(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3874420号
(P3874420)
(45)発行日　平成19年1月31日(2007.1.31)　(24)登録日　平成18年11月2日(2006.11.2)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 9/10	(2006.01)	C12N	9/10	
C07H 19/16	(2006.01)	C07H	19/16	
C12Q 1/48	(2006.01)	C12Q	1/48	
A61P 31/12	(2006.01)	A61P	31/12	

請求項の数 18　(全 28 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-509251
(86)(22)出願日　平成6年9月14日(1994.9.14)
(65)公表番号　特表平9-502612
(43)公表日　平成9年3月18日(1997.3.18)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/010130
(87)国際公開番号　WO1995/007718
(87)国際公開日　平成7年3月23日(1995.3.23)
審査請求日　平成13年9月13日(2001.9.13)
(31)優先権主張番号　122,321
(32)優先日　平成5年9月14日(1993.9.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　506149885
ザ　ユーエイビー　リサーチ　ファウンディシャン
アメリカ合衆国　３５２９４－０１１１　アラバマ，バーミングハム，サウス　２０ス　ストリート　７０１，スウィート　１１２０，ザ　ユーナヴァーサティ　オブ　アラバマ　アト　バーミングハム，アドミナストレイシャン　ビルディング
(73)特許権者　506149863
サザン　リサーチ　インスタテュート
アメリカ合衆国　３５２０５　アラバマ，バーミングハム，ナインス　アヴァニュー　サウス　２０００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト悪性腫瘍のプリンヌクレオシドホスホリラーゼによる遺伝子治療法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
(a)プリンアナログ基質を切断して細胞毒性プリンアナログをつくりだす酵素と、そして
(b)上記酵素によって切断された場合に、標的細胞を殺すのに有効な量の上記プリンアナログ基質と
を含む標的哺乳動物細胞致死用組成物であって、
前記酵素が、大腸菌ＰＮＰであり、前記プリンアナログ基質が、９－(β－Ｄ－２－デオキシエリスロペントフラノシル)－６－メチルプリン、アラビノフラノシル－２－フルオロアデニン及び２－フルオロ－２'－デオキシアデノシンで構成されるグループから選択されることを特徴とする組成物。
【請求項２】
標的細胞が腫瘍細胞である請求項１の組成物。
【請求項３】
標的細胞がウィルスに感染した細胞である請求項１の組成物。
【請求項４】
標的細胞が、プリンアナログ基質を切断する大腸菌ＰＮＰに加えて、治療用蛋白質をつくりだすように操作されている請求項１の組成物。
【請求項５】
大腸菌ＰＮＰが、抗体に接合されることによって、細胞を標的とする請求項１の組成物。
【請求項６】

大腸菌ＰＮＰが細胞に提供された遺伝子によってコードされる請求項１の組成物。
【請求項７】
大腸菌ＰＮＰをコードする遺伝子が組織特異性プロモーターまたは構成的プロモーターに操作的に結合される請求項６の組成物。
【請求項８】
大腸菌ＰＮＰをコードする遺伝子がチロシナーゼ遺伝子プロモーターに操作的に結合される請求項７の組成物。
【請求項９】
大腸菌ＰＮＰをコードする遺伝子が、ＳＶ40初期プロモーター、モロニーマウス肉腫ウィルスＬＴＲ、マウス乳がんウィルスＬＴＲおよびサイトメガロウィルス初期プロモーターで構成されるグループから選択されるプロモーターに操作的に結合される請求項７の組成物。
【請求項１０】
遺伝子がベクターで提供される請求項６の組成物。
【請求項１１】
遺伝子がポリマー性薄膜、ゲル、微小粒子およびリポソームを含むキャリア分子により提供される請求項６の組成物。
【請求項１２】
(a)プリンアナログ基質を切断して細胞毒性プリンアナログをつくりだす酵素、または上記酵素をコードする遺伝子を分離するステップと、
(b)上記プリンアナログ基質が上記酵素によって切断された場合に、標的細胞を殺すのに有効な量のプリンアナログ基質を選択するステップと
を含む標的哺乳動物細胞致死用組成物を製造する方法であって、
前記酵素が大腸菌ＰＮＰであり、前記プリンアナログ基質が、９－(β－Ｄ－２－デオキシエリスロペントフラノシル)－６－メチルプリン、アラビノフラノシル－２－フルオロアデニン及び２－フルオロ－２'－デオキシアデノシンで構成されるグループから選択されることを特徴とする方法。
【請求項１３】
標的細胞が腫瘍細胞である請求項１２の方法。
【請求項１４】
標的細胞がウィルスに感染した細胞である請求項１２の方法。
【請求項１５】
標的細胞が、プリンアナログ基質を切断する大腸菌ＰＮＰに加えて、治療用蛋白質をつくりだすように操作される請求項１２の方法。
【請求項１６】
さらに大腸菌ＰＮＰをコードする遺伝子を組織特異性プロモーターまたは構成的プロモーターに操作的に結合するステップを含んでいる請求項１２の方法。
【請求項１７】
大腸菌ＰＮＰをコードする遺伝子がチロシナーゼ遺伝子プロモーターに操作的に結合する請求項１６の方法。
【請求項１８】
大腸菌ＰＮＰをコードする遺伝子をＳＶ40初期プロモーター、モロニーマウス肉腫ウィルスＬＴＲ、マウス乳がんウィルスＬＴＲおよびサイトメガロウィルス初期プロモーターで構成されるグループから選択されるプロモーターに操作的に結合する請求項１６の方法。
【発明の詳細な説明】
本発明は癌治療の分野に関するものであり、特に、腫瘍細胞内に毒性化合物をつくり出すことによって、腫瘍細胞を特異的に殺すための組成物および方法に関するものである。
発明の背景
遺伝子伝達の非効率性は、局外者致死の不十分性と共に、ヒトの悪性腫瘍のための毒素で媒介された遺伝子治療の発展において、２つの重要な概念上の障害となっている。

遺伝子伝達は、ヒトの悪性腫瘍のための新しい治療法の開発における有益な手段に急速になりつつある。組織適合抗原、サイトカインあるいは成長因子(例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＧＭＣＳＦ)の腫瘍細胞発現は動物モデルにおける悪性腫瘍細胞の免疫媒介の除去を増強させるようであり、同原骨髄細胞内のｐ－グリコプロテインなどのケモ－プロテクタント遺伝子生成物の発現が、必要な手段を講じなければ致死量となる化学治療剤の投与後の骨髄毒性を抑制するための手段として、現在、研究の対象となっている(アンダーソン(W.F.Anderson),Science,256:808－813(1992);ミラー(A.D.Miller),Nature,357:455－460(1992);フリードマン(T.Friedmann),Science,244:1275－1281(1989);トンプソン(L.Thompson),Science,358:744－746(1992);テッパーら(R.I.Tepper,et al.),Cell,57:503－513(1989);ナベルら(G.J.Nabel,A.et al.),Hum.Gene Therapy３:399－410(1992);ソレンティノら(B.P.Sorrentino,et al.),Science,257(5066);99－103(1992))。

理論的には、遺伝子伝達を用いた腫瘍細胞致死に関する最も直接的なメカニズムは、腫瘍細胞内部での細胞毒性遺伝子生成物の選択的な発現である。しかしながら、組換え酵素あるいは毒素で、非特定腫瘍細胞内に高レベルの毒性を作り出す上で有用であることが分かっているものはない。シュードモナス外毒素Ａ、ジフテリア毒素、およびリシンなどの古典的な酵素毒素は、それらの酵素がその内部で発現された細胞だけを殺すので、上に述べたような目的のためには有用でないように思われ、また、現在の段階で利用できる遺伝子伝達ベクターはいずれも、上に述べた組換え酵素を利用するために十分に高い割合の腫瘍細胞に対して遺伝子伝達を行うことはできない(アンダーソン(W.F.Anderson),Science,256:808－813(1992);ミラー(A.D.Miller),Nature,357:455－460(1992);フリードマン(T.Friedmann),Science,244:1275－1281(1989);トンプソン(L.Thompson),Science,358:744－746(1992);テッパーら(R.I.Tepper,et al.),Cell,57:503－513(1989);ナベルら(G.J.Nabel,A.et al.),Hum.Gene Therapy３:399－410(1992);ソレンティノら(B.P.Sorrentino,et al.),Science,257(5066);99－103(1992);ヒューストン(L.L.Houston),フランケル編(A.E.Frankel,Ed.)イムノトキシン(Immunotoxins)(Kluwer Academic Publishers,Boston)pp.１－７(1988);ロベルタス(J.D.Robertus),同書pp.11－23;R.コリアー(J.Collier),同書pp.25－35(1988);マーフィー(J.R.Murphy),Current Topics in Microbiology and Immunology,118:235－251(1985);マックスウエルら(I.H.Maxwell,et al.),Cancer Research,46:4660－4664(1986);バッグショー(K.D.Bagshawe),J.Cancer,60:275－281(1989))。

腫瘍細胞を選択的に殺すために開発されているもうひとつの基本的な方針は複製腫瘍細胞にＨＳＶ　ｄＴhdキナーゼ遺伝子を伝達、発現させ、次に、ガンシクロビルで処理するステップを含んでいる(ラムら(Z.Ram,et al.),Cancer Res.,53:83－88(1993);モールトン(F.L.Moolten),Cancer Res.,46:5276－5281(1986);モールトン及びウェル(F.L.Moolten,and J.M.Well),J.Natl.Cancer Inst.,82:297－300(1990);フーバーら(B.E.Huber,et al.),Proc.Aacd.Sci.USA,88:8039－8043(1991);タカミヤら(Y.Takamiya,et al.),J.Neuroscience Res.,33:493－503(1992);カルバーら(K.W.Culver,et al.),Science,256:1550－1552(1992))。ガンシクロビルはＨＳＶ　ｄＴhdキナーゼで容易にリン酸化され、そのリン酸化代謝物はその細胞に対して毒性がある。正常なヒトの細胞では、ガンシクロビルのリン酸化は非常にわずかしか起こらない。ＨＳＶ　ｄＴhdキナーゼを発現するこれらの細胞だけがガンシクロビルに対して感受性を持つべきであるが(そのリン酸化代謝物は細胞膜を簡単には通過しない)、インビトロおよびインビボの実験は、ＨＳＶ　ｄＴhdキナーゼ遺伝子を含む細胞のパーセンテージに基づいて予想されるよりも多い数の腫瘍細胞がガンシクロビル処理で殺されることを示している。こうした予想外の結果は“局外者効果”あるいは“代謝協同”と呼ばれている。ガンシクロビルのリン酸化代謝物がギャップ結合を通じて、１つの細胞から別の細胞に送られるのではないかと考えられる(ラムら(Z.Ram,et al.),Cancer Res.,53:83－88(1993);モールトン(F.L.Moolten),Cancer Res.,46:5276－5281(1986);モールトン及びウェル(F.L.Moolten,and J.M.Well),J.Natl.Cancer Inst.,82:297－300(1990);フーバーら(B.E.Huber,et al.),Proc.Aacd.Sci.USA,88:8039－8043(1991);タカミヤら(Y.Takamiya,et al.),J.Neuroscience Res.,33:493－503(1992);カルバーら(K.W.Culver,et al.),Science,256:1550－1552(1992);フーパー及びスバックシャープ(M.L.Hooper a

nd J.H.Subak－Sharpe),Int.Rev.Cytol.,69:45－104(1981))。しかしながら、ガンシクロビルモノホスフェートなどのようなヌクレオシドモノホスフェートが細胞溶解によって培地内に放出されたとしても、代謝物は隣接する細胞に入り込むことはできないであろうし、ホスホターゼによってヌクレオシドが劣化(不活性化)されてしまう可能性がある。

局外者効果はＨＳＶ　ｄＴｈｄキナーゼを用いた初期の実験でも観察されているが、現在用いられているすべての遺伝子伝達ビヒクルに存在する一定の制約は、こうした方法でヒトの腫瘍をうまく措置するためにはずっと大きな局外者効果が必要であることを意味している。現在の局外者毒性モデルに伴う困難の１つは、細胞膜を容易に通過しない代謝物による局外者毒性は遺伝子伝達(例えば、トランスフェクションや形質導入等)の効率の低さを克服するのには十分ではないということである。現在知られている遺伝子治療システムにおいては、インビボでも形質導入および／またはトランスフェクションは一般的に低い。ヒトにおける脳腫瘍を措置するための現在の処置法の１つはＨＳＶ　ｄＴｈｄキナーゼをレトロウィルスによって伝達し、次にガンシクロビルを投与する方法が用いられる。ラットモデルでは、こうした方法でＨＳＶ　ｄＴｈｄを用いた場合、腫瘍が退縮することが観察されている(カルバーら(Culver,et al.),Science,256:1550－1552(1992))。これまでのところ、ＨＳＶ　ｄＴｈｄキナーゼによる方法はヒトでは十分でないことが分かっており、これは一部には(１)ＨＳＶ　ｄＴｈｄキナーゼによる局外者毒性の不十分さ、および(２)ＨＳＶ　ｄＴｈｄキナーゼをガンシクロビルと共に用いた場合、細胞致死が細胞分割だけによって行われること、などを理由としている可能性がある。

同様に、５－フルオロシトシンを５－フルオロウラシルに転化する大腸菌シトシンデアミナーゼも、かなりの局外者効果をもたらす上で有効であることが報告されている(フーバーら(Huber,B.E.,et al.),Ann.N.Y.Acad.Sci.,716:104－114(1994))。

他の無毒性の酵素(例えば、ＨＳＶ　ｄＴｈｄキナーゼ、シトシンデアミナーゼ)によるプロドラッグ活性化は、リシン、ジフテリア毒素、あるいはシュードモナス外毒素などの直接毒性遺伝子より利点を有している。こうした利点には、(１)細胞致死の滴定、(２)プロドラッグまたは組換え酵素発現のいずれかのレベルを調節することにより治療係数の最適化、そして(３)プロドラッグの投与を不必要とすることにより毒性の遮断などである(アンダーソン(W.F.Anderson),Science,256:808－813(1992);ミラー(A.D.Miller),Nature,357:455－460(1992);フリードマン(T.Friedmann),Science,244:1275－1281(1989);トンプソン(L.Thompson),Science,358:744－746(1992);テッパー、パッテンゲイル、リーダー(R.I.Tepper,P.K.Pattengale,P.Leder),Cell,57:503－513(1989);ナベルら(G.J.Nabel,A.et al.),Hum.Gene Therapy３:399－410(1992);ソレンティノら(B.P.Sorrentino,et al.),Science,257(5066);99－103(1992);ヒューストン(L.L.Houston),フランケル編(A.E.Frankel,Ed.)イムノトキシン(Immunotoxins)(Kluwer Academic Publishers,Boston)pp.１－７(1988);ロベルタス(J.D.Robertus),同書pp.11－23;コリアー(R.J.Collier),同書pp.25－35(1988);マーフィー(J.R.Murphy),Current Topics in Microbiology and Immunology,118:235－251(1985);マックスウェルら(I.H.Maxwell,et al.),Cancer Research,46:4660－4664(1986);バッグショー(K.D.Bagshawe),J.Cancer,60:275－281(1989);ラムら(Z.Ram,et al.),Cancer Res.,53:83－88(1993);モールトン(F.L.Moolten),Cancer Res.,46:5276－5281(1986);モールトンおよびウェル(F.L.Moolten and J.M.Well),J.Natl.Cancer Inst.,82:297－300(1990);フーバーら(B.E.Huber,et al.),Proc.Acad.Sci.USA,88:8039－8043(1991);タカミヤら(Y.Takamiya,et al.),J.Neuroscience Res.,33:493－503(1992);カルバーら(K.W.Culver et al.)、Science,256:1550－1552(1992);センター(P.D.Senter),FASEB.J.,４:188－193(1990);センターら(P.D.Senter et al),Cancer Research,49:5789－5792(1989);センターら(P.D.Senter et al),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:4842－4846(1988))。しかしながら、他の組換え毒性遺伝子と同様、ＨＳＶ　ｄＴｈｄキナーゼによる遺伝子伝達を行いガンシクロビルで措置するステップは、局外者細胞を殺すために行われていないし、インビボで幅広い局外者毒性をもたせるためにも行われていないようである。

