

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第6998862号
(P6998862)

(45)発行日 令和4年2月4日(2022.2.4)

(24)登録日 令和3年12月23日(2021.12.23)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	9/52 (2006.01)	C 1 2 N	9/52	Z N A
C 1 2 P	21/00 (2006.01)	C 1 2 P	21/00	Z
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	

請求項の数 10 (全50頁)

(21)出願番号	特願2018-515482(P2018-515482)	(73)特許権者	591003013 エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN - LA ROCH E AKTIENGESELLSCHA FT
(86)(22)出願日	平成28年9月22日(2016.9.22)		スイス・シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼル ・グレンツァーヘルストラッセ 1 2 4
(65)公表番号	特表2018-531006(P2018-531006 A)	(74)代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(43)公表日	平成30年10月25日(2018.10.25)	(74)代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86)国際出願番号	PCT/EP2016/072502	(74)代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87)国際公開番号	WO2017/050866	(74)代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87)国際公開日	平成29年3月30日(2017.3.30)		
審査請求日	令和1年9月10日(2019.9.10)		
(31)優先権主張番号	15186951.8		
(32)優先日	平成27年9月25日(2015.9.25)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 可溶性ソルターゼA

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 配列番号38のアミノ酸配列、および

b) 配列番号38のアミノ酸配列のN末端またはC末端にあるアフィニティタグまたは精製タグからなるポリペプチドであって、該タグが、配列番号38のアミノ酸配列に直接的にまたは介在するリンカーを介してコンジュゲートされている、前記ポリペプチド。

【請求項2】

タグが、Argタグ、Hisタグ、Flagタグ、3×Flagタグ、Strepタグ、HAタグ、ナノタグ、SBPタグ、c-mycタグ、Sタグ、SNUTタグ、NusA、T7、チオレドキシシ、カルモジュリン結合ペプチド、セルロース結合ドメイン、キチン結合ドメイン、GSTタグ、またはMBPタグより選択される、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】

配列番号38のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項4】

ソルターゼモチーフを含むポリペプチドと、

a) オリゴグリシンをN末端に含むか、または

b) オリゴアラニンを含むか、または

c) 1～3個のグリシンもしくはアラニンアミノ酸残基が後に続くシステインアミノ酸残基をN末端に含むポリペプチドとの、コンジュゲーションのための、請求項1～3のいずれか一項記載のポリペプチドの使用。

【請求項 5】

(i) アミノ酸配列LPXTG (配列番号01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) またはLPXTA (配列番号41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) を含む第1のポリペプチド、
 (ii) (a) グリニル化合物、またはアラニル化合物をN末端に含むか、あるいは (b) オリゴグリシンまたはオリゴアラニンをN末端に含むか、あるいは (c) 1~3個のグリシンもしくはアラニンアミノ酸残基が後に続くシステインアミノ酸残基をN末端に含む第2のポリペプチド、および
 (iii) 請求項1~3のいずれか一項記載のポリペプチドをインキュベートし、それによって、ポリペプチドを作製する工程を含む、ポリペプチドの酵素的作製のための方法。

10

【請求項 6】

2個のポリペプチドの酵素的コンジュゲーションのための、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

第2のポリペプチドがN末端にアミノ酸配列GGG、AAA、CGG、またはCAAを有する、請求項5~6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

第1のポリペプチドがアミノ酸配列LPXTG (配列番号01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) またはLPXTA (配列番号41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) をC末端に含む、請求項5~7のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 9】

第1のポリペプチドがアミノ酸配列LPETG (配列番号04) またはLPETA (配列番号42) をC末端に含む、請求項5~8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが相互に独立に、抗体可変ドメイン、抗体重鎖Fab断片、抗体Fc領域、タグ、ならびに、アミノ酸配列LPXTG (配列番号01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) またはLPXTA (配列番号41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)、リンカー、および非ソルターゼモチーフ部分を含むペプチドから選択される、請求項5~9のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

従来未知であったリステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) ソルターゼAに由来する新規可溶性ソルターゼAを、本明細書において報告する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

ソルターゼA (SrtA) は、タンパク質を細菌細胞壁に共有結合で付着させる膜結合型酵素である。SrtA基質上の特異的な認識モチーフは、LPXTGであり、酵素は、残基トレオニンとグリシンとの間で切断する。ペプチドグリカン上の認識モチーフは、ペンタグリシンモチーフである。N末端のトリグリシンモチーフ、そしてジグリシンモチーフですら、SrtA反応を支持するのに十分であることが示されている (Clancy, K. W., et al., *Peptide science* 94(2010)385-396 (非特許文献1))。その反応は、チオエステルアシル酵素中間体を通して進行し、それが、オリゴグリシンからのアミン求核剤の攻撃によって分離され、ペプチドグリカンがタンパク質基質に共有結合で連結され、SrtAが再生される。化学合成されたペプチドを組換え発現されたタンパク質に共有結合でコンジュゲートするため、SrtAを使用することが可能である。

40

【0003】

技術的バイオコンジュゲーションのために適用可能なソルターゼは限定されている。最も広く使用されている黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) ソルターゼA (St.au. SrtA) は、技術的適用のために適当な変換動力学を示すが、限定された基質スペクトルを

50

有し、LPXTGソルターゼモチーフのみを認識する。N末端膜アンカリングモチーフを欠く *St.au.* SrtAは、細胞表面タンパク質の標識、共有結合性のタンパク質固定化、およびタンパク質への新規官能性の組み入れのために使用されている。直交/二重の標識戦略のためには、新しい基質スペクトルを有するソルターゼが必要とされる。標準的なソルターゼによって媒介されるバイオコンジュゲーションアプローチについても、産物内のLPXTGモチーフが、例えば、その構造および/または機能に対して負の効果を有する場合、同様である。従って、LPXTGと異なる認識配列を有するソルターゼは、高度に有益であろう。化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) SrtA (*St.py.* SrtA) は、LPXTAソルターゼモチーフを認識するが、酵素の変換動力学的パラメータのため、技術的スケールで適当なソルターゼではない。

10

【0004】

LPXTGと異なるソルターゼモチーフを受け入れるソルターゼは、文献において報告されている。それらには、野生型、例えば、化膿性連鎖球菌由来のソルターゼA (*St.py.* SrtA) およびクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 由来のソルターゼA (*Cl.di.* SrtA) が含まれ、改変型ソルターゼも含まれる。LPXTAモチーフを認識するソルターゼは、*St. py.* SrtA以外には報告されていない (例えば、van Leeuwen, H. C., et al., *FEBS Lett.* 588(2014)4325-4333 (非特許文献2); Dorr, B. M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111(2014)13343-13348 (非特許文献3); Bentley, M. L., et al., *J. Biol. Chem.* 282(2007)6571-6581 (非特許文献4); Race, P. R., et al., *J. Biol. Chem.* 284(2009)6924-33 (非特許文献5); Antos, J. M., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 131(2009)10800-10801 (非特許文献6)を参照すること)。

20

【0005】

WO 2010/087994 (特許文献1)に、ライゲーションのための方法およびその使用が報告されている。IgG様二重特異性抗体の組換えアプローチは、Marvin, J. S.ら (*Acta Pharmacol. Sinica* 26(2005)649-658 (非特許文献7))によって報告されている。WO 2013/003555 (特許文献2)には、タンパク質ライゲーションのためのクリックケミストリーハンドルを設置するためのソルターゼの使用が報告されている。

【0006】

Strijbis, K.ら (*Traffic* 13(2012)780-789 (非特許文献8))は、ソルターゼを使用した生細胞におけるタンパク質ライゲーションを報告している。Ca²⁺依存性の黄色ブドウ球菌ソルターゼAは、細胞内で機能性でないが、Ca²⁺非依存性の化膿性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) ソルターゼAは、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) および哺乳動物HEK293T細胞の両方のサイトゾルおよび小胞体 (ER) 内腔において機能性であることが記述されている。

30

【0007】

Levary, D. A.らは、ソルターゼAによって触媒されたタンパク質間融合を報告している (*PLOS ONE* 6(2011) (非特許文献9))。抗上皮増殖因子受容体抗体の単鎖フォーマットへの設計およびソルターゼAによって媒介されるタンパク質ライゲーションによる標識は、Madej, M. P.ら (*Biotechnol. Bioeng.* 109(2012)1461-1470 (非特許文献10))によって報告されている。Ta, H. T.らは、心血管疾患における分子標的イメージングおよび細胞ホーミングのためのユニバーサルなアプローチとして、酵素的単鎖抗体タグ付けを報告している (*Cir. Res.* 109(2011)365-373 (非特許文献11))。Popp, M.らは、ソルターゼを使用した、ペプチド結合の作成および破壊、即ち、タンパク質設計を報告している (*Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 50(2011)5024-5032 (非特許文献12))。DOTAキレートに対する高い親和性を有するよう設計されたタンパク質は、WO 2010/099536 (特許文献3)に報告されている。

40

【0008】

ソルターゼの逆向き反応を阻止するための種々の努力が報告されている。Yamamura, Y.ら (*Chem. Commun.* 47(2011)4742-4744 (非特許文献13))は、基質の認識部位の周辺にヘアピンを導入することによって、ライゲーション部位の周辺にヘアピン構造

50

を誘導することによる、ソルターゼAによって媒介されるタンパク質ライゲーシオンの増強を報告した。

【0009】

原型ソルターゼAによるLPXTGペプチドの選別、酵素動力学をモジュレートするための不変基質残基の役割、および生成基質のコンフォメーションサインは、Biswas, T.ら (Bioc hem. 53(2014)2515-2524 (非特許文献14)) によって報告された。

【0010】

Li, Y. M.らは、ソルターゼの使用による、タンパク質の不可逆性の部位特異的なヒドラジン分解を報告している (Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 53(2014)2198-2202 (非特許文献15))。

10

【0011】

Lingらは、ソルターゼを介したチオエステルの導入を示した (Ling, J. J. J., et al., J. A m. Chem. Soc. 134(2012)10749-10752 (非特許文献16))。

【0012】

Bellucci, J. J.らは、求核剤としてのリジンの使用を報告している (Angew. Chem. Int. E d. Engl. 53(2014)1-6 (非特許文献17))。

【0013】

Uniprotアクセッション番号A0A0E1R5I2_LISMNには、推定システインプロテアーゼが報告されている。119残基を含むリステリア・モノサイトゲネス由来のソルターゼAは、U niprotアクセッション番号A9LY59_LISMNにおいて報告されている。

20

【0014】

WO 2014/183066 (特許文献4)には、ソルターゼが、ソルターゼ基質を、動物細胞によって発現された内在性非改変型ポリペプチドへコンジュゲートするために適当な条件下で、ソルターゼの存在下で、ソルターゼ認識配列および薬剤を含むソルターゼ基質と動物細胞を接触させる工程を含む、薬剤を動物細胞へコンジュゲートする方法が報告されている。

【0015】

組換え抗体Fc領域を第1の成分として含み、標的に特異的に結合する少なくとも1個の組換え結合エンティティを第2の成分として含む抗体Fc領域コンジュゲートを、該抗体Fc領域と少なくとも1個の該結合エンティティとの酵素的コンジュゲーションのためにソルターゼAを使用して作製する方法は、WO 2014/001325 (特許文献5)において報告されている。

30

【0016】

ソルターゼによって媒介される反応を使用した、タンパク質の部位特異的C末端内部ループ標識は、Guimaraes, C. P., et. al. (Nat. Protoc. 8(2013)1787-1799 (非特許文献18)) によって報告されている。Nguyen, H. D.およびSchumann, W.は、パチルス・スプチリス (Bacillus subtilis) 細胞の表面へのタンパク質の固定化を可能にする実験系の確立を報告した (J. Biotechnol. 122(2006)473-482 (非特許文献19))。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0017】

【文献】WO 2010/087994

WO 2013/003555

WO 2010/099536

WO 2014/183066

WO 2014/001325

【非特許文献】

【0018】

【文献】Clancy, K. W., et al., Peptide science 94(2010)385-396

van Leeuwen, H. C., et al., FEBS Lett. 588(2014)4325-4333

50

Dorr, B. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111(2014)13343-13348
 Bentley, M. L., et al., J. Biol. Chem. 282(2007)6571-6581
 Race, P. R., et al., J. Biol. Chem. 284(2009)6924-33
 Antos, J. M., et al., J. Am. Chem. Soc. 131(2009)10800-10801
 Marvin, J. S.ら、Acta Pharmacol. Sinica 26(2005)649-658
 Strijbis, K.ら、Traffic 13(2012)780-789
 Levary, D. A.ら、PLOS ONE 6(2011)
 Madej, M. P.ら、Biotechnol. Bioeng. 109(2012)1461-1470
 Ta, H. T.ら、Cir. Res. 109(2011)365-373
 Popp, M.ら、Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 50(2011)5024-5032
 Yamamura, Y.ら、Chem. Commun. 47(2011)4742-4744
 Biswas, T.ら、Biochem. 53(2014)2515-2524
 Li, Y. M.ら、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 53(2014)2198-2202
 Ling, J. J. J., et al., J. Am. Chem. Soc. 134(2012)10749-10752
 Bellucci, J. J.ら、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 53(2014)1-6
 Guimaraes, C. P., et. al., Nat. Protoc. 8(2013)1787-1799
 Nguyen, H. D.およびSchumann, W., J. Biotechnol. 122(2006)473-482

【発明の概要】

【0019】

ソルターゼモチーフ（ソルターゼ認識配列）LPXTA（SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る）に対する高い活性を有する、従来未知であったリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAに由来する新規可溶性ソルターゼAが、本明細書において報告される。

【0020】

新規リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAの特異的にN末端が短縮された可溶性バリエーションが、同一の新規リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAの他のN末端またはC末端が短縮されたバリエーションと比較して、増加した酵素活性を有することが見出された。

【0021】

本明細書において報告される一つの局面は、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。このポリペプチドにおいて、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列のみが、リステリア・モノサイトゲネスから入手される/入手されたものである。一つの態様において、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列は、ポリペプチド内の唯一のリステリア・モノサイトゲネス由来アミノ酸配列である。

【0022】

一つの態様において、ポリペプチドは、直接的にまたは介在するリンカーを介してN末端またはC末端にコンジュゲートされたタグをさらに含む。

【0023】

一つの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:32のC末端タグからなる。一つの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列からなる。

【0024】

一つの態様において、ポリペプチドはソルターゼAである。

【0025】

本明細書において報告される一つの局面は、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列を有する1個のドメインおよび1個または複数個のさらなるドメインを含む（融合）ポリペプチドであり、ここで両ドメインは直接的にまたはペプチドリンカーを介して相互にコンジュゲートされている。一つの態様において、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列を有するドメインおよび該さらなるドメイン（の各々/いずれか）は、異なる生物に由来するポリペプチドであり（から入手され）、かつ/または、合成/人工ポリペプチドである。一つの態様において、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列を有するドメインおよび1個または複数個のさらなるドメ

10

20

30

40

50

インは、異なる生物に由来し/自然界においてこの組み合わせでは存在しない。

【0026】

本明細書において報告される一つの局面は、ソルターゼモチーフを含む第1のポリペプチドと、(i) グリシニル化合物、アラニニル化合物、またはシステニル化合物をN末端に含むか、あるいは(ii) オリゴグリシンまたはオリゴアラニンまたはシステインアミノ酸残基に続く1~3個のグリシンもしくはアラニンアミノ酸残基をN末端に含むか、あるいは(iii) リジンアミノ酸残基をN末端の5アミノ酸残基内に含む第2のポリペプチドとのコンジュゲーションのための、本明細書において報告されるポリペプチドの使用である。

【0027】

本明細書において報告される一つの局面は、

(i) (任意で、C末端の100アミノ酸残基内に) アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) を含む第1のポリペプチド、

(ii) (i) グリシニル化合物、アラニニル化合物、またはシステニル化合物をN末端に含むか、あるいは(ii) オリゴグリシンまたはオリゴアラニンまたはシステインアミノ酸残基に続く1~3個のグリシンもしくはアラニンアミノ酸残基をN末端に含むか、あるいは(iii) リジンアミノ酸残基をN末端の5アミノ酸残基内に含む第2のポリペプチド、および(iii) 本明細書において報告されるポリペプチド

をインキュベートし、それによって、(融合)ポリペプチドを作製する工程を含む、(融合)ポリペプチドの(酵素的)作製のための方法である。

【0028】

一つの態様において、方法は、2個のポリペプチドの酵素的コンジュゲーションのためのものである。

【0029】

一つの態様において、第2のポリペプチドは、アミノ酸配列GGG、AAA、CGG、CAA、KGG、またはKAAをN末端に有する。

【0030】

一つの態様において、第1のポリペプチドは、アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) をC末端に含む。一つの態様において、第1のポリペプチドは、アミノ酸配列LPETG (SEQ ID NO:04) またはLPETA (SEQ ID NO:42) またはLPKTG (SEQ ID NO:43) またはLPKTA (SEQ ID NO:44) をC末端に含む。

【0031】

一つの態様において、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは相互に独立に、抗体可変ドメイン、抗体重鎖Fab断片、抗体Fc領域、タグ、ならびに、ペプチドまたはポリペプチド、リンカー、および非ソルターゼモチーフ部分からなる群より選択され、第1のポリペプチドは、各々、アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) を含む。

[本発明1001]

SEQ ID NO:38のアミノ酸配列を有する1個のドメインおよび1個もしくは複数個のさらなるドメインを含むポリペプチドであって、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列を有する該ドメインおよびいずれかの該さらなるドメインが、異なる生物に由来するポリペプチドであるかまたは合成/人工であり、両ドメインが、直接的にまたはペプチドリンカーを介して相互にコンジュゲートされている、ポリペプチド。

[本発明1002]

SEQ ID NO:38からなるポリペプチド。

[本発明1003]

ソルターゼモチーフを含むポリペプチドと、オリゴグリシンまたはオリゴアラニンまたはシステインアミノ酸残基に続く1~3個のグリシンもしくはアラニンアミノ酸残基をN末端に含むポリペプチドとのコンジュゲーションのための、本発明1001または1002のいずれ

10

20

30

40

50

れかのポリペプチドの使用。

[本発明1004]

(i) アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) を含む第1のポリペプチド、

(ii) (i) グリシニル化合物、アラニニル化合物、またはシステイニル化合物をN末端に含むか、あるいは(ii) オリゴグリシンまたはオリゴアラニンまたはシステインアミノ酸残基に続く1~3個のグリシンもしくはアラニンアミノ酸残基をN末端に含むか、あるいは(iii) リジンアミノ酸残基をN末端の5アミノ酸残基内に含む第2のポリペプチド、および

(iii) 本発明1001または1002のいずれかのポリペプチドをインキュベートし、それによって、ポリペプチドを作製する工程を含む、ポリペプチドの酵素的作製のための方法。

[本発明1005]

2個のポリペプチドの酵素的コンジュゲーションのための、本発明1004の方法。

[本発明1006]

第2のポリペプチドがN末端にアミノ酸配列GGG、AAA、CGG、CAA、KGG、またはKAAを有する、本発明1004~1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

第1のポリペプチドがアミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) をC末端に含む、本発明1004~1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

