

【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3部門第2区分

【発行日】平成19年8月2日(2007.8.2)

【公表番号】特表2003-518075(P2003-518075A)

【公表日】平成15年6月3日(2003.6.3)

【出願番号】特願2001-546685(P2001-546685)

【国際特許分類】

C 07 K	7/08	(2006.01)
A 61 K	39/395	(2006.01)
A 61 K	47/48	(2006.01)
A 61 P	43/00	(2006.01)
C 07 K	19/00	(2006.01)
A 61 K	38/00	(2006.01)
C 12 N	15/09	(2006.01)

【F I】

C 07 K	7/08	
A 61 K	39/395	V
A 61 K	47/48	
A 61 P	43/00	1 2 1
C 07 K	19/00	
A 61 K	37/02	
C 12 N	15/00	Z N A A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成19年6月15日(2007.6.15)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0019

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0019】

本明細書のこの態様に従って、図、及び特に哺乳動物の血清アルブミンに結合するペプチドリガンド選択に適当なアミノ酸、及び例示されるペプチドについては図5Aないし5F、8Aないし8F及び図9を作成した。好ましい態様では、数種の血清アルブミンにわたって結合するペプチドリガンドの選択については図9に具体例を示した。

本発明のこの態様に従う好ましい化合物は次のものを含む：

Asp-Leu-Cys-Leu-Arg-Asp-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (配列番号：119)

Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (配列番号：120)

Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp (配列番号：121)

Gln-Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp-Phe
(配列番号：122)

Gln-Gly-Leu-Ile-Gly-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Gly-Asp-Ser-Val
(配列番号：123)

Gln-Gly-Leu-Ile-Gly-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Gly-Asp-Ser-Val-Lys
(配列番号：124)

Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (配列番号：125)

Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (配列番号：126)

Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (配列番号：127)

Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp (配列番号 : 121)
 Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Ala-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Gly-Asp-Asp (配列番号 : 128)
 Glu-Val-Arg-Ser-Phe-Cys-Thr-Asp-Trp-Pro-Ala-Glu-Lys-Ser-Cys-Lys-Pro-Leu-Arg-Gly (配列番号 : 129)
 Arg-Ala-Pro-Glu-Ser-Phe-Val-Cys-Tyr-Trp-Glu-Thr-Ile-Cys-Phe-Glu-Arg-Ser-Glu-Gln (配列番号 : 130)
 Glu-Met-Cys-Tyr-Phe-Pro-Gly-Ile-Cys-Trp-Met (配列番号 : 131)

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0049

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0049】

以下の実施例は、例示のために提供されるもので、限定するものではない。明細書中の全ての文献の開示は、ここに出典明示することにより取り込まれる。

実施例 1

IgG-Fcペプチドリガンド

インビトロでの選択は、インビボでのペプチド機能の作用を制限することなく、IgG-Fc表面に結合するペプチドリガンドを同定してなされた。選択は様々な細胞性ホルモン及びレセプターに結合するペプチドを生成するのに近年使用されている多価及び一価のファージディスプレーの組み合わせを用いて行われた。N. C. Wrighton, 等(1996), Science 273:458, O. Livnah, 等(1996), Science 273:464。 4×10^9 の $Xaa_i-Cys-Xaa_j-Cys-Xaa_k$ の形態の異なるペプチドからなる单一のジスルフィド制限ペプチドライブリが構築され、ここで Xaa は NNS コドン由来のランダムアミノ酸であり、 $i+j+k=18$ 、及び $j=4$ から 10 である。このライブリはグリシンとセリンの残基からなる短いリンカーを有する遺伝子 V I I I タンパク質との N 末端融合体として M 1 3 のバクテリオファージの表面で発現した。H. B. Lowman 等(1998), Biochemistry 37: 8870-8878。より具体的には、ライブリは S T I I 分泌シグナルペプチド、20 アミノ酸長のペプチドライブリ、つまり $Xaa_i-Cys-Xaa_j-Cys-Xaa_k$ (ここで、 Xaa は NNS コドン由来のランダムアミノ酸、 $i+j+k=18$ 、及び $j=4$ から 10 である)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly リンカー (配列番号 : 1)、及び成熟タンパク質の一番目の残基で開始する M 1 3 遺伝子 V I I I を含んでいた。

原則として、このライブリの偏りのない性質によって IgG-Fc の任意の領域に潜在的に結合するペプチドが選択された。しかしながら、数回の選択の後、ライブリは単一のペプチド、Fc-I (Glu-Thr-Gln-Arg-Cys-Thr-Trp-His-Met-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Glu-Arg-Glu-His-Asn) (配列番号 : 2) が優位となつた。選択は H. B. Lowman 等, 上掲に記載されるように、次の修飾で実施された:マイクロタイマーのウェルを 5 μ g / ml の IgG-Fc を用いて被覆し; 非特異性結合を更に防ぐためにカゼイン阻害バッファ (Pierce 社) を 0.1 % の BSA の代わりに使用し; ファージの溶出に 75 mM の DDT 又は同等の結果となる 0.2 mM のグリシン pH 2.0 の何れかを作用させた。IgG-Fc は C D 4 - IgG1 イムノアドヘシンタンパク質のパバイン切断によって得られる、Capon 等, (1989), Nature, 337:525。切断された物質はタンパク質 A セファロース、続いて Superdex-75 (Pharmacia 社) に通して精製し、次いで 280 nm の吸光度で定量した。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0050