腫瘍細胞内に毒性代謝物をつくるためのＨＳＶ　ｄＴｈｄキナーゼあるいはシトシンデアミナーゼを使用に伴うさらに別の問題は、ＨＳＶ　ｄＴｈｄキナーゼによって活性化される薬

剤(ガンシクロビルなど)およびシトシンデアミナーゼによって活性化される薬剤(５－フルオロシトシン)がＤＮＡを合成する細胞だけを殺すということである(バルザリニら(Balzarini,et al.)、J.Biol.Chem.,268:6332－6337(1993)並びにブルース及びメーカー(Bruce and Meeker),J.Natl.Cancer Inst.,38:401－405(1967))。かなりの数のトランスフェクトされない細胞が殺されるとしても、これらの薬剤で非分割腫瘍細胞を殺そうとは思わないであろう。

したがって、非効率な細胞伝達、細胞複製依存致死、および細胞間の低毒性分散などの問題を克服できる毒性遺伝子治療方法を開発する必要性がある。本発明は、細胞膜を通じて自由に分散し、分裂するタイプと分裂しないタイプの両方の隣接細胞を殺すことができる細胞毒性プリンアナログをつくりだすことができるシステムをつくりだすことによって、こうした必要性を満たすものである。

発明の要約

(ａ)基質プリンアナログヌクレオシドからプリンアナログを放出させる適切なプリンアナログヌクレオシド切断酵素をコードする核酸で標的哺乳動物細胞をトランスフェクトまたは形質導入するか、或いは、そうした酵素を標的細胞に直接与えるステップと、(ｂ)上記プリンアナログヌクレオシド切断酵素を発現する、あるいはそれを与えられた標的細胞を基質と接触させて、その酵素が毒性プリン塩基アナログをつくりだし、それによって標的細胞を殺させると同時に、上記切断酵素を発現しない、あるいは含んでいない局外者細胞も殺させるようにするステップを含む、複製、あるいは非複製、トランスフェクトないし形質導入された標的哺乳動物および局外者細胞を殺すための方法および組成物である。細胞を殺すための本方法においては、非ヒトプリンアナログヌクレオシドホスホリラーゼは大腸菌プリンアナログヌクレオシドホスホリラーゼ(大腸菌ＰＮＰ)であってもよい。この方法では、基質９－(β－Ｄ－２－デオキシエリスロペントフラノシル)－６－メチルプリン(ＭｅＰ－ｄＲ)などの、プリンアナログヌクレオシドアナログである基質を用いることができる。

非ヒト、あるいは哺乳動物細胞内の遺伝子的に修飾されたヒトＰＮＰをコードする分離された核酸も提供されるし、非ヒト、あるいは遺伝子的に修飾されたヒトプリンアナログヌクレオシドホスホリラーゼをコードする核酸を含む真核性伝達ベクターも提供されている。このベクターはＰＮＰあるいはその他の適切なプリンアナログヌクレオシド切断酵素を発現することができる宿主内で存在することができる。

【図面の簡単な説明】

図１は、Ｔ84結腸腫瘍細胞を10，20あるいは40μｇ(それぞれ図１の１，２および３に対応)の大腸菌ＰＮＰまたはＬａｃＺ遺伝子を含んでいるｃＤＮＡをＳＶ－40初期プロモーターの転写コントロール下(それぞれ、ＳＶ－ＰＮＰおよびＳＶ－ＬａｃＺ)でトランスフェクトするのに用いられるＤＯＴＭＡ－ＤＯＰＥリポゾームの毒性、及び、ＭｅＰ－ｄＲ(160μＭ)を、ＰＮＰ遺伝子をコードするＴ84をトランスフェクトされた細胞に加えた場合(ＰＮＰ＋ＭｅＰ－ｄＲ)の追加毒性を示している。ＳＶ－ＰＮＰ構成体でトランスフェクトされた細胞をＭｅＰ－ｄＲの存在下(ＰＮＰ＋ＭｅＰ－ｄＲ)、およびＭｅＰ－ｄＲが存在しない条件の下(ＰＮＰ)で処理した。ＳＶ－ＬａｃＺ構成体でトランスフェクトされた細胞はＭｅＰ－ｄＲの存在下(ＬａｃＺ＋ＭｅＰ－ｄＲ)、およびＭｅＰ－ｄＲが存在しない条件の下(ＬａｃＺ)で処理した。トランスフェクトされていない細胞はＭｅＰ－ｄＲの存在下(ＭｅＰ－ｄＲ)、およびＭｅＰ－ｄＲの存在しない条件の下(コントロール)で処理した。

図２ａ～ｄは、黒色腫細胞Ｍｅｌ－１およびＭｅｌ－21(図２ａ)内でのヒトチロシナーゼ転写プロモーター配列(Ｔｙｒ)と発現が制限されたルシファラーゼレポーター遺伝子(Ｌｕｃ)が操作的に結合されたもの(Ｔｙｒ－Ｌｕｃ)、及び、悪性腫瘍細胞系内でのＳＶ40初期プロモーター(ＳＶ)と構成的発現ルシフェラーゼ遺伝子(Ｌｕｃ)が操作的に結合されたもの(ＳＶ－Ｌｕｃ)を示している(図２ａ～２ｄ参照)。Ｒｅｖ－Ｔｙｒ－Ｌｕｃは、Ｌｕｃ遺伝子と逆方向に結合したためＬｕｃは転写しない(発現しない)Ｔｙｒプロモーター配列である。ベーシックは、プロモーターを含まないＬｕｃ遺伝子構成物である。

図３ａおよび３ｂは、プリンアナログヌクレオシドＭｅＰ－ｄＲ毒性に対する大腸菌プリン

アナログヌクレオシドホスホリラーゼ(ＰＮＰ)の発現の依存性を示している。ＳＶ－ＰＮＰはその内部で、構成的ＳＶ40初期プロモーターが操作的にＰＮＰ遺伝子に結合される構成体でトランスフェクトされた細胞である；Ｔyr－ＰＮＰはその内部で黒色腫固有ヒトチロシナーゼプロモーター配列がＰＮＰ遺伝子に操作的に結合される構成体でトランスフェクトされた細胞である；Ｔyr－Ｌucは、その内部で黒色腫固有ヒトチロシナーゼプロモーター配列がルシフェラーゼレポーター遺伝子に操作的に結合される構成体でトランスフェクトされた細胞である；no－txfは組換え構成物でトランスフェクトされた細胞である。Ｔ－84は悪性腫瘍細胞系である(３ａ)、Mel－１は黒色腫細胞系である(３ｂ)。

図４は、組換えレトロウィルス発現ベクターＬＮ／ＰＮＰ(大腸菌ＰＮＰの発現を指示する)で形質導入されたマウス乳腺悪性腫瘍16ｃ細胞を移植されたアトヒミックヌードマウスの腫瘍のインビボでの成長の差と、ＭｅＰ－dRプロドラッグ投与後の時間経過との関係を示したものである。示されているものは、ＭｅＰ－dRを注入しなかったもの(コントロール)；移植後１～４日目にＭｅＰ－dRを注入したもの(初期rx)；移植後１１～15日目にＭｅＰ－dRを注入したもの(後期rx)である。

発明の詳細な説明

本発明は複製または非複製、トランスフェクトまたは形質導入された哺乳動物細胞および局外者細胞を殺すための方法を提供するものであり、この方法は(ａ)標的哺乳動物細胞を、基質プリンアナログヌクレオシドからプリンアナログを放出する適切なプリンアナログヌクレオシド切断酵素をコードする核酸でトランスフェクトまたは形質導入するか、或いは、そうした酵素を直接標的細胞に提供するステップと；(ｂ)上記アナログヌクレオシド切断酵素を発現する、あるいはそれを提供された上記標的細胞を基質と接触させて、上記酵素が毒性のプリン塩基アナログをつくりだし、それによって、標的細胞と、上記酵素を発現しない、あるいは含んでいない局外者細胞とを殺すステップとを含むものである。

以下に具体的に示す方法および組成物の一部は細胞を大腸菌ＤeoＤ遺伝子(プリンアナログヌクレオシドホスホリラーゼ(ＰＮＰ)をコードする)でトランスフェクトし、次に、非毒性プリンヌクレオシドアナログ(例えば、Ｎ７アナログを含むデオキシアデノシンまたはデオキシグアノシンアナログ)で措置するステップを含んでおり、上記非毒性プリンヌクレオシドホスホリラーゼは毒性プリンアナログに転化される。大腸菌ＰＮＰは基質としてのアデニンおよび一部のグアニンを含有したヌクレオシドアナログなどをより効率的に受容する点でヒトＰＮＰと異なっている(ジャンセンおよびニガード(K.F.Jensen and P.Nygaard),Eur.J.Biochem.,51:253－265(1975);ドスコシルおよびホーリー(J.Doskocil and A.Holy),Collection Czechoslov.Chem.Commun.,42:370－383(1977);パークスら(R.E.Parks et al),「プリンヌクレオシドホスホリラーゼ」：がん化学治療剤の分子作用と標的(Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents)(Academic Press,Inc.)内,pp.229－252,1988;ヘルシュフィーリドら(M.S.Hershfield,et al.),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:7185－7189(1991))。腫瘍細胞内で発現された大腸菌ＰＮＰはヌクレオシドを切断し、毒性プリンアナログを放出する。プリンアナログは細胞膜を自由に通過するのに対して、ＨＳＶ　Thdキナーゼを用いてつくられたようなヌクレオシドモノフォスフェートは、通常、それらがつくられる細胞内部に留まる。大腸菌ＰＮＰによる転化後に形成される毒性アデニンアナログはアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼによって毒性ヌクレオシドに転化され、すべてのトランスフェクトされた細胞を殺すことができると同時に、細胞の外に分散してトランスフェクトされなかった周囲の細胞(局外者細胞)を殺す場合がある。

プリンアナログ転化を触媒する酵素

ホスホリラーゼ(ＰＮＰ)選択

ホスホリラーゼおよびヌクレオシダーゼの２種類の酵素を用いることができる。ここで述べられているような方法および組成物において有用なＰＮＰはプリンアナログヌクレオシド＋無機ホスフェートの転化に対して触媒作用を示し、毒性プリンアナログ＋リボース－１－ホスフェート(あるいはデオキシリボース－１－ホスフェート)を放出する。

プリンアナログ／ヌクレオシド＋PO_4⇔

プリンアナログ＋リボース－１－PO_4
(またはデオキシリボース－１－ホスフェート)
非哺乳動物および修飾されたヒト、あるいは修飾された他の哺乳動物のＰＮＰを用いることができる。非哺乳動物ＰＮＰは大腸菌プリンアナログヌクレオシドホスホリラーゼであってよい。しかしながら、基質を選択的に転化して毒性のプリンアナログをつくりだすことができるいずれのＰＮＰでも用いることができる。したがって、この活性に影響を及ぼさない大腸菌ＰＮＰの修飾は、毒性プリンアナログ構成を放出させるためにプリンアナログヌクレオシドを切断するように修飾されたヒトＰＮＰ酵素分子と同様、上に述べた方法および組成物に適したタイプの酵素の範囲に含まれるものである。以下に、どんなＰＮＰあるいは他のプリンアナログヌクレオシド切断酵素についてでも、任意の基質を比較的毒性の弱い形態から、その細胞にとっての毒素に転換する能力をもっているかどうかをテストできる方法について説明する。表１はアデニン含有ヌクレオシドを切断してアデニンを放出させ、したがって、ここに述べる方法において有用な酵素を有する生物を示す。表１はまた、ヒトおよびマラリア寄生虫プラスモディウムファルシパルム(Plasmodium falciparum)が上述の方法で有用な酵素を含んでいないことも示している。したがって、上述の方法において有用であるためには、ヒトまたはＰ．ファルシパルムＰＮＰを修飾して、プリンアナログヌクレオシド基質を切断して毒性のプリンアナログを放出できるようにしなければならない。こうした修正は遺伝子レベルでも蛋白質レベルでも行うことができる。例えば、変異誘発を用いてインビトロでヒトあるいはＰ．ファルシラルムＰＮＰをコードする遺伝子配列を変え、特定のプリンアナログヌクレオシドを切断できるＰＮＰをコードさせることができる。
上に述べたように、好ましい実施例においては、本発明で用いられるＰＮＰは一般的に、致死の対象となる腫瘍細胞内に存在するＰＮＰが認識しない、あるいは非常に僅かしか認識しない基質と反応することができる哺乳動物、または非哺乳動物ＰＮＰ、およびバクテリアＰＮＰを含む。したがって、有用なＰＮＰをコードする核酸は、それらが異なった生物からのものであるか、あるいは本来の状態から修飾されてしまっているかのいずれかの理由で、自然の状態ではその内部で見つからないような細胞内にも存在しているのである。ＰＮＰまたはその他のプリンアナログヌクレオシド切断酵素をコードする核酸の最も重要な必要条件は、それらがその細胞に本来存在するＰＮＰによってはよく認識されない基質を認識して作用を及ぼすことができる機能性酵素をコードしなければならないということである。
ヌクレオシダーゼまたはヒドロラーゼもここで述べる方法および組成物として用いるのに適した別のタイプの酵素である。プリンアナログヌクレオシダーゼとは、プリンアナログヌクレオシド＋水を転化して遊離毒性プリンアナログ＋リボース(あるいはデオキシリボース)を放出させる作用において触媒作用を果たす酵素のことである：

プリンアナログヌクレオシド＋H_2O⇔

プリンアナログ＋リボース

(あるいはデオキシリボース)

