

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7270141号  
(P7270141)

(45)発行日 令和5年5月10日(2023.5.10)

(24)登録日 令和5年4月27日(2023.4.27)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/56 (2006.01)	C 1 2 N 15/56	
C 1 2 N 9/24 (2006.01)	C 1 2 N 9/24	Z N A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 0 7 K 17/00 (2006.01)	C 0 7 K 17/00	
請求項の数 30 (全44頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2019-557612(P2019-557612)	(73)特許権者	500182460 ユニバーシティ・オブ・ジョージア・リサーチ・ファウンデーション・インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 6 0 2 , アセンズ, ジャクソン ストリート 2 1 0 , テレル ホール 1 1 0
(86)(22)出願日	平成30年4月24日(2018.4.24)	(73)特許権者	511140367 グリコセンサーズ アンド ダイアグノスティクス リミテッド ライアビリティカンパニー アメリカ合衆国 ジョージア州 アテネリバーバンド ロード 1 1 1
(65)公表番号	特表2020-517280(P2020-517280 A)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(43)公表日	令和2年6月18日(2020.6.18)		
(86)国際出願番号	PCT/US2018/029079		
(87)国際公開番号	WO2018/200478		
(87)国際公開日	平成30年11月1日(2018.11.1)		
審査請求日	令和3年4月23日(2021.4.23)		
(31)優先権主張番号	62/489,243		
(32)優先日	平成29年4月24日(2017.4.24)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シアル酸結合性ポリペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対応する野生型 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質と比較して少なくとも1つのアミノ酸変異を有する、触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片を含むシアル酸認識親和性試薬であって、前記少なくとも1つの変異は、( i ) 配列番号1の E 5 4 1 Q もしくは配列番号4の E 5 1 2 Q、( i i ) 配列番号1の R 1 9 3 A、D 2 7 0 Q、A 5 3 8 V、及び E 5 4 1 D もしくは配列番号4の R 1 6 4 A、D 2 4 1 Q、A 5 0 9 V、及び E 5 1 2 D、( i i i ) 配列番号1の E 5 4 1 A もしくは配列番号4の E 5 1 2 A、あるいは、( i v ) 配列番号1の Y 6 5 3 F もしくは配列番号4の Y 6 2 4 F、であり、

ここで、前記触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片の少なくとも1つの変異は、

- ( a ) 前記 N a n B タンパク質のノイラミニダーゼ活性を低減又は排除し、且つ
- ( b ) シアル酸結合親和性又は結合特異性を変化させ、

前記触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片は、グリカンのシアル酸成分に結合し、ここで、前記( i )、( i i i )、又は、( i v ) の少なくとも1つの変異を含む前記触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片は、シアル酸に対して p a n 特異的であるか、あるいは、前記( i i ) の変異を含む前記触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片は、 2 , 6 結合及び 2 , 8 結合と比べて 2 , 3 結合シアルグリカンに対して特異的である、シアル酸認識親和性試薬。

## 【請求項 2】

前記触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片は、N e u 5 A c の少なくとも 1 つのバリエーションに結合する、請求項 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

## 【請求項 3】

前記グリカンは、グリコシル化生体分子の構成成分である、請求項 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

## 【請求項 4】

前記グリコシル化生体分子は、糖タンパク質、グリコペプチド、糖脂質、グリコリポタンパク質又はグリコリポペプチドを含む、請求項 3 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

## 【請求項 5】

( i ) 請求項 1 に記載の触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片と ( i i ) 第 2 成分とを含むコンジュゲートであって、ここで、前記触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片が、前記第 2 成分に共有結合されている、コンジュゲート。

10

## 【請求項 6】

前記第 2 成分は、タンパク質成分である、請求項 5 に記載のコンジュゲート。

## 【請求項 7】

前記第 2 成分は、タンパク質以外の成分である、請求項 5 に記載のコンジュゲート。

## 【請求項 8】

前記第 2 成分は、治療成分又は診断成分である、請求項 5 に記載のコンジュゲート。

20

## 【請求項 9】

請求項 1 に記載の触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片を含む融合タンパク質。

## 【請求項 10】

請求項 1 に記載の触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片、請求項 5 又は 6 に記載のコンジュゲート、あるいは、請求項 9 に記載の融合タンパク質を含む親和性マトリックス。

## 【請求項 11】

固体担体、表面、カラム、樹脂、ビーズ、マイクロアレイ、粒子及びナノ粒子からなる群から選択される、請求項 10 に記載の親和性マトリックス。

30

## 【請求項 12】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート、請求項 9 に記載の融合タンパク質、あるいは、請求項 10 及び 11 のいずれか一項に記載の親和性マトリックスと、使用説明書とを含むキット。

## 【請求項 13】

請求項 1 に記載の触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片、タンパク質性成分に結合された請求項 1 に記載の触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片のコンジュゲート、あるいは、請求項 9 に記載の融合タンパク質、をコードする単離ポリヌクレオチド。

## 【請求項 14】

請求項 13 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

40

## 【請求項 15】

発現ベクターである、請求項 14 に記載のベクター。

## 【請求項 16】

請求項 14 又は 15 に記載のベクターを含む宿主細胞。

## 【請求項 17】

細菌細胞である、請求項 16 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 18】

請求項 1 又は 2 のいずれか一項に記載の触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片を製造する方法であって、宿主細胞において前記触媒不活性 N a n B ノイ

50

ラミニダーゼタンパク質又はその断片を発現することを含む方法。

【請求項 19】

グリカンのシアル酸成分を検出する方法であって、生体試料又は実験試料を、請求項 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬、請求項 5 に記載のコンジュゲート、あるいは、請求項 9 に記載の融合タンパク質と、シアル酸への前記親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の結合を可能にする条件下で接触させる工程と、前記シアル酸を検出する工程とを含む方法。

【請求項 20】

前記生体試料又は実験試料は、組換え抗体を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記グリカンは、バイオマーカーである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記バイオマーカーは、癌バイオマーカーである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

シアル酸含有グリカンをエンリッチ、単離又は精製する方法であって、生体試料又は実験試料を、請求項 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬、請求項 5 に記載のコンジュゲート、あるいは、請求項 9 に記載の融合タンパク質と、シアル酸への前記親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の結合を可能にする条件下で接触させて、エンリッチ、単離又は精製されたシアル酸含有グリカンをもたらすことを含む方法。

【請求項 24】

請求項 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬、請求項 5 に記載のコンジュゲート、あるいは、請求項 9 に記載の融合タンパク質を含む診断用又は治療用組成物。

【請求項 25】

前記シアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の前記触媒不活性 NanB ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片は、検出可能に標識化される、請求項 24 に記載の診断用又は治療用組成物。

【請求項 26】

検出可能な標識は、放射性標識、蛍光標識、リン光性標識、比色定量標識、酵素的標識、免疫学的標識、磁気標識、常磁性標識、反磁性標識又は電磁標識を含む、請求項 25 に記載の診断用又は治療用組成物。

【請求項 27】

治療薬としての使用のための、請求項 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬、請求項 5 に記載のコンジュゲート、あるいは、請求項 9 に記載の融合タンパク質を含む組成物。

【請求項 28】

診断薬としての使用のための、請求項 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬、請求項 5 に記載のコンジュゲート、あるいは、請求項 9 に記載の融合タンパク質を含む組成物。

【請求項 29】

標的化薬物送達のための、請求項 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬、請求項 5 に記載のコンジュゲート、あるいは、請求項 9 に記載の融合タンパク質を含む組成物。

【請求項 30】

生体試料又は実験試料中のシアル酸の存在又は量を検出するための、請求項 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬、請求項 5 に記載のコンジュゲート、あるいは、請求項 9 に記載の融合タンパク質の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照により本明細書に組み込まれる 2017 年 4 月 24 日出願の米国仮特許出願第 62 / 489 , 243 号明細書の利益を主張する。

【0002】

10

20

30

40

50

## 政府による財政的支援

本発明は、アメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health) により授与された譲与番号 R 4 1 G M 1 1 3 3 5 1 の元で政府による支援を受けた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

### 【 0 0 0 3 】

#### 配列表

本出願は、22キロバイトのサイズを有する「Seq-List-02740201\_\_ST25.txt」という名称の2018年4月16日に作成されたASCIIテキストファイルとして、米国特許商標庁にEFSウェブを介して電子的に提出された配列表を含む。配列表に含まれる情報は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

### 【背景技術】

### 【 0 0 0 4 】

グリカンは、いくつかの固有の特性を有し、その開発は、疾患のバイオマーカーとして魅力的なものとなっている。細胞表面のその位置は、細胞の相互作用の最初の接触箇所となり、したがって正常な代謝プロセスの制御において重要である。それらは、病原体接着受容体としても機能する。糖タンパク質上に存在しないか又は正常状態において少量で存在するグリカン構造は、疾患状態においてその配列を増殖又は改変し得る。多くのグリカンの顕著な特徴は、末端シアル酸である。

### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

20

### 【 0 0 0 5 】

本発明は、新規なシアル酸認識親和性試薬を提供する。親和性試薬は、糖タンパク質、グリコペプチド、糖脂質、オリゴ糖又は多糖などのグリコシル化生体分子上に存在するシアル酸 (5 - (アセチルアミノ) - 3, 5 - ジデオキシ - D - グリセロ - D - ガラクト - 非 - 2 - ウロピラノソン酸、Neu5Ac、N - アセチルノイラミン酸、NANA及びSiaとも呼ばれる) を認識し、結合する。

### 【 0 0 0 6 】

本明細書において提供されるシアル酸認識親和性試薬は、シアリル化グリカンに対する親和性及び特異性を有する、改変Lectenz (登録商標) タイプのタンパク質である。Lectenz (登録商標) は、グリコセンサー (Glycosensor) 及び診断の登録商標 (d/b/a Lectenz (登録商標) Bio) である。本発明の改変シアル酸認識親和性試薬の実施形態としては、限定されないが、1) 実施例 I に記載のリード候補Sia-PS1を有する、結合 (2, 3 -、2, 6 - 及び 2, 8 - 結合) とは無関係の、シアログリカンに対する広い特異性を有する、pan特異的なシアル酸認識親和性試薬 (本明細書においてSia-PS試薬と呼ばれる) ; 及び2) 実施例 II に記載のリード候補Sia-3S1を有する、2, 6 及び 2, 8 結合と比べて 2, 3 - 結合シアログリカンに対して特異的な 2, 3 シアル酸認識親和性試薬 (本明細書においてSia-3S試薬と呼ばれる) が挙げられる。これらの試薬は、非シアリル化グリカン又はペプチド主鎖に対して低い親和性を有するか又は親和性を有さない。

30

### 【 0 0 0 7 】

有利には、本発明のシアル酸認識親和性試薬は、シアル酸に結合する抗体又はレクチンと比べて高い基質特異性を有する。基質特異性は、本明細書に記載のSia-PS親和性試薬及びSia-3S親和性試薬を比較することによって証明されるように調整可能である。基質特異性は、コンテキスト依存性である必要はなく、親和性試薬は、望ましい結合キネティクスを有すると導き出され得る。従来のように、本発明の親和性試薬は、単量体タンパク質として効率的に生成され得る。

40

### 【 0 0 0 8 】

一部の実施形態において、肺炎連鎖球菌 (S. pneumoniae) NanB炭水化物処理酵素の構造的に誘導された遺伝子操作を用いて、変異の部位を同定し、シアル酸に対する向上した親和性を有する変異を選択し、それにより、Lectenz (登録商標)

50

として知られる、高い特異性の親和性試薬へと NanB が転化された。設計及び合成法は、一般に、それぞれが明示的に参照により組み込まれる米国特許出願公開第 2012/0040474 号明細書（「Glycan-Specific Analytical Tools」）及び国際公開第 2015/161201 号パンフレット（米国特許出願第 15/304,725 号明細書）に記述されており、更に具体的には以下の実施例 I 及び II に記述されている。しかしながら、本発明は、本明細書で同定且つ記載される様々な且つ特定のシアル酸認識親和性試薬に関するため、かかる試薬の製造方法によって全く限定されないことを理解されたい。

#### 【0009】

本発明のシアル酸認識親和性試薬は、研究及び臨床的設定のいずれにおいても有用である。例えば、それは、グリコペプチド及び糖タンパク質の疾患関連シアル酸修飾の検出に有用である。親和性試薬は、グリカンベースの疾患マーカーの発見のための様々な用途だけでなく、遺伝子組換えで製造されたバイオ医薬品の品質管理分析でも捕捉試薬又は認識要素として用いられ得、その多くは、抗体などの糖タンパク質である。これらの試薬は、アフィニティークロマトグラフィーエンリッチメント、ウェスタンブロット又は FACS に基づく検出などのプラットフォームに適用することができる。

10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0010】

【図 1 A - B】肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) NanB の立体画像を示す。図 1 B は、図 1 A から見て 90 度回転している。これらの画像において、NanB は、NanB 活性部位に結合された球体として示される基質、2,7-アンヒドロ-Neu5Ac との複合体で示される。Gut et al., FEBS Lett., 2008, 582(23-24): 2248-3352。

20

【図 2】Lectenz（登録商標）改変 (engineering) における重要な工程を略述するフローチャートを示す。

【図 3 A】影付きの残基として左のパネルに示されるシアル酸と近位 (4.5) の残基及び影付きの残基として右のパネルに示される 3' SLN の Gal/GlcNAc 残基と近位の残基を有する、酵素に結合された 3' シアリルラクトサミン (3' SLN, 棒) のモデルを示す。

【図 3 B】野生型肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) NanB (PDB ID: 2vw0) の配列ディスプレイを示す。697 アミノ酸配列 (配列番号 1) を示し、注釈する。3つのドメインを 2vw0A01、2vw0A02、2vw0A03 と標識化する。画像は、PDB ID 2vw0 の RCSB PDB (www.rcsb.org) からの画像である (Xu et al., J. Mol. Biol., 2008, 384: 436-449)。

30

【図 3 C】NanA (PDB ID 2VVZ; 配列番号 2)、NanB (PDB ID 2VW0; 配列番号 1) 及び NanC (PDB ID 5F9T; 配列番号 3) のアミノ酸配列のアラインメントを示す。NanB 及び NanC は、配列同一性 50% を有し、いずれも NanA と同一性 25% を共有する。「\*」は、完全に保存されていることを意味し；「:」は、類似性が高いアミノ酸の群間での保存を意味し；「.」は、類似性が低いアミノ酸の群間での保存を意味する。

40

【図 3 D】実施例 I における pET28a+ ベースのプラスミド（「NanB: AA30-697 (pET28a)」）から発現される NanB 断片 (30-697; 配列番号 4) と、野生型 NanB (PDB ID 2VW0; 配列番号 1) とのアラインメントを示す。野生型 NanB における残基 1~29 は、シグナル又はリーダー配列を表す。「\*」は、完全保存を意味し；「:」は、類似性が高いアミノ酸の群間での保存を意味し；「.」は、類似性が低いアミノ酸の群間での保存を意味する。

【図 4】NanB 及び Lectenz（登録商標）クローンの相対的酵素活性を示す。

【図 5】固定化された 3' SLN への Lectenz（登録商標）候補の結合についてのバイオセンサーでの BLI センサーグラムを示す。

50

【図6-1】固定化オリゴ糖へのSia-PS Lectenz（登録商標）候補（検体）の結合についてのBLIセンサーグラムを示す。Lsp = ラクトース（シアル酸なし）、3'SL = 2, 3 - シアリルラクトース、6'SL = 2, 6 - シアリルラクトース、GD3 = 末端 2, 8 - 結合Neu5Ac残基及び内部 2, 3 - 結合Neu5Ac残基を含有するGD3オリゴ糖。例えば、Sia-PS1検体は、定常状態 $K_D(3'SL) = 0.59 \mu M$ 、 $K_D(6'SL) = 0.69 \mu M$ 、 $K_D(GD3) = 0.30 \mu M$ を示す。

【図6-2】固定化オリゴ糖へのSia-PS Lectenz（登録商標）候補（検体）の結合についてのBLIセンサーグラムを示す。Lsp = ラクトース（シアル酸なし）、3'SL = 2, 3 - シアリルラクトース、6'SL = 2, 6 - シアリルラクトース、GD3 = 末端 2, 8 - 結合Neu5Ac残基及び内部 2, 3 - 結合Neu5Ac残基を含有するGD3オリゴ糖。例えば、Sia-PS1検体は、定常状態 $K_D(3'SL) = 0.59 \mu M$ 、 $K_D(6'SL) = 0.69 \mu M$ 、 $K_D(GD3) = 0.30 \mu M$ を示す。

【図6-3】固定化オリゴ糖へのSia-PS Lectenz（登録商標）候補（検体）の結合についてのBLIセンサーグラムを示す。Lsp = ラクトース（シアル酸なし）、3'SL = 2, 3 - シアリルラクトース、6'SL = 2, 6 - シアリルラクトース、GD3 = 末端 2, 8 - 結合Neu5Ac残基及び内部 2, 3 - 結合Neu5Ac残基を含有するGD3オリゴ糖。例えば、Sia-PS1検体は、定常状態 $K_D(3'SL) = 0.59 \mu M$ 、 $K_D(6'SL) = 0.69 \mu M$ 、 $K_D(GD3) = 0.30 \mu M$ を示す。

