

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5069562号  
(P5069562)

(45) 発行日 平成24年11月7日(2012.11.7)

(24) 登録日 平成24年8月24日(2012.8.24)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	A
C 12 N	9/22	(2006.01)	C 12 N	9/22	Z N A
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	

請求項の数 4 (全 104 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-534175 (P2007-534175)
(86) (22) 出願日	平成17年9月28日 (2005.9.28)
(65) 公表番号	特表2008-514224 (P2008-514224A)
(43) 公表日	平成20年5月8日 (2008.5.8)
(86) 國際出願番号	PCT/IL2005/001041
(87) 國際公開番号	W02006/035439
(87) 國際公開日	平成18年4月6日 (2006.4.6)
審査請求日	平成20年9月18日 (2008.9.18)
(31) 優先権主張番号	60/613,702
(32) 優先日	平成16年9月29日 (2004.9.29)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	502275425 イッサム リサーチ ディベロップメント カンパニー オブ ザ ヘブリュー ユ ニバーシティー オブ エルサレム イスラエル, 91390 エルサレム, ギヴァット ラム, ザ ヘブリュー ユニバーシティー オブ エルサレム, ザ エドモンド ジェー. サフラ キャ <sup>ン</sup> パス, ハイ テック パーク
(74) 代理人	100103816 弁理士 風早 信昭
(74) 代理人	100120927 弁理士 浅野 典子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組換えヒトT2RNaseおよびその使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなるT2ファミリーの単離されたリボヌクレアーゼ蛋白質であって、アクチン結合によって特徴付けられ、かつリボヌクレアーゼ活性を欠くリボヌクレアーゼ蛋白質。

## 【請求項2】

配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなるT2ファミリーの熱安定性リボヌクレアーゼを単離する方法であって、この方法は：

熱変性した試料を得るために、前記T2ファミリーのリボヌクレアーゼを発現する細胞を含む試料を熱変性すること；

前記熱変性した試料の上清を単離すること；

前記T2ファミリーの熱安定性リボヌクレアーゼを有する前記上清の画分を同定すること；および

前記T2ファミリーの熱安定性リボヌクレアーゼを有する前記画分を前記上清から実質的に純粋となるまで精製することを含む、方法。

## 【請求項3】

腫瘍脈管形成を、それを必要とする哺乳動物対象において予防または阻害するための医薬の製造のための、配列番号4に記載されるアミノ酸配列からなるT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質であってアクチン結合によって特徴付けられるリボヌクレアーゼ蛋白

10

20

質の使用。

【請求項 4】

癌細胞クローリン原性を、それを必要とする哺乳動物対象において予防または阻害するための医薬の製造のための、配列番号 4 に記載されるアミノ酸配列からなる T 2 ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アクチン結合および抗腫瘍特性を有するヒト T 2 リボヌクレアーゼ蛋白質、ならびに酵母細胞におけるそのクローニングおよび発現に関する。さらに、本発明は、対象における固体腫瘍および転移性成長に関連する疾患および状態の治療におけるヒト T 2 リボヌクレアーゼ蛋白質の使用方法、ならびにヒト T 2 リボヌクレアーゼの精製のための新規な方法に関する。本発明は、さらに、有効成分として、一般に増殖性疾患または障害、特に癌を治療するための、T 2 ファミリーのヒトリボヌクレアーゼまたはそれをコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

医療界および一般的集団の両方の中では、癌等の細胞増殖性疾患および障害の治療用の新規な治療剤の開発に対して継続的な興味がある。

【0003】

哺乳動物細胞に対して（抗脈管形成のような）抗増殖性、抗コロニー化、抗分化および/または抗発生特性を呈する剤は、潜在的には、抗癌薬として用いることができる。従って、これらの剤は、天然ならびに合成源の双方から広く求められている。

【0004】

RIBASES は、RNA を分解するその能力から区別される生物学的活性を呈するリボヌクレアーゼ (RNase) である。RIBASES およびそれらの構造的ホモログは、非常に多数の細胞反応をもたらすことが知られている (Rybalk, M. ら、1991, J. Biol. Chem. 266: 21202 - 21207; Schein, C. H. 1997 Nature Biotechnol. 15: 529 - 536)。細胞傷害性好酸球の分泌性顆粒で見出される 2 つの主要な蛋白質である EDN および ECP (RNase A ファミリーのメンバー) は、免疫応答に参画すると考えられている。自家不和合性植物においては、花柱 S - RNase (RNase T 2 ファミリーのメンバー) は花粉管の成長を阻止し、かくして、受精を妨げる。ウシガエル卵母細胞から生産された RC - RNase は、イン・ビトロにて、P388、L1210 白血病細胞系のような腫瘍細胞の成長を阻害し、肉腫 180、Erllich、および Mep I I 腹水細胞のイン・ビボ殺傷に有効である (Chang, C - F. ら、1988, J. Mol. Biol. 283: 231 - 244)。いくつかの RNase は制限されたリボヌクレアーゼ活性を呈し、その例は、血管形成を刺激するアンジオゲニンを含む (Fett, J. W. 1985, Biochemistry 24: 5480 - 5486)。

【0005】

生体は、病原体および腫瘍細胞に対する防御のために細胞外 RNase を用いる。例えば、ECP は寄生虫の攻撃に応答して分泌され (Newton, D L. 1992, J. Biol. Chem. 267: 19572 - 19578)、抗菌および抗ウイルス活性を呈する。この活性は、血液、精液、母乳、滑液、唾液、尿および汗を含めたほとんどのヒト体液に存在する RNase である Zinc-<sub>2</sub>-糖蛋白質 (Zn<sub>2</sub>g p) によっても呈される (Lei G, ら、1988, Arch Biochem Biophys. Jul 15: 355 (2): 160 - 4)。

【0006】

細胞外 RNase が細胞反応において機能する特異的メカニズムは知られていない。

【0007】

10

20

30

40

50

あるRNaseの細胞傷害性活性に対する主なバリアーは、細胞膜である。ECPは、人工膜および細胞膜の双方においてチャネルを形成することが見出されている。恐らくは、EDN(小脳プルキニ工細胞の破壊の原因である好酸球RNase)と共に顆粒膜から放出されたECPは、EDNを細胞間空間に移動させる。真菌トキシン-サルシン(RNase Aファミリーのメンバー)の標的細胞への進入は、細胞膜を透過するウイルス感染に依存する(Rybalk, M.ら、1991, J. Biol. Chem. 266: 21202-21207)。また、RNaseがエンドサイトーシスを介して細胞に進入する可能性もある。ゴルジ-破壊薬物であるレチノイン酸またはモネンシンを用いて人工的にBS-RNaseを細胞に送達した場合、細胞傷害性は劇的に増加した(Wu Y, ら、1995, J. Biol. Chem. 21; 270 (29): 17476-81)。

10

#### 【0008】

RNaseの細胞傷害性は、治療目的で用いることができる。ヒトRNase Lは、インターフェロンによって活性化され、ウイルス増殖を阻害する。ヒトRNase L遺伝子の発現は、タバコ植物における2'5'-Aシンテターゼ遺伝子の発現と共に、キュウリモザイクウイルスから植物を保護し、ジャガイモウイルスYの複製を妨げるので十分である。ヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)は、RNase L抗ウイルス経路において遮断を誘導する(Schein, C. H. 1997 Nature Biotech. 15: 529-536)。RNaseは特異的膜蛋白質抗体と融合して、イムノトキシンを作成することができる。例えば、RNase Aと、トランスフェリン受容体に対するまたはT細胞抗原CD5に対する抗体との融合は、前記トキシンの各々に対する特異的受容体を保有する腫瘍細胞における蛋白質合成の阻害をもたらす(Rybalk, M. ら、1991, J. Biol. Chem. 266: 21202-21207; Newton DL, ら、1998, Biochemistry 14; 37 (15): 5173-83)。RNaseは動物に対して毒性が低いので、それらは、現在使用されるイムノトキシンよりも少數の望ましくない副作用を有し得る。

20

#### 【0009】

細胞傷害性リボヌクレアーゼの細胞傷害性は、リボヌクレアーゼ阻害剤(RI)およびRNaseの間の相互作用の強さに対して逆の関係にあるように見える。リボヌクレアーゼ阻害剤(RI)は、リボヌクレアーゼの潜在的な致死効果からこれらの細胞を保護するように働く脊椎動物細胞内で見出される天然分子である。リボヌクレアーゼ阻害剤は、種々の親和性でもってRNaseに結合する50kDaのサイトゾル蛋白質である。例えば、RIは、 $K_i$ が $10^{-6}$ ないし $10^{-16}$ Mの範囲である、10桁の大きさにわたる阻害定数を持つ、リボヌクレアーゼのウシ臍臍リボヌクレアーゼA(RNase A)スーパーファミリーのメンバーに結合する。

30

#### 【0010】

##### A-RNase

ONCONASEは、RNase AおよびBS-RNaseのように、RNase Aスーパーファミリーのメンバーである。RNase Aスーパーファミリーのメンバーは、アミノ酸配列において約30%の同一性を共有する。非保存残基の大部分は表面ループに位置し、各RNaseの専用生物学的活性において重要な役割を演じているように見える。ONCONASEは、Northern Leopardカエル(Rana pipiens)卵母細胞および初期胚から単離された。それは、イン・サイチュおよびイン・ビボの双方において、種々の固形腫瘍に対して抗腫瘍効果を有する(Mikulkis S. M. ら、1990 J. Natl. Cancer 17; 82 (2): 151-3)。ONCONASEは、非細胞傷害性濃度において、感染したH9白血病細胞におけるHIV-1複製を特異的に阻害することも見出された(Youle R. J. ら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 21; 91 (13): 6012-6)。

40

#### 【0011】

ONCONASEのRNase活性は比較的低いが、その酵素活性および細胞傷害性活性はある程度関連していることが認められている。A-RNaseの三次構造は細胞傷害

50

性および非細胞傷害性タイプの間を区別すると考えられる。例えば、ONCONASEおよびRNase Aの三次構造の間の差は、ONCONASEで観察された増大した細胞傷害性が関与していると考えられる。ONCONASEは、RNase Aとは異なり、酵素活性および細胞傷害性活性の双方で必須であるプロックされたN-末端Glu1残基(ピログルタメート)を含有する。このユニークな構造は、ONCONASEが標的細胞に浸透することを可能とする(Boix E.ら、1996, J. Mol. Biol. 19: 257 (5) : 992 - 1007)。加えて、ONCONASEにおいては、Lys 9残基はRNase AのGln11残基を置き換え、これは、活性部位の構造をもたらすと考えられる。さらに、ONCONASEおよびRNase Aの間の一次構造のアミノ酸配列の差は、その特異性をもたらす活性部位の周辺においてトポロジー的变化を引き起こす(Mosimann S. C.ら、1992, Proteins 14 (3) : 392 - 400)。

#### 【0012】

A-RNaseの間の毒性の差は、RIに結合するそれらの能力にも帰される。ウシ精液リボヌクレアーゼ(BS-RNase)は、そのアミノ酸配列がRNase Aに対して80%同一であるが、RNase Aスーパーファミリーの他のメンバーとは異なり、BS-RNaseは二量体形態で存在する。BS-RNaseの四次構造はRIによる結合を妨げ、それにより、酵素が、RIの存在下においてそのリボ核酸分解活性を保持することを可能とすることが示されている(Kimら、1995, J. Biol. Chem. 270 No. 52 : 31097 - 31102)。RNase Aに対して高度の相同性を有するONCONASEは、RIによる結合に対して耐性である。RI-ONCONASE複合体は、RI-RNase A複合体のK<sub>d</sub>よりも少なくとも一億倍低いK<sub>d</sub>を有する。RIに対するONCONASEのより低い結合親和性は、リボ核酸分解活性の効果的な阻害を妨げ、RNase AがそうではないのにONCONASEが低濃度で細胞傷害性である理由を説明できるであろう。

#### 【0013】

細胞表面受容体への結合は、ONCONASE細胞傷害性において最初の工程であることが示唆されている。哺乳動物細胞表面のONCONASE受容体の性質については何も知られていない。ONCONASEは、リシンの場合のように細胞表面炭水化物に結合することができるか、あるいは、それは、ポリペプチドホルモンのような生理学的に取り込まれた分子について元来発生した受容体に結合することができる(Wu Y.ら、1993, J. Biol. Chem. 15; 268 (14) : 10686 - 93)。マウスにおいては、ONCONASEは、RNase Aよりは50ないし100倍遅い速度で腎臓から排出された。ONCONASEのより遅い排出速度は、管状細胞に結合するそのより高い能力の結果として、および/または蛋白質分解に対するその耐性によって説明される。腎臓におけるONCONASEの強い保持は、臨床的関連を有し得る(Vasandani V. M.ら、1996, Cancer Res. 15; 56 (18) : 4180 - 6)。ONCONASEは、ブルキニエ細胞EDN受容体に結合することもできる(Mosimann S. C.ら、1996, J. Mol. Biol. 26; 260 (4) : 540 - 52)。ONCONASEの特異性もまたそのtRNA選択性にて発現される。ウサギ網状赤血球溶解物において、およびXenopus卵母細胞において、ONCONASEは、rRNAまたはmRNA分解を介するよりはむしろ、tRNAを介して蛋白質合成を阻害することが発見された。対照的に、RNase AはrRNAおよびmRNAを主に分解する(Lin J. J.ら、1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 14; 204 (1) : 156 - 62)。

#### 【0014】

感受性組織培養のONCONASEでの処理の結果、非常に低いレベルのRNA含有量を有する、細胞周期のG1期において阻止された細胞が蓄積する(Mosimann S. C.ら、1992, Proteins 14 (3) : 392 - 400)。神経膠細胞において、ONCONASEは、細胞密度の有意な低下なくして蛋白質合成を阻害し、これ

10

20

30

40

50

は、ONCONASEが細胞静止性であることに加え細胞に対して細胞傷害性でもあることを示す(Wu Y.ら、1993, J. Biol. Chem. 15; 268(14): 10686-93)。化学療法剤と組み合わせたONCONASEは多剤耐性を克服することができる。ビンクリスチンおよびONCONASEでの処置は、ビンクリスチン単独で処置したマウスにおける44日までと比較して、ビンクリスチン耐性腫瘍を保有するマウスの平均生存時間(MST)を66日まで増加させた(Schein, C. H., 1997, Nature Biotechnol. 15: 529-536)。

#### 【0015】

さらに、いくつかの化学療法剤はONCONASEと相乗的に作用することができる。ONCONASEおよびタモキシフェン(抗エストロゲン)、トリフルオロフェラジン(ステラジン、カルモジュリン阻害剤)またはロバスタチン(3-ヒドロキシル-3-メチルグルタルチル補酵素A(HMG-CoA)レダクターゼ阻害剤)との組み合わせで処理したヒト膵臓腺癌およびヒト肺癌腫の腫瘍細胞系においては、より強い成長阻害が、ONCONASE単独で処理した細胞よりも観察された(Mikulski S. M.ら、1990, Cell Tissue Kinet. 23(3): 237-46)。かくして、より大きな有効性および/またはより小さな毒性での組合せ療法養生法を開発する可能性は明らかである。

#### 【0016】

ウシ精液RNaseはRNase Aファミリーのユニークなメンバーである。というのは、それは2つのジスルフィドブリッジによって連結されたRNase A-様サブユニットのダイマーを含有する唯一のRNaseだからである。加えて、それは、基質および反応産物の双方によるアロステリック調節を維持する。該調節は、周期的スクレオチド加水分解相で起こる。それは、一本鎖および二本鎖RNA双方を切断する能力を有する。BS-RNaseは高度に細胞傷害性である。それは、マウス白血病細胞、HeLaおよびヒト胚肺細胞、マウス神経芽細胞腫細胞、およびヒト線維芽細胞およびマウスプラスマ細胞腫細胞系に対してイン・ビトロで抗腫瘍効果を呈する。イン・ビボで固体癌腫(甲状腺小胞癌腫およびその肺転移)を有するラットへ投与した場合、BS-RNaseは腫瘍重量の劇的な低下を誘導し、処置した動物に対して検出可能な毒性効果はなかった(Laccetti, P.ら、1992, Cancer Research 52: 4582-4586)。人工的にモノマー化されたBS-RNaseは、天然ダイマーBS-RNaseよりも高いリボヌクレアーゼ活性を有するが、より低い細胞傷害性を有する(D'Allessio G.ら、1991, TIBS: 104-106)。これは、再度、生物学的活性に対する分子構造の重要性を示す。ONCONASEのように、BS-RNaseは、標的細胞への侵入に先立って、標的細胞の表面の認識部位に結合する。

#### 【0017】

細胞傷害性であることに加えて、BS-RNaseは免疫抑制性もある。BS-RNaseは活性化されたT細胞の増殖をブロックし、同種異形マウスへ移植された皮膚移植片の生存を延長することができる。SB-RNaseの免疫抑制性活性は、雌免疫系から精子細胞を保護する必要性によって説明される。

#### 【0018】

##### T2-RNase

植物においては、自家和合性は豊富であって、自家受精の防止において効果的である。自家不和合性を制御するS遺伝子座において特定の対立遺伝子を保有する花粉は、同一のS-対立遺伝子を保有する植物を受精させることができない。多くの自家不和合性植物、特に、SolanaceaeおよびRosaceaeのメンバーにおいては、T2-RNaseファミリーのメンバーであるS-RNaseは、雌器官によって分泌される。S-RNaseは自家花粉を特異的に認識し、受精が起こる前に柱頭または花柱におけるその成長を阻止する(Clarkie, A. E. およびNewbiggin, E. , 1993, Ann. Rev. Genet. 27: 257-279)。花粉管成長の阻止はRNA分解の直接的結果であることが提案されているが、S-RNaseの該管細胞への進入の態様は

10

20

30

30

40

50

依然として曖昧である。

**【0019】**

RNase T2ファミリーのメンバーは、最初、真菌で同定された(Egami, F. および Nakamura, K. 1969, Microbial ribonucleases. Springer-Verlag, Berlin)。それらが、ウイルスから哺乳動物の範囲で、広く種々の生物で発見された。特に、T2-RNaseは、広く記載されたRNase Aファミリーよりもかなり広い分布を示す。しかしながら、哺乳動物細胞におけるT2-RNaseのイン・ビトでの役割は依然として知られていない。

**【0020】**

微生物においては、細胞外T2-RNaseは、一般には、培養基に存在するポリリボヌクレオチドの消化に寄与すると考えられており、それにより、拡散可能な栄養素を生起する。それらは防御剤としても働くことができる(Egami, F. および Nakamura, K., 1969, Microbial ribonucleases. Springer-Verlag, Berlin)。

**【0021】**

植物においては、T2-RNaseは、胚珠に向かって移動する花粉管の伸長を選択的に制限することによって、受粉プロセスにおいて役割を演じる(Roiz, L. および Shoseyov, O., 1995, Int. J. Plant Sci. 156: 37-41, Roiz L. ら、1995, Physiol. Plant. 94: 585-590)。現在まで、これらのRNaseが花粉管に影響を及ぼすメカニズムに関する論争があった。しかしながら、以下の実施例セクションにおいて詳細に記載するように、A. niger RNase B1に関して研究する本著者らは、T2-RNase B1が花粉管F-アクチン細胞骨格ネットワークの構造に干渉し、細胞質ストリーミングの破壊および先端へのF-アクチンネットワークの崩壊を引き起こすことを示した。さらに、検出できないレベルのリボ核酸分解活性を有するRNase B1での実験においては、本著者らは、花粉管成長阻止がRNase活性とは独立していることを示した(Roiz ら、準備中)。

**【0022】**

かくして、癌治療剤として効果的に用いることができる細胞傷害性リボヌクレアーゼの例はほとんど存在しない。哺乳動物細胞に対して抗増殖、抗コロニー化、抗分化および/または抗発生活性を有する新しいリボヌクレアーゼが、ヒト癌の治療で利用可能な治療剤のスペクトルを増強させ、それにより、癌治療の分野において新しい展望を開くのに必要である。

**【0023】**

**アポトーシスおよび疾患**

細胞死は、機能的および形態学的特徴の特異的組によって区別することができる、壞死およびアポトーシスと呼ばれる2つの異なるプロセスを介して起こり得る。壞死は、細胞外環境における有害な因子(例えば、低酸素症、高熱、ウイルス侵入、トキシンへの暴露、または病原体による攻撃)に対する応答として起こる外傷的細胞死である。原形質膜におけるイオンポンプおよび水ポンプは、濃度勾配を維持するそれらの能力を失い、細胞およびミトコンドリアが膨潤し、最終的に破裂し、細胞構成要素を漏出し、周囲の組織における炎症応答を引き起こす。アポトーシス、すなわちプログラムされた細胞死(PCD)においては、細胞は、固有のゲノムプログラムを介して自己破壊するように誘導される。細胞は収縮し、ミトコンドリアは破壊され、チトクロームcを放出する。核DNAは徐々に約200塩基のモノマーおよびマルチマーに分解する。最終的に、細胞はプレビングを受け、近くのファゴサイトーシス細胞によって食されるアポトーシス体と呼ばれる小さな膜に囲まれた断片に分解する(Rudin CM および Thompson CB. 1997. Annu Rev Med. 48: 267-81; Chamond R. R. ら、1999. Allergol Immunol Clin. 14: 367-374)。重要なことには、周囲の組織における炎症応答は誘導されない。2つの細胞死の形態間の相違を

10

20

30

40

50

以下の表1にまとめる。

表1：アポトーシス-対-壊死

	壊死	アポトーシス	
原因	細胞外刺激体による急性細胞負傷	種々の細胞内または細胞外刺激体	
特徴	病理学的	生理学的または病理学的	
分布	細胞の群または組織のパッチ	かなり散乱した単離細胞	
エネルギーの必要性	受動プロセス (ATP非依存性)	能動的プロセス (ATP依存性)	10
形態学的特徴	細胞質の膨潤 細胞およびオルガネラ内容物の喪失 を伴う膜溶解	細胞質の収縮、ホスファチジルセリンの外部化。  細胞質およびオルガネラを含むアポトーシス体を形成する細胞膜プレビング。	
		クロマチン凝縮、および200塩基のマルチマーへのDNA断片化。	
炎症周囲組織の反応		炎症反応無しのファゴサイトーシス	

20

(Nikitakis N.G. ら、 2004. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 97:476-90.)

#### 【0024】

アポトーシスは、正常なプロセスにおいて、および病理学的プロセスにおいて、ホメオスタシスの調節において中枢的な役割を演じる。胚形成の間に、アポトーシスは、オタマジャクシ尾の喪失、指および足指の分化、および脳における不必要なニューロンの除去を担う。また、アポトーシスは、月経における子宮内膜のディスアセンブリー、および老化プロセスに関与する (Herrndon F J. ら、 1997. Mechanism of aging and development 94 : 123 - 134)。

#### 【0025】

アポトーシスは、生物の一体性に対する脅威を示す細胞を除去するために必要である。例えば、それは、細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) がウイルス感染細胞を殺傷するメカニズムである (Barber GN. 2001. Cell Death Differ. 8 : 113 - 126)。CTLは相互においてさえアポトーシスを誘導でき、従って、それらはその生理学的機能の完了の後に排除でき、それらが周囲の細胞にマイナスに作用するようになることを妨げる (Duke RC. 1992. Semin Immunol. 4 : 407 - 412)。

#### 【0026】

前眼房および精巣は、抗原がこれらの部位において免疫応答を誘導しないことが判明しているように、「免疫特権」器官として知られている。これらの部位において、細胞は、構成的に、高レベルのFasリガンド (FasL) (Fasと命名され (CD95とも呼ばれる) 且つ強力な死滅アクチベーターとしても公知の細胞表面受容体に結合するサイトカイン) を発現する。FasLはT細胞に対して毒性であり、かくして、外来性組織および腫瘍グラフトの延長したおよび時には永久的な生存を許容する (阻害されたアポトーシス) (Niederkorn JY. 2002. Crit Rev Immunol. 22 : 13 - 46 ; Takeuchi T. ら、 1999. J. Immunol. 162 : 518 - 522 ; Sugihara A, ら、 1997. Anticancer Res. 17 : 3861 - 3865)。かくして、特異的細胞 (例えば、リンパ球) におけるアポトーシスプロセスのアップレギュレーションは、グラフト拒絶の防止に有用であり得、潜在的に、免疫抑制薬物の使用の減少、および患者の生活の質の改善をもたらす。

30

40

50

## 【0027】

種々の疾患がアポトーシスの調節に関連付けられている。それらの中には、種々の神経変性病、とりわけ、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、および癲癇（全て、ニューロンの選択的アポトーシスと関連する）がある。これらのニューロン死は、これらの細胞におけるアポトーシスに対する感受性の増加に関連すると思われる。

## 【0028】

成熟血液細胞は、骨髓に位置する造血前駆体に由来する。造血、ならびに成熟血液細胞の維持は、多数の向性因子（エリストポエチン、コロニー刺激因子、サイトカイン）によって調節される。造血細胞の生産および排除の間のバランスは、アポトーシスによって調節される。アポトーシス調節の喪失は、多数の血液障害、例えば、無形成貧血、骨髓形成不全症候群、CD4<sup>+</sup>T細胞リンパ球減少症およびG6PD不全に関連付けることができる。10

## 【0029】

心筋梗塞および脳血管障害、虚血性腎臓損傷および多囊胞性腎臓において、虚血性ゾーンの周囲の細胞はアポトーシスを介して排除される。

## 【0030】

アポトーシスは、種々の細胞、例えば、ニューロン、筋細胞、リンパ球、肝細胞においてアップレギュレートされ、老化は、酸化的ストレス、グリケーションおよびDNA損傷等のホメオスタシス機能不全を引き起こす生理学的条件下でアポトーシスを増強することを示す証拠がある。20

## 【0031】

アポトーシスは、アレルギーの後期および慢性段階に参画する炎症細胞（好酸球、好中球、リンパ球、マクロファージ、肥満細胞）において記載されてきた（Sampson A P . 2000 . Clin Exp Allergy . 30 Suppl 1 : 22 - 7 ; Haslett C . 1999 . Am J Respir Crit Care Med . 160 : S5 - 11）。例えば、好酸球のアポトーシス死は気管支喘息、アレルギ性鼻炎およびアトピー性皮膚炎に関連付けられている（Wooley K L ら、1996 . Am J Respir Crit Care Med ; 154 : 237 - 243 ; Boyce JA . Allergy Asthma Proc . 18 : 293 - 300）。リンパ球アポトーシスは、Olea europaeaおよびLolium perenne induce等のアレルゲンによって誘導され得る（Guerra F ら、1999 . Hum Immunol ; 60 : 840 - 847）。30

## 【0032】

アポトーシスの阻害に関連した疾患は、細胞の過剰の蓄積が起こる疾患を含む（新生物疾患、自己免疫疾患）。かつて、これらの疾患における細胞の過剰蓄積が増大した細胞増殖によるものであると考えられていたが、現在では、欠陥的アポトーシスによるものと考えられる。

## 【0033】

固形腫瘍および血液学的腫瘍双方において、悪性細胞はアポトーシスインデューサーに対して異常な応答を示す（Watson AJM . 1995 . Gut . 37 : 165 - 167 ; Burch W ら、1992 . Trends Pharmacol Sci . 13 : 245 - 251）。これらの疾患において、p53、ras、c-mycおよびbc1-2等の周期調節遺伝子は、悪性変性に関連する突然変異、不活化または調節不全を被る（Merritt AJ ら、1994 . Cancer Res . 54 : 614 - 617 ; Iwadate Y ら、1996 . Int J Cancer . 69 : 236 - 240 ; Muel lauer L ら、1996 . Hepatology . 23 : 840 - 847 ; Newcomb EW . 1995 . Leuk Lymphoma . 17 : 211 - 221 ）。bc1-2の発現は、前立腺および結腸癌における、ならびに神経芽細胞腫における、より悪い予後についての予測因子であると考えられている（Thompson CB .40  
50

1995. Science 267: 1456 - 1462)。多数の抗新生物療法が腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導することが示されている(レビューについては: Sun SYら、2004. J Natl Cancer Inst. 96: 662 - 672; Schulze-Bergkamen HおよびKrammer PH. 2004. Semin Oncol. 31: 90 - 119; Abend M. 2003. Int J Radiat Biol. 79: 927 - 941参照)。

#### 【0034】

アポトーシスにおける欠陥は、ループスエリテマトーデス(Carson DA. およびRebeiro JM. 1993. Lancet. 341: 1251 - 1254. Aringer M. ら、1994. Arthritis Rheum. 37: 1423 - 1430)、関節リウマチ(Liu H. およびPope RM. 2003. Curr Opin Pharmacol. 3: 317 - 22.)および重症筋無力症(Masunaga A. ら、1994. Immunol Lett. 39: 169 - 172)等の自己免疫疾患をもたらし得る。

#### 【0035】

病原体がアポトーシスに干渉するいくつかの方法がある。例えば、(いくつかのリンパ系および上皮悪性疾患に関連する)アデノウイルスおよびエプスタイン・バールウイルスはBcl-2癌遺伝子の発現を促進し(Thompson CB. 1995. Science 267: 1456 - 1462; Marshall WL. ら、1999. J Virol. 73: 5181 - 5185)、牛痘はカスパーーゼを不活化するプロテアーゼ阻害剤をコードし(Deveraux QL. ら、1999. J Clin Immunol. 19: 388 - 98.)；クラミジアはサイトゾルへのミトコンドリアチトクロームc放出に干渉する(Fan T. ら、1998. J Exp Med. 187: 487 - 496)。

#### 【0036】

乾癬等の慢性炎症性の過剰増殖皮膚病においては、アポトーシスの異常に低い速度は、表皮過形成の発生に寄与する。ケラチノサイトは、IL-15等のケラチノサイトアポトーシスを抑制し得るいくつかのプロ炎症性サイトカインを含めた、種々の外部および内部増殖因子に応答することが示された(Ruckert R. ら、2000. J Immunol. 165: 2240 - 2250)。

#### 【0037】

##### アクチンおよび細胞運動性

アクチンは、細胞骨格を含み、全てのタイプの細胞において運動性を供する性質が普遍性である。細胞アクチン細胞骨格は、アクチンフィラメントの種々の空間的および時間的に制御されたアセンブリーに組織される。アクチンフィラメントは、細胞周囲のラメリポディウムおよび糸状足においてモノマーG-アクチンから重合される。これらの新しく重合されたアクチンフィラメントは高度に動的であって、迅速に代謝回転する。細胞の残りで見出されるアクチンフィラメントは、ラメリポディウムにおいて、およびラメラを通じて起こる小さな膜波立ちにおいてその起源を有する。アクチンフィラメントは、ストレスファイバー、ラメリポディウムネットワーク、糸状足束、後ろ側弧、末梢凹凸束ならびに側地線アレイのような種々のアレイに組織される(Small, ら、Trends in Cell Biol. 2002; 12: 112 - 20)。これらのアセンブリーの各々の組織化は、それらに異なる機能を付与するアクチン関連蛋白質の特異的組によって制御され、安定化される。細胞中の異なるアクチニアレイの非対称かつ分極した組織化が、細胞の移動、成長、分裂、分化および防御についての基本である(Hilpeilaら、Mol Cell Biol. 2003; 14: 3242 - 53)。

#### 【0038】

細胞運動性は、アクチン骨格の重合および脱重合の周期的ダイナミックスに依存する。細胞運動性は、細胞前部の突出および後部の引き続いての収縮を含む。突出は、ラメリポディウムおよび糸状足におけるアクチンフィラメントの前向きの周期的成長または重合に

10

20

30

40

50

基づく。一方で、収縮は、収縮性束におけるミオシン - I I と予め形成されたアクチンフィラメントとの相互作用に基づく。顕微鏡的研究は、ラメリポディウムの後ろのアクチンの逆方向流動の連続を示し、これは、ラメリポディウムにおいて発生したフィラメントの集団が、アクチン骨格の残りをなすアクチンのネットワークに寄与することを示す。かくして、アクチンフィラメントはラメリポディウムで生じ、それらがアクチン細胞骨格に取り込まれるようになるに従いそれらの関連蛋白質を放出し、次いで、他のアクチン関連蛋白質、特にミオシン - I I 等の収縮性蛋白質を獲得し、細胞突出の収縮のための準備において収縮性束となる。

#### 【 0 0 3 9 】

細胞の形状の変化および運動性は、癌転移、炎症病、神経変性病等の病理学的事象に関連する。細胞運動性関連蛋白質は、ウィスコット - アルドリッチ症候群等の多数の疾患の病因で同定されている (W A S 蛋白質)。ウィスコット - アルドリッチ症候群の代表的な症状として、湿疹、血小板減少症等の徵候、および感染に対する感受性が挙げられる。

10

#### 【 0 0 4 0 】

多数のかつ増大する数の蛋白質は、アクチン細胞骨格の状態を調節し、変調することが知られており、いくつかは、部分的に重複する機能を有すると思われる。これらの蛋白質として、フィラミン、タリン、A r p 2 / 3 複合体、 - アクチンニン、フィラメント作用蛋白質およびとげのある端部キャッピング蛋白質等のアクチンおよびインテグリン結合蛋白質が挙げられる (レビューについては、B r a k e b u s c h ら、E M B O J o u r n a l , 2 0 0 3 ; 2 2 : 2 3 2 4 - 3 3 参照)。加えて、アクチン細胞骨格、ならびに小さなR a s 関連G T P a s e 、例えば、R a c 、R h o およびC d c 4 2 の細胞形態および挙動の変化をもたらす異なる上流シグナリング経路の蛋白質が存在する。これらの小さなG T P a s e に加えて、ホスホイノシタードおよびカルシウムは、アクチンのダイナミックスおよび細胞移動を調節することが知られている。

20

#### 【 0 0 4 1 】

現在、炎症性疾患、癌、神経変性病等に対する現存の療法についての補充としてそのような薬物に対して大きな潜在能力が存在するが、細胞運動性の特異的阻害剤は非常に少数しか入手できない。例えば、細胞の形状の変化および運動性は、癌の進行における2つの律速段階：炎症性疾患における血管エレメントからのリンパ球の血管外遊出における、および感染した宿主組織への多くの細胞寄生体の侵入的進行における、脈管形成 (すなわち、血管動員) および転移 (すなわち、体内の1つの位置から他の位置への腫瘍の拡大) に関連している。細胞成長阻害剤と組み合わせて、特異的細胞運動性阻害剤での処置は、H I V 感染およびA I D S の治療に対する多剤アプローチと同様な、炎症疾患、癌、感染等の細胞運動性および増殖の疾患のより効果的な治療を提供する能力を有する。

30

#### 【 0 0 4 2 】

直接的にアクチンを標的とする多数の化合物が、細胞運動性を変調するにおいて効果的であることが知られている。最良な公知の化合物は、アクチンフィラメントの細胞浸透性脱安定化剤であるサイトカラシン、およびアクチンフィラメントの細胞不浸透性安定化剤であるファロイジンである (J . A . Coo p e r , J . C e l l B i o l , 1 0 5 ( 1 9 8 7 ) )。加えて、ラトルンクリンはアクチンフィラメントの細胞浸透性破壊剤である (I . S p e c t o r , S c i e n c e , 2 1 9 , 4 9 3 ( 1 9 8 3 ) )。ジャスプラキノリドは、アクチンフィラメントの細胞浸透性安定化剤である (M . R . B u b b ら、C hem . , 2 6 9 , 1 4 8 6 9 ( 1 9 9 4 ) )。R h o - キナーゼ阻害剤Y - 2 7 6 3 2 (M . U e h a t a ら、N at u r e , 3 8 9 , 9 9 0 ( 1 9 9 7 ) )、およびM L - g (M . S a i t o h ら、B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . , 1 4 0 , 2 8 0 ( 1 9 8 6 ) )等のミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤のごとき、アクチン細胞骨格の上流の蛋白質を標的とする少数の化合物が知られている。最近、A r p 2 / 3 複合体によるC d c 4 2 媒介アクチン核形成に関する蛋白質であるN - W A S P の活性を阻害する環状ペプチドダイマーが発見された (J . R . P e t e r s o n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 8 , 1 0 6 2 4 ( 2 0 0 1 ) )。それにも拘らず、

40

50

アクチンダイナミックスおよび細胞運動性に影響する利用可能な化合物の欠乏がある。

【0043】

ヒトRNase6PL

ヒトにおける染色体6の長腕の異常性は、結腸および直腸(Honchel Rら、1996.Cancer Res. 56: 145-9)、乳房(Devilleeら、1991.Oncogene 6: 1705-1711; Theileら、1996.Oncogene 13: 677-685; Chappellら、1997.Br.J.Cancer 75: 1324-1329)、胃(Queimadoら、1995.Genes Chromosomes Cancer 14: 28-34)、肝臓(DeSouzaら、1995.Oncogene 10: 1725-1729)、腎臓(Moritaら、1991.Cancer Res. 51: 5817-5820)、メラノーマ(Milikinら、1991.Cancer Res. 51: 5449-5443)、卵巣(Saitoら、1992.Cancer Res. 52: 5815-5817; Foulkesら、1993.Br.J.Cancer 67: 551-559; Cookeら、1996.Genes Chromosomes Cancer 15: 223-233; Orphanosら、1995.Br.J.Cancer 71: 290-293; Tibilettiら、1996.Cancer Res. 56: 4493-4498)および子宮(Tibilettiら、1997.Br.J.Cancer 75: 1831-1835)の癌腫を含めたいくつかの固形新生物に関連付けられている。染色体6q27はクローリン化され、配列決定されている。植物からヒトに高度に保存された細胞質RNase遺伝子のファミリーに対して高い相同意を有するRNase6PL遺伝子は、この染色体に位置している。10 20

【0044】

ヒトにおける染色体6の領域の欠失(6q27)は、いくつかのヒト悪性疾患に関連付けられている(Cookeら、1996.Gene Chromosomes Cancer 15: 223-233; Saitoら、1992.Cancer Res. 52: 5815-5817)。この領域は、RNase T<sub>2</sub>ファミリーに対する相同意を共有する推定腫瘍サブレッサーRNase6PL遺伝子を含有することが判明した(Trubiaら、1997.Genomics 42: 342-344; Acquatiら、2001,Meth.Mol.Biol 160: 87-101およびOncogene 2000; 22: 980-88)。RNase6PL遺伝子の配列は、ヒトゲノムプロジェクトで同定されている。しかしながら、ヒトRNase6PL蛋白質は単離または精製されておらず、またヒトT2RNaseの抗腫瘍および抗転移活性は示されていない。30

【0045】

酵母からのT2RNase(RNaseB1)は、花粉管成長阻害について非常に重要なアクチン結合活性を保有することが示されている(Roiz, Lら、準備中)。他のT2RNaseにおいて発見されていないものと同様な、アクチン結合、抗腫瘍および抗転移活性を有するヒトT2RNase蛋白質は、外来性T2RNase蛋白質よりも優れた治療的利点を供するであろうことは認識されるであろう。というのは、そのような天然蛋白質は、宿主によってより許容されると予測されるからである。40

【0046】

かくして、広く認識された要望があり、炎症性疾患、癌、神経変性病および感染症等の細胞運動性関連疾患の治療および予防において潜在的有用性を有する、アクチン結合活性を有するT2ファミリーの単離された組換えヒトリボヌクレアーゼを有するのはかなり有利であろう。

【発明の開示】

【0047】

本発明の1つの態様によると、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーの単離されたリボヌクレアーゼ蛋白質が提供される。

【0048】

本発明のもう1つの態様によると、配列番号4に対して少なくとも85%相同であって、T2リボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、および異種発現系において該ポリペプチドの発現を指令するための異種プロモーターを保有する第2のポリヌクレオチドを含む異種ポリヌクレオチドが提供される。

#### 【0049】

本発明のなおもう1つの態様によると、配列番号4に対して少なくとも85%相同であって、T2リボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、および異種発現系において該ポリペプチドの発現を指令するための異種プロモーターを保有する第2のポリヌクレオチドを含む異種ポリヌクレオチドを含む遺伝的に修飾された細胞が提供される。

10

#### 【0050】

本発明のなおもう1つの態様によると、増殖、発生、分化、形質転換、腫瘍形成、腫瘍成長、コロニー化および脈管形成からなる群から選択される異常に増殖する細胞に関連するプロセスを、それを必要とする哺乳動物対象において予防し、阻害し、または逆行させる方法であって、治療上有効量のT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質（該リボヌクレアーゼ蛋白質は、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有する）またはT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質をコードし、イン・ビボでそれを発現することができるポリヌクレオチドを対象に投与すること、それにより、異常に増殖する細胞に関連するプロセスを哺乳動物対象において逆行させることを含む方法が提供される。

20

#### 【0051】

本発明のさらにもう1つの態様によると、リボヌクレアーゼ活性を実質的に欠き、かつアクチン結合活性を有する、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーの単離されたリボヌクレアーゼが提供される。

#### 【0052】

本発明のさらにもう1つの態様によると、有効成分として、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質、またはイン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドを、医薬上許容される担体と共に含む医薬組成物が提供される。

#### 【0053】

本発明のさらにもう1つの態様によると、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質、またはイン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドを、医薬上許容される担体と組み合わせることを含み、異常に増殖する細胞の増殖、コロニー化、分化および/または発生を予防し、阻害しあり/または逆行させるのに有用な医薬を調製する方法が提供される。

30

#### 【0054】

本発明のなおもう1つの態様によると、(i)対象において腫瘍を治療し；(ii)対象において腫瘍の発生を予防し、阻害しあり/または逆行させ；(iii)対象において良性腫瘍から悪性腫瘍への形質転換を予防し、阻害し、および/または逆行させ；(iv)対象において腫瘍脈管形成を予防し、阻害しあり/または逆行させ；(v)対象において個々の腫瘍数を低下させ；(vi)対象において腫瘍サイズを低下させ；(vii)対象において悪性腫瘍の数を低下させ；そして(viii)対象において組織の腫瘍への形質転換を予防し、阻害しあり/または逆行させる方法が提供され、該方法の各々は、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質、またはイン・ビボでそれをコードし、それを発現させることができるポリヌクレオチドの治療上有効量を対象に投与することによって行われる。

40

#### 【0055】

以下に記載する本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によると、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ蛋白質はリ

50

ボ核酸分解活性を実質的に欠く。本明細書中で用いる用語「リボ核酸分解活性を実質的に欠く」とは、(i) 同様な非不活化リボヌクレアーゼと比較して、0ないし10%リボ核酸分解活性を有する、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有する不活化リボヌクレアーゼ(天然または組換えいずれかの)蛋白質；および/または(ii) 同様な非突然変異体リボヌクレアーゼと比較して、0ないし10%のリボ核酸分解活性を有する、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有する組換え突然変異体(天然またはヒト誘導)リボヌクレアーゼ蛋白質をいう。配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ蛋白質のリボヌクレアーゼのリボ核酸分解活性の不活化は、煮沸、オートクレーブ処理および化学的変性からなる群から選択されるプロセスによって行うことができる。

10

#### 【0056】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によると、異常に増殖する細胞は癌性細胞である。

#### 【0057】

記載された好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によると、治療上有効量のT2ファミリーのRNaseを対象に投与する工程は、経口投与、局所投与、経粘膜投与、非経口投与、直腸投与および吸入からなる群から選択される投与様式によって行われる。

#### 【0058】

本発明のなおさらなる態様によると、(i)過剰の細胞運動性；または(ii)細胞の異常な蓄積によって特徴付けられる疾患または状態を、それを必要とする対象において治療または予防する方法が提供される。該方法の各々は、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ蛋白質の治療上有効量、またはイン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドの治療上有効量を対象に投与することによって行われる。

20

#### 【0059】

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、過剰細胞運動性によって特徴付けられる疾患または状態は、炎症性疾患、神経変性病および癌からなる群から選択される。

#### 【0060】

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、過剰の細胞運動性によって特徴付けられる疾患または状態は癌である。

30

#### 【0061】

記載された好ましい実施形態のさらなる特徴によると、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有する該リボヌクレアーゼ蛋白質の治療上有効量、またはイン・ビトロでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドの治療上有効量を対象に投与することは、経口投与、静脈内投与、皮下投与、全身投与、局所投与、経粘膜投与、非経口投与、直腸投与および吸入からなる群から選択される投与様式によって行われる。

#### 【0062】

本発明のさらにもう1つの態様によると、(i)細胞の運動性を阻害し；(ii)細胞においてアクチンフィラメントのアセンブリーおよびディスアセンブリーを阻害し；ならびに(iii)細胞のアポトーシスを増強する方法が提供される。該方法の各々は、有効な濃度の、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ蛋白質、あるいは治療上有効量の、イン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドを細胞に供することによって行われる。

40

#### 【0063】

記載された好ましい実施形態のさらなる特徴によると、リボヌクレアーゼ蛋白質はT2ファミリーのヒトリボヌクレアーゼ蛋白質である。

#### 【0064】

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、リボヌクレアーゼ蛋白質は

50

配列番号 4 に記載される。

**【 0 0 6 5 】**

記載された好ましい実施形態におけるさらなる特徴によると、配列番号 4 に対して少なくとも 85% 相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ蛋白質は、異種発現系で発現された組換え蛋白質である。該異種系は細菌発現系、酵母発現系および高等細胞発現系であり得る。

**【 0 0 6 6 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、リボヌクレアーゼ蛋白質のリボヌクレアーゼ活性は熱安定性である。

**【 0 0 6 7 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、配列番号 4 に対して少なくとも 85% 相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ蛋白質は、リボヌクレアーゼ活性を実質的に欠く。

**【 0 0 6 8 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、リボヌクレアーゼ蛋白質はアクチン結合活性によって特徴付けられる。

**【 0 0 6 9 】**

記載された好ましい実施形態のさらなる特徴によると、リボヌクレアーゼ蛋白質のリボヌクレアーゼ活性は熱安定性である。

**【 0 0 7 0 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、リボヌクレアーゼ蛋白質のアクチン結合活性は熱安定性である。

**【 0 0 7 1 】**

記載された好ましい実施形態のさらなる特徴によると、細胞の、または対象の細胞のゲノム安定に組み込むことができる発現可能なポリヌクレオチドが選択される。

**【 0 0 7 2 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、該細胞は癌細胞である。

**【 0 0 7 3 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、該提供はイン・ビトロまたはイン・ビボで行われる。

**【 0 0 7 4 】**

本発明のさらにもう 1 つの態様によると、配列番号 4 に対して少なくとも 85% 相同であるアミノ酸配列を有する熱安定性リボヌクレアーゼ蛋白質、または治療上有効量の、イン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドを単離する方法が提供される。該方法は：配列番号 4 に対して少なくとも 85% 相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ蛋白質、または治療上有効量の、イン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドを発現する細胞を含む試料を熱変性して、熱変性した試料を得、該熱変性した試料の上清を単離し；配列番号 4 に対して少なくとも 85% 相同であるアミノ酸配列を有する熱安定性リボヌクレアーゼ蛋白質、または治療上有効量の、イン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドを有する上清の画分を同定し；配列番号 4 に対して少なくとも 85% 相同であるアミノ酸配列を有する熱安定性リボヌクレアーゼ蛋白質、または治療上有効量の、イン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドを有する画分を該上清から実質的に純粋となるまで精製する工程を含む。

**【 0 0 7 5 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、熱変性は少なくとも 90 の温度によって少なくとも 10 分間行われる。

**【 0 0 7 6 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、画分の同定は、リボ核酸分解活性のモニタリングおよび / またはゲル電気泳動によって行われる。

10

20

30

40

50

**【 0 0 7 7 】**

記載された好ましい実施形態のさらなる特徴によると、該画分の精製は、カラムクロマトグラフィーによって行われる。

**【 0 0 7 8 】**

本発明のなおもう1つの態様によると、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ蛋白質、または治療上有効量の、イン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドのアクチン結合活性を依然として維持しつつ、リボヌクレアーゼ活性を不活化する方法が提供され、該方法は、該アクチン結合活性を依然として維持しつつ、該リボヌクレアーゼ活性を実質的に不活化するのに十分な変性条件に該リボヌクレアーゼを付すことによって行われる。 10

**【 0 0 7 9 】**

記載された好ましい実施形態のさらなる特徴によると、該リボヌクレアーゼの不活化は、オートクレーブ処理および/または化学的変性によって行われる。

**【 0 0 8 0 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、該リボヌクレアーゼは組換えリボヌクレアーゼである。

**【 0 0 8 1 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、該リボヌクレアーゼはリボヌクレアーゼ活性を実質的に欠き、アクチン結合活性を有する。

**【 0 0 8 2 】**

本発明のさらなる態様によると、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ、または治療上有効量の、イン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチド、またはイン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドを、医薬上許容される担体と組み合わせることを含み、過剰な細胞運動性によって特徴付けられる疾患または状態を治療および/または予防するのに有用な医薬を調製する方法が提供される。 20

**【 0 0 8 3 】**

本発明のなおもう1つの態様によると、細胞の異常な蓄積によって特徴付けられる疾患または状態を治療または予防するのに有用な医薬の調製方法が提供され、該方法は配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ、または治療上有効量の、イン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチド、またはイン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドを、医薬上許容される担体と組み合わせる医薬の調製方法が提供される。 30

**【 0 0 8 4 】**

記載された好ましい実施形態のさらなる特徴によると、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ蛋白質は、異種発現系で発現される組換え蛋白質である。該異種発現系は細菌発現系、酵母発現系および高等細胞発現系であり得る。

**【 0 0 8 5 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ蛋白質は実質的にリボヌクレアーゼ蛋白質を欠く。 40

**【 0 0 8 6 】**

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、該細胞増殖性障害または疾患はパピローマ、神経膠芽細胞腫、カポシ肉腫、メラノーマ、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平細胞癌腫、神経膠星状細胞腫、頭部癌、頸部癌、膀胱癌、乳癌、肺癌、結直腸癌、甲状腺癌、膵臓癌、胃癌、肝細胞癌腫、白血病、リンパ腫、ホジキン病、バーキット病、関節炎、関節リウマチ、糖尿病性網膜障害、脈管形成、再狭窄、ステント再狭窄、および血管移植片再狭窄、増殖性硝子体網膜症、慢性炎症性増殖性病、皮膚線維腫および乾癬からなる群から選択される。 50

## 【0087】

記載された好ましい実施形態のなおさらなる特徴によると、該治療上有効量の該T2リボヌクレアーゼまたは該ポリヌクレオチドの対象への投与は、経口投与、静脈内投与、皮下投与、全身投与、局所投与、経粘膜投与、非経口投与、直腸投与および吸入からなる群から選択される投与様式によって行われる。

## 【0088】

本発明のさらにもう1つの態様によると、癌の治療を増強する方法が提供され、該増強は、癌の該治療と組み合わせて、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼ蛋白質、またはイン・ビボでそれをコードし、それを発現することができるポリヌクレオチドを、それを必要とする対象に投与することを含む。  
該治療は化学療法、放射線療法、光療法および光力学療法、外科的処置、栄養療法、切除療法、放射線療法および化学療法の組み合わせ、近接照射療法、プロトンビーム療法、免疫療法、細胞療法およびフォトンビーム放射線外科療法であり得る。

10

## 【0089】

図面の簡単な記述

本明細書では本発明を単に例示し図面を参照して説明する。特に詳細に図面を参照して、示されている詳細が例示として本発明の好ましい実施態様を例示考察することだけを目的としており、本発明の原理や概念の側面の最も有用でかつ容易に理解される説明であると考えられるものを提供するために提示していることを強調するものである。この点について、本発明を基本的に理解するのに必要である以上に詳細に本発明の構造の詳細は示さないが、図面について行う説明によって本発明のいくつもの形態を実施する方法は当業者には明らかになるであろう。

20

図1は、Roiz, L. および Shoseyov, O., 1995, Int. J. Plant Sci. 156: 37-41の教示に従って単離されたAspergillus niger RNase B1の吸光度およびRNase活性のグラフ表示である。グラフAは、粗製濾液のEMD-TMAEカラムクロマトグラフィーを介して得られた画分を表し、他方、グラフBは、粗製濾液のEMD-TMAEカラムクロマトグラフィーから得られた活性画分のMONO-Qカラムクロマトグラフィーから得られた画分を表す。実線は280nmにおける吸光度を表し、点線はRNase活性を表す。

図2は、使用した精製工程を通じてのRNase B1蛋白質濃度の増加を示すSDS-PAGEザイモグラムである。レーン1は粗製濾液を表し；レーン2はEMD-TMAEカラムからの溶出物を表し；レーン3はMONO-Qカラムからの溶出物を表し；レーン4は、RNase活性についてイン・サイチュウでアッセイし、トルイジンブルーで染色したレーン3の溶出物を表し；レーン5は、PNGase Fによる脱グリコシル化に続いて精製されたRNaseを表す。レーン1ないし3および5はクーマシープルーで染色させる。

30

図3は、桃花粉発芽（塗りつぶした四角と実線）および花粉管長さ（ボックスと点線）に対する異なる濃度のB1 RNaseのイン・ビトロ効果を示すグラフである。

図4aおよび4bは、柱頭および花柱の上部分における桃花粉管成長に対するRNase B1の効果を示す。図4aは対照花を表し、他方、図4bは受粉前にRNase B1で処理された花である。バー=0.2mm

40

図5aおよび5bは、タンジェリン花の柱頭における花粉管成長に対するRNase B1の効果を示す。図5aは、放任受粉に48時間暴露された対照花を表す。図5bは、受粉に先立ってRNase B1で処理された花を表す。バー=0.1mm

図6aおよび6bは、ネクタリン種子で行った生存性テストを示す。図6aは未処理花によって生産された対照種子を表し、他方、図6bはRNase B1処理花によって生産された種子を表す。バー=0.3mm

図7は、ユリ cv. Osnat花粉管長さに対する、未処理、煮沸またはオートクレーブ処理されたRNase B1の効果を示す。

図8aおよび8bは、イン・ビトロで成長し、IKIで染色されたユリ花粉管に対する

50

R N a s e B 1 の効果を示す。

図 9 a および 9 b は、 R N a s e B 1 未処理 ( 図 9 a ) および処理 ( 図 9 b ) 花粉管におけるオルガネラ移動および局所化を示す統合ビデオイメージから捕獲されたスチルショットを示す。

図 1 0 a および 1 0 b は、成長するユリ花粉管のアクチンフィラメントに対する R N a s e B 1 の効果を示す。図 1 0 a は対照花粉管を表し、他方、図 1 0 b は R N a s e B 1 処理花粉管を表す。双方の花粉管を切り出し、実験後の可視化のために T R I T C ファロイジンで染色した。

図 1 1 は、アクチンへの R N a s e B 1 結合を表す S c a t c h a r d プロットである。A - アクチン濃度 (  $\mu M$  ) 、 R f フリー R N a s e B 1 濃度 (  $\mu M$  ) 、 R b 結合 R N a s e B 1 濃度 (  $\mu M$  ) 。

図 1 2 a ないし c は 1 時間成長させたイムノゴールド銀染色ユリ花粉管を示す。図 1 2 a は対照を表し、他方、図 1 2 b および 1 2 c は共に R N a s e B 1 処理花粉管である。図 1 2 b の花粉管をウサギプレ免疫血清とともにインキュベートし、他方、図 1 2 c の花粉管は抗 R N a s e B 1 ウサギポリクローナル抗体と共にインキュベートした。

図 1 3 a および 1 3 b は、 H T 2 9 結腸癌細胞の生存性に対する異なる濃度の R N a s e B 1 の効果を示す。細胞の複連試料を 3 7 にて 4 8 時間または 7 2 時間成長させ、トリパンブルー差別化染色を用いて可視化し、カウントした。図 1 3 a は細胞の合計数を表し、他方、図 1 3 b は死細胞のパーセントを表す。

図 1 4 は、 H T 2 9 細胞のクローニ原性に対する R N a s e B 1 の効果を示す。細胞の複連試料を、  $10^{-6} M$  R N a s e B 1 の存在下または非存在下で 4 8 時間成長培地と共にブレインキュベートし、トリプシン処理し、洗浄し、系列希釈にて R N a s e B 1 フリー成長培地中に再度懸濁させ、 9 6 ウェルマイクロタイタープレートに平板培養して、 1 4 日間コロニー化させた。固定化およびメチレンブルーでの染色に続いてコロニーをカウントした。

図 1 5 は、 H T 2 9 細胞のクローニ原性に対する R N a s e B 1 への暴露時間の効果を示す。細胞の複連試料を、  $10^{-6} M$  R N a s e B 1 を含有する成長培地と共に 4 8 時間ブレインキュベートし、次いで、同一濃度の R N a s e B 1 を含有する成長培地中で、または R N a s e B 1 フリー培地中でコロニー化させた。コロニー化は、 9 6 ウェルマイクロタイタープレートにて 7 日間行った。各処理は、ウェル当たり異なる初期数の細胞を含有した。固定化、およびメチレンブルーでの可視化の後にコロニーをカウントした。R N a s e B 1 フリー成長培地中でブレインキュベートし、コロニー化させた細胞を対照として供した。

図 1 6 a ないし c は、 H T 2 9 細胞のコロニー化能力に対する R N a s e B 1 の効果を示す。対照細胞 ( 図 1 6 a ) を、 R N a s e B 1 フリー成長培地中で 4 8 時間ブレインキュベートし、次いで、トリプシン処理し、コロニー化のために 9 6 マイクロタイタープレート中で同一成長培地と共にインキュベートした。図 1 6 b は、  $10^{-6} M$  R N a s e B 1 を含有する成長培地中で 4 8 時間ブレインキュベートし、次いで、 R N a s e B 1 フリー成長培地中でコロニー化させた細胞を表す。図 1 6 c は、ブレインキュベートし、次いで、  $10^{-6} M$  R n a s e B 1 を含有する成長培地中でコロニー化させた細胞を表す。細胞コロニーは、メチレンブルー染色を用いて可視化した。

図 1 7 は、 6 匹のラットの各群についての処理を記載する、ラットで行ったイン・ビボ実験の模式図である。

図 1 8 は、 C A P マイクロカプセルからの R N a s e B 1 放出の速度に対する 2 つの異なる pH の効果を示す。 1 0 mg の R N a s e B 1 を含有するマイクロカプセルを、 1 0 m l の 0 . 1 M H C l ( pH 1 ) または 0 . 1 M トリス緩衝液 ( pH 8 ) に懸濁させ、攪拌しつつ 3 7 でインキュベートした。上方の溶液の試料を、 R N a s e 活性テストのために 3 0 分毎に採取した。

図 1 9 a ないし d は、各実験の最後の体重によって示されるように、ラット成長速度に対する R N a s e B 1 および / または D M H の効果を示す。最初のラットの体重は約 2

10

20

30

40

50

00グラムであった。 $n = 6$ 。19a - PBS、RNase B1またはI-RNase B1は最初のDMH注射から1ないし9週間後に浸透圧ポンプを介して与えた(予防的処置)。対照として、DMHの非存在下であることを除いて前記したように処理したラットを用いた。19b - PBS、RNase B1またはI-RNase B1は、最初のDMH注射から12ないし17週間後に浸透圧ポンプを介して与えた(治療的処置)。19c - ラットには、予防的処置として、RNase B1またはグルコースを含有するマイクロカプセルを与えた。対照として、DMHの非存在下でRNase B1で処理したラットを用いた。19d - ラットには、RNase B1またはグルコースを含有するマイクロカプセルを与えた。

図20aないしcは、予防的処置として、RNase B1(20a)、I-RNase B1(20b)またはPBS(20c)を含有する浸透圧ポンプを移植したラットの糞におけるRNase活性を示す。対照として、ラットを、DMHの非存在下でRNase B1またはPBSで処理した。RNase活性は、後の実施例セクションに記載したように測定した。

図21は、予防的処置として、RNase B1またはグルコースを含有するマイクロカプセルを与えたラットの糞におけるRNase活性を示す。対照として、ラットに、DMHの非存在下でRNase B1またはグルコースを与えた。RNase活性は、実施例セクションに記載したように測定した。

図22は、予防的処置として、浸透圧ポンプで移植したラットの末端側結腸(5cm)における異常な陰窩病巣(ACF)の数を示す( $n = 6$ )。

図23aないしcは、予防的処置として、マイクロカプセル化RNase B1またはグルコースを与えたラットの末端側(5cm)結腸で調べた異なるパラメータに対するRNase B1の効果を示す( $n = 6$ )。23a - 結腸当たりの腫瘍の数；23b - 腫瘍のサイズ；23c - 結腸当たりのACF。

図24aないし dは、切除から1時間後の内側粘膜表面において写真を撮った際の、異なるタイプの腫瘍を示す。24a - 赤色腫瘍；24b - 白色腫瘍。24c - ピンク色腫瘍および赤色腫瘍；24d - 予防的処置としての、グルコースまたはRNase B1を含有するマイクロカプセルを与えたラットにおける3つのタイプの腫瘍の分布。

図25aないし dは、マイヤーのヘマトキシリンおよびマルチウスイエローで染色された腫瘍の組織病理学的調査を示す。25a - アデノーマまたはアデノパピローマ - 良性腫瘍；25b - 粘膜細胞が粘膜下組織直下に貫通する腺癌；25c - 組織配置が全く中断されたよく発達した腺癌；25d - 予防的処置として、カプセル化グルコースまたはRNase B1で処理したラットの結腸における腫瘍のアデノーマおよび腺癌タイプの分布パターン。

図26aないし cは、治療的処置としての、PBS、RNase B1またはI-RNase B1を含有する浸透圧ポンプで処理したラットの末端側(5cm)結腸において調べた異なるパラメータに対するRNase B1の効果を示す。26a - 結腸当たりの腫瘍の数；26b - サイズによる腫瘍の分布；26c - 脈管形成を示す、色による腫瘍の分布。

図27aないし cは、治療的処置としての、マイクロカプセル化RNase B1またはグルコースを与えたラットの末端側(5cm)結腸において調べた異なるパラメータに対するRNase B1の効果を示す。27a - 結腸当たりの腫瘍の数；27b - サイズによる腫瘍の分布；27c - 脈管形成を示す、色による腫瘍の分布。

図28aないし bは、アクチンについてTRIRCで染色したヒト結腸癌腫HT-29-4-d培養細胞を示す。28a - 対照細胞；28b - 10-6M RNase B1の存在下で成長させた細胞。

図29aないし bは、膜アクチンについて免疫染色したヒト結腸癌腫HT-29-4-d培養細胞を示す。29a - 対照細胞；29b - 10-6M RNase B1の存在下で成長させた細胞。

図30aないし cは、FITC免疫染色したヒト結腸癌腫HT-29-4-d培養細胞

10

20

30

40

50

を示す。抗RNase B1を一次抗体として用いた。30a 対照細胞；30b - 細胞表面に結合したRNase B1を示す、RNase B1の存在下で成長させた細胞；30c - プレ免疫化血清(PIIS)を一次抗体として用いた。

図31は、ユリ花粉管の長さに対する異なる蛋白質処理の効果を示す。花粉管は、実施例セクションに記載したように、25で1時間イン・ビトロ成長させた。

図32aないしは、 $1\mu\text{g}$  m1アンジオゲニンの存在下または非存在下における、およびRNase(各々 $2\mu\text{M}$ )の存在下または非存在下におけるMatrigel上のHUVEC管形成を示す顕微鏡写真である。図32a - アンジオゲニンおよびRNaseの非存在(対照)；図32b - アンジオゲニン(陽性対照)；図32c - RNase B1(陰性対照)；図32d - RNase B1 + アンジオゲニン；図32e RNase T2(陰性対照)；図32f - RNase T2 + アンジオゲニン；図32g - RNase I(陰性対照)；図32h - RNase I + アンジオゲニン。Aspergillus oryzae T2 RNase(図32f)と比較した、Aspergillus niger RNase B1(図32d)による内皮細胞管形成の優れた阻害に注意されたし。

図33aないしは、BDF1(黒色)およびBalb/c(白色)マウスでのip/ip実験におけるB16F1メラノーマに対するRNase B1の効果を示す写真である。 $2 \times 10^6$  B16F1メラノーマ細胞を腹腔内(i.p.)注射し、24時間および5日後に、マウスにさらにRNase B1( $100\mu\text{l}$  PBS中 $5\text{mg}$ /マウス)またはPBSをi.p.注射した。腫瘍の存在は、メラノーマ細胞注射から14日後に評価した。図33a メラノーマ細胞のみを注射したBalb/c；図33b - メラノーマ細胞およびRNase B1を注射したBalb/c；図33c - メラノーマ細胞のみを注射したBDF1；図33d - メラノーマ細胞およびRNase B1を注射したBDF1。RNase B1処理マウスにおけるかなり小さな腫瘍(図33bおよびd、矢印)と比較した、メラノーママウスマルコニモデルにおけるかなり発達した典型的な黒色腫瘍(図33aおよびc、矢印)に注意されたし。

図34aないしは、 $5 \times 10^5$ (図34aないし)または $5 \times 10^6$ (図34dないし)細胞/マウスを移植した、balb/cマウスの肺で形成されたB16F10メラノーマ病巣の発達の低下におけるRNase B1の効果を示す。図34aないしは、RNase B1( $10\text{mg}$ /マウス、3回、4日毎、細胞注射から24時間後)またはPBS処理後の、B16F10移植マウスの肺の写真である。図34a PBS；図34b - RNase B1。PBS注射(図34a、矢印)と比較した、RNase B1処理(図34B、矢印)後のメラノーマ病巣および転移の顕著な減少に注意されたし。図34cないしは、肺当たりの転移の数(図34c)、肺の重量(図34d)および平均転移直径(図34e)の定量的測定を示すグラフである。PBSを注射したマウスと比較した、RNase B1処理マウスにおける、転移の数/肺( $76\%$ 、 $P < 0.01$ 、図34c)、平均肺重量( $25\%$ 、 $P < 0.01$ 、図34d)、および平均転移直径( $25\%$ 、 $P < 0.001$ 、図34e)の有意な減少に注意されたし。

図35は、ヌードマウスにおけるヒトメラノーマ細胞の腫瘍成長に対するRNase B1の効果を示す。A375SMメラノーマ細胞( $5 \times 10^5$ )をヌードマウス( $n = 5$ )に皮下注射し、3日後に腫瘍細胞を注射した動物に $1\text{mg}$ のRNase B1/マウスまたはPBS(対照)をi.p.引き続いて腹腔内注射した。動物は30日間(隔日毎、一週間に3日)注射し、腫瘍の寸法を示した時点で記録した。腫瘍の容量は(長さ $\times$ 幅 $^2$ ) $/2$ の方程式から計算して $\text{mm}^3$ で表す。PBSを注射したマウスにおいては、腫瘍の容量は劇的に増加し、30日以内に $800\text{mm}^3$ のサイズに到達し、RNase B1処理マウスにおいては、腫瘍の容量は比較的低いままであって、メラノーマ細胞注射から30日後において $180\text{mm}^3$ を超えたことを注意されたし。

図36aないしは、s.c./i.v.実験における、HT-29由来ヌードマウス異種移植片における腫瘍サイズに対するRNase B1の効果を示す。HT-29細胞(マウス当たり $3 \times 10^6$ )を用いて腫瘍をマウスで誘導し、マウスを、さらに、RNase

s e B 1 (各々 1 0 0  $\mu$  l の P B S 中 5 m g の R N a s e B 1 を含有する 2 回の注射) または P B S (対照) 注射に付した。図 3 6 a P B S (対照、黄色矢印) または R N a s e B 1 (青色矢印) 処理における腫瘍の全体図。P B S 注射マウス (黄色矢印) と比較した、R N a s e B 1 処理マウス (青色矢印) における腫瘍のサイズの大幅な減少に注意されたし; 図 3 6 b は、P B S または R N a s e B 1 処理マウス (n = 5) における腫瘍のサイズを示す棒グラフである。R N a s e B 1 処理後の腫瘍サイズの平均 6 0 % 減少に注意されたし。

図 3 7 は、R N a s e B 1 による脈管形成のイン・ビボ阻害を示す写真である。1 0 0 n g / スポンジのアンジオゲニンを含浸したゲルフォームを、ヌードマウスの両側に皮下移植し、4 8 時間後に、マウスの腹膜の両側に腹腔内注射し (7 回、2 日毎)、各々は異なる処理とし; 一方側は R N a s e B 1 (1 0 0  $\mu$  l 中の 2 5 0  $\mu$  M R N a s e B 1 ) で処理し、他方側は P B S で処理した。血管のアンジオゲニン誘導発生の R N a s e B 1 媒介阻害を示す、R N a s e B 1 注射の側における無視できる脈管形成 (矢印を付した丸い領域、アンジオゲニンおよび R N a s e B 1 ) と比較した、P B S 注射の側における大幅な脈管形成 (矢印を付した丸い領域、アンジオゲニン) に注意されたし。

図 3 8 は、A 3 7 5 S M 細胞侵入の阻害における R N a s e B 1 の効果を示す棒グラフである。A 3 7 5 S M 細胞を R N a s e B 1 の存在下または非存在下で処理し、2 2 時間後に、M a t r i g e l 被覆フィルターに侵入した細胞の数をカウントした。M a t r i g e l 被覆フィルターへの A 3 7 5 S M 侵入の阻害における R N a s e B 1 の用量依存性効果に注意されたし。未処理 A 3 7 5 S M 細胞 (対照) においては、1 2 1 6  $\pm$  6 8 細胞が M a t r i g e l 被覆フィルターに貫入し、1 または 1 0  $\mu$  M R N a s e B 1 で処理した 7 2 5  $\pm$  5 9 または 2 1 1  $\pm$  1 4 A 3 7 5 S M 細胞が、M a t r i g e l 被覆フィルターに貫入した。\* = P < 0 . 0 1 ; \*\* = P < 0 . 0 0 1 。

図 3 9 a ないし b は、s c / i p モデルにおける H T - 2 9 由来ヌードマウス異種移植片を示す棒グラフである。細胞移植 (1 0 <sup>6</sup> 細胞 / マウス) 後 2 4 時間に開始し、1 日おきに、R N a s e B 1 を示した濃度で注射した。腫瘍のサイズは、R N a s e B 1 処理の開始から 3 0 日後に測定した。R N a s e B 1 処理の予防的 (図 3 9 a) および治療的 (図 3 9 b) 効果を示す、2 つの引き続いての実験 (各場合 N = 6) における広い範囲の用量、0 . 0 0 1 ないし 1 m g / 注射 (図 3 9 a) および 1 ないし 5 m g / 注射 (図 3 9 b) での R N a s e B 1 処理後の腫瘍サイズの有意な低下 (最大で 6 0 %) に注意されたし。C o n t . = P B S を注射した H T - 2 9 - 移植マウス。

図 4 0 a ないし c は、R N a s e B 1 の存在下または非存在下における、s . c . / i . p . モデルでの H T - 2 9 移植ヌードマウスからの腹膜断面の顕微鏡写真である。図 4 0 a - ヘマトキシリンおよびエオシン (H & E) 染色。筋肉に重なる薄い腹膜 (矢印) に注意されたし; 図 4 0 b ないし c - ウサギ抗 R N a s e B 1 および F I T C 結合ヤギ抗ウサギを用いて、R N a s e B 1 処理マウス (図 4 0 b) または P B S 処理マウス (図 4 0 c) から採取した腹膜の免疫染色。P B S 処理マウスではなく、R N a s e B 1 処理マウスの腹膜上への R N a s e B 1 の蓄積を示す緑色蛍光に注意されたし。

図 4 1 a ないし c は、該 s . c . / i . p ヌードマウスモデルの H T - 2 9 由来腫瘍からの断面の顕微鏡写真である。図 4 1 a - H & E 染色; 図 4 1 b ないし c - ウサギ抗 R N a s e B 1 および F I T C 結合ヤギ抗ウサギを用いる、R N a s e B 1 処理 (図 4 1 b) または P B S 処理 (図 4 1 c) マウスに由来する腫瘍の血管の免疫染色。矢印は血管を示す。基底膜上への R N a s e B 1 の蓄積に注意されたし。

図 4 2 a ないし b は、D M H 誘導結腸腫瘍での C D 3 1 発現に対する R N a s e B 1 の効果を示す結腸癌組織の代表的な組織病理学的切片である。ジメチルヒドラジン (D M H) 処理ラット (図 4 2 a) からの、または D M H および R N a s e B 1 処理ラット (図 4 2 b) からの腫瘍切片を、抗 C D 3 1 抗体 (s c - 8 3 0 6 抗体 Santa C r u z B i o t e c h n o l o g y I n c . S a n t a C r u z , C A ) で染色した。D M H 処理ラットの腫瘍における多数の大きな血管の存在 (図 4 2 a)、および D M H - R N a s e B 1 処理ラットにおける血管の大幅に小さなサイズおよび数 (図 4 2 b) に

注意されたし。倍率×200。サイズバー=100μm。

図43aないしbは、マウスマラノーマ細胞における腫瘍のサイズおよびアポトーシスに対するRNase B1のプロアポトーシス効果を示す、ヌードマウスにおける腫瘍の代表的な組織病理学的切片の顕微鏡写真である。マウスB16F1由来マラノーマ細胞( $2 \times 10^6$ 細胞/マウス)を、BDF1およびBalb/cマウスの腹腔で成長させた。RNase B1処理マウスは、マラノーマ細胞での注射から24時間および5日後に、100μlのPBS中の5mg RNase B1の2回の腹腔内注射を受けた。未処理対照マウスはPBS注射を受けた。14日後に、マウスを屠殺し、分析のために試料を調製した。Klenow-FragE1キット(Oncogene, Cambridge, MA)を用いて、パラフィン断面をアポトーシスのために染色した。未処理対照(図43a)における活発に分裂する核(緑色染色)と比較した、RNase B1処理マウス(図43b)からの腫瘍におけるアポトーシス細胞核(褐色染色)の優勢性に注意されたし。  
10

図44aないしbは、DMH誘導結腸腫瘍におけるアポトーシス速度に対するRNase B1の効果を示す、代表的な結腸腫瘍切片の顕微鏡写真である。ジメチルヒドラジン(DMH)処理ラットからの結腸腫瘍の切片を固定し、パラフィンに包埋し、Klenow-FragE1(Oncogene, Cambridge, MA)を用い、デオキシヌクレオチドトランスクレオチドフェラーゼ媒介dUTP-ニック末端-標識(TUNEL)アッセイによってアポトーシスについて検定した。アポトーシス細胞を染色し、ペドオキシダーゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体で可視化した(褐色染色)。図44a DMH処理ラット;図44b-RNase B1-DMH処理ラット。DMH処理ラット(図44a)の腫瘍切片においてはTUNEL陽性細胞は観察されなかつたが、RNase B1-DMH処理ラット(図44b)の腫瘍切片においては非常に多数のTUNEL陽性(すなわち、アポトーシス)細胞が観察される。サイズバー=100μm。  
20

図45aないし dは、ヒト結腸癌異種移植片における腫瘍サイズおよびアポトーシスに対するRNase B1のプロアポトーシス効果を示すヌードマウスでの腫瘍の代表的な組織病理学切片である。HT29癌細胞( $2.5 \times 10^6$ 細胞/マウス)をヌードマウスの左側臀部に注射した。RNase B1処理マウス(n=5)は、癌細胞注射から24時間後に開始し、5日毎に、5mg RNase B1の3回の静脈内注射を受けた(図45bおよびd)。対照マウス(n=5)は未処理のまま放置した(図45aおよびc)。腫瘍のパラフィン切片は組織学評価のためにヘマトキシリントンおよびエオシン(H&E)によって(図45aないし b)、およびアポトーシスのためにKlenow-FragE1キット(Oncogene, Cambridge, MA, 図45cないし d)で染色した。生きた活発に分裂する核は明るい緑色に染色され、他方、アポトーシス核は褐色に染色される。未処理対照からの腫瘍における正常な生きた外観(図45a)、有糸分裂活性(図45c)と比較した、RNase B1処理マウスからの腫瘍における、凝縮した細胞質および核(図45b)およびアポトーシス細胞の高い割合(図45d)に注意されたし。  
30

図46は、LS174T誘導腫瘍の相対的容量に対するタキソールおよびRNase B1の効果を示すグラフである。Balb/c nu/nu(Charles River, Wilmington, MA)ヌードマウスにLS174T癌細胞を皮下注射し、細胞注射から10ないし13日後に(腫瘍が触知できる場合)、マウスを、3週間にわたって7日のうち5連続日の間、示した処理の腹腔内注射で処理した。対照: PBSまたはブロピレングリコール+エタノール; RNase B1: 50mg/kg RNase B1(1000μg/注射); RNase B1+タキソール: 50mg/kg RNase B1および5mg/kgタキソール; タキソール: 5mg/kgタキソール(100μg/注射)。タキソール処理マウスと比較した、RNase B1処理マウスにおける相対的腫瘍容量(RTV)に対する顕著な効果、ならびにRNase B1およびタキソールの組合せ処置で処理したマウスにおける腫瘍成長の予測されない顕著な阻害に注意されたし。  
40  
50

図47aないしbは、イン・ビトロでアクチンに結合するRNase B1の能力を示す、アクチンおよびアクチン結合蛋白質のウエスタンプロット(図47a)およびSDS-PAGE蛋白質染色(図47b)である。アクチンおよびアクチン結合蛋白質はSDS-PAGEに流し、ニトロセルロース膜に移した。該膜をアクチンと共にインキュベートし、次いで、抗アクチン、引き続いて、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgM[Actin(Ab-1)Kit, CAT#CP01-1EA(Oncogene)]と共にインキュベートした。ECL検出システム(Pieirc CAT No#24080)を用いてシグナルを検出した。レーン1-RNase B1、レーン2-アンジオゲニン、レーン3-E.coli RNase I、レーン4-アクチン。アクチンに対するRNase B1の強い会合を示す、レーン1および4における強いバンド強度に注意されたし。10

図48は、A375SMメラノーマ癌細胞による全MMP-2放出の阻害におけるRNase B1の用量依存性効果を示す棒グラフである。A375SM細胞を、1または $10\mu M$  RNase B1の存在下または非存在下で、完全イーグル最小必須培地(CMEM)中で成長させ、培地中のMMP-2のレベルを、ELISA[Quantikine MMP-2イムノアッセイキット(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)]を用いて測定し、mg MMP-2/10<sup>6</sup>細胞として表す。10 $\mu M$  RNase B1の存在下で得られた最大阻害効果に注意されたし。20

図49aないしbは、A375SM(図49a)またはHUVEC(図49b)細胞におけるMMP-2放出に対するRNase B1処理の効果を示すMMP-2コラゲナーゼ活性のザイモグラムである。種々の濃度のRNase B1の存在下または非存在下で処理した細胞の上清を、ゼラチン含有SDSゲルに負荷し、電気泳動に續いて、ゲルをトリトン処理し、クーマシープルーで染色した。MMP-2コラゲナーゼ活性の存在は、72kDa MMP-2コラゲナーゼ活性によるゼラチン分解を反映する青色ゲル上で白色バンドとして見られる。1 $\mu M$  RNase B1の非存在(図49a、対照)または存在下におけるA375SM細胞での強いバンド、ならびに5および10 $\mu M$  RNase B1(図49a)でのA375SM細胞の処理後のバンド強度の大幅な減少に注意されたし。また、HUVEC細胞における1および10 $\mu M$  RNase B1の存在下での72kDa MMP-2のバンド強度における用量依存性減少(図49b)、ならびにMMP-9のバンド強度の減少(図49b、矢印)にも注意されたし；血清含有CMEM(完全イーグル最小必須培地)培地=陽性対照。30

図50aないしtは、RNase B1処理HUVEC細胞におけるRNase B1の細胞局所化を示す共焦点顕微鏡写真である。HUVEC細胞を0.4mg/ml(すなわち、10 $\mu M$ )RNase B1で処理し、48時間後に、RNase B1およびCD31抗体を用い、細胞を免疫染色に付した。共焦点顕微鏡によってなされた一連のデジタル焦点の結果を示す。全てのスライスは同一の時点で行い、処理された細胞における異なる領域を示す。CD31=赤色、RNase B1=緑色。RNase B1は(HUVEC細胞の膜中でのみ発現されるCD31の赤色標識によって検出されるように)細胞膜に徐々に貫入し、細胞に進入することに注意されたし。

図51aないし cは、RNase B1処理A375SM細胞におけるRNase B1の細胞局所化を示す共焦点顕微鏡写真である。A375SM細胞を0.4mg/ml(すなわち、10 $\mu M$ )RNase B1で処理し、RNase B1免疫染色および共焦点顕微鏡を用い、2時間(図51a)、4時間(図51b)または8時間(図51c)後に、RNase B1の細胞局所化を検出した。細胞膜(図51a、2時間)、細胞の細胞質(図51b、4時間)および細胞核(図51c、8時間)へRNase B1が徐々に貫入することに注意されたし。また、4時間後に細胞がRNase B1に誘導されて丸くなること(図51b)、および8時間後のA375SMメラノーマ細胞のアポトーシス特徴(図51c)にも注意されたし。40

図52は、A.nigerゲノムDNAからのT2 RNaseの増幅を示すアガロースゲルイメージである。A.nigerから調製したゲノムDNAは、RNase B150

および*A. saitoi* RNase M (GenBank受託番号P19791、配列番号3)において同一であることが判明したアミノ酸F107ないしN112、およびY200ないしK206に従って設計された順方向(アミノ酸F107ないしN112については、5'-TTYTGGGARCAYGARTGGAAAY-3'、配列番号1)および逆方向(アミノ酸Y200ないしK206について、5'-CCYTTIACRTTAAARTARTARTA-3'、配列番号2)縮重PCRプライマーを用いるPCR增幅に付した。*A. niger* T2 RNaseコード配列を反映する400bp PCR産物の存在に注意されたし。

図53は、(図52bにあるように)*A. niger*ゲノムDNAから調製された300bp PCR産物のヌクレオチド配列である。RNase B1において、E123(ボックス化)が*A. saitoi* RNase MのD123を置き換える以外は、RNase MのF107-K206と同一であるアミノ酸配列のオープンリーディングフレームに注意されたし。10

図54は、染色体6q27に位置するヒト細胞外RNase(RNase6PL)のゲノム構造の模式的説明である。ゲノム配列上のエクソンの位置(黒色番号)およびエクソンの長さ(赤色番号)により9つのエクソン(黒色四角)のエクソン-イントロン境界が示される。全長遺伝子の28571bpのうち、(9つのエクソンに配置される)719bpのみがオープンリーディングフレームを形成することに注意されたし。

図55aないしbは、組換えRNase6PL cDNA(図55a)および蛋白質(図55b)の*P. pastoris*における存在を示す。RNase6PLのコード配列を、酵母細胞を形質転換するのに用いたpPIC9Kベクターにクローン化した。図55a-クローン化されたインサートcDNAのPCR分析。RNase6PL cDNAの存在を示す750bp断片の存在に注意されたし。図55b-組換え酵母蛋白質の銀染色分析。酵母コロニーの1つにおける27kDa蛋白質バンドの存在(レーン1)および組換え蛋白質を発現しない他の酵母コロニーにおけるそのような蛋白質の非存在(レーン2ないし6)に注意されたし。レーン7は、陰性対照(RNase6PLインサートを含まないベクターでトランスフェクトされたコロニー)であった。20

図56は、組換えRNase6PLの銀染色分析である。陽性酵母コロニーの組換え蛋白質は、高速FPLCにおけるQ Sepharoseカラムを通し、溶出した蛋白質をSDS-PAGEに負荷した。得られた27kDa精製蛋白質(レーン1)に注意されたし。レーン2：蛋白質分子マーカー。30

図57aないしbは、組換えヒトRNase6PL(*P. pastoris*からのT2-RNase)蛋白質の熱安定性(図57a)および活性(図57b)を示す。図57aは蛋白質SDS-PAGEゲルである。55ないし100に変化させた温度における27kDa蛋白質バンド(矢印)の存在に注意されたし。図57bは、上昇させる温度でインキュベートした組換えヒトT2 RNaseのRNase活性のアガロースアッセイの写真である。*P. pastoris*培養基からのヒト組換えT2 RNaseの試料アリコット(5μl)を、20mM酢酸緩衝液中に0.1%RNAおよび0.8%アガロースを含有するプレートにスポットし、37にて30分間インキュベートした。水中の0.02%(w/v)トルイジンブルーで染色することによって、RNase活性を可視化した。55ないし100の温度の全範囲を通じての、熱-安定性RNase活性の持続に注意されたし。*A. niger* T2 RNase(RNase B1)は、RNase活性の陽性対照として機能した(C)。40

図58は、組換えヒトT2 RNaseのユリ花粉管阻害活性を示すヒストグラムである。列開されたユリ(L. longiflorum)薬からの花粉培養を、組換えヒトT2 RNase(RNase6PL)、*A. niger* T2 RNase(RNase B1)、酵素的に加熱-不活化された組換えヒトT2 RNase(EI-RNase6PL)、酵素的に加熱-不活化された*A. niger* T2 RNase(EI-RNase B1)、精製された形質転換(pPIC9Kプラスミド単独)酵母培養基蛋白質(酵母蛋白質)、および緩衝液単独(対照)を補った(最終蛋白質濃度=1μM)。暗所50

におけるインキュベーション（2時間25℃）の後に、顕微鏡接眼レンズを用いて花粉管の長さを微視的に測定した（mm）。RNase酵素活性の加熱・不活化後においてさえ強く活性が残存する（酵母蛋白質活性の42%、RNase 6PL）、組換えヒトT2 RNase（RNase 6PL）での有意な阻害（酵母蛋白質対照の45%）に注意されたし。

図59aないし1は、ヒト臍帯内皮細胞における管形成に対するヒトT2 RNaseの阻害効果を示す顕微鏡写真である。新たに単離されたヒト臍静脈内皮帯細胞（H U V E C）を、図に示すように、成長因子[アンジオゲニン（1μg/ml）またはbFGF（1μg/ml）]、およびA.niger T2 RNase（RNase B1、10μg/ml）、組換えヒトT2 RNase（RNase 6PL、10μg/ml）、对照酵母培養基（pPIC9Kプラスミド単独、酵母対照）またはPBSいずれかの存在下または非存在下で補足された培地中の成長・枯渇Matrigel（商標）被覆した96ウェルプレートにて、ウェル当たり14000細胞の密度で平板培養した。管成長を評価し、一晩のインキュベーションの後にプレートの写真を撮った。3回の個々の測定を各処理について行った。図59a-（成長因子およびRNaseを含まない）対照；図59b-アンジオゲニン；図59c-RNase B1；図59d-アンジオゲニン+RNase B1；図59e-RNase 6PL；図59f-アンジオゲニン+RNase 6PL；図59g-酵母対照；図59h-アンジオゲニン+酵母対照；図59i-bFGF；図59j-bFGF+RNase B1；図59k-bFGF+RNase 6PL；図59l-bFGF+酵母対照；A.niger T2 RNase（RNase B1、各々、図59dおよびj）と比較した、組換えヒトT2 RNase（RNase 6PL、図59fおよびk）による内皮管形成の優れた阻害に注意されたし。

図60は、ヒトT2 RNaseのクローニングおよび発現で用いられる合成RNase 6PL遺伝子のヌクレオチド配列および翻訳されたアミノ酸配列である。

図61は、多様な系統発生的起源からの他のT2ファミリーメンバーとヒトT2ヌクレアーゼとのClustalW多重配列整列である。

図62は、図60にあるように、合成RNase 6PL（配列番号4）のアミノ酸配列のBLAST整列であり、T2 RNaseファミリーメンバーのアミノ酸配列はヒトRNase 6PLに対して最も近い相同性を有する。

図63aないし○は、ヒト臍帯内皮細胞における管形成に対するヒトT2 RNaseの阻害効果を示す顕微鏡写真である。新たに単離されたヒト臍静脈内皮帯細胞（H U V E C）を、図に示すように、さらなる成長因子[1μg/mlアンジオゲニン（図63aないしe）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）（図63fないしj）または組換えVEGF（図63kないし○）]、および組換えヒトT2 RNase（RNase 6PL、10μg/ml）またはPBSを補足した、FCSおよびECGFを含有する培地中の成長・枯渇Matrigel（商標）を被覆した96ウェルプレートにて、ウェル当たり14000細胞の密度で平板培養した。管成長を評価し、一晩のインキュベーションの後にプレートを写真に撮った。3回の個々の測定は、各処理について行った。図63a、fおよびk-対照（さらなる成長因子を含むが、RNase 6PLを含まない）；図63b、gおよびl-さらなる成長因子およびRNase 6PL 0.5μM；図63c、hおよびm-さらなる成長因子およびRNase 6PL 1.0μM RNase B1；図63d、iおよびn-さらなる成長因子およびRNase 6PL 5μM；図63e、jおよびo-さらなる成長因子およびRNase 6PL 10μM。テストした全ての濃度における、プロ脈管形成因子の存在下での、組換えヒトT2 RNaseによる内皮管形成の優れた阻害に注意されたし（図63bないしe、gないしjおよびlないし○）。

図64は、LS174T誘導腫瘍の容量に対するタキソールおよびヒトT2 RNaseの効果を示すグラフである。CD-1 nu/nu（Charles River, Wilmington, MA）ヌードマウスにLS174T癌細胞を皮下注射し、細胞注射から2週間後に（腫瘍が触知できる時、80ないし100mm<sup>3</sup>、移植から10ないし1

3日後)、マウスを、示すように、3ないし4週間の間にわたって、RNase 6PLで腹腔内、および/または示した処置のタキソール静脈内注射で処理した。RNase 6PL: 0.5 mg / kg RNase 6PL (100 μl 中 10 μg / マウス); タキソール: 25 mg / kg タキソール (100 μl 中 500 μg / マウス)。処理方法は以下のようであった: 6PL (赤色四角): RNase 6PL 単独 2q X 12; 6PL - PBS - 6PL (青色四角): RNase 6PL 2q X 4、PBS 2q X 3、RNase 6PL 2q X 5; 6PL - Tax - 6PL (紫色四角): RNase 6PL 2q X 4、タキソール 2q X 3、RNase 6PL 2q X 5; PBS - Tax - PBS (緑色三角): PBS 2q X 4、タキソール 2q X 3、PBS 2q X 5; PBS (塗り潰すしていない菱形): PBS 2q X 12。未処理マウスと比較した、RNase 6PL 処理マウスにおける (mm<sup>3</sup>で表した) 腫瘍容量に対する有意な効果、ならびに RNase 6PL およびタキソールの組合せ処置で処理したマウスにおける腫瘍成長の予期せぬ相乗的阻害に注意されたし。  
10

図 65 aないし d は、イン・ビトロで成長したユリ花粉管中でのオルガネラの分布に対する A. niger RNase B1 の効果を示す顕微鏡写真である。L. longiflorum. cv. Osnat 花粉粒を前記した図 9 a および b にるように発芽させ、暗所にて 1 μM の A. niger RNase B1 に 2 時間暴露し (図 65 a および 65 c)、アミロラストについてはヨウ素 (IKI) (図 65 a および 65 b)、またはミトコンドリアについては DiOC<sub>6</sub> (図 65 c および 65 d) で染色した。対照は RNase B1 を受けなかった。RNase 処理花粉における花粉管先端に向けてのオルガネラの蓄積 (図 65 a および 65 c) に注意されたし。スケールバー = 10 μm。  
20

図 66 a および b は、ヒト RNase 6PL のアクチン結合活性を示す SDS - PAGE およびスロットプロットアッセイの写真である。図 66 a は、(インキュベーションおよび架橋から 30 分後の) G - アクチンとのヒト RNase 6PL 複合体の SDS - トリシン (Tricaine) ゲル分離を示す。レーン 1 は MW サイズマーカーであり、レーン 2 は アクチン (MW 42 kDa) であり、レーン 3 はヒト RNase 6PL (MW 27 ないし 30 kDa) であり、レーン 4 は RNase 6PL - アクチン複合体である。RNase 6PL による アクチン結合の高い親和性を示す、レーン 4 における RNase 6PL - アクチンの高分子量複合体に注意されたし。図 66 b は、5 μg / ml G - アクチンとのインキュベーション、および HRP 結合二次抗 IgM 抗体 (Sigma Chemicals, St Louis MO) でのケミルミネンスによって可視化された、抗アクチン mAb での検出の後の、ニトロセルロース上のヒト RNase 6PL、RNase B1 および G - アクチン (陽性対照) のスロットプロットを示す。RNase 6PL および RNase B1 スロット双方におけるアクチンの検出に注意されたし。  
30

図 67 a および b は、コンカナバリン A でのアフィニティ - クロマトグラフィーによる RNase 6PL の精製を示す。図 67 a は、Sephadose Con A および RNase 6PL の結合の後の、Sephadose Con A カラムから 0.5 M - マンノピラノシドで溶出させた画分における蛋白質 (O.D. 280 nm、塗りつぶした四角) および RNase 触媒活性 (塗り潰した三角) の分布を示すグラフである。画分 48 ないし 61 を集めた。図 67 b は、Sephadose Con A カラムからの、プールされた画分 (レーン 3) における蛋白質および未結合上清 (レーン 2) の 12.5 % SDS - PAGE 分離である。レーン 1 は分子量マーカーである。  
40

図 68 は、ヒト癌細胞のクローニ原性に対する多様な起源の T2 RNase の効果を示すヒストグラムである。ヒト結腸癌 (HT-29) 細胞は、10<sup>-6</sup> M A. niger RNase B1、ヒト RNase 6PL、または E. coli RNase I と共におよび/またはそれなくして 48 時間インキュベートした。対照細胞を RNase T2 フリー成長培地で 48 時間プレインキュベートした。次いで、全ての細胞をトリプシン処理し、コロニー化のために 96 マイクロタイタプレート中で同一成長培地と共にインキュベートした。さらに、1 μM RNase の存在下または非存在下で、5 日間で  
50

、クローン原性を 1 0 0 0 細胞 / ウェルでアッセイした。個々のウェルをコロニー発生についてスコア取りした。各細胞系について 6 回の測定を行った。細菌、酵母およびヒト T 2 RNase によるクローン形成の強力な阻害に注意されたし。

