

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4709465号
(P4709465)

(45) 発行日 平成23年6月22日(2011.6.22)

(24) 登録日 平成23年3月25日(2011.3.25)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 N 9/78	(2006.01) C 12 N 9/78
A 61 K 38/46	(2006.01) A 61 K 37/54
A 61 P 31/04	(2006.01) A 61 P 31/04
A 61 P 33/00	(2006.01) A 61 P 33/00

請求項の数 9 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-580381 (P2001-580381)
(86) (22) 出願日	平成13年5月2日 (2001.5.2)
(65) 公表番号	特表2003-533186 (P2003-533186A)
(43) 公表日	平成15年11月11日 (2003.11.11)
(86) 國際出願番号	PCT/US2001/014116
(87) 國際公開番号	W02001/083774
(87) 國際公開日	平成13年11月8日 (2001.11.8)
審査請求日	平成20年4月24日 (2008.4.24)
(31) 優先権主張番号	09/564,559
(32) 優先日	平成12年5月4日 (2000.5.4)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	508034761 ポラリス・グループ 台灣106・台北・セクション4・チヤン グーシアオイーストロード・ナンバー28 9・9エフ
(74) 代理人	110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(72) 発明者	エンサー, チャールズ・マーク アメリカ合衆国ケンタッキー州40517 レキシントン・デイクソニアコート708
(72) 発明者	ホルツバーグ, フレデリク・ウエイン アメリカ合衆国ケンタッキー州40356 ニコラスビル・ガーネットドライブ214

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アルギニンデイミナーゼの新規突然変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1の112位のリシン残基及び配列番号1の210位のプロリン残基を異なるアミノ酸残基で置換することにより改変が加えられている配列番号1のアミノ酸配列を含んでなる、アルギニンデイミナーゼ。

【請求項 2】

該アルギニンデアミナーゼが、配列番号1の112位のリシン残基をグルタミン酸、バリン、アスパラギン酸、アラニン、イソロイシンまたはロイシンで置換することによって改変されている、請求項1記載のアルギニンデアミナーゼ。

【請求項 3】

配列番号2のアミノ酸配列を含んでなる、請求項1記載のアルギニンデアミナーゼ。

【請求項 4】

該アルギニンデアミナーゼが、配列番号1の210位のプロリン残基をセリン、トレオニン、アルギニン、アスパラギン、グルタミンまたはメチオニンで置換することによって改変されている、請求項1記載のアルギニンデアミナーゼ。

【請求項 5】

該アルギニンデアミナーゼが、配列番号1の210位のプロリン残基をセリンで置換することによって改変されている、請求項4記載のアルギニンデアミナーゼ。

【請求項 6】

配列番号4のアミノ酸配列を含んでなる、請求項1記載のアルギニンデアミナーゼ。

10

20

【請求項 7】

ポリエチレングリコールに共有結合されている、請求項1記載のアルギニンデアミナーゼ。

【請求項 8】

該アルギニンデアミナーゼがポリエチレングリコールに連結基を介して共有結合されている、請求項7記載のアルギニンデアミナーゼ。

【請求項 9】

請求項1-8のいずれか1つに記載のアルギニンデアミナーゼ、および少なくとも1つのキャリヤー、希釈剤または賦形剤、を含んでなる組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

(技術分野)

発明の分野

本発明は、より効率的な生産および処理(processing)のためのアルギニンデイミナーゼの変異、すなわち癌および他の疾患状態の改善された処置を対象とする。

【0002】

発明の背景

現在、アミノ酸であるアルギニンは特定の疾患状態を媒介する重要な役割を果たすことができると考えられている。例えば黒色腫、肝腫瘍、肉腫および白血病のような腫瘍には成長にアルギニンを必要とすることが報告された。Sugimura et al., Melanoma Res. 2:191-196(1992) ; Takaku et al., Int.J.Cancer 51:244-249(1992) ; Miyazaki et al., Cancer Res. 50:4522-4527(1990) ; J.B.Jones、「マウスの白血病のリンパ芽球に及ぼすアルギニンデイミナーゼの効果 (The Effect of Arginine Deiminase on Murine Leukemic Lymphoblasts)」、Ph.D.Dissertation、オクラホマ大学、第1~165頁(1981)。悪性の黒色腫(第3段階)および肝腫瘍は、ほとんどの患者が診断から1年以内に死亡する致命的な疾患である。米国では年間、約16,000人がこれらの疾患により死亡している。黒色腫の発生は米国で急激に増加しつつあり、そしてオーストラリアのような他の国に比べて一層多い。肝腫瘍の発生は肝炎が地方病である世界の地域でさらに一層多い。例えば肝腫瘍は日本および台湾では癌を導く形態である。

20

【0003】

30

多くの原生動物は成長にアルギニンが必要であると報告されており、すなわちアルギニンは多くの寄生性疾患に重要な役割を果たすことができる。van Wagtendonk et al.、「原生動物における窒素代謝 (Nitrogen Metabolism in Protozoa)」、窒素代謝の比較生化学、第1~56頁 (J.W.Campbell 編集、1970)。アルギニン(循環に由来する)は敗血症ショックの媒介に重要な役割を果たし得る窒素酸化物の供給源となることも示された。Chang et al., Am.J.Physiol. 274:H342-H348(1998) ; McDonald et al., J.Biol.Chem. 272:31213-31216(1997)。これらの疾患に対する効果的処置が緊急に必要とされている。

【0004】

アルギニンのような非必須アミノ酸を分解する酵素は、ある種の形態の癌を制御する効果的手段となり得ることが報告された。例えばシードモナス プジタ (Pseudomonas putida) から単離されたアルギニンデイミナーゼがJ.B.Jonesにより、「マウスの白血病のリンパ芽球に及ぼすアルギニンデイミナーゼの効果 (The Effect of Arginine Deiminase on Murine Leukemic Lymphoblasts)」、Ph.D.Dissertation、オクラホマ大学、第1~165頁(1981)に記載された。アルギニンデイミナーゼはアルギニンからシトルリンへの転換を触媒し、これは動物の循環からアルギニンを排除するために役立つので、アルギニンデイミナーゼは癌およびアルギニンが役割を果たす他の疾患の効果的治療として使用できると考えられる。アルギニンデイミナーゼは哺乳動物では生産されないが、種々の細菌、真菌およびマイコプラズマで見いだされる。このようにアルギニンデイミナーゼはそれを生産する生物から単離できるか、または酵素は組換えDNA法を使用して生成してもよい。Misawa et al., J.Biotechnol. 36:145-155(1994)。

40

50

【0005】

微生物からアルギニンデイミナーゼを単離することにはある種の欠点が伴った。インビトロで腫瘍細胞を殺すことには効果的であるが、シュードモナス プジタ (Pseudomonas putida) から単離したアルギニンデイミナーゼは中性pHでは酵素活性がほとんど無く、そして実験動物の循環から急速に排除されるのでインビトロで効力を表すことができなかった。マイコプラズマ アルギニニ (Mycoplasma arginini) に由来するアルギニンデイミナーゼは、例えばTakaku et al., Int.J.Cancer, 51:244-249(1992)および米国特許第5,474,928号明細書に記載され、その開示は全部、引用により本明細書に編入する。そのようなヘテロガスなタンパク質の治療的使用に付随する問題は、その抗原性である。マイコプラズマ アルギニニ (Mycoplasma arginini) に由来するアルギニンデイミナーゼの塩化シアヌル連結基を介したポリエチレングリコールでの化学的改変は、Takaku et al., Int.J.Cancer Res. 84:1195-1200(1993)に記載された。改変されたタンパク質は、塩化シアヌル連結基からシアン化物を放出するので代謝された時に毒性であった。

10

【0006】

組換えDNA法を介するアルギニンデイミナーゼの生産もある種の欠点を提供する。例えば大腸菌 (Eschria coli) により生産されるアルギニンデイミナーゼは酵素的に不活性であり、すなわち変性させ、次いで酵素的に活性するために正しく再生させなければならない。大腸菌 (E.coli) により生産されたアルギニンデイミナーゼを再生する常法は、不活性酵素を単離し、塩化グアニジンに溶解し、そして低イオン強度のバッファーで急速に希釈することにより再生する。この最後の工程には大量のバッファーを必要とし、すなわちアルギニンデイミナーゼの製造を経費かつ時間がかかるものとしている。しかし組換え技法には特定の利点がある。例えばより発酵し易い微生物を宿主として使用することができる。さらにこれらの発酵宿主は一般にはより病原性が低く、しかも大量のアルギニンデイミナーゼを得ることができる。大腸菌 (E.coli) は大量のマイコプラズマ (Mycoplasma) アルギニンデイミナーゼを生産できることが示された。

20

【0007】

アルギニンデイミナーゼに関する別の問題は、酵素が高度に抗原性であり、すなわち循環から急速に排除されることである。したがってアルギニンデイミナーゼは治療剤として使用する前に正しく製剤されなければならない。本発明の目的に関して、製剤という用語は酵素の抗原性を下げる目的のための任意のアルギニンデイミナーゼの化学的改変と定義する。例えばアルギニンデイミナーゼを含む数種のタンパク質とポリエチレングリコールとの配合、すなわちペギレーション (pegylation) はタンパク質の抗原性を下げ、そして循環半減期を大きく増大させることができる。不幸であるのは、アルギニンデイミナーゼとポリエチレングリコールとの配合がしばしば酵素を不活性化することである。

30

【0008】

従来技術に付随するこれらの問題に取り組む方法および化合物が必要である。本発明はこれら、ならびに他の重要な目的を対象とする。

【0009】

発明の要約

本発明は、より効率的な生産および処理が可能な改変されたアルギニンデイミナーゼ酵素に関する。

40

【0010】

本発明は、さらに改変されたアルギニンデイミナーゼをコードする組換えDNA分子に関する。

【0011】

関連する観点において、本発明はさらに改変されたアルギニンデイミナーゼをコードするスクレオチド配列を含んで成る組換えベクター、およびそのようなベクターを含んで成る宿主細胞に関する。

【0012】

本発明はさらに、本発明の改変されたアルギニンデイミナーゼ酵素を調製するための方法

50

に関する。これらの方法は本発明の組換えDNA分子で形質転換した宿主細胞を適当な培養基中で成長させることを含んで成る。

【0013】

別の観点では、本発明は癌の処置法ならびに腫瘍細胞の転移を処置および／または抑制する方法に関する。また本発明は、寄生性疾患、敗血症ショックおよび他の疾患状態を処置する方法に関する。

【0014】

本発明のこれらのおよび他の観点は、本発明の以下の詳細な説明から明確になるだろう。

【0015】

本発明の好適な態様の詳細な説明

10

本発明は、マイコプラズマ ホミニス (*Mycoplasma hominis*) に由来するアルギニンデイミナーゼの自然に存在するアミノ酸残基の1以上の変更が、より容易に再生、そして処理される酵素を提供し、それによりアルギニンデイミナーゼおよびそれを含んで成る治療用組成物の製造のための既存の技法を改良することができるという知見に基づく。本発明の治療用組成物は、組換えDNA分子、プラスミドを含む組換えベクター、形質転換した宿主細胞および他の製薬学的組成物を含んで成ることができる。またこの治療用組成物は、当業者に既知である生物適合性キャリアまたは希釈剤を含んでもよい。本発明の治療用組成物は容易に滅菌され、そして非発熱性である。そのような改良された技法および組成物は癌および他の疾患状態の効果的処置に必要である。

【0016】

20

本明細書で使用する「黒色腫」という用語は、口腔、食道、肛門管、膣、軟齶膜、および／または結膜または目を含む皮膚および他の器官のメラノサイト系から生じる悪性または良性の腫瘍であり得る。用語「黒色腫」には、例えば末端部黒子黒色腫、メラニン欠乏性黒色腫、良性若年性黒色腫、悪性黒子黒色腫、悪性黒色腫、結節性黒色腫、爪下黒色腫および表在拡大型黒色腫を含む。

【0017】

「肝癌」は、肝臓の悪性または良性の腫瘍であり、例えば肝細胞癌を含む。

【0018】

「患者」は動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを称する。

【0019】

30

「生物適合性」とは、一般に生物機能に対して有害ではなく、しかもアレルギーおよび疾患状態を含む許容できない程度の毒性をもたらさない材料または化合物を称する。

【0020】

「ポリエチレングリコール」または「PEG」とは、分枝または直鎖の一般式H(OCH₂CH₂)_nOH（式中、nは少なくとも4である）で表されるエチレンオキシドと水の縮合ポリマーの混合物を称する。ポリエチレングリコールは直鎖であることが好ましい。一般にポリエチレングリコールは分子量が上がると、アルギニンデイミナーゼの免疫原性は下がる。ポリエチレングリコールは、アルギニンデイミナーゼおよび場合により生物適合性の連結基と一緒に使用して、例えば黒色腫、肝癌および肉腫、好ましくは黒色腫を処置することができる。

40

【0021】

正常細胞はアルギノスクシネットシンターゼおよびアルギノスクシネットリアーゼにより触媒される2段階法でシトルリンから合成することができるので、正常細胞は成長にアルギニンを必要としない。対象的に、黒色腫、肝癌および数種の肉腫は、アルギノスクシネットシンターゼを発現せず；したがってアルギニンについて栄養要求性であり、すなわちそれらは成長にアルギニンが必要である。この代謝的差異を、これらの形態の癌を処置するための安全かつ効果的な治療を開発するにあたり利用することができる。アルギニンデイミナーゼはアルギニンからシトルリンへの転換を触媒し、そしてアルギニンを排除するために使用することができる。すなわちアルギニンデイミナーゼは、黒色腫、肝癌、数種の肉腫および他の疾患状態の処置として利用することができる。

50

【0022】

マイコプラズマ ホミヌス (Mycoplasma hominus) 遺伝子に由来するアルギニンデイミナーゼのアミノ酸配列を図1または2に開示する。アルギニンデイミナーゼ酵素の化学的および遺伝的改変は、この生物活性に影響を及ぼすことができる。例えばアルギニンデイミナーゼは典型的には抗原性であり、そして患者の循環から急激に排除されることが示された。しかしアルギニンデイミナーゼとポリエチレングリコールの配合は抗原性を下げ、そして酵素の循環半減期を上げることも示された。Abuchowski et al., Cancer Biochem. Bio phys. 7:175-186(1984) ; Abuchowski et al., J. Biol. Chem. 252:3582-3586(1977)。特にアルギニンデイミナーゼはポリエチレングリコールを用いて共有的に改変することができる。ポリエチレングリコールで共有的に改変したアルギニンデイミナーゼは(連結基を含むか、または含まない)、今後「ADI-PEG」と称する。米国特許出願第09/023,809号明細書でClarkは、ポリエチレングリコールを用いたアルギニンデイミナーゼの改良された改変を記載し、その開示内容は全部、引用により本明細書に編入する。天然のアルギニンデイミナーゼと比較した時、ADI-PEGはその酵素活性のほとんどを保持し、抗原性がはるかに低く、大いに延長した循環半減期を有し、そして腫瘍の処置により一層効果力がある。本発明の目的に關して、ポリエチレングリコールを用いた任意のアルギニンデイミナーゼの改変は、ペギレーション(pegylation)と呼ぶ。

10

【0023】

しかし抗原性を低下させるために最大量のポリエチレングリコールを用いてアルギニンデイミナーゼを改変する必要がある。例えばアルギニンデイミナーゼは、最大量のスクシニミジルスクシネットポリエチレングリコール(SS-PEG)と配合することができる。SS-PEGはペギレーション中にタンパク質上の1級アミンに結合する(n-末端およびリシン)。不幸なことには、ペギレーション法は完全に進行するとアルギニンデイミナーゼを不活性化する可能性があることが示された。本発明を限定することは意味しないが、ポリエチレングリコールが反応を触媒するための酵素能力を妨害する酵素の部位上に結合するのでアルギニンデイミナーゼは不活性化されると思われる。すなわち、抗原性を下げる同時に不活性化を防止するために、酵素に対するSS-PEGの正確な比率、反応物質の濃度および反応時間を慎重に定めることが従来は必要であった(すなわち最適なペギレーション)。さらに製造規模が上がるとペギレーション反応を制御することはより難しくなることは明らかで、そして過剰なポリエチレングリコールを除去する前にSS-PEGを不活性化することがしばしば必要である。

20

【0024】

組換え法により生産されたアルギニンデイミナーゼ、特に大腸菌(E.coli)で生産されたアルギニンデイミナーゼは、最初は不活性であることも示された。組換えアルギニンデイミナーゼは、酵素を変性させ、次いで正しく再生することにより活性化することが必要であった。典型的には、不活性酵素を単離し、塩化グアニジンに溶解し、そして次いで低イオン強度バッファーでの急激な希釈により再生した。しかし大量のバッファーが必要であり、これは組換えアルギニンデイミナーゼの製造を経費がかかり、しかも時間を要するものとする。

30

【0025】

アルギニンデイミナーゼの特定の改変は、酵素の再生および配合(すなわちペギレーション)の両方を行い易くし、これにより製造工程を改善することができると見いだされた。本発明はアルギニンデイミナーゼ中の特定のアミノ酸の変化が酵素の組換え生産および配合に優れた結果を提供するという予期せぬ知見に基づく。アルギニンデイミナーゼの生産は従来、組換え生産および配合に付隨する困難さから経費がかさみ、そして時間を要した。このように本発明は、アルギニンをシトルリンに転換する能力を維持しながら、改良された再生および配合法を提供する改変されたアルギニンデイミナーゼを開示する。本発明の目的に關して、改変されたアルギニンデイミナーゼは1以上のアミノ酸置換を有するアルギニンデイミナーゼと定義することができる。改変されたアルギニンデイミナーゼは、1つのアミノ酸置換または複数のアミノ酸置換を有するアルギニンデイミナーゼを含むこ

40

50

とができると理解するべきである。また本発明は、本発明の改変されたアルギニンデイミナーゼをコードするDNA配列も開示する。本発明の改変されたアルギニンデイミナーゼは、特定の種類の癌の処置、癌の転移の抑制および他の疾患状態の処置に優れた結果を提供することができる。

【0026】

本発明の好適な態様は、アルギニンデイミナーゼに付随する特定のペギレーション部位が酵素の触媒領域に、または隣接して位置し得るという知見に基づくと理解される。本発明の目的に關して、「ペギレーション部位」と言う句は、ポリエチレングリコールで共有的に改変され得るアルギニンデイミナーゼの任意の部位または位置と定義することができる。この「ペギレーション部位」は、その部位のペギレーションが酵素の触媒活性の十分な減少をもたらす酵素の触媒領域に、またはそれに隣接して位置すると考えることができる。そのような部位のペギレーションは通常、酵素の不活性化をもたらす。例えばマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来するアルギニンデイミナーゼは、酵素の触媒部位またはそに隣接すると考えられている112位にリシンを有する。112位でのリシンに対するポリエチレングリコールの結合は、酵素を不活性化することができる。さらにマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来するアルギニンデイミナーゼは、酵素の触媒部位またはそに隣接すると考えられている397位にシステインを有する。このシステインの重要性は、397位でのシステインのアミノ酸置換が酵素を不活性化することができるが見いだされた時に示された。特に397位のシステインをアラニン、ヒスチジン、アルギニン、セリン、リシンまたはチロシンに置換すると、すべての検出可能な酵素活性の損失をもたらすことが示された。またマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来するアルギニンデイミナーゼは、この保存されたシステイン付近に位置する3つのリシン、特にLys³⁷⁴、Lys⁴⁰⁵およびLys⁴⁰⁸も有する。Lys³⁷⁴、Lys⁴⁰⁵、Lys⁴⁰⁸またはそれらの組み合わせへのポリエチレングリコールの結合は、酵素を不活性化すると考えられる。

【0027】

他の微生物に由来するアルギニンデイミナーゼも、マイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来するアルギニンデイミナーゼの112位に対応するペギレーション部位を有するかもしれないと理解される。例えばステプトコッカス ピロゲネス (*Streptococcus pyogenes*) に由来するアルギニンデイミナーゼは、104位にリシンを有し、マイコプラズマ ニューモニア (*Mycoplasma pneumoniae*) に由来するアルギニンデイミナーゼは106位にリシンを有し、そしてキアルジア インテスチナリス (*Giardia intestinalis*) に由来するアルギニンデイミナーゼは114位にリシンを有する。さらに数種の微生物に由来するアルギニンデイミナーゼは、マイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来するアルギニンデイミナーゼの112位と全体的に同じ位置に対応するリシンを有し得る。そのような微生物に由来するアルギニンデイミナーゼのリシンの位置を以下に示すことができる：

【0028】

【表1】

表1：種々の微生物に由来するアルギニンデイミナーゼのペギレーション部位

アルギニンデイミナーゼを生産する微生物	アルギニンデイミナーゼのリシン位置
マイコプラズマ ホミヌス (<i>Mycoplasma hominus</i>)	112
マイコプラズマ アルギニニ (<i>Mycoplasma arginini</i>)	111
クリストリジウムパーフリンゲス (<i>Clostridium perfringens</i>)	105
バチルス リケンホルミス (<i>Bacillus licheniformis</i>)	97, 108
ボレリア ブルゲルフェリ (<i>Borrelia burgdorferi</i>)	102, 111
ボレリア アフゼリー (<i>Borrelia afzelii</i>)	101
エンテロコッカスフェカリス (<i>Enterococcus faecalis</i>)	102, 110
ストレプトコッカス ヒオゲネス (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	104
ステフトコッカス ニューモニア (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	103
ラクトバチルス サケ (<i>Lactobacillus sake</i>)	97, 106
キアルジア インテスキナリス (<i>Giardia intestinalis</i>)	114, 116

10

20

【0029】

現在、そのようなリシンまたはそれらの組み合わせへのポリエチレングリコールの結合が酵素を不活性化できると考えられている。現在、そのようなリシンでのアミノ酸置換はペギレーションでその酵素的活性の損失がより少ないタンパク質をもたらすと考えられている。

【0030】

このように本発明は、アルギニンデイミナーゼのポリペプチド中に特定のアミノ酸置換を提供する。これらのアミノ酸置換は、ペギレーションで活性の損失が少ない改変されたアルギニンデイミナーゼを提供し、すなわちペギレーションで、改変されたアルギニンデイミナーゼにおいてペギレーション後の酵素活性の減少は、非改変アルギニンデイミナーゼにおけるペギレーション後の酵素活性の減少よりも少ない。酵素の触媒領域での、または隣接するペギレーション部位を排除することにより、最適なペギレーションがこれまでの活性の損失無しに達成される。上記で検討したように特定の微生物に由来するアルギニンデイミナーゼは、ペプチド鎖上の様々な位置に配置されるペギレーション部位を有する。本発明を限定するわけではないが、アルギニンデイミナーゼは酵素の触媒領域、またはそれに隣接するアミノ酸リシンを有する可能性があり、そしてこれら部位のペギレーションは酵素を不活性化し得ると考えられる。これらペギレーション部位の少なくとも1つを排除することにより、ペギレーションを行い、そしてより多くの酵素活性を保持することができる。本発明に従い、リシンはグルタミン酸、バリン、アスパラギン酸、アラニン、イソロイシン、ロイシンまたはそれらの組み合わせと置換することが好ましい。リシンをグルタミン酸に置換することがより好適である。本発明の1態様では、マイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来する改変されたアルギニンデイミナーゼは、Lys¹¹² (配列番号2)、Lys³⁷⁴、Lys⁴⁰⁵、Lys⁴⁰⁸またはそれらの組み合わせでアミノ酸置換を有する。好ましくはマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来する改変されたアルギニンデイミナーゼは、Lys¹¹²からGlu¹¹²、Lys³⁷⁴からGlu³⁷⁴、Lys⁴⁰⁵からGlu⁴⁰⁵、Lys⁴⁰⁸からGlu⁴⁰⁸またはそれらの組み合わせへのアミノ酸置換を有する。より好適にはマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来する改変されたアルギニンデイミナーゼは、グルタミン酸で置換された112位のリシンを有する。

30

40

50

【0031】

本発明の他の好適な態様は、アルギニンデイミナーゼの特定の構造的特徴が組換え法を介して生産された時に、アルギニンデイミナーゼの正しい、かつ迅速な再生を防止または妨害するかもしれないという知見に基づくと考える。特に、これらの構造的特徴は酵素が組換え体の生産中に活性なコンホーメーションを再成することを妨害、または妨げる。本発明の目的に關して、「活性なコンホーメーション」という句は非改変または改変アルギニンデイミナーゼによる酵素的活性を可能とする3次元構造と定めることができる。活性なコンホーメーションは、特にアルギニンからシトルリンへの転換を触媒するために必要であり得る。「構造的特徴」という句は、特定のアミノ酸またはアミノ酸の組み合わせから生じるポリペプチド鎖の形質、性質または特性と定義することができる。例えばアルギニンデイミナーゼは正常なペプチド鎖中で曲がりまたはよじれを生じるアミノ酸を含むことができ、そしてこのように酵素の再生中に酵素が活性なコンホーメーションをとることを妨害する。特にマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来するアルギニンデイミナーゼは、ペプチド鎖中で曲がりまたはよじれを生じる210位でのプロリンを有し、組換え体生産中に酵素を再生し難くする。他の微生物に由来するアルギニンデイミナーゼも、マイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来するアルギニンデイミナーゼの210位に相当する部位を有するかもしれないと理解すべきである。

10

【0032】

このように本発明は、ここでもアルギニンデイミナーゼのポリペプチド鎖中に特定のアミノ酸置換を提供する。そのようなアミノ酸置換はアルギニンデイミナーゼのペプチド鎖中で問題の多い特徴的構造を排除することができる。そのようなアミノ酸置換は、改変されたアルギニンデイミナーゼの改良された再生を提供する。これらのアミノ酸置換は、減少させたバッファー量を使用して改変されたアルギニンデイミナーゼの迅速な再生を可能とする。これらのアミノ酸置換はまた、再生した改変アルギニンデイミナーゼの収量の増加も提供する。本発明の1態様では、改変されたアルギニンデイミナーゼはPro²¹⁰で1つのアミノ酸置換を有する。上記のように、マイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来するアルギニンデイミナーゼは、210位に位置するアミノ酸プロリンを有する。本発明を限定するわけではないが現在、210位のアミノ酸プロリンの存在が、アルギニンデイミナーゼの再生（すなわちリホールディング）を難しさを増す正常なポリペプチド鎖中に曲がりおよびよじれを生じると考えられている。210位でのプロリンの置換は、減少したバッファー量を使用して改変アルギニンデイミナーゼの迅速な再生を可能とする。210位のプロリンの置換は、再生される改変アルギニンデイミナーゼの収量の上昇も提供することができる。好適な態様では210位のプロリンは、セリンに置換される（配列番号3）。本発明の観点に従い、210位での他の置換も行うことができる。好適な置換の例には、Pro²¹⁰からThr²¹⁰、Pro²¹⁰からArg²¹⁰、Pro²¹⁰からAsn²¹⁰、Pro²¹⁰からGln²¹⁰またはPro²¹⁰からMet²¹⁰を含む。野生型アルギニンデイミナーゼの210位のアミノ酸に伴うこれらの構造的特徴を排除することにより、酵素の正しいリホールディングを達成することができる。

20

【0033】

本発明の別の態様では、改変されたアルギニンデイミナーゼが多数のアミノ酸置換を有することが好適である。この改変されたアルギニンデイミナーゼは、酵素の触媒領域で、またはそれに隣接してペギレーション部位を排除する少なくとも1つのアミノ酸置換を有することができる。改変されたアルギニンデイミナーゼは、酵素の再生を妨害するこれら構造的特徴を排除する少なくとも1つのアミノ酸置換も有することができる。このようにアミノ酸置換は、本発明の改変されたアルギニンデイミナーゼを提供することができる。アミノ酸置換は、酵素活性を失う事なく改変されたアルギニンデイミナーゼのペギレーションを提供することができる。アミノ酸置換は、減少したバッファー量を使用して迅速に再生することができる改変アルギニンデイミナーゼを提供することができる。またアミノ酸置換は、上昇した収量の再生された改変アルギニンデイミナーゼを提供することもできる。好適な態様では、マイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来する改変さ

30

40

50

れたアルギニンデイミナーゼはセリンに置換される210位でのプロリン、およびグルタミン酸で置換された112位のリシンを含む（配列番号4）。しかし上記に検討したように、改変されたアルギニンデイミナーゼは他の好適な置換を含んでもよいと理解される。

【0034】

本発明の改変されたアルギニンデイミナーゼは、マイコプラズマ ホミヌス (Mycoplasma hominus) に由来することが好適である。しかし本発明に従い、当業者は改変されたアルギニンデイミナーゼが他の微生物に由来してもよいと理解するだろう。例えば上記に検討したように、本発明のアルギニンデイミナーゼは、ステプトコッカス バイロゲネス (Streptococcus pyogenes)、マイコプラズマ ニューモニア (Mycoplasma pneumoniae)、キアルジア インテスチナリス (Giardia intestinalis)、マイコプラズマ ホミヌス (Mycoplasma hominus)、マイコプラズマ アルギニニ (Mycoplasma arginini)、クロストリジウム パーフリンゲス (Clostridium perfringens)、バチルス リケニホルミス (Bacillus licheniformis)、ボレリア ブルグドルフェリ (Borrelia burgdorferi)、ボレリア アフゼリー (Borrelia afzelii)、エンテロコッカス フェカリス (Enterococcus faecalis)、ストレプトコッカス ピオゲネス (Streptococcus pyogenes)、ステプトコッカス ニューモニア (Streptococcus pneumoniae)、ラクトバチルス サケ (Lactobacillus sake)、キアルジア インテスチナリス (Giardia intestinalis) に由来することができる。

改変されたアルギニンデイミナーゼは本発明の種々の観点に従い1以上のアミノ酸置換を有することができると理解される。

【0035】

本発明の特定の態様では、改変されたアルギニンデイミナーゼはポリエチレングリコールを用いて配合できると考えられる。本発明は酵素をこれまでのようにな活性化する事なく循環半減期を上げるために、ポリエチレングリコールの改変されたアルギニンデイミナーゼへの結合を提供する。従来、アルギニンデイミナーゼ上のポリエチレングリコールの結合部位の選択は当業者には既知であるように、タンパク質の活性ドメイン内の各部位の役割により定められる。本発明は酵素活性の実質的な損失無しで、アルギニンデイミナーゼの1級アミンにポリエチレングリコールの結合を提供する。例えばマイコプラズマ ホミヌス (Mycoplasma hominus) に由来する改変されたアルギニンデイミナーゼは、ポリエチレングリコールにより改変され得るリシンアミノ酸を含む。換言すると、これらのリシンは改変されたアルギニンデイミナーゼをポリエチレングリコールに結合させることができるすべての可能な点である。しかし当業者には明白であるように、ポリエチレングリコールは改変されたアルギニンデイミナーゼ上の他の部位に結合させてもよい。改変されたアルギニンデイミナーゼ上のポリエチレングリコール単位の数が上昇すると、酵素の特異活性を従来のように低下することなく酵素の循環半減期が上昇する。

【0036】

ポリエチレングリコールを改変されたアルギニンデイミナーゼに共有的に結合するために使用する連結基は、生物適合性の連結基であることができる。上記に検討したように、「生物適合性」とは化合物または基が非毒性であり、そして傷害、病気、疾患または死亡を引き起こすことなくインピトロまたはインピボで使用することができる事を示す。ポリエチレングリコールは例えばエーテル結合、エステル結合、チオール結合またはアミド結合を介して連結基に結合することができる。適当な生物適合性連結基には、例えばエステル基、アミド基、イミド基、カルバメート基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、炭水化物、マイミド基（例えばスクシンイミジルスクシネット（SS）、スクシンイミジルプロピオネット（SPA）、スクシンイミジルカルボキシメチレート（SCM）、スクシンイミジルスクシンイミド（SSA）またはN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を含む）、エポキシド基、オキシカルボニルイミダゾール基（例えばカルボニルジイミダゾール（CDI）を含む）、ニトロフェニル基（例えばニトロフェニルカルボネット（NPC）またはトリクロロフェニルカルボネット（TPC）を含む）、トリシレート基、アルデヒド基、イソシアネート基、ビニルスルホン基、チロシン基、システイン基、ヒスチジン基または1級アミンを含む。好ましくは生物適合性連結基は、エステル基および/またはマイミド基である。より好ましく

10

20

30

40

50

は連結基はSS、SPA、SCM、SSAまたはNHSであり；SS、SPAまたはNHSがより好適であり、そしてSSまたはSPAが最も好適である。

【0037】

あるいはポリエチレングリコールは改変されたアルギニンディミナーゼに直接（すなわち連結基無しで）、アミノ基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基またはカルボキシル基を介してカップリングさせることができる。ポリエチレングリコールは、例えばPark et al ., *Cancer Res.* 33:3-14(1973)；およびZaplinsky and Lee、ポリエチレングリコール化学：生物技術および生物医学的応用 (Polyethylene Glycol Chemistry:Biotechnical and Bio medical Application)、J.M.Harris 編集、プレナム出版、NY、第21章(1992)に記載されているように（これらの開示は、引用により全部、本明細書に編入する）、当該技術分野で既知の方法を使用して生物適合性連結基を介して、改変されたアルギニンディミナーゼに共有的に結合させることができる。

10

【0038】

本発明はまた、本発明の改変されたアルギニンディミナーゼをコードする組換えDNA分子に関する。本発明の組換えDNA分子を含んで成るDNA分子は、既知の技法、例えば遺伝子バンクからの遺伝子の単離し、mRNAの鑄型から、またはポリメラーゼ連鎖反応（米国特許第4,800,159号明細書）を介して相補鎖またはcDNAの作成を使用して、または臨床的検体からの単離物からのマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) に由来することができる。あるいはそのような組換えDNA分子は、標準的なDNA合成法により合成してもよい。種々のマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) 株が商業技術用の寄託機関、例えば米国、メリーランド州ベセスダのアメリカンタイプカルチャコレクション(ATCC)から公に入手可能である。

20

【0039】

本発明のDNA分子は、例えば調節要素、1以上の選択可能なマーカーおよび複製および維持機能をコードする配列を含む付加的なDNA配列を含んで成ることができる。この調節領域は典型的には本発明のコード配列から上流に見いだされるプロモーターを含み、これはRNAポリメラーゼの結合およびRNA転写の開始において機能する。換言すると、調節要素または領域は本発明のコード配列に操作可能に連結することができる。当業者には調節領域の選択は使用する宿主細胞に依存することが明らかであろう。

30

【0040】

本発明はまた、組換えベクター、特に本発明の改変されたアルギニンディミナーゼをコードする配列を含んで成る組換えプラスミドに関する。

【0041】

本発明の別の観点は、本発明の組換えDNA分子により形質転換される宿主細胞である。そのような宿主細胞は適当な培養基中で成長し、そして本発明のコード配列を発現することができる。そのような宿主細胞は、本発明の方法により、例えば所望の宿主細胞を本発明のプラスミドで形質転換することにより調製することができる。そのような形質転換は、通例の形質転換法を使用することにより達成できる。さらに本発明のDNA分子は、通例の技法、例えば相同的組換えにより宿主細胞のゲノムに組み込むことができる。本発明での使用に適するこれらの宿主細胞には限定するわけではないが、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母および他の細菌細胞、例えばストレプトミセス、バチスルおよびサルモネラを含む。本発明の宿主細胞に、大腸菌 (*E.coli*) 種に属するものを含むことが好ましい。本発明およびそれらの産物は、特別な宿主細胞に限定されない。改変されたアルギニンディミナーゼは、本発明の形質転換した宿主細胞により生産されることが好ましいが、そのような酵素は通例のペプチド合成法により調製することができる。

40

【0042】

本発明はまた、本発明の組換えDNA分子によりコードされる酵素を生産する方法にも関し、この方法は本発明の形質転換した宿主を適当な培養基中で培養し、そしてそのような酵素を単離することを含んで成る。本発明の目的に關して、「適当な培養基」という句は、そのような宿主が本発明の改変されたアルギニンディミナーゼをコードする組換えDNA分

50

子を発現し易くする培地と定義することができる。当業者は適当な培養基は使用する宿主細胞に依存すると言えるだろう。そのように生産された酵素の単離は宿主のカルチャー溶解物から、あるいは適当な場合は宿主の培養基から直接行うことができ、そしてそのような単離は通常のタンパク質分離法により行われる。

【0043】

好適な態様では、本発明の改変されたアルギニンデイミナーゼをコードするDNAコード配列が形質転換したマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) の宿主細胞で発現する。好ましくはマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) 細胞はアルギニンデイミナーゼを欠失し、すなわち相補を必要とする。そのような系では、改変されたアルギニンデイミナーゼをコードする配列は典型的にはベクター上に位置している。そのようなベクターは、大腸菌 (*E.coli*) または他の幾つかの適当な宿主中でベクターを増やすために十分な量の細菌DNAを含む。そのようなベクターは、アルギニンデイミナーゼ遺伝子を欠失しているマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) 宿主とヘテロロガスな改変されたアルギニンデイミナーゼ遺伝子との間で組換えが可能となるように、酵素をコードする配列を挟む十分な量のマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) DNAも含む。当業者は改変されたアルギニンデイミナーゼ遺伝子が欠失したマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) 宿主を使用することは必須ではないが、組換え前に宿主中にその遺伝子の不存在が目的遺伝子を包含した組換え体宿主のスクリーニングおよび単離を行い易くすると理解している。そのような相同的組換えから生じた組換えマイコプラズマ ホミヌス (*Mycoplasma hominus*) は、次いで当業者に既知の標準法により選択することができる。

10

【0044】

本発明は治療に効果的な量の本発明の化合物の1つを投与することを含んで成る、癌および/または他の疾患状態の処置法も包含する。治療に効果的な量の本発明の化合物の1つは、疾患状態の発生を減少させるために効果的な量である。疾患状態が癌である場合、治療に効果的な量の本発明の化合物の1つは腫瘍の成長を阻害するために効果的な量であることができる。一般に、処置は少ない投薬用量から始め、これをその状況下で最適な効果が達成されるまで少ない増分で上昇させることができる。一般に、本発明の化合物の治療的投薬用量は、1週間に2回からおよそ隔週に1回の約1～約200mg/kgであることができる。例えば投薬用量は約1mg/kgを2mlの静脈内注射として1週間に1回から、3日に1回の約20mg/kgでよい。PEG-ADIはリン酸緩衝化塩溶液と、または当業者には既知の他の適当な溶液と注射前に混合することができる。PEG-ADI製剤は所望により固体 (リオファラート : lyophalate) として、または液体製剤として投与することができる。

20

【0045】

本発明の方法は、インピトロまたはインピボ応用のいずれかに関与し得る。細胞培養の応用を含めインピトロの応用の場合は、本明細書に記載の化合物を培養中の細胞に加え、そしてインキュベーションすることができる。本発明の化合物は、当該技術分野で周知の抗体生産技法を使用して、モノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体を生産し易くするためにも使用することができる。ついでモノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体は、当業者には明白な広い様々な診断的応用で使用することができる。

30

【0046】

本発明の化合物の投与のインピボ手段は、意図する応用に依存して変動するだろう。当業者は本発明のPEG-ADI組成物の投与は、例えば経口、鼻内、腹腔内、非経口、静脈内、リンパ内、腫瘍内、筋肉内、間隙内、動脈内、皮下、眼内、滑液包内、経上皮、経皮的に行うことができると認識するだろう。

40

【0047】

【実施例】

本発明はさらに以下の実施例で示し、これらは具体的説明の目的であり、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1：ADIのクローニングおよび部位特異的な突然変異誘発

50

マイコプラズマ ホミヌス (Mycoplasma hominus) (ATCC23114) のカルチャーは、メリーランド州、ベセスダのアメリカンタイプカルチャーから得た。DNAを抽出し、そしてポリメラーゼ連鎖反応によりアルギニンデイミナーゼをコードする遺伝子を単離した。

【0048】

アルギニンデイミナーゼ遺伝子はpGEM-tおよび大腸菌 (E.coli) JM101株にサブクローン化した。部位特異的な突然変異誘発法はAltered Sites IIキット (プロメガ (Promega) 、マジソン、ウィスコンシン州) を使用して行った。

【0049】

改変されたアルギニンデイミナーゼは、JM101細胞中でTakaku et al., 同上により以前記載されたように発現させた。改変されたアルギニンデイミナーゼは、112位にグルタミン酸を、そして210位にセリンを含んだ (配列番号4)。マイコプラズマ ホミヌス (Mycoplasma hominus) に由来する改変されたアルギニンデイミナーゼのアミノ酸配列は、図2に記載する。

10

実施例2. 酵素的に活性なADIの再生および精製

改変されたアルギニンデイミナーゼは、Takaku et al., 同上により以前記載されたように単離し、そして精製した。しかし幾つかの改善が観察された。

【0050】

【表2】

表2. アルギニンデイミナーゼの再生

20

化合物	時間(°C)	希釀比	収量
アルギニンデイミナーゼ	90時間(15 °C)	1:200	70 mg/L
改変されたアルギニンデイミナーゼ	6-12時間(室温)	1:50	500 mg/L

【0051】

上記表2に示すように、改変されたアルギニンデイミナーゼの再生は、バッファー中で塩化グアニジン含有体の1:50の希釀比を使用して、室温で約6~12時間で完了した。対照的にTakaku et al.は、1:200の希釀比を使用して15~90時間を要したと報告した。さらに改変されたアルギニンデイミナーゼの収量は日常的に、1リットルの発酵あたり約500mgであるが、Takaku et al.は1リットルの発酵あたり約70mgの収量を報告した。

30

実施例3. PEGを用いた改変ADIの配合

改変されたアルギニンデイミナーゼは、前に記載したようにSS-PEGを使用して配合した。ペギレーション法は、改変されたアルギニンデイミナーゼを不活性化することなく4時間にわたり未検査で進行できた。さらにペギレーション法を止めるためにグリシンの添加は必要なかった。表3を参照にすると、改変されたアルギニンデイミナーゼの酵素活性の約70~80%が保持された。

40

【0052】

【表3】

表3：特異的酵素活性(IU/mg タンパク質)

	ペキレーションなし	ペキレーションを実施
野生型ADI	20-21	5-8
改変ADI	20-21	12-16

【0053】

10

これは、改変されたアルギニンデイミナーゼがより一貫した発酵を可能とすることを示す。さらに改変されたアルギニンデイミナーゼが野生型のアルギニンデイミナーゼに比べて製造工程のスケールアップを可能とする。

【0054】

本明細書に記載した各特許、特許出願および公報は、引用により全部、本明細書に編入する。

【0055】

本明細書での記載に加え、本発明の様々な改変が前述の説明から当業者には明白であろう。そのような改変も前述の特許請求の範囲内にあることを意図している。

【0056】

20

これにより本出願の明細書は、引用により特許請求の範囲およびそれら全開示を包含すると理解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 野生型マイコプラズマ ホミヌス (Mycoplasma hominus) からクローン化したアルギニンデイミナーゼのアミノ酸配列を表す（配列番号1）。

【図2】 本発明の好適な態様によるマイコプラズマ ホミヌス (Mycoplasma hominus) に由来する改変されたアルギニンデイミナーゼのアミノ酸配列を表す（配列番号4）。

【配列表】

PHOE0063.ST25.txt
 SEQUENCE LISTING

<110> Phoenix Pharmacologics, Inc.
 <120> Novel Mutated Form of Arginine Deiminase
 <130> PHOE-0063
 <150> 09/564,559
 <151> 2000-05-04
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.0

<210> 1
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hominis 10

<400> 1

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
 20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Gln Ser Phe Val Lys Ile
 50 55 60

Met Lys Asp Arg Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala
 65 70 75 80 20

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Lys Ala Ala Lys Glu Glu Phe Ile Glu
 85 90 95

Thr Phe Leu Glu Thr Val Pro Val Leu Thr Glu Ala Asn Lys Lys
 100 105 110

Ala Val Arg Ala Phe Leu Leu Ser Lys Pro Thr His Glu Met Val Glu
 115 120 125

Phe Met Met Ser Gly Ile Thr Lys Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ser Glu
 130 135 140

Asn Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp
 145 150 155 160

Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Phe Met Arg Tyr
 165 170 175 30

Ile Val Arg Arg Glu Thr Leu Phe Ala Arg Phe Val Phe Arg Asn
 180 185 190

His Pro Lys Leu Val Lys Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Met Lys
 195 200 205

Met Pro Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Glu Thr Leu
 210 215 220

Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Asp Thr Ile Thr Leu Leu
 225 230 235 240

PHOE0063.ST25.txt

Ala Lys Asn Ile Lys Ala Asn Lys Glu Val Glu Phe Lys Arg Ile Val
 245 250 255
 Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp
 260 265 270
 Leu Thr Met Leu Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala Asn
 275 280 285
 Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala Glu
 290 295 300
 Pro Gln Pro Gln Leu Asn Gly Leu Pro Leu Asp Lys Leu Leu Ala Ser
 305 310 315 320
 Ile Ile Asn Lys Glu Pro Val Leu Ile Pro Ile Gly Gly Ala Gly Ala
 325 330 335
 Thr Glu Met Glu Ile Ala Arg Glu Thr Asn Phe Asp Gly Thr Asn Tyr
 340 345 350
 Leu Ala Ile Lys Pro Gly Leu Val Ile Gly Tyr Asp Arg Asn Glu Lys
 355 360 365
 Thr Asn Ala Ala Leu Lys Ala Ala Gly Ile Thr Val Leu Pro Phe His
 370 375 380
 Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met
 385 390 395 400
 Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405

<210> 2
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hominis

<400> 2

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
 20 25 30
 Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45
 Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Gln Ser Phe Val Lys Ile
 50 55 60
 Met Lys Asp Arg Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala
 65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Lys Ala Ala Lys Glu Glu Phe Ile Glu
 85 90 95

Thr Phe Leu Glu Glu Thr Val Pro Val Leu Thr Glu Ala Asn Pro Glu
 100 105 110

Ala Val Arg Ala Phe Leu Leu Ser Lys Pro Thr His Glu Met Val Glu
 115 120 125

Phe Met Met Ser Gly Ile Thr Lys Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ser Glu
 130 135 140

10

20

30

PHOE0063.ST25.txt

Asn Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp
 145 150 155 160
 Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Phe Met Arg Tyr
 165 170 175
 Ile Val Arg Arg Arg Glu Thr Leu Phe Ala Arg Phe Val Phe Arg Asn
 180 185 190
 His Pro Lys Leu Val Lys Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Met Lys
 195 200 205
 Met Pro Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Glu Thr Leu
 210 215 220
 Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Asp Thr Ile Thr Leu Leu
 225 230 235 240
 Ala Lys Asn Ile Lys Ala Asn Lys Glu Val Glu Phe Lys Arg Ile Val
 245 250 255
 Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp
 260 265 270
 Leu Thr Met Leu Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala Asn
 275 280 285
 Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala Glu
 290 295 300
 Pro Gln Pro Gln Leu Asn Gly Leu Pro Leu Asp Lys Leu Leu Ala Ser
 305 310 315 320
 Ile Ile Asn Lys Glu Pro Val Leu Ile Pro Ile Gly Gly Ala Gly Ala
 325 330 335
 Thr Glu Met Glu Ile Ala Arg Glu Thr Asn Phe Asp Gly Thr Asn Tyr
 340 345 350
 Leu Ala Ile Lys Pro Gly Leu Val Ile Gly Tyr Asp Arg Asn Glu Lys
 355 360 365
 Thr Asn Ala Ala Leu Lys Ala Ala Gly Ile Thr Val Leu Pro Phe His
 370 - 375 380
 Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met
 385 390 395 400
 Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405
 <210> 3
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hominis
 <400> 3
 Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
 20 25 30
 Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45

10

20

30

PHOB0063.ST25.txt

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Gln Ser Phe Val Lys Ile
 50 55 60
 Met Lys Asp Arg Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala
 65 70 75 80
 Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Lys Ala Ala Lys Glu Glu Phe Ile Glu
 85 90 95
 Thr Phe Leu Glu Glu Thr Val Pro Val Leu Thr Glu Ala Asn Lys Lys
 100 105 110
 Ala Val Arg Ala Phe Leu Leu Ser Lys Pro Thr His Glu Met Val Glu
 115 120 125
 Phe Met Met Ser Gly Ile Thr Lys Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ser Glu
 130 135 140
 Asn Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp
 145 150 155 160
 Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Phe Met Arg Tyr
 165 170 175
 Ile Val Arg Arg Glu Thr Leu Phe Ala Arg Phe Val Phe Arg Asn
 180 185 190
 His Pro Lys Leu Val Lys Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Met Lys
 195 200 205
 Met Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Glu Thr Leu
 210 215 220
 Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Asp Thr Ile Thr Leu Leu
 225 230 235 240
 Ala Lys Asn Ile Lys Ala Asn Lys Glu Val Glu Phe Lys Arg Ile Val
 245 250 255
 Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp
 260 265 270
 Leu Thr Met Leu Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala Asn
 275 280 285
 Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala Glu
 290 295 300
 Pro Gln Pro Gln Leu Asn Gly Leu Pro Leu Asp Lys Leu Leu Ala Ser
 305 310 315 320
 Ile Ile Asn Lys Glu Pro Val Leu Ile Pro Ile Gly Gly Ala Gly Ala
 325 330 335
 Thr Glu Met Glu Ile Ala Arg Glu Thr Asn Phe Asp Gly Thr Asn Tyr
 340 345 350
 Leu Ala Ile Lys Pro Gly Leu Val Ile Gly Tyr Asp Arg Asn Glu Lys
 355 360 365
 Thr Asn Ala Ala Leu Lys Ala Ala Gly Ile Thr Val Leu Pro Phe His
 370 375 380
 Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met
 385 390 395 400
 Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp

10

20

30

PHOEB0063.ST25.txt

405

<210> 4
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma hominis

<400> 4

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
 20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Gln Ser Phe Val Lys Ile
 50 55 60

Met Lys Asp Arg Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala
 65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Lys Ala Ala Lys Glu Glu Phe Ile Glu
 85 90 95

Thr Phe Leu Glu Glu Thr Val Pro Val Leu Thr Glu Ala Asn Lys Glu
 100 105 110

Ala Val Arg Ala Phe Leu Leu Ser Lys Pro Thr His Glu Met Val Glu
 115 120 125

Phe Met Met Ser Gly Ile Thr Lys Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ser Glu
 130 135 140

Asn Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp
 145 150 155 160

Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Phe Met Arg Tyr
 165 170 175

Ile Val Arg Arg Arg Glu Thr Leu Phe Ala Arg Phe Val Phe Arg Asn
 180 185 190

His Pro Lys Leu Val Lys Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Met Lys
 195 200 205

Met Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Glu Thr Leu
 210 215 220

Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Asp Thr Ile Thr Leu Leu
 225 230 235 240

Ala Lys Asn Ile Lys Ala Asn Lys Glu Val Glu Phe Lys Arg Ile Val
 245 250 255

Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp
 260 265 270

Leu Thr Met Leu Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala Asn
 275 280 285

Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala Glu
 290 295 300

Pro Gln Pro Gln Leu Asn Gly Leu Pro Leu Asp Lys Leu Leu Ala Ser
 305 310 315 320

Ile Ile Asn Lys Glu Pro Val Leu Ile Pro Ile Gly Gly Ala Gly Ala
 325 330 335

Thr Glu Met Glu Ile Ala Arg Glu Thr Asn Phe Asp Gly Thr Asn Tyr
 340 345 350

Leu Ala Ile Lys Pro Gly Leu Val Ile Gly Tyr Asp Arg Asn Glu Lys
 355 360 365

Thr Asn Ala Ala Leu Lys Ala Ala Gly Ile Thr Val Leu Pro Phe His
 370 375 380

Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met
 385 390 395 400

Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405

10

20

30

40

【図1】

FIG 1. 野生型イコガラシアキレス (*Mycoplasma hominis*) に由来するアミノ酸配列

M. hominis ADI	MSVFDKSFNGHVVSEIGELETVL VHEPGREIDYITPARLDLFLSALESIDARKEHQ	60
M. hominis ADI	FYKIMKDRGIVNVVELTDVAETYDLSKAAKEEFIEETVPLTEANKKAVRAFLS	120
M. hominis ADI	KPTHEMVEFIMMSGITKYELGVESENELIVDPMPNLYFTRDFAST/GNGVTHFMRYVRR	180
M. hominis ADI	RETLFARIVFRNHPKLVKTPWYYPDAMKMPBEGDVFYNNETL VGVSERTDLDTILL	240
M. hominis ADI	AKNIKANKEVEKRVIAINVPKWTNLMLHDWTMLDKNKFELYSPANDYFKFWDYDLYN	300
M. hominis ADI	GGAEPOPQLINGPLDKLKLASHNKEPVLPPIGGAGATEMEIARETINFGTNYLAIPGLV	360
M. hominis ADI	IGYDRNEKTNAAALKAAAGTVLPFHGNQLSLGMGNACRMSMPLSRKDVKW	409

【図2】

FIG 2. アイコガラシアキレス (*Mycoplasma hominis*) に由来する変異されたアミノ酸配列

ADI E112, S210	MSVFDKSFNGHVVSEIGELETVL VHEPGREIDYITPARLDLFLSALESIDARKEHQ	60
ADI E112, S210	FYKIMKDRGIVNVVELTDVAETYDLSKAAKEEFIEETVPLTEANKAVERAFLS	120
ADI E112, S210	KPTHEMVEFIMMSGITKYELGVESENELIVDPMPNLYFTRDFAST/GNGVTHFMRYVRR	180
ADI E112, S210	RETLFARIVFRNHPKLVKTPWYYPDAMKMSIEGDVFYNNETL VGVSERTDLDTILL	240
ADI E112, S210	AKNIKANKEVEKRVIAINVPKWTNLMLHDWTMLDKNKFELYSPANDYFKFWDYDLYN	300
ADI E112, S210	GGAEPOPQLINGPLDKLKLASHNKEPVLPPIGGAGATEMEIARETINFGTNYLAIPGLV	360
ADI E112, S210	IGYDRNEKTNAAALKAAAGTVLPFHGNQLSLGMGNACRMSMPLSRKDVKW	409

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02 (2006.01) A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 35/04 (2006.01) A 6 1 P 35/04

(72)発明者 クラーク,マイク・エイ
アメリカ合衆国ケンタッキー州40502レキシントン・スコピルロード1276

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第98/033519 (WO, A1)
国際公開第98/035026 (WO, A1)
国際公開第98/051784 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

BIOSIS/WPIDS(STN)
PubMed
CA/REGISTRY(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq