【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】令和5年9月4日(2023.9.4)

【国際公開番号】WO2021/050217
【公表番号】特表2022-547574(P2022-547574A)
【公表日】令和4年11月14日(2022.11.14)
【年通号数】公開公報(特許)2022-209
【出願番号】特願2022-516046(P2022-516046)
【国際特許分類】
C12N 15/13(2006.01)
C07K 16/38(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12N 1/15(2006.01)
C12N 1/19(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12P 21/02(2006.01)
C12P 21/08(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61K 31/5386(2006.01)
A61K 38/07(2006.01)
A61K 38/08(2019.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)
A61K 47/55(2017.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61K 51/10(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ １５/１３
Ｃ０７Ｋ １６/３８　　ＺＮＡ
Ｃ０７Ｋ １６/４６
Ｃ０７Ｋ １９/００
Ｃ１２Ｎ １５/６２　　Ｚ
Ｃ１２Ｎ １５/６３　　Ｚ
Ｃ１２Ｎ　１/１５
Ｃ１２Ｎ　１/１９
Ｃ１２Ｎ　１/２１
Ｃ１２Ｎ　５/１０
Ｃ１２Ｐ ２１/０２　　Ｃ

Ｃ１２Ｐ ２１/０８
Ａ６１Ｋ ３９/３９５ Ｎ
Ａ６１Ｋ ３９/３９５ Ｌ
Ａ６１Ｐ ４３/００ １１１
Ａ６１Ｐ ４３/００ １０５
Ａ６１Ｐ １/１６
Ａ６１Ｐ ３５/００
Ａ６１Ｐ ３１/１２
Ａ６１Ｐ ２９/００
Ａ６１Ｋ ３１/５３８６
Ａ６１Ｋ ３８/０７
Ａ６１Ｋ ３８/０８
Ａ６１Ｋ ４５/００
Ａ６１Ｋ ４７/６８
Ａ６１Ｋ ４７/５５
Ｇ０１Ｎ ３３/５３ Ｄ
Ｇ０１Ｎ ３３/５７４ Ｄ
Ａ６１Ｋ ４８/００
Ａ６１Ｋ ５１/１０ １００

【手続補正書】
【提出日】令和5年8月18日(2023.8.18)
【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】
異常分泌－セリンプロテアーゼインヒビターＫＡＺＡＬ（ＡＳ－ＳＰＩＫ）タンパク質（配列番号２）の立体構造エピトープに特異的に結合し、正常分泌－セリンプロテアーゼインヒビターＫＡＺＡＬ（ＮＳ－ＳＰＩＫ）タンパク質（配列番号４）に特異的に結合しない単離抗体であって、前記ＡＳ－ＳＰＩＫタンパク質の前記立体構造エピトープは、
配列番号２のＬ１４、Ｌ１５、Ｓ１６、Ｌ１７、Ｄ２４及びＳ２５からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸と、
配列番号２のＣ５８、Ｖ５９、Ｌ６０、Ｃ６１、及びＦ６２からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸と
を含む、２つの別々の領域を含み、
前記単離抗体が、前記２つの別々の領域のそれぞれにおいて少なくとも１つのアミノ酸に結合する、単離抗体。
【請求項２】
前記立体構造エピトープは、配列番号２のアミノ酸Ｌ１４、Ｌ１５、Ｓ１６、及びＬ１７、配列番号２のアミノ酸Ｌ６０及びＣ６１、または配列番号２のアミノ酸Ｌ１４、Ｌ１５、Ｓ１６、Ｌ１７、Ｌ６０、及びＣ６１、を含む、請求項１に記載の単離抗体。
【請求項３】
前記立体構造エピトープは、配列番号２のアミノ酸Ｄ２４及びＳ２５、配列番号２のアミノ酸Ｃ５８、Ｖ５９及びＦ６２、または配列番号２のアミノ酸Ｌ１４、Ｌ１５、Ｓ１６、Ｌ１７、Ｄ２４、Ｓ２５、Ｃ５８、Ｖ５９、Ｌ６０、Ｃ６１及びＦ６２をさらに含む、請求項２に記載の単離抗体。
【請求項４】

Ｓ６を含むＣＤＲＨ１配列；及び／または
Ｉ２、Ｇ５、Ｇ６、Ｙ１０及びＫ１６を含むＣＤＲＨ２配列；及び／または
Ｇ４及びＹ７を含むＣＤＲＨ３配列；及び／または
Ｑ４及びＳ９を含むＣＤＲＬ１配列；及び／または
Ａ２、Ｓ３、Ｔ４及びＳ７を含むＣＤＲＬ２配列；及び／または
Ｑ１、Ｑ２、Ｙ４及びＳ５を含むＣＤＲＬ３配列
を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の単離抗体。
【請求項５】
Ｓ６を含むＣＤＲＨ１配列と、
Ｉ２、Ｇ５、Ｇ６、Ｙ１０及びＫ１６を含むＣＤＲＨ２配列と、
Ｇ４及びＹ７を含むＣＤＲＨ３配列と、
Ｑ４及びＳ９を含むＣＤＲＬ１配列と、
Ａ２、Ｓ３、Ｔ４及びＳ７を含むＣＤＲＬ２配列と、
Ｑ１、Ｑ２、Ｙ４及びＳ５を含むＣＤＲＬ３配列と
を含む、請求項４に記載の単離抗体。
【請求項６】
ＡＳ－ＳＰＩＫタンパク質（配列番号２）の立体構造エピトープに特異的に結合し、ＮＳ－ＳＰＩＫタンパク質（配列番号４）に特異的に結合しない単離抗体であって、前記ＡＳ－ＳＰＩＫタンパク質の前記立体構造エピトープは、
配列番号２のＬ３６、Ｎ３７、Ｉ４２及びＹ４３からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸と、
配列番号２のＲ６７、Ｑ６８、Ｉ７１及びＬ７２からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸と
を含む、２つの別々の領域を含み、
前記単離抗体が、前記２つの別々の領域のそれぞれにおいて少なくとも１つのアミノ酸に結合する、単離抗体。
【請求項７】
前記立体構造エピトープは、配列番号２のアミノ酸Ｌ３６及びＮ３７、配列番号２のアミノ酸Ｉ４２及びＹ４３、配列番号２のアミノ酸Ｌ３６、Ｎ３７、Ｉ４２及びＹ４３、配列番号２のアミノ酸Ｒ６７、Ｑ６８、Ｉ７１及びＬ７２、または配列番号２のアミノ酸Ｌ３６、Ｎ３７、Ｉ４２、Ｙ４３、Ｒ６７、Ｑ６８、Ｉ７１及びＬ７２、を含む、請求項６に記載の単離抗体。
【請求項８】
Ｙ３、Ｓ７及びＷ９を含むＣＤＲＨ１配列；及び／または
Ａ１、Ｉ２、Ｇ４、Ｇ６及びＹ１０を含むＣＤＲＨ２配列；及び／または
Ｒ１及びＤ７を含むＣＤＲＨ３配列；及び／または
Ａ２、Ｓ３、Ｑ４、Ｉ６、Ｙ９、Ｌ１０及びＳ１１を含むＣＤＲＬ１配列；及び／または
Ａ２、Ｓ３、Ｌ５及びＳ７を含むＣＤＲＬ２配列；及び／または
Ｑ１、Ｑ２、及びＴ５を含むＣＤＲＬ３配列を含む、請求項６または７に記載の単離抗体。
【請求項９】
Ｙ３、Ｓ７及びＷ９を含むＣＤＲＨ１配列と、
Ａ１、Ｉ２、Ｇ４、Ｇ６及びＹ１０を含むＣＤＲＨ２配列と、
Ｒ１及びＤ７を含むＣＤＲＨ３配列と、
Ａ２、Ｓ３、Ｑ４、Ｉ６、Ｙ９、Ｌ１０及びＳ１１を含むＣＤＲＬ１配列と、
Ａ２、Ｓ３、Ｌ５及びＳ７を含むＣＤＲＬ２配列と、
Ｑ１、Ｑ２、及びＴ５を含むＣＤＲＬ３配列と
を含む、請求項８に記載の単離抗体。
【請求項１０】
請求項１～９のいずれか１項に記載の単離抗体を含む、医薬組成物。

【請求項１１】
ＡＳ－ＳＰＩＫの発現を特徴とする障害の処置における使用のための、請求項１～９のいずれか１項に記載の単離抗体。
【請求項１２】
前記障害が、肝細胞癌、肝内胆管癌、肝臓のウイルス感染症、肝臓の炎症性障害、及び肝硬変症からなる群から任意選択的に選択される肝障害である、請求項１１に記載の使用のための単離抗体。
