｗｔ）およびｈび９Ｌ／Ｐ４５０（示したヒトＰ４５０遺伝子の各々で形質導入した９Ｌ細胞）（６０μｇ／レーン）から単離したミクロソームのウエスタンブロットを示す。図１１Ａのレーン３は、レーン２に示した２Ｂ６クローンの選択の前に、レトロウイルス２Ｂ６形質導入細胞のオリジナルプールから調製した９Ｌミクロソームを示す。ｃＤＮＡ発現Ｐ４５０　２Ｂ６（図１１Ａ、レーン４、５；リンパ芽球発現）およびｃＤＮＡ発現Ｐ４５０　２Ｃ標準（図１１Ｂ、レーン１、２、９、１０；酵母発現）を、ウェルあたりｐｍｏｌＰ４５０タンパク質の示した数で並行して分析した。比較可能なバンド強度を、リンパ芽球（Ｇｅｎｔｅｓｔ）で発現したＣＹＰ２Ｃについて得た。この研究において使用した抗ＣＹＰ２ＣＣＯＯＨ末端抗体（抗ＦＩＰＶ－ＣＯＯＨ）は、一貫して、２Ｃ１８および２Ｃ１９と比較して、ｃＤＮＡ発現２Ｃ８で強いウエスタンブロットシグナルおよび２Ｃ９での弱いシグナルを与えた。

【図１２】　図１２は、示した９Ｌ／Ｐ４５０細胞株の各々における、Ｐ４５０に触媒される７－ベンジルオキシレゾルフィンＯ－デエチラーゼ（７－ｂｅｎｚｙｌｏｘｙｒｅｓｏｒｕｆｉｎ　Ｏ－ｄｅｅｔｈｙｌａｓｅ（ＢＲＯＤ）活性の棒グラフを示す。オリジナルレトロウイルスＰ４５０感染９Ｌ細胞プール（黒棒）、またはＣＰＡまたはＩＦＡに対するそれらの増強された感受性に基づいて選択した個々のクローナル細胞株（この図において－１、－２、－３と称する）（斑点棒）から調製したミクロソームにおいて測定した

ＢＲＯＤ活性値を示す（実施例２を参照のこと）。縦の矢印は、続く研究のために選択された各９Ｌ／Ｐ４５０プールの個々のクローンを示す。

【図１３Ａ】　図１３Ａ～１３Ｄは、９Ｌ／Ｐ４５０細胞において、ＣＰＡ（図１３Ａおよび１３Ｂ）およびＩＦＡ（図１３Ｃおよび１３Ｄ）に対する化学増感化を評価するための増殖阻害アッセイの結果を示す。細胞を、４８ウェルプレートに５００細胞／ウェルで播種し、そして示した濃度のＣＰＡまたはＩＦＡで４日間処理した。各細胞株についてのコントロール細胞は、薬物処理を受けなかった。実験の終わりの相対細胞数を、実施例２の「材料および方法」において以下に記載するように、クリスタルバイオレット染色によって決定した。データ（平均±ＳＤ、ｎ＝３）は、対応する薬物なしのコントロールの割合として、薬物処理したプレートにおけるクリスタルバイオレットの吸光度に基づく。図１３Ａおよび１３Ｃに示したＰ４５０欠損コントロール細胞株についてのデータ（９Ｌ／ｗｔおよび９Ｌ／ｐＢａｂｅ）は、図１３Ｂおよび１３Ｄに示したものと同じである。

【図１３Ｂ】　図１３Ａ～１３Ｄは、９Ｌ／Ｐ４５０細胞において、ＣＰＡ（図１３Ａおよび１３Ｂ）およびＩＦＡ（図１３Ｃおよび１３Ｄ）に対する化学増感化を評価するための増殖阻害アッセイの結果を示す。細胞を、４８ウェルプレートに５００細胞／ウェルで播種し、そして示した濃度のＣＰＡまたはＩＦＡで４日間処理した。各細胞株についてのコントロール細胞は、薬物処理を受けなかった。実験の終わりの相対細胞数を、実施例２の「材料および方法」において以下に記載するように、クリスタルバイオレット染色によって決定した。データ（平均±ＳＤ、ｎ＝３）は、対応する薬物なしのコントロールの割合として、薬物処理したプレートにおけるクリスタルバイオレットの吸光度に基づく。図１３Ａおよび１３Ｃに示したＰ４５０欠損コントロール細胞株についてのデータ（９Ｌ／ｗｔおよび９Ｌ／ｐＢａｂｅ）は、図１３Ｂおよび１３Ｄに示したものと同じである。

【図１３Ｃ】　図１３Ａ～１３Ｄは、９Ｌ／Ｐ４５０細胞において、ＣＰＡ（図１３Ａおよび１３Ｂ）およびＩＦＡ（図１３Ｃおよび１３Ｄ）に対する化学増感化を評価するための増殖阻害アッセイの結果を示す。細胞を、４８ウェルプレートに５００細胞／ウェルで播種し、そして示した濃度のＣＰＡまたはＩＦＡで４日間処理した。各細胞株についてのコントロール細胞は、薬物処理を受けなかった。実験の終わりの相対細胞数を、実施例２の「材料および方法」において以下に記載するように、クリスタルバイオレット染色によって決定した。データ（平均±ＳＤ、ｎ＝３）は、対応する薬物なしのコントロールの割合として、薬物処理したプレートにおけるクリスタルバイオレットの吸光度に基づく。図１３Ａおよび１３Ｃに示したＰ４５０欠損コントロール細胞株についてのデータ（９Ｌ／ｗｔおよび９Ｌ／ｐＢａｂｅ）は、図１３Ｂおよび１３Ｄに示したものと同じである。

【図１３Ｄ】　図１３Ａ～１３Ｄは、９Ｌ／Ｐ４５０細胞において、ＣＰＡ（図１３Ａおよび１３Ｂ）およびＩＦＡ（図１３Ｃおよび１３Ｄ）に対する化学増感化を評価するための増殖阻害アッセイの結果を示す。細胞を、４８ウェルプレートに５００細胞／ウェルで播種し、そして示した濃度のＣＰＡまたはＩＦＡで４日間処理した。各細胞株についてのコントロール細胞は、薬物処理を受けなかった。実験の終わりの相対細胞数を、実施例２の「材料および方法」において以下に記載するように、クリスタルバイオレット染色によって決定した。データ（平均±ＳＤ、ｎ＝３）は、対応する薬物なしのコントロールの割合として、薬物処理したプレートにおけるクリスタルバイオレットの吸光度に基づく。図１３Ａおよび１３Ｃに示したＰ４５０欠損コントロール細胞株についてのデータ（９Ｌ／ｗｔおよび９Ｌ／ｐＢａｂｅ）は、図１３Ｂおよび１３Ｄに示したものと同じである。

