(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4934761号
(P4934761)

(45)発行日　平成24年5月16日(2012.5.16)　(24)登録日　平成24年3月2日(2012.3.2)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/25	(2006.01)	C07K	14/25	ZNA
C07K 7/06	(2006.01)	C07K	7/06	
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
C40B 40/10	(2006.01)	C40B	40/10	
C40B 30/04	(2006.01)	C40B	30/04	

請求項の数 38　(全 20 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-504218 (P2007-504218)
(86)(22)出願日　平成16年3月26日 (2004.3.26)
(65)公表番号　特表2007-531716 (P2007-531716A)
(43)公表日　平成19年11月8日 (2007.11.8)
(86)国際出願番号　PCT/CA2004/000443
(87)国際公開番号　WO2005/092917
(87)国際公開日　平成17年10月6日 (2005.10.6)
審査請求日　平成19年3月22日 (2007.3.22)

(73)特許権者　506324459
ガリピー，ジーン
カナダ　エム５ピー　２エル５　オンタリオ，トロント，エルムスソーペ　アヴェニュー　２９
(73)特許権者　506324460
ウェイ，シン
カナダ　エム４エッチ　１ジェイ４　オンタリオ，トロント，ソーンクリフェ　パーク　アヴェニュー　４３　アパートメント　１８０９
(74)代理人　100094112
弁理士　岡部　讓
(74)代理人　100064447
弁理士　岡部　正夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】毒素変異体ライブラリーおよびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

複数のタンパク質種を含むコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーであって、各タンパク質種が、プロテアーゼ感受性ループにインサートが導入されたＡＢｘ毒性タンパク質のＡ鎖を含み、インサートが、２から７個のアミノ酸残基長を有するさまざまなアミノ酸配列のポリペプチドであり、上記複数のタンパク質種を少なくとも１の候補となる標的／レセプターと接触したときに、特定の標的／レセプターに結合するインサートを含むタンパク質種について、そのインサートがその特定の標的／レセプターのリガンドと同定するコンビナトリアル・タンパク質ライブラリー。

【請求項２】

複数のタンパク質種を含むコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーであって、各タンパク質種が、プロテアーゼ感受性ループにインサートが導入されたＡＢｘ毒性タンパク質のＡ鎖を含み、インサートが、２から７個のアミノ酸残基長を有するさまざまなアミノ酸配列のポリペプチドであり、上記複数のタンパク質種を少なくとも１の候補となる細胞表面に存在する標的／レセプターと接触したときに、特定の標的／レセプターに結合するインサートを含み、その細胞に毒性を示すタンパク質種について、そのインサートがその特定の標的／レセプターのリガンドと同定するコンビナトリアル・タンパク質ライブラリー。

【請求項３】

その標的／レセプターが細胞の表面に存在することを特徴とする請求項１のコンビナト

リアル・タンパク質ライブラリー。
【請求項４】
ライブラリーが、少なくとも１００のタンパク質種を含む、請求項１から３のいずれかに記載のコンビナトリアル・タンパク質ライブラリー。
【請求項５】
タンパク質種が、インサートを志賀毒素様毒素ＩＡ鎖に導入することで形成され、配列番号１のアミノ酸配列を含む、請求項１から４のいずれに記載のコンビナトリアル・タンパク質ライブラリー。
【請求項６】
タンパク質種が、配列番号１のアミノ酸２４２位と２６１位の間にインサートを導入することで形成される、請求項５に記載のコンビナトリアル・タンパク質ライブラリー。
【請求項７】
タンパク質種が、配列番号１のアミノ酸２４５位と２４６位の間にインサートを導入することで形成される、請求項６に記載のコンビナトリアル・タンパク質ライブラリー。
【請求項８】
タンパク質種が、配列番号１で規定された志賀毒素様毒素ＩＡ鎖のアミノ酸１から２３９位の前または後にインサートを導入することで形成される、請求項５に記載のコンビナトリアル・タンパク質ライブラリー。
【請求項９】
インサートが７アミノ酸長を有する、請求項１乃至８のいずれか１項に記載のコンビナトリアル・タンパク質ライブラリー。
【請求項１０】
発現系の複数の種を含み、それぞれの種が、請求項１乃至９のいずれか１項に記載の１つのタンパク質種を発現するコンビナトリアル発現ライブラリー。
【請求項１１】
インサートが導入されたＡＢｘ毒性タンパク質のＡ鎖を含む変異タンパク質であって、
（ａ）インサートが、２から７個のアミノ酸残基長を有するさまざまなアミノ酸配列のポリペプチドであり、
（ｂ）インサートが、Ａ鎖配列のプロテアーゼ感受性ループに導入された
変異タンパク質。
【請求項１２】
ＡＢｘ毒性タンパク質のＡ鎖が志賀毒素様毒素ＩＡ鎖である、請求項１１に記載の変異タンパク質。
【請求項１３】
インサートが、配列番号１のアミノ酸２４２位と２６１位の間に導入された、請求項１２に記載の変異タンパク質。
【請求項１４】
インサートが、配列番号１のアミノ酸２４５位と２４６位の間に導入された、請求項１３に記載の変異タンパク質。
【請求項１５】
インサートが配列ＩＹＳＮＫＬＭ（配列番号６）を含む、請求項１４に記載の変異タンパク質。
【請求項１６】
インサートが配列ＡＡＦＡＤＬＩ（配列番号７）を含む、請求項１４に記載の変異タンパク質。
【請求項１７】
インサートが、配列番号１で規定された志賀毒素様毒素ＩＡ鎖のアミノ酸１から２３９位の前または後に導入された、請求項１２に記載の変異タンパク質。
【請求項１８】
インサートが７アミノ酸長を有する、請求項１１乃至１７のいずれか１項に記載の変異

タンパク質。
【請求項１９】
特定の標的／レセプターに結合するリガンドの同定方法であって、
（ａ）標的／レセプターを保有することが既知の細胞を、請求項１乃至９のいずれか１項に記載のコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーのメンバーに曝露する工程と、
（ｂ）細胞に対する毒性が観察されるタンパク質ライブラリーのメンバーを選択する工程を含む方法。
【請求項２０】
さらに、選択したタンパク質ライブラリーのメンバーを評価して挿入領域の配列を決定し、それにより細胞の標的／レセプターのリガンド候補として挿入領域の配列ペプチドを同定する工程を含む、請求項１９記載の方法。
【請求項２１】
さらに、挿入領域の配列ペプチドをさらに試験して、それらが特定の標的／レセプターのリガンドであることを確認する工程を含む、請求項１９または２０のいずれかに記載の方法。
【請求項２２】
標的／レセプターに特異的な毒素を分離する方法であって、
（ａ）標的／レセプターを、請求項１乃至９のいずれか１項に記載のコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーに曝露する工程と、
（ｂ）標的／レセプターへの結合により得られたコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーから、少なくとも１つのタンパク質種を分離する工程と
を含む方法。
【請求項２３】
標的／レセプターの発現細胞を対象として、分離したタンパク質をスクリーニングして、標的／レセプターの細胞に対するその毒性を確認する工程をさらに含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
標的／レセプターが、精製された標的／レセプターであり、固体支持体上に固定化されている、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
標的／レセプターが細胞表面にある、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
前記細胞が固体支持体上に固定化されている、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
毒素がレポーターとして働き、前記細胞の死がレポーターの結合を示す、請求項２５または２６に記載の方法。
【請求項２８】
特定の標的／レセプターを発現する細胞に対する毒素を同定する方法であって、
（ａ）特定の標的／レセプターをもつことを知られる細胞を請求項１から９のいずれかに記載のコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーのメンバーに暴露し、
（ｂ）その細胞に対して毒性が観察されるタンパク質ライブラリーのメンバーを選択する工程
を含む方法であって、細胞に毒性が観察されるタンパク質ライブラリーのメンバーが特定の標的／レセプターに結合するリガンドである方法。
【請求項２９】
請求項２８に記載の方法であって、特定の標的／レセプターと
結合するリガンドを特定する工程と、
（ａ）標的／レセプターを、請求項１乃至９のいずれか１項に記載のコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーに曝露する工程と、
（ｂ）標的／レセプターへの結合により得られたコンビナトリアル・タンパク質ライブラ

リーから、少なくとも１つのタンパク質種を分離する工程と
を含む方法であって、上記細胞に毒性が観察されるタンパク質ライブラリーのメンバーが特定の標的／レセプターに結合するリガンドである方法。
【請求項３０】
請求項２８または２９のいずれかに記載の方法で、さらにそのタンパク質の毒性の特性をもとのインサートを含むタンパク質種と比較して増強するためにインサートを変異させる工程をさらに含む方法。
【請求項３１】
請求項１１に記載のタンパク質種の毒性を増強する方法であって以下の工程を含む方法：
（ａ）特定のターゲット／レセプターを発現する細胞に毒性を有する既知のインサートを変異する工程；
（ｂ）変異したインサートを有するタンパク質種の毒性をもとのインサートを含むタンパク質種と比較する工程。
【請求項３２】
請求項２８から３１のいずれかに記載の方法で、さらに、選択したタンパク質ライブラリーのメンバーを評価して挿入領域の配列を決定する工程を含む方法。
【請求項３３】
請求項２８から３２のいずれかに記載の方法で、さらに、挿入領域のペプチドの配列の特定の標的／レセプターを発現する細胞に対する毒性を確認するために試験する工程を含む方法。
【請求項３４】
請求項１９、２０、２１、２３及び２５から３３のいずれかに記載の方法で、細胞が癌細胞である方法。
【請求項３５】
請求項３４の方法であって、癌細胞が、メラノーマ細胞、子宮頸癌細胞、または脳癌細胞からなるグループから選ばれる癌細胞である方法。
【請求項３６】
請求項３５の方法であって、癌細胞が、メラノーマ細胞である方法。
【請求項３７】
請求項３５の方法であって、癌細胞が、子宮頸癌細胞である方法。
【請求項３８】
請求項３５の方法であって、癌細胞が、脳癌細胞である方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
この出願は、毒素変異体ライブラリーに関し、特定の細胞種を標的とした治療法の開発におけるその使用方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
植物および細菌の毒素は、ＡおよびＢと呼ばれる別個の機能を司る２つ以上のポリペプチドドメインまたはサブユニットを伴う構造機構を有する。毒素は、AB_X毒素と呼ばれることがあり、この場合ｘは、毒素中の同一または相同のＢサブユニットの数を表す。この骨格に関連する毒素ファミリーには、例えば志賀毒素（Ｓｈｉｇａ）および志賀毒素様毒素（Ｓｈｉｇａ－ｌｉｋｅ　ｔｏｘｉｎ）、大腸菌易熱性エンテロトキシン（Ｅ．ｃｏｌｉ　ｈｅａｔ－ｌａｉｂｌｅ　ｅｎｔｅｒｏｔｏｘｉｎ）、コレラ毒素（ｃｈｏｌｅｒａ　ｔｏｘｉｎ）、ジフテリア毒素（ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ　ｔｏｘｉｎ）、百日咳毒素（ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ　ｔｏｘｉｎ）、緑膿菌外毒素Ａ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ　ｅｘｏｔｏｘｉｎ　Ａ）（Ｏｌｓｎｅｓ，Ｓ．およびＳａｎｄｖｉｋ，Ｋ．（１９８８）、Ｉｍｍｕｎｏｔｏｘｉｎｓ、３９～７３頁、Ｋｌｕｗｅｒ　Ａｃａｄ

ｅｍｉｃ、ボストン；Ｓａａｄｖｉｋ，Ｋ．、Ｄｕｂｉｎｉｎａ，Ｅ．、Ｇａｒｒｅｄ，Ｏ．ら（１９９２）、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓ．２０、７２４頁）、ならびにリシンおよびアブリンなどの植物毒素が挙げられる。時として毒素は、Ｂ鎖が、非共有結合により毒性のＡ鎖に結合する事実上別の実体であるという点でヘテロメリックである。あるいは毒素が自然界で産生される場合、Ｂ鎖は同じタンパク質の一部であるため、毒素はモノメリックであることもある。

【０００３】

タンパク質合成の阻害能に基づき、志賀毒素および志賀毒素様毒素、ならびにリシン（ｒｉｃｉｎ）、アブリン（ａｂｒｉｎ）、ゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）、クロチン（ｃｒｏｔｉｎ）、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質（ｐｏｋｅｗｅｅｄ ａｎｔｉｖｉｒａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ）、サポリン（ｓａｐｏｒｉｎ）、モモルジン（ｍｏｍｏｒｄｉｎ）、モデシン（ｍｏｄｅｃｃｉｎ）、サルシン（ｓａｒｃｉｎ）、ジフテリア毒素およびエキソトキシンＡなどのタンパク質は、リボソーム不活性化タンパク質（ＲＩＰ）と呼ばれている。ＲＩＰの効力はきわめて高く、真核生物細胞１個を死滅させるには、ジフテリア毒素Ａ鎖（Ｙａｍａｉｚｕｍｉら（１９７８）、Ｃｅｌｌ １５、２４５～２５０頁）またはリシンＡ鎖（Ｅｉｋｌｉｄら（１９８０）、Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．１２６、３２１～３２６頁）の１分子で十分であることが示されている。

【０００４】

国際特許出願公開第ＷＯ９９／４０１８５号は、毒性種が送達される細胞のタイプを変えるために、結合ドメイン中に変異を導入された変異毒素のライブラリーを記載している。新たなタンパク質は、野生型のヘテロメリックタンパク質細胞毒性タンパク質の結合サブユニットを変異させて、変異タンパク質を産生する微生物クローンのライブラリーを作成することで得られる。ライブラリーは次に、標的細胞型に特異的に結合しそれを死滅させることができるかどうかについてスクリーニングされる。

【０００５】

米国特許第５，５５２，１４４号は、変異がＡ鎖の１６７位に導入され、この位置のアミノ酸を異なる電荷を有するものに変化させる、赤痢菌様毒素ＩＩ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ－ｌｉｋｅ ｔｏｘｉｎ ＩＩ）バリアントを開示している。この結果、毒性を伴う酵素活性の低い毒素が得られた。

【０００６】

米国特許第６，５９３，１３２号は、異常細胞には特異的な毒性を示すが、その作用特異性が特定の細胞結合成分に依存しない組換え毒性タンパク質を記載している。’１３２号特許の組換えタンパク質は、合成リンカー配列によりＢ鎖に結合するリシン様毒素のＡ鎖を有する。このリンカー配列は、特定の疾患に罹患した細胞または組織に局在するプロテアーゼにより特異的に切断されて、毒性のＡ鎖を遊離させ、それにより病変細胞または組織が選択的に阻害または破壊される。

【０００７】

米国特許第６，６４９，７４２号は、タイプＩのリボソーム不活性化タンパク質（ＲＩＰ）および標的分子とのジスルフィド結合に利用可能なシステインを有するＲＩＰアナログを開示している。ＲＩＰおよびＲＩＰアナログは、細胞傷害性療法薬の成分として使用されて、薬剤の第２成分の特異的結合能によりそのＲＩＰ成分が送り込まれるいずれの細胞型も選択的に除去する。

【非特許文献１】Ｏｌｓｎｅｓ，Ｓ．およびＳａｎｄｖｉｋ，Ｋ．（１９８８）、Ｉｍｍｕｎｏｔｏｘｉｎｓ、３９～７３頁、Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ、ボストン
【非特許文献２】Ｓａａｄｖｉｋ，Ｋ．、Ｄｕｂｉｎｉｎａ，Ｅ．、Ｇａｒｒｅｄ，Ｏ．ら（１９９２）、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓ．２０、７２４頁
【非特許文献３】Ｙａｍａｉｚｕｍｉら（１９７８）、Ｃｅｌｌ １５、２４５～２５０頁
【非特許文献４】Ｅｉｋｌｉｄら（１９８０）、Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．１２６、３２１～３２６頁

【特許文献１】国際特許出願公開第ＷＯ９９／４０１８５号
【特許文献２】米国特許第５，５５２，１４４号
【特許文献３】米国特許第６，５９３，１３２号
【特許文献４】米国特許第６，６４９，７４２号
【非特許文献５】Ｍｅｒｉｔｔ，Ｅ．Ａ．、およびＨｏｌ，Ｗ．Ｇ．Ｊ．（１９９５）、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５、１６５１頁
【非特許文献６】Ｏ’Ｂｒｉｅｎ，Ａ．Ｄ．、およびＨｏｌｍｅｓ，Ｒ．Ｋ．（１９８７）、Ｓｈｉｇａ ａｎｄ Ｓｈｉｇａ－ｌｉｋｅ ｔｏｘｉｎｓ．、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｒｅｖ ５１、２０６～２２０頁
【非特許文献７】Ｌｉｎｇｗｏｏｄ，Ｃ．Ａ．（１９９３）、Ｖｅｒｏｔｏｘｉｎｓ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ｇｌｙｃｏｌｉｐｉｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ、Ａｄｖ Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ ２５、１８９～２１１頁
【非特許文献８】Ｊａｃｅｗｉｃｚら（１９８６）、Ｐａｔｈｏｇｅｎｓｉｓ ｏｆ ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｉａｒｒｈｅａ．ＸＩ．Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｓｈｉｇｅｌｌａ ｔｏｘｉｎ－ｂｉｎｄｉｎｇ ｇｌｙｃｏｌｉｐｉｄ ｆｒｏｍ ｒａｂｂｉｔ ｊｅｊｕｎｕｍ ａｎｄ ＨｅＬａ ｃｅｌｌｓ ａｎｄ ｉｔｓ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｓ ｇｌｏｂｏｔｒｉａｏｓｙｌｃｅｒａｍｉｄｅ、Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １６３、１３９１～１４０４頁
【非特許文献９】Ｓａｎｄｖｉｇら（１９８９）、Ｅｎｄｏｃｙｔｏｓｉｓ ｆｒｏｍ ｃｏａｔｅｄ ｐｉｔｓ ｏｆ Ｓｈｉｇａ ｔｏｘｉｎ：ａ ｇｌｙｃｏｌｉｐｉｄ－ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ ｆｒｏｍ Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ １．Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １０８、１３３１～１３４３頁
【非特許文献１０】３２．Ｇａｒｒｅｄら（１９９５）、Ｒｏｌｅ ｏｆ ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ ａｎｄ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｔｒａｎｓｐｏｒｔ ｆｏｒ ｏｐｔｉｍａｌ ｔｏｘｉｃｉｔｙ ｏｆ Ｓｈｉｇａ ｔｏｘｉｎ ａｎｄ ｔｏｘｉｎ ｍｕｔａｎｔｓ、Ｅｘｐ Ｃｅｌｌ Ｒｅ．２１８、３９～４９頁
【非特許文献１１】Ｏ’Ｂｒｉｅｎら（１９９２）、Ｓｈｉｇａ ｔｏｘｉｎ：ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，ｇｅｎｅｔｉｃｓ，ｍｏｄｅ ｏｆ ａｃｔｉｏｎ，ａｎｄ ｒｏｌｅ ｉｎ ｐａｔｈｏｇｅｎｅｓｉｓ、Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ １８０、６５～９４頁
【非特許文献１２】Ｂｒｉｇｏｔｔｉら（１９９７）、Ｔｈｅ ＲＮＡ－Ｎ－ｇｌｙｃｏｓｉｄａｓｅ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ Ｓｈｉｇａ－ｌｉｋｅ ｔｏｘｉｎ Ｉ：Ｋｉｎｅｔｉｃ ｐａｒａｍｅｔｅｒｓ ｏｆ ｔｈｅ ｎａｔｉｖｅ ａｎｄ ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｔｏｘｉｎ、Ｔｏｘｉｃｏｎ ３５、１４３１～１４３７頁
【非特許文献１３】Ｄｅｒｅｓｉｅｗｉｃｚら（１９９２）、Ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ａｆｆｅｃｔｉｎｇ ｔｈｅ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｓｈｉｇａ－ｌｉｋｅ ｔｏｘｉｎ Ｉ Ａ－ｃｈａｉｎ、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３１、３２７２～３２８０頁
【非特許文献１４】Ｒｅａｄｙら（１９９１）、Ｓｉｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｏｆ ｒｉｃｉｎ Ａ－ｃｈａｉｎ ａｎｄ ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｍｍｅｃｈａｎｉｓｍ ｏｆ ａｃｔｉｏｎ、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ １０、２７０～２７８頁
【非特許文献１５】Ｈｏｖｄｅら（１９８８）、Ｅｖｉｄｅｎｃｅ ｔｈａｔ ｇｌｕｔａｍｉｃ ａｃｉｄ １６７ ｉｓ ａｎ ａｃｔｉｖｅ－ｓｉｔｅ ｒｅｓｉｄｕｅ ｏｆ Ｓｈｉｇａ－ｌｉｋｅ ｔｏｘｉｎ Ｉ、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８５、２５６８～２５７２頁
【非特許文献１６】Ｙａｍａｓａｋｉら（１９９１）、Ｉｍｐｏｒｔａｎｃｅ ｏｆ ａｒｇｉｎｉｎｅ ａｔ ｐｏｓｉｔｉｏｎ １７０ ｏｆ ｔｈｅ Ａ ｓｕｂｕｎｉｔ ｏｆ Ｖｅｒｏ ｔｏｘｉｎ １ ｐｒｏｄｕｃｅｄ ｂｙ ｅｎｔｅｒｏｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｆｏｒ ｔｏｘｉｎ ａｃｔｉｖｉ

ty、Microb Pathog 11, 1～9頁
【非特許文献17】Gendlerら（1988）、A highly immunogenic region of human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats、J Biol Chem 263、12820～12823頁
【非特許文献18】Girlingら（1989）、A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM－3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas、Int J Cancer 43、1072～1076頁
【非特許文献19】Linsleyら（1988）、Monoclonal antibodies reactive with mucin glycoproteins found in sera from breast cancer patients、Cancer Res 48、2138～2148頁
【非特許文献20】Sarkar G, およびSommers S, （1990）、The ‘megaprimer’ method of site－directed mutagenesis、Biotechniques 8、404～407頁
【非特許文献21】Noren, K. A. およびNoren, C. J. （2001）、Construction of high－complexity combinatorial phage display peptide libraries、Methods 23、169～178頁
【非特許文献22】Reidhaar－Olsonら（1991）、Random mutagenesis of protein sequence using oligonucleotide cassettes、Methods Enzymo 208、564～586頁
【非特許文献23】Brayら（2001）、Probing the surface of sukaryotic cells using combinatorial toxin libraries、Current Biology 11、697～701頁
【非特許文献24】Skehanら（1990）、New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer－drug screening、J Natl Cancer Inst 82、1107～1112頁

【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【０００８】
本発明は、複数のタンパク質種を含み、各タンパク質種は、インサートが導入されたヘテロメリックな毒性タンパク質のＡ鎖を含む、コンビナトリアル・タンパク質ライブラリーを提供する。本発明によれば、インサートは、２個以上のアミノ酸残基長、例えば３～２００アミノ酸残基を有するさまざまなアミノ酸配列のポリペプチドであり、かつインサートは、Ａ鎖配列のプロテアーゼ感受性ループに導入される。インサート導入の結果、Ａ鎖が、Ｂ鎖の結合領域に関連する正常な特異性とは無関係かつ異なる毒性特異性を発現するように、Ａ鎖内に人工の結合ドメインが作り出される。ライブラリーをスクリーニングすることで、癌細胞型を含めたさまざまな細胞型に特異的な変異毒素の選択および同定が可能になる。本発明の一実施形態では、コンビナトリアル・ライブラリーは、志賀毒素様毒素ＩＡ鎖の、例えば配列番号１を参照して規定されたアミノ酸２４２位と２６１位の間の領域にインサートを導入して形成されるタンパク質種を含む。
【０００９】

本発明はまた、発現系の複数の種を含むコンビナトリアル発現ライブラリーも提供する。それぞれの種は、上記に記載のインサートが導入されたヘテロメリックな毒性タンパク質のＡ鎖を含む１つのタンパク質種を発現する。コンビナトリアル発現ライブラリー由来のタンパク質を発現した結果、コンビナトリアル・タンパク質ライブラリーが形成される。

【００１０】

さらなる態様では、本発明は、メラノーマの治療用組成物、およびそのような組成物の使用方法を提供する。組成物は、２個以上のアミノ酸残基長、例えば３～２００アミノ酸残基長を有するポリペプチドが、Ａ鎖配列のプロテアーゼ感受性ループに導入された、ヘテロメリックな毒性タンパク質のＡ鎖を含むタンパク質種を含む。インサートは、タンパク質種がメラノーマ細胞に対する毒性活性を有するように選択される。タンパク質種は、メラノーマと診断された患者に、メラノーマの生細胞数の減少をもたらすのに十分な量で投与することによりメラノーマ治療に使用される。

【００１１】

さらなる態様では、本発明は、他のタイプの癌を治療するための組成物を提供する。組成物は、２個以上のアミノ酸残基長、例えば３～２００アミノ酸残基長を有するポリペプチドが、Ａ鎖配列のプロテアーゼ感受性ループに導入された、ヘテロメリックな毒性タンパク質のＡ鎖を含むタンパク質種を含む。インサートは、タンパク質種が癌細胞に対する毒性活性を有するように選択される。具体的な実施形態では、インサートは、ＭＵＣ－１レセプターに結合するために選択される。タンパク質種は、メラノーマと診断された患者に、メラノーマの生細胞数の減少をもたらすのに十分な量で投与することによりメラノーマ治療に使用される。

【００１２】

さらなる態様では、本発明は、癌細胞に存在することが既知の腫瘍マーカーなど、特定の標的／レセプターに結合するリガンドの同定方法を提供する。この方法では、コンビナトリアル・ライブラリーの毒素は、レポーターとして働き、本発明によるコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーは、標的／レセプターを保有することが既知の細胞と対照してスクリーニングされる。細胞に毒性を示すことが明らかにされたタンパク質は、挿入領域の配列を決定するために評価される。次に、この配列のペプチドを、毒素または他の分子との併用により、標的／レセプターの保有細胞へ化合物を導くために用いることができる。

【００１３】

本発明のさらなる態様では、既知の細胞マーカーに特異的な毒性物質を同定する方法が提供される。本発明のこの実施形態では、毒素はレポーターとして働く必要がない。したがって、マーカー、または入手可能であれば単離した標的／レセプターを有する細胞は、コンビナトリアル・タンパク質ライブラリーに曝露される。好ましい実施形態では、細胞または単離した標的／レセプターは、プラスチックウェルなどの固体支持体上に固定化される。ライブラリーから得られたタンパク質は、次に、標的／レセプターの発現細胞に対するその毒性ならびに特異性、および治療薬として使用するための適性を確認するため、細胞と対照して再スクリーニングされる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１４】

本発明は、複数のタンパク質種を含むコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーに関し、各タンパク質種は、インサートが導入されたヘテロメリックな毒性タンパク質のＡ鎖を含む。インサートは、２個以上のアミノ酸残基長、例えば３～２００アミノ酸残基を有するさまざまなアミノ酸配列のポリペプチドであり、Ａ鎖配列のプロテアーゼ感受性ループに導入される。本ライブラリーは、特定の癌細胞型といった特定の細胞型に対し毒性を示す個々のタンパク質についてスクリーニングすることができるタンパク質種のコレクションを提供する。したがって、選択された個々のタンパク質種は、癌治療に適切に使用される。

【００１５】
この出願の明細書および請求項の範囲で用いられている「コンビナトリアル・ライブラリー」という用語は、それぞれが共通部分と可変部分を有する種の混合物のことである。「コンビナトリアル・タンパク質ライブラリー」という場合は、それぞれの種はタンパク質またはペプチドであり、共通部分と可変部分はそれぞれアミノ酸配列である。コンビナトリアル発現ライブラリーという場合、種は微生物、発現ベクターまたはポリヌクレオチドであり、これらは発現すると、共通部分および可変部分を有するタンパク質またはペプチドを産生する。この場合、共通部分および可変部分は、それぞれヌクレオチド配列である。コンビナトリアル・ライブラリーの目的は、スクリーニング用の複数のバリアントを提供することにあるため、コンビナトリアル・ライブラリーは、好ましくは少なくとも１００種類、より好ましくは少なくとも１０００種類の異なるタンパク質または発現ユニットを含有する。

【００１６】
この出願の明細書および請求項の範囲で用いられている「ヘテロメリック毒性タンパク質」という用語は、別個の機能を司る２つ以上のポリペプチドドメインまたはサブユニットを有する、事実上ヘテロメリックであるという共通の機構テーマを伴うタンパク質毒素のクラスのことである（Ｍｅｒｉｔｔ，Ｅ．Ａ．、およびＨｏｌ，Ｗ．Ｇ．Ｊ．（１９９５）、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５、１６５１頁）。そのようなタンパク質では、２つ以上のサブユニットまたは領域をＡおよびＢ、毒素を$ＡＢ_{X}$毒素と呼ぶことがあるが、ｘは、毒素中の同一または相同のＢサブユニットの数を表す。この骨格に関連する毒素ファミリーには、例えば志賀毒素および志賀毒素様毒素、大腸菌易熱性エンテロトキシン、コレラ毒素、ジフテリア毒素、百日咳毒素、緑膿菌外毒素Ａ、ならびにリシンおよびアブリンなど植物毒素が挙げられる。タンパク質合成の阻害能に基づき、志賀毒素および志賀毒素様毒素、ならびにリシン、アブリン、ゲロニン、クロチン、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サポリン、モモルジン、モデシン、サルシン、ジフテリア毒素およびエキソトキシンＡなどのタンパク質は、リボソーム不活性化タンパク質（ＲＩＰ）と呼ばれている。これらの自然発生のヘテロメリック毒性タンパク質では、Ａ鎖は毒性タンパク質であるのに対し、Ｂ鎖は、毒素に対する感受性細胞のレセプターに結合する結合部分を形成することで、Ａ鎖をその細胞に送達する。

【００１７】
ヘテロメリック毒性タンパク質Ａ鎖の一具体例が、配列番号１に配列が提供されているＳＬＴ－１Ａ鎖である。ＳＬＴ－１のＡ鎖は、酵素（毒性）ドメインが１～２３９残基の２９３個のアミノ酸を含む。２４２～２６１残基を包含するプロテアーゼ感受性ループは通常曝露され、ペプチド配列を挿入するのには適した部位である。

【００１８】
ＳＬＴ－１は、大腸菌（Ｏ１５７：Ｈ７）（２４）の病原株により産生されるタイプＩＩのリボソーム不活性化タンパク質である。ＳＬＴ－１は、約７０ｋＤのＡＢ５複合体である（Ｏ’Ｂｒｉｅｎ，Ａ．Ｄ．、およびＨｏｌｍｅｓ，Ｒ．Ｋ．（１９８７）、Ｓｈｉｇａ ａｎｄ Ｓｈｉｇａ－ｌｉｋｅ ｔｏｘｉｎｓ、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｒｅｖ ５１、２０６～２２０頁）。１つの３２ｋＤ触媒Ａサブユニットが、５つの同一の７．７ｋＤＢサブユニットであるペンタマーと非共有結合的に会合している。Ｂサブユニットペンタマーは、標的細胞表面の糖脂質グロボトリアオシルセラミド（ＣＤ７７またはＧｂ３としても知られる）を認識する（Ｌｉｎｇｗｏｏｄ，Ｃ．Ａ．（１９９３）、Ｖｅｒｏｔｏｘｉｎｓ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ｇｌｙｃｏｌｉｐｉｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ、Ａｄｖ Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ ２５、１８９～２１１頁；Ｊａｃｅｗｉｃｚら（１９８６）、Ｐａｔｈｏｇｅｎｓｉｓ ｏｆ ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｉａｒｒｈｅａ．ＸＩ．Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｓｈｉｇｅｌｌａ ｔｏｘｉｎ－ｂｉｎｄｉｎｇ ｇｌｙｃｏｌｉｐｉｄ ｆｒｏｍ ｒａｂｂｉｔ ｊｅｊｕｎｕｍ ａｎｄ ＨｅＬａ ｃｅｌｌｓ ａｎｄ ｉｔｓ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｓ ｇｌｏｂｏｔｒｉａｏｓｙｌｃｅｒａｍｉｄｅ、Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １６３、１３９１～１４０４頁）。Ａ鎖Ｃ末端のＣｙ

ｓ２４２と２６１の間に位置するプロテアーゼ感受性ループは、細胞経路の間にフリンにより切断される（図１）。Ａ鎖は、ＥＲルーメンへ移動する際、Ｃｙｓ２４２と２６１間の鎖内ジスルフィド結合により、そのＢサブユニットペンタマーと結合し続ける（Ｓａｎｄｖｉｇら（１９８９）、Ｅｎｄｏｃｙｔｏｓｉｓ ｆｒｏｍ ｃｏａｔｅｄ ｐｉｔｓ ｏｆ Ｓｈｉｇａ ｔｏｘｉｎ：ａ ｇｌｙｃｏｌｉｐｉｄ－ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ ｆｒｏｍ Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ １．Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １０８、１３３１～１３４３頁；３２．Ｇａｒｒｅｄら（１９９５）、Ｒｏｌｅ ｏｆ ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ ａｎｄ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｔｒａｎｓｐｏｒｔ ｆｏｒ ｏｐｔｉｍａｌ ｔｏｘｉｃｉｔｙ ｏｆ Ｓｈｉｇａ ｔｏｘｉｎ ａｎｄ ｔｏｘｉｎ ｍｕｔａｎｔｓ、Ｅｘｐ Ｃｅｌｌ Ｒｅ．２１８、３９～９頁）。ジスルフィド結合は、最終的にＥＲルーメンで還元され、Ａ１鎖（最初の２５１ａａ）が遊離された後、Ａ１鎖はサイトゾルにレトロ転位され、そこでリボソームを不活化する（Ｏ’Ｂｒｉｅｎら（１９９２）、Ｓｈｉｇａ ｔｏｘｉｎ：ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，ｇｅｎｅｔｉｃｓ，ｍｏｄｅ ｏｆ ａｃｔｉｏｎ，ａｎｄ ｒｏｌｅ ｉｎ ｐａｔｈｏｇｅｎｅｓｉｓ、Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ １８０、６５～９４頁）。より具体的には、ＳＬＴ－１のＡ鎖は、２８ＳｔＲＮＡから特定のアデニンヌクレオチド（４３２４）を触媒的に切断するＮ－グリコシダーゼである（Ｂｒｉｇｏｔｔｉら（１９９７）、Ｔｈｅ ＲＮＡ－Ｎ－ｇｌｙｃｏｓｉｄａｓｅ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ Ｓｈｉｇａ－ｌｉｋｅ ｔｏｘｉｎ Ｉ：Ｋｉｎｅｔｉｃ ｐａｒａｍｅｔｅｒｓ ｏｆ ｔｈｅ ｎａｔｉｖｅ ａｎｄ ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｔｏｘｉｎ、Ｔｏｘｉｃｏｎ ３５、１４３１～１４３７頁）。この事象は、アミノアシルｔＲＮＡのリボソームへの結合を阻害し、タンパク質の伸張を阻止することでタンパク質合成を結果的に阻害する。ＳＴのＡ鎖およびリシンに関して行われる突然変異誘発試験ならびに構造解析は、触媒活性に関与する主な保護残基を明らかにした（Ｄｅｒｅｓｉｅｗｉｃｚら（１９９２）、Ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ａｆｆｅｃｔｉｎｇ ｔｈｅ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｓｈｉｇａ－ｌｉｋｅ ｔｏｘｉｎ Ｉ Ａ－ｃｈａｉｎ、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３１、３２７２～３２８０頁；Ｒｅａｄｙら（１９９１）、Ｓｉｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｏｆ ｒｉｃｉｎ Ａ－ｃｈａｉｎ ａｎｄ ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｍｅｃｈａｎｉｓｍ ｏｆ ａｃｔｉｏｎ、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ １０、２７０～２７８頁）。ＳＬＴ－１の触媒活性に不可欠な残基は、チロシン７７、グルタミン酸１６７、アルギニン１７０およびトリプトファン２０３である（Ｈｏｖｄｅら（１９８８）、Ｅｖｉｄｅｎｃｅ ｔｈａｔ ｇｌｕｔａｍｉｃ ａｃｉｄ １６７ ｉｓ ａｎ ａｃｔｉｖｅ－ｓｉｔｅ ｒｅｓｉｄｕｅ ｏｆ Ｓｈｉｇａ－ｌｉｋｅ ｔｏｘｉｎ Ｉ、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８５、２５６８～２５７２頁；Ｙａｍａｓａｋｉら（１９９１）、Ｉｍｐｏｒｔａｎｃｅ ｏｆ ａｒｇｉｎｉｎｅ ａｔ ｐｏｓｉｔｉｏｎ １７０ ｏｆ ｔｈｅ Ａ ｓｕｂｕｎｉｔ ｏｆ Ｖｅｒｏ ｔｏｘｉｎ １ ｐｒｏｄｕｃｅｄ ｂｙ ｅｎｔｅｒｏｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｆｏｒ ｔｏｘｉｎ ａｃｔｉｖｉｔｙ、Ｍｉｃｒｏｂ Ｐａｔｈｏｇ １１，１～９頁）。さらに、毒素の細胞表面への結合は、細胞内への導入、ひいては毒性活性に不可欠である。なぜなら、このＡ鎖だけでは有意な毒性を示さないのである。

【００１９】

ＳＬＴ－１Ａ鎖に加えて、他の毒性を用いて本発明によるライブラリーおよび組成物を形成することも、他の毒性を本発明の方法に用いることもできる。具体的には、志賀毒素および他の志賀毒素様毒素、ならびにリシン、アブリン、ゲロニン、クロチン、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サポリン、モモルジン、モデシン、サルシン、ジフテリア毒素およびエキソトキシンＡ、および他の機能的に関連のあるリボソーム不活性化タンパク質（ＲＩＰ）を使用することができる。

【００２０】

本発明のコンビナトリアル・ライブラリーを作成する目的で、少なくとも２個のアミノ

酸、例えば３～２００アミノ酸残基長の短いアミノ酸配列が、このプロテアーゼ感受性ループに導入される。インサート中のアミノ酸の数は、ライブラリーに存在しうるランダムバリアント候補の数を規定する。例えば、インサート中のアミノ酸数が３である場合、最大バリアント数は、20^3または８０００バリアントである。インサートが大きくなるほど、相応するバリアント候補数も大きくなる。

【００２１】

純粋なランダム配列を伴うインサートを用いる代わりに、インサートは既知のテンプレートをもとに設計することができる。例えば、Ｍｕｃ－１との関連で以下に記載する通り、特定の細胞型に対する結合特性をレセプターにもたらすことが既知の配列の変化を、タンパク質構築物の毒性活性を最適化するインサートを同定するために用いることができる。この同じ最適化は、大きなコンビナトリアル・ライブラリーのスクリーニングにより単離された個々の配列で行ってもよい。しかし、実施例１の原則的試験の証明に用いたインサートが標的／レセプターであるのに対し、実際には、最大効果および特異性を得るために、インサートは既知のリガンドの配列に基づき最適化されることを理解されたい。

【００２２】

特定の、既知のレセプター型を標的にするこのアプローチは、本発明のさらなる態様、すなわち、癌細胞に存在することが既知の腫瘍マーカーなど、特定の標的／レセプターに結合するペプチドリガンドを同定する方法を示すものである。この方法では、本発明によるコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーは、その標的／レセプターを保有することが既知の細胞と対照してスクリーニングされる。細胞に毒性を示すことが明らかにされたタンパク質を評価して挿入領域の配列を決定するため、毒素はレポーターとして働く。次にこの配列のペプチドは、毒素または他の分子との併用により、標的／レセプターの保有細胞へ化合物を導くために用いることができる。さらに、挿入領域配列の休んでいるペプチドは、その細胞型の他のレセプターとは対照的に、それらが特定の標的／レセプターのリガンドであることを確認することが適切であると考えられる。これは、単離したレセプターが入手可能ならば、それを用いた結合アッセイにより行うことができる。

【００２３】

本発明はまた、既知の細胞マーカー、および特に単離形で利用可能なマーカーに特異的な毒性物質を同定する方法も提供する。本発明のこの実施形態では、毒素はレポーターとして働く必要がない。したがって、マーカー、または利用可能であれば単離した標的／レセプターを有する細胞は、コンビナトリアル・タンパク質ライブラリーに曝露される。好ましい実施形態では、細胞または単離した標的／レセプターは、プラスチックウェルなどの固体支持体上に固定化される。ライブラリーから捕らえられたタンパク質は、次に、標的／レセプター発現細胞に対するその毒性ならびに特異性、および治療薬として使用するための適性を確認するため、細胞と対照して再スクリーニングされる。この方法は、ＭＵＣ－１およびその糖型などのムチン、Ｈｅｒ－２、Ｈｅｒ２－Ｎｅｕ、チロシンキナーゼマーカー、ＥＧＦＲ、ＧＤ２、およびＧＤ３など限定されない腫瘍マーカーを含む、いずれかの腫瘍マーカーまたは細胞レセプターに特異的な結合インサートを伴う毒素を同定するために用いることができる。

【００２４】

したがって、本発明のこの特定の態様により、

（ａ）標的／レセプターを、複数のタンパク質種を含むコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーであって、各タンパク質種が、インサートが導入された毒性タンパク質のＡ鎖を含み、

インサートが、少なくとも２個のアミノ酸残基長を有するさまざまなアミノ酸配列のポリペプチドであり、

インサートが、Ａ鎖配列のプロテアーゼ感受性ループに導入された
コンビナトリアル・タンパク質ライブラリーに曝露する工程と、

（ｂ）標的／レセプターへの結合により得られたコンビナトリアル・タンパク質ライブラリーから、少なくとも１つのタンパク質種を分離する工程とを含む、既知の標的／レセ

プターに特異的な毒素の分離方法が提供される。この明細書および請求項の範囲で用いられている「分離する」という用語は、さらなる分析に適した形態で発現する環境から切り離されたタンパク質を含有する組成物を得るための、なんらかの機構のことである。これには、捕捉後（例えば競合的結合剤への曝露による）の標的／レセプターからの遊離、または捕捉されたことが明らかなタンパク質を発現するクローンの培養物からの分離が挙げられよう。この方法は、さらに分離したタンパク質を、標的／レセプターを発現する細胞と対照してスクリーニングし、標的／レセプターの発現細胞に対するその毒性を確認する工程を含むことができる。このスクリーニングに適した手順は、実施例３に記載されている。上述の通り、この方法では、標的／レセプターは精製された標的／レセプターであってよく、固体支持体上に固定化することができる。標的／レセプターは、固定化することができる細胞表面にあってもよい。標的／レセプターが細胞表面にある場合、毒素はレポーターとして働くことができ、細胞の死はレポーターの結合を示す。

【００２５】

ＳＬＴ－１ライブラリー構築での我々の経験から、コンビナトリアル・ライブラリー構築用のタンパク質のテンプレートを選択するうえで考慮することがふさわしい、いくつかの実用的な問題が指摘された。１つの重要な要素は、単鎖タンパク質、好ましくは３００未満のアミノ酸である細菌タンパク質（ライブラリーが原核生物で発現するとする場合）の選択である。より小さな毒素の使用は、固形腫瘍へのその浸潤能を増加させ、かつその免疫原性を低下させる。第２に、タンパク質のテンプレートは、宿主のシャペロンの必要が最小限で済むよう、溶液中で自然発生的に活性形態へフォールディングすべきである。例えば、通常はジスルフィド架橋に関与する複数のシステイン残基を含有するスカフォールドは避けるべきである。さらに、マルチサブユニット複合体とは対照的な単鎖タンパク質は、細菌からより容易にエクスポートすることができる。第３に、タンパク質のテンプレートは、単独および複数の部位特異的突然変異を含有するペプチドバリアントにおける適正なフォールディングを確認するための迅速測定が可能な酵素活性を保有すべきである。第４に、単純なスクリーニング法を、コンビナトリアル・ライブラリーの設計に取り入れるべきである。そのような検索は、高速スループットスクリーニング法に適したものにすべきである。ＳＬＴ－１の触媒性Ａ鎖（１～２９３残基）は、既知のレセプター結合機能をいずれも欠損し、明確な構造と触媒部位を有する単鎖であるため、これらの基準を満たしている。

【００２６】

本発明のさらなる態様は、発現系の複数の種を含むコンビナトリアル発現ライブラリーである。発現ライブラリー内の種はそれぞれ、インサートが導入されたヘテロメリックな毒性タンパク質のＡ鎖を含むタンパク質種を発現する。インサートは、２個以上のアミノ酸残基長、例えば３～２００アミノ酸残基長を有するさまざまなアミノ酸配列のポリペプチドであり、かつインサートは、Ａ鎖配列のプロテアーゼ感受性ループに導入される。好適な発現系には、プラスミドおよびウイルスベクターがある。

ここで本発明を、以下の実施例を参照してさらに説明するが、本発明はこれに限定されない。

【実施例１】

【００２７】

コンセプトの実証：典型的なＡ鎖トリペプチド・ライブラリーの設計およびデータマイニング

我々は当初、ＳＬＴ－１Ａ鎖のＣ末端プロテアーゼ感受性ループに挿入する簡単なトリペプチド・ライブラリーを作成した（図２ＡおよびＢ）。このＡ鎖のループ領域は、Ｃｙｓ２４２～Ｃｙｓ２６１を架橋するジスルフィド結合が１つあるために、必然的に制約を受ける。このライブラリーの最大多様性は、トリペプチド配列の20^3または８０００通りの順列になると計算することができる。新たなレセプター結合活性について、Ａ鎖ライブラリーを容易にスクリーニングできるというコンセプトの実証として、我々は、このＡ鎖トリペプチド・ライブラリーから３０００コロニー以上を取り出し、各クローンが産生

した変異毒素を精製した。我々は、Ａ鎖変異体が野生型ＳＬＴ－１Ｂサブユニットの存在下で発現する場合、その発現程度は劇的に上昇することに、本試験のきわめて初期に気づいた。そこで、Ａ鎖の変異体型を発現し、最初はＡＢ５毒素バリアントとして精製した。すべてのＡサブユニットはｐｏｌｙＨｉｓ精製タグを保有しているため、Ａ鎖を金属親和性カラムまたはビーズで回収する一方、Ｂサブユニットを変性剤（例えば尿素）により除去することは比較的容易である。ランダムに選択した細菌のクローンで行ったウェスタンブロット法は、これらのコロニーの＞７０％が、大量のこれらのＡ鎖変異体を生成することを示した。

【００２８】

次に、これらの毒素バリアントを、９６ウェルプレートの個々のウェル中で被覆し、ヒトＭＵＣ１反復配列（Ｇｅｎｄｌｅｒら（１９８８）、Ａ ｈｉｇｈｌｙ ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｉｃ ｒｅｇｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｃ ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ ｍｕｃｉｎ ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ ｂｙ ｃａｒｃｉｎｏｍａｓ ｉｓ ｍａｄｅ ｕｐ ｏｆ ｔａｎｄｅｍ ｒｅｐｅａｔｓ、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２６３、１２８２０～１２８２３頁；Ｇｉｒｌｉｎｇら（１９８９）、Ａ ｃｏｒｅ ｐｒｏｔｅｉｎ ｅｐｉｔｏｐｅ ｏｆ ｔｈｅ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｃ ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ ｍｕｃｉｎ ｄｅｔｅｃｔｅｄ ｂｙ ｔｈｅ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ＳＭ－３ ｉｓ ｓｅｌｅｃｔｉｖｅｌｙ ｅｘｐｏｓｅｄ ｉｎ ａ ｒａｎｇｅ ｏｆ ｐｒｉｍａｒｙ ｃａｒｃｉｎｏｍａｓ、Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ４３、１０７２～１０７６頁）の特徴が明らかな乳癌トリペプチドエピトープＴｈｒ－Ａｒｇ－Ｐｒｏに対し、モノクローナル抗体Ｏｎｃ Ｍ２７（Ｌｉｎｓｌｅｙら（１９８８）、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｒｅａｃｔｉｖｅ ｗｉｔｈ ｍｕｃｉｎ ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎｓ ｆｏｕｎｄ ｉｎ ｓｅｒａ ｆｒｏｍ ｂｒｅａｓｔ ｃａｎｃｅｒ ｐａｔｉｅｎｔｓ、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ４８、２１３８～２１４８頁）を結合するその能力をＥＬＩＳＡ法でスクリーニングした。表１および２に示されている通り、Ａ鎖変異体のほとんどは、Ｏｎｃ Ｍ２７の標的エピトープに適合するトリペプチドインサートをコードすることも、抗体により認識されることもなかった。しかし、２例においては、毒素バリアントは正確なエピトープを保有しており（表１、図３）、ＭＵＣ１トリペプチドエピトープを保有する我々の対照Ａ鎖で観察されたものに匹敵する、強いＥＬＩＳＡ信号を発したが、これらはその無作為に選んだトリペプチド領域に予測したエピトープ配列を有していた。９６Ａ鎖変異体の典型的なＥＬＩＳＡデータセットを図３に示す。１例のＡ鎖変異体（表１および２の変異体＃４１）を除くＡ鎖変異体の大部分が、ｍＡｂ Ｏｎｃ Ｍ２７を認識しなかったことが明らかにわかる。これらの結果は、Ａ鎖ライブラリーは容易に構築およびスクリーニングされ、特定のレセプター、この場合では抗原結合部位を特異的に標的にすることが可能な毒素変異体を見つけることができることを、明らかに立証した。

【実施例２】

【００２９】

コンビナトリアルＳＬＴ－１Ａペプタペプチド・ライブラリーの作成

ライブラリーの多様性は、特定の標的に特異的に結合することが可能で高い親和性を有するリガンドについて、コンビナトリアル・ライブラリーをスクリーニングするうえで不可欠なパラメータを示す。実施例Ｉに記載したＳＬＴ－１Ａ鎖トリペプチド・ライブラリーは、20^3または８０００通りの変異した可能性があるＡ鎖最大多様性を有する。このサンプリング範囲は小さいが、我々のコンセプトを実証するためにトリペプチドエピトープをマッピングするうえでは有用であった。７残基ライブラリー（20^7または1.3×10^9通りの変異体）は、合成ペプチド・ライブラリーと並んでファージディスプレイの設計に一般に用いられる、より典型的な最小多様性レベルを示している。そこで、手始めに我々は、そのＣ末端に7アミノ酸長のランダム配列を挿入したＳＬＴ－１Ａ鎖ライブラリーを構築した。このライブライーは、ジスルフィド結合により必然的に制約される感受性領域である、Ａ鎖のプロテアーゼ感受性ループに組み込まれた。このライブラリーは、

Ａ鎖毒素変異体が、新たなまたは既知の、癌細胞に取り込まれたレセプターを標的にすることを確実に確認できるだけの十分な多様性を提供する。このライブラリーの要素はすべて（提案された他のライブラリーと同様）、迅速にＡ鎖変異体を精製するためのＮ末端Ｈｉｓタグを含有している。ライブラリー（図４）は、メガプライマーＰＣＲ法（Ｓａｒｋａｒ Ｇ，およびＳｏｍｍｅｒｓ Ｓ，（１９９０）、Ｔｈｅ‘ｍｅｇａｐｒｉｍｅｒ’ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ ｓｉｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ８、４０４～４０７頁）により生成された。メガプライマー法は、２個のフランキングプライマーおよび内部変異プライマーを用いる２回のＰＣＲにより、標的ＤＮＡ配列に変異を導入するために広く用いられている。ＳＬＴ－１Ａ鎖ヘプタペプチド・ライブラリーのライブラリー設計に関する説明は、今後他の単一Ａ鎖ライブラリーに対する例として役立つであろう。ＳＬＴ－１Ａ鎖ヘプタペプチド・ライブラリー（図５）は、我々のＳＬＴ－１Ａ鎖トリペプチド・ライブラリーを構築するため用いたのと同じ部位である、Ａ鎖のアミノ酸２４５位と２４６位の間に７つのアミノ酸がランダム挿入されている（表１、２、図３）。簡単には、それぞれにＨｉｎｄｌ１１およびｐｓｔ１の制限酵素認識部位を保有する２つのフランキングプライマー、Ａ（ＧＴＴ ＡＣＴ ＧＴＧ ＡＣＡ ＧＣＴ ＧＡＡ ＧＣＴ ＴＴＡ ＣＧＴ ＴＴＴ ＣＧ（配列番号２）およびＢ（ＧＡＧ ＡＡＧ ＡＡＧ ＡＧＡ ＣＴＧ ＣＡＧ ＡＴＴ ＣＣＡ ＴＣＴ Ｇ ＴＴ Ｇ（配列番号３））を、ＳＬＴ－１オペロンの５’および３’末端内でアニールした。７つのランダムアミノ酸（ＮＮＳ）すべてのほか、テンプレートにアニールするための長いマッチした配列を含有するライブラリ・オリゴヌクレオチドＦを合成した。ランダム・オリゴヌクレオチドの合成では、各コドンの３番目の位置をＧまたはＴに制限することで、各アミノ酸の相対的発現量を改善した（Ｎｏｒｅｎ，Ｋ．Ａ．およびＮｏｒｅｎ，Ｃ．Ｊ．（２００１）、Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｈｉｇｈ－ｃｏｍｐｌｅｘｉｔｙ ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ ｐｈａｇｅ ｄｉｓｐｌａｙ ｐｅｐｔｉｄｅ ｌｉｂｒａｒｉｅｓ、Ｍｅｔｈｏｄｓ ２３、１６９～１７８頁）。このタイプの制限は、残基間のコーディングの不一致だけでなく全般的なＤＮＡ配列複雑性も減少させる（Ｒｅｉｄｈａａｒ－Ｏｌｓｏｎら（１９９１）、Ｒａｎｄｏｍ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｕｓｉｎｇ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｃａｓｓｅｔｔｅｓ、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏ ２０８、５６４～５８６頁）。この方法はまた、ＴＡＧコドンが翻訳される際のＧｌｎ残基の挿入を規定するｓｕｐＥ細菌株を用いて、終止コドン（ＴＡＧ）を抑制する一方、終止コドン（ＴＡＡおよびＴＧＡ）の発生を最少化する。最初のＰＣＲ反応は、プライマーＡおよびＦおよび変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した結果産物を用いて行った。この産物を次に、ランダムＤＮＡを増幅する２回目のＰＣＲ反応用のプライマーＢを伴うメガプライマーとして用いた。最終のライブラリーＤＮＡ（ＰＣＲ産物）を次に、Ｈｉｎｄｌ１１およびＰｓｔ１で分解し、ｐＥＣＨＥ９ａ発現ベクター（ＭＴＩ、トロント）の骨格にクローニングする。続いて、以上の結果得られたｐＥＣＨＥベクターで大腸菌株ＪＭ１０１を形質転換し、単一の細菌コロニーを取り出し、溶解して単一Ａ鎖毒素の発現についてその上清を分析するか、または癌細胞上に層状化し、細胞の細胞傷害活性分析のためＳＲＢを用いてスクリーニングした。

【実施例３】

【００３０】

細胞傷害活性分析による、癌細胞系と対照したコンビナトリアルＳＬＴ－１Ａヘプタペプチド・ライブラリーの検索

我々は、Ａ鎖の細胞傷害機能をレポーターシグナルとして用い、我々のＳＬＴ－１Ａヘプタペプチド・ライブラリーをスクリーニングした。細胞傷害活性は、毒素が内在化され、処理され、リボソーム近傍に送達される、明らかに多段階の事象であることを示唆するため、レセプターへの結合の測定よりも豊富な情報を所有する。細胞傷害活性分析は基本的に前述の通りに行った（Ｂｒａｙら（２００１）、Ｐｒｏｂｉｎｇ ｔｈｅ ｓｕｒｆａｃｅ ｏｆ ｓｕｋａｒｙｏｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ｕｓｉｎｇ ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒ

ｉａｌ ｔｏｘｉｎ ｌｉｂｒａｒｉｅｓ、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｂｉｏｌｏｇｙ １１、６９７～７０１頁）。簡単には、我々のＡ鎖ライブラリーすべてをスクリーニングする方法は、以下の原則を基に行われた。ＳＫ－ＢＲ－３（ヒト乳癌）、ＣＡＭＡ－１（ヒト乳癌）、５１８Ａ２（ヒトメラノーマ）、ＰＣ３（ヒト前立腺癌）およびＢ１６（マウスメラノーマ）などの確立された癌細胞系を９６ウェルプレートで増殖させ、１次スクリーニング段階で標的として用いた。これらの細胞系は当初、その接着力（樹脂）、高速スループットスクリーニング設定におけるその細胞生存染色特性（ＳＲＢ）のほか、野生型ＳＬＴ－１に対するレセプターおよび感受性の欠損を基に（擬陽性度を確実に減らすため）、我々のホロトキシンライブラリー検索（Ｂｒａｙ、上記）のために選択された。各ライブラリーから単一細菌コロニーを取り出し、深い９６ウェルプレートで増殖した。細胞を採取し、溶解してその溶解物を精製した。すべての発現したＳＬＴ－１Ａ鎖バリアントは、Ｎ－末端に６－ヒスチジン標識を有するため、ニッケル親和性ビーズ（９６ウェルフォーマット）によりその溶解物から各バリアントを精製し、標的細胞上に層状化した。Ａ鎖バリアントで処置した標的細胞を含有するプレートを、次に３７℃で４８時間培養した後、固定し、スルホローダミンＢ（ＳＲＢ）で染色した。ＳＲＢアッセイは、その細胞のタンパク質量を染色して生存細胞を定量化する比色エンドポイントアッセイである（Ｓｋｅｈａｎら（１９９０）、Ｎｅｗ ｃｏｌｏｒｉｍｅｔｒｉｃ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ ａｓｓａｙ ｆｏｒ ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ－ｄｒｕｇ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ、Ｊ Ｎａｔｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ ８２、１１０７～１１１２頁）。ＳＲＢアッセイは、癌細胞系で薬剤候補の高速スループットスクリーニングを行うためにＮＣＩ／ＮＩＨにより採用されている。生存率分析を、細胞死をもたらすいずれの細菌抽出物についても繰り返し行った。１回目のスクリーニングをは、５０００個を超える細菌クローンに対して行い（５０００の異なるＡ鎖の毒素に相当）、ヒトメラノーマ細胞系５１８Ａ２の再現可能なキラーとして７つの毒素バリアントを同定した（図５）。横座標は細胞の治療に用いられた毒素の対数濃度を表し、縦座標は４８時間後の生存細胞の実測率を表す。塗りつぶされた三角は、５１８Ａ２細胞に対する野生型毒素の効果を示し、２つの最も効果的なＡ鎖バリアントを、ＳＡＭ＃３（塗りつぶしなしの四角）およびＳＡＭ＃５（Ｘ記号）と名づけた。

【００３１】

次に、７つの有望なＡ鎖バリアントを、細胞系パネル（ベロ［サル、正常な腎臓］；ＰＣ－３［ヒト、前立腺癌］；ＨｅｐＧ２［ヒト、肝癌］；ＳｉＨａ［ヒト、子宮頸癌］；ＰａｎＣ［ヒト、膵臓癌］；ＳＫＢＲ－３［ヒト、乳癌］；５１８－Ａ２［ヒト、メラノーマ］；Ｕ８７［ヒト、神経膠腫］；Ｂ１６－Ｆ１０［マウス、メラノーマ］；ＨＳ－２１６［ヒト、正常な線維芽細胞］；ＣＡＭＡ－１［ヒト、乳癌］；ＯＶＣａｒ－３［ヒト、卵巣癌］）と対照して再スクリーニングした。これら７つのうち、４つは１つの癌細胞系に対し活性があり、そのうち２つは５１８－Ａ２ヒトメラノーマに対し、その他はＳｉＨａ（ヒト子宮頸癌細胞）およびＵ８７－Ａ（ヒト脳癌細胞；神経膠腫）に対してそれぞれ活性を有することが観察された。

【００３２】

ヒトメラノーマ細胞系に毒性をもたらす２つのＡ鎖毒素（ＳＡＭ３およびＳＡＭ５）をコードする遺伝子の配列を決定し、野生型Ａ鎖の残基２４５位と２４６位の間に挿入されたアミノ酸配列を決定した。Ｈｉｓタグを含むこの配列は、配列番号４および５にそれぞれリストされている。

表１：ＳＬＴ－１Ａ鎖トリペプチド・ライブラリーからランダムに取り出したクローンのＤＮＡ配列。太字は変異塩基。変異体＃４１は、我々のＥＬＩＳＡスクリーニングでｍＡｂ Ｏｎｃ Ｍ２７の強力なバインダーとして同定された（図３）。

【表１】

SLT-1 A 鎖ヌクレオチド配列バリアント		多様性（変異領域におけるヌクレオチドの変化）
MUC1 エピトープ	CCA GAC ACG CGA CCA GCT CCA	0/9
変異体#1	CCA GAC GGG ATC GGG GCT CCA	8/9
変異体#2	CCA GAC CTG GAG ATG GCT CCA	8/9
変異体#3	CCA GAC CCC CGT GGG GCT CCA	6/9
変異体#4	CCA GAC GAC GAC TTG GCT CCA	9/9
変異体#5	CCA GAC GTC CGG TGG GCT CCA	7/9
変異体#6	CCA GAC CAG CG CTGG GCT CCA	6/9
変異体#7	CCA GAC CTC AGG ATG GCT CCA	8/9
変異体#8	CCA GAC TCC CAG GAG GCT CCA	7/9
変異体#9	CCA GAC TCC GAC CCC GCT CCA	6/9
変異体#41	CCA GAC ACG CG CCC C GCT CCA	2/9

表２：ＳＬＴ－１Ａ鎖トリペプチド・ライブラリーからランダムに選択したクローンのアミノ酸配列アライメント、およびＭＵＣ１エピトープＴｈｒ－Ａｒｇ－Ｐｒｏに対するｍＡｂ（Ｏｎｃ　Ｍ２７）を用いて検出した精製ＳＬＴ－１Ａ鎖バリアントのＥＬＩＳＡ信号。太字は変異トリペプチド領域。変異体＃４１は、我々のＥＬＩＳＡスクリーニングでｍＡｂ　Ｏｎｃ　Ｍ２７の強力なバインダーとして同定された。

【表２】

SLT-1 A 鎖推定アミノ酸配列バリアント		ELISA 測定値 (405 nm)
MUC1エピトープ	CHHHPD TRP APASRVARMASDEFPSMC	1.3
変異体#1	CHHHPD GIG APASRVARMASDEFPSMC	0.08
変異体#2	CHHHPD LQM APASRVARMASDEFPSMC	0.03
変異体#3	CHHHPD PRG APASRVARMASDEFPSMC	0.03
変異体#4	CHHHPD DDL APASRVARMASDEFPSMC	0.06
変異体#5	CHHHPD VRW APASRVARMASDEFPSMC	0.07
変異体#6	CHHHPD QRL APASRVARMASDEFPSMC	0.06
変異体#7	CHHHPD LRM APASRVARMASDEFPSMC	0.11
変異体#8	CHHHPD SQE APASRVARMASDEFPSMC	0.13
変異体#9	CHHHPD SDP APASRVARMASDEFPSMC	0.07
変異体#41	CHHHPD TRP APASRVARMASDEFPSMC	1.25

【図面の簡単な説明】

【００３３】

【図１】ＳＬＴ－１のＡ１およびＡ２ドメインを示す概略図である。Ａ鎖は２９３個のアミノ酸からなる。この鎖は、Ａ１触媒フラグメントおよびＢペンタマーと非共有結合的に関連するＡ２Ｃ末端尾部を生成するため、フリンにより切断される。プロテアーゼ感受性ループ（斜線部分）は、Ａ鎖（Ｃｙｓ２４２および２６１）のわずか２個のシステイン残基により規定される。Ｔｙｒ７７、Ｇｌｕ１６７、Ａｒｇ１７０およびＴｒｐ２０３は、Ａ１ドメインの触媒活性に不可欠な残基を示している（矢印）。

【図２Ａ】残基２４５位と２４６位の間に挿入された乳癌関連ＭＵＣ１エピトープＰＤＴＲＰＡＰ（ｍＡｂ　Ｏｎｃ　Ｍ２７により認識される対照配列）およびＮ－末端に６－ヒスチジン標識を有する、ＳＬＴ－１Ａ鎖（１～２９３）の概略図である。

【図２Ｂ】ｍＡｂ　Ｏｎｃ　Ｍ２７により認識されるＭＵＣ１エピトープの３つの主要な位置がランダム化された（ＸＸＸ領域）、我々のＳＬＴ－１Ａ鎖－トリペプチド・ライブラリー構築の図である。トリペプチド・ライブラリーは、Ｃｙｓ２４２とＣｙｓ２６１の間にジスルフィド架橋が存在することで生成されるＡ鎖の自然発生のループ領域に挿入された。

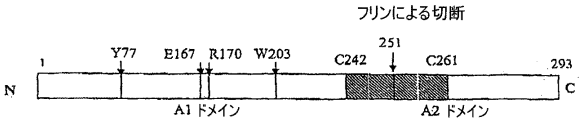
【図３】我々のＳＬＴ－１Ａ鎖－トリペプチド・ライブラリーから、９６個の異なる単独Ａ鎖バリアントを、ｍＡｂ　Ｏｎｃ　Ｍ２７を用いてスクリーニングして得られた、代表的なＥＬＩＳＡデータセットを示した図である。毒素バリアント＃４１（表１および２）は、強いＥＬＩＳＡ信号を発し、予測されたエピトープを有していた。

【図４】Ａ鎖の２４５残基と２４６残基の間に挿入された７アミノ酸ランダムセグメントの概略図である。

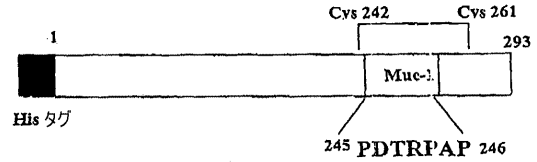
【図５】ヒトメラノーマ細胞系５１８Ａ２の再現可能なキラーとして同定された７つの毒素バリアントの試験結果を示した図である。横座標は細胞の治療に用いられた毒素の対数濃度を表し、縦座標は４８時間後の生存細胞の実測率を表す。塗りつぶされた三角は、５

１８Ａ２細胞に対する野生型毒素の効果を示し、２つの最も効果的なＡ鎖バリアントを、ＳＡＭ＃３（塗りつぶしなしの四角）およびＳＡＭ＃５（Ｘ記号）と名づけた。

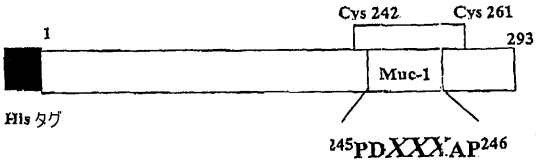
【図１】



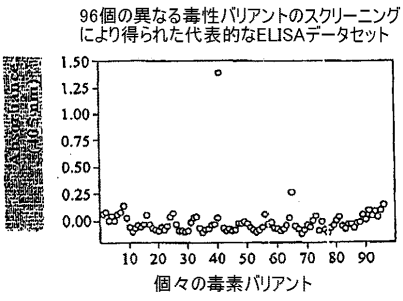
【図２Ａ】



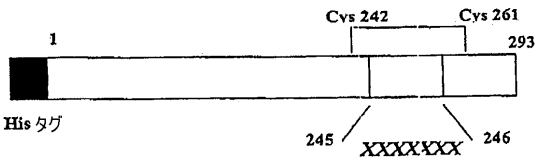
【図２Ｂ】



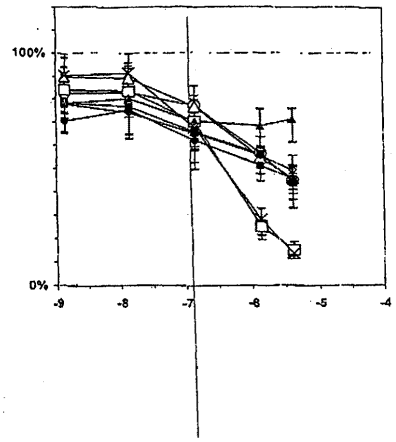
【図３】



【図４】



【図５】



【配列表】

0004934761000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
C12N 15/09	*(2006.01)*	C12N	15/00	A
G01N 33/68	*(2006.01)*	G01N	33/68	

(74)代理人 100085176
弁理士 加藤 伸晃
(74)代理人 100096943
弁理士 臼井 伸一
(74)代理人 100091889
弁理士 藤野 育男
(74)代理人 100101498
弁理士 越智 隆夫
(74)代理人 100096688
弁理士 本宮 照久
(74)代理人 100102808
弁理士 高梨 憲通
(74)代理人 100128646
弁理士 小林 恒夫
(74)代理人 100128668
弁理士 齋藤 正巳
(74)代理人 100134393
弁理士 木村 克彦
(72)発明者 ガリピー, ジーン
カナダ エム５ピー ２エル５ オンタリオ, トロント, エルムスソーペ アヴェニュー ２９
(72)発明者 ウェイ, シン
カナダ エム４エッチ １ジェイ４ オンタリオ, トロント, ソーンクリフェ パーク アヴェニュー ４３ アパートメント １８０９

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 特表２００２－５０３４５３（ＪＰ, Ａ）
米国特許第０５５５２１４４（ＵＳ, Ａ）
Current Biology, 2001, Vol.11, No.9, p.697-701
Immunology, 1997, Vol.90, p.176-182
日本細菌学雑誌, 1999, Vol.54, No.2, p.387-399
J. Bacteriol., 1993, Vol.175, No.23, p.7652-7657

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K 14/00-14/825
C07K 7/00-7/66
C07K 19/00
C12N 15/00-15/90
C40B 30/00-30/10
C40B 40/00-40/18
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
WPI