

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4418155号
(P4418155)

(45) 発行日 平成22年2月17日(2010.2.17)

(24) 登録日 平成21年12月4日(2009.12.4)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 14/475	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C12N 1/15	(2006.01)
C12N 1/19	(2006.01)
C07K 14/475	14/475
C12N 15/00	15/00
C12N 5/00	5/00
C12N 1/15	1/15
C12N 1/19	1/19

請求項の数 11 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-517821 (P2002-517821)
(86) (22) 出願日	平成13年7月18日 (2001.7.18)
(65) 公表番号	特表2004-505635 (P2004-505635A)
(43) 公表日	平成16年2月26日 (2004.2.26)
(86) 國際出願番号	PCT/CN2001/001178
(87) 國際公開番号	W02002/012537
(87) 國際公開日	平成14年2月14日 (2002.2.14)
審査請求日	平成17年7月1日 (2005.7.1)
(31) 優先権主張番号	00 1 19553.0
(32) 優先日	平成12年8月2日 (2000.8.2)
(33) 優先権主張国	中国 (CN)
(31) 優先権主張番号	01 1 03102.6
(32) 優先日	平成13年1月18日 (2001.1.18)
(33) 優先権主張国	中国 (CN)

(73) 特許権者	503044329 ペイジン エスティエム バイオテク リ ミテッド 中華人民共和国, ペイジン, ゾングアン カン ハイ-テク ゾーン, ハイティア ン アベニュー 46, ザインロン ビ ルディング
(74) 代理人	100086324 弁理士 小野 信夫
(72) 発明者	ケ, イーバオ 中華人民共和国, シャンハイ 2016 12, ソンジアン ディストリクト, ザイ ンクイアオ, チャンナン ロード, レイン 1, 85番

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】変異天花粉蛋白

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天然トリコサンチンのアミノ酸配列において、グルタミン酸による177番目のリジンの置換およびグリシンによる203番目のセリンの置換を有することを特徴とする生体内でのアレルギー反応性が低下した変異トリコサンチン。

【請求項 2】

請求項1項記載の生体内でのアレルギー反応性が低下した変異トリコサンチンをコードする核酸。

【請求項 3】

請求項2記載の核酸を含有するベクター。

10

【請求項 4】

請求項2記載の核酸または請求項3記載のベクターによって形質転換された宿主細胞。

【請求項 5】

請求項4記載の宿主細胞を、生体内でのアレルギー反応性が低下した変異トリコサンチンを発現するための好ましい条件下で培養し、該変異蛋白を該培養物より回収することを特徴とする、請求項1項記載の生体内でのアレルギー反応性が低下した変異トリコサンチンの製造方法。

【請求項 6】

請求項1項記載の生体内でのアレルギー反応性が低下した変異トリコサンチンと、薬学的に許容される担体もしくは賦形剤とを含有する医薬組成物。

20

【請求項 7】

請求項 1 項記載の生体内でのアレルギー反応性が低下した変異トリコサンチンを有効成分として含有する医薬。

【請求項 8】

流産誘発剤である請求項 7 記載の医薬。

【請求項 9】

子宮外妊娠治療剤である請求項 7 記載の医薬。

【請求項 10】

エイズ治療剤である請求項 7 記載の医薬。

【請求項 11】

白血病治療剤である請求項 7 記載の医薬。

10

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は変異トリコサンチン (M T C S) 蛋白、その製造法及びその使用に関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

トリコサンチン (Trichosanthin : T C S) は、最初は、漢方生薬であるかつ樓 (Trichosanthes Kirilowii Maximowicz) と呼ばれる植物の根茎部から抽出されたものであり、2000年以前より書物に記載され、臨床的に使用されている漢方薬、ティアン フア フエン (Tian Hua Fen) の活性成分として同定されている。

20

【0003】

化学的に、T C S は分子量が 27 kDa でタイプ 1 のリボソーム - 不活性蛋白 (R I P) である。これは真核細胞のリボソームの 60S サブユニットを不活性化する RNA - N - グリコシダーゼ活性を有している (Zhang JS, Liu WY, The Mechanism of Action Trichosanthin on Eukaryotic Ribosome RNA N-glycosidase of the Cytotoxin, Nucleic Acids Res, 20 (6) : 1271 - 1275, 1992)。天然のT C S は 247 個のアミノ酸残基によって構成されている。その一次構造が図 1 に示されている (Nie HL, et al., The Cloning and Structure Analysis of Trichosanthin Gene, The 4th China Conference on Gene Structure Cloning and Expression, Haikou, A-23, 1991)。

30

【0004】

T C S は、1970年代から中国において、妊娠中期における流産の誘発や絨毛性臓器の疾患、例えば、胞状奇胎の治療に、臨床で使用されている (Second Research Group of Shanghai Institute of Experimental Biology, Science in China, 19: 811 - 830, 1976)。

40

【0005】

1989年、T C S がH I V に感染した人のTリンパ細胞と貪食細胞の両細胞中でH I V - 1 の複製を抑制を示したとの実験室的な報告がなされると (Mcgrath MS, Hwang KM, Caldwell SE, et al., GLQ 223 : An Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Replication in Acutely and Chronically Infected Cells of Lymphocyte and Mononuclear Phagocyte Lineage, Proc. Natl

50

. Acad. Sci. USA, 86: 2844-2848, 1989)、すぐにエイズの治療可能性についてTCSの臨床試験が行われた。HIVに加え、TCSは他の型のウィルスを攻撃できるものである。

【0006】

また、白血病細胞や他の癌細胞に対する毒性も発見された(Kong M, Ke YB, Zhou MY, et al., Study on Trichosanthin Induced Apoptosis of Leukemia K562 Cells, Acta Biologiae Experimentalis Sinica, 31 (3): 233-243 1998; Zheng YT, Zhang KL, Ben KL, et al., In Vitro Immunotoxicity and Cytotoxicity of Trichosanthin Against Human Normal Immunocytes and Leukemia-lymphoma Cells, Immunopharmacology and Immunotoxicology, 17 (1): 69-79, 1995; Wu YX, Xiang DN, Zhang SP, et al., The Toxic Effect and Its Mechanism of Trichosanthin Against Stomach and Colon Cancer Cells, Chinese Journal of Digestion, 13 (3): 263-266, 1993)。

【0007】

しかし、臨床上の使用において、この薬剤による重篤な合併症が観察された。これは稀に、イムノグロブリンE(IgE)抗体を介する即時型アレルギー反応を引き起こす。TCS特異的IgEが体内でTCSと反応することによるI型の過敏症の攻撃の開始は、アレルギー性蕁麻疹、血管神経性水腫、およびアナフィラキシーショック-急性の、重篤な生命にかかるアレルギー反応で、数分で死亡する-のような合併症として臨床的に現れた。このTCSに対する免疫応答不全は一般に多年の間患者の体内に強陽性として残る。

【0008】

そのために、妊娠中絶薬としては一生で一回しか使えないというふうに規制されている。妊娠中絶だけでなく、他の疾患の治療にTCSを用いた時にもアレルギー反応が見られた。従って、その適用は、強く制限されていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、安全に何度も投与できるような抗原性が少ない新しいTCS蛋白製品の開発することによって、TCSの副作用を除去することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明は天然のトリコサンチン(TCS)のアミノ酸配列の3つの領域: 174-180、203-226および230-244のアミノ酸残基:の少なくとも1つのアミノ酸残基を改変した、抗原性の低い変異トリコサンチン(MTCS)蛋白または、該改変および天然のTCSの生物活性を実質的に保持しているMTCS蛋白の断片もしくは誘導体を提供する。

【0011】

本発明はさらに、本発明のMTCSをコードする核酸も提供する。

本発明はさらに、本発明の核酸を含むベクター、特に発現ベクターおよび本発明の核酸または本発明のベクターによって形質変換された宿主細胞に関する。

【0012】

本発明はさらに、本発明の宿主細胞をMTCSを発現させるための好ましい条件下で培養し、その培養物からMTCSを回収することからなる、本発明のMTCSの製造方法にも関する。

【0013】

本発明はさらに、本発明のMTCSおよび薬物学的に許容される担体もしくは賦形剤から

10

20

30

40

50

なる、医薬組成物に関する。

本発明はさらに、医薬としての本発明のM T C S にも関する。

本発明はさらに、ウイルス性疾患の治療、癌の治療、子宮外妊娠の治療および/または流産の誘発のための医薬を製造するための本願発明のM T C S の使用にも関する。

【 0 0 1 4 】

最後に、本発明は、哺乳類に本発明のM T C S の治療的有効量を投与することからなる、哺乳類の流産の誘発、子宮外妊娠の治療、ウイルス性疾患の治療および/または癌の治療のための方法に関する。

【 0 0 1 5 】

【発明の実施の形態】

本発明者らは鋭意研究の後、T C S の免疫活性に関する領域は構造的に 1 7 4 - 1 8 0 位、2 0 3 - 2 0 6 および 2 3 0 - 2 4 4 位間のアミノ酸の残基にあることを見出した。これらの 3 領域中の少なくとも一つのアミノ酸の残基の改変は、優れた性質を持つ新規なM T C S を製造することができる。

【 0 0 1 6 】

T C S の生物学的活性はM T C S 中に実質的に保持されているにもかかわらず、T C S の抗原性はM T C S 中では著しく低下している。

本願発明のM T C S は、少なくともリボソーム不活性化蛋白 (R I P) 活性およびおよび人工流産活性を保持しており、好ましくは抗癌、抗ウイルス活性などの全ての活性を保持している。

【 0 0 1 7 】

従って、本発明は、T C S のアミノ酸残基の 3 領域： 1 7 4 1 8 0 位、2 0 3 2 2 6 位と 2 3 0 2 4 4 位：の少なくとも 1 つのアミノ酸の残基が改変された低抗原性のT C S を提供するものである。

【 0 0 1 8 】

本願の明細書および特許請求の範囲中でのアミノ酸の残基の位置に関する番号は、図 1 で示されている番号を参照している。

【 0 0 1 9 】

本発明のM T C S は、本発明で定義されたアミノ酸残基の少なくとも一つの改変を含有する全長の成熟蛋白または断片もしくは誘導体であってもよい。

【 0 0 2 0 】

本願で用いられている、アミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸の残基の欠失、挿入、付加、置換または化学的改変のことを言う。

【 0 0 2 1 】

好ましい態様では、アミノ酸残基の改変が、改変されたアミノ酸部位の電荷の変化を引き起こす。

【 0 0 2 2 】

「置換」という語は好ましくは、親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸で置換、疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸で置換、酸性アミノ酸を塩基性アミノ酸で置換および塩基性アミノ酸を酸性アミノ酸で置換することを言う。

【 0 0 2 3 】

ここで用いる「親水性アミノ酸」という語は、特にセリン (S e r) 、スレオニン (T h r) 、システイン (C y s) 、チロシン (T y r) 、アスパラギン酸 (A s p) 、アスパラギン (A s n) 、グルタミン酸 (G l u) 、グルタミン (G l n) 、リジン (L y s) 、アルギニン (A r g) およびヒスチジン (H i s) を指す。これらの親水性アミノ酸のうちで、A s p 、A s n 、G l u および G l n が酸性アミノ酸、L y s 、A r g および H i s が塩基性アミノ酸である。

【 0 0 2 4 】

「疎水性アミノ酸」という語は、特にグリシン (G l y) 、アラニン (A l a) 、バリン (V a l) 、ロイシン (L e u) 、イソロイシン (I l e) 、プロリン (P r o) 、フェ

10

20

30

40

50

ニルアラニン (Phe)、トリプトファン (Trp) およびメチオニン (Met) を指す。

【0025】

本発明の好ましい態様においては、MTCsの領域 174 - 180 位が、表 1 から選ばれる少なくとも 1 個以上のアミノ酸残基の改変を含有している。

【0026】

【表 1】

元のアミノ酸の残基および位置番号	好ましい改変
Arg 174	Glu、Asp、またはGlyで置換
Val 175	欠失
Asp 176	Lys またはGlyで置換
Lys 177	Glu、Asp、またはGlyで置換
Thr 178	Gly またはAlaで置換
Phe 179	欠失
Leu 180	欠失

10

20

【0027】

本発明の他の好ましい態様においては、MTCsの領域 203 - 226 位が、表 2 から選ばれる少なくとも 1 個以上のアミノ酸残基の改変を含有している。

【0028】

【表 2】

元のアミノ酸の残基および位置番号	好ましい改変
Ser 203、Ser 211	Gly またはAlaで置換
Thr 204、Thr 224、Thr 226	Gly またはAlaで置換
Asn 205、Asn 206、Asn 217、Asn 220	Lys またはGlyで置換
Gly 207	欠失
Gln 208、Gln 219、Gln 221	Lys またはGlyで置換
Phe 209	欠失
Glu 210	Lys またはGlyで置換
Pro 212	欠失
Val 213、Val 214、Val 215、Val 223	欠失
Ile 216、Ile 225	欠失
Ala 218	欠失
Arg 222	Glu、Asp またはGlyで置換

30

40

【0029】

本発明の他の好ましい態様においては、MTCsの領域 230 - 244 位が、表 3 から選ばれる少なくとも 1 個以上のアミノ酸残基の改変を含有している。

【0030】

【表 3】

50

元のアミノ酸の残基および位置番号	好ましい改変
A l a 2 3 0, A l a 2 3 8	欠失
G l y 2 3 1	欠失
V a l 2 3 2, V a l 2 3 3	欠失
T h r 2 3 4	G l y またはA l aで置換
S e r 2 3 5	G l y またはA l aで置換
A s n 2 3 6, A s n 2 4 2, A s n 2 4 4	L y s またはG l yで置換
I l e 2 3 7	欠失
L e u 2 3 9, L e u 2 4 0, L e u 2 4 1	欠失
A r g 2 4 3	G l u, A s p またはG l yで置換

【0031】

好ましくは、本発明のM T C S は上述の三つの領域、174 - 180、203 - 226および230 - 244でアミノ酸残基の改変を含有している。さらに好ましい態様においては、それぞれの領域における改変は、表1、表2および表3からそれぞれ選択される。

10

【0032】

好ましい態様において、本発明のM T C S は、下記の両方のアミノ酸残基改変を有する：177位のL y s をG l uで、203位のS e r をG l yで置換。

20

さらに好ましい態様において、本発明のM T C S は、下記の3つのアミノ酸残基改変を有する：177位のL y s をG l uで、203位のS e r をG l yで、236位のA s n をG l yで置換。

【0033】

本発明は、さらに本願発明のM T C S をコードする核酸に関する。

【0034】

30

本発明のM T C S は、共に当業者にとってはよく知られた、遺伝子工学方法またはペプチド合成法、例えば固相ペプチド合成法 (Merrifield J. J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2154, 1963) によって製造できる。好ましくは、M T C S は天然T C S の遺伝子を改変し、次いで適切な生物学的宿主中で改変した遺伝子を発現させて製造される。

【0035】

M T C S をコードする本発明の核酸は、適当なベクター、特にプラスミドベクターp E T - 2 d またはp E T - 3 a のようなプラスミドベクター中でクローン化することができる。

30

【0036】

40

本発明の核酸あるいはその核酸を含有するベクターは、適切な宿主細胞、例えば大腸菌 (E. Coli.) を形質転換するために用いることができる。得られた形質転換された宿主細胞は、本発明のM T C S を生産するために培養することができる。本発明は、このような宿主細胞にも関する。

【0037】

したがって、本発明は、本発明の宿主細胞をM T C S の発現のための好ましい条件下で培養し、培養物からM T C S を回収することからなる本発明のM T C S の製造法にも関する。

【0038】

天然のT C S の遺伝子の配列はA T G (開始コドン) からT A G (終始コドン) までの8

50

70の塩基対からなっている。当業者にとっては、その遺伝子はその配列に関する公表された情報に基き、下記の標準方法、例えば、染色体DNAライブラリー(Chow TP, Feldman RA, Lovett M, Piatak M, et al., Isolation and DNA Sequence of a Gene Encoding Alpha-trichosanthin, a Type I Ribosome-inactivating Protein, J. Biol. Chem. 265(15): 8670-8674, 1990)またはcDNAライブラリー(Shaw PC, Young MH, Zhu RH, Ho WK, Ng TB, Yeung HW, et al., Cloning of Trichosanthin cDNA and its Expression in Escherichia Coli, Gene, 97(2): 267-72, 1991)からの分離による方法、あるいはPCR(Polymerase Chain Reaction)を用いる方法(Nie HL, et al., The Cloning and Structure Analysis of Trichosanthin Gene, The 4th China Conference on Gene Structure Cloning and Expression, Haikou, A-23, 1991)、あるいは化学的合成する方法によって得ることができる。
10

【0039】

この遺伝子は289個のアミノ酸より構成されるプレプロ-蛋白をコードする。247個のアミノ酸の残基を有する成熟した天然のTCSに加え、このプレプロ-蛋白は、N-末端に23個のシグナルペプチドおよびC-末端に19個の末端ペプチドを有している。
20

【0040】

TCSのプレプロ-蛋白をコードするcDNAは、先に発表された方法を用いて都合よくクローン化できる(Sambrook J, et al., Molecular Cloning, A laboratory Manual(Second Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982)。このcDNAを含有するプラスミドも直接用いることもできる。

【0041】

天然のTCSの遺伝子は、当業者によく知られている位置特異的突然変異処理を利用して、改変することができる。本発明の1態様において、この改変は次のとおりである。

【0042】

a) 必要に応じ、成熟天然TCSをコードするDNA配列の5'末端の前で、3'末端の後の適切な制限酵素位置を構築し、開始コドンと終止コドンをそれぞれ導入する。例えば、成熟天然TCSをコードするDNA配列の5'末端の前の制限酵NcoI位置(CCCA TG G)を開始コドンATGを導入し、成熟天然TCSの1位にMetを付加するように構築するか、制限酵素NdeI位置(CATATG)を、成熟天然TCSの1位をAspからMetにアミノ酸残基を置換するように構築できる。成熟天然TCSをコードするDNA配列の3'末端の後に、制限酵素BamHI位置(GGATCC)を、終止コドンを導入するように構築することができる；そして

【0043】

b) 本願発明のMTCsの遺伝子を得るために、変異させるアミノ酸配列(174-180、203-226および230-240領域のアミノ酸残基)をコードするDNA配列を改変する。コドンの縮重により、1個のアミノ酸を改変するために複数の遺伝突然変異方法を用いることができる。市販のキット、例えばバイオ-ラード社のMutagenesis Kitは特定のDNA部位の突然変異を行うのによくデザインされている。手順は製造会社の取扱説明書に従うことができる。
40

【0044】

位置特異的突然変異誘発によって得られたMTCsをコードするDNA配列は、適当な制限酵素、例えばNcoI(またはNdeI)およびBamHIで消化し、次いで発現ベクター、例えばプラスミドベクターpET-2d(またはpET-3a)にクローンする。
50

得られた突然変異発現ベクターは、標準操作に従って、適当な宿主細胞、例えば E . C o l i B L 2 1 (D E 3 , p L y s S) の形質転換に用いることができる。この形質転換体は次いで適当な培地で培養される。誘導剤、例えばイソプロピル - ベータ - D - チオ - ガラクロシド (I P T G) を必要に応じ、M T C S の発現を誘導するために、培地中に適当な時間に加えることができ、このM T C S は次いで、宿主細胞の溶解、溶解物の遠心分離そしてカラムクロマトグラフィーなどで精製することを含む通常の方法で培地から採取することができる。