【図１４】　図１４は、９Ｌ腫瘍／Ｐ４５０細胞株における、Ｐ４５０レダクターゼ活性を示す棒グラフである。示した細胞株の各々から調製したミクロソームを、実施例２の「材料および方法」節において以下に記載するように、Ｐ４５０レダクターゼ活性（シトクロムＣ還元）についてアッセイした。Ｐ４５０レダクターゼで形質導入した細胞株を、「Ｒｅｄ」と称する。示したデータは、ｎ＝３の決定に基づく、平均±ＳＤである。

【図１５Ａ】　図１５Ａおよび１５Ｂは、Ｐ４５０レダクターゼ遺伝子のレトロウイルス形質導入が、Ｐ４５０媒介性ＣＰＡおよびＩＦＡ細胞傷害性を増強することを示すグラフである。Ｐ４５０および／またはＰ４５０レダクターゼ（「Ｒｅｄ」）で形質導入した９

Ｌ　ｐＢａｂｅ細胞および９Ｌ細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、そして漸増濃度のＣＰＡ（図１５Ａ）またはＩＦＡ（図１５Ｂ）で４日間処理した。薬物なしのコントロールと比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製について平均±ＳＤとして示す。

【図１５Ｂ】　図１５Ａおよび１５Ｂは、Ｐ４５０レダクターゼ遺伝子のレトロウイルス形質導入が、Ｐ４５０媒介性ＣＰＡおよびＩＦＡ細胞傷害性を増強することを示すグラフである。Ｐ４５０および／またはＰ４５０レダクターゼ（「Ｒｅｄ」）で形質導入した９Ｌ　ｐＢａｂｅ細胞および９Ｌ細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、そして漸増濃度のＣＰＡ（図１５Ａ）またはＩＦＡ（図１５Ｂ）で４日間処理した。薬物なしのコントロールと比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製について平均±ＳＤとして示す。

【図１６】　図１６は、化学的に活性化されたＣＰＡおよびＩＦＡに対する９Ｌ／ｗｔ細胞の固有の化学感受性を示すグラフである。４８ウェルプレートにおいて２０００細胞／ウェルで播種した９Ｌ／ｗｔ細胞を、漸増濃度の４－ヒドロペルオキシ－ＣＰＡまたは４－ヒドロペルオキシ－ＩＦＡ（０～１００μＭ）で３～４時間処理した。次いで、細胞を、新鮮な薬物なしの培地中でインキュベートし、そして４日間増殖させた。次いで、薬物なしのコントロールの割合としての細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定した。示したデータは、二連のサンプルについての平均±範囲である。

【図１７】　図１７は、細胞培養物における４－ヒドロキシ代謝物についてのセミカルバジドトラッピング／蛍光アッセイを示す棒グラフである。示した９Ｌ細胞株の各々を、２×10^4細胞／ウェルで二連で４８ウェルプレートに播種した。２４時間後、２ｍＭ　ＣＰＡ（斜線棒）または２ｍＭ　ＩＦＡ（実線棒）を、１ｍｌの容量で、５ｍＭ　セミカルバジド（最終濃度）とともに細胞に添加した。培養培地を、薬物添加後２４時間で、４－ヒドロキシ－ＣＰＡまたは４－ヒドロキシ－ＩＦＡについて分析した。示したデータは、実施例２の「材料および方法」節において以下に記載するように、各ウェルにおける全細胞数に対して正規化する。９Ｌ／Ｂａｂｅ細胞において観察されたバックグランド蛍光を、各サンプルから引いた。

【図１８】　図１８Ａおよび１８Ｂは、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼおよび９Ｌ／２Ｂ６細胞のバイスタンダー細胞傷害性を示すグラフである。図１８Ａにおいて、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ細胞のバイスタンダー細胞傷害性を、９Ｌ／２Ｂ６細胞のものと比較する。両方の場合において、９Ｌ／ｐＢａｂｅをバイスタンダー細胞として供した。９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞を、６ウェルプレート（下部チャンバ）の10^5細胞／ウェルで二連でプレートした。９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ細胞または９Ｌ／２Ｂ６細胞を、Ｘ軸に示すように、下部チャンバで増殖するバイスタンダー９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞に対して０．１から６の比に対応する、10^4から６×10^5細胞の範囲の濃度で、２５ｍｍ細胞培養インサート（上部チャンバ）にプレートした。細胞を、最終ＣＰＡ濃度で１ｍＭ　ＣＰＡを含む、全容量３ｍｌダルベッコ最小必須培地（ＤＭＥＭ）（１０％ＦＢＳ）中でインキュベートした。

図１８Ｂは、プロドラッグとしてＣＰＡまたはＩＦＡのいずれかを用いる、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ細胞対９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞のバイスタンダー細胞傷害性の比較を示す。実験設計は、最終薬物濃度が０．６７ｍＭであることを除いて、図１８Ａと同じである。両方のパネルに示したデータは、下部チャンバにおける９Ｌ／ｐＢａｂｅバイスタンダー細胞の生存度に対応する。

【図１９Ａ】　図１９Ａ～１９Ｄは、９Ｌ／ｐＢａｂｅ、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ、および９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ固形腫瘍を保有する重症複合免疫不全（ｓｃｉｄ）マウスにおける腫瘍増殖遅延アッセイの結果を示すグラフである。右脇腹において９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ腫瘍（図１９Ａ）または９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ腫瘍（図１９Ｃ）のいずれかをまた保有するｓｃｉｄマウスの左脇腹で増殖する、９Ｌ／ｐＢａｂｅ腫瘍の増殖におけるＣＰＡ処置の効果を示す。これらの同じマウスにおける、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ（図１９Ｂ）または９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダク

ターゼ腫瘍（図１９Ｄ）の増殖におけるＣＰＡの効果もまた示す。腫瘍面積を、ベルニエカリパスで１週間２回測定した。各パネルにおけるＸ軸上の矢印は、実施例２の「材料および方法」節において記載するように、ＣＰＡが１５０ｍｇ／ｋｇでの腹腔内（ｉ．ｐ．）注射によって与えられる日を示す。示したデータは、処置群あたりｎ＝４腫瘍についての平均腫瘍面積（mm^2）±ＳＥＭである。ｎ＝４（群当たりの初期マウス数）からｎ＝３、２、または１へと残存マウスの数がより早くに減少することによって示されるように、ＣＰＡで処置していないマウスは、ＣＰＡ処置したマウスより早期に死亡した。白丸は、ＣＰＡ処置したマウスを示す；黒丸は生理食塩水コントロールを示す。

