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

特許第5683603号
(P5683603)

(45)発行日　平成27年3月11日(2015.3.11)　(24)登録日　平成27年1月23日(2015.1.23)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/245	(2006.01)	C07K	14/245	
C07K 16/08	(2006.01)	C07K	16/08	
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C

請求項の数 12　(全 18 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-543448 (P2012-543448)
(86)(22)出願日　平成22年2月26日 (2010.2.26)
(65)公表番号　特表2013-514060 (P2013-514060A)
(43)公表日　平成25年4月25日 (2013.4.25)
(86)国際出願番号　PCT/CN2010/070762
(87)国際公開番号　WO2011/072501
(87)国際公開日　平成23年6月23日 (2011.6.23)
審査請求日　平成24年8月20日 (2012.8.20)
(31)優先権主張番号　200910242838.0
(32)優先日　平成21年12月17日 (2009.12.17)
(33)優先権主張国　中国 (CN)

(73)特許権者　512159786
プロテイン　デザイン　ラブ　リミテッド
中華人民共和国　北京　１０００９５　ハイディアン　ディストリクト　スジアチュオ　チアンシャジャン
(74)代理人　100079049
弁理士　中島　淳
(74)代理人　100084995
弁理士　加藤　和詳
(74)代理人　100085279
弁理士　西元　勝一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＥＢウィルスにより誘発される腫瘍に対する融合ポリペプチドとコリシンＩＡ変異体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

イオンチャネルを形成することのできるコリシンＩａの変異ポリペプチドと、抗ＥＢウィルス抗体のポリペプチドまたは抗ＥＢウィルス抗体模倣物のポリペプチドとの機能可能な連結により形成される、ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドであって、前記イオンチャネルを形成することのできるコリシンＩａの変異ポリペプチドが、野生型コリシンＩａの、Ｇ１１Ａ、Ｈ２２Ｇ、Ａ２６Ｇ、Ｖ３１Ｌ、およびＨ４０Ｄのアミノ酸残基の変異により得られるものであり、前記抗ＥＢウィルス抗体のポリペプチドのアミノ酸配列が、ＡＴＣＣ　ＨＢ‐１６８のハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体のポリペプチドと同じである、新規ポリペプチド。

【請求項２】

前記抗体模倣物のポリペプチドが、抗ＥＢウィルス抗体の、重鎖のＣＤＲ１領域と、重鎖のＣＤＲ１‐ＣＤＲ２連結ペプチドセグメントと、軽鎖のＣＤＲ３との結合ペプチドである、請求項１に記載の、ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチド。

【請求項３】

前記ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドが、配列番号２９に示されるアミノ酸配列を有する、請求項２に記載の、ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチド。

【請求項４】

請求項１～請求項３のいずれか１項に記載のＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規

ポリペプチドをコードする遺伝子。
【請求項５】
配列番号３０に示されているヌクレオチド配列を有する、請求項４に記載の遺伝子。
【請求項６】
請求項４または請求項５に記載の遺伝子を含む組換えプラスミド。
【請求項７】
請求項１～請求項３のいずれか１項に記載のＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドの生産方法であって、請求項６に記載の組換えプラスミドを、発現のために発現系へと形質転換する工程、および、発現したポリペプチドを単離する工程、を含む生産方法。
【請求項８】
請求項１～請求項３のいずれか１項に記載のＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドの、ＥＢウィルスが原因である腫瘍の治療および予防のための医薬の生産における使用。
【請求項９】
アミノ酸配列が、配列番号２４に示されているものである、コリシンＩａの変異ポリペプチド。
【請求項１０】
請求項９に記載のコリシンＩａの変異ポリペプチドをコードする遺伝子。
【請求項１１】
請求項１０に記載の遺伝子の使用であって、前記遺伝子を、前記ペプチドを誘導する遺伝子と機能可能に連結し、発現ベクターにクローニングし、次いで、前記発現ベクターを、発現系に形質転換し、発現したポリペプチドを単離する、ペプチド医薬の生産における、前記遺伝子の使用。
【請求項１２】
請求項１～請求項３のいずれか１項に記載の新規ポリペプチドを含有する、ＥＢウィルスが原因である腫瘍の治療および予防のための医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、抗腫瘍剤の分野に関し、より具体的には、ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチド、ならびに、その使用および生産方法、に関する。
【背景技術】
【０００２】
抗生物質研究の領域においては、研究は、同種の異種の株間の相互殺傷機構をまねた新しい抗生物質の開発へと向けられてきた。自然界には、細菌の細胞膜上に直接的にイオンチャネルを形成することにより細胞を殺傷する細菌毒素が数多く存在する。そうした毒素のモデル例が、大腸菌により分泌される細菌毒素であるコリシンである。コリシンＩａは、１９５２年にＪａｃｏｂにより発見され、それ以降、何世代にもわたる努力を経て、Ｑｉｕ ｅｔ ａｌ．（Ｍａｊｏｒ ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ ｍｏｖｅｍｅｎｔ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｃｏｌｉｃｉｎ Ｉａ ｃｈａｎｎｅｌ ｇａｔｉｎｇ．Ｊ．Ｇｅｎ．Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ，１０７：３１３‐３２８（１９９６））は、人工の脂質二重膜中に形成されたイオンチャネルが開いている又は閉じられているときの、コリシンＩａの膜貫通型立体構造をついに明らかにした。これは、分子レベルでの新しい抗生物質の設計および製造のための基礎をもたらすものである。その後、コリシンポリペプチドと、白色連鎖球菌またはブドウ球菌の誘引物質などのシグナルペプチドとの結合により作製された、コリシンを目的の細菌の細胞膜へと向かわせ、形成された膜貫通型イオンチャネルを通っての細胞含有物の漏出により細胞を殺傷するポリペプチド分子が存在している。
【０００３】

悪性腫瘍は人間の健康に大きな脅威を与えるものである。毎年、世界中で七百万人が悪性腫瘍により亡くなっており、その六分の一は中国におけるものである。現在、悪性腫瘍は、我が国における死亡原因の第二位となっている。悪性腫瘍の病因、病原および臨床症状が明確に解明されてはいないため、予防および治療は効果的ではない。抗腫瘍剤は腫瘍の治療において重要である。それらにより一部の腫瘍に対しての治療効果は達成されるが、例えば不十分な腫瘍選択性、免疫学的抑制、有害反応、薬剤耐性等の、いくつかの欠点が残っている。

【０００４】

ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫および上咽頭癌の細胞の表面は、ＥＢウィルスの特異的表面抗原を有する。したがって、ＥＢウィルス表面抗原は、そうした腫瘍細胞の特異的マーカーとみなすことができる。ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する薬剤について、中国特許第ＺＬ２００４１００８１４４６．８号の発明では、コリシンと、ＥＢウィルス表面抗原を認識する抗体模倣物との結合により形成される抗腫瘍ポリペプチドが開示されている。この抗腫瘍ポリペプチドは、体内の、ＥＢウィルスが原因であるがん細胞を、特異的に殺傷することができるものであり、正常細胞に対して害がなく、その殺傷能力は他の抗腫瘍剤の数倍であり、腫瘍選択性、薬剤耐性、がん細胞が殺傷されるときの正常組織の障害などの問題を克服する。Ｘｉａｏ‐Ｑｉｎｇ Ｑｉｕ ｅｔ ａｌ．（Ｘｉａｏ‐Ｑｉｎｇ Ｑｉｕ ｅｔ ａｌ．，２００７，Ｓｍａｌｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｍｉｍｅｔｉｃｓ ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ ｔｗｏ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ‐ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎｓ ａｎｄ ａ ｆｒａｍｅｗｏｒｋ ｒｅｇｉｏｎ ｆｏｒ ｔｕｍｏｒ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２５，９２１‐９２９，１ Ａｕｇｕｓｔ ２００７）は、一連の抗体模倣物とコリシンとにより構築される抗腫瘍ポリペプチドの殺傷効果を比較し、V_HＣＤＲ１‐V_HＦＲ$_2$‐V_LＣＤＲ３およびV_LＣＤＲ１‐V_HＦＲ$_2$‐V_HＣＤＲ３の抗体模倣物とコリシンとにより構築される抗腫瘍ポリペプチドが、優れた殺傷能力を有することを発見している。この研究は、ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対するポリペプチドの調製のための、より多くの候補抗体模倣物をもたらす。

【０００５】

しかしながら、上述の抗腫瘍ポリペプチドについては、コリシンの疎水性末端が、過敏性を有し得るいくつかのアミノ酸残基を有しているため、コリシンのポリペプチドを含む薬品は、ｉｎ ｖｉｖｏでの異常な免疫応答をより容易に引き起こす可能性がある。多くのがん患者の代謝機構は、がん細胞からの妨害に起因して異常になっており、彼らはポリペプチドの薬に対するアレルギー応答を起こしやすく、それ故、こうした薬によって治療することができない、と報告されている。したがって、より安全な、かつ、より多くの患者に適した抗がん薬を得るためには、コリシンポリペプチドを改良する必要がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

上述の先行技術の欠点に基づいて、本発明は、ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチド、ならびに、その使用および生産方法を提供し、ひいては、高い殺傷能力、および、高い特異性を有し、かつ、アレルギーの可能性の低い、ＥＢウィルスが原因である腫瘍の治療のための薬品を提供する。

【０００７】

イオンチャネルを形成することのできるコリシンの変異ポリペプチドと、抗ＥＢウィルス抗体ポリペプチドまたは抗ＥＢウィルス抗体模倣物ポリペプチドとの機能可能な連結により形成される、ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドであって、前記イオンチャネルを形成することのできるコリシンの変異ポリペプチドが、野生型コリシンＥ１、Ｉａ、Ｉｂ、Ａ、Ｂ、Ｎまたはそれらの水溶性チャネルドメインのペプチド鎖の、Ｇ１１Ａ、Ｈ２２Ｇ、Ａ２６Ｇ、Ｖ３１Ｌ、およびＨ４０Ｄのアミノ酸残基の変異により得られるものであり、前記抗ＥＢウィルス抗体のポリペプチドのアミノ酸配列が、ＡＴ

ＣＣ　ＨＢ‐１６８のハイブリドーマにより分泌されるモノクローナル抗体のポリペプチドと同じである、新規ポリペプチド。

【０００８】

前記抗体模倣物のポリペプチドが、抗ＥＢウィルス抗体の、重鎖のＣＤＲ１領域と、重鎖のＣＤＲ１‐ＣＤＲ２連結ペプチドセグメントと、軽鎖のＣＤＲ３との結合ペプチドである。

【０００９】

前記イオンチャネルを形成することのできるコリシンの変異ポリペプチドが、野生型コリシンＩａの変異により得られるものである。

【００１０】

前記ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドが、配列番号２９に示されているアミノ酸配列を有する。

【００１１】

前記ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドをコードする遺伝子。

【００１２】

配列番号３０に示されているヌクレオチド配列を有する、前記遺伝子。

【００１３】

前記遺伝子を含む組換えプラスミド。

【００１４】

前記ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドの生産方法であって、前記組換えプラスミドを、発現のために発現系に形質転換する工程、および、発現したポリペプチドを単離する工程、を含む、生産方法。

【００１５】

前記ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドの、ＥＢウィルスが原因である腫瘍の治療および予防のための医薬の生産における使用。

【００１６】

そのアミノ酸配列が、配列番号２４に示されているものである、コリシンＩａの変異ポリペプチド。

【００１７】

コリシンＩａの変異ポリペプチドをコードする遺伝子。

【００１８】

前記遺伝子を、そのペプチドを誘導する遺伝子と機能可能に連結し、発現ベクターにクローニングし、次いで、前記発現ベクターを発現系に形質転換し、その発現したポリペプチドを単離する、ペプチド医薬の生産における、前記遺伝子の使用。

【課題を解決するための手段】

【００１９】

本発明は、イオンチャネルを形成することのできるコリシンの変異ポリペプチドと、抗ＥＢウィルス抗体のポリペプチドまたは抗ＥＢウィルス抗体模倣物のポリペプチドとにより形成される、ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチド、を提供する。野生型コリシンポリペプチド分子中には、過敏性を有し得るいくつかのアミノ酸残基が存在するため、イオンチャネル構築物を形成することのできるコリシンのポリペプチド分子において、本発明は、アレルギー応答を容易に引き起こし得る疎水性の領域のアミノ酸残基を選択的に変異させている。例えば、本発明の好ましい一実施形態においては、コリシンＩａのポリペプチドの変異の部位は以下である：Ｇ１１Ａ、Ｈ２２Ｇ、Ａ２６Ｇ、Ｖ３１ＬおよびＨ４０Ｄ。コリシンＩａのポリペプチドまたは変異体Ｉａのポリペプチドの注射によりそれぞれ免疫したマウスにおいては、その実験データは、変異体Ｉａのポリペプチドを注射したマウスによりもたらされる血清力価は前者よりも数桁低い、すなわち、免疫応答のレベルがより低いことを示しており、これは、この変異ポリペプチドが、細胞膜にイオンチャネルを形成するという機能を保持していながらも、アレルギーの可能性を低減することを実証するものである。実験は、本発明の組換えポリペプチドの殺傷能力は影

響を受けないことを示し、これは、変異体アミノ酸残基が、コリシンのイオンチャネルを形成する機能に影響を与えないことを意味している。本発明により提供される、ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドにおいては、抗ＥＢウィルス抗体のポリペプチドまたは抗ＥＢウィルス抗体模倣物のポリペプチドがＥＢウィルスによる腫瘍細胞の表面抗原を認識することを通じて、コリシンの変異ポリペプチドは標的細胞の膜にターゲティングされ、コリシンの変異ポリペプチド膜貫通型イオンチャネルドメインの疎水性の領域が腫瘍細胞の細胞膜へと挿入され、イオンチャネルを形成し、よって、腫瘍細胞が細胞内容物の漏出によって死ぬ。抗ＥＢウィルス抗体のポリペプチドのアミノ酸配列は、ＡＴＣＣ　ＨＢ‐１６８のハイブリドーマにより分泌される抗体のポリペプチドのアミノ酸配列を完全に参照する。

【００２０】

本発明の一実施形態においては、上述の抗ＥＢウィルス抗体模倣物のポリペプチドと、コリシンの変異ポリペプチドのカルボキシル末端との機能的連結により得られる、本発明の低分子量の抗腫瘍ポリペプチドが好ましい。つまり、そのような低分子量の模倣ポリペプチドは、抗ＥＢウィルス抗体のポリペプチドの、ＶＨＣＤＲ１領域、ＶＬＣＤＲ３領域、ＶＨＣＤＲ１‐ＶＨＣＤＲ２の連結ペプチドセグメントと、軽鎖のＶＬＣＤＲ３の結合により得られる、ＶＨＣＤＲ１‐ＶＨＦＲ２‐ＶＬＣＤＲ３のペプチド鎖を含む。抗体模倣物の新規抗腫瘍ペプチド１のアミノ酸配列を、配列番号２５に示す。この抗体模倣物は、３０個未満のアミノ酸しか含んでおらず、アミノ酸１５０個の天然の抗体よりもずっと低い分子量を有する。これは、抗腫瘍ポリペプチドの分子量を大幅に減少させて、本発明の抗腫瘍ポリペプチドの組織浸透能に貢献するものでありながらも、抗原認識の要件を満たす。

【００２１】

本発明のもう１つの目的は、本発明の抗腫瘍ポリペプチドをコードする遺伝子配列を提供することである。本発明の抗腫瘍ポリペプチドの遺伝子は、コリシンの変異ポリペプチドをコードする遺伝子と、抗ＥＢウィルス抗体のポリペプチドまたはその抗体模倣物のポリペプチドをコードする遺伝子との機能可能な連結により形成され、ここで、コリシンのポリペプチド、および、抗ＥＢウィルス抗体の遺伝子配列は、当該分野において公知であり、コリシンの変異ポリペプチドの遺伝子は、コリシンポリペプチドの遺伝子の対応するコドンにおける、以下の点変異により得られるものである：Ｇ１１Ａ、Ｈ２２Ｇ、Ａ２６Ｇ、Ｖ３１ＬおよびＨ４０Ｄ。遺伝コードの縮重の結果として、当業者は、アミノ酸配列を変えることなく、本発明の抗腫瘍ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を調整してもよい。

【００２２】

本発明の組換えプラスミドは、野生型コリシンの遺伝子が組み込まれた元のベクターが、二本鎖ヌクレオチドに部位特異的に変異導入され、変異標的部位に変異コドンにより挿入され、それにより、コリシン変異ポリペプチドの遺伝子を含む変異体ベクターを得る、ということを意味するものである。同じプロセスの部位特異的突然変異誘発により、抗ＥＢウィルス抗体の抗体模倣物をコードする遺伝子を、前記コリシン変異ポリペプチドの遺伝子のカルボキシル末端へと挿入し、本発明の組換えプラスミドを得る。当該元のベクターｐＳＥＬＥＣＴＴＭ‐１は、プロメガ社から購入したものであり、コリシンＩａおよび免疫タンパク質の遺伝子を有する。部位特異的突然変異誘発のプロセスは、Ｓｔｒａｔｅｇｅｎｅ社からのキットの指示書に従ったものである。本発明は、コリシンの変異ポリペプチドを調製するべく、いくつかの部位特異的突然変異誘発を行なうが、ここでは、５つのコドンを部位特異的に変異させる。よって、５対のプライマー配列が設計されている（配列番号１～１０）。本発明の実施例においては、６対のプライマー配列が、抗体模倣物の遺伝子用に設計されている（配列番号１１～２２）。

【００２３】

本発明は、上記で得られる組換えベクターを、改変細菌 大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）中へと形質転換すること、陽性クローンを選抜すること、陽性クローンにより発現した当該

タンパク質を単離および精製すること、それにより、本発明のＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドを得ること、を含む、本発明の抗腫瘍ポリペプチドの生産のための方法も提供する。

【００２４】

本発明により提供される、ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドは、ＥＢウィルスが原因である腫瘍の治療および予防のための医薬の生産において用いることができる。本発明において得られる新規抗生物質のポリペプチドを、薬剤的に許容できる担体もしくは賦形剤または他の所望により選択される成分中へと加えることにより、臨床上適切な医薬組成物を作製することができる。

【００２５】

本発明は、コリシンＩａの変異ポリペプチドのアミノ酸配列および遺伝子配列も提供する。この変異ポリペプチドは、本発明において用いることができ、他の標的化ポリペプチドを用いる抗体ポリペプチドの構築においても用いることができる。本発明中の実施例３の実験データは、当該変異ポリペプチドを含むペプチド医薬の免疫原性が低いこと、および、他の標的化ポリペプチドを用いる当該変異ポリペプチドにより形成される抗体ポリペプチドが殺菌能を有するとのこと、を証明するものである。当該生産方法は、当該分野における常用の実験プロセスである。

【００２６】

本発明により提供される新規抗腫瘍ポリペプチドは、特許第ＺＬ２００４１００８１４４６．８号に開示されている抗腫瘍ポリペプチドの利点、すなわち、高い特異性のターゲティング、正常細胞に対する安全性、および、薬剤耐性を生じさせにくい、といった利点を有する。それと同時に、本発明の抗腫瘍ポリペプチドは、アレルギー応答を引き起こしやすいアミノ酸残基に変異を受けたものであり、そうした変異ポリペプチドを含む当該抗腫瘍ポリペプチドの免疫原性は低減される。すなわち、アレルギー反応の可能性が低下する。そうしたポリペプチドの医薬の、使用安全性、および、腫瘍を殺傷するという効果は改善される。これは、また、コリシンポリペプチドを含む他の医薬の改良のための良い例でもあり得る。

【図面の簡単な説明】

【００２７】

【図１】抗体模倣物V_HＣＤＲ１－V_HＦＲ$_2$－V_LＣＤＲ３のポリペプチドの遺伝子と、コリシンＩａの変異ポリペプチドの遺伝子とを含む、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ１１の構造の略図である。

【図２】抗体模倣物V_HＣＤＲ１－V_HＦＲ$_2$－（Ｒｅｖ）V_LＣＤＲ３のポリペプチドの遺伝子と、コリシンＩａの変異ポリペプチドの遺伝子とを含む、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ２２の構造の略図である。

【図３】コリシンＩａの変異ポリペプチドの感作効果の実験１を示す図である。　（Ａ）致死量のＭＲＳＡ（ＡＴＣＣ　ＢＡＡ４２）を腹腔内注射した昆明（Ｋｕｎｍｉｎｇ）マウスを、（１）コントロールグループ、（２）アンピシリングループ、（３）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド（ＺＬ０１１２８８３６．１）のグループ、（４）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ、へとランダムにグループ分けする。　（Ｂ）１４日後、昆明マウスの新たな一群を、コントロールグループおよびアンピシリングループへとグループ分けする。黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループおよび黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ由来の生き残ったマウスを、黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループおよび黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループへとグループ分けし、当該実験を繰り返す。　（Ｃ）４１日後、昆明マウスの新たな一群を、（１）コントロールグループ、（２）レボフロキサシンのグループ、（３）セフトリアキソンナトリウムのグループ、へとグループ分けし、また、（４）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループおよび（５）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ由来の生き残ったマウスは、緑膿菌に対するポリペプチド２のグループおよび緑膿菌に対するポリペプチド１のグループへとグループ分けする。

【図４】コリシンＩａの変異ポリペプチドの低感作効果の実験３を示す図である。（Ａ）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド／緑膿菌に対するポリペプチド２のグループの血清、１：５０，０００の力価；（Ｂ）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１／緑膿菌に対するポリペプチド１のグループの血清、１：５０，０００の力価。（１）第１週、（２）第２週、（３）第７週の血清、（４）ネガティブコントロール。
【図５】ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫に対する、新規抗腫瘍ポリペプチドのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける殺傷効果の比較を示す図である。（Ａ）コントロールグループ、（Ｂ）新規抗腫瘍ポリペプチド１処理グループ、（Ｃ）新規抗腫瘍ポリペプチド２処理グループ。
【図６】ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫の細胞および他の腫瘍細胞に対する、新規抗腫瘍ポリペプチドのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける殺傷効果を示す図である。（Ａ）バーキットリンパ腫のＥＢＶ陽性細胞、（Ｂ）バーキットリンパ腫のＥＢＶ陰性細胞、（Ｃ）ＡＩＤＳ患者由来の悪性リンパ肉腫のＥＢＶ陽性細胞。（１）コントロールグループ、（２）新規抗腫瘍ポリペプチド１処理グループ。
【図７】ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫の細胞を移植したヌードマウス由来の成長した固形腫瘍に対する新規抗腫瘍ポリペプチドの殺傷効果を示す図である。（Ａ）コントロールグループ、（Ｂ）新規抗腫瘍ポリペプチド１治療グループ、に由来するすべてのＳＣＩＤ免疫不全マウスの、両方の脇の下の側面部中に、バーキットリンパ腫の細胞を接種する。左矢印はＥＢＶ陰性リンパ肉腫、右矢印はＥＢＶ陽性リンパ肉腫である。
【図８】ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫の細胞を移植したヌードマウス由来の成長した固形腫瘍に対する新規抗腫瘍ポリペプチドの殺傷効果を示す図である。（Ａ）コントロールマウスのＥＢＶ陰性リンパ肉腫の切片、（Ｂ）コントロールマウスのＥＢＶ陽性リンパ肉腫の切片、（Ｃ）新規抗腫瘍ポリペプチド１治療マウスのＥＢＶ陰性リンパ肉腫の切片、（Ｄ）新規抗腫瘍ポリペプチド１治療マウスのＥＢＶ陽性リンパ肉腫の切片。
【発明を実施するための形態】
【００２８】
以下、本発明の好ましい実施形態を記述することにより、および、添付の図面を参照して、本発明を説明する。
【００２９】
本発明において使用される元のベクターｐＳＥＬＥＣＴ^{TM}－１は、プロメガ社から購入したものである。
【００３０】
大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）という改変細菌は、ノバジェン社から購入したものである。
【実施例】
【００３１】
（実施例１）
変異体コリシンＩａをコードする遺伝子を含む組換えプラスミドの構築。
元のベクターは、プラスミドｐＳＥＬＥＣＴＴＭ－１（８．３ｋｂ）（プロメガ社から購入）であり、これは、コリシンＩａおよび免疫タンパク質の遺伝子を有する。変異体アミノ酸をコードする配列番号１～１０に示されているオリゴヌクレオチドプライマーの配列を、それぞれ、二本鎖オリゴヌクレオチド部位特異的突然変異誘発技術（ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅＴＭキット、Ｓｔｒａｔｅｇｅｎｅ社）により、野生型コリシンＩａの遺伝子へと機能可能に連結し、コリシンＩａの変異ポリペプチドをコードする配列番号２３に示されている遺伝子、および、変異体プラスミド、を得る。その後、この変異体プラスミドに、配列番号２６または配列番号２８の遺伝子を、コリシンＩａの変異ポリペプチドの遺伝子のＩ６２６のコドンの後に挿入し、ＥＢウィルスが原因である腫瘍に対する新規ポリペプチドのための、２種類の組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ１１（図１に示されている）およびｐＣＨＣＥＢ２２（図２に示されている）を得る。組換えプラスミド中の、ＥＢウ

ィルスに対する抗体をコードする遺伝子の調製のために設計された６対のオリゴヌクレオチドプライマーの配列が配列番号１１～２２に示されている。前記組換えプラスミドを、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）（ノバジェン社から購入）という改変細菌中へとトランスフェクションし、ポリペプチドを調製する。得られるポリペプチドは、配列表の、配列番号２９（以下、「新規抗腫瘍ポリペプチド１」という）および配列番号３１（以下、「新規抗腫瘍ポリペプチド２」という）に示されたものである。

【００３２】

二本鎖オリゴヌクレオチド部位特異的突然変異誘発のプロセスは、Ｓｔｒａｔｅｇｅｎｅ　ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇ部位特異的突然変異誘発キット（カタログ番号２００５１８）に従ったものである。

１．　部位特異的突然変異誘発のための反応物の調製：

５μｌの１０×緩衝液

２μｌ（１０ｎｇ）の、コリシンＩａの野生型のポリペプチドの遺伝子および免疫タンパク質の遺伝子を有する元のプラスミドｐＳＥＬＥＣＴ^{TM}－１。

１．２５μｌ（１２５ｎｇ）の、設計された５’－３’オリゴヌクレオチドプライマー

１．２５μｌ（１２５ｎｇ）の、設計された３’－５’オリゴヌクレオチドプライマー

１μｌのｄＮＴＰ

再蒸留水５０μｌ

１μｌ　ｐｆｕ

（プラスミド、プライマーおよび再蒸留水以外は、前記キットにより提供されるものである）

２．　ＰＣＲ増幅、増幅条件：９５℃で３５秒間の変性、５３℃で７０秒間のアニール、および６８℃で１７分間の伸長、を２５サイクル；

３．　１μｌのエンドヌクレアーゼＤｐｎ１を加えて、親ＤＮＡ鎖を消化（３７℃、１時間）し、１μｌの反応物と５０μｌのＸＬ１－Ｂｌｕｅコンピテント細胞とを、共に、氷上で３０分間インキュベートし、４２℃での４５秒間のヒートショックの後に、氷中で２分間インキュベートする；

４．　０．５ｍｌの培養培地ＮＺＹを加え、３７℃および２２０ｒｐｍにて１時間振盪する。５０～１００μｌの反応物をまく（１％寒天および５０μｇ／ｍｌアンピシリンを加えたＬＢ培地、３７℃で一晩）；

５．　１８時間後にコロニーをピックアップする。プラスミドを抽出し、配列決定を行い、変異が成功していることを確認する；

６．　複数の部位における変異によって最終的に得られた５０ｎｇの組換えプラスミドを、４０μｌの大腸菌ＢＬ－２１（ＤＥ３）コンピテント細胞と共に氷上で５分間インキュベートし、４２℃で３０秒間ヒートショックを与え、氷中で２分間インキュベートする。ノバジェン社からの１６０μｌの培養培地ＳＯＣを加え、３７℃および２２０ｒｐｍにて１時間振盪した後にまく（１％寒天および５０μｇ／ｍｌアンピシリンを加えたＬＢ培地、３７℃で一晩）。

７．　増幅のためにシングルコロニーをピックアップし、８～１６リットルＦＢ培地、２５０ｒｐｍ、３０℃で４～５時間とし、４２℃でヒートショックを与え、２５０ｒｐｍにて３０分間、３７℃にて２時間。細菌を、６０００ｇおよび４℃での２０分間の遠心分離により沈殿させる。４℃の５０ｍＭホウ酸緩衝液（２ｍＭ　ＥＤＴＡ＋２ｍＭ　ＤＴＴ）および５０～８０ｍｌの細菌懸濁液は、２５０ｍｌの０．２Ｍ　ＰＭＳＦを加え、超音波処理により処理する（４℃、４００Ｗ、２分）。細菌破砕物（ｄｅｂｒｉｓ）を高速遠心分離する（４℃、７５，０００ｇ、９０分）。その上清には、５００万単位の硫酸ストレプトマイシンを加え、ＤＮＡを沈殿させる。１５０００ｇおよび４℃での１０分間の遠心分離による沈殿の後、その上清を、４℃にて、５０ｍＭホウ酸緩衝液中、分子量１５，

０００の透析バッグ中で一晩透析する。再び１５０００ｇおよび４℃での１０分間の遠心分離による沈殿の後、その上清を、ＣＭイオン交換カラムにロードする。このカラムを、０．１～０．３Ｍ　ＮａＣｌ＋５０ｍＭホウ酸緩衝液の勾配を用いて溶出し、組換え抗腫瘍ポリペプチドを得る。

【００３３】

部位特異的突然変異誘発のために設計されたプライマーの配列は以下の通りである：

【００３４】

配列番号１、コリシンの遺伝子におけるＧ１１Ａの変異のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー５’-３’：

ｃｇｔ　ａｔｔ　ａｃａ　ａａｔ　ｃｃｃ　ＧＣＡ　ｇｃａ　ｇａａ　ｔｃｇ　ｃｔｇ　ｇｇｇ

配列番号２、コリシンの遺伝子におけるＧ１１Ａの変異のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー３’-５’：

ｃｃｃ　ｃａｇ　ｃｇａ　ｔｔｃ　ｔｇｃ　ＴＧＣ　ｇｇｇ　ａｔｔ　ｔｇｔ　ａａｔ　ａｃｇ

配列番号３、コリシンの遺伝子におけるＨ２２Ｇの変異のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー５’-３’：

ｇａｔ　ｔｃａ　ｇａｔ　ｇｇｃ　ＧＧＴ　ａａａ　ｔｔａ　ｔｇｇ　ｇｔｇ

配列番号４、コリシンの遺伝子におけるＨ２２Ｇの変異のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー３’-５’：

ｃａｃ　ｃｃａ　ｔａａ　ｔｔｔ　ＡＣＣ　ｇｃｃ　ａｔｃ　ｔｇａ　ａｔｃ

配列番号５、コリシンの遺伝子におけるＡ２６Ｇの変異のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー５’-３’：

ｇａａａ　ｔｔａｔｇＧＧＴｇｔ　ｔｇａｔａｔｔｔａｔ

配列番号６、コリシンの遺伝子におけるＡ２６Ｇの変異のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー３’-５’：

ａｔａａａｔａｔａｃａａｃＡＣＣｃａｔａａｔｔｔｃ

配列番号７、コリシンの遺伝子におけるＶ３１Ｌの変異のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー５’-３’：

ｇｔ　ｔｇａｔａｔｔｔａｔ　ＣＴＣ　ａａｃｃｃｔｃ　ｃａｃｇｔｇｔｃ

配列番号８、コリシンの遺伝子におけるＶ３１Ｌの変異のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー３’-５’：

ｇａｃａｃｇｔｇｇａｇｇｇｔｔＧＡＧａｔａａａｔａｔｃａａｃ

配列番号９、コリシンの遺伝子におけるＨ４０Ｄの変異のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー５’-３’：

ｃｇｔｇｔｃｇａ　ｔｇｔｃｔｔｔＧＡＴｇｇｔａｃｃｃｃｇｃ　ｃｔｇｃａｔ

配列番号１０、コリシンの遺伝子におけるＨ４０Ｄの変異のために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー３’-５’：

ａｔｇｃａｇｇｃｇｇｇｇｔａｃｃＡＴＣａａａｇａｃａｔｃｇａｃａｃｇ

【００３５】

配列番号１１、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ１１中のV_HＣＤＲ１の遺伝子のためのプライマー５’-３’：

ｇｃｇ　ａａｔ　ａａｇ　ｔｔｃ　ｔｇｇ　ｇｇｔ　ａｔｔ　ＴＣＣ　ＴＴＣ　ＧＧＴ　ＡＴＧ　ＣＡＴ　ＴＧＧ　ＧＴＧ　ＣＧＴＣＡＧｔａａ　ａｔａ　ａａａ　ｔａｔ　ａａｇ　ａｃａ　ｇｇｃ

配列番号１２、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ１１中のV_HＣＤＲ１の遺伝子のためのプライマー３’-５’：

ｇｃｃ　ｔｇｔ　ｃｔｔ　ａｔａ　ｔｔｔ　ｔａｔ　ｔｔａ　ＣＴＧ　ＡＣＧ　ＣＡＣ　ＣＣＡ　ＡＴＧ　ＣＡＴ　ＡＣＣ　ＧＡＡ　ＧＧＡ　ａａｔ　ａｃｃ　ｃｃａ　ｇａａ　ｃｔｔ　ａｔｔ　ｃｇｃ

配列番号１３、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ１１中のＶ$_H$ＦＲ$_2$の遺伝子のためのプライマー５’-３’：
ｇｇｔ　ａｔｇ　ｃａｔ　ｔｇｇ　ｇｔｇ　ｃｇｔ　ｃａｇ　ＧＣＣ　ＣＣＣ　ＧＡＧ　ＡＡＡ　ＧＧＴ　ＣＴＧ　ＧＡＧ　ＴＧＧ　ＧＴＧ　ＧＣＣ　ｔａａ　ａｔａ　ａａａ　ｔａｔ　ａａｇ　ａｃａ　ｇｇｃ
配列番号１４、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ１１中のＶ$_H$ＦＲ$_2$の遺伝子のためのプライマー３’-５’：
ｇｃｃ　ｔｇｔ　ｃｔｔ　ａｔａ　ｔｔｔ　ｔａｔ　ｔｔａ　ＧＧＣ　ＣＡＣ　ＣＣＡ　ＣＴＣ　ＣＡＧ　ＡＣＣＴ　ＴＴＴ　ＣＴＣ　ＧＧＧ　ＧＧＣ　ｃｔｇ　ａｃｇ　ｃａｃ　ｃｃａ　ａｔｇ　ｃａｔ　ａｃｃ
配列番号１５、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ１１中の（Ｒｅｖ）Ｖ$_l$ＣＤＲ３の遺伝子のためのプライマー５’-３’：
ａａａ　ｇｇｔ　ｃｔｇ　ｇａｇ　ｔｇｇ　ｇｔｇ　ｇｃｃ　ＡＣＣ　ＴＡＣ　ＣＣＣ　ＴＡＣ　ＴＣＣ　ＴＡＣ　ＧＧＴ　ＣＡＧ　ＧＧＴ　ｔａａ　ａｔａ　ａａａ　ｔａｔ　ａａｇ　ａｃａ　ｇｇｃ
配列番号１６、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ１１中の（Ｒｅｖ）Ｖ$_L$ＣＤＲ３の遺伝子のためのプライマー３’-５’：
ｇｃｃ　ｔｇｔ　ｃｔｔ　ａｔａ　ｔｔｔ　ｔａｔ　ｔｔａ　ＡＣＣ　ＣＴＧ　ＡＣＣ　ＧＴＡ　ＧＧＡ　ＧＴＡ　ＧＧＧ　ＧＧＴ　ｇｇｃ　ｃａｃ　ｃｃａ　ｃｔｃ　ｃａｇ　ａｃｃ　ｔｔｔ
配列番号１７、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ２２中のＶ$_H$ＣＤＲ１の遺伝子のためのプライマー５’-３’：
ｇｃｇ　ａａｔ　ａａｇ　ｔｔｃ　ｔｇｇ　ｇｇｔ　ａｔｔ　ＴＣＣ　ＴＴＣ　ＧＧＴ　ＡＴＧ　ＣＡＴ　ＴＧＧ　ＧＴＧ　ＣＧＴ　ＣＡＧ　ｔａａ　ａｔａ　ａａａ　ｔａｔ　ａａｇ　ａｃａ　ｇｇｃ
配列番号１８、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ２２中のＶ$_H$ＣＤＲ１の遺伝子のためのプライマー３’-５’：
ｇｃｃ　ｔｇｔ　ｃｔｔ　ａｔａ　ｔｔｔ　ｔａｔ　ｔｔａ　ＣＴＧ　ＡＣＧ　ＣＡＣ　ＣＣＡ　ＡＴＧ　ＣＡＴ　ＡＣＣ　ＧＡＡ　ＧＧＡ　ａａｔ　ａｃｃ　ｃｃａ　ｇａａ　ｃｔｔ　ａｔｔ　ｃｇｃ
配列番号１９、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ２２中のＶ$_H$ＦＲ$_2$の遺伝子のためのプライマー５’-３’：
ｇｇｔ　ａｔｇ　ｃａｔ　ｔｇｇ　ｇｔｇ　ｃｇｔ　ｃａｇ　ＧＣＣ　ＣＣＣ　ＧＡＧ　ＡＡＡ　ＧＧＴ　ＣＴＧ　ＧＡＧ　ＴＧＧ　ＧＴＧ　ＧＣＣ　ｔａａ　ａｔａａａａ　ｔａｔ　ａａｇ　ａｃａ　ｇｇｃ
配列番号２０、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ２２中のＶ$_H$ＦＲ$_2$の遺伝子のためのプライマー３’-５’：
ｇｃｃ　ｔｇｔ　ｃｔｔ　ａｔａ　ｔｔｔ　ｔａｔ　ｔｔａ　ＧＧＣ　ＣＡＣ　ＣＣＡ　ＣＴＣ　ＣＡＧ　ＡＣＣＴ　ＴＴＴ　ＣＴＣ　ＧＧＧ　ＧＧＣ　ｃｔｇ　ａｃｇ　ｃａｃ　ｃｃａ　ａｔｇ　ｃａｔ　ａｃｃ
配列番号２１、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ２２中のＶ$_L$ＣＤＲ３の遺伝子のためのプライマー５’-３’：
ａａａ　ｇｇｔ　ｃｔｇ　ｇａｇ　ｔｇｇ　ｇｔｇ　ｇｃｃ　ＧＧＴ　ＣＡＧ　ＧＧＴ　ＴＡＣ　ＴＣＣ　ＴＡＣ　ＣＣＣ　ＴＡＣ　ＡＣＣ　ｔａａ　ａｔａ　ａａａ　ｔａｔ　ａａｇ　ａｃａ　ｇｇｃ
配列番号２２、組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ２２中のＶ$_L$ＣＤＲ３の遺伝子のためのプライマー３’-５’：
ｇｃｃ　ｔｇｔ　ｃｔｔ　ａｔａ　ｔｔｔ　ｔａｔ　ｔｔａ　ＧＧＴ　ＧＴＡ　ＧＧＧ　ＧＴＡ　ＧＧＡ　ＧＴＡ　ＡＣＣ　ＣＴＧ　ＡＣＣ　ｇｇｃ　ｃａｃ　ｃｃａ　ｃｔｃ　ｃａｇ　ａｃｃ　ｔｔｔ

【００３６】
（実施例２）
組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ１１およびｐＣＨＣＥＢ２２から調製した新規抗腫瘍ポリペプチドの免疫効果の観察。
実施例１において得られた組換えプラスミドｐＣＨＣＥＢ１１およびｐＣＨＣＥＢ２２から調製した新規抗腫瘍ポリペプチド１および新規抗腫瘍ポリペプチド２、ならびに、発明者が所有する、先の発明（ＺＬ２００４１００８１４４６．８）からの抗腫瘍ポリペプチド１および抗腫瘍ポリペプチド２、により、マウスを免疫する。上述の各タンパク質をアジュバントと混合する。プライミング投与量およびブースト投与量は、各マウスにつき５０μｇ（０．５ｍｌ）の１回の腹腔内注射、２週間の間隔をあけて合計５回の注射、である。血清力価は、間接ＥＬＩＳＡ法により決定する。本発明により調製した新規抗腫瘍ポリペプチド１および２により免疫したマウスの力価は、10^{-3}～10^{-4}の範囲であり、一方、抗腫瘍ポリペプチド１および抗腫瘍ポリペプチド２により免疫したマウスの力価は、10^{-4}～10^{-5}の範囲である。
本発明の新規抗腫瘍ポリペプチドにより誘発される過敏性反応の可能性は、野生型コリシンＩａを含む抗腫瘍ポリペプチドにより誘発される過敏性反応の可能性よりも１桁～２桁低い、とのことがわかる。
【００３７】
（実施例３）
新規抗腫瘍ポリペプチドを形成するコリシンＩａの変異ポリペプチドの低感作効果の実験。
実施例１の、コリシンＩａの変異ポリペプチドの変異体プラスミド（水溶性チャネルドメインのペプチド鎖において、Ｇ１１Ａ、Ｈ２２Ｇ、Ａ２６Ｇ、Ｖ３１Ｌ、およびＨ４０Ｄのアミノ酸残基に変異を受けている）を、変異ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端にて、黄色ブドウ球菌のフェロモンＡｇｒＤ１（ＹＳＴＣＤＦＩＭ）に機能可能に連結し、２種類の抗菌ポリペプチドを得る。当該変異体コリシンＩａのカルボキシル末端におけるＡｇｒＤ１の連結により得られるポリペプチドを、黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１と名付け、当該変異体コリシンＩａのアミノ末端におけるＡｇｒＤ１の連結により得られるポリペプチドを、緑膿菌に対するポリペプチド１と名付ける。野生型コリシンＩａについてのプラスミドを、アミノ末端にて、黄色ブドウ球菌のフェロモンＡｇｒＤ１（ＹＳＴＣＤＦＩＭ）に連結し、緑膿菌に対するポリペプチド２を得る。
【００３８】
実験１：昆明マウスの一群に、致死量のＭＲＳＡ（ＡＴＣＣ　ＢＡＡ４２）を腹腔内注射し、（１）コントロールグループ、（２）アンピシリングループ、（３）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループ、（４）黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ、へとランダムにグループ分けする。各グループは、１０匹のマウスからなる。
処理方法：
致死量のＭＲＳＡ（ＡＴＣＣ　ＢＡＡ４２）の腹腔内注射の１時間後に：
コントロールグループ：０．５ｍｌの０．３Ｍ　ＮａＣｌ＋５０ｍＭホウ酸緩衝液を、尾静脈を介して１回注射する；
アンピシリンのグループ：２．５ｍｇ／ｋｇのアンピシリンを、尾静脈を介して１回注射する；
黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループ：６ｍｇ／ｋｇの、本発明者が所有する、黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド（ＺＬ０１１２８８３６．１）を、尾静脈を介して１回注射する；
黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ：６ｍｇ／ｋｇの、黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１を、尾静脈を介して１回を注射する；
結果：コントロールグループおよびアンピシリンのグループのマウスは、すべて、２日以内に死亡。黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループおよび黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループの８５％のマウスは生き残る。

【００３９】
実験２：実験１の１４日後に、昆明マウスの新たな一群を、コントロールグループおよびアンピシリンのグループへとグループ分けする。黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループおよび黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ由来の生き残ったマウスを、黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループおよび黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループへとグループ分けし、上記の実験を繰り返す。コントロールグループおよびアンピシリンのグループのマウスは、すべて、２日以内に死亡。黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループの７５％のマウスは生き残り、黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループの９０％のマウスは生き残る。
【００４０】
実験３：実験１の４１日後に、昆明マウスの新たな一群を、コントロールグループ、レボフロキサシンのグループ、およびセフトリアキソンナトリウムのグループへとグループ分けする。黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループおよび黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ由来の生き残ったマウスは、緑膿菌に対するポリペプチド２のグループおよび緑膿菌に対するポリペプチド１のグループへとグループ分けする。
マウスに、致死量の多剤耐性緑膿菌（四川大学華西医院実験医学科からの臨床分離株１３５７８）を腹腔内注射する。１時間の後、
コントロールグループに、０．５ｍｌの０．３Ｍ　ＮａＣｌ＋５０ｍＭホウ酸緩衝液を、尾静脈を介して１回注射する；
レボフロキサシンのグループに、５ｍｇ／ｋｇのレボフロキサシンを、尾静脈を介して１回注射する；
セフトリアキソンナトリウムのグループに、３０ｍｇ／ｋｇのセフトリアキソンナトリウムを、尾静脈を介して１回注射する；
緑膿菌に対するポリペプチド２のグループに、８ｍｇ／ｋｇの、緑膿菌に対するポリペプチド２を、尾静脈を介して１回注射する；
緑膿菌に対するポリペプチド１のグループに、８ｍｇ／ｋｇの、緑膿菌に対するポリペプチド１を、尾静脈を介して１回注射する。
コントロールグループおよびレボフロキサシンのグループのマウスは、すべて、１日以内に死亡。セフトリアキソンナトリウムのグループの２５％のマウスは生き残る。緑膿菌に対するポリペプチド２のグループの６０％のマウスは生き残る。緑膿菌に対するポリペプチド１のグループのマウスは、すべて、生き残る。宿主の抗体が、変異ポリペプチドの殺傷効果を、野生型ポリペプチドの殺傷効果よりも低く妨害をすることが示されている。
図３を参照のこと。
【００４１】
この実験の第１週、第２週および第７週において、黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループ／緑膿菌に対するポリペプチド２のグループ、および、黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ／緑膿菌に対するポリペプチド１のグループ、に由来する、生き残ったマウスの血清について、血液中の抗体を検出するために、間接ＥＬＩＳＡ法により分析する。酵素標識プレートのウェルを、野生型コリシンＩａおよびコリシンＩａの変異ポリペプチドで、１００ｎｇ／ウェルでコーティングする。一次抗体は、黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループ／緑膿菌に対するポリペプチド２のグループ、および、黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ／緑膿菌に対するポリペプチド１のグループ、に由来する、生き残ったマウスの血清である。二次抗体は、ヤギ抗マウス標識抗体である。一次抗体のネガティブコントロールは、５％ミルク‐ＰＢＳである。１：５０，０００の力価の結果は、以下の通りである（図４参照）：
【００４２】

【表１】

	Ａ（黄色ブドウ球菌に対するポリペプチドのグループ／緑膿菌に対するポリペプチド２のグループ)	Ｂ（黄色ブドウ球菌に対するポリペプチド１のグループ／緑膿菌に対するポリペプチド１のグループ)
１（第１週）	０．９１４	０．２５４
２（第２週）	１．６２３	０．５９８
３（第７週）	２．９１１	１．４１
４（コントロール)	０．０６５	０．０６９

【００４３】
本発明により調製されたコリシンＩａの変異ポリペプチドにより誘発される宿主の過敏感反応の可能性は、野生型コリシンＩａにより誘発される宿主の過敏感反応の可能性よりも低いことが示されている。
【００４４】
（実施例４）
ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫に対する新規抗腫瘍ポリペプチドのｉｎｖｉｔｒｏにおける殺傷効果。
ＥＢＶ陽性細胞株およびＥＢＶ陰性細胞株は、米国のＡＴＣＣからの、標準的な細胞株である。
細胞培養：起こしたＲａｊｉ細胞の懸濁液０．１ｍｌを、ゆっくりと、培養ディッシュ中の３ｍｌの１６４０液体培地（１０％血清を加えたもの）へと加え（希釈率、１：３０）、混合し、CO_2を含有する３７℃インキュベーター中で培養する。当該ＥＢＶ陽性細胞株は、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ‐８６（世界中の研究室において使用されている標準的なバーキットリンパ腫細胞。Ｒａｊｉ細胞。１２歳のアフリカの少年から１９６３年に単離されたもの）である。
この試験細胞を、３つのグループにグループ分けする。
グループ１は、ブランクのグループであり、抗腫瘍ポリペプチドを含有しない保存液（１０ｍＭＰＢ＋０．２Ｍ　ＮａＣｌリン酸緩衝液（ｐＨ７．４））が加えられたものである。
グループ２は、２００μｇ／ｍｌの新規抗腫瘍ポリペプチド１（プラスミドｐＣＨＣＥＢ１１、保存液、１０ｍＭＰＢ＋０．２Ｍ　ＮａＣｌリン酸緩衝液、ｐＨ７．４）が加えられたものである。
グループ３は、２００μｇ／ｍｌの新規抗腫瘍ポリペプチド２（プラスミドｐＣＨＣＥＢ２２、保存液、１０ｍＭＰＢ＋０．２Ｍ　ＮａＣｌリン酸緩衝液、ｐＨ７．４）が加えられたものである。
２４時間の培養後、培養ディッシュに、上述の処理剤を加える。これらの処理剤の添加の７２時間後、この培養ディッシュに、２０μｌの１００μＭｏｌヨウ化プロピジウム（ＰＩ）を加え、１０分後、この培養ディッシュを顕微鏡下で観察する。その結果が示すのは、ブランクのグループの細胞はよく成長し、新規抗腫瘍ポリペプチド１のグループの細胞の大部分はＰＩにより赤く染色されるということであり、この抗腫瘍ポリペプチドによって、細胞膜が破壊されることを示しており、これは腫瘍細胞の死を導く。死細胞の数を比較すると、２種類の新規抗腫瘍ポリペプチドのうちで、新規抗腫瘍ポリペプチド２の効果はあまり良くない。図５を参照のこと。
【００４５】
（実施例５）
ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫の細胞および他の腫瘍細胞に対する新規抗

腫瘍ポリペプチドのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける殺傷効果についての多重蛍光染色の観察。
細胞培養の条件は実施例２と同じである。本実験では、次の３種類の細胞株を使用する：ＥＢウィルス陽性細胞株：ＡＴＣＣ　ＣＣＬ‐８６（Ｒａｊｉ細胞。バーキットリンパ腫細胞）；ＥＢウィルスおよびカポジ肉腫ウィルスが陽性の、４６歳のＡＩＤＳ男性患者由来の悪性リンパ肉腫細胞の株である、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ‐２２３０；ＥＢウィルス陰性細胞株：ＡＴＣＣ　ＣＲＬ‐１６４８（ＣＡ‐４６。アメリカのバーキットリンパ腫患者の腹水から単離された細胞）。
各株は、２つの試験グループにグループ分けする。グループ１は、新規抗腫瘍ポリペプチドを含有しない保存液（１０ｍＭＰＢ＋０．２Ｍ　ＮａＣｌリン酸緩衝液（ｐＨ７．４））が加えられたものである。グループ２は、２００μｇ／ｍｌの新規抗腫瘍ポリペプチド１（プラスミドｐＣＨＣＥＢ１１）が加えられたものであり、保存液は１０ｍＭＰＢ＋０．２Ｍ　ＮａＣｌリン酸緩衝液、ｐＨ７．４である。
２４時間の培養後、培養ディッシュに、上述のグループの処理剤を加える。これらの処理剤の添加の７２時間後、この培養ディッシュに、２種類の蛍光色素、すなわち、２０μｌの５０μＭｏｌ　ＦＩＴＣと、２０μｌの５０ｕＭｏｌ　ローダミン１２３とを加え、１０分後、この培養ディッシュを顕微鏡オリンパスＩＸ‐７１下で観察する。
その結果、ＥＢＶ陰性腫瘍細胞の株は、新規抗腫瘍ポリペプチド１の処理後、よく成長すること、及び、ＥＢＶ陽性腫瘍細胞の株は、いずれの株も、大部分の細胞がミトコンドリアおよび核を消失し、膨張し、ネクローシスを起こし、それらのうちのほとんどが死んでいることを示す。実施例４のＰＩ染色実験と比較すると、明らかに、多重蛍光染色実験からの結果は、ＥＢウィルス陽性腫瘍細胞に対する新規抗腫瘍ポリペプチド１の強力な殺傷効果を、より明確に示しているようである。図６を参照のこと。
ＥＢＶ陰性腫瘍細胞はよく成長し、当該新規抗腫瘍ポリペプチドは、細胞膜中にＥＢウィルスの表面抗原を有しない細胞を攻撃しないことを意味する。本発明の新規抗腫瘍ポリペプチドは理想的なターゲティング特異性と安全性とを有している、とのことが示唆される。

【００４６】

（実施例６）

ＥＢウィルスが原因であるバーキットリンパ腫の細胞を移植したヌードマウスの体内で成長した固形腫瘍に対する新規抗腫瘍ポリペプチドの殺傷効果。
ＳＣＩＤ免疫不全マウスは、中国科学院上海実験動物センターから購入したものである。マウスは、標準飼育要件に従って飼育する。水、敷き藁および飼料は、すべて、高温またはＵＶ光により滅菌する。マウスは、相対的無菌条件下で、１週間飼育し、異常性が全くみとめられない場合に、本接種実験に使用する。
対数期にあるＲａｊｉ（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ‐８６）および１６４８（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ‐１６４８）の細胞の懸濁液を、５０ｍｌの遠心管中に集め、４℃で遠心する。次いで、その上清を捨てる。細胞を、１６４０液体培養培地（仔ウシ血清を加えたもの）に再懸濁して、１．０×10^7細胞／ｍｌにする。０．１ｍｌのＲａｊｉの細胞懸濁液をマウスの左腋窩、また、０．１ｍｌの１６４８（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ‐１６４８）の細胞懸濁液をマウスの右腋窩に、皮下注射する。
注射の３～４日後、腫瘍は成長して約２×２ｍｍとなる。腫瘍を有するマウスを、以下のグループに分ける：
（グループＡ）コントロールグループとしての、抗腫瘍ポリペプチドを含有しない保存液（１０ｍＭ　ＰＢＳ＋０．２Ｍ　ＮａＣｌリン酸緩衝液（ｐＨ７．４））；
（グループＢ）処理グループとしての、新規抗腫瘍ポリペプチド１（プラスミドｐＣＨＣＥＢ１１）、３００μｇ／マウス／日（２５ｇとして計算）で２０日間連続。
各グループの１０匹のマウスに、１日２回、２０日間連続で、０．５ｍｌ皮下注射する。マウスの挙動は、毎日観察および記録する。腫瘍の大きさについては、２日ごとに測定し、写真撮影する。
その結果（図７参照）は、新規抗腫瘍ポリペプチドのグループＢの腫瘍の成長が有意に

阻害され、７匹のマウスの腫瘍は消失し、残りの３匹のマウスの腫瘍は、コントロールグループのそれよりも明らかに小さいことを示す。新規抗腫瘍ポリペプチドは、リンパ肉腫のＥＢＶ陽性細胞により引き起こされるマウス体内の固形腫瘍の成長を阻害するのに効果的である。しかし、当該新規抗腫瘍ポリペプチドは、リンパ肉腫のＥＢＶ陰性細胞により引き起こされるマウス体内の固形腫瘍の成長の阻害には効果がない。

【００４７】

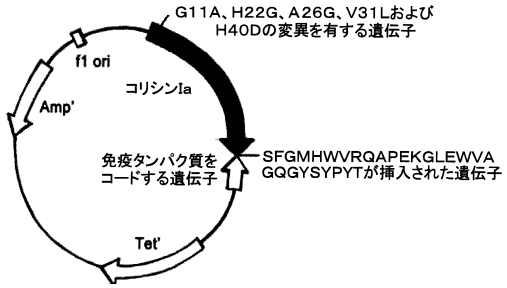
（実施例７）

腫瘍消失のｉｎ　ｖｉｖｏ実験の病理学的観察

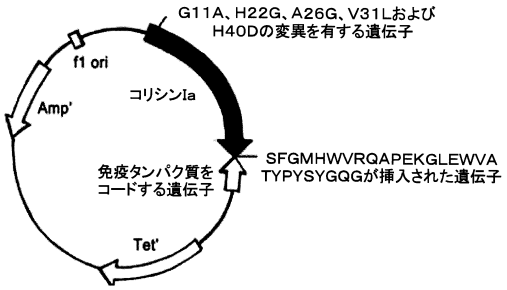
腫瘍の組織病理学的観察：実施例６の実験の終わりにマウスを屠殺する。腫瘍を抽出し、１０％ホルマリン中で固定する。パラフィンスライスを、ＨＥ染色し、常用の光学顕微鏡法に基づき観察する。

顕微鏡下で観察すると、コントロールグループのマウス由来の固形腫瘍は活発に増殖しており、；当該新規抗腫瘍ポリペプチドのグループのマウス由来のＥＢＶ陽性固形腫瘍の細胞は著しく縮小している。切片中のこれら細胞塊のほとんどは壊死した腫瘍細胞であり、多量の、腫瘍周辺のリンパ球浸潤が観察される。この組織病理学的結果は、２０日間の処理の間に、新規抗腫瘍ポリペプチドが、固形腫瘍中の腫瘍細胞をほぼすべて殺傷したことを示唆している（図８、Ｄを参照のこと）。

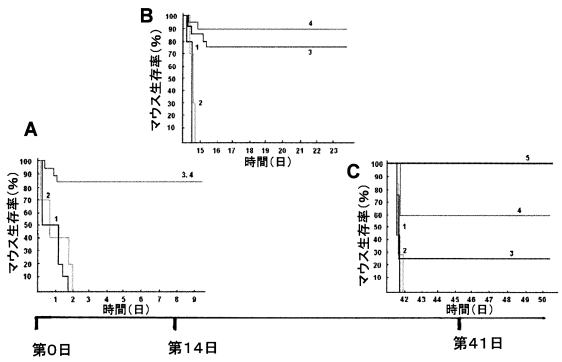
【図１】



【図２】



【図３】



【図４】

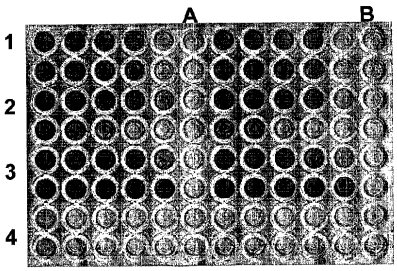
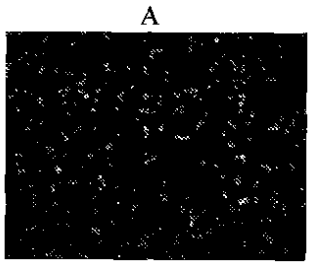
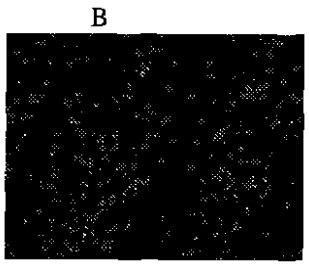


図４

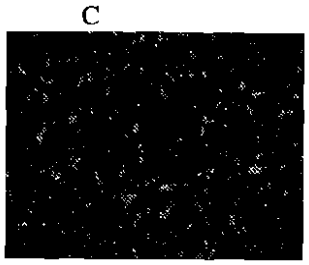
【図５Ａ】



【図５Ｂ】



【図５Ｃ】



【図６】

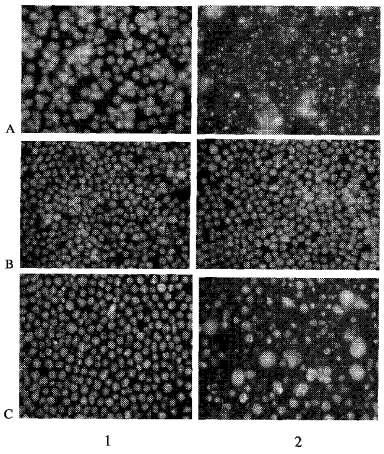
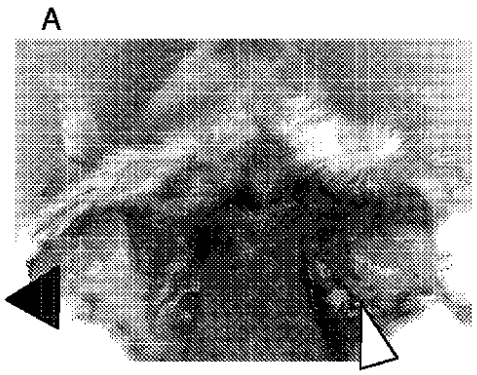
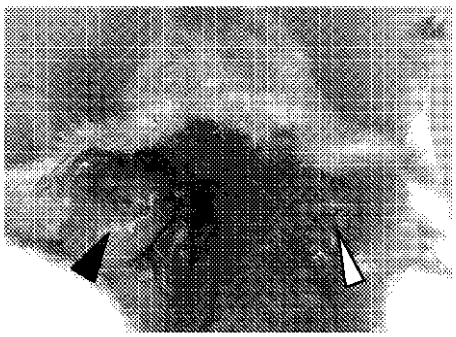


図6

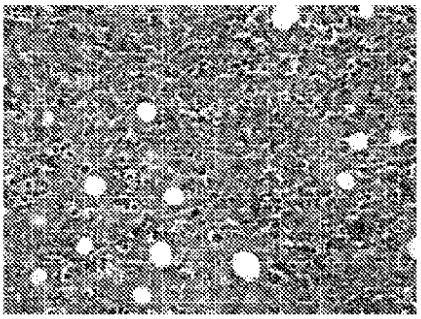
【図７Ａ】



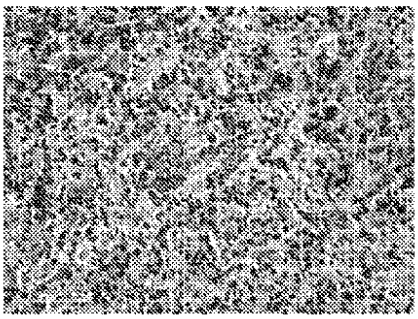
【図７Ｂ】



【図８Ａ】

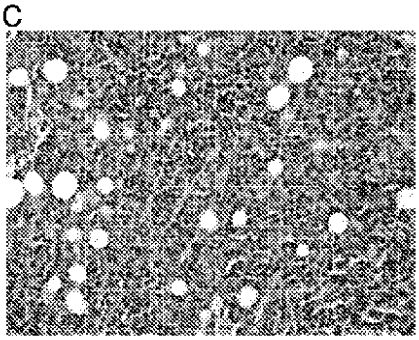


【図８Ｂ】



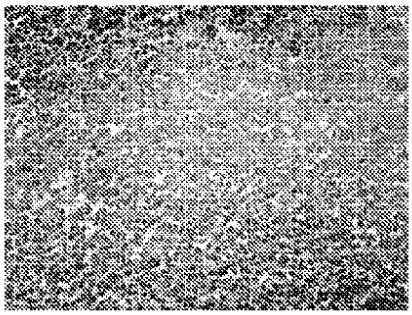
【図８Ｃ】

C



【図８Ｄ】

D



【配列表】

0005683603000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI	
A61K 38/00	***(2006.01)***	A61K	37/02
A61K 47/42	***(2006.01)***	A61K	47/42
A61K 47/48	***(2006.01)***	A61K	47/48
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00

(72)発明者 キュウ、シャオチン
中華人民共和国 シチュアン ６１００４１ チェンジュ グオスーシャン ナンバー３７ フアシー ホスピタル オブ シチュアン ユニバーシティ

審査官 水野 浩之

(56)参考文献 国際公開第２００６／１０３４９４（WO, A1）
国際公開第２００７／０８３１７５（WO, A1）
Nat. Biotechnol., ２００７年, Vol. 25, No. 8, p. 921-929
UniProtKB/Swiss-Prot, [online], Accession No. P06716, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/37999919?sat=12&satkey=6111845>, 24-Nov-2009 uploaded, [retrieved on 2013-02-12]

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ０７Ｋ １４／００－１９／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
Ｔｈｏｍｓｏｎ Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