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0050】

選択実験を再び繰り返して Fc-I、更に関連ペプチド、Fc-I (Lys-Glu-Ala-Ser-

Cys-Ser-Tyr-Trp-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Val-Ala-Gly-Val-Glu) (配列番号: 3)を得た。Fc-I IペプチドはFc-Iに見られる開始Gly-Glu-Leu-Val-Trp(配列番号: 132)配列及びシスティンスペーシングを共有していた。明らかに、これら2つのペプチドは、開始プールに存在する他のIgG-Fc結合ペプチドの何れをも超えて選択されるのに十分高い親和性を有するIgG-Fcに結合した。2つのペプチドは標準9-フルオレニルメトキシカルボニルプロトコルを用いて固相ファージ上で合成され、逆相HPLCにより精製された。質量をエレクトロスプレー質量分析により確認し、精製したペプチドを280nmのUV吸光度で定量した。

競合ELISAをH. B. Lowman, 等, 上掲に記載される方法と同様の方法で実施した。概略して言うと、タンパク質A Zドメインを5μg/mlの濃度でマイクロタイターウェル上に固定し、遮断して、記載したように洗浄した。濃度312nMから0.3nMのビオチニル化IgG-Fcと濃度215μMから0.8μMのペプチドの混合物の基質を調製した。これらの混合物を固定したタンパク質A Zドメインと1時間インキュベートした。次いでプレートをアビジン/HRPコンジュゲートを用いて記載したように洗浄して発色させた。次にビオチン-IgG-Fcの各濃度について阻害曲線を算定し、次いでKiを得るために最大阻害の半分の値の曲線、「IC₅₀」をゼロビオチン-IgG-Fc濃度に対して推定した。Fc-I及びFc-I Iペプチド双方とも、約5μMの阻害定数(Ki)でのIgG-Fcとの結合においてタンパク質A (Zドメイン) (B. Nilsson等(1987), Protein Eng. 1:107)と競合することが分かった。結果から、これらのペプチドがタンパク質A結合部位と一致するIgG-Fc上の重複部位に結合することが示唆された。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0051

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0051】

Fc-I IペプチドのDNA配列を、STIIシグナル配列、Fc-I Iペプチド Lys-Glu-Ala-Ser-Cys-Ser-Tyr-Trp-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Val-Ala-Gly-Val-Glu (配列番号: 3)、Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Gly リンカー(配列番号: 4)、及び残基253で開始するM13遺伝子II Iタンパク質を有する構築物を得るためにカセット突然変異によって一価のファージディスプレイフォーマットを実施した。Fc-I I配列を一価のファージディスプレイによって親和性成熟した。5組の残基をペプチド配列の非システィン位置を完全に網羅する6つの分離したライプラリで無策位に突然変異させ、次いでIgG-Fcに対してスクリーニングした。

一組の二次生成の一価のファージディスプレイライプラリをFc-I I配列 Lys-Glu-Ala-Ser-Cys-Ser-Tyr-Trp-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Val-Ala-Gly-Val-Glu (配列番号: 3)に基づいて構築し、ここで5つの配列残基は2つのシスティン以外の1、4、7、10、12、及び16の位置で開始する各ライプラリのNNNコドンを用いてランダム化された。各ライプラリは約1×10⁸の多様性を有していた。これらのライプラリをそれぞれIgG-Fcに結合させるために6回スクリーニングし、次いで配列決定した。次にこの選択からの好ましい残基を、完全長ペプチド配列に及ぶ3つの更なるライプラリを用いて組換えた。3つの更なるライプラリを1つのペプチドの各位置の好ましいアミノ酸を再結合するために遺伝子コードの縮重を用いて構築した。これらのライプラリのDNA配列は次の塩基(IUPACコード)の混合物を含む: DRG GWA GMA RRC TGC KCT TRS CAC MTG GGC GAG CTG GTC TGG RVC RVM BKC GAS KDW (配列番号: 5)、DRS VWG SVG RRC TGC KCC TRS YRS MTG GGC GAG CTG GTC TGG TGC RNC VVS NBS GWS KDM (配列番号: 6)、及び DNS NNS NNS VNS TGC BVG TDS HRS MDS GGC GAG STC KKG WRG TGC RNM NNS NNS NNM (配列番号: 7)。またこれらのライプラリをIgG-Fcに対して6回ソートし、次いで配列決定した。