図 69 a および b は、多様な起源の T 2 RNase によるヒト結腸癌腫瘍成長の効果的な阻害を示すヒストグラムである。CD-1 nu / nu (Charles River, Wilmington, MA) ヌードマウスに、L S 174 T 癌細胞を皮下注射した。癌細胞移植後に、腫瘍が触知できるようになると（約 14 日後）、マウスに、1 日おきに、PBS、または A. niger RNase B (図 69 a) またはヒト T 2 RNase 6 PL (図 69 b) (100 μl 中の 0.5 mg / kg) で腹腔内注射した。腫瘍容量を 1 週間当たり 3 回モニターした。30ないし 42 日後にマウスを屠殺し、腫瘍を評価した。相対的腫瘍容量を、最初の処理における腫瘍に対して計算する。未処理マウスと比較した、T 2 RNase 処理マウスにおける (mm<sup>3</sup> で表した) 相対的腫瘍容量に対する有意な効果に注意されたし。  
10

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0090】

本発明は、アクチン結合活性を有するクローン化された組換えヒト T 2 RNase のためのもの、および T 2 RNase の精製のための新規な方法のためのものである。さらに、本発明は、固体腫瘍の成長および増殖を阻害し、細胞運動性を変調し、それにより、対象において異常に増殖する細胞の増殖、コロニー化、分化、発生、炎症、および / または感染を予防し、阻害しおよび / または逆行させるための、ヒト T 2 RNase またはそれをコードするポリヌクレオチドの使用を教示する。本発明は、さらに、アクチン結合活性を有する T 2 ファミリーの組換えヒトリボヌクレアーゼ、またはそれをコードするポリヌクレオチドを有効成分として含有する医薬組成物を教示する。  
20

##### 【0091】

腫瘍細胞の増殖を阻害するための細胞傷害性活性を持つリボヌクレアーゼの使用は新しくはなく、当該分野においては従前に示されている。ONCONASE として商業的に知られている A ファミリーのリボヌクレアーゼは、臨床試験において腫瘍組織における細胞増殖を阻害することが示されている。RNase A スーパーファミリーのいくつかの他の RNase もまた、それらのリボ核酸分解活性に加えて、細胞傷害性活性を有することが示されている。ONCONASE および他の細胞傷害性 RNase 変種の毒性は、サイトゾルリボヌクレアーゼ阻害剤蛋白質 (RI) を回避し、細胞 RNA を分解するそれらの能力に依存することが示されている (Haigisら、Nuc Acid Res 2003; 31: 1024-33)。  
30

##### 【0092】

いくつかのリボヌクレアーゼの細胞傷害性は、ある程度それらのリボ核酸分解活性に依存するが、リボ核酸分解活性のレベルは、常には、リボヌクレアーゼについて観察された細胞傷害性のレベルに相關しない。さらに、細胞傷害性活性を全く呈しないが、リボヌクレアーゼとして同様に機能するリボヌクレアーゼのいくつかの例が存在する。最も知られている例は RNase A である。他の場合には、反応速度が、いくつかの他の能力において、より特異的な結合または改良される機能のために犠牲とされる。例えば、アンギゲニンの活性部位は、RNase A に存在しない側鎖によってブロックされ、それを一般的な基質に対して 1 0 0 0 0 倍低い活性とするが、リボソーム RNA の切断においてより特異的にする。BS-RNase は、それがモノマーである場合、より速いヌクレアーゼである。しかしながら、その細胞傷害性はより大きく、リボヌクレアーゼ阻害剤による阻害は、ダイマー形態ではかなり低下する。グリコシリ化 RNase B は殆どの基質に対して RNase A よりも活性が低いが、BS-RNase においてしばしば観察される脱アミド化 (アスパラギン 67 からイソアスパルテートへ) は、蛋白質における H 結合構造の全鎖を切断することによって、RNase A 突然変異体の活性を低下させる (Shein, C. H. 1997. Nature Biotechnol 15: 529-536 にレビューされている)。  
40  
50

## 【0093】

T<sub>2</sub> ファミリーのリボヌクレアーゼは、それらのユニークな分子特徴によって特徴付けられる。AおよびT<sub>2</sub> ファミリーのRNaseメンバー間の比較を以下の表2にまとめると（アミノ酸の位置は、各々、ファミリーAおよびT<sub>2</sub>において、RNase AおよびRNase T<sub>2</sub>の後である）。

表 2

特徴	RNase A	RNase T <sub>2</sub>
分子質量	11ないし14 kDa (BS-RNaseを例外とする)	36 kDa.
RNase活性についての最適な温度：	37°C	50-60°C
RNase活性についての最適なpH：	6.5-8	3.5-5
グリコシル化：	グリコシル化されていない	合計分子質量の12ないし25%
塩基特異性：	ピリミジン塩基-特異的	アデニル酸優先性を有し非特異的
ジスルフィド結合：	4： 共通：Cys 28-84、Cys 40-96、 Cys 58-110 膀胱RNaseにおいては、4番目のS-S結合はCys 65-72の間に位置し、 Glu 69およびAsn 71を含有する ループを形成し、これは、ヌクレオチド- 結合部位の一部である。ONCONASE およびウシガエルレクチンにおいて、 Cys 87-Cys 104はCOOH-末端 ループを形成し、これは、活性部位の近くに 位置する。アンジオゲニンは3つのジスルフ イド結合を有するに過ぎない。	5： Cys3-20, Cys10-53, Cys19-120, Cys63-112およびCys182-213.
RNase活性のメカニズム：	活性部位 <u>RNA切断における2つの工程</u> (i) His 12は一般的な塩基として作用し、RNAの2'-ヒドロキシル基からプロトンを除去する。His 119は一般的な酸として作用し、脱離ヌクレオチドの5' Oからプロトンを供与する。 (ii) 得られた2' 3' -環状ヌクレオチドは加水分解され、His 12およびHis 119の役割は逆転される。Lys 41は五価遷移状態を安定化する。  <u>基質結合部位：</u> GLn 11およびPhe 120は基質と水素結合を形成する。 ONCONASEおよびウシガエルレクチンにおいては、Glu 111は基質のホスフェートとH-結合を形成する。 Gln 96, Asn 71, Glu 111, なかでもAsn 71は最も保存されており、RNA切断を触媒するであろう。	活性部位 RNA触媒はRNase Aと同様である。His 46およびHis 109は一般的な酸および塩基触媒として機能する。Glu 105およびLys 108は、基質のP=O結合を分極するのに役立つか、または五価遷移状態を安定化するのに役立つであろう。  <u>基質結合部位：</u> His 104（植物においては、それはTyrまたはAsp）は、基質のホスフェート受容体として作用するであろう。 2つの認識部位がある：主な(B1)部位はTyr 57, Trp 49およびAsp 51を含有する。 Asp 51はアデニル塩基認識を行う。 従たる(B2)部位はPhe 101, Gln 95, Asn 94, Ser 93, Pro 92およびGln 32を含有する。

10

20

30

40

## 【0094】

T<sub>2</sub> ファミリーのリボヌクレアーゼは多数の微生物において、ならびに植物において同定されており、そこでは、それらは、胚珠に向かって伸びる花粉管の伸長を選択的に制限することによって、受粉プロセスにおいて活動的な役割を演じる。

## 【0095】

本発明の発明者によって発見されたように、および実施例1、2、6、16および20において後にさらに詳細に述べるように、T<sub>2</sub>リボヌクレアーゼファミリーの、RNase B1およびヒトRNase 6PLは、リボ核酸分解的に活性であるか、またはリボ核酸分解的に活性でないかを問わず、花粉管の伸長においてアクチンに特異的に結合し、そ

50

れにより、花粉管の伸長を阻害し、また哺乳動物細胞のアクチンにも結合する。

#### 【0096】

アクチンは、細胞構造を維持すること、およびオルガネラの細胞内輸送を支持することの両方において活性な、細胞の必須の骨格成分であるフィラメントを形成することが知られている。その結果、アクチンフィラメントは、線維芽細胞、免疫系の細胞、神経系の細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋内皮細胞、および組織形成を含めた組織負傷および他の発生態様の修復に関連する細胞を含めた、中胚葉および／または神経外胚葉および／または外胚葉および／または内胚葉起源の種々の細胞の運動性、増殖、コロニー化、分化、形質転換、および生存を含めた、正常なおよび異常な細胞のライフサイクルを通じての多くの細胞プロセスにとって非常に重要である。多数の研究はまた、アクチンが、癌細胞の発生を制御する種々の細胞プロセスにおいて参画することを示している (Jordan, M. A. & Wilson, L. 1998. Curr. Opin. Cell Biol. 10: 123-130; Jammy, P. A. & Chaponnier, C. 1995. Curr. Opin. Cell Biol. 7: 111-117; Sigmond, S. H. 1996. Curr. Opin. Cell Biol. 8: 66-73; Tapon, N. ら、1997. Curr. Opin. Cell Biol. 9: 86-92)。かくして、例えば、アクチンフィラメントは異常な細胞増殖に参画する (Assoian, R. K. & Zhu, X. 1997. Curr. Opin. Cell Biol. 9: 93-98)。悪性細胞は正常な細胞よりもサイトカラシンBに対してより感受性であることが判明した (Hemstreet G. P. ら、1996. J. Cell Biochem. 25S: 197-204)。

#### 【0097】

アクチンは高度に保存された蛋白質であり、進化的に離れた生物の間で高いレベルの相同意性を維持するので、花粉管伸長を阻害する RNase B1 のアクチン結合活性は、この理論によって拘束されることなく、哺乳動物細胞のアクチンに特異的に結合し、それにより、その増殖、コロニー化、分化および／または発生を阻害するのに利用することができると仮定される。

#### 【0098】

本発明を具体化することにおいて、実施例セクションの実施例 2 および 5 にさらに記載されているように、外因性 RNase B1 は膜アクチンに特異的に結合し、細胞アクチンネットワーク障害を引き起こす。実施例 3 ないし 5 に示されているように、哺乳動物癌細胞に対する RNase B1 および RNase 6 PL の効果は、イン・ビトロおよびイン・ビボでさらに調査された。そこで明瞭に示されるように、RNase B1 は、結腸または他の場所における健康な組織に対して明らかな副作用を有さずして、(i) 培養で成長した腺癌細胞の成長、増殖および／またはコロニー化を実質的に減少し：ならびに (ii) 予防的および／または治療的に、異常な陰窩病巣 (ACF) の数を低下させ、腫瘍の数およびサイズを低下させ、腫瘍脈管形成に干渉し、結腸癌腫ラットモデルにおいて腫瘍の悪性度およびアデノーマから腺癌への転移を低下させる。ヒト RNase 6 PL は同様な熱安定性を有することが判明し (図 57)、単独で、および種々のプロ脈管形成因子の存在下で (図 63)、花粉管形成 (図 58) および HUVE 細胞脈管形成 (図 59) の阻害において同様な活性を示した。さらに、ヒト RNase 6 PL は、RNase B1 のように、リボ核酸分解活性の不活化の後でさえ、アクチン結合、花粉管阻害性および抗脈管形成活性を保有することが示された (図 58)。

#### 【0099】

本発明の少なくとも 1 つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は以下の記載に述べられる、または実施例によって説明される詳細にその適用が制限されないことは理解されるべきである。本発明は、他の実施形態が可能であり、または種々の方法で実行されまたは行うことができる。また、本明細書中で用いる用語は、記載の目的のためであり、限定的と見なされるべきではないことが理解されるべきである。また、本発明は本明細書中に示す理論または仮定に拘束されず、またはそれによって制限されないことが理解されるべ

きである。

**【0100】**

T 2 ファミリーの 1 以上のリボヌクレアーゼは、本明細書において、まとめて T 2 - R N a s e と言われる。同様に、T 2 ファミリーの 1 以上のリボヌクレアーゼをコードする 1 以上のポリヌクレオチドを、本明細書において、まとめて、T 2 - R N a s e をコードするポリヌクレオチド（または、それ）という。

**【0101】**

R N a s e 6 P L 遺伝子は、ヒト対象における、染色体領域 6 q 2 7 における突然変異と（自然発生卵巣癌等の）癌の高い発生率との間の相関の発見以来、候補腫瘍および転移サプレッサー遺伝子であった。多数の研究は、R N a s e 6 P L 遺伝子のクローニング、および種々の癌細胞系の細胞へのトランスフェクションを報告している（A c q u a t i , ら、O n c o g e n e 2 0 0 1 ; 2 2 : 9 8 0 - 8 8 , L i u ら、B M C G e n e t . 2 0 0 2 ; 3 : 2 0 ; および L i u ら、O n c o g e n e , 2 0 0 2 ; 2 1 - 3 8 7 - 9 9 参照）。しかしながら、組換え蛋白質を単離しない、ヒト R N a s e 6 P L 遺伝子の異種発現は、対立する論争のある結果を生じた。A c q u a t i ら（O n c o g e n e 2 0 0 1 ; 2 2 : 9 8 0 - 8 8 ）は、卵巣腫瘍細胞における腫瘍形成性の抑制、およびトランスフェクトされた R N a s e 6 P L による不滅化された細胞系における老化の誘導を報告しているが、R N a s e 6 P L でのトランスフェクションによる卵巣癌細胞成長の抑制は L i u らによって観察されなかった（O n c o g e n e , 2 0 0 2 ; 2 1 - 3 8 7 - 9 9 ）。かくして、L i u らは、「クローン原性アッセイは、・・・この遺伝子が推定腫瘍サプレッサー遺伝子ではないようであることの裏付けを提供する」と結論している。

**【0102】**

本発明を具体化することにおいて、発明者らは、最初に、R N a s e 6 P L 遺伝子からの 7 1 9 b p オープンリーディングフレームを含むヒト R N a s e 6 P L 遺伝子の蛋白質コード配列をクローン化し、異種発現系（P . p a s t o r i s ）において発現させるのに成功し、該ポリペプチドは R N a s e 6 P L コード配列によってコードした。予測される分子量を有する発現されたポリペプチドは培養基に分泌され、新規な精製プロセスにおいてそれから単離され、精製された。かくして、本発明者らは、最初に、T 2 R N a s e ファミリーの新規なメンバーである組換えヒト R N a s e 6 P L をクローン化し、発現させ、精製した（実施例 1 9 ）。精製されたヒト R N a s e 6 P L は、R N a s e B 1 のそれと同様に強く活性および熱安定性を呈した（実施例 2 0 ）。また、それは同様の最適な pH ( 4 ないし 5 ) および温度 ( 5 0 ) を示す。しかしながら、R N a s e の T 2 ファミリーのメンバーであるヒト R N a s e 6 P L は、他の外来性 T 2 R N a s e の不利なくして、アクチン結合活性を有する他の T 2 R N a s e と同様に治療的および臨床的適用で用いることができる。

**【0103】**

クローン化 R N a s e 6 P L コード配列によってコードされる R N a s e 6 P L ポリペプチドと、他の多様な種の T 2 R N a s e 蛋白質のアミノ酸配列とを比較すると、多くの他の T 2 R N a s e に対して配列相同意性が変化するが、同様の構造を示した（図 6 0 ないし 6 2 ）。最も近い相同意性は、m u s m u s c u l u s からの T 2 R N a s e 蛋白質に対して見出された。8 2 % B l a s t G e n e B a n k ( 図 6 2 )。

**【0104】**

本明細書では、用語「相同意性」は、2 つのアミノ酸またはヌクレオチド配列の間での組み合わされた配列同一性および類似性と定義される。

**【0105】**

本発明を具体化することにおいて、発明者らは、蛋白質のリボ核酸分解触媒活性とは別で、それから独立した、T 2 R N a s e ファミリーのメンバーの従前に開示されていなかったアクチン結合活性を明らかとした（後記実施例 6 および図 3 1 参照）。T 2 R N a s e のアクチン結合活性はイン・ビトロで定量されており（後記実施例 3 、図 1 1 参照

10

20

30

40

50

)、細胞の成長、運動性および増殖の多様なモデルにおいて細胞表面に限局された(後記実施例3、図12aないし12cおよび実施例5、図29および30参照)。さらに、T2 RNase アクチン結合活性は、細胞突起におけるアクチンフィラメント組織化の破壊、ならびに管成長(後記実施例3、図9aおよび9b、および実施例5、図28aおよび28b参照)および脈管形成(後記実施例4、図24aないし24cおよび26c参照)の強い阻害に相關する。さらなる結果は、T2 RNase アクチン結合活性、細胞突起の破壊、および運動性の阻害が、さらに、新しく増殖するおよび確立されたよく発達した腫瘍双方において、腫瘍成長の有意な阻害(後記実施例4、図22ないし24参照)および悪性疾患の予防(後記実施例4、図26参照)に相關することを明らかにした。T2

RNase 处理腫瘍のミクロ組織病理学およびDNAベースの(TUNEL)分析は、腫瘍成長の阻害、増殖および転移成長、ならびに腫瘍容量の低下に関連した、アクチン結合活性を有するT2 RNase の強いプロアポトーシス効果を明らかにした(後記実施例14、図43aないし43b、44aないし44bおよび45aないし45b参照)。前記背景セクションで詳細に記載したように、細胞表面における動的なアクチンフィラメントのアセンブリーおよびディスアセンブリーは高度に調節され、正常および異常細胞双方の細胞運動性、成長および発生の全ての態様にとって重要である。

#### 【0106】

かくして、本発明の1つの態様によると、対象において異常に増殖する細胞の増殖、コロニー化、分化および/または発生を予防し、阻害しあり/または逆行させる方法が提供される。本発明のこの態様による方法は、治療上有効量のT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質(該リボヌクレアーゼ蛋白質は、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有する)またはT2ファミリーの該リボヌクレアーゼ蛋白質をコードし、それをイン・ビボで発現することができるポリヌクレオチドを、それ自体、または医薬組成物の有効成分として、対象に投与することによって行われる。

#### 【0107】

1つの実施形態において、リボヌクレアーゼ蛋白質はT2ファミリーのヒトリボヌクレアーゼ蛋白質である。好ましい実施形態において、該リボヌクレアーゼ蛋白質は配列番号4に対して少なくとも85%、好ましくは88%、より好ましくは90%、なおより好ましくは93%、さらにより好ましくは95%、なおより好ましくは98%、最も好ましくは100%相同である。さらに好ましい実施形態において、リボヌクレアーゼ蛋白質は配列番号4に記載されている通りである。

#### 【0108】

本発明を具体化することにおいて、腫瘍、異種移植片および転移等の異常に増殖する細胞を(実施例10および14、および図43ないし45参照)、T2ファミリーのリボヌクレアーゼに暴露すると、細胞におけるアポトーシスプロセスを増強させることができが初めて発見された。T2 RNase のプロアポトーシス効果は、実施例10および14で見られた腫瘍および転移成長ならびに増殖の抑制に相關する。アポトーシスの阻害に関連する疾患は、細胞の過剰な蓄積が起こる疾患(新生生物疾患、自己免疫疾患)を含むことは認識されよう。

#### 【0109】

固形腫瘍および血液学的腫瘍の双方において、悪性細胞はアポトーシスインデューサーに対して異常な応答を示す(Watson AJM. 1995. Gut 37: 165-167; Burch W.ら、1992. Trends Pharmacol Sci 13: 245-251)。これらの疾患において、p53、ras、c-myc およびbcl-2等の周期・調節遺伝子は、悪性変性に関連する突然変異、不活化または調節不全を被る(Merritt AJら、1994. Cancer Res 54: 614-617; Iwadate Yら、1996. Int J Cancer 69: 236-240; Muel lauer Eら、1996. Hepatology 23: 840-847; Newcomb EW. 1995. Leuk Lymphoma 17: 211-221)。bcl-2の発現は、前立腺および結腸癌において、ならびに神経芽細胞腫において

10

20

30

40

50

より悪い予後に関する予測因子であると考えられる (Thompson C B. 1995. Science 267: 1456 - 1462)。多数の抗新生物療法が腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導することが示されている (レビューについては: Sun SYら、2004. J Natl Cancer Inst. 96: 662 - 672; Schulze-Bergkamen HおよびKrammer PH. 2004. Semin Oncol. 31: 90 - 119; Abend M. 2003. Int J Radiat Biol. 79: 927 - 941 参照)。

#### 【0110】

アポトーシスにおける欠陥は、ループスエリテマトーデス (Carson DA. およびRebeiro JM. 1993. Lancet. 341: 1251 - 1254. Arrienger M. ら、1994. Arthritis Rheum. 37: 1423 - 1430)、関節リュウマチ (Liu H. およびPope RM. 2003. Curr Opin Pharmacol. 3: 317 - 22) および重症筋無力症 (Masunaga A. ら、1994. Immunol Lett. 39: 169 - 172) 等の自己免疫疾患をもたらし得る。アデノウイルス、EBV、牛痘およびクラミジアの等の病原体 (Thompson CB. 1995. Science 267: 1456 - 1462; Marshall WL. ら、1999. J Virol. 73: 5181 - 5185, Deveraux QL. ら、1999. J Clin Immunol. 19: 388 - 98, Fan T. ら、1998. J Exp Med. 187: 487 - 496) は、細胞アポトーシスに干渉することも示されている。乾癬等の慢性炎症過剰増殖性皮膚病において、アポトーシスの異常に低い速度は、表皮過形成の発生に寄与する。ケラチノサイトは、IL-15 等のケラチノサイトアポトーシスを抑制し得るいくつかのプロ炎症性サイトカインを含めた、種々の外部および内部成長因子に応答することが示された (Ruckert R. ら、2000. J Immunol. 165: 2240 - 2250)。

#### 【0111】

かくして、本発明のもう1つの態様によると、細胞のアポトーシスを増強する方法が提供され、該方法は、有効濃度のT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質 (該リボヌクレアーゼ蛋白質は、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有する) またはT2ファミリーの該リボヌクレアーゼ蛋白質をコードし、それをイン・ビボで発現することができるポリヌクレオチドを該細胞に供し、それにより、アポトーシスを増強することを含む。本発明の方法による細胞のアポトーシスの増強は、前記した新生物疾患、自己免疫疾患、炎症病、過剰増殖病および乾癬症等の、アポトーシスに関連する疾患の治療および/または予防において臨床的に適用することができる。それを必要とする対象の細胞においてアポトーシスを増強するための、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼ、またはT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質をコードし、それをイン・ビボで発現することができるポリヌクレオチドの投与は、本明細書に記載された方法のいずれかによって行うことができる。増強されたアポトーシスの検出、およびT2 RNaseへの暴露後の細胞または組織もしくは組織試料中のアポトーシスのレベルの変化のモニタリングは、後に記載するように、当該分野で知られた細胞学的、病理学および生化学 (例えば、後に記載するTUNELアッセイ) 手段によって行うことができる。アクチン結合活性を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼは、異種発現系で発現された組換えT2 RNase であり得る。アクチン結合活性を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼのアクチン結合および治療の特徴はリボ核酸分解活性とは別々で、それから独立していることが示されているが、1つの実施形態において、T2 RNaseはリボヌクレオ溶解活性を欠く。治療上有効量の、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質、またはT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質をコードし、それをイン・ビボで発現することができるポリヌクレオチドを、それ自体で、または医薬組成物の有効成分として、それを必要とする細胞対象に投与することができる。

## 【0112】

かくして、本発明のもう1つの態様によると、有効成分として、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質、またはT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質をコードし、それをイン・ビボで発現することができるポリヌクレオチド、および医薬上許容される担体を含む医薬組成物が提供される。

## 【0113】

本発明のなおもう1つの態様によると、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質、またはT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質をコードし、それをイン・ビボで発現することができるポリヌクレオチドを、医薬上許容される単体と組み合わせる工程を含む、異常に増殖する細胞の増殖、コロニー化、分化および/または発生を予防し、阻害しおよび/または逆行するのに有用な医薬を調製する方法が提供される。 10

## 【0114】

なおさらに、細胞の過剰な細胞運動性および/または異常な蓄積によって特徴付けられる疾患または状態を治療し、および/または予防するのに有用な医薬を調製する方法が提供される。該方法は、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質、またはT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質をコードし、それをイン・ビボで発現することができるポリヌクレオチドを、医薬上許容される担体と組み合わせることによって行われる。 20

## 【0115】

該医薬は、好ましくは、特定の癌等の特定の増殖性障害または疾患のための治療を提供するものとして識別される。そのような識別は、例えば、当該分野で良く知られているように、医薬を含有する容器上の、またはリーフレット上の印刷で行うことができる。

## 【0116】

本発明の該方法および医薬組成物は、例えば、(i)対象において腫瘍を治療し；(ii)対象において腫瘍の発生を予防し、阻害しおよび/もしくは逆行させ；(iii)対象において良性腫瘍から悪性腫瘍への形質転換を予防し、阻害しおよび/もしくは逆行させ；(iv)対象において腫瘍脈管形成を予防し、阻害し、および/もしくは逆行させ；(v)対象において個々の腫瘍の数を減少させ；(vi)対象において腫瘍サイズを低下させ；(vii)対象において悪性腫瘍の数を減少させ；ならびに/または(viii)対象において組織の腫瘍への形質転換を予防し、阻害しおよび/または逆行させるのに用いることができる。 30

## 【0117】

T2-RNaseは、後の実施例1にさらに例示されるように、天然源に由来することができ、または別法として、それは、実施例19に詳細に記載されるように、適当なポリヌクレオチド（以下の表3、および以下の記載）および発現系を用いて組換え蛋白質として生産することができる。組換え蛋白質の発現および精製は当該分野で良く知られており、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrookら(1989)；「Current Protocols in Molecular Biology」第I-II卷 Ausubel, R. M. ., ed. (1994)；Ausubelら「Current Protocols in Molecular Biology」, John WileyおよびSons Baltimore, Maryland(1989)；Perbal, 「A Practical Guide to Molecular Cloning」, John Wiley & Sons, New York(1988)；Watsonら「Recombinant DNA」, Scientific American Books, New York；Birrenら(eds)「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York(19 40

98)を含めた多数のテキストブックおよび実験手順書のいずれか1つに詳細に記載されている複数の代替技術のいずれか1つによって行うことができる。

表 3

供給源		名称 (蛋白質)	名称 (遺伝子)	文献	GeneBank 受託番号
細菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>		遺伝子座 RNI	Favre,D. et al. 1993. J. Bacteriol. 175:3710-3722.	Q07465
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Rnase HI0526	遺伝子座 RN26	Fleischmann, R.D., et al. 1995. Science 269:496-512.	P44012
	<i>Escherichia coli</i>	Rnase I	遺伝子座 RNI	Meador,J. III. & Kennell,D. 1990. Gene 95:1-7. Oshima, T., et al. 1996. DNA Res. 3:137-155. Henikoff, S. & Henikoff, J.G. 1994. Genomics 19:97-107.	P21338
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Rnase T2	rnt B	Kawata Y. et al. 1988. Eur J. Biochem 176(3):683-97. Kawata Y. et al. 1990. Eur J. Biochem 187:255-62. Ozeki K, et al. 1991. Curr Genet. 19:367-73.	P10281
真菌	<i>Rhisopus niveus</i>	Rnase Rh		Horiuchi,H. et al. 1988. J. Biochem. 103:408-418. Kurihara,H. et al. 1992. FEBS Lett. 306:189-192. Kurihara,H. et al. 1996. J. Mol. Biol. 255:310-320. Ohgi, K. et al. 1991. J. Biochem. 109:776-785.	P08056
	<i>Trichoderma viride</i>	Rnase Trv		Inada,Y. et al. 1991. J. Biochem. 110 (6), 896-904.	P24657
	<i>Lentinula edodes</i> (シイタケキノコ)	Rnase Irp		Kobayashi, H. et al. 1992. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:2003-2010.	AAB24971
	<i>L. edodes</i>	Rnase Le2		Kobayashi,H. et al. 1992. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:2003-2010. Shimada,H. et al. 1991. Agric. Biol. Chem. 55:1167-1169.	P81296
	<i>Irpex lacteus</i>	Rnase Irp1		Watanabe,H., et al. 1995. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59:2097-2103.	AAB35880
	<i>Physarum polycephalum</i>	Rnase Phyb		Inokuchi,N. et al. 1993. J. Biochem. 113:425-432.	P81477
植物	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RNS2	遺伝子座 RNS2	Green,P.J. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5118-5122.	P42814
	<i>A. thaliana</i>	Rnase 3	遺伝子座 RNS3	Bariola,P.A., et al. 1994. Plant J. 6:673-685.	P42815
	<i>A. thaliana</i>	Rnase 1	遺伝子座 RNS1	Bariola,P.A., et al. 1994. Plant J. 6:673-685.	P42813
	<i>Lycopersicon esculentum</i> (培養されたトマト)	Rnase LE	RNALE	Kock,M. et al. 1995. Plant Mol. Biol. 27:477-485. Jost,W. et al. 1991. Eur. J. Biochem. 198:1-6.	P80022
	<i>L. esculentum</i>	Rnase LX	RNLX	Kock,M., et al. 1995. Plant Mol. Biol. 27:477-485. Loffler,A., et al. 1993. Eur. J. Biochem. 214:627-633.	P80196
	<i>Nicotiana alata</i> (タバコ)	S-RNase	S	Anderson ,M.A., et al. 1986. Nature 321:38-44.	P04002

10

20

30

40

				Matton,D.P. et al. 1995. Plant Mol. Biol. 28:847-858. McClure ,B.A. et al. 1989. Nature 342:95-97.	
	<i>Malus domestica</i> (リンゴの木)	S-RNases	S	Sassa,H., et al. 1996. Mol. Gen. Genet. 250:547-557.	
	<i>Pyrus pyrifolia</i> (日本梨)	S-RNases	S	Norioka,N., et al. 1996. J. Biochem. 120 ;335-345.	
	<i>Momordica charantia</i> (ニガウリ)	RNase MC	遺伝子座 RNMC	Blaxter,M.L., et al. 1996. Mol. Biochem. Parasitol. 77:77-93. Ide,H. et al. 1991. FEBS Lett. 284:161-164. Ide,H. et al. 1991. FEBS Lett. 289:126.	P23540
動物	<i>Gallus gallus</i> (ニワトリ)	RNase CL1		Uchida,T. et al. 1996. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:1982-1988.	JC5126
	<i>Rana catesbeiana</i> (ウシガエル)	RNase RCL2		Yagi,H. et al. 1995. Biol. Pharm. Bull. 18:219-222. Liao,Y.D. et al. 1996. Protein Expr Purif. 7:194-202. Liao YD, et al. 1994. Eur J Biochem. 222:215-20. Lião,Y.D. et al. 1998. J. Biol. Chem. 273: 6395-401	PC2347
	<i>Drosophila melanogaster</i>	RNase DM	DmRNase	Lankenau,D.H. et al. 1990. Chromosoma 99:111-117. Hime,G., et al. 1995. Gene 158:203-207.	X15066
	<i>Crassostera gigas</i> (マガキ)	RNase Oy	遺伝子座 JX0295	Watanabe,H. et al. 1993. J. Biochem. 114:800-807.	JX029
	<i>Todarodes pacificus</i> (スルメイカ)	RNase Tp		Kusano, A. et al. 1998. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62:87-94.	PMID 9501521
	<i>Homo sapiens</i>	RNase 6 前駆体	RNase6PL	Trubia, M. et al. 1997. Genomics 42:342-344.	NP003721

## 【 0 1 1 8 】

いくつかの適用のためには、望まれない副作用を有し得るか、または起こし得る、実質的にリボ核酸分解（リボヌクレアーゼ）活性を欠くリボヌクレアーゼを用いるのが有益であろう。本明細書において、用語「実質的にリボ核酸分解（リボヌクレアーゼ）活性を欠く」とは、（ i ）同様の非不活化リボヌクレアーゼと比較して、 0 ないし 10 % リボ核酸分解（リボヌクレアーゼ）活性を有する T 2 ファミリーの不活化リボヌクレアーゼ（天然または組換えいずれか）；および / または（ ii ）同様の非突然変異体リボヌクレアーゼと比較して、 0 ないし 10 % リボ核酸分解（リボヌクレアーゼ）活性を有する T 2 ファミリーの組換え突然変異体（天然単離体またはヒト誘導）リボヌクレアーゼをいう。 T 2 ファミリーのリボヌクレアーゼのリボ核酸分解（リボヌクレアーゼ）活性の不活化は、オートクレーブ処理および化学的変性または不活化からなる群から選択されるプロセスによって行うことができる。

## 【 0 1 1 9 】

本明細書において、用語「オートクレーブ処理」は、オートクレーブ中における、高圧条件（例えば、 15 p s i ）で約 121 ℃ に加熱した超加熱スチームへの少なくとも 20 分間の暴露と定義される。化学的変性は、後に詳細に記載するよう（実施例 6 ）、ヨードアセチル化等の、 T 2 ファミリーのリボヌクレアーゼのアミノ酸側鎖および / または化学的結合構造において変化を引き起こす極端な pH および化学剤への暴露によって行うことができる。

## 【 0 1 2 0 】

以下の実施例 2 、 6 および 20 にてさらに詳細に記載するように、本発明の発明者らは、ほとんど（ 10 % ）または実質的に（ 0 ないし 10 % ）リボ核酸分解活性を有さない煮

10

20

30

40

50

沸した、オートクレーブ処理した、および化学的に不活化した（アセチル化）RNase B1およびRNase6PLが、そのアクチン結合および抗増殖、抗コロニー化、抗分化および／または抗発生活性の実質的に全てを保有するので、RNase B1およびRNase6PLの細胞運動性の阻害、アポトーシスの阻害、抗増殖、抗コロニー化、抗分化および／または抗発生活性は、そのリボ核酸分解活性に依存しないことを示した。さらに、RNase6PLにおける、リボ核酸分解ならびに抗増殖、抗コロニー化、抗分化および／または抗発生活性の分離についての決定的な証拠は、腫瘍形成および転移のRNase6PL媒介抑制が、リボヌクレアーゼ触媒部位に標的化された二重点突然変異によって影響されないことを最近示したAcquatilis (Int J Oncol. 2005; 26: 1159-68) によって報告されている。

10

#### 【0121】

かくして、本発明によるT2-RNase蛋白質は、全く（0%）またはほとんど（10%まで）リボ核酸分解活性を有しないが、その他の活性を保有する、天然のリボ核酸分解活性形態、あるいは別法として、サイレントな、または抑制されたリボ核酸分解形態の双方で利用することができる。従って、用語「T2-RNase」は、その他の活性にかかわらず、蛋白質の全ての抗増殖、抗コロニー化、抗分化、抗脈管形成および／または抗発生形態を含むことを意味する。かくして、1つの実施形態において、本発明のT2-RNaseは、リボヌクレアーゼ活性を実質的に欠くが、アクチン結合活性を有する。好ましい実施形態において、T2-RNaseのアクチン結合活性は熱安定性である。さらに、リボヌクレアーゼ活性を不活化するが、T2ファミリーのリボヌクレアーゼのアクチン結合活性を維持する方法が提供される。該方法は、（前記した変性条件等の）リボヌクレアーゼ活性を実質的に不活化するが、アクチン結合活性を維持するのに十分な変性条件にリボヌクレアーゼを付すことによって行われる。

20

#### 【0122】

所望の活性を呈するが、リボ核酸分解活性を欠く、またはそれが抑制された、直接的に、またはポリヌクレオチドから発現されたT2-RNaseを利用することができる、特に有利であると認識されよう。というのは、リボ核酸分解活性は対象において望まれない副作用を生じ得るからである。

#### 【0123】

本明細書中で定義されるT2-RNaseのアミノ酸配列を表すポリペプチドは、当該分野で良く知られたいいくつかの方法のうちのいずれか1つによって生産することができる。例えば、該ポリペプチドは、例えば、標準的な9-フルオレニルメトキシカルボニル(F-Moc)化学（例えば、Atherton, E. および Sheppard, R. C. 1985, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 165参照）または標準的なブチルオキシカルボネート(T-Boc)化学のいずれかを用いて、標準的なペプチド合成技術によって合成的に製造することができるが、より最近では、Sheppardによって開発されたフルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)/tert-ブチルシステムが益々広い適用を見出していることを注記する( Sheppard, R. C. 1986 Science Tools, The LKB Journal 33, 9)。

30

#### 【0124】

本発明を具体化するにおいて、細菌から酵母までの多様な系統発生的起源の生物に由来するT2ファミリーの多くのリボヌクレアーゼ（実施例16、図47aないし47b）は、細胞運動性、異常な細胞増殖およびアポトーシスの治療的特徴および阻害に相關するアクチン結合活性を有することが初めて発見された。かくして、T2-RNase蛋白質は、この蛋白質を発現することが知られている生物から当該分野でよく知られた方法によって単離し、精製することもできる。そのような生物として、例えば、Aeromonas hydrophila、Haemophilus influenzae、Escherichia coli、Aspergillus oryzae、Aspergillus phoenicis、Rhizopus niveus、Trichoderma viride、Lentinula edodes、Irpepx lacteus；P

40

50

*hysarum polyccephlum*、*Arabidopsis thaliana*、*Lycopersicon esculentum*、*Nicotiana alata*、*Malus domestica*、*Pyrus pyrifolia*、*Momordica charantia*、*Gallus gallus*、*Rana catesbeiana*、*Drosophila melanogaster*、*Crassostrea gigas*、*Todarodes pacificus*および*Homo sapiens*が挙げられる。しかしながら、T2-RNaseを生産することが未だ知られていない他の生物は、一旦それ自体が発見されると、T2-RNaseについての源として用いることもできると予測される。

## 【0125】

10

本発明のT2リボヌクレアーゼのいくつかの治療的および診断的使用は、精製されたT2 RNaseを必要とするであろうことは認識されるであろう。かくして、T2 RNaseの精製の単純で安価な方法が有利である。本発明を具体化することにおいて、T2ファミリーの組換えリボヌクレアーゼは、リボ核酸分解活性についての収集された画分を煮沸し、カラムクロマトグラフィーによって分画し（後記実施例19、図55参照）、およびアッセイすることによって単離し、精製することができる事が見出された。かくして、T2リボヌクレアーゼ蛋白質を単離する新規な方法も提供され、該方法は、T2リボヌクレアーゼ蛋白質を発現する細胞を含むT2含有試料を熱変性し、好ましくは遠心分離によって、上清を分離し、上清を分画し、T2リボヌクレアーゼ蛋白質を有する上清の画分を同定し、T2 RNase画分をかなりの純度まで精製することを含む。1つの実施形態において、上清の分画は、カラムクロマトグラフィー、例えば、過去に用いられたQ

Sephadose、または当業者によく知られた他の蛋白質分離媒体の代わりに用いるQ SEPHADOSE、Sephadose Con Aカラムによって行われる。T2 RNase担持画分の同定は、（電気泳動移動度等の）物理的特徴、および機能的基準（リボ核酸分解活性、アクチン結合活性）に従ってなすことができる。精製されたRNaseの物理的および機能的評価の方法は、後に記載するように、当該分野で良く知られている。

## 【0126】

別法として、かつ好ましくは、T2-RNase蛋白質は、適当な発現ベクター系を用い、それをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって組換えにより生産することができる。1つの実施形態において、発現系が細菌、酵母、または高等細胞発現系から選択される異種発現系であり、ここで、高等細胞発現系は動物または植物発現系を含む。好ましくは、適当な翻訳後修飾を提供する発現系が選択される。適当な発現ベクター系として、限定されるものではないが、ウイルス（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、単純疱疹ウイルス、アビポックスウイルス）で感染された哺乳動物細胞；ウイルス（例えば、バキュロウイルス）で感染された昆虫細胞；プラスミド、植物ウイルスまたはAgrobacteriumで形質転換された遺伝的に修飾された植物または植物細胞；酵母ベクターを含有する酵母、バクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNAで形質転換された細菌等の形質転換された微生物が挙げられる。1つの好ましい実施形態において、発現系は、他のT2 RNaseファミリーメンバーのように、形質転換されたP. pastoris細胞における発現された蛋白質のグリコシル化によりグリコシル化された蛋白質である、ヒトRNase6PLの発現に適したP. pastorisのpPIC9Kプラスミドである。しかしながら、後に詳細に記載するように、脱-グリコシル化RNase B1は阻害性およびアクチン結合特徴を保有することが認識されよう。ベクターの発現制御エレメントは、利用される宿主-ベクター系に依存してその強度および規格が変化し、多数の適当な転写および翻訳エレメントのいずれか1つを用いることができる。組換えにより生産されたT2-RNaseは後に記載する方法によって、あるいはアフィニティーコロマトグラフィー、電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、免疫沈降、沈積、または当該分野で知られたいずれかの他の方法によって宿主細胞から精製することができる。

20

30

40

50

## 【0127】

精製されたT2-RNaseを用いて、適当な医薬上許容される担体および／または賦形剤を加えて、慣用的な混合、溶解、造粒、糖衣・作成、混練、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥プロセスによって本発明に従って医薬を調製することができるか、あるいは別法として、それを前記したように適当な送達ビヒクルに連結することができる。

## 【0128】

本発明によるポリヌクレオチドは天然T2-RNase蛋白質をコードすることができ、その用語は、本文中では、抗増殖性およびリボ核酸分解活性の双方を有するT2-RNaseを記載し、あるいは別法として、本発明によるポリヌクレオチドは、イン・ビボにて、リボ核酸分解活性が実質的でない蛋白質に発現される（例えば、転写および翻訳される）べき、全くまたはほとんどリボ核酸分解活性を有しないサイレントなまたは抑制されたT2-RNase突然変異体をコードすることができる。10

## 【0129】

従って、用語「ポリヌクレオチド」は、一般にT2-RNaseに関して、あるいはいずれかの特異的なT2-RNaseに関して本明細書中で用いる場合、リボ核酸分解活性を有するか、または実質的にそれを欠くかのいずれかである、異常に増殖する細胞の増殖、コロニー化、分化および／または発生を予防し、阻害しあるいは逆行させることにおいて活性なT2-RNaseをコードするいずれのポリヌクレオチド配列もいう。リボ核酸分解活性を欠くT2-RNaseをコードするポリヌクレオチドは、ランダム突然変異誘発、部位・特異的突然変異誘発および増強された進化技術等の、公知の分子生物学技術を用いて得ることができる。部位特異的突然変異誘発は容易に使用することができる。なぜならば、T2-RNaseのリボ核酸分解活性に必須のアミノ酸残基が認識されているからである（ここに引用して援用する、Kusanoら、1998.Biosci.Biochem.62:87-94、および前記表3参照）。20

## 【0130】

アクチン機能および細胞内アクチン分布および細胞運動性の異常な、または過剰なまたは不十分な調節は、乱れた細胞機能をもたらし得、これは、次には、細胞障害をもたらし得る（または存在する細胞障害を悪化させ得る）ことは認識されよう。本明細書において、「細胞障害」は、ある種の刺激（例えば、組織損傷）に応答して適切に運動または移動する異常または不十分な細胞能力、あるいは細胞内のアクチン機能および分布を適切に調節することができないことによって特徴付けられる障害、疾患または状態を含む。30

## 【0131】

本発明を具体化することにおいて、T2-RNaseは、細胞運動性、アクチンフィラメントのアセンブリーおよびディスアセンブリー、管形成および細胞増殖をイン・ビボで阻害するのみならず、イン・ビトロで測定されるように、癌細胞の運動性および侵入性を直接的に阻害することが初めて示された（実施例12、表5）。かくして、本発明のアクチン結合活性を有するT2-RNase、およびそれを含む組成物は、癌（例えば、腫瘍脈管形成および転移）、免疫調節、神経変性および炎症疾患を含めた、運動性に関連する細胞障害を制御するための新規な治療剤として作用することができる。加えて、アクチン結合活性を有するT2-RNaseは、移動し、および組織負傷応答を調節するそれらの能力を介して、ある種の細胞障害および疾患を軽減するための新規な治療剤として作用することができる。40

## 【0132】

かくして、本発明によると、細胞の運動性を阻害する方法が提供される。該方法は、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質、またはT2ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質をコードし、かつそれをイン・ビボで発現することができるポリヌクレオチドを細胞に供することによって行われる。さらに、それを必要とする対象において過剰な細胞運動性によって特徴付けられる疾患または状態を治療し、および／または予防する方法が提供される。該方法は、治療上有効量の、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有する50

T 2 ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質、またはT 2 ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質をコードし、かつそれをイン・ビボで発現することができるポリヌクレオチドを対象に投与することによって行われる。

【 0 1 3 3 】

アクチンのアセンブリーおよびディスアセンブリーの破壊は、細胞の運動性、発生、成長、増殖および再生に影響する。かくして、本発明の組成物および方法は、細胞の異常な蓄積によって特徴付けられる疾患、症候群または疾患を治療するのに用いることができる。細胞の異常な蓄積によって特徴付けられる疾患または状態として、限定されるものではないが、炎症性疾患、神経変性病および癌が挙げられる。さらに、本発明の組成物および方法は、細胞におけるアクチンフィラメントのアセンブリーおよびディスアセンブリーで用いることができ、これは、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT 2 ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質、またはT 2 ファミリーのリボヌクレアーゼ蛋白質をコードし、かつそれをイン・ビボで発現することができるポリヌクレオチドを細胞に供することによって行われる。

10

【 0 1 3 4 】

かくして、本発明は、限定されるものではないが、胆管癌、脳癌、乳癌、頸部癌；総毛癌；子宮内膜癌；食道癌；胃癌；表皮内新生物；リンパ腫；肺癌（例えば、小細胞および非小細胞）；メラノーマ；神経芽細胞腫；眼癌；卵巣癌；肺臓癌；前立腺癌；直腸癌；肉腫；皮膚癌；精巣癌；甲状腺癌；および腎臓癌、ならびに他の癌腫および肉腫、乳頭腫、神経膠芽細胞腫、カポシ肉腫、扁平細胞癌腫、神経星状細胞腫、頭部癌、首部癌、膀胱癌、結直腸癌、甲状腺癌、肺臓癌、胃癌、肝細胞癌腫、白血病、リンパ腫、ホジキン病、バーキット病、関節炎、関節リウマチ、糖尿病性網膜障害、脈管形成、再狭窄、イン・ステント再狭窄、血管移植片再狭窄、増殖性硝子体網膜障害、慢性炎症性増殖性病、皮膚線維腫および乾癬を含めた悪性癌または非悪性癌等の癌性細胞または他の細胞のごとき異常に増殖する細胞によって特徴付けられる疾患、症候群または疾患を治療するのに用いることができる。

20

【 0 1 3 5 】

本明細書において、用語「癌」または「腫瘍」は臨床的に記載される用語であり、これらは、異常な細胞増殖を呈する細胞によって特徴付けられる膨大な疾患を含む。用語「腫瘍」は、組織に適用される場合、一般には、過剰かつ異常な細胞増殖に特徴付けられる、いずれの異常な組織成長もいう。腫瘍は「良性」であり得、その元の病巣から拡大できず、または「悪性」または「転移性」であり得、その解剖学的部位を超えて宿主身体全体の他の領域に拡大することができる。用語「癌」は、一般には、悪性腫瘍、またはそれから生起する疾患状態を記載するのに用いられるより古い用語である。別法として、該用語は新生物としての異常な成長、および悪性新生物としての悪性異常成長をいう。

30

【 0 1 3 6 】

本発明の配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT 2 RNase蛋白質は、癌を有する危険性がある対象の予防的処置で用いることができる。本明細書で用いる「癌を有する危険性がある対象」は、癌を発症する高い確率を有する対象である。これらの対象は、例えば、その存在が、癌を発症するより高い尤度に対する相關性を有することが示されている遺伝的異常性を有する対象、およびタバコ、アスベストもしくは他の化学トキシン等の癌を引き起こす剤に暴露された対象、または從前に癌について治療されたことがあって、明らかな緩解期にある対象を含む。癌を発症する危険性がある対象を本発明のT 2 RNaseに暴露した場合、対象は、形成するいずれの癌も転移性となるのを防止することができよう。

40

【 0 1 3 7 】

本発明のT 2 RNaseは、対象において炎症に関連する障害を治療および/または予防するのにも有用である。アクチン結合活性を有するT 2 RNaseに暴露された免疫または造血細胞は、移動する能力が低いであろう。かくして、アクチン結合活性を有するT 2 RNaseは、免疫細胞移動に関連した炎症を妨げるのに、ならびに炎症障害お

50

および虚血性病を治療し、予防するのに有用である。

**【0138】**

炎症障害および虚血症病は、損傷した、あるいはそうでなければ好中球の移動および活性化を誘導してしまった局所組織領域への好中球の移動に関連する炎症によって特徴付けられる。いずれかの特定の理論に拘束されるつもりはないが、負傷の部位への好中球移動に由来する好中球の過剰な蓄積は、周囲の組織を損傷する毒性因子の放出を引き起こすと考えられる。炎症病が急性発作である場合、好中球刺激によってしばしば損傷される組織は脳である。活性な好中球は脳に蓄積するので、梗塞が発症する。

**【0139】**

本明細書において、「炎症疾患または状態」は、負傷または感染の部位における局所的炎症によって特徴付けられるいずれの状態もいい、自己免疫疾患、感染性炎症性状態のある種の形態、器官移植または他のインプラントに特徴的な望ましくない好中球活性、および局所組織部位における望まない好中球蓄積において特徴付けられる実質的にいずれの他の状態も含む。これらの状態としては、限定されるものではないが、髄膜炎、大脳浮腫、関節炎、腎炎、成人呼吸逼迫症候群、肺臓炎、筋炎、神経炎、結合組織病、静脈炎、動脈炎、血管炎、アレルギー、アナフィラキシー、エールリヒア症、痛風、器官移植および/または潰瘍性結腸炎が挙げられる。

**【0140】**

本明細書において「虚血性の疾患または状態」とは、心筋または脳梗塞で見られるように、組織へ血液を供給することを担う血管のブロックまたは出血による、組織への血液供給の中止に由来する局所的炎症によって特徴付けられる疾患をいう。脳虚血性発作または脳虚血症は、脳への血液供給がブロックされた虚血性疾患の形態である。脳への血液供給のこの中断は、血管それ自体の固有のブロックまたは閉塞、閉塞の遠くで由来する源、不適切な大脳血流をもたらす減少した灌流圧もしくは増加した血液粘度、またはクモ膜下空間もしくは大脳内組織における破裂した血管を含めた、種々の原因に由来し得る。

**【0141】**

本発明のいくつかの態様において、本発明の T<sub>2</sub> RNase は、バリアーを横切っての腫瘍細胞の移動を妨げるのに十分な量で供される。癌の侵入および転移は、形質転換された細胞が、細胞外マトリックス (ECM) を通って侵入し、移動し、そして繋留 - 独立性成長特性を獲得するのを可能とする細胞接着特性の変化を含む複雑なプロセスである (Liotta, L. A. ら、Cell 1991 64; 327-336)。これらの変化のいくつかは、膜関連細胞骨格、および細胞内シグナリング分子を含有する細胞 / ECM 接触点である病巣接着において起こる。転移性疾患は、腫瘍細胞の播種性病巣が、それらの成長および繁殖を支える組織に播かれた場合に起こり、腫瘍細胞のこの第 2 の拡大は、癌の大部分に関連する罹病率および死亡率を担う。かくして、本明細書で用いる用語「転移」とは、原発性腫瘍部位から離れた腫瘍細胞の侵入および移動をいう。

**【0142】**

本発明の T<sub>2</sub> RNase またはそれをコードするポリヌクレオチドを用いて、例えは、バリアーを横切るそれらの能力のテストにおいて、細胞運動性の阻害に対する感受性について細胞をアッセイすることができる。好ましくは、腫瘍細胞はバリアーを横切ることが妨げられる。腫瘍細胞に対するバリアーは、イン・ビトロ人工バリアー、またはイン・ビボ天然バリアーであり得る。イン・ビトロバリアーとして、限定されるものではないが、Matrigel 等の細胞外マトリックス被覆膜が挙げられる。かくして、T<sub>2</sub> RNase を細胞に供することができ、該細胞は、次いで、Parish, C. R. ら、「A Basement-Membrane Permeability Assay which Correlates with the Metastatic Potential of Tumour Cells」, Int. J. Cancer (1992) 52: 378-383 によって詳細に記載されているように、Matrigel 侵入アッセイシステムにおいて腫瘍細胞侵入を阻害するそれらの能力についてテストすることができる。Matrigel は、IV 型コラーゲン、ラミニン、bFGF に結合し、それを局

10

20

30

40

50

所化する、ペルレカン等のヘパラン硫酸プロテオグリカン、ビトロネクチン、ならびにトランスフォーミング成長因子 - ベータ ( TGF - ) ウロキナーゼ - 型プラスミノーゲンアクチベーター ( uPA ) 、組織プラスミノーゲンアクチベーター ( tPA ) 、およびプラスミノーゲンアクチベーター阻害剤 1 型 ( PAI - 1 ) として知られたセルピンを含有する復元された基底膜である。転移についての他のイン・ビトロおよびイン・ビボアッセイは、先行技術に記載されている。例えば、ここに引用して援用する、1999年8月10日に発行された米国特許第5935850号参照。イン・ビボバリアーとは、対象の身体に存在する細胞バリアーをいう。

#### 【 0143 】

本明細書に記載され、後の実施例セクションで例示される、アクチン結合、抗増殖、抗コロニー化、抗分化および / または抗発生活性を有する、配列番号 4 に対して少なくとも 85 % 相同であるアミノ酸配列を有する T 2 ファミリーのいずれのリボヌクレアーゼも、本発明の教示に従って治療剤として用いることができる。同様に本明細書に記載された抗増殖、抗コロニー化、抗分化および / または抗発生活性を有する、配列番号 4 に対して少なくとも 85 % 相同であるアミノ酸配列を有する T 2 ファミリーのリボヌクレアーゼをコードするいずれのポリヌクレオチドも、本発明の教示に従って治療剤として用いることができる。T 2 ファミリーのリボヌクレアーゼの非限定的リストは前記表 3 に掲げる。後の実施例によってさらに例示されるように、T 2 ファミリーのメンバーである RNase

B 1 および RNase 6 PL は、イン・ビボおよびイン・ビトロアッセイによって測定して、抗増殖、抗コロニー化、抗分化および / または抗発生活性を有する。加えて、RNase B 1 および RNase 6 PL は、それをリボヌクレアーゼ活性がないようにするよう処置した場合でさえ、アクチンに結合することが示される。かくして、本発明は、それにより、当業者がそのアクチン結合、抗増殖、抗コロニー化、抗分化および / または抗発生活性について与えられたリボヌクレアーゼをテストすることができる 3 つの異なるアッセイを提供し、これらは、癌性細胞に対するテストされたリボヌクレアーゼの効果を測定するためのイン・ビトロアッセイ、腫瘍発生に対するテストされたリボヌクレアーゼの効果を測定するためのイン・ビボアッセイ、ならびに細胞および / または遊離アクチンに結合するテストされたリボヌクレアーゼの能力を測定するためのもう 1 つのイン・ビトロアッセイである。本発明をいずれかの理論によって制限することなく、アクチンに結合するリボヌクレアーゼの能力は、そのようなリボヌクレアーゼが抗増殖、抗コロニー化、抗分化および / または抗発生活性を有することを示すと考えられる。

#### 【 0144 】

本発明によるリボヌクレアーゼは、それ自体、あるいはそれが適当な担体または賦形剤と混合された医薬組成物において、ヒトまたはいずれかの他の哺乳動物等の生物に投与することができる。

#### 【 0145 】

本明細書中で使用される「医薬組成物」または「医薬」は、本明細書中に記載されるリボヌクレアーゼおよびそれをコードするポリヌクレオチドの 1 以上と、他の化学的成分 ( 例えば、生理学的に好適な担体および賦形剤 ) との調製物を示す。医薬組成物の目的は、治療される対象に対する化合物の投与を容易にすることである。

#### 【 0146 】

本明細書中において、用語「賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性な物質を示す。賦形剤の非限定的な例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖およびタイプのデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが含まれる。

#### 【 0147 】

医薬組成物はまた、限定されない、炎症性薬剤、抗菌剤、麻酔、癌治療剤などの 1 以上のさらなる有効成分を、主要な有効成分に加えて含むことができる。本発明の組成物と一緒に使用するのに好適な一般的に使用される追加の薬剤の詳細な説明は、以下に示される。

10

20

30

40

50

**【 0 1 4 8 】**

本発明の医薬組成物は、当該分野でよく知られている様々なプロセスによって、例えば、混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、研和、乳化、カプセル化、包括化または凍結乾燥の従来のプロセスによって製造することができる。

**【 0 1 4 9 】**

本発明に従って使用するための医薬組成物は有効成分を医薬として使用可能な製剤にする加工を容易にする賦形剤及び補助剤を含む一つ以上の生理学的に許容される担体を使用して従来のように配合されてもよい。適切な配合は選択された投与経路に依存する。

**【 0 1 5 0 】**

本発明を具体化することにおいて、アクチン結合活性を有する T 2 ファミリーのリボヌクレアーゼの有意な治療効果は、異常な細胞増殖および蓄積の多様なモデルにおいて、広く種々の投与手段を用いて明らかにされた。T 2 RNase の迅速な全身摂取および分配をもたらす腹腔内投与は、ヌードマウスにおける皮下腫瘍（実施例 9 および 13 、図 35 39 a ないし b 、および 64 ）、および腹腔内腫瘍（実施例 8 、図 33 a ないし d ）において、腫瘍成長および発生を抑制するにおいて効果的であることが判明した。T 2 RNase のなにより迅速な全身摂取をもたらす静脈内投与もまた、皮下異種移植片（実施例 13 、図 36 a ないし b ）、および静脈内腫瘍の遠隔（肺）転移拡大（実施例 8 、図 34 a ないし e ）を抑制し、治療するにおいて効果的なことが判明した。T 2 RNase での細胞の直接的投与、およびプレインキュベーションは、乳房癌腫（実施例 12 、表 6 ）、大腸癌腫（実施例 12 、表 6 ）、メラノーマ（実施例 12 、図 38 ）、イン・ビボでの脈管形成因子誘導脈管形成および微小血管密度（実施例 10 、図 37 ）、および植物（実施例 1 、図 8 および 9 、図 65 a ないし d ）およびヒト H U V E 細胞（実施例 7 、図 32 a ないし h 、 59 a ないし l および 63 a ないし o ）双方における細胞管形成での腫瘍成長の防止において効果的なことが判明した。T 2 RNase の経口投与は、マイクロカプセルの形態では、結腸腫瘍（ D M H モデル）誘導において初期に投与した場合、腫瘍成長、増殖、腫瘍サイズ、腫瘍血管形成および異常な陰窩病巣の数（実施例 4 、図 23 a ないし 23 c 、 24 a ないし 24 d 、および 25 a ないし 25 c ）を低下させるのに効果的なことが判明した。既によく発生した腫瘍を保有する動物への T 2 RNase の同様な経口投与は、消化プロセスおよび腸内送達されたと推定される低用量への RNase の暴露にかかわらず、ラットにおける結腸癌腫瘍の血管形成および悪性の度合いを低下させた（実施例 4 、図 27 c ）。組成物の効果的な腸放出をもたらすカプセル化方法は当該分野で良く知られており、その使用は、既に確立された腫瘍の場合には T 2 RNase の経口投与の有効性を増加させると予測されることが認識されよう。

**【 0 1 5 1 】**

かくして、投与を行うためには、本発明の医薬組成物は適当な医薬担体、および有効量の T 2 - RNase またはそれをコードするポリヌクレオチドを含み、例えば、局所、眼内、非経口、経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下、または当該分野で良く知られた方法を介するいずれかの他の効果的な手段によって投与される。

**【 0 1 5 2 】**

静脈内、筋肉内または皮下注射のためには、 T 2 - RNase またはそれをコードするポリヌクレオチドは、水性溶液、好ましくは、ハンクスの溶液、リングル液、または生理食塩水緩衝液等の生理学的に適合する緩衝液中に処方することができる。例えば、 T 2 - RNase またはそれをコードするポリヌクレオチドの有効量を含有する生理学的に適当な溶液を血液循環中に全身投与して、直接的に到達または解剖学的に摘出することができない癌または腫瘍を治療することができる。有効量の、 T 2 - RNase またはそれをコードするポリヌクレオチドを含有する生理学的に適当な溶液は、標的組織の腫瘍細胞を治療するのに有効な量にて針によって標的癌または腫瘍組織に直接的に注射することができる。

**【 0 1 5 3 】**

経粘膜投与の場合、浸透される障壁に適切な浸透剤が配合において使用される。そのよ

10

20

30

40

50

うな浸透剤は当該分野では一般に知られている。

**【0154】**

経口投与の場合、本発明の医薬組成物は、T2RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドを、当該分野でよく知られている医薬上許容される担体と組み合わせることによって容易に配合することができる。そのような担体により、T2RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドは、患者によって経口摂取される錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー剤、懸濁物などとして配合することができる。経口使用される薬学的調製物は、錠剤または糖衣錠コアを得るために、固体の賦形剤を使用し、得られた混合物を場合により粉碎し、そして所望する場合には好適な補助剤を添加した後、顆粒の混合物を加工して作製することができる。好適な賦形剤は、具体的には、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールを含む糖などの充填剤；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボメチルセルロースなど；および／またはポリビニルピロリドン（PVP）などの生理学的に許容されるポリマーである。所望する場合には、架橋型ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩（アルギン酸ナトリウムなど）などの崩壊剤を加えることができる。  
10

**【0155】**

糖衣錠コアには、好適なコーティングが施される。この目的のために、高濃度の糖溶液を使用することができ、この場合、糖溶液は、場合により、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含有し得る。色素または顔料が、活性な化合物の量を明らかにするために、または活性な化合物の量の種々の組合せを特徴づけるために、錠剤または糖衣錠コーティングに添加され得る。  
20

**【0156】**

経口使用され得る医薬組成物には、ゼラチンから作製されたプッシュ・フィット型カプセル、ならびにゼラチンおよび可塑剤（グリセロールまたはソルビトールなど）から作製された軟密閉カプセルが含まれる。プッシュ・フィット型カプセルは、充填剤（ラクトースなど）、結合剤（デンプンなど）、滑剤（タルクまたはステアリン酸マグネシウムなど）および場合により安定化剤と混合された有効成分を含有し得る。軟カプセルでは、T2RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドを好適な液体（脂肪油、流動パラフィンまたは液状のポリエチレングリコールなど）に溶解または懸濁させることができる。さらに、安定化剤を加えることができる。経口投与される配合物はすべて、選ばれた投与経路に好適な投薬形態でなければならない。  
30

**【0157】**

本発明の医薬組成物の経口送達は、胃腸管に存在するpHおよび酵素分解のため、成功しないであろう。かくして、そのような医薬組成物は、望ましくない環境を回避するように処方されなければならない。例えば、腸溶コーティングを経口固体処方に適用することができる。セルロースアセテートフタレート（CAP）、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート（HPMCP）およびアクリル樹脂等の酸性耐性特性を持つ物質は、ミクロカプセル化のための錠剤または顆粒をコーティングするのに最も一般に用いられる。好ましくは、湿式造粒を用いて腸溶被覆顆粒を調製し、有効成分およびコーティングの間の反応を回避する（Lin, S. Y. および Kawashima, Y. 1987, Pharmaceutical Research 4: 70-74）。溶媒蒸発方法を用いることができる。溶媒蒸発方法を用いて、糖尿病ラットに投与されるインスリンをカプセル化し、血中グルコース濃度を維持した（Lin, S. Y. ら、1986, Biomater, Medicine Device, Artificial Organ 13: 187-201 および Lin, S. Y. ら、1988, Biochemical Artificial Cells Artificial Organ 16: 815-828）。また、それを用いて、ウイルス抗原およびコンカナバリンA等の高分子量の生体物質をカプセル化  
40  
50

した (Maharaj, I. ら、1984, J. Pharmac. Sci. 73: 39-42)。

**【0158】**

口内投与の場合、本発明の医薬組成物は、従来の様式で配合された錠剤またはトローチの形態を取ることができる。

**【0159】**

直腸投与の場合、坐剤は当該分野でよく知られているように使用されることがある。

**【0160】**

吸入による投与の場合、本発明に従って使用される T 2 R N a s e またはそれをコードするポリヌクレオチドは、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素）の使用により加圧パックまたはネプライザーからのエアロゾルスプレー提示物の形態で都合よく送達される。加圧されたエアロゾルの場合、投薬量単位は、計量された量を送達するためのバルブを提供することによって決定され得る。吸入器または吹き入れ器で使用される、例えば、ゼラチン製のカプセルおよびカートリッジで、T 2 R N a s e またはそれをコードするポリヌクレオチドと好適な粉末基剤（ラクトースまたはデンプンなど）との粉末混合物を含有するカプセルおよびカートリッジを配合することができる。

**【0161】**

本発明の医薬組成物はまた、非経口投与、例えばボーラス注射または連続点滴のために配合されることがある。注射のための組成物は、単位用量形態（例えばアンプルまたは多用量コンテナ）で提供されることができ、これらには所望により保存剤が添加されている。組成物は懸濁物、溶液または油性もしくは水性ビヒクル中のエマルションであることができ、懸濁剤、安定化剤および／または分散剤の如き配合剤を含むことができる。

**【0162】**

非経口投与される医薬組成物には、水溶性形態における活性な調製物の水溶液が含まれる。さらに、T 2 R N a s e またはそれをコードするポリヌクレオチドの懸濁物を、適切なオイル状注射用懸濁物として調製することができる。好適な親油性の溶媒またはビヒクルには、脂肪油（ゴマ油など）、または合成脂肪酸エステル（オレイン酸エチルなど）、トリグリセリドまたはリポソームが含まれる。水性の注射用懸濁物は、懸濁物の粘度を増大させる物質、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールまたはデキストランなどを含有し得る。場合により、懸濁物はまた、高濃度の溶液の調製を可能にするために T 2 R N a s e またはそれをコードするポリヌクレオチドの溶解性を増大させる好適な安定化剤または薬剤を含有し得る。

**【0163】**

あるいは、T 2 R N a s e またはそれをコードするポリヌクレオチドは、使用前に好適なビヒクル（例えば、滅菌されたバイロジエン非含有水）を用いて構成される粉末形態にする。

**【0164】**

本発明の医薬組成物はまた、例えば、カ力オ脂または他のグリセリドなどの従来の座薬基剤を使用して、座薬または停留浣腸剤などの直腸用組成物に配合することができる。

**【0165】**

加えて、目、胃腸管、生殖泌尿器系管（例えば、泌尿器系膀胱）、肺および気管支系等のような、体腔に存在する癌または腫瘍は、針での直接的注射を介して、あるいは癌または腫瘍に罹患した中空器官に入れられたカテーテルまたは他の送達チューブを介して、有効量の T 2 - R N a s e またはそれをコードするポリヌクレオチドを含有する生理学的に適当な組成物（例えば、滅菌された、生理食塩水またはリン酸緩衝液、懸濁液、またはエマルジョン等の溶液）を受けることができる。X線、ソノグラム、またはファイバー光学可視化システムの等のいずれかの効果的なイメージングデバイスを用いて、標的組織を突き止め、それに近接する針またはカテーテルチューブをガイドすることができる。

**【0166】**

10

20

30

40

50

本発明の医薬組成物は浸透圧ミクロポンプによって送達することもできる。浸透圧ミクロポンプは体腔の1つに移植し、薬物は治療すべき組織に一定に放出される。この方法は、医薬組成物に対する免疫応答が経験された場合に特に有利である。この方法は、ONC ONASEで用いられてきた(Vasandani V.M.ら、1996, Cancer Res. 15; 56(18): 4180-6)。

#### 【0167】

別法として、かつ本発明のもう1つの好ましい実施形態によると、医薬上許容される担体は、T2-RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドを対象の哺乳動物細胞に送達することができる送達ビヒクルを含む。

#### 【0168】

蛋白質または核酸を腫瘍または癌細胞へ、またはその上へ標的化するための多数の送達ビヒクルおよび方法は当該分野で公知である。例えば、リポソームは、蛋白質または核酸を標的細胞へ送達するのに利用できる人工膜小胞である(Newton, A.C.およびHuestis, W.H., Biochemistry, 1988, 27: 4655-4659; Tanswell, A.K.ら、1990, Biophysica Acta, 1044: 269-274; ならびにCeccollo, J.ら、Journal of Investigative Dermatology, 1989, 93: 190-194)。かくして、T2-RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドは、リポソーム小胞で高い効率にてカプセル化し、哺乳動物細胞に送達することができる。加えて、T2-RNase蛋白質または核酸を、例えば、ここに引用して援用するLeeに対する米国特許第5925628号に記載されたように、ミセルを介して腫瘍または癌細胞を標的化するように送達することもできる。

10

#### 【0169】

T2-RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドをカプセル化したリポソームまたはミセルは、標的組織の異常に増殖する細胞を治療するのに有効な用量で、局所、眼内、非経口、鼻腔内、気管内、気管支内、筋肉内、皮下、またはいずれかの他の効果的な手段によって投与することができる。リポソームは、有効量のカプセル化されたT2-RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドを含有するいずれかの生理学的に適当な組成物にて投与することができる。

20

#### 【0170】

別法として、かつ本発明のもう1つの好ましい実施形態によると、送達ビヒクルは、限定されるものではないが、特異的細胞受容体またはマーカーに結合することができる抗体またはリガンドであり得る。抗体またはリガンドは適当なリンカーを介してT2-RNase蛋白質または核酸に直接的に連結させることができ、あるいは別法として、そのような抗体またはリガンドは、T2-RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドをカプセル化するリポソームの表面に供することができる。

30

#### 【0171】

例えば、T2-RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドは、当該分野で従前に記載されたように、特異的組織または細胞に標的化するために特異的膜蛋白質抗体またはリガンドと融合させることができる。この点に関し、リボヌクレアーゼAスーパーファミリーのRNaseと、トランスフェリン受容体に対する、またはT細胞抗原CD5に対する抗体との融合は、前記トキシンの各々に対する特異的受容体を保有する腫瘍細胞における蛋白質合成の阻害をもたらすことが認識される(Rydak, M.ら、1991, J. Biol. Chem. 266: 21202-21207およびNewton DL, ら、1997, Protein Eng. 10(4): 463-70)。

40

#### 【0172】

本発明に関連した使用のために好適な医薬組成物には、有効成分が、意図された目的を達成するために効果的な量で含有される組成物が含まれる。より具体的には、治療効果がある量は、処置されている対象の疾患の症状を防止、軽減または改善するために、あるいは、処置されている対象の生存を延ばすために効果的な有効成分の量を意味する。

50

**【0173】**

治療効果がある量の決定は、特に本明細書中に提供される詳細な開示に照らして、十分に当業者の範囲内である。

**【0174】**

本明細書中に記載される有効成分の毒性および治療効力は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法、例えば、対象の有効成分に対するIC<sub>50</sub>およびLC<sub>50</sub>（試験された動物の50%における死亡を引き起こす致死量）を決定することによって、明らかにすることができます。これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトへの使用のための投薬量範囲を定める際に使用することができる。投薬量は、用いられる投薬形態物および利用される投与経路に依存して変化し得る。正確な配合、投与経路および投薬量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選ぶことができる（例えば、Fingl他、1975、“The Pharmaceutical Basis of Therapeutics”（第1章、1頁）を参照のこと）。 10

**【0175】**

処置される状態の重篤度および応答性に依存して、投薬は徐放性組成物の単回投与が可能であり、処置の経過が、数日から数週間まで、あるいは、治癒が達成されるまで、または、疾患状態の縮小が達成されるまで続く。

**【0176】**

投与される組成物の量は、当然のことではあるが、処置されている対象、苦痛の重篤度、投与様式、主治医の判断などに依存する。 20

**【0177】**

本発明を具体化することにおいて、アクチン結合活性を有するT2 RNaseの投与は、TAXOL治療の抗腫瘍効率に対して相乗効果を有することが驚くべきことに発見された（実施例15、図46）。同様に、アクチン結合活性を有する組換えヒトRNase 6PLの投与は、マウスにおけるヒトLS174T異種移植片のTAXOL治療の抗腫瘍効率に対して相乗効果を有した（図64）。かくして、本発明のT2 RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドを用いて、単独で、あるいはそのような障害についての他の確立されたまたは実験的な治療方法と組み合わせた、異常な細胞運動性に関連する疾患または状態を治療することができる。かくして、本発明によると、癌の治療的措置を増強する方法が提供される。該方法は、治療的措置と組み合わせて、配列番号4に対して少なくとも85%相同であるアミノ酸配列を有するT2ファミリーのリボヌクレアーゼ、または該ヌクレアーゼをコードし、かつそれをイン・ビボで発現することができるポリヌクレオチドを、それを必要とする対象に投与することによって行われる。さらなる治療方法または組成物とのT2 RNase治療のそのような相乗活性は、そのような治療の有効臨床用量を大幅に低下させる能力を有し、それにより、しばしば破壊的な負の副作用および治療の高いコストを低下させることができることが認識されよう。 30

**【0178】**

本発明のT2 RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドとの組み合わせに適した癌の治療のための治療的養生法として、限定されるものではないが、化学療法、放射線療法、光療法および光動的療法、外科的処置、栄養療法、切除療法、組み合わせた放射線療法および化学療法、近接照射療法、プロトンビーム療法、免疫療法、細胞療法およびフォトンビーム放射線外科的療法が挙げられる。 40

**【0179】**

本発明の化合物と共に投与することができる抗癌薬物として、限定されるものではないが、アシビシン；アクラルビシン；アコダゾール塩酸塩；アクロニン；アドリアマイシン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタニン；アンボマイシン；アメタントロン酢酸塩；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスピラギナーゼ；アスペルリン；アザシチジン；アゼテバ；アゾトマイシン；バチマスタッフ；ベンゾデパ；ビカルタミド；ビスマントレン塩酸塩；ビスナフィドジメシレート；ビゼレシン；ブレオマイシン硫酸塩；ブレキナールナトリウム；ブロピリミン；ブルファ 50

ン；カクチノマイシン；カルステロン；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルムスチン；カルビシン塩酸塩；カルゼレシン；セデフィンゴル；クロラムブシリ；シロレマイシン；シスプラチン；クラドリビン；クリスナトールメシレート；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；ダウノルビシン塩酸塩；デシタビン；デキソルマプラチン；デザグアニン；デザグアニンメシレート；ジアジクオン；ドセタキセル；ドキソルビシン；ドキソルビシン塩酸塩；ドロロキシフェン；ドロロキシフェンクエン酸；ドロモスタノロンプロピオン酸塩；ドゥアゾマイシン；エダトレキセート；エフロルニチン塩酸塩；エルサニトルシン；エンロプラチン；エンプロメート；エピプロピジン；エビルビシン塩酸塩；エルブロゾル；エソルビシン塩酸塩；エストラムスチン；エストラムスチンリン酸ナトリウム；エタニダゾール；エトポシド；エトポシドリン酸塩；エトプリン；ファドロゾール塩酸塩；ファザラビン；フェンレチニド；フロクスリジン；フルダラビンリン酸塩；フルオロウラシル；フルロシタビン；foskodin；fosstriketil；ゲムシタビン；ゲムシタビン塩酸塩；ヒドロキシ尿素；イダルビシン塩酸塩；イフォスファミド；イルモフォシン；インターフェロン - 2a；インターフェロン - 2b；インターフェロン - n1；インターフェロン - n3；インターフェロン - Ia；インターフェロン - Ib；イプロプラチン；イリノテカン塩酸塩；ランレオチド酢酸塩；レトロゾール；ロイプロリド酢酸塩；リアゾゾール塩酸塩；ロメトレキソールナトリウム；ロムスチン；ロソキサントロン塩酸塩；マソプロコール；メイタンシン；メクロレタミン塩酸塩；メゲストロール酢酸塩；メレンゲストロール酢酸塩；メルファラン；メノガリル；メルカプトプリン；メトレキセート；メトレキセートナトリウム；メトプリン；メツレデパ；ニチンドミド；マイタルシン；マイタルミン；マイタルギン；マイタルシン；マイタルミン；マイタルマイシン；マイタルスペール；マイタルタン；マイタルサントロン塩酸塩；ニコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマプラチン；オキシスラン；パクリタキセル；ペガスパルガーゼ；ペリオマイシン；ペニタムスチン；ペプロマイシン硫酸塩；ペルフォスファミド；ピポプロマン；ピポスルファン；ピロキサントロン塩酸塩；ブリカマイシン；プロメスタン；ポルフィメールナトリウム；ポルフィロマイシン；ブレドニムスチン；プロカルバジン塩酸塩；ピューロマイシン；ピューロマイシン塩酸塩；ピラゾフリン；リボプリン；ログレチミド；サフィンゴール；サフィンゴール塩酸塩；セムスチン；シムトラゼン；スバルフォセートナトリウム；スバルソマイシン；スピロゲルマニウム塩酸塩；スピロムスチン；スピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプトゾシン；スロフェヌール；タリソマイシン；タキソール；テコガランナトリウム；テガフル；テロキサントロン塩酸塩；テモポルフィン；テニポシド；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテパ；チアゾフィリン；チラバザミン；トポテカン塩酸塩；トレミフェンクエン酸；トレストロン酢酸塩；トリシリビンリン酸塩；トリメトレキサート；トリメトレキサートグルクロン酸塩；トリプトレシン；ツブロゾール塩酸塩；ウラシルマスター；ウレデパ；バブレオチド；ベルテポルフィン；ビンプラスチン硫酸塩；ビンクリスチン硫酸塩；ビンデシン；ビンデシン硫酸塩；ビネビジン硫酸塩；ビングリシネット硫酸塩；ビンロイロシン硫酸塩；ビノレルビン酒石酸塩；ビンロシジン硫酸塩；ビンゾリジン硫酸塩；ベロゾール；ゼニプラチン；ジノスタチン；ゾルビシン塩酸塩が挙げられる。さらなる抗新生物剤として、GoodmanおよびGilmannの「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Eighth Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division) のChapter 52, Antineoplastic Agents (Paul CalabresiおよびBruce A. Chabner)、およびそれに対する緒言、1202-1263に開示されたものが挙げられる。

## 【0180】

本発明のT2 RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドと組み合わせて投与することができる抗炎症薬物として、限定されるものではないが、アルクロフェナック；アルクロメタゾンジプロピオン酸塩；アルゲストンアセトニド；アルファアミラーゼ；

アムシナファール；アムシナフィド；アムフェナックナトリウム；アミブリローズ塩酸塩；アナキンラ；アニロラック；アニトラザフェン；アパゾン；バルサラジドニナトリウム；ベンダザック；ベノキサプロフェン；ベンジダミン塩酸塩；プロメライン；プロペラモール；ブデソニド；カルプロフェン；シクロプロフェン；シンタゾン；クリプロフェン；クロベタゾールプロピオン酸塩；クロベタゾン酪酸塩；クロピラック；クロチカゾンプロピオン酸塩；コルメタゾン酢酸塩；コルトドキソン；デフラザコルト；デソニド；デソキシメタゾン；デキサメタゾン二プロピオン酸塩；ジクロフェナックカリウム；ジクロフェナックナトリウム；ジフロラゾン二酢酸塩；ジフルミドンナトリウム；ジフルニザール；ジフルプレドネート；ジフタロン；ジメチルスルホキシド；ドロシノニド；エンドリゾン；エンリモマブ；エノリカムナトリウム；エピリゾール；エトドラック；エトフェナメート；フェルビナック；フェナモール；フェンブフェン；フェンクロフェナック；フェンクロラック；フェンドザール；フェンピパロン；フェンチアザック；フラザロン；フルアザコルト；フルフェナム酸；フルミゾール；フルニゾリド酢酸塩；フルニキシン；フルニキシンメグルミン；フルオコルチンブチル；フルオロメトロン酢酸塩；フルクアゾン；フルルビプロフェン；フルレトフェン；フルチカゾンプロピオン酸塩；フラプロフェン；フルブフェン；ハルシノニド；ハロベタゾールプロピオン酸塩；ハロプレドン酢酸塩；イブフェナック；イブプロフェン；イブプロフェンアルミニウム；イブプロフェンピコノール；イロニダップ；インドメタシン；インドメタシンナトリウム；ヨードプロフェン；インドキソール；イントラゾール；イソフルプレドン酢酸塩；イソキセパック；イソキシカム；ケトプロフェン；ロフェミゾール塩酸塩；ロモキシカム；ロテプレドノールエタボネット；メクロフェナメートナトリウム；メクロフェナム酸；メクロリゾン二酪酸塩；メフェナム酸；メサラミン；メセクラゾン；メチルプレドニゾロンスレプタネット；モミフルメート；ナブメトン；ナプロキセン；ナプロキセンナトリウム；ナプロキソール；ニマゾン；オルサラジンナトリウム；オルゴテイン；オルパノキシン；オキサプロジン；オキシフェンブタゾン；パラニリン塩酸塩；ペントザンポリサルフェートナトリウム；フェンブタゾンナトリウムグリセレート；ピルフェニドン；ピロキシカム；ピロキシカムシンナメート；ピロキシカムオラミン；ピルプロフェン；プレドナゼート；プリフェロン；プロドリン酸；プロカゾン；プロキサゾール；プロキサゾールクエン酸塩；リメキソロン；ロマザリット；サルコレックス；サルナセジン；サルサレート；サンギナリウム塩化物；セクラゾン；セルメタシン；スドキシカム；スリンダック；スプロフェン；タルメタシン；タルニフルメート；タロサレート；テブフェロン；テニダップ；テニダップナトリウム；テノキシカム；テシカム；テシミド；テトリダミン；チオピナック；チキソコルトールピバリン酸塩；トルメチン；トルメチンナトリウム；トリクロニド；トリフルミデート；ジドメタシン；ゾメビラックナトリウムが挙げられる。

## 【0181】

既に前記で述べたように、本発明の態様によると、医薬組成物の有効成分は、T2-RNaseをコードするポリヌクレオチドである。

## 【0182】

本発明のこの態様によると、ポリヌクレオチドは医薬上許容される担体と共に哺乳動物細胞に導入され、その導入の結果、この細胞は遺伝子的に修飾され、T2-RNaseのそこでの発現が可能となる。

## 【0183】

最近、Aqua t i らは、HEY4およびSG10G卵巣腫瘍細胞系へのRNase 6PL cDNAのトランスフェクションはヌードマウスにおいて腫瘍形成性を抑制し、さらに、RNase 6PL cDNAでトランスフェクトされた、HEY4クローン、および色素性乾皮症DV40-不死化細胞系のクローンは、イン・ビトロでの成長の間に顕著な老化プロセスを発生することを示しており(Aqua t i ら, Oncogene. 2001 22; 20(8): 980-8)、かくして、T2 RNaseでのそのような遺伝的修飾の実現可能性を示す。

## 【0184】

10

20

30

40

50

本明細書中、および後の請求の範囲のセクションにおいて、用語「遺伝的修飾」とは、核酸を細胞に挿入するプロセスをいう。該挿入は、例えば、ウイルス感染、注入、トランスフェクション、粒子衝撃、あるいは核酸を細胞に導入するにおいて効果的ないずれかの他の手段によって行うことができ、そのうちいくつかは後にさらに詳細する。遺伝的修飾に続き、核酸は全てが、または部分的に細胞のゲノム（DNA）に組み込まれるか、あるいは細胞のゲノムに対して外部に留まり、それにより、安定に修飾された、または一過的に修飾された細胞を供する。

## 【0185】

従って、本発明のこの態様による医薬組成物は、遺伝子治療で使用することができる。

## 【0186】

本明細書において、用語「遺伝子治療」または「遺伝的治療」は相互交換的に用いられ、癌細胞等の増殖性細胞の安定なまたは一過的な遺伝的修飾がこの細胞の増殖の阻害をもたらす療法の方法をいう。そのGene Bank受託番号、および配列番号3によって表3中で確認されるポリヌクレオチドのいずれか1つは、本発明に従って、T2-RNaseをコードするポリヌクレオチドとして使用することができる。加えて、リストされたポリヌクレオチドに対して少なくとも40%以上相同である、および/または温和なおよび/またはストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でリストされたポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドも、T2-RNaseをコードするポリヌクレオチドとして使用することができ、但し、それによりコードされる蛋白質はT2-RNaseとして特徴付けられ、所望の活性を呈するものとする。さらに、そのようなポリヌクレオチドの部分、突然変異体キメラまたは対立遺伝子もまた、本発明に従って、T2-RNaseをコードするポリヌクレオチドとして使用することもできることが認識され、また、但し、そのようなポリヌクレオチドのそのような部分、突然変異体キメラまたは対立遺伝子は、所望の活性を呈するT2-RNaseをコードするものとする。

## 【0187】

T2-RNaseをコードする新規なポリヌクレオチドの単離もまた考えられる。そのような単離は、限定されるものではないが、ライプラリースクリーニング、ハイブリダイゼーション、PCR增幅、標識されたプライマー、標識された縮重プライマー等の当該分野で良く知られた方法を用いて行うことができる。ゲノムおよびcDNAポリヌクレオチドの双方は、かくして、使用することができる。

## 【0188】

本発明によるポリヌクレオチドは、当該分野で良く知られた方法を用い、ポリペプチドをコードするいずれかの他の蛋白質にイン・フレームで融合させて、融合された蛋白質をコードさせることができる。例えば、該ポリペプチドは、分泌のために、リーダー配列またはシグナルペプチドに融合させることができる。同様に、T2-RNase蛋白質は、当該分野で良く知られた方法を用い、他の蛋白質に融合（結合）させることができる。多くの方法は、蛋白質を含め、異なるタイプの分子を結合させる、または縮合（カップリング）させることができるが当該分野で知られている。これらの方法は本発明に従って用い、T2-RNaseをリガンドまたは抗体等の他の分子にカップリングさせ、それにより、特異的細胞型へのT2-RNaseの標的化および結合を助けることができる。蛋白質のいずれかの対を、当業者に知られたいずれかの結合方法を用い、一緒に結合または融合させることができる。蛋白質は、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシンイミジルとも呼ばれる)(「SDPD」)(Sigma, カタログ番号P-3415)、グルタルアルデヒド結合手法、またはカルボジイミド結合手法を用いて結合することができる。

## 【0189】

本発明の好ましい実施形態によると、該ポリヌクレオチドは、T2-RNaseコード配列に操作可能に連結した転写制御配列を保有する1以上のセグメントを含む。そのような転写制御配列として、限定されるものではないが、さらに後に詳細に記載されるプロモーターおよびエンハンサーを挙げることができる。これらの転写制御配列は、典型的には

10

20

30

40

50

、コーディング領域の上流に操作可能に連結され、その転写および／または翻訳を調節するにおいて機能する。

【0190】

本発明のもう1つの好ましい実施形態によると、T2-RNaseをコードするポリヌクレオチドは真核生物発現ベクター内に含まれる。用語「発現ベクター」とは、T2-RNaseをコードする配列、および転写制御配列を含み、かつ哺乳動物細胞内でT2-RNaseを発現することができる核酸配列をいう。

【0191】

哺乳動物遺伝子発現の目的で、DNA断片をベクターに挿入する多数の方法は当該分野で知られており、それを用いて、適当な転写／翻訳制御配列および所望のT2-RNaseポリヌクレオチド配列を含む、T2-RNaseコーディング遺伝子発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、イン・ビトロDNA組換えおよび合成技術、ならびにイン・ビオ遺伝子組換えを含むことができる。T2-RNaseをコードするポリヌクレオチドの発現は、T2-RNaseが組換えDNA分子で感染された、またはトランスフェクトされた宿主細胞で発現されるように、転写制御配列によって調節することができる。例えば、T2-RNaseの発現は、当該分野で公知のいずれかのプロモーター／エンハンサー要素によって制御することができる。プロモーター活性は組織特異的であってよく、または代謝産物または投与された物質によって誘導できるものであってよい。

【0192】

標的組織内でT2-RNase発現を制御するのに用いることができるプロモーター／エンハンサーとして、限定されるものではないが、天然RBプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター／エンハンサー(Karasuyama, H.ら、1989, J. Exp. Med., 169: 13)、ヒト-アクチンプロモーター(Gunning, P.ら、1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4831-4835)、マウス乳癌ウイルスロングターミナルリピート(HHTV-LTR)に存在するグルココルチコイド誘導性プロモーター(Klessig, D. F.ら、1984, Mon. Cell. Biol., 4: 1354-1362)、Holoneyネズミ白血病ウイルスのロングターミナルリピート配列(MULV-LTR)(Weiss, R.ら、1985, RNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)、SV40初期領域プロモーター(BernouistおよびChambon, 1981, Nature 290: 304-310)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)の3'ロングターミナルリピートに含まれるプロモーター(Yamamotoら、1980, Cell 22: 787-797)、単純疱疹ウイルス(HSV)チミジンキナーゼプロモーター／エンハンサー(Wagner, ら、1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 78: 1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinsterら、1982, Nature 296: 39-42)、アデノウイルスプロモーター(Yamadaら、1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82(11): 3567-71)、および単純疱疹ウイルスLATプロモーター(Wolfe, J. H.ら、1992, Nature Genetics, 1: 379-384)が挙げられる。

【0193】

腫瘍または癌細胞の遺伝子治療で用いられる哺乳動物宿主細胞に適合する発現ベクターとして、限定されるものではないが、例えば、米国特許第5174993号によって開示された、プラスミド、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、および非複製アビポックスウイルスが挙げられる。

【0194】

いくつかの方法を用いて、本発明のこの態様による発現ベクターを標的哺乳動物細胞に送達することができる。

10

20

30

40

50

**【 0 1 9 5 】**

例えば、生理学的に適當な溶液等の、かつ有効量の発現ベクターを含有する適當な医薬上許容される担体を局所、眼内、非経口、経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下またはいずれかの他の効果的な手段によって投与することができる。

**【 0 1 9 6 】**

有効量の発現ベクターを含有する生理学上適當な溶液は、血液循環系に全身投与することにより、直接的に到達できないか、あるいは解剖学的に単離することができない癌または腫瘍を治療することができる。

**【 0 1 9 7 】**

腫瘍塊を治療するには、有効量の発現ベクターを含有する生理学上適當な溶液を、針を介して、標的腫瘍塊の腫瘍細胞を治療するのに有効な量にて、標的腫瘍塊に直接的に注射することができる。 10

**【 0 1 9 8 】**

別法として、目、胃腸管、生殖泌尿器科管（例えば、泌尿器系膀胱）、肺、および気管支系等の体腔に存在する癌または腫瘍は、針での直接的注射を介して、または癌もしくは腫瘍に罹患した中空器官に入れられたカテーテルもしくは他の送達チューブを介して、有効量の発現ベクターを含有する生理学的に適當な組成物（例えば、発現ベクターを除いて滅菌された生理食塩水またはリン酸緩衝液等の溶液）を受けることができる。X線、ソノグラム、またはファイバー光学可視化システム等の効果的なイメージングデバイスを用いて、標的組織を突き止め、針またはカテーテルチューブをガイドすることができる。 20

**【 0 1 9 9 】**

「裸の」発現ベクターは、哺乳動物細胞によって活発に取り込むことができるので、もし該発現ベクターが適切にパッケージされ、またはカプセル化されれば、取り込みおよび標的化送達は増強されると認識されるであろう。

**【 0 2 0 0 】**

かくして、本発明のもう1つの好ましい実施形態によると、医薬上許容される担体は、標的化様式による哺乳動物細胞への発現ベクターの送達に適した送達ビヒクルを含む。

**【 0 2 0 1 】**

ウイルス発現ベクターは、感染または形質導入によって発現可能な形態で標的細胞へ送達ビヒクルによって導入することができる。そのような送達ビヒクルとして、限定されるものではないが、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスおよびアビポックスウイルスが挙げられる。ベクター構築体を標的細胞に導入することができ、かつ、その中で細胞増殖阻害量でT 2 - R N a s eを発現することができる送達ビヒクルは、前記したいずれかの効果的な方法によって投与することができる。 30

**【 0 2 0 2 】**

別法として、そのような送達ビヒクルとして、限定されるものではないが、前記したリポソーム、ミセル、抗体またはリガンドを挙げることができる。

**【 0 2 0 3 】**

本明細書に記載されたポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドを適當な医薬上許容される担体と混合することによって、哺乳動物の哺乳動物細胞の増殖を阻害するのに有用な医薬の調製で用いることができるることが認識されよう。 40

**【 0 2 0 4 】**

既に記載したように、T 2 - R N a s eをコードするポリヌクレオチドは、限定されるものではないが、T 2 - R N a s eを発現するのが知られた生物から単離されたm R N Aを增幅するためのT 2 - R N a s e特異的プライマーと共に逆転写P C Rを用い、あるいは適當な生物からT 2 - R N a s eをコードするD N A配列を直接的に単離して、T 2 - R N a s e特異的プライマーを用いるゲノムまたはc D N Aライブライアリースクリーニングのポリメラーゼ鎖反応（P C R）増幅を含めた種々の方法によって得ることができる。この場合、前記した方法を用いて、前記したT 2 - R N a s eの活性な形態のいずれかを単離し、または作成することもできることが認識されよう。 50

**【0205】**

次いで、精製されたポリヌクレオチドを適當な発現ベクターに挿入することができ、あるいは適當な転写制御配列を設け、前記したように調製することができる。

**【0206】**

以下の実施例セクションにさらに例示し、かつ前記したように、特異的T2-RNaseまたはそれをコードするポリヌクレオチドの効果を測定するアッセイもまた本発明の教示に従って提供される。そのようなアッセイは、例えば、増殖する細胞をT2-RNaseに曝露することによって、かつ対照の未処理細胞と比較した経時的なそれらの増殖挙動に従って行うことができる。このアッセイは、全て、T2ファミリーのRNase B1についてさらに本明細書で例示するように、いずれかの特別な適用のための最も優れたT2-RNaseを選択するのみならず、イン・ビボ実験中に、あるいは対象の治療の間に、最初の治療用量に移行させることができる用量応答を確立させるために使用することができる。このアッセイを用いて、抗増殖活性部位もしくは部分、またはT2-RNaseを測定し、あるいはリボ核酸分解活性を呈しない作製された、または単離された突然変異体の活性を測定することもできる。

10

**【0207】**

本発明のさらなる目的、利点および新規な特徴が、限定であることが意図されない下記の実施例を検討したとき、当業者には明らかになるだろう。加えて、本明細書中上記に描かれるような、また、下記の請求項の節において特許請求されるような本発明の様々な実施形態および態様のそれぞれは、実験的裏付けが下記の実施例において見出される。

20

**【実施例】****【0208】**

次に下記の実施例が参照されるが、下記の実施例は、上記の説明と一緒に、本発明を非限定様式で例示する。

**【0209】**

本願で使用される用語と、本発明で利用される実験方法には、分子学、生化学、微生物学及び組換えDNAの技法が広く含まれている。これらの技法は文献に詳細に説明されている。例えば以下の諸文献を参照されたい：「Molecular Cloning: A laboratory Manual」Sambrookら1989年；Ausubel, R.M.編1994年「Current Protocols in Molecular Biology」I~III巻；Ausubelら著1989年「Current Protocols in Molecular Biology」John Wiley and Sons, 米国メリーランド州バルチモア；Perbal著「A Practical Guide to Molecular Cloning」John Wiley & Sons, 米国ニューヨーク1988年；Watsonら、「Recombinant DNA」Scientific American Books、米国ニューヨーク；Birrenbawelら編「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、米国ニューヨーク1998年；米国特許の4666828号、4683202号、4801531号、5192659号及び5272057号に記載される方法；Cellis, J.E.編「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I~III巻1994年；Freshney, Wiley-Liss著、「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」(第3版)N.Y.(1994年)；Coligan, J.E.編「Current Protocols in Immunology」I~III巻1994年；Stitesら編「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、米国コネティカット州ノーウォーク1994年；MisraとShiigi編「Selected Methods in Cellular Immunology」、W.H. Freeman and Co.、米国ニューヨーク1980年

30

40

50

；また利用可能な免疫検定法は、例えば以下の特許と科学文献に広範囲にわたって記載されている：米国特許の3791932号、3839153号、3850752号、3850578号、3853987号、3867517号、3879262号、3901654号、3935074号、3984533号、3996345号、4034074号、4098876号、4879219号、5011771号及び5281521号；Gait, M. J. 編「Oligonucleotide Synthesis」1984年；Hames, B. D. 及び Higgins S. J. 編「Nucleic Acid Hybridization」1985年；Hames, B. D. 及び Higgins S. J. 編「Transcription and Translation」1984年；Freshney, R. I. 編「Animal Cell Culture」1986年；「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press 1986年；Perbal, B. 著「A Practical Guide to Molecular Cloning」1984年及び「Methods in Enzymology」1~317巻、Academic Press；「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、米国カリフォルニア州サンディエゴ1990年；Marshakら、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」、CSHL Press、1996年；なお、これらの文献類は、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである。その外の一般的な文献は、本明細書を通じて提供される。本明細書に記載の方法は当業分野で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。本明細書に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。20

#### 【0210】

##### 実施例1

*Aspergillus niger* B1 RNaseの特徴付け、および果実樹木における花粉管成長に対するその阻害効果

##### 材料および方法

###### *A. niger* 細胞外RNaseの調製および精製

*Aspergillus niger* B1(CMI CC 324626)を、1% (w/v) 小麦粉および0.05% (w/v) 硫酸アンモニウムを含有する液体培養中で成長させた。混合物を塩酸でpH 3.5に調整し、オートクレーブ処理した。約10<sup>6</sup>胞子の接種物を100mlの培地に懸濁させ、オービタルシェーカー中30°にて200rpmで100時間インキュベートした。成長培地を0.2μm膜を通して、10容量の2mM酢酸ナトリウムpH 6に対して3回透析した。2リットルの透析した溶液を、20mM酢酸ナトリウムpH 6で平衡化したFrac t o g e l EMD-TMAE 650(M)26-10(Merck)カラムに負荷した。結合した蛋白質を、5ml/分の高速蛋白質液体クロマトグラフィー(FPLC)システム(Pharmacia)を用い、同一緩衝液中の0ないし1.0M塩化ナトリウムの500ml直線グラジエントで溶出させた。最高のRNase活性を呈する画分をプールし、2mM酢酸ナトリウムpH 6に対して透析し、20mM酢酸ナトリウムpH 6で平衡化したMONO-Q 5/5 HR(Pharmacia)カラムに50mlアリコットを負荷した。10mlの0ないし1.0M塩グラジエントのみを1ml/分の流速で用いた以外は、溶出はEMD-TMAEカラムでのように行つた。精製された*A. niger* RNase B1を用いて、RNase B1についての全長ゲノム(配列番号15)配列、およびコードされたB1蛋白質に対応するより短いコーディング領域(配列番号16)を決定した。40

#### 【0211】

蛋白質は280nmでモニターし、標準としてウシ血清アルブミン(BSA)を用い、Bradford(Bradford, M.M. 1976. Anal. Biochem. 72: 248-245)に従つて測定した。種々の画分を、12.5%ドデシル硫酸ナト50

リウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) (Laemmeli, U. K. 1970. Nature 227: 680 - 685) によって分析した。RNase活性は従前に記載されているように測定した (RoizおよびShoseyov 1995, Int. J. Plant Sci. 156: 37 - 41)。

#### 【0212】

精製されたRNase B1は、Broothaertsらによって記載された手法に従って酵素により脱グリコシル化した (Broothaerts, W. p. ら、1991. Sex. Plant Reprod. 4: 258 - 266)。該酵素を0.5% (w/v) SDSおよび5% (w/v) -メルカプトエタノールと混合し、100にて5分間加熱した。一旦冷却すれば、反応混合物を50 mMリン酸ナトリウムpH 7.5、25 mM EDTA、1% (w/v) トリトンX-100および0.02% (w/v) アジ化ナトリウムを含有する緩衝液で2.5倍希釈した。ペプチド-N-グリコシダーゼF (PNGase F, Boehringer, Mannheim) を20ユニット/mlの最終濃度まで加え、インキュベーションを37にて一晩行った。次いで、試料を試料適応緩衝液と混合し、100にて5分間加熱し、12.5%ゲルを用いてSDS-PAGEによって分析した。

#### 【0213】

##### RNaseアッセイ

50および12 mMリン酸 - クエン酸緩衝液を用いて確立された、10増分の20ないし100の温度の範囲、および0.5 pHユニックト増分の2.5ないし7のpHの範囲を用い、BrownおよびHoからの改変された手法に従って、RNase活性についての最適条件を決定した (Brown, P. H. およびHo, T. H. D. 1986. Plant Physiol. 82: 801 - 806)。10 μlの試料を各々、4 mg/ml酵母RNA (Sigma) を含有する490 μlの氷冷緩衝液に加えた。各試料の半分を、25% (w/v) 過塩素酸中の50 μlの0.75% (w/v) 硫酸ウラニルを含有する停止溶液を直ちに加えることによって、ブランクとして用いた。残りの半分は10分間インキュベートし、それに続いて、50 μlの停止溶液を各々に加えた。15000 × gにおける5分間の遠心分離に続き、上清を蒸留水で20倍希釈し、吸光度を260 nmで測定した。RNase活性の1ユニックトは、1分当たり1のA.U<sub>260 nm</sub>の速度で可溶性ヌクレオチドを放出する酵素の量と決定した。

#### 【0214】

RNase B1は、従前に記載されているように活性ゲルによって可視化した (RoizおよびShoseyov, 1995, Int. J. Plant Sci. 156: 37 - 41)。RNase B1を含有するSDSゲルは、25% (v/v) イソ-プロパノールを含有するpH 3.5の20 mM酢酸緩衝液で各々15分間2回、次いで、緩衝液単独で各々15分間2回洗浄することによって再生した。RNase B-1を含有する再生されたゲルを、20 mM酢酸緩衝液中に0.1% RNAおよび0.8% アガロースを含有するプレート上に置き、37にて30分間インキュベートした。次いで、ゲルを取り出し、アガロースプレートを水中で0.02% (w/v) トルイジンブルーで染色して、RNase活性を可視化した。

#### 【0215】

RNaseの比活性は定量的なアッセイによって評価する：既知の蛋白質濃度の、増大させる容量のT2 RNaseのストック溶液を、前記したようにリボ核酸分解活性について分光学的にアッセイし、得られた値をmgまたはμg蛋白質当たりのRNase活性のユニックトとして表す。

#### 【0216】

##### 花粉管成長に対するRNase B1の効果

桃cv. Almond花粉を従前に記載されているように液体培養中でイン・ビトロにて発芽させた (RoizおよびShoseyov, 1995, Int. J. Plant Sci. 156: 37 - 41)。花粉粒を、100 μlの15% (w/v) スクロース、1

10

20

30

40

50

0.0 μg / ml ホウ酸、2.00 μg / ml 硫酸マグネシウム、2.00 μg / ml 硝酸カルシウム、および種々の濃度のRNase B1を含有するアリコットに懸濁させた。暗いチャンバー中の2.5における一晩のインキュベーションに続き、発芽パーセンテージを記録した。花粉管の長さを接眼レンズマイクロメーターで調べた。

#### 【0217】

花粉管成長に対するRNase B1処理の効果もイン・ビボでテストした。桃およびタンジェリン(*Citrus reticulata*, Blanco cv. Murcott)の完全な花に、pH 3.5の2.0 mM クエン酸緩衝液中の100 ユニット / ml RNase B1で開花期の初期段階に噴霧した。各種において、異なる枝にある同段階のさらなる花に緩衝液単独で噴霧したか、対照として未処理のままとした。4.8 時間の開放受粉への曝露に続き、花柱を3:1の酢酸 - エタノール(容量)中で2.4時間固定し、蒸留水で洗浄し、8 M 水酸化ナトリウム中で一晩吸収させた。蒸留水中での徹底的な洗浄に続き、花柱を縦方向に切断し、スライド上の0.1 M リン酸カリウム中の0.1% (w/v) アニリンブルーの液滴中に各々浸漬し、カバーグラスで注意深く漬した。花粉管を落射蛍光顕微鏡によって観察した(WIBキューブを備えたOlympus BX40)。

#### 【0218】

着果に対するRNase B1の効果

屋外実験はネクタリン(*Prunus persica* var. *Nectarina Fantasia*)において行った。ほぼ10%開いた花をつけた3.0ないし4.0 cm 長の枝に、2.0 mM クエン酸緩衝液 pH 3.5 および 0.025% トリトン-X 1.00 中の異なる濃度のRNase B1を噴霧した。未処理の枝、ならびに緩衝液およびトリトン-X 1.00 のみを噴霧した枝を対照として供した。枝に、開花期間(14日)の間、2ないし3日間隔で噴霧した。1ヶ月後、枝当たりの果実の数を調べた。生存性テストでは、種子を胚を通じて縦方向に切断し、水中の1% 塩化2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムに暗室中で2.0にて4時間浸漬した。赤色の染色は生きた組織を示した。

#### 【0219】

実験結果

RNase B1の精製および特徴付け

液体培養で成長した*A. niger* は、かなりの量の細胞外RNase B1を生じた。6.0 の温度および3.5のpHはRNase活性で最適なことが判明し、引き続いてのRNaseアッセイのための標準的条件として採用した。

#### 【0220】

RNase B1精製は3つの工程を含んだ(表4)。最初の工程において、1.000 ユニット / ml および 0.05 mg / ml 蛋白質を含有する粗製濾液を得た。粗製濾液をEMD-TMAEカラムに通し、プールされた活性な画分(図1、グラフA)は0.1 mg / ml 蛋白質を含有し、RNase活性は4.0000 ユニット / ml であった。最後の工程において、プールされた画分をMONO-Qカラムに通し、活性なRNase画分を溶出した(図1、グラフB)。この画分は、1.05 μg / ml の蛋白質濃度、および543.000 ユニット / ml のRNase活性を含んだ。4.0 および 3.2 kDa の2つの主要な蛋白質バンドが、精製されたRNase B1画分のSDS-PAGEの後に観察された(図2)。RNase活性ゲルは、3.2 および 4.0 kDa 蛋白質に対応する活性なバンドを示した。PNGase Fに付した場合、単一の蛋白質バンドが2.9 kDa に出現した。RNase活性はPNGase消化後に保持した(図示せず)。

表 4

精製工程	合計 ユニット	蛋白質濃度 (mg/ml)	回収 (%)	比活性 (ユニット/ mg 蛋白質)
粗製濾液	2,000,000	0.05	100	20,000
EMD-TMAE カラム	1,120,000	0.1	56	400,000
MONO-Q カラム	652,200	1.05	32.6	517,143

10

## 【0221】

## 花粉管および着果に対する RNase B1 の効果

イン・ビトロ実験において、対照花粉粒の 75 % は発芽し、花粉管は長さが約 0 . 5 mm に到達した。RNase B1 の成長培地への添加は、用量応答様式で、発芽のパーセンテージおよび花粉管の長さを低下させた(図3)。RNase B1 は顕著な阻害効果、すなわち、0 . 1 µg / ml 蛋白質を表す 50 ユニット / ml を有し、致命的であり、他方、125 µg / ml の BSA は花粉発芽性および管成長の半分のみを低下させた。

## 【0222】

イン・ビトロにて桃の対照花粉管は、受粉から 48 時間後に花柱に向けられた柱頭組織を通って成長するのが観察された(図4a)。同様な効果が緩衝液のみで処理した花柱で観察された。対照的に、RNase B1 で処理した柱頭で発芽した花粉粒は短い花粉管を生じ、これはいずれの成長方位も欠くように見え、花柱組織に進入できなかった(図4b)。タンジェリンにおいては、その直径が 2 ないし 3 mm である柱頭組織の小さな割合のみが、顕微鏡の観察視野によって捕えられた。従って、少数の花粉管のみが図5に示すように観察された。しかしながら、対照花粉管の正常な成長(図5a)およびRNase 処理花粉管の不規則な成長(図5b)の間の差ははっきりと明らかであった。

20

## 【0223】

ネクタリン cv. Fantasiaにおいては、RNase B1 は着果の低下を引き起こした(表5)。トリトン X - 100 を含む緩衝液を噴霧したまたは未処理のままであった枝においては、着果は、各々、48 . 3 % および 36 . 3 % であった。低い pH の緩衝液は着果に対して阻害効果を有するように見えたが、RNase B1 の 500 および 1000 ユニット / ml で処理した枝は、各々、23 . 3 % および 18 . 4 % の果実を結び、これは、用量依存様式において、RNase の有意な間引き効果を示した。

30

表 5

処理	花(合計数)	着果 (%)
未処理の対照	169	48.3 a*
対照緩衝液	143	36.3 ab
500 ユニット / ml RNase B1	148	23.3 bc
1000 ユニット / ml RNase B1	106	18.4 c

40

\* 共通の文字を有しない値は P = 0 . 05 にて有意に異なる。

## 【0224】

RNase B1 処理枝においては、多くの発生しなかった小果実が観察された。生存性テストは、対照花(未処理であるか、または緩衝液のみを噴霧)においては、胚組織は赤色に染色され(図6a)、他方、RNase 处理花で発生した胚の組織は茶色に染色され、これは壞死を示した(図6b)。

## 【0225】

Aspergillus niger B1 細胞外 RNase (RNase B1) を

50

均一になるまで精製した。それは32および40kDa糖蛋白質の2つのイソ形態を含有し、29kDa蛋白質コアを有することが判明した。最適なRNase活性は60の温度および3.5のpHで観察された。桃(*Prunus persica* cv. Almog)およびタンジェリン(*Citrus reticulata*, Blanco cv. Murcott)においては、酵素は花粉発芽および管成長をイン・ビトロならびにイン・ビボで阻害した。屋外試験においては、RNaseはネクタリン(*Prunus persica* var. nectarina Fantasia)着果の低下を引き起こし、正常な胚の発生を阻害した。

## 【0226】

## 実施例2

10

T2-RNaseによる花粉発芽および管成長の阻害は、アクチンとの相互作用を通じて媒介される。

RNaseによる花粉発芽および管成長の阻害はよく認識されているが、この酵素が伸長プロセスに干渉するメカニズムが依然として不明確である。従って、この研究は、花粉管の伸長プロセスに干渉するにおけるRNase B1の役割を解明するように設定される。

## 【0227】

## 材料および実験方法

## 花粉管成長に対するRNase B1の効果

ユリ(*Lilium grandiflorum* L. cv. Osnat)の薬を室温にて24時間裂開させ、次いで、新たに用いるか、または-20で貯蔵した。RNase B1を実施例1に記載されたように、*Aspergillus niger*成長培地濾液から生産し精製した。花粉を、イン・ビトロにて各々、水中に7%スクロース、1.27 mM CaNO<sub>3</sub>、0.16 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、1 mM K<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>および3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を含有する100 μlの水性培養で発芽させた(YokotaおよびShimmen 1994)。いくつかの培養は、16 μg/mlの最終蛋白質濃度まで100ユニット/mlのRNase活性を有するRNase B1を補充した。さらなる培養は、活性の50%の喪失を生じさせるように従前に30分間沸騰させたRNase、あるいはいかなる触媒活性も欠くオートクレーブ処理したRNaseを補充した。暗所での25

における2時間のインキュベーションの後、顕微鏡接眼レンズマイクロメータ下で花粉管の長さを測定した。花粉管を、IKI(水中の0.3%I<sub>2</sub>および1.5%KI)で染色して澱粉体(アミノロプラスチ)を検出するか、又はDio<sub>6</sub>で染色してミトコンドリアを検出した。

## 【0228】

活発に伸びる1時間花粉管を顕微鏡ステージ上のガラス細胞に移した。花粉管成長パターンおよびオルガネラの運動を、Applitec MSV-800ビデオプレゼンターを用い、Heslop-HarrisonおよびHeslop-Harrison(Heslop-Harrison, J.およびHeslop-Harrison, Y. 1990. Sex Plant Reprod. 3: 187-194)を改変してビデオ記録した。イメージはScion LG-3フレームグラバーによって8秒間0.8フレーム/秒で捕獲し、次いで、NIHイメージソフトウェアによってデジタル化し、統合させた。写真は、Adobe Photoshop(Adobe Systems Inc., Mountain View, CA)およびPower-Point(Microsoft Co.)ソフトウェアを用いて処理した。

## 【0229】

## 花粉管アクチンフィラメントに対するRNaseの効果

花粉は、イン・ビトロにて、RNaseを含むまたは含まない水性培養で発芽させた。一晩のインキュベーションに続き、花粉管を温和にペレット化し、成長培地を、PBST緩衝液(150 mM NaCl、3 mM KCl、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>および0.02%Tween-20)中の10<sup>-6</sup> Mテトラメチルローダミ

20

30

40

50

ン B イソチオシアネート (TRITC) - 標識ファロイジン (Sigma) で置き換えた。イン・ビトロ観察のために、ユリ cv. Star gazer 花を開花の開始において除雄し、100 ユニット / ml の RNase を含有する 0.5 ml の成長培地を柱頭を通じて花柱管に注入した。RNase を含まない成長培地が注入された花を対照として用いた。液体を 25 ℃ にて 5 時間花柱組織に吸収させ、それに続いて、柱頭にユリ cv. Orient 花粉を手で受粉させた。25 ℃ における 48 時間のインキュベーションに続き、各雌しべを縦方向に切断し、花粉管を注意深く切り出し、TRITC - PBS 溶液中に取り出し、1 時間インキュベートした。柱頭における切開は花粉管に影響しなかった。というのは、その生きたプロトプラストがカロースプラグによって保護された末端部分に位置したからである。イン・ビトロおよびイン・ビボの双方の実験において、染色された花粉管を TBS (Tween-20 を欠く PBS) で灌ぎ、スライドグラス上に置き、落射蛍光顕微鏡 (USH-102D 水銀灯を備えた Olympus BX40) で観察した。  
10

#### 【0230】

##### アクチンの RNase B1 への結合

RNase B1 およびアクチンの間の相互作用は、Simm (Simm, F. C.ら、1987. Eur. J. Biochem. 166: 49-54) から改変されたように定量した。ウサギ筋肉グロブ (G-) アクチン (Sigma Co.) を、室温にて 30 分間、緩衝液 F (10 mM Tris pH 8, 0.1 mM ATP, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>、0.1 M KCl および 2 mM MgCl<sub>2</sub>) 中でフィラメント状 (F-) アクチンへ重合した。各々 30 μM の F- アクチンを含有する 50 μl の試料を 1 ないし 33 μM の RNase B1 と共に 4 ℃ にて一晩インキュベートした。対照として、各濃度の RNase を緩衝液 F 単独と共にインキュベートした。試料を 15000 g において 40 分間遠心分離し、上清の RNase 活性を測定した (Roiz, L. Goren, R. および Shoseyov, O. 1995, Physiol. Plant. 94: 585-590)。  
20

#### 【0231】

##### 花粉管上での RNase B1 のイムノゴールド銀染色

イムノゴールド銀染色 (IGSS) を用いてユリ花粉管への RNase 付着を検出した。ポリクローナル抗体をウサギにおいて RNase B1 に対して惹起させた (Aminolab, Rehovot, Israel)。イン・ビトロで 2 時間のユリ花粉管を PBS 中の 2.5% グルタルアルデヒドで 4 ℃ にて一晩固定した。花粉管を PBS 中で 1 時間洗浄し、1% BSA および 2% スキムミルクを含有する PBS 中で 1 時間ブロックし、PBS 中に 1:500 希釈した抗 RNase B1 中で 1 時間インキュベートした。ウサギ免疫前血清 (PIS) を対照として用いた。花粉管を各々 PBS 中で 10 分間 3 回洗浄し、次いで、PBS 中に 1:100 希釈した 5 nm 金粒子と結合したヤギ抗ウサギ IgG 中で 1 時間インキュベートした。PBS 中での 2 回の 10 分の洗浄および水中での 1 回の 10 分の洗浄の後、銀 - 染色キット (BioCell Research Laboratories) を反応の最終発色で用いた。花粉管を組合せキット溶液中に 10 ないし 15 分間浸漬させ、過剰の蒸留水中で洗浄し、光学顕微鏡下で観察した (Olympus BX40)。  
30

#### 【0232】

##### 実験結果

RNase を含まない成長培地中でイン・ビトロにて発芽したユリの花粉管の対照試料は、長さが約 300 μm に到達した。同一条件下で RNase で処理した培養は、長さが 160 μm までにしか到達しなかった。RNase の煮沸またはオートクレープ処理は、各々、長さが 130 および 170 μm の花粉管を生じた。花粉管の 3 つの RNase 処理群の間の差は、有意でないと見なされた。  
40

#### 【0233】

澱粉染色は、対照試料のアミロプラストが、先端ゾーンを除いて、花粉管に沿って拡大するのが観察された (図 8a および 65b)。他方、RNase 処理花粉管においては、  
50

I K I で染色された体は先端ゾーンに蓄積した(図8 b および65 a )。D i O<sub>6</sub> 染色は、ミトコンドリアが対照花粉管先端には存在せず、RNase 处理の後に先端に蓄積することを示した(図65 c およびd )。

#### 【0234】

活発に拡大する花粉管の統合されたビデオイメージは、細胞質流れ線を呈した(図9 a および9 b )。対照試料においては、管周囲における求頂的な流れ、および中央における求基的な流れのように、正常な花粉管発生に特徴的な連続的縦方向運動が最も普通であり、先端ゾーン直下に「逆泉」パターンを形成する(図9 a )。先端ゾーンそれ自体は、かなり小さな体、主としてP - 粒子によって占められ、その運動パターンは殆ど観察されなかった。RNase 阻害花粉管においては、アクチンフェラメントアセンブリーの破壊は明らかである。成長の止まった成長先端は膨潤しているように見え、よく見える澱粉および脂質粒子は先端ゾーンに到達していた(図9 b )。連続的運動は検出できなかつたが、その代わり、拡大した不規則なイメージは、ランダムに回転する細胞質体を示した。

#### 【0235】

アクチンフェラメントの分布に対するRNase の効果を、1時間のイン・ビトロおよび48時間のイン・ビボ花粉管で調べた。イン・ビボ花粉管は約3ないし4 cm の長さに到達し、それらのTRITC - ファロイジン染色はイン・ビトロ管におけるよりも強かつた。しかしながら、RNase 効果の態様は双方の実験において同様であった。対照において、アクチンミクロフェラメントは管軸に沿って縦方向にアセンブルされ、先端ゾーンにおいて微細なネットワークを形成した(図10 a )。他方、RNase 处理花粉管においては、F - アクチンの塊は先端細胞壁に蓄積した(図10 b )。

#### 【0236】

RNase B1 およびアクチン間の相互作用は、Scatchard 分析を用いて定量した。アクチン - RNase B1 結合実験においては、0.45において横軸と交わる回帰線(図11)は、RNase : アクチンのモル比は0.45であることを示し、これは、2つのアクチン分子が各RNase 分子に結合することを示唆する。

#### 【0237】

RNase B1 の存在下で発現した花粉は光学顕微鏡用に準備し、抗RNase 抗体を用いてIGSS によってRNase の位置を測定した(図12 a ないし c )。RNase なしに(図12 a )、またはRNase があるが、PISで処理して(図12 b )成長させた花粉管において、細胞壁外部表面は銀染色を欠いた。他方、RNase B1 で処理した花粉管においては、明瞭なイムノゴールド銀染色が出現し、先端ゾーンに蓄積した(図12 c )。

#### 【0238】

この研究においては、ユリ(Lilium grandiflorum)花粉発芽および管伸長が、A. niger RNase B1 によって特に阻害された。元の触媒活性の90ないし100%を欠く煮沸したまたはオートクレーブ処理したRNase は、同様な阻害効果を示した。結果は、A. niger RNase が、花粉管伸長に対するT2

RNase の阻害効果に明らかに関連したアクチン結合活性を有する蛋白質であることを示す。RNase B1 の触媒活性に関連しないこのアクチン結合活性は、花粉管アクチンフェラメントの配置を変更し、それにより、細胞質のストリーミング、細胞運動性および成長を破壊する。

#### 【0239】

これらの結果は、T2 RNase が花粉管成長の効果的な阻害剤であることを示し、花粉管F - アクチン細胞骨格ネットワークの構造に干渉することを示す。対照花粉管において、ビデオ - イメージ、ヨウ素およびD i O C<sub>6</sub> 染色は、花粉管に沿っての正常な細胞質ストリーミング、および見掛けの細胞内帯状分布を示した。TRITC - 染色は、管に沿って平行束上に、および先端ゾーンにおけるデリケートなメッシュワークにて配置されたアクチンフェラメントを示した。対照的に、T2 RNase 阻害花粉管は、方向付けされた細胞質ストリーミングの喪失によって、および先端に向けてのF - アクチンネット

10

20

30

40

50

ワークの突然の崩壊によって特徴付けられた。

【0240】

もし花粉管成長の阻止が、厳格に、RNA分解および蛋白質生合成枯渇の結果であれば、RNase活性を欠く不活化されたT2 RNaseは効果的でないであろう。しかしながら、T2 RNaseは、そのRNase活性にも拘らず、花粉管成長を阻害することが判明した。さらに、活発に成長する花粉管においては、T2 RNaseの添加は、数秒でオルガネラ運動の破壊をもたらし、これは、蛋白質合成の徐々にというよりは直接的な阻害を示唆する。さらに、T2 RNase処理ユリ花粉管は、数時間のオルガネラの強い回転を維持し、これは、生存性の低下がないことを示す。先端成長細胞に対するF-アクチンフィラメント破壊の阻害効果を示す他の研究は、正常なアクチン重合が花粉管成長に必須であることを示した。かくして、単一の仮定に限定されることを意図しないが、これらの結果は、(RNase分解を介するよりはむしろ) F-アクチン変調を介して花粉管成長を阻害するT2 RNaseの能力が、花粉管成長阻害の主な原因であることを示唆する。

【0241】

実施例3

ヒト結腸癌細胞に対するRNase B1の効果

花粉管におけるRNase B-1について発見されたアクチン結合活性は可能な細胞傷害性活性にヒントとなったので、ヒト結腸癌細胞に対するRNase B1の細胞傷害性効果を調べることを決定した。

10

20

【0242】

材料および実験方法および結果

細胞培養

全ての実験はイン・ビトロで行った。ヒト結腸腺癌(HT29)細胞を、10%胎児子ウシ血清、1%グルタミンおよび10%抗生物質・抗真菌溶液(Biolab)を補充したDMEM培地(Biological Industries, Bet Haemek)中で成長させた。細胞を、5%CO<sub>2</sub>を含有する加湿雰囲気中にて37度でインキュベートした。RNase B1溶液はPBS緩衝液、pH 6.8中で作成した。

【0243】

予備的細胞生存性アッセイ

30

細胞を50mlフラスコでインキュベートした。各フラスコは、異なる濃度(10<sup>-8</sup>ないし10<sup>-6</sup>M)のRNase B1の非存在または存在下、7ml培地中に2×10<sup>5</sup>細胞を含有した。細胞を48時間または72時間成長させ、次いで、生存および非生存細胞をトリパンブルー染色を用いて別々にカウントした。

全ての処理において、72時間成長させた細胞の合計数(55ないし60×10<sup>5</sup>)は、48時間の培養後に得られた細胞の数(25ないし30×10<sup>5</sup>)を約2倍だけ超えた(図13a)。成長培地中でのRNase B1の存在は、細胞成長に対して有意な効果を有しなかった。しかしながら、死滅した細胞の数に対するRNase B1の小さいが有意な効果が、48時間および72時間のインキュベーション双方において見出された(図13b)。

40

【0244】

クローン原性アッセイI

腫瘍細胞の長期間生存は、クローンを分裂させ、生産するそれらの能力によって測定する。細胞を、10<sup>-6</sup>M RNase B1を含有する成長培地中で48時間プレインキュベートし、次いで、トリプシン処理し、洗浄し、そしてRNase B1を欠く成長培地に再懸濁させた。96ウェルマイクロタイヤプレートに平板培養するに先立ち、細胞を、各ウェル(200ml)中50ないし10<sup>5</sup>細胞の間の範囲に系列5倍希釈に希釈した。プレートを、新鮮な成長培地を加えることなく、前記した条件で14日間インキュベートし、その後、コロニーを固定し、メチレンブルーで染色した。各ウェル中のクローン原性細胞を、クローン可視化に統一してナンバリングした。RNase B1を欠く培地中

50

で最初の48時間プレインキュベートした以外は、対照細胞を前記したように処理した。

#### 【0245】

双方の処理において、同様な数のコロニーが、100細胞を平板培養したウェルで観察された(図14)。RNase B1の細胞傷害性効果は、より高い密度の細胞を含有するウェルで出現した。各々500細胞で平板培養したウェルにおいて、対照およびRNase B1処理細胞は、各々ウェル当たり180および100コロニーを生じた。さらに、各々1000細胞で平板培養したウェルにおいて、RNase B1処理細胞はウェル当たり約250コロニーを形成し、他方、対照細胞は、連續層に融合した多数のコロニーを形成し、かくして、図14でカウントおよび説明することができなかった。より高い密度で平板培養した細胞は、培地を変更しない培養で生存しなかった。

10

#### 【0246】

##### クローン原性アッセイⅠ

増殖し、コロニー化する腫瘍細胞の能力を、RNase B1への短時間の vs. 連続的な暴露において調べた。該実験は、(i) 対照細胞、(ii)  $10^{-6}$  M RNase B1を含有する培地と共にプレインキュベートし、次いで、RNase B1を含まない成長培地中でコロニー化させた細胞、および(iii)(ii)におけるようにプレインキュベートし、次いで、コロニー化アッセイの間に $10^{-6}$  M RNase B1を含有する成長培地中でインキュベートした細胞を用いて、クローン原性アッセイⅠに記載したように行った。これらの実験において、最初の密度はウェル当たり250ないし1000細胞の間の範囲であり、コロニー化期間は7日であった。

20

#### 【0247】

14日のプレインキュベーションと比較して本実験で用いた短い時間(7日)のインキュベーションは、結果として、緩和されていないコロニーをもたらし、これは、高密度の細胞を含有するウェルにおいてさえ区別できなかった。全ての密度において、RNase B1での48時間のプレインキュベーションは、対照と比較して、コロニー化する細胞の能力の20ないし30%の低下をもたらした(図15)。しかしながら、各密度において、RNase B1への連続的暴露は、クローン原性の劇的な90%の低下をもたらした。図16aないしcは、連続的RNase B1処理細胞(図16c)が、RNase B1において48時間プレインキュベートした細胞(図16b)または対照細胞(図16a)よりも小さく、染色性は低かったことを示す。この結果、RNase B1がコロニー成長速度に影響したことを示す。

30

#### 【0248】

かくして、本明細書中で示した結果から明瞭に示されるように、A. niger RNase B1は、ヒト腺癌HT29癌細胞に対して明瞭な細胞傷害性効果を有する。RNase B1の細胞傷害性効果は、細胞生存性の低下よりはむしろ細胞クローン原性の低下を介して発現される。RNase B1は腫瘍細胞に対して長期間の効果を有する可能性がある。RNase B1は、対照と比較してコロニー成長速度の低下を引き起こし、これは、それが増殖する細胞の能力に影響し得ることを示す。

#### 【0249】

##### 実施例4

40

##### ラットモデルにおける腫瘍発生に対するRNase B1のイン・ビボ効果

RNase B1の抗癌効果をさらに調べるために、イン・ビボ実験をラットにおいて行った。

#### 【0250】

##### 材料および実験方法

Charles-River由来の4週齢雄ラットを6つの群に分けた。いくつかの群においては、ジメチルヒドラジン(DMH)の5回の毎週の注射によって結腸癌を発生するようにラットを誘導した。この実験においては、RNase B1投与の2つの様式を調べた。浸透圧ミクロポンプによってRNase B1を結腸に直接的に適用したか、あるいは腸溶被覆マイクロカプセルを用いて経口投与した。各ラット群が受けた処置の全組

50

を図1のスキームによって記載する。実験の間、ラットの体重を毎週測って、その成長速度に対するD M Hおよび/またはR N a s e B 1の効果をモニターした。R N a s e B 1で処理した群においては、各ケージから毎週糞を収集し、60で乾燥した。250mgの乾燥糞の試料を粉碎し、リン酸緩衝性食塩水(P B S)に再度溶解させた。遠心分離に続き、上方溶液中のR N a s e活性をR o i zら(R o i z, L.ら, J. A m e r . S o c . H o r t . S c i . 1 2 5 ( 1 ) : 9 - 1 4 . 2 0 0 0 )に記載されているように調べた。

#### 【0251】

##### 浸透圧マイクロポンプを介するR N a s e B 1の結腸への投与

R N a s e B 1を浸透圧マイクロポンプ(A L Z E T)に負荷した。該ポンプをラットの腹部に皮下移植した。ラットの結腸の容量が約4mlであると仮定して、少なくとも6週間、結腸内で $10^{-6}$ Mの計算された濃度にて、カテーテルを介して、浸透圧ポンプはR N a s e B 1を直接的に結腸に一定放出させた。ラットを以下のように処理した：1つの群のラットには、全R N a s e活性を有する、「生きた」R N a s e B 1(R N a s e B 1)を含有するポンプを移植した。第2の群のラットには、いずれのR N a s e活性も欠く、オートクレーブ不活性化R N a s e B 1(I-R N a s e B 1)を含有するポンプを移植した。他方、第3の群のラットには、最初の2つの群においてはR N a s e B 1ビヒカルとして用いたP B Sを含有するポンプを移植し、対照として供した。

#### 【0252】

R N a s e B 1の可能な予防的効果を調べるために、最初のD M H注射から1ないし9週間後に、選択されたD M H処理マウスにR N a s e B 1を与えた。次いで、ラットを屠殺し、その結腸を切り出し、P B Sで、次いで、0.1Mジチオスレイトール(D T T)を含有するP B Sで洗浄した。その後、結腸を縦方向に開き、濾紙上で、P B S中の4%ホルムアルデヒド中で少なくとも1時間固定した。P B S中の0.025%メチレンブラーでの染色に続き、結腸粘膜を、異常な陰窩病巣(A C F)について低倍率下で顕微鏡を介して観察した。A C Fを末端側(5cm)結腸においてカウントした。

#### 【0253】

R N a s e B 1の治療効果を調べるために、ラットの残りには、最初のD M H注射から12ないし17週間後に、R N a s e B 1を与えた。結腸を切り出し、前記したように固定し、腫瘍をカウントし、測定した。組織病理学的調査のために、各腫瘍をパラフィンに包埋した。薄い(10μm)切片を染色し、悪性の度合いを評価した。

#### 【0254】

##### R N a s e B 1の経口投与

##### マイクロカプセルの調製

マイクロカプセルはL i n らによって記載された改変された手法で調製した(L i n J. J. , ら, 1 9 9 4 , B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 1 4 ; 2 0 4 ( 1 ) : 1 5 6 - 6 2 )。0.6グラムの凍結乾燥したR N a s e B 1および2.4グラムのグルコースの混合物を乳鉢および乳棒によってよく粉末化した。微細な粉末を、200mlの流動パラフィンおよび2mlのS p a n - 8 0を含有する1Lのビーカーに注ぎ、600r p mにおいて20分間攪拌した。アセトン-エタノール-セルロースアセテートフタレート(C A P)溶液を前記攪拌混合物(9:1酢酸:95%エタノールの40ml中3.2グラムのC A P)に注意深く加え、フード中さらに2時間攪拌して、痕跡量のアセトンを除去した。30mlのエーテルを加えることによって、マイクロカプセルを硬化させ、ブヒナー漏斗を用いて濾紙上で乾燥し、痕跡量の流動パラフィンを、30mlのエーテルでのさらなる2回の洗浄によって除去した。次いで、マイクロカプセルを一晩乾燥させ、微細なメッシュに通した。殆どのマイクロカプセルは200および500μmの間であった。

#### 【0255】

予備的実験(図18)において、C A Pマイクロカプセルは、胃環境を表す酸性p Hにおいて不溶性であることが判明した。しかしながら、1時間後アルカリ性p Hにおいて最

10

20

30

40

50

大 RNase 活性に到達し、これは、マイクロカプセルはその内容物を容易に腸中に放出できることを示した。

#### 【0256】

##### RNase B1マイクロカプセルの経口投与

RNase B1またはプラセボとしてのグルコースを含有するマイクロカプセルを、粉碎された Purina エサと混合した。各 RNase B1 処理ラットには 1.6 mg の RNase B1 の日用量を与えて、結腸中  $10^{-5}$  M の最終濃度を得た。経口投与についての実験の詳細は、RNase B1 の予防的效果を評価しつつ（図 17）、遅延した停止（11週）以外は、マイクロポンプ投与について前記した通りであった。

#### 【0257】

10

##### 実験結果

###### ラット成長速度に対する異なる処理の効果

ラット初期体重は約 200 グラムであった。実験は、前記したように、各処理について異なる時点で終了した。一般に、ラットは約 400 ないし 500 グラムの最終体重に到達し、異なる処理の間で有意な差はなかった（図 19 a ないし d）。しかしながら、DMH 処理群は、DMH の存在下または非存在下において、RNase B1 処理群と比較して体重の僅かな減少を示した。

#### 【0258】

##### ラット糞における RNase 活性

20

図 20 a ないし c は、8 週間の間、予防的様式で、RNase B1、I-RNase B1 または PBS を含有する浸透圧ポンプを移植したラットの糞における RNase 活性の変化を示す（図 1）。RNase B1 で処理したラットにおいては（図 20 a）、糞における RNase 活性は、I-RNase B1（図 20 b）または PBS（図 20 c）で処理したラットよりも 5 倍高かった。この活性は 5 週間高く維持され、次いで、ポンプ中の RNase B1 の貯蔵器が空になるにつれて徐々に減少した。基礎内因性 RNase 活性は、2 つの後者の群の糞で検出された。

#### 【0259】

30

同様なパターンが、マイクロカプセル化された RNase B1 を与えたラットで観察されたが、グルコースのみを含有するマイクロカプセルを与えられたラットと比較して、8 倍高い RNase 活性が検出された（図 21）。この実験において、RNase 活性の暫時の減少は、ラット体重の増加および、その結果としての、結腸容量の増加の結果として説明することができる。

#### 【0260】

##### 予防剤としての RNase B1 の効果

ポンプ部位における感染が観察されたので、ポンプ - 移植ラットを 8 週間後に屠殺した。この段階においては、ACF のみが明らかであった。ACF は、癌形成の初期相の間のラット結腸の癌形成性変化の代用バイオマーカーである。陰窓中の杯細胞はより大きくなり、正常な粘膜細胞と比較して強く染色された。ACF カウントは、RNase B1 または I-RNase B1 処置により劇的に低下した（図 22）。結腸粘膜に対する損傷効果は、DMH の非存在下で、RNase B1 または I-RNase B1 で処理したラットで観察されなかった。

40

#### 【0261】

マイクロカプセル化 RNase B1 を与えたラットにおいて、実験は、最初の DMH 投与に続いて 11 週間継続した。その時点において、腫瘍および ACF が共に存在した。RNase B1 は、対照と比較して、結腸当たりの腫瘍の数（図 23 a）、腫瘍サイズ（図 23 b）、ならびに ACF の数（図 23 c）の低下を引き起こした。

#### 【0262】

50

加えて、結腸腫瘍の色の多様性が観察された；強い血液供給を有した赤色腫瘍（図 24 a）、血管をほとんど欠く白色腫瘍（図 24 b）、および少数の血管しか持たない「ピンク色」腫瘍（図 24 c）。グルコース処理ラットにおいて、全ての腫瘍は赤色であった。

他方、RNase B1処理ラットにおいて、赤味がかった腫瘍の数の大幅な低下が観察された(図24d)；腫瘍の10%および50%は、おのの、ピンク色および白色であった。これらの結果は、RNase B1の抗血管形成効果を明らかに示す。

#### 【0263】

腫瘍は組織病理学的パラメータによって良性または悪性として区別することもできよう。アデノーマと言われる良性腫瘍(図25a)は増殖した粘膜層と定義され、および時々は、アデノパピローマの発生によって定義することができるが、粘膜下組織は無傷であって、他の結腸層からよく区別される。腺癌と言われる悪性腫瘍においては、粘膜細胞は粘膜下組織直下に進入し、結局は、組織の組織化の喪失に至る(図25bおよび25c)。グルコースまたはRNase B1で予防的に処理されたラットにおける異なるタイプの腫瘍の分布の調査は、RNase B1が悪性の程度を明瞭に低下させたことを示した(図9d)。

#### 【0264】

##### 治療剤としてのRNase B1の効果

浸透圧ポンプによる直接的な、または経口による適用の双方の様式において、よく発達した腫瘍を、実験の12ないし17週間、RNase B1に暴露した。浸透圧ポンプによって処理されたラットにおいて、RNase B1は結腸当たりの腫瘍の数の低下を引き起こした(図26a)。対照に対して約50%の阻害効果は、不活化されたリボ核酸分解活性を有するI-RNase B1で処理したラットにおいて最も有意であった。

#### 【0265】

サイズ分布によって示されるように、RNase B1もまた腫瘍成長に影響した(図26b)。一般に、殆どの腫瘍は3ないし5mmの直径を有したが、PBS処理ラットにおいては、9ないし12mmを超える例外的に大きな腫瘍が出現した。この結果は、RNase B1が予め存在する腫瘍の発達を阻害し、または阻止することを示唆する。それにもかかわらず、RNase B1およびI-RNase B1の効果の間に有意な差は観察されなかった。

#### 【0266】

RNase B1予防的効果の実験におけるように、脈管形成のパターンもまた、浸透圧ポンプを介して適用されたRNase B1による影響を受けた(図26c)。PBS処理ラットにおいては、腫瘍の殆ど(約80%)はかなり血管が形成され、色は赤色であった。対照的に、RNase B1およびI-RNase B1処理ラットの双方においては、腫瘍の30%のみが赤色であり、他方、他の腫瘍は血管形成が貧弱であり、ピンク色または白色に見えた。かくして、RNase B1は、予め存在する腫瘍においても脈管形成を低下させるようである。

#### 【0267】

カプセル化されたRNase B1を与えたラットにおいては、処置の効果は、浸透圧ポンプによって得られたものよりも有意性は低かった(図27aないしc)。この結果は、蛋白質の非常に小さな割合が、カプセル化されたRNase B1を与えた場合に結腸に到達することを仮定することによって説明することができる。前記したように、マイクロカプセルは実際には胃を通過するが、小腸および盲腸を通る長い経路を依然として有する。この仮定をテストする実験は、従って、蛍光蛋白質を負荷したCAPマイクロカプセルを用いて行い、ラットに与えた。6時間後にラットを屠殺し、その胃腸管の内容物を蛍光顕微鏡下で観察した。十二指腸においては、マイクロカプセルは溶解し始めたことが判明した。該溶解は、さらに回腸および空腸において進行した。マイクロカプセルが盲腸に到達すると、蛍光の殆どは盲腸内容物に拡散した。マイクロカプセルが損傷したので、RNase B1効果は、腸および盲腸に存在するプロテアーゼにより低下し得る。

#### 【0268】

経口投与されたRNase B1は予め存在する腫瘍の数およびサイズを減少させなかつたという事実にもかかわらず、結腸の腫瘍タイプの間の分布は僅かに影響を受けた(図27c)。グルコース-およびRNase B1処理マウスは、各々、約60%および4

10

20

30

40

50

0 % 赤色腫瘍を有した。本処方での経口投与された R N a s e B 1 も脈管形成に影響を及ぼすが、中程度であるようである。

### 【 0 2 6 9 】

#### 実施例 5

イン・ビトロにおけるヒト H T - 2 9 結腸癌細胞に対する R N a s e B 1 の効果

材料および実験方法

細胞成長条件

全ての実験は、ヒト結腸腺癌（H T - 2 9）細胞で行った。細胞は、10 % 胎児子ウシ血清、1 % グルタミンおよび1 % 抗生物質 - 抗真菌剤溶液（B i o l a b ）を補充した、D M E M 培地（B i o l o g i c a l I n d u s t r i e s , B e t H a e m e k ）<sup>10</sup> を含有する 5 0 m l フラスコ中で成長させた。細胞をトリプシン処理し、 $5 \times 10^4$  細胞を含有する 2 m l 培地を 6 ウェルプレートの各ウェル中で平板培養した。いくつかのプレートには、 $10^{-6}$  M の最終濃度まで R N a s e B 1 を補充した。細胞を、5 % C O<sub>2</sub> を含有する加湿雰囲気中にて 3 7 °でインキュベートした。48 時間後に、R N a s e B 1 の存在下または非存在下での培地を、各々、各ウェル中に置き換えて、成分および R N a s e B 1 の一定の供給を維持した。4 日後に、培地を取り出し、細胞培養を、氷上で 15 分間、P B S ( 1 5 0 m M N a C l 、 3 m M K C l 、 1 0 m M N a<sub>2</sub>H P O<sub>4</sub> 、 2 m M N a H<sub>2</sub>P O<sub>4</sub> ) p H 7 . 2 中の 4 % ホルムアルデヒドで固定した。細胞を異なる目的で以下のように染色した。

### 【 0 2 7 0 】

#### 細胞内アクチンについての直接的染色

細胞を P B S 中で洗浄し、0 . 0 2 % T w e e n - 2 0 ( P B S T ) を含有する P B S 中で室温にて 1 時間浸透させた。P B S での 3 回の洗浄の後、細胞を  $10^{-6}$  M テトラメチルローダミン B イソチオシアネート ( T R I T C ) - 標識ファロイジン ( S i g m a ) で 1 時間アクチンにつき染色し、P B S 中で 4 ℃ にて一晩放置して、いずれの過剰の染色材料も除去した。細胞をスライドガラス上の水中に広げ、共焦点レーザー走査型顕微鏡 ( L S M ) 5 1 0 ( Z e i s s ) を用いて可視化した。

### 【 0 2 7 1 】

#### 膜アクチンについての免疫染色

細胞をホルムアルデヒドで固定し、前記したように P B S で洗浄し、次いで、P B S 中に 1 : 5 0 0 希釈したウサギ抗アクチン抗体 ( S i g m a ) と共に室温で 1 時間インキュベートし、P B S で 3 回洗浄した。次いで、細胞を、同一条件にて、P B S 中に 1 : 1 0 0 希釈したフルオレセインイソチオシアネート ( F I T C ) に結合したヤギ抗ウサギ I g G と共にさらに 1 時間インキュベートし、再度洗浄し、前記したように可視化した。

### 【 0 2 7 2 】

#### 細胞表面での R N a s e B 1 の免疫染色

ポリクローナル抗体 ( A m i o l a b , I s r a e l ) を精製された R N a s e B 1 に対してウサギにおいて惹起させた。抗 R N a s e B 1 は、前記した手法に従い、H T - 2 9 免疫染色において一次抗体として用いた。

### 【 0 2 7 3 】

#### 実験結果

#### 細胞内アクチンについての直接的染色

R N a s e B 1 なくして成長する対照細胞において、微細なアクチンネットワークが T R I T C で染色されて観察され、細胞質を満たしていた。明るい染色が膜表面で観察された（図 2 8 a ）。対照的に、R N a s e B 1 処理細胞において、各細胞における細胞質の膜および末梢ゾーンは強く染色され（図 2 8 b ）、これは、R N a s e B 1 の外部からの添加に対する応答としてのアクチンネットワークの再編成を示した。

### 【 0 2 7 4 】

#### 膜アクチンについての免疫染色

F I T C - 免疫染色は、対照細胞における膜ゾーンでのアクチンの微小な蛍光スポット

20

30

40

50

を示した(図29a)。この結果は、図28aで示されたTRITC染色と合致する。この実験において、界面活性剤は使用せず、かくして、抗体は細胞質に殆ど浸透しなかった。従って、これらの細胞においては、膜アクチンは外部環境と相互作用するよう見える。RNase B1処理細胞において、かなり弱い免疫染色が観察され(図29b)、これは、膜アクチンに従前に結合したRNase B1が、抗アクチン抗体の結合に干渉したことを示唆する。

#### 【0275】

RNase B1で処理されなかつたさらなる細胞は、予め混合したウサギ抗アクチンおよび1μMアクチンと共にインキュベートした。図29bに記載したように、同様な僅かな蛍光が観察された(示さず)。自然発生FITC蛍光の可能性を排除するために、抗アクチンを省略する以外は、前記したように細胞を処理した。蛍光染色は検出されなかつた。

#### 【0276】

##### 細胞表面でのRNase B1の免疫染色

非常に僅かなFITC-蛍光が、抗RNase B1と共にインキュベートした対照細胞で出現した(図30a)。しかしながら、RNase B1処理細胞は強い蛍光応答を呈した(図30b)。この結果は、細胞の表面にわたって、特に細胞のエッジおよび延長でのRNase B1の顕著な存在を示す。抗RNase B1の代わりのウサギ免疫前血清(PIIS)での処理の結果、非常に弱い蛍光がもたらされた(図30c)。

#### 【0277】

##### 実施例6

###### ユリ花粉管成長に対するIAC-RNase B1の効果

###### 材料および実験方法

###### RNase B1のヨードアセチル化

RNase B1のヨードアセチル化はIrieら(Irie M,ら、1986 J. Biochem. 99(3):627-33)に従って行った。RNase B1を、10nMの最終濃度まで、0.1Mヨードアセテートを含有する2.5mlの0.1M酢酸緩衝液に溶解させた。37℃における一晩のインキュベーションの後、蛋白質をSephadex G-15カラムで脱塩した。蛋白質を含有する画分を集め、水に対して徹底的に透析した。凍結乾燥の後、10mgの蛋白質を得た。ヨードアセチル化(IAC-)RNase B1 RNase活性を非修飾RNase B1と比較した。

#### 【0278】

##### ユリ花粉管に対するIAC-RNase B1の効果

凍結乾燥したIAC-RNase B1を、水中の7%スクロース、1.27mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、0.16mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、1mM KNO<sub>3</sub>および3mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を含有するユリ花粉管成長培地中に1または5μMの最終濃度まで溶解させた(Yokota, E. および Shimmen, T. 1994. Protoplasma 177: 153-162)。ユリ(Lilium longiflorum)花粉粒を、インピトロにて、10<sup>-6</sup>MのIAC-RNase B1の存在または非存在下で、100μlの成長培地を含有する管中で発芽させた。さらなる対照として、ユリ花粉を、成長培地中で同一濃度のRNase B1またはBSAにて発芽させた。暗所での25℃における1.5時間のインキュベーションの後、花粉管長さを光学顕微鏡下で各処理において測定した。

#### 【0279】

##### 実験結果

###### RNase B1のヨードアセチル化

ヨードアセテートは、RNaseの活性部位中のヒスチジン残基への結合を介してRNase活性の阻害をもたらす。IAC-RNase B1のRNase活性は、非処理RNase B1と比較して90%低かった。

#### 【0280】

10

20

30

40

50

### ユリ花粉管成長に対する I A c - R N a s e B 1 の効果

対照ユリ花粉管は 0 . 2 6 mm の長さに到達する（図 3 1）。この実験においては、B S A は対照として用いた。というのは、それは花粉管に対していずれの細胞傷害性効果も有しないからである。実際に、 $10^{-6}$  M の濃度においては、B S A は花粉管成長に対して有意な効果を有しなかった。 $5 \times 10^{-6}$  M B S A の阻害効果は、花粉管が成長培地浸透圧ポテンシャルの変化に対して敏感であるという事実の結果として説明することができる。R N a s e B 1 および I A c - R N a s e B 1 の双方は、花粉管成長に対して明らかな阻害効果を呈した。双方の濃度において、I A c - R N a s e B 1 は R N a s e B 1 よりも効果的であったが、差は有意でなかった。かくして、ユリ花粉管において、I A c - R N a s e B 1 は非修飾 R N a s e B 1 と同様式で花粉管成長を阻害し、R N a s e 活性の喪失がその阻害効果を低下させないことを示す。

#### 【 0 2 8 1 】

##### 実施例 7

T 2 R N a s e ファミリーのメンバーは抗脈管形成および抗癌特性を示す。

T 2 ファミリーのリボヌクレアーゼは、基本的な特徴、例えば、触媒活性部位の完全な相同性、高温および低 pH における最適な R N a s e 活性、少なくとも 2 4 k D a の分子量 ( R N a s e A ファミリーのそれの 2 倍)、およびグリカン鎖の存在を共有することが示されている。T 2 R N a s e 蛋白質のメンバーが抗脈管形成特性を有するかを判断するために、ヒト臍静脈内皮細胞 ( H U V E C ) 管形成アッセイを以下のように使用した。

10

20

#### 【 0 2 8 2 】

##### 材料および方法

ヒト臍静脈内皮細胞 ( H U V E C ) 管形成アッセイ - 概して、該実験は P o n o e , M . L . , 2 0 0 1 において R N a s e B 1 について既に記載されたように行なった ( In vitro matrigel angiogenesis assay . Murray , J . C . ( ed . ) Methods in Molecular medicine : Angiogenesis Protocols . Humana Press , Totowa , NJ , vol . 4 6 , pp . 2 0 5 - 2 0 9 ) 。簡単に述べると、新たに単離したヒト臍静脈内皮細胞 ( H U V E C ) を、 2 0 % F C S 、 1 % グルタミン、 1 % 抗生物質 - 抗真菌溶液、 0 . 0 2 % の E C G F および 5 0 U / 1 0 0 m l のヘパリンを補充した M 1 1 9 培地中に維持した。 9 6 ウエルプレートのウェルを、(管形成を誘導するための ) 1  $\mu$  g / m l アンジオゲニンを補充した、 5 % F C S および 0 . 0 0 5 % E C G F を含有する M 1 1 9 培地中の成長因子枯渇 Matrigel ( Pono e ML . 2 0 0 1 . In : Murray JC , editor . Methods in molecular medicine . Vol . 4 6 : Angiogenesis protocols . Totowa ( NJ ) : Humana Press . p . 2 0 5 - 9 ) で被覆し、平板培養 / ウェル当たり 1 4 0 0 0 H U V E C で平板培養した。種々の R N a s e 、すなわち、 A s p e r g i l l u s n i g e r R N a s e B 1 、 A s p e r g i l l u s o r y z a e R N a s e T 2 ( Sigma , 2 9 k D a ) または E . c o l i R N a s e I ( Ambion , 2 7 k D a ) を 2  $\mu$  M の最終濃度で加えた。対照では、前記 R N a s e のいずれかの非存在下または存在下であるが、アンジオゲニンの非存在下で、細胞を同一条件下で平板培養した。 9 6 ウエルプレートを加湿雰囲気および 5 % 二酸化炭素下で 3 7 ℃ にて 2 4 時間インキュベートした。各処理について、 3 連で行った。

30

40

#### 【 0 2 8 3 】

##### 実験結果

R N a s e B 1 は H U V E C 管形成に対して顕著な抗脈管形成効果を呈する - 種々の R N a s e ( すなわち、 A s p e r g i l l u s n i g e r R N a s e B 1 、 A s p e r g i l l u s o r y z a e R N a s e T 2 および E . c o l i R N a s e I ) の能力を、 H U V E C 管形成アッセイを用いて測定した ( 図 3 2 a ないし b ) 。 図 3 2 a ないし b に示すように、アンジオゲニンおよび R N a s e の非存在下、培地中でイ

50

ンキュベートした H U V E C (対照、図 32 a) は、M a t r i g e l 表面で唯少数のデリケートな管を形成したが、アンジオゲニンの存在下でインキュベートした H U V E C (陽性対照)においては、塊状管が出現した(図 32 b)。加えて、A s p e r g i l l u s n i g e r R N a s e B 1 および A s p e r g i l l u s o r y z a e R N a s e T 2 は単独で与えた場合には細胞に対していずれの効果も有しなかった(陰性対照、各々、図 32 c および 32 e)が、これらの R N a s e はアンジオゲニン誘導管形成を明瞭に阻害した(各々、図 32 d および 32 f)。さらに、R N a s e T 2 は、R N a s e B 1 よりも弱い阻害効果を有することが判明した(図 32 f を図 32 d と比較されたし)。それにも拘らず、管形成の完全な阻害が、10 μM の R N a s e B 1 または 50 μM の R N a s e T 2 で得られた(データは示さず)。他方、R N a s e I はアンジオゲニンの非存在下(陰性対照、図 32 g)または存在下(図 32 h)で、管形成に対して顕著な阻害効果を呈した。

#### 【0284】

かくして、これらの結果が、高度に発散した源からの T 2 R N a s e の抗脈管形成特性を明瞭に示す。現在までに、T 2 ファミリーに属する多様な系統発生起源の R N a s e の抗脈管形成活性を示し、または示唆した刊行物はないため、これらの結果は本発明にとってユニークである。

#### 【0285】

##### 実施例 8

R N a s e B 1 は、B 1 6 F 1 および B 1 6 F 1 0 メラノーマ細胞誘導腫瘍の成長を阻害する。

R N a s e B 1 の抗癌特性をテストするために、イン・ビボメラノーママウスモデルを以下のように作製した。

#### 【0286】

##### 材料および実験方法

全身腹腔内メラノーママウスモデルで用いたマウスおよび腫瘍細胞 - C D B D F 1 および B a l b / c マウスを腫瘍誘導で用いた。マウスマラノーマ B 1 6 F 1 (低転移性)は、I N S I G H T B I O P H A R M A C E U T I C A L S L T D . ( R e h o v o t , I s r a e l ) から入手した。

#### 【0287】

メラノーマ全身腹腔内マウスモデルの作製 - メラノーママウスモデルは本質的には記載されているように作製した(Geranら、1972. Protocol for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. In: Cancer Chemotherapy Reports Part 3 Vol 3 No 2)。簡単に述べれば、 $2 \times 10^6$  B 1 6 F 1 低転移性細胞を各マウスの腹腔に注射し、癌腫瘍の存在を、マウスの総括的な観察および/または組織病理学的調査によって、メラノーマ細胞注入の 14 日後に評価した。

#### 【0288】

メラノーマ全身腹腔内マウスモデルへの R N a s e B 1 腹腔内投与 - B 1 6 F 1 メラノーマ細胞注射から 24 時間および 5 日後に、R N a s e B 1 (100 μl の P B S 中 5 mg / マウス) または P B S 単独を腹腔に注射した。

#### 【0289】

全身静脈内(i.v.) メラノーママウスモデルで用いられるマウスおよび腫瘍細胞 - B a l b / c マウスをマウス B 1 6 F 1 0 (高度に転移性の) メラノーマ細胞の静脈内投与に用いた。

#### 【0290】

メラノーマ全身静脈内マウスモデルの作製 - B 1 6 F 1 0 メラノーマ細胞 ( $5 \times 10^5$  または  $5 \times 10^6$  細胞 / マウス) を B a l b / c マウスの側尾静脈に注射し、癌腫瘍の存在を、マウスの総括的観察および/または組織病理学的調査によって、メラノーマ細胞注射

10

20

30

40

50

の 14 日後に評価した。

**【0291】**

メラノーマ全身静脈内マウスモデルへの RNase B1 静脈内投与 - 細胞注射から 24 時間後に開始し、合計 3 回の注射での 4 日間隔で、RNase B1 (100 μl の PBS 中 10 mg の RNase B1) または PBS をメラノーママウスモデルの側尾静脈に静脈内注射した。実験の最後に、肺を取り出し、秤量し、表面転移を定量した。

**【0292】**

実験結果

RNase B1 はメラノーマ全身腹腔内マウスモデルにおいて腫瘍成長を顕著に阻害する - 腹腔内 / 腹腔内（すなわち、メラノーマ細胞および RNase B1 双方の腹腔内注射）メラノーママウスモデルにおける RNase B1 の効果を、処理したマウスの腹部腔における定性的腫瘍観察によってメラノーマ細胞注射から 14 日後にスコア取りした。図 33 a および c に示すように、BDF1 および Balb/c マウスの双方において、メラノーマ細胞は、腹部腔を満たし、腸にわたって拡大する塊状腫瘍を誘導した。他方、RNase B1 処理マウスにおいて、唯少数の小さな腫瘍が観察され（図 33 b, d）、これは、RNase B1 の腫瘍成長阻害効果を示した。この実験において、RNase B1 の合計量は 10 mg / マウスであった。同様の結果は、マウスを、10 mg の RNase B1 の単回注射によって、あるいは 1 mg の RNase B1 の 10 回の毎日の注射によって処理した場合に観察された（データは示さず）。

**【0293】**

RNase B1 はメラノーマ全身静脈内マウスモデルにおいて、高度に転移性の悪性メラノーマ腫瘍の転移 / コロニー化および成長を阻害する - 静脈内 / 静脈内（すなわち、メラノーマ細胞および RNase B1 の双方の静脈内注射）メラノーママウスモデルにおいて、尾静脈に注射されたメラノーマ細胞は、約 2 週間で肺転移の発生をもたらす。図 34 a ないし c に示すように、 $5 \times 10^5$  の B16F10 メラノーマ細胞注射から 2 週間後に、RNase 処理マウスにおける唯少数の転移（図 34 b）と比較して、多数の転移が PBS 注射マウスで観察された（図 34 a）。転移の数の定量的測定は、RNase B1 処理マウスにおいて有意な減少 76 % を示した（P < 0.001、図 34 c）。 $5 \times 10^6$  細胞 / マウスの初期ボーラスを用いる場合、PBS 注射マウスにおける転移はかなり強く、カウントするのに余りにも密であった（データは示さず）。これらのマウスにおいて、肺重量（図 34 b）および腫瘍サイズ（図 34 b）の測定は、PBS 处理マウスと比較して、RNase B1 腫瘍マウスにおける肺重量（P < 0.01、図 34 d）および腫瘍サイズ（P < 0.001、図 34 e）の 25 % の有意な低下を示した。

**【0294】**

従って、これらの結果は、確信されることには、RNase B1 を用いて、高度に転移性の悪性メラノーマ腫瘍の成長および転移を効果的に阻害することができることを示す。

**【0295】**

実施例 9

RNase B1 は、A375SM 注射メラノーママウスモデルにおいて腫瘍成長、肺転移および MMP-2 生産を阻害する。

癌腫瘍の成長を阻害する RNase B1 の能力をさらに確実なものとするために、RNase B1 を A375SM メラノーマ細胞誘導マウスモデルに以下のように注射した。

**【0296】**

材料および実験方法

メラノーママウスモデルを作製するのに用いるマウス - 雄無胸腺 Balb/c ヌードマウスは、Animal Production Area of the National Cancer Institute, Frederick Cancer Research Facility (Frederick, MD) から購入した。マウスを、

10

20

30

40

50

特異的病原体がない条件下で層流キャビネットに収容し、2ないし9週齢に用いた。

【0297】

メラノーマ細胞 - 高度に腫瘍形成性かつ転移性ヒトメラノーマA375SM細胞系はM D Anderson Cancer Center, Houston, TXから入手した。接種のための腫瘍細胞を調製するために、指数関数的成长期にある細胞を、0.25%トリプシン/0.02%エチレンジアミン4酢酸溶液(w/v)へ短時間暴露することによって収穫した。フラスコを鋭く叩いて、細胞を散らばらせ、補充した培地を加えた。細胞懸濁液をピペット処理して、単一細胞懸濁液を得た。細胞を洗浄し、所望の細胞濃度まで、Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>フリーのハンクスの平衡塩溶液(HBSS)に再懸濁させた。細胞生存性はトリパンブルー排除によって測定し、>90%生存性の単一細胞懸濁液のみを用いた。 10

【0298】

メラノーママウスマodelの作製 - 皮下(s.c.)腫瘍は、10<sup>5</sup>腫瘍細胞/0.1m l HBSSをマウスの右側頭皮領域にわたって注射することによって生じさせた。皮下腫瘍の成長は、マウスの毎週の調査、およびキャリバーでの腫瘍の測定によってモニターした。メラノーマ細胞注射の5週間後にマウスを屠殺し、腫瘍をOCT化合物(Sakura Fineter, Torrance, CA)中で凍結し、またはホルマリン固定し、次いで、免疫染色およびヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)染色のために処理した。

【0299】

実験的肺転移の作製 - 肺転移を形成するために、0.1m lのHBSS中の10<sup>6</sup>腫瘍細胞をヌードマウスの側尾静脈内(i.v.)に注射した。マウスをメラノーマ細胞注射から60日後に屠殺し、肺を取り出し、水中で洗浄し、腫瘍節のカウンティングを容易にするために24時間Bouinの溶液で固定した。表面腫瘍節の数を、解剖顕微鏡下でカウントした。

【0300】

RNase B1投与 - 皮下および静脈内メラノーマ細胞注射マウスを、共に、1mg/100μlのRNase B1水溶液で、またはリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で、腹腔内(i.p.)注射によって1日置きに処理した。

【0301】

CD31およびMMP-2免疫組織化学分析 - 凍結した組織の切片を腫瘍異種移植片から調製した。組織切片スライドをPBSで2回濯ぎ、PBS中の3%過酸化水素の使用によって、内因性ペルオキシダーゼを12分間ブロックした。次いで、試料をPBSで3回洗浄し、5%正常ウマ血清および1%正常ヤギ血清を補充したPBS(pH7.5)による蛋白質ブロッキング溶液と共に室温にて10分間インキュベートした。過剰なブロッキング溶液を排出し、試料を、モノクローナルラット抗CD31(1:800)抗体の1:100希釈、または抗MMP-2(PharMingen, San Diego, CA)の1:200希釈と共に4にて18時間インキュベートした。次いで、試料をPBSで4回濯ぎ、ペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG1、抗ウサギIgG、または抗ラットIgGの適当な希釈と共に室温にて60分間インキュベートした。スライドをPBSで濯ぎ、ジアミノベンジジン(Research Genetics, Huntsville, AL)と共に5分間インキュベートした。次いで、切片を蒸留水で3回洗浄し、Gill 1のヘマトキシリン(Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO)で逆染色した。微小血管密度(MVD)の定量のために、CD31染色試料の10の視野を100倍の倍率でカウントした。また、ホルマリン固定したパラフィン包埋腫瘍の切片(4μm厚み)をルーチン的な組織学的調査のためにH&Eで染色した。 40

【0302】

実験結果

RNase B1処理は、A375SMメラノーマ細胞注射マウスにおいて腫瘍のサイズを有意に低下させた - ヒトメラノーマ細胞の腫瘍成長に対するRNase B1の効果 50

は二組のヌードマウスにおいて測定した。ヌードマウスの最初の組 ( $n = 5$ ) において、A375SMメラノーマ細胞 ( $5 \times 10^5$ ) を皮下注射し、3日後、腫瘍細胞を注射した動物に、引き続いで、1mgのRNase B1または対照PBSを30日間1日置きに腹腔内注射した。PBSで処理した動物における腫瘍細胞は徐々に成長し、大きな腫瘍を生じ、 $700\text{mm}^3$  平均容量までのサイズに到達した(図35、対照)。対照的に、RNase B1での処理は、同一期間の間に腫瘍成長を最大 $100\text{mm}^3$  平均容量まで低下させた(図35、RNase B1)。第2の組のヌードマウス( $n = 8$ )において、第1の組について記載されたように正確にマウスを注射し、処理し、それは、腫瘍成長に対するRNase B1の正確に同一な効果を示した(データは示さず)。

## 【0303】

RNase B1処理は、A375SMメラノーマ細胞注射マウスにおいて肺転移の発生および数を有意に低下させた - ヒトメラノーマ細胞の転移に対するRNase B1の効果を調べるために、A375SM  $10^6$  細胞をヌードマウスに静脈内注射して、実験的肺転移を生じさせた。5日後、腫瘍細胞を注射した動物はまた、1mgのRNase B1または対照PBSで60日間1日置きに腹腔内注射した。A375SM細胞の肺転移の発生および数の双方は、対照群と比較すると、RNase B1処理マウスにおいて低下したことが判明した。対照マウスにおいて、A375SM細胞は多数の肺転移(メジアン, 65; 範囲, 16ないし200)を生じ、他方、RNase B1での処理は、ヌードマウスにおいて転移を形成するA375SM細胞の能力を有意に阻害した(メジアン, 10; 範囲, 0ないし75;  $P < 0.05$ )。

## 【0304】

RNase B1処理は、A375SMメラノーママウスマodelにおいて MMP-2 の発現を減少させる - RNase B1がイン・ビボにて MMP-2 の発現を抑制するか否かを判断するために、腫瘍異種移植片の組織切片を、MMP-2特異的抗体を用いる免疫組織化学分析に付した。MMP-2染色は対照注射 A375SM腫瘍で観察されたが、RNase B1処理腫瘍において有意に減少した(データは示さず)。かくして、RNase B1はメラノーマ細胞においてイン・ビボで MMP-2 の発現を有意に阻害した。

## 【0305】

概して、これらのデータは、RNase B1でのマウスの処理が腫瘍の成長および転移の抑制をもたらし、かつMMP-2等の脈管形成因子の合成の阻害をもたらすことを示す。

## 【0306】

## 実施例 10

RNase B1の局所的皮下投与は脈管形成を阻害する。

MMP-2は重要な脈管形成因子であるので、本発明者らは、RNase B1がイン・ビボで脈管形成に影響し得るか否かを以下のように判断した。

## 【0307】

## 材料および実験方法

脈管形成の局所的誘導 -  $100\text{ng}$  / スポンジのアンジオゲニンを含浸させたゲルフォームを、ヌードマウスの両側に皮下移植し、2日後に、マウスに、RNase B1 ( $100\mu\text{l}$  中  $250\mu\text{M}$  RNase B1) を片側に、PBSを他方側に、2日毎に7回腹腔内注射した。

## 【0308】

CD31 / PE CAM-1の免疫蛍光染色 - (Pharmacia & Upjohn, Peapack, NJから得られた)凍結ゲルフォーム検体を切片化し(10ないし $12\mu\text{m}$ )、正に荷電されたスライド上に設置し、30分間風乾した。次いで、切片を冷アセトン中で5分間固定し、続いて、1:1アセトン:クロロホルムの溶液中で5分インキュベートし、アセトン単独中でさらに5分間インキュベートした。次いで、試料をPBSで3回洗浄し、PBS中の4%魚ゼラチンを含有する蛋白質-ブロッキング溶液と共に室温にて20分間インキュベートし、ラットのモノクローナル抗マウスCD31抗体(Ph

10

20

30

40

50

arming en , San Diego , CA ) の 1 : 800 希釀と共に 4 にて 18 時間インキュベートした。抗体のインキュベーションに続き、スライドを PBS で 3 回濯ぎ（各々 3 分）、ヤギ抗ラット Alexa 594 (Molecular Probes Inc. , Eugene , OR ) に結合した二次ヤギ抗ラット抗体の 1 : 200 希釀と共に室温にて暗所で 1 時間インキュベートした。次いで、試料を PBS で 3 回洗浄し（各々 3 分）、次いで、水中の Hoechst 33342 、三塩酸塩、三水和物 10 mg / mL を含む蛍光用の Vectashield 設置培地 (Molecular Probes Inc. , Eugene , Oregon ) を設置した。免疫蛍光顕微鏡は、 Chroma , Inc. (Burlington , VT ) からの 100W HBO 水銀球およびフィルター組を備えた Zeiss Axio plan 顕微鏡 (Carl Zeiss , New York , NY ) を用いて行って、赤色、緑色、および青色蛍光イメージを個々に捕獲した。イメージは、 C5810 Hamamatsu 色冷却 3 CCD カメラ (Hamamatsu , Japan ) を用いて捕獲し、 Optimas イメージングソフトウェア (Silver Springs , MD ) を用いてデジタル化した。Adobe Photoshop ソフトウェア (Adobe Systems , Mountain View , CA ) を用いてイメージをさらに処理した。内皮細胞を赤色蛍光によって同定した。

#### 【 0309 】

TUNEL アッセイ - ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスクレアーゼ媒介 dUTP ニック末端標識 (TUNEL) アッセイでは、Klenow-Frag E1 キット (Oncogene Cambridge , MA ) を用いた。切片 (10 μm) をキシレン中で脱パラフィン化し、続いて、暫時のエタノール溶液 (100, 100, 95 および 70% エタノール - 各々 5 分) 中に再度水和した。調製物をプロテイナーゼ K 处理に 15 分間付し、PBS 中で十分に洗浄し、製造業者によって供された平衡緩衝液中で室温にてブレインキュベートした。過剰の液体を落とした後、ターミナルデオキシヌクレオチドトランスクレアーゼおよびジゴキシゲニン - 11-dUTP を調製物に適用した。スライドを 37 にて 1 時間インキュベートし、予め加温した停止 / 洗浄緩衝液中で 37 にて 30 分間洗浄し、次いで、PBS 中で 3 回洗浄した。特異的染色は、結合体としてフェロキシダーゼを担持する抗ジゴキシゲニン抗体の添加によって達成した。逆染色の後、カバーガラス下にスライドを設置し、茶色のアポトーシス細胞を光学顕微鏡によって可視化した。

#### 【 0310 】

##### 実験結果

RNase B1 は血管のアンジオゲニン誘導発生を阻害する - イン・ビボにて脈管形成を阻害する RNase B1 の能力をテストするために、アンジオゲニン含浸ゲルフォームをヌードマウスの両側に皮下移植し、続いて、RNase B1 または PBS を腹腔内注射した。図 37 に示されるように、アンジオゲニン - PBS 処理の結果、血管の塊状発生がもたらされた（図 37 、アンジオゲニン）が、アンジオゲニン - RNase B1 処理の結果、血管が顕著に減少した（図 37 、アンジオゲニンおよび RNase B1 ）。

#### 【 0311 】

これらの結果は、イン・ビボで脈管形成を阻害する RNase B1 の能力を示す。

#### 【 0312 】

RNase B1 は A375SM 誘導腫瘍において腫瘍 MVD を低下させる - 微小血管密度 (MVD) によって示される腫瘍関連新生血管形成は、抗 CD31 抗体を用いて免疫組織化学によって測定した。視野当たりの腫瘍 MVD の顕著な低下は、対照腫瘍と比較して、RNase B1 での処理に続いて観察された。MVD の平均数は、対照の未処理 A375SM 誘導腫瘍についての  $43 \pm 7$  と比較して、RNase B1 処理 A375SM 腫瘍において  $12 \pm 5$  であった（データは示さず）。さらに、TUNEL 陽性腫瘍細胞の数は、調べた腫瘍における MVD と強く相関した。アポトーシスを受けている腫瘍細胞の数は、対照マウスでの腫瘍におけるよりも RNase B1 処理動物においてより高かった。かくして、アポトーシス細胞のパーセンテージは、RNase B1 処理 A375SM 50

メラノーマ腫瘍において $31.2 \pm 7.3\%$ であった。対照的に、アポトーシス細胞のパーセンテージは、対照 A 375SM 腫瘍に対して $2.2 \pm 1.1\%$ であった。

### 【0313】

かくして、これらの結果は、RNase B1処理が、メラノーマ腫瘍関連新生血管形成を有意に減少させ、腫瘍細胞のアポトーシスを増加させることを示す。

### 【0314】

#### 実施例11

RNase B1はDMHモデルにおいて微小血管密度を低下させる。

#### 材料および実験方法

ラット - 6週齢で体重が約160gの雄Wistarラットは、Charles River由来異系交配雄ラットから得られた。

### 【0315】

DMH-1, 2-ジメチルヒドラジン(DMH)はSigma(St. Louis, MD, USA)から購入した。DMHを使用直前にPBS中の1.5%EDTAの溶液に溶解させ、溶液のpHをpH 6.5にした。

### 【0316】

DMHモデルの作製 - DMHをラットに筋肉内(i.m.)注射した(40mg/kg体重)。注射の時点において、ラットは体重が250グラムであった。

### 【0317】

腫瘍は、DMHの皮下注射で投与したジメチルヒドラジン(DMH)を用いてラットで誘導した(15mg/100g体重、5週間の間一週間にについて1回)。対照群にはPBS+ビヒクリル(EDTA)の注射を与えた。

### 【0318】

DMH-モデルの分析 - ラットはまずエーテルで麻酔し、次いで、屠殺した。各ラットから、結腸を切り出し、異常な陰窩病巣(ACF)または腫瘍をカウントし、測定した。対照からの、およびRNase B1処理ラットからの腫瘍を固定し、パラフィン中に包埋し、腫瘍切片を、さらに、組織病理学(H&E染色)、血管モニタリングのための抗CD-31抗体での免疫染色、またはアポトーシスについてのTUNELアッセイによって分析した。

### 【0319】

CD31/PECAM-1の免疫蛍光染色 - は、前記した実施例10に記載されているように行った。簡単に述べると、DMHまたはDMH+RNase B1処理マウスで発生した腫瘍からのパラフィン切片(10μl)を、PECAM-1(H-300)抗体を用いるCD31免疫染色に付した(sc-8306, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA)。メジアン腫瘍断面における血管をカウントし、その直径を測定した。各腫瘍において、血管の合計面積および腫瘍-断面積の間の比率を計算した。実験は2回反復し、各処理は6ないし10匹のラットに適用した。

### 【0320】

#### 実験結果

腫瘍関連新生血管形成は、RNase B1-DMH処理マウスにおいて減少した - CD31免疫染色は、腫瘍内の血管の存在を明らかとし、微小血管密度(MVD)の計算の基礎として供した。図42aないしbに示すように、RNase B1投与は、腫瘍当たりの血管(脈管形成)の数を顕著に低下させることが判明した。

### 【0321】

#### 実施例12

RNase B1は、メラノーマ、結腸および乳頭癌腫細胞の侵入性/コロニー化能力をイン・ビトロで阻害する。

RNase B1は癌細胞の形態およびアクチン組織化に影響することが示されたので、本発明者らは、さらに、RNase B1が細胞運動性に影響するか否かを以下のよう

10

20

30

40

50

にさらに調べた。

### 【0322】

#### 材料および実験方法

結腸癌腫 (HT - 29) または乳癌細胞 (ZR - 75 - 1) 侵入 / コロニー化アッセイ - HT - 29 結腸癌細胞または ZR - 75 - 1 細胞を、1 および  $10 \mu\text{M}$  RNase B1 の存在下または非存在下で 4 日間処理した。市販の 24 ウェル侵入チャンバー (Becton Dickinson, Bedford, MA) のウェルおよび Matrigel 被覆インサートを  $0.5 \text{ ml}$  の無血清培地で一晩再水和し、製造業者の指示に従って処理した。 $0.5 \text{ ml}$  の HT - 29 対照 (すなわち、RNase B1 の非存在下)、または  $2.5 \times 10^4$  細胞を含有する RNase B1 処理細胞懸濁液を、各々、チャンバーの頂部に加え、10% FCS を含有する  $0.750 \text{ ml}$  の DMEM 培地を下方チャンバーに加えた。侵入チャンバーを 37° の細胞培養インキュベーター中で 22 時間インキュベートした。インサートの膜の上方表面の非侵入細胞をスクラビングによって除去した。膜の下方表面の細胞を Diff - Quick (商標) 染色で染色した。膜を固定し、光学顕微鏡下で細胞を 200 倍倍率でカウントした。アッセイは三連で行った。

### 【0323】

Matrigel 被覆フィルター侵入アッセイ - A375SM 細胞を RNase B1 の存在下または非存在下で処理し、22 時間後に、Matrigel 被覆フィルターに侵入した細胞の数をカウントした。

### 【0324】

A375SM 細胞からの MMP - 2 放出 - 転移性 A375SM 細胞 ( $5 \times 10^3$ ) を完全イーグル最小必須培地 (CMEM) 中で成長させ、6 ウェルプレート中で平板培養し、24 時間付着させた。細胞を 1 または  $10 \mu\text{M}$  の RNase B1、あるいは PBS で 4 日間処理した。4 日間の処理は、RNase B1 が MMP - 2 放出に影響するのに最適なことが判明した。5 日目に、CMEMを取り出し、無血清培地で一晩置き換えた。上清を集め、遠心分離し、培地を  $500 \mu\text{l}$  の試料にアリコットし、-20° にて貯蔵した。全 MMP - 2 は、キンチキン MMP - 2 イムノアッセイキット (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN) によって測定した。試料をキットによって供給された希釈剤中に 10 倍希釈した。MMP - 2 は供給業者の指示に従って測定し、結果を細胞数に従って調整した。

### 【0325】

MMP - 2 コラゲナーゼ活性 (ザイモグラム) - MMP - 2 活性は、基材 - 含浸ゲル上で測定した。HUEC 細胞または転移性 A375SM 細胞 ( $5 \times 10^3$ ) を 6 ウェルプレート中で平板培養し、24 時間付着させた。細胞を 1 ないし 5 または  $10 \mu\text{M}$  RNase B1、あるいは PBS で 4 日間処理した。4 日間の処理は、RNase B1 が MMP - 2 活性に影響するのに最適であることが判明した。5 日目に、CMEMを取り出し、無血清培地で一晩置き換えた。上清を集め、容量を細胞数につき調整し、負荷し、非還元条件下でゼラチン含浸 ( $1 \text{ mg/ml}$ ; Difco, Detroit, MI) ドデシル硫酸ナトリウム / 8% ポリアクリルアミドゲル上で分離し、続いて、2.5% トリトン X - 100 (BDH, Poole, UK) 中で 30 分間振盪した。次いで、ゲルを、pH 7.6 の 50 ミリモル / L トリス、0.2 モル / L NaCl、5 ミリモル / L CaCl<sub>2</sub> (w/v) 中で 37° にて 16 時間インキュベートした。インキュベーションの最後に、ゲルを、メタノール / 酢酸 / H<sub>2</sub>O (30 : 10 : 60) 中の 0.5% クーマシー G 250 (Bio-Rad, Richmond, CA) で染色した。MMP - 2 コラゲナーゼ活性の存在は青色ゲル上の白色バンドとして見られる。

### 【0326】

#### 実験結果

RNase B1 はイン・ビトロにて HT - 29 または ZR - 75 - 1 侵入性を低下させる - 以下の表 6 に示すように、HT - 29 および ZR - 75 - 1 細胞は Matrigel 被覆フィルターに進入することができた。驚くべきことに、RNase B1 は有意か

10

20

30

40

50

つ用量依存的に(1および10 μM)結腸癌腫細胞の侵入性/コロニー化能力を阻害することが判明した。

表 6

HT-29またはZR-75-1侵入性に対するRNase B1の効果

細胞系	対照	RNase B1 濃度	
		1 μM	10 μM
HT-29	963.7±95.7	623.3±104.2	223.7±13.1
ZR-75-1	1297.7±62.5	784.0±51.5	271.7±16.6

表6: Matrigel被覆フィルターを通してのZR-75-1乳癌およびHT-29-結腸癌細胞侵入性に対するRNase B1の効果。HT-29およびZR-75-1細胞において、1 μM(各々、P<0.05およびP<0.01)および10 μM(各々、P<0.01およびP<0.001)においてRNase B1は用量応答様式で細胞侵入性を阻害した。

## 【0327】

RNase B1はイン・ビトロにてA375SM侵入性を低下させる - A375SM細胞は1または10 μM RNase B1の存在下または非存在下で処理し、細胞侵入性の程度をmatrigel被覆フィルターにて測定した。図38に示すように、A375SM侵入性の阻害に対するRNase B1の有意な用量依存性効果を観察した。未処理A375SM細胞(対照)においては、1216±68細胞がMatrigel被覆フィルターに進入したが、1または10 μM RNase B1で処理した725±59または211±14 A375SM細胞はMatrigel被覆フィルターに進入した。

## 【0328】

RNase B1はMMP-2の分泌を有意に阻害する - MMP-2放出のレベルをA375SM細胞からイン・ビトロで測定した。図48に示すように、全MMP-2放出を阻害するにおけるRNase B1の用量依存性効果が得られ、最大阻害効果は10 μM RNase B1の存在下で観察された。

## 【0329】

MMP-2コラゲナーゼ活性はRNase B1処理に続いて低下する - A375SMまたはH U V E C細胞の上清のザイモグラムを用いて、MMP-2活性を決定した。図49aないし bに示すように、未処理A375SM(図49a)およびH U V E C(図49b)細胞は共に強いMMP-2活性を呈し、RNase処理細胞は72 kDa MMP-2のバンド強度の用量依存性減少を呈し、これは、減少したMMP-2活性を示唆する。同様に、用量依存性減少もまた、RNase B1処理細胞でのMMP-9活性で観察された(図49b)。

## 【0330】

考え合わせると、これらの結果は、RNase B1の抗脈管形成/抗癌特徴を明瞭に示す。

## 【0331】

## 実施例 13

RNase B1の静脈内および腹腔内投与は、HT-29結腸癌モデルにおいて腫瘍のサイズを低下させる。

## 材料および実験方法

s.c./i.v. 結腸癌異種移植片モデルの作製 - ヒト結腸癌起源の腫瘍(HT-29)を、実験の開始において、体重が18ないし20グラムの4ないし5週齢ヌードマウス(CD-1 nu/nu)雄に移植した。HT-29細胞(2×10<sup>6</sup>/マウス)をマウスの左側臀部に皮下(s.c.)注射した。T2 RNase(RNase B1、100 μlのPBS中5mg)またはPBS単独を、結腸癌細胞の投与から24時間、5日

10

20

30

40

50

および10日後に、尾静脈に静脈内( i . v . )注射した。15日後に、マウスを屠殺し、腫瘍または注射の領域を組織病理学的実験によって評価した。

#### 【0332】

対照およびT2 RNase処理腫瘍のパラフィン切片を、アポトーシスの証拠のために、ヘマトキシリンおよびエオシン( H & E )で、Klenow-FragE1キット( Oncogene , Cambridge , MA )で染色した。

#### 【0333】

s . c . / i . p . 結腸癌異種移植片モデルの作製 - 結腸癌細胞( HT - 29 )およびヌードマウス( CD - 1 nu / nu )は該 s . c . / i . v . モデルに関してであった。実験の初日において、細胞をマウスの左側臀部に注射した( 10<sup>6</sup> 細胞 / マウス )。RNase B1を腹腔に注射し、2日目に開始し、1日毎に注射した。2つの実験を行った。最初の実験においては、100 μl の PBS 中の 1 および 5 mg / 注射の用量の RNase B1 を適用した。第 2 の実験においては、0 . 01 ないし 1 mg / 注射の間の範囲の RNase B1 の用量を用いた。PBS 単独を対照として注射した。サイズ測定および組織病理学的調査のために、腫瘍を実験の 30 日目に切り出した。方程式( 長さ × 幅<sup>2</sup> ) / 2 を用いて腫瘍容量を計算した。

#### 【0334】

##### 実験結果

RNase B1 の静脈内投与は腫瘍重量を効果的に低下させることができる - RNase B1 処理マウスにおいては、腫瘍重量の 60 % 低下が対照と比較して観察された( 図 36 a ないし b )。これらの結果は、RNase B1 の静脈内投与が、結腸癌腫成長を阻害するにおいてかなり効果的であることを示す。

#### 【0335】

RNase B1 の腹腔内投与は腫瘍のサイズを効果的に低下させる - s c / i p マウスモデルにおいて、RNase B1 は HT - 29 由来 - 癌腫の成長を有意に阻害した( 図 39 a ないし b )。1 および 5 mg / 注射の治療用量( 50 および 250 mg / kg )において、腫瘍の用量は、各々、44 % および 41 % だけ低下した( P < 0 . 05 、図 39 b )。0 . 001 、 0 . 01 、 0 . 1 、 0 . 5 および 1 mg / 注射( 各々、 0 . 05 、 0 . 5 、 5 、 25 および 50 mg / kg )においては、腫瘍容量は、対照と比較して、各々、 3 % 、 41 . 5 % 、 34 . 4 % 、 51 . 1 % および 62 . 2 % ( 図 39 a )だけ低下した( P < 0 . 05 )。これらの結果は、 1 ないし 4 μg / 100 μl ( 0 . 25 ないし 1 μM ) の間の濃度の RNase B1 がクローニ原性の速度に対して同様な阻害効果を有する、HT - 29 細胞での従前のイン・ビトロ実験と合致する。かくして、これらの結果は、結腸腫瘍サイズに対する RNase B1 の予防( 図 39 a )ならびに治療( 図 39 b )効果を示す。

#### 【0336】

RNase B1 は処理されたマウスの腹膜に蓄積する - 図 40 a ないし c に示すように、ウサギ抗 RNase B1 および FITC 結合ヤギ抗ウサギを用いる免疫組織化学染色は、PBS 处理マウスにおいてはそうでないが( 図 40 c )、RNase B1 处理マウスにおける( 図 40 b ) RNase B1 の存在を明らかにした。加えて、処理したマウスの断面の RNase B1 免疫染色は、腫瘍血管の基底膜への RNase B1 の蓄積を明らかにした( 図 41 a ないし c )。

#### 【0337】

かくして、これらの結果は、RNase B1 が腹膜に進入し、次いで、腫瘍血管の基底膜への道を見出すことを示す。

#### 【0338】

投与の腹腔内様式はヌードマウスにとって非毒性であるように思われるが言及するに値する。というのは、体重および他の運動パラメータは、実験を通じて未処理マウスのそれと同等なままだからである。

#### 【0339】

10

20

30

40

50

#### 実施例 14

R N a s e B 1 は癌動物モデルにおいてアポトーシスを増強する。

##### 材料および実験方法

T U N E L アッセイ - は前記した実施例 10 に記載したように行つた。

##### 【 0 3 4 0 】

メラノーママウスマodel - B 1 6 F 1 誘導メラノーママウスマodelは、前記実施例 8 に記載したように作製した。

##### 【 0 3 4 1 】

結腸癌マウスマodel - D M H および H T - 2 9 結腸癌モデルは、各々、前記実施例 11 および 13 に記載される。

##### 【 0 3 4 2 】

##### 実験結果

R N a s e B 1 は、B 1 6 F 1 誘導メラノーマ細胞腫瘍においてアポトーシスを増強する - 腫瘍内のアポトーシスの速度を測定するために、R N a s e B 1 処理または未処理メラノーママウスマodelからの腫瘍組織切片を T U N E L アッセイに付した。図 4 3 a ないし b に示すように、R N a s e B 1 処理マウスにおいては、アポトーシス速度は、未処理メラノーママウスマodelと比較して顕著に増加した。

##### 【 0 3 4 3 】

R N a s e 処理 D M H - 結腸癌ラットモデルにおける増強されたアポトーシス速度 - 図 4 4 a に示すように、D M H 結腸癌モデルから得られた腫瘍は、無視できるレベルのアポトーシスを呈した。他方、R N a s e B 1 処理ラットから得られた腫瘍は顕著なレベルのアポトーシスを呈した(図 4 4 b )。2 0 0 倍倍率の 1 0 の異なる顕微鏡視野を 3 つの異なる組織切片でカウントすると、アポトーシス細胞の数は対照未処理腫瘍において  $2 . 0 1 \pm 0 . 2$  / 顕微鏡視野であり、R N a s e B 1 処理動物の腫瘍においては  $3 7 \pm 5$  / 顕微鏡視野であることが判明した。

##### 【 0 3 4 4 】

R N a s e B 1 で処理した H T - 2 9 結腸癌腫瘍誘導マウスにおける高い割合のアポトーシス細胞 - 図 4 5 a ないし d に示すように、未処理 H T - 2 9 誘導結腸癌腫瘍マウスは生きたかつ活発に分裂する核を呈したが(図 4 5 a および c )、R N a s e 処理マウスは凝縮した細胞質および核(図 4 5 b )ならびに高い割合のアポトーシス細胞(図 4 5 b )を呈した。

##### 【 0 3 4 5 】

概して、これらの結果は、種々の癌誘導動物モデルに対する R N a s e B 1 の顕著なアポトーシス効果を示し、癌および炎症 / 虚血性病のような、細胞のアポトーシスおよび異常な蓄積の障害の処置における R N a s e B 1 の使用を示唆する。

##### 【 0 3 4 6 】

##### 実施例 15

T 2 R N a s e およびタキソールは、結腸癌異種移植片モデルにおける相対的腫瘍容量の阻害に対する相乗的効果を呈する。

T 2 R N a s e が樹立された腫瘍についての腫瘍成長を阻害できるか否かをテストし、かつ T 2 R N a s e がタキソール(一般的な結腸癌細胞傷害性薬物)による相加的または相乗的効果を呈するかを判断するために、R N a s e B 1 およびヒト R N a s e 6 P L を、以下のように、結腸癌異種移植片モデルについてタキソールと一緒に使用した。

