(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2016-520292
(P2016-520292A)
(43)公表日　平成28年7月14日(2016.7.14)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 7/01	(2006.01)	C12N	7/01	ZNA	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B064
A61K 35/76	(2015.01)	A61K	35/76		4B065
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4C084
A61P 37/04	(2006.01)	A61P	37/04		4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 21 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-503419 (P2016-503419)
(86)(22)出願日　平成26年3月17日 (2014.3.17)
(85)翻訳文提出日　平成27年10月22日 (2015.10.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/030551
(87)国際公開番号　WO2014/145740
(87)国際公開日　平成26年9月18日 (2014.9.18)
(31)優先権主張番号　14/073,210
(32)優先日　平成25年11月6日 (2013.11.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　13/836,487
(32)優先日　平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　515251610
パナシア　ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　メリーランド　２０８７７，　ゲイザースバーグ，　ペリー　パークウェイ　２０９，　スイート　１３
(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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＨＡＡＨ（アスパルチル－（アスパラギニル）－β－ヒドロキシラーゼ）を標的とする治療用癌ワクチン

(57)【要約】
本発明は、アスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼ（ＨＡＡＨ）を標的とする癌ワクチン療法を包含する。本発明は、ＨＡＡＨペプチドフラグメントを発現するバクテリオファージ、および癌を処置する方法において上記バクテリオファージを使用するための方法を意図する。本発明は、バクテリオファージ表面に発現されたＨＡＡＨが高度に免疫原性であり、提示の変化およびバクテリオファージそれ自体のアジュバント機能のために自己抗原寛容性を克服できたという発見に基づいている。

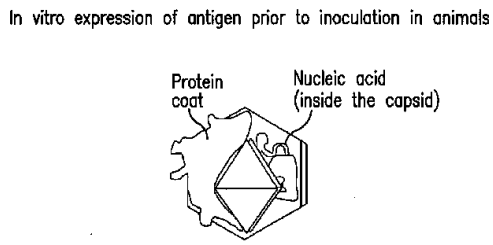


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
アスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼに対してネイティブな少なくとも１つのアミノ酸配列を含む、バクテリオファージ。
【請求項２】
前記アスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼに対してネイティブな少なくとも１つのアミノ酸配列が構築物Ｉのアミノ酸配列からなる群より選択される、請求項１に記載のバクテリオファージ。
【請求項３】
前記バクテリオファージが構築物ＩＩのアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のバクテリオファージ。
【請求項４】
前記バクテリオファージが構築物ＩＩＩのアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のバクテリオファージ。
【請求項５】
前記バクテリオファージが、ラムダ、Ｔ４、Ｔ７、およびＭ１３／ｆ１からなる群より選択される、請求項１に記載のバクテリオファージ。
【請求項６】
前記バクテリオファージがバクテリオファージラムダである、請求項５に記載のバクテリオファージ。
【請求項７】
癌を処置する方法であって、免疫系刺激量の請求項１に記載のバクテリオファージを患者に提供する工程を含む、方法。
【請求項８】
アスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼに対してネイティブなアミノ酸配列をコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列、およびｇｐＤをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸構築物。
【請求項９】
前記アスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼに対してネイティブな少なくとも１つのアミノ酸配列が構築物Ｉのアミノ酸配列である、請求項８に記載の核酸構築物。
【請求項１０】
前記アスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼに対してネイティブな少なくとも１つのアミノ酸配列が構築物ＩＩのアミノ酸配列である、請求項８に記載の核酸構築物。
【請求項１１】
前記アスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼに対してネイティブな少なくとも１つのアミノ酸配列が構築物ＩＩＩのアミノ酸配列である、請求項８に記載の核酸構築物。
【請求項１２】
請求項８に記載の核酸構築物を含む組換えラムダファージ。
【請求項１３】
ナノ粒子を含む組成物であって、該ナノ粒子がアスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼに対してネイティブな少なくとも１つのアミノ酸配列をさらに含む、組成物。
【請求項１４】
前記アスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼに対してネイティブな少なくとも１つのアミノ酸配列が構築物Ｉのアミノ酸配列である、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】

前記ナノ粒子が構築物ＩＩのアミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１６】
前記ナノ粒子が構築物ＩＩＩのアミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１７】
癌を処置する方法であって、免疫系刺激量の請求項１３に記載の組成物を患者に提供する工程を含む、方法。
【請求項１８】
癌を処置する方法であって、患者の樹状細胞を免疫系刺激量の請求項１３に記載の組成物と接触させる工程を含む、方法。
【請求項１９】
癌を処置する方法であって、免疫系刺激量のラムダファージを患者に提供する工程を含み、該ラムダファージがそれらの表面に発現されたアスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼに対してネイティブなアミノ酸配列を含む、方法。
【請求項２０】
前記アスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼに対してネイティブなアミノ酸配列が、構築物Ｉのアミノ酸配列、構築物ＩＩのアミノ酸配列、および構築物ＩＩＩのアミノ酸配列を含む、請求項１９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２０１３年3月１５日に出願された米国特許出願第１３／３８６，４８７号の一部継続であり、当該出願の開示は本明細書においてその全体が参考として援用される。
【背景技術】
【０００２】
癌は、ヒトの生命の機会の喪失と保健医療のコストの両方の点から、最も破壊的な疾患の１つである。癌はまた、未だ対処されていない臨床的な必要性を提示している。現在利用可能な化学療法は有効性が限られており、標的患者集団が限られている。首尾よい免疫療法でさえ、化学療法と同様の短所を有している。さらに、本質的にすべての癌治療薬が、顕著に有害な副作用を有する。
【０００３】
アスパルチル－（アスパラギニル）－β－ヒドロキシラーゼ（ＨＡＡＨ）は、肝細胞癌腫および肺癌腫を含む様々な悪性新生物において過剰発現されている。ＨＡＡＨは腫瘍特異的抗原であり、これは、特定の悪性細胞の表面上で特異的に発現される。ＨＡＡＨは、細胞増殖、運動性、および侵襲性を引き起こすことによって癌の病因に寄与するＮｏｔｃｈなどの因子を修飾する水酸化酵素である。この酵素を無力化するか、またはその発現を減少させることにより、癌細胞における正常な表現型がもたらされる。抗ＨＡＡＨ抗体（ならびにｓｉＲＮＡ）は、細胞増殖抑制性であることが示されている。すべてヒト配列の抗ＨＡＡＨ（ＰＡＮ－６２２）は、受動免疫療法によって、動物研究において９０％を超えて腫瘍成長を阻害することが示されている。しかし、ＨＡＡＨは十分に保存されており、胎盤中でもまた過剰発現されているので、ＨＡＡＨは動物中では十分に免疫原性ではなく、ヒトにおいては、確実に自己抗原である。
【０００４】
癌の病因に対する関連性が判明しているＨＡＡＨなどの汎癌特異的抗原に標的化されたワクチン療法が非常に望ましい。その経済的な影響は、雇用創出と生産性の増大の点、および保健医療の節約と生産寿命の延長においての両方で、膨大である。本発明のワクチン療法は、その標的とワクチンの実体（ｅｎｔｉｔｙ）の両方の点から新規である。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】

【０００５】
発明の要旨
本発明は、ヒトアスパルチル－［アスパラギニル］－β－ヒドロキシラーゼ（ＨＡＡＨ）を標的とする癌ワクチン療法を包含する。
【０００６】
本発明の特定の実施形態は、ＨＡＡＨペプチドフラグメントを発現するバクテリオファージであって、ここで、上記バクテリオファージが、ラムダ、Ｔ４、Ｔ７、またはＭ１３／ｆ１のいずれか１つであり得る、バクテリオファージを意図する。
【０００７】
本発明はさらに、癌を処置する方法であって、ＨＡＡＨフラグメントを発現するバクテリオファージで患者の免疫系を刺激することを含む、方法を意図する。
【０００８】
本発明はまた、ＨＡＡＨに対してネイティブな少なくとも１つのアミノ酸配列を含むナノ粒子を意図する。
【０００９】
本発明はまた、癌を処置する方法であって、免疫系刺激量のラムダファージを患者に提供する工程を含み、ここで、上記ラムダファージは、その表面に発現されたＨＡＡＨに対してネイティブなアミノ酸配列を含む、方法を包含する。
【００１０】
本発明はまた、癌を処置する方法であって、免疫系刺激量のナノ粒子を患者に提供する工程を含み、ここで、上記ナノ粒子は、ＨＡＡＨに由来するアミノ酸配列を含む、方法を包含する。
【００１１】
本発明の１つの実施形態は、ＨＡＡＨに対してネイティブな少なくとも１つのアミノ酸配列を含むバクテリオファージであって、ここで、ＨＡＡＨに対してネイティブな少なくとも１つのアミノ酸配列は、構築物Ｉのアミノ酸配列、構築物ＩＩのアミノ酸配列、および構築物ＩＩＩのアミノ酸配列からなる群より選択される、バクテリオファージを意図する。
【００１２】
本発明はまた、構築物Ｉのアミノ酸配列、構築物ＩＩのアミノ酸配列、または構築物ＩＩのアミノ酸配列をその表面上に発現するラムダファージを意図する。
【００１３】
本発明の実施形態はまた、ＨＡＡＨに対してネイティブなアミノ酸配列をコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列、およびバクテリオファージラムダヘッドデコレーションタンパク質Ｄ（本明細書中以後、「ｇｐＤ」）をコードする核酸配列を含む核酸構築物を意図する。
【００１４】
本発明の別の実施形態は、構築物Ｉのアミノ酸配列、構築物ＩＩのアミノ酸配列、または構築物ＩＩＩのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を含む。
【図面の簡単な説明】
【００１５】
【図１】図１は、抗原のインビトロ発現の表示である。
【００１６】
【図２－１】図２は、ＡＡＨアミノ酸配列の比較を提供する。
【図２－２】図２は、ＡＡＨアミノ酸配列の比較を提供する。
【００１７】
【図３】図３は、肝臓癌細胞中のＨＡＡＨに対する抗体の有効性を実証するグラフである。
【００１８】
【図４】図４は、本発明に従う免疫化のメカニズムを示す。

【００１９】
【図５】図５は、免疫応答を示す。
【００２０】
【図６Ａ】図６Ａ－Ｂは、ドナープラスミドｐＡＮ－Ａ－とレシピエントファージベクターとの相同組み換えである。いくつかのラムダ遺伝子のみが示される。クローニングのために使用されるラムダゲノム中の独特なＮｈｅ　ＩおよびＢｓｓｈ　ＩＩ部位が、ｌａｃＰＯ、ＲＢＳ、およびｌａｃＺの最初の５８コドンからなるＤＮＡカセットであるｌａｃＺａと同様に示される。生成された組換えファージは、ＨＡＡＨフラグメントの挿入物を含有し、ＨＡＡＨ構築物Ｉ、ＩＩ、およびＩＩＩと命名される。構築物Ｉのダイアグラムのみがここで示されている。挿入物は、ラムダのｇｐＤヘッドタンパク質遺伝子と融合して、ラムダキャプシド上にｇｐＤ－ＨＡＡＨ構築物Ｉ融合物を産生する。マップは一定の縮尺ではない。
【図６Ｂ】図６Ａ－Ｂは、ドナープラスミドｐＡＮ－Ａ－とレシピエントファージベクターとの相同組み換えである。いくつかのラムダ遺伝子のみが示される。クローニングのために使用されるラムダゲノム中の独特なＮｈｅ　ＩおよびＢｓｓｈ　ＩＩ部位が、ｌａｃＰＯ、ＲＢＳ、およびｌａｃＺの最初の５８コドンからなるＤＮＡカセットであるｌａｃＺａと同様に示される。生成された組換えファージは、ＨＡＡＨフラグメントの挿入物を含有し、ＨＡＡＨ構築物Ｉ、ＩＩ、およびＩＩＩと命名される。構築物Ｉのダイアグラムのみがここで示されている。挿入物は、ラムダのｇｐＤヘッドタンパク質遺伝子と融合して、ラムダキャプシド上にｇｐＤ－ＨＡＡＨ構築物Ｉ融合物を産生する。マップは一定の縮尺ではない。
【００２１】
【図７】図７は、本発明に従う構築物を成長させ、精製する１つの方法を図示する。
【００２２】
【図８】図８は、癌ワクチン候補についてのウェスタンブロットＨＡＡＨ－ワクチンスクリーニングの一例である。
【００２３】
【図９】図９は、本発明に従ってＨＡＡＨ構築物に対してブロットされたＦＢ５０　ＭＡｂを示す。
【００２４】
【図１０】図１０は、ＥＬＩＳＡの結果を示す。
【００２５】
【図１１】図１１は、癌を有さないことが知られている２１１例の個体および癌と診断された６４６例の患者からなる８５７例の個体のグループに対する、癌のバイオマーカーとしてのＨＡＡＨテストの結果を示す散布図である。癌グループは、ステージ１からステージ４までの様々なステージである異なるタイプの癌（乳癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌）の個体の混合からなる。１２の偽陽性および３４の偽陰性の結果を合わせると、このテストは、このような大きな患者グループにおいてさえ、５．４％未満の誤差である。横軸は患者インデックスである。
【００２６】
【図１２】図１２は、腫瘍体積に関する腫瘍チャレンジデータを示す。
【００２７】
【図１３】図１３は、腫瘍体積に関する腫瘍チャレンジデータを示す。
【００２８】
【図１４】図１４は、腫瘍体積に関する腫瘍チャレンジデータを示す。
【００２９】
【図１５】図１５は、本発明の１つの実施形態に関連するマウス血清データを提供する。
【００３０】
【図１６】図１６は、本発明の１つの実施形態に関連するマウス血清データを提供する。
【００３１】

【図１７】図１７は、用量に対する免疫原性に関するデータを提供する。
【００３２】
【図１８】図１８は、ＦＢ５０およびＨＡＡＨ血清のウェスタンブロットを示す。
【００３３】
【図１９】図１９は、本発明の実施形態に従うアミノ酸配列を示す。
【発明を実施するための形態】
【００３４】
発明の詳細な説明
単純化および例証目的のために、本発明の原理は、その様々な例示的な実施形態を参照することによって記載される。本発明の好ましい実施形態は特に本明細書に開示されているが、当業者は、同じ原理が他のシステムにおいて等しく適用可能であり、他のシステムにおいて実行できること、およびこのような任意の変形は本発明の範囲から逸脱しない変更の範囲内にあることを容易に認識する。本発明の開示された実施形態を詳細に説明する前に、本発明は他の実施形態が可能であるので、本発明は任意の特定の示される構成の詳細に対してその適用が限定されるものではないことを理解されたい。本明細書において使用される用語法は、説明の目的のためであって、限定のためではない。さらに、特定の方法が、多くの場合において、特定の順序で、本明細書で提示される特定の工程を参照して記載されるが、当業者によって理解されるように、これらの工程は任意の順序で実施されてもよく、これらの方法は、本明細書に開示される工程の特定の構成に限定されない。
【００３５】
本発明は、バクテリオファージ表面に発現されたＨＡＡＨが高度に免疫原性であり、提示の変化およびバクテリオファージそれ自体のアジュバント機能のために自己抗原寛容性を克服できたという発見に基づいている。本発明は、バクテリオファージ発現ＨＡＡＨフラグメントを使用して、ＨＡＡＨを標的とする癌ワクチン療法を提供する。
【００３６】
すべてヒトの抗ＨＡＡＨを使用する受動免疫療法が、癌の細胞および動物モデル（ヌードマウスモデルにおいて、図１）において有効であることが示されている。本発明は、ワクチンとしてのＨＡＡＨフラグメントのバクテリオファージ送達が、新規な抗原提示および固有のファージアジュバント特性を提供することによって、自己抗原寛容性の問題を克服できることを実証する。
【００３７】
患者の体への投与前の、腫瘍抗原による樹状細胞のインビトロ活性化は、癌療法のための有望な結果を示す。残念なことに、このプロセスは、様々な癌に対する大規模な免疫療法のためには、煩雑であり、高価であり、そして時間を費やすものである。バクテリオファージディスプレイは、免疫系へのペプチドの好ましい提示を達成する単純な方法である。以前の知見は、組換えバクテリオファージが、インビトロとインビボの両方で、すべて通常はアジュバントなしで、それらの表面上に複数コピーでディスプレイされたエピトープに対して強力なＣＤ８＋Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答を抗原刺激でき、Ｔヘルパー細胞を活性化でき、そして特異的抗体の産生を誘発できることを明らかにした。
【００３８】
本明細書で提示されるように、ＨＡＡＨなどのラムダファージ－ディスプレイ癌特異的抗原を用いるワクチン接種は多くの潜在的な利点を有する。１つの利点は、同じラムダファージ上での複数のペプチドのコピーのディスプレイであり、一旦、最初のファージディスプレイが行われると、引き続く産生は、ペプチドをキャリアにカップリングする進行中のプロセスよりも遙かに容易かつ安価なはずである。粒子状の性質に起因して、ファージ－ディスプレイされたペプチドは、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）ＩとＭＨＣＩＩの両方の経路にアクセスできるという良好な証拠もまた存在し、このことは、ラムダファージディスプレイワクチンが、細胞外抗原であるため、応答の大部分は抗体（ＭＨＣクラスＩＩ）に偏ることが予測されるにもかかわらず、免疫系の細胞と体液の両方の部分を刺激できることを示唆している。粒子状抗原、およびファージは特に、交差抗原刺激を通して、Ｍ

ＨＣ　Ｉ経路にアクセスできることが示されており、細胞応答を刺激する原因であるのはこのプロセスである可能性が高い。ＣＤ８＋Ｔ細胞によって媒介されるこの付加された細胞応答は、癌細胞を排除するための手助けをする。また、癌における先天性免疫の役割は、十分に確立された事実である。ラムダファージはまた、非特異的免疫刺激因子としても作用し得る。外来性ＤＮＡ（おそらく、ＣｐＧモチーフの存在に起因する）およびファージコートの反復ペプチドモチーフの組み合わせが非特異性免疫刺激の原因である可能性が高い。まとめると、ラムダファージ粒子全体は、多数の固有の特徴を有し、これらは、ファージをワクチン送達ビヒクルとして理想的なものとする。ファージディスプレイワクチンとしての使用について、ファージの粒子状性質は、それらが、可溶性組換えタンパク質よりも、はるかに容易かつ安価に精製することができるはずであることを意味する。なぜなら、単純な遠心分離／限外ろ過およびカラムクロマトグラフィー工程が、可溶性夾雑物の大部分を除去するために十分なはずだからである。加えて、ペプチド抗原は、天然のアジュバント特性を有する不溶性免疫原性キャリアにすでに共有結合的にコンジュゲートされており、各ワクチンバッチを用いて反復しなければならない複雑な化学的コンジュゲーションおよび下流の精製プロセスを必要としない。

【００３９】

本発明は、癌の防止と処置の両方のための、予防用かつ治療用「ファージワクチン」を提供する。本発明において、フラグメント化ＨＡＡＨペプチドは、ラムダヘッドの表面で首尾よくディスプレイされ、動物実験を行うために大規模の産生および精製が実行される。これらの手順の詳細を以下に示す。

【００４０】

Ａ．ＨＡＡＨペプチドのディスプレイのためのバクテリオファージラムダの構築

本発明者らは、ファージラムダのヘッドタンパク質ｇｐＤのＣ末端に融合されたＨＡＡＨペプチドをディスプレイするために、バクテリオファージラムダ系を設計した。ＨＡＡＨの分子分析により、ＪｕｎｃｔｉｎおよびＨｕｍｂｕｇと呼ばれる他の２つのタンパク質とのこのタンパク質の部分的アミノ末端相同性が明らかとなる。ヒトの生理学におけるこれらの他の２つのタンパク質の役割は完全には知られていない。これらの相同タンパク質に対して免疫系を活性化するなどの任意の複雑な状態を回避するために、本発明者らは、本発明者らのファージディスプレイ構築物から、これらの配列を特異的に除外した。ラムダヘッド上でのＨＡＡＨペプチドの適切なディスプレイのために、残りのＨＡＡＨ配列は３つのセクションにセグメント化される。

【００４１】

これらは、ＨＡＡＨ構築物１、ＨＡＡＨ構築物２、およびＨＡＡＨ構築物３と命名される（図７を参照のこと）。ＨＡＡＨ特異的オリゴプライマーを使用して、これらのセグメントを、バキュロウイルス系における発現のために本発明者らの研究室で先にクローニングされたＨＡＡＨ遺伝子から増幅する。各ＰＣＲプライマーのオリゴ配列は、増幅されたＨＡＡＨセグメントの各末端においてＮｈｅ　ＩおよびＢｓｓｈ　ＩＩ制限部位を生じるように、わずかに修飾されている。制限消化後、これらのセグメントは、ｌａｃプロモーターの制御下にあるｇｐＤをコードするＤＮＡセグメントの３’末端のＮｈｅＩ－ＢｓｓｈＩＩ部位に別々に挿入される。これらの構築物は、プラスミドベクター（ドナープラスミドｐＡＮ－Ａ）の中で作られ、また、ｌｏｘＰｗｔ配列およびｌｏｘＰ５１１配列を有する。Ｃｒｅ発現細胞（大腸菌）は、これらの組換えプラスミドで形質転換され、続いて、ｌｏｘＰｗｔ部位とｌｏｘＰ５１１部位と隣接するスタッファーＤＮＡセグメントを有するレシピエントラムダファージで感染される。組換えはｌｏｘ部位においてインビボで起こり、Ａｍｐｒ融合体（ｃｏｉｎｔｅｇｒａｔｅ）が形成され（図２）、これらは、自発的に大腸菌を溶解し、培養培地に放出される。融合体は、ｇｐＤのＣ末端に融合したＨＡＡＨペプチドをディスプレイする組換えファージを産生する。およそ２００コピーのこれらのペプチドが単一のファージヘッド上でディスプレイされる。

【００４２】

Ｂ．ラムダ融合体の選択およびＨＡＡＨペプチドをディスプレイする組換えファージの産

生

ラムダ融合体は、Ｌｕｒｉａ　Ｂａｒｔａｎｉ（ＬＢ）アンピシリン寒天（１００ｕｇ／ｍｌ　アンピシリン、１５％寒天）プレート上で選択される。手短に述べると、自発的に溶解した大腸菌培養物を使用して、Ｃｒｅ－ｖｅ大腸菌細胞に感染させ、ＬＢアンピシリン寒天プレート上に広げる。プレートを４８時間、３２℃でインキュベーションし、Ａｍｐｒコロニーを得る。これらのＡｍｐｒコロニーは重感染に影響されず、プラスミド融合体としてファージを有する。ラムダ融合体を含有するＡｍｐｒコロニーを、３７℃にて４時間、ＬＢアンピシリン（１００ｕｇ／ｍｌ）で別々に成長させる。ラムダファージは、これらの培養中で自発的に誘導され、完全な溶解を生じる。この無細胞上清が大腸菌細胞に感染させるために使用され、固形ＬＢ寒天（１５％）プレート上にプレーティングされて、ファージプラークが得られる。得られたファージプラークをプレートから収集し、Ｓａｍｂｒｏｏｋらによって記載された標準的な手順によって、単一プラークを大腸菌上で３回精製する。

【００４３】

Ｃ．ＨＡＡＨフラグメントを含有するラムダ融合体のコンホメーション：

ＨＡＡＨファージワクチン産生のために使用される、ラムダ融合体を含有するすべての細菌コロニーがＰＣＲによって検証される。このプロセスにおいて、細菌コロニー中の各々のクローニングされた挿入物の存在は、ＸｂａＩ－５／（ＴＴＧＧＴＴＡＧＣＡＡＧＴＴＡＡＴＡＣＣ）およびＸｂａＩ－３／（ＴＡＧＡＴＴＴＧＡＡＴＧＡＣＴＴＣＣＣＣ）のプライマーセットによるＨＡＡＨ特異的挿入ＤＮＡのＰＣＲ増幅によって確認される。これらの２つの特異的プライマーは、ラムダゲノムの独特なＸｂａ　Ｉ部位に隣接し、ラムダＤＮＡのＬｏｘ組換え部位間における完全な挿入物の存在のＰＣＲのために使用される。

【００４４】

Ｄ．ＨＡＡＨペプチドをディスプレイする組換えファージの成長および精製

プラーク精製ファージの成長は２工程で実施される。これらの工程は、プレート溶解法および大規模液体溶解法と称する。これらの手順の詳細はＳａｍｂｒｏｏｋらに記載されている。溶解した培養物は、液体カラムクロマトグラフィー技術によるさらなる精製のために室温で冷却される。

【００４５】

Ｅ．カラムクロマトグラフィー技術を使用する組換えラムダ構築物の大規模精製

ＣＩＭ（登録商標）モノリシックカラムは、大きな生体分子およびナノ粒子、細菌ウイルス、およびプラスミドＤＮＡを精製するための理想的なクロマトグラフィー支持体である。これらのモノリシックカラムの孔径は、最大の分子にさえも適応する（ａｃｃｏｍｍｏｄａｔｅ）ように調整され、最高の流速における非常に高い結合能力のために最適化されている。本発明者らは、ＨＡＡＨ－ペプチドをディスプレイするラムダファージのラージスケール精製のためにこれらのモノリシックカラムを採用した。精製プロセスの間に感染性ウイルスを得るために、本発明者らは、最大収量のファージを提供し、高感染度もまた保存していた化学的条件を調べた。この情報は、クロマトグラフィー方法を調整し、それによって、プロセシングの間に望ましくないファージ不活性化を回避するために必要である。

【００４６】

ＨＰＬＣ装置：すべての実験は、Ｕｎｉｃｏｒｎ５．１クロマトグラフィーソフトウェア、Ｐ－９００　ＦＰＬＣポンプ、ＵＰＣ－９００可変波長検出器、およびＦＲＡＣ－９２０フラクションコレクターを備えた、勾配ＡＫＴＡ　ｐｕｒｉｆｉｅｒ　ＦＰＬＣクロマトグラフィーシステム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上で実施される（ｐｒｅｆｏｒｍｅｄ）。ＣＩＭイオン交換クロマトグラフィーを、注入の点およびフラクション番号についてのマークと関連付けて、ＵＶ　２８０ｎｍならびに電気伝導度、および勾配プロフィールについてモニタリングする。固定相：強力アニオン交換（四級アミン－ＱＡ）メタクリレートベースＣＩＭディスクモノリシックカラム（ＢＩＡ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓ

，Ｌｊｕｂｌｊａｎａ，Ｓｌｏｖｅｎｉａ）をこの精製手順のために使用する。移動層：１２５ｍＭ ＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、ｐＨ ７．０（ローディングバッファー）および異なるｐＨ値の１２５ｍＭ ＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、１．５Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ ７．０（溶出バッファー）を使用する。すべてのバッファーを、０．２２ミクロン孔径サイズフィルターを通したろ過の後に使用する。これらの強力アニオン交換（四級アミン－ＱＡ）メタクリレートベースＣＩＭディスクモノリシックカラムを、プロセシング後、１Ｍ ＮａＯＨを使用する２時間の手順によって定期的に殺菌する。ＱＡカラム分析のためのファージ溶解物のプロセシング：ファージ溶解物（１０ｍＬ）を１２０００×ｇで４℃にて１０分間遠心分離し、ファージ含有上清を０．２２ミクロンフィルターを通してろ過した後にクロマトグラフィー用カラム上にファージをロードする。収集された１ｍＬの画分を、プラークアッセイで分析し、感染性ファージの存在を決定する。プラークアッセイデータを分析し、ディスプレイファージのカラムクロマトグラフィー精製のための具体的条件を最適化する。大量の高濃度のファージが必要とされる場合は、直線勾配が、より狭いピークが達成され、画分収集がより容易である段階勾配に変更される。直線勾配からのデータに基づいて、本発明者らは、ディスプレイファージのラージスケール精製のための段階的勾配のための条件を導入する。

【００４７】

Ｆ．組換えラムダ構築物のイムノブロットおよびウェスタンブロット分析

ラムダヘッド上での融合ペプチドの発現を検証するために、イムノブロットおよびウェスタンブロット分析を実行する。

【００４８】

イムノブロットアッセイのために、各ファージ構築物をＬＢ寒天プレート上で別々にプレーティングし、各プレートにおいて１００～１５０プラークを得る。プラークが約１ｍｍサイズになるまで、プレートを３７℃で１８時間インキュベーションする。次に、１３７ｍｍコロニー／プラークスクリーン膜（ＮＥＮ（登録商標）Ｒｅｓｅａｒｃｈ ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）を蒸留水中に浸漬させ、ろ紙上で吸い取って乾燥させる。この膜を、上面寒天上に注意深く配置し、インキュベーションを３７℃でさらに１５分間継続した。膜を寒天から剥離し、Ｔｒｉｓ生理食塩水で３回洗浄して、細片および細菌を除去する。次いで、プレートを４℃で保存し、洗浄したＮＥＮ膜を２％カゼイン溶液で１時間ブロックする。ブロッキング後、膜を、１．２５ｕｇ／ｍｌの希釈ＦＢ５０モノクローナル抗体を含有するカゼイン溶液中でインキュベーションする。このＦＢ５０ ＨＡＨ特異的モノクローナル抗体は、前立腺癌の診断的適用に本発明者らの研究室において先に生成したものであった。室温で２時間のインキュベーション後、膜を、０．０５％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００を含むＴｒｉｓ生理食塩水で２回、Ｔｒｉｓ生理食塩水で１回、各１５分間洗浄する。モノクローナル処理膜を、２．０μｇ／ｍｌのアルカリホスファターゼ標識ウサギ抗マウスＩｇＧ（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ ａｎｄ Ｐｅｒｒｙ）とともに、室温で１時間インキュベーションする。膜を、この手順において前に記載されたのと同じ方法で連続で３回洗浄し、続いて、最終洗浄を０．９％ ＮａＣｌを用いて行う。最後に、膜を、Ｆａｓｔ Ｒｅｄおよびナフトール基質溶液で約１０分間処理し、反応を蒸留水中で膜を洗浄することによって停止させた。ピンクの免疫反応性スポットは、ラムダヘッド上でＨＡＡＨ特異的ペプチドを発現する組換え体に対応する。ウェスタンブロットのために、精製ラムダファージ粒子を、還元条件下、０．１％（ｗ／ｖ）ＳＤＳ／１０％ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動にかけ、続いて、ＰＶＤＦ膜（Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎ，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｂｅｄｆｏｒｄ， ＭＡ）上にエレクトロブロッティングした。融合タンパク質を、組換え発現ラムダＧｐＤに対して惹起された、２．５ｕｇ／ｍｌの希釈ウサギポリクローナル血清、またはＨＡＡＨ特異的Ｅ６マウスモノクローナル抗体（最終濃度１．２５ｕｇ／ｍｌ）のいずれかで検出する。ウサギ抗血清処理膜を、２．０μｇ／ｍｌのアルカリホスファターゼ標識化ヤギ抗ウサギＩｇＧとともにインキュベーションし、マウスモノクローナル処理膜を、２．０μｇ／ｍｌのアルカリホスファターゼ標識化ウサギ抗マウスＩｇＧとともに、室温で１時間インキュベーションする。膜を、プラー

クリフトアッセイにおいて前に記載されたのと同じ方法で連続で３回洗浄する。最後に、膜を、Ｆａｓｔ　Ｒｅｄおよびナフトール基質溶液で約１０分間処理し、反応を蒸留水中で膜を洗浄することによって停止させる。免疫反応性系統はｇｐＤ特異的組換えタンパク質に対応する。

【００４９】

ＨＡＡＨファージワクチンの抗原性性質を評価するための動物実験：

Ａ．雌性ＢＡＬＢ／ｃマウスマウスに対するＨＡＡＨ－ファージワクチンの抗原性の研究

【００５０】

この実験の目的は、ＨＡＡＨファージワクチンが、ＢＡＬＢ／ｃ雌性マウスにおける抗体応答を誘発する有効性を決定することである。フラグメント化ＨＡＡＨ抗原がラムダキャプシドタンパク質ｇｐＤの融合物としてラムダファージヘッドの表面上にディスプレイされる、３つの別々のＨＡＡＨ－ラムダファージ構築物が先に調製された。かかる３つの構築物は、ＨＡＡＨ構築物１、ＨＡＡＨ構築物２、およびＨＡＡＨ構築物３と命名される。マウスの４つの別々のグループ（グループＡ、グループＢ、グループＣ、各グループ５匹のマウス、およびグループＤ、４０匹のマウス）には、以下のチャート（チャート１）に記載される様々なＨＡＡＨファージ構築物を皮下（ｓ／ｃ）注射する。手短に述べると、グループＡのマウスは、５００μｌの滅菌ＰＢＳ中に懸濁された5×10^{8}ｐｆｕのＨＡＡＨ構築物１ファージ粒子を受ける。同様に、グループＢおよびグループＣのマウスは、それぞれ、同じ量のＨＡＡＨ構築物２およびＨＡＡＨ構築物３のファージ粒子を受ける。グループＤのマウスは、３つすべてのファージ構築物の等モル濃度混合物を受ける。第５グループのマウス（グループＥ、４０匹のマウス）は、滅菌ＰＢＳに懸濁された組換えＨＡＡＨ抗原（５０μｇ／マウス）を受容ける。コントロール（グループＦ、４０匹のマウス）には、野生型ファージｐＡＮ－Ａ－λを注射する。最初の接種後、マウスは、対応する抗原の初回および２回目のブースターを２週間間隔で受ける（用量は初回接種と同じである）。すべての動物は初回接種前に採血される。血清サンプルを、ＨＡＡＨ抗原に対する免疫応答の進行をモニタリングするために各ブースターの前に収集する。２１日後、動物を、心臓穿刺を通しての最終採血のために安楽死させる。最後に、動物を、脊髄脱臼により屠殺する。グループＤ、グループＥ、およびグループＦの動物からの血清は、第２の動物実験のために、－７０℃フリーザーに保管される。実験の間、すべての動物を、その健康状態についてモニタリングする。様々なＨＡＡＨ－ファージワクチンに対する免疫応答を、ウェスタンイムノブロットおよびＥＬＩＳＡによってモニタリングする。

【化１】

	グループ						
日数	A	B	C	D	E	F	スコアリング
0	HAAH **構築物1** 5×10^{8} pfu	HAAH **構築物2** 5×10^{8} pfu	HAAH **構築物3** 5×10^{8} pfu	3つのHAAH構築物の混合物 5×10^{8} pfu	**組換え** HAAH 50 μg	pAN-A-λ 5×10^{8} pfu	*
7	HAAH **構築物1** 5×10^{8} pfu	HAAH **構築物2** 5×10^{8} pfu	HAAH **構築物3** 5×10^{8} pfu	3つのHAAH構築物の混合物 5×10^{8} pfu	**組換え** HAAH 50 μg	pAN-A-λ 5×10^{8} pfu	
14	HAAH **構築物1** 5×10^{8} pfu	HAAH **構築物2** 5×10^{8} pfu	HAAH **構築物3** 5×10^{8} pfu	3つのHAAH構築物の混合物 5×10^{8} pfu	**組換え** HAAH 50 μg	pAN-A-λ 5×10^{8} pfu	
21	**最終採血**	**最終採血**	**最終採血**	**最終採血**	**最終採血**	**最終採血**	*21日間

スコアリング：０－正常、１－不活発およびしわの寄った毛皮、２－不活発、しわの寄った毛皮、および背中の曲がり、３－不活発、しわの寄った毛皮、背中の曲がり、および部分的に閉じた目、４－瀕死、５－死亡。

【００５１】
Ｂ．ＨＡＡＨファージ構築物に対する体液性免疫応答の評価：
以前に、最初の標的疾患であるヒト原発性肝臓癌の異種移植片モデルにおいて、抗ＨＡＡＨ抗体を用いる処置によって、すべての動物において癌の腫瘍サイズが減少し、処置の４週間後、７５％の症例において腫瘍は検出できないサイズに維持されていた。肝臓に伝播するヒト結腸癌細胞を使用する腫瘍転移モデルにおいて、抗ＨＡＡＨ抗体を用いる処置により、転移の数およびサイズが大きく減少した。これらの結果は、高度に有意であり、そしてヒトの癌の処置における抗ＨＡＡＨの有用性を明確に示す。これら両方の場合において、動物が抗体単独で処理され、任意の他の処置と組み合わせていなかったことは注目に値する。この実験において、４つのグループのヌードマウス（グループＡ、グループＢ、およびグループＣ、ならびにグループＤ、各グループにおいて５匹のマウス）には、それらの左脇腹に、原発性ヒト肝臓癌を皮下注射する。７２時間後、グループＡ、グループＢ、およびグループＣのヌードマウスを、１回目の動物実験のグループＤ、グループＥ、およびグループＦのマウスから先に収集された３００ｕｌの血清で、それぞれ、腹腔内（ｉ／ｐ）経路によって処置する。コントロールとして、グループＤのヌードマウスは、３００ｕｌのＰＢＳを受ける。処置は、さらに４週間の間、４８時間毎に継続する。その後、動物を、いかなる干渉もなくさらに２週間の間、モニタリングする。腫瘍の進行は、処置グループとコントロールグループで４８時間毎にモニタリングされ、結果を評価する。最後に、動物を脊髄脱臼により屠殺し、病理学者によってそれらの臓器を転移について調査される。

【実施例】
【００５２】
実施例１
現在、本発明者らは、ヒト（アスパラギニル）－β－ヒドロキシラーゼ（ＨＡＡＨ）を標的とするラムダファージベースの治療用抗癌ワクチン（ナノ粒子）を設計、開発、および製造している。この分子の自己抗原寛容を克服するために、本発明者らは、免疫刺激因子を含有し、身体になじみのない様態でＨＡＡＨを提示するワクチン実体を設計している。本発明者らは、バクテリオファージラムダの表面上で（ｇｐＤバクテリオファージ抗原との）融合タンパク質としての、ＨＡＡＨタンパク質の３つの部分、Ｎ末端、中間部分、およびＣ末端部分からの配列を発現させており、ファージあたり２００～３００コピーを生成させている。これらのワクチン実体は特徴付けられており、大腸菌培養物の１リッターあたり１０１２プラーク形成単位（ｐｆｕ）のレベルで、容易かつ日常的に産生される。バクテリオファージワクチンは、高度にスケールアップ可能なプロセスであるタンジェンシャルフロー・フィルトレーションを使用して、ならびにＰＥＧ沈殿とそれに続く徹底透析（ｅｘｈａｕｓｔｉｖｅ　ｄｉａｌｙｓｉｓ）によって、首尾よく単離および精製されている。これらの両方のプロセスは、製剤化したヒト投薬についてＦＤＡガイドラインの中でのレベルまで細菌エンドトキシンを減少させている。製造プロセスの容易さおよび収率により、培養物の１リッターあたりおよそ１００ヒト用量（ヒト被験体における免疫原性についての予測される用量要求に基づく）の生産が可能になる。バクテリオファージは、紫外線照射によって非感染性とすることができる。従って、これはナノ粒子ベースのワクチンといわれる。

【表１】

表１：HAAHラムダファージ構築物についての成長および精製データ

HAAT構築物	HAAH-1λ	HAAH-2λ	HAAH-3λ
培養中のファージ量（pfu／L）	3.5×10^{12}	2.7×10^{12}	5.7×10^{12}
精製されたファージ（pfu／L）および収量	2.1×10^{12} (58%)	1.9×10^{12} (71%)	4.0×10^{12} (70%)
UV処理されたファージ（pfu／L）	0	---	0
ナノ粒子／L（感染性＋非感染性ファージ）	4.6×10^{13}	9.1×10^{13}	8.6×10^{12}
エンドトキシン（EU／10^8ファージ）	156	140	4

【００５３】

実施例２

３つすべての実体は、抗体ＥＬＩＳＡによって評価されるように、高度に顕著に、用量依存的な免疫原性をディスプレイする。ナノ粒子ワクチンの治療効果を評価するために、本発明者らは、マウス肝細胞癌腫系統ＢＮＬＴ３を使用して、ＢＡＬＢ／ｃマウスにおける腫瘍形成を開始した。この細胞系統は、ＡＴＣＣ細胞系統、ＢＮＬ　１ＭＥ　Ａ．７Ｒ．１の高度に腫瘍形成原性のサブクローンであり、これは、親の細胞系統（ｃｅｌｌ　ｌｉｎｅ）の３回の連続皮下パッセージにより、ｔｈｅ　Ｌｉｖｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｅｎｔｅｒ、Ｒｈｏｄｅ　Ｉｓｌａｎｄ、ＨｏｓｐｉｔａｌのＪ．Ｗａｎｄｓによって開発された。腫瘍チャレンジ研究の０日目に、５匹の４つのグループのマウスに、各々、５　Ｅ０３　ＢＮＬＴ３細胞を皮下投与した。同じ日に、動物は、３つのバクテリオファージ構築物の各々の一価ワクチンとしてナノ粒子ワクチンの３回の週１回の皮下投薬（０日目、７日目、および１４日目）の第１回目（１０Ｅ１０　ｐｆｕ／用量）またはバッファーコントロールを受けた。次いで、マウスを腫瘍成長について観察し、腫瘍体積を測定した。４週間後（研究２８日目）、コントロールグループの５匹のマウスのうちの３匹が測定可能な腫瘍成長を有したのに対して、ＨＡＡＨのＮ末端、中間部分、およびＣ末端の構築物ワクチングループにおいては、それぞれ、０／５、２／５、および０／５の動物が、測定可能な腫瘍成長を有した。腫瘍成長を伴う２つのグループの各々において、５匹の動物の平均腫瘍体積は、コントロールグループについては、８５．８mm^3、ＨＡＡＨ中間部分グループについては２４．９mm^3（コントロール腫瘍体積の２９％）であった。全体として、ワクチン接種グループは、２／１５動物を有し、平均腫瘍成長が８．３mm^3（コントロールグループ腫瘍サイズの１０％超）であった。

【００５４】

実施例３

免疫応答性マウスを使用して、ＨＡＡＨ細胞外ドメインのＮ末端部分、中間部分、およびＣ末端部分を包含する、３つのファージベースのワクチン候補の免疫原性をテストした。３つすべての実体が、高度に顕著に、用量依存性の免疫原性をディスプレイしている。動物に、０日目、７日目、および１４日目に、５ｘ１０７～５ｘ１０９ｐｆｕを注射した。動物を２１日目に採血し、免疫原性を、ＥＬＩＳＡフォーマットで、組換えＨＡＡＨを使用してスクリーニングした。肝臓癌（ＦＯＣＵＳ）細胞系統および肺癌（Ｈ４６０）細胞系統を使用する細胞ベースのＥＬＩＳＡ、ならびにこれらの系統に対するＦＡＣＳ分析を実施した。免疫化マウス血清は、すべてのテストにおいて、明確な抗ＨＡＡＨ（または抗癌細胞）活性を有した。免疫原性は、用量依存性および構築物依存性であった。本研究は、ファージベースのワクチンであるナノ粒子は、天然のＨＡＡＨタンパク質の免疫寛容を突破でき、そして特異的抗体応答を誘発でき、このようなワクチンが有意な治療的価値を有し得ることを示す。

【００５５】

本発明は、その特定の例示的な実施形態を参照して記載されてきたが、当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく本発明の記載された実施形態に様々な変更を行ってもよい。本明細書において使用される用語および説明は、例示のみによって示され、限定を意味しない。特に本発明は、実施例によって記載されているが、様々な組成物およびプロセスにより、本明細書に記載される本発明の技術思想が実施される。本発明は、様々な用語および特定の実施形態において記載および開示されてきたが、本発明の範囲は、様々な用語および特定の実施形態によって限定されることを意図するものではなく、様々な用語および特定の実施形態によって限定されるように見なされるべきでもなく、そして本明細書における教示によって示唆され得るようなこのような他の変更または実施形態は、とりわけ、添付の特許請求の範囲の幅および範囲内に含まれるものとして、特に留保される。当業者は、以下の特許請求の範囲およびそれらの等価物において定義されるように、これらおよび他の変形が本発明の範囲内で可能であることを認識する。

【図１】

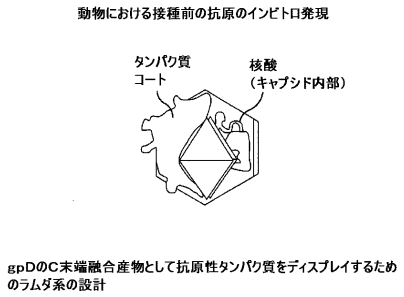


FIG. 1

【図２－１】

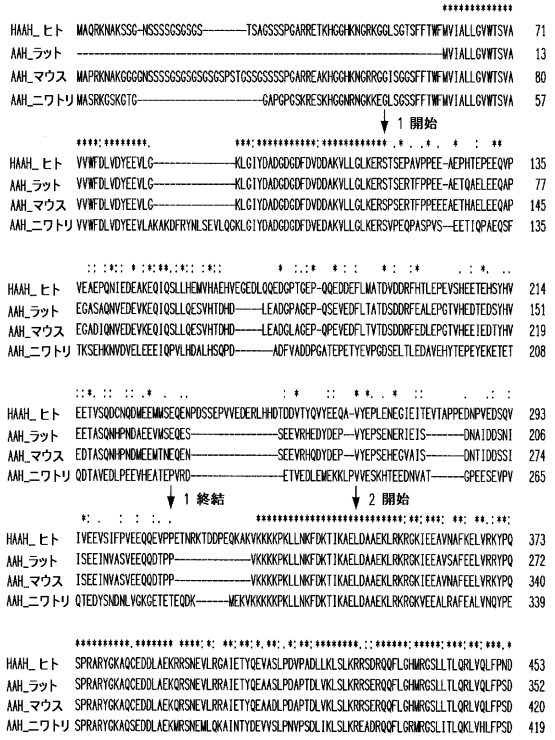


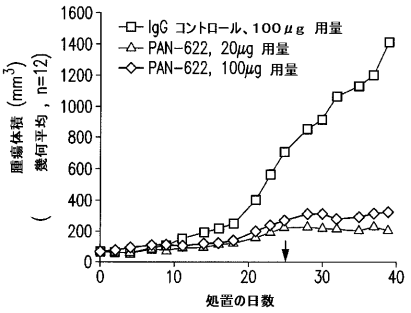
FIG. 2

【図２－２】



FIG. 2（続き）

【図３】



- 腫瘍は10^7FOCUS細胞（肝臓癌細胞系統）で3日目に確立した
- 抗体は0～25日目にIV 3X／週で注射した（最後の注射を矢印で示す）
- PAN－622で処置した12匹の動物のうちの5匹は検出できない腫瘍体積に達し、これは細胞傷害性効果の直接的な証拠である。

FIG. 3

【図４】

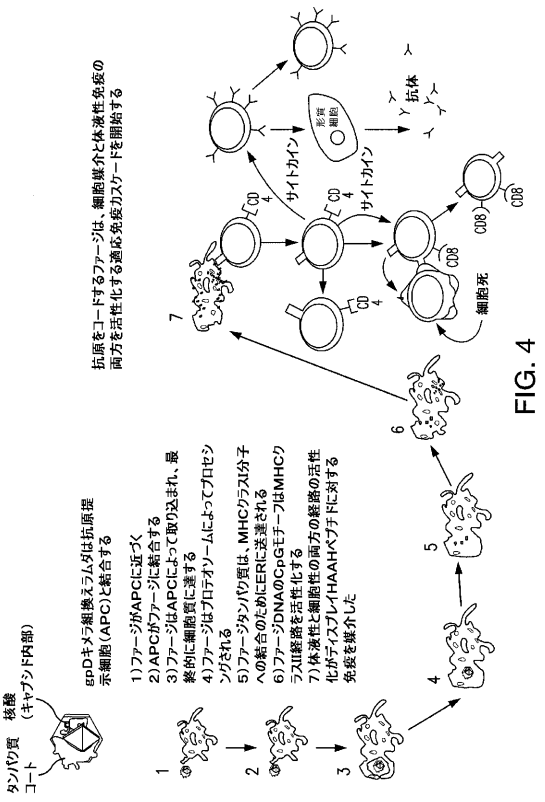


FIG. 4

【図５】

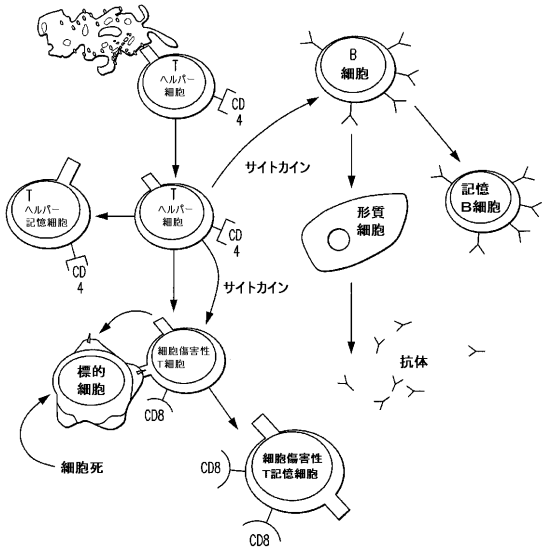


FIG. 5

【図６Ａ】

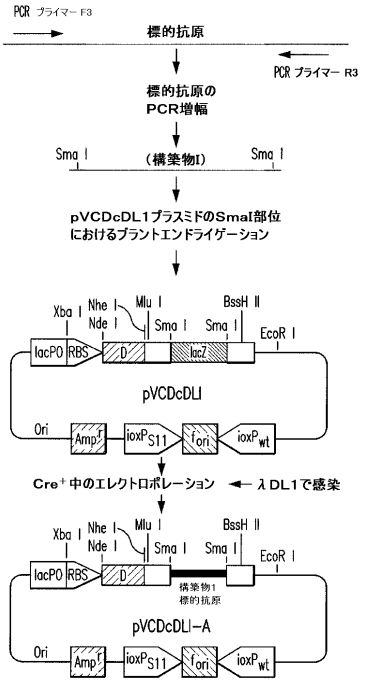


FIG. 6A

【図６Ｂ】

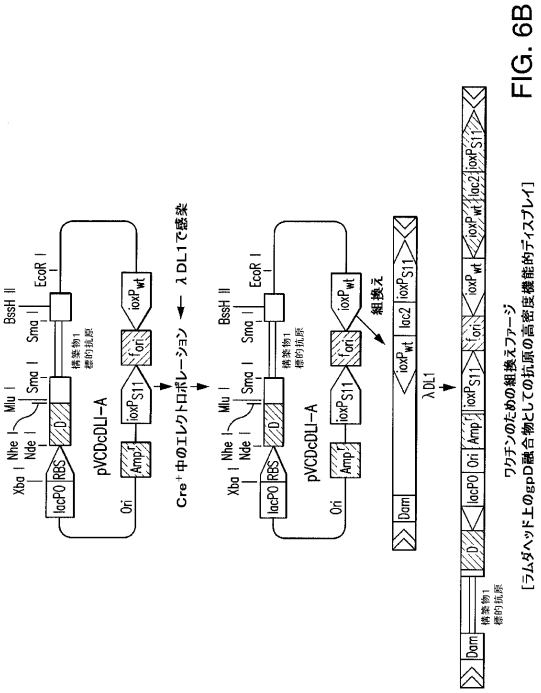


FIG. 6B

【図７】

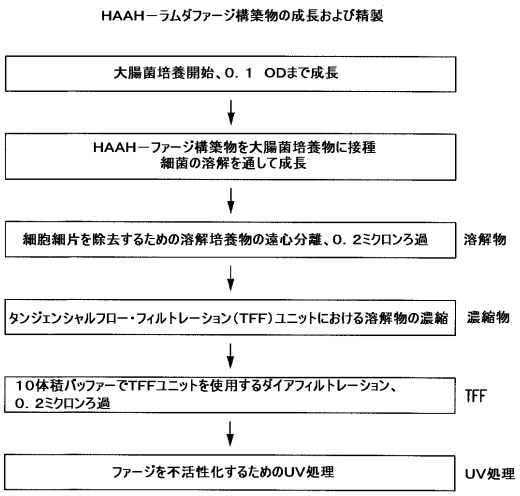


FIG. 7

【図１０】

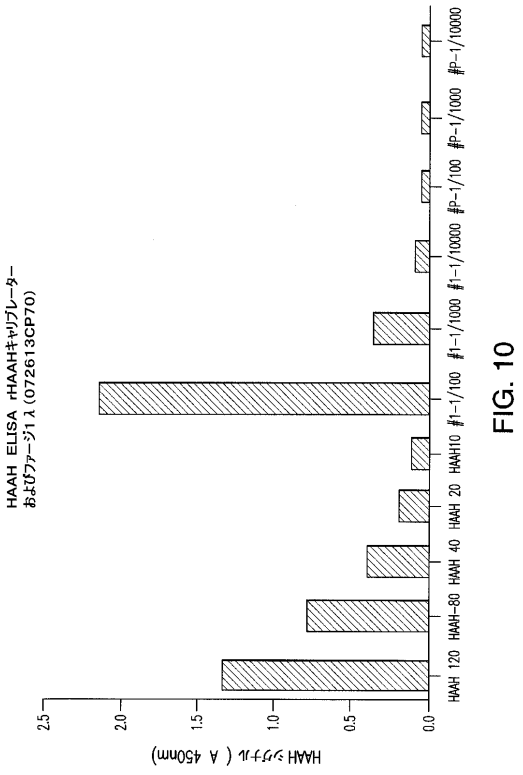


FIG. 10

【図１１】

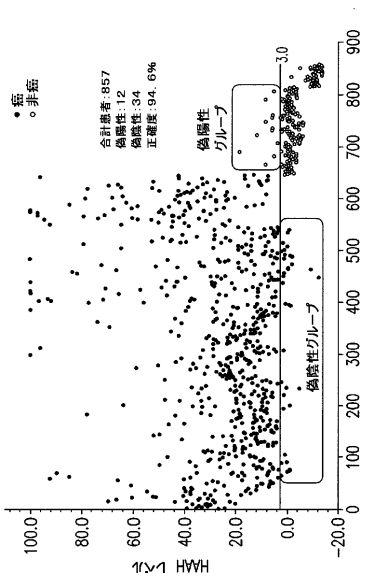


FIG. 11

【図１２】

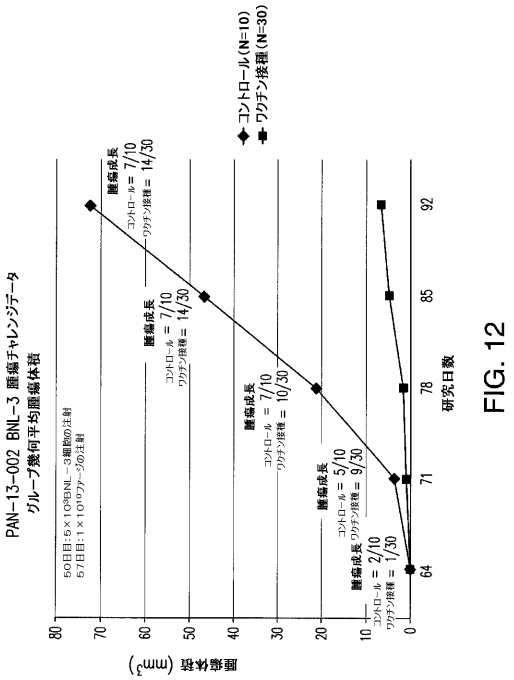


FIG. 12

【図１３】

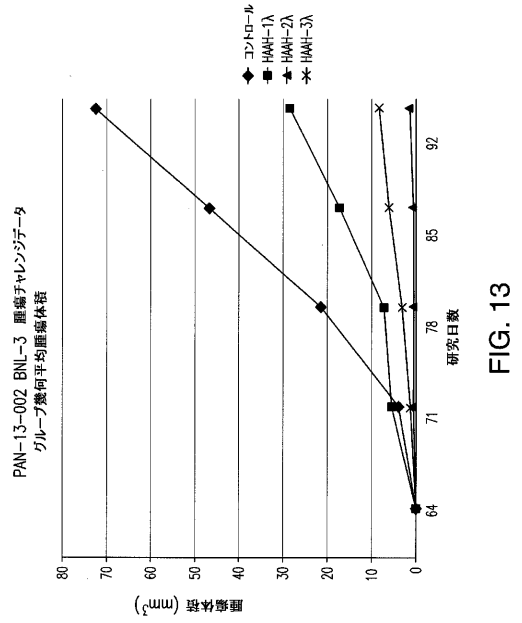


FIG. 13

【図１４】

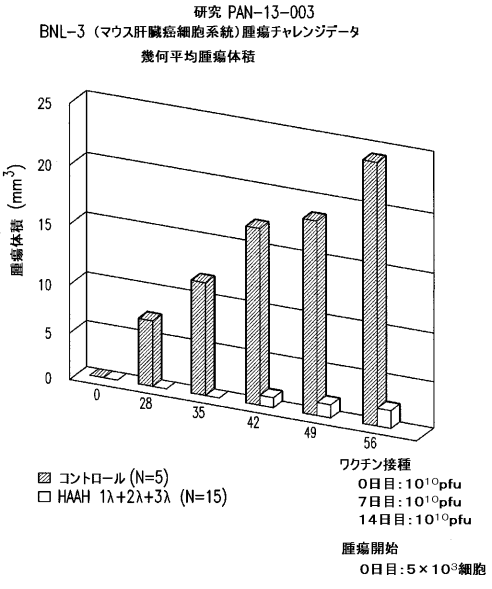
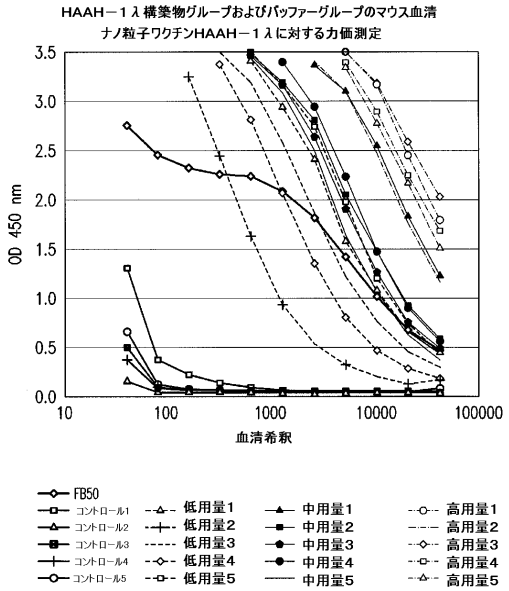


FIG. 14

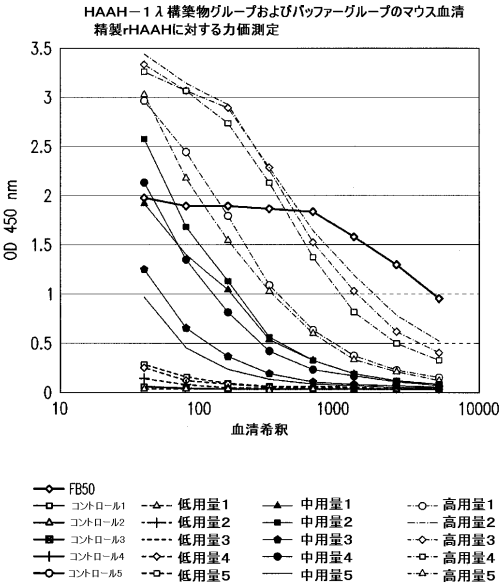
【図１５】



血清滴定:2倍段階希釈1／40で開始
コントロール＝バッファーコントロール
低用量＝HAAH－１λ、５×10E7 PFU
中用量＝HAAH－１λ、５×10E8 PFU
高用量＝HAAH－１λ、５×10E9 PFU
FB50モノクローナル抗体滴定5．0μg／mLで開始

FIG. 15

【図１６】



血清滴定:2倍段階希釈1／40で開始
コントロール＝バッファーコントロール
低用量＝HAAH－１λ、５×10E7 PFU
中用量＝HAAH－１λ、５×10E8 PFU
高用量＝HAAH－１λ、５×10E9 PFU
FB50滴定312．5ng／mLで開始

FIG. 16

【図１７】

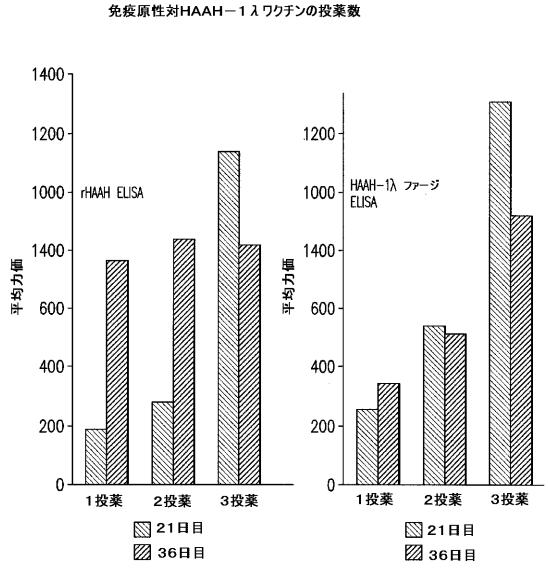


FIG. 17

【図１９】

Map HAAH－構築物 I

DRAMAQRKNAKSSGNSSSSGSGSGSTSAGSSSPGARRETKHGGHKNGRKG 50
GLSGTSFFTWFMVIALLGVWTSVAVVWFDLVDYEEVLGKLGIYDADGDGD 100
FDVDDAKVLLGLKERSTSEPAVPPEEAEPHTEPEEQVPVEAEPQNIEDEA 150
KEQIQSLLHEMVHAEHVEGEDLQQEDGPTGEPQQEDDEFLMATDVDDRFE 200
TLEPEVSHEETEHSYHVEETVSQDCNQDMEEMMSEQENPDSSEPVVEDER 250
LHHDTDDVTYQVYEEQAVYEPLENEGIEITEVTAPPEDNPVEDSQVIVEE 300
VSIFPVEEQQEVPP

Map HAAH－構築物 II

LDA 350
AEKLRKRGKIEEAVNAFKELVRKYPQSPRARYGKAQCEDDLAEKRRSNEV 400
LRGAIETYQEVASLPDVPADLLKLSLKRRSDRQQFLGHMRGSLLTLQRLV 450
QLFPNDTSLKNDLGVGYLLIGDNDNAKKVYEEVLSVTPNDGFAKVHYGFI 500
LKAQNKIAESIPYLKEGIESGDP

Map HAAH－構築物 III

GTDDGRFYFHLGDAMQRVGNKEAYKWY 550
ELGHKRGHFASVWQRSLYNVNGLKAQPWWTPKETGYTELVKSLERNWKLI 600
RDEGLAVMDKAKGLFLPEDENLREKGDWSQFTLWQQGRRNENACKGAPKT 650
CTLLEKFPETTGCRRGQIKYSIMHPGTHVWPHTGPTNCRLRMHLGLVIPK 700
EGCKIRCANETRTWEEGKVLIFDDSFEHEVWQDASSFRLIFIVDVWHPEL 750
TPQQRRSLPAI*HEFMQAWET

FIG. 19

【図８】

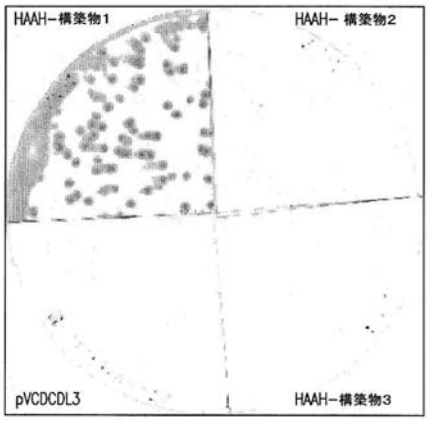


FIG. 8

【図９】

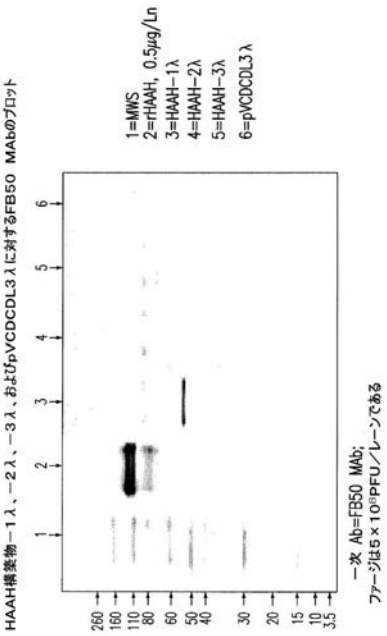


FIG. 9

【図１８】

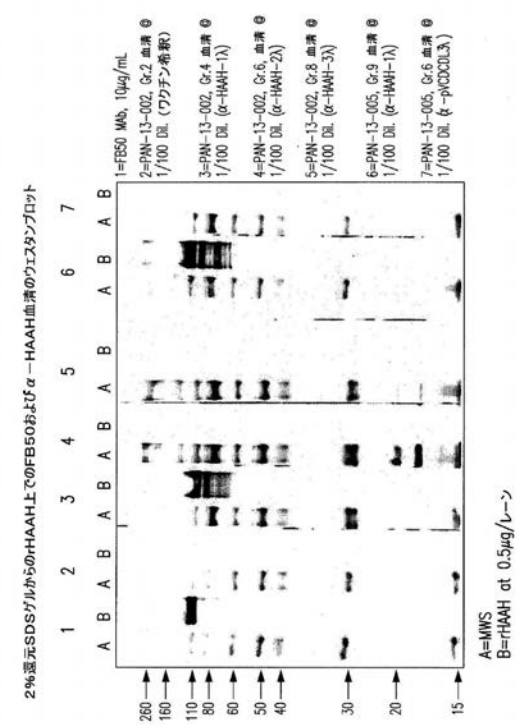


FIG. 18

【手続補正書】
【提出日】平成27年12月21日(2015.12.21)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2016520292000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US14/30551

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 7/00, 7/01; A01N 63/00 (2014.01)
USPC - 424/93.6, 93.1, 184.1; 435/235.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) Classification(s): C12N 7/00, 7/01; A01N 63/00 (2014.01)
USPC Classification(s): 424/93.6, 93.1, 184.1; 435/235.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google/Google Scholar; PubMed; ProQuest; bacteriophage, 'Aspartyl[Asparaginyl] -β-hydroxylase', HAAH, 'Amino acid sequence', gpD

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y — A	WO 2007/076101 A2 (MERRIL, C et al.) July 05, 2007; page 6, paragraphs 4-5; page 7, paragraph 2; page 12, paragraph 2; page 13, paragraph 2; page 16, paragraphs 1-2; page 17, paragraphs 3-4; Claims 1, 5; figures 4, 8	1, 5-7, 19 — 3, 8, 10, 12, 17, 18 — 2, 4, 9, 11, 14, 16, 20
Y — A	US 2005/0123545 A1 (WANDS, J et al.) June 09, 2005; abstract; Table 1	3, 10, 13, 15, 17, 18 — 2, 4, 9, 11, 14, 16, 20
Y	YANG, F et al. Novel Fold And Capsid-Binding Properties Of The λ-phage Display Platform Protein gpD. Nature Structural Biology. March 2000, Vol. 7, pp 230-237; figure 3b	8, 10, 12
Y	US 2005/0226892 A1 (RAO, VB) October 13, 2005; paragraphs [0038], [0057]	13, 15, 17, 18
A	DINCHUK, JE et al. Aspartyl b-Hydroxylase (Asph) and an Evolutionarily Conserved Isoform of Asph Missing the Catalytic Domain Share Exons with Junctin. The Journal of Biological Chemistry. 23 August 2000, Vol. 275, pp 39543–39554; figure 2; DOI10.1074/jbc.M006753200.	2, 4, 9, 11, 14, 16, 20
A	LAVAISSIERE, L et al. Overexpression Of Human Aspartyl(asparaginyl)beta-hydroxylase In Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma. NCBI GenBank Accession No. AAB50779.1, aspartyl(asparaginyl)beta-hydroxylase [Homo sapiens]. Submitted 1996; downloaded from the Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1911652?report=genbank&log$=protalign&blast_rank=1&RID=XGP8TSN8015> on 29 July 2014, pp 1-2.	2, 4, 9, 11, 14, 16, 20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 August 2014 (01.09.2014)	22 AUG 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　39/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ　48/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ　39/39	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/39		
Ａ６１Ｋ　39/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/12		
Ｃ１２Ｐ　33/06	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	33/06		

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人　230113332
弁護士　山本　健策
(72)発明者　ビスワス,　ビスワジット
アメリカ合衆国　メリーランド　２０８７４,　ジャーマンタウン,　オータム　トレイル　ドライブ　１３６０３
(72)発明者　メリル,　カール　アール.
アメリカ合衆国　メリーランド　２０８１７,　ベセスダ,　カプリ　プレイス　６８４０
(72)発明者　ガンバリ,　ホッセイン　エー.
アメリカ合衆国　メリーランド　２０８５４,　ポトマック,　トービン　サークル　９４６０

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 BA36 CA01 DA02 DA03 EA03 FA13 FA20 GA11 HA08 HA09
4B064 AG01 AG26 CA12 CA19 CC24 CE10 DA01 DA14
4B065 AA98X AB10 BA01 CA45
4C084 AA13 NA05 NA14 ZB05 ZB09 ZB26
4C085 AA03 AA38 BA51 BB01 CC08 CC21 DD62 EE01 EE06 GG01
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 NA05 NA14 ZB09 ZB26