

(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2013-512683

(P2013-512683A)

(43) 公表日 平成25年4月18日(2013.4.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 B 0 6 4
C O 7 K 14/47 (2006.01)	G O 1 N 33/53 J	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-542505 (P2012-542505)	(71) 出願人 512029319 ピエリス アーゲー P I E R I S A G ドイツ 8 5 3 5 4 フライジング リー ゼーマイトナーシュトラッセ 3 0
(86) (22) 出願日 平成22年12月7日 (2010.12.7)	(74) 代理人 100121728 弁理士 井関 勝守
(85) 翻訳文提出日 平成24年8月7日 (2012.8.7)	(74) 代理人 100129997 弁理士 田中 米藏
(86) 国際出願番号 PCT/EP2010/069028	(72) 発明者 スケラ アルネ ドイツ 8 5 3 5 4 フライジング マッ クスレーナーシュトラッセ 1 9
(87) 国際公開番号 W02011/069992	(72) 発明者 ゲバウエル ミヒャエルラ ドイツ 0 4 1 7 8 ライツツイヒ リュ ツシェナアーシュトラッセ 3 8 最終頁に続く
(87) 国際公開日 平成23年6月16日 (2011.6.16)	
(31) 優先権主張番号 61/267,098	
(32) 優先日 平成21年12月7日 (2009.12.7)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	

(54) 【発明の名称】 所定の標的に対して親和性を有するヒトリポカリン2 (Lcn2、hNGAL) の突然変異タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、突然変異タンパク質生成のための新規ライブラリ、及びヒトリポカリン (Lcn2、hNGAL) に由来して且つ検出可能な親和性を有する所定の非天然標的に結合する突然変異タンパク質に関する。本発明はまた、そのような突然変異タンパク質をエンコードする対応の核酸分子及びその生成方法に関する。本発明はさらに、そのような突然変異タンパク質を製造する方法に関する。例えば、そのような突然変異タンパク質は、アルツハイマー病におけるアミロイドベータペプチドのような天然生体分子の病原学的な形に結合して枯渇するように機能してもよいし、又は、腫瘍新生血管と関連するフィブロネクチンエクストラドメインBを標的としてもよい。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検出可能な親和性を有する所定の非天然標的に結合することができ、ヒトリボカリン 2 (Lcn2、hNGAL) に由来する突然変異タンパク質の生成方法であって、

ヒトLcn2タンパク質をコードする核酸分子を、ヒトLcn2の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置96、100、及び106に対応する配列位置のうちのいずれかの少なくとも1つをコードするヌクレオチドトリプレットで突然変異誘発させて、1つ又はそれ以上の突然変異タンパク質核酸分子を生じるステップ(a)を備えている方法。

【請求項 2】

請求項1の方法において、

ステップ(a)で得られた1つ以上の突然変異タンパク質核酸分子を適切な発現系で発現させるステップ(b)と、

所定の標的に対して検出可能な結合親和性を有する1つ又はそれ以上の突然変異タンパク質を、選択及び/又は単離によって濃縮するステップ(c)とをさらに備えている方法。

【請求項 3】

請求項1又は2の方法において、

前記核酸分子を、前記Lcn2の配列位置96、100、及び106のいずれかをコードするヌクレオチドトリプレットの少なくとも1つ、2つ又は3つ全てで突然変異誘発させることをさらに備えている方法。

【請求項 4】

請求項1～3のいずれか1項の方法において、

前記核酸分子を、hLcn2の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、103、125、127、132及び134のいずれかをコードする少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16又は17全てのヌクレオチドトリプレットで突然変異誘発させることをさらに備えている方法。

【請求項 5】

請求項1～4のいずれか1項の方法において、

ヌクレオチドトリプレットのサブセットによって置換を可能にすることのみによって、hLcn2の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132及び134のいずれかをコードする少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20のヌクレオチドトリプレットでランダム突然変異誘発させることをさらに備えている方法。

【請求項 6】

請求項1～5のいずれか1項の方法において、

システインをコードするヌクレオチドトリプレットは、突然変異誘発時の置換に用いられない方法。

【請求項 7】

請求項1～6のいずれか1項の方法により得られるLcn2タンパク質由来の突然変異タンパク質であって、

Lcn2の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置96、100、及び106に対応する配列位置のうちのいずれかにおける少なくとも1つの突然変異したアミノ酸残基を備え、検出可能な親和性を有する所定の非天然標的に結合することができる突然変異タンパク質。

【請求項 8】

請求項7の突然変異タンパク質において、

Lcn2の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置96、100、及び106に2つ又は3つの突然変異したアミノ酸残基を備えている突然変異タンパク質。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

請求項 7 又は 8 の突然変異タンパク質において、

h L c n 2 の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置 3 6、4 0、4 1、4 9、5 2、6 8、7 0、7 2、7 3、7 7、7 9、8 1、1 0 3、1 2 5、1 2 7、1 3 2 及び 1 3 4 に対応する配列位置のいずれかで少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6 又は 1 7 の突然変異したアミノ酸残基をさらに備えている突然変異タンパク質。

【請求項 1 0】

請求項 8 又は 9 の突然変異タンパク質において、

L c n 2 の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置 3 6、4 0、4 1、4 9、5 2、6 8、7 0、7 2、7 3、7 7、7 9、8 1、9 6、1 0 0、1 0 3、1 0 6、1 2 5、1 2 7、1 3 2 及び 1 3 4 のいずれかで少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6 又は 1 7 の突然変異したアミノ酸残基をさらに備えている突然変異タンパク質。

10

【請求項 1 1】

請求項 1 0 の突然変異タンパク質において、

L c n 2 の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置 3 6、4 0、4 1、4 9、5 2、6 8、7 0、7 2、7 3、7 7、7 9、8 1、9 6、1 0 0、1 0 3、1 0 6、1 2 5、1 2 7、1 3 2 及び 1 3 4 のいずれかで 1 8、1 9 又は 2 0 の突然変異したアミノ酸残基をさらに備えている突然変異タンパク質。

【請求項 1 2】

20

請求項 7 ~ 1 1 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質において、

前記非天然標的は、ペプチド、タンパク質、タンパク質のフラグメント又はドメイン、及び有機小分子からなる群から選択される突然変異タンパク質。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 の突然変異タンパク質において、

前記有機小分子は、免疫学的ハプテンの特性を示す化合物である突然変異タンパク質。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 の突然変異タンパク質において、

前記ペプチドは、2 ~ 4 5 アミノ酸の長さを有する突然変異タンパク質。

【請求項 1 5】

30

請求項 1 4 の突然変異タンパク質において、

前記ペプチドは、アミロイドベータペプチドである突然変異タンパク質。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 の突然変異タンパク質において、

前記アミロイドベータペプチドは、A 4 0 ペプチド又は A 4 2 ペプチドである突然変異タンパク質。

【請求項 1 7】

請求項 1 5 又は 1 6 の突然変異タンパク質において、

成熟 h L c n 2 の野生型アミノ酸配列について、L e u 3 6 V a l 又は C y s、A l a 4 0 T y r 又は L y s 又は V a l、I l e 4 1 T h r 又は S e r 又は L e u、G l n 4 9 L e u 又は T r p、L e u 7 0 G l y、A r g 7 2 G l y 又は A s p、L y s 7 3 L e u 又は T h r 又は A s p、A s p 7 7 A s n 又は H i s 又は L e u、T r p 7 9 L y s、A s n 9 6 I l e 又は A r g、T y r 1 0 0 G l n 又は A r g 又は G l u、L e u 1 0 3 M e t 又は A r g 又は G l y、T y r 1 0 6 T y r 又は A l a 又は T r p、L y s 1 2 5 T h r 又は V a l 又は G l u、S e r 1 2 7 G l y 又は G l n 又は A l a、T y r 1 3 2 M e t 又は S e r 又は T h r、及び L y s 1 3 4 A s n からなる群から選択される、少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、又は 1 2 のアミノ酸置換を含む突然変異タンパク質。

40

【請求項 1 8】

請求項 1 7 の突然変異タンパク質において、

50

配列番号 39 (S1 - A4) 又は配列番号 41 (US7) 又は配列番号 43 (H1 - G1) の配列を有する突然変異タンパク質。

【請求項 19】

請求項 12 の突然変異タンパク質において、
前記タンパク質は、フィブロネクチン又はそのドメインである突然変異タンパク質。

【請求項 20】

請求項 19 の突然変異タンパク質において、
前記フィブロネクチンドメインは、エキストラドメイン B 又はそのフラグメントである突然変異タンパク質。

【請求項 21】

請求項 19 又は 20 の突然変異タンパク質において、
成熟 hLcn2 の野生型アミノ酸配列について、Leu36 Lys 又は Glu 又は Arg 又は Ala、Ala40 His 又は Met 又は Thr 又は Ser、Ile41 Asp 又は Arg 又は Trp 又は Leu、Gln49 Arg 又は Ala 又は Tyr、Leu70 Leu 又は Arg 又は Met、Arg72 Val 又は Arg 又は Gln 又は Met、Lys73 His 又は Arg 又は Ser、Asp77 Asn 又は His 又は Lys 又は Arg、Trp79 Arg 又は Met 又は Leu、Asn96 Lys 又は Ala 又は Ser、Tyr100 Trp 又は Pro 又は Lys、Leu103 His 又は Pro、Tyr106 Phe 又は Trp 又は Thr、Lys125 Arg 又は His 又は Thr、Ser127 Thr 又は Phe 又は Ala、Tyr132 Leu 又は Phe、Lys134 Glu 又は His 又は Gly 又は Phe、及び Ser146 Asn からなる群から選択される、少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は 12 のアミノ酸置換を含む突然変異タンパク質。

10

20

【請求項 22】

請求項 21 の突然変異タンパク質において、
配列番号 20 (N7A) 又は配列番号 22 (N7E) 又は配列番号 24 (N9B) 又は配列番号 26 (N10D) の配列を有する突然変異タンパク質。

【請求項 23】

請求項 7 ~ 22 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質において、
成熟 hLcn2 の野生型アミノ酸配列について、Glu28 His、及び Cys87 Ser からなる群から選択されるアミノ酸置換をさらに含む突然変異タンパク質。

30

【請求項 24】

請求項 7 ~ 23 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質において、
Lcn2 の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置 137 及び 145 に対応する配列位置のいずれかで突然変異したアミノ酸残基を備えていない突然変異タンパク質。

【請求項 25】

請求項 7 ~ 24 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質において、
成熟 hLcn2 の野生型アミノ酸配列について、Tyr52 Gln 又は Val、Ser68 Lys 又は Asn、及び Arg81 Trp 又は Asn 又は His からなる群から選択されるアミノ酸置換を含む突然変異タンパク質。

40

【請求項 26】

請求項 7 ~ 25 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質において、
有機分子、酵素標識、放射性標識、呈色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、細胞増殖抑制剤、毒素、金属錯体、金属及びコロイド金からなる群から選択される化合物に接合された突然変異タンパク質。

【請求項 27】

請求項 7 ~ 26 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質において、
融合パートナーであるタンパク質、タンパク質ドメイン、又はペプチドに、その N 末端及び / 又はその C 末端で融合された突然変異タンパク質。

【請求項 28】

50

請求項 7 ~ 26 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質において、
血清半減期を延長する化合物に接合された突然変異タンパク質。

【請求項 29】

請求項 28 の突然変異タンパク質において、

前記化合物は、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルデンブロン、免疫グロブリンの Fc 部分、免疫グロブリンの CH3 ドメイン、免疫グロブリンの CH4 ドメイン、アルブミン結合ペプチド、又はアルブミン結合タンパク質からなる群から選択される血清半減期を延長する突然変異タンパク質。

【請求項 30】

請求項 29 の突然変異タンパク質において、

前記ポリアルキレングリコールは、ポリエチレン (PEG) 又はその活性誘導体である突然変異タンパク質。

【請求項 31】

請求項 27 の突然変異タンパク質において、

前記融合パートナーは、前記突然変異タンパク質の血清半減期を延長するタンパク質ドメインである突然変異タンパク質。

【請求項 32】

請求項 31 の突然変異タンパク質において、

前記タンパク質ドメインは、免疫グロブリンの Fc 部分、免疫グロブリンの CH3 ドメイン、免疫グロブリンの CH4 ドメイン、アルブミン結合ペプチド、又はアルブミン結合タンパク質である突然変異タンパク質。

【請求項 33】

請求項 29 又は 32 の突然変異タンパク質において、

前記アルブミン結合タンパク質は、細菌性アルブミンドメイン又はリボカリン突然変異タンパク質である突然変異タンパク質。

【請求項 34】

請求項 33 の突然変異タンパク質において、

前記細菌性アルブミン結合ドメインは、連鎖球菌性タンパク質 G のアルブミン結合ドメインである突然変異タンパク質。

【請求項 35】

請求項 29 又は 32 の突然変異タンパク質において、

前記アルブミン結合ペプチドは、Cys - Xaa1 - Xaa2 - Xaa3 - Xaa4 - Cys の式を有し、Xaa1 は Asp、Asn、Ser、Thr 又は Trp であり、Xaa2 は Asn、Gln、His、Ile、Leu 又は Lys であり、Xaa3 は Ala、Asp、Phe、Trp 又は Tyr であり、Xaa4 は Asp、Gly、Leu、Phe、Ser 又は Thr である突然変異タンパク質。

【請求項 36】

請求項 1 ~ 35 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質において、

1 μ M 若しくはそれ以下、100 μ M 若しくはそれ以下、1 μ M 若しくはそれ以下、500 nM 若しくはそれ以下、200 nM 若しくはそれ以下、100 nM 若しくはそれ以下、50 nM 若しくはそれ以下、10 nM 若しくはそれ以下、又は 1 nM 若しくはそれ以下の K_D 値で非天然標的に結合する突然変異タンパク質。

【請求項 37】

請求項 7 ~ 36 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質をコードするヌクレオチド配列を備えている核酸分子。

【請求項 38】

請求項 37 の核酸分子において、

前記核酸分子の発現を可能にする制御配列に動作可能に結合された核酸分子。

【請求項 39】

請求項 37 又は 38 の核酸分子において、

10

20

30

40

50

ベクターの中に含まれている核酸分子。

【請求項 40】

請求項 37 又は 38 の核酸分子において、
ファージミドベクターの中に含まれている核酸分子。

【請求項 41】

請求項 37 ~ 40 のいずれか 1 項の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 42】

請求項 7 ~ 36 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質の産生方法であって、
前記突然変異タンパク質、前記突然変異タンパク質のフラグメント、又は前記突然変異
タンパク質と他のポリペプチドとの融合タンパク質は、遺伝子工学的方法によって、前記
突然変異タンパク質をコードする核酸から産生される方法。 10

【請求項 43】

請求項 42 の方法において、
前記突然変異タンパク質は、細菌性又は真核の宿主生物で産生され、この宿主生物又は
その培養物から分離される方法。

【請求項 44】

請求項 7 ~ 36 のいずれか 1 項の少なくとも 1 つの突然変異タンパク質を含む医薬組成
物。

【請求項 45】

所定の標的を結合して検出するための請求項 7 ~ 36 のいずれか 1 項の突然変異タンパ
ク質の使用であって、 20

前記標的を含むと予想される試験サンプルに前記突然変異タンパク質を接合するステップ
(a) と、

適切なシグナルによって前記突然変異タンパク質 / 標的複合体を検出するステップ (b
) とを備えている突然変異タンパク質の使用。

【請求項 46】

事前選択された部位を化合物が標的とするための請求項 7 ~ 36 のいずれか 1 項の突然
変異タンパク質の使用であって、

前記化合物に前記突然変異タンパク質を接合するステップ (a) と、

前記事前選択された部位に前記突然変異タンパク質 / 化合物複合体を送達するステップ
(b) とを備えている突然変異タンパク質の使用。 30

【請求項 47】

所定の標的との複合体形成のための請求項 7 ~ 36 のいずれか 1 項の突然変異タンパ
ク質の使用。

【請求項 48】

医薬組成物の製造のための請求項 7 ~ 36 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質の使用
。

【請求項 49】

請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質の使用であって、
前記医薬組成物は、神経変性疾患の治療に用いられる突然変異タンパク質の使用。 40

【請求項 50】

請求項 47 の使用において、
前記神経変性疾患は、アルツハイマー病である使用。

【請求項 51】

請求項 19 ~ 22 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質の使用であって、
前記医薬組成物は、癌の治療、線維症の治療、神経変性疾患を含む疾患の治療、又は炎
症の治療に用いられる突然変異タンパク質の使用。

【請求項 52】

請求項 7 ~ 36 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質を含む診断又は分析キット。

【請求項 53】

請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質の有効量を哺乳類に投与することを含む哺乳類の神経変性疾患の治療方法。

【請求項 54】

請求項 17 ~ 20 のいずれか 1 項の突然変異タンパク質の有効量を哺乳類に投与することを含む哺乳類の癌、線維症及び炎症からなる群から選択される疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、突然変異タンパク質を生成するための新規ライブラリに関し、さらにヒトリポカリン 2 (Lcn2、hNGAL) 及び検出可能な親和性で所定の標的に結合する関連タンパク質に由来する新規突然変異タンパク質に関する。また、本発明は、そのような突然変異タンパク質のコードに対応する核酸分子に関し、さらにそれらを生成する方法に関する。本発明は、さらにそのような突然変異タンパク質を製造する方法に関する。さらに、本発明は、リポカリン突然変異タンパク質を含む医薬組成物に関するとともに、その突然変異タンパク質の様々な使用に関する。

10

【0002】

本発明による Lcn2 突然変異タンパク質は、それぞれの疾患領域において治療及び/又は診断試薬としての可能性を示す。例えば、それらは、アルツハイマー病におけるアミロイドベータペプチドのような天然生体分子の病理学的な形に結合して枯渇するのに役立つ可能性がある。他の例において、それらは、腫瘍新生血管と関連するフィブロネクチンのエキストラドメイン B のような疾患関連細胞表面マーカーを様々なラベル又は毒素の特異的な標的にすることに用いられる。本発明によって得られる Lcn2 突然変異タンパク質の特有な利点に従って、様々な他の応用又は例が可能である。

20

【背景技術】

【0003】

アルツハイマー病 (AD) は、高齢者人口における認知症の中で最もよくある疾患である。AD に関連付けると、アミロイド前駆体タンパクの不完全な処理によって、40 - 42 残基が含まれるアミロイドベータペプチド (A β) の潜在的な神経毒を生じさせる。その後、A β のオリゴマー及び長い原線維への凝集は、老人斑の形成に至る疾患の経過に極めて重要な影響を与える (非特許文献 1)。AD がますます重要となるにもかかわらず、認知症の効果的な治療、予防、治癒、又は軽減に対する要求は依然として満たされていない。

30

【0004】

現在の抗アミロイドのアプローチは、(i) A β の形成を予防することと、(ii) A β の凝集を遮断することと、(iii) 脳における可溶性 A β レベルを減少させることと、(iv) 既存のアミロイド斑を分解させることとを目的とする。これまで、AD 患者の能動免疫付与及び受動免疫付与を含む免疫療法は、この分野で最も有望になっている (非特許文献 2、非特許文献 3、非特許文献 4)。しかし、AD 患者の能動免疫付与による最近の臨床試験は、6% の患者に髄膜脳炎を発症するために中止された。これらの Fc- 介在の免疫学的機能による潜在的副作用のために、アンチカリン (Anticalins) のような非免疫グロブリン (non-Ig) 結合試薬は、別の代替薬として提供されている。アミロイドベータに対して特異性を有するアフィボディ (Affibody) 分子の同定は、遺伝子工学的 non-Ig 結合タンパク質の将来性を説明するための一例である (非特許文献 5、非特許文献 6)。

40

【0005】

しかし、アフィボディの細菌起源は、ヒト患者における免疫原性の問題を引き起こす可能性がある。

【0006】

フィブロネクチン (FN) は、細胞の接着、移動、増殖、及び分化に極めて重要な役割を果たす。FN は、I 型、II 型、及び III 型の多重ドメインを有する、大規模なモジ

50

ユラー二量体の糖タンパク質である。FNの代替スプライスバリエーション、例えばFNin7とFNin8ドメインの間に組み込まれるFNのエキストラドメインB(ED-B)は、組織特異的に且つ発達段階依存的に表現される(非特許文献7)。

【0007】

ED-Bは、創傷治癒及び腫瘍性血管新生の期間を除いて、正常成人組織に存在していない。従って、ED-Bを含有するフィブロネクチンは、新血管形成を誘導し、且つ、異常血管形成を受ける多くの異なる腫瘍型において多量に発現される。血管形成におけるED-Bの実際的な生物学的機能は依然として分かりにくい一方、そのFNへの取り込みは腫瘍形成のための優れるマーカーとして機能する。一般的に、悪性組織と健全組織との差別は、薬物を腫瘍組織に直接運ぶ選択的な標的として、局所薬物濃度の増加につながる有利な治療方針である。

10

【0008】

特異的に検出してED-Bを標的にするために、ファージディスプレイ抗体テクノロジーを用いて、組み換え抗体を増加させる。単離抗体フラグメントの一つとして、L19一本鎖Fvがある(非特許文献8、非特許文献9)。効果的な細胞毒性薬と組み合わせてL19でED-Bをアドレスすることは、現在、癌の治療及び診断への見込みを示している(非特許文献10、非特許文献11)。

【0009】

しかし、L19のscFvフラグメントは、オリゴマー化される傾向がある。

【先行技術文献】

20

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Haass and Selkoe (2007) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 8, 101-112

【非特許文献2】Dodel et al. (2003) Lancet Neurology 2, 215-220

【非特許文献3】Lichtlen and Mohajeri (2007) J. Neurochem. 104, 859-874

【非特許文献4】Brody and Holtzman (2008) Annu. Rev. Neurosci. 31, 175-193

30

【非特許文献5】Gronwall et al (2007) J. Biotechnol. 128, 162-183

【非特許文献6】Hoyer et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 5099-5104

【非特許文献7】Zardi et al. (1987) EMBO J 6, 2337-2342

【非特許文献8】Carnemolla et al. (1996) Int. J. Cancer 68, 397-405

【非特許文献9】Ebbinghaus et al. (2004) Curr. Pharm. Des. 10, 1537-1549

40

【非特許文献10】Schliemann and Neri (2007) Biochim. Biophys. Acta 1776, 175-192

【非特許文献11】Kaspar et al. (2006) Int. J. Cancer 118, 1331-1339

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

上記のようにアルツハイマー病の治療、及び腫瘍の診断又は治療に存在する問題により、本発明の目的は、アルツハイマー病の治療、及び腫瘍の診断又は治療に用いられる代替方法及び化合物を提供することにある。

50

【0012】

本発明者らは、リポカリン2に由来するタンパク質による特異的な突然変異タンパク質は、そのより高い安定性及びより小さいサイズにより魅力的な化合物になることを発見した。本発明者らは、例えば、ED-Bに対する高い親和性及び特異性を示す特異的な位置に突然変異性があるリポカリン2突然変異タンパク質の特異的なグループを同定した。そのようなLcn2突然変異タンパク質は、ヒト細胞にED-B含有フィブロネクチンを高感度で特異的に認識するので、腫瘍疾患の診断及び治療のための治療試薬とする見込みを示す。

【0013】

本発明者らは、また、Aペプチドに対して高い親和性及び特異性を有する特異的なLcn2突然変異タンパク質を識別することができる。このようなLcn2突然変異タンパク質は、さらにAの凝集を抑制することができるので、更なる改善及び修飾の上で、ADを治療するための治療試薬とする可能性の見込みを示す。

10

【0014】

さらに、本発明は、またヒトLcn2骨格に基づく新たなランダムライブラリを説明する。そのランダムライブラリは、一般的に所定の標的に対して高い親和性及び特異性を有する本発明にかかる突然変異タンパク質のような突然変異タンパク質の効果的な生成を可能にする。そのようなライブラリ又はそのセクションの例は、図1及び図2に示される。

【課題を解決するための手段】

【0015】

1つの実施形態において、hLcn2の直鎖状ポリペプチド配列における任意の配列位置36、40、41、49、5268、70、7273、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132、及び134をコードする少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20のヌクレオチドトリプレットでは、ヌクレオチドトリプレットのサブセットによってこの位置における置換を可能にすることでランダム突然変異誘発を行う。ヌクレオチドトリプレットのサブセットは、(a)ヌクレオチドNNN(N=A、T、G、Cの場合、 $4 \times 4 \times 4 = 64$ の可能なトリプレットということになる)によってコードされる64の可能なトリプレット以内、(b)ヌクレオチドNNK又はNNSによってコードされる32の可能なトリプレット以内、(c)全ての20天然タンパク質を構成するアミノ酸をコードするための必需トリプレット以内を参照することができるが、これに限定されるものではない。もう1つの実施形態において、システインをコードするヌクレオチドトリプレットは、突然変異誘発時の置換に用いられない。突然変異誘発は、すでに元の突然変異しない配列に含まらなかった新たなシステインを持つ突然変異タンパク質につながるものではないことを意味する。従って、この実施形態において、この段落に特定される突然変異しようとする位置に導入すべきヌクレオチドトリプレットがどのように見えるかということは特定される(また、実施例1及び図2を参照)。

20

30

【0016】

従って、本発明の第1の態様には、ヒトリポカリン2(Lcn2、ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン、hNGAL、又はシデロカリンとしても知られている)に由来する突然変異タンパク質の生成方法を対象にする。この方法で得られる突然変異タンパク質は、検出可能な親和性を有する非天然標的に結合することができる。この方法は、ヒトリポカリン2(Lcn2、hNGAL)をコードする核酸分子を、ヒトリポカリン2の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置96、100、及び106に対応する配列位置のうちのいずれかの少なくとも1つをコードするヌクレオチドトリプレットで、突然変異誘発させることを含み、結果として1つ又はそれ以上の突然変異タンパク質核酸分子となる方法である。

40

【0017】

上述に従って、「ヒトリポカリン2」又は「ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(hNGAL)」という用語は、約60%以上のアミノ酸配列相同性又は配列同一性を有す

50

る、他の種由来の、既に同定された又はまだ単離されていない構造的ホモログを含む。好ましくは、上述のこれらのヒトリポカリンは、hNGALの直鎖状ポリペプチド配列における配列位置33、36、40、41、4243、44、46、47、48、49、50、51、5254、55、59、65、68、70、7273、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136、及び138に対応する配列位置のいずれか1つにおいて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、1213、14、15、16、又は17の突然変異したアミノ酸残基を含む。「相同性」という用語は本明細書に使用される場合、その通常の意味であり、また、互いに比較される2つのタンパク質の直鎖状アミノ酸配列における同等の位置における、同一のアミノ酸、及び同類置換と見なされるアミノ酸（例えば、グルタミン酸残基のアスパラギン酸残基による置換）を含む。「配列同一性」又は「同一性」という用語は本発明に使用される場合、問題になっている配列と本発明のポリペプチドの配列の相同性アラインメントに従った、これら2つの配列のより長いものにおける残基数について、ペアワイズ同一残基の割合を意味する。

10

【0018】

配列相同性又は配列同一性の割合は、本明細書ではプログラムBLASTP、version blastp 2.2.5 (November 16, 2002, cf. Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389 - 3402を参照)を用いて決定される。相同性の割合は、ペアワイズ比較の参照としてヒトリポカリン2を用いた、プロペプチド配列を含む全ポリペプチド配列のアラインメントに基づく(マトリックス: BLOSUM62、ギャップコスト: 11.1、切り捨て値を10~3に設定)。それは、BLASTPプログラムアウトプットでの結果として示される「陽性」(相同アミノ酸)の数を、アラインメントのためにプログラムによって選択されたアミノ酸の総数で除した割合として計算される。これに関して、この選択されたアミノ酸の総数はヒトリポカリン2の長さとは異なり得ることに注意すべきである。

20

【0019】

ヒトリポカリン2以外のタンパク質が本発明に使用される場合、ヒトリポカリン2に対して与えられた突然変異した配列位置の定義は、公開されている配列アラインメント又は当業者に利用可能なアラインメント方法を用いて、他のリポカリンに割り当てることができる。配列アラインメントは、例えば、Redl, B. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 241 - 248の図1におけるもののように、公開されているアラインメントを用いて、WO99/16873(その中の図3を参照)に説明されるように実施され得る。リポカリンの三次元構造が利用可能な場合、本発明の突然変異誘発の対象となるべきこれらの配列位置の決定のために、構造の重ね合わせもまた使用され得る。多次元核磁気共鳴分光法のような他の構造解析の方法もまた、この目的のために使用され得る。

30

【0020】

ヒトリポカリン2のホモログはまた、アミノ酸置換が本発明において選択された位置以外の位置に導入されたヒトリポカリン2自体の突然変異タンパク質であり得る。例えば、このような突然変異タンパク質は、タンパク質の溶解性又は安定性を増加させるために、
- パレルの溶媒に露出した表面の位置がヒトリポカリン2の野生型配列と比較して突然変異されたタンパク質であり得る。

40

【0021】

一般的に、「ヒトリポカリン2」という用語は、ヒトヒトリポカリン2と比較して60%、70%、80%、85%、90%、又は95%以上の配列相同性又は配列同一性を有するすべてのタンパク質を含む。好ましくは、上述のこれらのヒトリポカリンは、hNGALの直鎖状ポリペプチド配列における配列位置33、36、40、41、4243、44、46、47、48、49、50、51、5254、55、59、65、68、70、

50

7273、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136及び138に対応する配列位置のいずれか1つにおいて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、1213、14、15、16、又は17の突然変異したアミノ酸残基を含む。

【0022】

従って、更なる態様において、本発明はヒトリポカリン2（例えば、ヒトリポカリン突然変異タンパク質又は突然変異したヒトリポカリン、突然変異した成熟hNGALがあり、ここで、SWISS-PROT データ Bank 受入番号P80188、さらに好ましくは配列番号44に示すアミノ酸配列を有する上記成熟hNGALがある）に由来する突然変異タンパク質を提供している。この突然変異タンパク質は、ヒトLcn2の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置96、100、及び106に対応する配列位置のいずれか1つでの少なくとも1つ又は二つの突然変異したアミノ酸残基を含み、ここで、その突然変異タンパク質は検出可能な親和性を有する所定の非天然標的に結合する。

10

【0023】

本明細書に使用される場合、「突然変異タンパク質」、「突然変異した」実体（タンパク質か核酸か）又は「突然変異体」は、それぞれ、天然に存在する（野生型）核酸又はタンパク質「参照」骨格と比べて、1つ又はそれ以上のヌクレオチド又はアミノ酸の置換、欠失、又は挿入を言及する。好ましくは、置換、欠失、又は挿入されるヌクレオチド又はアミノ酸の数は、それぞれ、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、又はそれ以上の25、30、35、40、45若しくは50。

20

【0024】

「ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン」、「hNGAL」、「リポカリン2」、又は「Lcn2」という用語は本発明に使用される場合、SWISS-PROT データ Bank 受入番号P80188（ここで、配列番号44として例示される）で供託された成熟hNGALを言及する。

【0025】

この状況において、本発明は、既定の標的に対して十分な親和結合を有する突然変異タンパク質を提供するこれらの上記3つの配列位置における1つ又はそれ以上の位置において、ヒトリポカリン2、ラット2-ミクログロブリン-関連タンパク質(A2m)、及びマウス24p3/uterocalin(24p3)を突然変異誘発をさせるという大変驚くべき発見に基づくことが知られている。ここで、上記既定の標的は、ペプチド、タンパク質、タンパク質のフラグメント又はドメイン、及び有機小分子が含まれるが、これに限定されるものではない。

30

【0026】

所定の標的は、任意の所望非天然標的/リガンドであってもよい。一実施形態において、「非天然リガンド」という用語は、生理的条件下で天然成熟hNGALに結合しない化合物を言及する。

【0027】

「有機分子」又は「有機小分子」という用語は、非天然標的のために本明細書に使用される場合、少なくとも2の炭素原子、好ましくは7又は12以下の回転可能な炭素結合を含み、100ダルトン~2000ダルトン、好ましくは100ダルトン~1000ダルトンの範囲に分子量を有し、選択的に1又は2の金属原子を含む有機分子を意味する。

40

【0028】

「ペプチド」という用語は、非天然標的のために本明細書に使用される場合、2~45のアミノ酸を有するジペプチド又はオリゴペプチドをいう。一実施形態において、このペプチドは、2~40、2~35、2~30、2~25、2~20、2~15、又は2~10のアミノ酸残基を有する。このペプチドは、天然に存在するペプチド又は合成ペプチドであってもよく、また、20の天然に存在するL-アミノ酸を除いて、D-アミノ酸、非

50

天然に存在するアミノ酸、及びアミノ酸類似体を含んでもよい。一実施形態において、このペプチドはアミロイドベータペプチド (A b e t a 又は A) である。もう1つの実施形態において、このアミロイドベータペプチドは A 40 ペプチド又は A 42 ペプチドである。

【0029】

一実施形態において、この有機小分子は、免疫学的ハプテンの特性を示す化合物である。

【0030】

一実施形態において、タンパク質であるこの非天然標的は、フィブロネクチン又はそのドメインであり、例えば、E B - ドメイン又は E B - ドメインのフラグメントである。

10

【0031】

本発明にかかるヒトリポカリン2突然変異タンパク質は、突然変異したアミノ酸配列位置の外側に野生型 (天然) アミノ酸配列を含んでもよい。他方、本明細書に開示されるリポカリン突然変異タンパク質は、さらにその突然変異が突然変異タンパク質の結合親和性及び折り畳みを妨げない限り、突然変異誘発を受ける配列位置の外側にもアミノ酸の突然変異を含んでもよい。このような突然変異は、確立された標準的な方法 (Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY を参照) を用いて DNA レベルで非常に容易に達成されることができる。可能なアミノ酸配列の改変は、挿入又は欠失並びにアミノ酸置換である。このような置換は保存的であってもよく、すなわち、アミノ酸残基は化学的に類似したアミノ酸残基で置換される。保存的置換の例としては、以下の群のメンバー間、すなわち、1) アラニン、セリン、及びトレオニン、2) アスパラギン酸及びグルタミン酸、3) アスパラギン及びグルタミン、4) アルギニン及びリジン、5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、及びバリン、ならびに 6) フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンの間での置換である。他方では、アミノ酸配列に非保存的な改変を導入することも可能である。さらに、単一アミノ酸残基を置換する代わりに、ヒトリポカリン2の一次構造の1又はそれ以上の連続的なアミノ酸を挿入するか、それとも欠失させることは、さらに、この欠失又は挿入が安定して折り畳まれた/機能的な突然変異タンパク質を生じさせる限りにおいては可能である。

20

30

【0032】

概説として、アミノ酸配列のこのような修飾は、特定の制限酵素に対し切断部位を組み込むことによって、突然変異したリポカリン遺伝子又はその一部のサブクローン化を単純化するために、単一アミノ酸位置の定方向の突然変異誘発を含む。さらに、これらの突然変異は所定の標的に対するリポカリン突然変異タンパク質の親和性をさらに改善するために、さらに組み込まれることができる。さらに、突然変異は必要に応じて、折り畳みの安定性、血清安定性、タンパク質の耐性、若しくは水溶解性を改善する目的、又は凝集傾向を低減する目的のような突然変異タンパク質の特定の特徴を調節する目的で導入されることができる。例えば、ジスルフィド架橋を防止するために、天然に存在するシステイン残基を他のアミノ酸に突然変異してもよい。しかしながら、例えばポリエチレングリコール (PEG)、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、ビオチン、ペプチド又はタンパク質のような化合物に接合する目的、又は非天然に存在するジスルフィド結合を形成する目的で新しい反応基を導入するために、他のアミノ酸配列位置をシステインに意図的に突然変異させることはさらに可能である。システイン残基をヒトリポカリン2突然変異タンパク質の変異タンパク質におけるアミノ酸配列に導入するための、このような突然変異の例示的な可能性は、少なくとも h N G A L の野生型配列における配列位置 14、21、60、84、88、116、141、145、143、146 又は 158 に対応する配列位置の1つにシステイン (Cys) 残基を導入することを含む。アミノ酸位置アミノ酸位置 14、21、60、84、88、116、141、145、143、146、及び/又は 158 のいずれかの側で産生されたチオール部分は、変異タンパク質を PEG 化又は HES 化

40

50

するために、例えば各々のヒトリポカリン2突然変異タンパク質の血清半減期を増加させるために用いてもよい。

【0033】

一実施形態において、本発明にかかる突然変異タンパク質は、ヒトリポカリン2の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置96、100、及び106に対応する配列位置のいずれか二つ又は三つにおいて突然変異したアミノ酸残基を含む。

【0034】

本発明の更なる実施形態において、突然変異タンパク質は、hNGALの直鎖状ポリペプチド配列における配列位置33、36、40、41、4243、44、46、47、48、49、50、51、5254、55、59、65、68、70、7273、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136、及び138に対応する配列位置のいずれかにおいて、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、又は17の突然変異したアミノ酸残基を含む。更なる実施形態において、突然変異タンパク質は、hNGALの直鎖状ポリペプチド配列における配列位置33、36、40、41、4243、44、46、47、48、49、50、51、5254、55、59、65、68、70、7273、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136、及び138の少なくとも1つにおいて、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17の突然変異したアミノ酸残基を含む。また、更なる実施形態において、突然変異タンパク質は、直鎖状ポリペプチド配列における配列位置33、36、40、41、4243、44、46、47、48、49、50、51、5254、55、59、65、68、70、7273、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136、及び138の少なくとも1つにおいて、ヒトリポカリン218、19、又は20の突然変異したアミノ酸残基を含む。

10

20

【0035】

本発明の一実施形態において、突然変異タンパク質は、少なくとも上記に挙げられた配列位置の10、14、15、20、22、24、26、28、29、30、31、32、33、35又は全ての45いずれかにおいて突然変異したアミノ酸残基を含む。

30

【0036】

アミロイドベータペプチドに結合して、A₄₀ペプチド又はA₄₂ペプチドのような本発明の突然変異タンパク質は、図17(Lcn2)に示される成熟ヒトリポカリン2の野生型アミノ酸配列について少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12のアミノ酸置換を含んでもよい。そのアミノ酸置換は、Leu36 Val又はCys、Ala40 Tyr又はLys又はVal、Ile41 Thr又はSer又はLeu、Gln49 Leu又はTrp、Leu70 Gly、Arg72 Gly又はAsp、Lys73 Leu又はThr又はAsp、Asp77 Asn又はHis又はLeu、Trp79 Lys、Asn96 He又はArg、Tyr100 Gin又はArg又はGlu、Leu103 Met又はArg又はGly、Tyr106 Tyr又はAla又はTrp、Lys125 Thr又はVal又はGlu、Ser127 Gly又はGin又はAla、Tyr132 Met又はSer又はThr、並びに、Lys134 Asnを含むが、これに限定されるものではない。また、このような突然変異タンパク質は、in vitro又はin vivoのA凝集を減少させることができる。上述の突然変異タンパク質は、A、好ましくはA₄₀に結合してその凝集を抑制し、より好ましくは実施例11に定めるような検定条件(好ましくは突然変異タンパク質:A₄₀は比率1:10である)で行うことが分かる。本発明は、さらに突然変異タンパク質US7と比べて同等の生物学的機能を有する前記のような突然変異タンパク質に関する。「同等の生物学的機能」は、これらの突然変異タンパク質は、およそ40%、30%

40

50

、20%、15%、10%、5%、2.5%、2%又は1%以下のUS7に対する凝集阻害活性の偏差で、例えば、実施例11に設定される条件（好ましくは、突然変異タンパク質:A40の比例は1:10である）と同じ又は一致する条件において、A、好ましくはA40に結合して阻害することができることを意味する。本発明は、さらにアルツハイマー病のような神経変性疾患の治療又は予防に用いられる上述の突然変異タンパク質に関する。

【0037】

一実施形態において、アミロイドベータペプチド、例えばA40ペプチド又はA42ペプチドに結合する本発明にかかる突然変異タンパク質は、Leu36 Val、Ala40 Tyr、Ile41 Thr、Gln49 Leu、Leu70 Gly、Lys73 Leu、Asp77 Asn、Trp79 Lys、Asn96 He、Tyr100 Gin、Leu103 Met、Lys125 Thr、Ser127 Gly、Tyr132 Met、及びLys134 Asnのアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換が含まれる突然変異タンパク質の例は、図17に示されるS1-A4（配列番号:39）がある。

10

【0038】

更なる実施形態において、アミロイドベータペプチド、例えばA40ペプチド又はA42ペプチドに結合する本発明にかかる突然変異タンパク質は、Leu36 Val、Ala40 Lys、Ile41 Ser、Gln49 Trp、Leu70 Gly、Arg72 Gly、Lys73 Thr、Asp77 His、Trp79 Lys、Asn96 Arg、Tyr100 Arg、Leu103 Arg、Tyr106 Ala、Lys125 Val、Ser127 Gin、Tyr132 Ser、及びLys134 Asnのアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換が含まれる突然変異タンパク質の例は、図17に示されるUS7（配列番号:41）がある。

20

【0039】

本発明は、また本明細書に記載されるように、突然変異した成熟hNGALリポカリン（SWISS-PROT データ Bank 受入番号P80188の寄託のように、好ましくは配列番号:40に示すアミノ酸配列を有する）は、野生型hNGALの直鎖状ポリペプチド配列における位置36、40、41、49、70、7273、77、79、96、100、103、106、125、127、132、134に対応する位置に1つ又はそれ以上の突然変異したアミノ酸を含むことが想定される。

30

【0040】

もう一つの実施形態において、アミロイドベータペプチド、例えばA40ペプチド又はA42ペプチドに結合する本発明にかかる突然変異タンパク質は、Leu36 Cys、Ala40 Val、Ile41 Leu、Gln49 Leu、Leu70 Gly、Arg72 Asp、Lys73 Asp、Asp77 Leu、Trp79 Lys、Asn96 Arg、Tyr100 Glu、Leu103 Gly、Tyr106 Trp、Lys125 Glu、Ser127 Ala、Tyr132 Thr、及びLys134 Asnのアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換が含まれる突然変異タンパク質の例は、図17に示されるH1-G1（配列番号:43）がある。

40

【0041】

もう一つの実施形態において、アミロイドベータペプチド、例えばA40ペプチド又はA42ペプチドに結合する本発明にかかる突然変異タンパク質は、Leu36 Ala、Ala40 Val、Ile41 Leu、Gln49 Leu、Leu70 Gly、Arg72 Asp、Lys73 Asp、Asp77 Leu、Trp79 Lys、Asn96 Arg、Tyr100 Glu、Leu103 Gly、Tyr106 Trp、Lys125 Glu、Ser127 Ala、Tyr132 Thr、及びLys134 Asnのアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換が含まれる突然変異タンパク質の例は、配列番号:50に示されるH1GAがある。

【0042】

50

本明細書に記載される上記の突然変異タンパク質は、A、好ましくはA 40に結合してその凝集を抑制することが好ましく、より好ましくは実施例23に定める検定条件（好ましくはA 40:H1GAの比率は10:2である）で行う。本発明は、さらに突然変異タンパク質H1GAと比べて同等の生物学的機能を有する前記のような突然変異タンパク質に関する。「同等の生物学的機能」は、これらの突然変異タンパク質は、およそ40%、30%、20%、15%、10%、5%、2.5%、2%又は1%以下のH1GAに対する凝集阻害活性の偏差で、例えば、実施例23に設定される条件（好ましくはA 40:H1GAの比率は10:2である）と同じ又は一致する条件において、A、好ましくはA 40に結合して阻害することができることを意味する。本発明は、さらにアルツハイマー病のような神経変性疾患の治療又は予防に用いられる上述の突然変異タンパク質に関する。

10

【0043】

もう1つの実施形態においてアミロイドベータペプチド、例えばA 40ペプチド又はA 42ペプチドに結合する本発明にかかる突然変異タンパク質は、Leu36 Val、Ala40 Val、Ile41 Leu、Gln49 Leu、Leu70 Gly、Arg72 Asp、Lys73 Asp、Asp77 Leu、Trp79 Lys、Asn96 Arg、Tyr100 Glu、Leu103 Gly、Tyr106 Trp、Lys125 Glu、Ser127 Ala、Tyr132 Thr、及びLys134 Asnのアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換が含まれる突然変異タンパク質の例は、配列番号:52に示されるH1GVがある。

20

【0044】

本明細書に記載される上記の突然変異タンパク質は、実施例21に定める検定条件でA 40に結合することが好ましい本発明は、さらに突然変異タンパク質H1GVと比べて同等の生物学的機能を有する前記のような突然変異タンパク質に関する。「同等の生物学的機能」は、これらの突然変異タンパク質は、およそ40%、30%、20%、15%、10%、5%、2.5%、2%又は1%以下のH1GVに対する凝集阻害活性の偏差で、例えば実施例21に設定される条件と同じ又は一致する条件において、A、好ましくはA 40に結合して阻害することができることを意味する。本発明は、さらにアルツハイマー病のような神経変性疾患の治療又は予防に用いられる上述の突然変異タンパク質に関する。

30

【0045】

更なる実施形態において、エキストラドメインB又はそのフラグメントに結合する本発明にかかる突然変異タンパク質は、Leu36 Lys、Ala40 His、Ile41 Asp、Gln49 Arg、Tyr52 Gin、Ser68 Asn、Leu70 Arg、Arg72 Val、Lys73 His、Asp77 Asn、Trp79 Arg、Arg81 Trp、Tyr100 Trp、Tyr106 Trp、Lys125 Arg、Ser127 Tyr、Tyr132 Leu、Lys134 Glu、及びSer146 Asnのアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換が含まれる突然変異タンパク質の例は、図17に示されるN7A（配列番号:20）がある。

40

【0046】

もう1つの実施形態において、エキストラドメインB又はそのフラグメントに結合する本発明にかかる突然変異タンパク質は、Leu36 Arg、Ala40 Met、Ile41 Arg、Gln49 Ala、Tyr52 Val、Ser68 Lys、Leu70 Met、Arg72 Gin、Lys73 Arg、Asp77 Lys、Trp79 Met、Arg81 Asn、Asn96 Ala、Tyr100 Pro、Leu103 Pro、Tyr106 Thr、Lys125 His、Ser127 Phe、及びLys134 Hisのアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換が含まれる突然変異タンパク質の例は、図17に示されるN9B（配列番号:24）がある。

【0047】

もう1つの実施形態において、エキストラドメインB又はそのフラグメントに結合する

50

本発明にかかる突然変異タンパク質は、Leu36 Ala、Ala40 Thr、Ee41 Trp、Gln49 Tyr、Tyr52 Gln、Ser68 Asn、Arg72 Met、Lys73 Ser、Asp77 Arg、Trp79 Met、Arg81 His、Asn96 Ser、Tyr100 Trp、Tyr106 Trp、Lys125 Arg、Ser127 Tyr、Tyr132 Phe、及びLys134 Glyのアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換が含まれる突然変異タンパク質の例は、図17に示されるN10（配列番号：26）がある。

【0048】

更なる実施形態において、エキストラドメインB又はそのフラグメントに結合する本発明にかかる突然変異タンパク質は、Leu36 Glu、Ala40 Ser、Ile41 Leu、Gln49 Arg、Leu70 Arg、Lys73 Ser、Asp77 His、Trp79 Leu、Asn96 Leu、Tyr100 Lys、Leu103 His、Tyr106 Phe、Lys125 Thr、Ser127 Ala、及びLys134 Pheのアミノ酸置換を含む。そのようなアミノ酸置換が含まれる突然変異タンパク質の例は、図17に示されるN7E（配列番号：22）がある。

10

【0049】

図17に示されるような上記の突然変異タンパク質は、さらにアミノ酸置換を含むことができる。その突然変異タンパク質は、さらに、Gln28 His又はCys87 Serが含まれるアミノ酸置換を含むことができるが、当該アミノ酸置換はGln28 His及びCys87 Serに限定されない。他の可能なアミノ酸置換は、Tyr52 GlnやVal、Ser68 LysやAsn、又はArg81 Trp or AsnやHisを含むことができるが、これに限定されるものではない。

20

【0050】

本発明にかかるリポカリン突然変異タンパク質は、検出可能な親和性、例えば少なくとも200nmの解離定数(K_D)を有する所望の非天然標的に結合することができる。もう一つの実施形態において、この突然変異タンパク質は、1 μ M以下の K_D 、100 μ M以下の K_D 、1 μ M以下の K_D 、500nmの K_D 、200nm以下の K_D 、100nm以下の K_D 、50nm以下の K_D 、10nm以下の K_D 、又は1nM以下の K_D を有する所定の非天然標的に結合する。もう一つの実施形態において、リポカリン突然変異タンパク質は、少なくとも100、20、1nM又はそれ以下の所定の標的に対する解離定数で所望の標的に結合する。突然変異タンパク質の所望の標的に対する結合親和性は、蛍光滴定、競合ELISA、又は表面プラズモン共鳴(Biacore)のような多数の方法によって測定することができる。

30

【0051】

標的との複合体形成が結合相手の濃度、競合相手の存在、緩衝系のイオン強度などの多くの因子に依存することは、当業者に容易に発見される。選択及び濃縮は、一般的に、リポカリン突然変異タンパク質の分離が所望の標的と複合して、前述のような解離定数を有することが可能な条件下で行われる。しかしながら、洗浄及び溶出のステップは、可変のストリンジェンシ下で行うことができる。動的特性に関連する選択は同様に可能である。例えば、その選択は、標的からの遅い解離、又は言い換えると低い k_{off} 速度が示される突然変異タンパク質と標的との複合体形成を助ける、複数の条件で行うことができる。また、その選択は、突然変異タンパク質と標的との間の速い複合体形成、又は言い換えると高い k_{on} 速度を助ける複数の条件で行うことができる。

40

【0052】

本発明にかかる突然変異タンパク質は、一般的に、単量体タンパク質として存在する。しかし、本発明のリポカリン突然変異タンパク質は自発的に二量化、又はオリゴマー化する可能性もある。安定な単量体を形成するリポカリン突然変異タンパク質の使用は、例えばさらに速い拡散と良好な組織浸透のためのいくつかの用途に好適にできるが、安定な同質二量体又は多量体を形成するリポカリン突然変異タンパク質の使用は、このような多量体が所定の標的に対する親和性及び/又は結合活性の(更なる)増加を提供できるため、

50

その他の場合に有利になり得る。さらに、リボカリン突然変異タンパク質の低重合体の形成は、さらに遅い解離速度、又は長期の血清半減期を有することができる。

【0053】

各々の突然変異タンパク質とそのリガンドとの間の複合体形成は、また、各々の結合相手の濃度、競合相手の存在、用いられる緩衝系のpH及びイオン強度、及び解離定数 K_D の測定に用いられる実験的方法（数例だけを挙げると、例えば蛍光滴定、競合ELISA、又は表面プラズモン共鳴）、又は実験データの評価に用いられる数学アルゴリズムのような多くの異なる因子によって影響されることは留意されるべきである。

【0054】

従って、 K_D 値（各々の突然変異タンパク質とその標的リガンドとの間に形成される複合体の解離定数）は、特定の実験範囲内で変更してもよく、所定のリガンドに対する特定のリボカリンの突然変異タンパク質の親和性を決定するのに用いられる方法及び実験設定に依存することはさらに、当業者に明らかである。このことは、測定された K_D 値にわずかな偏差、若しくは例えば、 K_D 値が表面プラズモン共鳴（Biacore）によって、又は、競合ELISAによって決定されるかどうかに依存する許容範囲があり得ることを意味する。

10

【0055】

一実施形態において、本明細書中に開示された突然変異タンパク質は、N末端又はC末端のいずれかで、ペンタヒスチジンタグ、ヘキサヒスチジンタグ、又はStreptag（登録商標）という親和性標識に結合できることは留意すべきである。従って、本出願はさらに、このようなタグを有するすべての明確かつ一般的に記載される突然変異タンパク質を含む。

20

【0056】

特性リボカリン突然変異タンパク質のフラグメントに関連して、本発明において用いられる用語「フラグメント」は、N末端及び/又はC末端で短縮された、すなわち、N末端及び/又はC末端のアミノ酸のうち少なくとも1つを欠失する全長の成熟Lcn2から得られたタンパク質又はペプチドに関連する。このようなフラグメントは、成熟Lcn2の一次配列である、好適には少なくとも10個の、より好適には20個の、最も好適には30個以上のアミノ酸を含み、成熟Lcn2の免疫測定において通常検出可能である。

【0057】

本発明の範囲にさらに含まれるのが、上記の突然変異タンパク質であり、その免疫原性について変更されてきた。

30

【0058】

細胞毒性T細胞は、class Iの主要組織適合抗原複合体（MHC）分子と関連して、抗原呈示細胞の細胞表面でペプチド抗原を認識する。ペプチドのMHC分子に結合する能力はアレル特異的であり、その免疫原性と相関する。所定のタンパク質の免疫原性を低減するために、タンパク質中のどのペプチドが所定のMHC分子に結合する可能性を予測する能力は、大きい価値を有する。潜在的なT細胞エピトープを同定するために計算機でのスレッディングアプローチを用いたアプローチは、MHCのclass I分子に対する所定のペプチド配列の結合を予測するために既に述べられている（Altuvia et al. (1995) J. Mol. Biol. 249: 244 - 250）。

40

【0059】

このようなアプローチをさらに用いて、本発明の突然変異タンパク質における潜在的なT細胞エピトープを同定し、免疫原性の予測による特異的な突然変異タンパク質の選択をその使用目的に依存させてもよい。さらには、T細胞エピトープを含むのを予測させるペプチド領域を、更なる突然変異誘発に供して、これらのT細胞エピトープを低減又は除去し、ひいては免疫原性を最小化することが可能であってもよい。遺伝子操作された抗体からの両親媒性のエピトープの除去は述べられてきており（Mateo et al. (2000), Hybridoma 19(6): 463 - 471）、本発明の突然変異タンパク質に適用されてもよい。

50

【0060】

こうようにして得られた突然変異タンパク質は、最小限の免疫原性を有することができ、以下に記載のような治療及び診断用途での使用が望ましい。

【0061】

いくつかの用途においては、接合形態で本発明の突然変異タンパク質を用いることはさらに有用である。従って、本発明は、また特定の化合物に接合される、リポカリン突然変異タンパク質に関連する。その特定の化合物として、数例のみを挙げると、有機分子、酵素標識、呈色標識、細胞増殖抑制剤、毒素、光力学治療に適用されかつ光活性化され得る標識、蛍光標識、放射性標識、発色標識、発光標識、金属錯体、コロイド金のような金属、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、化学療法用金属 (chemotherapeutic metal)、又は化学療法用金属を含んでもよいが、これに限定されるものではない。その突然変異タンパク質は、また有機薬物分子に接合されてもよい。このような接合は当該技術分野で周知された従来の方法によって行うことができる。

10

【0062】

一般的に、適切な化学物質又は酵素で本明細書中に記載の Lcn2 突然変異タンパク質を標識することは可能であり、化学的、物理的、光学的又は酵素学的な反応で検出可能な化合物又はシグナルを直接的又は間接的に産生する。物理的反応及び同時の光学的反応/標識の例は、照射での蛍光の放出である。アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、又は -ガラクトシダーゼは、発色反応産物の形成を触媒する酵素標識 (及び同時の光標識) の例である。一般的に、抗体に通常用いられる総ての標識はさらに (免疫グロブリンの Fc 部分内の糖部分で排他的に用いられるものを除いて)、本発明の突然変異タンパク質への接合のために用いてもよい。本発明の突然変異タンパク質はさらに、例えば、所定の細胞、組織又は器官への標的送達のために、又は周囲の正常細胞に影響を与えることなく細胞、例えば腫瘍細胞を選択的に標的化するために、このような薬剤の任意の好適な治療用活性剤と接合させてもよい。このような治療用活性剤の例は、放射性核種、毒素、小さな有機分子、及び (細胞表面受容体のアゴニスト/アンタゴニストとして作用するペプチド、又は所定の細胞内標的にタンパク質結合部位に対し競合するペプチドなど) 治療用ペプチドを含む。好適な毒素の例は限定しないが、百日咳毒素、ジフテリア毒素、リシン、サポリン、緑膿菌外毒素、カリチアマイシン又はその誘導体、タキソイド、マイタンシノイド、ツブリン、又はドラスタチンアナログを含む。ドラスタチンアナログは、アウリスタチン E、モノメチルアウリスタチン E、アウリスタチン P Y E、及びアウリスタチン P H E であってもよい。分裂停止剤の例は限定しないが、シスプラチンと、カルボプラチンと、オキサリプラチンと、5 -フルオロウラシルと、タキソテル (ドセタキセル) と、パクリタキセルと、アントラサイクリン (ドキソルビシン) と、メトトレキサートと、ビンブラスチンと、ピンクリスチンと、ビンデシンと、ビノレルビンと、ダカルバジンと、シクロホスファミドと、エトポシドと、アドリアマイシンと、カンプトテシンと、コンプレタスタチン A - 4 関連化合物と、スルホンアミドと、オキサジアゾリンと、ベンゾ [b] チオフェンと、合成型スピロケタールピランと、モノテトラヒドロフラン化合物と、クラシン及びクラシン誘導体と、メトキシエストラジオール誘導体と、ロイコボリンとを含む。本発明のリポカリン突然変異タンパク質はさらに、アンチセンス核酸分子、低分子干渉 RNA、マイクロ RNA、又はリボザイム治療用活性核酸で接合させてもよい。このような接合体は当該技術分野で周知の方法によって産生できる。

20

30

40

【0063】

一実施形態においては、本発明の突然変異タンパク質は、さらに本発明の突然変異タンパク質を身体内の所望の領域又は区域に送達するために、特異的な身体領域を標的とする標的部分に連結してもよい。このような修飾が所望されうる一実施例は、血液脳関門の通過である。血液脳関門を通過するために、本発明の突然変異タンパク質はこのバリアを通過する能動輸送を促進する部分に連結できる (Gaillard PJ, et al., Diphtheria-toxin receptor-targeted brain drug delivery. International Congress Serie

50

s. 2005 1277; 185-198、又は Gaillard PJ, et al., Targeted delivery across the blood-brain barrier. Expert Opin Drug Deliv. 2005 2(2): 299-309 参照)。このような化合物は、例えば、商品名 2B-Trans (登録商標) (オランダ国ライデンの to-BBB technologies BV 5 社) で入手可能である。本発明の突然変異タンパク質に結合できる他の例示的な標的分子は、所望の標的分子に対して親和性を有する抗体、抗体フラグメント、又はリポカリン突然変異タンパク質を含む。標的部分の標的分子は、例えば、細胞表面抗原であってもよい。細胞表面抗原は、例えば、癌細胞のような細胞又は組織型に対して特異的であってもよい。このような細胞表面タンパク質の説明に役立つ実例として、HER-2、又は NEU-2 のようなプロテオグリカンがある。

10

【0064】

上述のように、本発明の突然変異タンパク質はいくつかの実施形態においては、突然変異タンパク質の血清半減期を延長する化合物に接合されうる(これに関しては、さらに、国際公開第 2006/56464 号参照のこと。このような接合戦略は、CTLA-4 に対する結合親和性を有するヒト好中球ゼラチナーゼ結合性突然変異タンパク質について述べられている)。血清半減期を延長する化合物は数例のみを挙げると、ポリエチレン(PEG)又はその活性誘導体のようなポリアルキレングリコール分子、ヒドロキシエチルデンブ、パルミチン酸のような脂肪酸分子(Vajo & Duckworth (2000) Pharmacol. Rev. 521-9)、免疫グロブリンのFc化合物、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン又はそのフラグメント、アルブミン結合ペプチド、又は、アルブミン結合タンパク質であってもよい。アルブミン結合タンパク質は、細菌性のアルブミン結合タンパク質、抗体、ドメイン抗体を含む抗体フラグメント(例えば、米国特許第 6,696,245 号参照)、又はアルブミンに対して結合活性を有するリポカリン突然変異タンパク質を含む。従って、本発明のリポカリン突然変異タンパク質の半減期を延長するための好適な接合相手は、アルブミン(Osborn et al. (2002) J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548)、又は、例えば、連鎖球菌性プロテインGのもののような細菌性アルブミン結合ドメインのような、アルブミン結合タンパク質(König, T. and Skerra, A. (1998) J. Immunol. 方法 218, 73-83)を含む。接合相手として用いられうるアルブミン結合ペプチドの別の例は、例えば、Cys-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Cys の共通配列を有するものであり、米国特許出願第 2003/0069395 号又は Dennisら(Dennis et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 35035-35043)に記載のように、Xaa1 は Asp、Asn、Ser、Thr、又は Trp であり、Xaa2 は Asn、Gln、His、Ile、Leu、又は Lys であり、Xaa3 は Ala、Asp、Phe、Trp、又は Tyr であり、Xaa4 は Asp、Gly、Leu、Phe、Ser、又は Thr である。

20

30

【0065】

他の実施形態において、アルブミン自体又はアルブミンの生物学的活性のフラグメントは、突然変異タンパク質の血清半減期を延長する本発明のリポカリン突然変異タンパク質の化合物として用いられうる。用語「アルブミン(albumin)」は、ヒト血清アルブミン、又はウシ血清アルブミン、又はラットアルブミンのような総ての哺乳類アルブミンを含む。アルブミン又はそのフラグメントは、米国特許第 5,728,553 号、又は欧州特許出願 EP0330451 及び EP0361991 に記載のように組換えて産生されうる。タンパク質安定剤として用いられる組換えヒトアルブミン(Recombumin (登録商標))は、例えば Novozymes Delta 社(英国、ノッティンガム)から入手できる。

40

【0066】

アルブミン結合タンパク質が抗体フラグメントである場合は、ドメイン抗体であっても

50

よい。ドメイン抗体 (d A b s) は生物物理学的な特性にわたる正確な制御を可能にするように操作され、生体内での半減期は、最適な安全性及び産生効率特性を生成するように設計される。ドメイン抗体は例えば、D o m a n t i s 社 (英国ケンブリッジ及び米国マサチューセッツ州) から商業上入手可能である。

【 0 0 6 7 】

本発明の突然変異タンパク質の血清半減期を延長する部分としてトランスフェリンを使用する場合、突然変異タンパク質は非グリコシル化トランスフェリンのN又はC末端、又はその双方に遺伝学的に融合できる。非グリコシル化トランスフェリンは14ないし17日の半減期を有し、トランスフェリン融合タンパク質は延長された半減期を同様に有する。担体であるトランスフェリンはさらに、高いバイオアベイラビリティ、体内分布、及び循環安定性を提供する。この技術はB i o R e x i s (米国ペンシルベニア州のB i o R e x i s P h a r m a c e u t i c a l C o r p o r a t i o n 社) から商業上入手可能である。タンパク質安定剤として用いるための組換えヒトトランスフェリン (D e l t a F e r r i n (登録商標)) はさらに、N o v o z y m e s D e l t a 社 (英国ノッティンガム) から商業上入手可能である。

10

【 0 0 6 8 】

免疫グロブリンのFc部分が本発明の突然変異タンパク質の血清半減期を延長するために用いられる場合、S y n t o n i x P h a r m a c e u t i c a l s 社 (米国マサチューセッツ州) から商業上入手可能なS y n 融合 (登録商標) の技術を用いてもよい。このFc融合技術の使用によって、長時間作用する生物製剤の産生が可能となり、例えば抗体のFc領域に結合される突然変異タンパク質の2のコピーからなり、薬物動態、溶解性、及び産生効率を改善することができる。

20

【 0 0 6 9 】

本発明の突然変異タンパク質の半減期を延長するためのさらに別の選択肢は、本発明の突然変異タンパク質のN又はC末端に、長く不定形でフレキシブルなグリシンリッチな配列 (例えば、約20ないし80個の連続的なグリシン残基を有するポリグリシン) を融合することである。国際公開第2007/038619号に公開されたこのアプローチはさらに、例えば、用語「r P E G (組換えP E G)」等である。

【 0 0 7 0 】

ポリアルキレングリコールが本発明の突然変異タンパク質の血清半減期を延長する化合物として用いられる場合、ポリアルキレングリコールは置換型又は非置換型であってもよい。ポリアルキレングリコールはさらに、活性化したポリアルキレン誘導体にてできる。好適な化合物の例はインターフェロンに関連して、国際公開第99/64016号、米国特許第6,177,074号、又は米国特許第6,403,564号に記載のような、又は、P E G 修飾アスパラギナーゼ、P E G - アデノシンデアミナーゼ (P E G - A D A)、又はP E G - スーパーオキシドジスムターゼのような他のタンパク質について記載されたような (例えば、F u e r t g e s ら (1990) The C l i n i c a l E f f i c a c y o f P o l y (E t h y l e n e G l y c o l) - M o d i f i e d P r o t e i n s J . C o n t r o l . R e l e a s e 1 1 , 1 3 9 - 1 4 8 参照)、ポリエチレングリコール (P E G) 分子である。このような高分子、好適にはポリエチレングリコールの分子量は、約300ダルトン~約70,000ダルトンの範囲にでき、例えば約10,000、約20,000、約30,000、又は約40,000ダルトンの分子量を有するポリエチレングリコールを含む。さらに、例えば米国特許第6,500,930号、又は6,620,413号に記載されるように、デンプン又はヒドロキシエチルデンプン (H E S) のような炭水化物の低重合体及び高分子は血清半減期延長のために本発明の突然変異タンパク質に接合できる。

30

40

【 0 0 7 1 】

もう1つの実施形態において、上述の化合物のうちの1つを本発明の突然変異タンパク質に接合すべく好適なアミノ酸側鎖を提供するために、人工アミノ酸は突然変異誘発によって導入してもよい。一般的に、このような人工アミノ酸はより反応性に、ひいては所望

50

の部分への接合を促進するように設計される。人工 tRNA を介して導入できるこのような人工アミノ酸の一例はパラアセチルフェニルアラニンである。

【0072】

本明細書中で開示される突然変異タンパク質のいくつかの用途について、融合タンパク質の形態で用いることは有利になりうる。いくつかの実施形態においては、本発明のヒト涙液突然変異タンパク質は、そのN末端及び/又はそのC末端で、タンパク質、タンパク質ドメイン、又はシグナル配列及び/又は親和性標識のようなペプチドに融合される。

【0073】

薬学的な用途のために、本発明の突然変異タンパク質は、突然変異タンパク質の生体内での血清半減期を延長する融合パートナーに融合されうる（国際公開第2006/56464号を再度参照。好適な融合パートナーは、CTLA-4に対し結合親和性を有するヒト好中球ゼラチナーゼ結合性突然変異タンパク質について記載されている）。上述の接合化合物と同様に、融合パートナーは数例のみを挙げると、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン、アルブミン結合ペプチド、又はアルブミン結合タンパク質であってもよい。また、アルブミン結合タンパク質は細菌性のアルブミン結合タンパク質、又はアルブミンに対し結合活性を有するリポカリン突然変異タンパク質であってもよい。従って、本発明のリポカリン突然変異タンパク質の半減期を延長するための好適な融合パートナーはアルブミン（Osborn, B. L. et al. (2002) 上記を参照、*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 540-548）、例えば、連鎖球菌性プロテインGのもののような細菌性アルブミン結合ドメインのような、アルブミン結合タンパク質（Konig, T. 及びSkerra, A. (1998) 上記を参照、*J. Immunol. Methods* 218, 73-83）を含む。Cys-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Cysの共通配列を有し、Xaa1はAsp、Asn、Ser、Thr、又はTrpであり、Xaa2はAsn、Gln、His、Ile、Leu、又はLysであり、Xaa3はAla、Asp、Phe、Trp、又はTyrであり、Xaa4はAsp、Gly、Leu、Phe、Ser、又はThrである、Dennis (2002)ら、上記を参照、又は米国特許出願第2003/0069395号に記載のアルブミン結合ペプチドはさらに、融合パートナーとして用いられうる。本発明のリポカリン突然変異タンパク質の融合パートナーとしてアルブミン自体、又はアルブミンの生物学的な活性フラグメントを用いることはさらに可能である。用語「アルブミン」はヒト血清アルブミン、又はウシ血清アルブミン、又はラット血清アルブミンのような総ての哺乳類アルブミンを含む。アルブミン又はそのフラグメントの組換え産生は当該技術分野の当業者に公知であり、例えば米国特許第5,728,553号、欧州特許出願EP0330451又はEP0361991に記載されている。

【0074】

本発明のリポカリン突然変異タンパク質に酵素活性又は他の分子に対する結合親和性などの新たな性質を付与しうる。適切な融合タンパク質の例は、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、プロテインGのアルブミン結合ドメイン、プロテインA、抗体断片、オリゴマー化ドメイン、同一又は異なる結合特異性のリポカリン突然変異タンパク質（その結果、「duocalin」の形成を引き起こす。Schlehuber, S. 及びSkerra, A. (2001), *Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. Biol. Chem.* 382, 1335-1342 参照。）の突然変異タンパク質、又は毒素である。

【0075】

特に、得られた融合タンパク質の両方の「成分」がともに特定の治療標的に作用できるように、本発明のリポカリン突然変異タンパク質を別個の酵素活性部位と融合することが可能でありうる。リポカリン突然変異タンパク質の結合ドメインは、疾患の原因となる

10

20

30

40

50

標的に結合し、酵素ドメインがその標的の生物学的機能を止めることを可能にする。

【0076】

融合パートナー、また、組換えタンパク質の容易な検出及び/又は精製を可能にする、Strept-tag (登録商標)又はStrep-tag (登録商標)II (Schmidt, T.G.M.ら(1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766)、mycタグ、FLAGタグ、His6タグ又はHAタグ、又はグルタチオンS-トランスフェラーゼのようなタンパク質などの親和性タグは、好ましい融合パートナーの更なる例である。最後に、緑色蛍光タンパク質(GFP)又は黄色蛍光タンパク質(YFP)などの発色特性又は蛍光特性を有するタンパク質は、同様に、本発明のリポカリン突然変異タンパク質に適した融合パートナーである。

10

【0077】

本明細書において使用される場合、「融合タンパク質」という用語はまた、シグナル配列を含む本発明のリポカリン突然変異タンパク質を含む。ポリペプチドのN末端でのシグナル配列は、このポリペプチドを特定の細胞内区画、例えば、E.coliのペリプラズム又は真核細胞の小胞体に指向させる。多数のシグナル配列が当技術分野において知られている。E.coliのペリプラズムへのポリペプチドの分泌のための好ましいシグナル配列はOmpAシグナル配列である。

【0078】

本発明は、また本明細書に記載されるように、突然変異タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子(DNA及びRNA)に関する。遺伝子コードの縮重はあるコドンを同一のアミノ酸を指定する他のコドンに置換することを許容するので、本発明は、本発明の融合タンパク質をコードする特定の核酸分子に限定されず、機能的な融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むすべての核酸分子を含む。

20

【0079】

従って、本発明はさらに、Lcn2の直鎖状ポリペプチド配列におけるアミノ酸配列位置96、100、及び106のいずれかの少なくとも1のコドンに突然変異を有する、本発明により突然変異タンパク質をコード化する核酸配列を含む。

【0080】

本明細書中に開示される発明はさらに、Lcn2突然変異タンパク質をコード化する核酸分子を含み、実験的な突然変異誘発の確定配列位置の外側に更なる突然変異を含む。このような突然変異は、例えば突然変異タンパク質の折り畳み効率、血清安定性、熱安定性、又はリガンド結合親和性の改善に寄与する場合、多くの場合許容されるか、又はさらに有利にもなり得る。

30

【0081】

本出願に開示された核酸分子は、この核酸分子の発現を可能にするように、制御配列(又は複数の制御配列)に「動作可能に結合(operably linked)」できる。

【0082】

DNAのような核酸分子は、転写及び/又は翻訳制御に関する情報を有する配列要素を含む場合、「核酸分子を発現可能である」と見なされるか、又は「ヌクレオチド配列の発現を許容」できると見なされ、このような配列はポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列に「動作可能に結合」される。動作可能な結合は、制御配列要素及び発現すべき配列が遺伝子発現を可能にする方法で結合される結合部のことである。遺伝子発現に必要な制御領域の詳細な性質は種の間で変りうるが、一般的にはこれらの領域は、原核生物においてはプロモータ自体、すなわち、転写の開始に関するDNA要素、並びにRNAに転写されるときに翻訳の開始を伝えるDNA要素の双方を有するプロモータを含む。このようなプロモータ領域は通常、原核生物における-35/-10ボックス及びシャインダルガン配列、又は真核生物におけるTATAボックス、CAAT配列、及び5'キャッピング配列のような、転写及び翻訳に関連する5'非コード配列を含む。これらの領域はさらに、エンハンサ又はリプレッサ配列、並びに宿主細胞の特異的な区画を天然型ポリペプチド

40

50

が標的にするための翻訳シグナル及びリーダ配列を含みうる。

【0083】

さらに、3'非コード配列は転写終結又はポリアデニル化に関する制御配列を含んでもよい。しかしながら、これらの終結配列が特定の宿主細胞において十分に機能的ではない場合、その細胞内で機能的な信号と置換されうる。

【0084】

従って、本発明の核酸分子は制御配列、好適にはプロモータ配列を含むことができる。別の好適な実施形態においては、本発明の核酸分子はプロモータ配列と、転写終結配列とを含む。好適な原核生物のプロモータは例えば、tetプロモータ、lacUV5プロモータ、又はT7プロモータである。真核細胞の発現に有用なプロモータの例は、SV40プロモータ又はCMVプロモータである。

10

【0085】

本発明の核酸分子はさらに、プラスミド、ファージミド、ファージ、バキュロウイルス、コスミド、又は人工染色体のような、ベクターの一部又は任意のその他のクローニング媒体にできる。

【0086】

一実施形態において、核酸分子はファスミドに含まれる。ファスミドベクターは、M13又はf1のような溶原性ファージの遺伝子間領域をコード化するベクターか、又は対象のcDNAに融合されるその機能的部分を意味する。このようなファージミドベクター、及び好適なヘルパーファージ(例えば、M13K07、VCS-M13、又はR408)での細菌性宿主細胞の重感染後に、無傷のファージ粒子が産生され、これによってファージ表面に表示されたその対応するポリペプチドへの、コード化した異種cDNAの物理的結合を可能にする(例えば、Kay, B. K. et al. (1996) *Faerie Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual*, 1st Ed., Academic Press, New York NY; Lowman, H. B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 401-424; 又はRodi, D. J., 及びMakowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87-93に概説)。

20

【0087】

このようなクローニング媒体は、上述の制御配列、及び本発明のリポカリン突然変異タンパク質をコード化する核酸配列とは別に、発現用に用いられる宿主細胞と種から得られる互換性のある複製及び制御配列と、形質転換又は形質移入された細胞上に選択可能な表現型を与える選択マーカーとを含みうる。多数の好適なクローニングベクターは当該技術分野で周知であり、商業上利用可能である。

30

【0088】

本発明のリポカリン突然変異タンパク質をコード化するDNA分子、特にこのようなリポカリン突然変異タンパク質を含むクローニングベクターは、遺伝子を発現可能な宿主細胞に形質転換されうる。形質転換は標準的な技術を用いて行われ得る(Sambrook, J. et al. (1989)、上記を参照)。

40

【0089】

従って、本発明は本明細書中に記載のように、核酸分子を含む宿主細胞に関する。

【0090】

形質転換された宿主細胞は本発明の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現に好適な条件下で培養される。好適な宿主細胞は、大腸菌(E. coli)又は枯草菌のような原核細胞か、又はサッカロマイセスセレビシエ、ピキアパストリス、SF9若しくはHigh5昆虫細胞、哺乳類の不死化細胞株(例えば、HeLa細胞若しくはCHO細胞)、又は哺乳類の初代細胞のような真核細胞にできる。

【0091】

本発明はさらに、本発明の突然変異タンパク質の産生方法に関し、突然変異タンパク質

50

、突然変異タンパク質のフラグメント、又は突然変異タンパク質と別のポリペプチドとの融合タンパク質は、遺伝子工学的方法によって、突然変異タンパク質をコードする核酸から産生される。本方法は生体内で行うことができ、突然変異タンパク質は例えば細菌性又は真核の宿主生物で産生し、次いでこの宿主生物又はその培養物から分離できる。生体外、例えば生体外の翻訳系の使用によって、タンパク質を産生することはさらに可能である。

【0092】

生体内で突然変異タンパク質を産生する場合、本発明の突然変異タンパク質をコード化する核酸は、(上に既に概説したように)組換えDNA技術によって、好適な細菌性又は真核の宿主生物に導入される。この目的のために、確立した標準的な方法を用いて(Sambrook, J. et al. (1989)、上記を参照)、宿主細胞は、本発明の突然変異タンパク質をコード化する核酸分子を含むクローニングベクターで最初に形質転換される。宿主細胞は次いで、複数の条件下で培養され、異種DNAの発現、ひいては対応するポリペプチドの合成を可能にする。その後、ポリペプチドは細胞から、又は培養培地のいずれかから回収される。

10

【0093】

一実施形態において、本発明は、本発明の突然変異タンパク質を生成する方法に関し、その生成方法は、

(a) ヒトリポカリン2をコードする核酸分子に、Lcn2の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置96、100、及び106に対応する配列位置のうちのいずれかの少なくとも1つをコードするヌクレオチドトリプレットで、突然変異誘発を受けさせることによって、1つ又はそれ以上の突然変異タンパク質核酸分子を生じるステップを含む。

20

【0094】

上記の方法はさらに、

(b) (a)で得られた1つ以上の突然変異タンパク質核酸分子を適切な発現系で発現させるステップ、及び、

(c) 所定の標的に対して検出可能な結合親和性を有する1つ又はそれ以上の突然変異タンパク質を、選択及び/又は単離によって濃縮するステップ、を含んでもよい。

【0095】

「突然変異誘発」という用語は本明細書において用いられる場合、Lcn2(hNGAL、SWISS-PROTデータバンク受入番号P80188)の特定の配列位置に天然に存在するアミノ酸が、それぞれの天然のポリペプチド配列においてこの特異的な位置に存在しない少なくとも1つのアミノ酸によって置換され得るように、実験条件が選択されることを意味する。「突然変異誘発」という用語はまた、1以上のアミノ酸の欠失又は挿入による配列セグメントの長さの(更なる)改変を含む。従って、例えば、選択された配列位置の1つのアミノ酸が一続きの3つのランダム突然変異によって置換され、野生型タンパク質のそれぞれのセグメントの長さと比較して2アミノ酸残基の挿入を生じるとは、本発明の範囲内である。このような挿入又は欠失は、本発明において突然変異誘発の対象となり得る任意のペプチドセグメントにおいて、互いに独立に導入されうる。本発明の1つの例示的な実施形態では、いくつかの突然変異の挿入は、選択されたりポカリン骨格のループABに導入される(それぞれ、実施例2及び28参照)。「ランダム突然変異誘発」という用語は、所定の単一アミノ酸(突然変異)は特定の配列位置に存在しないが、少なくとも2のアミノ酸が、突然変異誘発の際に、既定の配列位置にある確率で取り込まれうることを意味する。

30

40

【0096】

ヒトリポカリン2は、本発明で選択されるペプチドセグメントの突然変異誘発のための開始点として用いられる。列挙されたアミノ酸位置の突然変異誘発について、当該技術分野の当業者は自由裁量で、部位特異的突然変異誘発のための様々に確立された標準的な方法を有する(Sambrook, J. et al. (1989)、上記を参照)。通常用いられる技術は、合成オリゴヌクレオチドの混合物を用いた、PCR(ポリメラーゼ連鎖

50

反応)による突然変異の導入であり、所望の配列位置に変性した塩基組成物を有する。例えば、コドンNNK又はNNS(ここで、N=アデニン、グアニン、又はシトシン、又はチミン; K=グアニン又はチミン; S=アデニン又はシトシン)の使用は、20の総てのアミノ酸に加え、終止コドンであるアンバーの取り込みを、突然変異誘発中に可能にするが、一方、コドンVVSはアミノ酸Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Valがポリペプチド配列の選択された位置に取り込まれるのを排除するために、取り込まれるアミノ酸の最大数を12に限定し、例えば、コドンNMS(ここで、M=アデニン又はシトシン)の使用は、アミノ酸Arg、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Valが選択された配列位置に取り込まれるのを排除するために、選択された配列位置でのアミノ酸の最大数を11に限定する。この点において、セレノシステイン又はピロールリジンのような(天然に存在する通常の20のアミノ酸以外の)アミノ酸用のコドンはさらに、突然変異タンパク質の核酸に取り込んでよいことは留意すべきである。さらに、Wang, L.ら(2001) Science 292, 498-500、又はWang, L.及びSchultz, P.G.(2002) Chem. Comm. 1, 1-11に記載されるように、他の特異的なアミノ酸、例えば、o-メチル-L-チロシン又はp-アミノフェニルアラニンを挿入するために、終止コドンとして通常認識される、UAGのような「人工的な(artificial)」コドンを用いることは可能である。

10

【0097】

例えば、イノシン、8-オキソ-2'-デオキシグアノシン、又は6(2-デオキシ-D-リボフラノシル)-3,4-ジヒドロ-8H-ピリミド(pyrimido)-1,2-オキサジン-7-オン(Zaccolo et al.(1996) J. Mol. Biol. 255, 589-603)のような、還元型の塩基対特異性を有するヌクレオチド構成要素の使用は、選択された配列セグメントへの突然変異の導入のための、他の選択肢である。

20

【0098】

更なる可能性はいわゆる三塩基組での突然変異誘発(triplet-mutagenesis)である。この方法は、別個のヌクレオチドの三塩基組の混合物を用いており、その各々が1のアミノ酸について、コード配列への取り込みのためにコードされる(Virnekas B, Ge L, Pluckthun A, Schneider KC, Wellnhofer G, Moroney SE. 1994 Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. Nucleic Acids Res 22, 5600-5607)。

30

【0099】

各ポリペプチドの選択された領域に突然変異を導入するための1の可能なストラテジは、4のオリゴヌクレオチドの使用に基づいており、その各々は、変異導入すべき対応する配列セグメントのうちの一つから部分的に得られる。これらのオリゴヌクレオチドを合成する場合、当該技術分野の当業者は、総ての天然アミノ酸をコード化するコドンがランダムに生じるように、変異導入すべきアミノ酸位置に対応する、ヌクレオチドの三塩基組の合成用の核酸構成要素の混合物を用いることができ、最終的にはリボカリンのペプチドライブラリを産生する。例えば、第1のオリゴヌクレオチドはその配列中において、突然変異した位置から離れ、ペプチドセグメントがリボカリンのポリペプチドの最もN末端の位置で変異導入される、コーディング鎖に対応する。従って、第2のオリゴヌクレオチドは、ポリペプチド配列に続く第2の配列セグメント用の非コーディング鎖に対応する。第3のオリゴヌクレオチドはさらに、対応する第3の配列セグメント用のコーディング鎖に対応する。最後に第4のオリゴヌクレオチドは、第4の配列セグメント用の非コーディング鎖に対応する。ポリマーゼ連鎖反応は、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの各々で実行でき、別個に必要な応じて、第1及び第2のオリゴヌクレオチドの各々で実行してもよい。

40

50

【0100】

これらの反応の双方の増幅産物は、第1ないし第4の配列セグメントの配列を含む単一核酸に、様々な所定の方法によって結合でき、突然変異は選択された位置で導入されていた。このため、産物の双方は、例えば隣接するオリゴヌクレオチド、並びに1又はそれ以上のメディエータの核酸分子を用いて、新しいポリメラーゼ連鎖反応に供することができ、第2及び第3の配列セグメント間の配列を提供する。突然変異誘発に用いられるオリゴヌクレオチドの配列内の数及び配列の選択において、当該技術分野の当業者は自由裁量で、数多くの選択肢を有する。

【0101】

上記に規定された核酸分子は、リボカリンのポリペプチドをコード化する、欠損した核酸の5' - 及び3' - 配列及び/又はベクターでの核酸連結によって結合でき、周知の宿主生物中でクローン化できる。多数の確立した手順が核酸連結及びクローン化用に利用可能である(Sambrook, J. et al. (1989) 上記参照)。例えば、クローニングベクターの配列中にさらに存在する制限エンドヌクレアーゼの認識配列は、合成オリゴヌクレオチドの配列で操作されうる。従って、各々のPCR産物の増幅及び酵素切断後に、得られたフラグメントは対応する認識配列を用いて容易にクローン化されうる。

10

【0102】

突然変異誘発用に選択されたタンパク質のためにコード化する遺伝子内の長い配列セグメントはさらに、例えば、誤差率の増加条件下でのポリメラーゼ連鎖反応の使用によって、化学的な突然変異誘発によって、又は細菌性の突然変異誘発株を用いることによって、周知の方法を介してランダムな突然変異誘発に供されうる。このような方法はさらに、リボカリン突然変異タンパク質の標的の親和性又は特異性の更なる最適化のために用いられうる。実験的な突然変異誘発のセグメント外部に場合により生じる突然変異は多くの場合許容され、例えばリボカリン突然変異タンパク質の折り畳みの効率又は折り畳みの安定性の改善に貢献する場合、利点にさえなりうる。

20

【0103】

本発明の一実施形態によると、上記の方法は、少なくとも上記に示されるヒトリボカリン2の配列位置のいずれかをコードする2又は3のヌクレオチドトリプレットで、突然変異誘発を受けさせることを含む。

【0104】

更なる1つの実施形態において、その方法はさらに、hNGALの直鎖状ポリペプチド配列における配列位置33、36、40、41、4243、44、46、47、48、49、50、51、5254、55、59、65、68、70、7273、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136、及び138に対応する配列位置のいずれかをコードする少なくとも1つのヌクレオチドトリプレットで、核酸分子に突然変異誘発を受けさせることを含む。

30

【0105】

更なる1つの実施形態において、その方法は、ヒトリボカリン2の直鎖状ポリペプチド配列における配列位置33、36、40、41、4243、44、46、47、48、49、50、51、5254、55、59、65、68、70、7273、75、77、78、79、80、81、86、87、98、96、99、100、103、106、107、110、111、125、127、132、134、136、及び138に対応する配列位置の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20をコードするヌクレオチドトリプレットで、核酸分子に突然変異誘発を受けさせることを含む。

40

【0106】

本発明の方法によると、突然変異タンパク質はhNGALをコード化する核酸から得られる。このような核酸は突然変異誘発に供されて、組換えDNA技術によって、好適な細菌性又は真核性の宿主生物に導入される。ヒトリボカリン2の核酸ライブラリを得ること

50

は、抗体様の特性を有するリボカリン突然変異タンパク質、すなわち、所定の標的に対する親和性を有する突然変異タンパク質を産生するのに好適な、当該技術分野の当業者に周知の任意の技術を用いて行われることができる。このような組合せ型の方法の実施例は例えば、開示内容全体が本明細書中に引用によって取り込まれる、国際公開第99/16873号、国際公開第00/75308号、国際公開第03/029471号、国際公開第03/029462号、国際公開第03/029463号、国際公開第2005/019254号、国際公開第2005/019255号、国際公開第2005/019256号、又は国際公開第2006/56464号に詳細に記載されている。これらの特許出願の各々の内容は参照によりその全体において本明細書に組み込まれている。適切な宿主中で突然変異誘発に供された核酸配列の発現後、複数の各リボカリン突然変異タンパク質用の遺伝情報を保有するクローンは、所定の標的を結合し、得られたライブラリから選択されることができる。ファージディスプレイ (Kay, B. K. et al. (1996) 上記を参照; Lowman, H. B. (1997) 上記を参照; 又は Rodi, D. J. 及び Makowski, L. (1999) 上記参照; に概説)、コロニースクリーニング (Pini, A. et al. (2002) Comb. Chem. High Throughput Screen. 5, 503-510; に概説)、リボソームディスプレイ (Amstutz, P. et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12, 400-405; に概説)、又は Wilson, D. S. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98, 3750-3755; に報告されるような mRNA ディスプレイ、又は、開示内容全体が本明細書中に引用によって取り込まれる、国際公開第99/16873号、国際公開第00/75308号、国際公開第03/029471号、国際公開第03/029462号、国際公開第03/029463号、国際公開第2005/019254号、国際公開第2005/019255号、国際公開第2005/019256号、又は国際公開第2006/56464号に記載される公知の技術は、これらのクローンの選択用に用いられることができる。

【0107】

この開示によると、ステップ(c)はさらに、上記の方法の別の実施形態において、
 (i) 所定の標的/リガンドとして、免疫学的ハプテンの特性が示される遊離型又はコンジュゲート型の化学化合物、ペプチド、タンパク質、又は、例えば多糖、核酸分子(例えば、DNA又はRNA)、若しくは全ウイルス粒子やウイロイド等の他の高分子からなる群より選択される化合物を提供するステップと、
 (ii) 上記標的/リガンドと、当該標的/リガンドに対し結合親和性を有する突然変異タンパク質との間で複合体の形成を可能にするように、複数の突然変異タンパク質を上記リガンドと接触させるステップと、
 (iii) 結合親和性を有さない、又は実質的に有さない突然変異タンパク質を除去するステップと、
 を備える。

【0108】

本発明の特異的な実施形態において、標的/リガンドは非天然標的を含み、その非天然標的はペプチド、タンパク質、タンパク質のフラグメント若しくはドメイン、又は有機小分子含むが、これに限定されるものではない。一実施形態において、その有機小分子は、免疫学的ハプテンの特性が示される化合物である。更なる実施形態において、そのペプチドは、A₄₀ペプチドやA₄₂ペプチドのようなアミロイドベータペプチドである。また、更なる実施形態において、その非天然標的は、EB-ドメインやEB-ドメインのフラグメントのような、フィブロネクチン又はそのドメインである。

【0109】

本明細書中で用いられるような競合条件は、突然変異タンパク質及びヒトリボカリン2の所定の非天然型リガンド(標的)が更なるリガンドの存在時に接触する少なくとも1のステップを、突然変異タンパク質の選択が含むことを意味し、それは突然変異タンパク質の標的への結合と競合する。この更なるリガンドは、標的の生理学的リガンド、標的

そのものの過剰、又は本発明の突然変異タンパク質を認識するエピトープに、重複するエピトープを少なくとも結合し、ひいては突然変異タンパク質の標的結合と干渉する標的のその他の非生理学的リガンドであってもよい。また、この更なるリガンドは、アロステリック効果により、突然変異タンパク質の標的への結合部位と異なるエピトープを複合体化することによって、突然変異タンパク質の結合と競合する。

【0110】

溶原性のM13ファージを用いた、ファージディスプレイ技術の、ある実施形態(Kay, B, K. et al. (1996) 上記を参照; Lowman, H. B. et al. (1997) 上記を参照; 又は、Rodi, D. J. 及びMakowski, L. (1999) 上記を参照; に概説)は、本発明で用いられうる選択方法のある実施例として提供される。本発明の突然変異タンパク質の選択に用いられうるファージディスプレイ技術の別の実施形態は、Brodersによって記載のようなハイパーファージ(hyperファージ)のファージ技術である(Brodersら(2003) "Hyperファージ. Improving antibody presentation inファージdisplay." Methods Mol. Biol, 205: 295-302)。f1のような他の溶原性ファージ、又はT7のような溶菌性ファージは同様に用いてもよい。例示的な選択方法について、N末端でシグナル配列、好適にはOmpAシグナル配列を有し、かつ、C末端でファージカプシドに組み込まれうる、ファージM13のカプシドタンパク質pIII、又はそのフラグメントを有するシグナル配列融合タンパク質として、変異導入されるリポカリンの核酸配列の発現を可能にするM13ファージミドが産生される。野生型の配列のアミノ酸217ないし406を含むファージカプシドタンパク質のC末端のフラグメントpIIIは、融合タンパク質を産生するのに好適に用いられる。一実施形態において特に好適であるのは、pIIIのC末端のフラグメントであり、位置201でのシステイン残基は欠損しているか、又は別のアミノ酸に置換される。

10

20

【0111】

従って、本発明の方法の更なる実施形態は、ヒトリポカリン2の複数の突然変異タンパク質をコード化する核酸を動作可能に融合するステップと、所定のリガンドの結合用の少なくとも1の突然変異タンパク質を選択するように、M13ファミリの線維状ファージのコートタンパク質pIIIか、又はこのコートタンパク質のフラグメントをコード化する遺伝子で、3'末端での突然変異誘発を生じさせるステップとを含む。

30

【0112】

融合タンパク質は親和性標識のような更なる成分を含んでもよく、融合タンパク質又はその一部分の固定化、検出、及び/又は精製を可能にする。さらに、終止コドンは、リポカリン又はその突然変異タンパク質をコード化する配列領域と、ファージカプシド遺伝子又はそのフラグメントとの間に配置でき、終止コドン、好適にはアンバーの終止コドンは、好適なサプレッサー株における翻訳時に、アミノ酸に少なくとも部分的に翻訳される。

【0113】

例えば、本明細書に記載のように、pTlc27とも呼ばれるファスミドベクターpTLC27は、ヒトリポカリン2突然変異タンパク質をコード化するファージミドライブラリの調製に用いられうる。hNGAL突然変異タンパク質をコード化する本発明の核酸分子は、2のBstXI制限部位を用いてベクターに挿入される。核酸連結後、大腸菌のXL1-Blueのような好適な宿主株は、多数の別個のクローンを産生するために、得られた核酸混合物で形質転換される。各ベクターは必要に応じて、ハイパーファージミド(hyperファージミド)ライブラリの調製のために産生できる。

40

【0114】

得られたライブラリはその後、機能的なファージミドを産生するために、液体培養中に適切なM13ヘルパーファージ又はハイパーファージに重感染する。組換え型ファージミドは、コートタンパク質pIII又はそのフラグメントを有する融合物としてその表面上にリポカリン突然変異タンパク質を表示する一方、融合タンパク質のN末端のシグナル配列は通常切断される。他方、ヘルパーファージによって供給される天然型カプシドタンバ

50

ク質 p I I I の 1 又はそれ以上のコピーをさらに有し、従ってレシピエント、一般的には F - 又は F ' - プラスミドを保有する菌種を感染させることができる。ハイパーファージディスプレイの場合において、ハイパーファージミドは感染性のコートタンパク質 p I I I を有するが、天然型カプシドタンパク質を有しない融合物として、その表面にリポカリン突然変異タンパク質を表示する。ヘルパーファージ又はハイパーファージの感染中又はその後、リポカリン突然変異タンパク質とカプシドタンパク質との間の融合タンパク質の遺伝子発現が、例えばアンヒドロテトラサイクリンの添加によって誘発できる。誘発条件は、実質的に一部分の得られたファージミドが、その表面上に少なくとも 1 のリポカリン突然変異タンパク質を表示するように選択される。ハイパーファージディスプレイの場合においては、誘発条件は、リポカリン突然変異タンパク質とカプシドタンパク質 p I I I とからなる、3 ないし 5 の融合タンパク質を保有するハイパーファージミドの集団を生じさせる。様々な方法がポリエチレングリコールでの沈殿のようなファージミドを分離することで知られる。分離は一般的に、6 時間 ~ 8 時間のインキュベーション期間後に生じる。

10

【 0 1 1 5 】

分離されたファスミドはその後、所望の標的とのインキュベーションによって選択に供することができ、標的はそれらのコート中の融合タンパク質として、所望の結合活性を有する突然変異タンパク質を保有する、そのファージミドの少なくとも一時的な固定化を可能にする形態で示される。当該技術分野の当業者に周知の様々な実施形態の間で、標的は例えば、血清アルブミンのような担体タンパク質と接合され、この担体タンパク質を介してタンパク質結合面、例えばポリスチレンに結合されうる。E L I S A 技術に好適なマイクロタイタープレート、又はいわゆる「イムノスティック」は好適には、このような標的の固定化のために用いられうる。また、ビオチンのような他の結合基での標的の接合が用いられうる。標的はその後、例えばマイクロタイタープレート、又はストレプトアビジン、ニュートラアビジン、若しくはアビジンでコーティングされた常磁性粒子のような、この群を選択的に結合する表面に固定化できる。標的が免疫グロブリンの F c 部分に融合される場合、固定化はさらに、例えばマイクロタイタープレート又は常磁性粒子のような、プロテイン A 又はプロテイン G でコーティングされた表面で得られうる。

20

【 0 1 1 6 】

表面にある非特異的なファージミド結合部位は、E L I S A 法で知られるようにブロッキング溶液で飽和できる。ファージミドは次いで、一般的には、生理学的バッファーの存在下で表面に固定化される標的と接触する。結合されないファージミドは複数の洗浄によって除去される。表面上に残ったファージミド粒子はその後溶出される。溶出では、いくつかの方法が可能である。例えば、ファージミドはプロテアーゼの添加によって、又は酸、塩基、界面活性剤、若しくはカオトロピック塩の存在下で、又は適度な変性条件下で溶出できる。好適な方法は、p H 2 . 2 のバッファーを用いた溶出であり、溶出物はその後中和される。また、遊離型の標的の溶液は、ファージミドへの結合用に固定化された標的と競合するように添加でき、標的特異性のファージミドは、対象の標的に特異的に結合する免疫グロブリン又は天然型リガンドのタンパク質との競合によって溶出できる。

30

【 0 1 1 7 】

その後、大腸菌細胞は溶出されたファージミドに感染する。また、核酸は溶出されたファージミドから抽出でき、別の方法においては細胞の配列解析、増幅、又は形質転換のために用いられうる。この方法で得られた大腸菌クローンから、新しいファージミド又はハイパーファージミドが上述の方法によって、M 1 3 ヘルパーファージ又はハイパーファージでの重感染によってさらに産生され、この方法で増幅されたファージミドは再度、固定化された標的の選択に供される。複数の選択サイクルは多くの場合、十分に濃縮された形態での本発明の突然変異タンパク質で、ファージミドを得るために必要である。選択サイクルの数は、その後の機能解析において、少なくとも 0 . 1 % の調査されたクローンが所定の標的に対する検出可能な親和性を有する突然変異タンパク質を産生するように、好適に選択される。用いられるライブラリの大きさ、すなわち、複雑度に依存して、2 ないし

40

50

8のサイクルが一般的にはこのために要求される。

【0118】

選択された突然変異タンパク質の機能解析では、大腸菌株は、選択サイクルから得られるファージミドによって感染され、対応する二本鎖のファスミドDNAが分離される。このファスミドDNAから、又はさらにファージミドから抽出される単鎖DNAから、本発明の選択された突然変異タンパク質の核酸配列は、当該技術分野に周知の方法によって決定でき、アミノ酸配列はそれから推定されうる。変異導入された領域、又はhNGAL突然変異タンパク質全体の配列は、別の発現ベクターでサブクローン化され、好適な宿主生物で発現されうる。例えば、現在pTlc26とも呼ばれるpTlc26は、大腸菌TG1のような大腸菌株中の発現のために用いられうる。このように産生されたヒトリポカリン2突然変異タンパク質は、様々な生化学的方法によって調製されうる。例えばpTlc26で産生されたhNGAL突然変異タンパク質は、そのC末端で親和性ペプチドのStreptag(登録商標)II(Schmidt et al. 上記参照)を保有し、従ってストレプトアビジン親和性クロマトグラフィによって好適に調製されることができる。

10

【0119】

その選択はさらに、他の方法によって行われうる。多くの対応する実施形態が当該技術分野の当業者に周知であるか、又は文献中に記載されている。さらに、方法の組合せが適用されうる。例えば、「ファージディスプレイ」によって選択されるか、又は少なくとも濃縮されるクローンはさらに、「コロニースクリーニング」に供されうる。この手順は、標的に対する検出可能な結合親和性を有するヒトリポカリン2突然変異タンパク質の産生に対して、直接的に分離されうるような利点を有する。

20

【0120】

「ファージディスプレイ」技術又は「コロニースクリーニング」法における宿主生物としての大腸菌の使用に加えて、他の菌種、酵母、又はさらに昆虫細胞又は哺乳類細胞はこの目的に用いられうる。上述のようなランダムライブラリからの、ヒトリポカリン2突然変異タンパク質の選択に加えて、突然変異誘発の限定を含む発展的方法はさらに、標的に対する親和性又は特異性について、標的に対する結合活性を既に有する突然変異タンパク質を最適化するために適用できる。

【0121】

所定の標的に対して親和性を有する突然変異タンパク質は一度選択されると、さらに高い親和性の変異体、又は、高い熱安定性、血清安定性の改善、熱力学的安定性、溶解性の改善、単量体の挙動の改善、熱変性、化学変性、タンパク質分解、若しくは界面活性剤に対する耐性の改善等のような改善された特性を有する変異体を次に選択するために、このような突然変異タンパク質を別の突然変異誘発に供することがさらに可能である。この更なる突然変異誘発は、高親和性を目的とする場合においては生体内での「親和性成熟(affinity maturation)」とみなしうるが、合理的設計に基づく部位特異的な突然変異、又はランダムな突然変異によって得られる。より高い親和性又は改善された特性を得るための別の可能なアプローチは、エラープロンプCRの使用であり、リポカリン突然変異タンパク質の配列位置の選択した範囲にわたる点突然変異が生じる。エラープロンプCRはZaccolòら(1996) J. Mol. Biol. 255, 589-603:で記載されるもののような任意の周知のプロトコルによって行われうる。この目的に好適な他のランダムな突然変異誘発方法は、Murakami, H et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20, 76-81:で記載のようなランダムな挿入/欠失(RID)か、又はBittker, J. Aら(2002) Nat. Biotechnol. 20, 1024-1029:で記載のような非相同性のランダムな組換えを含む。必要に応じて、親和性成熟はさらに、国際公開第00/75308号、又はSchlehuber, S. et al. (2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120:に記載の手順によって行うことができ、ジゴキシゲニンに対し高親和性を有するピリン結合型のタンパク質の突然変異タンパク質が得られた。親和性を改善する更なるアプローチは、位置的な飽和突然変異誘発を行うことである。このアプロー

30

40

50

チにおいて、「小さな」核酸ライブラリは、アミノ酸交換/突然変異が任意の4のループセグメント内の単一位置にのみ導入されて産生される。これらのライブラリはその後、更なるパニングのラウンドなしに、選択ステップ(親和性スクリーニング)に直接的に供される。このアプローチによって、所望の標的の結合の改善に寄与する残基の同定が可能となり、結合に重要な「ホットスポット(hot spot)」の同定が可能となる。

【0122】

一実施形態において、突然変異タンパク質を改良するための上記方法は、さらに、ヒトリポカリン2の野生型配列における配列位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146、又は158に対応する配列位置のいずれかの少なくとも1つでCys残基を導入すること、及びhNGALの野生型配列における配列位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146、又は158に対応する配列位置のいずれかの少なくとも1つで導入されたCys残基のチオール基によって、上記突然変異タンパク質の血清半減期を改良できる部分を接合することを含む。上記突然変異タンパク質の血清半減期を改良できる部分は、ポリアルキレングリコール分子、及びヒドロキシエチルデンプンからなる群より選ばれてもよい。

10

【0123】

更なる実施形態においては、本発明はヒトリポカリン2の所定の非天然リガンド対して検出可能な結合親和性を有するヒトリポカリン2の突然変異タンパク質に関し、上に詳述した本発明の方法によって取得可能であるか、又は取得される。

【0124】

いくつかの本発明のヒトリポカリン2突然変異タンパク質においては、Cys76とCys175との間に天然に存在するジスルフィド結合が除去される。従って、このような突然変異タンパク質(又は分子内ジスルフィド結合を含まないその他のヒトリポカリン2突然変異タンパク質)は、還元した酸化還元環境を有する細胞区画中、例えばグラム陰性菌の細胞質中に産生できる。

20

【0125】

本発明のリポカリン突然変異タンパク質が分子内ジスルフィド結合を含む場合、適切なシグナル配列を用いて、酸化した酸化還元環境を有する細胞区画に新生ポリペプチドを向けることが好ましい。このような酸化環境は、グラム陽性菌の細胞外環境において、又は真核細胞の小胞体の内腔において、大腸菌のようなグラム陰性菌のペリプラズムによって提供してもよく、通常、構造的なジスルフィド結合の形成を支持する。

30

【0126】

しかしながら、宿主細胞、好適には大腸菌の細胞質ゾルにおいて本発明の突然変異タンパク質を産生することはさらに可能である。この場合においては、ポリペプチドは溶解可能及び折り畳まれた状態で直接的に得られるか、又は封入体の形態で回収して、その後生体外で還元するかのいずれかにできる。更なる選択肢は酸化した細胞内環境を有する特異的な宿主株の使用であり、このように細胞質ゾル中のジスルフィド結合の形成を可能にする(Venturi et al. (2002) J. Mol. Biol. 315, 1-8.)。

【0127】

しかしながら、本発明の突然変異タンパク質は、遺伝子工学の使用のみによって産生又は生成されとは限らない。逆に、リポカリン突然変異タンパク質はさらに、Merrifieldの固相ポリペプチド合成のような化学合成によって、又は生体外での転写及び翻訳によって得ることができる。例えば、有望な突然変異は分子モデリングを用いて同定され、その後、生体外で所望の(設計された)ポリペプチドを合成し、所定の標的に対する結合活性を検討することが可能である。タンパク質の固相及び/又は溶液相合成のための方法は当該技術分野に公知である(例えば、Lloyd-Williams, P. et al. (1997) Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins. CRC Press, Boca Raton; Fields, G. B. 及び Colowick, S. P. (1997

40

50

) Solid - Phase Peptide Synthesis . Academic Press , San Diego ; 又は Bruckdorfer , T . et al . (2004) Curr . Pharm . Biotechnol . 5 , 29 - 43 に概説) 。

【 0 1 2 8 】

もう 1 つの実施形態において、本発明の突然変異タンパク質は、当該技術分野の当業者に周知の確立した方法を用いて、生体外での転写 / 翻訳によって産生してもよい。

【 0 1 2 9 】

本発明は、さらに請求項に示される本発明の突然変異タンパク質の少なくとも 1 つ又はその融合タンパク質若しくはその接合体と、選択的に、薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物に関する。

【 0 1 3 0 】

1 2 9

本発明によるリポカリン突然変異タンパク質は、タンパク薬剤で治療上有効である任意の非経口的又は非経口的ではない（腸内）経路を介して投与できる。非経口的な適用方法は例えば、注射液、輸液、又はチンキ剤の形態のような皮内、皮下、筋肉内、又は静脈内の注射及び注入技術と、煙霧混合物、噴霧、又は粉末の形態でのような煙霧導入及び吸入とを含む。非経口ではない送達モードは、例えば経口的に、丸剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、若しくは懸濁剤のような形態、又は直腸的に坐剤のような形態である。本発明の突然変異タンパク質は、従来の非毒性で薬学的に許容可能な、所望されるような賦形剤又は担体、添加剤、及び媒体を含む剤形で全身的又は局所的に投与できる。

【 0 1 3 1 】

本発明の一実施形態においては、医薬品は哺乳類、特にヒトに非経口的に投与される。対応する投与方法は限定しないが、例えば、注射液、輸液、又はチンキ剤の形態のような皮内、皮下、筋肉内、又は静脈内の注射及び注入技術と、煙霧混合物、噴霧、又は粉末の形態のような煙霧導入及び吸入とを含む。静脈内及び皮下の注入及び / 又は注射の組合せは、比較的短い血清半減期を有する化合物の場合に最も好都合になりうる。医薬組成物は水溶液、水中油型乳剤、又は油中水型乳剤であってもよい。

【 0 1 3 2 】

1 3 1

1 1 (4) : 3 1 2 - 3 1 6 ; に記載の、例えばイオン導入、超音波導入、又はマイクロニードル式の経皮送達技術はさらに、本明細書中に記載の突然変異タンパク質の経皮送達に用いられうことは留意すべきである。非経口ではない送達モードは例えば経口的に、丸剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、若しくは懸濁剤のような形態の経口投与、又は坐剤のような形態の直腸投与である。本発明の突然変異タンパク質は、従来の非毒性で薬学的に許容可能な、種々の賦形剤又は担体、添加剤、及び媒体を含む剤形で全身的又は局所的に投与できる。

【 0 1 3 3 】

1 3 2

適用される突然変異タンパク質の用量は、所望の予防効果又は治療反応を得るために、の突然変異タンパク質とリガンドとの間の複合体の半減期とに依存する。さらに、最適な用量は突然変異タンパク質又はその融合タンパク質若しくはその接合体の体内分布と、投与モードと、治療中の疾患 / 障害の重症度と、患者の医学的状态とに依存する。例えば、局所塗布用に軟膏で用いられる場合、高濃度のヒトリポカリン 2 突然変異タンパク質が用いられうる。しかしながら所望される場合、突然変異タンパク質はさらに、例えば、Poly Active (登録商標) 又は OctoDEX (登録商標) (cf. Bos et al. , Business Briefing : Pharmatech 2003 : 1 - 6) のような、リポソーム分散液又はヒドロゲルを基剤とした高分子マイクロスフェアなどの徐放性製剤で提供してもよい。

【 0 1 3 4 】

従って、本発明の突然変異タンパク質は、薬学的に許容可能な成分ならびに確立された

10

20

30

40

50

調整方法を用いた組成物に調剤できる (Gennaro, A. L. 及び Gennaro, A. R. (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。医薬組成物を調製するために、薬学的に不活性な無機又は有機賦形剤が用いられうる。例えば、丸剤、粉末、ゼラチンカプセル剤、又は坐剤を調製するために、例えばラクトース、滑石、ステアリン酸及びその塩、脂肪、ろう、固体又は液体ポリオール、天然及び硬化油は用いることができる。使用前に溶剤又は煙霧混合物に再構成するための溶剤、懸濁剤、乳剤、煙霧混合物、又は粉末の産生に好適な賦形剤は、水、アルコール、グリセロール、及びその好適な混合物、ならびに植物油を含む。

10

【0135】

医薬組成物はさらに、例えば充填剤、結合剤、湿潤剤、流動促進剤、安定剤、保存剤、乳化剤のような添加剤と、更なる溶剤若しくは可溶化剤、又は畜性効果を得るための薬剤とを含んでもよい。後者は、リポソーム及びマイクロカプセルのような緩効系若しくは徐放系又は標的送達系に取り込まれてもよいものである。

【0136】

製剤は細菌保持性フィルタを通した濾過を含む多数の手段によって、又は、使用の直前に滅菌水若しくは他の滅菌手段で溶解又は分散できる無菌の固体組成物の形態で、滅菌剤を組み込むことによって滅菌できる。

【0137】

本発明の突然変異タンパク質、又はその融合タンパク質若しくは接合体は、多くの用途に用いられうる。一般的に、このような突然変異タンパク質は、Fc部分の糖鎖付加に特異的に依拠するものを除いて、抗体が用いられる総ての用途で用いられうる。

20

【0138】

従って、本発明の別の態様においては、本発明のヒトリポカリン2の突然変異タンパク質は、ヒトリポカリン2の所定の非天然リガンドの結合及び/又は検出に用いられる。このような使用は、好適な条件下で所定のリガンドを有するとされるサンプルと突然変異タンパク質を接触させて、これによって、突然変異タンパク質と所定のリガンドとの間の複合体の形成を可能にして、好適なシグナルによって複合体化された突然変異タンパク質を検出するステップを具えてもよい。

30

【0139】

検出可能なシグナルは、上に説明されるような標識によって、さらに結合、すなわち複合体形成そのものによる物理的特性の変化によって生じうる。一例は表面プラズモン共鳴であり、その値は、一方が金箔のような表面上に固定される結合相手の結合時に変更される。

【0140】

本明細書中に開示されるヒトリポカリン2の突然変異タンパク質はさらに、ヒトリポカリン2の所定の非天然リガンドの分離に用いられてもよい。このような使用は、好適な条件下で前記リガンドを含むとされるサンプルと突然変異タンパク質を接触させ、これによって、突然変異タンパク質と所定のリガンドとの間で複合体の形成を可能にし、サンプルから突然変異タンパク質/リガンドの複合体を分離するステップを具えてもよい。

40

【0141】

本発明のヒトリポカリン2突然変異タンパク質はさらに、事前選択された部位を化合物が標的とするように用いてもよい。このような一実施形態においては、ヒトリポカリン2突然変異タンパク質は、生物又は組織中の事前選択された部位を薬学的に能動的な化合物が標的にするのに用いられ、

a) 突然変異タンパク質を前記化合物と接合するステップと、

b) 突然変異タンパク質/化合物の複合体を事前選択された部位に送達するステップと

、
を備える。

50

【0142】

このような目的のために、突然変異タンパク質は複合体形成を可能にするように所望の化合物と接触する。次いで、突然変異タンパク質と、対象の化合物とを含む複合体は事前選択された部位に送達される。これは、例えば、所望の標的に対して結合親和性を有する抗体、抗体フラグメント、又はリポカリン突然変異タンパク質若しくはリポカリン突然変異タンパク質のフラグメントのような、標的部分に突然変異タンパク質を接合することによって実現できる。

【0143】

この使用は限定しないが、薬剤で治療されることとなる、感染した身体部分、組織又は器官のような、生物における事前選択された部位に（選択的に）薬剤を送達するのに特に好適である。突然変異タンパク質と対象の化合物との間での複合体の形成の他に、突然変異タンパク質はさらに所定の化合物と反応させて、突然変異タンパク質と化合物との接合体を提供できる。上の複合体と同様に、このような接合体は化合物を事前選択された標的部位に送達するのに好適であってもよい。突然変異タンパク質と化合物とのこのような複合体はさらに、突然変異タンパク質と化合物とを相互に共有結合するリンカを含んでもよい。選択的に、このようなリンカは血流中で安定であるが、細胞内環境においては切断可能である。

10

【0144】

本明細書中で開示される突然変異タンパク質及びその誘導体は従って、抗体又はそのフラグメントと同様、多くの分野で用いられうる。担体に結合させる使用に加えて、所定の突然変異タンパク質の標的、又はこの標的の接合体若しくは融合タンパク質を固定化又は分離するのが可能であるため、突然変異タンパク質は酵素、抗体、放射性物質、又は生化学的活性若しくは規定される結合特性を有するその他の群で標識されるように用いられうる。そのようにすることによって、各々の標的、又はその接合体若しくは融合タンパク質は検出又は接触できる。例えば、本発明の突然変異タンパク質は確立した分析方法（例えば、ELISA又はウェスタンブロット）によって、又は顕微鏡若しくは免疫センサによって、化学的構造を検出するのに役立つ。ここで検出シグナルは、好適な突然変異タンパク質、接合体又は融合タンパク質の使用によって直接的に、又は抗体を介して結合された突然変異タンパク質の免疫化学的検出によって間接的に、のいずれかで産生できる。

20

【0145】

本発明の突然変異タンパク質について可能な多数の用途がさらに医学に存在する。生体外での診断及び薬剤送達における使用に加えて、本発明の変異ポリペプチドは、例えば組織特異型又は腫瘍特異型の細胞表面分子を結合して産生されることができ、このような突然変異タンパク質は、例えば接合形態で、又は融合タンパク質として、「腫瘍イメージング」に又は直接に癌治療に用いられてもよい。

30

【0146】

従って、本発明は、また本発明にかかるヒトリポカリン2突然変異タンパク質の、所定の非天然リガンド又は標的と複合体を形成するための使用を含む。

【0147】

更なる実施形態において、本発明はまた、本発明による突然変異タンパク質の、医薬組成物の製造への使用を含む。このようにして得られた医薬組成物は、アルツハイマー病のような神経変性疾患の治療に適用されてもよい。その医薬組成物は、また癌の治療、線維症の治療、又は炎症の治療に用いられることができる。その医薬組成物は、単剤療法又は併用療法として用いられてもよい。

40

【0148】

また、他の実施形態において、本発明は本発明による突然変異タンパク質が含有される診断又は分析キットを特徴とする。

【0149】

本発明の他の実施形態において、神経変性疾患、癌、線維症、又は炎症を患う対象者を治療するために、各々の本発明の突然変異タンパク質、又は本発明の突然変異タンパク質

50

が含有される医薬組成物を必要に応じて対象者投与することを含む方法に関する。

【0150】

治療を必要とする対象者はいくつかの例示のみを挙げると、ヒト、イヌ、マウス、ラット、ブタ、カニクイザルのようなサルなどの哺乳類であってもよい。

また、他の実施形態において、本発明は、対象者において生体内撮像を行うために、本発明の突然変異タンパク質又は本発明の突然変異タンパク質が含まれる医薬組成物を、上記対象者に投与することを含む方法を特徴とする。その対象者は、上記のように定義されてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0151】

本発明は以下の限定されない実施例及び添付の図面によってさらに例示される。

【図1】図1は、成熟Lcn2のアミノ酸配列における20のアミノ酸位置36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132、及び134（下線付き及び番号付き）の同時ランダム突然変異誘発のためのPCR組み立て法を示す。これらの20の位置は4つの配列サブセットに分かれる。各サブセットにおけるアミノ酸のランダム化のために、ヌクレオチドのNNK混合物が突然変異したコドンで採用されたオリゴデオキシヌクレオチドは合成された（配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4）。Nは全ての4つの塩基A、C、G、及びTの混合物を意味する一方、Kは2つの塩基G及びTの混合物を意味する。それ故に、このようなトリプレットは、全ての20の天然アミノ酸だけでなく、ファージミド生産及び遺伝子発現に用いられる*E. coli* supE - strains XL1-blue (Bullock et al., BioTechniques 5 (1987), 376-378) 又はTGI (Sambrook et al., Molecular クローニング. A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Press) においてグルタミンとして翻訳されるアンバー終止コドンTAGもコードした。4つの追加のオリゴデオキシヌクレオチド（配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8）は、また、集合反応に用いられる。その4つの追加のオリゴデオキシヌクレオチドは、非コード鎖（DNA二本鎖配列の3-5方向において記入される）に対応して上記のオリゴデオキシヌクレオチド同士の間ギャップをフィリングする固定のヌクレオチド配列を有する。過剰に添加してかつピオチングループを運ぶ2つの短い隣接オリゴデオキシヌクレオチド（配列番号：9及び配列番号：10）は、組立てられ、かつ完全に合成された遺伝子フラグメントのPCR増幅のためのプライマーとしての機能を果たす。その2つの隣接プライマーは、それぞれBstXI制限酵素認識部位（CCANNNNNNTGG）を包み、酵素消化物の上に互換性のないオーバーハングを生じさせた。制限酵素認識部位のこの特別配置は、合成遺伝子の特に効果的なライゲーション及びクローニングを可能にする。最初のLcn2配列に対してアミノ酸Gln28のHisへの置換は、第一のBstXI部位を導入することが必要である一方、第二のBstXI部位がLcn2のcDNAにおいて自然に発生した。さらに、不対残基Cys87は、遺伝子組立ての間にSerによって置換された。ワンポットPCRの後、得られた遺伝子フラグメントは、Lcn2構造遺伝子の欠落部分を提供するベクターに挿入した。この図面はまた、二本鎖DNAシーケンシングに役立つ2つのBstXI制限酵素認識部位によって挟まれたカセットの上流及び下流のそれぞれにおける2つの短いプライマー（配列番号：45及び配列番号：46）を示す。

【図2】図2は、合成Lcn2遺伝子（図1に示すように、中央のカセットのみを2つのBstXI制限酵素認識部位によって挟まれる）のライブラリにおけるヌクレオチド配列を示す。この遺伝子フラグメントは、Sloning BioTechnology GmbHによって製造された。図1に示すDNAライブラリと比べて、2つの相違点がある。第一は、いつでも*E. coli* 発現に最適化可能なコドンが非突然変異したアミノ酸位置にわたって用いられることである。第二は、Cysを除く異なるアミノ酸をそれぞれコードする19の異なるトリプレット（GAC、TTC、CTG、CAC、AAT、AGC、

10

20

30

40

50

A C C、G C A、A T G、C C T、G T T、T G G、G A G、C A A、A T C、G G A、C G T、G C A、T A C)の混合物は、図1に示すものと同じである20のランダム化位置で採用されることである。アミノ酸の番号付けはここでS l o n i n g B i o T e c h n o l o g y G m b Hに採用される内部方式に対応することで、G l y N O . 1は直接に上流のB s t X I制限酵素認識部位に従う第一のアミノ酸コドンとする。

【図3】図3は、E . c o l iにおいて発現された後の組み換え型A融合タンパク質T r x - A 28 (A)及びM B P - A 40 (B)のS E C溶出プロフィールを示す。合成型A 40と組み換え型A融合タンパク質両方の純度は、S D S - P A G E分析(C)によって評価される。両方の融合タンパク質は、E . c o l i J M 8 3の細胞質で発現された。F r e n c h P r e s s u r e C e l lで細胞を破壊された後、タンパク質はH i s 6-タグ親和性クロマトグラフィーによって精製された。その後、さらに、T r x - A 28の場合はS u p e r d e x 7 5 H R 1 0 / 3 0 c o l u m nに適用し、- A 40の場合はS u p e r d e x 2 0 0 H R 1 0 / 3 0 c o l u m nに適する。両方のタンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーにおいて主に単量体として溶出し、精製した後で本質に均質になる。A 40はK e c k F o u n d a t i o nから得られ、H F I Pで処理され、S p e e d V a cで蒸発し、最後に蒸留水に溶解された。15%ゲルはH F I P処理された後のA 40、T r x - A 28、並びにI M A C精製及びS E Cで処理された後のM B P - A 40のサンプルを示す。Mはゲルの左側に表示されたk D aで対応するバンドのサイズを有する分子量マーカーを示す。

【図4】図4は、L c n 2突然変異タンパク質H 1 - G 1、S 1 - A 4、及びU S 7 (A)のS E C溶出プロフィールのオーバーレイと、15% S D S - P A G E (B)によって精製されたタンパク質の分析とを示す。その3つのL c n 2突然変異タンパク質H 1 - G 1、S 1 - A 4、及びU S 7は、E . c o l i J M 8 3又はT G 1 - Fのペリプラズムにおいて発現し(ここに示すように)、且つS t r e p - t a g I I親和性クロマトグラフィーによって精製された。全ての3つの突然変異タンパク質は、主に単量体タンパク質としてS u p e r d e x 7 5 H R 1 0 / 3 0 c o l u m nから10ml~11mlの保持容量で溶出した。ピーク強度は所定の突然変異タンパク質の発現量によって異なる。(B)はS t r e p - t a g I I親和性精製及びS E Cで処理された、組み換え型野生型L c n 2 (lanes 1、5)及び突然変異タンパク質U S 7 (lanes 2、6)、H 1 - G 1 (lanes 3、7)、並びにS 1 - A 4 (lanes 4、8)の15% S D S - P A G E分析を示す。L a n e s 1 ~ 4は2-メルカプトエタノールで還元されたL c n 2突然変異タンパク質を示し、l a n e s 5 ~ 8は非還元条件におけるタンパク質を示す。Mはゲルの左側に表示されたk D aで対応するバンドのサイズを有する分子量マーカーを示す。

【図5】図5は、L c n 2突然変異タンパク質H 1 - G 1、S 1 - A 4、及びU S 7がキャプチャーE L I S A sにおいて異なるビオチニル化A標的との結合活性を示す。10g/mlのS t r e p M A B - I m m oはマイクロタイタープレートに固定され、S t r e p - t a g I Iによって1 μ M L c n 2突然変異タンパク質の獲得に用いられる。図A~図Cには、L c n 2突然変異タンパク質S 1 - A 4及びU S 7の、(A)ビオチニル化A 40、(B)ビオチニル化T r x A 28、及び(C)ビオチニル化 - A 40への結合が示される。その結合は、E x t r A v i d i n / A Pによる培養及び後続のp N P Pとの発色反応によって検出された。オポアルブミン(O v a)、チオレドキシン(T r x)、及びマルトース結合タンパク質(M B P)は陰性対照として用いられる。さらに、野生型(w t)リポカリンの結合は試験された。そのデータは一価結合モデルに適合される。図Dはターゲットとして、L c n 2 H 1 - G 1、ビオチニル化A 40、及びT r x - A 28で行われる同じE L I S Aセットアップを示す。A 40に対して決定されるK_D値は、S 1 - A 4の場合は2.7 nM、U S 7の場合は6.8 nM、及びH 1 - G 1の場合は16.2 nMであり、T r x - A 28に対応する値はそれぞれ1.9 nM、2.4 nM及び24.3 nMである。M B P - A 40への結合は、S 1 - A 4の場合は4.7 nMのK_D値、及びU S 7の場合は11.4 nMのK_D値が示される。従って、A 1

10

20

30

40

50

6 ~ 27 の場合の K_D 値は 2.6 nM 及び 2.1 nM である。

【図6】図6は、直接ELISAにおいてLcn2突然変異タンパク質S1-A4とUS7との結合活性を示す。A 標的Trx-A 28及びMBP-A 40は、制御タンパク質マルトース結合タンパク質(MBP)と同様に、2 μ MでPBSに一晩固定された。結合したLcn2突然変異タンパク質は、NPPによる発色反応の後でストレプトアビジン/APを用いてこれらのStrep-tag IIによって検出された。コントロールとして、野生型(wt)リポカリンの結合は試験された。そのデータは一価結合モデルに適合される。Trx-A 28に対して決定される K_D 値は、S1-A4の場合は16.2 nM、US7の場合は9.6 nMであり、MBP-A 40に対応する値は149 nM及び49.7 nMである。

10

【図7】図7は、競合ELISAにおいてLcn2突然変異タンパク質S1-A4(A)とUS7(B)との結合活性を示す。StrepMAB-Immは10 g/mlでマイクロタイタープレートに固定され、Strep-tag IIによって1 μ Lcn2突然変異タンパク質の獲得に用いられる。競合のために、トレーサーとして定濃度のビオチニル化Trx-A 28は種々の濃度の非標識Trx-A 28と混合された。結合したビオチニル化Trx-A 28は、続いて、NPPによる発色反応の後でExtravidin/APによる培養によって検出された。データはシグモイドの式を用いて適合される。 K_D 値は、S1-A4の場合は21.7 nM、US7の場合は76.9 nMである。

【図8】図8は、Biacore計測器によって10 μ l/minの流量で測定されたLcn2突然変異タンパク質S1-A4(A)及びUS7(B)の動態実時間解析を示す。MBP-A 40融合タンパク質は、アミン化学によってCMD200チップ(ARU = 1455)に連結され、精製されたLcn2突然変異タンパク質のそれぞれは一連の異なる濃度で適用された。いずれの場合にも、測定信号はグレイラインとして示されるのに対して、曲線適合はブラックラインとして示される。両方の突然変異タンパク質の k_{on} 及び k_{off} 速度は有意差がある($k_{on}(S1-A4) = 0.48 \cdot 10^5 M^{-1} S^{-1}$ 、 $k_{on}(US7) = 2.02 \cdot 10^5 M^{-1} S^{-1}$ 、 $k_{off}(S1-A4) = 8.36 \cdot 10^{-5} S^{-1}$ 、 $k_{off}(US7) = 25.2 \cdot 10^{-5} S^{-1}$)。しかし、全体の K_D 値は、S1-A4の場合は1.74 nM及びUS7の場合は1.25 nMとして非常に類似している。

20

【図9】図9は、チオフラビンT凝集アッセイで試験されたLcn2突然変異タンパク質S1-A4及びUS7の機能活性を示す。100 μ MのA 40は、37 °Cにおいて振とうせずに、10 μ MのUS7、S1-A4、及び野生型(wt)リポカリンで、又はPBSで培養された。指定された時点でそれぞれ採取した20 μ lの各サンプルは、180 μ lの5 μ MチオフラビンTと混合され、蛍光が450 nmの励起波長及び482 nmの発光波長で測定された。Lcn2突然変異タンパク質US7は、1:10の比率(US7:A40)で凝集の強力な抑制作用を示す。S1-A4はこの比例で凝集を著しく抑制できないが、1:2の比率(81-A4:A40)で(図示せず)明確な抑制作用を発揮した。野生型Lcn2は、A 凝集に対する抑制効果を解明しなかった。

30

【図10】図10は、イオン交換クロマトグラフィーで処理された組み換え型ED-B(lane 1)、FN7B8(lane 2)クマシーブリリアントブルー、及びFN789(lane 3)の、クマシーブリリアントブルーで染色した後のSDS-PAGE分析を示す。すべてのサンプルは、2-メルカプトエタノールによって還元された。M:分子量マーカー(Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)。

40

【図11】図11は、Strep-tag II親和性精製したLcn2突然変異タンパク質N7A(lane 1)、N7E(lane 2)、N9B(lane 3)、及びN10D(lane 4)の、クマシーブリリアントブルーで染色した後のSDS-PAGE分析を示す。すべてのサンプルは、2-メルカプトエタノールによって還元された。M:分子量マーカー(Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)。

【図12】図12は、ELISAにおける結合活性を示す。マイクロタイタープレートは、精製したタンパク質FN7B8及びFN789でコーティングされ、選択したLcn2

50

突然変異タンパク質の希釈系列で培養され、続いてストレプトアビジン - アルカリ - ホスファターゼ結合及びpNPP基質で検出された。組み換え型Lcn2突然変異タンパク質N7A、N9B、及びN10Dは、ED-Bが欠失して、且つ陰性対照として機能することで、このアッセイにおいてFN789に対して無視できるシグナルを解明した。

【図13】図13は、Biacore計測器で測定されたLcn2突然変異タンパク質N9Bの動態実時間解析を示す。FN7B8は、アミン化学によってCMD200mセンサーチップ(ARU=500)に連結され、精製されたLcn2突然変異タンパク質は種々の濃度で適用された。いずれの場合にも、測定信号はグレイラインとして示されるのに対して、曲線適合はブラックラインとして示される。この一連の曲線から決定された速度定数は表2(実施例17)に記載される。

10

【図14】図14は、Biacore計測器で測定されたLcn2突然変異タンパク質N7Eの動態実時間解析を示す。FN7B8は、アミン化学によってCMD200mセンサーチップ(ARU=500)に連結され、精製されたLcn2突然変異タンパク質は種々の濃度で適用された。いずれの場合にも、測定信号はグレイラインとして示されるのに対して、曲線適合はブラックラインとして示される。この一連の曲線から決定された速度定数は表2(実施例17)に記載される。

【図15】図15は、Biacore計測器で測定されたLcn2突然変異タンパク質N7Aの動態実時間解析を示す。FN7B8は、アミン化学によってCMD200mセンサーチップ(ARU=500)に連結され、精製されたLcn2突然変異タンパク質は種々の濃度で適用された。いずれの場合にも、測定信号はグレイラインとして示されるのに対して、曲線適合はブラックラインとして示される。この一連の曲線から決定された速度定数は表2(実施例17)に記載される。

20

【図16】図16は、Biacore計測器で測定されたLcn2突然変異タンパク質N10Dの動態実時間解析を示す。FN7B8は、アミン化学によってCMD200mセンサーチップ(ARU=500)に連結され、精製されたLcn2突然変異タンパク質は種々の濃度で適用された。いずれの場合にも、測定信号はグレイラインとして示されるのに対して、曲線適合はブラックラインとして示される。この一連の曲線から決定された速度定数は表2(実施例17)に記載される。

【図17】図17は、ヒトLcn2突然変異タンパク質に指定された、S1-A4(配列番号:39)、US7(配列番号:41)、H1-G1(配列番号:43)、N7A(配列番号:20)、N7E(配列番号:22)、N9B(配列番号:24)、及びN10D(配列番号:26)とLcn2との配列アラインメントを示す。配列の下方における最後の一行は、リボカリンの二次構造特性(Schonfeld et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 8198-8203)を示す。

30

【図18】図18は、Lcn2突然変異タンパク質HIGA及びHIGV(A)のSEC溶出プロフィールのオーバーレイと、15%SDS-PAGE(B)によって精製されたタンパク質の分析とを示す。その2つのLcn2突然変異タンパク質HIGA及びHIGVは、E.coli JM83において発現し、且つStrep-tag II親和性クロマトグラフィーによって精製された。両方の突然変異タンパク質は、主に単量体タンパク質としてSuperdex75HR10/30columnから10ml~11mlの保持容量で溶出した。ピーク強度は突然変異タンパク質の発現量によって異なる。(B)はStrep-tag II親和性精製及びSECで処理された、組み換え型Lcn2突然変異タンパク質H1-G1、HIGA及びHIGVの15%SDS-PAGE分析を示す。全ての3つのLcn2突然変異タンパク質は、2-メルカプトエタノールで還元条件において示される。Mは分子量マーカを表す。

40

【図19】図19は、Lcn2突然変異タンパク質HIGA、HIGV、及びH1-G1がキャプチャーELISAsにおいてビオチニル化A 標的A 40(A)及びTrx-A 28(B)との結合活性を示す。StrepMAB-Immは10g/mlをマイクロタイタープレートに固定され、Strep-tag IIによって1µMLcn2突然

50

変異タンパク質の獲得に用いられる。希釈系列に適用されたビオチニル化標的の結合は、その後、Extravidin/APによる培養及び後続のpNPPとの発色反応によって検出された。ビオチニル化オボアルブミン(Ova)及びチオレドキシン(Trx)は陰性対照として用いられ、Lcn2突然変異タンパク質との結合がないと示される(図示せず)。そのデータは一価結合モデルに適合される。A40に対して決定される K_D 値は、HIGAの場合は4.2 nM、H1GVの場合は4.9 nM、H1-G1の場合は21.5 nMであり、Trx-A28に対応する値はそれぞれ3.8 nM、4.2 nM、及び24.4 nMである。

【図20】図20は、BiacoreX計測器によって20 μ l/minの流量で測定されたLcn2突然変異タンパク質HIGA(A)及びH1GV(B)の動態実時間解析を示す。MBP-A40融合タンパク質は、アミン化学によってCMD200Iチップ(ARU=1316)に連結され、精製されたLcn2突然変異タンパク質のそれぞれは一連の様々な濃度で適用された。いずれの場合にも、測定信号はグレイラインとして示されるのに対して、曲線適合はブラックラインとして示される。両方の突然変異タンパク質の k_{on} 及び k_{off} 速度は以下のように計算される。即ち、 $k_{on}(HIGA) = 5.77 \cdot 10^4 M^{-1} S^{-1}$ 、 $k_{on}(H1GV) = 6.84 \cdot 10^4 M^{-1} S^{-1}$ 、 $k_{off}(HIGA) = 2.75 \cdot 10^{-5} S^{-1}$ 、 $k_{off}(H1GV) = 7.26 \cdot 10^{-5} S^{-1}$ 。全体の K_D 値は、HIGAの場合は0.476 nM、H1GVの場合は1.06 nMである。

【図21】図21は、高濃度で測定されたトレースのために延長した解離時間を用いて固定されたA40によって、BiacoreT100計測器で測定されたLcn2突然変異タンパク質HIGAの動態実時間解析を示す。標的ペプチドA40は、アミン化学によってBiacoreCM5チップ(ARU=325)に連結され、精製されたLcn2突然変異タンパク質HIGAは30 μ l/minの流量で適用された。低い k_{off} 速度を正確に測定するため、解離は試験された最高濃度で7200s行われ、 k_{on} 速度はLcn2突然変異タンパク質HIGAの希釈系列を用いて300sの会合及び解離時間で測定された。HIGAの動態値は以下のように決定される。即ち、 $k_{on} = 1.25 \cdot 10^5 M^{-1} S^{-1}$ 、 $k_{off} = 1.18 \cdot 10^{-5} S^{-1}$ 、 $K_D = 0.095 nM$ 。

【図22】図22(A)は、チオフラビンT凝集アッセイで試験されたLcn2突然変異タンパク質HIGAの機能活性を示す。500 μ lの1 mg/ml単量体Aは、異なるモル比のLcn2突然変異タンパク質HIGAの欠失又は存在下で、37にて0.5 x PBSにおいて攪拌しながら培養された。凝集反応は3連で調製された。蛍光測定のために定期的な間隔で採取した20 μ lのサンプルは、それぞれ0.5 x PBSにおいて50 μ Mの終末濃度で180 μ l ThTと混合され、450 nmの励起波長及び482 nmの発光波長で分析された。Lcn2突然変異タンパク質HIGAは、等モル比で凝集の強力阻害作用を示す。10:2(A40:HIGA)のサブモル比で、凝集は依然として大幅に減少した。(B)は対照的に、陰性対照として等モル量のBSAもLcn2もないものは、A40の凝集に対する抑制作用を持っている。

【図23】図23は、異なるELISAセットアップ及びLcn2突然変異タンパク質HIGA及びH1GVに対する表面プラズモン共鳴測定で検出された K_D 値をまとめた図である。

【図24】図24は、Lcn2突然変異タンパク質S1-A4(配列番号:39)、US7(配列番号:41)、H1-G1(配列番号:43)、HIGA(配列番号:50)、H1GV(配列番号:52)、N7A(配列番号:20)、N7E(配列番号:22)、N9B(配列番号:24)、及びN10D(配列番号:26)とLcn2(配列番号:44)との配列アラインメントを示す。

【図25】図25は、突然変異タンパク質HIGA(配列番号:50)及びH1GV(配列番号:52)とそれらの前駆体H1-G1(配列番号:43)及びwtLcn2(配列番号:44)との相互配列アラインメント。

【図26】図26は、ELISAにおいてLcn2変異N7EのFN7B8に対する特異

10

20

30

40

50

的な結合活性を示す。マイクロタイプレートは、FN7B8、FN789、BSA又はオボアルブミンでコーティングされ、N7Eの希釈系列によって培養され、続いてストレプトアビジン-アルカリ-ホスファターゼ結合及びpNPP基質で検出された。Lcn2変異N7Eは、このアッセイにおいてFN789、BSA、及びオボアルブミンに対して無視できるシグナルを解明した。

【図27】図27は、Biacore X計測器によって測定されたLcn2変異N7A(A)、N7E(B)、N9B(C)、及びN10D(D)の動態実時間解析を示す。単一のフィブネクチンドメインED-Bは、アミン化学によってCMD200mセンサーチップ(ARU=180)に連結され、精製されたLcn2変異は、種々の濃度で適用された。測定信号は、曲線適合とともにトレースとして示される。これらのセンサーグラムから決定された速度定数は表3(実施例24)に記載される。

【図28】図28は、Lcn2変異N7A(A)、N10D(B)、N9B(C)、及びN7E(D)の分析用サイズ排除クロマトグラフィーを示す。アフィニティー精製したタンパク質は、TBSと平衡されてスーパーデックスS75 10/30カラムに適用された。矢印は、カラムの排除体積(6.7ml)を示す。分析用ゲルろ過は、4つのLcn2変異のそれぞれに対して顕著なピークを生じさせる。そのタンパク質の見掛け分子量は、N7Aの場合は21.0kDa、N10Dの場合は21.3kDa、N9Bの場合は21.7kDa、N7Eの場合は21.7kDaであり、単量体形態のみ存在することが示される。

【発明を実施するための形態】

【0152】

(実施例1)

突然変異体Lcn2ファージディスプレイライブラリの構造

Lcn2変異のコンビナトリアルライブラリは、クローン化cDNA(Breustedt et al. (2006) Biochim. Biophys. Acta 1764, 161-173)に基づいて生成された。そのクローン化cDNAは、シングル不対チオール側鎖(Goetz et al. (2000) Biochemistry 39, 1935-1941)を除去するためにアミノ酸置換Cys87Serを運ぶとともに、第2のBstXI制限酵素認識部位を導入するためにアミノ酸置換Gln28Hisを運んだ。この領域の突然変異誘発及びポリメラーゼ連鎖反応(PCR)アセンブリは、基本的に(Beste et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1898-1903、Skerra (2001) J. Biotechnol. 74, 257-275)に公開された方法に従って行っており、このとき、図1に示すように、オリゴデオキシヌクレオチド(配列番号:1-10)とのワンポット増幅反応を使用した。オリゴデオキシヌクレオチドは、配列番号:1-4のプライマーがコード鎖に対応してかつそれぞれアミノ酸位置36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132、又は134で縮重したコドン運ぶ一方、配列番号:5-8のプライマーが非コード鎖に対応して且つ縮重したコドンやアンチコドン運ばないように設計された。配列番号:9及び配列番号:10の2つの隣接するプライマーは、過剰に使用され、組み立てられたランダム化遺伝子フラグメントの増幅に役立つ。上記のように(Schlehuber et al. (2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120)、全てのPCRステップは、Go-TaqホットスタートDNAポリメラーゼ(Promega, Mannheim, Germany)を用いて行った。

【0153】

縮重したコドン運ばないオリゴデオキシヌクレオチドは、HPLCグレードでMetabion(Munich, Germany)から購入された。NNK含有オリゴデオキシヌクレオチドは、同じベンダーから脱塩して得られ、さらに尿素PAGEによって精製された。得られたDNAライブラリは、BstXI(Promega, Mannheim, Germany)で切断され、ファージミドベクターphNGAL102(配列

番号: 11) にクローニングされた。ここで、ファージミドベクター *phNGAL102* は、遺伝子発現ベクター *pASK111* (Vogt and Skerra (2001) *J. Mol. Recognit.* 14 (1), 79-86) に基づいて、OmpAシグナルペプチド、アンバーコドンに続く変性された成熟 *Lcn2*、及び糸状バクテリオファージ *M13* の遺伝子 *III* 外被タンパク質における C 末端フラグメントからなる融合タンパク質、即ち、上記のようなピリン結合タンパク質 (Beste et al., *supra*, Skerra, *supra*) に類似する融合タンパク質をコードした。8.4 μ g の消化 PCR 産物と 94 μ g の消化プラスミド DNA とのライゲーション混合物によって *E. coli* *XL1-Blue* (Bullock et al. (1987) *Bio techniques* 5, 376-378) をエレクトロポレーションした後、 1×10^{10} の形質転換細胞を得た。

10

【0154】

また、図 2 に示されるクローニングされた合成 *Lcn2* ランダムライブラリは、*Sloining BioTechnology* 社の GmbH (Puchheim, Germany) から得られた。その 2 つの *Bst* XI 制限酵素認識部位に挟まれた中央遺伝子カセットは、適切なプライマー (配列番号: 9 及び配列番号: 10) を用いて 20 サイクルで PCR を介して増幅するとともに、 1.7×10^{10} の独立した形質転換細胞に対応して複雑性を有するライブラリが得られる *phNGAL108* (配列番号: 12) にサブクローニングした。遺伝子発現ベクター *pASK75* (Skerra (1994) 遺伝子 151、131~135) に基づく *phNGAL108* は、OmpAシグナルペプチド、変性した成熟 *Lcn2*、及びアンバーコドンに続く *Strep-tag*、及び糸状バクテリオファージ *M13* (Vogt and Skerra (2004) *ChemBioChem* 5, 191-199) の全長の遺伝子 *III* 外被タンパク質からなる融合タンパク質をコードした。

20

【0155】

ライブラリ生成に次のステップは、*Lcn2* ライブラリの両方に対して同様に行われた。ファージ錠剤の融合タンパク質としてリポカリン突然変異タンパク質ライブラリをそれぞれコードする *phNGAL102* 又は *phNGAL108* の基質にナナフシのベクターと形質転換された細胞を含む 100 ml の培養物は、無菌三角フラスコに移され、抗生物質選択圧がない 2YT 培地において、160 rpm、37 °C で 1 時間培養した。VCS-M13 ヘルパーファージによって感染する前に、培養物は、対応する抗生物質を添加し、0.6 の OD₅₅₀ に達するまで同一の条件下でさらに培養することことで、2YT 培地において 0.1 の OD₅₅₀ に希釈した。約 10 の感染の多重度で VCS-M13 ヘルパーファージ (Agilent Technologies, La Jolla, USA) によって感染された後、その培養物は、37 °C、100 rpm でさらに 30 分間振り混ぜた。その後、培養器温度が 26 °C に低下させて且つシェーカー速度が再び 160 rpm に増加させ、25 μ g/l (ジメチルホルムアミドに 200 μ g/ml の原液 125 μ l、培養物 1 リットル当たりの DMF) のアンヒドロテトラサイクリン (ACROS Organics, Geel, Belgium) を添加することによって遺伝子発現を誘導した後、10 分間後でカナマイシン (70 μ g/ml) を添加した。培養は 26 °C、160 rpm でさらに 12 時間 ~ 15 時間続いた。

30

40

【0156】

完全培養物からの細胞を遠心分離 (30 分間、18000 g、4 °C) によって沈殿させた。ファージミド粒子を含む上清は、滅菌濾過 (0.45 μ M) され、1/4 量の 20% (w/v) PEG 8000、15% (w/v) の NaCl と混合され、さらに氷上で少なくとも 2 時間培養した。遠心分離 (30 分間、18000 g、4 °C) した後、1 リットルの培養物から沈殿したファージミド粒子を、50 mM のベンズアミジン (Sigma) 及び 1 μ g/ml のペファブロック (Roth, Karlsruhe, Germany) が含まれる冷 BBS/E (200 mM のホウ酸ナトリウム、160 mM の NaCl、1 mM の EDTA (pH 8.0)) 30 ml に溶解させた。溶液を 1 時間氷上で培養した。

50

未溶解成分 (10 分間、43000 g、4) を遠心分離した後、各上清を新しい反応容器に移した。

【0157】

1/4量の20% (w/v) PEG8000、15% (w/v) のNaClを加え、ファージミドがアリコートされたまでファージミド粒子を再沈殿させるように氷上で60分間培養し、さらに貯蔵するために-80 で凍結した。最初の選択サイクルファージミドを解凍して遠心分離 (30分間、34000 g、4) させるため、上清を除去し、沈殿したファージミド粒子を50mMベンズアミジンが含まれるPBS合計で400 μ lに溶解させ混合した。氷上で30分間培養した後、残留凝集物を除去するために溶液を遠心分離し (5分間、18500 g、4)、さらに上清をファージディスプレイ選択に直接に用いた。

(実施例2)

異なるフォーマットでA 標的の調製

成熟 - アミロイド配列 (Dodel et al. (2003) Lancet Neurology 2, 215-220) のアミノ酸1~40に対応するA 40ペプチド (配列番号:29) は、リジンスペーサ (Peptide Speciality Laboratory, Heidelberg, Germany) を介して接続されたC末端ピオチン基を有するとともに非標識の形 (W. M. Keck Laboratory, New Haven, USA) で凍結乾燥されたペプチドの合成品として購入された。均一単量体のA 40は5mg以下のペプチドを0.5mlの1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) に室温で少なくとも0.5時間溶解させることによって得られた。その後、HFIPをSpeedVac濃縮器で蒸発させ、A 40は冷水で15分間超音波処理 (Bandelin, Sonorex, RK100, Germany) された後、適量の蒸留水に溶解した。0.22 μ Mフィルター (Spin-X Centrifuge Tube filter, Corning, USA) をろ過した後、タンパク質の濃度は、1490M⁻¹cm⁻¹の計算された吸光係数を用いて280nmで吸収測定によって検出された (Gasteiger et al. (2003) ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 31, 3784-3788, <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 。

【0158】

N-末端ペプチドA 1-11 (配列番号:30) 及び中央ペプチドA 16-27 (配列番号:31) のような - アミロイドペプチドの短いバージョンは、また、Peptide Speciality Laboratoryから購入した。これらの短いバージョンは、予めHFIP処理されなかった選択のバッファーに溶解した。

【0159】

合成ペプチドに加えて、異なる組み換え型A 融合タンパク質をコードする2つのベクターは、細菌発現の目的で構成された。即ち、その1つは、マルトース結合タンパク質 (MBP, pMBP-His, 配列番号:32) を有する融合タンパク質はHortschanskyら ((2005) Protein Sci. 14, 1753-1759) によって構成され、pASK75-MBP-Abeta40 (配列番号:33) を得た。もう1つは、成熟アミロイド ペプチドのアミノ酸1~28がチオレドキシニン (Trx, pASK75-TrxH6, 配列番号:35) の活性部位ループに挿入されたpASK75-TrxAbeta28H6 (配列番号:34) は、Morettoら ((2007) J. Biol. Chem. 28211436-11445) によって構成された。

【0160】

マルトース結合タンパク質の遺伝子でフレームに延長したN末端を運ぶヒトA 40の連続クローニングは、ベクターpASK75 (Skerra (1994) Gene 15

10

20

30

40

50

1, 131-135) の誘導体である新たなプラスミド pA8K75-MBP-A 40 を得られた。このベクターは、簡易なタンパク質精製のための His6-tag、融合タンパク質を切断するためのタバコエッチ病ウイルス (TEV) 認識部位、及びヒト A40 の配列が付けられるマルトース結合タンパク質の融合タンパク質をコードした。そのベクターは、テトラサイクリンプロモーター/オペレーターシステムの厳密な制御下であり、高収率で E. coli の細胞質に融合蛋白質の発現を可能にする。

【0161】

成熟アミロイドペプチド (A 28) のアミノ酸 1~28 をコードする配列は、ベクター pASK75-Trx-A beta 28H6 が得られるチオレドキシン (ヌクレオチド位置 99~105、アミノ酸残基 34 及び 35 に対応する) の活性部位ループにおけるユニークな Cpol 部位によって、チオレドキシンループに挿入された。

10

【0162】

A 融合タンパク質、Trx-A 28、及び MBP-A 40 は、ともに非融合制御タンパク質 Trx 及び MBP と同様に、37 で E. coli JM83 (Yanisch-Perron et al. (1985) Gene 33, 103-119) において発現した。タンパク質発現は、200 µg/l のアンヒドロテトラサイクリン (atc, Acros, Geel, Belgium) を加えて無水ジメチルホルムアミド (DMF, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) に溶解され、さらに攪拌しながら 3 時間継続的な培養されることによって、0.5 の光学濃度 OD550 で誘導された。細胞は、4200 g で 4 において 20 分間遠心分離することによって回収された。2 L の培養物からの細胞ペレットを、20 ml の溶解バッファー (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) に再懸濁し、得られた懸濁液を French Pressure Cell を介して 3 つの通路によって均質化させた。不溶性物質を遠心分離 (34500 g, 4、20 分間) で除去し、上清を 0.45 µm フィルター (Filtropur S 0.45; Sarstedt, Nuembrecht, Germany) で濾過し、さらに各タンパク質の His6-tag によって親和性精製に用いた。固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) で処理された融合タンパク質を、さらにサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって精製した。

20

【0163】

タンパク質濃度は、MBP (配列番号: 32) 用 $66350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、A 40 (配列番号: 33) 用 $69330 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、Trx-A 28 (配列番号: 34) 用 $15470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、及び Trx (配列番号: 35) 用 $13980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Gasteiger et al., supra) の計算された吸光係数を用いて 280 nm での吸収測定によって検出された。

30

【0164】

次の実験のために A 融合タンパク質、Trx-A 28、MBP-A 40 は、ともに制御タンパク質として機能するオボアルブミン (Ova, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)、Trx、及び MBP と同様に、モル比 2:1 (標識試薬: 標的タンパク質) でビオチン又はジゴキシゲニン (DIG) によって標識された。

40

【0165】

そのため、無水ジメチルホルムアミド (DMF; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 又はジメチルスルホキシド (DMSO; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) に溶解された D-ビオチノイル-e-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシルスクシンイミドエステル (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 又はジゴキシゲニン-3-0-メチルカルボニル-e-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシルスクシンイミドエステル (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を、タンパク質に対して 2 倍量モル比で PBS (4 mM KH_2PO_4 、16 mM Na_2

50

HP0₄、115 mM NaCl、pH 7.4)に加えた。その混合物を室温で1時間回転させた。その後、1 M Tris/HCl pH 8.0を10 mMの終末濃度まで添加し、残留活性NHSエステル基を飽和させるように10分間培養し、さらに標識されたタンパク質をSuperdex 75 HR 10/30 column (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany)でSECによって精製された。標的としてファージディスプレイ選択に用いられるために、まず、*rx-A* 28をジゴキシゲニンで、1時間標識し、その後、任意の不对Cys残基をブロックするためにモルで50倍過剰のヨードアセトアミド (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)を加えた後、1時間培養した。その後、変異したタンパク質を、1 M Tris/HCl pH 8.0で処理して上記のように精製した。

10

(実施例3)

ファージディスプレイによるA 40ペプチドに対する親和性を有するLcn2突然変異タンパク質の選択

各パニングサイクルのために、PBS (4 mM KH₂PO₄、16 mM Na₂HPO₄、115 mM NaCl、pH 7.4)における約10¹²組み換え型ファージミドは、PBS/T (0.1% (v/v)のTween 20 [ポリオキシエチレン ソルビタンラウリン酸モノエステルを含むPBS、AppliChem, Darmstadt, Germany])において2% (w/v) BSAで1時間ブロックされた。50の部分及び25 µLのストレプトアビジン被覆電磁ビーズ懸濁液 (Dynaビーズ M-280 Streptavidin; Dynal Biotech, Invitrogen, Karlsruhe, Germany and Streptavidin Magnetic Particles; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)は、それぞれPBS/Tで洗浄され、さらにPBS/Tにおいて2% (w/v) BSAで1時間ブロックされた。25のブロックされたビーズは、ビーズの特異的なファージミドを除去するためにブロックされたファージミドの前吸着に用いられ、50のブロックされたビーズは、その後、選択サイクルに用いられる。

20

【0166】

ブロックされたファージミドを、洗浄され且つブロックされた25のストレプトアビジン被覆磁気ビーズとともに30分間培養した。ビーズは、その後、単一チューブ磁気スタンド (Promega, Mannheim, Germany)で2分間引き下ろされ、ビーズに結合しないファージミドを含有する上清は、全量400 µLを100 nmの実施例2からのビオチニル化されたA 40で1~2時間培養された。続いて、ファージミドとペプチド標的との混合物は50のブロックされたビーズで0.5時間培養された後、単一チューブ磁気スタンドで2分間引き下ろされた。非結合ファージミドを含有する上清を捨てた。電磁ビーズに結合した標的/ファージミド複合体は、400 µLのPBS/Tで10回洗浄された後、結合したファージミドは350 µLの0.1 M、pH 2.2グリシン/HClで、10分間回転しながら溶出し、続いて55 µLの0.5 Mトリス塩基で即時中和された。また、溶出は変性条件においてPBSに400 µLの4 M尿素で30分間行った後、1 mlのPBSで希釈された。変性条件において酸や尿素でされた溶出は選択サイクル1及び2に適用される一方、選択サイクル3及び4の溶出は、400 µLの100 µM非ビオチニル化されたA 40を結合したファージミドを有するビーズに加えて1時間回転させることによって競争条件において行った。合計で、4回の選択サイクルを行った。

30

40

【0167】

溶出したファージミドを増幅されるため、E. coli XL-1 Blueの指数増殖期培養物を37 °Cで30分間感染させた。残りのビーズに結合したファージミドは、指数増殖期のE. coli XL-1 Blueを直接にそのビーズに加えることによって溶出した。4 で遠心分離した後、細菌ペレットを適量の2x YT培地 (16 g/L Bacto Tryptone、10 g/L Bacto Yeast Extract、5 g/L NaCl、pH 7.5)に再懸濁し、LB-Cam plates (10 g/L Ba

50

cto Tryptone、5 g/L Bacto Yeast Extract、5 g/L NaCl、15 g/L Bacto Agar、35 mg/L クロラムフェニコール、pH 7.5) に播種し、そして、32 で14~16時間培養した。次に、細胞をプレートから掻き取り、組換えファージミドの脱出や再増幅のために用いる。

【0168】

濃縮したファージミドプールのスクリーニングは、第4のパニングステップの後でスクリーニングELISA(実施例5)によって行った。

(実施例4)

ファージディスプレイによるTrx - 28融合タンパク質に対して親和性を有するLcn2突然変異タンパク質の選択

各パニングサイクルのために、まず、PBS(4 mM KH₂PO₄、16 mM Na₂HPO₄、115 mM NaCl、pH 7.4)における約10¹²の組み換え型ファージミドをサイクル1及び2のPBS/T(0.1%(v/v)のTween 20を含有するPBS)に2%(w/v)のBSAで1時間ブロックした。選択サイクル3以降、PBS/Tにおける2%(w/v)のスキムミルク(Sucofin, TSI, Zeven, Germany)をブロッキング試薬として用いた。50及び25 µLのanti-DIG-IgG被覆電磁ビーズ懸濁液(Europa Bioproducts Ltd, Cambridge, UK)は、PBS/Tで洗浄され、PBS/T又はスキムミルクに2%(w/v)のBSAでそれぞれ1時間ブロックした。

【0169】

ブロックされたファージミドを、洗浄され且つブロックされた25 µLのanti-DIG-IgG被覆電磁ビーズとともに30分間培養した。ビーズは、その後、単一チューブ磁気スタンド(Promega, Mannheim, Germany)で2分間引き下ろされ、ビーズに結合しないファージミドを含有する上清は、Trx特異的なファージミドを除去するために、15 µMの実施例2からの非標識Trxで30分間培養された。実施例2からの、脱酸素され且つルボキシメチル化したTrx-A 28を、100 nMの終末濃度まで加え、混合液を全量400 µLで1時間~2時間培養した。その後、ファージミドとTrxとTrx-A 28との混合物を、50 µL部分からの乾燥且つブロックされたビーズで0.5時間培養した。ビーズは、その後、単一チューブ磁気スタンドで2分間引き下ろされた。結合しないファージミドを含有する上清を捨てた。結合したファージミドを含有する電磁ビーズは500 µLのPBS/Tで10回洗浄された。その後、結合したファージミドはPBSに400 µLの4Mの尿素で30分間回転しながら溶出した後、1 mlのPBSで希釈された。合計で、6回の選択サイクルを行った。

【0170】

溶出したファージミドを増幅されるために、E. coli XL-1 Blueの指数増殖期培養物を37 で30分間感染させた。残りのビーズに結合したファージミドは、指数増殖期のE. coli XL-1 Blueを直接にそのビーズに加えることによって溶出した。4 で遠心分離した後、細菌ペレットを適量の2x YT培地(16 g/L Bacto Tryptone、10 g/L Bacto Yeast Extract、5 g/L NaCl、pH 7.5)に再懸濁し、LB-Camp plates(10 g/L Bacto Tryptone、5 g/L Bacto Yeast Extract、5 g/L NaCl、15 g/L Bacto Agar、35 mg/L クロラムフェニコール、pH 7.5)に播種し、そして、32 で14~16時間培養した。次に、細胞をプレートから掻き取り、組換えファージミドの脱出や再増幅のために用いる。

【0171】

濃縮したファージミドプールのスクリーニングは、第6のパニングステップの後でフィルタサンドイッチコロニースクリーニングアッセイ(実施例6)によって行った。

(実施例5)

スクリーニングELISAによるA に対して特異性を有するLcn2突然変異タンパク質の同定

10

20

30

40

50

実施例3に示すように、A 40とファージミド選択の4つのサイクル後、Lcn2突然変異タンパク質の濃縮したプールはpHNGAL98(配列番号:27)にサブクロニングされ、E.coliスーパ株TG1-Fの形質転換に用いられ(a derivative of E.coli K12 TGI (Kim et al. (2009) J. Am. Chem. Soc. 131, 3565-3576)、そして、スクリーニングELISAに供した。

【0172】

このため、濃縮したプールからの単一コロニーは、96-well plates (Multiple Well Plate 96 round bottom with lid, Sarstedt, Nuembrecht, Germany)において、100 μ LのTB-Amp培地(12g/LのBacto Tryptone、24g/Lの55mMグリセロール、17mMのKH₂PO₄、72mMのK₂HPO₄、100mg/Lのアンピシリン)に37°Cで一晩成長した。100 μ LのTB-Amp培地を有する新たなプレートに一晩培養した培養物を接種し、22°C又は37°Cで指数増殖期まで成長させた。Lcn2突然変異タンパク質のペリプラズム発現は、無水ジメチルホルムアミド(DMF、Sigma-Aldrich、Steinheim, Germany)に溶解して、20 μ Lの0.2 μ g/mlアンヒドロテトラサイクリン(aTc、Acros, Geel, Belgium)によって20°Cで13~17時間誘導した。ペリプラズムタンパク質は、1mg/mlのリゾチームを含有するBBS(800mMのホウ酸ナトリウム、640mMのNaCl、8mMのEDTA、pH8.0)40 μ Lで4°Cにおいて、750rpm(Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Germany)で1時間攪拌しながら培養することによって放出された。40 μ Lの10%(w/v)BSAでPBS/T(4mMのKH₂PO₄、16mMのNa₂HPO₄、115mMのNaCl、pH7.4、0.05%(v/v)のTween 20)に4°C、750rpmで1時間ブロッキングした後、そのプレートを4°C、3000gで10分間遠心分離した。その上清をELISAに用いた。

【0173】

C末端のStrep-tag II (Schmidt and Skerra (2007) Nat. Protoc. 2, 1528-1535)を運ぶLcn2突然変異タンパク質を選択的に獲得するために、96-well MaxiSorp ポリスチレンマイクロタイタープレート(Nunc, Langensfeld, Germany)は、10 μ g/mlのStrepMAB-Imm (IBA, Göttingen, Germany)でPBSに4°Cにおいて一晩コーティングされ、3%(w/v)のBSAでPBS/T(0.1%(v/v)のTween 20を有するPBS)に室温において1時間ブロックした。PBS/Tで3回の洗浄ステップの後、上記するような120 μ Lの細胞抽出物をそれぞれのウェルに提供して300rpmで1.5時間培養した。洗浄した後、実施例2からのピオチニル化されたA 40を0.5 μ Mの濃度で加えて1時間培養した。コントロールとして、A 40の代わりにピオチニル化されたOvaを用いた。そのウェルを再び洗浄し、結合したピオチニル化ペプチド又はタンパク質を、1:500希釈された50 μ LのExtravidin/AP接合物(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)でPBS/Tに1時間検出した後、100 μ Lの0.5mg/mlパラニトロフェニルリン酸塩(AppliChem, Darmstadt, Germany)の存在下で、100mMのTris/HCl、pH8.8、100mMのNaCl、5mMのMgCl₂に1時間シグナル形成した。405nmでの吸収はSpectraMax 250 reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)に測定された。

【0174】

また、実施例2からの0.5 μ Mの非ピオチニル化されたA 40は、96-well MaxiSorp ポリスチレンマイクロタイタープレート(Nunc, Langensfeld, Germany)で直接に固定されてブロッキングされた。上記のよな

細胞抽出物によって培養して洗浄した後、結合したLcn2突然変異タンパク質は、1:1500希釈されたStreptactin/AP接合物(IBA, Gottingen, Germany)を用いるStrep-tag IIによって検出された。コントロールとして、0.5 μMのOvaをELISA plateで固定した。

(実施例6)

フィルターサンドイッチコロニースクリーニングアッセイによるTrx-A 28に対して特異性を有するLcn2突然変異タンパク質の同定

実施例4に示すように、Trx-A 28とファージミド選択の6つのサイクル後、突然変異したLcn2遺伝子カセットは、BstXI (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)によって、プラスミドpHNGAL124 (配列番号: 42)でサブクローニングされた。そのプラスミドpHNGAL124 (配列番号: 42)は、OmpAシグナルペプチドの融合物と、C末端Strep-tag II (Schmidt 及び Skerra (2007) Nat. Protoc. 2, 1528-1535)の後にアンバー終止コドンを含むLcn2コーディング領域と、連鎖球菌性のタンパク質G (Schlehuber ら, (2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120)からのアルブミン結合ドメイン(ABD)のための遺伝子とをコードする。

【0175】

その後、フィルターサンドイッチコロニースクリーニングアッセイを行った。ここでは、Lcn2-ABD融合タンパク質は、親水性フィルター膜(PVDF type GVWP, 0.22 μL, Millipore, Schwalbach, Germany)に播かれたコロニーから放出され、Schlehuber ら((2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120)に詳細に記載された手順で、ヒト血清アルブミン(HSA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)によりコートされた基礎の第2の膜(Immobilon-P膜, 0.45 μL, Millipore, Schwalbach, Germany)に機能的に捕獲された。この膜は、実施例2からの100 nMのDIGで標識されたTrx-A 28のPBS/T溶液を用いて1時間プローブされた。結合した標的接合体は、抗DIG Fab/アルカリホスファターゼ(AP)接合体(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用い、続いて、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸塩、4-トルイジン塩(BCIP, AppliChem, Darmstadt, Germany)及びニトロブルーテトラゾリウム(NBT, AppliChem, Darmstadt, Germany)を用いた発色反応により検出された。この膜における強い発色シグナルを用いてスポットを同定して、対応するコロニーが第1のフィルターから回収され、2次的なコロニースクリーンにおける対象比較のための増殖を行った。

【0176】

この目的のため、単離された細菌、及び野生型リボカリン等のコントロールLcn2突然変異タンパク質を発現する細菌は、新しい親水性の膜に点刻され、小さいコロニーが見えるまで増殖される。結合は、DIGで標識されたTrx-A 28、並びにDIGで標識された制御タンパク質であるTrx及びOvaの両方で試験された。この2次的なスクリーンにおけるTrx-A 28標的のための特異的なシグナルを起こしたLcn2突然変異タンパク質は、さらにプラスミドの単離及びその後の配列分析のために増やされた。

(実施例7)

A 及びED-Bに特異的なLcn2突然変異タンパク質の可溶性物質の生成及びその精製

組み換え型Lcn2及びその突然変異タンパク質は、E. coli BL21 (Studier 及び Moffat (1986) J. Mol. Biol. 189, 113-130), E. coli W3110 (Bachmann (1990) Microbiol. Rev. 54, 130-197), E. coli JM83 (Yanisch-Perron ら, (1985) Gene 33, 103-119)又はE. coli s

upE strain TG1-F (アクリジニウムオレンジを用いてそのエピソームから取り除かれたE. coli K12 TGIの誘導體 [Kimura, (2009) J. Am. Chem. Soc. 131, 3565-3576])におけるペリプラズム分泌により産生された。可溶性タンパク質の発現のために、成熟Lcn2タンパク質を有するOmpAシグナルペプチド(配列番号:28)とC末端Strep-tag IIの融合体をコードするプラスミドpHNGAL98(配列番号:27)が用いられた。そのプラスミドは、突然変異した遺伝子カセットの一方方向性サブクローニングのための2つの互換性のないBstXI制限酵素認識部位を有する。

【0177】

可溶性タンパク質は、Strep-tag II (Schmidt及びSkerra (2007) Nat. Protoc. 2, 1528-1535)により、また、その後のPBSバッファーを用いるSuperdex 75 HR 10/30カラムでのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC) (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany)によりアフィニティー精製された。タンパク質の純度は、SDS-PAGE (Fling及びGregerson (1986) Anal. Biochem. 155, 83-88)により確認された。タンパク質濃度は、野生型Lcn2(配列番号:44)では $31400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、A 特異的突然変異タンパク質H1-G1(配列番号:43)では $26930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、S1-A4(配列番号:38)では $24410 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、及びUS7(配列番号:41)では $26930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ の算出された吸光係数を用いた280nmの吸収測定により決定された。E D-B特異的Lcn2突然変異タンパク質の算出された吸光係数は、突然変異タンパク質N7A(配列番号:20)では $37930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、N7E(配列番号:22)では $22920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、N9B(配列番号:24)では $21430 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、及びN10D(配列番号:26)では $39420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった(上記Gasteigerら)。

(実施例8)

E L I S A 試験における種々のA 標的の結合活性の測定

C末端Strep-tag IIを有するLcn2突然変異タンパク質の選択的捕獲 (Schmidt及びSkerra (2007) Nat. Protoc. 2, 1528-1535)のために、96-well MaxiSorp ポリスチレンマイクロタイタープレート (Nunc, Langensfeld, Germany) は、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ StrepMAB-Imm (IBA, Göttingen, Germany) のPBS溶液を用いて4 で一晩中コートされ、3% (w/v) BSAのPBS/T溶液を用いて室温で1時間ブロッキングされた。PBS/Tを用いた3回の洗浄ステップの後、実施例7からの精製されたLcn2突然変異タンパク質の $1 \mu\text{M}$ 溶液 $50 \mu\text{l}$ が1時間全てのWellにアプライされた。洗浄後、実施例2からのビオチニル化標的A 40、

- A 40又はTrx-A 28の希釈系列の $50 \mu\text{l}$ が加えられ、1時間インキュベートされた。ここで、実施例2からのOva、MBP及びTrxのビオチニル化型は、陰性対照タンパク質として用いられた。Wellは、再度洗浄され、結合した接合体は、 $50 \mu\text{l}$ の1:5000でPBS/Tにより希釈されたExtravidin/AP

接合体 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) を用いて1時間検出され、続いて、 100 mM Tris/HCl, pH 8.8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 中の $0.5 \text{ mg} / \text{ml}$ パラニトロフェニルリン酸塩 (AppliChem, Darmstadt, Germany) $100 \mu\text{l}$ の存在下でシグナルが生成された。 405 nm での吸収 / tのタイムコースは、SpectraMax 250リーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) で測定され、データは、KaleidaGraphソフトウェア (Synergy software, Reading, PA) を用いて以下の方程式に適合された。

$$= A_{\text{max}} \times [L]_{\text{tot}} / (K_D + [L]_{\text{tot}})$$

上記式において、 $[L]_{\text{tot}}$ は、アプライされたリガンド接合体の濃度を表し、 K_D は

解離定数である (Voss 及び Skerra (1997) Protein Eng. 10, 975-982)。

【0178】

また、「直接」の ELISA のために、実施例 2 の 2 μ 非標識 A 40 標的は、96-well MaxiSorp ポリスチレンマイクロタイタープレート (Nunc, Langensfeld, Germany) に吸着され、精製された Lcn2 突然変異タンパク質と共にインキュベートされた。それは、1:1500 の比で希釈したストレプトアビジン/AP 接合体 (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) を用いて、Strep-tag II を介して検出された。コントロールとして、実施例 2 の 2 μ の MBP が ELISA プレートに吸着された。405 nm の吸収は、SpectraMax 250 reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) により測定された。

10

【0179】

また、「競合」の ELISA は、上記の「キャプチャー」と同様の方法で行われた。さらに、StrepMAB-Immobilized の固定及び洗浄の後、実施例 7 の精製された Lcn2 突然変異タンパク質の 1 μ 溶液の 50 μ l は、1 時間、全ての well にアプライされた。洗浄後、実施例 2 のビオチニル化 標的 Trx-A 28 は、競合相手として種々の濃度の遊離非標識 Trx-A 28 標的の存在下において、5 nM (S1-A4) 又は 40 nM (US7) の固定濃度でアプライされた。100 倍の過剰量を用いて開始して、競合相手の濃度は、3 倍の段階希釈がなされた。この場合、そのデータは、下記のシグモイド式に適應された。

20

【0180】

$$= (A_{max} - A_{min}) / (1 + ([L]_{tot} / K_D)^p) + A_{min}$$

この式では、更なるパラメータとして曲線の傾き p (Hill 係数) を有する。

【0181】

以下の表 1 は、種々の ELISA 機構及び表面プラズモン共鳴 (実施例 9 を参照) により決定された K_D 値をまとめている。

【0182】

(表 1)

30

	KD[nM]		
	S1-A4	US7	H1-G1
A β 40 (キャプチャーELISA、 図5を参照)	2.7 \pm 0.1	6.8 \pm 0.4	16.2 \pm 1.9
Trx-A β 28 (キャプチャーELISA、 図5を参照)	1.9 \pm 0.1	2.4 \pm 0.2	24.3 \pm 3.8
MBP-A β 40 (キャプチャーELISA、 図5を参照)	4.7 \pm 0.1	11.4 \pm 0.6	n.d.
A β 16-27 (キャプチャーELISA、 図5を参照)	2.6 \pm 0.3	2.1 \pm 0.1	n.d.
Trx-A β 28 (直接ELISA、 図6を参照)	16.2 \pm 4.4	9.6 \pm 1.7	290 \pm 62
MBP-A β 40 (直接ELISA、 図6を参照)	149 \pm 31	49.7 \pm 8.1	n.d.
Trx-A β 28 (競合ELISA、 図7を参照)	21.7 \pm 1.5	76.9 \pm 4.5	n.d.
MBP-A β 40 (SPR、図8、実 施例9を参照)	1.7	1.3	n.d.

10

20

30

40

50

(実施例9)

表面プラズモン共鳴 (SPR) を介した A β への結合活性の測定

Lcn2 突然変異タンパク質のリアルタイム分析は、ランニングバッファーとして PBS/T (0.005% (v/v) Tween 20 を含む PBS) を用いて、Biacore X system (Biacore, Uppsala, Sweden) で行われる。10 mM Na 酢酸塩, pH 4.5 に溶解した、実施例 2 の S1-A40 の 50 μ g/ml 溶液は、標準のアミンカップリング化学を用いて CMD 200 I チップ (Xantec, Dusseldorf, Germany) に固定されて、リガンド濃度は 1455 共鳴単位 (RU) であった。実施例 7 の精製された Lcn2 突然変異タンパク質の S1-A4 及び US7 は、10 μ L/min の流速で、2 nM から 125 nM までの濃度範囲でアプライされた。センサーグラムは、エタノールアミンを用いて活性化及び抑制されたコントロールチャンネルで測定された対応する信号を差し引くことにより校正された。キネティクスデータの評価は、BIAevaluation ソフトウェア V 3.0 を用いてフィッティングすることにより行われた (Karlsson ら, (1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240)。このステップの間、 k_{on} 及び k_{off} の比率は、全体的にフィットされ、一方、最大反応差 R_{max} は、各曲線に局所的にフィットされる。

(実施例10)

S POT 膜におけるエピトープマッピングを介した A β エピトープの決定

Lcn2 突然変異タンパク質 S1-A4 及び US7 の A β エピトープのマッピングのための S POT 膜 (Amino-PEG 500-UC 540 シート, 100 x 150 mm, Mavis, Koln, Germany) は、MultiPep RS 計測器 (Intavis, Koln, Germany) 及び同一の販売業者から得た活性化アミノ酸を用いて、Frank ((2002) J. Immunol. Methods 26213-26) に記載されているように、自動化手順で準備された。A β 40 のアミノ酸配列 (配列番号: 29) は、一連のヘキサマー、デカマー及びペンタデカマーのそれぞれの 1 アミ

ノ酸を転位して全体の配列をカバーして、膜において合成された。これらのペプチドのC末端は、膜に共有結合され、一方、それらのN末端は、アセチル化された。固定されたStrept-tag IIは、検出方法の陽性対照として用いられた。

【0183】

側鎖の脱保護は、95%トリフルオロ酢酸(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)、3%トリイソプロピルシラン(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)、及び2%蒸留水を用いて2時間行われた。ジクロロメタン(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)を用いて4回、ジメチルホルムアミド(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)を用いて2回、及びエタノールを用いて2回膜を洗浄した後、膜を空気乾燥した。

使用の前に、膜は、エタノールで1回、PBS(4mM KH_2PO_4 , 16mM Na_2HPO_4 , 115mM NaCl , pH 7.4)で3回洗浄し、3%(w/v)BSAのPBS/T溶液(0.1%(v/v)Tween20を含むPBS)で1時間ブロッキングされた。PBS/Tで3回洗浄した後、膜は、PBS/Tに溶解されたLcn2突然変異タンパク質S1-A4(50nm)、US7(100nm)又は野生型Lcn2(100nm)と共に1時間インキュベートされ、PBS/Tで3回洗浄された。その後、Strept-tag IIを介したタンパク質検出のために、膜は、PBS/Tが溶媒である1:1500希釈されたストレプトアビジン/AP接合体(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)と共に1時間インキュベートされた。その後、膜は、PBS/Tで3回洗浄され、APバッファー(100mM Tris/HCl, pH 8.8, 100mM NaCl , 5mM MgCl_2)で1回洗浄された後、Schlehuberら.(2000)J. Mol. Biol. 297, 1105-1120に記載されているように、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸塩、4-トルイジン塩(BCIP, AppliChem, Darmstadt, Germany)及びニトロブルーテトラゾリウム(NBT, AppliChem, Darmstadt, Germany)のAPバッファー溶液を用いて発色反応を行った。

【0184】

S1-A4及び野生型Lcn2のそれぞれとインキュベートされた膜を比較してS1-A4と共に、野生型Lcn2の非存在下で膜をインキュベートすることでのみ生じる明確なスポットが得られた。ペンタデカマーA40フラグメントで、LVFFAEDモチーフはS1-A4の結合のために本質的であることが明らかとなった。より短ヘキサマー及びデカマーペプチド配列を用いて、S1-A4に結合する最小のモチーフのVFFAED及びFFAEDVが検出された。Lcn2突然変異タンパク質US7は、このアッセイにおいて、非常に類似のエピトーププロファイルを示した。

(実施例11)

ThT凝集アッセイにおけるAへの親和性を有するLcn2突然変異タンパク質の機能分析

実施例2からの、可溶化され、均質な単量体の非ビオチニル化A40に対して、様々なLcn2突然変異タンパク質の存在下又は非存在下において、チオフラビンT凝集アッセイを行った。チオフラビンT(ThT, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)は、 β -シートリッチのアミロイド原線維及びオリゴマー前駆体に特異的に結合するが、Aペプチドに結合せず、それは、ThT蛍光の増大を伴う(Khuranaら.(2005)J. Struct. Biol. 151, 229-238)。

【0185】

そのため、ThTは1mMの濃度になるように蒸留水に溶解された。希釈標準溶液は、5mMグリシン/NaOH, pH 8.5を用いて1mM原液を5 μ の終末濃度までに希釈することにより調製された。500 μ lの蒸留水に溶解された200 μ A40(実施例2に従って溶解)と実施例7のPBSに溶解された20 μ のLcn2突然変異タ

10

20

30

40

50

ンパク質との1:1の混合液は、37で攪拌することなくインキュベートされた。種々の時点における各蛍光測定の前に、サンプルは、短時間で10回ボルテックスされ、20 μ lの各サンプルは、180 μ lのThT希釈標準溶液と混合された。蛍光強度は、発光分光計(LS50B, Perkin Elmer, Waltham, USA)で、450nmの励起波長及び482nmの発光波長を用いて測定された。

【0186】

図9に示すように、Lcn2突然変異タンパク質US7は、1:10の比率でA40の凝集の強力阻害作用を示した。

(実施例12)

エキストラドメインB(ED-B)を含む組み換え型フィブロネクチンフラグメントの調製

ヒトフィブロネクチンの3つの異なる組み換え型フラグメントは、選択のための標的として用いられた:単独のエキストラドメインB(ED-Bと呼ばれる、Zardiら。(1987)EMBO Journal, 6, 2337-2342)、その隣接するドメイン7及び8に関連して同一のドメイン(FN7B8と呼ばれる)、並びに従来型ドメイン7、8及び9を含み、ED-Bを欠失しているFN789(Carnemollaら。(1996), Int. J. Cancer, 68, 397-405、Leahyら。(1994) Proteins 19, 48-54)。

【0187】

FN7B8、FN789及びED-Bコード配列は、pASK75(Skerra (1994) Gene 151, 131-135)又はその誘導体pASG-IBA-33(IBA, Göttingen, Germany)のベクターに基づいて、pASK75-FN7B8(配列番号:13)、pASK75-FN789(配列番号:17)、及びpASG-IBA-33-EDB(配列番号:15)ベクターのそれぞれを産生するようにクローニングされた。全てのコンストラクトは、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(EVIAc)を介して精製されるために、カルボキシ末端にHis6タグが付けられ、E. coli TG1/F[E. coli K12 TGIの誘導体(Gibson (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome, Cambridge University, England)]又はBL21(Studier及びMoffatt (1986), 189, 113-130)の細胞質における可溶性タンパク質として産生された。従って、発現プラスミドを有するE. coliの2-Lインキュベーターは、100 μ g/mlアンピシリンを含むLB培地を用いて37において、中間対数期で増殖された。200 μ g/Lアンヒドロテトラサイクリン(Acros, Geel, Belgium)の添加後に、増殖が37で5時間から7時間続けられた。細胞は、遠心分離により濃縮され、35mlの氷冷クロマトグラフィーバッファー(40mM Hepes/NaOH, 1M NaCl, pH7.5)に再懸濁され、超音波処理(S250D, Branson, Danbury CT, USA)により溶解された。

【0188】

以下の精製プロトコルは、3つ全ての組み換え型フィブロネクチンフラグメントにおいて同一である。清澄な溶解液は、10mM ZnSO₄で充填され、40mM Hepes/NaOH, 1M NaCl, pH7.5で平衡化されたZn²⁺/IDAセファロースカラム(GE Healthcare, Munich Germany)にアプライされた。結合したタンパク質は、0から300mMまでのイミダゾール(HC1を用いてpHが調整された)が溶解したクロマトグラフィーバッファー溶液の勾配を用いて溶出された。組み換え型タンパク質を含む分画は、SDS-PAGEにより同定され、EDTAを用いて1mMの終末濃度に混合され、一晩中20mM Hepes/NaOH, pH7.4で透析分離された。その後、そのタンパク質は、20又は40mM Hepes/NaOH, pH7.4を用いて平衡化されたイオン交換クロマトグラフィーカラム(Resource Q, GE Healthcare, Munich, Germany)に口

10

20

30

40

50

ードされた。結合したフィブロネクチンフラグメントを溶出するために、0から300 mMまでのNaCl勾配が用いられた。

【0189】

最後に、タンパク質の純度は、SDS-PAGE分析及びサイズ排除クロマトグラフィーにより確認された。280 nmにおける吸収の測定によりタンパク質の濃度を決定するために、続いて算出された吸光係数 (Gasteiger ら、(2003) *nucleic Acids Res.* 31, 3784-3788) が用いられた: FN7B8では $31,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、FN789では $28420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、及びED-Bでは $11460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。通常、約10から20 mgの精製タンパク質が2-L振とうインキュベーターで得られた。精製タンパク質は、4 で保存され、全ての試験のために用いられた。

10

【0190】

精製フィブロネクチンフラグメントは、供給業者の説明書に従って、室温で1時間、過剰(4:1モル比)のジゴキシゲニン-3-O-メチルカルボニル- -アミノカプロン酸-N-ヒドロキシルスクシニミドエステル (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いてジゴキシゲニン標識された。遊離ジゴキシゲニンを除去するために、タンパク質溶液は、40 mM Tris/HCl, 115 mM NaCl及び1 mM EDTA, pH 7.5を用いて平衡化されたPD-10脱塩カラム (GE Healthcare, Munich, Germany) にアプライされた。成功したジゴキシゲニン化及びタンパク質の完全性は、SDS-PAGE、ESI質量分析又は抗ジゴキシゲニン-AP, Fabフラグメント (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いた染色を介したドットプロットにより確認された。

20

(実施例13)

ファージディスプレイによるED-Bに対する親和性を有するLcn2変異体の選択
全部で4つのファージディスプレイ選択サイクルは、実施例1に記載されたように、Sloning Biotechnology GmbHにより最初に合成された合成遺伝子コレクションに基づくLcn2ランダムファージミドライブラリを用いて行われた。第1の選択サイクルのために、300 μl のTBS/E (40 mM Tris/HCl, 115 mM NaCl、及び1 mM EDTAに溶解され、50 mMベンズアミジンが添加された約 5×10^{12} の組み換え型ファージミドは、0.4% (v/v) Tween 20 [ポリオキシエチレンソルビタンラウリン酸モノエステル、AppliChem, Darmstadt, Germany] を含むTBSに溶解された8% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) を100 μl 加えることにより30分間ブロックされた。その後、この溶液は、2% (w/v) BSAのTBS/T (0.1% (v/v) Tween 20を含むTBS) 溶液により1時間ブロックされた抗ジゴキシゲニンIgG電磁ビーズ (Europa Bioproducts, Cambridge, UK) と共に1時間インキュベーターされ、400 μl の0, 1 μg ジゴキシゲニン標識組み換え型FN7B8でチャージされた(実施例12を参照)。

30

40

【0191】

磁石を用いてビーズを回収し、上清を除去した後、TBS/Tを用いた10回の洗浄ステップが行われ、結合維持したファージミドは400 μl の0.1 M トリエチルアミン (pH 調整せず) を用いて6分間の第1溶出が行われ、続いて、350 μl の0.1 M グリシン/HCl, pH 2.2を用いて8分間の第2溶出が行われた。溶出液は回収され、2 M 酢酸又は50 μl の0.5 M Tris塩基の適量をそれぞれ組み合わせて用い、すぐに中和され、対数増殖期のE. coli XL1-Blueに移すために用いられた。ファージミドは、以下の公開されたプロトコル (Beste ら、(1999) *PNAS* 96, 1898-903、Schlehuber ら、(2000) *J Mol Biol* 297 1109-20) の次のパニングステップの前に、力価が上げられ

50

、増幅された。

【0192】

第2回の選択のために、約 2×10^{-12} に増幅されたファージミドが用いられ、結合したファージミドの溶出は、 $400 \mu\text{l}$ の $231 \text{ nmol} / \text{ml}$ 遊離組み換え型 ED-B を用いた競合により75分間行われた。

【0193】

第3及び第4の選択サイクルにおいて、約 2×10^{-12} に増幅されたファージミドは、 100 nm のジゴキシゲニン標識 FN7B8 を用いて1時間の第1インキュベートされた。その後、ファージミド-抗原複合体は、抗ジゴキシゲニン IgG 電磁ビーズに20分間捕獲された。TBS/T を用いてビーズを10回洗浄した後、結合したファージミドは、 140 から $231 \text{ nmol} / \text{ml}$ までの遊離組み換え型 ED-B $400 \mu\text{l}$ による競合により、室温で75分間溶出された。

(実施例14)

スクリーニング ELISA による ED-B に対する親和性を有する Lcn2 変異体の選択

実施例13に記載されたファージディスプレイ選択から生じた、標的タンパク質 ED-B に特異的に結合する Lcn2 突然変異タンパク質の濃縮は、スクリーニング ELISA により観察された。最後のパニングステップからのファージミドのプールされた調製液を用いて、突然変異遺伝子カセットが発現プラスミド pNGAL98 の BstXI を介してサブクローニングされた。それは、E. coli におけるペリプラズム生産のための OmpA シグナルペプチドと C 末端 Strep-tag II を有する Lcn2 コーディング領域との融合体をコードする (Schmidt 及び Skerra (2007) Nat. Protoc. 2, 1528-1535)。96-well プレートにおける個々の Lcn2 突然変異タンパク質の可溶性発現は、以下のように行われた： $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ アンピシリンを含む $100 \mu\text{l}$ TB 培地 (Tartof 及び Hobbs (1987) Bethesda Research Laboratory Focus 9, 12) に、ランダムに選択された単一コロニーが播かれ、 37°C で5時間振とう培養した (500 rpm から 800 rpm 、Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Germany)。各クローンのために、 $100 \mu\text{l}$ の新鮮培地に、この培養液の $10 \mu\text{l}$ を播き、 37°C で1時間から2時間振とう培養された後、 22°C まで温度を下げられた。2時間から4時間の更なる培養の後に、Lcn2 突然変異タンパク質の発現が、 $0.2 \mu\text{g} / \text{ml}$ アンヒドロテトラサイクリン (Acros, Geel, Belgium) を添加して12時間から14時間の対数増殖期細胞において誘導された。タンパク質のペリプラズム放出は、 $1 \text{ mg} / \text{ml}$ リゾチーム (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を含む $40 \mu\text{l}$ の $2 \times \text{BBS}$ (0.2 M ホウ酸塩 / NaOH, 160 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を加えて室温で1時間振とう培養することにより生じた。溶解液は、 $40 \mu\text{l}$ の $10\% \text{ w/v}$ BSA (Applichem, Darmstadt, Germany) の TBS 溶液及び $0, 5\%$ Tween-20 を用いて1時間ブロッキングされ、細胞破片は、10分間の遠心分離により粗抽出物から除去された。

【0194】

FN7B8 又は FN789 を 96-well Nunc Maxisorp プレート (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Germany) の表面に吸着するために、 $50 \mu\text{l}$ の TBS に溶解された $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ タンパク質溶液が各 well に加えられ、 4°C で一晩中インキュベートされた。E. coli からの粗抽出物への暴露の前に、TBS/T を用いた3回の洗浄ステップの後に、well は TBS/T に溶解された $2\% \text{ (w/v)}$ BSA を用いて室温で3時間ブロッキングされ、繰り返し洗浄された。ELISA のために、 $50 \mu\text{l}$ の清澄な溶解液は well にアプライされ、1時間インキュベートされ、続いて、TBS/T を用いて3回洗浄された。結合した Lcn2 突然変異タンパク質は、4-ニトロフェニルリン酸塩基質

10

20

30

40

50

(pNPP, 0.5 mg/ml, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) を用い、0.1 M Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 8.8 に溶解されたストレプトアビジン - アルカリ - ホスファターゼ結合体 (TBS/T で 1:1500 希釈、GE Healthcare, Munich, Germany) を用いて検出された (実施例 16 を参照)。

【0195】

4つのクローンは、このスクリーニング ELISA で同定された。後続の試験 (実施例 16 - 18 を参照) において、それら 4つの Lcn2 突然変異タンパク質は、ELISA、SPR 分析、及び免疫蛍光顕微鏡での ED - B ポジティブヒト結腸癌細胞の観察により、FN7B8 の特異的な結合活性をも示すことが分かった。これら Lcn2 突然変異タンパク質は、N7A (配列番号: 20)、N7E (配列番号: 22)、N9B (配列番号: 24) 及び N10D (配列番号: 26) と呼ばれる。

10

(実施例 15)

Lcn2 及びその変異体の可溶性タンパク質の産生及び精製

詳細は実施例 7 を参照。

(実施例 16)

ELISA における ED - B への結合活性の測定

96-well Nunc Maxisorp プレート (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Germany) の表面への FN7B8 又は FN789 の吸着のために、TBS/E に溶解された 50 µl の 100 µg/ml タンパク質溶液は、各 well に加えられ、室温で 2 時間インキュベートされた。さらに、コントロールタンパク質を含むために、ブランク well は 120 µl の TBS/ET に溶解された 2% (w/v) BSA (AppliChem, Darmstadt, Germany) に暴露された。3 回の洗浄ステップの後に、TBS/ET に溶解された 120 µl の 2% (w/v) BSA (AppliChem, Darmstadt, Germany) を用いて室温で 2 時間ブロッキングされ、繰り返し洗浄され、50 µl の精製 Lcn2 突然変異タンパク質の希釈系列が加えられ、1 時間インキュベートされた。well は再度洗浄され、結合した Lcn2 突然変異タンパク質は、TBS/T で 1:1500 希釈された 50 µl のストレプトアビジン - アルカリ - ホスファターゼ結合体 (GE Healthcare, Munich, Germany) を用いて 1 時間検出され、続いて、100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 8.8 が溶媒である 50 µl の 0.5 mg/ml パラニトロフェニルリン酸塩の存在下でシグナルを生成した。405 nm における吸収 / t の経時変化は、SpectraMax 250 リーダー (Molecular Devices, Sunny Vale, CA) で測定され、データは Kaleida Graph ソフトウェアを用いて下記の式に適用させた。

20

30

【0196】

$$= A_{max} \times [L]_{tot} / (K_D + [L]_{tot})$$

この式において、[L]_{tot} はアプライされたリガンド接合体の濃度を表し、K_D は解離定数 (Voss 及び Skerra (1997) Protein Eng. 10, 975 - 982) を表す。Lcn2 変異体 N7A、N9B 及び N10D のそれぞれは、14.8 nM (N7A)、40.1 nM (N9B)、30.0 nM (N7E) 及び 51.2 (N10D) の K_D 値で FN7B8 に特異的に結合するが、FN789 又は BSA に結合しないことが分かった。

40

(実施例 17)

表面プラズモン共鳴 (SPR) を介した組み換え型フィブロネクチン FN7B8 への結合活性の測定

Lcn2 突然変異タンパク質のリアルタイム分析は、ランニングバッファーとして、HBS/ET (0.005% (v/v) Tween 20 を含む 20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) を用いて Biacore X s

50

system (Biacore, Uppsala, Sweden) で実行された。10 mM Na 酢酸塩, pH 4.0 が溶媒である 200 μ g/ml 組み換え型 FN7B8 溶液は、標準のアミンカップリング化学 (Biacore, Uppsala, Sweden) を用いて、CMD 200 m センサーチップ (Xantec bioanalytics, Dueseldorf, Germany) に固定されて、リガンド濃度は約 500 共鳴単位 (RU) であった。精製 Lcn2 突然変異タンパク質は、2.5 から最大で 160 nM の濃度において、25 μ l/min の流量でアプライされた。The センサーグラムは、コントロールチャンネルのために測定される対応するシグナルを差し引くことにより校正された。それは、エタノールアミンを用いて活性化又は抑制された。キネティクスデータの評価は、BIAevaluation ソフトウェア V4.1 を用いた全体的なフィッティングにより行われた (Karlsson ら. (1991) J. Immunol. Methods 145, 229-240)。

10

(表 2) 表面プラズモン共鳴により測定された、選択した Lcn2 突然変異タンパク質の FN7B8 に対するキネティクス結合データ

Lcn2 変異体	k_{on} [$M^{-1} S^{-1}$]	k_{off} [S^{-1}]	K_D [M]
N7A	4.6×10^6	2.6×10^{-2}	5.8×10^{-9}
N7E	4.1×10^6	3.0×10^{-2}	7.2×10^{-9}
N9B	2.1×10^6	7.5×10^{-2}	3.6×10^{-9}
N10D	1.5×10^6	5.8×10^{-2}	3.8×10^{-9}

20

(実施例 18)

ED-B ポジティブ CaCo2 細胞の免疫染色

ヒト結腸癌細胞 (CaCo2 細胞は、H. Daniel, Technische Universität München, Germany により快く提供された; Pujuguet ら., Am. J. Pathol. 148, 579-592) は、細胞コンフルエンスが約 50 から 70% となるまで 37 の湿気環境で、10% ウシ胎児血清、1x MEM 非必須 L アミノ酸及び 50 μ g/ml ゲンタマイシン (PAA Laboratories, Pasching, Austria) が添加された Earle 塩及び L-グルタミンを含む MEM において、Nunc Lab-TekTM II Chamber slideTM system (各スライドに 4 つのチャンバ、Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Germany) で培養された。カバースライドに付着された細胞単層は、PBS (Dulbecco's Ca²⁺ 及び Mg²⁺ 非含有、PAA Laboratories, Pasching, Austria) を用いて洗浄され、続いて蒸留水で洗浄され、その後 5 μ g/ml DAPI (4', 6-ジアミノ-2-フェニルインドール、Sigma-Aldrich, Munich, Germany) を含む氷冷メタノールを用いて 5 分間固定及び対比染色された。

30

40

【0197】

全ての後続のインキュベーションは、暗室で行われた。固定化細胞は、洗浄され、50 μ l の 1 μ 野生型 Lcn2、Lcn2 突然変異タンパク質、PBS 又は ED-B 特異的抗体 scFv-L19 (Pini ら. (1998) J. Biol. Chem. 273, 21769-21776) を用いて 1 時間インキュベートされた。これらの試薬の全ては、Strep-tag II 融合タンパク質として精製された (上記 Schmidt 及び Skerra)。細胞は PBS を用いて洗浄され、非標識抗体 StrepMABimmo (PBS を溶媒として 5 μ g/ml、IBA, Göttingen, Germany) と共に 1 時間インキュベートされ、続いて、2 回の洗浄ステップを行った。最後に、CaCo2 細胞に対する特異的な結合は、2 次抗体として PBS で 1:200 希釈された蛍光標

50

識抗マウスIgG (H+L) F(ab')₂フラグメントDyLight-488接合体 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) を用いて検出された。

【0198】

Axiovert 40 CFL顕微鏡 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) による観察において、全てのLcn2変異体及び抗体scFv-L19は、特異的な細胞染色を示した。その一方、組み換え型野生型Lcn2及びPBSは、このアッセイにおける無視できるシグナルを示した。

(実施例19)

H1-G1の配列位置36におけるフリーシステイン残基の置換によるA 特異的Lcn2突然変異タンパク質H1GA及びH1GVの生成

Cys36は、部位特異的突然変異誘発によりAla又はValに置換された。そのため、PCRは縮重したオリゴデオキシヌクレオチドDH-4 (配列番号: 45)、第2のオリゴデオキシヌクレオチドJ08rev (配列番号: 48)、及び鑄型としてLcn2突然変異タンパク質H1-G1をコードするプラスミドDNA (配列番号: 37) を用いて行われた。増殖されたフラグメントは、発現プラスミドpHNGAL98におけるBstXIを介してサブクローニングされ、個々の置換変異体を同定するために配列決定された。アミノ酸置換の導入により生じたLcn2変異体は、H1GA (配列番号: 49, 50) 及びH1GV (配列番号: 51, 52) と名付けられた。

(実施例20)

高光学濃度を有するE. coli培養物を用いる新規のA 特異的Lcn2突然変異タンパク質H1GA及びH1GVの可溶性物質及びその精製

組み換え型Lcn2及びその突然変異タンパク質は、E. coli JM83におけるペリプラズム分泌により産生された。可溶性タンパク質の発現のために、H1GA (配列番号: 49) 又はH1GV (配列番号: 51) のいずれかをコードする対応するBstXI挿入を有するプラスミドpHNGAL98が用いられた。

【0199】

培養体は、100mg/Lアンピシリン (Amp) を含む2L LB培地により22で振とう培養された。遺伝子発現は、終末濃度が0.2mg/Lになるようにアンヒドロテトラサイクリン (anhydrotetracycline, anTc) を加えることにより、OD₅₅₀ = 2.5の細胞濃度で誘導された。5時間の培養後、細胞は遠心分離により回収され、0.1mg/mlリゾチームを含む40ml氷冷ペリプラズム分別バッファー (0.5Mスクロース, 1mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8.0) に再懸濁され、30分間氷上でインキュベートされた。生じたスフェロプラストは、遠心分離を繰り返して沈殿され、可溶性組み換え型タンパク質を含む上清が回収された。

【0200】

可溶性タンパク質は、Strep-tag IIを用い、その後、PBSバッファー (4mM KH₂PO₄, 16mM Na₂HPO₄, 115mM NaCl, pH 7.4) を用いたSuperdex 75 HR 10/30カラムでのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によりアフィニティー精製された。タンパク質純度は、SDS-PAGEにより確認された。タンパク質濃度は、A 特異的突然変異タンパク質H1GA (配列番号: 50) 及びH1GV (配列番号: 52) において、27055 M⁻¹ cm⁻¹ の算出された吸光係数を用いて、280nmでの吸収測定により決定された。

(実施例21)

Biacore X計測器での表面プラズモン共鳴を介した - A 40に対する結合活性の測定

Lcn2突然変異タンパク質H1GA又はH1GVと - A 40 (配列番号: 33) との相互作用のリアルタイム分析は、ランニングバッファーとしてPBS/T (0.005% (v/v) Tween 20を含む4mM KH₂PO₄, 16mM Na₂HPO₄, 115mM NaCl, pH 7.4) を用いて、Biacore X syst

10

20

30

40

50

emで行われた。10 mM Na 酢酸塩, pH 4.5 を溶媒とした実施例 2 からの 15 μ g/ml - A 40 溶液は、標準のアミンカップリング化学を用いて CMD 200 チップ (Xantec, Dusseldorf, Germany) に固定されて、リガンド濃度は 1316 共鳴単位 (RU) であった。実施例 20 の精製 Lcn2 突然変異タンパク質 H1GA 及び H1GV は、20 μ L/min の流量で、4 nM から 128 nM までの濃度範囲でアプライされた。そのデータは、エタノールアミンを用いて活性化及び抑制されたコントロールチャンネルの測定された対応する信号を差し引くこと、及びバッファ注入の平均の測定信号を差し引くことにより 2 重参照された。キネティクスデータは、BIAevaluation ソフトウェア V 3.0 を用いて全体的に適合された (Karlssonら. (1991) J. Immunol. Methods 145, 229 - 240)。

(実施例 22)

Biacore T100 計測器測定における表面プラズモン共鳴を介した A 40 の結合活性の測定

Lcn2 突然変異タンパク質 H1GA と A 40 (配列番号: 29) との相互作用のリアルタイム分析は、ランニングバッファとして PBS/P (0.005% (v/v) Surfactant P20 を含む 4 mM KH_2PO_4 , 16 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl, pH 7.4) を用いて、Biacore T100 system (Biacore, Uppsala, Sweden) で行われた。10 mM 酢酸ナトリウム pH 4.5 を溶媒とした実施例 2 からの 10 μ g/ml A 40 溶液は、標準のアミンカップリング化学を用いて、CM5 チップ (Biacore, Uppsala, Sweden) に固定化されて、リガンド濃度は 325 RU であった。実施例 20 の精製 Lcn2 突然変異タンパク質 H1GA は、30 μ L/min の流量で、1 nM から 32 nM までの濃度範囲でアプライされた。H1GA の希釈系列は、 k_{on} の情報を得るために、300 s の結合及び解離時間の両方を用いて導入された。低 k_{off} 比の正確な測定のために、最高濃度は、7200 s の解離時間を用いて分析された。そのデータは、実施例 21 のように 2 重参照された。結合反応の k_{on} 及び k_{off} は、データ処理及びキネティクスフィッティングのために Biacore T100 Evaluation ソフトウェア V2.0.3 を用いて全体のデータセットから決定された。そのデータは、1:1 結合モデルを用いて、全体的に適合された。

(実施例 23)

ThT 凝集アッセイによる Lcn2 突然変異タンパク質 H1GA の機能分析

チオフラビン T (ThT) 凝集アッセイのために、合成 A ペプチド (配列番号: 29) は、1, 1, 1, 3, 3, 3 - ヘキサフルオロ - 2 - プロパノール (HFIP, Sigma - Aldrich, Steinheim, Germany) に 12 時間溶解された。HFIP は、真空下で蒸発され、A は適量の蒸留水に溶解され、4 で 15 分間超音波処理され、濾過された (Costar Spin-X 遠心管フィルターセルロース酢酸塩膜, 0.45 μ M; Corning Inc., Corning, NY)。可溶化単量体 A は、その後すぐに、凝集アッセイに用いられた。

【0201】

500 μ L の 1 mg/ml A は、種々のモル比の様々な Lcn2 突然変異タンパク質又は BSA を含む 0.5 x PBS の非存在又は存在下において、37 で攪拌しながらインキュベートされた。凝集反応は、3 つ組で準備された。蛍光測定のために、20 μ L の定期的に取りられたサンプルは、0.5 x PBS に含まれる 50 μ の終末濃度で 180 μ L ThT と混合され、FluoroMax - 3 分光蛍光光度計を用いて (HORIBA Jobin Yvon, Grasbrunn, Germany)、450 nm の励起波長及び 482 nm の発光波長で分析された。

(実施例 24)

表面プラズモン共鳴 (SPR) を介した組み換え型フィブロネクチン単ドメイン ED - B への結合活性の測定測定

10

20

30

40

50

Lcn2 突然変異タンパク質のリアルタイム相互作用分析は、ランニングバッファーとして、HBS / ET (0 . 0 0 5 % (v / v) Tween 20 を含む 2 0 m M Hepes , pH 7 . 5 , 1 5 0 m M NaCl , 1 m M EDTA) を用いて、Biacore X 計測器で行われた。1 0 m M Na 酢酸塩 , pH 4 0 が溶媒である 1 0 0 μ g / m l 組み換え型 ED - B 溶液は、標準のアミンカップリング化学を用いて、CMD 2 0 0 m センサーチップに固定化されて、リガンド濃度は約 1 8 0 共鳴単位 (RU) であった。精製 Lcn2 突然変異タンパク質は、2 5 μ l / m i n の流量で、2 . 5 から 1 6 0 n m までの濃度でアプライされた。センサーグラムは、エタノールアミンを用いて活性化及び抑制されたコントロールチャンネルの測定された対応するシグナルを差し引くことにより校正された。キネティクスデータの評価は、BIAevaluationソフトウェア

10

V 4 . 1 を用いて全体的にフィッティングすることにより行われた (Karlsson ら . (1 9 9 1) J . Immunol . Methods 1 4 5 , 2 2 9 - 2 4 0) 。 N 1 0 D の場合において、異種検体競合反応モデルは、データフィッティングのために用いられ、2 つの速度定数を生じた。

(表 3) 表面プラズモン共鳴により測定された Lcn2 突然変異タンパク質の ED - B に対するキネティクス結合データ

Lcn2 変異体	$k_{on}[M^{-1}S^{-1}]$	$k_{off}[S^{-1}]$	$K_D[M]$
N7A	1.8×10^6	0.138	1.27×10^{-7}
N7E	3.1×10^6	0.054	1.73×10^{-8}
N9B	1.45×10^6	7.62×10^{-3}	5.26×10^{-9}
N10D	$k_1 = 6.21 \times 10^5$ $k_2 = 2.94 \times 10^4$	$k_1 = 0.064$ $k_2 = 3.35 \times 10^{-3}$	

20

FIG. 10

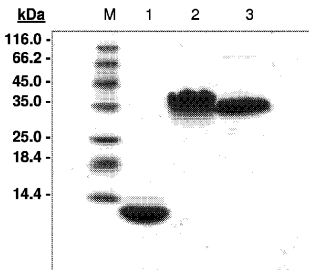
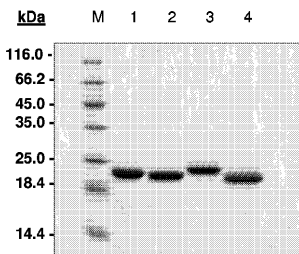
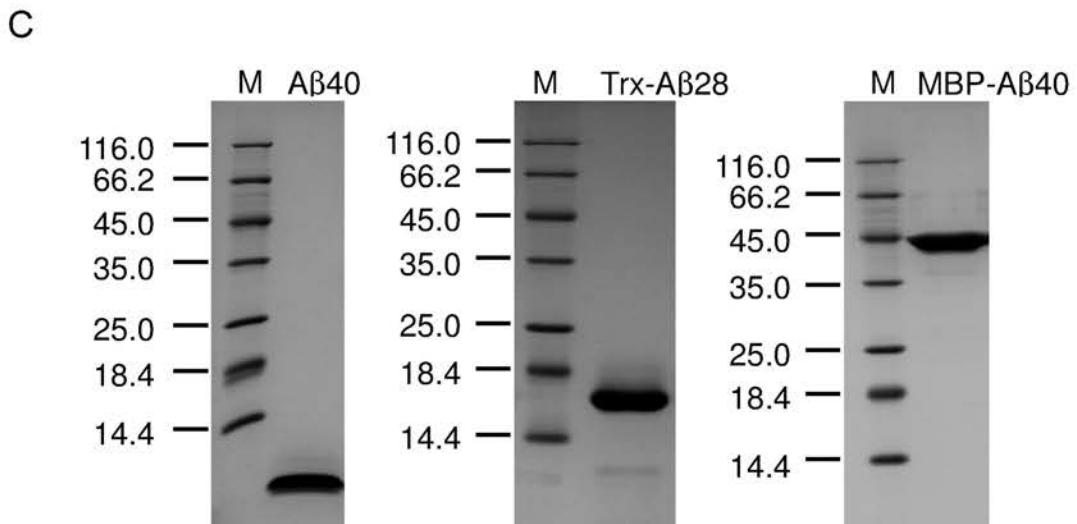
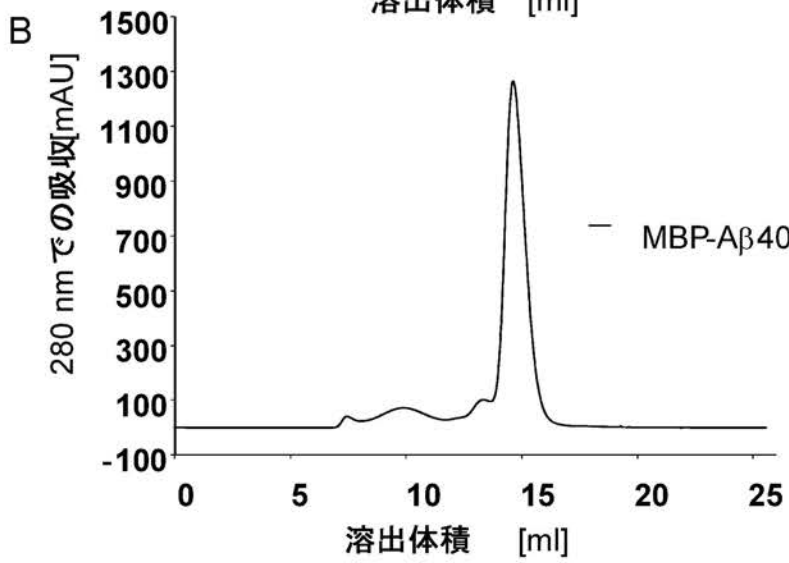
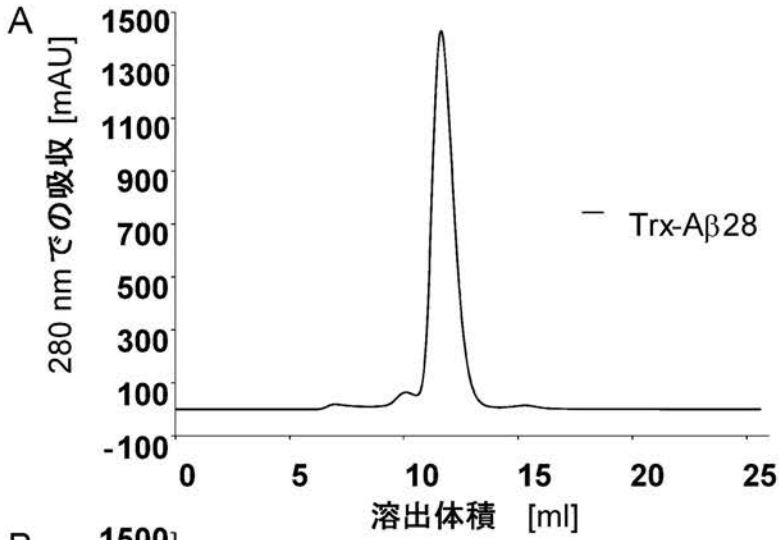


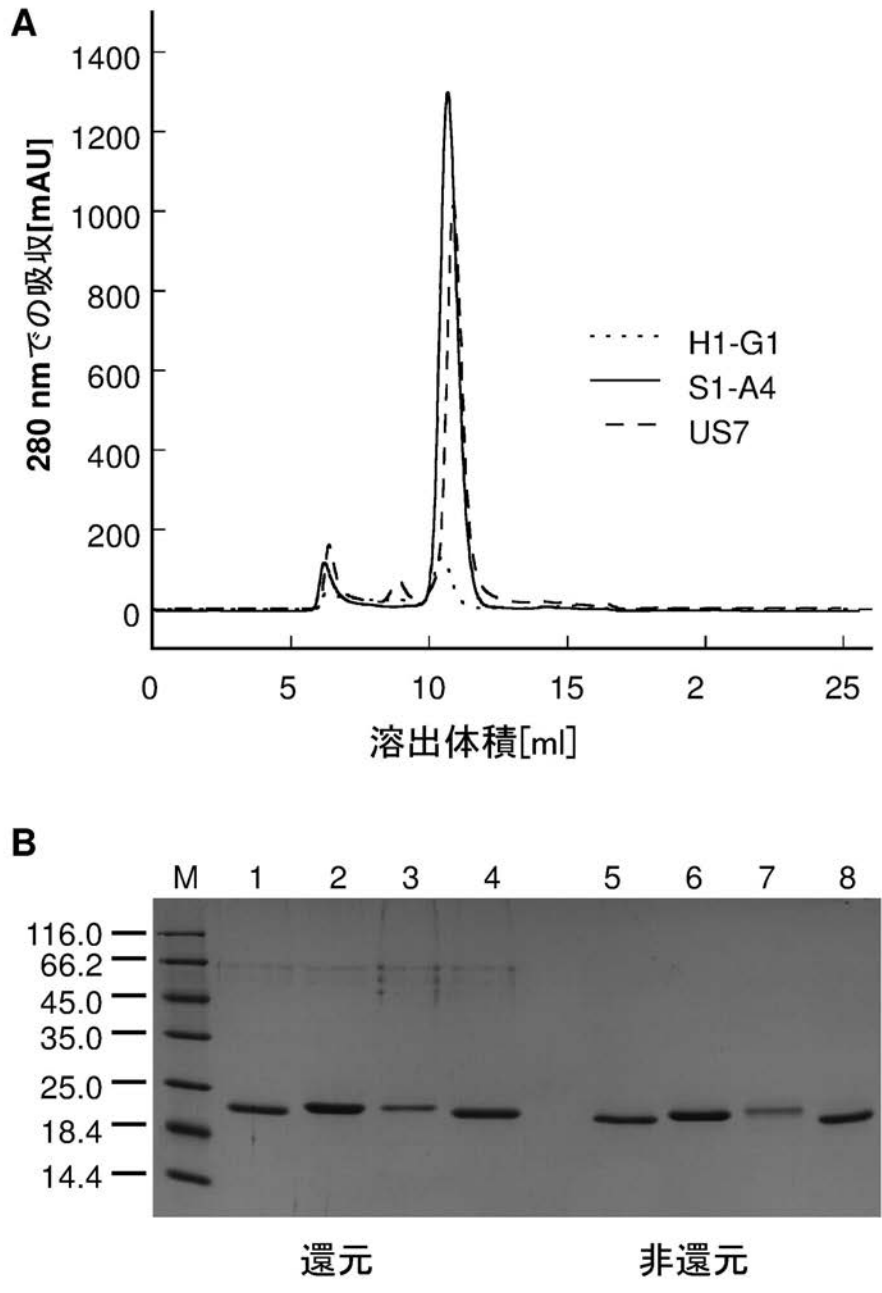
FIG. 11



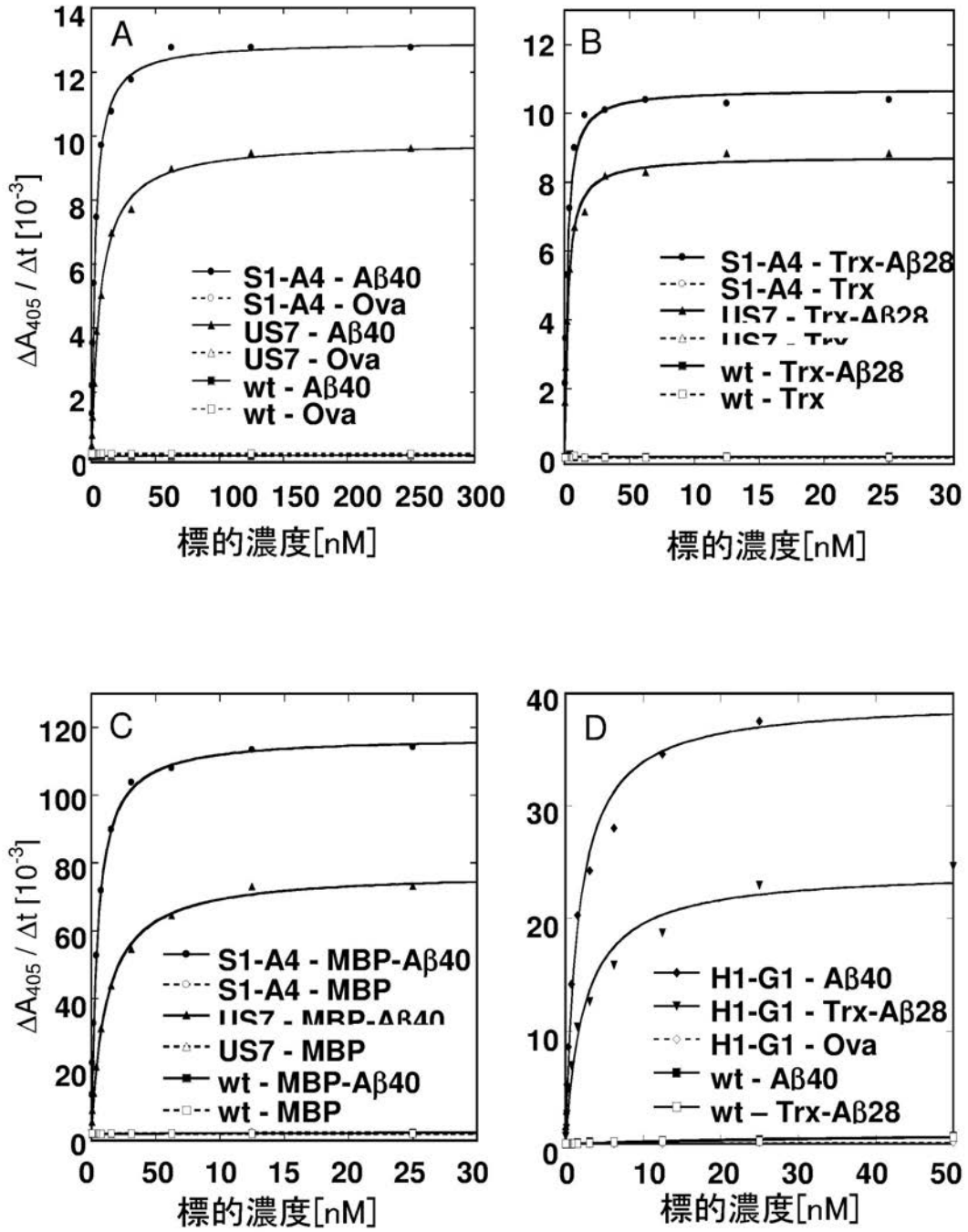
【 図 3 】



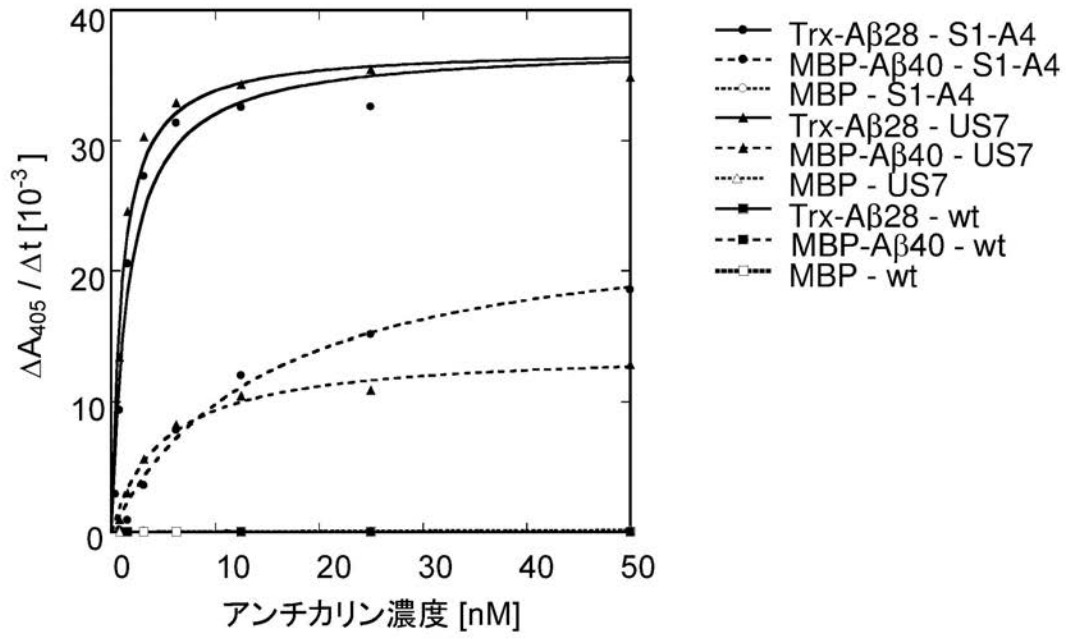
【 図 4 】



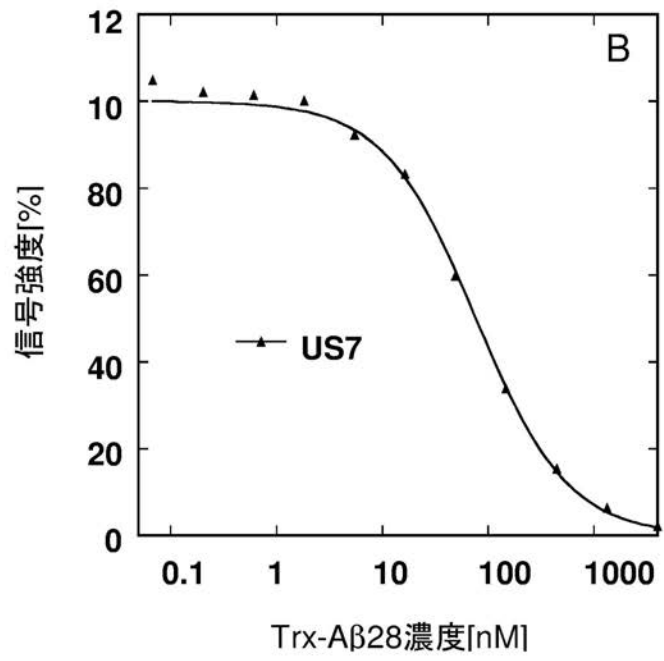
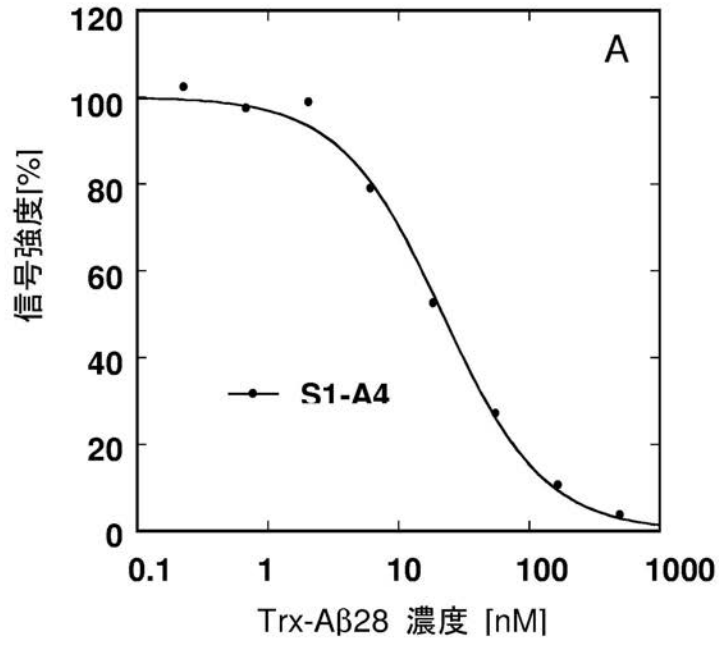
【 図 5 】



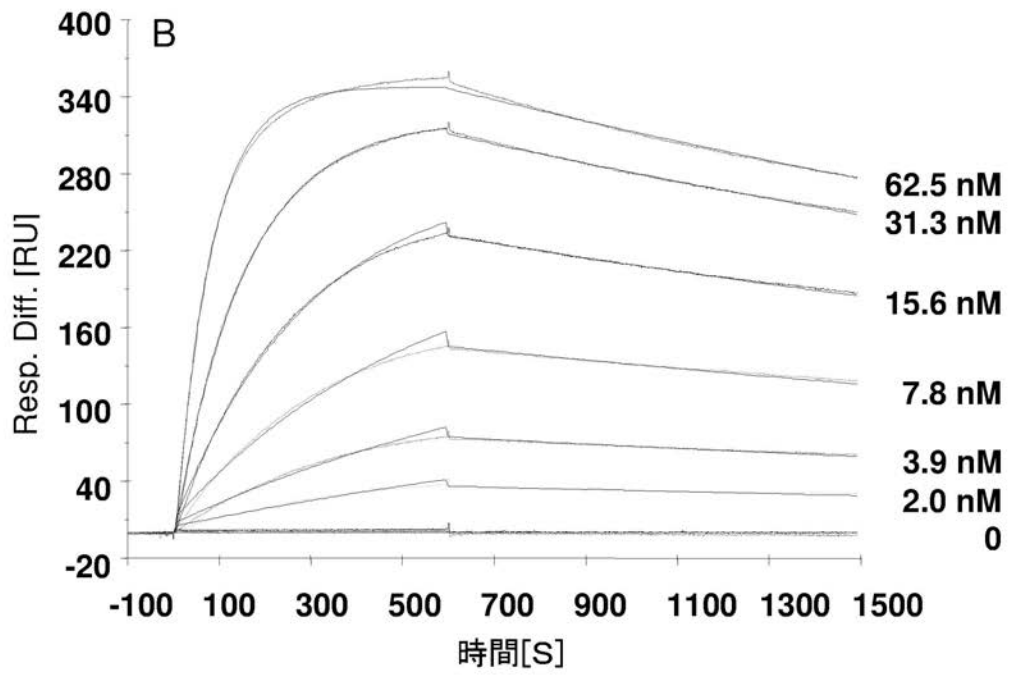
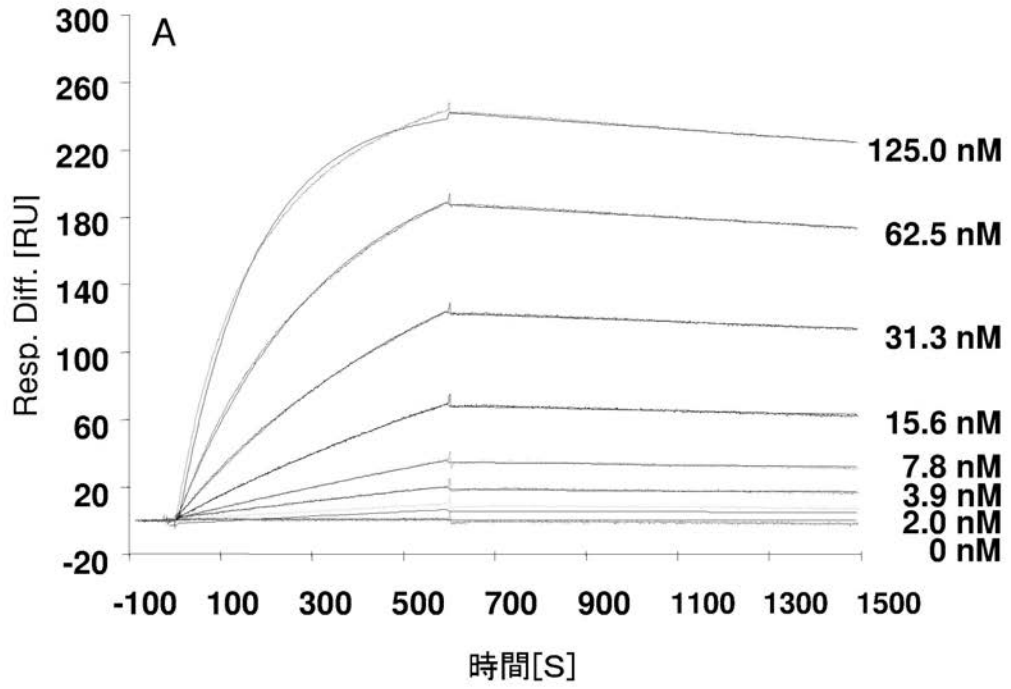
【 図 6 】



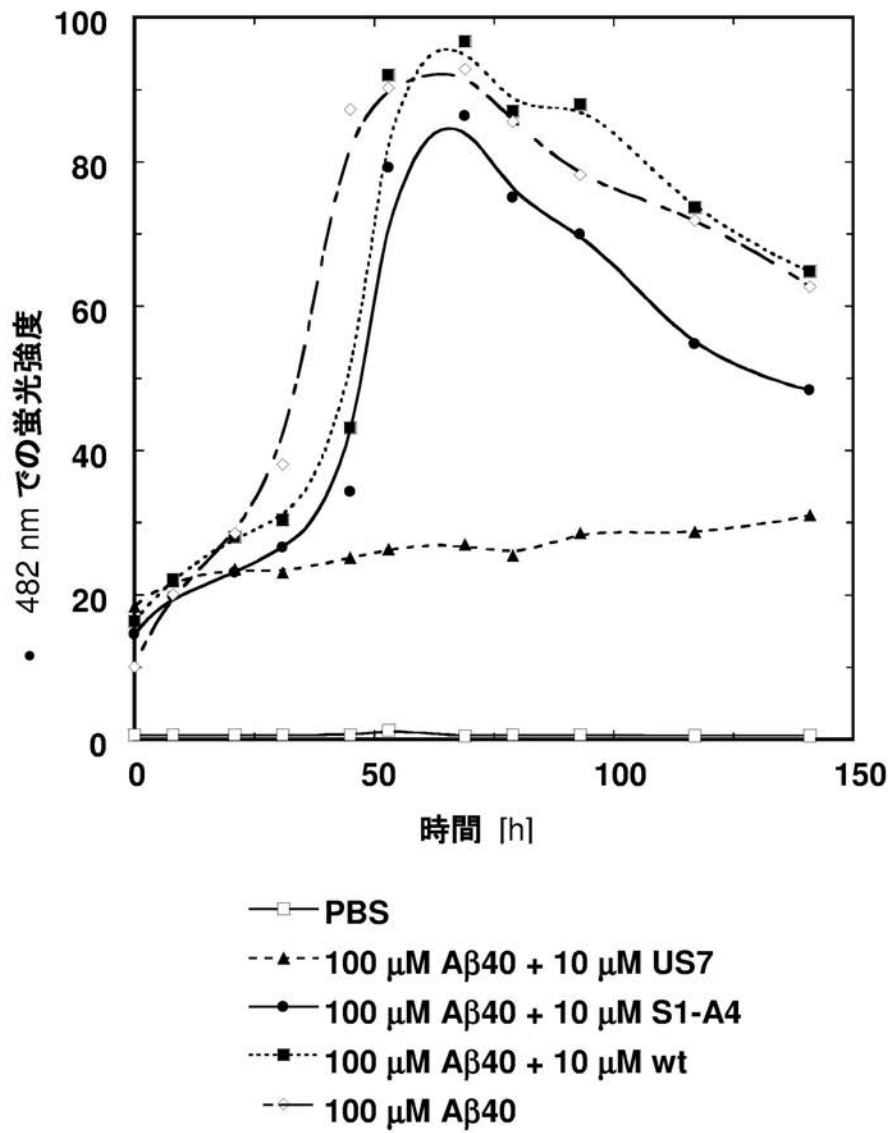
【 図 7 】



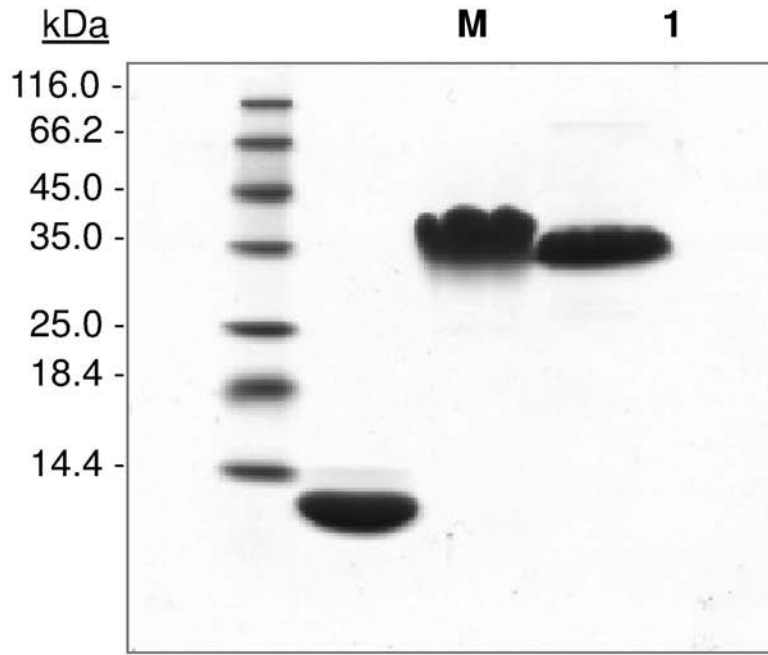
【 図 8 】



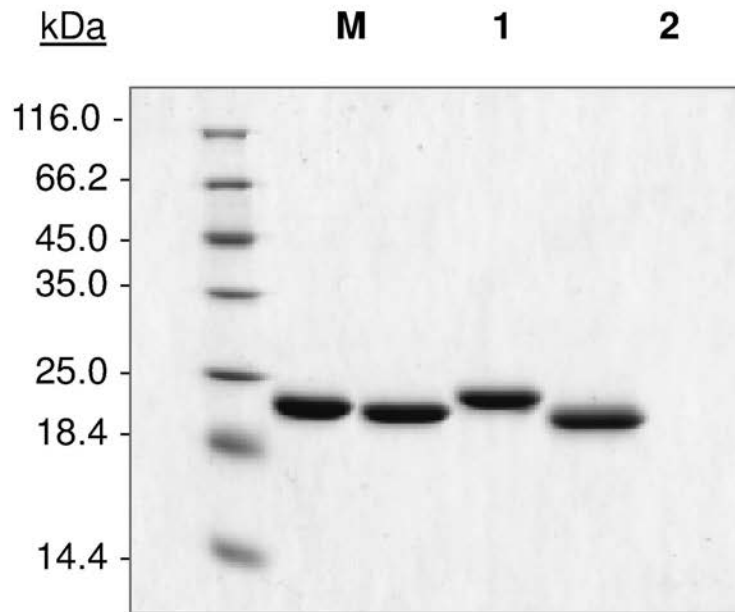
【 図 9 】



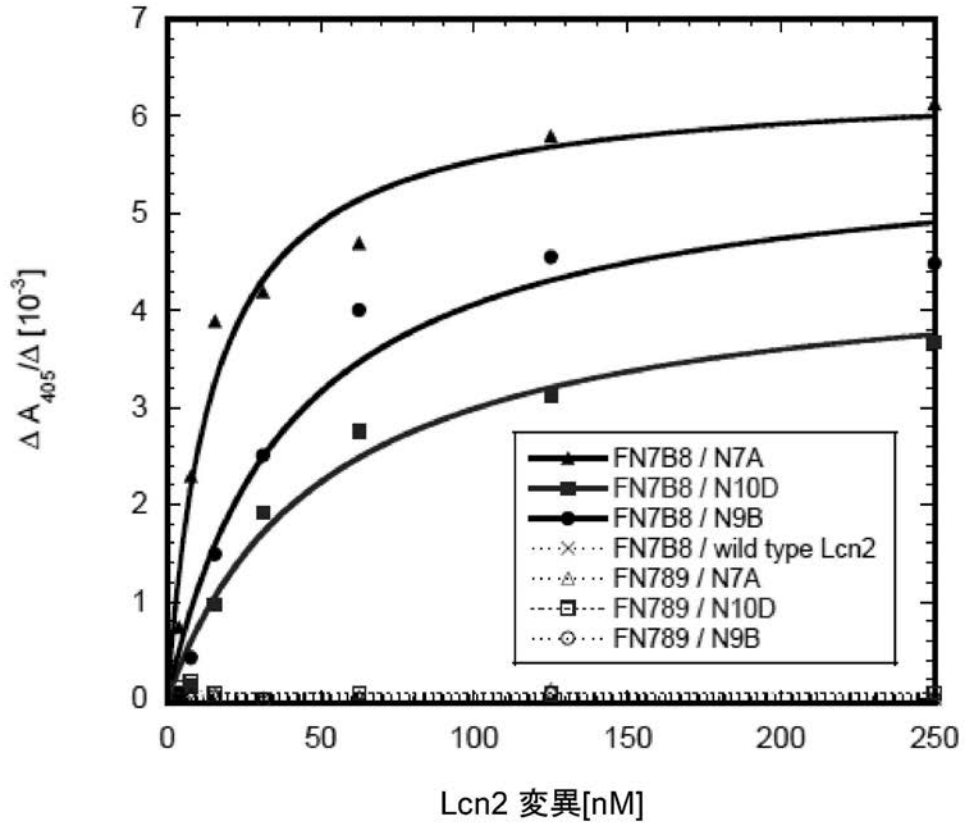
【 図 1 0 】



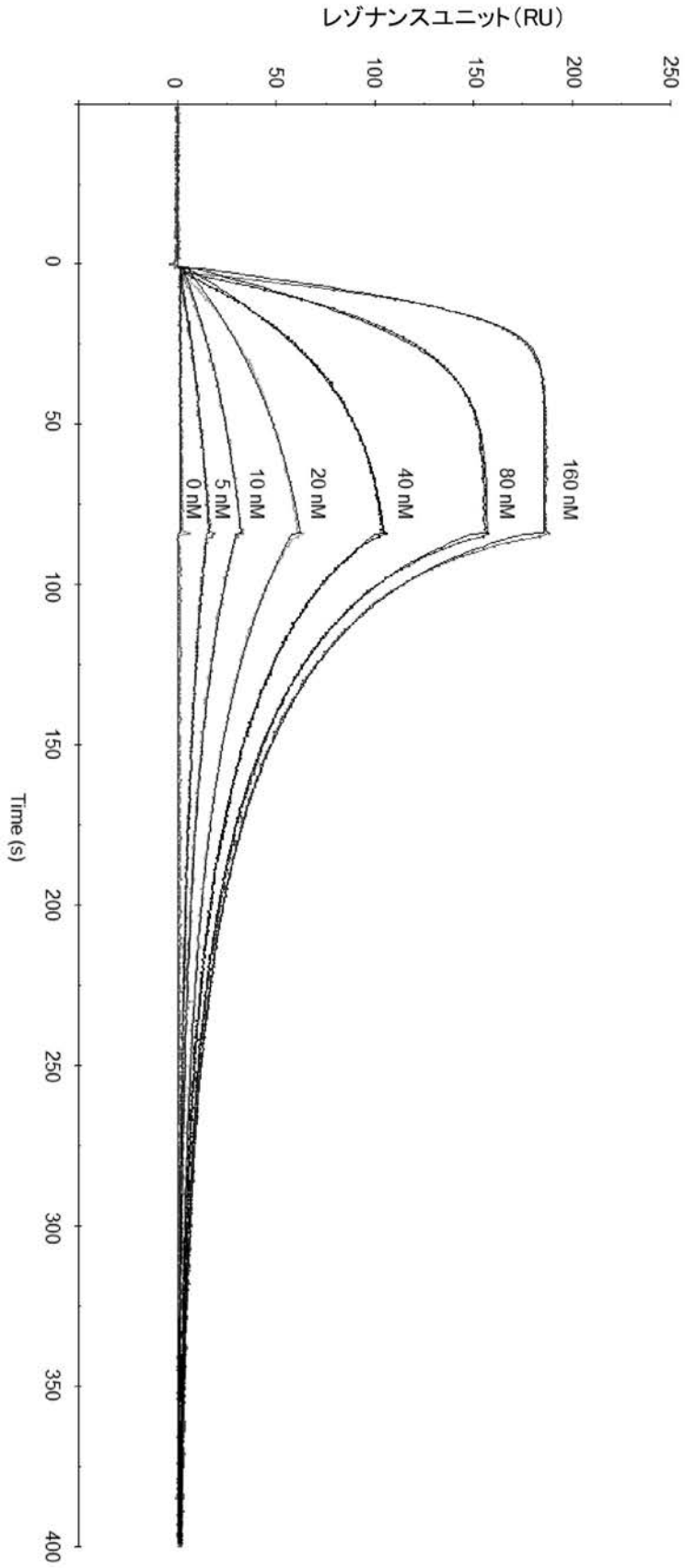
【 図 1 1 】



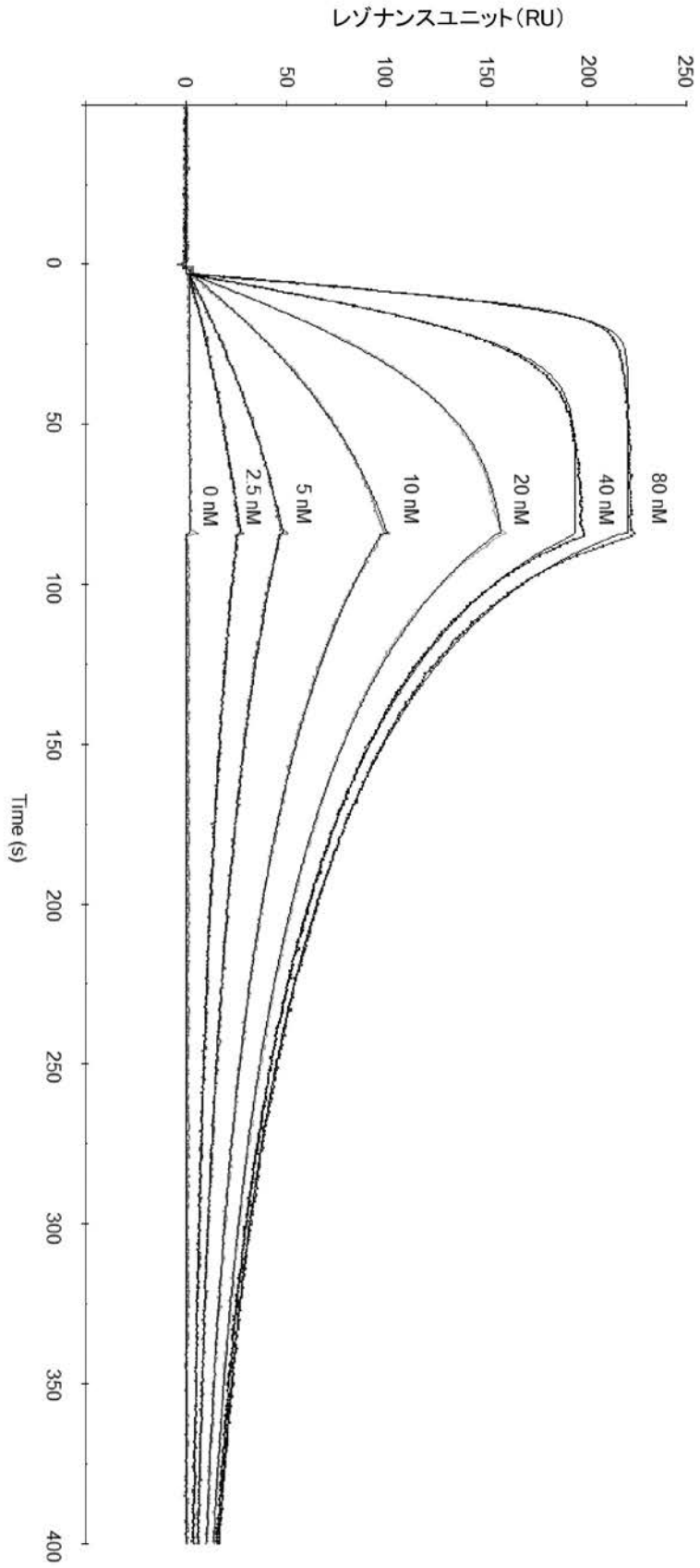
【 図 1 2 】



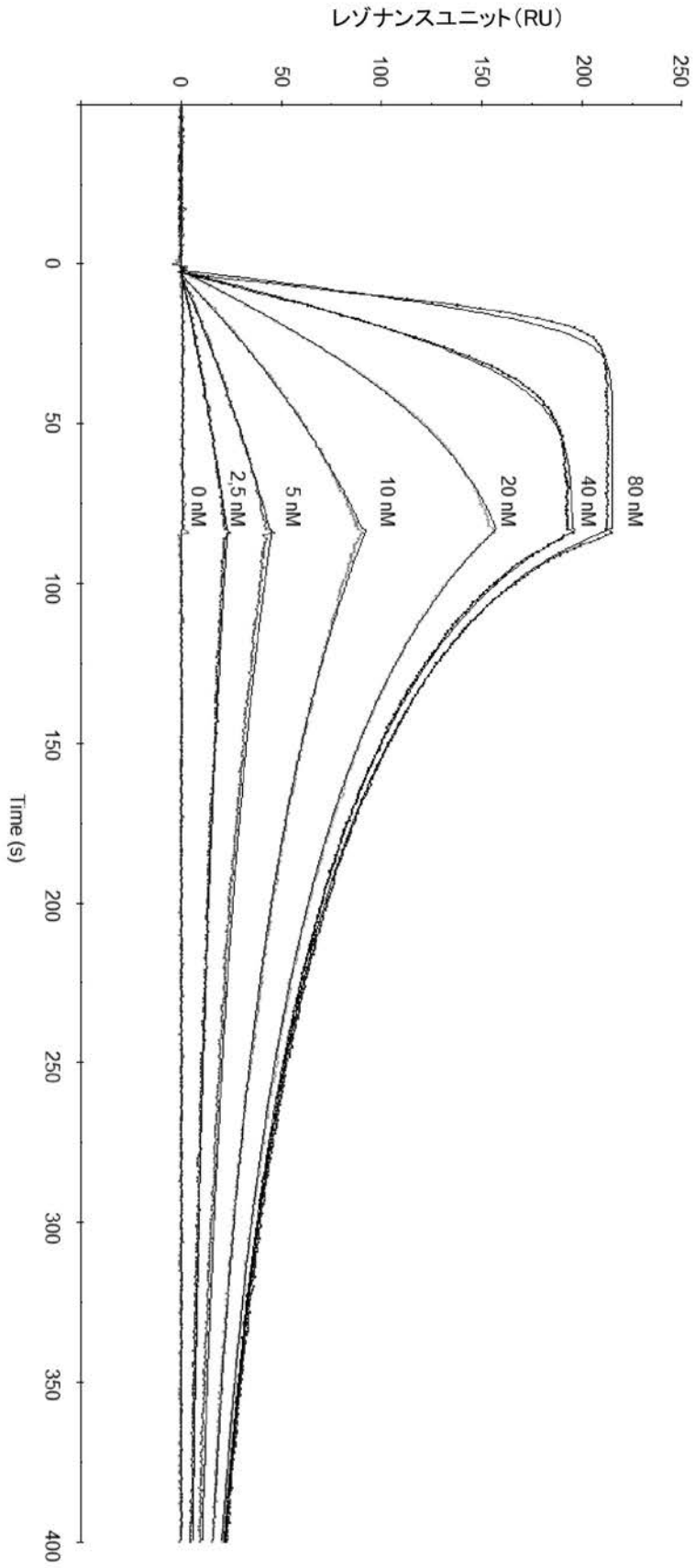
【 図 1 3 】



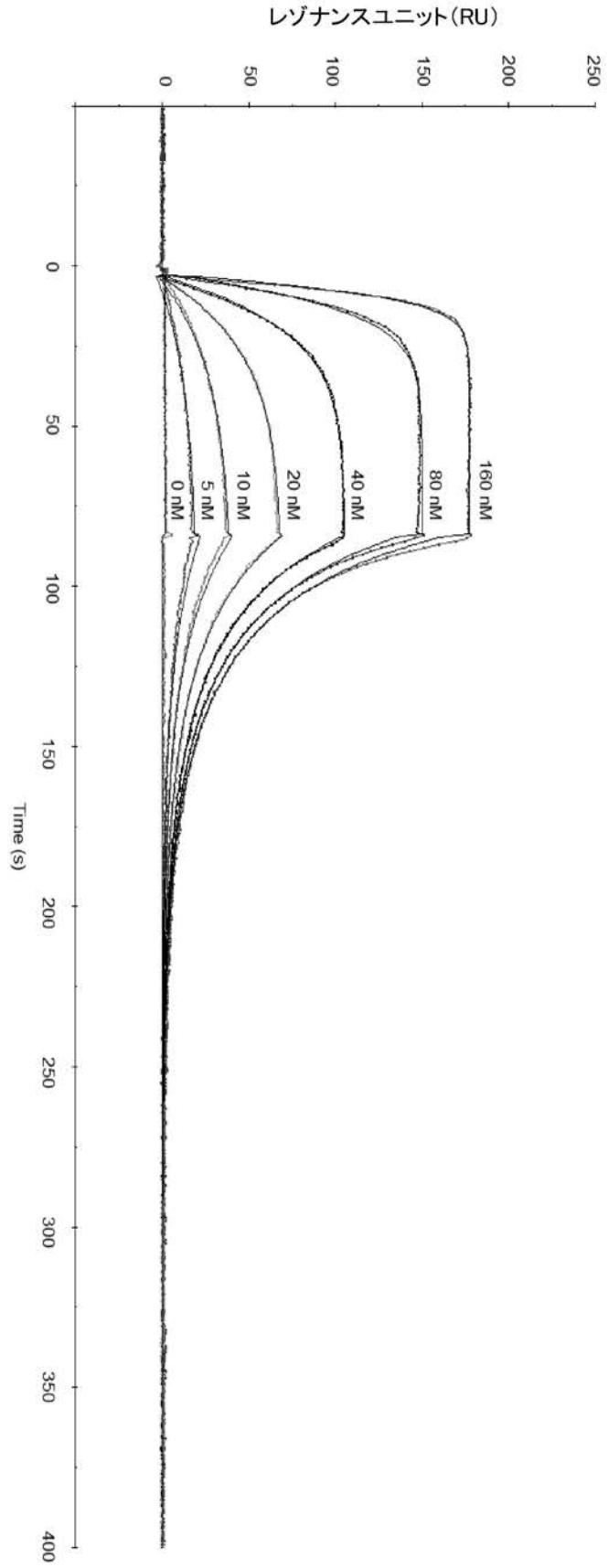
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

