

【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18年10月19日(2006.10.19)

【公表番号】特表2005-537032(P2005-537032A)

【公表日】平成17年12月8日(2005.12.8)

【年通号数】公開・登録公報2005-048

【出願番号】特願2004-569756(P2004-569756)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/08 (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 9/00 (2006.01)

C 1 2 N 9/50 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 38/43 (2006.01)

A 6 1 K 38/46 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 37/08

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 9/00

C 1 2 N 9/50

C 1 2 N 5/00 A

A 6 1 K 37/48

A 6 1 K 37/54

【手続補正書】

【提出日】平成18年8月28日(2006.8.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

基質を酵素的に変化させるためのアドザイムであって、該アドザイムは、該基質を一つまたは複数の産物に変換する化学反応を触媒する触媒ドメインと、該基質上のアドレス部位または基質の機能する近傍に生ずる第二の分子上のアドレス部位と可逆的に結合する標的化部分とを含み、ここで、

該標的化部分と該触媒ドメインは、相互に対し異種であり、

該標的化部分は、単独で与えられた場合、基質に結合し、

該触媒ドメインは、単独で与えられた場合、該基質を一つまたは複数の産物に変換する化学反応を触媒し、かつ

該アドザイムは、該基質との反応に関して、(a) 触媒ドメインまたは標的化部分単独よりも少なくとも2倍高い効力；(b) $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ またはそれ以上の k_{on} ；(c) 0.1 sec^{-1} またはそれ以上の k_{cat} ；(d) 触媒ドメインの K_m よりも少なくとも5倍低い K_D ；(e) 10^{-4} sec^{-1} またはそれ以上の k_{off} 、(f) 触媒ドメイン単独の触媒効率よりも少なくとも5倍高い触媒効率、(g) 触媒ドメイン単独の K_m よりも少なくとも5倍低い K_m 、および/または(h) 実際の基質濃度よりも少なくとも5倍高い有効基質濃度のうちの一つまたは複数の特性を有する、アドザイム。

【請求項2】

基質を酵素的に変化させるためのアドザイムであって、該アドザイムは、該基質を一つまたは複数の産物に変換する化学反応を触媒する触媒ドメインと、該基質上のアドレス部位または基質の機能する近傍に生ずる第二の分子上のアドレス部位と可逆的に結合する標的化部分とを含み、ここで、

該基質は細胞外シグナル伝達分子であり、

該標的化部分と該触媒ドメインは、相互に対し異種であり、

該標的化部分は、単独で与えられた場合、基質に結合し、

該触媒ドメインは、単独で与えられた場合、該基質を一つまたは複数の産物に変換する化学反応を触媒し、かつ

該アドザイムは、該基質との反応に関して、該触媒ドメインまたは標的化部分よりも効力がある、アドザイム。

【請求項3】

基質を酵素的に変化させるためのアドザイムであって、該アドザイムは、該基質を一つまたは複数の産物に変換する化学反応を触媒する触媒ドメインと、該基質上のアドレス部位または基質の機能する近傍に生ずる第二の分子上のアドレス部位と可逆的に結合する標的化ドメインと、該触媒ドメインと該標的化ドメインとを連結するリンカーとを含むポリペプチドを含み、ここで、

該基質は受容体であり、

該標的化部分と該触媒ドメインは、相互に対し異種であり、

該標的化ドメインは、単独で与えられた場合、基質に結合し、

該触媒ドメインは、単独で与えられた場合、該基質を一つまたは複数の産物に変換する化学反応を触媒し、かつ

該アドザイムは、該基質との反応に関して、該触媒ドメインまたは標的化部分よりも効力がある、アドザイム。

【請求項4】

基質を酵素的に変化させるためのアドザイムであって、該アドザイムは、該基質を一つまたは複数の産物に変換する化学反応を触媒する触媒ドメインと、該基質上のアドレス部位または基質の機能する近傍に生ずる第二の分子上のアドレス部位と可逆的に結合する標的化部分とを含み、ここで、該産物の一つまたは複数が、該基質の活性のアンタゴニストとなる、アドザイム。

【請求項5】

基質を酵素的に変化させるためのアドザイムであって、該アドザイムは、該基質の少なくとも一つのペプチド結合を切断して、一つまたは複数の産物を生成する触媒ドメインと、該基質上のアドレス部位または基質の機能する近傍に生ずる第二の分子上のアドレス部位と可逆的に結合するポリペプチド標的化ドメインとを含み、ここで、

該アドザイムは、触媒ドメインによる切断に抵抗性であり、

該標的化部分は、単独で与えられた場合、基質に結合し、

該触媒ドメインは、単独で与えられた場合、該基質の少なくとも一つのペプチド結合を切断して、一つまたは複数の産物を生成し、かつ

該アドザイムは、該基質との反応に関して、該触媒ドメインまたは標的化部分よりも効力がある、アドザイム。

【請求項6】

基質を酵素的に変化させるためのアドザイムであって、該アドザイムは、該基質を一つまたは複数の産物に変換する化学反応を触媒する触媒ドメインと、該基質上のアドレス部位または基質の機能する近傍に生ずる第二の分子上のアドレス部位と可逆的に結合する標的化ドメインと、該触媒ドメインと該標的化ドメインとを連結するリンカーとを含むポリペプチドを含み、ここで、

該基質は細胞外シグナル伝達ポリペプチド分子であり、

該標的化部分と該触媒ドメインは、相互に対し異種であり、

該標的化ドメインは、単独で与えられた場合、該基質に結合し、

該触媒ドメインは、単独で与えられた場合、該基質を一つまたは複数の産物に変換する化学反応を触媒し、かつ

該アドザイムは、該基質との反応に関して、該触媒ドメインまたは標的化部分よりも効力がある、アドザイム。

【請求項 7】

基質はヒト患者に内在する、請求項 1～6のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項 8】

基質に対するアドザイムの効果は、生理学的レベルの豊富なヒト血清タンパク質が存在する場合に標的分子に対して効果的である、請求項 7記載のアドザイム。

【請求項 9】

豊富なヒト血清タンパク質はヒト血清アルブミンである、請求項 8記載のアドザイム。

【請求項 10】

基質との反応に関して、(a) 触媒ドメインまたは標的化部分単独よりも少なくとも2倍高い効力；(b) $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ またはそれ以上の k_{on} ；(c) 0.1 sec^{-1} またはそれ以上の k_{cat} ；(d) 触媒ドメインの K_m よりも少なくとも5倍低い K_D ；(e) 10^{-4} sec^{-1} またはそれ以上の k_{off} ；(f) 触媒ドメイン単独の触媒効率よりも少なくとも5倍高い触媒効率、(g) 触媒ドメイン単独の K_m よりも少なくとも5倍低い K_m 、および/または(h) 実際の基質濃度よりも少なくとも5倍高い有効基質濃度のうちの一つまたは複数の特性を有する、請求項 2～6のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項 11】

融合タンパク質である、請求項 1、2、4または5のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項 12】

融合タンパク質は、触媒ドメインと標的化部分との間にリンカーを含む、請求項 11記載のアドザイム。

【請求項 13】

リンカーは、アドザイムが基質との反応に関して、触媒ドメインまたは標的化部分よりも強力であるような触媒ドメインと標的化部分との間の立体構造を与えるように選択される、請求項 11記載のアドザイム。

【請求項 14】

基質は細胞により産生される生体分子である、請求項 1、4または5記載のアドザイム。

【請求項 15】

基質はポリペプチドである、請求項 1～5のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項 16】

基質はポリサッカライド、核酸、脂質、または小分子である、請求項 1、4または5記載のアドザイム。

【請求項 17】

基質は拡散性の細胞外分子である、請求項 1、4または5のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項 18】

細胞外シグナル伝達分子は、インターロイキン-1およびTNF- α の中から選択される、請求項 17記載のアドザイム。

【請求項 19】

細胞外分子は、細胞表面受容体に結合し、受容体を介した細胞シグナル伝達を誘発する、請求項17記載のアドザイム。

【請求項20】

基質はポリペプチドを含み、触媒ドメインは、基質の少なくとも一つのペプチド結合を切断するプロテアーゼである、請求項1、2、4または5のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項21】

アドザイムは触媒ドメインによる切断に抵抗性である、請求項20記載のアドザイム。

【請求項22】

プロテアーゼは酵素前駆体である、請求項20記載のアドザイム。

【請求項23】

可逆的プロテアーゼ阻害剤の存在下で細胞培養物から精製される、請求項20記載のアドザイム。

【請求項24】

触媒ドメインは、ポリペプチド基質の翻訳後修飾のレベルを変化させる、請求項15記載のアドザイム。

【請求項25】

翻訳後修飾は、グリコシル化、リン酸化、硫酸化、脂肪酸修飾、アルキル化、プレニル化およびアシル化からなる群より選択される、請求項24記載のアドザイム。

【請求項26】

触媒ドメインは、プロテアーゼ、エステラーゼ、アミダーゼ、ラクタマーゼ、セルラーゼ、オキシダーゼ、オキシドレダクターゼ、レダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、スルファターゼ、リゾチーム、グリコシダーゼ、ヌクレアーゼ、アルドラーゼ、クトラーゼ、リアーゼ、シクラーゼ、リバーシ・トランスクリプターゼ、ヒアルロニダーゼ、アミラーゼ、セレブロシダーゼおよびキチナーゼからなる群より選択される、請求項1、2、4または5のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項27】

自己触媒反応に抵抗性である、請求項1～6のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項28】

被検体に投与される溶液中のアドザイム濃度にほぼ等しいアドザイム濃度で自己触媒反応に抵抗性である、請求項27記載のアドザイム。

【請求項29】

生体分子の半減期をインビボで変化させるか、生体分子の分布をインビボで変化させるか、該生体分子の生物活性を減少させるか、または該生体分子の結合特異性を変化させる、請求項14記載のアドザイム。

【請求項30】

他の分子との生体分子の相互作用をインビボで変化させる、請求項14記載のアドザイム。

【請求項31】

受容体-リガンド相互作用、タンパク質-タンパク質相互作用およびDNA-タンパク質相互作用のうちの一つまたは複数を変化させる、請求項30記載のアドザイム。

【請求項32】

受容体を介したまたはイオンチャネルを介したシグナル伝達を減少させる、請求項14記載のアドザイム。

【請求項33】

細胞の増殖、分化または生存度をインビボでまたはインビトロで変化させる、請求項14記載のアドザイム。

【請求項34】

化学反応の産物が、基質のアンタゴニストとなる、請求項1～3、5または6のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項 35】

化学反応の産物は、基質に対してさらに高い生物活性を有する、請求項1～3、5または6のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項 36】

生体分子に固有の酵素活性を変化させる、請求項14記載のアドザイム。

【請求項 37】

基質はポリペプチドである、請求項1、2、4、または5記載のアドザイム。

【請求項 38】

ポリペプチドは、動物の体液中に存在する、請求項37記載のアドザイム。

【請求項 39】

体液は血液またはリンパ液である、請求項38記載のアドザイム。

【請求項 40】

ポリペプチド基質は、ポリペプチドホルモン、成長因子および/またはサイトカインである、請求項37記載のアドザイム。

【請求項 41】

ポリペプチド因子は、4本ヘリックスバンドル因子、EGF様因子、インスリン様因子、-トレフォイル(trefoil)因子およびシステイン・ノット因子からなる群より選択される、請求項38記載のアドザイム。

【請求項 42】

ポリペプチドは前炎症性メディエータであり、酵素構築物は該ポリペプチド因子の前炎症誘発活性を減少させる、請求項38記載のアドザイム。

【請求項 43】

ポリペプチドはインターロイキン-1またはTNF であり、アドザイムは基質の活性をインビボで減少させる、請求項38記載のアドザイム。

【請求項 44】

標的化部分は、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含む、請求項1、2、4または5記載のアドザイム。

【請求項 45】

標的化部分は、ポリアニオン系またはポリカチオン系結合剤である、請求項1、2、4または5記載のアドザイム。

【請求項 46】

標的化部分は抗体またはその抗原結合部位を含むポリペプチドである、請求項1～6のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項 47】

標的化部分はモノクローナル抗体、FabおよびF(ab)₂、scFv、重鎖可変領域および軽鎖可変領域からなる群より選択される、請求項46記載のアドザイム。

【請求項 48】

基質は受容体リガンドであり、標的化部分は該リガンドの同族受容体のリガンド結合ドメインを含む、請求項1～6のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項 49】

標的化部分は、基質に結合するように遺伝子工学的に改変された人工タンパク質またはペプチド配列である、請求項1～6のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項 50】

基質は受容体であり、標的化部分は受容体の同族リガンドである、請求項1、4または5のいずれかに記載のアドザイム。

【請求項 51】

基質はTNF であり、標的化部分はTNF に結合する、請求項43記載のアドザイム。

【請求項 52】

触媒ドメインは、TNF のプロアポトーシス活性を減少させるプロテアーゼを含む、請求項51記載のアドザイム。

【請求項 5 3】

プロテアーゼは、MT1-MMP; MMP12; トリプターゼ; MT2-MMP; エラスターゼ; MMP7; キモトリプシン; およびトリプシンの中から選択される、請求項52記載のアドザイム。

【請求項 5 4】

標的化部分は、TNF 受容体の可溶性部分およびTNF に結合する一本鎖抗体の中から選択される、請求項51記載のアドザイム。

【請求項 5 5】

標的化部分はTNFR1のsp55部分である、請求項51記載のアドザイム。

【請求項 5 6】

基質はIL-1であり、標的化部分はIL-1に結合する、請求項43記載のアドザイム。

【請求項 5 7】

触媒ドメインは、IL-1の生物活性を減少させるプロテアーゼを含む、請求項56記載のアドザイム。

【請求項 5 8】

ヒト患者で治療的に使用するためのアドザイム製剤であって、請求項1～6のいずれかに記載のアドザイムを含む製剤。

【請求項 5 9】

アドザイムの自己触媒的な修飾が阻害されるように製剤化される、請求項58記載のアドザイム製剤。

【請求項 6 0】

アドザイムは、プロテアーゼである触媒ドメインを含む、請求項59記載のアドザイム製剤。

【請求項 6 1】

請求項1～6のいずれか一項記載のアドザイムの基質の活性と関連がある疾患の治療で用いる薬剤の作製方法であって、ヒト患者に投与するためのアドザイムを製剤化する段階を含む方法。

【請求項 6 2】

炎症性またはアレルギー性疾患の治療で用いる薬剤の作製方法であって、その必要性があるヒト患者への投与を目的として、請求項1、2、または4～6のいずれか一項記載のアドザイムを製剤化する段階を含み、アドザイムの基質が炎症性サイトカインである方法。

【請求項 6 3】

請求項1～6のいずれか一項記載のアドザイムの基質の活性と関連がある疾患の治療方法であって、その必要性があるヒト患者にアドザイムの治療有効量を投与する段階を含む方法。

【請求項 6 4】

アレルギー性疾患の炎症の治療方法であって、その必要性があるヒト患者にアドザイムの治療有効量を投与する段階を含み、アドザイムの基質が炎症性サイトカインである方法。

【請求項 6 5】

請求項3または請求項6記載のアドザイムのコード配列を含む核酸。

【請求項 6 6】

請求項11記載のアドザイムのコード配列をコードする核酸。

【請求項 6 7】

適当な宿主細胞中でアドザイムの発現を導く、請求項65記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 6 8】

適当な宿主細胞中でアドザイムの発現を導く、請求項66記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 6 9】

請求項67記載の発現ベクターを含む細胞。

【請求項 7 0】

請求項68記載の発現ベクターを含む細胞。

【請求項 7 1】

第一コード配列を含む第一核酸と第二コード配列を含む第二核酸とを含む細胞であって、第一コード配列は、免疫グロブリン重鎖と触媒ドメインとを含む第一融合タンパク質をコードし、第二コード配列は、免疫グロブリン重鎖と標的化ドメインとを含む第二融合タンパク質をコードする細胞。

【請求項 7 2】

適当な培養条件で、細胞は、第一融合タンパク質と第二融合タンパク質との二量体であるFc融合タンパク質の構築物を含むアドザイムを分泌する、請求項71記載の細胞。

【請求項 7 3】

以下の段階を含む、アドザイムの製造方法：

- a) 発現ベクターによりコードされるアドザイムを細胞に産生させるような条件で、請求項69記載の細胞を培養する段階；および
- b) 実質的に純粋となるまでアドザイムを精製する段階。

【請求項 7 4】

以下の段階を含む、アドザイムの製造方法：

- a) 発現ベクターによりコードされるアドザイムを細胞に産生させるような条件で、請求項70記載の細胞を培養する段階；および
- b) 実質的に純粋となるまでアドザイムを精製する段階。

【請求項 7 5】

以下の段階を含む、アドザイムの製造方法：

- a) アドザイムを細胞に産生させるような条件で、請求項72記載の細胞を培養する段階；および
- b) 実質的に純粋となるまでアドザイムを精製する段階。

【請求項 7 6】

以下の段階を含む、有効なアドザイムの設計および構築方法：

- a) 治療的に有効な結合剤に対する周知の標的である基質を選択する段階；
- b) 基質の活性を減少させるのに有効な、一連の一つまたは複数の候補触媒ドメインを得るため、基質の活性を減少させる有効性について複数の触媒ドメインを試験する段階；
- c) 基質に結合するのに有効な、一連の一つまたは複数の候補標的化部分を得るため、基質に結合する有効性について複数の結合部分を試験する段階；
- d) 一つまたは複数の触媒ドメインおよび一つまたは複数の候補標的化部分は、少なくとも二つの異なる幾何学的立体配座で結合される、一つまたは複数の候補触媒ドメインと一つまたは複数の候補標的化部分とを含む、複数のアドザイムを構築し且つ生成する段階；
- e) 一連の一つまたは複数の候補アドザイムを得るため、基質の活性を減少させる有効性について複数のアドザイムを試験する段階であって、ここで、基質の活性を減少させるのに有効なアドザイムが有効なアドザイムである段階。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 2 1 2

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 2 1 2】

内在化ペプチドの他の例は、HIV転写因子(TAT)タンパク質である。このタンパク質は、4つのドメインに分けられるように思われる(Kuppuswamyら、(1989) Nucl. Acids Res. 17 :3551~3561)。精製TATタンパク質は、組織培養で細胞により取り込まれ(FrankelおよびPabo、(1989) Cell 55 :1189~1193)、そしてペプチド、例えば、TATの残基37~62に相当する断片は、インビトロで細胞により迅速に取り込まれる(GreenおよびLoewenstein、(19

89) Cell 55:1179~1188)。高塩基性領域により、核への内在化部分の内在化および標的化が媒介される(Rubenら、(1989) J. Virol. 63:1~8)。高塩基性領域、例えば、

CFITKALGISYGRKKRRQRRPPQGS (SEQ ID NO: 7)

の中に含まれる配列を含むペプチドまたは類似体をアドザイムのなかに使用して、内在化を補助することができる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0214

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0214】

特定の理論に拘束されることを望むわけではないが、疎水性ポリペプチドおよび有機分子はまた、受容体を介したトランスサイトシスによって膜を横断できる運搬用ペプチドに、そのポリペプチドを連結するかまたは結合させることにより、膜障壁を越えて生理的に輸送できるということが知られている。この種の適当な内在化ペプチドは、例えば、ヒストン、インスリン、トランスフェリン、ベーシックナアルブミン、プロラクチンおよびインスリン様成長因子I(IGF-I)、インスリン様成長因子II(IGF-II)または他の成長因子の全体または一部分を用いて作製することができる。例えば、毛細血管細胞上のインスリン受容体に親和性を示し、血糖の低下でインスリンよりも効果が低いインスリン断片は、受容体を介したトランスサイトシスによる膜透過輸送能を有することが見出されており、従って、主題のアドザイムに対する内在化ペプチドとしての機能を果たすることができる。好ましい成長因子由来の内在化ペプチドには、

CMHIESLDSYTC (SEQ ID NO: 8) および

CMYIEALDKYAC (SEQ ID NO: 9)

のようなEGF(上皮成長因子)由来のペプチド；TGF- (形質転換成長因子)由来のペプチド；PDGF(血小板由来成長因子)またはPDGF-2由来のペプチド；IGF-I(インスリン様成長因子)またはIGF-II由来のペプチド；およびFGF(線維芽細胞増殖因子)由来のペプチドが含まれる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0217

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0217】

この点で特に好ましいpH依存的な膜結合内在化ペプチドは、

Xaa1-Xaa2-Xaa3-EAALA(EALA)4-EALEALAA-アミド (SEQ ID NO: 10)

であり、これにはSubbaraoら(Biochemistry 26:2964, 1987)によるペプチド配列の修飾が示されている。このペプチド配列のなかで、最初のアミノ酸残基(Xaa1)は、標的化タンパク質複合体への内在化ペプチドの化学結合を促進する、システインまたはリジンのような、特異な残基であることが好ましい。アミノ酸残基(Xaa2-Xaa3)は、異なる膜に対して、内在化ペプチドの親和性を調節するように選択することができる。例えば、残基2と3の双方がlysまたはargである場合、内在化ペプチドは、陰性の表面電荷を有する脂質の膜または斑に結合する能力を有するものと思われる。残基2-3が中性アミノ酸である場合、内在化ペプチドは、中性の膜の中に入り込むものと思われる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0487

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0487】

図4の場合、異種発現系からの分泌を可能とするように設計したN末端のリーダーペプチドと免疫検出および精製を可能とするC末端のタンデムのmycおよびHis₆タグとを含んだ、pSecTag2Aベクター系(Invitrogen, Carlsbad, CA)の中で、全ての成分を組み立てた。アドレスドメインは、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)エピトープDVPDYA (SEQ ID NO:11) [18]を認識した、モノクローナル抗体mAb26/9由来の一本鎖抗体(scFv HA)とした。酵素ドメインは、プレトロンピン(ヒトプレトロンピンの残基315~622; アクセション番号AAC63054)、つまり第Xa因子を用いて活性化できるトロンピンの酵素前駆体とした。アドレスおよび酵素ドメインは、15アミノ酸のリンカー([GGGGGS]₃, SEQ ID NO:12)で連結させた。DVPDYA (SEQ ID NO:11)および次善最適のトロンピン切断部位(例えば、GGVR, SEQ ID NO:13)を含む標的に対して試験した場合、アドザイムのトロンピンドメインは、scFvドメイン(アドレスドメイン)によるDVPDYA (SEQ ID NO:11)との結合を介して達成されるペプチドの高い局所濃度により、切断の促進を示す。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0489

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0489】

HAエピトープに対する一本鎖抗体およびプレトロンピンを、Invitrogenから得たpSecTag2AベクターのHindIIIおよびXhoI部位に個別にクローニングして、その後の生化学的な性質決定のため、培地中に分泌されるタンパク質を産生させる。プレトロンピンは、第Xa因子またはエカリンにより活性化される不活性型である。プレトロンピン(G₄S)₃-scHAおよびscHA(G₄S)₃-プレトロンピンを、重複/組換えPCR(下記の表Xに記述されるオリゴを用いて)により組み立てて、HindIIIおよびXhoI断片としてpSecTag2Aベクターにクローニングする。これらは、C末端にタグとしてmycおよびHis₆を含んでいるものと思われる。斜線は、シグナルペプチドで切断の起こる箇所を示す。プレトロンピン(G₄S)₃scFv HAのアミノ酸配列は、以下である。

METDTLLLWVLLLWVPGSTG/DAAQPARRAVRSLMTATSEYQTFNPRTFGSGEADCGLR
PLFEKKSLEDKTERELLESEYIDGRIVEGSDAEIGMSPWQVMLFRKSPQELLCGASLISDR
WVLTAAHCLLYPPWDKNFTENDLLVRIGKHSRTRYERNIEKISMLEKIYIHPRYNWRENL
DRDIALMKLKKPVAFSDYIHPVCLPDRETAASLLQAGYKGRVTGWGNLKETWTANVGKGQ
PSVLQVVNLPIVERPVCKDSTRIRITDNMFCAGYKPDEGKRGDACEGDSGGPFVMKSPFN
NRWYQMGIVSWGEGCDRDGKYGFYTHVFRI)KWIQKVIDQFGEGGGSGGGSGGGGSME
VQLLESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSTYGMWSVRQTPDKRLEWVATISNGGGYTYYP
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARRERYDENGFAWGRGTLVTVSAG
GGGSGGGSGGGGSDIVMSQSPSSLAVSVGEKITMSCKSSQSLFNQSGKQKNYLTWYQQKP
GQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQNDYSHPLTFGG
GTKLEIKRADAAAPTARGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHHH*(SEQ ID NO:14)

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0490

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0490】

pSecTag2から作製したときのscHA(G₄S)₃プレトロンビンのアミノ酸配列は、以下である。

METDTLLLWVLLLWVPGSTG/DAAQPARRAVRSLMEVQLLESGGDLVKPGGSLKLSCAAS
GFTFSTYGMSWVRQTPDKRLEWVATISNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSS
LKSEDTAMYYCARRERYDENGFAIWGRGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIVMSQSPSS
LAVSVGEKITMSCKSSQSLFNSGKQKNYLTWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG
SGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQNDYSHPLTFGGGTKLEIKRADAAPTGGGGSGGGGS
GGGGSMTATSEYQTFNPRFTFGSGEADCLRPLFEKKSLEDKTERELLESYIDGRIVEGS
DAEIGMSPWQVMLFRKSPQELLCGASLISDRWVLTAHCLLYPPWDKNFTENDLLVRIGK
HSRTRYERNIEKISMLEKIYIHPRYNWRENLDRLDIALMKLKKPVAFSDYIHPVCLPDRET
AASLLQAGYKGRVTGWGNLKETWTANVGKGQPSVLQVVNLPIVERPVCKDSTRIRITDNM
FCAGYKPDEGKRGDACEGDSGGPFVMKSPFNNRWYQMGIVSWGEGCDRDGKYGFYTHVFR
LKKWIKVIDQFGEARGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH* (SEQ ID NO: 15)

【 手続補正 8 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 4 9 1

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 4 9 1 】

(表 X)

オリゴ名	代替名	配列 (5' ~ 3')	長さ	T m	目的
31	scHAfwdHindIII	CCCGGAAGCTTAatggaggtgcagctgttg (SEQ ID NO:16)	30	56	HindIIIを用いた pSecTag2A へのクローニングを目的としてScHAを増幅するためのFwdプライマー。AをHindIII部位の後に加えて、読み枠を維持した。
32	scHArevXhoI	acgcccCTCGAGCagttggtgcagcatcagc (SEQ ID NO:17)	31	56	XhoIを用いた pSecTag2A へのクローニングを目的としてScHAを増幅するためのリバースプライマー。CをXhoI部位の前に加えて、読み枠を維持した。
33	プレトロンビンfwdH3	CCCGGAAGCTTAATGaccgccaccagttagtac (SEQ ID NO:18)	33	58	HindIIIを用いた pSecTag2A へのプレトロンビンを増幅するためのFwdプライマー。AをHindIIIの後に加えて、読み枠を維持した。
B4	プレトロンビンrevXhoI	ggcccCTCGAGCctctccaaactgatcaatg (SEQ ID NO:19)	31	56	pSecTag2A のXhoI 部位にプレトロンビンをクローニングするためのRevプライマー。Cを加えて、読み枠を維持した。
B5	G4ScHAfwd	tttgagagggaggcggtgggtctggtggggcggtagt gcggagggtggagcatggaggtgcagctgttg (SEQ ID NO:20)	72	56	scHA の5'末端に (G4S)3 を導入するためのフォワードプライマー。
B6	プレトロンビンG4Srev	cacctccatgctccaccctcgccactaccgccccacca gaccacccgcctccctctccaaactgatcaatg (SEQ ID NO:21)	73	54	プレトロンビンの3'末端に (G4S)3 タグを導入するためのリバースプライマー。
B7	G4Sプレトロンビンfwd	gcaccaactggaggcggtgggtctggtggggcggtagt ggcggagggtgggagcATGaccgccaccagttagtac (SEQ ID NO:22)	75	58	ScHA との重複を作り出すため、5'末端に (G4S)3 が付いたプレトロンビンを増幅するためのFwdプライマー。
B8	scHAG4Srev	ggtggcggtCATgctccacccctcgccactaccgcccc accagaccacccgcctccagtgtgtgcagcatcagc (SEQ ID NO:23)	75	56	G4S プレトロンビンとの重複を作り出すため、3'末端に (G4S)3 が付いた scHA を増幅するためのRevプライマー。

【 手続補正 9 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 4 9 2

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 4 9 2 】

試験した基質には、以下が含まれる：S1、つまりscFv HAにより認識される高親和性のエピトープ

(DVPDYA, SEQ ID NO: 11)

が、タンパク質分解の標的部位に連結されている

(HAE-PT: NH₂- YPYDVPDYA-(SGSGS)₄-GGVR-p-ニトロアニリド, SEQ ID NO: 24)

；およびS2、つまりタンパク質分解の標的のみ(PT: NH₂-GGVR-p-ニトロアニリド)。基質の結合および切断配列を変えながら他の合成ペプチド基質も作製した。トロンビン切断部位は、Backesら、(2000) Nature Biotechnology 18:187~193の教示に基づいて選択した。代替選択物には、最良の切断部位としてIle-Thr-Pro-Argおよび不十分な標的としてIle-Thr-Leu-Argが含まれる。