第1のポリペプチドがアミノ酸配列LPETG (SEQ ID NO:04) またはLPETA (SEQ ID NO:42) をC末端に含む、本発明1004~1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが相互に独立に、抗体可変ドメイン、抗体重鎖Fab断片、抗体Fc領域、タグ、ならびに、アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)、リンカー、および非ソルターゼモチーフ部分を含むペプチドからなる群より選択される、本発明1004~1008のいずれかの方法。

【発明を実施するための形態】

【0032】

発明の詳細な説明

本発明は、新規リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAのN末端が短縮されたバリエーションならびにN末端およびC末端が短縮されたバリエーションが、酵素活性において予想外に異なるという所見に少なくとも一部分基づく。

【0033】

L.定義

「に由来する」という用語は、それぞれのアミノ酸配列が、同一のアミノ酸配列を含むか、またはアミノ酸配列の変化を含有しているか、または親アミノ酸配列の短縮バリエーションもしくは融合バリエーションであることを示す。

【0034】

「グリシニル、アラニニル、またはシステイニル化合物」という用語は、フリーなアミノ基を、例えば、NH₂またはNH₃⁺として含み、もう一つの部分とのペプチド結合内にあるカルボキシ基を含むグリシンまたはアラニンまたはシステインアミノ酸残基を1位に含む化合物を意味し、部分は、単離されたアミノ酸残基、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、低分子、色素、または(化学的もしくはペプチド)リンカーのような、任意のアミノ基含有部分であり得る。

【0035】

10

20

30

40

50

「を含む」という用語は、本明細書において使用される時、「からなる」という用語を明確に含む。

【0036】

本明細書および特許請求の範囲において、免疫グロブリン重鎖Fc領域の残基のナンバリングは、カバットのEUインデックス（参照によって明確に本明細書に組み入れられるKabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91 3242）のものである。

【0037】

「改変」という用語は、バリエーション抗体または融合ポリペプチドを入手するための、例えば、Fc領域のFcRn結合部分を少なくとも含む抗体または融合ポリペプチドの親アミノ酸配列の1または複数のアミノ酸残基の変異、付加、または欠失を意味する。

10

【0038】

「アミノ酸変異」という用語は、親アミノ酸配列のアミノ酸配列における修飾を意味する。例示的な修飾には、アミノ酸の置換、挿入、および/または欠失が含まれる。一つの態様において、アミノ酸変異は置換である。「位置におけるアミノ酸変異」という用語は、指定された残基の置換もしくは欠失、または指定された残基の近位への少なくとも1個のアミノ酸残基の挿入を意味する。「指定された残基の近位への挿入」という用語は、その1~2残基以内への挿入を意味する。挿入は、指定された残基のN末端側またはC末端側であり得る。

20

【0039】

「アミノ酸置換」という用語は、予定された親アミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸残基の、異なる「交換」アミノ酸残基への交換を意味する。交換残基は、「天然に存在するアミノ酸残基」（即ち、遺伝暗号によってコードされたもの）であってよく、アラニン（Ala）；アルギニン（Arg）；アスパラギン（Asn）；アスパラギン酸（Asp）；システイン（Cys）；グルタミン（Gln）；グルタミン酸（Glu）；グリシン（Gly）；ヒスチジン（His）；イソロイシン（Ile）；ロイシン（Leu）；リジン（Lys）；メチオニン（Met）；フェニルアラニン（Phe）；プロリン（Pro）；セリン（Ser）；トレオニン（Thr）；トリプトファン（Trp）；チロシン（Tyr）；およびバリン（Val）からなる群より選択される。一つの態様において、交換残基はシステインではない。1または複数の天然に存在しないアミノ酸残基への置換も、本明細書におけるアミノ酸置換の定義に包含される。「天然に存在しないアミノ酸残基」とは、ポリペプチド鎖において近位アミノ酸残基と共有結合することができる、上記の天然に存在するアミノ酸残基以外の残基を意味する。天然に存在しないアミノ酸残基の例には、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン、 α -アミノイソ酪酸、およびEllman, et al., Meth. Enzym. 202 (1991) 301-336に記載されたもののようなその他のアミノ酸残基類似体が含まれる。そのような天然に存在しないアミノ酸残基を生成するためには、Norenら（Science 244 (1989) 182）および/またはEllmanら（前記）の手法を使用することができる。簡単に説明すると、これらの手法は、天然に存在しないアミノ酸残基を含むサブレッサー-tRNAの化学的な活性化に続く、RNAのインピット口の転写および翻訳を含む。化学的なペプチド合成、およびその後の抗体または抗体断片のような組換え作製されたポリペプチドとのこれらのペプチドの融合により、天然に存在しないアミノ酸をペプチドへ組み込むこともできる。

30

40

【0040】

「アミノ酸挿入」という用語は、少なくとも1個の付加的なアミノ酸残基の予定された親アミノ酸配列への組み込みを意味する。挿入は、通常、1個または2個のアミノ酸残基の挿入からなるであろうが、本願は、より大きい「ペプチド挿入」、例えば、約3~約5個またはさらには約10個ものアミノ酸残基の挿入を企図する。挿入される残基は、前記定義のような、天然に存在するものまたは天然に存在しないものであり得る。

【0041】

「アミノ酸欠失」という用語は、アミノ酸配列の予定された位置における少なくとも1個

50

のアミノ酸残基の除去を意味する。

【 0 0 4 2 】

本願において、アミノ酸改変に言及する場合には常に、それはランダムなアミノ酸修飾ではなく計画的なアミノ酸改変である。

【 0 0 4 3 】

「タグ」という用語は、特異的結合特性を有する、ペプチド結合によって相互に接続されたアミノ酸残基の配列を意味する。一つの態様において、タグは、アフィニティタグまたは精製タグである。一つの態様において、タグは、Argタグ、Hisタグ、Flagタグ、3×Flagタグ、Strepタグ、HAタグ、ナノタグ、SBPタグ、c-mycタグ、Sタグ、SNUTタグ、NusA、T7、チオレドキシソ、カルモジュリン結合ペプチド、セルロース結合ドメイン、キチン結合ドメイン、GSTタグ、またはMBPタグより選択される（例えば、Amou, J., et al., Prot. Expr. Purif. 48 (2006) 1-13を参照すること）。

10

【 0 0 4 4 】

一つの態様において、タグは、SEQ ID NO: 07 (RRRRR), またはSEQ ID NO: 08 (RRRRRR), またはSEQ ID NO: 09 (HHHHHH), またはSEQ ID NO: 10 (KDHLIHNHVFKEFHAAHANK), またはSEQ ID NO: 11 (DYKDDDDK), またはSEQ ID NO: 12 (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK), またはSEQ ID NO: 13 (AWRHPQFGG), またはSEQ ID NO: 14 (WSHPQFEK), またはSEQ ID NO: 15 (MDVEAWLGAR), またはSEQ ID NO: 16 (MDVEAWLGARVPLVET), またはSEQ ID NO: 17 (MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP), またはSEQ ID NO: 18 (EQKLISEEDL), またはSEQ ID NO: 19 (KETAAAKFERQHMDS), またはSEQ ID NO: 20 (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL), またはSEQ ID NO: 21 (セルロース結合ドメイン), またはSEQ ID NO: 22 (セルロース結合ドメイン), またはSEQ ID NO: 23 (TNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEP SNVPALWQLQ), またはSEQ ID NO: 24 (GSTタグ), またはSEQ ID NO: 25 (MBPタグ), またはSEQ ID NO: 32 (MRGSHHHHHHGS)

20

30

より選択される。

【 0 0 4 5 】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的または予防的な結果を達成するために必要な投薬量および期間で有効な量をさす。

【 0 0 4 6 】

「個体」または「対象」という用語は、哺乳動物を意味する。哺乳動物には、飼育された動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類（例えば、ヒト、およびサルのような非ヒト霊長類）、ウサギ、ならびに齧歯類（例えば、マウス、ラット、およびハムスター）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。ある種の態様において、個体または対象はヒトである。

40

【 0 0 4 7 】

「薬学的製剤」という用語は、そこに含有されている活性成分の生物学的活性が有効であることを可能にするような形態をとっており、その製剤が投与される対象に対して許容され得ないほど毒性である付加的な成分を含有していない調製物をさす。

【 0 0 4 8 】

「薬学的に許容される担体」とは、対象に対して非毒性である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分をさす。薬学的に許容される担体には、緩衝剤、賦形剤、安定剤、または保存剤が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【 0 0 4 9 】

50

「位置」という用語は、ポリペプチドのアミノ酸配列内のアミノ酸残基の位置を意味する。位置は、連続的にナンバリングされてもよいし、または確立されているフォーマット、例えば、抗体ナンバリングのためのカバットのEUインデックスに従ってナンバリングされてもよい。

【0050】

本明細書において使用されるように、「治療」（および「治療する」または「治療すること」）のようなそれらの文法上の変動）とは、治療されている個体の自然経過を改変する試みにおける臨床的介入をさし、予防のために実施されてもよいしまたは臨床病理の経過中に実施されてもよい。治療の望ましい効果には、疾患の発生もしくは再発の防止、症状の軽減、疾患の直接もしくは間接の病理学的事象の縮小、転移の防止、疾患進行の速度の減少、疾患状態の回復もしくは緩和、および寛解、または予後の改善が含まれるが、これらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるかまたは疾患の進行を遅くするために使用される。

10

【0051】

II. ソルターゼAを使用した酵素的コンジュゲーション

インビボでは共有結合で会合していない2種の要素を含む共有結合コンジュゲート（すなわち、融合ポリペプチド）を、酵素ソルターゼ、特に、ソルターゼAを使用することによって、インビトロで入手することができる。

【0052】

トランスアミダーゼは、一般に、アシルドナーと求核性アシルアクセプターとの間のペプチド結合（アミド結合）の形成を触媒する。ペプチド結合を形成するため、アシルアクセプターは、NH₂-CH₂部分を含有していなければならない。グラム陽性菌には、以下の属が含まれる：アクチノミセス（*Actinomyces*）、バチルス、ビフィドバクテリウム（*Bifidobacterium*）、セルロモナス（*Cellulomonas*）、クロストリジウム、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）、マイクロコッカス（*Micrococcus*）、マイコバクテリウム（*Mycobacterium*）、ノカルジア（*Nocardia*）、スタフィロコッカス、ストレプトコッカス、およびストレプトマイセス（*Streptomyces*）。

20

【0053】

ソルターゼは、グラム陽性菌ゲノム由来の61のソルターゼの配列アライメントおよび系統発生的分析に基づき、A、B、C、およびDと名付けられた四つのクラスへ分類されている（Dramsai, S., et al., *Res. Microbiol.* 156(2005)289-297）。これらのクラスは、ComfortおよびClubb（Comfort, D. and Clubb, R. T., *Infect. Immun.* 72(2004)2710-2722）によってソルターゼが分類された以下のサブファミリーに相当する：クラスA（サブファミリー1）、クラスB（サブファミリー2）、クラスC（サブファミリー3）、クラスD（サブファミリー4および5）。前記の参照は、多数のソルターゼおよび認識モチーフを開示している（Pallen, M. J., et al., *Trends Microbiol.* 9(2001)97-101も参照すること）。この情報によって、当業者は、Dramsai（前記）に記載されたもののような、配列および/またはその他の特徴に基づき、正確なクラスにソルターゼを割り当てることができる。

30

【0054】

ソルターゼA（SrtA）は、トランスアミダーゼ活性を有する膜結合型酵素であり、グラム陽性菌から同定され単離された。インビボでソルターゼAは、タンパク質を細菌細胞壁に共有結合で付着させる。SrtA基質上の特異的認識モチーフは、LPXTGであり、酵素は、残基トレオニンとグリシンとの間で切断する。ペプチドグリカン上の認識モチーフは、ペンタグリシンモチーフである。N末端のトリグリシンモチーフ、そしてジグリシンモチーフですら、SrtA反応を支持するのに十分であることが示されている（Clancy, K. W., et al., *Peptide Science* 94(2010)385-396）。反応は、チオエステルアシル酵素中間体を通して進行し、それが、オリゴグリシンからのアミン求核剤の攻撃によって分離され、ペプチドグリカンがタンパク質基質に共有結合で連結され、SrtAが再生される。化学的に合成されたペプチドを、組換え発現されたタンパク質に共有結合でコンジュゲートするため、SrtAを使用することが可能である。

40

50

【 0 0 5 5 】

多くのグラム陽性菌が、病原性因子を含む多様な表面タンパク質を細胞壁（ペプチドグリカン）に共有結合でアンカリングするためにソルターゼを使用する。ソルターゼは膜会合型酵素である。野生型黄色ブドウ球菌ソルターゼA（SrtA）は、N末端膜貫通領域を含む206アミノ酸のポリペプチドである。第1工程において、ソルターゼAが、LPXTG（SEQ ID NO:01）アミノ酸配列モチーフを含有している基質タンパク質を認識し、活性部位Cysによって、ThrとGlyとの間のアミド結合を切断する。このペプチド切断反応は、ソルターゼA基質チオエステル中間体をもたらす。第2工程において、（黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンのペンタグリシン単位に相当する）オリゴグリシンを含有している第2の基質ポリペプチドのアミノ基の求核攻撃によって、チオエステルアシル酵素中間体が分離され、共有結合で連結された細胞壁タンパク質およびソルターゼAの再生に至る。オリゴグリシン求核剤の非存在下では、アシル酵素中間体は水分子によって加水分解され得る。

10

【 0 0 5 6 】

ソルターゼによって媒介されるライゲーション/コンジュゲーションは、多様なタンパク質工学およびバイオコンジュゲーションの目的のために適用され始めている。この技術は、LPXTGタグ付きの組換えのまたは化学的に合成されたポリペプチドへの天然および合成の官能性の導入を可能にする。例には、オリゴグリシンによって誘導体化されたポリマー（例えば、PEG）、フルオロフォア、ビタミン（例えば、ビオチンおよび葉酸）、脂質、炭水化物、核酸、合成のペプチドおよびタンパク質（例えば、GFP）の共有結合性の付着が含まれる（例えば、Tsukiji, S. and Nagamune, T., ChemBioChem 10(2009)787-798 ; Popp, M. W. L. and Ploegh, H. L., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 50(2011)5024-5032を参照すること）。

20

30

40

50

年/引用	内容
1990 Fischetti et al. Mol. Microbiol. 4 (1990) 1603-1605	- LPETG ソルターゼモチーフ
1999 Mazmanian et al. Science 285 (1999) 760-763	-黄色ブドウ球菌株0S2 -保存されたLeu-Pro-X-Thr-Gly (LPXTG) モチーフ -srtA遺伝子は、可能性のあるNH2末端シグナルペプチド/膜アンカー配列および184位の推定活性部位システインを有する206アミノ酸のタンパク質を特定する -srtA相同体は、アクチノミセス・ネスルンディ (<i>naeslundii</i>)、バチルス・スブチリス、エンテロコッカス・フェカリス (<i>Enterococcus faecalis</i>)、黄色ブドウ球菌、ストレプトコッカス・ミュータンス (<i>Streptococcus mutans</i>)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (<i>pneumoniae</i>)、および化膿性連鎖球菌に存在する -AF162687はコード配列 (フレーム1リーディング) を開示する MKKWTNRLMT IAGVVLILVA AYLFAKPHID NYLHDKDKDE KIEQYDKNVK EQASKDKKQQ AKPQIPKDKS KVAGYIEIPD ADIKEPVYYPG PATPEQLNRG VSFAEENESL DDQNISIAGH TFIDRPNYQF TNLKAAKKG S MVYFKVGNET RKYKMTSIRD VKPTDVGVL D EQKGKDKQLT LITCDDYNEK TGVWEKRKIF VATEVK
1999 Ton-That et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 12424-12429	-黄色ブドウ球菌株0S2 -黄色ブドウ球菌ソルターゼA -残基2~25欠失 (N末端シグナル配列) -MW : 22139Da -変異C184Sは触媒活性を消失させる -化膿性連鎖球菌由来(<i>Spyo</i>)、エンテロコッカス・フェカリス由来(<i>Efea</i>)、アクチノミセス・ネスルンディ由来(<i>Anei</i>)、ストレプトコッカス・ミュータンス由来(<i>Smut</i>)、バチルス・スブチリス由来(<i>Bsub</i>)、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ由来(<i>SpnA</i> , <i>SpnB</i> , および <i>SpnC</i>)のソルターゼ相同体 -水はアシル酵素中間体を分解することができる
2000 Dhar et al. Biochem. 39 (2000) 3725-3733	-リステリア・モノサイトゲネスは、スタフィロコッカス属種のペンタグリシン架橋とは化学的に異なる、それよりはるかに短いペプチドグリカン架橋 (m-Dpm) を有する -リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAは黄色ブドウ球菌ソルターゼAと同じソルターゼモチーフ : LPXTG (LPTTG) を有する

10

20

30

40

50

年/引用	内容																																
2000 Ton-That et al. J. Biol. Chem. 275 (2000) 9876-9881	<p>-精製された組換え黄色ブドウ球菌ソルターゼA</p> <p>-LPXTGモチーフを有するペプチドを加水分解する</p> <p>-トリプルGモチーフ</p> <p>-H2N-GGGの存在下で排他的ペプチド転移</p> <p>-アミノドナーの存在下で、ソルターゼによって媒介されるLPXTGモチーフ切断速度が増加した</p> <p>-ソルターゼは、N末端シグナル配列/ストップトランスファードメインを有する206アミノ酸ポリペプチドであり、スタフィロコッカス属種の細胞膜にアンカリングされている</p> <p>-残基1~25はN末端シグナル配列に相当する</p> <p>-反応条件:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 5 mM アミノ基求核剤 - 4.71 μM SrtADN - 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) - 520 μ lの体積 <p>-反応条件:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 μM 蛍光ペプチド - 5 mM アミノ基求核剤 H2NNGGG - 15 μM SrtADN - 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) - 520 μ lの体積 - 37 °C, 16 h <p style="text-align: center;">表III SrtA_{ΔN}の動力的分析</p> <p>動力的定数K_m、V_{max}、およびk_{cat}をラインウィーバーバークプロットを使用したミカエリスメンテン式についての曲線適合から計算した。反応条件は図4の説明に記載される。</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>求核剤</th> <th>K_m</th> <th>V_{max}</th> <th>K_{cat}</th> <th>K_m/K_{cat}</th> </tr> <tr> <td></td> <td>μM</td> <td>μM/s</td> <td>l/s</td> <td>l/μM·s</td> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H₂O</td> <td>10.88</td> <td>5.08×10^{-5}</td> <td>1.06×10^{-5}</td> <td>9.77×10^{-7}</td> </tr> <tr> <td>NH₂-Gly₃</td> <td>16.48</td> <td>1.08×10^{-4}</td> <td>2.27×10^{-5}</td> <td>1.38×10^{-6}</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">表IV ソルターゼ (SrtA_{ΔN}) によるLPXTGペプチド切断の速度に対する異なる求核剤の効果</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>求核剤</th> <th>$M (s^{-1})^a$</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H₂O</td> <td>1.84 (±0.11)</td> </tr> <tr> <td>NH₂OH</td> <td>1.91 (±0.07)</td> </tr> <tr> <td>NH₂-Gly</td> <td>1.95 (±0.05)</td> </tr> <tr> <td>NH₂-Gly₂</td> <td>2.03 (±0.13)</td> </tr> <tr> <td>NH₂-Gly₃</td> <td>2.91 (±0.03)</td> </tr> </tbody> </table> <p>^a 図4に示される動力的曲線の傾き。基質ペプチドd-QALPETGEE-eをSrtA_{ΔN}および様々な求核剤と共にインキュベートした。トレオニンとグリシンとの間での基質切断を蛍光の増加として測定した。水を例外として、全ての求核剤を5mMの濃度で添加した。3回の独立の実験から平均値を計算した。標準偏差が報告される (括弧)。</p>	求核剤	K_m	V_{max}	K_{cat}	K_m/K_{cat}		μ M	μ M/s	l/s	l/ μ M·s	H ₂ O	10.88	5.08×10^{-5}	1.06×10^{-5}	9.77×10^{-7}	NH ₂ -Gly ₃	16.48	1.08×10^{-4}	2.27×10^{-5}	1.38×10^{-6}	求核剤	$M (s^{-1})^a$	H ₂ O	1.84 (±0.11)	NH ₂ OH	1.91 (±0.07)	NH ₂ -Gly	1.95 (±0.05)	NH ₂ -Gly ₂	2.03 (±0.13)	NH ₂ -Gly ₃	2.91 (±0.03)
求核剤	K_m	V_{max}	K_{cat}	K_m/K_{cat}																													
	μ M	μ M/s	l/s	l/ μ M·s																													
H ₂ O	10.88	5.08×10^{-5}	1.06×10^{-5}	9.77×10^{-7}																													
NH ₂ -Gly ₃	16.48	1.08×10^{-4}	2.27×10^{-5}	1.38×10^{-6}																													
求核剤	$M (s^{-1})^a$																																
H ₂ O	1.84 (±0.11)																																
NH ₂ OH	1.91 (±0.07)																																
NH ₂ -Gly	1.95 (±0.05)																																
NH ₂ -Gly ₂	2.03 (±0.13)																																
NH ₂ -Gly ₃	2.91 (±0.03)																																
	10																																
	20																																
	30																																
	40																																

年/引用	内容
2001 Bolken et al. Infect. Immun. 69 (2001) 75-80	-ストレプトコッカス・ゴルドニ (gordonii) 由来のソルターゼA -N末端シグナル配列を有する252アミノ酸残基 -210位にシステイン -S. ゴルドニタンパク質のカルボキシ末端は黄色ブドウ球菌と比較して12アミノ酸長い
2001 Glaser et al. Science 294 (2001) 849-852	-リステリア・モノサイトゲネスゲノムは、LPXTGを含むタンパク質を41個含有している -Lmゲノムは他の全グラム陽性菌(化膿性連鎖球菌:13個;黄色ブドウ球菌:18個)より多くのLPXTGタンパク質を含有している
2001 Ilangovan et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 6056-6061	-黄色ブドウ球菌ソルターゼAのNMR構造 -2個の短いヘリックスおよび数個のループを含む独特のbバレル構造 -システイン184の活性部位スルフヒドリルは、ヒスチジン120によるイオン化の用意が整っており、おそらく、結果として生じるチオレートがLPXTGペプチドを攻撃するのを可能にする -H120およびC184の保存 -活性部位付近でのカルシウム結合は触媒作用を刺激する -約2mMカルシウムイオンによる刺激 -マグネシウムイオンおよびマンガンイオンがカルシウムイオンの代わりに用いられてもよい -残基1~29が欠失しているソルターゼ -残基1~59が欠失しているソルターゼ -16, 595. 12Daという平均分子量が観察される -反応条件: -2mM H2N-GGG -5 μM ソルターゼN末端欠失バリエーション -150mM NaCl, 5mM CaCl2, 50mM トリス*HCl pH7.5 -反応体積520 μL -黄色ブドウ球菌SrtA残基26~59はアミノ酸保存を示さず; コアSrtA残基60~206は調査された全てのソルターゼ相同体に存在する
2001 Mazmanian et al. Mol. Microbiol. 40 (2001) 1049-1057	-黄色ブドウ球菌選別モチーフ: LPETG, LPDTG, LPKTG, LPNTG, PLAAG, LPKAG, LPQTG -アクチノミセス・ネスルンディ、炭疽菌 (Bacillus anthracis)、バチルス・スプチリス、クロストリジウム・アセトブチリカム (acetabutylicum)、ジフテリア菌 (Corynebacterium diphtheria)、エンテロコッカス・フェカリス、リステリア・モノサイトゲネス、ストレプトコッカス・ミュータンス、ストレプトコッカス・ニューモニエ、化膿性連鎖球菌

10

20

30

40

50

年/引用	内容
2004 Mao et al. J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 2670-2671	<ul style="list-style-type: none"> -求核剤としての1個のアミノグリコシドを有するペプチド -水より50倍速く攻撃する -収率はグリシン残基の数によって影響を受けない -30分後に30%、6時間後に50%、24時間後に90%の収率 -D-アミノ酸含有ペプチドをコンジュゲートさせる；L-アミノ酸ペプチドの半分速度 -トリグリシンにカップリングされた低分子(葉酸)のコンジュゲーション -分岐型ペプチドは直鎖型ペプチドと同等の効率でカップリングされる
2004 Kruger et al. Biochem. 43 (2004) 1541- 1551	<ul style="list-style-type: none"> -黄色ブドウ球菌、ストレプトコッカス・ゴールドニ、リステリア・モノサイトゲネス、ストレプトマイセス・セリカラー、化膿性連鎖球菌、ストレプトコッカス・スイス(suis)のSrtA -黄色ブドウ球菌の2種のソルターゼアイソフォーム：SrtA、SrtB(MPQTNモチーフ) -LPXTGモチーフは全てのグラム陽性菌の間で高度に保存されている -NPQTNモチーフは、ヘム鉄獲得isd遺伝子座を含有している 少なくとも3種の細菌(炭疽菌、バチルス・ハロデュランス(halodurans)および黄色ブドウ球菌)の間でのみ保存されているようである -黄色ブドウ球菌ソルターゼA -残基2~24欠失 -トランスペプチダーゼ反応条件： <ul style="list-style-type: none"> - 100 μL 反応体積 - 150 mM NaCl, 300 mM Tris, 5 mM CaCl₂ (pH 7.5), ペンタグリシン(2 mM), SrtAΔN24 (840 nM), および 0~10mM Abz-LPETG-Dap(Dnp)-NH₂ - 37 $^{\circ}$C, 30 分間 -トランスペプチダーゼ反応条件： <ul style="list-style-type: none"> - 100 μL 反応体積 - 150 mM NaCl, 300 mM Tris, 5 mM CaCl₂ (pH 7.5) - SrtAΔN24 (15 μM), Gly5 (2 mM), ペプチド(300 μM) - 37 $^{\circ}$C で 30 分間 -1N HCl (50 μL) によって反応停止 -トランスペプチダーゼ反応条件： <ul style="list-style-type: none"> - 100 μL 反応体積 - 150 mM NaCl, 300 mM Tris, 5 mM CaCl₂ (pH 7.5) - SrtAΔN24 (60 μM), Gly5 (2 mM), ペプチド(300 μM) - 37 $^{\circ}$C で 360 分間 -逆向きのソルターゼモチーフまたはSrtBモチーフでは反応が起こらない -初速度モチーフ：LPXTG (X=P, C以外；X=Mが最も速い) -終点モチーフ：L/M-P-X-A/L/S/T/V-G (X=P, C以外；LはMより良好；TおよびAは同等、次いで、SおよびVおよびLは同等) -表3選別シグナル：LM: IPKTG, IPALG, LAASS, LPATG, LPKAG, LPISS, IPALG, LPKTS

10

20

30

40

50

年/引用	内容
2007 Parthasarathy et al. Bioconjug. Chem. 18 (2007) 469-476	<p>-非タンパク質種（ポリスチレンビーズ、PEG）の表面へのコンジュゲーション</p> <p>-求核剤としてのアルキルアミン</p> <p>-環状ペプチドの作成</p> <p>-159アミノ酸ソルターゼの使用</p> <p>-トランスペプチダーゼ反応条件： -50mM トリス、150mM NaCl、pH8、0.1% トゥイーン-20、6mM CaCl₂、3mM βメルカプトエタノール -37°C、3時間 -15 μM eGFP、10 μM ソルターゼ -反応を停止させるため、10mM EDTAを添加</p> <p>-トランスペプチダーゼ反応条件： -50mM トリス、150mM NaCl、pH8 -37°C、3時間 -12 μM eGFP-LPETG、40 μM ソルターゼ、36 μM GGG-eGFP</p> <p>-ビーズの場合、同等の収率を得るには、より高い濃度のソルターゼを使用しなければならない</p> <p>-求核剤を保護するための切断可能な上流タグ（GGG）の使用</p> <p>-酵素は、1位のグリシンについて強い選好性を示す；2位のグリシンについてアラニンおよびバリンで置換してもよいようであるが、反応はそれほど効率的ではない</p>
2007 Chan et al. PlosOne 11 (2007) e1164	<p>-固体支持体へのコンジュゲーション</p> <p>-テトラグリシンビーズはジグリシンビーズより速く反応し、ジグリシンビーズはモノグリシンビーズより速く反応する</p> <p>-反応条件： -85 μM eGFP-LPETGG-His6 -40nm His6-ソルターゼ -50mM トリスHCl、150mM NaCl、5mM CaCl₂、pH7.5</p> <p>-黄色ブドウ球菌ゲノムについて増幅されたソルターゼ</p> <p>-N末端膜ターゲティング配列除去</p> <p>-SDSゲル上で30kDa</p>
2008 Samantaray et al. J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 2132-2133	<p>-ペプチド-糖コンジュゲーション</p> <p>-6-アミノヘキソース</p> <p>-ペプチド抗生物質ライゲーション（アミノグリコシド）</p> <p>-カナマイシンクラスについては35~70%、リボスタマイシンクラスについては約18~30%の収率での、抗生物質とペプチドとの間のコンジュゲート</p> <p>-YALPET-糖付加物</p> <p>-YALPMTGK-糖付加物</p> <p>-黄色ブドウ球菌ソルターゼおよびペプチドを伴うLPNTGモチーフ</p>

10

20

30

40

【 0 0 5 7 】

酵素的コンジュゲーションのため、膜通過領域を欠く可溶性短縮型ソルターゼA（SrtA；黄色ブドウ球菌SrtAのアミノ酸残基60~206）を使用することができる（SEQ ID NO:05；Ton-That, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(1999)12424-12429；Ilangoan, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(2001)6056-6061も参照すること）。

【 0 0 5 8 】

ソルターゼAによって媒介される反応は、ソルターゼモチーフ（配列）を含有している種の、1個または複数個のN末端グリシン残基を保持するものとのライゲーションをもたらす。ソルターゼモチーフは、アミノ酸配列LPXTGであってもよいが、それと異なっても

50

よい（以下を参照すること）。しかしながら、そのような配列をアシルドナーとして使用することの欠点は、求核性アシルアクセプターへのLPXT単位の転移が、少なくとも1個のN末端グリシン残基を含有している対応する断片を、化学量論的な量、遊離させるということである。遊離したグリシン含有断片は、意図されたアシルアクセプターと酵素中間体について競合し、酵素的ライゲーション反応の進行に拮抗する。さらに、酵素中間体およびLPXTG含有基質の加水分解的切断も、比較的遅いであるが、その反応と競合する。ソルターゼによって媒介される反応の使用の最初に、少なくとも5mMの濃度のソルターゼモチーフを含むアシルドナーを使用した場合にのみ、有用なレベルのライゲーションが入手され得る。

【0059】

一般的なソルターゼモチーフは、アミノ酸配列LPXT [Xは任意のアミノ酸残基、即ち、天然に存在するアミノ酸残基または天然に存在しないアミノ酸残基であり得る] を有する。いくつかの態様において、Xは、(1文字コードにおいて) D、E、A、N、Q、K、およびRを含むかまたはそれらからなるアミノ酸残基の群より選択される。いくつかの態様において、ソルターゼモチーフは、アミノ酸配列LPXT、LPXA、SPXT、LAXT、LSXT、NPXT、VPXT、IPXT、LGXT、およびYPXRを含むかまたはそれらからなる群より選択される。いくつかの態様において、ソルターゼモチーフは、LPST、LPKT、LPIT、LPDT、SPKT、LAET、LAAT、LAET、LAST、LAET、LPLT、LSRT、LPET、VPDT、IPQT、YPRR、LPMT、LPLT、LAFT、およびLPQTからなるアミノ酸配列の群より選択される。ソルターゼAが使用されるある種の態様において、ソルターゼモチーフは、アミノ酸配列X1PX2X3 [(i) X1はアミノ酸残基ロイシン、イソロイシン、バリン、およびメチオニンからなる群より選択され、(ii) X2は任意のアミノ酸であり、(iii) X3はトレオニン、セリン、およびアラニンからなる群より選択される] を含む。具体的な態様において、前述のように、X1はロイシンであり、X3はトレオニンである。ある種の態様において、X2は、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、リジン、およびメチオニンからなる群より選択される。

【0060】

いくつかの態様において、ソルターゼモチーフは、LPKTG、LPITG、LPDTA、SPKTG、LAETG、LAATG、LAHTG、LASTG、LAETG、LPLTG、LSRTG、LPETG、VPDTG、IPQTG、YPRRG、LPMTG、LPLTG、LAFTG、およびLPQTSを含むかまたはそれらからなるアミノ酸残基の群より選択される。本発明のいくつかの態様において、ソルターゼはソルターゼA (SrtA) である。SrtAは、アミノ酸配列LPXTGを有するソルターゼモチーフを認識する。一般的なソルターゼモチーフアミノ酸配列は、例えば、LPKTG、LPATG、LPE TG、およびLPNTGである。いくつかの態様において、LPETGが使用される。しかしながら、このコンセンサスソルターゼモチーフアミノ酸配列に一致しないソルターゼモチーフも認識され得る。例えば、いくつかの態様において、ソルターゼモチーフは、4位にアミノ酸残基Tではなくアミノ酸残基Aを含む（例えば、LPXAGまたはLPNAG）。いくつかの態様において、ソルターゼモチーフは、5位にアミノ酸残基Gではなくアミノ酸残基Aを含む（例えば、LPXTAまたはLPNTA）。いくつかの態様において、ソルターゼモチーフは、2位にアミノ酸残基Pではなくアミノ酸残基Gを含む（例えば、LGXTGまたはLGATG）。いくつかの態様において、ソルターゼモチーフは、1位にアミノ酸残基Lではなくアミノ酸残基Iを含む（例えば、IPXTGまたはIPNTGまたはIPETG）。

【0061】

いくつかの態様において、ソルターゼモチーフがLPXTGまたはLPXTである場合、Xは、D、E、A、N、Q、K、およびRからなる群より選択される。いくつかの態様において、ソルターゼがソルターゼAである場合、LPXTGモチーフまたはLPXTモチーフのXは、K、E、N、Q、およびAからなるアミノ酸残基の群より選択される。一つの態様において、ソルターゼモチーフは、LPETまたはLPETGまたはLPETAである。

【0062】

黄色ブドウ球菌由来のソルターゼA (St.au.SrtA) が使用されるある種の態様において、

10

20

30

40

50

ソルターゼモチーフは、アミノ酸配列LPX1TX2 [(i) X1はD、E、A、N、Q、K、およびRからなるアミノ酸残基の群より選択され、(ii) X2はアラニンおよびグリシンからなるアミノ酸残基の群より選択される] を有する。ある種の態様において、*St.au.SrtA*のソルターゼモチーフはLPX1TAである。他の態様において、*St.au.SrtA*のソルターゼモチーフはLPX1TGである。X1は前述の意味を有する。

【 0 0 6 3 】

化膿性連鎖球菌ソルターゼA (*St.py.SrtA*) は、ジアラニンに基づく求核剤を受容するであろう。このソルターゼは、トレオニン残基とアラニン残基との間でソルターゼモチーフアミノ酸配列LPXTAを効率的に切断し、修飾されたアラニンに基づく求核剤をインストールするであろう。*St.py.SrtA*は、低下した効率ではあるが、LPXTGモチーフも認識し切断するであろう。

10

【 0 0 6 4 】

黄色ブドウ球菌ソルターゼA (*St.au.SrtA*) は、LPXTAモチーフを有意に切断せず、アラニンに基づく求核剤も受容しないであろう。

【 0 0 6 5 】

一つの態様において、ポリペプチドは、*Strep.SrtA*およびアラニン含有求核剤と接触させられる。ポリペプチドは、*Strep.SrtA*によって認識され得るソルターゼモチーフアミノ酸配列をC末端またはその付近に含み、求核剤は、*St.au.SrtA*によって媒介される反応のための求核剤として役立つことができる1個または複数個のアミノ酸 (例えば、(G)_n [nは1~10、例えば、1~5である]) をN末端またはその付近に含む。これによって、*St.au.SrtA*による切断を受けにくいモチーフLPXTA配列が反応部位に形成される。これは、例えば、*Strep.SrtA*によってインストールされたC末端修飾に影響を与えることなく、*St.au.SrtA*がN末端に作用することを可能にする。

20

【 0 0 6 6 】

ソルターゼアミド基転移活性を有するソルターゼ断片は、本明細書において報告される方法において使用され得る。ソルターゼ断片は、例えば、組換え技術または全長ソルターゼのタンパク質分解消化によって、ソルターゼの断片を作製し、ペプチド結合形成、即ち、ライゲーションの速度を決定することによって同定され得る。断片は、黄色ブドウ球菌ソルターゼA (GenBankアクセッション番号AAD48437) のもののような全長ソルターゼのアミノ酸配列の約80%、全長ソルターゼのアミノ酸配列の約70%、約60%、約50%、約40%、または約30%を含んでいてよい。いくつかの態様において、断片は、ソルターゼの触媒活性に必須でない全長ソルターゼアミノ酸配列のN末端部分を欠き、例えば、断片は、膜アンカー配列の末端までのN末端部分を欠く。いくつかの態様において、断片は、全長ソルターゼアミノ酸配列のC末端を含む。いくつかの態様において、断片は、ソルターゼの触媒コア領域を含む。一つの態様において、コア領域は、*SrtA*、例えば、黄色ブドウ球菌*SrtA*の約60位~約206位、または*Strep.SrtA*の約82位~約249位である。

30

【 0 0 6 7 】

他の生物由来のソルターゼを、本明細書において報告される手法において利用することもできる。そのようなソルターゼは、しばしば、*SrtA*をコードするヌクレオチド配列と実質的に同一であるかまたは類似しているヌクレオチド配列によってコードされる。類似しているかまたは実質的に同一であるヌクレオチド配列は、1個または複数個のヌクレオチドの置換、欠失、または挿入のような、ネイティブ配列への修飾を含んでいてよい。ネイティブヌクレオチド配列と少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、もしくは85%、またはそれ以上同一であるヌクレオチド配列が含まれ、しばしば、ネイティブヌクレオチド配列と90%もしくは95%またはそれ以上同一であるヌクレオチド配列が含まれる (同一率は各々1%、2%、3%、または4%の分散を含み得る)。二つの核酸が実質的に同一であるか否かを決定するための一つの試験は、二つの核酸の間で共有される同一ヌクレオチド位置の百分率を決定することである。

40

【 0 0 6 8 】

関連配列を同定するため、公のデータベースに対する検索を実施するための「クエリー配

50

列」として、SrtAヌクレオチド配列を使用することができる。そのような検索は、Altschulら（J.Mol.Biol.215(1990)403-410）のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して実施され得る。BLASTヌクレオチド検索は、相同ヌクレオチド配列を入手するため、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12によって実施され得る。比較目的のためのギャップ付きアライメントを入手するため、Altschulら（Nuc.Acids Res.25(1997)3389-3402）に記載されるように、ギャップド（gapped）BLASTを利用することができる。BLASTプログラムおよびギャップドBLASTプログラムを利用する時、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる（例えば、www.ncbi.nlm.nih.govを参照すること）。

10

【0069】

バリエーションアミノ酸配列は、ネイティブアミノ酸配列と相違している。極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、ヘリックス形成特性、および/または両親媒特性の類似性に基づき、アミノ酸置換を施すことができ、欧州特許出願EP14198535において報告されたもののような適当なアッセイによって、得られたバリエーションを酵素活性についてスクリーニングする。例えば、陰性荷電アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ；陽性荷電アミノ酸には、リジンおよびアルギニンが含まれ；類似した親水性値を有する非荷電の極性または非極性の頭部を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンが含まれる。ある種の態様において、保存的置換は、以下の表に従って作成され得る。第2列の同一ブロック、第3列の同一行のアミノ酸は、保存的置換において相互に置換され得る。ある種の保存的置換は、第2列のあるブロックに対応する第3列の一つの行のアミノ酸の、第2列の同一ブロック内の第3列のもう一つの行からのアミノ酸との置換である。

20

脂肪族アミノ酸残基	非極性	G, A, P
		I, L, V
	極性非荷電	C, S, T, M
		N, Q
	極性荷電	D, E
		K, R
芳香族		H, F, W, Y

30

【0070】

ある種の態様において、例えば、塩基性と塩基性、酸性と酸性、極性アミノ酸と極性アミノ酸、疎水性と疎水性のような、類似アミノ酸の置換または取り替えである相同的置換が存在してもよい。

【0071】

ネイティブ配列に対して、あるクラスの残基から異なるクラスの残基（例えば、非疎水性アミノ酸と疎水性アミノ酸）への、または非天然アミノ酸を用いた天然アミノ酸による置換、または非古典的アミノ酸取り替えのような、非相同的置換が導入されてもよい。

40

【0072】

本明細書において報告される方法において、ソルターゼ、ソルターゼモチーフを含むポリペプチド（即ち、アシルドナー）、および求核剤（即ち、アシルアクセプター）が、ソルターゼモチーフを含むポリペプチドのN末端部分と求核剤との間のペプチド結合の形成を達成するのに適当な条件の下で、共にインキュベートされる。本明細書において使用されるように、「インキュベートする」という用語またはその文法的な等価物は、分子の間の接触を可能にするため、プロセスの成分を相互に密接に接近させることを示す。例えば、1個の反応容器にそれらを添加することによって、インキュベーションを行うことができ

50

る。多様な様式で、例えば、容器を振とうするか、容器をボルテックス生成装置に供するか、またはピペットによって繰り返し混合することによって、系内の成分を混合することができる。成分は、任意の順序で、系に添加されてよい。

【0073】

ソルターゼ反応は、任意の便利な容器（例えば、微量遠心管のような試験管、フラスコ、ディッシュ）、マイクロタイタープレート（例えば、96穴もしくは384穴のプレート）、ガラススライド、シリコンチップ、フィルタ、または分子が固定化され任意でアレイ状に配置された（任意でコーティングされた）表面を有する固体もしくは半固体の支持体（例えば、米国特許第6,261,776号およびFodor, Nature 364(1993)555-556を参照すること）、ならびにマイクロ流体デバイス（例えば、米国特許第6,440,722号；米国特許第6,429,025号；米国特許第6,379,974号；および米国特許第6,316,781号を参照すること）において実施され得る。

10

【0074】

反応混合物は、一般に、細胞を含まず、さらに、細菌細胞壁成分または完全細菌細胞壁を含まない。いくつかの態様において、ソルターゼモチーフを含むポリペプチドおよび/または求核剤は、ヌクレオチド配列が細胞ゲノムへ組み込まれているかまたは組み込まれていない（例えば、プラスミド内に存在する）細胞において、1種または複数種の組換えヌクレオチド配列によって発現される。

【0075】

反応混合物は、ソルターゼ反応が実施され得る任意の便利な温度に維持される。いくつかの態様において、ソルターゼ反応は、約15 ~ 約50 の温度で実施される。いくつかの態様において、ソルターゼ反応は、約23 ~ 約37 の温度で実施される。ある種の態様において、温度は室温（即ち、約20 ~ 25 ）である。温度は、異なる温度で同一のソルターゼ反応を反復的に実施し、ライゲーション速度を決定することによって最適化されてよい。

20

【0076】

任意の便利な体積および成分比を使用することができる。

【0077】

ある種の態様において、ソルターゼ酵素とソルターゼモチーフを含むポリペプチドとの1:1000以上の（モル濃度）比が利用され、またはソルターゼ酵素と求核剤との1:1000以上の（モル濃度）比が利用される。具体的な態様において、ソルターゼ酵素とソルターゼモチーフを含むポリペプチドとの比または酵素と求核剤との比は、約1:1、例えば、1:2以上、1:3以上、1:4以上、1:5以上、1:6以上、1:7以上、1:8以上、および1:9以上である。

30

【0078】

いくつかの態様において、ソルターゼモチーフを含むポリペプチドは、約10 μ M ~ 約10mMの範囲の濃度で存在する。いくつかの態様において、ソルターゼモチーフを含むポリペプチドは、約100 μ M ~ 約1mMの範囲の濃度で存在する。いくつかの態様において、ソルターゼモチーフを含むポリペプチドは、約100 μ M ~ 約50mMの範囲の濃度で存在する。いくつかの態様において、ソルターゼモチーフを含むポリペプチドは、約200 μ M ~ 約10mMの範囲の濃度で存在する。いくつかの態様において、ソルターゼモチーフを含むポリペプチドは、約200 μ M ~ 約800 μ Mの範囲の濃度で存在する。いくつかの態様において、ソルターゼモチーフを含むポリペプチドは、約400 μ M ~ 約600 μ Mの範囲の濃度で存在する。

40

【0079】

ある種の態様において、求核剤は、ソルターゼモチーフを含むポリペプチドに対して過剰に存在する。ある種の態様において、求核剤は、ソルターゼモチーフポリペプチドに対して10倍過剰に存在する。ある種の態様において、求核剤は、ソルターゼモチーフポリペプチドに対して25倍過剰に存在する。ある種の態様において、求核剤は、ソルターゼモチーフポリペプチドに対して50倍過剰に存在する。ある種の態様において、求核剤は、ソルターゼモチーフポリペプチドに対して100倍過剰に存在する。ある種の態様において、求核

50

剤は、ソルターゼモチーフポリペプチドに対して250倍過剰に存在する。

【0080】

ある種の態様において、求核剤は、約1 μ M～約50mMの範囲の濃度で存在する。ある種の態様において、求核剤は、約15 μ M～約1500 μ Mの範囲の濃度で存在する。ある種の態様において、求核剤は、約25 μ M～約1000 μ Mの範囲の濃度で存在する。ある種の態様において、求核剤は、約40 μ M～約250 μ Mの範囲の濃度で存在する。

【0081】

ある種の態様において、ソルターゼは、約1 μ M～約500 μ Mの範囲の濃度で存在する。ある種の態様において、ソルターゼは、約15 μ M～約150 μ Mの範囲の濃度で存在する。ある種の態様において、ソルターゼは、約25 μ M～約100 μ Mの範囲の濃度で存在する。ある種の態様において、ソルターゼは、約40 μ M～約60 μ Mの範囲の濃度で存在する。

10

【0082】

ある種の態様において、方法は、水性環境を含む反応混合物において実施される。適切な緩衝剤および/または塩含量を含む水が、しばしば、利用され得る。アルコールまたは有機溶媒が、ある種の態様において、含まれていてもよい。有機溶媒の量は、しばしば、ライゲーション処理においてタンパク質またはペプチドを認識可能な程度にエステル化しないものである（例えば、アルコールまたは有機溶媒の添加によって、エステル化されたタンパク質またはペプチドは、しばしば、5%以下しか増加しない）。アルコールおよび/または有機溶媒の含量は、時に、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下であり、より多量のアルコールまたは有機溶媒が利用される態様において、30%以下、40%以下、50%以下、60%以下、70%以下、または80%以下のアルコールまたは有機溶媒が存在する。ある種の態様において、反応混合物は、アルコールまたは有機溶媒のみを含み、存在する場合、限定された量の水しか含まない。

20

【0083】

いくつかの態様において、反応混合物は緩衝液を含む。本明細書において報告される方法に従って使用され得る多様な緩衝液は、当業者に周知であろう。いくつかの態様において、緩衝液はカルシウムイオンを含む。ある種の態様において、緩衝液は、カルシウムイオンを沈殿させる物質を含有していない。いくつかの態様において、緩衝液はリン酸イオンを含まない。いくつかの態様において、緩衝液はキレート剤を含有していない。

【0084】

いくつかの態様において、方法は、6～8.5の範囲のpH値で実施される。いくつかの態様において、方法は、6～8の範囲のpH値で実施される。いくつかの態様において、方法は、6～7.5の範囲のpH値で実施される。いくつかの態様において、方法は、6.5～8.5の範囲のpH値で実施される。いくつかの態様において、方法は、7～8.5の範囲のpH値で実施される。いくつかの態様において、方法は、7.5～8.5の範囲のpH値で実施される。いくつかの態様において、方法は、7.0～8.5の範囲のpH値で実施される。いくつかの態様において、方法は、7.3～7.8の範囲のpH値で実施される。

30

【0085】

反応混合物の1個もしくは複数個の成分または生成物が、固体支持体に固定化されてもよい。反応混合物成分と固体支持体との間の付着は、共有結合性または非共有結合性であり得る（非共有結合性の付着については、例えば、米国特許第6,022,688号を参照すること）。固体支持体は、例えば、マイクロタイタープレートの各ウェルの1個または複数個の表面、ガラススライドまたはシリコンウエハ、BIAcoreチップの表面、もう一つの固体支持体に任意で連結されていてもよい粒子、例えば、ビーズ（例えば、Lam,Nature 354(1991)82-84を参照すること）、またはマイクロ流体デバイスのチャンネルの表面のような、系の1個または複数個の表面であり得る。固体支持体の型、固体支持体への共有結合性および非共有結合性の付着のためのリンカー分子、ならびに固体支持体へ分子を固定化する方法は、公知である（例えば、米国特許第6,261,776号；米国特許第5,900,481号；米国特許第6,133,436号；米国特許第6,022,688号；WO 2001/18234を参照すること）。任意の材料、例えば、プラスチック（例えば、ポリスチレン）、金属、ガラス、セル

40

50

コース、（例えば、PDMSのような有機ポリマーから少なくとも一部分形成された）ゲル等が使用され得る。いくつかの態様において、固体支持体は、半固体かつ/またはゲル様、変形可能、フレキシブル等である。

【0086】

任意のポリペプチドが、ソルターゼモチーフまたはオリゴグリシンもしくはオリゴアラニンの導入後、最終的には、本明細書において報告される方法においてソルターゼモチーフを含むポリペプチドまたは求核剤として使用され得る。

【0087】

以上を要約すると、ドナーとも示される第1の基質は、ソルターゼ認識モチーフを含む。それは、認識モチーフ内のトレオニン残基の後でソルターゼによって切断される。それによって、C末端の活性化されたカルボキシル基（アシル中間体）が生成される。アクセプターまたは求核剤とも示される第2の基質は、（フリーなN末端）アミノ基を提供する。ソルターゼによって触媒されるペプチド転移反応において、フリーなアミノ基と活性化されたカルボキシル基との間にペプチド結合が形成される。

10

【0088】

従って、ソルターゼによって媒介される酵素的ペプチド転移反応のためには、ソルターゼ認識モチーフを含むドナー、およびN末端のフリーなグリシン、アラニン、システイン、または等価な官能基を含むアクセプターが、ソルターゼA触媒活性を有するポリペプチドと共にインキュベートされることのみが必要とされる。ドナーおよびアクセプターの残りは、反応に干渉しない。

20

【0089】

従って、ソルターゼによって媒介されるペプチド転移反応は、ソルターゼ認識配列および求核剤の対を含む限り、事実上任意のタンパク質または低分子を、相互に独立に、ドナーまたはアクセプターとして用いて、実施され得る。

【0090】

これは当技術分野によって確認されている。

【0091】

例えば、Marraffiniら（*Microbiol.Mol.Biol.Rev.*70(2006)192-221）は、フリーなアミノ基を有するグリシン残基を含有している化学物質を、組換えタンパク質のLPXTGモチーフへ組み入れるため、ソルターゼAを使用することができ、即ち、タンパク質が制限されないことを報告した。提示された例は、トリグリシル-リジン-葉酸と（GFPまたはCreまたはp27）-LPETG-His6との高い効率でのコンジュゲーション、分岐型ペプチドAT-P-022のポリペプチドへの組み入れ、およびHis6-ソルターゼ-LPETG-標的タンパク質のキメラの自己切断（酵素がカルシウムおよびトリグリシンの添加によって活性化された後、融合物は自己を切断する）である。

30

【0092】

さらに、Antosら（*J.Am.Chem.Soc.*131(2009)10800-10801）は、ソルターゼAによって触媒されたペプチド転移反応が、事実上任意の型の機能性材料によるタンパク質の部位特異的な誘導体化を可能にすることを報告した。標的タンパク質は、C末端付近に認識部位（LPXTG）を含有し、従って、トレオニンのC末端側の残基が合成オリゴグリシンペプチドと交換されるアシル基転移反応を可能にするよう改変される。反応に影響を与えることなく、ソルターゼ認識モチーフの末端G残基をメチルエステルに取り替えることができることが報告されている。この文書においては、蛍光性の標識またはタンパク質のいずれかを含む求核剤が、コレラ毒素Bサブユニットへのコンジュゲーションのために使用された。

40

【0093】

さらに、Poppら（*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 108(2011)3169-3174）は、ポリペプチドの環化およびPEG化のためのソルターゼの使用を報告した。方法は、一般的であり、多様なタンパク質に適用可能である。インターフェロン α 2、GCSF、およびエリスロポエチンを使用して例示されたように、ソルターゼトランスペプチダーゼ反応は、複数の別個の

50

タンパク質の容易な部位特異的PEG化を可能にする。試験された全てのケースにおいて、部位特異的C末端PEG化が効率的に進行した。

【0094】

EP 2 990 423には、自己切断ソルターゼ構築物が報告されている。この構築物においては、ソルターゼ認識配列LPETGおよび触媒ソルターゼドメインが、同一分子において組み合わせられた。ソルターゼ認識配列を含むタンパク質として、例えば、ポリマータンパク質、糖タンパク質、サイトカイン、増殖因子、血液製剤、ワクチン、ホルモン、酵素、抗体およびその一部または断片（単離された軽鎖または重鎖）を含む群より選択されるタンパク質のような任意のタンパク質。

【0095】

III.本明細書において報告される新しいソルターゼ

新規リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAの特異的にN末端が短縮された可溶性バリエーションは、同一の新規リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAの他のN末端またはC末端が短縮されたバリエーションと比較して、増加した酵素活性を有することが見出された。

【0096】

全長化膿性連鎖球菌ソルターゼA（Uniprot Q1J6K9；触媒コアは下線付き；保存されたヒスチジンは下線付き）は、以下のアミノ酸配列：

MVKKQKRRKI KMSWARKLL IAVLLILGLA LLFNKPIRNT LIARNSNKYQ
 VTKVSKKQIK KNKEAKSTFD FQAVEPVSTE SVLQAQMAAQ QLPVIGGIAI
 PELGINLPIF KGLGNTIELIY GAGTMKEEQV MGGENNYSLA SHHIFGITGS
 SQMLFSPLER AQNGMSIYLT DKEKIYEYII KDVFTVAPER VDVIDDTAGL
 KEVTLVTCTD IEATERIIVK GELKTEYDFD KAPADVLKAF NHSYNQVST
 (SEQ ID NO: 33)

を有する。

【0097】

化膿性連鎖球菌に由来する成熟可溶性ソルターゼAのアミノ酸配列は、

VLQAQMAAQQ LPVIGGIAIP ELGINLPIFK GLGNTIELIYG AGTMKEEQVM
 GGENNYSLAS HHIFGITGSS QMLFSPLERA QNGMSIYLT DKEKIYEYIIK
 DVFTVAPERV DVIDDTAGLK EVTLVTCTDI EATERIIVKG ELKTEYDFDK
 APADVLKAFN HSYNQVST (SEQ ID NO: 06)

である。

【0098】

全長黄色ブドウ球菌ソルターゼA（Mazmanian et al.を参照すること；触媒コアは下線付き；保存されたヒスチジンは下線付き）は、以下のアミノ酸配列：

MKKWTNRLMT IAGVVLILVA AYLFAKPHID NYLHDKDKDE KIEQYDKNVK
 EQASKDKKQQ AKPQIPKDKS KVAGYIEIPD ADIKEPVYYPG PATPEQLNRG
 VSFAEENESL DDQNISIAGH TFIDRPNYQF TNLKAAKKG MVYFKVGN
ET RKYKMTSIRD VKPTDVGVL D EQKGKDKQLT LITCDDYNEK TGVWEKRKIF
 VATEVK (SEQ ID NO: 26)

を有する。

【0099】

当技術分野において報告された黄色ブドウ球菌ソルターゼAは、全て、膜貫通ドメインを除去するため、N末端において短縮されている。Ilango vanら（Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98(2001)6056-6061）は、黄色ブドウ球菌由来のN(2-29)末端短縮型ソルターゼAが、N(2-59)末端短縮型黄色ブドウ球菌ソルターゼAと同一の触媒活性を有し、同一の陽イオン依存性活性を示すことを報告している（Ilango vanの図1を参照すること）。

【0100】

10

20

30

40

50

N末端28アミノ酸残基（N(2-29)膜貫通ドメイン）を含まない黄色ブドウ球菌ソルターゼAは、以下のアミノ酸配列：

MDNYLHDKDK DEKIEQYDKN VKEQASKDKK QQAKPQIPKD KSKVAGYIEI
PDADIKEPVY PGPATPEQLN RGVSF AEENE SLDDQNISIA GHTFIDRPNY
QFTNLKAAKK GSMVYFKVGN ETRKYKMTSI RDVKPTDVG V LDEQKGKDKQ
LTLITCDDYN EKTGVWEK RK IFVATEVK (SEQ ID NO: 34)

を有する。

【0101】

N末端59アミノ酸残基（膜貫通ドメイン）を含まない黄色ブドウ球菌ソルターゼAは、以下のアミノ酸配列：

QAKPQIPKDK SKVAGYIEIP DADIKEPVYP GPATPEQLNR GVSFAEENES
LDDQNISIAG HTFIDRPNYQ FTNLKAAKKG SMVYFKVGNE TRKYKMTSIR
DVKPTDVGVL DEQKGKDKQL TLITCDDYNE KTG VWEKRKI FVATEVK
(SEQ ID NO: 05)

を有する。

【0102】

黄色ブドウ球菌ソルターゼAの全長型、N(2-29)末端短縮型、およびN(1-59)末端短縮型のアライメント：

全長：	MKKWTNRLMT	IAGVVLILVA	AYLFAKPHID	NYLHDKDKDE
N(2-29)：	-----	-----	-----MD	NYLHDKDKDE
N(1-59)：	-----	-----	-----	-----

全長：	KIEQYDKNVK	EQASKDKKQQ	AKPQIPKDKS	KVAGYIEIPD
N(2-29)：	KIEQYDKNVK	EQASKDKKQQ	AKPQIPKDKS	KVAGYIEIPD
N(1-59)：	-----	-----Q	AKPQIPKDKS	KVAGYIEIPD

全長：	ADIKEPVYPG	PATPEQLNRG	VSFAEENESL	DDQNISIAGH
N(2-29)：	ADIKEPVYPG	PATPEQLNRG	VSFAEENESL	DDQNISIAGH
N(1-59)：	ADIKEPVYPG	PATPEQLNRG	VSFAEENESL	DDQNISIAGH

全長：	TFIDRPNYQF	TNLKAAKKG S	MVYFKVGN ET	RKYKMTSIRD
N(2-29)：	TFIDRPNYQF	TNLKAAKKG S	MVYFKVGN ET	RKYKMTSIRD
N(1-59)：	TFIDRPNYQF	TNLKAAKKG S	MVYFKVGN ET	RKYKMTSIRD

全長：	VKPTDVGVL D	EQKGKDKQL T	LITCDDYNE K	TGVWEKRKIF
N(2-29)：	VKPTDVGVL D	EQKGKDKQL T	LITCDDYNE K	TGVWEKRKIF
N(1-59)：	VKPTDVGVL D	EQKGKDKQL T	LITCDDYNE K	TGVWEKRKIF

全長：	VATEVK
N(2-29)：	VATEVK
N(1-59)：	VATEVK

【0103】

以下のアミノ酸配列（触媒中心は下線付きである；保存されたヒスチジンは下線付きである）：

10

20

30

40

50

MLKKTIAAAA LAAGLLLIFS PFIKNGIVKY MSGHETIEQY KASDIKKNNE
 KDATFDFESV QLPSMTSVIK GAANYDKDAV VGSIAVPSVD VNLLVFKGTN
 TANLLAGATT MRSDQVMGKG NYPLAGHHMR DESMLFGPIM KVKKGDKIYL
 TDLENLYEYT VTETKTIDET EVSVIDDTKD ARITLITCDK PTETTKRFVA
 VGELEKTEKL TKELENKYFP SK (SEQ ID NO: 35)

を有するリステリア・モノサイトゲネス由来の新規ソルターゼAが、本明細書において報告される。

【0104】

黄色ブドウ球菌ソルターゼA (sa-srtA) および本明細書において報告される新規リステリア・モノサイトゲネスソルターゼA (lm-srtA) のアライメントが、以下に示される (触媒中心は下線付きである; 保存されたヒスチジンは下線付きである)。

sa-srtA: MKKWTNRLMT IAGVVLILVA AYLFAKPHID NYLHDKDKDE
 lm-srtA: MLKKTIAAAA LAAGLLLIFS PFIKNGIVKY MSGHETIEQY

sa-srtA: KIEQYDKNVK EQASKDKKQQ AKPQIP---- ----KDKSKV
 lm-srtA: KASDIKKNNE KDATFDFESV QLPSMTSVIK GAANYDKDAV

sa-srtA: AGYIEIPDAD IKEPVYPGPA TPEQLNRGVS FAENESLDD
 lm-srtA: VGSIAVPSVD VNLLVFKG-T NTANLLAGAT TMRSDQVMGK

sa-srtA: QNISIAGHTF IDRPNYQFTN LKAAKKGSMV YFKVGNETRK
 lm-srtA: GNYPLAGHHM RD-ESMLFGP IMKVKKGDKI YLTDLENLYE

sa-srtA: YKMTSIRDVK PTDVGVLDEQ KGKDKQLTLI TCDDYNEKTG
 lm-srtA: YTVTETKTID ETEVSVIDD- -TKDARITLI TCDKPTETTK

sa-srtA: VWEKRKIFVA TEVK
 lm-srtA: RFVAVGELEK TEKLTKELEN KYFPSK

【0105】

hywt: Garandeaら (Infect.Immun.70(2002)1382-1390; 触媒コアおよび保存されたヒスチジンは下線付きである) によって発表されたリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAの仮説上の配列:

MLKKTIAAAA LAAGLLLIFS PFIKNGIVKY MSGHETIEQY KASDIKKNNE
 KDATFDFESV QLPSMTSVIK GAANYDKDAV VGSIAVPSVD VNLLVFKGTN
 TANLLAGATT MRSDQVMGKG NYPLAGHHMR DESMLFGPIM KVKKGDKIYL
 TDLENLYEYT VTETKTIDET EVSVIDNTKD ARITLITCDK PTETTKRFVA
 VGELEKTEKL TKELENKYFP SK (SEQ ID NO: 27)

A: 本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエントA:

EKDATFDFES VQLPSMTSVI KGAANYDKDA VVGSIAVPSV DVNLLVFKGT
 NTANLLAGAT TMRSDQVMGK GNYPLAGHHM RDESMLFGPI MKVKKGDKIY
 LTDLENLYEY TVTETKTIDE TEVSVIDDTK DARITLITCD KPTETTKRFV
 AVGELEKTEK LTKELENKYF PSK (SEQ ID NO: 36)

B: 本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエントB:

10

20

30

40

50

SVIKGAANYD KDAVVGSI AV PSVDVNLLVF KGTNTANLLA GATTMRSDQV
 MGKGNYP LAG HHRDESMLF GPIMKVKKGD KIYLTDLLENL YEYTVTETKT
 IDETEVSVID DTKDARITLI TCDKPTETTK RFVAVGELEK TEKLTKELEN
 KYFPSK (SEQ ID NO: 37)

C : 本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションC
 :

ANYDKDAVVG SIAVPSVDVN LLVFKGTNTA NLLAGATTMR SDQVMGKGN Y
 PLAGHHMRDE SMLFGPIMKV KKGDKIYLT D LENLYEYTVT ETKTIDETE V
 SVIDDTKDAR I T LITCDKPT E TTKRFVAVG ELEKTEK LTK ELENKYFPSK
 (SEQ ID NO: 38)

10

D : 本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションD
 :

ANYDKDAVVG SIAVPSVDVN LLVFKGTNTA NLLAGATTMR SDQVMGKGN Y
 PLAGHHMRDE SMLFGPIMKV KKGDKIYLT D LENLYEYTVT ETKTIDETE V
 SVIDDTKDAR I T LITCDKPT E TTKRFVAVG ELEKTEK (SEQ ID NO:
 39)

E : 本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションE :

20

G SIAVPSVDV NLLVFKGTNT ANLLAGATTM RSDQVMGKGN YPLAGHHMRD
 ESMLFGPIMK VKKGDKIYLT DLENLYEYTV TETKTIDETE VSVIDDTKDA
 RITLITCDKP TETTKRFVAV GELEKTEKLT KELENKYFPS K
 (SEQ ID NO: 40)

【 0 1 0 6 】

本明細書において報告される仮説上のリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAおよび
 バリエーションA~Eのアライメントは、以下に示される(アミノ酸の違いは太字で下線付きで
 ある; 触媒中心は下線付きである)。

30

40

50

```

hywt : MLKKTIAAAA LAAGLLLIIFS PFIKNGIVKY MSGHETIEQY
A: -----
B: -----
C: -----
D: -----
E: -----

```

```

hywt : KASDIKKNNE KDATFDFESV QLPSMTSVIK GAANYDKDAV
A: -----E KDATFDFESV QLPSMTSVIK GAANYDKDAV
B: -----SVIK GAANYDKDAV
C: ----- --ANYDKDAV
D: ----- --ANYDKDAV
E: -----

```

10

```

hywt : VGSIAVPSVD VNLLVFKGTN TANLLAGATT MRSDQVMGKG
A: VGSIAVPSVD VNLLVFKGTN TANLLAGATT MRSDQVMGKG
B: VGSIAVPSVD VNLLVFKGTN TANLLAGATT MRSDQVMGKG
C: VGSIAVPSVD VNLLVFKGTN TANLLAGATT MRSDQVMGKG
D: VGSIAVPSVD VNLLVFKGTN TANLLAGATT MRSDQVMGKG
E: -GSI VPSVD VNLLVFKGTN TANLLAGATT MRSDQVMGKG

```

20

```

hywt : NYPLAGHHMR DESMLFGPIM KVKKGDKIYL TDLENLYEYT
A: NYPLAGHHMR DESMLFGPIM KVKKGDKIYL TDLENLYEYT
B: NYPLAGHHMR DESMLFGPIM KVKKGDKIYL TDLENLYEYT
C: NYPLAGHHMR DESMLFGPIM KVKKGDKIYL TDLENLYEYT
D: NYPLAGHHMR DESMLFGPIM KVKKGDKIYL TDLENLYEYT
E: NYPLAGHHMR DESMLFGPIM KVKKGDKIYL TDLENLYEYT

```

```

hywt : VTETKTIDET EVSVIDNTKD ARITLITCDK PTETTKRFVA
A: VTETKTIDET EVSVIDDTKD ARITLITCDK PTETTKRFVA
B: VTETKTIDET EVSVIDDTKD ARITLITCDK PTETTKRFVA
C: VTETKTIDET EVSVIDDTKD ARITLITCDK PTETTKRFVA
D: VTETKTIDET EVSVIDDTKD ARITLITCDK PTETTKRFVA
E: VTETKTIDET EVSVIDDTKD ARITLITCDK PTETTKRFVA

```

30

```

hywt : VGELEKTEKL TKELENKYFP SK
A: VGELEKTEKL TKELENKYFP SK
B: VGELEKTEKL TKELENKYFP SK
C: VGELEKTEKL TKELENKYFP SK
D: VGELEKTEK- -----
E: VGELEKTEKL TKELENKYFP SK

```

40

【 0 1 0 7 】

本明細書に示された新規リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAの異なる短縮バージョンは、異なる酵素活性を有する。

リステリア・モノサイトゲネスソルターゼバリエーション	最大dE/分
A	0.037
B	0.026
C	0.113
D	0.044
E	0.019

50

【0108】

本明細書において報告された新規リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAの短縮バージョンは、インピトロバイオコンジュゲーションのために特に適している。それは、LPXTAソルターゼモチーフを認識し、St.py.SrtAと比較して改善された反応動力学的特性を示す。

【0109】

新規リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAの本明細書において報告された短縮バージョンは、それ自体（即ち、単離された形態で）、または融合ポリペプチドの一部として使用され得る。

【0110】

図1および2に、本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションCおよびSt.py.SrtAの活性が示される。

【0111】

LPKTAソルターゼモチーフに対する2種のソルターゼの親和性を決定するため、異なる濃度での反応を分析した。酵素中間体の形成がソルターゼによって媒介されるライゲーションの律速段階であることが理解され得る。従って、飽和ではない求核剤によって反応を実施することが可能であった（例えば、Chen, I., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(2011)11399-113404を参照すること）。図3および4は、異なるLPKTA濃度による、本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションCおよびSt.py.SrtAの活性を示す。グラフは、リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションCのより高い活性および300 μMより高い濃度でのSt.py.SrtAの基質阻害効果を示す。

【0112】

IV. 本明細書において報告される新しいソルターゼの使用

本明細書において報告される一つの局面は、

(i) アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) を（任意で、C末端の100アミノ酸残基内に）含む第1のポリペプチド、

(ii) (i) グリニル化合物、アラニル化合物、またはシステニル化合物をN末端に含むか、あるいは (ii) オリゴグリシンまたはオリゴアラニンまたはシステインアミノ酸残基に続く1~3個のグリシンもしくはアラニンアミノ酸残基をN末端に含むか、あるいは (iii) リジンアミノ酸残基をN末端の5アミノ酸残基内に含む第2のポリペプチド、および (iii) 本明細書において報告されるポリペプチド

をインキュベートし、それによって、ポリペプチドを作製する工程を含む、ポリペプチドの酵素的作製のための方法である。

【0113】

一つの態様において、方法は、2個のポリペプチドの酵素的コンジュゲーションのためのものである。

【0114】

一つの態様において、第2のポリペプチドは、アミノ酸配列GGG、AAA、CGG、CAA、KGG、またはKAAをN末端に有する。

【0115】

一つの態様において、本明細書において報告されるポリペプチドは、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列を含むか、あるいは、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列を有する1個のドメインおよび1個または複数個のさらなるドメインを含む（融合）ポリペプチドであり、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列を有する該ドメインおよびいずれかの該さらなるドメインは、異なる生物由来のポリペプチドに由来し、両ドメインは直接的にまたはペプチドリンカーを介して相互にコンジュゲートされている。

【0116】

一つの態様において、第1のポリペプチドは、アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る) またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸

10

20

30

40

50

残基であり得る)をC末端の250アミノ酸残基内に含む。一つの態様において、第1のポリペプチドは、アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)をC末端の100アミノ酸残基内に含む。一つの態様において、第1のポリペプチドは、アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)をC末端の25アミノ酸残基内に含む。一つの態様において、第1のポリペプチドは、アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)をC末端の10アミノ酸残基内に含む。

【0117】

一つの態様において、第1のポリペプチドは、アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)をC末端に含む。一つの態様において、第1のポリペプチドは、アミノ酸配列LPETG (SEQ ID NO:04)またはLPETA (SEQ ID NO:42)またはLPKTG (SEQ ID NO:43)またはLPKTA (SEQ ID NO:44)をC末端に含む。

【0118】

一つの態様において、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは相互に独立に、抗体可変ドメイン、抗体重鎖Fab断片、抗体Fc領域、タグ、ならびに、ペプチド、リンカー、および非ソルターゼモチーフ部分より選択され、第1のポリペプチドは、アミノ酸配列LPXTG (SEQ ID NO:01、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)またはLPXTA (SEQ ID NO:41、Xは任意のアミノ酸残基であり得る)を含む。

【0119】

第1または第2のポリペプチド

ソルターゼモチーフ(アミノ酸配列)は、これらの分子、治療剤(薬)、細胞傷害性薬剤(例えば、ドキシソルピシンもしくは百日咳毒素のような毒素)、フルオレセインもしくはローダミンのような蛍光色素のようなフルオロフォア、イメージングもしくは放射線治療のための金属のキレート剤、ペプチド性もしくは非ペプチド性の標識、タグ、またはポリエチレングリコールの様々な異性体のようなクリアランス修飾剤、第3の成分に結合するペプチド、もう一つの炭水化物もしくは親油性薬剤、または、例えば、合成低分子(例えば、アセチルサリチル酸)のような低分子のうちの一つに直接含まれていない場合、コン

【0120】

(a) 治療剤

治療剤は、例えば、抗体、細胞傷害性もしくは細胞分裂阻害性の化合物のような、治療効果を有する任意の化合物、部分、または基であり得る。抗体は、全長のもしくは完全な抗体であってもよいしまたはそれらの抗原結合断片であってもよい。

【0121】

リツキサン(Rituxan)/マブセラ(MabThera)/リツキシマブ、2H7/オクレリズマブ、ゼヴァリン(Zevalin)/イブリツモマブ、アーゼラ(Arzerra)/オフアツムマブ(CD20)、HLL2/エブラツズマブ、イノツズマブ(CD22)、ゼナパックス(Zenapax)/ダクリズマブ、シムレクト(Simulect)/バシリキシマブ(CD25)、ハーセプチン(Herceptin)/トラスツズマブ、ペルツズマブ(Her2/ERBB2)、マイロターグ(Mylotarg)/ゲムツズマブ(CD33)、ラプティバ(Raptiva)/エファリズマブ(Cd11a)、アービタックス(Erbix)/セツキシマブ(EGFR、上皮増殖因子受容体)、IMC-1121B(VEGF受容体2)、タイサブリ(Tysabri)/ナタリズマブ(4-1インテグリンおよび4-7インテグリンの4サブユニット)、レオプロ(ReoPro)/アブシキシマブ(gpIIb-gpI

10

20

30

40

50

laおよび v 3インテグリン)、オルソクロン(Orthoclone) OKT3/ムロモナブ-CD 3 (CD3)、ベンリスタ(Benlysta)/ベリムマブ(BAFF)、Tolerx/オテリキズマブ(CD3)、ソリリス(Soliris)/エクリズマブ(C5補体タンパク質)、アクテムラ(Actemra)/トシリズマブ(IL-6R)、パノレックス(Panorex)/エドレコロマブ(EpCAM、上皮細胞接着分子)、CEA-CAM5/ラベツズマブ(CD66/CEA、癌胎児抗原)、CT-11(PD-1、プログラム死1、T細胞阻害性受容体、CD-d279)、H224G11(c-Met受容体)、SAR3419(CD19)、IMC-A12/シズツムマブ(IGF-1R、インスリン様増殖因子1受容体)、MEDI-575(PDGF-R、血小板由来増殖因子受容体)、CP-675、206/トレメリムマブ(細胞傷害性Tリンパ球抗原4)、RO5323441(胎盤増殖因子またはPGF)、HGS1012/マパツズマブ(TRAIL-R1)、SGN-70(CD70)、ベドチン(Vedotin)(SGN-35)/ブレンツキシマブ(CD30)、ならびにARH460-16-2(CD44)のような、細胞表面分子およびそれらのリガンドに対する多数の治療用抗体が公知である。

10

【0122】

本明細書において報告される方法によって入手されたコンジュゲートは、例えば、腫瘍性疾患、心血管疾患、感染性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、代謝性(例えば、内分泌腺)疾患、または神経学的(例えば、神経変性)疾患の治療のための医薬の調製において使用され得る。これらの疾患の例示的な非限定的な例は、アルツハイマー病、非ホジキンリンパ腫、急性および慢性のB細胞リンパ性白血病、パーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、ヘアリーセル白血病、急性および慢性の骨髄性白血病、T細胞リンパ腫およびT細胞白血病、多発性骨髄腫、神経膠腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、(口腔、胃腸管、結腸、胃、気道、肺、乳房、卵巣、前立腺、子宮、子宮内膜、子宮頸部、膀胱、膵臓、骨、肝臓、胆嚢、腎臓、皮膚、および精巣の細胞腫のような)細胞腫、黒色腫、肉腫、神経膠腫、および皮膚癌、急性特発性血小板減少性紫斑病、慢性特発性血小板減少性紫斑病、皮膚筋炎、シドナム舞踏病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、糖尿病、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、連鎖球菌感染後腎炎、結節性紅斑、高安動脈炎、アジソン病、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発性動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、閉塞性血栓血管炎、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、甲状腺中毒症、硬皮症、慢性活動性肝炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発性軟骨炎、尋常性天疱瘡、ウェゲナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄癆、巨細胞性動脈炎/多発性筋痛、悪性貧血、急速進行性糸球体腎炎、乾癬、または線維性肺胞炎である。

20

30

【0123】

多数の細胞表面マーカーおよびそれらのリガンドが公知である。例えば、癌細胞は、炭酸脱水酵素IX、フェトプロテイン、アクチニン4、A3(A33抗体に特異的な抗原)、ART-4、B7、Ba-733、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CDS、CD8、CD1-1A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1、結腸特異的抗原p(CSAp)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、葉酸受容体、G250抗原、GAGE、GROB、HLA-DR、HM1.24、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)およびそのサブユニット、HER2/neu、HMGB-1、低酸素誘導因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2または1a、IGF-1R、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、インスリン様増殖因子1(IGF-1)、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2

40

50

、MUC3、MUC4、MUC5、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、臍臓癌ムチン、胎盤増殖因子、p53、PLAGL2、前立腺酸性ホスファターゼ、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、サバイピン、サバイピン2B、TAC、TAG-72、テネイシン、TRAIL受容体、TNF、Tn抗原、トムソン・フリーデンライヒ(Thomson-Friedenreich)抗原、腫瘍壊死抗原、VEGFR、ED-Bフィブロネクチン、WT-1、17-1A抗原、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管形成マーカー、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、癌遺伝子マーカー、および癌遺伝子産物(例えば、Sensi, et al., Clin. Cancer Res. 12(2006)5023-5032; Parmiani, et al., J. Immunol. 178(2007)1975-1979; Novellino, et al., Cancer Immunol. Immunother. 54(2005)187-207を参照すること)を含むが、これらに限定されるわけではない細胞表面マーカーおよびまたはリガンドのうちの少なくとも一つを発現することが報告されている。

10

【0124】

従って、リガンドを含む特異的な細胞表面受容体を認識する抗体は、疾患に関連している多数/複数の細胞表面マーカーへの特異的かつ選択的なターゲティングおよび結合のために使用され得る。細胞表面マーカーは、例えば、シグナリングイベントまたはリガンド結合に関連している、細胞(例えば、疾患関連細胞)の表面に位置するポリペプチドである。

【0125】

一つの態様において、癌/腫瘍の治療のため、Herberman, "Immunodiagnosis of Cancer", in Fleisher(ed.), "The Clinical Biochemistry of Cancer", page 347(American Association of Clinical Chemists(1979))、ならびにUS 4,150,149; US 4,361,544; およびUS 4,444,744において報告されたもののような、腫瘍関連抗原を標的とする多重特異性結合分子/二重特異性抗体が作製される。

20

【0126】

腫瘍関連抗原(TAA)に関する報告には、同定されたTAAに関して、参照によって各々本明細書に組み入れられる、Mizukamiら(Nature Med. 11(2005)992-997); Hatfieldら(Curr. Cancer Drug Targets 5(2005)229-248); Vallbohmerら(J Clin. Oncol. 23(2005)3536-3544); およびRenら(Ann. Surg. 242(2005)55-63)が含まれる。

【0127】

疾患がリンパ腫、白血病、または自己免疫障害を含む場合、標的とされる抗原は、CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD54、CD67、CD74、CD79a、CD80、CD126、CD138、CD154、CXCR4、B7、MUC1または1a、HM1.24、HLA-DR、テネイシン、VEGF、P1GF、ED-Bフィブロネクチン、癌遺伝子、癌遺伝子産物(例えば、c-metまたはPLAGL2)、CD66a-d、壊死抗原、IL-2、T101、TAG、IL-6、MIF、TRAIL-R1(DR4)、およびTRAIL-R2(DR5)からなる群より選択され得る。

30

【0128】

BCMA/CD3、HERファミリーの異なる抗原(EGFR、HER2、HER3)の組み合わせ、CD19/CD3、IL17RA/IL7R、IL-6/IL-23、IL-1/IL-8、IL-6またはIL-6R/IL-21またはIL-21R、ルイスx構造、ルイスb構造、およびルイスy構造、グロボ(Globo)H構造、KH1、Tn抗原、TF抗原、およびムチンの炭水化物構造、CD44、Gg3、Gb3、GD3、GD2、Gb5、Gm1、Gm2、シアリルテトラオシルセラミドのような糖脂質および糖スフィンゴ脂質からなる群より選択される抗原の糖鎖エピトープに対する第1の特異性、ならびにEGFR、HER2、HER3、およびHER4からなる群より選択されるErbB受容体チロシンキナーゼに対する第2の特異性、Tリンパ球、NK細胞、Bリンパ球、樹状細胞、単球、マクロファージ、好中球、間葉系幹細胞、神経幹細胞からなる群より選択される免疫学的細胞に関連している第2の抗原結合部位と組み合わせられたGD2、ANG2/VEGF、VEGF/PDGFR、血管内皮増殖因子(VEGF)アクセプター2/CD3、PSMA/CD3、EPCAM/CD3、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、FLT3、c-FMS/CSF1R、RET、c-Met、EGFR、Her2/neu、H

40

50

ER3、HER4、IGFR、PDGFR、c-KIT、BCR、インテグリン、およびMMPからなる群より選択される抗原と、VEGF、EGF、PIGF、PDGF、HGF、およびアンジオポエチンからなる群より選択される水溶性リガンドとの組み合わせ、ERBB-3/C-MET、ERBB-2/C-MET、EGF受容体1/CD3、EGFR/HER3、PSCA/CD3、C-MET/CD3、エンドシアリン/CD3、EPCAM/CD3、IGF-1R/CD3、FAPALPHA/CD3、EGFR/IGF-1R、IL 17A/F、EGF受容体1/CD3、ならびにCD19/CD16のような、2種の異なる標的に対する多数の二重特異性抗体が、公知である。

【0129】

毒性薬物部分には、(i) 微小管阻害剤、有糸分裂阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、またはDNA挿入剤として機能し得る化学療法剤；(ii) 酵素的に機能し得るタンパク質毒素；および(iii) 放射性同位体が含まれる。

10

【0130】

例示的な毒性薬物部分には、マイタンシノイド、アウリスタチン(auristatin)、ドラスタチン、トリコテシン、CC1065、カリチアマイシンおよびその他のエンジン抗生物質、タキサン、アントラサイクリン、ならびにそれらの立体異性体、アイソスター、類似体、または誘導体が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0131】

タンパク質毒素には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来の)外毒素A鎖、リシンA鎖(Vitetta et al(1987)Science,238:1098)、アブリンA鎖、モデシンA鎖、サルシン、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(*Phytolaca americana*)タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-5)、ニガウリ(*Momordica charantia*)阻害剤、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サボンソウ(*Sapona officinalis*)阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)、ならびにトリコテシン(WO 93/21232)が含まれる。

20

【0132】

治療用放射性同位体には、³²P、³³P、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹³¹In、¹⁵³Sm、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、²¹²B、²¹²Pb、およびLuの放射性同位体が含まれる。

【0133】

放射性同位体またはその他の標識は、公知の方式で組み入れられ得る(Fraker et al(1978)Biochem.Biophys.Res.Comm.80:49-57;"Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy"Chatal,CRC Press 1989)。炭素14によって標識された1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、複合体への放射性核種のコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である(WO 94/11026)。

30

【0134】

(b) 標識

非ソルターゼモチーフ部分は、標識であり得る。ソルターゼアミノ酸配列に共有結合で付着し得る任意の標識部分が使用され得る(例えば、Singh et al(2002)Anal.Biochem.304:147-15; Harlow E.and Lane,D.(1999)Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Springs Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.; Lundblad R.L.(1991)Chemical Reagents for Protein Modification,2nd ed.CRC Press,Boca Raton,Fla.を参照すること)。標識は、(i) 検出可能なシグナルを提供するか；(ii) 第1もしくは第2の標識によって提供される検出可能なシグナルを修飾するため、例えば、FRET(蛍光共鳴エネルギー転移)を与えるため、第2の標識と相互作用するか；(iii) 電荷、疎水性、形、もしくはその他の物理的パラメータによって、移動度、例えば、電気泳動移動度もしくは細胞透過性に影響を与えるか、または(iv) 例えば、イオン複合体化をモジュレートするため、キャプチャー部分を提供するよう、機能し得る。

40

【0135】

本明細書において報告されるハプテン化された標識を含むコンジュゲートは、例えば、特

50

異的な細胞、組織、または血清における関心対象の抗原の発現を検出するための診断アッセイにおいて有用であり得る。診断的な適用のため、第1の結合特異性が標的に結合し、第2の結合特異性がハプテン化された標識に結合する二重特異性抗体が使用されるであろう。ハプテンは、典型的には、検出可能部分によって標識されるであろう。一般に以下のカテゴリへ分類され得る多数の標識が入手可能である：

【 0 1 3 6 】

(a) 3H、11C、14C、18F、32P、35S、64Cu、68Gn、86Y、89Zr、99TC、111In、123I、124I、125I、131I、133Xe、177Lu、211At、または131Biのような放射性同位体（放射性核種）。放射性同位体によって標識されたコンジュゲートは、受容体標的イメージング実験において有用である。抗原（ハプテン）は、Current Protocols in Immunology, (1991) Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubsに記載された技術を使用して、放射性同位体金属に結合するか、キレート化するか、またはその他の方法で錯体化するリガンド試薬によって標識され得る。金属イオンを錯体化し得るキレティングリガンドには、DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA、およびTETA（Macrocyclics, Dallas, Tex.）が含まれる。放射性核種は、本明細書において報告される複合体との錯体化を介してターゲティングされ得る（Wu et al, Nature Biotechnology 23(9)(2005)1137-1146）。放射性核種によって標識された複合体による受容体標的イメージングは、腫瘍組織における複合体または対応する治療用抗体の進行的な蓄積の検出および定量化によって経路活性化のマーカーを提供することができる（Albert et al(1998)Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210）。

10

20

【 0 1 3 7 】

イメージング実験のための標識として適当な金属キレート錯体
 (US 2010/0111856; US 5,342,606; US 5,428,155; US 5,316,757; US 5,480,990;
 US 5,462,725; US 5,428,139; US 5,385,893; US 5,739,294; US 5,750,660;
 US 5,834,456; Hnatowich et al, J. Immunol. Methods 65 (1983) 147-157; Meares
 et al, Anal. Biochem. 142 (1984) 68-78; Mirzadeh et al, Bioconjugate Chem. 1
 (1990) 59-65; Meares et al, J. Cancer (1990), Suppl. 10:21-26; Izard et al,
 Bioconjugate Chem. 3 (1992) 346-350; Nikula et al, Nucl. Med. Biol. 22 (1995)
 387-90; Camera et al, Nucl. Med. Biol. 20 (1993) 955-62; Kukis et al, J. Nucl. Med.
 39 (1998) 2105-2110; Verel et al., J. Nucl. Med. 44 (2003) 1663-1670; Camera et
 al, J. Nucl. Med. 21 (1994) 640-646; Ruegg et al, Cancer Res. 50 (1990) 4221-
 4226; Verel et al, J. Nucl. Med. 44 (2003) 1663-1670; Lee et al, Cancer Res. 61
 (2001) 4474-4482; Mitchell, et al, J. Nucl. Med. 44 (2003) 1105-1112; Kobayashi
 et al Bioconjugate Chem. 10 (1999) 103-111; Miederer et al, J. Nucl. Med. 45
 (2004) 129-137; DeNardo et al, Clinical Cancer Research 4 (1998) 2483-90; Blend
 et al, Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18 (2003) 355-363; Nikula et al J.
 Nucl. Med. 40 (1999) 166-76; Kobayashi et al, J. Nucl. Med. 39 (1998) 829-36;
 Mardirossian et al, Nucl. Med. Biol. 20 (1993) 65-74; Roselli et al, Cancer
 Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14 (1999) 209-20)

30

40

【 0 1 3 8 】

(b) 希土類キレート（ユーロピウムキレート）、FITC、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセインを含むフルオレセイン型；TAMRAを含むローダミン型；ダンシル；リサミン；シアニン；フィコエリトリン；テキサスレッド；およびそれらの類似

50

体のような蛍光標識。蛍光標識は、例えば、Current Protocols in Immunology (前記)において開示された技術を使用して、抗原(ハプテン)にコンジュゲートされ得る。蛍光色素および蛍光標識試薬には、Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) およびPierce Biotechnology, Inc. (Rockford, Ill.) から市販されているものが含まれる。

【0139】

蛍光色素および化学発光色素のような検出標識 (Briggs et al "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J.Chem.Soc.,Perkin-Trans.1(1997)1051-1058) は、検出可能なシグナルを提供し、特に、以下の特性によって、標識のために一般に適用可能である：(i) 少量のコンジュゲートが無細胞アッセイおよび細胞アッセイの両方において高感度に検出され得るよう、標識されたコンジュゲートは低いバックグラウンドで極めて高いシグナルを生ずるべきであり；かつ(ii) 蛍光シグナルが有意な光退色なしに観察され、モニタリングされ、記録され得るよう、標識されたコンジュゲートは光に対して安定であるべきである。標識されたコンジュゲートの膜または細胞表面、特に、生細胞への細胞表面結合を含む適用のため、標識は、(iii) 有効なコンジュゲート濃度および検出感度を達成するために良好な水溶解度を有しており、かつ(iv) 細胞の正常な代謝プロセスを妨害せず早熟の細胞死を引き起こさないよう、生細胞に対して非毒性であるべきである。

【0140】

(c) 様々な酵素基質標識が、入手可能であるかまたは開示されている(例えば、US 4,275,149を参照すること)。酵素は、一般に、様々な技術を使用して測定され得る発色性基質の化学的改変を触媒する。例えば、酵素は、分光測光法によって測定され得る基質の色変化を触媒してもよい。あるいは、酵素は、基質の蛍光または化学発光を改変してもよい。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、次いで、(例えば、ケミルミネーターを使用して)測定され得る光を放射するか、または蛍光アクセプターにエネルギーを供与することができる。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ；US 4,737,456)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)のようなペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ(AP)、(3-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素)、(ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼのような)複素環オキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ(microperoxidase)等が含まれる。酵素をポリペプチドへコンジュゲートするための技術は、O'Sullivan et al "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", in Methods in Enzym.(ed.by J.Langone & IT Van Vunakis),Academic Press,New York,73(1981)147-166に記載されている。

【0141】

酵素と基質の組み合わせ(US 4,275,149；US 4,318,980)の例には、例えば、以下のものが含まれる：

- (i) 過酸化水素が色素前駆物質(例えば、オルトフェニレンジアミン(OPD)または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩(TMB))を酸化する、過酸化水素を基質として用いる西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)；
- (ii) 発色性基質としてパラニトロフェニルリン酸を用いるアルカリホスファターゼ(AP)；および
- (iii) 発色性基質(例えば、p-ニトロフェニル-(3-D-ガラクトシダーゼ)または蛍光発生性基質4-メチルウンベリフェリル-(3-D-ガラクトシダーゼを用いる(3-D-ガラクトシダーゼ(3-D-Gal))。

【0142】

本明細書において報告される標識されたコンジュゲートは、ELISA、競合結合アッセイ、

直接および間接のサンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイのような任意の公知のアッセイ法において利用され得る (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (1987) pp. 147-158, CRC Press, Inc.)。

【0143】

本明細書において報告される標識されたコンジュゲートは、以下のもののような、生物医学的イメージングおよび分子イメージングの様々な方法および技術によるイメージングバイオマーカーおよびイメージングプローブとして有用である: (i) MRI (磁気共鳴画像法); (ii) マイクロCT (コンピュータ断層撮影法); (iii) SPECT (単一光子放射型コンピュータ断層撮影法); (iv) PET (ポジトロン放出断層撮影法) (Tinianow, J. et al, Nuclear Medicine and Biology, 37(3)(2010)289-297; Chen et al, Bioconjugate Chem. 15(2004)41-49; US 2010/0111856)、(v) 生物発光; (vi) 蛍光; ならびに (vii) 超音波。イムノシンチグラフィは、放射性物質によって標識されたコンジュゲートを動物またはヒトの患者へ投与し、コンジュゲートが局在する体内の部位の写真を撮影するイメージング手法である (US 6,528,624)。イメージングバイオマーカーは、正常な生物学的プロセス、病原性プロセス、または治療的介入に対する薬理的応答の指標として客観的に測定され評価され得る。バイオマーカーは、いくつかの型のものであり得る: 0型マーカーは、疾患の自然経過マーカーであり、公知の臨床的指標、例えば、慢性関節リウマチにおける滑膜炎のMRI査定と長期的に相関する; I型マーカーは、機序が臨床的転帰に関連していないとしても、作用機序によって介入の効果を捕獲する; II型マーカーは、バイオマーカーの変化またはバイオマーカーからのシグナルが、CTによって測定された慢性関節リウマチにおける骨びらんのような標的とされた応答を「バリデートする」ため、臨床的利益を予測する、代理終点として機能する。従って、イメージングバイオマーカーは、以下のものに関する薬力学的 (PD) な治療情報を提供し得る: (i) 標的タンパク質の発現、(ii) 治療薬の標的タンパク質への結合、即ち、選択性、ならびに (iii) クリアランスおよび半減期の薬物動態学的データ。実験室に基づくバイオマーカーと比べたインビボイメージングバイオマーカーの利点には、以下のものが含まれる: 非侵襲的な処置、定量可能な全身査定、反復的な投薬および査定、即ち、複数の時点、ならびに前臨床の結果 (小動物) から臨床の結果 (ヒト) への可能性のある転移可能な効果。いくつかの適用のため、バイオイメージングは、前臨床研究における動物実験に取って代わるかまたはその数を最小化する。

【0144】

ペプチド標識法は、周知である。

10

20

30

40

50

Haugland (2003) *Molecular Probes*

Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.;

Brinkley (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive*

Labeling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990)

Bioconjugate Chem. 1:2; Glazer et al *Chemical Modification of Proteins.*

Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E.

Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and

Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II,

CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins",

Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter,

Berlin and New York; and Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and*

Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.); DeLeon-Rodriguez et al, *Chem. Eur.*

J. 10 (2004) 1149-1155; Lewis et al, *Bioconjugate Chem.* 12 (2001) 320-324; Li et

al, *Bioconjugate Chem.* 13 (2002) 110-115; Mier et al *Bioconjugate Chem.* 16

(2005) 240-237

10

20

を参照すること。

【 0 1 4 5 】

(c) リンカー

「リンカー」という用語は、第1の部分と第2の部分とコンジュゲート（連結）するために使用され得る二官能性または多官能性の部分を意味する。2種の反応官能性を有するリンカーを使用して、連結されたコンジュゲートを便利に調製することができる。

【 0 1 4 6 】

一つの態様において、リンカーは、ソルターゼアミノ酸配列内に存在する求核基に対して反応性の求電子基を有する反応部位を有する。有用な求電子基には、もう一つのチオール基、マレイミド基、およびハロアセトアミド基が含まれるが、これらに限定されるわけではない（例えば、Klussman et al, *Bioconjugate Chemistry* 15(4)(2004)765-773の766頁のコンジュゲーション法を参照すること）。

30

【 0 1 4 7 】

チオール反応官能基の例には、チオール、マレイミド、およびハロアセチルが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【 0 1 4 8 】

リンカーには、ソルターゼアミノ酸配列を非ソルターゼモチーフ部分に連結するアミノ酸残基が含まれ得る。アミノ酸残基は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチド、またはドデカペプチドの単位を形成してよい。アミノ酸残基には、天然に存在するものが含まれ、例えば、シトルリンのような天然に存在しないアミノ酸類似体、または、例えば、アラニンのようなアミノ酸、または4-アミノ酪酸のようなアミノ酸も含まれる。

40

【 0 1 4 9 】

もう一つの態様において、リンカーは、ソルターゼアミノ酸配列内に存在する求電子基に対して反応性の求核基を有する反応官能基を有する。有用な求電子基には、アルデヒドおよびケトンのカルボニル基が含まれるが、これらに限定されるわけではない。リンカーの求核基のヘテロ原子は、ソルターゼアミノ酸配列内の求電子基と反応し、ソルターゼアミノ酸配列との共有結合を形成することができる。リンカー上の有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒ

50

ドラジドが含まれるが、これらに限定されるわけではない。抗原（ハプテン）上の求電子基は、リンカーとの付着のために便利な部位を提供する。

【0150】

典型的には、ペプチド型リンカーは、2個以上のアミノ酸および/またはペプチド断片の間のペプチド結合の形成によって調製され得る。そのようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の領域において周知である液相合成法（E.Schroder and K.Lubke "The Peptides", volume 1(1965)76-136, Academic Press）によって調製され得る。

【0151】

もう一つの態様において、リンカーは、可溶性または反応性をモジュレートする基によって置換されていてもよい。例えば、スルホネート（ SO_3^- ）もしくはアンモニウムのような荷電置換基またはPEGのようなポリマーは、試薬の水溶解度を増加させ、リンカー試薬の抗原（ハプテン）もしくは薬物部分とのカップリング反応を容易にするか、または利用された合成経路に依るカップリング反応を容易にすることができる。

【0152】

本明細書において報告される非ソルターゼモチーフ部分を含むコンジュゲートは、以下のリンカー試薬：BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、S BAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホEMCS、スルホGMBS、スルホKMUS、スルホMBS、スルホSIAB、スルホSMCC、およびスルホSMPB、およびSVSB（サクシニミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート）、ならびにPierce Biotechnology, Incより市販されているビスマレイミド試薬：DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、BM(PEO)₃、およびBM(PEO)₄によって調製された複合体を明確に企図するが、これらに限定されるわけではない。ビスマレイミド試薬は、例えば、チオール基のチオール含有薬物部分、標識、またはリンカー中間体への連続的なまたは同時の付着を可能にする。例えば、チオール基と反応性であるマレイミド以外の官能基には、ヨードアセトアミド、プロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネート、およびイソチオシアネートが含まれる。

【0153】

例示的なリンカーには、マレイミドストレッチャーおよびパラアミノベンジルカルバモイル（PAB）自己犠牲スペーサーを有するバリンシトルリン（val-citまたはvc）ジペプチドリンカー試薬、ならびにマレイミドストレッチャー単位およびp-アミノベンジル自己犠牲スペーサーを有するphe-lys（Mtr）ジペプチドリンカー試薬が含まれる。

【0154】

システインチオール基は、求核性であり、以下のものを含む、リンカー試薬および非ソルターゼモチーフ部分またはソルターゼアミノ酸配列の求電子基と共有結合を形成するよう反応することができる：(i) NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、および酸ハロゲン化物のような活性エステル；(ii) ハロアセトアミドのようなアルキルハロゲン化物およびベンジルハロゲン化物；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル基、およびマレイミド基；ならびに(iv) スルフィド交換を介したピリジルジスルフィドを含むジスルフィド。ハプテン化された化合物の求核基には、リンカー部分およびリンカー試薬の求電子基と共有結合を形成するよう反応することができる、アミン基、チオール基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、オキシム基、ヒドラジン基、ヒドラジンカルボキシレート基、およびアリールヒドラジド基が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0155】

V. 組換え方法

例えばオリゴグリシンモチーフ（GG（SEQ ID NO: 28）、GGG（SEQ ID NO: 29）、GGGG（SEQ ID NO: 30）、GGGGG（SEQ ID NO: 31））などの求核性アミノ酸配列をN末端に含む任意のポリペプチドメイン（例えば、scFv、scFab、もしくはdarpinのような単鎖抗原結合ポリペプチド、またはdsFvもしくはFabのような多鎖抗原結合ポリペプチド）を、発現させ、真核細胞（例えば、HEK293細胞、CHO細胞）の上清から精製することができる。ポリペプチドが、単離されたポリペプチドであるか、それとも多量体または

10

20

30

40

50

ヘテロマーの要素に含まれているかは、重要でない。

【0156】

ポリペプチドをコードするベクターのクローニングまたは発現/分泌のために適当な宿主細胞には、本明細書に記載された原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、ポリペプチドは、特に、グリコシル化が必要でない時、細菌において作製され得る（例えば、大腸菌（*E.coli*）における抗体断片の発現を記載している、US 5,648,237、US 5,789,199、およびUS 5,840,523、Charlton, *Methods in Molecular Biology* 248(2003)245-254(B.K.C.Lo, (ed.), Humana Press, Totowa, NJ)を参照すること）。発現の後、ポリペプチドは、細菌細胞ペーストから可溶性画分へ単離されてもよいし、または可溶化され生理活性型へと再び折り畳まれ得る不溶性画分、いわゆる封入体から単離されてもよい。その後、ポリペプチドはさらに精製され得る。

10

【0157】

原核生物に加えて、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的にまたは完全にヒトのグリコシル化パターンを有するポリペプチドの産生をもたらす真菌株および酵母株を含む、糸状菌または酵母のような真核微生物も、ポリペプチドをコードするベクターのための適当なクローニング宿主または発現宿主である（例えば、Gerngross, *Nat. Biotech.* 2(2004)1409-1414およびLi, et al., *Nat. Biotech.* 24(2006)210-215を参照すること）。

【0158】

グリコシル化ポリペプチドの発現のために適当な宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物および脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物細胞および昆虫細胞が含まれる。具体的には、スポドプテラ・フルギベルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞のトランスフェクションのため、昆虫細胞と共に使用され得る多数のバキュロウイルス株が同定されている。

20

【0159】

植物細胞培養物も宿主として利用され得る（例えば、（トランスジェニック植物における抗体の作製のためのPLANTIBODIES（商標）テクノロジーを記載している）US 5,959,177、US 6,040,498、US 6,420,548、US 7,125,978、およびUS 6,417,429を参照すること）。

【0160】

脊椎動物細胞も宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中での増殖に適した哺乳動物細胞株が有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、COS-7細胞株（SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1細胞）；HEK293細胞株（ヒト胎児腎臓）；BHK細胞株（ベビーハムスター腎臓）；TM4マウスセルトリ細胞株（例えば、Mather, *Biol. Reprod.* 23(1980)243-251に記載されたようなTM4細胞）；CV1細胞株（サル腎臓細胞）；VERO-76細胞株（アフリカミドリザル腎臓細胞）；HELA細胞株（ヒト子宮頸癌細胞）；MDCK細胞株（イヌ腎臓細胞）；BRL-3A細胞株（バッファローラット肝臓細胞）；W138細胞株（ヒト肺細胞）；HepG2細胞株（ヒト肝臓細胞）；MMT 060562細胞株（マウス乳房腫瘍細胞）；（例えば、Mather, et al., *Anal. N.Y. Acad. Sci.* 383(1982)44-68に記載された）TRI細胞株；MRC5細胞株；およびFS4細胞株である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、DHFR陰性CHO細胞株（例えば、Urlaub, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(1980)4216を参照すること）を含むCHO細胞株（チャイニーズハムスター卵巣細胞）、ならびにY0細胞株、NS0細胞株、およびSp2/0細胞株のような骨髓腫細胞株が含まれる。ポリペプチド産生のために適当なある種の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki, and Wu, *Methods in Molecular Biology, Antibody Engineering* 248(2004)255-268(B.K.C.Lo, (ed.), Humana Press, Totowa, NJ)を参照すること。

30

【図面の簡単な説明】

【0161】

【図1】異なる濃度のリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションC（三角）およびSt.py.SrtA（バツ印）を、LPKTAモチーフを保有している92 μMグルコースデヒド

50

ロゲナーゼならびに7 μ M AAAA-ビオチンおよび7 μ M GGGG-ビオチンと共に2時間インキュベートした。ストレプトアビジンビーズ上でのインキュベーションの後、10 μ lの懸濁液をレポーター酵素活性について分析した。

【図2】0.67mg/mlのリステリア・モノサイトゲネスSrtAバリエーションC(菱形)およびSt.py.SrtA(四角)を、LPKTAモチーフを保有している92 μ Mグルコースデヒドロゲナーゼならびに7 μ M AAAA-ビオチンおよび7 μ M GGGG-ビオチンと共に異なる時間インキュベートした。ストレプトアビジンビーズ上でのインキュベーションの後、10 μ lの懸濁液をレポーター酵素活性について分析した。

【図3】1mg/mlのリステリア・モノサイトゲネスSrtAバリエーションCを、異なる濃度のLPKTAモチーフを保有しているグルコースデヒドロゲナーゼおよび14 μ M GGGG-ビオチンと共に2時間インキュベートした。ストレプトアビジンビーズ上でのインキュベーションの後、40 μ lの懸濁液をレポーター酵素活性について分析した。

【図4】3mg/mlのSt.py.SrtAを、異なる濃度のLPKTAモチーフを保有しているグルコースデヒドロゲナーゼおよび14 μ M GGGG-ビオチンと共に2時間インキュベートした。ストレプトアビジンビーズ上でのインキュベーションの後、40 μ lの懸濁液をレポーター酵素活性について分析した。

【0162】

以下の実施例、添付の図面、および配列は、本発明の理解を助けるために提供され、その真の範囲は、添付の特許請求の範囲において示される。本発明の本旨から逸脱することなく、示された手法に修飾を施し得ることが理解される。

【実施例】

【0163】

組換えDNA技術

Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されているような標準的な方法を、DNAを操作するために使用した。分子生物学的試薬は、製造業者の説明書に従って使用された。

【0164】

遺伝子およびオリゴヌクレオチドの合成

所望の遺伝子セグメントは、Geneart GmbH (Regensburg, Germany)において、化学合成によって調製された。合成された遺伝子断片を、増大/増幅のため、大腸菌プラスミドへクローニングした。サブクローニングされた遺伝子断片のDNA配列を、DNA配列決定によって確認した。あるいは、化学合成されたオリゴヌクレオチドのアニーリングによって、またはPCRによって、短い合成DNA断片を組み立てた。それぞれのオリゴヌクレオチドは、metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Germany)によって調製された。

【0165】

基本的/標準的な哺乳動物発現プラスミドの説明

所望の遺伝子/タンパク質(例えば、全長抗体重鎖、全長抗体軽鎖、またはN末端にオリゴグリシンを含有しているFc鎖)の発現のため、以下の機能要素を含む転写単位を使用する

:

- イントロンAを含むヒトサイトメガロウイルス(P-CMV)由来の前初期エンハンサーおよびプロモーター、
- ヒト重鎖免疫グロブリン5'非翻訳領域(5'UTR)、
- マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- 発現させるべき遺伝子/タンパク質(例えば、全長抗体重鎖)、ならびに
- ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列(BGH pA)。

【0166】

発現させるべき所望の遺伝子を含む発現単位/カセットの他に、基本的/標準的な哺乳動物発現プラスミドは、以下のものを含有している:

- 大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、

10

20

30

40

50

および

- 大腸菌にアンピシリン耐性を付与する ラクタマーゼ遺伝子。

【0167】

タンパク質測定

ポリペプチドのアミノ酸配列に基づき計算されたモル吸光係数を使用して、280nmにおける光学濃度(OD)を決定することによって、精製されたポリペプチドのタンパク質濃度を決定した。

【0168】

実施例1

可溶性ソルターゼAのための発現プラスミドの生成

10

黄色ブドウ球菌由来ソルターゼA

ソルターゼ遺伝子は、N末端が短縮された黄色ブドウ球菌ソルターゼA(60~206)分子(SEQ ID NO:05のアミノ酸配列)をコードする。

【0169】

大腸菌(E.coli)細胞における可溶性ソルターゼの発現のための発現プラスミドは、可溶性ソルターゼ発現カセットに加えて、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および選択可能マーカーとしてのURA3遺伝子、およびIPTGを使用した転写の誘導を可能にするLacI遺伝子を含んでいた。

【0170】

可溶性ソルターゼの転写単位は、以下の機能性要素を含んでいた：

20

- T5プロモーター、
- 精製タグ、
- N末端が短縮された黄色ブドウ球菌ソルターゼAをコードする核酸、ならびに
- Toおよびfdの終結配列。

【0171】

HEK293細胞における可溶性ソルターゼの一過性発現のための発現プラスミドは、可溶性ソルターゼ発現カセットに加えて、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および大腸菌にアンピシリン耐性を付与する ラクタマーゼ遺伝子を含んでいた。

【0172】

30

可溶性ソルターゼの転写単位は、以下の機能性要素を含んでいた：

- イントロンAを含むヒトサイトメガロウイルス(P-CMV)由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター、
- ヒト重鎖免疫グロブリン5'非翻訳領域(5'UTR)、
- マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- 精製タグをコードする核酸、
- N末端が短縮された黄色ブドウ球菌ソルターゼAをコードする核酸、ならびに
- ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列(BGH pA)。

【0173】

成熟可溶性ソルターゼのアミノ酸配列は、

40

QAKPQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNRGVSF AEENESLD
DQNISIAGHTFIDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNETRKYKMTSIRDV
KPTDVGVLDEQK GKDKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRKIFVATEVK
(SEQ ID NO: 05)

である。

【0174】

精製タグは、アミノ酸配列

MRGSHHHHHHGS (SEQ ID NO: 32)

50

を有する。

【0175】

化膿性連鎖球菌由来ソルターゼA

ソルターゼ遺伝子は、N末端が短縮された化膿性連鎖球菌ソルターゼA分子 (SEQ ID NO: 06のアミノ酸配列) をコードする。

【0176】

大腸菌細胞における可溶性ソルターゼの発現のための発現プラスミドは、可溶性ソルターゼ発現カセットに加えて、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および選択可能マーカーとしてのURA3遺伝子、およびIPTGを使用した転写の誘導を可能にするLacI遺伝子を含んでいた。

10

【0177】

可溶性ソルターゼの転写単位は、以下の機能性要素を含んでいた：

- T5プロモーター、
- 精製タグ、
- N末端が短縮された化膿性連鎖球菌ソルターゼAをコードする核酸、ならびに
- Toおよびfdの終結配列。

【0178】

HEK293細胞における可溶性ソルターゼの一過性発現のための発現プラスミドは、可溶性ソルターゼ発現カセットに加えて、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および大腸菌にアンピシリン耐性を付与するラクタマーゼ遺伝子を含んでいた。

20

【0179】

可溶性ソルターゼの転写単位は、以下の機能性要素を含んでいた：

- イントロンAを含むヒトサイトメガロウイルス (P-CMV) 由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター、
- ヒト重鎖免疫グロブリン5'非翻訳領域 (5'UTR)、
- マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- 精製タグをコードする核酸、
- N末端が短縮された化膿性連鎖球菌ソルターゼAをコードする核酸、ならびに
- ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列 (BGH pA)。

30

【0180】

成熟可溶性ソルターゼのアミノ酸配列は、

VLQAQMAAQQLPVIGGIAIPELGINLPFKGLGNTIELIYGAGTMKEEQVMG
GENNYSLASHHIFGITGSSQMLFSPLEAQNQMSIYLTDKKIEYIHKDVFT
VAPERVDVIDDTAGLKEVTLVTCTDIEATERIIVKGELKTEYDFDKAPADV
LKAFNHSYNQVST (SEQ ID NO: 06)

である。

【0181】

精製タグは、アミノ酸配列

MRGSHHHHHHGS (SEQ ID NO: 32)

40

を有する。

【0182】

リステリア・モノサイトゲネス由来ソルターゼA

N末端が短縮されたリステリア・モノサイトゲネスソルターゼA分子をコードする異なるソルターゼ遺伝子を発現させた：

A：本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションA
：

50

EKDATDFESVQLPSMTSVIKGAANYDKDAVVGSIAPPSVDVNLLVFKGT
 NTANLLAGATTMRSDQVMGKGNYP LAGHHMRDESMLFGPIMKVKKGDK
 IYLTDLNLYEYTVTETKTIDETEVSVIDDTKDARITLITCDKPTETTKRFVA
 VGELEKTEKLTKELENKYFPSK (SEQ ID NO: 36)

B : 本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションB
 :
 SVIKGAANYDKDAVVGSIAPPSVDVNLLVFKGTNTANLLAGATTMRSDQ
 VMGKGNYP LAGHHMRDESMLFGPIMKVKKGDKIYLTDLNLYEYTVTET
 KTIDETEVSVIDDTKDARITLITCDKPTETTKRFVAVGELEKTEKLTKELEN
 KYFPSK (SEQ ID NO: 37)

10

C : 本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションC
 :
 ANYDKDAVVGSIAPPSVDVNLLVFKGTNTANLLAGATTMRSDQVMGK
 NYPLAGHHMRDESMLFGPIMKVKKGDKIYLTDLNLYEYTVTETKTIDET
 EVSVIDDTKDARITLITCDKPTETTKRFVAVGELEKTEKLTKELENKYFPSK
 (SEQ ID NO: 38)

20

D : 本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションD
 :
 ANYDKDAVVGSIAPPSVDVNLLVFKGTNTANLLAGATTMRSDQVMGK
 NYPLAGHHMRDESMLFGPIMKVKKGDKIYLTDLNLYEYTVTETKTIDET
 EVSVIDDTKDARITLITCDKPTETTKRFVAVGELEKTEK (SEQ ID NO: 39)

E : 本明細書において報告されるリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションE :
 GSIAPPSVDVNLLVFKGTNTANLLAGATTMRSDQVMGKGNYP LAGHHMR
 DESMLFGPIMKVKKGDKIYLTDLNLYEYTVTETKTIDETEVSVIDDTKDA
 RITLITCDKPTETTKRFVAVGELEKTEKLTKELENKYFPSK (SEQ ID NO: 40)

30

【 0 1 8 3 】

大腸菌細胞における短縮型ソルターゼの発現のための発現プラスミドは、ソルターゼ発現カセットに加えて、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および選択可能マーカーとしてのURA3遺伝子、およびIPTGを使用した転写の誘導を可能にするLacI遺伝子を含んでいた。

40

【 0 1 8 4 】

可溶性ソルターゼの転写単位は、以下の機能性要素を含んでいた :

- T5プロモーター、
- 精製タグ、
- リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションをコードする核酸、ならびに
- Toおよびfdの終結配列。

【 0 1 8 5 】

HEK293細胞における短縮型ソルターゼの一過性発現のための発現プラスミドは、ソルターゼ発現カセットに加えて、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および大腸菌にアンピシリン耐性を付与するラクタマーゼ遺

50

伝子を含んでいた。

【0186】

可溶性ソルターゼの転写単位は、以下の機能性要素を含んでいた：

- イントロンAを含むヒトサイトメガロウイルス (P-CMV) 由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター、
- ヒト重鎖免疫グロブリン5'非翻訳領域 (5'UTR)、
- マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- 精製タグをコードする核酸、
- L.モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションをコードする核酸、ならびに
- ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列 (BGH pA)。

10

【0187】

精製タグは、アミノ酸配列MRGSHHHHHHGS (SEQ ID NO:32) を有する。

【0188】

実施例2

一過性発現および分析的特徴決定

大腸菌：

それぞれのソルターゼ発現プラスミドによって形質転換された大腸菌細胞を37 °Cでおよそ0.9のOD578にまで増殖させること(予備培養)によって、ソルターゼの組換え作製を実施した。このおよそ0.9のOD578で、2mM IPTGを添加し、28 °Cにおいてさらに24時間細胞を増殖させることによって、タンパク質発現を誘導した。その後、細胞を遠心分離によって採集し、ホモジナイザーを使用して高圧を介して溶解した。細胞片を除去するため、細胞溶解物を遠心分離し、その後、精製まで、低温(例えば、-80 °C)で細胞溶解物を保管した。可溶性ソルターゼを、Ni-NTAクロマトグラフィ後のサイズ排除クロマトグラフィを使用して精製した。内毒素の枯渇のため、陰イオン交換クロマトグラフィをフロースルーモードで実施した。アミノ酸配列に基づき計算されたモル吸光係数を使用して、280nmでの光学濃度(OD)を測定することによって、ソルターゼ調製物のタンパク質濃度を決定した。還元剤(5mM 1,4-ジチオスレイトール)の存在下および非存在下でのSDS-PAGEならびにクーマシーブリリアントブルーによる染色によって、ソルターゼの純度および完全性を決定した。

20

【0189】

アミノ酸配列に基づき計算されたモル吸光係数を使用して、280nmでの光学濃度(OD)を測定することによって、タンパク質濃度を決定した。還元剤(5mM 1,4-ジチオスレイトール)の存在下および非存在下でのSDS-PAGEならびにクーマシーブリリアントブルーによる染色によって、純度を分析した。

30

【0190】

HEK：

F17培地(Invitrogen Corp.)において培養されたHEK293細胞(ヒト胎児腎臓細胞株293由来)の一過性トランスフェクションによって、組換え作製を実施した。トランスフェクションのため、「293-Fectin」トランスフェクション試薬(Invitrogen)を使用した。製造業者の説明書に指定されたように、トランスフェクションを実施した。細胞培養上清をトランスフェクションの3~7日後に採集した。上清を低温(例えば、-80 °C)で保管した。

40

【0191】

例えば、HEK293細胞における、ヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般情報は、Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75(2001)197-203に与えられる。

【0192】

アミノ酸配列に基づき計算されたモル吸光係数を使用して、280nmでの光学濃度(OD)を測定することによって、タンパク質濃度を決定した。還元剤(5mM 1,4-ジチオスレイトール)の存在下および非存在下でのSDS-PAGEならびにクーマシーブリリアントブルーによる染色によって、純度を分析した。

50

【0193】

リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションDは、極めて低い発現収率を示した。

【0194】

実施例3

活性アッセイ

40 μ lの各バリエーションを80 μ lの基質溶液（50mM トリスpH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、30 μ M グルコースデヒドロゲナーゼ（ソルターゼ反応の基質のうちの一つ（LPX TG）を含有）、およびビオチン（ソルターゼ反応の他の基質、GGGGを含有））と混合した。この反応混合物を37 °Cで2時間インキュベートした。その後、反応混合物を5000 \times gで10分間遠心分離した。上清（50 μ L）を、200mM NaCl、10mM CaCl₂、およびストレプトアビジンによってコーティングされた磁気ビーズを含む100 μ Lの50mM トリス緩衝液（pH7.5）に添加した。混合物を200rpmで30 °Cで30分間インキュベートした。その後、磁気ビーズを、磁石および真空ポンプを使用して、V底マイクロタイタープレートにおいて、各300 μ Lの洗浄緩衝液（50mM トリス、pH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、5mg/mL BSA、0.1% トリトンX-100）によって5回洗浄した。その後、ビーズを、100 μ Lのクエン酸緩衝液に再懸濁させ、そのうちの10 μ Lを新しいウェルに移した。それに、150 μ Lの試験緩衝液（0.2M クエン酸ナトリウム、pH5.8、0.3g/L 4-ニトロソアニリン、1mM CaCl₂、30mM グルコース）を添加した。レポーター酵素の動力学を、620nmで5分間にわたり測定した。

【0195】

異なるバリエーションの活性は、以下の表に示される。

リステリア・モノサイトゲネスソルターゼバリエーション	最大dE/分
A (SEQ ID NO: 36 + C末端 SEQ ID NO: 32)	0.037
B (SEQ ID NO: 37 + C末端 SEQ ID NO: 32)	0.026
C (SEQ ID NO: 38 + C末端 SEQ ID NO: 32)	0.113
D (SEQ ID NO: 39 + C末端 SEQ ID NO: 32)	0.044
E (SEQ ID NO: 40 + C末端 SEQ ID NO: 32)	0.019

【0196】

実施例4

動力学的アッセイ

酵素量

異なる濃度のソルターゼ（0.02mg/ml、0.17mg/ml、0.33mg/ml、0.67mg/ml、1.33mg/ml、2.00mg/ml、2.67mg/ml、3.33mg/ml）を、基質溶液（50mM トリスpH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、92 μ M グルコースデヒドロゲナーゼ（ソルターゼ反応の基質のうちの一つ（LPKTA）を含有）、および7 μ M ビオチン（ソルターゼ反応の他の基質AAAAを含有）、および7 μ M ビオチン（ソルターゼ反応の他の基質GGGGを含有））と混合した。この反応混合物を37 °Cで2時間インキュベートした。20倍過剰の阻害緩衝液（50mM トリス、pH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、5mM ヨードアセトアミド）の添加によって、反応を停止させた。停止した反応混合物を、5000 \times gで10分間遠心分離した。上清（50 μ L）を、200mM NaCl、10mM CaCl₂、およびストレプトアビジンによってコーティングされた磁気ビーズを含む、100 μ Lの50mM トリス緩衝液（pH7.5）に添加した。混合物を、200rpmで30 °Cで30分間インキュベートした。その後、磁気ビーズを、磁石および真空ポンプを使用して、V底マルチウェルプレートにおいて各300 μ Lの洗浄緩衝液（50mM トリス、pH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、5mg/mL BSA、0.1% トリトンX-100）によって5回洗浄した。その後、ビーズを、100 μ Lのクエン酸緩衝液に再懸濁させ、そのうちの10 μ Lを新しいウェルに移した。それに、150 μ Lの試験緩衝液（0.2M クエン酸ナトリウム、pH5.8、0.3g/L 4-ニトロソアニリン、1mM CaCl

2、30mMグルコース)を添加した。レポーター酵素の動力学を、620nmで5分間にわたり測定した。

【0197】

St.py.SrtAおよびリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションCの活性は、図1に示される。

【0198】

インキュベーション時間

固定された濃度のソルターゼ(0.67mg/ml)を、基質溶液(50mMトリスpH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、92μMグルコースデヒドロゲナーゼ(ソルターゼ反応の基質のうちの一つ(LPKTA)を含有)および7μMピオチン(ソルターゼ反応の他の基質AAA Aを含有)および7μMピオチン(ソルターゼ反応の他の基質GGGGを含有))と混合した。この反応混合物を、37℃で2時間、6.5時間、または18時間インキュベートした。20倍過剰の阻害緩衝液(50mMトリス、pH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、5mMヨードアセトアミド)の添加によって、反応を停止させた。停止した反応混合物を、5000×gで10分間遠心分離した。上清(50μL)を、200mM NaCl、10mM CaCl₂、およびストレプトアビジンによってコーティングされた磁気ビーズを含む、100μLの50mMトリス緩衝液(pH7.5)に添加した。混合物を、200rpmで30℃で30分間インキュベートした。その後、磁気ビーズを、磁石および真空ポンプを使用して、V底マルチウェルプレートにおいて各300μLの洗浄緩衝液(50mMトリス、pH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、5mg/mL BSA、0.1%トリトンX-100)によって5回洗浄した。その後、ビーズを、100μLのクエン酸緩衝液に再懸濁させ、そのうちの10μLを新しいウェルに移した。それに、150μLの試験緩衝液(0.2Mクエン酸ナトリウム、pH5.8、0.3g/L 4-ニトロソアニリン、1mM CaCl₂、30mMグルコース)を添加した。レポーター酵素の動力学を、620nmで5分間にわたり測定した。

【0199】

St.py.SrtAおよびリステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションCの活性は、図2に示される。

【0200】

ソルターゼモチーフポリペプチド濃度

固定された濃度のリステリア・モノサイトゲネスソルターゼバリエーションC(1mg/ml)を、基質溶液(50mMトリスpH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、2.5μM、5μM、10μM、20μM、40μM、80μM、160μM、325μM、650μM、1300μMグルコースデヒドロゲナーゼ(ソルターゼ反応の基質のうちの一つ(LPKTA)を含有)および14μMピオチン(ソルターゼ反応の他の基質GGGGを含有))と混合した。この反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。20倍過剰の阻害緩衝液(50mMトリス、pH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、5mMヨードアセトアミド)の添加によって反応を停止させた。停止した反応混合物を、5000×gで10分間遠心分離した。上清(50μL)を、200mM NaCl、10mM CaCl₂、およびストレプトアビジンによってコーティングされた磁気ビーズを含む、100μLの50mMトリス緩衝液(pH7.5)に添加した。混合物を、200rpmで30℃で30分間インキュベートした。その後、磁気ビーズを、磁石および真空ポンプを使用して、V底マルチウェルプレートにおいて各300μLの洗浄緩衝液(50mMトリス、pH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、5mg/mL BSA、0.1%トリトンX-100)によって5回洗浄した。その後、ビーズを、100μLクエン酸緩衝液に再懸濁させ、そのうちの40μLを新しいウェルに移した。それに、150μLの試験緩衝液(0.2Mクエン酸ナトリウム、pH5.8、0.3g/L 4-ニトロソアニリン、1mM CaCl₂、30mMグルコース)を添加した。レポーター酵素の動力学を、620nmで5分間にわたり測定した。

【0201】

リステリア・モノサイトゲネスソルターゼAバリエーションCの活性は、図3に示される。

【0202】

ソルターゼモチーフポリペプチド濃度

10

20

30

40

50

固定された濃度の化膿性連鎖球菌ソルターゼ（3mg/ml）を、基質溶液（50mMトリスpH 7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、2.5 μM、5 μM、10 μM、20 μM、40 μM、80 μM、160 μM、325 μM、650 μM、1300 μMグルコースデヒドロゲナーゼ（ソルターゼ反応の基質のうちの一つ（LPKTA）を含有）および14 μMピオチン（ソルターゼ反応の他の基質GGGGを含有））と混合した。この反応混合物を37 °Cで2時間インキュベートした。20倍過剰の阻害緩衝液（50mMトリス、pH7.5、200mM NaCl、10mM CaCl₂、5 mMヨードアセトアミド）の添加によって、反応を停止させた。停止した反応混合物を、5000 × gで10分間遠心分離した。上清（50 μL）を、200mM NaCl、10mM CaCl₂、およびストレプトアビジンによってコーティングされた磁気ビーズを含む、100 μLの50mMトリス緩衝液（pH7.5）に添加した。混合物を、200rpmで30 °Cで30分間インキュベートした。その後、磁気ビーズを、磁石および真空ポンプを使用して、V底マルチウェルプレートにおいて各300 μLの洗浄緩衝液（50mMトリス、pH7.5、200mM NaCl、10 mM CaCl₂、5mg/mL BSA、0.1%トリトンX-100）によって5回洗浄した。その後、ビーズを、100 μLクエン酸緩衝液に再懸濁させ、そのうちの40 μLを新しいウェルに移した。それに、150 μLの試験緩衝液（0.2Mクエン酸ナトリウム、pH5.8、0.3g/L 4-ニトロソアニリン、1mM CaCl₂、30mMグルコース）を添加した。レポーター酵素の動力学を、620nmで5分間にわたり測定した。

【0203】

化膿性連鎖球菌ソルターゼAの活性は、図4に示される。

【0204】

上記の発明は、理解を明確にするため、例示および実施例によってある程度詳細に記載されたが、説明および実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

10

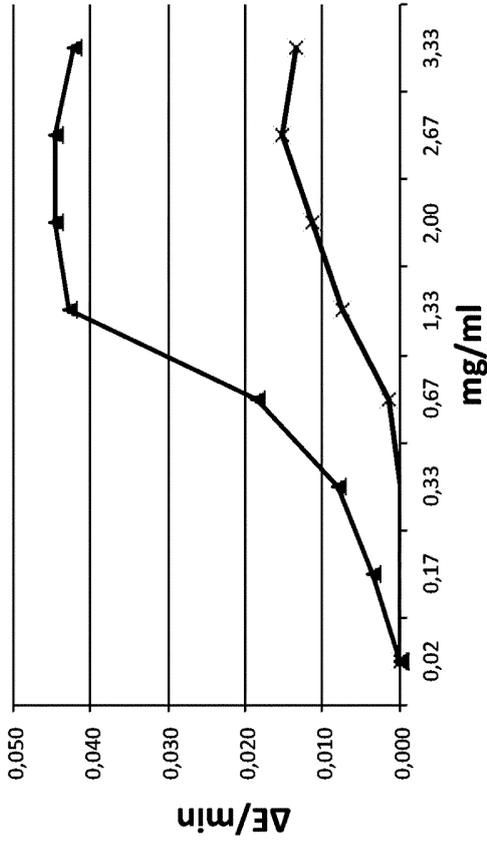
20

30

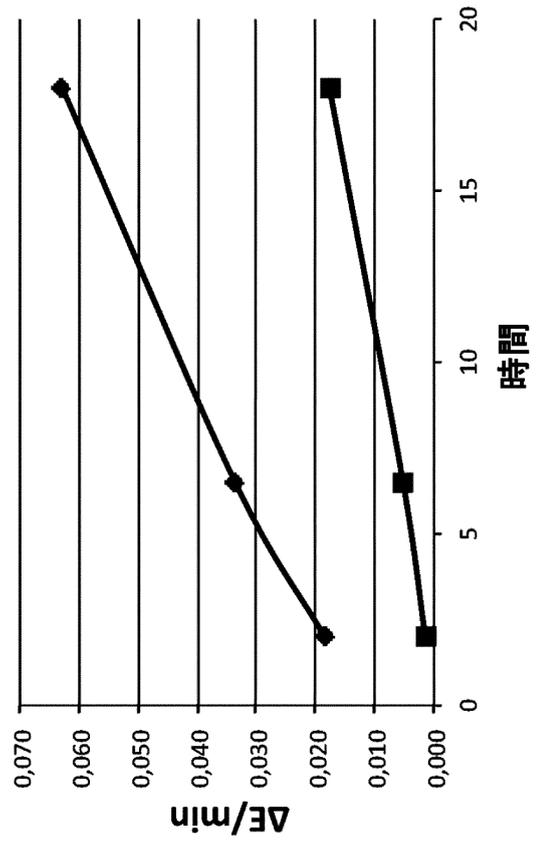
40

50

【 図 面 】
【 図 1 】



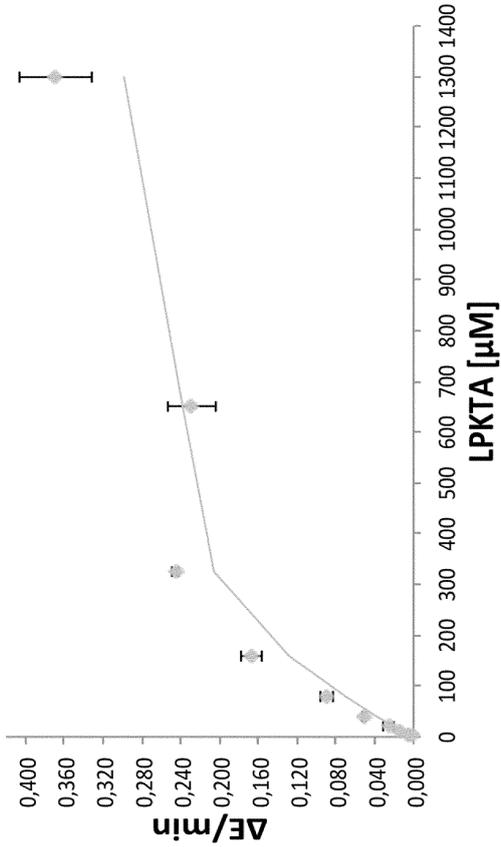
【 図 2 】



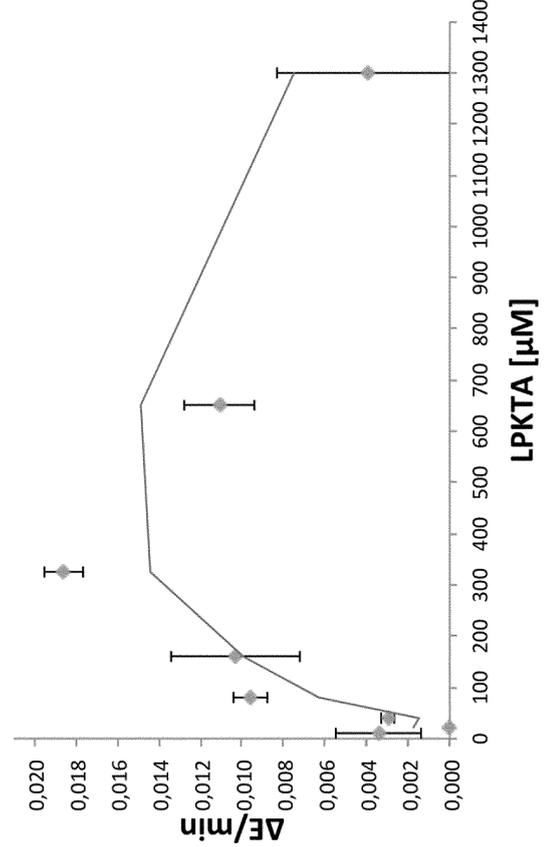
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】



30

40

50

【配列表】

0006998862000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ベーニッツ - デュラ マーラ
ドイツ連邦共和国 8 2 3 2 7 トウツィング ホーフマイアーシュトラーゼ 2 3
- (72)発明者 シャッテ マーティン
ドイツ連邦共和国 7 6 3 0 7 カールスバート アルプタールシュトラーゼ 3 5
- 審査官 小金井 悟
- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 1 8 3 0 6 6 (W O , A 2)
国際公開第 2 0 1 4 / 0 0 1 3 2 4 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 4 / 0 0 1 3 2 5 (W O , A 1)
Putative cysteine protease ywpE , DATABASE Uniport KB accession no.A0A0E1R5I2 , 検索日 2 0 2 0 年 7 月 1 0 日 , 2015年09月16日 , <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0E1R5I2.txt?version=4>
Class A sortase , DATABASE uniprot KB accession no.A0A0B8RCN4 , 検索日 2 0 2 0 年 7 月 1 0 日 , 2015年09月16日 , <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0B8RCN4.txt?version=6>
Nature Protocols , 2013年 , Vol.8, No.9 , pp.1787-1799
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
P u b M e d
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / B I O S I S / M E D L I N E / E M B A S E (S T N)
G o o g l e / G o o g l e S c h o l a r