

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4319908号
(P4319908)

(45) 発行日 平成21年8月26日(2009.8.26)

(24) 登録日 平成21年6月5日(2009.6.5)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 7/06	(2006.01)	C07K 7/06	Z N A
C07K 14/195	(2006.01)	C07K 14/195	
C07K 19/00	(2006.01)	C07K 19/00	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	A
A61K 38/00	(2006.01)	A61K 37/02	

請求項の数 39 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-523270 (P2003-523270)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月23日 (2002.8.23)
 (65) 公表番号 特表2005-520490 (P2005-520490A)
 (43) 公表日 平成17年7月14日 (2005.7.14)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2002/027061
 (87) 國際公開番号 WO2003/018611
 (87) 國際公開日 平成15年3月6日 (2003.3.6)
 審査請求日 平成17年8月19日 (2005.8.19)
 (31) 優先権主張番号 60/314,613
 (32) 優先日 平成13年8月24日 (2001.8.24)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 501365952
 ユニバーシティ オブ ピクトリア イノ
 ベーション アンド ディベロップメント
 コーポレーション
 カナダ国 ブリティッシュ コロンビア
 州 ピクトリア マッケンジー アベニュー
 一 アール. ハット ピー. オー.
 ボックス 3975
 (73) 特許権者 599019100
 ジョンズホプキンスユニバーシティ
 米国、メリーランド、バルチモア、ルット
 ランド アベニュー 720
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】プロテアーゼ活性化配列を含むプロアエロリシンおよび前立腺癌の治療のための使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

バリアントプロアエロリシンアミノ酸配列を含む精製されたペプチドであって、バリアントプロアエロリシンアミノ酸配列は、前立腺特異的なプロテアーゼ切断部位を含み、且つフリン切断部位の配列を部分的もしくは完全に欠失しているか、またはフリン切断部位の配列に挿入もしくは変異を有し、該欠失、挿入または変異の結果、該ペプチドがフリンによって切断および活性化される能力が、野生型プロアエロリシンの能力と比べて減少された、ペプチド。

【請求項2】

前立腺特異的なプロテアーゼ切断部位が、前立腺特異的抗原(PSA)切断部位、前立腺特異的膜抗原(PSMA)切断部位、またはヒト腺性カリクレイン2(hK2)切断部位を含む、請求項1記載のペプチド。 10

【請求項3】

PSA切断部位が、配列番号：5、8、11、14、15、16、17、18、19、20、または21を含む、請求項2記載のペプチド。

【請求項4】

PSA切断部位が配列番号：5を含む、請求項3記載のペプチド。

【請求項5】

バリアントプロアエロリシンアミノ酸配列が、機能的に欠失された結合ドメインをさらに含む、請求項1記載のペプチド。

【請求項 6】

結合ドメインが、配列番号：2または4のアミノ酸1～83の欠失によって機能的に欠失されている、請求項5記載のペプチド。

【請求項 7】

結合ドメインが、配列番号：2または4のW45A、I47E、M57A、Y61A、およびK66Qからなる群より選択される少なくとも1つの変異の挿入によって機能的に欠失されている、請求項5記載のペプチド。

【請求項 8】

前立腺組織特異的な結合ドメインをさらに含む、請求項5記載のペプチド。

【請求項 9】

前立腺組織特異的な結合ドメインが、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）配列を含む、請求項8記載のペプチド。

10

【請求項 10】

LHRH配列が、配列番号：22または23を含む、請求項9記載のペプチド。

【請求項 11】

バリアントプロアエロリシンのN末端に結合されたLHRH配列をさらに含む、請求項6記載のペプチド。

【請求項 12】

LHRH配列が配列番号：2または4のアミノ酸215または300に結合され、このアミノ酸215または300がシスティンに変異されている、請求項9記載のペプチド。

20

【請求項 13】

前立腺組織特異的な結合ドメインが、PSA、hK2、PSMAまたはLHRHを認識する抗体を含む、請求項8記載のペプチド。

【請求項 14】

抗体が、バリアントプロアエロリシンのN末端に結合されている、請求項13記載のペプチド。

【請求項 15】

抗体が、バリアントプロアエロリシンのC末端に結合されている、請求項13記載のペプチド。

【請求項 16】

30

ペプチド配列が、配列番号：24または25を含む、請求項9記載のペプチド。

【請求項 17】

固体の表面に固定されている、請求項1記載のペプチド。

【請求項 18】

表面がビーズである、請求項17記載のペプチド。

【請求項 19】

ビーズが、前立腺特異的なリガンドをさらに含む、請求項18記載のペプチド。

【請求項 20】

請求項1記載のペプチドをコードする、精製された核酸配列。

【請求項 21】

40

被検体の前立腺癌を治療するための、請求項1記載のペプチドを含む組成物。

【請求項 22】

腫瘍内におよび／または前立腺内に投与される、請求項21記載の組成物。

【請求項 23】

静脈内に、筋肉内に、皮下に、または経口的に投与される、請求項21記載の組成物。

【請求項 24】

被検体の前立腺癌を治療するための、請求項1記載のペプチドをコードする核酸配列を含む組成物。

【請求項 25】

被検体の前立腺癌の治療において前立腺癌細胞に接触させるための、請求項1記載のペ

50

ペプチドを含む組成物。

【請求項 26】

被検体が局在性前立腺腫瘍を有する、請求項21記載の組成物。

【請求項 27】

請求項1記載のペプチドと被検体由來の前立腺癌細胞を接觸させることにより生成された細胞可溶化液を含む、被検体の前立腺癌を全身的に治療するための組成物。

【請求項 28】

被検体が転移性前立腺腫瘍を有する、請求項27記載の組成物。

【請求項 29】

GM-CSFをさらに含む、請求項27記載の組成物。

10

【請求項 30】

放射線照射を受けた前立腺癌細胞をさらに含む、請求項29記載の組成物。

【請求項 31】

投与により前立腺腫瘍細胞体積が減少する、請求項21記載の組成物。

【請求項 32】

投与により前立腺腫瘍細胞体積が少なくとも10%減少する、請求項31記載の組成物。

【請求項 33】

投与により前立腺腫瘍細胞体積が少なくとも50%減少する、請求項31記載の組成物。

【請求項 34】

投与により前立腺腫瘍細胞体積が減少する、請求項27記載の組成物。

20

【請求項 35】

投与により転移性前立腺腫瘍が減少する、請求項34記載の組成物。

【請求項 36】

投与により転移性前立腺腫瘍が治療される、請求項34記載の組成物。

【請求項 37】

バリアントクロストリジウムセプティカムアルファ毒素アミノ酸配列を含む精製されたペプチドであって、バリアントクロストリジウムセプティカムアルファ毒素アミノ酸配列は、前立腺特異的なプロテアーゼ切断部位を含み、且つフリン切断部位の配列を部分的もしくは完全に欠失しているか、またはフリン切断部位の配列に挿入もしくは変異を有し、該欠失、挿入または変異の結果、該ペプチドがフリンによって切断および活性化される能力が、野生型クロストリジウムセプティカムアルファ毒素の能力と比べて減少された、ペプチド。

30

【請求項 38】

バリアントバチルスチュリンギエンシスデルタ毒素アミノ酸配列を含む精製されたペプチドであって、バリアントバチルスチュリンギエンシスデルタ毒素アミノ酸配列は、前立腺特異的なプロテアーゼ切断部位および機能的に欠失された野生型活性化配列を含む、ペプチド。

【請求項 39】

バリアントヒトパーフォリンアミノ酸配列を含む精製されたペプチドであって、バリアントヒトパーフォリンアミノ酸配列は、前立腺特異的なプロテアーゼ切断部位および機能的に欠失された野生型パーフォリン活性化部位を含む、ペプチド。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2001年8月24日に出願された米国特許仮出願第60/314,613号に対する優先権の利益を主張し、その全体が本明細書に参照として組み入れられる。

【0002】

技術分野

本出願は、新規バリアントプロアエロリシン(proaerolysin; PA)タンパク質と、局所

50

性および転移性前立腺癌を治療するためのこれらのタンパク質の使用方法とに関する。

【背景技術】

【0003】

背景

アメリカの男性において診断されるあらゆる癌のうちの3つに1つは、前立腺起源のものであり、前立腺癌は、米国の男性において最も一般的に診断される悪性のものとなっている (Bergesら、Clin. Cancer Res. 1 : 473-480, 1995)。米国における前立腺癌の発病率は、生活様式の変化によっても減少しておらず；事実、臨床的前立腺癌の発生率は、1930年代から着実に増加してきた (Pinskiら、Cancer Res. 61 : 6372-6, 2001)。前立腺癌の発病率は、他のいかなるタイプの癌よりも急速に年齢とともに増大し；前立腺癌が50歳未満の男性において診断されるのは、1%未満だけである (Furuyaら、Cancer Res. 54 : 6167-75, 1994)。したがって、男性人口の平均余命が時間とともに増大すると、臨床的前立腺癌の発病率も増大する (Furuyaら、Cancer Res. 54 : 6167-75, 1994)。

【0004】

現在、転移性前立腺癌の男性の生存を有意に延長する治療法はない (KhanおよびDenmeade. Prostate 45 : 80-83, 2000)。経口エストロゲン（アンドロゲン除去）による医学的な去勢は、癌のための第1の有効な全身性治療であり、依然として最も一般的に有用な前立腺癌治療である。アンドロゲン除去治療は、実質的な対症利益を有するが、これは生存全体に対してはほとんど影響を有さない (Bergesら、Clin. Cancer Res. 1 : 473-480, 1995)。個々の患者内の転移性前立腺癌はアンドロゲン依存的およびアンドロゲン非依存的な癌細胞から構成されていて不均一なので、この治療は結局失敗におわる (Christensenら、Bioorg. Medicinal Chem. 7 : 1273-80, 1999)。アンドロゲン除去後には、これらの腫瘍内のアンドロゲン依存性の細胞は増殖を停止し、プログラムされた細胞死 (PCD) またはアポトーシスと呼ばれる細胞の自殺経路を活性化する。このアンドロゲン依存性の細胞のサブグループの除去により、転移性前立腺癌の大多数の男性は、アンドロゲン剥奪治療に有益な反応をする。しかし、転移部内にアンドロゲン非依存的な前立腺癌細胞が存在するために、どんなに完全に与えられても、全ての患者において、結局さらなる抗アンドロゲン治療に非応答性の状態が再発する。残念なことに、現在、効果的にアンドロゲン非依存的な前立腺癌細胞を除去する治療法がないので、本疾患は、この点において一様に致命的である (KhanおよびDenmeade. Prostate 45 : 80-83, 2000)。

【0005】

前立腺癌の治療に対するその他のいくつかのアプローチが提唱されている。1つは、なおも前立腺に存在する局部疾患を積極的にスクリーニングし、決定的な局部的治療によって潜在的に治療できる方法が開発された。局在性癌は、ある程度分化しており、体積が小さいことが多い。過去数十年間の間に、局在性前立腺癌の外科的および放射線療法による対応は改善されている。これらの改善により、ここ数年にわたって、50年のうちに初めて前立腺癌の死亡率の減少に達した。

【0006】

しかし、この進歩により治癒率は増大したが、局部的治療によって治癒せずに、最終的に転移性疾患で死亡する男性がまだ多く存在する。この臨床面の現実により、転移性前立腺癌のための非ホルモン性治療の開発がなされた。標準的な抗増殖化学療法剤は、前立腺癌の治療として成功していなかった。アンドロゲン非依存的な前立腺癌は、その他の腫瘍タイプ、ならびに皮膚、胃腸管、および骨髄などの多くの正常組織と比較して著しく遅い増殖速度を有するので、これらのタイプの薬剤は、これらの癌に対して効果がない可能性がある。たとえば、「温熱」剖検で11のアンドロゲン除去に失敗した患者から得た前立腺癌の117の転移部位の増殖分画では、 $7.1 \pm 0.8\%$ であった (Pinskiら、Cancer Res. 61 : 6372-6, 2001)。この遅い増殖速度は、標準的な抗増殖化学療法に対するヒト前立腺癌細胞における相対的な不応答性を説明するであろうが、増殖性の高いアンドロゲン非依存的な前立腺癌細胞株は、インビトロにおけるPCD誘導に対してきわめて感受性のままである。

【0007】

10

20

30

40

50

ゆっくりと増殖する前立腺癌を治療するためのいくつかのストラテジーが提唱された。1つのアプローチは、前立腺癌細胞が、悪性形質転換の間に、生存するために独特の依存性を獲得するための特異的なシグナリング経路を同定することである。一旦同定されれば、これらの経路の小分子または生物学的な阻害剤を治療薬として開発することができる。このアプローチの例は、Her2/neuもしくはEGF受容体経路における小分子またはモノクローナル抗体の阻害剤の使用である。もう1つの方法は、その機能が全ての細胞種の生存のために必須である遍在性の細胞内タンパク質を阻害することである。このアプローチは、このアプローチを経て腫瘍内の全ての癌細胞を死滅させることができるので、不均一性および「抵抗性」の問題が克服されるであろう。しかし、細胞毒性は、細胞種特異的ではなく、このような一般的な毒素の投与は、有意な全身毒性を伴う。したがって、前立腺癌の部位に細胞毒を直接ターゲティングするための方法に対する要望がある。10

【0008】

ゆっくりと増殖する前立腺癌の治療のための別のストラテジーは、重要なシグナリングまたは代謝経路を阻害後のアボトーシスの誘導を介さず、むしろ形質膜の破壊を経た非特異的細胞溶解を介して細胞を殺す細胞毒をデリバリーすることである。多くの細胞溶解毒素が記載されている (Lesieurら、Mol. Membr. Biol. 14 : 45064, 1997)。これらの細胞溶解毒素は、細菌起源のものであることが多く、一般に、シートタンパク質であり、形質膜においてオリゴマー形成して、よく特徴づけられた細孔を生じ、一旦形成されたならば、迅速に細胞溶解性細胞死を引き起こす (Rossjohnら、J. Struct. Biol. 121 : 92-100, 1998)。また、これらの毒素が細胞を死滅させる能力は、非特異的であり、したがって、有意な毒性を伴わない治療薬として投与することができない。したがって、主に前立腺癌細胞に対して細胞毒性である、前立腺癌を治療するための薬剤に対する要望がある。20

【発明の開示】

【0009】

概要

バリアントプロアエロリシン (PA) 分子、ならびにゆっくりと増殖する前立腺癌などの局在性および転移性の前立腺癌を治療するためのこれらの使用方法を本明細書に開示する。

【0010】

一つの例において、バリアントPA分子は、天然のPAフリン (furin) 切断部位を機能的に置換する、前立腺特異的な抗原 (PSA)、前立腺特異的な膜抗原 (PSMA)、またはヒト腺性カリクレイン2 (HK2) に特異的な切断部位などの前立腺特異的なプロテアーゼ切断部位を含む。このような方法で、前立腺癌を有する被検体に対して、開示されたバリアントPA分子を投与すると、前立腺特異的なプロテアーゼの存在下において、開示されたバリアントPA分子の活性化、および前立腺癌細胞などの細胞の細胞溶解を生じる。一部の例において、バリアントPA分子はまた、癌細胞に対するターゲティングを増強するための前立腺組織特異的な結合ドメインも含む。30

【0011】

もう1つの例では、バリアントPA分子は、前立腺癌細胞に対するターゲティングを補助するための、フリン切断部位、および天然のPA結合ドメインを機能的に置換する前立腺組織特異的な結合ドメインを含む。40

【0012】

開示されたバリアントPA分子を使用する局在性および転移性の前立腺癌の治療のための方法を開示する。加えて、被検体の免疫系を刺激して、局在性および転移性の前立腺癌の治療を増強するための方法を開示する。

【0013】

配列表

添付の配列表に一覧を示す核酸およびアミノ酸の配列は、ヌクレオチド塩基の標準的な文字略記号、およびアミノ酸の3文字コードを使用して示してある。それぞれの核酸配列の一方の鎖のみを示してあるが、示された鎖に対するいかなる言及によっても相補鎖が含50

まれることが理解される。

【0014】

配列番号：1および2は、それぞれ、野生型プロアエロリシンcDNAおよびタンパク質配列を示す。

【0015】

配列番号：3および4は、それぞれ、PSA-PA1 cDNAおよびタンパク質配列であって、プロアエロリシンのフリン部位が、PSA切断部位で置換されているものを示す。

【0016】

配列番号：5および15～21は、ヒトセメノゲリンIおよびIIタンパク質において見出されるPSA切断部位である。

10

【0017】

配列番号：6および7は、それぞれ、PSA-1K cDNAおよびタンパク質配列であって、プロアエロリシンのフリン部位がPSA切断部位で置換されたものを示す。

【0018】

配列番号：8、11、および14～21は、別のPSA切断部位である。

【0019】

配列番号：9および10は、それぞれ、PSA-PA2 cDNAおよびタンパク質配列であって、プロアエロリシンのフリン部位がPSA切断部位で置換されたものを示す。

【0020】

配列番号：12および13は、それぞれ、PSA-PA3 cDNAおよびタンパク質配列であって、プロアエロリシンのフリン部位がPSA切断部位で置換されたものを示す。

20

【0021】

配列番号：22は、天然の黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）タンパク質配列である。

【0022】

配列番号：23は、修飾されたLHRHタンパク質配列である。

【0023】

配列番号：24は、バリアントPAペプチドのタンパク質配列であって、PAのフリン部位がPSA切断部位で置換され、PAの天然の結合ドメインが欠失し、配列番号：23で置換されているものである。

30

【0024】

配列番号：25は、バリアントPAペプチドのタンパク質配列であって、PAのフリン部位は保持されており、PAの天然の結合ドメインが欠失し、配列番号：23で置換されているものである。

【0025】

いくつかの態様の詳細な説明

略記号および用語

以下の用語および方法の説明は、本開示をより適切に記載し、本開示の実施において当業者を手引きするために提供される。本明細書においておよび添付の特許請求の範囲において使用されるものとして、単数形の「a」または「an」または「the」は、文脈により明らかに他に示されていない限り、複数の対象を含む。たとえば、「バリアントPA分子（a variant PA molecule）」に関しては、複数のこのような分子を含み、「抗体（the antibody）」に関しては、1つまたは複数の抗体および当業者に既知のその同等物などに関するものを含む。

40

【0026】

別に説明されない限り、本明細書に使用される全ての技術的および科学的な用語は、この開示が属する技術分野における当業者が共通に理解するものと同じ意味を有する。

【0027】

アエロリシン：プロアエロリシン（PA）と呼ばれる不活性プロトキシンとして産生されるチャンネル形成毒素（野生型PAは、配列番号：1および2に示してある）。PAタンパク質

50

は、多くの別々の機能を含み、これには結合ドメイン（配列番号：2のほぼアミノ酸1～83）、毒素ドメイン（配列番号：2のほぼアミノ酸84～426）、およびプロテアーゼ活性化部位（配列番号：2のアミノ酸427～432）を含むC末端の抑制性ペプチドドメイン（配列番号：2のほぼアミノ酸427～470）を含む。

【0028】

結合ドメインは、Tリンパ球上のThy-1において見出されるもの、赤血球膜および前立腺幹細胞抗原（PSCA）において見出されるPIGA遺伝子産物などの、グリコホスファチジルイノシトール（GPI）膜アンカーを認識して結合する。大部分の哺乳類細胞は、これらの表面上にGPIアンカーされたタンパク質を発現する。プロアエロリシン内の活性化部位またはタンパク質分解部位は、プロテアーゼのフリンファミリーによってタンパク分解性基質として認識される6アミノ酸配列である。PAは、フリンによるC末端の抑制性部分の加水分解によって活性化される（図1）。活性化されたアエロリシンは、細胞膜のGPIアンカータンパク質に結合して七量体を形成し、膜に挿入されて、よく定義された約17 のチャンネルを生じる。チャンネル形成により、ネクローシスを経た迅速な細胞死が引き起こされる。野生型アエロリシンは、赤血球を含む哺乳類細胞に対して、たとえば1ナノモル濃度以下で毒性がある。

【0029】

動物：生存する多細胞脊椎動物生物、たとえば哺乳類および鳥類を含むカテゴリー。

【0030】

抗体：免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、特異的に抗原を結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含む分子。

【0031】

天然に存在する抗体（たとえば、IgG）は、ジスルフィド結合によって相互接続した2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖の4つのポリペプチド鎖を含む。しかし、抗体の抗原結合機能は、天然に存在する抗体の断片によって行うことができる。このように、これらの抗原結合性断片もまた、抗体の用語によって表されることが企図される。抗体の用語の範囲内に含まれる結合断片の例は、(i) VL、VH、CLおよびCH1ドメインから成るFab断片；(ii) VHおよびCH1ドメインから成るFd断片；(iii) 抗体の單一アームのVLおよびVHドメインから成るFv断片、(iv) VHドメインから成るdAb断片（Wardら、Nature 341：544-6, 1989）；(v) 単離された相補性決定領域（CDR）；ならびに(vi) F(ab')2断片（ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合された2つのFab断片を含む二価の断片）を含む。さらに、Fv断片の2つのドメインは、別々の遺伝子によってコードされるが、組換え法によって、合成リンカーにより、単一タンパク質鎖として作製されるようにこれらを作製することもできる（単鎖Fv（scFv）として既知；Birdら、Science 242：423-6, 1988；およびHustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 85：5879-83, 1988）。このような単鎖抗体も含まれる。1つの態様において、抗体は、キャメライズド抗体（camelized antibody）を含む（たとえば、Tanhaら、J. Biol. Chem. 276：24774-80, 2001を参照されたい）。

【0032】

1つの例において、抗体断片は、これらの標的抗原を架橋することができる、たとえば、F(ab')2断片などの二価の断片である。または、それ自体ではその標的抗原を架橋しない抗体断片（たとえば、Fab断片）は、抗体断片を架橋するように機能する二次抗体と組み合わせて使用し、これにより、標的抗原を架橋することができる。抗体は、従来技術を使用して断片化することができ、断片は、全抗体について記載されているような同様の手段で有用性についてスクリーニングすることができる。抗体は、標的抗原に特異的に結合する2特異性分子およびキメラ分子を含むことがさらに企図される。

【0033】

「特異的に結合する」とは、個々の抗体が抗原と特異的に免疫反応する能力をいう。結合は、抗体分子とT細胞表面分子の抗原決定基との間の非ランダム結合反応である。所望の結合特異性は、典型的には、抗体がT細胞表面分子および無関係な抗原に差別的に結合し、特に2つの抗原が独特のエピトープを有する場合に2つの異なる抗原間を区別する能力

10

20

30

40

50

の基準点によって決定される。特に特定のエピトープに特異的に結合する抗体を「特異的抗体」と称する。

【0034】

癌：特徴的な退形成を受けて分化状態を喪失し、増殖速度を増大し、周囲組織を侵襲する、転移することができる悪性新生物。

【0035】

cDNA（相補DNA）：内部の非コード部分（インtron）および転写を決定する調節配列を欠いているDNA断片。cDNAは、細胞から抽出したメッセンジャーRNAから逆転写によって実験室において合成することができる。

【0036】

化学合成：タンパク質またはペプチドを作ることができる人為的手段。合成タンパク質またはペプチドは、このような人為的手段によって作製されるものである。

【0037】

化学療法：癌治療法において、化学療法とは、化合物の1つまたは組み合わせを投与して、急速に増殖する細胞を殺すまたは再生産を減速させることをいう。化学療法剤は、以下のものを含む当業者に既知のものを含むが、これらに限定されない：5-フルオロウラシル（5-FU）、アザチオプリン、シクロホスファミド、代謝拮抗剤（フルダラビンなど）、抗新生物剤（エトポシド、ドキソルビシン、メトトレキセート、およびピンクリスチンなど）、カルボプラチニン、シスプラチニン（cis-platinum）、ならびにタキソールおよびタキソテールなどのタキサン類。このような薬剤は、被検体に対して開示されたバリアントPA分子と共に同時投与することもできる。代わりに、または加えて、被検体に対して開示されたバリアントPA分子を投与する前および／または後に、化学療法剤を投与することができる。1つの例において、化学療法剤は、局在性前立腺癌腫の治療のために、ホルモン療法および放射線療法と、開示されたバリアントPA分子と共に同時投与される。

【0038】

保存的な置換：同種の生化学的特性を有するアミノ酸残基の1つまたは複数のアミノ酸置換（たとえば2、5、または10個の残基）。典型的には、保存的な置換は、生じるポリペプチドの活性に対してほとんど影響を有さないか、または全く有さない。たとえば、理想的には、1つまたは複数の保存的な置換を含む修飾PAペプチドは、プロアエロリシン活性を保持する。ポリペプチドは、たとえば、部位特異的突然変異またはPCRなどの標準的な手順を使用してそのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を操作することによって、1つまたは複数の保存的な置換を含むように生じさせることができる。

【0039】

置換バリアントは、アミノ酸配列の少なくとも1つの残基が除去され、その位置に異なる残基が挿入されたものである。タンパク質において元のアミノ酸を置換してもよく、保存的な置換と考えられるアミノ酸の例は、以下を含む：Alaに対してSer；Argに対してLys；Asnに対してGlnまたはHis；Aspに対してGlu；Cysに対してSer；Glnに対してAsn；Gluに対してAsp；Glyに対してPro；Hisに対してAsnまたはGln；Ileに対してLeuまたはVal；Leuに対してIleまたはVal；Lysに対してArgまたはGln；Metに対してLeuまたはIle；Pheに対してMet、LeuまたはTyr；Serに対してThr；Thrに対してSer；Trpに対してTyr；Tyrに対してTrpまたはPhe；および、Valに対してIleまたはLeu。

【0040】

非保存的なアミノ酸置換も許容される置換であるが、これもまた、有意にプロアエロリシン活性を変更しない。例は、配列番号：2または4の位置300のAlaに対するCysの置換である。

【0041】

保存的な置換についてのさらなる情報は、Ben-Bassatら（J. Bacteriol. 169 : 751-7, 1987）、O'Reganら（Gene 77 : 237-51, 1989）、Sahin-Tothら（Protein Sci. 3 : 240-7, 1994）、Hochuliら（Bio/Technology 6 : 1321-5, 1988）、国際公開公報第00/67796号（Curdら）において、ならびに遺伝学および分子生物学の標準的な教科書において、その他

10

20

30

40

50

の位置においても見出すことができる。

【0042】

一つの例において、このようなバリエントは、バリエントがバリエントPA活性を保持するかどうか決定するためのアッセイ法（実施例2～5に記載されたものなど）を実行することによって、さらなる試験のために容易に選択することができる。

【0043】

含む：「含むこと」を意味する用語。たとえば、「AまたはBを含む」は、他に明瞭に示されない限り、AもしくはB、またはAおよびBの両方ともを含む。

【0044】

欠失：いずれの側面の領域も共に接続されている核酸、たとえばDNAの配列の除去。

10

【0045】

DNA：デオキシリボ核酸。DNAは、大部分の生存生物の遺伝物質を含む長い鎖の重合体である（一部のウイルスは、リボ核酸（RNA）を含む遺伝子を有する）。DNA重合体の反復単位は、4個の異なるヌクレオチドであり、それぞれは、リン酸基が付着したデオキシリボース糖に結合した4つの塩基、アデニン、グアニン、シトシン、およびチミンのうちの1つを含む。ヌクレオチドのトリプレットは、ポリペプチドにおけるアミノ酸をコードするDNA分子のコドンと称される。また、コドンの用語は、DNA配列が転写されるmRNAにおける対応する（および相補的な）3つのヌクレオチド配列についても使用される。

【0046】

増強する：品質、量、または何かの強度を改善すること。1つの態様において、被検体が腫瘍との戦いにより有効な場合、治療は、被検体が前立腺癌などの腫瘍を減少する能力を増強する。もう1つの態様において、薬剤が腫瘍の減少により有効な場合、治療は被検体において薬剤の前立腺癌などの腫瘍を減少する能力を増強する。このような増強は、本明細書に開示された方法、たとえば、腫瘍体積の減少の決定を使用して測定することができる（実施例5を参照されたい）。

20

【0047】

機能的欠失：遺伝子配列になされる変異、部分的もしくは完全な欠失、挿入、またはその他のバリエーションであって、遺伝子配列の一部を機能しなくさせる。

【0048】

たとえば、PA結合ドメインの機能的欠失は、PAが細胞膜に結合する能力および細胞膜において濃縮する能力の減少を生じる。この機能的欠失は、プロアエロリシンに、前立腺特異的な結合ドメイン、たとえばLHRHペプチドなどの、別の機能的結合ドメインを挿入することによって逆転することができる。

30

【0049】

機能的にプロアエロリシン結合ドメインを欠失させるために使用することができる方法の例は、以下を含むが、これらに限定されない：配列番号：2のおよそアミノ酸1～83、もしくは配列番号：2のおよそアミノ酸45～66などの、その断片の欠失、またはバリエントプロアエロリシン配列に以下の変異の1つまたは複数を挿入すること、W45A、I47E、M57A、Y61A、K66Q（アミノ酸番号は、配列番号：2を参照）（たとえば、Mackenzieら、J. Biol. Chem. 274 : 22604-22609, 1999を参照されたい）。

40

【0050】

もう1つの例では、天然のPAのフリン切断部位の機能的欠失により、野生型PA分子と比較して、フリンによってPAが切断および活性化される能力の減少を生じる。

【0051】

固定された：固体の表面などの、表面に結合されていること。固体の表面は、ポリスチレンまたはポリプロピレンなどの重合体であることもできる。1つの態様において、固体の表面は、ビーズの形態である。もう1つの態様において、表面は修飾PA毒素を含み、いくつかの例において、LHRHペプチド、PSMA抗体、およびPSMA単鎖抗体などの1つまたは複数の前立腺特異的な結合リガンドをさらに含む。理想的には、一旦ビーズが前立腺細胞標的に達したならば、修飾PA毒素はビーズから解放される。固体の表面上にペプチドを固定

50

する方法は、国際公開公報第94/29436号、および米国特許第5,858,358号において見出すことができる。

【0052】

分子をビーズに付着させることができる方法の例は、以下を含むが、これらに限定されない：PA毒素-PSA切断部位-ビーズ-前立腺結合リガンド；または、前立腺結合リガンド-ビーズ-PSA部位-PA毒素-PSA切断部位-阻害剤。

【0053】

単離された：「単離された」生物学的成分（核酸分子またはタンパク質など）は、成分が天然に存在する生物の細胞のその他の生物学的成分（すなわち、その他の染色体および染色体外のDNAならびにRNA）から実質的に分離されたか、または精製されている。「単離された」核酸およびタンパク質は、標準的な精製法によって精製された核酸およびタンパク質を含む。また、本用語は、宿主細胞に組換え発現することによって調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学的に合成した核酸およびタンパク質を包含する。10

【0054】

単離された細胞は、細胞が天然に存在する生物のその他の生物学的成分から実質的に分離されたまたは精製されたものである。

【0055】

悪性：退形成侵襲および転移の特性を有する細胞。

【0056】

哺乳類：この用語は、ヒトおよび非ヒト哺乳類を共に含む。同様に、「被検体」の用語は、ヒトおよび家畜の両方の被検体を含む。哺乳類の例は、ヒト、ブタ、ウシ、ヤギ、ネコ、イヌ、ウサギ、およびマウスを含むが、これらに限定されない。20

【0057】

新生物：異常な細胞増殖。

【0058】

正常細胞：非腫瘍細胞、非悪性、非感染細胞。

【0059】

オリゴヌクレオチド：長さが約200ヌクレオチド塩基までの直鎖状ポリヌクレオチド配列、たとえば少なくとも約6ヌクレオチド、たとえば少なくとも15、50、100、または200ヌクレオチドの長さであるポリヌクレオチド（DNAまたはRNAなど）。30

【0060】

操作可能な状態で結合される：第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的に関連して配置されるとき、第1の核酸配列は操作可能な状態で第2の核酸配列に結合されている。たとえば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターは操作可能な状態でコード配列に結合している。一般に、操作可能な状態で結合されたDNA配列は隣接しており、2つのタンパク質コード領域を接続することが必要である場合には、同じ読み枠にある。

【0061】

ORF（オープンリーディングフレーム）：いかなる終止コドンも有さないアミノ酸をコードする一連のヌクレオチドトリプレット（コドン）。これらの配列は、通常ペプチドに翻訳される。40

【0062】

ポリヌクレオチド：任意の長さの直鎖状核酸配列。したがって、ポリヌクレオチドは、少なくとも15、50、100、200、400、500、1000、1100、または1200（オリゴヌクレオチド）である分子および全長cDNAまたは染色体と同等の長さのヌクレオチドを含む。

【0063】

プロアエロリシン：エロリシンの不活性プロトキシン。野生型または天然のプロアエロリシンのcDNAおよびタンパク質は、それぞれ配列番号：1および2に示してある。

【0064】

1つの例において、バリエントまたは修飾プロアエロリシン分子は、PSA特異的な切断部50

位などの前立腺特異的なプロテアーゼ切断部位を含み、これは、PSA、PMSA、またはHK2(たとえば、図5C-1を参照されたい)などの前立腺特異的なプロテアーゼの存在下において、バリアントPAを活性化させる。1つの例において、前立腺特異的なプロテアーゼ切断部位は、PAの天然のフリン切断部位に挿入され、その結果、PAは前立腺特異的なプロテアーゼの存在下において活性化されるが、フリンではされない(たとえば、図5D-1を参照されたい)。または、フリン切断部位は、6アミノ酸配列の突然変異生成、および前立腺特異的なプロテアーゼ切断配列(たとえば、図5Cを参照されたい)の挿入を使用して、機能的に欠失させることができる。もう1つの例では、バリアントPA分子は、天然のPAアミノ酸のうちの少なくとも2つなどの、1つまたは複数の欠失または置換をさらに含む。さらにもう1つの例において、バリアントPA分子は、バリアントPA分子に(または、分子内に)結合されたか、または付加された別の分子(抗体またはペプチドなど)をさらに含む。もう1つの例では、バリアントPA分子は、前立腺組織特異的な結合ドメインを含む。

【0065】

もう1つの例では、バリアントPA分子は、機能的に欠失した結合ドメイン(配列番号:2のおよそアミノ酸1~83)をさらに含む。機能的欠失は、欠失、挿入、変異、または置換などの当該技術分野において既知のいかなる方法を使用して作製することもできる。例には、全ての結合ドメインを欠失させること(もしくはその一部(たとえば、図5G-1を参照されたい))、または点変異の導入(上記のものなど(たとえば、図5D-Fを参照されたい))を含み(しかし、これらに限定されない)、これにより機能が減少された結合ドメインを生じる。たとえば、結合ドメインが機能的に欠失されたPA分子(したがって置換された結合配列はない)は、細胞膜に蓄積する能力が減少され、したがって、野生型PA配列(たとえば、図5Dを参照されたい)より遅い速度で細胞が溶解する。また、天然の結合ドメインを機能的に欠失させ、後述するように前立腺組織特異的な結合ドメイン(たとえば、図5E-1を参照されたい)によって置換したバリアントPA分子も開示する。

【0066】

もう1つの例では、バリアントまたは修飾PA分子は、フリン切断部位、および前立腺組織特異的な結合ドメイン(たとえば、図5J-Mを参照されたい)によって置換された機能的に欠失した結合ドメインを含む。このようなバリアントPA分子は、前立腺組織特異的な結合ドメインを介して前立腺細胞にターゲットされ、フリンの存在下において活性化される。

【0067】

バリアントPSAタンパク質の特定の限定されない例を、配列番号:4、7、10、13、24、および25に示す。

【0068】

修飾PAの活性は、細胞の溶解が影響を受ける薬剤の活性である。細胞は、ゆっくりと増殖する前立腺癌細胞などの前立腺癌細胞などの、PSA分泌細胞などの前立腺特異的なプロテアーゼを分泌する細胞を含むが、これに限定されない。薬剤は、修飾PAタンパク質、核酸、特異的な結合剤を含み、本明細書に開示されたバリアント、ミュータント、多型、融合体、およびその断片を含むが、これらに限定されない。1つの例において、修飾PAの活性は、PAタンパク質またはPA核酸を修飾したときに増強され、PSA分泌細胞(前立腺癌細胞など)と接触したときに、非PSA産生細胞の溶解と比較して、細胞の溶解および死亡を、たとえば少なくとも10%まで、またはたとえば少なくとも25%、50%、100%、200%、または500%までさえ促進するものをいう。その他の例において、修飾PAの活性は、PAタンパク質またはPA核酸を修飾したときに増強され、腫瘍と接触したときに、前立腺腫瘍などの腫瘍細胞体積を、たとえば少なくとも10%、たとえば少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または100%(腫瘍の完全な除去)までさえ減少させるものをいう。

【0069】

薬剤が修飾PA活性を有するかどうかを決定するために使用することができるアッセイ法は、本明細書に、たとえば実施例2~5および9に記載されている。たとえば、修飾PAペプ

10

20

30

40

50

チドは、これが特異的にPSA産生細胞（実施例2および5）を溶解させる能力について評価することができ、ヒト血漿において安定であり（実施例3）、PSA酵素活性の効率的な基質である（実施例9）。機能的タンパク質の活性は、非PSA産生細胞に対するPSA産生細胞の優先的な溶解によって検出することができ、前立腺腫瘍体積を減少し、野生型PAと比較したときに毒性が減少され、野生型PAと比較したときに血液中での安定性が増大される。

【0070】

本明細書に開示された修飾PA薬剤が、腫瘍体積（前立腺腫瘍などの）を減少させることができ、特異的にPSA産生細胞を溶解させることができるとどうかを決定するために、同種のアッセイ法を使用することができる。たとえば、配列番号：4、24、および25で示される修飾PAペプチドは、前立腺腫瘍体積を減少させると期待される。精製されたタンパク質を投与する代わりに、修飾PA遺伝子、ならびにそのバリアント、融合物、および断片のインビオにおける発現を使用することにより、これらのアッセイ法のどれをも修飾することができる。

10

【0071】

プロモーター：核酸の転写を指示する核酸制御配列の配列。プロモーターは、ポリメラーゼIIタイププロモーターの場合のTATAエレメントなどの転写開始部位の近くに必要な核酸配列を含む。また、プロモーターは、選択的に、転写開始部位から数千塩基対ほどに位置し得る遠位のエンハンサーまたはリプレッサーエレメントを含む。

【0072】

前立腺特異的なプロモーター：テストステロンおよびその他のアンドロゲンに応答するプロモーターであり、したがって、これは、前立腺細胞の遺伝子発現を促進する。例には、プロバシン（probasin）プロモーター；前立腺特異的抗原（PSA）プロモーター；前立腺特異的膜抗原（PSMA）プロモーター；およびヒト腺性カリクレイン2（HK2）プロモーターを含むが、これらに限定されない。

20

【0073】

前立腺特異的プロテアーゼ切断部位：前立腺特異的プロテアーゼによって認識され、特異的かつ効率的に加水分解される（切断される）アミノ酸配列。例には、PSA特異的切断部位、PSMA特異的切断部位、およびHK2特異的切断部位を含むが、これらに限定されない。

【0074】

30

PSA特異的切断部位は、前立腺特異的な抗原（PSA）によって認識され、特異的かつ効率的に加水分解される（切断される）アミノ酸配列である。PSAによって活性化されるプロドラッグを產生するために、このようなペプチド配列を、PAなどのその他の分子に導入することもできる。PSAによる修飾PAの活性化によって、PAは活性化され、その細胞毒性を及ぼすことができる。PSA特異的な切断部位の例は、配列番号：5、8、11、および14~21に示したもの、DeFeo-Jonesらに対する米国特許第5,866,679号、Garskyらに対する第5,948,750号、Fengらに対する第5,998,362号、Isaacsらに対する第6,265,540号、D'Amicoらに対する第6,368,598号、およびFengらに対する第6,391,305号に開示されたもの（全てが、本明細書に参照として組み入れられる）を含むが、これらに限定されない。

【0075】

40

PSMA特異的な切断部位の特定の例は、IsaacsおよびDenmeadeに対する国際公開公報第0243773号（本明細書に参照として組み入れられる）において見出すことができる。HK2特異的な切断部位の特定の例は、Denmeadeらに対する国際公開公報第0109165号（本明細書に参照として組み入れられる）において開示されている。

【0076】

前立腺組織特異的な結合ドメイン：前立腺細胞に対して、その他の細胞種よりも高い特異性を有するペプチドリガンド、毒素、または抗体などの分子。1つの例において、前立腺組織特異的な結合ドメインは、前立腺組織または細胞において、その他の細胞種よりも低い K_D 、たとえば少なくとも20、50、75、100、または200分の1よりさえも低い K_D などの、少なくとも10分1よりも低い K_D を有する（すなわち、被検体のその他の正常組織と比較

50

して、選択的に前立腺組織に結合する）。このような配列は、バリアントPA分子などの薬剤を前立腺に対して標的化するために使用することができる。例には：PSA、PSMA、hK2、プロスタシン（prostasin）、およびヘプシン（hepsin）などの比較的前立腺特異的であるタンパク質を認識する抗体；天然および合成の黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）などの前立腺選択的受容体を有するリガンド；ならびに、エンドセリン（同族のエンドセリン受容体に対して結合する）を含むが、これらに限定されない。

【0077】

精製された：「精製された」の用語は、絶対的な純度を必要とせず；むしろ、それは相対的な用語であることが企図される。したがって、たとえば、実質的に精製されたタンパク質または核酸標品（本明細書に開示した修飾PA毒素など）は、参照するタンパク質または核酸が、細胞内の、または産生反応容器（適切なもの）内のその天然の環境におけるタンパク質よりも純粋なものである。たとえば、タンパク質が、標品の総タンパク含有量の少なくとも50%、たとえば少なくとも70%を示す場合、修飾PAタンパク質標品は精製されている。タンパク質および核酸の精製のための方法は、当該技術分野において周知である。修飾PAなどのタンパク質を精製するために使用することができる方法の例は、Sambrookらに開示された方法を含むが、これに限定されない（*Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1989, Ch. 17）。

10

【0078】

組換え：組換え核酸は、天然に存在しない配列を有するか、または2つの、さもなければ分離された配列の部分の人為的な組み合わせによって作製される配列を有するものである。この人為的な組み合わせは、化学合成によって、またはより一般的には、単離された核酸の部分の人為的操作をすることによって、たとえば遺伝子操作技術によって達成されることが多い。組換えタンパク質は、タンパク質をコードする組換え核酸の発現により生じるものである。

20

【0079】

試料：被検体の細胞から得られるゲノムDNA、cDNA、RNA、またはタンパク質を含む、末梢血液、尿、唾液、精液、組織生検、外科検体、針吸引、羊水穿刺試料、および剖検材料に存在するものなどの生体試料。1つの例において、試料は、被検体から得られる前立腺癌細胞を含む。

【0080】

30

配列同一性 / 類似性：2つ以上の核酸配列または2つ以上のアミノ酸配列の間の同一性 / 類似性は、配列間の同一性または類似性に関して表される。配列同一性は、パーセンテージ同一性に関して測定することができ；より高いパーセンテージでは、配列はより同一である。配列類似性は、パーセンテージ類似性（保存的なアミノ酸置換を考慮に入れる）に関して測定することができ；より高いパーセンテージでは、配列はより類似である。

【0081】

比較のための配列のアラインメントの方法は、当該技術分野において周知である。種々のプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが以下のものに記載されている：Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2 : 482, 1981 ; Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48 : 443, 1970 ; Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 2444, 1988 ; Higgins & Sharp, *Gene*, 73 : 237-44, 1988 ; Higgins & Sharp, *CABIOS* 5 : 151-3, 1989 ; Corpetら、*Nuc. Acids Res.* 16 : 10881-90, 1988 ; Huangら、*Computer Apps. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992 ; および、Pearsonら、*Meth. Mol. Bio.* 24 : 307-31, 1994。Altschulら、*J. Mol. Biol.* 215 : 403-10, 1990では、配列アラインメントおよび相同性計算の方法の詳細な考察を提示されている。

40

【0082】

配列解析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastn、およびtblastxに関して使用するに、NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschulら、*J. Mol. Biol.* 215 : 403-10, 1990) は、National Center for Biological Information (NCBI, National Library of Medicine, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894) および

50

インターネット上を含むいくつかの供与源から入手可能である。さらなる情報は、NCBIウェブサイトで見出すことができる。

【0083】

約30アミノ酸を超えるアミノ酸配列の比較のためには、Blast 2配列機能を、デフォルトパラメータ（gap existence costは11、per residue gap costは1）にセットしたデフォルトBLOSUM62マトリックスを使用して採用する。短いペプチド（約30より少ないアミノ酸）を整列させる場合、アラインメントは、デフォルトパラメータ（open gap 9、extension gap 1 penalties）にセットしたPAM30マトリックスを用いて、Blast 2配列機能を使用して行われなければならない。この方法によって評価したときに、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%もの配列同一性などの、参照配列に対してより大きな類似性を有するタンパク質は、パーセンテージ同一性が増大することを示す。全長よりも短い配列を配列同一性について比較するときは、相同体は、典型的には10～20アミノ酸の短い領域にわたって少なくとも75%の配列同一性を有し、参照配列に対するこれらの同一性に依存して少なくとも85%、90%、95%、または98%の配列同一性を有し得る。このような短い領域にわたる配列同一性を決定するための方法は、NCBIウェブサイトに記載されている。10

【0084】

タンパク質相同体は、典型的には、nrまたはswissprotデータベースなどのデータベースでNCBI Basic Blast 2.0、gapped blastpを使用して、アミノ酸配列を全長アラインメントを通じて計数すると、少なくとも70%、たとえば少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、または98%もの配列同一性を有することによって特徴づけられる。blastnプログラムによって検索されるクエリーは、DUSTでフィルターをかける（HancockおよびArmstrong, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10 : 67-70）。その他のプログラムでは、SEGを使用する。20

【0085】

当業者であれば、これらの配列同一性の範囲が、ガイダンスのみのために提供されることを認識し；非常に有意な相同体が、提供された範囲外において得られる可能性がある。上記したペプチド相同体、ならびにこのような相同体をコードする核酸分子が、本明細書に提供される。

【0086】

遺伝コードの縮重のために、同一のまたは類似の（保存された）アミノ酸配列をコードするにもかかわらず、高度な同一性を示さない核酸配列である可能性もある。全てが実質的に同じタンパク質をコードする多くの核酸分子を作製するために、この縮重を使用して核酸配列を変化させることもできる。このような相同的ペプチドは、たとえば、この方法によって決定されるものとして少なくとも75%、80%、90%、95%、98%、または99%の配列同一性を有することができる。全配列よりも短い配列の同一性を比較するときは、相同体は、たとえば、10～20アミノ酸の短い領域にわたって少なくとも75%、85%、90%、95%、98%または99%の配列同一性を有し得る。このような短い領域にわたる配列同一性を決定するための方法は、NCBIウェブサイトに見出すことができる。当業者であれば、これらの配列同一性の範囲が、ガイダンスのみのために提供されることを認識し；有意な相同体またはその他のバリエントが、提供された範囲外において得られる可能性がある。3040

【0087】

被検体：生きている多細胞脊椎動物生物、このカテゴリーには、所望の生物学的效果の増加を必要とするヒトおよび家畜の被検体を含む。例には：ヒト、類人猿、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ブタ、およびウシを含むが、これらに限定されない。

【0088】

治療的に有効な量：所望の生物学的效果を達成するために十分な量、たとえば前立腺癌の大きさ（すなわち体積）、副作用、および／または転移を減少させるために有効である量。1つの例において、腫瘍の大きさなどの前立腺癌腫の症状または効果を減少させるために十分な量である。特定の例において、少なくとも30%、40%、50%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%（腫瘍の完全除去）までさえ前立腺腫瘍および／または前立腺転移の50

大きさを減少させるために有効な量である。

【0089】

特定の例において、これが投与された被検体、たとえば1つまたは複数の前立腺癌腫を有する被検体においてなど、前立腺腫瘍を減少させるために有効な修飾PA分子の量および／または修飾PAによって溶解される前立腺癌細胞の量である。その他の例において、これは、前立腺癌腫の転移を減少させるために有効な、修飾PA分子の量および／またはこのような修飾PA分子によって溶解された前立腺癌細胞の量である。

【0090】

1つの態様において、治療的に有効な量は、また、治療される被検体において所望の効果を達成するために十分な、修飾PAの量および／または修飾PAによって溶解された前立腺癌細胞の量を含む。たとえば、これらは、癌、たとえば前立腺癌などの疾患の徴候および／または症状を改善するために必要な量であり得る。

10

【0091】

修飾PAおよび／またはこのような修飾PA分子によって溶解された前立腺癌細胞の有効な量は、治療の経過の間に単一用量で、または数回の用量、たとえば毎日投与することができる。しかし、有効な量は、治療される被検体、治療される症状の重篤さおよびタイプ、ならびに投与方法に依存する。たとえば、治療的に有効な修飾PAの量は、ivで投与される場合、70kg体重につき約1～10mgで変更することができ（たとえば約2.8mg）、前立腺内にまたは腫瘍内に投与される場合には、70kg体重につき約10～100mgで投与することができる（たとえば約28mg）。加えて、PA（バリアントまたは野生型）によって溶解された前立腺癌細胞の治療的に有効な量は、約 10^6 ～ 10^8 細胞で変更することもできる。

20

【0092】

治療的に有効な用量：1つの例において、投与される被検体において、病状の回復を生じるか、またはその病状によって引き起こされる徴候もしくは症状を軽減することができる、前立腺癌腫などの腫瘍細胞体積を減少させるために十分な修飾PAの用量。特定の例において、前立腺癌の転移を減少させるために十分な修飾PAの用量である。

【0093】

さらにもう1つの例において、投与される被検体において、病状の回復を生じるか、または本病状によって引き起こされる徴候もしくは症状を軽減することができる、前立腺癌腫などの腫瘍細胞体積を減少させるために十分な修飾PAと細胞の接触により生じる細胞可溶化液の用量である。特定の例において、前立腺癌の転移を減少させるために十分な修飾されたまたは野生型PAと細胞の接触により生じる細胞可溶化液の用量である。

30

【0094】

腫瘍：新生物。 固形および血液の（または液体）腫瘍を含む。

【0095】

血液腫瘍の例は、以下のものを含むが、これらに限定されない：急性白血病（急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髓性白血病、ならびに骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄单球性、单球性の白血病、および赤白血病など）、慢性白血病（慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病、慢性骨髓性白血病、および慢性リンパ球性白血病など）を含む白血病、真性多血症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（低度、中度、および高度のものを含む）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、マントル細胞リンパ腫、ならびに脊髄形成異常。

40

【0096】

肉腫および癌腫などの固形腫瘍の例は、以下のものを含むが、これらに限定されない：線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、およびその他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、大腸癌腫、悪性リンパ球、膵臓癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌腫、乳頭状癌、乳頭状腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛膜癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、睾丸腫瘍、膀胱癌腫、ならびに中枢神経系腫瘍（神経膠腫、神経膠星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管

50

芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、メナンジオーマ(menangioma)、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫など)。

【0097】

形質転換される：形質転換細胞は、分子生物学技術によって核酸分子が導入された細胞である。本明細書において使用されるものとして、トランスフォーメーションの用語は、核酸分子がこのような細胞に導入されるであろう全ての技術を含み、ウイルスベクターによるトランスフェクション、プラスミドベクターによるトランスフォーメーション、ならびにエレクトロポレーション、リポフェクション、および粒子銃加速による裸のDNAの導入を含む。

【0098】

トランスジェニック細胞：外来の非天然のDNAを含む形質転換細胞。

10

【0099】

トランスジェニック哺乳類：外来の非天然のDNAを含む形質転換哺乳類。1つの態様において、非天然のDNAは、配列番号：3などのPSA切断部位、または配列番号：24もしくは25で示されるタンパク質をコードする核酸配列を含む修飾PAである。

【0100】

バリアントまたは断片または融合タンパク質：修飾PAタンパク質の産生は、さまざまな方法で達成することができる(たとえば、実施例12および16を参照されたい)。修飾PAタンパク質もしくは融合タンパク、またはタンパク質の断片もしくはバリアント(たとえば修飾PAに対して80%、90%、または95%の配列同一性を有する断片またはバリアント)をコードするDNA配列は、真核細胞もしくは生物、細菌、昆虫、および/または植物にタンパク質を発現させるように操作することができる。発現を得るために、DNA配列を変更することもでき、操作可能な状態でその他の調節配列に結合させることもできる。調節配列および治療的な修飾PAタンパク質を含む最終産物は、ベクターと称する。このベクターは、真核細胞、細菌細胞、昆虫細胞、および/または植物細胞に導入することができる。一旦細胞内に入れば、ベクターによってタンパク質を産生させることができる。

20

【0101】

融合タンパクは、タンパク質の所望の活性、たとえばPSA分泌細胞を溶解させる能力を阻害しない他のアミノ酸配列に結合された修飾PA(またはそのバリアント、多型、ミュータント、もしくは断片)を含む。1つの例において、他のアミノ酸配列は、長さがせいぜい5、6、7、8、9、10、20、30、または50アミノ酸残基だけである。

30

【0102】

当業者であれば、コードされたタンパク質の生物学的活性に影響を及ぼすことなく、多くの方法でDNAを変更することができることを認識するであろう。たとえば、バリアントPA毒素をコードするDNA配列のバリエーションを作製するために、PCRを使用することができる。このようなバリアントは、タンパク質を発現させるために使用される宿主細胞のコドン優先度、または発現を容易にするその他の配列変化について、最適化されたバリアントでありうる。

【0103】

ベクター：宿主細胞に導入され、これにより形質転換された宿主細胞を生じる核酸分子。ベクターは、複製開始点などの、宿主細胞において複製することができる核酸配列を含むことができる。また、ベクターは、1つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子および当該技術分野において既知のその他の遺伝的エレメントを含むこともできる。

40

【0104】

分子遺伝学において共通に使用される用語のさらなる定義は、オックスフォード大学出版部によって刊行されたBenjamin Lewin, *Genes V*, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Blackwell Science Ltd.によって刊行されたKendrewら(eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); およびVCH Publishers, Inc.によって刊行されたRobert A. Meyers(ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)において見出すことができる。

50

【0105】

バリアントプロアエロリシン分子

アエロモナスヒドロフィリア (*Aeromonas hydrophilia*) によって產生されるアエロリシンおよびスタファウレウス (*Staph aureus*) によって產生される - 溶血素などの細菌性の毒素は、形質膜においてオリゴマー形成して細孔を生じ、急速な細胞溶解性細胞死を引き起こす シートタンパク質である(図1)。細孔形成は、物理的に細胞膜を崩壊させ、非増殖細胞(すなわちG0静止しているもの)を含む全ての細胞周期段階の細胞死を生じる。しかし、野生型アエロリシンは、無差別に細胞を死滅させる。前立腺癌特異的なタンパク質にターゲットされ、かつ活性化され得るアエロリシンの不活性プロトキシン形態(バリアントPA)を本明細書に開示する。局在性および転移性の前立腺癌の治療のための、開示されたバリアントPA分子の1つの利点は、前立腺特異的な薬剤デリバリーと増殖非依存的な治療を組み合わせて、患者に対する副作用を最小にすることである。当業者であれば、クロストリジウムセプティカム (*Clostridium septicum*) アルファ毒素、バチルスチュリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*) デルタ毒素、およびヒトバーフォリンなどのその他のプロトキシンを、プロアエロリシンの代わりに使用することができるこ¹⁰と理解するであろう。

【0106】

前立腺特異的なプロテアーゼ切斷配列を含む、DNAおよびタンパク質配列の両者を含むバリアントPA分子を本明細書に開示する。前立腺特異的なプロテアーゼ切斷配列の例は、PSA、PSMA、およびHK2切斷配列を含むが、これらに限定されない。前立腺特異的なプロテアーゼ切斷配列は、PAの天然のフリン切斷部位を機能的に置換する(たとえば、図5B-Iを参考されたい)。この置換は、PSA、PSMA、またはhK2などの酵素的に活性なプロテアーゼの存在下においてのみ、細胞溶解的に活性になるプロアエロリシンバリアントを生じる。PSAは、特異的ペプチド配列を認識し、加水分解する能力を有するセリンプロテアーゼである。これは、酵素的に活性な形態で正常および悪性前立腺細胞によって分泌され、循環に入ると即座に不活性化される。前立腺以外の血液も正常組織も、酵素的に活性なPSAを含まないので、PSAのタンパク分解性活性を、前立腺癌部位においてプロトキシンを活性化するために使用した。いかなるPSA、PSMA、またはhK2切斷部位を使用することもできる。PSA切斷部位の例は、配列番号：5、8、11、および14～21に示されるものを含むが、これらに限定されない。特定の例において、PSA切斷部位は、配列番号：5を含む。²⁰

【0107】

一部の例において、PAのフリン切斷部位(配列番号：2のアミノ酸427～432)を欠失させ、PSA切斷部位などの、前立腺特異的なプロテアーゼ切斷部位が挿入される(たとえば、図5Bを参考されたい)。その他の例において、PAのフリン切斷部位を変異させ、PSA切斷部位などの、前立腺特異的なプロテアーゼ切斷部位が、フリン部位(たとえば、図5Cを参考されたい)のN末端もしくはC末端に挿入され、または付加される。

【0108】

また、PA結合ドメインが機能的に欠失されたバリアントPA分子を開示する(たとえば、図5D～Mを参考されたい)。このようなバリアントPA分子は、天然のフリン切斷部位を含むことができ(たとえば、図5J～Mを参考されたい)、これにより、前立腺細胞に対するターゲティングが、前立腺組織特異的な結合ドメインでPA結合ドメインを機能的に置換することによって達成される。または、バリアントPA分子は、前立腺特異的なプロテアーゼ切斷部位を含み(たとえば、図5D-Iを参考されたい)、これにより、主に前立腺特異的なプロテアーゼを分泌する細胞において、プロトキシンの活性化が起こる。PA結合ドメインは、配列番号：2のおよそアミノ酸1～83を含む。結合ドメインは、当該技術分野において既知のいずれかの方法を使用して、たとえば結合ドメインのアミノ酸の全てまたはいくつかの欠失によって、配列番号：2もしくは4のアミノ酸1～83の欠失など(たとえば、図5Gを参考されたい)、または配列番号：2もしくは4のアミノ酸45～66として示される1つまたは複数のアミノ酸の欠失(たとえば、図5Dを参考されたい、*は、1つまたは複数の欠失を表す)などによって機能的に欠失することができる。その他の例において、結合ドメイ³⁰ン

10

20

30

40

50

ンは、配列番号：2または4のW45A、I47E、M57A、Y61A、およびK66Qなどの、バリアントPA配列内の1つまたは複数の部位特異的突然変異の導入によって機能的に欠失する（たとえば、図5Dを参照されたい、*は、1つまたは複数の突然変異を表す）。

【0109】

天然のPA結合ドメインを機能的に置換する、前立腺組織特異的な結合ドメインを含むバリアントPA分子を開示する（たとえば、図5E、5F、5H、および5I～Mを参照されたい）。1つまたは複数の前立腺組織特異的な結合ドメインの使用により、前立腺細胞およびその転移に対する開示されたバリアントPA分子のターゲティングを増大することができる。いくつかの前立腺組織特異的な結合ドメインは、既知である。例には、配列番号：22および23に示したものなどの黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）配列、ならびにPSAおよび/またはPSMAを認識する抗体を含むが、これらに限定されない。10

【0110】

1つまたは複数の前立腺組織特異的な結合ドメインは、開示されたバリアントPA分子の1つまたは複数のアミノ酸に結合することもできるが、理想的には、PSAなどの前立腺特異的プロテアーゼによって活性化されるバリアントPAの能力、および細胞膜において細孔を形成する能力を有意に妨げないものである。たとえば、前立腺組織特異的な結合ドメインは、バリアントPAのN末端および/またはC末端に結合または挿入することができる（たとえば、図5Eおよび5Hを参照されたい）。一部の例において、N末端に対する前立腺組織特異的な結合ドメインの付着または連結が、配列番号：2または4のアミノ酸84に対して付着される（たとえば、図5Hおよび5Lを参照されたい）ように、PAの天然の結合ドメインを消失させる（すなわち、配列番号：2または4のアミノ酸1～83）。その他の例において、N末端に対する前立腺組織特異的な結合ドメインの付着または連結が、配列番号：2または4のアミノ酸1に対して付着される（または、いずれかのアミノ酸は、天然のPA結合ドメインの機能的欠失後のN末端である）ように、よりわずかな欠失または点変異がPAの天然の結合ドメインに導入される（たとえば、図5Eおよび5Iを参照されたい）。一部の例において、PAのN末端アミノ酸は、前立腺組織特異的な結合ドメインをバリアントPAタンパク質に結合することを補助するために、前立腺組織特異的な結合ドメインを付着する前に、Cysまたはその他のアミノ酸に変更される。20

【0111】

代わりに、または加えて、1つまたは複数の前立腺組織特異的な結合ドメインは、配列番号：2もしくは4のアミノ酸215もしくは300などの、バリアントPA分子のその他のアミノ酸に付着または結合させることもできる（たとえば、図5F、5I、5K、および5Mを参照されたい）。一部の例において、Cysアミノ酸は、その位置で天然のアミノ酸を置換する。たとえば、以下の変更を配列番号：2または4：Tyr215CysまたはAla300Cysに対して行うことができる。1つの例において、前立腺組織特異的な結合ドメインが抗体である場合、バリアントPAに抗体を付着するために、たとえばPAバリアントに位置するシステインと抗体上のアミノ基を反応することによる架橋を使用することができる（配列番号：2のアミノ酸Cys19、Cys75、Cys159、および/またはCys164など）。30

【0112】

また、配列番号：3、4、6、7、9、10、12、13、24、および25に示したものなどの、特定のバリアントPA分子を開示する。40

【0113】

一部の例において、開示されたバリアントPA分子は、ビーズなどの表面に結合または固定される。また、ビーズは、局在性または転移性の前立腺癌細胞などの前立腺細胞に対するターゲティングを増強するための前立腺特異的なリガンドを含むこともできる。

【0114】

修飾プロアエロリシンを使用する前立腺癌の治療

上で開示し、かつ論議したバリアントPA分子は、PSA、PSMA、およびhK2などの前立腺特異的なプロテアーゼのタンパク分解性活性を経て、特異的に活性化されて前立腺癌部位内で強力な細胞毒になる。一部の例におけるターゲティングは、前立腺癌細胞によって発現50

されたその同族LHRH受容体に結合することができるLHRHペプチド、または前立腺癌細胞の表面に発現したPSMAもしくはLHRHに結合することができるPSMAもしくはLHRH抗体などの、1つまたは複数の前立腺組織特異的な結合ドメインを含むことによって達成される。当業者であれば、フリン切断部位およびLHRHペプチドまたは抗体を含むバリアントPA分子の使用を、本明細書に開示されたバリアントPA分子および方法を使用して、黒色腫ならびに胸、卵巣、および肺における癌などの、LHRH受容体を発現するその他の癌を治療するために使用することができることを認識するであろう。さらに、当業者であれば、フリンまたはPSMA切断部位、および／またはPSMA抗体を含むバリアントPA分子の使用を、本明細書に開示したバリアントPA分子および方法を使用して、胸、結腸、腎臓、膀胱、および脳の癌などのPSMAが発現される（たとえば、腫瘍の血管において）その他の癌を治療するために使用することができることを認識するであろう。

【0115】

開示されたバリアントPA分子の核酸および／またはタンパク質などは、局在性または転移性の前立腺癌を有する被検体に対して、当該技術分野において既知の任意の方法を使用して、局所的または全身的に投与することができる。加えて、開示されたバリアントPA分子は、免疫賦活性治療のために被検体に投与することもできる。開示されたバリアントPA分子の結合および活性化の特異性のために、局部的および全身的な投与は、患者の正常組織に対して最小の効果を有し、かつ理想的には、ほとんど副作用を生じてはならない。

【0116】

1つの例において、開示されたバリアントPA分子は、局在性腫瘍などの前立腺癌を有する被検体の前立腺（前立腺内に）に、および／または前立腺腫瘍（腫瘍内に）に注入される。このような局在性注入およびその後の前立腺内の前立腺癌細胞の溶解により、治療された被検体の微小転移性病態の減少または除去を引き起こす免疫賦活性効果を生じる。このような方法で、全身性疾患は、毒性が最小の、局所的に適用される治療を介して治療または減少される。

【0117】

加えて、または代わりに、開示されたバリアントPA分子は、たとえば静脈内に、筋肉内に、皮下に、または経口で、転移性前立腺腫瘍などの前立腺癌を有する被検体に対して全身投与することができる。また、全身性の治療は、免疫賦活性抗癌効果を有し得る。PSA切断部位を含む開示されたバリアントPA分子は、血液内で血清プロテアーゼまたは酵素的に不活性のPSAによっては加水分解されない。その代わりに、加水分解されていない開示されたバリアントPA分子は、血液を経て、転移癌沈着物内の細胞外液に送達され、ここで、これらの前立腺癌細胞によって分泌される酵素的に活性なPSAによってこれらが加水分解されて治療的な毒素に活性化される。一旦加水分解されると、遊離した毒素は、その高い膜透過能により、すぐ周辺のPSA産生および非産生の傍観者（bystander）細胞に侵入し、これらの細胞の細胞溶解性の死を誘導する。

【0118】

被検体の前立腺癌の全身的に治療するためのさらなる方法も開示する。この方法では、前立腺癌細胞を、転移性前立腺腫瘍などの前立腺癌を有する被検体から除去する。代わりに、または加えて、確立された前立腺癌細胞株を使用することもできる。使用することができる前立腺癌細胞株の例は、LNCaP（ATCC番号CRL-1740およびCRL-10995など）およびCW R22R（ATCC番号CRL-2505およびNagabhusanら、Cancer Res. 56 (13) : 3042-6, 1996）などのPSA産生細胞、またはPC-3（ATCC番号CRL-1435）およびDU145（ATCC番号HTB-81）などのPSA非産生細胞を含むが、これらに限定されない。除去された細胞または細胞株を、開示されたバリアントPA分子とインキュベートまたは接触させる。このインキュベーションにより、バリアントPA分子による細胞の溶解、および被検体に投与される細胞可溶化液の產生を生じる。1つの例において、本方法は、免疫賦活性因子、免疫賦活性因子を產生するように操作された前立腺癌細胞からの可溶化液、および／または放射線照射を受けた前立腺癌細胞（免疫賦活性因子を產生するように操作された前立腺癌細胞を含む）を投与することをさらに含む。免疫賦活性因子の例は、顆粒球マクロファージコロニー刺激性因

10

20

30

40

50

子 (GM-CSF) ; インターロイキン2およびインターロイキン6など (しかし、これらに限定されない) のインターロイキンファミリーのタンパク質のメンバー、顆粒球コロニー刺激性因子 (G-CSF) ; ならびにインターフェロン 、 、 または などのインターフェロンファミリーのメンバーを含むが、これらに限定されない。被検体に対するこのような物質の投与は、細胞可溶化液と同時 (共投与) 、細胞可溶化液の投与前、および / または細胞可溶化液の投与後であることもできる。

【 0 1 1 9 】

1つの例において、このような投与は、被検体が前立腺腫瘍および / または転移性腫瘍の体積を減少させる能力を増強する。たとえば、開示された方法は、前立腺腫瘍細胞体積および / または転移性腫瘍細胞容積を、少なくとも10%まで、たとえば少なくとも20%以上までなど減少させることができる。加えて、開示された方法は、前立腺腫瘍および / または転移性前立腺腫瘍に伴う症状を減少させることができる。10

【 0 1 2 0 】

開示されたバリアントPA分子は、単一様式の治療として投与することができ、または放射線療法および / もしくはアンドロゲン除去療法 (LHRH受容体アゴニスト / アンタゴニスト、抗アンドロゲン、エストロゲン、副腎ステロイド合成阻害剤、ケトコナゾールおよびアミノグルテチミドなど) などのその他の治療と組み合わせて使用することもできる。加えて、開示されたバリアントPA分子の投与は、単独で、または薬学的に許容されるキャリアと組み合わせて、および / または投与されたバリアントPAタンパク質 (たとえば、Rituximabおよびステロイド) ならびにその他の抗腫瘍因子に対する抗体産生を減少させるものなどの、その他の治療的な化合物と組み合わせて行うことができる。20

【 0 1 2 1 】

ある特定の実施例の開示は、その他の態様を除外するものではない。加えて、本明細書に記載されているいかなる治療も、その他の治療を必ずしも除外するというわけではなく、その他の生物活性剤または治療様式と組み合わせることもできる。

【 0 1 2 2 】

実施例1

PSA活性化されたプロアエロリシン毒素の作製

本実施例には、表1に示したPSAによって活性化されるバリアントプロアエロリシン毒素を产生するために使用される方法を記載する。当業者であれば、PSAまたは他の任意の前立腺特異的なプロテアーゼによって活性化されるその他のバリアントプロアエロリシントンパク質を产生するために、同様の方法を使用することができることを理解するであろう。このようなタンパク質は、PSA特異的な切断配列 (実施例9を参照されたい) などの、前立腺特異的なプロテアーゼ切断部位を有するプロアエロリシンのフリン配列を置換することによって产生することができる。30

【 0 1 2 3 】

(表1) PSA特異的なプロアエロリシンバリアント

ミュータント (配列番号)	作製した変更(配列番号)	wt プロアエロリシンとの比較
		ADSKVRRARSDGAGQGLRLEIPLD (配列番号:2の aa 424-448)
PSA-PA1 (3 & 4)	KVRRAR (配列番号:2のaa 427-432) を HSSKLQ (5) に変更した	ADSHSSKLQSDGAGQGLRLEIPLD (配列番号:4の aa 424-448)
PSA-1K (6 & 7)	KVRRARSV (配列番号:2のaa 427-432) を HSSKLQSA (8) に変更した	ADSHSSKLQSADGAGQGRLEIPLD (配列番号:7の aa 424-448)
PSA-PA2 (9 & 10)	KVRRAR (配列番号:2のaa 427-432) を QFYSSN (11) に変更した	ADSQFYSSNSVDGAGQGLRLEIPLD (配列番号:10の aa 424-448)
PSA-PA3 (12 & 13)	KVRRAR (配列番号:2のaa 427-432) を GISSFQS (14) に変更した	ADSGISSFQSSVDGAGQGLRLEIPLD (配列番号:13の aa 424-448)

【 0 1 2 4 】

表1に示したバリエントまたは修飾プロアエロリシン(PA)は、6アミノ酸のフリンプロテアーゼ認識部位(配列番号 :2のアミノ酸427~432)がPSA基質によって置換されたプロアエロリシン配列(配列番号 :1および2に示した野生型PA)を含む。たとえば、PSA-PA1と名付けられたバリエントプロアエロリシン(PA)毒素(配列番号 :3および4)は、フリン切断部位がPSA基質HSSKLQによって置換されたPA配列(配列番号 :5)を含む。

【 0 1 2 5 】

エアロリシンのフリン部位(配列番号 :2のアミノ酸427~432)をPSA特異的な切断部位(配列番号 :5、8、11、または14)と置換するために、以前に記載した方法を使用する(Valletteら、Nucl. Acids Res. 17 : 723-33, 1988)、組換えPCRを使用した。簡単には、組換えPCRは、0.2mMのデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTPs)、0.5 μMのフォワードおよびリバースプライマー、0.1 μgの鑄型DNA、ならびに2.5ユニットのクローン化したpfuポリメラーゼのpfu反応緩衝溶液[20mMのトリス-HCl(pH8.8)、10mMのKCl、10mMの(NH₄)₂SO₄、2mMのMgSO₄、0.1%のTriton X-100、および0.1mg/mlのBSA]を含む最終体積50 μlにおいて行った。

【 0 1 2 6 】

形質転換細胞のプロアエロリシンインサートのスクリーニングは、Taqポリメラーゼを使用するPCRによって行った。反応混液は、0.2mMのdNTPs、0.5 μMのフォワードおよびリバースプライマー、ならびに5ユニットのTaqポリメラーゼを含むPCR反応緩衝液[50mMのKC l、1.5mMのMgCl₂、および10mMのトリス-HCl(pH9.0)]に調製した。この反応混液の10 μlの試料を0.2mlのチューブに等分し、形質転換細胞を滅菌爪楊枝を使用して添加した。

【 0 1 2 7 】

最終的なPCR産物を適切な制限酵素を使用して消化し、次いで、増幅のためにクローニングベクターpTZ18u(BioRad)にライゲーションした。簡単には、制限消化は、1 μgのDNA毎に約1ユニットの制限酵素を含むPharmacia One-Phor-AII緩衝液[10mMのトリス-酢酸(pH7.5)、10mMの酢酸Mg、および50mMの酢酸K]中で37 °Cにおいて90分間行った。生じたインサートおよびpTZ18uベクターDNAを、約5 : 1の比で混合し、45 °Cで15分間加熱した。その後、試料をOne-Phor-AII緩衝液に希釈して、粘着末端ライゲーションについては1mMまたは平滑末端ライゲーションについては0.5mMの終濃度に、ATPを添加した。次いで、11ユニットのT4 DNAリガーゼをそれぞれの試料に添加し、試料を穏やかに混合した。ライゲーションは、13 °Cにおいて4時間(粘着末端ライゲーション)または16時間(平滑末端ライゲーション)行った。

【 0 1 2 8 】

正しく置換がなされたことを確認するために、DNAシーケンシングを行った。その後、インサートをクローニングベクターから単離し、大腸菌の発現のために、広範な宿主域のプラスミドpMMB66HEにサブクローニングした(Fursteら、Gene 48 : 119-131, 1986)。大

10

20

30

40

50

腸菌DH5 細胞は、以前に記載されているCaCl₂洗浄法を使用して、形質転換受容性とした(Cohenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 : 2110-4, 1972)。対数期の細胞(OD₆₀₀=0.4~0.7)を遠心によって回収し、1/4体積の冷却した100mMのMgCl₂中で洗浄した。細胞を再びペレットにし、冷却した100mMのCaCl₂の2倍の体積に再懸濁した。次いで、約45分間細胞を氷中でインキュベートした。次いで、細胞を遠心分離し、1/10体積の100mMのCaCl₂に再懸濁した。15%の終濃度にグリセロールを添加する前に、さらに45分間インキュベーションを続けた。形質転換受容性細胞を使用するまで-70°で保存した。

【0129】

形質転換受容性の大腸菌細胞への組換えプラスミドの形質転換は、Inoueら(Gene 96 : 23-8, 1990)の方法に従って行った。形質転換受容性細胞(200 μlの一定分量)を0.5~10ngのDNAと共に氷上で1時間インキュベートした。次いで、細胞を42°で4分間熱ショックに供した。細胞を急いで氷上に戻して5分間おいた。その後、500 μlのLB培地をそれぞれの試料に添加し、細胞を軽くかき混ぜて37°で1時間インキュベートした。一定分量(150 μl)を50 μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天上へまいた。これらのプレートを37°において一晩(ON)インキュベートした。

【0130】

Harayamaら(Mol. Gen. Genet. 180 : 47-56, 1980)のフィルター接合技術を使用する接合によって、組換えpMMB66HEクローンをエアロモナスサルモニシダ(Aeromonas salmonicida)株CB3(Buckley, Biochem. Cell. Biol. 68 : 221-4, 1990を参照されたい)に導入した。このA.サルモニシダのプロテアーゼ欠損株の使用により、活性化したアエロリシンが混入していないプロアエロリシンバリエントを產生し、大量のタンパク質を產生した。最終的なプロアエロリシンタンパク質を、以前に述べられているようにヒドロキシアバタイトクロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーによって精製した(Buckley, Biochem. Cell. Biol. 68 : 221-4, 1990)。この方法により、バッチ間で同一のプロアエロリシンタンパク質を調製した。

【0131】

実施例2

PSA-PA1は、インビトロにおいてPSA産生細胞を特異的に溶解させる

本実施例は、実施例1に記載されているプロアエロリシンバリエントの特異性を決定するために使用する方法を記載する。このような方法は、PSA特異的な切断部位を含む任意のプロアエロリシンバリエントの特異性を試験するために使用することができる。

【0132】

PSA産生LNCaP細胞(アメリカンタイプカルチャーコレクション、Manassas、VA)および非PSA産生TSU細胞(T. Itzumi博士、帝京大学、日本)に対して、PSA-PA1毒素を試験した。細胞を10⁻¹²M~10⁻⁶Mの毒素の存在下において24時間インキュベートした。その後、トリパンブルーを排除する能力に基づいて細胞を計数し、パーセント生存細胞をスコアした。LNCaPおよびTSU株の両者に対する毒性について、50%の細胞を殺すために必要な濃度(I_{C₅₀})を決定した。

【0133】

PSA産生細胞に対するPSA-PA1のI_{C₅₀}は、10⁻¹⁰Mであった。対照的に、非PSA産生TSU細胞に対するI_{C₅₀}は約5×10⁻⁸Mであった。この結果は、PSA産生ヒト癌細胞株対非PSA産生ヒト癌細胞株についての毒性の500倍の相違によって証明されるように、PSA-PA1毒素がPSAによって特異的に活性化されることを示す。

【0134】

実施例3

PSA-PA1は、PSAを含む血液中で活性化されない

実施例1において記載されたものなどの、開示した前立腺特異的なプロテアーゼ活性化バリエントプロアエロリシンペプチドは、前立腺癌の局部的な治療薬として前立腺内(または腫瘍内に)に注入することができる。また、毒素は、転移性前立腺癌の全身性の治療薬として静脈内に(または筋肉内に)注入することもできる。大過剰モルの₁-抗キモト

リプシンおよび α_2 -マクログロブリンなどの血清プロテアーゼ阻害剤の存在のために、血液中ではPSAが酵素的に不活性化されているので、PSA部位を含むこれらのバリアントPA分子は、血液中では活性化されないはずである。

【0135】

ヒト血清中のその他の血清プロテアーゼおよびPSAによるPSA-PA1の非特異的な活性化について試験するために、感受性溶血アッセイ法を次のように行った。赤血球（RBC、2% v/v）を、PSA-PA1毒素±PSAを含む緩衝液または血漿に添加した。溶血の程度を、上清へのヘモグロビンの放出を測定することによってアッセイした。0.1%のトリトンの添加により、数秒以内に100%の溶血を生じ、陽性対照として使用した。加水分解の量は、トリトン処理した試料の吸光度に対する540nmにおける試料の吸光度の比として表した。RBCを添加する前に1時間、PSAの水性緩衝液中のみの溶液と共にPSA-PA1毒素（ 10^{-8} M）をブレインキュベーションすると、約45%の溶血を生じた（図2）。 10

【0136】

PSA-PA1がヒト血漿中で活性化されるかどうかを決定するために、PSA-PA1毒素（ 10^{-8} M）を50%のヒト血漿中で1時間インキュベートした。関連実験において、最初にヒト血漿中に過剰なPSA（10,000ng/ml）を添加し、数時間インキュベートした。次いで、血漿±PSAを含むPSA-PA1をヒトRBC（2% v/v）と共にインキュベートした。ヒト血漿にPSA-PA1を添加すること、または高濃度のPSAによってヒト血漿をスパイクすることによっては、測定できるほどの溶血は生じなかつた（すなわち、<1%トリトン対照）（図2）。これらの結果は、血液が測定可能なPSAを含む場合であっても、PSA-PA1が血液中でいかなる有意な活性化も伴わずに、全身的に投与することができることを示す。 20

【0137】

実施例4

インビトロおよびインビボにおける毒性プロアエロリシンバリアント

本実施例は、開示した修飾プロアエロリシンタンパク質のインビトロおよびインビボにおける毒性を決定するために使用される方法を記載する。このような方法は、すべての前立腺特異的なプロテアーゼで切断されるプロアエロリシンバリアントタンパク質の毒性を測定するために使用することができる。

【0138】

インビトロにおける毒性を決定するために、細胞生存率アッセイ法を次のように行った。E14マウスT細胞リンパ腫細胞（ATCC TIB-39）をMTS / PMS Cell Titer96（Promega）において 10^{+5} 細胞/ウェルで培養した。 1×10^{-13} M～ 1×10^{-7} Mのプロアエロリシンバリアントを図3に示すように添加し、細胞と共に37℃で4時間インキュベートした。その後、MTS / PMSキットの製造業者による指示通りに、プレートリーダー上でプレートを読み込んで細胞の生存率を決定した。図3に示したように、プロアエロリシンバリアントは、野生型プロアエロリシンよりも有毒ではなく、野生型の 1.5×10^{-10} のLC₅₀とは対照的に、 4×10^{-9} （PSA-PA1）、 1×10^{-9} （PSA-1K）、および 1×10^{-7} （PSA-PA2）のLC₅₀であった。 30

【0139】

インビボにおける毒性を決定するために、プロアエロリシンバリアントをマウスの静脈内に投与した。野生型プロアエロリシン（配列番号：2）は、マウスに非常に有毒であり； $1 \mu\text{g}$ の用量によって1時間以内に死が引き起こされ、一回のIV注入の24時間後のLD₁₀₀（すなわち、24時間以内に100%の動物を殺す用量）は、 $0.1 \mu\text{g}$ であった。対照的に、注入後24時間のPSA-PA1（配列番号：4）のLD₁₀₀は、25倍高かった（すなわち、 $2.5 \mu\text{g}$ 全量）。 40

【0140】

実施例5

PSA-PA1は、PSA分泌腫瘍細胞の体積を減少する

実施例4に記載した毒性データに基づいて、一連のLNCaPを有するマウス（PSAを産生するヒトLNCaP前立腺癌異種移植片）および一連のSN12Cを有するマウス（PSAを産生しないヒト腎癌異種移植片を有する対照マウス）に、 $0.25 \sim 25 \mu\text{g}$ のPSA-PA1（ $0.1 \sim 10$ 倍のLD₁₀₀用量）の一回の $100 \mu\text{l}$ 注入を腫瘍内に投与した。注入の48時間後、腫瘍を回収し、固定し 50

、Ki-67(増殖インデックス)およびTunel(アポトーシスインデックス)のためにH&Eで染色した。試料内の腫瘍の割合は、薄い腫瘍切片の画像分析に続いて、総腫瘍面積に対する生存可能な腫瘍の比を算出することによって決定した。

【0141】

図4に示すように、2.5～25μgのPSA-PA1の投与により、腫瘍細胞体積が85～99%に減少したが、0.25μgのPSA-PA1では、<20%の減少が観察された。対照的に、非PSA産生SN12Cヒト腎癌異種移植片(Isaiah Fidler博士、Anderson Cancer Center, Houston TXによって提供された細胞)を有するマウスにPSA-PA1を腫瘍内に注入したときは、生存可能な腫瘍の割合に有意な減少(すなわち<25%)が、同じ用量範囲にわたって全く観察されなかつた(図4)。

10

【0142】

対照腫瘍(SN12Cマウス)では、腫瘍内PSA-PA1の投与の48時間後に、増殖インデックスが約40%であった。対照的に、PSA-PA1処理した腫瘍の応答は、48時間においてKi-67陽性細胞の割合が<1%であった。加えて、対照腫瘍では、腫瘍内PSA-PA1の投与の48時間後において、アポトーシスインデックスが<1%であったが、PSA-PA1処理した腫瘍では、全ての細胞は、48時間まで陽性であった(すなわち、アポトーシスインデックス>99%)。

【0143】

これらの結果は、PSA-PA1毒素が効率的かつ迅速にPSA産生細胞を死滅させ、インビボにおけるこの細胞毒性は特異的であり、かつ腫瘍の細胞外液に存在するPSAの存在に依存することを示す。

20

【0144】

実施例6

前立腺特異的な結合ドメインを経たプロトキシンのターゲティング

本実施例は、野生型(または天然の)PA結合ドメイン(配列番号:2のほぼアミノ酸1～83)が、LHRHペプチドなどの前立腺組織特異的な結合ドメインによって機能的に置換されたバリアント前立腺特異的プロテアーゼで活性化されたプロアエロリシン毒素を作製および使用するための方法を記載する。当該技術分野において既知のいずれかの方法によって、たとえば、配列番号:2のおよそアミノ酸1～83(もしくは45～66などのその断片)の欠失によって、またはPAが細胞膜において濃縮する能力を減少させる変異の挿入によって、PAの天然の結合ドメインを機能的に欠失することができる。

30

【0145】

PAのN末端GPIアンカータンパク質結合ドメイン(配列番号:2のほぼアミノ酸1～83)は、細孔形成に有意に影響を与えるに機能的に欠失することができる(たとえば、アミノ酸1～83の欠失によって、またはドメインを機能しなくなる変異の挿入によって)。しかし、結合ドメインは、細胞膜において毒素を濃縮するために必要である。結合ドメインを欠く変異タンパク質は、細胞溶解性であるが、細胞が数桁高い濃度の毒素にさらされた場合だけである。実施例4において上記した野生型およびバリアントのPSAで活性化されたPAのインビボ毒性の大部分は、大部分の哺乳類の細胞によって発現されるGPIアンカータンパク質に非特異的に結合するためである。より特異的で、より全身的に毒性の低いプロトキシンを作製するために、プロアエロリシンの非特異的GPIアンカータンパク質結合ドメインを機能的に欠失させて、前立腺組織特異的な結合ドメインと置換することができる。

40

【0146】

抗体

前立腺組織に高い特異性を有する修飾プロアエロリシンタンパク質をターゲットするために使用することができる結合部分の例は、前立腺特異的な膜タンパク質に対する单鎖抗体を含む融合タンパク質、および毒素ドメインに融合されたPSMAまたはLHRHを認識する抗体である。理想的には、修飾PA分子に対する抗体の付着は、分子が細胞膜に結合し、濃縮し、細胞死を生じる能力を有意に妨げない。抗体は、当該技術分野において周知の遺伝子融合法を使用して、修飾PAのN末端またはC末端に付着させることができる(たとえば、DebinskiおよびPastan, Clin. Cancer Res. 1: 1015-22, 1995を参照されたい)。たとえば

50

、抗体は、プロアエロリシンの天然の小さなロープ（配列番号：2のアミノ酸1～83）を置換することができ、または抗体は、天然の結合ドメインに変異を有するPA分子に付加することもできた。また、このような修飾プロアエロリシンは、特異性を増大させるためのPSA活性化配列を含むこともできる。1つの例において、抗体は、PAの毒素ドメインに融合されたPSMAに対する单鎖抗体である。

【0147】

または、抗体またはFAB断片は、共有結合で架橋することによって修飾PAに付着させることもできる（たとえば、Wooら、Arch. Pharm. Res. 22(5) : 459-63, 1999、DebinskiおよびPastan, Clin. Cancer Res. 1(9) : 1015-22, 1995を参照されたい）。架橋は、たとえば、同二機能性のリジン反応性架橋剤を使用することによって非特異的であることもでき、またはたとえば、抗体上のアミノ基と、およびプロアエロリシンバリアントに位置するシステイン（配列番号：2のアミノ酸Cys19、Cys75、Cys159、および／またはCys164など）と反応する架橋剤を使用して、特異的であることもできる。10

【0148】

リガンド

使用することができるその他の結合部分は、前立腺癌細胞の膜に発現されたこれらの同族受容体に結合する小さなペプチドリガンドである。例には、LHRH受容体に高親和性で結合する天然および合成の黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニストペプチド（たとえば、Genbankアクセション番号CAA25526および配列番号：22および23を参照されたい）ならびにPMSAに選択的に結合することができるペプチドを含むが、これらに限定されない。LHRH受容体は、高い割合でヒト前立腺癌に発現されているが、造血幹細胞では発現されていない。この差別的な発現により、結合特異性が提供される。20

【0149】

第6位のGly (Gly6)などのLHRHの特定の残基が受容体結合親和性を損なわずに置換することができることは既知である（Janakyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 972-6, 1992；Nechushtanら、J. Biol. Chem., 272 : 11597-603, 1997）。したがって、精製されたLHRH D-Lys6（このリシンのイプシロンアミンで）に共有結合で結合されているバリアントPA毒素（その天然の結合ドメインが機能的に欠失しているもの）を產生することができる。

【0150】

LHRH D-Lys6（配列番号：23）は、機能的に欠失した結合ドメインを有する修飾プロアエロリシタンパク質の種々の部分に付着させることができる。しかし、理想的には、このような配置によっては、毒素が膜に挿入されて細孔を形成する能力を有意に妨げない。たとえば、D-Lys6類似体のイプシロンアミンは、ジカルボン酸リンカーを介して修飾プロアエロリシンのアミノ末端に連結することができる。フリンまたは前立腺特異的プロテアーゼによる切断（プロアエロリシンペプチドにどの切断部位が存在するかに依存する）により、C末端の抑制性部分を放出するが、毒素は、LHRH受容体に結合したままである。30

【0151】

代わりに、または加えて、LHRHのD-Lys6類似体のイプシロンアミンは、修飾PAのC末端に対してCysを付加し、次いでLHRHのD-Lys6類似体のイプシロンアミンにこのCysを架橋することにより、機能的な野生型結合ドメインを欠く修飾プロアエロリシンのC末端のカルボキシルに直接結合することができる。この結合により、LHRHペプチドがPAのC末端の抑制性ドメインに付着された誘導体PAタンパク質を产生する。フリンによるか、またはPSAなどの前立腺特異的なプロテアーゼによる切断で、毒素を解放するが、抑制性の断片をLHRH受容体に結合したままである。したがって、受容体にしっかりと結合することにより、細孔形成は阻害されないはずである。加えて、組換え融合タンパクは、修飾LHRHペプチドが機能的な天然の結合ドメインを欠く修飾PA毒素のN末端およびC末端の両方に融合されたものとして产生することもできる。40

【0152】

その他の例において、システイン残基は、LHRHペプチドの第6位に導入され、ペプチド

50

は、ジスルフィド架橋を介して修飾PA毒素に、たとえばアミノ酸215および／または300がシスティンに変異された配列番号：2のアミノ酸215および／または300に付着する。もう1つの例では、組換えタンパク質は、LHRHペプチドが修飾PA毒素のアミノ末端に融合されたものとして産生される。

【0153】

天然のPA結合ドメインに機能的に置換された前立腺組織特異的な結合ドメインを含む、得られた修飾プロアエロリシンタンパク質を、実施例1～5に記載されている方法を使用して、インピトロおよびインピボにおける結合特異性および毒素活性化について試験する。

【0154】

LHRHまたはPSMAなどの前立腺組織特異的な結合ドメインが天然のPA結合ドメインに機能的に置換することができることを証明するために、以下の実験を行うことができる。下記の方法は、天然のPA結合ドメインを欠失した分子、および生じたプロアエロリシンに結合したLHRHの使用を記載する。しかし、他の前立腺組織特異的な結合ドメインが使用されている分子などの任意のバリアントPA分子を試験するために、同種の方法を使用することができ、この場合、PA結合ドメインを欠失させる代わりに、変異させる（たとえば、1つまたは複数の以下の変異の挿入により：W45A、I47E、M57A、Y61A、K66Q、およびW324A）。

10

【0155】

天然のPAフリン活性化配列を含むLHRH-プロアエロリシンタンパク質を産生する。LHRH受容体陽性（LNCaP）および陰性（TSU）の細胞に対するこれらの毒素の結合特異性を、実施例2に記載した方法を使用して比較する。両細胞株は、野生型の、フリン活性化部位含有PAを活性化する。したがって、それぞれの株は、LHRH-プロアエロリシンタンパク質を活性化しうるが、理想的なペプチドは、LHRH受容体陽性細胞に対して低濃度で毒性であるものである。これらの方法を使用して、毒素によるチャンネル形成を妨げずにLHRHペプチドを付着させることができるプロアエロリシンの領域が同定される。

20

【0156】

LHRH-プロアエロリシンタンパク質は、LHRH受容体に結合し、かつPSAによって活性化されることの両方を証明するために、実施例1に記載されている方法を使用して、フリン部位の代わりにPSA活性化部位を含む毒素を作製する。LHRH陽性のPSA産生LNCaP細胞によるこれらの毒素の活性化を、実施例2に記載されている方法を使用して、LHRH受容体陰性のPSA非産生TSU細胞による活性化と比較する。

30

【0157】

LHRH結合部分の導入により、非特異的な毒性が減少し、かつターゲティング能が増大したことを証明するために、LHRH-PSA活性化されたプロアエロリシン毒素をインピボで試験する。上記の通りに、実施例4に記載されている方法を使用して、一回の静脈内注射後のこれらの毒素のLD₁₀₀を決定して、対応する非LHRH包含のPSA活性化された毒素と比較する。その後、LNCaPを有する動物に対して0.1 μg～1mgなどの種々の用量で静脈内に毒素を投与して、抗腫瘍効果の増強が、より高い、毒性のない毒素の用量で観察されることを示す。

40

【0158】

実施例7

プロアエロリシンの抗原性の決定

本実施例は、本明細書に開示された修飾プロアエロリシンペプチドが抗原性かどうかを決定するための方法を提供する。加えて、潜在的な抗原性を減少させる方法を開示する。

【0159】

上記実施例に記載したように、PSA-PA1（配列番号：4）の腫瘍内注入は、前立腺内注入を介した局在性前立腺癌の治療としての毒素の有効性を示す。しかし、このような治療は、転移性前立腺癌のための全身性治療として、静脈内（iv）、筋肉内、経口などの、その他の経路によって投与することもできる。しかし、本明細書に開示されたバリアントPAペプチド類の全身性投与は、中和抗体応答の発生を生じ、反復投薬を制限するであろう。

50

【0160】

本明細書に開示されたPAバリエントのいずれかに対する抗体反応の速度および程度は、次のように決定することができる。たとえば、免疫適格性のヒトに使用することができる投薬療法を開発するために、PSA-PA1（配列番号：4）に対する抗原性反応を免疫適格性マウスにおいて決定することもできる。免疫適格性マウス（C57-BL6）には、 $0.1\text{ }\mu\text{g}\sim 5\text{ }\mu\text{g}$ の用量範囲で毎日×5および毎週×3の両方でPSA-PA1（配列番号：5）のiv用量を投与する。マウスを様々な間隔（たとえば、一回投与後、多回投与後）で屠殺し、血清を得る。ELISAに基づいたアッセイ法を、抗プロアエロリシン抗体の存在を検出するために使用することができる。このアッセイ法では、規定量のプロアエロリシンを96ウェルプレートのポリスチレン表面に固定する。ウシ血清アルブミン（BSA）で十分にプロッキングした後、プロアエロリシンにさらしたマウス由来の血清を、希釈を変えてウェルに添加する。規定されたインキュベーション時間後、ウェルを洗浄し、アルカリホスファターゼ結合ヤギ-抗マウス二次抗体を添加し、続いて基質を添加する。存在する抗体の量を分光光度計で吸光度を測定することによって決定し、これにより、iv PSA-PA1のスケジュールおよび用量を変化させることによって抗体反応の時間経過および程度の決定をすることができる。

10

【0161】

プロアエロリシンの抗原性を減少させるために、実施例6に記載したように、天然の結合ドメインを機能的に欠失させることもでき、たとえばLHRHで置換することもできる。このようなペプチドの抗原性は、上記方法を使用して、天然の結合ドメイン部分を欠いているLHRH-プロアエロリシンタンパク質のスケジュールを変化して暴露した結果として決定することができる。前立腺特異的なプロテアーゼで活性化した毒素で継続して治療するために使用することができるもう1つの方法は、非重複抗原性を有する他の溶解性の毒素を使用することである（実施例10を参照されたい）。1つの例は、クロストリジウムセプティカムアルファ毒素などの、修飾された、構造的に関連した細菌毒素を使用することであり、これも、PSAなどの前立腺特異的なプロテアーゼによって活性化され得るが、PAを認識する抗体によって認識または中和されないであろう（実施例10を参照されたい）。もう1つの例は、細胞溶解性ヒトT細胞によって產生されるヒトパーフォリンなどのヒト組織によって產生される細孔形成毒素を使用することである。野生型活性化配列が、PSAなどの前立腺特異的なプロテアーゼのための基質であるペプチドによって置換されている修飾パーフォリンを投与することもでき、タンパク質がヒト起源であるので、抗体反応を生じない。

20

【0162】

加えて、產生された抗体がアエロリシンの細胞溶解特性を中和することができるかどうか決定するための方法が提供される。開示した修飾PA（配列番号：4、24、および25など）をPSAとインキュベートして毒素を活性化する。活性化された毒素を、用量を変化させて血清を含む抗体とインキュベートする。対照（血清に暴露されていない毒素）に対する溶血の程度を決定するために、上記実施例2に記載のとおりに、洗浄したRBCを添加する。

30

【0163】

加えて、PSA產生腫瘍を有する動物には、PSA活性化プロアエロリシン毒素を2回接種することができ、次いで、毒素の致死用量を再投与して、インビボにおいて抗体が毒性を中和するかどうかを決定する（実施例4を参照されたい）。その後、ワクチン接種をした動物における腫瘍内注入後の抗腫瘍反応を評価して、抗体が腫瘍内に注射されたときに、毒素を中和するかどうかを決定する。

40

【0164】

実施例8

全身性免疫賦活反応の誘導

本実施例は、プロアエロリシンを媒介した細胞溶解が、全身性免疫賦活効果を生じることを証明するために使用することができる方法を提供する。本明細書に開示された毒素の前立腺内投与により生じるこのような全身性免疫賦活効果は、前立腺内における前立腺癌の局部的な治療を提供し、一方で同時に、潜在性の微小転移性病態に対する全身性の抗腫

50

癌効果を誘導する。代わりに、または加えて、GMCSFなどのサイトカインの存在下または非存在下において、被検体を修飾プロアエロリシンで溶解した前立腺癌細胞によってワクチン接種して、再発性または初期の転移性疾患を治療することもできる。

【0165】

修飾プロアエロリシンで溶解した前立腺腫瘍細胞の投与

修飾プロアエロリシンで処理した細胞が、被検体において全身性の免疫応答を刺激することを証明するために、以下の方法を使用することができる。簡単には、被検体（前立腺癌を有する免疫適格性のマウスまたはヒト被検体など）に、本明細書に開示された1つまたは複数の修飾プロアエロリシン分子によって溶解した前立腺腫瘍細胞（TC2マウス前立腺腫瘍細胞、前立腺癌を有する被検体から得られた前立腺癌細胞、および／または患者へ投与するためのヒト前立腺癌細胞株など）を投与する。全身性の免疫応答が起こるかどうかを決定するために、溶解した前立腺癌細胞が投与されたマウスには、同じ細胞を再投与し、これらの接種をした腫瘍細胞の細胞増殖を測定することもできる。たとえば、C57-BL 6マウスに、プロアエロリシン溶解TC2細胞を皮下に注射する。これを達成するためには、¹⁰ 10^7 TC2細胞を、プロアエロリシンと共に37℃において1時間滅菌リン酸緩衝食塩水（PBS）中でインキュベーションすることによって溶解する。動物に、この細胞可溶化液を毎週2回の注入で投与して、TC2細胞に対する免疫応答を刺激する。その後、動物に、第2回の可溶化液接種の1週後に、TC2癌細胞の皮下注射によって再投与する。TC2は、TRAMPマウスから単離された癌性組織に由来するマウス前立腺癌細胞株である（Fosterら、Cancer Res. 57 : 3325-30, 1997）。対照被検体には、凍結融解によって溶解したか、または放射線で処理してアポトーシスを誘導した同数の細胞を受けさせる。もう1つの対照群には、修飾プロアエロリシンペプチドのみを受けさせる。実施例5に記載されている方法を使用して、腫瘍増殖を群間で比較する。

【0166】

ヒト被検体については、前立腺癌細胞を前立腺切除術もしくは生検の際に患者から得ることができ、またはヒト前立腺癌細胞株を使用することができる。ヒト前立腺癌細胞株の例は、PSA産生LNCaP（ATCC番号CRL-1740およびCRL-10995など）もしくはCWR22R（ATCC番号CRL-2505およびNagabhusanら、Cancer Res. 56 (13) : 3042-6, 1996）、またはPSA非産生PC-3（ATCC番号CRL-1435）およびDU145（ATCC番号HTB-81）を含む。いずれかの供与源（患者または細胞株）からの約 10^7 ～ 10^8 細胞を、1μgのPA（野生型またはバリアント）と共に37℃において1時間滅菌PBS中でインキュベートする。生じた可溶化液を激しくビペッティングして完全に混合し、懸濁液を約0.5mlの皮下注射を介して被検体に投与する。³⁰ 患者は、毎週3用量で治療することができる。患者は、毎週の身体検査によって綿密にモニターする。皮下のPAに対する免疫応答は、PSA、PSMA、およびhK2に対する抗体の存在をアッセイすること、および以前に記載された方法を使用してBおよびT細胞反応をアッセイすることによってモニターすることができる（Simonsら、Cancer Res. 59 : 5160-8, 1999）。

【0167】

代わりに、または加えて、患者からの前立腺癌細胞または免疫賦活性タンパク質（GM-CSFなど）を発現するように操作した前立腺癌細胞株を、PA（野生型またはバリアント）と共にインキュベートし、可溶化液を作製するために使用する（たとえば、Simonsら、Cancer Res. 59 : 5160-8, 1999を参照されたい）。PAで溶解された前立腺癌細胞を、免疫賦活性分子を産生する放射線照射を受けた前立腺癌細胞と共に同時投与することもできる。放射線照射は、細胞にアポトーシスを誘導する。細胞溶解によって死滅した細胞およびアポトーシスの誘導によって死滅した細胞の組み合わせにより、優れた免疫賦活性効果を生じることが期待される（Sauterら、J. Exp. Med. 191 : 423-33, 2000）。1つの例において、被検体に、免疫賦活性タンパク質を混合したPAで溶解された前立腺癌細胞を同時投与する。もう1つの例では、PAで溶解された前立腺癌細胞を皮下に投与し、GM-CSF、インターロイキン、インターフェロン、G-CSF（Dranoffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 3539-43, 1993）などの免疫賦活性タンパク質を全身投与する。⁴⁰

10

20

30

40

50

【0168】

修飾プロアエロリシンの前立腺内投与

前立腺癌を有する被検体において全身性の免疫応答を刺激するために使用することができるもう1つの方法は、被検体の前立腺に本明細書に開示された修飾プロアエロリシン毒素を直接投与することである。たとえば、修飾プロアエロリシン毒素を、前立腺腫瘍を有するヒト被検体の前立腺（もしくは腫瘍自身）に、またはヘマグルチニン（HA）初回抗原刺激を受けたT細胞の養子移入に続くトランスジェニックProHAマウスに直接投与することができる。修飾プロアエロリシン毒素の前立腺内注入後の細胞溶解により、ProHAマウスの前立腺のHAに対して、またはヒト前立腺腫瘍抗原に対して免疫応答が引き起こされることが期待される。ProHAトランスジェニックマウスは、前立腺限定プロモーターのプロバシンの制御下でインフルエンザタンパク質HAを発現する。ProHAマウスは、前立腺のみにおいてHAを発現する。この系では、別々のドナーマウスに由来する特異的CD4およびCD8 T細胞を、HAに暴露することによって初回抗原刺激を受けさせて、次いでHAトランスジェニック動物に養子移入する。

10

【0169】

被検体に、致死量以下の修飾プロアエロリシンの前立腺内用量（たとえば、実施例4に記載されている方法を使用して決定されたもの）を投与する。ProHAマウスは、PSAまたは酵素的に同等な相同体を産生しないので、野生型アエロリシンを使用する。しかし、ヒトでは、1つまたは複数の開示された修飾プロアエロリシン毒素を投与する。前立腺内注入の24時間後に、一部のマウスを屠殺して、前立腺を除去し、ネクローシスの程度を解析する。注入したマウスの第2のグループには、以前に記載されたように、組換えヘマグルチニンを発現する 10^9 pfuのワクシニアウイルスを接種したTCRトランスジェニックドナーから回収したHA特異的なCD4およびCD8 T細胞を受けさせる（Staveley-O'Carrollら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 1178-83, 1998）。これらのT細胞は、Thy1.1+であり、Thy1.2+であるProHAマウスに導入する。プロアエロリシン処理したProHAマウスへの養子移入の4日後に、レシピエントマウスを屠殺し、脾臓、腋窩（無関係）、および前立腺流入節を解剖し、分離し、および洗浄する。

20

【0170】

特異的T細胞の活性化を評価するために、以下のアッセイ法を行うことができる：1,000,000個の単離した細胞をフィコエリトリリンラベルされた抗Thy1.1抗体およびcychromeラベルされた抗CD4またはCD8抗体（Pharmingen, San Diego, CA）を使用して染色する。単離した細胞をFacScan（Becton Dickinson）を使用して解析する。HA特異的T細胞の増殖インデックスは、ProHA処理した動物のクロノタイプ（Thy1.1+）細胞の割合を、未処置のProHA対照の同じ組織位置のクロノタイプ細胞の割合で割ることによって算出する。加えて、無関係なリンパ節に対する前立腺流入節におけるクロノタイプ細胞の割合比は、PA処理に続く前立腺特異的な増殖のインデックスを提供する。もう1つのアッセイ法では、抗原特異的な増殖を以前に記載されたとおりに測定する（Adlerら、J. Exp. Med. 187 : 1555-64, 1998）。簡単には、プールしたリンパ球または脾細胞をHAクラスIIペプチド（CD4細胞特異的増殖）またはHAクラスIペプチド（CD8細胞特異的増殖）と共にインキュベートする。細胞を3日間培養して、次いで、トリチウムチミジンで一晩パルスし、続いて回収してカウントを決定する。対照に対する、取り込まれたカウントの増大が、特異的なT細胞活性化を示す。

30

【0171】

HA特異的なThy1.1 T細胞を受けたPA処理ProHAマウス由来の前立腺を次のように解析する。処理したマウス由来の固定された前立腺切片を、標準的な免疫組織化学手順を使用して、ビオチン化したThy1.1抗体（Pharmingen）で染色し、ストレプトアビジンペルオキシダーゼで対比染色する。刺激の範囲を決定するために、陽性染色の程度を塩水処理した対照と比較する。

40

【0172】

前立腺内プロアエロリシンが、その後の腫瘍発生、増殖、または伝播のパターンに影響

50

を与えることができるかどうか評価するために、以下の方法を使用することができる。プロアエロリシン（または本明細書に開示された修飾プロアエロリシンペプチド）を、動物（軟毛におおわれる前、転移性疾患の前の軟毛におおわれた後、転移性疾患と同時（pre-pubescent, post pubescent prior to metastatic disease, with metastatic disease））の生活環の種々の時点においてTRAMPマウスの前立腺に注入することができる。麻酔した動物に、無菌条件下で前立腺内に注射する。前立腺内接種後の種々の時点において、動物を屠殺して剖検を行い、腫瘍の範囲を評価する。前立腺を除去し、免疫組織化学解析を行って前駆病変および顕性の前立腺癌の存在を評価する。同様に、軟毛におおわれる前のTRAMP動物に、プロアエロリシンで溶解したTC2細胞または後期癌を有するTRAMPマウスから除去されたプロアエロリシンで溶解した原発腫瘍を、皮下に2回投与することもできる。これらの動物を追跡し、規定の時点で屠殺して、対照と比較した腫瘍発生の時間経過および程度を評価する。

【0173】

同種のアプローチを、局在性前立腺癌患者に対して修飾PAを投与するために使用することができる。このような前立腺内での修飾PA療法は、局在性前立腺癌のための初期の治療として、単独で、または放射線（外部光線または近接照射療法）および／またはアンドロゲン切除治療と組み合わせて使用することができる。また、前立腺内での修飾PA療法は、放射線療法に失敗した患者、および前立腺内に前立腺癌を局所的に再発するだけであると思われる患者に投与することもできる。また、前立腺内での修飾PA療法は、局在性癌を直接治療するために、および全身性の抗腫瘍免疫応答の刺激を介した転移癌を治療するために、局在性および転移性の前立腺癌の患者に与えることもできる。

【0174】

前立腺内での修飾PA療法を行うためには、前立腺内近接照射療法で投与するために使用されるものと同種の所定のテンプレートに従って、修飾PAを患者の前立腺に注入する。また、前立腺内投与のために必要な技術および設備は、近接照射療法のために使用されるものと同様であり、以前に記載されている（Deweeseら、Cancer Res. 61 : 7464-72, 2001）。前立腺内に投与する適切な用量を決定するために、用量発見臨床試験を行う。患者に、前立腺全体を含むように所定の部位に複数の注入（20～80）を受けさせる。投与した修飾PAの全量は、約0.1～1.0mgの範囲であり、せいぜい合計10mgである。注入あたりの用量は、注入の総回数で全量を割ることによって決定する。患者を、患者において治療し、注入後の48時間を病院においてモニターする。その後、毒性の徴候について患者を毎週検査する。前立腺の大きさに対する直接の治療効果をモニターするために、前立腺のMRIを使用することができる。前立腺内PAに対する免疫応答は、以前に記載されたようにモニターされる（Simonsら、Cancer Res. 59 : 5160-8, 1999）。

【0175】

実施例9

さらなるPSA切断部位

さらなるPSA切断部位は、ヒト精液タンパク質セメノゲリン（semenogelin）IおよびIIのPSA切断地図、ならびにセルロース膜に基づいたアッセイ法に基づいたものが知られている（表2およびDenmeadeら、Cancer Res., 57 : 4924-30, 1997を参照されたい）。表2に示したPSA切断部位は、実施例1に記載されている方法を使用して、プロアエロリシンの野生型フリンプロテアーゼ活性化部位に対して置換することもできる（配列番号：2のアミノ酸427～432）。簡単には、表1および2に示したものなどのPSA特異的な切断部位でPAのフリン部位を置換するために、組換えPCRを使用することができる。大腸菌の発現のために、バリアントPA配列をpMMB66HEにサブクローニングする。組換えクローンを、プロテアーゼ欠損株のA. サルモニシダに導入し、生じたバリアントプロアエロリシタンパク質をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーによって精製する。

【0176】

（表2）PSA加水分解の速度*

10

20

30

40

50

PSA 基質 (配列番号)	K_m (uM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
KGISSQY (15)	160	0.043	270
SRKSQQY (16)	90	0.023	260
ATKSKQH (17)	1310	0.0091	6.9
KGLSSQC (18)	300	0.0017	5.6
LGGSQL (19)	900	0.0037	4.1
EHSSKLQ (20)	1165	0.012	10.6
HSSKLQ (5)	470	0.011	23.6
SKLQ (21)	813	0.020	24.6

*ペプチドは蛍光（アミノメチルクマリン）でラベルした。アッセイは、50mMトリス、0.1M NaCl、pH7.8中で行った。

【 0 1 7 7 】

表2に示した配列は、効率的であるがPSAによって特異的に加水分解されなかった基質（KGIISSQY；配列番号：15およびSRKSQQY；配列番号：16）、ならびに効率的でないがPSAによって特異的に加水分解されたもの（ATKSKQH；配列番号：17およびLGGSQL；配列番号：19）を含む。これらの修飾毒素の特性を、HSSKLQ（配列番号：5）配列を含むPSA-PA1と比較することもできる。対照として、活性化部位が完全に欠失した修飾毒素（EX-PA）を產生する。

【 0 1 7 8 】

これらの精製された毒素を、実施例3に記載されている溶血アッセイ法を使用して、PSA加水分解についてスクリーニングする。野生型プロアエロリシンは、活性化されないか、または赤血球に対して細胞溶解性ではない。しかし、プロテアーゼによるプロアエロリシンの活性化により、迅速な溶血を生じる。簡単には、PSA活性化をアッセイするために、様々の濃度の精製されたバリアントPA毒素をPSAと共に1時間インキュベートして、洗浄し、血清フリーの赤血球（RBC）（2% v/v）を添加する。さらに1時間後に、インキュベーション混合物を遠心分離して、540nmの上清の吸光度を決定する。RBCの50%を溶解させるために必要とされる修飾毒素の最小濃度を決定して、PSA加水分解の効率に基づいて毒素をランク付けする。

【 0 1 7 9 】

PSA活性化および活性化の特異性の両方を決定するために、実施例2に記載されている方法を使用して、精製されたPSA-プロアエロリシン毒素をPSA産生（LNCaP）および非産生癌細胞株（TSU）にインピトロでさらすことよって、細胞毒性アッセイを行う。LNCaPおよびTSU株の両者に対するそれぞれのバリアントPA毒素について、50%の細胞を死滅させるために必要とされる濃度（IC₅₀）を決定することができる。細胞毒性の倍率の相違を使用して、特異性に基づいてPSAで活性化された毒素をランク付けする。

【 0 1 8 0 】

また、実施例5に記載されている方法を使用して、ヌードマウスにおいてPSA産生LNCaP異種移植片内への腫瘍内注入による抗腫瘍性活性について、インピボでバリアントPA毒素をスクリーニングすることもできる。実施例5に上記したとおり、PSA-PA1毒素の腫瘍内注入により、48時間以内に腫瘍が減少する。対照的に、インピトロにおいて、PSA産生細胞株および非産生細胞株の両方によってより効率的に活性化される野生型プロアエロリシンは、LNCaP異種移植片に対してほとんど効果を有さなかった。これは、毒素活性化の速度が全体的な抗腫瘍効果に重要である可能性を示す。PSA-PA1は、PSAによってより特異的に活性化されるが、活性化の速度は野生型毒素よりも遅い。これにより、PSA-PA1を腫瘍の全体にわたってより広く分布させることができるであろう。したがって、活性化部位においてより良好なPSA基質は、逆説的にインピボにおいて全体的な抗腫瘍効果の減少を生じ

るかもしれない。

【0181】

腫瘍内または正常組織内において、PSAで活性化されたプロアエロリシン対野生型PAの分布を評価するために、蛍光ラベルした(FITCなど)PSA-PA1およびPAタンパク質を使用することができる。PSA産生LNCAP異種移植片に、蛍光ラベルしたPSA-PA1およびPAを注入する。腫瘍内注入の24時間後、顕微鏡分析のために腫瘍を回収し、固定して切断する。細胞膜に挿入された蛍光ラベルプロアエロリシタンパク質を、固定プロセスを通して保持する。次いで、これらのスライドを、腫瘍検体全体のプロアエロリシン毒素の分布の程度を決定するために、適切なフィルターセットを備えている蛍光顕微鏡を使用して解析する。10

【0182】

その後、バリアントPA毒素をLNCaP異種移植片に注入し、実施例5に記載されている方法を使用する腫瘍測定によって、48時間後に抗腫瘍反応を評価する。腫瘍内注入に続くインビボにおける抗腫瘍効果に基づいて、バリアントPA毒素をランク付けする。

【0183】

加えて、実施例4において記載されている方法を使用して、一回の静脈内注射後に100%のマウスを殺す用量(すなわちLD₁₀₀)を決定することによって、全体的な全身毒性についてバリアントPA毒素を試験することができる。

【0184】

これらの方法を使用して、PSAで活性化されるバリアントPA毒素であって、PSAによって最も効率的に、かつ特異的に活性化され、全身的に最も毒性がなく、インビボで最も顕著な抗腫瘍効果を產生するものを同定する。また、このようなPSAで活性化されるバリアントPA毒素を実施例6に記載されている方法を使用して修飾することもできる。20

【0185】

実施例10

PSAで活性化された修飾プロアエロリシン毒素の抗原性の減少

本実施例は、その他の修飾された細孔を形成するプロテアーゼで活性化されたプロトキシンの抗原性および抗腫瘍効力を產生し、特徴づけるために使用することができるさらなる方法を記載する。

【0186】

開示されたバリアントPA毒素の潜在的な抗原性を克服するための1つの方法は、PSAによって同様に活性化されるが、プロアエロリシン抗体によって認識されない、構造的に関連したプロトキシンを順番に投与することである。このようなプロトキシンの例は、クロストリジウムセプティカムアルファ毒素(Ballardら、Infect. Immun. 63: 340-4, 1995; Gordonら、J. Biol. Chem. 274: 27274-80, 1999; Genbankアクセッション番号S75954)、バチルスチュリンギエンシスデルタ毒素(Genbankアクセッション番号D00117)、およびヒトパーフォリン(Genbankアクセッション番号NM005041)を含むが、これらに限定されない。機構的にはエアロリシンと同様であるが、これらのプロトキシンは、異なるペプチド配列を有しており、その結果プロアエロリシン特異的な抗体は、これらを認識しないであろう。これらのプロトキシンは、クローン化され、組換え形態が產生されている(Imawaら、FEMS Microbiol. Lett. 17: 287-92, 1994; Mezaら、FEMS Microbiol. Lett. 145: 333-9, 1996)。30

【0187】

プロアエロリシンのようなこれらのプロトキシンは、活性化を引き起こすために、タンパク質分解性切断によって除去されなければならないC末端の抑制性ペプチドを含む。各々のこれらのタンパク質毒素内の活性化部位を特定した。クロストリジウムセプティカムアルファ毒素については、活性化部位は、フリン切断部位である(Gordonら、Infect. Immun. 65: 4130-4, 1997)。バチルスチュリンギエンシスデルタ毒素の活性化部位は、特定の昆虫の中腸プロテアーゼによって切断される(Mirandaら、Insect Biochem. Mol. Biol. 31: 1155-63, 2001)。ヒトパーフォリンについては、活性化配列は特定されたが、4050

活性化するプロテアーゼは、まだ同定されていない（Uellnerら、EMBO J. 16 : 7287-96, 1997）。

【0188】

各々のこれらのプロトキシンの活性化部位は、実施例1に記載されている方法を使用して、前立腺特異的プロテアーゼ切断部位（表1～2に示したPSA切断部位など）を含むように修飾することができる。必要に応じて、実施例6において記載されている方法を使用して、天然のプロトキシン結合ドメインを機能的に欠失させることもでき、前立腺組織特異的な結合ドメインと置換させることもできる。または、実施例6において記載されている方法を使用して、活性化部位は修飾させないが、結合ドメインを機能的に欠失させ、前立腺組織特異的な結合ドメインと置換させる。これらの修飾したプロトキシンを、たとえば、RBC溶血アッセイ法（実施例3）、PSA産生および非PSA産生細胞株に対するインビトロにおける活性（実施例2）、およびヒト血清における安定度（実施例3）を使用して、プロテアーゼの活性化についてアッセイする。これらの毒素がPSAによって特異的かつ効率的に活性化される場合、これらを実施例5において記載されている方法を使用して、PSA産生異種移植片に対する活性についてインビボで試験する。加えて、抗体産生の速度および程度を実施例7に記載されている方法を使用して決定する。それぞれの毒素で処理した動物に由来する血清を、毒素ファミリーのその他のメンバーの各々との交叉反応性についてスクリーニングして、交叉認識の程度を決定する。10

【0189】

全身性の免疫応答を減少させるためのその他の方法は、免疫抑制治療薬を投与することである。免疫抑制治療薬の例は、全身性または局所的コルチコステロイド（Sugaら、Ann. Thorac. Surg. 73 : 1092-7, 2002）、シクロスポリンA（Fangら、Hum. Gene Ther. 6 : 1 039-44, 1995）、シクロホスファミド（Smithら、Gene Ther. 3 : 496-502, 1996）、デオキシスペルグアリン（deoxyspergualin）（Kaplanら、Hum. Gene Ther. 8 : 1095-1104, 1 997）、ならびに、Tおよび／またはB細胞に対する抗体[たとえば、抗CD40リガンド、抗CD4抗体、抗CD20抗体（Rituximab）]（Manningら、Hum. Gene Ther. 9 : 477-85, 1998）を含むが、これらに限定されない。このような薬剤は、修飾PA分子、および／またはPA（野生型またはバリエント）とインキュベーションすることによって產生される細胞可溶化液の投与の前、間、後に投与することができる。20

【0190】

実施例11

配列バリエントの產生

前立腺特異的なプロテアーゼ切断部位を含む修飾プロアエロリシンペプチドの投与によって、前立腺癌を治療するための薬剤および方法を本明細書に開示する。他のプロアエロリシン、PSA、LHRH、およびPSMA配列（多型、断片、またはバリエントなど）の使用は、配列の特徴的な機能的特徴が保持されている限り、本開示の方法を実施するために使用することができるが、当業者によって理解されている。たとえば、前立腺特異的なプロテアーゼによって活性化されて、細胞膜に細孔を形成し、細胞死を生じる能力をプロアエロリシンバリエントが保持する場合、本明細書に開示される方法を実施するためにこれらを使用することができる。この活性は、本明細書に開示したアッセイ法、たとえば実施例2～5に記載されているものを使用して、容易に決定することができる。なお他の態様において、修飾プロアエロリシン分子は、PSA産生細胞を特異的に溶解させる（たとえば、非PSA産生細胞より広範囲にPSA産生細胞を溶解させる）特徴を有する。40

【0191】

この開示により、天然タンパク質に由来するがこれらの正確なヌクレオチドまたはアミノ酸配列が天然の配列から変化しているDNA分子、およびこれにより、タンパク質の使用が容易になる。このようなバリエントは、本明細書に開示した標準的な分子生物学実験技術および配列情報から得ることができる。

【0192】

また、天然のDNA分子に由来するDNA分子およびヌクレオチド配列は、開示されたDNA配50

列またはその断片にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA配列として定義することもできる。特定の程度のストリンジエンシーを生じるハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション方法および組成物の性質、ならびに使用するハイブリダイズDNAの長さによって変化する。通常、ハイブリダイゼーションの温度およびハイブリダイゼーション緩衝剤のイオン強度（特にNa⁺濃度）により、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する。特定の量のストリンジエンシーを達成するために必要なハイブリダイゼーション条件に関する計算は、Sambrookら（Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989, Chapters 9および11）において検討されており、これは参考として本明細書に組み入れられる。¹⁰ [³²P]-dCTPで標識された標的プローブとのハイブリダイゼーションは、一般に6×SSCなどの高イオン強度の溶液中で、融解温度T_mより低い温度約5～25　において行われる。ストリンジエントな条件の例は、短いプローブ（たとえば10～50ヌクレオチド）については、少なくとも約0.01～1.0MのNaイオン濃度（またはその他の塩）の塩濃度で、pH7.0～8.3で、かつ少なくとも約30　の温度である。また、ストリンジエントな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤を添加することによって達成することもできる。たとえば、25～30　で5×SSPE（750mMのNaCl、50mMのリン酸Na、5mMのEDTA、pH7.4）の条件は、アレル特異的なプローブハイブリダイゼーションに適している。

【0193】

遺伝コードの縮重により、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を維持しながら、DNA分子のヌクレオチド配列の多くのバリエーションが可能となり、さらに本開示の範囲が広範となる。たとえば、アミノ酸Alaは、ヌクレオチドコドントリプレットGCT、GCG、GCC、およびGCAによってコードされる。従って、ヌクレオチド配列は、コードされるタンパク質のアミノ酸組成またはタンパク質の特徴に影響を及ぼさずに変更することができるであろう。遺伝コードの縮重に基づいて、バリアントDNA分子は、上記の通りに標準的なDNA突然変異生成技術を使用するcDNA分子に由来するか、またはDNA配列の合成によっていてもよい。また、遺伝コードの縮重に基づいた配列のバリエーションによって、開示されたcDNA配列にストリンジエントな条件下でハイブリダイズしないDNA配列も、本開示に包含される。

【0194】

PAバリアント、断片、融合体、および多型は、本明細書に開示したアッセイ法を使用して決定すると、PSA産生細胞を溶解させる能力を保持するであろう（たとえば、実施例2および5を参照されたい）。開示された配列のバリアントおよび断片は、タンパク質アミノ酸配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、98%、またはより高い配列同一性を保持しており、当業者によって理解されるように、タンパク質の機能的活性を維持する。

【0195】

実施例12

タンパク質の組換え発現

公的に利用できるcDNA配列および対応するアミノ酸配列、ならびに本明細書のPAバリアント、断片および融合体の開示により、標準的な実験技術によっていずれのタンパク質を発現および精製することも可能である。精製されたタンパク質は、患者の治療のために使用することもできる。当業者であれば、開示された修飾PA毒素を、関心対象の任意の細胞または生物において産生することができ、被検体に投与する前に精製することができるこ⁴⁰とを理解するであろう。

【0196】

組換えタンパク質を産生するための方法は、当該技術分野において周知である。したがって、本開示の範囲は、いかなるタンパク質の組換え発現をも含む。たとえば、Johnsonらに対する米国特許第5,342,764号；Pauschらに対する米国特許第5,846,819号；Fleerらに対する米国特許第5,876,969号、およびSambrookら（Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989, Ch. 17、参考として本明細書に組み入れられる）を参照されたい。⁵⁰

【0197】

実施例13

ペプチドの修飾

PSAなどの前立腺特異的なプロテアーゼによって活性化される修飾PAタンパク質は、種々の化学的技術を使用して修飾して、本質的に修飾されていないペプチドと同じ活性を有し、選択的にその他の望ましい特性（抗原性の減少など）を有する誘導体を產生することができる。たとえば、カルボキシル末端または側鎖のいずれかに関わらず、ペプチドのカルボン酸基を、薬学的に許容されるカチオンの塩の形態で、またはC₁-C₁₆エステルの形態にエステル化して、またはR₁およびR₂がそれぞれ独立してHもしくはC₁-C₁₆アルキルである式NR₁R₂のアミドに変換して、または5員もしくは6員環などの複素環を形成するように組み合わせて提供することもできる。アミノ末端または側鎖のいずれかに関わらず、ペプチドのアミノ基を、HCl、HBr、酢酸、安息香酸、トルエンスルホン酸、マレイン酸、酒石酸、およびその他の有機塩などの薬学的に許容される酸付加塩の形態にすることができ、C₁-C₁₆アルキルもしくはジアルキルアミノに修飾し、またはさらにアミドに変換してもよい。

10

【0198】

ペプチド側鎖の水酸基は、十分に認識された技術を使用して、C₁-C₁₆アルコキシまたはC₁-C₁₆エステルに変換することができる。ペプチド側鎖のフェニルおよびフェノール環は、F、Cl、Br、もしくはIなどの1つまたは複数のハロゲン原子で、またはC₁-C₁₆アルキル、C₁-C₁₆アルコキシ、カルボン酸およびそのエステル、またはこのようなカルボン酸のアミドで置換することができる。ペプチド側鎖のメチレン基は、相同的なC₂-C₄アルキレンまで拡張することができる。チオールは、アセトアミド基のような十分に認識された多くの保護基のいずれかで保護することができる。また、当業者であれば、環状構造を本明細書に開示されるペプチドに導入して、安定度を増強させる構造にコンホメーションを制約するものを選択し、提供するための方法を認識するであろう。たとえば、酸化したときにペプチドがジスルフィド結合を含み、環状ペプチドを生成するように、カルボキシル末端またはアミノ末端のシステイン残基をペプチドに付加することができる。その他のペプチド環化する方法には、チオエーテル、ならびにカルボキシル末端およびアミノ末端アミドおよびエステルの形成を含む。

20

【0199】

30

機能的なペプチドを維持するために、特定のペプチドバリアントをペプチドから少数のアミノ酸のみを相違させる。このようなバリアントは、ペプチドの所望の活性を妨げない、欠失（たとえば1~3以上のアミノ酸の）、挿入（たとえば1~3以上の残基の）、または置換をさせることができる。置換バリアントは、アミノ酸配列の少なくとも1つの残基が除去されて、その位置に異なる残基が挿入されている。特定の態様において、このようなバリアントは、たとえばタンパク質の1、3、5、または10個もの単一の残基のアミノ酸置換を有する。

【0200】

40

また、ペプチド模倣および有機模倣の態様も、本明細書に開示されており、これにより、このようなペプチド模倣および有機模倣の化学的成分の三次元配置は、ペプチドにおけるペプチドバックボーンおよび成分アミノ酸側鎖の三次元配置を模倣し、PSA産生細胞を溶解させる能力を有する修飾PA毒素のこのようなペプチド模倣および有機模倣を生じる。コンピュータモデリングに適用するためには、生物学的活性に必要な構造の三次元での定義であるファルマコフォアが理想である。ペプチド模倣および有機模倣は、現在のコンピュータモデリングソフトウェアによってそれぞれのファルマコフォアに適合するようにデザインすることもできる（コンピュータ支援ドラッグデザインまたはCADDを使用する）。CADDに用いられる技術についての記載は、Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs" in Klegerman & Groves, eds., 1993, Pharmaceutical Biotechnology, Interpharm Press : Buffalo Grove, IL, pp. 165-174およびPrinciples of Pharmacology (ed. Munsen, 1995), chapter 102を参照されたい。

50

【0201】**実施例14****修飾プロアエロリシンペプチドを発現するための方法**

前立腺癌を治療するための修飾プロアエロリシンペプチドの投与に代わるものとして(または加えて)、開示された修飾プロアエロリシン毒素をインビポにおいて発現することにより、長期間または全身性の治療(たとえば、腫瘍の転移を治療するまたは阻止するために)を達成することもできる。

【0202】

本開示は、インビポにおいて細胞または組織に修飾プロアエロリシンペプチドを発現する方法を提供する。1つの例において、細胞または組織へのトランスフェクションは、インビトロで起こる。この例では、細胞または組織(移植片など)を被検体から除去し、次いで、関心対象のタンパク質をコードするcDNAを含む発現ベクターをトランスフェクトする。トランスフェクトされた細胞は、機能的タンパク質を産生し、被検体に再導入することもできる。もう1つの例では、関心対象のタンパク質をコードする核酸を直接被検体に投与し(たとえば、静脈内、腫瘍内、または前立腺内)、インビポでトランスフェクションする。

10

【0203】

本明細書に開示された修飾プロアエロリシンペプチドおよび方法は、前立腺腫瘍を有する被検体を治療するために使用することができる。このような方法により、腫瘍の体積を減少し、および一部の態様においては、前立腺腫瘍の転移を阻止または治療する。

20

【0204】

ヒト細胞トランスフェクションのために必要な科学的および医学的な手順は、現在ルーチンのものである。プロアエロリシン、結合ドメイン、ならびに前立腺特異的なプロテアーゼタンパク質およびcDNA配列は公的に利用可能であり、これらの手順に基づいてヒト(およびその他の哺乳類)のインビポにおける遺伝子発現の開発が可能となる。加えて、特定のバリエントプロアエロリシン分子を本明細書に開示する。遺伝的に操作された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を使用する黒色腫患者の免疫療法が、Rosenbergらによって報告されている(N. Engl. J. Med. 323: 570-8, 1990)。この研究において、TILにネオマイシン耐性の遺伝子を導入するために、レトロウイルスベクターが使用された。同様のアプローチを、前立腺癌を有する被検体に修飾プロアエロリシンペプチドcDNAを導入するために使用することができる。

30

【0205】

ドナー細胞に遺伝子を導入するための一般的なストラテジーは、米国特許第5,529,774号に開示されており、参照として組み入れられる。通常、治療的に所望の効果を有するタンパク質をコードする遺伝子をウイルス発現ベクターにクローニングし、次いで、このベクターを標的生物に導入する。ウイルスを細胞に感染させ、インビポでタンパク質配列を產生させ、これにより、その所望の治療的な効果を有する(Zabnerら、Cell 75: 207-16, 1993)。

【0206】

DNAまたはタンパク質エレメントを、ある細胞または組織に導入することのみが必要なこともある。たとえば、被検体が前立腺腫瘍を有するだけである場合、タンパク質またはDNAを前立腺(または腫瘍)のみに導入すれば十分であろう。しかし、一部の例では、被検体の細胞の全てを治療すること、またはたとえば血管内(i.v.)もしくは経口投与によってより広くベクターを散在させることは、より治療的に有効で、簡単であろう。たとえば、被検体が転移した前立腺腫瘍を有する場合、全身にタンパク質またはDNAを導入することが必要であろう。

40

【0207】

修飾プロアエロリシン毒素などの、少なくとも1つの治療薬をコードする核酸配列は、適切なプロモーターの制御下にある。使用することができる適切なプロモーターは、遺伝子の天然のプロモーター、レトロウイルスのLTRプロモーター、またはアデノウイルス主

50

要後期プロモーターなどのアデノウイルスプロモーター；CMVプロモーター；RSVプロモーター；MMTVプロモーターなどの誘導性プロモーター；メタロチオネインプロモーター；熱ショックプロモーター；アルブミンプロモーター；ヒストンプロモーター；-アクチンプロモーター；TKプロモーター；B19パルボウイルスプロモーター；およびApoAIプロモーターを含むが、これらに限定されない。1つの例において、プロモーターは、プロバシンプロモーターなどの、前立腺特異的なプロモーターである。しかし、本開示は、特定の外来遺伝子またはプロモーターに限定されない。

【0208】

組換え核酸を適切な細胞に到達させる任意の方法により、組換え核酸を被検体に投与することができる。これらの方法は、注射、注入、沈着、移植、または局所投与を含む。注射は、皮内または皮下であることができる。さらに、実施例15に記載されているように、組換え核酸は、アビポックスウイルス、組換えワクシニアウイルス、複製欠損アデノウイルス株、もしくはポリオウイルスなどのウイルスのベクターの一部として、または裸のDNAもしくはリボソーム被包DNAなどの非感染性の形態として送達することもできる。10

【0209】

実施例15

インビボにおける遺伝子発現のためのウイルスベクター

アデノウイルスベクターは、基本的に完全なアデノウイルスゲノムを含む(Shenkら、Curr. Top. Microbiol. Immunol. 111: 1-39, 1984)。または、アデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムの少なくとも一部が欠失した修飾アデノウイルスベクターである。1つの例において、ベクターは、アデノウイルス5'ITR；アデノウイルス3'ITR；アデノウイルスキャプシド形成シグナル；治療薬をコードするDNA配列；および治療薬をコードするDNA配列を発現するためのプロモーターを含む。ベクターは、少なくともアデノウイルスE1およびE3のDNA配列の大部分が取り除かれているが、E2およびE4のDNA配列の全て、ならびにアデノウイルス主要後期プロモーターによって転写されるアデノウイルスタンパク質をコードするDNA配列は必ずしも除かれていません。もう1つの例では、ベクターは、米国特許第4,797,368号(Carterら)およびMcLaughlinら(J. Virol. 62: 1963-73, 1988)などに記載されているアデノ随伴ウイルス(AAV)、およびAAVタイプ4(Chioriniら、J. Virol. 71: 6823-33, 1997)およびAAVタイプ5(Chioriniら、J. Virol. 73: 1309-19, 1999)である。2030

【0210】

このようなベクターは、5'末端から、アデノウイルス5'ITR、アデノウイルスキャプシド形成シグナル、およびE1aエンハンサー配列；プロモーター(これは、アデノウイルスプロモーターまたは外来プロモーターであってもよい)；3つに分かれたリーダー配列、マルチクローニングサイト(これは、本明細書に記載されたものであってもよい)；ポリアシグナル；およびアデノウイルスゲノムのセグメントに対応するDNAセグメントを包含するシャトルプラスミドを使用して、標準的な技術によって構築することができる。DNAセグメントは、修飾アデノウイルスまたは変異アデノウイルスとの相同組換えのための基質として機能し、たとえば、塩基3329～塩基6246よりも短いアデノウイルス5'ゲノムのセグメントを含んでいてもよい。また、プラスミドは、選択可能なマーカーおよび複製開始点を含むことができる。複製開始点は、細菌の複製開始点であってもよい。治療薬をコードする所望のDNA配列は、プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入することができる。40

【0211】

本明細書に開示された方法を実施するために使用することができるベクターの例は、以下に開示されたものを含むが、これらに限定されない：Wooらに対する国際公開公報第95/27512号；Walshらに対する国際公開公報第01/127303号；Coutoらに対する米国特許第6,221,349号；Highらに対する米国特許第6,093,392号。

【0212】

実施例16

融合タンパクの作製および発現

融合タンパクを作製するための方法は、当業者に周知である。たとえば、Bauerらに対する米国特許第6,057,133号（本明細書に参照として組み入れられる）は、ヒトインターロイキン3（hIL-3）バリエントから構成される融合分子、または第2のコロニー刺激因子、サイトカイン、リンフォカイン、インターロイキン、造血成長因子、もしくはIL-3バリエントに機能的に結合された変異タンパク質を作製するための方法を開示している。Davisらに対する米国特許第6,072,041号（本明細書に参照として組み入れられる）は、治療的タンパク質に共有結合で結合された経細胞輸送性受容体に対する単鎖Fv分子を含む融合タンパクの作製を開示する。

【0213】

10

同様の方法を使用して、前立腺特異的な結合ドメイン（たとえばLHRHまたは抗体）などのその他のアミノ酸配列に結合されたPA（またはそのバリエント、断片、その他）を含む融合タンパクを作製することができる。タンパク質の2つの部分を互いに間隔をおくために、およびこれらの間に柔軟性を提供するために、リンカー領域を使用することができる。リンカー領域は、一般に、長さが1～500アミノ酸の間、たとえば長さが30アミノ酸より短いポリペプチドである。2つの分子を接続するリンカーは、（1）2つの分子が折り重なり、互いに独立に作用することができるよう、（2）2つのタンパク質の機能的ドメインに干渉し得る秩序ある二次構造を発生する性向を有さないように、（3）機能的タンパク質ドメインと相互作用し得る最小の疎水性または電荷を持った特性を有するように、および（4）2つの領域を立体的に分離させるように、設計することができる。典型的には、可動性のタンパク質領域の表面アミノ酸は、Gly、Asn、およびSerを含む。また、ThrおよびAlaなどのその他の中性アミノ酸をリンカー配列に使用することもできる。融合体の構築を容易にするために、リンカー配列内に独特の制限部位を付加することによって、さらなるアミノ酸をリンカーに含めることもできる。必要であれば、その他の部分を含めることもできる。これらは、アビジンなどの結合領域、またはポリヒスタジンタグなどのエピトープを含むこともでき、これらは、融合タンパクの精製およびプロセシングに有用であり得る。加えて、検出可能なマーカーを融合タンパクに結合することもでき、その結果、体または細胞を介した融合タンパクの輸送を好都合にモニターすることができる。このようなマーカーは、放射性核種、酵素、蛍光団などを含む。

【0214】

30

別のタンパク質（または、そのバリエント、断片、その他）の核酸配列とPA（または、そのバリエント、断片、その他）の核酸配列の融合は、中間ベクターを使用することによって達成することができる。または、1つの遺伝子を、他の遺伝子を含むベクターに直接クローニングすることもできる。核酸配列を接続するため、ならびに欠失された配列を置換するために、リンカーおよびアダプターを使用することもでき、この場合、制限部位は関心領域の内部にある。1つのポリペプチド、ペプチドリンク、および他方のポリペプチドをコードする遺伝物質（DNA）は、原核細胞または真核細胞、たとえば細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳類細胞の形質転換に使用される適切な発現ベクターに挿入される。形質転換生物を増殖させて、標準的な技術によって、たとえばポリヒスタジンタグを使用している場合、ニッケルキレートアフィニティークロマトグラフィーなどの検出可能なマーカーを用いて、タンパク質を単離する。したがって、生じた生成物は、リンカー領域によって第2のタンパク質に結合された修飾PAを有する新規タンパク質、融合タンパク質である。融合タンパク質が発現されたことを確認するために、精製されたタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、確立された方法を使用してニトロセルロースメンブランフィルターに転写する。個々の成分、すなわちポリヒスタジンタグおよびPAに対する抗体を使用するウエスタンプロット解析によって、タンパク質産物を同定することができる。

40

【0215】

実施例17

薬学的組成物および投与方法

50

本明細書において有用な薬学的に有効なキャリアは従来のものである。MartinによるRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)には、薬学的な送達のために適した組成物および製剤が記載されている。

【0216】

ペプチドの投与

配列番号：4、24、および25などの修飾PA毒素が被検体に投与される態様において、タンパク質は、当業者によって使用される任意の経路によって送達される。例には、静脈内、腫瘍内、経口、前立腺内、筋肉内、皮下注射、経皮などを含むが、これらに限定されない。また、本開示は、治療的に有効な量の修飾PA毒素を単独または薬学的に許容されるキャリアと共に含む薬学的組成物を提供する。さらに、治療のための薬学的組成物または方法は、1つまたは複数のその他の治療的な処置と組み合わせて（または別々に）投与することもできる。その他の治療薬の例は、抗腫瘍薬、細胞可溶化液（修飾PA毒素とインキュベーションすることによって作製されたものなど）、非溶解細胞（放射線照射によって殺したものなど）、免疫抑制剤（たとえばRituximab、ステロイド）、および／またはサイトカイン（GM-CSFなど）を含むが、これらに限定されない。当業者には既知であろうが、薬物を含む本開示の態様は、従来の薬学的に許容されるキャリア、アジュバント、および対イオンと共に調製することができる。10

【0217】

修飾PA毒素は、少なくとも1つの、たとえば薬学的におよび生理的に許容される液体などの1つまたは複数の薬学的に有効なキャリアと組み合わせて投与することもできる。薬学的に有効なキャリアの例は、媒体として、水、生理食塩液、均衡塩類溶液、水性デキストロース、ゴマ油、グリセロール、エタノール、これらの組み合わせ等を含むが、これらに限定されない。キャリアおよび組成物は、滅菌することができ、製剤は、投与方法に適合させる。生物学的に中性のキャリアに加えて、投与される薬学的組成物は、保湿剤または乳化剤、防腐剤、およびpH緩衝剤など、たとえば酢酸ナトリウムまたはモノラウリン酸ソルビタンなどの微量の非毒性の補助的な物質を含むことができる。20

【0218】

組成物は、液体溶剤、懸濁液、エマルジョン、タブレット、ピル、カプセル、徐放性製剤、または粉末であることができる。固体組成物（たとえば、粉末、ピル、タブレット、またはカプセルの形態）については、従来の非毒性固体キャリアは、たとえば、医薬品等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、またはステアリン酸マグネシウムを含むことができる。組成物は、トリグリセライドなどの従来の結合剤およびキャリアと共に、坐薬として処方することができる。30

【0219】

配列番号：4、24、および25などの修飾PA毒素の、前立腺癌などの特定の障害または症状の治療に有効な量は、障害または症状の性質に依存し、標準的な臨床技術によって決定することができる。加えて、最適用量範囲を同定するために、インビトロにおけるアッセイ法を使用することができる（実施例2、4、および5を参照されたい）。また、製剤に使用される正確な用量は、疾患または障害の重症度に依存し、医薬技術者の判断およびそれぞれの被検体の状況に従って決定されなければならない。有効な用量は、インビトロまたは動物モデルの試験系に由来する用量反応曲線から推定することができる。70kgのヒトのための修飾PA毒素の有効なiv用量の例は、約1～10mg、たとえば約1～5mg、たとえば約1～3mg、たとえば約2.8mgの修飾PA毒素である。70kgのヒトのための修飾PA毒素の有効な前立腺内または腫瘍内の用量の例は、約10～100mg、たとえば約10～50mg、たとえば約10～30mg、たとえば約28mgの修飾PA毒素である。40

【0220】

本開示はまた、薬学的組成物の成分の1つまたは複数種で満たされた1つまたは複数の容器を含む薬学的パックまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって規定される形態の通知を、このような容器に選択的に伴ってもよく、この通知は、ヒト投与のための製造、使用、または販売機関による50

承認を示す。また、組成物の使用のための説明書を含めることもできる。

【0221】

核酸分子の投与

細胞において核酸を発現させるために核酸が使用される例において、核酸は、細胞内に送達される（たとえば、核酸ベクターからの発現により、または受容体を媒介した機構による）。1つの態様において、核酸は、配列番号：4、24、または25など、修飾PAをコードする。

【0222】

核酸を投与するための種々の送達システムが既知であり、リポソームのカプセル化法、微小粒子、マイクロカプセル化、受容体介在性エンドサイトーシス (WuおよびWu, J. Biol. Chem. 1987, 262 : 4429-32) およびレトロウイルスまたはその他のベクターの一部として治療的な核酸を構築することを含む。導入の方法は、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、経口の経路を含むが、これらに限定されない。化合物は、任意の便利な経路、たとえば注入またはボーラス注射よって、上皮または皮膚粘膜裏打ち（たとえば、口腔粘膜、直腸、膣、および腸の粘膜、その他）を介した吸収によつても投与されてもよく、その他の生物活性物質と共に投与されてもよい。投与は、全身性または局部的であることもできる。

【0223】

リポソームは標的部位と融合し、内腔の含有物を細胞内に送達する。リポソームは、単離剤および結合剤などの接触を維持するための種々の手段を使用して、融合が生じるために十分な時間標的細胞と接触して維持される。センダイウイルスまたはインフルエンザウイルスなどの膜融合を媒介する精製タンパク質またはペプチドにより、リポソームを調製することもできる。脂質は、ホスファチジルコリンなどの陽イオン性脂質を含む、既知のリポソームを形成する脂質のどのような有用な組み合わせでもあってもよい。その他の潜在的な脂質は、コレステロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロールなどの中性脂質を含む。リポソームを調製するためには、Katoら (J. Biol. Chem. 1991, 266 : 3361) によって記載されている手順を使用することができる。

【0224】

治療的分子が核酸である場合、投与されてその結果細胞内に入る適切な核酸発現ベクターよつて、たとえばレトロウイルスベクター（米国特許第4,980,286号を参照されたい）を使用することによつて、または直接注入よつて、または微小粒子砲撃（たとえば、遺伝子銃；Biolistic, Dupont）または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤での被覆を使用することによつて、または核に入ることが知られているホメオボックス様のペプチドに結合してこれを投与することよつて（たとえばJoliotら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88 : 1864-8を参照されたい）、その他によつて、投与することができる。または、核酸を細胞内に導入して、相同組換えによつて、発現のために宿主細胞DNA内に組み込ませることもできる。

【0225】

ベクターpcDNAは、発現を駆動するための強力なウイルスプロモーター (CMV) の制御下で、外来cDNAを細胞に導入する方法の一例である。しかし、その他のベクターを使用することもできる（実施例15を参照されたい）。また、その他のレトロウイルスのベクター (pRETRO-ON, Clontechなど) も、このプロモーターを使用するが、どのようなトランスフェクション補助剤も使用せずに細胞に入り、標的細胞が分裂し（特に、化学療法後の第1の寛解傾向の間に癌細胞が行うように）かつこれらが調節される場合にだけ、標的細胞のゲノムに統合されるという利点を有する。また、これらのプラスミドを使用した場合、テトラサイクリンを投与することよつて核酸を発現させることも可能である。

【0226】

pMAM-neo (Clontech) またはpMSG (Pharmacia) などのその他のプラスミドベクターは、MMTV-LTRプロモーター（これはステロイドによつて調節することができる）またはSV10後期プロモーター (pSVL, Pharmacia) またはメタロチオネイン応答性プロモーター (pBP

10

20

30

40

50

V、Pharmacia)、およびレトロウイルスを含むその他のウイルスのベクターを使用する。その他のウイルスのベクターの例は、アデノウイルス、AAV(アデノ随伴ウイルス)、組換えHSV、ポックスウイルス(ワクシニア)、および組換えレンチウイルス(HIVなど)を含む。これらのベクターにより、cDNA配列および転写に必要とされる調節要素を標的細胞に送達するという基本的な目標が達成される。本開示は、ゲノムに組み込まれるまたは組み込まれない、合成オリゴ、裸のDNA、プラスミド、およびウイルスを含む全ての核酸送達形態を含む。

【0227】

新規の修飾プロアエロリシン毒素、および前立腺癌および転移を治療するためにこれらの分子を使用する方法を例示し、記載したが、本開示がこのような原理から逸脱することなく、配置および詳細において修飾することができることは、当業者には明らかにはずである。我々の開示の原理が適用されうる多くの可能な態様からみて、例示された態様は開示の特定の例のみであることが認識されなければならず、開示範囲の限界として解されるべきでない。むしろ、開示の範囲は、以下の特許請求の範囲に従う。したがって、我々は、これら請求項の範囲および趣旨の範囲内にある全てを自身の発明として主張する。

10

【図面の簡単な説明】

【0228】

【図1】プロアエロリンドメイン(一定の比率で描かれていない)の模式図であり、フリンによる活性化の結果を示す。

【図2】ヒト血漿または酵素活性のあるPSA(10,000ng/ml)によってスパイクされたヒト血漿とブレインキュベートしたPSA-PA1における溶血アッセイ法の結果を示す棒グラフである。

20

【図3】天然のフリン部位の代わりにPSA切断部位を含むいくつかのプロアエロリシンバリエントのインビトロにおける、野生型プロアエロリシンに対する毒性を比較するグラフである。

【図4】PSA産生腫瘍(LNCaP)および非PSA産生腫瘍(SN12C)のインビボにおけるPSA-PA1の特異性を比較する棒グラフである。

【図5】図5A-5Mは、異なるいくつかのバリエントPA分子を生成するために、どのようにプロアエロリシン配列を変更することができるかを示す概略図である(一定の比率ではない)。「*」の記号は、1つまたは複数の点変異、および/またはPA結合ドメインの機能(すなわち、細胞膜において濃縮する能力)を減少させる1つまたは複数の欠失を表す。

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> University of Victoria Innovation and Development Corporation and
The Johns Hopkins University

<120> PROAEROLYSIN CONTAINING PROTEASE ACTIVATION SEQUENCES AND METHODS
OF USE FOR TREATMENT OF PROSTATE CANCER

<130> 2847-63499

<140>
<141>

<150> 60/314,613
<151> 2001-08-24

10

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 1410
<212> DNA
<213> Aeromonas hydrophilia

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1410)
<223>

20

<400> 1
gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

48

ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Ala Gln
20 25 30

96

agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45

144

ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

192

ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80

240

gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95

288

gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe

336

30

100	105	110	
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val 115 120 125			384
ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg 130 135 140			432
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Cys Asp 145 150 155 160			480
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala 165 170 175			528
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser 180 185 190			576
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser 195 200 205			624
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala 210 215 220			672
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr 225 230 235 240			720
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser 245 250 255			768
atc gag att gct gac aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260 265 270			816
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275 280 285			864
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr 290 295 300			912
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly 305 310 315 320			960
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg 325 330 335			1008
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala			1056

340

345

350

agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val 355 360 365	1104	
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr 370 375 380	1152	
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg cggt ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile 385 390 395 400	1200	
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile 405 410 415	1248	10
ggc gct ccc gtc ccg ctc gcg gct gac agc aag gtg cgt cgt gct cgc Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg 420 425 430	1296	
agt gtg gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp 435 440 445	1344	
gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtc Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val 450 455 460	1392	
acc cct gct gcc aat caa Thr Pro Ala Ala Asn Gln 465 470	1410	20
<210> 2 <211> 470 <212> PRT <213> Aeromonas hydrophilia		
<400> 2		
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln 1 5 10 15		
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln 20 25 30	30	
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser 35 40 45		
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu 50 55 60		
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro 65 70 75 80		

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
 115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
 130 135 140

10
 Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205

20
 Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

30
 Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg
 420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 3
<211> 1410
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site. 30

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1410)
<223>

<400> 3
gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa 48
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln 20 25 30	96
agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser 35 40 45	144
ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg egg ccg ggt tat aac ggt gaa Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu 50 55 60	192
ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro 65 70 75 80	240
gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly 85 90 95	288
gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gct aat ttc Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe 100 105 110	336
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val 115 120 125	384
ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg 130 135 140	432
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgg gac Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp 145 150 155 160	480
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala 165 170 175	528
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser 180 185 190	576
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser 195 200 205	624
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala 210 215 220	672
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr 225 230 235 240	720
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser 245 250 255	768

atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260 265 270	816
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275 280 285	864
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr 290 295 300	912
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly 305 310 315 320	960
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg 325 330 335	1008
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala 340 345 350	1056
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val 355 360 365	1104
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr 370 375 380	1152
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg cgg gcg ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile 385 390 395 400	1200
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile 405 410 415	1248
ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac agc cat tcc tcc aag ctg cag Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln 420 425 430	1296
agt gtg gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp 435 440 445	1344
gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val 450 455 460	1392
acc cct gct gcc aat caa Thr Pro Ala Ala Asn Gln 465 470	1410
<210> 4	
<211> 470	

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site.

<400> 4

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30

10

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95

20

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160

30

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

10

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

20

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

30

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln
 420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 5

His Ser Ser Lys Leu Gln
 1 5

10

<210> 6
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site

<220>

<221> CDS
 <222> (1)..(1410)
 <223>

20

<400> 6

gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa
 Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15

48

ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa
 Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Ala Gln
 20 25 30

96

agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc
 Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
 35 40 45

144

ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa
 Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
 50 55 60

192

ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct
 Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80

240

gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt
 Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95

288

gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc
 Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe

336

30

100	105	110	
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val	115 120	125	384
ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg	130 135	140	432
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp	145 150	155	480
ggc tat cgc tgt ggt gac aag aeg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala	165	170	528
165 170 175			10
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser	180 185	190	576
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser	195 200	205	624
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala	210 215	220	672
210 215 220			20
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr	225 230	235	720
225 230 235 240			
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser	245 250	255	768
245 250 255			
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser	260 265	270	816
260 265 270			
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg	275 280	285	864
275 280 285			
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr	290 295	300	912
290 295 300			30
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly	305 310	315	960
305 310 315 320			
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg	325 330	335	1008
325 330 335			
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala			1056

340	345	350	
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val 355	360	365	1104
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr 370	375	380	1152
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg cgg gcg ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile 385	390	395	1200
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile 405	410	415	1248
10			
ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac agc cat tcc tcc aag ctg cag Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln 420	425	430	1296
agt gcc gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat Ser Ala Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp 435	440	445	1344
gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val 450	455	460	1392
acc cct gct gcc aat caa Thr Pro Ala Ala Asn Gln 465	470	.	1410
20			
<210> 7			
<211> 470			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site			
<400> 7			
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln 1	5	10	30
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln 20	25	30	
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser 35	40	45	
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu 50	55	60	

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
 65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
 85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
 100 105 110

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
 115 120 125

10

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
 130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190

20

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

30

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

10

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser His Ser Ser Lys Leu Gln
 420 425 430

Ser Ala Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PSA cleavage site

<400> 8

30

His Ser Ser Lys Leu Gln Ser Ala
 1 5

<210> 9

<211> 1410

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1410)

<223>

<400> 9

gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa	48
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln	
1 5 10 15	

ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa	96
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Ala Gln	
20 25 30	

agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc	144
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser	
35 40 45	

ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa	192
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu	
50 55 60	

ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct	240
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro	
65 70 75 80	

gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt	288
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly	
85 90 95	

gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gct aat ttc	336
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe	
100 105 110	

atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg	384
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val	
115 120 125	

ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt	432
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg	
130 135 140	

gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgg gac	480
Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp	
145 150 155 160	

ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc	528
Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala	
165 170 175	

tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc	576
Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser	

10

20

30

180	185	190	
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser 195	200	205	624
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala 210	215	220	672
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr 225	230	235	720
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser 245	250	255	768
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser 260	265	270	816
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg 275	280	285	864
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr 290	295	300	912
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly 305	310	315	960
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg 325	330	335	1008
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala 340	345	350	1056
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val 355	360	365	1104
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr 370	375	380	1152
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg cgc ccg gtg ccg gcg ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile 385	390	395	1200
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile 405	410	415	1248
ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac tcc cag ttc tat agc agc aat Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Asp Ser Gln Phe Tyr Ser Ser Asn			1296

420	425	430	
agt gtg gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp			1344
435	440	445	
gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val			1392
450	455	460	
acc cct gct gcc aat caa Thr Pro Ala Ala Asn Gln			1410
465	470		
			10
<210>	10		
<211>	470		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site.			
<400> 10			
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln			
1	5	10	15
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln			
20	25	30	
20			
Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser			
35	40	45	
Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu			
50	55	60	
Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro			
65	70	75	80
Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly			
85	90	95	
30			
Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe			
100	105	110	
Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val			
115	120	125	
Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg			
130	135	140	

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
 145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
 165 170 175

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
 180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
 195 200 205

10

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
 210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

20

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

30

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Ser Gln Phe Tyr Ser Ser Asn
 420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 465 470

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PSA cleavage site

<400> 11

Gln Phe Tyr Ser Ser Asn
 1 5

<210> 12
<211> 1410
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1410)
<223>

<400> 12
gca gag ccc gtc tat cca gac cag ctt cgc ttg ttt tca ttg ggc caa 48
Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15

ggg gtc tgt ggc gac aag tat cgc ccc gtc aat cga gaa gaa gcc caa 96
Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln

10

20

30

20	25	30	
agc gtt aaa agc aat att gtc ggc atg atg ggg caa tgg caa ata agc Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser 35 40 45			144
ggg ctg gcc aac ggc tgg gtc att atg ggg ccg ggt tat aac ggt gaa Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu 50 55 60			192
ata aaa cca ggg aca gcg tcc aat acc tgg tgt tat ccg acc aat cct Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro 65 70 75 80			240
gtt acc ggt gaa ata ccg aca ctg tct gcc ctg gat att cca gat ggt Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly 85 90 95			288
gac gaa gtc gat gtg cag tgg cga ctg gta cat gac agt gcg aat ttc Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe 100 105 110			336
atc aaa cca acc agc tat ctg gcc cat tac ctc ggt tat gcc tgg gtg Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val 115 120 125			384
ggc ggc aat cac agc caa tat gtc ggc gaa gac atg gat gtg acc cgt Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg 130 135 140			432
gat ggc gac ggc tgg gtg atc cgt ggc aac aat gac ggc ggc tgt gac Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp 145 150 155 160			480
ggc tat cgc tgt ggt gac aag acg gcc atc aag gtc agc aac ttc gcc Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala 165 170 175			528
tat aac ctg gat ccc gac agc ttc aag cat ggc gat gtc acc cag tcc Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser 180 185 190			576
gac cgc cag ctg gtc aag act gtg gtg ggc tgg gcg gtc aac gac agc Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser 195 200 205			624
gac acc ccc caa tcc ggc tat gac gtc acc ctg cgc tac gac aca gcc Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala 210 215 220			672
acc aac tgg tcc aag acc aac acc tat ggc ctg agc gag aag gtg acc Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr 225 230 235 240			720
acc aag aac aag ttc aag tgg cca ctg gtg ggg gaa acc caa ctc tcc Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser 245 250 255			768
atc gag att gct gcc aat cag tcc tgg gcg tcc cag aac ggg ggc tcg Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser			816

260	265	270	
acc acc acc tcc ctg tct cag tcc gtg cga ccg act gtg ccg gcc cgc Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg			864
275	280	285	
tcc aag atc ccg gtg aag ata gag ctc tac aag gcc gac atc tcc tat Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr			912
290	295	300	
ccc tat gag ttc aag gcc gat gtc agc tat gac ctg acc ctg agc ggc Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly			960
305	310	315	320
ttc ctg cgc tgg ggc ggc aac gcc tgg tat acc cac ccg gac aac cgt Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg			1008
325	330	335	
ccg aac tgg aac cac acc ttc gtc ata ggt ccg tac aag gac aag gcg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala			1056
340	345	350	
agc agc att cgg tac cag tgg gac aag cgt tac atc ccg ggt gaa gtg Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val			1104
355	360	365	
aag tgg tgg gac tgg aac tgg acc ata cag cag aac ggt ctg tct acc Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr			1152
370	375	380	
atg cag aac aac ctg gcc aga gtg ctg ccg gtg cgg gcg ggg atc Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile			1200
385	390	395	400
acc ggt gat ttc agt gcc gag agc cag ttt gcc ggc aac ata gag atc Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile			1248
405	410	415	
ggt gct ccc gtg ccg ctc gcg gct gac ggt ata agt agt ttc cag agt Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Asp Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser			1296
420	425	430	
agt gtg gac ggc gct ggt caa ggc ctg agg ctg gag atc ccg ctc gat Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp			1344
435	440	445	
gcg caa gag ctc tcc ggg ctt ggc ttc aac aac gtc agc ctc agc gtg Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val			1392
450	455	460	
acc cct gct gcc aat caa Thr Pro Ala Ala Asn Gln			1410
465	470		
<210> 13			
<211> 470			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			

30

<220>

<223> Proaerolysin with a PSA sequence substituted for the furin site.

<400> 13

Ala Glu Pro Val Tyr Pro Asp Gln Leu Arg Leu Phe Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Val Cys Gly Asp Lys Tyr Arg Pro Val Asn Arg Glu Glu Ala Gln
20 25 30

Ser Val Lys Ser Asn Ile Val Gly Met Met Gly Gln Trp Gln Ile Ser
35 40 45 10

Gly Leu Ala Asn Gly Trp Val Ile Met Gly Pro Gly Tyr Asn Gly Glu
50 55 60

Ile Lys Pro Gly Thr Ala Ser Asn Thr Trp Cys Tyr Pro Thr Asn Pro
65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly
85 90 95

Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu Val His Asp Ser Ala Asn Phe
100 105 110 20

Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val
115 120 125

Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly Glu Asp Met Asp Val Thr Arg
130 135 140

Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp
145 150 155 160

Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala
165 170 175 30

Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys His Gly Asp Val Thr Gln Ser
180 185 190

Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser
195 200 205

Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala
210 215 220

Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser
 245 250 255

Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser
 260 265 270

Thr Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg
 275 280 285

10

Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr
 290 295 300

Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly
 305 310 315 320

Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg
 325 330 335

Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala
 340 345 350

20

Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val
 355 360 365

Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr
 370 375 380

Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile
 405 410 415

30

Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser
 420 425 430

Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp
 435 440 445

Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Val
 450 455 460

Thr Pro Ala Ala Asn Gln
465 470

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PSA cleavage site

<400> 14

Gly Ile Ser Ser Phe Gln Ser
1 5

10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Lys Gly Ile Ser Ser Gln Tyr
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 16

Ser Arg Lys Ser Gln Gln Tyr
1 5

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

30

Ala Thr Lys Ser Lys Gln His
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Lys Gly Leu Ser Ser Gln Cys

1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Leu Gly Gly Ser Ser Gln Leu
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu His Ser Ser Lys Leu Gln
1 5

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Lys Leu Gln
1

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5 10

30

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LHRH variant sequence.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Glu is a pyroglutamate

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Lys is a D-Lys

<400> 23

Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 24
<211> 397
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Variant proaerolysin peptide.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> pyroglutamate

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> D-Lys

20

<400> 24

Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser
1 5 10 15

Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu
20 25 30

Val His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His
35 40 45

Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly
50 55 60

30

Glu Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly
65 70 75 80

Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala
85 90 95

Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys

100

105

110

His Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val
 115 120 125

Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val
 130 135 140

Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu
 165 170 175

Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp
 180 185 190

Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val
 195 200 205

Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu
 210 215 220

Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser
 225 230 235 240

Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp
 245 250 255

Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile
 260 265 270

Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys
 275 280 285

30

Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile
 290 295 300

Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu
 305 310 315 320

Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln
 325 330 335

Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp

340

345

350

Ser His Ser Ser Lys Leu Gln Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu
 355 360 365

Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe
 370 375 380

Asn Asn Val Ser Leu Ser Val Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 385 390 395

<210> 25
<211> 397
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variant proaerolysin peptide.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> pyroglutamate

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> D-Lys

<400> 25

Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Glu Ile Pro Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Asp Ile Pro Asp Gly Asp Glu Val Asp Val Gln Trp Arg Leu
 20 25 30

Val His Asp Ser Ala Asn Phe Ile Lys Pro Thr Ser Tyr Leu Ala His
 35 40 45

Tyr Leu Gly Tyr Ala Trp Val Gly Gly Asn His Ser Gln Tyr Val Gly
 50 55 60

Glu Asp Met Asp Val Thr Arg Asp Gly Asp Gly Trp Val Ile Arg Gly
 65 70 75 80

Asn Asn Asp Gly Gly Cys Asp Gly Tyr Arg Cys Gly Asp Lys Thr Ala
 85 90 95

10

20

30

Ile Lys Val Ser Asn Phe Ala Tyr Asn Leu Asp Pro Asp Ser Phe Lys
 100 105 110

His Gly Asp Val Thr Gln Ser Asp Arg Gln Leu Val Lys Thr Val Val
 115 120 125

Gly Trp Ala Val Asn Asp Ser Asp Thr Pro Gln Ser Gly Tyr Asp Val
 130 135 140

Thr Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Thr Asn Trp Ser Lys Thr Asn Thr Tyr
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Glu Lys Val Thr Thr Lys Asn Lys Phe Lys Trp Pro Leu
 165 170 175

Val Gly Glu Thr Gln Leu Ser Ile Glu Ile Ala Ala Asn Gln Ser Trp
 180 185 190

Ala Ser Gln Asn Gly Gly Ser Thr Thr Ser Leu Ser Gln Ser Val
 195 200 205

Arg Pro Thr Val Pro Ala Arg Ser Lys Ile Pro Val Lys Ile Glu Leu
 210 215 220

Tyr Lys Ala Asp Ile Ser Tyr Pro Tyr Glu Phe Lys Ala Asp Val Ser
 225 230 235 240

Tyr Asp Leu Thr Leu Ser Gly Phe Leu Arg Trp Gly Gly Asn Ala Trp
 245 250 255

Tyr Thr His Pro Asp Asn Arg Pro Asn Trp Asn His Thr Phe Val Ile
 260 265 270

Gly Pro Tyr Lys Asp Lys Ala Ser Ser Ile Arg Tyr Gln Trp Asp Lys
 275 280 285

Arg Tyr Ile Pro Gly Glu Val Lys Trp Trp Asp Trp Asn Trp Thr Ile
 290 295 300

Gln Gln Asn Gly Leu Ser Thr Met Gln Asn Asn Leu Ala Arg Val Leu
 305 310 315 320

Arg Pro Val Arg Ala Gly Ile Thr Gly Asp Phe Ser Ala Glu Ser Gln
 325 330 335

Phe Ala Gly Asn Ile Glu Ile Gly Ala Pro Val Pro Leu Ala Ala Asp
 340 345 350

Ser Lys Val Arg Arg Ala Arg Ser Val Asp Gly Ala Gly Gln Gly Leu
 355 360 365

Arg Leu Glu Ile Pro Leu Asp Ala Gln Glu Leu Ser Gly Leu Gly Phe
 370 375 380

Asn Asn Val Ser Leu Ser Val Thr Pro Ala Ala Asn Gln
 385 390 395

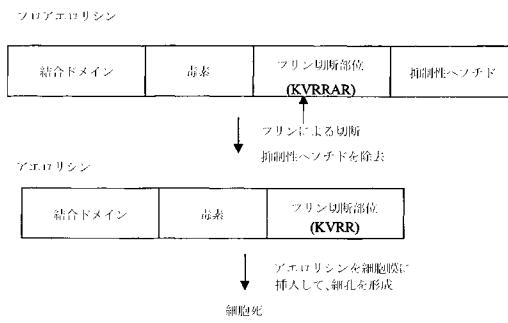
10

20

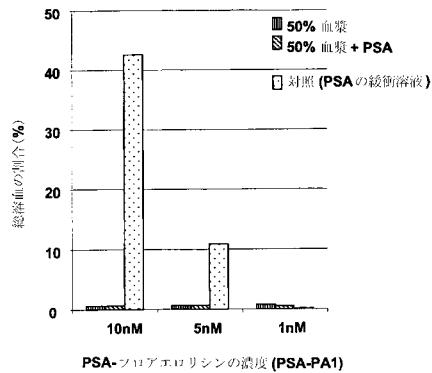
30

40

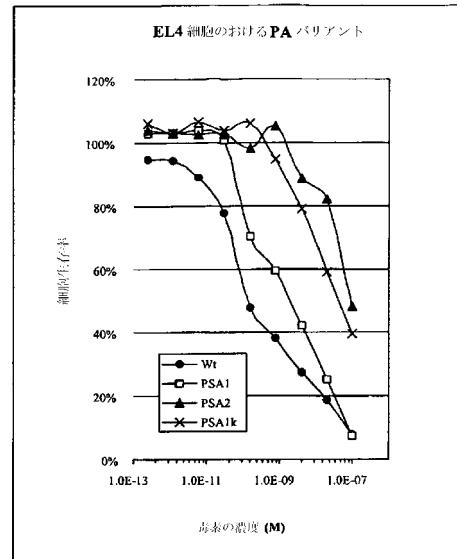
【図1】



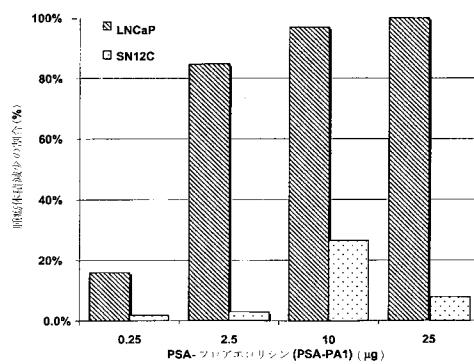
【図2】



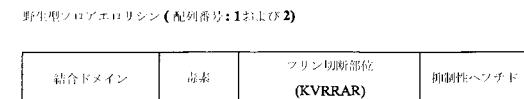
【図3】



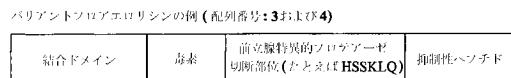
【図4】



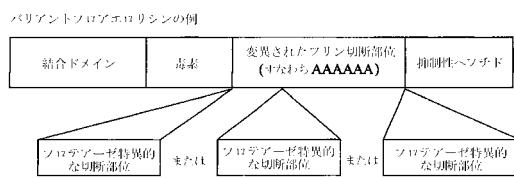
【図5 A】



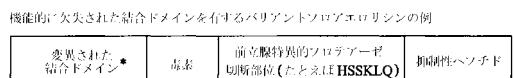
【図5 B】



【図5 C】



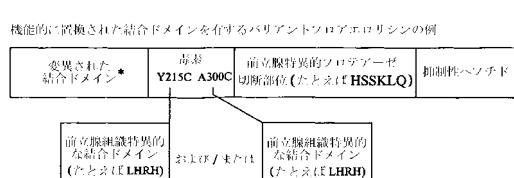
【図5 D】



【図5 E】

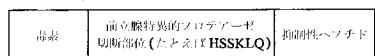


【図5 F】



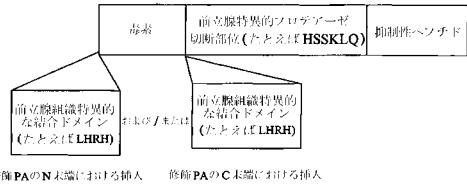
【図5G】

機能的に欠失された結合ドメインを有するバリアントプロアエロリシンの例
(アミノ酸1~83欠失)



【図5H】

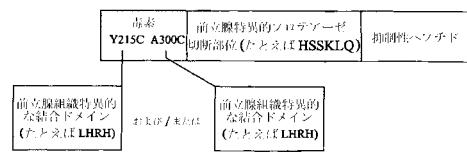
機能的に置換された結合ドメインを有するバリアントプロアエロリシンの例



修飾PAのN末端における挿入 修飾PAのC末端における挿入

【図5I】

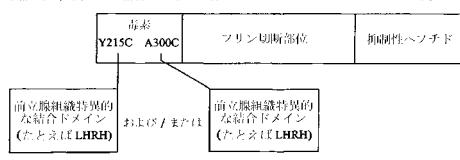
機能的に置換された結合ドメインを有するバリアントプロアエロリシンの例



修飾PAのアミノ酸Y215における付着 修飾PAのアミノ酸A300における付着

【図5M】

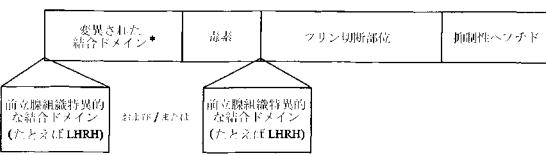
機能的に置換された結合ドメインを有するバリアントプロアエロリシンの例



修飾PAのアミノ酸Y215における付着 修飾PAのアミノ酸A300における付着

【図5J】

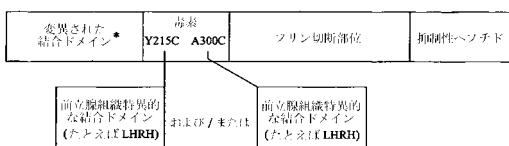
機能的に置換された結合ドメインを有するバリアントプロアエロリシンの例



修飾PAのN末端における挿入 修飾PAのC末端における挿入

【図5K】

機能的に置換された結合ドメインを有するバリアントプロアエロリシンの例



修飾PAのアミノ酸Y215における付着 修飾PAのアミノ酸A300における付着

【図5L】

機能的に置換された結合ドメインを有するバリアントプロアエロリシンの例



修飾PAのN末端における挿入 修飾PAのC末端における挿入

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395	C
A 61 K 48/00	(2006.01)	A 61 K 48/00	
A 61 P 13/08	(2006.01)	A 61 P 13/08	
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00	

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(72)発明者 デンミード サムウェル アール.

アメリカ合衆国 メリーランド州 エリコット シティ リトル クリーク ドライブ 5112

(72)発明者 イサアクス ジョン ティー.

アメリカ合衆国 メリーランド州 フェニックス ポプラ ヒル ロード 13638

(72)発明者 バックレイ ジェームズ トマス

カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 ピクトリア デニソン ロード 210

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 特表平09-500102 (JP, A)

特表2001-504334 (JP, A)

J. Biol. Chem., 米国, 1998年, Vol.273, No.49, 32565-32661

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 7/00

C07K 14/00

C07K 19/00

C12N 15/00

A61K 38/00

A61K 39/395

A61K 48/00

A61P 13/08

A61P 35/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS(STN)

PubMed