

(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2013-532031
(P2013-532031A)

(43) 公表日 平成25年8月15日 (2013.8.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 M 1/16 (2006.01)	A 6 1 M 1/16 5 0 0	4 C 0 7 7
A 6 1 M 1/18 (2006.01)	A 6 1 M 1/16 5 1 7	4 G 0 6 6
B 0 1 J 20/24 (2006.01)	A 6 1 M 1/16 5 1 3	
	A 6 1 M 1/18 5 2 3	
	A 6 1 M 1/18 5 2 7	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

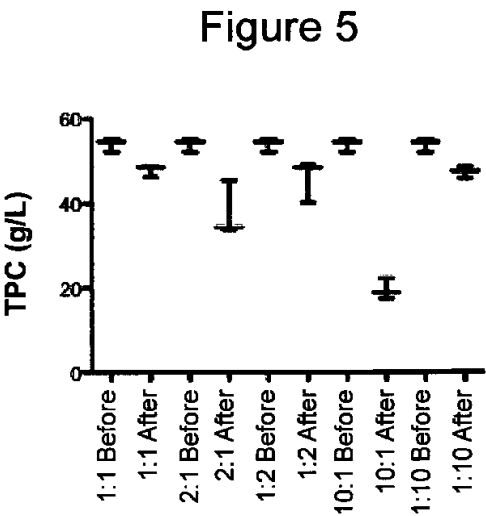
(21) 出願番号 特願2013-515822 (P2013-515822)	(71) 出願人 512324926 ジェイジェイケイ メディカル リミテッ ド J J K M E D I C A L L T D . イギリス領 ジェイイー4 オーエイチキ ュー チャンネル諸島 ジャージー島, セ ントヘリア, シートンプレイス 1 1 - 1 5
(86) (22) 出願日 平成23年6月17日 (2011.6.17)	
(85) 翻訳文提出日 平成25年2月12日 (2013.2.12)	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2011/060130	
(87) 国際公開番号 W02011/161017	
(87) 国際公開日 平成23年12月29日 (2011.12.29)	
(31) 優先権主張番号 61/357, 231	(74) 代理人 110001302 特許業務法人北青山インターナショナル
(32) 優先日 平成22年6月22日 (2010.6.22)	(72) 発明者 アクセルソン, ヨーナス
(33) 優先権主張国 米国 (US)	スウェーデン王国 エス-1 1 4 2 4
(31) 優先権主張番号 10166799.6	ストックホルム, オデンガータン 6, 2
(32) 優先日 平成22年6月22日 (2010.6.22)	テーエル
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	
最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規な媒体、装置および方法

(57) 【要約】

支持体に固定化された少なくとも1つのメガリンポリペプチドおよび/または少なくとも1つのキュビリンポリペプチドを含む分離媒体を提供する。さらに分離媒体を含む装置と、複雑な生物学的液体から低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を体外に除去するために分離媒体を利用する方法および使用とを提供する。

【選択図】 図 5



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

支持体に固定化された

- a. 少なくとも 1 つのメガリンポリペプチド、および
 - b. 少なくとも 1 つのキュビリンポリペプチド、
- を含む分離媒体。

【請求項 2】

支持体に固定化された少なくとも 1 つのメガリンポリペプチドを含む分離媒体。

【請求項 3】

支持体に固定化された少なくとも 1 つのキュビリンポリペプチドを含む分離媒体。

10

【請求項 4】

請求項 1 乃至 2 のいずれか 1 項に記載の分離媒体において、前記メガリンポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 および配列番号 12 と、それらと少なくとも 80%、たとえば少なくとも 85%、たとえば少なくとも 90%、たとえば少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列とからなる群から選択されることを特徴とする分離媒体。

【請求項 5】

請求項 1、3 および 4 のいずれか 1 項に記載の分離媒体において、前記キュビリンポリペプチドは、存在する場合、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19 および配列番号 20 と、それらと少なくとも 80%、たとえば少なくとも 85%、たとえば少なくとも 90%、たとえば少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列とからなる群から選択されることを特徴とする分離媒体。

20

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の分離媒体を含む、複雑な生物学的液体を体外処理するための医療装置。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の医療装置において、前記複雑な生物学的液体は血液であることを特徴とする医療装置。

30

【請求項 8】

請求項 6 乃至 7 のいずれか 1 項に記載の医療装置において、前記複雑な生物学的液体は低分子量タンパク質を含むことを特徴とする医療装置。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の医療装置において、前記低分子量タンパク質はペプチドホルモン、酵素、免疫グロブリン軽鎖、ミオグロブリンおよびビタミン結合タンパク質からなる群から選択されることを特徴とする医療装置。

【請求項 10】

請求項 6 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の医療装置において、前記装置はサイズフィルターを含むことを特徴とする医療装置。

40

【請求項 11】

請求項 6 乃至 10 のいずれか 1 項に記載の医療装置において、前記装置は電荷フィルターを含むことを特徴とする医療装置。

【請求項 12】

請求項 6 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の医療装置を含む、複雑な生物学的液体を体外処理するための透析装置。

【請求項 13】

複雑な生物学的液体から低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を体外に除去する方法において、

- a) メガリンおよび / またはキュビリンに対して結合親和性を有する、低分子量タンパク

50

質またはそのフラグメントもしくは誘導体を含む複雑な生物学的液体のサンプルを用意するステップと、

b) 前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体が前記少なくとも1つのメガリンポリペプチドおよび/または前記少なくとも1つのキュービンポリペプチドに結合できる条件下で、前記サンプルを請求項1乃至5のいずれか1項に記載の分離媒体、または請求項6乃至12のいずれか1項に記載の装置と接触させるステップと、

c) 前記支持体から前記サンプルを分離して、前記サンプル中に最初に存在していた前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の総量の少なくとも一部が前記支持体上に保持されるようにするステップと、

d) 量が減少した前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を含む前記サンプルを回収するステップと、
を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項14】

請求項13に記載の方法において、前記サンプルにサイズ分離濾過ステップが施されることをさらに含み、それによりステップb)を実施する前に高分子量成分が前記サンプルから除去されることを特徴とする方法。

【請求項15】

請求項13乃至14のいずれか1項に記載の方法において、前記サンプルに電荷濾過ステップが施されることをさらに含み、それによりステップb)を実施する前にpIが8以下の成分が前記サンプルから除去されることを特徴とする方法。

20

【請求項16】

請求項13乃至15のいずれか1項に記載の方法において、前記保持された低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体が溶出されるステップe)をさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項17】

低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体により引き起こされた、または悪化した状態に罹患している哺乳動物の被検体を処置するための方法において

a) 前記被検体から血液を抽出するステップと、

b) 請求項13乃至16のいずれか1項に記載の方法を用いて、前記抽出された血液から低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を除去して、前記血液中に最初に存在していた前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の総量の少なくとも一部が前記支持体上に保持されるようにするステップと、

30

c) 量が減少した前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を含む前記血液を前記被検体に再導入するステップと、
を含むことを特徴とする方法。

【請求項18】

血液透析、血液濾過および/または血液透析濾過のための、請求項6乃至12のいずれか1項に記載の医療または透析装置の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、支持体に固定化されたポリペプチドを含む分離媒体に関する。本発明はさらに、そうした分離媒体を含む医療装置、およびそうした医療装置を含む透析装置、ならびにそうした装置の、たとえば血液透析、血液濾過および/または血液透析濾過のための使用に関する。さらに、本発明は、複雑な生物学的液体から低分子量タンパク質を体外に除去する方法、および患者の血液から低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を除去することにより処置する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

腎臓は、哺乳動物の血液中の望ましくないポリペプチドのクリアランスに最も重要な臓

50

器であり (Brenner BM (2003) Brenner & Rector's The Kidney (7th edition))、腎機能が失われると、ポリペプチドの顕著な蓄積が起こる (Naseeb U et al (2008) Blood Purif. 26 (6): 561 - 8)。腎臓の機能障害は、急性腎不全 (数時間または数日間にわたる腎機能の低下を特徴とし、腎臓が窒素老廃物の排泄と、体液および電解質のホメオスタシスの維持とができなくなる)、および慢性腎疾患 (CKD) (程度の差はあるが、上記の機能の持続的な喪失を示す) に分けられる (Brenner BM (2003), 上掲)。急性腎不全は主に腎臓の濾過装置への血液供給の減少により起こり、血液量減少性ショックの患者に最も多く見られる (Brenner BM (2003), 上掲) のに対し、CKDには複数の原因があり、現在伝染病のように多発しており、欧米集団の 10 ~ 12 % が CKD の徴候を示す (Wen CP et al (2008) Lancet 371 (9631): 2173 - 82)。CKD を引き起こす基礎疾患には幅があり、定量的に最も重要なものは糖尿病による糖尿病性ニューロパチー、高血圧による腎硬化症、および糸球体腎炎である (Brenner BM (2003), 上掲)。CKD 腎機能障害の表現型は、初期には異なるものの、後期には各病因の間で著しく類似しており、遅かれ早かれ糸球体濾過量の劇的な減少が起こり、生存のため定期的な透析または腎移植が必要となる。腎代替療法の進歩にもかかわらず、急性腎傷害または慢性腎疾患の患者はどちらも、尿細管クリアランスの低下に由来し (Moestrup SK et al (1995), J Clin Invest. 96 (3): 1404 - 13; Vinge L et al (2010), Nephrol Dial Transplant, advance e-publication doi: 10.1093/ndt/gfq044)、生活の質および生存に関連すると考えられる循環血中のポリペプチドの増加に悩まされる (Naseeb U et al (2008), 上掲)。この症状は、現在の治療法により対処されない。

【0003】

低または中分子量の多くのポリペプチドのほか、高分子量のポリペプチドの一部は腎糸球体で濾過され、尿細管に入る。そこで、尿細管細胞の管腔表面のスカルジン受容体と結合し、エンドサイトーシスにより取り込まれる (Moestrup SK et al (1995), 上掲)。その後これらのポリペプチドはトランスサイトーシスにより循環血液に戻るか、または管周囲細胞で分解され、新鮮なタンパク質合成のためアミノ酸として再利用される (Christensen EI et al (2002) Nat Rev Mol Cell Biol. 3 (4): 256 - 66; Russo LM et al (2007) Kidney Int., 71 (6): 505 - 13)。このため、これらの管周囲受容体は、正常な身体機能に必須なタンパク質およびポリペプチドの過剰な尿中排泄に対する生理的防御に不可欠である。

【0004】

尿細管には、マルチリガンドなエンドサイトーシス受容体メガリンおよびキュビリンが共存する。どちらの受容体も、アルブミン尿におけるなど、糸球体で濾過されたタンパク質の尿細管の正常な再吸収にとって重要である (Russo LM et al (2007), 上掲; Vinge L et al (2010), 上掲)。

【0005】

腎機能障害に対する現在の処置法の選択肢は、特異的なバインダー (たとえばカリウム結合剤およびリン酸塩結合剤) による小分子、主に水および塩のホメオスタシス、または透析 (たとえば血液透析および腹膜透析) によるそれらの非特異的除去に力点が置かれている。腹膜透析は、腹膜をフィルターとして利用する。血液透析のほか、血液濾過および血液透析濾過は、体外回路と、合成フィルター、通常プラスチックフィルターとを利用する。非特異的な腎機能の喪失を処置する現在の方法はすべて、不要、かつ有害になる可能性がある分子を除去する分子サイズフィルターによる。さらに、特定の状況において標的化合物を除去する、いくつかのより特異的な方法も存在する。そうしたものとして、移植の前に白血球を除去するように設計されたプロテイン A カラム (Weiss L et

al (1986) Appl Biochem Biotechnol. 13 (2) : 87 - 96)、免疫グロブリン軽鎖に対する抗体でコーティングし、骨髓腫患者のそうした軽鎖を除去するためのカラム (Hutchinson CA et al (2007) J Am Soc Nephrol. 18 (3) : 886 - 95)、および炎症状態でヘパリン結合性サイトカインを除去する半特異的ヘパリンコーティング装置が挙げられる (Axelsson J et al (2010) ASAIO J. 56 (1) : 48 - 51)。

【0006】

米国特許出願公開第2004/0235161号明細書は、表面にメガリンが発現した細胞を含むスポンジシートを有する体内人工腎臓の使用に着目している。腎尿細管細胞はすべて血液の浄化に利用される。

10

【0007】

国際公開第2003/102593号パンフレットは、外部から投与されたポリペプチドから保護するためのメガリンの使用に着目している。

【0008】

透析処置中に有毒タンパク質、生理的タンパク質および異常ポリペプチドを複雑な生物学的液体、たとえば血液から特異的に除去する血液精製法が求められている。

【発明の概要】

【0009】

本開示の目的は、従来技術に伴う問題の少なくとも一部を軽減することである。

20

【0010】

特に、本開示の目的は、低分子量タンパク質および/またはそのフラグメントもしくは誘導体を体液から除去できる分離媒体を提供することである。

【0011】

さらに本開示の目的は、低分子量タンパク質および/またはそのフラグメントもしくは誘導体を複雑な生物学的液体から選択的に除去できる医療装置を提供することである。

【0012】

本開示のもう1つの目的は、複雑な生物学的液体の組成を回復できる医療装置を提供することである。

【0013】

本開示のさらに別の目的は、低分子量タンパク質および/またはそのフラグメントもしくは誘導体を複雑な生物学的液体から体外に除去する方法を提供することである。

30

【0014】

上記の目的、および本開示と共に提示されたとき、当業者に明らかになる他の目的は各々、本発明の様々な態様の少なくとも1つにより対応される。

【0015】

本発明は、その第1の態様では、支持体に固定化されたa) 少なくとも1つのメガリンポリペプチド、および/またはb) 少なくとも1つのキュビリンポリペプチドを含む分離媒体を提供する。