IgG-Fcに対してスクリーニングした後、これらのライプラリからのコンセンサス

型は、高度に保存された 13 残基を核にする配列(Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr) (配列番号 : 8)を示唆した。一致するペプチド(Fc-I III)を合成し、これが 100 nM の IC₅₀ を有する Fc に対するタンパク質 A (Z ドメイン) の結合を阻害することが分かった。従って、Fc-I III は Fc-I II よりも短い 7 つの残基であるが、50 倍強く結合する。サイズが小さいにも関わらず、Fc に対する Fc-I III の結合親和性はタンパク質 A 及びタンパク質 G のドメイン (それぞれ約 4 倍大きく、約 10 nM の K_d S で結合する) のものより 10 倍弱いに過ぎなかった。S. R. Fahnestock, 等 in Bacterial Immunoglobulin-Binding Proteins (Academic Press, Inc. 1990) Vol.1, chap. 11. R. Karlsson, L. Jendeberg, B. Nilsson, J. Nilsson, P. Nygren (1995), J. Immuno. Methods 183:43。

【誤訳訂正 5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0053

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0053】

実施例 2

IgG-Fc ペプチドリガンドで標識した抗 VEGF Fab の構築

ペプチドリガンドドメインと活性ドメインを有するハイブリッド分子を形成するために IgG-Fc ペプチドリガンドを生理活性化合物と結合させてよい。この実施例では、IgG-Fc ペプチドリガンドをヒト VEGF 認識 Fab 断片と結合させる。ヒト VEGF に対する中和抗体をマウスのハイブリドーマから事前に同定しておき、ヒト化し、ファージディスプレイで最適化した。Muller 等 (1998), Structure 6:1153-1167; Chen 等 (1999), J. Mol. Biol. 293:865-881; 及び国際特許公開番号 WO98/45331 参照。無関係の IgG に対する結合親和性を、それらの抗原結合親和性を壊すことなく Fab に加えることができるかを試験するために、この抗体の 2 つのヒト化 Fab 型を選択した。実施例 1 に記載されるペプチド-ファージディスプレイ方法で同定され、最適化された IgG-Fc ペプチドリガンド、DCAWHLGELVWCT (配列番号 : 8) を、ペプチドと Fab の間に可動性を与える短いペプチドリンカー (Gly-Gly-Gly) と共に使用する。この抗体の場合には軽鎖が抗原結合への僅かな寄与を有することが既知である (Muller 等, 1998, 上掲) ので、Fab の軽鎖が融合物に選択される。原則としてペプチドリガンドドメインは N 末端、C 末端に導入しても、又はもとの Fab 配列中に挿入しても、IgG 結合を導入するように機能することができる。ここで記載されるのは N 末端融合物 DCAWHLGELVWCTGGG-(軽鎖) (配列番号 : 109) 並びに C 末端融合物 (軽鎖)-GGGWEADCAWHLGELVWCT (配列番号 : 110) である。

抗体軽鎖の N 末端で IgG-Fc ペプチドリガンドの融合物を作成するように、抗 VEGF プラスマミドの突然変異のためにオリゴデオキシヌクレオチド、HL-569 を設計し、合成した。HL-569 の配列 (異なるペプチド配列に下線を引いた) は : 5'-ACA AAC GCG TAC GCT GAC TGC GCT TGG CAC CTG GGC GAG CTG GTC TGG TGC ACC GGA GGA GAT ATC CAG TTG ACC-3' (配列番号 : 111)。GAC コドンは軽鎖の N 末端の STII 選択シグナル配列に続き、GAT コドンは成熟 (野生型) 軽鎖の一番目の残基に相当する。

他のオリゴデオキシヌクレオチド、HL-570 を、抗体軽鎖の C 末端へのペプチドリガンドの融合物構築のために設計し、合成した。HL-570 の配列 (異なるペプチド配列に下線を引いた) は : 5'-AAC AGG GGA GAG TGT GGA GGA GGA TGG GAA GCA GAC TGC GCT TGG CAC CTG GGC GAG CTG GTC TGG TGC ACC TAA GCT GAT CCT CTA C-3' (配列番号 : 112)。下線を引いた GGA の前にある TGT コドンは軽鎖の残基 Cys-214 に相当し、TAA 「停止コドン」は翻訳されるペプチド配列の末端を標識する。ファージミド pY0192 及び pY0317 (Muller 等, 1998, 上掲; Chen 等, 1999; 及び国際特許公開番号 WO98/45331 に記載) はヒト化抗 VEGF 抗体の低親和性及び高親和性形態をそれぞれコードしており、2 つの IgG-ペプチドオリゴのそれを突然変異させて構築物 pY0192-569、pY0192-570、pY0317-569、及び pY0317-570 を得た。

【誤訳訂正 6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0054

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0054】

実施例3

ペプチドリガンド標識した抗V E G F F a b を含むハイブリッド分子のファージE L I S A 分析

ファージE L I S A 競合結合アッセイ (Lowman(1998), *Methods Mol. Biol.* 87:249-264) を、N末端とC末端でI g G - F c ペプチドリガンドで標識した抗V E G F 抗体変異体の見かけの結合親和性に比較して用い、遺伝子I I I タンパク質のC末端ドメインの融合物としてバクテリオファージM 13 粒子で一価的に表示した。

ハーセプチン(登録商標)としても知られる無関係のヒト化I g G、4 D 5 - I g G によってリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中2マイクロg / mLでNunc Maxisorp免疫吸着プレート上を被覆した。X L - 1 ブルーダー大腸菌(Stratagene)を一晩培養して得たファージミド粒子を0.5%のウシ血清アルブミンと0.05%のTween-20を含むPBSで希釈した。ファージミド粒子を溶解したハーセプチン(登録商標)の連続希釈液と混合し、非吸着プレート(Nunc F96)で20分間平衡化し、次いで非結合ファージの除去のためにハーセプチン(登録商標)被覆したMaxisorpプレートに移動させた。20分後プレートをPBS/Tweenで洗浄し、抗ファージモノクローナル抗体HRPコンジュゲート(Pharmacia)及びOPD基質(Sigma)で発色させた。構築物、p Y 0 1 9 2 - 5 6 9、p Y 0 1 9 2 - 5 7 0、p Y 0 3 1 7 - 5 6 9、及びp Y 0 3 1 7 - 5 7 0のそれぞれについての約100-300nMのIC₅₀値を置換曲線で示した(図1)。

【誤訳訂正 7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0055

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0055】

実施例4

I g G - F c ペプチドリガンドで標識した抗V E G F F a b へのI g G 結合のビアコア(商品名)分析

無関係のI g G、ハーセプチン(登録商標)としても知られる4 D 5 - I g G の、固定V E G F バイオセンサーチップに事前に結合させたF a b に対する結合を測定するために、表面プラズモン共鳴器(ビアコア社、ピスカタウェイ、ニュージャージー)を用いた。

p Y 0 3 1 7 及びp Y 0 3 1 7 - 5 7 0 (それぞれコントロール抗V E G F 高親和性のヒト化F a b、及びI g G - F c ペプチドリガンドドメインで標識した抗V E G F 高親和性ヒト化F a b ; 上掲の実施例2、及びW098/45331参照)によりコードされるF a b 変異体を大腸菌で発現させ、タンパク質G(Pharmacia社)親和性クロマトグラフィーで精製した。組み換えヒトV E G F を記述されるように(Muller等, 1998, 上掲)ビアコア(商品名)CM-5 バイオセンサーチップ(ビアコア社)上に固定した。V E G F の固定の後、チップをエタノールアミンで遮断し、ペプチドリガンドをY 0 3 1 7 - 5 7 0 F a b 、又はY 0 3 1 7 コントロールで標識し、0.05%のTween-20と0.01%のアジ化ナトリウムを含有するPBSバッファーに投入した。F a b 投入の後、ハーセプチン(登録商標)を投入し、投入後の解離率(k_{off})を得た。

結果(図2)は、ハーセプチン(登録商標)がコントロールY 0 3 1 7 F a b 以外への標識物に結合したこと示す。1:1ラングミュア結合モデル(Karlsson等(1991), *J. Immunol. Methods* 145:229-240(1991))を用いて、2.8 × 10⁻³、秒⁻¹のk_{off}、及び8.5分の対応する消失半減期(t_{1/2})をY 0 3 1 7 - 5 7 0について測定し

た。物質の限界は信頼できるon-rate(結合率)の測定を妨げた。しかしながら、得られた k_{ff} は30nMから300nM(k_n は $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ とみなす)の平衡結合親和性、 K_d がペプチド結合とファージELISAの結果(上記)に一致することを示唆する。重要なことには、ビアコア(商品名)の結果(図2)も、標識したFabが抗原(固定化VEGF)と無関係のIgGの両方に同時に結合できることを示す。

【誤訳訂正8】

【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】

実施例5

IgG-Fcペプチドリガンド標識した抗VEGF Fabは延長した消失半減期を有するIgG-Fcペプチドリガンド標識した抗VEGF Fab(Fab-Y0317-570)の血液クリアランス速度と組織分布を、標識していないコントロール抗VEGF Fab(Y0317)のものと比較する。消失半減期と分布容積の測定は重量2.8から3kgのニュージーランドシロウサギで行う。血漿試料中に存在する被験物質の量は当該分野で既知の任意の方法、例えばELISA又はRIAを用いて測定する。

薬物動態分析を被験物質血漿濃度を用いて実施する。投与後の経過時間に対してプロットした場合に各被験物質の集団平均血漿データは多次指數関数プロフィールに一致する。データを、標準的な2分画モデルによりボーラス投与量と分布及び消失相の一次速度定数に当てはめる。静脈内投与のデータに最適な一般式は： $c(t) = A e^{-k_1 t} + B e^{-k_2 t}$ であり、ここで $c(t)$ は時間 t における血漿濃度であり、AとBはY軸上の切片であり、

と k_1 はそれぞれ分布及び消失相の見かけの一次速度定数である。 k_1 相はクリアランスの初期相であり、動物の全ての細胞外液中へのタンパク質の分布を示すのに対し、衰退曲線の第2又は k_2 相部分は真の血漿クリアランスを示す。このような方程式に合致させる方法は当該分野でよく知られている。例えば、 $A = D / V(-k_2 t_1) / (-k_1)$ 、 $B = D / V(-k_2 t_1) / (-k_2)$ 、及び k_1 及び k_2 は次の二次方程式の平方根である： $V =$ 分布容積、 $k_1 =$ 消失率、 $k_2 =$ 分画1から分画2への移動率及び $k_3 =$ 分画2から分画1への移動率を用いた $r^2 + (k_2 + k_3 + k_1)r + k_2 k_3 = 0$ 、 $D =$ 投与量。

【誤訳訂正9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0057

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0057】

試験日の朝、6羽のニュージーランドシロウサギ(体重2.8 - 3.0kg)を固定器に入れた。血液試料採取のために耳動脈に、投与のために反対側の耳静脈にカテーテルを挿入した。

ウサギを2つの集団($n = 3$ /集団)に分けた。集団1の動物はコントロール抗VEGF Fab-Y0317の静脈内投与ボーラスを受けた。集団2のウサギはFab-Y0317-570を受けた。集団の条件の概要と投与量については以下の表に示す。

集団	重量 (kg)	投与集団	名目投与量	投与濃度	投与量
			(mg/kg)	(mg/mL)	(mL)
1	2.9	Control-Fab-Y0317	1	3	0.97
1	3.0	Control-Fab-Y0317	1	3	1.00
1	2.9	Control-Fab-Y0317	1	3	0.97
2	2.8	Fab-Y0317-5701		3	0.93

2 3 . 0 Fab-Y0317-5701
2 2 . 9 Fab-Y0317-5701

3 1 . 0 0
3 0 . 9 7

投与の直前と投与後 10、20、40 分、1、2、3、4、6、8、24 及び 48 時間に順次血液試料 (0.5 mL) を採取した。血液を血清分離管に収集し、室温で凝血させ (~30 分)、遠心分離した。血清を採取し、分析までの間直ちに -70° で保存した。

【誤訳訂正 10】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0058

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0058】

ELISA プレートを 0.5 マイクロ g / mL の VEGF を含有する 50 mM の炭酸バッファー、pH 9.6 で、4° で一晩被覆し、さらに 0.5% のウシ血清アルブミン、10 ppm のプロクリン 300 (スペルコ社、Bellefonte, PA) 含有 PBS (8 mM の Na₂HPO₄、1.5 mM の KH₂PO₄、2.7 mM の KCl 及び 137 mM の NaCl、pH 7.2) で室温で 1 時間遮断した。標準物 (0.41-100 ng / mL) と 0.5% のウシ血清アルブミン、0.05% のポリソルベート 20、0.25% の CHAPS、0.2% のウシグロブリン (シグマ社、St. Luis, MO) 及び 5 mM の EDTA を含有する PBS 中の試料の 2 倍連続希釈物 (最小希釈 1 : 100) をプレートで 2 時間インキュベートした。結合した抗体を、ペルオキシダーゼ標識ヤギ F(ab')₂ 抗ヒト IgG (ab')₂ (Jackson ImmunoResearch 社、West Grove, PA) で、次いで基質としての 3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン (Kirkegaard & Perry Laboratories) で検出した。プレートを工程の間で洗浄した。吸着を Titerek stacker reader (ICN 社、コスタメサ、カリフォルニア州) の 450 nm で読み取った。標準曲線を 4 つのパラメータの回帰曲線適合プログラム (カレイダグラフ、Synergy software 社、Reading, PA) を用いて当てはめた。標準曲線の範囲にあるデータの点を、試料の Fab 濃度を計測するのに使用した。

データ分析：時間プロフィールに対する濃度のグラフをカレイダグラフ (カレイダグラフ (商品名) V.3.09 著作権 1986-1997. Synergy software 社、Reading, PA) を用いて作成した。読み取り可能値未満 (LDR) として記録された値は PK 分析に含まれず、グラフには示されない。薬物動態パラメータは WinNonlin ソフトウェア (WinNonlin (登録商標) Professional V.3.1 WinNonlin (商品名) 著作権 1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, CA) を用いた分画別分析により測定された。薬物動態パラメータを他に記載されている (Ritschel WA 及び Kearns GL. Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications, 5th edition. American Pharmaceutical Assoc., Washington, DC. 著作権 1999) ようにして算定した。

【誤訳訂正 11】

【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】

結果を図 3 に記載する。ボーラス投与と一次生産性 (WinNonlin) を用いた 2 分画モデルは時間データに対する得られた血清濃度に当てはめて使用された。測定された薬物動態パラメータは以下の表に示した。

薬物動態パラメータ概要

(静脈内投与 ; 1 mg / kg)

パラメータ	集団 1	集団 2
	Control Fab-Y0317	Fab-Y0317-570
AUC (h* µg/mL)	13.6 ± 1.2	215 ± 56

C m a x (μ g/mL)	15.6 ± 0.6	13 ± 0.7
C L (mL/h/kg)	74.2 ± 6.7	4.8 ± 1.1
K 10 半減期 (hr)	0.6 ± 0.02	11.3 ± 3.6
半減期 (hr)	0.39 ± 0.03	1.15 ± 0.31
半減期 (hr)	1.93 ± 0.27	37.6 ± 19
V 1 (mL/kg)	64.1 ± 2.37	75.2 ± 4.23
V s s (mL/kg)	112 ± 7.7	225 ± 54

両方の薬剤の分布の初期量 (V1) は血清量にほぼ等しかった。Fab-Y0317-570 (225 mL / kg) の分布の見かけの定常状態量は内因性 IgGへの結合に十分な量を示すコントロールFab (112 mL / kg) の予測よりも約2倍高かった。コントロールFab-Y0317はFab-Y0317-570 (4.8 mL / h / d) に比較して血清から約15倍早く排除された (クリアランス = 74 mL / h / kg)。Fab-Y0317-570 の全体暴露 (AUC) はFab-Y0317のものよりも~16倍高かった。Fab-Y0317は投与の24時間後血清で検出不可能であったが、Fab-Y0317-570 の血清濃度は依然として投与の48時間後 1 μg / mL を超えていた。分布 () 半減期 (1.15 h) 及び消失 () 半減期 (37.6 h) は共にコントロールFabよりも著しく長かった。

これらの結果は、内因性 IgG に結合する13のアミノ酸のFab-Y0317への附加がFabクリアランスを有意に遅延させ、半減期を増加し、全体の暴露を促進することができることを示唆する。

【誤訳訂正12】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0060

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0060】

実施例6

血清アルブミンペプチドリガンド

ファージライブラリ及び選択条件 - ファージディスプレイペプチドライブラリをウサギ、ラット及びヒトアルブミンに対して選択した。遺伝子8に融合するランダムペプチド配列を発現するファージライブラリ (Lowman等, Biochem. 37, 8870(1998)) を5つのグループにプールした：プールAはCX₂GDX₄C (配列番号：133)、X₄CX₂GDX₄CX₄ (配列番号：134)及びX_iCX_jCX_kを含み、ここでj = 8 - 10；プールBはX₂0及びX_iCX_jCX_kを含み、ここでj = 4 - 7；プールCはX₈及びX₂CX_jCX₂を含み、ここでj = 4 - 6；プールDはX₂CX_jCX₂を含み、ここでj = 7 - 10；プールEはCX₆CX₆CCX₃CX₆C (配列番号：135)、CCX₃CX₆C (配列番号：136)、CCX₅CX₄CX₄CC (配列番号：137)、CXCCX₇CX₃CX₆ (配列番号：138)を含み、ここでXは20の天然発生Lアミノ酸を示す。それぞれの場合において、i + j + k = 18及び|i - k| < 2。10のライブラリのそれが108クローン以上である。

ファージライブラリプールを結合バッファ (PBS、1%のオボアルブミン、0.005%のTween-20) に懸濁し、maxisorpプレート (PBS中10 μg / mL、4度一晩；プレートはプロッカーカゼイン (Pierce Chemical, Rockford, IL) で遮断した) 上に直接固定したウサギ、ラット又はヒトアルブミンに対して分類した。2時間後、結合していないファージを洗浄 (PBS、0.05%のTween-20) を繰り返して取り除き、結合したファージを500 mMのKCl、10 mMのHCl、pH2で溶出した。溶出したファージをVCSM13ヘルパーファージ (Stratagene, La Jolla, CA) を用いてXL1-BLUE細胞で増殖した。濃縮を、オボアルブミン又はカゼインでの成功裏の被覆に比較して成功裏に被覆されたアルブミンと結合したファージ数の滴定によってモニターした。

ファージ E L I S A - ファージクローン ($\sim 10^{11}$ ファージ) をラット、ウサギ又はヒトアルブミンで被覆したプレートに加えた。マイクロタイタープレートを洗浄バッファーで洗浄し、結合したファージを H R P / 抗 M 1 3 コンジュゲートで溶出した。結合した H R P の量を A B S T / H₂O₂ 基質を用いて 405 nm での変化を監視することにより測定した。

【誤訳訂正 1 3】

【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】

ウサギ、ヒト又はラットアルブミンへの結合を選択したファージクローンにより示されるペプチド配列を図 4 に示す。また 3 種の固定したアルブミンに結合する個々のファージクローンの能力も示す。これは、ファージ E L I S A を用いて試験された。ラットアルブミンへの結合を選択したクローン R B はまた、ヒト及びウサギアルブミン結合能力もあることに注意してほしい。

