

(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2020-519244
(P2020-519244A)

(43) 公表日 令和2年7月2日(2020.7.2)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------|-----------------|-------------|
| C12N 15/62 (2006.01) | C12N 15/62 Z | 2G045 |
| C07K 14/005 (2006.01) | C07K 14/005 ZNA | 4B063 |
| C07K 19/00 (2006.01) | C07K 19/00 | 4B064 |
| C12N 15/70 (2006.01) | C12N 15/70 Z | 4B065 |
| C12N 15/33 (2006.01) | C12N 15/33 | 4C076 |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 103 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-556847 (P2019-556847)
 (86) (22) 出願日 平成30年3月13日 (2018. 3. 13)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年12月17日 (2019. 12. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2018/056311
 (87) 国際公開番号 W02018/192719
 (87) 国際公開日 平成30年10月25日 (2018. 10. 25)
 (31) 優先権主張番号 17305454.5
 (32) 優先日 平成29年4月20日 (2017. 4. 20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 507241492
 アンスティトゥート・ナショナル・ドゥ・ラ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシヤルシュ・メディカル・(インセルム)
 フランス・75013・パリ・リュ・ドゥ・トルビア・101
 (71) 出願人 506316557
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシヤルシュ シアンティフィック
 フランス国 75794 パリ セデックス 16、リュ ミシェル - アンジュ、3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 研究及び生物医学応用のためのペプチド、特にポリペプチド、ファージディスプレイスクリーニング法及び関連する手段、並びにその使用

(57) 【要約】

本発明は、ペプチド、そのようなペプチドを発現する宿主、及びそのようなペプチド又は宿主を産生及びスクリーニングするプロセスに関する。本発明はまた、疾患の検出におけるペプチド又はそのようなペプチドを発現する宿主の使用、宿主のライブラリ、特にペプチドを発現するファージのライブラリを構築する方法にも関する。本発明はまた、疾患の処置における、例えば試料中の分子及び/又は細胞を検出するための、ペプチドを発現する宿主のライブラリ及びその使用にも関する。本発明は、治療及び診断医学の技術分野に応用される。

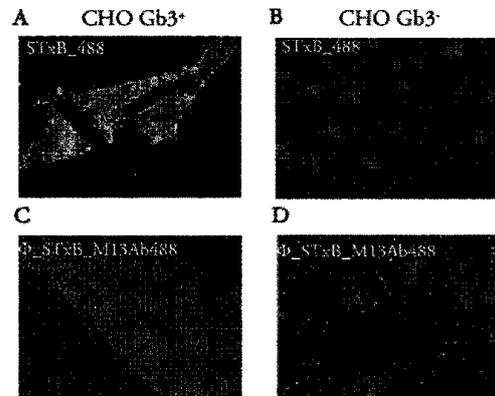


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項1】

55～85アミノ酸残基の長さを有するポリペプチドであって、

a) そのポリペプチド配列が、コンセンサス配列: XaPDCVTGKVEYTKYNXbXcXdTFXeVKVGDkXfXgXhXiXjXkXlXmLQSLLSAQITGMTVTIKXnXoXpCHNXqGxRxsXtEVIFR (配列番号2) を含むか、又は該配列から本質的になるか、又は該配列からなり、
式中、

Xaは、T、A、又はSから選択され、及び

Xb、Xc、Xd、Xf、Xmは、独立してD、E、又はNから選択され、及び

Xe、Xi、Xn、Xp、Xtは、独立してT、A、又はSから選択され、及び

Xgは、L、I、又はVから選択され、及び

Xhは、F、Y、W、又はAから選択され、及び

Xjは、N、E、又はSから選択され、及び

Xkは、R、K、又はEから選択され、及び

Xlは、W、F、Y、又はAから選択され、及び

Xoは、N、E、D、又はSから選択され、及び

Xqは、G A、又はSから選択され、及び

Xrは、G、A、S、又はTから選択され、及び

Xsは、F、L、又はYから選択され、

但し、XaがT又はAである場合、Xb、Xc、XdはDではなく、XeはTではなく、XfはEではなく、XgはLではなく、XhはFではなく、XiはTではなく、XjはNではなく、XkはRではなく、XlはWではなく、XmはNではなく、XnはTではなく、XoはNではなく、XpはAではなく、XqはGではなく、XrはGではなく、XsはFではなく、及びXtはSではなく、並びに/又は

b) そのポリペプチド配列が、コンセンサス配列: XaPDCVTGKVEYTKYNXbDDTFXeVKVGDkEXgXhTXjXkWNLQSLLSAQITGMTVTIKXnNXpCHNGGxRxsXtEVIFR (配列番号37) を含むか、又は該配列から本質的になるか、又は該配列からなり、式中、Xa、Xb、Xe、Xg、Xh、Xj、Xk、Xn、Xp、Xr、Xs、Xtは、項目a) で定義した通りであり、並びに/又は

c) そのポリペプチド配列が、構造Xa(S1)XbXcXd(S2)Xe(S3)XfXgXhXiXjXkXlXm(S4)XnXoXp(S5)Xq(S6)XrXsXt(S7)を有する配列を含むか、又は該配列から本質的になり、式中、S1、S2、S3、S4、S5、S6、及びS7は、ポリペプチドのN末端からC末端にこの順で以下:

S1は、アミノ酸配列PDCVTGKVEYTKYN (配列番号38) を表し、

S2は、アミノ酸配列TFを表し、

S3は、アミノ酸配列VKVGDk (配列番号39) を表し、

S4は、アミノ酸配列LQSLLSAQITGMTVTIK (配列番号40) を表し、

S5は、アミノ酸配列CHNを表し、

S6は、アミノ酸残基Gを表し、及び

S7は、アミノ酸配列EVIFR (配列番号41) を表す

ように定義され、式中、Xa、Xb、Xc、Xd、Xe、Xf、Xg、Xh、Xi、Xj、Xk、Xl、Xm、Xn、Xo、Xp、Xq、Xr、Xs、Xtは、上記の項目a) で定義されたアミノ酸であり、特にそのポリペプチド配列が配列番号1と少なくとも80%の同一性を維持し、及び/又は1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号1とは異なるポリペプチドであり、並びに/又は

d) そのポリペプチド配列が、a)、b)、若しくはc) に定義される配列のいずれか1つの断片、特に少なくとも55アミノ酸残基の連続するアミノ酸残基の断片を含むか、若しくは該断片から本質的になるか、若しくは該断片からなり、又は少なくとも55アミノ酸残基の長さにわたってa)、b)、若しくはc) に定義される配列のいずれか1つの一部分を含むか、若しくは該部分から本質的になるか、若しくは該部分からなり、

但し、ポリペプチドは、配列番号1、又は配列番号32、又は配列番号36、又は配列番号43、又は配列番号44、又は配列番号45、又は配列番号46、又は配列番号47、又は配列番号48、又は配列番号49、又は配列番号50、又は配列番号51、又は配列番号52、又は配列番号53からなるものではなく、

10

20

30

40

50

特に、前記ポリペプチドが5量体形態、特に同一のポリペプチドのホモ5量体アセンブリで存在する場合、Gb3、Gb4、Forssmann様iGb4、フコシル-GM1、GM1、GM2、GD2、グロボ-H、NeuAc-GM3、NeuGc-GM3、GD1a、O-アセチル-GD3、O-アセチル-GD2、O-アセチル-GT3、GD3からなる群から選択される少なくとも1つの、特に1つのグリコスフィンゴ脂質に対する結合能を有する、ポリペプチド。

【請求項2】

請求項1に記載の5個のポリペプチド、特に請求項1に記載の5個の同一のポリペプチドが会合している5量体形態で存在する場合に、以下の特性:

- a. Gb3、Gb4、Forssmann様iGb4、フコシル-GM1、GM1、GM2、GD2、グロボ-H、NeuAc-GM3、NeuGc-GM3、GD1a、O-アセチル-GD3、O-アセチル-GD2、O-アセチル-GT3、GD3、及びそれらの混合物からなる群から選択されるグリコスフィンゴ脂質に結合する特性、並びに/又は
- b. ITCによって測定した場合に、その標的に対する 10^2 M^{-1} に等しいか若しくはそれより高い親和性、並びに/又は
- c. SPRによって測定した場合に、その標的を呈示する膜に対する 10^6 M^{-1} に等しいか若しくはそれより高い見かけの親和性の1つ以上を有する、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】

配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、又はその断片から選択される配列のいずれか1つを含むか、又は該配列から本質的になるか、又は該配列からなる、請求項1又は2に記載のポリペプチド。

【請求項4】

請求項1~3のいずれか一項に記載のポリペプチドの5量体アセンブリ、特にホモ5量体アセンブリ、特に請求項2に規定の特性の1つ以上を有する5量体アセンブリ。

【請求項5】

得られたポリペプチドのアセンブリと活性成分との共役及び/若しくはコンジュゲーションを可能にするために、並びに/又は得られたポリペプチドのアセンブリを標識することができるように、その配列が更に修飾されている、又は志賀毒素のAサブユニットに会合している少なくとも1つのポリペプチドを含む、請求項4に記載の5量体アセンブリ。

【請求項6】

請求項1~3のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は配列番号1からなるポリペプチド、又はそのポリペプチド配列が、配列番号1と少なくとも80%の同一性を有し、及び/若しくは配列番号1とは1つ以上の保存的アミノ酸置換によって異なる配列を含むか、若しくは該配列から本質的になるか、若しくは該配列からなるポリペプチドを含む融合タンパク質であって、前記ポリペプチドがウイルスのコートタンパク質又はウイルスのコートタンパク質の一部に融合されている、融合タンパク質。

【請求項7】

コートタンパク質がpIIIファージコートタンパク質、特にM13バクテリオファージのpIIIファージコートタンパク質、特に配列番号16のpIIIファージコートタンパク質である、請求項6に記載の融合タンパク質。

【請求項8】

配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、及び配列番号33、又はその断片から選択される配列のいずれか1つを含むか、又は該配列から本質的になるか、又は該配列からなる、請求項6に記載の融合タンパク質。

【請求項9】

- a. 請求項1~3のいずれか一項に記載のポリペプチド、及び/又は
- b. 請求項6~8のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項10】

10

20

30

40

50

そのヌクレオチド配列が、請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド又は配列番号1からなるポリペプチドをコードする配列の末端に終止コドンを含む、請求項9に記載の核酸分子。

【請求項11】

その3'端部からその5'端部に：

c. 請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド又は配列番号1からなるポリペプチドをコードする第1の核酸配列、及び

d. pIII繊維状ファージコートタンパク質の少なくとも一部をコードする第2の核酸配列

を包含する融合遺伝子であり、

前記融合遺伝子が、第1の核酸配列と第2の核酸配列との間に少なくとも1つの終止コドンを含む、

請求項9又は10に記載の核酸分子。

【請求項12】

第1の核酸配列が、配列番号30、配列番号31、配列番号4、配列番号6、配列番号8、及び配列番号12から選択される配列のいずれか1つを含むか、若しくは該配列から本質的になるか、若しくは該配列からなり、又はこれらの配列のいずれか1つと少なくとも70%、若しくは少なくとも80%、好ましくは85%、より好ましくは90%、若しくは95%の同一性を有する核酸配列を含むか、若しくは該配列から本質的になるか、若しくは該配列からなる、請求項11に記載の核酸分子。

【請求項13】

第2の核酸配列が、配列番号19、又は300bpの長さにわたるその一部を含むか、又はそれから本質的になるか、又はそれからなる、請求項11又は12に記載の核酸分子。

【請求項14】

終止コドンが、DNA終止コドン：TAG、TAA、及びTGAから選択される、請求項11又は12に記載の核酸分子。

【請求項15】

配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、及び配列番号33のいずれか1つのポリペプチド、又は配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、及び配列番号32にそれぞれ対応するその断片をそれぞれコードする配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、及び配列番号34、又はその多様体のいずれか1つからなる、請求項11～14のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項16】

ベクター、特にプラスミド、更に特に、ファージミド若しくはファージベクターである、又はベクター、特にプラスミド、更に特に、ファージミド若しくはファージベクターに含まれる、又はファージゲノムである、請求項9～15のいずれか一項に記載の核酸分子を包含する核酸分子。

【請求項17】

(1) 請求項11又は12に記載の少なくとも1つの第1の核酸配列又はその多様体、

(2) TAG、TAA、及びTGAから選択される少なくとも1つの終止コドン、並びに

(3) 請求項11又は13に規定する第2の核酸配列、

を(1)、(2)、及び(3)の順で含むか、若しくはそれらから本質的になるか、若しくはそれらからなる核酸分子、又はその多様体を含むpHEN2ファージミドである、請求項16に規定するベクター。

【請求項18】

a) そのポリペプチド配列が、コンセンサス配列XaPDCVTGKVEYTKYNXbXcXdTFXeVKVGDKXfXgXhXiXjXkXlXmLQSLLLSAQITGMTVTIKXnXoXpCHNXqGXrXsXtEVI FR(配列番号2)を含むか、又は該配列から本質的になるか、又は該配列からなり、式中、

Xaは、T、A、又はSから選択され、及び

Xb、Xc、Xd、Xf、Xmは、独立してD、E、又はNから選択され、及び

10

20

30

40

50

Xe、Xi、Xn、Xp、Xtは、独立してT、A、又はSから選択され、及び
 Xgは、L、I、又はVから選択され、及び
 Xhは、F、Y、W、又はAから選択され、及び
 Xjは、N、E、又はSから選択され、及び
 Xkは、R、K、又はEから選択され、及び
 XIは、W、F、Y、又はAから選択され、及び
 Xoは、N、E、D、又はSから選択され、及び
 Xqは、G、A、又はSから選択され、及び
 Xrは、G、A、S、又はTから選択され、及び
 Xsは、F、L、又はYから選択される

10

55～85アミノ酸残基の長さを有するポリペプチドをコードする核酸、又は

b)そのポリペプチド配列が、配列TPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR(配列番号1)と少なくとも75%の同一性を有する、及び/若しくは配列番号1とは1つ以上の保存的アミノ酸置換によって異なる配列を含むか、若しくは該配列から本質的になるか、若しくは該配列からなる55～85アミノ酸残基の長さを有するポリペプチドをコードする核酸、又は

c)そのポリペプチド配列が、a)若しくはb)に定義される配列のいずれか1つの断片、特に少なくとも55アミノ酸残基の連続するアミノ酸残基の断片を含むか、若しくは該断片から本質的になるか、若しくは該断片からなるか、又は55アミノ酸残基の長さにおいてa)若しくはb)に定義される配列のいずれか1つの一部分を含むか、若しくは該部分から本質的になるか、若しくは該部分からなる、55～85アミノ酸残基の長さを有するポリペプチドをコードする核酸

20

を含む発現系であって、

プラスミド、ファージミド、又は発現ベクターのうちの少なくとも1つであり、特に請求項9～16のいずれか一項に記載の核酸分子又は請求項17に記載のベクターを包含する発現系である、発現系。

【請求項19】

プラスミド、ファージミド、又は発現ベクターのうちの少なくとも1つである、請求項9～16のいずれか一項に記載の核酸分子を含む発現系。

【請求項20】

請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項6～8のいずれか一項に記載の融合タンパク質、及び/又は請求項18若しくは19に記載の発現系を含む宿主。

30

【請求項21】

真核細胞又は原核細胞である、請求項20に記載の宿主。

【請求項22】

請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド、及び/又は請求項4若しくは5に記載の5量体アセンブリ、及び/又は請求項6～8のいずれか一項に記載の融合タンパク質をその表面に呈示するウイルス。

【請求項23】

請求項22に記載のウイルスを複数包含するウイルスのライブラリ。

40

【請求項24】

ウイルスがファージである、請求項23に記載のウイルスのライブラリ。

【請求項25】

請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド、及び/又は請求項4若しくは5に記載の5量体アセンブリ、及び/又は請求項6～8のいずれか一項に記載の融合タンパク質をその表面に呈示する繊維状バクテリオファージであって、繊維状バクテリオファージのゲノムが、請求項11～13のいずれか一項に規定する融合遺伝子を含む、繊維状バクテリオファージ。

【請求項26】

STxBサブユニット又はその多様体、特に請求項4又は5に記載の5量体アセンブリをその

50

表面に呈示する、請求項9～16のいずれか一項に記載の核酸分子又は請求項17に記載のベクター、特に請求項11～13のいずれか一項に規定する融合遺伝子を含む核酸分子又はベクターをカプセル化する繊維状バクテリオファージ。

【請求項27】

以下のファージ:f1、fd、及びM13から選択される、請求項25又は26に記載の繊維状バクテリオファージ。

【請求項28】

STxBサブユニット又はその多様体であるポリペプチドを呈示する、請求項25～27のいずれか一項に記載の繊維状バクテリオファージであって、多様体が、請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド若しくはその機能的同等物、及び/又は請求項4若しくは5に記載の5量体アセンブリから選択される、繊維状バクテリオファージ。

10

【請求項29】

呈示されたSTxBサブユニット又はその多様体が、機能的であり、及び/又はファージの表面で5量体構成をとる、請求項28に記載の繊維状バクテリオファージ。

【請求項30】

呈示されたSTxBサブユニット又はその多様体が、Gb3、Gb4、Forssmann様iGb4、フコシル-GM1、GM1、GM2、GD2、グロボ-H、NeuAc-GM3、NeuGc-GM3、GD1a、O-アセチル-GD3、O-アセチル-GD2、O-アセチル-GT3、GD3、及びそれらの混合物から選択される標的に対して結合能を有する、請求項29に記載の繊維状バクテリオファージ。

【請求項31】

呈示されたSTxBサブユニット又はその多様体が、1つのSTxB単量体又はその多様体がp11 Iファージコートタンパク質と融合しており、該STxB単量体又はその多様体が他の4つの遊離のSTxB単量体と共にアセンブルされた形態である、請求項28～30のいずれか一項に記載の繊維状バクテリオファージ。

20

【請求項32】

請求項9～16のいずれか一項に記載の核酸分子若しくは請求項17に記載のベクター、又は請求項25～31のいずれか一項に記載の繊維状バクテリオファージを含む細菌細胞。

【請求項33】

請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項6～8のいずれか一項に記載の融合タンパク質を、請求項9～16のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項17に記載のベクター、又は請求項18若しくは19に記載の発現系を使用する遺伝子組換えによって産生する方法。

30

【請求項34】

繊維状ファージ又はそのライブラリを産生する方法であって、

- a. 1つ以上のベクター、特に請求項16～19のいずれか一項に規定のファージミドを細菌細胞に導入する工程、及び
- b. 工程(a)の細菌細胞を、任意選択でヘルパーファージの存在下で、特にSTxBサブユニット若しくはその多様体をその表面に呈示する繊維状バクテリオファージ又はそのライブラリの産生を可能にする条件下で培養する工程、及び
- c. 任意選択で、産生された繊維状ファージ又はそのライブラリを回収する工程及び/又は産生された繊維状ファージ又はそのライブラリの特定の種を単離する工程を含む、方法。

40

【請求項35】

請求項25～31のいずれか一項に規定の核酸分子、若しくはベクター、若しくは細胞、若しくは繊維状ファージ、又は請求項34に記載の方法によって得ることができる繊維状ファージのライブラリ又はコレクション。

【請求項36】

ファージのライブラリを産生する方法であって、

- a) 核酸を発現するファージミドを含む請求項25～31のいずれか一項に記載のファージを細菌に感染させる工程、又は請求項19に規定する核酸を発現するファージミドで細菌を形

50

質転換する工程、

b)任意選択で、感染させた前記細菌に、融合タンパク質を粒子の表面に呈示する組換えファージミド粒子を産生するために十分な量の、ファージコートタンパク質をコードするヘルパーファージを感染させる工程、

c)請求項1~3のいずれか一項に記載の発現ペプチド、又は請求項4若しくは5に記載の5量体アセンブリ、又は請求項6~8のいずれか一項に記載の融合タンパク質を呈示するファージのライブラリを形成するために適した条件下で形質転換された感染細菌を培養する工程

を含む、方法。

【請求項37】

試料中の分子及び/又は細胞を検出するための、請求項1~3のいずれか一項に記載のポリペプチド、及び/又は請求項4若しくは5に記載の5量体アセンブリ、及び/又は請求項6~8のいずれか一項に記載の融合タンパク質、又は請求項20若しくは21に記載の宿主、又は請求項22に記載のウイルス、又は請求項23若しくは24に記載のウイルスのライブラリのin vitroでの使用。

【請求項38】

分子がグリコフィンゴ脂質である、請求項37に記載のin vitroでの使用。

【請求項39】

請求項22に記載のウイルスのグリコフィンゴ脂質に対する特異性を決定する方法。

【請求項40】

請求項39に記載のウイルスのグリコフィンゴ脂質に対する特異性を決定する方法であって、

e)請求項22に記載のウイルスと、その表面にグリコフィンゴ脂質を含む支持体とを接触させる工程、

f)ウイルスと、その表面に存在するグリコフィンゴ脂質を含む支持体とをインキュベートして、ウイルスをグリコフィンゴ脂質に結合させる工程、

g)インキュベートした表面を洗浄して、非結合ウイルスを除去する工程、及び

h)グリコフィンゴ脂質に結合したウイルスを回収する工程

を含む、方法。

【請求項41】

標的として特定のグリコフィンゴ脂質若しくはその多様体、又は複数のグリコフィンゴ脂質若しくはその多様体の混合物に結合する、特に特異的に結合するSTxBサブユニット又はその多様体を呈示する1つ以上の繊維状ファージ、特に請求項1~3のいずれか一項に記載のポリペプチド、及び/又は請求項4若しくは5に記載の5量体アセンブリ、及び/又は請求項6~8のいずれか一項に記載の融合タンパク質を呈示する繊維状ファージを同定する方法であって、

a. 特に標的との結合を可能にする条件下で、請求項25~31のいずれか一項に記載の繊維状バクテリオファージの複数を含む繊維状バクテリオファージのライブラリ、又は請求項35に記載の繊維状ファージのライブラリに、支持体に呈示される1つ以上のグリコフィンゴ脂質若しくはその多様体を接触させる工程であって、支持体が例えば1つ以上のグリコフィンゴ脂質若しくはその多様体をその表面に発現する細胞、又は1つ以上のグリコフィンゴ脂質若しくはその多様体を提示する単層小胞若しくはリポソーム、特に磁気粒子が組み込まれ、1つ以上のグリコフィンゴ脂質若しくはその多様体を提示する単層小胞若しくはリポソームである、工程、並びに

b. 標的に結合する繊維状バクテリオファージを、標的に結合しない繊維状バクテリオファージから、例えば洗浄によって分離する工程、並びに

c. 標的に結合した繊維状ファージを回収する工程、並びに

d. 任意選択で、標的に結合した繊維状ファージを分析する工程、並びに/又は回収された繊維状ファージの核酸内容物の少なくとも一部の配列、及び/若しくは前記回収された繊維状ファージによって呈示されるSTxBサブユニット若しくはその多様体の少なくとも

10

20

30

40

50

一部の配列、特にSTxBサブユニット単量体若しくはその多様体の配列、更に特に、標的との結合に關与する領域における前記配列を決定する工程を含む、方法。

【請求項42】

工程a)~c)が、前回の繰り返しの工程c)において回収された繊維状ファージを、それに続く工程a)を行うために使用して、複数回、例えば2、3、4、又は5回繰り返される、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

工程a)~c)が複数回繰り返され、複数のグリコフィンゴ脂質又はその多様体の混合物を標的として使用して少なくとも1回行われ、前記混合物が、それに対して繊維状ファージがその後の繰り返しにおいてスクリーニングされる所望の標的を構成する特定のグリコフィンゴ脂質又はその多様体に関して枯渇されている、請求項41又は42に記載の方法。

10

【請求項44】

標的が、例えば、Gb3、Gb4、Forsmann様iGb4、フコシル-GM1、GM1、GM2、GD2、グロボ-H、NeuAc-GM3、NeuGc-GM3、GD1a、O-アセチル-GD3、O-アセチル-GD2、O-アセチル-GT3、GD3、及びそれらの混合物から選択される特定のグリコフィンゴ脂質又はその多様体である、請求項41~43のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

請求項41~44のいずれか一項に規定する工程c)から回収した繊維状ファージを分析する工程を含む、標的としての特定のグリコフィンゴ脂質若しくはその多様体、又は複数のグリコフィンゴ脂質若しくはその多様体の混合物に結合する、特に特異的に結合するSTxBサブユニット又はその多様体を同定する方法。

20

【請求項46】

医薬として使用するための、請求項1~3のいずれか一項に規定のSTxBサブユニット若しくはその多様体、及び/若しくは請求項4若しくは5に記載の5量体アセンブリをその表面に呈示する繊維状バクテリオファージ、又は請求項25~31のいずれか一項に記載の繊維状バクテリオファージ。

【請求項47】

卵巣がん、乳癌、結腸がん、胃腺癌、パーキットリンバ腫、結腸癌、黒色腫、小細胞肺癌(SCLC)、腎臓癌、神経芽腫、子宮頸癌、膠芽腫、腎臓癌、神経膠腫、網膜芽腫、神経外胚葉性がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、ウィルムス腫瘍、骨肉腫、及びt-All状態から選択される1つ以上の新生物状態、特に1つの新生物状態に罹患している患者の処置に使用するための、請求項46に記載の繊維状バクテリオファージ。

30

【請求項48】

グリコフィンゴ脂質又はその多様体をin vitroで検出するためのプローブ又はマーカーとしての、請求項1~3のいずれか一項に規定のSTxBサブユニット若しくはその多様体、及び/又は請求項4若しくは5に記載の5量体アセンブリをその表面に呈示する標識繊維状バクテリオファージ、又は請求項25~32のいずれか一項に規定の繊維状バクテリオファージの使用。

【請求項49】

医薬として使用するための、請求項4又は5に記載の5量体アセンブリ。

40

【請求項50】

卵巣がん、乳癌、結腸がん、胃腺癌、パーキットリンバ腫、結腸癌、黒色腫、小細胞肺癌(SCLC)、腎臓癌、神経芽腫、子宮頸癌、膠芽腫、腎臓癌、神経膠腫、網膜芽腫、神経外胚葉性がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、ウィルムス腫瘍、骨肉腫、及びt-All状態から選択される1つ以上の新生物状態、特に1つの新生物状態に罹患している患者の処置における請求項49に記載の5量体アセンブリ。

【請求項51】

請求項1~3のいずれか一項に記載のポリペプチドと、その末端の1つに融合された化合物とを含むキメラタンパク質。

50

【請求項52】

医薬として使用するための、請求項51に記載のキメラタンパク質。

【請求項53】

グリコスフィンゴ脂質が異常調節されている疾患の処置のため、並びに/又は卵巣がん、乳癌、結腸がん、胃腺癌、パーキットリンパ腫、結腸癌、黒色腫、小細胞肺癌(SCLC)、腎臓癌、神経芽腫、子宮頸癌、膠芽腫、腎臓癌、神経膠腫、網膜芽腫、神経外胚葉性がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、ウィルムス腫瘍、骨肉腫、及びt-All状態から選択される1つ以上の新生物状態、特に1つの新生物状態に罹患している患者の処置において、医薬として使用するための請求項51に記載のキメラタンパク質。

【請求項54】

In vitro又はex vivoでの診断法における、請求項1~3のいずれか一項に記載のポリペプチド、及び/又は請求項4若しくは5に記載の5量体アセンブリ、及び/又は請求項6~8のいずれか一項に記載の融合タンパク質、又は請求項20若しくは21に記載の宿主、又は請求項22に記載のウイルス、又は請求項23若しくは24に記載のウイルスのライブラリの使用。

【請求項55】

グリコスフィンゴ脂質が異常調節されている疾患、並びに/又は卵巣がん、乳癌、結腸がん、胃腺癌、パーキットリンパ腫、結腸癌、黒色腫、小細胞肺癌(SCLC)、腎臓癌、神経芽腫、子宮頸癌、膠芽腫、腎臓癌、神経膠腫、網膜芽腫、神経外胚葉性がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、ウィルムス腫瘍、骨肉腫、及びt-All状態から選択される疾患を検出するin vitroでの方法における、請求項1~3のいずれか一項に記載のポリペプチド、及び/又は請求項4若しくは5に記載の5量体アセンブリ、及び/又は請求項6~8のいずれか一項に記載の融合タンパク質、又は請求項20若しくは21に記載の宿主、又は請求項22に記載のウイルス、又は請求項23若しくは24に記載のウイルスのライブラリの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペプチド、そのようなペプチドを発現する宿主、並びにそのようなペプチド又は宿主を産生及びスクリーニングするプロセスに関する。本発明はまた、疾患の検出におけるペプチド又はそのようなペプチドを発現する宿主の使用にも関する。

【0002】

本発明はまた、宿主のライブラリ、特にペプチドを呈示するファージのライブラリを構築する方法にも関する。

【0003】

本発明はまた、繊維状バクテリオファージの分野にも関し、特に少なくとも1つで最大5つのSTxBサブユニット又はその多様体をその表面に呈示する綿密に設計された繊維状バクテリオファージに関する。従って、本発明はまた、ペプチドを発現する宿主のライブラリ、及び例えば疾患の処置における試料中の分子及び/又は細胞を検出するためのその使用にも関する。

【0004】

本発明はまた、ベクター、特にプラスミド、更に特に、ファージミド又はファージベクターを含む、そのようなファージの産生を可能にするために適した核酸分子にも関する。細菌細胞、ライブラリ、及び繊維状ファージ又はそのライブラリを産生する方法もまた、本発明の一部である。

【0005】

本発明の特定の態様は、標的として特定のグリコスフィンゴ脂質若しくはその多様体、又は幾つかのグリコスフィンゴ脂質若しくはその多様体の混合物に結合する、特に特異的に結合する、1つの(すなわち、少なくとも1つの)STxBサブユニット又はその多様体を呈示する1つ又は複数の繊維状ファージを同定する方法に関する。

【0006】

従って、本発明はまた、新規の治療的に活性なツールのスクリーニング方法の分野、更

10

20

30

40

50

に特に、研究及び医学応用のために特定のタンパク質に適合させたファージディスプレイ技術にも関する。本発明はまた同時に、新規治療標的の決定を可能にするスクリーニング方法の分野にも関する。そのような達成を可能にする手段もまた、本発明の一部である。

【0007】

本発明はまた最終的に、医薬として使用するための本発明の繊維状バクテリオファージ、及びグリコスフィンゴ脂質又はその多様体の *in vitro*での検出のためのプローブ又はマーカーとしての標識された繊維状バクテリオファージの使用にも関する。

【0008】

本発明は、処置のためであるか診断目的のためであるかによらず、治療分野に応用される。

10

【0009】

以下の説明において、角括弧([])の間の言及は、本文の末尾に示す参考文献の一覧を指す。

【背景技術】

【0010】

がんは、依然として最も一般的な悪性疾患であり、西欧世界における死因の第2位である。早期検出は、治癒的がん治療にとって、及びがんの死亡率の減少の達成にとって必須である。

【0011】

多くの異なるタイプのプロセス及び技術が、がんを検出するために使用されている。がんの検出のために使用されるプロセス/技術は、人の年齢、医学的状态、疑われるがんのタイプ、症状の重症度、及び過去の検査結果等の多くのパラメータに依存する。ほとんどのがんにとって一般的なプロセスは、例えば、がんの診断を明白に決定する生検の採取、核磁気共鳴画像法(MRI)、組織中の腫瘍を明らかにするための音波検査又は超音波検査を含む。直腸、結腸、及び子宮のがんを標的とする場合、異常を明らかにするための造影剤としてのバリウム及びX線、直腸指診(DRE)、又はS字結腸鏡を使用する。骨、骨髄、又は血液細胞を標的とする場合、骨髄吸引及び生検、骨スキャニング、コンピューター断層撮影(CT)スキャンを使用する。消化管を標的とする場合、内視鏡、結腸鏡、上部消化管内視鏡を使用し、及び例えば乳房を標的とする場合、乳房のMRI及びマンモグラフィーを使用する。

20

30

【0012】

他の技術は、がんを有する人の血液、尿、又は体組織中で正常レベルより高いレベルで見出される物質に基づく。これらの技術は、がんの有無と相関しうる「バイオマーカー」を使用する。

【0013】

しかし、使用される技術/プロセスは、生検を除き、単独ではがんのタイプを明白且つ具体的に直接決定することはできず、他の方法を組み合わせる使用することによって確認する必要がある。特に、バイオマーカー単独では、がんを診断するためにはしばしば不十分である。例えば、急性白血病の場合、全血球数(CBC)を特に正確に測定することができず、そのため診断を確立することが非常に難しくなり、診断を可能にするのは骨髄生検のみである。このため、がん及び/又は疾患を明白に決定するために要する時間は、実行すべき試験の数により増加する。早期検出は、治癒的がん治療にとって、及びがんの死亡率の減少の達成にとって必須であることから、がんのより効率的及び/又は正確な診断を可能にする方法及び/又は化合物を発見することは真に必要である。

40

【0014】

他の多くの疾患と同様に、より良好な又はより迅速な診断方法が必要である。

【0015】

従って、がんのより効率的及び/又は正確な診断及び/又は処置を可能にする方法及び/又は化合物を発見することが真に必要である。特に、疾患のより早期の検出及び/又は決定及び/又は治療標的化を可能にする方法及び/又は化合物を発見することが真に必要であ

50

る。

【0016】

がんが検出されると、より良好若しくは迅速な処置を発見すること、及び/又は公知の処置を改善するための手段もまた明らかに必要である。処置の方法は、例えば、可能であれば、化学療法及び/又は放射線療法、免疫療法、標的化治療、又はホルモン療法と共に腫瘍を除去する手術を含む。同様に、例えば白血病の場合、化学療法及び/又は放射線療法、及び/又は必要であれば及び可能であれば骨髄移植を含みうる。

【0017】

がんの処置に使用される最も一般的な薬物は、殺滅又は細胞分裂の防止によって作用する細胞傷害薬である。しかし、そのような薬物は、活発に分裂する細胞の割合が高い非がん様組織又は臓器、例えば骨髄、毛包、消化管に損傷を与えることから、問題のある副作用を有し、それによって薬物投与の許容可能な量及び回数が制限される。加えて、細胞傷害薬の副作用はまた、患者の処置の服薬遵守に影響を及ぼしうる及び/又は服薬遵守を低減させうる。従って、がんの処置における重要な改善は、腫瘍細胞に対してより特異的な薬物、及び/又は細胞傷害性化合物及び/又は薬物を腫瘍細胞に標的化することができる手段を発見することである。

10

【0018】

従って、細胞傷害性化合物の公知の副作用を低減/除去するために、腫瘍細胞を特異的に標的とし、及び/又は細胞傷害化合物の腫瘍細胞への送達を改善する手段及び/又は薬物を発見することが真に必要である。

20

【0019】

特定の組織及び/又は細胞に化合物を標的化する幾つかの手段が、既に公知であるか、又は使用されている。大抵の場合、標的は、タンパク質並びに/又は組織及び/若しくは細胞によって発現される他の分子である。例えば、モノクローナル抗体に共役させた薬物は、対応する抗原を発現する細胞及び/又は組織に薬物を標的化するために使用される。抗原はしばしば、疾患のバイオマーカー又は複数のバイオマーカーである。しかし、モノクローナル抗体には結合限度があり、モノクローナル抗体の特異性及び選択性は、グリコスフィンゴ脂質等の抗原に関しては多様でありうる。

【0020】

従って、細胞傷害性化合物の腫瘍細胞への送達を改善して細胞傷害性化合物の公知の副作用を低減/除去するために、グリコスフィンゴ脂質等の特定のバイオマーカーのより良好な標的化を可能にする、及び/又は標的化することができる手段及び/又は薬物を発見することは真に必要である。

30

【0021】

志賀毒素ファミリーに関係するタンパク質は、グリコスフィンゴ脂質を標的とすることが知られている。

【0022】

志賀毒素ファミリーメンバー、すなわち本明細書におけるいわゆる志賀毒素及び志賀様毒素は、志賀赤痢菌(*Shigella dysenteriae*)及び大腸菌(*Escherichia coli*)腸管出血(EHEC)株によって産生される。これらの毒素は、2つの非共有結合部分:酵素的に活性なAサブユニット、及び非毒性の5量体Bサブユニット(STxB)で構成される。志賀毒素ファミリーメンバーは、構造的及び機能的に関連する外毒素を包含し、これには、特にJohannes and Romer, *Nat Rev Microbiol.* 2010 Feb;8(2):105~16頁. doi: 10.1038/nrmicro2279. Epub 2009年12月21日に詳述される、志賀赤痢菌血清型1からの志賀毒素及び大腸菌腸管出血株によって産生される志賀毒素が挙げられる。この刊行物は、公知のStx1及びStx2多様体についての説明を提供している。特にJohannes and Romer、2010年の表1は、例えばStx1及びStx2多様体を包含する、志賀毒素とEHEC産生志賀様毒素との間の配列類似性の比較を提供している。注目すべきことに、Stx2多様体は、Stx2と84~99%相同であるが、これらの毒素は、志賀毒素とは多くて53%の同一性を共有するに過ぎない。これに対し、本発明は、基準配列とされるいわゆるSTx1B多様体(NCBI参照配列GenBank:ABR10023.1として同定さ

40

50

れる)を基準にして解釈される。このデータベース登録のSTx1B多様体は、そのN末端部で融合されたペプチドシグナルを包含することが観察されている(本明細書において配列番号13と呼ぶ)。

【0023】

志賀毒素ファミリーメンバーは、AB₅分子構成を有する。酵素的に活性な単量体AサブユニットであるSTxA(分子量32kDaを有する)は、同様に本明細書においてBサブユニットを形成する単量体、STxBと呼ばれる同一のB断片(各々のB断片は、分子量7.7kDaを有する)の5量体に非共有結合によって会合しており、STxBは、5量体形態で細胞表面受容体に対する結合に関与している。STxBは、その中にSTxAのカルボキシル末端が挿入される中心コアを有するドーナツ形状の構造を形成する。

10

【0024】

最初に同定されたSTxB部分は、N. A. Stockbine, M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes, A. D. O'Brien, *J Bacteriol* 170,1116~22頁(1988)によって報告され、標的細胞の細胞膜上に見出されるグリコスフィンゴ脂質グロボトリアオシルセラミド(CD77、Gb3、及びセラミドトリヘキソシドという名称でも知られている)の糖部分に特異的に結合し、これは結合すると毒素の取り込み及び細胞内輸送を媒介する。志賀毒素は、クラスリン依存的及び非依存的エンドサイトーシスによって内部移行した後、逆行性経路に従って小胞体に輸送される。

【0025】

Brayら、*Current Biology* Vol 11 No 9, 697~701頁, 2001は、志賀様毒素1(SLT-1)のBサブユニットが、溶液中で自然に5量体を形成する69アミノ酸残基で構成される低分子タンパク質であることを報告している。野生型毒素に対して耐性である細胞株を殺滅することができる毒素変異体を同定するために、変更された受容体特異性を有する毒素多様体のコンビナトリアルライブラリを作製することがBrayらによって提唱されている。しかし、Brayらは、Gb3に対してもはや特異的ではないSTxB多様体の単離に成功したが、彼らはその標的を同定することができなかった。Brayらの著者は、出発配列に関してわずか9個のアミノ酸位置を変異させることによって縮重SLT-1ライブラリを産生したことが観察されている。これは多様体SLT-1配列の変動の全ての可能性を包含していないが、本発明の本発明者らが更に評価したところ、同じ機能的特性を保持している。本発明はまた、この起こり得る変動を更に定義し、精密化する。同様にBrayらの著者が、基準配列とされるSLT-1の15位及び/又は19位で見出されるアミノ酸を必ず変異させたことも観察されている。

20

30

【0026】

Lingら、1998, *Structure of the Shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. Biochemistry*, 37(7), 1777~1788頁は、STxB部分のGb3結合部位の特定の変異が、タンパク質の三次元構造を乱すことなく、このGSLに関するSTxBの親和性を消失させうるか、又はかなり減少させうることを観察した。このように、STxBの構造には、結合部位配列のわずかな修飾を可能にしている程度の柔軟性が存在する。

【0027】

志賀毒素ファミリーメンバーのほとんどのBサブユニット(STxB)は、それがStx1に関連するかStx2に関連するかによらず、グリコスフィンゴ脂質Gb3に特異的に結合することが知られているが、ある特定の腫瘍細胞において過剰発現されることが証明されている特定のタイプの脂質であるが、優先的にGb4に結合するSTxBファミリーの天然の多様体である、いわゆるSLT-IIe B部分は例外である(同様に、上記で引用したJohannesら、2010を参照されたい)。

40

【0028】

2つの研究から、SLT-IIe B足場の特異性を変化させることが可能であることが示されている。Lingら、2000, *A mutant Shiga-like toxin IIe bound to its receptor Gb3: structure of a group II Shiga-like toxin with altered binding specificity. Structure*, 3, 253~264頁は、その特異性をGb4からGb3に変化させるSLT-IIe B多様体の変異に成

50

功したことを報告した。同様に、Boydら、1993, Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters in vivo tissue targeting and results in a verotoxin 1-like disease in pigs. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(6), 1745 ~ 1753頁は、GSLの結合特異性をGb4からGb3に変換するためにSLT-IIe B多様体のGln64位及びLys66位で特異的に部位特異的変異誘発を使用した。以前に、Tyrrellら、PNAS USA 89 524 ~ 528頁(「Alteration of the carbohydrate binding specificity of verotoxins from Galalpha1-4Gal to GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Gal and vice versa by site-directed mutagenesis of the binding subunit」)の著者は、Gb4特異性に向けて変異させたGb3特異的多様体を記載した。

【0029】

しかし、先行技術は、結合部位に関係する全ての位置が修飾され、且つ結合部位に関係する位置のみが修飾されており、そのようなSTxB単量体の構造及びオリゴマー化特性を適切に維持することができる残った足場を伴う変異STxB配列を考案する方法に関して述べていない。

【0030】

先行技術はまた、本明細書に考察される適切な機能的特性(結合特性、親和性、又は内部移行特性等)を保持する5量体構造の更なる産生を可能にする変異STxB配列を考案する方法に関して述べていない。

【0031】

従って、実際に変異させることができ、おそらく新規標的特異性を付与することができるSTxBの可能性のある位置を定義する必要がなおも存在し、このことは、他の炭水化物との新規相互作用を保証するように野生型と比較して化学環境を変化させる新規結合部位腔の作製を意味する。

【0032】

Gb3は、ある特定の腫瘍細胞上に過剰発現されることが証明されているタイプの脂質であることから、例えば国際公開第02/060937号及び国際公開第2004/016148号に開示されるように、それに従って腫瘍標的化のためのベクターとしてのSTxBの使用が提唱されている。これらの開示に報告されているように、汎用担体としていわゆるSTxBベクターを使用すると、すなわちSTxBを抗原又は活性成分に共役させる場合、前記ベクター及び共役した活性な部分をGb3提示細胞に内部移行させることができるという利点があり、これは、細胞傷害性化合物の特異的細胞内送達にとって非常に興味深い(Johannes & W. Romer, *Nature Reviews Microbiology* 8, 105 ~ 116頁, 2010)。

【0033】

複数の細胞傷害性化合物(例えば、トポイソメラーゼI阻害剤SN38(El Alaouiら、2007 *S higa toxin-mediated retrograde delivery of a topoisomerase I inhibitor prodrug. Angewandte Chemie - International Edition*, 46(34), 6469 ~ 6472頁)、ベンゾジアゼピンR05-4864(El Alaouiら、2008 *Synthesis and properties of a mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor conjugate. ChemMedChem*, 3(11), 1687 ~ 1695頁)、及び非常に強力なアウリスタチン誘導体(Batissimeら、2015 *A new delivery system for auristatin in STxB-drug conjugate therapy. European Journal of Medicinal Chemistry*, 95, 483 ~ 491頁)へのSTxBの化学的共役が行われている。トランスジェニックマウスモデルにおいて、STxBは、経口での取り込み又は静脈内注射後に消化管のGb3発現自然発生腺癌を標的とすることが示された(Janssenら、2006 *In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. Cancer Research*, 66(14), 7230 ~ 7236頁)。次に、STxBを送達ツールとして使用するというコンセプトを、ヒト結腸直腸癌に拡大した。外科試料からの腫瘍腸細胞の初代培養は、STxBによって標的化され(Falguieresら、2008 *Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. Molecular Cancer Therapeutics*, 7(8), 2498 ~ 2508頁)、タンパク質もまた、マウスにおける一次ヒト腫瘍の異種移植片によって効率的に組み込まれる(Vielら、2008 *In vivo tumor targeting by the B subunit o*

10

20

30

40

50

f shiga toxin. *Molecular Imaging*, 7(6), 239~47頁)。しかし、マウスでは、上記のコンジュゲートに関して治療応答は得られなかった。Gb3はまた、腎臓によって主に発現されることから、可能性がある説明は、治療効果が、ベクターの用量制限細胞毒性のために達成できなかったという点である。

【0034】

実際に、残念なことに、Gb3は、健康な組織、特に腎臓においても高度に発現され、このことはSTxB-薬物コンジュゲートによって患者を処置する場合、副作用のリスクをかなり増加させる。他方で、他の種のグリコスフィンゴ脂質(例えば、例を挙げれば、いわゆるGb4、Forsmann様iGb4(Forsmann like iGb4)、フコシル-GM1、GM1、GM2、GD2、グロボ-H、NeuAc-GM3、NeuGc-GM3、GD1a、O-アセチル-GD3、O-アセチル-GD2、O-アセチル-GT3、GD3)が、がん治療の有望な標的として同定されている。

10

【0035】

これらの事実に基づき、特にある特定の特異性で特定のがん又はがん様組織における発現を見出すことができる、特にGb3とは異なるグリコスフィンゴ脂質の特定の明白な及び/又は多様体種の同定を可能にする研究ツールの開発が疑う余地なく必要である。

【0036】

これに関連して、本発明の別の目的は、おそらく多様な腫瘍タイプ及びプロファイルにより、新規治療ツールによって腫瘍細胞の非常に特異的且つ適切な標的化を可能にする方法及びツールを考案することである。

【0037】

これは、本発明者らが、真に腫瘍特異的なGSLに対するその特異性を誘導するという見通しを考慮して送達ツールとしてのその潜在性から恩典を得るために、その本質の洗練された及び注意深い定義を通してSTxB足場の工学操作を提唱した理由である。

20

【0038】

良好に確立されたファージディスプレイ技術により、バクテリオファージに呈示されたタンパク質候補体のスクリーニングが可能となる。このファージでの呈示により、大きい変異体ライブラリからの、特異的標的に対しておそらく高い親和性を有するタンパク質候補体の選択及び単離が可能となる。ファージディスプレイは、臨床応用に達した中でも、大きく最適化されており、抗体、低分子抗体(scFv、VHHナノボディ)、及び非抗体ベースの足場の他のライブラリ(T. Heyら、*Trends in Biotechnology*, 2005を参照されたい)の選択に使用され、成功している。

30

【0039】

しかし、それがGb3であるか別のグリコスフィンゴ脂質であるかによらず、グリコスフィンゴ脂質に対して高い親和性を有する抗体又は他のタンパク質を得ることはなおも難題であることを認識し得る。

【0040】

本明細書に報告した実験より以前に、本発明の本発明者らは、特にGb3⁺細胞株(その表面にGb3を呈示するGb3陽性細胞株)を使用するファージディスプレイ選択によってGb3特異的ナノボディを選択する試みに失敗している。実際に、3ラウンドの選択後、選択されたファージは、グリコスフィンゴ脂質に対して特異的ではなかった。これはまた更に、グリコスフィンゴ脂質種の同定を可能にする適当なツールを得るための代替の選択戦略の必要性及びそれらの定義に関連する難しさを強調している。

40

【0041】

志賀毒素の構造の独自性に目を向けると、全ての志賀毒素ファミリーメンバーは、AB₅分子構成をとる(上記及びJohannes & W. Romer, *Nature Reviews Microbiology* 8, 105~116頁, 2010の図1aを参照されたい)。STxBは、その中にSTxAのカルボキシル末端が挿入される中心コアを有するドーナツ形状の構造を形成するが、STxAの非存在下でも、STxBはなおも受容体結合におけるホロ毒素と機能的に同等である5量体構造をとることに注目すべきである(Johannes & W. Romer, *Nature Reviews Microbiology* 8, 105~116頁, 2010)。

【先行技術文献】

50

- 【特許文献】
 【0042】
 【特許文献1】国際公開第02/060937号
 【特許文献2】国際公開第2004/016148号
 【非特許文献】
 【0043】
 【非特許文献1】Johannes and Romer, *Nat Rev Microbiol.* 2010 Feb;8(2):105 ~ 16頁.
 doi: 10.1038/nrmicro2279. Epub 2009年12月21日
 【非特許文献2】N. A. Stockbine, M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes, A. D. O'Brien, *J Bacteriol* 170,1116 ~ 22頁(1988) 10
 【非特許文献3】Brayら、*Current Biology* Vol 11 No 9, 697 ~ 701頁, 2001
 【非特許文献4】Lingら、1998, Structure of the Shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry*, 37(7), 1777 ~ 1788頁
 【非特許文献5】Lingら、2000, A mutant Shiga-like toxin IIe bound to its receptor Gb3: structure of a group II Shiga-like toxin with altered binding specificity. *Structure*, 3, 253 ~ 264頁
 【非特許文献6】Boydら、1993, Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters in vivo tissue targeting and results in a verotoxin 1-like disease in pigs. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(6), 1745 ~ 1753頁 20
 【非特許文献7】Tyrrellら、*PNAS USA* 89 524 ~ 528頁("Alteration of the carbohydrate binding specificity of verotoxins from Galalpha1-4Gal to GalNAcbeta1-3Galalpha1-4Gal and vice versa by site-directed mutagenesis of the bindingサブユニット")
 【非特許文献8】Johannes & W. Romer, *Nature Reviews Microbiology* 8, 105 ~ 116頁, 2010
 【非特許文献9】El Alaouiら、2007 Shiga toxin-mediated retrograde delivery of a topoisomerase I inhibitor prodrug. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46 (34), 6469 ~ 6472頁
 【非特許文献10】El Alaouiら、2008 Synthesis and properties of a mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor conjugate. *ChemMedChem*, 3(11), 1687 ~ 1695頁 30
 【非特許文献11】Batisseら、2015 A new delivery system for auristatin in STxB-drug conjugate therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 95, 483 ~ 491頁
 【非特許文献12】Janssenら、2006 In vivo tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. *Cancer Research*, 66(14), 7230 ~ 7236頁
 【非特許文献13】Falguieresら、2008 Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(8), 2498 ~ 2508頁
 【非特許文献14】Vielら、2008 In vivo tumor targeting by the Bサブユニット of shiga toxin. *Molecular Imaging*, 7(6), 239 ~ 47頁
 【非特許文献15】T. Heyら、*Trends in Biotechnology*, 2005 40
 【非特許文献16】Smith & Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482頁(1981)
 【非特許文献17】Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443頁(1970)
 【非特許文献18】Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444頁(1988)
 【非特許文献19】Altschulら、*J. Mol. Biol.* 215: 403 ~ 410頁(1990)
 【非特許文献20】Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915頁(1989)
 【非特許文献21】Dufresneら、*Nature Biotechnology*, Vol. 20, Dec 2002, 1269 ~ 1271頁
 【非特許文献22】<http://www.lipidmaps.org/data/structure/LMSDSearch.php?Mode=SetupTextOntologySearch> 50

- 【非特許文献 2 3】Sudら、(2007). LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1), 527 ~ 532頁. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl838>
- 【非特許文献 2 4】「Pathogenesis of Shigella Diarrhea: Rabbit Intestinal Cell Microvillus Membrane Binding Site for Shigella Toxin」; Fuchs, G., Mobassaleh, M., Donohue-Rolfe, A., Montgomery, R. K., Gerard, R. J., and Keusch, G. T. (1986) *Infect. Immun.* 53, 372 ~ 377頁
- 【非特許文献 2 5】; 「Interaction of the Shiga-like Toxin Type 1 Bサブユニット with Its Carbohydrate Receptor」、St. Hilaire, P. M., Boyd, M. K., and Toone, E. J. (1994) *Biochemistry* 33, 14452 ~ 14463頁
- 【非特許文献 2 6】Gallegosら、「Shiga Toxin Binding to Glycolipids and Glycans」、*PLoS ONE* 7(2): e30368 10
- 【非特許文献 2 7】Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 4.17.
- 【非特許文献 2 8】Goeddel; *GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)
- 【非特許文献 2 9】D Bouardら、「Viral vectors : from virology to transgene expression」、*Br J Pharmacol.* 2009 May; 157(2): 153 ~ 165頁
- 【非特許文献 3 0】Vieira and Messing, 1987 Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1987;153:3 ~ 11頁
- 【非特許文献 3 1】Zacherら、*Gene*, 1980, 9, 127 ~ 140頁 20
- 【非特許文献 3 2】N.V. Tikunova and V.V. Morozova, *Acta Naturae.* 2009 Oct; 1(3): 20 ~ 28頁
- 【非特許文献 3 3】Ronald L Schnarrら、*Essentials of Glycobiology*. 2nd edition, Chapter 10 Glycosphingolipids
- 【非特許文献 3 4】http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/Nonsense_suppressor
- 【非特許文献 3 5】<http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/rev-sup/nonsense-suppressors.html>
- 【非特許文献 3 6】Bonnycastleら、*J. Mol. Biol.*, (1996), 258:747 ~ 762頁
- 【非特許文献 3 7】Vaughanら、*Nature Biotechnology* (1996), 14:309 ~ 314頁
- 【非特許文献 3 8】Dowerら、1988, *Nucleic Acids Research*, 16:6127 ~ 6145頁 30
- 【非特許文献 3 9】Ronald L Schnarrら、*Essentials of Glycobiology*. 2nd edition, Chapter 10 Glycosphingolipid
- 【非特許文献 4 0】Jonesら、(2016). Targeting membrane proteins for antibody discovery using phage display. *Scientific Reports*, 6(1), 26240
- 【非特許文献 4 1】Mirzabekov, Kontos, Farzan, Marasco, & Sodroski, 2000
- 【非特許文献 4 2】Carlssonら、1978. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem. J.* 173:723 ~ 737頁
- 【非特許文献 4 3】P. Schelteら、「Differential Reactivity of Maleimide and Bromoacetyl functions with Thiols: Application to the Preparation of Liposomal Display Constructs」、*Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2297 ~ 2308頁 40
- 【非特許文献 4 4】「Functional analysis of the Shiga toxin and Shiga-like toxin type II variant binding subunits by using site-directed mutagenesis.」、Jackson M.P., Wadolowski E.A., Weinstein D.L., Holmes R.K., O'Brien A.D. *J. Bacteriol.* 172:653 ~ 658頁(1990)
- 【非特許文献 4 5】Clark C., Bast D.J., Sharp A.M., St Hilaire P.M., Agha R., Stein P.E., Toone E.J., Read R.J., Brunton J.L, 「Phenylalanine 30 plays an important role in receptor binding of verotoxin-1」、*Mol. Microbiol.* 19:891 ~ 899(1996)
- 【非特許文献 4 6】Perera L.P., Samuel J.E., Holmes R.K., O'Brien A.D. 「Identification of three amino acid residues in the B subunit of Shiga toxin and Shiga-like 50

e toxin type II that are essential for holotoxin activity.」、J. Bacteriol. 173: 1151 ~ 1160頁(1991)

【非特許文献47】Jemal C., Haddad J.E., Begum D., Jackson M.P. 「Analysis of Shiga toxin subunit association by using hybrid A polypeptides and site-specific mutagenesis.」、J. Bacteriol. 177:3128 ~ 3132頁(1995)

【非特許文献48】Bast D.J., Banerjee L., Clark C., Read R.J., Brunton J.L. 「The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the Verotoxin 1 B subunit.」、Mol. Microbiol. 32:953 ~ 960頁(1999)

【非特許文献49】Rondot, Koch, Breitling, & Dubel, 2001

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0044】

本発明者らは、STxBがグリコスフィンゴ脂質の天然に選択された結合体であるという事実に依拠することを提唱した。これまで、STxB多様体(活性化合物として作用し易い)と多様なGSLとのマッチする会合を発見するという見通しをもったファージディスプレイ技術の実施の達成に成功した研究者はいない。

【0045】

本明細書に報告した実験は、上記で要約した障壁を克服するための革新的な戦略及び手段の定義を可能にした。それらは、STxBタンパク質の特定の性質を考慮に入れ、意外にも成功することが証明された、具体的に実行された実験に依拠する。

【0046】

概念実証として、本発明者らは、STxB部分の機能的完全性を保存しながら、M13バクテリオファージ上にいわゆるSTxBタンパク質及びSTxBタンパク質変異体を呈示することに成功した。それによって本発明者らは、上記の必要性に取り組むために具体的に適合させたスクリーニング戦略を定義し、グリコスフィンゴ脂質結合特性を維持する幾つかの変異体を同定することができた。本発明の一部として、本発明者らはまた、当技術分野で公知のSTxB足場のモデル及びこれをもたらしことができる可能性がある変化形態も精密化した。

【課題を解決するための手段】

【0047】

従って、本発明は、55~85アミノ酸残基の長さを有するポリペプチドであって、

a) そのポリペプチド配列が、コンセンサス配列: XaPDCVTGKVEYTKYNXbXcXdTFXeVKVGDkXfXgXhXiXjXkXlXmLQSLLSAQITGMTVTIKXnXoXpCHNXqXrXsXtEVI FR(配列番号2)を含むか、若しくはから本質的になるか、若しくはからなり、式中

Xaは、T、A、若しくはSから選択され、及び

Xb、Xc、Xd、Xf、Xmは、独立してD、E、若しくはNから選択され、及び

Xe、Xi、Xn、Xp、Xtは、独立してT、A、若しくはSから選択され、及び

Xgは、L、I、若しくはVから選択され、及び

Xhは、F、Y、W、若しくはAから選択され、及び

Xjは、N、E、若しくはSから選択され、及び

Xkは、R、K、若しくはEから選択され、及び

Xlは、W、F、Y、若しくはAから選択され、及び

Xoは、N、E、D、若しくはSから選択され、及び

Xqは、G A、若しくはSから選択され、及び

Xrは、G、A、S、若しくはTから選択され、及び

Xsは、F、L、若しくはYから選択され、

特に但し、XaがT若しくはAである場合、Xb、Xc、XdはDではなく、XeはTではなく、XfはEではなく、XgはLではなく、XhはFではなく、XiはTではなく、XjはNではなく、XkはRではなく、XlはWではなく、XmはNではなく、XnはTではなく、XoはNではなく、XpはAではなく、XqはGではなく、XrはGではなく、XsはFではなく、及びXtはSではなく、

10

20

30

40

50

並びに/又は

b)そのポリペプチド配列が、コンセンサス配列:XaPDCVTGKVEYTKYNXbDDTFXeVKVGDKEGgXhTXjXkWNLQSLLLSAQITGMTVTIKXnNXpCHNGGXrXsXtEVIFR(配列番号37)を含むか、若しくはから本質的になるか、若しくはからなり、式中Xa、Xb、Xe、Xg、Xh、Xj、Xk、Xn、Xp、Xr、Xs、Xtは、項目a)で定義された通りであり、

並びに/又は

c)そのポリペプチド配列が、構造Xa(S1)XbXcXd(S2)Xe(S3)XfXgXhXiXjXkXlXm(S4)XnXoXp(S5)Xq(S6)XrXsXt(S7)を有する配列を含むか、若しくはから本質的になり、式中S1、S2、S3、S4、S5、S6、及びS7はポリペプチドのN末端からC末端でこの順に、以下:

S1は、アミノ酸配列PDCVTGKVEYTKYN(配列番号38)を表し、

S2は、アミノ酸配列TFを表し、

S3は、アミノ酸配列VKVGDK(配列番号39)を表し、

S4は、アミノ酸配列LQSLLLSAQITGMTVTIK(配列番号40)を表し、

S5は、アミノ酸配列CHNを表し、

S6は、アミノ酸残基Gを表し、及び

S7は、アミノ酸配列EVIFR(配列番号41)を表す

ように定義され、式中Xa、Xb、Xc、Xd、Xe、Xf、Xg、Xh、Xi、Xj、Xk、Xl、Xm、Xn、Xo、Xp、Xq、Xr、Xs、Xtは、上記の項目a)で定義された通りのアミノ酸、特にそのポリペプチド配列が、配列番号1と少なくとも80%の同一性を維持し、及び/又は配列番号1と1つ以上の保存的アミノ酸置換によって異なるポリペプチドであり、

並びに/又は

d)そのポリペプチド配列が、断片、特にa)、b)、若しくはc)に定義される配列のいずれか1つの少なくとも55アミノ酸残基の連続アミノ酸残基の断片を含むか、若しくはから本質的になるか、若しくはからなり、又は少なくとも55アミノ酸残基の長さにわたって、a)、b)、若しくはc)に定義される配列のいずれか1つの一部を含むか、若しくはから本質的になるか、若しくはからなり;

但し、ポリペプチドは、配列番号1、若しくは配列番号32、若しくは配列番号36、若しくは配列番号43、若しくは配列番号44、若しくは配列番号45、若しくは配列番号46、若しくは配列番号47、若しくは配列番号48、若しくは配列番号49、若しくは配列番号50、若しくは配列番号51、若しくは配列番号52、若しくは配列番号53からならない、

ポリペプチドを提供する。

【0048】

Table 1(表1)は、定義されたコンセンサス配列と配列番号1のアミノ酸位置との一致を示し、本明細書において言及した「可変」及び「足場」領域のサイズを定義する(本発明者らによって定義されるコンセンサス配列の区分として)。当業者は、配列番号1の配列と一致させることによって、ポリペプチド配列のアミノ酸位置を容易に決定して、それらがTable 1(表1)に定義される位置に対応するか否かをチェックすることができることを理解するであろう。

【0049】

10

20

30

【表 1】

Table 1

| 区分の名称 | 略称 | 配列番号 2 との一致 | 配列番号 1 の対応するアミノ酸位置 | 連結する断片サイズ/足場サイズ |
|---------|----|--------------------|--------------------|-----------------|
| 可変区分 V1 | V1 | Xa | 1 | 1 |
| 足場区分 S1 | S1 | PDCVTGKVEYTKYN | 2-15 | 14 |
| 可変区分 V2 | V2 | XbXcXd | 16-18 | 3 |
| 足場区分 S2 | S2 | TF | 19-20 | 2 |
| 可変区分 V3 | V3 | Xe | 21 | 1 |
| 足場区分 S3 | S3 | VKVGDK | 22-27 | 6 |
| 可変区分 V4 | V4 | XfXgXhXiXjXkXlXm | 28-35 | 8 |
| 足場区分 S4 | S4 | LQSLLLSAQITGMTVTIK | 36-53 | 18 |
| 可変区分 V5 | V5 | XnXoXp | 54-56 | 3 |
| 足場区分 S5 | S5 | CHN | 57-59 | 3 |
| 可変区分 V6 | V6 | Xq | 60 | 1 |
| 足場区分 S6 | S6 | G | 61 | 1 |
| 可変区分 V7 | V7 | XrXsXt | 62-64 | 3 |
| 足場区分 S7 | S7 | EVIFR | 65-69 | 5 |

10

20

30

【0050】

本発明のポリペプチドは、代わりにTable 1(表1)に定義される可変区分及び足場区分の配列(この用語の一般的な言語定義による)を包含する構造を有すると定義することができると理解されるであろう。

【0051】

従って、項目c)の配列Xa(S1)XbXcXd(S2)Xe(S3)XfXgXhXiXjXkXlXm(S4)XnXoXp(S5)Xq(S6)XrXsXt(S7)はまた、Table 1(表1)に定義される可変区分及び足場区分では、V1(S1)V2(S2)V3(S3)V4(S4)V5(S5)V6(S6)V7(S7)と書くこともできる。実際に、足場区分は、配列番号1に関して不変のままであるポリペプチドの部分を定義するが、可変区分は、Table 1(表1)に定義される、可能性があるアミノ酸置換により変動を示すことができる連結断片を構成する。

40

【0052】

上記の項目d)に定義される断片ポリペプチドを考慮する場合、これは、その配列が、その長さが与えられたそのような断片が実際に呈示することができ、及び前記断片のN末端からC末端において構成的に見出される足場区分(Table 1(表1)に定義される)を保持する(断片)ポリペプチドを意味する。断片ポリペプチドがそのN末端及び/又はC末端部で短縮されている場合であっても、断片サイズが理由で存在することができない区分を除き、本明細書に定義される足場区分及び可変区分を保持しうる。

50

【0053】

しかし、特定の実施形態によれば、本明細書に定義されるポリペプチドは、「1つ又は幾つかの」置換がその後に定義される程度内に留まる程度に、好ましくは本明細書に定義される可変区分内でなおも1つ又は幾つかの保存的アミノ酸置換によって配列番号1とは異なりうる。

【0054】

別の又は累積的態様によれば、本明細書に定義されるポリペプチドは、本説明に定義される同一性パーセンテージの定義により、配列番号1と少なくとも80%又はそれより高い同一性を維持しうる。

【0055】

しかし、特定の実施形態では、足場区分は、定義により非修飾のままであると考えられるポリペプチドの部分であることから、本発明のポリペプチドは、前記のいわゆる「足場」区分内で配列番号1と100%の同一性を維持しうる。

【0056】

上記の項目b)に定義されるコンセンサス配列XaPDCVTGKVEYTKYNXbDDTFXeVKVGDkEXgXhTXjXkWNLQSLLLSAQITGMTVTIKXnNXpCHNGGXrXsXtEVI FR(配列番号37)を考慮すると、前記配列は、配列番号2に対応すると理解され、このうち17、18、28、31、34、35、55、60位のアミノ酸残基は、配列番号1の対応する位置で見出されるアミノ酸残基であり、残りの11個の可変位置、すなわち1、16、21、29~30、32~33、54、56、及び62~64位のアミノ酸残基は、それらの位置に関してTable 1(表1)に定義される変動を受ける。逆に、配列番号37に定義される足場の場合、配列番号1に関して固定される位置は、2~15、17~20、22~28、31、34~53、55、57~61位である。

【0057】

特定の独立した実施形態によれば、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、若しくは85アミノ酸残基の長さ、又はそのような値に基づいて定義することができる任意の間隔の間の長さを有するポリペプチドが包含される。特定の独立した実施形態によれば、55から83アミノ酸の間、又は65から73アミノ酸の間の長さを有するポリペプチド、特に上記で開示した変動により、及びそのような69アミノ酸の長さを包含する5アミノ酸の任意の間隔により、約69アミノ酸の長さを有するポリペプチドが包含される。特定の実施形態によれば、本発明のポリペプチドは、69アミノ酸の長さを有する。本段落で開示される同じ値、しかし最大69アミノ酸、又はそのような値の最大69アミノ酸の全ての可能性がある間隔が、項目d)に定義される連続するアミノ酸残基の長さの適切な定義に当てはまる。

【0058】

上記の項目c)は、「多様体ポリペプチド」に関し、これは配列番号1であるその基準配列に関する限定的な変動に起因するポリペプチドを意味する。本発明の多様体ポリペプチドは、基準の配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性、好ましくは、基準の配列と少なくとも85%又は少なくとも90%又は少なくとも95%又は99%の同一性を有するポリペプチドを包含する。

【0059】

「同一性」とは、多様体ポリペプチドを、従来のアライメントアルゴリズムを通してその基準配列と整列させた場合に、保存されたアミノ酸残基のパーセンテージが実質であることを意味し、このパーセンテージが、上記で開示されたものの少なくとも1つ、特に少なくとも80%であることを意味する。

【0060】

同一性のパーセンテージは従来、ローカル、好ましくはグローバル配列アライメントアルゴリズム及びその利用可能なコンピューターによる実行を通して計算することができる。最も好ましい実施形態では、同一性のパーセンテージは、比較される配列の全長にわたって計算される。比較のためのアミノ酸配列の最適なアライメントは、例えばダイナミッ

10

20

30

40

50

クプログラミングに基づく一般的なローカルアライメント方法であるSmith & Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482頁(1981)のローカルアルゴリズムによって、これもまたダイナミックプログラミングに基づくNeedleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443頁(1970)のアライメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444頁(1988)の類似性検索方法によって、又は肉眼での検分によって実行することができる。これらのアルゴリズムのコンピューターによる実行は、使用することができるデフォルトパラメータに関連する。

【 0 0 6 1 】

ローカル配列アライメントの一般的な実行は、Altschulら、J. Mol. Biol. 215: 403~410頁 (1990)によって記載されているBLAST解析を使用する。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは公開されている。アミノ酸配列の場合、BLASTプログラムは、デフォルトとしてワードサイズ(W)3、期待値(E値カットオフ)10、及びBLOSUM62スコア行列を使用する(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915頁(1989)を参照されたい)。更に、ギャップ開口を11に設定してもよく、ギャップ伸長を1に設定してもよい。ローカルアライメントは、より大きい配列コンテキスト内に類似性領域又は類似の配列モチーフを含有することが疑われる類似でない配列にとってより有用である。

【 0 0 6 2 】

グローバルアライメントは、あらゆる配列におけるあらゆる残基を整列させる試みであり、クエリセットの配列が類似で、ほぼ等しいサイズである場合に最も有用である。(これは、グローバルアライメントが、ギャップにおいて開始及び/又は終了することができないことを意味するのではない)。一般的なグローバルアライメント技術は、当業者が容易にアクセスすることができるデフォルトパラメータによって使用されうるNeedleman-Wunschアルゴリズムである。

【 0 0 6 3 】

別の適した配列アライメントアルゴリズムは、ある特定の実施形態によれば、文字列マッチングアルゴリズム、例えばKERR(Dufresneら、Nature Biotechnology, Vol. 20, Dec 2002, 1269~1271頁)である。KERRは、より短い配列をより長い配列に最適にフィットさせる試みによって、2つの配列間の差の最小数を計算する。KERRは、被験配列全体に対するパーセント同一性を実現する。この態様では、同一性パーセンテージは、比較される配列の各々の全長にわたって計算されることが好ましい。

【 0 0 6 4 】

更に、又は本明細書に定義される基準の配列との任意の同一性のパーセンテージに加えて、又はそれとは無関係に、本発明のポリペプチドはまた、本明細書に定義される基準の配列とは、1つ又は幾つかの保存的アミノ酸置換によって異なる配列を有するポリペプチドも包含する。保存的置換は、アミノ酸残基の以下の群に開示されるアミノ酸残基の特定の特性を考慮して作製した残基の変化を包含し、得られた置換ペプチド模倣体の機能を改変してはならない：

酸性：Asp、Glu；

塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；

芳香族：Trp、Tyr、Phe；

非荷電極性側鎖：Asn、Gly、Gln、Cys、Ser、Thr、Tyr；

非極性側鎖：Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、Trp；

疎水性：Ile、Val、Leu、Phe、Cys、Met、Nor；

中性親水性：Cys、Ser、Thr；

鎖の方向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro

小さいアミノ酸残基：Gly、Ala、Ser。

【 0 0 6 5 】

「1つ又は幾つか」とは、ポリペプチドの長さで一貫し、及び任意選択で、上記で定義した同一性のパーセンテージで一貫する任意の数を意味する。ある特定の実施形態によれば、「幾つか」とは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10を意味する。

10

20

30

40

50

【0066】

上記で詳述したように、特定の態様によれば、本明細書に定義されるポリペプチドは、好ましくは本明細書に定義される可変区分内での1つ又は幾つかの保存的アミノ酸置換によって配列番号1とは異なりうる、すなわちポリペプチドは、本開示により変動しうる任意の1つ又は幾つかの位置で、置換が、本明細書に定義されるアミノ酸Xa~Xtを可能にする選択に対して「保存的」である程度に異なる。

【0067】

特定の実施形態によれば、本発明のポリペプチドは、断片、特にa)、b)、若しくはc)、又は本明細書に定義される配列のいずれか1つの少なくとも55アミノ酸残基の連続するアミノ酸残基の断片を含むか、若しくはから本質的になるか、若しくはからなり、又は少なくとも55アミノ酸残基の長さにわたってa)、b)、若しくはc)に定義される配列のいずれか1つの部分を含むか、若しくはから本質的になるか、若しくはからなる。

10

【0068】

上記から、特定の実施形態によれば、本明細書に記載されるポリペプチドはそれにもかかわらず、前記コンセンサス配列を通して決定される足場領域を設定する本明細書に定義されるコンセンサス配列に関して、本明細書に定義される点保存的置換/変異によって更に変動しうると理解される。そのような点保存的置換/変異は、単独で又は可変領域において提供される多様性の可能性との全ての組み合わせにおいて、本明細書に定義される足場アミノ酸残基のいずれか1つに影響を及ぼしうる。特定の実施形態によれば、本明細書に定義される点保存的置換/変異は、得られた配列は本明細書において否認されていないか、又は好ましくは本明細書に定義される他の要件外であることを条件として、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、17、18、19、20、22、23、24、25、26、27、28、30、31、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、55、57、58、59、60、61位、好ましくはそれらの位置の1、2、若しくは3個のみで見出されるアミノ酸残基から選択されるいずれか1つ又は幾つかのアミノ酸残基に影響を及ぼしうる。

20

【0069】

同様に、そのような多様性は、ポリペプチドが、非変異実施形態の本明細書に定義される機能的特性を保持することを条件として許可されうる。当業者は、本説明に提供される実験及び指針を使用してそのような特性を容易に比較することができる。

30

【0070】

特定の実施形態によれば、本発明のポリペプチドは、5量体形態で見出される場合、Gb3、Gb4、Forsmann様iGb4、フコシル-GM1、GM1、GM2、GD2、グロボ-H、NeuAc-GM3、NeuGc-GM3、GD1a、O-アセチル-GD3、O-アセチル-GD2、O-アセチル-GT3、GD3、及びその混合物からなる群から選択される1つ又は幾つかのグリコスフィンゴ脂質に特異的に結合する能力を有する。

【0071】

これらのグリコスフィンゴ脂質は、当技術分野で一般的に公知であり、記載されている。その公知の同義語及び/又は系統名との一致をTable 2(表2)に提供する。それらは、特に、<http://www.lipidmaps.org/data/structure/LMSDSearch.php?Mode=SetupTextOntologySearch> (Sudら、(2007). LMSD: LIPID MAPS structure database. Nucleic Acids Research, 35(SUPPL. 1), 527~532頁. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl838>)で入手可能なLipid Maps(登録商標)構造データベースを参照することによって提供されるデータベース登録(LM ID)を参照することによって同定される。これらのGSLの発現を見出すことができる対応するがんのタイプも同様に提供する。がんにおける普遍的な変化の1つは腫瘍細胞の表面でのグリコシル化であり、正常組織に対して腫瘍細胞を選択的に認識する炭水化物結合タンパク質を産生することができると認識される。共通の特色は、腫瘍の表面でのGSLの過剰発現である。GSLは、公知であり、細胞表面標的の有望な基である。

40

【0072】

【表 2 A】

Table 2

| GSL 一般名(代替の一般名称又は同義語と共に) | 系統名 | LIPID MAPS(登録商標)データベースの LM ID | がんのタイプ |
|------------------------------------|--|-------------------------------|----------------------------|
| Gb3、グロボトリアオシルセラミド、CD77、セラミドトリヘキソシド | Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0502AA00</u> | 卵巣がん、乳癌、結腸がん、胃腺癌、パーキットリンパ腫 |
| Gb4、グロボシド、Gb4Cer、P 抗原 | GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0502AB00</u> | 結腸癌、乳癌 |
| Forsmann 様 iGb4 | GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0502AC00</u> | 黒色腫 |
| フコシル-GM1、Fuc-GM1 | Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0601BD00</u> | 小細胞肺がん (SCLC) |
| GM1 | Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0601AP00</u> | 腎臓癌、神経芽腫 |
| GM2 | GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0601AM00</u> | 黒色腫、子宮頸癌、神経芽腫、膠芽腫、SCLC、腎臓癌 |
| GD2 | GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0601AN00</u> | 黒色腫、神経芽腫、神経膠腫、SCLC |

10

20

30

40

【 0 0 7 3 】

【表 2 B】

| | | | | |
|------------|--|---------------------|--|----|
| グロボ-H、IV型H | Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0502AI00</u> | 上皮起源のがん、例えば非小細胞肺がん及び乳がん、又は乳房、結腸、子宮内膜、胃、膵臓、肺、及び前立腺がんから選択されるがん | 10 |
| NeuAc-GM3 | NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0601AJ00</u> | 黒色腫、乳癌、腎臓癌 | |
| NeuGc-GM3 | NeuGc α 2-3Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0601AF00</u> | 網膜芽腫、結腸がん、黒色腫、乳癌、神経外胚葉性がん、非小細胞肺がん(NSCLC)、ウィルムス腫瘍 | 20 |
| GD1a | NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0601AS00</u> | 卵巣がん | 30 |
| O-アセチル-GD3 | 9-OAc-NeuAc α 2-8NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0601BK00</u> | 乳癌 | |
| O-アセチル-GD2 | GalNAc β 1-4(9-OAcNeuAc α 2-8NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0601DA00</u> | 神経芽腫、膠芽腫 | |
| O-アセチル-GT3 | 9-OAc-NeuAc α 2-8NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0601BK00</u> | 乳癌 | 40 |
| GD3 | NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β -Cer | <u>LMSP0601AK00</u> | 黒色腫、神経芽腫、骨肉腫、神経膠腫、t-All | |

【0074】

STxBは、その構成的単量体が溶液中で見出される場合、自然に5量体形成するタンパク

質であることが観察されている。特定の実施形態によれば、本明細書に言及される5量体形態は、全てのサブユニットが同じであるホモ5量体形態である。

【0075】

志賀毒素は、 10^9 M^{-1} の結合定数で全細胞に結合することが示されている(「Pathogenesis of Shigella Diarrhea: Rabbit Intestinal Cell Microvillus Membrane Binding Site for Shigella Toxin」; Fuchs, G., Mobassaleh, M., Donohue-Rolfe, A., Montgomery, R. K., Gerard, R. J., and Keusch, G. T. (1986) *Infect. Immun.* 53, 372~377頁)。しかし、可溶性Gb3の結合定数は、わずか約 10^3 M^{-1} であるに過ぎない(「Interaction of the Shiga-like Toxin Type 1 B subunit with Its Carbohydrate Receptor」、St. Hilaire, P. M., Boyd, M. K., and Toone, E. J. (1994) *Biochemistry* 33, 14452~14463頁)。

10

【0076】

特定の実施形態によれば、本発明のポリペプチドは、本明細書に定義される5つのポリペプチド、特に本明細書に定義される5つの同一のポリペプチドが会合する5量体形態で見出される場合、 10^2 M^{-1} より高い親和性で(標的GSLに対応する可溶性炭水化物についてITC(等温滴定型カロリメトリー)によって測定)、及び/又は対応するGSL標的を含有する膜に関して 10^6 M^{-1} より高い見かけの親和性で(SPR(表面プラズモン共鳴)によって測定)本明細書に定義されるその標的の1つ、又は少なくとも1つに結合する。

【0077】

従って、本発明は、本明細書に定義される5つのポリペプチド、特に本明細書に定義される5つの同一のポリペプチドを会合する5量体形態で見出される場合、以下の特性:

20

- a. Gb3、Gb4、Forsmann様iGb4、フコシル-GM1、GM1、GM2、GD2、グロボ-H、NeuAc-GM3、NeuGc-GM3、GD1a、O-アセチル-GD3、O-アセチル-GD2、O-アセチル-GT3、GD3、及びその混合物からなる群から選択されるグリコスフィンゴ脂質に結合する特性、並びに/又は
- b. その標的に対して 10^2 M^{-1} より高い(ITCによって測定)、特に 10^3 M^{-1} より高い及び/若しくは約 10^3 M^{-1} の親和性、並びに/又は
- c. その標的を呈示する膜に関して 10^6 M^{-1} より大きい(SPRによって測定)、特に 10^7 より大きい、若しくは 10^8 より大きい、若しくは 10^9 M^{-1} 若しくは約 10^9 M^{-1} の親和性の1つ又は幾つかを有するポリペプチドに関する。

【0078】

30

「親和性」とは、本発明の5量体形成ポリペプチドとその標的との間の相互作用の物理的強度に対する言及である。本明細書に定義されるその標的に対する本発明の5量体形成ポリペプチドの親和性は、SPR(表面プラズモン共鳴)分析によって測定した場合に $100 \mu\text{M}$ に等しいか若しくはそれ未満、又は90、80、70、60、50、40、30、20、10、5、4、3、2、若しくは $1 \mu\text{M}$ に等しいか若しくはそれ未満、更に特に、 $0.5 \sim 10 \mu\text{M}$ 、 $1 \sim 10 \mu\text{M}$ 、 $1 \sim 5 \mu\text{M}$ の範囲、又は0.5であるKd値によって測定されうる。親和性は、 $K_{d_{eq}}$ 値(Kdとも呼ばれる)によって定義することができ、当技術分野で通常の方法、特に本明細書に報告される方法、特にSPR分析によって測定することができる。同様に、当業者に公知の方法及び範囲を説明する、ITCを使用する標的親和性測定の関連する説明に関しては、Gallegosら、「Shiga Toxin Binding to Glycolipids and Glycans」、*PLoS ONE* 7(2): e30368を参照されたい。更に特に、参照により本明細書に組み込まれている、2頁の「結果」(「ITCによる個々のグリカン結合部位の特徴付け」)の最初の節、及び9頁の「材料及び方法」の節における「等温滴定型カロリメトリー」の段落を参照されたい。

40

【0079】

文献において広く利用可能である知識又は適応に従って当業者が容易に実践可能であることが一般的に公知である、本発明のポリペプチドの機能性を評価する更なる手段には:

- 細胞での結合(FACS、免疫蛍光顕微鏡)、及び/又は
- 内部移行実験(精製したポリペプチドについて): ポリペプチドを4で細胞に接触させた後、37で少なくとも45分間インキュベートし、内部移行及び細胞内への輸送を評価する(STxB WTの場合、STxBはゴルジ体に到達しなければならない)

50

が挙げられる。

【0080】

特定の実施形態によれば、本発明のポリペプチドは、以下の配列：配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、及び配列番号11のいずれか1つを含むか、又はから本質的になるか、又はからなる。

【0081】

これらの配列はそれぞれ：

- クローンA3-D10-H3(選択後の最終プールにおいて3回の反復実験)、
- クローンB12-C03-D12-G05-G11-H11(選択後の最終プールにおいて6回の反復実験)
- クローンA06-C06(選択後の最終プールにおいて2回の反復実験)
- クローンB02(選択後の独自の配列)
- クローンB05(選択後の独自の配列)、

10

に対応する、本発明者らによってGb3に特異的に結合することが見出された(本明細書における実験の章を参照されたい)ヒット及びクローンにそれぞれ対応する。

【0082】

これらのクローンは全て、本明細書において提供される定義によれば「多様体ポリペプチド」であり、これは通常のBLASTアルゴリズムを通して定義すると、配列番号1と83~93%の同一性を有するが、本発明者らによって定義される足場区分を保持している。特定の実施形態によれば、上記の項目c)に定義されるこれらの多様体の連続する断片も同様に本発明に包含される。

20

【0083】

これらの配列は、本明細書において(配列番号37):XaPDCVTGKVEYTKYNXbDDDTFXeVKVGDKEGgXhTXjXkWNLQSLLLSAQITGMTVTIKXnNXpCHNGGXrXsXtEVIFRとして定義されるコンセンサス配列の定義に含まれると理解され、式中Xa、Xb、Xe、Xg、Xh、Xj、Xk、Xn、Xp、Xr、Xs、Xtは上記で定義された通りである。このコンセンサス配列では、残りの11個の可変位置、すなわち1、16、21、29~30、32~33、54、56、及び62~64位の残基は、それらの位置に関してTable 1(表1)で定義される変動を受ける。逆に、配列番号37に定義される足場の場合、配列番号1に関して固定される位置は、2~15、17~20、22~28、31、34~53、55、57~61位である。

【0084】

30

配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、及び配列番号11をそれぞれコードする核酸配列はそれぞれ、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、及び配列番号12として提供される。

【0085】

特に、本発明のポリペプチドは、それらのポリペプチドが本明細書に定義される5量体形態で見出される場合、細胞/組織によって発現されるグリコスフィンゴ脂質(GSL)、特に本明細書に定義されるグリコスフィンゴ脂質(GSL)(特にそれらはTable 2(表2)に記載の種の1つ、又は上記の「幾つか」の定義によるそれらの幾つかに結合する)に特異的に結合し、試料中の特定のグリコスフィンゴ脂質を検出する。

【0086】

40

特定の実施形態によれば、本明細書に定義される5量体形態で見出される本発明のポリペプチドは、Gb3に特異的に結合する。

【0087】

より特定の実施形態によれば、その多様体又は断片を含む、配列番号37により又は配列番号37に関して定義される本発明のポリペプチドは、本明細書に定義される5量体形態で見出される場合、Gb3に結合する特性を有する。

【0088】

本発明者らは具体的に、志賀毒素のBサブユニット(STxB)配列TPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR(配列番号1)から出発して、本明細書に記載される特定の変異部位を含む新規ペプチドを設計した。これらの新規ペプチドは、

50

有利には、特に例えば腫瘍細胞に新たに発現される又は過剰発現されることが公知である、Gb3ではない他のグリコスフィンゴ脂質に結合することが可能でありうる。

【0089】

用語ペプチド及びポリペプチドは、本明細書において互換的に使用されると定義される。

【0090】

特に、本発明のペプチドは、宿主に結合した場合であってもSTxBの自身の5量体構造と類似の5量体構造を形成することができ、従ってグリコスフィンゴ脂質に特異的に結合してこれを標的とすることができる。

【0091】

疾患関連抗原、抗体を標的とする従来手段は、その免疫原性が不良であるためにグリコスフィンゴ脂質に関して良い成績を収めていないことから、この技術的効果は非常に重要である。逆に、本発明のペプチドは、グリコスフィンゴ脂質の検出/標的化のための効率的な手段を提供する。

【0092】

本発明はまた、STxB単量体が溶液中で自然に5量体を形成し、この形態として機能的特性を示すことから、5量体アセンブリ、特に本明細書に定義されるポリペプチドのホモ5量体アセンブリ(すなわち、同一のポリペプチドのホモ5量体アセンブリ)にも関する。

【0093】

特定の実施形態によれば、5量体、特に本発明のポリペプチドのホモ5量体アセンブリは、得られたポリペプチドのアセンブリと活性成分との共役及び/若しくはコンジュゲーションを可能にするために、又は得られたポリペプチドのアセンブリの標識を可能にするために、自然界で見出される「天然の」単量体の配列に関してその配列が更に修飾されている少なくとも1つのポリペプチドを包含する。

【0094】

機能的なSTxBを活性成分に共役及び/又はコンジュゲートすることができることは当技術分野で公知である。非制限的な例は、細胞傷害性分子(例えば、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、及びダウノルピシン)又は造影剤又は抗原を包含する。機能的なSTxBはまた、志賀毒素のAサブユニットに会合して見出されうる。

【0095】

従って、単独、又は本明細書に記載のアセンブリ内で見出される少なくとも1つの単一のポリペプチド単量体の配列は、自然界で天然に見出されるいわゆるSTxB配列に関して、N末端、内部、若しくはC末端ペプチド修飾を通して従来法で修飾することができ、及び/又は活性成分と共役することができ、及び/又は標識することができる。

【0096】

N末端修飾は、(非制限的に):アセチル化、ビオチン化、ダンシル標識端部、N末端部に(又はリジン側鎖を通して内部に)結合した2,4-ジニトロフェニル(2,4-DNP)、フルオレセイン標識、7-メトキシマリン酢酸(Mca)標識、パルミチン酸コンジュゲーション、端部における更なるアミノ酸残基、例えば標識又は薬物と共役させるためのシステイン残基、又はこの末端に適合させた残基の付加を包含しうる。

【0097】

内部修飾は、(非制限的に):同位体標識アミノ酸、アミノ酸のリン酸化(特に、Tyr、Ser、及びThr残基)、スペーサーの付加(特に、薬物、色素、タグである積み荷、従って5量体アセンブリの結合部位に関する立体障害を回避又は低減する)、PEG化、アミノヘキサン酸スペーサーを包含しうる。

【0098】

C末端修飾は、(非制限的に)アミド化、標識若しくは薬物と共役させるためのシステイン残基、又はこの末端に適合させた残基等の更なるアミノ酸の端部での付加を包含する。修飾はまた、生体直交型ケミストリー、特にクリック生体直交型ケミストリーの使用にと

10

20

30

40

50

って適切な修飾も包含しうる。例として、生体直交型官能基、例えばアジド、シクロオクテン、又はアルシンを、そのような化学的ライゲーション戦略を利用するために導入することができる。

【0099】

本発明において、本明細書に開示のペプチドは当業者に公知の任意の化合物又はタンパク質に融合されうる。

【0100】

本発明のポリペプチドが、細胞によって発現される場合、それらは、ペプチドシグナルがそのN末端部で融合された状態で見出されることが観察される。そのようなペプチドシグナルは、配列MKKTLLIAASLSFFSASALA(配列番号13)を有しうる。

【0101】

例として、配列番号13に融合した配列番号1のポリペプチドは、配列番号14として同定され、本開示の一部である。

【0102】

配列番号13をコードする核酸配列は、配列番号15として提供される。従って配列番号15は、本明細書に定義される本発明のポリペプチドをコードする本発明の一部である任意の核酸分子に融合された状態で見出されうる。

【0103】

本発明の別の目的は、ファージ等のウイルスのコードタンパク質に融合された本発明のペプチド、又は配列TPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGG FSEVIFR(配列番号1)のペプチドを含む融合タンパク質を提供することである。

【0104】

本開示において、用語「コートタンパク質」は、その少なくとも一部がウイルス粒子の表面に存在するタンパク質を意味する。機能的な観点から、コートタンパク質は、宿主細胞におけるウイルスアセンブリプロセスの際にウイルス粒子と会合し、ウイルスが別の宿主細胞に感染するまでアセンブルされたウイルスに会合して留まる任意のタンパク質である。コートタンパク質は、メジャーコートタンパク質又はマイナーコートタンパク質でありうる。「メジャー」コートタンパク質は、ウイルスコートにおいてタンパク質10コピー又はそれより多く存在するコートタンパク質である。

【0105】

本開示によれば、コートタンパク質は、pIIIタンパク質及びpVIIIタンパク質ファージコートタンパク質を含む群から選択されうる。有利には、コートタンパク質は、例えばM13バクテリオファージのpIIIタンパク質ファージコートタンパク質でありうる。

【0106】

本発明において、用語「融合タンパク質」は、部分の各々が異なる特性を有するポリペプチドである、共に共有結合により連結された2つの部分を有するポリペプチドを意味する。特性は、*in vitro*又は*in vivo*の活性等の生物学的特性でありうる。特性はまた、標的分子の結合能等の単純な化学特性若しくは物理的特性、又は反応の触媒能等でありうる。2つの部分は、単一のペプチド結合によって直接、又は1つ若しくは複数のアミノ酸残基を含有するペプチドリンカーを通して連結されうる。一般的に、2つの部分及びリンカーは、リーディングフレーム、例えば互いに同じオープンリーディングフレームに存在する。

【0107】

特定の実施形態によれば、融合タンパク質は、ウイルスのコートタンパク質若しくはウイルスのコートタンパク質の一部に融合される、本明細書に開示される実施形態のいずれか1つに定義されるポリペプチド又は配列番号1からなるポリペプチドを含む。

【0108】

特定の実施形態によれば、融合タンパク質は、上記で提供される定義により、そのポリペプチド配列が、配列番号1と少なくとも80%同一性を有し、及び/又は配列番号1とは1つ又は幾つかの保存的アミノ酸置換によって異なる配列を含むか、又はから本質的になるか

10

20

30

40

50

、又はからなるポリペプチドを含む。

【0109】

特定の実施形態によれば、コートタンパク質は、pIIIファージコートタンパク質、特にM13バクテリオファージのpIIIファージコートタンパク質、特に配列番号16に定義されるpIIIファージコートタンパク質である。

【0110】

例えば、そのような融合タンパク質は、3~71位にSTxB配列(例えば、配列番号1に定義される配列)、72~74位に低分子リンカー、75~80位に6Hヒスチジンタグ、81~122位にMycタグ(3つの反復配列)、123~126位に低分子リンカー-GAA、次にTG1細菌(アンバーサブレッサー宿主)等の細菌に残っているQ残基、及び本明細書に定義されるpIII断片(配列番号16)を有する配列番号17の配列を有しうる。配列番号17において、1位及び2位のアミノ酸残基は、クローニングのための制限部位(NcoI)に由来する。このため、リーディングフレームはMAで始まるが、コードされるSTxBタンパク質は、実際には3位で始まる。

10

【0111】

配列番号17をコードする核酸配列を、配列番号18として提供する。特定の実施形態を例証すると、配列番号18は、376~378位にアンバー終止コドンTAGを含む。

【0112】

配列番号16をコードする核酸配列を、配列番号19に提供する。

【0113】

特定の実施形態によれば、本発明の融合タンパク質は、STxB多様体ポリペプチドとして、本明細書に定義される配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、及び配列番号11をそれぞれ包含する、以下の配列:配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、及び配列番号28のいずれか1つからなる。

20

【0114】

特定の実施形態によれば、本発明の融合タンパク質は、STxB多様体ポリペプチドとして、本明細書において以降に定義される配列番号32を包含する配列番号33からなる。

【0115】

配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、及び配列番号28をそれぞれコードする核酸配列は、それぞれ、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、及び配列番号29として提供される。特定の実施形態を例証すると、これらの配列は、376~378位に終止コドンを含む。

30

【0116】

配列番号33をコードする核酸配列を、配列番号34として提供する。

【0117】

本発明の別の目的は、全ての包含される実施形態により本明細書に定義されるポリペプチドをコードする核酸分子、及び/又は全ての包含される実施形態により本明細書に定義される本発明の融合タンパク質である。

【0118】

本開示に定義される全ての核酸分子に応用可能な特定の実施形態によれば、本発明の核酸分子は、本明細書に定義される本発明のポリペプチド又は配列番号1からなるポリペプチドをコードする配列の末端で終止コドンを含むヌクレオチド配列を有する。特定の態様によれば、そのような終止コドンは、以下に定義される通りである。

40

【0119】

例えば、本発明の核酸は、特に本明細書に提供される定義によれば、ウイルスのコートタンパク質に融合されたアミノ酸配列

XaPDCVTGKVEYTKYNXbXcXdTFXeVKVGDKXfXgXhXiXjXkXlXmLQSLLLSAQITGMTVTIKXnXoXpCHNXqGXrXsXtEVIFR (配列番号2)

のペプチドをコードし得て

式中、

Xaは、T、A、又はSであり、

50

Xb、Xc、Xd、Xf、Xmは、独立してD、E、又はNであり、
 Xe、Xi、Xn、Xp、Xtは、独立してT、A、又はSであり、
 Xgは、L、I、又はVであり、
 Xhは、F、Y、W、又はAであり、
 Xjは、N、E、又はSであり、
 Xkは、R、K、又はEであり、
 Xlは、W、F、Y、又はAであり、
 Xoは、N、E、D、又はSであり、
 Xqは、G A、又はSであり、
 Xrは、G、A、S、又はTであり、
 Xsは、F、L、又はYである。

10

【0120】

特定の態様によれば、本発明の核酸はまた、本発明のペプチド又は配列番号1のペプチドをコードする配列の末端に終止コドンを含みうる。言い換えれば、融合タンパク質をコードする核酸は、2つのコード配列の間に終止コドンを含みうる。終止コドンは、本発明に適合させた当業者に公知の任意の終止コドンでありうる。特に終止コドンは、アンバー終止コドン(TAG/UAG)でありうる。

【0121】

しかし、本発明はまた、そのような終止コドンを含まない核酸分子も包含する。

20

【0122】

本発明において、本発明のペプチド、配列番号1のペプチド、又は本発明の融合タンパク質をコードする本発明の核酸は、システインをコードする余分のコドン(UGC/TGC又はUGU/TGT)をその末端に更に含みうる。

【0123】

本発明の核酸は、本発明のペプチド又は融合タンパク質、その断片又は誘導体をコードする任意の適した核酸コード配列でありうる。この配列は、好ましくは、例えばトランスフェクションによって本発明のペプチド若しくは融合タンパク質、又はその断片若しくは誘導体を製造するために有用である。

【0124】

特定の実施形態によれば、及び本開示の核酸分子の更なる定義として、本発明の核酸分子は、その3'端部からその5'端部に以下:

30

- a. 本明細書に定義される本発明のポリペプチド又は配列番号1からなるポリペプチドをコードする第1の核酸配列、及び
 - b. 本明細書に定義される定義に特に従うpIII繊維状ファージコートタンパク質の少なくとも一部をコードする第2の核酸配列
- を包含する融合遺伝子であって、本明細書に提供される定義により、第1及び第2の核酸配列の間に少なくとも1つの終止コドンを含む融合遺伝子である。

【0125】

特定の実施形態によれば、第1の核酸配列は、以下のように定義される:これは、配列番号30、配列番号31、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12のいずれか1つを含むか、若しくはから本質的になるか、若しくはからなり、又は配列番号30、配列番号31、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12のいずれか1つと少なくとも70%、若しくは少なくとも80%、好ましくは85%、より好ましくは90%、若しくは95%の同一性を有する核酸配列を含むか、若しくはから本質的になるか、若しくはからなる。

40

【0126】

そのような核酸分子は、本明細書に提供される定義に従って、そのN末端部において、ペプチドシグナルをコードする核酸配列を含みうる。

【0127】

配列番号31は、STxB多様体である配列番号32をコードし、これは配列番号1に関して2つ

50

の変異D18E、G62Tを有するSTxB多様体に対応し、本明細書における実験の節で使用されている。

【0128】

特定の実施形態によれば、第2の核酸配列は以下のように定義される：これは、配列番号19、又は特に300bpの長さにわたる、その一部を含むか、又はから本質的になるか、又はからなる。

【0129】

特定の実施形態によれば、終止コドンは、DNA終止コドン：TAG、TAA、及びTGAから選択される。

【0130】

特定の実施形態によれば、本発明の核酸分子は、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、及び配列番号34のいずれか1つからなる。

【0131】

別の態様によれば、本明細書に定義される核酸分子を包含する核酸分子もまた、本発明に包含され、そのような核酸分子は、ベクター、特にプラスミド、更に特に、ファージミド若しくはファージベクターでありうるか、又はベクター、特にプラスミド、更に特に、ファージミド若しくはファージベクターに含有されるか、又はファージゲノムである。

【0132】

特定の実施形態によれば、そのようなベクターは：

- (1)少なくとも1つの第1の核酸配列又は本明細書に定義されるその多様体、
 - (2)TAG、TAA、及びTGAから選択される少なくとも1つの終止コドン、並びに
 - (3)本明細書に定義される第2の核酸配列、
- を(1)、(2)、及び(3)の順で、又はその多様体

を含むか、又はから本質的になるか、又はからなる核酸分子を含むpHEN2ファージミドである。

【0133】

本発明の実験の節に使用される本発明に包含されるベクターの例を、配列番号35として提供する。

【0134】

本発明の別の目的は、本発明のペプチド、又は配列TPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR(配列番号1)のペプチド、又は本発明の融合タンパク質をコードする核酸を含むプラスミド、ファージミド、及び/又は発現ベクターを含む発現系である。

【0135】

本発明のペプチド及び融合タンパク質は、上記に定義される通りである。

【0136】

本発明のペプチド、配列TPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR(配列番号1)のペプチド、又は本発明の融合タンパク質をコードする核酸配列は、上記で定義された通りである。

【0137】

特定の実施形態によれば、本発明の発現系は：

- a)そのポリペプチド配列が、コンセンサス配列XaPDCVTGKVEYTKYNXbXcXdTFXeVKVGDKXfXgXhXiXjXkXlXmLQSLLLLSAQITGMTVTIKXnXoXpCHNXqGXrXsXtEVIFR(配列番号2)、を含むか、若しくはから本質的になるか、若しくはからなり、
- 式中、

Xaは、T、A、又はSから選択され、及び

Xb、Xc、Xd、Xf、Xmは、D、E、又はNから独立して選択され、及び

Xe、Xi、Xn、Xp、Xtは、T、A、又はSから独立して選択され、及び

Xgは、L、I、又はVから選択され、及び

Xhは、F、Y、W、又はAから選択され、及び

10

20

30

40

50

Xjは、N、E、又はSから選択され、及び
 Xkは、R、K、又はEから選択され、及び
 Xlは、W、F、Y、又はAから選択され、及び
 Xoは、N、E、D、又はSから選択され、及び
 Xqは、G A、又はSから選択され、及び
 Xrは、G、A、S、又はTから選択され、及び
 Xsは、F、L、又はYから選択される、

55～85アミノ酸残基の長さを有するポリペプチドをコードする核酸、又は

b)そのポリペプチド配列が、配列TDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVT
 IKTNACHNGGGFSEVIFR(配列番号1)と少なくとも75%の同一性を有する、及び/又は配列番号1
 とは1つ以上の保存的アミノ酸置換によって異なる配列を含むか、若しくはから本質的に
 なる、若しくははからなる55～85アミノ酸残基の長さを有するポリペプチドをコードする核
 酸、又は

10

c)そのポリペプチド配列が、a)若しくはb)に定義される配列のいずれか1つの断片、特に
 少なくとも55アミノ酸残基の連続するアミノ酸残基の断片を含むか、若しくははから本質的
 になるか、若しくははからなり、又は55アミノ酸残基の長さにわたってa)若しくはb)に定義
 される配列のいずれか1つの一部を含むか、若しくははから本質的になるか、若しくははから
 なる、55～85アミノ酸残基の長さを有するポリペプチドをコードする核酸、を含み
 発現系は少なくとも1つのプラスミド、ファージミド、又は発現ベクターである。

20

【0138】

長さ及び同一性のパーセンテージは、本発明のポリペプチドに関して本明細書に開示の
 値と一貫して揃っていると理解される。

【0139】

本発明の別の目的は、本明細書の記載の任意の実施形態によれば、本発明の融合タンパ
 ク質をコードする核酸を含むプラスミド、ファージミド、及び/又は発現ベクターを含む
 発現系である。

【0140】

本発明において、プラスミドは、宿主においてペプチドの産生のために適合させた当業
 者に公知の任意のプラスミドでありうる。これは、例えばpIRES、pIRES2、pcDNA3、pGEX
 を含む群から選択されるプラスミドでありうる。

30

【0141】

本発明において、ファージミドは、宿主においてペプチドの産生のために適合させた当
 業者に公知の任意のファージミドでありうる。例えば、「ファージミド」は、細菌の複製
 開始点、例えばColE1、及びバクテリオファージの遺伝子間領域のコピーを有するプラス
 ミドベクターである、ファージミドは、繊維状バクテリオファージ及びラムダ状バクテリ
 オファージを含む当業者に公知の任意のバクテリオファージに基づきうる。プラスミドは
 また、好ましくは抗生物質耐性に関する選択可能マーカーを含有する。これらのベクター
 においてクローニングされたDNAのセグメントをプラスミドとして増殖させることができ
 る。これらのベクターを保有する細胞に、ファージ粒子の産生にとって必要な全ての遺伝
 子が備えられている場合、プラスミドの複製様式はローリングサークル複製に変化して、
 プラスミドDNAの1つの鎖のコピーを生成し、及びファージ粒子をパッケージングする。フ
 ァージミドは、感染性又は非感染性ファージ粒子を形成しうる。この用語は、ファージ粒
 子の表面に異種ポリペプチドが呈示されるように、遺伝子融合体として異種ポリペプチド
 遺伝子に連結されたファージコートタンパク質遺伝子又はその断片を含有するファージミ
 ドを含む。(Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, (198
 9) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 4.17.)。有利に
 は、ファージミドはpHEN2ファージミドである。

40

【0142】

本発明において、発現ベクターは、宿主においてペプチドの産生のために適合させた当
 業者に公知の任意の発現ベクターでありうる。

50

【0143】

本発明において、発現系は、宿主におけるその発現にとって適した形態で本発明の核酸を含み、このことは、プラスミド、ファージミド、及び/又は発現ベクターが、発現のために使用される宿主に基づいて選択される、発現される核酸配列に作動可能に連結された1つ又は複数の調節配列を含むことを意味する。プラスミド、ファージミド、及び/又は発現ベクターにおいて、「作動可能に連結された」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にするように(例えば、in vitro転写/翻訳系において、又はベクターが宿主細胞に導入されている場合には宿主細胞において)調節配列に連結されていることを意味すると意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御エレメント、例えば、ポリアデニル化シグナル、終止コドン等を含むと意図される。そのような調節配列は、例えば、Goeddel; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。調節配列は、多くのタイプの宿主においてヌクレオチド配列の構成的発現を指示する配列、及びある特定の宿主に限ってヌクレオチド配列の発現を指示する配列、例えば組織特異的調節配列を含む。発現系の設計が、形質転換される宿主の選択、所望のタンパク質の発現レベル等などの要因に依存しうることが当業者によって認識されるであろう。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入し、それによって本明細書に記載される核酸によってコードされる融合タンパク質又はペプチド、例えばキメラポリペプチド、キメラポリペプチドの変異体型、融合タンパク質等を含む、タンパク質又はペプチドを産生させることができる。

10

20

【0144】

本発明において、本発明のペプチド、又は配列(配列番号1)のペプチドをコードする核酸を含むプラスミド、ファージミド、及び/又は発現ベクターは、当業者に公知の適合させた任意のプロモーターを含みうる。例えば、ファージミドは、lacプロモーター、例えばLacP、LacOを含む群から選択されるプロモーターを含みうる。

【0145】

本発明において、本発明のペプチド、又は配列(配列番号1)のペプチドをコードする核酸を含むプラスミド、ファージミド、及び/又は発現ベクターは、その配列の末端に終止コドンを含みうる。

【0146】

本発明において、発現系は、本発明のペプチド又は配列番号1の配列をコードする配列の末端が終止コドンを含みうる、本発明の融合タンパク質をコードする核酸を含みうる。言い換えれば、融合タンパク質をコードする核酸は、2つのコード配列の間に終止コドンを含みうる。有利には、終止コドンはアンバー終止コドン(UAG)でありうる。

30

【0147】

本発明において、発現系は、本発明のペプチド、配列番号1のペプチドをコードする本発明の核酸を含みうるか、又は本発明の融合タンパク質は更に、システインをコードする余分のコドン(UGC/TGC又はUGU/TGT)をその末端に含みうる。

【0148】

本発明において、発現系は、有利には、本発明のペプチド又は配列番号1のペプチドをコードする配列の末端にアンバー終止コドン(UAG)、及びpIIIコートタンパク質をコードする配列を含む融合タンパク質をコードする本発明の核酸とインフレームでLacP、LacOプロモーターを含むpHEN2プラスミドでありうる。

40

【0149】

有利には、本発明者らは、発現系がファージミドである場合、lacプロモーター、例えばLacP、LacOの存在、及び融合タンパク質の2つの部分、すなわち本発明のペプチド又は配列(配列番号1)のペプチドをコードする核酸とウイルスのコートタンパク質をコードする核酸との間のアンバー終止コドンの存在は、本発明のペプチド又は配列番号1の「遊離の」ペプチド、又は前記コートタンパク質に融合された本発明のペプチド又は配列番号1のペプチドのいずれかの発現を可能にすることを証明した。

50

【0150】

特に、本発明者らは、融合タンパク質の2つの部分、すなわち、本発明のペプチド又は配列(配列番号1)のペプチドをコードする核酸と、別のタンパク質をコードする核酸との間のアンバー終止コドンの存在によって、本発明のペプチド又は配列番号1の配列の遊離のペプチド、すなわち融合されないペプチド、及びウイルスのコートタンパク質に融合される本発明のペプチド又は配列番号1のペプチドを産生することが可能となることを証明した。「融合タンパク質」と比較した「遊離のペプチド」の割合は、およそ50%又は50%に等しい。

【0151】

本発明において、発現系が本発明のペプチド又は本発明の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む場合、核酸配列はまた、コード配列の前及び/又は後にインフレームで前記発現系に同様に導入されうる。例えば、コード配列の前及び/又は後に、ペプチド又は融合タンパク質の回収を改善することができる、例えばタグ、例えばヒスチジンタグをコードする配列、標識タンパク質、例えば緑色蛍光タンパク質をコードする配列を発現系に含めてもよい。

10

【0152】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、分子、例えばペプチド又は融合タンパク質の回収を改善することができるタンパク質又はペプチドを知っている。

【0153】

本発明によれば、本発明のペプチド又は本発明の融合タンパク質は、ペプチドライブラリ又は融合タンパク質ライブラリを表しうる。

20

【0154】

本発明によれば、本発明の核酸を含む本発明の発現系は、本発明の異なるペプチド又は本発明の融合タンパク質をコードする発現系ライブラリを形成しうる。

【0155】

本発明の別の目的は、本発明によるペプチド、本発明による融合タンパク質、又は配列番号1の配列のペプチド、及び/又は本発明による核酸配列、若しくは配列(配列番号1)をコードする核酸配列、及び/又は本発明による発現系を含む宿主である。

【0156】

宿主は、形質転換されるように適合させた、及び本発明のペプチド、本発明の融合タンパク質、又は配列(配列番号1)のペプチドを製造するように適合させた当業者に公知の任意の適した宿主細胞又はウイルスでありうる。これは、例えば真核細胞又は原核細胞でありうる。例えば、これはCOS-7、HEK 293、N1E115を含む群から選択される真核細胞でありうる。例えば、これは、TG1細菌を含む群から選択される原核細胞でありうる。これはまた、例えばウイルス、例えばバクテリオファージ、例えばM13バクテリオファージを含む群から選択されるバクテリオファージでありうる。

30

【0157】

宿主細胞によらず、ファージは、例えばTG1(大腸菌(E.coli))細菌細胞において産生することができる。他の株、例えばNEBファージディスプレイキットの大腸菌ER2738宿主株(F' proA+ B+ lacIq (lacZ)M15 zzf::Tn10(TetR)/fhuA2 glnV (lac-proAB) thi-1 (hsdS-mcrB)5)が当業者に容易に利用可能である。他の適した細胞は、SS320、又はXL1-Blue大腸菌細胞でありうる。

40

【0158】

真核細胞は、ポリペプチドの産生を求める場合に適切であり、例えば当業者に周知のポリペプチド産生のための従来法を使用して、CHO細胞を使用することができる。

【0159】

宿主を産生/形質転換するプロセスは、当業者に公知のように適合させた任意のプロセスでありうる。これは例えば、金属イオン、一般的に塩化カルシウムの溶液による細菌の化学処理後に加熱を行い、レシピエント細菌として機能することができ、及び多様な起源に由来する異種DNAを取り込むことができるコンピテント細菌の産生を伴うプロセスであ

50

りうる。これは、例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に開示されるプロセスでありうる。宿主細胞を産生/形質転換するプロセスはまた、高圧電気穿孔を使用してよい。電気穿孔は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に開示されるように、DNAを真核細胞(例えば、動物細胞、植物細胞等)並びに細菌、例えば大腸菌に導入するために適している。当業者は、その技術に関する知識を考慮して、本発明の宿主を得るための公知のプロセスを適合させる/選択するであろう。

【0160】

本発明の別の目的は、本発明によるペプチド、本発明による融合タンパク質、又は配列(配列番号1)のペプチド、及び/又は本発明による核酸配列若しくは配列(配列番号1)をコードする核酸配列、及び/又は本発明による発現系を含むウイルスである。

10

【0161】

ウイルスは、ペプチド又は融合タンパク質の発現のために適合させた当業者に公知の任意のウイルスでありうる。これは、例えば、D Bouardら、「Viral vectors: from virology to transgene expression」、Br J Pharmacol. 2009 May; 157(2): 153~165頁に開示されるウイルスでありうる。これは、有利にはバクテリオファージ、例えばM13バクテリオファージでありうる。

【0162】

本発明の別の目的は、本発明のペプチド及び/又は本発明の融合タンパク質をその表面に呈示するウイルスである。

20

【0163】

本発明者らは、意外にも本発明が、STxBの5量体構造を再現する、本発明のペプチドからなる機能的5量体をウイルス上に呈示することができることを証明した。

【0164】

特に、本発明者らは、本発明が、本発明の発現系を使用して同じウイルスによるペプチド及び融合タンパク質の発現を可能にすることを証明した。ウイルス上の融合タンパク質と比較したペプチドの割合は各々50%である。

【0165】

本発明者らはまた、本明細書に開示の実施形態のいずれか1つによる本発明のポリペプチド、及び/又は本明細書に開示の実施形態のいずれか1つによる本発明の融合タンパク質をその表面に呈示するウイルスにも関する。

30

【0166】

従って本発明は、有利には、ファージ等のウイルス粒子の表面にSTxBと類似の5量体タンパク質の呈示を可能にする。STxBと類似の5量体タンパク質は、これらの狭いポケットの残基とグリコスフィンゴ脂質の炭水化物部分との間の水素結合及び疎水性スタッキング相互作用を伴う水素結合を伴う「結合ポケット」として定義される結合部位を含む。

【0167】

本発明によれば、本発明のウイルスは、本発明のペプチド及び/又は本発明の融合タンパク質をその表面に呈示する複数のウイルス粒子を含むウイルスのライブラリを形成しうる。

40

【0168】

本発明によれば、このため、本発明のウイルスのライブラリのウイルス粒子は、少なくとも本発明のペプチド及び/又は本発明の融合タンパク質をその表面に発現及び呈示しうる。

【0169】

本発明によれば、ウイルスのライブラリのウイルス粒子は、本発明のペプチドの5量体、例えば本発明の融合タンパク質に任意選択で結合した配列番号1のペプチドの5量体をその表面に呈示する。

【0170】

50

本発明によれば、ライブラリのウイルス粒子は、バクテリオファージ(ファージ)でありうる。それらは、例えばM13バクテリオファージでありうる。

【0171】

本発明はまた、特定の実施形態によれば、ファージである本発明のウイルスの複数を包含するウイルスのライブラリにも関する。

【0172】

従って、本発明のウイルスのライブラリは、ファージディスプレイライブラリでありうる。

【0173】

本発明はまた、本明細書に記載の全ての態様による本発明のポリペプチド、及び/又は本明細書に記載の全ての態様による本発明の融合タンパク質を、その表面に呈示する繊維状バクテリオファージであって、繊維状バクテリオファージのゲノムが、特に本明細書の記載において定義される融合遺伝子を含む繊維状バクテリオファージにも関する。融合遺伝子は、本明細書の記載において定義される第1及び第2の核酸分子をアセンブルする、上記で定義され、本明細書に記載の任意の実施形態による核酸分子であると理解される。

10

【0174】

本発明はまた、本明細書の記載による核酸分子又はベクター、特にSTxBサブユニット又はその多様体をその表面に呈示する、本明細書に定義される融合遺伝子を含む核酸分子又はベクターをカプセル化する繊維状バクテリオファージにも関する。

【0175】

「STxBサブユニット又はその多様体をその表面に呈示する」という表現は、最大5つのSTxBサブユニット又はその多様体を呈示することができることから、少なくとも1つのSTxBサブユニット又はその多様体が呈示されることを意味すると理解される。従って、「少なくとも1つ」とは、バクテリオファージの集団を考慮する場合、1、2、3、4、又は5つ、又はそれらの数の組み合わせを意味する。

20

【0176】

別の実施形態では、STxBサブユニット又はその多様体をその表面に呈示する繊維状バクテリオファージ、ここで、前記STxBサブユニットが以下の特性、前記STxBサブユニットが機能的であること、及び/又は適切にフォールディングされること、及び/又は5量体配置をとること、の少なくとも1つ又は幾つかを有する。

30

【0177】

本発明はまた、本明細書において以降及び本明細書に定義されるSTxBサブユニット又はその多様体をその表面に呈示する繊維状バクテリオファージであって、前記繊維状バクテリオファージのゲノムが、その3'端部からその5'端部に:

- a. STxBサブユニット単量体又はその多様体をコードする第1の核酸配列、及び
- b. pIII繊維状ファージコートタンパク質の少なくとも一部をコードする第2の核酸配列、

を包含する、上記及び本明細書において定義される融合遺伝子を含み、前記融合遺伝子が第1と第2の核酸配列の間に少なくとも1つの終止コドンを含む、繊維状バクテリオファージにも関する。

40

【0178】

本発明の繊維状バクテリオファージは、pIII融合タンパク質の使用を通して、STxBサブユニット又はその多様体をその表面に呈示する。この目的のため、目的の核酸配列、すなわち第1のヌクレオチド配列を、繊維状バクテリオファージゲノムにおいてpIII遺伝子の下流に挿入し、これによってpIIIコートタンパク質、すなわち融合タンパク質を有するpIIIコートタンパク質を組換え型で発現させることができる。pIII融合タンパク質の使用により、繊維状バクテリオファージの表面で最大5個の融合タンパク質の呈示が可能となる。

【0179】

言い換えれば、本発明の繊維状ファージのゲノムは、pIII繊維状ファージコートタンバ

50

ク質の少なくとも一部をコードする第2の核酸配列に作動可能に連結された及び/又は融合された、STxBサブユニット単量体断片又はその多様体をコードする第1の核酸配列を包含する。この文脈における「作動可能に連結された」とは、「同じ核酸分子の一部として結合していること」、すなわちゲノムを意味し、全ての部分が好ましくは、本明細書において考察される本発明の実施にとって簡便であるオープンリーディングフレームに従って、プロモーターから始まる転写にとって適切に配置されて適切な方向を向いていることを意味する。当業者は、自身の知識を考慮して当業者によって一般的に実施可能であるように、第1と第2の核酸配列の間の接合部が互いに物理的に隣接する形態と、第1及び第2の核酸配列が他の配列によって隔てられている形態のいずれかでありうることを認識するであろう。

10

【0180】

例として、本明細書に記載の融合遺伝子は、特に共に共有結合によって連結され、及び同じ核酸配列の一部であるが、異なる機能又は特性を有する配列を有する、本明細書における任意の実施形態により同定される幾つかの配列を有する核酸配列を意味する。融合遺伝子は、1つ又は複数のヌクレオチドを含有するリンカー配列を包含する。特定の実施形態によれば、融合遺伝子を構成する全ての配列は、全長にわたって融合遺伝子の適切な翻訳を確保するオープンリーディングフレーム内に存在する、特に少なくとも1つの終止コドンが前記オープンリーディングフレーム内に存在する。

【0181】

本明細書に使用されるように、「繊維状バクテリオファージ」という表現は、「繊維状バクテリオファージ粒子」の同義語として解釈される。同様に、「バクテリオファージ」及び「ファージ」という表現は、本明細書において互換的に使用される。

20

【0182】

「繊維状バクテリオファージ」とは、一本鎖DNAのゲノムを含有し、グラム陰性細菌に感染する、その繊維様又は棹様形状によって定義されるバクテリオファージ又は細菌のウイルスのタイプを意味する。特定の実施形態によれば、繊維状バクテリオファージは、繊維状外観を有し、細菌感染がF線毛に依存するFfファージである。従って、Ffファージは、グラム陰性細菌、特にFエピソームを有する大腸菌に感染する繊維状ファージである。

【0183】

特定の実施形態によれば、本明細書に定義される繊維状バクテリオファージ又はFfファージは、以下のファージ:f1、fd、及びM13から選択される。これらのファージは全て、その間に最大98%又はそれより高い相同性で高度に相同であるゲノムを共有することがわかっている。より詳しい実施形態によれば、本明細書に定義される繊維状バクテリオファージは、M13ファージである。当業者は、ファージの通常の産生を実行するために必要な配列を含む、本明細書に開示されるファージの全ての構造特色の全てを文献から容易に利用できる。

30

【0184】

最も一般的なヘルパーファージはM13K07であり、これはgIIにおいて変異Met40Ileを有し、P15A由来の複製開始点及びTn903由来のカナマイシン耐性遺伝子がいずれもM13複製開始点に挿入されるM13誘導体である(Vieira and Messing, 1987 Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1987;153:3~11頁)。このように、ヘルパーファージは、ファージミドより有効でない複製を引き起こすわずかに欠損した複製開始点を有する。このプロセスは「ファージ救出」と呼ばれる。当技術分野で公知の他のヘルパーファージには、R408、VCSM13(Stratagene社)、ファージベクターfd-tet(Zacherら、*Gene*, 1980, 9, 127~140頁)が挙げられる。

40

【0185】

本発明によるファージは、幾つかの遺伝子、特に文献に十分に報告されている以下の群の遺伝子の全て又は一部をコードする一本鎖DNAゲノムを有する:(1)ファージDNAの複製にとって必要なタンパク質をコードする遺伝子II、V、及びX、(2)それぞれpIII、pVI、pVII、及びpIXと呼ばれる表面エンベロープタンパク質をコードする遺伝子III、VI、V

50

II、VIII、及びIX、並びに(3)ピリオンアセンブリにとって必要なタンパク質をコードする遺伝子I、IV、及びXI。本発明によるファージは、特にしかしファージディスプレイ目的のためだけでなく、本発明の分野においてファージが作動性であるために一般的に公知の全ての特色を包含すると理解される。例として、ファージゲノムDNAは一般的に、ピリオンのアセンブリを開始する複製開始点(ori)及び「パッケージングシグナル」部位を有する。本発明の分野においてそれらが作動性であるために一般的に必要なファージの特色を報告する複数の刊行物が、当業者に容易に入手可能である。例えば、N.V. Tikunova and V.V. Morozova, *Acta Naturae*. 2009 Oct; 1(3): 20~28頁を参照されたい。特に、pIII配列は、データベース登録NP_510891.1として開示されている。pIIIの断片は一般的に使用されている。

10

【0186】

従って、特定の実施形態によれば、本発明の繊維状バクテリオファージのゲノムの融合遺伝子部分によってコードされるpIII繊維状ファージコートタンパク質は、本明細書に定義される繊維状バクテリオファージにおいて見出される少なくとも一部又は全てのpIII繊維状ファージコートタンパク質、特にf1、fd、及びM13ファージのいずれか1つのコートタンパク質に対応する。そのようなpIIIファージコートタンパク質又はその一部をコードする核酸配列は、当業者に容易に利用可能である(上記のデータベース登録を参照されたい)。

【0187】

特定の実施形態によれば、pIII繊維状ファージコートタンパク質は、配列番号16に示されるバクテリオファージM13のpIIIファージコートタンパク質に由来し、すなわち、前記配列又はその一部を含むか、又はから本質的になるか、又はからなる。

20

【0188】

特定の実施形態によれば、第2の核酸配列は、従って配列番号19又はその一部を含むか、又はから本質的になるか、又はからなる。

【0189】

「STxBサブユニット」は、本明細書において「志賀毒素のBサブユニット」、又は「STxBタンパク質」、又は「STxB」という表現を使用しても呼ばれ、これは、本明細書に定義される本発明のポリペプチドの5量体アセンブリによって形成されるいわゆるタンパク質STxBサブユニットを意味する。前記STxBサブユニットは、導入部分で定義したようにAB₅志賀毒素ファミリーメンバーのB部分に見出される「単量体」と類似の、5つのいわゆる「STxBサブユニット単量体」の非共有結合によるアセンブリに起因する5量体立体構造を有する。特定の実施形態によれば、STxBサブユニットは、本明細書に定義される本発明のポリペプチドに対応する、同一のB断片のホモ5量体アセンブリ又は単量体の形態で見出されうる。

30

【0190】

「STxBサブユニットの多様体」とは、(1)上記で定義されるB断片のホモ5量体アセンブリ若しくは単量体、すなわち本発明のポリペプチドのいずれか、又は(2)その構成する単量体が配列番号1の基準配列とは異なるアミノ酸配列を有するか、含むか、若しくはからなり、それによって多様体アミノ酸配列が、基準の配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、又は84%の同一性を有する、本明細書に定義されるSTxBサブユニットを意味する。特定の実施形態によれば、同一性のパーセンテージは、85%、86%、87%、88%、89%、90%、又はそれより高い、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のパーセンテージに達する。特定の実施形態では、同一性のパーセンテージは、好ましくは、基準の配列との少なくとも85%又は少なくとも90%又は少なくとも95%又は99%の同一性である。

40

【0191】

本明細書において考察した多様体アミノ酸配列は、特定の実施形態によれば、本明細書の記載に定義される「多様体ポリペプチド」のアミノ酸配列であると理解される。

【0192】

別の実施形態によれば、「多様体」はまた、その構成する単量体が、前出の段落に定義

50

したように基準配列と少なくとも80%同一である配列を有するSTxBサブユニットを含むSTxBサブユニットを含み、前記STxBサブユニットは、別の部分、特に薬物、例えば細胞傷害性化合物等の活性分子である部分に会合するか、特に共有結合による共役を含む共役されるか、又はコンジュゲートされるが、本明細書に提供する定義による機能的活性を保持するためにその構造的フォールディングにおいて前記STxBサブユニットの機能的完全性を保存している。そのような展開は、当技術分野で周知である。例として、システイン残基の導入は、フォールディングも結合も乱さないが、STxBサブユニットと活性成分との化学的共役を可能にすることが認識されている。そのような活性成分は、例えば、Johannesらによって既に行われたアウリスタチンでありうる。特定の実施形態によれば、前記STxBサブユニットは、志賀毒素の天然のAサブユニットに会合した状態で見出され、これは自然にSTxBの5量体と2量体を形成する。別の態様によれば、本発明はまた、医薬として使用するために、別の部分、特に薬物等の活性分子である部分に会合するか、特に共有結合による共役を含む共役されるか、又はコンジュゲートされたSTxBサブユニット又はその多様体をその表面に呈示する繊維状バクテリオファージにも関する。

【0193】

「STxBサブユニット単量体(又は断片)」はまた、「志賀毒素のBサブユニットの単量体(又は断片)」又は「STxBタンパク質単量体(又は断片)」、又は「STxB単量体(又は断片)」とも呼ばれ、これは、上記で及び本明細書に定義されるAB₅志賀毒素ファミリーメンバーのB部分に見出されるポリペプチドを意味する。「STxBサブユニット単量体の多様体」とは、基準配列である配列番号1に関して異なるアミノ酸配列を含むか又はからなるSTxBサブユニット単量体を意味し、そのため多様体アミノ酸配列は、基準の配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、又は84%の同一性を有する。特定の実施形態によれば、同一性のパーセンテージは、85%、86%、87%、88%、89%、90%、又はそれより高い、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のパーセンテージに達する。特定の実施形態では、同一性のパーセンテージは、好ましくは基準の配列との少なくとも85%又は少なくとも90%又は少なくとも95%、又は99%の同一性である。

【0194】

本明細書において考察される多様体アミノ酸配列は、特定の実施形態によれば、本明細書の記載に定義される「多様体ポリペプチド」の配列であると理解される。

【0195】

従って、特定の実施形態によれば、STxBサブユニット単量体又はその多様体をコードする第1の核酸配列は、本発明の核酸分子を記載する場合、本明細書に定義される通りである。

【0196】

更に進めると、本明細書に定義されるように、「多様体」に関して提供される定義はまた、本明細書に定義される又は本明細書に記載されるアミノ酸配列をコードする核酸分子を含む、本明細書に定義される核酸分子にも当てはまる。

【0197】

多様体アミノ酸配列を定義する修飾は、独立して、特に1つ以上のアミノ酸残基の点欠失を含む欠失でありうるか、又は置換、特に1つ以上のアミノ酸残基の保存的置換でありうる。

【0198】

「1つ又は幾つか」という用語又は表現に関して本明細書に提供される定義は、「同一性」、「同一性のパーセンテージ」にも当てはまる。

【0199】

本発明によれば、本発明の繊維状バクテリオファージのゲノムに組み込まれた融合遺伝子は、第1と第2の核酸配列の間に、本明細書において終了コドン又はナンセンスコドンとも呼ばれる少なくとも1つ、特に1つ又は2つの終止コドンを含む。本明細書に定義されるように、終止(又は終了、又はナンセンス)コドンは、DNAをコードする出発物質から得られたメッセンジャーRNAに見出される場合、RNA配列のタンパク質への翻訳の終止のシグナ

ルを送るヌクレオチドトリプレットである。

【0200】

従って、特定の実施形態では、本発明の繊維状バクテリオファージのゲノムは、(少なくとも1つの)終止コドンが前記第1と第2の核酸配列の間に挿入されるか、又は見出されるように操作されている。別の実施形態によれば、本発明の繊維状バクテリオファージのゲノムの配列は、少なくとも1つの終止コドンが前記第1と第2の核酸配列の間に挿入されるか又は見出されるように、前記第1と第2の核酸配列の間に、付加された及び/又は置換された及び/又は抑制されたヌクレオチドを含む。

【0201】

本明細書に定義される終止コドンは、タンパク質又は機能的なポリペプチド配列への翻訳の中途終止を引き起こす当技術分野で公知の任意の終止コドンでありうる。特定の実施形態によれば、終止コドンは、DNA終止コドン、TAG、TAA、及びTGAから選択される。言い換えれば、終止コドンは、UAG、UAA、及びUGA(RNA終止コドン)から選択されるmRNA抑制性の終了コドンをコードするDNAトリプレットヌクレオチド配列(コドン)に対応する。

10

【0202】

特定の実施形態によれば、終止コドンは、融合遺伝子内のいわゆる「アンバー変異」に起因し、すなわち、センスコドン(アミノ酸を明記する)を翻訳終止コドンに変化させるナンセンス変異に起因し、それによって翻訳の際にポリペプチド鎖の中途終止を引き起こす。用語「アンバー」は、特に本明細書に使用される場合、この機序を通して翻訳の終了を引き起こす変異、又はこの場合はTAGコドン(「UAG」RNAコドンに対応する)でありうるコ

20

【0203】

或いは又は累積的に、終止及び/又はアンバーコドンは、当技術分野で周知の技術を通して、融合遺伝子操作の際に融合遺伝子配列内に挿入することができる。この文脈において、本明細書の実験の節も参照されたい。例えば、市販のファージミドは、その配列内に、外来タンパク質遺伝子とタンパク質III遺伝子との間に挿入された終止コドンを含む。

【0204】

前述から、本発明の繊維状バクテリオファージのゲノムに組み込まれた融合遺伝子は、その3'端部からその5'端部に(1)本明細書に定義される少なくとも1つ、特に1つの第1のヌクレオチド配列、(2)本明細書に定義される少なくとも1つ、特に1つの終止コドン、及び(3)本明細書に定義される第2のヌクレオチド配列を、(1)、(2)、及び(3)の順に含む構造を有すると理解される。

30

【0205】

それにもかかわらず、当業者は、その組み込まれた融合遺伝子配列内を含む、本発明の繊維状バクテリオファージのゲノムの配列が、例えば核酸配列をコードするリンカー又はタグ等の、本発明の分野において有用であるとして当業者に従来から公知の他の配列を含みうることを容易に認識するであろう。

【0206】

特定の態様によれば、本発明の繊維状バクテリオファージは、本明細書に定義されるSTxBサブユニット又はその多様体をその表面に呈示する。

40

【0207】

排他的ではない特定の実施形態によれば、呈示されるSTxBサブユニット又はその多様体は機能的である。「機能的」とは、本明細書に定義される前記STxBサブユニット又はその多様体がSTxBサブユニット又はその多様体の標的に対する結合能を保持することを可能にする、すなわち測定可能な機能的標的結合活性を有する構成を有することを意味する。特定の実施形態によれば、前記標的は、グリコスフィンゴ脂質(GSL)である。従って、特定の実施形態によれば、呈示されるSTxBサブユニット又はその多様体は、グリコスフィンゴ脂質(GSL)、特に発がん性の細胞又は組織の新生物を含む細胞又は組織の表面に発現されるGSLに特異的に結合する。言い換えると、及び特定の実施形態によれば、本発明の繊維状ファージは、1つ又は幾つかのGSLを認識する、結合する、又は特異的に結合する機能的

50

能力を保持する。当業者に公知のGSLの例は、文献から容易に入手可能である。例えば、これは、Ronald L Schnarrら、Essentials of Glycobiology. 2nd edition, Chapter 10 Glycosphingolipidsに開示されるGSLでありうる。これは、例えばGb3、グロボH、isoGb4、フコシルGM1、GM2、neuAcGM3、GD1a、GD2、GD3、又は本明細書に定義されるものを含む群から選択されるGSLでありうる。

【0208】

特定の実施形態によれば、呈示されたSTxBサブユニット又はその多様体を通して本明細書に定義される標的に結合する能力を保持している本発明の繊維状ファージの機能的特性を、ウェスタンブロット分析によって試験し、pIIIとの融合体におけるSTxB又は多様体の適切な呈示を評価する(特に、指針に関しては実験の章を参照されたい)。

10

【0209】

結合を評価する他の手段は:

- FACS(蛍光活性化細胞選別)実験:ファージディスプレイSTxB又は多様体を、選択されるGSLを提示する細胞に接触させる。抗pIII抗体及び適切な蛍光二次抗体による染色後、細胞の蛍光強度を、FACSによって対照(すなわち、細胞に結合しないファージ)と比較して測定する、及び/又は

- 免疫蛍光顕微鏡(播種した細胞へのファージの結合、抗体の染色、落射蛍光顕微鏡)及び/又は

- GSLを含有するリボソームへの結合の評価(ファージを、ブルダウン実験と類似のように、磁気リボソームと混合し、洗浄後、磁石でリボソームを収集し、溶出し、ゲルにローディングする-本明細書における実験の節を参照されたい)

20

【0210】

特定の実施形態によれば、本発明の繊維状ファージの表面に呈示されるSTxBサブユニット又はその多様体、及び本明細書に定義されるGSLであるその標的の結合親和性を証明することができる場合、機能性が存在する。

【0211】

別の相互に排他的ではない特定の実施形態によれば、呈示されるSTxBサブユニット又はその多様体は、適切にフォールディングされるように思われる。「適切にフォールディングされる」とは、呈示されたSTxBサブユニット又はその多様体が、その天然の環境で、特に可溶性型で見出されるSTxBサブユニットのフォールディングと実質的に類似である四次フォールディングをとること、及び/又は上記で考察した機能的特性を保持することを意味する。

30

【0212】

別の相互に排他的ではない特定の実施形態によれば、呈示されるSTxBサブユニット又はその多様体は、上記及び本明細書に定義されるAB₅志賀毒素ファミリーメンバーのB部分に見出される5つのいわゆる「STxBサブユニット単量体」の非共有結合によるアセンブリに起因する5量体立体構造等の、5量体構成をとる。この文脈では、STxBサブユニットは、同一のB断片又は単量体のホモ5量体アセンブリの形態で見出されうると認識される。

40

【0213】

別の態様によれば、本発明者らは、pIIIファージコートタンパク質と融合した1つのSTxB単量体(又はその多様体)が、非融合状態、すなわち「遊離の」形態で見出される他の4つのSTxB単量体とアセンブルした場合、本発明のファージの表面に呈示されるSTxBサブユニット又はその多様体の適切なフォールディングを達成できると定義すると認識される(図11Bを参照されたい)。この構成は更に、ファージ粒子の表面で1から5つのSTxBサブユニット又はその多様体の呈示を可能にする。

【0214】

特定の実施形態によれば、本発明のファージの表面に呈示されるSTxBサブユニット又はその多様体は、以下の特に5量体構造をとり、1つのSTxB単量体又はその多様体がpIIIファージコートタンパク質に融合され、前記単量体又はその多様体は、非融合形態、すなわち

50

本明細書において採択する定義により遊離形態で見出される他の4つのSTxB単量体又はその多様体と共にアセンブルされている。

【0215】

本発明者らの実験は、pIIIファージコートタンパク質に融合した5つのSTxB単量体又はその多様体に対応する実施形態が、ファージの表面での5量体アセンブリの適切な呈示を可能にしないことを評価することが認識され得る(図11Aの原理)。

【0216】

それにもかかわらず、別の特定の実施形態によれば、本発明のファージの表面に呈示されたSTxBサブユニット又はその多様体は、以下の、特に5量体の構造をとる。1つのSTxB単量体又はその多様体がそれぞれ、pIIIファージコートタンパク質に融合し、この単量体又はその多様体が、非融合形態、すなわち本明細書において採択される定義により遊離形態で見出される他の4つのSTxB単量体又はその多様体と共にアセンブルされる。

10

【0217】

非融合形態は、前記単量体が任意のファージタンパク質、特にファージコートタンパク質、特にpIIIファージコートタンパク質に融合していないことを意味する。特定の実施形態によれば、非融合(又は遊離)型は、STxB単量体又はその多様体の実質的に本来の又は天然の形態である位相幾何学的形態である。

【0218】

特定の実施形態によれば、上記の段落の構成を有する呈示されたSTxBサブユニット又はその多様体は、上記で提供される定義によれば機能的であり、及び/又は適切にフォールディングされ、及び/又は5量体構成をとると更に定義され、すなわち、これは、他の4つのSTxB単量体とアセンブルしたpIIIファージコートタンパク質に融合した単一の単量体として見出される場合に、機能的活性、特に標的、特にGSL結合活性を保持する。特定の態様によれば、そのような呈示されたSTxBサブユニット又はその多様体は、機能的立体構造を保持していると定義される。

20

【0219】

特定の実施形態によれば、本明細書に定義される繊維状ファージは、その表面に1~5つのSTxBサブユニット又はその多様体、特に1、2、3、4、又は5つのSTxBサブユニット又はその多様体を呈示する。

【0220】

特定の実施形態によれば、繊維状バクテリオファージは、単離された及び/又は組換えバクテリオファージである。

30

【0221】

本発明はまた、STxBサブユニット又はその多様体であるポリペプチドを呈示する繊維状ファージにも関し、その多様体は、本明細書に定義されるポリペプチド又はその機能的同等物から選択される。特定の実施形態によれば、呈示されるSTxBサブユニット又はその多様体は、機能的であり、及び/又はファージの表面で5量体の構成をとる。

【0222】

更なる特徴によれば、呈示されるSTxBサブユニット又はその多様体は、本明細書の記載に定義される標的から選択される標的に対する結合能を有する。

40

【0223】

特定の実施形態では、呈示されるSTxBサブユニット又はその多様体は、1つのSTxB単量体又はその多様体がpIIIファージコートタンパク質と融合しておりSTxB単量体又はその多様体が他の4つの遊離のSTxB単量体とアセンブルされた形態である。

【0224】

本発明はまた、本明細書に定義される核酸分子、特に本開示の核酸分子、例えばベクター、特にプラスミドをクローニング又は発現させる手段として適した核酸構築物にも関する。

【0225】

従って、本発明はまた、ベクター、特に本明細書に定義される少なくとも1つの核酸分

50

子を含むプラスミドにも関する。

【0226】

プラスミド又はベクターは、クローニング目的、移入目的、又は発現目的のいずれかのために使用することができる。

【0227】

本発明の文脈において、特定の目的のプラスミドは、それが含有する核酸分子のクローニングにとって適したプラスミドである。そのようなクローニングプラスミドは、複製開始点、及びトランスジーンインサート(転写単位)、例えば本明細書に定義される本発明の核酸分子、特に本明細書における任意の実施形態により開示される第1及び第2の核酸配列及びその間の終止コドンを含む核酸分子、又はその断片の挿入を可能にする複数の制限酵素切断部位を包含する細菌プラスミドでありうる。

10

【0228】

しかし、別の特定の実施形態によれば、本発明のプラスミドは、それが含有する核酸分子の発現にとって適している。そのような発現プラスミドはまた、本明細書において発現ベクター又は発現構築物とも呼ばれ、一般的に、プロモーター配列、転写終止配列、及びトランスジーンインサート(転写単位)、例えば本明細書に定義される核酸分子、又はその断片を含有する。発現ベクターはまた、産生されるタンパク質又はRNAの量を増加させるエンハンサー配列も含有しうる。

【0229】

プラスミドは一本鎖DNA分子又は二本鎖DNA分子として見出されうる。

20

【0230】

特に包含されるプラスミドは、ファージミド及びファージベクターである。

【0231】

従って、本発明は、本明細書に定義される核酸分子を含むファージミドにも関する。ファージミド(又はプラスミド)は、いわゆる「ヘルパー」ウイルス(特にヘルパーファージ)又は適切なパッケージング細胞株と組み合わせて、あるタイプのクローニングベクターとして使用することができるf1ファージ由来のf1複製開始点を含有するプラスミドである。ファージミドは、プラスミドとして複製することができるか、又はウイルス粒子、特に本発明の繊維状バクテリオファージにおいて一本鎖DNAとしてパッケージングすることができる。ファージミドは、二本鎖複製のための少なくとも複製開始点(ori)、並びに一本鎖複製及びファージ粒子へのパッケージングを可能にするためのf1 oriを含有する。当業者は、本発明の実施目的のために適切なファージミド構造を容易に選択することができる。

30

【0232】

本発明の特定の実施形態によれば、本発明のファージミドは、以下:選択可能マーカー、ColE1複製開始点、f1複製開始点、転写ターミネーター、プロモーター、リボソーム結合部位、リーダー配列、及び本発明の繊維状バクテリオファージの表面での本明細書に定義されるSTxBサブユニット又はその多様体の呈示を可能にする本明細書に定義されるヌクレオチド配列、の1つ又は幾つかを起りうる全ての組み合わせにより包含する。

【0233】

特定の実施形態によれば、本発明のファージミドは、その配列が配列番号35(4804)のヌクレオチドとして本明細書に提供される、実験の節に開示されるファージミドの配列(いわゆる「pHEN2_STxBファージミド」)の全て又は一部を含む。

40

【0234】

特定の実施形態によれば、上記の項目(1)、(2)、及び(3)が見出される本発明の核酸分子は、その構造を当業者が容易に利用することができるpHEN2ファージミド内に埋め込まれ、そのようなファージミドは一般的に有用である。

【0235】

本発明はまた、本明細書に定義される本発明の核酸分子を含むファージベクターにも関する。

【0236】

50

本発明はまた、本明細書に定義される本発明の核酸分子又はベクター、特に本明細書に開示される実施形態のいずれか1つによるファージミド内に埋め込まれる核酸分子をカプセル化する繊維状バクテリオファージにも関する。特定の態様によれば、そのようなカプセル化により、繊維状バクテリオファージが適切な条件で、すなわち特にナンセンスサブレッサー株/細胞株内で複製することができる場合、項目(1)、(2)、及び(3)を含む構築物の存在により、バクテリオファージの表面でのSTxBサブユニット又はその多様体の呈示が可能となる。ナンセンスサブレッサー株は、アンチコドンに、ターミネーター(又は「ナンセンス」)コドン、UAG(アンバー)、UAA(オークル)、又はUGA(オパール)のうちの1つと対を形成させる、tRNAのアンチコドンに対応するDNAにおける塩基置換変異を呈示する。(大腸菌における一塩基置換によって産生されるナンセンスサブレッサーの例に関しては、http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/Nonsense_suppressor、及び<http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/rev-sup/nonsense-suppressors.html>を参照されたく、後者の頁は参照により本明細書に例証され、組み込まれている)。

10

【0237】

本発明者らはまた、終止コドンの存在が、図11Bに提供されるスキームにより、STxBサブユニット又はその多様体をファージの表面に呈示することができるために特に有用であることも証明した。実験の節は、終止コドンの存在を利用して、遊離のSTxBサブユニット単量体又はその多様体と、pIIIファージコートタンパク質に融合したSTxBサブユニット単量体又はその多様体の両方の形態の産生を可能にする方法を示している。STxBサブユニット単量体又はその多様体の融合及び遊離形態は、ファージ産生/複製のために使用される細胞のペリプラズムにおいてアSEMBLすることができ、それによって得られたファージは、本発明明細書に提供される定義による機能的なSTxBサブユニット又はその多様体をその表面に呈示する。

20

【0238】

本発明の別の目的は、細胞又は細胞宿主、特に本明細書に記載の実施形態のいずれか1つに開示される、本発明による核酸分子、ベクター、プラスミド、ファージミド、又は繊維状ファージを含む細菌細胞又は細菌細胞宿主である。

【0239】

特定の実施形態によれば、そのような宿主細胞は、大腸菌細胞、特に本明細書に記載のプロトコール及び方法を使用して、本明細書に開示されるファージミドを、本明細書に開示される本発明の繊維状ファージにパッケージングすることができる大腸菌細胞である。

30

【0240】

本発明はまた、本明細書に記載される実施形態のいずれか1つに開示される、本発明による核酸分子、ベクター、プラスミド、ファージミド、若しくは繊維状ファージ、又はこれらを含む細胞を含むか、又はからなる組成物にも関する。

【0241】

本発明はまた、本明細書に開示される核酸分子のライブラリ(又はコレクション)、特に本明細書に開示される核酸分子の多様体を包含するライブラリにも関する。

【0242】

本発明はまた、本明細書に開示されるベクター、特にプラスミド又はファージミドのライブラリ、特に、本明細書に開示されるベクター、特にプラスミド又はファージミドの多様体を包含するライブラリにも関する。

40

【0243】

本発明はまた、細菌細胞、特に本明細書に開示される核酸分子、又はプラスミド若しくはファージミド、又は繊維状ファージを含む細菌細胞のライブラリ、特に、本明細書に開示される核酸分子、又はプラスミド若しくはファージミド、又は繊維状ファージの多様体を包含するライブラリにも関する。

【0244】

本発明はまた、繊維状ファージのライブラリ、特に本明細書に開示される多様体繊維状ファージを包含するライブラリにも関する。そのようなライブラリは、一般的にファージ

50

ディスプレイに関して得られる。

【0245】

本発明は、実際に、

a)本明細書に開示される1つ又は幾つかのファージミドを、本明細書に開示される細菌細胞に導入する工程、及び

b)工程(a)の前記細菌細胞を、任意選択で、当技術分野で一般的に公知であり実践されるようにヘルパーファージの存在下、特にSTxBサブユニット又はその多様体を繊維状ファージの表面に呈示する本発明のファージ又はそのライブラリの産生を可能にする条件で培養する工程、並びに

c)任意選択で、産生された繊維状ファージ若しくはそのライブラリを回収する(収集する)工程、及び/又は産生された繊維状ファージ若しくはそのライブラリの特定の種を単離する工程、

を含む、本明細書に開示される繊維状ファージ又はそのライブラリを産生する方法も提供する。

【0246】

特定の実施形態によれば、本発明の繊維状ファージの産生方法により、特に本明細書に開示されるファージミド多様体を包含するファージミドのライブラリ(コレクション)を使用する場合、本明細書に開示される繊維状ファージのライブラリ(又はコレクション)、特に本明細書に開示されるファージ多様体を包含するライブラリの産生が得られる。

【0247】

本明細書の実験の節は、この点においてその特色が、その全ての起こりうる組み合わせにより本発明の一部であり、前記特色が特定の実施形態により互いに孤立している特定のプロトコルを提供する。

【0248】

本発明はまた、本明細書に開示される産生方法を通して得ることができる、本明細書に開示される繊維状ファージ、又はそのライブラリにも関する。

【0249】

本発明の繊維状ファージ又はそれらを包含するライブラリは、特にファージディスプレイを使用して、本明細書に開示されるSTxBサブユニット又はその多様体に対する結合能を保持している推定の標的をスクリーニングするためのおそらく関連性のあるツールであると理解される。本明細書に詳述されるように、Gb3は、ほとんどの公知のSTxBタンパク質に関する天然の結合体であることから、推定のSTxBサブユニット又はその多様体の標的は、グリコスフィンゴ脂質(GSL)を包含する。従って、本発明者らの理論的根拠及びコンセンサス配列の設計は、Gb3ではない他のGSLに結合するための立体構造要件に関するその知識及びデータを考慮していることから、推定の標的は、特に本明細書に記載される、特にTable 2(表2)の上記に記載される一般的に公知のグリコスフィンゴ脂質及びその多様体を包含する。

【0250】

本明細書における実験の節に示されるように、本発明者らは、配列番号1の単量体のアセンブリであるSTxB部分をM13バクテリオファージ上で呈示することにより、Gb3⁺細胞におけるその結合が特異的に駆動されることを確認した。そのような呈示は、STxB遺伝子を系統的に変異させて、天然のSTxBタンパク質が本来結合しないグリコスフィンゴ脂質に対して結合活性を獲得しうる多様体を得る、ライブラリのスクリーニングの状況において従来から利用することができる。

【0251】

天然のSTxBタンパク質が本来結合しないグリコスフィンゴ脂質に対して結合活性を獲得しうるそのような多様体は、本明細書に提供される多様体の定義に適切に包含されると理解される。

【0252】

ペプチド及びタンパク質のファージディスプレイライブラリの調製は、現在では当技術

10

20

30

40

50

分野で周知である。これらの方法は一般的に、細胞をファージミドベクター-DNAによって形質転換して、ファージ粒子の表面に呈示される多様体ペプチド又はタンパク質の1つ又は複数のコピーを有するファージ粒子としてライブラリを増殖させる工程を必要とする。例えば、Bonnycastleら、J. Mol. Biol., (1996), 258:747~762頁;及びVaughanら、Nature Biotechnology (1996), 14:309~314頁を参照されたい。

【0253】

本発明によれば、ファージディスプレイライブラリを産生する方法は、

a)本発明の核酸を発現するファージミドを含むファージを細菌に感染させる工程、又は本発明による核酸を発現するファージミドによって細菌を形質転換する工程、

b)任意選択で、粒子の表面に本発明のペプチド及び/又は本発明の融合タンパク質を呈示する組換えファージミド粒子を産生するために十分な量の、ファージコートタンパク質をコードするヘルパーファージを、感染又は形質転換した細菌に感染させる工程、

c)発現する本発明のペプチド又は本発明の融合タンパク質を呈示するファージのライブラリを形成するために適した条件で感染又は形質転換細菌を培養する工程を含みうる。

【0254】

方法において、細菌は、ファージを感染させて適合させることができる当業者に公知の任意の細菌でありうる。これは、例えば大腸菌、例えばTG1、SS320、ER2738、又はXL1-Blue大腸菌でありうる。

【0255】

本発明によれば、本発明の核酸を発現するファージミドを含むファージは、上記で定義した通りである。

【0256】

本発明によれば、感染工程a)は、当業者に公知の適合させた任意の方法及び/又は任意の条件で実行されうる。例えば、当業者はその技術に関する知識を考慮して、使用するファージ及び細菌に関する多数の感染条件を選択及び/又は適合させることができる。

【0257】

本発明によれば、ファージディスプレイライブラリの調製は、本発明によるファージミドベクターを細菌に感染させる工程を含みうる。

【0258】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、細菌を感染させる幾つかの方法を承知しており、そのようなプロセスを本発明に適合させることができるであろう。

【0259】

本発明によれば、ファージディスプレイライブラリの調製は、本発明によるファージミドベクターによって細菌を形質転換する工程を含みうる。

【0260】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、細菌を形質転換する幾つかのプロセスを知っており、そのようなプロセスを本発明に適合させることができるであろう。例えば、形質転換のプロセスは、金属イオン、一般的に塩化カルシウムの溶液による細菌の化学処理の後に加熱して、レシピエント細菌として機能することができ、多様な起源に由来する異種DNAを取り込むことができるコンピテント細菌を産生する工程を伴う方法、例えばDowerら、1988, Nucleic Acids Research, 16:6127~6145頁に開示される高圧電気穿孔を使用する方法でありうる。

【0261】

本発明によれば、工程a)の感染又は形質転換させた細菌に、ある量のヘルパーファージを感染させる任意選択の工程b)は、当業者に公知の任意の方法及び/又は任意の適合させた条件で実行されうる。例えば、当業者は技術に関する知識を考慮して、感染多重度、使用されるヘルパーファージ及び細菌に関する多数の感染技術を選択及び/又は適合させるであろう。

【0262】

本発明によれば、ヘルパーファージは、当業者に公知の、及び/又は市販されていて、及び本発明に適合させた任意のヘルパーファージでありうる。これは、例えば、M13K07ヘルパーファージでありうる。

【0263】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、使用されるファージ及び/又はファージミド及び/又は細菌に適合させたヘルパーファージを選択することができるであろう。

【0264】

有利には、ファージディスプレイライブラリの調製プロセスにおいて使用されるファージミドベクターは、本発明のペプチド又は配列番号1の配列をコードする配列の末端が終止コドンを含みうる、本発明の融合タンパク質をコードする核酸を含みうる。

10

【0265】

有利には、調製プロセスにおいて使用されるファージミドベクターは、本発明のペプチド又は配列番号1の配列をコードする配列の末端がアンバー終止コドンを含みうる、本発明の融合タンパク質をコードする核酸を含むpHEN2ファージミドでありうる。

【0266】

従って、本発明はまた、ファージ粒子が本発明のペプチド及び/又は配列番号1のペプチド及び/又は本発明の融合タンパク質をその表面に呈示する、複数のファージを含むファージ粒子のライブラリであって、各々の融合タンパク質がタンパク質IIIファージコートタンパク質の少なくとも一部及び本発明のペプチド又は配列番号1のペプチドを含み、前記ファージコートタンパク質が、前記本発明のペプチド又は配列番号1のペプチドのN末端に融合されている、ライブラリも提供する。

20

【0267】

従って、ファージライブラリのファージは、有利には、5量体あたり15個の結合部位で構成されるSTxB5量体と類似の5量体タンパク質をその表面に呈示する。それらの結合部位は「結合ポケット」と呼ぶことができる。水素結合及び疎水性スタッキング相互作用を通して、狭いポケットの残基は、グリコスフィンゴ脂質の炭水化物部分を受容してこれに連結することができる。

【0268】

従って、ファージライブラリのウイルスは、有利には、5量体あたり15個の結合部位で構成されるSTxB 5量体と類似の5量体タンパク質をその表面に呈示する。それらの結合部位は、この狭いポケットの残基と糖脂質の炭水化物部分との間の水素結合及び疎水性スタッキング相互作用を伴う「結合ポケット」として定義される。

30

【0269】

本発明によれば、本発明のファージはまた、ファージのコートタンパク質に融合されたポリペプチド構造を含む第2の融合タンパク質をコードする核酸を含む補助的なファージミドも更に含みうる。

【0270】

本発明によれば、ポリペプチド構造は、抗原又はエピトープでありうる。これは、例えば抗原提示細胞の標的となりうる、当業者に公知の任意の抗原又はエピトープでありうる。

40

【0271】

本発明によれば、補助的なファージミドは、上記で言及した融合タンパク質の発現に適合させた当業者に公知の任意のファージミドでありうる。

【0272】

本発明では、「提示細胞」は、当業者に公知の任意の提示細胞でありうる。これは、例えばTリンパ球、樹状細胞、マクロファージ、ランゲルハンス細胞等を含む群から選択される細胞でありうる。

【0273】

本発明によれば、第2の融合タンパク質のメジャーコートタンパク質は、pVIIIタンパク質ファージコートタンパク質でありうる。

50

【0274】

本発明によれば、本発明のファージはまた、ファージディスプレイスクリーニングのためにも使用されうる。

【0275】

本発明によれば、本発明のファージはまた、グリコフィンゴ脂質を発現する特定の組織又は細胞に化合物を標的化するためにも使用されうる。例えば、本発明のファージは、グリコフィンゴ脂質を発現する抗原提示細胞に、抗原又はそのエピトープ等のポリペプチド構造によって構成されうる又はポリペプチド構造を含みうる化合物を標的化させうる。

【0276】

本発明者らはまた、本発明のペプチドを産生するプロセス、及び特にSTxBの5量体構造をなおも有し、グリコフィンゴ脂質に特異的に結合して標的とすることができるペプチドを産生するプロセスも提供する。

【0277】

本発明はまた、本開示の核酸分子又は発現系を使用する遺伝子組換えによって本明細書に定義されるポリペプチド又は融合タンパク質を産生する方法にも関する。

【0278】

本発明はまた、本発明による核酸配列又は本発明による発現系を含む本発明の宿主を培養する工程を含む、本発明のペプチド及び/又は融合タンパク質を産生する方法にも関する。

【0279】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、宿主に応じた適切な培養条件の範囲、例えば使用する培養培地、温度を知っているであろう。

【0280】

本発明によるペプチド及び/又は融合タンパク質を産生する方法はまた、本発明に従う遺伝子組換えによる産生のために形質転換された任意の適合させた宿主を使用してもよい。

【0281】

本発明によるペプチド及び/又は融合タンパク質を産生する方法はまた、本発明のペプチド及び/又は本発明による融合タンパク質を回収又は単離する工程を含みうる。

【0282】

回収工程又は単離工程は、当業者に公知の任意の手段によって実行することができる。これは、例えば、電気泳動、分子ふるい、超遠心、例えば硫酸アンモニウムによる示差沈殿、限外濾過、膜若しくはゲル濾過、イオン交換、ヒドロキシアパタイトでの溶出、疎水性相互作用による分離、又は他の任意の公知の手段から選択される技術を伴いうる。

【0283】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、宿主、及び産生されるペプチド又は融合タンパク質に応じて回収工程又は単離工程を選択することができるであろう。

【0284】

本発明者らはまた、本発明のペプチドが宿主の成分として使用されうるか、又は宿主、例えばバクテリオファージの成分でありうることも証明した。特に、本発明者らは意外にも、本発明のペプチド若しくは配列番号1の配列のペプチド、又は本発明の融合タンパク質が宿主の表面で発現されうること、及び宿主を、試料中の分子、例えばグリコフィンゴ脂質を検出するために直接使用することができることを証明した。

【0285】

上記で言及したように、本発明者らは意外にも、本発明によって、5量体あたり15個の結合部位で構成されるSTxB 5量体と類似の構造を有する本発明によるペプチド/融合タンパク質によって形成された5量体構造を、ウイルス、例えばファージの表面に有利に呈示することができることを証明した。これらの5量体構造は、この狭いポケットの残基とグリコフィンゴ脂質の炭水化物部分との間の水素結合及び疎水性スタッキング相互作用を

10

20

30

40

50

通して、グリコスフィンゴ脂質等の糖脂質の結合を可能にする結合部位又は「結合ポケット」を含有する。

【0286】

従って、ウイルスライブラリのウイルスは、有利に、5量体あたり15個の結合部位で構成されるSTxB 5量体と類似の5量体タンパク質をその表面に呈示することができる。それらの結合部位は、上記で言及したグリコスフィンゴ脂質に結合することができる「結合ポケット」として定義される。

【0287】

別の態様によれば、ペプチド及び/又は融合タンパク質をその表面に呈示する本発明のウイルスを使用して、試料中のグリコスフィンゴ脂質を検出することができる。

10

【0288】

本発明者らはまた、ペプチド及び/又は融合タンパク質をその表面に呈示する本発明のウイルスを使用して、特定のグリコスフィンゴ脂質に結合する本発明のペプチドを同定及び/又は選択しうることを証明した。特に、本発明者らは、本発明のファージディスプレイライブラリを使用して、特定のグリコスフィンゴ脂質に結合する本発明のペプチドを同定及び/又は選択しうることを証明した。

【0289】

従って、本発明の別の目的は、試料中のグリコスフィンゴ脂質でありうる分子及び/又は細胞を検出するための、本明細書に定義されるポリペプチド及び/若しくは融合タンパク質、又は本発明のペプチドを発現する宿主、又は本発明のウイルス若しくは本発明のウイルスライブラリの *in vitro*での使用である。

20

【0290】

本発明では、試料は生物試料でありうる。生物試料は、当業者に公知の任意の生物試料でありうる。生物試料は、例えば液体又は固体試料でありうる。本発明によれば、試料は、任意の生物学的流体でありえ、例えば試料は、血液、血漿、血清、尿、組織、例えば筋肉の試料、又は組織生検からの試料でありうる。

【0291】

本発明では、分子は、当業者に公知の任意のグリコスフィンゴ脂質でありうる。例えば、これは、Ronald L Schnarrら、Essentials of Glycobiology, 2nd edition, Chapter 10 Glycosphingolipidに開示されるグリコスフィンゴ脂質でありうる。これは例えば、Gb3、グロボH、isoGb4、フコシルGM1、GM2、neuAcGM3、GD1a、GD2、GD3を含む群から選択されるグリコスフィンゴ脂質、又は特に本明細書に定義される及び/若しくは記載される任意のグリコスフィンゴ脂質でありうる。

30

【0292】

このように、本発明のペプチド及び/又は本発明によるペプチドを発現する宿主及び/又は本発明のウイルス、及び/又は本発明のファージディスプレイはまた、*in vitro*又は*in vivo*造影法にも使用されうる。

【0293】

本発明では、*in vitro*又は*in vivo*造影法は、ペプチド又はペプチドを発現する宿主細胞を使用することができる当業者に公知の任意の方法でありうる。例えば、*in vivo*造影法は、単一光子放射断層撮影(SPECT)、陽電子放出断層撮影(PET)、造影超音波検査、及び例えばmangradexナノ粒子を使用する核磁気共鳴画像法(MRI)を含む群から選択されうる。

40

【0294】

本発明では、本発明によるペプチド及び/又は本発明のウイルス及び/又は本発明のファージを、検出造影法に使用する場合、本発明のペプチド又は融合ペプチドは、標識及び/又はタグ付けされうる。例えば、ペプチドは、当業者に公知である適合させた任意のタグによってタグ付けされうる。これは、例えばビオチン、蛍光色素、例えばロドプシン、alex-Fluor、ナノゴールドコーティングリガンド、カーボンブラックコーティングリガンド、mangradex、又は蛍光リガンドを含む群から選択されるタグでありうる。

【0295】

50

例えば、ペプチド及び/又は融合タンパク質は、放射活性原子、例えばシンチグラフィ試験のための放射活性原子、例えば ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{111}In 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、蛍光色素を含む群から選択される化合物によって標識及び/又はタグ付けされうる。

【0296】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、ペプチド及びタンパク質を標識する様々な方法を知っており、本発明のペプチド及び/又は融合タンパク質に対してそのようなプロセスを選択し、及び/又は適合させるであろう。

【0297】

本発明者らはまた、本発明のペプチド又は配列(配列番号1)のペプチドが、グリコスフィンゴ脂質に結合してこれを標的とすることができ、このように、これを使用してグリコスフィンゴ脂質発現パターンのいかなる変化も検出することができることを証明した。特に、病的状況は、グリコスフィンゴ脂質のパターン発現に影響を及ぼし得て、疾患のバイオマーカーとして考慮することができる。

10

【0298】

このように、本発明のペプチド若しくは配列(配列番号1)のペプチド及び/又は本発明によるペプチドを発現する宿主、本発明のペプチド若しくは配列(配列番号1)のペプチドの融合タンパク質は、*in vitro*又は*in vivo*診断方法において使用されうる。

【0299】

特に、本発明のペプチド若しくは配列(配列番号1)のペプチド、及び/又は本発明によるペプチドを発現する宿主、本発明のペプチド若しくは配列(配列番号1)のペプチドの融合タンパク質は、グリコスフィンゴ脂質が異常調節される疾患を検出するための*in vitro*方法において使用されうる。

20

【0300】

本発明では、*in vitro*又は*in vivo*診断方法は、ペプチド又はペプチドを発現する宿主細胞を使用することができる当業者に公知の任意の方法でありうる。例えば、*in vivo*診断方法は、単一光子放射断層撮影(SPECT)、陽電子放出断層撮影(PET)、造影超音波検査、及び例えばmangradexナノ粒子を使用する核磁気共鳴画像法(MRI)を含む群から選択されうる。

【0301】

本発明では、用語「個体」は、カモノハシ目(Monotremata)、オポッサム目(Didelphimorphia)、ケノレステス目(Paucituberculata)、マイクロビオテリウム目(Microbiotheria)、フクロモグラ目(Notoryctemorphia)、フクロネコ目(Dasyuromorphia)、バンディクート目(Peramelemorphia)、双前歯目(Diprotodontia)、ツチブタ目(Tubulidentata)、ジュゴン目(Sirenia)、アフリカトガリネズミ目(Afrosoricida)、ハネジネズミ目(Macroscelidea)、イワダヌキ目(Hyracoidea)、ゾウ目(Proboscidea)、被甲目(Cingulata)、有毛目(Pilosa)、ツパイ目(Scandentia)、ヒヨケザル目(Dermoptera)、霊長目(Primates)、齧歯目(Rodentia)、ウサギ目(Lagomorpha)、ハリネズミ目(Erinaceomorpha)、モグラ目(Soricomorpha)、翼手目(Chiroptera)、センザンコウ目(Pholidota)、食肉目(Carnivora)、奇蹄目(Perissodactyla)、ウシ目(Artiodactyla)、及びクジラ目(Cetacea)からなる群から選択される哺乳動物を意味する。これは、例えばヒト又は動物でありうる。

30

40

【0302】

本発明では、生物試料は、哺乳動物、例えばカモノハシ目、オポッサム目、ケノレステス目、マイクロビオテリウム目、フクロモグラ目、フクロネコ目、バンディクート目、双前歯目、ツチブタ目、ジュゴン目、アフリカトガリネズミ目、ハネジネズミ目、イワダヌキ目、ゾウ目、被甲目、有毛目、ツパイ目、ヒヨケザル目、霊長目、齧歯目、ウサギ目、ハリネズミ目、モグラ目、翼手目、センザンコウ目、食肉目、奇蹄目、ウシ目、及びクジラ目からなる群から選択される哺乳動物から得られうる。これは、例えば、ヒト又は動物でありうる。

【0303】

本発明では、生物試料は、当業者に公知の任意の生物試料でありうる。生物試料は、例

50

えば液体又は固体試料でありうる。本発明によれば、試料は、任意の生物学的流体でありえ、例えば試料は、血液、血漿、血清、尿、組織、例えば筋肉の試料、又は組織生検からの試料でありうる。

【0304】

本発明では、「グリコスフィンゴ脂質が異常調節される疾患/状態」は、GSLが異常調節される、当業者に公知の任意の状態/疾患を意味する。これは、例えばがん、腫瘍でありうる。

【0305】

そのような疾患/状態は、卵巣がん、乳癌、結腸がん、胃腺癌、パーキットリンパ腫、結腸癌（結腸上皮悪性腫瘍）、黒色腫、小細胞肺癌(SCLC)、腎臓癌、神経芽腫、子宮頸癌、膠芽腫、腎臓癌、神経膠腫、網膜芽腫、神経外胚葉性がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、ウィルムス腫瘍、骨肉腫、及びt-All状態から選択されうる。

10

【0306】

本発明では、がんは、当業者に公知の任意のがんでありうる。がんは、例えば体の他の部分への侵入又は散布能を有する異常な細胞成長を伴う任意の疾患でありうる。がんは、例えば、ヒト又は動物の任意の臓器又は組織のがんでありうる。これは、例えば肺、肝臓、眼、心臓、肺、乳房、骨、骨髄、脳、頭頸部、食道、気管、胃、結腸、膵臓、子宮頸部、子宮、膀胱、前立腺、精巣、皮膚、直腸を含む群から選択されるがん、及びリンパ腫でありうる。

【0307】

本発明では、「腫瘍」は、細胞の異常な複製に起因する組織の異常な成長を指す。腫瘍は、良性、前悪性、又は悪性(すなわち、がん様)でありうる。腫瘍は、原発腫瘍、又は転移病変でありうる。

20

【0308】

本発明者らはまた、本発明のペプチド又は配列番号1の配列のペプチドががん様細胞の表面で発現されたグリコスフィンゴ脂質に結合してこれを標的とすることができること、従って本明細書に定義される手段を使用して、グリコスフィンゴ脂質を発現する細胞を検出/標的化することができることも示した。

【0309】

本発明の別の目的は、試料中のがん様細胞を検出するための本発明のペプチドの *in vitro* での使用である。

30

【0310】

本発明では、ペプチドは上記で定義される通りである。特にペプチドは、上記で言及されるように標識又はタグ付けされうる。

【0311】

本発明はまた、グリコスフィンゴ脂質に対する本発明のウイルスの特異性を決定する *in vitro* の方法についても言及する。

【0312】

特に、グリコスフィンゴ脂質に対する本発明のウイルスの特異性を決定する *in vitro* の方法は、

40

- a) 本発明のウイルスとその表面にグリコスフィンゴ脂質を含む支持体とを接触させる工程、
 - b) ウイルスとその表面に存在するグリコスフィンゴ脂質を含む支持体とをインキュベートして、ウイルスをグリコスフィンゴ脂質に結合させる工程、
 - c) インキュベートした表面を洗浄して非結合ウイルスを除去する工程、及び
 - d) グリコスフィンゴ脂質に結合したウイルスを回収する工程
- を含む。

【0313】

本発明によれば、ウイルスの特異性を決定する方法の工程a)は、溶液中、例えば液体溶液中で実行されうる。溶液は、当業者に公知の任意の溶液でありうる。溶液は、例えば培

50

養培地、例えば真核細胞及び/又は原核細胞培養培地、緩衝培地、例えば、当業者に公知の任意の緩衝培地、例えばリン酸緩衝食塩水(PBS)等の市販の緩衝培地でありうる。

【0314】

本発明によれば、その表面にグリコスフィンゴ脂質を含む支持体は、当業者に公知で適合させた任意の支持体でありうるが、但しグリコスフィンゴ脂質は構造的又は生物学的に修飾されない。

【0315】

本発明によれば、グリコスフィンゴ脂質は、支持体の表面に組み込まれているか、又は固定されてもよく、又は例えば細胞の表面に層として提供されてもよい。

【0316】

本発明によれば、支持体は、生物学的支持体又は人工支持体でありうる。支持体は、例えば特定のグリコスフィンゴ脂質を発現する細胞でありえ、例えば支持体は、グリコスフィンゴ脂質を発現するように適合させた当業者に公知の任意の細胞でありうる。支持体は、例えば特定のグリコスフィンゴ脂質を発現するように発現ベクターによって形質転換されたCHO細胞でありうる。当業者は、その技術に関する知識を考慮して、細胞を形質転換するプロセスを知っている。当業者は、発現ベクターに取り込むことができるグリコスフィンゴ脂質をコードする核酸配列を知っている。支持体はまた、グリコスフィンゴ脂質を安定に発現する任意の細胞株でもありうる。

【0317】

支持体はまた、人工支持体、例えば支持された脂質二重層、つながれた二重層脂質膜、単層小胞、又はリポソームでありうる。

【0318】

本発明によれば、支持された脂質二重層、つながれた二重層脂質膜、単層小胞、又はリポソームは、制御された量のグリコスフィンゴ脂質を充填されうる。例えば、支持された脂質二重層は、以下のプロセス：

- i) 脂質をグリコスフィンゴ脂質と混合する工程、
 - ii) 乾燥させて溶媒を除去する工程、
 - iii) 乾燥させた混合物を、前記脂質の融解温度より上の温度で再懸濁し、調製物を得る工程、
 - iv) 工程iii)で得た調製物を凍結融解し、リポソームを含む均一な調製物を得る工程、及び
 - v) 工程iv)の均一な調製物を押し出して、均一なサイズのリポソームを得る工程
- によって調製されるリポソームでありうる。

【0319】

本発明によれば、工程i)で使用した脂質は、脂質二重層を形成するように適合させた当業者に公知の任意の脂質でありうる。これは、例えば、グリセロホスホリピッド、例えばホスファチジルエタノールアミン(セファリン)(PE)、ホスファチジルコリン(レシチン)(PC)、ホスファチジルセリン(PS)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)を含む群から選択される脂質でありうる。

【0320】

本発明によれば、脂質はコレステロールを更に含むうる。

【0321】

本発明によれば、脂質は、修飾された脂質、例えば蛍光標識脂質、化学修飾脂質、例えばビオチン化脂質、及び/又は当業者に公知の任意の他の修飾を更に含むうる。

【0322】

本発明によれば、工程i)で混合した脂質及びグリコスフィンゴ脂質は、モルパーセントでの特定の濃度でありうる。

【0323】

脂質の濃度は、90%~99.9モル%、例えば95~99.9モル%でありうる。

【0324】

10

20

30

40

50

グリコスフィンゴ脂質の濃度は、0.1%~10モル%、例えば0.1~5モル%でありうる。

【0325】

本発明によれば、混合工程は、当業者に公知の任意の適合させた容器中で実行されうる。容器は、例えばガラス管でありうる。

【0326】

本発明によれば、乾燥工程ii)は、当業者に公知の任意の方法及びプロセスによって実行されうる。例えば、これは窒素又はアルゴン雰囲気下で溶媒の蒸発によって実行されうる。乾燥工程は、例えば任意の適合させた容器、例えばガラス管において実行されうる。

【0327】

本発明によれば、乾燥工程ii)は、例えば溶媒の蒸発後に、除去工程ii')を更に含むうる。除去工程は、溶媒を除去するように適合させた当業者に公知の任意の方法を使用して実行されうる。これは、例えば真空の2時間適用による、例えば真空除去でありうる。

10

【0328】

除去工程ii')は、有利には、必要に応じて乾燥工程ii)後に残っているいかなる溶媒も除去することができる。

【0329】

有利には、乾燥工程は、容器、例えばガラス管の壁における均一な乾燥脂質被膜、又は均一な乾燥混合物の形成を可能にする。

【0330】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、例えば使用される脂質及び/又はグリコスフィンゴ脂質に照らして、乾燥工程を適合させるであろう。

20

【0331】

本発明によれば、乾燥混合物は、工程iii)において任意の適合させた緩衝液中に再懸濁されうる。これは、例えばリン酸緩衝食塩水(PBS)、トリス緩衝液、Hepes緩衝液、スクロース緩衝液を含む群から選択される緩衝液中に懸濁されうるが、有利にはスクロース緩衝液中に懸濁されうる。

【0332】

本発明によれば、緩衝液は、工程iii)で使用する前に、方法で使用する脂質の融解温度より上の温度に加温されうる。

【0333】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、脂質の融解温度を知っており、使用される脂質に従ってこの温度を適合させるであろう。例えば、脂質がDOPCである場合、温度は65 でありうる。

30

【0334】

本発明によれば、乾燥混合物又は乾燥脂質は、工程iii)において、緩衝液中で0.9~1.1 mg/mLの濃度、例えば1mg/mLの濃度で懸濁されうる。

【0335】

有利には、乾燥混合物は、工程iii)において、磁気粒子が既に添加されている任意の適合させた緩衝液中で再懸濁されうる。

【0336】

本発明によれば、磁気粒子は、工程iii)の実施にとって適した任意の形態、例えばボール、パック、又は非対称幾何学形状の形態でありうる。

40

【0337】

本発明によれば、磁気粒子のサイズは、工程iii)の実施に適合させた任意のサイズでありうる。例えば、磁気粒子は、10nm~100 μm、又は0.1~10 μmのサイズを有しうる。

【0338】

有利には、緩衝液が磁気粒子を含む場合、これによって磁気粒子が組み込まれる単層小胞又はリポソームを形成することができる。

【0339】

本発明によれば、プロセスは、工程iv)の前に混合工程iii')を更に含むうる。本発明に

50

よれば、混合工程iii')は、脂質を含む溶液を混合するように適合させた当業者に公知の任意の混合方法によって実行されうる。これは、例えばボルテックスミキサーを使用して実行されうる。混合工程iii''')の時間は、1~8分間、例えば3~6分間、例えば5分間でありうる。当業者は、その技術に関する知識を考慮して、使用される脂質に照らして工程ii i')の時間を適合させるであろう。

【0340】

本発明によれば、凍結融解工程iv)は、凍結工程iv')の後に融解工程iv'')を含みうる。

【0341】

本発明によれば、凍結工程iv')は、脂質を含む溶液を凍結するように適合させた、当業者に公知の任意の方法及びプロセスによって実行されうる。例えば、これは、冷却浴、例えばエタノール/ドライアイス混合物とも呼ばれるエタノール及びドライアイスを含む溶液によって形成された冷却浴を使用する方法によって実行されうる。例えば、工程iii)で得られた懸濁液を含む容器を、冷却浴の中に入れてもよい。

10

【0342】

本明細書に使用されるように、当業者は、その技術に関する知識を考慮して、使用される脂質に照らして冷却時間を適合させるであろう。

【0343】

本発明によれば、融解工程iv'')は、脂質を含む溶液を融解するように適合させた当業者に公知の任意の方法及びプロセスによって実行されうる。

【0344】

例えば、これは、工程iv')で得た凍結溶液を含む容器を温水浴中に沈めることによる温水浴を使用する方法によって実行されうる。温水浴の温度は、使用される脂質の融解温度より上の温度でありうる。

20

【0345】

本明細書に使用されるように、当業者は、その技術に関する知識を考慮して、脂質の融解温度を知っており、使用される脂質に従ってこの温度を適合させるであろう。例えば、脂質がDOPCである場合、水浴の温度は65 でありうる。

【0346】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、使用される脂質に照らして融解時間を適合させるであろう。

30

【0347】

本発明によれば、凍結工程iv')及び工程iv'')は、2~5回、例えば2~4回、例えば3回のサイクルとして繰り返されうる。

【0348】

本発明によれば、プロセスは、工程iv'')の後に混合工程iv''')を含みうる。本発明によれば、混合工程iv''')は、脂質を含む溶液を混合するように適合させた当業者に公知の任意の混合方法によって実行されうる。これは、例えばボルテックスミキサーを使用することによって実行されうる。混合工程iv''')の時間は、0.5~2分、例えば1分間でありうる。当業者は、その技術に関する知識を考慮して、使用される脂質に照らして工程iv''')の時間を適合させるであろう。

40

【0349】

本発明によれば、押し出し工程v)は、適合させた当業者に公知の任意のプロセス/装置によって実行されうる。これは、例えば押し出し機、例えばAvanti Polar Lipids, Inc.社(<https://avantilipids.com/divisions/equipment/>)によって販売されている市販の押し出し機を使用する精製工程でありうる。

【0350】

これは、例えば、直径30~1000nmの孔を有する支持体、例えば直径30、50 100、200、400、800、1000nmの孔を有する支持体を使用する押し出しでありうる。

【0351】

支持体は、脂質を含む溶液を濾過するように適合させた当業者に公知の任意の支持体で

50

ありうる。これは、例えばポリカーボネート膜(PC膜)、例えばAvanti Polar Lipids, Inc社から販売されているポリカーボネート膜でありうる。

【0352】

本発明によれば、押し出し工程v)は、使用される脂質の融解温度より上の温度で実行されうる。

【0353】

本発明によれば、押し出し工程v)は、2~20回、例えば5~18回、例えば17回繰り返されうる。

【0354】

有利には、押し出し工程v)後に得られる均一な調製物は、均一なサイズを有するリボソームを含む。

10

【0355】

有利には、得られた均一な調製物は、使用する前に貯蔵及び保存されうる。例えば、得られた均一な調製物は4で貯蔵及び保存されうる。

【0356】

本発明によれば、グリコスフィンゴ脂質を含む支持体は、有利には、磁気粒子が組み込まれている単層小胞又はリボソームでありうる。

【0357】

有利には、単層小胞又はリボソームの表面に存在するグリコスフィンゴ脂質の密度は、脂質及びグリコスフィンゴ脂質の混合物中のグリコスフィンゴ脂質の濃度に比例する。

20

【0358】

本発明によれば、ウイルスをその表面にグリコスフィンゴ脂質を含む支持体と共にインキュベートしてウイルスをグリコスフィンゴ脂質に結合させる工程b)は、特定の温度で実行することができ、例えばこの工程は0~37、好ましくは少なくとも0で実行することができ、例えば、工程b.は、0の温度で実行することができる。

【0359】

本発明によれば、インキュベーション工程b)は、既定の時間実行することができ、例えばこの工程は少なくとも5分間、好ましくは少なくとも10分間実行することができ、例えば工程b.は、30~90分間実行することができる。

【0360】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、例えば使用される支持体に照らしてインキュベーション時間及び/又はインキュベーション工程の温度を適合させるであろう。

30

【0361】

本発明によれば、洗浄工程c)は、本発明と共に使用するために適合させた当業者に公知の任意の方法によって実行されうる。これは、例えばインキュベーション溶液を除去する工程の後にすすぎ溶液によって支持体を洗浄する工程を含みうる。

【0362】

すすぎ溶液は、本発明と共に使用するために適合させた当業者に公知の任意の溶液でありうる。これは、例えばタンパク質及びグリコスフィンゴ脂質の結合及びフォールディングを変更しないすすぎ溶液でありうる。これは、例えば緩衝培地、例えば適合させた当業者に公知の任意の緩衝培地、例えばリン酸緩衝食塩水(PBS)のような市販の緩衝媒体でありうる。

40

【0363】

本発明によれば、グリコスフィンゴ脂質に結合したウイルスを回収する工程d)は、本発明での使用に適合させた当業者に公知の任意の方法によって実行されうる。これは、例えば結合した表面を解離溶液中でインキュベートする工程の後にすすぎ溶液によって支持体を洗浄する工程を含みうる。これは例えば、上記で言及した回収又は単離方法でありうる。

【0364】

本発明によれば、支持体が単層小胞又はリボソームである場合、回収工程d)は、当業者

50

に公知の任意の方法によって実行されうる。例えば、そのような小胞又はリポソームは、遠心分離及び洗浄溶液の除去によって回収することができる。

【0365】

本発明によれば、支持体が、磁気粒子が組み込まれている単層小胞又はリポソームである場合、回収工程d)は、当業者に公知の任意の方法によって実行されうる。例えば、そのような小胞又はリポソームは、遠心分離及び洗浄溶液の除去によって回収することができる、又は更に及び本発明により好ましくは粒子を誘引することができる磁場又は電場を生成する系、特に磁石を使用して回収することができる。例えば、小胞又はリポソームは、試料中に浸されうる磁石を使用して採取されうる。磁石が試料中に浸されうる場合、本発明により、粒子を誘引することができる磁場又は電場を生成する系、特に磁石は、任意の系によって、特に磁波又は電波を妨害しない任意の材料、例えばプラスチック製の取り外し可能なコーティング又はカバーによって保護されうる。なおもより有利には、前記カバーは、使用後使い捨てである。磁気粒子が組み込まれている単層小胞又はリポソームはまた、それらを溶液中で沈降させうる磁石によって回収されうる。

10

【0366】

本発明によれば、分子の特異性を決定する本発明の方法は、本発明のウイルスライブラリ又は本発明のファージライブラリについて実行されうる。

【0367】

本発明によれば、グリコフィンゴ脂質に対するウイルスの特異性を決定する本発明の方法は、その表面にグリコフィンゴ脂質を含まない支持体にウイルスを溶液中で接触させる工程及び前記溶液を回収する工程を含む、予備工程a')を含みうる。

20

【0368】

溶液、インキュベーション条件、及び支持体は、上記に定義される通りである。

【0369】

有利には、予備工程a')によって、グリコフィンゴ脂質の非特異的結合体であるウイルスを除去することができる。

【0370】

本発明によれば、グリコフィンゴ脂質に対するウイルスの特異性を決定する方法は、溶液中に存在するウイルス数を増加させるために細胞にウイルスを感染させる別の予備工程a'')を含みうる。

30

【0371】

感染工程は、当業者に公知の任意の方法によって実行されうる。これは、例えば既に言及した方法でありうる。

【0372】

本発明によれば、予備工程a')及びa'')は、本発明のウイルスの特異性を決定する本発明の方法の工程a)の前に、独立して実行されうる。

【0373】

本発明によれば、予備工程a')の後に、工程a)の前の工程a'')が続く。

【0374】

本発明によれば、工程a'')が後に続く予備工程a')は、工程a)を実施する前に3~5回実施されうる工程のサイクルを表しうる。

40

【0375】

有利には、プロセスが、工程a'')が後に続く工程a')の繰り返しを伴う場合、有利には、グリコフィンゴ脂質の非特異的結合体であるウイルスを除去して、試験されるウイルス数を増加させることができる。

【0376】

本発明によれば、グリコフィンゴ脂質に対するウイルスの特異性を決定するin vitroでの方法を、本発明のウイルスライブラリ又は本発明のファージライブラリについて実行する場合、有利に、ライブラリのいずれのウイルス及び/又はファージが特定のグリコフィンゴ脂質に結合することができるか、及びライブラリのいずれのウイルス及び/又は

50

ファージが前記特定のグリコフィンゴ脂質に結合することができないかを決定することができる。

【0377】

本発明によれば、グリコフィンゴ脂質に対するウイルスの特異性を決定する *in vitro* での方法は、工程d)の後に、いずれのファージがグリコフィンゴ脂質に結合することができるかを決定する解析工程e)を含みうる。

【0378】

解析工程は、ペプチドの結合特異性を決定することができる当業者に公知の任意の方法でありうる。これは、例えばフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、又はプルダウン解析を使用する解析でありうる。例えばこれは、特異性を確認するために、陰性対照、例えばグリコフィンゴ脂質阻害剤、例えばPPMPによって処置した細胞、又はグリコフィンゴ脂質を有しない若しくは他のグリコフィンゴ脂質を有するリボソームを伴い、ファージ又はウイルスがグリコフィンゴ脂質を提示する膜、例えば細胞又は上記で言及したりリボソームに結合するフローサイトメトリー分析でありうる。適切な蛍光標識は、例えばペプチド/ファージへの蛍光体の直接のコンジュゲーション、又は例えば前記ファージ若しくはウイルスに対する蛍光標識抗体の使用、例えば抗M13抗体の使用のいずれかによって実施されうる。次に、細胞/リボソームを、例えばFACS装置、例えばBD accuriの中に通過させて、例えば20000~100000個の事象を収集してもよい。これは、例えばカバーガラス上にグリコフィンゴ脂質を提示する又は提示しない接着細胞上で本発明のファージ又は本発明のペプチドをインキュベートする工程、蛍光標識工程、及び膜結合に関して落射蛍光顕微鏡又はスピニング顕微鏡による画像を得る工程を含む、免疫蛍光顕微鏡を使用する解析でありうる。これはまた、本発明のファージ又は本発明のペプチドを、グリコフィンゴ脂質を含む又は含まない磁気リボソームと共にインキュベートする工程、磁石で磁気リボソームを回収する工程、及び前記リボソームを緩衝液によって洗浄する工程を含む、プルダウンを使用する解析でありえ、得られた洗浄リボソームを次に煮沸し、ウェスタンブロットのゲルにローディングして移動させ、各々のリボソームの結合分画の定量及び分析を可能にする抗体を使用して染色した。

【0379】

当業者は、その技術に関する知識を考慮して、様々な分析方法、例えばフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、又はプルダウン解析を知っており、そのような本発明のペプチド、及び/又は融合タンパク質、及び/又はウイルス及び/又はファージに対してそのような方法を選択する及び/又は適合させるであろう。

【0380】

解析工程はまた、ペプチド配列を決定するために当業者に公知の任意の方法を更に含む。例えば、これはシークエンシング方法において使用されうるファージクローンを得るために細菌にファージを感染させる工程を含む方法でありうる。本発明によれば、シークエンシング方法は、当業者に公知の適合させた任意のシークエンシング方法でありうる。例えば、これは市販のシークエンシング方法、例えばminiprep、及びT7プロモーターフォワードプライマー等の古典的なプライマーを使用するファージミドシークエンシングでありうる。

【0381】

本発明はまた、本明細書に提供される定義により、標的として特に特定のグリコフィンゴ脂質若しくはその多様体、又は幾つかのグリコフィンゴ脂質若しくはその多様体の混合物に結合する、特に特異的に結合するSTxBサブユニット又はその多様体を呈示する1つ又は幾つかの繊維状ファージを同定する方法であって、

a. 特に標的との結合を可能にする条件で、本明細書に定義される複数の繊維状バクテリオファージを含む繊維状バクテリオファージのライブラリ又は本明細書に定義される繊維状バクテリオファージのライブラリと、支持体上に呈示される1つ又は幾つかのグリコフィンゴ脂質又はその多様体とを接触させる工程であって、前記支持体が例えば1つ以上のグリコフィンゴ脂質若しくはその多様体をその表面に発現する細胞であるか、又は

10

20

30

40

50

1つ以上のグリコスフィンゴ脂質若しくはその多様体を提示する単層小胞若しくはリポソーム、特に磁気粒子が組み込まれ、1つ以上のグリコスフィンゴ脂質若しくはその多様体を提示する単層小胞又はリポソームである工程、並びに

b. 例えば洗浄を通して、標的に結合する繊維状バクテリオファージを、標的に結合しない繊維状バクテリオファージから分離する工程、並びに

c. 標的に結合した繊維状ファージを回収する工程、並びに

d. 任意選択で、標的に結合した繊維状ファージを解析する工程、及び/又は回収された繊維状ファージの核酸内容物の少なくとも一部の配列、及び/又は前記回収された繊維状ファージによって呈示されるSTxBサブユニット若しくはその多様体の少なくとも一部の配列、特にSTxBサブユニット単量体若しくはその多様体の配列、更に特に、標的との結合に關与する領域における前記配列を決定する工程を含む方法にも關する。

10

【0382】

工程a)の「標的との結合を可能にする条件」とは、例えば本明細書の実験の節から誘導することができる。

【0383】

「例えば、1つ以上のグリコスフィンゴ脂質若しくはその多様体をその表面に発現する細胞、又は1つ以上のグリコスフィンゴ脂質若しくはその多様体を提示する単層小胞若しくはリポソームである支持体」の例証に關しては、Jonesら、(2016). Targeting membrane proteins for antibody discovery using phage display. Scientific Reports, 6(1), 26240(細胞でのバイオパニング)、又はMirzabekov, Kontos, Farzan, Marasco, & Sodroski, 2000(磁気リポソーム)を参照されたい。同様に、本明細書の実験の節では、パニングの最後の仕上げは、Gb3結合体を単離するために細胞(CHO細胞)で実施する。

20

【0384】

磁気リポソームの利点は、このアプローチが細胞膜の生物学的状況を部分的に回復する最小の制御されたモジュール性の系の特性を組み合わせることであると理解される。本発明の文脈では、選択されるグリコスフィンゴ脂質(GSL)は、化学合成されるか、又は天然起源から精製され、その後大きい単層小胞に組み込まれる。磁気粒子の存在下で小胞を形成することにより、磁気粒子のカプセル化が可能となる。このため、生成されたりポソームは磁性であり、強い磁石で収集することができる。

30

【0385】

前記方法の文脈における「標的」とは、従って本明細書に提供される定義により、特定のグリコスフィンゴ脂質若しくはその多様体、又は幾つかのグリコスフィンゴ脂質若しくは多様体の混合物を意味する。特定の例により、標的は、例えばGb3、Gb4、Forsmann様iGb4、フコシル-GM1、GM1、GM2、GD2、グロボ-H、NeuAc-GM3、NeuGc-GM3、GD1a、O-アセチル-GD3、O-アセチル-GD2、O-アセチル-GT3、GD3、同様にその混合物から選択される特定のグリコスフィンゴ脂質又はその多様体でありうる。

【0386】

1つ又は幾つかのグリコスフィンゴ脂質又はその多様体を呈示する「支持体」は、1つ又は幾つかのグリコスフィンゴ脂質又はその多様体をその表面に発現する細胞でありえ、STxBサブユニット又はその多様体を呈示する1つ又は幾つかの繊維状ファージを同定する方法はin vitroで実行される。細胞は、卵巣がん、乳癌、結腸がん、胃腺癌、パーキットリンパ腫、結腸癌、黒色腫、小細胞肺癌(SCLC)、腎臓癌、神経芽腫、子宮頸癌、膠芽腫、腎臓癌、神経膠腫、網膜芽腫、神経外胚葉性がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、ウィルムス腫瘍、骨肉腫、及びt-All状態から選択される1つ又は幾つかの新生物状態、特に1つの新生物状態に罹っている、又は罹りやすい患者から回収及び/又は単離されうる。

40

【0387】

別の実施形態によれば、支持体は、1つ又は幾つかのグリコスフィンゴ脂質又はその多様体を提示する単層小胞又はリポソームでありうる。

【0388】

50

別の実施形態によれば、支持体は、磁気粒子が組み込まれ、1つ又は幾つかのグリコスフィンゴ脂質又はその多様体を提示する単層小胞又はリボソームでありうる。磁気粒子が組み込まれ、目的のグリコスフィンゴ脂質を提示する単層小胞又はリボソームの調製及び回収を記載する特定の例を、本明細書の実験の節に開示する。

【0389】

特定の実施形態によれば、本発明のSTxBサブユニット又はその多様体を呈示する1つ又は幾つかの繊維状ファージを同定する方法は、各々のその後の工程a)が、前回の繰り返しの工程c)で回収された繊維状ファージを使用する、上記の工程a)~c)の数回、例えば、2、3、4、又は5回の繰り返しを包含する。

【0390】

特定の実施形態によれば、本発明のSTxBサブユニット又はその多様体を呈示する1つ又は幾つかの繊維状ファージを同定する方法は、上記の工程a)~c)の数回の繰り返しを包含し、幾つかのグリコスフィンゴ脂質又はその多様体の混合物を標的として使用して少なくとも1回、例えば初めて実施され、前記混合物は、それに対して繊維状ファージがその後の繰り返しにおいてスクリーニングされる所望の標的を構成する特定のグリコスフィンゴ脂質又はその多様体が枯渇されている。

【0391】

そのような工程の連続により、同定方法の効率を減少させうるファージを繊維状バクテリオファージのライブラリから除去する及び/又は所望の標的に対する非特異的結合体を除去することが簡便に可能になると理解される。

【0392】

本発明はまた、標的として特定のグリコスフィンゴ脂質若しくはその多様体、又は幾つかのグリコスフィンゴ脂質若しくはその多様体の混合物に結合する、特に特異的に結合する本明細書に提供される定義によるSTxBサブユニット又はその多様体を同定する方法であって、必要に応じて、繰り返しのいずれかの段階で、上記の工程c)から回収した繊維状ファージを解析する工程を含む方法にも関する。

【0393】

回収された繊維状ファージを解析する工程は、従来及び周知の方法、例えばフローサイトメトリー、磁気リボソームでの収集(プルダウン)、GSLコーティングプレートでのELISA、又は免疫蛍光顕微鏡を使用して実施することができる。別の関連する方法は、シーケンシング、特に次世代シーケンシングを包含する。結合体を、選択の際に濃縮すべきであり、このことは最終の細菌プールにおいて、異なるクローン中に独立して見出される多様体が結合体である見込みが大きいことを意味する。次に、これをFACS及び本明細書に記載の及び当業者に周知の他の技術によって確認することができる。

【0394】

特定のグリコスフィンゴ脂質又はその多様体に結合する、特に特異的に結合する本明細書に提供される定義によるSTxBサブユニット又はその多様体を同定するために、回収された繊維状ファージの核酸内容物の少なくとも一部の配列の決定は、好都合には、周知の方法、特にシーケンシング方法を使用して達成することができる。任意の適したシーケンシング方法を使用してもよい。当業者は、使用されうる異なるシーケンシングを十分に承知している。

【0395】

STxBサブユニット又はその多様体の同定はまた、回収された繊維状ファージによって呈示されるSTxBサブユニット若しくはその多様体の少なくとも一部のタンパク質若しくはペプチド配列のシーケンシングを通して、又は回収された繊維状ファージのゲノム内の目的の領域のシーケンシングされたヌクレオチド配列からアミノ酸配列を予測することによって実施することができる。

【0396】

当業者は、本明細書に定義されるSTxBサブユニット単量体又はその多様体の配列内でありうる、更に特に、文献及び本記載において容易に考察される標的との結合に関与する領

10

20

30

40

50

域内でありうる、シーケンシングされる領域を容易に決定することができ、又は目的のそのような領域を容易に同定することができる。

【0397】

別の態様によれば、本発明はまた、医薬として使用するための、本明細書に開示される実施形態のいずれか1つによる、STxBサブユニット又はその多様体を本発明のその表面に呈示する繊維状バクテリオファージ、又はそれを含む組成物にも関する。

【0398】

本発明の繊維状バクテリオファージは、卵巣がん、乳癌、結腸がん、胃腺癌、パーキンソン病、結腸癌、黒色腫、小細胞肺癌(SCLC)、腎臓癌、神経芽腫、子宮頸癌、膠芽腫、腎臓癌、神経膠腫、網膜芽腫、神経外胚葉性がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、ウィルムス腫瘍、骨肉腫、及びt-All状態から選択される1つ又は幾つかの新生物状態、特に1つの新生物状態に罹っている患者の処置において、又はそれを必要とする対象をワクチン接種するために使用されうる。

10

【0399】

本開示の別の態様によれば、本発明の繊維状ファージはまた、特にそのようなファージが、本明細書に定義されるグリコスフィンゴ脂質に対する結合又は特異的結合を呈示する場合には、検出ツールとして、特に本明細書に定義されるグリコスフィンゴ脂質を標的とする検出造影法において使用することができる。特定の実施形態によれば、検出方法は、in vitroで培地において実行されるか、又はヒトでありうる動物から採取した生物試料について実行され、前記培地又は生物試料は、検出される目的のグリコスフィンゴ脂質を含有する又は含有し易い。動物から採取した試料は、がん等の病的状態、又はグリコスフィンゴ脂質の調節不全に関連する状態を有すると診断された又は状態を有し易い患者から回収した生物試料でありうる。

20

【0400】

この目的のため、本発明の繊維状ファージは、好都合には、表面に呈示されたSTxBサブユニット若しくはその多様体、STxBサブユニット、又は融合タンパク質に会合した、移植された、又は共有結合を含む共役された検出可能部分を含む、標識又はタグ等の検出可能な部分を有することができる。そのような移植を達成する適した方法は、当業者に容易に利用可能である。

【0401】

特定の実施形態によれば、検出可能部分を有する本発明の繊維状ファージは、特にそのような検出可能部分を有していない対応する繊維状ファージに対して、グリコスフィンゴ脂質の標的化又は標的化特異性に関して不変の機能的特性を有する。当業者は、周知の方法を使用して、機能的特性が不変のままであるか否かを比較によって容易に評価することができる。

30

【0402】

適切なタグ/標識は、ビオチン、蛍光色素、例えばロドプシン、alexa-Fluor、ナノゴールドコーティングリガンド、カーボンブラックコーティングリガンド、mangradex、蛍光色素等の蛍光リガンド、又は例えば ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{111}In 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 等の、シンチグラフィ試験のための放射活性原子を含む放射活性分子を含む群から選択されうる。

40

【0403】

従って、本発明は、ヒト組織又は細胞において目的のグリコスフィンゴ脂質のin vivo検出のためのプローブとして使用するために標識される、本明細書に定義される繊維状ファージにも関する。

【0404】

従って、本発明はまた、特に目的の標的をおそらく含有する生物試料中でin vivo又はin vitroで目的のグリコスフィンゴ脂質を染色するためのプローブとしての、本明細書に定義される繊維状ファージ又はこれらを含む組成物の使用にも関する。

【0405】

本発明はまた、本発明のペプチド及びその末端の1つで融合された化合物を含むキメラ

50

タンパク質にも言及する。

【0406】

本発明によれば、化合物は、本発明のペプチドのC末端若しくはN末端に直接、又はリンカーを介して融合されうる。本発明では、リンカーは、ペプチドのC末端又はN末端でありうる。リンカーがN末端にある場合、これは以下の式: pep-Z(n)-Cysを有し得て、式中pepは、本発明のペプチドであり、Zはスルフヒドリル基を欠如するアミノ酸であり、nは0、1、又はアミノ酸配列であり、及びCysはシステインアミノ酸である。

【0407】

本発明では、その末端に融合される化合物は、化学又は生物学的化合物でありうる。化合物は薬物、例えばハプテン、ソラレン、又はpep-Z(n)-Cysのシステイン部分の-SH基と連結可能な化学基を有することを条件とする任意の化合物でありうる。

10

【0408】

化合物は、直接、又はプロモ酢酸等の化合物による活性化後に、又は当業者に公知の他の任意の方法によって連結されうるが、但し反応の結果は、Mが上記で言及した全ての化合物である以下の式: pep-Cys-Mを有する化学実体である。

【0409】

ペプチド又はポリペプチド部分の共有結合のための共役アプローチは、当業者に公知の、及び/又は当業者によって記載若しくは実行される任意の方法又はプロセスでありうる。例えば、具体化することができる第1の方法は、Carlssonら、1978. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, a new heterobifunctional reagent. Biochem. J. 173:723~737頁に記載されるSPDPヘテロ二官能性架橋剤の使用である。本発明のペプチド又は本発明の融合タンパク質を目的の別のペプチドに共有結合によって共役する方法の別の例は、P. Schelteら、「Differential Reactivity of Maleimide and Bromoacetyl functions with Thiais: Application to the Preparation of Liposomal Diepitope Constructs」. Eur. J. Immunol. (1999) 29:2297~2308頁によって記載されるように、別のペプチド上にプロモアセチル又はマレイミド官能基を産生することである。本発明のペプチド又は本発明の融合タンパク質に分子を共役させる方法の別の例は、MBS(m-マレイミド-ベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)を使用することである。この共役は、MHCクラスI及び/又はMHCクラスII経路を通して抗原性タンパク質等の大きい化合物の輸送及びプロセッシングを可能にする。クリックケミストリーもまた、上記で考察したように共役目的のために使用されうる。当業者は、当技術分野のプロトコルをこの目的のために容易に適合させることができる。

20

30

【0410】

本発明によれば、本発明によるキメラタンパク質は、グリコスフィンゴ脂質を発現する特定の組織又は細胞に化合物を標的化することができる。例えば、本発明によるキメラタンパク質は、グリコスフィンゴ脂質を発現する抗原提示細胞に、ポリペプチド構造を構成しうる又は含みうる化合物、例えばキメラタンパク質の抗原若しくはエピトープ、糖ペプチド若しくは糖タンパク質、リポペプチド若しくはリポタンパク質を標的化することを可能にしうる。

40

【0411】

本発明によれば、化合物は、DNA、RNA、又はsiRNA分子等のポリヌクレオチド構造に結合することができるポリペプチドでありうる。そのような化合物は、標的細胞において発現される目的の配列を含むベクター又はプラスミドでありうる。これはまた、転写の抑制を通して遺伝子の沈黙化を引き起こしうる任意のsiRNA分子でもありうる。本発明では、標的細胞は、その膜にグリコスフィンゴ脂質を有する真核細胞である。このため、本発明のキメラタンパク質はまた、遺伝子治療のため、又は異種タンパク質を発現する組換え細胞を得るためのいずれかのために、標的細胞にヌクレオチド配列を導入するための担体でもありうる。本発明のキメラタンパク質はまた、遺伝子治療のため、又は例えば細胞の無秩序な複製に関係する遺伝子を沈黙化させるためのいずれかのために標的細胞にsiRNA分

50

子を導入するための担体でもありうる。

【0412】

本発明によれば、本発明のペプチドは、共有結合を通して直接、又はリンカーを通して間接的に細胞傷害薬に作動可能に連結されうる。

【0413】

有利には、本発明のペプチドは、グリコスフィンゴ脂質を発現する細胞に前記細胞傷害薬を標的化すること可能にする。有利には、本発明のペプチドは、グリコスフィンゴ脂質を発現する腫瘍細胞に前記細胞傷害薬を標的化することを可能にする。

【0414】

用語「間接的結合」は、本発明のペプチド又は本発明の融合ペプチドが、C末端システインのスルフヒドリル部分を通してリンカーに共有結合によって連結されうることを意味し、前記リンカーは、グリコスフィンゴ脂質を有する細胞に内部移行される薬物又はプロドラッグに作動可能に連結される。

10

【0415】

この連結は、共有結合又は非共有結合を通しての連結でありうるが、但し本発明のペプチド又は本発明の融合タンパク質の活性及び分子の活性は修飾されない。

【0416】

本発明のペプチドは、疾患に関係している標的分子を認識する新規方法を提供する。特に、本発明のペプチドは、がん細胞に存在することが示されているグリコスフィンゴ脂質の認識を可能にする。従って、本発明は、ある特定のがんを検出及び処置する刺激的な新規方法を提供し易い。

20

【0417】

有利には、本発明のペプチドは、グリコスフィンゴ脂質を発現する細胞及び/又は組織への化合物、例えば薬物の標的化を可能にし、このように、病的な部位での薬物濃度を増加させることによって処置の効率を改善することができる。加えて、本発明のペプチドはまた、「健康な」組織及び/又は細胞に対する薬物、特に細胞傷害薬による起こり得る副作用を低減することによって、服薬遵守を改善することができる。

【0418】

従って、本発明はまた、医薬として使用するための本発明によるキメラタンパク質にも関する。

30

【0419】

本発明によれば、医薬は、グリコスフィンゴ脂質が異常調節される疾患の処置にとって有用でありうる。グリコスフィンゴ脂質が異常調節される疾患の例は、上記で言及されている。

【0420】

本発明では、医薬は、ヒト又は動物に投与することができる任意の形態でありうる。投与は、直接実行することができ、すなわち純粋又は実質的に純粋な形態の医薬として、薬学的に許容される担体及び/又は担体と共に実行されうる。

【0421】

本発明によれば、医薬は粉末の形態、例えば注射用溶液の形態、又はカプセルの形態で飲み込むための経口投与の形態でありうる。

40

【0422】

本発明によれば、医薬は経口投与のための医薬でありうる。例えば、医薬が経口投与のための医薬である場合、これは例えばカプセルの形態でありうる。

【0423】

本発明によれば、医薬は非経口投与、例えば静脈内投与のための医薬でありうる。

【0424】

本明細書において以降記載する目的及び態様は、本発明及び開示の一部である：

項目1. 以下

XaPDCVTGKVEYTKYNXbXcXdTFXeVKVGDKXfXgXhXiXjXkXlXmLQSLLLSAQITGMTVTIKXnXoXpCHNXqGXr

50

XsXtEVIFR

のアミノ酸配列のペプチドであって、
式中、

- Xaは、T、A、又はSであり、
- Xb、Xc、Xd、Xf、Xmは、独立してD、E、又はNであり、
- Xe、Xi、Xn、Xp、Xtは、独立してT、A、又はSであり、
- Xgは、L、I、又はVであり、
- Xhは、F、Y、W、又はAであり、
- Xjは、N、E、又はSであり、
- Xkは、R、K、又はEであり、
- Xlは、W、F、Y、又はAであり、
- Xoは、N、E、D、又はSであり、
- Xqは、G A、又はSであり、
- Xrは、G、A、S、又はTであり、
- Xsは、F、L、又はYであり、

但し、XaがTである場合、Xb、Xc、XdはDではなく、XeはTではなく、XfはEではなく、XgはLではなく、XhはFではなく、XiはTではなく、XjはNではなく、XkはRではなく、XlはWではなく、XmはNではなく、XnはTではなく、XoはNではなく、XpはAではなく、XqはGではなく、XrはGではなく、XsはFではなく、及びXtはSではない

ペプチド。

【0425】

項目2. 項目1に記載のペプチド又は配列番号1のペプチドがウイルスのコートタンパク質に融合されている、項目1のペプチド又は配列番号1のペプチドを含む融合タンパク質。

【0426】

項目3. ウイルスのコートタンパク質がpIIIタンパク質ファージコートタンパク質である、項目2の融合タンパク質。

【0427】

項目4. 項目1に記載のペプチドをコードする核酸。

【0428】

項目5. 項目2又は3の融合タンパク質をコードする核酸。

【0429】

項目6. 項目1のペプチド又は配列番号1のペプチドをコードする配列の末端に終止コドンを含む、項目5に記載の核酸。

【0430】

項目7. アミノ酸配列

XaPDCVTGKVEYTKYNXbXcXdTFXeVKVGDKXfXgXhXiXjXkXlXmLQSLLLSAQITGMTVTIKXnXoXpCHNXqGXr
XsXtEVIFR

のペプチドをコードする核酸を含む発現系であって、
式中

- Xaは、T、A、又はSであり、
- Xb、Xc、Xd、Xf、Xmは、独立してD、E、又はNであり、
- Xe、Xi、Xn、Xp、Xtは、独立してT、A、又はSであり、
- Xgは、L、I、又はVであり、
- Xhは、F、Y、W、又はAであり、
- Xjは、N、E、又はSであり、
- Xkは、R、K、又はEであり、
- Xlは、W、F、Y、又はAであり、
- Xoは、N、E、D、又はSであり、
- Xqは、G A、又はSであり、
- Xrは、G、A、S、又はTであり、

Xsは、F、L、又はYであり、
 プラスミド、ファージミド、又は発現ベクターのうちの少なくとも1つである、
 発現系。

【0431】

項目8. プラスミド、ファージミド、又は発現ベクターのうちの少なくとも1つである、
 項目4に記載の核酸を含む発現系。

【0432】

項目9. 項目1に記載のペプチド、又は項目2若しくは3に記載の融合タンパク質、及び/
 又は項目7若しくは8に記載の発現系を含む宿主。

【0433】

項目10. 真核細胞、原核細胞である、項目9に記載の宿主。

【0434】

項目11. 項目1のペプチド並びに/又は項目2及び/若しくは3の融合タンパク質をその表
 面に含むウイルス。

【0435】

項目12. 項目1のペプチド並びに/又は項目2及び/若しくは3の融合タンパク質をその表
 面に呈示するウイルス。

【0436】

項目13. 項目1の異なるペプチドの複数並びに/又は項目2及び/若しくは項目3の融合タ
 ンパク質をその表面に呈示する、項目12のウイルスの複数を含むウイルスのライブラリ。

【0437】

項目14. ウイルスがファージである、項目13に記載のウイルスのライブラリ。

【0438】

項目15. 項目1に記載のペプチド、又は項目2若しくは3に記載の融合タンパク質を、項
 目4~6のいずれかに記載の核酸又は項目7若しくは8に記載の発現系を使用する遺伝子組換
 えによって産生する方法。

【0439】

項目16. a)細菌に、項目6の核酸を発現するファージミドを含むファージを感染させる
 か、又は項目6の核酸を発現するファージミドによって細菌を形質転換する工程、

b)任意選択で、感染した細菌に、融合タンパク質を粒子の表面に呈示する組換えファ
 ージミド粒子を産生するために十分な量の、ファージコートタンパク質をコードするヘルバ
 ーファージを感染させる工程

c)項目1の発現ペプチド又は項目2の融合タンパク質を呈示するファージのライブラリを
 形成するために適した条件で、形質転換された感染細菌を培養する工程
 を含むファージのライブラリを産生する方法。

【0440】

項目17. 試料中の分子及び/又は細胞を検出するための、項目1のペプチド及び/又は項
 目2の融合タンパク質、又は項目9の宿主、又は項目11のウイルス、又は項目13若しくは14
 のウイルスのライブラリの *in vitro*での使用。

【0441】

項目18. 分子がグリコスフィンゴ脂質である、項目17に記載の *in vitro*での使用。

【0442】

項目19. グリコスフィンゴ脂質に対する項目14に記載のウイルスの特異性を決定する
 方法。

【0443】

項目20. a)項目14に記載のウイルスと、その表面にグリコスフィンゴ脂質を含む支持
 体とを接触させる工程、

b)ウイルスとその表面に存在するグリコスフィンゴ脂質を含む支持体とをインキュベ
 ートして、ウイルスをグリコスフィンゴ脂質に結合させる工程、

c)インキュベートした表面を洗浄して、非結合ウイルスを除去する工程、及び

10

20

30

40

50

d)グリコスフィンゴ脂質に結合したウイルスを回収する工程を含む、グリコスフィンゴ脂質に対する項目19に記載のウイルスの特異性を決定する方法。

【0444】

項目21. 項目7に定義されるペプチド、及びその末端の1つに融合された化合物を含むキメラタンパク質。

【0445】

項目22. 医薬として使用するための、項目21に記載のキメラタンパク質。

【0446】

項目23. グリコスフィンゴ脂質が異常調節される疾患の処置のための医薬として使用するための項目22に記載のキメラタンパク質。

10

【0447】

項目24. In vitro又はin vivo診断法における項目1のペプチド、及び/又は項目2の融合タンパク質、又は項目9の宿主、又は項目11のウイルス、又は項目13若しくは14のウイルスのライブラリの使用。

【0448】

項目25. In vitro又はin vivo診断法における項目1のペプチド、及び/又は項目2の融合タンパク質、又は項目9の宿主、又は項目11のウイルス、又は項目13若しくは14のウイルスのライブラリの使用。

【0449】

項目26. グリコスフィンゴ脂質が異常調節される疾患を検出するin vitroでの方法における項目1のペプチド、及び/又は項目2の融合タンパク質、又は項目9の宿主、又は項目11のウイルス、又は項目13若しくは14のウイルスのライブラリの使用。

20

【0450】

本出願の読者を助けるために、本記述は、様々な段落若しくは節、及び/又は様々な実施形態に分けられている。このように分けられていても、段落若しくは節及び/又は実施形態の物質が、別の段落若しくは節及び/又は別の実施形態の物質と無関係であると考えてはならない。逆に、本出願は、企図することができる様々な節、段落、及び文章の全ての組み合わせを包含する。本出願は、本明細書に記載される様々な実施形態の全ての組み合わせを包含する。

30

【0451】

本出願において、特にそれ以外であると明記していない限り、又は本文がそれ以外であると指示していない限り、全ての用語は、関連する分野におけるその通常の意味を有する。

【0452】

用語「含む(comprising)」は、「含む(including)」又は「含有する」と同義で、制限がなく、追加の列挙されていない要素、成分、又は方法の工程を除外しないが、用語「からなる」は、閉鎖的な用語であり、明白に列挙されていない任意の追加の要素、工程、又は成分を除外する。

【0453】

用語「から本質的になる」は、これらの追加の要素、工程、又は成分が本発明の基本的及び新規の特性に実質的に影響を及ぼさない限り、追加の列挙されていない要素、工程、又は成分を除外しない、部分的に制限がない用語である。

40

【0454】

よって用語「含む(comprising)」(又は含む(comprises))は、用語「からなる」(「からなる」)、及び用語「から本質的になる」(「から本質的になる」)を含む。従って、用語「含む(comprising)」(又は含む(comprises))は、本出願では、より具体的に用語「からなる」(「からなる」)、及び用語「から本質的になる」(「から本質的になる」)を包含することを意味する。

【0455】

50

本出願の読者を助ける試みで、本記述は、様々な段落若しくは節及び/又は様々な実施形態に分けられている。このように分けられていても、段落若しくは節及び/又は実施形態の物質が、別の段落若しくは節及び/又は別の実施形態の物質と無関係であると考えてはならない。逆に、本出願は、企図することができる様々な節、段落、及び文章の全ての組み合わせを包含する。本出願は、本明細書に記載される様々な実施形態の全ての組み合わせを包含する。

【0456】

本明細書で引用した全ての参考文献の関連する開示の各々は、参照により本明細書に具体的に組み込まれている。以下の実施例は、例証として提供され、制限としてではない。

【0457】

本発明の他の実施例及び特色は、本発明者らが実施した実験を、本記述に与えられる特色及び定義を補足して例証する実施例及び図を読むことによって明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0458】

【図1】落射蛍光顕微鏡によって撮像された細胞の写真を示す図である。この図では、Gb3+CHO及びGb3-CHO細胞は、グリコフィンゴ脂質Gb3を発現する(Gb3+)又は発現しない(Gb3-)CHO細胞を意味する。図1A及び図1Bはそれぞれ、Gb3+CHO及びGb3-CHOにおけるAlexa_488標識志賀毒素Bサブユニット(STxB)の4で30分間の結合の写真を表す。図1C及び図1Dは、M13抗体を使用する免疫蛍光によって検出した、Gb3+CHO及びGb3-CHO細胞における配列番号1の配列(志賀毒素のBサブユニット(STxB))のペプチドを呈示するファージの4で45分間の結合の写真を表す。

【図2】フローサイトメトリーによって分析したGb3+CHO及びGb3-CHO細胞における配列番号1の配列(STxB)及び STxBのペプチドの結合のフローチャートを表す図である。図2A及び図2Bはそれぞれ、Gb3+CHO及びGb3-CHOにおけるAlexa_488標識STxBの4で30分間の結合のフローチャートを表す。図2C及び図2Dは、M13抗体を使用する免疫蛍光によって検出した、Gb3+CHO及びGb3-CHOにおける STxBの4で45分間の結合を表す。

【図3】免疫蛍光によって撮像された細胞におけるゴルジ体へのSTxBの逆行性輸送を例証する写真を示す図である。図3A及び図3Bはそれぞれ、Gb3+CHO及びGb3-CHOにおいて37で45分間インキュベートしたAlexa_488標識STxBの写真である。

【図4】発現ベクター及びバクテリオファージの略図である。図4Aは、タンパク質pIII配列に融合した志賀毒素のBサブユニット配列(STxB)を含むpHEN2発現ベクターを表し、図4Bは、STxBを提示するM13バクテリオファージを表す。

【図5】イムノプロットング後に得たニトロセルロース膜の写真である。この写真では、黒色の線は、TG1細菌によって発現され、培養培地の上清中に単離された、配列番号1の配列のペプチドとpIIIタンパク質ファージコートタンパク質との融合タンパク質(STxB-P111)、及び変異ペプチドの志賀毒素Bサブユニット配列と、pIIIタンパク質ファージコートタンパク質との融合タンパク質(STxB_mut_P111融合タンパク質)に対応する。

【図6】落射蛍光顕微鏡によって撮像された細胞の写真を表す図である。図6Aは、2-[4-(3,4-ジメトキシフェニル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]-5-[(2-メチルプロパ-2-エン-1-イル)オキシ]フェノール(PPMP)処置を行わないC2TA細胞におけるAlexa_488標識STxBの結合を示す写真である。図6Bは、PPMP処置後のC2TA細胞におけるAlexa_488標識STxBの結合を示す写真である。PPMPによって処置したC2TA細胞におけるSTxB結合の喪失は、グリコフィンゴ脂質合成の阻害を確認した。図6Cは、PPMP処置を行わないC2TA細胞におけるAlexa_488標識 STxBの結合を示す写真である。図6Dは、PPMP処置後のC2TA細胞におけるAlexa_488標識 STxBの結合を示す写真である。これらの画像では、明るいスポットは、Alexa_488標識STxBに対応する。グリコフィンゴ脂質合成の阻害後(PPMP処置C2TA)、 STxBの結合は失われ、グリコフィンゴ脂質における結合を確認した。

【図7】STxB_mut_P111融合タンパク質を発現するTG1細菌の培養上清をロードしたLabsafe Gel Blueによって染色したポリアクリルアミドゲルの写真、質量分析によって得た結果、及びSTxB_mut_P111融合タンパク質のアミノ酸配列である。STxB変異体及びP111の両方

10

20

30

40

50

の変異アミノ酸をカバーする13個のマッチするペプチドが検出された(図7の配列は、本明細書における配列番号33に対応する)。

【図8】落射蛍光顕微鏡によって撮像した細胞の写真を表す。図8Aは、落射蛍光顕微鏡によって撮像したC2TA細胞における $_STxB$ の結合を示す写真である。図8Bは、落射蛍光顕微鏡によって撮像したC2TA細胞における $_STxB_mut$ の結合を示す写真である。 $_STxB_mut$ の結合は失われ、M13バクテリオファージにおけるSTxBの呈示が、Gb3+細胞におけるその結合を特異的に駆動することを確認する。

【図9】フローサイトメトリーによって分析したC2TA細胞におけるSTxB₄₈₈、 $_STxB$ 、及び $_STxB_mut$ の結合のフローチャートを表す図である。図9Aは、Alexa₄₈₈標識STxBの結合のフローチャートを表す。図9Bは、M13抗体を使用する免疫蛍光によって検出した $_STxB$ の結合のフローチャートを表す。確認されたC2TA細胞における $_STxB$ の結合は、Gb3の認識能である。図9Cは、M13抗体を使用する免疫蛍光によって検出した $_STxB_mut$ の結合のフローチャートである。グリコシフィンゴ脂質合成が阻害されると結合が失われたことは再度、M13バクテリオファージにおけるSTxBの呈示が、Gb3+細胞におけるその結合を特異的に駆動することを確認する。

【図10】グリコシフィンゴ脂質に特異的に結合する本発明のペプチドのファージディスプレイ選択の略図である。本発明のファージディスプレイライブラリ(1)を、非特異的結合体(3)を除去するために所望の標的を発現しない細胞において最初に枯渇させる(2)。次に、非結合ファージを、標的を発現する細胞に集合させる(4)。洗浄(5)後、残っているファージを溶出させて増幅し(6)、別の選択ラウンドのために使用する。3~5サイクル後、ファージを所望の標的に対する特異的結合に関して試験する(7)。

【図11】M13バクテリオファージにおいて呈示された場合のSTxBタンパク質の立体構造を示す図である。A. それらの各々がファージの1つのpIIIタンパク質に融合している5つのSTxB単量体は、5量体形成することが可能であった。次に、STxBの1つのみの5量体を、ファージ粒子上に呈示することができる。B. pIIIタンパク質と融合した1つのSTxB単量体は、ファージ粒子のアセンブリの際に細菌のペリプラズムにおいて他の4つの遊離のSTxB単量体と5量体形成することが可能であった。次に、1~5つのSTxB 5量体をファージ粒子に呈示することができる。

【図12】落射蛍光顕微鏡によって撮像されたC2TA細胞における、アンバー終止コドンを含む及び含まない($_STxB$ 及び $_STxB_Namb$)並びに標準的なヘルパーファージ(HP)又はハイパーファージ(HY)を含む $_STxB$ の結合を示す図である。A. $_STxB_Namb_HP$ B. $_STxB_Namb_HY$ C. $_STxB_HP$ D. $_STxB_HY$. アンバー終止コドンが存在しないこと(Namb)は、ハイパーファージ及びヘルパーファージのいずれを使用しても、もはやGb3陽性細胞に結合することができないファージ調製物が、STxB_{pIII}の融合体の100%によって得られたことを意味している。

【図13】アンバー終止コドン及びヘルパー/ハイパーファージの組み合わせを使用するT_{G1}細菌の上清へのSTxB_{pIII}融合体の発現は、pIIIタンパク質に対する抗体を使用するイムノプロットングによって確認されることを示す図である。

【図14】Gb3結合体を特異的に集合させるための磁気単層小胞(MUV)を示す図である。説明:(1)磁気粒子、(2)STxB、(3)Gb3、(4)脂質二重層(DOPC)、(5)磁石。

【図15】STxB(A.)及びSTxBを呈示するファージ(B.) がGb3陽性MUVにおいて特異的に集合し、対照MUVでは集合しないことが、抗STxB抗体(A.)及び抗pIII抗体(B.)を使用するイムノプロットングによって確認されたことを示す図である。

【図16-1】磁気リボソームを含有するGb3へのSTxB及び $_STxB$ の特異的集合を示す図である。1.磁気リボソームの電子顕微鏡による特徴付け。2.Gb3含有リボソームにおけるSTxB及びPh_{STxB}の特異的集合。Ph_{STxB_mut}は、Gb3リボソーム又はDOPCリボソームのいずれにおいても集合せず、これを本明細書において対照として使用する。3.リボソームにおけるSTxB及び $_STxB$ 集合のフローサイトメトリー分析。Gb3含有リボソームに集合させると、STxB及びSTxBに関して蛍光のシフトが観察される。Gb3陰性リボソームに関して有意な集合は観察できなかった。更に、 $_STxB_mut$ の有意な集合は、Gb3陰性又はGb3陽性リ

10

20

30

40

50

ポソームのいずれにおいても観察できなかった。同様に、コレラ毒素のBサブユニット(CtxB)は、いずれのリポソームでも集合せず、STxB及び _STxBの集合が、そのGb3に対する結合を通して起こることを証明した。

【図16-2】図16-1の続きを示す。

【図17A-1-1】13個の選択したGb3結合体の特徴付けを示す図である。HeLa(赤色)及びPPMPによって処置したHeLa(GSL阻害-青色)におけるファージ結合のFACS分析。

【図17A-1-2】図17A-1-1の続きを示す。

【図17A-1-3】図17A-1-2の続きを示す。

【図17A-2】図17A-1-3の続きを示す。

【図17B】13個の選択したGb3結合体の特徴付けを示す図である。濃縮した配列LB01、LB02、及びLB03の配列アライメント。 10

【図18】Gb3陽性細胞における選択したファージの特異的結合を示す図である。各々のクローンを、Gb3+CHO及びGb3-CHO細胞における結合に関して試験した。それらの各々はGb3+CHOでは有意な結合を示したが、Gb3-CHOに関しては結合を示さなかった。

【図19】Gb3陽性細胞における溶液中で発現させた選択されたSTxB多様体の特異的結合を示す図である。各々のクローンを、Gb3+CHO及びGb3-CHO細胞における結合に関して試験した。それらの各々は、Gb3+CHOでは有意な結合を示したが、Gb3-CHOに関しては結合を示さなかった。

【発明を実施するための形態】

【0459】 20

配列

使用した志賀毒素のBサブユニットのアミノ酸配列は、

TPDCVTGKVEYTKYNDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR(配列番号1)である。

【0460】

配列番号2で定義したコンセンサス配列は、

XaPDCVTGKVEYTKYNXbXcXdTFXeVKVGDKXfXgXhXiXjXkXlXmLQSLLLSAQITGMTVTIKXnXoXpCHNXqGXrXsXtEVIFRであり、式中Xa~Xtは、本明細書の本説明に定義される通りである。

【0461】

クローンA3-D10-H3のSTxBポリペプチドのアミノ酸配列は、 30

SPDCVTGKVEYTKYNDDTFTVKVGDKELWTEKWNLQSLLLSAQITGMTVTIKSNACHNGGSFAEVIFR(配列番号3)である。

【0462】

配列番号3をコードする核酸配列は、

TCTCCTGATTGTGTAACCTGGAAGGTGGAGTATACAAAATATAATAACGACGACACCTTTACTGTTAAAGTGGGTGATAA
AGAACTGTGGACTGAAAAATGGAACCTTCACTCTTCTCTCAGTGCACAAATTACGGGGATGACTGTAACCATTAAAT
CTAACGCATGTCATAATGGTGGGTCTTTTGCAGAAAGTTATTTTTTCGT(配列番号4)である。

【0463】

クローンB12-C03-D12-G05-G11-H11のSTxBポリペプチドのアミノ酸配列は、

SPDCVTGKVEYTKYNDDTFTVKVGDKELWTEKWNLQSLLLSAQITGMTVTIKSNACHNGGSFAEVIFR(配列番号5) 40
である。

【0464】

配列番号5をコードする核酸配列は、

GCACCTGATTGTGTAACCTGGAAGGTGGAGTATACAAAATATAATAACGACGACACCTTTTTCTGTTAAAGTGGGTGATAA
AGAACTGTGGACTGAAAAATGGAACCTTCACTCTTCTCTCAGTGCACAAATTACGGGGATGACTGTAACCATTAAAA
CTAACGCATGTCATAATGGTGGGGCACTGTCTGAAGTTATTTTTTCGT(配列番号6)である。

【0465】

クローンA06-C06のSTxBポリペプチドのアミノ酸配列は、

SPDCVTGKVEYTKYNDDTFSVKVGDKEIYTSKWNLQSLLLSAQITGMTVTIKSNTCHNGGAFSEVIFR(配列番号7)
である。

【 0 4 6 6 】

配列番号7をコードする核酸配列は、

TCTCCTGATTGTGTAACCTGGAAAGGTGGAGTATACAAAATATAATAACGACGACACCTTTTCTGTTAAAGTGGGTGATAA
AGAAATCTACACTTCTAAATGGAACCTTCAGTCTCTTCTTCTCAGTGCGCAAATTACGGGGATGACTGTAACCATTAAAT
CTAACACTTGTGATAATGGTGGGCATTTTCTGAAGTTATTTTTTCGT(配列番号8)である。

【 0 4 6 7 】

クローンB02のSTxBポリペプチドのアミノ酸配列は、

SPDCVTGKVEYTKYNDEDTFSVKVGDKEVWTRCKLQSLLSAQITGMTVTIKTSSCHNAGGLTEVIFR(配列番号9)
である。

【 0 4 6 8 】

配列番号9をコードする核酸配列は、

TCTCCTGATTGTGTAACCTGGAAAGGTGGAGTATACAAAATATAATGACGAAGACACCTTTTCTGTTAAAGTGGGTGATAA
AGAAGTGTGGACTAACCGTTGCAAACCTTCAGTCTCTTCTTCTCAGTGCGCAAATTACGGGGATGACTGTAACCATTAAAA
CTTCTTCTTGTGATAATGCAGGGGGTTTACTGAAGTTATTTTTTCGT(配列番号10)である。

【 0 4 6 9 】

クローンB05のSTxBポリペプチドのアミノ酸配列は、

APDCVTGKVEYTKYNDDNTFSVKVGDKELYTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNSCHNGGGFAEVIFR(配列番号11)
)である。

【 0 4 7 0 】

配列番号11をコードする核酸配列は、

GCACCTGATTGTGTAACCTGGAAAGGTGGAGTATACAAAATATAATGACGACAACACCTTTTCTGTTAAAGTGGGTGATAA
AGAAGTGTACACTAACCGTTGGAACCTTCAGTCTCTTCTTCTCAGTGCGCAAATTACGGGGATGACTGTAACCATTAAAA
CTAACTCTTGTGATAATGGTGGGGGTTTTGCAGAAGTTATTTTTTCGT(配列番号12)である。

【 0 4 7 1 】

配列番号13(MKKTLLIAASLSFFSASALA)は、シグナルペプチドに対応する。

【 0 4 7 2 】

配列番号14は、配列番号13及び配列番号1の連結：

MKKTLLIAASLSFFSASALATPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNG
GGFSEVIFRである。

【 0 4 7 3 】

配列番号13のシグナルペプチドをコードする核酸配列は、

ATGAAAAAACATTATTAATAGCTGCATCGCTTTTCATTTTTTTTCAGCAAGTGCCTGGCG(配列番号15)である。

【 0 4 7 4 】

例示的なM13 pIII配列：

TVESCLAKPHTENSFTNWKDDKTLDRYANYEGCLWNATGVVVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGS
EGGKTPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGTVTQGTDPV
KTYYYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGGSSDLPQPPVNAGGGSGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGG
GSEGGSGGGSGSGDFDYEKMANANKGAMTENADENALQSDAKGKLDVATDYGAANGDA(配列番号16)。

【 0 4 7 5 】

STxB-PIII融合タンパク質の例：

【 0 4 7 6 】

10

20

30

40

【化1】

MATPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIF
RAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAAEQKLISEEDLNGAAEQKLISEEDLNGAAQTVESCLAKPHTENS
FTNWWKDDKTLDRYANYEGCLWNATGVVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGS
EGGGTKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNPNPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTV
YTGTVTQGTDPVKTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPVN
AGGGSGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGDFDYEKMANANKGAMTENADENA
LQSDAKGKLDVATDYGAANGDA (配列番号17)

10

【0477】

配列番号17の説明文は以下の通りである：

制限部位(NcoI)の残存(太字)

STxB(下線)

ヒスチジンタグ(太字、下線)

Mycタグ(3リピート)(斜体、下線)

リンカー(斜体)

Q(太字、白抜き文字):TG1(アンバー-サプレッサー宿主)細菌においてQと表記されるアンバー終止コドンの位置:これにより、非アンバー-サプレッサー宿主細菌のペリプラズムにおいて5量体アセンブリのためにSTxB単量体及びSTxB_pIII融合体を同時発現させることができる。非アンバー-サプレッサー宿主では、これは終止コドンとして表記され、アンバー-サプレッサー宿主ではQとして表記される。

20

PIII断片(太字、斜体、下線)

配列番号17の説明文は、全て一致してそれぞれ、配列番号20、22、24、26、28の全てに同様に当てはまる。

【0478】

配列番号18は、配列番号17をコードする核酸配列である：

【0479】

30

【化2】

atgGCGACGCCTGATTGTGTAAGTGGAAAGGTGGAGTATACAAAATATAATGATGACGATACCTTTAC
GTTAAAGTGGGTGATAAAGAATTATTTACCAACAGATGGAATCTTCAGTCTCTTCTTCAGTGC
AATTACGGGGATGACTGTAACCATTAATACTAATGCCTGTCATAATGGAGGGGGATTACAGCGAAGTT
ATTTTTCGTGCgcccGCACATCATCATCACCATCACGGGGCCGCgGAACAAAACTCATCTCAGAAGA
GGATCTGAATGGGGCCGCgAgagcaaaagctaataatctgaagaagatctcaacGGGGCCGCgAaacagaaacttatcaqtga
ggaggacttgaatGGGGCCGCATAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCTCATAACAGAAAATTCATTT
ACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTcTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGGAAT
GCTACAGGCGTTGTGGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGTTCTATTGGG
CTTGCTATCCCTGAAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGA
GGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCC
TCTCGACGGCACTTATCCGCCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTTTGAGGA
GTCTCAGCCTCTTAATACTTTTCAATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATTAAC
GTTTATACGGGCACTGTTACTCAAGGCACTGACCCCGTAAAACCTTATTACCAGTACACTCCTGTA
TCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCAGAGACTGCGCTTTCCATTCTGGC
TTAATGAGgattcCATTTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCA
ATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGG
CGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGCTCCGGTCCGGTGATTTTG
ATTATGAAAAAATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTA
CAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTTATTCTGTCTGCTACTGATTACGGTGTCTGCTAatgGCGACGCC

10

20

【0480】

(アンバー終止コドンTAG(太字、白抜き文字)を除去するために、これを、Q残基をコードするコドンCAGに交換し、それによって完全に融合したタンパク質を産生することができることに注意されたい)。上記の配列番号17の説明文の後に続く配列番号18の説明文は、全て一致してそれぞれ、配列番号21、23、25、27、29の全てに同様に当てはまる。

【0481】

配列番号30は、配列番号1をコードする核酸配列:

ACGCCTGATTGTGTAAGTGGAAAGGTGGAGTATACAAAATATAATGATGACGATACCTTTACAGTTAAAGTGGGTGATAA
 AGAATTATTTACCAACAGATGGAATCTTCAGTCTCTTCTTCTCAGTGCgCAAAATTACGGGGATGACTGTAACCATTAATA
 CTAATGCCTGTCATAATGGAGGGGGATTACAGCGAAGTTATTTTTTCGTである。

30

【0482】

配列番号31は、配列番号32のSTxB D18E、G62T変異体をコードする核酸配列を表す(太字のヌクレオチドは変異した位置である):

【0483】

【化3】

ACGCCTGATTGTGTAAGTGGAAAGGTGGAGTATACAAAATATAATGATGAAGATACCTTTACAGTTAA
 AGTGGGTGATAAAGAATTATTTACCAACAGATGGAATCTTCAGTCTCTTCTTCTCAGTGCgCAAAATTA
 CGGGGATGACTGTAACCATTAATACTAATGCCTGTCATAATGGAGGGACATTCAGCGAAGTTATTTT
 TCGT

40

【0484】

配列番号32は、STxB D18E、G62T変異体配列(太字の残基は変異した位置である):

【0485】

50

【化4】

TPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGTFSEVIFR

【0486】

である。

【0487】

配列番号33は、pIIIに融合した配列番号31のSTxB変異体に対応する：

【0488】

【化5】

MATPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGTFSEVIF
RAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAAEQKLISEEDLNGAAEQKLISEEDLNGAAQTVESCLAKPHTENS
FTNWKDDKTLDRYANYEGCLWNATGVVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGS
EGGGTKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTV
YGTVTQGDPVKTYTYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGGSSDLPQPPVN
AGGGSGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGGDFDYEKMANANKGAMTENADENA
LQSDAKGKLDVATDYGAANGDA

10

20

【0489】

配列番号33の説明文は以下の通りである：

制限部位(NcoI)残存(太字)

D18E、G62T STxB変異体(下線)

ヒスチジンタグ(太字、下線)

Mycタグ(3リピート)(斜体、下線)

リンカー(斜体)

Q(太字、白抜き文字):TG1(アンバー-サプレッサー宿主)細菌においてQと表記されるアンバー終止コドンの位置:これにより、非アンバー-サプレッサー宿主細菌のペリプラズムにおいて5量体アセンブリのためにSTxB単量体及びSTxB_pIII融合体を同時発現させることができる。非アンバー-サプレッサー宿主では、これは終止コドンとして表記され、アンバー-サプレッサー宿主ではQとして表記される。

30

PIII断片(太字、斜体、下線)

【0490】

配列番号34は、配列番号33に対応する核酸配列である(同じ説明文が当てはまる)：

【0491】

【化6】

ATGGCGACGCCTGATTGTGTAACTGGAAAGGTGGAGTATACAAAATATAATGATGAAGATACCTTTA
CAGTTAAAGTGGGTGATAAAGAATTATTTACCAACAGATGGAATCTTCAGTCTCTTCTTCAGTGCG
CAAATTACGGGGATGACTGTAACCATTAAACTAATGCCTGTCATAATGGAGGGACATTCAGCGAAG
TTATTTTTCGTGCggccGCACATCATCACCATCACGGGGCCGCgGAACAAAACTCATCTCAGAA
GAGGATCTGAATGGGGCCGCAgagcaaaagctaataatctgaagaagatctcaacGGGGCCGCAgaacagaaacttatcag
tgaggaggactgaatGGGGCCGCTAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAACCTCATAACAGAAAATTCAT
TACTAACGCTCTGGAAAGACGACAAAACTcTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGGA
ATGCTACAGGCGTTGTGGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGTTCTATTG
GGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCT
GAGGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAA
CCCTCTCGACGGCACTTATCCGCCTGGTACTGAGCAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGA
GGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGTGCATT
AACTGTTTATACGGCACTGTTACTCAAGGCACTGACCCCGTAAAACTTATTACCAGTACACTCC
TGTATCATCAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCAGAGACTGCGCTTCCATTC
TGGCTTAAATGAGgatcCATTGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCT
GTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGG
GTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGCTCCGGTCCGGTGA
TTTTGATTATGAAAAAATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACG
CGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACTTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCTGCTAatgGCG
ACGCC

10

20

【0492】

配列番号35は、本明細書の説明に記載される4804bpの核酸配列である。

【0493】

配列番号36は、最初のアミノ酸残基がAである配列番号1に対応する:APDCVTGKVEYTKYNDD DTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR。この配列は、「Functional analysis of the Shiga toxin and Shiga-like toxin type II variant binding subunits by using site-directed mutagenesis.」、Jackson M.P., Wadolkowski E.A., Weinstein D.L., Holmes R.K., O'Brien A.D. J. Bacteriol. 172:653~658頁(1990)において偶然記載されている。

30

【0494】

配列番号37に定義されるコンセンサ配列は:

XaPDCVTGKVEYTKYNXbDDTFXeVKVGDKEGxhTXjXkWNLQSLLLSAQITGMTVTIKXnNXpCHNGGXrXsXtEVIFRであり、式中、Xa、Xb、Xe、Xg、Xh、Xj、Xk、Xn、Xp、Xr、Xs、Xtは、本明細書の本説明に定義される通りである。

40

【0495】

配列番号38は、Table 1(表1)のいわゆる足場区分S1:PDCVTGKVEYTKYNに対応する。

【0496】

配列番号39は、Table 1(表1)のいわゆる足場区分S3:VKVGDKに対応する。

【0497】

配列番号40は、Table 1(表1)のいわゆる足場区分S4:LQSLLLSAQITGMTVTIKに対応する。

【0498】

配列番号41は、Table 1(表1)のいわゆる足場区分S7:EVIFRに対応する。

【0499】

配列番号42は、424アミノ酸残基を有する野生型pIIIタンパク質である:

50

【 0 5 0 0 】

【 化 7 】

**MKKLLFAIPLVVPFYSHSAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNATGVVCTGDET
 QCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINPLDGTYPGTEQNPA
 NPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGTVTQGTDPVKTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFR
 DCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLQPPVNAGGGSGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGG
 GSGSGDFDYEKMANANKGAMTENADENALQSDAKGKLDVATDYGAAIDGFIGDVSGLANGNGATGD
 FAGSNSQMAQVGDGDN SPLMNNFRQYLPSLPQSV ECRPFVFSAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLY
 VATFMYVFSTFANILRNKES**

10

【 0 5 0 1 】

単離されたポリペプチドを考慮する限り、本発明の一部ではない幾つかの変異体配列が当技術分野で公知である。例として、Jackson M.P., Wadolowski E.A., Weinstein D.L., Holmes R.K., O'Brien A.D.は、「Functional analysis of the Shiga toxin and Shiga-like toxin type II variant binding subunits by using site-directed mutagenesis」、J. Bacteriol. 172:653~658頁(1990)において、D16N(配列番号43)、D17N(配列番号44)、D17E(配列番号45)、D16N D17N(配列番号46)、D18N(配列番号47)変異体を記載している。

20

【 0 5 0 2 】

配列番号43(D16N):

【 0 5 0 3 】

【 化 8 】

TPDCVTGKVEYTKYNDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR

【 0 5 0 4 】

配列番号44(D17N):

【 0 5 0 5 】

【 化 9 】

TPDCVTGKVEYTKYNDNDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR

30

【 0 5 0 6 】

配列番号45(D17E):

【 0 5 0 7 】

【 化 1 0 】

TPDCVTGKVEYTKYNDEDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR

40

【 0 5 0 8 】

配列番号46(D16N D17N):

【 0 5 0 9 】

【化 1 1】

TPDCVTGKVEYTKYNNNDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR

【0 5 1 0】

配列番号47(D18N):

【0 5 1 1】

【化 1 2】

10

TPDCVTGKVEYTKYNDNDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR

【0 5 1 2】

Clark C., Bast D.J., Sharp A.M., St Hilaire P.M., Agha R., Stein P.E., Toone E.J., Read R.J., Brunton J.Lは、「Phenylalanine 30 plays an important role in receptor binding of verotoxin-1」、Mol. Microbiol. 19:891 ~ 899頁(1996)において変異体F30A(配列番号48)を開示している。

【0 5 1 3】

配列番号48 (F30A):

【0 5 1 4】

【化 1 3】

20

TPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELATNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR

【0 5 1 5】

Perera L.P., Samuel J.E., Holmes R.K., O'Brien A.D. 「Identification of three amino acid residues in the B subunit of Shiga toxin and Shiga-like toxin type II that are essential for holotoxin activity.」、J. Bacteriol. 173:1151 ~ 1160頁(1991)、及びJemal C., Haddad J.E., Begum D., Jackson M.P. 「Analysis of Shiga toxin s ubunit association by using hybrid A polypeptides and site-specific mutagenesis.」、J. Bacteriol. 177:3128 ~ 3132頁(1995)は、変異体R33D(配列番号49)を開示している。

30

【0 5 1 6】

配列番号49(R33D):

【0 5 1 7】

【化 1 4】

40

TPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNDWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR

【0 5 1 8】

上記のJemalらはまた、変異体W34G (配列番号50)も開示している。

【0 5 1 9】

配列番号50(W34G):

【0 5 2 0】

【化 1 5】

TPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRGNLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR

【 0 5 2 1】

Bast D.J., Banerjee L., Clark C., Read R.J., Brunton J.L. 「The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the Verotoxin 1 B subunit.」、Mol. Microbiol. 32:953 ~ 960頁(1999)は、変異体W34A(配列番号51)及びG62T(配列番号52)を開示している。

10

【 0 5 2 2】

配列番号51(W34A):

【 0 5 2 3】

【化 1 6】

TPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRANLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVIFR

【 0 5 2 4】

配列番号52(G62T):

20

【 0 5 2 5】

【化 1 7】

TPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGTFSEVIFR

【 0 5 2 6】

変異体D17E G62T(配列番号53)も公知である。

【 0 5 2 7】

配列番号53(D17E G62T):

30

【 0 5 2 8】

【化 1 8】

TPDCVTGKVEYTKYNDEDFTFTVKVGDKELFTNRWNLQSLLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGTFSEVIFR

【実施例】

【 0 5 2 9】

A. 材料及び方法

組換えSTxBの発現及び精製

40

STxB遺伝子を、pSU108プラスミドにクローニングし、熱誘導型LambdapL/PRプロモーターの転写及び翻訳制御下で発現を実施した。ペリプラズム抽出物の調製後、これらをQFFカラム(Pharmacia)にロードし、20mM Tris/HCl、pH 7.5中のNaClの直線勾配によって溶出した。組換えSTxBは、120 ~ 400mMの間に溶出した。STxB含有分画を20mM Tris/HCl、pH 7.5に対して透析し、Mono Qカラム(Pharmacia)に再ロードし、前回のように溶出した。得られたタンパク質は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって95%純粋であると推定され、使用するまで-80 °Cで貯蔵した。

【 0 5 3 0】

安定なGb3+CHO細胞株の生成

Gb3陽性及び陰性細胞を同じ遺伝的背景で利用することができる細胞系を生成するため

50

に、CHO細胞株を選択した。CHO細胞は通常、ラクトシルセラミドのGb3及びその誘導体への変換を触媒する酵素であるラクトシルセラミド 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼの発現を欠如する。Gb3陽性CHOクローンを生成するために、Gb3シントラーゼ遺伝子をサイトメガロウイルスプロモーターの制御下でこれらの細胞に安定にトランスフェクトした。次いで、Gb3の発現及びその細胞膜での位置を、STxBを使用して証明した。

【0531】

J. Wiels lab (Institut Gustave Roussy UMR 8126) の pCDNA3_Gb3_シントラーゼプラスミドを、電気穿孔によってCHO細胞にトランスフェクトした。簡単に説明すると、80%コンフルエント細胞をトリプシン処理し、600 × gで5分間遠心分離した後、リン酸緩衝食塩水(PBS)において1回洗浄した。細胞 8×10^6 個を、electrobuffer混合物(Cell projects社) 120 µL、pCDNA3_Gb3シントラーゼ 10 µg、サケ精子DNA 10 µg、及び水で構成される混合物 240 µL中に再懸濁させた。電気穿孔を、4mmギャップ電気穿孔用キュベットにおいて、0.975 µF × 1000で設定したHigh Capにより0.22kVで行い、細胞を、10%熱不活化ウシ胎児血清(Pan Biotech社)、0.01%ペニシリン-ストレプトマイシン(Invitrogen社)、41mM L-グルタミン及び51mMピルビン酸ナトリウムを補充したダルベッコ改変イーグル培地: 栄養混合物F-12(DMEM/F12, Gibco, Life Technologies社) 10mL中に再懸濁させた。

10

【0532】

細胞をT75培養皿に播種し、5%CO₂/空気雰囲気下、37 °Cで成長させた。24時間後、0.5mg/mLジェネティシン(G418, ThermoFischer社)を含有する選択培地を添加し、培地を2日おきに交換した。2週間選択後、単細胞を、96ウェルプレートにおける限界希釈によって選択した。

20

【0533】

最終選択は、蛍光標識STxBの結合を使用するFACS選別によって実施し、選択した細胞株におけるSTxBの細胞内逆行輸送を、免疫蛍光顕微鏡によって制御した。Gb3⁺CHO及びGB3⁻CHO細胞 7×10^4 個をP6プレートに播種し、37 °C、5%CO₂下で一晩成長させた。DMEM/F12培地によって48時間で3回洗浄後、細胞を、0.1 µM A488-標識STxBと共に48時間で30分間インキュベートして、洗浄し、固定するか(結合実験)又は37 °Cで45分間インキュベートした(逆行性輸送実験)。指示がある場合、ゴルジ装置を、GM130(BD transduction laboratories社)に関して標識した。画像を落射蛍光顕微鏡(Leica社 DM 6000B)において獲得し、ImageJソフトウェアによって処理した。

30

【0534】

HeLa C2TA細胞におけるGSLの合成阻害

DL-トレオ-1-フェニル-2-パルミトイルアミノ-3-モルフォリノ-1-プロパノール(PPMP)は、グルコシルセラミドシントラーゼ阻害剤であり、これを、GSLを枯渇させるために使用した。

【0535】

HeLa細胞は、グリコスフィンゴ脂質Gb3を発現する。HeLa細胞クローンC2TAは、Gb3を均一に発現する。HeLa C2TA細胞を、5 µM PPMP(Enzo LifeSciences社)を含有するDMEM培地中、37 °C、5%CO₂下で3日毎に細胞を継代して12日間培養した。グリコスフィンゴ脂質合成の阻害は、C2TA処置細胞における蛍光標識STxBの結合を、免疫蛍光及びフローサイトメトリーによって分析することによって確認した。

40

【0536】

安定なGb3+CHO細胞株のGb3シントラーゼ遺伝子トランスフェクション及び選択

安定なGb3+CHO細胞株のGb3シントラーゼ遺伝子トランスフェクション及び選択。J. Wiels lab (Institut Gustave Roussy UMR 8126) の pCDNA3_Gb3_シントラーゼプラスミドに、Sigma aldrich社のCHO細胞CHO-K1(ATCC(登録商標)CCL-61(商標))、参照番号:85051005-1VLを電気穿孔によってトランスフェクトした。簡単に説明すると、80%コンフルエント細胞をトリプシン処理し、600 × gで5分間遠心分離し、リン酸緩衝食塩水(PBS)中で1回洗浄した。細胞 8×10^6 個を、electrobuffer混合物(cell projects社) 120 µL、pCDNA3_Gb3シントラーゼ 10 µg、サケ精子DNA 10 µg及び水で構成される混合物 240 µL中に再懸濁させた。

50

【0537】

電気穿孔を、4mmギャップ電気穿孔キュベットにおいて、0.975 $\mu\text{F} \times 1000$ で設定したHigh Capによって0.22kVで行い、細胞を、10%熱不活化ウシ胎児血清(Pan Biotech社)、0.01%ペニシリン-ストレプトマイシン(Invitrogen社)、41mM L-グルタミン及び51mMピルビン酸ナトリウムを補充したダルベッコ改変イーグル培地:栄養混合物F-12(DMEM/F12、Invitrogen社)10mL中に再懸濁させた。細胞をT75培養皿に播種し、5% CO_2 /空気雰囲気下、37 で成長させた。24時間後、0.5mg/mLジェネティシン(G418、ThermoFischer社)を含有する選択培地を添加し、培地を2日おきに交換した。2週間選択後、単細胞を、96ウェルプレートにおける限界希釈によって選択した。最終選択は、蛍光標識STxBの結合を使用するFACS選別によって実施し、選択した細胞株におけるSTxBの細胞内逆行輸送を、免疫蛍光顕微鏡によって制御した。

10

【0538】

C2TA細胞のPPMP処置によるグリコフィンゴ脂質合成阻害

C2TA細胞を、5 μM PPMPを含有するDMEM培地中、37、5% CO_2 下で3日毎に細胞を継代して12日間培養した。グリコフィンゴ脂質合成の阻害は、C2TA処置細胞における蛍光標識STxBの結合を免疫蛍光及びフローサイトメトリーによって分析することによって確認した。

【0539】

安定なGb3⁺CHO細胞におけるSTxBの結合及び逆行性輸送を確認するための免疫蛍光実験

Gb3⁺CHO及びGb3⁻CHO細胞 7×10^4 個をP6プレートに播種し、37、5% CO_2 下で一晩成長させた。DMEM/F12培地によって4 で3回洗浄後、細胞を、0.1 μM A488-標識STxBと共に4 で30分間インキュベートして、洗浄し、固定するか(結合実験)又は37 で45分間インキュベートした(逆行性輸送実験)。指示がある場合、ゴルジ装置を、GM130(BD transduction laboratories社)に関して標識した。画像を落射蛍光顕微鏡(Leica社 DM 6000B)において獲得し、ImageJソフトウェアによって処理した。

20

【0540】

pHEN2_STxB ファージミド及びpHEN2_STxB_変異体の設計及びクローニング

pHEN2_STxBファージミドを、バクテリオファージM13のpIIIカプシドコートタンパク質と融合したSTxB又はSTxB変異体を発現させるために設計した。これらの構築物は、Gibsonアセンブリ技術を使用して、STxBインサートと市販のpHEN2ファージミドとの間の組換えによって得た。制限部位NcoI及びNotIをそれぞれ、STxB遺伝子の5'及び3'末端に導入した。第1の工程は、適切なプライマーを使用してプラスミド及びインサートによって共有される15塩基対のオーバーハングを作製する2つのPCRからなった。

30

【0541】

簡単に説明すると、これらのPCR増幅は、鑄型プラスミド10ng、各プライマー2.5ng、Phusion(商標) High-Fidelity DNAポリメラーゼ0.5 μl を、製造元(New England BioLabs社)によって記載される適切な緩衝液及び試薬と共に使用して全量50 μl 中で行った。PCRプログラムは、54 でのアニーリング5サイクルの後に72 のアニーリング温度で25サイクルからなった。PCR産物を、市販のDNAゲル抽出キット、カタログ番号28106(Qiagen社)を使用して精製した後、1ステップ等温DNAアセンブリ方法に従ってアセンブルした:各DNA断片0.025pmolを5 μl にプールし、Gibson社のプロトコールにより自家製アセンブリマスター混合物15 μl (500mM Tris-HCl pH 7.5、50mM MgCl_2 、1mM dGTP、1mM dATP、1mM dTTP、1mM dCTP、50mM DTT、25% PEG-8000、及び5mM NAD)を添加した。混合物をサーモサイクラーにおいて50 で1時間インキュベートした。Gibsonアセンブリ反応物3 μl を、製造元の説明書(Invitrogen社)によりDH5アルファサーモコンピテント大腸菌細胞の形質転換のために使用した。細菌を、抗生物質を含有するLBプレートにおいて培養した。クローン6個をシークエンシングして、1個を選択し、抗生物質を含む2 \times YT培地において成長させ、細菌プラスミドDNA抽出を、QIAprep Spin Miniprepキット(Qiagen社)を使用して実施した。50 ngを、2 \times YT 50mL、100 $\mu\text{g/mL}$ アンピシリン、1%グルコース中で成長させたサーモコンピテントTG1大腸菌細胞(Lucigen社)の形質転換のために使用した。

40

50

【 0 5 4 2 】

アンバー変異

TAGアンバー終止コドンがCAGコドンに交換されているpHEN2_STxB_noAmbファージミドを、GeneArt部位特異的変異誘発キット(ThermoFisher Scientific社)を使用して部位特異的変異誘発によって得た。適切なプライマーを設計し、Eurofins社に注文した。変異誘発産物の形質転換後、クローン8個をシーケンシングした(GATC)。1個を選択して、100 µg/mLアンピシリンを含有する2×YT培地において成長させた。細菌プラスミドDNA抽出は、QIA prep Spin Miniprepキット(Qiagen社)を使用して実施した。

【 0 5 4 3 】

ファージ上のSTxB発現

各ファージミド50ngを、2×YT 50mL、100 µg/mLアンピシリン、1%グルコース中で成長させたサーモコンピテントTG1大腸菌細胞(Lucigen社)の形質転換のために使用した。pHEN2_STxB、pHEN2_STxB_noAmb、又はpHEN2_STxB_mutによって形質転換したTG1細胞の一晚培養物を、10mLの2×YT培地、100 µg/mLアンピシリン、1%グルコース中で希釈し、OD600が0.1~0.5となるまで成長させ、 10^{13} 個のヘルパーファージM13K07(NEB)4 µL又は 10^{12} 個のハイパーファージM13 K07 pIII(Progen社)40 µLを感染させ、37 °Cの水浴中で30分間インキュベートした。

【 0 5 4 4 】

次に細菌を、3,200 × g、室温で10分間遠心分離し、グルコースを含まないが100 µg/mLアンピシリン及び50 µg/mLカナマイシンを含有する2×YT(sigma Aldrich社 Y2377-250Gの粉末)50mL中に再懸濁させた。30 °Cで一晩成長させた後、培養物を3,200 × gで15分間遠心分離し、ファージ含有上清を収集した。

【 0 5 4 5 】

ファージ粒子の更なる単離を、PEG沈殿によって得た。上清40mLを、30% PEG 8000 8mL、2.5M NaClと共に4 °Cで1時間インキュベートした。10,800 × gで30分間遠心分離後、ペレットをPBS 2mL中に再懸濁させ、13,000 × gで10分間再度遠心分離し、残っている細菌残渣を除去した。

【 0 5 4 6 】

STxB(_STxB)及びSTxB_mut_D18E;G62T(_STxB_mut)発現を呈示するファージ

pHEN2_STxB又はpHEN2_STxB_mutによって形質転換したTG1細胞の一晚培養物を、10mLの2×YT培地、100 µg/mLアンピシリン、1%グルコース中で希釈し、OD600が0.1~0.5となるまで成長させ、 10^{13} 個のヘルパーファージM13K07(NEB)4 µLを感染させ、37 °Cの水浴中で30分間インキュベートした。次に細菌を、3,200 × g、室温で10分間遠心分離し、グルコースを含まないが100 µg/mLアンピシリン及び50 µg/mLカナマイシンを含有する2×YT(sigma Aldrich社 Y2377-250Gの粉末)50mL中に再懸濁させた。30 °Cで一晩成長させた後、_STxB又は _STxB_mutを3,200 × gで15分間の遠心分離によって収集した。ファージを含有する上清を4 °Cで数日間貯蔵した。

【 0 5 4 7 】

_STxB/ _STxB_noAmb/ _STxB_mutのイムノプロットティング

_STxB、_STxB_noAmb、又は _STxB_mutを含有するTG1上清30 µlを、4×変性用ブローローディングダイと共に90 °Cに加熱し、4~15%勾配のポリアクリルアミドゲル(Mini-Protean TGXプレキャストゲル、Biorad社)にロードした。150Vで40分間泳動させた後、ニトロセルロース膜に転写し、抗pIIIマウス抗体(1/1,000希釈、New England Biolabs社(NEB))を、適切な抗マウスHRP二次抗体(Beckman Coulter社)と共に使用した。

【 0 5 4 8 】

STxB_mut_pIII融合体の質量分析。 _STxB_mutを含有するTG1上清30 µlを、5×ブローローディングダイと共に90 °Cに加熱し、4~15%勾配のポリアクリルアミドゲル(Mini-Protean TGXプレキャストゲル、Biorad社)にロードした。150Vで40分間泳動させた後、ゲルをLabSafe Gel Blue(Biosciences社)によって染色した。対応するバンドを切り出し、試料をde novoペプチドシーケンシングのためにトリプシン処理した。

10

20

30

40

50

【0549】

_STxB及び _STxB_mutのイムノブロットニング

_STxB又は _STxB_mutを含有するTG1上清30 μ lを、5 \times ブルーローディングダイと共に90 で加熱し、4~15%勾配のポリアクリルアミドゲル(Mini-Protean TGXプレキャストゲル、Biorad社)にロードした。150Vで40分間泳動させた後、ニトロセルロース膜に転写し、抗pIIIマウス抗体(1/1000希釈、New England Biolabs社(NEB))を、適切な抗マウスHRP二次抗体、すなわちJackson immunoresearch社の参照番号715-035-151の抗体と共に使用した。

【0550】

STxB_mut_PIII融合体の質量分析

_STxB_mutを含有するTG1上清30 μ lを、5 \times ブルーローディングダイと共に90 で加熱し、4~15%勾配のポリアクリルアミドゲル(Mini-Protean TGXプレキャストゲル、Biorad社)にロードした。150Vで40分間移動させた後、ゲルをLabSafe Gel Blue(Biosciences社)によって染色した。対応するバンドを切り出し、試料をde novoペプチドシーケンシングのためにトリプシン処理した。

【0551】

細胞に対する _STxB/ _STxB_noAmb/STxB_mutの結合

沈殿したファージ20 μ lを2%BSA PBS 200 μ lに希釈して、ブロッキングのために巡回型インキュベータにおいて4 で45分間インキュベートした。

【0552】

免疫蛍光実験に関して、Gb3⁺CHO、Gb3⁻CHO、C2TA、又はC2TA_PPMP細胞70,000個を、P24プレートのカバーガラスに播種し、37、5%CO₂下で一晩成長させた。DMEM/F12培地によって4 で3回洗浄後、細胞を、ブロッキングのために2%BSA PBS中、4 で45分間インキュベートした。ブロッキング溶液を除去後、ファージ溶液200 μ Lを添加して細胞を4 で45分間インキュベートした。細胞を2%BSA PBSによって3回洗浄し、再度PBS⁺⁺によって3回洗浄し、1% PFA溶液によって室温で15分間固定した。50mM NH₄Cl溶液によって中和後、細胞を2%BSA PBSによって3回洗浄し、適切なM13ファージコートタンパク質抗体(ThermoFisher社)によって標識し、再度3回洗浄し、抗マウスA488-修飾抗体によって標識し、3回洗浄した。画像を、落射蛍光顕微鏡(Leica社 DM 6000B)において獲得し、ImageJソフトウェアによって処理した。

【0553】

フローサイトメトリー実験に関して、条件(Gb3⁺CHO、Gb3⁻CHO、C2TA、C2TA_PPMP)あたり細胞100,000個を、2%BSA PBS中、4 で45分間インキュベートした。この飽和工程の後、細胞を600 \times gで5分間遠心分離し、_STxB、_STxB_noAmb、又は _STxB_mutに加えて適切な対照と共に4 で45分間インキュベートし、3回洗浄した後、マウス抗M13抗体(GE)及び抗マウス_488抗体(Molecular Probes社、Invitrogen社)と共にインキュベートした。STxBを、Alexa Fluor 488 NHSエステル色素(ThermoFisher Scientific社)によって直接標識した。細胞を固定し、フローサイトメトリーを実施した。BD Accuri C6サイトメーターを使用して、ゲートを対照細胞で設定し、細胞を複数回懸濁しつつ速い速度でゲートにおいて5,000事象を得るために読みを記録した。データはFlowjoソフトウェアを使用して解析した。

【0554】

細胞における _STxB及び _STxB_mutの結合並びにフローサイトメトリー

ファージ20 μ lを、2%BSA PBS 100 μ l中、4 で30分間インキュベートした。条件(Gb3⁺CHO、Gb3⁻CHO、C2TA、C2TA_PPMP)あたり細胞100,000個を2%BSA PBS中で30分間インキュベートした。この飽和工程の後、細胞を600 \times gで5分間遠心分離し、_STxB又は _STxB_mutに加えて適切な対照と共に4 で45分間インキュベートし、3回洗浄した後、マウス抗M13抗体(GE)及び抗マウス_488抗体(Molecular Probes社、Invitrogen社)と共にインキュベートした。STxBを、Alexa Fluor(登録商標)488 NHSエステル色素(ThermoFisher Scientific社)によって直接標識した。細胞を固定し、フローサイトメトリーを実施した。BD Accuri

10

20

30

40

50

(商標)C6サイトメーターを使用して、ゲートを対照細胞で設定し、細胞を複数回懸濁しつつ速い速度でゲートにおいて5,000事象を得るために読みを記録した。データはFlowjoソフトウェアを使用して解析した。

【0555】

磁気リポソームの調製

Gb3含有リポソームを生成するために、5mg/mL 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、18:1(9-Cis)PC、いわゆるDOPC(Avanti社)150 μ Lを、ガラス管中で100 μ Lの1mg/mLセラミドトリヘキソシド又はGb3(Matreya社)と混合した。窒素又はアルゴンを使用して蒸発によって溶媒を除去し、ガラス管の壁に均一な脂質の被膜を生成した。残っている溶媒を、真空下で2時間乾燥させることによって除去した。

10

【0556】

次に脂質混合物を、酸化鉄(II、III)磁性流体(7%保存液濃度-PlasmaChem社)10 μ Lを含有するPBS 1mL溶液によって65 $^{\circ}$ Cで再水和した。溶液をボルテックスミキサーで5分間処理した。エタノール/ドライアイス混合物中での凍結、65 $^{\circ}$ Cの水浴中での融解、及び1分間の混合を3サイクル実施した。

【0557】

次に、リポソーム混合物を、同様に65 $^{\circ}$ Cに予熱した押し出し機(Avanti社)の中に1 μ mフィルターを使用して17回通過させた。次に、リポソームを磁石に集合させることによって3回洗浄し、上清を除去し、2%BSA PBS溶液中に再懸濁させた。リポソームは、直接使用したか、又は最長で2日間4 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。同じ手順を使用して、Gb3を含まない対照リポソームを生成した。

20

【0558】

電子顕微鏡による磁気リポソームの特徴付け

磁気リポソーム調製物の異なる希釈を水中で行って、グロー放電(1~2mAで30秒間)によってイオン化したカーボンコーティング銅グリッドに沈着させた。試料を乾燥させた後、2%酢酸ウラニルを使用して1分間陰性染色を実施した。グリッドを水で洗浄して乾燥させた。画像は、Tecnai Spirit電子顕微鏡を使用して獲得した。

【0559】

リポソームへのSTxBの集合

ブロッキングのために、2%BSA PBS-500nM STxBの1mL溶液を旋回型インキュベータにおいて、4 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。この溶液を、磁気リポソーム調製物(以下を参照されたい)200 μ Lに添加し、旋回型インキュベータにおいて4 $^{\circ}$ Cで45分間インキュベートした。磁石で磁気リポソームを収集することによって、15mLチューブ中で2%BSA PBSによる洗浄を5回実施した。新しい15mLチューブにおいてPBSによって更に5回の洗浄を実施した。STxBの集合をイムノプロットング及びFACSによって分析した。

30

【0560】

最初の例では、リポソームをPBS 150 μ L中に再懸濁させ、これに変性用ブルーローディングダイ50 μ Lを添加した。溶液を90 $^{\circ}$ Cで10分間煮沸し、50 μ Lを4~15%勾配のポリアクリルアミドゲル(Mini-Protean TGXプレキャストゲル、Biorad社)にロードした。150Vで40分間泳動させた後、ニトロセルロース膜に転写し、抗STxB(13C4)抗体を適切な抗マウスHRP二次抗体と共に使用した。

40

【0561】

FACS分析に関して、Alexa_488標識STxBを使用した。リポソームを300 μ L中で洗浄した後再懸濁させ、フローサイトメーター(BD Accuri C6、BD Biosciences社)の中に通過させた。

【0562】

磁気リポソームへのファージの集合

ブロッキングのために、新たに産生して沈殿させたファージ(およそ 10^{12} 個のファージ)100 μ Lを、2%BSA PBSの最終容積1mLに希釈し、旋回型インキュベータにおいて4 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。この溶液を磁気リポソーム調製物(以下を参照されたい)200 μ Lに添

50

加し、旋回型インキュベータにおいて4 で45分間インキュベートした。15mLチューブ中で、磁石で磁気リポソームを収集することによって2%BSA PBSによる洗浄を5回実施した。新しい15mLチューブ中でPBSによって更に5回の洗浄を実施した。ファージの集合をイムノプロットング及びFACSによって分析した。

【0563】

最初の例では、リポソームをPBS 150 μ L中に再懸濁させ、これに変性用ブルーローディングダイ50 μ Lを添加した。溶液を90 で10分間煮沸し、50 μ Lを4~15%勾配のポリアクリルアミドゲル(Mini-Protean TGXプレキャストゲル、Biorad社)にロードした。150Vで40分間泳動させた後、ニトロセルロース膜に転写し、抗pIIIマウス抗体(1/1000倍希釈、New England Biolabs社(NEB))を適切な抗マウスHRP二次抗体と共に使用した。

10

【0564】

FACS分析に関して、リポソームを、抗M13抗体を含む2%BSA PBSの1mL溶液中に再懸濁させ、旋回型インキュベータにおいて4 で45分間インキュベートした。3回洗浄を実施した後、Alexa488標識抗マウス抗体と共にインキュベートした。更に3回洗浄後、リポソーム溶液を、フローサイトメーター(BD Accuri C6、BD Biosciences社)の中に通過させた。

【0565】

磁気リポソームにおけるファージディスプレイ選択のシミュレーション

_STxB_mut 10^{12} 個を2%BSA PBS 1mL中で _STxB 10^8 個(比率 1/10000)と混合し、ブロッキングのために、旋回型インキュベータにおいて4 で1時間インキュベートした。溶液を磁気リポソーム調製物(以下を参照されたい)200 μ Lに添加し、旋回型インキュベータにおいて4 で45分間インキュベートした。15mLチューブ中で、磁石で磁気リポソームを収集することによって2%BSA PBSによって10回洗浄を実施した。新しい15mLチューブ中でPBSによって更に10回の洗浄を実施した。

20

【0566】

ファージを50%トリプシンのPBS溶液1mLを使用して37 で10分間溶出させた。SVF 500 μ Lを添加後、溶液750 μ Lを使用して、TG1細菌(DO=0.5)10mLに攪拌せずに37 で30分間感染させた。100 μ Lを使用して、細菌溶液の幾つかの希釈液(10-1、10-2、及び10-3)を調製し、次にこれを2 \times YT寒天アンピシリン1%グルコースプレートに播種し、37 で一晩インキュベートした。

【0567】

翌日、クローン24個を収集し、2 \times YTアンピシリン1%グルコース溶液5mL中、37 で一晩成長させた。細菌プラスミドDNAを、QIAprep Spin Miniprepキット(Qiagen)を使用して抽出し、シーケンシングした(GATC)。

30

【0568】

STxB多様体ライブラリの設計

Gb3に対するSTxBの結合に関係する20個の位置、Thr1、Asp16、Asp17、Asp18、Thr21、Glu28、Leu29、Phe30、Thr31、Asn32、Arg33、Trp34、Asn35、Thr54、Asn55、Ala56、Gly60、Gly62、Phe63、Ser64(Lingら、1998)を、コンビナトリアルライブラリの作製のために選択した。

【0569】

多様体 1.5×10^{10} 個の全集団に達するためには、本明細書に記載される20個の位置の各々で、3~4個の代替のアミノ酸が可能である。代替アミノ酸は、配列アライメントに関するpfamプラットフォームウェブサイトの助けを借りて選択した。これに関して、Uniprotデータベースからの286個のSTxBホモログ及びNCBIデータベースからの211個のホモログを整列させ、結果をHidden Markovモデル(HMM)ロゴ生成ソフトウェアによって編集した。適切にフォールディングした5量体STxB多様体を得る機会を最大限にするために、最も代表的なアミノ酸を選択した。

40

【0570】

次に、トリマーオリゴヌクレオチド合成(TRIM technology、GeneArt社による)によってライブラリを合成して増幅し、適切なphen2発現系(GeneArt社)にサブクローニングして、

50

最終的に多様なクローン 10^9 個を達成した。

【0571】

ライブラリの特徴付け

ライブラリの内容物を、GeneArt社及び研究所(示していない)の両方により、シーケンシングによって特徴付けした。GeneArt社から得たクローンの異なる希釈液を $2 \times \text{YT}$ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン、1%グルコース寒天プレートに播種した。クローン96個を採取して、適切なプライマー(GATC)を使用してシーケンシングした。配列は、CLC Workbenchソフトウェアを使用して処理し、整列させた。

【0572】

ファージライブラリの増幅

GeneArt社からのTG1細菌(クローン 1.68×10^{11} 個/mL)100 μL を、250mLの $2 \times \text{YT}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン、1%グルコース中で、 $\text{DO}=0.5$ となるまで37 で成長させた。培養物75mLに 6×10^{11} 個のM13ヘルパーファージを感染させ、攪拌せずに37 で30分間インキュベートした。次に、溶液を、 $3,200 \times g$ 、室温で20分間遠心分離した。ペレットを1.5Lの $2 \times \text{YT}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシン中に再懸濁させ、30 で一晩成長させた。

【0573】

500mLを $10,800 \times g$ 、4 で遠心分離した。1/5容積の30% PEG、2.5M NaCl溶液を上清に添加し、攪拌せずに4 で1時間インキュベートした。次に、溶液を $10,800 \times g$ 、4 で30分間遠心分離し、ペレットを滅菌脱イオン水40mL中に再懸濁させた。30% PEG 8mL、2.5M NaClを添加し、溶液を再度4 で30分間インキュベートした。溶液を最後に $10,800 \times g$ 、4 で30分間遠心分離し、ペレットを15%グリセロールPBS 16.5mL中に再懸濁させた。

【0574】

$13,000 \times g$ 、4 での最後の遠心分離後、溶液をアリコートにし、 -80 で貯蔵した。5 μL を使用して、ファージ保存液の異なる希釈液によるTG1細菌の感染によるファージ濃度を滴定した。

【0575】

Gb3結合体のファージディスプレイ選択

1日目:磁気リポソームの調製

1 μm Gb3⁺及びGb3⁻磁気リポソーム溶液1mLを、既に記載したように产生した。次に、リポソームを、磁石での集合によって3回洗浄し、上清を除去して、2%BSA PBS溶液中に再懸濁させた。リポソーム溶液を2つに分けて、2%BSA PBS 1.5mL中に再懸濁させ、旋回型インキュベータにおいて4 で一晩インキュベートした。

【0576】

TG1細菌を、2 μM MgSO₄、1%グルコース、0.1%チアミンを補充したM9最少培地50mL中、37 で一晩成長させた。この培養物を4 で維持して、最長3週間使用した。

【0577】

2日目:リポソームにおけるファージディスプレイ選択

STxBライブラリ保存液の1つのアリコートを融解した。100 μL を、2%BSA PBS 900 μL 中、旋回型インキュベータにおいて4 で1時間希釈した。2本の15mLチューブを氷中で2%BSA PBSによってコーティングした。Gb3-リポソームを磁石によって4 で10~15分間集合させた。ファージ溶液1mLを添加し、旋回型インキュベータにおいて4 で1時間インキュベートした。

【0578】

並行して、1/50、1/100、及び1/200 TG1保存溶液を接種した15mLの $2 \times \text{YT}$ 、1%グルコースの3つの溶液を、攪拌しながら37 でインキュベートした。

【0579】

次に、リポソームを収集し、上清をGb3⁻リポソームの第2の溶液に添加し、旋回型インキュベータにおいて4 で1時間インキュベートした。リポソームを収集し、上清を除去した。これらの2回の枯渇工程の後、ファージ上清をGb3⁺磁気リポソームに添加し、旋回型インキュベータにおいて4 で1時間インキュベートした。次に、リポソームを磁石で収集

10

20

30

40

50

し、第1の予めコーティングした15mLチューブ中の2%BSA PBS 10mL中に再懸濁させた。4で磁石での5分間の集合と、冷2%BSA PBS溶液10mL中での再懸濁を交互に行う10回の洗浄を実施した。リポソームを、第2の予めコーティングした15mLチューブに移し、冷2%BSA PBS中での5回洗浄、及び冷PBS中での5回洗浄を実施した。

【0580】

最後に、リポソームを磁石で収集し、ファージを50%トリプシンのPBS溶液1mLを使用して37で10分間溶出させた。SVF 500 μ Lの添加後、溶液750 μ Lを使用して、TG1細菌(DO=0.5)10mLに、攪拌せずに37で30分間感染させた。100 μ Lを使用して、細菌溶液の幾つかの希釈液(10^{-1} 、 10^{-2} 、及び 10^{-3})を作製した。細菌を、100 μ g/mLアンピシリン、1%グルコースを有する2 \times YT寒天プレートに播種し、これを37で一晩インキュベートして、ファージのアウトプット濃度を計算した。

10

【0581】

残りのTG1溶液10mLを遠心分離して、2 \times YT 1.8mL中に再懸濁させた。600 μ Lを、100 μ g/mLアンピシリン、1%グルコースを含有する3つの大きい2 \times YT寒天プレートに播種し、37で一晩成長させた。

【0582】

3日目:選択されたファージの増幅

ファージのアウトプット濃度及びインプット濃度を計算し、3つの大きい寒天プレート上のクローンを10mLの2 \times YT、30%グリセロール中に収集し、細菌濃度を測定して、細菌保存液R1からなる溶液を-20で貯蔵した。

20

【0583】

ファージを増幅するために、細菌保存液R1のアリコート、100mLの2 \times YT、100 μ g/mLアンピシリン、1%グルコース中でDO=0.05に達するように希釈し、DO=0.5に達するまで成長させた。10mLにヘルパーファージ 8×10^{10} 個を感染させ、攪拌せずに37で30分間インキュベートした。次に、溶液10mLを3,200 \times g、室温で20分間遠心分離した。ペレットを50mLの2 \times YT、100 μ g/mLアンピシリン、100 μ g/mLカナマイシン中に再懸濁させ、30で一晩成長させた。

【0584】

40mLを、10,800 \times g、4で遠心分離した。1/5容積の30% PEG、2.5M NaCl溶液を上清に添加し、攪拌せずに4で1時間インキュベートした。次に、溶液を10,800 \times g、4で30分間遠心分離し、ペレットを冷PBS 2mL中に再懸濁させた。13,000 \times g、4での最後の遠心分離工程の後、100 μ Lを第2の選択ラウンドのために使用し、5 μ Lをインプット濃度の計算のために使用した。

30

【0585】

同じ手順に従って、リポソームに関する3回の選択ラウンドを実施した。最後の選択ラウンドをCHO細胞において実施した。

【0586】

CHO細胞におけるR4選択:

Gb3⁻CHO細胞 20×10^6 個及びGb3⁺CHO細胞 10×10^6 個を、トリプシン処理して、2%BSA PBS 10mL中、旋回型インキュベータにおいて4で1時間インキュベートした。R3から増幅したファージ100 μ Lを2%BSA PBS 1mL中で希釈し、旋回型インキュベータにおいて4で1時間インキュベートした。Gb3⁻細胞 10×10^6 個を600 \times g、4で5分間遠心分離し、ファージ溶液1mL中に再懸濁させ、旋回型インキュベータにおいて4で1時間インキュベートした。細胞を、600 \times g、4で5分間遠心分離した。上清を使用して、旋回型インキュベータでの4で1時間の第2の枯渇工程のために、Gb3⁻ CHOの残りの半分を再懸濁させた。

40

【0587】

細胞を600 \times g、4で遠心分離し、上清を収集した。Gb3⁺CHO細胞の10mL溶液を600 \times g、4で遠心分離し、枯渇させたファージの1mL溶液と共に再懸濁させ、旋回型インキュベータにおいて4で1時間インキュベートした。600 \times g、4での遠心分離及び冷2%BSA PBS 10mL中の再懸濁のサイクルからなる10回の洗浄を実施した。

50

【0588】

PBS中で最後の洗浄を実施して、ファージを溶出させ、これを使用して既に記載されたTG1細菌に感染させた。1日後、細菌を寒天プレートから収集し、2×YT、30%グリセロール中、-20℃で貯蔵した（細菌保存液R4_CHO）。

【0589】

Gb3結合体の特徴付け

細菌保存液R4_CHOの50 µLを遠心分離して、ファージミドDNAを、QIAprep Spin Miniprepキット(Qiagen社)を使用して抽出した。DNA調製物5ngを使用して、コンピテントTG1細胞を形質転換し、これを100 µg/mLアンピシリン、1%グルコースを含有する2×YT寒天プレートに播種し、37℃で一晩成長させた。クローン96個を採取して400 µLの2×YT、100 µg/mLアンピシリン、1%グルコース中に接種し、37℃で一晩成長させた。クローン96個を400 µLの2×YT、30%グリセロール中、-20℃で貯蔵した。

【0590】

5 µLをシーケンシングのために使用した(GATC)。CLCワークベンチソフトウェアを使用して配列を分析し、整列させた。

【0591】

a)HeLA C2TA細胞におけるフローサイトメトリーによるファージ候補体のスクリーニング発現及び産生:

96ウェル深型プレートにおいて、クローン96個の各々の2 µLを使用して、100 µg/mLアンピシリン、1%グルコースを含有する2×YT溶液200 µLに接種し、 $DO=0.5$ に達するまで成長させた。2つのウェルを使用して、適切な対照(_STxB及び _STxB_mut)を成長させた。ヘルパーファージ 1.5×10^9 個を使用して、各ウェルに感染させ、プレートを攪拌せずに37℃で30分間インキュベートした。次にプレートを遠心分離し、細菌を、600 µLの2×YT、100 µg/mLアンピシリン、50 µg/mLカナマイシン中に再懸濁させ、攪拌しながら30℃で一晩成長させた。プレートを $3,200 \times g$ 、4℃で30分間遠心分離した。

【0592】

フローサイトメトリー実験:

上清200 µLを、結合実験のために使用した。条件あたりC2TA、C2TA_PPMP細胞100,000個を2%BSA PBS中、4℃で45分間インキュベートした。この飽和工程の後、細胞を $600 \times g$ で5分間遠心分離し、ファージ上清200 µLと共に4℃で45分間インキュベートし、3回洗浄後、マウス抗M13抗体(GE)及び抗マウス_488抗体(Molecular Probes社、Invitrogen社)と共にインキュベートした。細胞を固定し、フローサイトメトリーを実施した。BD Accuri C6サイトメーターを使用して、ゲートを対照細胞で設定し、速い速度でゲートにおいて5,000事象を得るために読みを記録した。データはFlowjoソフトウェアを使用して分析した。

【0593】

b)CHO細胞におけるファージ候補体の結合及び免疫蛍光による特徴付け発現及び産生:

24ウェル深型プレートにおいて、選択したクローン14個の各々2 µLを使用して、100 µg/mLアンピシリン、1%グルコースを含有する2×YT溶液200 µLに接種し、 $DO=0.5$ に達するまで成長させた。2つのウェルを使用して、適切な対照(_STxB及び _STxB_mut)を成長させた。ヘルパーファージ 1.5×10^9 個を使用して、各ウェルに感染させ、プレートを攪拌せずに37℃で30分間インキュベートした。次にプレートを遠心分離し、細菌を、600 µLの2×YT、100 µg/mLアンピシリン、50 µg/mLカナマイシン中に再懸濁させ、攪拌しながら30℃で一晩成長させた。プレートを $3,200 \times g$ 、4℃で30分間遠心分離した。

【0594】

イムノブロッティング:

各ファージ候補体の上清75 µLに、4×変性用ブルーローディングダイ25 µLを添加し、溶液を90℃で10分間煮沸した。50 µLを、4~15%勾配のポリアクリルアミドゲル(Mini-Protean TGXプレキャストゲル、Biorad社)にロードした。150Vで40分間泳動させた後、ニトロセルロース膜に転写し、抗p111マウス抗体(1/1000希釈、New England Biolabs社(NEB))

を、適切な抗マウスHRP二次抗体と共に使用した。

【0595】

免疫蛍光

上清200 μ Lを結合実験のために使用した。Gb3⁺CHO及びGb3⁻CHO細胞70,000個を、P24プレートのカバーガラスに播種し、37℃、5%CO₂下で一晩成長させた。冷2%BSA PBSによって3回洗浄後、細胞を、ブロッキングのために2%BSA PBS中、4℃で45分間インキュベートした。ブロッキング溶液を除去後、ファージ上清溶液200 μ Lを添加して細胞を4℃で45分間インキュベートした。細胞を2%BSA PBSによって3回洗浄し、再度PBS⁺⁺によって3回洗浄し、1%PFA溶液によって室温で15分間固定した。50mM NH₄Cl溶液によって中和後、細胞を2%BSA PBSによって3回洗浄し、適切なM13ファージコートタンパク質抗体(ThermoFisher社)によって標識し、再度3回洗浄し、抗マウスA488-標識抗体によって標識し、更に3回洗浄した。画像を、落射蛍光顕微鏡(Leica社 DM 6000B)において獲得し、ImageJソフトウェアによって処理した。

【0596】

B. 結果

STxBを呈示するM13バクテリオファージ(_STxB)はGb3陽性細胞に特異的に結合することができる

M13バクテリオファージにおけるSTxB及びSTxB変異体(STxB_mut_D18E;G62T)の呈示

STxB遺伝子をM13バクテリオファージのコートタンパク質pIIIをコードする遺伝子に融合させて、TG1大腸菌における対応する融合タンパク質(図1)の発現を駆動した。TG1大腸菌の上清への適切な発現をイムノプロットティングによって試験した。pIIIに対する抗体の陽性バンドを、STxB-pIII融合タンパク質に対応するサイズで検出することができ、このタンパク質が実際に発現されたことを証明した(図5)。

【0597】

Gb3にもはや結合することができないSTxBの変異体(STxBmut-D18E;G62T)-配列番号32もまた、M13バクテリオファージにおいて提示された。TG1上清への正しい発現もまた、イムノプロットティング及び質量分析によって確認され、13個のマッチするペプチドが明らかになり、変異及びpIIIタンパク質との融合体の存在を確認した(図7)。

【0598】

それらのファージの濃度及び感染特性を、ファージ調製物の異なる希釈液を使用してTG1細菌に感染させる滴定アッセイによって試験した。

【0599】

チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞の細胞膜でのグロボトリアオシルセラミド(Gb3)の安定で機能的な発現

Gb3陽性及び陰性細胞が同じ遺伝的背景で利用可能である細胞系を生成するために、CHO細胞株を選択した。CHO細胞は通常、ラクトシルセラミドのGb3及びその誘導体への変換を触媒する酵素であるラクトシルセラミド 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼの発現を欠如する。Gb3陽性CHOクローンを生成するために、サイトメガロウイルスプロモーターの制御下でのGb3シターゼ遺伝子を、これらの細胞に安定にトランスフェクトさせた。次に細胞膜におけるGb3の発現及びその位置を、天然のGb3リガンドである志賀毒素のBサブユニット(STxB)を使用して証明した。

【0600】

タンパク質を、Gb3シターゼ遺伝子がトランスフェクトされているCHO細胞(Gb3⁺CHO)と共にインキュベートすると、非Gb3シターゼトランスフェクト対照細胞(Gb3⁻CHO)と比較してSTxBの明白な結合が免疫蛍光によって観察された(図1)。フローサイトメトリー実験により、平均蛍光強度が、Gb3⁺CHO細胞に限ってより高い値にシフトしたことが示され、この結果が確認された(図2)。

【0601】

STxBのゴルジ体への逆行性輸送もまた観察されており(図3)、Gb3がこれらのGb3⁺CHO細胞において機能的であることを証明している。

10

20

30

40

50

【0602】

Gb3陽性細胞におけるSTxBを発現するファージの特異的結合

Gb3⁺CHO及びGb3⁻CHO細胞を、ファージ-STxBコンジュゲート(_STxB)と共に氷中で45分間インキュベートした(エンドサイトーシスなし)。免疫蛍光顕微鏡によって分析すると、Gb3⁺CHO細胞に対して明白な結合が観察されたが、Gb3⁻CHO細胞では観察されなかった(図1)。

【0603】

細胞に対する _STxBの結合を、フローサイトメトリーによって更に分析した。 _STxBと共にインキュベーション後、平均蛍光強度のシフトがGb3⁺CHOとGb3⁻CHO細胞との間で観察され、STxBが、ファージの表面で機能的に発現されることを証明した(図2)。

10

【0604】

Gb3におけるこの _STxBの特異的結合を確認するために、同じ結合実験を、Gb3を天然に発現するC2TA細胞についても実施した。グリコシフィンゴ脂質合成の特異的阻害剤であるPPMPによる処置によって結合が失われたことは、Gb3標的の特異的認識を強く示唆している(図6)。

【0605】

最後に、STxB変異体(STxB mut-D18E;G62T)を提示するファージの結合を、免疫蛍光顕微鏡及びフローサイトメトリーによって分析したところ(図8~9)、いかなる有意な結合も示さなかった。このように、M13バクテリオファージにおいてSTxBを呈示することは、Gb3⁺細胞におけるその結合を特異的に駆動することが確認された。

20

【0606】

これらのデータは、STxBがファージ表面で機能的であること、及びその結合活性が乱されないことを証明している。本発明者らは、この構成を利用して、STxB遺伝子が系統的に変異され、ファージが、一般的に公知のSTxB部分が本来結合しないグリコシフィンゴ脂質に対する結合活性を獲得する、本発明のペプチドを発現するスクリーニングライブラリを産生することを提唱している(図10)。

【0607】

M13バクテリオファージにおいて提示されるSTxBの立体構造研究

本発明の概念の一部として、ファージ上のSTxBについて必要な実際の立体構造を調べた。実際に、STxB分子は、5量体として溶液中にのみ見出されている。各々のファージ粒子は、タンパク質の呈示のために使用される5つのpIIIタンパク質で構成される。

30

【0608】

本発明者らは、単量体がどのようにファージ上に提示されうるかを検討した。2つの仮説を想像した(図11):

- その各々がファージの1つのpIIIタンパク質に融合されている5つのSTxB単量体は、5量体形成することができた。この場合、1つのみの、STxBの5量体が、ファージ粒子上に呈示されうる(図11.A)。

- pIIIタンパク質と融合した1つのSTxB単量体は、ファージ粒子のアセンブリの際の細菌のペリプラズムにおける他の4つの遊離のSTxB単量体と5量体形成することができた。この場合、1~5つのSTxB 5量体が、ファージ粒子上に呈示されうる(図11.B)。

40

【0609】

実際に、STxB遺伝子とpIIIの1つとの間のアンバー終止コドンの存在は、遊離のSTxBタンパク質又はSTxB_pIII融合タンパク質のいずれかの発現が各々およそ50%の比率となるように設計されている(本明細書の実験の節を参照されたい)。更に、本発明を実施する可能性の基礎となる物理的原理を決定するために、2つのタイプのヘルパーファージが使用されている。標準的なヘルパーファージは、そのゲノムにpIIIをコードする遺伝子を保有する。細菌におけるpIIIタンパク質の産生は、ウイルスpIII遺伝子及び細菌遺伝子の発現の両方に起因する。ハイパーファージと呼ばれるファージ多様体は、このウイルスpIII遺伝子を有しない(Rondot, Koch, Breitling, & Dubel, 2001)。この場合のpIIIタンパク質の発現は、細菌pIII遺伝子の発現のみに起因する。アンバー終止コドンの使用によって、非

50

融合STxBタンパク質の発現が得られる場合、標準的なヘルパーファージの使用によって、非融合pIIIタンパク質の提示が起こりうる。

【0610】

STxB単量体を、pIIIタンパク質との融合体として常に(アンバー終止コドンがなし)又は時々(融合型及び非融合形態の両方が存在)(アンバー終止コドンあり)発現させることができる発現系の組み合わせ、及びファージカプシド上に非融合pIIIタンパク質を提示することができるか又は提示することができないヘルパーファージ粒子の組み合わせを使用することによって、本発明者らは、第2の仮説が正しいことを示すことができた。実際に、完全に融合したSTxB_pIIIの産生によって、ハイパー及びヘルパーファージのいずれの使用によってもGb3陽性細胞にもはや結合することができないファージ調製物が得られた(ファージ粒子の正確な発現は、イムノプロットング及び免疫蛍光による結合によって確認した、図12~13)。興味深いことに、アンバーコドンが発現系に存在しない場合、ハイパーファージの使用と組み合わせても、pIIIタンパク質はイムノプロットングによって検出できなかった。従って本発明者らは、最適な発現系の定義を達成し、M13バクテリオファージにおけるSTxBの最適な提示の提供を可能にする。

10

【0611】

これらのデータは、本発明者らによる独創的な設計により、M13バクテリオファージ上に呈示された場合に適切にフォールディングされて機能的であるSTxBの産生が可能となり、おそらくGb3陽性細胞に対するファージ粒子の結合を駆動することを証明している。

20

【0612】

磁気リポソームベースのファージディスプレイ

概念実証として、GSLが脂質二重層のその「生理的環境」で提示される機会を増加させる戦略が、磁気リポソームを使用して考案された。

【0613】

GSL含有磁気リポソームの生成

Gb3を含有する(又は含有しない)直径1 μ mの磁気DOPCベースのリポソームを生成した。電子顕微鏡により、丸く、電子密度が高い構造を観察することができ(図16)、リポソームの適切な形成及び磁気ナノ粒子の取り込みを確認した。これらの磁気リポソームの主な利点は、それらを強い磁石で集合させることができ、長い冗長な遠心分離工程を回避することができる点である。

30

【0614】

STxB及び _STxBのリポソームへの特異的集合

ファージディスプレイ選択のためのGb3含有磁気リポソームの潜在性を確認するために、STxB又は _STxBの集合をイムノプロットング又はフローサイトメトリーによって分析した。STxB及び _STxBは、Gb3含有リポソームに限って集合し、このことは、ゲル上のpIII_STxBバンドの存在によって(図16)、及びフローサイトメトリーによる蛍光のシフト(図16)によって証明されている。Gb3陰性リポソームでは有意な集合は観察されなかった(図16)。更に、_STxB_mutの有意な集合は、Gb3陰性リポソーム又はGb3陽性リポソーム(図16)のいずれにおいても観察されなかった。同様に、コレラ毒素のBサブユニット(CtxB)は、いずれのリポソームにも集合せず(図16)、STxB及び _STxBの集合がそのGb3への結合を通して起こることを証明した。

40

【0615】

磁気リポソームにおけるファージディスプレイ選択のシミュレーション

ファージディスプレイ選択に関する磁気リポソームの力を最終的に評価するために、1回の選択ラウンドを、_STxB及び _STxB_mutの1対10,000の比率の混合物について実施した。Gb3陰性磁気リポソームでの2回の枯渇工程後、残りのファージをGb3陽性磁気リポソームに適用した。十分に洗浄後、ファージを収集して、これを使用してTG1細菌に感染させた。選択後に得たクローンについてシーケンシングを実施し、_STxB及び _STxB_mutの間の1~24の比率を評価した。このことは、タンパク質ライブラリからのGSL結合体のファージディスプレイ選択に関する磁気リポソームの潜在性を証明した。

50

【0616】

ファージディスプレイによるGb3特異的STxB変異体の選択

本発明者らのSTxB多様体のファージディスプレイ選択戦略の探索の概念実証における更なる工程として、STxBの多様体 1.46×10^{10} 個のライブラリを使用して、Gb3含有磁気リボソームに関して完全なスクリーニングを実施した。

【0617】

STxB多様体ライブラリの設計

STxBは、B断片単量体あたり3個のGb3結合部位を含有する。STxB単量体の69個中20個の位置(配列の28.9%)が、これまでGb3の結合に関係することが示されている(Lingら、1998)。これらの20個の位置を、コンビナトリアルライブラリの作製のために選択した。本明細書に記載の多様体の総数 1.46×10^{10} 個に関して20個の位置の各々に関して3~4個のアミノ酸を選択することができる。代替アミノ酸は、配列アライメントに関するpfamプラットフォームウェブサイト(<http://pfam.xfam.org/>)の助けを借りて選択した。これに関して、Uniprotデータベースからの286個のSTxBホモログ及びNCBIデータベースからの211個のホモログを整列させ、結果をプラットフォームからHidden Markovモデル(HMM)ロゴ生成ツールによって編集した。適切にフォールディングした5量体STxB多様体を得る機会を最大限にするために、最も代表的なアミノ酸を選択した。次に、トリマーオリゴヌクレオチド合成(TRIM technology、GeneArt社による)によってライブラリを合成して増幅し、適切なphen 2発現系にサブクローニングして、STxB多様体とM13ファージのpIIIコートタンパク質との間の融合タンパク質のライブラリを得た。形質転換体の総数は、 1.03×10^9 cfuであった。ライブラリの内容物を、シーケンシングによって特徴付けした(示していない)。ファージのライブラリを産生し、30%グリセロール中、-80℃で貯蔵した。ファージは最終濃度ファージおよそ 10^{12} 個/mLで産生された。

【0618】

ライブラリの特徴付け

ライブラリの品質及び多様性をSangerシーケンシングによって検証した。形質転換プレートから96個のコロニーを採取してシーケンシングした(GeneArt社)。クローン96個中71個(73%)が正確な配列を含有した。71個の配列において、所望の変異は全て、アミノ酸F30に関して最少でも8%の発生率で見出された。残りのクローンは、明確なシーケンシングデータを示さなかったか、又は不正確な配列(挿入、欠失、及び置換)であった。これらのデータを確認するために、本発明者らはまた、自身で96個のクローンもシーケンシングした。クローン96個中76個(79%)が正確な配列を含有した。所望の変異は全て見出され、アミノ酸G62は最少の3%の発生率であり、他の変異は全て、10%を超える発生率を示した。残りのクローンは、明確なシーケンシングデータを示さなかったか、又は不正確な配列(挿入、欠失、又は置換)であった。

【0619】

Gb3結合体のファージディスプレイ選択

そのGb3に対する結合能を維持するSTxBの非天然の配列の選択に関する潜在性を評価するために、第1の選択をGb3に対して実施した。3ラウンドの選択を磁気リボソームに関して実施し、各ラウンドは、非特異的結合体を除去するためにGb3陰性リボソームに関する2つの枯渇工程の後に、Gb3陽性リボソームに関する1つの選択工程からなった(図10)。ファージ 10^{12} 個を各ラウンドに使用し、選択後におよそ 10^7 個のファージのアウトプットを得た。最後の選択ラウンドを、Gb3-CHOに関する2回の枯渇工程と共にGb3+CHO細胞に関して実施し、これによってファージ 10^5 個の最終的なアウトプットを得た。

【0620】

HeLa C2TA細胞及びPPMP(GSL合成の阻害)によって処置したHeLa C2TA細胞に関して、クローン96個を採取して、シーケンシングし、GSLに対するその特異的結合に関してフローサイトメトリーによって分析した。

【0621】

クローン96個中、21個(A03、A06、A08、B02、B05、B12、C02、C03、C06、D04、D07、D1

10

20

30

40

50

0、D12、E7、F12、G05、G11、H03、H07、H11)が、野生型STxBと完全に「相同な」配列を示した。これらの21個中13個は、FACSによって有意なGSL特異的結合を示した(図17)。

【0622】

これらのクローン13個のうち、5個の独自のSTxB多様体配列を同定した(図17)。(B12、C03、D12、G05、G11、H11)-(A03、D10、H03)-(A06、C06)-は、同一の配列を共有し、B02及びB05は独自であった。これらの群をそれぞれ、LB01、LB02、LB03、LB04、及びLB05と呼ぶ。本発明者らの知る限り、これらのいずれもこれまで文献に記載されていなかった。

【0623】

各位置での各々のアミノ酸の発生を分析した。興味深いことに、8個の位置(D17、D18、E28、T31、W34、N35、N55、G60)は、決して変異しなかった。

10

【0624】

注目すべきことに、それらのファージをGb3陽性リボソームに提示することによって、及び十分な洗浄後、残りの沈降したファージ集団は、関連するファージに関して高度に濃縮された(効率的な選択)。当業者は、任意の市販のグリコスフィンゴ脂質を含有するリボソームを原則的に生成することができ、本明細書に開示のプロトコールを使用して、その標的がおそらくGb3とは異なるSTxB多様体のライブラリをスクリーニングするために使用することができることを承知していると認識される。従って、特定の実施形態によれば、本発明の及び本明細書に記載のGSL提示磁気リボソームを使用するスクリーニング方法を、以下の特定の実施形態により実施することができると企図される：

- 各々の別個のリボソームバッチが1つの特定の精製GSLを特異的に提示する、リボソームのバッチに関して個々に実行されるSTxBライブラリのおそらく並行したスクリーニングを通して、又は

20

- GSLの混合物、特に他のGSLに結合するSTxB変異体の亜集団を予め選択するためにGb3を含有しないGSLの混合物を含有するリボソームのスクリーニングを実施することによって。

【0625】

Gb3結合体の特徴付け

5個の独自の潜在的Gb3結合体を、CHO細胞において免疫蛍光によって更に特徴付けした。STxB多様体を呈示するファージ、又はSTxB多様体そのものをTG1細菌において産生した。適切な発現をイムプロットイングによって特徴付けした。各々のクローンをGb3+CHO及びGb3-CHO細胞における結合に関して試験した。それらの各々は、それらがファージ上で呈示されるか(図18)、又は溶液中で遊離(図19)であるかによらず、Gb3+CHOにおいて有意な結合を示し、Gb3-CHOでは結合を示さなかった。

30

【0626】

継続中の実験

他のGSL(例としてGM3)の結合体のファージディスプレイ選択

別の結合特異性を有するSTxB多様体を選択する潜在性を評価するために、Gb3ではなくて別のGSLに対して、例えばGM3に関する選択を実施中である。幾つかの選択ラウンド(2から5回)を磁気リボソームについて実施し、各ラウンドは、非特異的結合体を除去するためにGM3陰性リボソームに関する2つの枯渇工程の後に、GM3陽性リボソームに関する1つの選択工程からなった(図10)。ファージ 10^{12} 個を各ラウンドに使用する。本明細書に記載の材料及び方法及びプロトコールが当てはまる。GM3陰性細胞(例えば、マウス黒色腫に由来し、GM3発現のその非存在に関して選択したGM95細胞)に関して2つの枯渇工程を行って、最終の選択ラウンドをGM3陽性細胞(例えば、マウス黒色腫に由来するMEB4細胞)に関して実施した。およそ100個のクローンを採取してシーケンシングし、GM3陽性及び陰性細胞におけるGSLに対するその特異的結合に関してフローサイトメトリーによって分析した。

40

【0627】

従って、これは、本明細書に開示される非常に多様なGSLに関して実行することができ、精製GSL種を使用してリボソームにおける、目的のGSLを発現する細胞における、又は更に生検から採取した患者試料における選択の実施の可能性がある。

50

【符号の説明】

【 0 6 2 8 】

- 1 磁気粒子
- 2 STxB
- 3 Gb3非特異的結合体
- 4 脂質二重層(DOPC)
- 5 磁石

【 図 1 】

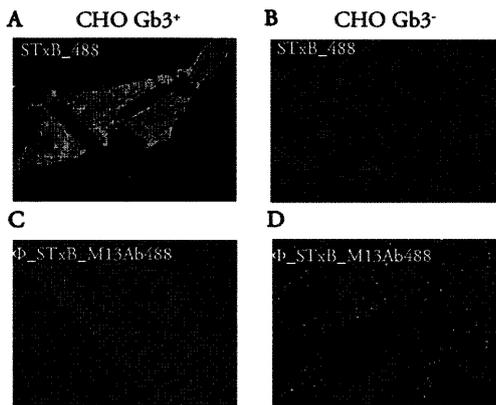
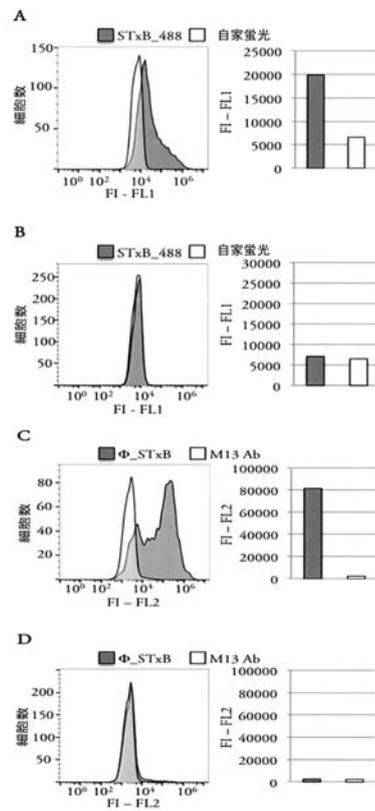
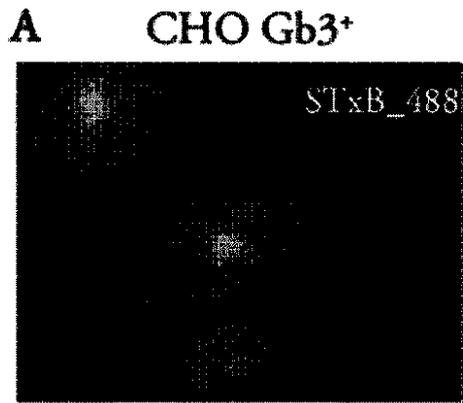


FIGURE 1

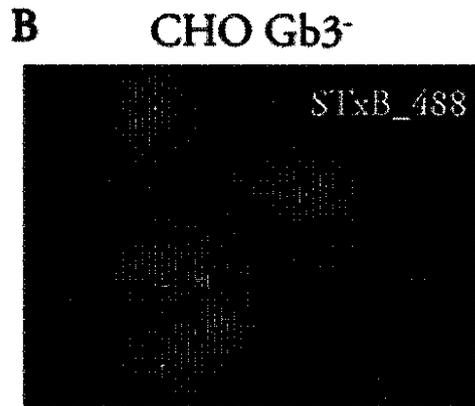
【 図 2 】



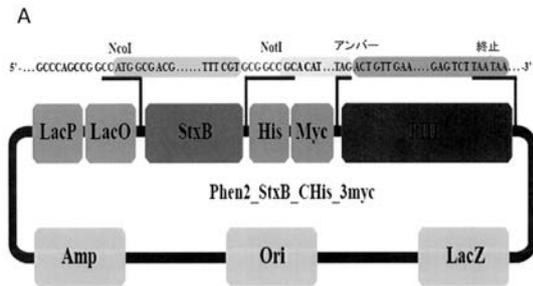
【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 図 4 】



【 図 5 】

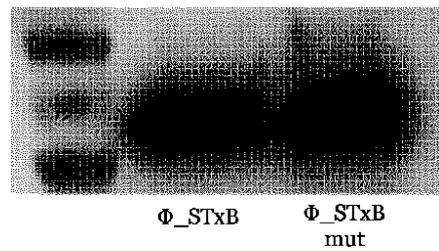
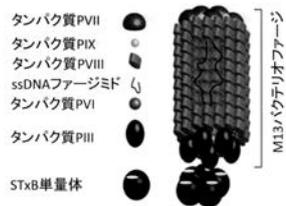


FIGURE 5

B



【 図 6 】

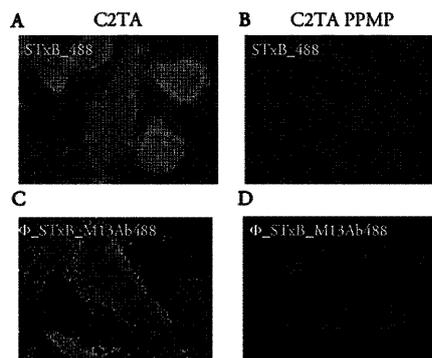
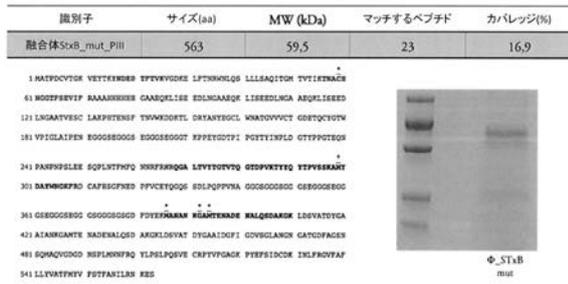
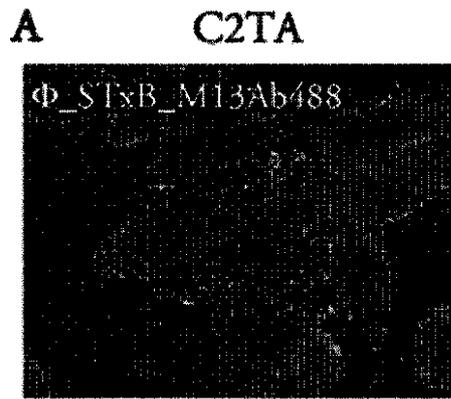


FIGURE 6

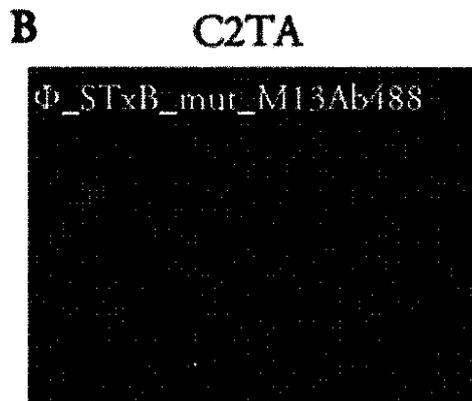
【 図 7 】



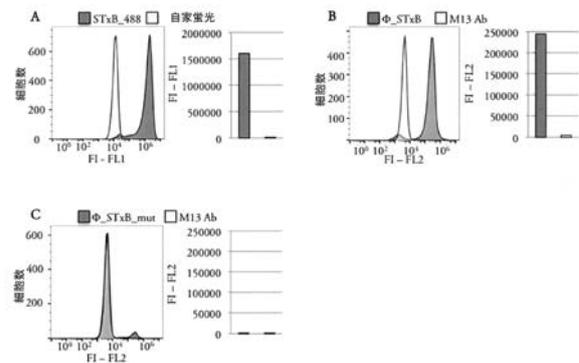
【 図 8 A 】



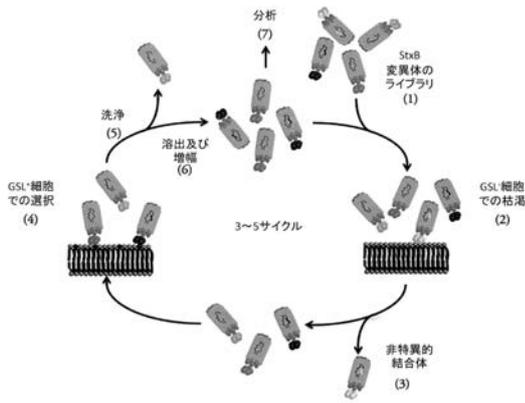
【 図 8 B 】



【 図 9 】



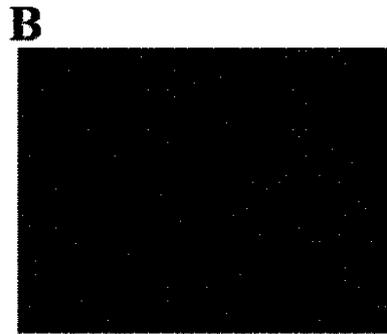
【 図 1 0 】



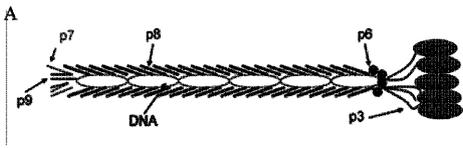
【 図 1 2 A 】



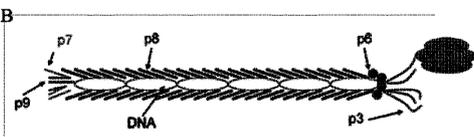
【 図 1 2 B 】



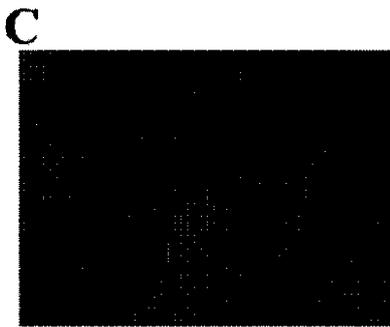
【 図 1 1 A 】



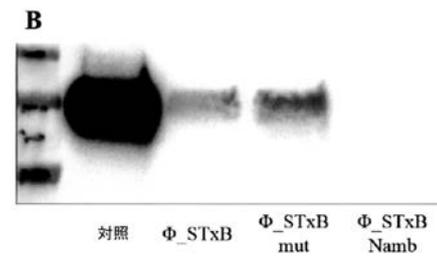
【 図 1 1 B 】



【 図 1 2 C 】



【 図 1 3 】



【 図 1 2 D 】



【 図 1 4 】

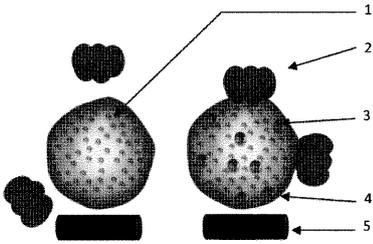
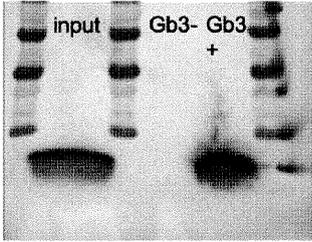


FIGURE 14

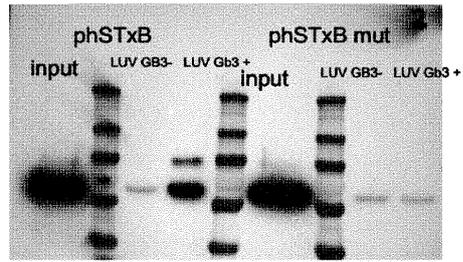
【 図 1 5 A 】

A



【 図 1 5 B 】

B



【 図 1 6 - 1 】

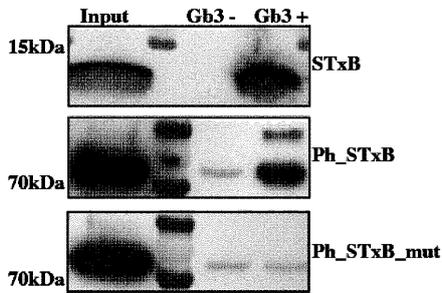
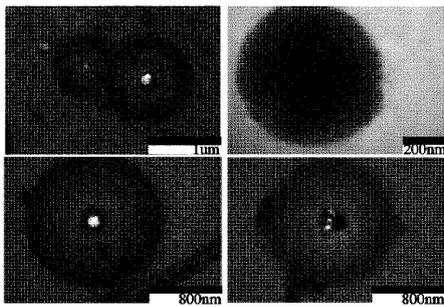
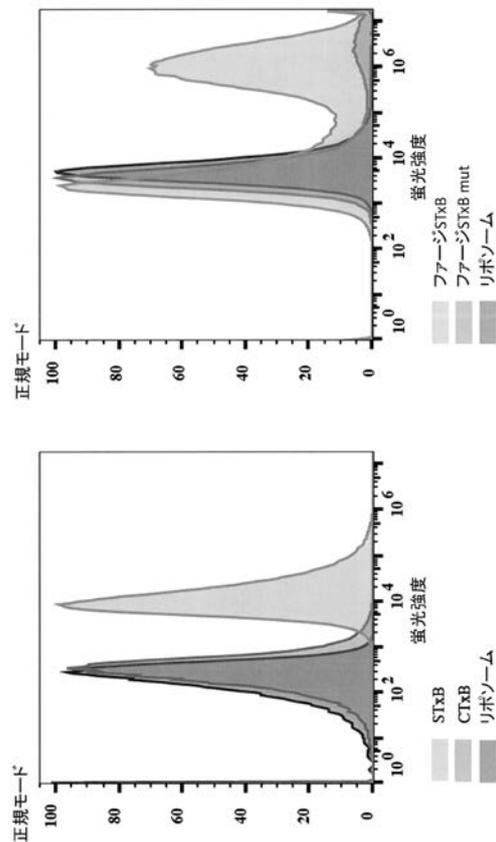
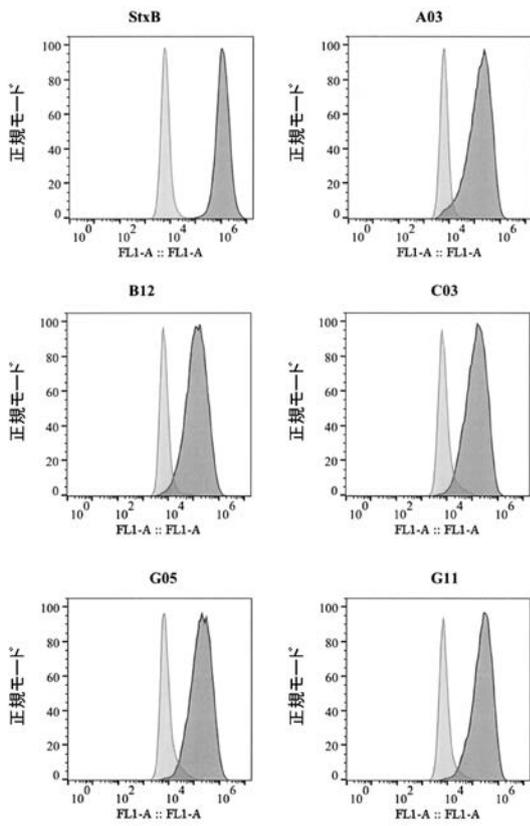


FIGURE 16.1

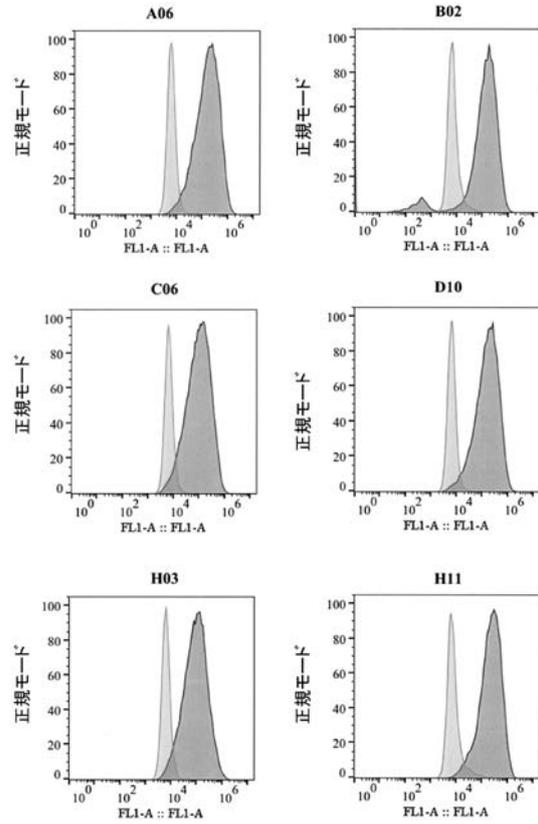
【 図 1 6 - 2 】



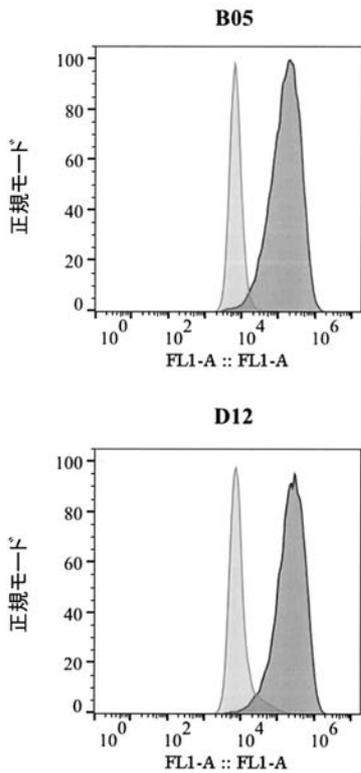
【 図 1 7 A - 1 - 1 】



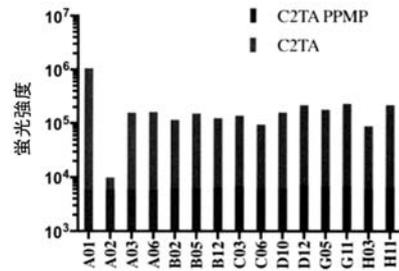
【 図 1 7 A - 1 - 2 】



【 図 1 7 A - 1 - 3 】



【 図 1 7 A - 2 】



【 17 B 】

| | | | | | | | | |
|-----------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|------------|------------|----|
| STAB - W1 (41) | ATPDCVTGKV | EYTRYDDDT | FTVKYGDKEI | FTWRNQLSL | LLSAQITGMT | VTKTKMACHN | GGGFSEVIFR | 70 |
| STAB - W2 (41) | A | N | S | W.EK | W.EK | W.EK | AL | 70 |
| STAB - C03 (41) | A | N | S | W.EK | W.EK | W.EK | AL | 70 |
| STAB - D12 (41) | A | N | S | W.EK | W.EK | W.EK | AL | 70 |
| STAB - G05 (41) | A | N | S | W.EK | W.EK | W.EK | AL | 70 |
| STAB - G11 (41) | A | N | S | W.EK | W.EK | W.EK | AL | 70 |
| STAB - G13 (41) | A | N | S | W.EK | W.EK | W.EK | AL | 70 |
| STAB - G01 (41) | S | N | S | W.EK | W.EK | W.EK | S.A | 70 |
| STAB - D10 (41) | S | N | S | W.EK | W.EK | W.EK | S.A | 70 |
| STAB - H03 (41) | S | N | S | W.EK | W.EK | W.EK | S.A | 70 |
| STAB - F06 (41) | S | N | S | W.EK | W.EK | W.EK | S.A | 70 |
| STAB - G08 (41) | S | N | S | W.EK | W.EK | W.EK | S.A | 70 |

FIGURE 17.B

【 18 】

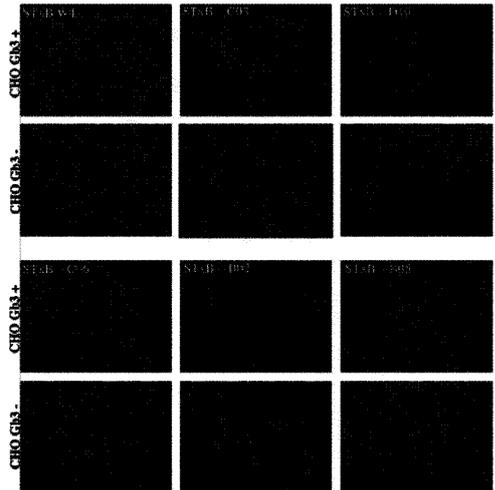


FIGURE 18

【 19 】

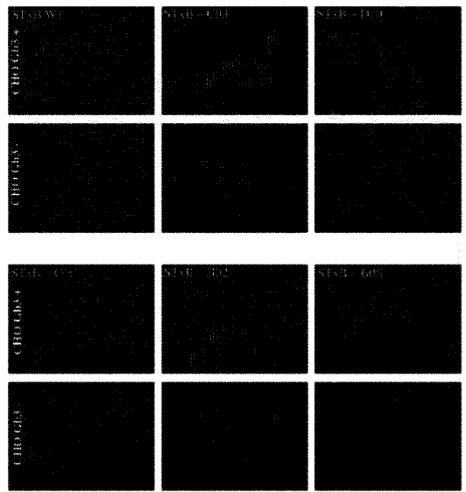


FIGURE 19

【配列表】

2020519244000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/EP2018/056311 |
|---|

| | | |
|---|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/25 ADD. | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | CN 101 691 406 A (INST MICROBIOLOGY & EPIDEMIOLOGY ACADEMY MILITARY MEDICAL SCIENCES PLA) 7 April 2010 (2010-04-07) SEQ ID NO:1 ----- | 6,7,9-37 |
| X | US 2013/266607 A1 (TINKER JULIETTE [US]) 10 October 2013 (2013-10-10) SEQ ID NO:14 ----- | 6,7, 9-12,18, 20,21,33 |
| X | US 2013/156802 A1 (TINKER JULIETTE [US]) 20 June 2013 (2013-06-20) SEQ 14 ----- | 6,7, 9-12,18, 20,21,33 |
| | ----- -/-- | |
| <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 | | "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 |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | | "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 |
| "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) | | "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 |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | "&" document member of the same patent family |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 6 June 2018 | 26/06/2018 | |
| 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 Hoff, Céline | |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/056311

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|------------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2012/101235 A1 (CENIX BIOSCIENCE GMBH [DE]; ECHEVERRI CHRISTOPHE J [US]; SOENNICHSEN B) 2 August 2012 (2012-08-02) SEQ ID NO:119 ----- | 6,7, 9-12,18, 20,21,33 |
| X | WO 2011/046520 A1 (KEMIJSKI INST [SI]; JERALA ROMAN [SI]; FEKONJA OTA [SI]; POHAR JELKA []) 21 April 2011 (2011-04-21) SEQ 14 ----- | 6,7, 9-12,18, 20,21,33 |
| Y | WO 02/060937 A1 (INST CURIE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; INST NAT SANTE RECH MED) 8 August 2002 (2002-08-08) cited in the application the whole document ----- | 1,2,4-55 |
| Y | WO 2004/016148 A2 (INST CURIE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; INST NAT SANTE RECH MED) 26 February 2004 (2004-02-26) cited in the application the whole document ----- | 1,2,4-55 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/056311

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|----|------------------|--|--|
| CN 101691406 | A | 07-04-2010 | NONE | |
| US 2013266607 | A1 | 10-10-2013 | NONE | |
| US 2013156802 | A1 | 20-06-2013 | US 2013156802 A1 US 2015017199 A1 | 20-06-2013 15-01-2015 |
| WO 2012101235 | A1 | 02-08-2012 | CA 2825023 A1 EP 2667898 A1 JP 2014505064 A US 2014065172 A1 WO 2012101235 A1 | 02-08-2012 04-12-2013 27-02-2014 06-03-2014 02-08-2012 |
| WO 2011046520 | A1 | 21-04-2011 | AT 511130 A2 WO 2011046520 A1 | 15-09-2012 21-04-2011 |
| WO 02060937 | A1 | 08-08-2002 | AT 362483 T CA 2435712 A1 DE 60220136 T2 DK 1355928 T3 EP 1229045 A1 EP 1355928 A1 ES 2287239 T3 JP 4296536 B2 JP 2004531230 A PT 1355928 E US 2004110935 A1 US 2010196418 A1 US 2015045536 A1 WO 02060937 A1 | 15-06-2007 08-08-2002 24-01-2008 24-09-2007 07-08-2002 29-10-2003 16-12-2007 15-07-2009 14-10-2004 23-08-2007 10-06-2004 05-08-2010 12-02-2015 08-08-2002 |
| WO 2004016148 | A2 | 26-02-2004 | AT 292144 T AT 439597 T AU 2003283228 A1 CA 2494541 A1 DE 60203491 D1 EP 1386927 A1 EP 1525478 A2 ES 2330429 T3 JP 4339251 B2 JP 2006509727 A US 2006008475 A1 US 2010329992 A1 US 2011243914 A1 WO 2004016148 A2 | 15-04-2005 15-08-2009 03-03-2004 26-02-2004 04-05-2005 04-02-2004 27-04-2005 10-12-2009 07-10-2009 23-03-2006 12-01-2006 30-12-2010 06-10-2011 26-02-2004 |

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 Q 1/04 (2006.01) | C 1 2 Q 1/04 | 4 C 0 8 4 |
| C 1 2 P 21/02 (2006.01) | C 1 2 P 21/02 | C 4 C 0 8 7 |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | 4 H 0 4 5 |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/10 | |
| C 1 2 N 7/01 (2006.01) | C 1 2 N 7/01 | |
| C 4 0 B 50/06 (2006.01) | C 4 0 B 50/06 | |
| A 6 1 K 38/16 (2006.01) | A 6 1 K 38/16 | |
| A 6 1 K 35/76 (2015.01) | A 6 1 K 35/76 | |
| A 6 1 K 47/64 (2017.01) | A 6 1 K 47/64 | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 35/02 (2006.01) | A 6 1 P 35/02 | |
| C 0 7 K 14/25 (2006.01) | C 0 7 K 14/25 | |
| G 0 1 N 33/92 (2006.01) | G 0 1 N 33/92 | Z |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | Y |

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, G T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX , MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(71)出願人 509181699

アンスティテュ・クリー

フランス・F - 7 5 2 4 8 ・パリ・セデックス・0 5 ・リュ・デュルム・2 6

(71)出願人 505002222

ユニヴェルシテ・パリ・シュド・オンズ

フランス・9 1 4 0 0 ・オルセイ・リュ・ジョルジュ・クレマンソー・1 5

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 トマ・ムララス

フランス・7 5 0 1 9 ・パリ・アヴェニュー・ドゥ・フランドル・3 4

(72)発明者 フランク・ペレス

フランス・7 5 0 1 3 ・パリ・リュ・ドゥ・クルールバルブ・6 7

(72)発明者 リュジェ・ジョアンヌ

フランス・9 2 4 0 0 ・クラブボア・リュ・ドゥ・ストラスブール・6 2

F ターム(参考) 2G045 AA26 DA60

4B063 QA01 QA13 QA18 QQ10 QQ70 QR48 QR79 QS05 QS32 QS38

4B064 AG30 AG32 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA12 CA19 CC24

DA01 DA13

4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y
AA98X AA98Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C076 AA95 EE59
4C084 AA02 AA07 BA01 BA20 BA41 BA42 CA04 NA13 NA14 ZB261
ZB262 ZB271 ZB272
4C087 AA01 BC83 CA12 NA13 ZB26 ZB27
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA20 BA41 CA01 CA11 DA50 DA83
EA20 EA50 FA74