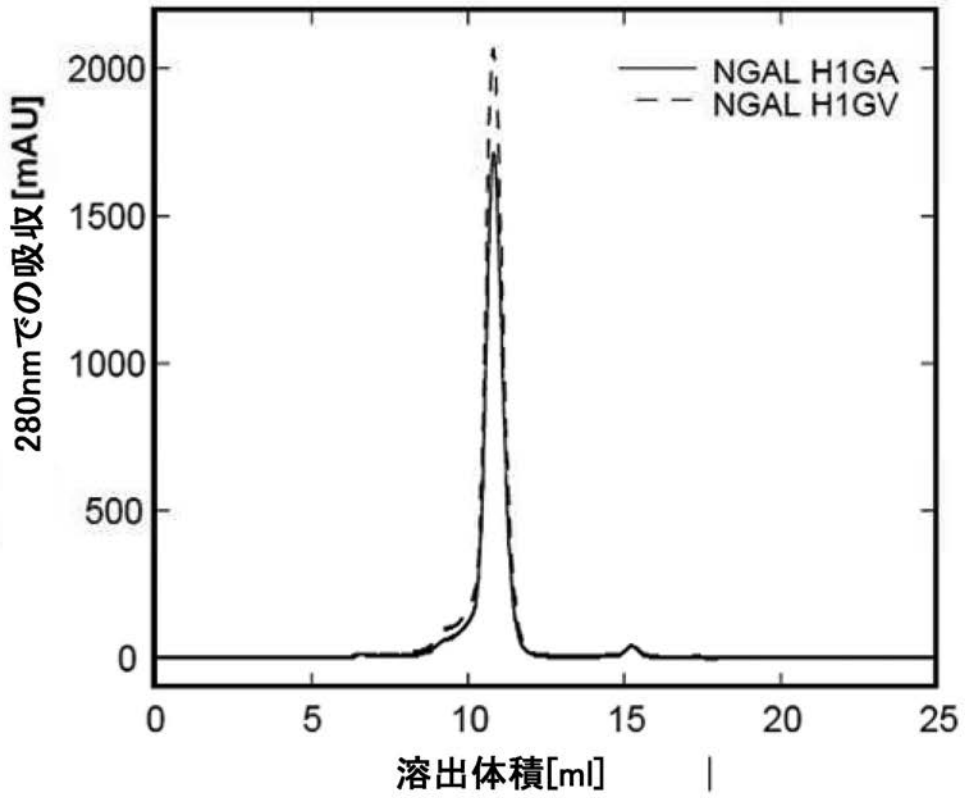


【 図 1 6 】

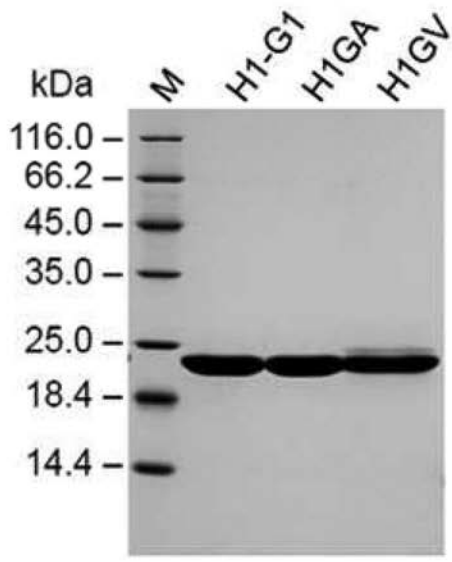


【 図 1 8 】

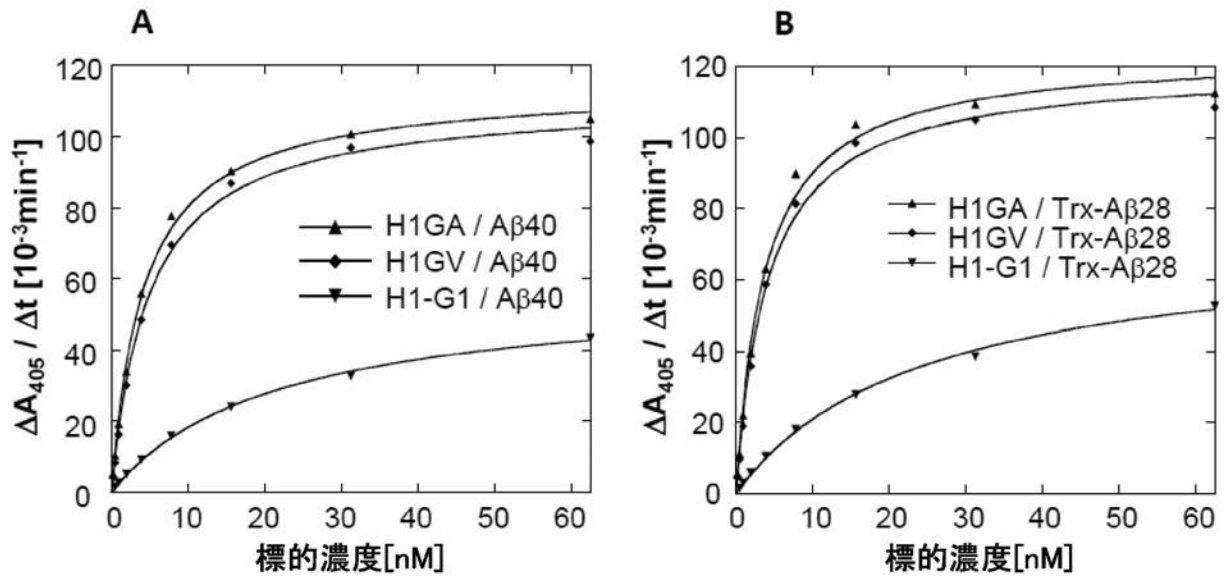
A



B

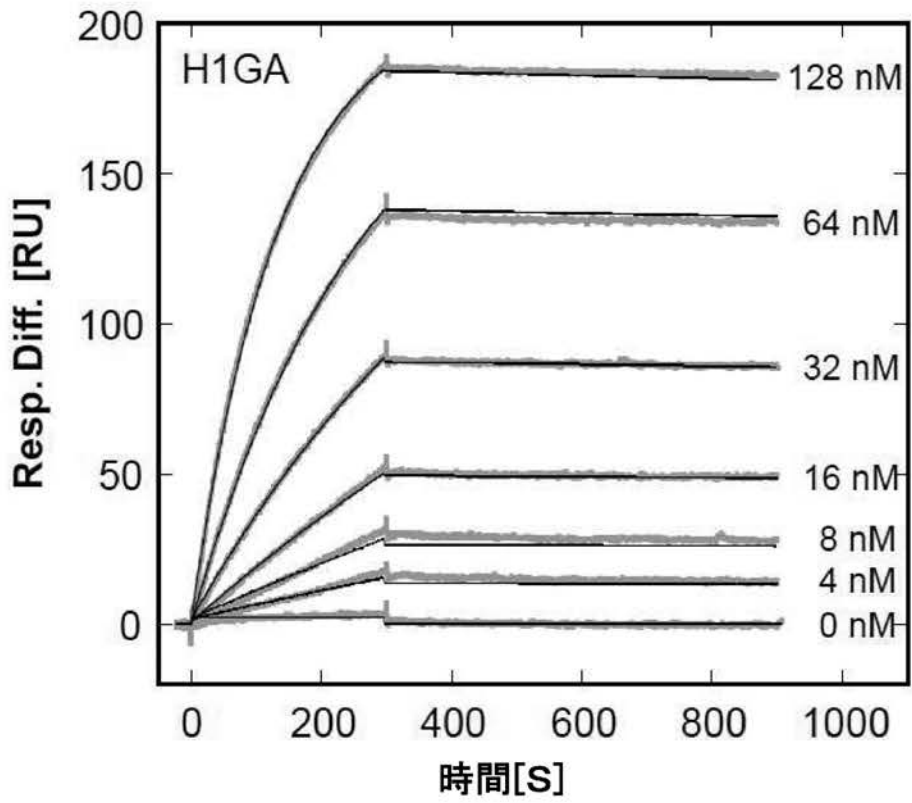


【 図 19 】

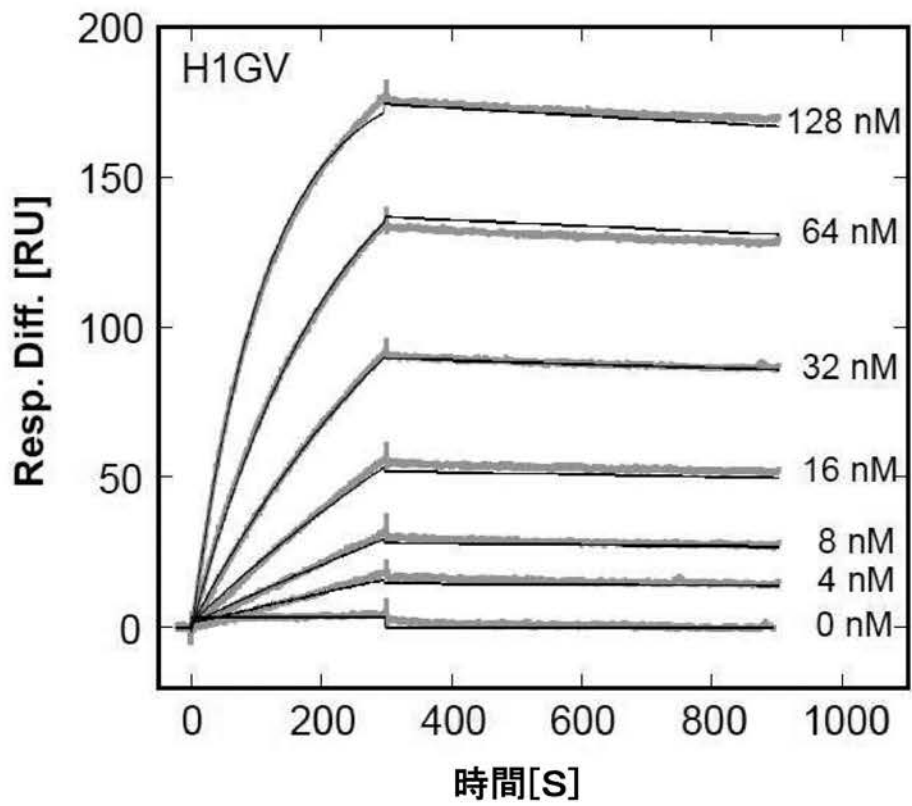


【 図 2 0 】

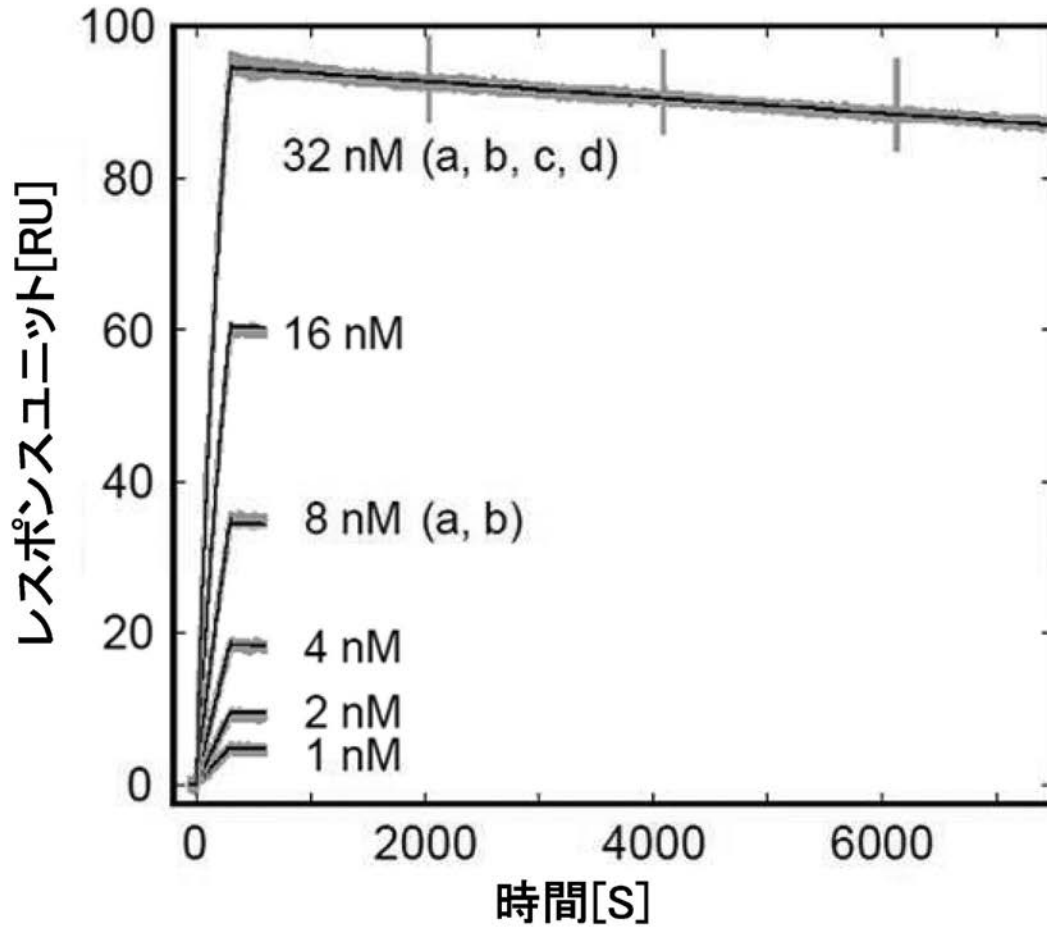
A



B

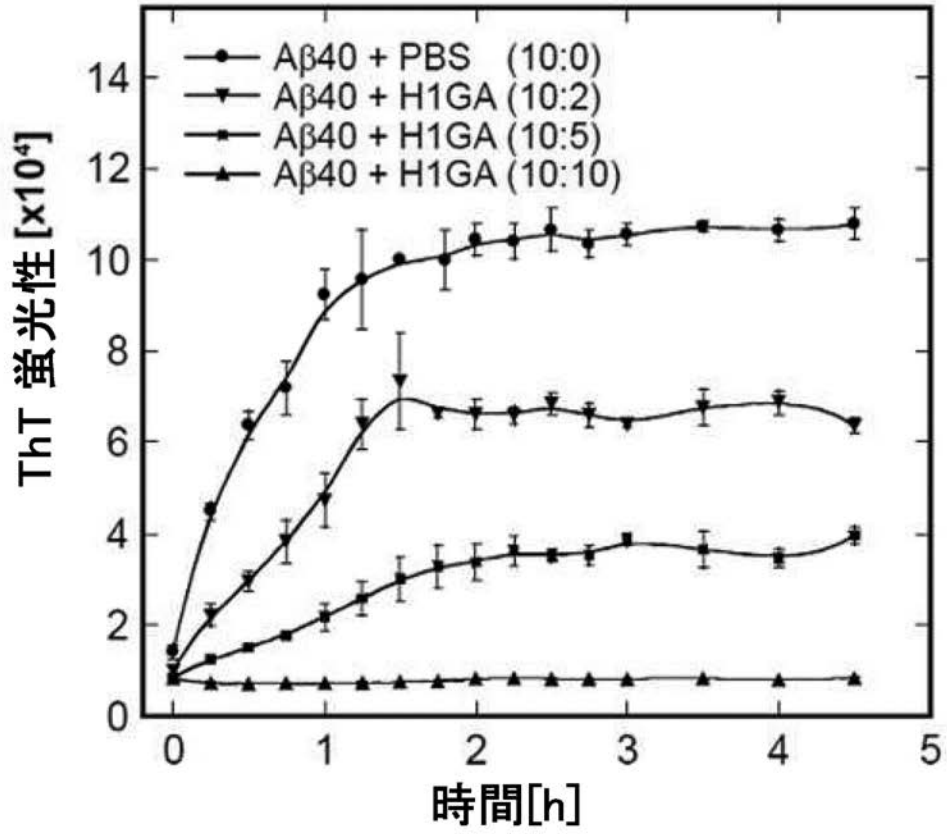


【 図 2 1 】

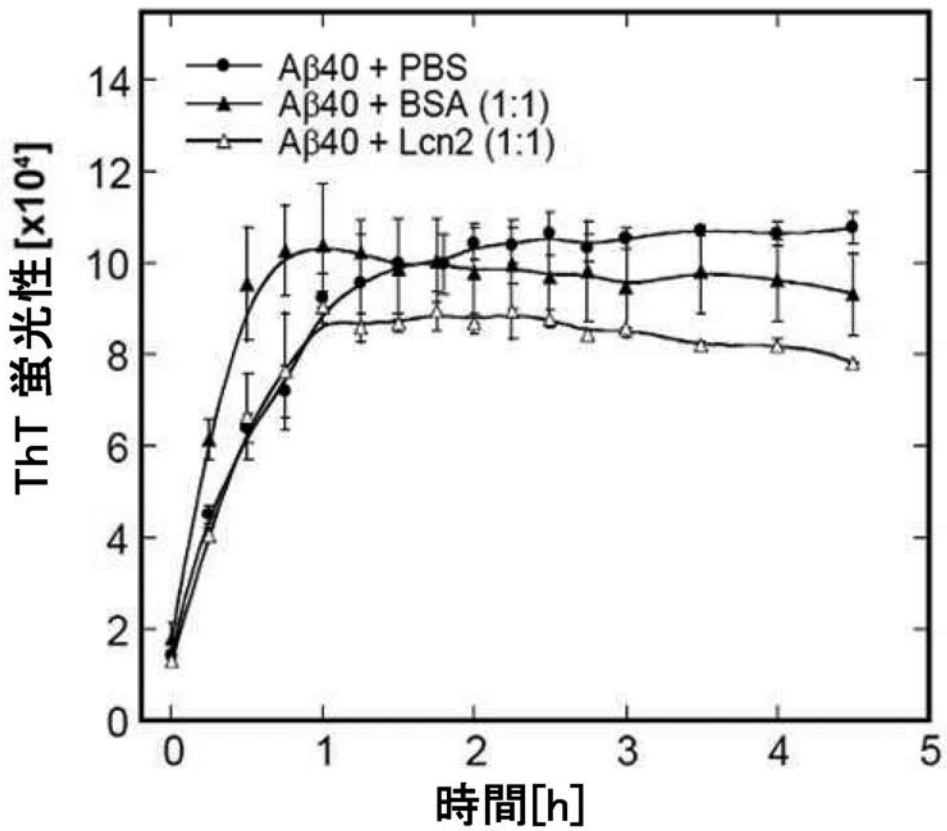


【 図 2 2 】

A



B



【 図 2 3 】

	K_D [nM]	
	H1GA	H1GV
Aβ40 (Capture ELISA, Fig 19)	4.2 ± 0.3	4.9 ± 0.3
Trx-Aβ28 (Capture ELISA, Fig 19)	3.8 ± 0.4	4.2 ± 0.4
MBP-Aβ40 (SPR, Fig 20) *	0.48	1.1
Aβ40 (SPR, Fig 21) **	0.095	-

* 十分長くない分離時間

* * 分離時間が十分長いためより信頼できる値

【 2 4 】

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90
Lcn2  QDSTDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVLGNAGNAILREDKDPQKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRRKKKDYWIRTFVPGCQPG
Lib   .....x.x.xx.....x.x.....x.x.xx.....x.x.....x.x.....x.x.....
S1-A4 .....V.....YT.....L.Y.....S.G.RL.....N.K.R.....S.....
US7   .....V.....KS.....W.Y.....S.G.GT.....H.K.R.....S.....
H1-G1 .....C.....VL.....L.Y.....S.G.DD.....L.K.R.....S.....
H1GA .....A.....VL.....L.Y.....S.G.DD.....L.K.R.....S.....
H1GV .....V.....VL.....L.Y.....S.G.DD.....L.K.R.....S.....
N7A   .....K.....HD.....R.Q.....N.R.VH.....N.R.W.....S.....
N7E   .....E.....SL.....R.Y.....S.R.RS.....H.L.R.....S.....
N9B   .....R.....MR.....A.V.....K.M.QR.....K.M.N.....S.....
N10D  .....A.....TW.....Y.Q.....N.L.MS.....R.M.H.....S.....
=====A=====1-----B=====C-----#2-----D=====

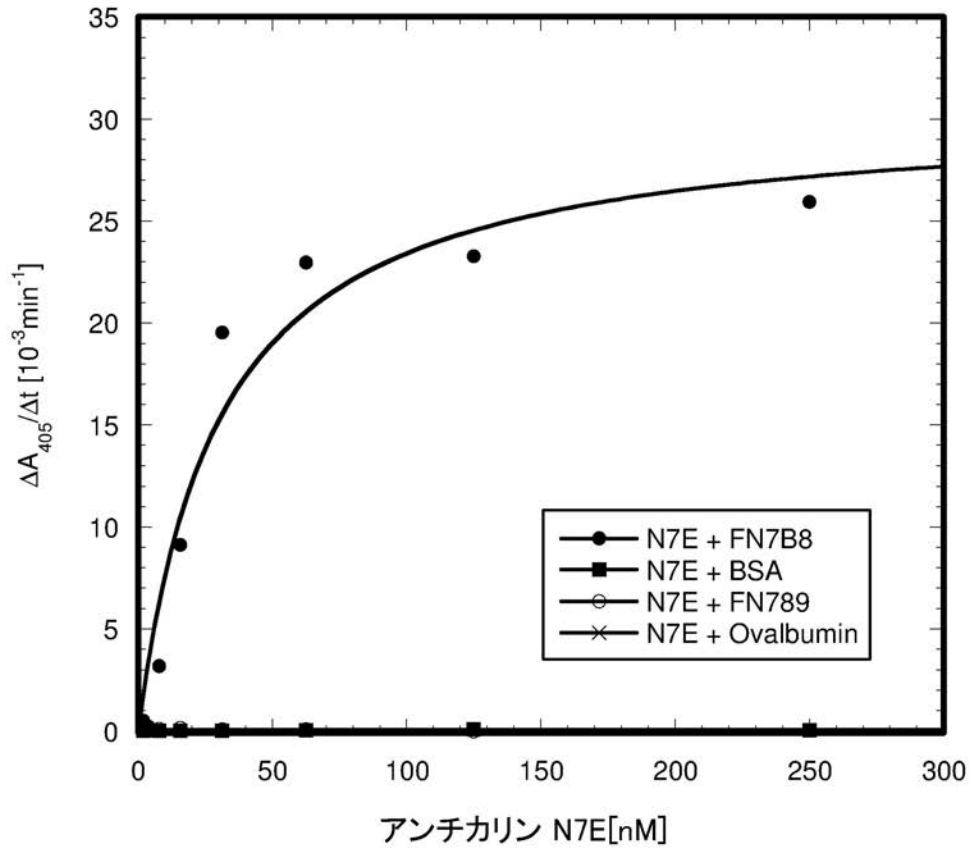
```

```

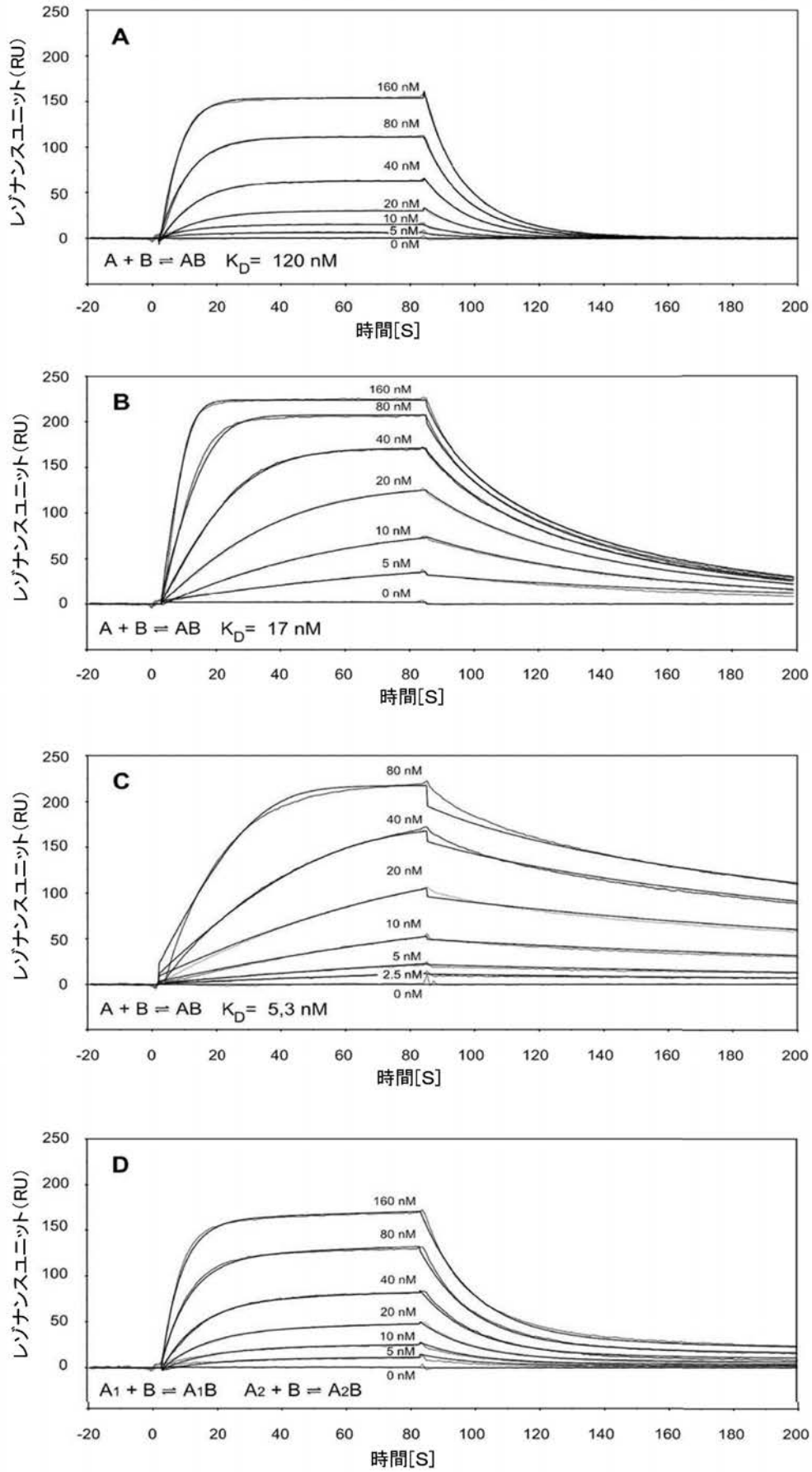
100     110     120     130     140     150     160     170
Lcn2  EFTLGNIKSYPLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSONREYFKITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVIDQCIDG
Lib   .....x.x.x.x.....x.x.....x.x.....x.x.....x.x.....x.x.....
S1-A4 .....I.....Q.M.Y.....T.G.....M.N.....S.....S.....
US7   .....R.....R.A.....V.Q.....S.N.....S.....S.....
H1-G1 .....R.....E.G.W.....E.A.....T.N.....T.N.....T.N.....
H1GA .....R.....E.G.W.....E.A.....T.N.....T.N.....T.N.....
H1GV .....R.....E.G.W.....E.A.....T.N.....T.N.....T.N.....
N7A   .....N.....W.L.W.....R.Y.....L.E.....N.....N.....
N7E   .....L.....K.H.F.....T.A.....Y.F.....Y.F.....Y.F.....
N9B   .....A.....P.P.T.....H.F.....Y.H.....Y.H.....Y.H.....
N10D  .....S.....W.L.W.....R.Y.....F.G.....F.G.....F.G.....
==E-----#3-----F=====G-----#4-----H=====

```

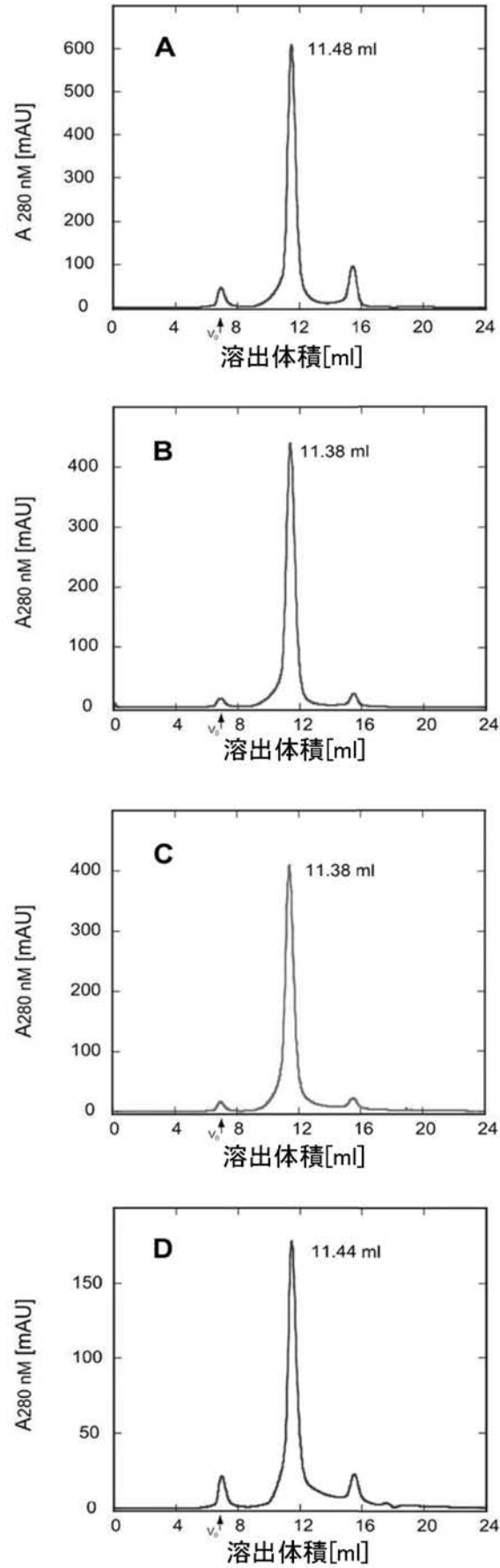

【 図 2 6 】



【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



【 配 列 表 】

2013512683000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2010/069028
Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)		
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:	
a.	(means)	
	<input checked="" type="checkbox"/>	on paper
	<input checked="" type="checkbox"/>	in electronic form
b.	(time)	
	<input checked="" type="checkbox"/>	in the international application as filed
	<input type="checkbox"/>	together with the international application in electronic form
	<input type="checkbox"/>	subsequently to this Authority for the purpose of search
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3.	Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP2010/069028**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.:
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.:

1-54(partially)

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 SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/069028

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/566 C07K1/00 C07K14/775 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) G01N C07K		
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, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM H ET AL: "High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2", JOURNAL OF THE PHYSICAL SOCIETY OF JAPAN, vol. 131, no. 10, March 2009 (2009-03), pages 3565-3576, XP002554901, table 2	1-16,19, 20,23-54
X	SKERRA A: "Anticalins as alternative binding proteins for therapeutic use", CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, vol. 9, no. 4, 2007, pages 336-344, XP009101213, page 340	1-16,19, 20,23-54
A	WO 99/16873 A1 (SKERRA ET AL) 8 April 1999 (1999-04-08) the whole document	1-54
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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		*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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
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)		*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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
24 February 2011	15/06/2011	
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 Gunster, Marco	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/069028

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	W0 2009/156456 A1 (SKERRA ET AL) 30 December 2009 (2009-12-30) the whole document -----	1-54

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/069028

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9916873	A1	08-04-1999	AT 496128 T 15-02-2011
			AT 226248 T 15-11-2002
			AU 1143799 A 23-04-1999
			DE 19742706 A1 15-04-1999
			DE 59805995 D1 21-11-2002
			DK 1270725 T3 02-05-2011
			DK 1017814 T3 17-02-2003
			EP 1270725 A1 02-01-2003
			EP 1017814 A1 12-07-2000
			US 2006058510 A1 16-03-2006
			US 7250297 B1 31-07-2007
			US 2010285564 A1 11-11-2010

WO 2009156456	A1	30-12-2009	AU 2009264214 A1 30-12-2009
			CA 2729322 A1 30-12-2009
			EP 2313430 A1 27-04-2011

International Application No. PCT/ EP2010/ 069028

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-54(partially)

Lipocalin 2 Mutein mutated at position 96 of the amino acid sequence and methods related thereto.

2. claims: 1-54(partially)

Lipocalin 2 Mutein mutated at position 100 of the amino acid sequence and methods related thereto.

3. claims: 1-54(partially)

Lipocalin 2 Mutein mutated at position 106 of the amino acid sequence and methods related thereto.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
		A 6 1 P 29/00	

(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, T M), 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, R S, 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, I D, 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

(72) 発明者 ヒンツ ドミニク

ドイツ 8 5 3 5 4 フライジング ドームベルク 6

(72) 発明者 ラウト サビネ

ドイツ 8 1 6 6 9 ミュンヘン ホーホシュトラッセ 1 9

(72) 発明者 マツィヒナー ガブリエレ

ドイツ 8 0 3 3 6 ミュンヘン バヴァリアリング 3 5

(72) 発明者 ヒュルスマイアー マルティン

ドイツ 8 5 3 9 5 ヴォルフアースドルフ ローゼンシュトラッセ 1 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA07 DA05 EA03 FA01 GA11 HA03 HA11
 4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA06 AA07 BA02 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19
 BA37 BA41 BA42 CA03 NA14 ZA162 ZB112 ZB262
 4H045 AA20 AA30 BA41 CA40 EA20 EA21 EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2013512683A5	公开(公告)日	2013-11-28
申请号	JP2012542505	申请日	2010-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	皮里斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	Pierisu AG		
[标]发明人	スケラアルネ ゲバウエルミヒャエルラ ヒントドミニク ラウトサビネ マツイヒナーガブリエレ ヒュルスマイアーマルティン		
发明人	スケラ アルネ ゲバウエル ミヒャエルラ ヒント ドミニク ラウト サビネ マツイヒナー ガブリエレ ヒュルスマイアー マルティン		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/53 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 A61K38/00 A61P25/28 A61P35/00 A61P29/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61K38/1709 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61K47/60 C07K14/775 G01N33/566 C07K14/47 C12N15/63 C12N2795/00041 C07K2319/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A G01N33/53.D G01N33/53.J C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00. 101 C12P21/02.C A61K37/02 A61P25/28 A61P35/00 A61P29/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA05 4B024/EA03 4B024/FA01 4B024 /GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA02 4C084/BA14 4C084 /BA15 4C084/BA16 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA37 4C084/BA41 4C084/BA42 4C084/CA03 4C084/NA14 4C084/ZA162 4C084/ZB112 4C084/ZB262 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /BA41 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA21 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	61/267098 2009-12-07 US		
其他公开文献	JP2013512683A JP5913120B2		

摘要(译)

一种用于检测一个或多个安全漏洞的方法和系统。该方法包括为应用程序（例如Web应用程序或客户端服务器应用程序）提供测试指令，根据测试指令将测试代码添加到应用程序的代码段，根据测试指令向应用程序发送至少一个消息在运行时，监测与执行测试代码期间应用程序与至少一个消息的至少一个反应有关的测试信息，执行至少一个反应的分析，以及至少检测是否存在根据分析，一个安全漏洞。