【 0 0 4 5 】

M T C S の活性に関する実験

本発明のM T C S の免疫反応性および生物活性の確認試験をその結果とともに以下に記す。
。

【 0 0 4 6 】

1 . 欠失 T C S 変異蛋白および改変 T C S 変異蛋白の性質

一次構造と生物学的活性および免疫学的反応性との関係を調べるために、表 1 から表 3 に示した変異に従って、T C S の分子を遺伝子的に改変した。遺伝子は C 末端の配列の欠失 (欠失変異体) または複数のアミノ酸配列の改変 (改変変異体) させた T C S をコードして得られた。変異蛋白は大腸菌を発現し、ついでこれを純化して、欠失変異体および改変変異体の何れかに対応して得られた。

【 0 0 4 7 】

T C S およびその変異体は、リボソームを不活性化し、細胞蛋白合成を阻害する R N A N - グリコシダ - ゼ活性を有する。生物学活性および免疫学的反応性は、これらの欠失変異体および改変変異体について測定を行った。

T C S の活性断片に対する構造的基盤は、T C S の三次元構造から得られる情報とともに、これらの測定結果によって解析することができる。

【 0 0 4 8 】

R I P 活性は P e l h e m & J a c k s o n の記載によって決定した (H . K . B . P e l h e m and R . J . J a c k s o n , Eur . J . B i o c h e m . 6 7 : 2 4 7 - 2 5 6 . 1 9 7 6) 。人工流産活性の測定は下記に示す本発明者らの研究室の標準手順に従って行った (N i e H L , C a i X F et al . , P o s i t i o n 1 2 0 - 1 2 3 , a P o t e n t i a l A c t i v e S i t e o f T r i c h o s a n t h i n , L i f e S c i e n c e s , 6 2 (6) : 4 9 1 - 5 0 0 , 1 9 9 8) 。試験管内 (i n v i t r o) における免疫学的反応性は、競争的エライザ (E L I S A) 法 (X H H e , et al . , E f f e c t s o f C h e m i c a l M o d i f i c a t i o n o f L y s i n e a n d A r g i n i n e R e s i d u e s o f T r i c h o s a n t h i n o n i t s R e a c t i v i t i y w i t h I g E , A c t a B i o c h e m i c a e t B i o p h y s i c a S i n i c a , 2 6 : 6 5 7 - 6 6 2 , 1 9 9 4) で測定した。結果は表 4 に示した。

【 0 0 4 9 】

【表 4 】

10

20

30

TCS欠失変異体およびTCS改変変異体の特性試験

製品	欠失アミノ酸の位置	改変アミノ酸の位置	RIP活性*	人工流産活性**	in vitro IgGとの反応性***	in vitro IgEとの反応性***
NTCS(1-247)	N/A	N/A	++	++	++	++
L3TCS(1-244)	247-245	N/A	++	++	++	++
L5TCS(1-242)	247-243	N/A	++	++	+	+
L10TCS(1-237)	247-238	N/A	++	++	+	+
L14TCS(1-233)	247-234	N/A	++	++	+	+
L29TCS(1-218)	247-219	N/A	+	+	-	-
L46TCS(1-201)	247-202	N/A	+	+	-	-
L52TCS(1-195)	247-196	N/A	±	±	-	-
L67TCS(1-180)	247-181	N/A	-	-	-	-
L74TCS(1-173)	247-174	N/A	-	-	-	-
L7TCS (1-173, 181-247)	180-174	N/A	±	±	±	±
L52TCS(1-173, 181-202)	247-203, 180-174	N/A	-	-	-	-
M7TCS(1-247)	N/A	180-174の1	++	++	±	±
M24TCS(1-247)	N/A	226-203の1	++	++	±	±
M15TCS(1-247)	N/A	244-230の1	++	++	+	+
M31TCS(1-247)	N/A	226-203の1 と 180-174の1	++	++	- ^(a)	- ^(a)
M46TCS(1-247)	N/A	244-230の1 と226-203の 1と180-174 の1	++	++	- ^(b)	- ^(b)

NTCS-天然のTCS

LTCs-TCSの欠失体

MTCS-TCSの改変体

*RIP活性 IC₅₀(ng/ml) :

++ ≤ 50, 50 < + ≤ 500, 500 < ± ≤ 5000, - > 5000

**人工流産活性(%) :

++ ≥ 80, 80 > + ≥ 30, 30 > ± ≥ 5, - < 5

***体外免疫反応の能力(%) :

++ > 80, 80 > + > 30, 30 > ± > 10, 10 > -^(a) > 5, -^(b) ≤ 5

【0050】

40

欠失TCS変異体および改変TCS変異体の性質に関する上記測定の結果は下記のことを示す。

欠失TCS変異体においては、C末端から3個のアミノ酸残基を欠失した場合、in vitroにおけるイムノグロブリンG (IgG)とIgEの反応性は天然のTCSと同様に強陽性である。アミノ酸の残基を5個まで欠失させると、免疫反応性が減少するが、RIP活性と人工流産活性に影響は認められない。29個を越えてアミノ酸を失乏させた場合、生物学活性が減少する。

【0051】

TCSの生物活性中心は110-174位の間にあることが、本発明者らによって報告されている (Ke YB, Chen JK, Nie HL, et al., Structu

50

re - function Relationship of Trichosanthin, Life Sciences, 60 (7) : 465 - 472, 1997)。C末端配列の欠失による三次元構造の変化もまたこの活性中心に対して影響する。アミノ酸残基の欠乏が活性の中心に近いほど、生物活性に対する影響が一層大きくなる。免疫反応性の部分は生物活性の中心より、C末端に近いことが発見された。従って、C末端配列の欠失によってさらに容易に影響される。

【0052】

表4の改変変異体M7TCS(1-247)[174-180位の間のアミノ酸酸残基の一つを変異させた]、M24TCS(1-247)[203-226位の間のアミノ酸酸残基の一つを変異させた]およびM15TCS(1-247)[230-244位の間のアミノ酸酸残基の一つを変異させた]は、*in vitro*における弱いIgGとIgEの反応性、およびRIPと人工流産活性を含むある程度の生物活性を示した。この結果はこの改変した三つのアミノ酸配列(180-174、226-203、244-230位)は免疫反応性に関連することを示している。これらの領域のどのような構造変化も免疫反応性の減弱を引き起こす。

10

【0053】

これらの構造変化は、少なくとも1個のアミノ酸残基の除去；二つの隣接したアミノ酸残基の間の少なくとも1個のアミノ酸残基の挿入；これらの配列に少なくとも1個のアミノ酸残基を付加；少なくとも1個の親水性アミノ酸残基を疎水性アミノ酸残基で置換；一個以上の疎水性アミノ酸残基を親水性アミノ酸残基で置換；一個以上の酸性アミノ酸残基を塩基性アミノ酸残基で置換；一個以上の塩基性アミノ酸残基が酸性アミノ酸残基で置換；一個以上のアミノ酸残基の化学物質でのカップリング；および/またはこの改変がなされたアミノ酸側の電荷を変化させることができる少なくとも一個のアミノ酸の残基の挿入を含むいかなる改変を含む。

20

【0054】

改変変異体M31TCS(1-247)[174から180位の間の1個のアミノ酸残基および203から226位の間の1個のアミノ酸残基が変異されている]とM46TCS(1-247)[174から180位の間の1個のアミノ酸残基、203から226位の間の1個のアミノ酸残基および230から244位の間の1個のアミノ酸残基が変異されている]は、ネガティブの免疫反応性および元来のRIPおよび人工流産活性を含む生物活性を示している。これらの二つは優れた性質を有する改変体である。天然のTCSの抗原性が大きく減弱されている。しかしながら、天然のTCSの生物活性は保持されている。M46TCS(1-247)の抗原性は、M31TCS(1-247)に比較するとやや弱い。

30

【0055】

2. 本発明のMTCsの性質

*in vitro*でのRIPの活性試験、妊娠中期のマウスの人工流産についての試験、*in vitro*におけるIgGおよびIgEの反応性試験を、先に述べた手順に従い、本発明のMTCs(M177, 203)(177位のLysをGluで置換および203位のSerをGlyで置換)について行った。培養癌細胞に対する毒性試験は本発明者らの実験室での次の標準手順に従って行った(Kong M, et al., Study on Trichosanthin Induced Apoptosis of Leukemia K562 Cells, *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 31 (3) : 233 - 243, 1998)。

40

【0056】

a) MTCsと天然のTCSの免疫反応性および生物学的活性の比較を表5に示す。

【0057】

【表5】

M T C S と天然T C S との免疫学的反応および生物活性の比較

	天然のTCS	MTCS
R I P 活性(%)	++	++
人工流産活性(%)	++	++
腫瘍細胞に対する毒性(K 5 6 2 セルライン)	++	++
in vitro IgEとの反応(%)	++	— ^(a)
in vitro IgGとの反応(%)	++	— ^(a)
ラット体内のIgE反応の誘発*	++	—
モルモット体内の即時的過敏反応の誘発**	++	±

* : 詳細は (C-i v)

** : 詳細は (C-iii)

【0058】

b) 異なったセルラインに対するM T C S の毒性を表 6 に示す。

【0059】

【表 6】

異なったセルラインに対するM T C S の毒性

セルライン	LC ₅₀ (ug/ml)	セルライン	LC ₅₀ (ug/ml)	セルライン	LC ₅₀ (ug/ml)
J ar	7.0	B16	69.2	W ish	>1000
HL60	8.1	A431	77.6	HPPLC*	>1000
MLT	10.0	B7-325	218.8		
K562	11.0	SPCA1	257.0		
U937	17.0	7404	354.8		

