

【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 0 7 K 7/08 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 7/08

A 6 1 K 39/395 V

A 6 1 K 47/48

A 6 1 P 43/00 1 2 1

C 0 7 K 19/00

A 6 1 K 37/02

C 1 2 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】0 0 1 9

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 9】

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切なアミノ酸、及び例示されるペプチドについては図 5 A ないし 5 F、8 A ないし 8 F 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

I g G - F c 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、I g G - F c 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イ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単一のジスルフィド制限ペプチドライブラリが構築され、ここで Xaa は N N S 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。このライブラ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、ライブラリは 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ラリ、つまり Xaa_i-Cys-Xaa_j-Cys-Xaa_k (ここで、Xaa は N N S 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-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、このライブラリの偏りのない性質によって I g G - F c 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、ライブラリは単一のペプチド、F c - 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) が優位となった。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：マイクロタイターのウェルを 5 μ g / ml の I g G - F c 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 B S A の代わりに使用し；ファージの溶出に 75 mM の D D T 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。I g G - F c は C D 4 - I g G₁ イムノアドヘシンタンパク質のパパ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 F c - I、更に関連ペプチド、F c - I 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) 配列及びシステイ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5 µg/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312 nMから0.3 nMのビオチニル化IgG-Fcと濃度215 µMから0.8 µM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5 µM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-Gly リンカー (配列番号: 4)、及び残基253で開始するM13遺伝子III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イン位置を完全に網羅する6つの分離したライブ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ブラリを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つのシステイン以外の1、4、7、10、12、及び16の位置で開始する各ライブラリのNNSコドンを用いてランダム化された。各ライブラリは約 1×10^8 の多様性を有していた。これらのライブラリをそれぞれ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び3つの更なるライブラリを用いて組換えた。3つの更なるライブラリを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。これらのライブラリの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 TGC 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 NNS NM (配列番号: 7)。またこれらのライブラリを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、これらのライブ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-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-III は Fc-III よりも短い 7 つの残基であるが、50 倍固く結合する。サイズが小さいにも関わらず、Fc に対する Fc-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, et al. in *Bacterial Immunoglobulin-Binding Proteins* (Academic Press, Inc. 1990) Vol. 1, chap. 11. R. Karlsson, L. Jendeborg, B. Nilsson, J. Nilsson, P. Nygren (1995), *J. Immunol. 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もよい。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 W098/45331 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 (更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 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 (更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 W098/45331 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ぞ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VEGF Fabを含むハイブリッド分子のファージELISA分析

ファージELISA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IgG-Fcペプチドリガンドで標識した抗VEGF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III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M13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IgG、4D5-IgG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。XL-1ブルー大腸菌(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、pY0192-569、pY0192-570、pY0317-569、及びpY0317-570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

IgG-Fcペプチドリガンドで標識した抗VEGF FabへのIgG結合のピアコア(商品名)分析

無関係のIgG、ハーセプチン(登録商標)としても知られる4D5-IgGの、固定VEGFバイオセンサーチップに事前に結合させたFabに対する結合を測定するために、表面プラズモン共鳴器(ピアコア社、ピスカタウェイ、ニュージャージー)を用いた。

pY0317及びpY0317-570(それぞれコントロール抗VEGF高親和性のヒト化Fab、及びIgG-Fcペプチドリガンドドメインで標識した抗VEGF高親和性ヒト化Fab; 上掲の実施例2、及びW098/45331参照)によりコードされるFab変異体が大腸菌で発現させ、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VEGFを記述されるように(Muller等, 1998, 上掲)ピアコア(商品名)CM-5バイオセンサーチップ(ピアコア社)上に固定した。VEGF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Y0317-570 Fab、又はY0317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。Fab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Y0317 Fab以外への標識物に結合したことを示す。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Y0317-570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_{off} は30 nMから300 nM(k_{on} 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、ピアコア(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3 kg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数関数プロファイルに一致する。データを、標準的な2分画モデルによりボ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： $c(t) = Ae^{-\lambda_1 t} + Be^{-\lambda_2 t}$ 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、

λ_1 と λ_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のに対し、衰退曲線の第2又は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、 $A = D / V(1 - k_{12}) / (\lambda_1 - \lambda_2)$ 、 $B = D / V(\lambda_1 - k_{21}) / (\lambda_2 - \lambda_1)$ 、及び λ_1 及び λ_2 ($\lambda_1 > \lambda_2$)は次の二次方程式の平方根である： $V =$ 分布容積、 $k_{10} =$ 消失率、 $k_{12} =$ 分画1から分画2への移動率及び $k_{21} =$ 分画2から分画1への移動率を用いた $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ 、 $D =$ 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 - 3.0 kg)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 (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与量 (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	3	1 . 0 0
2	2 . 9	Fab-Y0317-5701	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50mMの炭酸バッファー、pH9.6で、4℃で一晩被覆し、さらに0.5%のウシ血清アルブミン、10ppmのプロクリン300(スペルコ社、Bellefonte, PA)含有PBS(8mMのNa₂HPO₄、1.5mMのKH₂PO₄、2.7mMのKCl及び137mMのNaCl、pH7.2)で室温で1時間遮断した。標準物(0.41-100ng/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5mM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、コストメサ、カリフォルニア州)の450nm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: 時間プロファイ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(LTR)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; 1mg/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 \pm 0.6	13 \pm 0.7
C L (mL/h/kg)	74.2 \pm 6.7	4.8 \pm 1.1
K 1 0 半減期 (hr)	0.6 \pm 0.02	11.3 \pm 3.6
半減期 (hr)	0.39 \pm 0.03	1.15 \pm 0.31
半減期 (hr)	1.93 \pm 0.27	37.6 \pm 19
V 1 (mL/kg)	64.1 \pm 2.37	75.2 \pm 4.23
V s s (mL/kg)	112 \pm 7.7	225 \pm 54

両方の薬剤の分布の初期量 (V 1) は血清量にほぼ等しかった。F a b - Y 0 3 1 7 - 5 7 0 (2 2 5 m L / k g) の分布の見かけの定常状態量は内因性 I g G への結合に十分な量を示すコントロール F a b (1 1 2 m L / k g) の予測よりも約 2 倍高かった。コントロール F a b - Y 0 3 1 7 は F a b - Y 0 3 1 7 - 5 7 0 (4 . 8 m L / h / d) に比較して血清から約 1 5 倍早く排除された (クリアランス = 7 4 m L / h / k g) 。 F a b - Y 0 3 1 7 - 5 7 0 の全体暴露 (A U C) は F a b - Y 0 3 1 7 のものよりも ~ 1 6 倍高かった。F a b - Y 0 3 1 7 は投与の 2 4 時間後血清で検出不可能であったが、F a b - Y 0 3 1 7 - 5 7 0 の血清濃度は依然として投与の 4 8 時間後 1 μ g / m L を超えていた。分布 () 半減期 (1 . 1 5 h) 及び消失 () 半減期 (3 7 . 6 h) は共にコントロール F a b よりも著しく長かった。

これらの結果は、内因性 I g G に結合する 1 3 のアミノ酸の F a b - Y 0 3 1 7 への付加が F a b 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 1 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 6 0

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 6 0】

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 C X₂ G P X₄ C (配列番号: 133)、X₄ C X₂ G P X₄ C X₄ (配列番号: 134) 及び X_i C X_j C X_k を含み、ここで j = 8 - 1 0 ; プール B は X₂₀ 及び X_i C X_j C X_k を含み、ここで j = 4 - 7 ; プール C は X₈ 及び X₂ C X_j C X₂ を含み、ここで j = 4 - 6 ; プール D は X₂ C X_j C X₂ を含み、ここで j = 7 - 1 0 ; プール E は C X₆ C X₆ C C X₃ C X₆ C (配列番号: 135)、C C X₃ C X₆ C (配列番号: 136)、C C X₅ C X₄ C X₄ C C (配列番号: 137)、C X C X₇ C X₃ C X₆ (配列番号: 138) を含み、ここで X は 2 0 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 = 1 8 及び | i - k | < 2 。1 0 のライブラリのそれぞれが 1 0 8 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 (P B S 、 1 % のオボアルブミン、0 . 0 0 5 % の T w e e n - 2 0) に懸濁し、maxisorp プレート (P B S 中 1 0 μ g / m l 、 4 で一晚; プレートはブロッカーカゼイン (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 (P B S 、 0 . 0 5 % の T w e e n - 2 0) を繰り返して取り除き、結合したファージを 5 0 0 m M の K C l 、 1 0 m M の H C l 、 p H 2 で溶出した。溶出したファージを V C S M 1 3 ヘルパーファージ (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて X L 1 - B l u e 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 (~ 1 0 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 / H ₂ O ₂ 基質を用いて 4 0 5 n m 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】0 0 6 1

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 6 1】

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ブラリを図 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 7 0 - 1 0 - 1 0 - 1 0 混合物で合成した。これらのライブラリの潜在的な多様性は当初の未処置のライブラリと同じであるが、各「ソフトランダム化」ライブラリは図 4 の選択配列に偏りを有する。各ライブラリは再びその起源に関係なくラット、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ブラリはラット、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ブ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ブ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】0 0 6 2

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 6 2】

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 X ₅ D X C L P X W G C L W X ₄ (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ブラリを構築した。N 及び C 末端の両方で 1 残基さらに短い、第 2 のライブラリも構築された。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ブ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 . 2 5 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 9 5 % のトリフルオロ酢酸 (T F A) と 5 % のトリイソプロピルシ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 T F A を含有する水 / アセトニトリル勾配を用いた逆相 H P L C によって精製した。ペプチドは分析用 H P L C 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 S A 0 8 のカルボキシ末端リシンを、N H S - L C - ピオチン (Poerke Chemical社, Rockford, IL) で誘導体化し、得られた S A 0 8 b を上述のように H P L C で精製した (Ac-QGLIGDICLPWGCLWGDSVK_b (配列番号: 124)-nここで K_b はリシン-ピオチンを表す)。

S A 0 8 結合アッセイ - ウサギ、ラット又はマウスアルブミンを P B S 中 10 μg / 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 10 nM の S A 0 8 b 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 P B S、0.05% の T w e e n 20 で洗浄し、アルブミンに結合した S A 0 8 b をストレプトアビジン / H R P で希釈した。H R P 結合量は、A B T S / H₂ O₂ 基質を用いて測定し、405 nm 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 S A 0 8 b 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 F a b 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、S A 0 6 の配列を結合組織因子 (T F) に対する F a b 断片 (D 3 H 4 4) に融合させた。S A 0 6 配列を F a b の軽鎖 (D 3 H 4 4 - L) 又は重鎖 (D 3 H 4 4 - L s) 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、D 3 H 4 4 - L s 及び D 3 H 4 4 - H s) 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、s t I I 分泌シグナルを用いて大腸菌から分泌させた。F a b 融合体を、1 mM の E D T A、10 mM の トリス - H C l、p H 8、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 T F F a b を H i - T r a p (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) T F 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 D 3 H 4 4 - L 又は D 3 H 4 4 - L s をウサギアルブミン親和性カラム (C N B r 活性化セファロース 4 B 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 P B S で洗浄し、50 mM の H C l で溶出した。溶出した分画を 1 M の トリス p H 8 で中和した。内毒素をトリトン X 114 (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。

F X 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 D 3 H 4 4 融合物は T F に結合する能力を保持していた。アルブミン結合配列 (W T) を欠く D 3 H 4 4 と異なり、D 3 H 4 4 - L 及び D 3 H 4 4 - L s は共に S A 0 8 b 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、D 3 H 4 4 アルブミン結合融合物は共に、ピオチン T F 結合アッセイ (図 15) で判断されるように、T F 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 D 3 H 4 4 融合物の結合は、ピオチニル化 T F で検出される。野生型 D 3 H 4 4 (W T) はアルブミン結合能力がなく、従って

ピオチニル化TFの添加でシグナルを発生しない。

D3H44アルブミン結合融合物の薬物動態 - D3H44変異体をウサギに0.5mg/kgボラスとして与えた。各グループは3羽のウサギ(Fab')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、TF結合ELISAを用いてD3H44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】0064

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0064】

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ァイルに従う。データをボラス投与での標準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又は相の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分野でよく知られている。例えば、 $A = D / V(1 - k_2 / k_1) / (k_1 - k_2)$ 、 $B = D / V(k_2 / k_1) / (k_1 - k_2)$ 、及び $(k_1 > k_2)$ 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、及び $D =$ 投与量を用いた $r^2 + (k_2 + k_3 + k_1)r + k_2 k_3 = 0$ 。

データ分析：時間プロファイ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(LTD)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。

アルブミン結合ペプチドのD3H44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)。D3H44-Lは野生型Fabに比較して70倍増加した半減期($k_1 - k_2$)及び20K又は40Kポリエチレングリコール(PEG)で誘導体化されたD3H44 Fab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。