【図１９Ｂ】　図１９Ａ～１９Ｄは、９Ｌ／ｐＢａｂｅ、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ、および９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ固形腫瘍を保有する重症複合免疫不全（ｓｃｉｄ）マウスにおける腫瘍増殖遅延アッセイの結果を示すグラフである。右脇腹において９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ腫瘍（図１９Ａ）または９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ腫瘍（図１９Ｃ）のいずれかをまた保有するｓｃｉｄマウスの左脇腹で増殖する、９Ｌ／ｐＢａｂｅ腫瘍の増殖におけるＣＰＡ処置の効果を示す。これらの同じマウスにおける、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ（図１９Ｂ）または９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ腫瘍（図１９Ｄ）の増殖におけるＣＰＡの効果もまた示す。腫瘍面積を、ベルニエカリパスで１週間２回測定した。各パネルにおけるＸ軸上の矢印は、実施例２の「材料および方法」節において記載するように、ＣＰＡが１５０ｍｇ／ｋｇでの腹腔内（ｉ．ｐ．）注射によって与えられる日を示す。示したデータは、処置群あたりｎ＝４腫瘍についての平均腫瘍面積（mm^2）±ＳＥＭである。ｎ＝４（群当たりの初期マウス数）からｎ＝３、２、または１へと残存マウスの数がより早くに減少することによって示されるように、ＣＰＡで処置していないマウスは、ＣＰＡ処置したマウスより早期に死亡した。白丸は、ＣＰＡ処置したマウスを示す；黒丸は生理食塩水コントロールを示す。

【図１９Ｃ】　図１９Ａ～１９Ｄは、９Ｌ／ｐＢａｂｅ、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ、および９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ固形腫瘍を保有する重症複合免疫不全（ｓｃｉｄ）マウスにおける腫瘍増殖遅延アッセイの結果を示すグラフである。右脇腹において９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ腫瘍（図１９Ａ）または９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ腫瘍（図１９Ｃ）のいずれかをまた保有するｓｃｉｄマウスの左脇腹で増殖する、９Ｌ／ｐＢａｂｅ腫瘍の増殖におけるＣＰＡ処置の効果を示す。これらの同じマウスにおける、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ（図１９Ｂ）または９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ腫瘍（図１９Ｄ）の増殖におけるＣＰＡの効果もまた示す。腫瘍面積を、ベルニエカリパスで１週間２回測定した。各パネルにおけるＸ軸上の矢印は、実施例２の「材料および方法」節において記載するように、ＣＰＡが１５０ｍｇ／ｋｇでの腹腔内（ｉ．ｐ．）注射によって与えられる日を示す。示したデータは、処置群あたりｎ＝４腫瘍についての平均腫瘍面積（mm^2）±ＳＥＭである。ｎ＝４（群当たりの初期マウス数）からｎ＝３、２、または１へと残存マウスの数がより早くに減少することによって示されるように、ＣＰＡで処置していないマウスは、ＣＰＡ処置したマウスより早期に死亡した。白丸は、ＣＰＡ処置したマウスを示す；黒丸は生理食塩水コントロールを示す。

【図１９Ｄ】　図１９Ａ～１９Ｄは、９Ｌ／ｐＢａｂｅ、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ、および９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ固形腫瘍を保有する重症複合免疫不全（ｓｃｉｄ）マウスにおける腫瘍増殖遅延アッセイの結果を示すグラフである。右脇腹において９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ腫瘍（図１９Ａ）または９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ腫瘍（図１９Ｃ）のいずれかをまた保有するｓｃｉｄマウスの左脇腹で増殖する、９Ｌ／ｐＢａｂｅ腫瘍の増殖におけるＣＰＡ処置の効果を示す。これらの同じマウスにおける、９Ｌ／２Ｂ６／レダクターゼ（図１９Ｂ）または９Ｌ／２Ｃ１８－Ｍｅｔ／レダクターゼ腫瘍（図１９Ｄ）の増殖におけるＣＰＡの効果もまた示す。腫瘍面積を、ベルニエカリパスで１週間２回測定した。各パネルにおけるＸ軸上の矢印は、実施例２の「材料および方法」節において記載するように、ＣＰＡが１５０ｍｇ／ｋｇでの腹腔内（ｉ．ｐ．）注射によって与えられる日を示す。示したデータは、処置群あたりｎ＝４腫瘍についての平均腫瘍面積（mm^2）±ＳＥＭである。ｎ＝４（群当たりの初期マウス数）からｎ＝

３、２、または１へと残存マウスの数がより早くに減少することによって示されるように、ＣＰＡで処置していないマウスは、ＣＰＡ処置したマウスより早期に死亡した。白丸は、ＣＰＡ処置したマウスを示す；黒丸は生理食塩水コントロールを示す。

【図２０Ａ】　図２０Ａおよび２０Ｂは、ヒトＰ４５０レダクターゼ遺伝子（ｈＲＥＤ）のレトロウイルス形質導入が、酸素正常状態培養条件下（図２０Ａ）および低酸素性培養条件下（図２０Ｂ）の両方で、Ｐ４５０　２Ｂ６遺伝子で形質導入した培養９Ｌ神経膠肉腫細胞に対するＣＰＡの細胞傷害性を増強することを示すグラフである。細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、そして漸増濃度のＣＰＡで４日間処理した。薬物なしのコントロールと比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製についての平均±ＳＤとして示す。

【図２０Ｂ】　図２０Ａおよび２０Ｂは、ヒトＰ４５０レダクターゼ遺伝子（ｈＲＥＤ）のレトロウイルス形質導入が、酸素正常状態培養条件下（図２０Ａ）および低酸素性培養条件下（図２０Ｂ）の両方で、Ｐ４５０　２Ｂ６遺伝子で形質導入した培養９Ｌ神経膠肉腫細胞に対するＣＰＡの細胞傷害性を増強することを示すグラフである。細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、そして漸増濃度のＣＰＡで４日間処理した。薬物なしのコントロールと比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製についての平均±ＳＤとして示す。

【図２１】　図２１は、酸素正常状態培養条件下で、９Ｌ／ｐＢａｂｅコントロール細胞、ならびにヒトＲＥＤおよび／またはＰ４５０　２Ｂ６をコードするレトロウイルスで形質導入した９Ｌ細胞に対する生還元性薬物ＴＰＺの細胞傷害性効果を示すグラフである。細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、そして漸増濃度のＴＰＺで４日間処理した。薬物なしのコントロールと比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製についての平均±ＳＤとして示す。

【図２２】　図２２は、Ｐ４５０　２Ｂ６および／またはヒトＲＥＤをコードするレトロウイルスで形質導入した９Ｌ腫瘍細胞に対する、低酸素性条件下（１％O_2）の漸増濃度のＴＰＺの細胞傷害性を示すグラフである。９Ｌ／ｐＢａｂｅ細胞をコントロールとして供した。細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、そして漸増濃度のＴＰＺで４日間処理した。薬物なしのコントロールと比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製についての平均±ＳＤとして示す。

【図２３】　図２３は、ラットＲＥＤと組み合わせて、Ｐ４５０　２Ｂ１を発現する９Ｌ腫瘍細胞に対するアドリアマイシンの増強された細胞傷害性を示すグラフを示す。示した９Ｌ、９Ｌ／２Ｂ１および９Ｌ／２Ｂ１／ＲＥＤクローナル細胞株（実施例１に記載する）を、示した薬物濃度で２日間アドリアマイシンで処理した。細胞傷害性を、実施例１の図２Ｂの下で記載したように、増殖阻害アッセイを用いて、５日間の連続培養後に測定した。増強された細胞傷害性は、Ｐ４５０発現と組み合わせて、約５倍のＲＥＤを過剰発現する２つの独立した細胞株（株ＰＲ１１およびＰＲ７；表１を参照のこと）において見られた。より緩やかな化学増感は、細胞株ＰＲ１の場合に見られ、ここでＲＥＤ過剰発現の程度は、わずか約２倍である（表１）。示したデータは、二回の平均である。

【図２４Ａ】　図２４Ａ、図２４Ｂ、および２４Ｃは、酸素正常状態培養条件（１９．６％O_2、５％CO_2）下で、漸増濃度のＣＰＡと組み合わせて、ＴＰＺ（示したように、５または１０μＭ）の細胞傷害性効果を示すグラフである。示したデータは、９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞（図２４Ａ）、９Ｌ／ｈＲＥＤ細胞（図２４Ｂ）、および９Ｌ／ｐＢａｂｅ（コントロール）細胞（図２４Ｃ）を用いて得られた。データを、腫瘍細胞の同じプールを用いて測定した、漸増濃度のＣＰＡ単独（すなわち、ＴＰＺの非存在下）の細胞傷害性に対して比較した。細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、次いで示した薬物濃度で４日間処理した。薬物なしのコントロール（すなわち、ＣＰＡおよびＴＰＺの非存在下）と比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製についての平均±ＳＤとして示す。

【図２４Ｂ】　図２４Ａ、図２４Ｂ、および２４Ｃは、酸素正常状態培養条件（１９．６

％O_2、５％CO_2）下で、漸増濃度のＣＰＡと組み合わせて、ＴＰＺ（示したように、５または１０μＭ）の細胞傷害性効果を示すグラフである。示したデータは、９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞（図２４Ａ）、９Ｌ／ｈＲＥＤ細胞（図２４Ｂ）、および９Ｌ／ｐＢａｂｅ（コントロール）細胞（図２４Ｃ）を用いて得られた。データを、腫瘍細胞の同じプールを用いて測定した、漸増濃度のＣＰＡ単独（すなわち、ＴＰＺの非存在下）の細胞傷害性に対して比較した。細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、次いで示した薬物濃度で４日間処理した。薬物なしのコントロール（すなわち、ＣＰＡおよびＴＰＺの非存在下）と比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製についての平均±ＳＤとして示す。

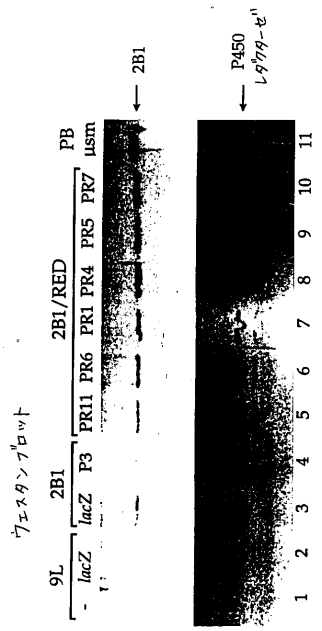
【図２４Ｃ】　図２４Ａ、図２４Ｂ、および２４Ｃは、酸素正常状態培養条件（１９．６％O_2、５％CO_2）下で、漸増濃度のＣＰＡと組み合わせて、ＴＰＺ（示したように、５または１０μＭ）の細胞傷害性効果を示すグラフである。示したデータは、９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞（図２４Ａ）、９Ｌ／ｈＲＥＤ細胞（図２４Ｂ）、および９Ｌ／ｐＢａｂｅ（コントロール）細胞（図２４Ｃ）を用いて得られた。データを、腫瘍細胞の同じプールを用いて測定した、漸増濃度のＣＰＡ単独（すなわち、ＴＰＺの非存在下）の細胞傷害性に対して比較した。細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、次いで示した薬物濃度で４日間処理した。薬物なしのコントロール（すなわち、ＣＰＡおよびＴＰＺの非存在下）と比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製についての平均±ＳＤとして示す。

【図２５Ａ】　図２５Ａ、２５Ｂ、および２５Ｃは、低酸素性培養条件（１％O_2、５％CO_2）下で、漸増濃度のＣＰＡと組み合わせて、ＴＰＺ（示したように０．５または１．５μＭ）の細胞傷害性効果を示すグラフである。示したデータは、９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞（図２５Ａ）、９Ｌ／ｈＲＥＤ細胞（図２５Ｂ）、および９Ｌ／ｐＢａｂｅ（コントロール）細胞（図２５Ｃ）を用いて得られた。データを、腫瘍細胞の同じプールを用いて測定した、漸増濃度のＣＰＡ単独（すなわち、ＴＰＺの非存在下）の細胞傷害性に対して比較した。細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、次いで示した薬物濃度で４日間処理した。薬物なしのコントロール（すなわち、ＣＰＡおよびＴＰＺの非存在下）と比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製についての平均±ＳＤとして示す。

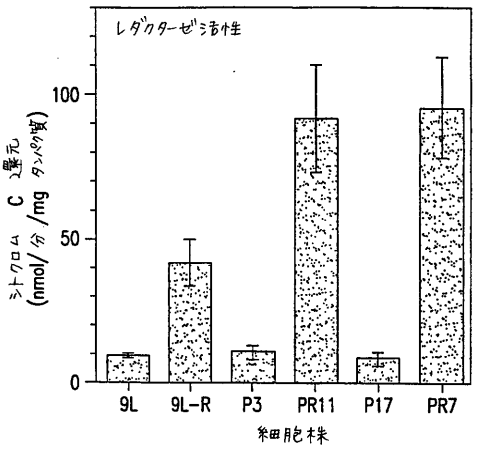
【図２５Ｂ】　図２５Ａ、２５Ｂ、および２５Ｃは、低酸素性培養条件（１％O_2、５％CO_2）下で、漸増濃度のＣＰＡと組み合わせて、ＴＰＺ（示したように０．５または１．５μＭ）の細胞傷害性効果を示すグラフである。示したデータは、９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞（図２５Ａ）、９Ｌ／ｈＲＥＤ細胞（図２５Ｂ）、および９Ｌ／ｐＢａｂｅ（コントロール）細胞（図２５Ｃ）を用いて得られた。データを、腫瘍細胞の同じプールを用いて測定した、漸増濃度のＣＰＡ単独（すなわち、ＴＰＺの非存在下）の細胞傷害性に対して比較した。細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、次いで示した薬物濃度で４日間処理した。薬物なしのコントロール（すなわち、ＣＰＡおよびＴＰＺの非存在下）と比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製についての平均±ＳＤとして示す。

