

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成26年12月4日 (2014.12.4)

【公表番号】特表2011-525354(P2011-525354A)

【公表日】平成23年9月22日 (2011.9.22)

【年通号数】公開・登録公報2011-038

【出願番号】特願2011-514065(P2011-514065)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 51/00 (2006.01)

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

A 6 1 K 47/42 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 41/00 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 T 1/161 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 1 2 P 21/02 C

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 14/47

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 49/02 A

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/42

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 41/00

G 0 1 N 33/53 V

G 0 1 T 1/161 E

【誤訳訂正書】

【提出日】平成26年10月16日 (2014.10.16)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リボカリン(hNGAL)から選択されるタンパク質に由来するムテインであって、配列番号 1 に示される hNGAL の直鎖状ポリペプチド配列の配列位置 33、36、41、52、54、68、70、79、81、134、136、および 138 に対応する配列位置のうちのいずれかにおいて、少なくとも 11 の突然変異させたアミノ酸残基を含み、但し hNGAL の直鎖状ポリペプチド配列の配列位置 138 に対応する配列位置のアミノ酸残基は変異されており、検出可能なアフィニティーで所与の小分子である標的に結合するムテイン。

【請求項 2】

hNGAL の直鎖状ポリペプチド配列の配列位置 42、48、49、55、75、77、80、および 127 に対応する配列位置のうちのいずれかにおいて、少なくとも 1 つの突然変異させたアミノ酸残基をさらに含む、請求項 1 に記載のムテイン。

【請求項 3】

hNGAL の直鎖状ポリペプチド配列の配列位置 43、44、46、47、50、51、59、65、78、86、87、98、99、103、107、110、および 111 に対応する配列位置のうちのいずれかにおいて、少なくとも 1 つの突然変異させたアミノ酸残基をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載のムテイン。

【請求項 4】

hNGAL の野生型配列の配列位置 14、21、60、84、88、116、141、145、143、146、または 158 に対応する配列位置のうちの少なくとも 1 カ所において Cys 残基が導入される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項 5】

hNGAL の野生型配列の配列位置 65、71、73、74、116、125、および 135 に対応する配列位置のうちの少なくとも 1 カ所において、成熟 hNGAL の野生型アミノ酸配列に対してさらなるアミノ酸置換を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項 6】

有機低分子またはペプチドに結合する、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項 7】

有機低分子が、金属キレート化剤または薬剤である、請求項 6 に記載のムテイン。

【請求項 8】

突然変異させたアミノ酸が、Val33 Gln; Leu36 Arg; Ile41 Ala; Tyr52 Thr; Thr54 Gln; Ser68 Ala; Leu70 Arg; Trp79 Ala、Leu; Arg81 Met; Lys134 Ser; Thr136 Ser; および Tyr138 Leu からなる群から選択される、成熟 hNGAL の野生型アミノ酸配列に対して含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項 9】

Leu42 Pro、Pro48 Leu、Gln49 Leu、Ile55 Thr、Lys75 Met、Asp77 Glu、Ile80 Thr、および Ser127 Gln からなる群から選択されるアミノ酸置換を、成熟 hNGAL の野生型アミノ酸配列に対してさらに含む、請求項 8 に記載のムテイン。

【請求項 10】

Arg43 Pro、Glu44 Val、Glu44 Met、Lys46 Pro、Asp47 Glu、Lys50 Leu、Met51 Leu、Lys59 Arg、Asn65 Asp、Tyr78 His、Gly86 Ser、Ser87 Pro、Ser87 Phe、Lys98 Glu、Ser99 Asn、Leu103 Ile、Leu107 Phe、Val110 Met、および Val111 Ala からなる

群から選択されるアミノ酸置換を、成熟hNGALの野生型アミノ酸配列に対してさらに含む、請求項8または9に記載のムテイン。

【請求項11】

アミノ酸置換：

- (a) Val133 Gln; Leu36 Arg; Ile41 Ala; Tyr52 Thr; Thr54 Gln; Ser68 Ala; Leu70 Arg; Trp79 Ala; Ile80 Thr; Arg81 Met; Lys134 Ser; および Tyr138 Leu;
- (b) Val133 Gln; Leu36 Arg; Ile41 Ala; Tyr52 Thr; Thr54 Gln; Ser68 Ala; Leu70 Arg; Trp79 Leu; Ile80 Thr; Arg81 Met; Lys134 Ser; および Tyr138 Leu;
- (c) Val133 Gln; Leu36 Arg; Ile41 Ala; Tyr52 Thr; Thr54 Gln; Ser68 Ala; Leu70 Arg; Trp79 Leu; Ile80 Thr; Arg81 Met; Ser127 Gln; Lys134 Ser; および Tyr138 Leu;
- (d) Val133 Gln; Leu36 Arg; Ile41 Ala; Tyr52 Thr; Thr54 Gln; Ser68 Ala; Leu70 Arg; Trp79 Leu; Ile80 Thr; Arg81 Met; Lys134 Ser; Thr136 Ser; および Tyr138 Leu;
- (e) Val133 Gln; Leu36 Arg; Ile41 Ala; Tyr52 Thr; Thr54 Gln; Ser68 Ala; Leu70 Arg; Trp79 Leu; Ile80 Thr; Arg81 Met; Ser127 Gln; Lys134 Ser; Thr136 Ser; および Tyr138 Leu;
- (f) Val133 Gln; Leu36 Arg; Ile41 Ala; Tyr52 Thr; Thr54 Gln; Ser68 Ala; Leu70 Arg; Asp77 Glu; Trp79 Leu; Ile80 Thr; Arg81 Met; Ser127 Gln; Lys134 Ser; Thr136 Ser; および Tyr138 Leu;
- (g) Val133 Gln; Leu36 Arg; Ile41 Ala; Leu42 Pro; Pro48 Leu; Gln49 Leu; Tyr52 Thr; Thr54 Gln; Ile55 Thr; Ser68 Ala; Leu70 Arg; Lys75 Met; Asp77 Glu; Trp79 Leu; Ile80 Thr; Arg81 Met; Ser127 Gln; Lys134 Ser; Thr136 Ser; および Tyr138 Leu;
- (h) Val133 Gln; Leu36 Arg; Ile41 Ala; Leu42 Pro; Arg43 Pro; Glu44 Val; Lys46 Pro; Asp47 Glu; Pro48 Leu; Gln49 Leu; Lys50 Leu; Met51 Leu; Tyr52 Thr; Thr54 Gln; Ile55 Thr; Ser68 Ala; Leu70 Arg; Lys75 Met; Asp77 Glu; Trp79 Leu; Ile80 Thr; Arg81 Met; Ser127 Gln; Lys134 Ser; Thr136 Ser; および Tyr138 Leu;
- (i) Val133 Gln; Leu36 Arg; Ile41 Ala; Leu42 Pro; Arg43 Pro; Glu44 Val; Lys46 Pro; Asp47 Glu; Pro48 Leu; Gln49 Leu; Lys50 Leu; Met51 Leu; Tyr52 Thr; Thr54 Gln; Ile55 Thr; Asn65 Asp; Ser68 Ala; Leu70 Arg; Lys75 Met; Asp77 Glu; Trp79 Leu; Ile80 Thr; Arg81 Met; Lys98 Glu; Val110 Met; Ser127 Gln; Lys134 Ser; Thr136 Ser; および Tyr138 Leu;

(j) Val 33 Gln; Leu 36 Arg; Ile 41 Ala; Leu 42 Pro; Arg 43 Pro; Glu 44 Val; Lys 46 Pro; Asp 47 Glu; Pro 48 Leu; Gln 49 Leu; Lys 50 Leu; Met 51 Leu; Tyr 52 Thr; Thr 54 Gln; Ile 55 Thr; Asn 65 Asp; Ser 68 Ala; Leu 70 Arg; Lys 75 Met; Asp 77 Glu; Trp 79 Leu; Ile 80 Thr; Arg 81 Met; Gly 86 Ser; Ser 127 Gln; Lys 134 Ser; Thr 136 Ser; および Tyr 138 Leu;

(k) Val 33 Gln; Leu 36 Arg; Ile 41 Ala; Leu 42 Pro; Arg 43 Pro; Glu 44 Met; Lys 46 Pro; Asp 47 Glu; Pro 48 Leu; Gln 49 Leu; Lys 50 Leu; Met 51 Leu; Tyr 52 Thr; Thr 54 Gln; Ile 55 Thr; Asn 65 Asp; Ser 68 Ala; Leu 70 Arg; Lys 75 Met; Asp 77 Glu; Trp 79 Leu; Ile 80 Thr; Arg 81 Met; Gly 86 Ser; Ser 87 Pro; Ser 99 Asn; Leu 107 Phe; Ser 127 Gln; Lys 134 Ser; Thr 136 Ser; および Tyr 138 Leu;

(l) Val 33 Gln; Leu 36 Arg; Ile 41 Ala; Leu 42 Pro; Arg 43 Pro; Glu 44 Val; Lys 46 Pro; Asp 47 Glu; Pro 48 Leu; Gln 49 Leu; Lys 50 Leu; Met 51 Leu; Tyr 52 Thr; Thr 54 Gln; Ile 55 Thr; Lys 59 Arg; Asn 65 Asp; Ser 68 Ala; Leu 70 Arg; Lys 75 Met; Asp 77 Glu; Trp 79 Leu; Ile 80 Thr; Arg 81 Met; Ser 127 Gln; Lys 134 Ser; Thr 136 Ser; および Tyr 138 Leu;

(m) Val 33 Gln; Leu 36 Arg; Ile 41 Ala; Leu 42 Pro; Arg 43 Pro; Glu 44 Val; Lys 46 Pro; Asp 47 Glu; Pro 48 Leu; Gln 49 Leu; Lys 50 Leu; Met 51 Leu; Tyr 52 Thr; Thr 54 Gln; Ile 55 Thr; Asn 65 Asp; Ser 68 Ala; Leu 70 Arg; Lys 75 Met; Asp 77 Glu; Trp 79 Leu; Ile 80 Thr; Arg 81 Met; Ser 87 Phe; Ser 127 Gln; Lys 134 Ser; Thr 136 Ser; および Tyr 138 Leu; または

(n) Val 33 Gln; Leu 36 Arg; Ile 41 Ala; Leu 42 Pro; Arg 43 Pro; Glu 44 Val; Lys 46 Pro; Asp 47 Glu; Pro 48 Leu; Gln 49 Leu; Lys 50 Leu; Met 51 Leu; Tyr 52 Thr; Thr 54 Gln; Ile 55 Thr; Ser 68 Ala; Leu 70 Arg; Lys 75 Met; Asp 77 Glu; Tyr 78 His; Trp 79 Leu; Ile 80 Thr; Arg 81 Met; Leu 103 Ile; Leu 107 Phe; Val 111 Ala; Ser 127 Gln; Lys 134 Ser; Thr 136 Ser; および Tyr 138 Leu

を、成熟 hNGAL の野生型アミノ酸配列に対して含む、請求項 9 または 10 に記載のムテイン。

【請求項 12】

Glu 28 His、Cys 87 Ser、および Thr 145 Ala からなる群から選択されるアミノ酸置換を、成熟 hNGAL の野生型アミノ酸配列に対してさらに含む、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項 13】

選択される標的分子に対する結合アフィニティーでターゲティング部分とコンジュゲートされているか、あるいは、有機分子、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、発色

標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、金属錯体、金属、金コロイドからなる群から選択される標識にコンジュゲートされている、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項 14】

その N 末端および / またはその C 末端において、タンパク質、タンパク質ドメイン、またはペプチドと融合されているか、あるいは、その血清半減期を延長する部分とコンジュゲートされている、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項 15】

ムテインが、所与の 小分子である 標的に、 $1\ \mu\text{M}$ 以下、 $100\ \mu\text{M}$ 以下、 $1\ \mu\text{M}$ 以下、 $500\ \text{nM}$ 以下、 $200\ \text{nM}$ 以下、 $100\ \text{nM}$ 以下、 $50\ \text{nM}$ 以下、 $10\ \text{nM}$ 以下、または $1\ \text{nM}$ 以下の K_D により結合する、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項 16】

化合物を事前に選択された部位にターゲティングするための、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のムテインの使用であって、

(a) 前記ムテインを、前記化合物と接触させるステップと、

(b) 前記ムテイン / 標的複合体を、前記事前に選択された部位に送達するステップとを含む使用。

【請求項 17】

請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のムテインを含む診断用キットまたは解析用キット。

【請求項 18】

請求項 1 から 12、14、および 15 のいずれか一項に記載のムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の核酸分子を含有する宿主細胞。

【請求項 20】

請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のムテインを生成させる方法であって、

(a) h N G A L タンパク質をコードする核酸分子を、h N G A L の直鎖状ポリペプチド配列の配列位置 33、36、41、52、54、68、70、79、81、134、136、および 138 に対応する配列位置のうちの任意の少なくとも 11 カ所をコードするヌクレオチドトリプレットにおいて突然変異誘発にかける結果、1 または複数のムテイン核酸分子を得るステップ、但し h N G A L の直鎖状ポリペプチド配列の配列位置 138 に対応する配列位置のアミノ酸残基は変異されるステップと、

(b) 適切な発現系において、(a) で得られた 1 または複数のムテイン核酸分子を発現させるステップと、

(c) 選択および / または単離により、所与の 小分子である 標的に対する検出可能な結合アフィニティーを有する 1 または複数のムテインを濃縮するステップとを含む方法。

【請求項 21】

核酸分子を、h N G A L の直鎖状ポリペプチド配列の配列位置 42、48、49、55、75、77、80、および 127 に対応する配列位置のうちのいずれかをコードする、少なくとも 1 つのヌクレオチドトリプレットにおいて突然変異誘発にかけるステップをさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

核酸分子を、h N G A L の直鎖状ポリペプチド配列の配列位置 43、44、46、47、50、51、59、65、78、86、87、98、99、103、107、110、および 111 に対応する配列位置のうちのいずれかをコードする、少なくとも 1 つのヌクレオチドトリプレットにおいて突然変異誘発にかけるステップをさらに含む、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0012

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0012】

上記の参考文献で開示されるリボカリウムテインは、タンパク質様の標的高分子に優先的に結合するように選択され、小分子に結合するようには選択されていない。したがって、この分野でなされた進歩にもかかわらず、高度の結合アフィニティー、例えば、ナノモル範囲のアフィニティーで小分子に結合するように特異的に適合させたhNGALムテインが得られれば望ましいであろう。このようなムテインによれば、診断的適用および治療的適用におけるhNGALムテインの適性がさらに改善されるであろう。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0017

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0017】

核医学用ヒト化抗体の主要な障害は、循環時間が長いことであり、これにより、RITにおける造影コントラストが低下し、腫瘍特異性が制約される。この問題を回避するため、キレート化された放射性核種から、腫瘍ターゲティング抗体を結合解除する、いわゆるプレターゲティング戦略が開発されている（Changら（2002年）、*Mol. Cancer Ther.*、1巻、553～563頁）。これにより、第1段階における、抗体による位置特定および循環からのクリアランスという緩徐な過程の後、第2段階において、小分子の放射性積載物の迅速かつ特異的な送達が可能となる。まず、ビオチニル化された放射性核種のキレートと共に、抗体-スト렙トアビジンコンジュゲートを適用し、その後、エピトープペプチドとコンジュゲートしたキレート錯体と共に、二特異性抗体を適用した。さらに、金属キレートに直接的に結合しうるモノクローナル抗体が開発された（Le Doussalら（1990年）、*Cancer Res.*、50巻、3445～3452頁；Corneillieら（2003年）、*J. Am. Chem. Soc.*、125巻、3436～3437頁；Corneillieら（2003年）、*J. Am. Chem. Soc.*、125巻、15039～15048頁）。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0018

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0018】

しかし、理想的な系となると、遺伝子融合戦略を用いて、ターゲティングペプチド/タンパク質のモジュール（例えば、天然の受容体リガンド、抗体フラグメント（KenanovaおよびWu、前出）、または代替的な結合タンパク質（Skerra（2007年）、*Curr. Opin. Biotechnol.*、18巻、295～304頁；Skerra（2007年）、*Curr. Opin. Mol. Ther.*、9巻、336～344頁）に容易に結合させうる、頑健な折り畳み特性を有する単一のポリペプチド鎖を含む、小分子金属キレート（small metal chelate）に特異的な結合タンパク質であろう。hNGAL、ラット₂ミクログロブリン類縁タンパク質（A2m）、およびマウス24p3/ウテロカリン（24p3）のムテインは、このような標的小分子に対する高度の結合アフィニティーを有する、このようなタンパク質を提供する。

【誤訳訂正5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0020

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0020】

所与の標的は、任意の所望の非天然標的／リガンドでありうる。「非天然リガンド」という用語は、生理学的条件下においては天然の成熟 h N G A L に結合しない、任意の化合物を指す。標的（リガンド）は、免疫学的ハプテン、例えば、金属キレート化剤などの有機小分子、または、例えば、2～約25、もしくは約30、もしくは約35アミノ酸の長さのペプチド（下記を参照されたい）の特徴を示す、遊離形態またはコンジュゲート形態にある任意の化合物でありうる。

【誤訳訂正6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0021

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0021】

本明細書で用いられる「有機分子」または「有機小分子」という用語は、少なくとも2つの炭素原子を含むが、7または12以下の回転可能な炭素結合を含むことが好ましく、分子量が100～2000ドルトン、好ましくは100～1000ドルトンの範囲にあり、また場合によって、1つまたは2つの金属原子を包含する有機分子を指す。

【誤訳訂正7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0033

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0033】

本発明の一実施形態によれば、ムテインは、有機小分子に結合する。有機小分子は、金属キレート化剤の場合もあり、金属キレート化剤を含有するカルボキシ基またはアミノ基などの薬剤の場合もある。このようなキレート化剤の非限定的な例は、少数の例示的な例だけを挙げれば、エチレン-ジアミン-四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、1,4,7,10-テトラ-アザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸（DOTA）、または2-メチル-6-(p-イソチオシアナトベンジル)-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（1B4M-DOTA）、2-(p-イソチオシアナトベンジル)-5,6-シクロヘキサノ-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（CHX-DOTA）、2-(p-イソチオシアナトベンジル)-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（C-DOTA）、および1,4,7,10-テトラアザ-N-(1-カルボキシ-3-(4-ニトロフェニル)プロピル)-N',N'',N'''-トリス(酢酸)シクロドデカン（PA-DOTA）など、これらの誘導体（例えば、Chappell, L, 「Synthesis and evaluation of novel bifunctional chelating agents based on 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid for radiolabeling proteins」、Nuclear Medicine and Biology、30巻、6号、581～595頁を参照されたい）である。DTPA、DOTA、またはこれらの誘導体は、例えば、イットリウム（Y）、テルビウム（Tb）、インジウム（In）、ルテチウム（Lu）、およびビスマス（Bi）からなる群から選択される金属イオンと錯化しうる。DTPA誘導体は、例えば、米国特許第5,124,471号、同第5,286,850号、同第5,434,287号で説明される、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）系列のアミノ酸を含めたシクロヘキシル-DTPAでありうる。本発明のムテインにより結合されうるキレート化剤の別の例は、米国特許第

【 0 0 3 5 】

【 0 0 5 6 】

一般に、本明細書に記載の h N G A L ムテインを、化学反応、物理反応、光学反応、または酵素反応において検出可能な化合物またはシグナルを直接的または間接的に発生させる、任意の適切な化学物質または酵素により標識することが可能である。物理反応であり、また、同時に光学反応 / マーカーでもある例は、照射時における蛍光の発光である。アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、または - ガラクトシダーゼが、発色反応生成物の形成を触媒する酵素標識（また、同時に、光学標識）の例である。一般に、抗体に対して広く用いられるすべての標識（もっぱら、免疫グロブリンの F c 部分における糖部分と共に用いられる標識を除く）もまた、本発明のムテインに対するコンジュゲーションに用いることができる。本発明のムテインはまた、例えば、所与の細胞、組織、もしくは内臓に対する治療的に活性な薬剤の標的送達に適するか、または、細胞の選択的ターゲティング、例えば、周囲の正常細胞に影響を与えない、腫瘍細胞の選択的ターゲティングに適する、任意のこのような薬剤ともコンジュゲートさせることができる。このような治療的に活性な薬剤の例には、放射性核種、毒素、有機小分子、および治療用ペプチド（細胞表面受容体のアゴニスト / アンタゴニストとして作用するペプチド、または所与の細胞標的上におけるタンパク質結合部位について競合するペプチドなど）が含まれる。適切な毒素の例には、百日咳毒素、ジフテリア毒素、リシン、サボリン、シュードモナス属外毒素、カリチアマイシンもしくはその誘導体、タキソイド、メイタンシノイド、ツブリシン、またはドラスタチン類似体が含まれるがこれらに限定されない。ドラスタチン類似体は、アウリスタチン E、モノメチルアウリスタチン E、アウリスタチン P Y E、およびアウリスタチン P H E でありうる。細胞増殖抑制剤の例には、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、5 - フルオロウラシル、タキソテル（ドセタキセル）、バクリタキセル、アントラサイクリン（ドキソルピシン）、メトトレキサート、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、ダカルバジン、シクロホスファミド、エトポシド、アドリアマイシン、カンプトテシン、コンブレタスタチン A -

4 類縁化合物、スルホンアミド、オキサジアゾリン、ベンゾ[b]チオフェン、合成スピロケタールピラン、モノテトラヒドロフラン化合物、キュラシンおよびキュラシン誘導体、メトキシエストラジオール誘導体、およびレウコボリンが含まれるが、これらに限定されない。本発明のリボカリンムテインはまた、アンチセンスの核酸分子、小分子干渉RNA、マイクロRNA、またはリボザイムなど、治療的に活性な核酸ともコンジュゲートさせることができる。このようなコンジュゲートは、当技術分野でよく知られる方法により產生することができる。

【誤訳訂正 1 0】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 0 3

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 0 3】

本発明の具体的な実施形態において、リガンドは、金属キレート化剤など、有機小分子でありうる。

【誤訳訂正 1 1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 4 9

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 4 9】

【図 1】h N G A L についてデザインされるランダムライブラリーの概略表示と併せて、エンテロバクチンと複合体化されたh N G A L の 3 次元構造を示す図である。

【図 2】Me・D T P A 結合活性を有するh N G A L 変異体の特性を示す図である。

【図 3】Me・D T P A 結合活性を有するh N G A L 変異体の結晶構造を示す図である。

【図 4】放射免疫療法またはi n v i v o イメージングのプレターゲティングに、Me・D T P A 結合活性を有するh N G A L 変異体を適用する可能性を示す図である。

【図 1 A】エンテロバクチンと複合体化されたヒトh N G A L (P D B エントリー: 1 L 6 M、鎖 A、完全リガンドを含有する; R o l a n d S t r o n g 博士のご厚意による) の 3 次元構造を示す図である。ポリペプチド骨格をライトグレーのリボンとして示す一方、天然リガンドを黒色で示す。初期「天然」ライブラリーにおいてランダム化された側鎖は、グレーで示す。

【図 1 B】1 2 のアミノ酸位置 3 3、3 6、4 1、5 2、5 4、6 8、7 0、7 9、8 1、1 3 4、1 3 6、および 1 3 8 に対し、同時的なランダム突然変異誘発を行うためのアセンブリー P C R 戦略の概略表示を示す図である。フラグメント (a) をもたらす縮重オリゴデオキシヌクレオチド P 1 および P 2、また、フラグメント (b) をもたらす縮重プライマー P 3 および P 4 と共に、N G A L の構造遺伝子を、P C R における鋳型として用いた。ランダム化された位置を、明色のバーで示す。両方のフラグメントを単離し、組み合わせ、P C R プライマー P 5 および P 6 により実施される次の増幅において適用した。2 つの異なる B s t X I 制限部位を、ファージディスプレイのためのプラスミドベクターである p N G A L 3 5 上において遺伝子カセットをサブクローニングするのに用いた。

【図 2】Me・D T P A 結合活性を有するh N G A L 変異体の特性を示す図である。

【図 2 A】S t r e p タグ I I によるアフィニティー精製およびゲル濾過後における、組換えによる野生型h N G A L (レーン 1、4)、および変異体 T b 7、N 9 (レーン 2、5) のほか、C 2 6 (レーン 3、6) に対する S D S - P A G E 解析を示す図である。レーン 1 ~ 3 は、2 - メルカプトエタノールにより還元された試料を示す。非還元性条件下において、電気泳動の運動性がわずかながら増強されたことは、各場合において一重のジスルフィド結合が適正に形成されていることを示す。

【図 2 B】E L I S A における結合活性を示す図である。S t r e p タグ I I に対して特

異的な抗体により捕捉された精製 h N G A L 変異体によりマイクロ滴定プレートにコーティングし、Y・D T P A - D I G (小分子) コンジュゲートの希釈系列と共にインキュベートした後で、抗 D I G F a b / A P および p N P P 基質により検出した (シグナル強度は、m O D / 分単位で与えられる)。このアッセイにおいて、組換えによる野生型 h N G A L が示したシグナルは、無視できるものであった (図示しない)。最後の成熟ステップに由来する h N G A L 変異体である C 2 6 (挿入図を参照されたい) は、著明な低密度 (2.5 対 10 μ g / ml の捕捉抗体濃度による、100 対 250 nM) で固定化したことに留意されたい。

【図 2 C】競合 E L I S A における h N G A L 変異体 C 2 6 の金属キレート結合活性を示す図である。この E L I S A のセットアップは、パネル (B) で示したセットアップと同様であったが、可変濃度の遊離 Me・B n - C H X - A ' ' - D T P A - トリスキレート錯体、または (比較としての) F e ³⁺・エンテロバクチンの存在下におけるトレーサーとして、固定濃度の Y・D T P A - R N アーゼ - D I G (タンパク質) コンジュゲートを用いた。

【図 2 D】B i a c o r e 測定器上で測定された、h N G A L 変異体 C 2 6 についての、リアルタイムにおける反応速度解析を示す図である。アミン化学反応により、Y・D T P A - R N アーゼコンジュゲートを、C M 5 センサーチップに結合させ (R U = 240)、様々な濃度で、精製された h N G A L 変異体 C 2 6 を適用した。各場合において、測定されたシグナルをグレーの線で示す一方、曲線近似は黒色の線で示す。この曲線セットから決定される反応速度定数を、表 3 に列挙する (実施例 13)。

【図 2 E】流速 25 μ l / 分の B i a c o r e 測定器上で測定された、h N G A L 変異体 C L 3 1 についての、リアルタイムにおける反応速度解析を示す図である。アミン化学反応により、Y・D T P A - R N アーゼコンジュゲートを、C M 5 センサーチップに結合させ (R U = 300)、表示される様々な濃度で、精製された h N G A L 変異体 C L 3 1 を適用した。各場合において、測定されたシグナルをグレーの線で示す一方、曲線近似は黒色の線で示す。

【図 3】ポリペプチド骨格を有する、Y・D T P A - トリスキレートと複合体化させた h N G A L 変異体 T b 7 . N 9 の結晶構造を、ライトグレーのリボンとして示す一方、結合した Y ³⁺・D T P A リガンドは、2 F_o - F_c 電子密度 (配位子である D T P A、および Y ³⁺ に配位する 1 つの水分子の周囲の 1 軌道、ならびに Y ³⁺ イオンの周囲の 4 軌道を輪郭とする) を含めた黒色のスティックによるモデルとして示す。結合した金属キレート錯体との接触距離である半径 4 Å 以内に、8 本のストランド各々において少なくとも 1 つずつの、全体で 15 の残基: G l n 33、A r g 36、T h r 52、G l n 54、V a l 66、A l a 68、A r g 70、A s p 77、T y r 78 (骨格を介してだけ)、L e u 79、M e t 81、P h e 83、T y r 106、P h e 123、および T h r 136 が見出されている。これらの残基の側鎖は、残基 S e r 134、および金属に結合する水への架橋を形成する、水素結合した水分子と共に、グレーのスティックとして示す。

【図 4】放射免疫療法または i n v i v o イメージングのプレターゲットングに、Me・D T P A 結合活性を有する h N G A L 変異体を適用する可能性を示す図である。図 4 (A) は、(i) 本発明による、Me・D T P A 結合活性を有する N G A L ムテイン (黒色)、および (ii) 腫瘍標的に対する特異性を有する、抗体 / フラグメント、または代替的な結合タンパク質 (例えば、別のリポカリンムテイン) を含む、二特異性融合タンパク質またはコンジュゲートが、血流に適用されることを示す。図 4 (B) は、融合タンパク質が腫瘍において蓄積される一方で、結合しなかった融合タンパク質は腎臓を経て消失することを示す。図 4 (C) : 放射性核種 - D T P A 複合体を血流に適用することを示す図である。図 4 (D) : 放射性核種 - D T P A 複合体に、腫瘍に結合した融合タンパク質が結合する一方で、過剰な複合体は腎臓により迅速に排出されることを示す図である。図 4 (E) : 結合した放射性核種の局所的な崩壊により、腫瘍内における効果的な細胞死がもたらされ、また、バースタング効果も活用されることを示す図である。図 4 (D') : Me・D T P A 複合体の 2 価性を適用することにより、アビディティー効果を介して腫瘍

部位においてより堅固な結合がもたらされ、これにより、放射性核種の半減期の延長が可能となることを示す図である。

【誤訳訂正 1 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 6 0

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 6 0】

ある程度のアフィニティー成熟ステップを行うため、突然変異誘発させた h N G A L ライブラリーをコロニースクリーンに直接適用したが、T b / Y · D T P A - R N アーゼ - D I G コンジュゲートの濃度を、5 0 n M から 5 n M に低下させることにより、厳密性を上昇させる条件下において行った。厳密性をさらに上昇させるため、2 0 n M ~ 1 n M の濃度において、厳密に 1 価の T b / Y · D T P A - D I G 小分子コンジュゲートを適用した。最後に、第 2 の膜を、まず、1 0 n M Y · D T P A - D I G と共に 1 時間にわたり、また、次いで、P B S / T による 3 回にわたる洗浄後において、1 0 μ M の遊離錯体である Y · p - N H ₂ - B n - C H X - A ' ' - D T P A と共にインキュベートした後、上記の通り、洗浄、検出、および染色することにより、競合コロニースクリーンを実施した。

【誤訳訂正 1 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 7 8

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 7 8】

この戦略であれば、リガンドとしての昆虫リボカリンおよび有機分子について既に示された (B e s t e ら、前出 ; S c h l e h u b e r ら、前出) のと同様に、リガンドポケットを効果的に再整形して、より 小分子 の D T P A 金属キレート錯体 (smaller DTPA metal chelate complex) に対する新たな特異性を達成すると予測できるだろう。

【誤訳訂正 1 4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 9 1

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 9 1】

T b ³⁺ および Y ³⁺ のほか、他の 3 価金属イオンも用いて、遊離リガンド競合物質としての T b · D T P A - R N アーゼおよび M e · p - N H ₂ - B n - C H X - A ' ' - D T P A によりコーティングしたマイクロ滴定プレートを用いる競合 E L I S A において、小分子 の可溶性キレートリガンド (small soluble chelate ligand) に対する h N G A L 変異体の結合活性をさらに調べた。これらの測定は、T b ³⁺ / Y ³⁺ により帯電させたキレート複合体、とりわけ、アフィニティー成熟から得られる変異体 T b 7 . N 9、Y d 5、および C 2 6 の場合に、良好な阻害曲線を示した。これに対し、固定化されたりガンドに対する T b 7 の結合活性は、適正な競合効果をもたらすにはおそらく低度に過ぎた。最後の変異体である C 2 6 は、異なる金属イオンを用いてより完全に解析された (図 2 C)。遊離金属キレートの 5 0 % 最大濃度から推定されるその K_D 値は、2 . 7 ± 0 . 0 3 n M (Y ³⁺)、3 . 6 ± 0 . 2 4 n M (G d ³⁺)、2 . 9 ± 0 . 1 7 n M (T b ³⁺)、9 . 4 ± 0 . 3 3 n M (L u ³⁺)、4 4 . 7 ± 2 . 5 n M (I n ³⁺)、および 9 5 ± 7 n M (B i ³⁺) であった。したがって、操作された h N G A L 変異体、とりわけ C 2 6 が、小分子 の金属キレートリガンドに対して強力な結合活性を示すのに対し、選択時におけるキャリアータンパク質として用いられた R N アーゼの関連は、さほどの役割を果たさない。

【誤訳訂正 1 5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0196

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0196】

予測されるキラリティーを示す電子密度により良好に定義される (Brechbiel および Gansow (1992 年)、J. Chem. Soc. Perkin Trans、1 巻、1173 ~ 1178 頁)、配位子の DTPA 部分は、 In^{3+} ・DTPA 錯体の 小分子結晶構造において既に見られている (Maeckeら (1989 年)、J. Nucl. Med.、30 巻、1235 ~ 1239 頁) のと同様に、金属イオンが、捕捉された野球ボールを表す、野球グラブとして説明することができる。 Y^{3+} イオンには、9 つの原子が配位している。それらのうちの 8 つが、8 座のキレート化配位子に由来し、5 つがそのカルボン酸酸素 (距離 2.3 ~ 2.5) に由来し、3 つがそのアミン窒素 (距離 2.5 ~ 2.7) に由来するのに対し、1 つは、結合水の酸素 (距離約 2.7) である。天然の hNGAL エンテロバクチン複合体の場合と同様、金属イオンとタンパク質側鎖の間には、直接の配位的接触が存在するわけではない。該 DTPA 誘導体のベンジル側鎖から突出するチオ尿素基と、コンジュゲートしたトリス部分とは、リボカリンの裂け目の外側に配向する。チオ尿素基の原子 N4 と、Asp77 の 2 つのカルボン酸酸素との間には、2 つの水素結合が存在する (OD1: 距離 3.4; OD2: 距離 2.9)。末端のトリスヒドロキシメチル基は、電子密度において部分的に定義されるに過ぎない (図 3)。