【0016】

本発明の文脈では、「分離媒体」という用語は、分離用媒体、たとえばカラムまたはフィルターをいう。

40

【0017】

本開示を通して、「メガリンポリペプチド」という用語は、メガリン受容体、またはメガリン受容体の少なくとも1つの機能を保持するその変異体、ドメイン、フラグメントもしくは誘導体をいう。たとえば、少なくとも1つの機能は、少なくとも1つのリガンドに対する結合機能であってもよい。メガリン受容体は、低密度リボタンパク質受容体 (LDLR) と構造上の類似性を有する受容体ファミリーのメンバーであり、「低密度リボタンパク質関連タンパク質2」 (LRP2) とも呼ばれる (Christensen EI et al (2002), 上掲; Cui S et al (2010) Am J. Phy

50

siol. Renal Physiol. 298(2):335-345)。メガリン受容体は、多くの吸収上皮細胞の形質膜に見られるマルチリガンド結合受容体である。このタンパク質は、リガンドのエンドサイトーシスを仲介してリソソームにおける分解またはトランスサイトーシスを誘導する働きをする。このタンパク質は、ヒトでは、LRP2遺伝子がコードする。ヒトメガリン受容体のアミノ酸配列の非限定的な例については、添付の配列表に配列番号1として開示されている。以下の実施例の項に例示されるように、メガリン受容体の様々なフラグメントは、メガリン受容体の少なくとも1つの機能を保持しており、それ自体で、あるいは、そうしたフラグメントを相互に任意に組み合わせると、全長受容体と任意に組み合わせると、または他のフラグメントと任意に組み合わせると本発明の様々な態様に有用である場合がある。本明細書でこうしたフラグメントまたはドメインの例は、MEG1(配列番号2)、MEG2(配列番号3)、MEG3(配列番号4)、MEG4(配列番号5)、MEG5(配列番号6)、MEG6(配列番号7)、MEG7(配列番号8)、MEG8(配列番号9)、MEG9(配列番号10)、MEG10(配列番号11)およびMEG5-8(配列番号12)と呼ぶ。ただし、「メガリンポリペプチド」は、メガリン受容体の機能の少なくとも1つを果たす類似のタンパク質、フラグメント、ドメインまたは誘導体をいうこともある。そうしたポリペプチドのアミノ酸配列は、たとえば1つまたは複数の保存的置換変異により、本明細書に具体的に開示されたアミノ酸配列に関連するものでもよい。この場合、開示された配列のアミノ酸残基が、物理化学的特性を共有する同じグループのアミノ酸残基の別のアミノ酸残基に置き換わっている。こうしたグループは、タンパク質工学の当業者によく知られている。言い換えれば、「メガリンポリペプチド」は、具体的に開示されたメガリンポリペプチド配列に少なくとも80%、たとえば少なくとも85%、たとえば少なくとも90%、またはたとえば少なくとも95%の程度の類似性または同一性で似ていればよい。

10

20

30

40

50

【0018】

同様に、本発明の文脈では、「キュビリンポリペプチド」という用語は、キュビリン受容体の少なくとも1つの機能を保持するキュビリン受容体またはそのフラグメントをいう。たとえば、少なくとも1つの機能は、少なくとも1つのリガンドに対する結合機能であってもよい。キュビリン(キュプリン、腸内因子受容体、内因子-ビタミンB12受容体および460kDa受容体とも呼ばれる)はインビボで、腸および腎臓の上皮内に位置する(Christensen EI et al(2002), 上掲; Kozyraki R et al(1998) Blood 91(10):3593-3600; 米国特許第6586389号明細書)。このタンパク質は、ヒトでは、CUBN遺伝子がコードする。ヒトキュビリン受容体のアミノ酸配列の非限定的な例については、配列表に配列番号13として開示されている。以下の実施例の項に例示するように、キュビリン受容体の様々なフラグメントは、キュビリン受容体の少なくとも1つの機能を保持しており、それ自体で、あるいはそうしたフラグメントを相互に任意に組み合わせると、全長受容体と任意に組み合わせると、または他のフラグメントと任意に組み合わせると本発明の様々な態様に有用である場合がある。本明細書でこうしたフラグメントまたはドメインの例は、CUBEGF(配列番号14)、CUB1-7(配列番号15)、CUB5-8(配列番号16)、CUB6-12(配列番号17)、CUB11-17(配列番号18)、CUB16-22(配列番号19)およびCUB21-27(配列番号20)と呼ぶ。ただし、「キュビリンポリペプチド」は、キュビリン受容体の少なくとも1つの機能を果たす類似のタンパク質、フラグメント、ドメインまたは誘導体をいうこともある。そうしたポリペプチドのアミノ酸配列は、たとえば1つまたは複数の保存的置換変異により、本明細書に具体的に開示されたアミノ酸配列に関連するものでもよい。この場合、開示された配列のアミノ酸残基が、物理化学的特性を共有する同じグループのアミノ酸残基の別のアミノ酸残基に置き換わっている。こうしたグループは、タンパク質工学の当業者によく知られている。言い換えれば、「キュビリンポリペプチド」は、具体的に開示されたキュビリンポリペプチド配列に少なくとも80%、たとえば少なくとも85%、たとえば少なくとも90%、またはたとえば少なくとも95%の程度の類似性または同一性で似ていればよい。

【0019】

本出願に開示される分離媒体では、同一でも異なってもよい1つまたは複数のメガリンポリペプチド、および/または同一でも異なってもよい1つまたは複数のキュビリンポリペプチドを使用してもよい。

【0020】

本発明の文脈では、「支持体」という用語は、少なくとも1つのメガリンポリペプチドおよび/または少なくとも1つのキュビリンポリペプチドが固定化された表面をいう。たとえば、支持体は、ビーズまたは膜からなってもよい。存在する場合、ビーズをカラム内に使用してもよく、膜をフィルター内に使用してもよい。メガリンおよび/またはキュビリンポリペプチドが固定化されたカラムまたはフィルターを使用して、タンパク質、たとえば低分子量タンパク質および/またはそのフラグメントもしくは誘導体を分離してもよい。

10

【0021】

また、本発明の文脈では、当業者であれば容易に理解されるように、「支持体に固定化された」という用語は、ある種が、やはり同じ支持体に固定化される他の種とは別にその支持体に意図的に固定化されていることを意味する。メガリンおよびキュビリンポリペプチドの両方が存在する本発明の実施形態では、これらのポリペプチドが「支持体に固定化された」ということは、支持体に各ポリペプチド種が別々に固定化されたことを意味する。固定化は、よく知られたアフィニティー系を使用するなど間接的なものであってもよい。例として、それぞれのポリペプチドのHis-tagとNi-NTA基などのキレート部分を設定した支持体と（またはその逆）の相互作用、またはそれぞれのポリペプチドのビオチン基とストレプトアビジン基を設定した支持体と（またはその逆）の相互作用が挙げられる。固定化はまた、直接的なものであってもよい、すなわちポリペプチドを支持体に共有結合してもよい。これらおよび他の方法と各当該ポリペプチドの固定化の手段との任意の組み合わせを意図しており、当業者はこれを過度の負担なく実施することができる。

20

【0022】

少なくとも1つのメガリンポリペプチドおよび/または少なくとも1つのキュビリンポリペプチドを含む分離媒体の利点は、本媒体が、メガリン、キュビリンもしくはその両方、場合によっては、および/またはそれらのフラグメントもしくは誘導体に結合できるタンパク質の結合を可能にすることである。メガリンおよび/またはキュビリンとの相互作用を利用することにより、これらのタンパク質の少なくとも一部を体液から除去することができる。たとえば、そうした分離媒体は、たとえば患者の血液の透析を目的として医療装置に利用しても、または透析装置に利用してもよい。この用途では、低分子量のポリペプチドおよび/またはそのフラグメントもしくは誘導体の血液中の量が減少する可能性があり、血液中の低分子量分子の元の組成が回復し得る。各タンパク質の組成が回復した血液は、腎臓を通過した血液に似ており、腎臓により通常血液中に維持されるタンパク質の組成を有する。

30

【0023】

媒体がメガリンポリペプチドおよびキュビリンポリペプチドの両方を含む分離媒体のいくつかの実施形態では、メガリンポリペプチドとキュビリンポリペプチドとのモル比は、1:100~100:1の範囲、たとえば1:50~50:1の範囲、たとえば1:10~10:1の範囲、たとえば1:5~5:1の範囲、たとえば1:2~2:1の範囲、または、たとえば1:1の範囲であってもよい。本開示の文脈では、モル比は、キュビリンポリペプチドのモル濃度に対するメガリンポリペプチドのモル濃度の比率である。本発明者は、メガリンポリペプチドとキュビリンポリペプチドとの10:1という特定のモル比から、本分離媒体により多くの低分子量タンパク質が捕捉され、複雑な生物学的液体から除去されるという良好な結果が示されることを見出した。しかしながら、他のモル比でもうまくいく。本明細書の教示内容を踏まえ、上記の比率をガイドラインとして用いれば、当業者は、本発明による分離媒体のこうした実施形態でメガリンポリペプチドとキュビリンポリペプチドとのモル比を最適化するのに必要な実験を行うことができる。

40

50

【 0 0 2 4 】

誤解を避けるため、本発明の態様はまた、場合によっては低分子量タンパク質および／またはそのフラグメントもしくは誘導体を捕捉するのに満足のいく作用を有することがある、固定化したメガリンポリペプチドのみを含む（すなわちキュビリンポリペプチドを含まない）、または固定化したキュビリンポリペプチドのみを含む（すなわちメガリンポリペプチドを含まない）分離媒体も提供する。たとえば、下記実施例 1 1 に記載されているように、固定化したメガリンポリペプチド（MEG 5 - 8）を含む分離媒体は、複雑な生物学的液体のインスリンに結合する。さらに、下記実施例 1 2 および 1 3 に記載されているように、固定化した全長メガリンを含む分離媒体を用いて、部分腎摘出ラットの血液の処理に成功し得る。これらの例では、メガリンポリペプチドは、少なくとも 1 つの低分子量タンパク質の除去に有用な分離媒体を得るのに十分である。しかしながら、他の状況では、満足のいく結果を得るために少なくとも 1 つのメガリンポリペプチドと少なくとも 1 つのキュビリンポリペプチドとの組み合わせが必要となる。

10

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、固定化したメガリンの表面密度は、1 ~ 1 0 0 0 0 0 メガリンポリペプチド分子 / μm^2 、たとえば 1 0 0 ~ 5 0 0 0 0 分子 / μm^2 、たとえば 1 0 0 0 ~ 2 0 0 0 0 分子 / μm^2 、または、たとえば 3 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 分子 / μm^2 であってもよい。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、固定化したキュビリンの表面密度は、1 ~ 1 0 0 0 0 0 キュビリンポリペプチド分子 / μm^2 、たとえば 1 0 0 ~ 5 0 0 0 0 分子 / μm^2 、たとえば 1 0 0 0 ~ 2 0 0 0 0 分子 / μm^2 、または、たとえば 3 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 分子 / μm^2 であってもよい。

20

【 0 0 2 7 】

メガリンポリペプチドは、組換えにより製造しても、または化学合成により製造してもよい。同様に、キュビリンポリペプチドも組換えにより製造しても、または化学合成により製造してもよい。

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態では、支持体の材料は、ガラス、セルロース、酢酸セルロース、キチン、キトサン、架橋デキストラン、架橋アガロース、寒天ゲル支持体、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスルホン、ポリアクリロニトリル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリスチレン、ポリウレタン、シリコーンおよびアミラーゼコーティング粒子からなる群から選択されてもよい。たとえば、ポリスチレンは、アニロスルホン酸ポリスチレンおよびトリエタノールアミンメチルポリスチレンから選択されてもよい。一例では、支持体は、架橋デキストラン、たとえば S e p h a d e x（登録商標）からなる。支持体の他の例には、S e p h a r o s e（登録商標）および D y n a b e a d s（登録商標）がある。当業者であれば、本明細書に示したガイドラインを踏まえて試行錯誤により支持体を選択することができることを理解する。安価で製造および取扱いが容易な支持体は都合がよく、支持体材料からの物質の漏出を最小限に維持する支持体も同様である。さらに、支持体は滅菌してもよい。

30

40

【 0 0 2 9 】

支持体は、様々な形態をとってもよい。たとえば、支持体は、微小粒子またはナノ粒子などのビーズまたは粒子を含んでもよい。他の例では、支持体は、1 つまたは複数の中空繊維を含んでもよい。支持体は、カラム、たとえば多孔性カラムであってもよい。さらに、支持体はフィルターであってもよい。

【 0 0 3 0 】

少なくとも 1 つのメガリンポリペプチドおよび／または少なくとも 1 つのキュビリンポリペプチドは、支持体に共有結合していてもよい。共有結合は、共有結合によるポリマーグラフト、プラズマ処理、物理吸着、化学吸着および化学誘導体化からなる群から選択されてもよい。他の例では、少なくとも 1 つのポリペプチドを C n B r カップリングにより

50

支持体に結合してもよい。なお他の例では、ピオチン - アビジンまたはグルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T) カップリングを使用してもよい。

【 0 0 3 1 】

本発明は、その別の態様では、上記のような分離媒体を含む、複雑な生物学的液体の体外処理のための医療装置を提供する。

【 0 0 3 2 】

上記および本発明の他の態様の文脈では、「複雑な生物学的液体」という用語は、たとえば様々な溶質、懸濁された天然または製造されたポリペプチドおよび細胞を含む水性液体をいう。たとえば、複雑な生物学的液体は、タンパク質、塩および他の分子、たとえば細胞を含んでもよい。いくつかの例では、複雑な生物学的液体は血液、たとえば哺乳動物血液、たとえばヒト血液である。他の例では、複雑な生物学的液体は血漿、血清または尿である。本開示の文脈では、血漿は、通常全血中の血液細胞が浮遊している血液の黄色の液体成分である。血漿は血管内液であり、細胞外液の一部である。血漿は大部分が水であり、溶解したタンパク質、グルコース、凝固因子、ミネラルイオン、ホルモンおよび二酸化炭素を含む。血漿は、抗凝固薬を含む新鮮な血液のチューブを血液細胞がチューブの底に沈殿するまで遠心機で回転させることにより調製することができる。その後血漿を注ぐか、または取り除く。本開示の文脈では、血清は、フィブリノーゲンまたは他の凝固因子を含まない血漿である (すなわち全血から細胞と凝固因子との両方を取り除いたもの)。血清は、血液凝固に使用されないすべてのタンパク質、およびすべての電解質、抗体、抗原、ホルモン、ならびに任意の外因性物質 (たとえば、薬剤および微生物) を含んでもよい。