【図２５Ｃ】　図２５Ａ、２５Ｂ、および２５Ｃは、低酸素性培養条件（１％O_2、５％CO_2）下で、漸増濃度のＣＰＡと組み合わせて、ＴＰＺ（示したように０．５または１．５μＭ）の細胞傷害性効果を示すグラフである。示したデータは、９Ｌ／２Ｂ６／ｈＲＥＤ細胞（図２５Ａ）、９Ｌ／ｈＲＥＤ細胞（図２５Ｂ）、および９Ｌ／ｐＢａｂｅ（コントロール）細胞（図２５Ｃ）を用いて得られた。データを、腫瘍細胞の同じプールを用いて測定した、漸増濃度のＣＰＡ単独（すなわち、ＴＰＺの非存在下）の細胞傷害性に対して比較した。細胞を、４８ウェルプレートにおいて４０００細胞／ウェルで播種し、次いで示した薬物濃度で４日間処理した。薬物なしのコントロール（すなわち、ＣＰＡおよびＴＰＺの非存在下）と比較した細胞増殖を、クリスタルバイオレット染色によって決定し、そしてｎ＝３複製についての平均±ＳＤとして示す。

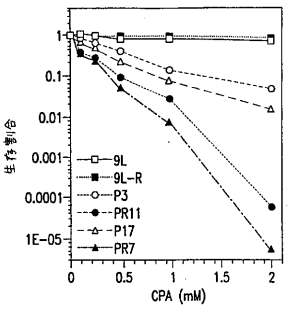
【図１Ａ】



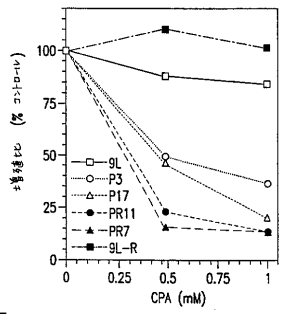
【図１Ｂ】



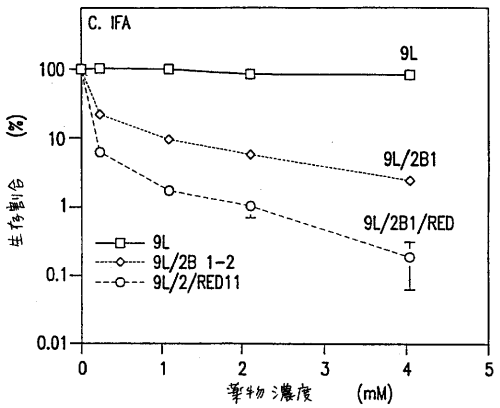
【図２Ａ】



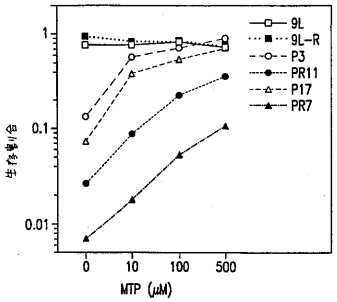
【図２Ｂ】



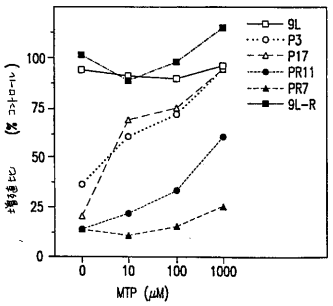
【図２Ｃ】



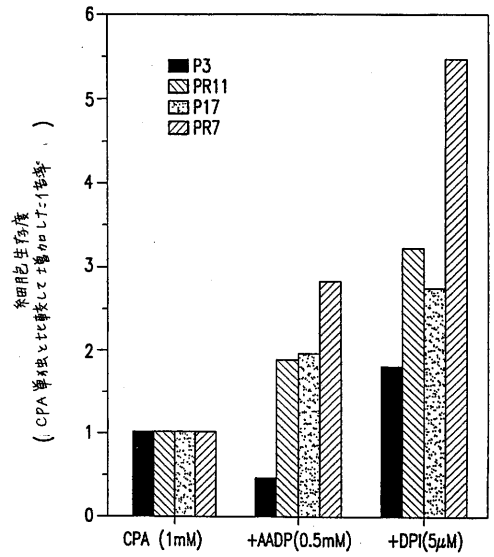
【図３Ａ】



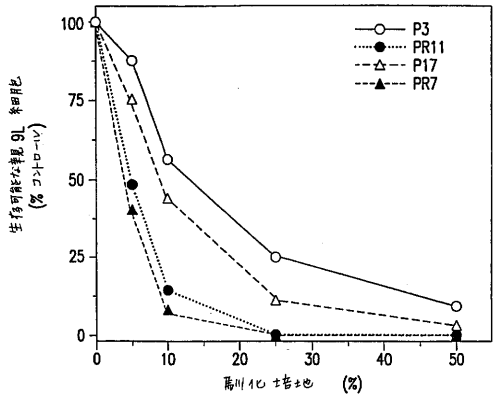
【図３Ｂ】



【図４】



【図５】



【図６Ａ】