* : 臨床で採取した正常人の末梢血液のリンパ細胞

【0060】

M T C S の白血病セルラインK 5 6 2 、 H L 6 0 、 M L T 、 U 9 3 7 および絨毛性癌セルラインJ ar に対する平均致死量 (L C ₅₀) は 3 0 u g / m l より少ない。 L C ₅₀ 5 0 のセルラインを最高感作セルラインとする。 M T C S の L C ₅₀ が 3 0 u g / m l 以上の癌細胞セルラインB 1 6 、 A 4 3 1 、 B 7 - 3 2 5 、 S P C A 1 および 7 4 0 4 等を中等度感作セルラインとする。 M T C S の L C ₅₀ が 1 0 0 0 u g / m l 以上の正常体細胞セルラインすなわち、 H M P L C および W i s h (羊膜の細胞) を非感作セルラインとする。このデータは、ある範囲の濃度では、 M T C S は白血病細胞および他のタイプの癌細胞に対して強い毒となるが、正常細胞は無傷のままであることを明確に示している。この結果は先の T C S に対する同様な研究と一致している。

【0061】

c) 動物モデル実験

c - i) 抗腫瘍活性

8 週令のヌードマウスにヒト慢性骨髄性白血病細胞 K 5 6 2 の 1 × 1 0 ⁷ 細胞を皮下に接種する。接種 1 0 日後に 5 0 % の動物で生体内で接種細胞が発育して、肉眼で観察できる 固形癌を形成する。異種の癌を移植された動物を無作為に 4 群に分ける。 3 群の動物には異なる用量の M T C S を注射投与する。他の群には、コントロールとして生理食塩水を与える。治療群に投与する M T C S の投与量は人工流産有効量より少ないか同量であり、 3 群それぞれに 1 5 n m / K g 、 4 5 n m / K g および 7 5 n m / K g である。 M T C S は毎 4 日間に 1 回合計 4 回投与する。異なる腫瘍抑制の値、それぞれ (4 0 ± 3) % 、 (7 1 ± 2) % および (9 2 ± 4) % の抑制比が 3 投与群で観察された。

【0062】

T および B リンパ球を欠如している S C I D (s e v e r e c o m b i n e d i m m

10

20

30

40

50

unodeficient) マウスを、K562細胞に対するMTCSの毒性を検討するために選択する。9週齢のSCIDマウスにK562細胞 1×10^7 個を皮下接種する。接種された動物の100%が固体癌を発生する。接種5日後に、動物を無作為に4群に分ける。それらの3群が投与群である。その他が生理食塩水のコントロール群である。異なる投与群の動物に、それぞれ高用量、中用量および低用量の異なる用量でMTCSを投与する。高用量群は150nm/Kgを1回投与；中用量群は75nm/Kgを2回(週1回)投与；低用量群は37nm/Kgを3回(4日毎に投与)投与。全ての群で合計投与量は150nm/Kgである。腫瘍の抑制比は高、中および低用量群でそれぞれ(43±6)%、(64±8)%および(94±3)%である。

【0063】

10

両実験動物の結果の結論は、人工流産の有効量で、MTCSは明らかな腫瘍抑制効果を有するということである。上記90%の腫瘍抑制比は、人工流産有効量の半量を4回投与することによって得ることができる。少量の多回投与は優れた結果をもたらす。

【0064】

MTCSは、ヒト慢性骨髄性白血病細胞を異種移植された動物モデルの上記の両実験において、優れた抗腫瘍効果を示す。これらの動物モデルに基いて、他の異種移植SCID-ヒト慢性骨髄性白血病モデルを確立する。K562細胞の接種後に液癌がネズミ宿主中に形成され、これはネズミ宿主中の白血球の計測および他の血液生化学的变化によって証明される。異種移植されたマウスの3投与群それぞれに、3.75nm/Kg、7.5nm/Kgおよび15nm/Kgの用量でMTCSを静脈内投与する。3回投与後、計測白血球細胞が正常範囲に戻ったマウスのパーセンテージは、投与3群それぞれで、(25+6)%、(75+8)%および(94+3)%である。このデータは、固体癌の治療においてより、液癌の治療においての方がより少量のMTCSを用いることができるこを示唆している。そして固体癌よりも液癌の方が一層良い結果を達成することができる。

20

【0065】

c-ii) マウスに対する急性毒性試験

マウスに対する急性毒性は下記の標準手順で行った。8週齢のFiマウス(IRC/Balb-c)を用いた。それぞれの動物に天然のTCSまたはMTCSを1回注射投与した。天然のTCSとMTCSの間の平均致死量(LD₅₀)を比較するために、動物を7日間観察した。同用量において、MTCS群の動物に比べて、天然のTCSを注射投与した動物の方が高い死亡率および早い死が観察される。LD₅₀(天然のTCS)=18.4mg/Kg、LD₅₀(MTCS)=27.5mg/Kg。MTCSの急性毒性は天然のTCSのそれよりも約50%低い。

30

【0066】

c-iii) モルモットに対する急性アレルギー毒性試験

天然のTCSとMTCSについて別々にモルモットに対する急性アレルギー毒性試験を行う。モルモットは、ヒト人工流産有効量の4.5倍量を皮下投与して感作する。14日後、動物にヒト人工流産有効量の10倍量を静脈内投与誘発する。アレルゲン投与後30分間、アナフィラキシー反応および死亡を観察した。天然のTCS群の死亡数/全動物数比は12/14、約86%である。MTCS群のこの比は3/15、約20%である。有意な差が存在した。MTCSは天然のTCSに比べて、モルモットにおける急性アレルギー反応を非常に弱く引き起こす。

40

【0067】

c-iv) ラットに対する受動性皮膚アナフィラキシー(PCA)

ラットに対するPCAをOvaryの方法(Ovary Z, et al., PCA Reaction with Mouse Antibodies in Mice and Rats, Inter Archs allergy Appl Immun, 48: 16-21, 1975)で行う。2群のマウスを天然のTCSおよびMTCSで別々に感作する。14日後に、天然のTCSおよびMTCSに対して生成されたマウス抗血清を得る。2群のラットを麻酔し、毛を剃った背部に、天然のTCSおよびMTCSに対する抗

50

血清をそれぞれ皮内投与し、対応する天然のTCSまたはMTCsの1%エンバンスブルーを含有する溶液を静脈内投与して誘発する。30分後、動物を殺して背部の青斑の直径を測定してPCA反応を判定する。青斑が0.5cm以上のものを陽性反応とみなす。天然のTCS群の動物は全て陽性反応を示す。MTCs群の動物は全て陰性である。天然のTCSによって引き起こされる生体内IgE反応はMTCsの場合には劇的に低減する。

【0068】

3. MTCsの抗腫瘍のメカニズム

a) MTCsは感作細胞中でアポートシスを誘発する。

先の2aおよび2bで述べたように、MTCsは正常な体細胞を傷つけないが、培養白血病細胞に対して高毒性である。K562細胞に対するMTCsの作用を例として挙げることができるが、多数の研究がそのメカニズムを解明するために行われている。電子顕微鏡下でK562細胞にMTCsを作用させると、プログラム細胞死またはアポトーシスした細胞形態の特徴的な変化を観察することができる：細胞体の縮小、細胞質の凝縮、小胞体の膨張、核小体の消失、核染色質の分離した塊への辺縁化、および細胞の幾つかの膜結合体（すなわちアポトーシス体）への崩壊。MTCs処理された細胞はまた、生化学的なアポトーシスの証明であるオリゴヌクレオゾームのDNAラダーおよび蛍光活性化セルソート（FACS）分析でアポトーシスの二重ピークを示す。この結果はMTCsがK562細胞においてアポトーシスの引きがねになることを示している。

10

【0069】

b) 感作細胞の細胞膜にはMTCsの特異的結合部位が存在する。

20

本研究では、リアルタイムのバイオモレキュラー・インターラクション・アナライシス（BIA）を用いる。MTCsはマイクロフローセルの壁を形成しているセンサーチップ上のデキストランマトリックスに固定される。次いで、細胞膜抽出物をコントロールフローの表面に注入する。相互作用によるいずれの表面濃度の変化も表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance: SPR）信号として検出し、共鳴ユニット（RU）で表わす。異なったタイプの感作細胞は、MTCsが細胞膜蛋白に強力に結合していることを示す100-300RUの応答を与える。正常体細胞、例えば羊膜の細胞、を相互作用試験に用いると、意味のある結合はない。

【0070】

c) 共焦点レーザー顕微鏡により、MTCsは受容体介在エンドサイトーシスを介してK562に取り込まれることが観察される。

30

【0071】

d) GTP-ガンマ-³⁵S結合試験において、MTCsは感作細胞中でG-蛋白を介するシグナル伝達を活性化する。このような現象は、非感作細胞中では観察されない。

【0072】

e) 共焦点レーザー顕微鏡により、MTCsは感作細胞中で、細胞内貯留カルシウムから、細胞内カルシウム放出を誘発することが観察される。

【0073】

抗腫瘍メカニズム研究の結論は次のとおりである。感作細胞中に存在する膜レセプターはMTCsのエンドサイトシスを伝え、次いでRIP効果を働かせる。一方、MTCsも細胞シグナル伝達を妨げる。これらの二つの効果が結びついて感作細胞をアポトーシスに導く。感作細胞の大部分は腫瘍細胞であるから、腫瘍を阻害すると同時に正常な体組織にも障害を与える細胞障害性または細胞分裂抑制性の化学療法剤に比べて、MTCsは腫瘍に対する作用メカニズムがユニークである。これは、新規な抗腫瘍剤としてのMTCsに臨床適用の理論的根拠を提供する。

40

【0074】

上で述べたように、本発明のMTCsは、天然のTCSの生物学的活性を実質的に保持しているにもかかわらず、天然のTCSに比べて、抗原性が著しく低下している。低抗原性であるので、安全な多回投与用および天然のTCSによって処置できる全ての医療適用において、より好ましい処置をすることができる。より具体的には、これらに制限されるも

50

のでないが次の適用を含む。

【0075】

1. 白血病およびその他の固形癌。標的細胞に選択的に取り込まれるメカニズムにより、M T C S の低用量のたった数回の投与のみが臨床治療で必要とされる。M T C S は腫瘍細胞には高毒性であるが、一定の用量範囲内では、正常の体細胞にはそのままとするので、副作用を非常に少なくしている。

【0076】

2. ウィルス性疾患および特にエイズ。M T C S は、天然のT C S によるエイズの治療に比べて副作用が少ないので患者に対して安全である。

【0077】

3. 子宮外妊娠および中期における流産の誘発。人工妊娠中絶薬として患者の生涯に一度だけの投与に限定されているT C S とは異なり、M T C S は低抗原性であるため、安全な多回投与が可能である

【0078】

本願発明のM T C S は、薬学的に許容される担体もしくは賦形剤と共に、医薬組成物中に包含させることができる。従って、本願発明は治療的有効量の本願発明のM T C S を薬学的に許容される担体もしくは賦形剤と組合わせてなる医薬組成物も提供する。このような薬学的に許容される担体もしくは賦形剤の例としては、これに限定されるものではないが、単独でまたは組合わせて、生理食塩水、水性緩衝溶液、ブドウ糖溶液、水、グリセリンおよびエタノール等が含まれる。このような医薬組成物は選ばれる投与ルートに適合させるべきである。

【0079】

本願発明はまた、本願発明の医薬組成物の1またはそれ以上の成分を充填した1またはそれ以上の容器よりなる、医薬包装物またはキットを提供する。本願発明のM T C S およびその断片または誘導体もまた、さらなる他の治療薬と組合わせて用いることができる。

【0080】

本願発明の医薬組成物は、ヒトの患者のような哺乳類に種々の投与ルート例えば、経口、局所、静脈内、腸管内、筋肉内、腫瘍内、皮下、鼻内または皮内投与などで投与することができる。この医薬組成物の有効量は、病気や体調の本質に基き、特定の病気や体調の治療または予防において使用するのに必要なものである。本願発明のM T C S の適切な用量は天然のT C S の有効量を参考にして決定することができる。

【0081】

【実施例】

以下に実施例を示すが、本発明を限定することを意図するものではない。

【0082】

実施例 1

この実施例は、T C S 遺伝子の部位特異的突然変異誘発および成熟天然T C S のc D N A のクローニングを説明する。

当業者にとって、天然T C S の遺伝子は下記の標準的な方法すなわち、天然T C S 蛋白をプローブとして用いて かつ 横のc D N Aライブラリーから単離することにより (Shaw P C, Yung M H, Zhu R H, Ho W K, Ng T B, Yeung H W, et al., Cloning of Trichosanthin cDNA and its Expression in Escherichia Coli, Gene, 97 (2) : 267 - 72, 1991)、適切にデザインされたD N Aをプローブとして用いて かつ 横のゲノミックD N Aライブラリーから単離することにより (Chow T P, Feldman R A, Lovett M, Piatak M, et al., Isolation and DNA Sequence of a Gene Encoding Alpha-trichosanthin, a Type I Ribosome-inactivating Protein, J. Biol. Chem. 265 (15) : 8670 - 8674, 1990)、または適切にデザインされたプライマーを用い

10

20

30

40

50

るポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)により(Nie HL, et al., The Cloning and Structural Analysis of Trichosanthin Gene, The 4th China Conference on Gene Structure and expression, Haikou, A-23, 1999)容易に得ることができる。

【0083】

シグナルペプチドおよびテイルペプチドを含有しているTCSプレプロ蛋白のcDNA(配列を図1に示す)の部位特異的変異を、変異原プライマーIおよびIIを用い、成熟天然TCSをコードするDNA配列の5'末端の前に開始コドンを構築し、3'末端の後に終止コドンを構築する方法で行った。成熟天然TCSをコードするDNAは次いで、発現ベクターにクローンした。この実験のために二つの変異原プライマーがデザインされた。

10

【0084】

プライマーI. 5' GTG CAG GCC ATG GAT GTT
AGG 3' (SEQ ID NO. 3)

プライマーII. 5' AAC AAT ATG GCA TAG GAT CCC
ATG GAT GAC 3' (SEQ ID NO. 4)

プライマーIは、開始コドン(ATG)を導入し、成熟天然TCSの1位にメチオニンを付加するために、制限酵素NcoIの認識部位(GGATCC)を含有しているという特徴がある。

プライマーIIは、成熟天然TCSをコードするDNAの3'末端の後に終止コドン(TA G)を付加するために、制限酵素BamHIの認識部位(GGATCC)を含有しているという特徴がある。

20

【0085】

突然変異は、ビオーラッド社の、Mutagenesis Kit (カタログ番号170-3576)を用いて行った。手順は、製造会社の指示に従った。変異は配列分析で確認した。詳細は製造会社の指示書を参照されたし。

手短にいうと、この方法は下記の工程からなる。

【0086】

ウラシル含有錆型DNAの抽出

30

TCSプレプロ-蛋白をコードする天然遺伝子を、ファージミドベクターpTZ-19Uにクローンし、錆型DNAとしてpTZ-19U-TCS'を得た(Nie et al., The Cloning and Structural Analysis of Trichosanthin Gene, The 4th China Conference on Gene Structure Cloning and Expression, Haikou, A-23, 1999)。クロラムフェニコール含有培地中で生育しているE. coli CJ236をpTZ-19U-TCS'で形質転換させ、個々のコロニーを採取するために、アンピシリン含有プレートに塗抹した。ファージミド保持バクテリア細胞をアンピシリン含有培地50ml中でOD₆₀₀が約0.3になるまで培養した。次いで、ヘルパー・ファージM13K07を1×10¹⁰pfuで培地に加え、通気下、37℃で1時間培養し、更にカナマイシン3.5mgを加えた。更に、4ないし6時間培養した後、培地を遠心分離して上澄液をRNase 100ugと混合して再び30分培養した。この培養混合物を酢酸アンモニウム/PEGを用いて氷冷下で30分沈殿させてから、遠心分離した。析出物を高塩緩衝液200u1中で再度けん濁させ、氷上で30分放置し、再び遠心分離した。次いで、上澄液中のウラシル含有錆型DNAを、フェノール、フェノール/クロロホルムおよびクロロホルムで抽出した。最後に、このウラシル含有錆型DNAを酢酸アンモニウム/エタノールで-70℃で再度沈殿させ、70%エタノールで洗浄して、10-20u1のTE緩衝液中で再度けん濁させた。

40

【0087】

突然変異原ストランドの合成

50

上で得られたウラシル含有鑄型DNAを0.1-0.3 pmolの変異原プライマー、アニーリング緩衝液および水と混合した。この混合物を70℃に加熱し、次いで40分間で30℃まで冷却した。この冷却した混合物を氷浴に入れ、3単位のT4 DNAリガーゼと1単位のT4 DNAポリメラーゼを添加した。この合成混合物を氷上で5分、次いで25℃で5分、最後に37℃で90分培養した。合成反応を停止緩衝液90u1を加えて終結した。この変異させたDNAを、塩化カルシウムで処理したコンピテントE. coli. MV1190の形質変換に用いた。この形質変換体をアンピシリンプレート上で、37℃で終夜培養した。数個のコロニーをプレートから採取した。プラスミドDNAは、これらの各コロニーから抽出した。最後に、変異を配列分析で確認した。この実施例においては、該プラスミドDNAはpTZ-19U-TCSであり、5'末端にNcoI認識部位を、3'末端にBamHI認識部位を持つ天然のTCSをコードするDNA配列を含有している。
10

【0088】

プライマーIおよびプライマーIIで変異させて得られたプラスミドpTZ-19U-TCSは、更に、実施例2から6において鑄型DNAとして用いられた。一方、プラスミドpTZ-19U-TCSは、次にNcoIおよびBamHIを用い、37℃で2時間、二重消化をした。消化された混合物を低融点アガロースゲル電気泳動に付し、長さ約750bpのTCS遺伝子のDNA断片を得た。次にこの断片を、T4 DNAを用い、前もってNcoIおよびBamHIで二重消化してある発現ベクターpET-2dと4℃でライゲートし、発現で用いるpET-2d-TCSを得た。
20

【0089】

実施例2

MTCs(M177)をコードするDNAの突然変異およびクローニング：

突然変異はビオ-ラッド社の、Mutagenesis Kitを用いて行った。手順は、製造会社の指示に従った。実施例1で得られたpTZ-19U-TCSを鑄型DNAとして用いた。変異原プライマー-IIIを部位特異的突然変異誘発に用いた。簡単に述べると、E. coli. CJ236をpTZ-19U-TCSで形質変換させた。次いで、ウラシル含有鑄型DNAをヘルパー・ファージの存在下で抽出した。次に、変異原ストランドを、ウラシル含有鑄型DNAを変異原プライマーと混合する、T4 DNAリガーゼを添加する、T4 DNAポリメラーゼを添加するなどを含む一連の操作で合成した。この変異したDNAをコンピテントE. coli. MV1190の形質転換に用いた。最後に、突然変異コロニーを採取し、変異を配列分析で確認してpTZ-19U-MTCs(M177)を得た。
30

【0090】

変異原プライマー-IIIは本実験のためにデザインされた。

プライマー-III 5' AAG CGT GTT GAC GAA ACC TTG
CTA CCA 3' (SEQ ID NO. 5)

プライマー-IIIは、天然のTCSの177位のLysをコードするコドンが、Gluをコードするコドンに置き換わるという特徴がある。コドンの縮重により、アンダーラインをしたコドンは、Gluをコードする他のコドン、すなわちGAGで置き換えることができる。
40

【0091】

こうして得られたpTZ-19U-MTCs(M177)は、次いでNcoIおよびBamHIで二重消化し、MTCs(177)をコードするDNA断片を得た。次いで、この断片を前もってNcoIおよびBamHIで二重消化した発現プラスミドベクターpET-2dとライゲートして、pET-2d-MTCs(177)を得た。

【0092】

実施例3

MTCs(203)をコードするDNAの突然変異およびクローニング：

10

20

30

40

50

突然変異およびクローニングするために、異なった突然変異原プライマーIVをデザインし実験に用いた以外は、実施例2に記載した手順に従い、pET-2d-MTCS(203)を得た。

突然変異原プライマーIVは本実験のためにデザインされた。

プライマーIV 5' ATT CAG ATA GCG GGT ACT AAT
AAT GGA 3' (SEQ ID NO. 6)

プライマーIVは、天然TCSの203位のSerをコードするコドンをGlyをコードするコドンに置き換えるようにデザインされている。コドンの縮重により、アンダーラインを引いたコドンはGlyをコードする他のコドン、例えばGGA、GGC、GGGに置き換えることができる。すなわち、Glyをコードするコドンには4種の代替があるということである。 10

【0093】

実施例4

MTCS(236)をコードするDNAの突然変異およびクローニング：

突然変異およびクローニングするために、異なった突然変異原プライマーVをデザインし、実験に用いた以外は、実施例2に記載した手順に従い、pET-2d-MTCS(236)を得た。

突然変異原プライマーVは本実験のためにデザインされた。

プライマーV 5' GTT GTA ACC TCC GGC ATC GCG
TTG CTG 3' (SEQ ID NO. 7)

プライマーVは、天然TCSの236位のAsnをコードするコドンをGlyをコードするコドンに置き換えるようにデザインされている。コドンの縮重により、アンダーラインを引いたコドンはGlyをコードする他のコドン、例えばGGA、GGG、GGTに置き換えることができる。 20

【0094】

実施例5

MTCS(M177, 203)をコードするDNAの突然変異およびクローニング：

突然変異およびクローニングするために、異なった突然変異原プライマーIIIおよびIVをデザインし、実験に用いた以外は、実施例2に記載した手順に従い、pET-2d-MTCS(M177, 203)を得た。 30

プライマーIII 5' AAG CGT GTT GAC GAA ACC TTC
CTA CCA 3' (SEQ ID NO. 5)

プライマーIV 5' ATT CAG ATA GCG GGT ACT AAT
AAT GGA 3' (SEQ ID NO. 6)

プライマーIIIは、天然のTCSの177位のLysをコードするコドンが、Gluをコードするコドンに置き換わるという特徴がある。コドンの縮重により、アンダーラインを引いたコドンは、Gluをコードする他のコドン、すなわちGAGで置き換えることもできる。

プライマーIVは、天然TCSの203位のSerをコードするコドンをGlyをコードするコドンに置き換えるようにデザインされている。コドンの縮重により、アンダーラインを引いたコドンはGlyをコードする他のコドン、例えばGGA、GGC、GGGに置き換えることができる。 40

【0095】

実施例6

MTCS(M177, 203, 236)をコードするDNAの突然変異およびクローニング：

突然変異およびクローニングするために、異なった突然変異原プライマーIII、IVおよびVをデザインし、実験に用いた以外は、実施例2に記載した手順に従い、pET-2d-MTCS(M177, 203, 236)を得た。 50

プライマー-III 5' A A G C G T G T T G A C G A A A C C T T C
 C T A C C A 3' (SEQ ID NO. 5)
 プライマー-IV 5' A T T C A G A T A G C G G G T A C T A A T
 A A T G G A 3' (SEQ ID NO. 6)
 プライマー-V 5' G T T G T A A C C T C C G G C A T C G C G
 T T G C T G 3' (SEQ ID NO. 7)

プライマー-IIIは、天然のT C Sの177位のL y sをコードするコドンが、G l uをコードするコドンに置き換わるという特徴がある。コドンの縮重により、アンダーラインをしたコドンは、G l uをコードする他のコドン、すなわちG A Gで置き換えることもできる。

10

プライマー-IVは、天然T C Sの203位のS e rをコードするコドンをG l yをコードするコドンに置き換えるようにデザインされている。コドンの縮重により、アンダーラインを引いたコドンはG l yをコードする他のコドン、例えばG G A、G G C、G G Gに置き換えることができる。

プライマー-Vは、天然T C Sの236位のA s nをコードするコドンをG l yをコードするコドンに置き換えるようにデザインされている。コドンを縮重により、アンダーラインを引いたコドンはG l yをコードする他のコドン、例えばG G A、G G G、G G Tに置き換えることができる。

【0096】

実施例7

20

T C Sの発現：

下記の標準手順によって、塩化カルシウムで処理したコンピテントE. coli BL2 1 (DE3, pLysS)を、実施例1で得たT C S遺伝子を含有するプラスミドpET-2d-T C Sで形質転換した。要約すると、1-100ngのpET-2d-T C Sを、100u1のコンピテント細胞と静かに混合した。30ないし60分氷の上で保持した後、混合物に42で90秒熱ショックを与え、次いで氷に戻した。5分後、混合物に0.5mlのLB培地を加え、次いで37で1時間通気下で培養した。培養した混合物の10分の1を0.1mlのLB培地で希釈し、アンピシリンおよびクロラムフェニコールを含有するBプレートに広げた。これらのプレートを37で終夜培養し、個々のコロニーを均一の大きさ、形で採取した。形質転換体を、アンピシリンおよびクロラムフェニコールを含有するLB培地で37で終夜培養し、次いで更に大きなスケールで、アンピシリンおよびクロラムフェニコールを含有するM9ZB培地中、同温度で、細胞濃度がA₅₇₀ = 0.8になるまで培養した。次いで、IPTGを最終濃度が0.5mMになるまで加え、細胞を更に3時間培養した。次に、細胞を集め、超音波で溶菌した。溶解液を遠心分離し上澄液をCMセファデックスまたはCMセファロースのカラムにかけた。カラムを0.1mMのフェニルメタンスルフォニルフロライド(PMSF)を含有する50mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)で、A280が基底値になるまで洗浄した後、洗浄緩衝液に0.1-0.4M食塩を加えた溶液を用いる線型濃度勾配法で溶出した。最も高いピーク中の物質がリコンビナントT C Sを示した。リコンビナントT C Sのアミノ酸配列は図1中の1位にM e tが付加した1から247のアミノ酸残基で示される。

30

【0097】

実施例8

40

M T C S (M177)の発現：

実施例2で得られたM T C S (M177)をコードするDNAを含有するプラスミドpET-2d-M T C S (M177)をE. coli BL21 (DE3, pLysS)の形質転換に用いた。実施例7に記載された手順に従って、遺伝子の形質転換、発現およびタンパク質を精製を行い、M T C S (M177)を得た。M T C S (M177)のアミノ酸配列は、177位のL y sがG l uに置き換わった以外は実施例7のリコンビナントT C Sと同一である。

【0098】

50

実施例 9

M T C S (M 2 0 3) の発現 :

実施例 3 で得られた M T C S (M 2 0 3) をコードする DNA を含有する プラスミド p E T - 2 d - M T C S (M 2 0 3) を E . c o l i B L 2 1 (D E 3 , p l y s S) の形質転換に用いた。実施例 7 に記載された手順に従って、遺伝子の形質転換、発現およびタンパク質を精製を行い、M T C S (M 2 0 3) を得た。M T C S (M 2 0 3) のアミノ酸配列は、2 0 3 位の S e r が G l y に置き換わった以外は実施例 7 のリコンビナント T C S と同一である。

【 0 0 9 9 】

実施例 10

10

M T C S (M 2 3 6) の発現 :

実施例 4 で得られた M T C S (M 2 3 6) をコードする DNA を含有する プラスミド p E T - 2 d - M T C S (M 2 3 6) を E . c o l i B L 2 1 (D E 3 , p l y s S) の形質転換に用いた。実施例 7 に記載された手順に従って、遺伝子の形質転換、発現およびタンパク質を精製を行い、M T C S (M 2 3 6) を得た。M T C S (M 2 3 6) のアミノ酸配列は、2 6 3 位の A s n が G l y に置き換わった以外は実施例 7 のリコンビナント T C S と同一である。

【 0 1 0 0 】

実施例 11

20

M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) の発現 :

実施例 5 で得られた M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) をコードする DNA を含有する プラスミド p E T - 2 d - M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) を E . c o l i B L 2 1 (D E 3 , p l y s S) の形質転換に用いた。実施例 7 に記載された手順に従って、遺伝子の形質転換、発現およびタンパク質を精製を行い、M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) を得た。M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) のアミノ酸配列は、1 7 7 位の L y s が G l u に、2 0 3 位の S e r が G l y に置き換わった以外は実施例 7 のリコンビナント T C S と同一である。

【 0 1 0 1 】

実施例 12

M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) の発現 :

30

実施例 6 で得られた M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) をコードする DNA を含有する プラスミド p E T - 2 d - M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) を E . c o l i B L 2 1 (D E 3 , p l y s S) の形質転換に用いた。実施例 7 に記載された手順に従って、遺伝子の形質転換、発現およびタンパク質を精製を行い、M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) を得た。M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) のアミノ酸配列は、1 7 7 位の L y s が G l u に、2 0 3 位の S e r が G l y に、2 3 6 位の A s n が G l y に置き換わった以外は実施例 7 のリコンビナント T C S と同一である。

【 0 1 0 2 】

実施例 13

M T C S (M 1 7 7) の生物活性および免疫反応性の試験 :

40

R I P 活性は P e l h e m & J a c k s o n の記載によって決定した (H . K . B . P e l h e m a n d R . J . J a c k s o n , Eur . J . B i o c h e m . 6 7 : 2 4 7 - 2 5 6 . 1 9 7 6) 。ウサギ網状赤血球の溶解物はプロメガ (P r o m e g a) から入手した。[³ H] - ロイシンはニューウェイ イングランド ヌクレア (N e w E n g l a n d N u c l e a r) から入手した。人工流産活性試験は本発明者らの研究室の標準手順に従って、妊娠 11 日の I C R マウスを用いて行われた (N i e H L , e t a l . , P o s i t i o n 1 2 0 - 1 2 3 , a P o t e n t i a l A c t i v e S i t e o f T r i c h o s a n t h i n , L i f e S c i e n c e s , 6 2 (6) : 4 9 1 - 5 0 0 , 1 9 9 8) 。動物は、M T C S (M 1 7 7) の 7 5 n m o l / K g を背部に注射で投与した 4 8 時間後に屠殺し、解剖した。総数および死亡した胎児数 (吸着胚を含む) を記録し、胎児死亡比を計算した。

50

【0103】

in vitro 免疫反応性は競合ELISA法で測定した。IgG抗体および抗IgEモノクローナル抗体は本願発明者らの研究室で作成、精製した(He XH, et al., Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 26: 657-662, 1994)。抗体はイムノアフィニティークロマトグラフィーで精製した。本実施例に記載された全ての試験で天然TCSを陽性コントロールとして用いた。結果を表7に掲載する。

【0104】

【表7】

MTCS (M177) の生物活性および免疫反応性の試験

10

製品	変更アミノ酸の位置	RIP活性(%)	人工流産活性(%)	<i>in vitro</i> IgGとの反応性	<i>in vitro</i> IgEとの反応性
天然のTCS	0	++*	++	++	++
MTCS (M177)	177	++	++	±	±

* 記号“+”、“-”の詳細については表4を参照。

実施例13~17についても同じ。

【0105】

実施例14

20

MTCS (M203) の生物活性および免疫反応性の試験:

実施例13に記載されたのと同じ方法を、MTCS (M203) のRIP活性、人工流産活性および*in vitro* 免疫反応性を決定するために用いた。本試験の全てで、天然TCSを陽性コントロールとして用いた。結果を8に掲載する。

【0106】

【表8】

MTCS (M203) の生物活性および免疫反応性の試験

30

製品	変更アミノ酸の位置	RIP活性(%)	人工流産活性(%)	<i>in vitro</i> IgGとの反応性	<i>in vitro</i> IgEとの反応性
天然のTCS	0	++	++	++	++
MTCS (M203)	203	++	++	±	±

【0107】

実施例15

MTCS (M236) の生物活性および免疫反応性の試験:

実施例13に記載されたのと同じ方法を、MTCS (M236) のRIP活性、人工流産活性および*in vitro* 免疫反応性を決定するために用いた。本試験の全てで、天然TCSを陽性コントロールとして用いた。結果を9に掲載する。

【0108】

【表9】

MTCS (M236) の生物活性および免疫反応性の試験

40

製品	変更アミノ酸の位置	RIP活性(%)	人工流産活性(%)	<i>in vitro</i> IgGとの反応性	<i>in vitro</i> IgEとの反応性
天然のTCS	0	++	++	++	++
MTCS (M236)	236	++	++	+	+

【0109】

実施例16

50

M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) の生物活性および免疫反応性の試験 :

実施例 13 に記載されたのと同じ方法を、M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) の R I P 活性、人工流産活性および *in vitro* 免疫反応性を決定するために用いた。本試験の全てで、天然 T C S を陽性コントロールとして用いた。結果を 10 に掲載する。

【 0 1 1 0 】

【表 10】

M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) の生物活性および免疫反応性の試験

製品	改変アミノ酸の位置	RIP活性(%)	人工流産活性(%)	<i>in vitro</i> IgGとの反応性	<i>in vitro</i> IgEとの反応性
天然のTCS	0	++	++	++	++
M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3)	177, 203	++	++	- ^(a)	- ^(a)

10

【 0 1 1 1 】

実施例 17

M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) の生物活性および免疫反応性の試験 :

実施例 13 に記載されたのと同じ方法を、M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) の R I P 活性、人工流産活性および *in vitro* 免疫反応性を決定するために用いた。本試験の全てで、天然 T C S を陽性コントロールとして用いた。結果を 11 に掲載する。

20

【 0 1 1 2 】

M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) の生物活性および免疫反応性の試験

【表 11】

M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) の生物活性および免疫反応性の試験

製品	改変アミノ酸の位置	RIP活性(%)	人工流産活性(%)	<i>in vitro</i> IgGとの反応性	<i>in vitro</i> IgEとの反応性
天然のTCS	0	++	++	++	++
M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6)	177, 203, 236	++	++	- ^(b)	- ^(b)

30

【 0 1 1 3 】

実施例 18

M T C S (M 1 7 7) の K 5 6 2 細胞に対する毒性 :

M T C S (M 1 7 7) のヒト慢性骨髄性白血病 K 5 6 2 細胞およびヒト正常リンパ球に対する毒性を、MTT (3 - (4 , 5 - ジメチル - チアゾール - 2 - イル) - 2 , 5 - ジフェニル テトラゾリウム ブロマイド) 細胞毒性試験を行うことにより試験した。10 %牛胎児血清を添加した R P M I 1 6 4 0 培地の中で成育中の約 2 0 0 , 0 0 0 個の各タイプの細胞を、それぞれ培養プレートのウェルに 3 7 、 5 % C O ₂ で接種し、M T C S (M 1 7 7) と培養した。M T C S (M 1 7 7) の濃度は、それぞれ 1 、 5 、 1 0 、 2 0 、 5 0 および 1 0 0 u g / m l である。試験は、4 8 時間後に 2 5 u l の M T T (シグマ社製、5 m g / m l) を各ウェルに添加して終結させ、さらに 2 時間培養し、最後にライジング緩衝液を各ウェルに添加し、細胞を溶解した。3 7 で終夜培養した後、プレートを分光学的に、5 7 0 n m で測定した。M T C S (M 1 7 7) の K 5 6 2 細胞に対する L C ₅₀ は、3 0 u g / m l より少ないと算出された。ヒト正常リンパ球は、M T C S (M 1 7 7) の濃度が 1 0 0 0 u g / m l のように高いときでも L C ₅₀ 値を得られなかつたので、M T C S (M 1 7 7) に対して感受性がなかった。

40

【 0 1 1 4 】

実施例 19

50

M T C S (M 2 0 3) の K 5 6 2 細胞に対する毒性 :

実施例 18 に記載されたのと同じ方法を、M T C S (M 2 0 3) のヒト慢性骨髄性白血病 K 5 6 2 細胞およびヒト正常リンパ球に対する毒性を測定するために用いた。M T C S (M 2 0 3) の K 5 6 2 細胞に対する L C ₅₀ は 3 0 u g / m l より少ないと算出された。ヒト正常リンパ球は、M T C S (M 2 0 3) の濃度が 1 0 0 0 u g / m l のように高いときでも I C ₅₀ 値を得られなかったので、M T C S (M 2 0 3) に対して感受性がなかった。

【 0 1 1 5 】

実 施 例 2 0

M T C S (M 2 3 6) の K 5 6 2 細胞に対する毒性 :

10

実施例 18 に記載されたのと同じ方法を、M T C S (M 2 3 6) のヒト慢性骨髄性白血病 K 5 6 2 細胞およびヒト正常リンパ球に対する毒性を測定するために用いた。M T C S (M 2 0 3) の K 5 6 2 細胞に対する L C ₅₀ は 3 0 u g / m l より少ないと算出された。ヒト正常リンパ球は、M T C S (M 2 3 6) の濃度が 1 0 0 0 u g / m l のように高いときでも I C ₅₀ 値を得られなかったので、M T C S (M 2 3 6) に対して感受性がなかった。

【 0 1 1 6 】

実 施 例 2 1

M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) の K 5 6 2 細胞に対する毒性 :

20

実施例 18 に記載されたのと同じ方法を、M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) のヒト慢性骨髄性白血病 K 5 6 2 細胞およびヒト正常リンパ球に対する毒性を測定するために用いた。M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) の K 5 6 2 細胞に対する L C ₅₀ は 3 0 u g / m l より少ないと算出された。ヒト正常リンパ球は、M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) の濃度が 1 0 0 0 u g / m l のように高いときでも I C ₅₀ 値を得られなかったので、M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3) に対して感受性がなかった。

【 0 1 1 7 】

実 施 例 2 2

M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) の K 5 6 2 細胞に対する毒性 :

実施例 18 に記載されたのと同じ方法を、M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) のヒト慢性骨髄性白血病 K 5 6 2 細胞およびヒト正常リンパ球に対する毒性を測定するために用いた。M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) の K 5 6 2 細胞に対する L C ₅₀ は 3 0 u g / m l より少ないと算出された。ヒト正常リンパ球は、M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) の濃度が 1 0 0 0 u g / m l のように高いときでも I C ₅₀ 値を得られなかったので、M T C S (M 1 7 7 , 2 0 3 , 2 3 6) に対して感受性がなかった。

30

【 0 1 1 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 BEIJING STM BIOTECH LTD.

KE, YI-BAO

NIE, HUI-LING

〈120〉 Mutant Trichosanthin

〈130〉 US0158

10

〈150〉 CN 00119553.0

〈151〉 2000-08-02

〈150〉 CN 01103102.6

〈151〉 2001-01-18

〈160〉 7

〈170〉 PatentIn version 3.1

20

〈210〉 1

〈211〉 289

〈212〉 PRT

〈213〉 Trichosanthes Kirilowii M.

〈400〉 1

Met Ile Arg Phe Leu Val Leu Ser Leu Leu Ile Leu Thr Leu Phe Leu
1 5 10 15

Thr Thr Pro Ala Val Glu Gly Asp Val Ser Phe Arg Leu Ser Gly Ala
20 25 30

Thr Ser Ser Ser Tyr Gly Val Phe Ile Ser Asn Leu Arg Lys Ala Leu
35 40 45

10
Pro Asn Glu Arg Lys Leu Tyr Asp Ile Pro Leu Leu Arg Ser Ser Leu
50 55 60

Pro Gly Ser Gln Arg Tyr Ala Leu Ile His Leu Thr Asn Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Glu Thr Ile Ser Val Ala Ile Asp Val Thr Asn Val Tyr Ile Met Gly
85 90 95

20
Tyr Arg Ala Gly Asp Thr Ser Tyr Phe Phe Asn Glu Ala Ser Ala Thr
100 105 110

Glu Ala Ala Lys Tyr Val Phe Lys Asp Ala Met Arg Lys Val Thr Leu
115 120 125

Pro Tyr Ser Gly Asn Tyr Glu Arg Leu Gln Thr Ala Ala Gly Lys Ile

130 135 140

Arg Glu Asn Ile Pro Leu Gly Leu Pro Ala Leu Asp Ser Ala Ile Thr

145 150 155 160

Thr Leu Phe Tyr Tyr Asn Ala Asn Ser Ala Ala Ser Ala Leu Met Val

165 170 175

10

Leu Ile Gln Ser Thr Ser Glu Ala Ala Arg Tyr Lys Phe Ile Glu Gln

180 185 190

Gln Ile Gly Lys Arg Val Asp Lys Thr Phe Leu Pro Ser Leu Ala Ile

195 200 205

20

Ile Ser Leu Glu Asn Ser Trp Ser Ala Leu Ser Lys Gln Ile Gln Ile

210 215 220

Ala Ser Thr Asn Asn Gly Gln Phe Glu Ser Pro Val Val Leu Ile Asn

225 230 235 240

Ala Gln Asn Gln Arg Val Thr Ile Thr Asn Val Asp Ala Gly Val Val
245 250 255

Thr Ser Asn Ile Ala Leu Leu Leu Asn Arg Asn Asn Met Ala Ala Met
260 265 270

Asp Asp Asp Val Pro Met Thr Gln Ser Phe Gly Cys Gly Ser Tyr Ala
275 280 285

10

Leu

⟨210⟩ 2

⟨211⟩ 870

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ *Trichosanthes Kirilowii* M.

20

⟨400⟩ 2

atgatcagat tcttagacct ctcttgcta atttcaccc tcttcttaac aactccgtct 60

gtggagggcg atgttagctt ccgtttatca ggtgcaacaa gcagttccctt tggagtttc 120

atttcaaatac tgagaaaaagc tcttccaaat gaaaggaaac tgtacgataat ccctctgtta 180

cgttccagtc ttccagggttc tcaacgctac gcattgatcc atctcacaaa ttacgcccgt 240

gaaaccattt cagtgccat agacgtaacg aacgtctata ttatggata tcgcgtggc	300
gatacatctt atttttcaa cgaggcttct gcaacagaag ctgcaaata tgtattcaa	360
gacgctatgc gaaaagttac gcttccatat tctggcaatt acgaaaggct tcaaactgct	420
gcaggcaaaa taagggaaaa tattccgcctt ggactccctg ctttggacag tgccattacc	480
actttgtttt actacaacgc caattctgct gcgtcggcac ttattgtact cattcagtcg	540
acgtctgagg ctgcgaggta taaatttatt gagcaacaaa ttggaaagcg ttttgacaaa	600
accttcciac caagtttagc aattataagt ttggaaaata gttggctcgc tctctccaag	660
caaattcaga tagcgagta ctaataatgga cagttgaaa gtcctgttgt gcttataat	720
gctcaaaacc aacgagtcac gataaccaat gtttatgcgtg gagttgtaac ctccaacatc	780
gcgttgcgtgc tgaatagaaa caatatggca gccatggatg acgtatgtcc tatgacacag	840
agctttggat ttggaaagttt tgcattttat	870

〈210〉 3

〈211〉 21

〈212〉 DNA

〈213〉 artificial sequence

〈220〉

〈223〉 **primer**

〈400〉 3

gtgcaggcca tggatgttag g

21

〈210〉 4

〈211〉 30

〈212〉 DNA

〈213〉 **artificial sequence**

10

〈220〉

〈223〉 **primer**

〈400〉 4

aacaatatgg cataggatcc catggatgac

30

〈210〉 5

〈211〉 27

〈212〉 DNA

〈213〉 **artificial sequence**

20

〈220〉

〈223〉 **primer**

〈400〉 5

aagcgtgttg acgaaacctt cctacca

27

〈210〉 6
〈211〉 27
〈212〉 DNA
〈213〉 artificial sequence

〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 6
attcagatag cgggtactaa taatgga

10

27

〈210〉 7
〈211〉 27
〈212〉 DNA
〈213〉 artificial sequence

〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 7
gttgtaacct ccggcatcgc gttgctg

20

27

【図面の簡単な説明】

【図1】 天然TCSのアミノ酸配列（配列表中の配列番号1）およびこれをコードする塩基配列（配列表中の配列番号2）を示す。第1から247位の部分は成熟天然TCSのアミノ酸配列を示す。

【図1】

ATG ATC AGA
Met Ile Arg

TTC TTA GAC CTC TCT TTG CTA ATT CTC ACC CTC TTC CTA ACA ACT CCT GCT GTG GAG GGC 1
Phe Leu Val Leu Ser Leu Ile Leu Thr Leu Phe Leu Thr Thr Pro Ala Val Glu Gly

GAT GTT AGC TTC CGT TIA TCA GGT GCA ACA AGC AGT TCC TAT GGA GTT TTC ATT TCA ATT Asp Val Ser Phe Arg Leu Ser Gly Ala Thr Ser Ser Ser Tyr Gly Val Phe Ile Ser Asn 10 20
I
CTG AGA AAA GCT CTT CCA ATT GAA AGG AAA CTG TAC GAT ATC CCT CTG TTA CGT TCC AGT Leu Arg Lys Ala Leu Pro Asn Glu Arg Lys Leu Tyr Asp Ile Pro Leu Leu Arg Ser Ser 30 40
CTT CCA GGT TCT CAA CGC TAC GCA TGG ATC CAT CTC ACA ATT TAC GCC GAT GAA ACC ATT Leu Pro Gly Ser Glu Arg Tyr Ala Leu Ile His Leu Thr Asn Tyr Ala Asp Glu Thr Ile 50 60
TCA GTG GCC ATA GAC GIA AGC AAC GTC TAT ATT GGA TAT CGC GCT GGC GAT ACA TCC Ser Val Ala Ile Asp Val Thr Asn Val Tyr Ile Met Gly Tyr Arg Ala Gly Asp Thr Ser 70 80
TAT TTT TTC AAC GAG GCT TCT GCA ACA GGT GCA AAA ATT GIA TTC AAA GAC GCT ATG Tyr Phe Phe Asn Glu Ala Ser Ala Thr Glu Ala Ala Lys Tyr Val Phe Lys Asp Ala Met 90 100
CGA AAA GTT AGC CTT CCA ATT TCT GGC ATT AAC TAC GAA AGG CTT CAA ACT GCT GCA GGC AAA Arg Lys Val Thr Leu Pro Tyr Ser Gly Asn Tyr Glu Arg Leu Glu Thr Ala Ala Gly Lys 110 120
ATA AGG GAA ATT ATT CGG CTT GGA CCT CCT GCT TTG GAC AGT GGC ATT ACC ACT TTG ATT Ile Arg Glu Asn Ile Pro Leu Glu Leu Pro Ala Leu Asp Ser Ala Ile Thr Leu Phe 130 140
TAC TAC AAC GCC ATT CCT GCT GCG TCG GCA ATT ATT GTA CTC ATT CAG TCG AGC TCT GAG Tyr Tyr Asn Ala Asn Ser Ala Ala Ser Ala Leu Met Val Leu Ile Glu Ser Thr Ser Glu 150 160
GCT GCG AGG ATT AAA ATT ATT GAG CAA CAA ATT GGG AAG CGT GTT GAC AAA ACC TTC CTA Ala Ala Arg Tyr Lys Phe Ile Glu Glu Ile Glu Lys Arg Val Asp Lys Thr Phe Leu 170 180
CCA AGT TTA GCA ATT ATA AGT TTG GAA ATT AGT TGG TCT GCT CTC TCC AAG CAA ATT CAG Pro Ser Leu Ala Ile Ser Leu Glu Asn Ser Thr Ser Ala Leu Ser Lys Glu Ile Glu 190 200
ATA GCG AGT ACT ATT AAT GGA CAG TTT GAA AGT CCT CCT GTG GTT ATA ATT GCT CAA AAC Ile Ala Ser Thr Asn Asn Gly Glu Ser Pro Val Val Leu Ile Asn Ala Glu Asn 210 220
GAA ATT ATA AGT GCT ATT TAG 240
GCA CGA GTC ACG ATA ACC AAT ATT GAT GCT GGA GTT GTC ACC TCC AAC ATC GCG TTG CTG Gln Arg Val Thr Ile Thr Asn Val Asp Ala Gly Val Val Thr Ser Asn Ile Ala Leu Leu 230 240
CTG ATT AGA AAC AAT ATT GCA I GCC ATG GAT GAC GAT GTT CCT ATG ACA CAG AGC TTT Leu Asn Arg Asn Asn Met Ala Ala Met Asp Asp Asp Val Pro Met Thr Glu Ser Phe 247
GGA TGT GGA AGT TAT GCT ATT TAG
Gly Cys Gly Ser Tyr Ala Leu End

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	A
A 6 1 P	15/04	(2006.01)	A 6 1 P	15/04	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	

(72)発明者 ニエ , フイリン

中華人民共和国 , シャンハイ 200336 , ホンクイアオ ロード , チェンクイアオエラカン
, 85番 , ルーム 603

審査官 滝口 尚良

(56)参考文献 特表平04-504208 (JP, A)

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 270(1), p.279-285
Life Science, 1997, 60(7), p.465-472
Life Science, 1999, 64(14), p.1163-1175
Life Science, 1999, 65(4), p.355-368
Life Science, 1997, 61(23), p.2291-2303

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C07K 14/00-14/825
C12N 15/00-15/90
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
UniProt/GeneSeq