【図7A-C】Sia-PS1 Lectenz（登録商標）アフィニティークロマトグラフィー（LAC）によるシアリル化及び非シアリル化タンパク質の分離を示す。精製Sia-PS1試料（2mg）を1mLセファロースカラムに化学的に結合させ、続いて検体をローディングした。競合的に溶離した後、次の検体の結合及び溶離のためにカラムを再生した。AKTA Pureクロマトグラフィーシステムで実験を行った。図7Aは、非シアリル化糖タンパク質ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）の素通り及び重ねられたクロマトグラムにおけるフェチュインの保持を示す。図7Bは、BSA（非グリコシル化）とフェチュイン（シアリル化糖タンパク質）との混合物の分離を示す溶離プロファイルを示す。図7Cは、アシアロフェチュイン（脱シアリル化フェチュイン）とフェチュインとの分離を示す溶離プロファイルを示す。

【図8A-B】Sia-PS1及び合成ネオ糖タンパク質のLAC溶離プロファイルを示す。図8Aは、3'-シアリルラクトース-BSAのSia-PS1LAC溶離プロファイルを示す。図8Bは、6'-シアリルラクトース-BSAのSia-PS1LAC溶離プロファイルを示す。検体（200 $\mu g$ ）のそれぞれを結合バッファー中でLACカラム上に適用し、洗浄し、重力流れ下で競合的に溶離した。使用されたLACカラムは、図7に記載のカラムと同じであった。回収された画分のタンパク質濃度は、280nmでの分光光度吸収によって決定された。比較のために（図9を参照されたい）、ネオ糖タンパク質をそれぞれバッファー体積1mL中に200 $\mu g$ でローディングし、一般的な1mLレクチンアフィニティークラムに対する推奨に合わせた。それぞれの実験において、ローディングされた検体の量は、競合的に溶離によってほぼ完全に回収された。

【図9A-B】標準レクチンアフィニティークラム及び合成ネオ糖タンパク質の溶離プロファイルを示し、図9Aは、市販のMAAカラムからの3'-シアリルラクトース-BSA（200 $\mu g$ ）の溶離プロファイルを示す。図9Bは、市販のSNAカラムからの6'-シアリルラクトース-BSA（200 $\mu g$ ）の溶離プロファイルを示す。

【図10A-C】MCF7無細胞抽出物（CFE）からのシアロ-グリココンジュゲートのSia-PS1LACエンリッチメントを示す。Lee et al. [36]に従って調製されたCFEの試料（約500 $\mu g$ ）をSia-PS1LACカラムにローディングし（図7を参照されたい）、ローディングバッファー中でそれぞれ50mMの3'SLと6'SLの1:1混合物によって洗浄し、競合的に溶離した。図10Aは、結合工程での未結合タンパク質（素通りピーク；319 $\mu g$ ）と、結合タンパク質（溶離ピーク；30 $\mu g$ ）との分離を示すLACプロファイルを示す。図10Bは、CFE（ローディング約125 $\mu g$ ）及びLAC溶離画分（ローディング約7 $\mu g$ ）のSDS-PAGEを示す。図

10

20

30

40

50

10 Cは、LAC溶離画分中の小分子のエンリッチメントを示すMALDIプロファイルを示す。MALDI実験に使用される質量分析計は、15 kDを超えるサイズの分子を解明するほど十分に感度が高くないことに留意されたい。

【図11】アレイ上のすべてのシアリル化グリカン(Neu5Ac-グリカン)(I)及び多くの非ヒトNeu5Gc-Siaグリカン(II)を特異的に認識する能力を示す、Sia-PS1についての結果をスクリーニングするグリカンアレイを示す。

【図12】エンリッチ化クローン配列のアミノ酸iceLogoを示す。野生型配列は、下部にわたって示される。5つのランダム化された位置の好ましいアミノ酸をグラフ表示で示す。Y軸は、アミノ酸のそれぞれの検出のパーセンテージ(差異%)を示す。D237及びS673での野生型配列の優勢は、iceLogoによって無視され、したがってこれらの位置についてiceLogoの上部でのブランクスペースである。

10

【図13】野生型(wt)NanB、R193A点変異体及びSia-3SLectionz(登録商標)候補の酵素活性を示す。

【図14A-B】異なるバッファー条件下でのSia-3S1(検体)の、オリゴ糖(固定化リガンド):3'SL=2,3-シアリルラクトース、6'SL=2,6-シアリルラクトースへの結合についてのBLIセンサーグラムを示す。図14Aは、10mM EPPS、10mM NaClで構成されるバッファー(pH7.5)を使用した、オリゴ糖へのSia-3S1(検体)の結合についてのBLIセンサーグラムを示す。図13Bは、10mM EPPS、25mM NaClで構成されるバッファー(pH7.5)を使用した、オリゴ糖へのSia-3S1(検体)の結合についてのBLIセンサーグラムを示す。

20

【図15】Sia-3S1 LACカラムに結合されたフェチュインの差次的溶離を示す。精製Sia-3S1(2mg)を1mLセファロースカラムに共有結合し、続いてフェチュイン100µgをローディングする。Sia-3S1カラムに結合されたフェチュイン分子をローディングバッファー中の50mM 3'SL又は6'SL溶液で競合的に溶離した(保持体積18mLでのA280UVスパイクは、装置ポンプによる人工産物である)。

【図16A】6'SL-BSAと比べて3'SL-BSAへの選択的な結合を実証するSia-3S1 LACクロマトグラフィーを示す。図16Aは、Sia-3S1 LACカラムへローディングされた3'SL-BSA100µgについての結果を示す。図16Bは、Sia-3S1 LACカラムへローディングされた6'SL-BSA100µgについての結果を示す。1M NaClを含有する10mM EPPS(pH7.5)バッファーで再生(「NaCl再生」)する前に、Sia-3S1カラム上に結合されたシアリル化BSA分子を50mM 3'SL又は6'SL溶液で競合的に溶離した。それぞれの条件下での素通り量は、約5µgであった。

30

【図16B】6'SL-BSAと比べて3'SL-BSAへの選択的な結合を実証するSia-3S1 LACクロマトグラフィーを示す。図16Aは、Sia-3S1 LACカラムへローディングされた3'SL-BSA100µgについての結果を示す。図16Bは、Sia-3S1 LACカラムへローディングされた6'SL-BSA100µgについての結果を示す。1M NaClを含有する10mM EPPS(pH7.5)バッファーで再生(「NaCl再生」)する前に、Sia-3S1カラム上に結合されたシアリル化BSA分子を50mM 3'SL又は6'SL溶液で競合的に溶離した。それぞれの条件下での素通り量は、約5µgであった。

40

【図17】110mM NaClを含有する結合バッファーを使用して、Sia-3S1 LACカラムが3'SL-BSAにのみ結合することを示す。3'SL-BSA又は6'SL-BSA50µgをSia-3S1 LACカラム上にローディングした。1M NaClを含有する10mM EPPSバッファー(pH7.5)を使用して、Sia-3S1カラムに結合されたシアリル化BSA分子を溶離した。

【図18】Sia-PS1、Sia-PS4、Sia-PS5及びSia-3S1は、対応するそのグリココンジュゲートに結合することを示す。

【発明を実施するための形態】

50

## 【 0 0 1 1 】

本発明のシアル酸認識親和性試薬は、L e c t e n z (登録商標)と呼ばれ、その用語は、生物学的に重要なグリカン構造に対する特異性を有する、改変されたレクチン様酵素由来試薬の新規なクラスであると説明される。L e c t e n z (登録商標)試薬は、親酵素から改変されているが、ほとんど又は全く酵素活性を有さず、レクチン様炭水化物結合性を有する。一部の実施形態において、L e c t e n z (登録商標)試薬は、その酵素から改変された内因性親酵素の特異性を維持する。他の実施形態において、L e c t e n z (登録商標)試薬の特性は、相同的グリカン構造又はモチーフに調整される。したがって、L e c t e n z (登録商標)試薬は、調整可能な特異性、調整可能な親和性及び製造の容易さなど、レクチン又は抗体のいずれかと比較していくつかの利点を有する。

10

## 【 0 0 1 2 】

本明細書に記載のシアル酸認識親和性試薬は、高い親和性を有するように改変されており、更に炭水化物処理酵素、N a n B に基づく基質特異性を保持することから、シアル酸認識レクチンに比べて多くの利点を提供する。一部の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬の基質特異性は、N a n B と同じであり得る。一部の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬の基質特異性は、N a n B よりも広いことができ、すなわち本明細書に記載の p a n 特異的な S i a - P S 親和性試薬と同様に拡張又は広げることができる。一部の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬の基質特異性は、N a n B よりも狭いことができる(特異性の向上又は増加)。本明細書に記載のように、且つ米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 4 0 4 7 4 号明細書(「G l y c a n - S p e c i f i c A n a l y t i c a l T o o l s」)及び国際公開第 2 0 1 5 / 1 6 1 2 0 1 号パンフレット(米国特許出願第 1 5 / 3 0 4 , 7 2 5 号明細書)に記載のように、一般に構造的に誘導された遺伝子操作を用いて、シアル酸認識親和性が向上した修飾 N a n B 分子の設計又は評価において、シアル酸の結合親和性及び特異性は、研究者又は臨床家の必要性に応じて独立して調整可能である。

20

## 【 0 0 1 3 】

## N a n B シアリダーゼ

シアリダーゼ(ノイラミニダーゼ)は、種々のグリココンジュゲートの末端糖としてシアル酸、C 9 炭水化物を除去する。本発明では、新規なシアル酸認識親和性試薬を開発するために鑄型として、肺炎連鎖球菌(S . p n e u m o n i a e ) N a n B シアリダーゼを用いる。肺炎連鎖球菌(S . p n e u m o n i a e ) N a n B の立体画像を図 1 に示す。パネル B は、パネル A から見て 9 0 度回転される。これらの画像において、N a n B は、N a n B 活性部位に結合された球体として示される基質、2 , 7 - アンヒドロ - N e u 5 A c との複合体で示される。G u t e t a l . , F E B S L e t t . , 2 0 0 8 , 5 8 2 ( 2 3 - 2 4 ) : 2 2 4 8 - 3 3 5 2 .

30

## 【 0 0 1 4 】

C B M ドメイン又は C B M 4 0 ドメインとしても知られる L - ドメイン(レクチン様)は、炭水化物結合性分子(C B M )を構成し、C B M 4 0 ファミリー内に分類されている。ノイラミニダーゼ活性を保有する、G H 3 3 ドメインの、グリコシルヒドロラーゼ(G H )ドメインとしても知られる触媒 N - ドメインも示される。短いリンカー(残基 2 2 5 ~ 2 3 0 )が L - ドメイン及び N - ドメインを連結する。不規則なドメイン、I - ドメインも示される。配列番号 1 を参照すると、N a n B のドメインのおよその位置は、以下の通りに特徴付けることができる:シグナル/リーダー配列(残基 1 ~ 2 9 )、C B M 4 0 ドメイン(残基 3 0 ~ 2 2 8 )、触媒ドメイン(残基 2 2 9 ~ 3 4 5 及び 4 5 9 ~ 6 9 7 )及び不規則ドメイン(残基 3 4 6 ~ 4 5 8 )。活性部位としては、古典的なシアリダーゼアルギントリアッド、A r g 2 4 5 , A r g 5 5 7 及び A r g 6 1 9 並びに T y r 6 5 3 , G l u 5 4 1 及び A s p 2 7 0 ( G u t e t a l . , F E B S L e t t . , 2 0 0 8 , 5 8 2 ( 2 3 - 2 4 ) : 2 2 4 8 - 3 3 5 2 ; X u e t a l . , J . M o l . B i o l . , 2 0 0 8 , 3 8 4 : 4 3 6 - 4 4 9 ) が挙げられる。

40

## 【 0 0 1 5 】

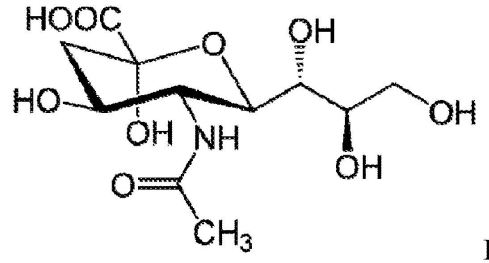
50

N a n B 鑄型は、配列番号 1 であるか、又は配列番号 1 の切り詰め型であり得る。通常、シグナル配列は、鑄型に含まれず、したがって、有用な N a n B 鑄型は、配列番号 1 のアミノ酸 3 0 ~ 6 9 7 によって例示される。

【 0 0 1 6 】

「シアル酸」という用語は、C 9 主鎖を有する酸性糖のファミリーを意味するために使用される場合が多い。哺乳動物細胞において見いだされる最も一般的なシアル酸は、C 5 位置でアセチル化されている N - アセチルノイラミン酸 ( N e u 5 A c , 又は N A N A ) である ( 式 I ) 。

【 化 1 】



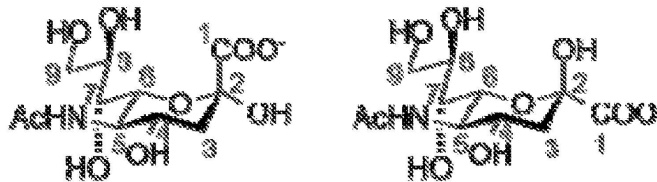
I

10

【 0 0 1 7 】

シアル酸構造の番号付けは、カルボキシレートの炭素で始まり、その鎖周囲に続く。アキシアル位置にカルボキシレートが配置される立体配置は アノマーである ( 式 I I ) 。

【 化 2 】



α-アノマー

II

β-アノマー

III

30

【 0 0 1 8 】

本発明において、「シアル酸」とは、一般に、実施例 I 及び I I に記載の N e u 5 A c を意味するが、適切な文脈では、ノイラミン酸の他の誘導体、例えば C 5 位置でヒドロキシル化されている ( 例えば、ケトデオキシノノン酸、 K d n ) 又はヒドロキシル化 5 - N - アセチル基 ( 例えば、N - グリコリルノイラミン酸、 N e u 5 G c ) を有するか又は N - アシル化されていない ( 例えば、ノイラミン酸、 N e u ) 変形体なども含み得る。 V a r k i e t a l . , S i a l i c a c i d s , C h . 1 4 i n E s s e n t i a l s o f G l y c o b i o l o g y , 2 n d E d . ( C u m m i n g s e t a l . , E d . ) , C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y ( 2 0 0 9 ) 。 シアル酸は、末端位置又は内部位置のいずれかでグリカン内に存在し得る。それらは、生物学的に関連性のある N - グリカン、O - グリカン及びスフィンゴ糖脂質 ( ガングリオシド ) の末端サッカリド成分として見られる。それらは、グリコシルホスファチジルイノシトール ( G P I ) アンカーの側鎖をキャップすることも知られている。オリゴシアル酸又はポリシアル酸としても見出され得る。 V a r k i e t a l . , S i a l i c a c i d s , C h . 1 4 i n E s s e n t i a l s o f G l y c o b i o l o g y , 2 n d E d . ( C u m m i n g s e t a l . , E d . ) , C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , C o l d S p r i n g

40

50

Harbor, NY (2009)。シアル酸は、ムチン、糖タンパク質、グリコペプチド及び糖脂質、例えばスフィンゴ糖脂質及びグリコリポペプチドのオリゴ糖鎖の成分として存在し得る。一般に、シアル酸は、 $\alpha$ -結合において他の単糖に結合する。

#### 【0019】

##### シアル酸認識

本発明のシアル酸認識親和性試薬は、オリゴ糖のシアル酸成分を認識する（すなわちシアル酸成分に結合する）。シアル酸は、いくつかの結合トポグラフィーのいずれかにおいてオリゴ糖の隣接モノマーに共有結合し得る。2つの結合コンフォメーション（ $\alpha$ 及び $\beta$ ）が可能である一方、通常、隣接サッカリドへの結合は、 $\beta$ コンフォメーションにある。隣接モノマーの3位、6位又は8位など、隣接モノマー上の多くの位置のいずれかで結合が生じ得、その結果、 $\alpha$ 2,3結合、 $\alpha$ 2,6結合又は $\alpha$ 2,8結合がそれぞれ形成される。シアル酸を含有するオリゴ糖は、二糖（2つのモノマー）又は三糖以上のオリゴ糖（3つ以上のモノマー）であり得る。有利には、オリゴ糖は、糖タンパク質、グリコペプチド又は糖脂質など、グリコシル化生体分子中に存在するグリカン構造の一部（すなわち構成成分）であり得る。

