

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4272263号
(P4272263)

(45) 発行日 平成21年6月3日 (2009.6.3)

(24) 登録日 平成21年3月6日 (2009.3.6)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 31/4406 (2006.01)

A 6 1 K 31/4406

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 3

請求項の数 18 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願平11-503953
 (86) (22) 出願日 平成10年6月15日 (1998.6.15)
 (65) 公表番号 特表2002-511754 (P2002-511754A)
 (43) 公表日 平成14年4月16日 (2002.4.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB1998/001731
 (87) 国際公開番号 W01998/057662
 (87) 国際公開日 平成10年12月23日 (1998.12.23)
 審査請求日 平成17年1月13日 (2005.1.13)
 (31) 優先権主張番号 9712370.7
 (32) 優先日 平成9年6月14日 (1997.6.14)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者

エンザクタ・アール・アンド・ディ・リミ
 テッド
 イギリス・ロンドン・WC1E・6HQ・
 ゴワー・スリート・55・サード・フロア
 ・ロナルドソンズ

(74) 代理人

弁理士 志賀 正武

(74) 代理人

弁理士 高橋 詔男

(74) 代理人

弁理士 渡邊 隆

(74) 代理人

弁理士 青山 正和

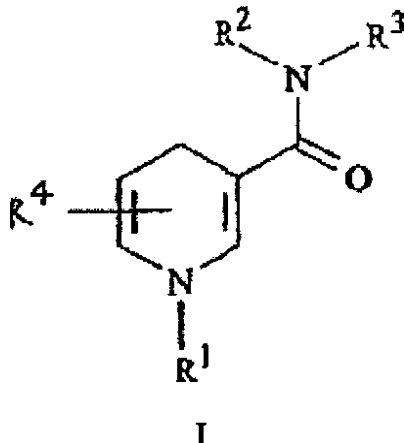
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療システム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

NQO2の作用によって実質的に細胞毒性薬に変換されるプロドラッグ、及び、NQO2
 に還元当量を伝達することができる化学式 I :



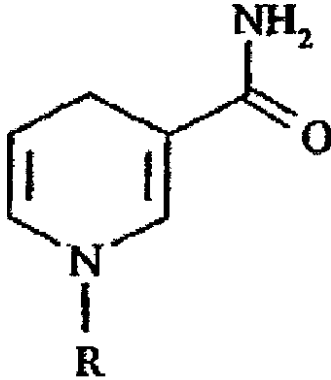
[式中、R¹は、CONH₂、OH、ハロゲン、CNまたはCOOHによる置換を含む置換アルキル；ア
 リール；置換アリール；CONR^aR^b（式中、R^aおよびR^bは、独立してH、アルキル、または置
 換アルキルである）から選択され、R²およびR³は、独立してH、アルキル、または置換アル
 キルであり、R⁴は、H、アルキル、置換アルキル、ハロゲン、CN、COOH、CONH₂またはOH

のいずれかである]

を有するニコチンアミドリボシド(還元型)(NRH)の類似物を含む治療システム。

【請求項2】

前記NRHの類似物が、化学式II:



10

II

(式中、Rは、CONH₂、OH、ハロゲン、CNまたはCOOHによる置換を含む置換アルキルである)

を有する、請求項1記載のシステム。

【請求項3】

前記アルキル基が、C₁からC₆アルキルである、請求項1または2記載のシステム。

【請求項4】

Rが、-CH₂CONH₂; -CH₂CH₂CH₂SO₃⁻; -CH₂CH₂CH₂OH; -CH₂CH₂OH; 及び -CH₂CH₂COOHからなる群から選択される、請求項2または3記載のシステム。

【請求項5】

前記NRHの類似物が、1-(カルボキシアミドメチル)-ジヒドロニコチンアミドである、請求項4に記載のシステム。

【請求項6】

前記プロドラッグが、CB1954またはその類似物である請求項1から5のいずれかに記載のシステム。

【請求項7】

前記プロドラッグが、CB1954である請求項6記載のシステム。

【請求項8】

NQO2に還元当量を伝達することができる、請求項1から5のいずれかに記載のニコチンアミドリボシド(還元型)(NRH)の類似物の、NQO2の作用により実質的に細胞毒性薬に変換されるプロドラッグを投与された、投与されている、または投与される、治療すべき腫瘍を有するヒト患者の治療薬の製造における使用。

【請求項9】

NQO2の作用によって実質的に細胞毒性薬に変換されるプロドラッグの、NQO2に還元当量を伝達することができる請求項1から5のいずれかに記載のNRHの類似物を投与された、投与されている、または投与される、治療すべき腫瘍を有するヒト患者の治療薬の製造における使用。

【請求項10】

前記プロドラッグが、CB1954またはその類似物である請求項8または9記載の使用。

【請求項11】

前記プロドラッグが、CB1954である請求項10記載の使用。

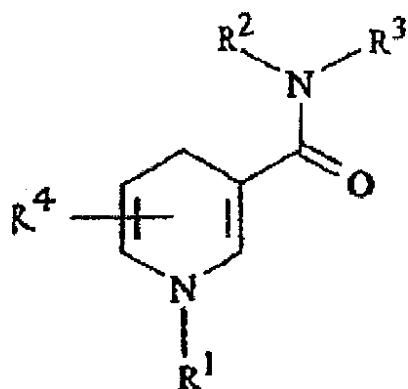
【請求項12】

化学式I:

20

30

40



10

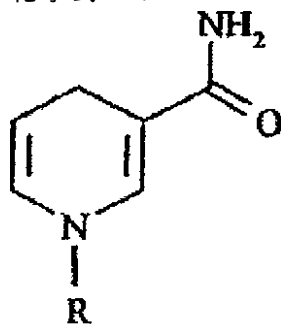
I
 [式中、 R^1 は、 CONH_2 、 OH 、ハロゲン、 CN または COOH による置換を含む置換アルキル；アリール；置換アリール； CONR^aR^b （式中、 R^a および R^b は、独立して H 、アルキル、または置換アルキルである）から選択され、 R^2 および R^3 は、独立して H またはアルキルであり、 R^4 は、 H 、アルキル、置換アルキル、ハロゲン、 CN 、 COOH 、 CONH_2 または OH のいずれかである]

を有する化合物からなる、プロドラッグを細胞毒性薬へと変換するNQO2に還元当量を伝達するための薬剤。

【請求項13】

化学式II：

20



II

30

（式中、 R は、 CONH_2 、 OH 、ハロゲン、 CN または COOH による置換を含む置換アルキルである）

を有する、請求項12記載の薬剤。

【請求項14】

前記アルキル基が、 C_1 から C_6 アルキルである、請求項12または13記載の薬剤。

【請求項15】

R が、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ； $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ ； $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ； $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ；及び $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ からなる群から選択される、請求項13または14記載の薬剤。

【請求項16】

1-（カルボキシアミドメチル）-ジヒドロニコチンアミドである、請求項15に記載の薬剤。

40

【請求項17】

請求項12から16のいずれかに記載の化合物の、哺乳類の腫瘍の治療薬の製造における使用。

【請求項18】

治療すべき標的細胞がNQO2を発現するか否かを測定するための、NQO2ポリペプチド又はmRNAに特異的なプローブ、及び請求項1から7のいずれかに記載の治療システム又は請求項12から16のいずれかに記載の還元剤を含む部品の哺乳類の腫瘍の治療用キット。

【発明の詳細な説明】

50

本発明は治療システム（system）、特にプロドラッグを活性化させる治療システムおよび標的細胞、特に腫瘍細胞を死滅させる際のかかるシステムの使用に関する。

細胞傷害性薬剤は全身投与すると、腫瘍細胞ばかりでなく体内の正常細胞も死滅させるので、これらの薬剤の腫瘍部位への送達が非常に望まれている。その結果生じる正常細胞への細胞毒性により細胞毒性薬の用量は制限され、従ってこれらの薬剤の治療の可能性を低下させる。しかしながら、いくつかの場合においては、投与した薬剤は内因性の活性は持たないが、インビボにおいて適切な時間または場所で活性薬剤に変換される。かかる類似体はプロドラッグと呼ばれ、医薬で広く用いられている [ConnorsおよびKnox, 1995]。プロドラッグの活性型への変換は、例えばpHの変化、酸素圧力、温度または塩濃度に依存する多くのメカニズムによって、あるいは薬剤の自発的分解または分子内の開環もしくは環化によって起こすことができる。

10

WO 88/07378には二成分系およびその治療上の使用が記載されており、ここで第1の成分は腫瘍関連抗原と結合できる抗体フラグメントおよびプロドラッグを細胞毒性薬に変換できる酵素を含んでなり、第2の成分は細胞毒性薬に変換できるプロドラッグである。しばしば「抗体指向性酵素プロドラッグ治療」（ADEPT）と呼ばれるこの一般システムもまた、特異的酵素およびプロドラッグに関連してEP 0 302 473およびWO 91/11201に記載されている。

WO 89/10140には、WO 88/07378に記載されているシステムへの改変が記載されており、ここでは系にさらなる成分を使用している。このさらなる成分は、第1および第2の成分を臨床的に投与する場合に、血液からの第1成分のクリアランスを促進する。第2の成分は通常は抗体-酵素複合体と結合する抗体であって、クリアランスを促進する。酵素の活性部位に向けられた抗体は、酵素を不活性化するというさらなる利点を有していた。しかしながら、かかる不活性化抗体は腫瘍部位で酵素を不活性化するという望ましくない効力を有しているが、その腫瘍中への浸透は抗体へのガラクトース残基の付加によって回避された。このガラクトシル化抗体は、肝臓のガラクトース受容体を介して結合した抗体-酵素成分とともに血液から迅速に除去された。この系は、臨床試験において安全および効果的に使用されてきた。しかしながら、血液からその迅速なクリアランスをもたらすかかる不活性化抗体のガラクトシル化もまた、その正常組織の浸透およびそこに局在する酵素の不活性化を阻害する。

20

WO 93/13805には、腫瘍細胞抗原に特異的な抗体など、標的細胞に特異的な部分、およびその天然状態で細胞毒性薬の効果を阻害することができる物質をその細胞毒性薬に対する効果のより低い物質に変換することができる酵素のような不活性化部分を含有する化合物を含んでなるシステムが記載されている。それゆえに細胞毒性薬の効果から正常組織を保護している間は、腫瘍部位における細胞毒性薬を長時間作用させることが可能である。

30

WO 93/13806には、宿主において標的細胞を破壊する方法に使用する成分の3成分キットを含んでなるADEPT系のさらなる改変が記載されている。第1の成分は標的細胞に特異的な部分およびプロドラッグを細胞毒性薬に変換できる酵素的に活性な部分を含んでなり、第2の成分はその酵素活性のある部分によって細胞毒性薬に変換することができるプロドラッグであり、さらに第3の成分は少なくともその成分を血管コンパートメントに投与するときに成分が宿主の血管画分から流出するのをある程度に制限することができる部分、および細胞毒性薬をより毒性の少ない物質に変換することができる不活性化部分を含んでなる。

40

発明者らの非公開の同時係属特許出願GB 9624993.3には、高分子プロドラッグ治療システムが記載されている。発明者らの非公開の同時係属特許出願PCT/GB96/03000には、ADEPTの改良における酵素阻害剤の使用が記載されており、また発明者らの非公開の同時係属特許出願PCT/GB96/03254には、ADEPTの改良における細胞取り込み抗体および/または細胞内補因子の使用が記載されている。

EP 0 415 731には、しばしばGDEPT（遺伝子指向性酵素プロドラッグ治療）と呼ばれる治療システムが記載されている。

プロドラッグの設計における主要なアプローチとしては、酵素作用によって活性型薬剤に

50

変換される不活性な類似体の合成がある。ガンの化学療法では、プロドラッグがより良い処方特性を有する類似体から腫瘍環境中で特異的に活性化されるよう設計された前駆体までという種々の目的のために臨床的に用いられている。動物実験の結果およびヒトにおける用量の強化研究によって、ある腫瘍の型、例えば卵巣ガンは、それらが反応する抗ガン剤の用量を100倍に増やすと化学療法によって完全に根絶されることが指摘されている。

高用量の骨髄傷害性療法後の自己由来骨髄移植により、救助実験、例えばメトトレキサート後のホリニン酸により、または単離した周縁部の灌流により、用量強化を用いて投与される用量を高める試みは、与えられる全用量をより高めることができるが、このオーダーの規模でしか高められない。しかしながら、腫瘍中に存在する酵素によって特異的に活性化されるプロドラッグを使用することによって、このレベルの用量強度を理論的に達成することができるという多くの例がある。腫瘍担持動物での実験は、プロドラッグが腫瘍環境中で特異的に活性化される場合、マウスが担持する大きな初期腫瘍および広範囲の転移に治癒をもたらすことができることを示している [ConnorsおよびWhisson, 1996, WhissonおよびConnors, 1965]。プロドラッグが腫瘍中で特異的に発現した酵素に対する良好な基質であり、プロドラッグと薬剤との間の毒性の差が100倍以上であるので、ひとたび候補となる酵素が同定（特に腫瘍の細胞外の空間に高濃度の酵素が存在するかどうか）されれば、多くの異なるクラスの抗ガン剤をしばしば誘導体化して好適なプロドラッグを形成させることができる。このことは、細胞毒性アルキル化剤のプロドラッグを設計するのに用いられるアプローチで実証することができる。このクラスの抗ガン剤は優先的に作用するが、隣接するDNA鎖の共有結合アルキル化によりおそらく独占的ではないので、細胞毒性に対する第1の基本的な必要条件は、薬剤がその注入後に主要部位に到達することができ、DNAをアルキル化するに十分な反応性がある最適レベルの化学反応性を持たなければならないということである。試薬の反応性が高すぎると、腫瘍と反応する前にそれが加水分解してしまい、反応性が低すぎると、十分にDNAのアルキル化が起こる前に排泄されてしまう。次に、その標的に到達するためには内皮および細胞および核膜を通り抜けることができなければならない。最後に、細胞毒性をもたらす主要な反応は架橋反応であり、従ってアルキル化剤は少なくとも2本のアルキル化アームを持っていなければならない。

好適なプロドラッグを設計するためには、ひとたび独特の腫瘍酵素が同定されれば、記載された特徴のうち1つ以上を欠損しているが酵素の作用によって好適な薬剤を産生するプロドラッグが合成される。従って、多くのアルキル化プロドラッグとは、化学的に不活性であって無毒であるが、それらを代謝させてより活性で有毒な化合物にする酵素の基質である。アルキル化剤が生物学的分子と反応する能力は最小レベルの化学反応性に依存し、このレベルの活性は化学構造に依存して大きく変化する。電子供与または吸引特性の小さな変化は、化学反応性を大きく変えることができる。多数の抗腫瘍アルキル化剤が実験的に試験されており、例外なくほとんどの活性誘導体が少なくとも二官能基性であり、すなわち少なくとも2本のアルキル化アームを持っていなければならない。

単官能基剤は発ガン物質であることがあるが、通常それらは非常に毒性が低く、それらを酵素的に二官能基剤に変換できる場合には効果的なプロドラッグとすることができる。この例としてはCB 1954という単官能アジリジンがあり、これは通常二官能基性アルキル化剤にのみ感受性があるラットWalker腫瘍に対して非常に効果的であった (Knoxら, 1993によって総説されている)。この腫瘍は比較的高濃度の酵素DT-ジアホラーゼ (NQO1, EC1.6.99.2) を有し、これは4-ニトロ基をヒドロキシルアミンに還元し、次いでそれを（おそらくアセチルCoAによって）二官能基剤に変換する（図1）。しかしながら、DT-ジアホラーゼのヒト型は、CB 1954をラット型よりも極めて遅く還元され、ヒト腫瘍は（ラットWalker腫瘍と同一レベルのDT-ジアホラーゼを含有するものでさえも）この薬剤に耐性がある [Knoxら, 1993]。還元速度の差異は大部分がアミノ酸104位におけるただ1つのアミノ酸変化、すなわちグルタミンからチロシンへの変化によるものである [Chenら, 1997]。ラット腫瘍に対するCB 1954の起源がわかったので、ヒト腫瘍でCB 1954を活性化させる多数の方法が提案されている。最初は抗体に向けられた酵素プロドラッグ治療（前述のADEPT）であり、その中で抗体を用いて大腸菌（E. coli）ニトロリダクターゼを腫瘍に局在化

10

20

30

40

50

させる。このニトロリダクターゼはCB 1954をラットDT-ジアホラーゼよりも極めて速く還元することができる。この系はWO 93/08228に記載されている。遺伝子に向けられた酵素プロドラッグ治療 (GDEPT) は、大腸菌由来のニトロリダクターゼをコードする遺伝子を腫瘍細胞中で発現させ、次いでCB 1954に対する感受性を付与する方法である。これはWO 95/12678に記載されている。また、内生DT-ジアホラーゼをNRHで刺激することによってヒト細胞中のCB 1954細胞毒性を劇的に増加させることができるということも報告されている [Friedlosら, 1992a]。これらの実験において、ヒト細胞に対するCB 1954 (5-(アジリジン-1-イル)-2,4-ジニトロベンズアミド) の毒性は、(ウシ胎児血清が培養培地に存在すると) MADHによっておよびニコチンアミドリボシド (NRH) (還元型) によって非常に強まるが、ニコチン酸リボシド (還元型) によっては強まらなかった。ヒト細胞をCB 1954およびNADHで同時に処理すると、それらのDNAに架橋が形成された。その他のDNA架橋剤によって生じた毒性は、還元されたニコチンアミド化合物によって影響を受けなかった。カフェインが培地に含まれると、CB 1954の細胞毒性が減少した。CB 1954およびNADHにさらした後にヒト細胞系が受けた毒性は、酵素DT-ジアホラーゼのそれらのレベルに比例していた。ラットDT-ジアホラーゼに対する補因子であることが示されているNRH [Friedlosら, 1992b] は、ウシ胎児血清において酵素によってNADHから発生し [FriedlosおよびKnox, 1992]、CB 1954に対するヒトDT-ジアホラーゼの活性を刺激すると結論付けられた。しかしながら、最近、NRHの存在下でヒト細胞において検出可能な活性を減少させる他のCB 1954が存在し、この活性はDT-ジアホラーゼに帰することができるものよりも非常に大きいことが示されている [Quinn, 1996]。

「ニコチンアミドモノヌクレオシド還元」、「ジヒドロニコチンアミドリボシド」、「ニコチンアミドリボシド (還元型)」および「NRH」はすべて同等であり、本明細書において相互に交換して用いられる。ニコチンアミドリボシドは、出典開示して本明細書の一部とみなされるFriedlos & Knox (1992) Biochem. Pharmacol. 44, 631-635に記載されているものをはじめとする当技術分野で十分公知の方法を用いてその市販のモノヌクレオチドから酵素的に産生してもよい。

ヒトNAD(P)H: キノンオキシドリダクターゼ2 (NQO2) は、DT-ジアホラーゼ (NQO1) に対する相同性によって同定した [Jaiswalら, 1990]。NQO2遺伝子の最後のエキソンはNQO1遺伝子の最後のエキソンよりも1603bp短く、NQO1遺伝子によってコードされる101個のアミノ酸と比較して58個のアミノ酸コードする。これにより、NQO2タンパク質はNQO1タンパク質よりも43個のアミノ酸だけ短くなる。NQO2とNQO1との間の遺伝子構成および配列がよく保存されていることにより、NQO2遺伝子はヒトにおけるNQO遺伝子ファミリーの別のメンバーをコードするが、それはDT-ジアホラーゼのキノンリダクターゼの特徴を欠いていることが確かめられた [Jaiswal, 1994]。サル腎臓COS1細胞中で発現したNQO2 cDNA由来のタンパク質は、CB 10-200、CB 1954の類似体のニトロ還元を効果的に触媒した [Jaiswal, 1994]。ノーザンブロット分析によって、NQO2遺伝子はヒトの心臓、脳、肺、肝臓、および骨格筋肉においては発現するが、胎盤においては発現しないことが示された。これに対し、NQO1遺伝子はすべてのヒトの組織において発現した。種々の組織の中でのNQO2およびNQO1遺伝子の発現に関する大きな多様性が注目された [Jaiswal, 1994]。