【 0 0 3 3 】

本発明の文脈では、体外処理とは、体、たとえば人体外での処理をいう。たとえば、体外処理は、血液の透析を含んでもよい。血液などの複雑な生物学的液体の処理は、タンパク質などの分子の血液からの除去を含んでもよい。

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、複雑な生物学的液体は、少なくとも 1 つの低分子量タンパク質、および / またはそのフラグメントもしくは誘導体を含む。低分子量タンパク質は、より大きなタンパク質の一部であってもよい。いくつかの例では、低分子量タンパク質は、50 k D a 以下の分子量を有する。他の例では、低分子量タンパク質は、35 k D a 以下の分子量を有する。なお他の例では、低分子量タンパク質は、20 k D a 以下の分子量を有する。たとえば、複雑な生物学的液体は、低分子量タンパク質および / またはそのフラグメントもしくは誘導体の混合物を含んでもよい。さらに、複雑な生物学的液体は、たとえば 50 k D a より大きなタンパク質、およびタンパク質以外の分子を含んでもよい。

【 0 0 3 5 】

本発明のいくつかの実施形態では、低分子量タンパク質を修飾してもよい。こうした修飾の例として、グリコシル化、たとえばマンノース - 6 - リン酸付加およびシアル酸付加、およびロイシンリッチ領域の修飾がある。他の例には、メタロプロテイナーゼまたはエンドプロテアーゼの作用がある。いくつかの例では、低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を分解してもよい。

【 0 0 3 6 】

低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は、メガリン結合モチーフを有していてもよく、このタンパク質が本明細書で定義したメガリンポリペプチドに結合する能力を有することを意味する。他の例では、低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は、キュビリン結合モチーフを有していてもよい、すなわち本明細書で定義したキュビリンポリペプチドに結合する能力を有していてもよい。低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は、少なくとも 1 つのメガリン結合モチーフ、少なくとも 1 つのキュビリン結合モチーフ、またはそれらの組み合わせを有していてもよい。

【 0 0 3 7 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、低分子量タンパク質は、ペプチドホルモン、酵素およびビタミン結合タンパク質からなる群から選択されてもよい。たとえば、低分子量タンパク質は、サイトカイン、インスリン、アルブミン、アポリポタンパク質、 α_2 -および α_1 -ミクログロブリン、ミオグロブリンおよび免疫グロブリン軽鎖、ならびにそれらのフラグメントおよび誘導体からなる群から選択されてもよい。一例では、アポリポタンパク質はアポリポタンパク質Hであってもよい。

【0038】

いくつかの実施形態では、本発明による医療装置は、サイズフィルターをさらに含んでもよい。濾過は、液体のみが通過できる媒体を置いて液体から固体を分離するのに使用される機械的または物理的操作である。液体に懸濁された大きな粒子の除去にはメッシュフィルター、バッグフィルターおよびペーパーフィルターを使用してもよいのに対し、精密濾過、限外濾過、ナノ濾過、逆浸透および透析などの膜処理では合成膜が利用され、これをマイクロメートルサイズまたはより小さい種を分離するのに使用してもよい。本発明による医療装置に使用してもよいサイズフィルターは、カットオフが50 kDaである。他の例では、カットオフは35 kDaである。なお他の例では、カットオフは20 kDaである。たとえば、サイズフィルターは、複雑な生物学的液体からアルブミンなどの大きなタンパク質を除去することができる。他の例では、サイズフィルターは、血液から血液細胞を除去することができる。

【0039】

本発明による医療装置のいくつかの実施形態に使用されるサイズフィルターは、様々な形態をとってもよい。たとえば、サイズフィルターは繊維でも、穿孔処理したシートでも、またはメッシュタイプのフィルターでもよい。サイズフィルターは、天然材料で作られていてもよい。たとえば、天然材料はセルロースもしくはその誘導体でも、キトサンでも、カーボンでも、または酸化アルミニウムでもよい。他の例では、サイズフィルターは、たとえば、ナイロン6-6、フッ化ポリビニリデン、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエーテルスルホン、ガラスおよび金属からなる群から選択される人工材料で作られていてもよい。当業者であれば、サイズフィルターは、本明細書に示したガイドラインを踏まえて試行錯誤により選択してもよいことを理解する。サイズフィルターは、好ましくは安価かつ滅菌可能で製造および取扱いが容易であり、サイズフィルターの材料の漏出が少ないと好ましい。

【0040】

いくつかの実施形態では、医療装置は電荷フィルターをさらに含んでもよい。いくつかの例では、電荷フィルターは、等電点、 pI が8の種のみを通過させる。他の例では、電荷フィルターは、 pI が7の種のみを通過させる。なお他の例では、電荷フィルターは、 pI が5-8の種のみを通過させる。

【0041】

電荷フィルターは、様々な形態をとってもよい。たとえば、電荷フィルターは、繊維でも、穿孔処理したシートでも、またはメッシュタイプのフィルターでもよい。電荷フィルターは、天然材料で作られていてもよい。たとえば、天然材料はセルロースもしくはその誘導体でも、キトサンでも、カーボンでも、または酸化アルミニウムでもよい。他の例では、電荷フィルターは、たとえば、ナイロン6-6、フッ化ポリビニリデン、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエーテルスルホン、ガラスおよび金属からなる群から選択される人工材料で作られていてもよい。当業者であれば、電荷フィルターは、本明細書に示したガイドラインを踏まえて試行錯誤により選択してもよいことを理解する。電荷フィルターは、好ましくは安価かつ滅菌可能で製造および取扱いが容易であり、電荷フィルターの材料の漏出が少ないと好ましい。

【0042】

いくつかの実施形態では、サイズフィルターおよび電荷フィルターは同じフィルターであってもよい。いくつかの例では、サイズフィルターおよび電荷フィルターは、2つの異なるフィルターであってもよい。たとえば、医療装置には、サイズフィルターを設置した

後に電荷フィルターを設置してもよい。この例では、医療装置に加える複雑な生物学的液体は、サイズフィルターに達した後に電荷フィルターに達する。他の例では、医療装置に電荷フィルターを設置した後にサイズフィルターを設置する。

【0043】

本発明のいくつかの実施形態では、医療装置を使用前に滅菌してもよい。滅菌とは、表面から伝染性病原体（たとえば真菌、細菌、ウイルス、芽胞体等）を効率的に死滅させるか、または除去する任意のプロセスをいう。滅菌は、加熱、化学物質、照射、高圧または濾過を用いて行うことができる。広く用いられている加熱滅菌の方法としてオートクレーブがある。オートクレーブは一般に121～134に加熱された蒸気を使用する。他の例では、線装置を滅菌してもよい。線は非常に透過性があり、シリンジなどの使い捨ての医療機器の滅菌に一般に使用される。他の代替手段には、エタノールなどの滅菌溶液の使用がある。本発明のいくつかの実施形態では、装置を全体として滅菌しなくてもよいが、代わりに予め滅菌した部品を用いて無菌環境で組み立てる。

10

【0044】

本発明は、その別の態様では、複雑な生物学的液体を体外処理するための透析装置であって、本明細書に記載するような医療装置を含む透析装置を提供する。透析装置は、本明細書に記載するような医療装置以外の部品を含んでもよい。たとえば、本発明による透析装置は、2つ以上の医療装置を含んでもよい。2つ以上の医療装置は、並列に配置しても、または直列に配置してもよい。

20

【0045】

本発明は、その別の態様では、複雑な生物学的液体から低分子量タンパク質を体外に除去する方法であって、

- a) メガリンおよび/またはキュビリンに対して結合親和性を有する、低分子量タンパク質を含む複雑な生物学的液体のサンプルを用意するステップと、
- b) 前記低分子量タンパク質が前記少なくとも1つのメガリンポリペプチドおよび/または少なくとも1つのキュビリンポリペプチドに結合できる条件下で、前記サンプルを上記に開示したような分離媒体、医療装置または透析装置と接触させるステップと、
- c) 前記支持体から前記サンプルを分離して、前記サンプル中に最初に存在していた前記低分子量タンパク質の総量の少なくとも一部が支持体上に保持されるようにするステップと、
- d) 量が減少した前記低分子量タンパク質を含む前記サンプルを回収するステップと、を含む方法を提供する。

30

【0046】

複雑な生物学的液体から少なくとも1つの低分子量タンパク質を体外に除去する方法は、複雑な生物学的液体を体外処理するための方法として使用してもよい。体外処理のための方法では、本明細書に記載するような本発明による分離媒体は、本明細書に記載するような本発明による医療装置中で使用してもよい、たとえば本明細書に記載するような本発明による医療装置中に含まれていてもよい。

【0047】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、複雑な生物学的液体は血液であってもよい。いくつかの例では、血液は哺乳動物の血液、たとえばヒト血液である。他の例では、複雑な生物学的液体は血漿でも、血清でも、または尿でもよい。

40

【0048】

複雑な生物学的液体のサンプルは、たとえば血液透析回路を使用して得てもよい。血液透析回路は、腎疾患に罹患している患者に接続してもよい。

【0049】

サンプルは、少なくとも1つのメガリンポリペプチドおよび/または少なくとも1つのキュビリンポリペプチドと接触させる。たとえば、サンプルは、メガリンポリペプチドおよびキュビリンポリペプチドのどちらかまたは両方を含む分離媒体と接触させても、あるいはそうした分離媒体を含む医療装置または透析装置と接触させてもよい。

50

【0050】

分離の過程で、複雑な生物学的液体由来の少なくとも1つの低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は、メガリンポリペプチドおよび/またはキュビリンポリペプチドに結合し、保持されることを意図している。この液体が分離媒体を通過する一方で、少なくとも1つの低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は、分離媒体の支持体上に固定化したポリペプチドに結合する。分離の過程で、複雑な生物学的液体中の低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の量の少なくとも一部が保持され、その後複雑な生物学的液体から除去することができる。

【0051】

複雑な生物学的液体は、分離媒体の通過後に回収することができる。回収された複雑な生物学的液体は、分離媒体に進入する複雑な生物学的液体のタンパク質の組成（および量）と比較してタンパク質の組成（および量）が変化する。

10

【0052】

複雑な生物学的液体から低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を体外に除去する方法の1つの利点は、この方法が正常に機能している腎臓の機能に似ていることである。腎臓が機能不全を起こしている人は、血液中の低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の量の増加に関連する問題を抱え、アミロイドーシス（血液中の - 2 ミクログロブリンの濃度上昇）または小胞体ストレス（メガリンおよび/またはキュビリン結合残留物の濃度上昇）などの深刻な問題を引き越す可能性がある。血液などの複雑な生物学的液体から低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を体外に除去する方法を用いることにより、この液体のタンパク質の量およびタンパク質の組成を、正常に機能している腎臓を持つ人の血液の内容に似た状態に回復させることができる。

20

【0053】

さらに、複雑な生物学的液体から低分子量タンパク質を体外に除去する方法は、血液中の低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の量を減少させることにより、腎不全を予防するために使用してもよい。たとえば、血液から低分子量タンパク質を体外に除去する方法を用いて、筋肉損傷により起こり得る血液中のミオグロブリンの濃度上昇を抑制してもよい。血液中のミオグロブリンの濃度上昇は、腎不全を引き起こす恐れがある。別の例では、血液から低分子量タンパク質を体外に除去する方法を用いて、骨髄腫など血液の悪性腫瘍に関連する循環血中の免疫グロブリン軽鎖の量を減少させてもよい。

30

【0054】

誤解を避けるため、本発明の態様はまた、分離媒体を用いて複雑な生物学的液体から、場合によっては低分子量タンパク質の捕捉に満足 of いく作用を有することがある固定化したメガリンポリペプチドのみ（すなわちキュビリンではない）または固定化したキュビリンポリペプチドのみ（すなわちメガリンではない）を含む、低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を体外に除去する方法を提供する。しかしながら、他の状況では、満足 of いく結果を得るには、少なくとも1つのメガリンポリペプチドと少なくとも1つのキュビリンポリペプチドとの組み合わせが必要である。

40

【0055】

いくつかの実施形態では、低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は、50 kDa 以下の分子量を有していてもよい。他の例では、低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は、35 kDa 以下の分子量を有する。なお他の例では、低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は、20 kDa 以下の分子量を有する。

【0056】

本発明のいくつかの実施形態では、低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を修飾することができる。どのような特定の科学理論にも拘泥するわけではないが、こうした修飾のいくつかの例には、グリコシル化、マンノース - 6 - リン酸付加、口

50

イシンリッチ領域の修飾、およびシアル酸付加がある。他の例としてメタロプロテインゼまたはエンドプロテアーゼが挙げられる。いくつかの例では、低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を分解してもよい。

【0057】

本発明による方法の実施形態では、低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は、少なくとも1つのメガリン結合モチーフ、少なくとも1つのキューリン結合モチーフ、またはそれらの組み合わせを有していてもよい。

【0058】

いくつかの実施形態では、低分子量タンパク質は、ペプチドホルモン、酵素およびビタミン結合タンパク質からなる群から選択されてもよい。たとえば、低分子量タンパク質は、サイトカイン、インスリン、アルブミン、アポリポタンパク質、₂ - および ₁ - ミクログロブリンおよび免疫グロブリン軽鎖からなる群から選択されてもよい。一例では、アポリポタンパク質はアポリポタンパク質Hであってもよい。

【0059】

いくつかの実施形態では、本方法は、サンプルにサイズ分離濾過ステップを施すステップをさらに含み、ステップb)を実施する前にサンプルから高分子量成分を除去することができる。本発明の文脈では、「成分」という用語は、複雑な生物学的液体中に存在するタンパク質または他の分子をいう。たとえば、高分子量成分は、50 kDa以上の分子量を有していてもよい。他の例では、高分子量成分は35 kDa以上の分子量を有する。なお他の例では、高分子量成分は20 kDa以上の分子量を有する。