10

#### 【0020】

肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）からのNanBによって例示され、且つ配列番号1（リーダーペプチドを含む完全野生型アミノ酸配列；図3C）及び配列番号4（リーダーペプチドを含まないアミノ酸配列；図3D）に示されるように、本発明のシアル酸認識親和性試薬は、NanBのアミノ酸配列に基づき、すなわちそのアミノ酸配列から改変される。例示的な変異部位を表1に示し、結合に重要であると指定される1つ又は複数の部位（例えば、R619、W674、R245、R676、Y653、S675、R264、H269、I246、I326、R557及びD327）及び/又は「tepid」として若しくは結合に弱く寄与するとして指定される1つ又は複数の部位（例えば、E541、E669、S673、T539、L679、T268、P492、D270、Y671、A538、N353、N316、P660及びN683）を含み得る。

20

#### 【0021】

改変された配列番号4であり、且つ実施例I及びIに記載のSia-PS1、Sia-PS2、Sia-PS3、Sia-PS4、Sia-PS5、Sia-3S1、Sia-3S2、Sia-3S3、Sia-3S5、Sia-3S6、Sia-3S7、Sia-3S7\*、Sia-3S8、Sia-3S9など、NanBから改変された親和性試薬は、一部の実施形態において、更なる修飾を含み得ることを理解されたい。親和性試薬のドメイン構造全体がインタクトな状態のままであり、且つシアル酸へのpan特異的結合（Sia-PS試薬の場合）又はSia $\alpha$ 2,3結合への特異的結合（Sia-3S試薬の場合）が保存される限り、例えば、それらは、配列番号4の末端に切り詰め又は付加、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10アミノ酸の切り詰め又は付加及び/又は活性若しくは基質結合性に関与しない領域の保存的変異を含み得る。更に、シアル酸認識親和性試薬の一部の実施形態は、グリコシルヒドロラーゼ（GH）ドメインではなく、NanBの炭水化物結合性分子（CBM）ドメイン（例えば、配列番号1の30～約229の残基）を含有し得；シアル酸認識親和性試薬の他の実施形態は、NanBの炭水化物結合性分子（CBM）ドメインではなく、グリコシルヒドロラーゼ（GH）ドメイン（例えば、配列番号1の229～697の残基）を含有し得る。

30

40

#### 【0022】

##### pan特異的なシアル酸認識親和性試薬

一実施形態において、シアル酸認識親和性試薬は、シアル酸のその認識（すなわちシアル酸への結合）においてpan特異的である。このpan特異的な親和性試薬は、Neu5Acと隣接サッカリドとの結合立体配置と無関係にシアル酸（Neu5Ac）を認識する。pan特異的な親和性試薬により認識される結合立体配置としては、Sia $\alpha$ 2,3-、 $\alpha$ 2,6-及び $\alpha$ 2,8-結合が挙げられる。任意選択的に且つ有利には、Sia-PS1の場合、pan特異的なシアル酸認識親和性試薬は、9-Oアセチル化などのNe

50

u5Acの一般的な修飾及びシアル酸のN-グリコリル形の変形体も認識する。

【0023】

本発明のpan特異的なシアル酸認識親和性試薬は、単点突然変異を有するNanB断片(残基30~697;配列番号4)によって例示される。例示的な変異部位としては、Y653、D270及びE541が挙げられる。注記されるNanBGHDメインにおいて単点突然変異をそれぞれが有する、例示的なpan特異的な親和性試薬が表2に示され、Sia-PS1(Y653F)、Sia-PS2(D270A)、Sia-PS3(D270N)、Sia-PS4(E541A)及びSia-PS5(E541Q)が挙げられる。意外なことに、これら単点突然変異は、二重の作用を有する。それらは、(Sia-PS2及びSia-PS3)触媒活性を低減するか、又は(Sia-PS1、Sia-PS4及びSia-PS5)触媒活性を有効に除去し、且つシアル酸リガンド結合に対する特異性を広げる。更なるパリテーション研究のために本発明者らが選択するpan特異的なシアル酸認識親和性試薬は、活性部位残基Tyr653においてY653Fを含有するSia-PS1であった。単一ヒドロキシル基の除去を伴うこの1つの変異は、NanBの炭水化物結合性分子(CBM)ドメインからのその距離にもかかわらず、酵素活性を除去するだけでなく、変異され、不活性化された酵素へのpan特異的な結合を驚くほど導く。

10

【0024】

結合特異的なシアル酸認識親和性試薬

他の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬は、単一シアル酸結合立体配置、すなわち2,3-結合シアル酸に特異的である。これらの親和性試薬は、2,3-結合における隣接サッカリドへのシアル酸結合を認識する(すなわち結合する)が、2,6-結合又は2,8-結合における隣接サッカリドへのシアル酸結合を認識しない。

20

【0025】

本発明の結合特異的なシアル酸認識親和性試薬は、多重突然変異を有するNanB断片(残基30~697;配列番号4)によって例示される。それと合わせて、その突然変異は、触媒活性を低減又は除去し、不活性化酵素の結合特異性を2,3-結合シアル酸に特異的に変化させる(2,6-結合シアル酸及び2,8-結合シアル酸に対して)。例示的な変異部位としては、R193、D270、A538、E541、P660、S673、D327及びN683が挙げられる。2,3-結合シアル酸に対して高い特性を有する例示的なシアル酸認識親和性試薬を表4に示し、同定された変異部位を有する、以下:

30

Sia-3S1 R193A, D270Q, A538V, E541D

Sia-3S2 R193A, D270G, A538W, E541D, P660Q, S673A

Sia-3S3 R193A, D270G, A538V, E541D, S673A

Sia-3S5 R193A, D327E, A538F, E541A

Sia-3S6 R193A, D270G, A538H, E541A, N683S

Sia-3S7 R193A, D270H, D427Y, A538M, E541A, L690F

40

Sia-3S7\* R193A, D270H, A538M, E541A

Sia-3S8 R193A, D270I, D327V, A538F, E541I, S673Q

Sia-3S9 R193A, D270G, A538I, E541S, S673A

が挙げられる。

【0026】

Sia-3S7\*は、突変変異D427Y及びL690Fを含まないが、Sia-3S7に基づく。これらの2つの欠損した突変変異は、結合特異性に影響を及ぼさないと予想される。

【0027】

50

## コンジュゲート

本発明は、シアル酸認識親和性試薬のコンジュゲートも含む。コンジュゲートは、タンパク質性成分又は非タンパク質性成分であり得る少なくとも第2成分に共有結合されるシアル酸認識親和性試薬を第1成分として含む。一部の実施形態において、タンパク質性成分を含むコンジュゲートは、既知の組換えDNA法を用いて融合タンパク質として合成することができる。一部の実施形態において、コンジュゲートは、シアル酸認識親和性試薬に化学的又は酵素的にコンジュゲートされるタンパク質性又は非タンパク質性成分を含む。

### 【0028】

本発明のコンジュゲートの一例は、本明細書で薬物とも呼ばれる治療薬とコンジュゲートされたシアル酸認識親和性試薬を含む。シアル酸認識親和性試薬が抗体の代わりに使用されることを除いて、このコンジュゲートは、既知の抗体-薬物コンジュゲート(ADC)に類似している。シアル酸認識親和性試薬にコンジュゲートすることができる薬物としては、限定されないが、細胞毒、抗代謝産物、アルキル化剤、抗生物質及び有糸分裂阻害剤が挙げられる。

10

### 【0029】

癌及び前癌症状並びに炎症及び免疫症状は、タンパク質グリコシル化パターンにおける変化と関連する場合が多いことから、抗癌、抗炎症、炎症誘発及び免疫調節薬がシアル酸認識親和性試薬へのコンジュゲーションに特に適している。例えば、治療又は診断用放射性薬剤をシアル酸認識親和性試薬に結合するか、又はシアル酸認識親和性試薬中に組み込み、癌グリコマーカに標的化され得る「Lectenz(登録商標)薬物」コンジュゲートが得られる。一実施形態において、治療薬又は診断薬は、肺又は腸などの粘液内層(lining)又は粘液膜に標的化することができる。

20

### 【0030】

同様に、標的化ウイルス性又は細菌性グリコシル化生体分子は、大きい治療的可能性を有するため、抗ウイルス薬及び抗菌薬も「Lectenz(登録商標)薬物」コンジュゲート中に組み込むのに特に適している。

### 【0031】

本発明のコンジュゲートの他の例は、診断又は検出剤にコンジュゲートされたシアル酸認識親和性試薬を含む。診断又は検出剤としては、検出可能な標識、限定されないが、放射性、蛍光、リン光性、比色定量、酵素的、免疫学的、磁気、常磁性、反磁性又は電磁標識が挙げられる。シアル酸認識親和性試薬は、例えば、イムノアッセイによって直接検出することができるため、診断剤又は検出剤として機能させるためにシアル酸認識親和性試薬をコンジュゲートする必要はないことを理解されたい。

30

### 【0032】

本発明のコンジュゲートの他の例としては、精製を容易にするために、マーカ配列、例えばヘキサ-ヒスチジン又は赤血球凝集素などのペプチドにコンジュゲートされたシアル酸認識親和性試薬が挙げられる。例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン、ウシ血清アルブミン、ウシの膵臓トリプシン阻害剤又は緑色蛍光タンパク質(GFP)などの蛍光タンパク質に共有結合されたシアル酸認識親和性試薬を含む融合タンパク質が本発明に含まれる。

40

### 【0033】

#### 使用方法

そのレクチン様特性により、シアル酸認識親和性試薬の可能性のある多くの用途は、当業者に即座に明らかとなるであろう。本発明のシアル酸認識親和性試薬は、臨床又は研究設定において診断、治療、生物学又は研究試薬として使用され得る。例えば、末端シアル酸などのグリカン構造の正常レベルの変化は、疾患状態のマーカであり得る。したがって、疾患関連グリカンの発見及び利用における現在の制限を克服するために、高度に特異的な新規な試薬が望まれる。シアル酸認識親和性試薬を用いて、グリコペプチド、糖タンパク質及び糖脂質の新規な疾患関連シアル酸修飾を同定することができ、又は以前に同定された疾患関連シアル酸修飾を検出することができる。例えば、シアル酸認識親和性試

50

薬は、シアルの検出並びに前立腺特異的な抗原（PSA）及びインフルエンザウイルスと関連するマーカーの分析に有用である。

【0034】

他の例として、試料エンリッチメントのための親和性マトリックス中で研究又は診断ツールとしてシアル酸認識親和性試薬を用いることができ、以下に更に記述されるように、質量分析に基づく既存の方法と組み合わせることで結合情報を提供することができる。

【0035】

シアル酸認識親和性試薬は、抗グリカン抗体又はレクチンを用いて実施され得るいずれかの方法において用いることができる。したがって、本発明のシアル酸認識親和性試薬は、診断、分析及び治療法などの多くの医療及び実験法において、抗グリカン抗体の代わりに有利に使用することができる。同様に、本発明のシアル酸認識親和性試薬は、多くの診断及び分析実験法においてレクチンの代わりに有利に使用することができる。例えば、シアル酸認識親和性試薬は、アフィニティークロマトグラフィーエンリッチメント又は組織学的研究、ウェスタンブロット、FACSに基づく検出等と同様に捕捉試薬として用いられ得る。捕捉試薬又は認識エレメントとして、グリコプロファイリング分析と同様に、グリカンベースの疾患マーカーの発見に多様な用途において有用である（例えば、2014年1月2日公開の米国特許出願公開第2014/0005069号明細書を参照されたい）。例えば、本発明のシアル酸認識試薬は、異なる特異性を有する、他のLectenz（登録商標）試薬及び/又はレクチン、抗体又は他の炭水化物結合性分子を含有する多成分マイクロアレイの一構成成分であり得る。

【0036】

治療用途は、以下に更に詳細に構想され、説明される。例えば、シアル酸認識親和性試薬は、生物製剤の製造において品質管理のために、関連するシアル酸の検出に使用することができる。更に具体的には、合成又は保管中の品質管理における工程のように、治療抗体などの合成若しくは組換えで生成された糖タンパク質ベース又は糖脂質ベースの生物製剤の存在、非存在又は結合位置の検出に使用され得る。

【0037】

診断及び分析法

シアル酸認識親和性試薬又はそのコンジュゲートを使用して、生体又は合成試料中のシアル酸含有グリカンを検出することができる。例えば、組織又は体液などの生体試料をシアル酸認識親和性試薬又はそのコンジュゲートと単独で又は他の分析用試薬と共に接触させて、生体試料中のグリコシル化及び/又はグリケーションのレベル又はタイプを検出し且つ/又は特徴付けることができる。特徴付けは、グリカンの構成成分サッカリドを同定すること、グリカンのサッカリド組成を決定すること、グリカン内の結合位置を決定すること、又はグリカンの立体化学を決定することを含み得る。他の例として、シアル酸認識親和性試薬又はそのコンジュゲートは、治療用生物製剤の合成、例えば治療抗体の合成における品質管理に使用され、グリコシル化のレベル又はタイプをモニターすることができる。2012年9月7日公開の国際公開第2012/118928号パンフレット及び2014年1月2日公開の米国特許出願公開第2014/0005069号明細書を参照されたい。シアル酸認識親和性試薬又はそのコンジュゲートは、親和性試薬として又は親和性マトリックスの一部として用いられ得る。例えば、表面、カラム、樹脂、ビーズ、粒子若しくはナノ粒子などの固体担体に繋ぎ止められ、生体若しくは合成試料中又は生体若しくは合成試料からのシアル酸含有化合物を検出又はエンリッチする方法において使用することができる。繋がれたシアル酸認識親和性試薬は、合成グリコシル化化合物を単離及び/又は精製するために使用することもできる。

【0038】

対象から採取された生体試料で診断を実施することができるが、生体内でも実施することができる。生体内用途では、シアル酸認識親和性試薬又はそのコンジュゲートは、対象に投与され、対象内のシアル酸認識親和性試薬の結合が検出される。好ましくは、コンジュゲートが対象に投与され、そのコンジュゲートは、生物医学的イメージングを容易にす

10

20

30

40

50

るために検出可能な標識を含む。適切なコンジュゲートの例としては、放射標識、常磁性標識又は反磁性標識にコンジュゲートされたシアル酸認識親和性試薬が挙げられる。

【 0 0 3 9 】

シアル酸認識親和性試薬を使用して、異常なグリコシル化の研究において生体試料を調べることができる。生体試料の例としては、限定されないが、いずれかの生物体液、組織又は臓器が挙げられる。生物体液の例としては、限定されないが、尿、血清、唾液、大脳髄液及び精液が挙げられる。他の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬は、生物体液及び組織中の標的検体の存在又は量の検出に使用され得る。標的の例は、外因的に消費された種、例えば植物多糖、炭水化物ベースの薬物及び病原体であり、その表面は、多くの場合、固有の複合グリカンにおいて被覆されている。シアル酸認識親和性試薬は、新規なグリカンベースの化合物の創薬及びその生物活性の評価における用途も有する。

10

【 0 0 4 0 】

シアル酸認識親和性試薬は、異常なグリコシル化によって顕在化する疾患を診断及び/又は治療するために使用することができる。それを用いて、糖タンパク質、糖脂質及び/又は様々な炭水化物エピトープを含む特定の腫瘍抗原を検出することができる。これらの多くの腫瘍抗原は、腫瘍性疾患状態でアップレギュレートされることが判明している。腫瘍性疾患の発症及び進行を知らせ得る腫瘍抗原の例としては、限定されないが、結腸直腸、胃、膵臓癌、肺癌及び乳癌並びに発育中の胎児と関連する糖タンパク質である癌胎児抗原 ( C E A ) ; 膵臓癌の患者に見られる糖脂質中に存在する炭水化物抗原 1 9 - 9 ( C A 1 9 - 9 ) 又はシアリル化ルイス ( L e w i s ) A 抗原 ; 及び乳癌と関連する炭水化物抗原 1 5 - 3 ( C A 1 5 - 3 ) が挙げられる。

20

【 0 0 4 1 】

抗原の存在によって必ずしも癌細胞への癌化が示されるわけではないが、 C E A の場合と同様に、細胞でのその局在性によって暗示される。この理由から、高度に選択的且つ高い親和性の分析ツールが必要とされている。診断テストは、現在、糖タンパク質のペプチド部分又は糖脂質の糖部分に対して産生される場合が多い抗体に依存しているが、正確なエピトープのみが現在定義されている。グリカンが特徴付けられている実施例において、複数のグリコフォーム ( g l y c o f o r m ) が多くの場合に存在する ( 例えば、 C E A ) 。グリコフォーム間で区別することができる試薬を欠くと、グリコシル化におけるわずかな修飾が疾患状態、癌タイプ又は組織の局在化と相関する程度を決定することは、現在、不可能である。現時点で、これらの問題は、主にグリコフォームの混合物として調べられる単離された糖タンパク質の M S 分析によって解決することができる。通常、実施されているグリコフォームフォーカスの唯一のレベルは、レクチン ( コンカナバリン A 、 ( C o n A ) ) アフィニティークロマトグラフィーを用いた高マンノース含有グリカンにおけるエンリッチメントである。より効率的な実験分析及び通常の臨床診断技術は、グリコフォーム特異的試薬の欠如によって厳しく制限されたままである。

