

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成30年2月15日 (2018.2.15)

【公表番号】特表2014-518063(P2014-518063A)

【公表日】平成26年7月28日 (2014.7.28)

【年通号数】公開・登録公報2014-040

【出願番号】特願2014-513625(P2014-513625)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 0 7 K 1/16 (2006.01)

A 6 1 K 38/43 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 1 2 N 9/24 (2006.01)

C 0 7 K 1/14 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 19/00 Z N A

C 1 2 P 21/02 A

C 1 2 P 21/02 C

C 0 7 K 1/16

A 6 1 K 37/48

A 6 1 P 43/00 1 1 1

C 1 2 N 9/24

C 0 7 K 1/14

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 5/00 1 0 1

【誤訳訂正書】

【提出日】平成29年12月28日 (2017.12.28)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 5 4

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【 0 0 5 4 】

[0063]別の反応において、短い伸長リンカー領域を（N - 末端に）含有する [ d e l ( 1 - 4 ) 、 A r g 6 、 L e u 2 7 、 A r g 6 5 ] I G F - 2 等の変異型 I G F 2 ペプチドを、ヘテロ二官能性架橋剤 P E G 4 - ペンタフルオロベンゼン - 4 - ホルミル安息香酸 ( P E G 4 - P F B ) を使用して、pH 約 7 . 5 で、2 - 3 時間室温で、化学的に修飾する。この反応において、P E G 4 - P F B は、短い伸長リンカー領域からの第 1 アミノ酸のグリシンの - アミノ基を修飾して、アミノ末端に新規な反応性のアルデヒド化学基を導入する。変異型 I G F - 2 ペプチドの化学的修飾は、C 4 逆相クロマトグラフィーによってモニターして、化学的修飾の進行及び完全性を、図 5 に示すように評価することができ

る。次いで PEG4 - ベンズアルデヒド修飾 IGF - 2 ペプチドを、ゲル濾過クロマトグラフィー又は透析によって精製して、結合のための適当な緩衝液（例えば、50 mM NaOAc、pH 4.8 / 100 mM NaCl / 0.05 % ポリソルベート - 80）中の過剰の架橋剤及び化学的副産物を除去する。次いで最後の反応を行い、S - Hynic 修飾 rhGAA を、50 mM NaOAc、pH 4.8 / 100 mM NaCl / 0.05 % ポリソルベート - 80 緩衝液中で、24 時間かけて室温で、PEG4 - ベンズアルデヒド修飾 IGF - 2 ペプチドに結合させる。この化学反応（chemistry）は、S - Hynic 修飾 rhGAA からのヒドラジド基を、PEG4 - ベンズアルデヒド修飾 IGF 2 ペプチドからの化学的に活性なアルデヒド基にカップリングして、安定な共有（ヒドラゾン）結合を形成させる。この反応は、カップリングを最適化するために、アニリンの存在下（例えば、10 mM）で、様々な量の PEG4 - ベンズアルデヒド修飾 IGF - 2 ペプチド（例えば、1 - 10 倍のモル過剰）で行うことができる。次いで IGF - 2 ペプチド結合 rhGAA を、サイズ排除クロマトグラフィー、又は 50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.2 / 100 mM NaCl / 0.05 % ポリソルベート - 80 に対する透析によって、精製して、過剰の PEG4 - ベンズアルデヒド修飾 IGF - 2 ペプチドを除去し、そして変異型 IGF 2 ペプチド結合 rhGAA（vIGF2 - rhGAA）を、4 の同じ緩衝液中で、或いは - 20 又は - 70 で冷凍して保存する。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0056

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0056】

[0065]別の反応において、短い伸長リンカー領域を（N - 末端において）含有する [del] (1 - 4)、Arg6、Leu27、Arg65] IGF - 2 等の変異型 IGF - 2 ペプチドを、30 倍モル過剰のヘテロ二官能性架橋剤 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル - PEG4 - アジド（NHS - PEG4 - アジド）を使用して、第一アミンを欠く pH 約 7.5 の緩衝液（例えば、50 mM リン酸ナトリウム / 50 mM NaCl、pH 7.5）中で 1 - 3 時間室温で化学的に修飾する。この反応において、NHS - PEG4 - アジドの反応性 NHS 基は、短い伸長リンカー領域からのグリシンの - アミノ基と反応して、N - 末端に新規なアジド化学基を導入する。変異型 IGF 2 ペプチドの化学的修飾は、C4 逆相クロマトグラフィーによってモニターして、化学的修飾の進行及び完全性を評価することができる。次いで PEG4 - アジド修飾 IGF - 2 ペプチドを、C4 逆相クロマトグラフィーによって精製し、そして修飾されたペプチドを、凍結乾燥して、溶媒を除去し、そして乾燥粉末として保存する。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0059

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0059】

[0068]別の反応において、短い伸長リンカー領域（N - 末端において）を含有する [del] (1 - 4)、Arg6、Leu27、Arg65] IGF - 2 等の変異型 IGF - 2 ペプチドを、30 倍モル過剰のヘテロ二官能性架橋剤 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル - PEG4 - アジド（NHS - PEG4 - アジド）を使用して、第一アミンを欠く pH 約 7.5 の緩衝液（例えば、50 mM リン酸ナトリウム / 50 mM NaCl、pH 7.5）中で、1 - 3 時間室温で化学的に修飾する。この反応において、NHS - PEG4 - アジドの反応性 NHS 基は、短い伸長リンカー領域からのグリシンの - アミノ基と反応して、新規なアジド化学基を N - 末端に導入する。変異型 IGF 2 ペプチドの化学的修飾は、C4 逆相クロマトグラフィーによってモニターして、化学的修飾の進行及び完全性

を評価することができる。次いで PEG 4 - アジド修飾 IGF - 2 ペプチドを、C 4 逆相クロマトグラフィーによって精製し、そしてペプチドを凍結乾燥し、そして乾燥粉末として保存する。

【誤訳訂正 4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0061

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0061】

実施例 4

[0070]哺乳動物製造系から誘導された組換えヒト酸性 - グルコシダーゼ (rhGAA) を、修飾 IGF - 2 ペプチドへの結合のために使用して、優れた rhGAA の ERT を開発するために、改善されたタンパク質ターゲティング及び細胞取込みのために、IGF - 2 / CI - MPR に対する親和性を増加させる。この実施例において、N - 末端にシステイン残基を伴う短い伸長リンカー領域を含有する [de1 (1 - 4)、Arg 6、Leu 27、Arg 65] IGF - 2 等の変異型 IGF - 2 ペプチドを、ヘテロ二官能性架橋剤 m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) で、pH 約 6 で、30 - 60 分間室温で修飾する。この反応において、MBS からの化学的に反応性のマレイミド基は、N - 末端システインからの遊離のスルフヒドリル基と反応し、一方、rhGAA にカップリングするために N - ヒドロキシスクシンイミドエステル反応性基を保存する。MBS 修飾 IGF - 2 ペプチドを、ゲル濾過クロマトグラフィー又は透析によって急速に精製して、過剰の MBS を除去する。次いで rhGAA を、MBS 修飾 IGF - 2 ペプチドへのカップリングのために、pH 7.3 のアミン非含有緩衝液中で 30 分間室温で加える。この化学反応において、化学的に反応性の N - ヒドロキシスクシンイミドエステル基 (MBS 修飾 IGF - 2 ペプチドから) は、rhGAA 上の N - 末端の第 1 アミノ酸残基の - アミノ基及びリシンの - アミノ基と反応して、安定な共有結合を形成する。この反応を、様々な量の MBS 修飾 IGF - 2 ペプチド (例えば、1 - 20 倍のモル過剰) を使用して滴定し、rhGAA 上に 1 - 4 個の IGF - 2 ペプチドをカップリングさせるための、MBS 修飾 IGF - 2 ペプチドのモル過剰を決定する。次いで最適なカップリング条件を、この方法をスケールアップするために使用する。IGF - 2 結合 rhGAA を、ゲル濾過クロマトグラフィー又は透析によって精製して、過剰の IGF - 2 ペプチドを除去し、そして酸性の pH の緩衝液 (0.1 M クエン酸ナトリウム、pH 5.5 緩衝液) 中で保存する。

【誤訳訂正 5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0063

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0063】

[0072]別の反応において、短い伸長リンカー領域 (N - 末端において) を含有する [de1 (1 - 4)、Arg 6、Leu 27、Arg 65] IGF - 2 等の変異型 IGF - 2 ペプチドを、30 倍のモル過剰のヘテロ二官能性架橋剤 PEG 4 - ペンタフルオロベンゼン - 4 - ホルミル安息香酸 (PEG 4 - PFB) を使用して、第一アミンを欠く pH 約 7.5 の緩衝液 (例えば、50 mM リン酸ナトリウム / 50 mM NaCl、pH 7.5) 中で、1 - 3 時間室温で化学的に修飾する。この反応において、PEG 4 - PFB は、短い伸長リンカー領域からのグリシンの - アミノ基を修飾して、新規なアルデヒド化学基を N - 末端に導入する。変異型 IGF 2 ペプチドの化学的修飾は、C 4 逆相クロマトグラフィーによってモニターして、化学的修飾の進行及び完全性を評価することができる。次いで PEG 4 - ベンズアルデヒド修飾 IGF - 2 ペプチドを、ゲル濾過クロマトグラフィー又は透析によって精製して、結合のための適当な緩衝液 (例えば、50 mM NaOAc

c、pH 4.8 / 100 mM NaCl / 0.05 % ポリソルベート - 80 ) 中で、過剰の架橋剤及び化学的副産物を除去する。

【誤訳訂正 6】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換えリソソーム酵素に結合したターゲティングペプチドを製造する方法であって：

第 1 の架橋剤で修飾された組換えヒトリソソーム酵素を、一つ又はそれより多い第 2 の架橋剤で修飾された変異型 IGF - 2 ペプチドに結合させること；

を含んでなり、ここで

第 1 の架橋剤で修飾された組換えリソソーム酵素は、第 1 の架橋剤で化学的に修飾された N - 末端及び一つ又はそれより多い第 1 の架橋剤で修飾されたリシン残基を有するとして特徴付けられる組換えリソソーム酵素を含んでなり；そして

一つ又はそれより多い第 2 の架橋剤で修飾された変異型 IGF - 2 ペプチドは、アミノ (N) 末端の、5 ないし 20 個のアミノ酸残基を含んでなる短い伸長リンカー内の第 2 の架橋剤で修飾されたアミノ酸を含んでなる一つ又はそれより多い変異型 IGF - 2 ペプチドを含んでなり、

変異型 IGF - 2 ペプチドは、野生型ヒト IGF - 2 ペプチドに対し、

少なくとも以下の修飾：

1 - 4 位のアミノ酸の削除、6 位におけるグルタミン酸のアルギニンへの置換、27 位におけるチロシンのロイシンへの置換、及び 65 位におけるリシンのアルギニンへの置換；

を含み、かつ

任意選択的に以下の修飾：

7 位のアミノ酸の削除；又は 7 位におけるトレオニンのリシンへの置換；

を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記組換えヒトリソソーム酵素が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (rhGAA) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

二つのリシン残基が、前記組換えヒトリソソーム酵素上で修飾される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 の架橋剤が、N - スクシンイミジル 6 - ヒドラジノニコチン酸アセトン (SHynic) を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 2 の架橋剤が、PEG 4 - ペンタフルオロベンゼン - 4 - ホルミル安息香酸 (PEG 4 - PFB) を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

組換えヒトリソソーム酵素上の N - 末端及び一つ又はそれより多いリシン残基が、第一アミンを欠く pH 7.3 の緩衝液中で、30 分間室温で修飾される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 の架橋剤で修飾された組換えヒトリソソーム酵素を、前記短い伸長リンカーを含有する第 2 の架橋剤で修飾された変異型 IGF - 2 ペプチドに結合させる前に、前記短い伸長リンカーを含有する第 2 の架橋剤で修飾された変異型 IGF - 2 ペプチドを精製することを更に含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記第 1 の架橋剤が、スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル - ホスフィン (スルホ - N H S - ホスフィン) を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記第 1 の架橋剤が、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル - テトラオキサペンタデカンアセチレン (N H S - P E G 4 - アセチレン) を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記第 1 の架橋剤が、ジフルオロシクロオクチン (D I F O) 及びジベンゾシクロオクチン (D I B O) から選択されるヘテロ二官能性架橋剤を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記第 2 の架橋剤が、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル - P E G 4 - アジド (N H S - P E G 4 - アジド) を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 12】**

酵素置換療法に適した分子を製造する方法であって：

ヘテロ二官能性架橋剤を変異型 I G F - 2 ペプチドに結合させること；及び

ヘテロ二官能性架橋剤で修飾された変異型 I G F - 2 ペプチドを、組換えヒトリソソーム酵素に結合させること；

又は、

ヘテロ二官能性架橋剤を組換えヒトリソソーム酵素に結合させること；及び

ヘテロ二官能性架橋剤で修飾された組換えヒトリソソーム酵素を、変異型 I G F - 2 ペプチドに結合させること；

を含んでなり、

変異型 I G F - 2 ペプチドは、野生型ヒト I G F - 2 ペプチドに対し、

少なくとも以下の修飾：

1 - 4 位のアミノ酸の削除、6 位におけるグルタミン酸のアルギニンへの置換、27 位におけるチロシンのロイシンへの置換、及び 65 位におけるリシンのアルギニンへの置換；

を含み、かつ

任意選択的に以下の修飾：

7 位のアミノ酸の削除；又は 7 位におけるトレオニンのリシンへの置換；

を含む、前記方法。

**【請求項 13】**

前記組換えヒトリソソーム酵素が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (r h G A A) である、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記二官能性架橋剤が、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (M B S) を含んでなる、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 15】**

組換えヒトリソソーム酵素に化学的に結合した一つ又はそれより多い変異型 I G F - 2 ペプチドを含んでなり、

変異型 I G F - 2 ペプチドは、野生型ヒト I G F - 2 ペプチドに対し、

少なくとも以下の修飾：

1 - 4 位のアミノ酸の削除、6 位におけるグルタミン酸のアルギニンへの置換、27 位におけるチロシンのロイシンへの置換、及び 65 位におけるリシンのアルギニンへの置換；

を含み、かつ

任意選択的に以下の修飾：

7 位のアミノ酸の削除；又は 7 位におけるトレオニンのリシンへの置換；

を含む、複合体。

【請求項 16】

前記組換えヒトリソソーム酵素が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ ( r h G A A ) である、請求項 15 に記載の複合体。

【請求項 17】

化学的結合が、アミノ反応性二官能性架橋剤から誘導される架橋剤に媒介されている、請求項 15 に記載の複合体。

【請求項 18】

化学的結合が、N - スクシンイミジル 6 - ヒドラジノニコチン酸アセトン ( S - H y n i c ) から誘導される架橋剤に媒介されている、請求項 15 に記載の複合体。

【請求項 19】

化学的結合が、スルホ - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル - ホスフィン ( スルホ - N H S - ホスフィン ) から誘導される架橋剤に媒介されている、請求項 15 に記載の複合体。

【請求項 20】

化学的結合が、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル - テトラオキサペンタデカンアセチレン ( N H S - P E G 4 - アセチレン ) から誘導される架橋剤に媒介されている、請求項 15 に記載の複合体。

【請求項 21】

化学的結合が、ジフルオロシクロオクチン ( D I F O ) 及びジベンゾシクロオクチン ( D I B O ) から選択されるヘテロ二官能性架橋剤から誘導される架橋剤に媒介されている、請求項 15 に記載の複合体。

【請求項 22】

組換えヒトリソソーム酵素に結合したヘテロ二官能性架橋剤で修飾された変異型 I G F - 2 ペプチドを含んでなる、請求項 15 に記載の複合体。

【請求項 23】

リソソーム蓄積症に罹った対象を治療するための医薬であって、請求項 15 に記載の複合体のリソソーム蓄積症を治療するために十分な量を含んでなる、医薬。

【請求項 24】

前記リソソーム蓄積症が、以下の：ポンペ病、ファブリー病、及びゴーシェ病、M P S I、M P S I I、M P S V I I、テイ・サックス、サンドホフ、 - マンノシドーシス、並びにウォルマンの少なくとも一つである、請求項 23 に記載の医薬。

【請求項 25】

前記変異型 I G F - 2 ペプチドが、配列番号：2 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記変異型 I G F - 2 ペプチドが、配列番号：2 のアミノ酸配列を含んでなる、請求項 15 に記載の複合体。