【0060】

いくつかの実施形態では、本方法は、サンプルに電荷濾過ステップを施し、ステップb)を実施する前にpIが8以下である成分をサンプルから除去することをさらに含む。他の例では、除去される成分は、pIが7.0以下であってもよい。なお他の例では、除去される成分は、pIが5.8以下であってもよい。

【0061】

いくつかの実施形態では、サイズ分離濾過および電荷濾過を同時に実施する。サイズフィルターと電荷フィルターとは同じであってもよい。他の例では、サイズ分離濾過を電荷濾過の前に実施してもよい。なお他の例では、電荷濾過をサイズ分離濾過の前に実施する。

【0062】

いくつかの実施形態では、本方法は、保持された低分子量タンパク質を溶出するステップe)をさらに含んでもよい。溶出されたタンパク質は、集めて解析してもよい。たとえば、タンパク質の量およびタンパク質の種類は、患者の疾患の状態を判定する、または腎疾患の患者の処置を決定するのに重要であり得る。医療装置または透析装置は、2回以上再利用してもよい。装置は、複雑な生物学的液体の2回の添加の間に溶出に供してもよい。

【0063】

本発明はまた、低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体により引き起こされた、または悪化した状態に罹患している哺乳動物の被検体を処置する方法であって、

- a) 被検体から血液を抽出するステップと、
 - b) 上記のような体外に除去する方法を用いて、前記抽出された血液から低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を除去して、前記血液中に最初に存在していた前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の総量の少なくとも一部が支持体上に保持されるようにするステップと、
 - c) 量が減少した前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を含む血液を被検体の血流に再導入するステップと、
- を含む方法を提供する。

【0064】

10

20

30

40

50

低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体により引き起こされた、または悪化した状態に罹患している被検体は、腎疾患に罹患している患者であってもよい。腎疾患に罹患している患者は、1つまたは2つの機能不全の腎臓を有していてもよい。機能不全の腎臓にあり得る結果は、血液中の低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の量の増加であってもよい。

【0065】

たとえば、血液の抽出および再導入は連続ループで行ってもよい。ループは、被検体の血流の一部を構成してもよい。他の例では、血液の抽出は外部血液回路を含む透析装置を用いて行ってもよい。

【0066】

他の例では、処置の方法は、メガリンポリペプチドおよび/またはキュビリンポリペプチドを含む装置と血液が接触する人体内で行ってもよい。装置は人体に配置してもよい。装置から出た血液は、装置に入ったときと比較してタンパク質の量が減少し得る。

【0067】

本発明は、その別の態様では、血液透析、血液濾過および/または血液透析濾過に使用することができる医療または透析装置を提供する。装置は、血液回路と直列および/または並列で使用してもよい。いくつかの例では、血液回路は透析器具であってもよい。

【0068】

装置は、複雑な生物学的液体から低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を体外に除去するのに使用してもよい。複雑な生物学的液体は、本明細書に記載するような血液、血漿、血清または尿であってもよい。複雑な生物学的液体は、本明細書に記載するような少なくとも1つの低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を含んでもよい。

【0069】

低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は、ペプチドホルモンでも、酵素でも、またはビタミン結合タンパク質でもよい。たとえば、低分子量タンパク質は炎症性サイトカインであってもよい。別の例では、低分子量タンパク質は、免疫グロブリン軽鎖でもよい。たとえば、骨髄腫は腎臓において軽鎖の沈着を引き起こすため、本発明による装置を使用すると、血液中の免疫グロブリン軽鎖の量を減少させるのに有利である場合がある。

【0070】

いくつかの例では、装置は、複雑な生物学的液体の組成を回復させるために使用してもよい。腎疾患に罹患している人は、血液中の修飾タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の量が増加していることがある。修飾タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の大部分は、腎臓の機能不全のため腎臓で血液から除去されない(少なくとも満足のいく程度まで除去されない)。血液の組成を回復させるために本開示による装置を使用してもよい。

【0071】

本発明による装置は、腎不全に罹患するリスクがある被検体を処置または予防するための方法に使用してもよい。たとえば、装置は、腎不全の症状を示す被検体の血液中に凝集している低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の量を減少させるために使用することができる。

【0072】

本発明の一実施形態では、本発明による装置は、バイオリアクターから機能タンパク質を採取するために使用してもよい。たとえばアフィニティークラムを使用してタンパク質を単離および分離した後、機能不全タンパク質と機能タンパク質とを識別するために本発明による装置を使用してもよい。本発明による装置は、バイオリアクターで作製後、単離されたタンパク質を採取する際の付加的ステップとしてとして使用してもよい。

【0073】

他の例では、本発明による装置は敗血症の治療に使用してもよい。たとえば、装置は、

10

20

30

40

50

敗血症の症状を示す被検体の血液中のサイトカイン量を減少させるために使用してもよい。

【 0 0 7 4 】

なお他の例では、本発明による装置を急性腎不全の処置に使用してもよい。急性腎不全は、たとえば筋肉損傷後のミオグロブリンの蓄積により引き起こされることがある。本発明による装置は、急性腎不全の症状を示す被検体のミオグロブリン量を減少させるために使用してもよい。

【 0 0 7 5 】

本開示による医療または透析装置は、体外の血液回路に連結された別の医療または透析装置と並列で使用しても、または直列で使用してもよい。たとえば、他の医療または透析装置は透析血液フィルターでも、または体外の血液酸素化装置でもよい。

10

【 0 0 7 6 】

実施形態の項目別のリスト

以下は、本発明により本発明のある種の態様で提供される様々な特徴および組み合わせを記載することを目的とした、本開示の実施形態の非限定的な項目別のリストである。

【 0 0 7 7 】

項目：

- 1．支持体に固定化された少なくとも1つのメガリンポリペプチドを含む分離媒体。
- 2．前記メガリンポリペプチドは配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11および配列番号12と、それらと少なくとも80%、たとえば少なくとも85%、たとえば少なくとも90%、たとえば少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列とからなる群から選択される、項目1に記載の分離媒体。
- 3．前記メガリンポリペプチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11および配列番号12からなる群から選択される、項目2に記載の分離媒体。
- 4．固定化したメガリンの表面密度が1～100000メガリンポリペプチド分子/ μm^2 である、先行する項目のいずれか1つに記載の分離媒体。
- 5．固定化したメガリンの前記表面密度が3000～10000メガリンポリペプチド分子/ μm^2 である、項目4に記載の分離媒体。
- 6．少なくとも1つのメガリンポリペプチドは組換えにより製造されるか、または化学合成により製造される、先行する項目のいずれか1つに記載の分離媒体。
- 7．支持体に固定化された少なくとも1つのキュビリンポリペプチドを含む分離媒体。
- 8．前記キュビリンポリペプチドは配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19および配列番号20と、それらと少なくとも80%、たとえば少なくとも85%、たとえば少なくとも90%、たとえば少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列とからなる群から選択される、項目7に記載の分離媒体。
- 9．前記キュビリンポリペプチドは配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19および配列番号20からなる群から選択される、項目8に記載の分離媒体。
- 10．支持体に固定化された少なくとも1つのメガリンポリペプチドおよび少なくとも1つのキュビリンポリペプチドを含む、先行する項目のいずれか1つに記載の分離媒体。
- 11．前記メガリンポリペプチドと前記キュビリンポリペプチドとのモル比は1：100～100：1の範囲である、項目10に記載の分離媒体。
- 12．前記メガリンポリペプチドと前記キュビリンポリペプチドとのモル比は1：10～10：1の範囲など1：50～50：1の範囲である、項目11に記載の分離媒体。
- 13．前記メガリンポリペプチドと前記キュビリンポリペプチドとのモル比は10：1である、項目12に記載の分離媒体。
- 14．固定化したキュビリンの表面密度が1～100000キュビリンポリペプチド分子

20

30

40

50

/ μm^2 である、項目 7 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の分離媒体。

15. 固定化したキュピリンの前記表面密度が 3000 ~ 10000 キュピリンポリペプチド分子 / μm^2 である、項目 14 に記載の分離媒体。

16. 少なくとも 1 つのキュピリンポリペプチドは組換えにより製造されるか、または化学合成により製造される、項目 7 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の分離媒体。

17. 前記支持体の材料はガラス、セルロース、酢酸セルロース、キチン、キトサン、架橋デキストラン、架橋アガロース、寒天ゲル支持体、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスルホン、ポリアクリロニトリル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリスチレン、ポリウレタン、シリコンおよびアミロースコーティング粒子からなる群から選択される、先行する項目のいずれか 1 つに記載の分離媒体。

10

18. 前記材料はポリスチレンであり、前記ポリスチレンはアニロスルホン酸ポリスチレンおよびトリエタノールアミンメチルポリスチレンから選択される、項目 17 に記載の分離媒体。

19. 前記材料は架橋デキストランである、項目 17 に記載の分離媒体。

20. 前記支持体はビーズを含む、項目 17 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の分離媒体。

21. 前記ビーズは微小粒子である、項目 20 に記載の分離媒体。

22. 前記ビーズはナノ粒子である、項目 20 に記載の分離媒体。

23. 前記少なくとも 1 つのメガリンポリペプチドおよび / または前記少なくとも 1 つのキュピリンポリペプチドおよび / またはその両方は前記支持体に共有結合している、先行する項目のいずれか 1 つに記載の分離媒体。

20

24. 前記共有結合は共有結合によるポリマーグラフト、プラズマ処理、物理吸着、化学吸着および化学誘導体化からなる群から選択される、項目 23 に記載の分離媒体。

25. 先行する項目のいずれか 1 つに記載の分離媒体を含む、複雑な生物学的液体を体外処理するための医療装置。

26. 前記複雑な生物学的液体は血液である、項目 25 に記載の医療装置。

27. 前記複雑な生物学的液体は低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を含む、項目 25 ~ 26 に記載の医療装置。

28. 前記低分子量は 50 kDa 以下の分子量を有することを意味する、項目 27 に記載の医療装置。

29. 前記低分子量タンパク質は 35 kDa 以下の分子量を有することを意味する、項目 28 に記載の医療装置。

30

30. 前記低分子量タンパク質は修飾される、項目 27 ~ 29 のいずれか 1 つに記載の医療装置。

31. 前記低分子量タンパク質はメガリン結合モチーフを有する、項目 27 ~ 30 のいずれか 1 つに記載の医療装置。

32. 前記低分子量タンパク質はキュピリン結合モチーフを有する、項目 27 ~ 31 のいずれか 1 つに記載の医療装置。

33. 前記低分子量タンパク質はペプチドホルモン、酵素、免疫グロブリン軽鎖、ミオグロブリンおよびビタミン結合タンパク質、ならびにそれらのフラグメントおよび誘導体からなる群から選択される、項目 27 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の医療装置。

40

34. 前記低分子量タンパク質はサイトカイン、インスリン、アルブミン、アポリポタンパク質、 α_2 -および α_1 -ミクログロブリン、免疫グロブリン軽鎖、ミオグロブリンおよび酸素結合タンパク質、ならびにそれらのフラグメントおよび誘導体からなる群から選択される、項目 33 に記載の医療装置。

35. 前記装置は使用前に滅菌される、項目 25 ~ 34 のいずれか 1 つに記載の医療装置。

36. 前記装置はサイズフィルターを含む、項目 25 ~ 35 のいずれか 1 つに記載の医療装置。

37. 前記サイズフィルターはカットオフが 50 kDa である、項目 36 に記載の医療装置。

50

- 38．前記カットオフは35 kDaである、項目37に記載の医療装置。
- 39．前記サイズフィルターは繊維、穿孔処理したシートまたはメッシュタイプのフィルターである、項目36～38のいずれか1つに記載の医療装置。
- 40．前記サイズフィルターは、たとえばセルロースもしくはその誘導体、キトサン、カーボンまたは酸化アルミニウムからなる群から選択される天然材料で作られている、項目36～39のいずれか1つに記載の医療装置。
- 41．前記サイズフィルターはたとえばナイロン6-6、フッ化ポリビニリデン、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエーテルスルホン、ガラスおよび金属からなる群から選択される人工材料で作られている、項目36～39のいずれか1つに記載の医療装置。
- 42．前記装置は電荷フィルターを含む、項目25～41のいずれか1つに記載の医療装置。
- 43．前記電荷フィルターはpIが8の種のみを通過させる、項目42に記載の医療装置。
- 44．前記電荷フィルターはpIが5.8の種のみを通過させる、項目43に記載の医療装置。
- 45．前記電荷フィルターは、たとえばセルロースもしくはその誘導体、キトサン、カーボンおよび酸化アルミニウムからなる群から選択される天然材料で作られている、項目42～44のいずれか1つに記載の医療装置。
- 46．前記電荷フィルターは、たとえばナイロン6-6、フッ化ポリビニリデン、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエーテルスルホン、ガラスおよび金属からなる群から選択される人工材料で作られている、項目42～44のいずれか1つに記載の医療装置。
- 47．前記サイズフィルターおよび前記電荷フィルターは、両方が存在する場合、同じフィルターである、項目36～46のいずれか1つに記載の医療装置。
- 48．項目25～47のいずれか1つに記載の医療装置を含む、複雑な生物学的液体を体外処理するための透析装置。
- 49．複雑な生物学的液体から低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を体外に除去する方法であって、
- a) メガリンおよび/またはキュビリンに対して結合親和性を有する、低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を含む複雑な生物学的液体のサンプルを用意するステップと、
- b) 前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体が前記少なくとも1つのメガリンポリペプチドおよび/または前記少なくとも1つのキュビリンポリペプチドに結合できる条件下で、前記サンプルを項目1～24のいずれか1つに記載の分離媒体、または項目25～48のいずれか1つに記載の装置と接触させるステップと、
- c) 前記支持体から前記サンプルを分離して、前記サンプル中に最初に存在していた前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の総量の少なくとも一部が支持体上に保持されるようにするステップと、
- d) 量が減少した前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を含む前記サンプルを回収するステップとを含む方法。
- 50．前記複雑な生物学的液体は血液である、項目49に記載の方法。
- 51．前記血液は哺乳動物の血液である、項目50に記載の方法。
- 52．前記哺乳動物の血液はヒト血液である、項目51に記載の方法。
- 53．前記複雑な生物学的液体は血漿である、項目49に記載の方法。
- 54．前記複雑な生物学的液体は尿である、項目49に記載の方法。
- 55．前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は50 kDa以下の分子量を有する、項目49～54のいずれか1つに記載の方法。
- 56．前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は35 kDa以下