【 手続補正 10 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 4 9 5

【 補正方法 】 変更

【補正の内容】

【0495】

手短に言えば、哺乳動物発現ベクターpSecTag2A(カタログ番号V90020; Invitrogen, Carlsbad, CA)を全ての構築物の骨格として使用した。ポリリンカーの上流はマウスIg 鎖V-J2-Cシグナルペプチドであり、下流はmycおよびHis₆タグ、TAA停止コドンならびにウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルである。このベクターの他の注目すべき特徴は、挿入されたコード配列ならびに選択可能マーカーのゼオシンおよびアンピシリンの発現を誘導するサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターである。個々の成分に相当するcDNAをPCRにより産生させて、5'末端のHindIIIおよび3'末端のXhoIを利用して、読み枠を維持するようにポリリンカーに直接的にクローニングした。アドレス成分(scFv HA)は、scFv HA (engineOS, Waltham, MA)のコード配列を含む鑄型プラスミドから増幅させた; プレトロンピンは、完全長のヒトcDNAクローン(ResGen; カタログ番号FL1001)から増幅させた、および; アドザイムは、N末端のプレトロンピンドメインとC末端のアドレスドメインとの間に15アミノ酸のリンカー(GGGGS)₃ (SEQ ID NO:12)を挿入するように設計した重複PCRにより作製した。全ての構築物を配列確認した。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0497

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0497】

図5に示されるように、モデルアドザイムのプレトロンピン-(GGGGS)₃-scFv HA (SEQ ID NO:12)を293T細胞で一過性に発現させて、条件培地を第7日目に回収した。材料物質を上記のように処理し且つ精製した。各分画の等価な分量に相当する試料を4~20%ポリアクリルアミドゲルに添加して、Tris-グリシン-SDS緩衝液(Novex)中で電気泳動した。パネルA: ウエスタンブロット-電気泳動後、ゲルをニトロセルロース膜に電氣的にブロットし、その膜を抗-myc抗体(Invitrogen, Carlsbad, CA)で染色した。レーン(1) ロード; (2) 素通り; (3) 洗浄液1; (4) 洗浄液3; (5) 溶出液1; (6) 溶出液2; (7) 溶出液3; (8) サンプルローディングバッファー中で煮沸した樹脂; (9) Cruz分子量マーカー(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)。パネルB: 銀染色したゲル。レーン(1) 出発物質; (2) 素通り; (3) 洗浄液1; (4) 洗浄液3; (5) 分子量標準物質SeeBlue Plus 2; (6) 溶出液1; (7) 溶出液2; (8) 溶出液3; (9) サンプルローディングバッファー中で煮沸した樹脂; (10) 分子量標準物質SeeBlue Plus 2。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0504

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0504】

標的エピトープとの結合

本実験により、アドザイムのアドレスドメインの結合特性を評価した。本出願人らは、ビオチオン化ペプチドを用い、サンドイッチELISA形式で種々の成分の結合活性を評価した。精製した成分をPBSに対して透析し、抗-myc抗体(mAb 9E10; Sigma)でコーティングしたプレートに捕捉し、次いで、高親和性エピトープ(下線)を含んだビオチオン化標的ペプチド

(NH₂- YPYDVPDYAGSGDYKA^{FD}, SEQ ID NO: 25)

との結合についてELISA法により分析した。結合したペプチドをストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ検出系(Quantablu; Pierce, Rockford, IL)により定量化した。アドレスドメインのみならびに活性化型および酵素前駆体型双方のアドザイムは、1モル当

たりかなりの量のペプチドを結合した。しかしながら、酵素ドメインのみでは、予想通り、測定可能な量のペプチドを結合できなかった。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 5 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 5 1 2】

2.3. アドザイムの機能試験

本出願人らにより、アドザイム、つまりプレトロンビンの酵素ドメインが15アミノ酸のポリペプチドにより、アドレスドメインとして、HAエピトープに対する一本鎖抗体に連結された、トロンビン-(GGGGS)₃scFv HAが設計された。トロンビンは、HAエピトープを結合しないまたは切断しないが、しかしながらその標的とする基質部位GGVR (SEQ ID NO:13)を、S1との関連であれS2との関連であれ、同じ親和性で結合する。トロンビン-scFv HAアドザイムのなかの活性化トロンビン成分も同様に、S1のGGVR (SEQ ID NO:13)を同じ親和性で結合する；しかしながら、アドザイムの概念から、抗-HA抗体に結合されたトロンビンは、抗体の典型的な高い親和性でHAエピトープを含有する基質に結合して、アドザイムの反応速度に影響を及ぼし得ることが予想される。アドザイムはトロンビンと比較して、酵素活性を増大させた可能性が予想された。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 5 4 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 5 4 0】

c. リンカーの選択

リンカーの重要な機能は、融合タンパク質の中で触媒ドメインとアドレスドメインとを連結させて、協調的な機能をもたらすことである。リンカーの長さは、実験的に調べることができる。本出願人らは、柔軟性のペンタペプチドGGGGSのトリプルリピート(または「3回の繰り返し」)により、酵素およびアドレスドメインの機能的な連結が可能になることを見出した。このリンカーは長さが、 α -ヘリックス構造で23.60 から伸張鎖で50.72 に及び得る。初期のアドザイムは、リンカーとしてアミノ酸0個(分子内消化を最少化するため)、アミノ酸3個(AAA)およびアミノ酸20個(繰り返し4回のG₄S)で構築された。構築中のさらなるリンカー長は、繰り返し2回のG₄S(アミノ酸10個)、繰り返し6回のG₄S(アミノ酸30個)、繰り返し8回のG₄S(アミノ酸40個)および繰り返し10回のG₄S(アミノ酸50個)である。

	伸張型	α -ヘリックス型
(GGGGS) ₂ (SEQ ID NO: 12)	32.02 Å	15.96 Å
(GGGGS) ₄ (SEQ ID NO: 12)	64.04 Å	31.92 Å
(GGGGS) ₆ (SEQ ID NO: 12)	96.06 Å	47.88 Å
(GGGGS) ₈ (SEQ ID NO: 12)	128.08 Å	63.84 Å
(GGGGS) ₁₀ (SEQ ID NO: 12)	160.1 Å	79.8 Å

【手続補正 1 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 5 4 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0548】

トリブシノーゲン (tgn) のアミノ酸配列は、以下である：

METDTLLLWVLLLWVPGSTG↓DIAPFDDDDKIVGGYNCEENSVPYQVSLNSGYHFCGGSL
INEQWVVSAGHCYKSRIQVRLGEHNIEVLEGNEQFINAAKIIRHPQYDRKTLNNDIMLIK
LSSRAVINARVSTISLPTAPPATGTKCLISGWGNTASSGADYPDELQCLDAPVLSQAKCE
ASYPGKITSNMFCVGFLEGGKDSCQGDSSGGPVVCNGQLQGVVSWGDGCAQKNKPGVYTKV
YNYVKWIKNTIAANSTRGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH* (SEQ ID NO: 26)

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0549

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0549】

pSecTag2Aから発現されるトリブシノーゲン-0aa-sp55 (tgn-0-sp55) のアミノ酸配列は、以下である：

METDTLLLWVLLLWVPGSTG↓DIAPFDDDDKIVGGYNCEENSVPYQVSLNSGYHFCGGSL
INEQWVVSAGHCYKSRIQVRLGEHNIEVLEGNEQFINAAKIIRHPQYDRKTLNNDIMLIK
LSSRAVINARVSTISLPTAPPATGTKCLISGWGNTASSGADYPDELQCLDAPVLSQAKCE
ASYPGKITSNMFCVGFLEGGKDSCQGDSSGGPVVCNGQLQGVVSWGDGCAQKNKPGVYTKV
YNYVKWIKNTIAANSLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTLYNDPCG
PGQDTCRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTCGCRKNQYRH
YWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLECTKL
CLPQIENVKGTEDSGTTRGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH* (SEQ ID NO: 27)

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0550

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0550】

pSecTag2Aから発現されるトリブシノーゲン-3aa-sp55 (tgn-3-sp55) のアミノ酸配列は、以下である：

METDTLLLWVLLLWVPGSTG↓DIAPFDDDDKIVGGYNCEENSVPYQVSLNSGYHFCGGSL
INEQWVVSAGHCYKSRIQVRLGEHNIEVLEGNEQFINAAKIIRHPQYDRKTLNNDIMLIK
LSSRAVINARVSTISLPTAPPATGTKCLISGWGNTASSGADYPDELQCLDAPVLSQAKCE
ASYPGKITSNMFCVGFLEGGKDSCQGDSSGGPVVCNGQLQGVVSWGDGCAQKNKPGVYTKV
YNYVKWIKNTIAANSAALVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTLYND
CPGPGQDTCRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTCGCRKNQ
YRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLEC
TKLCLPQIENVKGTEDSGTTRGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH* (SEQ ID NO: 28)

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0551

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0551】

pSecTag2Aから発現されるトリプシノーゲン-20aa-sp55 (tgn-20-sp55)のアミノ酸配列は、以下である：

METDTLLLWVLLLWVPGSTG↓DIAPFDDDDKIVGGYNCEENSVPYQVSLNSGYHFCGGSL
INEQWVVSAGHCYKSRIQVRLGEHNIEVLEGNEQFINAAKIIRHPQYDRKTLNNDIMLIK
LSSRAVINARVSTISLPTAPPATGTKCLISGWGNTASSGADYPDELQCLDAPVLSQAKCE
ASYPGKITSNMFCVGFLEGGKDSCQGDSSGGPVVCNGQLQGVVSWGDGCAQKNKPGVYTKV
YNYVKWIKNTIAANSAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSRLLVPHLGDREKRDSVCPQGKYI
HPQNNISICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQDTDRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMG
QVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHA
GFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGTTRGGPEQKLI SEEDLNSAVD
HHHHHH* (SEQ ID NO: 29)

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0552

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0552】

さらに、sp55も同様の方法でpSecTagにクローニングした。pSecTag2Aから発現されるsp55のアミノ酸配列は、以下である：

METDTLLLWVLLLWVPGSTG↓DAAQPARRAVRSLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNN
ICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQDTDRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISS
CTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRE
NECVSCSNCKKSLECTKLCLPQIENVKGTEDSGTTRGGPEQKLI SEEDLNSAVDHHHHHH
* (SEQ ID NO: 30)