

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3612020号
(P3612020)

(45) 発行日 平成17年1月19日(2005. 1. 19)

(24) 登録日 平成16年10月29日(2004. 10. 29)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

A 6 1 K 38/46

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00

1 1 1

A 6 1 P 43/00

C 1 2 N 9/22

C 1 2 N 9/22

A 6 1 K 37/54

請求項の数 10 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2000-516046 (P2000-516046)
 (86) (22) 出願日 平成10年10月13日 (1998. 10. 13)
 (65) 公表番号 特表2001-520016 (P2001-520016A)
 (43) 公表日 平成13年10月30日 (2001. 10. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/021545
 (87) 国際公開番号 WO1999/019494
 (87) 国際公開日 平成11年4月22日 (1999. 4. 22)
 審査請求日 平成12年7月19日 (2000. 7. 19)
 (31) 優先権主張番号 08/950, 866
 (32) 優先日 平成9年10月15日 (1997. 10. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 500056873
 ウィスコンシン アラムニ リサーチ フ
 ァンデーション
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53
 705 マディソン ウォルナット スト
 リート 614
 (74) 代理人 100059959
 弁理士 中村 稔
 (74) 代理人 100067013
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100065189
 弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低減されたリボヌクレアーゼインヒビターアフィニティーを有するヒトリボヌクレアーゼA

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ウシ腩臓RNase Aのアミノ酸残基85番～94番に対応するループ領域に少なくとも1個のアミノ酸置換を有する改変されたリボヌクレアーゼであって、リボヌクレアーゼインヒビターに対して結合アフィニティーが低下しており、リボ核酸分解活性を保持している前記改変リボヌクレアーゼ。

【請求項2】

改変リボヌクレアーゼがウシ腩臓リボヌクレアーゼAに由来する、請求項1に記載のリボヌクレアーゼ。

【請求項3】

ウシ腩臓リボヌクレアーゼAのアミノ酸の88番位置のグリシン残基が正電荷を有するアミノ酸残基に置換された、請求項2に記載のリボヌクレアーゼ。

【請求項4】

正電荷を有するアミノ酸残基がアルギニンである、請求項3に記載のリボヌクレアーゼ。

【請求項5】

ウシ腩臓リボヌクレアーゼAのアミノ酸の88番位置のグリシン残基が負電荷を有するアミノ酸残基に置換された、請求項2に記載のリボヌクレアーゼ。

【請求項6】

負電荷を有するアミノ酸残基がアスパラギン酸である、請求項5に記載のリボヌクレアーゼ。

10

20

【請求項 7】

人為的改変によって操作された、対応する野生型リボヌクレアーゼAに比べてその構造が変化した改変リボヌクレアーゼAであって、その変化が(i)ウシ膵臓RNase Aのアミノ酸残基番号85～94に対応する領域に始まり、(ii)リボヌクレアーゼインヒビターの結合に対して立体障害または静電的障害を与えるものである、前記リボヌクレアーゼA。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の改変リボヌクレアーゼを含む医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の改変リボヌクレアーゼを含む、腫瘍細胞の増殖抑制用医薬組成物。

【請求項 10】

リボヌクレアーゼAをコードする改変遺伝子であって、ウシ膵臓リボヌクレアーゼAのアミノ酸85番～94番に対応するコード領域に変異を有する改変遺伝子を作製すること、前記改変遺伝子を適切な宿主内で発現させること、発現されたリボヌクレアーゼAのリボヌクレアーゼインヒビターに対するアフィニティーを試験すること、を含む、細胞障害特性を有する新規な改変リボヌクレアーゼAを作製する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

新薬の開発は近年の種々のタイプの癌の治療における進歩に貢献してきた。しかしながら、ある種の癌は現在使用されている化学療法剤に抵抗性である。これらの悪性度は特に高い傾向があり、高い死亡率と関連している。既存の大部分の化学療法剤は望ましくない副作用も有している。従って、医学会および一般大衆の間の両方において悪性腫瘍および他のタイプの癌の治療のための新規化学療法剤の開発に関心がもたれ続けている。

ヒョウガエル (*Rana pipiens*) から単離された天然に存在するリボヌクレアーゼの一つは進行した手術不可能な膵臓癌患者およびフェーズ I / II 試験における悪性の中皮腫において抗腫瘍活性を示している (Delmonte, *Oncology Times Vol. 18, No. 8, August 1996*)。このリボヌクレアーゼ (オンコナーゼ (Onconase) と称する) の抗腫瘍活性は種々の固形癌を有する 350 人以上の患者において調べられ、転移性膵臓癌、進行した転移性乳癌、および悪性中皮腫に対して抗腫瘍活性を示している。オンコナーゼは現在フェーズ III のヒト臨床試験において膵臓癌および肝臓癌に対して使用されている。

【0002】

一般に、オンコナーゼはヒトにおいて化学療法剤として使用するのに比較的安全に見える。オンコナーゼは例えば骨髄抑制、消化管毒性または粘膜炎のような従来の細胞障害性薬剤に伴う主要な毒性を全く生じさせない。オンコナーゼ治療された患者のおよそ 1 / 3 はインフルエンザ様 (flu-like) 症状および末梢性浮腫を伴うまたは伴わない第 3 級関節痛を起こした。オンコナーゼの投与に伴う最も重大な合併症は腎機能の低下であり、フェーズ I 用量試験において見られた。腎機能の低下は用量低減に伴って可逆的であった。

【0003】

種々のタイプの癌の治療に加えて、リボヌクレアーゼは HIV に感染したヒトの治療にも有用なことがある。非細胞障害的濃度のオンコナーゼはいくつかの持続的に HIV 感染したヒト細胞株において HIV 産生を顕著に阻害することが報告されている。

リボヌクレアーゼの細胞障害性はウシ膵臓リボヌクレアーゼ A (RNase A; EC 3.1.27.5) のミリグラム量を注射された固形腫瘍で最初に証明された (Ledoux, L. *Nature* 176: 36-37, 1995; Ledoux, L. *Nature* 175: 258-259)。より少ない量は腫瘍に対して効果がないことが見出されていた (de Lamirande, *Nature* 192: 52-54, 1961)。低濃度で細胞障害性であるリボヌクレアーゼが雄ウシ精漿中に発見された (Floridiら, *Ital. Biol. Sper.* 43: 32-36, 1967; Do

10

20

30

40

50

stalら、J. Reprod. Fertil. 33:263-274, 1973)。さらに強い細胞障害性を有するリボヌクレアーゼがカエル卵から単離され(Ardeltら、J. Biol. Chem. 266:245-251, 1991)、このリボヌクレアーゼがオンコナーゼの名で臨床試験においてテストされているものである。

【0004】

リボヌクレアーゼはRNAの分解を触媒する。細胞障害性のためには細胞障害性リボヌクレアーゼのリボ核酸分解活性(ribonucleolytic activity)が必要であることが証明されている(Kimら、J. Biol. Chem. 270:10525-10530, 1995; Ardeltra、J. Biol. Chem. 266:245-251, 1991)。リボヌクレアーゼの細胞障害性にはリボ核酸分解活性を必要とするが、リボ核酸分解活性単独ではリボヌクレアーゼ間に観察される細胞障害性の差異を説明するのに十分ではない。例えば、RNase Aのリボ核酸分解活性はオンコナーゼよりもおよそ1000倍高いが、オンコナーゼはRNase Aよりもずっと強い細胞障害性を有している。従って、酵素の他の性質がこの違いを説明するに違いない。脊椎動物細胞はリボヌクレアーゼの潜在的致死性効果から細胞を保護するリボヌクレアーゼインヒビター(RI)を含んでいる。RIは種々のアフィニティーでリボヌクレアーゼと結合する50kDaの細胞質タンパク質である。例えば、RIはウシ臍臓リボヌクレアーゼA(RNase A)スーパーファミリーのメンバーと 10^{-6} から 10^{-16} Mの範囲の K_i sで、10桁のオーダーにわたる阻害定数をもって結合する。

リボヌクレアーゼの細胞障害性はRIとリボヌクレアーゼとの間の相互作用の強さに逆相関するようにみえる。例えば、RNase AはRIと高いアフィニティーで($K_i = 10^{-14}$ M)結合するが細胞障害性でない。反対に、オンコナーゼはRIと比較的低アフィニティー($K_i > 10^{-6}$ M)で結合する。

【0005】

いくつかの天然のリボヌクレアーゼはRIに結合しない。ウシ精液リボヌクレアーゼ(BS-RNase)はアミノ酸配列においてRNase Aと80%同一であるが、RNase Aと異なり、BS-RNaseは2量体の形で存在する。BS-RNaseの4次構造はRIの結合を妨げ、それによってRI存在下でもそのリボ核酸分解活性を維持することができることが示されている(Kimら、Biochem. J. 308:547-550, 1995; Kimら、J. Biol. Chem. 270:10525-10530, 1995; Kimら、J. Biol. Chem. 270:31097-31102, 1995)。オンコナーゼは104アミノ酸残基のタンパク質であり、RNase Aと高いホモロジーがあるが、それにもかかわらずRIによる結合に抵抗性である。RI-オンコナーゼ複合体は 10^{-6} M以上の K_d を有し(Boixら、J. Mol. Biol. 257:992-1007, 1996)、これはRI-RNase A複合体の K_d よりも少なくとも 10^8 倍低い。

【0006】

従って、オンコナーゼとRNase Aとに見られる異なる細胞障害性を説明する両者のキーとなる違いはオンコナーがRIによる阻害に耐性であるということである。正常な細胞は1:1の化学量論で非共有結合的にリボヌクレアーゼに結合するRIを産生し、リボヌクレアーゼ活性を阻害する。オンコナーゼがRIに対して結合アフィニティーが低いことはリボ核酸分解活性の効果的な阻害を妨げる。これがオンコナーゼが細胞障害性であるのに対してリボヌクレアーゼAがそうでないと観察されることの最もよい説明である。最近の研究において、マウスにおけるオンコナーゼおよびRNase Aの血漿消失率と組織分布が調べられ、オンコナーゼまたはRNase Aの注入の3時間後、オンコナーゼの57%が腎臓に見られたが、一方ヒト臍臓リボヌクレアーゼのわずか0.9%しか腎臓に見られなかった(Sungら、Cancer Res. 56:4180, 1996)。オンコナーゼを与えられた患者に見られる腎機能の低下は腎臓からオンコナーゼタンパク質を効果的に消失させられない結果かもしれない。

【0007】

10

20

30

40

50

好ましい治療用リボヌクレアーゼはオンコナーゼよりも速やかに腎臓から消失することのできる細胞障害性リボヌクレアーゼであろう。腎臓から速やかに消失する細胞障害性リボヌクレアーゼは腎臓障害をより起しにくいであろう。腎機能の低下はオンコナーゼにとって用量限定的であるために、腎機能に干渉しない細胞障害性リボヌクレアーゼは最適用量の決定においてより大きな自由度という利点を与え得るであろう。より毒性の低いリボヌクレアーゼは、例えば、特定のタイプの癌または特定の個人にたいして用量の増加がより効果的な治療を与えるであろう症例において、より高い用量で投与することができる。

【0008】

オンコナーゼの臨床試験の被験者によって経験される副作用は免疫反応に通常伴う症状である。ヒョウガエルよりもヒトにより近い種のリボヌクレアーゼは免疫反応をより起しにくいであろうと期待するのは合理的である。さらに免疫反応を起しにくいのはヒトリボヌクレアーゼであろう。免疫反応の強度はより多量の免疫原性タンパク質が投与されたときにより大きいであろう。従って、オンコナーゼよりもより高い比活性を有する細胞障害性リボヌクレアーゼはより効果的な化学療法剤である可能性がある。より少量のタンパク質の投与で効果的な細胞障害性を達成することが可能になるかもしれず、それによって免疫反応に伴う事象および症状の重篤性を低減するかもしれない。

抗腫瘍活性を有する新規な細胞障害性リボヌクレアーゼがヒトの癌の治療のために利用できる化学療法剤のスペクトルを増強するために必要とされている。

【0009】

(発明の概要)

本発明の目的は、ヒトの疾病の治療に有用であろう、新規な、細胞障害性のリボヌクレアーゼを提供することである。

本発明の目的は新規な細胞障害性リボヌクレアーゼを提供するために野生型リボヌクレアーゼのアミノ酸配列を改変する方法を提供することである。

本発明は改変されたアミノ酸配列を有するリボヌクレアーゼであって、その改変されたりリボヌクレアーゼがリボ核酸分解活性を維持し、かつ未改変リボヌクレアーゼよりもRIに対する結合アフィニティーが低く、野生型リボ核酸分解活性を維持しているリボヌクレアーゼである。

本発明はリボヌクレアーゼのアミノ酸配列を改変して改変リボヌクレアーゼを作製する方法であって、この改変リボヌクレアーゼはリボ核酸分解活性を保持し、かつRIに対して未改変リボヌクレアーゼよりも低い結合活性を有し、野生型リボ核酸分解活性を保持している。

本発明はまた、癌細胞に未改変リボヌクレアーゼよりもRIに対して低い結合活性を有し野生型リボ核酸分解活性を保持している改変リボヌクレアーゼの効果的量をデリバリーすることを含む、癌細胞の増殖を抑制する方法である。

本発明の他の目的、利点、および特徴は本明細書、図面および請求の範囲を検討すれば明らかになるであろう。

【0010】

(実施の形態)

本発明は、対応する野生型リボヌクレアーゼと少なくとも1個のアミノ酸残基が異なるアミノ酸配列を有する改変操作されたりリボヌクレアーゼであって、その野生型リボヌクレアーゼはRNase Aリボヌクレアーゼスーパーファミリーのメンバーのリボヌクレアーゼである。改変リボヌクレアーゼはリボ核酸分解活性を保持しており、未改変リボヌクレアーゼのリボヌクレアーゼインヒビターに対する結合活性に比べて改変リボヌクレアーゼのリボヌクレアーゼインヒビターに対する結合活性は低く、改変リボヌクレアーゼは増強した細胞障害性活性を示す。

以下の実施例には、低下したRI結合活性、野生型リボ核酸分解活性および増強された細胞障害活性を有するG88R RNase AおよびG88D RNase Aの二種の改変された膵臓リボヌクレアーゼA分子の設計、生産および特性解析が記載されている。本明細書の知見および方法論はRNase Aスーパーファミリーのどのリボヌクレアーゼに

10

20

30

40

50

も適用できるであろう。

【0011】

R I に対するリボヌクレアーゼの結合アフィニティーを低下させるがリボ核酸分解活性に干渉しないどんなアミノ酸置換も本発明の実施において利用することができる。R I とのアフィニティーを低下させるためにこの酵素の特定の部位を効果的に改変することができるが見出されている。G 8 8 R R N a s e A はアミノ酸残基 8 8 番のグリシン残基の代わりにアルギニン残基を有している。同様に、G 8 8 D のアミノ酸残基 8 8 番のグリシン残基はアスパラギン酸残基に置換されている。ウシ臍臓リボヌクレアーゼ A のアミノ酸残基 8 8 番に対応する位置の他のアミノ酸残基置換は、特にそのアミノ酸残基が電荷を持つ側鎖を有している場合は、R I に対する結合活性の変化を生じさせるであろう。このアミノ酸残基 8 8 番付近の、R I への結合に立体障害を生じさせる置換も効果的であろう。

10

【0012】

ウシ臍臓リボヌクレアーゼ A のアミノ酸配列に対して、アミノ酸残基 8 5 - 9 4 によって規定されるループ領域中に生じ、そのような立体障害を生じさせる他の改変は R I に対して結合アフィニティーが低下し、野生型リボ核酸分解活性を有し、増強された細胞障害活性を有する改変リボヌクレアーゼを生じさせるであろう。糖側鎖のような、この領域に結合して立体障害を与える他の共有結合部分 (m o i e t y) または側鎖もよく機能するであろう。

G 8 8 R R N a s e A および G 8 8 D R N a s e A を得るために使用したオリゴヌクレオチドはそれぞれ配列番号 1 および配列番号 2 に示した。遺伝コードの縮退を考慮すれば、G 8 8 R R N a s e A および G 8 8 D R N a s e A と同一の改変リボヌクレアーゼを得るために他のオリゴヌクレオチドを使用することができることはよく知られたことである。本発明は、改変リボヌクレアーゼを作製する手段に関わりなく、ウシ臍臓 R N a s e A の 8 8 番位置に対応するアミノ酸残基にアミノ酸置換を有する改変リボヌクレアーゼを包含することを意図している。ウシ臍臓 R N a s e A に加えて、R N a s e A スーパーファミリーの他のメンバーも本発明の実施に使用できることは当然に予想される。ウシ臍臓 R N a s e A のアミノ酸残基 8 5 - 9 4 に対応するループ領域に生じる、ウシ臍臓 R N a s e A 以外のリボヌクレアーゼの改変が、R I に対するアフィニティーが低下し、野生型リボ核酸分解活性を有し、増強された細胞障害性を有するリボヌクレアーゼを生じさせることが予測される。「ウシ臍臓 R N a s e A のアミノ酸残基 8 5 - 9 4 に対応するループ領域」とは、2 つのシステイン残基によって形成されるジスルフィド結合で定義される、約 1 0 - 1 2 アミノ酸残基を有するループを意味し、このループ領域はリボヌクレアーゼの N - 末端からおよそ 7 5 - 8 5 アミノ酸残基から始まり、「ベストフィット」によればそのアミノ酸配列はウシ R N a s e A の残基 8 5 番および 9 4 番に対応する。

20

30

【0013】

リボヌクレアーゼの R N a s e A スーパーファミリーは多くの哺乳動物、鳥類、は虫類、および両生類起源の相同 (即ち、進化的に関連した) タンパク質の群を構成する。これらのタンパク質はそのポリペプチド鎖の類似したフォールディングを有し、RNA の切断を触媒する。このスーパーファミリーの記載は B e i n t e m a らの R i b o n u c l e a s e s : S t r u c t u r e s a n d F u n c t i o n s 1 9 9 7, p p 2 4 5 - 2 6 9 に見ることができ、この記載は引用によって本明細書に含まれるものとする。ヒトの疾病の治療に使用する細胞障害性リボヌクレアーゼの開発に有用であると期待されるウシ臍臓リボヌクレアーゼ A のヒトホモログの例が 5 つある。これらの 5 つのホモログの各々には R N a s e A の 1 0 - アミノ酸残基ループ領域に類似のループ領域が保存されている (表 1)。

40

【0014】

【表 1】

表 1

50

酵素	配列アラインメント	配列番号
ウシ膵臓 リボヌクレアーゼ A	(C) R E T G S S K Y P N (C) 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95	3
ヒト膵臓 リボヌクレアーゼ	(C) R L T N G S R Y P N (C) 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95	4
ヒト アンジオテンシン	(C) K L H G G S P W P P (C) 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95	5
ヒト好酸球陽イオン性タンパク質	(C) D L I N P G A Q N I S N (C) 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96	6
ヒト好酸球由来 神経毒素	(C) N L T T P S P Q N I S N (C) 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96	7
ヒト リボヌクレアーゼ 4	(C) R D T G S S R A P N (C) 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92	8

10

20

【0015】

「増強された細胞障害性」とは改変リボヌクレアーゼが対応する未改変リボヌクレアーゼよりも強い細胞障害性を示すことを言う。以下の実施例では、細胞障害性はヒト赤白血病細胞株 K-562 を用いて評価した。本発明の改変リボヌクレアーゼは K-562 細胞に加えて他の腫瘍細胞に対して細胞障害性であることが予想される。

30

細胞増殖の阻害は改変または未改変リボヌクレアーゼで処理した K-562 細胞の生存率 % を計算することによって決定した。ここで、100% 生存率はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で処理した生細胞数と考えた。

好ましくは、改変リボヌクレアーゼは少なくとも細胞生存率を約 10% 低下させる。より好ましくは、改変リボヌクレアーゼは細胞生存率を少なくとも約 20% 低下させる。最も好ましいは、改変リボヌクレアーゼは約 50%、あるいは約 75% 程細胞生存率を低下させる。

【0016】

本発明はまた、改変された細胞障害性リボヌクレアーゼを提供し、そのリボヌクレアーゼの効果的量を腫瘍細胞にデリバリーすることを含む、腫瘍細胞の増殖を抑制する方法である。

40

「効果的量」とは、腫瘍細胞の増殖を有意に低減させるために必要とされるリボヌクレアーゼの量を意味する。

オリゴヌクレオチド媒介部位特異的変異導入を用いて、以下の実施例に記載したように幾つかの改変ウシ膵臓リボヌクレアーゼ A 種を設計し作製した。各改変リボヌクレアーゼは単一のアミノ酸残基が野生型ウシ膵臓リボヌクレアーゼ A と異なるアミノ酸配列を有している。複数の置換を有する改変リボヌクレアーゼも本発明の実施に有用であることは予測される。

RI は RNase A と 1:1 の化学量論で非共有結合的に結合する。RI と RNase A との複合体の 3 次元構造は 25 nm の解像度で決定されている (R-因子 19.4%)

50

(Kobeら、Nature 374:183-186, 1995)。この構造はRNase Aの124個のアミノ酸の24個がRIと接触していることを明らかにした。RNase AのRIと接触するいくつかの領域は触媒部位とは異なることが見出された。

【0017】

リボヌクレアーゼ細胞障害性におけるRIーリボヌクレアーゼ相互作用の役割を更に明らかにするために、以下の実施例に詳述したように部位特異的変異導入を使用した。簡単に言うと、リボヌクレアーゼをコードするDNA配列をこの配列の発現が特定のアミノ酸置換を含むリボヌクレアーゼを生じさせるように改変した。アルギニンまたはアスパラギン酸残基を指定するコドンで、RI残基と複数の接触を形成することが分かっている3個アミノ酸残基の一つをコードするコドンを置換した、種々の改変配列が開発された。Arg またはAsp残基の導入はRIとRNase Aとの間に立体的および電氣的反発の双方を生じさせることが予測される。このことはRNase A変異体のRIに対する結合アフィニティーの低下を生じさせると期待される。

【0018】

(材料と方法)

DNA変異導入

部位特異的変異導入によるRNase Aの改変は米国特許第5,389,537号に詳細に記載されており、この特許文献は本明細書に含まれるものとする。RNase AをコードするcDNAはpET22B(+)発現ベクター(Novagen社、Madison, WI)のMscIおよびSalI部位にライゲーションされた。このプラスミドはpBXRと命名され(del Cardayreら、Protein Engng 8:261-273, 1995)大腸菌内でRNase Aを発現させる。プラスミドpBXRのオリゴヌクレオチド媒介部位特異的変異導入(Kunkelら、1987)を使用して特定の位置において特定のアミノ酸置換を有する改変RNase A分子を作製した。88番残基にアルギニン置換を有する改変RNase AをG88R RNase Aと命名し、88番残基にアスパラギン酸置換を有する改変RNase AをG88D RNase Aと命名した。G88R RNase Aを得るために使用したオリゴヌクレオチドは配列番号1に、G88Dを得るために使用したオリゴヌクレオチドは配列番号2に示した。同様に、特に設計したオリゴヌクレオチドを用いて38番のアミノ酸残基であるアスパラギン酸残基をアルギニン残基に置換し(D38R RNase A)および、アミノ酸残基番号109のアラニン残基をアルギニン残基に置換した(A109R RNase A)。

【0019】

タンパク質変異体の精製

RNase A変異体は本質的に既に報告されたように(del Cardayreら、Protein Engng 8:261-273, 1995)精製した。オンコナーゼは北米産ヒョウガエルの卵から、Wuら(J. Biol. Chem. 268:10686-10693, 1993)に記載されているように精製した。あるいは、オンコナーゼは実質的にCoixら(J. Mol. Biol. 257:992-1007)に記載されたように大腸菌発現系から精製した。

リボ核酸分解活性

変異リボヌクレアーゼがポリマーRNAの切断を触媒する能力をUV分光法によって、既報のように(del CardayreとRaines, Biochemistry, 33:6031-6037, 1994; del CardayreとRaines, J. Mol. Biol. 252:328-336, 1995)測定した。

抗腫瘍活性アッセイ

リボヌクレアーゼ抗腫瘍活性は既報のように(Kimら、J. Biol. Chem. 270:10525-1-530, 1995)評価した。オンコナーゼを陽性対照として含め、未改変ウシ臍臓リボヌクレアーゼAを陰性対照として含めた。ヒト骨髓性白血病細胞株K-562(ATCC #CCL-243)の増殖に対する種々のリボヌクレアーゼの効果を以下のように評価した。細胞はATCCの推奨にしたがって抗生物質を添加し

10

20

30

40

50

て維持した。K-562細胞に対するリボヌクレアーゼ細胞障害性は新規合成されるDNAへの $[^3\text{H}]$ ーチミジン取込を測定することによって評価した。簡単にいうと、K-562細胞(0.5×10^4 /ウェル)を69穴マイクロタイタープレートに95 μl の体積で播いた。この細胞をリボヌクレアーゼの存在下で44時間培養し、続いて、 $[^3\text{H}]$ ーチミジン(7.4 kBq) (0.2 μCi)で4時間パルスした。

【0020】

PHDセルハーベスター (Cambridge Technology, Inc.; Cambridge, MA)を用いて細胞をグラスファイバーフィルター上に集め、フィルターに数mlの水を通すことによって溶解した。DNAおよび他の細胞性高分子はフィルターに保持され、ラベルを含む小分子はフィルターを素通りする。水でフィルターをよく洗浄した後、このフィルターをメタノールで乾燥させ液体シンチレーション計測器で計測した。

10

$[^3\text{H}]$ ーチミジンの取込は実際にはDNA合成を測定するものである。 $[^3\text{H}]$ ーチミジンの取込の減少は細胞死というよりも細胞の静止を反映するものである。しかしながら、他のアッセイにより、オンコナーゼは細胞死をもたらすことが示されている(Wuら、J. Biol. Chem. 268:10686-10695)。

RIに対する結合アフィニティー

種々のRNase A変異体の結合アフィニティーをゲルを基礎としたアッセイによって定性的(Wuら、J. Biol. Chem. 268:10686-10693)および定量的(Stone & Hofsteenge, Biochemistry 25:4622-4628)に評価した。

20

熱安定性の測定

変異リボヌクレアーゼの熱安定性を評価し、それらの変異体が比較的高温(37°C)に対する曝露に耐えるかどうかを測定した。融点が低くなった変異体は変性し活性を失うであろう。各変異体の熱安定性を紫外線または円偏光二色分光測定によって決定してT_mを評価した。T_mはタンパク質が半分フォールディングし、半分フォールディングしていない温度である。

結果

Asp38に対するアルギニン置換(D38R RNase A)およびAla109に対するアルギニン置換(A109R RNase A)はこれらの変異体のRIに対する結合アフィニティーに対してほとんどまたは全く影響を与えないことが分かった。これらの変異体のリボ核酸分解活性はRIの存在下で低下した。対照的に、Gly88をアルギニンまたはアスパラギン酸に置換した変異体RNase A(それぞれ、G88R RNase A、およびG88D RNase A)はRIに対する結合アフィニティーの低下を示し、これらの変異体はRI存在下でも触媒活性を維持していた(表2)。

30

【0021】

【表2】

表2

リボヌクレアーゼ	リボヌクレアーゼ分解	RI-回避性	細胞障害性
RNaseA	Yes	NO	NO
D38R RNase A	Yes	NO	NO
G88R RNase A	Yes	Yes $K_i=4 \times 10^{-10} \text{M}$	$\text{IC}_{50}=5 \mu \text{M}$
G88D RNase A	Yes	Yes $K_i=5 \times 10^{-11} \text{M}$	$\text{IC}_{50}=35 \mu \text{M}$
A109R RNase A	Yes	NO	NO
ONC	Yes	Yes $K_i \geq 10^{-6} \text{M}$	$\text{IC}_{50}=0.7 \mu \text{M}$

10

【0022】

20

変異RNase A G88RおよびG88Dはヒト骨髄性白血病細胞株K-562に障害性であったが、D38R RNase AおよびA109R RNase Aは細胞障害性でなかった（図1）。変異G88R RNase Aは細胞増殖の阻害においてオンコナーゼとおよそ同程度に効果的であった。G88R RNase Aは $5 \mu \text{M}$ の IC_{50} を有していたが、オンコナーゼは $0.7 \mu \text{M}$ の IC_{50} を有していた（表2）。これらの結果は、RIに対するリボヌクレアーゼの結合アフィニティを改変し細胞障害性を増強することができることを示すものである。RI存在下で触媒活性を維持している改変リボヌクレアーゼは効果的な細胞毒素である。

【0023】

癌の治療に効果的であるために、細胞障害性リボヌクレアーゼは体温において安定でなければならない。アミノ酸置換はタンパク質を熱変性により感受性にするため、改変リボヌクレアーゼの熱安定性を評価した。アルギニン置換およびアスパラギン酸置換はこの酵素の熱安定性に最小限の効果しか有しないことが見出された（表3）。

30

【0024】

【表3】

表3

リボヌクレアーゼ	熱安定性 (T _m ; °C)
RNase A	64
D38R RNase A	59
G88R RNase A	60
G88D RNase A	64
A109R RNase A	64
ONC	90

10

【0025】

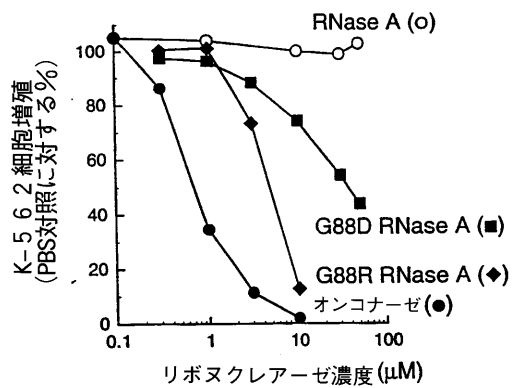
腫瘍細胞の増殖を抑制するために、本発明の改変リボヌクレアーゼはどんな標準的な方法によってデリバリーしてもよい。一般的に使用されるデリバリーモードには筋肉内、静脈内、腹腔内、および腫瘍への直接注入が含まれる。リボヌクレアーゼはリボヌクレアーゼ活性を阻害せず選択したデリバリーモードに適した製薬的担体と一緒にしてもよい。

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 種々のリボヌクレアーゼで処理した腫瘍細胞の生存性を示したものである。

【図1】



フロントページの続き

- (74)代理人 100074228
弁理士 今城 俊夫
- (74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
- (74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫
- (74)代理人 100086771
弁理士 西島 孝喜
- (74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
- (72)発明者 レインズ ロナルド ティー
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53704 マディソン レイクランド アベニュー 23
20
- (72)発明者 リーランド ピーター エイ
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53705 マディソン シェボイガン アベニュー 48
49-#321
- (72)発明者 シュルツ エル ウェイン
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53562 ミドルトン アレン ブールヴァード 215
2 アpartment 1

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 国際公開第97/031116 (WO, A1)
Biochemistry, 1996年, Vol.35, p.12978-12992

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
- C12N 15/00-90
 - C07K 14/00-16/46
 - C12P 21/00-08
 - C12N 1/00-7/08
 - G01N 33/50-98
 - C12Q 1/00-70
 - A61k 31/00-48/00
 - A61P 1/00-43/00
 - PubMed、MEDLINE(STN)
 - BIOSIS/WPI(DIALOG)
 - EUROPAT(QUESTEL)
 - GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq