

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-528230

(P2011-528230A)

(43) 公表日 平成23年11月17日 (2011.11.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/415 (2006.01)	C O 7 K 14/415	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-518880 (P2011-518880)	(71) 出願人	511013522
(86) (22) 出願日	平成21年7月15日 (2009.7.15)		セダス、インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成23年3月11日 (2011.3.11)		アメリカ合衆国コロラド州80525、フ
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/050685		ォート・コリンズ、シルバー・クリーク・
(87) 国際公開番号	W02010/009227		ドライブ 2625
(87) 国際公開日	平成22年1月21日 (2010.1.21)	(71) 出願人	592246587
(31) 優先権主張番号	61/080,773		コロラド ステート ユニバーシティー
(32) 優先日	平成20年7月15日 (2008.7.15)		リサーチ ファウンデーション
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 コロラド州 80522
			フォート コリンズ ピー オー ボッ
			クス 483
		(74) 代理人	100140109
			弁理士 小野 新次郎
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 組換えヨウシュヤマゴボウ (pokeweed) 抗ウイルスタンパク質、それに関連する組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、新規修飾ヨウシュヤマゴボウ (pokeweed) 抗ウイルスタンパク質、該タンパク質をコードする核酸、該タンパク質を取り込むコンジュゲート、および該タンパク質を作製しそして使用する方法を提供する。本発明はまた、特定の細胞に毒素を導く目的のため、該コンジュゲートを動物に投与する方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

未結合 (f r e e) シス테인を有する組換えヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質を含む物質の組成物。

【請求項 2】

前記組換えヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質が全長 P A P である、請求項 1 の組成物。

【請求項 3】

前記未結合シス테인が末端シス테인である、請求項 2 の組成物。

【請求項 4】

C y s - G l y - G l y - G l y - G l y - S e r - 全長 P A P を含む、請求項 3 の組成物。

【請求項 5】

請求項 1 の組成物をコードする核酸を含む核酸。

【請求項 6】

請求項 5 の核酸を含むプラスミド。

【請求項 7】

請求項 6 の核酸を含む細胞。

【請求項 8】

大腸菌である、請求項 7 の細胞。

【請求項 9】

構造：

X - Y - Z、

式中、X は未結合シス테인を有する全長 r P A P であり；Y は存在しないかまたは化学的リンカーであり、そして Z は化合物であることを有するコンジュゲート。

【請求項 10】

前記化合物が細胞ターゲティング・タンパク質である、請求項 9 のコンジュゲート。

【請求項 11】

抗体；ホルモン；修飾ホルモン放出因子；およびホルモン放出因子からなる群より選択される、請求項 10 のコンジュゲート。

【請求項 12】

前記リンカーが：G M B S；E M C S；S M P H；S P D P；および L C - S P D P からなる群より選択される、請求項 10 のコンジュゲート。

【請求項 13】

前記リンカーが G M B S であり、そして前記タンパク質が d - l y s₆ - ギナドトロピン放出ホルモンである、請求項 10 のコンジュゲート。

【請求項 14】

請求項 1 の化合物を別の化合物とコンジュゲート化する方法であって、組換えヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質の前記未結合シス테인および別の化合物間に、化学結合を誘導する工程を含む、前記方法。

【請求項 15】

前記化学結合が、ヘテロ二官能性架橋剤を介して誘導される、請求項 14 の方法。

【請求項 16】

前記ヘテロ二官能性架橋剤が G M B S である、請求項 15 の方法。

【請求項 17】

化合物が d - l y s₆ - ギナドトロピン放出ホルモンである、請求項 15 の方法。

【請求項 18】

G M B S リンカーを d - l y s₆ - ギナドトロピン放出ホルモンに結合させる方法であって、G M B S と d - l y s₆ - ギナドトロピン放出ホルモンを、非水性条件下でインキ

10

20

30

40

50

ュベーションする工程を含む、前記方法。

【請求項 19】

前記非水性条件が：G M B S をメタノール中に溶解させて、第一の非水性溶液を生成し；d - l y s 6 - ゴナドトロピン放出ホルモンをメタノール中に溶解させて、第二の非水性溶液を生成し；前記の第一および第二の非水性溶液を、1 . 1 : 1 のモル比で混合する工程を含む、請求項 19 の方法。

【請求項 20】

大腸菌 (E . c o l i) において、全長 r P A P をコードする核酸を発現する工程を含む、請求項 1 の組成物を作製する方法。

【請求項 21】

細胞を増殖させる方法であって、T7プロモーター系の調節下にある全長 r P A P を含む核酸で形質転換された細胞をインキュベーションする工程を含み、前記 T7 プロモーター系がアラビノース・プロモーターの調節下にある R N A ポリメラーゼを有し、前記インキュベーションが細胞増殖を生じる、前記方法。

【請求項 22】

前記細胞が大腸菌細胞である、請求項 21 の方法。

【請求項 23】

前記細胞増殖後に前記全長 r P A P の発現を誘導する工程をさらに含む、請求項 22 の方法。

【請求項 24】

前記の発現誘導後に、前記細胞から前記全長 r P A P を単離する工程をさらに含む、請求項 23 の方法。

【請求項 25】

前記全長 r P A P が：化学的に修飾された r P A P 、天然変異体 r P A P 、および遺伝子操作された r P A P からなる群より選択される、請求項 22 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

連邦政府が資金援助した研究に関する言及

[0002]なし

技術分野

[0003]本発明は、一般的に、分子生物学および生化学に関し、より詳細には、ヨウシュヤマゴボウ (p o k e w e e d) 植物由来の修飾リボソーム不活性化タンパク質に関する。ヨウシュヤマゴボウ植物はまた、P h y t o l a c c a a m e r i c a n a としても知られ、そしてヨウシュヤマゴボウ・リボソーム不活性化タンパク質はまた、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質とも呼ばれ、しばしば「P A P」と略される。本発明はまた、獣医学的薬剤を含む薬剤にも関する。

【背景技術】

【0002】

[0004]化合物コンジュゲート化ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質 (P A P) 、ならびにリシンおよびジフテリア毒素などの他の天然毒素のコンジュゲートは、長らく、療法的有効性の可能性を秘めてきた。理論的には、コンジュゲートの「化合物」部分としての天然リガンドの存在は、ターゲット細胞損傷を生じ、そして他の細胞損傷を生じない。実際には、部分的に、コンジュゲート化されていない毒素が、意図されない細胞損傷を生じるために、不正確なターゲティング毒性を生じる。P A P に関しては、1つの問題は、コンジュゲート化 P A P および非コンジュゲート化 P A P のサイズが非常に類似であるため、分離技術がこれらを区別不能であることである。

【0003】

[0005]自然 (「天然」とも称される) P A P はヨウシュヤマゴボウ植物から単離され、

10

20

30

40

50

そして天然 P A P を化合物 - 毒素コンジュゲートにおいて利用しようとする試みがなされてきたが、こうした試みは信頼性があることを示していない。予期されるように、年ごとおよびバッチごとのアイソフォームの変動が、薬学的品質調節の背景では、厄介でそして実現不能であることがわかった。さらに、いくつかのアイソフォームはコンジュゲートを形成せず、そして異なるアイソフォームは互いに異なってコンジュゲートを形成した。

【 0 0 0 4 】

[0006]理想的には、組換え発現は、これらの変動に対する調節を提供するであろう。しかし、P A P の組換え発現もまた、困難に遭遇してきた。大腸菌 (E . c o l i) における以前の発現は、毒性および成長阻害、ならびに封入体における組換えヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質 (r P A P) の集積を生じた。これに関連して、組換え P A P は、別個の可溶化工程およびそれに続くタンパク質の再フォールディングを必要とし、その結果、収量が劣り、そしてスケールアップが困難であった。大腸菌、S . セレビシエ (S . c e r e v i s i a e) 、植物および P . パストリス (P . p a s t o r i s) における他の試みは低収量を生じ、または P . パストリスの場合、潜在的に炎症反応を誘導しうる配列が導入された。さらに、組換え P A P - 化合物融合タンパク質は、毒素と結合するのに失敗するかまたはターゲット細胞に毒素を導くのに失敗するか、あるいは天然 P A P に比較して、はるかに減少した活性を示すか、いずれかであった。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

[0007]したがって、未結合 (f r e e) システインを有する r P A P 分子、該分子から作製されるコンジュゲート、および r P A P を産生する方法、特に、高収量であり、容易にフォールディングし、そして精製される r P A P を生じ、そして場合によってコンジュゲート化に化学的に利用可能な r P A P を提供する方法は、大きな貢献となる。

20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

[0008]一般論として、本発明は、未結合システイン、好ましくは末端システイン、より好ましくは N 末端システインを有する組換えヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質を含む組成物を提供する。やはり提供するのには、P A P が全長 r P A P 、より好ましくは未結合システインを含む全長 r P A P 、最も好ましくは未結合システインおよびアミノ酸リンカーを含む全長 r P A P である、r P A P 分子である。好ましいのは、N 末端 C y s およびアミノ酸リンカーを含む r P A P 分子であり、最も好ましくは、G l y - G l y - G l y - G l y - S e r の少なくとも 1 つの反復を有するものである。より好ましくは、C y s - G l y - G l y - G l y - G l y - S e r - 全長 r P A P および C y s - G l y - G l y - G l y - G l y - S e r - G l y - G l y - G l y - S e r - 全長 r P A P である。

30

【 0 0 0 7 】

[0009]本発明は、本発明の方法にしたがって発現された場合、宿主細胞を殺さない r P A P を提供する。本発明の組成物および方法で利用される r P A P は、好ましくは、29 . 5 ダルトン以上であり、より好ましくは 30 ダルトン以上であり、最も好ましくは 30 . 5 ダルトン以上である。しかし、31 . 5、31 . 75 および 32 ダルトン以上の分子量を有する全長 r P A P を利用する組成物および方法もまた、本発明の範囲内である。全長 r P A P タンパク質 (翻訳後修飾されていない天然 P A P の分子量と一致するもの) が、本発明で用いるのに好ましい物質である。

40

【 0 0 0 8 】

[00010]核酸、プラスミド、ならびに本発明の核酸およびタンパク質を含む細胞もまた提供し、好ましい細胞は大腸菌である。

[00011]構造：

X - Y - Z、

式中、X は未結合システインを有する全長 r P A P であり；Y は存在しないかまたは化

50

学的リンカーであり、そしてZは化合物である
を有するコンジュゲートもまた提供する。

【0009】

[00012]細胞ターゲティング化タンパク質である化合物が好ましく、より好ましくは：抗体；ホルモン；修飾ホルモン放出因子；およびホルモン放出因子からなる群より選択されるものが好ましい。化学的リンカーが柔軟なリンカーである化合物が好ましく、ヘテロ二官能性リンカーを持つものがより好ましく、マレイミド基を有するリンカーを持つものが最も好ましい。リンカーがG M B S；E M C S；S M P H；S P D P；およびL C - S P D Pからなる群より選択される、本明細書に記載するようなコンジュゲートが好ましい。前記リンカーがG M B Sであり、そして前記タンパク質がd - l y s₆ - ギナドトロピン放出ホルモンであるコンジュゲートが最も好ましい。

10

【0010】

[00013]本明細書のr P A Pを別の化合物とコンジュゲート化する方法であって、組換えヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質の前記の未結合システインおよび別の化合物間に、化学結合を誘導する工程を含む、前記方法もまた提供する。好ましい方法は、前記化学結合が、ヘテロ二官能性架橋剤を介して誘導されるものであり、より好ましくは、化学結合が、未結合システインおよび化合物上のマレイミド基間に誘導されるものである。ヘテロ二官能性架橋剤がG M B Sであり、そして/または化合物がd - l y s₆ - ギナドトロピン放出ホルモンであるものが最も好ましい。

20

【0011】

[00014]G M B Sリンカーをd - l y s₆ - ギナドトロピン放出ホルモンに結合させる方法であって、G M B Sとd - l y s₆ - ギナドトロピン放出ホルモンを、非水性条件下でインキュベーションする工程を含む、前記方法もまた提供し、好ましくは、前記非水性条件は：G M B Sをメタノール中に溶解させて、第一の非水性溶液を生成し；d - l y s₆ - ギナドトロピン放出ホルモンをメタノール中に溶解させて、第二の非水性溶液を生成し；前記の第一および第二の非水性溶液を、1：1：1のモル比で混合する工程を含む。

【0012】

[00015]大腸菌において、全長r P A Pをコードする核酸を発現する工程を含む、r P A Pを得る方法もまた提供する。

30

[00016]全長r P A Pを含む核酸で形質転換された細胞をインキュベーションする工程を含み、r P A PがT7プロモーター系の調節下にあり、そして前記T7プロモーター系がアラビノース・プロモーターの調節下にあるR N Aポリメラーゼを有する、細胞を増殖させる方法もまた提供する。前記細胞が大腸菌細胞である方法が好ましい。r P A Pが未結合システインを含む方法が好ましく、r P A Pが末端システインを含むものが最も好ましい。全長r P A Pが：化学的に修飾されたr P A P、天然変異体r P A P、および遺伝子操作されたr P A Pからなる群より選択される方法もまた好ましい。

【0013】

[00017]本明細書のP A P組成物を含むコンジュゲートもまた提供する。構造：

X - Y - Z、

式中、XはN末端C y s - G l y - G l y - G l y - G l y - S e rを有する全長r P A Pであり；Yは化学的リンカーであり、そしてZはタンパク質である
を有するものが特に好ましい。XがG M B Sであり、そしてZがd - l y s₆ - G n R Hであるものが最も好ましい。

40

【0014】

定義

[00018]「未結合システイン」は、ジスルフィド結合を介して別のシステインに結合しているもの以外の任意のシステインを意味する。これに関連して、「未結合システイン」には、システインがジスルフィド結合を介して別のシステインに結合していない限り、別の残基または化合物に結合しているシステインが含まれる。

【0015】

50

[00019]「全長 r P A P」は、毒素活性を有し、そして 29,500 ダルトン以上の分子量を有する、任意の組換え P A P を意味する。

[00020]本発明のこれらのおよび他の特徴および利点は、好ましい態様の詳細な説明から、当業者にはより明らかとなるであろう。詳細な説明に付随する図を以下に記載する：

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】[00021]図1は、全長ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質の構造の定型化された描写であり、翻訳後プロセシング中、植物において通常は切断されるC末端残基、およびさらなる非天然存在N末端残基を示す。

【図2】[00022]図2は：翻訳後プロセシング中、植物において通常は切断されるC末端；およびさらなる非天然存在N末端残基を示す、全長ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質；N末端リンカー；ならびに例示的な化合物、修飾ゴナドトロピン放出ホルモン（G n R H）の構造の定型化された描写である。

【図3】[00023]図3は、組換え切断不能（「n c」と略され、そしてリンカーがジスルフィド切断部位を所持しないことを意味する）ヨウシュヤマゴボウ・コンジュゲートの構造の定型化された描写であり、リンカーおよび修飾ゴナドトロピン放出ホルモンを示すアミノ末端の詳細を伴う。

【図4】[00024]図4は、ゴナドトロピン放出ホルモンおよびゴナドトロピン放出ホルモン受容体の細胞外ドメインの相互作用の定型化された描写である。

【図5】[00025]図5は、ウサギ網状赤血球溶解物アッセイにおいて、ルシフェラーゼ m R N A のタンパク質合成阻害によって測定されるような r P A P の生物学的活性を示すグラフである。

【図6】[00026]図6は、競合的ラジオイムノ受容体結合アッセイの結果を示すグラフである。X軸に最も近い曲線は、標準に関するデータを反映する。次の曲線は、P A P が植物部分から精製された（自然または天然 P A P としても知られる）d - l y s₆ - G n R H - G M B S - P A P に関するデータを反映する。データ点が三角形で示される曲線は、d - l y s₆ - G n R H - G M B S - r P A P に関するデータを反映する。データ点が X として示される線は、非コンジュゲート化組換え P A P（d - l y s₆ - G n R H - G M B S に結合していない）を反映する。

【図7】[00027]図7。本発明の核酸 - r P A P D N A 配列 - 配列番号__。

【図8】[00028]図8。本発明のアミノ酸配列 - r P A P タンパク質配列 - 配列番号1。太字：A T G およびリンカー配列；黒字：天然成熟 P A P 配列；太字および下線：植物において翻訳後切断されるタンパク質のC末端部分をコードする天然ブレ P A P 配列。

【図9】[00029]図9。本発明の r P A P（上部） - 配列番号2、および天然成熟（植物において翻訳後修飾されたもの）P A P（下部）発現 D N A 配列のアライメント。

【図10】[00030]図10。r P A P（上部）、および天然成熟 P A P（下部）タンパク質配列のアライメント。

【図11】[00031]図11。大きな太字で示す内部ジスルフィド結合システインを含む、発現された r P A P の配列：C y s - 34 は C y s - 258 に結合し、そして C y s - 84 は C y s - 105 に結合する；太字；N末端システインを伴う操作されたリンカー；V N T I I . . . : 天然 P A P 配列；太字および下線は天然ブレ P A P（植物において翻訳後修飾されたもの）のC末端である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

[00032]本発明は、大腸菌において高収量で発現可能であり、そしていかなる他の組換え P A P よりも 30 ~ 40 倍高い比活性（生物学的活性 / 単位質量）を有する、組換えヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質を提供する。さらに、本発明は、薬学的な量で、r P A P を産生するための方法を提供する。

【0018】

[00033]本発明の r P A P 物質（タンパク質、核酸、構築物、細胞等）を用いて、r P

10

20

30

40

50

A P、およびリンカーを介するかまたは直接のいずれかで、これらに結合されたターゲティング化合物を有する、r P A Pコンジュゲートを産生してもよい。1つの態様において、r P A Pは、別の化合物に対するリンカーを連結するのに場合によって使用するための、未結合システインを有する。1つのこうした態様において、本発明のr P A Pタンパク質は、こうした目的のために都合のよいN末端システインを提供するが、本発明のr P A Pの使用はN末端コンジュゲート化に限定されない。例えば、本発明のr P A Pを、コンジュゲート化なしの毒素として用いてもよいし、あるいは、末端システインまたは内部システインの未結合システインを介して、コンジュゲート化してもよい。

【0019】

[00034]本明細書記載のr P A P分子は、これらにコンジュゲート化されたリンカーまたはターゲティング化合物を伴いまたは伴わず、ウサギ網状赤血球溶解物アッセイにおいて活性である。

【0020】

[00035]本発明には、組換えP A Pを発現させ、再フォールディングさせ、コンジュゲート化し、そして精製する方法が含まれる。いくつかの障害を克服して、発現成功を達成した。非ヨウシュヤマゴボウ宿主細胞においてr P A Pを発現するのに伴う基本的な問題は、これが毒素であり、そして宿主細胞を殺すことである。T7系を用いて、大腸菌において成熟（翻訳後切断された）P A Pを発現する試みを行った。細胞はまったくではなくてもあまり増殖せず、そしてr P A Pタンパク質誘導前に弱っているように見えた。続いて、大腸菌において、T7誘導性プロモーター系を用いて、全長r P A P（植物において通常は翻訳後に切断されるC末端部分を加えた成熟P A P）を発現する試みもまた失敗した。細胞はやはり、増殖期中およびr P A Pの誘導前に、弱っているように見えた。最後に、2つの制御調節シグナル下の全長r P A Pを、大腸菌において試みた。T7 RNAポリメラーゼをアラビノース（AraD）プロモーターの調節下に置き、T7プロモーターを全長r P A P配列の上流に置いた。アラビノース・プロモーターが嚴重に抑制されていると、プラスミド上にr P A P遺伝子を宿する場合であっても、細胞は増殖可能であった。抑制の除去を介して誘導すると、薬学的に作業しうる収量のr P A Pが生じた。

【0021】

[00036]本発明のr P A Pを再フォールディングする多様な方法がある。最も成功した1つは、実施例2に記載するようなものである。別の方法は、スクロースの代わりに0.5 M L-アルギニンを代用して、実施例2のプロトコルを用いるものである。さらに、実施例2のプロトコルにおいて、システアミンの代わりに、グルタチオンを用いてもよい。場合によって、8 M尿素の代わりに6 Mグアニジン・HClで封入体を可溶化してもよい。再フォールディングは、理想的には、塩基性pH範囲で行われる。

【0022】

[00037]すべて当該技術分野でよく記載される、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを含む多様な方法によって、タンパク質を精製してもよい。好ましい方法は、特に実施例5に記載するような陽イオン交換クロマトグラフィーである。

【0023】

[00038]さらに、この組換えタンパク質に対して行う実験に基づいて、本発明のr P A Pの比活性（生物学的活性/単位質量）が、ウサギ網状赤血球溶解物におけるタンパク質翻訳の阻害において、別の報告されるr P A Pよりも、30～40x高い活性であることが決定された。非常に感受性であり、そしてナノモル未満の量のr P A Pを検出可能なr P A P特異的放射免疫アッセイによって、r P A P濃度を決定した。

【0024】

[00039]理想的には毒素機能を保持するようにフォールディングされた組換えP A Pタンパク質、好ましくは天然存在システインの天然ジスルフィド架橋を保持するもの、そして好ましくは少なくとも1つの未結合システイン（例えば天然存在配列には存在しないもの）、最も好ましくは、他の化合物に選択的に結合可能な末端未結合システインを有する

10

20

30

40

50

ものが、本明細書に提供される。当該技術分野の技術のように、任意のPAP配列が、本発明の出発物質として使用するのに適している。任意の既知のアイソタイプ、または明らかになる任意のものが、本発明を用意するのに有用であろう。

【0025】

[00040]全長PAPは、C末端に以下のアミノ酸配列を有する：Y N Q N A M F P Q L I M S T Y Y N Y V N L G D L F E G F - C O O H。該配列は、通常、ヨウシュヤマゴボウ植物において、翻訳後に切断されるが、本発明の好ましい態様においては保持される。天然存在翻訳後切断PAPは、29,308.5ダルトンの分子量を有する。

【0026】

[00041]特に、配列番号1；未結合システインを含み、そしてデフォルト設定でBLASTソフトウェアバージョン2.2.21を用いて、配列番号1に対して少なくとも90%同一であるタンパク質；配列番号2にコードされるタンパク質；未結合システインを含み、そしてデフォルト設定でBLASTソフトウェアバージョン2.2.21ソフトウェアを用いて、配列番号2に対して少なくとも90%同一である核酸によってコードされるタンパク質からなる群より選択される、上述のようなrPAP組成物。しかし、配列同一性が：95%；96%；97%；98%；および99%からなる群より選択される、上述のような組成物もまた好ましい。

【0027】

[00042]配列番号2；デフォルト設定でBLASTソフトウェアバージョン2.2.21を用いて、配列番号2に対して少なくとも85%同一であり、そして未結合システインを有するタンパク質をコードする核酸；配列番号1をコードする核酸；および未結合システインを有するタンパク質をコードし、そしてデフォルト設定でBLASTソフトウェアバージョン2.2.21を用いて、配列番号1に対して少なくとも85%同一である核酸からなる群より選択される、核酸もまた提供する。しかし、配列同一性が：90%；95%；96%；97%；98%；および99%からなる群より選択される、上述のような組成物もまた好ましい。好ましい核酸は、本明細書のタンパク質をコードする核酸を含む。

【0028】

[00043]GMB Sリンカーをd-lys6-ゴナドトロピン放出ホルモンに結合させる方法であって、GMB Sとd-lys6-ゴナドトロピン放出ホルモンを、非水性条件下でインキュベーションする工程を含む、前記方法もまた提供する。この方法のより好ましい態様は、前記非水性条件が：GMB Sをメタノール中に溶解させて、第一の非水性溶液を生成し；d-lys6-ゴナドトロピン放出ホルモンをメタノール中に溶解させて、第二の非水性溶液を生成し；前記の第一および第二の非水性溶液を、1:1:1のモル比で混合する工程を含むものである。

【0029】

[00044]特に、配列番号1に対して、少なくとも90%同一、好ましくは少なくとも95%同一、最も好ましくは少なくとも99%同一であるrPAPが、本発明の方法において有用である。未結合CYS残基もまた含むものが最も有用である。さらに、保存配列は変更されてはならず、そして非保存配列は場合によって変更可能である。PAPにおいて、天然存在システイン間のジスルフィド結合は、毒素機能に必要な三次構造を提供し、そして理想的には本発明の分子および方法において保存される。C末端ドメインにおける突然変異は、PAPの局在化プロセッシングに影響を及ぼし、そして改変されたプロセッシングが望ましい場合には、改変可能である。RNA結合ならびに脱プリン化に影響を及ぼす突然変異が知られる。例えば、最初の16アミノ酸の一部切除(truncation)によって、PAP細胞毒性およびリボソームを脱プリン化する能力が排除される。さらに、リボソーム脱プリン化は、アミノ酸がC末端から除去されるにつれて減少し、そしてGlu-244に停止コドンが導入されると排除される。さらに、特に毒性が高い化合物を得るために、既知の方法によって、過剰活性突然変異体をスクリーニングすることも可能である。本発明の機能を最適化するために、これらの突然変異効果を利用してよい。さらに、これらの突然変異rPAPおよびこうした突然変異体を利用する組成物は、本発明の

10

20

30

40

50

範囲内である。

【 0 0 3 0 】

[00045]発現された際に、r P A Pタンパク質を生じるヌクレオチドもまた本発明に含まれる。特に、配列番号2が好ましい。しかし、上記配列における特定の変化は、本発明の基本的な側面を改変しないであろうことを当業者は認識する。したがって、本発明には、本発明の核酸と、ストリンジェントな条件下のハイブリダイゼーションを用いて相同であるか、B L A S Tを用いて同一であるか、タンパク質配列を変化させない点突然変異、タンパク質配列を変化させないコドン変化などの、機能に影響を及ぼさない重要でない変化を有する核酸などが含まれる。

【 0 0 3 1 】

[00046]本明細書のコンジュゲートおよび本明細書の化合物をコンジュゲート化する方法もまた提供する。コンジュゲートは、理想的には、細胞損傷が望ましい受容体に選択的に結合するように設計される。一般的に、ターゲティング化合物を介して受容体に結合した後、コンジュゲートは、受容体が仲介するエンドサイトーシスによって取り込まれ、そしてコンジュゲートを細胞に送達する。取り込み後、コンジュゲートのr P A P部分は、大リボソームRNAの保存されたサルシン(s a r c i n) / リシンループを脱プリン化することによって、リボソームRNAに結合する。脱プリン化されたりボソームは、伸長因子2に結合不能であり、そしてしたがって、伸長サイクルの転位置工程が阻害され、タンパク質合成のシャットダウンが生じる。細胞は最終的に死ぬ。

【 0 0 3 2 】

[00047]本明細書の特定のr P A Pタンパク質に化合物をコンジュゲート化するための1つの特定の方法は、N末端システインおよび別の化合物間に化学結合を導入する工程を含む。化合物が抗体、ホルモン、修飾ホルモン放出因子、またはホルモン放出因子であるような、こうした方法が好ましい。特に、ホルモン放出因子がG n R Hであるものがより好ましいが、d - l y s ₆ - 修飾G n R Hへのコンジュゲート化が最も好ましい。コンジュゲート化は、任意の既知の方法を介して実行可能であるが、好ましくは、リンカーまたは他の架橋化合物を介すかのいずれかで、ターゲティング化合物およびr P A P間にスルフヒドリル結合を生成することを介する。言い換えると、未結合システインを利用して、r P A Pにおける他のシステインへの結合を排除することが理想的であるが、当業者は、機能性を最適にするため、r P A Pおよびそれにコンジュゲート化される化合物の両方を修飾する方法を知っている。

【 0 0 3 3 】

[00048]本発明の好ましい態様において、修飾ゴナドトロピン放出ホルモン「d - l y s ₆ - G n R H」を全長r P A Pにコンジュゲート化する。d - l y s ₆ - G n R Hは、好ましくは、全長r P A P上の未結合システインへの結合を容易にするため、リンカーG M B Sで活性化される。d - l y s ₆ - G n R HのG M B Sでのこうした「活性化」は、通常試みられるような水性条件下で試みた場合には障害であることが証明された。水性条件下では、1つのd - l y s ₆ - G n R H分子は、2 ~ 3分子のG M B Sに結合し、これはd - l y s ₆ - G n R Hあたり1つのr P A Pを結合させるためには許容しえない。しかし、d - l y s ₆ - G n R Hを非水性条件下(メタノール)で活性化すると、障害は克服され：1つのG M B Sリンカー分子に対する1つのd - l y s ₆ - G n R Hの比が達成された。したがって、r P A P対d - l y s ₆ - G n R Hの1対1比もまた達成された。

【 0 0 3 4 】

[00049]ヘテロ二官能性架橋剤、特にG M B Sを利用する方法が好ましいが、リンカー上に位置するN H Sエステル基を介してd - l y s ₆ - G n R Hに結合するか、またはリンカー上に位置するマレイミド基を介してr P A P上の未結合スルフヒドリル基に付着するのを容易にするであろう任意のヘテロ二官能性架橋剤もまた好ましい。

【 0 0 3 5 】

[00050]G n R H分子の両端が受容体への結合に必要である。G n R Hおよびd - l y s ₆ - G n R H(交換可能に、「D K 6」または「d K 6」または「d - l y s ₆」また

10

20

30

40

50

は「d - L y s 6」とも称される)の唯一の相違は、6位のグリシンのD - リジンでの置換である。さらに、末端がブロッキングされる。C末端はエチルアミド基(E T - N H₂)でブロッキングされ、それによって天然化合物の10位のグリシンが置換される。天然G n R H化合物は、N H₂ G l u - H i s - T r p - S e r - T y r - G l y - L e u - A r g - P r o - G l y C O O Hである。好ましい類似体は、d K 6 : H p - G l u - H i s - T r p - S e r - T y r - D L y s - L e u - A r g - P r o - E t - N H₂である。

【0036】

[00051]別の態様において、アミノ酸配列C y s - G l y - G l y - G l y - G l y - S e rが全長r P A Pに付加され、そしてターゲティング化合物に結合するのに用いられる。C y s - G l y - G l y - G l y - G l y - S e rは、天然P A P配列の一部ではない。V a l - A s pは、天然P A P配列の最初の2つのアミノ酸である。

10

【0037】

[00052]本発明の最も好ましいコンジュゲートは、以下の構造：

X - Y - Z

式中、Xはd - l y s₆ - G n R Hであり；YはG M B Sであり；そしてZはN末端にC G G G G Sを有する全長r P A Pである

を有する。

【0038】

[00053]本明細書記載の方法、あるいは当該技術分野で知られるかまたは発展される任意の方法を介して、コンジュゲートを作製してもよい。さらに、当該技術分野に知られるように、任意の望ましい機能性を提供するため、コンジュゲートを修飾してもよい。実施例は好ましいコンジュゲート化法を記載する。

20

【0039】

[00054]本発明のコンジュゲートを投与するため、任意の塩、懸濁物、分散物等を用いてもよい。無菌であり、そして非発熱性である、0.7%~10%、より好ましくは0.9%の塩化ナトリウム溶液が好ましく、より好ましくは、4.5~7のpHでもある溶液が好ましい。さらに、コンジュゲートが適切な影響を提供するならば、任意の投与法が許容されうる。本発明の最も好ましい態様は、不妊処置の目的のために動物に注射するため、溶液中のr P A P - G n R H塩を用いるものである。不妊は完全である必要も、可逆的である必要もない；しかし、意図される最適な様式は、動物、特にイヌ、ネコ、ウマ、食物または他の製品ののための家畜(畜牛、乳牛、ブタ、ヒツジ、ヤギ、バイソン、バイソン/畜牛種等)、労働する家畜、動物園の動物、および野生生物(特にシカ、エルク、および慢性消耗病に感受性である他の有蹄動物)で使用するための非可逆性r P A P - d - l y s₆ - G n R H注射液である。

30

【0040】

[00055]前述の発明は、適切な法律基準にしたがって記載されてきており、したがって、説明は、事実上、限定するのではなく例示的である。開示する態様に対する変動および修飾が、当業者に明らかになることも可能であり、そしてこれらは本発明の範囲内である。

40

【実施例】

【0041】

実施例1. 大腸菌におけるr P A Pの発現。

[00056]順方向プライマー、r P A P - F : 5' - C C C G G G C A T A T G T G C G G A G G C G G A G G C A G T G T G A A T A C A A T C A T C T A C A A T G T T G G A A G T A C C - 3、および逆方向プライマー、r P A P - R : 5' - G C G C G C A A G C T T T C A G G A T T C T T C A A A T A G A T C A C C A A G A T T A A C Cを用いて、P C R増幅によって、全長配列(配列番号2)を得た。

【0042】

50

[00057]反応混合物は、以下の構成要素からなった： 600mM Tris-SO₄ (pH 8.9)、180mM硫酸アンモニウム、0.2mM dATP、0.2mM dCTP、0.2mM dGTP、0.2mM dTTP、2mM MgSO₄、0.2μM rPAP-Fプライマー、0.2μM rPAP-Rプライマー、1ngテンプレートDNA、1単位のPlatinum^R Taq高忠実度ポリメラーゼ (Invitrogen社、カリフォルニア州カールスバッド)。PCR反応を以下の条件下で行った： 94 × 2分間 (1サイクル)、94 × 30秒間、52 × 30秒間、68 × 1分間 (15サイクル)、94 × 30秒間、55 × 30秒間、68 × 1分間 (25サイクル)。

【0043】

10

[00058]製造者の説明書にしたがってNdeIおよびBamHI (New England Biolabs、マサチューセッツ州イプスウィッチ)を用いて、pET3a発現プラスミド中、T7プロモーターの下流に、rPAPをコードする全長配列を導入した (連結した)。

【0044】

[00059]rPAP配列含有プラスミドを用いて、One Shot (登録商標) TOP10化学的コンピテント大腸菌株 (Invitrogen社、カリフォルニア州カールスバッド)を形質転換した。いくつかのコロニーを摘み取り、そして挿入物の存在に関して、DNA配列分析によってスクリーニングした。正しいrPAP配列を含有するプラスミドを宿することが示されたコロニー由来のプラスミドDNAを精製し、そして続いて、アンピシリン耐性選択可能マーカーとともに厳重に制御されるアラビノース・プロモーター (AraD)の調節下のT7 RNAポリメラーゼを所持する大腸菌BL21 (AI)株を形質転換するのに、該プラスミドDNAを用いた。形質転換体を選択し、そしてrPAP発現を抑制するため、推定される形質転換体をLB選択培地およびグルコース上にプレティングした。

20

【0045】

[00060]2つの単離体を研究用に選択し、そしてrPAP配列を含まない発現プラスミドを含有する対照を生成した。各単離体を別個に、ラクトースおよびアラビノースを含まず、そしてグルコースが存在する最少培地中で、振盪しながら37 °Cでおよそ12時間 (一晚)増殖させた。対照を同じ条件下で増殖させた。アラビノース・プロモーター系の誘導を抑制する目的のために増殖培地を選択し、それによって、rPAP RNA発現/タンパク質翻訳を抑制した。

30

【0046】

[00061]結果は以下の通りである。

【0047】

【表1】

単離体 I	単離体 I I	対照
<u>A600</u>	<u>A600</u>	<u>A600</u>
T0 .06	.07	.060
T1 時間 .22	.22	.17
T2 時間 .44	.50	.48
T2.3 時間 .68	.73	.69

40

【0048】

[00062]少量の各一晚培養物を、アンピシリンを含有するLB培地に移し、そしてA600が0.4に到達した後、続いて、L-アラビノースを最終濃度0.2%に、そしてイソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシドを1mMの濃度に添加することによって、rPAPを大腸菌細胞から誘導した。誘導をさらに3.5時間行った。

50

【0049】

実施例2. rPAPの再フォールディングおよび精製。

[00063] スナップ希釈によってrPAPを再フォールディングした。封入体の単離後、8 M尿素、50 mM Tris HCl、pH 8.5中で封入体を可溶化した。DTTを最終濃度10 mMまで添加し、そして混合物を室温で90分間攪拌した。次いで、可溶化されたタンパク質を室温で攪拌しながら、50 mM Tris、pH 8.5、0.4 Mスクロース、0.05%ポリエチレングリコール-3550、0.9 mM酸化システアミン(TPEGS)を含有する溶液内に一滴ずつ添加した。再フォールディング溶液中のrPAPの最終濃度は、10 µg/mlおよび50 µg/mlの間であった。可溶化されたrPAPを再フォールディング溶液に添加した後、混合物を4 でさらに24時間攪拌した。24時間後、混合物を16000 x gで15分間遠心分離し、上清をデカントし、そして再フォールディング後、50 mM Tris、pH 7.0、1 mM EDTAを含有する緩衝液に対して、タンパク質溶液を透析した。緩衝液pHは、6.8~8.5の範囲を有した。透析後、溶液を16000 x gで15分間遠心分離し、そして上清を陽イオン交換樹脂上に置いた。次いで、カラムを50 mM Tris-HCl、pH 7.0、1.0 mM EDTAで洗浄し、そして50 mM Tris、pH 7.0、1 M NaClを含有する緩衝液でタンパク質を溶出させる。50 mM NaPO₄、pH 7.2、100 mM NaCl、1 mM EDTAを含有するコンジュゲート化緩衝液に対して、溶出タンパク質を透析する。タンパク質濃度を、0.2 mg/ml~1.0 mg/mlの濃度に調整する。

10

20

【0050】

実施例3. d-lys₆修飾ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)のマレイミドブチリルオキシ-スクシンイミドエステル(GMBS)リンカーでの活性化。

[00064] 1224ダルトンの分子量を有するd-lys₆-GnRHを、固相合成(A naspec社、カリフォルニア州フレモント)によって調製した。6ミリグラムのd-lys₆-GnRHを1.5 ml脱イオン化メタノールと混合し、そしてジイソプロピルエタノールアミン(DIPEA)を用いて、pH 7.0に調整した。

【0051】

[00065] Thermo Fisher Scientific(イリノイ州ロックフォード)からGMBSを購入した。1.25 mgのGMBSを1.5 ml脱イオン化メタノールと混合した。

30

【0052】

[00066] 1.5 mlのd-lys₆-GnRH-メタノールおよび1.5 mlのGMBS-メタノールを、キャップ付血清ボトル中で一緒に混合し、そしてDIPEAを用いてpH 7.0に調整した。金属キャップを用いて血清ボトルを密封した。溶液を脱気し、そして窒素で4回パージした。血清ボトルをアルミニウムホイルで覆い、そして反応を攪拌しながら室温で90分間進行させた。

【0053】

[00067] 生じたd-lys₆-GnRH-GMBSは、およそ1421ダルトンの分子量を有し、1分子のGMBSが1分子のd-lys₆-GnRHに結合したことが示された。これを質量分析によって確認した。

40

【0054】

実施例4. d-lys₆-GnRH-GMBSへのrPAPのコンジュゲート化。

[00068] 実施例3の溶液を遠心分離蒸発装置で蒸発させた。TCEP・HCl Tris(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩を、コンジュゲート化緩衝液中に溶解され、再フォールディングされた組換えPAPに、最終濃度0.05 mMまで添加した。混合物を室温で1~2時間インキュベーションした。インキュベーション後、コンジュゲート化緩衝液中に溶解され、再フォールディングされたrPAPを、d-lys₆-GnRH-GMBS対rPAPの比が20:1であるように、乾燥させたd-lys₆-GnRH-GMBSに直接添加した。Tween 20を最終濃度0.25%まで添加した。必要

50

であれば、10 mM リン酸を用いて、pH を 7.3 に調整し、そして反応を暗所中、室温 (70 °F) でおよそ 2 ~ 3 時間進行させた。

【0055】

実施例 5 . d - l y s ₆ - G n R H - G M B S - r P A P の精製

[00069] コンジュゲート化後、コンジュゲート化反応後に残った過剰の d K 6 を除去するために、10 ml Bio - Rad Bio - Gel P 10 カラムを用いて、d - l y s ₆ - G n R H - G M B S - r P A P をサイズ排除クロマトグラフィーにさらに供した。50 mM Tris、pH 7.0、1 mM EDTA を含有する緩衝液に対して、タンパク質溶液を透析した。緩衝液の pH は、6.8 ~ 8.5 の範囲を有した。透析後、溶液を 16000 x g で 15 分間遠心分離し、そして上清を陽イオン交換樹脂上に置いた。次いで、カラムを同じ緩衝液で洗浄し、そして 50 mM Tris、pH 7.0、1 M NaCl を含有する緩衝液で、タンパク質を溶出させた。

【0056】

実施例 6 . 受容体結合アッセイ

[00070] 実施例 5 の精製され、再フォールディングされた d - l y s ₆ - G n R H - G M B S - r P A P を、競合的ラジオイムノ受容体結合アッセイで用いた。ゴナドトロピン放出ホルモン受容体を有する精製下垂体膜を I¹²⁵ 放射標識 d - l y s ₆ - G n R H に浸した。続いて、異なる濃度の d - l y s ₆ - G n R H - G M B S - r P A P を膜に添加し、膜を 1 mM Tris - Cl pH 7.4、1 mM CaCl₂、1% BSA で洗浄した。反応を 4 時間インキュベーションし、同じ緩衝液で希釈した。希釈後、試験管を 4、16000 x g で 15 分間遠心分離し、試験管をデカントし、そして放射能の減少を測定した。d - l y s ₆ - G n R H - G M B S - 植物由来成熟 P A P に関して、同じ方法にしたがった。濃度を本実施例のついでに表に記載する。

【0057】

[00071] 図 6 は本研究の結果を示す。天然 P A P に基づくコンジュゲートおよび r P A P に基づくコンジュゲートは 70 ~ 200 nM 範囲の IC₅₀ を有する。r P A P 単独では結合せず、そしてしたがって、濃度依存応答を示さない。

【0058】

[00072] 実施例 6 に関する表

【0059】

【表 2】

nM	標準	nM	GnRH- rPAP	nM	GnRH- nPAP	nM	rPAP
32	12.18	1102.94	9.24	1250	0.00	1136.36	74.75
12.8	36.67	441.18	34.04	500	3.38	454.55	98.71
5.12	74.26	176.47	49.42	200	10.05	181.82	96.36
2.048	97.57	70.59	78.20	80	37.53	72.73	110.76
0.819	88.00	28.24	75.05	32	65.53	29.09	91.50
0.32	84.12						

【0060】

実施例 7 . ウサギ網状赤血球溶解物アッセイ

[00073] 本実施例において、以下の材料を用いた： Promega Flexi (登録商標) ウサギ網状赤血球溶解物系： L 4540； Promega ルシフェラーゼアッセイ試薬： L 1483； Fischer Optizyme 組換え RNアーゼ阻害剤： BP 3222 - 5； ルミノメーター： Turner TD - 20e。すべての緩衝液および溶液を、DEPC 処理 H₂O で調製した。試験しようとする毒素および/ま

たは毒素緩衝液用に、希釈緩衝液を調製した〔0.5 ml ~ 1 ml の 0.5 M ストック (DEPC 処理 H₂O、0.1 M NaCl、希釈緩衝液 (50 mM NaCl 0.5 % フラクション V BSA))〕。

【0061】

[00074] プロトコルは以下の通りであった：

[00075] まず、0.5 nM の毒素 / コンジュゲート希釈物を調製した。次いで、0.5 nM (500 pM) ストックを用いて、100 µL 連続希釈 (各希釈に関して 1 : 2.5) の毒素 / コンジュゲートを調製した。以下の希釈物を調製した： 200 pM； 80 pM； 32 pM； 12.8 pM； 5.12 pM。

【0062】

[00076] アッセイをセットアップするため、500 pM から開始して、上述の希釈各々に関して、2.5 µL の DEPC 処理 H₂O および 2.5 µL の毒素 / コンジュゲート希釈物を無菌 0.65 ml エッペンドルフ試験管に添加した。

【0063】

[00077] 以下の対照反応もまた調製した：希釈緩衝液：RR 溶解物に関する陽性対照；0.5 µM 毒素 / コンジュゲート：毒素 / コンジュゲート活性に関する高濃度陽性対照。

【0064】

[00078] 溶解物を氷上で融解し、そして 17.5 µL の試験希釈物または対照を各試験管に氷上で添加し、そしてピペットで穏やかに混合した。次いで、溶解物 / 試験または対照を氷上で 15 分間ブレインキュベーションし、そして 15 分間のブレインキュベーション期間後、2.5 µL の栄養プレミックスを添加した (アミノ酸 (- l u e)； 4.2 µL；アミノ酸 (- m e t)； 4.2 µL； 2.5 M KCl 11.76 µL；RNA sin 8.4 µL；DEPC H₂O 10.92 µL；ルシフェラーゼ mRNA 2.52 µL；総体積 42 µL まで)。15 分間のブレインキュベーション期間中、mRNA をプレミックスに添加する。各反応試験管の総体積は 25 µL であった。

【0065】

[00079] 各反応試験管の内容物をピペットで穏やかに混合し、そして 30 水槽中で 90 分間インキュベーションした。50 µL の融解した室温のルシフェラーゼアッセイ試薬 (LAR) のアリコットを、ルミノメーター試験管 (3 つ組) 内に移し、そして 1 µL の反応試験管内容物をルミノメーター試験管に添加した。ルミノメーターで明度を計測した。各毒素 / コンジュゲート希釈シリーズに関する最高カウントのパーセンテージに対して、濃度の対数をプロットした。各試料に関して、グラフから IC₅₀ を決定した。図 5 は、本実施例にしたがったデータから産生したグラフである。

【0066】

実施例 8 . 大腸菌に対する成熟 rPAP の毒性

[00080] 植物由来成熟 PAP の成熟型と同じ構造を有する PAP の組換え型の生物学的活性を調べるため、4 つの成熟 PAP コード配列のうちの 1 つの上流に T7 プロモーターを含有する pET3a 発現プラスミド (各プラスミドは、植物由来 PAP の翻訳後修飾型と同一の rPAP の成熟型をコードする DNA 配列を含有する：クローン 1 - 4 . 1、1 - 4 . 2、1 - 4 . 3、および 1 - 4 . 4) を、アラビノース・プロモーター (AraD) の調節下の T7 RNA ポリメラーゼを有する大腸菌 BL21 (AI) (Invitrogen 社、カリフォルニア州カールスバッド) に形質転換した。細胞を振盪しながら、グルコースおよびアンピシリンを含有する最少培地中、37 °C でおよそ 12 時間 (一晚) 増殖させた。朝、細胞をルリアブロスに移した。全長クローン (3.2) に関して、同じプロセスにしたがった。2 時間増殖させた後、アラビノースを最終濃度 0.2 % に、そしてイソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシドを 1 mM の濃度に添加することによって、プラスミドを宿する細胞を誘導した。その後、3 時間に渡って 1 時間ごとに A600 を測定した。結果を実施例 8 についての表に示す。

【0067】

[00081] 実施例 8 についての表

【 0 0 6 8 】

【 表 3 】

クローン	接種	1 時間	2 時間	3 時間
1-4.1	0.100	0.052	0.022	0.038
1-4.2	0.107	0.041	0.026	0.032
1-4.3	0.099	0.052	0.090	0.037
1-4.4	0.094	0.045	0.067	0.087
3-2 (+)	0.102	0.182	0.429 (誘導)	0.894
3.2 (-)	0.094	0.221	0.474	1.147

10

【 0 0 6 9 】

実施例 9 . 特定の発現条件下での全長 r P A P の毒性

[00082] 2 つの異なる単離体および r P A P 挿入物を含まないプラスミドを宿する対照由来の単一コロニーを、各々、100 μ g / ml のアンピシリンを含有するルリアブロス培地内に接種した。次いで、3 つの培養物を振盪しながら、37 °C でおよそ 18 時間（一晩）増殖させた。各増殖培養物を、100 μ g / ml アンピシリンの存在下で、新鮮なルリアブロス培地内に 1 : 25 で希釈し、そして振盪しながら 37 °C で 2 時間増殖させた。

20

【 0 0 7 0 】

[00083] 結果は以下の通りであった：

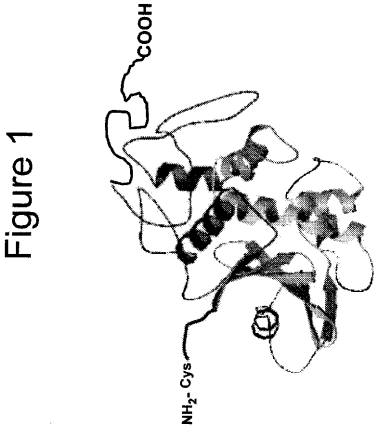
【 0 0 7 1 】

【 表 4 】

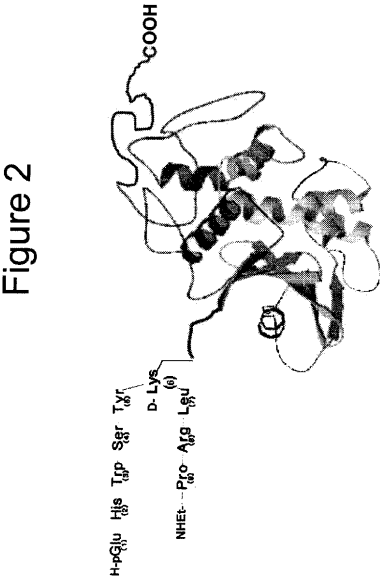
	単離体 I	単離体 I I	対照
	<u>A600</u>	<u>A600</u>	<u>A600</u>
T0	.058	.063	.062
T1 時間	.029	.038	.278
T2 時間	.016	.040	.737

30

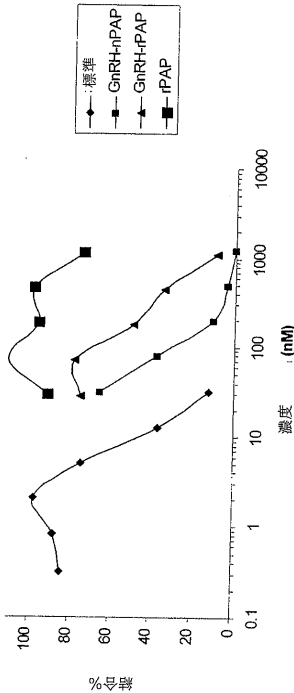
【 図 1 】



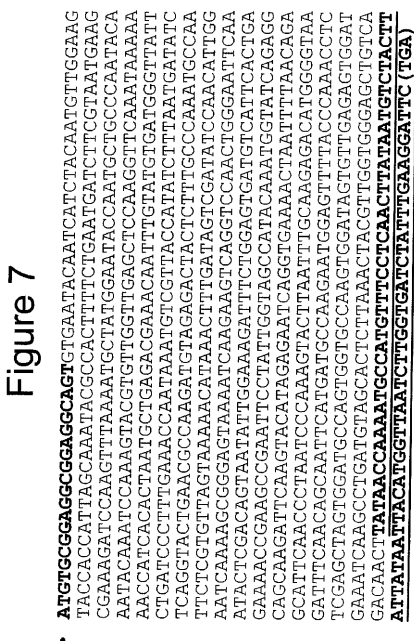
【 図 2 】



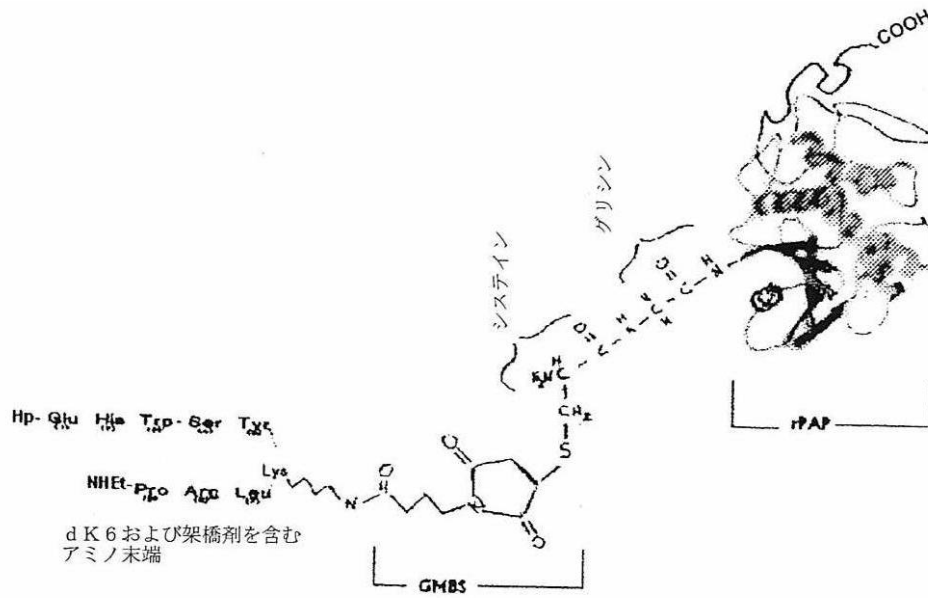
【 図 6 】



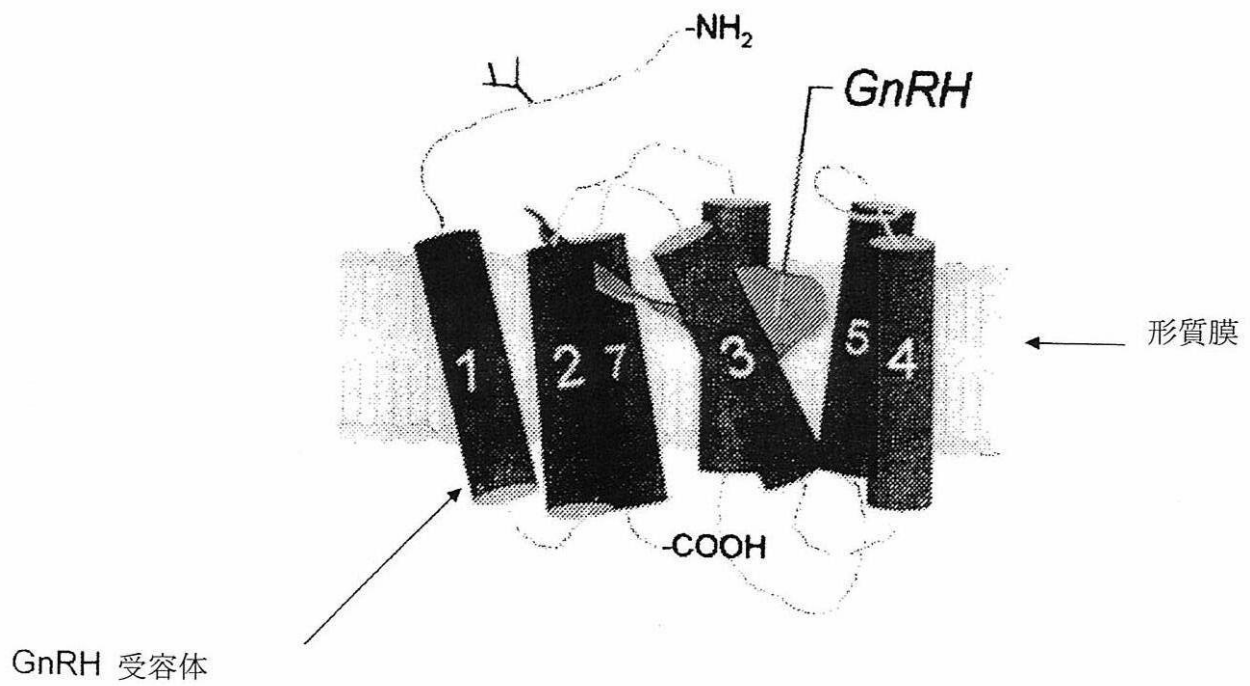
【 図 7 】



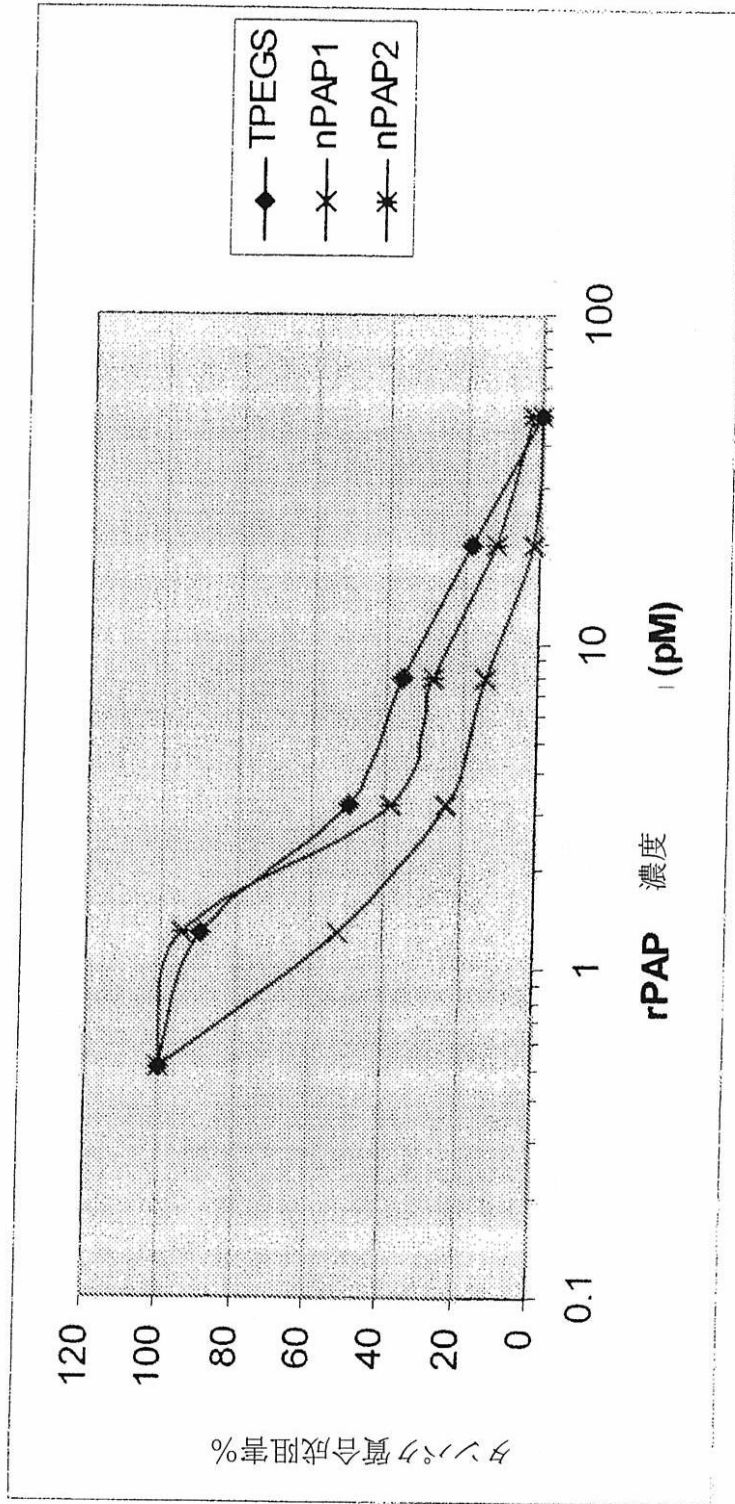
【 図 3 】



【 図 4 】



【図 5】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/415 C07K19/00 C07K7/23 A61K38/09 C12N1/15 C12N1/21 ADD. A61P5/02 A61P35/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		International application No PCT/US2009/050685
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/277582 A1 (NETT TORRANCE M [US] ET AL) 15 December 2005 (2005-12-15) paragraph [0024] - paragraph [0028] paragraph [0042]	1-17
X	QI LIN ET AL: "Binding and cytotoxicity of conjugated and recombinant fusion proteins targeted to the gonadotropin-releasing hormone receptor." CANCER RESEARCH, vol. 64, no. 6, 15 March 2004 (2004-03-15), pages 2090-2095, XP002557871 ISSN: 0008-5472 the whole document ----- -/--	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 November 2009		Date of mailing of the international search report 12/03/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kools, Patrick

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/050685

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YANG WEI-HSIUNG ET AL: "Cytotoxic activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-pokeweed antiviral protein conjugates in cell lines expressing GnRH receptors." ENDOCRINOLOGY, vol. 144, no. 4, April 2003 (2003-04), pages 1456-1463, XP002557872 ISSN: 0013-7227 the whole document</p>	1-17
A	<p>WO 90/09799 A1 (UNIV COLORADO RES [US]) 7 September 1990 (1990-09-07) the whole document</p>	1-17
Y	<p>CHADDOCK JOHN A ET AL: "Pokeweed antiviral protein (PAP) mutations which permit E. coli growth do not eliminate catalytic activity towards prokaryotic ribosomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 9, 1994, pages 1536-1540, XP002557873 ISSN: 0305-1048</p>	20-25
A	<p>abstract</p>	1-17
Y	<p>DORE J M ET AL: "Mutations dissociating the inhibitory activity of the pokeweed antiviral protein on eukaryote translation and Escherichia coli growth." NUCLEIC ACIDS RESEARCH 11 SEP 1993, vol. 21, no. 18, 11 September 1993 (1993-09-11), pages 4200-4205, XP002557874 ISSN: 0305-1048</p>	20-25
A	<p>the whole document</p>	1-17
Y	<p>anonymous: "BL21-AI One-Shot, chemically competent E. coli"[Online] 7 October 2002 (2002-10-07), XP002557875 online Invitrogen Retrieved from the Internet: URL: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/oneshot_bl21ai_man.pdf [retrieved on 2009-11-26] the whole document</p>	20-25
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/050685

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAIDA F.: "Unit 5.19 Overview on the expression of toxic gene products in Escherichia coli" CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, vol. supplement, no. 50, November 2007 (2007-11), pages 5.19.1-5.19.13, XP002557876 online DOI: 10.1002/0471140864.ps0519s50 the whole document	20-25
T	anonymous: "Instructions GMBS and Sulfo-GMBS"[Online] XP002557877 online PIERCE Rockford, IL, USA Retrieved from the Internet: URL: http://www.piercenet.com/files/1763dh4.pdf [retrieved on 2009-11-26] the whole document	12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/050685

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-17, 20-25

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2009/050685

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-17, 20-25

Compositions comprising a recombinant Pokeweed Antiviral protein having a free cysteine. Nucleic acids encoding said protein, plasmids comprising said polynucleotide, cells comprising said plasmid. Conjugates comprising said recombinant PAP. Methods of preparing said conjugates, or recombinant PAP. Methods to grow recombinant PAP transformed cells by using a T7 promoter system under the control of an arabinose promoter.

2. claims: 18-19

Methods to bind GMBS linker to d-lys-6-gonadotropin releasing hormone.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/050685

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005277582	A1	15-12-2005	NONE
WO 9009799	A1	07-09-1990	AU 5186090 A 26-09-1990
			NZ 232643 A 23-12-1992
			US 6103881 A 15-08-2000
			US 5378688 A 03-01-1995
			ZA 9001391 A 30-10-1991

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 0 7 K 16/00
C 0 7 K	14/575	(2006.01)	C 0 7 K 14/575
C 0 7 K	1/10	(2006.01)	C 0 7 K 1/10
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100128750

弁理士 廣瀬 しのぶ

(72)発明者 ウェバー, エリック・アール

アメリカ合衆国コロラド州 8 0 5 2 5, フォート・コリンズ, シルバー・クリーク・ドライブ 2 6 2 5

(72)発明者 ネット, トーランス・エム

アメリカ合衆国コロラド州 8 0 5 2 1, ベルビュー, ブリアンナ・レイン 5 4 5 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA38 CA06 DA06 EA04 GA11 HA01

4B064 AG30 CA19 CE07 CE11 DA01

4B065 AA26X AA88Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA43 CA44

4C084 AA01 AA06 AA07 CA13 NA14 ZB331

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA30 DA30 DA75 DA83 EA20

FA10 FA74 GA15 GA22 GA23