30

【 0 0 4 2 】

シアル酸認識親和性試薬は、生体試料中の所定のいずれかの糖タンパク質に対して、存在する種々のグリコフォームの相対存在量を定量化する有用性を有し得る。本明細書で使用される「グリコフォーム」という用語は、特異的なグリカンが結合したタンパク質を意味する。糖タンパク質は、複数のグリコフォームを有し得る。更に具体的には、グリコフォームは、結合グリカンの数又はタイプに関してのみ異なるタンパク質のアイソフォームであり ; アミノ酸配列は、様々なグリコフォームに関して同じである。糖タンパク質は、多くの場合、結合サッカリド又はオリゴ糖における改変を伴う多くの異なるグリコフォームを含む。有利には、シアル酸認識親和性試薬を使用して、シアル酸含有グリカンに関して生体試料をエンリッチすることができる。同様に、グリカンがそれに結合されたタンパク質表面上の特異的なグリコシル化部位を同定するために使用することができる。糖タンパク質のタンパク質分解による消化から、インタクトなグリコペプチドを分離するために使用することもできる。対象となる検体における試料のエンリッチメントは、グリコペプチド画分の更なる特徴付けにおいて大きい補助となる。特に、エンリッチメントは、ペプ

40

50

チド配列及びグリカン構造の同定を容易にし、それによりグリコシル化部位の、インタクトなタンパク質内での同定及びそれぞれのグリコシル化部位に存在する特定のグリカンの特徴付けが可能となる。

【0043】

生物体液、組織、臓器又は生細胞におけるタンパク質の特異的なグリカン修飾のモニタリングにシアル酸認識親和性試薬を使用することができる。認識は、タンパク質の同一性に依存すると考えられず、シアル酸認識親和性試薬は、シアル酸を含むいずれかのタンパク質配列を認識することができると考えられ（シアル酸認識親和性試薬の特定の特異性と一致し、すなわちそれがpan特異的であろうと、特定の結合に対して特異的であろうと）、したがって特定のグリカン修飾の検出に非常に有用である。

10

【0044】

更に他の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬は、生体外又は生体内の染色細胞又は組織に使用することができる。

【0045】

シアル酸認識親和性試薬を用いて、製薬又は研究産業で使用される組換え糖タンパク質の生成中に生じ得る、混合物中のグリカンのシアル化をモニターすることができる。

【0046】

前述の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬は、染色又は色素で標識化することができ、対象の細胞、又は組織、又は糖タンパク質、又はグリコペプチド、又はオリゴ糖、又は多糖を含む生体試料に適用され得る。

20

【0047】

本発明の他の態様は、分析用途でシアル酸認識親和性試薬を使用する方法を提供する。本発明のシアル酸認識親和性試薬は、シアル酸特異的な分析ツールとして使用することができる。グリカン特異的な分析ツールは、環境、発酵、食品及び医療分野などの多くの分野における検出方法としての潜在的な用途を有し、ヒト又は動物における生体外又は生体内での検出に用いることができる。例えば、本発明のシアル酸認識親和性試薬は、親和性試薬として又は組織染色の賦形剤として使用することができる。他の例としては、シアル酸含有グリカンについて生体試料をエンリッチするために、シアル酸認識親和性試薬を使用することができる。更に他の実施例において、シアル酸認識親和性試薬を使用して、糖タンパク質上の特異的なグリコシル化部位を決定することができる。

30

【0048】

特定の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬は、例えば、アフィニティークロマトグラフィーなどのアフィニティー分離の試薬として使用することができる。アフィニティークロマトグラフィーは、結合性タンパク質とグリカンとの間など、高度に特異的な生物学的相互作用に基づく生化学的混合物の分離方法である。本発明は、いずれかの特異的な設計又はクロマトグラフシステムに限定されない。一般に、シアル酸認識親和性試薬は、固体担体に共有結合されるか、そうでなければ固体担体に固定化され、固定相を構成する。特定の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬で誘導体化される固定相をカラムクロマトグラフィーにおいて使用することができる。これらの実施形態において、固体固定相の粒子は、チューブの全内部容積を満たすために使用される（充填カラム）。代替方法としては、チューブ（開放管状カラム）の中間部分に生体試料（すなわち移動相）のための無制限開放経路が残されているチューブ壁内部上に又はそれに沿って固相粒子が濃縮される。他の実施形態において、誘導体化固定相は、バッチ式クロマトグラフィーに使用することができる。これらの実施形態において、固定相は、容器に添加され、生体試料と混合され得る。前述の実施例は、一般にアフィニティークロマトグラフィーに注目しているが、これらの原理は、他のアフィニティー精製プロトコルに容易に適用されることが理解される。

40

【0049】

治療法

特定の実施形態において、本発明のシアル酸認識親和性試薬は、治療薬として使用する

50

ことができ、又は活性治療薬の送達のために修飾することができる。本発明のシアル酸認識親和性試薬は、定義されたグリカン特異性を有し、治療薬の送達は、シアル酸認識親和性試薬によって認識されるグリカン構造を有する糖タンパク質又は糖脂質などの生体分子を示す細胞、組織又は臓器のみに標的化することができる。

#### 【0050】

したがって、標的化薬物送達などの多くの用途において治療法として用いられるシアル酸認識親和性試薬の可能性が存在する。シアル酸含有グリカンのレベル及び位置の変化は、癌などの多くに疾患と関連することが示されている。したがって、シアル酸認識親和性試薬は、癌研究の分野における直接的な用途を有すると期待され、特定の形態の癌を検出するための製品が開発される可能性がある。グライコミクスにおいて使用される試薬としての有用性を有することも期待され、シアル酸含有グリカンを含む試料をエンリッチするためにそれを使用し得、これらの重要な炭水化物の検出及び分析が可能となる。シアル酸認識親和性試薬は、治療薬の標的送達の賦形剤として使用することができる。

10

#### 【0051】

シアル酸認識親和性試薬又はそのコンジュゲートは、感染症、疾患又は障害を治療又は予防するために対象に投与され得る。感染症は、例えば、ウイルス、細菌、寄生虫又は真菌感染症であり得る。疾患又は障害は、外来性の作用物質から生じるか、又は自己若しくは自己免疫のものであり得る。

#### 【0052】

一実施形態において、シアル酸認識親和性試薬は、治療的又は予防的効果が達成されるように、対象内に存在するシアル酸含有グリカンに結合するように投与される。シアル酸含有グリカンは、対象によって産生される内因性生体分子であるか、又は病原体によって産生される外来性生体分子であり得る。一実施形態において、シアル酸認識親和性試薬は、内因性生体分子、例えば対象の癌、前癌症状又は免疫障害と関連する生体分子に結合する。他の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬は、宿主細胞に対する病原体の結合を防ぎ；他の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬は、宿主細胞内への病原体のインターナリゼーションを防ぐ。

20

#### 【0053】

他の実施形態において、シアル酸認識親和性試薬のコンジュゲートは、対象に投与され、コンジュゲートは、上記に例示される治療薬を含む。治療薬は、抗生物質、例えば微生物病原体を標的とする薬剤であり得る。治療薬は、自己又は自己免疫疾患を標的とする薬剤、例えば細胞毒などの抗癌剤又は免疫活性剤であり得る。部位特異的送達に使用され得る治療薬の例としては、限定されないが、種々の化学療法剤、抗生物質及び抗ウイルス剤、毒素、ラジオアイソトープ、サイトカイン等が挙げられる。

30

#### 【0054】

治療用途のシアル酸認識親和性試薬又はそのコンジュゲートは、適切な動物モデルシステムにおいて、例えばラット、マウス、サル又はウサギにおいて毒性に関して試験され得る。ウイルス感染を治療又は予防するシアル酸認識親和性試薬又はそのコンジュゲートの有用性は、ウイルス複製を阻害するか、ウイルス伝染を阻害するか、又はウイルス感染に伴う症状を治療又は予防するその能力を評価することによって推定され得る。同様に、細菌性感染を治療又は予防するシアル酸認識親和性試薬又はそのコンジュゲートの有用性は、細菌複製を阻害するか、又は細菌性感染に伴う症状を治療又は予防するその能力を評価することによって推定され得る。癌治療における有用性は、癌細胞の増殖又は拡散転移を阻害するか、血管形成を阻害するか、又は細胞死を引き起こすシアル酸認識親和性試薬又はそのコンジュゲートの能力を評価することによって推定され得る。

40

#### 【0055】

##### 製造方法

本発明のシアル酸認識親和性試薬は、遺伝子操作技術を用いて宿主細胞において発現され得る。「細胞」という用語は、生物細胞のいずれかのタイプを含むことが意図される。宿主細胞は、真核細胞又は原核細胞であり得る。好ましくは、宿主細胞は、細菌細胞など

50

の原核細胞であるが、原生生物又は酵母などの単細胞真核生物も宿主細胞として有用である。好ましい宿主細胞は、微生物細胞、好ましくは細菌細胞若しくは酵母細胞などの単細胞微生物の細胞である。細菌及び/又は微生物細胞に対する上記の優先にもかかわらず、シアル酸認識親和性試薬は、動物、植物、昆虫、酵母、原生動物、細菌又は古細菌の細胞において、制限されることなく発現され得ることを理解されたい。本発明のシアル酸認識親和性試薬を発現するように改変することができる微生物細胞の例としては、大腸菌 (*E. coli*) に加えて、エシェリヒア属 (*Escherichia*)、サルモネラ菌属 (*Salmonella*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ザイモモナス属 (*Zymomonas*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、バチルス属 (*Bacillus*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、パエニバシラス属 (*Paenibacillus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルスロバクター属 (*Arthrobacter*)、ブレビバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、カンジダ属 (*Candida*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、ピキア属 (*Pichia*) 及びサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) のメンバーを含む多様な細菌及び酵母が挙げられる。好ましい微生物細胞としては、限定されないが、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、バシラス・リシェニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、アルカリゲネス・ユートロフス (*Alcaligenes eutrophus*)、ロドコッカス・エリスポリス (*Rhodococcus erythropolis*)、パエニバシラス・マセランス (*Paenibacillus macerans*)、シュードモナスプチダ (*Pseudomonas putida*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、エンテロコッカス・ガリナラム (*Enterococcus gallinarum*) 及びエンテロコッカスフェカリス (*Enterococcus faecalis*) が挙げられる。

#### 【0056】

本発明のシアル酸認識親和性試薬を発現するように遺伝子操作された細胞は、「宿主」細胞、「組換え」細胞、「遺伝子操作」細胞又は単に「改変」細胞と呼ばれ得る。これらの且つ同様の用途は、区別なく使用される。遺伝子操作細胞は、共に天然に見出されない遺伝物質を1つにまとめるように標準分子クローニング技術によって作成された、ヌクレオチドの1つ又は複数の人工配列を含有する。組換えDNA分子の構築で使用されるDNA配列は、いずれかの種に由来し得る。例えば、植物DNAは、細菌DNAに連結し得、又はヒトDNAは、真菌DNAと連結し得る。代わりに、天然に存在しないDNA配列がDNAの化学合成又はDNAの定方向突然変異により作成され得、組換え分子に組み込まれ得る。組換えDNAの発現から生じるタンパク質は、組換えタンパク質と呼ばれることが多い。組換えの例は、以下に更に詳細に記述され、細胞内に外来性ポリヌクレオチド(他の細胞種から得られた)を挿入すること、合成ポリヌクレオチドを細胞内に挿入すること、又は細胞内にポリヌクレオチドを再配置若しくは再配列することを含み得る。組換えのいずれかの形態は、遺伝子操作であると考えることができ、したがってあらゆる組換え細胞も遺伝子操作細胞であると考えられ得る。

#### 【0057】

当業者によって理解されるように、本発明のシアル酸認識親和性試薬などのタンパク質の発現は、多くの分子生物学技術によって達成することができる。例えば、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの1つ又は複数のコピーを宿主細胞に導入することによって発現を達成することができる。目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、内因性であるか、又は宿主細胞に対して異種性であり得る。好ましくは、ポリヌクレオ

チドは、ベクターを用いて細胞内に導入されるが、裸のDNAも使用され得る。ポリヌクレオチドは、環状又は直鎖状、一本鎖又は二本鎖であり得、DNA、RNA又はそのいずれかの修飾若しくは組み合わせであることができる。ベクターは、細胞内に遺伝物質を導入するためにビヒクルとして使用され得る分子であることができる。ベクターの例としては、限定されないが、プラスミド、ウイルスベクター、コスミド及び人工染色体が挙げられる。微生物にヌクレオチド配列を導入する分子生物学技術の例としては、限定されないが、トランスフェクション、電気穿孔法、形質導入及び形質転換が挙げられる。これらの方法は、技術分野でよく知られている。標的細胞へのベクターの挿入は、通常、細菌細胞について形質転換及び真核細胞についてトランスフェクションと呼ばれるが、ウイルスベクターの挿入は、形質導入と呼ばれることが多い。本発明の目的では、形質転換、トランスフェクション及び形質導入という用語は、本明細書において区別なく使用される。ベクターの使用によって細胞内に伝達されているポリヌクレオチドは、導入遺伝子と呼ばれることが多い。

10

## 【0058】

好ましくは、ベクターは、発現ベクターである。「発現ベクター」又は「発現構築物」は、標的細胞に特異的なポリヌクレオチドを導入するために使用されるいずれかのベクターであり、発現ベクターが細胞内に入ると、ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質が細胞の転写及び翻訳機構によって産生される。通常、発現ベクターは、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された調節配列を含む。調節配列は、当業者に一般に知られており、例えば複製開始点、プロモーター配列及び/又はエンハンサー配列を含み得る。目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、染色体外に存在し得、或いは宿主細胞染色体DNAに組み込まれ得る。

20

## 【0059】

染色体外DNAは、ミトコンドリア(大部分の真核生物における)などの細胞小器官並びに葉緑体及びプラスチド(植物における)に含有され得る。より一般的には、染色体外DNAは、DNAがそのベクター上で宿主細胞に導入されるベクター内に維持される。多くの場合、タンパク質の発現を最大限にするために、高いコピー数のベクターを選択することが有益であり得る。任意選択的に、ベクターは、選択マーカーを更に含有し得る。ベクターが標的細胞内に存在することを確認するために、特定の選択マーカーを使用し得る。他の選択マーカーを使用して、ベクター及び/又は導入遺伝子が宿主細胞染色体DNAに組み込まれたかを更に確認し得る。選択マーカーの使用は、当技術分野では一般的であり、当業者であれば、選択マーカーの多くの使用を理解且つ認識するであろう。任意選択的に、ベクターは、レポーター遺伝子を更に含有し得る。レポーター遺伝子を使用して、ベクターが標的細胞内で発現しているかを確認し得、更にベクターからの発現をモニターするために使用し得る。レポーター遺伝子の使用は、当技術分野では一般的であり、当業者であれば、レポーター遺伝子の多くの使用を理解且つ認識するであろう。

30

## 【0060】

本発明のシアル酸認識親和性試薬は、本明細書に記載の遺伝子操作細胞から単離し、任意選択的に精製することができる。例えば、好気性又は嫌気性発酵プロセス中に細胞から又は培地から直接、それを単離することができる。公知の方法を用いて、単離及び/又は精製を達成することができる。

40

## 【0061】

シアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート、融合タンパク質又は特許請求の範囲のいずれかの親和性マトリックスと、使用説明書とを含むキットも本発明によって提供される。

## 【0062】

## 例証的な実施形態

実施形態1. 対応する野生型NanBノイラミニダーゼタンパク質と比較して少なくとも1つのアミノ酸変異を有する、触媒不活性なNanBノイラミニダーゼタンパク質又はその断片を含むシアル酸認識親和性試薬であって、その変異は、

(a) NanBタンパク質のノイラミニダーゼ活性を低減又は除去し、且つ

50

(b) シアル酸結合親和性又は結合特異性に影響し、  
前記親和性試薬は、グリカンのシアル酸成分に結合する、シアル酸認識親和性試薬。

【0063】

実施形態2. NanB断片は、NanBタンパク質の炭水化物結合性分子(CBM)ドメイン及びNanBタンパク質のグリコシルヒドロラーゼ(GH)ドメインの少なくとも1つを含む、実施形態1のシアル酸認識親和性試薬。

【0064】

実施形態3. シアル酸に対してpan特異的である、実施形態1又は2のシアル酸認識親和性試薬。

【0065】

実施形態4. 2, 3結合で隣接サッカリドモノマーに結合されたNeu5Ac、2, 6結合で隣接サッカリドモノマーに結合されたNeu5Ac及び2, 8結合で隣接サッカリドモノマーに結合されたNeu5Acに結合する、実施例3のシアル酸認識親和性試薬。

【0066】

実施形態5. Neu5Acの少なくとも1つのバリエーションに結合する、実施形態3又は4のシアル酸認識親和性試薬。

【0067】

実施形態6. 変異は、配列番号1又は配列番号4に表されるY653、D270及びE541からなる群から選択される部位におけるものである、実施例3~5のいずれかのシアル酸認識親和性試薬。

【0068】

実施形態7. 変異は、肺炎連鎖球菌(*S. pneumoniae*)NanB(配列番号1若しくは配列番号4)又はその断片或いは相同的NanB配列での対応する位置におけるものである、実施例6のシアル酸認識親和性試薬。