の分子量を有する、項目 55 に記載の方法。

57. 前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は修飾される、項目 49 ~ 56 のいずれか 1 つに記載の方法。

58. 前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体はメガリン結合モチーフを有する、項目 49 ~ 57 のいずれか 1 つに記載の方法。

59. 前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体はキュビリン結合モチーフを有する、項目 49 ~ 58 のいずれか 1 つに記載の方法。

60. 前記低分子量タンパク質はペプチドホルモン、酵素、免疫グロブリン軽鎖、ミオグロブリンおよびビタミン結合タンパク質、ならびにそれらのフラグメントおよび誘導体からなる群から選択される、項目 49 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の方法。

61. 前記低分子量タンパク質はサイトカイン、インスリン、アルブミン、アポリポタンパク質、₂ - および ₁ - ミクログロブリン、免疫グロブリン軽鎖、ミオグロブリンおよび酸素結合タンパク質、ならびにそれらのフラグメントおよび誘導体からなる群から選択される、項目 60 に記載の方法。

62. サンプルにサイズ分離濾過ステップを施すステップをさらに含み、それによりステップ b) を実施する前にサンプルから高分子量成分を除去する、項目 49 ~ 61 のいずれか 1 つに記載の方法。

63. 前記高分子量成分は 50 kDa 以上の分子量を有する、項目 62 に記載の方法。

64. 前記高分子量成分は 35 kDa 以上の分子量を有する、項目 63 に記載の方法。

65. サンプルに電荷濾過ステップを施すステップをさらに含み、それによりステップ b) を実施する前にサンプルから pI が 8 以下の成分を除去する、項目 49 ~ 64 のいずれか 1 つに記載の方法。

66. 前記除去された成分は pI が 5.8 以下の成分である、項目 65 に記載の方法。

67. 前記サイズ分離濾過および前記電荷濾過は、両方が存在する場合、同時に実施される、項目 62 ~ 66 のいずれか 1 つに記載の方法。

68. 前記方法は、前記保持された低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を溶出するステップ e) をさらに含む、項目 49 ~ 67 のいずれか 1 つに記載の方法。

69. 低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体により引き起こされた、または悪化した状態に罹患している哺乳動物の被検体を処置する方法であって、

a) 被検体から血液を抽出するステップと、

b) 項目 49 ~ 68 のいずれか 1 つに記載の方法を用いて、前記抽出された血液から低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を除去して、前記血液中に最初に存在していた前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体の総量の少なくとも一部が支持体上に保持されるようにするステップと、

c) 量が減少した前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体を含む血液を被検体に再導入するステップと、

を含む方法。

70. 血液の抽出および再導入が連続ループで実施され、ループは被検体の血流の一部を構成する、項目 69 に記載の方法。

71. 血液透析、血液濾過および / または血液透析濾過のための、項目 1 ~ 24 のいずれか 1 つに記載の分離媒体の使用。

72. 血液透析、血液濾過および / または血液透析濾過のための、項目 25 ~ 48 のいずれか 1 つに記載の医療または透析装置の使用。

73. 項目 72 に記載の使用、前記装置は血液回路を含む直列および / または並列で使用される。

74. 前記血液回路は透析器具である、項目 73 に記載の使用。

75. 複雑な生物学的液体から低分子量タンパク質を体外に除去するための、項目 25 ~ 48 のいずれか 1 つに記載の医療または透析装置の使用。

76. 複雑な生物学的液体の組成を回復させるための、項目 25 ~ 48 のいずれか 1 つに

10

20

30

40

50

記載の医療または透析装置の使用。

77. 複雑な生物学的液体は血液である、項目76に記載の使用。

78. 前記血液は少なくとも1つの低分子量タンパク質、またはそのフラグメントもしくは誘導体を含む、項目77に記載の使用。

79. 前記低分子量タンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体は修飾される、項目69~70のいずれか1つに記載の方法または項目78に記載の使用。

80. 前記低分子量タンパク質は炎症性サイトカインである、項目69~70のいずれか1つに記載の方法または項目78~79のいずれか1つに記載の使用。

81. 前記低分子量タンパク質は免疫グロブリン軽鎖である、項目69~70のいずれか1つに記載の方法または項目78~79のいずれか1つに記載の使用。

82. 体外の血液回路に連結された別の医療または透析装置と並列および/または直列された、項目25~48のいずれか1つに記載の医療または透析装置の使用。

83. 前記他の医療または透析装置は透析血液フィルターまたは体外の血液酸素化装置である、項目82に記載の使用。

【0078】

次に、本発明に記載の低分子量タンパク質を結合するための、少なくとも1つのメガリンポリペプチドおよび/または少なくとも1つのキュビリンポリペプチドの使用について、以下の図および実施例により非限定的に記載する。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】図1は、3つの異なる個体の腎生検よりmRNAをノーザンブロット解析した結果を示すゲルの写真である。凡例は、左から右に「ラダー」、「生検標本1」、「生検標本2」および「生検標本3」である。

【図2】図2は、2つのポリペプチド、すなわちMEG1（配列番号2）およびCUB5-8（配列番号16）をウエスタンブロット解析した結果を示すゲルの写真である。MEG1およびCUB5-8の大きさはどちらもほぼ40kDaである。

【図3】図3は、メガリンポリペプチドおよびキュビリンポリペプチドを固定化したSepharose（登録商標）を含むカラム（HEP）、またはSepharose（登録商標）のみを含むカラム（CTR）を通す前後の、健常被験者（健常）、および維持血液透析により処置した慢性腎疾患の患者（尿毒症）の濾過（<30kDa）血液をイムノブロット解析したゲルの写真である。

【図4】図4は、ポリペプチドMEG3（配列番号4）およびCUB1-7（配列番号15）を固定化したビーズを含むカラムを通す前（「COL-」）、および通した後（「COL+」）に、サイズ排除カラムを通した（「サイズ+」）、および通さない（「サイズ-」）4つの異なるサンプルの結果を示す逆相HPLCのクロマトグラムを示す。

【図5】図5は、様々な比率のメガリンおよびキュビリンでメガリンポリペプチドおよびキュビリンポリペプチドを固定化したカラムを通した前後のサンプル中の総タンパク質含有量（TPC）（g/l）の図である。

【図6A】図6Aは、固定化したメガリンポリペプチドMEG5-8（配列番号12）を含むカラムを通した後のインスリン量（pg/ml）の変化を示す、ELISAアッセイの結果の図を示す。3つの異なるカラムの結果は、対照カラム（抗体を加えていない）、抗インスリン抗体を加えたカラム、および抗メガリン抗体を加えたカラムを示す。

【図6B】図6Bは、ウエスタンブロット解析したゲルの写真を示す。第1のレーンは、抗体を加えていない複雑な生物学的液体の通過を示す。第2のレーンは、抗インスリン抗体を加えた複雑な生物学的液体の通過を示す。第3のレーンは、抗メガリン抗体を加えた複雑な生物学的液体の通過を示す。第4のレーンは、抗インスリン抗体および抗メガリン抗体の両方を加えた複雑な生物学的液体の通過を示す。各通過について、TPCの値を示す。

【図7A】図7Aは、<30kDaのプールされたラット血漿のプロテオームに対するMEGカラムの作用を示す2-Dゲルの写真である。

10

20

30

40

50

【図 7 B】図 7 B は、 $< 30 \text{ kDa}$ のプールされたラット血漿のプロテオームに対する C T R L カラムの作用を示す 2 - D ゲルの写真である。

【図 8】図 8 は、プールされた血液サンプルを、結合したメガリンを含むカラム (M E G)、および結合したメガリンを含まないカラム (C T R L および S H A M) に通した後の腎摘出 (M E G および C T R L) ラット、および非腎摘出 (S H A M) ラットの 3 日間の記録における典型的な行動の頻度を示す図である。S H A M は $n = 4$; M E G は $n = 3$; および C T R L は $n = 3$ 。

【実施例】

【0080】

以下の非限定的な実施例 1 ~ 10 では、複雑な生物学的液体から少なくとも 1 つの低分子
10
量タンパク質を除去するための、メガリンポリペプチドおよびキュビリンポリペプチド
の使用の原理を示す。さらに、非限定的な実施例 11 ~ 13 は、ある種の環境において複
雑な生物学的液体から少なくとも 1 つの低分子量タンパク質を除去する場合、メガリンポ
リペプチドは、満足のいく結果を得るのに十分であることを示す。

【0081】

実施例 1

メガリンおよびキュビリンの c D N A の作製

A n d e r s e n C B e t a l , (2 0 1 0) , N a t u r e 4 6 4 : 4 4 5
- 4 4 8 に記載された手順に従った。手短に言えば、製造者の指示通り A l l P r e p (
登録商標) D N A / R N A / P r o t e i n M i n i K i t (Q i a g e n) を用い
20
て、ヒト腎皮質 (3 個体の腎生検標本) から全 R N A を抽出した。m R N A は、O l i g
o t e x (登録商標) キット (Q i a g e n) を用いて単離した。

【0082】

c D N A を得るため、表 1 および 2 に示したプライマーを用い Q i a g e n R e v e
r s e T r a n s c r i p t i o n K i t を使用して R A C E を行い、表記のメガリ
ンポリペプチドおよびキュビリンポリペプチド (その全アミノ酸配列を添付の配列表に示
す) と、表記の制限酵素の切断部位とをコードする D N A を作製した。品質を保証するた
め 1 % ホルムアルデヒドゲルおよび $1 \mu \text{g}$ の m R N A を用いて 100 V で 1 時間ノーザン
ブロッティングを行い、西洋わさびペルオキシダーゼ標識リボプローブで可視化して品質
30
を点検した (図 1) 。

表 1 大腸菌(E.coli)細胞で発現するメガリンおよびキュビリンの cDNA を得るために RACE に使用したプライマー

プライマーの名称	プライマー配列および制限部位
メガリン_フォワード	GTCGACTCatggatcgcgggccggcagcag (Sal I)
メガリン_リバース	GCGGCCGCctatacttcagagctcttcttaac (Not I)
MEG1_フォワード	GAATTCgtgacagtgcgcatcttcg (EcoR I)
MEG1_リバース	CTCGAGccgatagctccatccaaatttac (Xho I)
MEG2_フォワード	GTCGACTCgttctcaatgtttctgttgaaacc (Sal I)
MEG2_リバース	GCGGCCGCtcgatctgttccatccacg (Not I)
MEG3_フォワード	GGATCCattgtgaacagcagctctgg (BamH I)
MEG3_リバース	CTCGAGtcgatgggtggccctccaaatcag (Xho I)
MEG4_フォワード	GTCGACTCcgcacacgggtgtatgatg (Sal I)
MEG4_リバース	GCGGCCGCtacttcagagctcttcttaac (Not I)
MEG5_フォワード	GGATCCgtgacagtgcgcatcttc (BamH I)
MEG5_リバース	CTCGAGttcatccgcgtcatctgaacag (Xho I)
MEG6_フォワード	GGATCCtgctcaagtcacagataac (BamH I)
MEG6_リバース	CTCGAGgcaagcatgttcgtcactg (Xho I)
MEG7_フォワード	GTCGACTCtgcggtggtaccagttcac (Sal I)
MEG7_リバース	GCGGCCGCtctgtctaaacctcaaaagg (Not I)
MEG8_フォワード	GAATTCcagtggtgcttatttccctt (EcoR I)
MEG8_リバース	CTCGAGgcggaagtttctcccaatgtg (Xho I)
MEG9_フォワード	GGATCCattgtgaacagcagctctgg (BamH I)
MEG9_リバース	CTCGAGatcaacacaagtcgctgtgc (Xho I)
MEG10_フォワード	GTCGACTCgatattgatgaatgcacagag (Sal I)
MEG10_リバース	GCGGCCGCtacttcagagctcttcttaac (Not I)
MEG5-8_フォワード	GGATCCgtgacagtgcgcatcttc (BamH I)
MEG5-8_リバース	CTCGAGgcggaagtttctcccaatgtg (Xho I)
キュビリン_フォワード	GTCGACTCatgatgaacatgtcttacctttc (Sal I)
キュビリン_リバース	GCGGCCGCttagctgtcccaagtaatcgg (Not I)
CUBEGF_フォワード	GGATCCaaaaaggtttgcagcagcaatc (BamHI)
CUBEGF_リバース	CTCGAGaggaacctgacagagagctccag (XhoI)
CUB1-7_フォワード	GGATCCtgtggagagtcctctcaggaa (BamHI)
CUB1-7_リバース	GCGGCCGCtgtctgccggtattcagccttg (Not I)
CUB5-8_フォワード	GGATCCtgtggagaaattcttacagaac (BamHI)
CUB5-8_リバース	CTCGAGaccgtaaacaaaccactgct (XhoI)
CUB6-12_フォワード	GGATCCtgtttgcaagactacacagatg (BamHI)
CUB6-12_リバース	CTCGAGgccaaatatcttcataaatgtg (Xho I)
CUB11-17_フォワード	GGATCCtgcggaggccacatcctcacc (BamHI)
CUB11-17_リバース	CTCGAGctcttcatactggattcaaactcg (Xho I)
CUB16-22_フォワード	CGGCCGtgtgggggcaacgtctacatccat (Eag I)
CUB16-22_リバース	CTGCAGggagattatctataggaaaact (Pst I)
CUB21-27_フォワード	GGATCCtgtgggtggaatatttattctg (BamHI)
CUB21-27_リバース	CTCGAGgctgtcccaagtaatcggaatgc (Xho I)

10

20

30

40

表 2: HEK293 細胞で His₁₀ タグを付加して発現するメガリンおよびキュビリンの cDNA を得るために RACE に使用したプライマー

プライマーの名称	プライマー配列および制限部位
HIS-メガリン_フォワード	CTCGAGTatggatcgcgggccggcagcag (Xho I)
HIS-メガリン_リバース	GGGCCcctatacttcagagtcttcttaac (Apa I)
HIS-キュビリン_フォワード	GGATCCaaaaaggttgcagcagcaatc (BamHI)
HIS-キュビリン_リバース	CTCGAGgctgtcccaagttaatcggaatgc (Xho I)

10

【 0 0 8 3 】

実施例 2

大腸菌 (E. coli) を用いた GST 結合メガリンポリペプチドおよびキュビリンポリペプチドの発現

実施例 1 に記載されているように作製された cDNA 産物を pGEX-4T-3 ベクター (GE Healthcare) にライゲートし、エレクトロポレーションを用いて *Escherichia coli* 株 DH5 (New England Biolabs Inc.) に形質転換した。cDNA 産物の再利用を DNA Gel Extraction Kit (Promega) により行った。形質転換細胞は、100 mg/ml のアンピシリンを含む LB 寒天プレートに蒔き、37 で一晩インキュベーションを行うことにより同定した。単一コロニーを 3 ml の LB - アンピシリン培地に接種し、オービタルシェーカーにて 250 rpm で一定の振盪を行いながら、37 にて一晩増殖させた。次いで、培養液を 1 : 100 で 200 ml の新鮮な LB - アンピシリン (100 mg/ml) 培地に希釈し、250 rpm で一定の振盪を行いながら、OD₆₀₀ がほぼ 0.5 になるまで (2 ~ 3 時間) 37 でインキュベートした。次いで IPTG を 0.5 mM の最終濃度になるように培養液に添加してタンパク質を誘導し、250 rpm で一定の振盪を行いながら培養液を 15 で一晩再びインキュベートした。翌日、培養液を 6000 g、4 で 10 分間遠心して細胞ペレットを形成させた。さらに 4 でペレットを 10 ml の冷やした溶解緩衝液に再懸濁し、氷上で超音波処理し (30 % 振幅、5 回の 10 秒バースト、各バースト間に 30 秒の冷却間隔)、タンパク質の遊離を Bradford 反応によりモニターした (10 µl の画分 + 90 µl の水 + 1 ml の Bradford 試薬 (Pierce); 590 nm および 450 nm で吸光度を測定し、それらの間の比率を使用してタンパク質濃度を算出した)。ライセートを 20000 g、4 で 30 分間遠心分離により清澄にし、その後上清をアリコートに分割し、氷上で保存した。品質管理のため、Illustra Plasmid Prep Mini Spin (GE Healthcare) により、製造者の指示に従い組換えプラスミドを抽出し、表記のポリペプチドの表 1 に示す制限酵素を用いて切断し、キットに用意されたゲルを用いて評価した。

20

30

【 0 0 8 4 】

発現したコンストラクトの精製を、Hodneland et al, (2002), Proc Natl Acad Sci USA, 91 (21): 9725 - 9 に記載されているようにグルタチオン S - トランスフェラーゼ (GST) アフィニティークロマトグラフィーにより行った。簡単に説明すると、2 ml のグルタチオン - セファロース (Sigma) 樹脂をガラスカラム中で細胞ライセートおよび 0.25 M の NaCl 1 ml と混合し、穏やかに 1 時間攪拌した。洗浄は、3 カラム体積、各回 15 ml の洗浄用緩衝液 (20 mM のトリス、pH 7.5 + 0.25 M の NaCl + 2 mM の EDTA + 2 mM の EGTA + 0.03 % Brij - 35 (Sigma)) を用いて行った。次いで、pH 8.0 になるように 20 mM のグルタチオン (Sigma) および NaOH を加えて予め混合した洗浄用緩衝液を用いてタンパク質の溶出を行った。各溶出後、Bradford 反応を用いてタンパク質の収量を調べた。次に純粋なタンパク質 (典型的な収量: MEG

40

50

1で9～12mg/l培養液、およびCUB5-8で18～21mg/l培養液)をPBSで溶出し、4、3000gでVivaSpin 20(Sartorius Stedim Biotech)限外濾過スピナラムを用いて濃縮し、最後に-80で保存した。得られた産物のウエスタンブロットのゲルの代表的なサンプルを図2に示す。

【0085】

実施例3

大腸菌(E.coli)を用いたビオチン結合メガリンポリペプチドおよびキュビリンポリペプチドの発現

以前に記載されているようにシステイン-ビオチンを合成した(Liu et al, (2008), Mol Biotechnol. 39(2): 141-53)。簡単に説明すると、2.6mmolのN-t-Boc-S-トリチル-L-システイン、3.1mmolのテトラメチル-O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムテトラフルオロボレート(TBTU)および3.9mmolの1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを50mlの乾燥ジメチルホルムアミド(DMF)に加えた。この混合物を室温で20分間撹拌した。次に、7.8mmolのN-メチルモルホリンおよび2.6mmolのビオチニルエチレンジアミン(Promega)を加えた。穏やかに撹拌しながら反応を3時間継続させ、その後オイルポンプを備えたロータリーエバポレーターを用いて、溶媒を真空蒸発させた。この粗反応混合物を200mlのジクロロメタン(DCM)に溶解させ、有機層を水で抽出し(3×100ml)、次いで無水MgSO₄(25g)を加えて周期的に撹拌しながら5分間乾燥させた。得られた溶液(180ml)を清浄なフラスコにデカン

10

20

【0086】

実施例1に記載されているように作製されたcDNA産物(1バッチ当たり1つのプライマー対)をpMD-18-TXベクター(Promega)にライゲートし、エレクトロポレーションを用いてエシェリキア・コリ(Escherichia coli)株ER2566に形質転換した。形質転換細胞は、100mg/mlのアンピシリンを含むLB寒天プレートに蒔き、37で一晩インキュベートした。単一コロニーを3mlのLB-アンピシリン培地に接種し、オービタルシェーカーにて250rpmで一定の振盪を行

いながら、37にて一晩増殖させた。次いで、培養液を1:100で200mlの新鮮なLB-アンピシリン(100mg/ml)培地に希釈し、250rpmで一定の振盪を行

いながら、OD₆₀₀がほぼ0.5になるまで(2～3時間)37でインキュベートした。次いで0.5mMの最終濃度になるように培養液に添加したイソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)によりタンパク質を誘導し、250rpmで一定の振盪を行

いながら培養液を15で一晩再びインキュベートした。翌日、培養液を6000g、4で10分間遠心して細胞ペレットを形成させた。さらに4でペレットを10mlの冷やした溶解緩衝液に再懸濁し、氷上で超音波処理し(30%振幅、5回の10秒バースト、各バースト間に30秒の冷却間隔)、タンパク質の遊離をBradford

タンパク質アッセイによりモニターした。ライセートを20000g、4で30分間遠心分離により清澄にし、その後上清をアリコートに分割し、氷上で保存した。カラム中に培養液1リットル当たり20mlのキチンビーズを用い0.5～1ml/分の流量でHPLCクロマトグラフィーによりタンパク質を単離し、30mMの2-メルカプトエタンスルホン酸(Sigma)および1mMのシステイン-ビオチンを用いてカラムでビオチン化した。最後に、ビオチン化タンパク質を10mlのPBSで溶出し、-80で保存した。

30

40

【0087】

実施例4

HEK293細胞を用いた全長His₁₀タグ付きメガリンおよびキュビリンの発現

ベクターpcDNA(商標)4/HisMax A, B, & Cと共にInvitrog

50

en (登録商標) FreeStyle (商標) MAX 293 Expression System (カタログ番号 K9000-10) を用いて発現を行い、N 末端に His₁₀-タグを付加した CMV プロモーターの制御下で組換えタンパク質を発現させた。表 2 に示すプライマーを用いて実施例 1 に従い cDNA を得た。

【0088】

実験の開始前に、細胞を少なくとも 5 回継代して樹立した。実験には初期継代細胞を使用した (10 継代未満)。 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 生細胞 / ml の細胞密度になった時点で (一般に 48 ~ 72 時間毎に) 培養液を分割した。トリパンブルー排除を用いて細胞生存率を判定した (下記を参照)。FreeStyle (商標) 293 Expression Medium を記載されているように使用した。懸濁した FreeStyle (商標) 293 - F 細胞のトランスフェクションでは、キットに含まれていたカチオン性脂質ベースの FreeStyle (商標) MAX 試薬を導入した。陽性対照 pCMV SPORT-gal をトランスフェクションおよび発現の陽性対照ベクターとして用意した。30 ml 量の懸濁液の FreeStyle (商標) 293 - F 細胞にトランスフェクトするため、37.5 μ g のプラスミド DNA を加えた。トランスフェクションのほぼ 24 時間前、FreeStyle (商標) 293 - F 細胞を $6 \sim 7 \times 10^5$ 細胞 / ml で継代した。フラスコをオービタルシェーカーのプラットフォーム上に置き、135 rpm、37、8% CO₂ で回転させた。トランスフェクションの当日、細胞密度を調べ、 1.2×10^6 細胞 / ml 未満を含むコロニーを捨てた。次に、細胞を 1×10^6 細胞 / ml に希釈した。次いで 125 ml の振盪フラスコにそれぞれ 30 ml の細胞を加えた。次いで FreeStyle (商標) MAX Transfection Reagent のチューブを数回反転させ、全量 0.6 ml となるように 37.5 μ g のプラスミド DNA を含む、キットに用意された OptiPro (商標) SFM (Invitrogen) で希釈した。別のチューブで、37.5 μ l の FreeStyle (商標) MAX 試薬を含む OptiPro (商標) SFM を全量 0.6 ml になるように希釈し、揺動により穏やかに混合した。混合物を室温で 10 分間穏やかにインキュベートして複合体を形成させた。次いで、細胞を含む 125 ml のフラスコにそれぞれ 1.2 ml の DNA - 脂質混合物を加えた。次に、トランスフェクトした細胞培養液をオービタルシェーカープラットフォーム上で 37、8% CO₂ にてインキュベートし、135 rpm で 5 日間回転させた。タンパク質発現は、トランスフェクションから 4 ~ 8 時間以内で検出可能であり、タンパク質の収率は、発現したコンストラクトによってトランスフェクションから 2 ~ 7 日後に最大となった。

【0089】

発現したコンストラクトの精製は、Smith T et al (2000), Arch Biochem Biophys 375 (1): 195 - 200 に記載されているように Ni - 親和性およびイオン交換 FPLC クロマトグラフィーにより行った。次に純粋なタンパク質を緩衝液で溶出し、4、3000 g で VivaSpin 20 (Sartorius Stedim Biotech) 限外濾過スピンカラムを用いて濃縮し、最後に -80 で保存した。

【0090】

発現タンパク質は、遅延引き出しおよびリフレクターを備えた Bruker Biflex III 機器 (Bruker Daltonics) を用いてマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型 (MALDI - TOF) 質量分析法 (MS) により解析した。ペプチドのスペクトルは、トリプシン自己消化ペプチド内部標準を使用して校正した。タンパク質を同定するため、ProFound 検索エンジンを用いて NCBI nr 配列データベースの検索を行った。1 つのミスカット、アルキル化、およびメチオニンの部分酸化を許容した。同定の重要性は、確率値である「Z」値、およびシーケンスカバレッジ率により評価した。ペプチドの予想 m/z はすべて、質量スペクトルの主要なピークとして出現した。

【0091】

実施例 5

G S Tを用いた、M E G 1およびC U B 5 - 8のビーズへの末端結合

実施例 2 に記載されているように発現させたM E G 1およびC U B 5 - 8を、H o d n e l a n d C D e t a l , 上掲に記載されているようにグルタチオン - S e p h a d e x (登録商標) ビーズに結合させた。簡単に説明すると、2 m g のグルタチオン - S e p h a d e x (S i g m a) を、ガラスカラム中で20 μ g の精製されたM E G 1、20 μ g のC U B 5 - 8および2 m l の0.25 M のN a C l と混合し、穏やかに1時間攪拌した。洗浄は、緩衝液(20 m M のトリス、p H 7.5 + 0.25 M のN a C l + 2 m M のE D T A + 2 m M のE G T A + 0.03 % B r i j - 35 (S i g m a))で行った。

10

【0092】

成功した結合の検出は、最初にカラムをP B Sで5回(合計5カラム体積)洗浄し、次いで1 m g のビーズを0.5 m l の洗浄用緩衝液(20 m M のトリス + 0.25 M のN a C l + 2 m M のE D T A + 2 m M のE G T A + 0.03 % B r i j - 35 + 20 m M のグルタチオン)およびN a O Hとp H 8.0まで混合し、上清のウエスタンブロット解析を行い、M E G 1およびC U B 5 - 8を検出することにより行った。

【0093】

実施例 6

ビオチン - アビジン結合を用いた、M E G 3およびC U B 1 - 7のビーズへの末端結合

ビオチン化タンパク質を実施例 3 に記載されているように合成した。結合には、製造者の指示に従いD y n a b e a d s (登録商標) M y O n e (商標) ストレプトアビジンC 1 (I n v i t r o g e n) を使用した。簡単に説明すると、P B Sに再懸濁し、3回洗浄した後、ビーズ1 m g に対して10 μ g の精製されたM E G 3タンパク質および10 μ g の精製されたC U B 1 - 7タンパク質を加えた。混合液を穏やかに回転させながら室温で30分間インキュベートした。コーティングされたビーズを磁石を使用して分離し、次いでP B Sで6回洗浄し、これに0.1 % B S Aおよび0.01 % T w e e n - 20を加えた。カラムは、使用時まで湿保存した。

20

【0094】

成功した結合の検出は、最初にカラムをP B Sで15回(合計15カラム体積)洗浄し、次いで1 m g のビーズを10 m l の1,8 m g / m l のE D T A p H 8.2および95 %ホルムアミドと混合することにより行った。室温で4時間穏やかに攪拌した後、上清のウエスタンブロット解析を行い、M E G 3およびC U B 1 - 7を検出した。

30

【0095】

実施例 7

H i s₁₀ - t a gを用いた、全長メガリンおよびキュビリンのビーズへの末端結合

ニッケル - ニトリロ三酢酸 (N i - N T A) アガロースビーズ (Q i a g e n) を、5 m M のC a C l₂ および1 m M のM g C l₂ を含むトリス - 緩衝食塩水 (T B S) (25 m M のトリス - H C l、137 m M のN a C l および3 m M のK C l、p H 7.0) で平衡化し、実施例 4 に記載されているように発現させて同じ緩衝液で調製した10 μ g の組換えH i s タグ付きメガリンタンパク質およびキュビリンタンパク質を室温で1時間インキュベートした。結合が飽和するまで(残った上清中の過剰なタンパク質を検出して判定)さらにタンパク質を加えた。1 m l のニッケルアガロースビーズでは、約12 μ g のキュビリンおよびメガリンがそれぞれ結合した。次いで、タンパク質コーティングされたビーズを1 m l のT B S + 20 m M のイミダゾールで4回(それぞれ5分間)洗浄し、T B Sに50 %スラリーとして懸濁した。

40

【0096】

成功した結合の検出は、最初にカラムを15回(合計15カラム体積)洗浄し、次いで1 m g のビーズを150 m M のイミダゾール1 m l と混合し、室温で5分間穏やかに振盪することにより行った。次いで上清をウエスタンブロットにより解析して結合したメガリンおよびキュビリンを検出した。

50

【0097】

実施例 8

メガリンポリペプチドおよびキュビリンポリペプチドでコーティングされたビーズを用いた、循環血中のペプチドホルモンの結合

実施例 2 に記載されているように作製された G S T と M E G 1 および C U B 5 - 8、または M E G 3 および C U B 1 - 7 との融合タンパク質を、実施例 5 に記載されているようにグルタチオン S e p h a r o s e (登録商標) 4 B ビーズ上にタンパク質のモル比 1 : 1 で固定化した。次いでビーズを 5 m l のカラム (「H E P」と呼ぶ; 4 m l のビーズ、デッドスペース 1 m l) に詰めた。対照カラムは、セファロース 4 B ビーズのみで調製した (「C T R」と呼ぶ; 4 m l のビーズ、デッドスペース 1 m l)。静脈血 (各 10 m l) を健常ヒトドナーおよび維持血液透析患者 1 例から採取し、ダルテパリン (P f i z e r ; 1 I E / m l の血液) と混合し、回転させて細胞を除去した。得られた血漿のうち、各個体の 1 つのアリコート を 1 g で各カラム (H E P および C T R) に通した。次いで非結合の画分を二次元ゲル電気泳動に直接使用し、続いてカラムを P B S で 10 回洗浄し、その後結合した画分を、15 m l の溶出緩衝液 (50 m M のトリス - H C l の p H 8 および 10 m M の R e d u c e d G l u t a t h i o n e、S i g m a) を使用し、栓をしたカラムにそれぞれ溶出し、これを室温で 20 分間揺動し、次いで 500 g で 5 分間遠心し、排出し、液体を集めた。カラム毎にこの溶出手順を合計 3 回繰り返し、各カラムの全溶出液を二次元ゲル電気泳動用にプールした。

【0098】

通過の前および後の血漿について、B r a d f o r d 反応を用いて総タンパク質含有量を試験した (10 μ l の画分 + 90 μ l の水 + 1 m l の B r a d f o r d 試薬 (P i e r c e) ; 590 n m および 450 n m で吸光度を測定し、これらの間の比率を使用してタンパク質濃度を算出した)。次いで同じアリコートを、 β -メルカプトエタノールを含む等量の S D S - P A G E ローディングバッファーと混合し、100 で 5 分間煮沸した。次いで変性したタンパク質を個別に 10 % S D S - ポリアクリルアミドゲル上で分離し、その後銀溶液およびクーマシーブリリアントブルー溶液で染色した。精製されたタンパク質をニトロセルロース膜にトランスファーし (定電流 20 m A、4 で一晚)、5 % 粉乳を含む P B S でブロッキングした (室温 2 時間)。ゲルを乾燥させ、露出させて F u j i X 2000 ホスホイメジャー (F u j i) でスキャンした。次いで銀染色したゲルを、M a g i c S c a n 32 (A m e r s h a m) および A I D A (I M G) ソフトウェアを含む I m a g e S c a n n e r (A m e r s h a m) でスキャンし、I m a g e M a s t e r 2 D E l i t e ソフトウェア (A m e r s h a m) で解析した。得られた画像を図 3 に示す。

【0099】

実施例 9

タンパク質結合に対するサイズ排除の影響

維持血液透析を必要とする慢性腎疾患の 7 例の患者から静脈血 (各 5 m l) を採取し、プールし、ダルテパリン (P f i z e r ; 1 I E / m l の血液) と混合した。次いで混合物を遠沈させて細胞を除去した。得られた血漿のうち 1 m l のアリコート 1 つを、実施例 6 により M E G 3 および C U B 1 - 7 にビオチン化し、調製した 2 m g の S e p h a d e x (登録商標) を含むカラムに通した。1 m l の血漿の別のアリコートをサイズ排除フィルター (C e n t r i c o n e 30 K, M i l l i p o r e ; 5000 g で 10 分間回転) に通し、次いで実施例 6 により調製した M E G 3 および C U B 1 - 7 を含む別のカラムに通した。

【0100】

4 群のそれぞれのサンプル (サイズ排除を用いたものおよび用いないものと、カラムの前のものおよび後のもの) を、r p H P L C を用いて別々に解析した。300 μ g の血漿を m R P - C 18 カラム (A g i l e n t T e c h n o l o g i e s) にロードした。各サンプルに、尿素ベレット (22 m g) を 6 μ l の純水酢酸と共に加え、最終濃度を 6

Mの尿素および0.1%酢酸とした。逆相HPLCを0.75 ml/分の流量、および80 のカラム温度で行った。緩衝液A（水/0.1% TFA）およびB（アセトニトリル/0.1% TFA）の直線マルチセグメントグラジエントは、以下の通りである：時間0分3%B；1分3%B；6分30%B；39分55%B；49分100%B；53分100%B；58分3%B。予想通り、サイズ排除により、比較的高分子量のタンパク質のかなりの量が除去されたが、全部が除去されるわけではなかった。この除去の結果、おそらく競合的結合が減少したため、残りのペプチドがカラムに非常に結合しやすくなった。得られたクロマトグラムの代表的なサンプルを図4として示す。

【0101】

実施例10

総タンパク質結合に対する通過量およびメガリン：キュビリン比の影響

精製されたメガリンドメインおよびキュビリンドメインの比（w/w）を1:10（1 μgのMEG1および10 μgのCUB5-8/mlのビーズ）~10:1（10 μgのMEG1および1 μgのCUB5-8/mlのビーズ）に変更したこと以外は、実施例5に記載されているようにカラムを作製した。次に、静脈血漿を実施例9に記載されているように採取した。1 mlの血漿のアリコート1つを、メガリンおよびキュビリンを表面固定化した2 mgのビーズを含むガラスカラムに通す一方、1 mlの血漿を直ちに解析した。実施例8に記載されているようにBradford反応を用いて総タンパク質含有量（TPC）を判定した。実験は3回繰り返し、タンパク質濃度の変化の平均差（アリコートの前後）を図5に示す。このように、2 molのメガリンと1 molのキュビリンとの比率では、1 molのメガリンと2 molのキュビリンと同様にタンパク質が減少した。しかしながら、10 molのメガリンと1 molのキュビリンでは、カラムを通過する過程で著しく高レベルのタンパク質が除去された。

【0102】

実施例11

アフィニティーカラム中のMEG5-8に対するインスリンの結合

GST融合タンパク質MEG5-8を実施例2に記載されているように作製し、実施例5に記載されているようにグルタチオン-Sephadex（登録商標）4Bビーズ上に固定化した（2 mgのマトリックスをそれぞれ20 μgの精製されたMEG5-8と混合）。次いでビーズを3つの同等の5 mlカラムに詰めた（4 mlのビーズ、デッドスペース1 ml）。

【0103】

リガンドに対するメガリンの結合の特異性を試験するため、5 mlの最終容量になるように5% BSA（Sigma）およびPBSと混合した60 pg/mlの精製されたヒトインスリン（ヒューマリン100 IE/ml；Sanofi-Aventis）を使用した。この混合物をそのまま（ブランク）で、抗メガリン抗体（Abcam；20 ng）と混合して、抗インスリン抗体（Millipore；20 ng）と混合して、または両方の抗体（20 + 20 ng）と共にカラムに加えた。通過画分を集め、ウエスタンブロットを行った。その代表的なサンプルを図6Bに示す。さらに市販のELISA（Millipore）を用いて、通過したサンプル中のインスリン濃度を評価した（図6Aを参照）。図6Bに示すように、抗メガリンは、インスリンのカラムへの結合を著しく低下させたが、抗インスリンはそうではなかったことから、我々の装置によりメガリン特異的にインスリンが捕捉されることが証明された。

【0104】

実施例12

全長メガリンカラムの調製

Invitrogen（登録商標）Freestyle（商標）MAX HEK-293細胞（カタログ番号R790-07）を用いて既に調製したpcDNA（商標）4ベクターを使用して、実施例4と同様に全長His₁₀タグ付きメガリンを調製した。発現は、Prof. Renata Kozyraki, INSERM, Parisから好意によ

10

20

30

40

50

り提供された抗体を用いて、以前に記載されているようにウエスタンブロット解析により確認した (Le Panse et al (1995) Eur J Cell Biol 67 (2) : 120 - 129 ; Moestrup et al (1993) J Biol Chem 268 : 16564 - 16570)。

【0105】

5 mMのCaCl₂ および 1 mMのMgCl₂ を含むトリス - 緩衝食塩水 (TBS) (25 mMのトリス - HCl、137 mMのNaCl および 3 mMのKCl、pH 7.0) でニッケル - ニトリロ三酢酸 (Ni-NTA) アガロースビーズ (Qiagen) を平衡化し、同じ緩衝液で調製した 2 µg の組換え His₁₀ タグ付きタンパク質を室温で 1 時間インキュベートした。結合が飽和するまで (Bradford アッセイを用いて残った上清中の過剰なタンパク質を検出して判定) さらにタンパク質を加えた。1 ml のニッケルアガロースビーズでは、約 10 µg のメガリンが結合した。次いで、タンパク質コーティングされたビーズを 1 ml の TBS + 20 mM のイミダゾールで 4 回洗浄し (それぞれ 5 分間)、50 % スラリーとして TBS に懸濁した。

10

【0106】

成功した結合の検出は、最初にカラムを 15 回 (合計 15 カラム体積) 洗浄し、次いで 1 mg のビーズを 150 mM のイミダゾール 1 ml と混合し、室温で 5 分間穏やかに振盪することにより行った。次いで上記のように上清をウエスタンブロットにより解析して結合メガリンを検出した。

20

【0107】

最後に、8 µM のフリット (Whatman (登録商標) Grade 40 ディスクフィルター) を備えた、1.5 ml のオートクレープ処理したガラスカラムを、ビーズを用いて調製し、室温で乾燥させ、穏やかに振盪しながら 20 % エタノールを一杯となるまで充填した。最終カラムにキャップし、シールし、使用時まで 8 で保存した (8 日以内)。

【0108】

実施例 13

全長メガリンカラムを用いた 5 / 6 腎摘出したラットの処置。

動物：雌雄の 8 週齢 Sprague - Dawley ラットを Charles River Labs から取得した。この動物をメガリン (MEG) カラムもしくはプラセボ (CTRL) カラム、またはシャム手術 (SHAM) に 1 : 1 : 1 の比で無作為に割り付けた。

30

【0109】

カラム：全長メガリンカラムを実施例 12 と同様に調製した。プラセボカラムは、まったく同じように調製したが、結合メガリンタンパク質を含まないニッケル - ニトリロ三酢酸 (Ni-NTA) アガロースビーズ (Qiagen) を使用した。

【0110】

動物の取扱い：1 週間の馴化期間後、以前に記載されているように 8 匹の雄ラットに 5 / 6 腎全摘出を施行した (Shimamura and Morrison (1975) Am J Pathol 79 : 95 - 106)。4 匹の他の雄ラットには、腎実質の除去を行わずに偽腹壁切除術を施行した。各腎摘出群の動物 1 匹が手術中に死亡した。種々後、ラットに 2 週間の回復期間を与え、実験ストレスを低下させるように毎日面倒を見た。全試験期間中、水および標準的な固形飼料を自由に与えた。ラットは、標準的なケージにそれぞれ雄 1 匹および雌 2 匹を収容して飼育した。環境エンリッチメントを実施した。

40

【0111】

試験のサンプリング：本試験は、手術から 15 日後に開始した。セボフロランガス吸入によりラットを 1 日 1 回朝麻醉し、全手順中 O₂ を補給した。以前の麻醉軟膏を用いて各アフレーシス後に除去した尾静脈カテーテルを使用して、2 ml の血液を、抗凝固薬として 1.1 mg のクエン酸一水和物を含むチューブに移した。血液を混合し、直ちに 3

50

0 k D a カットオフ C e n t r i C o n e (登録商標) フィルター (M i l l i p o r e) を通して回転させ、ずっと 39 の加熱フードで保管した。次いでフィルターを後方から、38 に予め加熱した 0 . 5 m l の等張食塩水で慎重に洗浄した。次にサイズフィルター通過画分を予め洗浄したビーズカラムを通過させ (試験群に従い決定された M E G または C T R L) 、 0 . 1 m l を集め、その後のプール解析のため - 80 で保存した。処理した残りの血漿は、サイズフィルター溶出液 / 非通過画分と混合した。得られた処理血液を直ちにカテーテルにより再注入し、この手順を 3 回繰り返した。偽手術動物は、プラセボカラム (すなわち結合メガリンを含まない) に流した。

【 0 1 1 2 】

行動のモニタリング：試験の 20 日目から 3 日間の期間、ラットを 1 日 24 時間記録した。記録は、P C 接続されたデジタルビデオカメラ (S o n y H D R - C X 5 5 0) で I R を用いて行った。保存された画像を検討し、ラットの摂食頻度および性行動 (S i s k a n d M e e k (2 0 0 1) 、 「 S e x u a l a n d R e p r o d u c t i v e B e h a v i o r s 」 i n C u r r e n t P r o t o c o l s i n N e u r o s c i e n c e , s e c t i o n s 8 . 2 . 1 - 8 . 2 . 1 5 に記載されている) を、ソフトウェア S B R を用いて定量した (C l a r o e t a l (1 9 9 0) P h y s i o l B e h a v 4 8 (3) : 4 8 9 - 4 9 3) 。

10

【 0 1 1 3 】

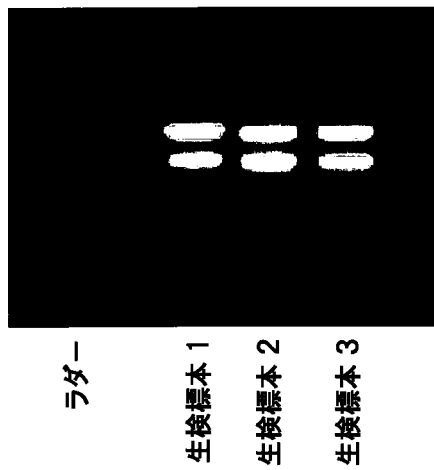
結果：8 日にわたる 24 回のカラム通過で処理された、プール画分のゲルおよびタンパク質含有量を図 7 に示す。正常な腎機能を持つ S H A M 群と比較して、腎摘出ラットは、血清クレアチニン (S H A M 0.8 ± 0.1 m g / d l と M E G 1.8 ± 0.4 m g / d l および C T R L 1.5 ± 0.4 m g / d l ; S H A M とそれ以外の群の $p < 0.05$) 、および尿素 (22 . 7 \pm 6 . 1 m g / d l と 45 . 0 \pm 5 . 7 m g / d l および 57 . 8 \pm 8 . 2 m g / d l ; $p < 0.05$) のレベルが有意に高かった。さらに、図 8 に示すように、腎摘出していない S H A M ラットと比較して、C T R L ラットでは性行動および摂食行動がどちらも有意に抑制されたのに対して、M E G ラットではそうではなかった。S H A M と C T R L との差はすべて有意であったのに対し、S H A M と M E G との差は有意ではなかった。摂食、勃起行動および q u i c k f l i p 行動は、C T R L ラットより M E G ラットで有意に ($p < 0.05$) よく認められるのに対し、l o n g f l i p 行動の差はこれらの 2 群間で統計学的に有意ではなかった。

20

30

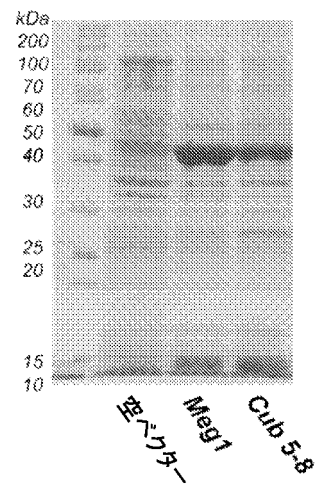
【 図 1 】

図1



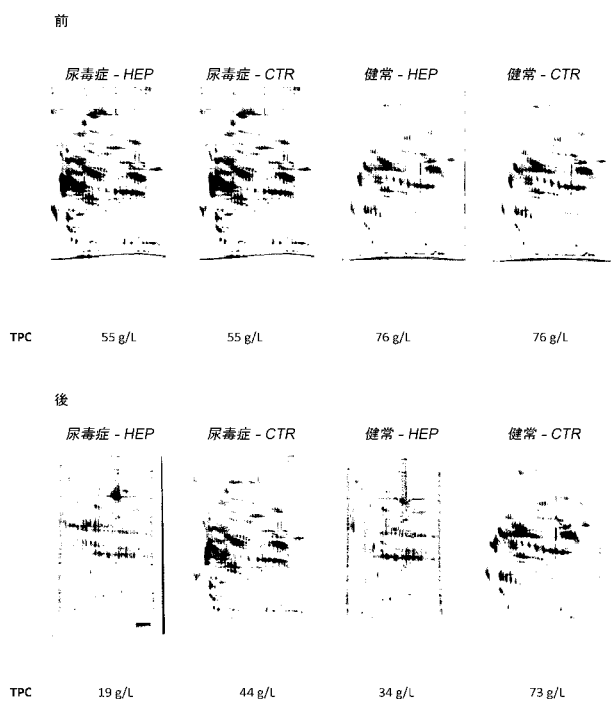
【 図 2 】

図2



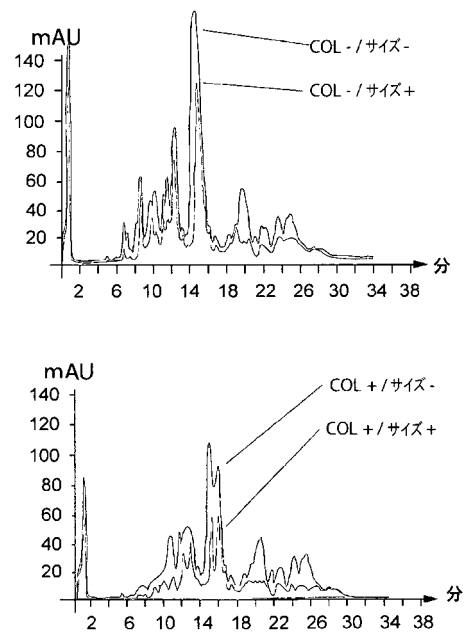
【 図 3 】

図3

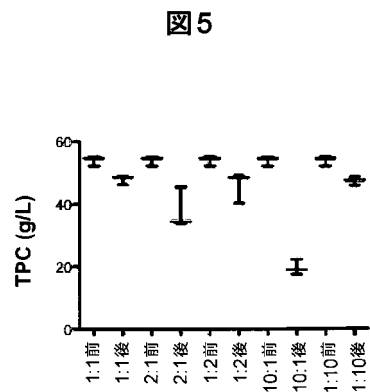


【 図 4 】

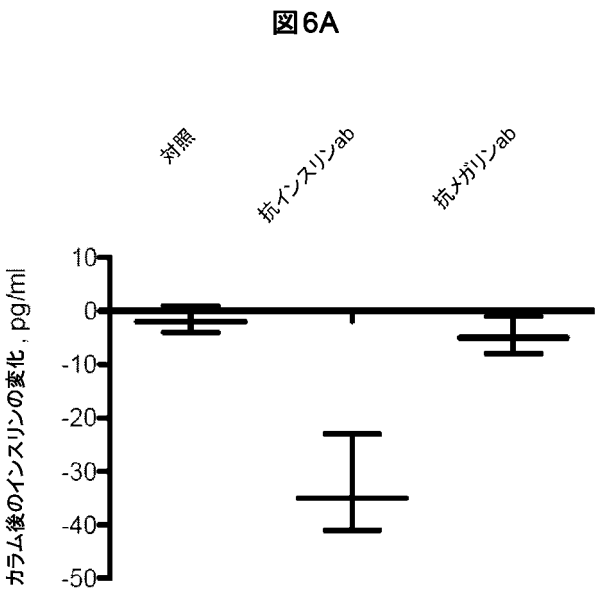
図4



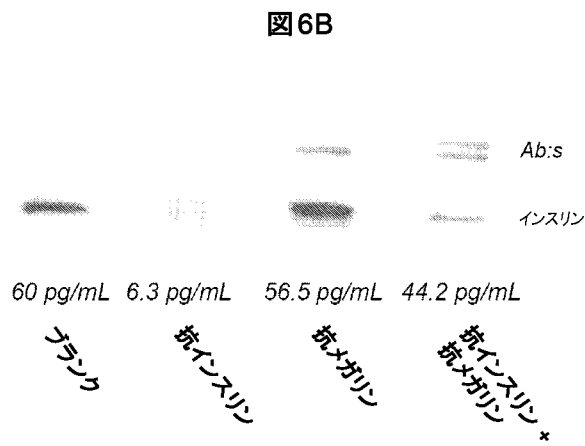
【 図 5 】



【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【 図 7 A 】

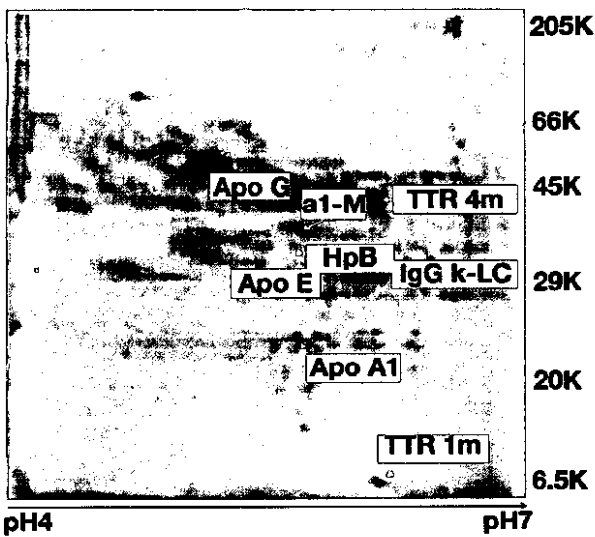


Figure 7A

【 図 7 B 】

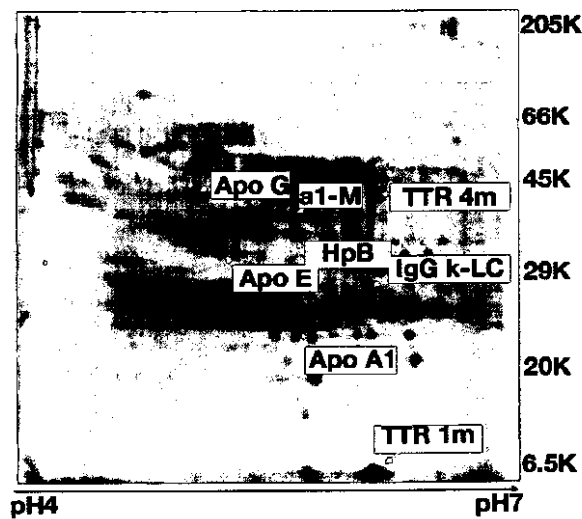


Figure 7B

【 図 8 】

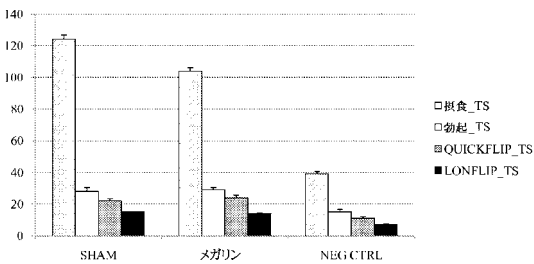


図 8

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/060130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K17/02 C07K14/705 A61M1/14
ADD.

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)

C07K A61M

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/080103 A1 (MAX DELBRUECK CENTRUM [DE]; WILLNOW THOMAS [DE]) 2 October 2003 (2003-10-02) page 5, line 16 - line 25; claim 53 page 22, line 1 - line 10 -----	1-18
X	US 6 586 389 B1 (VERROUST PIERRE J [FR] ET AL) 1 July 2003 (2003-07-01) column 4, line 53 - line 64; figures 9,10; examples 5-7, 20 ----- -/--	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* 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 document 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

13 September 2011

Date of mailing of the international search report

21/09/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bayer, Martin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/060130

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEHESTE JOERG-ROBERT ET AL: "Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria", AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 155, no. 4, October 1999 (1999-10), pages 1361-1370, XP002651582, ISSN: 0002-9440 the whole document	1-18
Y	----- EP 1 388 327 A1 (KANEKA CORP [JP]; TABATA YASUHIKO [JP]; SAITO AKIHIKO [JP]) 11 February 2004 (2004-02-11) the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP2011/060130**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-18(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2011/ 060130

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising
 a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 1, and
 b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 13
 immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

2-8. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising
 a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 1, and
 b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 14-20
 immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

9-16. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising
 a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 2, and
 b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 13-20
 immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

17-24. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising
 a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 3, and
 b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 13-20
 immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a

International Application No. PCT/ EP2011/ 066130

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

25-32. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising

a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 4, and

b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 13-20

immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

33-40. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising

a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 5, and

b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 13-20

immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

41-48. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising

a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO.6, and

b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 13-20

immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

49-56. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising

a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 7, and

b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 13-20

immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a

International Application No. PCT/EP2011/060130

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

57-64. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising
 a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 8, and
 b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 13-20
 immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

65-72. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising
 a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 9, and
 b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 13-20
 immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

73-80. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising
 a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 10, and
 b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 13-20
 immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

81-88. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising
 a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 11, and
 b. at least one cubilin polypeptide,consisting of SEQ ID NO: 13-20
 immobilized on a support, a medical device comprising said

International Application No. PCT/ EP2011/ 060130

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

89-96. claims: 1, 4-18(all partially)

A separation medium comprising
a. at least one megalin polypeptide consisting of SEQ ID NO. 12, and
b. at least one cubilin polypeptide, consisting of SEQ ID NO: 13-20
immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

97-108. claims: 2, 4, 6-18(all partially)

A separation medium comprising at least one megalin polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1-12
immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

109-116. claims: 3, 5-18(all partially)

A separation medium comprising at least one cubilin polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 13-20
immobilized on a support, a medical device comprising said separation medium, a method for extracorporeal removal of a low molecular weight protein or fragment thereof, from a complex biological fluid comprising using said separation medium, and the use of said device.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/060130

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03080103	A1	02-10-2003	AU 2002307802 A1 08-10-2003 EP 1501535 A1 02-02-2005
US 6586389	B1	01-07-2003	NONE
EP 1388327	A1	11-02-2004	CA 2445785 A1 21-11-2002 CN 1509155 A 30-06-2004 HK 1064024 A1 11-04-2008 WO 02091955 A1 21-11-2002 JP 4181877 B2 19-11-2008 TW 1221421 B 01-10-2004 US 2004235161 A1 25-11-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

B 0 1 J 20/24

C

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4C077 AA05 BB01 BB03 KK11 LL01 LL05 MM02 MM03 NN04 NN05
NN08
4G066 AC01C AC03B AC03C CA54 DA12 EA04