

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成19年6月28日(2007.6.28)

【公表番号】特表2006-523191(P2006-523191A)

【公表日】平成18年10月12日(2006.10.12)

【年通号数】公開・登録公報2006-040

【出願番号】特願2006-505052(P2006-505052)

【国際特許分類】

C 07 K	14/47	(2006.01)
G 01 N	33/68	(2006.01)
G 01 N	33/53	(2006.01)
G 01 N	27/62	(2006.01)
C 07 K	16/18	(2006.01)
G 01 N	33/543	(2006.01)
G 01 N	33/50	(2006.01)
G 01 N	33/15	(2006.01)

【F I】

C 07 K	14/47	
G 01 N	33/68	Z N A
G 01 N	33/53	D
G 01 N	27/62	V
C 07 K	16/18	
G 01 N	33/543	5 5 1 Z
G 01 N	33/50	Z
G 01 N	33/15	Z

【手続補正書】

【提出日】平成19年4月9日(2007.4.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

心筋虚血はまた、高血圧症または大動脈弁狭窄症による重篤な心室肥大に見られるよう、心筋酸素要求が異常に高まった場合にも生じ得る。後者は冠動脈アテローム性動脈硬化症により引き起こされるものと区別できない狭心症を示し得る。極端に重篤な貧血またはカルボキシヘモグロビンの存在下で見られるように、血液の酸素担持能力の低下は稀に心筋虚血の原因になる。往々にして、左心室肥大および冠動脈アテローム性動脈硬化症に続く酸素供給の低下のための酸素要求の増大のような2つまたはそれ以上の虚血の原因が共存する。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

安静時的心臓血管障害の顕著な症状はないかもしれないが、胸部圧迫感のような症状は活動またはストレスの増加と共に生じ得る。現れ得るその他の最初の徴候は胸やけ、悪心

、嘔吐、痺れ感、息切れ、ひどい冷や汗、原因不明の疲労、および不安感である。心臓血管障害のさらに重篤な症状は胸痛（狭心症）、律動障害（不整脈）、卒中または心臓発作（心筋梗塞）である。卒中および心臓発作は各々脳および心臓組織の動脈遮断の結果である。症状は異なるので、選択される試験および処置は患者によって大きく異なり得る。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0047

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0047】

「化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含有しない」なる言語は、タンパク質が、タンパク質の合成に関与する化学的前駆体またはその他の化学物質から分離されている本発明のタンパク質の調製物を含む。1つの実施態様では「化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含有しない」なる言語は、約30%（乾燥重量）未満の化学的前駆体または非タンパク質化学物質、さらに好ましくは約20%未満の化学的前駆体または非タンパク質化学物質、なおさらに好ましくは約10%未満の化学的前駆体または非タンパク質化学物質、そして最も好ましくは約5%未満の化学的前駆体または非タンパク質化学物質を有する本発明によるタンパク質の調製物を含む。

本明細書では「組換えポリペプチド」なる用語を用いて人工的に設計され、そして最初の天然の環境で近接するポリペプチド配列として見出されない少なくとも2つのポリペプチド配列を含むポリペプチドを指すか、または組換えポリヌクレオチドから発現されたポリペプチドを指す。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0057】

本明細書中で使用される際には、「有効量」は望ましい効果を有するのに十分な薬剤、好ましくは本発明のCPPモジュレーターの量を記載する。例えば、抗心臓血管障害の有効量は少なくとも1、2、5、10、15または好ましくは25%まで個体における心臓血管障害の症状を低減させるのに必要な薬剤の量である。その用語はまた個体における、心臓血管障害により引き起こされる症状を改善するのに必要な薬剤の量をも記載する。心臓血管障害の共通の症状には：胸部圧迫感、胸やけ、恶心、嘔吐、痺れ感、息切れ、ひどい冷や汗、原因不明の疲労、および不安感が挙げられる。心臓血管障害のさらに重篤な症状は胸痛（狭心症）、律動障害（不整脈）、卒中または心臓発作である。特定の患者のための有効量は、測定される症状の診断方法、処置される状態の状況、患者の全体的な健康状態、投与の方法、および副作用の重篤度のような因子に依存して異なり得る。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0077

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0077】

CPPの特徴付け

本発明のポリペプチド、CPPは表1に列挙する配列番号：3-5、8-10、13-14、18-23、および26-28のトリプシンペプチドにより定義される。実施例1に記載するように、これらのペプチドを冠動脈疾患の患者の血漿から単離し、そしてMicroProt（商標）法によって特徴付けした。配列番号：1-2、6-7、11-12、15-17、および24-25はトリプシンペプチドが放出されたCAD血漿において見出さ

れたポリペプチド種を表す。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0081】

C P P 9 に関しては、表1 b で提供された情報は C A D 患者の血漿中に存在するポリペプチド種の多くの特徴を表す。以下は表1 b に含まれるデータの実例的説明を表す。表1 b は同一のトリプシンペプチドが所定の分離の1つ以上の分画において見出されることを示している。いくつかの分画の間を広く空けているが、これはトリプシンペプチドが異なる循環ポリペプチド種から放出されることを示している。例えば、C P P 9 は2から5の連続する一連のC E X 分画において、そして次に8から9の連続する一連のC E X 分画において再度観察された。これは、トリプシンペプチドが誘導された、異なる正電荷特性を保有する少なくとも2つのポリペプチド種の存在を示している。これは1つの種においてさらに別のアミノ酸または荷電した修飾（例えばリン酸基）が存在するが、その他の種では存在しないことを示している。同様に、C P P 9 はR P 1 分画8で、そして次に10から12の連続する一連のR P 1 分画において観察された。再び、これはトリプシンペプチドが誘導された、異なる疎水性指標を保有する少なくとも2つのポリペプチド種の存在を示している。一緒にして考えると、これらの観察により、観察されたペプチドが3つの非配列特異的溶出クラスター：第1の溶出クラスターはC E X 分画2およびR P 1 分画8で溶出されたフラグメントを含む；第2のクラスターはC E X 分画3-5およびR P 1 分画10-11で溶出されたフラグメントを含む；そして第3のクラスターはC E X 分画8-9およびR P 1 分画11-12で溶出されたフラグメントを含む；に入ることが示される。配列番号：3-5のトリプシンペプチドに関して合わせた分画情報に基づいて、C P P 9 の3つの異なる形態または種がC A D を有する個体の血漿中で循環する可能性がある。これらのC P P 9 形態は翻訳後修飾および/またはアミノ酸の長さで異なっている可能性がある。配列番号：8-10のトリプシンペプチドは配列番号：7のポリペプチドから誘導され、これはC A D を有する個体の血漿中に存在する異なるポリペプチド種を形成するようにプロセシングされる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0096

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0096】

前記したC P P ヌクレオチド配列に加えて、C P P のアミノ酸配列に変化を導くD N A 配列多型が集団（例えばヒト集団）内に存在し得ることは、当業者に理解されよう。かかる遺伝子多型は天然のアレル変異体のために集団内の個体間に存在し得る。かかる天然のアレル変異体は典型的にはC P P コード化遺伝子のヌクレオチド配列または核酸配列で1-5%の分散に至る。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0103

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0103】

オリゴヌクレオチドおよびアンチセンス化合物

P C R プライマーおよびアンチセンス化合物を含む本発明のオリゴヌクレオチドを市販されている自動D N A 合成器、例えばApplied Biosystems (Foster City, CA) モデル3

80B、392または394DNA/RNA合成器または同様の装置で慣用される手段により合成する。好ましくは、例えば以下の参考文献に開示されるようなホスホラミダイト化学を用いる：Beaucage and Iyer, Tetrahedron, 48:2223-2311(1992); Molko et al., 米国特許第4980460号; Koster et al., 米国特許第4725677号; Caruthers et al., 米国特許第4415732号; 第4458066号; および4973679号; 等。治療用途では、スクレアーゼ抵抗性バックボーンが好ましい。スクレアーゼ抵抗性を付与する多くの型の修飾オリゴスクレオチド、例えばホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホラミダート等が利用可能であり、多くの文献、例えばホスホロチオアート: Stec et al.、米国特許第5151510号; Hirschbein、米国特許第5166387号; Bergot、米国特許第5183885号; ホスホラミダート: froehler et al. 国際出願PCT/US90/03138; およびさらに別の適用可能な化学の概説に関しては: Uhlmann and Peyman(前記で引用)に記載されている。アンチセンスオリゴスクレオチドの長さは、特異的結合が望ましい標的ポリヌクレオチドでのみ生じ、そしてその他の偶発的な部位では生じないことを確実にするのに十分大きくなければならない。長さの範囲の上限は、約30-40スクレオチド以上の長さのオリゴマーを合成および精製する不都合および経費、短いオリゴスクレオチドよりも長いオリゴスクレオチドで誤対合に関する寛容性がより大きいこと等を含む、いくつかの因子により決定される。好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴスクレオチドは約15から40スクレオチドの反応の長さを有している。さらに好ましくは、オリゴスクレオチド部分は約18から25スクレオチドの範囲の長さを有している。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0107

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0107】

固体支持体上でのプライマーまたは増幅されたDNAのようなプライマー伸長生成物の固定を促進するために、標識を用いてプライマーを捕捉することもできる。捕捉標識はプライマーまたはプローブに結合し、そして固相試薬の特異的結合メンバーと結合対を形成する特異的結合メンバー(例えばビオチンおよびストレプトアビシン)でよい。したがってポリヌクレオチドまたはプローブにより担持される標識の型に依存して、標的DNAの捕捉または検出を行うことができる。さらに、本明細書にて提供されるポリヌクレオチド、プライマーまたはプローブは、それ自体捕捉標識として提供されると理解されよう。例えば固相試薬の結合メンバーが核酸配列である場合、それによりプライマーまたはプローブを固相に固定するために、プライマーまたはプローブの相補的部分に結合するようそれを選択することができる。ポリヌクレオチドプローブ自身が結合メンバーとして提供される場合、プローブが標的に相補的でない配列または「テイル」を含有することは当業者には認識されよう。ポリヌクレオチドプライマー自体が捕捉標識として提供される場合、プライマーの少なくとも一部が固相の核酸と自由にハイブリダイズする。DNA標識技術は当業者に公知である。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0116

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0116】

本発明またはCPPキメラまたは融合タンパク質をも提供する。CPP「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は本明細書中で使用される際には、非CPPポリペプチド配列に作動可能なように連結されているかまたはフレーム内で融合されている本発明のCPPまたはそのフラグメントを含む。好ましい実施態様では、CPP融合タンパク質は

少なくとも 1 つの CPP の生物学的活性部分を含む。さらに別の好ましい実施態様では、CPP 融合タンパク質は少なくとも 2 つの CPP の生物学的活性部分を含む。例えば 1 つの実施態様では、融合タンパク質は、CPP ドメイン配列が GST 配列の C 末端に融合されている GST - CPP 融合タンパク質である。かかる融合タンパク質は組換え CPP の精製を促進することができる。さらに別の実施態様では、融合タンパク質は、例えば特定の宿主細胞における望ましい細胞局在を可能にするために、その N 末端で異種性のシグナル配列を含有する CPP である。なおさらに別の実施態様では、融合は CPP 生物学的活性フラグメントおよび免疫グロブリン分子である。かかる融合タンパク質は、例えば CPP 結合部位の価数を増加させるのに有用である。例えば生物学的に活性な CPP フラグメントを IgG Fc タンパク質に融合させることにより、2 価の CPP 結合部位を形成することができる。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 7】

本発明の CPP 融合タンパク質を免疫原として用いて対象において、抗 CPP 抗体を生成し、CPP または CPP リガンドを精製し、そしてスクリーニングアッセイにおいて CPP モジュレーターを同定することができる。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 9】

挿入された配列の発現を調整する、または望ましい様式で発現されたタンパク質をプロセシングする能力に関して宿主細胞株を選択することができる。タンパク質のかかる修飾には、限定するものではないがグリコシル、アセチル、リン酸塩、アミド、脂質、カルボキシル、アシルまたは炭水化物基が挙げられる。タンパク質の「プレプロ」形態を切断する翻訳後プロセシングもまた正確な挿入、フォールディングおよび / または機能に重要であろう。実例としては、CHO、HeLa、BHK、MDCK、293、W138 等のような宿主細胞は特異的細胞機構およびかかる翻訳後活性のための特徴的なメカニズムを有し、そして導入された外来のタンパク質の正確な修飾およびプロセシングを確実にするために選択することができる。特に興味深いのはキイロショウジョウバエ細胞、出芽酵母およびその他の酵母、大腸菌、枯草菌、SF9 細胞、C129 細胞、293 細胞、パンカビ属、BHK、CHO、COS および HeLa 細胞、線維芽細胞、シュワノーマ細胞系、不死化哺乳動物骨髄およびリンパ細胞系、ジャーカット細胞、ヒト細胞およびその他の初代細胞である。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 2】

CPP をコードするスクレオチド配列で形質転換された宿主細胞を、細胞培養からのコードされたタンパク質の発現および回収に適当な条件下で培養することができる。用いる配列および / またはベクターに依存して、組換え細胞により生成されたタンパク質を分泌する、膜結合する、または細胞内に含有することができる。当業者に理解されるように、CPP をコードするポリスクレオチドを含有する発現ベクターを、原核または真核細胞膜

を通した CPP の分泌を指向するシグナル配列と共に設計することができる。望ましい CPP を直接的のみならず、異種性ポリペプチドとの融合ポリペプチドとして組換えにより生成することもできる、この異種性ポリペプチドはシグナル配列または成熟タンパク質もしくはポリペプチドの N 末端で特異的切断部位を有するその他のポリペプチドでよい。一般的にシグナル配列はベクターの成分でよいか、またはベクターに挿入される CPP コード化 DNA の一部でよい。シグナル配列は例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1pp、または熱安定性エンテロトキシン I I リーダーの群から選択される原核細胞シグナル配列でよい。酵母分泌に関しては、シグナル配列は例えば酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（サッカロミセスおよびクルイベロミセス a 因子リーダー、後者は米国特許第 5 0 1 0 1 8 2 号に記載）、または酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンスグルコアミラーゼリーダー（1990 年 4 月 4 日に公開された欧州特許第 3 6 2 1 7 9 号）、または 1990 年 1 1 月 1 5 日に公開された WO 9 0 0 1 3 6 4 6 に記載されるシグナルでよい。哺乳動物細胞発現では、同一のまたは関連する種の分泌ポリペプチドからのシグナル配列のような哺乳動物シグナル配列、およびウイルス分泌リーダーを用いてタンパク質の分泌を指向することができる。選択した発現系によってコード化配列を適当なベクターに挿入し、これは今度は特定の特徴的な「制御エレメント」または「調節配列」の存在を必要とする。適切な構築物は一般的に当分野で公知であり (Ausubel, et al., 1990)、そして多くの場合、Invitrogen (San Diego, Calif.)、Stratagene (La Jolla, Calif.)、Gibco BRL (Rockville, Md.) または Clontech (Palo Alto, Calif.) のような商業用提供者から入手可能である。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 7 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 7 3】

ヒト化抗体

本発明の抗 CPP 抗体はさらにヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。「ヒト化抗体」なる用語は、ヒト以外の抗体から誘導された配列のいくらかを含有するキメラ抗体、免疫グロブリン鎖または (Fv、Fab、Fab'、Fc(ab')_n)、または抗体のその他の抗原結合部分配列のような) そのフラグメントであるヒト以外の (例えばマウス) 抗体のヒト化形態を指す。ヒト化抗体には、ヒト免疫グロブリンの相補性決定領域 (CDR) からの残基が、望ましい結合特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギのようなヒト以外の種の CDR からの残基により置き換えられているヒト免疫グロブリンを含む。一般的に、ヒト化抗体は少なくとも 1 つの、そして一般的には 2 つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで CDR 領域の全てまたは実質的に全てはヒト以外の免疫グロブリンのものに相当し、そして Fc 領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた最適には、免疫グロブリン、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域 (Fc) の少なくとも一部を含む (Jones, et al., Nature 321:522-525 (1986) および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992))。ヒト化したヒト以外の抗体のための方法は当分野で公知である。一般的に、さらにヒト抗体に酷似するために、ヒト化抗体はヒト以外である供給源からそれに導入された 1 つまたはそれより多いアミノ酸を有するが、抗体の独自の結合活性は依然保持している。抗体のヒト化のための方法は Jones, et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann, et al., Nature 332:323-327 (1988); および Verhoeyen, et al., Science 239:1534-1536 (1988) にさらに詳記されている。かかる「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない領域が、ヒト以外の種に由来する対応する配列で置換されている、キメラ抗体である。

【手続補正 1 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0215

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0215】

さらに別の実例的な実施態様ではメチル化に感受性があり、そしてその認識部位がC P Pコード化遺伝子（フランкиングおよびイントロン配列を含む）に存在する、1つまたはそれより多い制限エンドヌクレアーゼで患者の試料に由来するゲノムDNAを消化することによりC P P核酸のメチル化パターンの異常を検出することができる。例えばBuiting et al., (1994) Human Mol Genet 3:893-895を参照のこと。消化したDNAをゲル電気泳動により分離し、そして例えばゲノムまたはcDNA配列から誘導されたプローブでハイブリダイズする。試料DNAから作成した制限パターンを既知のメチル化の標準のパターンと比較することにより、C P Pコード化遺伝子のメチル化状態を決定することができる。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0270

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0270】

注射使用に適当な医薬組成物は無菌水溶液（水溶性の場合）または分散液および無菌注射用溶液または分散液の即時調製用無菌粉末を含む。静脈内投与に適当な担体には生理学的食塩水、静菌性水、Cremophor EL（登録商標）（BASF、Parsippany, N.J.）またはリン酸塩緩衝食塩水（PBS）が挙げられる。全例で、組成物は無菌でならなければならず、そして容易な注射針通過性が存在する程度まで流動性であるべきである。これは製造および保存条件下で安定でなければならず、そして細菌および真菌のような微生物の夾雜作用に対して保存されなければならない。担体は例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）および適当なその混合物を含有する溶媒または分散媒でよい。例えばレクチンのようなコテイングの使用により、分散液の場合、必要とされる粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により適切な流動性を維持することができる。種々の抗細菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサール等により微生物作用の防御を達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールのような、多価アルコール、塩化ナトリウムを組成物中に含むのが好ましい。組成物に吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることにより、注射用組成物の吸収延長をもたらすことができる。