ＰＮＰコーディング配列の転写調節
バクテリア性ＰＮＰは無核遺伝子にコードされるので、哺乳動物細胞内のバクテリア性ＰＮＰの発現には、ＰＮＰコーディング配列と結合した真核転写調節配列が必要になる。バクテリア性ＰＮＰ遺伝子は、一般的に市販されているプラスミド(例えば、ＳＶ40初期プロモーター／エンハンサー(pＳＶＫ３、ファルマシア(Pharmacia),Piscataway,NJ,カタログ番号27－4511－01)、モロニーマウス肉腫ウィルスＬＴＲ(pＢＰＶ，ファルマシア(Pharmacia)，カタログ番号4274390－01)、マウス乳がんウィルスＬＴＲ(pＭＳＧ，ファルマシア(Pharmacia)カタログ番号27－4506－01)、および、サイトメガロウィルス初期プロモーター／エンハンサー(pＣＭＶＢ，クローンテック(Clontech),Palo Alto,CA,カタログ番号6177－１)によって得られる強力な構成的プロモーター／エンハンサーの制御下で発現することができる。

一般的に“転写標的化”と称される、バクテリア性ＰＮＰ(あるいは他の適切なプリンアナログヌクレオシド切断酵素)をコードする配列の発現を制限する遺伝子転写調節配列を用いて、特定の細胞の集団を標的として、それを破壊することができる。転写標的に用いることができる調節配列の候補としては、実験で確認された以下のような２つの重要な基準を持っていなければならない：(ｉ)その調節配列は標的とされた細胞内で治療に用いることができる量の酵素の生産にむすびつくのに十分な遺伝子発現をもたらすものでなければならない、そして(ii)その調節配列は標的とされない細胞内で治療方式を損なうのに十分な量の酵素をもたらすものであってはいけない。こうした標的形態においては、調節配列はＰＮＰ配列を機能的に結合して、そこから調節配列が導き出される遺伝子を発現する細胞内でのみ活性化される遺伝子をつくりだす。遺伝子治療での転写標的化の基準を満たすことが分かっている調節配列としては、分泌型ロイコプロテアーゼ抑制因子からの調節配列(ガーバー、ゴールドスミスら(Garver,Goldsmith et al.),Clin.Res.,41:308Ａ(1993))、表面活性蛋白質Ａ(スミスら(Smith et al.),Human Gene Therapy,５:29－35(1994))、およびα－胎仔蛋白質遺伝子(フーバーら(Huber et al.),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:8039－8043(1991))。こうした方式の変形としては、誘発因子の局所投与が局所的な遺伝子発現にむすびつくような“誘発可能性”を付与する調節配列を活用する方法である。こうした方式の一例として、放射能－誘発配列が開示され、遺伝子治療目的のために適用可能と主張されている(ウェッシュセルバウムら(Weichselbaum,et al.),Int.J.Radiation Oncology Biol.Phys.,24:565－567(1992))。他の誘発可能調節によって、バクテリア性ＰＮＰ－遺伝子発現を特定の部位を標的とすることも可能であると予想される。

ＰＮＰ発現を指示し、それによって、特定の組織に対するＰＮＰによって媒介された毒性をもたらすための手段として、組織特異性エンハンサー／プロモーターを活用する必要性がある場合もある。例えば、ヒトチロシナーゼ遺伝子調節配列は悪性黒色腫細胞に対してＰＮＰ毒性を十分に発揮させる。ウイルおよびハート(Vile and Hart)(Cancer Reserch,53:962－967(1993))による研究では、その遺伝子の５′フランキング領域(転写開始分部位から－769bp)から採取したマウスチロシナーゼ配列は悪性黒色腫細胞に対するレポーター遺伝子発現をもたらすことができることが、他のタイプに対してはそうした力は発揮できないことが示されている。マウスおよびヒトの５′フランキング領域内のチロシナーゼ配列は類似しているけれども、シバタら(Shibata et al.)(The Journal of Biological Chemistry,267:20584－20588(1992))はウイルおよびハートが用いた同じ領域のヒトの５′フランキング配列(転写開始部位から－616bp)は組織特異性発現をもたらさなかったことを示すデータを発表している。シバタらの報告は５′フランキング配列がチロシナーゼ発現細胞(黒色腫またはメラノサイト)に対する標的遺伝子発現では役に立たないであろうと示唆しているが、シバタらが用いたものよりわずかに違った上流の断片は、以下の実施例２に示されているように、実際に、特に黒色腫細胞に対してレポーターまたはバクテリア性ＰＮＰ遺伝子発現をもたらすことができる。

実施例２に示されているように、ヒトのチロシナーゼ遺伝子の５′フランキング領域はヒトゲノミックＤＮＡからのポリメラーゼ鎖反応によって増幅された。これらのプライマーは、公表されているヒトチロシナーゼ遺伝子およびフランク(flanks)(キクチら(Kikuchi,et al.),Biochimica et Biophysica Acta,1009:283－286(1989))を用いて、それぞれ転写開始部位に対して－451から＋78bpまで広がっている529bpの断片を増幅するために設計されたものである。レポーター遺伝子アッセイによって、これらの断片は黒色腫細胞内にレポーター遺伝子発現をもたらすことができることが示された。同じチロシナーゼ断片を用いて、プラスミドベクター内でのＰＮＰ発現が試みられ、黒色腫細胞内でだけＰＮＰによって媒介された毒性が発現されることが分かった。したがって、ヒトチロシナーゼ配列はヒトの黒色腫細胞にＰＮＰ発現をもたらす上で有用である。これら同じ配列は黒色腫あるいはメラノサイトに他の治療遺伝子発現ももたらす上でも有用な役割を果すであろう。他の組織特異性遺伝子調節配列および要素を用いて、黒色腫以外の特異的な細胞タイプに対して適切なプリンアナログヌクレオシド切断酵素をコードする遺伝子を発現させることも可能である。

表１　　アデニン含有ヌクレオシドをアデニンに切断できる生物

生　　物	酵　　素
ルイシマニア ドンバニイ (Leishmania Donvani)	ヒロドラーゼ（殆どdAdo）
トリコモナス バギナリス (Trichomonas vaginalis)	ホスホリラーゼ(ARPTアーゼを含んでいない)
トリパノゾーマ クルチ (Trypanosoma Cruzi)	ヒドロラーゼ
チストソマ マンソニイ (Schistosoma Mansoni)	ホスホリラーゼ
ルイシマニア トロピカ (Leishmania Tropica)	ヒドロラーゼ
クリシジア ファスシキュラータ (Crithidia Fasciculata)	ヒドロラーゼ
アスペルギルス及びペニシリウム(カビ) (Aspergillus and Penicillium(fungi))	ヒドロラーゼ
エルウイナ カロトボラ (Erwinia carotovora)	ホスホリラーゼ
ヘリックス ポマチア（かたつむり) (Helix pomatia(snail))	ホスホリラーゼ
オフィオデン エロンガルス（たら) (Ophiodon Elongatus(lingcod))	ホスホリラーゼ
大　腸　菌 (E. coli)	ホスホリラーゼ
サルモネラ チフィムリウム (Salmonella typhimurium)	ホスホリラーゼ
バチル ズブチリス (Bacillus subtilis)	ホスホリラーゼ
クロストリジウム (Clostridium)	ホスホリラーゼ
マイコプラズマ (mycoplasmas)	ホスホリラーゼ

アデニンヌクレオシドをアデニンに（または僅かにしか）転化できない生物

生　　物	酵　　素
ヒ　　ト	ホスホリラーゼ
Ｐ．ファルシパルム (P. falciparum)	ホスホリラーゼ

基質の選択

酵素がこれらの細胞を殺す毒性物質をつくりだすための基質となるプリンアナログヌクレオシドはここでは“プロドラッグ”と表現する。以下、および表２に示されているような塩基で構成されたいずれかのデオキシプリンアナログヌクレオシドを、大腸菌ＰＮＰ、あるいはその他の同等のプリンアナログヌクレオシド切断酵素の基質とするべきである。必要なことは、そのアナログがヌクレオシドレベルでは(つまりプロドラッグとしては)低い毒性を持っていることである。リボース－またはデオキシリボース－含有物質を用いるこ

とによって、大腸菌ＰＮＰは６－チオグアニンまたは３－デアザグアニンなどの、グアニン環内でＮ－７位置を介してリボースまたはデオキシリボースに取りつく種々の毒性グアニンアナログを選択的につくりだすことができる(例えば、ストリーターら(D.G.Streeter,et al.),Biochemical Pharmacology,29:1791－1797(1979))。治療ＰＮＰ遺伝子移送に関してここで述べられている基本方針は、いくつかの幅広いタイプのヒト悪性腫瘍の措置における特殊に活性化できる細胞毒性プリンアナログの新しい使い方を示唆している。ほとんどの腫瘍で成長フラクションは非常に少量であるので、分裂性細胞、および非分裂性細胞の両方に対して活性を有する化合物を選択するのが望ましい。現在の方法で大腸菌ＰＮＰを用いてつくりだされた毒性プリンアナログの一部は、非分裂性、および分裂性細胞の両方に対して毒性を持つようである。ここで述べられている組成物および方法において作用を示す適切なプリンアナログヌクレオシドのいくつかの具体例を、実施例に示す手順にしたがってテストすることができる。

１つの好ましい実施例においては、基質は９－(β－Ｄ－２－デオキシエリスロペントフラノシル)－６－メチルプリン(ＭｅＰ－ｄＲ)である。ＭｅＰ－ｄＲは比較的低毒性であるが、この化合物の治療指数を増強することができる。例えば、ＭｅＰ－ｄＲの毒性はデオキシヌクレオシドキナーゼのホスホリル化によるのであれば、５′－デオキシ－ＭｅＰ－ｄＲなどのホスホリル化できないアナログを合成して、インビボでＭｅＰを発生させるためにプロドラッグとして用いることができる。

６－メチルプリン－２′－デオキシリボシド(Gene Therapy,１:233－238,1994)、２－アミノ－６－クロロ－１－デアザプリンリボシド(Biochem.Pharmacol.,33:261－271,1984)、および７－リボシル－３－デアザグアニン(Biochem.Pharmacol.,29:1791－1787,1979)などの化合物は、大腸菌ＰＮＰに対しては有用な基質であるプロドラッグの例である。これらはそれぞれの対応するプリンアナログよりずっと毒性が低く、大腸菌ＰＮＰにとっては非常に優れた基質となるが、哺乳動物のＰＮＰに対しては良い基質とはなれない。

大腸菌ＰＮＰは、アラビノフラノシル　２－フルオロアデニン(Ｆ－araＡ)または２－フルオロ－２′－デオキシアデノシン(Ｆ－ｄＡdo)を切断して、非常に毒性の高い化合物である２－フロオロアデニン(Ｆ－Ａde)に切断することができる。Ｆ－araＡおよびＦ－ｄＡdoはインビボで抗腫瘍性活性を有していることが実証されている。Ｆ－araＡは、白血病の治療のために人に対して使用することが認められている。これらの化合物の抗腫瘍性活性はＦ－Ａdeの生産には関係していないので、大腸菌ＰＮＰあるいはその他の適切なプリンアナログヌクレオシド切断酵素を発現する腫瘍のＦ－araＡまたはＦ－ｄＡdoによる措置は、それら腫瘍細胞におけるＦ－Ａdeの選択的生産による細胞致死により、より増強された抗腫瘍効果につながることが予測される。

実施例３に示されているように、ここで述べられているような方法を用いてさらに調査すれば、ここでＭｅＰ－ｄＲに関して示されているよりも更に優れた治療指数をもった他のプリンアナログヌクレオシドアナログによって確認することができる。悪性腫瘍内部での大腸菌ＰＮＰ(あるいは他の適切なプリンアナログヌクレオシド切断酵素)の発現は、２－フルオロアデニン(基質：毒性を改良するために付加された２′－デオキシサイチジンを持っている、あるいは持っていない２－フルオロ－２′－デオキシアデノシン)、あるいは２－アザアデニン、４－アミノ－ピロゾロ［３，４－ｄ］ピリミジンなどの毒性プリンアナログをつくりだす種々の判定用基質を選別するのに用いることができる。

遺伝子の伝達

ＰＮＰ遺伝子は当業者に公知の種々の方法で哺乳動物の細胞に伝達することができる。第１の好ましい実施例においては、ウィルス性宿主が用いられる。これらの実施例には、レトロウィルス、アデノウィルス、アデノ関連ウィルス、ヘルペスウィルスおよび牛痘ウィルスなどがある。以下の実施例は、適切な組換えウィルスの構成とバクテリア性ＰＮＰの哺乳動物細胞への伝達のためのアデノウィルスの使用について述べる。

ウィルスによらない遺伝子伝達も用いることができる。その例としては、どんなキャリアあるいはスタビライザーも存在しない状態でのＤＮＡ(“裸ＤＮＡ”)の拡散、医薬的安定化因子(スタビライザー)またはキャリアの存在下でのＤＮＡ(“調製ＤＮＡ”)の拡散、細

胞への侵入をより容易にする蛋白質に複合化されたＤＮＡ(“分子接合”)、または脂質類に複合化されたＤＮＡの拡散などである。バクテリア性ＰＮＰ遺伝子の脂質を媒介とした哺乳動物細胞への遺伝子伝達の方法を、以下に具体例として述べる。より具体的には、非－ヒトＰＮＰ遺伝子を含むプラスミドのカチオン性リポソーム媒介伝達について説明する。しかしながら、ＰＮＰ遺伝子を伝達するためのある特定の方法が腫瘍細胞致死を成功させるための決定的な要因ということではないので、他の遺伝子伝達方法も用いることは可能である。したがって、ウィルスによる伝達ベクターを用いての遺伝子形質導入も用いることができる。こうした方法は公知であり、ここで述べられているような遺伝子を媒介とする毒物治療での使用に簡単に応用することができる。さらに、これらの方法は大腸菌ＰＮＰなど、適切なプリンアナログヌクレオシド切断酵素をコードする遺伝子の特定のキャリアの標的指向特性を用いて特定の疾患や細胞群を標的とするために、これらの方法を用いることもできる。

外来遺伝子を腫瘍細胞に伝達するために、非病原性で、非好気性バクテリアが従来用いられてきた。例えば、腫瘍を持ったマウスに静脈注射で注入されたクロストリジウムアセトブチリシウム(Clostridium acetobutylicum)は、低酸素テンションを持った腫瘍の壊死領域でのみ成長した(レモンら(Lemmon,M.J.,et al.),Proc.Am.Ass.for Cancer Research,35:374(要約番号No.2231)(1994))。以下に述べる標準的なＰＮＰアッセイ(実施例１)では、ウェルチ菌(Clostridium perfingens)(シグマ化学(Sigma Chemical Co.),St.Louis,MO)はＭｅＰ－ｄＲとＭｅＰに転化することができる酵素活性を示すことが認められた。この観察結果は、壊死性、非好気性センターを有する腫瘍性物質内で選択的にバクテリア性ＰＮＰ活性を発現するメカニズムを示唆している。このように、腫瘍にクロストリジウム等の菌株を感染させて、次に、ＭｅＰ－ｄＲなどのプリンアナログに露出させることができる。腫瘍組織の非好気性センター内で成長しているクロストリジウムバクテリアのＰＮＰ活性は、次にＭｅＰ－ｄＲをＭｅＰに転化し、これが局所的に放出されて、腫瘍細胞を殺すのである。

治療用ＤＮＡ伝達およびＤＮＡ標的化(targeting)の急速に進歩しつつある分野には、“ステルス(stealth)”およびその他の抗体接合リポソーム(コロニー性悪性腫瘍への脂質によって媒介される薬品の標的化を含む)、細胞特異性リガンドを通じてのＤＮＡのレセプターによって媒介された標的化、リンパ球に向けた腫瘍標的化、およびインビボでのマウスグリマ細胞の高度に特殊な治療用レトロウィルスの標的化などがある(ハンら(S.K.Huang et al.),Cancer Research,52:6774－6781(1992);デブスら(R.J.Debs et al.),Am.Rev.Respir.Dis.,135:731－737(1987);マルヤマら(K.Maruyama,et al),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:5744－5748(1990);ピンナヅワーゲおよびハン(P.Pinnaduwage,and L.Huang),Biochemistry,31:2850－2855(1992);ガビゾンおよびパパハジョポーロス(A.Gabizon,and D.Papahadjopoulos),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:6949－6953(1988);ローゼンベルグら(S.A.Rosenberg,et al.),N.Engl and J.Med.,323:570－578(1990);カルバーら(K.Culver et al.),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:3155－3159(1991);ウおよびウ(G.Y.Wu and C.H.Wu),J.Biol.Chem.263,No.29:14621－14624(1988);ワグナーら(E.Wagner et al.),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:3410－3414(1990);キュリエールら(D.T.Curiel et al.),Hum.Gene Ther.,３:147－154(1992);リチジンガーおよびハン(D.C.Litzinger and L.Huang),Biochimica et Biophysica Acta,1104:179－187(1992);ツルベツコイら(V.S.Trubetskoy,et al.),Biochimica et Biophysica Acta,1131:311－313(1992)参照)。ヒト神経膠腫内部での細胞分裂の速度(この場合、腫瘍細胞の分裂は、実験的な脳腫瘍細胞の場合よりかなり下回っている可能性がある)がＨＳＶ　ｄＴｈｄキナーゼを用いた腫瘍退緒を可能にするのに十分なレベルのレトロウィルス性組み込みをもたらすかどうかは分かっていない。ここで述べられている方式は、分裂性腫瘍細胞に向けられたものであれ、腫瘍の新血管形成(neovascularization)に向けられたものであれ、遺伝子の標的化メカニズムの範囲で、成長しつつある腫瘍集団内部に、適切な信号、つまり、腫瘍細胞内に存在する、あるいはそれに吸収された大腸菌などの適切なプリンアナログヌクレオシド切断酵素のための基質(プロドラッグ)の投与後に腫瘍退縮および壊死を媒介する腫瘍細胞の小さな塊を確立するためのより改善された方

法を提供する。

措置の方法

措置の方法は、基本的には、ＰＮＰ遺伝子を細胞に与え、次にその細胞を適切な基質に露出させるステップで構成されており、この基質はＰＮＰ遺伝子を発現する細胞、およびＰＮＰ遺伝子を発現する細胞の近くに存在する細胞を殺す毒性物質に転化される。ＰＮＰ遺伝子は、特定のウィルス性ベクターまたは伝達用製剤の選択など、標的化手段との組み合わせで、系統的に標的化された細胞に直接与えることができる。細胞はインビボで、措置を受ける患者の体内で、あるいはインビトロで措置することができ、その後、患者に注入することができる。患者の体内の細胞へのＰＮＰ遺伝子の導入に続いて、ＰＮＰによって標的とされる細胞を殺すのに十分な毒性物質に転化されるのに有効な量で、系統的、あるいは局所的にプロドラッグが投与される。

Ａ．腫瘍の措置

大腸菌ＰＮＰ遺伝子は、黒色腫、膵臓、肝臓、あるいは結腸悪性腫瘍などの転移性の充実性腫瘍を治療するための方針の一部としても用いることができる。これらのタイプの転移性腫瘍の効果的な治療法は現在の段階では存在していない。この方法においては、ＰＮＰ遺伝子を含んだプラスミドＤＮＡが腫瘍特異性プロモーターのコントロール下で用いられる。例えば、チロシナーゼプロモーターは黒色腫細胞における発現の媒介には高度の特異性を示し、他の組織タイプでの遺伝子発現はもたらさない(ウイルおよびハート(Vile and Hart),Cancer Res.,55:962－967(1993))。したがって、このプロモーターによる調節的コントロール下で、ＰＮＰ遺伝子は黒色腫瘍内部で圧倒的に活性化され、患者の体内の他の場所では活性化されない筈である(以下の実施例２および図２ａ～ｄ)。他の腫瘍タイプへの特異性を示すプロモーター、例えば、新血管内の結束(tie)遺伝子など、すべての充実性腫瘍に存在している急速に分裂する内皮細胞内で活性を示すプロモーターを、特に、一次、あるいは転移性腫瘍内部でだけＰＮＰを活性化させるために用いることができる。この方法では、腫瘍特異性プロモーターの制御下でＰＮＰを含んだプラスミドＤＮＡがカチオン性リポゾームを用いて細胞に伝達される。例えば、動物での研究に基づいて、脂質ＤＯＴＭＡ(１，２－ジオレイルオキシプロピル－３－トリメチルアンモニウムブロマイド)とＤＯＰＥ(ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン)との１：１混合物の1200～3600マイクロモルに複合化された100～400mgプラスミドＤＮＡを用いて、ＰＮＰ遺伝子を患者の体内の転移腫瘍に伝達することができる。そうすれば、上に述べた量のプロドラッグを上に述べたように投与することができる。

ヒトの脳癌の措置においてプロドラッグを活性化するためにＰＮＰ遺伝子を用いることができる(国立健康協会組換え体諮問委員会、プロトコール＃9206－019、オールドフィールドら(Oldfield et al.)、承認日：１９９２年６月１日)。この方法では、その内部でウィルス性粒子が大腸菌ＰＮＰ遺伝子を含んでいるレトロウィルス性粒子をつくりだす細胞株が患者体内の中枢神経系(ＣＮＳ)に注入される。そのレトロウィルス生産細胞株を患者の体内に適切に注入するために、ＭＲＩスキャナーが用いられる。レトロウィルスは分裂している細胞内部でのみ十分な活性を示し、癌患者の頭蓋骨内部の分裂性細胞の大部分は腫瘍内部に存在しているので、このレトロウィルスは、その脳の非悪性腫瘍細胞よりも、主に腫瘍自体内部で活性を示す。腫瘍の大きさおよび局所化などを含む患者の臨床上の特徴が、注入されるプロデューサー細胞の量を決定する。例えば、それぞれ100マイクロリッターの30回注入の範囲のプロデューサー細胞の容量(総量３mlで、約１×10^8プロデューサー細胞/ml)が、外科的にアクセスできない腫瘍に向着性ガイダンスに基づいて与えられる。内科手術的方法(intraoperatively)でアプローチできる腫瘍の場合、100μlのアリコートを、総注入量が10mlに達するまで(１×10^8細胞/mlの割合で)注入される。ＭｅＰ－ｄＲ投与後に、大腸菌ＰＮＰ遺伝子伝達の方法を用いて非－分割性細胞に対する局外者致死および毒性を可能にすることができ、したがって、ＨＳＶ　ｄＴhdおよびガンシクロビル(ganciclovir)を用いるこれまでの試みより、一層大幅な腫瘍退縮を実現することができる。

細胞の一定の群の破壊は、上に述べたように、バクテリア性ＰＮＰ遺伝子、あるいはアデニン含有ヌクレオシドからアデニンの切断などのプリンアナログヌクレオシドからプリン

アナログを切断することができる酵素をコードする遺伝子の伝達の標的化によって達成することができる(例えば、表１参照)。ウィルス性ベクターの自然の向性あるいは生理機能を特定の細胞タイプを標的化させるための手段として開発することができる。例えば、レトロウィルスは、複製細胞内でのみ十分に活性化されることが良く知られている。この事実は、動物およびヒトの臨床研究の両方で、正常の(非悪性)細胞が複製していない部位内部で成長している複製癌細胞への選択的な、レトロウィルスによって媒介された遺伝子伝達の基礎として用いられている(カルバーら(Culver et al.),1992;ラムら(Ram et al.),Cancer Gene Ther.,１：１(1993))。また、遺伝子伝達のほとんどがそのまわりを取り囲んでいる組織に対して行われる場合、ウィルス性ベクターは充実性腫瘍などの特殊な部位に直接投与することができる。こうした選択的伝達のコンセプトはアデノウィルス性ベクターによる、マウスの腫瘍への遺伝子の伝達において実証されている(タンら(Tang et al.),Cancer Gene Ther.,１：15－20(1994))。レクチンによって媒介された肺癌細胞の標的化において実証されているように、レセプター結合リガンドが選択的な細胞タイプに対してだけ結合するように、分子接合体を開発させることができる(バトラら(Batra et al.),1994)。

このように、細胞は、悪性腫瘍性のものであれ、あるいはそうでないものであれ、少なくとも半数以下の割合の細胞に対して適切なプリンアナログヌクレオシド切断酵素をコードする遺伝子を選択的に伝達したり、あるいは発現したりする能力に基づく本発明の方法によって殺すことができる。

最近、例えば、ＤＮＡを含んでいるリポソームを静脈注射することによって、一定の細胞タイプにおける遺伝子の標的化発現を媒介することが示された。プリンアナログヌクレオシド切断酵素をコードする遺伝子の標的化、あるいは腫瘍集団内部の少数の細胞での遺伝子の発現とそれに続く基質投与によって、十分に退縮を起こすことができるであろう(ズーら(Zhu,et al.),Science,261:209－211(1993))。これらの実施例で示されているかなりの局外者効果および非分裂細胞の致死を通じて、腫瘍を破壊するために、この方法を用いることができる。

Ｂ．ウィルスに感染した細胞の措置

腫瘍細胞の致死に加えて、ここに述べる方法は、ウィルスに感染した細胞を殺すためにも用いることができる。ウィルス致死の実施形態において、ウィルスに感染した細胞の切断酵素の発現を標的とする能力を基礎として、特定の遺伝子伝達方法を選ぶことができる。例えば、ウィルスに感染した細胞は、遺伝子発現を調節したり、発現を可能にしたりすることができる、特定のウィルス遺伝子配列、つまり、ウィルス特異性プロモーターを用いることができるであろう。こうした配列は感染していない細胞には存在していない。ＰＮＰ遺伝子がそうしたウィルス性プロモーターに対して適切に結合させることができれば、切断酵素はウィルスに感染した細胞の内部で発現され、他の、感染されていない細胞では発現されない。この場合、ウィルスに感染した細胞は、ＭｅＰ－ｄＲまたは非－ヒトあるいは修飾ＰＮＰによって毒性形態に転化される他の基質の投与に対して、より高い感受性を示す。

Ｃ．遺伝子工学的に操作した細胞の投与

ある応用例においては、ＰＮＰ遺伝子を受け取る細胞が選択されて、患者の体内に送り込まれる。この方法は、通常、バクテリア性ＰＮＰ遺伝子などの切断酵素をコードする遺伝子と、治療用蛋白質をコードする第２の遺伝子の両方のエクスビボ共伝達を伴う。両方の遺伝子を受け取る細胞は、宿主となる患者の体内に再び送り込まれ、そこでそれらの細胞は、そうした操作された細胞を排除するためにＭｅＰ－ｄＲなどのプロドラッグが投与されるまで、治療に役立つ蛋白質をつくりだすことができる。こうした方法は、脳内部でチロシンヒドロキシラーゼをつくりだすように操作された非－複製筋原細胞で用いられるような“細胞療法”において有益である(ジアオら(Jiao,et al.),Nature,362:450(1993))。

Ｄ．ＰＮＰ酵素の細胞への直接伝達

バクテリア性ＰＮＰ蛋白質とプロドラッグの組み合せによってもたらされる局外者効果は、ＰＮＰ蛋白質をＰＮＰ遺伝子にではなく、標的細胞に伝達することによっても達成され

る。例えば、上に述べたようなプリンアナログヌクレオシドを切断できるＰＮＰ酵素は、市販されている試薬を使って、公知の組換え蛋白質技術によって製造される。バクテリア性ＰＮＰ蛋白質をつくる方法の１例として、大腸菌ＰＮＰコーディング配列が、通常の技術を用いて、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ(ＧＳＴ)融合蛋白質を用いて、インフレームによりpＧＥＸ－４Ｔ－１(ファルマシア(Pharmacia),Piscataway,NJ)の多重クローニング部位に結紮される(なお、このベクターのクローニング部位の場合、このステップをより速やかに実行するために３つの可能な翻訳解読枠のすべてにコーデイング配列を挿入することができる)。その結果できるプラスミドは、ＩＰＴＧ－誘導可能原核tacプロモーターの転写制御下のＧＳＴ－ＰＮＰ融合コーディング配列を含む。大腸菌の細胞は組換えプラスミドおよびＩＰＴＧによって誘導されるtacプロモーターによって形質転換される。ＩＰＴＧによって誘導された細胞は細胞溶解され、そのＧＳＴ－ＰＮＰ融合蛋白質はグルタチオンセファロース４Ｂカラムでの親和性クロマトグラフィーによって精製される。ＧＳＴ－ＰＮＰ融合蛋白質が溶出され、その分子のＧＳＴ部分がトロンビン切断によって取り除かれる。これらの技術および試薬のすべては市販されているキットで利用することができる(ファルマシア(Pharmacia),Piscataway,NJ,カタログ番号27－457001)。組換え蛋白質生産の他の方法は出版されている実験室マニュアル(例えば、「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」の第16章“蛋白質発現”参照)。

バクテリア性ＰＮＰはプロドラッグを活性化して分散可能な毒素に変えるので、必要なのはプロドラッグの投与前に標的細胞の外側にＰＮＰ蛋白質を運ぶだけである。ＰＮＰ蛋白質はいろいろな方法で標的まで運ぶことができる。その１例は、その蛋白質をキャリアと共に、あるいはキャリアなしで標的組織に直接与える方法で、例えば、腫瘍集団をアクセス可能な部位に直接注入することによって行うことができる。別の例は、腫瘍部位上の抗原を識別するモノクローナル抗体にＰＮＰ蛋白質を取りつけることである。機能性蛋白質をモノクローナル抗体に取りつける方法はこれまでにも述べられており、詳細な手順は公開されている実験室マニュアル(例えば、「抗体：実験マニュアル(Antibodies:A Laboratory Manual)」の第９章“標識化抗体”)。ＰＮＰ接合モノクローナル抗体は、例えば、静脈注射(IV)などの方法で、系統的に投与され、標的組織に特異的に取りつく。その後でプロドラッグを系統的に投与すると、腫瘍部位の近くで分散可能な毒素が局所的につくりだされる。多数の研究が、特定の蛋白質の腫瘍組織に対する標的化でのこの技術の実用性を実証している(例えば、センターら(Senter,et al.),Bioconjugate Chem.,２:447－451,1991;バッグショー(Bagshawe,K.D.),Br.J.Cancer,60:275－281,1989;バッグショーら(Bagshawe,et al.),Br.J.Cancer,58:700－703,1988;センターら(Senter,et al.),Bioconjugate Chem.,４:３－９,1993;バットリーら(Battelli,et al.),Cancer Immunol.Imununother.,35:421－425,1992;ピエテルズおよびマッケンジー(Pietersz and Mckenzie),Immunolog.Reviews,129:57－80(1992);およびロフターら(Roffler et al.),Biochem.Pharmacol,42:2062－2065(1991)参照))。モノクローナル抗体に加えて、他のリガンドも標的細胞に対する特異性を基準として選び出し、ここで教示されている方法でテストすることができる。

特定の標的への蛋白質伝達の他の例としては、リポソームによる方法がある。リポソームをつくりだす方法は公開されている実験室マニュアルに述べられている(例えば、「リポソーム：実施手引(Liposomes:A practical Approach)」)。リポソームはファンベルケルら(Van Berkel et al.)によって詳しく述べられているように、外部表面に特定のリガンドあるいは抗体を取り込むことによって標的部位の標的化させることができ、このファンベルケルらの例では、特定の肝臓細胞群がリポソーム表面へのアシアロフェチュイン(asialofetuin)の取り込みによって標的化された(ファンベルケルら(Van Berkel et al.),Targeted Diagnosis and Therapy,５:225－249(1991))。特定のリポソーム製剤も標的への伝達を達成することができ、例えば、薬品を移植された腫瘍に優先的に伝達するいわゆるStealth^{TM}リポソームがその最も優れた実施例である(アレン(Allen),感染症およびがんの治療におけるリポソーム(Liposomes in the Therapy ofInfectious Diseases and Cancer),405－415(1989))。リポソームを注入あるいは移植後、結合しないリポソームを血液から

取り除き、次に、患者を、標的部位で大腸菌ＰＮＰまたは他の適切な切断酵素によってＭｅＰに切断されるＭｅＰ－ｄＲなどのプリンアナログヌクレオシドプロドラッグによって措置する。この手順の場合も、必要なのは適切な標的化伝播体が利用可能であることだけである。以下の引例は特定の蛋白質の腫瘍組織への集中の例である(ヒュジェスら(Hughes et al.),Cancer Research,49:6214－6220(1989);およびリトジンガーおよびハン(Litzinger and Huang),Biochimicaet Biophysica Acta,1104:179－187(1992))。広い意味で、こうした標的化の戦略は、ＰＮＰ蛋白質、または遺伝子伝達後のプロドラッグの特殊な伝達にも拡大して応用することができる。

Ｅ．基質の投与

ヒトを対象として投与できる最大許容量を判定するためにはフリードリッヒら(Freireich et al.)の式を用いることができる(Cancer Chemother.Rep.,50:219－244,(1966))。例えば、１日体重１kgあたり25mg(ＭｅＰ－ｄＲ)の投与量を９日間(全部で９回投与)続けた場合、一定の毒性(ただし致死的なものではない)が形成されたことを示すマウスでの系統的に投与された投与量－反応データに基づいて、ヒトに対する投与量が25mg/kg×３＝75mg/m^2の式に基づいて、75mg ＭｅＰ－ｄＲ/m^2と決定された。この量、あるいはこれをやや下回る量はヒトにおいて、治療対象を殺すことなく最大の細胞致死効果をもたらした。この有効性標準値は癌治療の分野でも受け入れられている。しかしながら、最大許容投与量の10％から１％程度の範囲(例えば、7.5mg/m^2～0.75mg/m^2)の投与量の方がより望ましい。さらに、基質が腫瘍の部位、あるいはその近くに局所化されたままでいるような投与モードの方が、系統的に投与された基質よりも、より低い投与量で有効であることもわかるであろう。

基質は経口的に投与してもよいし、例えば、静脈注射、組織内注射、腹膜経由、あるいは、皮膚経由のように非経口的に投与してもよい。投与に必要な基質の正確な量は、治療の対象によって、年齢、体重、一般的な状態、措置対象である疾病の重度、腫瘍の場所やサイズ、用いられる化合物、その投与モードなどの要因によって決まる。したがって、正確な量を指定することは不可能である。しかしながら、ここに示されている知見に基づいた日常的な実験を行うことによって、当業者なら適量を決めることは可能であろう。通常、例えば、ＭｅＰ－ｄＲ、あるいはそれと同等の機能性蛋白質を想定した場合は、投与量は好ましくは約0.5～約50mg/m^2の範囲である。

意図された投与モードに基づいて、基質は例えば錠剤、坐薬、丸薬、カプセル、粉末、液体、懸濁液など固体、半固体、あるいは液体投与形態のいずれも形態であってもよく、好ましくは、１回の投与量を正確に決めることができるユニット投与量が望ましい。これらの組成物としては、上にも述べたように薬学的に受け入れ可能なキャリアと組み合わせられた有効な量の指定された基質を含み、さらに、他の医学的試薬、薬学的試薬、キャリア、そして希釈剤なども含まれる。“薬学的に受け入れ可能”という意味は、生物学的、あるいはその他の意味で望ましくないものではなく、指定された基質と共に投与された場合に、望ましくなく生物学的な影響や、それが含まれている医薬品組成物の他の組成物のいずれかと有害な形態で反応を起こさずに、治療対象の個人に投与することができるということである。

固体組成物の場合、従来の非毒性固体キャリアとしては、例えば、医薬品的なグレードのマンニトール、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、タルク、セルロース、グルコース、蔗糖および炭酸マグネシウムなどである。液体状の薬学的に投与可能な組成物は、例えば、水、食塩水、水性デキストロース、グリセロール、あるいは、エタノールなどによって水溶液または懸濁液を形成するための付形剤に最適な薬学的助剤を持った活性化合物を溶解、または分散することによって調製することができる。望ましい場合、投与されるこの医薬品組成物は、酢酸ナトリウムまたはオレイン酸トリエタノールアミルなどの加湿剤、または乳化剤、pH緩衝などの非毒性補助物質などを含んでいてもよい。こうした投与する形態に調製するための実際の方法は当業者には公知であり、あるいは明らかであろう。例えば、「(マーチン編(Martin,E.W.ed.)レミントン製薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)の最新版、マック出版(Mack Publishing Co.),Ea

ston,PA.」参照。
経口投与の場合、微粉あるいは粒剤は希釈性、分散性、および／あるいは界面活性剤を含んでいてもよく、水やシロップ中、あるいはカプセルや乾燥状態の袋中に入れても、あるいはまた、水溶液または懸濁剤が含まれている懸濁剤中でも、結合剤や潤滑剤を含んだ錠剤中でも、あるいは水やシロップに懸濁させた状態であってもよい。望ましいか、あるいは必要な場合には、香剤、保存剤、懸濁剤、濃縮剤、あるいは乳化剤が含まれていてもよい。錠剤および粒剤が経口投与の場合には好ましく、これらはコーティングされていてもよい。
非経口投与は一般的には注射によって行われる。注射薬は溶液か懸濁液、注射前に液体に入れて溶液または懸濁液にするのに適した固体形態、あるいは乳剤などのいずれであってもよい。
以下の実施例はここに述べられている組成物および方法のいくつかの側面を説明するためのものである。
実施例
実施例１：ヒト結腸悪性腫瘍に対するＭｅＰ－ｄＲの効果
大腸菌ＰＮＰをコードする細胞
基質
ＭｅＰ－ｄＲが選ばれるのは、ＨＥｐ－２細胞に対して、６－メチルプリン(ＭｅＰ)より20分の１以下の毒性しかもたず、マイコプラズマによって感染された培養体を検出するために用いられてきており、マイコプラズマは大腸菌ＰＮＰと類似した酵素をコードするからである(モントゴメイーおよびヒューソン(J.A.Montogomery and K.Hewson),J.Med.Chem.,11:48－52(1968)、マックグリティーおよびカーソン(G.J.McGarrity and D.A.Carson),Experimental Cell Research,139:199－206(1982);ハタンカら(M.Hatanka,et al.),In Vitro,13:429－433(1977))。
細胞系
Ｔ84結腸悪性腫瘍細胞(ソルジャーら(E.J.Sorscher et al,),Amer.J.Physiol.,262:Ｃ136－Ｃ147(1992))を６－ウェルトレイを用いてＦ12栄養性培地を含んだダルベッコの修正イーグル培地(ＤＭＥＭ／Ｆ12)(ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬ, Gaithersburg,MD)中で、１～２×10^5細胞／ウェル程度の濃度(～20％密集)まで成長させた。
結腸悪性腫瘍細胞内でのＭｅＰ－ｄＲの毒性
トランスフェクトされていないＴ84結腸悪性腫瘍細胞をＭｅＰｄＲまたはＭｅＰを濃度を上げながら処理した。５日間後、各ウェルから細胞を取り出して、ヘマサイトメータにより、染料排除細胞の数についての判定を行った。これらの細胞を、通路48(ｐ.48)および通路61(ｐ.61)の両方で調べた。ＭｅＰはシグマ化学(Sigma Chemical Company(St.Louis,MO))から入手した。ＭｅＰ－ｄＲは(モントゴメリーおよびヒューソン(J.A.Montgomery and K.Hewson),J.Med.Chem.,11:48－52(1968))などに述べられている標準的な方法で合成された。ヌクレオシドおよび塩基を１mg/mlの濃度で血清を含まないＤＭＥＭ/Ｆ12に溶かし、１～２×10^5細胞／ウェルをカバーするために、以下に述べる濃度で、10％仔ウシ胎児血清と共に１mL ＤＭＥＭ/Ｆ12に直接加えた。
24時間以内では(例えば、細胞の丸まり、そしていくつかの細胞はプレートから離れるなど)ＭｅＰによる初期細胞治療効果は観察された。薬の投与から５日後に成長可能な細胞の数をカウントした。ＭｅＰの濃度が高くなると(3.75μＭ～75μＭ)、細胞が溶解し、細胞構造が完全に失われて、措置から２日目までにウェル内には細胞の残骸だけが残された；そして、トリパンブルー排除を用いて、調査されたすべての濃度で認識できる程度の構造を保持している細胞の成長可能性を調べた。濃度が低いと、ＭｅＰ－ｄＲは認められる程の細胞の死は起きなかったが、濃度が高くなると(200および400μＭ)、半分以上の細胞が死んだ。ＭｅＰ－ｄＲの毒性がヒトＰＭＰによるＭｅＰ遊離のレベルが低過ぎるためだとすると、その場合、ヒトＰＮＰの選択的抑制因子との結合はこうした毒性を防ぐ可能性がある(モントゴメリーら(J.A.Montogomery et al.),J.Medicinal Chem.36:55－69(1993))。
大腸菌ＰＮＰ発現ベクターによって媒介されるＭｅＰ－ｄＲの毒性強化

バクテリア性ＰＮＰ－コード配列をプラスミド発現ベクターに挿入した。ガイ(N.J.Gay), J.Bacterial.158:820－825(1984)に述べられている方法を用いて、大腸菌(ＪＭ101株)クロモソーム性ＤＮＡテンプレートが得られた。大腸菌ＤeoD遺伝子(５)の全長コーディング配列を決定し、そして望ましい生成物の５′および３′端にNotl部位を組み込むために、２つのＰＣＲプライマー
ＧＡＴＣＧＣＧＧＣＣＧＣＡＴＧＧＣＴＡＣＣＣＣＡＣＡＣＡＴＴＡＡＴＧＣＡＧ(ＳＥＱ　ＩＤ　NO:１)、および、ＧＴＡＣＧＣＧＧＣＣＧＣＴＴＡＣＴＣＴＴＴＡＴＣＧＣＣＣＡＧＣＡＧＡＡＣＧＧＡＴＴＣＣＡＧ(ＳＥＱ　ＩＤ　NO:２)
が用いられた。増幅(2.5ユニットtaqポリメラーゼ、200μmの各dＮＴＰ，50mM　ＫＣｌ、10mMトリスＣｌ(pH8.3)、1.5mM　ＭｇＣｌ２および0.01%ゼラチン(重量／体積)を含んだ反応液混合物100μl内に各プライマーの100ngを用いた、94℃×１分の変性化、５０℃×２分のアニーリング、そして１ngテンプレートを用いての72℃×３分の延長化)を30サイクル繰り返したところ、予想されたサイズ(716塩基対)の単一ＰＣＲ生成物が得られた。この生成物はフェノール／クロロフォルムによって抽出され、エタノールで析出され、ＮotＬで消化され、ジーンクリーン(Gene Clean)キット(Bio.101,La Jolla,CA)を用いてゲル精製された。
増幅されたバクテリア性ＰＮＰ配列を、プラスミド真核発現ベクターに付加した。大腸菌ＰＮＰの真核発現を指令することができるベクターを得るために、ＮotＩによる消化でpＳＶβ(クローンテック(Clontech),Palo Alto,CA)から切り離し、ベクターバックボーンを脱ホスホリル化し(仔ウシ腸アルカリ性ホスファターゼ、ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ，Gaithersburg,MD)、上記と同様の手順でゲル精製した。上に述べたようにして作成されたＰＮＰインサートを、次に、ＳＶ－40初期プロモーターによって制御されるＰＮＰ発現を有する新しい構成体をつくるために、プラスミドバックボーンのＮotＩ端に結索した。(ベクターとインサートの両方をカットインする12の制限消化を用いる)制限マッピング、および上に述べたプライマーを用いての組換えプラスミドからの全長インサトの再増幅によって、正しい組換え体(およびインサートの方向性)の確認を行った。この方法によりプラスミドＳＶ－ＰＮＰが得られた。
Ｔ84結腸悪性腫瘍細胞のトランスフェクション
Ｔ84結腸悪性腫瘍細胞をトランスフェクトするために、陽イオン性リポソーム媒介遺伝子伝達を用いた。要約的に言うと、ＰＮＰまたはＬacＺを含んだ６μgのプラスミドを最終体積200μlのＤＭＥＭ／Ｆ12無血清培地内でＤＯＴＭＡ／ＤＯＰＥの１：１モル混合物(Lipofectin™(ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬ，Gaithersburg,MD))10μgに加えた。室温で10分間インキュベートした後、ＤＮＡ－脂質混合物を500μl無血清培地に加えて、ウェル内部の細胞をカバーするために用いられた。４時間後、各ウェルからトランスフェクション媒地を取り除き、10%仔ウシ胎児血清を含んだ２ml　ＤＭＥＭ／Ｆ12を加えた。
トランスフェクションの効率
ＬacＺ遺伝子が上に述べた手順でＴ84細胞にトランスフェクトされた。要約的に言うと、上に述べたものと同じ脂質媒介遺伝子伝達手順を用いて、ＳＶ－40初期プロモーターの制御下の大腸菌ＬacＺ遺伝子を含んだプラスミド６μgを１～２×10^5個のＴ84細胞に伝達した。トランスフェクションから48時間後、ＰＢＳで細胞を３回洗浄し、0.2%グルタルアルデヒド(80mM　ＮａＨＰＯ２を含む)で４℃×10分間(80mM　ＮａＨＰＯ２で)固定し、ＰＢＳで２度すすぎ、その後、80mM
ＮａＨ２ＰＯ４、20mM　ＮａＨ２ＰＯ４，1.3mM　MgＣｌ２，３mM　Ｋ３Ｆe(ＣＮ)６，３mM　Ｋ４Ｆe(ＣＮ）６および１mg/ml　Ｘ－gal(５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－ガラクトピラノシド)を含む溶液内で染色した。染色から12時間後、β－ガラクトシダーゼＤＮＡで措置した細胞の0.1～１%は遺伝子発現に関してポジティブに染色された。これらの細胞のトランスフェクション２日後のＸ－gal染色は、全トランスフェクション効率の0.1～１%(ブルー細胞のパーセンテージで確認）を示した。措置されなかったＴ84細胞、脂質だけで措置した細胞、そしてプラスミドＤＮＡだけで措置した細胞では、ポジティブな細胞は観察されなかった。各標的指向配列を含み、組換え細胞の核