##### 【 0 3 4 7 】

##### 材料および実験方法

(以下のプロトコルは Fujii T. ,ら、Anticancer Res. 2003 23 : 2405 - 2412 に基づく)

動物 - R N a s e B 1 : 各々体重が 2 0 グラムの 7 週齢のヌード雄マウス( B a l b / c n u / n u )。R N a s e 6 P L : 各々体重が 3 0 グラムで、自由に正常な食事を

10

20

30

40

50

とらせ、かつ病原体フリーの条件下の、7ないし9週齢の雄CD-1 nu/nuヌードマウス( Charles River, Wilmington, MA)。

【0348】

癌細胞 - ヒト結腸癌 LS174T。LS174T癌細胞 [マウス当たり $1 \times 10^6$  細胞 (RNase B1) または $100 \mu l$  培地当たりマウス当たり $5 \times 10^5$  細胞 (RNase 6PL)] を、前記したように、ヌードマウスの左側臀部に皮下注射した。

【0349】

RNase B1投与 - 腫瘍が触知できると(細胞注射から10ないし13日後)開始し、かつ1日おきに3週間の腹腔内注射よりなる。RNase B1容量は10および1000マイクログラム/ $100 \mu l$ /注射(各々0.5および50mg/kg)。

10

【0350】

RNase 6PL投与 - 腫瘍が触知でき(80ないし100mm<sup>3</sup>)、かつマウスを以下の処理群(n=6)にランダム化した、移植から10ないし13日後に実験を開始した:群1:RNase 6PL、2q×12腹腔内注射(0.5mg/kg)、群2:RNase 6PL、2q×4、続いてPBS、2q×3および、次いで、RNase 6PL、2q×5、群3:PBS、2q×4、続いてタキソール 2q×3静脈内注射(25mg/kg)、ついで、PBS、2q×5、群4:RNase 6PL、2q×4腹腔内注射(0.5mg/kg)、続いてタキソール 2q×3静脈内注射(25mg/kg)および、次いで、RNase 6PL、2q×5。腫瘍化したマウスの対照群には100μlのPBSを12回腹腔内にて2日ごとに与えた。

20

【0351】

腫瘍が触知できる(直径3ないし5mm)場合に処置を開始した。RNase B1およびRNase 6PLの双方については、腫瘍は3つの直交直径においてキャリパーで一週間当たり3回測定した。腫瘍容量は半楕円体についての式[(長さ×幅<sup>2</sup>)/2]によって記載されるように計算し、平均値として表した。実験は最初の処置の30日後に(RNase B1)または24日後(RNase 6PL)停止し、次いで、全てのマウスを同時に殺し、オートプシーに付し、それらの腫瘍組織を収穫した。免疫組織化学およびH&E-染色手法では、腫瘍の1つの部分をホルマリン中に固定し、パラフィン中に包埋した。

【0352】

30

タキソール調製および投与 - RNase B1 - タキソール研究では(図46):50mgのタキソールを18mlのプロピレングリコールおよび3mlのエタノールに溶解させ、それに続いて、9mlの水を加えた。タキソールは3週間にわたって7日のうち5連続日の間腹腔内注射によって投与し、腫瘍が触知できると開始した(細胞注射から13日後)。対照にはPBSまたはポリプロピレングリコール+エタノールを与えた。タキソールおよびRNase 6PL実験では(図64)、商業的タキソール調製物[527mgの精製されたクレモフォールELおよび49.7% v/v脱水アルコール中6mg/mlのストックパクリタクセル注射(6mg)、USP, Mead Johnson (Oncology Products), Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ]を使用前にPBSで希釈し、前記したように、尾静脈に静脈内注射した。

40

【0353】

実験の間、キャリパーを用いて腫瘍を1週間に2回測定した。腫瘍容量を、方程式(長さ×幅<sup>2</sup>)/2(半楕円体)を用いて計算した。各マウスにタグを付け、個々にモニターした。相対的腫瘍容量(RTV)はRTV =  $V_i / V_0$ と定義され、ここに、 $V_i$ はいずれかの与えられた時点における腫瘍容量であり、 $V_0$ は最初の処置の時間におけるそれであった。実験の最後において、試料を組織学のために採取した。

【0354】

実験結果

高度に脈管形成性のLS174T細胞系を、組み合わせたRNase B1およびRN

50

a s e 6 P L、ならびにタキソール処置で用いた。図46で明瞭に示すように、タキソールは相対的腫瘍容量(R T V)に対してわずかな効果を呈するに過ぎないが、RNase B1は腫瘍成長を阻害するにおいて有利な効果を呈する。しかしながら、RNase B1およびタキソールを同時にマウスに注射した場合、腫瘍成長の有意な阻害が観察され、これは、タキソール処置に対してRNase B1の相加的効果よりもむしろ相乗的効果を示した。さらに、終点におけるRTVは、各々、対照、タキソール、RNase B1およびRNase B1+タキソール処置において158.2、195.3、61.4および13.43であり(図46)、これは腫瘍成長の効果的な抑制を最初に示すものである。

## 【0355】

10

タキソールと共に組換えヒトT2 RNase 6 P L蛋白質を用いる結果(図64)もまた相乗的効果を示し、ヒトT2 RNaseが、もう1つの抗癌処置と共に投与した場合に腫瘍の成長および容量を相乗的に阻害するというさらなる証拠を提供する。

これらの結果は、組み合わせた処置が各薬物単独よりも腫瘍成長速度を阻害するより大きな潜在能力を有することを示す。これらの結果は、同様に予め樹立された腫瘍の成長を阻害する多様な起源のT2 RNaseの能力をさらに示す(RNase B1およびRNase 6 P L)。

## 【0356】

## 実施例16

多様なT2 RNaseにおけるアクチン結合

20

T2ファミリーの多様なRNaseのアクチン結合活性を調べた。

## 材料および実験方法

アクチンウエスタンプロット - このアッセイはHuら、1993(Actin is a binding protein for angiogenin. Proc Natl Acad Sci USA. 90:1217-21)に記載された方法に基づく。簡単に述べれば、RNase B1、アンジオゲニン、RNase I(1 μgの各蛋白質)および(陽性対照としての)G-アクチンをSDS-PAGE、続いてウエスタンプロット分析に付した。ニトロセルロース膜をBSAで一晩ブロックし、25 μgのG-アクチンを含有する5 mlの緩衝液中でさらに一晩インキュベートし、それに続いて、モノクローナルマウス抗アクチンIgMを適用し、続いてHRP結合ヤギ抗マウスIgMアクチン(Ab-1)キット[CAT # CP01-1EA(Oncogene)]を適用した。HRP由来シグナルは、Super-Signal(登録商標)増強-ケミルミネセンスシステム(ECL, Pierce)によって検出した。

30

## 【0357】

RNase 6 P Lアクチン結合アッセイ：スロットプロットおよびSDS-PAGE-Slot Blot(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Calif.)を用いて直接的にプロットした25 μg(50 μg中)のRNase 6 P L、RNase B1、またはG-アクチンを含有するニトロセルロース膜を、0.25%Tween 20を含む1×リン酸-緩衝化生理食塩水(PBS)中の5%(wt/vol)スキムミルクで4にて一晩ブロックし、0.25%Tween 20を含む1×PBS中の1%(wt/vol)ミルクで各々10分間2回洗浄した。次いで、膜を、0.2 mM CaCl<sub>2</sub>、0.2 mM ATPを含有する新たに調製した2 mMトリス-HCl pH 8.0緩衝液(緩衝液G)で室温にて10分間平衡化し、引き続いて、5 μg/mlのG-アクチンを添加して4にて一晩インキュベートした。膜を0.25%Tween 20、0.2 mM CaCl<sub>2</sub>を含む1×PBS中の1%(wt/vol)ミルクで室温にて毎回10分間3回洗浄し、2 mMトリス-HCl pH 7.4、0.2 mM CaCl<sub>2</sub>中の抗アクチン-IgM抗体(1/5000)で1時間プローブした。次いで、膜を、0.25%Tween 20、2 mM CaCl<sub>2</sub>を含むPBSで10分間3回洗浄し、第2の抗体、HRP結合ヤギ抗マウスIgM(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)と、前記したよう

40

50

に 1 / 1 0 0 0 0 の希釈にて反応させた。膜を、基質としてのルミノール (Super Signal Substrate; Pierce, Rockford, III) を含有する検出試薬を用いて増強されたケミルミネセンス (ECL) で処理し、X線フィルム (Hyperfilm-MP; Amersham International plc) に暴露して、結合した抗体を可視化した。

#### 【0358】

S D S - P A G E におけるアクチン結合アッセイは 12 . 5 % S D S - T r i c i n e ゲルで行った。溶液中の蛋白質結合は Huら ( Proc Natl Acad Sci U S A . 1993 ; 90 : 1217 - 1221 ) に従って行った。R N a s e 6 P L および G - アクチンをエッペンドルフチューブ中で、緩衝液 G 中 1 : 1 (モル : モル) の比率 10 にて予め混合し、室温にて 30 分間インキュベートした。次いで、1 - 3 (ジメチルアミノ) プロピル] - 3 エチル - カルボジイミドメチオダイド ( E D C , Sigma - A l d r i c h ) を 5 mM の最終濃度まで加えた。室温でのさらに 30 分間のインキュベーションの後、架橋された複合体をウェルに溶出させた。各未反応対照もゲルに適用した： R N a s e 6 P L および G - アクチンは、それらの間の複合体のように同一の予備処理を従前に受けた。

#### 【0359】

##### 実験結果

細菌および A . n i g e r T 2 R N a s e のアクチン結合特性 - 図 4 7 a ないし b 20 に示すように、アクチン - ウエスタンプロット分析は、G - アクチンへの E . c o l i R N a s e I および A . n i g e r R N a s e B 1 双方の強い会合を示し、これは、それらのアクチン結合能力を示す。

#### 【0360】

ヒト R N a s e 6 P L のアクチン結合 - 図 6 6 a および 6 6 b に示すように、細菌および酵母 T 2 R N a s e のように、R N a s e 6 P L はアクチンに対して強くかつ特異的な結合を示した。密な会合にて分子と反応するに過ぎない架橋剤 1 - [ 3 - (ジメチルアミノ) プロピル] - 3 - エチル - カルボジイミドメチオダイド ( E D C , A l d r i c h ) を用い、アクチンに対するヒト R N a s e 6 P L の高い親和性が示された ( 図 6 6 a 、 レーン 4 参照 ) 。アクチンと反応した R N a s e 6 P L および R N a s e T 2 のスロットプロットもまた、抗アクチン抗体で検出可能な双方のリボヌクレアーゼに対するアクチンの結合を示す ( 図 6 6 b ) 。このシリーズの実験において、アクチンもまたプロットされて、アクチンに対する抗アクチン結合の特異性を示す ( 底部スロット ) 。 30

#### 【0361】

これらの結果は、広く多様な ( 細菌からヒトまで ) 起源の T 2 R N a s e に特徴的な強いアクチン結合活性のさらに直接的な証拠を提供し、これは、異常に増殖する細胞の増殖、コロニー化、分化および / または発生を予防し、阻害しある / または逆行させる際の T 2 R N a s e の効率、ならびに細胞の運動性および成長に対する効果に相關する。

#### 【0362】

##### 実施例 17

###### R N a s e B 1 の細胞局所化

###### 材料および実験方法

培養された細胞の免疫細胞化学染色 - A 3 7 5 S M または H U V E C 細胞をチャンバースライド上で培養し、冷アセトンで 20 分間固定した。スライドを濯ぎ、次いで、4 % ゲルフィッシュで室温にて 20 分間ブロックした。チャンバースライドを一次抗体と共に 4

にて一晩インキュベートした。0 . 0 1 M p H 7 . 4 P B S で 3 回洗浄した後、細胞を、P B S 中の 4 % ゲルフィッシュで希釈した F I T C 結合抗ウサギ二次抗体と共に 60 分間インキュベートした。H U V E C C D 3 1 免疫染色のために、検体を、ラットモノクローナル抗マウス C D 3 1 抗体 ( Ph a r m i n g e n , San Diego , C A ) の 1 : 8 0 0 希釈と共に 4 にて 18 時間インキュベートした。試料を P B S で各々 3 分間 3 回濯いだ後、スライドを、ヤギ抗ラット A l e x a 5 9 4 ( M o l e c u l a r 50

Probes Inc., Eugene, OR)に結合した二次ヤギ抗ラット抗体の1:200希釈と共に室温にて暗所にて1時間インキュベートした。試料をPBSで3回各々3分間洗浄し、水中のHoechst 33342、三塩酸塩、三水和物10mg/ml溶液(Molecular Probes Inc., Eugene, O)と共に蛍光用のVectashield設置培地を設置した。スライドを、Zeissレーザー走査共焦点顕微鏡で観察した。Z-セクションおよびXZ-セクションは、LMS510ソフトウェアを用いることによって3D走査から得た。

## 【0363】

## 実験結果

RNase B1はHUVEC細胞内に局所化される - 図50aないし<sub>t</sub>に示すように、RNase B1は細胞膜に徐々に進入し、これは、CD31免疫染色の赤色標識によって検出され、細胞に進入する。

## 【0364】

RNase B1はA375SMメラノーマ細胞の核に到達する - 図51aないし<sub>c</sub>に示すように、RNase B1への2時間の暴露中に、細胞の形態は変化し、丸くなるが(図51a)、4時間後には、いくつかの細胞の細胞質内にRNase B1が観察され(図51b)、8時間後に、細胞核に到達する(図51c)。メラノーマA375SM細胞の多くは、RNase B1への8時間の暴露後にアポトーシスの特徴を呈することが言及するに値する(図51c)。

## 【0365】

かくして、これらの結果は、RNase B1がHUVECおよびメラノーマA375SM細胞双方に進入し、メラノーマ細胞においてアポトーシスを誘導することを示す。該結果は、細胞へのRNase B1進入が、花粉管で観察された直後の応答と対照的には、数時間続く遅いプロセスであることも明瞭に示す。

## 【0366】

## 実施例18

## RNase B1をコードする遺伝子のクローニング

RNase B1が真菌*Aspergillus niger*によって生産されるメカニズムは未だ知られていない。RNase T2-ファミリーメンバーである、*Aspergillus oryzae* RNase T2(Ozekiら、1991. Cloning and nucleotide sequence of the genomic ribonuclease T2 gene (mtB) from *Aspergillus oryzae*. Curr Genet. 19: 367-73)および*Rhizopus niveus* RNase Rh(Horiuchiら、1988. Primary structure of a base non-specific ribonuclease from *Rhizopus niveus*. J Biochem. 103: 408-18)をコードする遺伝子はクローニングされている。RNase B1の遺伝学的理解は非常に重要である。というのは、組換え蛋白質生産についての潜在能力が増大し得るからである。RNase B1のアミノ酸配列を調べるために、それまずトリプシンおよびキモトリプシンで消化し、液体クロマトグラフィーマススペクトル(LC-MS)によって断片を分析し、データベースに対して比較した。いくつかのペプチド配列は*A. saitoi* RNase M(受託番号:P19791; Watanabeら、1990. Primary structure of a base non-specific and adenylic acid preferential from *Aspergillus saitoi*. J Biochem. 10: 303-310)に対して100%相同であることが判明し、同時に、それらは該蛋白質配列の60%よりなるものであった(データは示さず)。taxons saitoiおよび*phoenicus*は、従前は、*A. niger*群の変種として分類されていたことに言及するのは興味深い(Al-Musaallam, A. 1980. Revision of the black *Aspergillus* species. PhD. Thesis

10

20

30

40

50

is, State University, Utrecht, Netherlands)。同定されたアミノ酸配列は、ゲノムDNAで用いることができるDNAオリゴヌクレオチドプライマーの設計を可能とした。殆どのアミノ酸は少なくとも2つのヌクレオチドコドンによってコードされるので、本発明者らは、以下のように、A. nigerコドン用法に従って、低い縮重性を有する縮重プライマーを用いた：順方向プライマー - 5' - T T Y T G G G A R C A Y G A R T G G A A Y - 3' (アミノ酸F107-N112について) (配列番号1) および逆方向プライマー - 5' - C C Y T T I A C R T T R A A R T A R T A R T A - 3' (アミノ酸Y200ないしK206についての逆相補体) (配列番号2)。文字「Y」とはヌクレオチドCまたはTのいずれかをいい、文字「R」とはヌクレオチドAまたはGのいずれかをいう。デオキシイノシン(I)は4つのヌクレオチドのいずれかを置き換える。10

### 【0367】

#### 実験結果

PCR增幅後に得られた主な400-bpバンド(図52)をゲルから切り出し、DNA配列分析のためにpGEM-Tベクター(Promega)にクローニングした。得られた300ヌクレオチドは100アミノ酸についてのオープンリーディングフレームを作り出し(図53)、これは(各々、RNase B1およびRNase Mにおけるアスパラギン酸をグルタミン酸が置き換えた位置123を除いて)RNase MのF107ないしK206に殆ど完全にマッチした。この配列は該遺伝子の中央領域を表す。この配列を用い、Aspergillus niger B1からのRNase B1遺伝子の完全な配列を決定し(GenBank受託番号DQ115376、配列番号15)、RNase B1蛋白質のアミノ酸配列を決定した(GenBank受託番号AAZ22530、配列番号16)。20

### 【0368】

#### 実施例19

##### ヒトRNase 6PL蛋白質のクローニングおよび精製

ヒトにおける染色体6の領域(6q27)の欠失は、いくつかのヒト悪性疾患と関連すると考えられてきた(Cookeら、1996.Genes Chromosomes Cancer 15:223-233; Saitoら、1992.Cancer Res 52:5815-5827)。この領域は、RNase B1を含めた、RNase T2ファミリーと相同性を共有する推定腫瘍サプレッサーRNase 6PL遺伝子を含有することが判明している(Trubiaら、1997.Genomics 42:342-344; Acquatiら、2001.Meth Mol Biol 160:87-101)。T2-ファミリーRNaseの抗癌能力のため、ヒトRNase T2は、内因性ヒト起源のその存在により、癌を治療するためのかなり有利な剤を表し、それにより、ヒトに投与した場合に最適に非免疫原性であって非毒性である。ヒトRNase 6PL蛋白質を抗癌剤として用いることができる可能性をテストするために、ヒトRNase 6PL蛋白質を以下のように合成した。30

### 【0369】

#### 材料および実験方法

Pichia pastorisにおけるヒトRNase 6PL蛋白質の発現 - RNase 6PLについての遺伝子の配列はヒトゲノムプロジェクトにおいて同定され(ゲノム配列: GenBank受託番号NT\_007422; cDNA配列: GenBank受託番号NM\_003730)、図54に模式的に掲げる。全長遺伝子の28751bpのうち、719bpのみがオープンリーディングフレームを形成する。組換えRNase 6PL蛋白質を生産するために、合成719bp cDNA(GenArt GmbH, ドイツ国)をpPIC9Kプラスミドに連結し、さらに、Pichia pastoris酵母に形質転換した。組換え酵母を誘導条件下で(すなわち、1%メタノールの存在下で)成長させ、得られたコロニーをRNase 6PLインサートの存在についてテストした。40

### 【0370】

50

酵母クローニーからのヒト RNase 6 PL 蛋白質の精製 - 組換え RNase 6 PL 蛋白質を精製するために、陽性コロニー（すなわち、RNase 6 PL インサート cDNA を含有するコロニー）を製造業者の指示に従って発酵させ（Invitrogen Inc., Life Technologies）、培地上清を熱処理し（90 にて 10 分間）、続いて、20 mM Tris-HCl pH 7 を用いる透析によって緩衝液を交換した。比較的純粋な蛋白質を、5 ml / 分の流速の 5 ml カラムを用いる高速蛋白質液体クロマトグラフィー（FPLC）における Q Sepharose カラム（Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, U.K.）に負荷した。活性な RNase 6 PL 蛋白質を溶出させるために、0ないし 1 M の NaCl グラジエントを（20 分間の間）カラムに適用し、溶出した蛋白質を 0.5 ml の画分に集めた。別法として、選択された発現するコロニーからの蛋白質抽出物を 5000 rpm において 10 にて 10 分間遠心分離し、上清を、各々、0.45 および 0.2 μm フィルターに通した。濾過した上清を、連続的に回転させつつ、4 にて、500 mM NaCl、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub> を含有する 20 mM Tris-HCl pH 7.4 緩衝液で予め平衡化した 4% 架橋ビーズ化アガロース（Sigma, St Louis, U.S.A.）に固定化されたコンカナバリン A と一晩バッヂ様式で反応させた。溶出および収集のために、カラム（3.5 × 1.3 cm）を蛋白質抽出物 - SEPHAROSE Con A スラリーで調製し、平衡緩衝液で洗浄した。次いで、RNase 6 PL を 500 mM メチル-D マンノピラノシドで溶出させ、5 ml / チューブの画分を集めめた。280 nm における光学密度、および RNase 活性を画分について測定し、ピーク画分（図 67 a）をプールし、透析し、凍結乾燥した。次いで、精製した画分を SDS PAGE でさらに分析した（図 67 b）。

### 【0371】

RNase 活性のアッセイ - 基質としての 1% (w/v) アガロース中の 0.1% (w/v) torula 酵母 RNA (Sigma Chemicals St Louis MO) を用い、RNase 活性を拡散プレートアッセイによって測定した。試料 10 μl を直径 1.5 cm のペトリ皿に加え、37 で 30 分間インキュベートした、次いで、基質を水中の 0.02% (w/v) トルイジンブルーで染色した。RNase 活性は、青色のバックグラウンド上の白色ハローによって示した。

### 【0372】

ヒト RNase 6 PL の物理化学的評価 - 温度最適化のために、種々の温度における RNase 6 PL のインキュベーションに続いて反応混合物に残存する RNase 活性のパーセントを前記したように 0ないし 70 の温度範囲にわたってアッセイした。pH 最適化のために、酢酸ナトリウム緩衝液で調整した 3.5 ないし 7 の pH 範囲にて、RNase 活性を前記したように測定した。

### 【0373】

#### 実験結果

ヒト RNase 6 PL 遺伝子の構造 - RNase 6 PL についての遺伝子の配列をヒトゲノムプロジェクトにおいて同定した。図 54 に模式的に示すように、全長遺伝子の 28751 bp のうち、（9つのエクソンに配置された）719 bp のみがオープンリーディングフレームを形成する（配列番号 3）。

### 【0374】

RNase 6 PL 酵母クローニーの同定 - RNase 6 PL のコーディング領域を Pichia pastoris 酵母の pPIC9K プラスミドにクローニングし、1つのクローニーは約 750 bp の遺伝子インサートを含有することが見出され（図 55 a）、これは、酵母における組換え RNase 6 PL のクローニングを示す。

### 【0375】

組換え RNase 6 PL を Pichia pastoris 酵母において生産する - 陽性コロニーを適当な条件下で培養して、組換え RNase 6 PL を過剰発現させた。酵母蛋白質抽出物を高速蛋白質液体クロマトグラフィー（FPLC）における Q Sepha

10

20

30

40

50

roseカラム(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, U.K.)に通し、あるいはSEPHAROSE Con Aアフィニティーカラムに通すことによってアフィニティ-精製した。溶出した蛋白質を、RNase 6 PL蛋白質の存在についてSDS-PAGEでテストした。図56に示すように、27kDa蛋白質は、15mgの精製されたRNase 6 PL蛋白質よりなる溶出された画分から得た。

#### 【0376】

精製された組換えRNase 6 PL蛋白質は種々の温度において熱安定性である - 組換え蛋白質の熱安定性は、55ないし100の上昇温度でのRNase 6 PLの10分間のインキュベーションに続いて、SDS-PAGEで評価した。図57aに示すように、組換えRNase 6 PLはテストした全ての温度にて安定であった。

#### 【0377】

組換えヒトRNase 6 PLは種々の温度にて触媒的に活性である - 組換えRNase 6 PLの触媒活性を、RNAを分解するその能力によってイン・ビトロでテストした。図57bに示すように、組換え蛋白質は、55ないし100の種々の温度における(10分間の)蛋白質のインキュベーションに続いてRNAを分解することができた。RNase 6 PLリボ核酸分解活性の定量的アッセイで評価すると、最適活性は約50にて検出された(図64)。RNase 6 PLのリボ核酸分解活性についての最適pHは、酵母T2 RNaseと同様に4および5の間であった。

#### 【0378】

概して、これらの結果は、酵母での蛋白質合成の間における組換えRNase 6 PL蛋白質の正確な折畳みを示す。加えて、上昇温度における熱安定性および活性は、組換え蛋白質が、RNase T2ファミリーのメンバーに典型的な特徴的特性を呈することを示す。

#### 【0379】

##### 実施例20

ヒトT2 RNase(RNase 6 PL)はイン・ビトロにて花粉管形成を阻害する花粉管成長を頂ドームに焦点を当てた拡大の部位にて偏光させる。細胞質オルガネラは逆噴射様式によって花粉管に沿って移動し、頂下領域に主として濃縮される。細胞質ストリーミングおよび花粉管の成長は、細胞骨格蛋白質によって調節され、そのフィラメント状(F-)アクチンは主な役割を演じる。アクチンフィラメントは、花粉管に沿った長い束が落ち、頂ドームにおいて散漫なメッシュワークを形成するにつれて配置される。F-アクチン構造の中斷は、成長の阻害をもたらす。植物起源のT2ファミリーのRNaseは、リボ核酸分解活性に拘らず、花粉管成長を阻害することが示されている。かくして、RNase 6 PLの哺乳動物起源(ヒト)に拘らず、我々は、RNase 6 PLの存在下および非存在下で花粉管伸長をテストした。

#### 【0380】

##### 材料および方法

ユリ花粉管アッセイ - ユリ(Lilium longiflorum Thunb. cv. Osnat)花を室温に24時間維持した。裂開した薬からの花粉を、別に前記したように、7%スクロース(w/v)、1.27mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、0.16mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、1mM KNO<sub>3</sub>および3mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を含有する100μlの水性培養中でイン・ビトロで発芽させた(YokotaおよびShimmen 1994. Protoplasma 177: 153-162)。花粉培養を、組換えRNase 6 PLまたはRNase B1で1μMの最終蛋白質濃度まで補充した。さらなる培養を、同一濃度の(1.5気圧の存在下で120にて20分間オートクレーブ処理した)酵素的に熱不活化された(EI-)RNaseを補充した。陰性対照は、培養および精製の同一手法に付された、RNase 6 PL遺伝子インサートなしのpPIC9Kプラスミドを含有する酵母培養であった。暗所での25における2時間の花粉培養のインキュベーションに続き、花粉管の長さをアイピースマイクロメーターによって微視的に測定した。

10

20

30

40

50

**【0381】****実験結果**

組換えヒトRNase6PLはイン・ビトロにて花粉管形成を阻害する - 花粉管の長さは、ユリ花粉管のアクチンフィラメントに対する組換えヒトRNase6PLの脈管形成効果についての機能的アッセイとして用いた。図58に示すように、RNase6PLは、RNaseB1で達成された阻害(対照に対して36.5%)と同様に、酵母蛋白質対照に対して45%だけ花粉管成長を効果的に阻害した。

**【0382】**

図58にさらに示すように、酵素的に不活化されたRNase6PL(EI-RNase6PL)は、EI-RNaseB1のように、いずれのRNase活性をも欠き、花粉管伸長に対してその阻害効果を依然として維持する(各々、42%および55%)。 10

**【0383】**

これらの結果は、RNase6PLが、他のアクチン結合T2RNaseのように、加熱不活化後においてさえ、花粉管形成に対する阻害効果を呈することを示す。

**【0384】**

ヒトT2RNase(RNase6PL)は、イン・ビトロにて抗脈管形成特性を示す

脈管形成および血管形成は、癌の生存および発達に必須である(レビューについては、ValleeおよびRiordan 1997. Cell Mol Life Sci. 53, 803-15、ならびに、strydom 1998. Cell Mol Life Sci. 54: 811-24参照)。アンジオゲニンは脈管形成についての効果的なインデューサーとして知られており、いくつかの癌細胞(例えば、HT-29)においては、主な成長因子の1つである。内皮細胞においては、アクチンはアンジオゲニンに対する細胞表面受容体であるので、本発明者らは、RNase6PLが、RNaseB1について先に示したように、脈管形成を阻害するためのアンジオゲニンまたはbFGFもしくはVEGFに対する競合体として働くことができると仮定した。 20

**【0385】**

ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)管形成アッセイ-は、培地を成長因子[アンジオゲニン、VEGFまたはbFGF(1μg/ml)]、およびA.niger T2 RNase(RNASE B1、10μg/ml)、組換えヒトT2RNase(RNase6PL、図58において10μg/ml、および図63において0.5ないし10μM)、対照酵母培養基(pPIC9Kプラスミド単独、酵母対照)またはPBSいずれかの存在下または非存在下で補充した以外は、前記実施例7に記載したように行った。 30

**【0386】****実験結果**

RNase6PLはHUVEC管形成に対する有意な抗脈管形成効果を呈する - 組換えヒトRNase6PLの抗脈管形成効果を、HUVEC管形成アッセイでテストした。図58aないし1で示すように、RNase6PLは、RNaseB1のように、10μMの濃度で、HUVECにおけるアンジオゲニン-またはbFGF誘導管形成を有意に破壊した。また、後記表6にさらに示すように、RNase6PLの抗脈管形成効果は、RNaseB1のそれよりも有意に高かった。 40

**表 6**  
H U V E C 管形成に対する T 2 R N a s e の効果

蛋白質	対照	成長因子	
		アンジオゲニン	b F G F
対照	+	+++	+++
R N a s e B 1	+	+ -	-
R N a s e 6 P L	--	--	--
酵母対照	+	++	++

表 6 : H U V E C 管形成に対する種々の T 2 R N a s e の効果。相対的效果、すなわち、 H U V E C 管形成の「-」(阻害)、「+ -」(中程度の阻害)、「--」(有意な阻害)、「+」(促進)、「++」(有意な促進)を示す。

10

### 【 0 3 8 7 】

ヒト T 2 R N a s e ( R N a s e 6 P L ) は、対照 ( P B S ) アッセイウェルにおける管形成の程度と比較して、アンジオゲニン、 b F G F および V E G F ( 図 6 3 a ないし 6 3 o ) 等の種々のプロ脈管形成因子の存在下で H U V E 細胞管形成も顕著に阻害した。 H U V E 細胞培養における脈管形成の完全な阻害は、 5  $\mu$  M R N a s e 6 P L の濃度で明らかである ( 図 6 3 d, h および n ) 。

### 【 0 3 8 8 】

ここに提示した R N a s e 6 P L の抗脈管形成特徴は T 2 - R N a s e ファミリーのメンバーに典型的であり、これは、ヒト T 2 - R N a s e ( R N a s e 6 P L ) が、 R N a s e B 1 の同一の抗癌 / 抗脈管形成能力を保有することを強く示す。

20

### 【 0 3 8 9 】

#### 実施例 2 1

多様な起源の T 2 R N a s e は癌細胞のクローン原性を阻害する

前記で示したように、 A . n i g e r R N a s e B 1 は、イン・ビトロコロニー形成アッセイにおいてヒト結腸癌細胞のクローン原性能力を阻害する。広く多様な起源の T 2 R N a s e が特徴的な活性のある範囲にわたって強い類似性を維持するか否かを判断するために、ヒト結腸癌 H T - 2 9 細胞のクローン原性に対する細菌、酵母およびヒト起源からの T 2 R N a s e の効果を調べた。

30

### 【 0 3 9 0 】

#### 材料および方法

クローン原性アッセイ - コロニー形成アッセイは、若干改変したが、本質的に前記したように行つた。ヒト結腸癌 H T - 2 9 細胞を、フラスコ当たり  $10^5$  細胞の濃度にて 5 0 m l フラスコ中で成長させた。該培地は、 1  $\mu$  M の A . n i g e r T 2 R N a s e ( R N a s e B 1 ) 、 E . c o l i R N a s e I または R N a s e 6 P L ( ヒト T 2 R N a s e ) の存在下または非存在下で、 1 0 % F C S 、 1 % グルタミン、および 1 % 抗生物質 - 抗真菌溶液を補充した 7 m l の D M E M を含有し、細胞移植の 2 4 時間後に交換した。細胞を、 5 % C O <sub>2</sub> を含有する加湿雰囲気中で 3 7 度でインキュベートした。4 8 時間後に 1 0 0 0 細胞 / ウェルを、 1  $\mu$  M R N a s e の存在下または非存在下で 2 0 0  $\mu$  l 培地中の 9 6 ウェルプレートに播き、 5 日間成長させた。コロニーの数をカウントした。6 つの個々の測定を各 R N a s e で行った。

40

### 【 0 3 9 1 】

#### 結果 :

図 6 8 は、ヒト癌細胞のクローン原性、またはコロニーに組織化するヒト癌細胞の能力は、起源に拘らず、 T 2 R N a s e の投与によって大幅に損なわれることを明確に示す。明確にするため別個の実施態様で説明されている本発明の特定の特徴は単一の実施態様に組み合わせて提供することもできるることは分かるであろう。逆に、簡潔にするため単一の実施態様で説明されている本発明の各種の特徴は別個にまたは適切なサブコンビネーションで提供することもできる。

50

## 【0392】

本発明はその特定の実施態様によって説明してきたが、多くの別法、変更及び変形があることは当業者には明らかであることは明白である。従って、本発明は、本願の請求項の精神と広い範囲の中に入るこのような別法、変更及び変形すべてを包含するものである。本願で挙げた刊行物、特許、特許願、および受託番号によって特定される配列はすべて、個々の刊行物、特許、特許願または配列が各々あたかも具体的にかつ個々に引用提示されているのと同程度に、全体を本明細書に援用するものである。さらに、本願で引用又は確認したことは本発明の先行技術として利用できるという自白とみなすべきではない。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0393】

10

【図1】Roiz, L. および Shoseyov, O., 1995, Int. J. Plant Sci. 156: 37 - 41の教示に従って単離された Aspergillus niger RNase B1 の吸光度およびRNase活性のグラフ表示である。

【図2】使用した精製工程を通じてのRNase B1蛋白質濃度の増加を示す SDS-PAGE ザイモグラムである。

【図3】桃花粉発芽（塗りつぶした四角と実線）および花粉管長さ（ボックスと点線）に対する異なる濃度のRNase B1のイン・ビトロ効果を示すグラフである。

【図4】柱頭および花柱の上部分における桃花粉管成長に対するRNase B1の効果を示す。

【図5】タンジェリン花の柱頭における花粉管成長に対するRNase B1の効果を示す。 20

【図6】ネクタリン種子で行った生存性テストを示す。

【図7】ユリ cv. Osnat 花粉管長さに対する、未処理、煮沸またはオートクレーブ処理されたRNase B1の効果を示す。

【図8】イン・ビトロで成長し、IKIで染色されたユリ花粉管に対するRNase B1の効果を示す。

【図9】RNase B1未処理（図9a）および処理（図9b）花粉管におけるオルガネラ移動および局所化を示す統合ビデオイメージから捕獲されたスチルショットを示す。

【図10】成長するユリ花粉管のアクチンフィラメントに対するRNase B1の効果を示す。 30

【図11】アクチンへのRNase B1結合を表すScatchardプロットである。

【図12】1時間成長させたイムノゴールド銀染色ユリ花粉管を示す。

【図13a】HT29結腸癌細胞の生存性に対する異なる濃度のRNase B1の効果を示す。

【図13b】HT29結腸癌細胞の生存性に対する異なる濃度のRNase B1の効果を示す。

【図14】HT29細胞のクローン原性に対するRNase B1の効果を示す。

【図15】HT29細胞のクローン原性に対するRNase B1への暴露時間の効果を示す。 40

【図16】HT29細胞のコロニー化能力に対するRNase B1の効果を示す。

【図17】6匹のラットの各群についての処理を記載する、ラットで行ったイン・ビボ実験の模式図である。

【図18】CAPマイクロカプセルからのRNase B1放出の速度に対する2つの異なるpHの効果を示す。

【図19a-b】各実験の最後の体重によって示されるように、ラット成長速度に対するRNase B1および/またはDMHの効果を示す。

【図19c-d】各実験の最後の体重によって示されるように、ラット成長速度に対するRNase B1および/またはDMHの効果を示す。

【図20】予防的処置として、RNase B1(20a)、I-RNase B1(2

50

0 b ) または P B S ( 2 0 c ) を含有する浸透圧ポンプを移植したラットの糞における R N a s e 活性を示す。対

【図 2 1】予防的処置として、R N a s e B 1 またはグルコースを含有するマイクロカプセルを与えたラットの糞における R N a s e 活性を示す。

【図 2 2】予防的処置として、浸透圧ポンプで移植したラットの末端側結腸 ( 5 c m ) における異常な陰窩病巣 ( A C F ) の数を示す ( n = 6 ) 。

【図 2 3】予防的処置として、マイクロカプセル化 R N a s e B 1 またはグルコースを与えたラットの末端側 ( 5 c m ) 結腸で調べた異なるパラメータに対する R N a s e B 1 の効果を示す ( n = 6 ) 。

【図 2 4】切除から 1 時間後の内側粘膜表面において写真を撮った際の、異なるタイプの腫瘍を示す。 10

【図 2 5】メイヤーのヘマトキシリンおよびマルチウスイエローで染色された腫瘍の組織病理学的調査を示す。

【図 2 6】治療的処置としての、P B S 、 R N a s e B 1 または I - R N a s e B 1 を含有する浸透圧ポンプで処理したラットの末端側 ( 5 c m ) 結腸において調べた異なるパラメータに対する R N a s e B 1 の効果を示す。

【図 2 7】治療的処置としての、マイクロカプセル化 R N a s e B 1 またはグルコースを与えたラットの末端側 ( 5 c m ) 結腸において調べた異なるパラメータに対する R N a s e B 1 の効果を示す。

【図 2 8】アクチンについて T R I R C で染色したヒト結腸癌腫 H T - 2 9 4 - d 培養細胞を示す。 20

【図 2 9】膜アクチンについて免疫染色したヒト結腸癌腫 H T - 2 9 4 - d 培養細胞を示す。

【図 3 0】F I T C 免疫染色したヒト結腸癌腫 H T - 2 9 4 - d 培養細胞を示す。

【図 3 1】ユリ花粉管の長さに対する異なる蛋白質処理の効果を示す。

【図 3 2】1 μ g m l アンジオゲニンの存在下または非存在下における、および R N a s e ( 各々 2 μ M ) の存在下または非存在下における M a t r i g e l 上の H U V E C 管形成を示す顕微鏡写真である。

【図 3 3】B D F 1 ( 黒色 ) および B a l b / c ( 白色 ) マウスでの i p / i p 実験における B 1 6 F 1 メラノーマに対する R N a s e B 1 の効果を示す写真である。 30

【図 3 4 a - b 】 5 × 1 0 5 細胞 / マウスを移植した、 b a l b / c マウスの肺で形成された B 1 6 F 1 0 メラノーマ病巣の発達の低下における R N a s e B 1 の効果を示す。

【図 3 4 c - e 】 5 × 1 0 5 ( 図 3 4 c ) または 5 × 1 0 6 ( 図 3 4 d ないし e ) 細胞 / マウスを移植した、 b a l b / c マウスの肺で形成された B 1 6 F 1 0 メラノーマ病巣の発達の低下における R N a s e B 1 の効果を示す。

【図 3 5】ヌードマウスにおけるヒトメラノーマ細胞の腫瘍成長に対する R N a s e B 1 の効果を示す。

【図 3 6】s . c . / i . v . 実験における、 H T - 2 9 由来ヌードマウス異種移植片における腫瘍サイズに対する R N a s e B 1 の効果を示す。

【図 3 7】R N a s e B 1 による脈管形成のイン・ビボ阻害を示す写真である。 40

【図 3 8】A 3 7 5 S M 細胞侵入の阻害における R N a s e B 1 の効果を示す棒グラフである。

【図 3 9】s c / i p モデルにおける H T - 2 9 由来ヌードマウス異種移植片を示す棒グラフである。

【図 4 0】R N a s e B 1 の存在下または非存在下における、 s . c . / i . p . モデルでの H T - 2 9 移植ヌードマウスからの腹膜断面の顕微鏡写真である。

【図 4 1】s . c . / i . p ヌードマウスモデルの H T - 2 9 由来腫瘍からの断面の顕微鏡写真である。

【図 4 2】D M H 誘導結腸腫瘍での C D 3 1 発現に対する R N a s e B 1 の効果を示す結腸癌組織の代表的な組織病理学的切片である。 50

【図43】マウスマエラノーマ細胞における腫瘍のサイズおよびアポトーシスに対するRNase B1のプロアポトーシス効果を示す、ヌードマウスにおける腫瘍の代表的な組織病理学的切片の顕微鏡写真である。

【図44】DMH誘導結腸腫瘍におけるアポトーシス速度に対するRNase B1の効果を示す、代表的な結腸腫瘍切片の顕微鏡写真である。

【図45】ヒト結腸癌異種移植片における腫瘍サイズおよびアポトーシスに対するRNase B1のプロアポトーシス効果を示すヌードマウスでの腫瘍の代表的な組織病理学切片である。

【図46】L5174T誘導腫瘍の相対的容量に対するタキソールおよびRNase B1の効果を示すグラフである。  
10

【図47】イン・ビトロでアクチンに結合するRNase B1の能力を示す、アクチンおよびアクチン結合蛋白質のウエスタンプロット(図47a)およびSDS-PAGE蛋白質染色(図47b)である。

【図48】A375SMメラノーマ癌細胞による全MMP-2放出の阻害におけるRNase B1の用量依存性効果を示す棒グラフである。

【図49】A375SM(図49a)またはHUVEC(図49b)細胞におけるMMP-2放出に対するRNase B1処理の効果を示すMMP-2コラゲナーゼ活性のザイモグラムである。

【図50】RNase B1処理HUVEC細胞におけるRNase B1の細胞局所化を示す共焦点顕微鏡写真である。  
20

【図51】RNase B1処理A375SM細胞におけるRNase B1の細胞局所化を示す共焦点顕微鏡写真である。

【図52】*A. niger*ゲノムDNAからのT2 RNaseの増幅を示すアガロースゲルイメージである。

【図53】*A. niger*ゲノムDNAから調製された300bp PCR産物のヌクレオチド配列である。

【図54】染色体6q27に位置するヒト細胞外RNase(RNase6PL)のゲノム構造の模式的説明である。

【図55】組換えRNase6PL cDNA(図55a)および蛋白質(図55b)のP. pastorisにおける存在を示す。  
30

【図56】組換えRNase6PLの銀染色分析である。

【図57a】組換えヒトRNase6PL(P. pastorisからのT2-RNase)蛋白質の熱安定性を示す。

【図57b】組換えヒトRNase6PL(P. pastorisからのT2-RNase)蛋白質の活性(図57b)を示す。

【図58】組換えヒトT2 RNaseのユリ花粉管阻害活性を示すヒストグラムである。

【図59a-h】ヒト臍帯内皮細胞における管形成に対するヒトT2 RNaseの阻害効果を示す顕微鏡写真である。

【図59i-1】ヒト臍帯内皮細胞における管形成に対するヒトT2 RNaseの阻害効果を示す顕微鏡写真である。  
40

【図60-1】ヒトT2 RNaseのクローニングおよび発現で用いられる合成RNase6PL遺伝子のヌクレオチド配列および翻訳されたアミノ酸配列である。

【図60-2】ヒトT2 RNaseのクローニングおよび発現で用いられる合成RNase6PL遺伝子のヌクレオチド配列および翻訳されたアミノ酸配列である。

【図61-1】多様な系統発生の起源からの他のT2ファミリーメンバーとヒトT2ヌクレアーゼとのClustalW多重配列整列である。

【図61-2】多様な系統発生の起源からの他のT2ファミリーメンバーとヒトT2ヌクレアーゼとのClustalW多重配列整列である。

【図61-3】多様な系統発生の起源からの他のT2ファミリーメンバーとヒトT2ヌク  
50

レアーゼとのClustal W多重配列整列である。

【図62】図60にあるように、合成RNase6PL（配列番号4）のアミノ酸配列のBLAST整列であり、T2 RNaseファミリーメンバーのアミノ酸配列はヒトRNase6PLに対して最も近い相同意性を有する。

