世界知的所有権機関
国 際 事 務 局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6		(11) 国際公開番号
C07K 14/52, C12N 15/00, C12P 21/02	A1	WO 95/09871
		(43) 国際公開日 1995年4月13日 (13.04.95)

(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01632
(22) 国際出願日 1994年9月30日(30. 09. 94)

(30) 優先権データ
特願平5/277269 1993年10月1日(01. 10. 93) JP

(71) 出願人；および
(72) 発明者
梶 昭(KAJI, Akira)〔JP/JP〕
〒203 東京都東久留米市大門町1丁目1番9号 Tokyo, (JP)
(74) 代理人
弁理士 南 孝夫(MINAMI, Takao)
〒102 東京都千代田区麹町3丁目2番地 相互第一ビル
Tokyo, (JP)

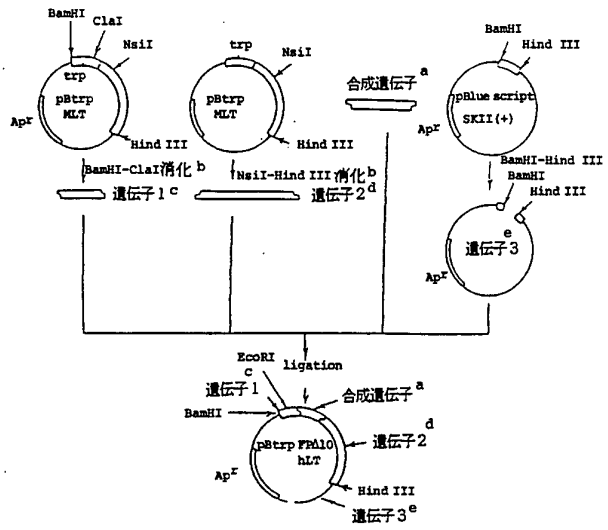
(81) 指定国
US, 欧州特許(DE, FR, GB, IT).

添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : NOVEL ANTITUMOR PEPTIDE

(54) 発明の名称 新規抗腫瘍性ペプチド

a ... synthetic gene
b ... digestion
c ... gene 1
d ... gene 2
e ... gene 3



(57) Abstract

A novel polypeptide wherein ten N-terminal amino acid residues of a natural lymphotoxin have been deleted and which contains a group represented by R-Phe-Pro (wherein R represents Met or H) introduced into the side of deletion. It has a high antitumor activity and a reduced toxicity and is free from the hypotensive effect which is deemed to be a fatal disadvantage of lymphotoxins. Thus it can be used as an active ingredient of an excellent antitumor drug.

（５７）要約

本発明により、天然型リンホトキシンのＮ末より10アミノ酸を欠失せしめ、その欠失部位に、

Ｒ－Phe－Pro－（ＲはMet又はＨである）

を付加した新規なポリペプチドが提供される。

この新規なポリペプチドは、抗腫瘍活性が高く、毒性が少ないと同時にリンホトキシン類の致命的な欠点とされている血圧降下作用の見られないものであり、優れた抗腫瘍剤の有効成分として使用することができる。

情報としての用途のみ
ＰＣＴに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にＰＣＴ加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴー	IT	イタリー	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェッコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュー・ジーランド	VN	ヴィェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

明　　細　　書

新規抗腫瘍性ペプチド

〔産業上の利用分野〕

本発明は、新規な抗腫瘍性ペプチドに関するものである。

〔背景技術〕

従来知られている抗腫瘍性ペプチドとしては、ＴＮＦ、リンホトキシン等がある。ＴＮＦについては、その副作用として血圧降下が問題となり、実際の治療では適応が限定されているのが現状であり、またリンホトキシンについても血圧降下作用があり、その遺伝子組換え生産自体についても欠点が存在するため、研究自体が進んでいないのが現状である。

これまでに、天然型リンホトキシンのペプチドについて改変を行った誘導体について種々報告されている。例えば、特開昭63-8398号公報、特開昭63-8399号公報、特開昭63-270698号公報、特開昭64-6298号公報、特開昭64-29399号公報、特開平3-184994号公報、特開平4-45789号公報が例示される。

ところで、これらの従来報告されているリンホトキシン誘導体(以下、ＬＴ誘導体という)については、ＴＮＦに見られると同様に血圧降下作用が見られるため、この点において解決されるべき課題が存在している。