【0069】

実施形態8. 変異は、Y653F、D270A、D270N、E541A及びE541Qからなる群から選択される、実施形態6又は7のシアル酸認識親和性試薬。

【0070】

実施形態9. 変異は、Y653Fである、実施例8のシアル酸認識親和性試薬。

【0071】

実施形態10. Sia-PS1、Sia-PS2、Sia-PS3、Sia-PS4及びSia-PS5からなる群から選択される、実施形態8のシアル酸認識親和性試薬。

【0072】

実施形態11. Sia-PS1である、実施形態10のシアル酸認識親和性試薬。

【0073】

実施形態12. 対応する野生型NanBノイラミニダーゼタンパク質と比べて複数のアミノ酸変異を有する、実施例1又は2のシアル酸認識親和性試薬。

【0074】

実施形態13. 前記複数の変異は、  
(a) NanBタンパク質の触媒活性を低減又は除去する少なくとも1つの第1変異、及び  
(b) 結合親和性又は結合特異性に影響を及ぼす少なくとも1つの第2変異を含む、実施例12のシアル酸認識親和性試薬。

【0075】

実施形態14. 2, 3結合で隣接サッカリドモノマーに結合されているNeu5Acに特異的である、実施形態12又は13のシアル酸認識親和性試薬。

【0076】

実施形態15. 複数の変異は、配列番号1又は配列番号4において表されるR193、D270、A538、E541、P660、S673、D327及びN683からなる群

10

20

30

40

50

から選択される部位におけるものである、実施形態 12 ~ 14 のいずれかのシアル酸認識親和性試薬。

【0077】

実施形態 16 . 複数の変異は、肺炎連鎖球菌 ( *S . p n e u m o n i a e* ) N a n B ( 配列番号 1 若しくは配列番号 4 ) 又はその断片或いは相同的 N a n B 配列での対応する位置におけるものである、実施例 15 のシアル酸認識親和性試薬。

【0078】

実施形態 17 . 複数の変異は、R 1 9 3 A、D 2 7 0 Q、D 2 7 0 G、D 2 7 0 H、D 2 7 0 I、A 5 3 8 V、A 5 3 8 W、A 5 3 8 F、A 5 3 8 H、A 5 3 8 M、A 5 3 8 I、E 5 4 1 D、E 5 4 1 A、E 5 4 1 I、E 5 4 1 S、P 6 6 0 Q、S 6 7 3 A、S 6 7 3 Q、D 3 2 7 E、D 3 2 7 V 及び N 6 8 3 S からなる群から選択される、実施形態 15 又は 16 のシアル酸認識親和性試薬。

10

【0079】

実施形態 18 . 複数の変異は、R 1 9 3 A、D 2 7 0 Q、A 5 3 8 V 及び E 5 4 1 D を含む、実施形態 17 のシアル酸認識親和性試薬。

【0080】

実施形態 19 . S i a - 3 S 1、S i a - 3 S 2、S i a - 3 S 3、S i a - 3 S 5、S i a - 3 S 6、S i a - 3 S 7、S i a - 3 S 7 \*、S i a - 3 S 8 及び S i a - 3 S 9 からなる群から選択される、実施形態 17 のシアル酸認識親和性試薬。

【0081】

実施形態 20 . S i a - P S 1 である、実施形態 19 のシアル酸認識親和性試薬。

20

【0082】

実施形態 21 . グリカンは、グリコシル化生体分子の構成成分である、実施形態 1 ~ 20 のいずれかのシアル酸認識親和性試薬。

【0083】

実施形態 22 . グリコシル化生体分子は、糖タンパク質、グリコペプチド、糖脂質、グリコリポタンパク質又はグリコリポペプチドを含む、実施形態 21 のシアル酸認識親和性試薬。

【0084】

実施形態 23 . 第 2 成分に共有結合されている、実施形態 1 ~ 22 のいずれかのシアル酸認識親和性試薬を含む第 1 成分を含むコンジュゲート。

30

【0085】

実施形態 24 . 第 2 成分は、タンパク質性成分である、実施形態 23 のコンジュゲート。

【0086】

実施形態 25 . 第 2 成分は、非タンパク質性成分である、実施形態 23 のコンジュゲート。

【0087】

実施形態 26 . 第 2 成分は、治療薬又は診断薬である、実施形態 23 ~ 25 のいずれかのコンジュゲート。

【0088】

実施形態 27 . 実施形態 1 ~ 22 のいずれかのシアル酸認識親和性試薬を含む融合タンパク質。

40

【0089】

実施形態 28 . 実施形態 1 ~ 27 のいずれかのシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質を含む親和性マトリックス。

【0090】

実施形態 29 . 固体担体、表面、カラム、樹脂、ビーズ、マイクロアレイ、粒子及びナノ粒子からなる群から選択される、実施形態 28 の親和性マトリックス。

【0091】

実施形態 30 . 実施形態 1 ~ 29 のいずれかのシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート

50

ト、融合タンパク質又は親和性マトリックスと、使用説明書とを含むキット。

【0092】

実施形態31．実施形態1～24のいずれかのシアル酸認識親和性試薬若しくはコンジュゲート又は実施形態27の融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド。

【0093】

実施形態32．実施形態31のポリヌクレオチドを含むベクター。

【0094】

実施形態33．発現ベクターである、実施形態32のベクター。

【0095】

実施形態34．実施形態32又は33のベクターを含む宿主細胞。

10

【0096】

実施形態35．細菌細胞である、実施形態34の宿主細胞。

【0097】

実施形態36．実施形態1～24のいずれかのシアル酸認識親和性試薬若しくはコンジュゲート又は実施形態27の融合タンパク質を製造する方法であって、宿主細胞において親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質を発現させることを含む方法。

【0098】

実施形態37．グリカンのシアル酸成分を検出する方法であって、生体試料又は実験試料を、実施形態1～27のいずれかのシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質と、シアル酸への親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の結合を可能にする条件下で接触させる工程と、シアル酸を検出する工程とを含む方法。

20

【0099】

実施形態38．生体試料又は実験試料は、組換え抗体を含む、実施形態37の方法。

【0100】

実施形態39．グリカンは、バイオマーカーである、実施形態37の方法。

【0101】

実施形態40．バイオマーカーは、癌バイオマーカーである、実施形態39の方法。

【0102】

実施形態41．シアル酸含有グリカンをエンリッチ、単離又は精製する方法であって、実施形態1～27のいずれかのシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質を、シアル酸への親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の結合を可能にする条件下で接触させて、エンリッチ、単離又は精製されたシアル酸含有グリカンをもたらすことを含む方法。

30

【0103】

実施形態42．実施形態1～27のいずれかのシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質を含む診断用又は治療用組成物。

【0104】

実施形態43．シアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質は、検出可能に標識化される、実施形態42の診断用又は治療用組成物。

【0105】

実施形態44．検出可能な標識は、放射性標識、蛍光標識、リン光性標識、比色定量標識、酵素的標識、免疫学的標識、磁気標識、常磁性標識、反磁性標識又は電磁標識を含む、実施形態43の診断用又は治療用組成物。

40

【0106】

実施形態45．治療薬としての、実施形態1～27のいずれかのシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の使用。

【0107】

実施形態46．診断薬としての、実施形態1～27のいずれかのシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の使用。

【0108】

50

実施形態 47 . 標的化薬物送達のための、実施形態 1 ~ 27 のいずれかのシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の使用。

【0109】

実施形態 48 . 生体試料又は実験試料中のシアル酸の存在又は量を検出するための、実施形態 1 ~ 27 のいずれかのシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の使用。

【0110】

実施形態 49 . 本明細書に記載される特徴の 1 つ又は複数を含む化合物、組成物又は方法。

【0111】

本発明は、以下の実施例によって例証される。本明細書に記載の本発明の範囲及び趣旨に従い、特定の実施例、材料、量及び手順は、広く解釈されるべきであることを理解されたい。

【実施例】

【0112】

実施例 I . pan 特異的なシアル酸試薬導入

現在、複数のレクチン（一般にセイヨウニワトコ (*S. Nigra*)、イヌエンジュ (*M. amurensis*) 及びコムギ胚芽) は、シアリル化グリカンエンリッチするために連続レクチンアフィニティークロマトグラフィーを利用しなければならない [2]。これらのレクチン（特に WGA 及び MAL）は、非シアリル化グリカンとの交叉反応性を示すため [3, 4]、その使用では、無関係の成分を捕捉するリスクがある。Sia-PS1 Lectenz（登録商標）（PS = pan 特異的）は、隣接サッカリドへの末端 Neu5Ac (Sia<sub>2,3</sub>-、<sub>2,6</sub>- 及び <sub>2,8</sub>-) 結合にかかわらず、一般的なシアロ-グリココンジュゲートの検出及びエンリッチメントに関して開発途上にある。本発明者らの知る限りでは、これは、シアル酸 (Sia、ノイラミン酸、Neu5Ac) に対して pan 特異的な第 1 試薬であり、それ自体がシアログリカンバイオマーカーの検出及びグライコミックスのエンリッチメントを有意に高める可能性を有する。

【0113】

方法

図 2 に示すフローチャートは、Lectenz（登録商標）候補をスクリーニングし、最適化し、選択するための、実施例 I 及び II で用いられる方法を図示している。可能性のある Lectenz（登録商標）候補の特異性及び親和性は、最適なクローンの選択を可能にするように設計された、構造的に誘導される部位特異的及び/又は部位飽和変異誘発によって評価される。バイオレイヤー干渉法 (BLI) を用いて、グリカン及び糖タンパク質に結合するための結合キネティクス及び親和性が決定される。アフィニティークロマトグラフィーは、カラムフォーマットに Lectenz（登録商標）候補を固定化することによって実施され、シアリル化グリカン及びシアログリカン及びグリココンジュゲートを分画するその能力が評価される。すべての有望な Lectenz（登録商標）候補が、600 を超える O- 及び N- 結合グリカンを含む現在含有する CFG においてグリカンアレイに対してスクリーニングされる。

【0114】

結果及び結論

酵素-リガンド複合体の計算シミュレーションから Sia-PS1 特異性が予測された。

NanB は、シアリル化グリカン基質を認識する、十分に特徴付けられた酵素である。その配列及び更なる特徴は、文献 [9] において以前に記述されている。計算シミュレーション [10] を用いて、基質親和性最適化のための突然変異誘発に適している可能性が高い、NanB における残基を同定した。図 3 A に示す 3D モデルは、GLYCAM-Web ([www.glycam.org](http://www.glycam.org)) のオンラインツールを使用して構築された。

【0115】

10

20

30

40

50

リガンドのアラインメント後、酵素 - リガンド複合体を完全溶媒和分子 (MD) シミュレーション [ 11 - 13 ] にかき、続いて分子力学一般化ボルン表面近似 (MM - GBSA) 法 [ 12 , 14 ] を用いて、平均相互エネルギーを計算した。3' - シアリルラクトサミン (Neu5Ac<sub>2</sub>, 3Gal<sub>1</sub>, 4GlcNAc又は3'SLN) に結合された選択アミノ酸の NanB 自由エネルギーのリストについては、表 1 を参照されたい。シミュレーション解析から、Sia - PS Lectenz (登録商標) がシアリル化グリカンに対して有意な親和性を示し、非シアリル化グリカンに対して測定可能な親和性を示さないはずであることが示されている。生成された Sia - PS Lectenz (登録商標) を表 2 に示し、それによって突然変異誘発部位配列同一性も同定される。表 3 は、これらの Sia - PS Lectenz (登録商標) 試薬の様々な物理的及び化学的性質を示す。

10

【 0 1 1 6 】

【 表 1 】

表1. 3'SLNに結合されたWT NanBのPer残基結合自由エネルギー(kcal/mol)。挙げられる残基は、ファンデルワールス力(ΔE<sub>VDW</sub>)又は静電(ΔE<sub>ELE</sub>)相互作用による総モル力学的エネルギーに、或いは総結合自由エネルギー(ΔG<sub>Binding</sub>)に少なくとも0.5kcal/mol寄与した。ライブラリーカラムは実施例IIに該当し、知識ベースのライブラリーデザインの最適化のために選択される残基(X-C-P=変異誘発のいずれかのアミノ酸であるが、Cys又はPro; X-C-E-P=Cys, Glu又はProを除くいずれかのアミノ酸)を示す。

20

結合に重要な残基	ΔE <sub>VDW</sub>	ΔE <sub>ELE</sub>	ΔG <sub>GB-SA</sub>	ΔG <sub>Binding</sub>	ライブラリー-1	ライブラリー-2	ライブラリー-3
R619	0.5	-47.3	40.0	-6.8			
W674	-4.7	0.7	-0.4	-4.3			
R245	-0.1	-41.7	37.7	-4.2			
R676	-2.4	-23.6	22.7	-3.2			
Y653	-1.9	0.4	-0.6	-2.2			
S675	-0.1	-2.3	1.0	-1.5			
R264	-0.2	-27.7	26.6	-1.3			
H269	-0.9	-1.3	0.9	-1.2			
I246	-1.0	-0.8	0.8	-1.0			
I326	-0.9	-0.6	0.6	-0.9			
R557	-0.4	-28.3	27.9	-0.7			
D327	-0.5	6.1	-6.3	-0.7	X-C-P	X-C-P	X-C-P
結合にわずかに弱く寄与するTepid残基							
E541	-0.9	21.8	-21.6	-0.6	X-C-E-P	X-C-E-P	X-C-E-P
E669	-0.1	23.5	-23.9	-0.6			
S673	-1.1	2.4	-2.0	-0.6	X-C-P	X-C-P	X-C-P
T539	-0.7	-1.4	1.7	-0.5			
L679	-0.5	-0.6	0.6	-0.5			
T268	-0.4	1.4	-1.4	-0.4			
P492	-0.4	0	0.1	-0.4			
D270	-2.3	18.5	-16.5	-0.4	X-C-P	X-C-P	X-C-P
Y671	-0.2	0.9	-1.0	-0.2			
A538	-0.2	-1.1	1.3	0	X-C-P	X-C-P	X-C-P
N353	-0.1	-0.7	0.7	0			
N316	-0.3	0.4	-0.1	0			
P660	0.0	-0.1	0.1	0			
N683	-4.7	-0.3	0.3	0			

30

40

【 0 1 1 7 】

50

## 【表 2】

表2: NanBに基づく、選択されたPan特異的なシアル酸認識Lectenz®試薬の部位突然変異。影つき枠は、その部位での野生型アミノ酸の保存を示す。

wtNanB	D270	E541	Y653
Sia-PS1	D	E	F
Sia-PS2	A	E	Y
Sia-PS3	N	E	Y
Sia-PS4	D	A	Y
Sia-PS5	D	Q	Y

10

## 【0118】

## 【表 3】

表3: NanB及びPan特異的なシアル酸認識Lectenz®試薬の物理的及び化学的性質。アミノ酸配列に基づくExPASy ProtParam計算特性を報告する。[15]分子量、等電点、及び吸光率( $\epsilon$ )の値を示す。

タンパク質	分子量	等電点	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon$ (L g <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon$ 1%
(690アミノ酸)					
wtNanB	76965.9	6.53	97640	1.269	12.69
Sia-PS1	76949.9	6.53	96150	1.250	12.50
Sia-PS2	76921.9	6.67	97640	1.269	12.69
Sia-PS3	76964.9	6.67	97640	1.269	12.69
Sia-PS4	76907.9	6.67	97640	1.270	12.70
Sia-PS5	76964.9	6.67	97640	1.269	12.69

20

## 【0119】

Sia-PS Lectenz (登録商標) は、酵素活性を有さないか又は減弱された酵素活性を有する。

wt NanB 酵素及びその変異体のノイラミニダーゼ活性を、pNP-Neu5Ac を比色定量用基質として用いて測定した。図4に示すように、野生型酵素と比較して、Sia-PS3は、19%活性であり、Sia-PS2は、9%活性であり、その他は、不活性であった。したがって、Sia-PS1、Sia-PS4及びSia-PS5は、適切なLectenz (登録商標) 候補である。

## 【0120】

Sia-PS Lectenz (登録商標) 試薬は、固有の標的親和性を有する。

Lectenz (登録商標) 候補とシアル酸リガンドとの定常状態結合定数は、BLIによって測定された。Sia-PS4が、3'SLに対する $\mu$ M以下のKD値を有する最高結合応答を有し、Sia-PS2、残留ノイラミニダーゼ活性を有する候補は、より高いKD値を有する最も低い結合応答を有することが図5から示された。6'-シアリルラクトース (Neu5Ac<sub>2</sub>, 6Gal<sub>1</sub>, 4Glc<sub>1</sub> 又は6'SL) への5つの候補の結合により、低い結合応答ではあるが、同様のKD値が得られた (図6)。注目すべきことに、3'SL又は6'SLに対するSia-PS1、Sia-PS4及びSia-PS5の親和性は、レクチンMALに対して報告された値と同等であるか又はそれより優れているMAL (KD約1~3 $\mu$ M [16, 17]) 及びSNA (0.6~0.9 $\mu$ M [16]) 。

40

## 【0121】

Sia-PS1は、結合と無関係にNeu5Acを検出する。

50

更なるBLI測定から、Sia-PS1、Sia-PS2、Sia-PS3、Sia-PS4及びSia-PS5が、3'SL、6'SL及びガングリオシドGD3のオリゴ糖(Neu5Ac<sub>2</sub>, 8Neu5Ac<sub>2</sub>, 3Gal<sub>1</sub>, 4Glc)のそれぞれに存在するNeu5Ac<sub>2</sub>, 3-, 2, 6-及び2, 8-結合を認識することが確認された。結合親和性は、オリゴ糖のそれぞれに関して $\mu\text{M}$ 又は $\mu\text{M}$ 以下である(図6)。

#### 【0122】

Lectenz(登録商標)アフィニティークロマトグラフィー

本発明者らが開発しているLectenz(登録商標)の一般的な適用は、バイオマーカーのエンリッチメントのための複合試料のアフィニティークロマトグラフィーを用いたものである。Sia-PS1についての低KD値及びオフ速度( $k_{\text{off}} = 0.008\text{ s}^{-1}$ )により、アフィニティークロマトグラフィーのマトリックスとして理想的となる。実際に、Lectenz(登録商標)アフィニティークロマトグラフィー(LAC)において、セファロースカラムに結合されたSia-PS1は、非シアリル化糖タンパク質ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を全く保持しなかった。そのすべてが素通りであった。対照的に、シアリル化フェチュインは、カラムに保持され、溶離された(図7A)。1:1混合物中において、カラムは、シアリル化フェチュインを捕捉するのに対して、非シアリル化BSA又は脱シアリル酸アシアロフェチュインは、検体のローディング工程においてカラムを素通りした(図7B及び7C)。

#### 【0123】

Sia-PS1は、3'-シアリル化及び6'-シアリル化糖タンパク質の両方に特異的に結合する。

BLIデータ(図6)の他に、本発明者らは、合成シアリル化糖タンパク質(ネオ糖タンパク質)、3'-シアリルラクトース-BSA(3'SL-BSA)及び6'-シアリルラクトース-BSA(6'SL-BSA)を検体として使用してLACを行った。Sia-PS1 LACは、ネオ糖タンパク質のそれぞれを捕捉することができ、続いて3'SL及び6'SLによってそれぞれ溶離された(図8)。

#### 【0124】

Sia-PS1は、シアロ-グリココンジュゲートのエンリッチメント試薬としてレクチンよりも優れている。

比較のために、MAA(3'Sia特異的として知られる)及びSNA(6'Sia特異的として知られる)の市販のアフィニティークロマトグラフィーカラム(1mL)に、ローディングバッファー1mL中に検体200 $\mu\text{g}$ の推奨ローディングレベルにおいて3'SL-BSA及び6'SL-BSAをそれぞれローディングした。図9で明らかであるように、それぞれのカラムがネオグリココンジュゲートの一部を保持すると同時に、かなりの量が素通り画分中に確認された。製造元の技術的データに従って、レクチンカラムの結合能力は、ローディングされる糖タンパク質200 $\mu\text{g}$ をはるかに超える。更に、溶離ピークは、Sia-PS1 LACから溶離されるよりもはるかに広い。多くの因子、例えばレクチンカラムの質又は固定化レクチンとネオグリココンジュゲート検体との不適合性又は製造元の推奨溶離剤が結果に影響を及ぼしているが、これらの実験から、シアロ-グリココンジュゲートのエンリッチメント試薬としてSia-PS1が優れていることが示されている。

#### 【0125】

Sia-PS1は、MCF7無細胞抽出物からシアロ-グリココンジュゲートをエンリッチする。

Sia-PS1 LACの適用は、MCF7無細胞抽出物からのシアロ-グリココンジュゲートのエンリッチメントに応用されている[18]。図10に示すように、MCF7抽出物における総タンパク質の約10%がSia-PS1 LACカラムに親和性であり、競合的試薬3'SL及び6'SLによって溶離することができた。本発明者らは、MCF7タンパク質約1.5mgを、カラムを通して4で一晚循環させることによって結合効率を高めることができ、タンパク質207 $\mu\text{g}$ 又は13.8%の溶離ピークが得られた。既知のグリコシル化データベース並びにSia-PS1 LACエンリッチ化タンパク質

10

20

30

40

50

の同一性及び相対存在量の比較により、バイオマーカー発見試薬としての *Sia-PS1* の特異性及び有効性が更に実証されるであろうと予想される。

#### 【0126】

グリカンアレイスクリーニングから、シアログリカンに対する *Sia-PS1 Lectenz* (登録商標) 特異性が確認される。

およそ64のグリカン構造を有するシアログリカンマイクロアレイ上で濃度200 µg/mLにおいて、ビオチン標識標 *Sia-PS1 Lectenz* (登録商標) 試料を用いて、グリカンアレイスクリーニングを実施した[19]。ストレプトアビジン-Cy3を用いて第2の検出を達成し、実験を上述のように行った。特異性データ(図11)から、2, 3, 2, 6などのアレイ上のNeu5Acのすべての結合バリエーションだけでなく、9-Oアセチル化などのNeu5Acの一般的な修飾への結合も確認される。更に、一部の9-O-アセチル化構造を除いて、シアル酸のN-グリコシル形態(Neu5Gc, Gc-Sia)のすべてのバリエーションが検出された。非シアル酸末端ガラクトース構造に関してシグナルは確認されず、シアル酸に対する *Sia-PS1* の特異性が再確認された。

10

#### 【0127】

*Sia-PS1*、*Sia-PS4* 及び *Sia-PS5* をプローブとして用いたウェスタンブロット

アシアロフェチュイン、フェチュイン、BSA、3'SL-BSA又は6'SL-BSAの試料(それぞれ1 µg)をSDS-PAGEゲル上で電気泳動させた。ゲルは、ニトロセルロース膜に移動し、ブロックされた。それぞれ1 µMの *Sia-Lectenz* (登録商標) をブロットと共にインキュベートし、末端シアル酸に対してプローブした。洗浄後、抗Poly His-HRPコンジュゲートをブロットと共にインキュベートし、*Sia-PS1* のN末端ヘキサ-ヒスチジン標識化を検出した。ブロットを洗浄し、化学発光基質で展開した。画像(図18)は、*Sia-PS1*、*Sia-PS4* 及び *Sia-PS5* がシアル化タンパク質フェチュイン、3'SL-BSA及び6'SL-BSAに結合するが、非シアル化タンパク質アシアロフェチュイン及びBSAに結合しないことを示す。比較のために、*Sia-PS2, 3* 結合及び *Sia-PS2, 6* 結合のそれぞれに対して特異的であることが知られている市販のビオチン標識標レクチンMALII及びSNAがプローブとして使用された。HRPストレプトアビジンが二次検出試薬として使用された。レクチンは、その非同族BSAネオ糖タンパク質に結合しなかった。このことから、*Sia-PS Lectenz* (登録商標) は、市販のレクチンと異なり、pan特異的であることが実証されている。

20

30

#### 【0128】

##### 概要

1) 計算論モデリングは、触媒不活性なpan特異的なシアル酸 *Lectenz* (登録商標) 試薬へのwt NanB親酵素の転化に関連する構造的洞察を提供する。

2) すべてのpan特異的な *Lectenz* (登録商標) 候補は、wt親酵素に対して有意に減少した触媒活性又は未検出の触媒活性を有する。注目すべきことに、リード候補 *Sia-PS1* は、触媒不活性である。

40

3) *Sia-PS Lectenz* (登録商標) 試薬は、固有の親和性を有し、*Sia-PS1* は、最も高い親和性を有する。

4) *Sia-PS1 Lectenz* (登録商標) は、3'SL、6'SL及びGD3グリカン(Neu5Ac<sub>2</sub>, 8Neu5Ac<sub>2</sub>, 3Gal<sub>1</sub>, 4Glc)中に存在する *Sia-PS2, 3*、*Sia-PS2, 6* 及び *Sia-PS2, 8* 結合に対してpan特異的であり、3つのすべての標的グリカン構造に対してµM以下の親和性を有する。

5) *Sia-PS1 Lectenz* (登録商標) は、フェチュイン:アシアロフェチュイン及びフェチュイン:BSAの50:50混合物からフェチュインをエンリッチするための機能性捕捉試薬である。

6) *Sia-PS1 Lectenz* (登録商標) は、3'-シアルラクトース-BS

50

Aと6'-シアリルラクトース-BSAグリココンジュゲートの両方をエンリッチするための機能性捕捉試薬である。

7) Sia-PS1 Lectenz (登録商標)は、レクチンMAA及びSNAと比べて、シアロ-グリココンジュゲートをエンリッチするための優れた捕捉試薬である。

8) Sia-PS1 Lectenz (登録商標)は、複合MCF7乳癌細胞抽出物からシアロ-グリココンジュゲートをエンリッチするための機能性捕捉試薬である。

9) Sia-PS1 Lectenz (登録商標)は、シアリル化グリカンへの結合を示し、グリカンアレイスクリーンにより、非シアル酸末端ガラクトース保有グリカンへの結合は確認されない。

【0129】

実施例II. 2, 3-結合シアル酸に対して特異的な試薬導入

イヌエンジュ (*Maackia amurensis*) レクチン白血球凝集素 (MAL) 及び赤血球凝集素 (MAH) は、末端グリカン配列 Neu5Ac<sub>2</sub>, 3Gal に対して特異的であると広く考えられている。更に注目すべきことに、市販の *Maackia* レクチンは、多くの場合、混合物として販売され、複数の名称を有し (MAA, MAL I、MAL II 等)、且つある範囲の既報告の特異性を有する [5]。その特異性を完全に定義するために、これらのレクチンは、最近、機能グライコミクスコンソーシアム (Consortium for Functional Glycomics) においてグリカンアレイに対してスクリーニングされており、Neu5Ac<sub>2</sub>, 3Gal 配列に結合しないが、他の炭水化物物において末端のグリカン、例えば 3S-Gal、3S-GalNAc、Neu5Gc<sub>2</sub>, 3Gal b、Neu5Ac<sub>2</sub>, 8Neu5Gca、及び Neu5Gc<sub>2</sub>, 8Neu5Gc (MAL)、及び 3S-Gal、KDN<sub>2</sub>, 3Gal に等しく結合することができ、Neu5Gc (MAH) に結合しないことが確認された。末端 3S-Gal [6] 及び Neu5Gc [7] 修飾がいずれも癌に対して可能性のあるマーカーであると仮定すると、正常な Neu5Ac<sub>2</sub>, 3Gal 配列を他の配列と区別する能力が重要である。更に、特定の糖タンパク質における正常な「2, 3」配列の存在は、前立腺特異的な抗原 (PSA) の場合と同様に疾患と関連し得る [8]。この報告において、本発明者らは、2, 3-シアル酸特異的な Lectenz (登録商標) 試薬、Sia-3S1 の開発を例示する。更に、本発明者らは、Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィー適用のための捕捉試薬としてのその可能性を実証する。

【0130】

方法

その方法は、実施例Iに記載の通りである。

【0131】

結果及び結論

ライブラリーの構築

非計算的に誘導される定方向進化を用いて (図2、実施例I)、6'SLと比べて3'SLに対して様々な特異性を有する複数の Lectenz (登録商標) 候補が同定された。骨格として WTNanB 酵素を用いて、3つの異なる酵母表面ディスプレイライブラリーを作成した [1] (表1)。具体的には、酵母細胞表面上に Aga-2p の融合タンパク質として NanB 酵素を発現させた。これらの酵母ライブラリーは、表1に示すように対象となる位置での部位飽和変異誘発を用いて作成された。ライブラリー1は、NanB GH33ドメイン (残基230~697) を含む。ライブラリー2は、NanB CBM 及び GH33ドメイン (残基30~697) を含む。ライブラリー3は、R193A変異を有するライブラリー2と同じカバレッジを含む。ライブラリー2及び3は、いずれも3'SLグリカン標的に対してバイオパニングされた。ラウンド3、6及び9からのクローンを配列決定して、エンリッチされたクローンを同定した。タンパク質発現、精製及び特徴付けのために、ライブラリー3からのエンリッチ酵母クローンを大腸菌 (*E. coli*)

10

20

30

40

50

発現ベクターにクローニングした。ライブラリー2のクローンも配列決定されており、同様の手法で解析される。ライブラリー3から選択される候補のアミノ酸 i c e L o g o の表示は、図12に示され、それぞれのライブラリー変異誘発残基において様々なアミノ酸の頻度を示す。これらの候補すべてが、表4で同定されるライブラリー変異に加えて、アルギニン193残基乃至アラニン変異(R193A)を含有する。この変異は、NanBの炭水化物結合性分子に位置し、wt NanBの88%の酵素活性を有する(図13)。本発明者らは、以前に、R193AがSia-PS1 Lectenz(登録商標)に導入された場合、シアロ-グリココンジュゲートの減弱された結合を確認した。総合すると、選択前にSia-3S Lectenz(登録商標)ライブラリーにR193A変異を導入することにより、候補酵素活性にほとんど影響を及ぼさず、pan特異的なシアル酸の結合が減弱されるはずである。これにより、定方向進化を介して、3'SLに優先的に結合する候補のエンリッチメントが高められるであろう。

10

【0132】

これらのSia-3S Lectenz(登録商標)候補は、BLIによって特徴付けられており、2,3-結合シアル酸グリカンのエンリッチメントのための捕捉試薬としてのその有用性が現在評価されている。これらのSia-3S Lectenz(登録商標)の一部のリストは、その変異と共に表4に含まれる。これらの変異体のアミノ配列は、表4に示すアミノ酸部位で修飾された図3Dの野生型配列番号4によって表される。これらの候補試薬の物理的及び化学的性質を表5に示す。

20

【0133】

【表4】

表4: NanB(R193A)に基づくライブラリー3からの、選択された3'-結合特異的なシアル酸認識Lectenz®試薬の部位突然変異。影つき枠は、その部位での野生型アミノ酸の保存を示す。

wtNanB	R193	D270	D327	A538	E541	P660	S673	N683
Sia-3S1	A	Q	D	V	D	P	S	N
Sia-3S2	A	G	D	W	D	Q	A	N
Sia-3S3	A	G	D	V	D	P	A	N
Sia-3S5	A	D	E	F	A	P	S	N
Sia-3S6	A	G	D	H	A	P	S	S
Sia-3S7	A	H	D	M	A	P	S	N
Sia-3S8	A	I	V	F	I	P	Q	N
Sia-3S9	A	G	D	I	S	P	A	N

30

【0134】

Sia-3S7は、変異D427Y及びL690Fを更に有するが、これらは、変異に対して選択される部位中になく(表1に基づく)、むしろクローニングの人工産物である。

【0135】

40

## 【表 5】

表5: NanB及び3'-結合特異的なシアル酸認識Lectenz®試薬の物理的及び化学的性質。アミノ酸配列に基づくExPASy ProtParam計算特性を報告する。[15]分子量、等電点、及び吸光率( $\epsilon$ )の値を示す。

タンパク質 (690アミノ酸)	分子量	等電点	$\epsilon$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	$\epsilon$ ( $L g^{-1} cm^{-1}$ )	$\epsilon$ %
wtNanB	76965.9	6.53	97640	1.269	12.69
Sia-3S1	76907.9	6.53	97640	1.270	12.70
Sia-3S2	76938.9	6.53	103140	1.341	13.41
Sia-3S3	76820.8	6.53	97640	1.271	12.71
Sia-3S5	76912.9	6.53	97640	1.269	12.69
Sia-3S6	76803.8	6.70	97640	1.271	12.71
Sia-3S7	76904.9	6.70	97640	1.270	12.70
Sia-3S8	76964.1	6.84	97640	1.269	12.69
Sia-3S9	76806.8	6.67	97640	1.271	12.71

10

## 【0136】

Sia-3S1と指定される有望なリードLectenz(登録商標)候補のデータを以下に示す。

## 【0137】

Sia-3S Lectenz(登録商標)は、検出可能な酵素活性を有さない。

本発明者らは、同定されたSia-3S Lectenz(登録商標)候補がノイラミニダーゼ活性を示すかどうかを評価するために、wt NanB及びR193A点変異体に対してこれらの候補をスクリーニングした。比色定量用基質pNP-Neu5Acを使用して、活性を測定した。図13に示すように、野生型酵素と比較して、Sia-3S Lectenz(登録商標)候補に関して上記のバックグラウンドで活性を測定することができなかった。したがって、すべてのSia-3S Lectenz(登録商標)試薬が適切な候補である。

20

## 【0138】

Sia-3S1は、6'SLに比べて3'SLに対して特異的である。

酵素的に不活性であるSia-3S1は、明確な条件下において高い3'SL親和性を有する。図14は、2つの異なる結合バッファーにおいて3'SL及び6'SLそれぞれへのそのBLI結合キネティクスを示す。

30

## 【0139】

Sia-3S1は、フェチュインを保持し、且つ3'SLを用いて競合的に溶離される。

フェチュイン、3'-結合及び6'-結合シアル酸残基の両方を有する、高度にシアリル化された糖タンパク質で予備的なSia-3S1 LACを実施し、続いて3'SL又は6'SLのいずれかで競合的に溶離した。図15に示すように、Sia-3S1カラムに結合されたフェチュイン約85 $\mu$ gのうち、100%が3'SLによって競合的に溶離され、50%のみが6'SLによって溶離された。これらの結果から、Sia-3S1の3'-結合の優先が強く示されている。

## 【0140】

Sia-3S1 LACカラムに結合された3'SL-BSAは、3'SLによって競合的に溶離されるが、6'SLによって競合的に溶離されない。

40

50mM 3'SL又は6'SLで溶離する前に3'SL-BSA 100 $\mu$ g(図16A)又は6'SL-BSA 100 $\mu$ g(図16B)をSia-3S1 LACカラムに注入した。図16Aにおいて、3'SLは、予め結合された3'SL-BSA 90 $\mu$ gを溶離することができる。50mM 6'SLを用いて結合3'SL-BSAを溶離する試みで小さい溶離ピークが生じ、NaCl再生工程中に3'SL-BSAの大部分が溶離される。6'SL-BSA 100 $\mu$ gがSia-3S1カラムに結合された場合(図16B)、50mM 3'SL及び6'SLのいずれも6'SL-BSA 45 $\mu$ gを溶離する。総合すれば、これらの結果から、Sia-3S1は、6'SL-BSAと比べて3'SL-BSAに選択的に

50



- analysis: application to pancreatic cancer serum. *J Proteome Res*, 2006. 5(7): p. 1792 - 802.
3. Bai, X., et al., Enhanced 3-O-sulfation of galactose in Asn-linked glycans and *Maackia amurensis* lectin binding in a new Chinese Hamster ovary cell line. *Glycobiology*, 2001. 11(8): p. 621 - 32.
4. Nicholls, J.M., et al., Sialic acid receptor detection in the Human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for Human and avian influenza viruses. *Respir Res*, 2007. 8: p. 73. 10
5. Geisler, C. and D.L. Jarvis, Effective glycoanalysis with *Maackia amurensis* lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology*, 2011. 21(8): p. 988 - 93.
6. Zheng, J., et al., Serum 3'-sulfo-Lea indication of gastric cancer metastasis. *Clin Chim Acta*, 2009. 405(1-2): p. 119 - 26. 20
7. Samraj, A.N., et al., Involvement of a Non-Human Sialic Acid in Human Cancer. *Front Oncol*, 2014. 4: p. 33.
8. Tajiri, M., C. Ohyama, and Y. Wada, Oligosaccharide profiles of the prostate specific antigen in free and complexed forms from the prostate cancer patient serum and in seminal plasma: a glycopeptide approach. *Glycobiology*, 2008. 18(1): p. 2 - 8.
9. Gut, H., S.J. King, and M.A. Walsh, Structural and functional studies of *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase B: An intramolecular trans-sialidase. *FEBS Lett*, 2008. 582(23-24): p. 3348 - 52. 30
10. Ford, M.G., et al., MD Simulations of Galactin-1 Oligosaccharide Complexes Reveal the Molecular Basis for Ligand Diversity. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 2003. 53: p. 229 - 240.
11. Martin, J.C., et al., Defining the Structural Origin of the Substrate Sequence Independence of O-GlcNAcase Using a Combination of Molecular Docking and Dynamics Simulation. *Glycobiology*, 2013. 40
12. Kadirvelraj, R., et al., Structure and Binding Analysis of *Polyporus squamosus* Lectin in Complex with the Neu5Ac 2-6Gal 1-4 GlcNAc Human-type Influenza Receptor. *Glycobiology*, 2011. 21(7): p. 973 - 984.
13. Woods, R.J. and M.B. Tessier, Computation 50

al Glycoscience: Characterizing the Spatial and Temporal Properties of Glycans and Glycan-Protein Complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2010. 20: p. 575 - 583.

14. Hadden, J. A., et al., Calculating binding free energies for protein-carbohydrate complexes. *Method. Mol. Biol.*, 2015. 1273: p. 431 - 65.

15. Gasteiger E., H.C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A., Protein Identification and Analysis Tools on the EXPASY Server, in *The Proteomics Protocols Handbook* J.M. Walker, Editor. 2005, Copyright Humana Press. p. 571 - 607.

10

16. Haseley, S.R., et al., Characterization of the carbohydrate binding specificity and kinetic parameters of lectins by using surface plasmon resonance. *Anal Biochem*, 1999. 274(2): p. 203 - 10.

17. Yamamoto, K., Y. Konami, and T. Irimura, Sialic acid-binding motif of *Maackia amurensis* lectins. *J. Biol. Chem.*, 1997. 121(4): p. 756 - 61.

20

18. Lee, L.Y., et al., An optimized approach for enrichment of glycoproteins from cell culture lysates using native multi-lectin affinity chromatography. *J Sep Sci*, 2012. 35(18): p. 2445 - 52.

19. Padler-Karavani, V., et al., Cross-comparison of Protein Recognition of Sialic Acid Diversity on Two Novel Sialoglycan Microarrays. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. 287(27): p. 22593 - 22608.

30

#### 【0145】

本明細書に記載のすべての特許、特許出願及び出版物並びに電子的に入手可能な資料（例えば、GenBank及びRefSeqにおけるヌクレオチド配列登録及び例えばSwissProt、PIR、PRF、PDBにおけるアミノ酸配列登録並びにGenBank及びRefSeqにおける注釈付きコード領域からの翻訳）の完全な開示内容が参照により組み込まれる。参照により本明細書に組み込まれる本出願の開示内容と、いずれかの文書の開示内容との間に不一致が存在する場合、本出願の開示内容が優先すべきである。上記の詳細な説明及び実施例は、単に理解を容易にするために示されている。そこから不必要な限定が理解されるべきではない。本発明は、特許請求の範囲によって定義される本発明内に包含される、当業者に明らかな変形形態に関して示され、且つ記述される厳密な詳細に限定されない。

40

#### 【0146】

標題は、すべて読者の便宜上記載され、且つ指定がない限り、標題に続く文章の意味を限定するために使用されるべきではない。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

#### (項目1)

対応する野生型 NanB ノイラミニダーゼタンパク質と比較して少なくとも1つのアミノ

50

酸変異を有する、触媒不活性 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質又はその断片を含むシアル酸認識親和性試薬であって、前記変異は、

( a ) 前記 N a n B タンパク質のノイラミニダーゼ活性を低減又は排除し、且つ

( b ) シアル酸結合親和性又は結合特異性に影響を及ぼし、

前記親和性試薬は、グリカンのシアル酸成分に結合する、シアル酸認識親和性試薬。

( 項目 2 )

前記 N a n B 断片は、前記 N a n B タンパク質の炭水化物結合性分子 ( C B M ) ドメイン及び前記 N a n B タンパク質のグリコシルヒドロリアーゼ ( G H ) ドメインの少なくとも 1 つを含む、項目 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 3 )

シアル酸に対して p a n 特異的である、項目 1 又は 2 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 4 )

2 , 3 結合で隣接サッカリドモノマーに結合された N e u 5 A c 、 2 , 6 結合で隣接サッカリドモノマーに結合された N e u 5 A c 及び 2 , 8 結合で隣接サッカリドモノマーに結合された N e u 5 A c に結合する、項目 3 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 5 )

N e u 5 A c の少なくとも 1 つのバリエーションに結合する、項目 3 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 6 )

前記変異は、配列番号 1 又は配列番号 4 において表される Y 6 5 3 、 D 2 7 0 及び E 5 4 1 からなる群から選択される部位におけるものである、項目 3 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 7 )

前記変異は、肺炎連鎖球菌 ( S . p n e u m o n i a e ) N a n B ( 配列番号 1 若しくは配列番号 4 ) 又はその断片或いは相同的 N a n B 配列での対応する位置におけるものである、項目 6 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 8 )

前記変異は、Y 6 5 3 F 、 D 2 7 0 A 、 D 2 7 0 N 、 E 5 4 1 A 及び E 5 4 1 Q からなる群から選択される、項目 6 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 9 )

前記変異は、Y 6 5 3 F である、項目 8 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 1 0 )

S i a - P S 1 、 S i a - P S 2 、 S i a - P S 3 、 S i a - P S 4 及び S i a - P S 5 からなる群から選択される、項目 8 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 1 1 )

S i a - P S 1 である、項目 1 0 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 1 2 )

対応する野生型 N a n B ノイラミニダーゼタンパク質と比較して複数のアミノ酸変異を有する、項目 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 1 3 )

前記複数の変異は、

( a ) 前記 N a n B タンパク質の触媒活性を低減又は排除する少なくとも 1 つの第 1 変異、及び

( b ) 結合親和性又は結合特異性に影響を及ぼす少なくとも 1 つの第 2 変異を含む、項目 1 2 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 1 4 )

2 , 3 結合で隣接サッカリドモノマーに結合されている N e u 5 A c に対して特異的である、項目 1 2 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

( 項目 1 5 )

前記複数の変異は、配列番号 1 又は配列番号 4 において表される R 1 9 3 、 D 2 7 0 、 A

10

20

30

40

50

5 3 8、E 5 4 1、P 6 6 0、S 6 7 3、D 3 2 7 及び N 6 8 3 からなる群から選択される部位におけるものである、項目 1 2 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

(項目 1 6)

前記複数の変異は、肺炎連鎖球菌 (S . p n e u m o n i a e ) N a n B (配列番号 1 若しくは配列番号 4 ) 又はその断片或いは相同的 N a n B 配列での対応する位置におけるものである、項目 1 5 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

(項目 1 7)

前記複数の変異は、R 1 9 3 A、D 2 7 0 Q、D 2 7 0 G、D 2 7 0 H、D 2 7 0 I、A 5 3 8 V、A 5 3 8 W、A 5 3 8 F、A 5 3 8 H、A 5 3 8 M、A 5 3 8 I、E 5 4 1 D、E 5 4 1 A、E 5 4 1 I、E 5 4 1 S、P 6 6 0 Q、S 6 7 3 A、S 6 7 3 Q、D 3 2 7 E、D 3 2 7 V 及び N 6 8 3 S からなる群から選択される、項目 1 5 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

10

(項目 1 8)

前記複数の変異は、R 1 9 3 A、D 2 7 0 Q、A 5 3 8 V 及び E 5 4 1 D を含む、項目 1 7 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

(項目 1 9)

S i a - 3 S 1、S i a - 3 S 2、S i a - 3 S 3、S i a - 3 S 5、S i a - 3 S 6、S i a - 3 S 7、S i a - 3 S 7<sup>\*</sup>、S i a - 3 S 8 及び S i a - 3 S 9 からなる群から選択される、項目 1 7 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

(項目 2 0)

S i a - P S 1 である、項目 1 9 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

20

(項目 2 1)

前記グリカンは、グリコシル化生体分子の構成成分である、項目 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

(項目 2 2)

前記グリコシル化生体分子は、糖タンパク質、グリコペプチド、糖脂質、グリコリポタンパク質又はグリコリポペプチドを含む、項目 2 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬。

(項目 2 3)

第 2 成分に共有結合されている、項目 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬を含む第 1 成分を含むコンジュゲート。

30

(項目 2 4)

前記第 2 成分は、タンパク質性成分である、項目 2 3 に記載のコンジュゲート。

(項目 2 5)

前記第 2 成分は、非タンパク質性成分である、項目 2 3 に記載のコンジュゲート。

(項目 2 6)

前記第 2 成分は、治療薬又は診断薬である、項目 2 3 に記載のコンジュゲート。

(項目 2 7)

項目 1 に記載のシアル酸認識親和性試薬を含む融合タンパク質。

(項目 2 8)

項目 1、2 3 又は 2 7 のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質を含む親和性マトリックス。

40

(項目 2 9)

固体担体、表面、カラム、樹脂、ビーズ、マイクロアレイ、粒子及びナノ粒子からなる群から選択される、項目 2 8 に記載の親和性マトリックス。

(項目 3 0)

項目 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート、融合タンパク質又は親和性マトリックスと、使用説明書とを含むキット。

(項目 3 1)

項目 1、2 3 又は 2 7 のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド。

50

(項目 3 2)

項目 3 1 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

(項目 3 3)

発現ベクターである、項目 3 2 に記載のベクター。

(項目 3 4)

項目 3 2 又は 3 3 に記載のベクターを含む宿主細胞。

(項目 3 5)

細菌細胞である、項目 3 4 に記載の宿主細胞。

(項目 3 6)

項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬若しくはコンジュゲート又は項目 2 7 に記載の融合タンパク質を製造する方法であって、宿主細胞において前記親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質を発現することを含む方法。

10

(項目 3 7)

グリカンのシアル酸成分を検出する方法であって、生体試料又は実験試料を、項目 1、2 3 又は 2 7 のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質と、シアル酸への前記親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の結合を可能にする条件下で接触させる工程と、前記シアル酸を検出する工程とを含む方法。

(項目 3 8)

前記生体試料又は実験試料は、組換え抗体を含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記グリカンは、バイオマーカーである、項目 3 7 に記載の方法。

20

(項目 4 0)

前記バイオマーカーは、癌バイオマーカーである、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

シアル酸含有グリカンをエンリッチ、単離又は精製する方法であって、項目 1、2 3 又は 2 7 のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質を、シアル酸への前記親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の結合を可能にする条件下で接触させて、エンリッチ、単離又は精製されたシアル酸含有グリカンをもたらすことを含む方法。

(項目 4 2)

項目 1、2 3 又は 2 7 のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質を含む診断用又は治療用組成物。

30

(項目 4 3)

前記シアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質は、検出可能に標識化される、項目 4 2 に記載の診断用又は治療用組成物。

(項目 4 4)

検出可能な標識は、放射性標識、蛍光標識、リン光性標識、比色定量標識、酵素的標識、免疫学的標識、磁気標識、常磁性標識、反磁性標識又は電磁標識を含む、項目 4 3 に記載の診断用又は治療用組成物。

(項目 4 5)

治療薬としての、項目 1、2 3 又は 2 7 のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の使用。

40

(項目 4 6)

診断薬としての、項目 1、2 3 又は 2 7 のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の使用。

(項目 4 7)

標的化薬物送達のための、項目 1、2 3 又は 2 7 のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の使用。

(項目 4 8)

生体試料又は実験試料中のシアル酸の存在又は量を検出するための、項目 1、2 3 又は 2

50

7のいずれか一項に記載のシアル酸認識親和性試薬、コンジュゲート又は融合タンパク質の使用。

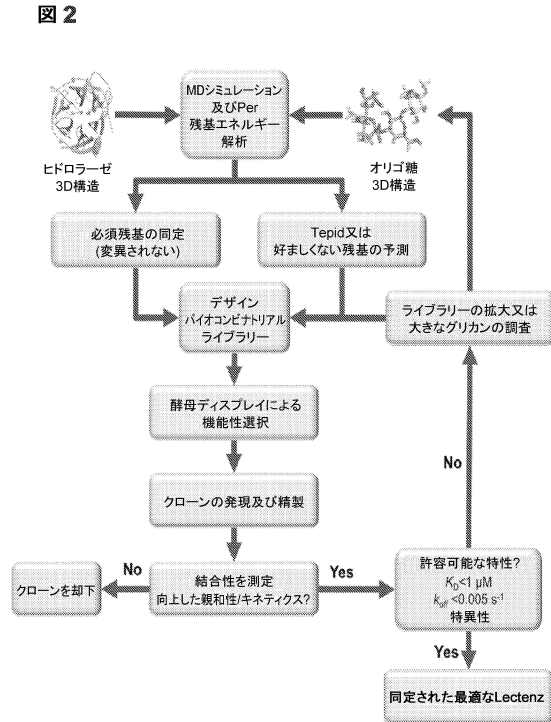
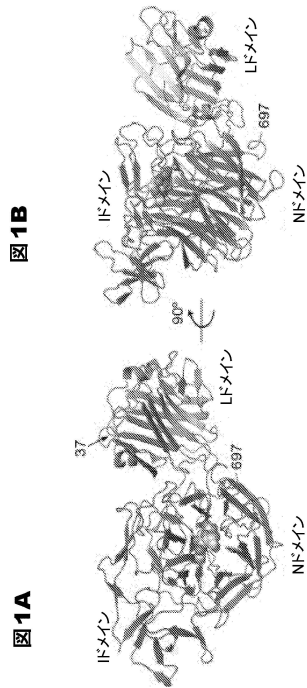
(項目49)

本明細書に記載される特徴の1つ又は複数を含む化合物、組成物又は方法。

【図面】

【図1A - B】

【図2】



10

20

30

40

50



【 図 4 】

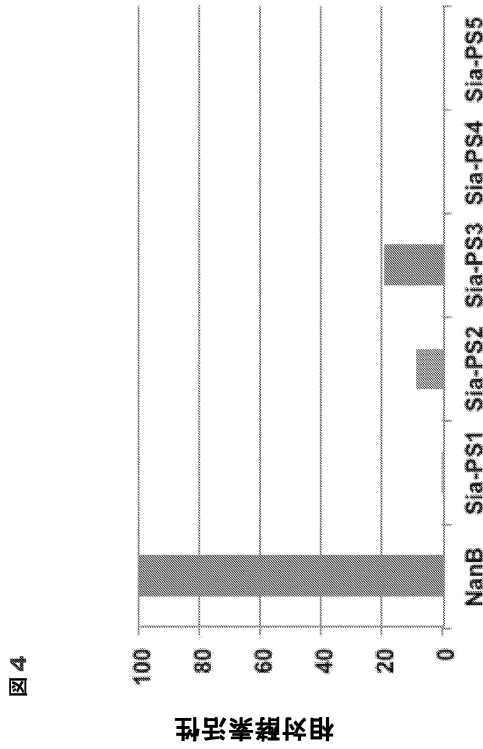


図 4

【 図 5 】

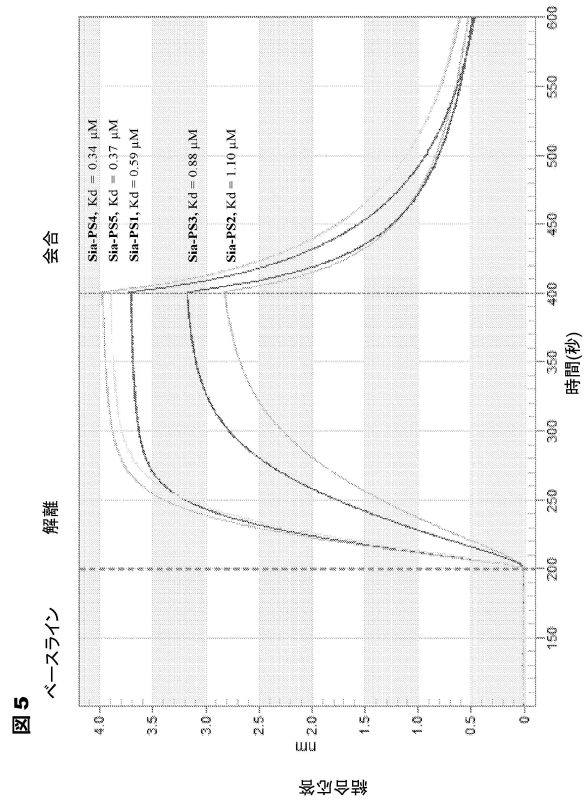
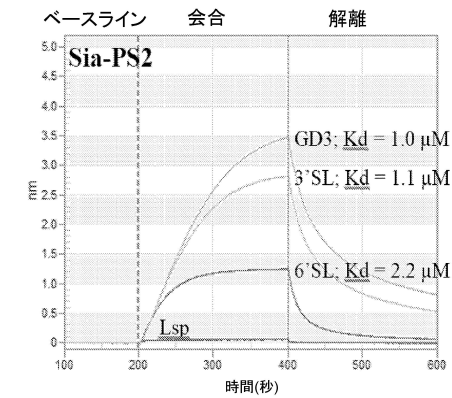
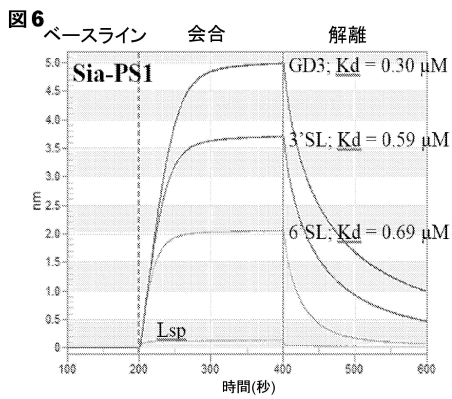
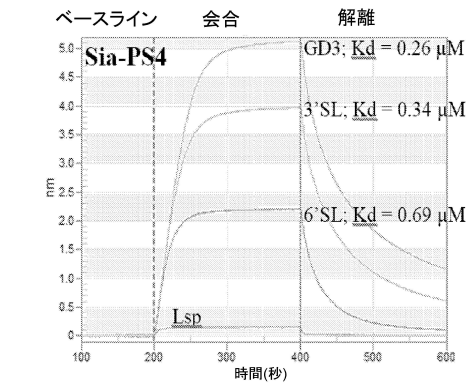
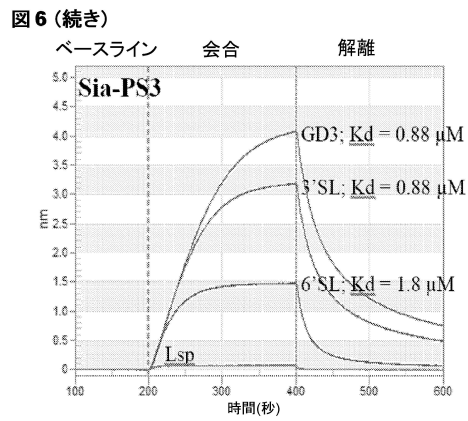


図 5

【 図 6 - 1 】



【 図 6 - 2 】



10

20

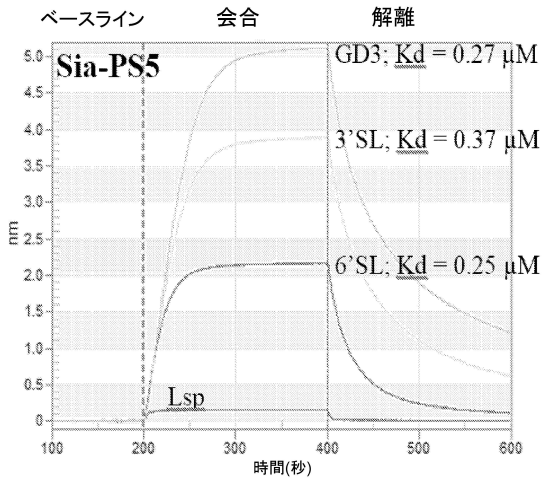
30

40

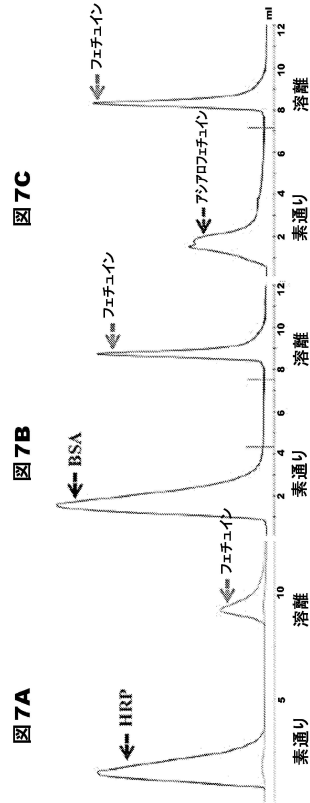
50

【 図 6 - 3 】

図 6 (続き)



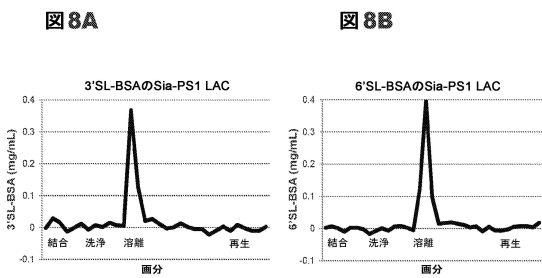
【 図 7 A - C 】



10

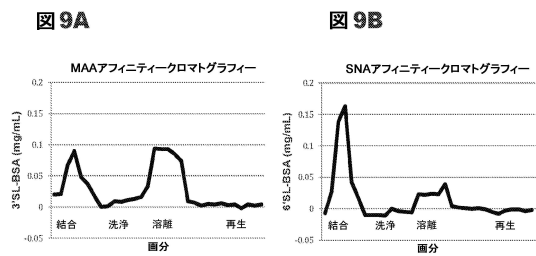
20

【 図 8 A - B 】



30

【 図 9 A - B 】

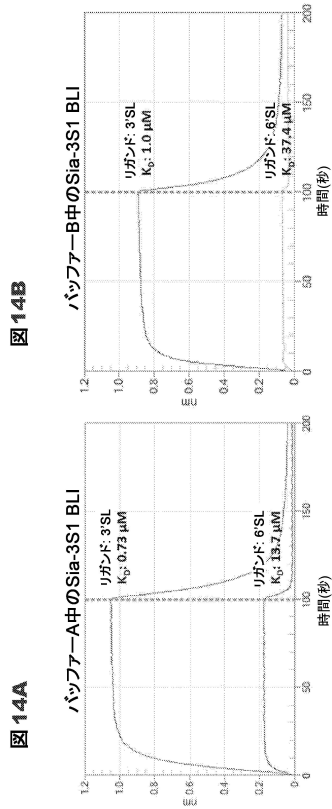


40

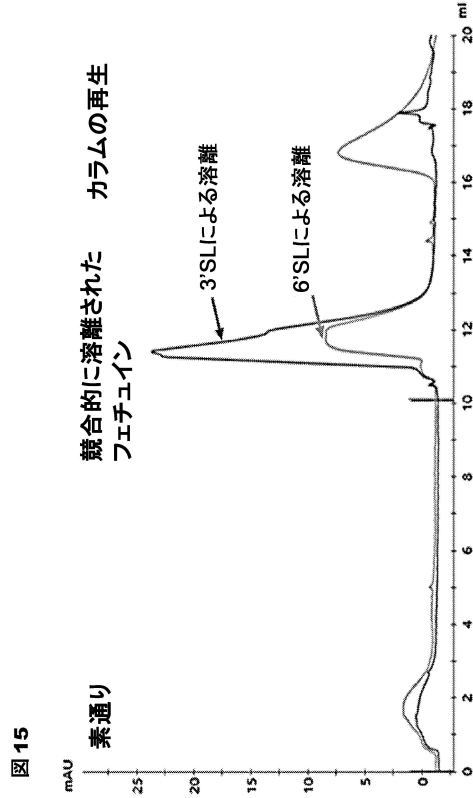
50



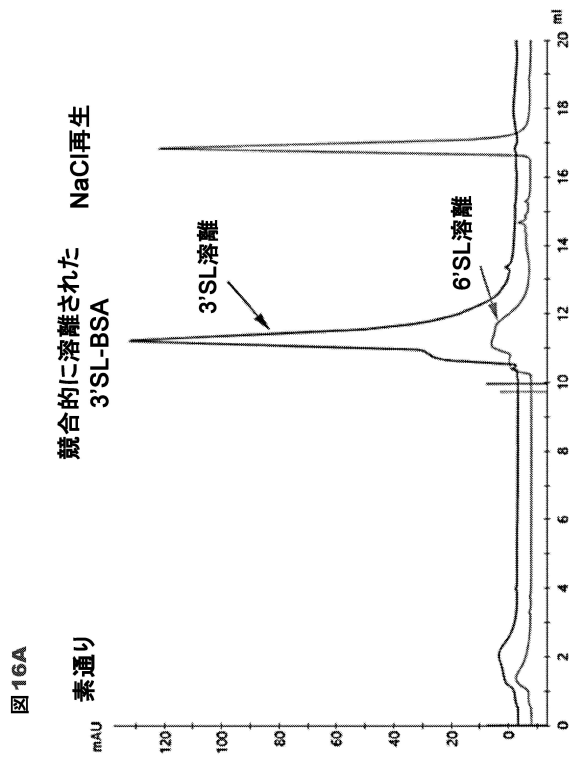
【 図 1 4 A - B 】



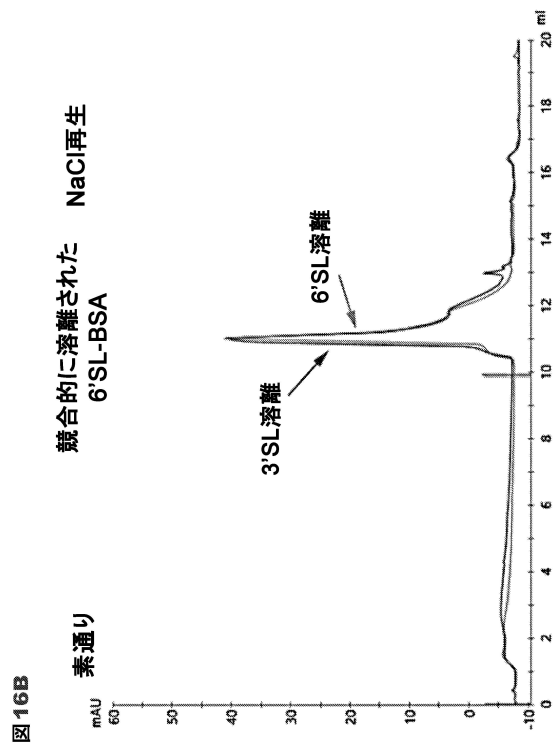
【 図 1 5 】



【 図 1 6 A 】



【 図 1 6 B 】



10

20

30

40

50

【 図 1 7 】

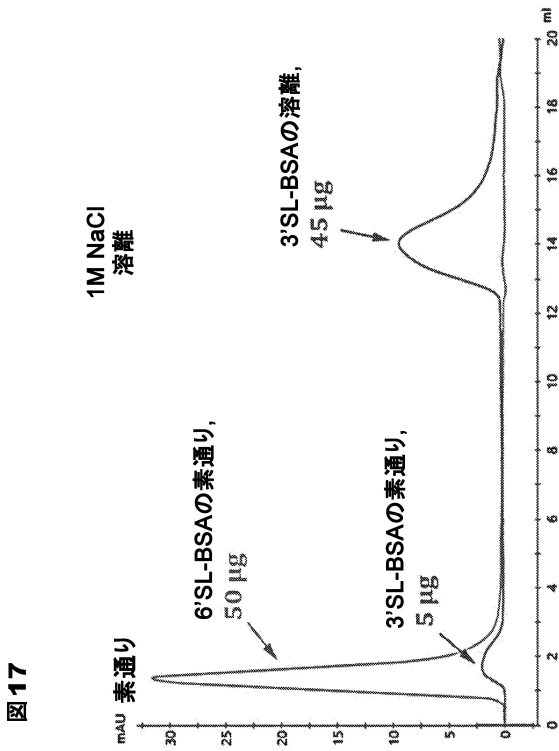


図 17

【 図 1 8 】

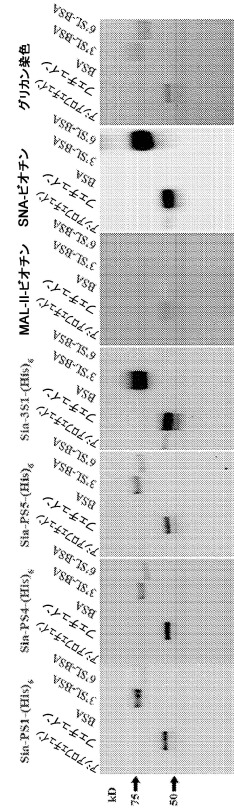


図 18

【 配 列 表 】

0007270141000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 Q	1/34	(2006.01)	C 1 2 Q	1/34	
C 1 2 P	19/04	(2006.01)	C 1 2 P	19/04	Z
A 6 1 K	49/14	(2006.01)	A 6 1 K	49/14	
A 6 1 K	51/08	(2006.01)	A 6 1 K	51/08	2 0 0
A 6 1 K	47/62	(2017.01)	A 6 1 K	47/62	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ヤン, ロレッタ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 2, サンディエゴ, ノーベル ドライブ 3 9 3 7 ユニット 1 3 0

(72)発明者 サムリ, カウサー エヌ.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 3 4, カーランド, 9 5 ティーエイチ アベニュー エヌイー 1 4 0 2 3

(72)発明者 ウッズ, ロバート ジェイ.

アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 6 0 6, アセンズ, グレーストーン テラス 2 5 0

(72)発明者 ウー, シェンチェン

アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 6 0 5 - 4 9 4 8, アセンズ, ボタンウッド ループ 1 1 2

(72)発明者 クーパー, ジョン シー.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 1 2 0 1, ブルックリン, マートル アベニュー 1 5 0, アパートメント 2 7 0 1

(72)発明者 ポール, マロリー ケー.

アメリカ合衆国 ワシントン ディーシー 2 0 0 0 2, ステープルズ ストリート エヌイー 1 4 2 5 アpartment 3

(72)発明者 サンダース, マシュー ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 7, サンディエゴ, ブライトン アベニュー 5 0 7 5

(72)発明者 エルター, ジアド エム.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 3, サマービル, ポーター ストリート 7 7, アpartment 1 5

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 特開 2 0 1 6 - 0 0 0 0 4 4 ( J P , A )

米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 0 5 0 6 9 ( U S , A 1 )

国際公開第 2 0 1 5 / 1 6 1 2 0 1 ( W O , A 1 )

Glycoconjugate Journal (2009) Vol.26, pp.827-828, Abstract Number 78

FEBS Letters (2008) Vol.582, pp.3348-3352

J. Mol. Biol. (2008) Vol.384, pp.436-449

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C12N 9/00  
C07K 1/00 - 19/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
UniProt/GeneSeq