【図63】ヒト臍帯内皮細胞における管形成に対するヒトT2 RNaseの阻害効果を示す顕微鏡写真である。

【図64】L5174T誘導腫瘍の容量に対するタキソールおよびヒトT2 RNaseの効果を示すグラフである。

【図65】イン・ビトロで成長したユリ花粉管中のオルガネラの分布に対するA. niger RNase B1の効果を示す顕微鏡写真である。10

【図66】ヒトRNase6PLのアクチン結合活性を示すSDS-PAGEおよびスロットプロットアッセイの写真である。

【図67】コンカナバリンAでのアフィニティクロマトグラフィーによるRNase6PLの精製を示す。

【図68】ヒト癌細胞のクローン原性に対する多様な起源のT2 RNaseの効果を示すヒストグラムである。

【図69】多様な起源のT2 RNaseによるヒト結腸癌腫瘍成長の効果的な阻害を示すヒストグラムである。

#### 【配列表フリーテキスト】

##### 【0394】

配列番号1および2は、一本鎖DNAオリゴヌクレオチドの配列である。

配列番号3は、組換えRNase6PLクローニングコード配列である。

配列番号4は、組換えRNase6PL産物の配列である。

【図1】

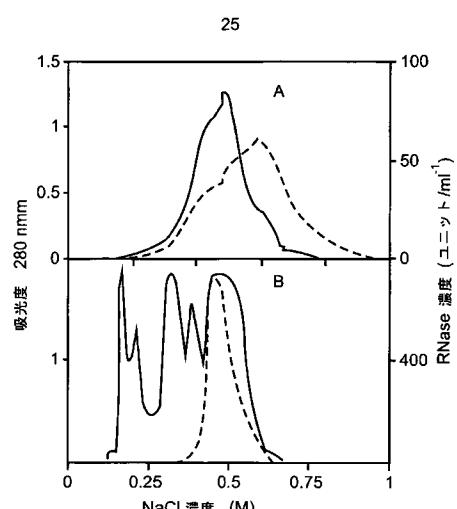


Fig. 1

【図2】

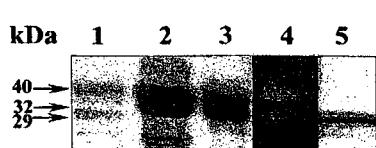


Fig. 2

【図3】

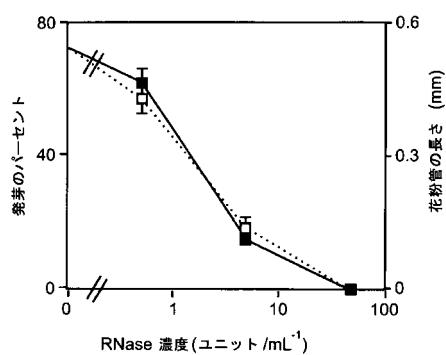


Fig. 3

【図4】

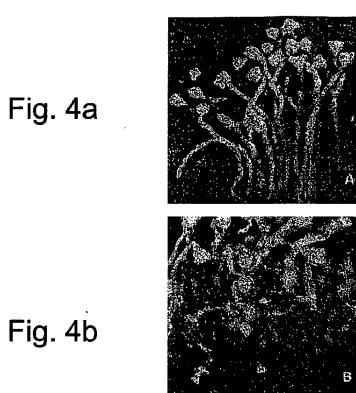


Fig. 4b

【図 5】

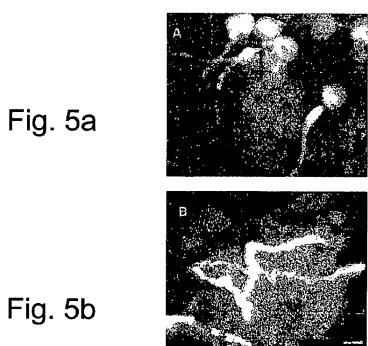


Fig. 5a

Fig. 5b

【図 7】

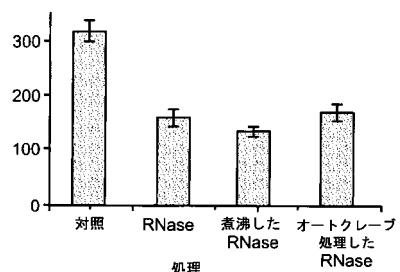


Fig. 7

【図 6】

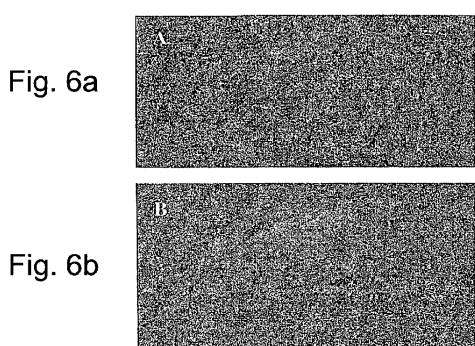


Fig. 6a

Fig. 6b

【図 8】

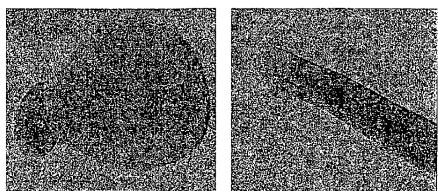


Fig. 8a

Fig. 8b

【図 9】

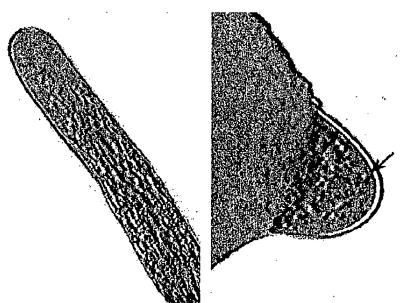


Fig. 9a

Fig. 9b

【図 11】

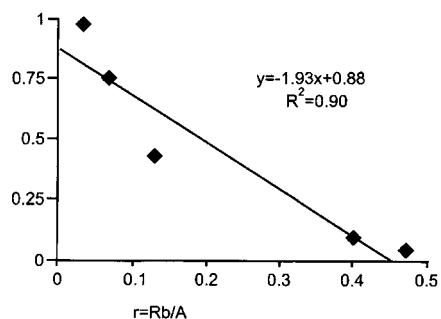


Fig. 11

【図 10】

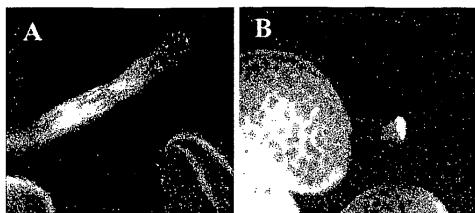


Fig. 10a

Fig. 10b

【図 12】

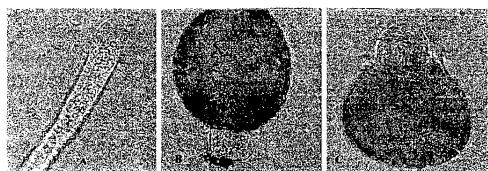


Fig. 12a

Fig. 12b

Fig. 12c

【図 13 a】

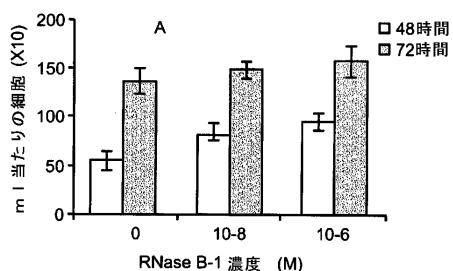


Fig. 13a

【図 14】

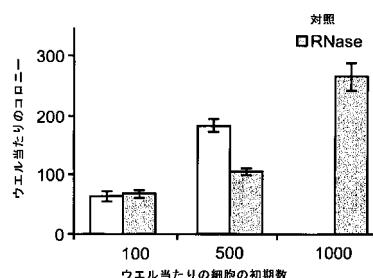


Fig. 14

【図 13 b】

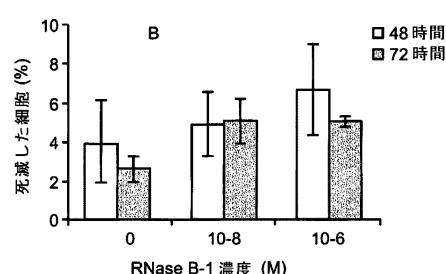


Fig. 13b

【図 15】

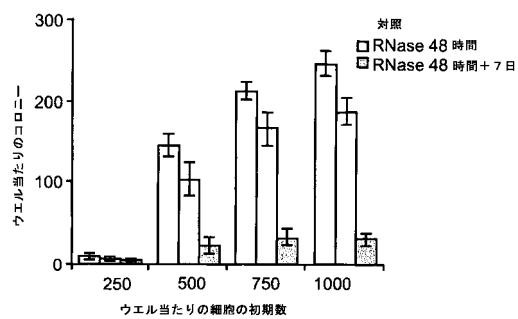


Fig. 15

【図 16】

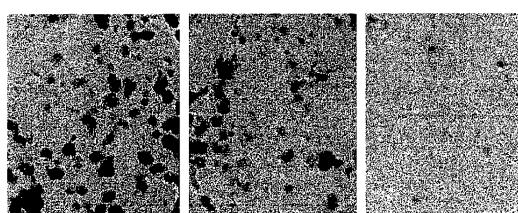


Fig. 16a

Fig. 16b

Fig. 16c

【図 18】

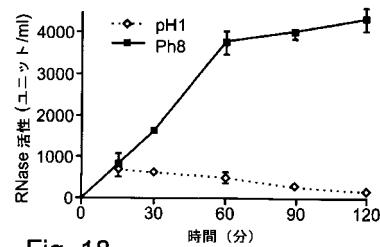


Fig. 18

【図 17】

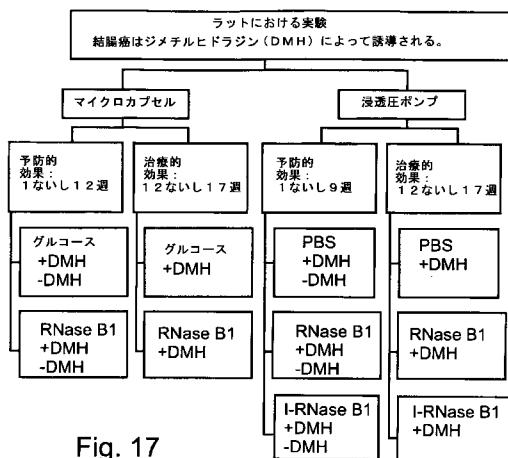


Fig. 17

【図 19 a - b】

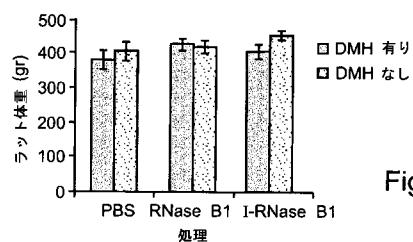


Fig. 19a

【図 19 c - d】

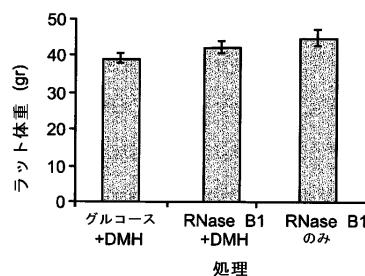


Fig. 19c

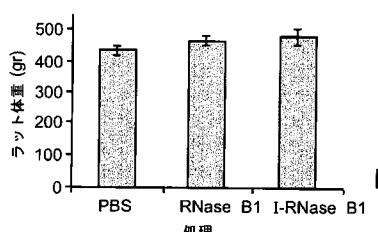


Fig. 19b

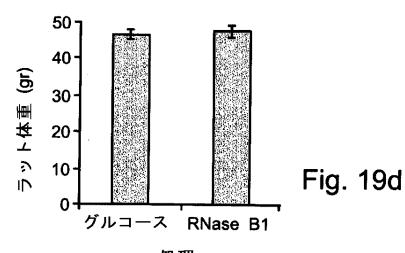


Fig. 19d

【図 20】

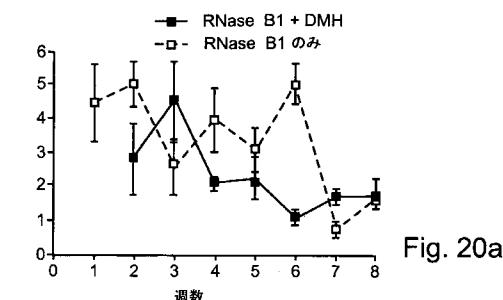


Fig. 20a

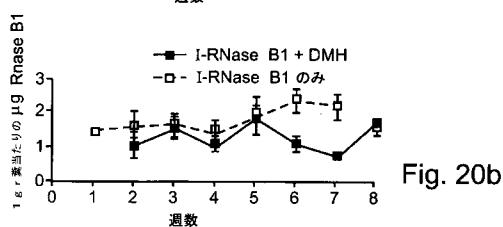


Fig. 20b

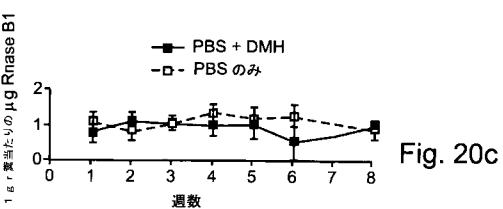


Fig. 20c

【図 21】

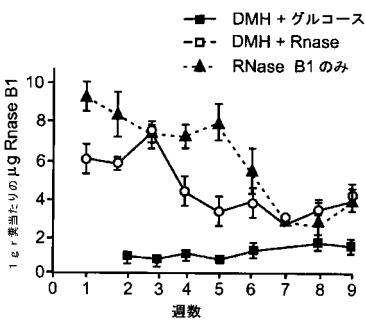


Fig. 21

【図 22】

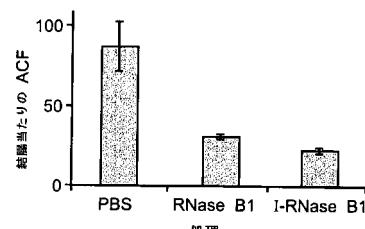


Fig. 22

【図23】

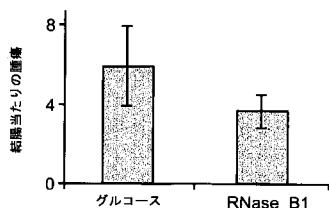


Fig. 23a

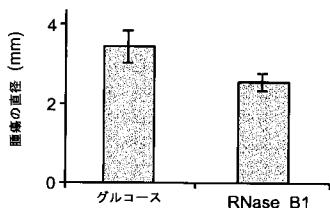


Fig. 23b

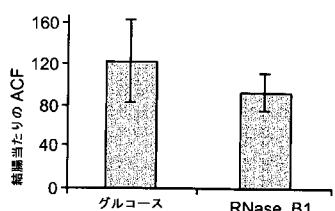


Fig. 23c

【図24】

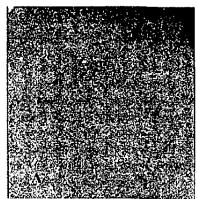


Fig. 24a

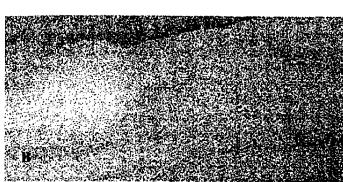


Fig. 24b

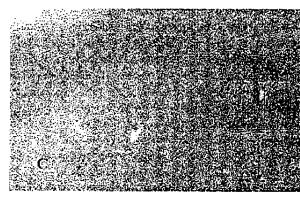


Fig. 24c

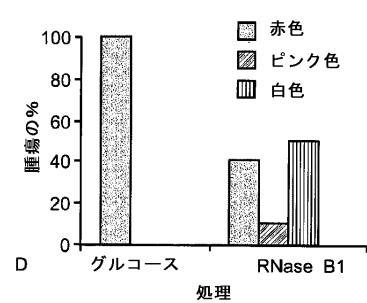


Fig. 24d

【図25】



Fig. 25a

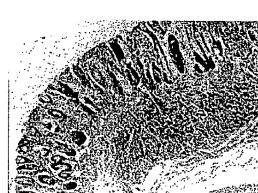


Fig. 25b



Fig. 25c

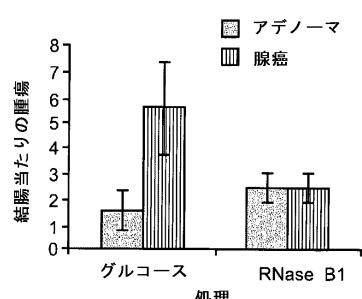


Fig. 25d

【図26】

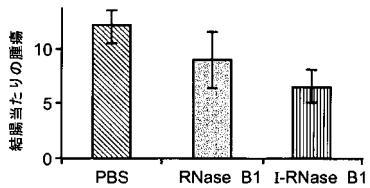


Fig. 26a

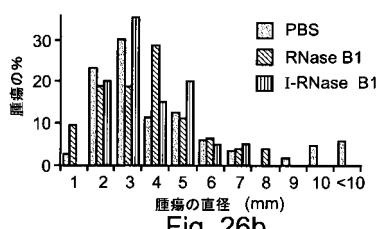


Fig. 26b

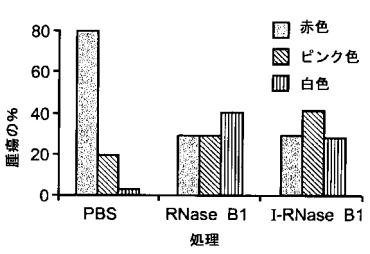


Fig. 26c

【図27】

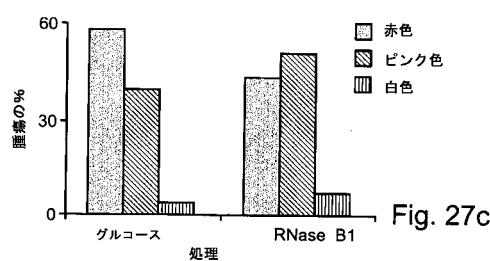
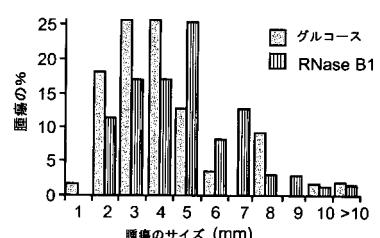
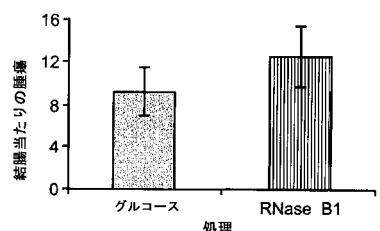
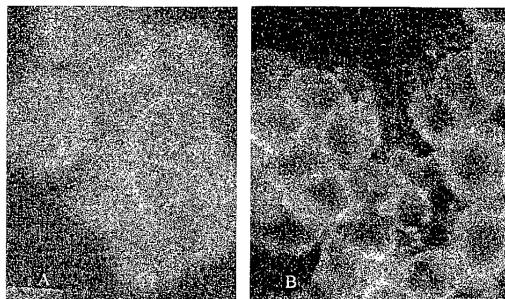
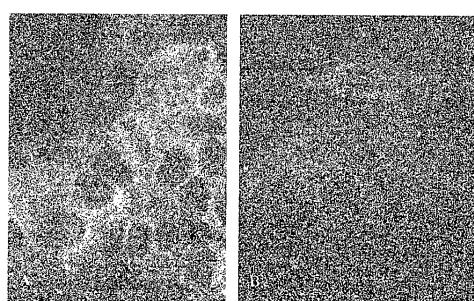


Fig. 27a

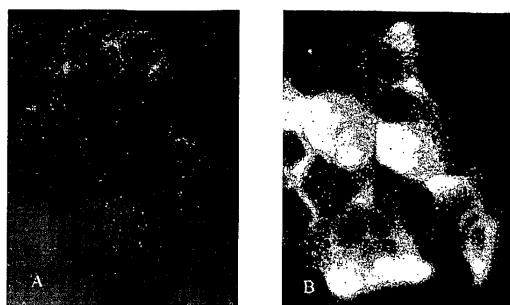
【図28】



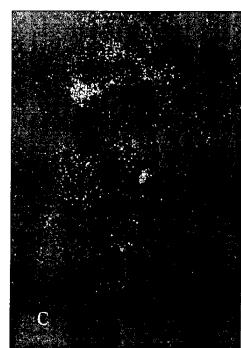
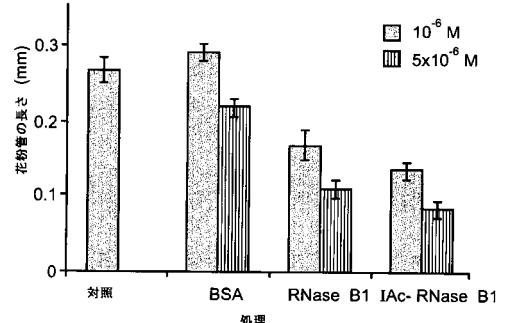
【図29】



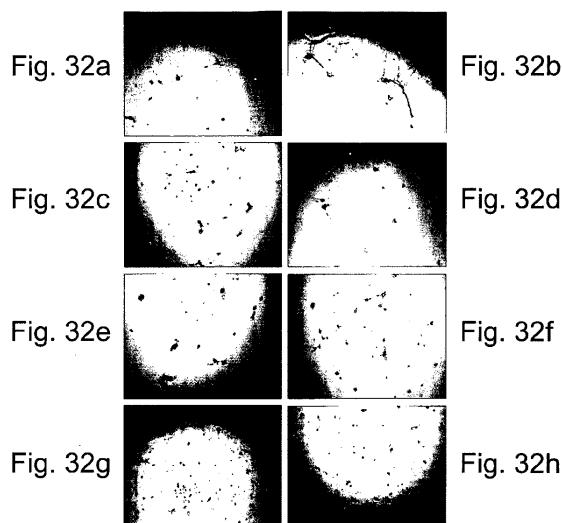
【図30】



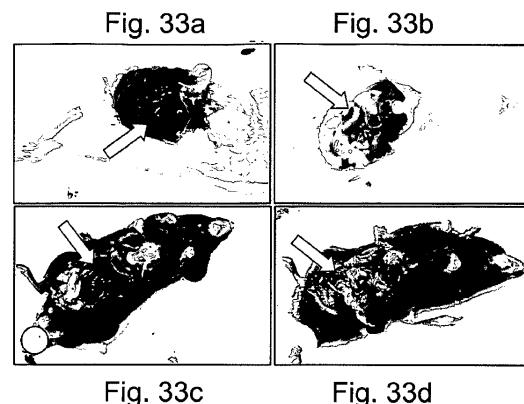
【図31】



【図32】



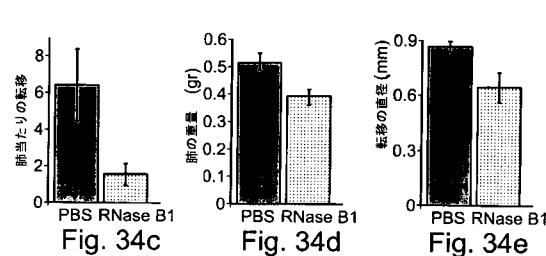
【図33】



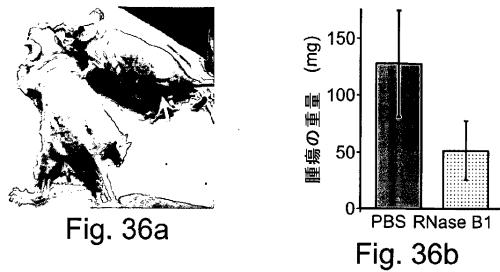
【図34a - b】



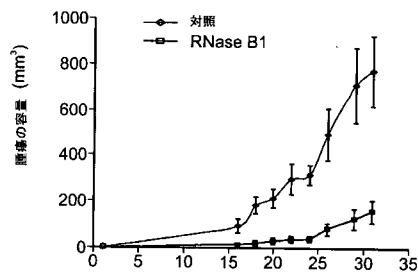
【図34c - e】



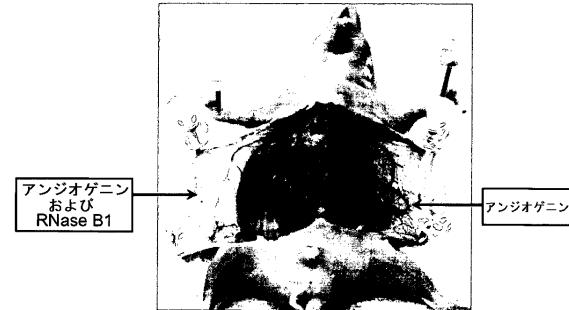
【図36】



【図35】



【図37】



【図38】

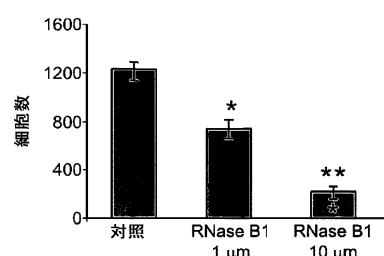


Fig. 38

【図39】

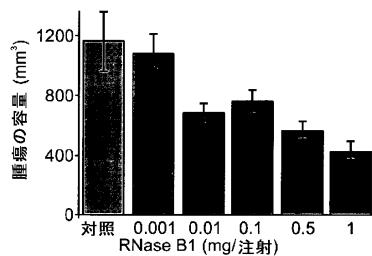


Fig. 39a

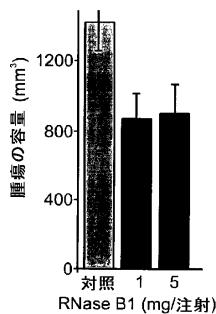


Fig. 39b

【図40】



Fig. 40a

Fig. 40b

Fig. 40c

【図43】

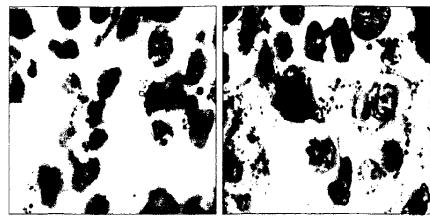


Fig. 43a

Fig. 43b

【図41】

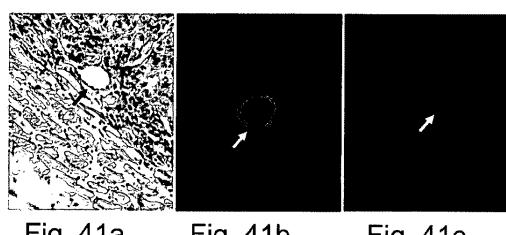


Fig. 41a

Fig. 41b

Fig. 41c

【図42】

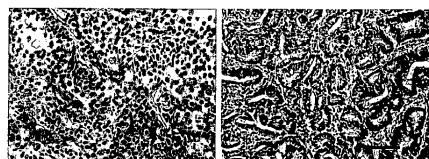


Fig. 42a

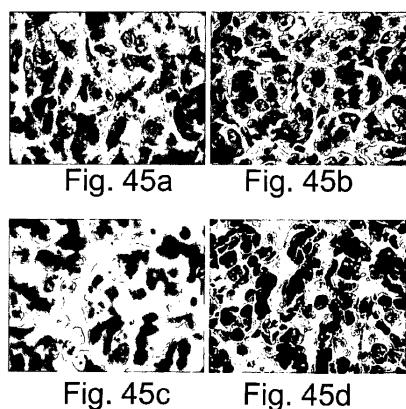
Fig. 42b



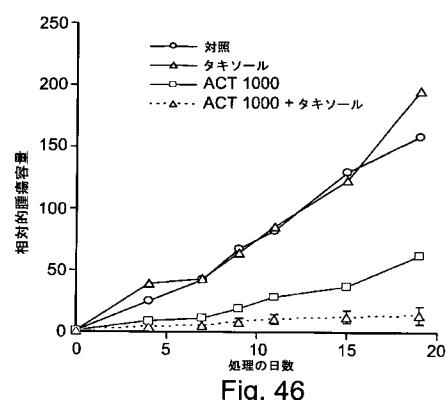
Fig. 44a

Fig. 44b

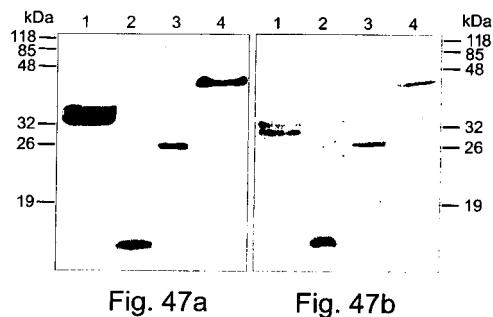
【図45】



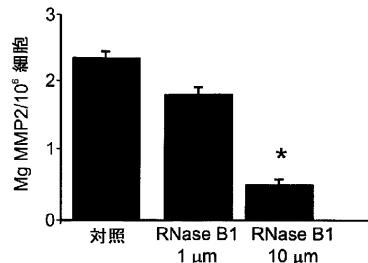
【図46】



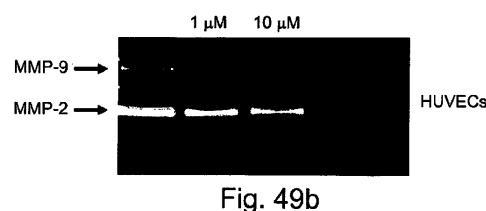
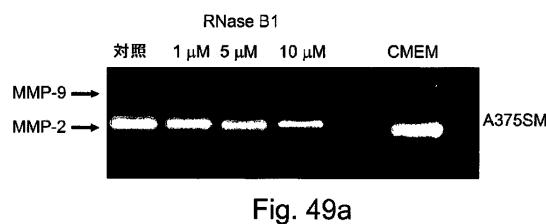
【図47】



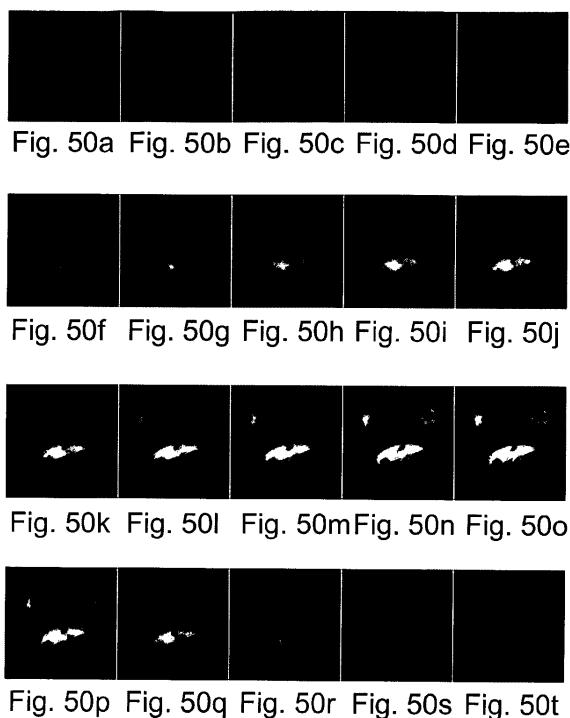
【図48】



【図49】



【図50】



【図 5 1】

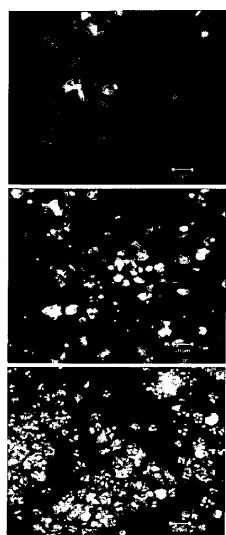


Fig. 51a

Fig. 51b

Fig. 51c

【図 5 2】

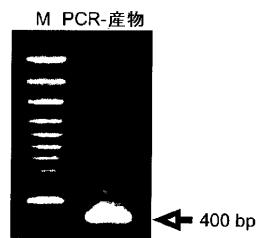


Fig. 52

【図 5 3】

107. F W E H E W N K H G T C I N T I ■ P S C  
1. TTC TGG GAG CAC GAG TGG AAC AAC GAC GGA ACT TGC ATC AAC ACC ATT GAG CCC AGC AGC TGC  
Y T D X Y A Q E E V G D F F Q Q V V D L  
61. TAC ACC GAC TAC TAC GCT CAG GAG GAA GTT GGT GAC TTT TTC CAG CAG GTC GTT SAC CTT  
F K T L D S Y T A L S D A G I T P S E D  
121. TTT AAG ACC TTG GAT TCC TAC ACC GCT CTC TCC GAC GCC GGA ATT ACT CCC TCC GAG GAT  
A T Y K L S D I E D A L A A I H D G Y P  
181. GCC ACC TAC AAG CTG AGC GAC ATT GAG GAT GCT CTC GCC GCG ATC CAC GAT GGG TAC CCC  
P Y V G C E D G A L S Q I Y Y I F N V K .206  
241. CCG TAT GTC GGG TGC GAG GAC GGT GCT CTC TCC CAG CTC TAC TAT TAC TTC AAC GTC AAC

Fig. 53

【図 5 4】

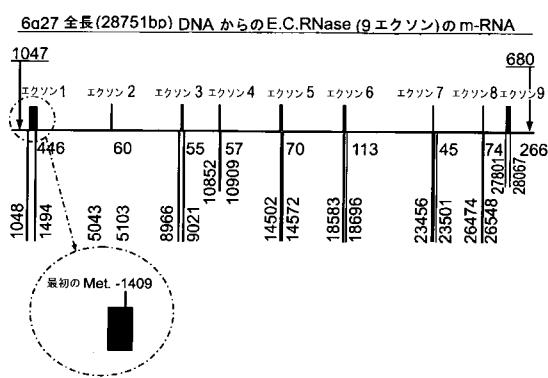


Fig. 54

【図 5 5】

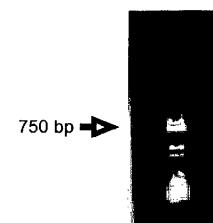


Fig. 55a

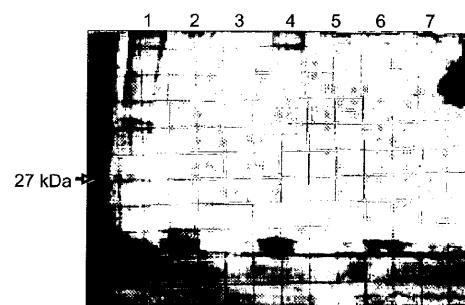


Fig. 55b

【図 5 6】

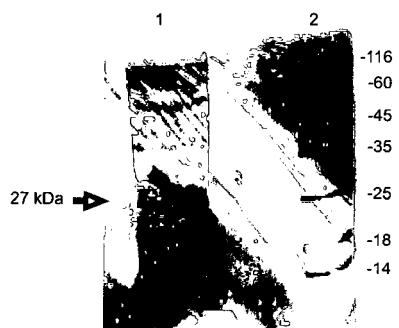


Fig. 56

【図 5 7 b】

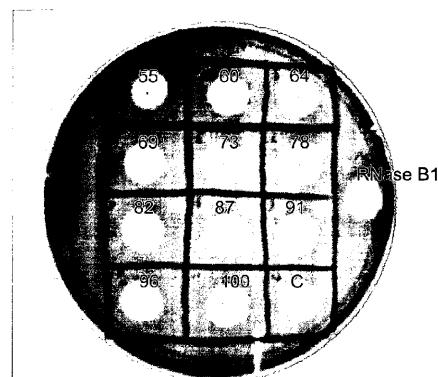


Fig. 57b

【図 5 7 a】

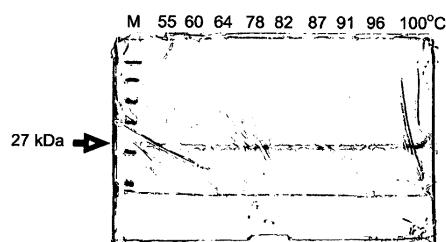


Fig. 57a

【図 5 8】

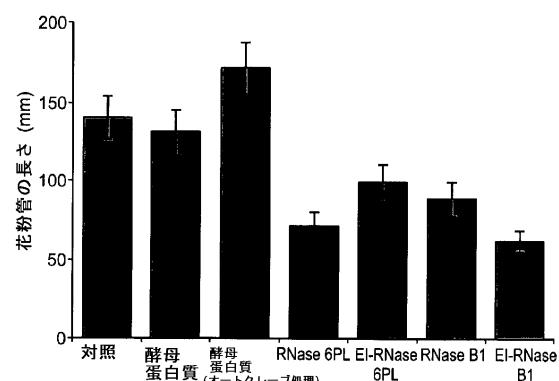


Fig. 58

【図 5 9 a - h】



Fig. 59a



Fig. 59b



Fig. 59c



Fig. 59d



Fig. 59e

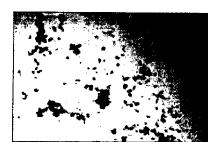


Fig. 59f



Fig. 59g



Fig. 59h

【図59i-1】



Fig. 59i



Fig. 59j



Fig. 59k



Fig. 59l

【図60-1】

```

EcoRI
GAATTCGGTCTGACAAGAGATTGAGAGACAAACCAAGAATGGAAGAAGTTGATTATGGTT
1 +-----+-----+-----+-----+-----+
CTTAAGCCACAGCTGTCTCTCTCGTGTGGTCTTACCTTCTCAACTAAATACCAA
E_F_G_A_D_K_R_L_R_D_N_H_E_W_K_R_L_I_M_V

BsaI
CAACACTGGCCAGAAACTGTTGTGAAAAGATTCAAAACGACTGTAGAGACCCACAGAC
61 +-----+-----+-----+-----+-----+
GTTGTAACCGGGTTTGTGACAACACTTCTCAAGTTTGTGACATCTCTGGTGGTCTC
Q_H_W_P_E_T_V_C_E_K_I_Q_N_D_C_R_D_P_F_D

TACTGGTACTTACCGGATTGCGGAGATAAGGCTGTAAGCGAAGGGTTGTAACAGATCTGGCCA
121 +-----+-----+-----+-----+-----+
ATGACCTGATAAGGTGCTAACACCGCTTATTCTAGGCTTCCAAACATGCTTAGACCGGT
Y_W_T_I_H_G_L_W_P_D_K_S_E_G_C_N_R_S_W_F

TTCACACTGGAGGAGATAAGGACTGTGTCGAAAGAACATGAGCCTTACTCTGAATGACCGGTACAA
181 +-----+-----+-----+-----+-----+
AAGTTGAACTCCCTATTCCTGAAACACGGCTTACTCTGAATGACCGGTACAA
F_N_L_E_E_I_K_D_L_L_P_E_M_R_A_Y_W_P_D_V

XbaI
BglII
ATTCACTCATCCCCAACAGATCTGAGATTCTGGAGACAGCACGAAATGGGAAAGCATGGTACT
241 +-----+-----+-----+-----+-----+
TAAGTGTAGTAAGGGTTTGTCTAGATCTAGACCTTGCGCTTACCCCTTCTGATCATGAG
I_K_S_F_P_N_R_S_R_F_W_K_H_E_W_E_R_H_G_T

HincII
ScaI
BglII
TGCTGCTCAAGTGCCTTGGACCTCCCAGAAAGAGTACTTCGGTAGATCTGGTACT
301 +-----+-----+-----+-----+-----+
ACACGACGGAGTTCACTGGAAACCTGGAGCTTTCCTGAGACCATCTAGAAACCT
C_A_A_O_V_D_A_I_N_S_Q_K_Y_F_G_R_S_L_E

TCTACAGAGAAATTGGATTGAACTCTGTTTGTGAAACTTGGGTATCAAGCCATCCATT
361 +-----+-----+-----+-----+-----+
AACATGTCCTTAACCTAAACTTGGAGACAAACAACTTCANCCATAGTTGGTAA
L_Y_R_E_I_D_L_N_S_V_I_L_K_L_G_I_K_P_S_I

AACTACTACCAAGTGGTCACTCAAGGAGCTTGGCTAGACTTTACGCTTATTCGA
421 +-----+-----+-----+-----+-----+
TTGATGATGGTTCAACGGTCAAGTGTCTGGAAACCGATCTCAAAATGCCAACATAAGGT
N_Y_X_Q_V_A_D_F_K_D_A_L_A_R_V_Y_G_V_I_P

AAGATCAATGTTGGCCACATCTCAAGAGAGAAAGTTCAAACTATTGGTCAAATTGAG
481 +-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTAAGTAAACACGGTGTAGACTCTGCTCTCTCAAGTTGATAACCAGTTAACCTC
K_I_Q_C_L_P_P_S_Q_D_E_R_V_Q_T_A_G_Q_I_E

MspI
TTGTTTGTACTAAAGCAAGATCAACAATTGCAAAACTGTACTGAACCCAGGTAAACACCA
541 +-----+-----+-----+-----+-----+
AACACAAACTGTTCTCTCTAGTTGTTAACGTGATCTGACTTGGTCCACTTGGT
L_C_L_T_K_Q_D_Q_Q_L_O_N_C_T_E_F_G_E_Q_P

```

Fig. 60

【図60-2】

```

XbaI
TCTCCAAGCAAGAGGTTGGTGGCTAATGGTGTGCTGAATCTAGAGGTTGAGAGTT
601 +-----+-----+-----+-----+-----+
AGAGGTTCGTTCTCAAACCAACCGATTACACGACGACTTAGATCTCAAACCTCTCAA
S_P_K_Q_E_V_W_L_A_N_G_A_A_E_S_R_G_L_R_V

NotI
EagI
TGTGAGGATGGTCCAGTTCTACCCACCACCTAAGAAACTAAGCAGTAAAGGCCCGC
661 +-----+-----+-----+-----+-----+
ACACTCTACCAACGGTCAAAGATGGTGGTGGATTCCTTGATTCTGTGATTCGGCCCGC
C_E_D_G_P_V_F_X_P_P_K_K_T_K_H_*

```

Fig. 60 (Cont.)

【図61-1】

```

全ての提出された配列を記載するCLUSTAL W (1.8.2) 多重配列整列。
配列番号:
5 g1|21326825|dbj|BAC00516..11
6 g1|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA
7 g1|16649978|sp|AAF21657..1|AP043
8 g1|16649979|sp|AAF21657..1|AP043
9 g1|5231228|ref|NP_003721..2|
10 g1|47116971|sp|QH329|RNT2_PIG
11 g1|21311883|ref|NP_080887..1|
12 g1|17435269|ref|NP_080887..1|
13 g1|2118020|pir|S64695

g1|21326825|dbj|BAC00516..11
g1|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA
g1|16649978|sp|AAF21657..1|AP043
g1|16649979|sp|AAF21657..1|AP043
g1|5231228|ref|NP_003721..2|
g1|47116971|sp|QH329|RNT2_PIG
g1|21311883|ref|NP_080887..1|
g1|17435269|ref|NP_080887..1|
g1|2118020|pir|S64695

g1|21326825|dbj|BAC00516..11
g1|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA
g1|16649978|sp|AAF21657..1|AP043
g1|16649979|sp|AAF21657..1|AP043
g1|5231228|ref|NP_003721..2|
g1|47116971|sp|QH329|RNT2_PIG
g1|21311883|ref|NP_080887..1|
g1|17435269|ref|NP_080887..1|
g1|2118020|pir|S64695

g1|21326825|dbj|BAC00516..11
g1|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA
g1|16649978|sp|AAF21657..1|AP043
g1|16649979|sp|AAF21657..1|AP043
g1|5231228|ref|NP_003721..2|
g1|47116971|sp|QH329|RNT2_PIG
g1|21311883|ref|NP_080887..1|
g1|17435269|ref|NP_080887..1|
g1|2118020|pir|S64695

g1|21326825|dbj|BAC00516..11
g1|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA
g1|16649978|sp|AAF21657..1|AP043
g1|16649979|sp|AAF21657..1|AP043
g1|5231228|ref|NP_003721..2|
g1|47116971|sp|QH329|RNT2_PIG
g1|21311883|ref|NP_080887..1|
g1|17435269|ref|NP_080887..1|
g1|2118020|pir|S64695

g1|21326825|dbj|BAC00516..11
g1|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA
g1|16649978|sp|AAF21657..1|AP043
g1|16649979|sp|AAF21657..1|AP043
g1|5231228|ref|NP_003721..2|
g1|47116971|sp|QH329|RNT2_PIG
g1|21311883|ref|NP_080887..1|
g1|17435269|ref|NP_080887..1|
g1|2118020|pir|S64695

g1|21326825|dbj|BAC00516..11
g1|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA
g1|16649978|sp|AAF21657..1|AP043
g1|16649979|sp|AAF21657..1|AP043
g1|5231228|ref|NP_003721..2|
g1|47116971|sp|QH329|RNT2_PIG
g1|21311883|ref|NP_080887..1|
g1|17435269|ref|NP_080887..1|
g1|2118020|pir|S64695

g1|21326825|dbj|BAC00516..11
g1|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA
g1|16649978|sp|AAF21657..1|AP043
g1|16649979|sp|AAF21657..1|AP043
g1|5231228|ref|NP_003721..2|
g1|47116971|sp|QH329|RNT2_PIG
g1|21311883|ref|NP_080887..1|
g1|17435269|ref|NP_080887..1|
g1|2118020|pir|S64695

```

Fig. 61



【図 6 4】

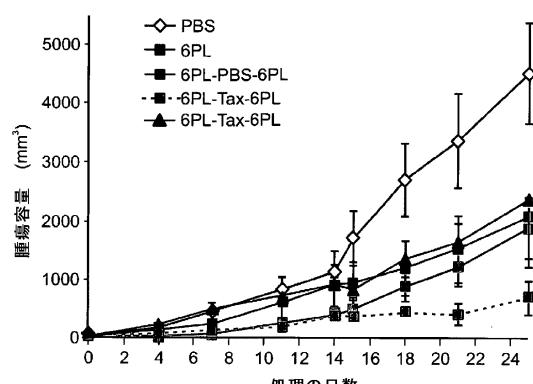


Fig. 64

【図 6 5】

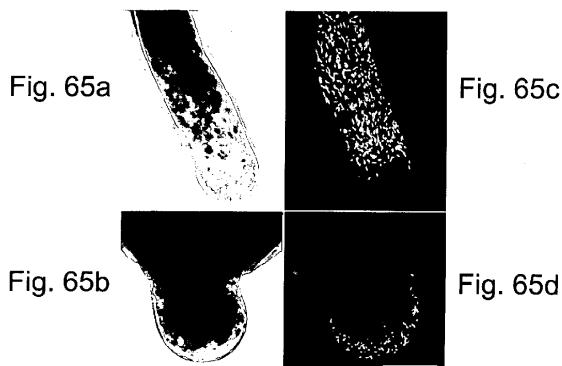


Fig. 65d

【図 6 6】

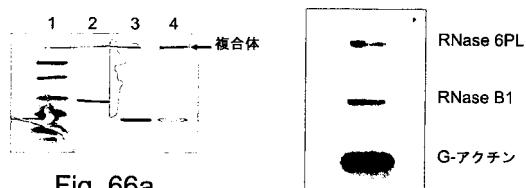


Fig. 66a

Fig. 66b

【図 6 7】

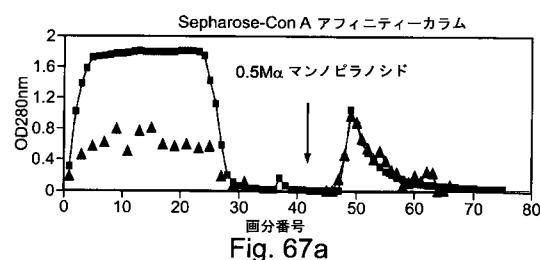


Fig. 67a

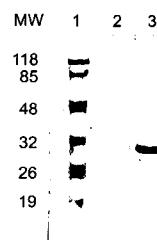


Fig. 67b

【図 6 9】

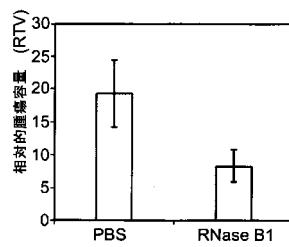


Fig. 69a

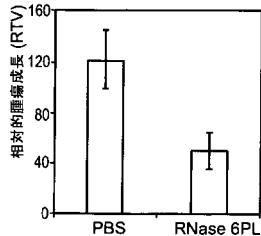


Fig. 69b

【図 6 8】

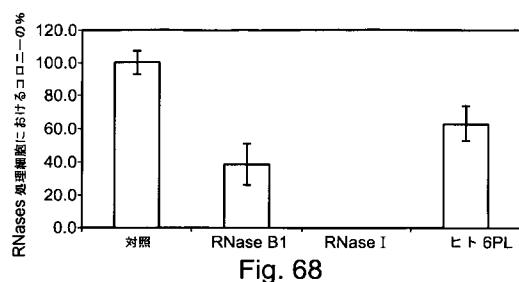


Fig. 68

【配列表】

0005069562000001.xml

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04

(72)発明者 ロイズ, レヴァヴァ  
イスラエル, 5 4 0 5 6 ギヴァト - シュムエル, レハヴァト - イラン 1 2

(72)発明者 シュワルツ, ベティ  
イスラエル, 7 6 6 6 7 レコヴォト, イツハク ベン - アリ ロード 6 / 2

(72)発明者 スミルノフ, パトリシア  
イスラエル, 7 6 8 2 3 レホヴォト, グラゼル ストリート 1 7 / 7

(72)発明者 ショセヨヴ, オデド  
イスラエル, 9 9 7 9 7 カルメ ヨセフ, エレズ ストリート 5

審査官 長谷川 茜

## (56)参考文献 特表2003-508411(JP, A)

Trubia,M. et al., Ribonuclease T2 precursor (Ribonuclease 6)., Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No. 000584, 2 0 0 4 年 6 月 1 5 日, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/20139363?sat=OLD04&satkey=1846679>>, [検索日2011.05.19]  
Oncogene , 2 0 0 1 年, Vol.20, p.980-988

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12N 9/22

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed