

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第1部門第1区分
【発行日】平成17年1月13日(2005.1.13)

【公表番号】特表2000-511424(P2000-511424A)

【公表日】平成12年9月5日(2000.9.5)

【出願番号】特願平9-543045

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

C 0 7 K 14/79

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/02

// A 6 1 P 31/04

A 6 1 K 38/00

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 14/79

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 5/00 B

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 31/00 6 3 1 C

C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91

【手続補正書】

【提出日】平成16年5月27日(2004.5.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

手続補正書

平成16年 5月27日



特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成09年特許願第543045号

2. 補正をする者

氏名(名称) ベイラー カレッジ オブ メディシン

3. 代理人

住所

〒540-0001

大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル

青山特許事務所

電話 06-6949-1261 FAX 06-6949-0361

氏名

弁理士 (6214) 青山 葆



4. 補正対象書類名 明細書および請求の範囲

5. 補正対象項目名 明細書および請求の範囲

6. 補正の内容
別紙の通り。

明 細 書

ラクトフェリン変異体およびその使用

I. 発明の分野

本発明は一般的にラクトフェリン関連糖タンパク質に関する。より詳しくは、本発明はラクトフェリン変異体およびその部位、その産物および使用に関する。

II. 本発明の背景

ラクトフェリンは非ヘム鉄結合糖タンパク質のトランスフェリンファミリーの一員であり (アイセン (Aisen) ら、1980、Ann. Rev. Biochem. 49: 357-393)、このファミリーは血液中の主要な鉄輸送タンパク質であるトランスフェリン (マクギリブレイ (MacGillivray) ら、1983、J. Biol. Chem. 258: 3543-3553)、鳥類卵白タンパク質であるオボトランスフェリン (Jeltsch) ら、1982、Eur. J. Biochem. 122: 291-295) およびヒトメラノサイトで見出されたこのファミリーの膜結合形態であるメラノトランスフェリン (ローズ (Rose) ら、1986、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1261-1265) を含む。ラクトフェリンは広範に分布し、体表面を覆う外分泌 (マッソン (Masson) ら、1971、Comp. Biochem. Physiol. 39: 119-129; ヘンナルト (Hennart) ら、1991、Am. J. Clin. Nutr. 53: 32-39; マッソンら、1966、Clin. Chim. Acta. 14: 735-739; ペンテコスト (Pentecost) ら、1987、J. Biol. Chem. 262: 10134-10139; ユ (Yu) ら、1993、Biochem. J. 296: 107-111) および好中球の活性化により血流に放出されることができる多形核好中球の二次的顆粒 (マッソンら、1969、J. Exp. Med. 130: 643-658) の両者に存在する。ラクトフェリンに提起される機能は、鉄結合および小腸への運搬 (フランソン (Fransson) ら、1980、J. Pediatrics 96: 380-384); アイアー (Iyer) ら、1993、Eur. J. Clin. Nutr. 47: 232-241; コックス (Cox) ら、1979、Biochem. Biophys. Acta. 558: 129-141; フ (Hu) ら、1988、Biochem. J. 249: 435-4

41 ; ギスラソン (Gislason) ら、1995、J. Pediatr. Gastroent. Nutr. 21 : 37-43) ; ミコガミ (Mikogami) ら、1994、Am. J. Physiol. 267 : G1-G8 ; ウォード (Ward) ら、1995、Biotechnology 13 : 498-503)、広範囲のグラム陰性およびグラム陽性細菌に対する抗微生物活性 (オラム (Oram) ら、1968、Biochem. Biophys. Acta. 170 : 351-365 ; アーノルド (Arnold) ら、1977、Science 197 : 263-265 ; エリソン (Ellison) ら、1988、Infect. Immun. 56 : 2774-2781 ; ベラミー (Bellamy) ら1992、Biochem. Biophys. Acta. 1221 : 130-136 ; ヤマウチ (Yamauchi) ら、1993、Infect. Immun. 61 : 719-728)、細胞増殖促進 (ハシズメ (Hashizume) ら、1983、Infect. Immun. 763 : 377-382 ; ニコラス (Nichols) ら、1989、Blood 1987、Pediatr. Res. 21 : 563-567)、骨髓造血の調節 (サワツキー (Sawatzki) ら、1989、Blood Cells 15 : 371-375 ; ブロキシメイヤー (Broxmeyer) ら、1986、Blood Cells 13 : 31-48 ; ズカリ (Zucali) ら、1979、Blood 54 : 951-954)、および免疫調節特性 (マッキニッキ (Machnicki) ら、1993、Int. J. Exp. Path. 74 : 433-439 ; クラウチ (Crouch) ら、1992、Blood 80 : 235-240 ; ザグルスキー (Zagulski) ら、1989、Br. J. Exp. Pathol. 70 : 697-704) を含む。

ラクトフェリンはトランスフェリンファミリーの他の成員と高度の構造ホモロジーを共有する。これらのタンパク質のすべては80kDaより低い分子量を有するモノマー糖タンパク質である。アイセンら、1980、Ann. Rev. Biochem. 49 : 357-393 ; メッツ-ブティック (Metz-Boutique) ら、1984、Eur. J. Biochem. 145 : 659-676。ラクトフェリン (アンダーソン (Anderson) ら、1989、J. Mol. Biol. 209 : 711-734) およびトランスフェリン (リンドレー (Lindley) ら、1988、Biochem. 27 : 5804-5812) の三次元構造はX線結晶構造解析によって正確に定義されている。該タンパク質は該タンパク質のアミノ末端およびカルボキシ末端の半分に対応する2つの小球ローブ (globular lobes) に折り畳まれている。この2ローブ構造

はアミノ末端半分とカルボキシ末端半分の間で40%より低く保存されているが、共通の祖先遺伝子からの遺伝子内重複により進化したと考えられる。ウィリアムズ (Williams) ら、1982、Trends. Biochem. Sci. 7 : 394-397。この各ローブはそれぞれ高親和性で、かつ通常、炭酸イオンである陰イオンの同時結合を伴って鉄に可逆的に結合することができる。アイセンら、1980、Ann. Rev. Biochem. 49 : 357-393。ラクトフェリンによる鉄結合に必要とされるアミノ酸はトランスフェリンファミリーの成員間で高度に保存されている。ベーカー (Baker) ら、1992、J. Inorg. Biochem. 47 : 147-160。ラクトフェリンにおいて、鉄原子は、アミノ末端ローブにおいてAsp 396、Tyr 93、Tyr 193およびHis 254に、カルボキシ末端ローブにおいて対応するAsp 396、Tyr 436、およびTyr 539およびHis 598にそれぞれ結合する。アンダーソンら、1989、J. Mol. Biol. 209 : 711-734。