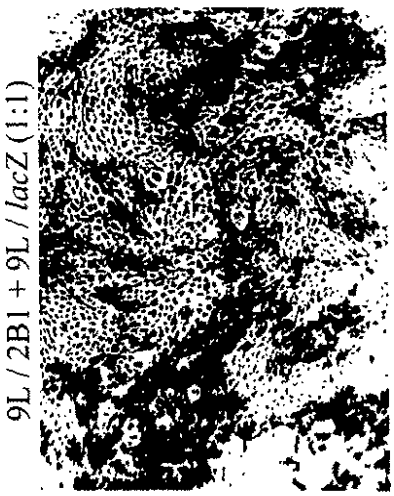


FIG.6A

【図６Ｂ】

FIG.6B

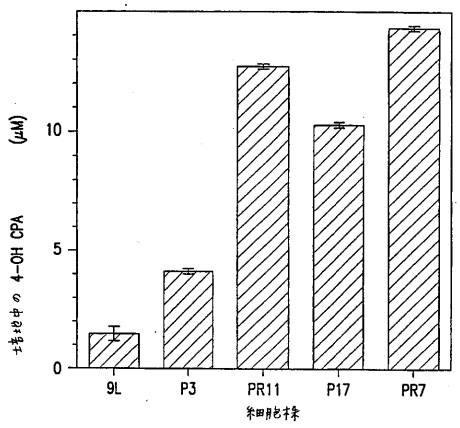
【図６Ｃ】

FIG.6C

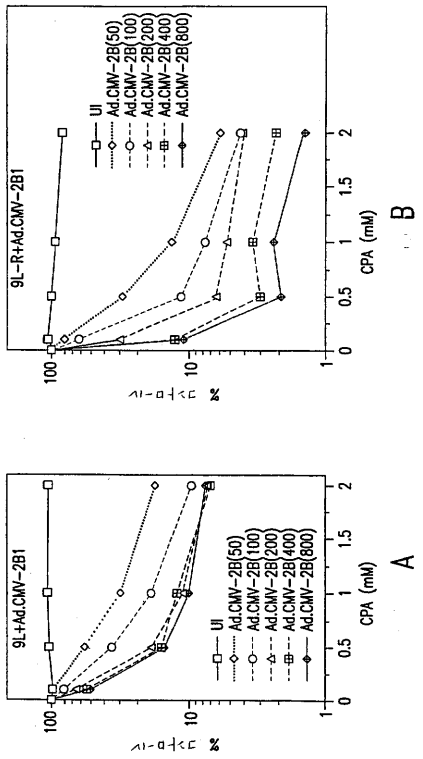
【図６Ｄ】

FIG.6D

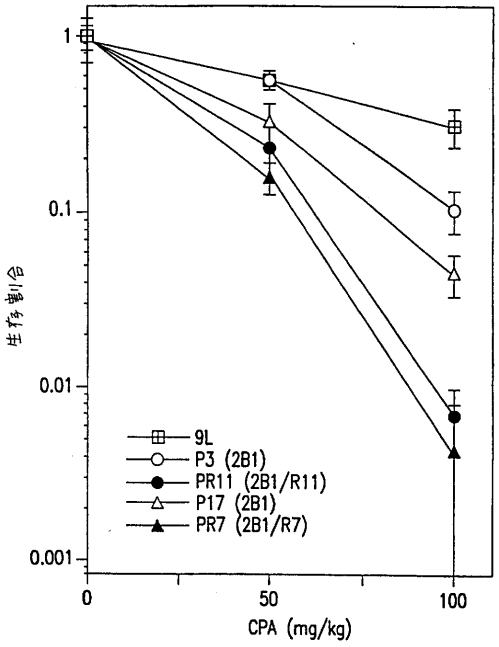
【図７】



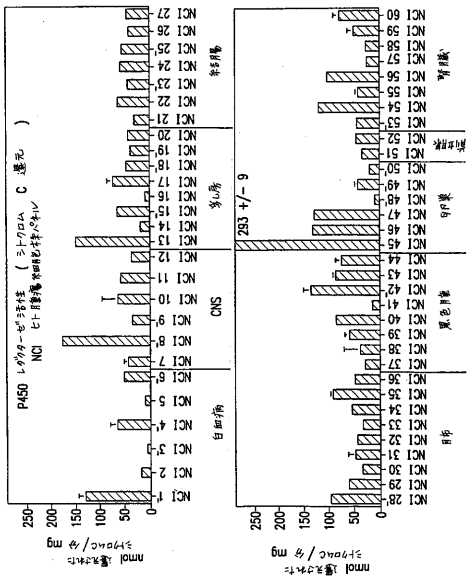
【図８】



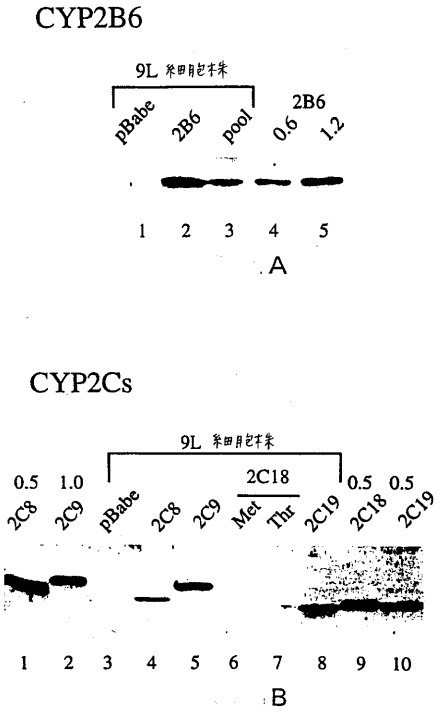
【図９】



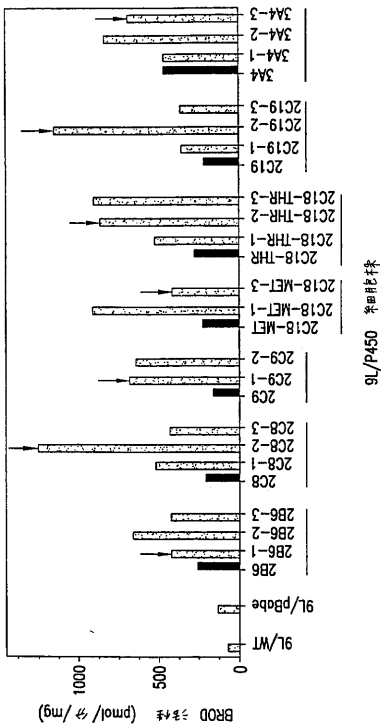
【図１０】



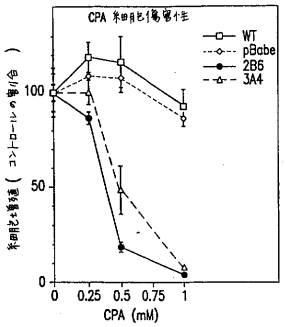
【図１１】



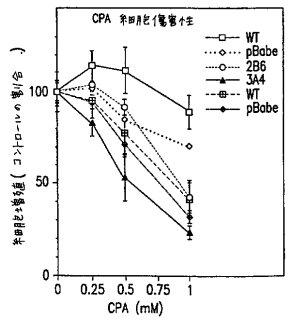
【図１２】



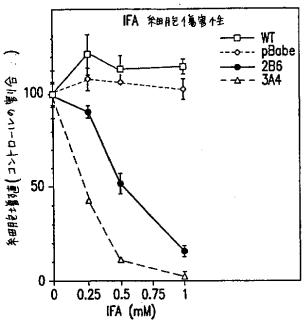
【図１３Ａ】



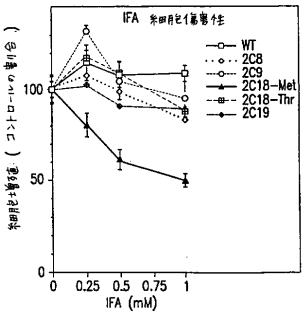
【図１３Ｂ】



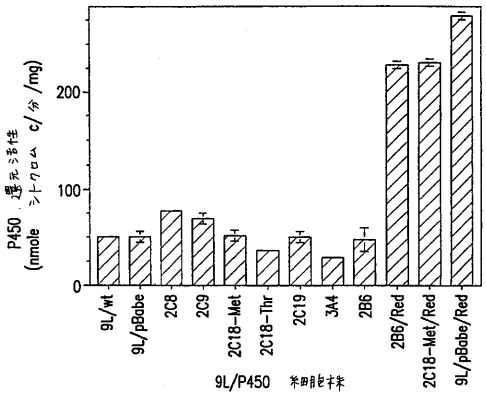
【図１３Ｃ】



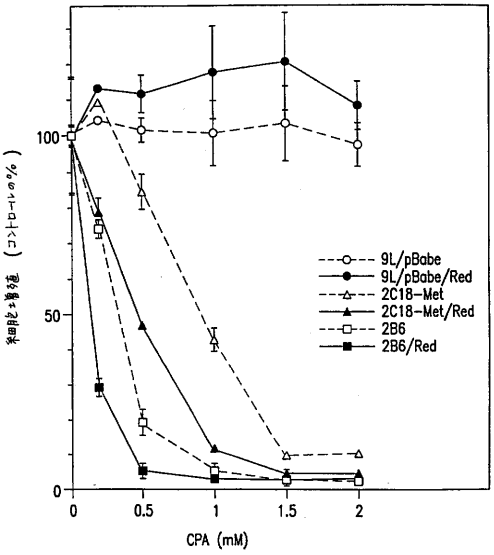
【図１３Ｄ】



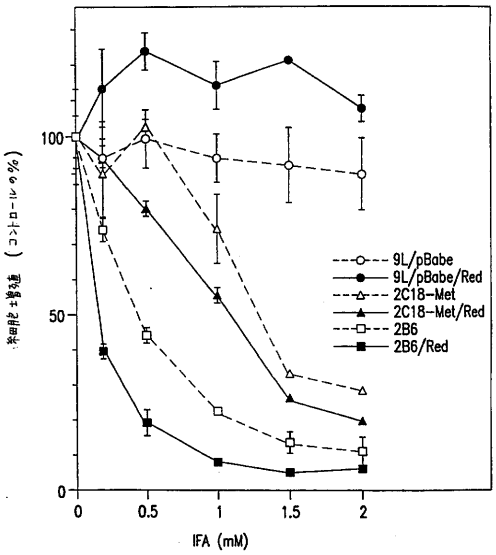
【図１４】



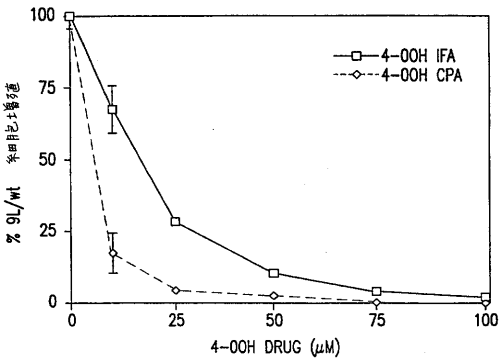
【図１５Ａ】



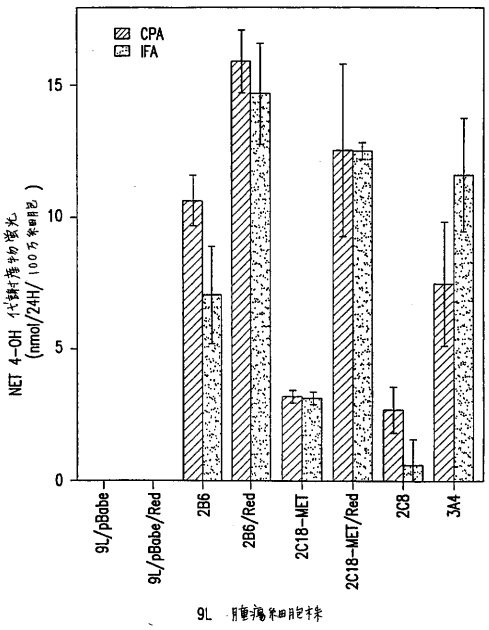
【図１５Ｂ】



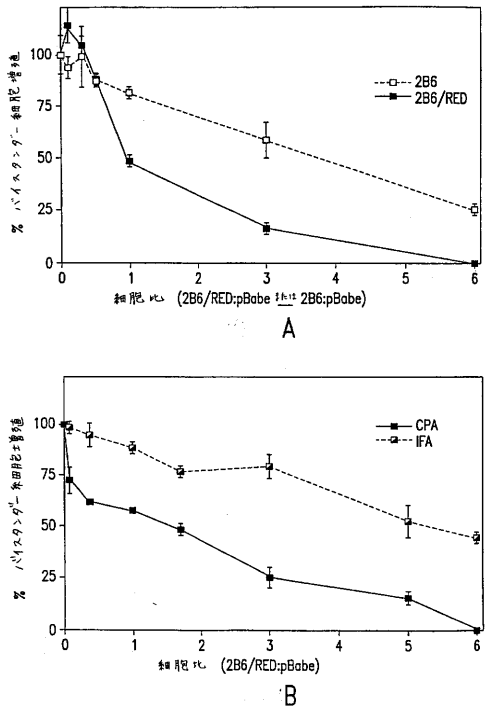
【図１６】



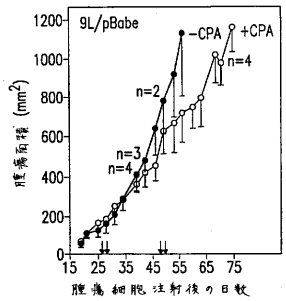
【図１７】



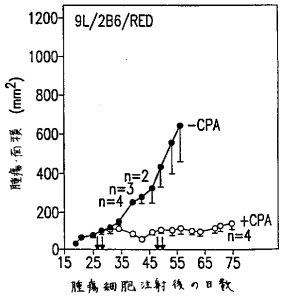
【図１８】



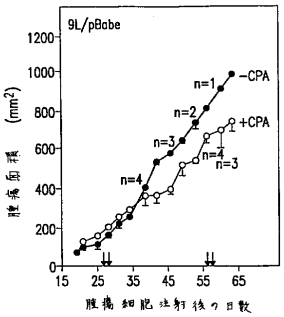
【図１９Ａ】



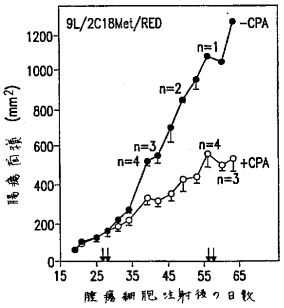
【図１９Ｂ】



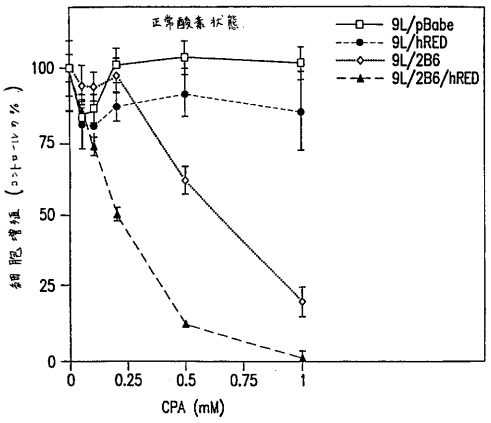
【図１９Ｃ】



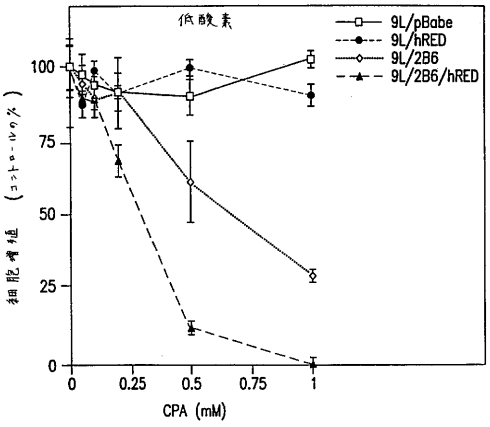
【図１９Ｄ】



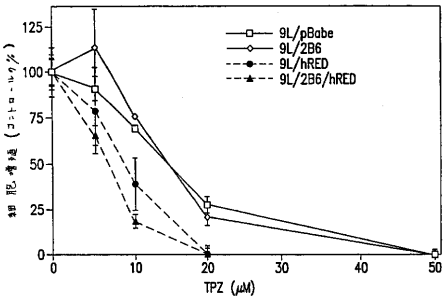
【図２０Ａ】



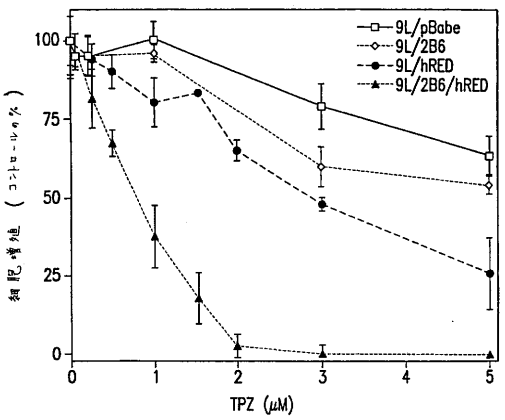
【図２０Ｂ】



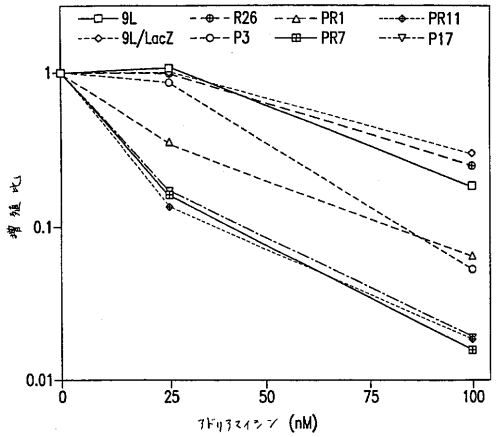
【図２１】



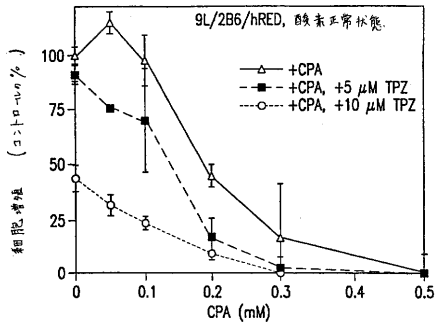
【図２２】



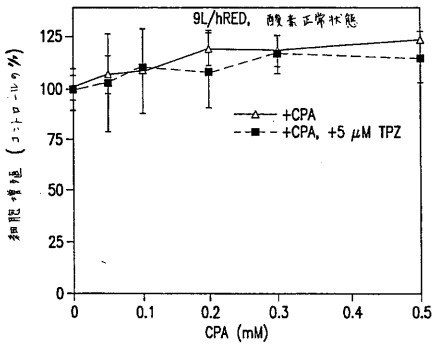
【図２３】



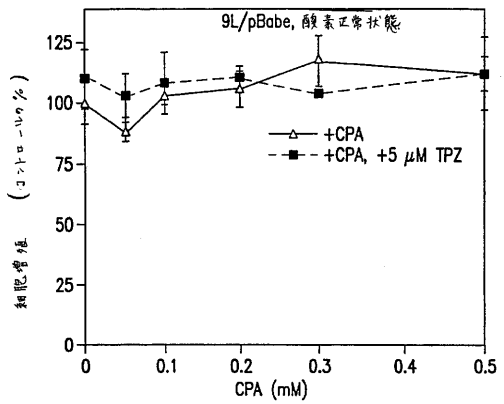
【図２４Ａ】



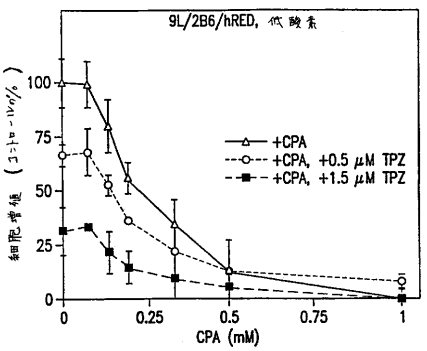
【図２４Ｂ】



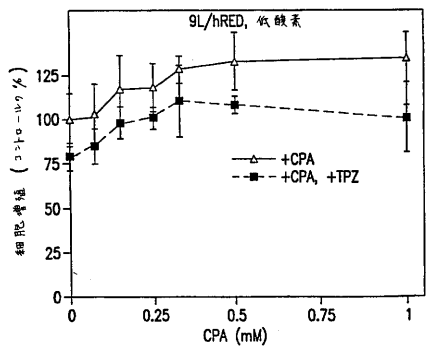
【図２４Ｃ】



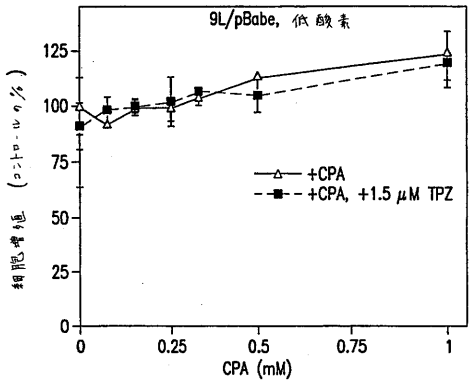
【図２５Ａ】



【図２５Ｂ】



【図２５Ｃ】


9L/pBabe, 低酸素
125
100
75
50
25
0
0
0.25
0.5
0.75
1
CPA (mM)
+CPA
+CPA, +1.5 μM TPZ

フロントページの続き

(72)発明者 ワックスマン, デイビッド ジェイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４５８, ニュートン, クレメンツ ロード ３０
(72)発明者 チェン, リン
アメリカ合衆国 ペンシルバニア １９４２２, ブルー ベル, オークマウント ドライブ ２０３

審査官 中野 あい

(56)参考文献 Cancer Res., 1995年, vol. 55, no. 3, p. 581-589
Cancer Res., 1996年, vol. 56, no. 6, p. 1331-1340
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 1996年, vol. 37, p. 340-341 (#2323)
Cancer Res., 1997年11月, vol. 57, no. 21, p. 4830-4837

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/90
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed