

PETITORIO

AS: 94.219



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04062951 00000000 Folios: 170
Fecha (AMD): 2004-07-01 16:31:13
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: HIROYUKI OHNO

Dirección: 1-12-10-204, Fukuei, Ichikawa-shi, Chiba
272-0137, Japón

Nacionalidad o Domicilio: Japón

Lugar de Constitución: Japón

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: RAMIRO CASTRO DUQUE

Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9

Teléfono: 380-2200

Fax: 380-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 170.322 TP 1003

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Hiroyuki Ohno, Hiromitsu Saisho, Hideki Tanzawa

Dirección: 1-12-10-204, Fukuei, Ichikawa-shi, Chiba 272-0137, JP; 4-23-15 Nishishinjuku,
Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, JP; 1922-49, Hirayamacho, Midori-ku, Chiba-shi, Chiba 266-
0002, Japón (Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio: Japón

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/JP02/12752 Fecha 05-12-2002

Publicación Internacional No. WO 03/048199 A1 Fecha 12-06-2003

Título (54): PROTEÍNA CITOTOXICA Y SU UTILIZACION

PROTEÍNA CITOTOXICA (PEPTIDA) PEPTIDA PARCIAL DE LA
MISMA, EL AGENTE ANTINEOPLASICO Q/HA CONTIENE Y MEDICAMENTO

7 Clasificación Internacional (51) A61K38/01 // A61K39/395.

8 Prioridad

SI ☒NO ☐(33) País de
Origen

JP

(32) Fecha

05-12-2001

(31) Número de Solicitud

2001-371210

9 Comprobante de pago No. 04-39.545

Fecha 30-06-2004

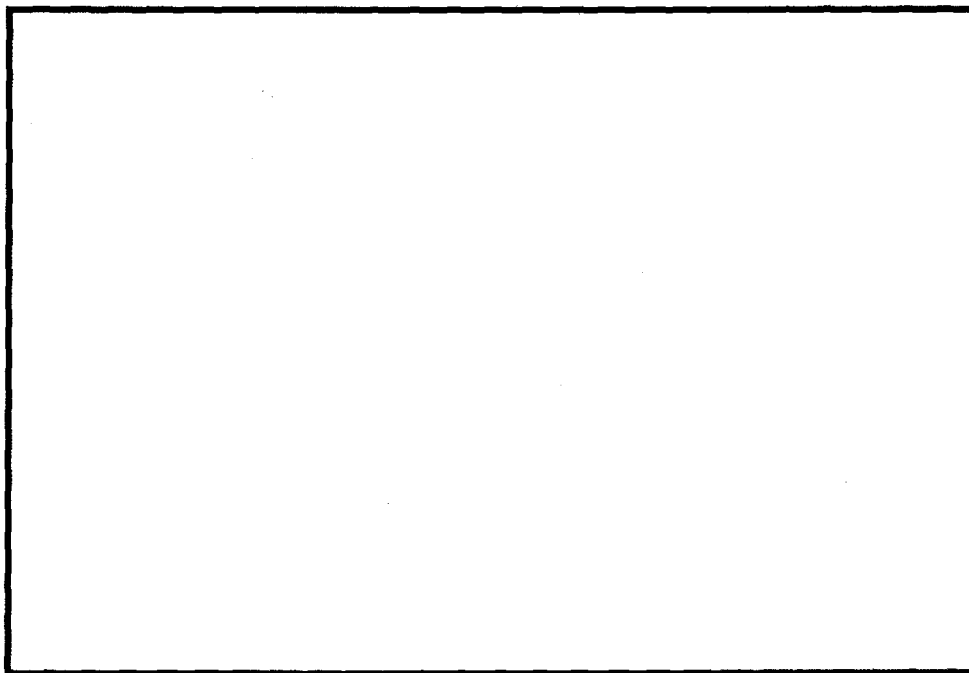
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$422.000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☒ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros Tarjeta de propietarios.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: RAMIRO CASTRO BUQUE

FIRMA:

C.C. 170.322 de Bogotá T.P. 1003 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

3 3

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04062951 00000000 Folios: 170
Fecha (AMD): 2004-07-01 16:31:13
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 39,545
FECHA : MAYO 17 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	21740989	17/05/2004	22,697,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
		TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 6 月 12 日 (12.06.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/048199 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 14/195, 16/12, C12N 15/31, C12Q 1/02, A61K 39/395, 38/00, 45/00, A61P 1/00, 1/04, 35/00, 43/00, G01N 33/15 // 33/50, C12P 21/08
- (74) 代理人: 舟橋 榮子 (FUNAHASHI, Eiko): 〒105-0003 東京都港区西新橋1丁目16番4号ノアックスビル3階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/12752
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2002 年 12 月 5 日 (05.12.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2001-371210 2001 年 12 月 5 日 (05.12.2001) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 大野 博之 (OHNO, Hiroyuki) [JP/JP]: 〒272-0141 千葉県市川市香取1-3-8 香取ハイツ101 Chiba (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 税所 宏光 (SAISHO, Hiromitsu) [JP/JP]: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿4-23-15 Tokyo (JP). 丹沢 秀樹 (TANZAWA, Hideki) [JP/JP]: 〒266-0002 千葉県千葉市緑区平山町1922-49 Chiba (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CYTOTOXIC PROTEIN AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 細胞障害タンパク質及びその利用

(57) Abstract: A novel cytotoxic protein (M toxin: mucous layer devastating toxin) of *Helicobacter pylori* and utilization thereof. Namely, it is intended to provide a cytotoxic protein (M toxin) produced by *Helicobacter pylori*, its partial peptide, and an antitumor agent comprising the cytotoxic protein. This cytotoxic protein can be obtained by culturing a transformant which has been transformed by a recombinant vector containing a DNA encoding this protein. Also, use of the cytotoxic protein is provided.

(57) 要約:

この発明は、ヘリコバクターピロリの新規細胞障害性タンパク質 (M毒素、mucous layer devastating toxin) およびその利用に関する。

この発明はヘリコバクターピロリで産生される細胞障害タンパク質 (M毒素)、部分ペプチド、該細胞障害タンパク質からなる抗腫瘍剤を提供するものである。この細胞障害タンパク質は該タンパク質をコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養することによって得られる。この発明はさらに該細胞障害タンパク質の用途を提供する。

明細書

細胞障害タンパク質及びその利用

技術分野

本発明は、ヘリコバクターピロリの産生する新規な細胞障害タンパク質であるM毒素 (mucous layer devastating toxin) 及びその利用に関する。

背景技術

多くの胃炎、胃潰瘍あるいは胃癌はヘリコバクターピロリによると考えられてきているが、今日まで、それらの疾患の端緒である胃上皮細胞の破壊と不可逆的な細胞死を惹起する、明らかな直接細胞障害因子は特定されてこなかった。胃内の pH 環境や免疫反応を変化させる因子や、ヘリコバクターピロリの胃上皮細胞への接着因子、あるいは菌自体の運動性などが疾患成立要件として指摘されてきたが、胃炎、胃潰瘍、胃癌のすべての出発点といえる胃粘膜破壊が、いかなる過程を経るのか、またその直接的な責任因子は何かということは現在まで不明だった。唯一、細胞障害性をもつ空胞化毒素が単離されていたが、これは細胞障害活性が弱く、可逆的な細胞障害活性にとどまり、致死的細胞障害因子としては、in vivo でも in vitro でも病原因子としては認められてこなかった。

ヘリコバクターピロリは、上述のごとく、生体の胃内環境において、胃粘膜細胞に対する直接障害因子を分泌していることは、多くの研究者により推定され、その疾患の重要性をも鑑み、遺伝子の全配列が 1996 年には確定されたが、血清を使用してもなお困難な培養条件と、分離精製条件および評価系の未確立が、推定毒素の単離同定を阻んできた。

発明が解決しようとする課題

そこで、ヘリコバクターピロリ感染にともなう胃炎、胃潰瘍、胃癌等の原因となる責任タンパク質を見だし、その毒素タンパク質を大量調製する方法を確立し、もって新規な毒素であるM毒素の同定、診断およびスクリーニング法を確立することが、1つの課題となった。またそれらを用いて、胃粘膜細胞障害の責任毒素の作用を抑制し、胃炎、胃潰瘍、胃癌等の予防・治療剤の開発の道を開き、あわせてその毒素の応用方法にまで緒をつけることが望まれた。

発明の開示

本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヘリコバク
ターピロリを従来と異なる、より胃内環境に近い状態である無血清培養条件下で
生育した場合に、不可逆的細胞死をもたらす新規な毒素を同定した。これは、上
述の空胞化毒素の単位当たり 1000 倍から 100000 倍の毒力を有し、胃上皮細胞の
5 みならず免疫系細胞を含む広範な温血細胞に対して、不可逆的な細胞死を惹起す
ることを見いだした。本発明者は、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ね
た結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、(1) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列に対する同一
性を少なくとも 70% 以上有するタンパク質からなることを特徴とする細胞障害
10 タンパク質、(2) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と等しい細胞障害活性を
有することを特徴とする (1) 記載のタンパク質の部分ペプチド、(3) ヘリコ
バクターピロリで産生される (1) 1 または (2) 記載の細胞障害タンパク質、
(4) (1) または (2) 記載の細胞障害タンパク質をコードする配列番号 2 の
DNA を含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養することを
15 特徴とする (1) または (2) 記載の細胞障害タンパク質、(5) 形質転換体が
独立行政法人産業技術総合研究所 (IPOD) に寄託番号 FERM BP-8218 で寄託され
ている (4) 記載の細胞障害タンパク質、(6) (1) 1 または (2) 記載の細胞
障害タンパク質を用いる抗腫瘍剤、(7) (1) または (2) 記載の細胞障害タン
パク質を哺乳類に免疫して得られる細胞障害タンパク質に特異的なモノクローナ
20 ル抗体、(8) 寄託番号 FERM BP-8222 のハイブリドーマクローンをを用いて産生さ
れる (7) 記載のモノクローナル抗体、(9) 寄託番号 FERM BP-8223 のハイブリ
ドーマクローンをを用いて産生される (7) 記載のモノクローナル抗体、(10)
寄託番号 FERM BP-8224 のハイブリドーマクローンをを用いて産生される (7) 記
載のモノクローナル抗体、(11) (1) または (2) 記載の細胞障害タンパク質を
25 哺乳類に免疫して得られる細胞障害タンパク質に特異的なポリクローナル抗体、
(12) (7) から (11) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはポリ
クローナル抗体を用いる (1) または (2) 記載の細胞障害タンパク質を検出する
方法および診断法、(13) (7) から (11) のいずれか 1 項に記載のモノクロー
ナル抗体またはポリクローナル抗体を用いる (1) または (2) 記載の細胞障害タ

6
8
X

ンパク質により惹き起こされる胃癌、胃炎、胃潰瘍の予防、治療剤、(14)(1) または(2)記載のタンパク質を用いることを特徴とする、(1)または(2)記載のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物について、温血動物細胞を用いて陰性または陽性対照群との比較で、細胞増殖阻害活性、細胞障害活性あるいは細胞死により当該化合物をスクリーニングする方法、(15)(1)または(2)記載のタンパク質を含有してなる、(1)または(2)記載のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(16)(14)記載のスクリーニング方法または(15)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、(1)または(2)記載のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、(17)(1)または(2)記載のタンパク質による温血動物細胞の細胞障害活性を阻害する活性を有する化合物またはその塩を含有する医薬、(18)胃炎、胃潰瘍、胃癌および(14)記載のスクリーニング方法または(15)記載のスクリーニング用キットによって、M毒素で惹起されることの示される疾患に対する予防・治療剤である(17)記載の医薬を提供する。

15 図面の簡単な説明

図1は、実施例1において得られたサンプルの陰イオンクロマトグラフィーの結果を示す。aは各分画におけるM毒素の活性と、その溶出蛋白質の吸光度である。

bはaのクロマトグラフィー中のフラクション16からフラクション22の銀染色によるSDS-PAGEである。cはエレクトロブロッティングによりPVDF膜に転写した蛋白毒素のバンドである。d、eはコントロールと1nMの抽出された細胞毒液の24時間後のヒラ細胞の形質変化を示す。スケールは50μmである。

図2は、実施例3において得られた遺伝子組換え体毒素による細胞形態変化を示す。aはヒラ細胞の陰性コントロールによる6時間後。b、cは組換え体M毒素5nM添加3時間後、6時間後のヒラ細胞。dは陰性コントロールの6時間後のCRL7407(ATCC)胎児正常胃細胞。e、fは組換え体M毒素5nM添加3時間後、6時間後のCRL7407細胞。

図3は、実施例3における各種癌細胞のM毒素に対する感受性を示す。WST

法を用いて計測した。X 軸は M 毒素の基質中の濃度、Y 軸は波長 415nm 光による吸光度を直接、あるいは陰性コントロールを 100%とした場合の相体割合で示す。HLF：ラット肝癌、colon26：マウス大腸癌を示す。

図 4 は図 3 と同様に、T24：ヒト膀胱癌、OVK18：ヒト卵巣癌、KLM-1：ヒト膵癌、A-549：ヒト肺癌、Ca9-22：ヒト歯肉癌、CRL1500：ヒト乳癌を示す。

図 5 は実施例 8 で行われたモノクローナル抗体のウェスタンブロッティングを示す。全てハイブリドーマ細胞の培養上清の希釈倍率は 20 倍である。

図 6 は実施例 9 において、吸着剤としてアルギン酸カルシウムを用いた場合の M 毒素活性を示す。陰性コントロールは基質として 10mM トリス pH7.7 のみ、陽性コントロールは基質と M 毒素 10mM を含む。X 軸はアルギン酸カルシウムカラムを通過する各フラクションである。各フラクションの M 毒素濃度は平均 10nM であり、いずれか 1 つは少なくとも 10nM を超える。赤血球の破壊が起こると溶液中のヘモグロビン濃度が上昇し、Y 軸においてその 415nm 吸光度が示される。

図 7 は実施例 10 で得られた吸着作用による M 毒素阻害活性を示す活性炭のヒーラ細胞における%生存率を示す。X 軸は各フラクションの溶出液を示し、M 毒素濃度は平均 10nM であり、いずれか 1 つは少なくとも 10nM を超える。Y 軸は各フラクションの溶液の毒性を WST 法で計測したものを陽性コントロールで除したものの 100 分率である。

図 8 は図 7 と同様に、実施例 10 で得られた吸着作用によるヒーラ細胞における M 毒素阻害活性を示すアルギン酸カルシウムおよび CM-セルロースの%生存率を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質は、ヘリコバクターピロリにおける細菌株、例えば NCTC 11637, NCTC 11916, DT 61A, NCTC 11639, R85-13 6P, R85-13-12F, R85-13-11P, T81213-NTB, J99、4、U2-1、85D08、MC903、MC123、Tx30a、26695、UA 1182 等に由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

イ
チ
ノ

配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。本発明の配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列と

5 実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。実質的に同質の活性としては、例えば、細胞増殖阻害活性、細胞障害活性あるいは細胞死をもたらす活性などがあげられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）

10 同質であることを示す。従って、細胞障害などの活性が同等（例、約 0.1~100 倍、好ましくは約 0.5~10 倍、より好ましくは約 0.5~2 倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。細胞増殖阻害活性、細胞障害活性あるいは細胞死をもたらす活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

15

また、本発明のタンパク質としては、例えば、配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列中の 1~150 個（好ましくは、1~50 個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列；配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列に 1~100 個（好ましくは、1~50

20 個（より好ましくは、1~30 個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列；配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列に 1~50 個（好ましくは、1~30 個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列；配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列中の 1~50 個（好ましくは、1~30 個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列；またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムチンも含まれる。前記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

25

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端が N 末端（アミノ末端）、右端が C 末端（カルボキシル末端）である。配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、

C末端が通常カルボキシル基 ($-COOH$) またはカルボキシレート ($-COO^-$) であるが、C末端がアミド ($-CONH_2$) またはエステル ($-COOR$) であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基である。本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基 (またはカルボキシレート) を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば前記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基 (例、メチオニン残基) のアミノ基が保護基 (例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など) で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基 (例えば $-OH$ 、 $-SH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など) が適当な保護基 (例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など) で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質と同様の活性 (例、細胞増殖阻害または細胞増殖阻害など) を有するものであればいかなるものでもよい。例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列中の少なくとも20%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上のアミノ酸配列を有し、細胞増殖阻害活性、細胞障害活性あるいは細胞死をもたらす活性を有するペプチドなどが用いられる。また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1~5個 (好ましくは、1~3個) のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1~10個 (好ま

しくは、1～5個（より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1～5個（好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

- 5 また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-COOH$ ）またはカルボキシレート（ $-COO^-$ ）であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド（ $-CONH_2$ ）またはエステル（ $-COOR$ ）（Rは前記と同意義を示す）であってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護
- 10 基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。また、本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原として用いることができるので、必ずしも細胞増殖阻害活性または細胞障害活
- 15 性等を有する必要はない。

- 本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のタンパク質またはその塩は、前述したヘリコバクターピロリの種々の菌株の菌体より自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後述するタンパク質をコードするDNA
- 20 を含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヘリコバクターピロリの種々の菌株の菌体から製造する場合、菌体を超音波破碎などにより菌体内タンパク質を遠心分離した後、硫酸沈殿などで抽出を行ない、該抽出液をイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み
- 25

合わせることににより精製単離することができる。

- 本発明のタンパク質、部分ペプチド、もしくはそれらの塩、またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmoc アミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそれらのアミド体を取得する。前記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物または HOBt エステルあるいは HOOBt エステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

- 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応

温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ~ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常 1.5~4 倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

- 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、*t*-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmoc などが用いられる。カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、*t*-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C1-6）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメ

チル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、
- 5 パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。前記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は前記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。
- 10
15
20

- 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、
- 25 カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を前記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については前記と同様で

10
①
/

ある。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、前記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。タンパク質のエステル体を得るには、
5 例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

- 本発明の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造
10 することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下に記載された方法があげられる。
15 M.Bodanszky および M.A.Ondetti、Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966 年); Schroeder および Luebke、The Peptide, Academic Press, New York (1965 年); 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年); 矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、(1977 年); 矢島治明監修、続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、広
20 川書店。また、反応後は通常の前記法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。前記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる
25 方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のタンパク質をコードする DNA としては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、前記した細胞・組織由来の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれ

でもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より totalRNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する)

- 5 によって増幅することもできる。本発明のタンパク質をコードする DNA としては、例えば、配列番号 2 で表わされる塩基配列を含有する DNA、または配列番号 2 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、細胞障害活性など）を有するタンパク質をコードする DNA などであれば何でもよい。

- 10 より具体的には、配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号 2 で表わされる塩基配列を有する DNA などが用いられる。

- 本発明の部分ペプチドをコードする DNA としては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、前記した細胞・組織由来の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のい
- 15 ずれでもよい。本発明の部分ペプチドをコードする DNA としては、例えば、配列番号 2 で表わされる塩基配列を有する DNA の部分塩基配列を有する DNA、または配列番号 2 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイ
- 20 ブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする DNA の部分塩基配列を有する DNA などが用いられる。

- 本発明のタンパク質または部分ペプチド（以下、これらタンパク質等をコードする DNA のクローニングおよび発現の説明においては、これらタンパク質等を
- 25 単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードする DNA のクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成 DNA プライマーを用いて自体公知の PCR 法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだ DNA を本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードする DNA 断片もしくは合成 DNA を用いて標識したもののハイブリダイゼ

ーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、Molecular Cloning、2nd、J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989 に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutanTM-G（宝酒造（株）製）、MutanTM-K（宝酒造（株）製）などを用いて、Gapped duplex 法や Kunkel 法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATG、GTG、TTGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pET30）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、入ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40初期プロモーター、HIV・LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア

属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neorと略称する場合がある、G418耐性）、カナマイシン耐性遺伝子等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、組換え体細胞をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1・DH5 α (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 60, 160(1968))、JM103 (Nucleic Acids Research,

12
2
1

Vol.9, 309(1981))、J A 2 2 1 (Journal of Molecular Biology, Vol. 120, 517(1978))、H B 1 0 1 (Journal of Molecular Biology, Vol. 41, 459(1969))、C 6 0 0 (Genetics, Vol. 39, 440(1954)) などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 (Gene, 5 Vol.24, 255(1983)), 2 0 7 - 2 1 (Journal of Biochemistry, Vol.95, 87(1984)) などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H 2 2, A H 2 2 R-, N A 8 7 - 1 1 A, D K D - 5 D, 2 0 B - 1 2、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N C Y C 1 9 1 3, N C Y C 2 0 3 6、ピヒア パストリス (*Pichia pastoris*) K M 7 1 などが用いられる。 10

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; S f 細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来の M G 1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High FiveTM 細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; B m N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、In Vivo, 13, 213-217(1977)) などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、Nature, Vol. 315, 5 9 2 (1 9 8 5)〕。動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S - 15 7, Vero, チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O 細胞と略記), d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O (d h f r -) 細胞と略記), マウス L 細胞, マウス A t T - 2 0, マウスミエローマ細胞, ラット G H 3, ヒト F L 細胞などが用いられる。さらに、各種の正常ヒト細胞、例えば肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髓細胞、メサ 25 ンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞 (例、マクロファージ、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など)

などを用いることも可能である。エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.69, 2110(1972)や Gene, Vol. 17,107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, Vol. 168, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, Vol. 194, 182-187(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.75, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。
- 10 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル、263-267(1995) (秀潤社発行)、Virology, Vol. 52, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、
- 15 培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物
- 20 質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

- エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 (Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, Vol. 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972) が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 15~43°Cで約 3~24 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 30~40°Cで

約 6～24 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 (Bostian, K.L.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, 4505(1980))や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地 (Bitter, G. A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.81, 5330(1984))があげられる。培地の pH は約 5～8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20℃～35℃で約 24～72 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195, 788(1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2～6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27℃で約 3～5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5～20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 (Science, Vol.122, 501(1952))、DMEM 培地 (Virology, Vol.8, 396(1959))、RPMI 1640 培地 (The Journal of the American Medical Association, Vol.199, 519(1967))、199 培地 (Proceeding of the Society for the Biological Medicine, Vol.73, 1(1950)) などが用いられる。pH は約 6～8 であるのが好ましい。培養は通常約 30℃～40℃で約 15～60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。
- 前記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-100TM などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・

精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、疎水性クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の存在または活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

- 本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらタンパク質等を単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

モノクローナル抗体の作製

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製：本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバ

A
X
/

ントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体

- 5 産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを
- 10 反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

- 15 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間
- 20 インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合
- 25 したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに

準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、前記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製：モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレ

15
78
K

イミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投

- 5 与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫
- 10 グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

- 本発明のタンパク質もしくは部分ペプチド等を含有する治療剤および本発明のタンパク質等は癌細胞障害活性を有しているので、疾患組織摘出（全摘出・部分摘出の双方を含むが、部分摘出が好ましい）とくに固定癌に対する治療医薬として使用することができる。本発明のタンパク質等を上記の治療・予防剤として使用
- 15 する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

- 本発明のタンパク質等の癌細胞増殖阻害活性は、自体公知の方法あるいは、細胞障害活性または細胞死をもたらす活性を、自体公知の方法等それに準じる方法などに従って測定することができ、後述の実施例に記載の方法で行なうことが好
- 20 ましい。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる
- 25 化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の細胞障害活性を阻害する活性あるいは癌細胞増殖阻害を阻害する活性を有する化合物である。該化合物の塩としては、上記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが

用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性
5 溶液、懸濁液剤などとしてすることができる。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、一般的に成人（体重 60kg として）
10 においては、一日につき該化合物を約 0.1~100mg、好ましくは約 1.0~50mg、より好ましくは約 1.0~20mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、注射剤の形で通常成人（60kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01~30mg 程度、好ましくは約 0.1~20mg 程度、より好ましくは約 0.1~10mg 程度を静脈注射により
15 投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg 当たりに換算した量を投与することができる。

疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング：本発明のタンパク質等は細胞障害活性を有するため、本発明のタンパク質等の機能（例、細胞障害活性など）を促進する化合物またはその塩は、例えば、癌治療剤などの医薬として使用でき
20 るが、一方、本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物またはその塩は、例えば、胃炎、胃潰瘍の治療・予防剤などの医薬として使用できる。従って、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。すなわち、本発明は、（1）本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用い
25 ることを特徴とする、本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の機能（例えば、細胞障害活性など）を促進する化合物もしくはその塩（「（3）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング」において促進剤と略記する場合がある）、または本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の機能（例えば、細胞障害活性など）を阻害する化合物（「（3）疾病に対する医薬

候補化合物のスクリーニング」において阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法;本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含む一ニング法、促進剤または阻害剤のスクリーニング用キット((3)有すること、疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング」において本発明のスクリーニング用キットと称することもある)を提供し、より具体的には、例えば、(2)(1)本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に細胞(例、上記の各種温血動物組織(好ましくはヒトなど)由来の血球細胞または上記の癌細胞など)を接触させた場合と(ii)本発明のタンパク質もしくはその塩および細胞(例、上記の各種温血動物組織(好ましくはヒトなど)由来の血球細胞または上記の癌細胞など)を含む正常細胞または上記の癌細胞など)を含有することを特徴とする、促進剤または阻害剤のスクリーニング用キットを提供する。具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i)と(ii)の場合における、本発明のタンパク質等の細胞障害活性などを測定して、比較することを特徴とするものである。

本発明のタンパク質等の細胞障害活性、細胞増殖阻害活性あるいは細胞死を導く活性は、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法などに従って測定することができる。しかし、さらに具体的には、樹立された細胞株等を用いて、試験化合物を含む基質と、試験化合物を含まない基質である陰性コントロールと、M毒素を含む基質としての陽性コントロールの3者すべて、あるいはこれらのうち2者を用いた方法によって、細胞数は統計的有意を満たしうる条件下で比較して、これらの活性の有無、あるいは増減において、細胞障害活性や細胞増殖活性の阻害活性、あるいは細胞増殖活性や細胞障害活性の阻害活性をもつ特定の試料を検出する。用いる細胞としては、例えば、上記の各種温血動物組織(好ましくはヒトなど)由来の血球細胞を含む正常細胞または上記の各種温血動物癌細胞(例、子宮体癌、子宮内膜腫瘍、乳癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、胆嚢癌、大腸癌、前立

25

20

15

10

5

腺癌、肺癌、腎臓癌、神経芽腫、膀胱癌、悪性黒色腫、舌癌、歯肉癌、マウス線維芽細胞、ミドリザル腎細胞、ラット肝癌等)などが用いられる。

- 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質等を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のタンパク質等の標品を調製する。バッファーには、pH約4~10（望ましくは、pH約6~8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどの、本発明のタンパク質等と試験化合物との反応を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

- 具体的スクリーニング方法としてはスクリーニング検査後、①細胞変化を顕微鏡下で直接観察し血球計算盤等をもちいて数える方法、②細胞死により細胞内より溶液中に溶出するカリウム、ヘモグロビン等の変化をとらえる方法、③反応後残った生細胞数をテトラゾリウム塩等をもちいて計測する方法、④放射性標識物質をもちいて残った生細胞数を計測する方法、⑤細胞のアポトーシスの誘導により細胞死を確認する方法等が挙げられる。例えば、上記(ii)の場合における細胞障害活性が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上上昇させる試験化合物を本発明のタンパク質等の細胞障害活性を促進する化合物として、一方、上記(ii)の場合における細胞障害活性が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質等の細胞障害活性を阻害する化合物として選択することができる。これらは多種大量スクリーニング方法としても行いうる。以下に②として赤血球の溶血反応によるヘモグロビン測定法と③としてWST法をそれぞれ用いて、活性炭、CMセルロース、アルギン酸カルシウムが吸着剤として抗M毒素作用を示す化合物として選択された方法を示す。

また、これらの陰性コントロール、陽性コントロールおよび試験化合物を含む溶液を動物モデルで検討比較し、抗M毒素物質の動物レベルでの効果を確認することも可能であり、その場合、ひろく温血動物が使用可能である。とくにマウス、

ラット、イヌ、サルが用いられるが、感染モデルとしてスナネズミ、マウス、サルは有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施すること

- 5 ことができる。例えば、上記した本発明のタンパク質等を含有する医薬と同様にし
て、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁
液剤などとすることができる。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であ
るので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツ
ジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することが
10 できる。該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投
与ルートなどにより差異はあるが、例えば、疾患組織摘出後の組織再生剤として、
本発明のタンパク質等の機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成
人（体重 60kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1~100mg、好ま
しくは約 1.0~50mg、より好ましくは約 1.0~20mg 投与する。他の動物の場合も、
15 60kg 当たりに換算した量を投与することができる。

- 本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量：本発明の
タンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本
発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の
タンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用すること
20 ができる。すなわち、本発明は、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化
された本発明のタンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化さ
れた本発明のタンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明
のタンパク質等の定量法、および (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗
体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたの
25 ち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明
のタンパク質等の定量法を提供する。上記 (ii) の定量法においては、一方の抗
体が本発明のタンパク質等の N 端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタ
ンパク質等の C 端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモ

ノクローナル抗体と称する場合がある)を用いて本発明のタンパク質等の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 Fab' 、あるいは Fab 画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質等

- 5 の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、タンパク質量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適
- 10 に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、
- 15 リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン
- 20 系を用いることもできる。

- 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、ある
- 25 いはガラス等があげられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ(1次反応)、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよい

し時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本

- 5 発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質等のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。
- 10

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B

15 /F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。

- 本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検
- 20 液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。
- 25

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、

- 操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol.70 (Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol.73 (Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol.74 (Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol.84 (Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol.92 (Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol.121 (Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。
- 5 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質等を感度良く定量することができる。さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質等の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質等の濃度の増加がヘリコバクターピロリ感染者において検出された場合、例えば、胃炎、胃潰瘍、胃癌、心臓弁膜症、糖尿病、各種癌(例、子宮体癌、子宮内膜腫瘍、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胆嚢癌、腎臓癌、神経芽腫、膀胱癌、黒色腫等)などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質等を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明の
- 10 20 25
- タンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

本発明の抗体を含有する医薬本発明のタンパク質等の活性を中和する作用を有する本発明の抗体(中和抗体)は、例えば、胃炎、胃潰瘍、胃癌、心臓弁膜症、糖尿病、各種癌(例、子宮体癌、子宮内膜腫瘍、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌、



腎臓癌、神経芽腫、膀胱癌、黒色腫等)などの疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。本発明のタンパク質等に対する本発明のヒト化抗体は、例えば、胃炎、胃潰瘍、胃癌、心臓弁膜症、糖尿病、各種癌(例、子宮体癌、子宮内膜腫瘍、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌、腎臓癌、神経芽腫、膀胱癌、黒色腫等)などの疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。該

5 ヒト化抗体は、Nat Biotechnol, 14, 845-851. (1996)、Nat Genet. 15, 146-156. (1997)、PNAS, 97(2), 722-727 (2000)等に記載の方法に準じて作製することができる。以下、「(5) 本発明の抗体を含有する医薬」において、本発明の中和抗体およびヒト化抗体を本発明の抗体と総称する。本発明の抗体を含有

10 する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例

15 えば、成人の子宮内膜腫瘍患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常 0.01~20mg/kg 体重程度、好ましくは 0.1~10mg/kg 体重程度、さらに好ましくは 0.11~5 mg/kg 体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。本発明の抗体は、

20 それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング

25 錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

後述の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号 1〕 本発明のヘリコバクターピロリ 60190 由来タンパク質 (M毒素) のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号 2〕 配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヘリコバクターピロリ 60190 由来タンパク質 (M毒素) をコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号 3〕 実施例 3 で用いられたプライマー (合成) DNA の塩基配列を示す。

10 〔配列番号 4〕 実施例 3 で用いられたプライマー (合成) DNA の塩基配列を示す。

後述の実施例 3 で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) M toxin/pET30EK/LIC/DH5 α は、平成 14 年 10 月 17 日から日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 の独立行政法人産業技術総合研究所 (IPOD) 特許生物寄託センターに寄託番号 FERM BP-8218 として寄託されている。

15 また、後述の実施例 4 で得られたハイブリドーマ (hybridoma) クローン No.4 は BALB-c/P3U1/004-1G9 として、平成 14 年 10 月 23 日から日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 の独立行政法人産業技術総合研究所 (IPOD) 特許生物寄託センターに寄託番号 FERM BP-8222 として寄託されている。またハイブリドーマ (hybridoma) クローン No.101 は BALB-c/P3U
20 1/101-1C10 として、平成 14 年 10 月 23 日から日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 の独立行政法人産業技術総合研究所 (IPOD) 特許生物寄託センターに寄託番号 FERM BP-8223 として寄託されている。またハイブリドーマ (hybridoma) クローン No.116 は BALB-c/P3U1/116-5D7 として、平成 14 年 10 月 23 日から日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 の独立行政法人産業技術総合研究所 (IPOD) 特許生物寄託センターに寄託番号 FERM BP-8224 として寄託されている。

実施例

以下に、実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれ限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラ

ー・クローニング (Molecular Cloning) に記載されている方法に従った。

実施例 1 ヘリコバクターピロリから本発明の毒素を精製抽出する方法

ヘリコバクターピロリはすでに確立されている分離株を入手（例えば、American Type Culture Collection から入手）するか、または臨床検体から分離培養することができる。本実施例ではヘリコバクターピロリ 60190 の分離株を用いた。この分離株を、まず Brain Heart Infusion 寒天培地 (Difco 社製) に 5% 牛血清 (Sigma 社製) を添加した寒天培地を用いて、温度 37°C、湿度 90% 以上の微好気性条件下 (CO₂ 5-10%) において 2-5 継体 (約 1-2 週間) 培養した。顕微鏡下で死滅またはココイド化していないことを確認し、良好な増殖を確認した後、Brain Heart Infusion 寒天培地 (Difco 社製) に血清を添加せず 5% 2, 6-ジ-0-メチルーβ-シクロデキストリンを添加したものに移植した。前記と同じ条件下で培養と生育状態を確認した後、2, 6-ジ-0-メチルーβ-シクロデキストリン濃度を漸次 2%、1%、0.5% としたものに移植していく。

ついで、0.5% 2, 6-ジ-0-メチルーβ-シクロデキストリン添加の Brain Heart Infusion 液体培地にて温度 37°C、微好気性条件下、100-120rpm にて約 16 時間振盪培養後、10000×g、20 分間遠心しベレット状の菌体を得た。これを 10mM Tris-HCl pH7.7 (以下 A 緩衝液と呼ぶ。pH は目的タンパク質が pI6.08 であるので約 pH6.1 以上であればよい) の緩衝液中で超音波破碎し、-80°C に一昼夜保存後、再度、超音波破碎したものを、100000×g、60 分間超遠心し、三層に分離した最上層部分のみを抽出した。

この抽出液に対して 70% 硫酸で粗精製を行った。これにより得た抽出液を比較的粒子口径の大きなビーズをもってなる陰イオン交換樹脂にてイオン交換クロマトグラフィー (Amersham Pharmacia Biotech AB の DEAE Sephacel) を行った。平衡緩衝液には A 緩衝液、溶出液には A 緩衝液に濃度 0.3M の塩 NaCl を加えたものを用いた。これらにより濃度勾配抽出を行い、各フラクションの適量を用いて、ヒラ細胞を植えたウェルに滴下して各ウェル中の細胞の生存率を評価した。評価は WST 試薬 ((株) 同仁化学研究所 Cell Counting Kit) を用い行った。コントロールと比較して、有意に生存率の少ない数値を示した画分と、比較的蛋白量の増加曲線の一致する画分を、電気泳動の結果とも合わせて評価し、次の精製工

程に用いるサンプル画分とした。

- 次に、次回と分離システムの異なるクロマトグラフィーである、疎水性クロマトグラフィー (Amersham Pharmacia Biotech AB の Phenyl Sepharose CL-4B) を選択した。平衡緩衝液には 10mM リン酸緩衝液に 1M 硫酸アンモニウムを加えたものを用い、溶出緩衝液には 10mM リン酸緩衝液に 40%エチレングリコールを用いた。濃度勾配溶出を行った後、各サンプルの評価は前記と同様に行った。

- さらに、前記工程より抽出されたサンプルを、再び粒子口径の比較的小さなビーズをもってなる陰イオン交換クロマトグラフィー (Amersham Pharmacia Biotech AB の RESOURCE Q) で抽出した。平衡緩衝液には A 緩衝液、溶出緩衝液には A 緩衝液に 1 M の塩 NaCl を加えたものを用いた。これらにより最終的に分子量約 41000 の単一タンパク質のバンドを得た。なお、クロマトグラフィーの種類と順序は、上述とことなることも可能であり、また、さらに追加することも可能である。

- 得られた単一のバンドをクーマシーブリリアントブルー染色後、プロッティング装置でニトロセルロース膜または (ポリビニリデンジフルオリド) 膜に転写し、アミノ酸シーケンサーで解析した。その結果、先に記述したように、登録データベース (ヘリコバクターピロリ 22695) の遺伝子座 HP1037 の N 末端アミノ酸配列と 95% (20 塩基中 19 塩基) の割合で一致した。(図 1)

実施例 2 遺伝子工学的調整法によるアミノ酸配列および DNA 配列

- 本実施例ではヘリコバクターピロリ 60190 の分離株を用いたが、上述のように、菌株の異なるヘリコバクターピロリ 22695 の全遺伝子解析がすでにおこなわれており、TIGR(The Institute for Genomic Research)のデータベースを検索することにより、相同する遺伝子座を推定しうる。これによりヘリコバクターピロリ 22695 の遺伝子座 HP1037 が相同タンパク質をコードしていることが判明した。

- これをもとに本発明の毒素のクローニングを行った。すなわち、ヘリコバクターピロリ 60190 をテンプレートとして、先ず便宜的に遺伝子座 HP1037 と、その上流の遺伝子座 HP1036 および下流の遺伝子座 HP1038 を基にした適当なプライマーを複数組 (5'側と 3'側) 作製してシーケンスを行った。DNA ポリメラーゼは、校正機能のあるブルーフリーディングのものを使用し、各プライマーの組

は十分互いのプライマー部分をも包含するように構成し、5'側からと3'側から複数回シーケンスが行われるようにした。このようにして得られたDNA配列を、配列表の配列番号2に示した。また、このアミノ酸配列を、配列番号1に示した。

5 実施例3

遺伝子組換えによる毒素タンパク質の発現実験、

- 遺伝子組換え実験には大腸菌を用いた。ベクターは、pET-30EK/LICベクター (Novagen社) を、発現用大腸菌はBL21(DE3)を用いた。挿入遺伝子は、実施例2でクローニングしたヘリコバクターピロリ60190由来の毒素タンパク質をコードしているものにsense鎖の5'側にGACGACGACAAGが付加された配列番号3をプライマーとして、またantisense鎖の5'側にはGAGGAGAAGCCCGGTTAが付加された配列番号4をプライマーとしてPCR法により作製した。この作製した挿入遺伝子を25mM dATPと100mM DTTの存在下でT4 DNAポリメラーゼによりベクターのLIC siteに合うように削りこみをおこなったのち、25mM EDTA存在下で加温した。
- 10 作製された組換え体を再度シーケンスし、配列番号1と同一であることを確認した後、発現用大腸菌BL21(DE3)へ形質転換し、30 µg/ml カナマイシンを含むLB培地で培養した。

- OD₆₀₀が約0.4ぐらいになるまで37°C、250rpmで振盪培養し、イソプロピルーベーターチオガラクトシドを終濃度1mMとなるように加え、さらに2時間同様に振盪する。融合タンパク質は封入体を形成していたため、この培養液から大腸菌を遠心回収し、BugBuster試薬およびBenzonase Nuclease (ともにNovagen社)により当該タンパク質の封入体を得た。本タンパク質をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) 電気泳動法で分離し、銀染色により、単一な該当するバンドを確認した後、リフォールディングレヒーラ細胞および他の
- 20 温血動物細胞を用いて、WST試薬 ((株) 同仁化学研究所 Cell Counting Kit) によりコントロールとの比較を行った。その結果、生存率に有意な差を認め、発現タンパク質においても精製タンパク質と同等の活性を認めるに至った。さらにヒト子宮頸癌であるヒーラ細胞だけでなく、正常ヒト胃細胞においても同様な活性をもつことを確認した。(図2) またヒトの他の組織のみならず、哺乳類細胞一
- 25

般に広範な活性を有することも確認された。(図3、図4)

実施例4

モノクローナル抗M毒素抗体の作製：BALB/C マウス 240 μ g の免疫原リフォー
ルディング済み発現M毒素を数カ所にわけて2回皮下投与を行なった。最終免疫
5 4日後のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫ろ過し、イーグル
ズ・ミニマム・エッセンシャルメデイウム (MEM) に浮遊させ、脾臓細胞浮遊液
を得た。細胞融合に用いる細胞として、BALB/C マウス由来ミエローマ細胞 P3-
X63. Ag 8. U1 (P3U1) を用いた〔カレントトピックスインマイクロバイオロジ
ーアンドイムノロジー、81、1 (1978)〕。細胞融合は、原法〔ネイチャー、256、
10 495 (1975)〕に準じて行なった。すなわち、脾臓細胞および P3U1 をそれぞれ血
清を含有しない MEM で3度洗浄し、脾臓細胞と P3U1 数の比率を 6.6 : 1 になるよ
う混合して、750 回転で 15 分間遠心を行なって細胞を沈殿させた。上清を充分
に除去した後、沈殿を軽くほぐし、45%ポリエチレン・グリコール (PEG) 6000
(和光純薬 (株)) を 0.3ml 加え、37°C 温水槽中で 7 分間静置して融合を行なっ
15 た。融合後細胞に徐々に MEM を添加し、合計 15 ml の MEM を加えた後 750 回転 15
分間遠心して上清を除去した。この細胞沈殿物を 10% 牛胎児血清を含有する GIT
メデイウム (和光純薬 (株)) (GIT-10%FCS) に P3U1 が 1ml 当り 2×10^5 個にな
るように浮遊し、24 穴マルチディッシュ (岩城 (株) 製) に 1 ウェル 1ml ずつ
168 ウェルに播種した。播種後、細胞を 37°C で 5% 炭酸ガスインキュベーター中
20 で培養した。24 時間後 HAT (ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、アミノプテリン 4×10^{-7} M、
チミジン 1.6×10^{-3} M) を含んだ GIT-10%FCS 培地 (HAT 培地) を 1 ウェル当り
1ml ずつ添加することにより、HAT 選択培養を開始した。HAT 選択培養は、培養
開始 4、7 日後に旧液を 1ml 捨てたあと、1ml の HAT 培地を添加することによ
り継続した。ハイブリドーマの増殖は、細胞融合後 9 日目で認められ、上清を採
25 取した。培養上清中の抗体価は、以下の要領で測定した。すなわち、抗マウスイ
ムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルに培養上清 100 μ l および
バッファー C で 200 倍に希釈した HRP 標識化 M 毒素 100 μ l を加え 4°C で一晚反
応させた。該プレートを PBS で洗浄したのち、抗マウスイムノグロブリン抗体結
合マイクロプレートを作製するため、まずヤギ抗マウスイムノグロブリン抗体

223
f

- (IgG 画分、ダコ社製) を $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む 0.1M 炭酸緩衝液、 $\text{pH}9.6$ 溶液を 96 ウェルマイクロプレートに $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C で 24 時間放置した。次に、プレートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、 $\text{pH}7.4$) で洗浄したのち、ウェルの余剰の結合部位をふさぐため 25% ブロックエース (雪印乳業社製) および $0.1\%\text{NaN}_3$ を含む PBS、 $\text{pH}7.2$ を $300\mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C で少なくとも 24 時間処理した。
- 5 上記、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファ EC [$0.2\%\text{BSA}$ 、 0.4M NaCl 、 0.4% ブロックエース、 $0.05\%\text{CHAPS}$ [(コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] プロパンスルホン酸]、 2mM EDTA および $0.1\%\text{NaN}_3$ を含む 0.02M リン酸緩衝液、 $\text{pH}7.0$] で希釈したマウス抗血清 $100\mu\text{l}$
- 10 1 を加え 4°C で 16 時間反応させた。次に、該プレートを PBS、 $\text{pH}7.4$ で洗浄したのち、HRP 標識化 TGC-839 ペプチド(26-34) $100\mu\text{l}$ を加え室温で 7 時間反応させた。バッファ C [$1\%\text{BSA}$ 、 0.4M NaCl 、および 2mM EDTA を含む 0.02M リン酸緩衝液、 $\text{pH}7.0$] で 100 倍に希釈した上記実施例 3 で作製した HRP 標識化リフォールディング毒素タンパクを調製した。次に、該プレートを PBS、 $\text{pH}7.4$ で洗浄
- 15 したのち、固相上の酵素活性を TMB マイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム (KIRKEGAARD & PERRY LAB. フナコシ薬品取り扱い) $100\mu\text{l}$ を加え室温で 10 分間反応させることにより測定した。反応を 1M リン酸 $100\mu\text{l}$ を加え停止させたのち、 450nm の吸光度 (Abs.450) をプレートリーダー (MTP-120、コロナ社製) で測定した。これらの方法に従い固相上の酵素活性を測定した。その結果、123
- 20 ウェルの中から抗体価の認められた 18 ウェルを選択し、ハイブリドーマを凍結保存した。さらに 6 ウェルのハイブリドーマ、No.4、No.53、No.61、No.76、No.101 および No.116 については、希釈法によるクローニングに付した。クローニングに際しては、フィーダー細胞として BALB/C マウスの胸腺細胞をウェル当り 5×10^5 個になるように加えた。クローニング後、培養上清中の抗体価を同様の方法
- 25 に従って測定した。陽性クローンは、No.4、No.101 および No.116 であった。これらを発現 M 毒素の抗体産生ハイブリドーマとした。

実施例 5

モノクローナル抗体のクラス・サブクラスの決定:

実施例 4 記載の方法に従い、抗ウサギ IgG 抗体結合マイクロプレートを作製

- した。すなわち、ヤギ抗ウサギイムノグロブリン抗体 (IgG 画分、ダコ社製) を 100 μ g/ml 含む 0.1 M 炭酸緩衝液、pH9.6 溶液を 96 ウェルマイクロプレートに 100 μ l ずつ分注し、4°C で 24 時間放置した。次に、プレートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH7.4) で洗浄したのち、ウェルの余剰の結合部位をふさぐため 25%
- 5 ブロックエース (雪印乳業社製) および 0.1% NaN_3 を含む PBS、pH7.2 を 300 μ l ずつ分注し、4°C で少なくとも 24 時間処理した。次に、抗ウサギ IgG 抗体結合マイクロプレートに、バッファ EC 50 μ l およびバイオラッド社製アイソタイプタイピングキットに含まれるサブタイプ特異的抗体 100 μ l を加え、4°C で 1 日反応させた。プレートを PBS、pH7.4 で洗浄後、上記ハイブリドーマ培養上清
- 10 を加え、4°C で 1 日反応させた。プレートを PBS pH7.4 で洗浄後、バッファ C で 100 倍に希釈した上記実施例 3 で作製した HRP 標識化リフォールディング毒素タンパク質 100 μ l を加え室温で 6 時間反応させた。該プレートを PBS、pH7.4 で洗浄したのち、実施例 4 に記載の方法に従い固相上の酵素活性を測定した。その結果、これらのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のクラス・サブ
- 15 クラスは No.4 (IgG1)、No.101 (IgG2b)、No.116 (IgG2a) であった。

実施例 6

- ハイブリドーマのマウス腹水化：ハイブリドーマ、No.4、No.101 および No.116 についてマウス腹水化を実施した。あらかじめミネラルオイル 0.5ml を腹腔内投与されたマウス (BALB/C、雌) に $1 \sim 3 \times 10^6$ セル/匹の上記ハイブリドーマを
- 20 腹腔内投与したのち、6~20 日後に抗体含有腹水を採取した。モノクローナル抗体は得られた腹水よりプロテイン A カラムにより精製した。即ち、腹水約 25 ml を等量の結合緩衝液 (3.5M NaCl、0.05% NaN_3 を含む 1.5M グリシン、pH9.0) で希釈したのち、あらかじめ結合緩衝液で平衡化したリコンビナントプロテイン A アガロース (Repligen 社製) カラムに供し、特異抗体を溶離緩衝液 (0.05% NaN_3
- 25 を含む 0.1M クエン酸緩衝液、pH3.0) で溶出した。溶出液は PBS、pH7.4 に対して 4°C、2 日間透析したのち、0.22 μ m のフィルター (ミリポア社製) により除菌濾過し 4°C あるいは -80°C で保存した。

実施例 7

ポリクローナル抗 M 毒素抗体の作製

23

本発明の細胞障害タンパク質M毒素 4.1mg をフロイント完全アジュバントと混合してウサギに皮下免疫し、1週間後さらに同量をフロイント不完全アジュバントと混合して皮下免疫した。免疫後、採血した血液は遠心によって血球成分を除去し、抗血清を得た。

5 実施例8 M毒素の Western Blotting による解析:

実施例3で得た培養上清に、2-メルカプトエタノールを含む SDS-Sample Buffer を加えて Peptide-PAGE (TEFCO) で電気泳動し、これを PVDF 膜 (Amersham) に電氣的に移した。一次抗体として、実施例4、実施例6で得た各抗体 (2 μ g/ml) を用い、二次抗体には HRP (Horseradish peroxidase) 標識抗ウサギおよび
10 抗マウス IgG 抗体 (2000 倍希釈; Dako) を用いた。発色は ECL Western Blot Detection System (Amersham) を用いて行なった。その結果、各1次抗体は該発現タンパク質を認識することを確認した。(図5)

実施例9

活性炭 (径 0.2~0.1mm)、CMセルロース、アルギン酸カルシウムをそれぞれ
15 0.5ml 体積ずつカラムに充填し、トリス緩衝液 10mM pH7.7 で平衡化後、0.5ml のリフォールディングした活性を有するM毒素 400nM をそれぞれのカラムに添加した状態でカラムを閉栓し、25°C、60 分間静置。その間、トリス緩衝液のみと、トリス緩衝液に同様のM毒素を含有したものを、同条件で静置した。その後、すべてのカラムを開栓して、100 μ l ずつ滴下したものを分取し、さらにトリス緩衝液を各カラムに 0.5ml ずつ添加して 100 μ l ずつ分取した。赤血球は健常成人
20 の全血を上清が透明になるまで 2-3 回、800 $\times$ g、10 分間遠心し、沈殿した赤血球 10 μ l 体積を 10mM トリス緩衝液 990 μ l に添加したものを陽性コントロールとし、同じく 10 μ l を 0.9%食塩 10mM トリス緩衝液に添加したものを陰性コントロールとし、上記のカラムより分取されたサンプルに赤血球を 100 分の 1 体積
25 くわえたものと比較した。比較はマルチプルプレートリーダー (Biorad) で溶出したヘモグロビン相対濃度を吸光度 415nm により計測することによりおこなった。(図6)

実施例10

実施例9でえられた各カラムからの分画にヒーラ細胞 (ヒト子宮頸癌細胞) が

曝され、細胞生存率をテトラゾリウム塩を用いた測定法のひとつであるWST法により測定した。ヒーラ細胞は96穴プレートに24時間、一穴当たり10000個ずつ培養する。培養液のみの陰性コントロールと各被検液、および20nMの濃度をふくむ陽性コントロールのそれぞれの各穴に加え、を37°C、12時間培養する。

- 5 その後、Cell Counting Kit (株式会社同仁研究所) を用いて、WST法により検出される細胞生存率を415nm波長の吸光度で計測した。(図7、図8)

産業上の利用の可能性

- 10 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドなどは、例えば、癌の治療剤として使用することができる。また本発明の抗体は、被検患者から採取の血液、組織、尿、便中の本発明タンパク質の同定ならびにヘリコバクターピロリによる感染証明に換えることができる。また本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。さらに、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングするための試薬として有用である。

24

請求の範囲

1. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列に対する同一性を少なくとも 70% 以上有するタンパク質からなることを特徴とする細胞障害タンパク質。
2. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と等しい細胞障害活性を有することを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質の部分ペプチド。
3. ヘリコバクターピロリで産生される請求項 1 または 2 記載の細胞障害タンパク質。
4. 請求項 1 または 2 記載の細胞障害タンパク質をコードする配列番号 2 の DNA を含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養することを特徴とする請求項 1 または 2 記載の細胞障害タンパク質。
5. 形質転換体が独立行政法人産業技術総合研究所 (IPOD) に寄託番号 FERM BP-8218 で寄託されている請求項 4 記載の細胞障害タンパク質。
6. 請求項 1 または 2 記載の細胞障害タンパク質を用いる抗腫瘍剤。
7. 請求項 1 または 2 記載の細胞障害タンパク質を哺乳類に免疫して得られる細胞障害タンパク質に特異的なモノクローナル抗体。
8. 寄託番号 FERM BP-8222 のハイブリドーマクローンを用いて産生される請求項 7 記載のモノクローナル抗体。
9. 寄託番号 FERM BP-8223 のハイブリドーマクローンを用いて産生される請求項 7 記載のモノクローナル抗体。
10. 寄託番号 FERM BP-8224 のハイブリドーマクローンを用いて産生される請求項 7 記載のモノクローナル抗体。
11. 請求項 1 または 2 記載の細胞障害タンパク質を哺乳類に免疫して得られる細胞障害タンパク質に特異的なポリクローナル抗体。
12. 請求項 7 から 11 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いる請求項 1 または 2 記載の細胞障害タンパク質を検出する方法および診断法。
13. 請求項 7 から 11 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いる請求項 1 または 2 記載の細胞障害タンパク質により惹き起こされる胃癌、胃炎、胃潰瘍の予防、治療剤。

14. 請求項1または2記載のタンパク質を用いることを特徴とする、請求項1または2記載のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物について、温血動物細胞を用いて陰性または陽性対照群との比較で、細胞増殖阻害活性、細胞障害活性あるいは細胞死により当該化合物をスクリーニングする方法。

5 15. 請求項1または2記載のタンパク質を含有してなる、請求項1または2記載のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

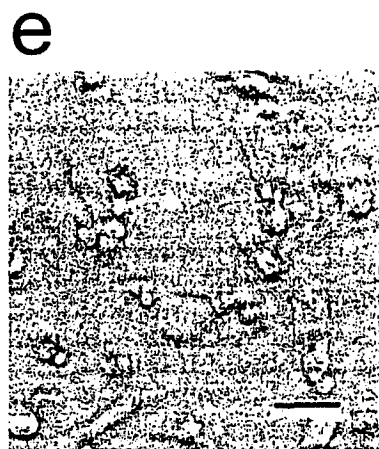
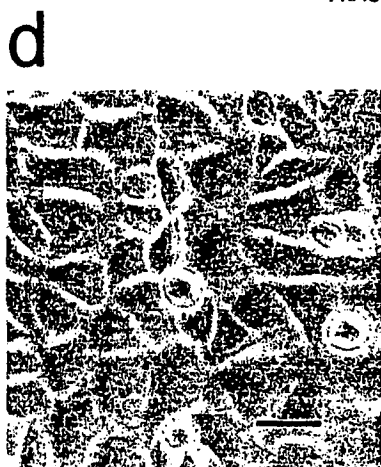
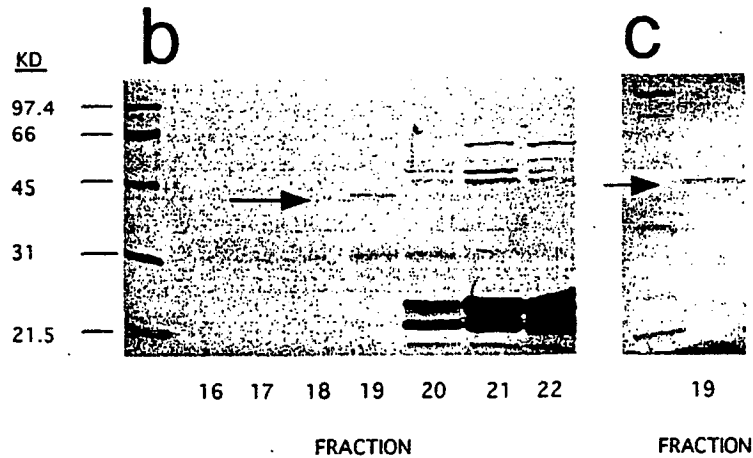
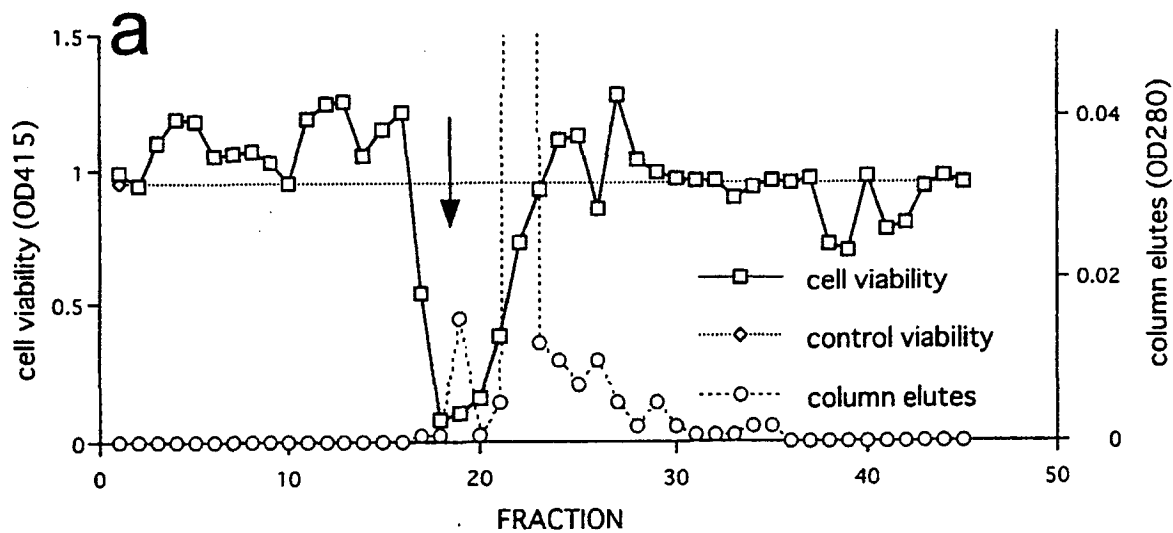
16. 請求項14記載のスクリーニング方法または請求項15記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1または2記載のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

17. 請求項1または2記載のタンパク質による温血動物細胞の細胞障害活性を阻害する活性を有する化合物またはその塩を含有する医薬。

18. 胃炎、胃潰瘍、胃癌および請求項14記載のスクリーニング方法または請求項15記載のスクリーニング用キットによって、M毒素で惹起されることの示
15 される疾患に対する予防・治療剤である請求項17記載の医薬。

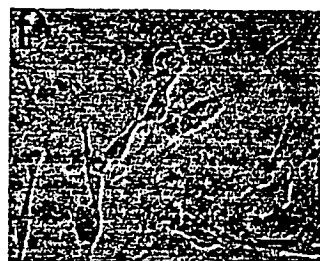
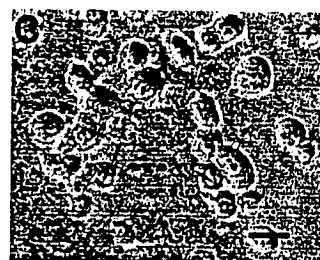
1 / 8

⊠1



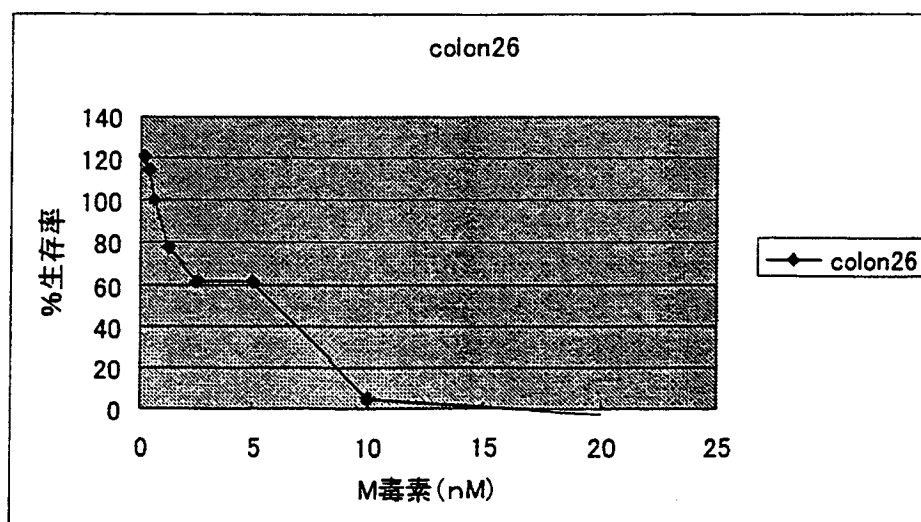
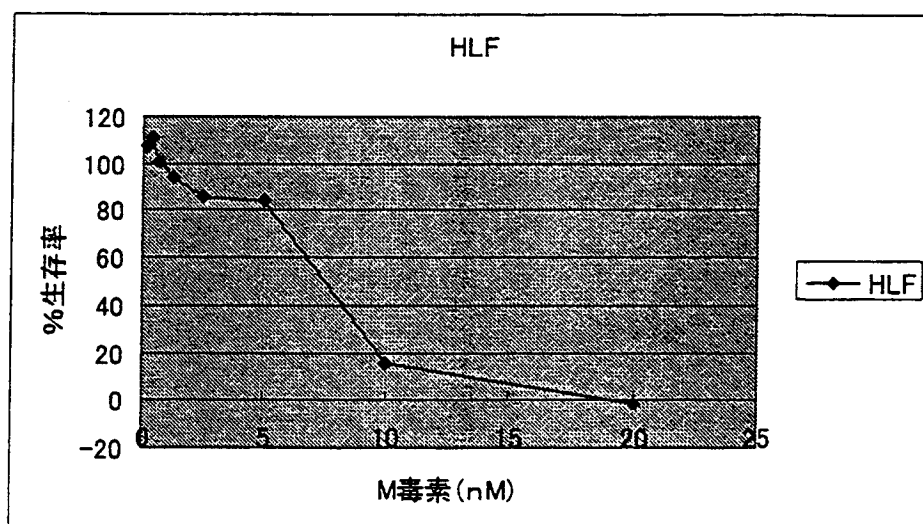
2 / 8

図2



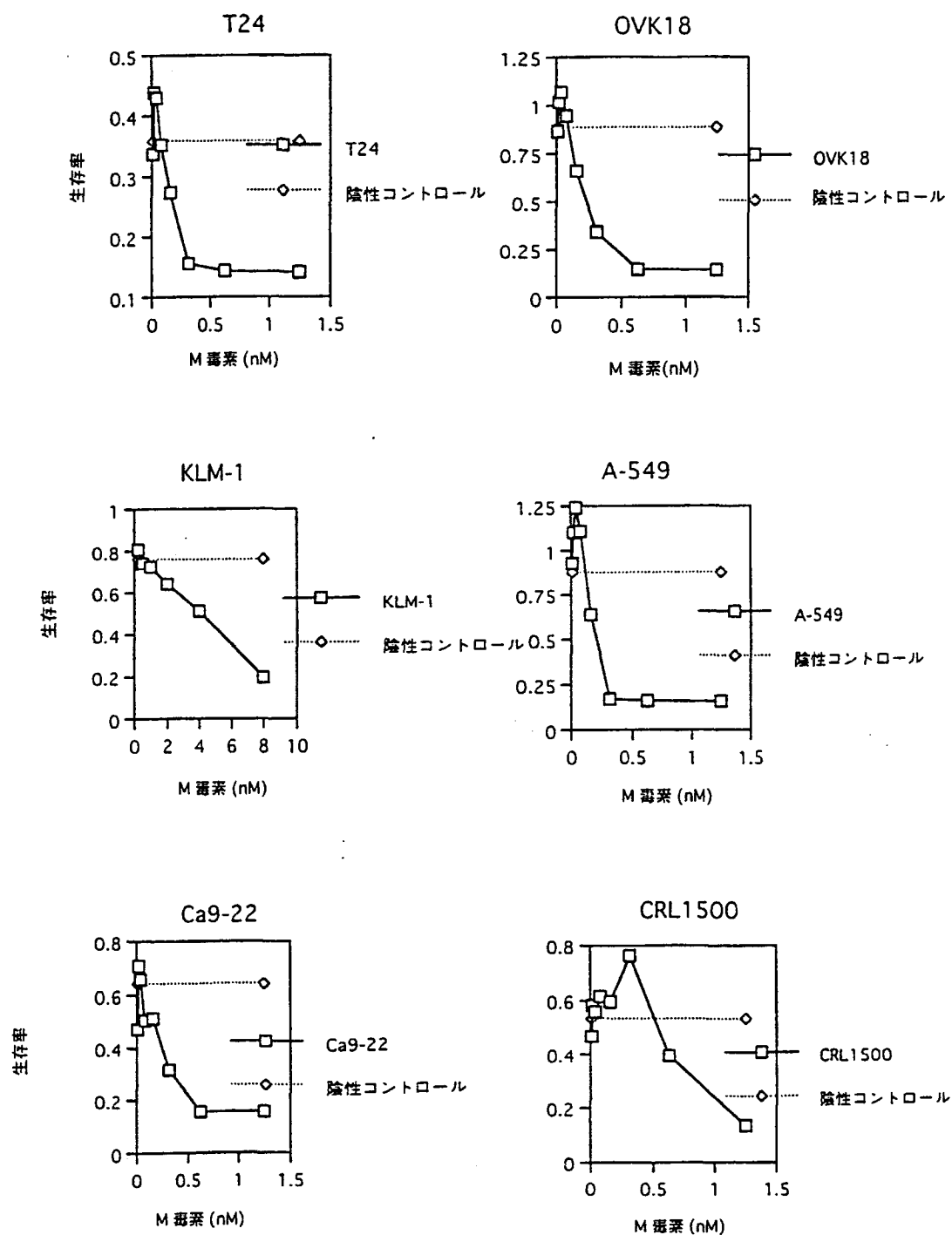
3 / 8

図 3



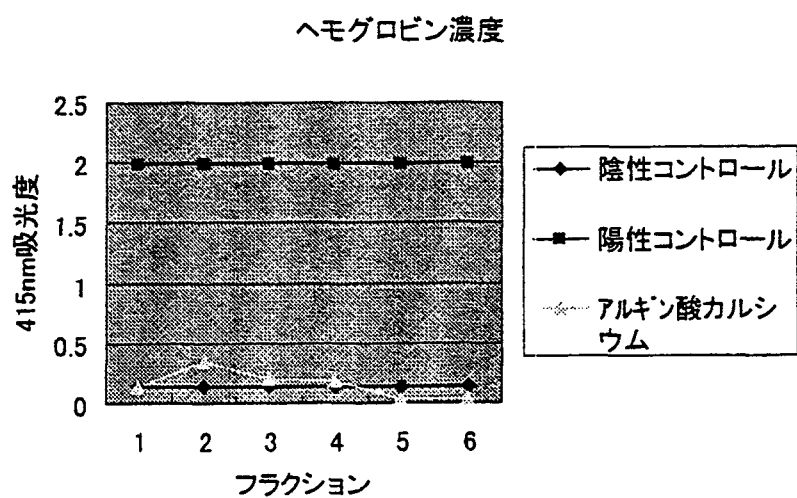
4 / 8

図 4



6 / 8

図 6

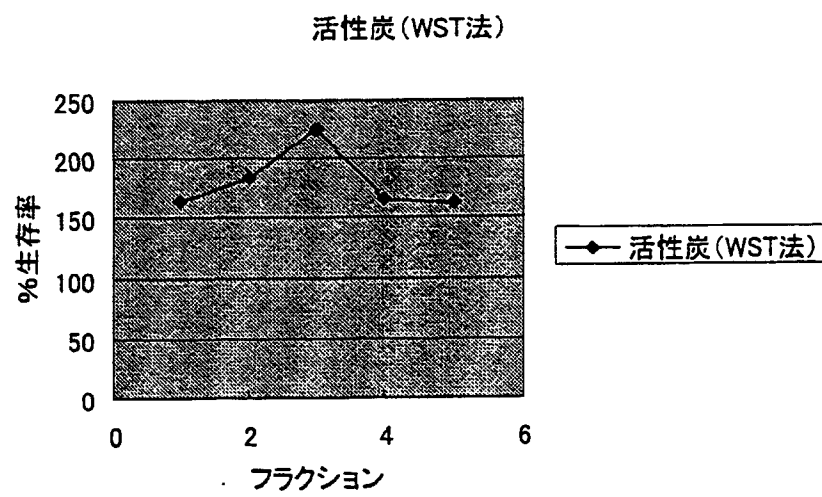


78

7

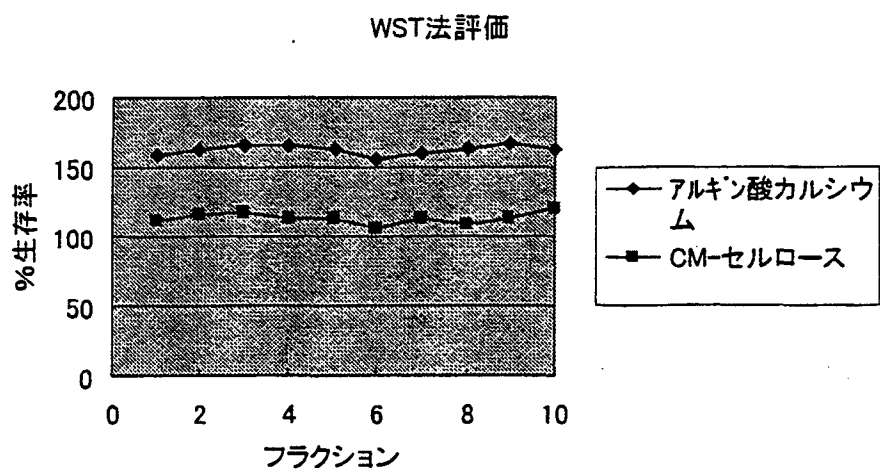
7 / 8

図 7



8 / 8

図 8



SEQUENCE LISTING

<110> Hiroyuki OHNO

<120> Cytotoxic Protein

<130> 200212050

5 <160> 4

<210> 1

<211> 357

<212> PRT

<213> Helicobacter pylori

10 <400> 1

Met Lys Gly Leu Glu Arg Glu Ser His Phe Thr Leu Asp Glu Asn Ala

1 5 10 15

Met Phe Phe Glu Cys Ala Tyr Ser Cys Asp Asn Ala Leu Phe Leu Gln

20 25 30

15 Leu Glu Asp Arg Ser Phe Phe Ile Thr Asp Ser Arg Tyr Thr Gln Glu

35 40 45

Ala Lys Glu Ser Ile Gln Pro Lys Asn Gly Val Leu Ala Glu Val Ile

50 55 60

Glu Ser Ser Asp Leu Val Gln Ser Thr Ile Asp Leu Ile Ala Lys His

20 65 70 75 80

Ser Val Lys Lys Leu Phe Phe Asp Pro Asn Gln Val Asn Leu Gln Thr

85 90 95

Tyr Lys Arg Leu Asp Ser Ala Ile Gly Asn Lys Val Ile Leu Glu Gly

100 105 110

25 Val Pro Ser Tyr His Arg Gln Lys Arg Ile Ile Lys Asn Asn His Glu

115 120 125

Ile Gln Leu Leu Lys Lys Ser Gln Ala Leu Asn Val Glu Ala Phe Glu

130 135 140

Asn Phe Ala Glu Tyr Val Lys Lys Ile Phe Asp Glu Lys Glu Ser Leu

~~2~~/₄

145 150 155 160
 Ser Glu Arg Tyr Leu Gln His Lys Val Lys Asp Phe Leu Thr Lys Glu
 165 170 175
 Gly Val Tyr Asp Leu Ser Phe Glu Pro Ile Leu Ala Leu Asn Ala Asn
 5 180 185 190
 Ala Ser Lys Pro His Ala Leu Pro Ser Ala Lys Asp Phe Leu Lys Ala
 195 200 205
 Glu His Ser Ile Leu Leu Asp Met Gly Ile Lys Tyr Glu Arg Tyr Cys
 210 215 220
 10 Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ala Phe Phe Asp Pro Lys Asp Phe Val Phe
 225 230 235 240
 Lys Arg Glu Gln Ser Phe Lys Asp Lys Glu Ser Gln Lys Ile Tyr Asp
 245 250 255
 Ile Val Lys Glu Ala Gln Glu Lys Ala Ile Ser Gly Ile Arg Ala Gly
 15 260 265 270
 Met Thr Gly Lys Glu Ala Asp Ser Leu Ala Arg Gly Val Ile Ser Asp
 275 280 285
 Tyr Gly Tyr Gly Gln Tyr Phe Thr His Ser Thr Gly His Gly Ile Gly
 290 295 300
 20 Leu Asp Ile His Glu Leu Pro Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Glu Thr Ile Leu
 305 310 315 320
 Glu Glu Gly Met Val Phe Ser Val Glu Pro Gly Ile Tyr Ile Pro Gly
 325 330 335
 Phe Phe Gly Val Arg Ile Glu Asp Leu Val Val Ile Lys Asn Ser Arg
 25 340 345 350
 Ala Glu Leu Leu
 355

<210> 2

<211> 1071

$\frac{3}{4}$ 30
P
M

<212> DNA

<213> Helicobacter pylori

<400> 2

atgaaaggat tagaaagaga atcgcatcttc acgcttgatg aaaacgcgat gttttttgag 60
5 tgtgcttata gttgcgataa tgctttgttt ttgcaattag aggatcgctc gttttttatc 120
actgattctc gctacactca agaagctaaa gaaagcattc agcctaaaaa tggcgtttta 180
gcggaagtga tagaatccag cgatttagtc caaagcacga ttgatttgat cgcaaaacac 240
tcggttaaaa agctcttttt tgatcccaat caagtgaatt tgcaaaccta caagcgtttg 300
gattcggcga ttgggaataa ggttatctta gagggcgtgc ctagttacca ccgccaaaaa 360
10 cgcacatta aaaacaatca tgagatccaa ctctcaaaa aatctcaagc gttgaatgtt 420
gaagcttttg aaaattttgc cgagtatgtg aaaaagattt ttgatgaaaa agagtccttg 480
agcgagcggg atttgcagca taaggttaag gactttttga cttaaagaggg ggtttatgat 540
ctgagctttg agcctatctt agccttgaat gcgaacgcga gcaaacccca tgctttgcct 600
agtgcgaagg attttttaaa agcggagcat agcattcttt tggatatggg gatcaaatac 660
15 gaacgctatt gctcggatag gactcgcacg gctttttttg accctaaaga ttttgtcttc 720
aaaagagagc agagtttcaa ggataaagag agtcaaaaga tttatgacat tgtgaaagaa 780
gcgcaagaaa aggctatttc aggtattaga gcgggcatga ccggtaaaga agcggacagc 840
ttggctaggg gagtgattag cgattatggt tatgggcaat atttactca cagcactgga 900
catggcattg gcttagacat tcatgagctt ccttatattt catcgcgag tgaaccatt 960
20 ttagaagagg gcatggtgtt ttctgtagag cctgggattt atatccctgg attttttggg 1020
gtgcgcattg aagatttagt ggtgatcaaa aattctaggg ctgagctttt g 1071

<210> 3

<211> 32

25 <212> DNA

<213> Helicobacter pylori

<400> 3

gacgacgaca agatgaaagg attagaaaga ga 32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/195, 16/12, C12N15/31, C12Q1/02, A61K39/395, 38/00, 45/00, A61P1/00, 1/04, 35/00, 43/00, G01N33/15, 33/50//C12P21/08

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)

Int.Cl⁷ C07K14/195, 16/12, C12N15/31, C12Q1/02, A61K39/395, 38/00, 45/00, A61P1/00, 1/04, 35/00, 43/00, G01N33/15, 33/50//C12P21/08

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)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Database PIR Accession No.A71938, 20 September, 1999 (20.09.99), Alm RA. et al., probable proline peptidase - Helicobacter pylori (strain J99), Nature, 1999, Vol.397, No.6715, p.176-80.	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18
X/A	Tomb JF. et al., The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature, 1997, Vol.1388, No.6642, p.539-47.	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18
X/A	WO 01/70955 A2 (ELITRA PHARMACEUTICALS, INC.), 27 September, 2001 (27.09.01), Full text & US 2002/0061569 A1 & EP 1268774 A2	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 March, 2003 (10.03.03)

Date of mailing of the international search report
25 March, 2003 (25.03.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 97/37044 A1 (ASTRA AB.), 09 October, 1997 (09.10.97), Full text & EP 901530 A1 & JP 2000-501621 A	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18
X/A	HAGIWARA A. et al., Prophylaxis with carbon- adsorbed mitomycin against peritoneal recurrence of gastric cancer. Lancet, 1992, Vol.339, No.8794, p.629-31.	16-18/1-11, 13-15
X/A	JP 2000-063280 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 29 February, 2000 (29.02.00), Full text & CN 1243004 A & KR 2000006124 A	16-18/1-11, 13-15
X/A	WO 99/18938 A1 (PERIO PRODUCTS LTD.), 22 April, 1999 (22.04.99), Full text & EP 1021171 A & JP 2001-519379 A	16-18/ 1-11, 13-15
A	BOTTOMLEY J. et al., Cloning, sequencing, expression, purification and preliminary characterization of a type II dehydroquinase from Helicobacter pylori. Biochem. J., 1996, Vol.319(Pt 2), p.559-65	1-11, 13-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

3232

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: 12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 12 pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body, and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

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

3. ☐ Claims Nos.:

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

<Subject of Search>

(1) Claim 16

Claim 16 relates to a compound which is defined by a desired property of "promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2" or its salt. Although claim 16 involves any compounds having this property, only part of the claimed compounds are disclosed in the description in the meaning as defined in PCT Article 5. It is recognized that claim 16 is not supported by the description in the meaning as defined in PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of "the compound promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 or its salt" cannot be specified. Thus, claim 16 also fails to fulfill the requirement of clearness in the meaning as defined in PCT Article 6.

Such being the case, this search was made on the compounds specifically stated as promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 (namely, showing an anti-M toxin effect) or salts thereof.

(2) Claims 17 and 18

Claim 17 relates to a drug containing a compound which is defined by a desired property of "inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells" or its salt. Although claim 17 involves any compounds having this property, only part of the claimed compounds are disclosed in the description in the meaning as defined in PCT Article 5. It is recognized that claim 17 is not supported by the description in the meaning as defined in PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of "inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells" cannot be specified. Thus, claim 17 also fails to fulfill the requirement of clearness in the meaning as defined in PCT Article 6.

Such being the case, this search was made on drugs containing the compounds specifically stated as inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells (namely, showing an anti-M toxin effect) or salts thereof.

The same applies to claim 18 depending on claim 17.

33 33

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K14/195, 16/12, C12N15/31, C12Q1/02, A61K39/395, 38/00, 45/00, A61P1/00, 1/04, 35/00, 43/00, G01N33/15, 33/50 // C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K14/195, 16/12, C12N15/31, C12Q1/02, A61K39/395, 38/00, 45/00, A61P1/00, 1/04, 35/00, 43/00, G01N33/15, 33/50 // C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Database PIR Accession No. A71938, September 20, 1999, Alm RA. et al., probable proline peptidase - Helicobacter pylori (strain J99), Nature, 1999, Vol. 397, No. 6715, p. 176-80.	1-5, 7-11 /6, 13-15, 16-18
X/A	Tomb JF. et al., The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature, 1997, Vol. 1388, No. 6642, p. 539-47.	1-5, 7-11 /6, 13-15, 16-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.03.03

国際調査報告の発送日

25.03.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子

印

4B

3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3447

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 01/70955 A2 (ELITRA PHARMACEUTICALS, INC.) 2001.09.27, 全文 & US 2002/0061569 A1 & EP 1268774 A2	1-5, 7-11 /6, 13-15, 16-18
X/A	WO 97/37044 A1 (ASTRA AKTIEBOLAG) 1997.10.09, 全文 & EP 901530 A1 & JP 2000-501621 A	1-5, 7-11 /6, 13-15, 16-18
X/A	Hagiwara A. et al., Prophylaxis with carbon-adsorbed mitomycin against peritoneal recurrence of gastric cancer. Lancet, 1992, Vol. 339, No. 8794, p. 629-31.	16-18 /1-11, 13-15
X/A	JP 2000-063280 A (武田薬品工業株式会社) 2000.02.29, 全文 & CN 1243004 A & KR 2000006124 A	16-18 /1-11, 13-15
X/A	WO 99/18938 A1 (PERIO PRODUCTS LTD.) 1999.04.22, 全文 & EP 1021171 A & JP 2001-519379 A	16-18 /1-11, 13-15
A	BOTTOMLEY J. et al., Cloning, sequencing, expression, purification and preliminary characterization of a type II dehydroquinase from Helicobacter pylori. Biochem. J., 1996, Vol. 319 (Pt 2), p. 559-65	1-11, 13-18

3459

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 12 は、人体の診断方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i) 及びPCT 規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT 規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

〈調査の対象について〉

①請求の範囲16

請求の範囲16は、「請求項1または2記載のタンパク質の活性を促進または阻害する」という所望の性質により定義された化合物またはその塩に関するものである。そして、請求の範囲16はそのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分に過ぎず、PCT6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「請求項1または2記載のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲16は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は明細書において、請求項1または2記載のタンパク質の活性を促進または阻害する（すなわち、抗M毒素作用を示す）ことが具体的に記載されている化合物またはその塩について行った。

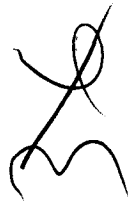
②請求の範囲17-18

請求の範囲17は、「請求項1または2記載のタンパク質による温血動物細胞の細胞傷害活性を阻害する」という所望の性質により定義された化合物またはその塩を含有する医薬に関するものである。そして、請求の範囲17はそのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分に過ぎず、PCT6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「請求項1または2記載のタンパク質による温血動物細胞の細胞傷害活性を阻害する」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲17は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は明細書において、請求項1または2記載のタンパク質による温血動物細胞の細胞傷害活性を阻害する（すなわち、抗M毒素作用を示す）ことが具体的に記載されている化合物またはその塩を含有する医薬について行った。

請求の範囲17を引用する請求の範囲18についても同様である。

36 AS 40 317


Specification

CYTOTOXIC PROTEIN AND UTILIZATION THEREOF

Field of the Invention

This invention relates to a new cytotoxic protein (M toxin, mucous layer
5 devastating toxin) produced by *Helicobacter pylori* and the use.

Background Art

It has been considered that the human gets many gastritis, gastric ulcer
and gastric cancer by *Helicobacter pylori*. A distinct direct cytotoxic factor
causing destruction of gastric epithelial cells and irreversible cell death at the
10 beginning of these diseases has not been specified. A factor changing pH
environment and immunity reaction in the stomach, a factor adhering to
gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori*, or move properties of bacteria
themselves has been indicated as a factor developing such diseases.
However, it has been unclear hitherto that gastric mucosal destruction
15 triggering gastritis, gastric ulcer and gastric cancer is injured in any process,
or what is a direct responsible factor to the gastric mucosal destruction.
The only is that vacuolating toxin having cytotoxicity is isolated, but it has
weak cytotoxic activity and reversible cytotoxic activity. As a fatal cytotoxic
factor of a pathogenic factor, it has not been found in vivo and in vitro.

20 Many researchers estimate that *Helicobacter pylori*, as described in the
above, in the environment stomach in vivo, secretes a direct cytotoxic factor
for gastric mucosal cells. Considering the importance of diseases, all
sequences of the gene is confirmed in 1996. However, in spite of the use of
serum, it is impossible to isolate and identify the presumable toxin due to
25 separation conditions, with difficult culture conditions and purification
conditions and unfixed valuation systems of the toxin.

Problems to be solved by the invention

One problem is that responsible protein causing gastritis, gastric ulcer and
gastric cancer by *Helicobacter pylori* infection is found, a mass production

39
Z

method of the toxic protein is established, new M toxin is identified, and diagnosis and screening method is established. Using these methods, it is desired that responsible toxin of a cytotoxic factor for gastric mucosal cells is controlled, and preventive and treating agents of gastritis, gastric ulcer, gastric cancer and the like are developed and a method for using the toxin is found.

Disclosure of the Invention

Inventors of this invention have studied earnestly to resolve the above-mentioned problem, and identified a new toxin that causes irreversible cell death when *Helicobacter pylori* is cultured under serum-free conditions that is similar to environment in the stomach different from usual. It has been found that this toxin has a toxic power 1000 to 100000 times per unit of above-mentioned vacuolating toxin, and it causes irreversible cell death for various warm-blooded animal cells comprising not only gastric epithelial cells but also immunocytes. The inventors of this invention have repeatedly researched on these views to attain to the present invention.

Namely, this invention provides the following. (1) A cytotoxic protein comprising a protein having at least 70 % or more identity for the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 1. (2) A partial peptide of the cytotoxic protein described in claim 1, characterized in that the protein has the same cytotoxic activity as that of the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 1. (3) The cytotoxic protein of claim 1 or claim 2 wherein the protein is produced with *Helicobacter pylori*. (4) The cytotoxin protein of claim 1 or claim 2 wherein the protein is obtained by culturing a transformant which is transformed with a recombination vector containing DNA of SEQ ID No. 2 coding the cytotoxin protein of claim 1 or 2. (5) The cytotoxin protein of claim 4 wherein the transformant is deposited by deposition No. FERM BP-8218 at National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (IPOD). (6) An antitumor agent which contains the cytotoxic protein of claim 1 or 2. (7) A monoclonal antibody specific against the cytotoxic protein which is



obtained by immunization of the cytotoxic protein of claim 1 or 2 against a mammal. (8) The monoclonal antibody of claim 7 which is produced with a hybridoma clone of deposition No. FERM BP-8222. (9) The monoclonal antibody of claim 7 which is produced with a hybridoma clone of deposition No. FERM BP-8223. (10) The monoclonal antibody of claim 7 which is produced with a hybridoma clone of deposition No. FERM BP-8224. (11) A polyclonal antibody specific against the cytotoxic protein which is obtained by immunization of the cytotoxic protein of claim 1 or 2 against a mammal. (12) A method for detecting and diagnosing the cytotoxic protein of claim 1 or 2 wherein the monoclonal antibody or polyclonal antibody described in any one of claims 7-11 is used. (13) An agent for preventing and treating gastric cancer, gastritis and gastric ulcer triggered by the cytotoxic protein of claim 1 or 2, wherein the monoclonal antibody or polyclonal antibody described in any one of claims 7-11 are used. (14) A method for screening a compound promoting or inhibiting activity of the protein of claim 1 or 2, wherein cell multiplication inhibition activity, cytotoxic activity or cell death is judged by comparison between negative or positive control groups with a warm-blooded animal cell. (15) A kit for screening a compound or its salt promoting or inhibiting activity of the protein of claim 1 or 2, wherein the protein of claim 1 or 2 is comprised. (16) A compound or its salt promoting or inhibiting activity of the protein of claim 1 or 2, wherein the compound is obtained by the screening method of claim 14 or with the kit for screening of claim 15. (17) A medicine containing a compound or its salt, wherein the compound has activity inhibiting cytotoxic activity of warm-blooded animal cells with the protein of claim 1 or 2. (18) A medicine of claim 17, which is an agent for preventing or treating gastritis, gastric ulcer, gastric cancer and a disease showing that it is caused with M toxin by the screening method of claim 14 or with the screening kit of claim 15.

Brief Description of the Drawings

39
✓

Fig. 1 shows an anion exchange chromatography of the sample obtained in Example 1. **a** shows activity of M toxin for each fraction and absorbances of the elute protein. **b** shows SDS-PAGE by silver stain of fraction 16 to fraction 22 in the chromatography of **a**. **c** shows bands of protein toxin transferred to a PVDF membrane by electroblotting. **d** and **e** show morphologic changes of HeLa cell 24 hours after exposure to the control extract and the cytotoxin including extract at a concentration of 1nM, respectively. Scale bar, 50 μ m.

Fig. 2 shows cell morphologic change with the gene recombinant toxin obtained in Example 3. **a** shows a negative control of HeLa cells after 6 hours. **b** and **c** show HeLa cells after 3 hours and after 6 hours of 5 nM addition of recombinant M toxin. **d** shows CRL7407(ATCC) normal human gastric cells of negative control after 6 hours. **e** and **f** show CRL7407 cells after 3 hours and 6 hours of 5nM addition of recombinant M toxin.

Fig. 3 shows sensitivity for M toxin of several kinds of cancer cells in Example 3. It was determined by a WST method. X axis shows concentration of M toxin in a substrate, and Y axis shows directly absorbance of wavelength 415nm or by a relative ratio when the absorbance of a negative control is estimated as 100%. HLF: rat hepatoma. colon 26: carcinoma of the mouse colon.

Fig. 4 is as shown in Fig. 3. T24: human cancer of the bladder. OVK18: human ovarian cancer. KLM-1: human pancreatic cancer. A-549: human lung cancer. Ca9-22: human cancer of the gum. CRL1500: human cancer of the breast.

Fig. 5 shows western blotting of monoclonal antibody which is conducted in Example 8. All dilution magnifications of cultured supernatants of hybridoma cells are 20 times.

Fig. 6 shows M toxin activity with calcium alginate as an adsorbent in Example 9. The negative control contains 10mM Tris buffer pH7.7 alone as a substrate, and the positive control contains a substrate and 10 mM M toxin.

90
X

X axis shows each fraction number passed through a calcium alginate column. An average concentration of each fraction is 10nM. and any one of the fractions shows at least 10 nM or more. When red corpuscles are destroyed, hemoglobin concentration in the solution is increased. Y axis shows 415nm absorbance.

Fig. 7 shows, in Example 10, % viability of HeLa cells showing M toxin inhibition activity by adsorption of activated carbon in Example 10. X axis shows each elute fraction number of column. M toxin concentrations are average 10nM and any one of them is at least 10nM or more. Y axis shows % obtained by dividing the value of the toxicity of each fraction by a positive control which is measured by a WST method.

Fig. 8 shows as shown in Fig. 7. It shows % viability in HeLa cells of CM-cellulose and calcium alginate showing M toxin inhibition activity by adsorption in Example 10.

Best Mode for Carrying Out the Invention

The protein having the same amino acid sequence or substantially identical amino acid sequence with the amino acid sequence represented by SEQ ID No.1 of this invention may be a protein originating from bacteria strains of *Helicobacter pylori*, for example, NCTC 11637, NCTC 11916, DT 61A, NCTC 11639, R85-13 6P, R85-13-12F, R85-13-11P, T81213-NTB, J99, 4, U2-1, 85D08, MC903, MC123, Tx30a, 26695, UA 1182 and the like, or may be a synthesized protein.

As substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 1, amino acid sequences having homology of about 70% or more, preferably about 80 % or more, more preferably about 90% or more, further more preferably about 95% or more can be exemplified. As a protein having substantially the same amino acid sequence as the amino acid sequence represented by SEQ ID No.1, a protein having substantially the same amino acid sequence and substantially the same activity as that of the

42
X
J

protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 1 can be exemplified. As substantially the same activity, a cell multiplication inhibition activity, a cytotoxic activity or an activity causing cell death can be exemplified. The term of substantially the same means that these activities

5 have the same quality, for example, in physiological chemistry or pharmacology. Accordingly, it is preferred that the activity of cytotoxin and the like has the same quality, for example, about 0.1-100 times, preferably about 0.5-10 times, more preferably about 0.5-2 times. The degree of these activities or quantity factors of molecular weights of proteins may be different.

10 The activities of a cell multiplication inhibition activity, a cytotoxic activity or an activity causing cell death can be determined by well-known methods, for example, by the screening method undermentioned.

As the protein of this invention, the following proteins can be exemplified: an amino acid sequence deleting 1-150 (preferably 1-50) amino acids in the

15 amino acid sequence represented by SEQ ID No.1; an amino acid sequence adding 1-100 (preferably 1-30) amino acids in the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 1; an amino acid sequence inserting 1-50 (preferably 1-30) amino acids in the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 1; an amino acid sequence that 1-50 (preferably 1-30) amino acids in

20 the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 1 are substituted by the other amino acids; or a protein containing a combination of these amino acid sequences, what is called mucin.

When an amino acid sequence is inserted, deleted or substituted as described in the above, the position of insertion, deletion or substitution is not

25 specifically limited.

In the protein of this specification, according to a usual practice, the left side is an N end (an amino end) and the right side is a C end (a carboxyl end). In the proteins of this invention, which comprises the protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID No.1, the C end is usually a carboxyl

92
52

group (-COOH) or a carboxylate (-COO-), but it may be an amid (-CONH₂) or an ester group (-COOR), wherein R is a C₁₋₆ alkyl group of methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl and the like, a C₃₋₈ cycloalkyl group of cyclopentyl, cyclohexyl and the like, a C₆₋₁₂ aryl group of phenyl, α -naphthyl and the like, benzyl, phenetyl and the like, a phenyl-C₁₋₂ alkyl group of benzyl, phenetyl and the like, or a C₇₋₁₄ aralkyl group of an α -naphthyl-C₁₋₂ alkyl group of α -naphthylmethyl and the like. When the protein of this invention has a carboxyl group (or carboxylate) at a position other than the C end, proteins having an amidic or esterified group are contained in the protein of this invention. As the ester, the ester of the above-mentioned C end may be used. In the proteins of this invention, further, there is a protein that the amino group of an amino acid residue (for example, a methionin residue) at the N end is protected by a protective group (for example, a C₁₋₆ acyl group of a C₁₋₆ alkanoyl group or the like of a formyl group, acetyl group or the like); a protein that the glutamic acid residue of the N end produced by incision in vivo is changed into pyrroglutamic acid group; a protein that the substituent group on the side chain of an amino acid in the molecular (for example, -OH, -SH, an amino group, an imidazole group, an indol group, a guanidino group or the like) is protected by a suitable protective group (for example, a C₁₋₆ acyl group or the like of C₁₋₆ alkanoyl group or the like of a formyl group); or a conjugated protein or the like of so-called glycoproteins that the sugar chain is bound.

As the partial peptide of the protein of this invention, it may be a partial peptide of the above-mentioned proteins of this invention, and preferably, it has similar activities (for example, a cell multiplication inhibition activity, a cytotoxic activity or the like) to the proteins of this invention. As an example, a peptide of an amino acid sequence having at least 20% or more, preferably 50% or more, more preferably 70% or more, further preferably 90% or more, and most preferably 95% or more in the amino acid sequence of this invention, and having a cell multiplication inhibition activity, a cytotoxic activity or an

activity causing cell death can be utilized. The partial peptide of this invention may be the following peptides: 1-5 (preferably 1-3) amino acids are deleted in the amino acid sequence; 1-10 (preferably 1-5 (more preferably 1-3)) amino acids added to the amino acid sequence; 1-5 (preferably 1-3) amino acids are inserted into the amino acid sequence; or 1-5 (preferably 1-3) amino acids are substituted by the other amino acids.

Although the partial peptide of this invention has usually a carboxyl group (-COOH) or carboxylate (-COO-) at the C end, as shown in the above proteins of this invention, the C end may be amide (-CONH₂) or ester (COOR) wherein R is the same meaning as shown in the above. In the partial peptide of this invention, further, as shown in the above proteins of this invention, there is a peptide that the amino group of an amino acid residue (for example, a methionin residue) at the N end is protected by a protective group; a protein that the glutamic acid residue of the N end produced by incision in vivo is changed into pyrroglutamic acid group; a protein that the substituent group on the side chain of an amino acid in the molecular is protected by a suitable protective group; or a conjugated protein or the like of so-called glycoproteins that the sugar chain is bound. The partial peptide of this invention can be used as an antigen for constructing an antibody, so that a cell multiplication inhibition activity, a cytotoxic activity or the like is no necessarily required.

As the salt of the protein or partial peptide of this invention, salts of physiologically allowable acids (for example, inorganic acids or organic acids) or bases (for example, alkali metal salts) can be used, and preferably physiologically allowable acid addition salts, can be used. As such salts, for example, there are salts of inorganic acids (for example, hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid), organic acids (for example, acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methane sulfonic acid, benzene sulfonic acid). The proteins and the salts of this invention can

54
174

be produced by well-known preparation methods of proteins from any kinds of strains of above-mentioned *Helicobacter pylori*, or by culturing a transformant containing DNA that after-mentioned protein is coded. They further can be produced in accordance with after-mentioned method for syntheizing peptides.

5 When the proteins are produced from any kinds of strains of *Helicobacter pylori*, proteins in bacterial cells are centrifuged off by ultrasonic crushing, then they are extracted by ammonium sulfate precipitation or the like, and the extracted liquid is purified and separated by combined chromatography such as ion exchange chromatography and hydrophobic chromatography.

10 In the synthesis of the protein, the partial peptide, salts thereof or amide thereof of this invention, commercially available resins for synthesizing proteins can be used. As such resins, the following resins can be exemplified: chloromethyl resin, hydroxymethyl resin, benzhydrylamine resin, aminomethyl resin, 4-benzyloxybenzylalcohol resin, 4-methylbenzhydryl-
15 amine resin, PAM resin, 4-hydroxymethylmethylphenylacetamidemethyl resin, polyacrylamide resin, 4-(2',4'-dimethoxyphenylhydroxymethyl)phenoxy resin, 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc aminoethyl) phenoxy resin. Using such resins, an amino acid that α -amino groups and functional groups of side chains are suitably protected is condensed on the resin to meet to the desired
20 protein sequence by a well-known condensation method. At the end of reaction, the protein is cut off from the resin and several protecting groups are deleted. Then, the desired proteins or amides thereof are obtained by a method for forming internal disulfide bonds in a high dilution solution. Concerning the above-mentioned condensation of protected amino acids,
25 several kinds of activated agents for protein synthesis can be used, and particularly, carbodiimides can be used. As such carbodiimides, DCC, N,N'-diisopropylcarbodiimide, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and the like can be used. In activation by these carbodiimides, the protected amino acid can be directly added to the resin with an additional agent for

45
45
J

controlling racemization (for example, HOBt or HOObt), or it can be added to the resin after previous activation of the protected amino acid as a symmetric acid anhydride or, HOBt ester or HOObt ester.

As the solvent used in the activation of the protected amino acid or the condensation with the resin, it can be selected from known solvents usable for the protein condensation reaction. As such solvent, acid amides such as N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetoamide and N-methylpyrrolidone, halogenated hydrocarbons such as methylene chloride and chloroform, alcohols such as trifluoroethanol, sulfoxides such as dimethylsulfoxide, pyridine, ethers such as dioxane and tetrahydrofuran, nitriles such as acetonitrile and propionitrile, esters such as methyl acetate and ethyl acetate, and mixtures thereof can be used. The reaction temperature is suitably selected from the known ranges that can be used in the reaction for forming protein bonds, and usually, it is suitably selected from $-20^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$.

Activated amino acid derivatives are usually used by 1.5-4 times of the mole equivalent. As a test result of ninhydrin reaction, when the condensation is insufficient, the condensation reactions can be repeated without the deletion of the protected groups to conduct sufficient condensation. When sufficient condensation can not be conducted by the repeated reactions, unreacted amino acids are acetylated with acetic anhydride or acetylimidazole, so that subsequent reactions have no influence.

As the protected groups of amino groups of starting materials, for example, Z, Boc, t-pentyloxycarbonyl, isobornyloxycarbonyl, 4-methoxybenzyloxycarbonyl, Cl-Z, Br-Z, adamantyloxycarbonyl, trifluoroacetyl, phthaloyl, formyl, 2-nitrophenylsulfenyl, diphenylphosphinothioyl, Fmoc and the like can be used. The carboxyl groups can be protected, for example, by alkyl-esterification (for example, alkylesteration of straight, branched or cyclic chains of methyl, ethyl, propyl, butyl, t-butyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, cyclooctyl and 2-adamantyl), aralkylesteration (for example,

- benzylester, 4-nitrobenzylester, 4-methoxybenzylester, 4-chlorobenzylester, benzhydrylester), phenacylesteration, benzyloxycarbonylhydrazidation, t-butoxycarbonylhydrazidation, tritylhydrazidation and the like. The hydroxyl group of serine can be protected, for example, by esterification or etheration. As
- 5 the suitable groups of this esterification, for example, lower (C_{1-6}) alkanoyl groups such as an acetyl group, an acyl group such as a benzoyl group, or groups derived from carbonate such as a benzyloxycarbonyl group and ethoxycarbonyl group can be used. As groups suitable to the etheration, a benzyl group, a tetrahydropyranyl group and a t-butyl group can be
- 10 exemplified. As the protected groups of phenolic hydroxyl groups of tyrosine, for example, Bzl, C_{12} -Bzl, 2-nitrobenzyl, Br-Z and t-butyl can be used. As the protected groups of imidazole of histidine, for example, Tos, 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl, DNP, benzyloxymethyl, Bum, Boc, Trt and Fmoc can be used.
- 15 As the activated carboxyl groups of starting materials, for example, corresponding acid anhydrides, azides and activated esters (esters of alcohol (for example, pentachlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4-dinitrophenol, cyanomethylalcohol, paranitrophenol, HONB, N-hydroxysuccinimide, N-hydroxyphthalimide and HOBt)) can be used. As the activated amino groups
- 20 of starting materials, for example, corresponding phosphoric amides can be used. As a method for removing (elimination) of the protected groups, for example, catalytic reduction in hydrogen stream in the presence of a catalyst of Pd-black or Pd-charcoal; acid treatment with anhydrous hydrogen fluoride, methanesulfonic acid, trifluoromethanesulfonic acid, trifluoroacetic acid or their
- 25 mixtures; base treatment with diisopropylethylamine, triethylamine, piperidine, piperazine or the like; or reduction with sodium in liquid ammonia can be used. The elimination reaction by using the above acid treatment is conducted usually at a temperature of $-20^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$. In the acid treatment, it is efficient to add a cation catching agent such as anisole, phenol, thioanisole,

metacresol, paracresol, dimethylsulfide, 1,4-butanedithiol or 1,2-ethanedithiol. The 2,4-dinitrophenyl group used as an imidazole protection group of histidine is removed by thiophenol treatment. The formyl group used as an indole protection group of tryptophan is removed by acid treatment in the presence
5 of the above 1,2-ethanedithiol, 1,4-butanedithiol or the like, and further it can be removed by alkali treatment with a diluted sodium hydroxide solution, diluted ammonia or the like.

The protection of functional groups that should not participate in the reaction of starting materials and the protected groups, elimination of the
10 protected groups, activation of the functional group that participate in the reaction or the like can be suitably selected from well-known groups and means. As the other methods for obtaining amides of proteins, for example, an α -carboxyl group of carboxy end-group amino acid is protected by amidation, a peptide chain (protein) is elongated to the desired chain length at
15 the side of the amino chain, a protein that the protected group of the α -amino group at the N-end of the peptide chain is eliminated and a protein that the protected group of the carboxyl group at the C-end of the peptide are produced, and the both peptide are condensed in a mixture solution as described above. The particular of the condensation reaction is as mentioned in the above.
20 The protected protein obtained by the condensation is purified, all protected groups are removed by the above method, and crude protein can be obtained. The crude protein is purified by using a known purification means, main fractions are lyophilized and an desired amide of the protein can be obtained. For obtaining esters of the protein, for example, α -carboxyl groups of
25 carboxy-end amino acids are condensed with desired alcohols to obtain amino acid esters, the esters are treated as shown in amides of the protein, and desired esters of the protein can be obtained.

The partial peptide or the salts of this invention can be produced by well-known methods for synthesizing peptides or by cutting the protein of this

48 98

invention with a suitable peptidase. As the method for synthesizing the peptide, for example, a solid-phase synthesis method or liquid-phase synthesis method can be used. Namely, a partial peptide able to constitute the partial peptide of this invention or an amino acid is condensed with the
5 remaining parts, when the product has a protected group, the protected group is eliminated, and the desired peptide can be produced.

As well-known condensation methods and the elimination of the protected groups, for example, the following methods are exemplified. M.Bodanszky and M.A.Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966);
10 Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965); Nobuo Izumiya et al., Fundament and Experiments of Peptide Synthesis, Maruzen Co., (1975); Haruaki Yajima and Shunpei Sakakibara, Biochemical Experiment Lectures 1, Chemistry of Proteins IV, 205 (1977); Haruaki Yajima supervised, Continued Development of Medicines, Vol.14, Peptide Synthesis,
15 Hirokawa Shoten. After the reaction, further, the partial peptide of this invention can be purified by usual purification methods, for example, solvent extraction, distillation, column chromatography, liquid chromatography, recrystalization and their combination. When the partial peptide is obtained by the above methods, it can be changed into a suitable salt by a known
20 method or the similar method. When a salt of the partial peptide is obtained, it can be changed into a released compound or the other salt by a known method or the similar method.

As the DNA coding the protein of this invention, any compounds that a base sequence coding the above-mentioned protein of this invention is contained
25 can be used. Further, a genome DNA, a genome DNA library, the above-mentioned cDNA derived from cells and tissues, the above-mentioned cDNA library derived from cells and tissues, or synthetic DNA can be used. A vector used in the library can be selected from any one of bacteriophage, plasmid, cosmid, phagemid and the like. Using a total RNA or mRNA fraction

49
49

prepared from the above cells or tissues, it can be directly amplified by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (called as a RT-PCR method hereinafter) . As the DNA coding the protein of this invention, any one of the following DNAs can be exemplified: for example, a DNA containing a base sequence represented by SEQ ID No.2, or a DNA, which has a base sequence hybridizing with a base sequence represented by SEQ ID No.2 under highstringent conditions and codes the protein having substantially the same activity as the protein of this invention (for example, citotoxin activity).

Further embodying, As the DNA coding a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 1, the DNA having the base sequence represented by SEQ ID No. 2 can be used.

As the DNA coding the partial peptide of this invention, any one of DNAs containing the above base sequence coding the partial peptide of this invention can be used. Further, a genome DNA, a genome DNA library, the above-mentioned cDNA derived from cells and tissues, the above-mentioned cDNA library derived from cells and tissues, or synthetic DNA can be used. As the DNA coding the partial peptide of this invention, for example, any one of the following DNAs can be exemplified: for example, a DNA having a partial sequence of DNA having a base sequence represented by SEQ ID No.2, or a DNA having a prtial sequence of DNA, which has a base sequence hybridizing with a base sequence represented by SEQ ID No.2 under highstringent conditions and codes the protein having substantially the same activity as the protein of this invention (for example, citotoxin activity).

As cloning methods of the DNA perfectly coding the protein of this invention or the partial peptide (hereinafter, in the description of the cloning and expression of the DNA coding these protein and the like, case by case, these protein and the like is shorten as the protein of this invention) , using a synthesized DNA primer having the partial base sequence of the protein of this invention, it is amplified by a known PCR method, or the DNA combined

50

50


in a suitable vector is selected by hybridization with a DNA fraction or a synthesized DNA that codes a part or all region of the protein of this invention. The hybridization method can be conducted by the description of, for example, Molecular Cloning, 2nd, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press
5 (1989). When a commercially available library is used, it can be conducted by the method described in an attached explanation. In the change of DNA base sequences, using a known kit such as MutanTM-G (produced by Takara Shuzou Co.) , MutanTM-K (produced by Takara Shuzou Co.) or the like, a Gapped duplex method, a Kunkel method, well-known methods or similar
10 methods can be conducted. The DNA coding a cloned protein can be used as it is, or by digesting with a restriction enzyme as desired, or by addition of a linker. The DNA may have ATG, GTG or TTG as a translation initiation codon at the 5' end side and TAA, TGA or TAG as a translation termination codon at the 3' end side. The translation initiation codon and the translation
15 termination codon can be added by using a suitable synthetic DNA adapter. The expression vector of the protein of this invention can be produced, for example, by means (i) that an desired DNA is cut off from the DNA coding the protein of this invention, and (ii) that the DNA fraction is bonded to the downstream of the promoter in a suitable expression vector.

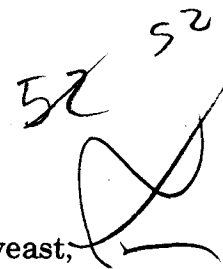
20 As the vector, a plasmid derived from *Echerichia coli* (such as pBR322, pBR325, pUC12, pUC13 or pET30), a plasmid derived from *Bacillus subtilis* (such as pUB110, pTP5 or pC194), a plasmid (such as pSH19, pSH15), bacteriophage derived from yeast, a bacteriophage such as λ phage, an animal virus such as a retro virus, a vaccinia virus, a Baculo virus or the like,
25 pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV or pcDNAI/Neo can be used. As the promoter used in this invention, any promoters suitable for the host used in the expression of genes can be used. For example, when animal cells are used as the host, a SR α promoter, SV40 early promoter, HIV $\cdot$ LTR promoter, CMV promoter or HSV-TK promoter can be exemplified. In these

51 52
T

promoters, the CMV (cytomegalovirus) promoter, SR α promoter can be preferably used. When the host is an *Escherichia* family fungus, a trp promoter, lac promoter, recA promoter, λ PL promoter, lpp promoter or T7 promoter is preferred. When the host is a *Bacillus* family fungus, a SPO1
5 promoter, SPO2 promoter or penP promoter is preferred. When the host is yeast, a PHO5 promoter, PGK promoter, GAP promoter or ADH promoter is preferred. When the host is an insect cell, a polyhedrin promoter, P10 promoter or the like preferred.

As the expression vectors other than the above vectors, if desired, vectors
10 containing an enhancer, a selection marker, SV40 replication origin (occasionally abbreviated as SV40ori hereinafter) or the like can be used. As the selection marker, for example, a dihydro folic acid reduction enzyme (occasionally abbreviated as dhfr hereinafter) gene (methotrxate (MTX) resistance), an ampicillin resistance gene (occasionally abbreviated as Ampr
15 hereinafter), a neomycin resistance gene (occasionally abbreviated as Neor hereinafter) G418 resistance and kanamycin resistance gene can be exemplified. Particularly, when the dhfr gene is used as a selection marker by using Chinese hamster cells defective a dhfr gene, combinant cells can be selected by a medium not containing thymidine. If necessary, further, a signal
20 sequence fitted to the host is added to N end sides of the protein of this invention. When the host is an *Escherichia* family fungus, a PhoA signal sequence, OmpA signal sequence or the like can be used. When the host is a *Bacillus* family fungus, an α -amylase signal sequence, a subtilisin signal sequence or the like can be used. When the host is yeast, an MF α signal
25 sequence, a SUC2 signal sequence, a SUC2 signal sequence or the like can be used. When the host is an animal cell, an insulin signal sequence, an α -interferon signal sequence, an antibody molecular signal sequence or the like can be used. Using a vector containing the DNA coding such constructed protein of this invention, a transformant can be produced.

52 52



As the host, for example, an Genus *Echerichia*, a Genus *Bacillus*, yeast, insect cells, insects, animal cells or the like can be used. As an embodiment of Genus *Echerichia*, for example, *Escherichia coli* K12, DH1, DH5 α (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.60, 160(1968)) , JM103 (Nucleic Acids Research, 5 Vol.9, 309(1981)) , JA221 (Journal of Molecular Biology, Vol.120, 517(1978)) , HB101 (Journal of Molecular Biology, Vol.41, 459(1969)) , C600 (Genetics, Vol.39, 440(1954)) or the like can be used. As Genus *Bacillus*, for example, *Bacillus subtilis* MI114 (Gene, Vol.24, 255(1983), 207-21 (Journal of Biochemistry, Vol.95, 87(1984)) or the like can be used. As the yeast, for 10 example, *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036, *Pichia pastoris* KM71 or the like can be used.

As the insect cells, for example, when the virus is AcNPV, *Spodoptera frugiperda* cell; Sf cells, MG1 cells derived from midintestine of *Trichoplusia ni*, High Five TM cells derived from the egg of *Trichoplusia ni*, cells derived 15 from *Mamestra brassicae*, cells derived from *Estigmena acrea* or the like can be used. When the virus is BmNPV, *Bombyx mori* N cells; BmN cells or the like can be used. As the Sf cells, for example, Sf9 cells (ATCC CRL1711) , Sf21 cells (Vaughn, J.L. et al., In Vivo, 13, 213-217(1977)) or the like can be used. 20 As the insects, for example, larvae of silkworms can be used (Maeda et al, Nature, Vol. 315, 592(1985)). As the animal cells, for example, monkey cell COS-7, Vero, chinese hamster cell CHO (abbreviated as a CHO cell hereinafter), dhfr gene defective chainese hamster cell CHO (abbreviated as a CHO(dhfr-) cell hereinafter), mouse L cells, mouse AtT-20, mouse myeloma 25 cells, rat GH3, human FL cells or the like can be used. Moreover, several kinds of normal human cells, for example, liver cells, splenocytes, nerve cells, neuroglia, spleen β cells, bone marrow cells, mesangium cells, Langerhans cells, skin cells, epithelium cells, endothelium, fibroblast, fibrocells, muscle cells, fat cells, immunological cells (for example, macrophages, T cells, B cells,

57 53


natural killer cells, mast cells, neutrophils, basophils, eosinophils, monocytes), megakaryocytes, synovial cells, cartilages, bone cells, osteoblasts, osteoclasts, mammary gland cells, hepatic cells, interstitial cells, or precursor cells, stem cells or cancer cells of these cells can be used. For the transformation of

5 Genus *Escherichia*, for example, it can be conducted by the method described in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.69, 2110(1972), Gene, Vol. 17, 107(1982) or the like.

For the transformation of Genus *Bacillus*, for example, it can be conducted by the method described in Molecular & General Genetics, Vol. 168,

10 111(1979) or the like. For the transformation of yeast, for example, it can be conducted by the method described in Methods in Enzymology, Vol. 194, 182-187(1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.75, 1929(1978) or the like. For the transformation of insect cells or insects, for example, it can be conducted by the method described in Bio/Technology, 6, 47-55(1988) or the like.

15 For the transformation of animal cells, for example, it can be conducted by the method described in Cell Engineering, separate volume 8, New Cell engineering Experiment protocol, 263-267(1995), published by Shujunsha, and Virology, Vol. 52, 456 (1973) . Using the above methods, transformants, which are transformed with expression vectors containing DNA coding the

20 protein, can be obtained. When the transformants that the hosts are Genus *Escherichia* or Genus *Bacillus* are cultured, a liquid medium is suitable as the medium used in the culture. In the medium, carbon sources, nitrogen sources, inorganic and the like, which are necessary for the growing of the transformants, are contained. As the carbon sources, for example, glucose,

25 dextrin, soluble starch, sucrose or the like can be exemplified. As the nitrogen sources, for example, inorganic or organic materials such as ammonium salts, nitrates, corn steep liquor, peptone, casein, meat extract, bean cakes, potato extract and the like can be used. As the inorganic materials, for example, calcium chloride, monosodium phosphate and

54 54
~~54~~

magnesium chloride can be exemplified. Yeast extract, vitamins, growth-stimulating materials or the like can be added. About pH 5-8 of the medium is preferably used.

As the medium for culturing Genus *Escherichia*, for example, a M9 medium
5 containing glucose and casamino acid (Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972) is preferred. If necessary, for efficient action of the promoter, for example, an agent such as 3 β -indolyl acrylic acid can be added. When the host is Genus *Escherichia*, the culture is usually conducted at a temperature
10 of about 15~43°C for about 3~24 hours, if necessary, aeration or stirring can be added. When the host is *Bacillus* family fungi, the culture is usually conducted at a temperature of about 30~40°C for about 6~24 hours, if necessary, aeration or stirring can be added.

When the transformant that the host is yeast is cultured, as the medium, for
15 example, a Burkholder minimal medium (Bostian, K.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, 4505(1980)) or a SD medium containing 0.5% casamino acid (Bitter, G. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.81, 5330(1984)) can be exemplified. About pH 5-8 of the medium is preferably used. The culture is usually conducted at a temperature of about 20~35°C for about 24~72
20 hours, if necessary, aeration or stirring can be added. When the transformant that the host is an insect cell or an insect is cultured, as the medium, Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195, 788(1962)) can be used by suitably adding an addition of immobilized 10% bovine serum or the like. About pH 6.2-5.4 of the medium is preferably used. The culture is
25 usually conducted at a temperature of about 27°C for about 3~5 days, if necessary, aeration or stirring can be added. When the transformant that the host is an animal cell, as the medium, for example, a MEM medium containing about 5~20% fetus bovine serum (Science, Vol.122, 501(1952)), a DMEM medium (Virology, Vol.8, 396(1959)), an RPMI 1640 medium (The

55
55
X

Journal of the American Medical Association, Vol.199, 519(1967)) , a 199 medium (Proceeding of the Society for the Biological Medicine, Vol.73,1(1950)) or the like can be used. About pH 6-8 of the medium is preferably used. The culture is usually conducted at a temperature of about 5 30~40°C for about 15~60 hours, if necessary, aeration or stirring can be added. As described in the above, the protein of this invention can be produced out of the cells of the transformants.

For separation and purification of the protein of this invention, for example, the following methods can be suitably used. When the protein of this 10 invention is extracted from the cultured fungi or cells, after the culture, the fungi or cells are collected by a well-known method, suspended in a suitable buffer, and destroyed by ultrasound, lysozyme and/or freeze-thawing or the like. Then, the crude extracted liquid of the protein is obtained by centrifugation or filtration. A protein denaturant such as urea or guanidine hydrochloride, or 15 a surface-active agent such as tritonX-100TM can be contained in the buffer. When the protein is secreted in the medium liquid, after the culture is finished, the fungi or cells and supernatant are separated by a well-known method, and the supernatant is collected. Such obtained culture supernatant or the protein contained in the extracted liquid is purified by a 20 combination of well-known separation and purification methods. These well-known separation and purification methods are methods using salting-out techniques or solubilities by a solvent precipitation method, a dialysis method, a method using a difference in the molecular weight such as ultrafiltration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis or the like, a 25 method using a difference of the charge such as ion exchange chromatography, a method using a difference of hydrophobic such as hydrophobic chromatography, a method using specific affinity such as affinity chromatography, a method using a difference of hydrophobic such as reverse phase high-speed liquid chromatography, a method using a difference of

56
56
7

isoelectric points such as isoelectrcophoresis can be used.

When such a protein is obtained in the form of free, it can be converted into a salt by a well-known method or a similar method. On the other hand, when the protein is obtained in the form of a salt, it can be converted into a free form or the other salt by a well-known method or a similar method. The protein produced by a recombinant may be further reacted with a suitable protein modification enzyme before or after purifying the protein to optionally modify or partially remove the polypeptide. As the protein modification enzyme, for example, trypsin, chymotrypsin, arginylendopeptidase, protein kinase, glycosidase or the like may be used. The activitis of such obtained protein of this invention or salts thereof may be determined by a bond experiment with a labeled ligand and enzyme immunoassay using a specific antibody or the like.

The antibodies for the protein, the partial peptide or the salts of this invention, may be a polyclonal antibody or monoclonal antibody on condition that the antibodies can recognize the protein, the partial peptide and the salts. The antibodies for the protein, the partial peptide or the salts of this invention (in the following description of antibodies, these protein and the like may be abbreviated as the protein of this invention) may be produced by using the protein as the antigen and by a well-known production method of antibodies or anti-serum.

Production of a monoclonal antibody

(a) Production of cells of monoclonal antibody production: The protein of this invention is administered to a warm-blodded animal at a position, which can produce an antibody by the administration, with itself or a carrier or a diluent. In the administration, to enhance the effect of antibody production, a complete Freund's adjuvant or an incomplete Freund's adjuvant may be administered. The administration is usually conducted once for each 2 ~ 6 weeks, and total is 2 ~ 10 times. The warm-blooded animals are, for example, monkeys,

57 57
57 57

rabbits, dogs, guinea pigs, mice, rats, sheep, goats, chickens and the like, preferably mice and rats. At the production of cells for producing a monoclonal antibody, the warm-blooded animal immunized with an antigen, for example, mice are used. A mouse recognizable an antibody value is selected from the mice, the spleen or the lymph is collected after 2~5 days of the final immunization, and the cells of monoclonal antibody production contained in the spleen or the lymph are fused with myeloma cells of the same kind or different kind of animals to prepare a hybridoma for producing a monoclonal antibody. The antibody value in the antiserum may be determined, for example, by a method that the antiserum is reacted with an after-mentioned labeled protein, and the activity of the labeled agent bound to the antibody is measured. The fusion operation may be conducted by a known method such as a method of Kohler and Milstein (Nature, 256, 495 (1975)). As the fusion promotion agent, for example, polyethylene glycol (PEG), a Sendai virus or the like, preferably PEG may be used.

As the myeloma, for example, myeloma cells of warm-blooded animals such as NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1 and AP-1, preferably P3U1 can be exemplified. The preferable ratio of the number of the antibody production cells (spleen cells) to the number of myeloma cells is around 1:1~20:1. PEG (preferably, PEG1000-PEG6000) is added in the concentration of around 10~80%, and incubation is conducted at a temperature of 20~40°C, preferably 30~37°C for 1~10 minutes, and cell fusion is efficiently performed. In screening of a hybridoma of monoclonal antibody production, several kinds of methods can be used, for example, there are a method that a supernatant of hybridoma culture is added to a solid phase (such as a micro plate) adsorbing a protein antigen directly or with a carrier, and an anti-immunoglobulin antibody, which is labeled with a radioactive material or an enzyme yeast, (when the cells for using in cell fusion is a mouse, an anti-mouse immunoglobulin is used) or a protein A is added so as to detect the monoclonal antibody bound to

5858
F

the solid phase; and a method that a supernatant of hybridoma culture is added to a solid phase adsorbing an anti-immunoglobulin antibody or a protein A, a protein labeling a radioactive material or an enzyme yeast is added, and the monoclonal antibody bound to the solid phase is detected. The selection of the monoclonal antibody may be conducted by a known method or a similar method thereof. Usually, it may be conducted by a medium for animal cells that HAT (hypoxanthine, amino pterin, thymidine) is added. As the medium for selection and breeding, any medium that the hybridoma can breed may be used. As an example, a RPMI 1640 medium containing 1 ~ 20%, preferably 10~20% bovine fetus serum, a GIT medium containing 1 ~ 10% bovine fetus serum (produced by Wako Junyaku Kougyou Co.) or a medium not containing serum for hybridoma culture (SFM-101, Nissui Seiyaku Co.) may be used. The culture temperature is usually 20~40°C, preferably about 37°C. The culture time is usually 5 days ~ 3 weeks, preferably 1 week ~ 2 weeks. The culture may be usually conducted in a 5% carbon dioxide. The antibody value of the supernatant of hybridoma culture can be determined as shown in the above-mentioned method for measuring the antibody value in the antiserum.

(b) Purification of the monoclonal antibody: The separation and purification of the monoclonal antibody may be conducted by a known method, for example, a separation and purification method for immunoglobulins (such as a salting-out method, an alcohol precipitation method, a isoelectric precipitation method, an electrophoresis method, a adsorption and desorption method with an ion-exchanger (for example, DEAE), a ultracentrifuge method, a gel filtration method, or a specific purification method that only an antibody is collected with an active absorbant such as an antigen-binding solid phase or protein A or protein G, and the bond is released to obtain the antibody).

[Production of the polyclonal antibody]

The polyclonal antibody of this invention can be produced by a known

59
59
H

method or a similar method. As an example, using an immunoanigen (protein antigen) itself or a complex of the immunoantigen and a carrier protein, it immunizes to a warm-blooded animal by using the same method as in the above-mentioed method for producing a monoclonal antibody, materials

5 containing the antibody for the protein of this invention are collected, and the antibody is separated and purified. As to the complex of an immunoantigen for immunizing a warm-blooded animal and a carrier protein, the kind of the carrier protein and a mixture ratio of the carrier to a hapten are not important, on condition that the antibody can be efficiently produced for the hapten

10 immunized by closslinking with the carrier. For example, the bovine serum albumin, bovine cyclogloblin, hemocyanin or the like can be used for coupling with the hapten at a weight ratio of about 0.1~20, preferably about 1~5 to 1 of hapten. In the coupling of the hapten and the carrier, several kinds of

15 condensation agents such as active ester agents containing glutaraldehyde, carbodiimide, maleimid active ester, a thiol group and a dithiopyridyl group can be used. The products from the condensation are administered to the parts of warm-blooded animals able to produce the antibody, along with itself or a carrier or a diluent. To enhance the ability of antibody production at the administration, a complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's

20 adjuvant may be administered. The administration is usually conducted once for every 2 ~ 6 weeks, and total is about 3 ~ 10 times. The polyclonal antibody can be collected from blood, ascites, preferably blood of the warm-blooded animal immunized by the above method. The polyclonal antibody value in the antiserum is determined by the same method described in the

25 above determination of the antibody value in the antiserum. The separation and purification of the polyclonal antibody can be conducted by the same method of separation and purification of immunogloblin as in that of the above separation and purification of the monoclonal antibody.

The treating agents containing the protein or the partial peptide of this

invention and the protein of this invention and the like have cancer cytotoxic activity, so that the agents may be used as agents for extracting disease tissues (the extract contains all and partial, preferably partial extract), and particularly, for treating fixed cancer. When the protein of this invention and
5 the like is used as the above treating and preventing agents, it is used after it is purified to at least 90%, preferably 95% or more, more preferably 98% or more, and further preferably 99% or more.

The inhibition activity of cancer cell proliferation of the protein of this invention or the like can be determined by a known method, or a cytotoxin
10 activity or an activity causing cell death is determined by known method or a similar method, preferably by the method described in the after-mentioned experiments. As the test compounds, for example, peptides, proteins, non-peptide compounds, synthetic compounds, fermentation products, cell extract, plant extract, animal tissue extract and blood plasma can be exemplified.
15 These compounds may be new compounds or known compounds.

The compounds or the salts obtained by the screening method or the kit for screening of this invention are selected from the above test compounds, for example, peptides, proteins, non-peptide compounds, synthetic compounds, fermentation products, cell extract, plant extract, animal tissue extract and
20 blood plasma. These compounds have an activity inhibiting the cytotoxic activity of the protein of this invention or the like or the inhibition activity of cancer cell proliferation of the protein of this invention or the like. As the salts of the compounds, the salts similar to the salts of the protein of this invention can be used.

25 When the compounds obtained by using the screening method or the kit for screening are used as the above treating agents, they can be used by usual means. For example, they are used as tablets, capsules, elixirs, microcapsules, sterile solutions, suspension or the like. As such obtained pharmaceutical preparations are safety and have low toxicity, for example,

62

✓

they may be administered to a human or a warm-blooded animal (such as mice, rats, rabbits, goats, pigs, cows, horses, birds, cats, dogs, monkeys and the like). The dosage weights of the compounds or salts thereof are changed by the action, the disease, the dosage route or the like. Commonly, in adults (estimated at 60 kg weight), about 0.1~100mg of the compound per day, preferably about 1.0~50mg, more preferably about 1.0~20mg can be administered. In parenteral administration, the dosage of the compounds that is variable by the object, the disease and the like, usually in adults (estimated at 60 kg weight), is suitably about 0.01~30mg of the compound per day, more preferably about 0.1~20mg, further preferably about 0.1~10mg by intravenous injection. In the other animals, the dosage of the weight estimated at 60kg can be used.

Screening of the candidate compounds of medicine for diseases: Since the protein or the like of this invention have a cytotoxic activity, the compounds or the salts promoting the function (such as a cytotoxic activity) of the protein or the like of this invention, for example, may be used as agents for treating cancers. On the other hand, the salts inhibiting the function of the protein or the like of this invention, for example, may be used as agents for treating and preventing gastritis and gastric ulcer. Accordingly, the protein or the like of this invention are effectively used as reagents for screening the compounds or the salts that promote or inhibit the function of the protein or the like of this invention.

Namely, this invention provides (1) a screening method characterized in that the protein or the partial peptide or the salts of this invention are used, and the method screens the compounds promoting the function (such as a cytotoxic activity) of the protein or the partial peptide or the salts of this invention, or the method screens the compounds inhibiting the function (such as a cytotoxic activity) of the protein or the partial peptide or the salts of this invention. The compounds promoting the function may be abbreviated as

6/7/62
70

'promoters' and the compounds inhibiting the function is abbreviated as 'inhibitors' hereinafter.

Moreover, this invention provides (2) a kit for screening promoters or inhibitors, characterized in that the protein or the partial peptide or the salts of this invention are contained. The above kit may be abbreviated as 'a kit for screening of this invention' hereinafter.

In embodiment, for example, in the above (1), it provides a screening method of promoters or inhibitors, characterized in that comparison is conducted between case (i) and case (ii). The case (i) is that the protein or the partial peptide or the salts of this invention are contacted with a cell, which is a normal cell containing a blood cell derived from a tissue of the above warm-blooded animals (preferably human) or the above-mentioned cancer cell. The case (ii) is that the protein or the partial peptide or the salts of this invention are contacted with a cell, which is a normal cell containing a blood cell derived from a tissue of the above warm-blooded animals (preferably human) or the above-mentioned cancer cell, and a test compound.

In embodiment, further, in the above (2), it provides a kit for screening promoters or inhibitors, characterized in that it contains the protein or the partial peptide or the salts of this invention, and a cell that is a normal cell containing a blood cell derived from a tissue of the above warm-blooded animals (preferably human) or the above-mentioned cancer cell or the like.

Further, concretely, in the screening method, case (i) and case (ii) are characterized in that the cytotoxic activities of the protein and the like of this invention are determined and compared.

The cytotoxic activity, the cell multiplication inhibition activity, and the activity causing cell death of the protein or the like of this invention can be determined by a known method or a similar method. However, more concretely, using established cell lines and the like, further, a substrate containing the test compound, a negative control which is a substrate not

63 63



containing the test compound, and a positive control which is a substrate containing M toxin, these three or two are used. Comparing the cell numbers under the conditions satisfactory in statistical significance, inhibition activity of the cytotoxic activity or the cell multiplication activity, or the specified
5 sample having the inhibition activity of the cytotoxic activity or the cell multiplication activity can be detected by existence or absence of the activities or increase and decrease. The cells used in the detection method are, for example, normal cells containing a blood cell derived from a tissue of the above warm-blooded animals (preferably human) or the above-mentioned
10 cancer cells of several kinds of warm-blooded animals (for example, cancer of the endometrium, endometrioma, breast cancer, cancer of the stomach, hepatic carcinoma, spleen cancer, carcinoma of the gallbladder, colon cancer, prostatic cancer, lung cancer, renal cancer, neuroblastoma, cancer of the urinary bladder, malignant melanoma, cancer of the tongue, carcinoma of the
15 gingiva, mouse fibroblast, African green monkey kidney, rat liver cancer, and the like).

As the test compounds, for example, peptides, proteins, non-peptide compounds, synthetic compounds, fermentation products, cell extracts, plant extracts, animal tissue extracts and the like can be exemplified. These
20 compounds may be new compounds or known compounds. For conducting the above screening method, the protein or the like of this invention is suspended in buffer suitable to the screening, and the samples of the protein or the like of this invention are prepared. As the buffer, phosphate buffer of pH about 4 ~ 10 (preferably, pH about 6 ~ 8), Tris-hydrochloride buffer or
25 the like, which does not inhibit the reaction of the protein or the like of this invention and the test compounds, may be used.

As concrete screening method, after the screening examination, ① a method for directly observing the cell changes under a microscope and counting the cells with a hemocytometer or the like, ② a method that the

69
X
6

- change of potassium, hemoglobins and the like, which are eluted from cells by the cell dath, is caught, ③ a method for determining the remaining cells after the reaction with tetrazolium salts or the like, ④ a method for determining the remining living cells with a radioactive labelled subsatance,
- 5 ⑤ a method for confirming the cell death by induction of cell apoptosis and the like can be exemplified. For example, as a compound increasing the cytotoxic activity of the protein or the like of this invention, a test compound in which the cytotoxic activity in the above case (ii) compared with the above case (i) is increased by about 20% or more, more preferably 30 % or more,
- 10 further preferably 50% or more, can be selected. On the other hand, as a compound inhibiting the cytotoxic activity of the protein or the like of this invention, a test compound in which the cytotoxic activity in the above case (ii) compared with the above case (i) is inhibited by about 20% or more, more preferably 30 % or more, further preferably 50% or more, can be selected.
- 15 These may be conducted as a method for high throughput screening. In the following, as method ②, a method for determining hemoglobins by hemolytic reaction and as method ③, a WST method are respectively used. In the methods, active carbon, CM cellulose and calcium alginate are selected as adsorbents which show the anti-M toxin activity.
- 20 It is further possible to examine and compare the solutions containing these anion control, positive control and test compounds with animal models to confirm the effects of the animal levels of the anti-M toxic materials. In these cases, many kinds of warm-blooded animals may be used. Particularly, a mouse, a rat, a dog, and a monkey may be used. As infected models, a
- 25 Mongolian gerbil, a mouse and a monkey are effectively used.

When the compounds obtained by the screening method or the kit for screening of this invention are used as the above treating and preventing agents, these compounds can be used by usual means. For example, using the same methods of the pharmaceutical preparations of the protein of the

65
67
F

invention, they are used as tablets, capsules, elixirs, microcapsules, sterile solutions, suspension or the like. As such obtained preparations are safety and have low toxicity, for example, they may be administered to a human or a warm-blooded animal (such as a mouse, a rat, a rabbit, a goat, a pig, a cow, a horse, a bird, a cat, a dog, a monkey and the like). The dosage weights of the compounds or salts thereof are changed by the action, the disease, the dosage route or the like. When the compounds are used for increasing the function of the protein or the like of this invention as a tissue regeneration agent after removing the disease tissues, commonly, in adults (estimated at 60 kg weight), about 0.1~100mg of the compound per day, preferably about 1.0~50mg, more preferably about 1.0~20mg can be orally administered. For the other animals, the dosage of the weight estimated at 60kg can be used.

Quantification of the protein or the partial peptide or the salts of this invention:

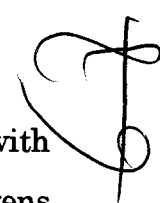
15 The antibodies for the protein and the like of this invention (occasionally, abbreviated as the antibodies of this invention, hereinafter) can specifically recognize the protein and the like of this invention, so that they can be used for quantification of the protein and the like of this invention in test liquid, particularly, quantification by a sandwich immunization technique. Namely, this invention provides (i) a method for quantifying the protein and the like of this invention in test liquid, characterized in that the antibody of this invention and test liquid and the protein and the like of this invention are competitively reacted, the ratios of the labelled protein and the like of this invention that bind to the antibody are determined, and (ii) a method for quantifying the protein and the like of this invention in test liquid, characterized in that the test liquid and the antibody insolubilized on a carrier and the other labelled antibody of this invention are reacted at the same time or continuously, and then the activity of the labeling agent on the insolubilized carrier is determined. In the above quantitative method (ii), preferably, one

antibody is an antibody recognizing the N ends of the protein and the like of this invention, the other antibody is an antibody reacting with the C ends of the protein and the like of this invention.

Moreover, using a monoclonal antibody for the protein and the like of this invention (ocasionally abbreviated as a monoclonal antibody of this invention, hereinafter), the quantification of the protein and the like of this invention can be conducted, and further, the detection can be conducted by using tissue dyeing. As these objects, antibody moleculars themselves may be used, or F(ab')₂, Fab', or Fab fraction of antibody moleculars may be used. The quantification of the protein and the like of this invention using of this invention should not be limited. For example, the quantity of the antibody, antigen or antibody-antigen complex corresponding to the quantity of the antigen (for example, the quantity of the protein) in the test liquid is chemically or physically detected, the obtained quantity is determined by a standard curve that is formed by standard liquid containing the antigen of a known quantity. As examples, nephelometry, a competition method, an immunometric method, and a sandwich method are preferably usable. Considering sensitivity and specificity, the after-mentioned sandwich method is preferred. As the labelling agents used in a determination method with a labelled substance, for example, a radioactive isotope, enzyme, fluorescence substance, luminescent substance and the like are exemplified. As the radioactive isotope, for example, [¹²⁵I], [¹³¹I], [³H], [¹⁴C] may be used. As the enzyme, stable and high active isotopes, for example, β -galactosidase, β -glucosidase, alkaliphosphatase, peroxidase, a dehydrogenase of malic acid and the like may be used. As the fluorescence substance, for example, fluorescamine, fluorescein isothiocyanate and the like may be used. As the luminescent substance, for example, luminol, luminol derivatives, luciferin, lucigenin and the like may be used. Moreover, for the bind of an antibody or an antigen and a labelling agent, a biotin-avidin type may be used.

The insolubilization of an antigen or an antibody may be conducted by physical adsorption, or the chemical bonding usually used for the insolubilization of proteins or enzymes. As the carrier, insoluble polysaccharides such as agarose, dextran and cellulose, synthetic resins such as polystyrene, polyacrylamide and silicone or glass can be exemplified. In the sandwich method, the test liquid is reacted with the insolubilized monoclonal antibody of this invention (primary reaction), then it is reacted with the other labelled monoclonal antibody of this invention (secondary reaction), and the activity of the labelling agent on the insolubilized carrier is determined to determine the quantity of the protein of this invention in the test liquid. The primary reaction and the secondary reaction can be changed. Otherwise these reactions may be conducted at the same time or by sliding the starting times. The labelling agent and the insolubilizing method may be treated the same as these reactions. In the immuno assay by using the sandwich method, it is unnecessary that the antibody used as an antibody for a solid phase or an antibody for labelling is one kind. A mixture of two or more kinds of antibodies may be used for improving the determination sensitivity. In the determination method of the protein and the like of this invention by using the sandwich method of this invention, the monoclonal antibodies used in the primary reaction and the secondary reaction preferably have different parts that the protein and the like of this invention is bound. Namely, as to the antibodies used in the primary reaction and the secondary reaction, for example, when the antibody used in the secondary reaction recognize the C end of the protein and the like of this invention, the antibody used in the primary reaction preferably recognize a part except the C end, for example, the N end.

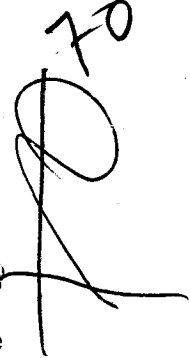
The monoclonal antibody of this invention may be used in a determination system except the sandwich method such as a competition method, or an immunometric method or nephelometry. In the competition method,



antigens and labelled antigens in test liquid are competitively reacted with antibodies, and then unreacted labelled antibodies (F) and labelled antigens (B) bound to the antibodies are separated (B/F separation), the labelled quantity of B or F is determined, and the antigen quantity is quantified. In the reaction method, soluble antibodies are used as antibodies. In the B/F separation, a liquid phase method that polyethyleneglycol or the second antibody for the above antibody is used, and a solid phase method that a solid phase antibody is used as the first antibody, or a soluble antibody is used as the first antibody and a solid phase antibody is used as the second antibody are exemplified. In the immunometric method, the antigens and the solid phase antigens in the test liquid are competitively reacted with labelled antibodies of a definite amount and then the solid phase and the liquid phase are separated. Otherwise, the antigens in the test liquid and the labelled antibodies of an excess amount are reacted, the solid phase antibodies are added to bind the unreacted labelled antibodies to the solid phase, and the solid phase and the liquid phase are separated. Continuously, the labelled quantity of any one of the both phases is determined, and the antigen quantity in the test liquid is determined. In the nephelometry, the quantity of unsoluble precipitates occurred as the result of the antigen-antibody reaction in the gel or in the solution is determined. When the quantity of antigens in the test liquid is little and a small amount of precipitates are obtained, laser nephelometry using laser scattering and the like may be preferably used.

When these immunological determination methods are applied in the determination method of this invention, special conditions and establishment of operations are unnecessary. Adding common technical ideas in the fields to usual conditions and operation methods in each method, the determination systems of the protein and the like of this invention may be constructed. As to the details of these common technical means, general books, specialized books may be referenced. For example, Kan Irie edited, Radioimmuno Assay,

Kodan-sha (1974), Kan Irie edited, Radioimmuno Assay, continued, Kodan-sha (1979), Eiji Ishikawa et al. edited, Immunoenzymometric Assay, Igaku Shoin (1978), Eiji Ishikawa et al. edited, Immunoenzymometric Assay, 2nd edition, Igaku Shoin (1982), Eiji Ishikawa et al. edited, Immunoenzymometric Assay, 3rd edition, Igaku Shoin (1987), Methods in ENZYMOLOGY, Vol.70, Immunochemical Techniques (Part A): ibid., Vol.73, Immunochemical Techniques (Part B), ibid., Vol.74, Immunochemical Techniques (Part C), ibid., Vol.84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays), ibid., Vol.92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), ibid., Vol.121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), all are published by Academic Press Co. can be referenced. As described above, by using the antibody of this invention, the protein and the like of this invention can be sensitively quantified. Moreover, by quantifying the concentrations of the protein and the like of this invention by using the antibody of this invention, when the increased concentrations of the protein and the like of this invention are detected in patients of *Helicobacter pylori* infection, patients have diseases, for example, gastritis, gastric ulcer, gastric cancer, valvular disease, diabetes mellitus, various cancers (such as cancer of the endometrium, endometrioma, breast cancer, colon cancer, prostatic cancer, lung cancer, hepatic carcinoma, spleen cancer, carcinoma of the gallbladder, renal cancer, neuroblastoma, cancer of the bladder, malignant melanoma and the like). Otherwise, it is possible to diagnose that the possibility of future morbidity is high. The antibody of this invention can be used for detection of the protein and the like of this invention in test liquid such as body fluid or tissues. It is used for formation of the antibody column for using purifying the protein and the like of this invention, detection of the protein and the like of this invention in each fraction at the purification, and analysis of the behavior of the protein and the like of this invention in test cells.

70 70


The medicine containing the antibody of this invention, the antibody of this invention (neutralizing antibody) having an action for neutralizing the activities of the protein and the like of this invention can be used as medicines for treating and preventing diseases such as gastritis, gastric ulcer, gastric cancer, valvular disease, diabetes mellitus, various cancers (such as cancer of the endometrium, endometrioma, breast cancer, colon cancer, prostatic cancer, lung cancer, renal carcinoma, neuroblastoma, cancer of the bladder, malignant melanoma and the like). The humanized antibody of this invention for the protein and the like of this invention can be used as medicines for treating and preventing diseases such as gastritis, gastric ulcer, gastric cancer, valvular disease, diabetes mellitus, various cancers (such as cancer of the endometrium, endometrioma, breast cancer, colon cancer, prostatic cancer, lung cancer, renal carcinoma, neuroblastoma, cancer of the bladder, malignant melanoma and the like). The humanized antibody can be formed with reference to the methods described in Nat Biotechnol, 14, 845-851 (1996), Nat Genet. 15, 146-156 (1997) and PNAS, 97(2), 722-727 (2000). In the following, these neutralizing antibody and humanized antibody of this invention are abbreviated as the antibody of this invention.

The above treating and preventing agents containing the antibody of this invention can be orally or parenterally administered as liquid as it is or a medicine composition of a suitable dosage form to human or mammalia (such as a mouse, a rabbit, a goat, a pig, a cow, a cat, a dog, a monkey and the like). The dosage of the agents is changed by the object, the disease, the condition of illness, the dosage route or the like. When the agents are used for treating or preventing a tumor of the endometrium, a dose of the antibody of this invention is usually 0.01~20mg/kg weight, preferably 0.1~10mg/kg weight, more preferably 0.1~5 mg/kg weight about 1-5 times per day, preferably about 1-3 times per day. It is convenient to administer the agent by an intravenous injection. A dosage in the other parenteral or oral

2271
X

administration also may be according to the above dosage. When the condition of illness is very severe, the dosage may be increased in proportion to the condition. The antibody of this invention can be administered as it is or as a suitable medical composition. The medical composition used in the

5 administration contains a pharmacologically allowable carrier for the above antibody or the salt, a diluent or an excipient. Such a composition may be provided as a dosage form suitable for oral or parenteral administration. Namely, for example, as the composition for oral administration, the dosage form is solid or liquid, concretely a tablet (containing a sugar-coated tablet

10 and a film coated tablet), a pill, a granule, powder, a capsule (containing a soft capsule), syrup, emulsion, suspension or the like. Such a composition is prepared by a known method, and it may contain the carrier usually used, a diluent or an excipient. For example, as the carrier for the tablet and the excipient, lactose, starch, sucrose, magnesium stearate and the like can be

15 used.

After-mentioned sequence numbers of the sequence listing show the following sequence.

SEQ ID No.1: it shows an amino acid sequence deribed from *Helicobacter pylori* 60190 (M toxin).

20 SEQ ID No.2: it shows a base sequence of DNA that codes derived from *Helicobacter pylori* 60190 protein (M toxin) of this invention having the amino acid sequence represented by SEQ ID No.1.

SEQ ID No.3: it shows a base sequence of the primer (synthetic) DNA used in Example 3.

25 SEQ ID No.4: it shows a base sequence of the primer (synthetic) DNA used in Example 3.

The transformant, *Escherichia coli* M toxin/pET30EK/LIC/DH5 α obtained in after-mentioned Example 3 has been deposited by deposit No. FERM BP-8218 on 17 October 2002 at National Institute of Advanced

22 72
X

Industrial Scienc and Technology (IPOD). Moreover, the hybridoma clone No. 4 obtained in after-mentioned Example 4 has been deposited by deposit No. FERM BP-8222 as BALB- c / P 3 U 1/004-1 G 9 on 23 October 2002 at National Institute of Advanced Industrial Scienc and Technology (IPOD).

- 5 Further, the hybridoma clone No.101 has been deposited by deposit No. FERM BP-8223 as BALB- c / P 3 U 1/101-1 C 10 on 23 October 2002 at National Institute of Advanced Industrial Scienc and Technology (IPOD). The hybridoma clone No.116 has been deposited by deposit No. FERM BP-8224 as B A L B - c / P 3 U 1/116-5 D 7 on 23 October 2002 at National Institute of
10 Advanced Industrial Scienc and Technology (IPOD).

Examples

- This invention will be understood more readily in reference to the following examples. However, these examples are intended to illustrate this invention and are not to be construed to limit the scope of the invention. The gene
15 manipulation using E.coli was according to the method described in Molecular Cloning.

Example 1: A method for purifying and extracting the toxin of this invention from *Helicobacter pylori*

- Helicobacter pylori* can be obtained by a separated strain which has already
20 established (for example, from American Type Culture Collection) or by culturing a strain separated from clinical test samples. In this example, a separated strain of *Helicobacter pylori* 60190 was used. Using an agar medium that 5% bovine serum (produced by Sigma Co.) was added to a Brain Heart Infusion agar medium (poduced by Difco Co.), this separated strain was
25 subcultured in 2-5 passages for about 1-2 weeks at a temperature of 37°C and a humidity of 90% or more under microaerobic conditions (CO₂ 5-10%). It was confirmed under a microscope that the cells were not died or not in a colloi form but grown satisfactorily. The cells were transferred to Brain Heart Infusion agar culture (produced by Difco Co.) plate containing not

73 73
↑

serum but 5% 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin. After the culture and grown conditions were confirmed under the same conditions as described in the above, the cells were transferred to cultures containing 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin with gradual stepwise decreases, i.e., 2%, 1% and 0.5% of the concentration.

In a liquid culture of Brain Heart Infusion containing 0.5% 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin, the cells were cultured at a temperature of 37°C under microaerobic conditions for about 16 hours, while agitated with a rotary shaker at 100-120rpm. Pelletal bacteria cells were collected in by centrifugation at 10000 $\times$ g for 20 minutes. These were suspended in 10mM Tris-HCl pH7.7 buffer (abbreviated as buffer A, hereinafter. The pH is fully 6.1 or more, because the pH of aimed protein is pI 6.08.) and sonicated. After storing overnight at a temperature of -80°C, the cells were sonicated again and centrifuged at 100000 $\times$ g for 60 minutes. Only the most upper layer of separated three layers was extracted.

The extract liquid was crudely purified with a 70% solution of ammonium sulfat. The resulting extract was purified by ion exchange chromatography with anion exchange resin of beads having relatively big particle diameters (DEAE Sephacel of Amersham Pharmacia Biotech AB). The buffer A was used as equilibrium buffer, and a mixture of the buffer A and a solution of 0.3M NaCl salt was used as eluate. Using the buffer A and the eluate, the cells were extracted by concentration gradient. A suitable quantity of each fraction was added dropwise on wells that HeLa cells were seeded, and cell viability was evaluated in each well. The evaluation was conducted by using WST assay using Cell Counting kits (DOJIN Laboratories). Comparing with a control, fractions showing significantly less viability and fractions having relatively coinciding increase curves of the protein were evaluated along with the results of electrophoresis to use as sample fractions for the next purification process.

74 74

Hydrophobic chromatography (Phenyl Sepharose CL-4B, Amersham Pharmacia Biotech AB) that has a different separation system from that of the next time was selected. Equilibrium buffer containing 1M ammonium sulfate in 10mM phosphate buffer was used. Elution buffer containing 40% ethylene glycol in 10mM phosphate buffer was used. After the cells were extracted by concentration gradient, each sample was evaluated by the same method as described in the above.

The samples extracted by the above process were extracted again by anion exchange chromatography with beads having relatively small particle diameters (RESOURCE Q of Amersham Pharmacia Biotech AB). The buffer A was used as equilibrium buffer, and a mixture of the buffer A and a solution of 1M NaCl salt was used as elution buffer. Using the chromatography, a single band of protein of about 41000 of a molecular weight was finally obtained. The kind and order of these chromatographys may be changed and may be further added.

After the resulting signal band was stained with Coomassie Brilliant Blue, it was transcribed on a nitrocellulose membrane or (polyvinylidene difluoride) membrane with a blotting apparatus and analyzed with an amino acid sequencer. As the results, as described in the above, the amino acid sequences of N ends of gene locus HP1037 of a registered database (*Helicobacter pylori* 22695) matched with 95% (19 bases in 20 bases). (Fig. 1)

Example 2: Amino acid sequences and DNA sequences by a gene technological production method

In this example, a separation strain of *Helicobacter pylori* 60190 was used. As described in the above, all gene analyses of *Helicobacter pylori* 22695 of different strains were already done. Homologous gene locus can be estimated by the search for the database of TIGR (The Institute for Genomic Research). It was found that gene locus HP1037 of *Helicobacter pylori* 22695 coded the homologous protein.

25 75

From the results, the cloning of the protein of this invention was performed. Namely, *Helicobacter pylori* 60190 was used as a template, firstly, conveniently plural groups of suitable primers based on gene locus HP1037 and gene locus HP1036 of the upstream and gene locus HP1038 of the downstream were formed (at 5' site and 3' site) to perform sequencing. DNA polymerase having proofreading function was used. Each group of primers was constituted so as to contain sufficient mutual primer parts, and plural sequencings from 5' site and 3' site were performed. The resulting DNA sequences were shown in SEQ ID No. 2 of the sequence listing. The amino acid sequences were shown in SEQ ID No.1.

Example 3

Expression experiment of the toxic protein by gene recombination

E.coli was used in the expression experiment. Vector pET-30EK/LIC (produced by Novagen Co.) and *E.coli* BL21 (DE3) for expression were used. The sense primer was SEQ ID No.3 inserting GACGACGACAAG at 5' site of the sense chain to the code of the toxic protein derived from *Helicobacter pylori* 60190 that was cloned in Example 2. The antisense primer was SEQ ID No.4 inserting GAGGAGAAGCCCGGTTA at 5' site. Inserting genes were formed by a PCR method by using the above primers. The inserted genes were prepared in the presence of 25mM dATP and 100mM DTT with T4 DNA polymerase to fit for LIC site of the vector and warmed in the presence of 25mM EDTA. The formed recombinant was again sequenced to confirm that was identical with SEQ ID No. 1. It was further transformed into *E.coli* BL21 (DE3) for expression, and cultured in a LB medium containing 30 μ g/ml of kanamycin.

Shake culture was conducted to obtain about 0.4 of OD₆₀₀ at a temperature of 37°C at 250rpm. Isopropyl-beta-thiogalactoside was added to obtain the final concentration of 1mM, and further the mixture was shaken for 2 hours. Since the fused protein formed an inclusion body, *E.coli* was collected with

76 76
f

centrifugation, and the inclusion body of the protein was obtained with a BugBuster reagent and Benzonase Nuclease (both are available from Novagen Co.) . The protein was separated by an electrophoresis method of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE), and the corresponding single
5 band was confirmed by silver stain. The protein was then refolded and compared with the control with a WST reagent (Dojin Chemical Laboratories Ltd. Cell Counting Kit) by using HeLa cells and the other warm-blooded animal cells. As the results, significant differences of survival were evaluated, and it was found that the expression protein had equal activities to
10 those of purified protein. It was found that the expression protein had the same activities to the normal human gastric cells as HeLa cells of cervical cancer cells. (Fig.2). It was also found that not only to the other human tissues, but also to mammalian cells the protein had broad activities. (Fig. 3, Fig.4).

15 Example 4

Forming of monoclonal anti-M toxic antibody:

Expression M toxin 240 μ g, which had been refolded, was subcutaneously administered two times at several positions of BALB/C mouse. After 4 days of final immunization, the mouse spleen was excised and press filtered with
20 stainless meshes, and suspended on Eagle's modified minimum essential medium (MEM) to obtain a suspended solution of spleen cells. As the cells used for cell fusion, Myeloma cells P3-X63. Ag 8. U1 (P3U1) derived from BALB/C mouse was used as the cells used in the cell fusion. [Current topics in microbiology and immunology, 81, 1(1978)]. The cell fusion was conducted in
25 accordance with the origin method [Nature, 256, 495 (1975)] . Namely, spleen cells and P3U1 were washed respectively with MEM not containing serum three times and mixed at 6.6 : 1 of a ratio of spleen cells and P3U1 numbers. Cells were precipitated by centrifugation at 750 $\times$ g for 15 minutes. All of the supernatant was removed, and the precipitate was unfastened, 0.3 ml of 45%

77 77
X

polyethylene glycol (PEG) 6000 (Produced by Wako Junyaku Co.) was added, and the mixture was permitted to stand in a warm water tank of 37°C for 7 minutes to perform the fusion. After the fusion, MEM in limited amounts was added to the cells, and MEM of total 15 ml was added. The mixture was

5 centrifuged at $750 \times g$ for 15 minutes and the supernatant was removed. The cell precipitate was suspended in GIT medium (produced by Wako Junyaku Co.) (GIT-10% FCS) containing 10% bovine fetal serum to obtain P3U1 of 2×10^5 per 1 ml, and seeded into 24-well multi dishes (produced by Iwaki Co.) at 1 ml per well in 168 wells. After seeding, the cells were incubated in 5%

10 carbon dioxide incubator at a temperature of 37°C. After 24 hours, GIT-10%FCS medium (HAT medium) containing HAT (hypoxanthin $1 \times 10^{-4}M$, aminopterin $4 \times 10^{-7}M$ and thymidine $1.6 \times 10^{-3}M$) was added at 1 ml per well to initiate HAT selective cultivation. After 4 and 7 days, 1ml of the old liquid was discarded and the HAT selective cultivation was continued by adding 1

15 ml of the HAT medium. Multiplication of hybridoma was found after 9 days of the cell fusion, and the supernatant was collected. The antibody value on the supernatant was determined by the following method. Namely, the culture supernatant 100 μ l and HRP-labelled M toxin 100 μ l, which is diluted to 200-fold with buffer C, were added into each well of microplates binding

20 anti-mouse immunoglobulin antibody, and reacted overnight at a temperature of 4°C. After the plates were washed with PBS, to make microplates binding anti-mouse immunoglobulin antibody, firstly, a 0.1M carbonate buffer solution, pH9.6 containing goat anti-mouse immunoglobulin antibody (IgG fraction, produced by DAKO Co.) 100 μ g/ml was pipetted into 96-well microplates at

25 100 μ l per plate, and is permitted to stand for 24 hours at a temperature of 4°C. Then, the plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH7.4), 25% Brock Ace (trademark, produced by Yukijirushi Milk Products Co.) and PBS, pH7.2 containing 0.1% NaN_3 were pipetted at each 300 μ l to block excess binding parts of the well and treated for at least 24 hours at a

78 78
X

temperature of 4°C. To each well of the above microplates binding anti-mouse immunoglobulin antibody, mouse anti-serum 100 μ l, which is diluted with buffer EC [0.02M phosphate buffer, pH7.0 containing 0.2% BSA, 0.4 M NaCl, 0.4 % Brock Ace, 0.05 % CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate), 2mM EDTA and 0.1% NaN₃], was added and reacted for 16 hours at a temperature of 4°C. Then, the plates were washed with PBS, pH7.4, and HRP-labelled refolding toxin protein 100 μ l was added and reacted for 7 hours at room temperature. The above refolding toxin protein was prepared in the above Example 3 by diluting to 100-fold with buffer C [0.02M phosphate buffer, pH7.0, containing 1% BSA, 0.4 M NaCl and 2mM EDTA]. The plates were then washed with PBS, pH7.4, a TMB microwell peroxidase substitute system (KIRKEGAARD & PERRY LAB. available from Funakoshi Yakuhin) 100 μ l was added, and reacted at room temperature for 10 minutes to determine the enzyme activity on the solid phase. After the reaction was stopped by adding 1M phosphoric acid 100 μ l, the absorbance at 450nm was determined with a plate reader (MTP-120, produced by Corona Co.). According these methods, the enzyme activity on the solid phase was determined. As the results, 18 wells that the antibody value is found were selected from 123 wells, and the hybridomas were frozen and stored. Hybridomas of 6 wells, No.4, No.53, No.61, No.76, No.101 and No.116 were cloned by dilution method. In the cloning, thymocytes of BALB/C mouse as feeder cells were added at 5×10^5 per well After the cloning, the antibody value of the supernatant was determined by the same method. Positive clones were No.4, No.101 and No.116. These clones were as antibody-producing hybridomas of expression M toxin.

Example 5

Determination of a class and a subclass of monoclonal antibodies:

By the method described in Example 4, anti-rabbit IgG-binding micro plates were formed. Namely, 0.1M carbonate buffer containing goat anti-

79 79
X

pH9.6 was pipetted into 96-well microplates at 100 μ l per well and left at a temperature of 4°C for 24 hours. The plates were then washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH7.4), 25% Block Ace (trademark, produced by Yukijirushi Milk Products Co.) and PBS, pH7.2 containing 0.1% NaN_3 were pipetted at each 300 μ l to block excess binding parts of the well and treated for at least 24 hours at a temperature of 4°C. To the anti-rabbit IgG antibody-binding microplates, buffer EC 50 μ l and subtype specific antibody 100 μ l containing in an iso-type typing kit produced by Bio-Rad Laboratories were added to react for one day at a temperature of 4°C. After the plates were washed with PBS, pH7.4, the culture supernatant of the hybridomas described above was added and reacted for one day at a temperature of 4°C. The plates was washed with PBS, pH7.4, and HRP-labelled refolding toxin protein 100 μ l, which was prepared in the above Example 3 by diluting to 100-fold with buffer C [0.02M phosphate buffer, pH7.0, containing 1%BSA, 0.4 M NaCl and 2mM EDTA], was added and reacted for 6 hours at room temperature. The plates were washed with PBS, pH7.4, and the enzyme activity on the solid phase was determined by the method described in Example 4. As the results, the subclasses of the monoclonal antibody produced by these hybridomas were No.4 (IgG1), No.101 (IgG2 b) and No.116 (IgG2a).

Example 6

A method for producing mouse ascites fluid of hybridoms:

Hybridomas, No.4, No.101 and No. 116 were mouse ascites. Mineral oil 0.5ml was parenterally administered to mice, previously. To the mice (BALB/C, female), the above s were parenterally administered at $1-3 \times 10^6$ cells/mouse, and the ascites containing the antibody were collected after 6-20 days. The monoclonal antibody was purified from the obtained ascites with a protein-A column. Namely, the ascites about 25ml were diluted with the same volume of binding buffer (3.5M NaCl, 1.5M glycine containing 0.05%

86
86

NaN₃, pH9.0), the solution was precipitate to a recombinant protein-A-agarose (Repligen Co.) column that was previously equilibrated with binding buffer, the specific antibody was eluted with elution buffer (0.1M citric acid buffer, pH3.0 containing 0.05% NaN₃). The elution liquid was dialyzed with PBS, pH7.4 at a temperature of 4°C for 2 days, and filtered for removing bacilli with a filter of 0.22 μ m (produced by Millipore Co.) or stored at a temperature of -80°C.

Example 7 Preparation of polyclonal antibody M toxin

Cytotoxic protein M toxin of this invention 4.1mg was mixed with Freund's complete adjuvant and the mixture was subcutaneously immunized to a rabbit. After one week, the same amount of the M toxin was mixed with Freund's incomplete adjuvant and the mixture was further subcutaneously immunized to the rabbit. After the immunization, collected blood was centrifuged to remove hemocyte components, and anti-serum was obtained.

Example 8

Analysis of M toxin by Western Blotting:

SDS-Sample Buffer containing 2-mercaptoethanol was added to the supernatant obtained in Example 3, the mixture was electrophoresed with Peptide-PAGE (TEFCO) and electrically transferred to a PVDFmembrane (Amersham). Each antibody (2 μ g/ml) obtained in Example 4 and Example 6 was used as primary antibody. HRP (Horseradish peroxidase) -labelled-anti-rabbit and anti-mouse IgG antibodies (2000-fold dilution; Dako) was used as secondary antibody. The coloration was performed with an ECL Western Blot Detection System (Amersham). As the results, it was confirmed that each primary antibody recognized the expression protein. (Fig.5).

Example 9

Active carbon (0.2~0.1mm of diameter), CM cellulose and calcium alginate, each 0.5ml, were charged in three colums. After equilibrating with Tris buffer 10mM, pH7.7, 0.5ml of M toxin 400nM having refolded activity was

81
A

added into each column, and these column was plugged and allowed to stand for 60 minutes at a temperature of 25°C. Meanwhile, Tris buffer alone and Tris buffer containing the same M toxin were allowed to stand under the same conditions. All columns were then opened, each 100 μ l dropping from columns was separated, further, each Tris-buffer 0.5ml was added to each column, and each 100 μ l was collected. Whole blood of normal adults was centrifuged 2-3 times at 800 $\times$ g for 10 minutes until the supernatant became transparent. The precipitated erythrocytes 10 μ l added to 10mM Tris buffer 990 μ l was used as a positive control. Similarly, the precipitated erythrocytes 10 μ l added to 0.9% salt 10mM Tris buffer was used as a negative control. Samples were collected from the above columns. Erythrocytes of 1 volume per 100 volume of the sample were added to the samples. The controls and the samples were compared by the eluted hemoglobin relative concentration with a multiple plate reader (Biorad) by measuring as an absorbance of 415nm. (Fig. 6).

Example 10

The ratios that HeLa cells (human cancer cells of the uterine cervix) were exposed to the fractions from each columns of Examole 9 and the viability were determined by a WST method using a tetrazolium salt. HeLa cells were cultured in 96-well plates for 24 hours at a ratio of 10000 cells per well. A negative control of culture liquid only, each sample liquid, and a positive control of 20nM of the toxin protein were respectively added to each well, and thsesse were cultured for 12 hoursat at a temperature of 37°C. Using a Cell Counting Kit (DOJIN LABORATORIES Ltd. Co.) , the ratios of cell viability detected by a WST method were measured as an absorbance of 415nm wavelength. (Fig. 7, Fig. 8).

Industrial Applicability

The protein and the partial peptide of this invention and the like can be used, for example, as treating agents of cancers. The antibody of this

83
M

Sequence Listing

<110> Hiroyuki OHNO

<120> Cytotoxic Protein

<130> 200212050

5 <160> 4

<210> 1

<211> 357

<212> PRT

<213> *Helicobacter pylori*

10 <400> 1

Met Lys Gly Leu Glu Arg Glu Ser His Phe Thr Leu Asp Glu Asn Ala

1 5 10 15

Met Phe Phe Glu Cys Ala Tyr Ser Cys Asp Asn Ala Leu Phe Leu Gln

20 25 30

15 Leu Glu Asp Arg Ser Phe Phe Ile Thr Asp Ser Arg Tyr Thr Gln Glu

35 40 45

Ala Lys Glu Ser Ile Gln Pro Lys Asn Gly Val Leu Ala Glu Val Ile

50 55 60

Glu Ser Ser Asp Leu Val Gln Ser Thr Ile Asp Leu Ile Ala Lys His

20 65 70 75 80

Ser Val Lys Lys Leu Phe Phe Asp Pro Asn Gln Val Asn Leu Gln Thr

85 90 95

Tyr Lys Arg Leu Asp Ser Ala Ile Gly Asn Lys Val Ile Leu Glu Gly

100 105 110

25 Val Pro Ser Tyr His Arg Gln Lys Arg Ile Ile Lys Asn Asn His Glu

115 120 125

Ile Gln Leu Leu Lys Lys Ser Gln Ala Leu Asn Val Glu Ala Phe Glu

130 135 140

Asn Phe Ala Glu Tyr Val Lys Lys Ile Phe Asp Glu Lys Glu Ser Leu

84 84
X

145 150 155 160
Ser Glu Arg Tyr Leu Gln His Lys Val Lys Asp Phe Leu Thr Lys Glu
165 170 175
Gly Val Tyr Asp Leu Ser Phe Glu Pro Ile Leu Ala Leu Asn Ala Asn
5 180 185 190
Ala Ser Lys Pro His Ala Leu Pro Ser Ala Lys Asp Phe Leu Lys Ala
195 200 205
Glu His Ser Ile Leu Leu Asp Met Gly Ile Lys Tyr Glu Arg Tyr Cys
210 215 220
10 Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ala Phe Phe Asp Pro Lys Asp Phe Val Phe
225 230 235 240
Lys Arg Glu Gln Ser Phe Lys Asp Lys Glu Ser Gln Lys Ile Tyr Asp
245 250 255
Ile Val Lys Glu Ala Gln Glu Lys Ala Ile Ser Gly Ile Arg Ala Gly
15 260 265 270
Met Thr Gly Lys Glu Ala Asp Ser Leu Ala Arg Gly Val Ile Ser Asp
275 280 285
Tyr Gly Tyr Gly Gln Tyr Phe Thr His Ser Thr Gly His Gly Ile Gly
290 295 300
20 Leu Asp Ile His Glu Leu Pro Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Glu Thr Ile Leu
305 310 315 320
Glu Glu Gly Met Val Phe Ser Val Glu Pro Gly Ile Tyr Ile Pro Gly
325 330 335
Phe Phe Gly Val Arg Ile Glu Asp Leu Val Val Ile Lys Asn Ser Arg
25 340 345 350
Ala Glu Leu Leu
355

<210> 2

<211> 1071

<212> DNA

<213> *Helicobacter pylori*

<400> 2

atgaaaggat tagaaagaga atcgcatc acgcttgatg aaaacgcat gtttttgag 60
 5 tgtgcttata gttgcgataa tgctttgttt ttgcaattag aggatcgtc gttttttatc 120
 actgattctc gctacactca agaangctaaa gaaagcattc agcctaaaaa tggcgtttta 180
 gcggaagtga tagaatccag cgatttagtc caaagcacga ttgattgat cgcaaaacac 240
 tcggttaaaa agctcttttt tgatcccaat caagtgaatt tgcaaacctt caagcgtttg 300
 gattcggcga ttgggaataa ggttatttta gagggcgtgc ctagttacca ccgcaaaaaa 360
 10 cgcattcatta aaaacaatca tgagatccaa ctctcaaaa aatctcaagc gttgaatggt 420
 gaagcttttg aaaattttgc cgagtatgtg aaaaagattt ttgatgaaaa agagtccttg 480
 agcgagcggg atttcagca taaggtaag gactttttga ctaaagaggg ggtttatgat 540
 ctgagctttg agcctatttt agccttgaat gcgaacgcga gcaaacccca tgctttgcct 600
 agtgcgaagg attttttaaa agcggagcat agcattcttt tggatatggg gatcaaatac 660
 15 gaacgctatt gctcgatag gactcgcag gcttttttg accctaaaga tttgtcttc 720
 aaaagagagc agagtttcaa ggataaagag agtcaaaaaga ttatgacat tgtgaaagaa 780
 gcgcaagaaa aggtatttc aggtattaga gcgggcatga ccggtaaaga agcggacagc 840
 ttggctaggg gagtgattag cgattatggt tatgggcaat attcactca cagcactgga 900
 catggcattg gcttagacat tcatgagctt ccttatattt catcgcgcag tgaaaccatt 960
 20 ttagaagagg gcatggtgtt ttctgtagag cctgggattt ataccctgg attttttggg 1020
 gtgcgcattg aagatttagt ggtgatcaaa aattctaggg ctgagctttt g 1071

<210> 3

<211> 32

25 <212> DNA

<213> *Helicobacter pylori*

<400> 3

gacgacgaca agatgaaagg attagaaaga ga 32

8A 8B
[Handwritten signature]

CLAIMS

1. A cytotoxic protein comprising a protein having at least 70 % or more identity for the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 1.
2. A partial peptide of the cytotoxic protein described in claim 1, characterized
5 in that the protein has the same cytotoxic activity as that of the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 1.
3. The cytotoxic protein of claim 1 or claim 2 wherein the protein is produced with *Helicobacter pylori*.
4. The cytotoxin protein of claim 1 or claim 2 wherein the protein is obtained
10 by culturing a transformant which is transformed with a recombination vector containing DNA of SEQ ID No. 2 coding the cytotoxin protein of claim 1 or 2.
5. The cytotoxin protein of claim 4 wherein the transformant is deposited by deposition No. FERM BP-8218 at National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (IPOD).
- 15 6. An antitumor agent which contains the cytotoxic protein of claim 1 or 2.
7. A monoclonal antibody specific against the cytotoxic protein which is obtained by immunization of the cytotoxic protein of claim 1 or 2 against a mammal.
8. The monoclonal antibody of claim 7 which is produced with a hybridoma
20 clone of deposition No. FERM BP-8222.
9. The monoclonal antibody of claim 7 which is produced with a hybridoma clone of deposition No. FERM BP-8223.
10. The monoclonal antibody of claim 7 which is produced with a hybridoma clone of deposition No. FERM BP-8224.
- 25 11. A polyclonal antibody specific against the cytotoxic protein which is obtained by immunization of the cytotoxic protein of claim 1 or 2 against a mammal.
12. A method for detecting and diagnosing the cytotoxic protein of claim 1 or 2 wherein the monoclonal antibody or polyclonal antibody described in any

34

one of claims 7-11 is used.

13. An agent for preventing and treating gastric cancer, gastritis, gastric ulcer triggered by the cytotoxic protein of claim 1 or 2, wherein the monoclonal antibody or polyclonal antibody described in any one of claims 7-11 are used.

5 14. A method for screening a compound promoting or inhibiting activity of the protein of claim 1 or 2, wherein cell multiplication inhibition activity, cytotoxic activity or cell death is judged by comparison between negative or positive control groups with a warm-blooded animal cell.

10 15. A kit for screening a compound or its salt promoting or inhibiting activity of the protein of claim 1 or 2, wherein the protein of claim 1 or 2 is comprised.

16. A compound or its salt promoting or inhibiting activity of the protein of claim 1 or 2, wherein the compound is obtained by the screening method of claim 14 or with the kit for screening of claim 15.

15 17. A medicine containing a compound or its salt, wherein the compound has activity inhibiting cytotoxic activity of warm-blooded animal cells with the protein of claim 1 or 2.

20 18. A medicine of claim 17, which is an agent for preventing or treating gastritis, gastric ulcer, gastric cancer and a disease showing that it is caused with M toxin by the screening method of claim 14 or with the screening kit of claim 15.

89
27

ABSTRACT

This invention relates to a new cytotoxic protein (M toxin, mucous layer devastating toxin) produced by *Helicobacter pylori* and the use.

This invention provides a cytotoxic protein (M toxin) produced by
5 *Helicobacter pylori*, a partial peptide, and an antitumor agent containing the
cytotoxic protein. The protein is obtained by culturing a transformant which
is transformed with a recombination vector containing DNA coding the
cytotoxin protein. This invention provides further the use of the protein.

10

15

20

25

Fig. 1

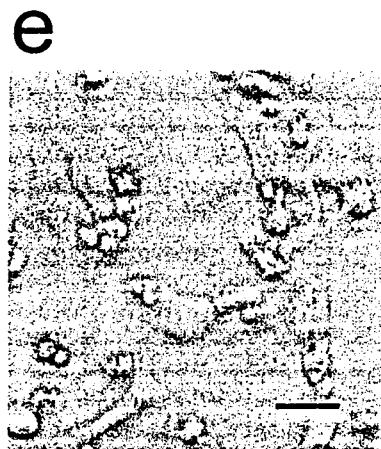
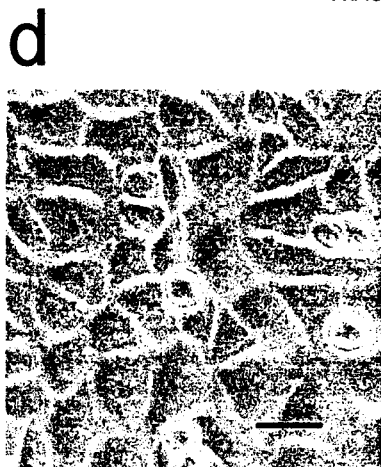
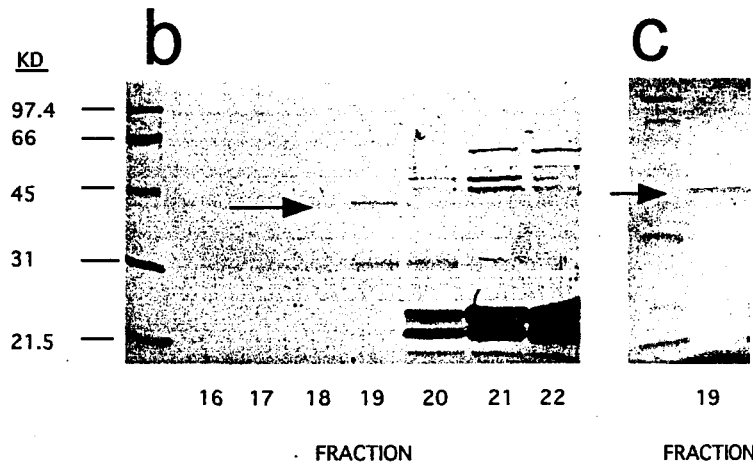
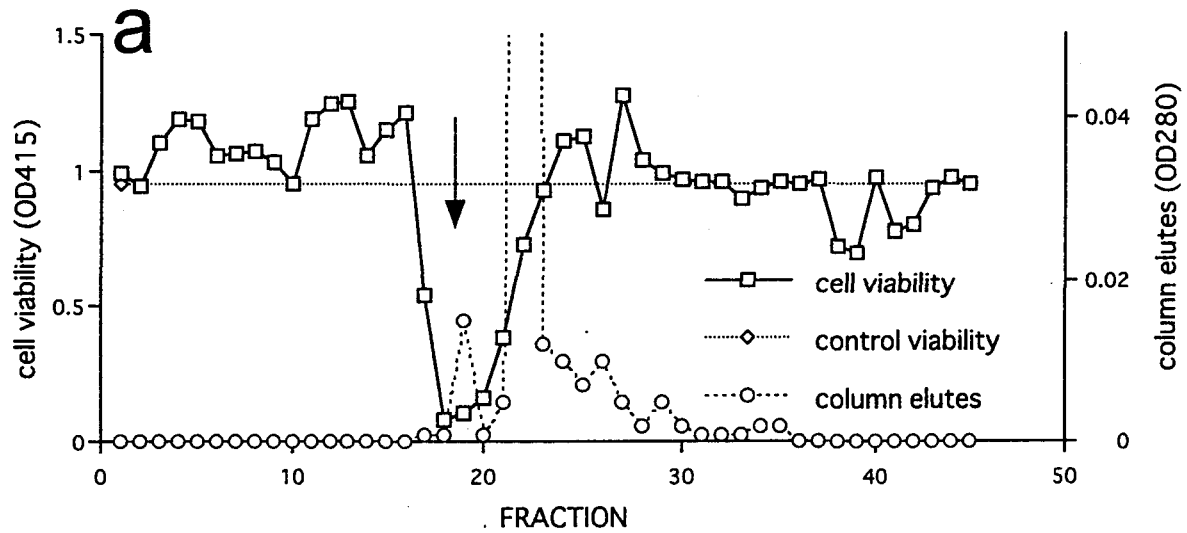


Fig. 2

2/8

Fig. 2

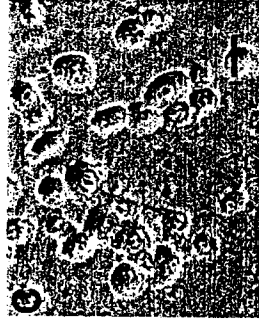
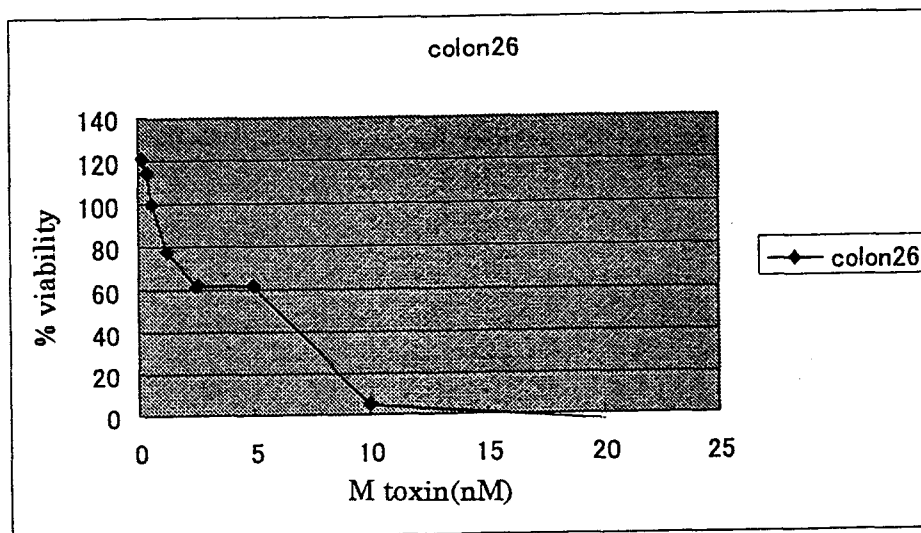
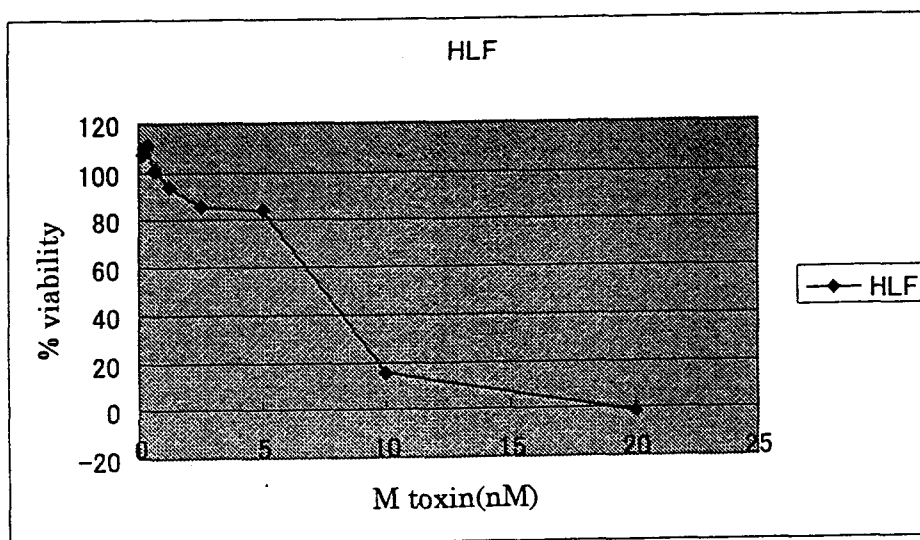
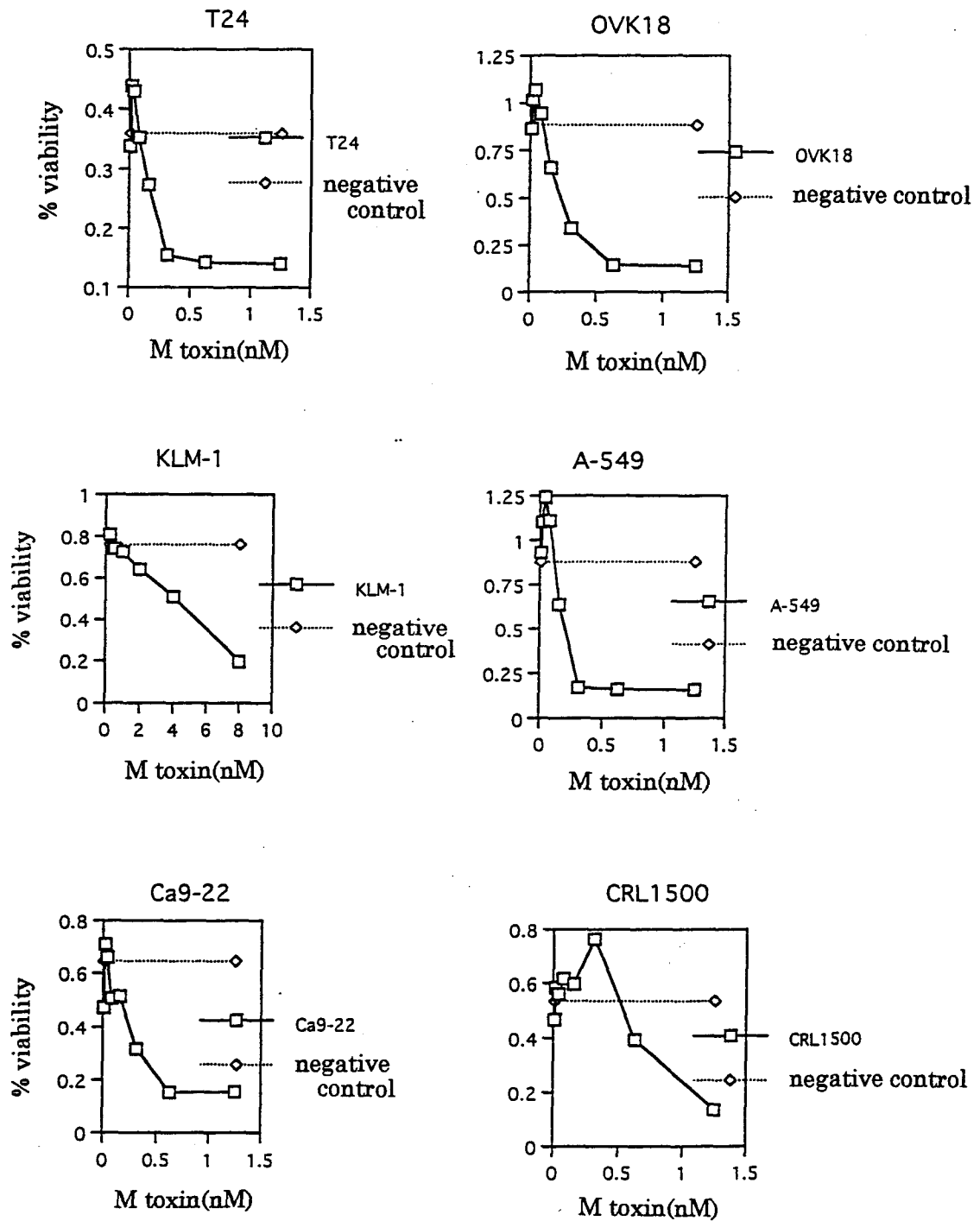


Fig. 3



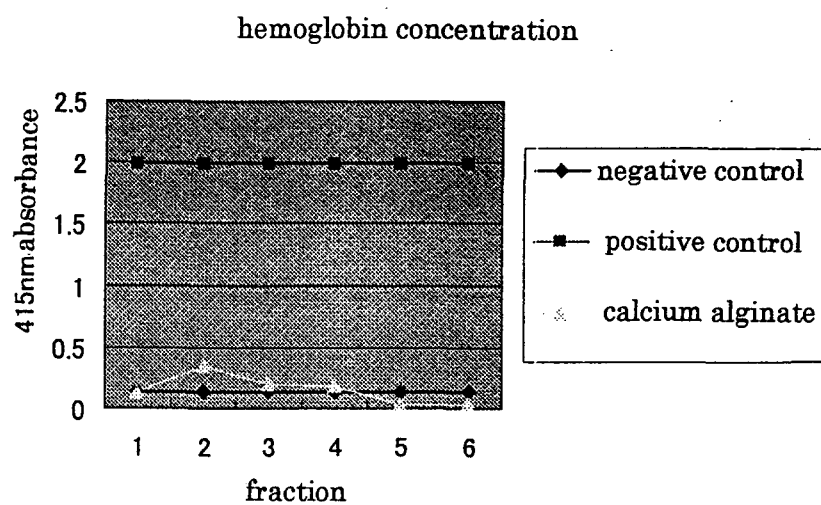
a3

Fig. 4



95

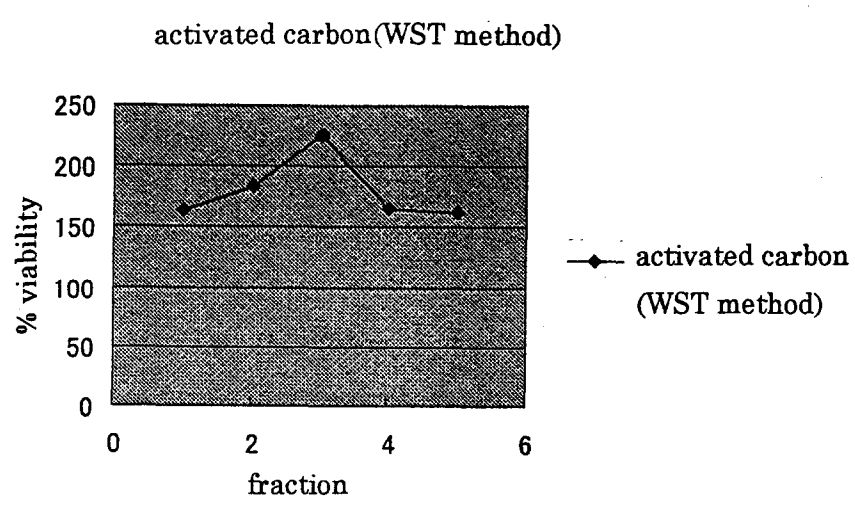
Fig. 6



~~96~~

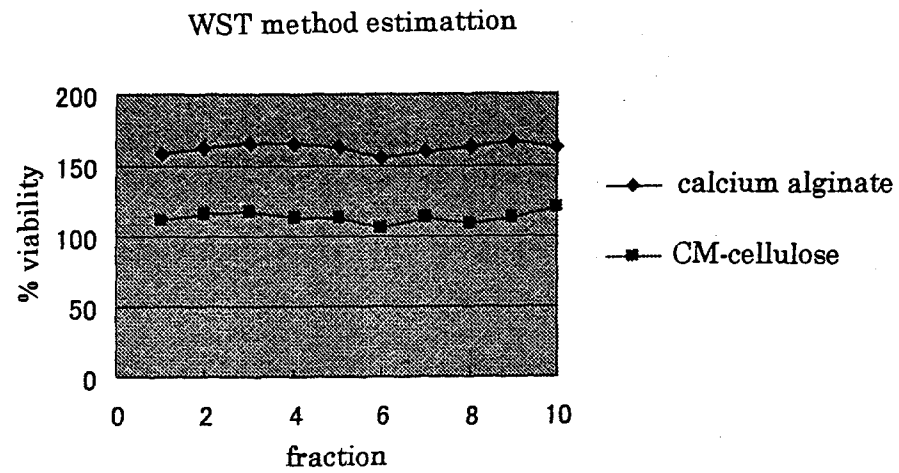
7 / 8

Fig. 7



~~97~~ 97

Fig. 8



98
2

Especificación

PROTEÍNA CITOTÓXICA Y SU UTILIZACIÓN

Campo de la Invención

Esta invención se relaciona con una nueva proteína citotóxica (Toxina M, toxina destructora de la mucosa) producida por *Helicobacter pylori* y la utilización.

Arte Antecedente

Se ha considerado que el humano padece de mucha gastritis y úlcera gástrica y contrae mucho cáncer gástrico por *Helicobacter pylori*. No se ha especificado un factor citotóxico claro y directo como el causante de la destrucción de las células epiteliales gástricas y una muerte irreversible de las células al comienzo de estas enfermedades. Se ha indicado un factor que modifica el pH del medio y la reacción de inmunidad en el estómago, un factor que se adhiere a las células epiteliales gástricas por *Helicobacter pylori*, u otras propiedades de la bacteria misma como factores que desencadenan estas enfermedades. Sin embargo, hasta la fecha no hay claridad que la destrucción de la mucosa gástrica que desencadena la gastritis, la úlcera gástrica y el cáncer gástrico se lesiona durante un proceso, o cual es el factor directamente responsable de la destrucción de la mucosa gástrica. Lo único es que la toxina de vacuolación que posee una citotoxicidad se aísla pero tiene una actividad citotóxica débil y una actividad citotóxica reversible. No se ha encontrado un factor citotóxico fatal de un factor patógeno in vivo ni in vitro.

Muchos investigadores consideran que la *Helicobacter pylori*, como se describe arriba, en el medio del estómago in vivo, secreta un factor citotóxico directo para las células de la mucosa gástrica. Considerando la importancia de las enfermedades, todas las secuencias del gen se confirmaron en 1996. Sin embargo, a pesar de la utilización de suero, es imposible aislar e identificar la posible toxina debido a las condiciones de separación, a unas condiciones de cultivo y de purificación difíciles y a causa de unos sistemas de evaluación no determinados de la toxina.

Problemas que la invención debe resolver.

99 99

Un problema es que se encontró la proteína responsable de causar gastritis, úlcera gástrica y cáncer gástrico por infección con *Helicobacter pylori*, se estableció un método de producción masiva de la proteína tóxica, se identificó una nueva toxina M y se estableció un método de diagnóstico y detección. Utilizando estos métodos se desea controlar la toxina responsable de un factor citotóxico para las células de la mucosa gástrica y desarrollar unos agentes de prevención y tratamiento para gastritis, úlcera gástrica y cáncer gástrico y se encuentra un método para emplear la toxina.

Divulgación de la Invención

Los inventores de esta invención han estudiado con gran seriedad para resolver el problema descrito anteriormente e identificaron una nueva toxina que causa la muerte irreversible de las células cuando se cultiva *Helicobacter pylori* bajo condiciones libres de suero similares a las del medio del estómago y diferentes de las usuales. Se ha encontrado que esta toxina tiene una capacidad de toxicidad de 1000 a 100000 veces mayor por unidad que la toxina de vacuolación previamente citada, y causa la muerte irreversible de las células de varias células de animales de sangre caliente comprendiendo no solo células epiteliales gástricas sino también inmunocitos. Los inventores de esta invención han investigado continuamente sobre estos aspectos para llegar a la presente invención.

A saber, esta dispone lo siguiente. (1) Una proteína citotóxica comprendiendo una proteína teniendo una identidad de por lo menos 70 % o más de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1. (2) Una peptida parcial de la proteína citotóxica descrita en la reivindicación 1, caracterizada en que la proteína tiene la misma actividad citotóxica que la de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1. (3) La proteína citotóxica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 donde la proteína se produce con *Helicobacter pylori*. (4) La proteína citotoxina de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 donde la proteína se obtiene al cultivar un transformante que se transforma con un vector de recombinación conteniendo ADN de SEC ID No. 2 codificando la proteína citotoxina de la reivindicación 1 o 2. (5) La proteína citotoxina de la reivindicación 4 donde



el transformante se deposita bajo declaración No. FERM BP-8218 en el *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (IPOD)*.

(6) Un agente antineoplásico que contiene la proteína citotóxica de la reivindicación 1 o 2. (7) Un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína citotóxica que se obtiene por medio de la inmunización de la proteína citotóxica de la reivindicación 1 o 2 contra un mamífero. (8) El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7 que se produce con un clon de hibridoma de la declaración No. FERM BP-8222. (9) El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7 que se produce con un clon de hibridoma de la declaración No. FERM BP-8223. (10) El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7 que se produce con un clon de hibridoma de la declaración No. FERM BP-8224. (11) Un anticuerpo policlonal específico contra la proteína citotóxica que se obtiene por medio de la inmunización de la proteína citotóxica de la reivindicación 1 o 2 contra un mamífero. (12) Un método para detectar y diagnosticar la proteína citotóxica de la reivindicación 1 o 2 donde se utiliza el anticuerpo monoclonal o el anticuerpo policlonal descrito en cualquiera de las reivindicaciones 7-11. (13) Un agente para prevenir y tratar el cáncer gástrico, la gastritis y la úlcera gástrica desencadenados por la proteína citotóxica de la reivindicación 1 o 2, donde se utiliza el anticuerpo monoclonal o el anticuerpo policlonal descrito en cualquiera de las reivindicaciones 7-11. (14) Un método para cribar un compuesto que promueve o inhibe la actividad de la proteína de la reivindicación 1 o 2, donde la inhibición de la actividad de multiplicación de las células, la actividad citotóxica o la muerte de las células se determinan por medio de la comparación de grupos de control negativos o positivos con una célula de un animal de sangre caliente. (15) Un estuche para cribar un compuesto o su sal promoviendo o inhibiendo la actividad de la proteína de la reivindicación 1 o 2, que comprende la proteína de la reivindicación 1 o 2. (16) Un compuesto o su sal promoviendo o inhibiendo la actividad de la proteína de la reivindicación 1 o 2, donde se obtiene el compuesto por medio del método de cribado de la reivindicación 14 o con el estuche de cribado de la reivindicación 15. (17)

102
10

Un medicamento conteniendo un compuesto o su sal, donde el compuesto tiene una actividad inhibiendo la actividad citotóxica de las células de animales de sangre caliente con la proteína de la reivindicación 1 o 2. (18)

Un medicamento de la reivindicación 17, que es un agente para prevenir o tratar gastritis, úlcera gástrica, cáncer gástrico y una enfermedad que evidencie que es causada por la Toxina M por medio del método de cribado de la reivindicación 14 o con el estuche de cribado de la reivindicación 15.

Breve Descripción de los Dibujos

La Fig. 1 muestra una cromatografía de intercambio de aniones de la muestra obtenida en el Ejemplo 1. a muestra la actividad de la Toxina M para cada fracción y las absorciones de la proteína levigada. b muestra SDS-PAGE por cepa argentaín de la fracción 16 a la fracción 22 en la cromatografía de a. c muestra bandas de toxinas de proteínas transferidas a una membrana PVDF por inmunoelectrotransferencia. d y e muestran los cambios morfológicos de la célula HeLa 24 horas después de su exposición al extracto de control y la citotoxina incluyendo el extracto a una concentración de 1nM, respectivamente. Escala bar, 50µm.

La Fig. 2 muestra los cambios morfológicos de la célula con la toxina del gen recombinado obtenida en el Ejemplo 3. a muestra un control negativo de las células HeLa después de 6 horas. b y c muestran las células HeLa después de 3 horas y después de 6 horas de una adición de 5 nM de una toxina M recombinada. d muestra células gástricas humanas normales CRL7407(ATCC) de control negativo después de 6 horas, e y f muestran células CRL7407 después de 3 horas y de 6 horas de una adición de otros 5 nM de toxina M recombinada.

La Fig. 3 muestra la sensibilidad de la Toxina M ante diferentes tipos de células cancerosas en el Ejemplo 3. Se determinó por medio de un método WST. El eje X muestra la concentración de la Toxina M en un substrato y el eje Y muestra directamente la absorción con una longitud de onda de 415nm o por una proporción relativa cuando la absorción de un control negativo se estima como el 100%. HLF: hepatoma en rata. colon 26: carcinoma del colon del ratón.

102
2/1

La Fig. 4 es como se muestra en la Fig. 3. T24: cáncer humano de la vejiga. OVK18: cáncer humano del ovario. KLM-1: cáncer humano de páncreas. A-549: cáncer humano de pulmón. Ca9-22: cáncer humano de encía. CRL1500: cáncer humano de seno.

La Fig. 5 muestra la inmunotransferencia del anticuerpo monoclonal que se efectúa en el Ejemplo 5. Todos los aumentos de dilución de los elementos sobrenadantes cultivados de las células de hibridoma corresponden a 20 veces.

La Fig. 6 muestra la actividad de la Toxina M con alginato de calcio como absorbente en el Ejemplo 9. El control negativo contiene 10 mM de solución amortiguadora Tris de pH 7.7 solo como sustrato y el control positivo contiene un sustrato y 10 mM de Toxina M. El eje X muestra cada número de fracción que se pasa a través de una columna de alginato de calcio. Una concentración promedio de cada fracción es de 10 nM y cualquiera de las fracciones muestra por lo menos 10 nM o más. Cuando se destruyen los corpúsculos rojos, la concentración de hemoglobina en la solución aumenta. El eje Y muestra la absorción de 415nm.

La Fig. 7 muestra, en el Ejemplo 10, el % de viabilidad de que las células HeLa muestren una inhibición de la actividad de la Toxina M por la absorción de carbono activado en el Ejemplo 10. El eje X muestra cada número de columna de la fracción levigada. Las concentraciones de la Toxina M son en promedio de 10 nM y cualquiera de ellas es por lo menos de 10 nM o más. El eje Y muestra el % obtenido al dividir el valor de la toxicidad de cada fracción por un control positivo que se mide por medio de un método WST.

La Fig. 8 es como aparece en la Fig. 7. Muestra el % de viabilidad en las células HeLa de CM-celulosa y alginato de calcio mostrando una inhibición de la actividad de la Toxina M por absorción en el Ejemplo 10.

Mejor Forma para Llevar a Cabo la Invención

La proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1 de esta invención puede ser una

103
M
Z

proteína originada en cepas bacterianas de *Helicobacter pylori*, por ejemplo, NCTC 11637, NCTC 11916, DT 61A, NCTC 11639, R85-13 6P, R85-13-12F, R85-13-11P, T81213-NTB, J99, 4, U2-1, 85D08, MC903, MC123, Tx30a, 26695, UA 1182 y similares o puede ser una proteína sintetizada.

Como una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1, se pueden ejemplificar secuencias de aminoácidos con una homología de alrededor de 70% o más, preferiblemente alrededor de 80 % o más, más preferiblemente alrededor de 90% o más, aún más preferiblemente alrededor de 95% o más. Como una proteína teniendo sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1, se puede ejemplificar una proteína teniendo sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos y sustancialmente la misma actividad que la de la proteína teniendo la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1. Una inhibición de la actividad de multiplicación de células, una actividad citotóxica o una actividad que causa la muerte de las células se puede ejemplificar como sustancialmente la misma actividad. El término sustancialmente la misma significa que estas actividades tienen la misma característica, por ejemplo en química fisiológica o en farmacología. Por lo tanto, se prefiere que la actividad de la citotoxina y similares tenga la misma característica, por ejemplo alrededor de 0.1-100 veces, preferiblemente alrededor de 0.5-10 veces, más preferiblemente alrededor de 0.5-2 veces. El grado de estas actividades o los factores de cantidad de los pesos moleculares de las proteínas pueden ser diferentes. Las actividades de una actividad de inhibición de la multiplicación de células, una actividad citotóxica o una actividad causando la muerte de las células se puede determinar mediante métodos muy conocidos, por ejemplo, por el método de cribado citado.

Como la proteína de esta invención, se pueden ejemplificar las siguientes proteínas: una secuencia de aminoácidos eliminando los aminoácidos 1-150 (preferiblemente 1-50) en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1; una secuencia de aminoácidos agregando

104

los aminoácidos 1-100 (preferiblemente 1-30) a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1; una secuencia de aminoácidos insertando los aminoácidos 1-50 (preferiblemente 1-30) en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1; una secuencia de aminoácidos donde los aminoácidos 1-50 (preferiblemente 1-30) de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1 se sustituye por los otros aminoácidos o por una proteína conteniendo una combinación de estas secuencias de aminoácidos que se denomina mucina.

Cuando se inserta, elimina o sustituye una secuencia de aminoácidos como se describe arriba, la posición de inserción, eliminación o sustitución no está específicamente limitada.

En la proteína de esta especificación, de conformidad con la práctica común, el lado izquierdo es un extremo N (un extremo amina) y el lado derecho es un extremo C (un extremo carboxilo). En las proteínas de esta invención, que comprende la proteína teniendo la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1, por lo general el extremo C es un grupo carboxilo (-COOH) o un carboxilato (-COO-), pero puede ser una amida (-CONH₂) o un grupo éster (-COOR), donde R es un grupo alquilo C₁₋₆ de metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo y similares, un grupo cicloalquilo C₃₋₈ de ciclopentilo, ciclohexilo y similares, un grupo arilo C₆₋₁₂ de fenilo, α -naftilo y similares, bencilo, fenetilo y similares, un grupo fenilo-C₁₋₂ alquilo de bencilo, fenetilo y similares o un grupo aralquilo C₇₋₁₄ de un grupo alquilo α -naftilo-C₁₋₂ grupo alquilo de α -naftilmetilo y similares. Cuando la proteína de esta invención tiene un grupo carboxilo (o carboxilato) en una posición distinta al extremo C, las proteínas que tienen un grupo amídico o esterificado se contienen en la proteína de esta invención. Como éster, se puede utilizar el éster del extremo C citado arriba. Entre las proteínas de esta invención, existe además una proteína que es un residuo del grupo amina de los aminoácidos (por ejemplo, un residuo de metionina) en el extremo N que está protegida por un grupo de protección (por ejemplo, un grupo acilo C₁₋₆ de un grupo alcanilo C₁₋₆ o similares de un grupo formilo, acetilo o similar); una proteína producida por

105

el residuo del ácido glutámico en el extremo N mediante una incisión in vivo que se convierte a un grupo ácido pirroglutámico; una proteína del grupo radical en el lado de la cadena de aminoácidos en la molécula (por ejemplo, -OH, -SH, un grupo amina, un grupo imidazole, un grupo indol, un grupo guanidino o similar) está protegida por un grupo de protección apropiado (por ejemplo, un grupo acilo C₁₋₆ o similar de un grupo alcanilo de C₁₋₆ o similar de un grupo formilo); o una proteína conjugada o similar a las denominadas glicoproteínas a la cual se fija la cadena de azúcar.

Como la peptida parcial de la proteína de esta invención, puede ser una peptida parcial de las proteínas de esta invención previamente descritas y preferiblemente con actividades similares (por ejemplo, una actividad de inhibición de la multiplicación de células, una actividad citotóxica o similar) a las proteínas de esta invención. Como un ejemplo, se puede emplear una peptida de una secuencia de aminoácidos teniendo por lo menos 20% o más, preferiblemente 50% o más, más preferiblemente 70% o más, aún más preferiblemente 90% o más, y más preferiblemente 95% o más en la secuencia de aminoácidos de esta invención, y teniendo una actividad de inhibición de la multiplicación de células, una actividad citotóxica o una actividad causando la muerte de las células. La peptida parcial de esta invención puede ser una de las siguientes peptidas: los aminoácidos 1-5 (preferiblemente 1-3) se eliminan en la secuencia de aminoácidos; los aminoácidos 1-10 (preferiblemente 1-5 (más preferiblemente 1-3)) se agregan a la secuencia de aminoácidos; los aminoácidos 1-5 (preferiblemente 1-3) se insertan en la secuencia de aminoácidos; o los aminoácidos 1-5 (preferiblemente 1-3) se sustituyen por los otros aminoácidos.

Aunque por lo general la peptida parcial de esta invención tiene un grupo carboxilo (-COOH) o carboxilato (-COO-) en el extremo C, como se muestra en las anteriores proteínas de esta invención, el extremo C puede ser una amida (-CONH₂) o un éster (COOR) donde R tiene el mismo significado que el descrito arriba. Además en la peptida parcial de esta invención, como se muestra en las proteínas anteriores de esta invención,

106
S

hay una peptida que es un residuo del grupo amina de los aminoácidos (por ejemplo, un residuo de metionina) en el extremo N que está protegida por un grupo de protección; una proteína producida por el residuo de ácido glutámico en el extremo N que por medio de una incisión in vivo se modifica a un grupo de ácido pirroglutámico; una proteína del grupo radical en el lado de la cadena de aminoácidos en la molécula que está protegida por un grupo de protección apropiado; o una proteína conjugada o similar de las denominadas glicoproteínas a la cual se fija la cadena de azúcar. La peptida parcial de esta invención se puede emplear como un antígeno para construir un anticuerpo, de manera que no se requiere necesariamente una actividad de inhibición de la multiplicación de células, una actividad citotóxica o similar.

Como la sal de la proteína o de la peptida parcial de esta invención, se pueden emplear sales de ácidos fisiológicamente permitidos (por ejemplo, ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos) o bases (por ejemplo, sales de metales alcalinos), y preferiblemente se pueden emplear sales de adición de ácidos fisiológicamente permitidos. Como estas sales por ejemplo, existen sales de ácidos inorgánicos, ácidos fosfóricos, ácidos hidrobromicos, ácidos sulfúricos), ácidos orgánicos (por ejemplo ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metano sulfónico, ácido benceno sulfónico). Las proteínas y las sales de esta invención se pueden producir mediante métodos de preparación muy conocidos de proteínas a partir de cualquier clase de cepas *Helicobacter pylori* previamente citado, o cultivando un transformante conteniendo el ADN en el cual se codifica la citada proteína. Adicionalmente se pueden producir de conformidad con el método de síntesis de peptidas citado. Cuando las proteínas se producen a partir de cualquier clase de cepas de *Helicobacter pylori*, las proteínas en las células bacterianas se centrifugan mediante el triturado ultrasónico, luego se extraen con una precipitación de sulfato de amonio o similar, y el líquido extraído se purifica y se separa por

medio de una cromatografía combinada como una cromatografía de intercambio de iones y una cromatografía hidrófoba.

En la síntesis de la proteína, la peptida parcial, las sales de las mismas o las amidas de las mismas de esta invención, se pueden emplear resinas disponibles en el comercio para sintetizar las proteínas. Como estas resinas, se pueden ejemplificar las siguientes: resina de clorometilo, resina de hidroximetilo, resina de benzidrilamina, resina de aminometilo, resina de 4-benciloxibencilalcohol, resina de 4-metilobenzohidril-amina, resina de PAM, resina de 4-hidroximetilmetilfenilacetoamidametilo, resina de poliacrilamida, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenilohidroximetilo)fenoxi, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenilo-Fmoc aminoetilo) fenox. Utilizando estas resinas, un aminoácido de los grupos α -amino y grupos funcionales de las cadenas de los lados protegidos en forma apropiada se condensa en la resina para obtener la secuencia de proteínas deseada por medio de un método de condensación bien conocido. Al final de la reacción, la proteína se retira de la resina por medio de un corte y se eliminan varios grupos de protección. Luego las proteínas deseadas o las amidas de estas se obtienen por medio de un método que forma unos enlaces disulfidos internos en una solución de alta dilución. En relación con la condensación citada arriba de los aminoácidos protegidos, se pueden emplear varias clases de agentes activados para la síntesis de la proteína, y en particular se pueden emplear carbodiimidas. Como estas carbodiimidas, se puede utilizar DCC, N,N'-diisopropilcarbodiimida, N-etilo-N'-(3-dimetilaminopropilo)carbodiimida y similares. En la activación por estas carbodiimidas, los aminoácidos protegidos se pueden agregar directamente a la resina con un agente adicional para controlar la racemización (por ejemplo, HOBt o HOObt), o se puede agregar a la resina después de la activación previa del aminoácido protegido como un ácido anhídrido simétrico o un éster HOObt.

Como el solvente empleado en la activación del aminoácido protegido o en la condensación de la resina, se puede seleccionar entre los solventes conocidos que se pueden emplear para la reacción de condensación de la proteína. Como este solvente, se pueden emplear amidas ácidas como N,N-

108
1

dimetilformamida, N,N-dimetilacetoamida y N-metilopirrolidona, hidrocarburos halogenados como cloruro de metileno y cloroformo, alcoholes como trifluoroetanol, sulfoxidas como dimetilsulfoxida, piridina, ésteres como dioxano y tetrahidrofurano, nitrilos como acetonitrilo y propionitrilo, ésteres como acetato de metilo y acetato de etilo y mezclas de los mismos. La temperatura de la reacción se selecciona en forma apropiada entre los rangos conocidos que se pueden emplear en la reacción para formar los enlaces de las proteínas, y por lo general se selecciona apropiadamente entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por lo general los derivados activados de los aminoácidos se emplean a 1.5-4 veces el equivalente de los moles. Como un resultado de la prueba de la reacción con ninhidrina cuando la condensación es insuficiente, las reacciones de condensación se pueden repetir sin eliminar los grupos protegidos para efectuar una condensación suficiente. Cuando no se puede efectuar una condensación suficiente por medio de reacciones repetidas, los aminoácidos sin reaccionar se acetilan con anhídrido acético o acetimidazole, para que las siguientes reacciones no tengan ninguna influencia.

Como grupos protegidos de grupos amina de los materiales de inicio se pueden emplear por ejemplo Z, Boc, t-pentiloxycarbonilo, isoborniloxycarbonilo, 4-metoxibenciloxycarbonilo, Cl-Z, Br-Z, adamantiloxycarbonilo, trifluoroacetilo, ftaloilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo, difenilfosfinotioilo, Fmoc y similares. Los grupos carboxilo se pueden proteger por ejemplo con una alquilo esterificación (por ejemplo, alquiloesterificación de cadenas rectas, ramificadas o cíclicas de metilo, etilo, propilo, butilo, t-butilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo y 2-adamantilo), aralquiloesterificación (por ejemplo, bencilo éster, 4-nitrobencilo éster, 4-metoxibencilo éster, 4-clorobencilo éster, bencidrilo éster), fenacilesterificación, la hidratación del grupo benciloxycarbonilo, la hidratación del grupo t-butoxycarbonilo, la hidratación del tritilo y similares. El grupo hidroxilo de serina se puede proteger por ejemplo, con esterificación o eterificación. Como grupos apropiados de esta esterificación, se pueden utilizar por ejemplo, grupos alcanoilos menores

(C₁₋₆) como un grupo acetilo, un grupo acilo como un grupo benzoilo o grupos derivados de carbonatos como un grupo benciloxycarbonilo y un grupo etoxycarbonilo. Como grupos apropiados para la eterificación se puede ejemplificar un grupo bencilo, un grupo tetrahidropiraniilo y un grupo t-butilo. Como los grupos protegidos de grupos fenólicos hidroxilos de tirosina, se puede emplear por ejemplo, Bzl, C₁₂-Bzl, 2-nitrobencilo, Br-Z y t-butilo. Como los grupos protegidos de imidazole de histidina se puede emplear por ejemplo, Tos, 4-metoxi-2,3,6- trimetilbenzenosulfonilo, DNP, benciloximetilo, Bum, Boc, Trt y Fmoc.

Como grupos carboxilo activados de los materiales de inicio, se pueden usar por ejemplo los ácidos anhídros, las azidas y los ésteres activados correspondientes (ésteres de alcohol (por ejemplo, pentaclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4-dinitrofenol, cianometilalcohol, paranitrofenol, HONB, N-hidroxisuccimida, N-hidroxiftalimida y HOBt)). Como grupos amino activados de los materiales de inicio, por ejemplo se pueden emplear las amidas fosfóricas correspondientes. Como un método para retirar (eliminación de) los grupos protegidos por ejemplo se puede utilizar una reducción catalítica del flujo de hidrógeno en presencia de un catalizador de *Pd-black* o *Pd-charcoal*; un tratamiento ácido con fluoruro anhídrico de hidrógeno, ácido metano sulfónico, ácido trifluorometano sulfónico, ácido trifluoroacético o sus mezclas; el tratamiento de las bases con diisopropiletilamina, trietilamina, piperidina, piperadina o similares; o la reducción con sodio en amonio líquido. La reacción de eliminación empleando el tratamiento ácido anterior por lo general se realiza a una temperatura de -20°C~40°C. En el tratamiento ácido, es eficiente agregar un agente capturador de catión como anisol, fenol, tioanisol, metacresol, paracresol, dimetilsulfida, 1,4-butanoditiol o 1,2-etanditiol. El grupo 2,4-dinitrofenilo empleado como un grupo de protección imidazole de histidina se retira mediante el tratamiento con tiofenol. El grupo formilo utilizado como un grupo de protección indol de triptofano se retira con un tratamiento con ácido en presencia de 1,2-etanoditiol, 1,4-butanoditiol o similares

descritos arriba, y además se puede retirar con un tratamiento alcalino con una solución diluida de hidróxido de sodio, amonio diluido o similar.

La protección de los grupos funcionales que no deben participar en la reacción de los materiales de inicio y los grupos protegidos, la eliminación de los grupos protegidos, la activación del grupo funcional que participa en la reacción o similares se pueden seleccionar en forma apropiada entre grupos y medios muy conocidos. Otros métodos para obtener amidas de proteínas por ejemplo incluyen que un grupo α -carboxilo de aminoácidos con un grupo final carboxilo se protege con la amidación; una cadena peptida (proteína) se alarga hasta alcanzar la longitud de cadena deseada en el extremo de la cadena amina; una proteína en el grupo protegido del grupo α -amino en el extremo N de la cadena peptida se elimina y una proteína en el grupo protegido del grupo carboxilo en el extremo C de la peptida se produce, y ambas peptidas se condensan en una solución de mezcla como se describió arriba. Los pormenores de la reacción de condensación son como se mencionan arriba. La proteína protegida obtenida por condensación se purifica, todos los grupos protegidos se retiran por medio del método anterior y se puede obtener una proteína cruda. La proteína cruda se purifica por medio de un método de purificación bien conocido, las fracciones principales se liofilizan y se puede obtener una amida deseada de la proteína. Para obtener ésteres de la proteína, por ejemplo, grupos α -carboxilo de aminoácidos con extremos carboxilo se condensan con alcoholes deseados para obtener aminoácido ésteres, los ésteres se tratan como se muestra en las amidas de la proteína y se pueden obtener los ésteres deseados de la proteína.

La peptida parcial o las sales de esta invención se pueden producir por métodos bien conocidos para sintetizar las peptidas o fraccionando la proteína de esta invención con una peptidasa apropiada. Como método para sintetizar la peptida se puede emplear por ejemplo un método de síntesis de fase sólida o un método de síntesis de fase líquida. A saber, una peptida parcial capaz de constituir la peptida parcial de esta invención o un aminoácido se condensa con las partes restantes, cuando el producto tiene

un grupo protegido, el grupo protegido se elimina y se puede producir la peptida deseada.

Como métodos de condensación y eliminación de los grupos protegidos bien conocidos, por ejemplo se ejemplifican los siguientes métodos. M.Bodanszky y M.A.Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966); Schroeder y Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965); Nobuo Izumiya y colaboradores, Fundament and Experiments of Peptide Synthesis, Maruzen Co., (1975); Haruaki Yajima y Shunpei Sakakibara, Biochemical Experiment Lectures 1, Chemistry of Proteins IV, 205 (1977); Haruaki Yajima supervisado, Continued Development of Medicines, Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten. Además después de la reacción, la peptida parcial de esta invención se puede purificar por medio de los métodos de purificación usuales, por ejemplo por extracción de solventes, destilado, cromatografía por columna, cromatografía líquida, recristalización y combinaciones de estas. Cuando se obtiene la peptida parcial a través de los métodos anteriores, se puede modificar a una sal apropiada por medio de un método conocido o por un método similar. Cuando se obtiene una sal de la peptida parcial, se puede cambiar a un compuesto liberado o a otra sal por medio de un método conocido o por el método similar.

Como el ADN que codifica la proteína de esta invención, se puede emplear cualquier compuesto que contenga la codificación de la secuencia base de la proteína citada de esta invención. Además se puede emplear un genoma ADN, una biblioteca de genoma ADN, la cADN citada arriba derivada de células y tejidos o ADN sintético. Se puede emplear un vector usado en la biblioteca de cualquiera de un bacteriófago, plásmido, cósmido, fagomidio y similares. Usando un ARN total o una fracción de mRNA preparado a partir de las células o los tejidos anteriores, se puede ampliar directamente mediante una Reacción en Cadena por Polimerasa de Transcriptasa Reversa (en adelante se denomina un método RT-PCR). Como el ADN codificando la proteína de esta invención, se puede ejemplificar cualquiera de los siguientes ADNs: por ejemplo un ADN

112
211

conteniendo una secuencia base representada por SEC ID No.2, o un ADN que tiene una secuencia base cruzada con una secuencia base representada por SEC ID No.2 bajo condiciones muy severas y que codifica la proteína teniendo sustancialmente la misma actividad que la proteína de esta invención (por ejemplo la actividad citotóxica).

En otra incorporación, como el ADN codificando una proteína teniendo la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1, se puede emplear el ADN teniendo la secuencia base representada por SEC ID No. 2.

Como el ADN codificando la peptida parcial de esta invención, se puede utilizar cualquiera de los ADNs conteniendo la secuencia base anterior codificando la peptida parcial de esta invención. Además se puede emplear un genoma ADN, una biblioteca de genoma ADN, el cADN citado arriba derivado de células y tejidos, la biblioteca de cADN citada arriba derivada de células y tejidos o el ADN sintético. Como el ADN codificando la peptida parcial de esta invención, por ejemplo se puede ejemplificar cualquiera de los siguientes ADNs: un ADN con una secuencia parcial de ADN con una secuencia base representada por SEC ID No.2, o un ADN teniendo una secuencia parcial de ADN que tiene una secuencia base cruzada con una secuencia base representada por la SEQ 3D No. 2 bajo condiciones severas y que codifica la proteína teniendo sustancialmente la misma actividad que la proteína de esta invención (por ejemplo la actividad citotóxica).

Como métodos de clonación del ADN codificando perfectamente la proteína de esta invención o la peptida parcial (en adelante, en la descripción de la clonación y la expresión del ADN codificando esta proteína y similares, caso por caso, estas proteínas y similares se acortan como la proteína de esta invención), usando un preparado sintetizado de ADN con la secuencia base parcial de la proteína de esta invención, se amplifica por un método conocido PCR, o se combina el ADN en un vector apropiado seleccionado para la hibridación con una fracción del ADN o un ADN sintetizado que codifica una parte o toda la región de la proteína de esta

invencción. El método de hibridación se puede realizar mediante la descripción por ejemplo de Molecular Cloning, 2nd, J. Sambrook y colaboradores, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989). Cuando se emplea una biblioteca disponible en el comercio, se puede utilizar el método descrito en una explicación adjunta. En la modificación de las secuencias base del ADN, empleando un estuche conocido como el MutanTM-G (producido por Takara Shuzou Co.), MutanTM-K (producido por Takara Shuzou Co.) o similar, se puede emplear un método dúplex Gapped, un método Kunkel, métodos muy conocidos o métodos similares. Se puede utilizar el ADN codificando una proteína clonada tal y como está o se puede digerir por medio de una enzima de restricción según se desea o mediante la adición de un enlazante. El ADN puede tener ATG, GTG o TTG como el codón de inicio de la traducción en el extremo 5' y TAA, TGA o TAG como el codón de terminación de la traducción en el extremo 3'. Se puede agregar el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción empleando un adaptador sintético apropiado del ADN. El vector de expresión de la proteína de esta invencción se puede producir por ejemplo por medios (i) que un ADN deseado se fracciona del ADN que codifica la proteína de esta invencción, y (ii) que la fracción del ADN está ligada corriente abajo del activador en un vector de expresión apropiado.

Como el vector, se puede utilizar un plásmido derivado de *Echerichia coli* (como pBR322, pBR325, pUC12, pUC13 o pET30), un plásmido derivado de *Bacillus subtilis* (como pUB110, pTP5 o pC194), un plásmido (como pSH19, pSH15), un bacteriófago derivado de levadura, un bacteriófago como λ fago, un virus animal como un retro virus, un virus de la vacuna, un Baculo virus o similares, pAl-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV o pcADNI/Neo. Como el activador utilizado en esta invencción, se puede usar cualquier activador apropiado para el anfitrión empleado en la expresión de los genes. Por ejemplo, cuando se emplean células de animales como anfitrionas, se puede ejemplificar un activador SR α , un activador precoz SV40, un activador HIV • LTR, un activador CMV o un activador HSV-TK. En estos activadores, el activador CMV (citomegalovirus),

preferiblemente se puede emplear el activador SR α . Cuando el anfitrión es un hongo de la familia *Echerichia*, se prefiere un activador trp, un activador lac, un activador recA, un activador λ PL, un activador lpp o un activador T7. Cuando el anfitrión es un hongo de la familia *Bacillus*, se prefiere un activador SPO1, un activador SPO2 o un activador penP. Cuando el anfitrión es una levadura, se prefiere un activador PHO5, un activador PGK, un activador GAP o un activador ADH. Cuando el anfitrión es una célula de un insecto, se prefiere un activador de polihedrina, un activador P10 o similares.

Como vectores de expresión diferentes a los vectores descritos arriba, si se desea se pueden emplear vectores conteniendo un intensificador, un etiquetador de selección, una replicación de origen SV40 (en adelante a veces se emplea abreviado como SV40ori) o similares. Por ejemplo como el etiquetador de selección se puede ejemplificar un gen (resistencia a metotrexato (MTX)) con una enzima de reducción ácida dihidrofólica (en adelante a veces se emplea abreviado como dhfr), un gen resistente a la ampicilina (en adelante a veces se emplea abreviado como Ampr), un gen de resistencia a la neomicina (en adelante a veces se emplea abreviado como Neor) de resistencia G418 y un gen de resistencia a la kanamicina. Particularmente, cuando se utiliza el gen dhfr como un etiquetador de selección empleando un gen defectuoso dhfr de unas células de hámster chino, se pueden seleccionar las células recombinantes por un medio que no contenga timidina. De ser necesario se agrega una secuencia señalizadora en el anfitrión en los extremos N de la proteína de esta invención. Cuando el anfitrión es un hongo de la familia *Echerichia*, se puede usar una secuencia señalizadora PhoA, una secuencia señalizadora OmpA o similares. Cuando el anfitrión es un hongo de la familia *Bacillus*, se puede emplear una secuencia señalizadora de una amilasa, una secuencia señalizadora de subtilicina. Cuando el anfitrión es una levadura, se puede utilizar una secuencia señalizadora MF α , una secuencia señalizadora SUC2, una secuencia señalizadora SUC2 o similares. Cuando el anfitrión es una célula animal, se puede emplear una secuencia señalizadora de insulina, una

125

secuencia señalizadora de α -interferon, una secuencia señalizadora de anticuerpo molecular o similar. Se puede producir un transformante utilizando un vector conteniendo la codificación de ADN de la proteína construida en esta invención.

Como anfitrión se puede emplear por ejemplo una especie *Echerichia*, una especie *Bacillus*, levadura, células de insectos, células de animales o similares. Como una incorporación de la especie *Echerichia*, por ejemplo se puede usar *Eschezichia coli* K12, DH1, DH5 α (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 60, 160(1968)), JM103 (Nucleic Acids Research, Vol. 9, 309(1981)), JA221 (Journal of Molecular Biology, Vol. 120, 517(1978)), HB101 (Journal of Molecular Biology, Vol. 41, 459(1969)), C600 (Genetics, Vol. 39, 440(1954)) o similares. Como una especie *Bacillus* por ejemplo se pueden emplear *Bacillus subtilis* MI114 (Gene, Vol. 24, 255(1983), 207-21 (Journal of Biochemistry, Vol. 95, 87(1984)) o similares. Como levadura, por ejemplo se puede emplear, *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036, *Pichia pastoris* KM71 o similares.

Como las células de insectos, por ejemplo, cuando el virus es AcNPV, se pueden usar células *Spodoptera frugiperda*; células Sf, células MGI derivadas del intestino medio de *Trichoplusia ni*, células High Five TM derivadas de los huevos de *Tdchoplusia ni*, células derivadas de *Mamestra brassicae*, células derivadas de *Estigmena acrea* o similares. Cuando el virus es BmNPV, se pueden emplear células *Bombyx mori* N; células BmN o similares. Como las células Sf por ejemplo se pueden usar células Sf9, (ATCC CRL1711), células Sf21 (Vaughn, J.L. y colaboradores, In Vivo, 13, 213-217(1977)) o similares. Como los insectos, por ejemplo se pueden emplear las larvas del gusano de seda (Maeda y colaboradores, Nature, Vol. 315, 592(1985)). Como las células animales por ejemplo se pueden usar células de mono COS-7, Vero, célula de hámster chino CHO (en adelante a veces se emplea abreviado como CHO), un gen defectuoso dhfr de célula de hámster chino CHO (en adelante a veces se emplea abreviado como célula CHO(dhfr-)), células L de ratón, ratón AtT-20, células de mieloma de ratón,

116
X

ratón GH3, células humanas FL o similares. Por otra parte, se pueden utilizar varias clases de células humanas normales por ejemplo, hepatocitos, esplenocitos, neuronas, neurogliocitos, células β del bazo, células de la médula ósea, células del mesangio, células Langerhans, células de la epidermis, células epiteliales, células del endotelio, fibroblastos, fibrocélulas, células musculares, adipocitos, células inmunológicas (por ejemplo, macrófagas, células T, células B, linfocitos citolíticos, mastocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos), megacariocitos, células sinoviales, cartílagos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de la glándula mamaria, hepatocitos, células intersticiales o células precursoras, hemocitoblastos o células cancerosas de estas células. Para la transformación de la especie *Echerichia*, por ejemplo se puede efectuar mediante el método descrito en Proc. Nad. Acad. Sci. USA, Vol. 69, 2110(1972), Gene, Vol. 17, 107(1982) o similar.

Para la transformación de la especie *Bacillus*, por ejemplo se puede efectuar por medio del método descrito en Molecular & General Genetics, Vol. 168, 111(1979) o similar. Para la transformación de almidón por ejemplo, se puede realizar mediante el método descrito en Methods in Enzymology, Vol. 194, 182-187(1991), Proc. Nad. Acad. Sci. USA, Vol. 75, 1929(1978) o similar. Para la transformación de las células de los insectos por ejemplo se puede efectuar por medio del método descrito en Bio/Technology, 6, 47-55(1988) o similar.

Para la transformación de células animales, por ejemplo se puede realizar a través del método descrito en Cell Engineering, Volumen Separado 8, New Cell Engineering Experiment Protocol, 263-267(1995), publicado por Shujunsha, y Virology, Vol. 52, 456 (1973). Empleando los anteriores métodos, se pueden obtener los transformantes que se transforman con vectores de expresión conteniendo el ADN que codifica la proteína. Cuando se cultivan los transformantes cuyos anfitriones son la especie *Echerichia* o la especie *Bacillus*, un medio líquido es el indicado como el medio para el cultivo. En el medio se contienen fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, elementos inorgánicos y similares que se

requieren para el crecimiento de los transformantes. Como fuentes de carbono, se pueden ejemplificar por ejemplo glucosa, dextrina, almidón soluble, sacarosa o similares. Como las fuentes de nitrógeno se pueden emplear por ejemplo materiales orgánicos o inorgánicos como sales de amonio, nitratos, licor de extracto de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, tortas de semillas, extracto de papas y similares. Como materiales inorgánicos se pueden ejemplificar por ejemplo el cloruro de calcio, el fosfato monosódico y el cloruro de magnesio. Se pueden agregar extractos de levadura, vitaminas, materiales que estimulan el crecimiento o similares. Preferiblemente se usa un medio con un pH de alrededor de 5-8

Como el medio para cultivar la especie *Escherichia* se prefiere por ejemplo, un medio M9 conteniendo glucosa y casaminoácido (Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972). En caso de que sea necesario para una eficiente acción del activador, se puede agregar por ejemplo un agente como el ácido 3 β -indolilo acrílico. Cuando el anfitrión es de la especie *Escherichia*, por lo general el cultivo se efectúa a una temperatura entre alrededor de 15~43 °C por unas 3 ~24 horas, y si es necesario se puede ventilar o revolver. Cuando el anfitrión es de la familia de los hongos *Bacillus* por lo general el cultivo se efectúa a una temperatura de alrededor 30~40 °C por unas 6~24 horas, y si es necesario se puede ventilar o revolver.

Cuando se cultiva el transformante donde la levadura es el anfitrión, se puede ejemplificar como medio, por ejemplo un medio mínimo Burkholder (Bostian, K.L. y colaboradores Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, 4505(1980)) o un medio SD conteniendo 0.5% casaminoácido (Bitter, G. A. y colaboradores Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, 5330 (1984)). Preferiblemente se emplea un medio con un pH de alrededor de 5-8. Por lo general el cultivo se efectúa a una temperatura de alrededor de 20~35 °C por unas 24~72 horas, y si es necesario se puede ventilar o revolver. Cuando se cultiva el transformante cuyo anfitrión es una célula de insecto o un insecto, se puede emplear como medio el Insect Medium de Grace

18
Z

(Grace, T.C.C., Nature, 195,788(1962)) al agregar en forma apropiada un 10% de suero bovino inmovilizado o similar. Preferiblemente se utiliza un medio con un pH de alrededor de 6.2-5.4. Por lo general el cultivo se efectúa a una temperatura de alrededor de 27°C durante unos 3~5 días, y si es necesario se puede ventilar o revolver. Cuando se cultiva el transformante cuyo anfitrión es una célula animal, se puede emplear como medio por ejemplo un medio MEM conteniendo alrededor de 5~20% de suero fetal bovino (Science, Vol. 122, 501(1952)), un medio DMEM (Virology, Vol. 8, 396 (1959)), un medio RPMI 1640 (The Journal of the American Medical Association, Vol. 199, 519 (1967), un medio 199 (Proceeding of the Society for the Biological Medicine, Vol. 73,1 (1950)) o similar. Preferiblemente se usa un medio con un pH de alrededor de pH 6-8. Por lo general el cultivo se efectúa a una temperatura de alrededor de 30~40 °C durante unas 15~60 horas, y si es necesario se ventila o se revuelve. Como se describió arriba, la proteína de esta invención se puede producir a partir de las células de los transformantes.

Para la separación y purificación de la proteína de esta invención, por ejemplo se pueden emplear los siguientes métodos en forma apropiada. Cuando la proteína de esta invención se extrae de un cultivo o de unas células de hongos, después del cultivo se recolectan los hongos o las células por medio de un método bien conocido, se suspenden en una solución amortiguadora apropiada y se destruyen con ultrasonido, lisozima, y / o congelamiento y descongelamiento o similares. Luego se obtiene el líquido crudo extraído de la proteína por un proceso de centrifugado o filtración. La solución amortiguadora puede contener un desnaturalizante de la proteína como urea o hidrocloreuro de guanidina o un agente tensioactivo como tritonX-100TM. Cuando la proteína se secreta en el medio líquido, una vez se termina el cultivo, el hongo o las células y el sobrenadante se separan mediante un método bien conocido, y el sobrenadante se recolecta. El cultivo del sobrenadante obtenido en esta forma o la proteína contenida en el líquido extraído se purifica por medio de unos métodos muy conocidos de separación y purificación. Estos métodos bien conocidos de separación

119
11

y purificación, y que se pueden utilizar, son métodos que emplean unas técnicas de precipitación, coagulación o separación de una sustancia en una solución mediante la adición de sal ("Salting-out Techniques") o solubilidades por medio de un método de precipitación de solventes, un método de diálisis, un método que emplea la diferencia del peso molecular como el ultrafiltrado y la electroforesia SDS-poliacrilamida en gel o similares, un método que utiliza la diferencia de cargas como una cromatografía de intercambio de iones, un método que utiliza la diferencia hidrófoba como la cromatografía hidrófoba, un método empleando una afinidad específica como una cromatografía por afinidad, un método empleando una diferencia hidrófoba como una cromatografía líquida a alta velocidad de fase inversa, un método usando una diferencia de puntos isoelectrónicos como la isoelectroforesia.

Cuando dicha proteína se obtiene en forma libre, se puede convertir en una sal por un método muy conocido o similar. Por otro lado, cuando la proteína se obtiene en forma de sal, se puede convertir a una forma libre o a la otra sal por un método muy conocido o similar. La proteína producida por medio de un recombinante se puede hacer reaccionar de nuevo con una enzima de modificación apropiada para la proteína antes o después de purificar la proteína opcionalmente para modificar o retirar la polipeptida parcialmente. Como la enzima de modificación de la proteína se puede utilizar por ejemplo, tripsina, quimotripsina, arginilendopeptidasa, proteína quinasa, glicosidasa o similares. Las actividades de la proteína de esta invención obtenida así o las sales de la misma se pueden determinar con un experimento de fijación con un ligando de etiquetado y un inmunoanálisis con enzimas empleando un anticuerpo específico o similar.

Los anticuerpos de la proteína, la peptida parcial o las sales de esta invención, pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales con la condición de que los anticuerpos puedan reconocer la proteína, la peptida parcial y las sales. Se pueden producir los anticuerpos de la proteína, de la peptida parcial o de las sales de esta invención (en la siguiente descripción de anticuerpos, esta proteína y similares se pueden

abreviar como la proteína de esta invención) utilizando la proteína como el antígeno por medio de un método de producción de anticuerpos o antisuero muy conocido.

Producción de un anticuerpo monoclonal

(a) Producción de células a partir de la producción de anticuerpos monoclonales: La proteína de esta invención se administra a un animal de sangre caliente en la posición que puede producir un anticuerpo debido a la administración del mismo con un excipiente o un diluyente. En la administración, para mejorar el efecto de la producción de anticuerpos, se puede administrar un potenciador Freund completo o un potenciador Freund incompleto. Por lo general la administración se efectúa una vez cada 2~6 semanas y para un total de 2~10 veces.

Animales de sangre caliente son por ejemplo, monos, conejos, perros, cobayos, ratones, ratas, carneros, cabras, pollos y similares, preferiblemente ratones y ratas. En la producción de células para producir un anticuerpo monoclonal, por ejemplo se utilizan ratones como el animal de sangre caliente inmunizado con un antígeno. Un valor de anticuerpo reconocible por un ratón se selecciona del bazo o de los ganglios linfáticos del ratón, de 2~5 días después de la inmunización final, y la producción de células del anticuerpo monoclonal contenido en el bazo o en los ganglios linfáticos se fusiona con células con mieloma de la misma clase o de diferentes clases de animales para preparar un hibridoma y producir un anticuerpo monoclonal. El valor del anticuerpo en el antisuero se puede determinar por ejemplo por un método en el cual el antisuero se hace reaccionar con la proteína etiquetada y citada a continuación, y se mide la actividad del agente etiquetado que se fijó al anticuerpo. La operación de fusión se puede realizar mediante un método bien conocido como un método de Kohler y Milstein (Nature, 256, 495 (1975). Y como el agente de promoción de la fusión por ejemplo se puede emplear polietilenglicol (PEG), un virus Sendai o similar, y preferiblemente PEG.

Como el mieloma, se pueden ejemplificar por ejemplo células de mieloma de animales de sangre caliente como NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1

122
122

yAP-1, preferiblemente P3U1. Una proporción preferible del número de las células de producción de anticuerpos (células del bazo) frente al número de células de mieloma es alrededor de 1:1 ~20:1. Se agrega PEG (preferiblemente, PEG1000-PEG6000) a una concentración de alrededor de 10~80% y se incuba a una temperatura de 20~40 °C, preferiblemente 30~37 °C durante 1~10 minutos y la fusión celular se realiza en forma eficiente. Al efectuar un cribado de un hibridoma de producción de anticuerpos monoclonales, se pueden emplear diversos tipos de métodos, por ejemplo, existe un método donde se agrega un sobrenadante al cultivo del hibridoma a una fase sólida (como una microplaca) absorbiendo el antígeno de la proteína directamente o a través de un excipiente, y un anticuerpo anti-inmunoglobulina, que está etiquetado con un material radioactivo o una enzima de la levadura, (cuando las células que se van a usar en la fusión celular son de un ratón, se utiliza una inmunoglobulina anti ratón) o se agrega una proteína A con el fin de detectar el anticuerpo monoclonal enlazado a la fase sólida; y un método donde un sobrenadante del cultivo de hibridoma se agrega a una fase sólida absorbiendo un anticuerpo de anti inmunoglobulina o una proteína A, una proteína etiquetada con un material radioactivo o una enzima de la levadura, y se detecta el anticuerpo monoclonal enlazado a la fase sólida. La selección del anticuerpo monoclonal se puede efectuar por medio de un método conocido o un método similar para ello. Por lo general se puede efectuar en un medio para células animales a las cuales se les agrega HAT (hipoxantina, amino pterina, timidina). Como el medio para la selección y reproducción, se puede emplear cualquier medio en el cual se pueda reproducir el hibridoma. Como un ejemplo se puede utilizar un medio RPMI 1640 conteniendo 1~20%, preferiblemente 10~20% de suero fetal bovino, un medio GIT conteniendo 1~10% de suero fetal bovino (producido por Wako Junyaku Kougyou Co.) o un medio que no contenga suero para el cultivo del hibridoma (SFM-101, Nissui Seiyaku Co.). Por lo general la temperatura del cultivo es de 20~40 °C, preferiblemente alrededor de 37°C. El tiempo del cultivo por lo general es de alrededor de 5 días ~ 3 semanas, preferiblemente 1 semana ~ 2

122
122

semanas. Por lo general el cultivo se puede efectuar en un 5 % de dióxido de carbono. El valor del anticuerpo del sobrenadante del cultivo del hibridoma se puede determinar como aparece en el método descrito arriba para medir el valor del anticuerpo en el antisuero.

(b) Purificación del anticuerpo monoclonal: La separación y purificación del anticuerpo monoclonal se puede efectuar por medio de un método conocido, por ejemplo un método de separación y purificación para inmunoglobulinas (como el método de precipitar, coagular o separar una sustancia de una solución por medio de la adición de una sal, un método de precipitación con alcohol, un método de precipitación isoelectrico, un método de electroforesis, un método de absorción y rechazo con un intercambio de iones (por ejemplo, DEAE), un método de ultracentrifugado, un método de filtración por gel o un método específico de purificación donde únicamente se recolecta un anticuerpo con un absorbente activo como un antígeno de fijación en fase sólida o una proteína A, o una proteína G y el enlace se libera para obtener el anticuerpo).

[Producción del anticuerpo policlonal]

El anticuerpo policlonal de esta invención se puede producir por un método conocido o similar. Como un ejemplo, usando un inmunoantígeno (proteína antígeno) mismo o un complejo del inmunoantígeno y una proteína de transporte, se inmuniza un animal de sangre caliente empleando el mismo método que en el método descrito arriba para producir un anticuerpo monoclonal, se recolectan los materiales conteniendo el anticuerpo para la proteína de esta invención y el anticuerpo se separa y se purifica. En cuanto al complejo de un inmunoantígeno para inmunizar un animal de sangre caliente y una proteína transportadora, el tipo de proteína transportadora y la proporción de la mezcla del excipiente a un hapteno no son importantes, siempre que el anticuerpo se pueda producir efectivamente para que el hapteno se inmunice por medio de un enlace cruzado con el excipiente. Por ejemplo, la albúmina de suero bovino, la cicloglobulina bovina, la hemocianina o similares se pueden emplear para acoplarlos con el hapteno a una proporción por peso de alrededor 0.1~20, preferiblemente

alrededor de 1~5 a 1 de hapteno. Al acoplar el hapteno y el excipiente, se pueden emplear varias clases de agentes de condensación como agentes ésteres activos conteniendo glutaraldehído, carbodiimida, éster activo maleimido, un grupo tiol y un grupo ditiopiridilo. Los productos de la condensación se administran a las partes de animales de sangre caliente capaces de producir el anticuerpo, junto con el mismo o con un excipiente o diluyente. Para aumentar la capacidad de producción de anticuerpos durante la administración se puede administrar un potenciador Freund completo o un potenciador Freund incompleto. Por lo general la administración se efectúa una vez cada 2~6 semanas, y en total es entre 3 ~10 veces. El anticuerpo policlonal se puede recolectar a partir de la sangre, ascitis, preferiblemente sangre del animal de sangre caliente inmunizada con el método descrito anteriormente. El valor del anticuerpo policlonal en el antisuero se determina por el mismo método descrito en la determinación anterior del valor del anticuerpo en el antisuero. La separación y purificación del anticuerpo policlonal se puede realizar mediante el mismo método de separación y purificación de la inmunoglobulina que el que se utilizó en la anterior separación y purificación del cuerpo monoclonal.

Los agentes tratantes que contienen la proteína o la peptida parcial de esta invención y la proteína de esta invención y similares tienen la actividad citotóxica del cáncer, de manera que los agentes se pueden emplear como agentes para extraer tejidos enfermos (el extracto contiene todo el extracto y una parte del extracto, preferiblemente una parte del extracto), y particularmente para tratar el cáncer arreactivo. Cuando la proteína de esta invención y similares se emplean como los agentes anteriores de tratamiento y prevención, se utilizan después de ser purificados a por lo menos 90%, preferiblemente 95% o más, más preferiblemente 98% o más, y aún más preferiblemente 99% o más.

La actividad inhibidora de la proliferación de células cancerosas de la proteína de esta invención o similares se puede determinar por un método conocido o por la actividad de una citotoxina o por una actividad que causa la muerte celular que se determina por un método conocido o por un método

329

similar, preferiblemente por el método descrito en los experimentos citados más adelante. Como los compuestos de prueba, por ejemplo se pueden ejemplificar las peptidas, proteínas, compuestos no peptidas, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extracto de células, extracto de plantas, extracto de tejidos animales y plasma sanguíneo. Estos compuestos pueden ser nuevos o conocidos.

Los compuestos o las sales obtenidos por el método de cribado o por el estuche de cribado de esta invención se seleccionan entre los compuestos de prueba citados arriba, por ejemplo, peptidas, proteínas, compuestos no peptidas, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extracto de células, extracto de plantas, extracto de tejidos animales y plasma sanguíneo. Estos compuestos tienen una actividad que inhibe la actividad citotóxica de la proteína de esta invención o similares o la actividad de inhibición de la proliferación de células cancerosas de la proteína de esta invención o similares. Como las sales de los compuestos, se puede utilizar sales similares a las sales de la proteína de esta invención.

Cuando los compuestos obtenidos mediante el método de cribado o con el estuche de cribado se utilizan como los agentes tratantes descritos arriba, se pueden emplear en las formas usuales. Por ejemplo, se utilizan como tabletas, cápsulas, elíxires, microcápsulas, soluciones estériles, suspensiones o similares. Las preparaciones farmacéuticas obtenidas en esta forma son seguras y de baja toxicidad, por ejemplo se pueden administrar a un humano o a un animal de sangre caliente (como ratones, ratas, conejos, cabras, cerdos, vacas, caballos, aves, gatos, perros, monos y similares). Los pesos de las dosis de los compuestos o las sales de los mismos se modifican por la acción, la enfermedad, la ruta de la dosis o similares. Por lo general, en los adultos (con un peso estimado de 60 kg) se pueden administrar alrededor de 0.1~100 mg del compuesto por día, preferiblemente alrededor de 1.0~50 mg, más preferiblemente alrededor de 1.0~20 mg. Para la administración parenteral, la dosis de los compuestos varía según el objetivo, la enfermedad y similares, por lo general en adultos (con un peso estimado de 60 kg) lo apropiado son alrededor de 0.01~30 mg

del compuesto por día, más preferiblemente alrededor de 0.1~20 mg, aún más preferiblemente alrededor de 0.1~10 mg por medio de una inyección intravenosa. En los otros animales, se puede emplear la dosis por peso estimado de 60 kg.

El cribado de los compuestos candidatos a medicamentos para enfermedades: Puesto que la proteína o similar de esta invención tiene una actividad citotóxica, los compuestos o las sales promocionando la función (como una actividad citotóxica) de la proteína o similar de esta invención, por ejemplo, se pueden emplear como agentes para tratar el cáncer. Por otro lado, las sales inhibiendo la función de la proteína o similar de esta invención, por ejemplo, se pueden emplear como agentes para tratar y prevenir la gastritis y la úlcera gástrica. Por lo tanto, la proteína o similar de esta invención se utiliza efectivamente como reactivo para cribar los compuestos o las sales que promueven o inhiben la función de la proteína o similar de esta invención.

A saber, esta invención dispone (1) un método de cribado caracterizado por la utilización de la proteína o la peptida parcial o las sales de esta invención, y el método de cribado de los compuestos promoviendo la función (como una actividad citotóxica) de la proteína o la peptida parcial o las sales de esta invención, o el método de cribado de los compuestos que inhiben la función (como una actividad citotóxica) de la proteína o la peptida parcial o las sales de esta invención. En adelante, los compuestos que promueven la función se pueden abreviar como 'activadores' y los compuestos que inhiben la función se abrevian como 'inhibidores'.

Más aún, esta invención provee (2) un estuche para cribar los activadores o inhibidores, caracterizados en que contienen la proteína o la peptida parcial o las sales de esta invención. En adelante el estuche anterior se puede abreviar como un 'estuche de cribado de esta invención'.

En una incorporación por ejemplo, en el (1) anterior se dispone un método de cribado de activadores o inhibidores, caracterizado en que la comparación se efectúa entre el caso (i) y el caso (ii). El caso (i) es que la proteína o la peptida parcial o las sales de esta invención entran en contacto

con una célula, que es una célula normal conteniendo una célula sanguínea derivada de un tejido de los animales de sangre caliente citados arriba (preferiblemente humano) o la célula cancerosa citada arriba. El caso (ii) es que la proteína o la peptida parcial o las sales de esta invención entran en contacto con una célula, que es una célula normal conteniendo una célula sanguínea derivada de un tejido de los animales de sangre caliente citados arriba (preferiblemente humano) o la célula cancerosa citada arriba y un compuesto de prueba.

En otra incorporación, en el (2) arriba, se dispone un estuche para cribar los activadores o inhibidores, caracterizado porque contiene la proteína o la peptida parcial o las sales de esta invención, y una célula que es una célula normal conteniendo una célula sanguínea derivada de un tejido de los animales de sangre caliente citados arriba (preferiblemente humano) o la célula cancerosa citada arriba o similar.

Además, concretamente en el método de cribado, el caso (i) y el caso (ii) se caracterizan en que se determinan y comparan las actividades citotóxicas de la proteína y similares de esta invención.

La actividad citotóxica, la actividad de inhibición de la multiplicación de células y la actividad causando la muerte celular de la proteína o similar de esta invención se puede determinar por medio de un método conocido o por un método similar. Sin embargo, más concretamente se utilizan las líneas de células establecidas y similar, además de un sustrato conteniendo el compuesto de prueba, un control negativo que es un sustrato que no contiene el compuesto de prueba y un control positivo que es un sustrato conteniendo la toxina M, estos dos o tres se utilizan. Al comparar los números de células bajo condiciones satisfactorias estadísticamente significativas, la actividad de inhibición de la actividad citotóxica o la actividad de la multiplicación de las células, o la muestra específica exhibiendo la actividad de la actividad citotóxica o la actividad de la multiplicación de las células se puede detectar por medio de la existencia o de la ausencia de las actividades o por el incremento o la reducción. Las células empleadas en el método de detección son por ejemplo células

normales conteniendo una célula sanguínea derivada de un tejido de los animales de sangre caliente citados arriba (preferiblemente humano) o de las células cancerosas citadas arriba de varias clases de animales de sangre caliente (por ejemplo, cáncer de endometrio, endometrioma, cáncer de seno, cáncer de estómago, carcinoma hepático, cáncer del bazo, carcinoma de la vesícula biliar, cáncer del colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer renal, neuroblastoma, cáncer de la vejiga, melanoma maligno, cáncer de la lengua, carcinoma gingival, fibroblasto de ratón, riñón de mono verde africano cáncer hepático en ratas y similares).

Como compuestos de prueba se pueden ejemplificar por ejemplo, peptidas, proteínas, compuestos no peptidas, compuestos sintéticos, productos de fermentación, extractos de células, extractos de plantas, extractos de tejido animal y similares. Estos compuestos pueden ser compuestos nuevos o conocidos. Para llevar a cabo el método de cribado anterior, la proteína o similar de esta invención se suspende en una solución amortiguadora apropiada para el cribado y se preparan las muestras de la proteína o similar de esta invención. Como solución amortiguadora se puede emplear una solución amortiguadora fosfato con un pH de alrededor de 4~10 (preferiblemente un pH alrededor de 6~8), una solución amortiguadora Tris-hidroclorhidrato o similar, que no inhibe la reacción de la proteína o similar de esta invención y los compuestos de prueba.

Como un método de cribado concreto, después del examen de cribado se pueden ejemplificar ① un método para observar directamente los cambios de las células bajo un microscopio y contar las células con un hemocitómetro o similar, ② un método donde se captura el cambio del potasio, las hemoglobinas y similares que se levigan de las células a causa de la muerte celular ③ un método para determinar las células restantes después de la reacción con sales de tetrazolio o similares, ④ un método para determinar las células vivas restantes con una sustancia etiquetada con un radioactivo, ⑤ un método para confirmar la muerte celular por medio de la inducción de la apoptosis celular y similar. Por ejemplo, como un compuesto que aumenta la actividad citotóxica de la proteína o similar de

esta invención, se puede seleccionar un compuesto de prueba en el cual la actividad citotóxica del caso (ii) anterior comparado con el caso (i) anterior se aumenta en alrededor de 20% o más, más preferiblemente 30 % o más, aún más preferiblemente 50% o más. Por otro lado, como un compuesto que inhibe la actividad citotóxica de la proteína o similar de esta invención, se puede seleccionar un compuesto de prueba en el cual la actividad citotóxica en el caso (ii) arriba comparada con el caso (i) arriba se inhibe por alrededor de 20% o más, más preferiblemente 30 % o más, aún más preferiblemente 50% o más. Estos se pueden realizar como un método para un cribado de alto rendimiento. En el siguiente, como un método②, un método para determinar las hemoglobinas por medio de una reacción hemolítica y como un método ③, un método WST se utilizan respectivamente. En los métodos, se selecciona un carbono activo, celulosa CM y alginato de calcio como los absorbentes que muestran la actividad anti-Toxina M.

Adicionalmente es posible examinar y comparar las soluciones que contienen este control de aniones, el control positivo y los compuestos de prueba con modelos animales para confirmar los efectos en los niveles de los animales de los materiales tóxicos anti-M. En estos casos se pueden emplear muchas clases de animales de sangre caliente. En particular se puede emplear un ratón, un perro y un mono. Como modelos infectados, se puede emplear con efectividad un gerbo mongólico, un ratón y un mono.

Cuando los compuestos obtenidos por medio del método de cribado o el estuche de cribado de esta invención se utilizan como los agentes de tratamiento y prevención descritos arriba, estos compuestos se pueden emplear en las formas usuales. Por ejemplo, usando los mismos métodos de las preparaciones farmacéuticas de la proteína de la invención, se emplean como tabletas, cápsulas, elixires, microcápsulas, soluciones estériles, suspensiones o similares. Las preparaciones obtenidas en esta forma son seguras y de baja toxicidad, por ejemplo se pueden administrar a un humano o animal de sangre caliente (como un ratón, una rata, un conejo, una cabra, un cerdo, una vaca, un caballo, un ave, un gato, un perro y mono y similar).

129
127

Los pesos de las dosis de los compuestos o las sales del mismo se cambian por la acción, la enfermedad, la ruta de la dosis o similar. Cuando los compuestos se utilizan para aumentar la función de la proteína o similar de esta invención con un agente de regeneración de tejido después de retirar los tejidos enfermos, por lo general en los adultos (con un peso estimado de 60 kg) se pueden administrar en forma oral alrededor de 0.1~100 mg del compuesto por día, preferiblemente alrededor de 1.0~50 mg, más preferiblemente alrededor de 1.0~20 mg. Para los otros animales, se puede emplear el peso de la dosis calculada a 60 kg.

Cuantificación de la proteína o la peptida parcial o las sales de esta invención:

Los anticuerpos para la proteína y similares de esta invención (en adelante, ocasionalmente se abrevian como los anticuerpos de esta invención,) específicamente pueden reconocer la proteína y similares de esta invención de manera que se pueden emplear para la cuantificación de la proteína y similar de esta invención en un líquido de prueba, particularmente por medio de una técnica de inmunización de sándwich. A saber, esta invención dispone (i) un método para cuantificar la proteína y similar de esta invención en un líquido de prueba caracterizado en que el anticuerpo de esta invención y el líquido de prueba y la proteína y similar de esta invención se hacen reaccionar en forma competitiva, se determinan las proporciones de la proteína etiquetada y similar de esta invención que se fija al anticuerpo y (ii) un método para cuantificar la proteína y similar de esta invención en un líquido de prueba caracterizado en que el líquido de prueba y el anticuerpo insolubilizado en un excipiente y el otro anticuerpo etiquetado de esta invención se hacen reaccionar al mismo tiempo o en forma continua y luego se determina la actividad del agente de etiquetado en el excipiente insolubilizado. En el método cuantitativo anterior (ii), preferiblemente, un anticuerpo es un anticuerpo que reconoce los extremos N de la proteína y similar de esta invención, el otro anticuerpo es un anticuerpo que reacciona con los extremos C de la proteína y similar de esta invención.

✓30
✓30

Más aún, utilizando un anticuerpo monoclonal para la proteína y similar de esta invención (en adelante ocasionalmente se abrevia como un anticuerpo monoclonal de esta invención), la cuantificación de la proteína y similar de esta invención se puede efectuar, y además, la detección se puede completar usando un colorante para tejidos. Como estos objetos, se pueden usar anticuerpos moleculares mismos o fracciones $F(ab')_2$, Fab' , o Fab de anticuerpos moleculares. La cuantificación de la proteína y similar de esta invención y los usos de esta invención no se deben limitar. Por ejemplo, la cantidad del anticuerpo, del antígeno o del complejo del anticuerpo – antígeno correspondiendo a la cantidad de antígeno (por ejemplo, la cantidad de la proteína) en el líquido de prueba se detecta en forma química o física, la cantidad obtenida se determina por medio de una curva de estándar que se forma por medio de un líquido estándar conteniendo el antígeno a una cantidad conocida. Como ejemplos preferiblemente se pueden emplear nefelometrías, un método de competencia, un método inmunométrico y un método de sándwich. Considerando la sensibilidad y la especificidad, se prefiere el método de sándwich citado. Como agentes de etiqueteado usados en el método de determinación con una sustancia de etiqueteado, por ejemplo se ejemplifica un isótopo radioactivo, una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente. Como el isótopo radioactivo por ejemplo se puede emplear $[^{125}I]$, $[^{131}I]$, $[^3H]$, $[^{14}C]$. Como la enzima se pueden emplear isótopos estables y altamente activos por ejemplo, β -galactosidasa, β -glucosidasa, alcalifosfatasa, peroxidasa, una hidrogenasa de ácido málico y similar. Como sustancia fluorescente, por ejemplo, se puede emplear fluorescamina, fluoresceína isotiocianato y similar. Como la sustancia luminiscente por ejemplo se puede usar, luminol, derivados del luminol, luciferina, ludgenina y similares. Más aún, para la fijación de un anticuerpo o de un antígeno y de un agente de etiqueteado, se puede utilizar un antígeno y un agente de etiqueteado de tipo biotina – avidina.

La insolubilización de un antígeno o de un anticuerpo se puede efectuar mediante la absorción física o la fijación química empleada

usualmente para la insolubilización de proteínas o enzimas. Como excipiente se pueden ejemplificar polisacáridos insolubles como agarosa, dextrano y celulosa, resinas sintéticas como poliestireno, poliacrilamida y silicona o vidrio. En el método de sándwich, el líquido de prueba se hace reaccionar con el anticuerpo monoclonal insolubilizado de esta invención (reacción primaria) y luego se hace reaccionar con el otro anticuerpo monoclonal etiquetado de esta invención (reacción secundaria) y se determina la actividad del agente de etiquetado en el excipiente insolubilizado para determinar la cantidad de la proteína de esta invención en el líquido de prueba. La reacción primaria y la reacción secundaria se pueden cambiar. De lo contrario, estas reacciones se pueden efectuar al mismo tiempo o cambiando los tiempos de inicio. El agente de etiquetado y el método de insolubilización se pueden tratar de la misma forma que estas reacciones. En el inmunoensayo que emplea el método de sándwich, no es necesario que el anticuerpo empleado como un anticuerpo para la fase sólida o un anticuerpo de etiquetado sea de un tipo. Se puede emplear una mezcla de dos o más tipos de anticuerpos para mejorar la sensibilidad de la determinación. En el método de determinación de la proteína y similar de esta invención mediante el uso del método de sándwich de esta invención, los anticuerpos monoclonales empleados en la reacción primaria y en la reacción secundaria preferiblemente tienen enlaces de diferentes partes la proteína y similar de esta invención. A saber, en cuanto los anticuerpos usados en la reacción primaria y en la reacción secundaria, por ejemplo cuando el anticuerpo usado en la reacción secundaria reconoce el extremo C de la proteína y similar de esta invención, el anticuerpo empleado en la reacción primaria preferiblemente reconoce una parte excepto el extremo C, por ejemplo el extremo N.

El anticuerpo monoclonal de esta invención se puede usar en un sistema de determinación excepto en el método sándwich tal como un método de competencia o un método inmunométrico o una nefelometría. En el método de competencia, los antígenos y los antígenos etiquetados en un líquido de prueba se hacen reaccionar competitivamente con anticuerpos

132
132

y luego los anticuerpos etiquetados sin reaccionar (F) y los antígenos etiquetados (B) fijados a los anticuerpos se separan (separación B/F), se determina la cantidad etiquetada de B o F y se cuantifica la cantidad de antígeno. En el método de reacción, se emplean anticuerpos solubles como anticuerpos. En la separación B/F, un método de fase líquida donde se utiliza polietilenglicol o el segundo anticuerpo del anticuerpo citado arriba, y un método de fase sólida donde se emplea un anticuerpo de fase sólida como el primer anticuerpo, o se emplea un anticuerpo soluble como el primer anticuerpo y un anticuerpo de fase sólida se emplea como el segundo anticuerpo se ejemplifican. En el método inmunométrico, los antígenos y los antígenos en fase sólida en el líquido de prueba se hacen reaccionar en forma competitiva con anticuerpos etiquetados con una cantidad definida y luego se separan la fase sólida y la fase líquida. De lo contrario, los antígenos en el líquido de prueba y los anticuerpos etiquetados con una cantidad excesiva reaccionan, los anticuerpos de la fase sólida se agregan para fijar los anticuerpos etiquetados sin reaccionar a la fase sólida, y se separan la fase sólida y la fase líquida. Continuamente se determina la cantidad etiquetada de cualquiera de las dos fases y se determina la cantidad del antígeno en el líquido de prueba. En la nefelometría, se determina la cantidad de sustancias precipitadas insolubles que resultó de la reacción antígeno - anticuerpo en el gel o en la solución. Cuando la cantidad de antígenos en el líquido de prueba es baja y la cantidad de sustancias precipitadas es pequeña, preferiblemente se puede usar una nefelometría láserica que emplea una dispersión por láser.

Cuando estos métodos de determinación inmunológica se aplican en el método de determinación de esta invención, no se requieren condiciones especiales ni es necesario establecer unas operaciones. Al agregar unas ideas técnicas comunes a los campos de unas condiciones usuales y a los métodos de operación de cada método, se pueden construir unos métodos de determinación de la proteína y similar de esta invención. En cuanto a los detalles de estos medios técnicos comunes, se pueden buscar referencias en libros generales y en libros especializados. Por ejemplo, se pueden remitir

X 33
Z

a Kan Irie editado, Radioimmune Assay, Kodan-sha (1974), Kan Irie editado, Radioimmuno Assay, continuado, Kodan-sha (1979), Eiji Ishikawa y colaboradores, editado, Immunoenzymometric Assay, Igaku Shoin (1978), Eiji Ishikawa y colaboradores, editado, Immunoenzymometric Assay, 2nd edición, Igaku Shoin (1982), Eiji Ishikawa y colaboradores, editado, Immunoenzymometric Assay, 3era edición, Igaku Shoin (1987), Methods in ENZYMOLOGY, Vol. 70, Immunochemical Techniques (Part A): ibid., Vol. 73, Immunochemical Techniques (Part B), ibid., Vol. 74, Immunochemical Techniques (Part C), ibid., Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays), ibid., Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), ibid., Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Híbridoma Technology and Monoclonal Antibodies), todos publicados por Academic Press Co. Como se describió arriba, al usar el anticuerpo de esta invención, la proteína y similar de esta invención se puede cuantificar sensiblemente. Más aún, al cuantificar las concentraciones de la proteína y similar de esta invención empleando el anticuerpo de esta invención, cuando las concentraciones aumentadas de la proteína y similar de esta invención se detectan en pacientes con infección por *Helicobacter pylori*, los pacientes tienen enfermedades por ejemplo, gastritis, úlcera gástrica, cáncer gástrico, enfermedades valvulares, diabetes sacarina, diversos tipos de cáncer (como cáncer de endometrio, endometrioma, cáncer de seno, cáncer del colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma hepático, cáncer del bazo, carcinoma de la vesícula biliar, cáncer renal, neuroblastoma, cáncer de la vejiga, melanoma maligno y similares). De lo contrario, es posible diagnosticar que la posibilidad de la morbilidad futura es alta. El anticuerpo de esta invención se puede utilizar para la detección de la proteína y similar de esta invención en líquidos de prueba como fluidos o tejidos del cuerpo. Se utiliza para la formación de la columna del anticuerpo para purificar la proteína y similar de esta invención, para detectar la proteína y similar de esta invención en cada fracción de la purificación y del análisis del

134
L327

comportamiento de la proteína y similar de esta invención en células de prueba.

El medicamento que contiene el anticuerpo de esta invención, el anticuerpo de esta invención (el anticuerpo neutralizante) teniendo una acción para neutralizar las actividades de la proteína y similar de esta invención se pueden emplear como medicamentos para tratar y prevenir enfermedades como gastritis, úlcera gástrica, cáncer gástrico, enfermedad valvular, diabetes sacarina, diversos tipos de cáncer (como cáncer de endometrio, endometrioma, cáncer de seno, cáncer del colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma renal, neuroblastoma, cáncer de la vejiga, melanoma maligno y similares). El anticuerpo humanizado de esta invención para la proteína y similar de esta invención se puede emplear como medicamento para tratar y prevenir enfermedades como gastritis, úlcera gástrica, cáncer gástrico, enfermedad valvular, diabetes sacarina, diversos tipos de cáncer (como cáncer de endometrio, endometrioma, cáncer de seno, cáncer del colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma renal, neuroblastoma, cáncer de la vejiga, melanoma maligno y similares). El anticuerpo humanizado se puede formar con referencia a los métodos descritos en Nat Biotechnol, 14, 845-851 (1996), Nat Genet. 15, 146-156 (1997) y PNAS, 97(2), 722-727 (2000). A continuación este anticuerpo neutralizante y este anticuerpo humanizado de esta invención se abrevian como el anticuerpo de esta invención.

Los agentes de tratamiento y prevención citados arriba que contienen el anticuerpo de esta invención se pueden administrar en forma oral o parenteral como un líquido o como se encuentra o una composición de un medicamento con una forma de dosis apropiada a un humano o a un mamífero (como un ratón, un conejo, una cabra, un cerdo, una vaca, un gato, un perro, un mono y similar). La dosis de los agentes varía según el objeto, la enfermedad, el grado de la enfermedad, la ruta de la dosis o similar. Cuando los agentes se utilizan para tratar o prevenir un tumor del endometrio, por lo general una dosis del anticuerpo de esta invención es 0.01~20 mg/kg por peso, preferiblemente 0.1~10 mg/kg por peso, más

135

preferiblemente 0.1~ 5 mg/kg por peso entre alrededor de 1 y 5 veces por día. Es conveniente administrar el agente por medio de una inyección intravenosa. Una dosis en otra administración parenteral u oral también puede estar acorde con la dosis anterior. Cuando el estado de la enfermedad es muy severo, se puede incrementar la dosis proporcionalmente al estado. El anticuerpo de esta invención se puede administrar como está o como una composición médica apropiada. La composición médica utilizada en la administración contiene un excipiente farmacéuticamente apropiado para el anticuerpo descrito arriba o la sal, un diluyente o un excipiente. Esta composición se puede administrar como una forma de dosis apropiada para una administración apropiada oral o parenteral. A saber por ejemplo, como la composición para la administración oral, la forma de dosis es un sólido o un líquido, concretamente una tableta (conteniendo una gragea y una tableta recubierta con una película), una pastilla, un gránulo, un polvo, una cápsula (conteniendo una cápsula blanda), un jarabe, una emulsión, una suspensión o similar. Dicha composición se prepara por medio de un método conocido y puede contener el excipiente empleado normalmente, un diluyente o un excipiente. Por ejemplo, como el medio de transporte de la tableta y el excipiente se puede emplear lactosa, almidón, sacarosa, estearato de magnesio y similares.

Los siguientes números de secuencia del listado de secuencias muestran la siguiente secuencia

SEC ID No. 1: muestra una secuencia de aminoácidos derivada de *Helicobacter pylori* 60190 (Toxina M).

SEC ID No. 2: muestra una secuencia base de ADN de códigos derivada de *Helicobacter pylori* 60190 proteína (Toxina M) de esta invención teniendo la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID No. 1.

SEC ID No.3: muestra una secuencia base del ADN preparado (sintético) usado en el Ejemplo 3.

SEC ID No.4: muestra una secuencia base del ADN preparado (sintético) usado en el Ejemplo 3.

El transformante, *Escherichia coli* Toxina M/pET30EK/LIC/DH5 α obtenido en el Ejemplo 3 citado a continuación fue depositado bajo declaración No. PERM BP-8218 el 17 de octubre de 2002 en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (IPOD). Más aún, el clon del hibridoma No. 4 obtenido en el Ejemplo 4 citado a continuación fue depositado bajo declaración No. FERM BP-8222 como BALB-C/P3U1/004-1G9 el 23 de octubre de 2002 en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (IPOD). Además, el clon del hibridoma No. 101 fue depositado bajo declaración No. FERM BP-8223 como BALB-c/P 3U 1/101-1 C 10 el 23 de octubre de 2002 en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (IPOD). El clon de hibridoma No. 116 fue depositado bajo declaración No. FERM BP-8224 como BALB-C/P3U1/116-5D7 el 23 de octubre de 2002 en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (IPOD).

Ejemplos

Esta invención se entenderá con mayor facilidad con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos tienen como finalidad ilustrar esta invención y no se deben interpretar de manera que limiten el ámbito de la invención. La manipulación de genes *E.coli* se efectuó de conformidad con el método descrito en Molecular Cloning.

Ejemplo 1: Un método para purificar y extraer la toxina de esta invención de *Helicobacter pylori*.

Se puede obtener *Helicobacter pylori* con una cepa separada ya establecida (por ejemplo, de American Type Culture Collection) o al cultivar una cepa a partir de muestras clínicas de ensayos. En este ejemplo, se utilizó una cepa separada de *Helicobacter pylori* 60190. Usando un medio agar al cual se agregó 5% de suero bovino (producido por Sigma Co.) a un medio agar de Infusión Cerebro Corazón (producido por Difco Co.), esta cepa separada se sub-cultivó en 2-5 pasos durante 1 – 2 semanas a una temperatura de 37°C y una humedad de 90% o más, bajo unas condiciones más microaeróbicas (CO₂ 5-10%). Bajo un microscopio se confirmó que las células no estaban muertas ni estaban en forma colloi sino que habían

crecido satisfactoriamente. Las células se transfirieron a una placa con un cultivo agar Infusión Cerebro Corazón (producido por Difco Co.) que no contenía suero sino 5% de 2,6-di-O-metilo- β -ciclodextrina. Después de confirmar que el cultivo y el crecimiento se encontraban bajo las mismas condiciones que las que se citan arriba, las células se transfirieron a cultivos conteniendo 2,6-di-O-metilo- β -ciclodextrina con unas reducciones graduales por pasos, es decir 2%, 1% y 0.5% de la concentración.

En un cultivo líquido de Infusión Cerebro Corazón conteniendo 0.5% de 2,6-di-O-metilo- β -ciclodextrina, se cultivaron las células a una temperatura de 37 °C bajo condiciones microaeróbicas durante unas 16 horas mientras se agitaba en un agitador rotatorio a 100-120 rpm. Se recolectaron células de bacteria Pelletal por medio de centrifugación a 10000 Xg durante 20 minutos. Estas se suspendieron en una solución amortiguadora 10 mM Tris-HCl pH 7.7 (en adelante abreviada como amortiguador A. El pH total es 6.1 o más, porque el pH de la proteína buscada es pH 6.08.) y se dispersaron por sonicación. Después de guardarlas durante la noche a una temperatura de -80°C, nuevamente las células se dispersaron por sonicación y se centrifugaron a 100000 Xg durante 60 minutos. Únicamente se extrajo la capa superior de las tres capas separadas.

El extracto líquido se purificó crudamente con una solución de sulfato de amonio al 70%. El extracto resultante se purificó por medio de una cromatografía de intercambio de iones con una resina de glóbulos de intercambio de aniones con unos diámetros de partícula bastante grandes (DEAE Sephacel de Amersham Pharmacia Biotech AB). El amortiguador A se empleó como una solución amortiguadora de equilibrio, y se empleó una mezcla del amortiguador A y una solución de sal de NaCl a 0.3M como eluido. Usando el amortiguador A y el eluido se extrajeron las células mediante un gradiente de concentración. Se agregó una cantidad apropiada de cada fracción en forma de gotas en los pozos donde se sembraron las Células HeLa y se evaluó una viabilidad de células en cada pozo. La evaluación se efectuó por medio de un ensayo WST usando Estuches de

13a
M

Conteo de Células (laboratorios DOJIN). Se comparó con un control, y se evaluaron las fracciones que mostraron una viabilidad significativamente inferior y las fracciones que mostraron unas curvas de crecimiento relativamente similares de la proteína junto con los resultados de la electroforesis para utilizarlas como fracciones de muestra para el siguiente proceso de purificación.

Se seleccionó una cromatografía hidrófoba (Phenyl Sepharose CL-4B, Amersham Pharmada Biotech AB) que tiene un sistema de separación diferente que el de la siguiente vez. Se empleó una solución amortiguadora de equilibrio conteniendo 1M de sulfato de amonio en 10 mM de solución amortiguadora. Se utilizó la solución amortiguadora de levigación conteniendo 40% de etilenglicol en 10 mM de solución amortiguadora de fosfato. Después de extraer las células por gradiente de concentración, cada muestra se evaluó con el mismo método descrito arriba.

Las muestras extraídas por el proceso citado arriba se extrajeron nuevamente por medio de una cromatografía de intercambio de aniones con glóbulos con unos diámetros de partícula relativamente pequeños (RESOURCE Q de Amersham Pharmada Biotech AB). Se utilizó la solución amortiguadora A como un amortiguador de equilibrio y una solución de sal de NaCl a 1 M como un amortiguador de levigación. Utilizando la cromatografía, finalmente se obtuvo una sola brida de proteína con un peso molecular de alrededor de 41000. El tipo y el orden de estas cromatografías se pueden modificar o se pueden añadir otras.

Después de que la brida señalizadora resultante fue teñida con Coomassie Brilliant Blue, se transcriptó a una membrana nitrocelulosa o (una membrana de polivinilideno difluoruro) con un aparato de inmunotransferencia y se analizó con un secuenciador de aminoácidos. Como los resultados, de la misma forma que se describió arriba, las secuencias de aminoácidos de los extremos N del locus del gen HP1037 de una base de datos registrada (*Helicobacter pylori* 22695) concordaban en un 95% (19 bases en 20 bases). (Fig. 1)

Ejemplo 2: Secuencias de aminoácidos y secuencias de ADN con un método de producción tecnológica de genes

En este ejemplo se utilizó una cepa de separación *Helicobacter pylori* 60190.

Como se describió arriba, ya se habían efectuado todos los análisis de *Helicobacter pylori* 22695 de diferentes cepas. Se puede determinar el locus del gen homólogo en la búsqueda en la base de datos de TIGR (The Institute for Genomic Research). Se encontró que el locus del gen HP 1037 de *Helicobacter pylori* 22695 codificaba la proteína homóloga.

A partir de los resultados se efectuó la clonación de la proteína de esta invención. A saber, se utilizó la *Helicobacter pylori* 60190 como una plantilla, en primer lugar se formaron grupos plurales apropiados de preparados apropiados basados en el locus del gen HP 1037 y en el locus del gen HP 1036 corriente arriba y del locus del gen HP 1038 corriente (en el sitio 5' y en el sitio 3') para completar la secuencia. Se empleó una polimerasa de ADN para la funciones de corrección de pruebas. Cada grupo de preparados se conformó de manera que contenía suficientes partes mutuas del preparado y se realizaron varias secuencias en los sitios 5' y 3'. Las secuencias resultantes de ADN se mostraron en la SEC ID No. 2 del listado de secuencias. Las secuencias de aminoácidos se muestran en la SEC ID No. 1.

Ejemplo 3

Experimento de expresión de la proteína tóxica por recombinación de gen *E.coli* se utilizó en el experimento de expresión. Se empleó el vector pET-30EK/LIC (producido por Novagen Co.) y *Kcoli'BL21* (DE3) para la expresión. El preparado de sensibilidad fue la SEC ID No. 3 insertando GACGACGCAAG en el sitio 5' de la cadena de sensibilidad al código de la proteína tóxica derivada de *Helicobacter pylori* 60190 que se clonó en el Ejemplo 2. El preparado de antisensibilidad fue la SEC ID No. 4 insertando GAGGAGAAGCCCGGTTA en el sitio 5'. Se formaron los genes de inserción por medio de un método PCR empleando los preparados anteriores. Los genes insertados se prepararon en presencia de 25 mM de

140
R

dATP y 100 mM de DTT con polimerasa de ADN T4 para el sitio LIC del vector y se calentó en presencia de 25mM de EDTA. El recombinante formado se secuenció nuevamente para confirmar que era idéntico a la SEC ID No. 1. Se transformó de Nuevo a *E.coli* BL21 (DE3) para su expresión y se cultivó en un medio LB conteniendo 30 µg/ml of kanamicina.

Se agitó el cultivo para obtener alrededor de 0.4 de OD₆₀₀ a una temperatura de 37°C a 250 rpm. Se agregó isopropilo-beta-tiogalactosida para obtener una concentración final de 1mM, y además la mezcla se agitó durante 2 horas. Puesto que la proteína fusionada formó un cuerpo de inclusión, se recolectó *E.coli* mediante centrifugado y el cuerpo de inclusión de la proteína se obtuvo con un reactivo BugBuster y Benzonase Nuclease (ambos disponibles en Novagen Co.) . La proteína se separó por medio de un método de electroforesia de gel de sodio dodecil sulfato poliacrilamida (SDS-PAGE), y la respectiva brida única se confirmó por una brida argentafín. Luego la proteína se replegó y se comparó con el control con un reactivo WST (Dojin Chemical Laboratories Ltd. Cell Counting Kit) usando células HeLa y otras células de animales de sangre caliente. Como resultados, se evaluaron unas diferencias significativas de supervivencia y se encontró que la proteína de expresión tenía las mismas actividades que las de la proteína purificada. Se encontró que la proteína de expresión tenía las mismas actividades que las células gástricas humanas normales como las células HeLa de las células del cáncer cervical. (Fig.2). Igualmente se encontró que la proteína tenía amplias actividades no solo sobre los otros tejidos humanos sino también sobre las células de los mamíferos (Fig. 3, Fig.4).

Ejemplo 4

Formando un anticuerpo monoclonal anti - Tóxico M:

La expresión de la Toxina M 240 µg, que se replegó se administró en forma subcutánea dos veces en diferentes posiciones de BALB/C ratón. 4 días después de la inmunización final, se extrajo el bazo del ratón y se filtró por presión por medio de un tramado sin manchas y se suspendió en un medio Eagle's modificado mínimo esencial (MEM) para obtener una

141

solución de suspensiones de células de bazo. Como las células usadas para la fusión celular, se emplearon células de mioma P3-X63. Ag 8. UI (P3U1) derivadas de BALB/C ratón como las células usadas en la fusión celular. [Temas actuales en microbiología e inmunología, 81, 1 (1978)]_o. La fusión celular se efectuó de conformidad con el método de origen [Nature, 256, 495 (1975)]. A saber, las células del bazo y P3U1 se lavaron tres veces respectivamente con MEM que no contenía suero y se mezclaron a una proporción de 6.6 : 1 de células del bazo y número P3U1. Las células se precipitaron por centrifugado a 750 x g durante 15 minutos. Se retiraron todos los sobrenadantes y se liberó el precipitado; se agregaron 0.3 ml de poliestilenglicol al 45% (PEG) 6000 (Producido por Wako Junyaku Co.) y se dejó reposar la mezcla en un tanque de agua tibia a 37°C durante 7 minutos para efectuar la fusión. Después de la fusión, se agregaron cantidades limitadas de MEM a las células y se agregó un total de 15 ml de MEM. La mezcla se centrifugó a 750 X g durante 15 minutos y se retiraron los sobrenadantes. El precipitado de las células se suspendió en un medio GIT (producido por Wako Junyaku Co.) (GIT-10% PCS) conteniendo 10% de suero fetal bovino para obtener P3U1 de 2×10^5 por 1 ml, y se sembró en placas de 24 pozos (producidas por Iwaki Co.) a 1 ml por pozo en 168 pozos. Después del semillamiento, las células se incubaron en una incubadora de dióxido de carbono al 5% a una temperatura de 37°C. Después de 24 horas, se agregó GIT— 10% medio FCS (medio HAT) conteniendo HAT (hipoxantina 1×10^{-4} M, aminopterina 4×10^{-7} M y timidina 1.6×10^{-3} M) a 1 ml por pozo para iniciar el cultivo selectivo de HAT. Después de 4 y 7 días, se descartó 1 ml del líquido viejo y se continuó el cultivo selectivo de HAT agregando 1 ml de medio HAT. Una multiplicación del hibridoma se notó 9 días después de la fusión celular y el sobrenadante se recolectó. El valor del anticuerpo en el sobrenadante se determinó con el siguiente método. A saber, se agregó el cultivo del sobrenadante 100 µl y la Toxina M etiqueteada HRP 100 µl, que está diluido a un múltiplo de 200 con solución amortiguadora C, a cada pozo de las microplacas fijando el anticuerpo de inmunoglobulina anti ratón, y se

dejó reaccionar durante la noche a una temperatura de 4°C. Después las placas se lavaron con PBS, para que las placas fijaran el anticuerpo de la inmunoglobulina anti ratón, en primer lugar se agregó 100 µg/ml mediante pipeta, de una solución amortiguadora de carbonato a 0.1M con un pH 9.6 conteniendo el anticuerpo de inmunoglobulina cabra anti ratón (fracción IgG, producido por DAKO Co.) a micro placas de 96 pozos a 100 µl por placa y se dejó reposar durante 24 horas a una temperatura de 4°C. Luego las placas se lavaron con solución salina con solución amortiguadora de fosfato (PBS, pH 7.4), 25% Brock Ace (marca registrada, producido por Yuldjirushi Milk Products Co.) y PBS, pH 7.2 conteniendo 0.1% de NaN₃ se agregaron mediante pipetas a cada 300 µl para bloquear una fijación excesiva del pozo y se trató por lo menos durante 24 horas a una temperatura de 4°C. A cada pozo de las placas anteriores se agregó el anticuerpo de inmunoglobulina de fijación anti ratón, ratón antisuero 100 µl, que se diluyó con solución amortiguadora EC [0.02M solución amortiguadora fosfato, con pH 7.0 conteniendo 0.2% de BSA, 0.4 M de NaCl, 0.4% Brock Ace, 0.05 % de CHAPS (3-[(3-colamidopropilo)dimetilo-ammonio]-l-propanosulfonato), 2mM de EDTA y 0.1% de NaN₃], y se dejaron reaccionar durante 16 horas a una temperatura de 4°C. Luego las placas se lavaron con PBS, pH 7.4, y se agregó 100µl de la proteína con la toxina replegante etiqueteada HRP y se dejó reaccionar durante 7 horas a temperatura ambiente. La anterior proteína de toxina replegante se preparó en el Ejemplo 3 arriba diluyendo a un múltiplo de 100 con una solución amortiguadora C [0.02M de solución amortiguadora de fosfato, pH 7.0, conteniendo 1% de BSA, 0.4 M de NaCl y 2mM de EDTA]. Luego las placas se lavaron con PBS, pH 7.4, se agregaron 100 µl de un sistema de sustitución de peroxidasa de micropozos TMB (KIRKEGAARD & PERRY LAB. Disponible en Funakoshi Yakuhin) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos para determinar la actividad de la enzima en la fase sólida. Luego se detuvo la reacción agregando 100 µl 1M de ácido fosfórico, se determinó la absorbencia a 450 nm con un lector de placas (MTP-120, producido por Corona Co.). De acuerdo con estos

123
M
X
1

métodos, se determinó la actividad de la enzima en la fase sólida. Como los resultados, se seleccionaron 18 pozos donde se encontró el valor del anticuerpo entre 123 pozos, y los hibridomas se congelaron y almacenaron. Los hibridomas de los pozos, No. 4, No. 53, No. 61, No. 76, No. 101 y No. 116 se clonaron por el método de dilución. En la clonación se agregaron timocitos de BALB/C ratón como las células de alimentación a 5×10^6 por pozo. Después de la clonación, se determinó el valor del anticuerpo del sobrenadante por el mismo método. Los clones positivos fueron No. 4, No. 101 y No. 116. Estos clones fueron los hibridomas de producción de anticuerpo de la expresión de la Toxina M.

Ejemplo 5

Determinación de una clase y de una subclase de anticuerpos monoclonales:

Con el método descrito en el Ejemplo 4, se formaron microplacas anti conejo de fijación IgG. A saber, se agregó mediante pipeta 0.1M de solución amortiguadora carbonato conteniendo anti cabra de pH 9.6 a unas microplacas de 96 pozos a 100µl por pozo y se dejaron a una temperatura de 4°C durante 24 horas. Luego las placas se lavaron con una solución salina amortiguada con fosfato (PBS, pH 7.4), 25% Block Ace (marca registrada, producida por Yukijirushi Milk Products Co.) y se agregó mediante pipeta PBS, pH 7.2 conteniendo 0.1% de NaN_3 a cada 300 µl para bloquear las partes excesivas de fijación del pozo y se trató por lo menos durante 24 horas a una temperatura de 4°C. A las microplacas de anticuerpo anti ratón IgG de fijación de anticuerpos se agregó 50 µl de solución amortiguadora EC y 100 µl del subtipo específico de anticuerpo conteniendo un estuche de iso-tipo producido por Bio-Rad Laboratories y se dejó reaccionar durante un día a una temperatura de 4°C. Después las placas se lavaron con PBS, pH 7.4, se agregó el cultivo de sobrenadantes de hibridoma descrito arriba y se dejó reaccionar durante un día a una temperatura de 4°C. Las placas se lavaron con PBS, pH 7.4, y se agregaron 100 µl de la proteína de toxina replegante etiquetada HRP que se preparó en el Ejemplo 3 arriba diluyendo a un múltiplo de 100 con solución amortiguadora C [0.02M solución

144
amortiguadora de fosfato con pH 7.0, conteniendo 1% de BSA, 0.4 M de NaCl 2mM de EDTA], y se dejó reaccionar durante 6 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS, pH 7.4, y la actividad de la enzima en la fase sólida se determinó por el método descrito en el Ejemplo 4. Como los resultados, las subclases del anticuerpo monoclonal producido por estos hibridomas fueron No. 4 (IgG1), No. 101 (IgG2b) y No. 116 (IgG2a).

Ejemplo 6

Un método para producir ascitas fluidas de ratón a partir de hibridomas:

Los hibridomas No. 4, No. 101 y No. 116 fueron ascitas de ratón. Previamente se administró 0.5 ml de aceite mineral en forma parenteral a los ratones. A los ratones (BALB/C, hembras), lo anterior se administró en forma parenteral a $1-3 \times 10^6$ células / ratón y las ascitas conteniendo el anticuerpo se recolectaron después de 6-20 días. El anticuerpo monoclonal se purificó a partir de las ascitas obtenidas con una columna de proteína-A. A saber, alrededor de 25 ml de ascitas se diluyeron con el mismo volumen de solución amortiguadora de fijación (3.5M de NaCl, 1.5M de glicina conteniendo 0.05% de NaN_3 , pH 9.0), la solución se precipitó a una columna de recombinante proteína-A-agalosa (Repligen Co.) previamente equilibrada con una solución amortiguadora de fijación, el anticuerpo específico se levigó con una solución amortiguadora de levigación (solución amortiguadora de ácido cítrico a 0.1M, pH 3.0 conteniendo 0.05% de NaN_3). El líquido de la levigación se sometió a diálisis con PBS, pH 7.4 a una temperatura de 4°C durante 2 días, y se filtró para retirar el bacilli con un filtro de 0.22 μm (producido por by Millipore Co.) o almacenando a una temperatura de -80°C.

Ejemplo 7 Preparación del anticuerpo policlonal Toxina M

Se mezcló 4.1 mg de la proteína citotóxica de la Toxina M de esta invención con un potenciador completo de Freund y la mezcla se inmunizó subcutáneamente a un conejo. Después de una semana, se mezcló la misma cantidad de la Toxina M con un potenciador incompleto de Freund y la

mezcla luego se inmunizó en forma subcutánea en un conejo. Después de la inmunización, se recolectó la sangre del conejo y se centrifugó para retirar los componentes del hematocito y se obtuvo el antisuero.

Ejemplo 8

Análisis de la Toxina M por Inmunotransferencia (Western Blotting):

Se agregó solución amortiguadora SDS-de muestra conteniendo 2-mercaptoetanol al sobrenadante obtenido en el Ejemplo 3, la mezcla se sometió a electroforesia con Peptida-PAGE (TEFCO) y se transfirió en forma eléctrica a una membrana PVDF (Amersham). Cada anticuerpo (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) obtenido en el Ejemplo 4 y en el Ejemplo 6 se empleó como el anticuerpo primario. Se empleó HRP (Peroxidasa de rábano picante) – etiquetado con anticuerpos IgG anti conejo y anti ratón (dilución en múltiplos de 2000; Dako) como el anticuerpo secundario. La coloración se efectuó por medio de un sistema de detección ECL de inmunotransferencia (Amersham). Como los resultados se confirmó que cada anticuerpo primario reconoció la proteína de expresión. (Fig.5).

Ejemplo 9

Se cargó carbono activo (0.2~0.1mm de diámetro), CM celulosa y alginato de calcio, cada uno a 0.5ml, en tres columnas. Después de equilibrarlas con solución amortiguadora Tris 10mM, pH 7.7, se agregaron 0.5ml de Toxina M 400 nM teniendo una actividad replegada a cada columna, y estas columnas se taponaron y se dejaron reposar durante 60 minutos a una temperatura de 25°C. Mientras tanto, se dejó que la solución amortiguadora Tris sola y la solución amortiguadora Tris conteniendo la misma Toxina M reposaran bajo las mismas condiciones. Luego se abrieron todas las columnas y luego se separaron cada 100 μl que caían de las columnas, además se agregaron 0.5 ml de la solución amortiguadora Tils a cada columna y se recolectaron cada 100 μl . Se centrifugó sangre entera de adultos normales 2 – 3 veces a 800 X g durante 10 minutos hasta que el sobrenadante se volvió transparente. Se utilizaron 10 μl de los eritrocitos precipitados agregados a 10 mM de la solución amortiguadora Tris 990 μl como control positivo. Similarmente, los 10 μl de eritrocitos precipitados

146

agregados a 10 mM de una sal de la solución amortiguadora Tris al 0.9% se emplearon como un control negativo. Se recolectaron muestras de las columnas anteriores. Se agregaron eritrocitos de 1 volumen por 100 volúmenes de la muestra a las muestras. Los controles y las muestras se compararon con la concentración relativa de hemoglobina levigada con un lector múltiple de placas (Biorad) mediante la medición como una absorbencia de 415 nm. (Fig. 6).

Ejemplo 10

Se determinaron las proporciones a las cuales las células HeLa (células humanas con cáncer de cervix uterino) estuvieron expuestas a las fracciones de cada columna del Ejemplo 9 y se determinó la viabilidad por un método WST usando una sal de tetrazolio. Las células HeLa se cultivaron en placas de 96 pozos durante 24 horas a una proporción de 10000 células por pozo. Únicamente se agregó respectivamente un líquido de cultivo de control negativo, cada muestra de líquido y un control positivo de 20 nM de la proteína toxina a cada pozo y estos se cultivaron durante 12 horas a una temperatura de 37°C. Empleando un Estuche de Conteo de Células (DOJIN LABORATORIES Ltd. Co.), se midieron las proporciones de la viabilidad de las células detectadas por un método WST como una absorbencia de una longitud de onda de 415nm. (Fig. 7, Fig. 8).

Aplicabilidad Industrial

La proteína y la peptida parcial de esta invención y similares se pueden usar por ejemplo como agentes para el tratamiento del cáncer. El anticuerpo de esta invención se puede utilizar para identificar la proteína de esta invención en la sangre, los tejidos, la orina y los excrementos recolectados de pacientes de ensayos y para confirmar la infección con *Helicobacter pylori*. Además se utiliza para la cuantificación de la proteína de esta invención. La proteína de esta invención se puede emplear como un agente de cribado de los compuestos que aumentan o inhiben las actividades de la proteína de esta invención.

147

Listado de secuencias

<110> Hiroyuki OHNO

<120> Proteína citotóxica

<130> 20021205O

<160> 4

<210> 1

<211> 357

<212> PRT

<213> *Helicobacter pylori*

<400> 1

Met Lys Gly Leu Glu Arg Glu Ser His Phe Thr Leu Asp Glu Asn Ala

1 5 10 15

Met Phe Phe Glu Cys Ala Tyr Ser Cys Asp Asn Ala Leu Phe Leu Gln

20 25 30

Leu Glu Asp Arg Ser Phe Phe Ile Thr Asp Ser Arg Tyr Thr Gln Glu

35 40 45

Ala Lys Glu Ser Ile Gln Pro Lys Asn Gly Val Leu Ala Glu Val Ile

50 55 60

Glu Ser Ser Asp Leu Val Gln Ser Thr Ile Asp Leu Ile Ala Lys His

65 70 75 80

Ser Val Lys Lys Leu Phe Phe Asp Pro Asn Gln Val Asn Leu Gln Thr

85 90 95

Tyr Lys Arg Leu Asp Ser Ala Ile Gly Asn Lys Val Ile Leu Glu Gly

100 105 110

Val Pro Ser Tyr His Arg Gln Lys Arg Ile Ile Lys Asn Asn His Glu

115 120 125

Ile Gln Leu Leu Lys Lys Ser Gln Ala Leu Asn Val Glu Ala Phe Glu

130 135 140

Asn Phe Ala Glu Tyr Val Lys Lys Ile Phe Asp Glu Lys Glu Ser Leu

145 150 155 160

Ser Glu Arg Tyr Leu Gln His Lys Val Lys Asp Phe Leu Thr Lys Glu

148


165	170	175	
Gly Val Tyr Asp Leu Ser Phe Glu Pro Ile Leu Ala Leu Asn Ala Asn			
180	185	190	
Ala Ser Lys Pro His Ala Leu Pro Ser Ala Lys Asp Phe Leu Lys Ala			
195	200	205	
Glu His Ser Ile Leu Leu Asp Met Gly Ile Lys Tyr Glu Arg Tyr Cys			
210	215	220	
Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ala Phe Phe Asp Pro Lys Asp Phe Val Phe			
225	230	235	240
Lys Arg Glu Gln Ser Phe Lys Asp Lys Glu Ser Gln Lys Ile Tyr Asp			
245	250	255	
Ile Val Lys Glu Ala Gln Glu Lys Ala Ile Ser Gly Ile Arg Ala Gly			
260	265	270	
Met Thr Gly Lys Glu Ala Asp Ser Leu Ala Arg Gly Val Ile Ser Asp			
275	280	285	
Tyr Gly Tyr Gly Gln Tyr Phe Thr His Ser Thr Gly His Gly Ile Gly			
290	295	300	
Leu Asp Ile His Glu Leu Pro Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Glu Thr Ile Leu			
305	310	315	320
Glu Glu Gly Met Val Phe Ser Val Glu Pro Gly Ile Tyr Ile Pro Gly			
325	330	335	
Phe Phe Gly Val Arg Ile Glu Asp Leu Val Val Ile Lys Asn Ser Arg			
340	345	350	
Ala Glu Leu Leu			

355

<210> 2

<211> 1071

<212> DNA

<213> *Helicobacter pylori*

<400> 2

atgaaaggat tagaaagaga atcgcatc acgcttgatg aaaacgcgat gtttttgag	60
tgtgcttata gttgcgataa tgctttgttt ttgcaattag aggatcgctc gttttttatc	120

149 199

actgattctc gctacactca agaagctaaa gaaagcattc agcctaaaaa tggcgtttta 180
 gcggaagtga tagaatccag cgatttagtc caaagcacga ttgatttgat cgcaaaacac 240
 tcggttaaaa agctcttttt tgatcccaat caagtgaatt tgcaaacctt caagcgtttg 300
 gattcggcga ttgggaataa ggttatttta gagggcgtgc ctagttacca ccgccaaaaa 360
 cgcatcatta aaaacaatca tgagatccaa ctctcaaaa aatctcaagc gttgaatgtt 420
 gaagcttttg aaaattttgc cgagtatgtg aaaaagattt ttgatgaaaa agagtccttg 480
 agcgagcggg atttgcagca taaggtaag gactttttga ctaaagaggg ggtttatgat 540
 ctgagctttg agcctatttt agccttgaat gcgaacgcga gcaaacccca tgctttgcct 600
 agtgcgaagg attttttaa agcggagcat agcattcttt tggatatggg gatcaaatac 660
 gaacgctatt gctcggatag gactcgcacg gcttttttg accctaaaga tttgtcttc 720
 aaaagagagc agagtttcaa ggataaagag agtcaaaaga tttatgacat tgtgaaagaa 780
 gcgcaagaaa aggctatttc aggtattaga gcgggcatga ccggtaaaga agcggacagc 840
 ttggctaggg gagtgattag cgattatggt tatgggcaat atttactca cagcactgga 900
 catggcattg gcttagacat tcatgagctt ccttatattt catcgcgcag tgaaaccatt 960
 ttagaagagg gcatggtgtt ttctgtagag cctgggattt atatccctgg atttttggg 1020
 gtgcgcattg aagatttagt ggtgatcaaa aattctaggg ctgagctttt g 1071

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Helicobacter pylori

<400> 3

gacgacgaca agatgaaagg attagaaaga ga 32

<210> 4

<211> 37

<212> DNA

<213> Helicobacter pylori

<400> 4

gaggagaagc ccggttacia aagctcagcc ctagaat 37

REIVINDICACIONES

150 
✓ 1. Una proteína citotóxica comprendiendo una proteína teniendo por lo menos una identidad del 70 % o mayor de la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID No. 1.

✓ 2. Una peptida parcial de la proteína citotóxica descrita en la reivindicación 1, caracterizada en que la proteína tiene la misma actividad citotóxica que la de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID No. 1.

✓ 3. La proteína citotóxica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 donde la proteína se produce con *Helicobacter pylori*.

✓ 4. La proteína citotoxina de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 donde la proteína se obtiene cultivando un transformante que se transforma con un vector de combinación conteniendo el ADN de SEC ID No. 2 codificando la proteína citotoxina de la reivindicación 1 o 2.

✓ 5. La proteína citotoxina de la reivindicación 4 donde el transformante se deposita bajo declaración No. FERM BP-8218 en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (IPOD).

6. Un agente antineoplásico que contiene la proteína citotóxica de la reivindicación 1 o 2.

✓ 7. Un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína citotóxica que se obtiene por la inmunización de la proteína citotóxica de la reivindicación 1 o 2 contra un mamífero. *¿mamífero de ratón?*

✓ 8. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7 que se produce con un clon de hibridoma de la declaración No. FERM BP-8222.

✓ 9. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7 que se produce con un clon de hibridoma de la declaración No. FERM BP-8223.

✓ 10. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7 que se produce con un clon de hibridoma de la declaración No. FERM BP-8224.

✓ 11. Un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína citotóxica que se obtiene por medio de la inmunización de la proteína citotóxica de la reivindicación 1 o 2 contra un mamífero. 

151
12. Un método para detectar y diagnosticar la proteína citotóxica de la reivindicación 1 o 2 donde se utiliza el anticuerpo monoclonal o policlonal que está descrito en cualquiera de las reivindicaciones 7-11.

13. Un agente para prevenir y tratar el cáncer gástrico, la gastritis, la úlcera gástrica desencadenados por la proteína citotóxica de la reivindicación 1 o 2, donde se emplea el anticuerpo monoclonal o el anticuerpo policlonal descrito en cualquiera de las reivindicaciones 7-11.

14. Un método de cribado de un compuesto que promueve o inhibe la actividad de la proteína de la reivindicación 1 o 2, donde la actividad de inhibición de la multiplicación de células, la actividad citotóxica o la muerte celular se juzga al compararse por medio de grupos de control negativos o positivos con una célula de animal de sangre caliente.

15. Un estuche para cribar un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad de la proteína de la reivindicación 1 o 2, que comprende la proteína de la reivindicación 1 o 2.

16. Un compuesto o su sal que promueve o inhibe la actividad de la proteína de la reivindicación 1 o 2, donde el compuesto se obtiene mediante el método de cribado de la reivindicación 14 o con el estuche de cribado de la reivindicación 15.

17. Un medicamento conteniendo un compuesto o su sal, donde el compuesto tiene una actividad que inhibe la actividad citotóxica de las células de animales de sangre caliente con la proteína de la reivindicación 1 o 2.

18. Un medicamento de la reivindicación 17, que es un agente para prevenir o tratar la gastritis, la úlcera gástrica, el cáncer gástrico y una enfermedad que demuestre que fue causada por la Toxina M mediante el método de cribado de la reivindicación 14 o por medio del estuche de cribado de la reivindicación 15.

Reservado

EXTRACTO

Esta invención se relaciona con una nueva proteína citotóxica (Toxina M, toxina destructora de la mucosa) producida por *Helicobacter pylori* y el uso.

Esta invención dispone una proteína citotóxica (Toxina M) producida por *Helicobacter pylori*, una peptida parcial y un agente antineoplásico que contienen la proteína citotóxica. La proteína se obtiene por medio del cultivo de un transformante que se transforma con un vector recombinante conteniendo ADN que codifica la proteína citotoxina. Esta invención dispone además el uso de la proteína.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT-OHNO		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP02/12752	International filing date (day/month/year) 05. 12. 02	Priority Date (day/month/year) 05. 12. 01	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC			
Applicant OHNO, Hiroyuki			
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examination Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.			
3. This report contains indications relating to the following items: I. ☒ Basis of the opinion II. ☐ Priority III. ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV. ☐ Lack of unity of invention V. ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI. ☐ Certain documents cited VII. ☐ Certain defects in the international application VIII. ☒ Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 25. 06. 03		Date of completion of this report 20. 11. 03	
Name and mailing address of the IPEA/ JP		Authorized officer	
		Telephone No. 03-3581-1101	

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

☒ the international application as originally filed☐ the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____.

☐ the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement) under Article 19

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____.

☐ the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____.

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____.

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in printed form.☒ filed together with the international application in computer readable form.☐ furnished subsequently to this Authority in written form.☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:☐ the description, pages _____.☐ the claims, Nos. _____.☐ the drawings, sheets/fig. _____.5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP02/12752

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement	Novelty (N)	Claims	2, 4-11, 13-15	YES
		Claims	1, 3, 16-18	NO
	Inventive step (IS)	Claims	6, 13-15	YES
		Claims	1-5, 7-11, 16-18	NO
	Industrial applicability (IA)	Claims	1-11, 13-18	YES
		Claims		NO

Citations and explanations (Rule 70.7)

文献1: Database PIR Accession No.A71938, September 20, 1999, Nature, 1999, Vol.397, No.6715, p.176-80
 文献2: Nature, 1997, Vol.388, No.6642, p.539-47
 文献3: WO 01/70955 A2(ELITRA PHARMACEUTICALS, INC.), 2001.09.27
 文献4: WO 97/37044 A1(ASTRA AKTIEBOLAG), 1997.10.09
 文献5: Lancet, 1992, Vol.339, No.8794, p.629-31.
 文献6: JP 2000-063280 A(武田薬品工業株式会社), 2000.02.29
 文献7: WO 99/18938 A1(PERIO PRODUCTS LTD.), 2001.10.23

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

157 158
International application No.

PCT/JP02/12752

VIII. Certain observation on the international application

(1) Claim 16

Claim 16 relates to a compound which is defined by a desired property of "promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2" or its salt. Although claim 16 involves any compounds having this property, only part of the claimed compounds are disclosed in the description in the meaning as defined in PCT Article 5. It is recognized that claim 16 is not supported by the description in the meaning as defined in PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of "the compound promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 or its salt" cannot be specified. Thus, claim 16 also fails to fulfill the requirement of clearness in the meaning as defined in PCT Article 6.

Such being the case, this search was made on the compounds specifically stated as promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 (namely, showing an anti-M toxin effect) or salts thereof.

(2) Claims 17 and 18

Claim 17 relates to a drug containing a compound which is defined by a desired property of "inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells" or its salt. Although claim 17 involves any compounds having this property, only part of the claimed compounds are disclosed in the description in the meaning as defined in PCT Article 5. It is recognized that claim 17 is not supported by the description in the meaning as defined in PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of "inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells" cannot be specified. Thus, claim 17 also fails to fulfill the requirement of clearness in the meaning as defined in PCT Article 6.

Such being the case, this search was made on drugs containing the compounds specifically stated as inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells (namely, showing an anti-M toxin effect) or salts thereof.

The same applies to claim 18 depending on claim 17.

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL (Artículo 36 y Regla 70 PCT)

No. de Expediente del Solicitante o Apoderado PCT-OHNO	PROCEDIMIENTO POSTERIOR véase comunicación sobre el envío del informe de examen preliminar internacional (Formulario PCT/IPEA/416)	
No. Solicitud Internacional PCT/JP02/12752	Fecha Internacional de Presentación (día/mes/año) 05.12.02	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 05.12.01
Clasificación Internacional de Patente (IPC) o Clasificación Nacional e IPC		
Solicitante OHNO, Hiroyuki		

1. Este informe de examen preliminar internacional fue elaborado por esta Oficina Encargada del Examen Preliminar Internacional y se envía al solicitante según Artículo 36.

2. Este INFORME comprende un total de 5 hojas, inclusive esta portada

☒ Además se adjuntan ANEXOS al informe; en este caso se trata de hojas con descripciones, reivindicaciones y/o dibujos, que se modificaron y que sirven de base para este informe, y/o hojas con correcciones efectuadas por esta oficina (véase Regla 70.16 y Sección 607 de las instrucciones administrativas bajo el PCT).

Estos anexos comprenden un total de ____ hojas.

3. Este informe contiene datos con respecto a los siguientes puntos:

- I ☒ Base del Informe
- II ☐ Prioridad
- III ☒ Sin elaboración de un dictamen sobre novedad, actividad inventiva y posibilidad de aplicación industrial
- IV ☐ Falta de unidad de la invención
- V ☒ Comprobación justificada según Artículo 35(2) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la posibilidad de aplicación industrial; documentos y explicaciones sustentando esta comprobación
- VI ☐ Ciertos documentos enumerados
- VII ☐ Ciertas deficiencias del registro internacional
- VIII ☒ Ciertas observaciones relacionadas con la solicitud internacional

Fecha de presentación de la petición 25.06.03	Fecha de la conclusión de este informe 20.11.03
Nombre y dirección postal de la IPEA JP	Empleado Autorizado Teléfono No. 03-3581-1101



INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No. PCT/JP02/12752

159
159

I. Bases del Informe

1. Con respecto a los **elementos** de la solicitud internacional

- ☒ la solicitud internacional como se presentó inicialmente
- ☐ la descripción:
páginas _____ como se presentaron inicialmente
páginas _____ presentadas con la petición
páginas _____ presentadas con la carta de _____
- ☐ las reivindicaciones:
páginas _____ como se presentaron inicialmente
páginas _____ como se modificaron (junto con cualquier declaración) bajo el Artículo 19
páginas _____ como se presentaron con la petición
páginas _____ presentadas con la carta de _____
- ☐ los dibujos:
páginas _____ como se presentaron inicialmente
páginas _____ presentadas con la petición
páginas _____ presentadas con la carta de _____
- ☐ la secuencia de la lista de la descripción:
páginas _____ como se presentaron inicialmente
páginas _____ presentadas con la petición
páginas _____ presentadas con la carta de _____

2. En lo concerniente al **idioma**, todos los elementos indicados más arriba estuvieron a disposición de esta Administración o le fueron enviados en el idioma en el cual se radicó la solicitud internacional, salvo indicación en contrario consignada bajo este punto.

Estos elementos estuvieron a disposición de esta Administración o le fueron enviados en el idioma siguiente: _____, que es:

- ☐ el idioma de una traducción enviada para efectos de la búsqueda internacional (según la regla 23.1 (b)).
- ☐ el idioma de publicación de la solicitud internacional (según la regla 48.3 (b)).
- ☐ el idioma de la traducción enviada para efectos del examen preliminar internacional (según la regla 55.2 y/o 55.3).

3. En lo que concierne a cualquier **secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos** divulgada en la solicitud internacional, el examen preliminar internacional se llevó a cabo sobre la base del listado de secuencias:

- ☐ contenido en la solicitud internacional, por escrito.
- ☒ presentado con la solicitud internacional, en formato de lectura por computador.
- ☐ remitido posteriormente a la administración, por escrito.
- ☐ remitido posteriormente a la administración, en formato de lectura por computador.
- ☐ se ha rendido la declaración, según la cual el listado de secuencias por escrito y suministrado posteriormente no va más allá de la divulgación hecha en la solicitud tal como se radicó.
- ☒ se ha rendido la declaración, según la cual las informaciones registradas en formato de lectura por computador son idénticas a las de los listados de secuencias, presentados por escrito.

4. Las modificaciones han acarreado la anulación:

- ☐ de la descripción, páginas:
- ☐ de las reivindicaciones, Nos.:
- ☐ de los dibujos, hojas:

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No. PCT/JP02/12752

160

5. ☐ El presente informe se preparó sin tener en cuenta (algunas de) las modificaciones, que se consideraron que van más allá de la exposición de la invención, como se indica en el Cuadro Adicional (regla 70.2 (c)).**

** Toda hoja intercambiable suministrada a la Oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el Artículo 14 se conoce en este informe como "presentada inicialmente" y no se anexan a este informe puesto que no contienen ninguna modificación (Reglas 70.16 y 70.17).*

**(Toda hoja intercambiable que incluya modificaciones de esta índole debe indicarse en el punto 1 y anexarse al presente informe.)*

III. Sin elaboración de un dictamen sobre novedad, actividad inventiva y posibilidad de aplicación industrial.

☐ Reivindicación 12.

V. Declaración motivada bajo Artículo 35(2) en cuanto a la novedad, la actividad inventiva y la posibilidad de aplicación industrial; citas y explicaciones sustentando esta declaración

1. DECLARACIÓN

Novedad (N)	Reivindicaciones 2, 4-11, 13-15	SI
	Reivindicaciones 1, 3, 16-18	NO

Actividad Inventiva (IS)	Reivindicaciones 6, 13-15	SI
	Reivindicaciones 1-5, 7-11, 16-18	NO

Posibilidad de Aplicación Industrial (IA)	1-11, 13-18	SI
		NO

Citas y explicaciones (Regla 70.7)

Acceso Base de Datos PIR No. A71938 Septiembre 29, 1999, Nature, 1999, Vol. 397, No. 6715, p. 176-80
Nature, 1977, Vol. 1388, No. 6642, p. 539-47
WO 01/70955 A2 (ELITRA PHARMACEUTICALS, INC.), 2001.09.27
WO 97/37044 A1 (ASTRA AKTIEBOLAG), 1997.10.09
Lancet, 1992, Vol. 339, No. 8794, p. 629-31
JP 2000-063280 A, 2000.02.29
WO 99/18938 A1 (PERIO PRODUCTS LTD), 2001.10.23

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No. PCT/JP02/12752

161
[Handwritten signature]

VIII. Ciertas observaciones sobre la aplicación internacional

(1) Reivindicación 16

La Reivindicación 16 hace referencia a un compuesto que se define por medio de una propiedad deseada de "promover o inhibir la actividad de una proteína como se establece en la reivindicación 1 o 2" o su sal. Aunque la reivindicación 16 comprende cualquier compuesto que tenga esta propiedad, únicamente una parte de los compuestos reivindicados se revela en la descripción en el significado como se define en el Artículo V del PCT. Se reconoce que la reivindicación 16 no está soportada por la descripción en el significado como se define en el Artículo 6 del PCT.

Aunque se tiene en cuenta el conocimiento técnico ordinario en el punto de la aplicación, no se puede especificar el ámbito del "compuesto promoviendo o inhibiendo la actividad de una proteína como se establece en la Reivindicación 1 o 2 o su sal". Por lo tanto, la Reivindicación 16 tampoco cumple con el requisito de claridad en el significado como se define en el Artículo 6 del PCT.

Dado el caso, esta búsqueda se efectuó sobre los compuestos sobre los cuales específicamente se afirma que promueven o inhiben la actividad de una proteína como se establece en la Reivindicación 1 o 2 (es decir, que muestran un efecto anti-toxina M) o sales de los mismos.

(2) Reivindicaciones 17 y 18

La Reivindicación 17 hace referencia a un fármaco conteniendo un compuesto que se define por medio de una propiedad deseada de "inhibir la actividad citotóxica de una proteína como se establece en la Reivindicación 1 o 2 en las células de un animal de sangre caliente" o su sal. Aunque la Reivindicación 17 comprende cualquier compuesto que tenga esta propiedad, únicamente una parte de los compuestos reivindicados se revela en la descripción en el significado como se define en el Artículo V del PCT. Se reconoce que la reivindicación 17 no está soportada por la descripción en el significado como se define en el Artículo 6 del PCT.

Aunque se tiene en cuenta el conocimiento técnico ordinario en el punto de la aplicación, no se puede especificar el ámbito de "inhibir la actividad citotóxica de una proteína como se establece en la Reivindicación 1 o 2 en células de animales de sangre caliente". Por lo tanto, la Reivindicación 17 tampoco cumple con el requisito de claridad en el significado como se define en el Artículo 6 del PCT.

Dado el caso, esta búsqueda se efectuó sobre los compuestos sobre los cuales específicamente se afirma que inhiben la actividad citotóxica de una proteína como se establece en la Reivindicación 1 o 2 en células de animales de sangre caliente (es decir, que muestran un efecto anti-toxina M) o sales de los mismos.

Lo mismo aplica para la reivindicación 18 que depende de la reivindicación 17.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/195, 16/12, C12N15/31, C12Q1/02, A61K39/395, 38/00,
45/00, A61P1/00, 1/04, 35/00, 43/00, G01N33/15,
33/50//C12P21/08

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)

Int.Cl⁷ C07K14/195, 16/12, C12N15/31, C12Q1/02, A61K39/395, 38/00,
45/00, A61P1/00, 1/04, 35/00, 43/00, G01N33/15,
33/50//C12P21/08

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)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Database PIR Accession No.A71938, 20 September, 1999 (20.09.99), Alm RA. et al., probable proline peptidase - Helicobacter pylori (strain J99), Nature, 1999, Vol.397, No.6715, p.176-80.	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18
X/A	Tomb JF. et al., The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature, 1997, Vol.1388, No.6642, p.539-47.	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18
X/A	WO 01/70955 A2 (ELITRA PHARMACEUTICALS, INC.), 27 September, 2001 (27.09.01), Full text & US 2002/0061569 A1 & EP 1268774 A2	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 10 March, 2003 (10.03.03)	Date of mailing of the international search report 25 March, 2003 (25.03.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 97/37044 A1 (ASTRA AB.), 09 October, 1997 (09.10.97), Full text & EP 901530 A1 & JP 2000-501621 A	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18
X/A	HAGIWARA A. et al., Prophylaxis with carbon- adsorbed mitomycin against peritoneal recurrence of gastric cancer. Lancet, 1992, Vol.339, No.8794, p.629-31.	16-18/1-11, 13-15
X/A	JP 2000-063280 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 29 February, 2000 (29.02.00), Full text & CN 1243004 A & KR 2000006124 A	16-18/1-11, 13-15
X/A	WO 99/18938 A1 (PERIO PRODUCTS LTD.), 22 April, 1999 (22.04.99), Full text & EP 1021171 A & JP 2001-519379 A	16-18/ 1-11, 13-15
A	BOTTOMLEY J. et al., Cloning, sequencing, expression, purification and preliminary characterization of a type II dehydroquinase from Helicobacter pylori. Biochem. J., 1996, Vol.319(Pt 2), p.559-65	1-11, 13-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

163

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: 12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 12 pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body, and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

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

3. ☐ Claims Nos.:

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

<Subject of Search>

(1) Claim 16

Claim 16 relates to a compound which is defined by a desired property of "promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2" or its salt. Although claim 16 involves any compounds having this property, only part of the claimed compounds are disclosed in the description in the meaning as defined in PCT Article 5. It is recognized that claim 16 is not supported by the description in the meaning as defined in PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of "the compound promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 or its salt" cannot be specified. Thus, claim 16 also fails to fulfill the requirement of clearness in the meaning as defined in PCT Article 6.

Such being the case, this search was made on the compounds specifically stated as promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 (namely, showing an anti-M toxin effect) or salts thereof.

(2) Claims 17 and 18

Claim 17 relates to a drug containing a compound which is defined by a desired property of "inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells" or its salt. Although claim 17 involves any compounds having this property, only part of the claimed compounds are disclosed in the description in the meaning as defined in PCT Article 5. It is recognized that claim 17 is not supported by the description in the meaning as defined in PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of "inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells" cannot be specified. Thus, claim 17 also fails to fulfill the requirement of clearness in the meaning as defined in PCT Article 6.

Such being the case, this search was made on drugs containing the compounds specifically stated as inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells (namely, showing an anti-M toxin effect) or salts thereof.

The same applies to claim 18 depending on claim 17.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/195, 16/12, C12N15/31, C12Q1/02, A61K39/395, 38/00, 45/00, A61P1/00, 1/04, 35/00, 43/00, G01N33/15, 33/50//C12P21/08

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)

Int.Cl⁷ C07K14/195, 16/12, C12N15/31, C12Q1/02, A61K39/395, 38/00, 45/00, A61P1/00, 1/04, 35/00, 43/00, G01N33/15, 33/50//C12P21/08

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)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Database PIR Accession No.A71938, 20 September, 1999 (20.09.99), Alm RA. et al., probable proline peptidase - Helicobacter pylori (strain J99), Nature, 1999, Vol.397, No.6715, p.176-80.	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18
X/A	Tomb JF. et al., The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature, 1997, Vol.1388, No.6642, p.539-47.	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18
X/A	WO 01/70955 A2 (ELITRA PHARMACEUTICALS, INC.), 27 September, 2001 (27.09.01), Full text & US 2002/0061569 A1 & EP 1268774 A2	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 March, 2003 (10.03.03)

Date of mailing of the international search report
25 March, 2003 (25.03.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 97/37044 A1 (ASTRA AB.), 09 October, 1997 (09.10.97), Full text & EP 901530 A1 & JP 2000-501621 A	1-5, 7-11/6, 13-15, 16-18
X/A	HAGIWARA A. et al., Prophylaxis with carbon- adsorbed mitomycin against peritoneal recurrence of gastric cancer. Lancet, 1992, Vol.339, No.8794, p.629-31.	16-18/1-11, 13-15
X/A	JP 2000-063280 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 29 February, 2000 (29.02.00), Full text & CN 1243004 A & KR 2000006124 A	16-18/1-11, 13-15
X/A	WO 99/18938 A1 (PERIO PRODUCTS LTD.), 22 April, 1999 (22.04.99), Full text & EP 1021171 A & JP 2001-519379 A	16-18/ 1-11, 13-15
A	BOTTOMLEY J. et al., Cloning, sequencing, expression, purification and preliminary characterization of a type II dehydroquinase from Helicobacter pylori. Biochem. J., 1996, Vol.319(Pt 2), p.559-65	1-11, 13-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

165

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: 12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 12 pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body, and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

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

3. ☐ Claims Nos.:

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12752

<Subject of Search>

(1) Claim 16

Claim 16 relates to a compound which is defined by a desired property of "promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2" or its salt. Although claim 16 involves any compounds having this property, only part of the claimed compounds are disclosed in the description in the meaning as defined in PCT Article 5. It is recognized that claim 16 is not supported by the description in the meaning as defined in PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of "the compound promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 or its salt" cannot be specified. Thus, claim 16 also fails to fulfill the requirement of clearness in the meaning as defined in PCT Article 6.

Such being the case, this search was made on the compounds specifically stated as promoting or inhibiting the activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 (namely, showing an anti-M toxin effect) or salts thereof.

(2) Claims 17 and 18

Claim 17 relates to a drug containing a compound which is defined by a desired property of "inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells" or its salt. Although claim 17 involves any compounds having this property, only part of the claimed compounds are disclosed in the description in the meaning as defined in PCT Article 5. It is recognized that claim 17 is not supported by the description in the meaning as defined in PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of "inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells" cannot be specified. Thus, claim 17 also fails to fulfill the requirement of clearness in the meaning as defined in PCT Article 6.

Such being the case, this search was made on drugs containing the compounds specifically stated as inhibiting the cytotoxic activity of a protein as set forth in claim 1 or 2 on warm-blooded animal cells (namely, showing an anti-M toxin effect) or salts thereof.

The same applies to claim 18 depending on claim 17.

166

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros)
domiciliado(s) en

I (We) Hiroyuki OHNO
domiciled in 1-12-10-204, Fukuei, Ichikawa-shi,
Chiba 272-0137 Japan

Nombro(amos) a: RAMIRO CASTRO DUQUE y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñanzas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

Hereby appoint RAMIRO CASTRO DUQUE and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; penal demands, actions of indemnities for damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures; and in other actions or similar proceedings.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las demás facultades legales necesarias.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: RAMIRO CASTRO DUQUE y/o HECTOR GOMEZ MEJIA domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint RAMIRO CASTRO DUQUE and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Otorgado y firmado en

Granted and signed in Chiba Japan

hoy de de 200_

this 14 day of May 2004

Firma

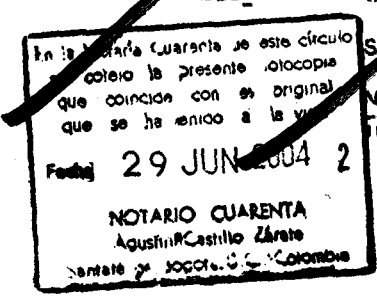
Signature Hiroyuki OHNO

Nombre

Name Hiroyuki OHNO

Cargo

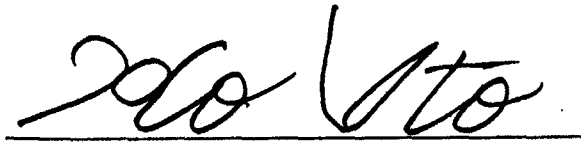
Title



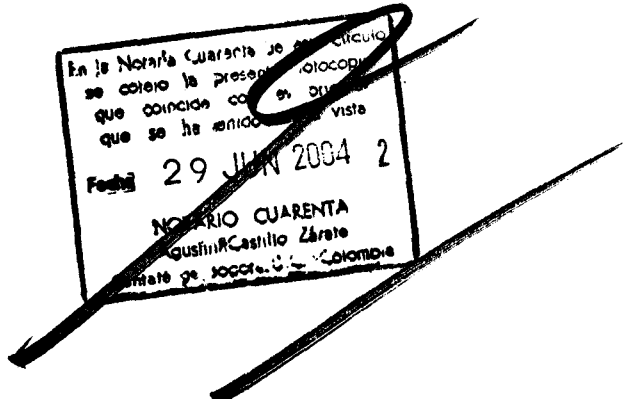
0575

167

Dated this 20th day of May, 2004.



1-1-1 Shimbashi,Minato-ku,Tokyo, Japan
Tokyo Legal Affairs Bureau.



認 証

添付書面の作成者である 大野博之 の代理人 舟橋和利 は本職に対し、
前記 大野博之 がその署名を自認している旨、陳述した。

よって、これを認証する。

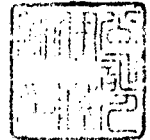
平成16年 5 月 20 日、本公証人役場において
東京都港区新橋 1丁目 1番 1号・

東京法務局所属

公 証 人
Notary

伊藤 剛

KO ITO

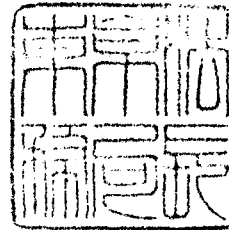


証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、
真実のものであることを証明する。

平成16年 5 月 20 日

東京法務局長 石井政治



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN

This public document

2. has been signed by KO ITO

3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of

Certified

6. 5/20/2004

5. at Tokyo

7. by the Ministry of Foreign Affairs

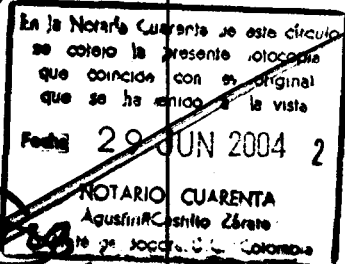
8. 04- № 024701

9. Seal/stamp:

10. Signature



Shinichi HAGIWARA
For the Minister for Foreign Affairs



169
70

TRADUCCIÓN OFICIAL NO.398/2004.-

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES, Y LLEVA EL SELLO Y LA FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGÚN RESOLUCIÓN No. 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972.

TRADUCCIÓN DE LOS SELLOS QUE APARECEN EN EL PODER OTORGADO
POR **HIROYUKI OHNO**, DOMILICILIADO EN 1-12-10-204 FUKUEI,
ICHIKAWA-SHI, CHIBA 272-0137, JAPON, A LOS DOCTORES RAMIRO
CASTRO DUQUE Y/O HECTOR GOMEZ MEJIA.

OTORGADO Y FIRMADO EN CHIBA, JAPON, EL 14 DE MAYO DE 2004.

FIRMADO: HIROYUKI OHNO.

REGISTRO NO. 0575

CERTIFICADO NOTARIAL

POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE KAZUTOSHI FUNAHASHI, un AGENTE
DE HIROYUKI OHNO, declaró en mi presencia que el mencionado
HIROYUKI OHNO reconoció haber firmado el documento adjunto.

FECHADO A LOS 20 DIAS DEL MES DE MAYO DE 2004.

FIRMADO: KO ITO, NOTARIO

1-1-1 SHIMBASHI, MINATO-KU, TOKIO, JAPÓN

OFICINA DE ASUNTOS LEGALES DE TOKIO

HAY SELLO EN RELIEVE DEL NOTARIO.



APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAÍS: JAPÓN

EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO:

2. HA SIDO FIRMADO POR: KO ITO

3. ACTUANDO EN SU CALIDAD DE: NOTARIO DE LA OFICINA DE
ASUNTOS LEGALES DE TOKIO

4. LLEVA EL SELLO DE:

CERTIFICADO

5. EN TOKIO

6. EL DÍA 20 DE MAYO DE 2004

7. POR EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

8. 04- NO. 024701

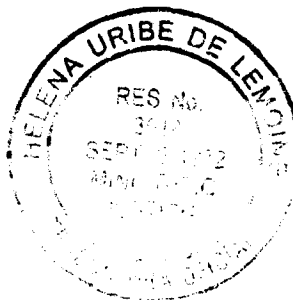
9. SELLO: HAY SELLO DEL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DE JAPÓN

10. FIRMADO POR: SHINICHI HAGIWARA, POR EL MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES.

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



50-7-17

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 84862951 00000000

Folios: 178

Fecha (AMD): 2004-07-01 16:31:13

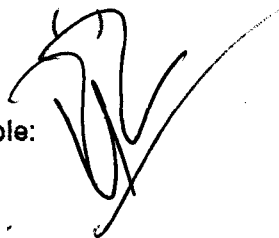
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓	()	() ✓
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	() ✓
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	() ✓
- Descripción de la invención.	()	() ✓
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	() ✓
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	() ✓
COMPLETA () ✓	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:



Fecha:

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
RAMIRO CASTRO DUQUE
Apoderado
HIROYUKI OHNO

Oficio N° 00392

ASUNTO:

Radicación N°	04-62951
Solicitud internacional	PCT/JP02/12752
Fecha inicio fase nacional	05/07/2004
Trámite	011
Evento	379
Actuación	416
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).
- El solicitante debe presentar un nuevo título, que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente (Regla 4.3 PCT, Art. 27, 27 Decisión 486, Circular Única 5.2.9).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,

202044

06 AGO. 2004