発明者らは、ここに、NQO2がCB 1954を迅速に還元し得ることを示し、DT-ジアホラーゼではなくてこの酵素がFriedlosら [1992a] によって報告されたヒト細胞に対するCB 1954細胞毒性へのNRHの効果を高める原因であると考えている。

動物の身体において腫瘍細胞のような標的細胞を死滅させるための前述の方法はすべて有用であるが、新しい治療システムを提供することがなお望ましい。

本発明の第1の態様は、標的細胞に特異的な部分および(a) ヒトNAD(P)H: キノンリダクターゼ2 (NQO2) または一定のプロドラッグに対してNQO2と実質的に同一の活性を有するその変異体もしくはフラグメントもしくは融合体もしくは誘導体、あるいは(b) 当該NQO2をコードするポリヌクレオチドまたはその変異体もしくはフラグメントもしくは融合体もしくは誘導体を含んでなる化合物を提供する。

標的細胞に特異的な部分によって認識されるものは、腫瘍細胞、ウイルスに感染した細胞

10

20

30

40

50

、病原微生物、遺伝子治療の一部として導入された細胞またはある理由で破壊したいと望む身体の正常細胞によって発現されるいずれの好適なものであってもよい。好ましくは、機能的に他の治療手段で置き換えることができない宿主のいずれの正常組織におけるよりも、破壊される細胞において著しく高い濃度で、そのものがターゲティング部分に存在または接近すべきである。ガン細胞により発現された標的の使用は、例えば内分泌組織または器官でのその同等またはより高い発現によっては妨げられない。救命の状況下では、その器官が、例えば睾丸の場合のようにその機能が必ずしも生命に必須ではないか、またはホルモン代替療法によって補うことができるかのいずれかであれば、犠牲にされる可能性がある。このような考え方は、例えば甲状腺、副甲状腺、副腎皮質および卵巣に当てはめられる。

10

認識されるものはしばしば抗原である。腫瘍関連抗原は、それらが細胞膜上で発現し、または細胞外液中に分泌されると抗体の標的の役割を果たす。

抗原特異的部分は、全抗体（通常は便利さおよび特異性のためにモノクローナル抗体）、その一部（例えばFabまたは $F(ab')_2$ ）または合成抗体もしくはその一部であってもよい。抗体部分のみを含んでなる複合体は血液からのクリアランス速度を最適化することによって有利となり、このFc部分のために非特異的結合を行いにくくなるものと思われる。選択された抗原に対して好適なモノクローナル抗体は、例えば "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H. Zola (CRC Press, 1988) および "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J.G.R. Hurrell (CRC Press, 1982) に開示されているもののような公知の技術によって調製してもよい。この明細書に記載された参考文献は、すべて出典開示して本明細書の一部とみなされる。二価特異的抗体を細胞灌流によって、1価フラグメントの再会合によって、またはその結果生じる細胞特異的抗原に向けられている二価特異的抗体および酵素に向けられているもう一方の抗体の一方の部分と全抗体の化学的架橋によって調製してもよい。二価特異的抗体は酵素に結合させて投与することができ、またはそれを最初に投与し、続いて酵素を投与することができる。二価特異的抗体を最初に投与し、腫瘍細胞に局在化させた後に酵素を投与して、腫瘍に局在化した抗体により捕捉させるのが好ましい。二価特異的抗体を調製する方法は、Coevalanら (1987) Cancer Immunol. Immunother. 24, 127-132および133-137および138-143、ならびにGillislandら (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7719-7723に開示されている。

20

30

抗体の可変重 (V_H) 鎖および可変軽 (V_L) 鎖は抗原認識に関与しており、このことは初期のプロテアーゼ消化実験によって初めて認識された。さらなる確証が齧歯類抗体の「ヒト化」によって見出された。齧歯類由来の可変ドメインをヒト由来の不変ドメインと融合させてもよく、その結果として生じた抗体は齧歯類を親とする抗体の抗原特異性を保持している (Morrisonら (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855)。

抗原特異性は可変ドメインによって付与され、不変ドメインとは無関係であるということは、すべて1つ以上の可変ドメインを含有する抗体フラグメントの細菌での発現を伴う実験から知られている。これらの分子にはFab様分子 (Betterら (1988) Science 240, 1041)、Fv分子 (Skerraら (1988) Science 240, 1038)、一本鎖Fv (ScFv) 分子、ここで V_H および V_L パートナードメインは柔軟なオリゴペプチドを介して結合されており (Birdら (1988) Science 242, 423; Hustonら (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879)、単離したVドメインを含んでなる単ドメイン抗体 (dAb) (Wardら (1989) Nature 341, 544) が含まれる。それらの特異的結合部位を保持する抗体フラグメントの合成に関する技術の総説はWinter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299において見出されるであろう。

40

「ScFv分子」により、発明者らは V_H および V_L パートナードメインが柔軟なオリゴペプチドを介して結合されている分子を意味する。

全抗体ではなく抗体フラグメントを用いる利点は数倍である。より小さいフラグメントは、固形組織へのよりよい浸透のような改良された薬理学的特性をもたらす得る。相補結合のような全抗体のエフェクター機能は除去される。Fab、Fv、ScFvおよびdAb抗体フラグメ

50

ントはすべて、大腸菌中で発現させて大腸菌から分泌させ、次いでこのフラグメントを多量に容易に産生させることができる。

全抗体、および $F(ab')_2$ は「二価」である。「二価」により、発明者らはこの抗体および $F(ab')_2$ フラグメントが2つの抗原結合部位を有することを意味している。これに対し、Fab、Fv、ScFvおよびdAbフラグメントは一価であり、ただ1つの抗原結合部位しか有していない。完全な免疫グロブリンをフラグメント化して $F(ab')_2$ フラグメントを産生することが、Harwoodら(1985) Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 21, 1515-1522に開示されている。

IgG類の抗体が好ましい。

あるいは、認識されるものは抗原性であってもなくてもよいが、他のいくつかの方法でそれを認識して特異的に結合させることができる。例えば、それはメラノーマ細胞で数多く発現しているメラノサイト刺激ホルモン(MSH)に対する受容体のような特徴的な細胞表面受容体であってもよい。次いで細胞に特異的な部分は、化合物または例えば細胞表面酵素に対する物質もしくはその類似体としてまたは伝達物質として非免疫性という点でそのものと特異的に結合している部分であってもよい。

腫瘍関連抗原に対する抗体およびそのフラグメントならびにガン胎児性抗原(CEA)に向けられた抗体または抗体フラグメントに関するかなりの研究がすでに行われており、ヒト絨毛膜ゴナドトロフィン(hCG)に向けられた抗体またはそれらのフラグメントをカルボキシペプチダーゼG2と結合させ、その結果得られた複合体は抗原結合および触媒機能の双方を保持している。これに続くこれらの複合体の静脈注射によって、それらはそれぞれCEAまたはhCGを発現する腫瘍中に特異的に局在化される。その他の抗体は相当する抗原を発現する腫瘍に局在化することが知られている。かかる腫瘍は初期のものならびにヒト患者における転移性結腸直腸ガン(CEA)および絨毛ガン(hCG)またはその他の形態のガンであってもよい。かかる抗体-酵素複合体はまた個々の抗原を発現するいくつかの正常組織に局在化される場合もあるが、抗原発現は正常組織ではより拡散される。かかる抗体-酵素複合体はそれら個々の抗原によって細胞膜と結合され、または細胞の間隙空間に分泌された抗原によって捕捉させてもよい。

腫瘍関連抗原、免疫細胞関連抗原、および感染性病原体関連抗原の例を表1に示す。

10

20

表1：ターゲッティング用細胞表面抗原

a)腫瘍に関連する抗原

抗原	抗体	存在する用途
癌胎児性抗原	C46(Amersham) 85A12(Unipath)	結腸／直腸腫瘍の 画像化及び治療
胎盤アルカリ ホスファターゼ	H17E2 (ICRF, Travers & Bodmer)	精巣及び卵巣ガンの 画像化及び治療
全てのガン腫	NR-LU-10 (NeoRx Corporation)	小細胞ガンを含む 種々のガン腫の画像化 及び治療
多形上皮ムチン (ヒト乳脂小球)	HMFG1 (Taylor- Paradimitriou, ICRF)	卵巣ガン及び胸水の 画像化及び治療
β -ヒト絨毛性 ゴナドトロピン	W14	マウスにおけるヒト異種移 植絨毛性ガンに対するカル ボキシペプチダーゼの ターゲッティング(Searle等 (1981) Br.J.Cancer 44, 137-144)
ヒトガン腫の炭化水素	L6(IgG2a) ¹	アルカリホスファターゼ のターゲッティング (Senter 等 (1988) PNAS USA 85, 4842-4846)
Bリンパ腫のCD20 抗原(平常または新形 成)	1F5(IgG2a) ²	アルカリホスファターゼ のターゲッティング (Senter 等 (1988) PNAS USA 85, 4842-4846)

¹Hellstromら (1986) Cancer Res. 46, 3917-3923²Clarkeら (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1766-1770

その他の抗原としては、胎児タンパク質、Ca-125および前立腺特異的抗原が挙げられる。

b)免疫細胞抗原

抗原	抗体	存在する用途
全てのTリンパ球 表面抗原 (CD 3)	OKT-3 (Ortho)	腎臓移植のために抗- 拒絶治療として
B-リンパ球 表面抗原 (CD 22)	RFB34 (Janossy, Royal Free Hospital)	B細胞リンパ腫の 免疫毒性治療
全てのTリンパ球 表面抗原 (CD 5)	H65 (Bodmer and Knowles, ICRF; Xoma Corp., USAに ライセンスされた)	急性対宿主性移植片病、 関節リウマチの免疫毒性 治療

10

c)感染性病原体に関連する抗原

抗原	抗体	存在する用途
流行性耳下腺炎ウイルス 関連	抗-流行性耳下腺炎ウ イルスポリクロナル 抗体	流行性耳下腺炎の治療の ためのジフテリア毒素に接 合した抗体
B型肝炎表面抗原	抗HBsAg	ヘパトームに対する免疫 毒性

20

その他の腫瘍特異的な標的および好適な結合部分を表2に示す。

表2：腫瘍特異的な標的および腫瘍に関連する抗原に対する結合部分

標的	結合部位	疾患
切断されたEGFR	抗-EGFR mAb	神経膠腫
イディオタイプ	抗-id mAbs	B-細胞リンパ腫
EGFR(c-erbB1)	EGF, TGF α 抗-EGFR mAb	乳ガン
c-erbB2	mAbs	乳ガン
IL-2レセプター	IL-2 抗-Tac mAb	リンパ腫及び白血病
IL-4レセプター	IL-4	リンパ腫及び白血病
IL-6レセプター	IL-6	リンパ腫及び白血病
MSH(メラノサイト刺激ホルモンレセプター)	α -MSH	メラノーマ
トランスフェリンレセプター(TR)	トランスフェリン 抗-TR mAb	神経膠腫
gp95/gp97	mAbs	神経膠腫
p-糖タンパク細胞	mAbs	薬物耐性
クラスター1抗原(N-CAM)	mAbs	小細胞肺ガン
クラスターw4	mAbs	小細胞肺ガン
クラスター5A	mAbs	小細胞肺ガン
クラスター6(LeY)	mAbs	小細胞肺ガン
PLAP(胎盤アルカリホスファターゼ)	mAbs	ある種のセミノーマ ある種の卵巣；ある種の非小細胞肺ガン
CA-125	mAbs	肺、卵巣
ESA(上皮特異的抗原)	mAbs	ガン
CD 19, 22, 37	mAbs	B-細胞リンパ腫
250 kDa	mAbs	メラノーマ
プロテオグリカンp55	mAbs	乳ガン
TCR-IgH融合	mAbs	小児T-細胞白血病
血液gp A抗原(B又はO固体において)	mAbs	胃腸及び結腸腫瘍
ムチンタンパクコア	mAbs	乳ガン

標的細胞特異的部分は抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体を含んでいれば好まし

い。

しかしながら、標的細胞特異的部分は（腫瘍のような）標的細胞の部位にNQ02またはその変異体またはそのフラグメントもしくは融合体もしくは誘導体の蓄積をもたらすいずれの化合物であってもよい。例えば、腫瘍による高分子の非特異的な取り込みは、ADEPT系の系において適当なレベルの酵素を送達するのに十分であり、腫瘍関連細胞障害性薬剤と腫瘍非関連薬剤の適切な比は、腫瘍から離れた場合に酵素高分子複合体をクリアランスまたは阻害されれば達成可能である。このアプローチは前記のADEPT系のいずれのものにも適用できるが、おそらくMDEPT（高分子指向性酵素プロドラッグ治療（macromolecule directed prodrug therapy））と呼ばれるべきである。

「腫瘍」とは、肺、肝臓、血液細胞、皮膚、脾臓、胃、結腸、前立腺、子宮、乳房、リンパ腺および膀胱の腫瘍をはじめとするあらゆる形態の腫瘍形成細胞増殖を意味するものと理解すべきである。固形腫瘍が特に適している。

この目的に抗体でない高分子を用いることの潜在的な利点はかなりのものである。第1に、非特異的高分子は免疫原性のないものを選択してもよい。第2に、高分子はヒト化した抗腫瘍抗体を産生するよりもはるかに安価なものであってよい。第3に、いくつかの重合体はそれらに結合した酵素をはじめとするタンパク質の免疫原性を低下させる、または消失させることが示されている（Abuchowskiら，1977，Wilemanら，1986，Mikołajczykら，1996）。第4に、抗体は限られた範囲のガンとのみ結合するが（抗体は全悪性腫瘍の約60%にしか存在しない）、腫瘍による高分子の取り込みは診察した限りすべての固形ガンに共通する特徴であるように思われる。

従って、特異的抗体がまだ報告されていない肉腫のような多くの腫瘍を、この原則を用いて標的としてもよい。

正常組織の酵素レベルが例えばガラクトシル化抗酵素抗体を用いることによって阻害される場合にのみ、非特異的高分子に対する腫瘍組織と腫瘍でない組織との間の比較的小さな差異を活用できる。酵素が非特異的高分子と結合しているときに腫瘍部位に対する酵素の必要量を得るには、特異的抗体酵素複合体の場合よりも多量のかかる複合体を投与する必要があるが、前者のより低価格のものはその効率の低さを相殺するはずである。

好ましくは、本発明に用いる高分子は親水性であり、体液および非経口投与用の通常の流動物に溶けることを特徴とする。反復投与中の全身的な蓄積を避けるためには高分子は生分解性であることが好適である。しかしながら、それは腫瘍部位で蓄積できないほど速く分解されてはならないことは明らかである。好ましくは、それは血液濃度を効果的な血液：腫瘍の濃度勾配を与えるに十分にするのに助けるので、選択された酵素と結合したときに濃度複合体の分子量および大きさが尿を排泄する腎臓の入り口の大きさ（MW 60 000）を越えなければならない。一般に、少なくとも800 000まで、例えば160 000までの分子量が好適である。高分子は網内系によって容易に捕捉されないものであることが好ましい。それを触媒にするために、高分子は結合した酵素を分解しない二官能基薬剤を用いて簡単な化学的方法により1つ以上の酵素分子と結合していてもよい。出発高分子は結合している免疫原性のある酵素上の免疫原性を低下させることが好ましい。

非生分解性成分を腎臓で濾過して尿として排泄するためには、サブユニットとして利用可能であって、非生分解性的高分子を生分解性結合単位によって結合してもよい。

いくつかの高分子は細胞に取り込まれることが知られていないが、N-（2-ヒドロキシプロピル）メチルアクリルアミド等の他のものは、1以上のメカニズムによって吸収される（Duncanら，1996）。

好ましくは、高分子はポリエチレングリコール（PEG）である。タンパク質のポリエチレングリコールによる誘導体化が、それらの血液循環中の寿命を引き延ばし、同時にそれらの抗原性および免疫原性を低下させること等も実証されている。

MDEPTは、出典開示して本明細書の一部とみなされる発明者らの同時継続特許出願PCT/GB97/03284にさらに詳しく説明されている。

従って、腫瘍部位に酵素を送達させるための好ましい実施形態は、腫瘍毛細管の漏出しやすいことおよび腫瘍のリンパを通しての排出が少ないことを利用することである。従って

10

20

30

40

50

、例えばポリエチレングリコールまたはデキストランとの結合によって結合されて高分子を形成した酵素は腫瘍によって特異的に取り込まれることが示されている。

ヒトNAD(P)HをコードするcDNA：キノニンリダクターゼ2(NQO2)はJaiswal(1990) Biochemistry 29, 1899-1906に与えられており、NQO2遺伝子の遺伝子構造はJaiswal(1994) J. Biol. Chem. 269, 14502-14508に示されており、これらは双方とも出典開示して本明細書の一部とみなされ、ヌクレオチド配列およびコードされたアミノ酸配列は図6に示されている。当業者ならば遺伝子工学およびよく知られている組換えDNA技術を用い、本明細書に含まれる技術に基づいてNQO2をコードするDNAを容易に入手して取り扱うことができ、それらのうちのいくつかはSambrookら(1989), "Molecular cloning, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載されている。

10

NQO2の変異体またはフラグメントまたは融合体または誘導体を、それが所定のプロドラッグに対してNQO2と実質的に同一の活性を有していると仮定すれば、NQO2の代わりに所定のアミノ酸配列とともに使用してもよい。酵素NQO2は、例えばプロドラッグCB 1954およびそのプロドラッグ類似体の変換を触媒する。従って、好ましくはNQO2の変異体またはフラグメントまたは融合体または誘導体はCB 1954に対してNQO2それ自体と実質的に同一の活性を有する。便宜には、この変異体またはフラグメントまたは融合体または誘導体は少なくとも0.1倍のNQO2の k_{cat}/K_m を有し、さらに好ましくは少なくとも0.5倍、一層好ましくは少なくとも0.9倍のNQO2の k_{cat}/K_m を有する。

好ましくはNQO2の変異体またはフラグメントまたは融合体または誘導体はまた、実質的に同一の補因子特異性を有する。好ましくはNQO2の変異体またはフラグメントまたは融合体または誘導体は、補因子としてニコチンアミドリボシド(還元型)(NRH)を使用することができる。好ましくはNQO2の変異体またはフラグメントまたは融合体または誘導体は、NQO2それ自体の少なくとも0.1倍、さらに好ましくは少なくとも0.5倍、そして一層好ましくは少なくとも0.9倍の十分に補因子と結合する。

20

「変異体」には、1つ以上のアミノ酸が置換または欠失しているポリペプチドが含まれる。典型的には、変異体は、例えばアミノ酸の以下の基：Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr, Lys, Arg; およびPhe, Tyrが交換されていてもよいアミノ酸相同置換を有する。かかる変異体はタンパク質工学および位置指定突然変異誘発の方法を用いて作製してもよい。「変異体」には、挿入および欠失をとまなうポリペプチドもまた含まれる。

30

「フラグメント」により、発明者らは所定のプロドラッグに対してNQO2それ自体と実質的に同一の活性を保持していると仮定した場合のNQO2の部分の意味する。

「融合体」により、発明者らは、NQO2またはその変異体もしくはフラグメントをその他のポリペプチドに融合することを意味し、例えばある環境でNQO2またはその変異体もしくはフラグメントを精製を容易にできる別のポリペプチドに融合することが望ましい。これは、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、または十分公知のMycタグ配列またはHis_n(ここでn>4)であってもよい。それぞれの場合において、付加したポリペプチドは融合体はアフィニティークロマトグラフィーにより精製される。

