

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6322652号
(P6322652)

(45) 発行日 平成30年5月9日 (2018.5.9)

(24) 登録日 平成30年4月13日 (2018.4.13)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00 Z N A

C O 7 K 14/195 (2006.01)

C O 7 K 14/195

C O 7 K 14/435 (2006.01)

C O 7 K 14/435

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

請求項の数 94 (全 135 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-551661 (P2015-551661)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月7日 (2013.1.7)
 (65) 公表番号 特表2016-508147 (P2016-508147A)
 (43) 公表日 平成28年3月17日 (2016.3.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/020602
 (87) 国際公開番号 W02014/107171
 (87) 国際公開日 平成26年7月10日 (2014.7.10)
 審査請求日 平成28年1月7日 (2016.1.7)

(73) 特許権者 515184754
 オムニオクス, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 70, サン カルロス, ショアウェイ
 75 スイート エー
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74) 代理人 230113332
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H-NOXタンパク質の重合体形態

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

3個のH-NOXドメインを含む三量体型H-NOXタンパク質であって、該3個のH-NOXドメインが、三量体形成ドメインに共有結合により連結しており、該H-NOXドメインが、1個または複数の遠位ポケット変異を含み、該H-NOXドメインが、*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOXドメイン、*L. pneumophila* 2 H-NOXドメイン、*Homo sapiens* β 1 H-NOXドメイン、*Rattus norvegicus* β 1 H-NOXドメイン、*Canis lupus* H-NOXドメイン、*Drosophila melanogaster* β 1 H-NOXドメイン、*D. melanogaster* CG14885-PA H-NOXドメイン、*Caenorhabditis elegans* GCY-35 H-NOXドメイン、*Nostoc punctiforme* H-NOXドメイン、*Caulobacter crescentus* H-NOXドメイン、*Shewanella oneidensis* H-NOXドメインまたは*Clostridium acetobutylicum* H-NOXドメインであり、該三量体H-NOXタンパク質が、グアニリルシクラーゼドメインを含まない、三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項2】

前記3個のH-NOXドメインが、同種H-NOXドメインである、請求項1に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 3】

単量体が会合して、前記三量体型H-NOXタンパク質を形成する、請求項1または2に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 4】

前記三量体形成ドメインが、バクテリオファージT4三量体形成ドメインである、請求項1から3のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 5】

前記三量体形成ドメインが、フォールドドメインである、請求項4に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 6】

前記フォールドドメインが、配列番号4のアミノ酸配列を含む、請求項5に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 7】

少なくとも1個のタグを含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 8】

前記H-NOXドメインが、*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOXドメインである、請求項1から7のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 9】

前記H-NOXドメインが、配列番号2に示される*T. tengcongensis*のH-NOXドメインに対し、少なくとも90%同一である、請求項1から8のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 10】

前記H-NOXドメインが、*T. tengcongensis* H-NOXドメインであり、該*T. tengcongensis* H-NOXドメインが、144位にアミノ酸置換を含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 11】

144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、請求項10に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 12】

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヒトヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い、請求項1から11のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 13】

前記三量体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において1nM~1000nMの間である、請求項1から12のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 14】

前記三量体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、20℃において700s⁻¹未満である、請求項1から13のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 15】

前記三量体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヒトヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い、請求項1から14のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 16】

前記三量体型H-NOXタンパク質の酸素に対するk_{off}が、20℃において0.65s⁻¹以下である、請求項1から15のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項 17】

前記三量体型H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度が、37℃において 1 h^{-1} 未満である、請求項1から16のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項18】

100kDaを超える、請求項1から17のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項19】

請求項1から18のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質であって、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後に、単一のH-NOXドメインを含む対応する単量体型H-NOXタンパク質と比較して、該哺乳動物における1種または複数の組織に優先的に蓄積する、三量体型H-NOXタンパク質。

10

【請求項20】

前記三量体型H-NOXの10%未満が、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後の3時間未満以内に、腎臓によって該哺乳動物から排除される、請求項19に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項21】

前記H-NOXタンパク質がペグ化されている、請求項1から20のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質。

【請求項22】

H-NOXドメインおよび三量体形成ドメインを含む組換えH-NOXタンパク質であって、該H-NOXドメインが、1個または複数の遠位ポケット変異を含み、該H-NOXドメインが、Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOXドメイン、L. pneumophila 2 H-NOXドメイン、Homo sapiens $\beta 1$ H-NOXドメイン、Rattus norvegicus $\beta 1$ H-NOXドメイン、Canis lupus H-NOXドメイン、Drosophila melanogaster $\beta 1$ H-NOXドメイン、D. melanogaster CG14885-PA H-NOXドメイン、Caenorhabditis elegans GCY-35 H-NOXドメイン、Nostoc punctiforme H-NOXドメイン、Caulobacter crescentus H-NOXドメイン、Shewanella oneidensis H-NOXドメインまたはClostridium acetobutylicum H-NOXドメインであり、該H-NOXタンパク質が、グアニリルシクラーゼドメインを含まない、組換えH-NOXタンパク質。

20

30

【請求項23】

前記H-NOXドメインが、前記三量体形成ドメインに共有結合により連結されている、請求項22に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項24】

前記三量体形成ドメインが、バクテリオファージT4 三量体形成ドメインである、請求項23に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項25】

前記三量体形成ドメインが、フォルドドメインである、請求項24に記載の組換えH-NOXタンパク質。

40

【請求項26】

前記フォルドドメインが、配列番号4を含む、請求項25に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項27】

タグを含む、請求項22から26のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項28】

前記H-NOXドメインが、Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOXドメインである、請求項22から27のいずれか一項に記載の

50

組換えH-NOXタンパク質。

【請求項29】

前記H-NOXドメインが、配列番号2に示されるT. tengcongensisのH-NOXドメインに対して、少なくとも90%同一である、請求項22から28のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項30】

前記遠位ポケット変異が、T. tengcongensis H-NOXのL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である、請求項22から29のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項31】

144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、請求項30に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項32】

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヒトヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い、請求項22から31のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項33】

前記組換えH-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において1nM~1000nMの間である、請求項22から32のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項34】

前記組換えH-NOXタンパク質のNO反応性が、20℃において700s⁻¹未満である、請求項22から33のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項35】

前記組換えH-NOXタンパク質のNO反応性が、ヒトヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い、請求項22から34のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項36】

前記組換えH-NOXタンパク質の酸素に対するk_{off}が、20℃において0.65s⁻¹以下である、請求項22から35のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項37】

前記組換えH-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度が、37℃において1h⁻¹未満である、請求項22から36のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項38】

前記H-NOXタンパク質がペグ化されている、請求項22~37のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

【請求項39】

三量体形成ドメインに共有結合により連結した3個のH-NOXドメインを含む三量体型H-NOXタンパク質を含む医薬組成物であって、

該H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヒトヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低く、該三量体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において1nM~1000nMの間であり、

該H-NOXドメインが、1個または複数の遠位ポケット変異を含み、該H-NOXドメインが、Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOXドメイン、L. pneumophila 2 H-NOXドメイン、Homo sapiens β1 H-NOXドメイン、Rattus norvegicus β1 H-NOXドメイン、Canis lupus H-NOXドメイン、Drosophila melanogaster β1 H-NOXドメイン、D. melanogaster CG14885-PA H-NOXドメイン、Caenorhabditis el

10

20

30

40

50

e g a n s G C Y - 3 5 H - N O X ドメイン、N o s t o c p u n c t i f o r m e H - N O X ドメイン、C a u l o b a c t e r c r e s c e n t u s H - N O X ドメイン、S h e w a n e l l a o n e i d e n s i s H - N O X ドメインまたは C l o s t r i d i u m a c e t o b u t y l i c u m H - N O X ドメインである、医薬組成物。

【請求項 4 0】

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項 3 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 1】

脳がんを有する個体における脳腫瘍へと O_2 を送達するための組成物であって、有効量の三量体型 H - N O X タンパク質を含み、

該三量体型 H - N O X タンパク質が、三量体形成ドメインに共有結合により連結した 3 個の H - N O X ドメインを含み、

該 H - N O X タンパク質の N O 反応性が、ヒトヘモグロビンの N O 反応性よりも少なくとも 1 0 倍低く、該三量体型 H - N O X タンパク質の O_2 解離定数が、2 0 °C において 1 n M ~ 1 0 0 0 n M の間であり、

該 H - N O X ドメインが、1 個または複数の遠位ポケット変異を含み、該 H - N O X ドメインが、T h e r m o a n a e r o b a c t e r t e n g c o n g e n s i s H - N O X ドメイン、L . p n e u m o p h i l i a 2 H - N O X ドメイン、H o m o s a p i e n s β 1 H - N O X ドメイン、R a t t u s n o r v e g i c u s β 1 H - N O X ドメイン、C a n i s l u p u s H - N O X ドメイン、D r o s o p h i l a m e l a n g a s t e r β 1 H - N O X ドメイン、D . m e l a n g a s t e r C G 1 4 8 8 5 - P A H - N O X ドメイン、C a e n o r h a b d i s e l e g a n s G C Y - 3 5 H - N O X ドメイン、N o s t o c p u n c t i f o r m e H - N O X ドメイン、C a u l o b a c t e r c r e s c e n t u s H - N O X ドメイン、S h e w a n e l l a o n e i d e n s i s H - N O X ドメインまたは C l o s t r i d i u m a c e t o b u t y l i c u m H - N O X ドメインであり、

該組成物が、該個体に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 4 2】

前記組成物が、前記 H - N O X タンパク質の投与のために製剤化され、放射線療法または化学療法と組み合わせて使用される、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記放射線が、X 線照射である、請求項 4 2 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記脳がんが神経膠芽腫である、請求項 4 1 から 4 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 5】

前記 H - N O X タンパク質の組成物が、放射線および別の療法と共に使用するために製剤化される、請求項 4 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記三量体型 H - N O X タンパク質が、三量体型の T . t e n g c o n g e n s i s H - N O X である、請求項 4 1 から 4 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 7】

前記三量体型 H - N O X タンパク質が、配列番号 2 に示される T . t e n g c o n g e n s i s の H - N O X ドメインに対し、少なくとも 9 0 % 同一である H - N O X ドメインを含む、請求項 4 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 8】

前記 H - N O X が、1 4 4 位にアミノ酸置換を含む T . t e n g c o n g e n s i s H - N O X である、請求項 4 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 9】

1 4 4 位における前記アミノ酸置換が、L 1 4 4 F 置換である、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 50】

前記三量体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、20℃において700 s⁻¹未満である、請求項41から49のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 51】

前記三量体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヒトヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い、請求項41から50のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 52】

前記三量体型H-NOXタンパク質の酸素に対するk_{off}が、20℃において0.6 s⁻¹以下である、請求項41から51のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 53】

前記三量体型H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度が、37℃において1 h⁻¹未満である、請求項41から52のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 54】

酸素の送達を必要とする個体へと酸素を送達するための組成物であって、有効量の三量体型H-NOXタンパク質を含む組成物であって、

該三量体型H-NOXタンパク質が、三量体形成ドメインに共有結合により連結した3個のH-NOXドメインを含み、

該H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヒトヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低く、該三量体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において1 nM~1000 nMの間であり、

該H-NOXドメインが、1個または複数の遠位ポケット変異を含み、該H-NOXドメインが、*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOXドメイン、*L. pneumophila* 2 H-NOXドメイン、*Homo sapiens* β1 H-NOXドメイン、*Rattus norvegicus* β1 H-NOXドメイン、*Canis lupus* H-NOXドメイン、*Drosophila melanogaster* β1 H-NOXドメイン、*D. melanogaster* CG14885-PA H-NOXドメイン、*Caenorhabditis elegans* GCY-35 H-NOXドメイン、*Nostoc punctiforme* H-NOXドメイン、*Caulobacter crescentus* H-NOXドメイン、*Shewanella oneidensis* H-NOXドメインまたは*Clostridium acetobutylicum* H-NOXドメインである、組成物。

【請求項 55】

がんの処置を必要とする個体におけるがんを処置するための組成物であって、有効量の三量体型H-NOXタンパク質を含み、該組成物が、有効量の放射線と組み合わせて該個体に投与されることを特徴とし、

該三量体型H-NOXタンパク質が、三量体形成ドメインに共有結合により連結した3個のH-NOXドメインを含み、

該H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヒトヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低く、該三量体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において1 nM~1000 nMの間であり、

該H-NOXドメインが、1個または複数の遠位ポケット変異を含み、該H-NOXドメインが、*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOXドメイン、*L. pneumophila* 2 H-NOXドメイン、*Homo sapiens* β1 H-NOXドメイン、*Rattus norvegicus* β1 H-NOXドメイン、*Canis lupus* H-NOXドメイン、*Drosophila melanogaster* β1 H-NOXドメイン、*D. melanogaster* CG14885-PA H-NOXドメイン、*Caenorhabditis elegans* GCY-35 H-NOXドメイン、*Nostoc punctiforme* H-NOXドメイン、*Caulobacter crescentus* H-NOX

10

20

30

40

50

ドメイン、Shewanella oneidensis H-NOXドメインまたはClostridium acetobutylicum H-NOXドメインである、組成物。

【請求項56】

腫瘍成長の低下を必要とする個体における腫瘍成長を低下させるための組成物であって、有効量の三量体型H-NOXタンパク質を含み、該組成物が、有効量の放射線と共に該個体に投与されることを特徴とし、

該三量体型H-NOXタンパク質が、三量体形成ドメインに共有結合により連結した3個のH-NOXドメインを含み、

該H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヒトヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低く、該三量体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において1nM～1000nMの間であり、

該H-NOXドメインが、1個または複数の遠位ポケット変異を含み、該H-NOXドメインが、Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOXドメイン、L. pneumophila 2 H-NOXドメイン、Homo sapiens β 1 H-NOXドメイン、Rattus norvegicus β 1 H-NOXドメイン、Canis lupus H-NOXドメイン、Drosophila melanogaster β 1 H-NOXドメイン、D. melanogaster CG14885-PA H-NOXドメイン、Caenorhabditis elegans GCY-35 H-NOXドメイン、Nostoc punctiforme H-NOXドメイン、Caulobacter crescentus H-NOXドメイン、Shewanella oneidensis H-NOXドメインまたはClostridium acetobutylicum H-NOXドメインである、組成物。

【請求項57】

前記放射線が、X線照射である、請求項55から56のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項58】

がんが脳がんである、請求項55から57のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項59】

前記H-NOXタンパク質が、別の療法と組み合わせて放射線と共に使用するために製剤化される、請求項55から58のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項60】

前記三量体形成ドメインが、バクテリオファージT4三量体形成ドメインである、請求項54から59のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項61】

前記三量体形成ドメインが、フォールドドメインである、請求項60に記載の組成物。

【請求項62】

前記フォールドドメインが、配列番号4のアミノ酸配列を含む、請求項61に記載の組成物。

【請求項63】

タグが、前記三量体形成ドメインのC末端に共有結合により連結されている、請求項60から62のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項64】

前記H-NOXドメインが、T. tengcongensis H-NOXドメインである、請求項54から63のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項65】

前記H-NOXドメインが、配列番号2に示されるT. tengcongensisのH-NOXドメインに対して、少なくとも90%同一である、請求項54から64のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項66】

10

20

30

40

50

前記H-NOXドメインが、144位にアミノ酸置換を含むT. tengcongensis H-NOXドメインである、請求項54から65のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項67】

144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、請求項66に記載の組成物。

【請求項68】

前記三量体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、20℃において 700 s^{-1} 未満である、請求項54から67のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項69】

前記三量体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヒトヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い、請求項54から68のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項70】

前記三量体型H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において 0.65 s^{-1} 以下である、請求項54から69のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項71】

前記三量体型H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度が、37℃において 1 h^{-1} 未満である、請求項54から70のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項72】

前記三量体型H-NOXタンパク質が、100kDaを超える、請求項54から71のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項73】

前記三量体型H-NOXタンパク質が、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後に、単一のH-NOXドメインを含む対応する単量体型H-NOXタンパク質と比較して、該哺乳動物における1種または複数の組織に優先的に蓄積する、請求項54から72のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項74】

前記H-NOXタンパク質がペグ化されている、請求項54から73のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項75】

請求項1から21のいずれか一項に記載の三量体型H-NOXタンパク質をコードする組換え核酸。

【請求項76】

請求項75に記載の核酸を含むベクター。

【請求項77】

請求項75に記載の核酸または請求項76に記載のベクターを含む細胞。

【請求項78】

三量体型H-NOXタンパク質を産生する方法であって、該三量体型H-NOXタンパク質の産生に適した条件下で、請求項77に記載の細胞を培養するステップを含む方法。

【請求項79】

前記H-NOXタンパク質を精製するステップをさらに含む、請求項78に記載の方法。

【請求項80】

請求項22から38のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質をコードする組換え核酸。

【請求項81】

請求項80に記載の核酸を含むベクター。

【請求項82】

請求項80に記載の核酸または請求項81に記載のベクターを含む細胞。

【請求項83】

10

20

30

40

50

三量体型H-N O Xタンパク質を産生する方法であって、請求項8 2に記載の細胞を、該細胞の前記組換えH-N O Xタンパク質が発現され、会合して三量体型H-N O Xタンパク質を形成する条件下で、培養するステップを含む方法。

【請求項 8 4】

前記三量体型H-N O Xタンパク質を精製するステップをさらに含む、請求項8 3に記載の方法。

【請求項 8 5】

請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の三量体型H-N O Xタンパク質を含むキット。

【請求項 8 6】

請求項 2 2 から 3 8 のいずれか一項に記載の組換えH-N O Xタンパク質を含むキット。

【請求項 8 7】

使用のための指示を含む、請求項8 5または8 6に記載のキット。

【請求項 8 8】

請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の三量体型H-N O Xタンパク質を含む製造品。

【請求項 8 9】

H-N O Xタンパク質およびバッグを含む、請求項8 8に記載の製造品。

【請求項 9 0】

前記バッグがI Vバッグである、請求項8 9に記載の製造品。

【請求項 9 1】

前記三量体型H-N O Xタンパク質が、O₂の送達を必要とする個体へとO₂を送達するためのものである、請求項8 9または9 0に記載の製造品。

【請求項 9 2】

前記個体が脳腫瘍を有する、請求項9 1に記載の製造品。

【請求項 9 3】

前記脳腫瘍が神経膠芽腫である、請求項9 2に記載の製造品。

【請求項 9 4】

前記三量体型H-N O Xタンパク質が、放射線療法と併せて使用される、請求項9 3に記載の製造品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、助成金番号2 R 4 4 C A 1 3 8 0 0 6 - 0 2 によって支援された。米国政府は、本願に関わる任意の特許における権利を有する。

【0 0 0 2】

本願は、重合体型H-N O Xタンパク質およびこれを使用して酸素を送達する方法に関する。重合体型H-N O Xタンパク質は、O₂をヒトに、獣医学目的では動物に送達するための新たな治療ツールを提供する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

H-N O Xタンパク質（ヘム—酸化窒素および酸素（Heme-Nitric oxide and OXygen）結合ドメインにちなみ命名）は、ヘムタンパク質の高度に保存され十分に特徴付けされたファミリーのメンバーである（Iyer, LMら（2003年）BMC Genomics 4巻（1号）：5頁；Karow, DSら（2004年）Biochemistry 43巻（31号）：10203～10211頁；Boon, EMら（2005年）Nature Chem. Biol. 1巻：53～59頁；Boon, EMら（2005年）Curr. Opin. Chem. Bi

10

20

30

40

50

ol. 9巻(5号): 441~446頁; Boon, EMら(2005年) J. Inorg. Biochem. 99巻(4号): 892~902頁; Cary, SPら(2005年) Proc Natl Acad Sci USA 102巻(37号): 13064~9頁; Karow DSら(2005年) Biochemistry 44巻(49号): 16266~74頁; Cary, SPら(2006年) Trends Biochem Sci 31巻(4号): 231~9頁; Boon, EMら(2006年) J Biol Chem 281巻(31号): 21892~902頁; Winger, JAら(2007年) J Biol Chem. 282巻(2号): 897~907頁)。H-NOXタンパク質は、以前のヘモグロビンに基づく酸素キャリアとは異なり一酸化窒素にニュートラル(neutral)であり、H-NOXは循環一酸化窒素をスキベンジせず、よって、高血圧性または腎性の副作用を伴わない。内在性NOによるH-NOXタンパク質の不活性化の確率がより低く、H-NOXタンパク質により内在性NOをスキベンジする確率がより低いことによる内因性低NO反応性(および高NO安定性)は、野生型および変異体H-NOXタンパク質を望ましい代用血液とする。重要なことに、一部のH-NOXタンパク質における遠位ポケットチロシンの存在(Pelliena, P.ら(2004年) Proc Natl. Acad Sci USA 101巻(35号): 12854~12859頁)は、望ましくない高NO反応性を示唆し、代用血液としての使用を禁忌とする。例えば、類推により、構造的に類似の遠位ポケットチロシンを有するMycobacterium tuberculosisヘモグロビンタンパク質は、NOと極度に迅速に反応し、感染宿主によって産生される防御的NOを効果的にスキベンジおよび回避するためにMycobacteriumによって使用される(Ouellet, H.ら(2002年) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99巻(9号): 5902~5907頁)。しかし、驚くべきことに、H-NOXタンパク質が、実際にはヘモグロビンのNO反応性よりもはるかに低いNO反応性を有することが発見され、代用血液としてのその使用を可能にする。

【0004】

NOに結合するがO₂に結合しないH-NOXタンパク質が、単一アミノ酸変異の導入により、NOおよびO₂の両方に結合するH-NOXタンパク質へと変換され得ることが発見された(WO2007/139791およびWO2007/139767を参照)。よって、O₂およびNOに対するH-NOXタンパク質の親和性ならびにO₂およびNOリガンドの間を識別するH-NOXタンパク質の能力は、1個または複数のアミノ酸変異を導入することにより変更され得、所望の親和性でO₂またはNOに結合するようH-NOXタンパク質を調整することができる。O₂および/またはNOに対する親和性をさらに変更するために、追加の変異が導入され得る。したがって、H-NOXタンパク質ファミリーを操作して、O₂送達に関して改善されたまたは最適な動力学的特性および熱力学的特性を示させることができる。例えば、種々の臨床および産業上の利用に対するH-NOXタンパク質の有用性を改善する、O₂結合の解離定数および/または解離速度(off rate)が変更された変異体H-NOXタンパク質が作製された。O₂に結合し送達するようH-NOXタンパク質を調整する能力は、現在のO₂キャリアの中心的な弱点に取り組みこれを克服する治療手段である。

【0005】

H-NOXタンパク質は、サイズが相対的に小さく、腎臓を通して濾過され、短い循環半減期を生じ得る。ある特定の治療用途に必要とされるのは、十分な期間O₂および/またはNOに結合し遠位組織へとO₂および/またはNOを送達することができる、より長い循環半減期を有するH-NOXである。より長い循環半減期を有する重合体型H-NOXタンパク質が本明細書に提供される。その上、H-NOXタンパク質は、腫瘍へと血管外遊出し、そこで異なる速度で蓄積する。重合体型H-NOXタンパク質は、腫瘍の正常酸素圧領域を通して酸素を輸送し、腫瘍内の低酸素ゾーンの深部で酸素を放出するよう調整される。このような特色の組合せは、腫瘍細胞の酸素化に依存する放射線療法、化学療法および他の抗がん処置の有効性を増加させるための、腫瘍の低酸素ニッチのモディファ

イヤーとしての酸素キャリアの使用における有意な前進を表す。

【0006】

特許出願および刊行物を含む、本明細書に引用されている全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2007/139791号

【特許文献2】国際公開第2007/139767号

【非特許文献】

10

【0008】

【非特許文献1】Iyer, LMら(2003年) BMC Genomics 4巻(1号): 5頁

【非特許文献2】Karrow, DSら(2004年) Biochemistry 43巻(31号): 10203~10211頁

【非特許文献3】Boon, EMら(2005年) Nature Chem. Biol. 1巻: 53~59頁

【非特許文献4】Boon, EMら(2005年) Curr. Opin. Chem. Biol. 9巻(5号): 441~446頁

【非特許文献5】Boon, EMら(2005年) J. Inorg. Biochem. 99巻(4号): 892~902頁

20

【非特許文献6】Cary, SPら(2005年) Proc Natl Acad Sci USA 102巻(37号): 13064~9頁

【非特許文献7】Karrow DSら(2005年) Biochemistry 44巻(49号): 16266~74頁

【非特許文献8】Cary, SPら(2006年) Trends Biochem Sci 31巻(4号): 231~9頁

【非特許文献9】Boon, EMら(2006年) J Biol Chem 281巻(31号): 21892~902頁

【非特許文献10】Winger, JAら(2007年) J Biol Chem. 282巻(2号): 897~907頁

30

【非特許文献11】Pelllicena, P.ら(2004年) Proc Natl. Acad Sci USA 101巻(35号): 12854~12859頁

【非特許文献12】Ouellet, H.ら(2002年) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99巻(9号): 5902~5907頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

一部の態様において、本発明は、2個以上のH-NOXドメインを含む重合体型H-NOXタンパク質を提供する。一部の実施形態において、2個以上のH-NOXドメインは、同種H-NOXドメインである。他の実施形態において、H-NOXドメインは、異種H-NOXドメインである。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、二量体、三量体、四量体または五量体である。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、共有結合により連結されている。

40

【0010】

本発明の一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、単量体を含み、該単量体が、H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、重合ドメインに共有結合により連結されている。一部の実施形態において、H-NOXドメインのC末端は、重合ドメインに共有結合により連結されている。他の実施形態において、H-NOXドメインのN末端は、重合ドメインに共有結合に

50

より連結されている。一部の実施形態において、単量体が会合して、重合体型H-NOXタンパク質を形成する。

【0011】

本発明の一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、三量体型H-NOXタンパク質である。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質は、1個または複数の三量体形成ドメイン (trimerization domain) を含む。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質は、3個の単量体を含み、該単量体は、H-NOXドメインおよび三量体形成ドメインを含む。一部の実施形態において、三量体形成ドメインは、バクテリオファージT4三量体形成ドメインである。一部の実施形態において、三量体形成ドメインは、フォルドン (foldon) ドメインである。一部の実施形態において、フォルドンドメインは、配列番号4のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、三量体形成ドメインに共有結合により連結されている。一部の実施形態において、H-NOXドメインのC末端は、三量体形成ドメインのN末端に共有結合により連結されている。他の実施形態において、H-NOXドメインのN末端は、三量体形成ドメインのN末端に共有結合により連結されている。

10

【0012】

上述の実施形態のうちいずれかの一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、グアニリルシクラーゼドメインを含まない。

【0013】

上述の実施形態のうち一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、少なくとも1個のタグを含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、少なくとも1個のHis₆タグを含む。

20

【0014】

上述の実施形態のうちいずれかの一部の実施形態において、アミノ酸リンカーは、H-NOXドメインおよび／または重合ドメインおよび／またはタグの間に位置する。一部の実施形態において、アミノ酸リンカーは、Gly-Ser-Gly配列またはArg-Gly-Ser配列である。

【0015】

上述の実施形態のうちいずれかの一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOXドメイン、L. pneumophila 2 H-NOXドメイン、Homo sapiens β1 H-NOXドメイン、Canis lupus H-NOXドメイン、Rattus norvegicus β1 H-NOXドメイン、Drosophila melanogaster β1 H-NOXドメイン、D. melanogaster CG14885-PA H-NOXドメイン、Caenorhabditis elegans GCY-35 H-NOXドメイン、Nostoc punctiforme H-NOXドメイン、Caulobacter crescentus H-NOXドメイン、Shewanella oneidensis H-NOXドメインまたはClostridium acetobutylicum H-NOXドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、配列番号2に示されるT. tengcongensisのH-NOXドメインに対応する。

30

40

【0016】

上述の実施形態のうちいずれかの一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、1個または複数の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、遠位ポケット変異は、T. tengcongensis H-NOXのL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である。一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、144位にアミノ酸置換を含む。一部の実施形態において、144位におけるアミノ酸置換は、L144F置換である。一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくと

50

も2個は、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも2個は、144位にアミノ酸置換を含む。一部の実施形態において、144位におけるT. tengcongensisのうち少なくとも1個のアミノ酸置換が、L144F置換である。一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、少なくとも2個の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、少なくとも2個の遠位ポケット変異は、T. tengcongensis H-NOXのW9およびL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である。一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、9位および144位にアミノ酸置換を含む。一部の実施形態において、9位におけるアミノ酸置換は、W9F置換であり、144位におけるアミノ酸置換は、L144F置換である。

10

【0017】

一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、T. tengcongensisの野生型H-NOXドメインを3個含み、該H-NOXドメインのそれぞれは、そのC末端において、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカーによって、T4バクテリオファージフォールドドメインのN末端に共有結合により連結されている。一部の実施形態において、His6タグが、Arg-Gly-Serアミノ酸リンカーを介して、フォールドドメインのC末端に連結されている。

【0018】

20

一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、T. tengcongensisのL144F H-NOXドメインを3個含み、該H-NOXドメインのそれぞれは、そのC末端において、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカーによって、T4バクテリオファージフォールドドメインのN末端に共有結合により連結されている。一部の実施形態において、His6タグが、Arg-Gly-Serアミノ酸リンカーを介して、フォールドドメインのC末端に連結されている。

【0019】

上述の実施形態のうちいずれかの一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、ヘモグロビンの O_2 解離定数の2桁以内であり、該H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、20℃において約1nM～約1000nMの間である。他の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、20℃において約1μM～約10μMの間である。さらに他の実施形態において、H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、20℃において約10μM～約50μMの間である。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃において約700s⁻¹未満である。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い。さらなる実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも1,000倍低い。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} は、20℃において約0.65s⁻¹以下である。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} は、20℃において約0.21s⁻¹～約0.65s⁻¹の間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} は、20℃において約1.35s⁻¹～約2.9s⁻¹の間である。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度は、37℃において約1h⁻¹未満である。

30

40

【0020】

上述の実施形態のうち一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、50kDaを超える、100kDaを超える、または150kDaを超える。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後に、単一のH-NOXドメインを含む対応する単量体型H-NOXタンパク

50

質と比較して、該哺乳動物における1種または複数の組織に優先的に蓄積する。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後に、該哺乳動物に1、2、3、4、6、12または24時間にわたって存続する。一部の実施形態において、重合体型H-NOXの10%未満は、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後の約1時間、2時間または3時間未満以内に、腎臓によって該哺乳動物から排除される。

【0021】

一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号26または配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0022】

一部の態様において、本発明は、H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む組換えH-NOXタンパク質を提供する。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、重合ドメインに共有結合により連結されている。一部の実施形態において、H-NOXドメインのC末端は、重合ドメインに連結されている。他の実施形態において、H-NOXドメインのN末端は、重合ドメインに連結されている。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、重合ドメインのN末端に連結されている。他の一部の実施形態において、H-NOXドメインは、重合ドメインのC末端に連結されている。一部の実施形態において、重合ドメインは、三量体形成ドメインである。さらなる実施形態において、三量体形成ドメインは、バクテリオファージT4三量体形成ドメインである。なおさらなる実施形態において、三量体形成ドメインは、フォールドドメインである。一部の実施形態において、フォールドドメインは、配列番号4を含む。

20

【0023】

上述の実施形態のうち一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質は、グアニリルシクラーゼドメインを含まない。

【0024】

上述の実施形態のうち一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質は、タグを含む。一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質は、His₆タグを含む。

【0025】

上述の態様の一部の実施形態において、アミノ酸リンカーは、H-NOXドメインおよび／または重合ドメインおよび／またはタグの間に位置する。一部の実施形態において、アミノ酸リンカーは、Gly-Ser-Gly配列またはArg-Gly-Ser配列である。

30

【0026】

上述の実施形態のうち一部の実施形態において、H-NOXドメインは、Thermoplasma acidophilum H-NOXドメイン、L. pneumophila 2 H-NOXドメイン、Homo sapiens β1 H-NOXドメイン、Canis lupus H-NOXドメイン、Rattus norvegicus β1 H-NOXドメイン、Drosophila melanogaster β1 H-NOXドメイン、D. melanogaster CG14885-PA H-NOXドメイン、Caenorhabditis elegans GCY-35 H-NOXドメイン、Nostoc punctiforme H-NOXドメイン、Caulobacter crescentus H-NOXドメイン、Shewanella oneidensis H-NOXドメインまたはClostridium acetobutylicum H-NOXドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、配列番号2に示されるT. tengcongensisのH-NOXドメインに対応する。

40

【0027】

上述の実施形態のうち一部の実施形態において、H-NOXドメインは、1個または複

50

数の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、遠位ポケット変異は、T. tengcongensis H-NOXのL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である。一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、144位にアミノ酸置換を含む。一部の実施形態において、144位におけるアミノ酸置換は、L144F置換である。一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、少なくとも2個の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、少なくとも2個の遠位ポケット変異は、T. tengcongensis H-NOXのW9およびL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である。一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、9位および144位にアミノ酸置換を含む。一部の実施形態において、9位におけるアミノ酸置換は、W9F置換であり、144位におけるアミノ酸置換は、L144F置換である。

10

【0028】

一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質は、そのC末端においてGly-Ser-Glyアミノ酸リンカーによってT4バクテリオファージフォールドドメインのN末端に共有結合により連結された、T. tengcongensisの野生型H-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、His₆タグが、Arg-Gly-Serアミノ酸リンカーを介して、フォールドドメインのC末端に連結される。

20

【0029】

一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質は、そのC末端においてGly-Ser-Glyアミノ酸リンカーによってT4バクテリオファージフォールドドメインのN末端に共有結合により連結された、T. tengcongensisのL144F H-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、His₆タグが、Arg-Gly-Serアミノ酸リンカーを介して、フォールドドメインのC末端に連結される。

【0030】

上述の実施形態のうち一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質のO₂解離定数は、ヘモグロビンのO₂解離定数の2桁以内であり、該H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い。一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質のO₂解離定数は、20℃において約1nM～約1000nMの間である。他の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質のO₂解離定数は、20℃において約1μM～約10μMの間である。さらに他の実施形態において、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、20℃において約10μM～約50μMの間である。一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃において約700s⁻¹未満である。一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い。さらなる実施形態において、組換えH-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも1,000倍低い。一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質の酸素に対するk_{off}は、20℃において約0.65s⁻¹以下である。一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質の酸素に対するk_{off}は、20℃において約0.21s⁻¹～約0.65s⁻¹の間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の酸素に対するk_{off}は、20℃において約1.35s⁻¹～約2.9s⁻¹の間である。一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度は、37℃において約1h⁻¹未満である。

30

40

【0031】

上述の態様の一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号26または配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む。

【0032】

50

一部の態様において、本発明は、2個以上のH-NOXドメインを含む重合体型H-NOXタンパク質を含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態において、医薬組成物は、上述の実施形態のうちいずれか1種の重合体型H-NOXタンパク質を含む。一部の実施形態において、医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む。一部の実施形態において、医薬組成物は滅菌されている。一部の実施形態において、医薬組成物は、エンドトキシンを本質的に含まない。一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号26または配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む。

【0033】

一部の実施形態において、医薬組成物は、*T. tengcongensis*の野生型H-NOXドメインを3個含む重合体型H-NOXタンパク質を含み、該H-NOXドメインのそれぞれは、そのC末端において、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカーによって、T4バクテリオファージフォールドドメインのN末端に共有結合により連結されている。一部の実施形態において、His6タグが、Arg-Gly-Serアミノ酸リンカーを介して、フォールドドメインのC末端に連結されている。

10

【0034】

一部の実施形態において、医薬組成物は、*T. tengcongensis*のL144F H-NOXドメインを3個含む重合体型H-NOXタンパク質を含み、該H-NOXドメインのそれぞれは、そのC末端において、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカーによって、T4バクテリオファージフォールドドメインのN末端に共有結合により連結されている。一部の実施形態において、His6タグが、Arg-Gly-Serアミノ酸リンカーを介して、フォールドドメインのC末端に連結されている。

20

【0035】

一部の態様において、本発明は、H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む組換えH-NOXタンパク質を含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態において、医薬組成物は、上述の実施形態のうちいずれか1種のH-NOXドメインおよび重合ドメインを含む組換えH-NOXタンパク質を含む。一部の実施形態において、医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む。一部の実施形態において、医薬組成物は滅菌されている。一部の実施形態において、医薬組成物は、エンドトキシンを本質的に含まない。一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号26または配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む。

30

【0036】

一部の態様において、本発明は、脳がんを有する個体における脳腫瘍へとO₂を送達する方法であって、有効量のH-NOXタンパク質を該個体に投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の投与は、放射線療法または化学療法と組み合わせて使用される。

【0037】

一部の態様において、本発明は、脳がんを有する個体における脳がんを処置する方法であって、有効量のH-NOXタンパク質を該個体に投与するステップと、有効量の放射線を該個体に投与するステップとを含む方法を提供する。

40

【0038】

一部の態様において、本発明は、脳がんを有する個体における脳腫瘍成長を低下させる方法であって、有効量のH-NOXタンパク質を該個体に投与するステップと、有効量の放射線を該個体に投与するステップとを含む方法を提供する。

【0039】

上述の態様の一部の実施形態において、放射線または化学療法は、H-NOXが投与されてから1、2、3、4、5または6時間後に上記個体に投与される。一部の実施形態において、放射線は、X線照射である。一部の実施形態において、X線照射は、約0.5グレイ～約75グレイで投与される。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の投

50

とおよび／または放射線の投与は反復される。一部の実施形態において、投与は、2、3または4回反復される。一部の実施形態において、投与は、1週間、2週間、3週間または4週間後に反復される。

【0040】

上述の態様の一部の実施形態において、脳がんは神経膠芽腫である。一部の実施形態において、個体は哺乳動物である。一部の実施形態において、哺乳動物はヒトである。他の実施形態において、哺乳動物は、ペット、実験研究用動物または家畜である。さらなる実施形態において、ペット、研究用動物または家畜は、イヌ、ネコ、ウマ、サル、ウサギ、ラット、マウス、モルモット、ハムスター、ブタまたはウシである。

【0041】

上述の態様の一部の実施形態において、H-NOXタンパク質および放射線の投与は、別の療法と組み合わせて使用される。

【0042】

上述の態様の一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、*T. tengcongensis* H-NOX、*L. pneumophila* 2 H-NOX、*H. sapiens* β 1、*R. norvegicus* β 1、*D. melangaster* β 1、*D. melangaster* CG1485-PA、*C. elegans* GCY-35、*N. punctiforme* H-NOX、*C. crescentus* H-NOX、*S. oneidensis* H-NOXまたは*C. acetobutylicum*

H-NOXである。一部の態様において、H-NOXタンパク質は、配列番号2に示される*T. tengcongensis*のH-NOXドメインに対応するH-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、H-NOXは、1個または複数の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、遠位ポケット変異は、*T. tengcongensis* H-NOXのL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である。一部の実施形態において、H-NOXは、144位にアミノ酸置換を含む*T. tengcongensis* H-NOXである。一部の実施形態において、144位におけるアミノ酸置換は、L144F置換である。一部の実施形態において、H-NOXは、少なくとも2個の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、少なくとも2個の遠位ポケット変異は、*T. tengcongensis* H-NOXのW9およびL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である。一部の実施形態において、H-NOXは、9位および144位にアミノ酸置換を含む*T. tengcongensis* H-NOXである。一部の実施形態において、9位におけるアミノ酸置換は、W9F置換であり、144位におけるアミノ酸置換は、L144F置換である。

【0043】

上述の態様の一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、グアニリルシクラーゼドメインを含まない。

【0044】

上述の態様の一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、タグを含む。一部の態様において、タグは、His₆タグである。

【0045】

上述の態様の一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、ヘモグロビンのO₂解離定数の2桁以内であり、該H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、20℃において約1nM～約1000nMの間である。他の実施形態において、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、20℃において約1μM～約10μMの間である。さらに他の実施形態において、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、20℃において約10μM～約50μMの間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃において約700s⁻¹未満である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い。さらなる実施形態において、H-NOX

10

20

30

40

50

タンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも1,000倍低い。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} は、20℃において約 0.65 s^{-1} 以下である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} は、20℃において約 0.21 s^{-1} ～約 0.65 s^{-1} の間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} は、20℃において約 1.35 s^{-1} ～約 2.9 s^{-1} の間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度は、37℃において約 1 h^{-1} 未満である。

【0046】

一部の態様において、本発明は、酸素の送達を必要とする個体へと酸素を送達する方法であって、該個体に有効量の重合体型H-NOXタンパク質を投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の投与は、放射線療法または化学療法と組み合わせて使用される。

10

【0047】

一部の態様において、本発明は、がんの処置を必要とする個体におけるがんを処置する方法であって、有効量の重合体型H-NOXタンパク質を該個体に投与するステップと、有効量の放射線を該個体に投与するステップとを含む方法を提供する。

【0048】

一部の態様において、本発明は、腫瘍成長の低下を必要とする個体における腫瘍成長を低下させる方法であって、有効量のH-NOXタンパク質を該個体に投与するステップと、有効量の放射線を該個体に投与するステップとを含む方法を提供する。

20

【0049】

上述の態様の一部の実施形態において、放射線または化学療法は、H-NOXが投与されてから1、2、3、4、5または6時間後に上記個体に投与される。一部の実施形態において、放射線は、X線照射である。一部の実施形態において、X線照射は、約0.5グレイ～約75グレイで投与される。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の投与および／または放射線の投与は反復される。一部の実施形態において、投与は、2、3または4回反復される。一部の実施形態において、投与は、1週間、2週間、3週間または4週間後に反復される。

【0050】

上述の実施形態の一部の実施形態において、がんは、脳がん、肺がん、結腸直腸がんまたは皮膚がんである。一部の実施形態において、個体は哺乳動物である。さらなる実施形態において、哺乳動物はヒトである。他のさらなる実施形態において、哺乳動物は、ペット、実験研究用動物または家畜である。なおさらなる実施形態において、ペット、研究用動物または家畜は、イヌ、ネコ、ウマ、サル、ウサギ、ラット、マウス、モルモット、ハムスター、ブタまたはウシである。

30

【0051】

上述の態様の一部の実施形態において、H-NOXタンパク質および放射線の投与は、別の療法と組み合わせて使用される。

【0052】

上述の態様の一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、2個以上のH-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、2個以上のH-NOXドメインは、同種H-NOXドメインである。他の実施形態において、H-NOXドメインは、異種H-NOXドメインである。

40

【0053】

上述の態様の一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、二量体、三量体、四量体または五量体である。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、共有結合により連結されている。

【0054】

上述の態様の一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、単量体を含み、該単量体は、H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む。一部の実施形態におい

50

て、H-NOXドメインは、重合ドメインに共有結合により連結されている。一部の実施形態において、H-NOXドメインのC末端は、重合ドメインに共有結合により連結されている。他の実施形態において、H-NOXドメインのN末端は、重合ドメインに共有結合により連結されている。一部の実施形態において、単量体は会合して、重合体型H-NOXタンパク質を形成する。

【0055】

上述の態様の一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、三量体型H-NOXタンパク質である。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質は、1個または複数の三量体形成ドメインを含む。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質は、3個の単量体を含み、該単量体は、H-NOXドメインおよび三量体形成ドメインを含む。一部の実施形態において、三量体形成ドメインは、バクテリオファージT4三量体形成ドメインである。一部の実施形態において、三量体形成ドメインは、フォルドンドメインである。一部の実施形態において、フォルドンドメインは、配列番号4のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、三量体形成ドメインに共有結合により連結されている。他の実施形態において、H-NOXドメインのC末端は、三量体形成ドメインのN末端に共有結合により連結されている。一部の実施形態において、H-NOXドメインのN末端は、三量体形成ドメインのN末端に共有結合により連結されている。

10

【0056】

上述の態様の一部の実施形態において、タグは、三量体形成ドメインのC末端に共有結合により連結されている。一部の実施形態において、His₆タグは、三量体形成ドメインのC末端に共有結合により連結されている。

20

【0057】

上述の態様の一部の実施形態において、アミノ酸リンカーは、H-NOXドメインおよび／または重合ドメインおよび／またはタグの間に位置する。一部の実施形態において、アミノ酸リンカーは、Gly-Ser-Gly配列またはArg-Gly-Ser配列である。

【0058】

上述の態様の一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、グアニリルシクラーゼドメインを含まない。

30

【0059】

上述の態様の一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、*T. tengcongensis* H-NOXドメイン、*L. pneumophila* 2 H-NOXドメイン、*H. sapiens* β 1 H-NOXドメイン、*C. lupus* H-NOXドメイン、*R. norvegicus* β 1 H-NOXドメイン、*D. melangaster* β 1 H-NOXドメイン、*D. melangaster* CG14885-PA H-NOXドメイン、*C. elegans* GCY-35 H-NOXドメイン、*N. punctiforme* H-NOXドメイン、*C. crescentus* H-NOXドメイン、*S. oneidensis* H-NOXドメインまたは*C. acetobutylicum* H-NOXドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、配列番号2に示される*T. tengcongensis*のH-NOXドメインに対応する。上述の態様の一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、*T. tengcongensis* H-NOX、*L. pneumophila* 2 H-NOX、*H. sapiens* β 1、*R. norvegicus* β 1、*D. melangaster* β 1、*D. melangaster* CG14885-PA、*C. elegans* GCY-35、*N. punctiforme* H-NOX、*C. crescentus* H-NOX、*S. oneidensis* H-NOXまたは*C. acetobutylicum* H-NOXである。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、配列番号2に示される*T. tengcongensis*のH-NOXドメインに対応するH-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、H-NOXは、

40

50

1個または複数の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、遠位ポケット変異は、T. tengcongensis H-NOXのL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である。一部の実施形態において、H-NOXは、144位にアミノ酸置換を含むT. tengcongensis H-NOXである。一部の実施形態において、144位におけるアミノ酸置換は、L144F置換である。一部の実施形態において、H-NOXは、少なくとも2個の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、少なくとも2個の遠位ポケット変異は、T. tengcongensis H-NOXのW9およびL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である。一部の実施形態において、H-NOXは、9位および144位にアミノ酸置換を含むT. tengcongensis H-NOXである。一部の実施形態において、9位におけるアミノ酸置換は、W9F置換であり、144位におけるアミノ酸置換は、L144F置換である。

10

【0060】

一部の実施形態において、本方法の重合体型H-NOXタンパク質は、T. tengcongensisの野生型H-NOXドメインを3個含み、該H-NOXドメインのそれぞれは、そのC末端において、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカーによって、T4バクテリオファージフォールドドメインのN末端に共有結合により連結されている。一部の実施形態において、His6タグが、Arg-Gly-Serアミノ酸リンカーを介して、フォールドドメインのC末端に連結されている。

【0061】

一部の実施形態において、本方法の重合体型H-NOXタンパク質は、T. tengcongensisのL144F H-NOXドメインを3個含み、該H-NOXドメインのそれぞれは、そのC末端において、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカーによって、T4バクテリオファージフォールドドメインのN末端に共有結合により連結されている。一部の実施形態において、His6タグが、Arg-Gly-Serアミノ酸リンカーを介して、フォールドドメインのC末端に連結されている。

20

【0062】

上述の態様の一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、ヘモグロビンの O_2 解離定数の2桁以内であり、該H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、20℃において約1nM～約1000nMの間である。他の実施形態において、H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、20℃において約1μM～約10μMの間である。さらに他の実施形態において、H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、20℃において約10μM～約50μMの間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃において約700s⁻¹未満である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い。さらなる実施形態において、H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも1,000倍低い。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} は、20℃において約0.65s⁻¹以下である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} は、20℃において約0.21s⁻¹～約0.65s⁻¹の間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} は、20℃において約1.35s⁻¹～約2.9s⁻¹の間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度は、37℃において約1h⁻¹未満である。

30

40

【0063】

上述の態様の一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、50kDaを超え、100kDaを超え、または150kDaを超え。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後に、単一のH-NOXドメインを含む対応する単体型H-NOXタンパク質と比較して、該哺乳動物における1種または複数の組織に優先的に蓄積する。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、哺乳動物へのH-NOXタンパク質の投与後

50

に、該哺乳動物に1、2、3、4、6、12または24時間にわたって存続する。一部の実施形態において、重合体型H-NOXの10%未満は、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後の約1時間、2時間または3時間未満以内に、腎臓によって該哺乳動物から排除される。

【0064】

一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号26または配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む。

【0065】

一部の態様において、本発明は、本明細書に記載されている実施形態のうちいずれかの重合体型H-NOXタンパク質をコードする組換え核酸を提供する。一部の実施形態において、核酸はベクター内に存在する。本発明は、また、本明細書に記載されている重合体型H-NOXタンパク質または単量体型H-NOXサブユニットをコードする核酸またはベクターを含む細胞を提供する。一部の実施形態において、核酸は、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号25または配列番号27に示される核酸配列を含む。

10

【0066】

一部の態様において、本発明は、重合体型H-NOXタンパク質を産生する方法であって、重合体型H-NOXタンパク質の産生に適した条件下で、重合体型H-NOXタンパク質または単量体型H-NOXサブユニットをコードする核酸を含む細胞を培養するステップを含む方法を提供する。さらなる実施形態において、本方法は、H-NOXタンパク質を精製するステップを含む。

20

【0067】

一部の態様において、本発明は、2個以上のH-NOXドメインを含む重合体型H-NOXタンパク質を含むキットを提供する。一部の実施形態において、本キットは、重合体型H-NOXタンパク質の使用のための指示をさらに含む。一部の実施形態において、2個以上のH-NOXドメインは、同種H-NOXドメインである。他の実施形態において、H-NOXドメインは、異種H-NOXドメインである。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、二量体、三量体、四量体または五量体である。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、共有結合により連結されている。

30

【0068】

本発明の一部の実施形態において、本キットの重合体型H-NOXタンパク質は、単量体を含み、該単量体は、H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、重合ドメインに共有結合により連結されている。一部の実施形態において、H-NOXドメインのC末端は、重合ドメインに共有結合により連結されている。他の実施形態において、H-NOXドメインのN末端は、重合ドメインに共有結合により連結されている。一部の実施形態において、単量体は会合して、重合体型H-NOXタンパク質を形成する。

【0069】

本発明の一部の実施形態において、本キットの重合体型H-NOXタンパク質は、三量体型H-NOXタンパク質である。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質は、1個または複数の三量体形成ドメインを含む。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質は、3個の単量体を含み、該単量体は、H-NOXドメインおよび三量体形成ドメインを含む。一部の実施形態において、三量体形成ドメインは、バクテリオファージT4三量体形成ドメインである。一部の実施形態において、三量体形成ドメインは、フォールドドメインである。一部の実施形態において、フォールドドメインは、配列番号4のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、三量体形成ドメインに共有結合により連結されている。一部の実施形態において、H-NOXドメインのC末端は、三量体形成ドメインのN末端に共有結合により連結されている。他の実施形態において、H-NOXドメインのN末端は、三量体形成ドメインのN末端に

40

50

共有結合により連結されている。

【0070】

上述の実施形態のうちいずれかの一部の実施形態において、本キットの重合体型H-NOXタンパク質は、グアニリルシクラーゼドメインを含まない。

【0071】

上述の実施形態の一部の実施形態において、本キットの重合体型H-NOXタンパク質は、少なくとも1個のタグを含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、少なくとも1個のHis₆タグを含む。

【0072】

上述の実施形態のいずれかの一部の実施形態において、アミノ酸リンカーは、H-NOXドメインおよび／または重合ドメインおよび／またはタグの間に位置する。一部の実施形態において、アミノ酸リンカーは、Gly-Ser-Gly配列またはArg-Gly-Ser配列である。

【0073】

上述の実施形態のうちいずれかの一部の実施形態において、本キットのH-NOXドメインのうち少なくとも1個は、Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOXドメイン、L. pneumophila 2 H-NOXドメイン、Homo sapiens β1 H-NOXドメイン、Canis lupus H-NOXドメイン、Rattus norvegicus β1 H-NOXドメイン、Drosophila melanogaster β1 H-NOXドメイン、D. melanogaster CG14885-PA H-NOXドメイン、Caenorhabditis elegans GCY-35 H-NOXドメイン、Nostoc punctiforme H-NOXドメイン、Caulobacter crescentus H-NOXドメイン、Shewanella oneidensis H-NOXドメインまたはClostridium acetobutylicum H-NOXドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、配列番号2に示されるT. tengcongensisのH-NOXドメインに対応する。

【0074】

上述の実施形態のうちいずれかの一部の実施形態において、本キットのH-NOXドメインのうち少なくとも1個は、1個または複数の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、遠位ポケット変異は、T. tengcongensis H-NOXのL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である。一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、144位にアミノ酸置換を含む。一部の実施形態において、144位におけるアミノ酸置換は、L144F置換である。一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも2個は、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも2個は、144位にアミノ酸置換を含む。一部の実施形態において、144位におけるT. tengcongensisのうち少なくとも1個のアミノ酸置換が、L144F置換である。一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、少なくとも2個の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、少なくとも2個の遠位ポケット変異は、T. tengcongensis H-NOXのW9およびL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である。一部の実施形態において、H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個は、9位および144位にアミノ酸置換を含む。一部の実施形態において、9位におけるアミノ酸置換は、W9F置換であり、144位におけるアミノ酸置換は、L144F置換である。

【0075】

一部の実施形態において、本キットの重合体型H-NOXタンパク質は、T. teng

10

20

30

40

50

c o n g e n s i s の野生型H-N O Xドメインを3個含み、該H-N O Xドメインのそれぞれは、そのC末端において、G l y-S e r-G l yアミノ酸リンカーによって、T 4バクテリオファージフォールドドメインのN末端に共有結合により連結されている。一部の実施形態において、H i s 6 タグが、A r g-G l y-S e rアミノ酸リンカーを介して、フォールドドメインのC末端に連結されている。

【0076】

一部の実施形態において、本キットの重合体型H-N O Xタンパク質は、T . t e n g c o n g e n s i s のL 1 4 4 F H-N O Xドメインを3個含み、該H-N O Xドメインのそれぞれは、そのC末端において、G l y-S e r-G l yアミノ酸リンカーによって、T 4バクテリオファージフォールドドメインのN末端に共有結合により連結されている。一部の実施形態において、H i s 6 タグが、A r g-G l y-S e rアミノ酸リンカーを介して、フォールドドメインのC末端に連結されている。

10

【0077】

上述の実施形態のうちいずれかの一部の実施形態において、本キットの重合体型H-N O Xタンパク質のO₂解離定数は、ヘモグロビンのO₂解離定数の2桁以内であり、該H-N O Xタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い。一部の実施形態において、重合体型H-N O Xタンパク質のO₂解離定数は、20℃において約1 nM～約1 0 0 0 nMの間である。他の実施形態において、重合体型H-N O Xタンパク質のO₂解離定数は、20℃において約1 μM～約1 0 μMの間である。さらに他の実施形態において、H-N O Xタンパク質のO₂解離定数は、20℃において約1 0 μM～約5 0 μMの間である。一部の実施形態において、重合体型H-N O Xタンパク質のNO反応性は、20℃において約7 0 0 s⁻¹未満である。一部の実施形態において、重合体型H-N O Xタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い。さらなる実施形態において、重合体型H-N O Xタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも1, 0 0 0倍低い。一部の実施形態において、重合体型H-N O Xタンパク質の酸素に対するk_{o f f}は、20℃において約0. 6 5 s⁻¹以下である。一部の実施形態において、重合体型H-N O Xタンパク質の酸素に対するk_{o f f}は、20℃において約0. 2 1 s⁻¹～約0. 6 5 s⁻¹の間である。一部の実施形態において、H-N O Xタンパク質の酸素に対するk_{o f f}は、20℃において約1. 3 5 s⁻¹～約2. 9 s⁻¹の間である。一部の実施形態において、重合体型H-N O Xタンパク質のヘム自動酸化の速度は、37℃において約1 h⁻¹未満である。

20

30

【0078】

上述の実施形態のうち一部の実施形態において、本キットの重合体型H-N O Xタンパク質は、5 0 k D a lを超える、1 0 0 k D a lを超える、または1 5 0 k D a lを超える。一部の実施形態において、重合体型H-N O Xタンパク質は、哺乳動物への該H-N O Xタンパク質の投与後に、単一のH-N O Xドメインを含む対応する単量体型H-N O Xタンパク質と比較して、該哺乳動物における1種または複数の組織に優先的に蓄積する。一部の実施形態において、重合体型H-N O Xタンパク質は、哺乳動物への該H-N O Xタンパク質の投与後に、該哺乳動物に1、2、3、4、6、1 2または2 4時間にわたって存続する。一部の実施形態において、重合体型H-N O Xの10%未満は、哺乳動物への該H-N O Xタンパク質の投与後の約1時間、2時間または3時間未満以内に、腎臓によって該哺乳動物から排除される。

40

【0079】

一部の実施形態において、本キットは、本明細書に記載されている重合体型H-N O Xタンパク質のうちいずれかを含む。一部の実施形態において、本キットは、本明細書に記載されている単量体型H-N O Xサブユニットのうちいずれかを含む。一部の実施形態において、本キットの重合体型H-N O Xタンパク質は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号26または配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む。

50

【0080】

一部の態様において、本発明は、本明細書に記載されている重合体型H-NOXタンパク質を含む製造品を提供する。一部の実施形態において、製造品は、H-NOXタンパク質およびバッグを含む。一部の実施形態において、バッグは、IVバッグである。一部の実施形態において、本製造品のH-NOXタンパク質は、O₂の送達を必要とする個体へとO₂を送達するためのものである。一部の実施形態において、個体は、脳腫瘍を有する。一部の実施形態において、脳腫瘍は、神経膠芽腫である。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、放射線療法と併せて使用される。

【0081】

一部の態様において、本発明は、本明細書に記載されている重合体型H-NOXタンパク質の単位用量を提供する。一部の実施形態において、単位用量のH-NOXタンパク質は、O₂の送達を必要とする個体へとO₂を送達するためのものである。一部の実施形態において、個体は、脳腫瘍を有する。一部の実施形態において、脳腫瘍は、神経膠芽腫である。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、放射線療法と併せて使用される。

10

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

2個以上のH-NOXドメインを含む重合体型H-NOXタンパク質。

(項目2)

前記2個以上のH-NOXドメインが、同種H-NOXドメインである、項目1に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

20

(項目3)

前記H-NOXドメインが、異種H-NOXドメインである、項目1に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目4)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、二量体、三量体、四量体または五量体である、項目1から3のいずれか一項に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目5)

前記H-NOXドメインが、共有結合により連結されている、項目4に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

30

(項目6)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、単量体を含み、該単量体が、H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む、項目4に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目7)

前記H-NOXドメインが、前記重合ドメインに共有結合により連結されている、項目6に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目8)

前記H-NOXドメインのC末端が、前記重合ドメインに共有結合により連結されている、項目7に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目9)

前記H-NOXドメインのN末端が、前記重合ドメインに共有結合により連結されている、項目7に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

40

(項目10)

単量体が会合して、前記重合体型H-NOXタンパク質を形成する、項目7に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目11)

三量体型H-NOXタンパク質である、項目1から10のいずれか一項に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目12)

前記三量体型H-NOXタンパク質が、1個または複数の三量体形成ドメインを含む、

50

項目 1 1 に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

(項目 1 3)

前記三量体型 H-NOX タンパク質が、3 個の単量体を含み、該単量体が、H-NOX ドメインおよび三量体形成ドメインを含む、項目 1 1 または 1 2 に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

(項目 1 4)

前記三量体形成ドメインが、バクテリオファージ T 4 三量体形成ドメインである、項目 1 3 に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

(項目 1 5)

前記三量体形成ドメインが、フォールドドメインである、項目 1 3 または 1 4 に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

10

(項目 1 6)

前記フォールドドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、項目 1 5 に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

(項目 1 7)

前記 H-NOX ドメインが、前記三量体形成ドメインに共有結合により連結されている、項目 1 3 から 1 6 のいずれか一項に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

(項目 1 8)

前記 H-NOX ドメインの C 末端が、前記三量体形成ドメインの N 末端に共有結合により連結されている、項目 1 7 に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

20

(項目 1 9)

前記 H-NOX ドメインの N 末端が、前記三量体形成ドメインの N 末端に共有結合により連結されている、項目 1 7 に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

(項目 2 0)

グアニリルシクラーゼドメインを含まない、項目 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

(項目 2 1)

少なくとも 1 個のタグを含む、項目 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

(項目 2 2)

少なくとも 1 個の His₆ タグを含む、項目 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

30

(項目 2 3)

前記 H-NOX ドメインのうち少なくとも 1 個が、Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOX ドメイン、L. pneumophila 2 H-NOX ドメイン、Homo sapiens β 1 H-NOX ドメイン、Rattus norvegicus β 1 H-NOX ドメイン、Canis lupus H-NOX ドメイン、Drosophila melanogaster β 1 H-NOX ドメイン、D. melanogaster CG14885-PA H-NOX ドメイン、Caenorhabditis elegans GCY-35 H-NOX ドメイン、Nostoc punctiforme H-NOX ドメイン、Caulobacter crescentus H-NOX ドメイン、Shewanella oneidensis H-NOX ドメインまたは Clostridium acetobutylicum H-NOX ドメインである、項目 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

40

(項目 2 4)

前記 H-NOX ドメインが、配列番号 2 に示される T. tengcongensis の H-NOX ドメインに対応する、項目 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の重合体型 H-NOX タンパク質。

(項目 2 5)

50

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、1個または複数の遠位ポケット変異を含む、項目1から24のいずれか一項に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目26)

前記遠位ポケット変異が、T. tengcongensis H-NOXのL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である、項目25に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目27)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、144位にアミノ酸置換を含む、項目25に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

10

(項目28)

144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目27に記載の重合体型H-NOXドメイン。

(項目29)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも2個が、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも2個が、144位にアミノ酸置換を含む、項目25に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目30)

20

144位における前記T. tengcongensisのうち少なくとも1個の前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目29に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目31)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、少なくとも2個の遠位ポケット変異を含む、項目25に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目32)

前記少なくとも2個の遠位ポケット変異が、T. tengcongensis H-NOXのW9およびL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である、項目31に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

30

(項目33)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、9位および144位にアミノ酸置換を含む、項目31に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目34)

9位における前記アミノ酸置換が、W9F置換であり、144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目33に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目35)

前記重合体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、ヘモグロビンのO₂解離定数の2桁以内であり、該H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い、項目1から34のいずれか一項に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

40

(項目36)

前記重合体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約1nM～約1000nMの間である、項目1から34のいずれか一項に記載の重合体型H-NOXタンパク質。

(項目37)

前記重合体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約1μM～約10μMの間である、項目1から34のいずれか一項に記載の重合体型H-NOXタンパク

50

質。

(項目 3 8)

前記 H-N O X タンパク質の O_2 解離定数が、20℃において約 $10 \mu M \sim 50 \mu M$ の間である、項目 1 から 3 4 のいずれか一項に記載の重合体型 H-N O X タンパク質。

(項目 3 9)

前記重合体型 H-N O X タンパク質の NO 反応性が、20℃において約 $700 s^{-1}$ 未満である、項目 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の重合体型 H-N O X タンパク質。

(項目 4 0)

前記重合体型 H-N O X タンパク質の NO 反応性が、ヘモグロビンの NO 反応性よりも少なくとも 100 倍低い、項目 1 から 3 9 のいずれか一項に記載の重合体型 H-N O X タンパク質。

10

(項目 4 1)

前記重合体型 H-N O X タンパク質の NO 反応性が、ヘモグロビンの NO 反応性よりも少なくとも 1,000 倍低い、項目 4 0 に記載の重合体型 H-N O X タンパク質。

(項目 4 2)

前記重合体型 H-N O X タンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 $0.65 s^{-1}$ 以下である、項目 1 から 4 1 のいずれか一項に記載の重合体型 H-N O X タンパク質。

(項目 4 3)

前記重合体型 H-N O X タンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 $0.21 s^{-1} \sim 0.65 s^{-1}$ の間である、項目 1 から 4 2 のいずれか一項に記載の重合体型 H-N O X タンパク質。

20

(項目 4 4)

前記 H-N O X タンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 $1.35 s^{-1} \sim 2.9 s^{-1}$ の間である、項目 1 から 4 3 のいずれか一項に記載の重合体型 H-N O X タンパク質。

(項目 4 5)

前記重合体型 H-N O X タンパク質のヘム自動酸化の速度が、37℃において約 $1 h^{-1}$ 未満である、項目 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の重合体型 H-N O X タンパク質。

(項目 4 6)

50 kDa l を超える、100 kDa l を超える、または 150 kDa l を超える、項目 1 から 4 5 のいずれか一項に記載の重合体型 H-N O X タンパク質。

30

(項目 4 7)

項目 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の重合体型 H-N O X タンパク質であって、哺乳動物への該 H-N O X タンパク質の投与後に、単一の H-N O X ドメインを含む対応する単量体型 H-N O X タンパク質と比較して、該哺乳動物における 1 種または複数の組織に優先的に蓄積する、重合体型 H-N O X タンパク質。

(項目 4 8)

項目 4 7 に記載の重合体型 H-N O X タンパク質であって、哺乳動物への該 H-N O X タンパク質の投与後に、該哺乳動物に 1、2、3、4、6、12 または 24 時間にわたって存続する、重合体型 H-N O X タンパク質。

40

(項目 4 9)

前記重合体型 H-N O X の 10% 未満が、哺乳動物への該 H-N O X タンパク質の投与後の約 1 時間、2 時間または 3 時間未満以内に、腎臓によって該哺乳動物から排除される、項目 4 7 に記載の重合体型 H-N O X タンパク質。

(項目 5 0)

H-N O X ドメインおよび重合ドメインを含む組換え H-N O X タンパク質。

(項目 5 1)

前記 H-N O X ドメインが、前記重合ドメインに共有結合により連結されている、項目 5 0 に記載の組換え H-N O X タンパク質。

50

(項目 5 2)

前記H-NOXドメインのC末端が、前記重合ドメインに連結されている、項目50または51に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 5 3)

前記H-NOXドメインのN末端が、前記重合ドメインに連結されている、項目50または51に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 5 4)

前記H-NOXドメインが、前記重合ドメインのN末端に連結されている、項目50から53のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 5 5)

前記H-NOXドメインが、前記重合ドメインのC末端に連結されている、項目50から53のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 5 6)

前記重合ドメインが、三量体形成ドメインである、項目50から55のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 5 7)

前記三量体形成ドメインが、バクテリオファージT4三量体形成ドメインである、項目56に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 5 8)

前記三量体形成ドメインが、フォールドドメインである、項目56または57に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 5 9)

前記フォールドドメインが、配列番号4を含む、項目58に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 6 0)

グアニリルシクラーゼドメインを含まない、項目50から59のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 6 1)

タグを含む、項目50から60のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 6 2)

H i s₆タグを含む、項目50から61のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 6 3)

前記H-NOXドメインが、Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOXドメイン、L. pneumophila 2 H-NOXドメイン、Homo sapiens β 1 H-NOXドメイン、Rattus norvegicus β 1 H-NOXドメイン、Canis lupus H-NOXドメイン、Drosophila melanogaster β 1 H-NOXドメイン、D. melanogaster CG14885-PA H-NOXドメイン、Caenorhabditis elegans GCY-35 H-NOXドメイン、Nostoc punctiforme H-NOXドメイン、Caulobacter crescentus H-NOXドメイン、Shewanella oneidensis H-NOXドメインまたはClostridium acetobutylicum H-NOXドメインである、項目50から62のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 6 4)

前記H-NOXドメインが、配列番号2に示されるT. tengcongensisのH-NOXドメインに対応する、項目50から63のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目 6 5)

10

20

30

40

50

前記H-NOXドメインが、1個または複数の遠位ポケット変異を含む、項目50から64のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目66)

前記遠位ポケット変異が、T. tengcongensis H-NOXのL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である、項目65に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目67)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、144位にアミノ酸置換を含む、項目65に記載の組換えH-NOXタンパク質。

10

(項目68)

144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目67に記載の組換えH-NOXドメイン。

(項目69)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、少なくとも2個の遠位ポケット変異を含む、項目65に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目70)

前記少なくとも2個の遠位ポケット変異が、T. tengcongensis H-NOXのW9およびL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である、項目69に記載の組換えH-NOXタンパク質。

20

(項目71)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、9位および144位にアミノ酸置換を含む、項目69に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目72)

9位における前記アミノ酸置換が、W9F置換であり、144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目71に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目73)

前記組換えH-NOXタンパク質のO₂解離定数が、ヘモグロビンのO₂解離定数の2桁以内であり、該H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い、項目50から72のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

30

(項目74)

前記組換えH-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約1nM～約1000nMの間である、項目50から72のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目75)

前記組換えH-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約1μM～約10μMの間である、項目50から72のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

40

(項目76)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約10μM～約50μMの間である、項目50から72のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目77)

前記組換えH-NOXタンパク質のNO反応性が、20℃において約700s⁻¹未満である、項目50から76のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質。

(項目78)

前記組換えH-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少

50

なくとも 100 倍低い、項目 50 から 77 のいずれか一項に記載の組換え H-NOX タンパク質。

(項目 79)

前記組換え H-NOX タンパク質の NO 反応性が、ヘモグロビンの NO 反応性よりも少なくとも 1,000 倍低い、項目 78 に記載の組換え H-NOX タンパク質。

(項目 80)

前記組換え H-NOX タンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 0.65 s^{-1} 以下である、項目 50 から 79 のいずれか一項に記載の組換え H-NOX タンパク質。

(項目 81)

前記組換え H-NOX タンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 0.21 s^{-1} ～約 0.65 s^{-1} の間である、項目 50 から 80 のいずれか一項に記載の組換え H-NOX タンパク質。

(項目 82)

前記 H-NOX タンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 1.35 s^{-1} ～約 2.9 s^{-1} の間である、項目 50 から 81 のいずれか一項に記載の組換え H-NOX タンパク質。

(項目 83)

前記組換え H-NOX タンパク質のヘム自動酸化の速度が、37℃において約 1 h^{-1} 未満である、項目 50 から 82 のいずれか一項に記載の組換え H-NOX タンパク質。

(項目 84)

2 個以上の H-NOX ドメインを含む重合体型 H-NOX タンパク質を含む医薬組成物。

(項目 85)

前記重合体型 H-NOX タンパク質が、項目 1 から 49 のいずれか一項に記載の重合体型 H-NOX タンパク質である、項目 84 に記載の医薬組成物。

(項目 86)

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、項目 84 または 85 に記載の医薬組成物。

(項目 87)

滅菌されている、項目 84 から 86 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目 88)

エンドトキシンを本質的に含まない、項目 84 から 87 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目 89)

H-NOX ドメインおよび重合ドメインを含む組換え H-NOX タンパク質を含む医薬組成物。

(項目 90)

前記組換え H-NOX タンパク質が、項目 50 から 83 のいずれか一項に記載の組換え H-NOX タンパク質である、項目 89 に記載の医薬組成物。

(項目 91)

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、項目 89 または 90 に記載の医薬組成物。

(項目 92)

滅菌されている、項目 89 から 91 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目 93)

エンドトキシンを本質的に含まない、項目 89 から 92 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目 94)

脳がんを有する個体における脳腫瘍へと O_2 を送達する方法であって、有効量の H-NOX タンパク質を該個体に投与するステップを含む方法。

(項目 95)

前記H-NOXタンパク質の前記投与が、放射線療法または化学療法と組み合わせて使用される、項目94に記載の方法。

(項目96)

脳がんを有する個体における脳がんを処置する方法であって、

a) 有効量のH-NOXタンパク質を該個体に投与するステップと、

b) 有効量の放射線を該個体に投与するステップと

を含む方法。

(項目97)

脳がんを有する個体における脳腫瘍成長を低下させる方法であって、

a) 有効量のH-NOXタンパク質を該個体に投与するステップと、

b) 有効量の放射線を該個体に投与するステップと

を含む方法。

(項目98)

前記放射線または化学療法が、前記H-NOXが投与されてから1、2、3、4、5または6時間後に前記個体に投与される、項目95から97のいずれか一項に記載の方法。

(項目99)

前記放射線が、X線照射である、項目94から98のいずれか一項に記載の方法。

(項目100)

前記X線照射が、約0.5グレイ〜約75グレイで投与される、項目99に記載の方法。

(項目101)

前記H-NOXタンパク質の前記投与および／または前記放射線の前記投与が反復される、項目95から100のいずれか一項に記載の方法。

(項目102)

前記投与が、2、3または4回反復される、項目101に記載の方法。

(項目103)

前記投与が、1週間、2週間、3週間または4週間後に反復される、項目101または102に記載の方法。

(項目104)

前記脳がんが神経膠芽腫である、項目94から103のいずれか一項に記載の方法。

(項目105)

前記個体が哺乳動物である、項目94から104のいずれか一項に記載の方法。

(項目106)

前記哺乳動物がヒトである、項目105に記載の方法。

(項目107)

前記哺乳動物が、ペット、実験研究用動物または家畜である、項目105に記載の方法。

(項目108)

前記ペット、研究用動物または家畜が、イヌ、ネコ、ウマ、サル、ウサギ、ラット、マウス、モルモット、ハムスター、ブタまたはウシである、項目107に記載の方法。

(項目109)

前記H-NOXタンパク質および前記放射線の前記投与が、別の療法と組み合わせて使用される、項目94から108のいずれか一項に記載の方法。

(項目110)

前記H-NOXタンパク質が、T. tengcongensis H-NOX、L. pneumophila 2 H-NOX、H. sapiens β 1、R. norvegicus β 1、C. lupus H-NOXドメイン、D. melanogaster β 1、D. melanogaster CG14885-PA、C. elegans GCY-35、N. punctiforme H-NOX、C. crescentus H-NOX、S. oneidensis H-NOXまたはC. acetobutylic

10

20

30

40

50

um H-NOXである、項目94から109のいずれか一項に記載の方法。

(項目111)

前記H-NOXタンパク質が、配列番号2に示されるT. tengcongensisのH-NOXドメインに対応するH-NOXドメインを含む、項目94から110のいずれか一項に記載の方法。

(項目112)

前記H-NOXが、1個または複数の遠位ポケット変異を含む、項目94から111のいずれか一項に記載の方法。

(項目113)

前記遠位ポケット変異が、T. tengcongensis H-NOXのL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である、項目112に記載の方法。

(項目114)

前記H-NOXが、144位にアミノ酸置換を含むT. tengcongensis H-NOXである、項目113に記載の方法。

(項目115)

144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目114に記載の方法。

(項目116)

前記H-NOXが、少なくとも2個の遠位ポケット変異を含む、項目112に記載の方法。

(項目117)

前記少なくとも2個の遠位ポケット変異が、T. tengcongensis H-NOXのW9およびL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である、項目116に記載の方法。

(項目118)

前記H-NOXが、9位および144位にアミノ酸置換を含むT. tengcongensis H-NOXである、項目116に記載の方法。

(項目119)

9位における前記アミノ酸置換が、W9F置換であり、144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目118に記載の方法。

(項目120)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、グアニリルシクラーゼドメインを含まない、項目95から119のいずれか一項に記載の方法。

(項目121)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、ヘモグロビンのO₂解離定数の2桁以内であり、該H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い、項目95から120のいずれか一項に記載の方法。

(項目122)

前記重合体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約1nM～約1000nMの間である、項目95から121のいずれか一項に記載の方法。

(項目123)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約1μM～約10μMの間である、項目95から121のいずれか一項に記載の方法。

(項目124)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約10μM～約50μMの間である、項目95から121のいずれか一項に記載の方法。

(項目125)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、20℃において約700s⁻¹未満である、項目95から124のいずれか一項に記載の方法。

(項目126)

10

20

30

40

50

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い、項目95から125のいずれか一項に記載の方法。

(項目127)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも1,000倍低い、項目126に記載の方法。

(項目128)

前記H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 0.65 s^{-1} 以下である、項目95から127のいずれか一項に記載の方法。

(項目129)

前記H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 0.21 s^{-1} ～約 0.65 s^{-1} の間である、項目95から128のいずれか一項に記載の方法。

(項目130)

前記H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 1.35 s^{-1} ～約 2.9 s^{-1} の間である、項目95から129のいずれか一項に記載の方法。

(項目131)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度が、37℃において約 1 h^{-1} 未満である、項目95から130のいずれか一項に記載の方法。

(項目132)

酸素の送達を必要とする個体へと酸素を送達する方法であって、該個体に有効量の重合体型H-NOXタンパク質を投与するステップを含む方法。

(項目133)

前記H-NOXタンパク質の前記投与が、放射線療法または化学療法と組み合わせて使用される、項目132に記載の方法。

(項目134)

がんの処置を必要とする個体におけるがんを処置する方法であって、
a) 有効量の重合体型H-NOXタンパク質を該個体に投与するステップと、
b) 有効量の放射線を該個体に投与するステップと
を含む方法。

(項目135)

腫瘍成長の低下を必要とする個体における腫瘍成長を低下させる方法であって、
a) 有効量のH-NOXタンパク質を該個体に投与するステップと、
b) 有効量の放射線を該個体に投与するステップと
を含む方法。

(項目136)

前記放射線または化学療法が、前記H-NOXが投与されてから1、2、3、4、5または6時間後に前記個体に投与される、項目133から135のいずれか一項に記載の方法。

(項目137)

前記放射線が、X線照射である、項目133から136のいずれか一項に記載の方法。

(項目138)

前記X線照射が、約0.5グレイ～約75グレイで投与される、項目137に記載の方法。

(項目139)

前記H-NOXタンパク質の前記投与および／または前記放射線の前記投与が反復される、項目133から138のいずれか一項に記載の方法。

(項目140)

前記投与が、2、3または4回反復される、項目139に記載の方法。

(項目141)

前記投与が、1週間、2週間、3週間または4週間後に反復される、項目139または140に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 4 2)	
がんが脳がんである、項目 1 3 4 から 1 4 1 のいずれか一項に記載の方法。	
(項目 1 4 3)	
前記個体が哺乳動物である、項目 1 3 2 から 1 4 2 のいずれか一項に記載の方法。	
(項目 1 4 4)	
前記哺乳動物がヒトである、項目 1 4 3 に記載の方法。	
(項目 1 4 5)	
前記哺乳動物が、ペット、実験研究用動物または家畜である、項目 1 4 3 に記載の方法。	
(項目 1 4 6)	10
前記ペット、研究用動物または家畜が、イヌ、ネコ、ウマ、サル、ウサギ、ラット、マウス、モルモット、ハムスター、ブタまたはウシである、項目 1 4 5 に記載の方法。	
(項目 1 4 7)	
前記 H-NOX タンパク質および前記放射線の前記投与が、別の療法と組み合わせて使用される、項目 1 3 2 から 1 4 6 のいずれか一項に記載の方法。	
(項目 1 4 8)	
前記重合体型 H-NOX タンパク質が、2 個以上の H-NOX ドメインを含む、項目 1 3 2 から 1 4 7 のいずれか一項に記載の方法。	
(項目 1 4 9)	20
前記 2 個以上の H-NOX ドメインが、同種 H-NOX ドメインである、項目 1 4 8 に記載の方法。	
(項目 1 5 0)	
前記 H-NOX ドメインが、異種 H-NOX ドメインである、項目 1 4 8 に記載の方法。	
(項目 1 5 1)	
前記重合体型 H-NOX タンパク質が、二量体、三量体、四量体または五量体である、項目 1 3 2 から 1 5 0 のいずれか一項に記載の方法。	
(項目 1 5 2)	30
前記 H-NOX ドメインが、共有結合により連結されている、項目 1 3 2 から 1 5 1 のいずれか一項に記載の方法。	
(項目 1 5 3)	
前記重合体型 H-NOX タンパク質が、単量体を含み、該単量体が、H-NOX ドメインおよび重合ドメインを含む、項目 1 3 2 から 1 5 1 のいずれか一項に記載の方法。	
(項目 1 5 4)	
前記 H-NOX ドメインが、前記重合ドメインに共有結合により連結されている、項目 1 5 3 に記載の方法。	
(項目 1 5 5)	
前記 H-NOX ドメインの C 末端が、前記重合ドメインに共有結合により連結されている、項目 1 5 4 に記載の方法。	
(項目 1 5 6)	40
前記 H-NOX ドメインの N 末端が、前記重合ドメインに共有結合により連結されている、項目 1 5 4 に記載の方法。	
(項目 1 5 7)	
単量体が会合して、前記重合体型 H-NOX タンパク質を形成する、項目 1 5 3 から 1 5 6 のいずれか一項に記載の方法。	
(項目 1 5 8)	
前記重合体型 H-NOX タンパク質が、三量体型 H-NOX タンパク質である、項目 1 3 2 から 1 5 7 のいずれか一項に記載の方法。	
(項目 1 5 9)	50
前記三量体型 H-NOX タンパク質が、1 個または複数の三量体形成ドメインを含む、	

項目 1 5 8 に記載の方法。

(項目 1 6 0)

前記三量体型H-NOXタンパク質が、3個の単量体を含み、該単量体が、H-NOXドメインおよび三量体形成ドメインを含む、項目 1 5 9 に記載の方法。

(項目 1 6 1)

前記三量体形成ドメインが、バクテリオファージT4三量体形成ドメインである、項目 1 6 0 に記載の方法。

(項目 1 6 2)

前記三量体形成ドメインが、フォールドドメインである、項目 1 6 0 または 1 6 6 に記載の方法。

(項目 1 6 3)

前記フォールドドメインが、配列番号4のアミノ酸配列を含む、項目 1 6 2 に記載の方法。

(項目 1 6 4)

前記H-NOXドメインが、前記三量体形成ドメインに共有結合により連結されている、項目 1 6 0 から 1 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 6 5)

前記H-NOXドメインのC末端が、前記三量体形成ドメインのN末端に共有結合により連結されている、項目 1 6 4 に記載の方法。

(項目 1 6 6)

前記H-NOXドメインのN末端が、前記三量体形成ドメインのN末端に共有結合により連結されている、項目 1 6 4 に記載の方法。

(項目 1 6 7)

タグが、前記三量体形成ドメインのC末端に共有結合により連結されている、項目 1 6 5 に記載の方法。

(項目 1 6 8)

His₆タグが、前記三量体形成ドメインのC末端に共有結合により連結されている、項目 1 6 7 に記載の方法。

(項目 1 6 9)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、グアニリルシクラーゼドメインを含まない、項目 1 3 2 から 1 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 7 0)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、*T. tengcongensis* H-NOXドメイン、*L. pneumophila* 2 H-NOXドメイン、*H. sapiens* β1 H-NOXドメイン、*R. norvegicus* β1 H-NOXドメイン、*C. lupus* H-NOXドメイン、*D. melangaster* β1 H-NOXドメイン、*D. melangaster* CG14885-PA H-NOXドメイン、*C. elegans* GCY-35 H-NOXドメイン、*N. punctiforme* H-NOXドメイン、*C. crescentus* H-NOXドメイン、*S. oneidensis* H-NOXドメインまたは*C. acetobutylicum* H-NOXドメインである、項目 1 3 2 から 1 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 7 1)

前記H-NOXドメインが、配列番号2に示される*T. tengcongensis*のH-NOXドメインに対応する、項目 1 3 2 から 1 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 7 2)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、1個または複数の遠位ポケット変異を含む、項目 1 3 2 から 1 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 7 3)

前記遠位ポケット変異が、*T. tengcongensis* H-NOXのL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である、項目 1 7 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 174)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、144位にアミノ酸置換を含む、項目172に記載の方法。

(項目 175)

144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目174に記載の重合体型H-NOXドメイン。

(項目 176)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも2個が、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも2個が、144位にアミノ酸置換を含む、項目172に記載の方法。

10

(項目 177)

144位における前記T. tengcongensisのうち少なくとも1個の前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目176に記載の方法。

(項目 178)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、少なくとも2個の遠位ポケット変異を含む、項目172に記載の方法。

(項目 179)

前記少なくとも2個の遠位ポケット変異が、T. tengcongensis H-NOXのW9およびL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である、項目178に記載の方法。

20

(項目 180)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、T. tengcongensis H-NOXドメインであり、該T. tengcongensis H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、9位および144位にアミノ酸置換を含む、項目179に記載の方法。

(項目 181)

9位における前記アミノ酸置換が、W9F置換であり、144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目180に記載の方法。

(項目 182)

前記重合体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、ヘモグロビンのO₂解離定数の2桁以内であり、該H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い、項目132から181のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 183)

前記重合体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約1nM～約100nMの間である、項目132から181のいずれか一項に記載の方法。

(項目 184)

前記重合体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約100nM～約500nMの間である、項目132から181のいずれか一項に記載の方法。

(項目 185)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約500nM～約1000nMの間である、項目132から181のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 186)

前記重合体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、20℃において約700s⁻¹未満である、項目132から185のいずれか一項に記載の方法。

(項目 187)

前記重合体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い、項目132から186のいずれか一項に記載の方法。

(項目 188)

前記重合体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも

50

少なくとも1, 000倍低い、項目187に記載の方法。

(項目189)

前記重合体型H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約0.65 s⁻¹以下である、項目132から188のいずれか一項に記載の方法。

(項目190)

前記重合体型H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約0.21 s⁻¹～約0.65 s⁻¹の間である、項目132から189のいずれか一項に記載の方法。

(項目191)

前記H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約1.35 s⁻¹～約2.9 s⁻¹の間である、項目132から190のいずれか一項に記載の方法。

(項目192)

前記重合体型H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度が、37℃において約1 h⁻¹未満である、項目132から191のいずれか一項に記載の方法。

(項目193)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、50 kDaを超える、100 kDaを超える、または150 kDaを超える、項目132から192のいずれか一項に記載の方法。

(項目194)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後に、単一のH-NOXドメインを含む対応する単体型H-NOXタンパク質と比較して、該哺乳動物における1種または複数の組織に蓄積する、項目132から193のいずれか一項に記載の方法。

(項目195)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後に、該哺乳動物に1、2、3、4、6、12または24時間にわたって存続する、項目194に記載の方法。

(項目196)

前記重合体型H-NOXの10%未満が、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後の約1時間、2時間または3時間未満以内に、腎臓によって該哺乳動物から排除される、項目194に記載の方法。

(項目197)

項目1から5のいずれか一項に記載の重合体型H-NOXタンパク質をコードする組換え核酸。

(項目198)

項目197に記載の核酸を含むベクター。

(項目199)

項目197に記載の核酸または項目198に記載のベクターを含む細胞。

(項目200)

重合体型H-NOXタンパク質を産生する方法であって、該重合体型H-NOXタンパク質の産生に適した条件下で、項目199に記載の細胞を培養するステップを含む方法。

(項目201)

前記H-NOXタンパク質を精製するステップをさらに含む、項目200に記載の方法。

(項目202)

項目50から83のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質をコードする組換え核酸。

(項目203)

項目202に記載の核酸を含むベクター。

(項目204)

10

20

30

40

50

- 項目 2 0 2 に記載の核酸または項目 2 0 3 に記載のベクターを含む細胞。
- (項目 2 0 5)
- 重合体型 H-N O X タンパク質を産生する方法であって、項目 2 0 4 に記載の細胞を、該細胞の前記組換え H-N O X タンパク質が発現され、会合して重合体型 H-N O X タンパク質を形成する条件下で、培養するステップを含む方法。
- (項目 2 0 6)
- 前記重合体型 H-N O X タンパク質を精製するステップをさらに含む、項目 2 0 5 に記載の方法。
- (項目 2 0 7)
- 重合体型 H-N O X タンパク質を含むキット。 10
- (項目 2 0 8)
- 前記重合体型 H-N O X タンパク質の使用のための指示をさらに含む、項目 2 0 7 に記載のキット。
- (項目 2 0 9)
- 前記重合体型 H-N O X タンパク質が、2 個以上の H-N O X ドメインを含む、項目 2 0 7 または 2 0 8 に記載のキット。
- (項目 2 1 0)
- 前記 2 個以上の H-N O X ドメインが、同種 H-N O X ドメインである、項目 2 0 9 に記載のキット。
- (項目 2 1 1) 20
- 前記 H-N O X ドメインが、異種 H-N O X ドメインである、項目 2 0 9 に記載のキット。
- (項目 2 1 2)
- 前記重合体型 H-N O X タンパク質が、二量体、三量体、四量体または五量体である、項目 2 1 7 から 2 1 1 のいずれか一項に記載のキット。
- (項目 2 1 3)
- 前記 H-N O X ドメインが、共有結合により連結されている、項目 2 0 9 から 2 1 2 のいずれか一項に記載のキット。
- (項目 2 1 4)
- 前記重合体型 H-N O X タンパク質が、単量体を含み、該単量体が、H-N O X ドメインおよび重合ドメインを含む、項目 2 0 7 から 2 1 2 のいずれか一項に記載のキット。 30
- (項目 2 1 5)
- 前記 H-N O X ドメインが、前記重合ドメインに共有結合により連結されている、項目 2 1 4 に記載のキット。
- (項目 2 1 6)
- 前記 H-N O X ドメインの C 末端が、前記重合ドメインに共有結合により連結されている、項目 2 1 5 に記載のキット。
- (項目 2 1 7)
- 前記 H-N O X ドメインの N 末端が、前記重合ドメインに共有結合により連結されている、項目 2 1 5 に記載のキット。 40
- (項目 2 1 8)
- 単量体が会合して、前記重合体型 H-N O X タンパク質を形成する、項目 2 1 4 から 2 1 7 のいずれか一項に記載のキット。
- (項目 2 1 9)
- 前記重合体型 H-N O X タンパク質が、三量体型 H-N O X タンパク質である、項目 2 1 4 から 2 1 8 のいずれか一項に記載のキット。
- (項目 2 2 0)
- 前記三量体型 H-N O X タンパク質が、1 個または複数の三量体形成ドメインを含む、項目 2 1 9 に記載のキット。
- (項目 2 2 1) 50

前記三量体型H-NOXタンパク質が、3個の単量体を含み、該単量体が、H-NOXドメインおよび三量体形成ドメインを含む、項目219または220に記載のキット。

(項目222)

前記三量体形成ドメインが、バクテリオファージT4三量体形成ドメインである、項目221に記載のキット。

(項目223)

前記三量体形成ドメインが、フォルドドメインである、項目220から222のいずれか一項に記載のキット。

(項目224)

前記フォルドドメインが、配列番号4のアミノ酸配列を含む、項目223に記載のキット。

(項目225)

前記H-NOXドメインが、前記三量体形成ドメインに共有結合により連結されている、項目220から224のいずれか一項に記載のキット。

(項目226)

前記H-NOXドメインのC末端が、前記三量体形成ドメインのN末端に共有結合により連結されている、項目225に記載のキット。

(項目227)

タグが、前記三量体形成ドメインのC末端に共有結合により連結されている、項目226に記載のキット。

(項目228)

His₆タグが、前記三量体形成ドメインのC末端に共有結合により連結されている、項目226に記載のキット。

(項目229)

前記H-NOXドメインのN末端が、前記三量体形成ドメインのN末端に共有結合により連結されている、項目225に記載のキット。

(項目230)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、グアニリルシクラーゼドメインを含まない、項目207から229のいずれか一項に記載のキット。

(項目231)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、*T. tengcongensis* H-NOXドメイン、*L. pneumophila* 2 H-NOXドメイン、*H. sapiens* β1 H-NOXドメイン、*R. norvegicus* β1 H-NOXドメイン、*C. lupus* H-NOXドメイン、*D. melangaster* β1 H-NOXドメイン、*D. melangaster* CG14885-PA H-NOXドメイン、*C. elegans* GCY-35 H-NOXドメイン、*N. punctiforme* H-NOXドメイン、*C. crescentus* H-NOXドメイン、*S. oneidensis* H-NOXドメインまたは*C. acetobutylicum* H-NOXドメインである、項目207から230のいずれか一項に記載のキット。

(項目232)

前記H-NOXドメインが、配列番号2に示される*T. tengcongensis*のH-NOXドメインに対応する、項目207から231のいずれか一項に記載のキット。

(項目233)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、1個または複数の遠位ポケット変異を含む、項目207から232のいずれか一項に記載のキット。

(項目234)

前記遠位ポケット変異が、*T. tengcongensis* H-NOXのL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である、項目233に記載のキット。

(項目235)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、*T. tengcongensis*

10

20

30

40

50

H-NOXドメインであり、該T. *tengcongensis* H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、144位にアミノ酸置換を含む、項目233に記載のキット。

(項目236)

144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目235に記載の重合体型H-NOXドメイン。

(項目237)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも2個が、T. *tengcongensis* H-NOXドメインであり、該T. *tengcongensis* H-NOXドメインのうち少なくとも2個が、144位にアミノ酸置換を含む、項目233に記載のキット。

(項目238)

144位における前記T. *tengcongensis*のうち少なくとも1個の前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目237に記載のキット。

(項目239)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、少なくとも2個の遠位ポケット変異を含む、項目233に記載のキット。

(項目240)

前記少なくとも2個の遠位ポケット変異が、T. *tengcongensis* H-NOXのW9およびL144に対応する部位におけるアミノ酸置換である、項目233に記載のキット。

(項目241)

前記H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、T. *tengcongensis* H-NOXドメインであり、該T. *tengcongensis* H-NOXドメインのうち少なくとも1個が、9位および144位にアミノ酸置換を含む、項目240に記載のキット。

(項目242)

9位における前記アミノ酸置換が、W9F置換であり、144位における前記アミノ酸置換が、L144F置換である、項目241に記載のキット。

(項目243)

前記重合体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、ヘモグロビンのO₂解離定数の2桁以内であり、該H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも10倍低い、項目207から242のいずれか一項に記載のキット。

(項目244)

前記重合体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約1nM～約1000nMの間である、項目207から243のいずれか一項に記載のキット。

(項目245)

前記重合体型H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約1μM～約10μMの間である、項目207から243のいずれか一項に記載のキット。

(項目246)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、20℃において約10μM～約50μMの間である、項目207から243のいずれか一項に記載のキット。

(項目247)

前記重合体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、20℃において約700s⁻¹未満である、項目207から246のいずれか一項に記載のキット。

(項目248)

前記重合体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも100倍低い、項目207から247のいずれか一項に記載のキット。

(項目249)

前記重合体型H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも1,000倍低い、項目248に記載のキット。

(項目250)

10

20

30

40

50

前記重合体型H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 0.65 s^{-1} 以下である、項目207から249のいずれか一項に記載のキット。

(項目251)

前記重合体型H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 0.21 s^{-1} ～約 0.65 s^{-1} の間である、項目207から250のいずれか一項に記載のキット。

(項目252)

前記H-NOXタンパク質の酸素に対する k_{off} が、20℃において約 1.35 s^{-1} ～約 2.9 s^{-1} の間である、項目207から251のいずれか一項に記載のキット。

(項目253)

前記重合体型H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度が、37℃において約 1 h^{-1} 未満である、項目207から252のいずれか一項に記載のキット。

(項目254)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、50kDaを超える、100kDaを超える、または150kDaを超える、項目207から253のいずれか一項に記載のキット。

(項目255)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後に、単一のH-NOXドメインを含む対応する単量体型H-NOXタンパク質と比較して、該哺乳動物における1種または複数の組織に蓄積する、項目207から254のいずれか一項に記載のキット。

(項目256)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後に、該哺乳動物に1、2、3、4、6、12または24時間にわたって存続する、項目255に記載のキット。

(項目257)

前記重合体型H-NOXの10%未満が、哺乳動物への該H-NOXタンパク質の投与後の約1時間、2時間または3時間未満以内に、腎臓によって該哺乳動物から排除される、項目255に記載のキット。

(項目258)

項目1から49のいずれか一項に記載の重合体型H-NOXタンパク質を含むキット。

(項目259)

項目50から83のいずれか一項に記載の組換えH-NOXタンパク質を含むキット。

(項目260)

使用のための指示を含む、項目258または259に記載のキット。

(項目261)

項目1から49のいずれか一項に記載の重合体型H-NOXタンパク質を含む製造品。

(項目262)

H-NOXタンパク質およびバッグを含む、項目261に記載の製造品。

(項目263)

前記バッグがIVバッグである、項目262に記載の製造品。

(項目264)

前記H-NOXタンパク質が、 O_2 の送達を必要とする個体へと O_2 を送達するためのものである、項目262または263に記載の製造品。

(項目265)

前記個体が脳腫瘍を有する、項目264に記載の製造品。

(項目266)

前記脳腫瘍が神経膠芽腫である、項目265に記載の製造品。

(項目267)

前記重合体型H-NOXタンパク質が、放射線療法と併せて使用される、項目265に

10

20

30

40

50

記載の製造品。

(項目 2 6 8)

重合体型H-NOXタンパク質の単位用量。

(項目 2 6 9)

前記H-NOXタンパク質が、O₂の送達を必要とする個体へとO₂を送達するためのものである、項目 2 6 8に記載の単位用量。

(項目 2 7 0)

前記個体が脳腫瘍を有する、項目 2 6 9に記載の単位用量。

(項目 2 7 1)

前記脳腫瘍が神経膠芽腫である、項目 2 6 9に記載の単位用量。

(項目 2 7 2)

前記重合体型H-NOXが、放射線療法と併せて使用される、項目 2 7 1に記載の単位用量。

10

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1】図1は、バクテリオファージT4フィブリチン (f i b r i t i n) のフォルドンドメインの核酸 (配列番号3) およびアミノ酸配列 (配列番号4) を示す。

【0083】

【図2A】図2Aは、His₆ タグを含む、Thermoanaerobacter tengcongensis L144F H-NOX配列のC末端に融合されたバクテリオファージT4フィブリチンのフォルドンドメインの核酸 (配列番号5) およびアミノ酸配列 (配列番号6) を示す。図2Bは、His₆ タグなしの、L144F H-NOX-フォルドン単量体の核酸 (配列番号7) およびアミノ酸配列 (配列番号8) を示す。

20

【0084】

【図2B】図2Aは、His₆ タグを含む、Thermoanaerobacter tengcongensis L144F H-NOX配列のC末端に融合されたバクテリオファージT4フィブリチンのフォルドンドメインの核酸 (配列番号5) およびアミノ酸配列 (配列番号6) を示す。図2Bは、His₆ タグなしの、L144F H-NOX-フォルドン単量体の核酸 (配列番号7) およびアミノ酸配列 (配列番号8) を示す。

30

【0085】

【図3A】図3Aは、野生型Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOX-フォルドン-His₆ キメラタンパク質のDNA配列 (上; 配列番号9) と、融合されたフォルドンおよびHis₆ 配列を有するH-NOXのL144Fバリエントをコードするクローン3I-Aの配列決定データ (下; 配列番号5) とのアライメントを示す。L144F置換ならびに融合に使用したXhoIおよびHindIII制限部位を強調表示する。図3Bは、野生型Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOX-フォルドン-His₆ 単量体のアミノ酸配列 (配列番号10) を示す。図3Cは、His₆ タグなしの野生型H-NOX-フォルドン単量体の核酸 (配列番号11) およびアミノ酸配列 (配列番号12) を示す。図3Dは、C末端においてバクテリオファージT4フォルドンドメインに融合された、Canis lupus H-NOX (1~385) の核酸 (配列番号25) およびアミノ酸 (配列番号26) を示す。図3Eは、C末端においてバクテリオファージT4フォルドンドメインに融合された、Canis lupus H-NOX (1~194) の核酸 (配列番号27) およびアミノ酸 (配列番号28) を示す。

40

【0086】

【図3B】図3Aは、野生型Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOX-フォルドン-His₆ キメラタンパク質のDNA配列 (上; 配列番号9) と、融合されたフォルドンおよびHis₆ 配列を有するH-NOXのL144Fバリエントをコードするクローン3I-Aの配列決定データ (下; 配列番号5) とのア

50

ライメントを示す。L144F置換ならびに融合に使用したXhoIおよびHindIII制限部位を強調表示する。図3Bは、野生型*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX-フォルドン-His₆単量体のアミノ酸配列（配列番号10）を示す。図3Cは、His₆タグなしの野生型H-NOX-フォルドン単量体の核酸（配列番号11）およびアミノ酸配列（配列番号12）を示す。図3Dは、C末端においてバクテリオファージT4フォルドンドメインに融合された、*Canis lupus* H-NOX（1～385）の核酸（配列番号25）およびアミノ酸（配列番号26）を示す。図3Eは、C末端においてバクテリオファージT4フォルドンドメインに融合された、*Canis lupus* H-NOX（1～194）の核酸（配列番号27）およびアミノ酸（配列番号28）を示す。

10

【0087】

【図3C】図3Aは、野生型*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX-フォルドン-His₆キメラタンパク質のDNA配列（上；配列番号9）と、融合されたフォルドンおよびHis₆配列を有するH-NOXのL144Fバリエントをコードするクローン3I-Aの配列決定データ（下；配列番号5）とのアライメントを示す。L144F置換ならびに融合に使用したXhoIおよびHindIII制限部位を強調表示する。図3Bは、野生型*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX-フォルドン-His₆単量体のアミノ酸配列（配列番号10）を示す。図3Cは、His₆タグなしの野生型H-NOX-フォルドン単量体の核酸（配列番号11）およびアミノ酸配列（配列番号12）を示す。図3Dは、C末端においてバクテリオファージT4フォルドンドメインに融合された、*Canis lupus* H-NOX（1～385）の核酸（配列番号25）およびアミノ酸（配列番号26）を示す。図3Eは、C末端においてバクテリオファージT4フォルドンドメインに融合された、*Canis lupus* H-NOX（1～194）の核酸（配列番号27）およびアミノ酸（配列番号28）を示す。

20

【0088】

【図3D】図3Aは、野生型*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX-フォルドン-His₆キメラタンパク質のDNA配列（上；配列番号9）と、融合されたフォルドンおよびHis₆配列を有するH-NOXのL144Fバリエントをコードするクローン3I-Aの配列決定データ（下；配列番号5）とのアライメントを示す。L144F置換ならびに融合に使用したXhoIおよびHindIII制限部位を強調表示する。図3Bは、野生型*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX-フォルドン-His₆単量体のアミノ酸配列（配列番号10）を示す。図3Cは、His₆タグなしの野生型H-NOX-フォルドン単量体の核酸（配列番号11）およびアミノ酸配列（配列番号12）を示す。図3Dは、C末端においてバクテリオファージT4フォルドンドメインに融合された、*Canis lupus* H-NOX（1～385）の核酸（配列番号25）およびアミノ酸（配列番号26）を示す。図3Eは、C末端においてバクテリオファージT4フォルドンドメインに融合された、*Canis lupus* H-NOX（1～194）の核酸（配列番号27）およびアミノ酸（配列番号28）を示す。

30

【0089】

【図3E】図3Aは、野生型*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX-フォルドン-His₆キメラタンパク質のDNA配列（上；配列番号9）と、融合されたフォルドンおよびHis₆配列を有するH-NOXのL144Fバリエントをコードするクローン3I-Aの配列決定データ（下；配列番号5）とのアライメントを示す。L144F置換ならびに融合に使用したXhoIおよびHindIII制限部位を強調表示する。図3Bは、野生型*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX-フォルドン-His₆単量体のアミノ酸配列（配列番号10）を示す。図3Cは、His₆タグなしの野生型H-NOX-フォルドン単量体の核酸（配列番号11）およびアミノ酸配列（配列番号12）を示す。図3Dは

40

50

、C末端においてバクテリオファージT4フォールドドメインに融合された、*Canis lupus* H-NOX (1~385) の核酸 (配列番号25) およびアミノ酸 (配列番号26) を示す。図3Eは、C末端においてバクテリオファージT4フォールドドメインに融合された、*Canis lupus* H-NOX (1~194) の核酸 (配列番号27) およびアミノ酸 (配列番号28) を示す。

【0090】

【図4】図4は、H-NOX-フォールド融合タンパク質の初期精製におけるステップのSDS-PAGEゲルを示す。ラダーは、3.5 kDaバンドがゲル下端から流れ出たNovex Sharpタンパク質標準 (Invitrogen、Grand Island、NY) である。Stdレーンは、公知の量のHis₆タグ付けされた単量体型H-NOXタンパク質 (23 kDa) である。H-NOX-フォールド融合体の誘導は、レーン4および5を比較することにより確かめることができる (融合単量体は、26.7 kDaの分子量を有する)。レーン11、13、14および15に認められる二重バンドは、SDS-PAGE試料バッファーにおける、この含量のタンパク質には不十分なDTTに起因する。レーン1：ラダー；レーン2：0.5 μg 標準；レーン3：1.0 μg 標準；レーン4：誘導前；レーン5：収集上清；レーン6：収集ペレット；レーン7：溶解後；レーン8：遠心分離後；レーン9：遠心分離後ペレット；レーン10：NiNTA素通り画分；レーン11：NiNTAプール；レーン12：NiNTA不良 (no-good) プール；レーン13：DEAE前試料；レーン14：DEAE後プール；レーン15：最終産物。

【0091】

【図5】図5は、H-NOX-フォールド融合タンパク質の発現および精製におけるステップのSDS-PAGEゲルを示す。H-NOX-フォールド融合タンパク質は、精製後に>95%純粋である。SDS-PAGEゲルにおける相対移動度は、26.7 kDa単量体と一致している。レーン1：Precision Plusタンパク質2色マーカー；レーン2：誘導前；レーン3：誘導；レーン4：溶解後；レーン5：加熱後；レーン6：スピニング後；レーン7：Niカラム素通り画分；レーン8：Niカラム洗浄液；レーン9：Niカラム後；レーン10：DEAEカラム前；レーン11：DEAEカラム後。

【0092】

【図6】図6は、H-NOX-フォールド融合タンパク質の解析から得たデコンボリューションしたLC-MSデータを示すグラフである。最終質量は、H-NOX-フォールド単量体単位の予測分子質量26,677 AMUと一致している。

【0093】

【図7】図7は、H-NOX-フォールドタンパク質の分析的サイズ排除クロマトグラフィーのクロマトグラムを示す。クロマトグラムは、3波長 (254、280および418 nm) を追跡して、タンパク質およびヘム構成物の両方をモニターする。H-NOX-フォールドタンパク質は、14.24 mL保持容量で溶出し、推定分子サイズは75.6 kDaである (H-NOX-フォールド三量体に予測される80.0 kDaと同様)。

【0094】

【図8】図8は、H-NOX-フォールドタンパク質の分光学的解析を示す。フォールドドメインの融合は、H-NOXドメインの三次構造、適切な配位でのポルフィリンIXの結合またはポルフィリンへの酸素の結合に干渉しない。ソーレー (Soret) ピーク (415 nm) およびα/βピーク (550~600 nm) を含む特徴的なスペクトルピークは全て、H-NOX単量体およびH-NOX-フォールド融合タンパク質の間で保存されている。

【0095】

【図9】図9は、三量体形成したフォールドドメインを中心に有する、三量体形成したH-NOXタンパク質のモデルである。ポルフィリンIX補助因子および結合した酸素を球で示す。

【0096】

【図10】図10は、2匹の異なるラットにおける、静脈内ボラス（100mg/kg）後のH-NOX三量体の血漿プロファイルを示す。

【0097】

【図11】図11は、ラットにおいて、H-NOX三量体（50mg/kg）投薬にตอบสนองしてIgGおよびIgM抗体が産生されることを示す。1、3、5および22日目に50mg/kg H-NOX三量体を静脈内投薬したラットの血漿（1:10, 000希釈）における、IgGまたはIgM抗体（個々のラットの曲線を示す）。血漿試料のELISAアッセイを3連で行った。平均、+/-SEM。

【0098】

【図12-1】図12は、H-NOX単量体およびH-NOX三量体が、HCT-116結腸由来腫瘍を有するマウスにおいて分布および保持されることを示す。A) H-NOXタンパク質抗体による腫瘍の免疫組織化学染色は、60分で部分的に排除されたH-NOX単量体と比較して、腫瘍における60分間のH-NOX三量体の残留性を示した。B) HCT-116腫瘍切片におけるH-NOXタンパク質染色強度の定量化。N=6、全群。平均値+/-SEM。C) RIF1同系肉腫腫瘍におけるH-NOXの体内分布。

10

【0099】

【図12-2】図12は、H-NOX単量体およびH-NOX三量体が、HCT-116結腸由来腫瘍を有するマウスにおいて分布および保持されることを示す。A) H-NOXタンパク質抗体による腫瘍の免疫組織化学染色は、60分で部分的に排除されたH-NOX単量体と比較して、腫瘍における60分間のH-NOX三量体の残留性を示した。B) HCT-116腫瘍切片におけるH-NOXタンパク質染色強度の定量化。N=6、全群。平均値+/-SEM。C) RIF1同系肉腫腫瘍におけるH-NOXの体内分布。

20

【0100】

【図13】図13は、H-NOX単量体およびH-NOX三量体が、HCT-116結腸由来腫瘍を有するマウスにおける腫瘍低酸素を低下させたことを示す。A) 媒体、H-NOX単量体またはH-NOX三量体で処置したマウスから単離された125mm³腫瘍の代表的腫瘍切片。B) 腫瘍切片における抗ピモニダゾール抗体（Hypoxyprobe-1）強度の定量化。N=6、全群。平均値+/-SEM。*は、腫瘍全体にわたる低酸素を示し、**は、腫瘍における低酸素なしを示す。

【0101】

30

【図14】図14は、HCT-116結腸由来腫瘍を有するマウスにおけるH-NOX単量体による腫瘍浸透および酸素化を示す。A) 抗H-NOXタンパク質抗体で染色した腫瘍切片。B) Hypoxyprobe-1で染色した腫瘍切片。C) 1群当たり6匹のマウスの腫瘍における血管系からの距離の関数としての、Hypoxyprobe-1の定量化。*は、腫瘍全体にわたる低酸素を示し、¥は、腫瘍における低酸素なしを示す。

【0102】

【図15-1】図15は、RIF-1同系肉腫腫瘍を有するマウスにおいてH-NOX三量体が分布および保持されたことを示す。A) 750mg/kg H-NOX三量体またはC) バッファの投与120分後のマウスから単離された400mm³腫瘍と、B) 750mg/kg H-NOX三量体またはD) バッファの投与120分後のマウスから単離された800mm³腫瘍の代表的な切片の免疫蛍光画像。H-NOXタンパク質染色は、抗H-NOX抗体を用いて行った。パネルEおよびFは、RIF-1同系肉腫腫瘍を有するマウスにおけるH-NOX三量体による腫瘍酸素化を示す。E) H-NOXまたはバッファ対照投与の2時間後の抗ピモニダゾール抗体で染色した腫瘍切片。腫瘍全体写真を示す。F) H-NOXまたはバッファ対照投与の2時間後の、抗ピモニダゾール抗体（Hypoxyprobe-1）および抗CD31抗体（BD Bioscience）で染色した腫瘍切片。高拡大率写真を示す。G) RIF1同系肉腫腫瘍におけるH-NOXの体内分布。静脈内注射2時間後に、H-NOX三量体は、血管系から腫瘍組織へと拡散する。H-NOX抗体およびCD31抗体（血管系マーカー、BD Bioscience）による腫瘍切片の免疫組織化学染色。バッファを注射したマウスにおいて、蛍

40

50

光染色は検出されない。

【0103】

【図15-2】図15は、RIF-1同系肉腫腫瘍を有するマウスにおいてH-NOX三量体が分布および保持されたことを示す。A) 750mg/kg H-NOX三量体またはC) バッファーの投与120分後のマウスから単離された400mm³腫瘍と、B) 750mg/kg H-NOX三量体またはD) バッファーの投与120分後のマウスから単離された800mm³腫瘍の代表的な切片の免疫蛍光画像。H-NOXタンパク質染色は、抗H-NOX抗体を用いて行った。パネルEおよびFは、RIF-1同系肉腫腫瘍を有するマウスにおけるH-NOX三量体による腫瘍酸素化を示す。E) H-NOXまたはバッファー対照投与の2時間後の抗ピモニダゾール抗体で染色した腫瘍切片。腫瘍全体写真を示す。F) H-NOXまたはバッファー対照投与の2時間後の、抗ピモニダゾール抗体(Hypoxyprobe-1)および抗CD31抗体(BD Bioscience)で染色した腫瘍切片。高拡大率写真を示す。G) RIF1同系肉腫腫瘍におけるH-NOXの体内分布。静脈内注射2時間後に、H-NOX三量体は、血管系から腫瘍組織へと拡散する。H-NOX抗体およびCD31抗体(血管系マーカー、BD Bioscience)による腫瘍切片の免疫組織化学染色。バッファーを注射したマウスにおいて、蛍光染色は検出されない。

10

【0104】

【図15-3】図15は、RIF-1同系肉腫腫瘍を有するマウスにおいてH-NOX三量体が分布および保持されたことを示す。A) 750mg/kg H-NOX三量体またはC) バッファーの投与120分後のマウスから単離された400mm³腫瘍と、B) 750mg/kg H-NOX三量体またはD) バッファーの投与120分後のマウスから単離された800mm³腫瘍の代表的な切片の免疫蛍光画像。H-NOXタンパク質染色は、抗H-NOX抗体を用いて行った。パネルEおよびFは、RIF-1同系肉腫腫瘍を有するマウスにおけるH-NOX三量体による腫瘍酸素化を示す。E) H-NOXまたはバッファー対照投与の2時間後の抗ピモニダゾール抗体で染色した腫瘍切片。腫瘍全体写真を示す。F) H-NOXまたはバッファー対照投与の2時間後の、抗ピモニダゾール抗体(Hypoxyprobe-1)および抗CD31抗体(BD Bioscience)で染色した腫瘍切片。高拡大率写真を示す。G) RIF1同系肉腫腫瘍におけるH-NOXの体内分布。静脈内注射2時間後に、H-NOX三量体は、血管系から腫瘍組織へと拡散する。H-NOX抗体およびCD31抗体(血管系マーカー、BD Bioscience)による腫瘍切片の免疫組織化学染色。バッファーを注射したマウスにおいて、蛍光染色は検出されない。

20

30

【0105】

【図16】図16は、H-NOX三量体が、肉腫由来の腫瘍を有するマウスにおいて腫瘍に浸透し、腫瘍低酸素を低下させたことを示す。A) ウェスタンブロットメンブランは、H-NOX三量体の検出のために抗H-NOX抗体で、低酸素関連タンパク質の検出のためにHypoxyprobe-1で、あるいは総タンパク質レベルの評価のために抗アクチン抗体で試験した。B) 腫瘍切片におけるピモニダゾール染色強度の定量化。C) 腫瘍切片における抗HIF-1 α 染色強度の定量化。

40

【0106】

【図17】図17は、U251同所性脳腫瘍を有するマウスにおけるH-NOX三量体による腫瘍浸透および脳腫瘍低酸素の低下を示す免疫組織化学画像のパネルである。A) H-NOX三量体または食塩水(対照)投与2時間後のU251腫瘍における抗H-NOX抗体によるH-NOX三量体染色。B) H-NOX三量体または食塩水(対照)投与2時間後のU251腫瘍におけるHypoxyprobe-1染色。腫瘍の一部の拡大画像を示す。

【0107】

【図18】図18は、U251同所性脳腫瘍を有するマウスにおけるH-NOX三量体による腫瘍浸透および脳腫瘍低酸素の低下を示す。A) H-NOX三量体(右パネル)また

50

は食塩水（バッファー、左パネル）投与2時間後のU251腫瘍におけるHypoxyprobe-1染色の免疫蛍光画像。B）免疫蛍光画像のHypoxyprobe-1染色の定量化（H-NOX三量体-右パネル、または食塩水-左パネル）。C）H-NOX三量体または食塩水（バッファー）投与2時間後のU251腫瘍におけるHIF-1 α 染色の免疫蛍光画像。D）免疫蛍光画像のHIF-1 α 染色の定量化。

【0108】

【図19】図19は、U251同所性脳腫瘍および健常脳におけるH-NOX三量体の体内分布を示す。A）H-NOX三量体投与2時間後のU251腫瘍における抗H-NOX抗体によるH-NOX三量体染色。B）脳における腫瘍局在化を示す、U251腫瘍における核DAPI染色。C）およびD）A）の腫瘍の一部の拡大画像は、腫瘍内部のH-NOXの拡散したパターンと、腫瘍外部の血管に制限されたパターンを示す。E）健常マウス脳における、抗H-NOX抗体によるH-NOX三量体染色および抗CD31抗体（BD Bioscience）による血管系染色。

10

【0109】

【図20】図20は、マウスU251同所性神経膠芽腫腫瘍におけるH-NOX単量体またはH-NOX三量体のリアルタイム蛍光画像を示す。A）H-NOX単量体は、2時間までに排除された。B）H-NOX三量体は、腫瘍に残り、1～4時間でピークとなった。IVISにより画像を取得した；矢印は、固有の閾値を超える蛍光の領域を示す；星印は、蛍光強度のピークレベルを示す。

20

【0110】

【図21】図21は、マウスBT-12同所性神経膠芽腫腫瘍におけるH-NOX単量体またはH-NOX三量体のex vivo蛍光画像を示す。A）750mg/kg H-NOX単量体投与の30分後に、B）750mg/kg H-NOX単量体投与の60分後に、C）750mg/kg H-NOX三量体投与の60分後に、あるいはD）媒体投与の60分後に、BT-12腫瘍を有する脳を切除した。

【0111】

【図22】図22は、マウスU251同所性神経膠芽腫腫瘍におけるH-NOX単量体のリアルタイム蛍光画像を示す。H-NOX単量体投与のA）30分後、B）60分後、C）120分後およびD）240分後に、イメージングを取得した。

30

【0112】

【図23】図23は、マウスU251同所性神経膠芽腫腫瘍におけるH-NOX三量体のリアルタイム蛍光画像を示す。H-NOX三量体投与のA）30分後、B）60分後、C）120分後およびD）240分後に、イメージングを取得した。矢印は、蛍光の領域を示す；星印は、蛍光強度のピークレベルを示す。

【0113】

【図24】図24は、マウスU251同所性神経膠芽腫腫瘍におけるH-NOX単量体のリアルタイム蛍光画像を示す。H-NOX単量体投与のA）30分後およびB）60分後の腎臓におけるH-NOX単量体の蓄積。

【0114】

【図25】図25は、マウスGBM-43同所性神経膠芽腫頭蓋内および脊髄性腫瘍におけるH-NOX三量体のリアルタイム蛍光画像を示す。A）H-NOX三量体投与前、ならびにH-NOX三量体投与のB）0.5時間、C）1時間、D）2時間、E）4時間およびF）6時間後の、脊柱におけるH-NOX三量体の分布。

40

【0115】

【図26】図26は、マウスU251同所性神経膠芽腫頭蓋内腫瘍におけるH-NOX三量体のリアルタイム蛍光画像を示す。上パネルは、H-NOX三量体投与前（0分）、ならびにH-NOX三量体投与の30分後、1時間後、2時間後、4時間後、6時間後および72時間後の、脳におけるH-NOX三量体の分布を示す。下パネルは、H-NOX単量体の分布を示す。

【0116】

50

【図27】図27は、マウスU251同所性神経膠芽腫頭蓋内および脊髄性腫瘍におけるH-NOX三量体のリアルタイム生物発光画像を示す。A) H-NOX三量体投与前、ならびに295mg/kgの用量のH-NOX三量体投与のB) 30分後、C) 1時間後、D) 2時間後、E) 4時間後およびF) 6時間後のH-NOX三量体分布。

【0117】

【図28】図28は、マウスU251同所性神経膠芽腫腫瘍におけるH-NOX三量体のリアルタイム蛍光画像を示す。A) H-NOX三量体投与前、ならびに30mg/kgの用量のH-NOX三量体投与のB) 30分後、C) 1時間後、D) 2時間後、E) 4時間後およびF) 6時間後のH-NOX三量体分布。

【0118】

【図29】図29は、小型の頭蓋内腫瘍を含有するU251同所性神経膠芽腫マウスモデルにおけるH-NOX三量体L144Fバリエント分布のリアルタイム蛍光画像を示す。A) H-NOX三量体投与前、ならびに30mg/kgの用量のH-NOX三量体L144Fバリエント投与のB) 30分後、C) 1時間後、D) 2時間後、E) 4時間後およびF) 6時間後のH-NOX三量体L144Fバリエント分布。生物発光(BLI)スコアによって決定される通り、小型の腫瘍は、大型の腫瘍よりも1000×倍小型であった。

【0119】

【図30】図30は、H-NOX三量体分布の蛍光画像を示す。A) 30mg/kg H-NOX三量体またはB) 750mg/kg H-NOX三量体を投与したGBM43同所性神経膠芽腫マウスモデルのex vivo蛍光画像。295mg/kg H-NOX三量体の投与後の、C) 大型頭蓋内腫瘍またはD) 小型頭蓋内腫瘍を含有するU251同所性神経膠芽腫マウスモデルにおけるリアルタイム生物発光イメージング。

【0120】

【図31】図31は、同所性神経膠芽腫腫瘍(U251およびGBM-43)の2種のマウスモデルおよび非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍(AT/RT)の1種のモデルにおけるH-NOX三量体分布のリアルタイム蛍光画像を示す。H-NOX三量体投与の60分後に撮像し、画像毎のカラースケールを最適化した。

【0121】

【図32】図32は、同所性神経膠芽腫腫瘍の3種のマウスモデルの腫瘍を有する半球におけるH-NOXタンパク質分布のex vivo蛍光画像を示す。A) GBM43同所性神経膠芽腫マウスモデルにおける投与の60分後のH-NOX三量体分布、B) U251同所性神経膠芽腫マウスモデルにおける投与の6日後のH-NOX三量体分布、C) BT-12非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍(AT/RT)マウスモデルにおける投与の30分後のH-NOX単量体分布、D) BT-12同所性AT/RTマウスモデルにおける投与の60分後のH-NOX三量体分布およびE) BT-12同所性AT/RTマウスモデルにおける媒体投与の30分後のH-NOXタンパク質シグナルの欠如。

【0122】

【図33】図33は、同所性神経膠芽腫腫瘍マウスモデルにおける血管系からのH-NOX三量体の漏出およびU251脳腫瘍の全体にわたる拡散を示す免疫蛍光画像である。抗H-NOX抗体(上パネル)および抗CD31抗体(血管系)(下パネル)で腫瘍切片を染色した。

【0123】

【図34】図34は、健常マウスの脳におけるH-NOX三量体のサンドイッチELISAアッセイを示す。A) H-NOX三量体(750mg/kg)の静脈内注射後の脳におけるELISAアッセイ。B) H-NOX三量体(200mg/kg)の静脈内注射後の脳におけるELISAアッセイ。C) H-NOX三量体(750mg/kg)の脳/血漿比。D) H-NOX三量体(200mg/kg)の脳/血漿比。H-NOX三量体投与の30、60、90および120分後に血漿および脳を採取した。N=3、全群。平均値+/-SEM。

【0124】

10

20

30

40

50

【図35】図35は、H-NOX三量体が、ヒト神経膠芽腫のU251マウスモデルにおいて分割放射線療法に対し頭蓋内異種移植片を感受性にしたことを示す一連のグラフである。A) 両処置群と共に未処置対照群（H-NOXなし、RTなし）におけるマウスの平均生物発光イメージング（BLI）スコア+/-SEM。N=9、全群。B) 29日目におけるRTおよびRT+H-NOX三量体群の個々のBLIスコア（Aにおけるボックス）。線は、群平均、+/-SEMを示す。RT+H-NOX三量体マウスのBLIスコアは、RT単独で処置したマウスのスコアよりも有意に低かった（ $p=0.039$ 、スチューデントt検定）。C) H-NOX三量体群は、放射線療法のみを与えたマウスと比較して、有意に増強された生存を示した（ $p=0.025$ 、ログランク検定）。

【0125】

10

【図36】図36は、H-NOX三量体が、ヒト神経膠芽腫の2種のマウスモデルにおいて分割放射線療法に対し頭蓋内異種移植片を感受性にしたことを示す一連のグラフである。A) 2Gy放射線療法（2Gy）、H-NOX三量体L144Fバリエーション（L144F三量体）、H-NOX三量体L144Fバリエーションと組み合わせた2Gy放射線療法（2Gy+L144F三量体）または処置バッファ（TB）を投与したU251同所性神経膠芽腫マウスモデルにおける生存パーセント。ログランクp値：2Gy対2Gy+L144F三量体（ $p=0.158$ ）、2Gy対TB（ $p=0.0612$ ）およびL144F三量体対TB（ $p=0.326$ ）。B) 2Gy放射線療法（2Gy）、4Gy放射線療法（4Gy）、8Gy放射線療法（8Gy）、2サイクルの4Gy放射線療法（4Gy×2）、H-NOX三量体と組み合わせた4Gy放射線療法（4Gy+H-NOX）または処置バッファ（未処置）を投与したGBM43同所性神経膠芽腫マウスモデルにおける生存パーセント。ログランクp値：4Gy対4Gy+H-NOX（ $p=0.597$ ）、4Gy対4Gy×2（ $p=0.038$ ）および4Gy×2対4Gy+H-NOX（ $p=0.111$ ）。

20

【0126】

【図37A】図37は、H-NOXタンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。A. 野生型 *Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX（配列番号1および2）。B. 野生型 *Legionella pneumophila* Orf2 H-NOX（配列番号13および14）。C. 野生型 *Legionella pneumophila* Orf1 H-NOX（配列番号15および16）。D. *Homo sapiens* $\beta 1$ （1~385）H-NOX（配列番号17および18）。E. *Homo sapiens* $\beta 2$ （1~217）H-NOX（配列番号19および20）。F. *Rattus norvegicus* $\beta 1$ H-NOX（配列番号21および22）。G. *Rattus norvegicus* $\beta 2$ H-NOX（配列番号23および24）。

30

【図37B】図37は、H-NOXタンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。A. 野生型 *Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX（配列番号1および2）。B. 野生型 *Legionella pneumophila* Orf2 H-NOX（配列番号13および14）。C. 野生型 *Legionella pneumophila* Orf1 H-NOX（配列番号15および16）。D. *Homo sapiens* $\beta 1$ （1~385）H-NOX（配列番号17および18）。E. *Homo sapiens* $\beta 2$ （1~217）H-NOX（配列番号19および20）。F. *Rattus norvegicus* $\beta 1$ H-NOX（配列番号21および22）。G. *Rattus norvegicus* $\beta 2$ H-NOX（配列番号23および24）。

40

【図37C】図37は、H-NOXタンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。A. 野生型 *Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX（配列番号1および2）。B. 野生型 *Legionella pneumophila* Orf2 H-NOX（配列番号13および14）。C. 野生型 *Legionella pneumophila* Orf1 H-NOX（配列番号15および16）。

50

D. *Homo sapiens* $\beta 1$ (1~385) H-NOX (配列番号17および18)。E. *Homo sapiens* $\beta 2$ (1~217) H-NOX (配列番号19および20)。F. *Rattus norvegicus* $\beta 1$ H-NOX (配列番号21および22)。G. *Rattus norvegicus* $\beta 2$ H-NOX (配列番号23および24)。

【図37D】図37は、H-NOXタンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。A. 野生型*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX (配列番号1および2)。B. 野生型*Legionella pneumophila* Orf2 H-NOX (配列番号13および14)。C. 野生型*Legionella pneumophila* Orf1 H-NOX (配列番号15および16)。D. *Homo sapiens* $\beta 1$ (1~385) H-NOX (配列番号17および18)。E. *Homo sapiens* $\beta 2$ (1~217) H-NOX (配列番号19および20)。F. *Rattus norvegicus* $\beta 1$ H-NOX (配列番号21および22)。G. *Rattus norvegicus* $\beta 2$ H-NOX (配列番号23および24)。

10

【図37E】図37は、H-NOXタンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。A. 野生型*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX (配列番号1および2)。B. 野生型*Legionella pneumophila* Orf2 H-NOX (配列番号13および14)。C. 野生型*Legionella pneumophila* Orf1 H-NOX (配列番号15および16)。D. *Homo sapiens* $\beta 1$ (1~385) H-NOX (配列番号17および18)。E. *Homo sapiens* $\beta 2$ (1~217) H-NOX (配列番号19および20)。F. *Rattus norvegicus* $\beta 1$ H-NOX (配列番号21および22)。G. *Rattus norvegicus* $\beta 2$ H-NOX (配列番号23および24)。

20

【図37F】図37は、H-NOXタンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。A. 野生型*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX (配列番号1および2)。B. 野生型*Legionella pneumophila* Orf2 H-NOX (配列番号13および14)。C. 野生型*Legionella pneumophila* Orf1 H-NOX (配列番号15および16)。D. *Homo sapiens* $\beta 1$ (1~385) H-NOX (配列番号17および18)。E. *Homo sapiens* $\beta 2$ (1~217) H-NOX (配列番号19および20)。F. *Rattus norvegicus* $\beta 1$ H-NOX (配列番号21および22)。G. *Rattus norvegicus* $\beta 2$ H-NOX (配列番号23および24)。

30

【図37G】図37は、H-NOXタンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。A. 野生型*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX (配列番号1および2)。B. 野生型*Legionella pneumophila* Orf2 H-NOX (配列番号13および14)。C. 野生型*Legionella pneumophila* Orf1 H-NOX (配列番号15および16)。D. *Homo sapiens* $\beta 1$ (1~385) H-NOX (配列番号17および18)。E. *Homo sapiens* $\beta 2$ (1~217) H-NOX (配列番号19および20)。F. *Rattus norvegicus* $\beta 1$ H-NOX (配列番号21および22)。G. *Rattus norvegicus* $\beta 2$ H-NOX (配列番号23および24)。

40

【発明を実施するための形態】

【0127】

本発明は、一部には、重合体型H-NOXタンパク質が、優先的に血管外遊出して脳等の組織に蓄積し、これにより、単量体型H-NOXタンパク質と比較して、より長い酸化ウィンドウおよびより長い循環半減期をもたらすという驚くべき発見に基づく。The

50

rmoanaerobacter tengcongensis由来の3個のH-NOXドメインを含み、L144F変異を含む三量体型H-NOXタンパク質は、神経膠芽腫腫瘍組織等、低酸素腫瘍組織への酸素の送達に有用であり、これにより、がんの放射線療法を増強することが示された。したがって、本発明は、例えば、放射線療法に対するアジュバントとしての、酸素の送達のためのタンパク質、組成物、キットおよび方法を提供する。

【0128】

定義

他に特段の定めがなければ、本明細書に使用されているあらゆる技術および科学用語の意味は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味である。当業者であれば、本明細書に記載されている方法および材料と同様または均等ないずれかの方法および材料を使用して、本発明を実施または試験してよいことも十分に理解されよう。

10

【0129】

本明細書における使用のため、それ以外のことが明らかに指示されていなければ、「a」、「an」などの用語の使用は、1個または複数を指す。

【0130】

本願において、「または」の使用は、明確に記述されていない限り、あるいは当業者によって理解されない限り、「および／または」を意味する。複数の従属クレームの文脈において、「または」の使用は、2項以上の先行する独立または従属クレームを遡って指す。

20

【0131】

「約」による値またはパラメータへの言及は、本明細書において、値またはパラメータそれ自体に関する実施形態を含む（記載する）。例えば、「約X」を指す記載は、「X」の記載を含む。

【0132】

本明細書に記載されている本発明の態様および実施形態が、態様および実施形態「を含む」、「からなる」および「から本質的になる」ことを含むことが理解される。

【0133】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基の重合体を指すよう互換的に使用されており、最小の長さには限定されない。このようなアミノ酸残基の重合体は、天然または非天然アミノ酸残基を含有することができ、その例として、ペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸残基の二量体、三量体および重合体が挙げられるがこれらに限定されない。この定義によって、全長タンパク質およびその断片の両方が包含される。この用語は、ポリペプチドの発現後改変、例えば、グリコシル化、シアリル化(sialylation)、アセチル化、リン酸化なども含む。さらに、本発明のために、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持するのであれば、ネイティブ配列に対する欠失、付加および置換（一般に、保存的な性質）等の改変を含むタンパク質を指す。これらの改変は、部位特異的な変異誘発によるなど、計画的であってもよいし、あるいはタンパク質を産生する宿主の変異またはPCR増幅によるエラーによるなど、偶発的であってもよい。本明細書において使用する場合、タンパク質は、共有結合または非共有結合により会合した2個以上のサブユニットを含むことができる；例えば、タンパク質は、2個以上の会合した単量体を含むことができる。

30

40

【0134】

用語「核酸分子」、「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、互換的に使用することができ、ヌクレオチドの重合体を指す。このようなヌクレオチドの重合体は、天然および／または非天然ヌクレオチドを含有することができ、その例として、DNA、RNAおよびPNAが挙げられるがこれらに限定されない。「核酸配列」は、核酸分子またはポリヌクレオチドを含むヌクレオチドの直鎖状配列を指す。

【0135】

50

本明細書において使用する場合、「H-NOXタンパク質」は、H-NOXドメイン（ヘム—酸化窒素および酸素（Heme-Nitric oxide and Oxygen）結合ドメインにちなみ命名）を有するタンパク質を意味する。H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインに加えて1個または複数の他のドメインを含有しても含有しなくてもよい。一部の例において、H-NOXタンパク質は、グアニリルシクラーゼドメインを含まない。H-NOXタンパク質は、重合ドメインを含んでも含まなくてもよい。

【0136】

本明細書において使用する場合、「重合体型H-NOXタンパク質」は、2個以上のH-NOXドメインを含むH-NOXタンパク質である。H-NOXドメイン同士は、共有結合または非共有結合により会合され得る。

10

【0137】

本明細書において使用する場合、「H-NOXドメイン」は、ヘムによって一酸化窒素および／または酸素に結合するタンパク質の全体または一部である。H-NOXドメインは、ヘムを含むことができる、あるいはヘムに結合することができるアポプロタンパク質（apoprotein）として見出すことができる。一部の例において、H-NOXドメインは、6個のアルファヘリックスと、続く2個のベータ鎖と、続く1個のアルファヘリックスと、続く2個のベータ鎖を含む。一部の例において、H-NOXドメインは、配列番号2に示される*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOXのH-NOXドメインに対応する。例えば、H-NOXドメインは、配列番号2に示される*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOXのH-NOXドメインに対し、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%同一であり得る。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、配列番号2に示される*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOXのH-NOXドメインに対し、10%～20%、20%～30%、30%～40%、40%～50%、50%～60%、60%～70%、70%～80%、80%～90%、90%～95%、95%～99%または100%同一であり得る。

20

【0138】

本明細書において使用する場合、「重合ドメイン」は、単量体部分の会合を促進して、重合体構造を形成させるドメイン（例えば、ポリペプチドドメイン）である。例えば、重合ドメインは、単量体型H-NOXドメインの会合を促進して、重合体型H-NOXタンパク質を作製することができる。例示的な重合ドメインは、三量体型ポリペプチドの形成を促進する、T4バクテリオファージのフォールドドメインである。重合ドメインの他の例として、Arc、POZ、コイルドコイルドメイン（GCN4、ロイシンジッパー、Velcroを含む）、ウテログロビン、コラーゲン、3本鎖コイルドコイル（collis）（マトリリン-1）、トロンボスポリン（thrombosporin）、TRPV1-C、P53、Mnt、アビジン（avadin）、ストレプトアビジン、Bcr-Ab1、COMP、ペロ毒素サブユニットB、CamKII、RCKおよびNエチルマレイミド感受性融合タンパク質由来のドメイン、STM3548、KaiC、TyrR、Hcp1、CcmK4、GP41、炭疽菌防御抗原、アエロリジン、αヘモリジン、C4b結合タンパク質、Mi-CK、アリールスルファターゼ（arylsulfatase）Aおよびウイルスカプシドタンパク質が挙げられるがこれらに限定されない。

30

40

【0139】

本明細書において使用する場合、「アミノ酸リンカー配列」または「アミノ酸スペーサー配列」は、タンパク質の2個のドメインの連結に使用することができる短いポリペプチド配列である。一部の実施形態において、アミノ酸リンカー配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11個以上のアミノ酸の長さである。例示的なアミノ酸リンカー配列として、Gly-Ser-Gly配列およびArg-Gly-Ser配列が挙げられるがこれらに限定されない。

【0140】

50

本明細書において使用する場合、「His₆ タグ」は、ポリペプチドに結合した6個のHis残基を含むペプチドを指す。His₆ タグを使用して、タンパク質精製を容易にすることができる；例えば、His₆ タグに特異的なクロマトグラフィーを使用する。精製後に、His₆ タグは、エキソペプチダーゼを使用して切断することができる。

【0141】

用語「実質的に類似」または「実質的に同じ」は、本明細書において使用する場合、当業者が、2種以上の数値の間の差に、該値によって評価される(measured)生物学的特徴の文脈の範囲内で、生物学的および／または統計学的有意性が殆どないまたは全くないとみなすような、該2種以上の数値の間の十分に高度な類似性を表す。一部の実施形態において、2種以上の実質的に類似の値は、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%または約50%のうちいずれか1種以下だけ異なる。

10

【0142】

語句「実質的に低下した」または「実質的に異なる」は、本明細書において使用する場合、当業者が、2種の数値の間の差に、該値によって評価される生物学的特徴の文脈の範囲内で、統計学的有意性があるとみなすような、該2種の数値の間の十分に高度な差を表す。一部の実施形態において、2種の実質的に異なる数値は、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約60%、約70%、約80%または約90%のうちいずれか1種を超えて異なる。一部の実施形態において、2種の実質的に異なる数値は、約10%～約20%、約20%～約30%、約30%～約40%、約40%～約50%、約50%～約60%、約60%～約70%、約70%～約80%、約80%～約90%、約90%～約95%、約95%～約99%または約100%のうちいずれか1種だけ異なる。

20

【0143】

「ネイティブ配列」のポリペプチドは、自然に見出されるポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。よって、ネイティブ配列のポリペプチドは、いずれかの生物由来の天然起源のポリペプチドのアミノ酸配列を有することができる。このようなネイティブ配列のポリペプチドは、自然から単離することができる、あるいは組換えまたは合成手段により生成することができる。用語「ネイティブ配列」のポリペプチドは、天然起源のトランケートまたは分泌型のポリペプチド(例えば、細胞外ドメイン配列)、天然起源のバリエーション型(例えば、選択的スプライス型)および天然起源のアレルバリエーションのポリペプチドを特に包含する。

30

【0144】

ポリペプチド「バリエーション」は、配列を整列し、必要であればギャップを導入して、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮せず、最大パーセント配列同一性を達成した後に、ネイティブ配列のポリペプチドと少なくとも約80%アミノ酸配列同一性を有する生物活性ポリペプチドを意味する。このようなバリエーションは、例えば、ポリペプチドのNまたはC末端において1個または複数のアミノ酸残基が付加または欠失されたポリペプチドを含む。一部の実施形態において、バリエーションは、ネイティブ配列のポリペプチドと、少なくとも約80%、約90%または約95%アミノ酸配列同一性のうちいずれか1種を有する。一部の実施形態において、バリエーションは、ネイティブ配列のポリペプチドと、約80%～約90%、約90%～約95%または約95%～約99%アミノ酸配列同一性のうちいずれか1種を有する。

40

【0145】

本明細書において使用する場合、「変異体タンパク質」は、自然に存在するタンパク質と比較して、1個または複数の変異を有するタンパク質を意味する。一実施形態において、変異体タンパク質は、自然に存在するあらゆるタンパク質の配列とは異なる配列を有する。様々な実施形態において、変異体タンパク質のアミノ酸配列は、自然に存在するタンパク質の対応する領域の配列に対し、少なくとも約10、約15、約20、約25、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約95、約97、約98、約99または約99.5%同一のうちいずれかである。一部の実施形態において、変異体タン

50

パク質のアミノ酸配列は、自然に存在するタンパク質の対応する領域の配列に対し、少なくとも約10%～約20%、約20%～約30%、約30%～約40%、約40%～約50%、約50%～約60%、約60%～約70%、約70%～約80%、約80%～約90%、約90%～約95%、約95%～約99%または約100%同一のうちのいずれかである。一部の実施形態において、変異体タンパク質は、全長タンパク質から少なくとも約25、約50、約75、約100、約150、約200、約300または約400個の連続アミノ酸のうちのいずれかを含有するタンパク質断片である。一部の実施形態において、変異体タンパク質は、全長タンパク質から約25～約50、約50～約75、約75～約100、約100～約150、約150～約200、約200～約300または約300～約400個の連続アミノ酸のうちのいずれかを含有するタンパク質断片である。配列同一性は、例えば、配列解析ソフトウェアを使用して、その中で指定されたデフォルトパラメータにより測定することができる（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705）。このソフトウェアプログラムは、様々なアミノ酸置き換え、欠失および他の改変に相同性の程度を割り当てることにより、類似の配列をマッチさせる。

10

【0146】

本明細書において使用する場合、「変異」は、自然に存在する参照核酸配列またはアミノ酸配列の変更を意味する。例示的な核酸変異は、挿入、欠失、フレームシフト変異、サイレント変異、ナンセンス変異またはミスセンス変異を含む。一部の実施形態において、核酸変異は、サイレント変異ではない。例示的なタンパク質変異は、1個もしくは複数のアミノ酸の挿入（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸の挿入）、1個もしくは複数のアミノ酸の欠失（例えば、少なくとも約5、約10、約15、約25、約50、約75、約100、約150、約200、約300個以上のアミノ酸のうちのいずれかの欠失、または約5～約10、約10～約15、約15～約25、約25～約50、約50～約75、約75～約100、約100～約150、約150～約200、約200～約300もしくは約300～約400個のアミノ酸のうちのいずれかの欠失等、N末端、C末端および／または内側残基の欠失）、1個もしくは複数のアミノ酸の置き換え（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸の置き換え）、または上記の2種以上の組合せを含む。特定のアミノ酸変異の言及に使用される命名法は、先ず野生型アミノ酸、続いて残基番号、最後に置換アミノ酸を同定する。例えば、Y140Lは、残基番号140のチロシンがロイシンに置き換えられたことを意味する。同様に、バリエーションH-NOXタンパク質は、H-NOXタンパク質のアミノ酸変種（variation）により参照することができる。例えば、T. tengcongensis Y140L H-NOXタンパク質は、位置番号140のチロシン残基がロイシン残基に置き換えられたT. tengcongensis H-NOXタンパク質を指し、T. tengcongensis W9F/Y140L H-NOXタンパク質は、9位のトリプトファン残基がフェニルアラニン残基に置き換えられ、位置番号140のチロシン残基がロイシン残基に置き換えられたT. tengcongensis H-NOXタンパク質を指す。

20

30

40

【0147】

「進化的に保存された変異」は、あるタンパク質におけるアミノ酸の、同じタンパク質ファミリーの別のタンパク質の対応する位置におけるアミノ酸による置き換えである。

【0148】

本明細書において使用する場合、「に由来する」は、1個または複数の変異が導入されるタンパク質の供給源を指す。例えば、「哺乳動物タンパク質に由来する」タンパク質は、野生型（即ち、自然に存在する配列）哺乳動物タンパク質の配列への1個または複数の変異の導入から結果として生ずる目的のタンパク質を指す。

【0149】

50

本明細書において使用する場合、ペプチド、ポリペプチドまたは抗体配列に関する「パーセント (%) アミノ酸配列同一性」および「相同性」は、配列を整列し、必要であればギャップを導入して、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮せず、最大パーセント配列同一性を達成した後、特定のペプチドまたはポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアライメントは、当業者の技能範囲内の様々な仕方で達成することができ、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMEGALIGNTM (DNASTAR) ソフトウェア等、公開されているコンピュータソフトウェアを使用する。当業者であれば、比較されている配列の全長にわたる最大アライメントの達成に必要とされるいずれかのアルゴリズムを含む、アライメントの測定に適切なパラメータを決定することができる。

10

【0150】

本明細書において使用する場合、「 k_{off} 」は、タンパク質からの O_2 または NO の放出速度等、解離速度を指す。数値的により低い k_{off} は、より遅い解離速度を示す。

【0151】

本明細書において使用する場合、「 k_{on} 」は、タンパク質への O_2 または NO の結合速度等、会合速度を指す。数値的により低い k_{on} は、より遅い会合速度を示す。

【0152】

本明細書において使用する場合、「解離定数」は、「動力学解離定数」または「計算された解離定数」を指す。「動力学解離定数」または「 K_D 」は、動力学解離速度 (k_{off}) の動力学結合速度 (on-rate) (k_{on}) に対する比であり、例えば、当業者に公知のおよび／または本明細書に記載されている方法を含む標準方法 (例えば、標準分光学的な方法、ストップフロー法または閃光光分解法) を使用して絶対値として決定される K_D 値である。「計算された解離定数」または「計算された K_D 」は、測定された k_{off} に基づく動力学解離定数の近似値を指す。 k_{on} の値は、本明細書に記載されている動力学 K_D および k_{off} の間の相関によって導かれる。

20

【0153】

本明細書において使用する場合、「酸素親和性」は、タンパク質のヘム部分への酸素結合の強度を指す定性的用語である。この親和性は、酸素に対する k_{off} および k_{on} の両方によって影響される。数値的により低い酸素 K_D 値は、より高い親和性を意味する。

30

【0154】

本明細書において使用する場合、「 NO 親和性」は、タンパク質への NO 結合の強度を指す定性的用語である (タンパク質と会合したヘム基へのまたはヘム基に結合した酸素への結合等)。この親和性は、 NO に対する k_{off} および k_{on} の両方によって影響される。数値的により低い NO K_D 値は、より高い親和性を意味する。

【0155】

本明細書において使用する場合、「 NO 安定性」は、酸素の存在下における NO による酸化に対するタンパク質の安定性または抵抗性を指す。例えば、酸素の存在下において NO に結合したときに酸化されないタンパク質の能力は、タンパク質の NO 安定性を示す。一部の実施形態において、約1、約2、約4、約6、約8、約10、約15または約20時間のうちいずれかの間、 $20^\circ C$ でインキュベーションした後に、 $H-NOX$ タンパク質の約50%未満、約40%未満、約30%未満、約10%未満または約5%未満のうちいずれかが酸化される。

40

【0156】

本明細書において使用する場合、「 NO 反応性」は、酸素の存在下において NO によってヘム結合タンパク質のヘムにおける鉄が酸化される速度を指す。 s^{-1} 単位で表す NO 反応性のより低い数値は、より低い NO 反応性を示す。

【0157】

本明細書において使用する場合、「自動酸化速度」は、ヘム結合タンパク質のヘムにおける鉄が自動酸化される速度を指す。 s^{-1} の単位で表すより低い数値の自動酸化速度は

50

、より低い自動酸化速度を示す。

【0158】

用語「ベクター」は、宿主細胞において増やすことができる、クローニングされたポリヌクレオチド（単数または複数）を含有するよう操作する（engineered）ことができるポリヌクレオチドを記載するために使用される。ベクターは、次のエレメントのうち1種または複数を含むことができる：複製起点、目的のポリペプチドの発現を調節する1種もしくは複数の調節配列（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー等）および／または1種もしくは複数の選択可能マーカー遺伝子（例えば、抗生物質抵抗性遺伝子および比色分析アッセイにおいて使用することができる遺伝子、例えばβ-ガラクトシダーゼ等）。用語「発現ベクター」は、宿主細胞における目的のポリペプチドの発現に使用されるベクターを指す。

10

【0159】

「宿主細胞」は、ベクターまたは単離されたポリヌクレオチドのレシピエントであり得るまたはベクターまたは単離されたポリヌクレオチドのレシピエントであった細胞を指す。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。例示的な真核細胞は、霊長類または非霊長類の動物細胞等の哺乳動物細胞；酵母等の真菌細胞；植物細胞；および昆虫細胞を含む。例示的な原核細胞は、細菌細胞；例えば、E. coli 細胞を含む。

【0160】

用語「単離された」は、本明細書において使用する場合、典型的に自然に見出されるまたは産生される構成成分の少なくとも一部から分離された分子を指す。例えば、ポリペプチドは、該ポリペプチドが産生された細胞の構成成分の少なくとも一部から分離される場合、「単離された」と称される。発現後に細胞によってポリペプチドが分泌され、産生した細胞から該ポリペプチドを含有する上清を物理的に分離する場合、それは、ポリペプチドを「単離すること」とみなされる。同様に、ポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドが典型的に自然に見出されるより大型のポリヌクレオチド（例えば、DNAポリヌクレオチドの場合、ゲノムDNAまたはミトコンドリアDNA等）の一部ではない場合、あるいは該ポリヌクレオチドが産生された細胞の構成成分の少なくとも一部から分離される場合、例えば、RNAポリヌクレオチドの場合、「単離された」と称される。よって、宿主細胞内部のベクターに含有されるDNAポリヌクレオチドは、「単離された」と称することができる。

20

30

【0161】

用語「個体」または「被験体」は、動物；例えば、哺乳動物を指すよう、本明細書において互換的に使用される。一部の実施形態において、ヒト、齧歯類、サル、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、哺乳動物の実験動物、哺乳動物の家畜、哺乳動物の競技（sport）動物および哺乳動物のペットが挙げられるがこれらに限定されない、哺乳動物を処置する方法が提供される。一部の例において、「個体」または「被験体」は、疾患または障害の処置を必要とする個体または被験体を指す。

【0162】

「疾患」または「障害」は、本明細書において使用する場合、処置が必要とされる状態を指す。

40

【0163】

用語「がん」は、制御できない細胞増殖、無制限の細胞成長およびアポトーシスによる細胞死の減少と関連する悪性増殖性障害を指す。

【0164】

用語「腫瘍」は、異常に高レベルの増殖および成長を示す細胞の群を指すよう本明細書において使用される。腫瘍は、良性、前悪性または悪性であり得る；悪性腫瘍細胞はがん性である。腫瘍細胞は、固形腫瘍細胞または白血病性腫瘍細胞であり得る。用語「腫瘍成長」は、腫瘍サイズの対応する増加をもたらす、腫瘍を含む細胞（単数または複数）による増殖または成長を指すよう本明細書において使用される。

【0165】

50

本明細書において使用する場合、「処置」は、有益なまたは所望の臨床結果を得るためのアプローチである。「処置」は、本明細書において使用する場合、ヒトを含む哺乳動物における疾患のための療法のいずれかの投与または適用を網羅する。本発明のために、有益なまたは所望の臨床結果として、次のうちいずれか1種または複数が挙げられるがこれらに限定されない：1種または複数の症状の軽減、疾患の程度の縮小、疾患の伝播（例えば、転移、例えば、肺またはリンパ節への転移）の防止または遅延、疾患の再発の防止または遅延、疾患進行の遅延または遅くすること、疾患状態の寛解、疾患または疾患進行の阻害、疾患またはその進行の阻害または遅くすること、その発症の抑止、および寛解（部分的であれ完全であれ）。「処置」には、増殖性疾患の病理学的意義の低下も包含される。本発明の方法は、処置の上述の態様のうちいずれか1種または複数を企図する。

10

【0166】

がんの文脈において、用語「処置する」は、次のうちいずれかまたは全てを含む：腫瘍細胞またはがん細胞の成長の阻害、腫瘍細胞またはがん細胞の複製の阻害、全体的な腫瘍負荷を和らげること、および疾患に関連する1種または複数の症状の寛解。

【0167】

用語「阻害」または「阻害する」は、いずれかの表現型特徴の減少もしくは休止または該特徴の発生率、程度もしくは見込みの減少もしくは休止を指す。「低下する」または「阻害する」は、参照と比較して、活性、機能および／または量を減少、低下または抑止することである。ある特定の実施形態において、「低下する」または「阻害する」とは、20%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。別の実施形態において、「低下する」または「阻害する」とは、50%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。さらに別の実施形態において、「低下する」または「阻害する」とは、75%、85%、90%、95%または99%の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。

20

【0168】

本明細書において使用する場合、「疾患の発症の遅延」は、疾患（がん等）の発症を延期する、妨害する、遅くする、減速する、安定化する、抑制するおよび／または先送りすることを意味する。この遅延は、疾患の病歴および／または処置されている個体に応じて時間の長さを変えられることができるというものである。当業者に明らかな通り、十分なまたは有意な遅延は、事実上、個体が疾患を発症しないという点において、防止を包含することができる。例えば、転移の発症等、後期がんを遅延させることができる。

30

【0169】

「参照」は、本明細書において使用する場合、比較目的で使用されるいずれかの試料、標準またはレベルを指す。参照は、健常および／または非罹患試料から得ることができる。一部の例において、参照は、未処置試料から得ることができる。一部の例において、参照は、被験体個体の非罹患または無処置試料から得られる。一部の例において、参照は、被験体または患者ではない1名または複数の健常個体から得られる。

【0170】

「防止」は、本明細書において使用する場合、疾患の素因を有する可能性があるが該疾患であるとは未だ診断されていない被験体における該疾患の発生または再発に関する予防の提供を含む。

40

【0171】

薬剤の「有効量」は、必要とされる投薬量および期間において、所望の治療的または予防的結果の達成に有効な量を指す。

【0172】

本発明の物質／分子、アゴニストまたはアンタゴニストの「治療有効量」は、個体の疾患状態、年齢、性別および体重、ならびに個体において所望の応答を誘発する物質／分子、アゴニストまたはアンタゴニストの能力等の因子に応じて変動し得る。治療有効量は、また、物質／分子、アゴニストまたはアンタゴニストの治療に有益な効果が、その物質／分子、アゴニストまたはアンタゴニストのいかなる毒性または有害効果をも上回る量である。治療有効量は、1回または複数の投与において送達することができる。

50

【0173】

「予防有効量」は、必要とされる投薬量および期間において、所望の予防的結果の達成に有効な量を指す。典型的には、但し、必ずしもそうではないが、予防的用量は、疾患に先立ちまたはその初期に被験体において使用されるため、予防有効量は、治療有効量に満たない。

【0174】

用語「医薬製剤」および「医薬組成物」は、活性成分（複数可）の生物活性を有効にするような形態の、かつ製剤が投与される被験体に許容できない毒性を有する追加の構成成分を含有しない調製物を指す。このような製剤は、滅菌されエンドトキシンを本質的に含まないものとし得る。

10

【0175】

「薬学的に許容されるキャリア」は、無毒性固体、半固体もしくは液体充填剤、希釈剤、カプセル封入材料、製剤補助剤、または被験体への投与のための「医薬組成物」を共に含む治療剤と使用するための当技術分野における従来のキャリアを指す。薬学的に許容されるキャリアは、用いられている投薬量および濃度において、レシピエントに対し無毒性であり、製剤の他の成分と適合性である。薬学的に許容されるキャリアは、用いられている製剤に適切である。

【0176】

「滅菌」製剤は、無菌であるまたは生きた微生物およびその胞子を本質的に含まない。

【0177】

1種または複数のさらに別の治療剤「と組み合わせた」投与は、同時（*simultaneous*）（同時（*concurrent*））およびいずれかの順序の継続的または逐次投与を含む。

20

【0178】

用語「同時に」は、投与の少なくとも一部が時間的に重複する、または一方の治療剤の投与が他方の治療剤の投与と比べて短い期間内に収まる、2種以上の治療剤の投与を指すよう本明細書において使用される。例えば、2種以上の治療剤は、約30分間以下、約15分間以下、約10分間以下、約5分間以下または約1分間以下のうちいずれか等、約60分間以下の時間的な隔たりで投与される。

【0179】

用語「逐次的に」は、1種または複数の薬剤の投与が1種または複数の他の薬剤の投与の中断後に続く、2種以上の治療剤の投与を指すよう本明細書において使用される。例えば、2種以上の治療剤の投与は、約20、約30、約40、約50もしくは約60分間、約1日間、約2日間、約3日間、約1週間、約2週間または約1カ月間のうちいずれか等、約15分間を超える時間的な隔たりで投与される。

30

【0180】

本明細書において使用する場合、「と併せて」は、ある処置様式の、別の処置様式に加えた投与を指す。そのようなものとして、「と併せて」は、個体へのある処置様式の、他の処置様式の投与の前、最中または後における投与を指す。

【0181】

用語「添付文書」は、このような治療製品の使用に関する適応症、利用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌および／または警告に関する情報を含有する、治療製品の商業的パッケージに習慣的に含まれる指示を指すよう使用される。

40

【0182】

「製造品」は、少なくとも1種の試薬、例えば、疾患もしくは障害（例えば、がん）の処置のための医薬、または本明細書に記載されているバイオマーカーを特異的に検出するためのプローブを含むいずれかの製造物（例えば、パッケージまたは容器）またはキットである。ある特定の実施形態において、製造物またはキットは、本明細書に記載されている方法を実施するための単位として販売促進、配給または販売される。

【0183】

50

H-NOXタンパク質

H-NOXタンパク質ファミリーの概要

他に特段の断りがなければ、本明細書に記載されている組成物、キットおよび方法において、いかなる野生型または変異体H-NOXタンパク質を使用してもよい。本明細書において使用する場合、「H-NOXタンパク質」は、H-NOXドメイン（ヘム—酸化窒素および酸素（Heme-Nitric oxide and OXygen）結合ドメインにちなみ命名）を有するタンパク質を意味する。H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインに加えて1個または複数の他のドメインを含有しても含有しなくてもよい。H-NOXタンパク質は、ヘムタンパク質の高度に保存され十分に特徴付けされたファミリーのメンバーである（Iyer, L. M. ら（2003年2月3日）BMC Genomics 4巻（1号）：5頁；Karow, D. S. ら（2004年8月10日）Biochemistry 43巻（31号）：10203～10211頁；Boon, E. M. ら（2005年）Nature Chem. Biol. 1巻：53～59頁；Boon, E. M. ら（2005年10月）Curr. Opin. Chem. Biol. 9巻（5号）：441～446頁；Boon, E. M. ら（2005年）J. Inorg. Biochem. 99巻（4号）：892～902頁）。H-NOXタンパク質は、Pfam 07700タンパク質またはHNOBタンパク質とも称される（Pfam — タンパク質ドメインファミリーアライメントおよび隠れマルコフモデルのデータベース、著作権（C）1996～2006年、The Pfam Consortium；GNU LGPL Free Software Foundation, Inc.、59 Temple Place — Suite 330, Boston, MA 02111-1307, USA）。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、6個のアルファヘリックスと、続く2個のベータ鎖と、続く1個のアルファヘリックスと、続く2個のベータ鎖を含む二次構造を有するまたは有すると予測される。H-NOXタンパク質は、ヘムに結合することができるアポタンパク質またはヘムが結合したホロタンパク質であり得る。H-NOXタンパク質は、ヘム基に共有結合または非共有結合により結合することができる。一部のH-NOXタンパク質は、NOに結合するが、O₂には結合せず、その他は、NOおよびO₂の両方に結合する。単離された通性好気性菌由来のH-NOXドメインは、NOに結合するが、O₂には結合しない。偏性好気性原核生物、C. elegansおよびD. melanogaster由来のH-NOXタンパク質は、NOおよびO₂に結合する。哺乳動物は、2種のH-NOXタンパク質：β1およびβ2を有する。マウス、ラット、ウシおよびヒトH-NOX配列のアライメントは、これらの種が、>99%同一性を共有することを示す。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のH-NOXドメインまたはH-NOXタンパク質全体は、天然起源のThermoanaerobacter tengcongens H-NOXタンパク質（例えば、配列番号2）または天然起源のsGCタンパク質（例えば、天然起源のsGC β1タンパク質）の対応する領域のそれに対し、少なくとも約10、約15、約20、約25、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約95、約97、約98、約99または約99.5%同一のうちいずれかである。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のH-NOXドメインまたはH-NOXタンパク質全体は、天然起源のThermoanaerobacter tengcongens H-NOXタンパク質（例えば、配列番号2）または天然起源のsGCタンパク質（例えば、天然起源のsGC β1タンパク質）の対応する領域のそれに対し、少なくとも約10～約20%、約20～約30%、約30～約40%、約40～約50%、約50～約60%、約60～約70%、約70～約80%、約80～約90%、約90～約95%、約95～約99または約99～約99.9%同一のうちいずれかである。本明細書にさらに記述されている通り、H-NOXタンパク質は、対応する天然起源のH-NOXタンパク質と比べて、1個または複数の変異を必要に応じて含有することができる。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインに加えて1個または複数のドメインを含む。特定の実施形態において、H-NOXタンパク質は、別のタンパク

10

20

30

40

50

質由来の1個もしくは複数のドメインまたは配列全体を含む。例えば、H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインと、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）等の別のタンパク質の一部または全体とを含む融合タンパク質であり得る。一部の実施形態において、H-NOXドメインのみが存在する。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、グアニリルシクラーゼドメインを含まない。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、タグ；例えば、His₆タグを含む。

【0184】

重合体型H-NOXタンパク質

一部の態様において、本発明は、2個以上のH-NOXドメインを含む重合体型H-NOXタンパク質を提供する。2個以上のH-NOXドメインは、共有結合により連結または非共有結合により連結されていてよい。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体（octomer）、九量体（nanomer）または十量体の形態である。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、同種H-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、異種H-NOXドメインを含む；例えば、H-NOXドメインは、特定の種のH-NOXドメインのアミノ酸バリエーションを含むことができる、あるいは異なる種由来のH-NOXドメインを含むことができる。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインのうち少なくとも1個は、T. tengcongensis H-NOXのL144F変異に対応する変異を含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインのうち少なくとも1個は、T. tengcongensis H-NOXのW9F/L144F変異に対応する変異を含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、1個または複数の重合ドメインを含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、三量体型H-NOXタンパク質である。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、少なくとも1個の三量体形成ドメインを含む。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質は、3個のT. tengcongensis H-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、三量体型H-NOXドメインは、3個のT. tengcongensis L144F H-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、三量体型H-NOXドメインは、3個のT. tengcongensis W9F/L144F H-NOXドメインを含む。

【0185】

本発明の一部の態様において、重合体型H-NOXタンパク質は、2個以上の会合した単量体を含む。単量体は、共有結合により連結または非共有結合により連結され得る。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質の単量体サブユニットが産生され、単量体サブユニットは、in vitroまたはin vivoで会合して、重合体型H-NOXタンパク質を形成する。一部の実施形態において、単量体は、H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む。一部の実施形態において、重合ドメインは、H-NOXドメインに共有結合により連結される；例えば、H-NOXドメインのC末端は、重合ドメインのN末端またはC末端に共有結合により連結される。他の実施形態において、H-NOXドメインのN末端は、重合ドメインのN末端またはC末端に共有結合により連結される。一部の実施形態において、アミノ酸スペーサーは、H-NOXドメインおよび重合ドメインの間に共有結合により連結される。「アミノ酸スペーサー」および「アミノ酸リンカー」は、本明細書において互換的に使用される。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質の単量体サブユニットのうち少なくとも1個は、T. tengcongensis H-NOXのL144F変異に対応する変異を含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質の単量体サブユニットのうち少なくとも1個は、T. tengcongensis H-NOXのW9F/L144F変異に対応する変異を含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、三量体型H-NOXタンパク質である。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質の単量体は、H-NOXドメインと、T4バクテリオファージのフォールドドメインとを含む。一

部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質の単量体は、T. tengcongensis H-NOXドメインと、フォルドンドメインとを含む。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質の単量体は、T. tengcongensis L144F H-NOXドメインと、フォルドンドメインとを含む。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質の単量体は、T. tengcongensis W9F/L144F H-NOXドメインと、フォルドンドメインとを含む。一部の実施形態において、三量体H-NOXタンパク質は、3個の単量体を含み、各単量体は、T. tengcongensis L144F H-NOXドメインと、フォルドンドメインとを含む。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、アミノ酸リンカー；例えば、Gly-Ser-Glyリンカーによりフォルドンドメインに連結される。一部の実施形態において、少なくとも1個のH-NOXドメインは、タグを含む。一部の実施形態において、少なくとも1個のH-NOXドメインは、His₆タグを含む。一部の実施形態において、His₆タグは、アミノ酸リンカー；例えば、Arg-Gly-Serリンカーによりフォルドンドメインに連結される。一部の実施形態において、H-NOXドメインの全てが、His₆タグを含む。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質は、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号26または配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0186】

T. tengcongensis由来の例示的なH-NOXドメインは、およそ26.7 kDalである。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、約50 kDal、75 kDal、100 kDal、125 kDalまたは約150 kDalのうちいずれかを超える原子質量を有する。

20

【0187】

本発明は、重合体型H-NOXタンパク質であって、個体への該H-NOXタンパク質の投与後に、単一のH-NOXドメインを含む対応する単量体型H-NOXタンパク質と比較して、該個体の1種または複数の組織においてより多くの蓄積を示す重合体型H-NOXタンパク質を提供する。対応するH-NOXタンパク質は、重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインのうちの少なくとも1個を含むH-NOXタンパク質の単量体形態を指す。優先的な重合体型H-NOX蓄積組織として、腫瘍および血管系が損傷した組織が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、個体へのH-NOXタンパク質の投与後に、哺乳動物に少なくとも約1、2、3、4、6、12または24時間にわたって存続する。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、個体へのH-NOXタンパク質の投与後に、哺乳動物に約1～2、2～3、3～4、4～6、6～12または12～24時間にわたって存続する。一部の実施形態において、重合体型H-NOXの約10%未満が、個体へのH-NOXタンパク質の投与後に、約1時間、2時間または3時間のうちいずれか未満以内に、腎臓によって哺乳動物から排除される。

30

【0188】

H-NOXタンパク質およびH-NOXドメインの供給源

40

本明細書に記載されている組成物、キットおよび方法において、いかなる属または種由来のH-NOXタンパク質およびH-NOXドメインを使用することもできる。様々な実施形態において、H-NOXタンパク質または重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインは、哺乳動物（例えば、霊長類（例えば、ヒト、サル、ゴリラ、類人猿、キツネザル等）、ウシ、ウマ、ブタ、イヌまたはネコ）、昆虫、酵母または細菌由来のタンパク質またはドメインである、あるいはこのようなタンパク質に由来する。例示的な哺乳動物H-NOXタンパク質として、野生型ヒトおよびラット可溶性グアニル酸シクラーゼ（β1サブユニット等）が挙げられる。H-NOXタンパク質の例として、野生型哺乳動物H-NOXタンパク質、例えば、H. sapiens、M. musculus、C. familiaris、B. Taurus、C. lupusおよびR. norvegicus

50

；ならびに野生型非哺乳動物脊椎動物H-NOXタンパク質、例えば、*X. laevis*、*O. latipes*、*O. curivatus*および*F. rubripes*が挙げられる。非哺乳動物野生型NO結合H-NOXタンパク質の例として、*D. melanogaster*、*A. gambiae*および*M. sexta*の野生型H-NOXタンパク質が挙げられる；非哺乳動物野生型O₂結合H-NOXタンパク質の例として、*C. elegans* gcy-31、gcy-32、gcy-33、gcy-34、gcy-35、gcy-36およびgcy-37；*D. melanogaster* CG14885、CG14886およびCG4154；ならびに*M. sexta*ベーター3の野生型H-NOXタンパク質が挙げられる；原核生物野生型H-NOXタンパク質の例として、*T. tengcongensis*、*V. cholera*、*V. fischerii*、*N. punctiforme*、*D. desulfuricans*、*L. pneumophila* 1、*L. pneumophila* 2および*C. acetobutylicum*が挙げられる。

【0189】

例示的なH-NOXタンパク質のNCBI受託番号として、次のものが挙げられる：*Homo sapiens* β1 [gi:2746083]、*Rattus norvegicus* β1 [gi:27127318]、*Drosophila melanogaster* β1 [gi:861203]、*Drosophila melanogaster* CG14885-PA [gi:23171476]、*Caenorhabditis elegans* GCY-35 [gi:52782806]、*Nostoc punctiforme* [gi:23129606]、*Caulobacter crescentus* [gi:16127222]、*Shewanella oneidensis* [gi:24373702]、*Legionella pneumophila* (ORF 2) [CUCGC_272624]、*Clostridium acetobutylicum* [gi:15896488]、および*Thermoanaerobacter tengcongensis* [gi:20807169]。*Canis lupus* H-NOXは、GenBank受託番号DQ008576により提供される。例示的なH-NOXタンパク質およびドメインの核酸およびアミノ酸配列を図37に提示する。

【0190】

例示的なH-NOXタンパク質として、その遺伝子名と、続くその種の略称およびGenbank識別子によって記載される次のH-NOXタンパク質も挙げられる（それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2006年5月21日；2006年5月22日；2007年5月21日；または2007年5月22日現在、利用できる次のタンパク質配列等）：*Npun5905__Npu__23129606*、*alr2278__Ana__17229770*、*SO2144__Sone__24373702*、*Mdeg1343__Mde__23027521*、*VCA0720__Vch__15601476*、*CC2992__Ccr__16127222*、*RspH2043__Rhsp__22958463* (gi:46192757)、*Mmc10739__Mmsp__22999020*、*Tar4__Tte__20807169*、*Ddes2822__Dde__23475919*、*CAC3243__Cac__15896488*、*gcy-31__Ce__17568389*、*CG14885__Dm__24647455*、*GUCY1B3__Hs__4504215*、*HpGCS-beta1__Hpul__14245738*、*Gycbeta100B__Dm__24651577*、*CG4154__Dm__24646993* (gi:NP_650424.2、gi:62484298)、*gcy-32__Ce__13539160*、*gcy-36__Ce__17568391* (gi:32566352、gi:86564713)、*gcy-35__Ce__17507861* (gi:71990146)、*gcy-37__Ce__17540904* (gi:71985505)、*GCY1a3__Hs__20535603*、*GCY1a2__Hs__899477*、または*GYCa-99B__Dm__729270* (gi:68067738) (Lakshminarayanら(2003年)BMG Genomics 4巻:5~13頁)。これらの名称に使用されている種の略称は、*Ana-Anabaena* Sp; *Ccr-Caulobacter crescentus*; *Cac*

-Clostridium acetobutylicum; Dde-Desulfovibrio desulfuricans; Mcsp-Magnetococcus sp.; Mde-Microbulbifer degradans; Npu-Nostoc punctiforme; Rhsp-Rhodobacter sphaeroides; Sone-Shewanella oneidensis; Tte-Thermoanaerobacter tengcongensis; Vch-Vibrio cholerae; Ce-Caenorhabditis elegans; Dm-Drosophila melanogaster; Hpul-Hemicentrotus pulcherrimus; Hs-Homo sapiensを含む。

【0191】

他の例示的なH-NOXタンパク質として、その生物名とPfamデータベース受託番号によって記載される次のH-NOXタンパク質が挙げられる（それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2006年5月21日；2006年5月22日；2007年5月17日；2007年5月21日；または2007年5月22日現在、利用できる次のタンパク質配列等）：Caenorhabditis briggsae Q622M5_CAEER、Caenorhabditis briggsae Q61P44_CAEER、Caenorhabditis briggsae Q61R54_CAEER、Caenorhabditis briggsae Q61V90_CAEER、Caenorhabditis briggsae Q61A94_CAEER、Caenorhabditis briggsae Q60TP4_CAEER、Caenorhabditis elegans GCY37_CAEEL、Caenorhabditis elegans GCY31_CAEEL、Caenorhabditis elegans GCY36_CAEEL、Caenorhabditis elegans GCY32_CAEEL、Caenorhabditis elegans GCY35_CAEEL、Caenorhabditis elegans GCY34_CAEEL、Caenorhabditis elegans GCY33_CAEEL、Oryzias curvinotus Q7T040_ORYCU、Oryzias curvinotus Q75WF0_ORYCU、Oryzias latipes P79998_ORYLA、Oryzias latipes Q7ZSZ5_ORYLA、Tetraodon nigroviridis Q4SW38_TETNG、Tetraodon nigroviridis Q4RZ94_TETNG、Tetraodon nigroviridis Q4S6K5_TETNG、Fugu rubripes Q90VY5_FUGRU、Xenopus laevis Q6INK9_XENLA、Homo sapiens Q5T8J7_HUMAN、Homo sapiens GCYA2_HUMAN、Homo sapiens GCYB2_HUMAN、Homo sapiens GCYB1_HUMAN、Gorilla gorilla Q9N193_9PRIM、Pongo pygmaeus Q5RAN8_PONPY、Pan troglodytes Q9N192_PANTR、Macaca mulatta Q9N194_MACMU、Hyllobates lar Q9N191_HYLLA、Mus musculus Q8BXH3_MOUSE、Mus musculus GCYB1_MOUSE、Mus musculus Q3UTI4_MOUSE、Mus musculus Q3UH83_MOUSE、Mus musculus Q6XE41_MOUSE、Mus musculus Q80YP4_MOUSE、Rattus norvegicus Q80WX7_RAT、Rattus norvegicus Q80WX8_RAT、Rattus norvegicus Q920Q1_RAT、Rattus norvegicus Q54A43_RAT、Rattus norvegicus Q80WY0_RAT、Rattus norvegicus Q80WY4_RAT、Rattus norvegicus Q8CH85_RAT、Rattus norvegicus Q80WY5_RAT、Rattus no

10

20

30

40

50

rvegicus GCYB1_RAT、Rattus norvegicus Q8C
 H90_RAT、Rattus norvegicus Q91XJ7_RAT、Rat
 tus norvegicus Q80WX9_RAT、Rattus norvegi
 cus GCYB2_RAT、Rattus norvegicus GCYA2_RA
 T、Canis familiaris Q4ZHR9_CANFA、Bos taur
 us GCYB1_BOVIN、Sus scrofa Q4ZHR7_PIG、Gry
 llus bimaculatus Q59HN5_GRYBI、Manduca se
 xta O77106_MANSE、Manduca sexta O76340_MA
 NSE、Apis mellifera Q5UAF0_APIME、Apis mel
 lifera Q5FAN0_APIME、Apis mellifera Q6L5L 10
 6_APIME、Anopheles gambiae str PEST Q7PYK
 9_ANOGA、Anopheles gambiae str PEST Q7Q9W
 6_ANOGA、Anopheles gambiae str PEST Q7QF3
 1_ANOGA、Anopheles gambiae str PEST Q7PS0
 1_ANOGA、Anopheles gambiae str PEST Q7PFY
 2_ANOGA、Anopheles gambiae Q7KQ93_ANOGA、D
 rosophila melanogaster Q24086_DROME、Dros
 ophila melanogaster GCYH_DROME、Drosophil
 a melanogaster GCY8E_DROME、Drosophila me
 lanogaster GCYDA_DROME、Drosophila melano 20
 gaster GCYDB_DROME、Drosophila melanogast
 er Q9VA09_DROME、Drosophila pseudoobscura
 Q29CE1_DROPS、Drosophila pseudoobscura Q
 296C7_DROPS、Drosophila pseudoobscura Q29
 6C8_DROPS、Drosophila pseudoobscura Q29BU
 7_DROPS、Aplysia californica Q7YWK7_APLCA
 、Hemicentrotus pulcherrimus Q95NK5_HEMPU
 、Chlamydomonas reinhardtii、Q5YLC2_CHLRE、
 Anabaena sp Q8YUQ7_ANASP、Flavobacteria b
 acterium BBFL7 Q26GR8_9BACT、Psychroflexu 30
 s torquis ATCC 700755 Q1VQE5_9FLAO、海洋ガンマ
 プロテオバクテリアHTCC2207 Q1YPJ5_9GAMM、海洋ガンマプロテオ
 バクテリア HTCC2207 Q1YTK4_9GAMM、Caulobacter
 crescentus Q9A451_CAUCR、Acidiphilium cry
 ptum JF-5 Q2DG60_ACICY、Rhodobacter sphae
 roides Q3J0U9_RHOS4、Silicibacter pomeroy
 i Q5LPV1_SILPO、Paracoccus denitrificans
 PD1222、Q3PC67_PARDE、Silicibacter sp TM10
 40 Q3QNY2_9RHOB、Jannaschia sp Q28ML8_JAN
 SC、Magnetococcus sp MC-1 Q3XT27_9PROT、Le 40
 gionella pneumophila Q5WXP0_LEGPL、Legion
 ella pneumophila Q5WTZ5_LEGPL、Legionella
 pneumophila Q5X268_LEGPA、Legionella pneu
 mophila Q5X2R2_LEGPA、Legionella pneumop
 hila subsp pneumophila Q5ZWM9_LEGPH、Legi
 onella pneumophila subsp pneumophila Q5Z
 SQ8_LEGPH、Colwellia psychrerythraea Q47Y
 43_COLP3、Pseudoalteromonas atlantica T6c
 Q3CSZ5_ALTAT、Shewanella oneidensis Q8EF
 49_SHEON、Saccharophagus degradans Q21E20 50

_SACD2、*Saccharophagus degradans* Q21ER7_S
 ACD2、*Vibrio angustum* S14 Q1ZWE5_9VIBR、*Vi*
brio vulnificus Q8DAE2_VIBVU、*Vibrio algi*
nolyticus 12G01 Q1VCP6_VIBAL、*Vibrio sp* D
 AT722 Q2FA22_9VIBR、*Vibrio parahaemolytic*
us Q87NJ1_VIBPA、*Vibrio fischeri* Q5E1F5_V
 IBF1、*Vibrio vulnificus* Q7MJS8_VIBVY、*Phot*
obacterium sp SKA34 Q2C6Z5_9GAMM、*Haella*
chejuensis Q2SFY7_HAHCH、*Oceanospirillum*
sp MED92 Q2BKV0_9GAMM、*Oceanobacter sp* R
 ED65 Q1N035_9GAMM、*Desulfovibrio desulfur*
icans Q310U7_DESDG、*Halothermothrix oreni*
i H 168 Q2AIW5_9FIRM、*Thermoanaerobacter*
tengcongensis Q8RBX6_THETN、*Caldicellulos*
iruptor saccharolyticus DSM 8903 Q2ZH17_
 CALSA、*Clostridium acetobutylicum* Q97E73_
 CLOAB、*Alkaliphilus metalliredigenes* QYMF
 Q3C763_9CLOT、*Clostridium tetani* Q899J9_
 CLOTE、および*Clostridium beijerinckii* NCIMB 8
 052 Q2WVN0_CLOBE。これらの配列は、本明細書に記載されているPfam
 データベースを使用して、これらのタンパク質がH-NOXタンパク質ファミリーに属
 するという同定に基づき、H-NOXタンパク質をコードすると予測される。

10

20

【0192】

本明細書に記載されている医薬組成物および方法における使用に適し得る追加のH-NOX
 タンパク質、重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインおよび核酸は、標
 準方法を使用して同定することができる。例えば、標準配列アライメントおよび／または
 構造予測プログラムを使用して、追加のH-NOXタンパク質および核酸であって、それ
 らの一次構造および／または予測されるタンパク質二次構造の、公知H-NOXタンパク
 質および核酸のそれとの類似性に基づき、該追加のH-NOXタンパク質および核酸を同
 定することができる。例えば、Pfamデータベースは、定義されたアライメントアルゴ
 リズムおよび隠れマルコフモデル（Pfam 21.0等）を使用して、タンパク質をH-
 NOXタンパク質ファミリー等のファミリーにカテゴリー化する（Pfam – タン
 パク質ドメインファミリーアライメントおよび隠れマルコフモデルのデータベース、著作
 権（C）1996～2006年、The Pfam Consortium；GNU L
 GPL Free Software Foundation, Inc.、59 Te
 mple Place – Suite 330、Boston、MA 02111-1
 307、USA）。swissprot-tremblデータベース（「expasy.
 org」のワールドワイドウェブ、Swiss Institute of Bioin
 formatics Swiss-Prot group CMU – 1 rue M
 ichel Servet CH-1211 Geneva 4、Switzerlan
 d）等の標準データベースを使用して、H-NOXタンパク質ファミリーのメンバーを同
 定することもできる。Predict Protein（630 West、168 St
 reet、BB217、New York、N. Y. 10032、USA）等の標準
 構造予測プログラムのデフォルト設定を使用して、H-NOXタンパク質の二次および／
 または三次構造を予測することができる。あるいは、標準方法を使用して、H-NOXタ
 ンパク質の実際の二次および／または三次構造を決定することができる。

30

40

【0193】

一部の実施形態において、H-NOXドメインは、*T. tengcongensis*
 H-NOXにおける次の遠位ポケット残基のいずれかと同じアミノ酸を対応する位置に有
 する：Thr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75

50

、Phe78、Phe82、Tyr140、Leu144または上記の2種以上のいずれかの組合せ。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、そのアミノ酸配列の配列アライメントに基づき、それぞれT. tengcongensis H-NOXのPro115またはArg135の位置に対応する位置にプロリンまたはアルギニンを有する。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、R. norvegicus β 1 H-NOXのHis105に対応するヒスチジンを有する。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、6個のアルファヘリックスと、続く2個のベータ鎖と、続く1個のアルファヘリックスと、続く2個のベータ鎖を含む二次構造を有するまたはそれを有すると予測される。H-NOXタンパク質についてのこの二次構造が報告されている。

【0194】

必要な場合、新たに同定されたH-NOXタンパク質またはH-NOXドメインを試験して、これがヘムに結合するかどうかを、標準方法を使用して決定することができる。O₂キャリアとして機能するH-NOXドメインの能力は、本明細書に記載されている方法等の標準方法を使用して、H-NOXドメインがO₂に結合するかどうかを決定することにより試験することができる。必要な場合、本明細書に記載されている変異のうち1種または複数をH-NOXドメインに導入して、O₂キャリアとしてのその特徴を最適化することができる。例えば、1個または複数の変異を導入して、酸素に対するそのO₂解離定数 k_{off} 、ヘム自動酸化の速度、NO反応性、NO安定性または上記のうち2種以上のいずれかの組合せを変更することができる。本明細書に記載されている技法等の標準技法を使用して、これらのパラメータを測定することができる。

【0195】

変異体H-NOXタンパク質

本明細書にさらに記述されている通り、H-NOXタンパク質または重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインは、対応する野生型タンパク質のH-NOXドメインと比較して、O₂解離定数、酸素に対する k_{off} 、ヘム自動酸化の速度、NO反応性、NO安定性または上記のうち2種以上のいずれかの組合せを変更する変異等、1個または複数の変異を含有することができる。一部の実施形態において、本発明は、O₂解離定数、酸素に対する k_{off} 、ヘム自動酸化の速度、NO反応性、NO安定性または上記のうち2種以上のいずれかの組合せを、対応する野生型タンパク質のそれと比較して、変更する変異等の1個または複数の変異を含有し得る1個または複数のH-NOXドメインを含む重合体型H-NOXタンパク質を提供する。操作されたH-NOXドメインのパネルは、本明細書に提供されている教示を考慮して、本明細書に記載の、当業者に公知の技法を使用して、ランダム変異誘発と、続く必要なまたは所望の解離定数、解離速度、NO反応性、安定性、生理的適合性または上記のうち2種以上のいずれかの組合せに関する経験的スクリーニングによって作製することができる。あるいは、変異誘発は、H-NOXタンパク質の実験的に決定されるもしくは予測される三次元構造から明らかとなる遠位ポケット残基（特に、野生型および変異体H-NOXタンパク質の配列に関して、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Boon, E. M. ら（2005年）Nature Chemical Biology 1巻：53～59頁を参照）または配列アライメントから同定される進化的に保存された残基（特に、野生型および変異体H-NOXタンパク質の配列に関して、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Boon, E. M. ら（2005年）Nature Chemical Biology 1巻：53～59頁を参照）等の特定の領域または残基を選択的に標的化することができる。

【0196】

本発明の一部の実施形態において、変異体H-NOXタンパク質または重合体型H-NOXタンパク質の変異体H-NOXドメインは、自然に存在するいかなるH-NOXタンパク質またはドメインの配列とも異なる配列を有する。様々な実施形態において、変異体タンパク質のアミノ酸配列は、自然に存在するH-NOXタンパク質の対応する領域の配列に対し、少なくとも約10、約15、約20、約25、約30、約40、約50、約6

10

20

30

40

50

0、約70、約80、約90、約95、約97、約98、約99または約99.5%同一のうちいずれかである。様々な実施形態において、変異体タンパク質のアミノ酸配列は、自然に存在するH-NOXタンパク質の対応する領域の配列に対し、約10~20%、20~30%、30~40%、40~50%、50~60%、60~70%、70~80%、80~90%、90~95%、95~99%または99.5%同一である。一部の実施形態において、変異体タンパク質は、全長タンパク質由来の少なくとも約25、約50、約75、約100約、150、約200、約300または約400個の連続アミノ酸のうちいずれかを含有するタンパク質断片である。一部の実施形態において、変異体タンパク質は、全長タンパク質由来の25~50、50~75、75~100、100~150、150~200、200~300または300~400個の連続アミノ酸を含有するタンパク質断片である。配列同一性は、例えば、配列解析ソフトウェアを使用して、それに指定されたデフォルトパラメータにより測定することができる（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705）。このソフトウェアプログラムは、様々なアミノ酸置き換え、欠失、および他の改変に相同性の程度を割り当てることにより、類似の配列をマッチさせる。

10

【0197】

本発明の一部の実施形態において、変異体H-NOXタンパク質または重合体型H-NOXタンパク質の変異体H-NOXドメインは、1個または複数のアミノ酸の挿入を含む（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸の挿入）。本発明の一部の実施形態において、変異体H-NOXタンパク質または変異体H-NOXドメインは、1個または複数のアミノ酸の欠失を含む（例えば、少なくとも約5、約10、約15、約25、約50、約75、約100、約150、約200、約300個以上のアミノ酸のうちいずれかの欠失または5~10、10~15、15~25、25~50、50~75、75~100、100~150、150~200、200~300または300~400個のアミノ酸の欠失等、N末端、C末端および／または内側残基の欠失）。本発明の一部の実施形態において、変異体H-NOXタンパク質または変異体H-NOXドメインは、1個または複数のアミノ酸の置き換え（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸の置き換え）、または上記のうち2種以上の組合せを含む。一部の実施形態において、変異体タンパク質は、自然に存在するタンパク質と比較して、少なくとも1個のアミノ酸変更を有する。一部の実施形態において、変異体核酸配列は、自然に存在するタンパク質と比較して、少なくとも1個のアミノ酸変更を有するタンパク質をコードする。一部の実施形態において、核酸は、自然に存在するタンパク質と同一のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする自然に存在する核酸の縮重バージョンではない。

20

30

【0198】

一部の実施形態において、H-NOXタンパク質または重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインにおける変異は、進化的に保存された変異である（クラスI変異とも表される）。クラスI変異の例は、表1Aに記載されている。表1Aにおいて、変異は、ヒトβ1 H-NOXの配列に従って番号をつけられている／アノテートされているが、あらゆるH-NOX配列に対し類似である。よって、他のいずれかのH-NOXタンパク質における対応する位置を表示の残基へと変異させることができる。例えば、ヒトβ1 H-NOXのPhe4をチロシンへと変異させることができるが、その理由として、他のH-NOXタンパク質が、この位置にチロシンを有するためである。他のいずれかのH-NOXタンパク質において、対応するフェニルアラニン残基をチロシンへと変異させることができる。特定の実施形態において、1個または複数の変異は、進化的に保存された残基に限定される。一部の実施形態において、1個または複数の変異は、少なくとも1個の進化的に保存された変異および少なくとも1個の進化的に保存されていない変異を含む

40

50

ことができる。必要な場合、これらの変異体H-NOXタンパク質は、本明細書に提供される教示を考慮して、NO/O₂解離定数、NO反応性、安定性および生理的適合性に関する経験的スクリーニングに付される。

【表1A】

表1A.進化的に保存された残基を標的とする例示的なクラスI H-NOX変異

F4Y	Q30G	I145Y
F4L	E33P	I145H
H7G	N61G	K151E
A8E	C78H	I157F
L9W	A109F	E183F

10

【0199】

一部の実施形態において、変異は、アルファヘリックスA、D、EまたはGにおける残基の変異等の遠位ポケット変異である（Pellucena, P.ら（2004年8月31日）Proc Natl Acad Sci USA 101巻（35号）：12854～12859頁）。例示的な遠位ポケット変異（クラスII変異とも表される）は、表1Bに記載されている。表1Bにおいて、変異は、ヒトβ1 H-NOXの配列に従って番号をつけられている／アノテートされているが、あらゆるH-NOX配列に対して類似である。列挙された残基それぞれにおいて、いくつかの置換は生存可能な変異をもたらすため、示された位置それぞれにおける残基は、他のいずれかの天然または非天然起源のアミノ酸（「X」と表される）に交換することができる。このような変異は、種々の所望の親和性、安定性および反応性の特徴を有するH-NOXタンパク質を産生することができる。

20

【表1B】

表1B.遠位ポケット残基を標的とする例示的なクラスII H-NOX変異

V8X	M73X	I145X
L9X	F77X	I149X
F70X	C78X	

30

【0200】

特定の実施形態において、変異は、ヘム遠位ポケット変異である。本明細書に記載されている通り、H-NOXファミリーのNO結合メンバーにおけるO₂結合を防止する重大な分子決定要因は、ヘムの遠位ポケットにおけるH結合ドナーの欠如である。したがって、一部の実施形態において、変異は、遠位ポケット内のH-NOXドメインおよびリガンドの間のH結合を変更する。一部の実施形態において、変異は、遠位ポケットのH結合ドナーを破壊する、および／または対応する野生型H-NOXドメインと比べて低下したO₂リガンド結合を付与する。例示的な遠位ポケット残基として、T. tengcongensis H-NOXのThr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75、Phe78、Phe82、Tyr140およびLeu144ならびに他のいずれかのH-NOXタンパク質における対応する残基が挙げられる。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質または重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインは、1個または複数の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質または重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11個以上の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、遠位ポケット変異は、T. tengcongensis H-NOXのL144F変異に対応する。一部の実施形態において、遠位ポケット変異は、T. tengcongensis H-NOXのL144F変異である。一部の実施形態において

40

50

、H-NOXタンパク質または重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインは、2個の遠位ポケット変異を含む。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質または重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインは、T. tengcongensis H-NOXのW9F/L144F変異に対応する。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質または重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインは、T. tengcongensis H-NOXのW9F/L144F変異である。

【0201】

遠位ポケットに存在しない残基も、ヘム基の三次元構造に影響を与え得る；この構造は次に、ヘム基における鉄へのO₂およびNOの結合に影響を与える。したがって、一部の実施形態において、H-NOXタンパク質または重合体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインは、遠位ポケットを除く1個または複数の変異を有する。変異させることができるが遠位ポケットに存在しない残基の例として、T. tengcongensis H-NOXのPro115およびArg135が挙げられる。一部の実施形態において、変異は、ヘム鉄にライゲーシオンする残基としてHis105を含む近位ポケットに存在する。

【0202】

一部の実施形態において、2個以上の変異が存在する場合；少なくとも1個の変異は、遠位ポケットに存在し、少なくとも1個の変異は、遠位ポケット以外にある（例えば、近位ポケットにおける変異）。一部の実施形態において、全変異が遠位ポケットに存在する。

【0203】

ヒト以外の供給源に由来するH-NOXタンパク質またはH-NOXドメインの免疫原性を低下させるために、H-NOXタンパク質またはH-NOXドメインにおけるアミノ酸を、ヒトH-NOXにおける対応するアミノ酸へと変異させることができる。例えば、非ヒトH-NOXタンパク質またはH-NOXドメインの三次構造の表面における1個または複数のアミノ酸を、ヒトH-NOXタンパク質またはH-NOXドメインにおける対応するアミノ酸へと変異させることができる。一部の変種において、1個または複数の表面アミノ酸の変異は、2個以上の遠位ポケット残基の変異、遠位ポケットを除く1個もしくは複数の残基の変異（例えば、近位ポケットにおける変異）または上記のうち2種以上の組合せと組み合わせることができる。

【0204】

本発明は、また、二重、三重またはより高次の多重変異等、本明細書に記載されている変異のいずれかの組合せに関する。例えば、本明細書に記載されている変異のいずれかの組合せは、同じH-NOXタンパク質で為すことができる。他の哺乳動物または非哺乳動物H-NOXタンパク質における均等な位置における変異も、本発明によって包含されることに留意されたい。例示的な変異体H-NOXタンパク質または変異体H-NOXドメインは、対応する野生型H-NOXドメインと比べて変更されたO₂またはNOリガンド結合を付与し、生理学的に適合性の哺乳動物O₂血液ガスキャリアとして働く（operative）、1個または複数の変異を含む。

【0205】

変異の残基番号は、記載されている特定のH-NOXタンパク質の配列における位置を示す。例えば、T. tengcongensis I5Aは、T. tengcongensis H-NOXの第5の位置における、アラニンによるイソロイシンの置き換えを指す。同じイソロイシンからアラニンへの変異は、他のいずれかのH-NOXタンパク質またはH-NOXドメインにおける対応する残基において為され得る（この残基は、他のH-NOXタンパク質の配列における第5の残基であってもよいし、それでもなくともよい）。哺乳動物β1 H-NOXドメインのアミノ酸配列は、せいぜい2個のアミノ酸が異なるため、野生型ラットβ1 H-NOXタンパク質に導入されると望ましい変異体H-NOXタンパク質またはH-NOXドメインを産生する変異は、ヒト等、他の哺乳動物由来の野生型β1 H-NOXタンパク質またはH-NOXドメインに導入されると望ましい

変異体H-NOXタンパク質またはH-NOXドメインを産生すると予想される。

【0206】

一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、3個のT. tengcongensis L144F H-NOXドメインおよび3個のフォルドドメインを含む三量体である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、3個のT. tengcongensis W9F/L144F H-NOXドメインおよび3個のフォルドドメインを含む三量体である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、3個のT. tengcongensis 野生型H-NOXドメインおよび3個のフォルドドメインを含む三量体である。

【0207】

H-NOXタンパク質への改変

重合体型H-NOXタンパク質を含む、野生型または変異体H-NOXタンパク質のいずれかは、治療上または産業上の利用を増強するための標準方法を使用して改変および／または製剤化することができる。例えば、そして特に、異種の操作されたH-NOXタンパク質に適用される場合、架橋、ペグ化、炭水化物デコレーション等を含む、免疫監視機構からこのような薬剤を遮蔽するための種々の方法（特に、タンパク質の改変に関して、例えば、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Rohlf s, R. J. ら（1998年5月15日）J. Biol. Chem. 273巻（20号）：12128～12134頁；Migita, R. ら（1997年6月）J. Appl. Physiol. 82巻（6号）：1995～2002頁；Vandegriff, K. D. ら（2004年8月15日）Biochem J. 382巻（Pt 1）：183～189頁）と共に当業者に公知の他の技法が、当技術分野において公知である。ヒト血清アルブミン等のヒトタンパク質と、重合体型H-NOXタンパク質を含むH-NOXタンパク質との融合は、血清半減期、粘性およびコロイド性膠質浸透圧を増加させることができる。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、その合成の最中または後に改変されて、その免疫原性を減少させる、および／またはその血漿保持時間を増加させる。H-NOXタンパク質は、カプセル封入することもできる（リポソームまたはナノ粒子内へのカプセル封入等）。

【0208】

一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、例えば、H-NOXタンパク質の精製を助ける、1個または複数のタグを含む。タグの例として、His₆、FLAG、GSTおよびMBPが挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、1個または複数のHis₆タグを含む。1個または複数のHis₆タグは、例えば、エキソペプチダーゼ処理により、重合体型H-NOXタンパク質の使用に先立ち除去することができる。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、3個のT. tengcongensis L144F H-NOXドメイン、3個のフォルドドメインおよび3個のHis₆タグを含む三量体である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、3個のT. tengcongensis W9F/L144F H-NOXドメイン、3個のフォルドドメインおよび3個のHis₆タグを含む三量体である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、3個のT. tengcongensis 野生型H-NOXドメイン、3個のフォルドドメインおよび3個のHis₆タグを含む三量体である。

【0209】

重合ドメイン

一部の態様において、本発明は、2個以上のH-NOXドメインと、1個または複数の重合ドメインとを含む重合体型H-NOXタンパク質を提供する。重合ドメインは、2個以上のH-NOXドメインを連結して、重合体型H-NOXタンパク質を形成するために使用される。1個または複数の重合ドメインは、H-NOXタンパク質の二量体、三量体、四量体、五量体等を産生するために使用することができる。T4バクテリオファージフィブリチンのフォルドン、Arc、POZ、コイルドコイルドメイン（GCN4、ロイシ

10

20

30

40

50

ンジッパー、Velcroを含む)、ウテログロビン、コラーゲン、3本鎖コイルドコイル(c o l l i s) (マトリリン-1)、トロンボスポリン、TRPV1-C、P53、Mnt、アビジン(avadin)、ストレプトアビジン、Bcr-Abl、COMP、ペロ毒素サブユニットB、CamKII、RCKおよびNエチルマレイミド感受性融合タンパク質由来のドメイン、STM3548、KaiC、TyrR、Hcp1、CcmK4、GP41、炭疽菌防御抗原、アエロリジン、 α -ヘモリジン、C4b-結合タンパク質、Mieck、アリアルスルファターゼ(arylsulfatase)Aならびにウイルスカプシドタンパク質等、重合ドメインは、当技術分野において公知である。重合ドメインは、H-NOXドメインに共有結合または非共有結合により連結され得る。一部の実施形態において、複数の単量体サブユニット由来の重合ドメインが会合して、重合体型H-NOXドメインを形成するように、重合ドメインがH-NOXドメインに連結されて、単量体サブユニットを形成する。一部の実施形態において、H-NOXドメインのC末端が、重合ドメインのN末端に連結される。他の実施形態において、H-NOXドメインのN末端が、重合ドメインのN末端に連結される。さらに他の実施形態(emodiment)において、H-NOXドメインのC末端が、重合ドメインのC末端に連結される。一部の実施形態(emodiment)において、H-NOXドメインのN末端が、重合ドメインのC末端に連結される。

10

【0210】

リンカーを使用して、重合ドメインをH-NOXドメインに繋ぐことができる。例えば、例えば、アミノ酸リンカー。一部の実施形態において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11個以上のアミノ酸のうちいずれか1種を含むリンカーを重合ドメインおよびH-NOXドメインの間に置くことができる。例示的なリンカーとして、Gly-Ser-GlyリンカーおよびArg-Gly-Serリンカーが挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0211】

バクテリオファージT4フィブリチン三量体形成ドメイン

例示的な重合ドメインは、バクテリオファージT4のフォールドドメインである。バクテリオファージT4由来のwac遺伝子は、C末端三量体形成ドメイン(残基457~483)を有する486アミノ酸のタンパク質である、フィブリチンタンパク質をコードする(Efimov, V. P. ら(1994年) J Mol Biol 242巻: 470~486頁)。このドメインは、in vitroおよびin vivoの両方でフィブリチンを三量体形成させることができる(Boudko, S. P. ら(2002年) Eur J Biochem 269巻: 833~841頁; Letarov, A. V. , ら(1999年) Biochemistry (Mosc) 64巻: 817~823頁; Tao, Y. , ら(1997年) Structure 5巻: 789~798頁)。多くの場合「フォールドドメイン」と称される、単離された27残基の三量体形成ドメインは、多数の異なるタンパク質においてキメラ三量体の構築に使用されてきた(HIV外被糖タンパク質(Yang, X. ら(2002年) J Virol 76巻: 4634~4642頁)、アデノウイルスアドヘシン(Papanikolopoulou, K. , ら(2004年) J Biol Chem 279巻: 8991~8998頁; Papanikolopoulou, K. ら(2004年) J Mol Biol 342巻: 219~227頁)、コラーゲン(Zhang, C. , ら(2009年) Biotechnol Prog 25巻: 1660~1668頁)、ファージP22 gp26(Bhardwaj, A. , ら(2008年) Protein Sci 17巻: 1475~1485頁)および狂犬病ウイルス糖タンパク質(Sissoeff, L. , ら(2005年) J Gen Virol 86巻: 2543~2552頁)を含む)。フォールドドメインの例示的な配列を図1に示し、配列番号4に提示する。

30

40

【0212】

単離されたフォールドドメインは、単一の β -ヘアピン構造へと折り畳まれ、3個のヘアピンを含む β -プロペラ構造へと三量体形成する(Guthe, S. ら(2004年

50

）J Mol Biol 337巻：905～915頁）。フォルドンドメイン単独の構造は、NMRによって決定され（Guthe, S.ら（2004年）J Mol Biol 337巻：905～915頁）、フォルドンドメインにより三量体形成した数種のタンパク質の構造は、X線結晶学によって解析した（Papanikolopoulou, K., ら、（2004年）J Biol Chem 279巻：8991～8998頁；Stetefeld, J.ら（2003年）Structure 11巻：339～346頁；Yokoi, N.ら（2010年）Small 6巻：1873～1879頁）。このドメインは、迅速に折り畳まれ、三量体形成し、ミスフォールディング中間体または経路を外れた（off-pathway）オリゴマー形成産物の機会を低下させる（Guthe, S.ら（2004年）J Mol Biol 337巻：905～915頁）。フォルドンドメインは、非常に安定的であり、>10% SDS、6.0M塩酸グアニジンまたは80℃において三次構造およびオリゴマー形成を維持することができ（Bhardwaj, A., ら（2008年）Protein Sci 17巻：1475～1485頁；Bhardwaj, A., ら（2007年）J Mol Biol 371巻：374～387頁）、フォルドンドメインに融合された配列の安定性を改善することができる（Du, C.ら（2008年）Appl Microbiol Biotechnol 79巻：195～202頁）。

【0213】

一部の実施形態において、H-NOXドメインのC末端は、フォルドンドメインのN末端に連結される。他の実施形態において、H-NOXドメインのN末端は、フォルドンドメインのN末端に連結される。さらに他の実施形態（emodiment）において、H-NOXドメインのC末端は、フォルドンドメインのC末端に連結される。一部の実施形態（emodiment）において、H-NOXドメインのN末端は、フォルドンドメインのC末端に連結される。

【0214】

一部の実施形態において、リンカーが使用されて、フォルドンドメインをH-NOXドメインに繋ぐ。一部の実施形態において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11個以上のアミノ酸のうちいずれか1種を含むリンカーを、重合ドメインおよびH-NOXドメインの間に置くことができる。例示的なリンカーとして、Gly-Ser-GlyおよびArg-Gly-Serリンカーが挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態において、本発明は、N末端からC末端へと：T. tengcongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカーおよびフォルドンドメインを含む、三量体型H-NOXタンパク質を提供する。一部の実施形態において、本発明は、N末端からC末端へと：T. tengcongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー、フォルドンドメイン、Arg-Gly-Serアミノ酸リンカーおよびHis₆タグを含む、三量体型H-NOXタンパク質を提供する。一部の実施形態において、T. tengcongensis H-NOXドメインは、L144F変異を含む。一部の実施形態において、T. tengcongensis H-NOXドメインは、W9F変異およびL144F変異を含む。一部の実施形態において、T. tengcongensis H-NOXドメインは、野生型H-NOXドメインである。

【0215】

単量体型H-NOXドメインサブユニット

一態様において、本発明は、会合して、重合体型H-NOXタンパク質を形成することができる、組換え単量体型H-NOXタンパク質（即ち、重合体型H-NOXタンパク質の単量体型H-NOXサブユニット）を提供する。一部の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されているH-NOXドメインおよび重合ドメインを含む、組換えH-NOXタンパク質を提供する。H-NOXドメインおよび重合ドメインは、共有結合により連結または非共有結合により連結され得る。一部の実施形態において、組換え単量体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインのC末端は、重合ドメインのN末端に連結され

る。他の実施形態において、組換え単量体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインのN末端は、重合ドメインのN末端に連結される。さらに他の実施形態（*emodiment*）において、組換え単量体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインのC末端は、重合ドメインのC末端に連結される。一部の実施形態（*emodiment*）において、組換え単量体型H-NOXタンパク質のH-NOXドメインのN末端は、重合ドメインのC末端に連結される。一部の実施形態において、組換え単量体型H-NOXタンパク質は、グアニリルシクラーゼドメインを含まない。

【0216】

一部の実施形態において、単量体型H-NOXタンパク質は、野生型H-NOXドメインを含む。本発明の一部の実施形態において、単量体型H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインに1個または複数の変異を含む。一部の実施形態において、1個または複数の変異は、O₂解離定数、酸素に対する k_{off} 、ヘム自動酸化の速度、NO反応性、NO安定性（*stability*）または上記のうち2種以上のいずれかの組合せを、対応する野生型H-NOXドメインのそれと比較して、変更する。一部の実施形態において、変異は、遠位ポケット変異である。一部の実施形態において、変異は、遠位ポケットに存在しない変異を含む。一部の実施形態において、遠位ポケット変異は、*T. tengcongensis*のL144変異に対応する（例えば、L144F変異）。一部の実施形態において、組換え単量体型H-NOXタンパク質は、*T. tengcongensis*のW9およびL144変異に対応する2個の遠位ポケット変異を含む（例えば、W9F/L144F変異）。

【0217】

一部の態様において、本発明は、会合して三量体型H-NOXタンパク質を形成する、組換え単量体型H-NOXタンパク質を提供する。一部の実施形態において、組換えH-NOXタンパク質は、H-NOXドメインおよび三量体形成ドメインを含む。一部の実施形態において、三量体形成ドメインは、本明細書に記述されているフォールドドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、*T. tengcongensis* H-NOXドメインである。一部の実施形態において、*T. tengcongensis* H-NOXドメインのC末端は、フォールドドメインのN末端に共有結合により連結される。一部の実施形態において、*T. tengcongensis* H-NOXドメインのC末端は、フォールドドメインのC末端に共有結合により連結される。一部の実施形態において、*T. tengcongensis*ドメインは、L144F H-NOXドメインである。一部の実施形態において、*T. tengcongensis*ドメインは、W9F/L144F H-NOXドメインである。一部の実施形態において、*T. tengcongensis*ドメインは、野生型H-NOXドメインである。

【0218】

一部の実施形態において、H-NOXドメインは、アミノ酸リンカー配列を使用して、重合ドメインに共有結合により連結される。一部の実施形態において、アミノ酸リンカー配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11個以上のアミノ酸の長さである。例示的なアミノ酸リンカー配列として、Gly-Ser-Gly配列およびArg-Gly-Ser配列が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、3個のH-NOXドメインおよび3個の三量体形成配列を含む三量体型H-NOXタンパク質であり、H-NOXドメインは、アミノ酸リンカー配列を介して三量体形成ドメインに共有結合により連結されている。一部の実施形態において、単量体型H-NOXタンパク質は、N末端からC末端へと、次のものを含む：L144F *T. tengcongensis* H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列およびフォールドドメイン。一部の実施形態において、単量体型H-NOXタンパク質は、N末端からC末端へと、次のものを含む：W9F/L144F *T. tengcongensis* H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列およびフォールドドメイン。一部の実施形態において、単量体型H-NOXタンパク質は、N末端からC末端へと、次のものを含む：野生型*T. tengc*

ongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列およびフォルドンドメイン。

【0219】

一部の実施形態において、組換え単量体型H-NOXタンパク質は、タグ；例えば、His₆、FLAG、GSTまたはMBPタグを含む。一部の実施形態において、組換え単量体型H-NOXタンパク質は、His₆タグを含む。一部の実施形態において、組換え単量体型H-NOXタンパク質は、タグを含まない。一部の実施形態において、タグ（例えば、His₆タグ）は、アミノ酸スペーサー配列を使用して、重合ドメインに共有結合により連結される。一部の実施形態において、アミノ酸リンカー配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11個以上のアミノ酸の長さである。例示的なアミノ酸リンカー配列として、Gly-Ser-Gly配列およびArg-Gly-Ser配列が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、3個のH-NOXドメイン、3個の三量体形成配列および3個のHis₆タグを含む三量体型H-NOXタンパク質であり、H-NOXドメインは、アミノ酸リンカー配列を介して三量体形成ドメインに共有結合により連結されており、三量体形成ドメインは、アミノ酸リンカー配列を介してHis₆タグに共有結合により連結されている。一部の実施形態において、単量体型H-NOXタンパク質は、N末端からC末端へと、次のものを含む：L144F T. tengcongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列、フォルドンドメイン、Arg-Gly-Serリンカー配列およびHis₆タグ。一部の実施形態において、単量体型H-NOXタンパク質は、N末端からC末端へと、次のものを含む：W9F/L144F T. tengcongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列、フォルドンドメイン、Arg-Gly-Serリンカー配列およびHis₆タグ。一部の実施形態において、単量体型H-NOXタンパク質は、N末端からC末端へと、次のものを含む：野生型T. tengcongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列、フォルドンドメイン、Arg-Gly-Serリンカー配列およびHis₆タグ。

【0220】

一部の実施形態において、組換え単量体型H-NOXタンパク質は、配列番号6、配列番号8、配列番号10または配列番号12のアミノ酸配列を含む。

【0221】

野生型および変異体H-NOXタンパク質の特徴

本明細書に記載されている通り、様々なNOおよびO₂解離定数、O₂ k_{off}、NO反応性および安定性をもたらす、重合体型H-NOXタンパク質を含む多数の多様なH-NOX変異体タンパク質が作製された。実働性の血液ガスキャリアを提供するために、H-NOXタンパク質を使用して、ヘモグロビン等の内在性O₂キャリアを機能的に置き換えるまたは補充することができる。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質等のH-NOXタンパク質は、放射線療法または化学療法に対するアジュバントとして、低酸素腫瘍組織（例えば、神経膠芽腫）へのO₂の送達に使用される。したがって、一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、ヘモグロビン等の内在性O₂キャリアと比較して、同様のまたは改善されたO₂会合速度、O₂解離速度、O₂結合に対する解離定数、NO安定性、NO反応性、自動酸化速度、血漿保持時間または上記のうち2種以上のいずれかの組合せを有する。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、重合体型H-NOXタンパク質である。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質であり、各単量体は、T. tengcongensis L144F H-NOXドメインおよびフォルドンドメインを含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質であり、各単量体は、T. tengcongensis W9F/L144F H-NOXドメインおよびフォルドンドメインを含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、3個の単量体を含む三量体型

H-NOXタンパク質であり、各単量体は、T. tengcongensis L144 F H-NOXドメインおよびフォルドドメインを含む。

【0222】

様々な実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質を含むH-NOXタンパク質の O_2 に対する k_{off} は、約 $0.1 \sim 200 s^{-1}$ 、約 $0.1 \sim 100 s^{-1}$ 、約 $1.0 \sim 16.0 s^{-1}$ 、約 $1.35 \sim 23.4 s^{-1}$ 、約 $1.34 \sim 18 s^{-1}$ 、約 $1.35 \sim 14.5 s^{-1}$ 、約 $0.21 \sim 23.4 s^{-1}$ 、約 $1.35 \sim 2.9 s^{-1}$ 、約 $2 \sim 3 s^{-1}$ 、約 $5 \sim 15 s^{-1}$ または約 $0.1 \sim 1 s^{-1}$ 等、 $20^\circ C$ において約 $0.01 \sim 200 s^{-1}$ の間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、 $20^\circ C$ において約 $0.65 s^{-1}$ 以下の酸素に対する k_{off} を有する（ $20^\circ C$ における約 $0.21 s^{-1} \sim 0.65 s^{-1}$ の間等）。

10

【0223】

様々な実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質を含むH-NOXタンパク質の O_2 に対する k_{on} は、約 $6 \sim 60 \mu M^{-1} s^{-1}$ 、約 $6 \sim 12 \mu M^{-1} s^{-1}$ 、約 $15 \sim 60 \mu M^{-1} s^{-1}$ 、約 $5 \sim 18 \mu M^{-1} s^{-1}$ または約 $6 \sim 15 \mu M^{-1} s^{-1}$ 等、 $20^\circ C$ において約 $0.14 \sim 60 \mu M^{-1} s^{-1}$ の間である。

【0224】

様々な実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質を含むH-NOXタンパク質による O_2 結合に対する動力的 K_D または計算された K_D は、約 $1 nM \sim 1 mM$ 、約 $1 \mu M \sim 10 \mu M$ または約 $10 \mu M \sim 50 \mu M$ の間である。一部の実施形態において、 O_2 結合に対する計算された K_D は、 $20^\circ C$ において約 $2 nM \sim 2 \mu M$ 、約 $2 \mu M \sim 1 mM$ 、約 $100 nM \sim 1 \mu M$ 、約 $9 \mu M \sim 50 \mu M$ 、約 $100 \mu M \sim 1 mM$ 、約 $50 nM \sim 10 \mu M$ 、約 $2 nM \sim 50 \mu M$ 、約 $100 nM \sim 1.9 \mu M$ 、約 $150 nM \sim 1 \mu M$ または約 $100 nM \sim 255 nM$ 、約 $20 nM \sim 2 \mu M$ 、 $20 nM \sim 75 nM$ 、約 $1 \mu M \sim 2 \mu M$ 、約 $2 \mu M \sim 10 \mu M$ 、約 $2 \mu M \sim 9 \mu M$ または約 $100 nM \sim 500 nM$ のうちいずれか1種である。一部の実施形態において、 O_2 結合に対する動力的 K_D または計算された K_D は、 $20^\circ C$ において約 $100 nM$ 未満、約 $80 nM$ 未満、約 $50 nM$ 未満、約 $30 nM$ 未満、約 $25 nM$ 未満、約 $20 nM$ 未満または約 $10 nM$ 未満のうちいずれかである。

20

【0225】

様々な実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質を含むH-NOXタンパク質による O_2 結合に対する動力的 K_D または計算された K_D は、同じ条件下における（ $20^\circ C$ 等）ヘモグロビンのその約 $0.1 \sim 10$ 倍の間または約 $0.5 \sim 2$ 倍の間等、同じ条件下における（ $20^\circ C$ 等）ヘモグロビンのその約 $0.01 \sim 100$ 倍以内である。様々な実施形態において、H-NOXタンパク質によるNO結合に対する動力的 K_D または計算された K_D は、同じ条件下における（ $20^\circ C$ 等）ヘモグロビンのその約 $0.1 \sim 10$ 倍の間または約 $0.5 \sim 2$ 倍の間等、同じ条件下における（ $20^\circ C$ 等）ヘモグロビンのその約 $0.01 \sim 100$ 倍以内である。

30

【0226】

一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質を含むH-NOXタンパク質の約 50% 未満、約 40% 未満、約 30% 未満、約 10% 未満または約 5% 未満のうちいずれかは、 $20^\circ C$ における約 1 、約 2 、約 4 、約 6 、約 8 、約 10 、約 15 または約 20 時間のうちいずれかのインキュベーション後に酸化される。

40

【0227】

様々な実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質を含むH-NOXタンパク質のNO反応性は、 $20^\circ C$ における約 $600 s^{-1}$ 、 $500 s^{-1}$ 、 $400 s^{-1}$ 、 $300 s^{-1}$ 、 $200 s^{-1}$ 、 $100 s^{-1}$ 、 $75 s^{-1}$ 、 $50 s^{-1}$ 、 $25 s^{-1}$ 、 $20 s^{-1}$ 、 $10 s^{-1}$ 、 $50 s^{-1}$ 、 $3 s^{-1}$ 、 $2 s^{-1}$ 、 $1.8 s^{-1}$ 、 $1.5 s^{-1}$ 、 $1.2 s^{-1}$ 、 $1.0 s^{-1}$ 、 $0.8 s^{-1}$ 、 $0.7 s^{-1}$ または $0.6 s^{-1}$ 未満等、 $20^\circ C$ における約 $700 s^{-1}$ 未満である。様々な実施形態において、H-NOXタンパク質

50

のNO反応性は、20℃における約0.5～約400 s⁻¹、約0.5～約100 s⁻¹、約0.5～約50 s⁻¹、約0.5～約10 s⁻¹、約1～約5 s⁻¹または約0.5～約2.1 s⁻¹の間等、20℃における約0.1～約600 s⁻¹の間である。様々な実施形態において、H-NOXタンパク質の反応性は、20℃において等の同じ条件下におけるヘモグロビンのそれよりも少なくとも約10、100、1,000または10,000倍低い。

【0228】

様々な実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質を含むH-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度は、37℃における約0.9 h⁻¹未満、約0.8 h⁻¹未満、約0.7 h⁻¹未満、約0.6 h⁻¹未満、約0.5 h⁻¹未満、約0.4 h⁻¹未満、約0.3 h⁻¹未満、約0.2 h⁻¹未満、約0.1 h⁻¹未満または約0.05 h⁻¹未満のうちいずれか等、37℃における約1.0 h⁻¹未満である。様々な実施形態において、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度は、37℃における約0.006～約1.0 h⁻¹、0.006～約0.9 h⁻¹または約0.06～約0.5 h⁻¹等、37℃における約0.006～約5.0 h⁻¹の間である。

【0229】

様々な実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質を含む変異体H-NOXタンパク質は、(a) O₂ またはNO解離定数、会合速度 (O₂ またはNOに対する k_{on}) または解離速度 (O₂ またはNOに対する k_{off}) がヘモグロビンのその2桁以内である、(b) NO親和性が、それぞれ sGC β1 のNO親和性よりも弱い (例えば、少なくとも約10倍、100倍または1000倍弱い)、(c) 結合したO₂ とのNO反応性が、ヘモグロビンよりも少なくとも1000倍低い、(d) in vivo 血漿保持時間が、ヘモグロビンの in vivo 血漿保持時間よりも少なくとも2、10、100または1000倍高い、あるいは (e) 上記のうち2種以上のいずれかの組合せを有する。

【0230】

例示的な適したO₂ キャリアは、ヘモグロビンの解離定数の2桁以内、即ち、ヘモグロビンの解離定数の約0.1～10倍の間または約0.5～2倍の間等、約0.01～100倍の間の解離定数をもたらす。本明細書に記載されている技法 (特に解離定数の測定に関して、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Boon, E. M. ら (2005年) *Nature Chem. Biol.* 1巻: 53～59頁; Boon, E. M. ら (2005年10月) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9巻 (5号): 441～446頁; Boon, E. M. ら (2005年) *J. Inorg. Biochem.* 99巻 (4号): 892～902頁)、Vandegriff, K. D. ら (2004年8月15日) *Biochem J.* 382巻 (Pt 1): 183～189頁) と共に当業者に公知の技法等、種々の確立された技法を使用して、解離定数を定量化することができる。例示的なO₂ キャリアは、ヘモグロビンのNO反応性よりも低いNO反応性等、結合したO₂ を有するH-NOXタンパク質の低いまたは最小化されたNO反応性をもたらす。一部の実施形態において、上記NO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも約10、100、1,000または10,000倍低い等、さらにより低い。種々の確立された技法 (特にNO反応性の測定に関して、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Boon, E. M. ら (2005年) *Nature Chem. Biol.* 1巻: 53～59頁; Boon, E. M. ら (2005年10月) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9巻 (5号): 441～446頁; Boon, E. M. ら (2005年) *J. Inorg. Biochem.* 99巻 (4号): 892～902頁)、Vandegriff, K. D. ら (2004年8月15日) *Biochem J.* 382巻 (Pt 1): 183～189頁) と共に当業者に公知の技法を使用して、NO反応性を定量化することができる。野生型 *T. tengcongensis* H-NOXは、このように低いNO反応性を有するため、他の野生型H-NOXタンパク質および変異体H-NOXタンパク質も同様の低いNO反応性を有し得る。例えば、*T. tengcongensis*

H-NOX Y140Hは、野生型T. tengcongensis H-NOXのNO反応性と同様のNO反応性を有する。

【0231】

加えて、適したO₂キャリアは、高いまたは最大化された安定性、特に、*in vivo*安定性をもたらす。酸化的安定性（例えば、自動酸化またはNOによる酸化に対する安定性）、温度安定性および*in vivo*安定性等、種々の安定性測定基準（metric）を使用することができる。本明細書に記載されている技法（Boon, E. M. ら（2005年）Nature Chem. Biol. 1巻：53～59頁；Boon, E. M. ら（2005年10月）Curr. Opin. Chem. Biol. 9巻（5号）：441～446頁；Boon, E. M. ら（2005年）J. Inorg. Biochem. 99巻（4号）：892～902頁）と共に当業者に公知の技法等、種々の確立された技法を使用して、安定性を定量化することができる。血漿、血液または組織における*in vivo*安定性に関して、安定性の例示的な測定基準は、保持時間、クリアランスの速度および半減期を含む。好熱性生物由来のH-NOXタンパク質は、高温で安定的であると予想される。様々な実施形態において、血漿保持時間は、ヘモグロビンの血漿保持時間よりも少なくとも約2、10、100または1000倍長い（例えば、Bobofchak, K. M. ら（2003年8月）Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 285巻（2号）：H549～H561）。当業者に認められる通り、ヘモグロビンに基づく代用血液は、血漿から無細胞ヘモグロビンを除去するヘモグロビンの受容体の存在による、血漿からの無細胞ヘモグロビンの急速なクリアランスによって制限される。血漿にはH-NOXタンパク質の受容体が存在しないため、野生型および変異体H-NOXタンパク質は、ヘモグロビンの血漿保持時間よりも長い血漿保持時間を有すると予想される。所望の場合、標準方法（本明細書に記載されている方法および当業者に公知の方法等）を使用して、H-NOXタンパク質をペグ化もしくは架橋することまたはH-NOXタンパク質を別のタンパク質と融合させることにより、血漿保持時間を増加させることができる。

【0232】

様々な実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質を含むH-NOXタンパク質は、20℃における約1nM～約1mMの間のO₂解離定数および20℃等の同じ条件下におけるヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも約10倍低いNO反応性を有する。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、20℃における約1nM～約1mMの間のO₂解離定数および20℃における約700s⁻¹未満のNO反応性（例えば、20℃における約600s⁻¹、500s⁻¹、100s⁻¹、20s⁻¹または1.8s⁻¹未満）を有する。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、ヘモグロビンのO₂解離定数の2桁以内のO₂解離定数および20℃等の同じ条件下におけるヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも約10倍低いNO反応性を有する。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、20℃における約0.01～約200s⁻¹の間の、酸素に対するk_{off}および20℃等の同じ条件下におけるヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも約10倍低いNO反応性を有する。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、20℃における約0.65s⁻¹未満の、酸素に対するk_{off}（20℃における約0.21s⁻¹～約0.64s⁻¹の間等）および20℃等の同じ条件下におけるヘモグロビンのNO反応性よりも少なくとも約10倍低いNO反応性を有する。本発明の一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、約1nM～約1μM（1000nM）、約1μM～約10μMまたは約10μM～約50μMの間である。特定の実施形態において、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、20℃における約2nM～約50μM、約50nM～約10μM、約100nM～約1.9μM、約150nM～約1μMまたは約100nM～約255nMの間である。様々な実施形態において、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、20℃における約20nM～約75nMの間等、20℃における約80nM未満である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃等の同じ条件下におけるヘモグロビンのNO反応性よりも少

なくとも約100倍低いまたは約1,000倍低い。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃における約600 s⁻¹、500 s⁻¹、400 s⁻¹、300 s⁻¹、200 s⁻¹、100 s⁻¹、75 s⁻¹、50 s⁻¹、25 s⁻¹、20 s⁻¹、10 s⁻¹、50 s⁻¹、3 s⁻¹、2 s⁻¹、1.8 s⁻¹、1.5 s⁻¹、1.2 s⁻¹、1.0 s⁻¹、0.8 s⁻¹、0.7 s⁻¹または0.6 s⁻¹未満等、20℃における約700 s⁻¹未満である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の酸素に対するk_{off}は、約0.1～約200 s⁻¹、約0.1～100 s⁻¹、約1.35～約23.4 s⁻¹、約1.34～約18 s⁻¹、約1.35～約14.5 s⁻¹、約0.21～約23.4 s⁻¹、約2～約3 s⁻¹、約5～約15 s⁻¹または約0.1～約1 s⁻¹等、20℃における0.01～200 s⁻¹の間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、20℃における約100 nM～約1.9 μMの間であり、H-NOXタンパク質の酸素に対するk_{off}は、20℃における約1.35 s⁻¹～約14.5 s⁻¹の間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度は、約0.9 h⁻¹未満、約0.8 h⁻¹未満、約0.7 h⁻¹未満、約0.6 h⁻¹未満、約0.5 h⁻¹未満、約0.4 h⁻¹未満、約0.3 h⁻¹未満、約0.2 h⁻¹未満または約0.1 h⁻¹未満のうちいずれか等、37℃における約1 h⁻¹未満である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の酸素に対するk_{off}は、20℃における約1.35 s⁻¹～約14.5 s⁻¹の間であり、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度は、37℃における約1 h⁻¹未満である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質の酸素に対するk_{off}は、20℃における約1.35 s⁻¹～約14.5 s⁻¹の間であり、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃における約700 s⁻¹未満である（例えば、20℃における約600 s⁻¹、500 s⁻¹、100 s⁻¹、20 s⁻¹または1.8 s⁻¹未満）。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化の速度は、37℃における約1 h⁻¹未満であり、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃における約700 s⁻¹未満である（例えば、20℃における約600 s⁻¹、500 s⁻¹、100 s⁻¹、20 s⁻¹または1.8 s⁻¹未満）。

【0233】

一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質溶液を含むH-NOXタンパク質溶液の粘性は、1～4センチポアズ（cP）の間である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質溶液のコロイド膠質浸透圧は、20～50 mmHgの間である。

【0234】

O₂ および／またはNO結合の測定

当業者であれば、当技術分野において公知の方法および後述する非限定的な例示的な方法によって、三量体型H-NOXタンパク質等、重合体型H-NOXタンパク質を含むいずれかのH-NOXタンパク質の酸素および一酸化窒素結合の特徴を容易に決定することができる。

【0235】

動力学的K_D：k_{off}のk_{on}に対する比

重合体型H-NOXタンパク質を含む野生型および変異体H-NOXタンパク質の動力学的K_D値は、特にO₂会合速度、O₂解離速度、O₂結合に対する解離定数、自動酸化速度およびNO解離速度の測定に関して、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Boon, E. M. ら（2005年）Nature Chemical Biology 1巻：53～59頁に本質的に記載されている通りに決定される。

【0236】

k_{on}（O₂会合速度）

ヘムへのO₂会合は、20℃において閃光光分解を使用して測定される。非常に速い対再結合動力学の結果としてのFe¹⁺-O₂複合体を閃光除去する（flash off）ことは不可能である；よって、Fe¹⁺-CO複合体は、560 nmのレーザー光による閃光光分解に付され（Hewlett-Packard, Palo Alto, CA）

、5配位 Fe^{1+} 中間体を産生し、これに対し、分子 O_2 の結合が様々な波長で追跡される。タンパク質試料は、10mM 亜ジチオン酸塩による嫌氣的還元と、続く PD-10 カラム (Millipore, Inc., Billerica, MA) における脱塩によって作製される。次に、100 μL ~ 1mL サイズで 1cm 路長のガス制御 (controlled-atmosphere) 石英キュベット内で 50mM TEA、50mM NaCl、pH 7.5 バッファーにおける 20 μM ヘムへと試料を希釈する。このキュベットのヘッドスペースを通して 10 分間 CO ガスを流動させて、 Fe^{1+} -CO 複合体を形成させ、この形成を UV-可視分光法により確かめる (ソーレー最大 423 nm)。次に、この試料は、1 気圧の CO ガス下のままで閃光光分解後の CO-再結合動態の測定に使用される、あるいは開放して、空気中で 30 分間攪拌して、閃光光分解前にバッファーを完全に酸素化して、 O_2 再結合事象を観察する。ヘムへの O_2 会合は、時間に対して複数の波長でモニターされる。Igor Pro ソフトウェア (Wavemetrics, Inc., Oswego, OR; 最新 2005 年バージョン) を使用した単一指数関数により、これらのトレースを適合させる。この速度は、観察波長に非依存性であるが、 O_2 濃度に依存性である。全体を通して UV-可視分光法が使用されて、あらゆる複合体および中間体を確認する (Cary 3K, Varian, Inc., Palo Alto, CA)。特に機器使用に関して、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Dmochowski, I. J. ら (2000 年 8 月 31 日) J Inorg Biochem. 81 巻 (3 号): 221 ~ 228 頁に記載されている機器を使用して、一過性吸収データが収集される。この機器は、20 ns の応答時間を有し、データは 200 メガ試料 s^{-1} でデジタル化される。

【0237】

k_{off} (O_2 解離速度)

k_{off} を測定するために、タンパク質 (5 μM ヘム) の Fe^{1+} - O_2 複合体を嫌氣的 50mM TEA、50mM NaCl、pH 7.5 バッファーに希釈し、様々な濃度の亜ジチオン酸塩および/または飽和 CO ガスを含有する等体積の同じバッファー (嫌氣的) と迅速に混合する。20 $^{\circ}\text{C}$ に設定した Neslab RTE-100 恒温槽を備える HI-TECH Scientific SF-61 ストップフロー分光光度計においてデータを取得する (TGK Scientific LTD., Bradford On Avon, United Kingdom)。437 nm (Fe^{1+} - Fe^{1+} - O_2 差スペクトルにおける最大)、または 425 nm (Fe^{1+} - Fe^{1+} -CO 差スペクトルにおける最大) における吸光度の増加として、ヘムからの O_2 の解離をモニターする。機器の一部であるソフトウェアを使用して、最終トレースを単一指数関数に適合させる。各実験を最小で 6 回行い、得られた速度を平均化する。測定された解離速度は、亜ジチオン酸塩濃度に非依存性であり、10mM 亜ジチオン酸塩の存在および非存在の両方において、還元種のトラップとしての飽和 CO に非依存性である。

【0238】

動力的 K_D

動力的 K_D は、上述の k_{off} および k_{on} の測定値を使用して、 k_{off} の k_{on} に対する比を計算することにより決定される。

【0239】

計算された K_D

計算された K_D を測定するために、上述の通りに得られる k_{off} および動力的 K_D の値をグラフにする。 k_{off} および動力的 K_D の間の直線関係性は、等式 ($y = mx + b$) によって定義される。次に、Excel: MAC 2004 (Microsoft, Redmond, WA) を使用して、 k_{off} 値を線に沿って内挿して、計算された K_D を導く。測定された k_{on} の非存在下において、この内挿は、 k_{off} を K_D に関係付ける仕方をもたらす。

【0240】

自動酸化の速度

自動酸化の速度を測定するために、タンパク質試料を嫌氣的に還元し、続いて好氣的 50 mM TEA、50 mM NaCl、pH 7.5 バッファーにおける 5 μ M ヘムへと希釈した。次に、37 $^{\circ}$ C に設定した Neslab RTE-100 恒温槽を備える Cary 3E 分光光度計において、これらの試料をインキュベートし、定期的に走査する (Cary 3E, Varian, Inc., Palo Alto, CA)。自動酸化の速度は、Excel:MAC 2004 (Microsoft, Redmond, WA) を使用して、時間に対してプロットされ、単一指数関数と適合された $\text{Fe}^{III} - \text{Fe}^{II}$ 差スペクトルの最大および最小の間の差から決定される。

【0241】

NO との反応速度

10

NO 反応性は、バッファー A において 2 μ M となるよう調製された精製タンパク質 (H-NOX、重合体型 H-NOX、Homo sapiens ヘモグロビン (Hs Hb) 等) およびバッファー A において 200 μ M となるよう調製された NO を使用して測定される (バッファー A: 50 mM Hepes, pH 7.5、50 mM NaCl)。20 $^{\circ}$ C に設定した Neslab RTE-100 恒温槽を備える HI-TECH Scientific SF-61 ストップフロー分光光度計において、データを取得する (TK Scientific LTD., Bradford On Avon, United Kingdom)。0.00125 秒の積分時間を伴い、タンパク質を NO と 1:1 比で迅速に混合する。NO による酸化の律速段階を本質的に測定して、分光計の一部であるソフトウェアを使用して、最大変化の波長を単一指数関数に適合させる。反応の最終産物は、HNOX タンパク質に関しては三価鉄 (ferric) -NO であり、Hs Hb に関しては三価鉄-水和 (aquo) である。

20

【0242】

p50 測定

所望の場合、特に p50 値の測定に関して、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Guarnone, R. ら (1995 年 9 月/10 月) Haematologica 80 巻 (5 号): 426~430 頁に記載されている通り、変異体または野生型 H-NOX タンパク質の p50 値を測定することができる。p50 値は、HemoX 分析計を使用して決定される。測定チャンバーは、0% 酸素で開始し、100% 酸素に向けてゆっくりと徐々に上げる。チャンバーにおける酸素プローブは、酸素飽和 % を測定する。第 2 のプローブ (UV-Vis 光) は、ヘムタンパク質 (例えば、ヘムと複合体形成した H-NOX 等のタンパク質) UV-Vis スペクトルのアルファおよびベータピークに調整される、吸収の 2 波長を測定する。これらの吸収ピークは、ヘムタンパク質が酸素に結合するにつれて直線的に増加する。次に、非結合から 100% 結合へのパーセント変化を % 酸素値に対しプロットして、曲線を作成する。p50 は、ヘムタンパク質の 50% が酸素に結合する、曲線上の点である。

30

【0243】

詳細には、HemoX 分析計 (TCS Scientific Corporation, New Hope, PA) は、50 μ L の血液またはヘムタンパク質を増加する酸素分圧に曝露し、これを窒素ガスで脱酸素化することにより、オキシヘムタンパク質解離曲線 (ODC) を決定する。Clark 酸素電極は、酸素圧の変化を検出し、これを x-y 記録計の x 軸に記録する。560 nm および 576 nm の二重波長分光光度法によって、得られたオキシヘムタンパク質画分の増加を同時にモニターし、y 軸に表示する。前内側 (antemedial) 静脈から血液試料を採取し、ヘパリンで抗凝固剤処置し、アッセイするまで湿った氷上で 4 $^{\circ}$ C にて維持する。溶液の pH を 7.4 $\pm$ 0.01 の値に維持する製造業者提供のバッファーである 5 μ L の HemoX 溶液に、50 μ L の全血を希釈する。HemoX 分析計の一部であるキュベットに試料-バッファーを引き入れ、混合物の温度を平衡化し、37 $^{\circ}$ C にする; 次に、試料を空気により 100% まで酸素化する。pO₂ 値の調整後に、試料を窒素で脱酸素化する; 脱酸素化プロセスの間に、曲線をグラフ用紙に記録する。HemoX 分析計の一部であるソフトウェアを使用して、O₂ 飽和が 5

40

50

0%である点として、P50値をx軸に外挿する。完全な記録に要求される時間は、およそ30分間である。

H-NOX 核酸

【0244】

本発明は、また、本明細書に記載されている変異体H-NOXタンパク質、重合体型H-NOXまたは組換え単量体H-NOXタンパク質サブユニットのうちいずれかをコードする核酸を特色とする。

【0245】

特定の実施形態において、核酸は、H-NOXタンパク質またはH-NOXドメインをコードする核酸のうちいずれかのセグメントまたはその核酸配列全体を含む。一部の実施形態において、核酸は、H-NOX核酸由来の少なくとも約50、100、150、200、300、400、500、600、700、800個以上の連続ヌクレオチドを含み、これが由来するH-NOX核酸と比較して、1個または複数の変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の変異）を含有する。様々な実施形態において、変異体H-NOX核酸は、これが由来するH-NOX核酸と比較して、約20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3または2個未満の変異を含有する。本発明は、また、変異体H-NOXタンパク質をコードするいずれかの核酸の縮重バリエーションを特色とする。

10

【0246】

一部の実施形態において、核酸は、2個以上のH-NOXドメインをコードする核酸を含む。一部の実施形態において、2個以上のH-NOXドメインを含む核酸は、該核酸から重合体型H-NOXタンパク質が発現されるように連結される。さらなる実施形態において、核酸は、1個または複数の重合ドメインをコードする核酸を含む。一部の実施形態において、2個以上のH-NOXドメインおよび1個または複数の重合ドメインを含む核酸は、該核酸から重合体型H-NOXタンパク質が発現されるように連結される。

20

【0247】

一部の実施形態において、核酸は、重合ドメインをコードするいずれかの核酸のセグメントまたは該核酸の核酸配列全体を含む。一部の実施形態において、核酸は、H-NOXドメインおよび重合ドメインをコードする核酸を含む。一部の実施形態において、H-NOXドメインをコードする核酸および重合ドメインをコードする核酸は、産生されたポリペプチドが、H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む融合タンパク質となるように連結される。

30

【0248】

一部の実施形態において、核酸は、1個または複数のHis₆タグをコードする核酸を含む。一部の実施形態において、核酸は、H-NOXドメイン、重合ドメインおよび／またはHis₆タグをコードする核酸の間に位置する、リンカー配列をコードする核酸をさらに含む。

【0249】

一部の実施形態において、本発明は、H-NOXドメインおよびフォールドドメインをコードする核酸を提供する。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、T. thermoaerobacter H-NOXドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、野生型T. thermoaerobacter H-NOXドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、T. thermoaerobacter L144F H-NOXドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、T. thermoaerobacter W9F/L144F H-NOXドメインである。

40

【0250】

一部の実施形態において、本発明は、5'から3'へと、次のもの：L144F T. tengcongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列およびフォールドドメインをコードする核酸を提供する。一部の実施形態にお

50

いて、本発明は、5'から3'へと、次のもの：W9F/L144F T. tengcongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列およびフォルドンドメインをコードする核酸を提供する。一部の実施形態において、本発明は、5'から3'へと、次のもの：野生型T. tengcongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列およびフォルドンドメインをコードする核酸を提供する。

【0251】

一部の実施形態において、本発明は、5'から3'へと、次のもの：L144F T. tengcongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列、フォルドンドメイン、Arg-Gly-Serリンカー配列およびHis₆ タグをコードする核酸を提供する。一部の実施形態において、本発明は、5'から3'へと、次のもの：W9F/L144F T. tengcongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列、フォルドンドメイン、Arg-Gly-Serリンカー配列およびHis₆ タグをコードする核酸を提供する。一部の実施形態において、本発明は、5'から3'へと、次のもの：野生型T. tengcongensis H-NOXドメイン、Gly-Ser-Glyアミノ酸リンカー配列、フォルドンドメイン、Arg-Gly-Serリンカー配列およびHis₆ タグをコードする核酸を提供する。

【0252】

一部の実施形態において、核酸は、配列番号5、配列番号7、配列番号9または配列番号11に示される核酸配列を含む。

【0253】

本発明は、また、本明細書に記載されている変異体H-NOXタンパク質をコードする少なくとも1種の核酸を含有する細胞または細胞の集団を含む。例示的な細胞として、昆虫細胞、植物細胞、酵母細胞、細菌細胞および哺乳動物細胞が挙げられる。これらの細胞は、本明細書に記載されている方法等、標準方法を使用した変異体H-NOXタンパク質の産生に有用である。

【0254】

一部の実施形態において、本発明は、H-NOXドメインおよびフォルドンドメインをコードする核酸を含む細胞を提供する。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、T. thermoanaerobacter H-NOXドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、野生型T. thermoanaerobacter H-NOXドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、T. thermoanaerobacter L144F H-NOXドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、T. thermoanaerobacter W9F/L144F H-NOXドメインである。一部の実施形態において、本発明は、配列番号5、配列番号7、配列番号9または配列番号11に示される核酸配列を含む核酸を含む細胞を提供する。

【0255】

H-NOXタンパク質の製剤

本明細書に記載されている重合体型H-NOXタンパク質を含むいずれかの野生型または変異体H-NOXタンパク質を、医薬組成物または非医薬組成物の製剤に使用することができる。一部の実施形態において、製剤は、単量体型H-NOXタンパク質がin vitroまたはin vivoで会合して、重合体型H-NOXタンパク質を産生するように、H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む単量体型H-NOXタンパク質を含む。さらに後述する通り、これらの製剤は、種々の治療上および産業上の利用において有用である。

【0256】

一部の実施形態において、医薬組成物は、重合体型H-NOXタンパク質を含む本明細書に記載されている1種または複数の野生型または変異体H-NOXタンパク質と、薬学

10

20

30

40

50

的に許容されるキャリアまたは賦形剤とを含む。薬学的に許容されるキャリアまたは賦形剤の例として、リン酸緩衝食塩水溶液、水、油／水エマルション等のエマルションおよび様々な種類の湿潤剤等、標準医薬品キャリアまたは賦形剤のうちいずれかが挙げられるがこれらに限定されない。エアロゾルまたは非経口の投与のための例示的な希釈剤は、リン酸緩衝食塩水またはノーマル（0.9%）セーラインである。このようなキャリアを含む組成物は、周知の従来方法によって製剤化される（例えば、特に製剤に関して、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、A. Gennaro編、Mack Publishing Co.、Easton、PA、1990年；およびRemington, The Science and Practice of Pharmacy、第20版、Mack Publishing、2000年を参照）。一部の実施形態において、製剤は、滅菌されている。一部の実施形態において、製剤は、エンドトキシンを本質的に含まない。

10

【0257】

本発明の医薬組成物において、当業者に公知のいかなる適したキャリアを用いることもできるが、キャリアの種類は、投与モードに応じて変動する。例えば、静脈内、動脈内、小胞内、吸入、腹腔内、肺内、筋肉内、皮下、気管内、経粘膜、眼内、髄腔内または経皮投与を含むいずれかの適切な投与様式のために、組成物を製剤化することができる。皮下注射等の非経口の投与のために、キャリアは、例えば、水、食塩水、アルコール、脂肪、ワックスまたはバッファーを含むことができる。経口投与のために、上述のキャリアまたは

20

【0258】

一部の実施形態において、医薬組成物または非医薬組成物は、バッファー（例えば、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水等）、炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、スクロース、デキストラン等）、抗酸化剤、キレート剤（例えば、EDTA、グルタチオン等）、保存料、酸素の結合および／または輸送に有用な別の化合物、不活性成分（例えば、安定剤、充填剤等）または上記のうち2種以上の組合せを含む。一部の実施形態において、組成物は、凍結乾燥物として製剤化される。H-NOXタンパク質は、周知の技術を使用して、リポソームまたはナノ粒子内にカプセル封入することもできる。H-NOXタンパク質に使用することができる他の例示的な製剤は、例えば、特にタンパク質の製剤に関して、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,974,795号および同第6,432,918号に記載されている。

30

【0259】

本明細書に記載されている組成物は、徐放製剤（例えば、投与後に化合物の緩慢放出を生じるカプセルまたはスポンジ等の製剤）の一部として投与することができる。このような製剤は、一般に、周知の技術を使用して調製し、例えば、経口、直腸もしくは皮下植え込みによってまたは所望の標的部位における植え込みによって投与することができる。徐放製剤は、キャリアマトリックス中に分散されたおよび／または速度制御膜に囲まれたリザーバー内に含有されたH-NOXタンパク質を含有することができる。このような製剤内における使用のためのキャリアは、生体適合性であり、生分解性となることもできる。一部の実施形態において、製剤は、相対的に一定レベルのH-NOXタンパク質放出をもたらす。徐放製剤内に含有されるH-NOXタンパク質の量は、植え込み部位、放出の速度および予想される持続時間ならびに処置または防止しようとする状態の性質に依存する。

40

【0260】

一部の実施形態において、医薬組成物は、有効量の野生型または変異体H-NOXタンパク質を含有する。一部の実施形態において、医薬組成物は、2個以上の野生型または変

50

異体H-NOXドメインを含む有効量の重合体型H-NOXタンパク質を含有する。一部の実施形態において、医薬組成物は、本明細書に記載されている野生型または変異体H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む有効量の組換え単量体型H-NOXタンパク質を含有する。一部の実施形態において、製剤は、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質を含み、各単量体は、T. tengcongensis L144F H-NOXドメインおよびフォルドンドメインを含む。一部の実施形態において、製剤は、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質を含み、各単量体は、T. tengcongensis W9F/L144F H-NOXドメインおよびフォルドンドメインを含む。一部の実施形態において、製剤は、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質を含み、各単量体は、T. tengcongensis L144F H-NOXドメインおよびフォルドンドメインを含む。

10

【0261】

代用血液としてのヘモグロビンの例示的な用量は、患者体重1キログラム当たり約10mg～約5グラム以上の細胞外ヘモグロビンである。よって、一部の実施形態において、ヒトへの投与のための有効量のH-NOXタンパク質は、数グラム～約350グラム超の間である。H-NOXタンパク質の他の例示的な用量は、約0.5ml/分等の適切な注入速度における約4.4、約5、約10または約13G/DL（G/DLは、循環への注入前のH-NOXタンパク質溶液の濃度である）のうちいずれかを含む（例えば、Winslow, R.、第12章、Blood Substitutesを参照）。複数の投与の効果の組み合わせによって必要な有効量に達することができるため、各剤形の個々の用量に含有される活性成分の単位含有量それ自体が、有効量を構成する必要がないことが認められよう。医薬組成物に含まれるH-NOXタンパク質の量の選択は、当該分野の当業者の決定に従って、利用される剤形、処置されている状態および達成しようとする特定の目的に依存する。

20

【0262】

例示的な組成物は、単離または精製することができる、遺伝子操作された組換えH-NOXタンパク質を含み、該H-NOXタンパク質は、対応する野生型H-NOXタンパク質と比べて、変更されたO₂またはNOリガンド結合をまとめて付与する1個または複数の変異を含み、生理学的に適合性の哺乳動物血液ガスキャリアとして働く。例えば、本明細書に記載されている変異体H-NOXタンパク質。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、重合体型H-NOXタンパク質である。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、本明細書に記載されている野生型または変異体H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む組換え単量体型H-NOXタンパク質である。一部の実施形態において、組成物は、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質を含み、各単量体は、T. tengcongensis L144F H-NOXドメインおよびフォルドンドメインを含む。一部の実施形態において、組成物は、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質を含み、各単量体は、T. tengcongensis W9F/L144F H-NOXドメインおよびフォルドンドメインを含む。一部の実施形態において、組成物は、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質を含み、各単量体は、T. tengcongensis L144F H-NOXドメインおよびフォルドンドメインを含む。

30

40

【0263】

医薬組成物を投与されたヒト被験体における免疫応答を低下または防止するために、ヒトH-NOXタンパク質もしくはドメイン（野生型ヒトタンパク質または1個もしくは複数の変異が導入されたヒトタンパク質のいずれか）または他の非抗原性H-NOXタンパク質もしくはドメイン（例えば、哺乳動物H-NOXタンパク質）を使用することができる。ヒト以外の供給源に由来するH-NOXタンパク質の免疫原性を低下または排除するために、H-NOXタンパク質またはH-NOXドメインにおけるアミノ酸を、ヒトH-NOXにおける対応するアミノ酸へと変異させることができる。例えば、非ヒトH-NOXタンパク質の三次構造の表面における1個または複数のアミノ酸を、ヒトH-NOXタ

50

ンパク質における対応するアミノ酸へと変異させることができる。

【0264】

H-NOXタンパク質の治療適用

本明細書に記載されている重合体型H-NOXタンパク質を含む野生型または変異体H-NOXタンパク質のいずれかまたは医薬組成物を治療適用において使用することができる。

【0265】

処置されている特定の適応症のために、所望のO₂会合速度、O₂解離速度、O₂結合に対する解離定数、NO安定性、NO反応性、自動酸化速度、血漿保持時間または上記のうち2種以上のいずれかの組合せに基づき、重合体型H-NOXタンパク質を含む特定のH-NOXタンパク質をこのような適用のために選択することができる。H-NOXタンパク質は、心血管疾患、神経学的疾患、腫瘍低酸素、失血または創傷の処置に使用することができる。例えば、O₂結合H-NOXタンパク質は、赤血球または血漿増量剤が現在利用されている状況の多くにおいて使用することができる。特に、H-NOXタンパク質は、外傷（例えば、戦場、災害救助または事故）、出血、出血性ショック、外科手術（例えば、腹部動脈瘤外科手術、股関節置換手術等の整形外科手術または大量失血を伴う他のいずれかの外科手術）、血液希釈、血液の拡張的使用（例えば、自己供血（auto-donation）の補充）および血液体積が失われるまたはO₂運搬能が低下する他のいずれかの状況の処置のための赤血球代替物として使用することができる。創傷修復適用の例として、照射後創傷修復（例えば、高圧酸素効果）、術後修復、糖尿病性潰瘍修復および熱傷修復が挙げられる。

【0266】

酸素結合（binding）重合体型H-NOXを使用して、自家血液の前供血（pre-donation）の間またはその後に、該自家血液を個体に戻す前に、O₂送達を一時的に増大化させることもできる（個体の血液が除去され、外科手術の終わりまたは回復の際に再注入するために保存される、外科手技の際に除去された血液の交換等）。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、大型のH-NOXタンパク質分子の存在により膠質浸透圧をもたらす単純な体積増量剤としても機能する。

【0267】

細胞外H-NOXタンパク質の血管系における分布は、赤血球のサイズによって制限されないため、本発明の重合体型H-NOXタンパク質を使用して、赤血球が浸透できない区域へとO₂を送達することができる。これらの区域は、1個または複数の血栓、鎌状赤血球閉塞、動脈閉塞、末梢脈管閉塞、血管形成術バルーン、外科的機器の下流区域等の赤血球流動に対する障害物の下流に位置するいずれかの組織の区域、酸素欠乏を患うまたは低酸素である組織などを含むことができる。その上、H-NOXタンパク質を使用して、あらゆる種類の組織虚血を処置することができる。このような組織虚血は、例えば、周術期虚血、脳卒中、新興脳卒中（emerging stroke）、一過性虚血性発作、心筋気絶および冬眠、急性または不安定狭心症、新興狭心症ならびに心筋梗塞（例えば、STセグメント上昇心筋梗塞）を含む。H-NOXタンパク質を使用して処置することができる他の例示的な心血管適応症は、心筋保護および鎌状赤血球貧血症を含む。例示的な標的適応症は、失血、低酸素等を含む、代用血液またはO₂キャリアが適応であるなどの、機能的ヘモグロビン欠損の状態を含む。

【0268】

重合体型H-NOXタンパク質を含むH-NOXタンパク質は、がんの処置のための放射線または化学療法の補助として使用することもできる。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、固形腫瘍における放射線療法アジュバントとして（例えば、前転移性予後不良の個体）または表面腫瘍におけるPDT療法アジュバントとして（例えば、結腸、肺もしくは皮膚がんまたは別の接触表面もしくは位置におけるがん）使用される。H-NOXタンパク質を使用して、貧血症を患う患者において追加の酸素運搬能を提供することにより、貧血症を処置することができる。例示的な神経学的適応症は、虚血性脳卒中

、外傷性脳傷害および脊髄傷害を含む。本方法および組成物は、急性（組織または特異的部位へと迅速に酸素を供給する、例えば、急性心筋梗塞、急性局所性もしくは全身性組織酸素化または輸血）および慢性状況（例えば、心臓梗塞からの急性回復後）の両方に適用可能である。

【0269】

特定の態様において、本発明は、H-NOXタンパク質を使用して、脳腫瘍（例えば、神経膠芽腫）へとO₂を送達する方法を提供する。一部の実施形態において、H-NOXの投与は、放射線療法または化学療法の補助として使用される。一部の実施形態において、本発明は、個体に有効量のH-NOXタンパク質を投与し、有効量の放射線を投与することにより、該個体における脳がん（例えば、神経膠芽腫）を処置する方法を提供する。一部の実施形態において、本発明は、個体に有効量のH-NOXタンパク質を投与し、有効量の放射線を投与することにより、該個体における脳腫瘍成長（例えば、神経膠芽腫成長）を低下させる方法を提供する。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、重合体型H-NOXタンパク質（例えば、三量体型H-NOXタンパク質）である。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOXのL144に対応する位置に変異を含む1個または複数のH-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOXのL144F変異に対応する変異を含む1個または複数のH-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOXのW9およびL144に対応する位置に変異を含む1個または複数のH-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOXのW9F/L144F変異に対応する変異を含む1個または複数のH-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、ヒトH-NOXドメインである。一部の実施形態において、H-NOXドメインは、イヌH-NOXドメインである。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、L144F T. tengcongensis H-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、W9F/L144F T. tengcongensis H-NOXドメインおよびフォールドドメインを含む。

【0270】

様々な実施形態において、本発明は、重合体型H-NOXタンパク質を含む野生型または変異体H-NOXタンパク質を、個体へのO₂の送達に十分な量で、O₂の送達を必要とする個体へと投与することにより、個体（例えば、霊長類（例えば、ヒト、サル、ゴリラ、類人猿、キツネザル等）、ウシ、ウマ、ブタ、イヌまたはネコ等の哺乳動物）へとO₂を送達する方法を特色とする。一部の実施形態において、本発明は、H-NOX組成物のうち1種または複数個体を（例えば、哺乳動物）の血液へと送達する（例えば、輸血する等）ステップを含む、哺乳動物等の個体へと血液ガスを運搬または送達する方法を提供する。血液または組織（例えば、哺乳動物の血液または組織）へとO₂キャリアを送達するための方法は、当技術分野において公知である。様々な実施形態において、H-NOXタンパク質は、ヘムに結合することができるアポタンパク質である、あるいはヘムが結合したホロタンパク質である。H-NOXタンパク質は、個体へのH-NOXタンパク質の投与に先立ち、ヘムが結合していてもしていなくてもよい。一部の実施形態において、O₂は、個体へと送達される前にH-NOXタンパク質に結合している。他の実施形態において、O₂は、個体へのH-NOXタンパク質の投与に先立ち該タンパク質に結合しておらず、該H-NOXタンパク質は、個体内のある位置から個体内の別の位置へとO₂を輸送する。

【0271】

O₂に対する相対的に低いK_Dを有する（約80 nM未満または約50 nM未満等）重合体型H-NOXタンパク質を含む野生型および変異体H-NOXタンパク質が、低い酸素圧を有する組織（腫瘍、一部の創傷または1 mmHgを下回るp50等、酸素圧が非常

に低い他の区域等)の処置に特に有用であると予想される。 O_2 に対するこのようなH-NOXタンパク質の高親和性は、 O_2 がH-NOXタンパク質と結合し続ける時間の長さを増加し、これにより、処置しようとする組織にH-NOXタンパク質が達する前に放出される O_2 の量を低下させることができる。

【0272】

身体内の特定の部位(神経膠芽腫等)へと O_2 結合したH-NOXタンパク質を直接送達するための一部の実施形態において、 O_2 は、該タンパク質に既に結合しており(k_{on} の重要性を低くする)、酸素は、身体内の特定の部位でまたはその付近で放出される必要がある(k_{off} により影響される速度で)ため、 O_2 に対する k_{off} は、 K_D 値よりも重要である。一部の実施形態において、 k_{off} は、H-NOXタンパク質が循環における赤血球の存在下にある場合にも重要であり得、この場合、H-NOXタンパク質が、赤血球からの O_2 の拡散を容易にし、恐らく、血管系のさらに別のポイントへと O_2 を輸送する希釈赤血球の能力を延ばす。

10

【0273】

個体の血流中を循環するH-NOXタンパク質を送達するための一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、肺で O_2 に結合し、身体内の1種または複数の他の部位において O_2 を放出する。これらの適用の一部に関して、 O_2 結合は、平衡であるまた平衡に近い場合、 K_D 値は、 k_{off} よりも重要である。一部の実施形態において、極度血液希釈に関して、H-NOXタンパク質は、循環中を移動する際に絶えず O_2 に結合および放出するため、H-NOXタンパク質が主要な O_2 キャリアである場合、 K_D は k_{off} よりも重要である。ヘモグロビンは、14mmHgのp50を有するため、赤血球(キャパシタ(capacitor)の様に作用する)は、ほぼ30mmHgのp50を有し、5mmHg~90mmHgの間の範囲を有するHBOCが開発され、したがって、H-NOXタンパク質の最適 K_D 範囲は、一部の適用のために約2mmHg~約100mmHgの間であり得る。

20

【0274】

重合体型H-NOXタンパク質は、イメージングに使用することもできる。特に、光イメージング(例えば、光干渉断層撮影;例えば、特に光干渉断層撮影に関して、その全体が参照により組み込まれる、Villard, J. W. (2002年)Circulation 105巻:1843~1849頁を参照)は、赤血球により暗黒化される。H-NOXタンパク質は、赤血球よりもはるかに小さいため、H-NOX溶液による灌流は、循環および血管壁のよりクリアな画像を可能にする。

30

【0275】

本発明の重合体型H-NOXタンパク質を含むH-NOXタンパク質および医薬組成物は、経口、外用、眼内、髄腔内、肺内、気管内またはエアロゾル投与;経皮もしくは粘膜(mucus membrane)吸着;または注射(例えば、皮下、静脈内、動脈内、小胞内または筋肉内注射)による等、いずれかの従来手段により個体に投与することができる。H-NOXタンパク質は、代用血液としての使用のために大容量非経口的溶液に含まれてもよい。例示的な実施形態において、H-NOXタンパク質は、個体の血液(例えば、静脈、動脈または毛細血管等の血管への投与)、創傷、腫瘍、低酸素組織または低酸素臓器に投与される。

40

【0276】

一部の実施形態において、組成物の持続性連続的放出製剤が使用される。H-NOXタンパク質の投与は、例えば、投与の目的に応じて数秒間から数時間の期間行われ得る。例えば、血液送達媒体として、投与の例示的な時間経過は、可能な限り迅速である。他の例示的な時間経過は、約10、約20、約30、約40、約60、約90または約120分間のうちいずれかを含む。血液代替物としてのH-NOX溶液の例示的な注入速度は、約100mL/時間~約3,000mL/時間等、約30mL/時間~約13,260mL/時間である。H-NOXタンパク質の例示的な総用量は、13,260mL/時間で20分間にわたって投与される約900mg/kgである。ブタのためのH-NOXタンパ

50

ク質の例示的な総用量は、約 18.9 グラムである。

【0277】

例示的な投薬頻度として、1週間に少なくとも1、2、3、4、5、6または7回（即ち、毎日）が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、1日少なくとも2、3、4または6回投与される。H-NOXタンパク質は、例えば、数日間または数週間の期間にわたり投与することができる。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質は、数カ月間または数年間等、より長期間投与される。組成物の投薬頻度は、投与担当の医師の判断に基づき、処置の経過にわたり調整することができる。

【0278】

本発明の一部の実施形態において、H-NOXタンパク質（例えば、重合体型H-NOXタンパク質）は、放射線療法または化学療法の補助として使用される。例えば、神経膠芽腫の処置のために。一部の実施形態において、H-NOXは、放射線または化学療法の投与の少なくとも1、2、3、4、5または6時間前のうちいずれかにおいて個体に投与される。一部の実施形態において、放射線は、X線照射である。一部の実施形態において、X線照射の線量は、約0.5 Gy～約75 Gyのうちいずれかである。一部の実施形態において、H-NOX投与および放射線投与のサイクルは、1、2、3、4、5または6回のうちいずれか1種の回数、反復される。一部の実施形態において、H-NOX投与および放射線投与のサイクルは、約1週間、2週間、3週間、4週間、5週間または6週間のうちいずれか1種の後に反復される。一部の実施形態において、H-NOXおよび放射線療法の投与（administration）は、別の療法；例えば、化学療法と併せて使用される。

【0279】

上に記す通り、H-NOXタンパク質の投薬量の選択は、当該分野の当業者の決定に従って、利用されている剤形、投与の頻度および回数、処置されている状態ならびに達成しようとする特定の目的に依存する。一部の実施形態において、ヒトへの投与のためのH-NOXタンパク質の有効量は、数グラム～350グラム超の間である。

【0280】

一部の実施形態において、2種以上の異なるH-NOXタンパク質は、同時に、逐次的にまたは同時に投与される。一部の実施形態において、O₂の送達に有用な別の化合物または療法は、1種または複数のH-NOXタンパク質の投与と同時に、逐次的にまたは同時に投与される。

【0281】

H-NOXタンパク質を使用することができる他の例示的な治療適用は、例えば、特にO₂キャリアの治療適用に関して、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,974,795号および同第6,432,918号に記載されている。

【0282】

H-NOXタンパク質を有するキット

重合体型H-NOXタンパク質を含む本明細書に記載されているH-NOXタンパク質のうちいずれかと、適したパッケージングとを含む製造品およびキットも提供される。一部の実施形態において、本発明は、(i) H-NOXタンパク質（本明細書に記載されている野生型もしくは変異体H-NOXタンパク質または本明細書に記載されているその製剤等）と、(ii) 個体へのO₂の送達にキットを使用するための指示とを含む。様々な実施形態において、本発明は、(i) H-NOXタンパク質（本明細書に記載されている野生型もしくは変異体H-NOXタンパク質または本明細書に記載されているその製剤等）と、(ii) 本明細書に記載されている産業使用のうちいずれかにキットを使用するための指示（例えば、参照標準を必要とする分析的機器使用のための参照標準としてのH-NOXタンパク質の使用、in vitroでO₂レベルを維持もしくは増加させることによる細胞培養における細胞成長の増強、溶液へのO₂の添加、または溶

10

20

30

40

50

液からの O_2 の除去)とを有するキットを特色とする。

【0283】

一部の実施形態において、脳がん（例えば、神経膠芽腫）の処置における使用のためのキットが提供される。一部の実施形態において、キットは、重合体型H-NOXタンパク質を含む。一部の実施形態において、キットは、2個以上の野生型または変異体H-NOXドメインを含む有効量の重合体型H-NOXタンパク質を含む。一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載されている野生型または変異体H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む有効量の組換え単量体型H-NOXタンパク質を含む。一部の実施形態において、キットは、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質を含み、各単量体は、T. tengcongensis L144F H-NOX変異に対応する変異および三量体形成ドメインを含む。一部の実施形態において、キットは、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質を含み、各単量体は、T. tengcongensis W9F/L144F H-NOX変異に対応する変異および三量体形成ドメインを含む。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質は、ヒトH-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、三量体型H-NOXタンパク質は、イヌH-NOXドメインを含む。一部の実施形態において、キットは、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質を含み、各単量体は、T. tengcongensis L144F H-NOXドメインおよびフォールドドメインを含む。一部の実施形態において、キットは、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質を含み、各単量体は、T. tengcongensis W9F/L144F H-NOXドメインおよびフォールドドメインを含む。一部の実施形態において、キットは、3個の単量体を含む三量体型H-NOXタンパク質を含み、各単量体は、T. tengcongensis L144F H-NOXドメインおよびフォールドドメインを含む。

【0284】

本明細書に記載されている組成物に適したパッケージングは、当技術分野において公知であり、例えば、バイアル（例えば、密封されたバイアル）、容器、アンプル、瓶、ジャー、可撓性パッケージング（例えば、密封されたMylarまたはプラスチック袋）などを含む。これらの製造品は、さらに滅菌および／または密封されていてよい。本明細書に記載されている組成物を含む単位剤形も提供される。これらの単位剤形は、適したパッケージングにおいて単一または複数の単位投薬量で貯蔵することができ、さらに滅菌および密封することもできる。本発明のキットに供給される指示は、典型的には、ラベルまたは添付文書における書面の指示である（例えば、キットに含まれる紙面）が、機械可読指示（例えば、磁気または光学式記憶ディスクに入力された指示）も許容される。H-NOXタンパク質の使用に関する指示は、一般に、企図される処置または産業使用のための投薬量、投薬スケジュールおよび投与経路に関する情報を含む。キットは、処置に適した個体の選択に関する記述をさらに含むことができる。

【0285】

容器は、単位用量、バルクパッケージ（例えば、マルチ用量パッケージ）またはサブユニット用量であってよい。例えば、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約3カ月間、約4カ月間、約5カ月間、約6カ月間、約7カ月間、約8カ月間、約9カ月間以上のうちいずれか等、延長された期間個体に有効な処置を提供するのに十分な投薬量の本明細書に開示されているH-NOXタンパク質を含有するキットを提供することもできる。キットは、H-NOXタンパク質の複数の単位用量および使用のための指示を含み、薬局、例えば、病院内薬局および調剤薬局における貯蔵および使用に十分な含量でパッケージされ得る。一部の実施形態において、キットは、再構成、再懸濁または再度水分補給させて、一般にH-NOXタンパク質の安定的な水性懸濁液を形成することができる乾燥（例えば、凍結乾燥した）組成物を含む。

【0286】

H-NOXタンパク質の産生のための例示的な方法

本発明は、また、本明細書に記載されている重合体型H-NOXタンパク質のいずれか

の産生のための方法を提供する。一部の実施形態において、本方法は、重合体型H-NOXタンパク質の産生に適した条件下で、重合体型H-NOXタンパク質をコードする核酸を有する細胞を培養するステップを包含する。様々な実施形態において、重合体型H-NOXはまた、精製される（細胞または培養培地からのH-NOXタンパク質の精製等）。一部の実施形態において、本方法は、H-NOXドメインおよび重合ドメインを含む単量体H-NOXタンパク質をコードする核酸を有する細胞を培養するステップを包含する。続いてこの単量体は、*in vivo*または*in vitro*で会合して、重合体型H-NOXタンパク質を形成する。異種H-NOXドメインを含む重合体型H-NOXタンパク質は、所望のH-NOXドメインを有する単量体型H-NOXタンパク質をコードする2種以上の核酸を共導入することにより作製することができ、該2種以上の単量体型H-NOXタンパク質は、同じ重合ドメインを含む。

10

【0287】

一部の実施形態において、異種H-NOXドメインを含む重合体型H-NOXタンパク質は、所望のH-NOXドメインおよび共通重合ドメインを含む同種単量体型H-NOXサブユニットを含む重合体型H-NOXタンパク質を別々に調製することにより調製される。異なる同種H-NOXタンパク質は、異種H-NOXサブユニットの所望の比で混合され、同種重合体型H-NOXタンパク質は解離され（例えば、熱、変性剤、高塩等により）、続いて会合させて、異種重合体型H-NOXタンパク質を形成させる。異種重合体型H-NOXタンパク質の混合物は、所望の比で所望のサブユニットの存在を選択することによりさらに精製することができる。例えば、異なるH-NOX単量体のそれぞれは、異種重合体型H-NOXタンパク質の精製ならびに異種サブユニットの同定および定量化に役立つ別個のタグを有することができる。

20

【0288】

上に記す通り、数種類の野生型H-NOXタンパク質および核酸の配列は公知であり、本発明の変異体H-NOXドメインおよび核酸の作製に使用することができる。組換えH-NOXタンパク質の変異、発現および精製のための技法は、例えば、特に組換えH-NOXタンパク質の変異、発現および精製に関して、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Boon, E. M. ら（2005年）*Nature Chemical Biology* 1巻：53～59頁およびKarrow, D. S. ら（2004年8月10日）*Biochemistry* 43巻（31号）：10203～10211頁に記載されている。これらの技法または他の標準技法を使用して、いずれかの変異体H-NOXタンパク質を作製することができる。

30

【0289】

特に、本明細書に記載されている変異体H-NOXタンパク質は、当技術分野において公知の多数の方法により作製することができる。変異は、アミノ酸の化学修飾によるアミノ酸レベルで、あるいは所定のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列の変更によるコドンレベルでのいずれかで起こり得る。タンパク質におけるいずれかの所定の位置におけるアミノ酸の置換は、該アミノ酸をコードするコドンを変更することにより達成することができる。これは、例えば：(i) Taylor, J. W. ら（1985年12月20日）*Nucleic Acids Res.* 13巻（24号）：8749～8764頁；Taylor, J. W. ら（1985年12月20日）*Nucleic Acids Res.* 13巻（24号）：8765～8785頁；Nakamaye, K. L. ら（1986年12月22日）*Nucleic Acids Res.* 14巻（24号）：9679～9698頁；およびDenteら（1985年）、DNA Cloning、Glover編、IRL Press、791～802頁の方法に基づくAmersham技法（Amersham変異誘発キット、Amersham, Inc.、Cleveland、Ohio）、(ii) Promegaキット（Promega Inc.、Madison、Wis.）または(iii) 特にタンパク質の変異誘発に関して、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kunkel, T. A.（1985年1月）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82巻（2号）：4

40

50

88～492頁；Kunkel, T. A. (1987年) Methods Enzymol. 154巻：367～382頁；Kunkel、米国特許第4,873,192号の方法に基づくBioradキット(Biorad Inc.、Richmond、California)を使用した部位特異的変異誘発により達成することができる。変異誘発は、変異体オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発を利用する手段等、他の市販のまたは非商業的手段により達成することもできる。

【0290】

部位特異的変異誘発は、特にタンパク質の変異誘発に関して、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Zhengbinら(1992年)205～207頁、PCR Methods and Applications、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York；Jones, D. H.ら(1990年2月)Biotechniques 8巻(2号)：178～183頁；Jones, D. H.ら(1991年1月)Biotechniques 10巻(1号)：62～66頁に記載のもの等、PCRに基づく変異誘発を使用して達成することもできる。部位特異的変異誘発は、当業者に公知の技法によるカセット変異誘発を使用して達成することもできる。

【0291】

変異体H-NOX核酸および／または重合ドメインは、標準技法を使用して、発現ベクター等のベクターに組み入れることができる。例えば、制限酵素を使用して、変異体H-NOX核酸およびベクターを切断することができる。次に、切断された変異体H-NOX核酸および切断されたベクターの適合性末端をライゲーションすることができる。コードされたH-NOXタンパク質の発現のため、標準技法(例えば、エレクトロポレーション)を使用して、得られたベクターを細胞(例えば、昆虫細胞、植物細胞、酵母細胞または細菌細胞)に挿入することができる。

【0292】

特に、昆虫細胞、植物細胞、酵母細胞および細菌細胞等、多数の生物学的発現系において、異種タンパク質が発現されてきた。よって、いずれかの適した生物学的タンパク質発現系を利用して、多量の組換えH-NOXタンパク質を産生することができる。一部の実施形態において、H-NOXタンパク質(例えば、変異体または野生型H-NOXタンパク質)は、単離されたタンパク質である。

【0293】

所望の場合、H-NOXタンパク質は、標準技法を使用して精製することができる。一部の実施形態において、上記タンパク質は、少なくとも約60重量%であり、該タンパク質が産生される際に存在する他の構成成分を含まない。様々な実施形態において、上記タンパク質は、少なくとも約75重量%、90重量%または99重量%純粋である。精製されたタンパク質は、例えば、天然の供給源、組換え発現系または化学合成の反応混合物からの精製(例えば、抽出)により得ることができる。例示的な精製方法として、免疫沈降、免疫親和性クロマトグラフィー等のカラムクロマトグラフィー、磁気ビーズ免疫親和性精製およびプレート結合抗体によるパニング、ならびに当業者に公知の他の技法が挙げられる。純度は、いずれかの適切な方法により、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリ

【0294】

一部の実施形態において、重合体型H-NOXタンパク質は、1個または複数のHis₆タグを含む。少なくとも1個のHis₆タグを含むH-NOXタンパク質は、クロマトグラフィーを使用して；例えば、Ni²⁺親和性クロマトグラフィーを使用して精製することができる。精製後に、His₆タグは、例えば、エキソペプチダーゼを使用することにより除去することができる。一部の実施形態において、本発明は、His₆タグの使用

により精製された、精製された重合体型H-NOXタンパク質を提供する。一部の実施形態において、精製されたH-NOXタンパク質は、エキソペプチダーゼで処理されて、His₆タグを除去する。

【実施例】

【0295】

本実施例は、本発明を純粹に例示するものとして企図されており、したがって、決して本発明を限定するものと考えすべきではなく、また、上述の本発明の態様および実施形態を説明および詳述する。本実施例は、後述する実験が、実施される全てまたは唯一の実験であることを表すようには企図されていない。他に断りがなければ、温度は、セ氏温度で表されており、圧力は大気圧またはその前後である。

（実施例1）

三量体形成されたH-NOXタンパク質の作製および発現

【0296】

H-NOXタンパク質の循環半減期を増加させるために、キメラ融合タンパク質をデザインして、*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOX配列を、バクテリオファージT4フィブリチンタンパク質由来の三量体形成ドメインと組み合わせた。この融合戦略は、分子量の3倍を超える増加を生じ、完全にモジュラーである（三量体形成ドメインは、いかなるH-NOX配列に付加してもよく、さらには単一の三量体分子における複数のH-NOX配列の組み合わせに使用してもよい）。

【0297】

H-NOXへのフォルドンドメインの融合

Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOX配列のC末端のXhoI制限部位およびフォルドンドメインの最初のグリシンの間に3アミノ酸（Gly-Ser-Gly）リンカーを使用して、フォルドンドメインを該H-NOX配列のC末端に遺伝子融合した。フォルドンドメインおよびHis₆タグの間に3アミノ酸（Arg-Gly-Ser）リンカーを使用して、His₆タンパク質精製タグをフォルドンドメインのC末端に付加した。完全融合タンパク質のDNAおよびアミノ酸配列を図2に示す。全長融合タンパク質は、26,677 AMU（単量体として）の分子量を有する229アミノ酸のタンパク質をコードする。

【0298】

H-NOX-フォルドン融合タンパク質配列の構築

H-NOX-フォルドン融合配列の構築をデザインして、制限エンドヌクレアーゼを使用して親H-NOXプラスミドからHis₆および終止コドンにコードするDNAセグメントを切除し、これをフォルドン配列、His₆タグおよび終止コドンにコードするカセットに置き換えた。制限酵素部位（5'端にXhoIならびにHis₆タグおよび終止コドン後の3'端にHindIII）に挟まれたフォルドンドメイン、His₆タグおよび終止コドンにコードするDNAをGenScript（Piscataway, NJ）から購入した。この配列をGenScriptクローニングベクターpUC57に送達した。

【0299】

制限酵素XhoIおよびHindIIIを使用して、pUC57プラスミドを消化して、フォルドン-His₆断片（147塩基対の長さ）を放出させた。*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOXのL144FバリエーションをコードするpCWベクターもXhoIおよびHindIIIで消化して、H-NOX配列からHis₆タグおよび終止コドンにコードする48塩基対断片を除去した。調製用アガロースゲル電気泳動により、制限消化反応由来の所望の断片を単離し、アガロースからDNA断片を精製した。T4リガーゼを使用して、H-NOX配列をコードする断片およびフォルドン-His₆タグをライゲーションし、ライゲーション反応物を使用して、コンピテントE. coli細胞を形質転換した。pCW特異的配列決定プライマーによる配列決定により、E. coliクローンのうち1個（クローン31-A）が、所望の融合配

10

20

30

40

50

列とマッチし、完全H-NOX-フォルドン-His₆キメラタンパク質をコードしたことを確認した（図3Aは、所望の配列と整列させた配列決定データを示す）。クローン3I-A配列は、融合したフォルドンドメイン（f）を有するL144F H-NOX配列（002）をコードするpCWベクター（v01）を示すように、新たにv01-f002と命名した。His6タグありおよびなしの野生型*T. thermoanaerobacter* H-NOX-フォルドン単量体の配列、ならびに*C. lupus* H-NOX-フォルドン単量体の配列を図3に示す。

【0300】

H-NOX-フォルドン融合タンパク質の発現および精製

pCW親ベクター（Gegner, JA & Dahlquist, FW（1991年）*Proc Natl Acad Sci USA* 88巻、750～75頁；Mutchmore, DCら（1989年）*Methods Enzymol* 177巻：44～73頁）に由来するv01-f002プラスミドは、複数のtac（ハイブリッドtrp-lac）プロモーターによるf002オープンリーディングフレームの発現をコードする。ヘム結合H-NOXタンパク質の効率的な発現のために、コンピテント*E. coli*株RP523（Li, JMら（1988年）*J Bacteriol* 170巻：1021～1025頁）をプラスミドv01-f002で形質転換した。様々な誘導温度において（37℃、30℃、18℃）、また、Rosetta2細胞（Merck Millipore, Darmstadt, Germany）においても、発現を試験した。

【0301】

100mg/Lアンピシリンおよび30mg/Lヘミンを補充したルリアブロス（Luria Broth）にて30℃で成長させた初期一晚スターター培養物を使用して、RP523細胞におけるv01-f002プラスミドの頑強な発現を達成した。次に、スターター培養物を使用して、100mg/Lアンピシリン、30mg/Lヘミンおよび1.5%グルコースを補充したテリフィックブロス（Terrific Broth）の6L発現培養物に接種した。発現培養物を30℃で成長させて、約0.5のOD₆₀₀とし、続いて最終濃度0.1mMとなるようIPTGを添加することによりタンパク質発現を誘導した。30℃で一晚（24.5時間の誘導）発現を続け、その後、遠心分離により細胞を収集し、精製のために-80℃で凍結した。

【0302】

熱処理ステップおよび2回のクロマトグラフィーステップを使用して、発現した細胞ペレットから融合タンパク質を精製した。まず、発現した細胞ペレットを、50mMリン酸ナトリウム、500mM NaCl、20mMイミダゾールおよび5%グリセロールバッファー、pH7.9に再懸濁した。Emulsiflex C-50ホモジナイザー（Avestin, Ottawa, Canada）を使用してこの溶液をホモジナイズして、細菌細胞を溶解させた。細胞ライセートを15分間75℃で加熱して、熱安定性でないタンパク質を沈殿させた。27,000g、15分間の遠心分離によりこの沈殿物を除去して、清澄化された上清を得た。清澄化された上清をHisTrap FastFlowカラム（GE, Piscataway, NJ）にアプライして、His₆タグ付き融合タンパク質を結合させた。50mMリン酸ナトリウム、500mM NaCl、250mMイミダゾールおよび5%グリセロールバッファー、pH7.9のバッファーにより、結合したタンパク質を溶出させた。溶出されたタンパク質のバッファーを、DEAEセファロースFastFlowカラム（GE, Piscataway, NJ）へのアプライのために、30mMトリエタノールアミン、50mM NaCl、pH7.4バッファーに交換した。宿主細胞夾雑物およびエンドトキシンはカラムに保持されつつ、H-NOX-フォルドン融合タンパク質は、DEAEカラムを素通りした。次に、-80℃における貯蔵のために、H-NOX-フォルドン融合タンパク質を濃縮することができる。初期精製からの精製プロセスの各ステージにおけるH-NOX-フォルドン融合タンパク質を示すSDS-PAGEゲルを図4に示す。

【0303】

精製されたH-NOX-フォルドン融合タンパク質の特徴付け

多数の技法を使用して、精製されたH-NOX-フォルドンタンパク質を特徴付けた。最終精製タンパク質の純度をSDS-PAGEにより解析した（図4および図5を参照）。ゲル電気泳動は、熱処理および2回のクロマトグラフィーステップの後に、H-NOX-フォルドン融合タンパク質が、>95%純粋であることを示す。変性SDS-PAGEゲルにおいて、H-NOX-フォルドン融合体は、単量体として泳動し、移動度は、単量体の分子量26.7kDaと一致した。

【0304】

単量体単位の正確な質量を決定するためのLC-MSならびに標準バッファー溶液における三量体のサイズおよび分散を推定するための分析的サイズ排除クロマトグラフィーの両方を使用して、融合タンパク質のサイズのより定量的な推定値を得た。図6は、H-NOX-フォルドン融合タンパク質のLC-MS解析を示す。LC-MSが導く質量26,678AMUは、単量体型H-NOX-フォルドン融合体に予測される質量26,677AMUと一致する。図7は、Superdex 200 10/300 GL (GE, Piscataway, NJ) カラムおよび30mMトリエタノールアミン、50mM NaCl、pH7.4バッファーを使用した分析的サイズ排除クロマトグラフィーを示す。分析的SEC条件下において、H-NOX-フォルドン融合体は、三量体形成を維持する筈であり、得られる保持容量は、H-NOX-フォルドン三量体に予測される分子量80.0kDaと一致する。

【0305】

ヘムタンパク質の分光法を使用して、結合したリガンドの性質およびヘムにおける鉄原子の酸化状態を特徴付ける。H-NOX-フォルドンタンパク質のUV-vis分光学的解析は、フォルドンドメインの融合が、特徴的H-NOXスペクトルを変更しないことを示す。ソーレーピーク（415nm）および α/β ピーク（550~600nm）を含む特徴的スペクトルピークは全て、H-NOX単量体およびH-NOX-フォルドン融合タンパク質の間で保存されており、H-NOX-フォルドン融合体が、元のH-NOX単量体と同様の様式でヘム補因子および二原子酸素ガスに結合することを示す（図8）。

【0306】

RCSBタンパク質データバンクに見出されるフォルドンドメイン（1V1H）およびThermoanaerobacter tengcongensis H-NOX単量体（1U4H）の結晶構造を使用して、H-NOX-フォルドン三量体の構造的モデルを構築した（図9）。

（実施例2）

半減期の延長および様々な酸素親和性を実証するH-NOX三量体のパネルの生成

【0307】

構造に基づく計算的デザインを使用して、H-NOXアミノ酸を体系的に変異させて、様々な親和性で酸素に結合するH-NOX単量体バリエーションのパネルを作製した。小型の23kDa H-NOX単量体が、30分間の半減期でラット循環系から排除されることが決定された。腎臓濾過限界を上回るよう分子量を上げることにより、恐らくH-NOXタンパク質の循環半減期を増加させることができ、したがって、より長期の持続時間にわたる持続的な酸素化を可能にすると仮定された。分子量の増加が、H-NOXタンパク質の循環半減期を増加し得るかを決定するために、低酸素組織の酸素化が成功したH-NOX単量体の三量体形成により、より大型の分子量を有するH-NOXバリエーションを作製した。三量体形成したバリエーションのパネルを作製するために、「フォルドン」ドメインと呼ばれるフィブリチンタンパク質由来の小型のアミノ酸三量体形成モチーフを、1~20mHgに及ぶ異なる酸素親和性を有する数種類のH-NOX単量体のC末端に遺伝子連結した。パネルは、野生型H-NOX、H-NOXバリエーションL144F、C末端にHis₆タグなしのH-NOXバリエーションL144F、H-NOXバリエーションL144F/L189C、H-NOXおよびフォルドンの間にリンカーなしのH-NOXバリエーションL144F、H-NOXおよびフォルドンの間に3アミノ酸リンカーありのH-NOXバリエーション

ト L 1 4 4 F、H-N O X および フォルドン の間に 9 アミノ酸 リンカー ありの H-N O X バリエーション、または H-N O X バリエーション W 9 F / L 1 4 4 F と アセンブル した H-N O X 三量体を含んだ。フォルドンドメインは、フィブリチンのアミノ酸残基 4 5 7 ~ 4 8 3 に対応する 2 7 アミノ酸残基、G Y I P E A P R D G Q A Y V R K D G E W V L L S T F L (配列番号 4) からなり、3. 0 8 k D a の予測質量を有した。上述の通り、フォルドンドメインは以前にタンパク質安定性を増加させることが示され、i n v i t r o および i n v i v o の両方におけるタンパク質の三量体形成に広く使用されている。簡潔に説明すると、それぞれ 5 ' および 3 ' 端に X h o I および H i n d I I I 制限部位を有するフォルドンドメインをコードする遺伝子を含むプラスミドを、X h o I および H i n d I I I 制限酵素で消化して、H-N O X タンパク質単量体をコードするプラスミドへとフォルドンドメイン遺伝子をクローニングした。細菌細胞 (E. c o l i) におけるプラスミドの発現後に、H-N O X + フォルドンタンパク質を精製および試験して、H-N O X + フォルドン単量体が三量体形成して、H-N O X + フォルドン三量体 (例えば、H-N O X 三量体) となることを確かめた。精製のために、細菌細胞をリゾチームで溶解し、ホモジナイズした。上清を採取し、7 5 °C で 1 5 分間熱処理し、その後、J A - 1 7 ローターにおいて 1 4 k r p m で遠心分離して、不溶性タンパク質を除去した。可溶性 H-N O X + フォルドンを H i s T r a p (I M A C) カラムに結合させ、イミダゾールで溶出し、溶出された試料をバッファー交換に供して、イミダゾールを含まない低塩バッファーでタンパク質試料を提供した。タンパク質試料を D E A E イオン交換カラムに供することにより、試料におけるさらなる混入タンパク質を除去し、解析に先立ち溶出されたタンパク質試料を濃縮した。質量分析法およびサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、それぞれ単量体の分子量 (およそ 2 6. 7 k D a) および三量体の分子量 (およそ 8 0. 1 k D a) を確かめた。各三量体形成バリエーションを試験して、次の項目を含む生化学的パラメータを満たすかを決定した: 均質な (h o m o g e n o u s) 分子量、1 ~ 2 0 m m H g の間の酸素結合親和性、これは、 k_{off} によって測定され、公知 k_{on} 値を内挿して、m m H g に対応する K_d に達する。 k_{off} によって測定される場合、ホモ三量体の K_{off} は、対応する単量体についてのもの、最小一酸化窒素 (N O) 反応性、低い自動酸化速度および 3 時間以上の循環残留時間、と本質的に同じである (表 2)。分光法を使用して、S T P において結合したガスの性質を決定し、ストップフロー分光法を使用して、酸素解離の動力学的速度定数を決定した。この解析から、2 μ M の酸素親和性を有する H-N O X 三量体を同定し、この親和性は恐らく、低い酸素レベルを有する組織における酸素の放出を可能にする。H-N O X 三量体はまた、約 1 μ M⁻¹ s⁻¹ 未満の一酸化窒素反応性を実証し、この値は、血管作用性および毒性であると以前に判明した 5 8 μ M⁻¹ s⁻¹ の一酸化窒素反応性を有するヘモグロビンと比較して最小と考えられた。

【表 2】

表2.重合したH-NOX三量体の生化学的およびクリアランス特性

産物パラメータ	標的プロファイル	臨床的論拠
分子量	80 kDa	- 臨床的に意義のある期間循環中に存続する。 - 虚血性大脳組織を灌流するのに十分に小さいままである。
酸素結合親和性	約1~約20 mmHg	- 正常酸素圧レベルにおいて酸素を放出して、神経学的機能および組織生存を維持する。
一酸化窒素反応性	< 7 s ⁻¹	- 心血管および神経学的機能の複数の側面に必須の一酸化窒素の破壊を回避する。
自動酸化速度	$k_{ox} < 0.1 \text{ h}^{-1}$	- 商業的に実現可能な製造および安定性。
循環クリアランス速度	$T_{1/2} > 3 \text{ 時間}$	- 腎臓によるクリアランスおよび他の組織への血管外遊出を低下させて、有効性および安全性を最大化する。

【0308】

ラットにおけるクリアランス試験のために、高純度かつ低エンドトキシンレベルの三量体を生成した。150mM NaCl、25mM HEPESバッファー（pH7.4）の生理的バッファーで、*in vivo*注射のためのH-NOX三量体を製剤化し、最大100mg/kgの用量での使用のために100mg/mLに濃縮した。H-NOX三量体の循環残留時間の延長を確かめるために、4匹の雄ウィスター（Wistar）ラットの群を使用して、三量体候補をそれぞれ試験した。N₂O：O₂（2：1）中2～3%イソフルランにより導入チャンバー内で麻酔を導入し、ノーズコーン（nose cone）による1～1.5%イソフルランにより維持した。後肢をつねることに対する引込めの欠如および目隠し（eye blind）反射の損失により、麻酔の適切な深さを評価した。動物に腹腔内注射により40mg/kgのセファゾリンナトリウムおよび0.1mg/kgの皮下ブプレノルフィンを与えた。クリアランス試験の1日前に、各動物に大腿静脈および動脈カテーテルを外科的に植え込み、それぞれ注射および血液除去を可能にした。静脈カテーテルへの静脈内ボラス注射により100mg/kgの用量の候補H-NOX三量体を時間0の時点で注射した。候補H-NOX三量体またはバッファー対照の注射の5分、30分、1時間、1.5時間、2時間、3時間、4時間、6時間、8時間および24時間後に、各ラットの動脈カテーテルから約250μLの血液を採取した。採取した血液を処理して血清および血漿にし、その後、H-NOXタンパク質に対するポリクローナル抗体を用いたELISAおよびSDS-PAGEアッセイを使用して、H-NOX三量体の存在について解析した。

【表3】

表3:ラットへと静脈内ボラス(100mg/kg)として投与した際の、HNOX単量体および三量体の薬物動態パラメータ

化合物	ラット ID	終末 t _{1/2} (分)	AUC _{ラスト} (μg*分/mL)	AUC _{0-∞} (μg*分/mL)	Cl (mL/分/kg)	Cl _r (mL/分/kg)	V _z (mL/kg)	V _{ss} (mL/kg)
HNOX 単量体	1	24.7	53992.3	54006.9	1.85	0.04	66.05	31.04
	2	49	6706.9	6722	14.88	<0.01	1052.39	242.83
	3	24.3	19774.8	19787.6	5.05	<0.01	177.08	114.28
	平均値	32.7	26824.7	26838.8	7.26	ND	431.84	129.38
	SD	14.2	24418.3	24418.3	6.79	ND	540.27	106.7
HNOX 三量体	5	62.4	84949.3	85081.5	1.18	<0.01	105.86	49.95
	6	60.5	52377.1	52516.9	1.9	<0.01	166.13	121.99
	平均値	61.5	68663.2	68799.2	1.54	ND	136	85.97
	SD	1.4	23832	23826.7	0.52	ND	42.62	58.94

ND: 未決定

【0309】

三量体毎のクリアランス時間の測定に加えて、動物における予備的安全性もモニターした。H-NOX単量体による優良試験所基準（Good Laboratory Practice）（GLP）様安全性試験は、1g/kgの最大実行可能用量であっても、48時間に主要有害または免疫学的事象を示さなかった。初期注射4週間後まで総毒性、血液化学および抗治療抗体をモニターすることにより、候補H-NOX三量体を同様に試験した。予備的安全性試験のため、6匹のマウスの群に時間0の時点で、尾静脈への静脈内ボラス注射により750mg/kgの用量の候補H-NOX三量体またはバッファー対照を投与した。H-NOX三量体の投与前に、各ラットの頸静脈から血液試料を採取し、H-NOX三量体の投与4週間後まで各週に採取した血液と比較した。採取した血液を処理して血清および血漿にし、その後、臨床化学解析およびELISAによって検出される抗治療抗体産生に供した。全動物を毎日観察して、総毒性のいかなる証拠もモニターした。

【0310】

2匹の異なるラットにおける静脈内ボラス（100mg/kg）後のH-NOX三量

体の血漿プロファイルを図10に示す。H-NOX三量体投与後のIgGおよびIgM抗体応答を図11に示す。

(実施例3)

虚血の*in vivo*マウスモデルにおける脳組織浸透および低酸素の低下を実証するH-NOX三量体候補の同定

【0311】

灌流し脳組織に存続するH-NOX三量体の同定のために、虚血性脳卒中の一時的MCA閉塞齧歯類モデル(tMCAO)において、少なくとも3時間の循環半減期を有するH-NOX三量体候補を試験した。24匹の雄ウィスターラットの群を使用して、リードH-NOX三量体候補をそれぞれ試験した。N₂O:O₂(2:1)中2~3%イソフルランにより導入チャンバー内で麻酔を導入し、ノーズコーンを介した1~1.5%イソフルランにより維持した。後肢をつねることに對する引込めの欠如および目隠し反射の損失により、麻酔の適切な深さを評価した。動物に、腹腔内注射により40mg/kgのセファゾリンナトリウムおよび0.1mg/kgの皮下ブプレノルフィンを与えた。標準的な縫合に基づく外科的技法を使用して、0日目に一時的中大脳動脈閉塞を開始した。簡潔に説明すると、右総頸動脈(CCA)の上で皮膚切開を行って、CCAの一時的クランプと、外頸動脈(ECA)の遠位セグメントの結紮を可能にした。近位ECAを通してナイロン縫合糸を挿入し、内頸動脈(ICA)へと進め、脳への血流を閉塞した。CCAクリップを除去し、外科的ステープルで皮膚切開を閉鎖し、動物を覚醒させた。中大脳動脈閉塞の30分後に、750mg/kg用量のH-NOX三量体候補を尾静脈注射によりラットに注入した。組織低酸素を解析するために、H-NOX三量体注射の約15分後に、60mg/kgの低酸素マーカーのピモニダゾールを腹腔内注射して、虚血性組織を不可逆的に標識した。ラットに麻酔を施して、創傷を再び開き、ECAから血管内縫合糸を除去し、その後、再び創傷を閉鎖して、再灌流前に総計1時間の閉塞を施し、H-NOX三量体注入の30分後に閉塞を解除した。H-NOX三量体の組織分布を解析し、低酸素の低下を定量化するために、再灌流の2、4、12および24時間後にラットを屠殺し(時点当たりH-NOX三量体当たりN=6匹のラット)、脳組織および血液を採取した。安楽死させた動物から得た脳の切片を作製し、その後の免疫組織化学的解析のために、それぞれH-NOXに対するポリクローナル抗体およびピモニダゾール低酸素マーカーに対するHydroxyprobe抗体(Hydroxyprobe International)を使用することにより、H-NOX分布および組織低酸素を染色した。カメラを備える顕微鏡を使用して撮像し、染色を定量化した。虚血および再灌流は、神経細胞の細胞死の引き金を引き、虚血後損傷をもたらす炎症応答を開始することが公知である。二次エンドポイントとして、TUNELアッセイ染色(Roche)を行ってTUNEL陽性細胞を計数することにより、また、切断カスパーゼ(Cleaved Caspase)-1、-3、BaxおよびBcl-2を含むアポトーシスマーカーを染色することにより、脳組織におけるアポトーシスを測定した。複数の時点で採取した試料における血液化学検査を行って、H-NOX三量体候補の使用に起因する炎症マーカーの低下ならびにいずれかの造血性および全身性効果を評価した。ELISA(Signosisラット炎症ELISAキット)およびRT-PCRを使用して、ラット血清のTNFα、IL-1α、IL-1β、IL-6、MCP-1、ランテス(Rantes)およびMIPを含む炎症促進性サイトカインの上方調節を定量化した。虚血性組織に浸透し、低酸素を有意に低下させたH-NOX三量体候補を同定した。

(実施例4)

H-NOX三量体は、虚血の*in vivo*マウスモデルにおいて梗塞体積を低下させ、神経学的転帰を改善した

【0312】

虚血および再灌流後の延長された時点における臨床的に意義のある評価に着目して、ラットtMCAO脳卒中齧歯類モデルにおいて、脳組織浸透および組織低酸素の低下を実証したH-NOX三量体候補をさらに評価した。12匹の雄ウィスターラットの群を使用し

10

20

30

40

50

て、リードH-NOX三量体候補をそれぞれ試験した。N₂O:O₂ (2:1) 中2~3%イソフルランにより導入チャンバー内で麻酔を導入し、ノーズコーンを介した1~1.5%イソフルランにより維持した。後肢をつねることに対する引込めの欠如および目隠し反射の損失により、麻酔の適切な深さを評価した。動物に、腹腔内注射による40mg/kgのセファゾリンナトリウムおよび0.1mg/kgの皮下ブプレノルフィンを与えた。標準的な縫合に基づく外科的技法を使用して、0日目に一時的中大脳動脈閉塞を開始した。簡潔に説明すると、右総頸動脈(CCA)の上で皮膚切開を行って、CCAの一時的クランプと、外頸動脈(ECA)の遠位セグメントの結紮を可能にした。近位ECAを通してナイロン縫合糸を挿入し、内頸動脈(ICA)へと進めて、脳への血流を閉塞した。CCAクリップを除去し、外科的ステープルで皮膚切開を閉鎖し、動物を覚醒させた。中大脳動脈の閉塞開始30分後に、750mg/kg用量のH-NOX三量体候補またはバッファ対照を尾静脈注射によりラットに注入した。ラットに麻酔を施して、創傷を再び開き、ECAから血管内縫合糸を除去し、その後、再び創傷を閉鎖して、再灌流前に総計1時間の閉塞を施し、H-NOX三量体注入の30分後に閉塞を解除した。神経学的検査のため、再灌流の72時間、1週間、2週間、3週間および4週間後に各動物を評価した。0~4スケールでスコア化することにより、神経学的欠損に関して動物を評価し、以前に記載された通り、該スケールは、0が欠損なしを示し、1が置かれたときに前肢を伸ばすことができないことを示し、2が旋回を示し、3が片側性脱力を示し、4が自発運動活性の欠如を示す。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Borlongan,

C. V. ら(1998年) *Exp Neurol*、149巻:310~321頁を参照されたい。再灌流後4週間目に動物を屠殺し、H&E染色およびその後の組織学的解析のために脳組織を採取して、梗塞体積を評価した。梗塞体積測定のために、各動物脳から得た7枚の切片(+4.7、+2.7、+0.7、-1.3、-3.3、-5.3および-7.3、それぞれブレグマと比較)をデジタルカメラにより撮影した。脳浮腫を補正するための「間接的方法」(インタクト対側性[左]半球の区域 - 同側性[右]半球のインタクト領域の区域)を使用して、Image Jにより各スライスの梗塞(infract)区域を定量化した。スライス間の梗塞区域を合計し、スライスの厚さを乗じて、インタクト対側性半球体積のパーセンテージとして表される総梗塞体積を得た。バッファ対照動物との比較のために梗塞体積を測定し、0.05レベルの有意性によるANOVAおよびNewman-Keuls多重範囲検定により、群毎のスコアを比較した。再灌流4週間後までの長期評価は、神経学的機能の改善または梗塞体積の低下のいずれも、H-NOXタンパク質の神経保護効果に起因し、単に、梗塞の遅い成熟による神経学的結果の発病の遅延によるものではないことを保証した。

(実施例5)

H-NOXタンパク質は、がんのin vivoマウスモデルにおける腫瘍浸透および酸素化を実証した

【0313】

酸素は、放射線誘導性DNA損傷および腫瘍死滅化を増強する決定的な因子である。固形腫瘍内の低い酸素レベルまたは低酸素は、腫瘍療法の治療効果を鈍らせ得る。例えば、腫瘍の低酸素領域において、放射線療法は、正常酸素レベルを有する腫瘍領域と比較して、有効性が3倍低いことが見出された。その結果、低酸素の領域を含有する腫瘍を有する多くの患者は、多くの場合、従来の腫瘍療法に対し不完全応答を示し、生存の予後が不良となる。患者転帰不良と低酸素との相関は、とりわけ、前立腺がん、肉腫、膵臓がん、頭頸部がん、子宮頸部がんおよび脳がんから生じる広範囲の腫瘍において観察されてきた。全てその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Moeller, BJら(2007年) *Cancer Metastasis Rev* 26巻:241~248頁; Vapnel, P(2004年) *Semin Radiat Oncol*、14巻:198~206頁; Varlotta, Jら(2005年) *Int J Radiat Oncol Biol Phys*、63巻:25~36頁; Rockwell, Sら(2009年) *Curr Mol Med*、9巻:442~458頁を参照されたい。

【0314】

腫瘍に浸透するH-NOXタンパク質の能力を決定するために、皮下HCT116結腸由来腫瘍を有する6匹のマウスの群に、尾静脈を介して750mg/kgのH-NOX単量体、750mg/kgのT. tengcongensis L144F H-NOX三量体または食塩水対照を注射した。その後、注射後30分または60分にマウスを屠殺した。腫瘍を切除し、切片を作製し、抗H-NOX抗体で染色し、H-NOX染色強度を撮像した(図12A)。染色されたHCT-116腫瘍切片の定量化は、23kDa T. tengcongensis L144F H-NOX単量体が、30分までに腫瘍に蓄積し、60分までに部分的クリアランスを示したことを実証した(図12B)。比較すると、80kDa L144F H-NOX三量体は、30分までに腫瘍に蓄積し、注射後60分で腫瘍に存続し、蓄積は注射後4時間にピークとなった(図12B)。静脈内注射2時間後に、H-NOX三量体は、血管系から腫瘍組織へと拡散する(図12C)。H-NOX抗体およびCD31抗体(血管系マーカー、BD Bioscience)による腫瘍切片の免疫組織化学染色。バッファを注射したマウスにおいて蛍光染色は検出されない。

10

【0315】

H-NOXタンパク質が腫瘍における低酸素を低下させたかを決定するために、皮下HCT116結腸由来腫瘍を有する6匹のマウスの群に、尾静脈を介して750mg/kgのL144F H-NOX単量体、750mg/kgのL144F H-NOX三量体または食塩水対照を注射した。安楽死に先立ち、腹腔内注射により低酸素マーカー、ピモニダゾールおよび静脈内注射により活性血管系マーカー、DiOC7₃をマウスに与えた。H-NOXタンパク質注射の30分または60分後のいずれかに腫瘍を収集し、免疫組織化学検査により、ピモニダゾールについてHydroxyprobe-1モノクローナル抗体により、総血管系を抗CD31抗体によりアッセイした(図13A)。染色されたHCT-116腫瘍切片の定量化は、対照処置マウスとは対照的に、23kDa H-NOX単量体が、注射後30分で低酸素を減少させたが、注射後60分で低酸素における回復がないことを実証した(図13B)。比較すると、80kDa L144F H-NOX三量体は、注射後30分で低酸素を低下させるようではなかったが、注射後60分で低酸素を実質的に低下させた(図13B)。さらに別の実験は、皮下HCT116結腸由来腫瘍を有するマウスにおいて、H-NOX単量体が、腫瘍組織の至るところに分布し(図14A、下パネル)、抗ピモニダゾール抗体によって検出されるとおり血管系から離れた距離における腫瘍低酸素を軽減した(図14B、下パネル)ことを確認した。血管系からの距離の関数としての染色量により、6匹のマウスから単離した腫瘍組織におけるHydroxyprobe-1(抗ピモニダゾール抗体)染色を定量化した。最も近い血管から約150μmの距離において、食塩水処置マウスの約13μMからH-NOX単量体処置マウスの5μMへと平均Hydroxyprobe-1染色が低下したことが判明した(図14C)。マウスRIF-1肉腫異種移植片を有するマウスにおいて、これらの結果をさらに確認した。

20

30

【0316】

RIF-1肉腫腫瘍を有するマウスに、尾静脈を介して750mg/kgのT. tengcongensis L144F H-NOX三量体または食塩水対照を注射した。安楽死に先立ち、腹腔内注射により低酸素マーカー、ピモニダゾールをマウスに与えた。L144F H-NOX三量体注射の120分後に腫瘍を収集し、免疫蛍光イメージングによりH-NOX三量体分布をアッセイした(図15)、あるいはウエスタンブロットにより、Hydroxyprobe-1モノクローナル抗体でピモニダゾールを、抗HIF-1α抗体で低酸素誘導性因子1(HIF-1α)を、抗H-NOX抗体でH-NOXタンパク質を、抗アクチン抗体で総タンパク質をアッセイした(図16)。免疫蛍光染色は、およそ400mm³および800mm³のサイズの大型の単離された腫瘍から調製された腫瘍切片におけるL144F H-NOX三量体の分布を実証した(図15)。処置マウスの収集された腫瘍から得た細胞ライセートのウエスタンブロット解析は、L144F

40

50

H-NOX三量体が腫瘍組織に局在化し、これらの腫瘍が、未処置マウスと比較して減少したピモニダゾールタンパク質付加物を有したことを実証した（図16A）。ウェスタンブロットの定量化は、食塩水処置マウスと比較して、処置マウスの腫瘍における低レベルのピモニダゾールタンパク質付加物と共に低レベルのHIF-1 α タンパク質をさらに確認した（図16Bおよび図16C）。

（実施例6）

H-NOXタンパク質は、神経膠芽腫の*in vivo*マウスモデルにおける腫瘍浸透および酸素化を実証した

【0317】

腫瘍組織に浸透するH-NOXタンパク質の能力をさらに特徴付けるため、神経膠芽腫の3種のマウスモデルを使用して、脳腫瘍におけるT. *tengcongensis* L144F H-NOX単量体およびT. *tengcongensis* L144F H-NOX三量体の分布を評価した。脊柱に高度に浸潤性である、BT-12細胞（小児期非定型奇形腫瘍／ラブドイド乳児脳腫瘍系）を使用して、小児神経膠芽腫のマウスモデルを作製し、GBM-43細胞を使用して、成体神経膠芽腫の放射線抵抗性モデルを作製し、U251細胞を使用して、成体神経膠芽腫の低酸素モデルを作製した。以前に記載された通りに神経膠芽腫マウスモデルを作製した。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ozawa, Tら（2010年）J. *Vis. Exp.*, Jul 13巻；（41号）を参照されたい。簡潔に説明すると、BT-12細胞、U251細胞またはGBM-42細胞を頭蓋内注射のために収集し、1mL当たり約 1×10^8 細胞の濃度となるようダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）に再懸濁した。ケタミン（100mg/kg）およびキシラジン（10mg/kg）の腹腔内（IP）注射によりマウスを麻酔した。両足の足蹠をつねることによる足引込め反射を使用して、最初の切開に先立ち、また、手順を通して一定間隔で、麻酔の深さをモニターした。頭皮に沿って1cmの矢状切開を行い、頭蓋縫合線を露出させた。ブregマの3mm側方および0.5mm前方において、25g針による穿刺により小孔を作製した。滅菌Hamiltonシリンジ（Stoelting）を使用して、3mmの深さで60秒間の期間にわたり、3 μ L中の 3×10^5 細胞を注射した。注射後に、シリンジを1分間適所に保持し、続いてゆっくりと除去した。頭蓋を3%過酸化水素で消毒し、次に骨ろうで密封し、その後、7mm外科的ステープル（Stoelting）を使用して頭皮を閉鎖した。0.1mg/kgブプレノルフィンの皮下注射を与えたマウスを加熱パッドに置き、これらの試験において使用するための移動性を回復するまでモニターした。

【0318】

L144F H-NOX三量体が、脳組織に浸透できるかを決定するために、U251同所性脳腫瘍を有するマウスに、尾静脈を介して750mg/kg T. *tengcongensis* L144F H-NOX単量体または750mg/kg T. *tengcongensis* L144F H-NOX三量体のいずれかを注射した。安楽死に先立ち、腹腔内注射により低酸素マーカー、ピモニダゾールをマウスに与えた。免疫組織化学解析のため、H-NOXタンパク質投与の約2時間後に脳を単離し、切片を作製し、Hydroxyprobe-1モノクローナル抗体でピモニダゾールを、抗HIF-1 α 抗体で低酸素誘導性因子1（HIF-1 α ）を、抗H-NOX抗体でH-NOXタンパク質を、抗HLA-ABC抗体（NvusBiologicalラットモノクローナル抗体クローン#YTH862.2）でHLA-ABCタンパク質を染色した。免疫蛍光イメージングのために、Jackson ImmunoResearchによって製造されたFITC（緑色チャンネル）とコンジュゲートした抗ウサギ抗体にコンジュゲートした二次抗体およびDAPIで脳組織試料のセットをさらに染色した。H-NOX三量体で処置したマウスは、対照処置マウスと比較して、H-NOXの染色の増加を実証し、H-NOX三量体が脳組織に浸透したことを示した（図17A）。加えて、Hydroxyprobe-1モノクローナル抗体によるピモニダゾールの染色の減少は、H-NOX三量体投与が、注射後60分で低酸素を実質的に低下させたことを示した（図17B）。ピモニダゾールお

よびH I F-1 α タンパク質の染色の減少を免疫蛍光画像においてさらに観察した（図18 Aおよび図18 C）。免疫蛍光画像の定量化は、食塩水処置マウスと比較して、L144 F H-NOX三量体処置マウスの腫瘍における低レベルのピモニダゾール染色と低レベルのH I F-1 α タンパク質染色を実証した（図18 Bおよび図18 D）。

【0319】

図19は、U251同所性脳腫瘍および健常脳におけるH-NOX三量体の体内分布を示す。高拡大率でのH-NOX三量体の蛍光イメージングは、健常脳における血管外部への弱い拡散を示す。

【0320】

T. tengcongensis L144 F H-NOX単量体およびT. tengcongensis L144 F H-NOX三量体の間の浸透および保持時間を比較するために、同所性脳腫瘍を有するマウスに、尾静脈を介して750mg/kg Alexa-647標識H-NOX単量体または750mg/kg Alexa-647標識H-NOX三量体のいずれかを注射し、様々な時点で生物発光イメージングに供した。Alexa-647標識H-NOXタンパク質を作製して、次の通りに、蛍光標識したH-NOXタンパク質の蛍光励起および発光スペクトルを確認した。

【0321】

精製タンパク質、H-NOX単量体タンパク質、H-NOX三量体またはBSA（Sigma、対照として使用）を氷上で解凍し、エンドトキシンフリー透析カセット（Pierce Slide-A-Lyzer、7kDa MWCO）を使用して、エンドトキシンフリー標識バッファー（50mM HEPES、50mM NaCl、pH8.0）にバッファー交換した。UV-vis分光法により、標識バッファーへと透析した後のタンパク質濃度を決定した。標識反応への添加の直前にAlexa 647色素（Alexa Fluor（登録商標）647カルボン酸、スクシンイミジルエステル、Invitrogen #A-20006）を調製した。色素を室温に温め、次に、最終濃度10mg/mLとなるようDMSOに溶解した。この混合物を10秒間ボルテックスし、続いて色素を各標識反応に添加した。標識反応は、様々なタンパク質：色素比を使用して、Alexa標識の程度を制御した。反応物は、最終DMSO濃度5~10%に対してタンパク質（標識バッファーに溶解）および色素からなった。穏やかに振盪しつつ、反応物を1時間室温でインキュベートした（光から保護した）。反応後に、エンドトキシンフリー透析カセット（Pierce Slide-A-Lyzer、7kDa MWCOカットオフ）を使用したエンドトキシンフリー製剤バッファー（30mMトリエタノールアミン、50mM NaCl、pH7.4）への大規模透析により、遊離Alexa色素を除去した。

【0322】

製剤バッファーへと透析した後、標識後の色素のタンパク質に対するモル比を決定するため、H-NOX（280および415nm）およびAlexa色素（653nm）の固有吸光度を使用したUV-vis分光法により、タンパク質濃度および標識の程度を決定した。647nmにおける励起による標識タンパク質の蛍光を解析して、発光スペクトルを収集した。標識タンパク質の発光スペクトルは、公表データおよびInvitrogenデータと一致した。サイズ排除クロマトグラフィーにより標識タンパク質をさらに解析して、標識がタンパク質のオリゴマー形成状態に影響を与えないことを確実にした。Charles River LAL Gel Clotアッセイ（0.03EU/mL感度）を使用して、標識タンパク質における最終のエンドトキシンの混入を決定した。

【0323】

生物発光イメージングのため、ケタミン（100mg/kg）およびキシラジン（10mg/kg）のIP注射によりマウスを麻酔し、続いてIPにより、滅菌食塩水に溶解した33.3mgのD-ルシフェリン（カリウム塩、Gold Biotechnology、St. Louis、MO、USA）を注射した。IVIS Lumina System（Caliper Life Sciences、Alameda、CA、USA）およびLiving Imageソフトウェアを使用して、ピークピクセル強度の25%の

10

20

30

40

50

下位閾値 (lower threshold value) によって定義される、目的の領域における毎秒光子計数の合計として、ルシフェリン注射の10分後に腫瘍生物発光を決定した。画像取得は非侵襲的であり、加熱したイメージングプラットフォームを使用して動物体温を維持した。H-NOX単量体またはH-NOX三量体で処置したBT-12マウスに対して、注射後0、0.5、1、2および4時間にイメージングを行った。H-NOX単量体またはH-NOX三量体で処置したGBM-41マウスに対して、注射後0、0.5、1、2、4および6時間にイメージングを行った。H-NOX単量体またはH-NOX三量体で処置したU251マウスに対して、注射後0、0.5、1、2、4、6および72時間にイメージングを行った。腫瘍生物発光は、同所性GB異種移植片を有するマウスにおける腫瘍体積に正比例することが以前に示された。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Moeller, BJら(2007年) Cancer Metastasis Rev、26巻:241~248頁を参照されたい。H-NOX単量体および三量体内分布の比較は、神経膠芽腫のBT-12マウスモデルにおいて、L144F H-NOX単量体(図20A)およびL144F H-NOX三量体(図20B)が両者共に脳腫瘍に浸透したことを実証した。H-NOX三量体は、H-NOX単量体と比較して、腫瘍における有意により長い保持時間を有した。HNOX単量体が、2時間までに大部分が腫瘍から排除された(図20A)一方、H-NOX三量体は、数時間腫瘍に蓄積し続けた(図20B)。H-NOX単量体注射後30および60分(図21Aおよび図18B)ならびにH-NOX三量体注射後60分(図21C)にマウスから単離された脳組織のex vivoイメージングにより、H-NOX頭蓋内局在化を確認した。注射後30、60、120および240分の生物発光によるさらなる可視化は、H-NOX単量体(図22)およびH-NOX三量体(図23)が、脊柱における転移性コロニーにも局在化したことも実証した。H-NOX単量体は、H-NOX三量体(図23A)と比較して、30分で脊柱に実質的に蓄積した(図22A)が、2時間までに大部分が排除された(図22B~D)、その一方、H-NOX三量体は、数時間脊柱に蓄積し続けた(図23B~D)。より少量の標識タンパク質を使用し、シグナル強度を増加させることにより、H-NOX単量体が、経時的に腎臓に蓄積したことが明らかになり、排除の経路が示唆された(図24)。

【0324】

GBM-43(図25)およびU251マウスモデル(図26)において、脳および脊柱におけるL144F H-NOX三量体の蓄積を確認した。より高用量のH-NOX三量体用量295mg/kgおよびより低用量の30mg/kgを注射したU251マウスにおいて、L144F H-NOX三量体の局在化をさらに調査した。注射後0、0.5、1、2、4および6時間における生物発光イメージングは、L144F H-NOX三量体が、高および低濃度のH-NOX三量体投与(それぞれ図27および図28)の両方において、マウスの脳腫瘍に蓄積したことを実証した。比較すると、H-NOX単量体L144FバリエーションからアセンブルしたH-NOX三量体の局在化は、30mg/kg注射後0、0.5、1、2、4および6時間の生物発光画像によって証明される通り(図29)、小型の脳腫瘍に蓄積しなかった。30mg/kg L144F H-NOX三量体(図30A)または750mg/kg L144F三量体(図30B)で処置したマウスから単離された脳のex vivo生物発光イメージングは、単回用量のH-NOXタンパク質の量が、頭蓋内腫瘍へのH-NOX局在化に殆ど効果がないことを示した。さらに、大型(図30C)または小型の腫瘍(図30D)を有するマウスのリアルタイム生物発光イメージングは、295mg/kgのL144F H-NOX三量体の投与後に、腫瘍サイズにかかわらず三量体が頭蓋内腫瘍に分布したことを示した(図30B)。神経膠芽腫の3種のマウスモデル、GBM、U251およびBT-12のリアルタイムおよびex vivo生物発光イメージングは、L144F H-NOX三量体が、全3種のモデルにおいて頭蓋内腫瘍および脊髄腫瘍に分布したことを実証した(図31および図32)。H-NOXタンパク質および血管系に対する抗体で染色した腫瘍切片の免疫蛍光イメージングは、L144F H-NOX三量体が血管系を通り過ぎて、脳腫瘍の至るところに

拡散したことを示した（図33）。全体的に見て、これらのデータは、臨床的に意義のある腫瘍体内分布プロファイルを有するH-NOXタンパク質を同定した。

【0325】

血漿および脳の間におけるH-NOX三量体の分配を確かめるために、3匹の雌FVBマウスの群を使用してL144F三量体を試験した（図34）。尾静脈への静脈内ボラス注射による200および750mg/kgの用量で、時間0の時点で候補H-NOX三量体を注射した。候補H-NOX三量体またはバッファー対照の注射後30分、1時間、1.5時間および2時間にマウスを屠殺した。心臓内穿刺により約1mlの血液を採取し、脳を収集した。採取した血液を処理して血漿にし、脳試料を溶解（lyzed）して、タンパク質を抽出した。その後、H-NOXタンパク質に対するポリクローナル抗体によるELISAアッセイを使用して、H-NOX三量体の存在に関して血漿および脳を解析した。

10

（実施例7）

H-NOX三量体は、神経膠芽腫のin vivoマウスモデルにおける放射線の効果を増強した

【0326】

H-NOX浸透による低酸素腫瘍の酸素化が、放射線誘導性の腫瘍死滅化を増強し得るかを決定するために、頭蓋内神経膠芽腫腫瘍を有する10匹の胸腺欠損U251マウスの群において試験を行って、H-NOX三量体の存在下における放射線療法（RT）の効果を評価した。静脈内注射によって送達される750mg/kg Alexa-647標識T.tengcongensis L144F H-NOX三量体の投与ありまたはなしのいずれかで、腫瘍植え込み後15、17および20日目に、1分割当たり2Gyの3分割の放射線療法によりマウスを処置した。29日目までマウスをモニターし、15、17、20、22、24および29日目に生物発光イメージングに供した。処置群毎に決定された平均生物発光イメージング（BLI）スコアは、複数用量のL144F H-NOX三量体が、腫瘍成長に統計学的に有意な遅延をもたらした（図35Aおよび図35B）、処置したU251同所性腫瘍の浸潤性かつ軽度に低酸素な性質にもかかわらず、L144F

20

H-NOX処置群において動物生存も有意に増強された（図35C）ことを実証した。免疫組織化学染色および解析のためにも腫瘍を収集した。

【0327】

頭蓋内神経膠芽腫腫瘍を有する2種のマウスモデル、U251およびGBM43において、ヒト神経膠芽腫の放射線療法におけるT.tengcongensis L144F

30

H-NOX三量体の効果をさらに調査した。1試験において、頭蓋内神経膠芽腫腫瘍を有する10匹の雌胸腺欠損U251マウスの群を、1）処置バッファー単独、2）単一線量の2Gy放射線（照射器セットアップ=0.81；セシウム照射器の線量率は247CGy/分）と組み合わせた処置バッファー、3）IVによる750mg/kg L144F H-NOX三量体単独または4）単一線量の2Gy放射線（照射器セットアップ=0.81；セシウム照射器の線量率は247CGy/分）と組み合わせたL144F H-NOX三量体のいずれかで処置した。L144F H-NOX三量体送達の2時間後に、併用処置を与えるマウスの脳のテント上部分（supratentorial port 40
ion）に照射を行った。3.0×10⁵ U251細胞によるマウスの頭蓋内注射の14日後に、全マウスの処置を始めた。動物生存が、L144F H-NOX三量体および2Gy放射線の併用処置を与えたコホートにおいて増加したことが判明した（図36A）。

別の試験において、頭蓋内神経膠芽腫腫瘍を有する10匹のGBM43マウスの群を、1）2Gy放射線療法；2）4Gy放射線療法；3）8Gy放射線療法；4）2サイクルの4Gy放射線療法；5）L144F H-NOX三量体と組み合わせた4Gy放射線療法または6）処置バッファーのいずれかで処置した。H-NOX三量体送達の1～1.5時間後に併用処置を与えるマウスを照射し、RTの複数線量を与えるマウスは、4日間空けてRTを投与した。全RT群において、脳のテント上部分に放射線処置を投与した。腫瘍植え込み7日後に全マウスの処置を始めた。L144F H-NOX三量体および4G

50

y放射線の併用処置を与えたコホートにおける動物生存が、4 Gy 処置単独を与えたコホートにおける動物生存と同様であったことが判明した（図36B）。

（実施例8）

H-NOXタンパク質の毒性試験

【0328】

IND許可申請（IND-enabling）毒性試験を見込んだH-NOX単量体の安全性プロファイルを評価するために、FDA認定の独立した医薬品開発受託機関（Contract Research Organization）（MPI Research Laboratories）において、スプラグドローリー（Sprague-Dawley）ラットにおける予備的GLP様毒性試験を行った。100および300mg/kg用量のT. tengcongensis L144F H-NOX単量体において、注射（IV）48時間後に有害事象または対照との差は検出されなかった。1000mg/kg最大実行可能用量において、毒性のある程度の軽度適応症が記述された（表4）。48時間の白血球細胞（white blood cell）数の上昇は、タンパク質製剤に存在する微量のエンドトキシンによる可能性があり、このようなレベルは、さらなる試験のための生産の実行において100倍低下した。別々の試験において、ラットに、50mg/kg L144F H-NOX単量体またはL144F H-NOX三量体のいずれかを注射し、32日目まで追跡した。IgMおよびIgG抗治療抗体の両方が作製されたが、H-NOXバリエーションまたは用量数（最大4用量を試験）にかかわらず、アナフィラキシーショックの症例はなかった。

【表4】

表4.H-NOX単量体は、ラットにおいて良好な耐容性を示した

1000mg/kgにおいて影響されない毒性パラメータ	1000mg/kgにおいて影響される毒性パラメータ
大部分の血液学尺度 RBC、Hb、HCT、血小板、好中球、好酸球	網状赤血球の減少 120±60[300±、対照について]×10 ³ 細胞/μl
全ての腎および肝機能検査 BUN、クレアチン、ALT、AST	白血球細胞の上昇(×10 ³ 細胞/μl) リンパ球:11.2±2.2[5.8±0.3、対照について] 白血球:14.2±0.9[7.3±0.7、対照について] 単球:0.4±0.2[0.145±0.007、対照について]
尿検査 体積、比重、pH	腎臓組織像 軽度封入(inclusion)および壊死
主要臓器組織像 心臓、肺、肝臓、小腸および大腸、脾臓	

（実施例9）

神経膠芽腫のin vivo動物モデルにおける最小H-NOX三量体投薬スケジュールの特徴付け

【0329】

IND許可申請毒性試験および臨床試験のデザインを最も良く通知するため、U251神経膠芽腫マウスモデルを使用して、リードH-NOX三量体の用量レベルおよびスケジュールを特徴付ける。神経膠芽腫の追加の動物モデルにおいて、これらの試験の結果を確かめて、患者選択を最も良く通知する。

【0330】

RTを増強するリードH-NOX三量体の最小有効用量を同定する

リードH-NOX三量体を与えた患者における有害事象を最小化するために、また、腫瘍の酸素化および放射線増感におけるリードH-NOX三量体の薬力学（PD）を定量化するために、U251神経膠芽腫マウスモデルにおけるH-NOX三量体の最小有効用量（MED）を同定する。予備試験は、750mg/kg H-NOX三量体の用量におい

て、投与2時間後に腫瘍低酸素の実質的な低下がもたらされ（図17Aおよび図17B）、この効果がRTに対する腫瘍応答を有意に増強するのに十分であった（図35）ことを実証した。他の異種移植腫瘍試験は、H-NOX三量体が、10 mg/kgもの低さの用量で腫瘍に蓄積したことを実証し、効果的な用量の広範な潜在的範囲を確立した。H-NOX三量体のMEDを同定するため、RTに対する腫瘍応答の増強に7.5 mg/kg～750 mg/kgに及ぶ投薬量を使用する。

【0331】

H-NOX三量体MEDを同定するために、以前に確立された効果的な用量の750 mg/kgに対し、75 mg/kgおよび7.5 mg/kg用量の放射線増感効果を比較する（表5）。ルシフェラーゼ修飾U251ヒトGB細胞系を使用して、GBの同所性マウスモデルに対する有効性を試験する。10匹のマウスの1コホートを使用して、生物発光イメージングにより腫瘍成長を追跡し、生存を追跡する。それぞれ3匹のマウスの3種の追加のコホートを使用して、免疫組織化学検査および定量的ELISAによるH-NOX三量体局在化、低酸素のマーカーとしてEF5を使用した免疫組織化学検査による腫瘍酸素化、ならびにγH2AX染色を使用した免疫組織化学検査によるDNA損傷の評価を含む、H-NOX三量体作用の背後にある分子機序を試験する（表5）。

【0332】

これらの試験のために、1 mL当たり約 1×10^8 細胞の濃度となるようU251細胞をダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）に再懸濁する。ケタミン（100 mg/kg）およびキシラジン（10 mg/kg）の腹腔内（IP）注射により胸腺欠損マウスを麻酔する。頭皮に沿って1 cmの矢状切開を行い、プレグマの3 mm側方および0.5 mm前方において、25 g針による穿刺により小孔を作製する。滅菌Hamiltonシリンジ（Stoelting）を使用して、60秒間の期間にわたり3 mmの深さに、3 μl体積中 3×10^5 細胞を注射する。注射後に、シリンジを除去し、頭蓋を骨ろうで密封し、その後、7 mm外科的ステープル（Stoelting）を使用して頭皮を閉鎖する。Ozawa, Tら（2010年）J Vis Exp, Jul 13巻；（41号）を参照されたい。マウスに、0.1 mg/kgブプレノルフィンの皮下注射を与え、移動性を回復するまでモニターする。腫瘍植え込み後21～25日間の間、尾静脈注射により、RTの2時間前にコホート毎に表示の投薬量のH-NOX三量体を投与し、テント上脳全体に2 Gy/回のRTが投与される（表6）。全脳RT投与のため、およそ280 cGy/分の線量率を送達する ^{137}Cs 源を使用し、2 Gyを生じるだけの長さの時間でマウスを照射する。

【表5】

表5.H-NOX三量体用量漸減試験のコホート

試験コホート	H-NOX三量体 投薬量	N有効性	N低酸素およびH-NOX 三量体IHC	NH-NOX 三量体ELISA	NDNA 損傷IHC
媒体	N/A	10	3	3	3
放射線療法	N/A	10	3	3	3
放射線療法+H-NOX三量体	7.5 mg/kg	10	3	3	3
放射線療法+H-NOX三量体	75 mg/kg	10	3	3	3
放射線療法+H-NOX三量体	750 mg/kg	10	3	3	3
H-NOX三量体	7.5 mg/kg	10	3	3	3
H-NOX三量体	75 mg/kg	10	3	3	3
H-NOX三量体	750 mg/kg	10	3	3	3

【0333】

全RTスケジュールは、2 Gy/回を1週間に3回からなる

【0334】

試験経過を通して生物発光イメージングにより非浸潤性腫瘍成長をモニターする。生物発光イメージングのため、ケタミン（100mg/kg）およびキシラジン（10mg/kg）のIP注射によりマウスを麻酔し、続いて、滅菌食塩水に溶解した33.3mgのDールシフェリン（カリウム塩、Gold Biotechnology, St. Louis, MO, USA）をIPにより注射する。IVIS Lumina System（Caliper Life Sciences, Alameda, CA, USA）およびLiving Imageソフトウェアを使用して、ピークピクセル強度の25%の下位閾値によって定義される目的の領域における毎秒光子計数の合計として、ルシフェリン注射の10分後に腫瘍生物発光を決定する。生存解析のため、体重が15%を超えて減少したら、あるいは神経学的欠損が観察されたらマウスを安楽死させる（N_{有効性}、表5）。10

【0335】

腫瘍酸素化または低酸素低下、および腫瘍におけるH-NOX三量体局在化を調査するために、各投薬量群由来の3匹のマウスに、低酸素の臨床バイオマーカーである10mM EF5をIVにより注射し、全脳切片におけるIHC解析のためにRTの直後に屠殺する（N_{低酸素およびH-NOX三量体IHC}、表5）。RTの直後に3匹のマウスの追加のコホートを屠殺し、定量的ELISAによるH-NOX三量体含有量の解析のために腫瘍を切除する（N_{H-NOX三量体ELISA}、表5）。RT完了の2時間後に、全脳切片におけるγH2AX IHCによるDNA損傷の解析のために3匹のマウスの追加のコホートを屠殺する（N_{DNA損傷IHC}、表5）。RT有効性解析ならびに低酸素、腫瘍局在化およびDNA損傷の分子解析のため、ANOVAとその後の対応するt検定により統計学的解析を行い、 $P \leq 0.05$ における変化を統計学的に有意であるとみなす。生存解析のため、ログランク検定は、1.5のエフェクトサイズを検出する88%検出力のための0.05に等しい両側アルファで使用する。エフェクトサイズは、処置内標準偏差で割った平均生存の差として定義される。20

【0336】

リードH-NOX三量体の滞留時間および腫瘍における酸素化を放射線増感と相関させる。H-NOX三量体の標的臨床プロファイルをより良く通知するために、放射線増感をもたらす腫瘍におけるH-NOX三量体酸素化効果の長寿命を調査する。H-NOX三量体のピーク頭蓋内腫瘍局在化時間枠に基づき、様々な時点でRTを投与し（図26）、H-NOX三量体のMEDを使用して、H-NOX三量体投与およびRTの間の時間の長さを変える（表6）。H-NOX三量体のMEDを決定するための試験と同様に、腫瘍組織におけるH-NOX三量体分布、低酸素低下、DNA損傷、腫瘍成長遅延および生存全体の増強等、数種類の薬力学的パラメータを評価する。30

【表6】

表6.放射線増感試験の長さについてのコホート

試験コホート	H-NOX三量体およびRTの間の時間	N _{有効性}	N _{低酸素およびH-NOX三量体IHC}	N _{H-NOX三量体ELISA}	N _{DNA損傷IHC}
媒体	N/A	10	3	3	3
放射線療法	N/A	10	3	3	3
放射線療法+H-NOX三量体	1 時間	10	3	3	3
放射線療法+H-NOX三量体	2 時間	10	3	3	3
放射線療法+H-NOX三量体	4 時間	10	3	3	3
放射線療法+H-NOX三量体	6 時間	10	3	3	3

全RTスケジュールは、2Gy/回を1週間に3回からなる

【0337】

10

20

30

40

50

GBの追加のクラスにおけるH-NOX三量体媒介性放射線増感の再現性

H-NOX三量体媒介性放射線増感に関して、3種の分子的に定義される臨床GBサブクラスが試験される。以前に記載された通りに、これら3種のサブクラスの細胞系（GBM43、GBM6およびGBM14）に由来する異種移植モデルを確立する。Verhaakら（2010年）Cancer Cell、17巻：98～110頁およびPhillipsら（2006年）Cancer Cell、9巻：157～173頁を参照されたい。簡潔に説明すると、これら3種のマウスモデルの作製のために、これら3種のがん型の皮下腫瘍をメスで刻み、40μmポアフィルターによる3ラウンドの通過に供し、濾過の各ラウンド後に、158×g、355×g、631×gと増加するスピードで各10分間、遠心分離を行う。最終ラウンドの遠心分離後に、細胞を1mLの滅菌DMEM培地に再懸濁し、計数し、頭蓋内注射のため 1×10^8 細胞/mLとなるよう希釈する。その上、GBの免疫適格性モデルにおいて（GL261）、H-NOX三量体媒介性放射線増感を試験するが、これは、GB患者におけるインタクト免疫系を再現する。GL261マウスモデルの作製のため、C57BL/6マウスと同系のマウスGB細胞系を使用して、U251モデルと同様に腫瘍細胞収集および注射を行う。Newcombら（2006年）Cell Cycle（5巻）：93～99頁を参照されたい。有効性試験のため、腫瘍モデル毎に4種の実験群を使用する（表7）。U251モデルと同様に、腫瘍モデルが75%完了したら処置が開始され、生存の平均日数が100%完了を反映する。H-NOX三量体のMEDを決定するための試験と同様に、腫瘍組織におけるH-NOX三量体分布、低酸素低下、DNA損傷、腫瘍成長遅延および生存全体の増強等、薬力学的パラメータを評価する。

【表7-1】

表7.追加のGBモデルにおける試験のコホート

試験コホート	GBモデル	N有効性	N低酸素およびH-NOX三量体IHC	NH-NOX三量体ELISA	NDNA損傷IHC
媒体	GBM43	10	3	3	3
放射線療法	GBM43	10	3	3	3
放射線療法+H-NOX三量体	GBM43	10	3	3	3
H-NOX三量体	GBM43	10	3	3	3
媒体	GBM6	10	3	3	3
放射線療法	GBM6	10	3	3	3
放射線療法+H-NOX三量体	GBM6	10	3	3	3
H-NOX三量体	GBM6	10	3	3	3
媒体	GBM14	10	3	3	3
放射線療法	GBM14	10	3	3	3

【表7-2】

放射線療法+H-NOX三量体	GBM14	10	3	3	3
H-NOX三量体	GBM14	10	3	3	3
媒体	GL261	10	3	3	3
放射線療法	GL261	10	3	3	3
放射線療法+H-NOX三量体	GL261	10	3	3	3
H-NOX三量体	GL261	10	3	3	3

全RTスケジュールは、2Gy/回を1週間に3回からなる

（実施例10）

神経膠芽腫の *in vivo* 動物モデルにおける H-NOX 三量体単回用量毒性の薬力学的特徴付け

【0338】

I N D 許可申請 G L P 毒性試験の種選択を正当化するために、また、第 1 b 相臨床試験を通知するため、ラット（齧歯類）およびイヌ（非齧歯類）において探索的非 G L P 毒性および G B P D 試験を行う。H-NOX 三量体は、ヒト特異的標的に結合しないかまたはそれと反応しないため、非霊長類種が F D A に許容される。

【0339】

ラットにおける非 G L P 単回用量範囲探索毒性試験

H-NOX 三量体の最大耐量（M T D）を同定し、H-NOX 三量体の毒性および毒物動態（T K）プロファイルを特徴付けするために、スプラグドローリー（S D）ラットにおける非 G L P 単回用量試験を行う。

【0340】

少なくとも 6～8 週齢の雄および雌 S D ラットを 5 試験群に割り当てる（表 8）。各動物に、尾静脈における緩徐な I V ボーラス（4～5 分間）投与により、最大 1 0 m L / k g の容量で、媒体または H-NOX 三量体を与える。各用量の間に 3 日間を置いて 1 群同時に動物に投薬する。H-NOX 三量体用量レベルは、ほぼ M E D から最大実行可能用量に及ぶ。投薬後一定間隔で血漿試料を採取して、H-NOX 三量体の血漿薬物動態（P K）を評価する。毒物動態解析の時点は、P K 結果に基づく。動物の直近の体重に基づき、用量を容積測定的に（*v o l u m e t r i c a l l y*）投与する。次の用量を選択する前に、臨床観察、体重、摂食量および臨床的病状をよく調べる（表 9）。最大 1 4 日間の回復期間は、いずれかの毒性事象の残留性、発生遅延および回復の評価を可能にする。

【表 8】

表8.ラットにおける単回用量毒性試験のコホート

試験コホート	H-NOX三量体投薬量	N雄	N雌	N毒物動態雄	N毒物動態雌
1	媒体	2	2	3	3
2	低用量	3	3	6	6
3	中用量	3	3	6	6
4	高用量	3	3	6	6
5	より高用量	3	3	6	6

【表 9】

表9.ラットにおける単回用量毒性試験の測定および観察

観察	時間/頻度
投薬スケジュール	1日目に単回用量(IVボーラス)
毎日の観察	毎日2回
体重	投薬前、1日目および3日目。回復の間は毎週(14日目まで)。
詳細な観察	投薬前に1回、1日目の投薬前後ならびに3日目および14日目。
摂食量	定量的、投薬前に1回および1～3日目に毎日。回復の間は毎週(14日目まで)。
血液学(凝血を含む)	投薬48時間後(3日目)
臨床化学	投薬48時間後(3日目)
用量解析検証	各用量調製時
毒物動態	あり、6時点
抗治療抗体	あり、投薬前、3日目、7日目および14日目
剖検	予定外の安楽死および死亡のみに行う

【0341】

GBのラットモデルにおけるH-NOX三量体腫瘍分布およびPDを評価する

H-NOX腫瘍分布および低酸素低下が、ラットおよびマウスで同様であることを確かめるために、ラット9L神経膠腫モデルにおけるH-NOX三量体の腫瘍分布およびPDを評価する。ラット9L神経膠腫モデルを作製するために、以前に記載された通りに、ウィスター（Wistar）ラットの頭蓋内に9L神経膠腫細胞を植え込む。Stojiljkovicら（2003年）J. Neurooncol（63巻）：1～7頁を参照されたい。簡潔に説明すると、頭蓋内注射のためにラット神経膠腫細胞系である9L細胞を単層トリプシン処理により収集し、DMEMへ再懸濁して5μL中 4×10^4 細胞の濃度にする。10mMケタミンおよび7.5mg/kgキシラジンのIP注射により麻酔を導入する。頭皮に沿って2cmの矢状切開を行い、ブレグマの3mm側方および0.5mm前方において、小型の歯科用ドリルを使用して穿頭孔を作製する。滅菌Hamiltonシリンジ（Stoelting）を使用して、4.5mmの深さに60秒間の期間にわたり、10μL中の 5×10^5 細胞を注射する。注射後にシリンジを除去し、頭蓋を骨ろうで密封し、その後、7mm外科的ステープル（Stoelting）を使用して頭皮を閉鎖する。10mL/kgを超えない投薬容量で、27g針を使用した尾静脈注射によりH-NOX三量体をラットに投与する。H-NOX三量体投与の1時間後に、ラットに10mM用量の低酸素マーカー、EF5をIVにより与える。H-NOX投与の2時間後に、免疫組織化学解析によるH-NOX三量体局在化および低酸素定量化のためまたはELISAによるH-NOX三量体定量化のために、ラットを安楽死させ、腫瘍を有する脳を収集する（表10）。

【表10】

表10.ラットにおけるH-NOX三量体体内分布および酸素化試験のコホート

試験コホート	N低酸素およびH-NOX三量体IHC	NH-NOX三量体ELISA
媒体	3	3
H-NOX三量体 - 低用量	3	3
H-NOX三量体 - 中程度用量	3	3
H-NOX三量体 - 最大耐量	3	3

【0342】

イヌにおける非GLP単回用量範囲探索毒性試験

ビーグル犬においてH-NOX三量体の毒性および毒物動態を調査する。簡潔に説明すると、少なくとも5か月齢の雄および雌ビーグル犬を4投薬群に割り当てる（表11）。H-NOX三量体用量レベルは、この種に計算された均等量としてのほぼMEDから最大実行可能用量に及ぶ。橈側皮静脈を介した緩徐なIVボラスにより、各動物にH-NOX三量体を与える。投薬後に一定間隔で血漿試料を採取して、H-NOX三量体の血漿薬物動態（PK）を評価する。毒物動態解析の時点は、PK結果に基づく。動物の直近の体重に基づき、用量を容積測定的に投与する。次の用量を選択する前に臨床観察、体重、摂食量および臨床的病状をよく調べる（表12）。最大14日間の回復期間は、いずれかの毒性事象の残留性、発生遅延および回復の評価を可能にする。Graph Pad Prism（バージョン4.03）を使用して統計学的解析を行う。パラメトリック（例えば、反復測定分散分析と、続くダネットの多重比較t検定）またはノンパラメトリック（例えば、フリードマン検定およびダンの事後検定）統計学の手順のいずれかを使用して、各対応するデータ解析時点において、媒体およびH-NOX三量体試験群の間で比較を行う。パラメトリックまたはノンパラメトリック統計学の選択は、比較される群が分散基準の均一性を満たすかどうかに基づく。媒体およびH-NOX三量体処置の間の差は、 $p < 0.05$ として記述される。

【表 1 1】

表11.イヌにおける単回用量毒性試験のコホート

試験コホート	H-NOX三量体投薬量	N雄	N雌
1	低用量	2	2
2	中用量	2	2
3	高用量	2	2
4	より高用量(必要な場合)	2	2

【表 1 2】

表12.イヌにおける単回用量毒性試験の測定および観察

観察	時間/頻度
投薬スケジュール	1日目に単回用量
毎日の観察	毎日2回
体重	投薬前、1日目、3日目、5日目および7日目、9日目、11日目、14日目
詳細な観察	投薬前に1回、1日目の投薬前ならびに7日目および14日目
摂食量	定量的、投薬前に1回および1～3日目に毎日。 回復の間は毎週(14日目まで)。
血液学(凝血を含む)	投薬前に2回、3日目、7日目、11日目、14日目
臨床化学	投薬前に2回、3日目、7日目、11日目、14日目
用量解析検証	各用量調製時
薬物動態/毒物動態時点	あり、6時点
抗治療抗体	あり、投薬前、3日目、7日目および14日目
剖検	予定外の安楽死および死亡のみに行う

【0 3 4 3】

GBのイヌモデルにおけるH-NOX三量体腫瘍分布およびPDを評価する

齧歯類GBモデルに観察された腫瘍分布および酸素化が、ヒト腫瘍と同様に腫瘍に代表的であることを確認するために、GBを有するイヌにおける第1b相様試験を行って、自発的脳腫瘍におけるH-NOX三量体蓄積を測定し、低酸素のための臨床的に意義のあるリアルタイムPETプローブ（およびPETプローブを使用することができる；例えば、 ^{18}F -MISOの ^{18}F -EF5）を使用して低酸素の変化を定量化する。クライアントが所有する、自発的GBを有する10匹のイヌ（本明細書において「イヌ患者」と称される）を本試験に登録する。全体的に見て、イヌ患者に、前または後の ^{18}F -EF5 PET走査を伴う単回用量のH-NOX三量体を与えて、H-NOX三量体処置に起因する腫瘍低酸素のいずれかの変化を評価する。H-NOX三量体投与に先立ち、低酸素腫瘍（腫瘍：正常脳比2.0として定義）がないイヌを本試験から除外する。十分に低酸素腫瘍を有するイヌ患者について、初期PET走査の72時間以上後に、H-NOX三量体による処置を予定する。10mL/kgを超えない投薬容量のボラスIV注射としてH-NOX三量体を投与する。H-NOX三量体投薬量レベルは、MEDから始まり、3+3用量漸増デザインに従って漸増する。3用量レベル後にまたは1匹以上のイヌにおいて用量規制毒性に達したら用量漸増を停止する。H-NOX三量体投与の2時間後に、イヌ患者は、第2のPET走査を受け、腫瘍低酸素をスコア化する。PET走査のため、麻酔に先立つ12時間食物を与えない。各イヌ患者に静脈内カテーテルを置き、10～25mg/kgチオペンタールまたは6mg/kgプロポフォールにより麻酔を導入し、酸素中の1～5%イソフルランにより維持する。麻酔が導入された直後に ^{18}F -EF5を投与し、 ^{18}F -EF5投与の1時間後にPET/CT走査を開始する。標準治療の一環として外科手術を受けるイヌ患者について、H-NOX三量体含有量の解析のために切除された

10

20

30

40

50

腫瘍の一部を確保する。H-NOX三量体腫瘍局在化を評価するために、H-NOXタンパク質およびピモニダゾールに対する抗体を使用した定量的IHCまたはELISAにより、切除された腫瘍を評価する。最大耐量等、安全性パラメータの解析のため、また、抗治療抗体の存在をアッセイするため、投薬前ならびにH-NOX三量体投与の24時間、48時間および14日後に少量の全血を得る。投薬前および投薬14日後に安全性データを収集する。銅(I I) (ジアセチルルビス(N4-メチルチオセミカルバゾン)) ($^{64}\text{Cu}-\text{ATSM}$)等、追加の低酸素バイオマーカーを本試験において使用する。

【0344】

イヌにおけるH-NOX三量体媒介性放射線増感

イヌにおける単回用量毒性試験の情報を利用して、これらの動物においてH-NOX三量体媒介性放射線増感をさらに試験する。少なくとも5か月齢の雄および雌ビーグル犬を、8 Gy単一分割の高線量放射線療法ありまたはなしのH-NOX三量体または媒体処置からなる投薬群に割り当てる。H-NOX三量体含有量の解析のため、これらのイヌ患者における腫瘍を切除する。H-NOX三量体腫瘍局在化のため、H-NOXタンパク質およびピモニダゾールに対する抗体を使用する定量的IHCまたはELISAにより、切除された腫瘍を評価する。 $^{64}\text{Cu}-\text{ATSM}$ 等、追加の低酸素バイオマーカーを本試験において使用する。

(実施例11)

H-NOX三量体のGMP生産

【0345】

臨床試験を開始するためのFDAの認可を得るために必要なcGMP生産、GLP安全性試験および規制に対する備え(regulatory preparation)を含む、H-NOX三量体の開発を調査する。

【0346】

候補H-NOX三量体のGMP製造

毒性試験、ラットおよびイヌPD試験ならびに臨床試験を支持するための大量(例えば、キログラム量)のGMPタンパク質を生産する。細胞の成長およびGMP細胞バンクの作製に必要な細胞系、プラスミドおよび培養成長条件を本明細書に提供する。ODが115もの高さに達する、4 L発酵からH-NOX三量体を産生するための方法も本明細書に提供する。12 Lの細胞培養物から最大1 gの精製されたH-NOX三量体タンパク質を作製することができる、H-NOX三量体のタンパク質精製のための方法が、本明細書にさらに提供される。本明細書において、SDS-PAGE、UV/VISスペクトル解析、LC-MS、分析的SEC、SEC-HPLC、エンドトキシン試験、微粒子の濾過試験、ウイルス混入試験および有効性のための酸素放出速度等が挙げられるがこれらに限定されない、H-NOX三量体の品質管理アッセイも提供される。本明細書においてさらに、マイクロリアクターシステム、プロセススケール機器、ポンプおよびフィルターが挙げられるがこれらに限定されない、H-NOX三量体の産生のためのシステムも提供される。H-NOX三量体は、前臨床および臨床試験に提供する前に、QC/QA試験および検証を受ける。

【0347】

ラットおよびイヌにおけるH-NOX三量体のGLP毒性試験

ICHガイドラインS6(R1)およびS9に従ってGLP毒性試験を行う。ICHガイドラインの通りに、齧歯類(スプラグドローラット)および非齧歯類(ビーグル犬)種において毒性試験を行う。ラット7日間反復用量試験のため、雄および雌スプラグドローラットを4処置群に割り当てる(表14)。H-NOX三量体用量レベルは、ほぼMEDから最大実行可能用量または最大耐量に及ぶ。各動物に、緩徐なIVボラスにより、尾静脈において最大10 mL/kgの容量で媒体またはH-NOX三量体を与える。動物の直近の体重に基づき、容積測定的に用量を投与する。1日1回を7日間連続で動物に投薬する。終末剖検に指定された動物(最大で最初の10匹のラット/性別/群)を8日目に剖検する。回復剖検に指定された動物(最大で最後の5匹のラット/性別/群)

は、7日間の投薬と、続く7日間の回復を経て、15日目に剖検し、H-N-O-X三量体の毒性および毒物動態を評価する。生命維持に不可欠な臓器（呼吸器、心血管および中枢神経系）の評価を含む標準毒性パラメータをモニターする（表15）。

【表14-1】

表14.ラットにおけるGLP毒性試験のコホート

試験コホート	H-N-O-X三量体投薬量	N雄	N雌
毒性用動物			
1	媒体	15	15
2	低用量	15	15
3	中用量	15	15
4	高用量	15	15

【表14-2】

毒物動態用動物			
5	媒体	3	3
6	低用量	9	9
7	中用量	9	9
8	高用量	9	9

【表15】

表15.ラットにおけるGLP毒性試験の測定および観察

観察	時間/頻度
投薬スケジュール	毎日1回を7日間(IVボラス)
毎日の観察	毎日2回
体重	投薬前、1、3、7、8、15日目
詳細な観察	投薬前に1回、1日目の投薬前、その後は毎週
摂食量	定量的、毎週
血液学(凝血を含む)	8日目および15日目
臨床化学	8日目および15日目
尿検査	8日目および15日目
製剤化法検証(安定性を含む)	あり
用量溶液解析	1日目および7日目
機能観察バッテリー(FOB)&運動活性	最後の10匹のラット/性別/群 - 投薬前および7日目。 続く残りの5匹のラット/性別/群 - 回復の最後の日。
生体分析法の開発および検証がATAを含む	あり
薬物動態/毒物動態時点	あり、6時点
抗治療抗体時点	あり、3時点
眼科学	投薬前に1回、1週目に1回
剖検	8日目および15日目
病理組織学	全臓器(標準)

【0348】

イヌ7日間反復用量試験のため、少なくとも5か月齢の雄および雌純血種ビーグル犬を4群に割り当てる（表16）。H-N-O-X三量体用量レベルは、ほぼMEDから最大実行可能用量または最大耐量に及ぶ。各動物に、緩徐なIVボラスにより、橈側皮静脈において最大10mL/kgの容量で媒体またはH-N-O-X三量体を与える。1日1回を7日

間連続で媒体またはH-N-O-X三量体を動物に与える。終末剖検に指定された動物（最大で最初の3匹のイヌ／性別／群）を8日目に剖検する。回復剖検に指定された動物（最大で最後の2匹のイヌ／性別／群）は、7日間の投薬と、続く7日間の回復を経て、15日目に剖検し、H-N-O-X三量体の毒性および毒物動態を評価する。生命維持に不可欠な臓器（呼吸器、心血管および中枢神経系）の評価を含む標準毒性パラメータをモニターする（表17）。投薬フェーズの間、心電図（ECG）をモニターすることにより、本試験の一環として心臓安全性を評価する。

【表16】

表16.イヌにおけるGLP毒性試験のコホート

試験コホート	H-NOX三量体投薬量	N雄	N雌
1	媒体	5	5
2	低用量	5	5
3	中用量	5	5
4	高用量	5	5

【表17】

表17.イヌにおけるGLP毒性試験の測定および観察

観察	時間/頻度
投薬スケジュール	毎日1回を7日間(IVボラス)
毎日の観察	毎日2回
体重	投薬前、1、4、7、8、11、15日目
詳細な観察	投薬前に1回、1日目の投薬前、その後は毎週
身体検査およびバイタルサイン(体温、呼吸数、心拍数およびパルスオキシメトリー)	投薬前、7および14日目
摂食量	定量的、3～4日毎
血液学(凝血を含む)	投薬前、8日目および15日目
臨床化学	投薬前、8日目および15日目
尿検査	8日目および15日目(膀胱穿刺(cystocentesis))
製剤化法検証(安定性を含む)	あり
用量溶液解析	1日目および7日目
生体分析的方法の開発および検証がATAを含む	あり
薬物動態/毒物動態時点	あり、6時点
抗治療抗体時点	あり、3時点
ECGs	投薬前、1日目および7日目(Tmax)
眼科学	投薬前に1回、7日目に1回
剖検	8日目および15日目
病理組織学	全臓器(標準)

【0349】

さらに、H-N-O-X三量体は、新規タンパク質治療薬であるため、イヌにおいてスタンダード心臓安全性試験を行って心機能および血管作用性における効果をモニターする。ラジオテレメトリーデバイス（DSI:TL11M2-D70-PC-T）を以前に植え込んだ4匹の非ナイーブ雄ビーグル犬（9～18kg）にIVボラス注射により投薬する。イヌに、上向きまたはラテン方格投薬レジメンを使用して媒体および3用量レベルのH-N-O-X三量体を投与する（表18）。各動物に4種の用量のうち1種を（所定の順序で）毎週1回（投薬フェーズの1、8、15および22日目）与える。イヌにおいて以前に行った試験に基づき用量を選ぶ。全動物について、H-N-O-X三量体または媒体に対する

反応の臨床的に意義のある徴候が頻繁に観察され、投薬日に、続いて本試験の生存中フェーズにおいて少なくとも毎日1回ケージ脇で観察する。血行動態パラメータ（動脈圧、心拍数およびリードⅠⅠ心電図〔ECG〕）を記録する。投薬の少なくとも1時間前に記録を開始し、投薬後少なくとも24時間続ける。評価されるパラメータは、収縮期、拡張期および平均動脈圧、心拍数、PR、QRS、QTおよびRR間隔、QRS持続時間ならびにQTcVWおよびQTcI補正QT間隔を含む（表19）。精度と、試験項目の薬物動態に基づき10個の所定の時点で作表された値に関してデータを目視により点検する。律動の攪乱および波形形態に関する全ECG波形の目視点検を加える。Graph Pad Prism（バージョン4.03）を使用して、血行動態およびECGデータの統計学的解析を行う。パラメトリック（例えば、反復測定分散分析と、続くダネットの多重比較t検定）またはノンパラメトリック（例えば、フリードマン検定およびダンの事後検定）統計学的手順のいずれかを使用して、各対応するデータ解析時点において媒体およびH-NOX三量体処置群の間で比較を行う。パラメトリックまたはノンパラメトリック統計学の選択は、比較される群が、分散基準の均一性を満たすかどうかに基づく。媒体およびH-NOX三量体処置の間の差は、 $p < 0.05$ として記述される。

【表18】

表18.イヌにおける心血管テレメトリー試験のコホート

動物 ID	指定の投薬日におけるH-NOX三量体投薬量			
雄	1日目	8日目	15日目	22日目
1	低用量	媒体	高用量	中用量
2	中用量	高用量	媒体	低用量
3	高用量	低用量	中用量	媒体
4	媒体	中用量	低用量	高用量

【表19-1】

表19.イヌにおける心血管テレメトリー試験の測定および観察

観察/試験	時間/頻度	コメント
用量調製	毎週	N/A
用量解析	あり、毎週。全用量レベルにおいて各間隔で濃度検証を1回。	方法の検証および安定性を検証 プロトコールのもとで行った

【表 19-2】

臨床徴候 - 死亡数チェック	毎日2回	N/A
臨床観察	ケージ観察は、投薬前に1回と、試験を通して毎日1回。詳細な観察は、各用量の前に毎週1回。	N/A
摂食量	定性的、毎日	N/A
体重	毎週と生存中最後の日	N/A
テレメトリー採取/データ解析	投薬各日における1時間ベースライン採取。各ブロックにおける4時点以内の2個の投薬後解析ブロック。ECG、血行動態測定値(心拍数、収縮期、拡張期、平均動脈圧)および脈圧および体温。	ECGは心電図検査の訓練を受けた獣医師により評価
剖検	なし	動物はストックコロニーに戻す

10

20

(実施例 11)

神経膠芽腫患者 (patient) における H-NOX 三量体の使用のための第 1 相臨床試験

【0350】

第 1 b 相試験を行って、反復性 GB を有する患者における H-NOX 三量体安全性、腫瘍における体内分布および低酸素低下を評価する。第 2 の第 1 b 相試験を行って、GB と新たに診断された患者における H-NOX 三量体安全性を評価する。

【0351】

反復性 GB 患者における第 1 b 相試験

第 1 の第 1 b 相試験は、第 2 の切除の候補である反復性 GB を有する患者のための単回用量標的化エンドポイント漸増試験である。本試験は、臨床的に意義のある集団における用量レベルおよび投与経路の選択の観点から方向性を提供する。算入および除外基準を満たす反復性 GB を有する 20 名の患者が本試験に含まれる。

30

【0352】

算入基準：

1. 標準治療の一環として反復切除を計画する、反復性 GB のイメージング証拠を有する患者が適格である。
2. 元の組織学的診断が低悪性度神経膠腫であり、その後の組織学的診断が GB である場合の患者は適格である。
3. 全患者は、患者が本試験の治験的性質を承知していることを示すインフォームドコンセントにサインしなければならない。患者は、保護される健康情報の公開の承諾にサインしていなければならない。患者は、試験薬物による処置に先立ちデータベースに登録しなければならない。
4. 患者は 18 歳以上でなければならない、平均余命 > 8 週間でなければならない。
5. 患者は、> 60 のカルノフスキーパフォーマンスステータスを有していなければならない。

40

6. 登録時に：患者は、先行する治療の毒性効果から回復していなければならない：あらゆる治験剤から > 28 日間、先行する細胞傷害性治療から > 28 日間、ビンクリスチンから > 14 日間、ニトロソウレアから > 42 日間、プロカルバジン投与から > 21 日間、非細胞傷害性薬剤、例えば、インターフェロン、タモキシフェン、サリドマイド、シスレーチ

50

ノイン酸等から>7日間でなければならない。非細胞傷害性薬剤の定義に関するいずれかの質問は、試験責任者（Chair）に尋ねるべきである。

7. 患者は、治療の開始前に、適切な骨髄機能（ $WBC > 3,000/\mu l$ 、 $ANC > 1,500/mm^3$ 、血小板数 $> 100,000/mm^3$ ）およびヘモグロビン $> 10 g/dl$ ）、適切な肝機能（SGOTおよびビリルビン $< ULN$ の2倍）および適切な腎機能（クレアチニン $< 1.5 mg/dL$ ）を有していなければならない。これらの検査は、登録に先立つ14日間以内に行われなければならない。ヘモグロビンの適格性レベルは、輸血によって達成することができない。

8. 患者は、MRIまたはCTにより腫瘍進行の明解なX線検査証拠を示していなければならない。登録に先立ち14日間以内に、少なくとも5日間安定的なステロイド用量において走査を行うべきである。イメージングおよび登録の日の間にステロイド用量が増加する場合、新たなベースラインMR/CTが要求される。腫瘍測定のためのプロトコール処置期間を通じて、同じ種類の走査、即ち、MRIまたはCTを使用しなければならない。

9. 患者は、いかなる回数かの以前の再燃を処置されていてよい。

10. 出産の可能性がある女性は、登録に先立ち14日間以内にB-HCG妊娠検査が陰性であることを実証づけられなければならない。

【0353】

除外基準：

1. 患者は、ベバシズマブ（アバスチン）、他のVEGFもしくはVEGFR剤または抗血管新生剤とみなされる他の薬剤による先行する治療を受けていてはならない。

2. 低い低酸素分画（ $SUV_{腫瘍}/SUV_{小脳}$ 比2.0）のPET証拠を有するいかなる患者も除外される。

3. 抗高血圧薬治療中のいかなる患者も除外される。

4. 患者は、試験責任医師の所見において、適切な治療により適切に制御できない、あるいは本治療に耐受性を示す患者の能力を損ないかねない、いかなる有意な医学的疾患も有してはならない。

5. 完全寛解し最小3年間該疾患のあらゆる治療を絶った場合を除き、他のいずれかのがん（非メラノーマ皮膚がんまたは子宮頸部の上皮内癌を除く）の病歴を有する患者は不適格である。

6. 患者は、活動性感染症または重篤な介入性医学的疾患を有してはならない。

7. 患者は、毒性を不明瞭にするまたは薬物代謝を危険に変更するいかなる疾患も有してはならない。

【0354】

本試験における患者に、他の同時療法なしで、H-NOX三量体単独を与える。4種の用量レベルが存在し、正確な投薬レベルは、前臨床毒性試験において良好な耐受性を示すと同定されたレベルから決定され、3+3デザインに従って漸増される。単回用量のH-NOX三量体に予想される低毒性のため、停止ポイントおよび用量漸増は、主に低酸素低下に基づく。H-NOXタンパク質の予備的毒性試験に基づき、H-NOX三量体に伴う毒性は殆どまたは全く予想されない。しかし、用量規制毒性（DLT）が観察される場合、漸増の基準は、DLTおよび標準3+3デザインに基づく漸増規定に基づくよう直ちに換えられる。本試験のDLTは、H-NOX三量体に起因し得る次の事象のいずれかとして定義される：

1. グレード3血小板減少症

2. グレード4貧血症および／またはグレード4好中球減少症

3. いずれかの非血液学的グレード3毒性、脱毛症を除外。

【0355】

H-NOX三量体の生物学的活性を評価するために、患者に、H-NOX三量体投薬の72時間前に ^{18}F -EF5 PET走査を与える。PET走査は、腫瘍の標準摂取値（SUV）の小脳（正常脳）のSUVに対する比として特徴付けされる、低酸素分画の定量化を可能にし、外科手術に先立つ腫瘍低酸素のベースラインレベルを確立する。低レベル

10

20

30

40

50

の低酸素（2.0を下回る腫瘍：正常脳比によって定義される）を有する患者を除外する。十分に低酸素の腫瘍を有する患者に、単回用量のH-NOXを静脈内に与え、H-NOX三量体投薬の2時間後に第2の ^{18}F -EF5 PET走査を行って、低酸素分画の変化を評価する。第2のPET走査をスコア化し、ベースライン走査からのいかなる変化も記録する。少なくとも15%の低酸素分画の変化が、臨床的に有望であると考慮され、「陽性」変化を構成する一方、15%未満の変化は、「陰性」変化であると明言される。H-NOX三量体投薬の24時間以内に、計画された外科的切除に進む。H-NOX三量体浸透は定量的免疫組織化学（IHC）により、EF5染色は定量的IHCにより、切除された腫瘍を検査して、PET結果を確認する。可能であれば、ホモジナイズした組織試料を使用した定量的ELISAにより、H-NOX三量体分布データを確認する。安全性のための全ルーチン臨床実験室検査（例えば、肝機能、腎機能、CBC）は、投薬前にならびに投薬後24時間、48時間および14日目に行われる。これらの時点のそれぞれから得た血液試料を使用して、血漿薬物動態（PK）を決定すると共に、抗治療抗体（ATA）の存在をアッセイする。一次エンドポイントは、単一薬剤安全性を含み、二次エンドポイントは、腫瘍PK、低酸素低下およびATA産生までの時間を含む。

10

【0356】

新たに診断されたGB患者における第1b相試験

第2の第1b相試験は、新たに診断されたGBのための現在の標準治療による治療とH-NOX三量体とを組み合わせる、古典的3+3用量漸増試験である。診断および初期切除後に、GB患者には現在、経口DNAアルキル化化学療法であるテモゾロミド（TMZ）と併せて、分割されたRTにおいておよそ60Gyを与えている。H-NOX三量体の作用機序は、固形腫瘍における低酸素の低下に関与するため、部分的（即ち、亜全）切除を有する患者のみが本試験に登録される。算入および除外基準を満たす新たに診断されたGBを有する20名の患者が、本試験に含まれる。

20

【0357】

算入基準：

1. 組織学的に証明された新たに診断された頭蓋内GBを有する患者は、本プロトコールに適格である。
2. 患者は、治療開始前に為される ^{18}F -EF5 PETイメージングにおいて有意な低酸素分画を有していなければならない。
3. 新たに診断されたGBの切除後に残留する評価可能な疾患は、本試験への適格性を義務付けられる。術後に残留する疾患の程度を最も良く評価するために、手術直後期間の96時間以内に、または少なくとも術後4週間に、登録に先立つ14日間以内にCT/MRIを行うべきである。96時間走査が、登録前の14日間を超える場合、走査は反復される必要がある。イメージングおよび登録の日の間にステロイド用量が増加する場合、少なくとも5日間の安定的ステロイド投薬量における新たなベースラインMRI/CTが要求される。
4. 生検または切除は、処置に先立つ5週間以内に行われていなければならない。
5. 全患者は、患者が本試験の治験的性質を承知していることを示すインフォームド Consentにサインしなければならない。患者は、保護される健康情報の公開の承諾にサインしていなければならない。患者は、試験薬物による処置に先立ちデータベースに登録しなければならない。
6. 患者は18歳以上でなければならない、平均余命>8週間でなければならない。
7. 患者は、>60のカルノフスキーパフォーマンスステータスを有していなければならない。
8. 患者は、治療開始前に適切な骨髄機能（WBC>3,000/ μl 、ANC>1,500/ mm^3 、血小板数>100,000/ mm^3 およびヘモグロビン>10g/dl）、適切な肝機能（SGOTおよびビリルビン<ULNの2倍）および適切な腎機能（クレアチニン<1.5mg/dl）を有していなければならない。これらの検査は、登録に先立つ14日間以内に行われなければならない。ヘモグロビンの適格性レベルは、輸血に

30

40

50

よって達成することができない。

9. 出産の可能性がある女性は、登録に先立ち14日間以内にB-HCG妊娠検査が陰性であることを実証づけられなければならない。

10. 患者は、先行する細胞傷害性薬物治療、非細胞傷害性薬物治療または脳腫瘍のための実験的薬物治療を受けていてはならない。元の切除時にカルムスチン留置（ギリアデル）ウェーハによりポリフェスパン（polifespán）20を与えた患者は除外される。

11. 患者は、H-NOX三量体およびテモゾロミド開始の翌日に部分的脳放射線療法の開始を計画しなければならない。放射線療法は、放射線腫瘍学者が、本プロトコールに指定される通りに放射線が行われ得ることの保証を与えることができるように、提携機関において為されなければならない。放射線療法は、1.8～2.0 Gyの毎日の分割線量における部分的脳領域への外部照射によって与えられて、59.4～61.0 Gyの腫瘍に計画される総線量とならなければならない。定位放射線手術（例えば、ガンマーナイフ処置）および近接照射療法は許可されない。

12. 患者は、H-NOX三量体およびテモゾロミドで処置されつつ、腫瘍に対する他の細胞傷害性および非細胞傷害性薬物治療に進む意思がなければならない。

13. 生殖能を有する男性および女性患者は、試験処置の間および試験処置中断後の3か月間、適切であれば、承認された避妊法を使用しなければならない（例えば、子宮内避妊具[IUD]、経口避妊薬またはバリアデバイス）。出産の可能性がある女性は、処置に先立つ14日間以内に、ベーターHCG妊娠検査で陰性であることが実証されなければならない。バリア避妊としてコンドームを使用する場合、殺精子剤が添加されて妊娠が起らないことを確実にするべきである。本試験に参加しながら女性が妊娠したまたは妊娠が疑われる場合、女性は、自身の処置担当の医師に直ちに伝えるべきである。

【0358】

除外基準：

1. 患者は、ベバシズマブ（アバスチン）、他のVEGFもしくはVEGFR剤または抗血管新生剤とみなされる他の薬剤による先行する同時療法を受けていてはならない。

2. 低い低酸素分画の¹⁸F-FEF5 PET証拠は除外をもたらす。

3. 抗高血圧薬治療中のいかなる患者も除外される。

4. 患者は、治験責任医師の所見において、適切な治療により適切に制御することができない、あるいは本治療に耐受性を示す患者の能力を損ないかねない、いかなる有意な医学的疾患も有してはならない。

5. 完全寛解し最小3年間該疾患のあらゆる治療を絶った場合を除き、他のいずれかのがん（非メラノーマ皮膚がんまたは子宮頸部の上皮内癌を除く）の病歴を有する患者は不適格である。

6. 患者は、活動性感染症または重篤な介入性医学的疾患を有してはならない。

7. 患者は、毒性を不明瞭にするまたは薬物代謝を危険に変更するいかなる疾患も有してはならない。

8. 著しい完全切除を有する患者は除外される。

9. 患者は、先行する頭蓋放射線療法を受けていてはならない。

【0359】

ベースライン¹⁸F-FEF5-PET走査を行い、正常酸素圧腫瘍（腫瘍：正常脳比<2.0として定義）を有する患者を本試験から除外する。RT治療の第1日目から開始して、RTの2時間前に患者にH-NOX三量体の用量をIVにより与える。H-NOX三量体タンパク質に対するアレルギー反応の可能性を最小化するために、残留する腫瘍が最大である場合、RTの最初の5日間に投薬を限定する。このレジメンを毎日5日間続け、3+3デザインに従って用量レベルを漸増させる。第1の第1b相試験に記載されている通り、但しDLT定義を修正しつつ、毒性をグレード付けする。DLTは、本試験の10週目に起こり、H-NOX三量体単独またはTMZおよびRTと組み合わせて投薬されたH-NOX三量体に起因し得る、次の事象のいずれかとして定義される：

1. 7日間を超えて持続する、いずれかのグレード3もしくは4血小板減少症、グレード4貧血症またはグレード4好中球減少症
2. いずれかの熱性好中球減少症
3. 最大限の医学的治療にもかかわらず生じる、いずれかの非血液学的グレード3以上の毒性、脱毛症を除外。発疹、悪心、嘔吐および下痢等、非血液学的毒性は、最大限の医学的治療にもかかわらずグレード3以上のままである場合にのみDLTとみなされる。
4. いずれかのグレード4放射線誘導性皮膚変化。

【0360】

同時RTおよびテモゾロミドからなるGBのための現在の標準治療による治療は、6名の患者のうちおよそ1名に用量規制毒性を誘発する。コホートによるH-NOX三量体用量漸増は、用量が、3名の患者のうち ≤ 1 名に、あるいはコホートサイズが増加される場合は6名の患者のうち ≤ 2 名にDLTを生じる限り続く。RTおよびテモゾロミドによる処置の間の公知および予想される毒性の頻度が相対的に高いため、コホートサイズは、より従来サイズの3名の患者よりも僅かに大きい。投薬コホートが、ドロップアウトにより3名の評価可能な登録患者を持たない場合、あるいは6名の患者のうち3名がDLTを経験する場合、最大3名の追加の患者が1名ずつコホートに登録される（表20）。

【表20】

表20.第2の第1b相試験のために規定される用量漸増

DLTの頻度	作用
0/3, 1/3	次の投薬レベルへと漸増
2/3	評価可能なコホートを最大6名の患者まで増加
3/3	MTDを上回り、次に低いレベルまで用量を減少
コホートを6名の患者へと増加させる場合の用量漸増規定	
DLTの頻度	作用
$\leq 3/6$	次の投薬レベルへと漸増
$>3/6$	MTDを上回り、次に低いレベルまで用量を減少

【0361】

H-NOX三量体投薬の完了後に、同時放射線/TMZフェーズの持続時間（一般に6週間の期間）にわたり毎週、有害事象に関して患者を評価する。患者は12カ月間追跡され、処置の6カ月および12カ月後に無増悪生存が決定される。H-NOX三量体のMTDは、患者の3分の1以下がDLTを経験する用量である。MTDは、同時放射線およびTMZの経過の間に観察されるDLTに基づき、その後の第2相試験における使用のために定義される。一次エンドポイントは、標準ケア処置と組み合わせた安全性を含み、二次エンドポイントは、ATA産生までの時間およびPFS-12を含む。

【0362】

H-NOX三量体の予想される低毒性のため、第1の第1b相試験は、生物学的に適切な用量、即ち、80%奏効率を生じる用量を見出すことができる。陽性/陰性低酸素分画変化のバイナリー応答による比率[4/6]のデザインが実行される。Brownら（2010年）Int J Radiat Oncol Biol Phys 78巻：323～327頁を参照されたい。このデザインは、用量に関連する真の奏効率が低い場合（ここでは0.3と定義）、次の用量へと漸増する確率が高い一方；高い真の奏効率（0.8と定義）は、さらに漸増する確率が低いことを確実にする。 $\leq 1/3$ 応答が観察される限り、漸増のために3名のコホートが使用される。 $\geq 2/3$ 応答が観察される場合、コホートは6名に拡大される。 $\leq 3/6$ 応答が観察される場合、漸増は続けられる。第2の第1b相試験に推奨される用量は、 $\geq 4/6$ 応答を達成する用量または最大用量レベル、即ち、100mg/kgである。出発用量の5mg/kgが、 $\geq 4/6$ 応答を達成する場合、十分な活性のためにより低用量が調査される。標準毒性デザインとは対照的に、ある特

定の用量で停止するための応答基準が満たされない（即ち、 $0/2$ または $2/5$ 応答が観察された）ことが明らかである場合、より高用量への早期漸増が行われる。真の率 = 0.3 の場合の漸増の確率は 0.94 であるが、真の率が 0.8 の場合の漸増の確率は 0.15 である。4 種の用量レベルの場合、最小 9 名かつ最大 24 名の患者が使用される。

【0363】

毒性が観察される場合、標的エンドポイント漸増試験から DLT に基づく試験へと試験を切り換える。そのようなものとして、MTD は、H-NOX 三量体による処置後の 2 週間における DLT の評価に基づき、患者の 3 分の 1 未満が DLT を経験する用量として定義される；即ち、MTD は、 $0/3$ または $1/6$ 名の患者が DLT を経験する用量レベルであり、次のより高用量は、少なくとも $2/3$ または $2/6$ 名の患者が DLT に遭遇する用量レベルである。用量レベル 100 mg/kg に至るまで、上に定義される DLT がいずれのコホートにおいても達成されない場合、さらなる漸増は行わない。

10

【図 1】

Figure 1

```
wac foldon sequence ape
/Users/omniolab2/Desktop/wac foldon sequence ape
1~81,
翻訳 27 a.a. MW=3081.5599999999995
1 G Y I P E A P R D G O A Y V R R K D G E W 20
1 GGT TAT ATT CCT GAA GCT CCA AGA CAT GCG CAA GCT TAC GTT CTT AAA GAT GCG GAA TGG 60
21 V L L L S T F L 27
61 GTA TTA CTT TCT ACC TTT TTA 81
```

【図 2 A】

Figure 2A

```
PCW-TL(L144F)+Foldon.gb
/Users/omniolab2/OmniolabData/100128-Sequencing/012810_OR/PCW-TL(L144F)+Foldon.gb
2521~3210.
■翻訳 229 a.a. MW=26677.059999999972
2521 ATG AAG GGC ACA ATC GTC GGG ACA TGG ATA AGC CTC AGC GAT CTT TAC GGG AAT GAT 2580
1 M K G T I V G T W I K T L R D L Y G N D 20
2531 CTC GTT GAT GAA TCT TTA AAA AGT CTC GGT TGG GAA CCA GAT AGC GTA ATT ACA GCT CTC 2640
21 V V D E S L R S V G H E F D R V I I F L 40
2641 GAG GAT ATT GAT GAC GAT GAT AGG AGA ATT TTT GCT AAG GTC AGT GAA AAA ACT GCT 2700
41 E D I D D E V R I F A K V S E K T G 60
2701 AAA AAT CTC AAC GAA ATA TGG AGA GAG GTA GGA AGG CAG AAC ATA ACT TTC AGC AAA 2760
61 K N V N E I W R E V G R Q N I K T F S E 80
2761 TGG TTT CCG TCC TAT TTT GCA GGC AGA AGC CTA GTG AAT TTT TTA ATG ATG GAT GAC 2820
81 W F S I F A G R L V N F L H H D E 100
2821 GTA CAG CTA CAG CTT ACC AAG ATG ATA AAA GGA GGC ACT CCT CCA AGG CTT ATT GCA AAG 2880
101 V H L Q L T R M I K G A T P P R L I A K 120
2881 CTT GTT GCA AAA GAT GGC ATT GAT GAG ATG GAT TGT AAA AGA AGG ATG TAC GAT TAC 2940
121 P V A K D A I E M E Y V S X R K N Y D Y 140
2941 TTT TTA GGG LTT ATR GAG GGT AAT TCT AAA TTT TTC AAG GAA GAA AAT TCA GTC GAA GAG 3000
141 F L G F I E G S S K F F K E I S V E 160
3001 GTC GAA AGA GGC GAA AAA GAT GGC TTT TCA AGG CTA AAA GTC AGG ATA AAA TTT AAA AAC 3060
161 V E R G E K D G F S R L K V R I K F K N 180
3061 CCG GTT TTT GAG TAT AGC AAA AAT CTC GAG GGC AGC GGC TAT ATT CTT GAT GAT CCA 3120
181 F V F E I K R N L E G S G I I F E A F 200
3121 AGA GAT GGC CAG CTT TAC GGT AAA GAT GGC GAA TGG GTA TTA CTT ACC TTT TTA 3180
201 R D Q Q A Y V R K D G E N V L L S T F L 220
3181 AGC GGT AAT CAG CAT GAT CAC CAT TGA 3210
221 R G S H H H H H *
```

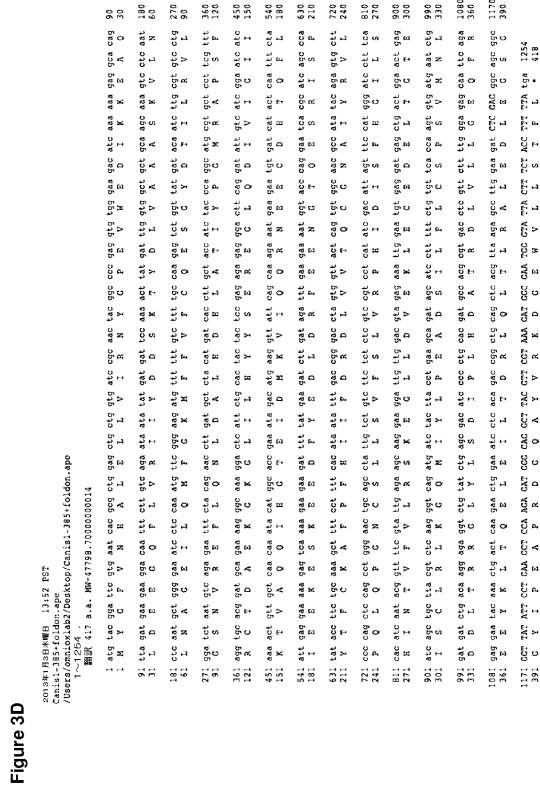
Figure 2B

Figure 3B

3188 GTCACCATCACCATCA
114 GTCACCATCACCATCA

Figure 3C

【図 3 D】



【図 3 E】

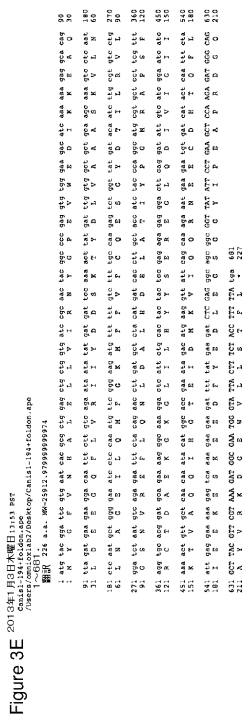


Figure 3E

【図 4】

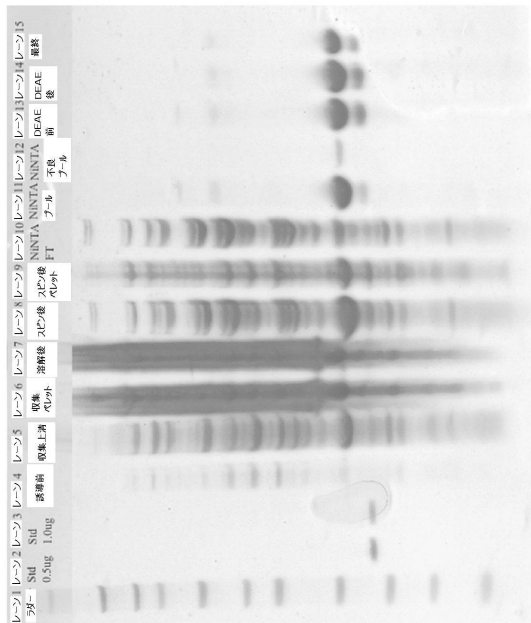


Figure 4

【図 5】

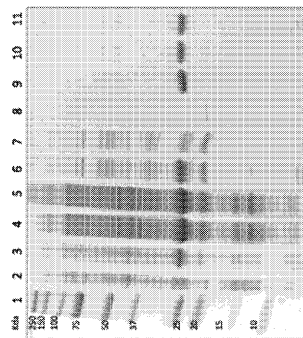
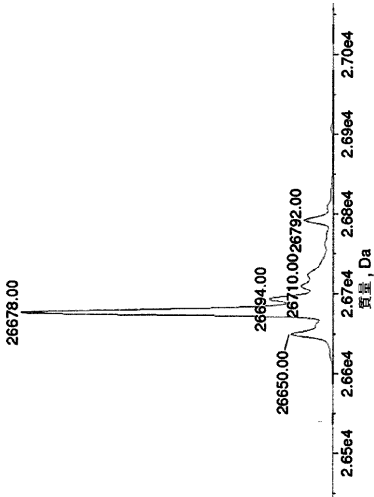


Figure 5

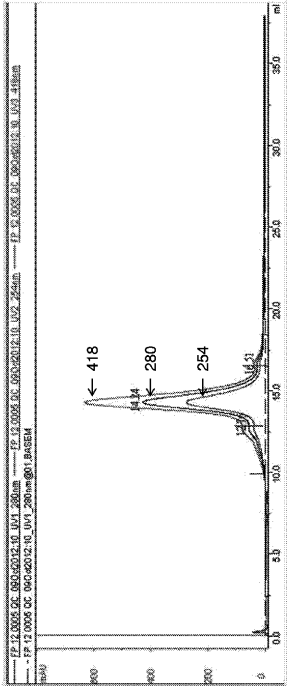
【図 6】

Figure 6



【図 7】

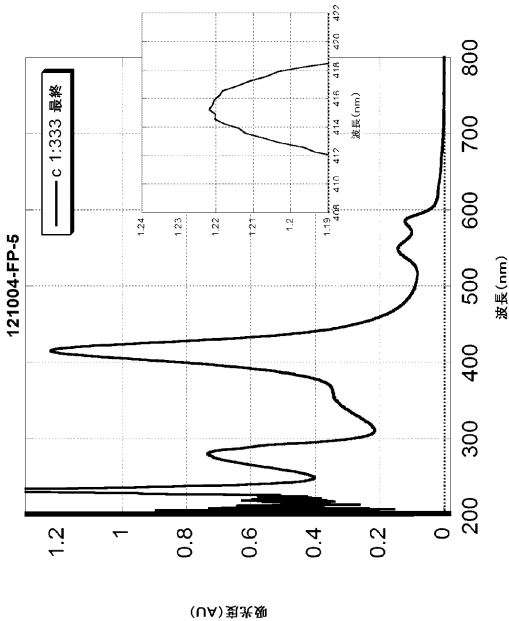
Figure 7



【図 8】

Figure 8

FP-12-0005 ソーレー解析

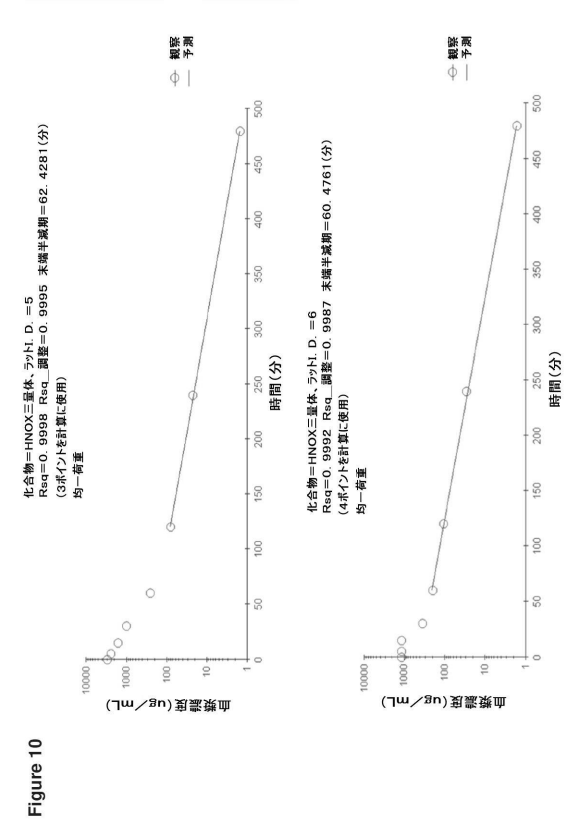


【図 9】

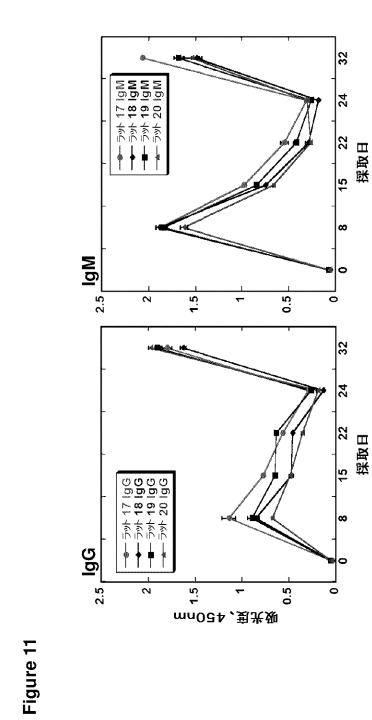
Figure 9



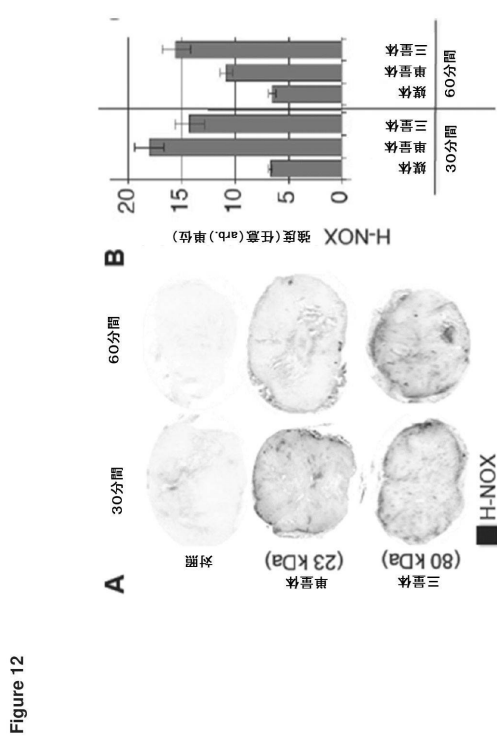
【図 1 0】



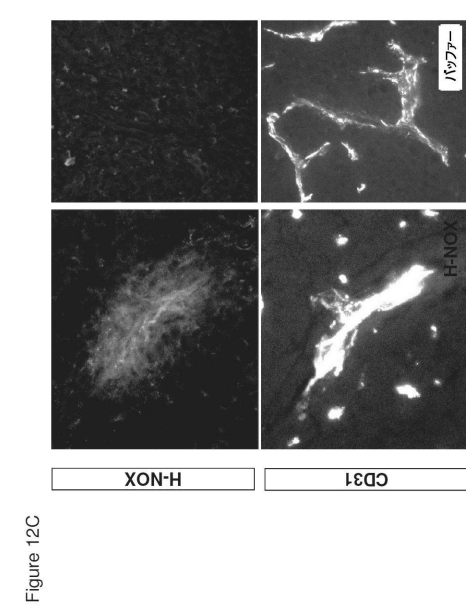
【図 1 1】



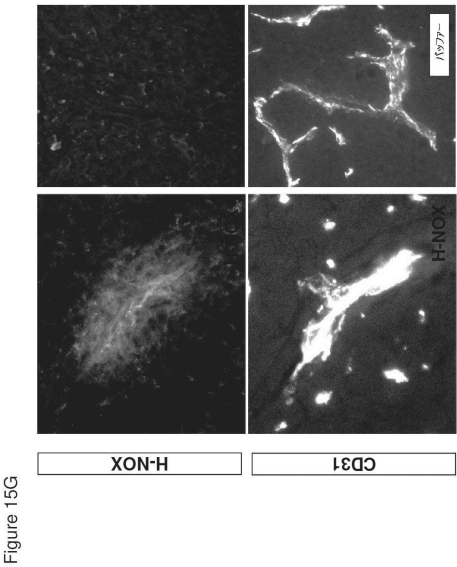
【図 1 2 - 1】



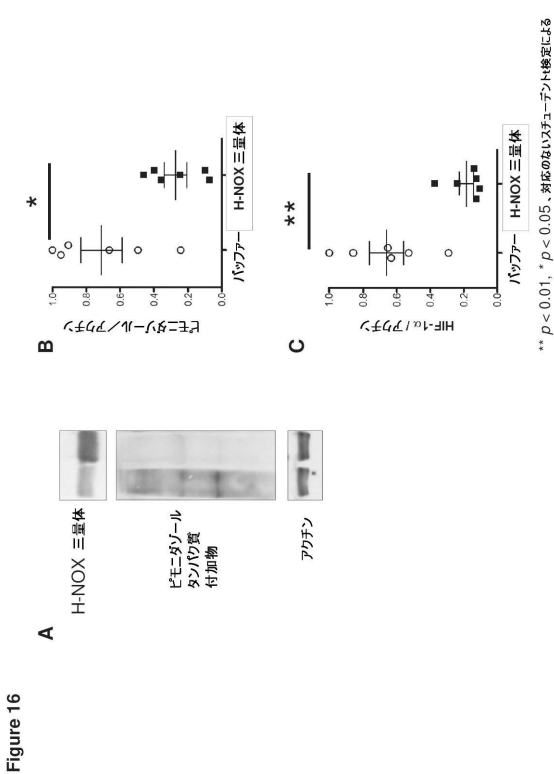
【図 1 2 - 2】



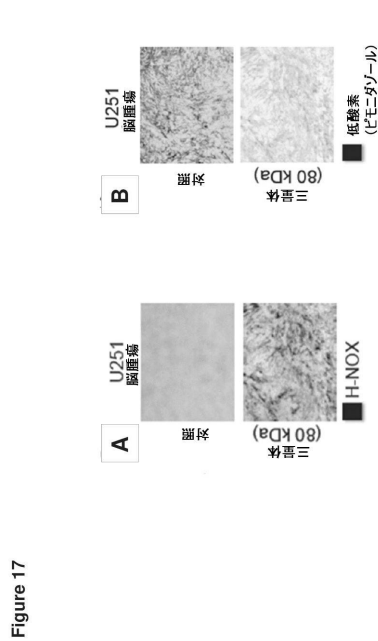
【図 15 - 3】



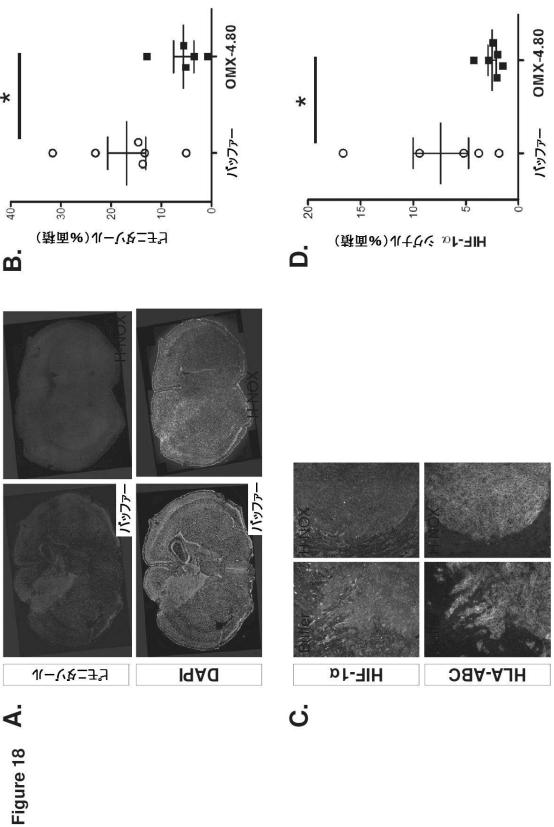
【図 16】



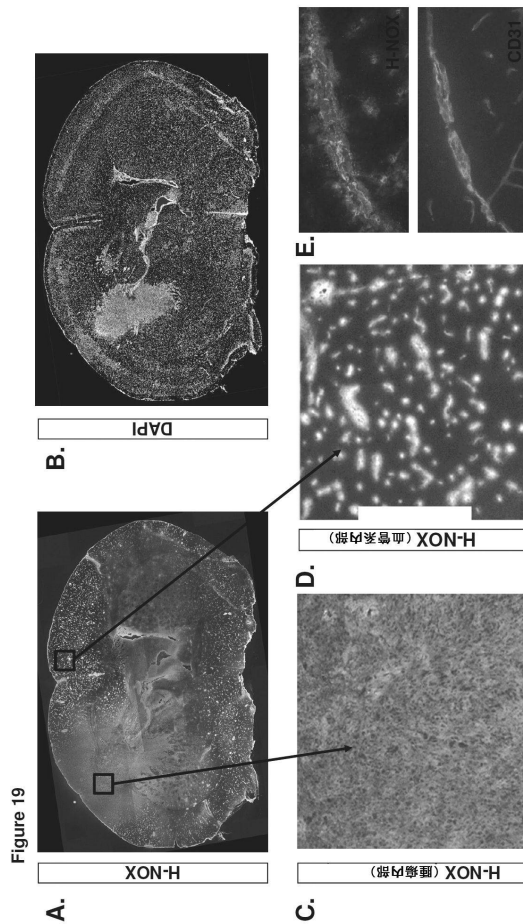
【図 17】



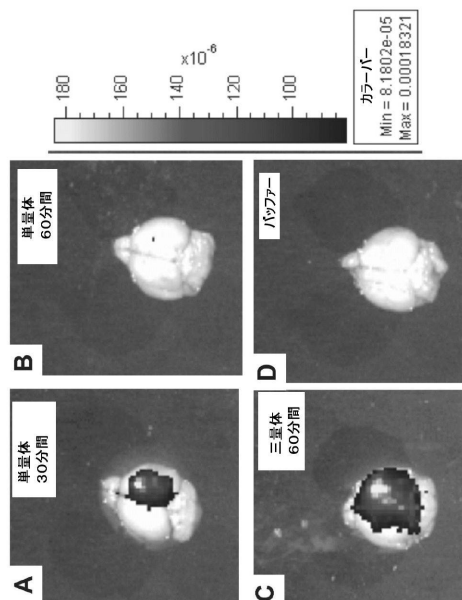
【図 18】



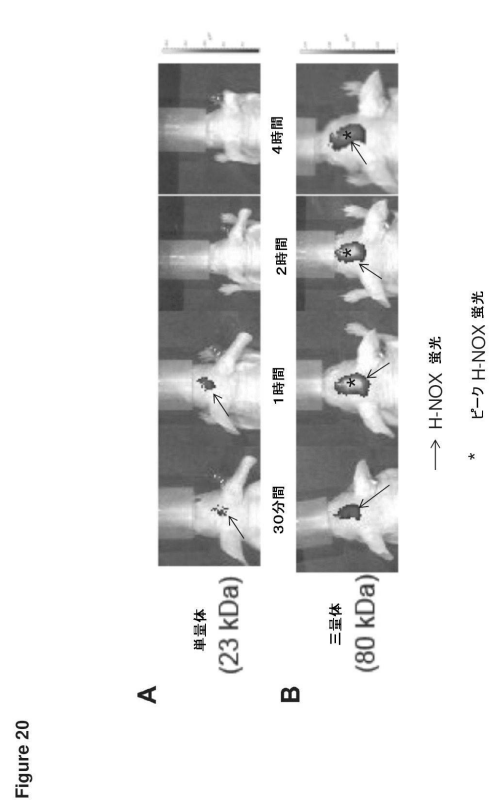
【図 19】



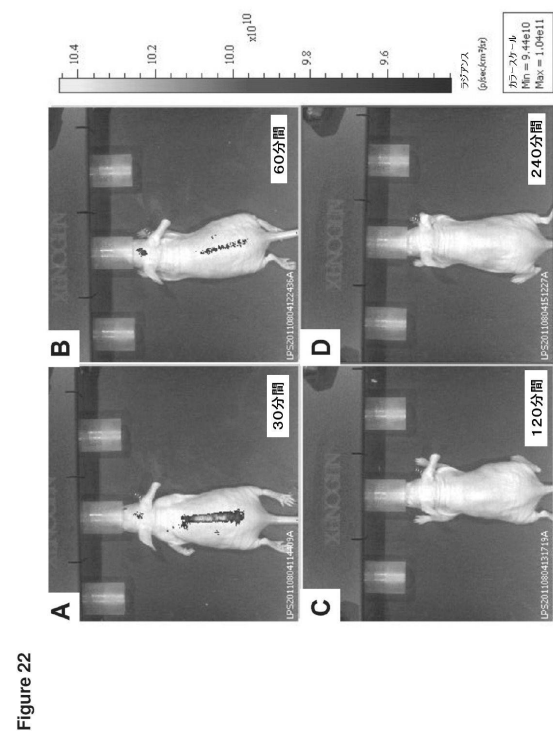
【図 21】



【図 20】



【図 22】



【図 23】

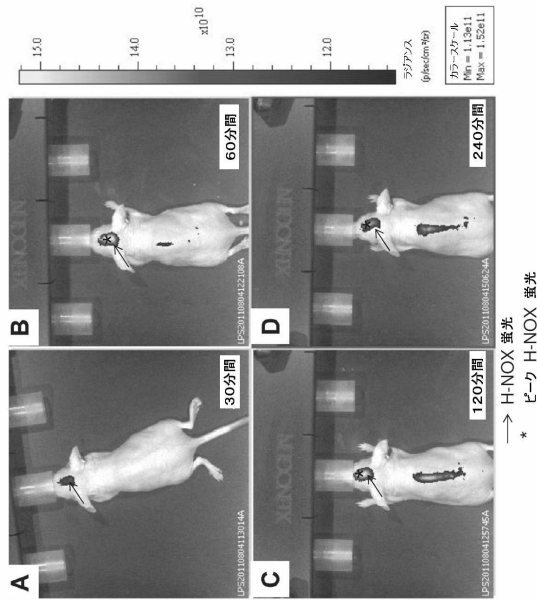


Figure 23

【図 24】

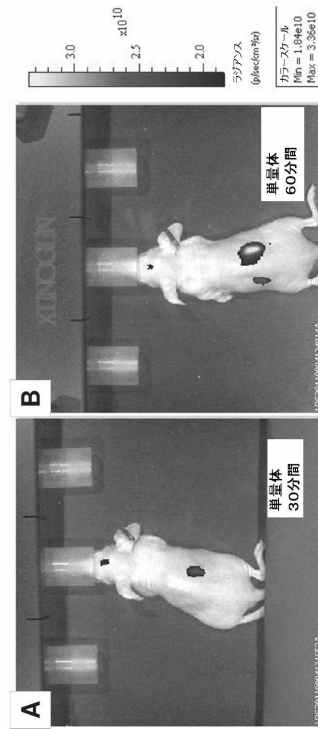


Figure 24

【図 25】

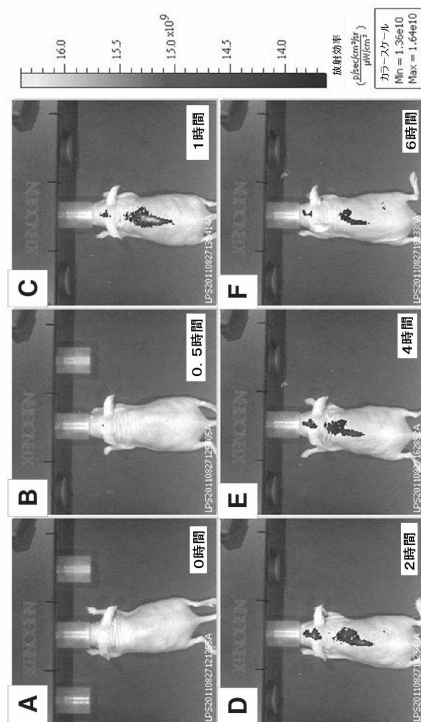


Figure 25

【図 26】

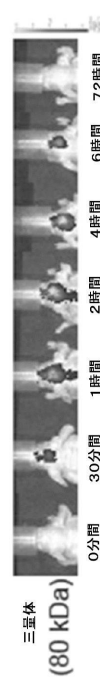


Figure 26

【図 3 1】

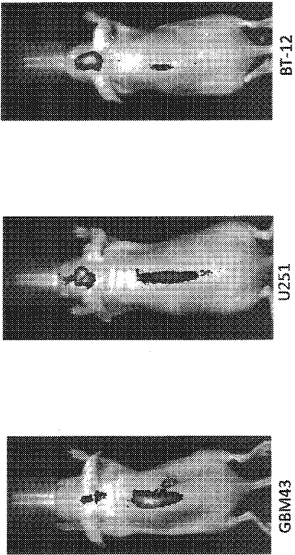


Figure 31

【図 3 2】

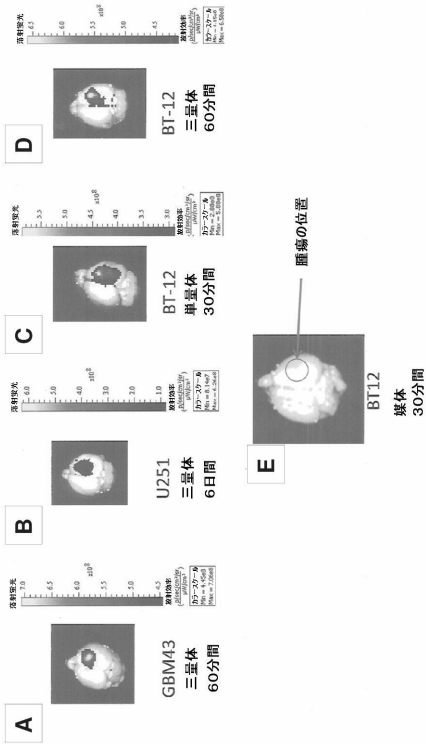


Figure 32

【図 3 3】

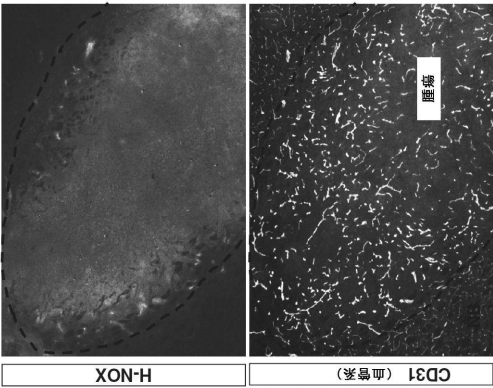


Figure 33

【図 3 4】

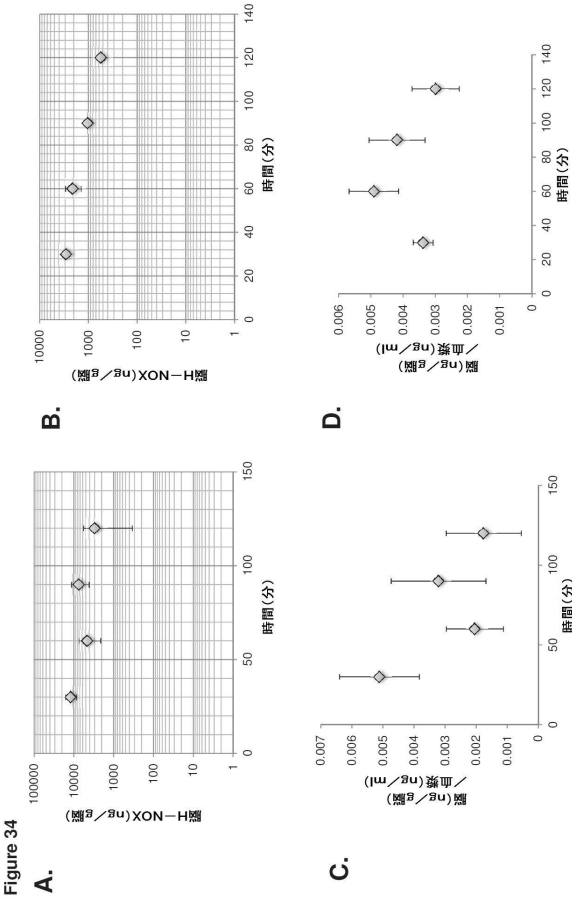


Figure 34

Figure 37A

【図 3 7 A】

WT. WT
ATGAAGGACAAATCGTCGGACATGATATAAGACCTGAGGACCTTTAC
GGGAATGATGTGTTGATGATCTTTAAAAAGTGTGGTGGGACCAAGAT
AGGTAATACACCTCTGGAGGATATGATGACATGAGGTTAGGAATTT
TTTCTAAGGTGAGTGAATAAACTGGTAAAAATGTCAAGAAATATGAGGA
GAGTAGGAGGAGCAATAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCCCTCTAT
TTTCAGGAGAGGCTAGTGAATTTTTTAAATGATGATGAGGTACAC
CTACAGCTTACCAAGATGATAAAGGACCTCTCCCAAGGCTTATTGCA
RAGCCTGTTCGCAAGATGCCATTGAATGGAGTAGTTCTTAAAGAAAG
ATGACGATTACTTTTTAGGGCTTATAGGGTAGTTCTAAATTTTTCAG
GAAAGAAATTCAGTGAAGGTCGAAAGGAGGCAAGAAAGATGGCTTTCA
AGGCTAAAAGTCAGATAAAATTTAAAAACCCGTTTTTGGATGA
(配列番号 1)
MKGTIVGTWIKLRDLVGNVDVDESLKSVGEPRVITPLEIDDDDEVRI
FAKUSEKTKKNVNEIWEVGRQNIKTSEWPFSEFAGRLNVLMMDEVH
LQTKMIKATPRLRIAPVAKDAIEMEYVSRKMYDYFLGLIEGSSRFFK
EEISVEEVERGEXDGF SRLKVR IKFNPVFE
(配列番号 2)

Figure 37B

【図 3 7 B】

L2 WT
ATGATGCTATGAAGGAATCAATTCACGAATTTCTCAATTTTGTAGAA
AAAAAGTAACTCTACACCCCTGGTAGATCAAAATATTATGATAGTCATTG
AAGTCCCATGCTGCTACGCTACGCTATCGGTACTACTCTCCCAAGAATTA
TTTCAATTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGCAACCAACATCAGTG
ATTTTACAGATATGAGTGTATTTGTTGAGGTTTTCGCAAAAAATAT
CCTCAATTTTCAGGAAAAAAGTCGGTGTTCATTTTGAAGCGCTT
GAAACACATATTCATTCGAAGTGAATAAATTTGATGACTATATCTGAACATA
CCCCATTTTGAATGCCAATATCACAGTCAAAATCAAAATGGAATGATTAC
ACTTCTCGGCTCTTTGGCGGATTTTGGGAGGTTTAAATAAGGTTGT
ATTAAATATCAATAAGAAACATGACTATTGTCTGTAATAATCTGCCTGCA
AAACAGGCTTTAAGGTAAGATTGTATTACAAAAAGGCGATCCTGATGAG
TGA
(配列番号 13)
MMSMGIIIFNEFLNEVESYTLVDQIIMDSHLKSHGAYTSIGTYSPEL
FQLVRALAMNGRPTSVILQEYGEYLFVFAKYPQOFFREKSVFQFLAL
ETHIHFEVKKLYDYTELPHEFCOXHSONOMEMIYTSRPLADFAEGLKGC
IKYHKNMTIVRENLPKATGFKVREVLTKGDPDE
(配列番号 14)

Figure 35

【図 3 5】

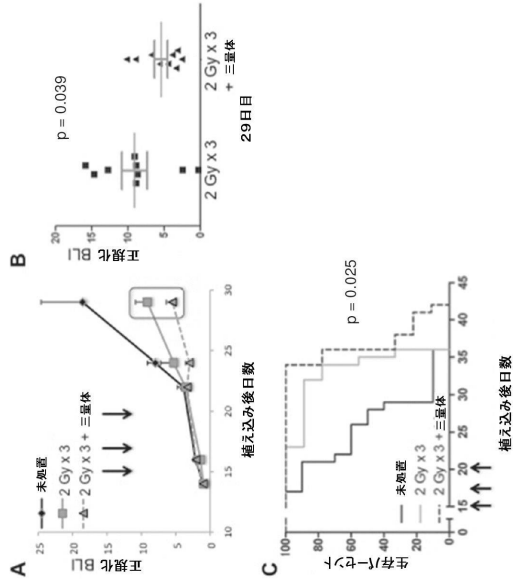
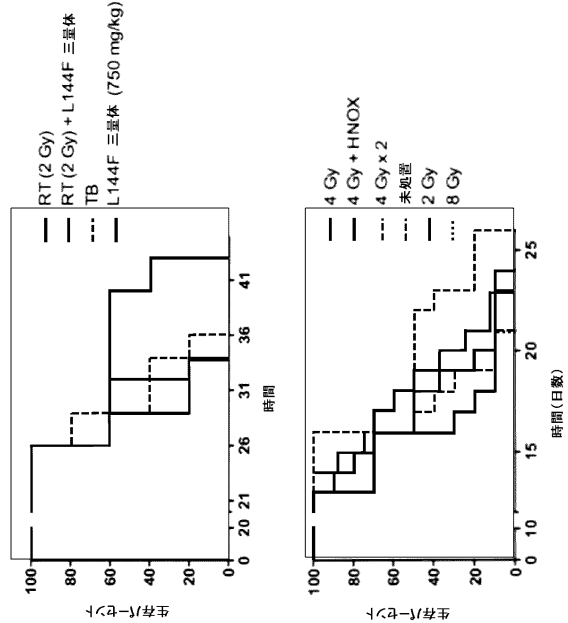


Figure 36

【図 3 6】



【図 3 7 C】

L1. WT

ATGAAGGTATCGTTTTTACCTCCTTAATGATGATGATATAGAACAAATTT
GGCATAGAACCCTGGGACCAACTCGTATCCTCACTAGACCTTCCAAAGTGGT
GGAAGTTATAGACAGGCGGCACTTACTCGGATACAGAATTTACAGCAATTG
ATTAAAGCCATTGGAGAGGACCAATCAGCACGCTTCTGTTTTTAGAG
GCCTTTGGTGAATACATGTTTCTCTATCTTATCGAGTAACTGCGCAATTTT
TTAAAAGGCACATGACATTAAGAAGATTTTAAAAGCATTTGATGGACAA
ATTATCTGGAGGTAGAAAGTTATACCCAGATGAACATTTACCTACCAAT
AGCTATGAAGAGCCTCTGCAAAACCAATTGGTATGTTGATCGATCGCAT
AGGAAGCTCTGCTAATTTGCAATGGGCTCATCCAGGAGCAGGCGCAACAT
TTAAAAAGAAATTTACCAATTAAGCAGCTCACTGCAATGTTAAAAAAGAT
GATCATTTGCTTTGGAGATTACCTTTGATGTA
(配列番号 15)

MGIVFTSLNMMIIIEQFIETWDLVSLDLFSGGSYTAGTYSDTEFQQL
IKAIARNTQHASVLEAFGEYMFPISSKCAIFLKXDMTLKEFLKSDGT
IHVEVKLYPDETLPTISYEPAANQLVWYRSHRRLCFAMGLIOGAQAH
FKKTIITKOTCHMLKKDDHCRLEITFE
(配列番号 16)

Figure 37C

【図 3 7 D】

Homo sapiens 6(11-385)

Hs. wt (1-385)

ATGTACGGATTTGTGAATCAGCCCTGGAGTTGCTGGTATCCGCCAATTACGGCCCGAGGTGTGGAGACATC
AAAAAGGACAGCATGTAGATGAAGAGGACAGATTTCTTGTGAGAAATATATATGATGACTCCAAAACCTTATGAT
TTGTTGCTGCTGCAAGCAAGTCTCAATCTCAATGTGAGAAATCCTCCAAATGTGTGGAGATGTTTTTC
GTCTTTTGGCAAGATCTGTTATGATCAATCTTGGCTGCTCGGCTCTAATGTCAGAGATTTCTCAGAGAC
CTTGAGTCTGTCAGACACACCTTCTACCATCTCCAGAGATCGGTGCACTTCTTTAGGTGGACATGATCA
GAAAGGCGCAAGGACTCAITTTGCTCTACTACTCAGAGAGAGGACTTCAGATATTTGTCTTTGGAATCATC
AATAAGTGGCAACAAATCCATGGCACTGAAATAGATGAAGAGATTTTATGAGAAATGAAGAATGAT
CATACTCAATTTTAAATTGAAGAAAAGAGTCAAAAGAGAGATTTTATGAGATCTTGACAGATTTGAGAA
AATGGTACCCAGGAATCAGCATCAGCCATATACATCTGCAAGCTTTTCTTTTCATATATTTGACGG
GACCTAGTGTCTCAGTGTGGCAATGCTATACAGAGTCTCCCGAGTCTCCCGAGTCCAGCTGGGAATTCAGCCCT
CTGCTGCTCTGCTGCTGCTCTCAATTTGATATTTAGTTTCCATGGGATCTTTCTCACAATCAATCTTT
TTTGAATTCAGAGCAGAGAGATTTGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATGAATGACTGGATCTGAG
ATCAGCTGCTTACGCTCAAGGCTCAATGATCTACTACTCAGAGCAGATAGATACATTTTCTATGTTCAACA
AGTGTCATGACCTGGACGATTTGAGAGAGGAGGCTGTATCTAGTGACATCCCTCTGATGATGATCGCAGGCG
GATCTTGTCTTTTGGGAGAACAAATTTAGAGAGGAATAGAACTCAACCAAGAGCTGGAAATCTCTCTGACG
CTACAGCTCAGGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA
(配列番号 17)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEWEDIKKEAQLDEEGFLVRIIYDDSKTYDLVAASKVLNINAGELIOMFQWFF
VFCDEGYDTILLVLGNSVREFLQNLDAHDHLATTPGMEAPSFRCITDAEKGLILHYSPREGGLQDVIIGIL
KTVAAQIHGTEIDMKVIOQRNECHDTQFLTEEKESKEDEYEDLDRENGTQESRIISPTFCRAFFPHIIFDR
DLIVTCGNAIYRVLPQNGCSLLSVLVRPHIDISFHLGSHINTVFLRSREGGLDVLRKECEDELDTGTE
ISCLRKGQMIYLPEDSILFLCSFVWMLDLTRRGLYLDLPHDTRDILVLGGEQFREYKLTQLELEILDR
LQTLRALED
(配列番号 14)

Figure 37D

【図 3 7 E】

Homo sapiens 62 (1-217)

ATGNTAGATTATCAACACTGCTGCAGTCTCTTGTGACAGAAATTT
GGTAGAGACATGGGAGAGCTGAGGCTCTGCGAGAGTGCAGATGTC
TTATGACCTACACCGTGATGATGACATCAATACCAATTAGCTATCCAA
GAAGCCTCGAAGGTTCTGATGTGCTCATGGAAGCAATCTGAAGCTCTTT
GGCAATACTCTTTAAAGTCTGTAAGATGCTGCGTATGACAGGATGCG
CGGCACTTTGGAGAAATCTCACCGAGTTTATGAAAACCTTAGATGCATC
CACAGTTACTTGGCACTGCTCTATCAGAAATGAAGCAGCATCTTTTGA
GTGGAGAGAGCTGACGGGCGATGCTCTCCACTACTACTCAGACAGA
CAIGGCTGTGTCATTTGTACAGGTAICATGAAGCTGTGGCCAGGAC
TTCTTTGACATGATGTGGCCATGAGTATCTGTATGATGAACGAAGGTT
GAAAGCAGGGAAGAAGACATGTGTGTTCTGCTGTGAGAGGCT
CACAGACATAGAGGAGCAAGGCAAGCGCGCCACAAAGCAGTGAAGAC
AGCCAGCAGACAGGAGGCTCTCCAGGGAACACTCCTT
(配列番号 19)

MYGFINTCLOSIVTEKEGSEETWEKHKAPAEVDQVFWTVVVDITIKLIQ
EACKVLDSMEAILLKEFYEFFKCRMSGYDRMLRTLGSLNTEFIENLDAL
HSYLALSYQEMNAPSFRVEEGADGAMLLHYVSDRHGLCHIVPGIIEAVARD
FFDIDVAMSILDNNEEVERTGRKEHVVLVYQAHQIRGAKASRFQGSSED
SQADQEALOGTILL
(配列番号 16)

Figure 37E

【図 3 7 F】

Rattus norvegicus 61(1-385)

Rn. wt (1-385)

(配列番号 21)

ATGTACGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGAATCGCAATTACGGTCCGAGGTGTGGG
AGCATCAAAAAAGAGCGGAGCTGGATGAAGAGGCGAGTTTCTTGTGAGAAATATCTACGATGA
TTCCAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTCGGAGCAAGTCTCTCAACCTCAATGTGTGGAATCTCTG
CAGATGTTTGGGAGATGTTTTCTGCTTCTGCAAGAGTCTGGCTATGATACCATCTTGGGTGCTCC
TGGATCTTAATGTGAGGAGTTTTTGCAGAACCTCAGCGCCCTGCAGCACCATCCGCCCATCTCA
CCAGGAGATCGCGCACCTTCTCTCGGTGCACCGATCGAAAAAGGCAAAAGGCTCAATCTCGAC
TAGTACTGGAAGAGAGGGGCTTCAGACATGTGATCGGGATTAACAAGCTGTAGCTCAAGAGA
TCCATGGCCTGAGATAGATGAAGGTTTATCAGCAAGAGATGAGAAATGTATCATCCCAAT
TTTAATTGAAGAAAAGATCAAAAGAGAGGATTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAC
GGTACCCAGGACTCCGCTATCAGCCGCTACACCTTCTGCAAGCGTTTCTTTTCACATCATATTTG
ACCGGACCTTAGTACGAGTGTGGAATGCTATCATAGAGTCTCCCGAGCTCCAGCTCCAGCTGG
GAAGTGACGCTTTGTGCTGCTCTGCTGGTCCGCTCATATTGACATCAGTTTCACAGGATTT
CTTTCACACATCAATACCGTCTTTGACTGAGAACGAGGAGGTTGCTGGATGTGAGAACTTTG
AATGTGAGGATGACTGACTGGGCGAGATAGCTGCTCCGCTCAAGGCCAAMATGATCTATT
ACCGGAGCAGATAGCATCTCTCTCTGTTTCAACAAAGTGTGATGAATGTGAATGGAATCAACAGA
AGAGCCCTGTACGTAGTGACATCCCTCTCCATGATGTACAGAGACCTGGTCTCTTTTGGGAGAC
AGTTCGCGGAGAGTACAAACTGCACAAGAGCTGGAATCTCTCAGACAGGCTGCAGCTCAGACT
GAGGCTTTTGGAGATTGA
(配列番号 22)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEWEDIKKEAQLDEEGFLVRIIYDDSKTYDLVAASKVLNINAGELI
QMFQWFFVFCDEGYDTILLVLGNSVREFLQNLDAHDHLATTPGMRAPSFRCITDAEKGLILH
YYSERGLQDVIIGIITVAQOIHGTEIDMKVIOQRSECDHTQFLTEEKESKEEDFYEDLDREFN
GTQDSRIISPTFCRAFFPHIIFDRDLVTCGNAIYRVLPQNGKSLLSVFLVRPHIDISFHLG
LSHINTVFLRSKEGLLDVLRKECEDELDTGAEISCLRKGQMIYLPEDSILFLCSFVWMLDLTR
RGLYLSDDILPHDTRDILVLGGEQFREYKLTQLELEILDRQLTLRALED

Figure 37F

Figure 37G

Rattus norvegicus β2

(配列番号 23)

[illegible]

(配列番号 24)

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525

0006322652000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K 38/16
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02
C 0 7 K	1/14	(2006.01)	C 0 7 K 1/14

特許法第30条第2項適用 インターネットURL http://projectreporter.nih.gov/project_info_description.cfm?aid=8396231&icde=25291235&ddparam=&ddvalue=&ddsub=&cr=1&csb=default&cs=ASCにおいて公開された「NIH RePORT (Project Information 1R43CA165629-01A1)」、公開日：2012年9月23日

特許法第30条第2項適用 インターネットURL http://projectreporter.nih.gov/project_info_description.cfm?aid=8396193&icde=13697663において公開された「NIH RePORT (Project Information 1R43NS076272-01A1)」、公開日：2012年7月8日

特許法第30条第2項適用 International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, Vol. 84, Issue 3, S707、公開日：2012年11月1日

前置審査

- (72)発明者 カップ, グレゴリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ショアウェイ 75 スイート エー
- (72)発明者 セルウェル, ローラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ショアウェイ 75 スイート エー
- (72)発明者 ル モアン, ナターシャ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ショアウェイ 75 スイート エー
- (72)発明者 キャリー, スティーブソン ピー. エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ショアウェイ 75 スイート エー

審査官 厚田 一拓

- (56)参考文献 特表2009-538134 (JP, A)
特表2009-537145 (JP, A)
特表2010-513405 (JP, A)
特開2012-235793 (JP, A)
特表2010-503418 (JP, A)
Biochemistry, 1997年, Vol.36, No.50, pp.15959-15964

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 19/00

CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)