一価のファージでの配列成熟 - 部分的にランダム化したライプラリを図 4 の選択クローンそれぞれをコードするオリゴヌクレオチドを用いて構築したが、記述されているように (Dennis 等, Nature 404, 465(2000)) 塩基の 70 - 10 - 10 - 10 混合物で合成した。これらのライプラリの潜在的な多様性は当初の未処置のライプラリと同じであるが、各「ソフトランダム化」ライプラリは図 4 の選択配列に偏りを有する。各ライプラリは再びその起源に關係なくラット、ウサギ又はヒトアルブミンへの結合を選択した。例えば、もとはラットアルブミンへの結合を同定していても、クローン R B のソフトランダム化から生じるライプラリはラット、ウサギ又はヒトアルブミンに対して選択された。ソフトランダム化に従って同定された配列を、ファージ E L I S A により決定されるようなそれらの種特異性と共に図 5 に示す。ほとんどのクローンがそれらが選択したアルブミンの種に特異的であるように見えるが、R B ソフトランダム化ライプラリ由来のクローンはこれらの種の全てに結合する。

またファージクローンをアカゲザル、マウス及びウシアルブミンへの結合について試験した。R B ソフトランダム化ライプラリ由来のクローンを同様にこれらの種のアルブミンのそれぞれへの結合に対して検出され、オボアルブミン及びカゼインへの結合欠如に基づいてアルブミンに固有であった (図 6)。複数種のアルブミンに結合するクローン (多重特異性結合剤) を図 7 に示す。

【誤訳訂正 1 4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0062

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0062】

ハードランダム化 - R B 配列のソフトランダム化由来の配列をさらに、ハードランダム化法を用いて成熟させた。選択残基 (下線を付した) 定常 X₅ D X C L P X W G C L W X₄ (配列番号 : 366) を高度に保存する一方、残りの部分を十分にランダム化する新しいライプラリを構築した。N 及び C 末端の両方で 1 残基さらに短い、第 2 のライプラリも構築された。ラット、ウサギ又はヒトアルブミンに対して選択されたこれらライプラリ由来の配列を図 8 A ないし 8 F に示す。

ペプチド合成 - ペプチドを手動又は自動 (Milligen 9050) 何れかの、P E G ポリスチレン樹脂を用いた 0.25 m モル大の F m o c での固相ファージ合成によって合成した (Bodanszky M., (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer, Berlin)。側鎖保護基を取り除き、ペプチドを 95 % のトリフルオロ酢酸 (T F A) と 5 % のトリイソプロピルシリランで樹脂から切断した。飽和したイオジンの酢酸溶液をジスルフィド結合の酸化

のために添加した。ペプチドを0.1%のTFAを含有する水／アセトニトリル勾配を用いた逆相HPLCによって精製した。ペプチドは分析用HPLCで>95%純粋であり、その同一性を質量分析により検証した。

ペプチドSA08のカルボキシ末端リシンを、NHS-LC-ビオチン(Pierce Chemical社, Rockford, IL)で誘導体化し、得られたSA08bを上述のようにHPLCで精製した(Ac-QGLIGDICLPRWGCLWGDSVK_b (配列番号: 124)-nここでK_bはリシン-ビオチンを表す)。

SA08結合アッセイ-ウサギ、ラット又はマウスアルブミンをPBS中10μg/ml、4℃で一晩、maxisorpプレート上に直接固定した。プレートを阻害剤カゼイン(Pierce Chemical社, Rockford, IL)を用いて25℃で1時間阻害した。続けて希釈した試料を結合バッファー(上記)に懸濁し、プレートに添加して、続いて10nMのSA08bを添加して25℃で1時間おいた。マイクロタイタープレートをPBS、0.05%のTween20で洗浄し、アルブミンに結合したSA08bをストレプトアビシン/HRPで希釈した。HRP結合量は、ABTS/H₂O₂基質を用いて測定し、405nmでの変化をモニターした。

同定したファージ配列に対応するペプチドを合成し、ラット、ウサギ又はマウスアルブミンに対する親和性をSA08b結合アッセイを用いて測定した(図9及び10)。

アルブミン結合Fab融合物の作成、発現及び精製-アルブミンとの結合がインビボのタンパク質及びペプチドの半減期を増加させるかどうかを試験するために、SA06の配列を結合組織因子(TF)に対するFab断片(D3H44)に融合させた。SA06配列をFabの軽鎖(D3H44-L)又は重鎖(D3H44-Ls)のどちらかのカルボキシ末端に加えた。さらに、折り畳みの問題に対する対策として、図11に記載されるようなアラニン(それぞれ、D3H44-Ls及びD3H44-Hs)により置換された鎖内ジスルフィド以外は同一の構成とした。

【誤訳訂正15】

【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】

融合物をアルカリホスファターゼプロモーターの制御下で発現させ、stII分泌シグナルを用いて大腸菌から分泌させた。Fab融合体を、1mMのEDTA、10mMのトリス-HCl、pH8.4に1時間、細胞を懸濁することによりペリプラズムから回収した。細胞の破片を遠心分離によって取り除き、抗TF FabをHiTrap(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)TF親和性カラムを用いて選択的に精製した。適切に折り畳まれたD3H44-L又はD3H44-Lsをウサギアルブミン親和性カラム(CNBr活性化セファロース4Bに結合したウサギアルブミン、Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)を用いて更に精製した。両方のカラムをPBSで洗浄し、50mMのHClで溶出した。溶出した分画を1MのトリスpH8で中和した。内毒素をトリトンX114(Aida及びpabst, J. Immunol. Methods 132, 191(1990))での抽出に従って更に取り除いた。

FX活性アッセイ(図12)、及び組織因子依存性凝固の延長を測定するプロトロンビン時間アッセイ(図13)(方法についてはDennis等, Nature 404, 465(2000)参照)で測定されるように、精製したD3H44融合物はTFに結合する能力を保持していた。アルブミン結合配列(WT)を欠くD3H44と異なり、D3H44-L及びD3H44-Lsは共にSA08b結合アッセイ(図14)で測定されるように、アルブミンに対する結合能力がある。更に、D3H44アルブミン結合融合物は共に、ビオチンTF結合アッセイ(図15)で判断されるように、TFとアルブミンを同時に結合する能力がある。このアッセイにおいて、固定化したアルブミンに対するD3H44融合物の結合は、ビオチニル化TFで検出される。野生型D3H44(WT)はアルブミン結合能力がなく、従って

ビオチニル化 T F の添加でシグナルを発生しない。

D 3 H 4 4 アルブミン結合融合物の薬物動態 - D 3 H 4 4 変異体をウサギに 0 . 5 m g / k g ボーラスとして与えた。各グループは 3 羽のウサギ (F (a b ') 2 グループで 5 つ) で構成される。提示した時点で得られた血清試料を連続希釈し、 T F 結合 E L I S A を用いて D 3 H 4 4 の濃度を測定した。

【誤訳訂正 16】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 6 4

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 6 4】

薬物動態分析を被験物質血漿濃度を用いて実施する。各被験物質の集団平均血漿データは投与後の経過時間に対してプロットした際、多次指数関数的プロフィールに従う。データをボーラス投与での標準 2 分画モデルと分布及び消失相の一次速度定数に当てはめる。静脈内投与のデータに最も適合する一般式は : $c(t) = A e^{-k_1 t} + B e^{-k_2 t}$ であり、ここで $c(t)$ は時間 t での血漿濃度、 A 及び B は Y 軸の切片、及び k_1 及び k_2 はそれぞれ分布及び消失相の見かけの一次速度定数である。相はクリアランスの初期相であり、動物の全ての細胞外液中へのタンパク質の分布を示すが、衰退曲線の第 2 又は 3 相の部分は真的血漿クリアランスを示す。このような方程式に合致させる方法は当分野でよく知られている。例えば、 $A = D / V(-k_2 t_1) / (-k_1)$ 、 $B = D / V(-k_2 t_1) / (-k_2)$ 、及び $(- >)$ は次の二次方程式の平方根である : $V = \text{分布容積}$ 、 $k_{10} = \text{消失率}$ 、 $k_{12} = \text{分画 1 から分画 2 への移動率}$ 及び $k_{21} = \text{分画 2 から分画 1 への移動率}$ 、及び $D = \text{投与量}$ を用いた $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ 。

データ分析 : 時間プロフィールに対する濃度のグラフをカレイダグラフ (カレイダグラフ(商品名)V . 3 . 0 9 著作権 1986-1997. Synergy software社, Reading, PA) を用いて作成した。読み取り可能値未満 (L T D) として記録された値は P K 分析に含まれず、グラフには示されない。薬物動態パラメータは WinNonlin ソフトウェア (WinNonlin(登録商標)Professional V.3.1 WinNonlin(商品名)著作権 1998-1999. Pharsight Corporation . Mountain View, CA) を用いた分画別分析により測定された。薬物動態パラメータを他に記載されている (Ritschel WA 及び Kearns GL. Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications, 5th edition. American Pharmaceutical Assoc., Washington, DC. 著作権 1999) ようにして算定した。

アルブミン結合ペプチドの D 3 H 4 4 に対する融合によって、改善した薬物動態パラメータを有するタンパク質となる (図 16 及び 17) 。 D 3 H 4 4 - L は野生型 F a b に比較して 70 倍増加した半減期 ($K_{10} - HL$) 及び $20K$ 又は $40K$ ポリエチレングリコール (P E G) で誘導体化された D 3 H 4 4 F a b に対する類似した半減期を有する。

ここに列挙した全ての文献は全文を出典明示によりここに取り込む。