本発明の第1の態様の化合物の2つの部分がポリペプチドである場合には、一般に、それらはO'Sullivan(1979) Anal. Biochem. 100, 100-108に記載されたもののような架橋ポリペプチドの常法のいずれによって結合していてもよい。例えば、抗体部分にチオール基を増やしてもよいし、酵素部分をそれらのチオール基と反応できる二官能基薬剤、例えばヨード酢酸のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHIA)または3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシンイミジル(SPDP)と反応させてもよい。例えば一般に、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルで達成されたアミドおよびチオエーテルは、インピボにおいてジスルフィド結合よりも安定である。

40

全NQO2が本発明の第1の態様の化合物中に存在することは必ずしも必要ではないが、もちろん触媒部分は存在しなければならない。

あるいは、ある長さのDNAが互いに隣接しているか、または化合物の所望の特性を破壊し

50

ないリンカーペプチドをコードする領域によって分離されているかのいずれかである本発明の化合物の2つの部分をコードする個々の領域を含むことによる組換えDNA技術によって化合物を融合化合物として産生してもよい。考えたところでは、化合物の2つの部分は完全にまたは部分的に重複してもよい。融合体の抗体成分（または細胞をターゲティングするその他のポリペプチド部分）は、少なくとも1つの結合部位によって表さなければならない。抗体（または抗体フラグメント）-酵素の融合体の構成の例は、Neubergerら（1984）Nature 312, 604に開示されている。

次いで、本発明のこの態様の化合物を含むポリペプチドを産生するためにDNAを好適な宿主中で発現させる。従って、本発明のこの態様の化合物を構成するポリペプチドをコードするDNAを、本明細書に含まれる教示を考慮して発現ベクターを構築し、次いで本発明のポリペプチドを発現および産生するためにそれを用いて好適な宿主細胞を形質転換するために好適に改変した公知の技術に従って使用してもよい。かかる技術には、Rutterらに対して1984年4月3日に発行された米国特許第4,440,859号、Weissmanに対して1985年7月23日に発行された同第4,530,901号、Crowlに対して1986年4月15日に発行された第4,582,800号、Markらに対して1987年6月30日に発行された同第4,677,063号、Goeddelに対して1987年7月7日に発行された同第4,678,751号、Itakuraらに対して1987年11月3日に発行された同第4,704,362号、Murrayに対して1987年12月1日に発行された同第4,710,463号、Toole, Jr.らに対して1988年7月12日に発行された同第4,757,006号、Goeddelらに対して1988年8月23日に発行された同第4,766,075号およびStalkerに対して1989年3月7日に発行された同第4,810,648号に開示されたものが含まれ、それらはすべて出典開示して本明細書の一部とみなされる。

本発明のこの態様の化合物を構成するポリペプチドをコードするDNAは、好適な宿主に導入するための種々の他のDNA配列と結合させてもよい。コンパニオンDNAは、宿主の性質、DNAを宿主に導入する方法、およびエピソーム的維持または組み込みが所望されるどうかによる。

一般に、DNAは、発現のために正しい方向および正しいリーディングフレームにあるプラスミドのような発現ベクター中に挿入する。必要であれば、一般にかかる制御が発現ベクターに利用されるが、DNAを所望の宿主によって認識される好適な転写および翻訳の調節制御ヌクレオチド配列と結合させてもよい。次いでベクターを標準技術によって宿主に導入する。一般に宿主のすべてがベクターによって形質転換されるわけではない。それゆえに形質転換された宿主細胞を選択することが必要になる。1つの選択技術には、形質転換細胞中に抗生物質耐性のような選択可能な特性をコードするDNA配列をいずれかの制御因子で発現ベクター中に取り入れることを含む。あるいは、かかる選択可能な特性に対する遺伝子は別のベクターに存在していてもよく、それを用いて所望の宿主細胞を同時に形質転換する。

次いで本発明の組換えDNAによって形質転換された宿主細胞を十分な時間ポリペプチドを発現させるために本明細書に開示された教示を考慮して当業者にとって公知である好適な条件下で培養し、次いでそれを回収することができる。

細菌（例えば、大腸菌およびバチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*））、酵母（例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Sacharomyces cerevisiae*））、糸状菌（例えば、アスペルギルス（*Aspergillus*））、植物細胞、動物細胞および昆虫細胞をはじめとする多くの発現系が知られている。

たとえベクターをその他の原核生物でない細胞型での発現に使用としても、ベクターには原核生物中で増殖させるためにColE1 oriのような原核生物レプリコンが含まれる。ベクターはまたそれによって形質転換された大腸菌のような細菌宿主細胞において遺伝子の発現（転写および翻訳）を命令することができる原核生物プロモーターのような好適なプロモーターを含む。

プロモーターはRNAポリメラーゼの結合および転写を誘導するDNA配列によって形成された発現制御因子である。例示的な細菌宿主と適合するプロモーター配列は、典型的には本発明のDNA切片を挿入するために都合のよい制限部位を含むプラスミドベクター中で得られ

10

20

30

40

50

る。

典型的な原核生物ベクタープラスミドとしては、Biorad Laboratories, (Richmond, CA, USA) から入手できるpUC18、pUC19、pBR322およびpBR329ならびにPharmacia, Piscataway, NJ, USAから入手できるpTrc99AおよびpKK223-3である。

典型的な哺乳類細胞ベクタープラスミドはPharmacia, Piscataway, NJ, USAから入手できるpSCLが挙げられる。このベクターはクローン化遺伝子の発現を誘導するためにSV40後期プロモーターを用い、最も高レベルの発現がCOS-1細胞のようなT抗原産生細胞において見出される。

誘発可能哺乳類発現ベクターの例としてpMSGがあり、これもまたPharmaciaから入手できる。このベクターはクローン化遺伝子の発現を誘導するために長い末端反復に対してマウスの乳房の腫瘍のグルココルチコイドで誘発可能なプロモーターを用いる。

有用な酵母プラスミドベクターとしてはpRS403-406およびpRS413-416があり、一般にStratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USAから入手できる。プラスミドpRS403、pRS404、pRS405およびpRS406は、酵母組み込み (Yeast Integrating) プラスミド (YIps) であり、酵母選択可能マーカーhis3、trp1、leu2およびura3を取り込む。プラスミドpRS413-416は、酵母動原体 (Yeast Centromere) プラスミド (YCps) である。

DNAを相補的な結合性末端にを介してベクターと操作可能に連結させるために種々の方法が開発されている。例えば、相補性ホモポリマーの束を、ベクターDNAに挿入されるべきDNA切片に付加することができる。次いでベクターおよびDNA切片を相補性ホモポリマーの尾部の間の水素結合によって結合させて組換えDNA分子を形成する。

1つ以上の制限部位を含む合成リンカーは、DNA切片をベクターに結合させる別法を提供する。前記のエンドヌクレアーゼ制限消化によって生じたDNA切片を、突部の3'-一本鎖末端を3'-5'-エンドヌクレアーゼ的活性で除去し、凹部の3'末端をそれらの重合活性で埋めるバクテリオファージT4 DNAポリメラーゼまたは大腸菌DNAポリメラーゼI酵素で処理する。

それゆえにこれらの活性の組み合わせにより、平滑末端化DNA切片が生じる。次いで平滑末端化切片をバクテリオファージT4 DNAリガーゼのような平滑末端化DNA分子の結合を触媒することができる酵素の存在下で、大過剰モルのリンカー分子とインキュベートする。従って、反応生成物は重合したリンカー配列をそれらの末端に有するDNA切片である。次いでこれらのDNA切片を好適な制限酵素で切断し、DNA切片のそれらと一致する末端を産生する酵素で切断される発現ベクターと連結させる。

種々のエンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーはInternational Biotechnologies Inc, New Haven, CN, USAを含む多くの供給源から市販されている。

本発明のこの態様のポリペプチドをコードするDNAを改変するための望ましい方法は、Sai kiら (1988) Science 239, 487-491に開示されているようにポリメラーゼ連鎖反応を使用することである。

この方法において、酵素的に増幅されるDNAはそれ自体が増幅されたDNAに取り込まれることになる2つの特異的オリゴヌクレオチドプライマーによってフラックされている。この特異的プライマーは、当技術分野で公知の方法を用いて発現ベクター中にクローニングするために用いることができる制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含んでいてもよい。

本発明の実施に有用であることが期待される酵母の属の例としては、ピチア (Pichia)、サッカロミセス (Saccharomyces)、クルイベロミセス (Kluyveromyces)、カンジダ (Candida)、トルロプシス (Torulopsis)、ハンセヌラ (Hansenula)、スキゾサッカロミセス (Schizosaccharomyces)、シテロミセス (Citeromyces)、パキソレン (Pachysolen)、デバロミセス (Debaromyces)、メツニコウィア (Metshunikowia)、ロドスポリジウム (Rhodosporidium)、ロイコスポリジウム (Leucosporidium)、ボトリオアスカス (Botryosacculus)、スポリドロドルス (Sporidiobolus)、エンドミコプシス (Endomycopsis) などがある。好ましい属はピチア (Pichia)、サッカロミセス (Saccharomyces)、クルイベロミセス (Kluyveromyces)、ヤロウィア (Yarrowia) およびハンセヌラ (Hansenula) からなる群より選択されるものである。サッカロミセスの例としては、サッカロミセス・

10

20

30

40

50

セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・イタリカス (*Saccharomyces italicus*) およびサッカロミセス・ロキシー (*Saccharomyces rouxii*) である。クルイペロミセスの例としては、クルイペロミセス・フラギリリス (*Kluyveromyces fragilis*) およびクルイペロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) がある。ハンセヌラの例としては、ハンセヌラ・ポリンモルファ (*Hansenula polymorpha*)、ハンセヌラ・アノマラ (*Hansenula anomala*) およびハンセヌラ・カプスラータ (*Hansenula capsulata*) がある。ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) は好適なヤロウィア種の例である。

S. セレビスエを形質転換する方法は一般にEP 251 744、EP 258 067およびWO 90/01063に教示され、これらはすべて出典開示して本明細書の一部とみなされる。

10

S. セレビスエに対する好適なプロモーターには、PGK1遺伝子、GAL1またはGAL10遺伝子、CYC1、PHO5、TRP1、ADH1、ADH2、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、トリオースホスフェートアイソメラーゼ、ホスホグルコースアイソメラーゼ、グルコキナーゼ、 γ -接合因子フェロモン、 α -交配因子フェロモン、PRB1プロモーター、GUT2プロモーター、他のプロモーターの5'調節領域の部分または上流活性化部位を有する5'調節領域の部分の雑種を含む雑種プロモーター（例えばEP-A-258 067のプロモーター）と関連するものが含まれる。

転写停止シグナルは、好ましくは転写停止およびポリアデニル化のための正しいシグナルを含む真核生物遺伝子の3'フランキング配列である。好適な3'フランキング配列は、例えば用いられる発現制御配列と天然において連結した遺伝子のものであってよく、すなわちプロモーターに相当してもよい。あるいは、S. セレビスエADH1遺伝子の停止シグナルが好ましい場合にそれらは異なってもよい。

20

「NQ02またはその変異体もしくはフラグメントもしくは融合体もしくは誘導体」により、発明者らはかかるポリヌクレオチドいずれをも含める。ポリヌクレオチドはRNAまたはDNAであってよく、好ましくはDNAである。

本発明の第1の態様の化合物がヒトNQ02をコードするポリヌクレオチドまたはその変異体もしくは一定のプロドラッグに対して実質的にNQ02と同一の活性を有するフラグメントもしくは融合体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドを含む場合には、化合物の標的細胞に特異的な部分はポリヌクレオチド（遺伝構築体）を標的細胞に送達するよう改変されているものであることを理解すべきである。

30

好ましくは遺伝構築体を細胞、好ましくはヒト細胞に送達するために改変される。さらに好ましくは遺伝構築体を動物の身体、さらに好ましくは哺乳類の身体中の細胞に送達するために改変され、最も好ましくはそれをヒトの身体中の細胞に送達するために改変される。

動物の体内の細胞に遺伝構築体を導入する手段および方法は当技術分野で公知である。例えば、何れかの便利な方法によって、例えばレトロウイルスを含む方法により本発明の構築体を腫瘍細胞に導入してもよく、その結果構築体が腫瘍細胞のゲノム中に挿入される。例えばKiryama (1991) Cell Struc. and Func. 16, 503-510において、精製されたレトロウイルスが投与されている。レトロウイルスは、それらが分裂中の細胞のゲノム中にのみ組み込むことができるので、ガン細胞を特異的に感染させることが可能な手段を提供する。すなわち、ガンを取り囲んでいるほとんどの正常細胞は静止中であるか、細胞増殖の非受容段階であるか、または少なくとも腫瘍細胞よりかなり遅い速度で分裂している。好適なプロモーターセグメントおよびNQ02または定義した変異体もしくはフラグメントもしくは融合体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドを含むレトロウイルスDNA構築体を、当技術分野で周知の方法を用いて産生してもよい。かかる構築体から活性型のレトロウイルスを産生するためには、10%ウシ胎児血清 (FCS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で増殖させた同種指向性のpsi2パッケージング細胞系を使用するのが通常である。便宜には細胞系のトランスフェクションはリン酸カルシウムによる共沈であり、安定な形質転換体はG418の添加によって選択され、（レトロウイルス構築体がneo^R遺伝子

40

50

を含むと仮定すると、最終濃度は1mg/mlとなる。独立のコロニーを単離して広げ、培養物の上清を除去し、孔径が0.45 μ mのフィルターを通して濾過して-70 で保存する。レトロウイルスを腫瘍細胞に導入するためには、10 μ g/ml Polybreneが添加されているレトロウイルスの上清を直接注入するのが便宜である。直径10mmを越える腫瘍には0.1mlと1mlとの間、好ましくは0.5mlのレトロウイルスの上清を注入することが適している。

あるいは、Culverら (1992) Science 256, 1550-1552に記載されているように、レトロウイルスを産生する細胞を腫瘍に注入する。このようにして導入されたレトロウイルス産生細胞を活発にレトロウイルスベクター粒子を産生するように設計し、その結果ベクターの連続的な産生がin situで腫瘍の塊の中で起こる。従って、増殖している腫瘍細胞をレトロウイルス産生細胞と混合するとインビボにおいてうまく変換することができる。

標的レトロウイルスはまた本発明における使用に利用でき、例えば特異的結合親和性を付与する配列がウイルスenv遺伝子を先在するように設計してもよい (この総説およびその他の遺伝子治療用標的遺伝子に関しては、Miller & Vile (1995) Faseb J. 9, 190-199を参照)。

その他の方法には、限られた時間またはより長時間 (次のゲノムへの取り込み) のいずれかでそこで発現させるためには、単に構築体を細胞に送達することが含まれる。後者のアプローチの例には (好ましくは腫瘍細胞を標的とした) リポソームが含まれる (Nassanderら (1992) Cancer Res. 52, 646-653)。

免疫リポソーム (抗体に向けられたリポソーム) は、抗体が用いられる細胞表面タンパク質を過剰発現するガン細胞種をターゲティングするのに特に有用である (実施例の表を参照)。免疫リポソームを調製するためには、MPB-PE (N- [4- (p-マレイミドフェニル) -ブチリル] -ホスファチジルエタノールアミン) をMartin & Papahadjopoulos (1982) J. Biol. Chem. 257, 286-288の方法に従って合成する。MPB-PEをリポソーム二重層中に取り込んで、抗体またはそのフラグメントをリポソーム表面に共有結合させる。標的細胞に送達するためには、例えばDNAまたはその他の遺伝構築体の溶液中でこのリポソームを形成させ、続いて0.8MPa孔径が0.6 μ mおよび0.2 μ mのポリカーボネート膜フィルターを連続して押し出すことによってリポソームに本発明のDNAまたはその他の遺伝構築体を充填する。押し出した後、80 000 x gで45分間の超遠心分離によってトラップしたDNA構築体を遊離のDNA構築体から分離する。脱酸素処理したバッファー中で新しく調製したMPB-PEリポソームを新しく調製した抗体 (またはそのフラグメント) と混合し、一晩中一定のend over end rotation下において4 の窒素雰囲気下カップリング反応を行う。80 000 x gで45分間の超遠心分離によって免疫リポソームを結合していない抗体から分離する。免疫リポソームを腹膜内にまたは直接腫瘍内に注入してもよい。

その他の送達方法には、抗体 - ポリリジン架橋を介して外来DNAを運ぶアデノウイルス (Curiel Prog. Med. Virol. 40, 1-18を参照) および担体としてトランスフェリン - ポリカチオン複合体 (Wagner (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414) が含まれる。これらの方法ではまず、ポリカチオン - 抗体複合体を本発明のDNA構築体またはその他の遺伝構築体で形成し、ここで抗体は、取り込まれている新しいエピトープが抗体に連結させる野生型アデノウイルスまたは変異アデノウイルスのいずれかに対して特異的である。ポリカチオン部分はリン酸骨格との静電的相互作用によってDNAと連結する。ポリカチオンがポリリジンである場合が好ましい。

DNAはまたアデノウイルスによって送達されてもよく、ここでそれは例えば後述のアデノウイルス粒子内に存在している。

これらの方法では第2に、受容体を媒介させたエンドサイトーシスを用いてDNA高分子を細胞まで運ぶ高親和性核酸送達系が実施される。このことは、鉄輸送タンパク質トランスフェリンを核酸と結合するポリカチオンと結合させることによって達成される。ヒトトランスフェリン、もしくはニワトリの相同コンアルブミン、またはそれらの組み合わせをジスルフィド結合によって小さいDNA連結タンパク質プロタミンまたは種々の大きさのポリリジンと共有結合させる。これらの改変トランスフェリン分子は、それらの同種受容体を結合させ、そして細胞への効率的な鉄の輸送を媒介するそれらの能力を維持する。トラン

10

20

30

40

50

スフェリン - ポリカチオン分子は、核酸の大きさとは無関係で（短いオリゴヌクレオチドないし21キロ塩基対）本発明のDNA構築体またはその他の遺伝構築体と電気泳動的に安定な複合体を形成する。トランスフェリン - ポリカチオンと本発明のDNA構築体またはその他の遺伝構築体との複合体を腫瘍細胞に供給すると、細胞中の構築体から高レベルの発現が期待される。

また、Cottonら（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6094-6098の方法によって産生した不完全なまたは化学的に不活性化させたアデノウイルス粒子のエンドソーム分裂活性を用いて、本発明のDNA構築体またはその他の遺伝構築体の高親和性受容体を介した送達を使用してもよい。このアプローチはアデノウイルスを改変してリソソームを通すことなくエンドソームからそれらのDNAを放出させ、例えば本発明のDNA構築体またはその他の遺

10

伝構築体と連結したトランスフェリンの存在下でアデノウイルス粒子と同一経路で細胞により構築体が吸収されるということに依存しているようである。このアプローチは複合体のレトロウイルス構築体を使用する必要がないという利点を有しており、レトロウイルス感染で起こるのであるがゲノムの永続的改変がなく、そして標的発現系を標的送達系とカップリングし、従ってその他の細胞型に対する毒性は低下する。局所的に腫瘍のある期間の間遺伝構築体を含んでなる好適な送達ビヒクルで灌流することが望ましく、それに加えてまたはそれに代えて送達ビヒクルまたは遺伝構築体を直接接近できる腫瘍に注入することができる。

「裸のDNA」ならびに陽性および中性脂質と複合体を形成したDNAもまた、本発明のDNAを治療すべき患者の細胞に導入するのに有用であり得る。遺伝子治療への非ウイルス性アプ

20

プローチは、Ledley（1995）Human Gene Therapy 6, 1129-1144に記載されている。従って、本発明のさらなる態様は、本発明中で定義された通りの遺伝構築体を含んでなる組成物およびその遺伝構築体を細胞、好ましくは動物の身体の細胞に導入する手段を提供するが理解されよう。

WO 94/10323に記載されている改変アデノウイルス系のような特異的標的細胞系もまた知られており、ここでは典型的にDNAがアデノウイルス、またはアデノウイルス様粒子の内部に運ばれる。Michaelら（1995）Gene Therapy 2, 660-668は、細胞選択部分を繊維タンパク質に加えるためのアデノウイルスの改変を記載している。Bischoffら（1996）Science 274, 373-376に記載されているもののようなp53欠乏のヒト腫瘍細胞において特異的に複製する突然変異アデノウイルスもまた、本発明の遺伝構築体を細胞に送達するのに有用

30

である。従って、本発明のさらなる態様は本発明の遺伝構築体を含んでなるウイルスまたはウイルス様粒子を提供することと理解されよう。その他の好適なウイルスまたはウイルス様粒子としては、HSV、AAV、ワクチンまたはバルボウイルスが挙げられる。本発明の第1の態様では、化合物がポリヌクレオチドを標的細胞をターゲティングするために前記の標的細胞特異的部分を含んでいるので、ポリヌクレオチドはNQ02またはその変異体もしくはフラグメントもしくは融合体もしくは誘導体の発現を駆動する標的細胞特異的プロモーターを有するものである必要はないことが理解されよう。しかしながら、ポリヌクレオチドがヒトNAD(P)H：キノンリダクターゼ2（NQ02）または一定のプロドラッグに対して実質的にNQ02と同一の活性を有するその変異体もしくはフラグメントもしくは融

40

合体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドと操作可能に連結された標的細胞特異的プロモーターを含んでいれば都合がよいかもしれない。NQ02またはその変異体、フラグメント、融合体もしくは誘導体の標的細胞特異的発現を、ポリヌクレオチドまたは遺伝構築体の本発明の第1の態様の化合物に含まれていようがいまいが、標的細胞特異的プロモーターを含むポリヌクレオチドまたは遺伝構築体を用いて達成してもよいことがさらに理解されよう。

従って、本発明の第2の態様は、ヒトNAD(P)H：キノンリダクターゼ2（NQ02）または一定のプロドラッグに対して実質的にNQ02と同一の活性を有するその変異体もしくはフラグメントもしくは融合体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドと操作可能に連結された標的細胞特異的プロモーターを含んでなる組換えポリヌクレオチドを提供する。

好ましくは、標的細胞特異的プロモーターは腫瘍細胞特異的プロモーターである。

50

標的細胞特異的プロモーターである有用な遺伝因子は以下に与えられるが、新規なものは常に本発明のこの実施形態において有用であることが見出されている。

チロシナーゼおよびTRP-1遺伝子は双方ともメラニン色素、メラニン形成細胞の特異的な産物の合成において鍵となる役割を果たすタンパク質をコードする。チロシナーゼおよびチロシナーゼ関連タンパク質 (TRP-1) 遺伝子の5'末端は、発現の組織特異性を、これらのプロモーター因子の下流でクローニングした遺伝子に付与する。

これらの遺伝子の5'配列は、Bradl, M. ら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 164-168およびJackson, I.J. ら (1991) Nucleic Acids Res. 19, 3799-3804に記載されている。

前立腺特異的抗原 (PSA) は、ヒト前立腺分泌の主要タンパク質構築体の1つである。それは前立腺ガンの検出および監視に有用なマーカーとなってきた。PSAをコードする遺伝子およびPSAの前立腺に特異的な発現を命令するそのプロモーター領域が記載されている (Lundwall (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 161, 1151-1159; Riegmanら (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 159, 95-102; Brawer (1991) Acta Oncol. 30, 161-168)。

胎児ガン抗原 (CEA) は、特にコロニーガン患者の監視において広く用いられている腫瘍マーカーである。CEAはまたいくつかの正常組織中にも存在しているが、それは明らかに相当する正常組織中よりも腫瘍組織中においてより高レベルで発現した。CEAをコードする完全な遺伝子がクローニングされ、そのプロモーター領域が分析されている。翻訳開始点から約400ヌクレオチド上流を含むCEA遺伝子プロモーター構築体は、HeLa細胞系と比較してアデノガン腫細胞系SW303において9倍高い活性を示した。このことは、細胞型特異的発現を伝達するシス作用配列はこの領域内に含まれているということを指摘する (Schreweら (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748)。

ムチン遺伝子、MUC1はWO91/09867で教示される非上皮細胞系ではなく、乳房および膵臓細胞系で特異的に発現を可能にさせる5'フランキング配列を含む。

-フェトプロテイン (AFP) エンハンサーは膵臓ガン特異的発現 (Suら (1996) Hum. Gene Ther. 7, 463-470) の制御に有用であると考えられる。

本発明の遺伝子構築物は当技術分野で十分に公知な方法を用いて調製できる。

本発明の第3の態様では、本発明の第1の態様の化合物または本発明の第2の態様のポリヌクレオチドおよびNQ02の作用により実質上細胞毒性薬へと変わるプロドラッグを含んでなる治療システム (または、部材キットと呼んでもよい) を提供する。

プロドラッグはCB1954またはその類似体であることが好ましく; プロドラッグがCB1954であることが最も好ましい。

CB1954類似体は置換基の相対配向および/またはRの性質のいずれかにおいて異なっているが、CB1954の本質的構造特徴、すなわちアジリジン環、2つのNO₂基および他の置換基Rを含むベンゼン環を保有する分子として適切に定義される。多くの類似体はKhan A. H. およびRoss W.C.J. (1969) Chem. Biol. Interact. 1, 27-47およびKhan A. H. およびRoss W.C.J. (1971) Chem. Biol. Interact. 4, 11-22で開示され、これらはともに出典明示して本明細書の一部とみなされ、特にCB1954類似体の詳細はこの記載に包含される。

さらに治療システムは還元当量をNQ02に供与できるNRHまたはその類似体を含んでなることが好ましい。好適な類似体として、ともに出典明示して本明細書の一部とみなされるFriedlosら (1992b) およびKnoxら (1995) にも記載される還元型1-メチルニコチンアミドおよび他のものが挙げられる。

本発明の第4の態様では、(a) 本発明の第1の態様の化合物または本発明の第2の態様の組換えポリヌクレオチドを患者へ投与し; (b) NQ02またはその変異体またはフラグメントまたは融合体または誘導体を標的細胞に局在、あるいはそこで発現させ; (c) NQ02の作用により実質上細胞毒性薬へと変わるプロドラッグを投与することを含んでなる方法で患者の標的細胞を破壊しようとする治療法を提供する。NRHまたはNQ02のもう1つの好適な補因子を患者に投与するのであれば特に好ましい。NQ02のもう1つの好適な補因子として還元当量をNQ02に供与できるNRH類似体が挙げられ、さらにNQ02を結合させ、実質上N

10

20

30

40

50

RHとして還元当量をNQO2に供与できる分子が挙げられる。補因子の投与はプロドラッグの投与前または後あるいは同時であってよい。

NRHまたはその類似体を前駆体の前に投与するのであれば特に好ましい。

従って、この方法は宿主（例えば患者）の標的細胞の破壊には有用である。

治療される患者がガンを保有していることが好ましい。

プロドラッグは前記のいずれの好適なプロドラッグであってよい。

プロドラッグはCB1954またはその類似体であることが好ましい。

その化合物が標的細胞特異的部分とヒトNAD(P)H：キノンリダクターゼ2(NQO2)または所与のプロドラッグに対して実質上NQO2と同じ働きをするその変異体またはフラグメントまたは融合体または誘導体を含んでなるものであれば、その化合物を投与する、さらにひとたび化合物の標的細胞の正常細胞に対する比率と標的と関連する化合物の絶対レベル間の最適均合があれば、NQO2の作用により実質上細胞毒性薬へと変わるプロドラッグを投与することが好ましい。化合物とプロドラッグの投与間隔は特定の化合物の標的細胞局在化特性にもよるが、一般的には6～48時間であろう。

酵素の血漿活性および、推論によって、正常組織の活性が、毒性を引き起こすのに十分なプロドラッグに触媒作用を及ぼすのに不十分であればすぐにプロドラッグ投与を開始するのが適当である。

従って、好ましい実施形態においてガン部位および酵素が血液および正常組織から取り出される場合に与えられるCB1954に局在化するようにNQO2をガン関連抗原に向けられるモノクローナル抗体へと結合させる。前記したようにNRHまたはNQO2のもう1つの好適な補因子を患者に投与するのであれば特に好ましい。NRHまたはその類似体を前駆体の前に投与することが好ましい。

その化合物が標的細胞特異的部分とヒトNAD(P)H：キノンリダクターゼ2(NQO2)をコードするポリヌクレオチドまたは所与のプロドラッグに対して実質上NQO2と同じ働きをするその変異体またはフラグメントまたは融合体または誘導体を含んでなるものであれば、その化合物を投与する、さらにひとたびNQO2またはその前記変異体または誘導体または融合体またはフラグメントが標的細胞で有用な程度まで発現するのであれば、プロドラッグを投与することが好ましい。前記したようにNRHまたはNQO2のもう1つの好適な補因子を患者に投与するのであれば特に好ましい。NRHまたはその類似体を前駆体の前に投与することが好ましい。

この実施形態において、化合物とプロドラッグの投与間隔は特定の化合物の標的細胞局在化特性、また特定の標的細胞でのポリヌクレオチドの発現特性にもよるであろう。

次いで本発明の治療法では本発明の第2の態様の組換えポリヌクレオチドを投与し、その組換えポリヌクレオチドを標的細胞で発現させて、NQO2またはその前記変異体または誘導体またはフラグメントまたは融合体を産生する、さらにその発現が有用なレベルであれば、プロドラッグを投与することが好ましい。前記したようにNRHまたはNQO2のもう1つの好適な補因子を患者に投与するのであれば特に好ましい。NRHまたはその類似体を前駆体の前に投与することが好ましい。

かくして、細胞毒性薬は非標的または非ガン部位ではなく、標的またはガン部位において比較的高い濃度で放出される。

その化合物がプロドラッグの投与に望ましい効果を及ぼすに十分な標的細胞に存在し、またはそこでポリヌクレオチドが発現されるであろうことを除き、本発明の化合物がすべての標的細胞に存在し、またはそこで本発明のポリヌクレオチドが発現される必要がないことが認められるであろう。

少なくとも本発明のADEPT型の実施形態では、血液から抗体酵素結合を浄化することによって向上した標的細胞特異性（特にガン細胞特異性）を考慮する改良システムを利用するのに有利であろう。

この利用についての原理は、出典明示して本明細書の一部とみなされるWO89/10140で詳細に記載される。かくして、血液および正常組織からの残留酵素活性のクリアランスは酵素のガンの正常組織に対する比率を最大化することにより促進されよう。例えばクリアラン

10

20

30

40

50

スの促進は抗体酵素結合のいずれの部分に向けられるが、抗酵素抗体が酵素を不活性化するのであれば、特に有効であるモノクローナル抗体により達成された。ガン部位での酵素の不活性化を避けるため、抗酵素抗体をガラクトシル化し、それにより抗酵素 - 酵素抗体複合体が肝細胞のガラクトース受容体により血液から迅速に除去される。このことはW089/10140およびSharmaら、1990に記載されている。

少なくとも本発明のADEPTおよびMDEPT型の実施形態では、NQ02の阻害剤の使用によって向上した標的細胞特異性（特にガン細胞特異性）を考慮する改変システムを利用するのに有利であろう。例えばフラボンはNQ02阻害剤である。ケルセチン（3,5,7,3',4'-ペンタヒドロキシフラボン）はこれまで試験した最も有効な阻害剤である。それはNPHについて拮抗的阻害剤であり（ $K_i=27\text{nm}$ ）、それゆえ特に有用であろう。この利用についての原理は、出典明示して本明細書の一部とみなされる本発明者らの共同特許出願中のPCT/GB96/03000で詳細に記載される。よって、血液および正常組織からの酵素のクリアランスについての第2のモノクローナル抗体の使用の別法として、基質ではないが、その部位で立体配置に結合する酵素活性部位を補う小分子の使用がある。かかる分子は血液および正常組織中の酵素を不活性化するために、ガン組織中の高濃度の酵素を不活性化するのに不十分な用量レベルを除いた用量レベルで投与する必要がある。

少なくとも本発明の方法のADEPT型の実施形態において、酵素が標的細胞内に存在するように化合物が標的細胞により吸収されるのであれば、それは有利であろう。この利用についての原理は出典明示して本明細書の一部とみなされる本発明者らの共同新案特許出願中のPCT/GB96/03254で詳細に記載される。

本発明の第4の態様の治療法は、標的細胞内または標的細胞外のいずれかに存在するであろうNQ02または前記誘導体またはフラグメントまたは変異体または融合体を考慮に入れる。例えば、NQ02のポリペプチド型を患者に投与するという実施形態において、ポリペプチドは標的細胞内に存在するか（例えば、内在化抗体とともにADEPT系を使用することによる）、または標的細胞外に存在するか（例えば、実質上標的細胞外に残存する抗体とともにADEPT系を使用することによる）のいずれかであろう。

同様に、NQ02をコードするポリヌクレオチドを患者に投与するという実施形態において、ポリヌクレオチドは標的細胞内に残存するNQ02を発現するか、または関連しない標的細胞外でNQ02を発現するかであろう。酵素の外的発現はそれをその酵素を哺乳類細胞の表面へ向けるシグナル配列へ結合させることにより達成されよう。これは通常、酵素を細胞表面に向ける能力を保有する哺乳類シグナル配列またはその誘導体であろう。好適なシグナル配列として、c-erbB2シグナル配列、すなわち出典明示して本明細書の一部とみなされるCousensら（1985）Science 230, 1132-1139で公開される配列などのトランスメンブラン受容体チロキシンキナーゼで見つけられたものが挙げられる。

NQ02が標的細胞外に存在するが、標的細胞に関連しないという方法についてのそれらの実施形態において、補基質が細胞膜透過性である必要がないことが認められ、さらにこのことが、内生細胞内NQ02によるプロドラッグの還元がなされないがための、この実施形態の補基質の好ましい特性である。この実施形態において、プロドラッグは細胞膜を透過してよいが、それが実質上そうできないのであれば好ましい。しかしながら、その細胞傷害効果は一般に細胞内の反応性に起因すると考えられるため、細胞毒性薬は細胞に浸透すべきであると考えられる。

本発明の第3の態様のシステムが、さらに実質上標的細胞膜透過性であるNQ02の補基質を含んでなるのであれば好ましい。

本発明の第4の態様の方法が、さらに実質上標的細胞膜を透過できるNQ02の補基質の有効量を患者へ投与することを含んでなるのであれば好ましい。

補基質がNRHまたはその類似体、特に実質上細胞膜を透過できるものであれば好ましい。好適な類似体として、ともに出典明示して本明細書の一部とみなされるFriedlosら（1992b）およびKnoxら（1995）にも記載される還元型1-メチルニコチンアミドおよび他のものが挙げられる。

かくして、本発明の第1の態様の化合物および本発明の第2の態様の組換えポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チドは医療に有用であり、それゆえそれらが医療用途用にパッケージングされて提供されることがわかるであろう。

本発明はまた本発明の第1の態様の化合物または本発明の第2の態様のポリヌクレオチドの、標的細胞を破壊しようとする治療のための医薬の製造における使用を提供する。患者はNQO2の作用により実質上細胞毒性薬へと変わるプロドラッグをかつて投与されたか、今現在投与中であるか、または今後投与されることが好ましい。

本発明はまた、NQO2の作用により実質上細胞毒性薬へと変わるプロドラッグの、患者の標的細胞を破壊しようとする治療のための医薬の製造における使用を提供する。この場合、患者は本発明の第1の態様の化合物または本発明の第2の態様のポリヌクレオチドを既に投与されたか、現在投与されているか、または今後投与されるかである。

10

本発明はまた、還元当量をNQO2に供与できるNRHまたはその類似体の、患者の標的細胞を破壊しようとする治療のための医薬の製造における使用を提供する。この場合、患者は本発明の第1の態様の化合物または本発明の第2の態様のポリヌクレオチドおよびNQO2の作用により実質上細胞毒性薬へと変わるプロドラッグを既に投与されたか、現在投与されているか、または今後投与されるかであろう。

本発明の第5の態様では、NQO2の作用により実質上細胞毒性薬へと変わるプロドラッグおよび還元当量をNQO2に供与できるニコチンアミドリボシド（還元型）（NRH）またはその類似体の患者への投与を含んでなる方法であり、ヒト患者の標的細胞にNQO2を発現させて標的細胞を破壊しようとする治療方法を提供する。

好ましくは、標的細胞は自然に（例えば疾患状態によって）NQO2を発現するが、それは誘導されてNQO2を産生した、または細胞の誘導または処理によってNQO2を発現する標的細胞であってよい。

20

NRH類似体は、本発明の前記態様に関して前記に記載されたものである。

プロドラッグは、本発明の前記態様に関して前記されたものである。プロドラッグはCB1954またはその類似体であれば特に好ましい。

本発明の第5の態様の方法で、実質上標的細胞膜を透過できるNRHまたはその類似体を使用するのであれば特に好ましい。

標的細胞がガン細胞であることが好ましい。非ガン組織に比べて、高いレベルのNQO2を示すガンの治療法を使用することが特に好ましい。

CB1954の補因子NRHとの同時投与で、NQO2が発現される細胞内部位にCB1954の活性化の基礎を提供する。現在、その酵素が結腸直腸ガンで高度に発現されることが示されている。それはいくつかの正常組織でも発現されるであろう、そうであれば、正常組織での活性化が用量限界となる。

30

従って、本発明の方法により結腸直腸ガンを治療することが特に好ましい。

本発明の方法によれば、プロドラッグおよび補基質を哺乳類担ガン宿主に投与する。プロドラッグは有効な薬剤よりガン細胞への細胞毒性がかなり低く、補基質の存在下で酵素ヒトNAD(P)H：キノン酸化リダクターゼ2（NQO2）のみにより、その活性型へと変わる。本発明の方法で有用なプロドラッグとして、限定されるものではないが、CB1954（5-（アジリジン-1-イル）-2,4-ジニトロベンズアミド）が挙げられる。本発明の方法で有用な補基質として、限定されるものではないが、NRH（モノヌクレオシド還元ニコチンアミド（ジヒドロニコチンアミドリボシド））（図2）が挙げられる。プロドラッグおよび補基質がともに実質上細胞膜を透過できるであろうことが認められるはずである。NADHおよびNMNHは実質上細胞膜に不透過である。しかしながら、本発明のこの態様および前記態様に関する「NRHまたはその類似体の投与による」について、本発明者らは患者の体内でNRHまたはその類似体へと変わる化合物の投与を包含することが認められるであろう。さらなる実施形態では、患者へのNRHまたはその類似体の前駆体の投与の可能性と前駆体をNRHまたはその類似体へと変換する手段とが包含されると理解されよう。

40

本発明の好ましい実施形態によれば、内生NQO2を用いてNRHの存在下でCB1954を活性化する（図3）。インビトロ酵素アッセイを用い、CB1954がその4-ヒドロキシルアミン誘導体（5-（アジリジン-1-イル）-4-ヒドロキシルアミノ-2-ニトロベンズアミド）へと還元さ

50

れることが実証される。この還元はヒトまたはラットDT-ジアホラーゼのいずれかによるものよりかなり強く、生命維持に不可欠な補基質、NADHまたはNADPHのいずれかにより容易に触媒作用を及ぼされない。

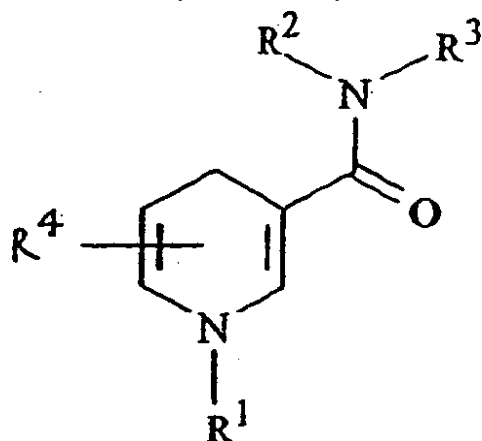
本発明の第5の態様の方法は、患者の標的細胞にNQO2を発現させ、標的細胞を破壊しようとする治療に特に適当である。よって、特に好ましい実施形態において、プロドラッグあるいはNRHまたは類似体の投与に先立ち、標的細胞がNQO2を発現するかどうかかが決定される。この決定は、例えば標的細胞を含んでなるサンプルのNQO2レベルの測定により達成され得る。これは酵素により、またはNQO2ポリペプチドまたはmRNAに特異的なプローブを用いて達成され得る。便宜には、それぞれウエスタンおよびノーザンブロッティングと一般に呼ばれる技術を用いて達成され得る。ポリペプチドの場合、プローブはNQO2タンパク質またはそのフラグメントに対して生ずるモノまたはポリクロナール抗体であってよい。かかる抗体を用いて、組織片のNQO2を免疫細胞化学および関連技術を使用して同定してもよい。mRNAに対するプローブは、NQO2 mRNA配列の部分配列に相補的なオリゴヌクレオチドまたはDNAフラグメントであろう。これらの方法が好ましいが、他の方法を使用して標的細胞または組織のNQO2ポリペプチドまたはmRNAレベルを検出し、定量してもよい。

従って、本発明はNQO2の作用により実質上細胞毒性薬へと変わるプロドラッグおよび還元当量をNQO2に供与できるニコチンアミドリボシド（還元型）（NRH）またはその類似体を含んでなる治療システムもまた包含する。そのシステムがさらに標的細胞がNQO2を発現するかどうかを決定する手段を含んでなるのであれば好ましい。

本発明はまた医療用の、還元当量をNQO2に供与できるニコチンアミドリボシド（還元型）（NRH）またはその類似体、ヒト患者の標的細胞を破壊しようとする治療のための医薬の製造における、還元当量をNQO2に供与できるニコチンアミドリボシド（還元型）（NRH）またはその類似体の使用、およびヒト患者の標的細胞を破壊しようとする治療のための医薬の製造における、NQO2の作用により実質上細胞毒性薬へと変わるプロドラッグの使用を包含する。この場合、患者は還元当量をNQO2に供与できるNRHまたはその類似体を既に投与されたか、現在投与されているか、または今後投与されるかである。

「還元当量をNQO2に供与できるNRHまたはその類似体」により、発明者らは、前記の、Friedlosら（1992b）およびKnoxら（1995）にも記載される還元型1-メチルニコチンアミドおよび他のものを包含する。NQO2/NRHの k_{cat} は電子受容体としてCB1954を用いて 360min^{-1} である。補基質（すなわち還元当量をNQO2に供与できるNRH類似体）は、酵素が $k_{cat}>50\text{min}^{-1}$ でCB1954をその4-ヒドロキシルアミン誘導体へと還元できるようNQO2の補基質として作用できる化合物である。明確には、「還元当量をNQO2に供与できるNRHまたはその類似体」は、それが還元当量をNQO2に渡すことが可能であるという意味で、必ずしもNRHの構造的類似体ではなく、NRHの機能的類似体である必要はない。明らかに、NADHおよびNADPHは、NQO2の補基質ではない。

ある補基質（NRH類似体）は次の構造を有する：

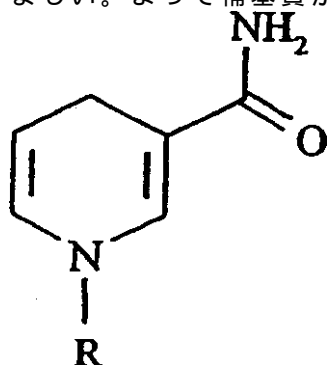


式中、 R^1 はアルキル、アリール、置換アルキル、置換アリール、 CONR^2R^b （ R^2 および R^b は、独立してH、アルキル、または置換アルキルである）であり、 R^2 および R^3 は、独立してH

、アルキル、または置換アルキルである。 R^4 はH、アルキル、置換アルキル、ハロゲン、C N、COOH、CONH₂またはOHのいずれかである。 R^4 はHであることが好ましい。

この構造の何れの化合物がNQO2の補基質として作用するか否かは本明細書で開示された方法により容易に決定することができる。

R^2 および R^3 はHであることが好ましい。 R^1 はアルキルまたは置換アルキルであることが好ましい。よって補基質が下記一般構造を有するものが好ましい。



10

式中、Rはアルキルまたは置換アルキルである。

アルキル基がC₁ないしC₆アルキルであることが好ましく、アルキル基が直鎖アルキル基であることがさらに好ましい。

「置換アルキル」により、発明者らはOH、ハロゲン、CN、COOHおよびCONH₂による置換を

20

包含させる。

発明者らは次の化合物：

- 1: R=-CH₂CH₂CH₂SO₃⁻
- 2: R=-CH₂CONH₂
- 3: R=-CH₂CH₂CH₃
- 4: R=-CH(CH₃)₂
- 5: R=-CH₂CH₂CH₂OH
- 6: R=-CH₂CH₂OH
- 7: R=-CH₂CH₂COOH
- 8: R=-CH₂C₆H₅
- 9: R=-CH₃
- 10: R=-CH₂CH₃
- 11: R=-CH₂CH₂C₆H₅

を合成した。

30

MDEPTについては、化合物1が好ましい。それは生理学的pHで荷電され、細胞から排除される。

本発明者らの定義によれば、化合物8および化合物11は補基質ではない。

帯電または極性化合物（例えば化合物1，7）は細胞へ容易に入り込まないであろうと推測される。脂肪親和性誘導体（例えば化合物3，4）は細胞へ容易に入り込むと推測される。

以下、実施例および図面によって本発明をさらに詳しく説明する。

40

図1は、CB1954の生物活性を示している。開始工程は5-（アジリジン-1-イル）-4-ヒドロキシルアミノ-2-ニトロベンズアミドを形成する酵素DTジアホラーゼによるCB1954の還元である。このヒドロキシルアミン誘導体はチオエステルと反応でき、DNA反応性種を生ずる。これはN-アセトキシ誘導体であると仮定される。しかしながら、この反応の主な生成物はDNAと容易に反応しない4-アミノ-5-（アジリジン-1-イル）-2-ニトロベンズアミドである。4-アミノ-5-（アジリジン-1-イル）-2-ニトロベンズアミドの形成はDNA結合産物の産生と拮抗的である。

図2は、NRHの構造を示す。

図3は、NQO2によるCB1954の生物活性の模式図である。

図4は、様々な補基質の存在におけるNQO2によるCB1954の還元を示す。

50

図5は、NQO2によるCB1954の還元からの5-(アジリジン-1-イル)-4-ヒドロキシルアミノ-2-ニトロベンズアミド(4-NHOH)の形成を示す。

図6は、ヒトNQO2をコードするcDNAのヌクレオチド配列およびその推定アミノ酸配列を示す。

図7は、可能性あるNQO2の補基質の構造を示す。

図8aは、CB1954を還元するための補基質としてNRHおよび様々な類似体を使用するNQO2の能力を示す。酵素不在ではCB1954還元は起こらなかった(図示せず)。補基質の開始濃度は500 μ Mであり、酵素濃度は1 μ g/mlであった。

図8bは、CB1954を還元するための補基質としてNRHおよび様々な類似体を使用するNQO2の能力を示す。酵素不在ではCB1954還元は起こらなかった(図示せず)。補基質の開始濃度は500 μ Mであり、酵素濃度は0.5 μ g/mlであった。

図8cは、CB1954を還元するための補基質としてNRHおよび様々な類似体を使用するNQO2の能力を示す。酵素不在ではCB1954還元は起こらなかった(図示せず)。補基質の開始濃度は500 μ Mであり、酵素濃度は0.5 μ g/mlであった。

図9は、様々な補基質の野生型V79細胞への取り込みを示す。化合物1は生理学的pHで添加され、細胞から排除される。よってこの補基質はMDEPT適用に、特に好適である。

図10は、プラスミドpIRES-PおよびH6を示す。

図11は、NQO2発現V79細胞のCB1954の細胞毒性へのNRHの効果を示す。NRHの添加によりCB1954の細胞毒性は少なくとも100倍増大した(V79TM13)、V79TM5および13細胞系では100以上であった。この効果は非トランスフェクトV79細胞では見られず(<3倍)、よってトランスフェクト細胞におけるNQO2の発現によるものである。

図12は、ヒトT98G神経膠芽細胞種細胞のCB1954の細胞毒性へのNRH、化合物1および化合物2の効果を示す。この細胞はV79細胞用として処理したが、CB1954の存在下で144時間処理した。NRHおよび化合物2の添加によりCB1954の細胞毒性は少なくとも100倍増大したが、不浸透性補基質化合物1は増大しなかった。

図13は、CB1954を還元するための補基質として化合物1および2を使用するラットDTジアホラーゼの能力を示す。

図14は、CB1954を還元するための補基質として化合物1および2を使用する大腸菌(E.coli)窒素リダクターゼの能力を示す。

図15および図14は、正常マウスの体重への化合物1の効果を示す。

図17および図18は、正常マウスの体重への化合物2の効果を示す。マウス[6グループの3]に1または2のいずれかを示される用量で静脈注射(尾部静脈)し、8日間マウスの体重をモニターした。対照マウスにはビヒクル[リン酸緩衝生理食塩水]だけを受容させた。

実施例1: ヒトNQO2活性に対する種々の補基質の作用

実験の詳細

組換えヒトNQO2は大腸菌中で作製した。cDNAの5'および3'-末端由来のプライマーおよびヌクレオチド配列を用いるPCR法により、完全な長さのNQO2 cDNAの5'-および3'-末端にA NcoIおよびHindIII制限部位をそれぞれ加えた。このPCR産物を1%アガロースゲル上で分析し、次いでQIAクイックゲル抽出キット(Qiagen Inc)を用いて抽出した。ゲル精製したPCR産物をTAクローニングキット(Invitrogen Co)のPCRIIベクター中にクローン化し、かつPCR産物の正確な配列をジデオキシ配列決定法により確認した。処理されたNcoIおよびHindIII制限部位を介して大腸菌発現ベクターであるpKK-233-2(Pharmacia)中に、得られた構築体を再連結した。発現プラスミドはpKK-hNQO2と示した。組換えDTジアホラーゼの精製について前記したように[Chenら、1992]、pKK-hNQO2大腸菌細胞を培養し、細胞を超音波破碎して遠心分離した。105,00gにて90分間の遠心分離により得られた上清を、50ml Affi-gel Blue(Bio-Rad)に適用し、公開された方法に従ってカラムを洗浄した。精製NQO2調製物をSDS-PAGE電気泳動により分析した。CB1954存在下におけるNQO2の活性、および種々の補助因子をHPLCにより測定した。反応速度パラメーターを測定するために、NQO2(1 μ g/ml)をNRH(500 μ M)および種々の濃度のCB1954(0.1ないし2mM)と共にリン酸ナトリウムバッファー中で(10mM、pH7)、37℃にてインキュベートした。種々

の時間に、部分標本（10 μ l）をPartisphere SCX（250 \times 4.5mm）HPLCカラム（Whatman Ltd）に注入し、1%メタノールを含有する50mM水性リン酸ナトリウムを用いて無勾配に（1.5 ml/分）溶出させた。320nmにおける溶出液の吸収を継続的に監視した。この分離系により、予測されたCB1954のすべての還元産物を分析することができた [Bolandら, 1991, Knoxら, 1992]。CB1954の還元は、還元産物5-（アジリジン-1-イル）-4-ヒドロキシアミノ-2-ニトロベンズアミドに相当するピークの面積の増加を定量することによりモニターした。すべての分析は酵素の添加により開始し、二重試験で行った。CB1954の各濃度における還元初期速度をその濃度に対してプロットし、コンピュータプログラムを用いてミハエリス-メンテンの式にそのデータを適合させることにより反応速度パラメーターを計算した（FigP）。データを変化させ、回帰分析によってそれを方程式の種々の直線にフィッティングさせることにより値を確認した。

CB1954に対する種々の補基質の作用を、前記の方法でNADHを用いて測定した。NADPHまたはNMNHをNRHの代わりとして用い、CB1954は100 μ Mの固定濃度で用いた。酵素濃度は5 μ g/mlであった。CB1954の還元は、HPLCトレースの、相当するピーク面積の減少と、還元産物5-（アジリジン-1-イル）-4-ヒドロキシアミノ-2-ニトロベンズアミドに相当するピーク面積の増加の双方によりモニターした。還元の相対速度は、時間に対するCB1954の還元のグラフ座標から、CB1954が10%還元された時点において決定した。時間軸は、等価である10 μ g/mlのNQ02に対して標準化した。

表1. NQ02に対する反応速度パラメーター。CB1954に関する大腸菌ニトロリダクターゼ、ヒトおよびラットDT-ジアホラーゼ。NRHをNQ02に対する補基質として使用する一方、他の酵素の値はNADHを用いて測定した。

酵素	K _m (μ M)	K _{cat} (s ⁻¹)
NQ02	263 \pm 13	6.01
ニトロリダクターゼ ¹	862 \pm 145	6.0
ラットDT-ジアホラーゼ ²	826	0.0683
ヒトDT-ジアホラーゼ ²	1403	0.0107

データ出典：¹[Anlezarkら, 1992]

²[Bolandら, 1991]

表2. 種々の補基質を用いる、NQ02によるCB1954還元の相対速度。すべての補基質は500 μ Mの初期濃度で、CB1954は100 μ Mの初期濃度で用いた。

補基質	還元相対速度
NADH	1.0
NADPH	1.24
NMNH	5.6
NRH	70.0

実施例2：モノクローナル抗体-NQ02複合体（conjugate）の投与

本実施例では、モノクローナル抗体 - NQ02複合体の投与後6ないし48時間にプロドラッグを投与した。正確な間隔は複合体の局在特性に依存するが、理想的には酵素の血漿活性が、毒性を引き起こすに十分なプロドラッグを触媒するには不十分になるとすぐ、プロドラッグ投与を開始する。複合体の用量は、患者あたり100ないし300mg・m⁻²である。プロドラッグの投与の約1時間前に補基質NRHの投与を開始し、プロドラッグ投与期間中を通して継続する。プロドラッグの用量はその性質に依存するが、有効用量は10ないし2000mg・m⁻²の範囲であろう。NRHの用量は、プロドラッグの用量の2ないし3倍でよい。このシステムにおいて、血漿および正常組織からの残余酵素活性のクリアランス力を促進する点が有利となる。これは、複合体の投与後、NRHの投与より先にガラクトシル化抗 - 酵素抗体を投与することにより達成してもよい。

10

実施例 3：組換えNQ02ポリヌクレオチドの投与

本実施例では、組換えポリヌクレオチドを投与する。投与は治療される条件に好適ないずれの投与経路により行われてよく、好適な経路には経口、鼻腔内および非経口が含まれる。用量は個々の臨床医により、個々の患者に応じて決定され、かつ、プロドラッグおよびプロドラッグから放出される細胞毒性物質の正確な性質により決定される。おおよその用量を前記の実施例 2 に示す。実施例 2 に詳述したようにNQ02の発現が有用なレベルである時、NRH投与後にプロドラッグの投与を開始できる。

実施例 4：NRHとプロドラッグの投与

本実施例では、患者にNRHを投与し1時間後にプロドラッグの同時投与を開始する。前記のように、プロドラッグおよびNRHの用量はプロドラッグおよびプロドラッグから放出される細胞毒性物質の性質に依存するであろう。

20

実施例 5：NQ02に対する可能性のある補基質

合成された化合物を図7に示した。

ここに、合成の詳細について説明する。

化合物1：1-(3-スルホネートプロピル)-ジヒドロニコチンアミド

5mlの水中の1-(3-スルホネートプロピル)-3-カルボキシアミドピリジニウム(20mg)に、50mgの無水炭酸ナトリウム、50mgの重炭酸ナトリウムおよび50mgの亜硫酸水素ナトリウムを加え、停止溶液を37℃にて30分間静置した。分取HPLCにより、反応混合物から還元化合物を精製した。5mlの反応混合物をDynamax Macro C18(21.4×250mm)逆相カラム(Rainin)に注入し、水中のアセトニトリル勾配(30分間にわたり0ないし100%)を用いて10.0

30

ml/分の速度で溶出させた。340nmおよび蛍光(ex 340、em 450)にて溶出液を継続的にモニターし、蛍光のピークに相当する分画を回収した。溶出液を回収し、凍結乾燥させて化合物1を得た。MNR(D₂O, 270MHz, 20℃) δ 1.95-2.08(m, J=7.3Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₂SO₃⁻), 2.94(t, J=7.7Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₂SO₃⁻), 3.04(br t, J=1.8Hz, 1H, 4-CH₂), 3.34(t, J=6.8Hz, 2H, NCH₂CH₂CH₂SO₃⁻), 4.88-4.98(m, 1H, H-5), 5.95(dd, J=8.1Hz, J=1.5Hz, 1H, H-6), 7.04(s, 1H, H-2)。

出発物質である1-(3-スルホネートプロピル)-3-カルボキシアミドピリジニウムを下記の方法で製造した：

N,N-ジメチルホルムアミド(DMF、20cm³)中のニコチンアミド(12.21g、0.10mol)の攪拌溶液に1,3-プロパンスルホン(12.21g、0.10mol)を一度に加えた。この透明な溶液を100℃にて1時間加熱し、その間(>5分)に重い無色固体が分離した。この反応混合物を室温にまで冷却し、濾過して固体を冷DMF(2×25cm³)、次いで無水ジエチルエーテル(2×30cm³)で連続洗浄した。DMF水溶液からの再結晶により無色斜方晶(prisms)として1-(3-スルホネートプロピル)-3-カルボキシアミドピリジニウムを得た：融点300-302℃分解, NMR(D₂O, 270MHz, 20℃) δ 2.52(4重線, J=7.3Hz, 2H, N⁺CH₂CH₂CH₂SO₃⁻), 3.04(t, J=7.3Hz, 2H, N⁺CH₂CH₂CH₂SO₃⁻), 4.89(t, J=7.3Hz, 2H, N⁺CH₂CH₂CH₂SO₃⁻), 7.95(br s, slow exchange, CONH₂), 8.24(br t, J=7.2Hz, 1H, H-5), 8.94(d, J=8.1Hz, 1H, H-4), 9.10(d, J=6.2Hz, 1H, H-6), 9.40(s, 1H, H-2)。実測値：C, 43.38; H, 4.95; N, 10.94%。C₉H₁₂N₂O₄S・0.25H₂O(無水M=244.27)理論値C, 43.45; H, 5.06; N, 11.26%。

40

化合物2

化合物1に関して記載した還元方法に従い、ヨウ化1-(カルボキシアミドメチル)-3-カル

50

ボキシアミドピリジニウムから化合物2である、1-(カルボキシアミドメチル)-ジヒドロニコチンアミドを製造した。NMR(D_2O , 270MHz, 20 °C) d 3.00(br t, $J=1.8\text{Hz}$, 2H, 4- CH_2), 3.90(s, 2H, CH_2CONH_2), 4.82-4.90(m, 1H, H-5), 5.76(dm, $J=8.1\text{Hz}$, H-6), 6.89(s, 1H, H-2). DMF (5ml) 中のニコチンアミド (2.0g、16.4mmol) および2-ヨウ化アセタミド (3.1g、16.8mmol) 混合物を55ないし60 °Cにて3時間加熱し、出発物質であるヨウ化1-(カルボキシアミドメチル)-3-カルボキシアミドピリジニウムを製造した。室温にまで冷却した後、酢酸エチル (50ml) を加えてこの混合物を30分間攪拌した。生成物を濾過して除去し、吸引乾燥させ、エタノール水溶液から再結晶させて、無色結晶としてヨウ化1-(カルボキシアミドメチル)-3-カルボキシアミドピリジニウム (3.3g、66%) を得た：融点210-211 °C。実測値：C, 31.37; H, 3.34; N, 13.77%. $C_8H_{10}N_3O_2I$ (無水M=307.09) 理論値C, 31.29; H, 3.28; N, 13.68%.

10

化合物3

化合物1に関して記載した還元方法に従い、臭化1-プロピル-3-カルボキシアミドピリジニウムから化合物3である、1-プロピル-ジヒドロニコチンアミドを製造した。NMR($CDCl_3$, 270MHz, 20 °C) d 0.90(t, $J=7.3\text{Hz}$, 3H, $NCH_2CH_2CH_3$), 1.56(7重線, $J=7.3\text{Hz}$, 2H, $NCH_2CH_2CH_3$), 3.05(t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H, $NCH_2CH_2CH_3$), 3.16(dd, $J=3.6\text{Hz}$, $J=1.8\text{Hz}$, 2H, 4- CH_2), 4.72(dt, $J=8.1\text{Hz}$, $J=3.6\text{Hz}$, 1H, H-5), 5.35(br s, 2H, slow D_2O exchange, $CONH_2$), 5.72(dq, $J=8.1\text{Hz}$, 1.8Hz, 1H, H-6), 7.04(d, $J=1.8\text{Hz}$, H-2).

出発物質である臭化1-プロピル-3-カルボキシアミドピリジニウムを下記の方法で製造した。DMF (20cm³) 中のニコチンアミド (12.21g、0.10mol) および1-ブロモプロパン (12.30g、0.10mol) 溶液を攪拌し、70 °Cにて1時間加熱した。重い沈殿が15分以内に出現した。室温に冷却し一晩放置した後、混合物を濾過して固体を冷DMF (10cm³) で、次いで無水ジエチルエーテル (2 × 20cm³) で洗浄した。DMFからの再結晶により、無色斜方晶として臭化1-プロピル-3-カルボキシアミドピリジニウム (19.42g、79%) を得た：融点171.5-172.5 °C; NMR(d_6 -DMSO, 270MHz, 20 °C) d 0.91(t, $J=7.3\text{Hz}$, 3H, $N^+CH_2CH_2CH_3$), 2.01(7重線, $J=7.3\text{Hz}$, 2H, $N^+CH_2CH_2CH_3$), 4.70(t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H, $N^+CH_2CH_2CH_3$), 8.20(br s, slow D_2O exchange, 1H, $CONH_3H_b$), 8.32(dd, $J=8.1\text{Hz}$, $J=6.2\text{Hz}$, 1H, H-5), 8.68(br s, slow D_2O exchange, 1H, $CONH_3H_b$), 9.02(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H, H-4), 9.35(d, $J=6.2\text{Hz}$, 1H, H-6), 9.65(s, 1H, H-2). 実測値：C, 44.21; H, 5.36; N, 11.32%. $C_9H_{13}N_2OBr$ (無水M=245.12) 理論値C, 44.10; H, 5.35; N, 11.43%.

20

化合物3もまた、ヨウ化1-プロピル-3-カルボキシアミドピリジニウムの還元により製造した。この出発物質は、DMF (5ml) 中のニコチンアミド (2.0g、16.4mmol) および1-ヨウ化プロパン (3.2ml、32.8mmol) を90ないし95 °Cにて4時間加熱することにより製造した。冷却した溶液に酢酸エチル (50ml) を加え、この混合物を室温にて30分間攪拌した。固体を濾過し、吸引乾燥させ、メタノールから再結晶させて、淡黄色結晶としてヨウ化1-プロピル-3-カルボキシアミドピリジニウムを得た (2.3g、48%)：融点183-184 °C (lit, 180-182 °C [S. Liao, J. T. Dulaney & Will 20 °C) 0.90(t, 3H), 1.98(m, 2H), 4.64(t, 2H), 8.17(s, 1H), 8.30(t, 1H), iams Ashman, J Biol Chem., 237, 2981-2987 (1962)]; NMR(d_6 -DMSO, 270MHz, 20 °C) d 0.90(t, 3H), 1.98(m, 2H), 4.64(t, 2H), 8.17(s, 1H), 8.30(t, 1H), 8.94(d, 1H), 9.23(s, 1H), 9.49(s, 1H). 実測値：C, 37.05; H, 4.47; N, 9.49%. $C_9H_{13}N_2OI$ (無水M=292.12) 理論値C, 37.01; H, 4.49; N, 9.59%.

30

化合物4

化合物1に関して記載された還元方法に従い、臭化1-(2-プロピル)-3-カルボキシアミドピリジニウムから化合物4である、1-(2-プロピル)-ジヒドロニコチンアミドを製造した。

40

出発物質である臭化1-(2-プロピル)-3-カルボキシアミドピリジニウムを下記の方法で製造した。DMF (20cm³) 中のニコチンアミド (12.21g、0.10mol) および2-ブロモプロパン (12.30g、0.10mol) 溶液を攪拌し、70 °Cにて10時間加熱した。この間に無色の沈殿が出現した。室温に冷却し一晩放置後、この混合物を濾過して固体を冷DMF (10cm³)、次いで無水ジエチルエーテル (2 × 20cm³) により洗浄した。DMFからの再結晶により、無色斜方晶として臭化1-(2-プロピル)-3-カルボキシアミドピリジニウム (16.81g、69%) を得た：融点215.5-217.0 °C; NMR(d_6 -DMSO, 270MHz, 20 °C) d 1.68(d, $J=7.0\text{Hz}$, 6H, $N^+CH(CH_3)_2$), 5.

50

17(septet, $J=7.0\text{Hz}$, 2H , $\text{N}^+\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 8.20(br s, slow D_2O exchange, 1H , CONH_aH_b), 8.31(dd, $J=8.1\text{Hz}$, $J=6.2\text{Hz}$, 1H , H-5), 8.71(br s, slow D_2O exchange, 1H , CONH_aH_b), 8.98(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H , H-4), 9.43(d, $J=6.2\text{Hz}$, 1H , H-6), 9.62(s, 1H , H-2). 実測値: C, 44.19; H, 5.34; N, 11.30%. $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OBr}$ (無水 $M=245.12$) 理論値 C, 44.10; H, 5.35; N, 11.43%.

化合物4はまた、ヨウ化1-(2-プロピル)-3-カルボキシアミドピリジニウムの還元によっても製造され得る。これは、DMF (5.0ml) 中のニコチンアミド (2.0g、16.4mmol) および2-ヨウ化プロパン (3.0ml、30.0mmol) 混合物を90ないし95 にて4時間加熱することにより製造される。冷却した溶液に酢酸エチル (50ml) を加え、この混合物を室温にて30分間攪拌した。この混合物を濾過し、固体を吸引乾燥させ、エタノール水溶液から再結晶させて、黄色結晶としてヨウ化1-(2-プロピル)-3-カルボキシアミドピリジニウム (1.1g、23%) を得た: 融点188-189 . 実測値: C, 37.16; H, 4.55; N, 9.53%. $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OI}$ (無水 $M=292.12$) 理論値 C, 37.01; H, 4.49; N, 9.59%.

化合物5

化合物1に関して記載した還元方法に従い、臭化1-(3-ヒドロキシプロピル)-3-カルボキシアミドピリジニウムから、化合物5である、1-(3-ヒドロキシプロピル)-ジヒドロニコチンアミドを製造した: NMR(D_2O , 270MHz, 20) d 1.89(br 4重線, $J=6.6\text{Hz}$, 2H , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.17(br t, $J=1.8\text{Hz}$, 2H , 4- CH_2), 3.38(t, $J=6.9\text{Hz}$, 2H , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.74(t, $J=6.2\text{Hz}$, 2H , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 4.95-5.05(m, 1H , H-5), 6.01(dm, $J=8.1\text{Hz}$, 1H , H-6), 7.13(s, 1H , H-2).

出発物質である臭化1-(3-ヒドロキシプロピル)-3-カルボキシアミドピリジニウムを下記の方法で製造した。DMF (20 cm^3) 中のニコチンアミド (12.21g、0.10mol) および3-ブ
ロモ-1-プロパノール (13.90g、0.10mol) 溶液を攪拌し、90 にて1時間加熱した。室温
に冷却し一晩放置後、この混合物を濾過して固体を冷DMF (10 cm^3)、次いで無水ジエチル
エーテル (2 \times 25 cm^3) により洗浄した。DMFからの再結晶により、無色斜方晶として臭化1
-(3-ヒドロキシプロピル)-3-カルボキシアミドピリジニウム (19.29g, 74%) を得た:
融点119.0-12.0 ; NMR(d_6 -DMSO, 270MHz, 20) d 2.14(br 4重線, $J=6.2\text{Hz}$, 2H , $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.48(t, $J=5.7\text{Hz}$, 2H , $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 4.77(t, $J=7.0\text{Hz}$, 2H , $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 8.18(br s, s
low D_2O exchange, 1H , CONH_aH_b), 8.28(dd, $J=8.1\text{Hz}$, $J=5.9\text{Hz}$, 1H , H-5), 8.63(br s, s
low D_2O exchange, 1H , CONH_aH_b), 8.97(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H , H-4), 9.26(d, $J=5.9\text{Hz}$, 1H , H-6), 9.56(s, 1H , H-2). 実測値: C, 40.07; H, 5.17; N, 10.16%. $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (無水 $M=261.12$) 理論値 C, 40.02; H
, 5.22; N, 10.37%.

化合物6

化合物1に関して記載した還元方法に従い、ヨウ化1-(2-ヒドロキシエチル)-3-カルボキシアミドピリジニウムから、化合物6である、1-(2-ヒドロキシエチル)-ジヒドロニコチンアミドを製造した。

DMF (5ml) 中のニコチンアミド (2.0g、16.4mmol) および2-ヨウ化エタノール (2.6ml、33.3mmol) の混合物を、90ないし95 にて4時間加熱して、出発物質であるヨウ化1-(2-ヒドロキシエチル)-3-カルボキシアミドピリジニウムを製造した。冷却した溶液に酢酸エチル (50ml) を加え、この混合物を室温にて30分間攪拌した。この混合物を濾過して吸引乾燥し、メタノールからの再結晶により、無色結晶としてヨウ化1-(2-ヒドロキシエチル)-3-カルボキシアミドピリジニウム (3.8g, 79%) を得た: 融点128-129 . NMR(d_6 -DMSO, 270MHz, 20) d 3.90(br t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H , $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 5.21(t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H , $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 8.17(br s, s
low D_2O exchange, 1H , CONH_aH_b), 8.32(dd, $J=8.1\text{Hz}$, $J=6.2\text{Hz}$, 1H , H-5), 8.56(br s, s
low D_2O exchange, 1H , CONH_aH_b), 8.98(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H , H-4), 9.16(d, $J=6.2\text{Hz}$, 1H , H-6), 9.43(s, 1H , H-2). 実測値: C, 33.06; H, 3.85; N, 9.57%. $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2\text{I}$ (無水 $M=294.09$) 理論値 C, 32.67; H, 3.77; N, 9.53%.

化合物7

化合物1に関して記載した還元方法に従い、ヨウ化1-(2-カルボキシエチル)-3-カルボキシアミドピリジニウムから、化合物7である、1-(2-カルボキシエチル)-ジヒドロニコチンアミドを製造した。NMR(D_2O , 270MHz, 20) 2.46(t, $J=6.9\text{Hz}$, 2H , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 2.96(t, $J=6.9\text{Hz}$, 2H , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 4.85-4.95(m, 1H , H-5), 7.33-7.31(m,), 8.19-8.24(m), 8.29-9.05(m

10

20

30

40

50

), 9.36(s).

DMF (5ml) 中のニコチンアミド (2.0g、16.4mmol) および3-ヨウ化プロピオン酸 (3.3g、16.5mmol) の混合物を、90ないし95 にて4時間加熱して、出発物質であるヨウ化1-(2-カルボキシエチル)-3-カルボキシアミドピリジニウムを製造した。冷却した溶液に酢酸エチル (50ml) を加え、この混合物を室温にて30分間攪拌した。この混合物を濾過し、固体を吸引乾燥し、エタノール水溶液からの再結晶により、無色結晶としてヨウ化1-(2-カルボキシエチル)-3-カルボキシアミドピリジニウム (2.4g, 46%) を得た：融点185-186 . 実測値：C, 33.80; H, 3.45; N, 8.57%. $C_9H_{11}N_2O_3I$ (無水M=322.10) 理論値C, 33.56; H, 3.44; N, 8.70%.

化合物8

化合物1に関して記載した還元方法に従い、ヨウ化1-ベンジル-3-カルボキシアミドピリジニウムから、化合物8である、1-ベンジル-ジヒドロニコチンアミドを製造した。

DMF (5ml) 中のニコチンアミド (2.0g、16.4mmol) および臭化ベンジル (3.9ml、32.8mmol) を55ないし60 に加熱することにより臭化1-ベンジル-3-カルボキシアミドピリジニウムを製造した。5分後に重い沈殿が形成され、さらにDMF (5ml) を加えた。30分後にこの混合物を室温にまで冷却し、酢酸エチル (50ml) を加えた。この混合物を室温にて30分間攪拌し、固体を濾過して吸引乾燥し、エタノール水溶液から再結晶させて無色斜方晶として臭化1-ベンジル-3-カルボキシアミドピリジニウム (4.2g、85%) を得た：融点212-213 . NMR(d_6 -DMSO, 270MHz, 20)d 5.99(s, 2H, N^+CH_2Ph), 7.35-7.55(m, 3H, H-3' / 4' / 5'), 7.55-7.70(m, 2H, H-2' / 6'), 8.22(br s, slow D_2O exchange, 1H, $CONH_aH_b$), 8.32(dd, J=8.1Hz, J=6.2Hz, 1H, H-5), 8.68(br s, slow D_2O exchange, 1H, $CONH_aH_b$), 9.03(d, J=8.1Hz, 1H, H-4), 9.39(d, J=6.2Hz, 1H, H-6), 9.74(s, 1H, H-2). 実測値：C, 53.35; H, 4.48; N, 9.40%. $C_{13}H_{13}N_2OBr$ (無水M=293.16) 理論値C, 53.26; H, 4.47; N, 9.56%.

化合物9

化合物1に関して記載した還元方法に従い、ヨウ化1-メチル-3-カルボキシアミドピリジニウムから、化合物9：1-メチル-ジヒドロニコチンアミドを製造した。

出発物質であるヨウ化1-メチル-3-カルボキシアミドピリジニウムを、Sigma-Aldrich Chemical Company、Poole Dorset, UKから入手した。
NMR(d_6 -DMSO, 270MHz, 20)d 4.41(s, 3H, N^+CH_3), 8.16(br s, slow D_2O exchange, 1H, $CONH_aH_b$), 8.26(dd, J=8.4Hz, J=6.2Hz, 1H, H-5), 8.52(br s, slow D_2O exchange, 1H, $CONH_aH_b$), 8.91(d, J=8.4Hz, 1H, H-4), 9.12(d, J=6.2Hz, 1H, H-6), 9.41(s, 1H, H-2).

化合物10

化合物1に関して記載した還元方法に従い、ヨウ化1-エチル-3-カルボキシアミドピリジニウムから、化合物10である、1-エチル-ジヒドロニコチンアミドを製造した。

DMF (5ml) 中のニコチンアミド (2.0g、16.4mmol) および1-ヨウ化エタン (2.6ml、32.5mmol) を55ないし60 にて3時間加熱することにより出発物質であるヨウ化1-エチル-3-カルボキシアミドピリジニウムを製造した。冷却後に、酢酸エチル (50ml) を加え、この混合物を室温にて30分間攪拌した。この混合物を濾過して淡黄色結晶を吸引乾燥し、DMFと酢酸エチルの混合溶液から再結晶させて淡黄色斜方晶としてヨウ化1-エチル-3-カルボキシアミドピリジニウム (3.7g、82%) を得た：融点202-203 . NMR(d_6 -DMSO, 270MHz, 20)d 1.59(t, J=7.3Hz, 3H, $N^+CH_2CH_3$), 4.72(q, J=7.3Hz, 2H, $H^+CH_2CH_3$), 8.16(br s, slow D_2O exchange, 1H, $CONH_aH_b$), 8.30(dd, J=8.1Hz, J=6.2Hz, 1H, H-5), 8.53(br s, slow D_2O exchange, 1H, $CONH_aH_b$), 8.93(d, J=8.1Hz, 1H, H-4), 9.27(d, J=6.2Hz, 1H, H-6), 9.50(s, 1H, H-2). 実測値：C, 34.11; H, 3.91; N, 9.80%. $C_8H_{11}N_2OI$ (無水M=278.09) 理論値C, 34.55; H, 3.99; N, 10.07%.

化合物11

化合物1に関して記載した還元方法に従い、ヨウ化1-フェニルエチル-3-カルボキシアミドピリジニウムから、化合物11である、1-フェニルエチル-ジヒドロニコチンアミドを製造した。

DMF (5ml) 中のニコチンアミド (2.0g、16.4mmol) および (2-ヨウ化エチル) ベンゼン (4.7ml、32.5mmol) を55ないし60 にて4時間加熱することにより出発物質であるヨウ化1-

フェニルエチル-3-カルボキシアミドピリジニウムを製造した。冷却した溶液に酢酸エチル (50ml) を加え、この混合物を室温にて30分間攪拌した。この混合物を濾過して吸引乾燥し、エタノール水溶液から再結晶させて黄色プリズムとしてヨウ化1-フェニルエチル-3-カルボキシアミドピリジニウム (3.8g、65%) を得た：融点188-189 °C。NMR(d_6 -DMSO, 270MHz, 20 °C) δ 3.32 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, $N^+CH_2CH_2Ph$), 4.93 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, $N^+CH_2CH_2Ph$), 7.15-7.40 (m, 5H, H-2' / 3' / 4' / 5' / 6'), 7.55-7.70 (m, 2H, H-2' / 6'), 8.17 (br s, slow D_2O exchange, 1H, $CONH^aH_b$), 8.26 (dd, $J=8.1$ Hz, $J=6.2$ Hz, 1H, H-5), 8.52 (br s, slow D_2O exchange, 1H, $CONH_aH_b$), 8.93 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, H-4), 9.15 (d, $J=6.2$ Hz, 1H, H-6), 9.47 (s, 1H, H-2)。

発明者らは、NQO2に対する可能性のある補基質として化合物1ないし11を試験し、化合物1および2に関しては完全な反応速度特性を測定した。実験に関する詳細と結果を以下に示す。

10

化合物3, 8, 9および10は文献中に報告されている (S Liao, JT Dulaney & HG Williams-Ashman, J. Biol. Chem., 237, 2981-2987, 1962; S Liao & HG Williams-Ashman, Biochem. and Biophys. Res. Comm., 4, 208-213, 1961; S Liao & HG Williams-Ashman, Biochem. Pharmacol., 6, 53-54, 1961.)。

図8aは、化合物8とニコチン酸モノヌクレオチド (還元型) はNQO2の補基質ではないことを示し、化合物11は不十分な補基質であることを示している。図4はNADH及びNADPHがNQO2に対し不十分な補基質であることを示している。

NRHとNQO2の k_{cat} は、CB1954を電子受容体として用いて360分 $^{-1}$ である。この反応の K_m は約30 μM である。新規補助因子は、確かにNQO2存在下でのCB1954の還元において非常に優れていた。

20

NQO2との補基質活性の測定

種々の可能性のある補基質を、CB1954およびNQO2存在下でのHPLC分析により測定した。反応速度パラメーターを測定するために、NRH (5000 μM) およびリン酸ナトリウムバッファー (10mM、pH7) 中の種々の濃度のCB1954 (0.1ないし2mM) をNQO2 (1 $\mu g/ml$) と共に37 °Cにてインキュベートした。種々の時間において、部分標本 (10 μl) をPartisphere SCX (250 \times 4.5mm) HPLCカラム (Whatman Ltd) に注入し、1%のメタノールを含有する50mMリン酸ナトリウム水溶液で無勾配 (1.5ml/分) に溶出させた。320nmにおける溶出液の吸収を継続的にモニターした。この分離系により、予想されたすべてのCB1954還元産物を分析することができた [Bolandら, 1991; Knoxら, 1992]。CB1954の還元は、還元産物5- (アジリジン-1-イル) -4-ヒドロキシシルアミノ-2-ニトロベンズアミドに相当するピーク面積の増加の定量によりモニターした。すべての分析は酵素添加により開始し、二重試験で行った。反応速度パラメーターは、CB1954の各濃度における還元の初期速度を、その濃度に対してプロットし、コンピュータプログラムを用いてデータをミハエリス-メンテンの式にそのデータをフィッティングさせることにより計算した (FigP)。データを変化させ、回帰分析によってそれを方程式の種々の線形型にフィッティングさせることにより値を確認した。

30

CB1954還元に対する種々の補基質の作用を、前記の方法で補基質をNRHおよびCB1954に換えて100 μM の固定濃度で検討した。酵素濃度は1または5 $\mu g/ml$ であった。CB1954の還元は、HPLCトレースの相当するピーク面積の減少と、還元産物5- (アジリジン-1-イル) -4-ヒドロキシシルアミノ-2-ニトロベンズアミドに相当するピーク面積の増加の双方によりモニターした。還元の相対速度は、時間に対するCB1954の還元のグラフ座標から、CB1954が10%還元された時点において決定した。時間軸は、等価である10 $\mu g/ml$ のNQO2に対して標準化した。種々の補基質に対するNQO2の反応速度パラメーターを、CB1954に関して測定したが、CB1954の初期濃度は10 μM と一定であるが、補基質の初期濃度は0ないし2mMと変化した。酵素濃度は0.5 $\mu g/ml$ であった。

40

図8a-cはすべての化合物の補基質として作用する能力を示す。

反応速度データは化合物1および2に対して測定し、表3に示した。

表3：種々の補基質に対するNQ02の反応速度パラメーター

補基質	K _m (μ M)	K _{cat} (分 ⁻¹)
NRH	28 \pm 2	360
2	198 \pm 19	750
1	1080 \pm 135	1530

10

実施例6：NQ02補基質の細胞中への内在化

化合物1は陰性電荷を有し、発明者らには、これが細胞内へ入ると思われず、事実そのとおりであった。化合物2はほとんど内在化しなかった(NRHの約10%)。細胞内部に入りにくいのは、細胞内代謝のためと考えられる。

種々のNQ02補基質のV79細胞への取り込みは蛍光光度法により測定した。V79細胞をT25組織培養フラスコに播種し、集塊となるまで増殖させた(2×10^7 細胞)。増殖培地を除去し、1mMの補基質を含有する新しい培地10mlと入れ換え、37℃にてインキュベートした。培地を除去して細胞単層を50mlの氷冷PBSを用いて5回洗浄した。細胞をトリプシン処理により除去して、遠心分離によりペレットとした。細胞ペレットをアルカリ細胞溶解バッファーに再懸濁し、攪拌により崩壊させ、10,000gでの遠心分離により細胞片を除去した。補基質の濃度は、100 μ lの上清を2.9mlの100mM重炭酸ナトリウムバッファー(pH10)で希釈し、蛍光光度法により測定した(励起360nm、放出450nm、スリット幅5nm)。蛍光光度計は適切な標準に対して校正した。すべての測定は3重測定で行った。結果を図9に示した。図9は種々の補基質の野生型V79細胞への取り込みを示している。化合物1は生理的pHで荷電しており、細胞から排除された。このようにして、この補基質はMDEPT適用に対して好適であった。

20

実施例7：補基質存在下での、NQ02によりトランスフェクトされた細胞に対するCB1954の細胞毒性

発明者らは、NQ02をV79(チャイニーズハムスター肺胚繊維芽)細胞にトランスフェクトし、補基質存在下でCB1954の細胞毒性を観察した。

30

NQ02ベクターH6の構築

実施例1に記載したように、NQ02配列はバクテリア発現プラスミドpKK-hNQ02由来であった。構築の工程は：

- 1) pKK-hNQ02からNcoI部位が開始コドンを含むNcoI/HindIIIフラグメントとして、NQ02 ORFを切り取った。
- 2) これをF58切断NcoI/HindIII中にクローン化し、ベクターH1を作製した。F58は当業者により作製されたpBluescript II SK(+) (Stratagene)の誘導體であり、余分のXhoI部位と優れた真核細胞発現のためのKozak配列およびBluescript EcoRV部位に挿入されたNcoI部位(CCTCGAGTCACCATGGATATCnnn...)を包含する。
- 3) 部分的に2つの塩基を埋め込み、NQ02 ORFの3' HindIII部位をピュロマイシン-耐性IRES 2シストロン性真核細胞発現ベクターF250(pIRes-P, EMBL:Z75185)のMCS XbaI部位に連結した(図10a)。H1およびF250はXhoIと精製されたプラスミドDNAにより最初に切断された。次いでHindIIIによりH1を切断し、dA+dGのみの存在下でKlenow DNAポリメラーゼにより処理する。XbaIによりF250を切断し、KlenowおよびdC+dTのみの存在下で処理する。次いでXhoI-[XbaI/CT]線状化F250およびXhoI-[HindIII/AG]nqo2挿入体を共に連結して最終発現ベクターH6を作製した(図10b)。

40

V79細胞のトランスフェクション

QIAGENエンドトキシフリーマキシプレップ(maxiprep)キットを用いて、トランスフェクション特性H6 DNAを調製した。製造業者の指示に従って(Boehringer Mannheim)、DOT APリボソーム試薬を用いて精製H6を用いてチャイニーズハムスター肺胚繊維芽細胞(V79

50

）をトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後に、10 µg/mlピュロマイシン（sigma）を含有するDMEM/10%FCS中でピュロマイシン - 耐性クローンを選択し、増殖させてそれぞれV79TM1, 5, 3, 7, 9, 11および13と示される細胞系統を確立させ、選択培地上で維持した。

インビトロにおける細胞毒性分析

対数増殖期にあたる細胞をトリプシン処理し、ウェルあたり（100 µl） 5×10^4 細胞の密度で96ウェルプレートに播種して24時間回復させた。次いで50 µlの培地を除去して200 µMのNRHを含有する新しい培地50 µlと置換し、最終濃度100 µMとした。In situにおいてCB1954（ 3.66×8 ）の連続希釈を行い、最終濃度を1000ないし0.46 µMとした。次いで細胞を薬物とともに37 °Cにて72時間インキュベートした。プレートを固定し、スルホローダミン-Bで染色した；590nmにおける吸収を読み取り、結果は対照増殖に対するパーセンテージで表した。IC₅₀は外挿により評価した。対照として、非トランスフェクトV79細胞を前記のごとく処理したが、培地にはピュロマイシンは含まれていなかった。図11に増殖曲線を示した。

10

図11はNQ02発現V79細胞におけるCB1954の細胞毒性に対するNRHの作用を示している。NRHの添加によりCB1954の細胞毒性が少なくとも100倍増強され（V79TM13）、V79TM5および13細胞系統においては100倍よりも強かった。この作用は非トランスフェクトV79細胞においては認められず（<3倍）、このように、トランスフェクト細胞におけるNQ02の発現に帰することができる。

実施例 8：NQ02補基質存在下でのT98G神経膠芽腫細胞に対するCB1954の細胞毒性

20

発明者らは、NRH、化合物1または化合物2いずれかの存在下における、T98G神経膠芽腫細胞系統に対するCB1954の細胞毒性を検討した。CB1954のみではこれらの細胞に毒性を示さない。細胞がNRHまたは化合物2の何れかと、CB1954とインキュベートされた時にCB1954の細胞毒性は少なくとも100倍に増大する。細胞内には入れない化合物1の存在下では、相乗作用は認められなかった。これは、NQ02が細胞内に存在し、それによりCB1954が活性化されて細胞毒性を示すことを意味する。

図12に結果を示す。

図12は、ヒトT98G神経膠芽腫細胞におけるCB1954の細胞毒性に対するNRH、化合物1および化合物2の作用を示している。CB1954存在下で細胞を144時間処理する以外は、V79細胞の場合と同様であった。NRHおよび化合物2の添加によりCB1954の細胞毒性は少なくとも100倍に増大したが、不透過性の補基質である化合物1は増強作用を示さなかった。

30

実施例 9：NQ02補基質の特異性およびインビボ毒性

新規補基質の特異性

図13および14は他のCB1954リダクターゼ（大腸菌ニトロレダクターゼおよびラットDTジアホラーゼ）の新規補基質の利用能を示す。NQ02とは異なり、これらの酵素は双方とも、NADHを補基質として利用し、CB1954を還元することができた。データは、ラットDTジアホラーゼが還元において化合物1および化合物2の双方を補基質として利用できることを示す。しかしながら、大腸菌ニトロリダクターゼはどちらも利用することはできなかった。このようにして、新規補助物質はある程度の特異性を示し、一般的な電子供与体ではない。

図15および図16は、正常マウスの体重に対する化合物1の作用を示す。

40

図17および図18は、正常マウスの体重に対する化合物2の作用を示す。マウス（6群のうち3群）に化合物1または2のいずれかの示された用量を静脈内投与（尾静脈）し、8日間にわたりマウスの体重を観察した。対照群のマウスには溶媒（リン酸バッファー生理食塩水）のみを投与した。

化合物1および2は、体重減少で判断した場合、マウスに対して本質的な毒性を示さなかった。

引用文献

Anlezark, G.M., Melton, R.G., Sherwood, R.F., Coles, B., Friedlos, F. 及び Knox, R.J. (1992) 「5-（アジリジン-1-イル）-2,4-ジニトロベンズアミド（CB1954）- I . 大腸菌からのニトロリダクターゼの精製及び特性 - 抗体指向性酵素プロドラッグ治療（

50

ADEPT) のための潜在的酵素」Biochem Pharmacol 44, 2289-95.

Boland, M.P., Knox, R.J. 及びRoberts, J.J. (1991) 「ラット及びヒトDTジアホラーゼの速度における相違は、誘導された細胞系のCB 1954 (5-(アジリジン-1-イル)-2,4-ジニトロベンズアミド) に対する識別される感受性をもたらす」Biochem Pharmacol 41, 67-75.

Chen, H.H., Ma, J.X., Forrest, G.L., Deng, P.S., Martino, P.A., Lee, T.D. 及びChen, S. (1992) 「大腸菌におけるラット肝臓NAD(P)H: キノン-アクセプターオキシドリダクターゼの発現及びArg-177におけるインビトロ突然変異」Biochem J. 284, 55-60.

Chen, S., Knox, R.J., Wu, K., Deng, P.S.K., Zhou, D., Biancher, M.A. 及びAmzel, L.M. (1997) 「ヒト、ラット及びマウスのDT-ジアホラーゼ間の触媒的相違の分子的基础」Journal of Biological Chemistry 272, 1437-1439.

Connors, T.A. 及びKnox, R.J. (1995) 「医薬品におけるプロドラッグ」Expert Opinion on Therapeutic Patents 5, 873-885.

Connors, T.A. 及びWhisson, M.E. (1966) 「進行したプラスマ細胞腫瘍を持つマウスのアニリンマスタードによる治療: グリクロニダーゼ活性と腫瘍感受性との関係」Nature 210, 866-7.

Friedlos, F., Biggs, P.J., Abrahamsom, J.A. 及びKnox, R.J. (1992a) 「DTジアホラーゼ活性の刺激によるヒト腫瘍細胞における還元されたピリジンヌクレオチドによるCB 1954細胞毒性の相乗作用」Pharmacol 44, 1739-43.

Friedlos, F., Jarman, M., Davies, L.C., Boland, M.P. 及びKnox, R.J. (1992b) 「酵素DTジアホラーゼ (NAD(P)Hデヒドロゲナーゼ (キノン), EC 1.6.99.2) の合成補因子としての新規な還元されたピリジニウム誘導体の同定」Biochem Pharmacol 44, 25-31.

Friedlos, F. 及びKnox, R.J. (1992) 「血液成分によるNAD(P)Hの代謝。ターゲティングされた酵素治療システムにおける生物還元的に活性化されたプロドラッグとの関係性」Biochem Pharmacol 44, 631-5.

Jaiswal, A.K. (1994) 「ヒトNAD(P)H: キノン オキシドリダクターゼ2。遺伝子構造、活性、及び組織特異的発現」J. Biol. Chem 269, 14502-8.

Jaiswal, A.K., Burnett, P., Adesnik, 及びWesley, M.O. (1990) 「NAD(P)H: キノン オキシドリダクターゼ遺伝子ファミリーの第2の成員に対応するヒトcDNA (NQO2) のヌクレオチド及び演繹されたアミノ酸配列。染色体6に位置するNQO-2遺伝子における膨大な多型性」Biochemistry 29, 1899-1906.

Knox, R.J., Friedlos, F. 及びBoland, M.P. (1993) 「CB 1954の生体活性化及びその抗体指向性酵素プロドラッグ治療 (ADEPT) におけるプロドラッグとしての使用」Cancer Metastasis Rev 12, 195-212.

Knox, R.J., Friedlos, F., Jarman, M., Davies, L.C., Goddard, P., Anlezark, G.M., Melton, R.G. 及びSherwood, R.F. (1995) 「大腸菌ニトロリダクターゼ酵素のための仮想補因子 - 抗体指向性酵素プロドラッグ治療 (adept) における還元的に活性化されたプロドラッグとの関係」Biochemical Pharmacology 49, 1641-1647.

Knox, R.J., Friedlos, F., Sherwood, R.F., Melton, R.G. 及びAnlezark, G.M. (1992) 「5-(アジリジン-1-イル)-2,4-ジニトロベンズアミド (CB1954) -II. 大腸菌ニトロリダクターゼの及びウォーカーDTジアホラーゼの比較」Biochem Pharmacol 44, 2297-301.

Mauger, A.B., Burke, P.J., Somani, H.H., Friedls, F. 及びKnox, R.J. (1994) 「自己犠牲プロドラッグ: ニトロリダクターゼ酵素と組み合わせた抗体指向性酵素プロドラッグ治療のための候補」J. Med. Chem., 37, 3452-8.

Quinn, J. (1996) 「CB1954及びその類似物についての研究」PhD Thesis: University of London.

Sharma, S.K., Bagshawe, K.D., Burke, P.J., Bodenm R.W. 及びRogers, G.T. (1990) 50

）「異種移植モデルにおける限局化後の血液における抗-CEAカルボキシペプチダーゼG2複合体の不活性化及びクリアランス」Br. J. Cancer 61, 659-662.

Whisson, M.E.及びConnors, T.A. (1965) 「進行したプラスマ細胞腫瘍を持つマウスのアニリンマスタードによる治療」Nature 206, 689-91.

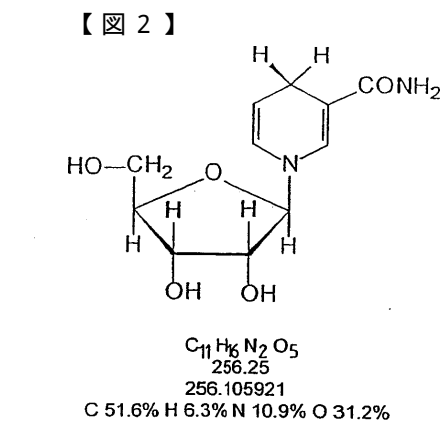
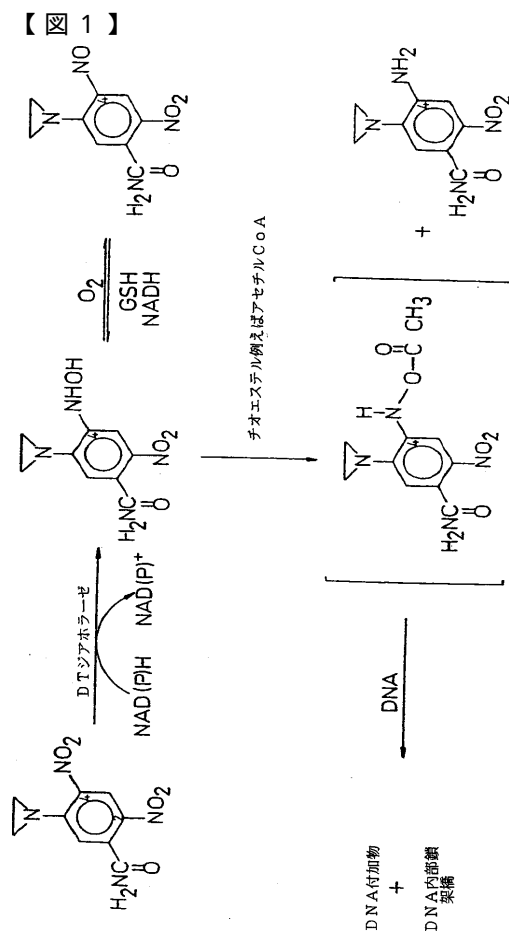


Fig. 1

Fig. 2

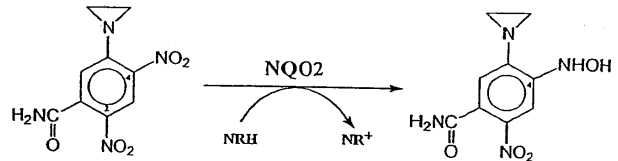


Fig. 3

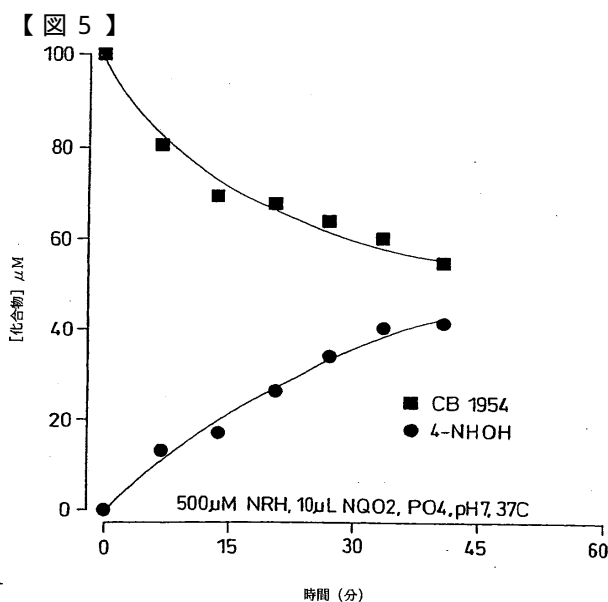


Fig. 5

Fig. 4

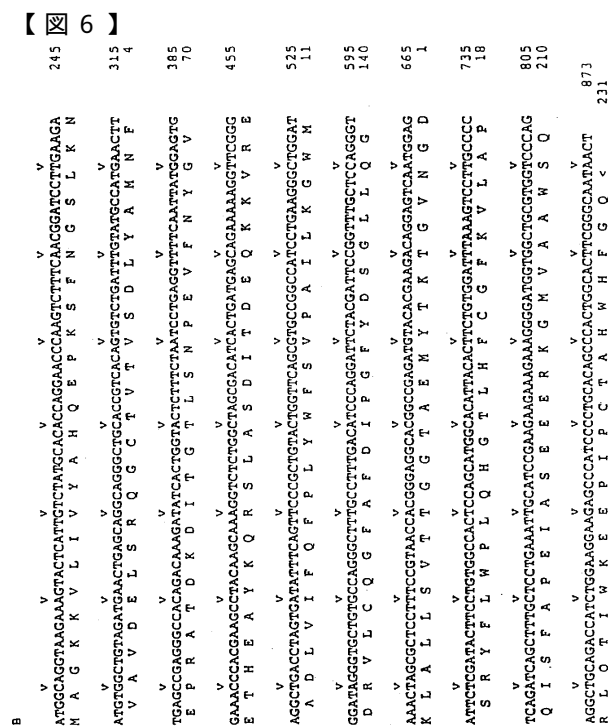


Fig. 6

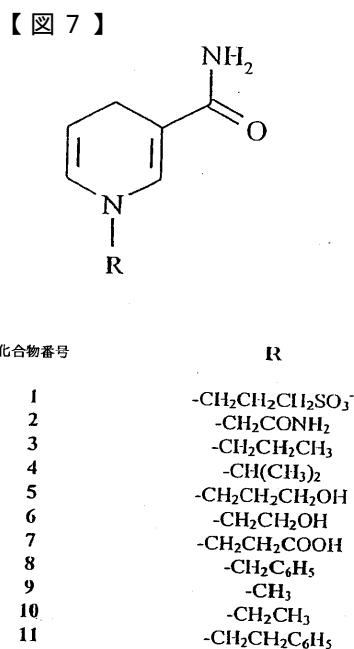
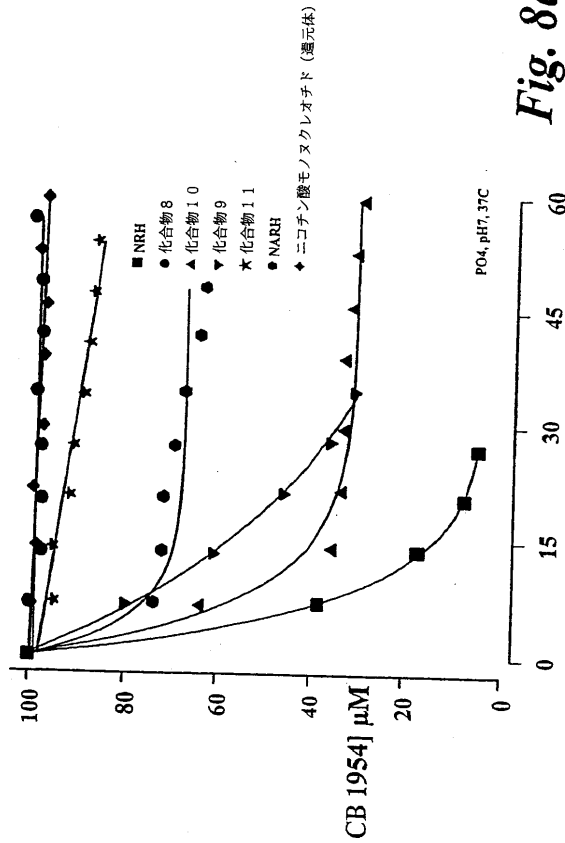
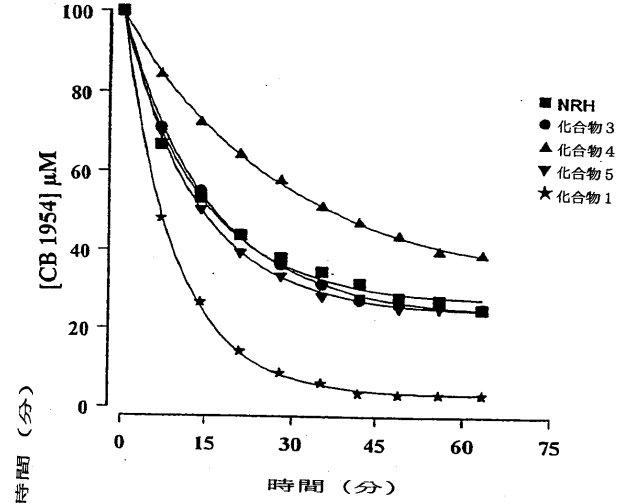


Fig. 7

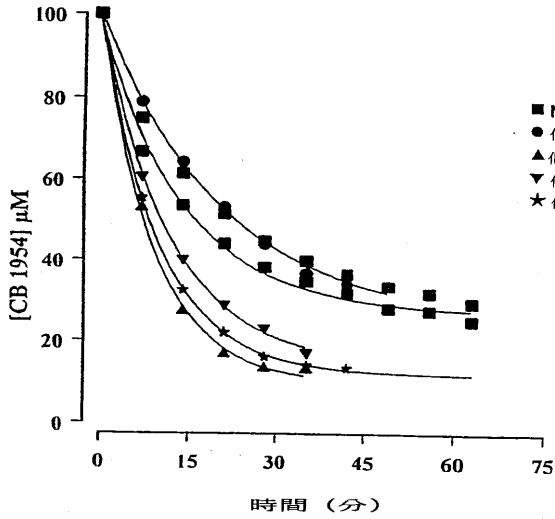
【図 8 a】



【図 8 b】



【図 8 c】



【図 9】

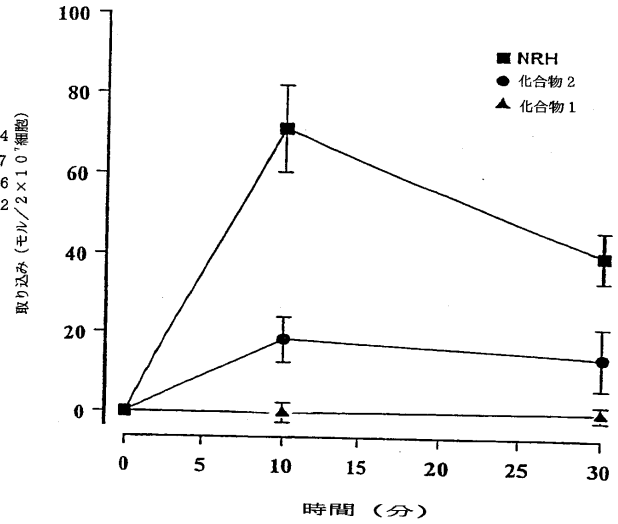
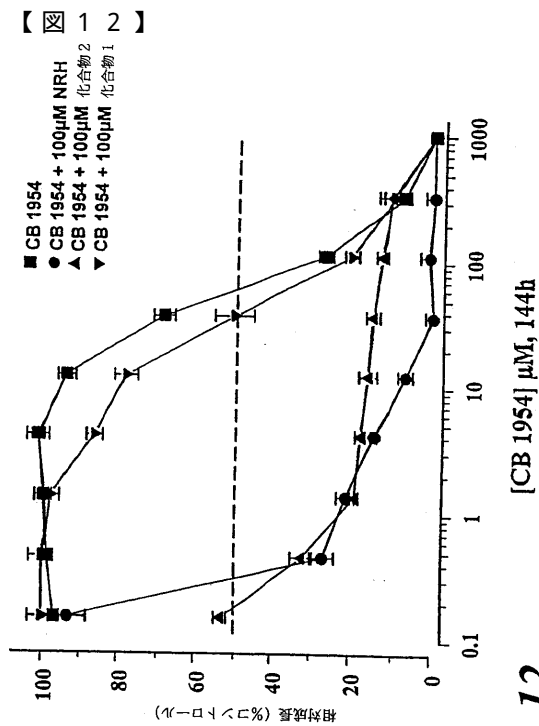
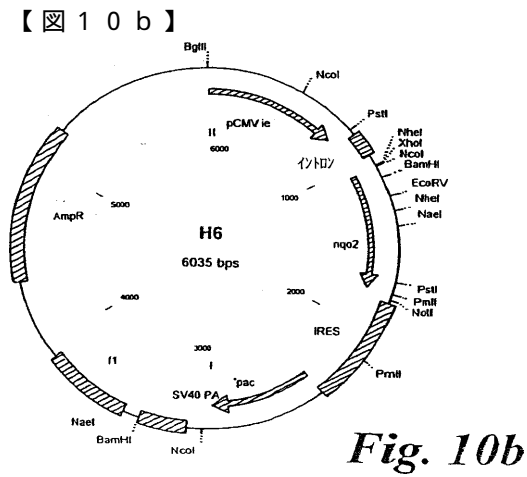
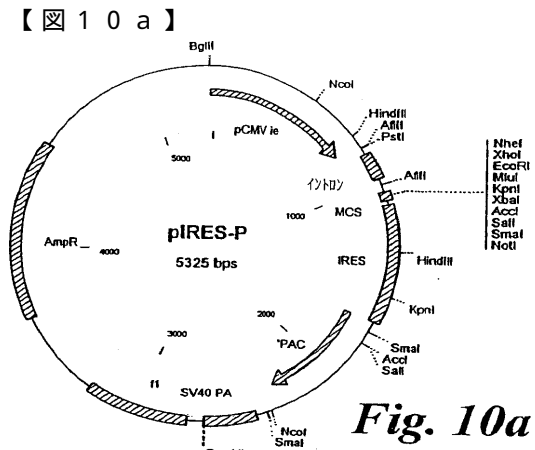
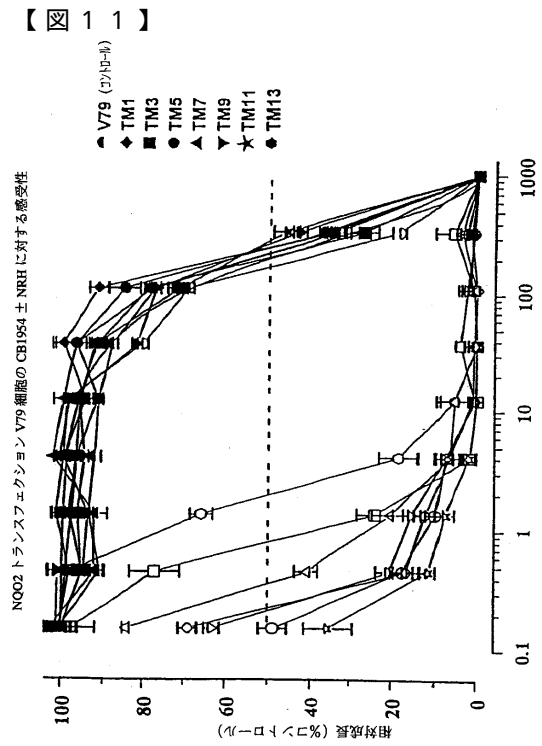
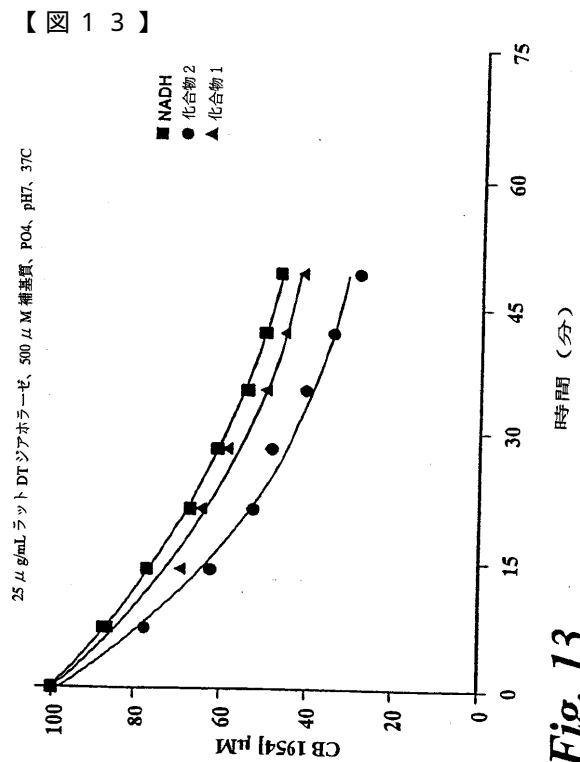


Fig. 8c

Fig. 9

**Fig. 12****Fig. 11****Fig. 13**

中実符号 - CB1954 のみ
中空符号 - CB 1954 + 100 μM NRH

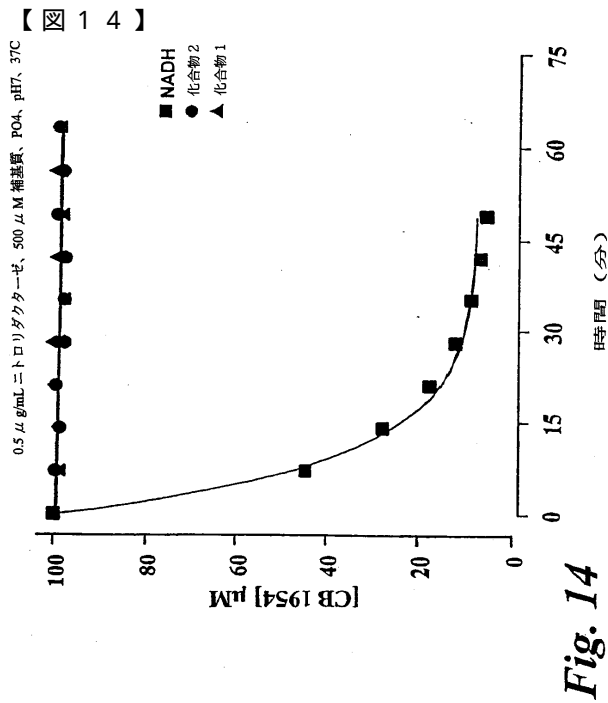


Fig. 14

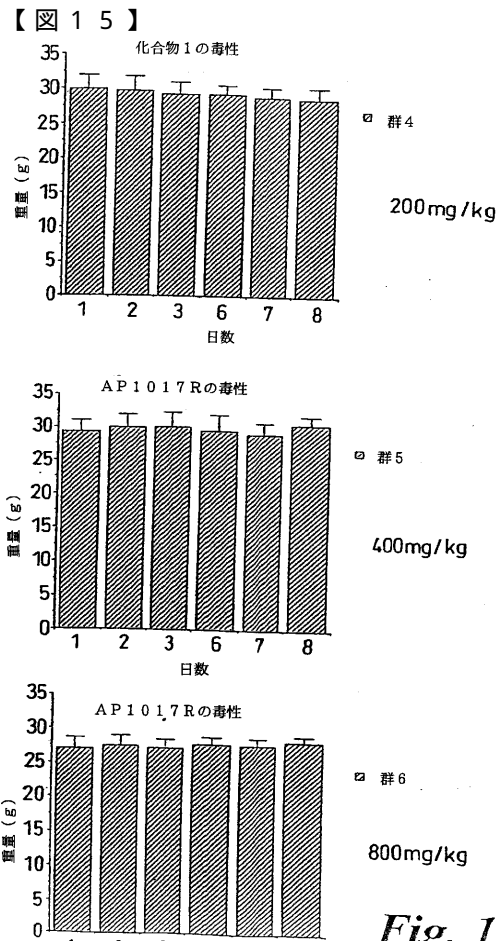


Fig. 15

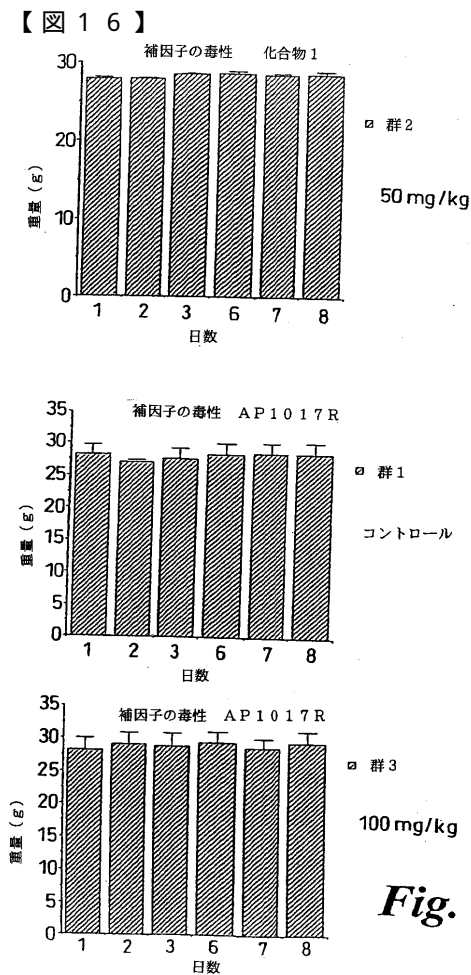


Fig. 16

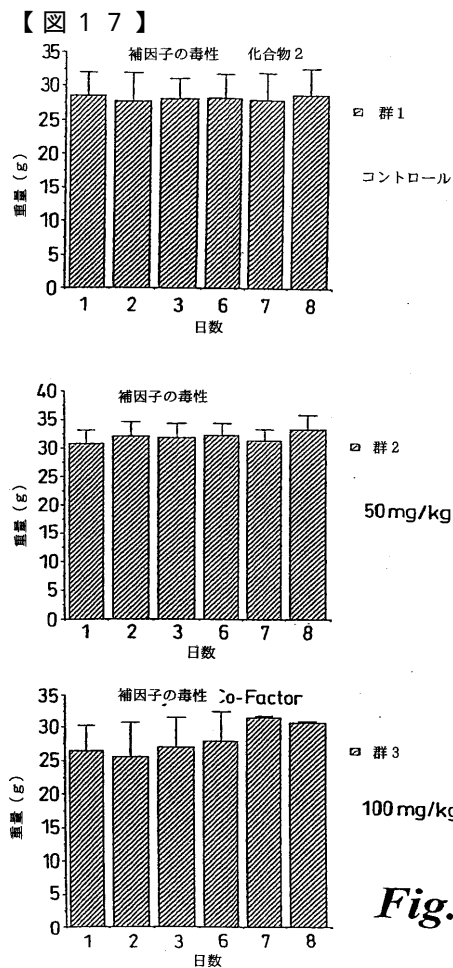
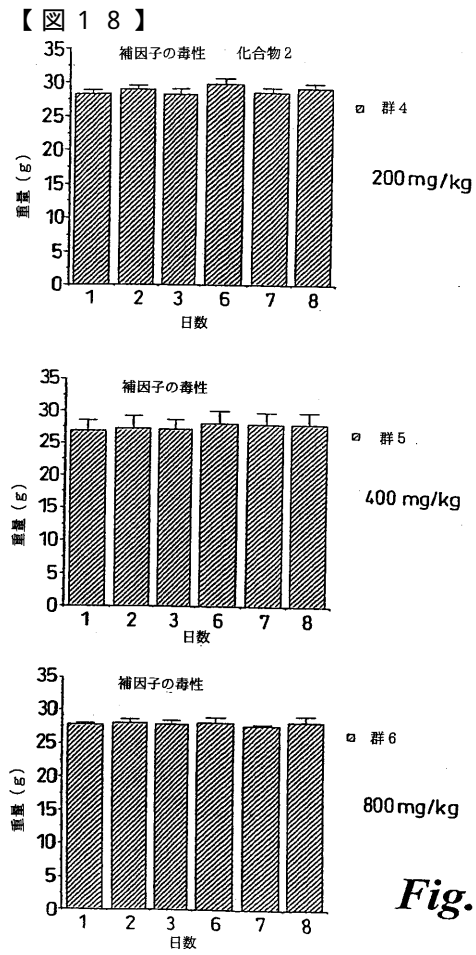


Fig. 17

**Fig. 18**

フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 鈴木 三義

(74)代理人

弁理士 松富 豊

(74)代理人

弁理士 西 和哉

(74)代理人

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 フィリップ・ジョン・バーク

イギリス・ロンドン・SE7・7PF・チャールトン・エリスコーム・ロード・45

(72)発明者 リチャード・ジョン・ノックス

イギリス・サリー・SM1・2SU・サトン・チーム・ロード・サイプレス・コート・21

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 国際公開第97/020580(WO, A1)

J. Am. Chem. Soc., 米国, 1982年, Vol.104, No.3, 807-812

Cancer Metastasis Rev., 1993年, Vol.12, No.2, 195-212

J. Biol. Chem., 1994年, V269 N20, 14502-14508

Biochem. Pharmacol., 1992年, Vol.44, No.4, 631-635

Biochem. Pharmacol., 1992年, Vol.44, No.9, 1739-1743

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 45/00

A61K 31/4406

A61P 35/00

A61P 43/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CA/REGISTRY(STN)

PubMed