本発明者は従来におけるＬＴ誘導体に関し、種々検討を行い研究を重ねた結果、本発明により、優れた抗腫瘍作用を有する新規なペプチドを提供することに成功し

た。

〔発明の開示〕

本発明は、次の式（Ｉ）、

R-Phe-Pro-Ala-Gln-Thr-Ala-Arg-Gln-His
Pro-Lys-Met-His-Leu-Ala-His-Ser-Thr-Leu
Lys-Pro-Ala-Ala-His-Leu-Ile-Gly-Asp-Pro
Ser-Lys-Gln-Asn-Ser-Leu-Leu-Trp-Arg-Ala
Asn-Thr-Asp-Arg-Ala-Phe-Leu-Gln-Asp-Gly
Phe-Ser-Leu-Ser-Asn-Asn-Ser-Leu-Leu-Val
Pro-Thr-Ser-Gly-Ile-Tyr-Phe-Val-Tyr-Ser
Gln-Val-Val-Phe-Ser-Gly-Lys-Ala-Tyr-Ser
Pro-Lys-Ala-Thr-Ser-Ser-Pro-Leu-Tyr-Leu
Ala-His-Glu-Val-Gln-Leu-Phe-Ser-Ser-Gln
Tyr-Pro-Phe-His-Val-Pro-Leu-Leu-Ser-Ser
Gln-Lys-Met-Val-Tyr-Pro-Gly-Leu-Gln-Glu
Pro-Trp-Leu-His-Ser-Met-Tyr-His-Gly-Ala
Ala-Phe-Gln-Leu-Thr-Gln-Gly-Asp-Gln-Leu
Ser-Thr-His-Thr-Asp-Gly-Ile-Pro-His-Leu
Val-Leu-Ser-Pro-Ser-Thr-Val-Phe-Phe-Gly
Ala-Phe-Ala-Leu

（Ｉ）

で表されるアミノ酸配列（但し、Ｒは、ＭｅｔまたはＨを表す）を有する新規なペプチドを提供するものである。本発明は、また、このペプチドを有効成分として含有す

る抗腫瘍剤への使用に関するものである。

本発明に係る新規なペプチドは、抗腫瘍活性を示す有効量において血圧降下作用を示さず、また、その抗腫瘍活性は、ＴＮＦの化学療法係数の７倍という格別な効果を顕現することが認められた。したがって、本発明に係る新規なペプチドは抗腫瘍剤としての医薬に使用することができるという点で極めて有用なものである

本発明の新規抗腫瘍性ペプチドは、天然型のヒトリンホトキシン（ＬＴ）の遺伝子において、ＬＴに相当するＤＮＡ配列のＮ末側先頭部分より、10アミノ酸分のＤＮＡ（30塩基）を除き、Met、Phe、Pro又はPhe、Proのアミノ酸配列が形成される塩基配列を、発現ベクターに組み込むことにより調製したＤＮＡよりペプチドを発現することにより得られる。このペプチドすなわち上記のPheおよびProのアミノ酸配列が組み込まれたペプチドを以下FP△10LTと記す。

上記のＤＮＡは、具体的には、例えば図１に示す手順によって構築することができる。図１に示された方法によれば、本発明のペプチドを発現するベクターは、後述する公知の改変ＬＴベクターからプロモーター部分ＳＤ領域をコードする塩基配列（遺伝子１）とＬＴの構造遺伝子の大部分をコードする塩基配列（遺伝子２）を切り出し、これらと、開始コドンとアミノ酸配列を含むように合成した塩基配列（合成遺伝子）とベクター（遺伝子３）とをライゲーションすることにより構築することができる。

なお、図１に示された手順において用いられる改変ＬＴベクター（以下pBtrp MLTという）は、本質的にはSeowら（Biotechnology 7, 363 (1989))により開発され、森田らが若干の改変を施したものである（特開平4-45789号)。これを利用するとリンホトキシン類を有利に発現させることができる。このものは、－10領域の塩基配列がＴＴＡＡＣＴ、－35領域の塩基配列がＴＴＧＡＣＡであるプロモーターを用い、ＳＤ領域（リボソーム結合部位)と開始コドン(ＡＴＧ）の間を13塩基とし、これにリンホトキシン類遺伝子を結合せしめ、かつ、リンホトキシン類構造遺伝子以外のベクターの塩基長を2.7～3.1kbとすることにより構築することができる。

上記のようにして得られた改変ＬＴベクターは、常法に従いこれを用いて宿主微生物を形質転換し、形質転換された微生物を培養することにより所望のペプチドを製造させることができる。

形質転換体の培養も常法にしたがって行うことができ、Ｌ－培地、Ｍ９培地、Ｍ９－カザミノ酸培地、高リン酸培地、高リン酸－カザミノ酸培地等を利用することができる。

特に高い発現を所望する場合には、培地中に３β－インドールアクリル酸を添加することが好ましい。３β－インドールアクリル酸の添加量としては、培地１mℓ当たり20～100μg程度である。

培養により得られた所望のペプチドを培養物中より分

離精製する方法としては、微生物菌体を例えば超音波処理等で破砕した後、遠心分離等によって上清を得、この上清を硫安沈殿、透析、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の精製手段を組み合わせて精製することにより行うのがよい。

次に実施例および試験例を挙げ、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例になんら制約されるものではない。

実施例　1

FP△10LTの遺伝子構築と発現

(1) pBtrp MLTベクターからtrpプロモーター部分およびＬＴ構造遺伝子の取得

pBtrp MLT DNAに、制限酵素BamHＩ(東洋紡社)およびClaＩ(ファルマシア社)を反応させ、低融点アガロースゲルによる泳動後、127bpからなるtrpプロモーター部分(遺伝子１)を回収した。また、pBtrp MLT DNAに制限酵素NsiＩ(NEB社)およびHindⅢ(東洋紡社)を反応させ、低融点アガロースゲルによる泳動後、ＬＴ構造遺伝子456bp(遺伝子２)を回収した。

(2) ＬＴ先頭部分の構築

下に示す1)～4)の４つのオリゴヌクレオチドから、ＳＤ領域と開始コドンを13塩基の距離を保ち、同様にＬＴの先頭部分をコードする遺伝子(合成遺伝子１)を調製した。

1)　5′ CGA TAA GCT ATG TTT CCA GCC CAG

2) 3′ T ATT CGA TAC AAA GGT CGG GTC TGA CGG

3) 5′ ACT GCC CGT CAG CAC CCC AAG ATG CA

4) 3′ GCA GTC GTG GGG TTC T

上記オリゴヌクレオチドのうち2)および3)のオリゴヌクレオチドの各々0.2 ODを滅菌水15μℓに溶解し、これにT4ポリヌクレオチドキナーゼ(東洋紡社)、10mM ATP 1μℓ、カイネーション緩衝液(600mM Tris-HCℓ pH8.0, 100mM $MgCℓ_2$, 150mM βメルカプトエタノール)を3μℓ、更に水を加えて総量を30μℓになるようにし37℃で2時間反応させた。反応終了後、65℃で10分間熱処理し、酵素を失活させた。

その後、オリゴヌクレオチド1)～4)の各々0.05 ODを1本のチューブにまとめ、25mM Tris-HCℓ(pH7.5)、5mM $MgCℓ_2$を含む40μℓの系で90℃で10分間熱変性させ、ゆっくり冷却した。

これにT4 DNAリガーゼ2000単位(東洋紡社)と1M DTT 0.5μℓ、10mM ATP 5μℓ、アニーリング緩衝液(500mM Tris-HCℓ pH7.6, 100mM $MgCℓ_2$) 5μℓおよび水7.5μℓとを入れ50μℓとした。その後16℃で16時間反応させ20%ポリアクリルアミドにて泳動後、EtBr染色し、目的の遺伝子を切り出し、溶出緩衝液(0.5Mアンモニウムアセテート、1mM EDTA)中で溶出した後、脱塩した。得られた合成遺伝子1は次の塩基配列を有していた。

合成遺伝子

```
                Met Phe Pro Ala Gln Thr
CGA TAA GCT ATG TTT CCA GCC CAG ACT
  T ATT CGA TAC AAA GGT CGG GTC TGA

Ala Arg Gln His Pro Lys Met
GCC CGT CAG CAC CCC AAG ATG CA
CGG GCA GTC GTG GGG TTC T
```

(3) ブルースクリプトSKII(+)の切断

ブルースクリプトSKII(+)2μg(東洋紡社)を制限酵素BamHI～HindIIIにて切断後、0.8%低融点アガロースゲルにて泳動し、EtBr染色後、目的の2.9KbからなるプラスミドDNA(遺伝子3)を得た。

(4) trpプロモーターを保有しFP△10LTの遺伝子を含むプラスミドの構築

遺伝子1、2、3および合成遺伝子1の混合物にT4 DNAリガーゼを作用させFP△10LTの遺伝子を有するプラスミド(pBtrp FP△10LT)を得た。更に－70℃で冷蔵保存しておいた形質転換用HB 101株菌体を融解し、この懸濁液100μℓ(1.3×10^8 cells)に、pBtrpFP△10LTを20μℓ(10ng DNA)添加した。

45分間氷冷後、42℃で90秒間ヒートショックを与え、更に2分間氷冷した。SOC培地(2%Bactotryptone, 0.5%yeast extract, 10mM NaCℓ, 2.5mM KCℓ, 10mM $MgC\ell_2$, 10mM $MgSO_4$, 20mM glucose)900μℓを添加し、37℃で1時間培養後、懸濁液を0.1mg／mℓのアンピシリン

を含むLB寒天培地プレート上にまき、37℃で一夜培養し、pBtrp FP△10MLTを有する形質転換体を得た。この形質転換体からDNAを分離し、制限酵素BamHI～HindIIIで切断した後、1%アガロースゲルにて泳動し、EtBr染色にて、635bpのフラグメントを確認した。

(5) pBtrp FP△10LTの発現

上記(4)で得たpBtrp FP△10LTについて、37℃の条件での蛋白質の発現を確認した。pBtrp FP△10LTの単一コロニーを100μg／mℓトリプトファンを含有するM9CA／Hepes培地（M9最小培地、0.5%グルコース、1mM $MgSO_4$、0.1mM $CaCℓ_2$、0.5%カザミノ酸、0.1mg／mℓチアミン塩酸塩、0.05mg／mℓアンピシリン、100mM Hepes)10mℓに植え付け、30℃にて一夜培養した。翌日新しいM9CA／Hepes培地10mℓに1／50量植え、OD_{550}＝0.5まで培養後、3－βインドールアクリル酸を20μg／mℓになる様に添加し、培養温度を37℃に変更後16時間培養した。

培養終了後、1mℓの菌体液を1.5mℓの遠心管に移し、遠心にて菌体を得た。この菌体を200μℓのSDS－PAGE用緩衝液にて溶解し、95℃で5分間熱処理後、15%SDS－PAGEにて泳動した。泳動後、クマシーブルーにて染色し、ついで脱色した。脱色後、ファルマシアレーザースキャナーにて全蛋白質当たりFP△10LTの発現量を測定したところ、37℃の培養条件で全蛋白質当たり10%のFP△10LT蛋白質の発現が確認された。これは、37℃の培養条件で1ℓ当たり10～20mgの蛋白質量に相当する。

(6) FP△10LTの生産および精製

pBtrp FP△10LTを有するE.coli HB101を、100μg/mlトリプトファンを含有するM9CA/Hepes培地200mlにて一晩培養し、この培養液を7lのM9CA/Hepes培地に接種し、OD_{550}=0.5まで30℃にて培養した。その後、3-βインドールアクリル酸を最終濃度20μg/mlになる様に加え、更に培養温度を37℃に変更後、16時間培養した。培養後、遠心分離により菌体17.81g(wet)を得た。そのうち菌体8.83gを30mM NaClおよび2mM p-APMSF(蛋白分解酵素阻害剤)、1mM EDTAを含む50mMトリス塩酸塩(pH8.0) 250mlに懸濁し、この菌体懸濁液を高圧ホモジナイザー(RANNIE社)に、6000psiで3回通し、菌体を破壊した。

更に遠心分離により菌体残渣を除き上清を得た。

得られた上清272mlに最終濃度が0.075%になるようにポリエチレンイミンを添加し、遠心分離を行い、除核酸を行った。この上清268mlを回収し、硫酸アンモニウムを50%飽和となる様に添加後、4℃にて2時間撹拌後、遠心分離を行い沈殿として粗蛋白質を得た。

この粗蛋白質を20mMリン酸緩衝液(pH7.0) 70mlに溶解後、同一緩衝液を用いて一晩透析した。翌日、この粗蛋白質溶液を遠心分離により、不溶性蛋白質を除去し、上清77mlを回収した。その回収液77mlをあらかじめ20mMリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したCMセファロースファーストフロー(ファルマシア社)のカラムに吸着させ、

20mMリン酸緩衝液（pH7.0）にて洗浄後、0～1M NaCℓを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.0）にて段階的濃度勾配により溶出した（65mℓ）。

この溶出液をアミコン社製限外濾過機(U-10)により濃縮し、17mℓの濃縮液を得た。この濃縮液をあらかじめ生理食塩水で十分に平衡化したゲル濾過担体であるセファクリルS-200(ファルマシア社)φ26×600mmに付した。

溶出液からペプチドを含む分画を回収した。L-929試験による活性を求め、各精製過程における比活性および回収率を求めた。なお、蛋白質量は、バイオラッド社製プロテインアッセイシステムを用いて測定し、活性を有する画分よりFP△10LT 49.4mgを得た。この結果を表1に示す。

表　1

	総液量 (mℓ)	蛋白質濃度 (mg／mℓ)	総蛋白質量 (mg)	ＬＴの生物活性 (unit／mℓ)	総生物活性 (unit)	比活性 (unit/mg)	収 率 (%)	精製度 (倍)
菌体破壊液	272	5.9	1604	5.2×10^{7}	1.4×10^{10}	8.7×10^{6}	100	1
0.075%ポリエチレンイミン処理	268	5.05	1353	4.5×10^{7}	1.2×10^{10}	8.8×10^{6}	85.7	1.01
50%硫安処理	77	4	280	8.6×10^{7}	6.7×10^{9}	2.4×10^{7}	47.8	2.75
ＣＭ－分取蛋白	65	1.68	109.2	9.5×10^{7}	6.2×10^{9}	5.7×10^{7}	44.2	6.55
Gel濾過分画	38	1.3	49.4	9.9×10^{7}	3.8×10^{9}	7.5×10^{7}	27.1	8.74

(7) 精製したFP△10LTの純度検定および分子量、部分構造の確認

精製したFP△10LT 2 μgを15%SDS-PAGEにて泳動後、クマシーブルーにて染色し、脱色した後、ファルマシアレーザースキャナーにて純度検定した。その結果、このペプチドは、純度95%以上で回収されていた。

また、このペプチドの分子量は、ゲル電気泳動上は約17800であり(理論値は18771)、気相プロテインシークエンサー(アプライドバイオシステム社製・モデル477A)によりN末端のアミノ酸配列の分析をしたところ、このペプチドのN末端のアミノ酸配列は、Met-Phe-Pro-Ala-Gln-Thr-Ala-Arg-Gln-Hisであることが確認された。

実施例 2

抗腫瘍作用の検討

治療係数(担癌体における毒性と有効性の比)を算出することを目的に以下の実験を行った。1群5匹から10匹とした6週齢の雌性Balb/cマウスの背部皮下に、2×10^5個のMeth Aマウス肉腫細胞を移植した。腫瘍移植7日後、試験対象物質を生理食塩水に溶解し(9.9×10^7 units/mℓ、5×10^7units/mg)、これをマウスに1週あたり2回で、合計5回、静脈内に投与した。対照群には生理食塩水のみを静脈内投与した。

移植後21日経過したところで、生存動物を屠殺し、腫瘍のみを摘出した。摘出した腫瘍は重量を測定し、各群での平均腫瘍重量を算出した。各投与群での平均腫瘍重

量は、対照群における平均腫瘍重量と対比し、腫瘍増殖抑制率を求めた。

ここで得られた各濃度での腫瘍増殖抑制率を基に、腫瘍増殖を50%抑制する濃度（50% Effective dose; ED_{50} mg／kg）を算出した。各投与群において、毒性死が認められた場合、腫瘍増殖抑制同様、50%致死量（50% Leathal Dose; LD_{50} mg／kg)を算出した。更に、この50%致死量（LD_{50}）と50%腫瘍増殖抑制量（ED_{50}）の比を持って、治療係数とした。

試験に用いた試験対象物質は、実施例1で調製した本発明に係るFP△10LTおよび特開平4－45789号に開示のMLT、特開昭63－270698号に開示のP△10LT およびF△10LTである。更にコントロールとしてのΔ10LT、ならびに特開昭60－185799号に開示のTNFである。

註1)：MLT：天然型リンホトキシンのN末より10アミノ酸残基を欠失せしめ、その欠失部位に5アミノ酸残基を付加したもの。

2)：P△10LT：上記の欠失部位にプロリン残基を付加したもの。

3)：F△10LT：上記の欠失部位にフェニルアラニン残基を付加したもの。

4)：△10LT：天然型リンホトキシンのN末より10アミノ酸残基を欠失せしめたもの。

この結果を表2に示す。

表　2

試験対象物質	投与濃度 (mg/kg)	抑制率 %	ED_{50} (mg/kg)	LD_{50} (mg/kg)	治療係数 (LD_{50}/ED_{50})
FP△10LT	3.75	95.8	0.31	7.5	23.8
(本発明実施例)	0.94	78.9			
	0.23	49.8			
	0.06	20.5			
MLT	0.94	95.8	0.29	3.26	11.4
(比較品)	0.23	39.8			
	0.06	12.1			
P△10LT	15.0	84.8	0.7	>15.0	>21.4
(比較品)	3.75	72.5			
	0.94	51.4			
	0.23	19.6			
F△10LT	3.75	87.2	0.57	7.5	13.1
(比較品)	0.94	70.5			
	0.23	14.9			
△10LT	15.0	84.2	0.46	>15.0	>32.9
(比較品)	3.75	81.2			
	0.94	63.6			
	0.23	38.5			
TNFα	0.94	86.5	0.31	1.08	3.5
(比較品)	0.23	43.3			

上記の結果から、本発明に係るFP△10LTによるMethAに対する抗腫瘍活性は、比較品であるTNFα、MLT、F△10LTと同程度であるが、それらに比較して治療係数では、2倍から7倍に改善されており、また、比較品であるP△10LT、△10LTよりも、ED_{50}が低いことも確認された。

試験例　1

血圧に対する検討

体重350～400gの、11週令雄Crj：CD(SD)系ラット(日本チャールスリバー）を用い、次の様にして各試験物質が血圧に対し与える作用を調べた。すなわち、上記ラットにエーテル麻酔を施した後、右大腿部の毛をバリカンを用いてカットし、小ハサミを使用して皮膚を切開した。その後、キシロカインゼリー（局所麻酔）を切開した皮膚に塗り、ピンセットを用いて注意深く各血管を剥離する。剥離後、動静脈へ三方コックをつけたSP10カニュレーションチューブ(夏目社）をつけそこより200unit／mlのヘパリン液を注入した。

挿入後、皮膚を自動縫合機を用いて縫合し、ラットを固定台(夏目社 ボールマンケージ）に固定した。固定後、動脈カニューレの三方コック内の空気を完全に抜き、ポリグラフ（モデル363システム 日本電気三栄）の圧力トランスジューサーに接続した。接続後ポリグラフをセットアップし、血圧測定を開始し、血圧、心拍数が安定した時点で、前記の抗腫瘍作用試験で用いたのと同じ各試

験物質を静注により投与し、投与後24時間の収縮期血圧を測定した。

また測定開始後、各ポイントの1時間前にフラッシュ（ヘパリン処理）を行ってトランスデューサーに対するシグナルが血塊により阻害されないよう注意した。

なお各サンプルともN＝4で行ない、投与量は、1㎎／㎏、3㎎／㎏、10㎎／㎏にて静脈内投与した。またデータの解析は、投与時を100％として収縮期血圧の低下をマイナスとして示した。この結果を表3に示す。

表　3

試験物質	24時間後の血圧低下率(SDラット) 対生理食塩水投与群(%)					
	1㎎/㎏ 投与	t－テスト	3㎎/㎏ 投与	t－テスト	10㎎/㎏ 投与	t－テスト
FP△10LT	＋0.4%	－	－1.5%	－	＋0.9%	－
MLT	＋0.9%	－	－2.8%	－	＋0.1%	－
P△10LT	－7.0%	＊	未試験		未試験	
F△10LT	－8.2%	＊	未試験		未試験	
△10LT	－6.8%	＊	未試験		未試験	
LT	－10.1%	＊	未試験		未試験	
TNFα	－9.6%	＊	未試験		未試験	

＊P＜0.05

上記の結果から、本発明に係るFP△10LTについてその抗腫瘍活性を示すED_{50}値より大なる有効投与量において、リンホトキシン類において最も致命的な副作用と考えられているところの血圧低下作用は認められなかった。一方、治療係数において本発明に係るFP△10LTと同等以上の有用性が示されたP△10LTおよび△10LTを含めて、既存のＬＴ類はすべて、有意の血圧低下作用を示し、治療に供し得ないものであることが認められた。

〔発明の効果〕

本発明に係る新規ペプチドは、従来報告されている組換え型リンホトキシン、組換え型リンホトキシン誘導体およびＴＮＦに比べ、抗腫瘍活性が高く、かつ副作用も改善されている。したがって、本発明にかかる新規ペプチドは抗腫瘍剤等の医薬として有利に利用することができるものである。

〔図面の簡単な説明〕

図１は、本発明のペプチドを生産するプラスミドの構築手順を示す図面である。

配列表

配列番号：１

配列の長さ：６１７

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖

配列の種類：ｃＤＮＡ

起源：ヒト白血球

配列の特徴

特徴を表す記号：－３５ｓｉｇｎａｌ

存在位置：５３．．５８

特徴を決定した方法：Ｅ

配列の特徴

特徴を表す記号：－１０ｓｉｇｎａｌ

存在位置：７６．．８１

特徴を決定した方法：Ｅ

配列

```
                                                        AATTCATTGTC      11

CGACATCACAACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAA      71

                                                              1
                                                        Met·Phe·Pro·
CTAGTTAACTAGTACGCAAGTTCACGTAAAAAGGGTATCGATAAGCT·ATG·TTT·CCA·     127

     5                  10                  15
Ala·Gln·Thr·Ala·Arg·Gln·His·Pro·Lys·Met·His·Leu·Ala·His·Ser·
GCC·CAG·ACT·GCC·CGT·CAC·CAT·CCC·AAG·ATG·CAT·CTT·GCC·CAC·AGC·     172

     20                 25                  30
Thr·Leu·Lys·Pro·Ala·Ala·His·Leu·Ile·Gly·Asp·Pro·Ser·Lys·Gln·
ACC·CTC·AAA·CCT·GCT·GCT·CAC·CTC·ATT·GGA·GAC·CCC·AGC·AAG·CAG·     217

     35                 40                  45
Asn·Ser·Leu·Leu·Trp·Arg·Ala·Asn·Thr·Asp·Arg·Ala·Phe·Leu·Gln·
AAC·TCA·CTG·CTC·TGG·AGA·GCA·AAC·ACG·GAC·CGT·GCC·TTC·CTC·CAG·     262

     50                 55                  60
Asp·Gly·Phe·Ser·Leu·Ser·Asn·Asn·Ser·Leu·Leu·Val·Pro·Thr·Ser·
GAT·GGT·TTC·TCC·TTG·AGC·AAC·AAT·TCT·CTC·CTG·GTC·CCC·ACC·AGT·     307
```

65 70 75

Gly·Ile·Tyr·Phe·Val·Tyr·Ser·Gln·Val·Val·Phe·Ser·Gly·Lys·Ala·

GGC·ATC·TAC·TTC·GTC·TAC·TCC·CAG·GTG·GTC·TTC·TCT·GGG·AAA·GCC· 352

80 85 90

Tyr·Ser·Pro·Lys·Ala·Thr·Ser·Ser·Pro·Leu·Tyr·Leu·Ala·His·Glu·

TAC·TCT·CCC·AAG·GCC·ACC·TCC·TCC·CCA·CTC·TAC·CTG·GCC·CAT·GAG· 397

95 100 105

Val·Gln·Leu·Phe·Ser·Ser·Gln·Tyr·Pro·Phe·His·Val·Pro·Leu·Leu·

GTC·CAG·CTC·TTC·TCC·TCC·CAG·TAC·CCC·TTC·CAT·GTG·CCT·CTC·CTC· 442

110 115 120

Ser·Ser·Gln·Lys·Met·Val·Tyr·Pro·Gly·Leu·Gln·Glu·Pro·Trp·Leu·

AGC·TCC·CAG·AAG·ATG·GTG·TAT·CCA·GGG·CTG·CAG·GAA·CCC·TGG·CTG· 487

125 130 135

His·Ser·Met·Tyr·His·Gly·Ala·Ala·Phe·Gln·Leu·Thr·Gln·Gly·Asp·

CAC·TCG·ATG·TAC·CAC·GGG·GCT·GCG·TTC·CAG·CTC·ACC·CAG·GGA·GAC· 532

140 145 150

Gln·Leu·Ser·Thr·His·Thr·Asp·Gly·Ile·Pro·His·Leu·Val·Leu·Ser·

CAG·CTA·TCC·ACC·CAC·ACA·GAT·GGC·ATC·CCC·CAC·CTA·GTC·CTC·AGC· 577

155 160 164

Pro·Ser·Thr·Val·Phe·Phe·Gly·Ala·Phe·Ala·Leu·***·***

CCT·AGT·ACT·GTC·TTC·TTT·GGA·GCC·TTC·GCT·CTG·TAG·TAG·A 617

請　求　の　範　囲

1．次の式（Ｉ）

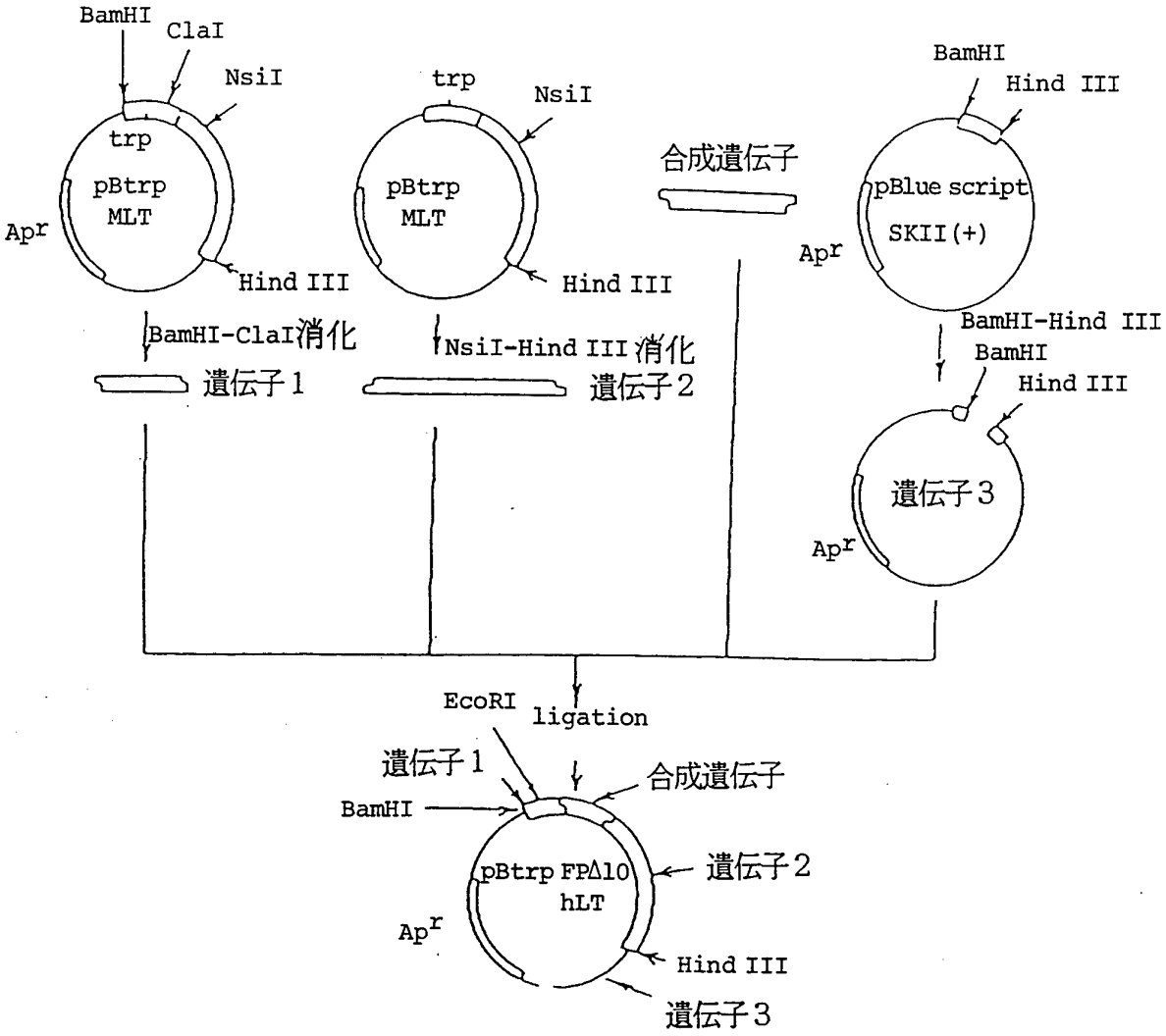
R-Phe-Pro-Ala-Gln-Thr-Ala-Arg-Gln-His
Pro-Lys-Met-His-Leu-Ala-His-Ser-Thr-Leu
Lys-Pro-Ala-Ala-His-Leu-Ile-Gly-Asp-Pro
Ser-Lys-Gln-Asn-Ser-Leu-Leu-Trp-Arg-Ala
Asn-Thr-Asp-Arg-Ala-Phe-Leu-Gln-Asp-Gly
Phe-Ser-Leu-Ser-Asn-Asn-Ser-Leu-Leu-Val
Pro-Thr-Ser-Gly-Ile-Tyr-Phe-Val-Tyr-Ser
Gln-Val-Val-Phe-Ser-Gly-Lys-Ala-Tyr-Ser
Pro-Lys-Ala-Thr-Ser-Ser-Pro-Leu-Tyr-Leu
Ala-His-Glu-Val-Gln-Leu-Phe-Ser-Ser-Gln
Tyr-Pro-Phe-His-Val-Pro-Leu-Leu-Ser-Ser
Gln-Lys-Met-Val-Tyr-Pro-Gly-Leu-Gln-Glu
Pro-Trp-Leu-His-Ser-Met-Tyr-His-Gly-Ala
Ala-Phe-Gln-Leu-Thr-Gln-Gly-Asp-Gln-Leu
Ser-Thr-His-Thr-Asp-Gly-Ile-Pro-His-Leu
Val-Leu-Ser-Pro-Ser-Thr-Val-Phe-Phe-Gly
Ala-Phe-Ala-Leu

（Ｉ）

で表されるアミノ酸配列を有するペプチド。（但し、Ｒは、MetまたはＨを表す。）

2．請求項１で示したアミノ酸配列を有するペプチドの抗腫瘍剤としての使用。

Fig. 1


BamHI
ClaI
NsiI
trp
pBtrp
MLT
Apr
Hind III
BamHI-ClaI消化
遺伝子1
trp
NsiI
pBtrp
MLT
Hind III
NsiI-Hind III 消化
遺伝子2
合成遺伝子
BamHI
Hind III
pBlue script
SKII(+)
Apr
BamHI-Hind III
BamHI
Hind III
遺伝子3
Apr
EcoRI
ligation
遺伝子1
合成遺伝子
BamHI
pBtrp FPΔ10
hLT
遺伝子2
Apr
Hind III
遺伝子3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/01632

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl^6 C07K14/52, C12N15/00, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl^5 C07K13/00, C12N15/19, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE,
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP, A, 6-41196 (Tsumura & Co.), February 15, 1994 (15. 02. 94), (Family: none)	1-2
A	JP, A, 4-45789 (Tsumura & Co.), February 14, 1992 (14. 02. 92), (Family: none)	1-2
A	JP, A, 3-184994 (Tsumura & Co.), August 12, 1991 (12. 08. 91), (Family: none)	1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
November 18, 1994 (18. 11. 94)	December 6, 1994 (06. 12. 94)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 94/01632

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁵ C07K14/52, C12N15/00, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁵ C07K13/00, C12N15/19, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAS ONLINE,
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
P, X	JP, A, 6-41196（株式会社 ツムラ）, 15. 2月. 1994（15. 02. 94）（ファミリーなし）	1-2
A	JP, A, 4-45789（株式会社 ツムラ）, 14. 2月. 1992（14. 02. 92）（ファミリーなし）	1-2
A	JP, A, 3-184994（株式会社 ツムラ）, 12. 8月. 1991（12. 08. 91）（ファミリーなし）	1-2

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
18. 11. 94

国際調査報告の発送日
06.12.94

名称及びあて先
日本国特許庁（ISA/JP）
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）
植野浩志 印
4B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

様式PCT/ISA/210（第2ページ）（1992年7月）