【請求項１３】
対象がＡＳ－ＳＰＩＫの発現を特徴とする障害を有するか、またはそれを発症するリスクがあるかどうかを決定するための診断方法であって、
（ａ）前記対象から得られた生物学的試験サンプルを提供することと、
（ｂ）前記生物学的試験サンプルを請求項１～９のいずれか１項に記載のＡＳ－ＳＰＩＫ抗体と接触させて、ＡＳ－ＳＰＩＫ・抗体複合体を形成することと、
（ｃ）前記生物学的試験サンプル中の前記ＡＳ－ＳＰＩＫ・抗体複合体の濃度を検出することと、
（ｄ）前記ＡＳ－ＳＰＩＫ・抗体複合体の前記濃度を基準値と比較して、前記対象が前記障害を有するか、またはそれを発症するリスクがあるかどうかを決定することと
を含む、診断方法。
【請求項１４】
対象がＡＳ－ＳＰＩＫの発現を特徴とする障害を有するか、またはそれを発症するリスクがあるかどうかを決定するための診断方法であって、
（ａ）前記対象から得られた生物学的試験サンプルを提供することと、
（ｂ）前記生物学的試験サンプルをＳＰＩＫに特異的に結合する第１の抗体または抗原結合フラグメントと接触させて、ＳＰＩＫ・抗体複合体を形成することと、
（ｃ）前記ＳＰＩＫ・抗体複合体を請求項１～９のいずれか１項に記載のＡＳ－ＳＰＩＫ抗体または抗原結合フラグメントと接触させて、ＡＳ－ＳＰＩＫ・抗体複合体を形成することと、
（ｄ）前記生物学的試験サンプル中の前記ＡＳ－ＳＰＩＫ・抗体複合体の濃度を検出することと、
（ｅ）前記ＡＳ－ＳＰＩＫ・抗体複合体の前記濃度を基準値と比較して、前記対象が前記障害を有するか、またはそれを発症するリスクがあるかどうかを決定することと
を含む、診断方法。
【請求項１５】
前記障害が肝障害である、請求項１３または１４に記載の診断方法。
【請求項１６】
請求項１～９のいずれか１項に記載の単離抗体を含む、キット。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００２】
政府の権利
本発明は、Ｓｍａｌｌ Ｂｕｓｉｎｅｓｓ Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（ＳＢＩＲ）プログラムのもとで米国国立衛生研究所（ＮＩＨ）により授与された助成金番号２Ｒ４４ＣＡ１６５３１４－０２Ａ１及びＦＡＩＮ番号Ｒ４４ＣＡ１６５３１４のもと政府支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出され、参照によりその全体を組み込んだものとする配列表を含む。２０２０年１０月１２日に作成された上記ＡＳＣＩＩコピーは、ＩＭ

Ｃ－０００３－ＷＯ＿ＳＬ．ｔｘｔという名称でサイズが５０，２９８バイトである。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２８】
【図１】ゲル電気泳動を使用してＡＳ－ＳＰＩＫ及びＮＳ－ＳＰＩＫのサイズを示す。
【図２】エドマンＮ末端分析によるＡＳ－ＳＰＩＫのＮ末端配列を示す。図は、「ＫＶＴＧＩ」を配列番号８５として開示する。
【図３】ＡＳ－ＳＰＩＫ及びＮＳ－ＳＰＩＫのアミノ酸配列の比較を示す（それぞれ、配列番号２及び４）。
【図４】ＡＳ－ＳＰＩＫの三次元構造のＮＳ－ＳＰＩＫの三次元構造との比較を示す。
【図５】ＡＳ－ＳＰＩＫ及びＮＳ－ＳＰＩＫに結合する抗体の結合活性の試験結果を示す。
【図６】合成ペプチドに対する抗ＡＳ－ＳＰＩＫ抗体の結合試験の結果を示す（出現順にそれぞれ、配列番号８６～８９）。
【図７】ＡＳ－ＳＰＩＫ及びそのエピトープの三次元構造（結晶モデル）を示す。
【図８】クラスＩ抗ＡＳ－ＳＰＩＫ抗体の結合部位の位置を特定するための阻害試験の結果を示す。図は、出現順にそれぞれ、配列番号９０～１０３を開示する。
【図９】クラスＩ抗ＡＳ－ＳＰＩＫ抗体におけるＣＤＲのコンセンサスアミノ酸を示す。
【図１０】クラスＩＩ抗ＡＳ－ＳＰＩＫ抗体におけるＣＤＲのコンセンサスアミノ酸を示す。
【図１１】ＡＳ－ＳＰＩＫ検出キットに関するメカニズムの説明を示す。
【図１２】パネルＡは、ＩＭ－ＣＡ２２がＡＳ－ＳＰＩＫに特異的に結合するが、ＮＳ－ＳＰＩＫには特異的に結合しない一方で、抗体ＩＭ－ＢＡ２はＡＳ－ＳＰＩＫ及びＮＳ－ＳＰＩＫの両方に結合することを示すグラフである。パネルＢは、ＡＳ－ＳＰＩＫはＨＣＣでは上昇しているが、膵炎または健康な患者では上昇していないことを示すグラフである。パネルＣは、ＮＳ－ＳＰＩＫは膵炎患者では上昇しているが、ＡＳ－ＳＰＩＫベースの検出キットの性能に干渉しないことを示すグラフである。
【図１３】クラスＩ及びクラスＩＩ抗ＡＳ－ＳＰＩＫ抗体の結合特性を示す表（表１）である。
【図１４】ＣＬＩＰＳ分析試験によって予測される抗ＡＳ－ＳＰＩＫ結合に関する領域、及びその中のエピトープを構成するアミノ酸残基を示す表（表２）である。図は、ＣＬＩＰＳが予測する領域１、領域４、領域２、及び領域４の配列を、全て出現順にそれぞれ、配列番号１０４～１０８及び７、配列番号１０９～１１３及び８、配列番号１１４～１１９及び９、ならびに配列番号１２０～１２５及び１０として開示する。
【図１５】本明細書においてさらに示されるエピトープＩに結合する４例のクラスＩ抗体のアミノ酸配列を示す表（表３）である。
【図１６】本明細書においてさらに示されるエピトープＩＩに結合する４例のクラスＩＩ抗体のアミノ酸配列を示す表（表４）である。
【図１７】５１２のサンプルによる臨床試験における血清ＡＳ－ＳＰＩＫレベルを示す表（表５）である。
【図１８】ＨＣＣの検出におけるＡＳ－ＳＰＩＫ対ＡＦＰの性能の概要を示す表（表６）である。
【図１９】初期ＨＣＣ対後期ＨＣＣのＡＳ－ＳＰＩＫレベルを示す表（表７）である。
【図２０】ＢＣＬＣステージ別のＨＣＣにおけるＡＳ－ＳＰＩＫレベルを示す表（表８）である。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０１１５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１１５】
「Ｆｖ」フラグメントは、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、１つの重鎖可変ドメインと１つの軽鎖可変ドメインが、共有結合で緊密に結合した二量体からなる。この構成において、各可変ドメインの３つの超可変領域が相互作用して、ＶＨ・ＶＬ二量体の表面上の抗原結合部位を定義する。６つの超可変領域が抗原結合特異性を付与するが、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な３つの超可変領域しか含まないＦｖの半分）でも、結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識し、それに結合する能力を有する。安定性を向上させるために、ＶＨ・ＶＬドメインが、（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）３（配列番号８３）などの柔軟なペプチドリンカーによって接続されて、一本鎖ＦｖまたはｓｃＦｖ抗体フラグメントが形成されてもよく、あるいはフレームワーク領域に２つのシステイン残基を導入することによってジスルフィド結合を形成するよう操作されて、ジスルフィド安定化Ｆｖ（ｄｓＦｖ）を得てもよい。
【手続補正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】
対照として、本発明者らは、同時に、配列$_{36}$ＥＬＮＧＣＴＫＩＹＤＰＶ$_{47}$（配列番号８４）を含むペプチドを使用して、マウスにおいて一連のモノクローナル抗体を開発した。この配列は、ＡＳ－ＳＰＩＫ及びＮＳ－ＳＰＩＫの両方の共通配列（配列番号４）であり、図４において緑で着色されている。これは、ＡＳ－ＳＰＩＫ及びＮＳ－ＳＰＩＫの両方に結合する抗体ＩＭ－ＢＡ２の産生をもたらす（データは示していない）。しかしながら、本発明者らは、この方法を使用して、ＡＳ－ＳＰＩＫに特異的に結合するが、ＮＳ－ＳＰＩＫには特異的に結合しない抗体を生成することができなかった。これは、ＡＳ－ＳＰＩＫに特異的なエピトープが直鎖状ではなく立体構造であることを示唆する。
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２２２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２２２】
実施例７．エピトープＩ及びエピトープＩＩの重要な残基
両クラスの抗体に対するＡＳ－ＳＰＩＫの可能性のある結合領域を特定することに加えて、ＣＬＩＰＳ研究はまた、各領域内のアミノ酸のその結合親和性に対する相対的重要性も評価している。領域１（$_{7}$ＦＬＬＳＡＬＡＬＬＳＬＳＧＮＴＧＡＤＳＬＧＲＥＡ$_{29}$、配列番号７）及び領域４（$_{58}$ＣＶＬＣＦＥＮＲＫＲＱ$_{68}$、配列番号８）は、全てのクラスＩ抗体に対して必須の結合部位を構成する。領域１において結合機能に最も重要なアミノ酸は、$_{14}$ＬＬＳＬ$_{17}$（配列番号１２）であり、それより低い程度なのが$_{24}$ＤＳ$_{25}$（配列番号１３）である。領域４の重要な残基は、$_{58}$ＣＶＬＣＦ$_{26}$（配列番号１４）である。一緒に、これらのアミノ酸は、エピトープＩと呼ばれる、全てのクラスＩ抗体に対する不連続の立体構造エピトープを構成する（表２（図１４）及び図７）。このエピトープの不連続の性質は、これらの発見を確認するために本発明者らが実施した阻害試験によってさらに裏づけられる（図８に示される）。ここで、本発明者らは、$_{14}$ＬＬＳＬ$_{17}$（配列番号１２）を含む９個のアミノ酸を有する短いペプチドを合成した。このペプチドは、天然のＡＳ－ＳＰＩＫとクラスＩ抗体との間のこの領域における結合を阻害することができる。しかしながら、この結合の阻害は不完全であり、これは、結合に関与す

ＡＳ－ＳＰＩＫの別の第２の領域が存在することを示唆する。これは、抗ＡＳ－ＳＰＩＫが、ＡＳ－ＳＰＩＫの少なくとも２つの離れた領域を含むはずである不連続の立体構造依存的なエピトープに結合するという本発明者らの仮説と一致する。ＣＬＩＰＳ研究はまた、領域２（$_{36}$ＬＮＧＣＴＫＩＹＤ$_{44}$、配列番号９）及び領域４（$_{64}$ＮＲＫＲＱＴＳＩＬＩＱ$_{75}$、配列番号１０）のアミノ酸が全てのクラスＩＩ抗体に対して必須の結合部位を構成することを示している。領域２において結合機能に最も重要なアミノ酸は、$_{36}$ＬＮ$_{37}$（配列番号１５）及び$_{42}$ＩＹ$_{43}$（配列番号１６）である。領域４の重要な残基は、$_{67}$ＲＱ$_{68}$（配列番号１７）及び$_{71}$ＩＬ$_{72}$（配列番号１８）である。一緒に、これらのアミノ酸は、エピトープＩＩと呼ばれる、全てのクラスＩＩ抗体に対する不連続の立体構造エピトープを構成する（表２（図１４）及び図７）。Ｐｏｌｙ　Ｓの結合エピトープに対するＣＬＩＰＳ研究の結果は、Ｐｏｌｙ　Ｓにおける主要な抗体が、他のクラスＩＩ抗体と同様にエピトープＩＩに結合するため、クラスＩＩ抗ＡＳ－ＳＰＩＫ抗体と分類できることを示す。