その構造類似性にも拘わらず、ラクトフェリンは、その対応血清部分であるトランスフェリンよりもはるかに強い鉄結合性を示す。特に、ラクトフェリンからの鉄の放出は、トランスフェリンよりも一層大きなpH安定性を示し、後者は約6～約4のpHの範囲で鉄を放出するが、前者は約4～約2の範囲のpHで鉄を放出する。マズイエー (Mazuier) ら、1989、Biochem. Biophys. Acta. 629 : 399-408。ラクトフェリン独特の鉄結合性は、このタンパク質に提唱される多様な機能的活性の幾つかに貢献していることが示唆されている。ラクトフェリン独特の鉄結合特性に関与する構造的および機能的な特性の解明は、以下に限るものではないが、改良された抗微生物活性のための一層高い鉄親和性を有するラクトフェリン変異体、改良された鉄放出特性を有する一層低い鉄親和性を有するラクトフェリン変異体、または鉄放出への修飾されたpH依存性効率を有するラクトフェリン変異体などを含む改良された特性を有するラクトフェリン変異体のモデリングおよび産生を可能にするであろう。

本発明の出願人は以前、アスペルギルス (*Aspergillus*) を含む繊維状真菌における組換えヒトラクトフェリンの高レベルの産生および特徴付けを報告した。ウォードら、1995、Biotechnology 13 : 498-503；米国特許第5,571,896号、第5,571,619号、第5,571,697号、参照のため

その全体を引用する。明確かつ独特な炭素組成であるにも拘わらず、組換えタンパク質は、鉄および受容体結合性および抗微生物活性を含む生理学的活性に関してヒト母乳ラクトフェリンと区別できない。従って、この発現系が利用できることから、今や、改良された特性を有する変異体を産生するために、このタンパク質の構造／機能上の役割と取り組むのに十分な量でラクトフェリン変異体が産生できる。

III. 発明の要約

本発明は、ラクトフェリン変異体またはその部分（該部分はラクトフェリンの少なくとも1つの鉄結合部位に対応する配列である）をコードする核酸配列に関する。該ラクトフェリン変異体またはその部分は野生型ラクトフェリンに比較される場合に修飾した鉄結合能を有することによってさらに定義される。

部位特異的突然変異誘発を用いて、本発明はラクトフェリンの独特の鉄結合特性への2ローブ（lobe）構造の貢献を明らかにしている。ヒトラクトフェリン cDNAは選択的に該タンパク質の片方の半分かあるいは、両方における鉄結合に関する2つのチロシン残基で変異する。得られた3つの鉄結合欠如変異体をアスペルギルス・アワモリ（*Aspergillus awamori*）中で発現させ、かつアスペルギルス・アワモリから精製した。⁵⁹FeCl₃を用いての鉄結合分析は、いずれか一方のローブへの鉄結合に関与する2つのチロシン残基の変異が、変異したローブの選択的な鉄結合の喪失という結果となることを確認した。さらに、pH依存性鉄放出実験は、ラクトフェリンのこれら2つの半分の異なった鉄結合安定性を示し、カルボキシ末端ローブよりもアミノ末端ローブが酸に対してはるかに安定であった。一層重要なことには、本発明は機能的な鉄結合カルボキシ末端ローブが、野生型ラクトフェリンの特徴であるアミノ末端ローブへの鉄結合のpH安定性に必要であることを示している。これらの結果は、ラクトフェリンの2ローブ間での共同相互作用がこのタンパク質の独特の鉄結合特性に貢献するという結論を支持している。

従って、本発明は例えば鉄に対する増大した親和性または減少した親和性などの修飾した鉄結合特性、または鉄結合のための修飾したpHまたは温度条件または範囲などの改良した鉄結合特性を有するラクトフェリン変異体の産生のための

ガイダンスを提供する。さらに本発明は、鉄結合活性を保持しながら、例えば治療耐性などの他の面で改良された特徴を有するラクトフェリン変異体のモデリングに関するガイダンスを提供する。

第2局面において、本発明はさらに、真核生物細胞におけるラクトフェリン変異体またはその部分の発現に適して、ラクトフェリン変異体またはその部分をコードする核酸を含むベクターに関する。好ましくは、該プラスミドはアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー

(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) およびアスペルギルス・アワモリを含む真菌細胞における発現に適している。

第三の局面において、本発明はさらにそのようなベクターの製造方法および同ベクターを含むトランスフェクションした細胞に関する。多様な真核生物細胞または原核生物細胞におけるラクトフェリンおよびその変異体の製造方法もまた提供する。最後に、本発明は本発明の方法によって製造されたラクトフェリンおよびその変異体に関する。従って、本発明は組換えラクトフェリントタンパク質およびその変異体およびラクトフェリン関連ポリペプチドの製造に効率的かつ経済的である手段を提供する。

IV. 図面の簡単な説明

図1 Aおよび1 Bは、精製した鉄結合欠損ラクトフェリン変異体のウエスタンイムノブロットおよび銀染色分析を示す。

図1 Aは、それぞれ200 ngの精製した組換えヒトラクトフェリン (Rec hLF)、アミノ末端 (MN-2Y)、カルボキシ末端 (MC-2Y) およびアミノ末端およびカルボキシ末端 (MNC-4Y) 鉄結合欠損ラクトフェリン変異体サンプルのウエスタンイムノブロット分析を示す。

図1 Bは、精製Rec hLF、MN-2Y、MC-2YおよびMNC-4Y (各1 μ g) の銀染色SDS-ポリアクリルアミドゲル分析を示す。

図2 A、2 B、2 Cおよび2 Dは、鉄結合欠損ラクトフェリン変異体によるヒト腸内細胞へのビオチン化した組換えラクトフェリンの結合の競合を示す。

図2 A. 鉄飽和ビオチン化組換えヒトラクトフェリン (0.4 μ M) を、未標

識鉄飽和組換えラクトフェリン (Fe-RechLF) またはアポ組換えラクトフェリン (Apo-RechLF) の増大濃度の存在下または不在下で、Caco-2 膜 (300 ng) と共にインキュベートした。ビオチン化ラクトフェリンのCaco-2 膜への結合の阻害をビオチン／アビジンマイクロタイターアッセイを用いて決定した (ウードら、1995、*Biotechnology* 13: 498-503)。

図2B、2Cおよび2D。アポビオチン化組換えヒトラクトフェリン (0.4 μ M) を未標識Apo-RechLFまたはMN-2Y (図2B)、MC-2Y (図2C) またはMNC-4Y (図2D) の増大濃度の存在下または不在下で、Caco-2 膜 (300 ng) と共にインキュベートした。ビオチン化ラクトフェリンのCaco-2 膜への結合の阻害をビオチン／アビジンマイクロタイターアッセイを用いて決定した。該データを平均 $\pm$ —S.E.M. として示す。

図3はラクトフェリンアミノ末端 (MN-2Y)、カルボキシ末端 (MC-2Y) およびアミノ末端およびカルボキシ末端 (MNC-4Y) 鉄結合欠損変異体の鉄飽和分析を示す。鉄不含組換えヒトラクトフェリン (Rech LF)、MN-2Y、MC-2YおよびMNC-4Yを実験手法に記載するようにして鉄と飽和させた。該サンプルに結合した ^{59}Fe を液体シンチレーションカウンティングを用いて定量し、ついでFe／タンパク質モル比を決定した。該データを平均 $\pm$ —S.E.M. として示す。

図4はラクトフェリンアミノ末端 (MN-2Y) およびカルボキシ末端 (MC-2Y) 鉄結合欠損変異体からのpH-依存 ^{59}Fe 放出を示す。 ^{59}Fe 飽和した組換えヒトラクトフェリン (Rech LF)、MN-2YおよびMC-2YをpH 7~2範囲のバッファーに対して透析した。透析後のラクトフェリンサンプルに結合した残存 ^{59}Fe を液体シンチレーションカウンティングによって定量し、ついでFe／タンパク質モル比を決定した。該データを平均 $\pm$ —S.E.M. として示す。

V. 定義

本明細書で一般的に使用される語句は典型的に当業界において使用されている。以下の語句は本明細書で使われる以下の一般的な意味を有すると意図されている：

「ラクトフェリン変異体」なる語句は少なくとも1つのアミノ酸位で天然に存在するラクトフェリンの変異によって産み出されるポリペプチドをいう。

「ベクター」なる語句は、ラクトフェリン変異体またはその部分をコードする核酸の挿入、増殖および／または発現を可能にするプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス、レトロウイルスまたは他のビヒクルを意味する。

「宿主細胞」なる語句はラクトフェリン発現を可能にする細胞を意味する。

「プロモーター」なる語句はラクトフェリン cDNA の転写をコントロールする調節 DNA 配列を意味する。

「形質転換」なる語句は細胞によって異種核酸配列の発現を可能にする取り込みを意味する。

「鉄結合能」は Fe に結合する能力を意味する。完全に機能的なヒトラクトフェリンは、ラクトフェリンの分子当たり 2 つの鉄原子と結合することができる。

「生物学的な活性／生物学的に活性である」なる語句は、鉄を結合する能力、または微生物を殺す能力または微生物の増殖の阻害または鉄輸送タンパク質として機能する能力によって測定されるラクトフェリンの生物学的活性を意味する。

VI. 発明の詳細な説明

A. 概要

本発明は部分的には、タンパク質の鉄結合能力／特性に貢献するラクトフェリンポリペプチドにおけるドメイン、配列および構造の同定に基づく。このように、本発明は、例えば増大した鉄結合能力または減少した鉄結合能力などの修飾した鉄結合特性、または鉄結合のための修飾された pH または温度条件または範囲などの改善された特徴を有するラクトフェリン変異体産生に関するガイダンスを提供する。さらに、本発明はその鉄結合活性を保持しながら、例えば治療上の耐性、分解に対する安定性または免疫応答などの他の改良された特徴を有するラクトフェリン変異体のモデリングのためのガイダンスを提供する。

従って、本発明はラクトフェリン変異体およびその部分をコードする組換え核酸および同組換え核酸を含むベクターに関する。本発明はさらにそのようなベクターの製造方法および同ベクターを有するトランスフェクションした細胞に関する。多様な真核生物細胞または原核生物細胞におけるラクトフェリン変異体およびその部分の製造方法もまた提供する。最後に、本発明は本発明の核酸によってコードされるラクトフェリン変異体およびその部分および／または本発明の方法

によって製造されるラクトフェリン変異体およびその部分に関する。従って、本発明は改良された特徴を有するラクトフェリン変異体またはその部分の設計のためのガイドンスおよびそのようなラクトフェリン変異体およびその部分の効率的かつ経済的な製造手段を提供する。

B. ラクトフェリンの2ローブ性構造の独特の鉄結合特性に対する貢献

本発明において、部位特異的突然変異誘発法を使用してラクトフェリンの2ローブ性構造のこのタンパク質の独特の鉄結合特性に対する貢献を調査した。

とりわけ、ラクトフェリンのいずれか一方のローブまたは両ローブにおける鉄結合に関する2つのチロシンを対応するアラニン残基に変異させて、3つの鉄結合欠損変異体を製造した。これらのラクトフェリン変異体を、野生型タンパク質に関して以前に記載したようにアスペルギルス・アワモリから発現させ、かつ精製した。米国特許第5,571,896号；ウォードら、1995、

Biotechnology 13 : 498-503。銀染色、ウエスタンイムノブロットおよび腸内受容体結合分析によって決定されたように、これらのラクトフェリン変異体の大きさ、免疫応答性および機能的活性は野生型組換えヒトラクトフェリンに類似であり、該アミノ酸置換が該タンパク質に対して何ら有害な作用を及ぼさないことを示す。⁵⁹FeCl₃を用いた鉄飽和分析は、そのままのカルボキシ末端鉄結合ローブを有するラクトフェリン変異体が、鉄とタンパク質の期待された1:1の比率で飽和するが、そのままのアミノ末端鉄結合機能を有する変異体は、一貫して1:1より低い比率で飽和したことを示し、これはこのラクトフェリン変異体の鉄結合安定性がpH 7.0で減少することを示唆している。さらに、鉄結合実験は、両ローブにおけるチロシン残基の変異は完全タンパク質の鉄結合能力を有効に破壊することを示す。VII. A、VII. CおよびVII. Dの章を参照。

本明細書で開示されるように、変異していないローブからのpH依存鉄放出実験はラクトフェリンのアミノ末端ローブおよびカルボキシ末端ローブに対する鉄結合安定性が類似ではないことを示している。そのままのカルボキシ末端鉄結合機能を含むラクトフェリン変異体からの鉄放出は天然のラクトフェリンで観察されるものと類似である。対照的に、そのままのアミノ末端鉄結合部位を有するラクトフェリン変異体はpH 7~5の間の鉄結合タンパク質すべてを放出するのに

一層酸に対する不安定性を有する。従って、これら2ローブ間の全体的な構造ホモロジー(40%)にもかかわらず、ラクトフェリンのアミノ末端ローブとカルボキシ末端ローブは鉄結合のpH安定性において異なっていることを証明している。さらに、鉄結合カルボキシ末端ローブは、野生型タンパク質の特徴であるアミノ末端ローブへの鉄結合の安定性を付与するために必要である。

ラクトフェリンのアミノ末端ローブおよびカルボキシ末端ローブに対する鉄結合の不均等が以前に報告されている。マズイエーら、1989、*Biochem. Biophys. Acta.* 629: 399-408; デイ (Day) ら、1992、*J. Biol. Chem.* 167: 13857-13862; シマザキ (Shimazaki) ら、1993、*J. Dairy Sci.* 76: 946-955。ヒトラクトフェリンのクローニングしたアミノ末端断片を用いた実験(デイら、1992、*J. Biol. Chem.* 167: 13857-13862) およびウシラクトフェリンにタンパク質分解的に由来のカルボキシ末端断片(シマザキら、1993、*J. Dairy Sci.* 76: 946-955)を用いた実験は本発明において報告されるように鉄結合のpH依存性において同様の差異を示した。しかしながら、以前の報告はカルボキシ末端ローブまたはその部分がアミノ末端ローブ鉄結合機能を安定させるために必要であることを示したが、これらの実験はカルボキシ末端ローブの構造的な存在または機能的なカルボキシ末端の鉄結合活性が、アミノ末端ローブへの鉄結合の安定化に必要なか否かが決定されていないため限界があった。本発明はこれらの実験を拡張するものであり、主として機能的なカルボキシ末端ローブによって駆動される協同的相互作用が鉄結合安定化に必要であることを示している。

トランスフェリンファミリーの進化における2ローブ構造の選択に関するバイアスは未知である。本開示はラクトフェリンの場合におけるこの選択に関する機能的な論理的根拠を提供する。このように、本発明は2ローブ構造の進化が、ラクトフェリンの独特の機能的活性に影響を及ぼすと思われる独特の鉄結合特性をこのタンパク質に付与したことを示す。興味深いことに、トランスフェリンは、このタンパク質およびタンパク質分解に由来するアミノ末端断片のpH依存性の鉄放出特性が類似であることを示す点でラクトフェリンと異なっている。マズイエーら、1989、*Biochem. Biophys. Acta.* 629: 399-408; リンバッ

クージンズ (Lineback-Zins) ら、1980、J. Biol. Chem. 255: 708-713。これらの知見は、トランスフェリンの2ローブ間の協同性の欠如が、このタンパク質の特徴的に弱い鉄結合安定性を説明する重要な要因であることを示唆する。本明細書に記載した研究と併せ考えると、ラクトフェリンおよびトランスフェリンの異なる鉄結合特性が少なくとも部分的には、増加した酸安定性およびアミノ末端ローブとの協同的機能を有して2ローブタンパク質の特徴であるpHの安定性を本ローブに付与する、ラクトフェリンのカルボキシ末端鉄結合ローブの進化によるものであることを示唆している。

C. ラクトフェリン変異体

該タンパク質の鉄結合特性に貢献しているラクトフェリンポリペプチドにおけるドメイン、配列および構造の同定に基づき、本発明は、修飾した鉄結合能力を有する新規のラクトフェリン変異体またはその部分の設計および産出のガイダンスを提供する。典型的には本発明のラクトフェリン変異体は、以下に限るものではないが、改良された抗微生物活性のために一層高い鉄親和性を有するラクトフェリン変異体、改良された鉄放出特性を有する一層低い鉄親和性を有するラクトフェリン変異体または鉄結合および／または鉄放出のための修飾したpHまたは温度条件または範囲を有するラクトフェリン変異体を含む改良された特性を有する。さらに、本発明は、鉄結合能を保持しながら例えば治療上の耐性、免疫応答性または生物学的半減期などの他の改良された特性を有するラクトフェリン変異体の設計を可能にしている。

本発明のラクトフェリン変異体は、以下に限るものではないが、ヒト、マウス、ラット、ウシおよびブタラクトフェリンを含む多様な哺乳類の野生型ラクトフェリン由来であってよい。該野生型ラクトフェリンは一般に公知である多様な方法によって変異されてよい。とりわけ、サンプブルック (Sambrook) ら、1990、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular cloning: a laboratory manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、ニューヨーク；クンケル (Kunkel) ら、1987、Meth. Enzymol. 154: 367-382；クンケル、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492参照。

好ましい態様において、該ラクトフェリン変異体は、少なくとも1つの鉄結合部位に影響を及ぼす少なくとも1つの変異を含む。そのような鉄結合部位は、野生型ラクトフェリンに比較して改変した鉄結合特性を有してよい。例えば、鉄に対する親和性は増加または減少してよい。さらに、鉄に対する親和性は改変したpH範囲の特徴を示してよい。あるいは、該鉄結合部位はラクトフェリン変異体またはその部分が全く鉄と結合しないように修飾されてよい。

他の態様において、該ラクトフェリン変異体は、その生物学的活性を保持しながらラクトフェリンの治療上の耐性、生物学的安定性または免疫耐性の修飾に影響を及ぼす少なくとも1つの変異を含む。

D. ラクトフェリン変異体の発現および産生

ラクトフェリン変異体をコードする本発明の核酸配列は、ラクトフェリン変異体の発現を可能にするような方法で真核生物細胞においてその発現に適しているベクターに挿入してよい。代わりに、本発明のラクトフェリン変異体の部分をコードする核酸配列は真核生物細胞における発現を可能にするベクターに挿入してよい。好ましくは、ラクトフェリン変異体の部分は、修飾されていてもよい少なくとも1つの鉄結合部位を含む。

好ましい態様において、ラクトフェリンは組換え発現系において産生される。とりわけ、ウォードら、1992、Biotechnology 10: 784-789; ウォードら、1995、Biotechnology 13: 498-503参照。この目的のため、所望の形態のラクトフェリンをコードする核酸（例えば、米国特許第5,571,691号（参照のためその全体を引用する）参照）は、細胞宿主において発現可能に組み込まれ、ついで該細胞宿主は特定のペプチドまたはタンパク質の発現に適切な条件下で培養される。多様な遺伝子発現系がこの目的に適合し、典型的に選択された宿主によって天然で使用する発現調節配列から所望の遺伝子の発現を駆り立てる。

本発明のラクトフェリン変異体は、天然に存在するラクトフェリンのように典型的には、いくつかのアミノ酸残基でのグリコシル化などの翻訳後修飾を必要とするので、多くのラクトフェリン変異体またはその部分は真核生物宿主中で産生されることが必要である。好ましい態様において、ラクトフェリン産物は、ウォ

ードら、1992、Gene 122: 219-223; および米国特許第5,571,896号および5,571,697号(参照のためその全体を引用する)に記載されるように、アスペルギルス発現系によって製造される。

ラクトフェリン変異体またはその部分のグリコシル化されていない形態が製造される場合は、しかしながら、その産物は例えば大腸菌などの細菌宿主において便利に達成できる。そのような産生のため、選択されたラクトフェリン変異体またはその部分をコードする核酸は、例えば大腸菌のlac、trpまたはPL遺伝子の発現制御下に有効に置くことができる。

ラクトフェリン変異体またはその部分をコードする核酸自体の発現の代わりとして、該宿主は、ラクトフェリン産物が発現産物の単離および安定性を容易にする担体タンパク質と放出可能に結合した融合タンパク質としてラクトフェリン産物を発現するよう適合させることができる。

さらに別法において、該ラクトフェリン変異体またはその部分は有機合成によって生成することができる。特にラクトフェリン変異体の部分、例えば約20～約50アミノ酸長のペプチドなどの産生を目的とする場合には、好ましくは自動化されたペプチド合成の充分に確立された技術が使用され、その一般的な記載は、例えば、ステュワート (J. M. Stewart) およびヤング (J. D. Young)、ソリッド・フェイス・ペプチド・シンセシス (Solid Phase Peptide Synthesis)、第2版、1984、ピアス・ケミカル・カンパニー (Pierce Chemical Company)、ロックフォード (Rockford)、イリノイ; およびボダンスキー (M. Bodanszky) およびボダンスキー (A. Bodanszky)、ザ・プラクティス・オブ・ペプチド・シンセシス (The Practice of Peptide Synthesis)、1984、スプリンガー・フェアラーク (Springer-Verlag)、ニューヨーク; アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 430A ユーザーズ・マニュアル、1987、ABI Inc. フォスター・シティー、カリフォルニア; およびソリッド・フェイス・ペプチド・シンセシス—ア・プラクティカル・アプローチ (A Practical Approach)、アザートン (E. Atherton) およびシェパード (R. C. Sheppard)、IRLプレス、オックスフォード (1989)に見出される。これらの技術において、ラクトフェリン変異体の部分は、FmocまたはtBocプロトコールのいずれかを

用いて適切に保護したアミノ酸を順に付加することによって、そのC-末端の樹脂結合残基から伸長される。

E. 応用

本発明のラクトフェリン変異体は広範囲な多様な応用に使用することができる。

例えば、改良された鉄結合能力を有するラクトフェリン変異体またはその部分は、ヒトまたは動物の食物に添加するか、点眼剤、点鼻剤、コンタクトレンズおよび他の眼球ケア溶液、局所的皮膚ケア製品、口内洗浄剤、チューインガムおよび歯磨き粉に添加して、感染の治療を含む抗菌的応用に使用できる。

修飾されたpHまたは温度条件を有するラクトフェリンまたはその部分もまた上記の応用に関して有用である。それらはさらに、増強または修飾された鉄輸送および送達のための治療上の添加物として使用されてよい。

ラクトフェリン変異体およびその部分の他の応用は、1997年4月10日に出願された代理人整理番号8206-041-888、継続中の分割出願（参照のためその全体を引用する）において記載されているように炎症性皮膚疾患の治療を含む。

上記で指摘した応用の多く（例示として理解されなければならない）に対し、改良された治療耐性、修飾した生物学的安定性または免疫寛容を有するラクトフェリン変異体およびその部分は特に好ましい。

F. 医薬製剤および投与経路

治療上の利用のため、選択したラクトフェリン変異体またはその部分は、個々の治療剤としてかまたは治療剤の組み合わせとして、医薬と組み合わせての使用に利用可能な通常的手段によって投与することができる。各々は単独で投与することができるが、一般的には選択された投与経路および標準的な製剤実務に基づいて選択した製薬学的担体と共に投与される。本発明の医薬組成物は経口、非経口、局所または直腸投与または吸入に適合させることができ、製剤分野の当業者によく知られた仕方で単位用量形態であってよい。非経口投与には以下に限るものではないが、皮下注入、静脈内、腹腔内または筋肉内投与を含む。

活性成分での治療は、治療されるべき徴候、例えば感染徴候または皮膚障害、例えば乾癬、接触性皮膚炎、UV誘発性炎症、乳児のオムツかぶれ、喘息、関節

炎などが診断された後ならいつでも開始してよい。治療は、最初の段階で多大な感染または炎症を予防するために、予防的または疾患の初期に開始されるのが好ましい。典型的に、治療は疾患が治癒するまで続けられる。感染、喘息または関節炎などの慢性疾患の場合またはアレルゲンに持続的にさらされた場合には、治療は徴候の治癒を越えて拡張されなければならない。

投与量はもちろん、(1) 特定のラクトフェリン産物の薬物動態的特徴およびその様式および投与経路、(2) レシピエントの年齢、健康状態、背丈および体重、(3) 徴候の特性および範囲、(4) 同時に行っている治療の種類、(5) 治療の頻度および(6) 望まれる効果などの既知の要因に依存して変化する。活性成分の一日用量は上記の要因に依存して当業者によって決定されることができる。

活性成分は、吸入として、または例えば炎症を起こした関節や軟骨への注射として局所的に投与してよい。しかしながら、代わりにラクトフェリン変異体は、硬ゼラチンカプセルまたは軟ゼラチンカプセル、錠剤または粉末剤などの固形または半固形の剤型にて、またはエリキシル剤、シロップまたは懸濁液などの液体剤型にて局所的に投与することができる。また非経口的に無菌液体剤型にて投与することもできる。パッチ剤または軟膏または経皮投与などの他の剤型も潜在的に可能である。

本発明のラクトフェリン変異体はまた、ラクトフェリン産物の延長されたかつ持続的な徐放性埋め込みデバイスとしての製剤であってもよい。そのような持続性徐放性製剤には、ポリ(乳酸)、ポリ(乳酸-グリコール酸 (lactic-co-glycolic acid)、メチルセルロース、ヒアルロン酸、コラーゲンなどの生体適合性ポリマーの複合体を含む。ドラッグデリバリービヒクルにおける分解可能なポリマーの構造、選択および使用は、ドーム (A. Comb) ら、ポリマーズ・フォー・アドバンスド・テクノロジーズ (Polymers for Advanced Technologies)

3:279-292 (1992) を含むいくつかの刊行物において概説されている。医薬製剤においてポリマーを選択および使用するうえでのさらなるガイダンスは、チェイシン (M. Chaisin) およびランガー (R. Langer) 編、「バイオデグラダブル・ポリマーズ・アズ・ドラッグ・デリバリー・システムズ

(Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems)」、「ドラッグズ・アンド・ザ・ファーマシューティカル・サイエンスイズ (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)」第45巻、デッカー (M. Dekker)、ニューヨーク、1990のテキストにおいて見出すことができる。リポソームを使用してラクトフェリン変異体またはその部分の徐放を提供することもできる。目的薬剤のリポソーム製剤の使用法および製造法に関する詳細は、とりわけ、米国特許第4,944,948号、米国特許第5,008,050号；米国特許第4,921,706号；米国特許第4,927,637号；米国特許第4,452,747号；米国特許第4,016,100号；米国特許第4,311,712号；米国特許第4,370,349号；米国特許第4,372,949号；米国特許第4,529,561号；米国特許第5,009,956号；米国特許第4,725,442号；米国特許第4,737,323号；米国特許第4,920,016号に見出すことができる。徐放性製剤は局所的に高濃度のラクトフェリン変異体が提供されるのが好ましい場合、例えば、関節炎の関節においてまたは局所的な皮膚炎症などに提供されるのが好ましい場合に特に重要である。

ゼラチンカプセルまたは液体を充填した軟ゼラチンカプセルは、活性成分およびラクトース、レシチンスターチ、セルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸などの粉末化しているかまたは液体の担体を含んでいてよい。同様の希釈剤は打錠剤の製造に使用することができる。錠剤およびカプセルの両者は、一定の時間をかけて薬物の持続的放出を提供するために徐放性産物として製造することができる。打錠剤は糖衣またはフィルムコートすることによってどんなに不快な風味も覆うことができ、空気から錠剤を保護することができ、または消化管における選択的な崩壊のため腸溶コートすることができる。経口投与のための液体剤型は、患者の受容を高めるために着色剤および／または香味剤を含有することができる。

適当な製薬学的担体はさらに、レミントンズ・ファーマシューティカル・サイエンスイズ (Remington's Pharmaceutical Sciences)、第17版、マック・パブリッシング・カンパニー (Mack Publishing Company)、イーストン、ペンシルバニア (1990) なる、本分野において標準的な参照テキスト (参照のため本

明細書にその全体を引用する)に記載されている。

以下の実施例は本発明をより詳細に説明する。以下の調製例および実施例は当業者が本発明を一層明確に理解し、かつ実施できるように与えられる。本発明はしかしながら、例示された態様によって本発明の範囲を制限されるものではないし、その例示態様は本発明の一側面の例示を意図するだけであり、かつ機能的に同等の方法は本発明の範囲内にある。事実、本明細書に記載されたものに加えて、本発明の多様な改変が上記の記載および添付の図面から当業者には明らかであろう。そのような改変は添付のクレームの範囲内に含まれると意図されている。

VII. 実施例

A. 材料と方法

p P L F-26、ユニバーサルアスペルギルス・アワモリ発現ベクターの構築：

アスペルギルス・アワモリにおけるラクトフェリン製造のための、発現ベクター p P L F-19 の構築は以前に記載されている。ウォードら、1995、*Biotechnology* 13 : 498-503 ; 米国特許第5,571,896号。ラクトフェリン変異体をコードする c D N A のクローニングのための唯一のサイトを含む発現ベクターの構築のため、p P L F-26 を製造した。端的には、p P L F-18 (ウォードら、1995、*Biotechnology* 13 : 498-503) を SphI で消化し、3.3 Kb および 4.4 Kb の 2 つの断片を産生した。ラクトフェリン c D N A を含むその 3.3 Kb の SphI 断片を SphI 消化した pALTER (プロメガ (Promega)、マジソン、ウィスコンシン) にサブクローニングして p L F 18 sp. Alt を産生した。その 4.4 Kb の SphI 断片を再度ライゲートして P R 18.2 を産生した。市販の pALTER キット (プロメガ、マジソン、ウィスコンシン) を用いるイン・ビトロ突然変異誘発を使用して、p L F 18 Sp. Alt 中の成熟ラクトフェリン c D N A の開始部に NotI 制限酵素部位を導入して pNot. 9 を産生した。突然変異誘発に使用した 5' リン酸化オリゴヌクレオチドは以下のとおりである：

5' AGCGCGGCCG CAGGAGAAGGA 3' [配列番号：1]

P R 18.2 を EcoRI で消化し、得られた 2 つの断片を DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片を用いて修復し、正しい方向に再度ライゲーションした。得られたプラスミド P ▲ E 12 を SphI で消化し、ついで pNot. 9 からの 3.3 Kb の SphI 断片と

ライゲーションしてpPLF-25を産生した。PL03は β -チューブリンプロモーターの制御下でフレオマイシン耐性遺伝子をコードするものであるが (Gatignolら、1987, Mol. Gen. Genet. 207: 342-348)、EcoRIで消化し、得られた断片をDNAポリメラーゼIのクレノウ断片を用いて修復し、正しい方向に再度ライゲーションした。得られたベクターPL03 Δ R1をHindIIIで消化し、ついで得られた2.3 Kb断片をHindIII消化したpPLF-25中にラクトフェリンcDNAと同方向にサブクローニングしてpPLF-26を産生した。

ラクトフェリンの鉄結合欠損変異体、MN-2Y、MC-2YおよびMNC-4Yの構築：

NotI部位をpALTERに導入するため、EcoRI/BamHI末端を有する合成5'リン酸化オリゴヌクレオチドを生成した。これらオリゴヌクレオチドの配列は以下のとおりであった。最初の (top) 鎖は

5'GATCCATGCGGCCGCATG 3' [配列番号：2]。

最後の (bottom) 鎖は

5'AATTCATGCGGCCGCATG 3' [配列番号：3]。

オリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、EcoRI/BamHI消化したpALTERにライゲーションしてpALTLinkを産生した。pLF-26をNotI/EcoRIで消化し、ついで得られた2.1 Kb断片含有ヒトラクトフェリンcDNAをNotI/EcoRI消化したpALTLinkにサブクローニングした。得られたプラスミドpALT_hLFを使用し、続いて突然変異誘発実験を行った。アミノ末端ローブ (Tyr 93、Tyr 193)、カルボキシ末端ローブ (Tyr 436、Tyr 529) およびアミノ末端およびカルボキシ末端ローブ (Tyr 93、Tyr 193、Tyr 436およびTyr 529) のラクトフェリンによる鉄結合に関与するチロシン残基をpALTERキットを用いたイン・ビトロ突然変異誘発により対応するアラニン残基に変換した。突然変異誘発に使用した5'リン酸化オリゴヌクレオチドは以下のとおりであった。

Tyr 93 $\rightarrow$ Ala 93: 5' CACAGCCACGGCATAAGCGTGAGTTCGTGGCTG 3'
[配列番号：4]；

TYR 193 $\rightarrow$ Ala 193: 5' CTTGAAGGCACCAGAGGCGCTGAAGTACGGTTC 3'
[配列番号：5]；

Tyr 436 → Ala 436: 5' CACCGCCACAGCAAGGGCTCCTTCCACAGGTCT 3'

[配列番号：6]；

Tyr 529 → Ala 529: 5' CCGGAAAGCCCCAGTGGCGCCGTAGTATCTCTC 3'

[配列番号：7]；

得られたプラスミド、pALTMN-2Y、pALTM-2YおよびpALTMNC-4YをNotI/EcoRIで消化し、ついでNotI/EcoRI消化したpPLF-26にサブクローニングして、アスペルギルス真菌菌体でのラクトフェリンの発現に適した発現プラスミド、すなわちp26MN-2Y、p26MC-2Yおよびp26MNC-4Yを産生した。すべてのオリゴヌクレオチド配列および構築結合物を、市販のシークエナーゼ・バージョン2.0キット (Sequenase Version 2.0 kit) (ユナイテッド・ステイツ・バイオケミカル・コーポレイション (United States Biochemical Corporation)、クリーブランド、オハイオ) を用いてシーケンシングした。

MN-2Y、MC-2YおよびMNC-4Yの発現および精製：

アスペルギルス・アワモリ発現ベクターである、p26MN-2Y、p26MC-2Yおよびp26MNC-4Yをアスペルギルス・アワモリに形質転換し、得られた形質転換体を以前に記載したようにして7日間培養した。ウォードら、1995、Biotechnology 13：498-503。その培地をELISAアッセイを用いて鉄結合変異体に関してスクリーニングした。ビジャ (Vija) ら、1985、J. Immunol. Meth. 76：73-83。陽性の培養物 (>50mg/l) を2リットルフラスコで7日間培養し、ついでそのラクトフェリン変異体をCM-セファデックス (CM-Sephadex) を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。ウォードら、1995、Biotechnology 13：498-503。そのタンパク質を0.1Mのクエン酸に対して透析し、ついでH₂Oおよび5mMリン酸ナトリウム、pH 7.5 (3g) に対して十分に透析した。

受容体結合アッセイ：

受容体結合アッセイを本質的に記載されたようにして、8日齢Caco-2可溶化膜 (300ng) を用いて、ビオチン/アビジンマイクロリットルプレートアッセイ (レジマン (Rejiman) ら、1994、Int. J. Biochem. 26：201-206) により行った。ウォードら、1995、Biotechnology 13：498-50

3。

ラクトフェリン変異体に対する鉄結合の鉄飽和およびPH安定性：

MN-2Y、MC-2YおよびMNC-4Y (5 mg) を4倍の過剰量の $\text{FeCl}_3 : ^{59}\text{FeCl}_3 : \text{NTA}$ (400 : 1 : 8) とインキュベートした。ウォードら、1995、*Biotechnology* 13 : 498-503。そのサンプルを室温で30分間インキュベートした。そのサンプルをNAP-10カラム (ファルマシア、ピスカタウェイ、ニュージャージー) を通して精製し、続いてラクトフェリン変異体に非特異的に結合した任意の鉄を除去するために0.05M Tris/HCl、0.2M NaCl、pH7.0に対して12時間の透析を行った。透析後にラクトフェリン変異体に結合した鉄を液体シンチレーションカウンティングにより定量した。ウォードら、1995、*Biotechnology* 13 : 498-503。

B. 実施例1：ラクトフェリンのアミノ末端およびカルボキシ末端ドメインにおける鉄結合欠損変異体の発現および精製

2つのドメイン構造のラクトフェリン独特の鉄結合特性への貢献を調べるために、部位特異的突然変異誘発法を使用して、タンパク質のいずれか一方のローブまたは両方のローブにおいて欠損しているタンパク質をコードするヒトラクトフェリンcDNAに変異を生成した。

詳細には、Tyr 93、Tyr 193をAla 93、Ala 193に変異させて、ラクトフェリンのアミノ末端半分において鉄を結合することができない変異体を産生させた (MN-2Y)。ラクトフェリンのカルボキシ末端半分における対応チロシン残基 Tyr 436、Tyr 529をアラニン残基に変換して、カルボキシ末端ドメインの鉄結合機能を不活性化した (MN-2Y)。ラクトフェリンによる鉄結合に関与する4つのチロシン残基 (すなわちTyr 93、Tyr 193、Tyr 436およびTyr 529) 全ても対応のアラニン残基に変異させて、ラクトフェリンの両方のローブにおいて鉄結合が可能ではない変異体を得た (MNC-4Y)。

これらラクトフェリン変異体を組換えヒトラクトフェリンに関して以前に記載されるように、アスペルギルス・アワモリから発現させて精製した。ウォードら、1995、*Biotechnology* 13 : 498-503、米国特許第5,571,896号。精製したタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて、ウエスタ

ンイムノブロット分析または銀染色分析のいずれかを行った。図1参照。図1Aのレーン1-4に示すように、ヒトラクトフェリンに対して特異的なポリクローナルIgGを用いたウェスタンイムノブロット分析は、3つのラクトフェリン変異体の各々について野生型組換えラクトフェリンのサイズに対応する免疫応答性のバンドを検出した。銀染色分析による2つのゲルの分析は、ラクトフェリン変異体が>95%純度であり、予期された分子量~80kDaの単独のバンドがタンパク質の各々に関して観察されることを示した。図1B、レーン1-4参照。従って、ラクトフェリン変異体のサイズおよび免疫応答性は野生型組換えラクトフェリンから区別可能であった。

C. 実施例2：ラクトフェリンの鉄結合欠損変異体は野生型組換えヒトラクトフェリンと同様の腸内受容体結合特性を有する

アミノ酸アラニンおよびチロシンの類似性に基づき、鉄結合ラクトフェリン変異体におけるチロシンからアラニン残基への単一のアミノ酸置換は、タンパク質に対して最小の構造を生じると仮定できた。従って、鉄結合に依存しない鉄結合欠損変異体の活性は、野生型組換えヒトラクトフェリンの活性と同様であるに違いない。出願人および他の研究者は、以前にヒト腸内細胞 (enterocyte cells) 上の鉄飽和ラクトフェリンに対する特異的かつ飽和性の受容体の存在を示している。アイアーら、1993、*Eur. J. Clin. Nutr.* 47: 232-241; コックス (Cox) ら、1979、*Biochem. Biophys. Acta.* 558: 129-141; フ (Hu) ら、1988、*Biochem. J.* 249: 435-441; ギスレイソン (Gislason) ら、1995、*J. Pediatr. Gastroent. Nutr.* 21: 37-43; ミコガミ (Mikogami) ら、1994、*Am. J. Physiol.* 267: G1-G8; ウォードら、*Biotechnology* 13: 498-503。従って、鉄結合ラクトフェリン変異体に関する競合受容体結合アッセイを使用するための前提条件として、鉄不含組換えラクトフェリンと鉄飽和組換えラクトフェリンとの相対的な受容体結合動力学が確立されることが必要である。

競合受容体結合アッセイを以前に記載されたようにして行った。ウォードら、1995、*Biotechnology* 13: 498-503。ビオチン化鉄飽和組換えヒトラクトフェリン (0.4 μ M) を0-20倍モル過剰の非標識アポーまたは鉄飽和

した組換えヒトラクトフェリンの存在下で、ヒト腸内Caco-2細胞膜とともにインキュベートし、ついでビオチン／アビジンマイクロタイターアッセイを行った。ウォードら、1995、*Biotechnology* 13 : 498-503。この分析の結果を図2Aに示す。驚くべきことに、アポラクトフェリンおよび鉄飽和ラクトフェリンの両者は、ヒト腸内Caco-2細胞膜に匹敵する鉄飽和ビオチン化ラクトフェリンの結合を置換する能力を示し、このことはラクトフェリンの両形態がラクトフェリン腸内細胞受容体に対して同様の親和性を有することを示していた。ラクトフェリンは鉄をこれらの受容体を介して腸内細胞へと運搬すると提唱されているが、鉄不含ラクトフェリンと鉄飽和ラクトフェリンとの類似の相対的な受容体結合親和性は、ラクトフェリンがこれらの受容体を介して鉄を運搬する能力が、腸管腔に存在する鉄飽和ラクトフェリンと鉄不含ラクトフェリンとの相対量に主として依存することを示唆している。

腸内受容体に対するアポラクトフェリンの親和性が確立されたので、ラクトフェリン変異体を用いた競合受容体結合アッセイを上記のようにして行ってその機能的活性を野生型タンパク質の機能的活性と比較した。この分析の結果を図2B、2Cおよび2Dに示す。3つの鉄結合欠損変異体はすべて、野生型タンパク質と比較してCaco-2膜への鉄不含ビオチン化ラクトフェリンの結合を特異的に阻害する能力において有意差を示さなかった（<2倍の変動）。これらの結果は、チロシン残基の変異が該タンパク質の鉄非依存受容体結合の機能的活性を妨害しないことを示している。

D. 実施例3：ラクトフェリンのアミノ末端およびカルボキシ末端のローブにおける鉄結合に関与するチロシン残基の変異はタンパク質の変異したローブの鉄結合能力を選択的に妨害する

ラクトフェリンのいずれか一方または両方のローブにおける2つのチロシン残基の変異が、その変異したローブの鉄結合能力を妨害するのに十分であることを確かめるために、 $^{59}\text{FeCl}_3$ を用いた鉄飽和分析を行った。

この分析の結果を図3に示す。4倍過剰量の鉄の存在下で、野生型組換えラクトフェリンは予期されたように、2：0モル比の鉄／タンパク質で飽和した。完全なカルボキシ末端鉄結合機能を有するMN-2Yは1：1モル比で飽和したが、完

全なアミノ末端を有するMC-2Yは1 : 1より低い比率で飽和し、このラクトフェリン変異体からpH 7.0にて幾分の鉄の損失があったことが示された。従って、ラクトフェリンのアミノ末端半分またはカルボキシ末端半分のいずれか一方における、鉄結合に関与するチロシン残基の妨害は、変異したローブの鉄結合能力を選択的に廃棄した。さらに、この分析からの結果は、ラクトフェリンによる鉄結合に関与する4つの全てのチロシン残基の変異がこのタンパク質の鉄結合能力を有効に除去することを示していた。

E. 実施例4：ラクトフェリンのアミノ末端ローブとカルボキシ末端ローブとの間の協同性はこのタンパク質の独特な鉄結合安定性に貢献する

サイズ、免疫応答性および受容体結合分析によって決定されたように、鉄結合欠損ラクトフェリン変異体が野生型組み換えラクトフェリンと同様であることが確立されたので、これらのラクトフェリン変異体からのpH依存性鉄放出を分析して、ラクトフェリンの鉄結合安定性への2ローブ構造の貢献を決定した。

ラクトフェリン変異体を $^{59}\text{FeCl}_3$ で飽和させて、pHが7～2の範囲のバッファーに対して4℃で48時間透析した。ラクトフェリン変異体に結合したまま残留した鉄の量を液体シンチレーションカウンティングで定量した。この分析の結果を図4に示す。完全なカルボキシ末端鉄結合ローブを含むMN-2Yからの鉄放出プロフィールは組換えラクトフェリンのプロフィールと同様であり、pH 5.0で鉄放出が開始し、pH 2.0で完了した。対照的に、完全なアミノ末端鉄結合ローブを含むMC-2YからのpH依存性鉄放出は顕著に異っていた。この変異体からの鉄放出はpH 7.0で開始され、このことはMC-2Yの鉄飽和が1 : 1より少ないことと一致していた（図4）。さらにMC-2Yからの鉄放出はpH 5.0で完了した。これらの結果は、ラクトフェリンのアミノ末端ローブおよびカルボキシ末端ローブが鉄結合のpH安定性に関して異っており、野生型タンパク質に特徴的であるアミノ末端ドメインに増大したpH安定性を付与するのには機能的な鉄結合カルボキシ末端ローブが必要であることを示唆していた。これらの観察に基づき、ラクトフェリンの2つの半分の間の協同的な相互作用（主としてカルボキシ末端ローブによって駆動される）が、このタンパク質に独特である鉄結合のpH安定性に貢献すると結論づけることができる。

本明細書の態様内に引用された全ての参照文献は、その全体を参照のため本明細書に引用する。

請 求 の 範 囲

1. ラクトフェリン変異体またはその部分をコードする核酸配列であって、該部分はラクトフェリンの少なくとも1つの鉄結合部位に対応する配列を含むものとして定義され、該ラクトフェリン変異体またはその部分が修飾した鉄結合能力を有し、ラクトフェリンの少なくとも1つの鉄結合部位に対応する配列が、アミノ末端ローブ中のAsp 3 9 6、Tyr 9 3、Tyr 1 9 3およびHis 2 5 4およびカルボキシ末端ローブ中のAsp 3 9 6、Tyr 4 3 6、Tyr 5 2 9およびHis 5 9 8よりなる群から選択される1またはそれ以上のアミノ酸の変異または欠失を含む核酸配列。
2. MN-2Y、MC-2YおよびMNC-4Yよりなる群から選択されるラクトフェリン変異体をコードする核酸配列。
3. (a) プロモーター；
(b) 請求項1に記載のラクトフェリン変異体またはその部分をコードするDNA；および
(c) 転写および翻訳開始および終止配列；
を含む組換えベクターであって、該ベクターは該ラクトフェリン変異体を産生することができ、該ラクトフェリン変異体をプロセシングされたタンパク質として発現することができる組換えベクター。
4. ラクトフェリン変異体またはその部分の真核細胞中での発現に適合したベクターであって、請求項1に記載のラクトフェリン変異体またはその部分をコードするDNAおよび該細胞中での該DNAの発現に必要な調節配列を含むベクター。
5. (a) 請求項1に記載のラクトフェリン変異体またはその部分をコードする核酸；および
(b) プロモーター、および転写および翻訳開始および終止配列
を含み、真核細胞中でのヒトラクトフェリンの発現に使用するベクター。
6. p26MN-2Y、p26MC-2Yおよびp26MNC-4Yよりなる群から選択されるベクター。
7. 請求項5に記載のベクターを含む形質転換した真核細胞。
8. 真菌細胞、哺乳動物細胞および昆虫細胞よりなる群から選択される請求項7に記載の真核細胞。

9. アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニデ
ュランスおよびアスペルギルス・アワモリよりなる群から選択される真菌細胞で
ある請求項8に記載の真核細胞。

10. 請求項6に記載のベクターを含む形質転換した真核細胞。

11. 真菌細胞、哺乳動物細胞および昆虫細胞よりなる群から選択される請求項
10に記載の真核細胞。

12. アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニ
デュランスおよびアスペルギルス・アワモリよりなる群から選択される真菌細胞
である請求項11に記載の真核細胞。

13. 請求項1に記載のラクトフェリン変異体またはその部分を製造する方法で
あって、下記工程：

(a) (i) 請求項1に記載の核酸；および

(ii) プロモーター、および転写および翻訳開始および終止配列
を含み、真核細胞中でのラクトフェリン変異体およびその部分の発現に適したベ
クターで真核細胞を形質転換し、ついで

(b) ラクトフェリン変異体タンパク質が生成され、栄養培地に分泌され、単離
されるまで、適当な栄養培地にて該形質転換した真核細胞を培養する
ことを含む方法。

14. 請求項1に記載の核酸によってコードされるラクトフェリン変異体または
その部分。

15. MN-2Y、MC-2YおよびMNC-4Yよりなる群から選択されるラクトフェリン変異
体。