染色をもたらすＬａｃＺレポーター遺伝子を用いても、同じ結論が得られた。
ＭｅＰ－ｄＲの付加
トランスフェクションから48時間後、新しい培地を加えて、そして、望ましい最終濃度を達成するために、ＭｅＰ－ｄＲ(ＰＢＳ内に１mg/ml)を細胞に直接加えた。ＭｅＰ－ｄＲ毒性調査に関連して上に述べたのと同様の手順で、措置から５日後に細胞の成長可能性に関する測定を行った。
１つの実験で、トランスフェクトされていない細胞、あるいはＳＶ－40初期プロモーターの制御化の大腸菌ＰＮＰまたはＬａｃＺを含んでいるｃＤＮＡを10，20または40μg(それぞれ図１の１，２および３)でトランスフェクトされた細胞を含むウェルにＭｅＰ－ｄＲ(160μＭ)を加えた。５日後、細胞を各ウェルから取り出して、染料を排除する細胞の数を、ヘマサイトメータで判定した。ＤＯＴＭＡ－ＤＯＰＥトランスフェクション手順による30～50％程度の毒性は、最適な条件で行われる場合、インビトロでＴ84に陽イオンリポソーム媒介遺伝子伝達を行うのには受け入れられるレベルである。この調査の結果を図１に示す。
追加的に行われた実験で、１ウェルあたり２×10^5個程度の細胞が、大腸菌ＰＮＰ　ｃＤＮＡを含んだプラスミド６μgを用いてトランスフェクトされた。トランスフェクションから２日後、いろいろな濃度のＭｅＰ－ｄＲ(０，２，４，20，40および160μＭ)をそれらのウェルに加えて、５日後に、ヘマサイトメータで、染料を排出する細胞の数を数えた。ＭｅＰ－ｄＲの濃度が４μＭ程度の低さであると、細胞の成長が80％以上抑制された。
１ウェルあたり２×10^5個の細胞がトランスフェクションで述べた手順を用いて、ＬａｃＺまたはＰＮＰでトランスフェクトされた３組体で、別の実験が行われた。トランスフェクションから２日後、16μＭのＭｅＰ－ｄＲがＰＮＰでトランスフェクトされた１組の培養体と、ＬａｃＺによってトランスフェクトされた別の１組の培養体に加えられた。別のＰＮＰおよびＬａｃＺでトランスフェクトされた培養体には薬品は与えられなかった。これらの結果は、ＰＮＰでトランスフェクトされた培養体、およびＭｅＰ－ｄＲで措置した培養体を除いて、すべての培養体で細胞致死は最低のレベルであった。
上に述べた実験で、ＭｅＰ－ｄＲ(160μＭ)はトランスフェクトされなかった細胞に対して最小レベルの毒性しか発揮しなかった。ＬａｃＺ遺伝子の発現はＭｅＰ－ｄＲによって媒介された毒性には何の影響も及ぼさなかったが、ＭｅＰ－ｄＲは大腸菌ＰＮＰによってトランスフェクトされたほとんどすべての細胞を殺した(図１)。ＰＮＰトランスフェクション後に16μＭのＭｅＰ－ｄＲを用いた場合も、かなりの細胞致死が認められた。これらの結果は、大腸菌ＰＮＰ　ｃＤＮＡの低効率発現(腫瘍細胞の１％以下での発現)でもトランスフェクトされた細胞および局外者細胞をほぼ100％殺すのに十分であることを示している。加えて、細胞を覆っている培地へのＭｅＰの分散がかなりの希釈効果を有しているので、インビボで大腸菌ＰＮＰを発現する腫瘍細胞のより低い部分でもＭｅＰ－ｄＲの存在下で腫瘍細胞の壊死を引き起こすことができる可能性を示唆している。
細胞抽出物内のＭｅＰ－ｄＲに対する大腸菌ＰＮＰの活性
大腸菌ＰＮＰ活性を発現するＴ84細胞内のＭｅＰ－ｄＲの毒性をトランスフェクトされたＴ84細胞で測定した。要約すると、上に述べたように、６μgの大腸菌ＰＮＰ遺伝子か、あるいはＬａｃＺ(β－ガラクトシダーゼ)遺伝子を含んだプラスミドでトランスフェクトされたＴ84細胞を、トランスフェクションの48時間後に遠心分離によって集め、３倍の体積の0.01Mリン酸カリウム(pH7.4)に再懸濁させ、その後、氷上で15分間インキュベーションした。ペレットを均一化させ、その後サンプルを100,000×ｇで60分間遠心分離にかけた。ＰＮＰ活性を50mMリン酸カリウム(pH7.4)、100μＭ　ＭｅＰ－ｄＲおよび１mg/mlの細胞抽出物から取り出した蛋白質を含む100μＭの溶液内で測定した。25℃で24時間のインキュベーション後、沸騰して反応を止め、沈殿した蛋白質を遠心分離で取り除き、反応混合物をSpherisorb ＯＤＳ１(５μm)カラム(キーストンサイエンティフィック(Keystone Scientific Inc.),State College,PA)に注入することによってＨＰＬＣ処理した、ＭｅＰ－ｄＲおよびＭｅＰは１ml/分の流速で、50mM第１リン酸アンモニウム緩衝剤(pH4.5)／アセトニトリル(95/５；Ｖ/Ｖ)の30分アイソクラティック勾配(isocratic gradient)により溶出され

た。ＭｅＰ－ｄＲおよびＭｅＰは254nmでの吸収により検出された。
ＭｅＰ－ｄＲの約24％は大腸菌ＰＮＰ遺伝子でトランスフェクトされたＴ84結腸悪性腫瘍細胞からの抽出物内でＭｅＰに転化されたのに対して、ＬａｃＺ遺伝子でトランスフェクトされた結腸悪性腫瘍細胞からの細胞抽出物では転化は起きなかった。基質としてイノシンを用いて測定された総ＰＮＰ活性(ヒト＋大腸菌)は大腸菌ＰＮＰでトランスフェクトされたＴ84細胞では変化しなかった。したがって、トランスフェクトされた細胞での大腸菌ＰＮＰの発現は比較的レベルが低いにもかかわらず、十分な量のＭｅＰ－ｄＲが形質転換されてすべての細胞を殺した。
大腸菌ＰＮＰでトランスフェクトされたＴ84細胞の培地におけるＭｅＰの検出
大腸菌ＰＮＰによるＴ84細胞のトランスフェクションから48時間後に、ＭｅＰ－ｄＲ(160μＭ)を加えた。ＭｅＰ－ｄＲを加えてから５日後に、培地を集めて、沸騰により蛋白質を沈殿させた。遠心分離の後、上に述べたような逆相ＨＰＬＣによってＭｅＰの出現に関する分析を行った。
ＭｅＰは大腸菌ＰＮＰでトランスフェクトされたＴ84細胞の培地の中でだけ検出された。
ＭｅＰ－ｄＲの75％以上は大腸菌ＰＮＰでトランスフェクトされた細胞内では５日間でＭｅＰに転化されたが、ＬａｃＺでトランスフェクトされた細胞では転化されなかった。これらの結果は重要な意味をもっている。というのは、それは、１)トランスフェクトされなかった、そしてmockトランスフェクトされた結腸悪性腫瘍細胞はＭｅＰ－ｄＲのＭｅＰへの形質転化に関するメカニズムを欠如しており、２)予想通り、ＭｅＰは細胞外地内に簡単に放出され、効果的な局外者致死効果を発揮し、そして、３)組換えＰＮＰによって作り出されるＭｅＰの細胞外濃度は、観察された局外者致死効果を説明するのに十分だったからである。加えて、これらの結果は、真核細胞内での(大腸菌ＬａｃＺによる場合と同様)原核ＰＮＰのＳＶ－40により発生される発現が高度に活性の高い、機能的な酵素をもたらすことを示している。大腸菌ＰＮＰは原核細胞内ではホモヘキサマー(Homohexamer)として集まると考えられるので、大腸菌ＰＮＰオリゴマー化のメカニズムは真核蛋白質合成と共存するようである。
非分裂細胞に対する毒性
２つの実験の結果は、ＭｅＰが非－増殖細胞を殺す可能性があることを示している。このことは、ＭｅＰが通常用いられている他の大部分の抗腫瘍薬品と違っている点である。
最初の実験で、ＣＥＭ細胞は通常の10％でなく１％血清内で培養された。これらの条件の下で、細胞は成長を止め、細胞の数は最初の細胞数の1.5～２倍の水準で安定した。細胞を10％血清を含んだ培地に戻すと、細胞の成長は続けられた。１％血清で48時間インキュベーションした後、ＣＥＭ細胞培地にＭｅＰを最終濃度が10μｇ/mlになるように追加すると、細胞の数は最初の数の25％以下程度まで低下し、ＭｅＰが非－増殖性細胞に対して毒性を持つことが示された。
第２の実施例で、ＤＮＡへのチミジンの組み込み、ＲＮＡへのウリジンの組み込み、そして蛋白質へのロイシンの組み込みに対するＭｅＰの影響を調べた。ＲＮＡと蛋白質合成はＭｅＰによる措置で最も大きな影響を受けた。ＤＮＡ合成に対する影響は、ＲＮＡおよび蛋白質合成に対する影響が明らかになった後でだけ起きた。これらの結果は、ＲＮＡまたは蛋白質合成に対するＭｅＰの抑制効果がその毒性に関与していることを示している。これら２つの機能は増殖状態には関係なくすべての細胞にとって不可欠のものであり、そのことはＭｅＰが増殖中の細胞と増殖中でない細胞の両方に対して毒性を持っていることを示している。
実施例２：別の有用な組換えベクター
組換えレトロウィルスが、バクテリア性ＰＮＰ配列をプラスミドレトロウィルスベクターに加えて、その後、ウィルス生産のためにパッケージング細胞ラインを通過させて作成された。このレトロウィルスベクター、ｐＬＮＳＸ(ミラーおよびローズマン(Miller and Rosman),BioTechnique,７:980－991(1989))は、クローニングサイト内に挿入されたコーディング配列の転写を指示するＳＶ40初期プロモーターの３′にあるクローニングサイトを含んでいる。バクテリア性ＰＮＰ配列は直鎖化ｐＬＮＳＸに結紮された。結紮混合物を用

いて、コロニーハイブリダイゼーションによって確認されたバクテリア性形質転換因子を発生させ、ＳＶ40プロモーターに対して５′－３′の方向にＰＮＰコーディング配列を含んでいる１つのクローン(pＬＮ／ＰＮＰ)が塩化セシウム勾配遠心分離を含む通常の技術によって増幅された。プラスミドはΨ２パッケージング細胞系に脂質で媒介された遺伝子伝達によってトランスフェクトされた。これらの細胞からの上澄液を48時間後に取り出して、0.45μMろ過でより不純物を取り除き、その後、別のΨ２パッケージング細胞系に与えた。24－36時間後、これらの細胞を酵素によって切り離し、Ｇ418(１ｇ/Ｌ)によて補強された培地内に最初の濃度の５分の１の濃度でプレートした。ウィルス生産細胞は７～10日後にコロニーとして出現し、それらはクローニングリングとして分離され、量および組換えウィルス生産の正確さについて検査された。

バクテリア性ＰＮＰ配列をプラスミドアデノウィルスベクターに加えて、その後、ウィルスを生産させるためにパッケージング細胞系を通過させて組換えアデノウィルスを作成した。このアデノウィルス性プラスミドベクター、pＡＣＣＭＶ(コールら(Kolls et al.),Proc.Natl.Acad.Sci.(USA),91:215－219(1993))がサイトメガロウィルス(ＣＭＶ)直前プロモーター(immediate early promoter)に操作的に結合された多重クローニングサイトでＥcoＲＩおよびHind IIIによって直線化された。バクテリア性ＰＮＰコード配列をNotＩを用いてＳＶ／ＰＮＰプラスミドから切除し、そのフラグメントをゲル精製してpＳＬ1180(ファルマシア(Pharmacia),Piscataway,NJ)のNotＩサイトに結紮して、pＳＬ／ＰＮＰと称されるプラスミドをつくりだした。ＥcoＲＩおよびHind IIIによってpＳＬ／ＰＮＰから切除して、ゲル精製し、pＡＣＣＭＶのＥcoＲＩおよびHind IIIサイトに結紮し、pＡＣＣＭＶ／ＰＮＰを呼ばれる新しいアプラスミドをつくりだした。pＡＣＣＭＶ／ＰＮＰの細胞へのトランスフェクションを行った後、ＭｅＰ－ｄＲプロドラッグへの露出後、投与量に比例した毒性が発生し、このことはＣＭＶプロモーターが治療レベルのバクテリア性ＰＮＰの生産を指令することを確認した。pＡＣＣＭＶ／ＰＮＰはpＪＭ17と共に、ウィルスの複製に不可欠なアデノウィルスＥ１Ａ配列を含むヒト胎児悪性腫瘍193細胞に共形質導入した。

チロシナーゼプロモーター配列が指令する発現プラスミド

ヒトのチロシナーゼ調節配列をヒトゲノムＤＮＡからのポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によって増幅した。このゲノム性ＤＮＡは標準的な方法で有核ヒト血液細胞から得たものである。ＰＣＲプライマーＡ(ＧＡＴ ＣＧＣ ＴＡＧ ＣＧＧ ＧＣＴ ＣＴＧ ＡＡＧ ＡＣＡ ＡＴＣ ＴＣＴ ＣＴＣ ＴＧＣ(ＳＥＱ ＩＤ No：３))およびＢ(ＧＡＴ ＣＧＣ ＴＡＧ ＣＴＣ ＴＴＣ ＣＴＣ ＴＡＧ ＴＣＣ ＴＣＡ ＣＡＡ ＧＧＴ ＣＴ(ＳＥＱ ＩＤ No：４)は、キクチらが発表している配列(キクチら(Kikuchi,et al.),Biochim.Biophys.Acta,1009:283－286(1989))を用いて各端部にNheＩ制限酵素を付加することによって、bp－451から＋78に増幅した。このＰＣＲ反応では、94℃×１分、50℃×２分、72℃×３分を１サイクルとして、30サイクルで行われた。最終的な精製物をフェノール／クロロホルム抽出によって精製し、NheＩで消化し、ゲルで精製し、市販されているルシフェラーゼベクターpＧＬ２ベイシック(プロメガ(Promega),Madison,WI)に結紮させた。組換え体を制限マッピングでスクリーニングし、正しい方向性を有するクローンが確認された(Tyr－Luc)。ネガティブコントロールとして用いるため、逆の方向性を有するチロシナーゼプロモーターを有するプラスミド(Rev－Tyr－Luc)も選び出された。ＳＶ－40ウィルス初期プロモーターおよびほたるルシフェラーゼを発現させるＳＶ－40エンハンサー領域を含んだコントロールベクター(ＳＶ－Luc) (pＧＬ２コントロールベクター、プロメガ((Promega),Madison,WI)を用いて、細胞のトランスフェクションの成功が確認された。その内部でチロシナーゼプロモーターがＰＮＰ発現を制御したプラスミドをつくりだすために、ＰＮＰ遺伝子をTyr－Luc内のルシフェラーゼと置換した。これは、ＳＶ－ＰＮＰからＰＮＰ遺伝子の全長を切り出すためにXhoＩ/ShalＩダイジェストを用い、その後、このフラグメントをTyr－Lucからルシフェラーゼ遺伝子を取り除くために、XhoＩ/ShalＩダイジェスト後に残っているXhoＩ/ShalＩサイトに挿入することによって行われた。

チロシナーゼレポーター構成体は一過性発現アッセイによってテストされた。すべてのル

シフェラーゼレポーター遺伝子の実験で、Lipofectin™(ＧＩＢＣＯ／ＢＲＬ, Gaithersburg,MD)トランスフェクション手順を用いた。細胞は６－ウェルプレートに50%の密集度で入れられ、１昼夜成長させられた。トランスフェクションの直前に、各ウェルは殺菌されたリン酸緩衝食塩水(ＰＢＳ)によって３度洗浄した。６－ウェルプレートの１つのウェルは、細胞系に応じて、リポソーム10μg：プラスミドＤＮＡ10～20μgの比率でトランスフェクトされた。リポソーム／ＤＮＡ複合体は、メーカーの指示に従って作成された。このリポソーム／ＤＮＡ複合体を血清を含まない培地(ＳＦＭ)と混合し、そして、全体で700μlを６－ウェルプレートの１つのウェルに入れた。37℃の温度下で14～16時間インキュベーションした後、トランスフェクション混合物を吸引して、２mlの完全培地を付加した。さらに48時間後に、これらの細胞を取り出して、市販されているキット(ルシフェラーゼアッセイキット, プロメガ(Promega),(Madison,WI)の指示と試薬に基づいてルシフェラーゼ活性を判定した。プロモーターのないルシフェラーゼベクター(“ベイシック”)を含んでいる構成物で種々の悪性腫瘍細胞系(黒色腫、肝臓、結腸、前立腺、骨髄腫、神経膠、ヘラ(HeLa))をトランスフェクトし、ヒトチロシナーゼプロモーターを逆の方向(ルシフェラーゼ遺伝子と転写するためには正しくない方向)にルシフェラーゼ遺伝子をヒトチロシナーゼプロモーターに結紮し、リシフェラーゼ遺伝子を操作によって構成的ＳＶ40初期プロモーター(ＳＶ－Luc)に結合し；あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子をヒトチロシナーゼプロモーターに(ルシフェラーゼ遺伝子を転写するのに正しい方向性で)結紮することによって(Tyr－Luc)、48時間後にルシフェラーゼレポーター遺伝子発現のついての評価を行った。

図２ａ～ｄに示されているように、チロシナーゼ転写プロモーター配列は、操作によって黒色腫細胞(Mel－１およびMep－21)に結合されたルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を特異的に制限した。対照的に、ＳＶ40はすべてのトランスフェクトされた悪性腫瘍細胞系でそれが操作的に結合されたルシフェラーゼ遺伝子を構成的に発現した。これらの結果は、特定の腫瘍にヘテロロガス酵素の発現を転写によって向かわせるために、組織特異性プロモーター配列を用いることを示している。

Lipofectin™の非－加水分解性陽イオン性脂質成分と関連して発現する可能性のある毒性を取り除くために、致死実験で別のリポソームトランスフェクション手段を用いた。陽イオン性脂質ＤＯＴＡＰ(１，２－ジオレオイルオキシ－３－(トリメチルアンモニウム)－プロパン)と中性脂質ＤＯＰＥ(ヂオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン)(アバントポーラリピッド(Avanti Polar Lipids))の１：１混合物で構成されるリポソームビヒクルはLipofectin™と類似したトランスフェクション特性を示すが、毒性の程度は低い(データは図示せず)。0.5mgのＤＯＴＡＰと0.5mgのＤＯＰＥを混合し、クロロフォルム溶媒を蒸発させてＤＯＴＡＰ／ＤＯＰＥリポソームを作成した。500μlのシクロヘキサンを500μl加えた後、この混合物を乾いた氷の上に置いて、凍結乾燥した。殺菌水１mlを粉末化した脂質に加えて、その溶液を５分間毎に、合計30分間撹拌した。Ｔ84またはＭＥＬ－１細胞を30%の密集度で24－ウェルに入れて、１昼夜成長させた。トランスフェクションの直前に、各ウェルを殺菌用ＰＢＳで３回洗浄した。24－ウェルの１つのウェルをトランスフェクトするために、7.5μgのＤＯＴＡＰ／ＤＯＰＥ(１μg/μl)を1.875μgのプラスミドＤＮＡ(１μg/μl)と混合して、15分間インキュベートした。15分間のインキュベーションに続いて、リポソーム／ＤＮＡ複合体を266μlのＳＦＭと混合して、24－ウェルプレートの１つのウェルに加えた。このプレートを37℃の温度で４時間インキュベーションし、その後、トランスフェクション混合物を吸引して、完全な培地500μlと取り替えた。トランスフェクションによる有意な毒性は認められなかった。

ＰＮＰまたはコントロールプラスミドを投与された細胞においては、トランスフェクションの２日後に培地を交換し、ＭｅＰ－ｄＲ(６－メチルプリン－デオキシリボシド)を該当するウェルに最終的な濃度が30μg/mlの濃度になるように加えた。四日後、ＭｅＰ－ｄＲ(30μg/ml)を含んだ新鮮な培地を加えて、古い培地を取り除かずに、細胞を培養した。２日後(６日目)、細胞をＰＢＳで一度洗浄して、再懸濁させ、ヘマサイトメータを用いて、トリパンブルー／リピート試薬(トリパンブルー染料0.4%, Gibco－ＢＲＬ、Gaithersburg,

MD)内でカウントした。
Ｔ84結腸悪性腫瘍細胞およびMel－１抗腫瘍細胞の両方を、ＤＯＴＡＰ／ＤＯＰＥリポソームを用いて、構成的ＳＶ40初期プロモーターを操作的にバクテリア性ＰＮＰ遺伝子に結合されたＳＶ－ＰＮＰ構成体、あるいは、黒色腫に対して特異性を示すチロシナーゼプロモーターがＰＮＰ遺伝子によって操作的に結合されているTyr－ＰＮＰ、あるいは、Tyr－Luc(上記参照）でトランスフェクトし、また、一部はどの構成体によってもトランスフェクトされなかった(“no txf”)。Tyr－ＰＮＰ構成体でトランスフェクトされた黒色腫細胞(Mel－１)だけが、図３ａのトランスフェクトされたＴ84結腸悪性腫瘍細胞を、図３ｂのトランスフェクトMel－１の黒色腫細胞と比較して分かるように、プロドラッグＭｅＰ－ｄＲプリンアナログヌクレオシドの投与による致死作用に対する感作性を示した。対照的に、構成的ＳＶ40初期プロモーターをバクテリア性ＰＮＰ遺伝子に操作によって結合した場合(ＳＶ－ＰＮＰ構成体)、ＳＶ－ＰＮＰ構成体でトランスフェクトされたＴ84結腸悪性腫瘍およびMel－１黒色腫細胞は、プロドラッグＭｅＰ－ｄＲの投与により致死効果に対する感作性を示した。これらの結果は、プリンアナログヌクレオシド切断遺伝子の発現の転写標的化により特定の腫瘍細胞を特異的に殺すことができるを示している。
実施例３：バクテリア性ＰＮＰのための候補プロドラッグを識別するための方法
以下の方法は、哺乳動物のＰＮＰよりバクテリア性ＰＮＰによって効果的に切断される基質(プロドラッグ)を識別する上で有効である。この方法で確認されたプロドラッグは、さらに、動物実験で、毒性、種々の医薬用基質との投与に対する適合性、および他の医薬品的特性について調べることができる。
この方法はインビトロで基質の切断を定量的に測定する。プリンアナログヌクレオシド(0.1または1.0mM)は、100mM　ＨＥＰＥＳ,pH7.4,50mMリン酸カリウム500μlおよび100μg/ml大腸菌ＰＮＰまたは0.1ユニット/mlヒトＰＮＰの中でインキュベートされた。この反応混合物を25℃の温度下で、１時間インキュベートし、その後各サンプルを２分間沸騰して、反応を停止した。各酵素による［^{14}Ｃ］イノシンの切断はポジティブコントロールとして判定された。各サンプルを逆相ＨＰＬＣで分析して、基質の製品への転化について測定した。50mMリン酸アンモニウム(95%)およびアセトニトリル(５%)を含む溶媒を用いて、Spherisorb　ＯＤＳ１(５μm)カラム(キーストンサイエンティフィック(Keystone Scientific,Inc.,State College,PA))からヌクレオシドおよびプリンアナログが１ml/分の流量で溶出された。基質および生成物は254nmでのその吸収によって検出され、その保持時間と吸収スペクトルを真正サンプルと比較することによって識別された。
この分析によって、ＭｅＰ－ｄＲ，２－Ｆ－ｄＡdo、１－デアザ－２－アミノ－６－Ｃｌ－プリン－リボシド、２－Ｆ－５′－デオキシアデノシン、２－Ｃｌ－２′－デオキシアデノシンはすべてバクテリア性ＰＮＰにとっては良い基質、そして、哺乳動物ＰＮＰに対しては貧弱な基質であることが示され、したがって、悪性疾患を措置するためにここで述べられている方法および組成物で使うためにさらに評価を行う条件を備えた好ましいプロドラッグ候補である(ここではＭｅＰ－ｄＲは適切なプロドラッグである)。基質５′－アミノ－５′－デオキシアデノシン、Ｆ－araAおよびα－アデノシンがバクテリア性ＰＮＰに対しては適切な基質であり、哺乳動物ＰＮＰに対しては貧弱な基質であった。基質キシロシルメチルプリン、２－Ｃｌ－２′－Ｆ－２′－デオキシアデノシン、２－Ｆ－２′－Ｆ－２′－デオキシアデノシンおよび７－リボシル－６－メルカプトプリンは両方の酵素に対して貧弱な基質であり、したがって、プロドラッグとしての候補とはならない。同様に、基質７－リボシル－ヒポキサンチンおよびシオグアノシンは両方の酵素に対して中程度または優れた基質であったが、これも、ここに述べられる組成物や方法を用いた腫瘍の措置のためのプロドラッグとしての候補にはならないであろう。
２－Ｆ－ｄＡdoおよびＦ－araAはフルオロアデニンの生産には関係のない抗腫瘍活性を示した。したがって、ここに述べられている方法では、これらの２つの基質の抗腫瘍活性は、大腸菌ＰＮＰによる代謝によって増強されるようである。加えて、これら２つの試薬の代謝と毒性は２′－デオキシシチジンの存在の下での培養によって妨げることができる。したがって、これらの基質を２′－デオキシシチジンと組み合わせることによって、フル

オロアデニンの生産だけに関連した抗腫瘍活性が可能になる。

表２：大腸菌ＰＮＰの基質としてのヌクレオシドのスクリーニング

基　　質	大腸菌ＰＮＰ		ヒトＰＮＰ	
	100μm	1μm	100μm	1μm
Ⅰ．大腸菌ＰＮＰに良好な基質であるがヒトＰＮＰに不良の基質ヌクレオシド				
ＭｅＰ－ｄＲ	93(87) 91(86)	29(24) 45(21)	0 0(86)	0 0(47)
ＦｄＡｄｏ	56(69) 60(86)	14(18) 38(21)	0(70) 0(86)	0(30) 0(47)
1-デアザ-2-アミノ-6-Cl-プリン-リボシド	62(87) 41(86)	16(23) 15(21)	0(88) 0(86)	0(52) 0(47)
2-F-5′-デオキシ-アデノシン	81(86) 65(86)	30(21) 44(21)	0(88) 0(86)	0(50) 0(47)
2-Cl-2′-デオキシ-アデノシン	41(86)	－	0(87)	－
Ⅱ．大腸菌ＰＮＰに中程度の基質しかしヒトＰＮＰに不良な基質のヌクレオシド				
5′-アミノ-5′-デオキシ-アデノシン	5(86) 9(86)	1(19) 5(21)	0(89) 0(86)	0(53) 0(47)
Ｆ－ａｒａＡ	3(86) 5(86)	3(21) 12(21)	0(88) 0(86)	0(50) 0(47)
α－アデノシン	0(86) 3(86)	0(21) 2(21)	0(88) 0(86)	0(50) 0(47)
Ⅲ．両酵素に不良の基質ヌクレオシド				
キシロシルメチルプリン	0(86) 0(86)	0(21) 0(21)	0(88) 0(86)	0(50) 0(47)
2-Cl-2′-F-2′-デオキシ-アデノシン	0(86) 0(86)	0(21) 0(21)	0(88) 0(86)	0(50) 0(47)
2-F-2′-F-2′-デオキシ-アデノシン	0(86) 0(86)	0(21) 0(21)	0(88) 0(86)	0(50) 0(47)
7-リボシル-6-メルカプトプリン	0 0(86)	0 0(21)	0 0(86)	0 0(47)
Ⅳ．両酵素の基質のヌクレオシド				
7-リボシル-ヒポキサンチン	16(86) 49(86)	30(21) 38(21)	3(86) 73(86)	5(47) 73(47)
チオグアノシン	49(86)	38(21)	73(86)	48(47)

上の表２で、各数字は、示されているホスホリラーゼによるプリンアナログヌクレオシドの形質転化率を示す。括弧内の数字は同じ実験でのイノシンのヒポキサンチンへの転化率を示す。

実施例４：バクテリア性ＰＮＰおよびＭｅＰ－ｄＲによるインビボでの措置

バクテリア性ＰＮＰおよびＭｅＰ－ｄＲなどのプロドラッグのインビボでの腫瘍の成長を抑

止する活性は、バクテリア性ＰＮＰ遺伝子を発現する腫瘍を移植されたマウスにおいて示された。この調査の第１のステップでは、上の実施例２で述べられたような、構成的に発現されたバクテリア性ＰＮＰ遺伝子を含んでいる組換えレトロウィルスを必要とした。バクテリア性ＰＮＰをコードする配列をＳＶ／ＰＮＰプラスミドから切除して、標準的な手法で、ｐＬＮＳＸベクターのHind IIIサイトに結紮した(ミラーら(Millet al.),BioTechnique,７:980－990,1989)。その結果得られたベクターｐＬＮ／ＰＮＰは、ＳＶ40初期プロモーターを用いてバクテリア性ＰＮＰの転写を構成的に指示した。このプラスミドベクターをΨ２パッケージング細胞系にトランスフェクトし、48時間後にこれらの細胞系から集めた上澄を用いて、別のΨ２パッケージング細胞に感染させた。上澄液を用いてから24時間後に、Ψ２細胞を酵素を用いて切り離し、レトロウィルスを含んだクローンを選別するために、低い濃度(１：５～１：10)でＧ418を含んだ(１gm/Ｌ)培地にプレートした。いくつかのクローンが選別され、クローンの力価についての判定を行った(これら標準的な方法については、ルスカルプら(Rousculp et al.)Human Gene T Therapy,３:471－477(1992)参照)。組換え体、ＬＮ／ＰＮＰウィルスの供給源として、最も高い力価を選択し、腫瘍細胞を感染するために用いた。

マウス乳腺悪性腫瘍細胞系16ｃをＬＮ／ＰＮＰウィルスによる感染によって、バクテリア性ＰＮＰを構成的に発現するように、修飾した。16ｃ細胞は、低濃度でプレートし、(上に述べた)Ψ２－プロデューサー系からの上澄液に含まれたＬＮ／ＰＮＰウィルスを、ポリブレン(５μg/ml)の存在下で数時間加えた。培地を24時間、通常の培地に加え、その後、細胞を酵素を用いて切り離し、感染された細胞を選別するために、Ｇ418(１gm/Ｌ)を含んでいる培地に低い濃度でプレートした。ここでは“16ｃ－ＰＮＰ細胞”と呼ばれるＧ418抵抗性細胞のポリクローナル混合物を増強して、マウスに移植した。

アトヒミックヌードマウスに16ｃ－ＰＮＰ細胞を移植した。各マウスには、第１日目に2×10^{6}の細胞を左の脇腹に皮下注射で投与した。その結果を図４に示した。コントロール用動物(ｎ＝４)を通常のヌードマウスの飼育条件下で飼育したところ、13日目に測定可能な腫瘍が発生した。すべてのコントロールマウスの腫瘍は、移植後22日目まで、サイズが大きくなり続けた。初期措置グループ(ｎ＝４)は、最初の４日間(１日目から４日目)、毎日、最大許容投与量をやや下回る投与量で、100mg/kgの量で６－ＭｅＰｄＲの腹膜内接種(ＩＰ)によって措置された。これらのマウスのうちの１匹を８日目に殺して、腫瘍組織について調べ、別の２匹は20日目に死亡したが、その原因は不明で、投与されたプロドラッグのレベルが高すぎた可能性がある。重要なことは、移植後18日目まで、どのマウスでも検出可能な腫瘍は認められなかったことである。１匹のマウスは22日目に非常に小さな腫瘍を形成した。後期措置グループ(ｎ＝４)は、移植後13日目、14日目、そして15日目の毎日、100mg/kgの量で６－ＭｅＰｄＲの腹膜内(ＩＰ)接種によって措置された。後期措置グループのすべては、コントロール用動物の13日目のサイズと比較できる程度の腫瘍を有していた。コントロール群とは違って、後期措置グループの腫瘍は、15日目以後はサイズが大きくならなかった。これらすべての動物は実験期間を生きのびた。これらの結果は、バクテリア性ＰＮＰ＋プロドラッグの組み合わせがインビボでの腫瘍の成長を遅らせることを明確に示している。

本願では、種々の出版物が引例として参照されている。これらの出版物における開示は、本発明が関連する技術をより十分に示すために、本願において引例として組み入れられている。

配列のリスト

(1)一般情報

(ｉ)出願人：The UAB Research Foundation Southern Research Institute

(ii)発明の名称：プリンヌクレオシドホスホリラーゼによる遺伝子治療法

(iii)配列の数：４

(iv)対応する住所

(Ａ)あて先：Patrea L.Pabst

(Ｂ)街路：1100 Peachtree Street,Suite 2800

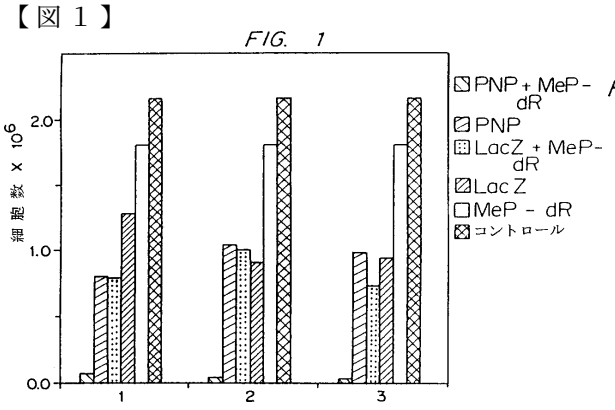
(C)都市：Atlanta
(D)州：Georgia
(E)国：USA
(F)郵便番号：30309-4530
(v)コンピュータ読取方式：
(A)メディアタイプ：フロッピーディスク
(B)コンピュータ：ＩＢＭ互換型　ＰＣ
(C)オペーレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS
(D)ソフトウエア：リリース特許＃1.0バージョン＃1.25
(vi)現出願データ：
(A)出願番号：US
(B)出願日：
(C)分類：
(viii)弁理士／代理人に関する情報：
(A)氏名：Pabst,Patrea L.
(B)登録番号：31,284
(C)参考／処理番号：IGI102CIP
(ix)電信電話情報：
(A)電話：(404)-815-6508
(B)ファックス：(404)-815-6555
(2)ＳＥＱ　ＩＤ　NO：１の情報
(ｉ)配列特徴：
(A)長さ：37塩基対
(B)タイプ：核酸
(C)鎖：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状
(ii)分子タイプ：他の核酸
(ｘｉ)配列図示：ＳＥＱ　ＩＤ　NO：１：
GATCGCGGCC GCATGGCTAC CCCACACATT AATGCAG 37
(2)ＳＥＱ　ＩＤ　NO：２の情報
(ｉ)配列特徴：
(A)長さ：45塩基対
(B)タイプ：核酸
(C)鎖：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状
(ii)分子タイプ：他の核酸
(ｘｉ)配列図示：ＳＥＱ　ＩＤ　NO：２：
GTACGCGGCC GCTTACTCTT TATCGCCCAG CAGAACGGAT TCCAG 45
(2)ＳＥＱ　ＩＤ　NO：３の情報
(ｉ)配列特徴：
(A)長さ：36塩基対
(B)タイプ：核酸
(C)鎖：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状
(ii)分子タイプ：他の核酸
(ｘｉ)配列図示：ＳＥＱ　ＩＤ　NO：３：
GATCGCTAGC GGGCTCTGAA GACAATCTCT CTCTGC 36
(2)ＳＥＱ　ＩＤ　NO：４の情報
(ｉ)配列特徴：
(A)長さ：35塩基対

(Ｂ)タイプ：核酸
(Ｃ)鎖：一本鎖
(Ｄ)トポロジー：直鎖状
(ii)分子タイプ：他の核酸
(ｘｉ)配列図示：ＳＥＱ　ＩＤ　NO：４：

GATCGCTAGC TCTTCCTCTA GTCCTCACAA GGTCT 35

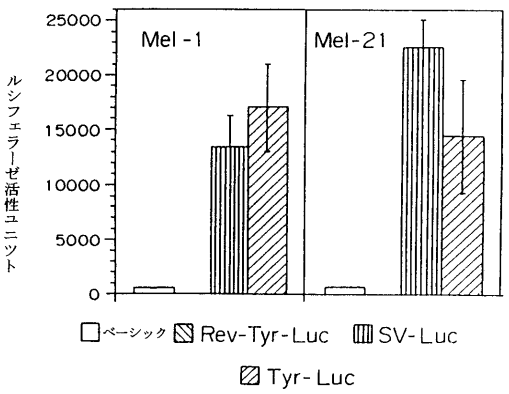
【図１】

FIG. 1



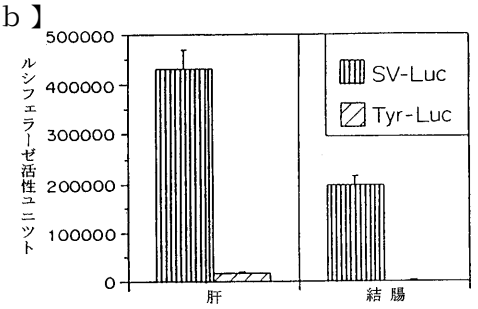
【図２ａ】

FIG. 2a



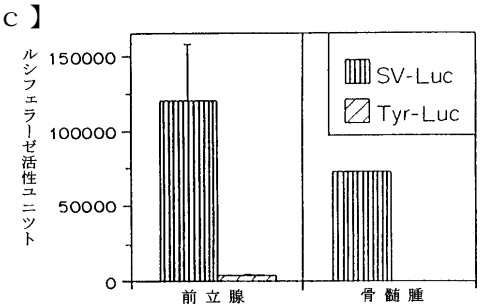
【図２ｂ】

FIG. 2b



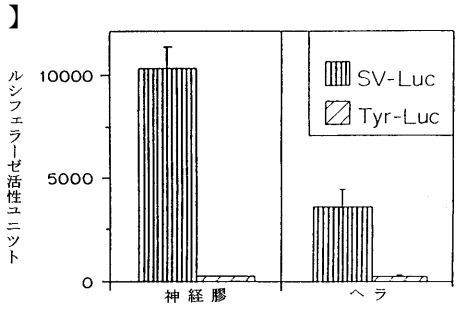
【図２ｃ】

FIG. 2c



【図２ｄ】

FIG. 2d



【図３ａ】

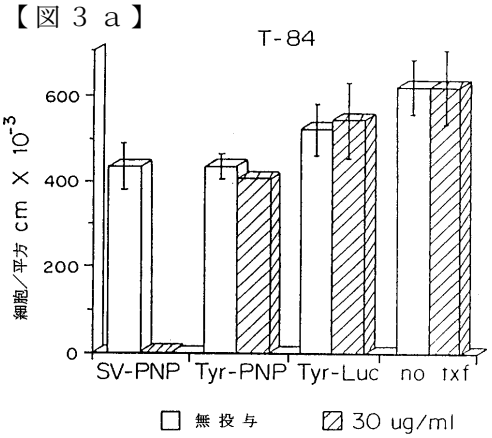


FIG. 3a

【図３ｂ】

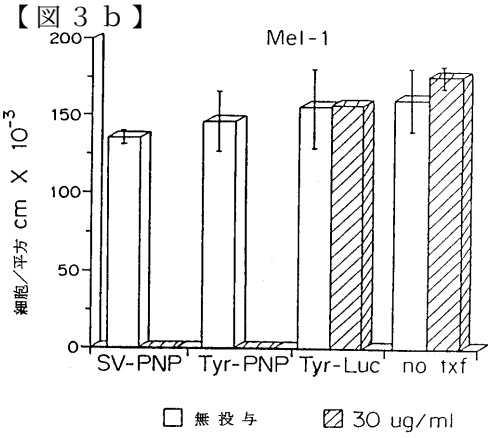
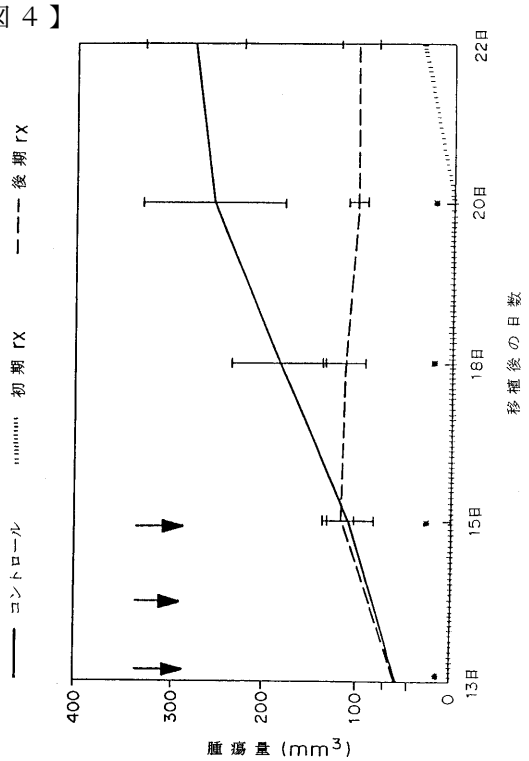


FIG. 3b

【図４】

FIG. 4



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00
Ａ６１Ｋ	*31/70*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/70
Ａ６１Ｋ	*38/45*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/52
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395

(74)代理人 100071478
弁理士 佐田 守雄
(74)復代理人 100080115
弁理士 五十嵐 和壽
(72)発明者 ソースチャー，エリク，ジェイ
アメリカ合衆国 ３５２０５ アラバマ，バーミングハム，サーティーセカンド ストリート サウス，１０１９
(72)発明者 パーカー，ウィリャム，ビー.
アメリカ合衆国 ３５２０２ アラバマ，バーミングハム，サーティーセカンド ストリート サウス １０２２
(72)発明者 ベニット，レナド，エル. ジュニア
アメリカ合衆国 ３５２１３ アラバマ，バーミングハム，モントロウズ ロウド ３７４２

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 Proc.Natl.Acad.Sci.USA，1992，Vol.89，p.33-37
J.Clin.Invest.，1986，Vol.78，p.1261-1269
Gene Therapy，1994，Vol.1，p.233-238

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/09
C12Q 1/48
C07H 19/16
C07H 21/04
C12N 9/10
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDream2)