

(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2013-511725

(P2013-511725A)

(43) 公表日 平成25年4月4日(2013.4.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566 Z N A	4 C 0 8 4
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 D	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-540020 (P2012-540020)	(71) 出願人	504104899
(86) (22) 出願日	平成22年11月17日 (2010.11.17)		アレス トレーディング ソシエテ アノ ニム
(85) 翻訳文提出日	平成24年6月28日 (2012.6.28)		スイス連邦 CH-1170 オーボンヌ ゾーヌ アンデュストリエル ドゥル リエッタ
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/057108	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02011/063045		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成23年5月26日 (2011.5.26)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	61/281,470		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成21年11月17日 (2009.11.17)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	61/386,909	(74) 代理人	100087413
(32) 優先日	平成22年9月27日 (2010.9.27)		弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血清タンパク質に基づくランダム配列ポリマー組成物の検出による、ランダム配列ポリマー組成物の設計、生物学的利用性、及び有効性を改良するための方法

(57) 【要約】

単純なペプチドを検出する方法は、当該技術分野に存在する。しかしながら、指向性配列ポリマー(DSP)の有効血漿濃度を測定するための方法は、画定されたアミノ酸配列を有する個別のペプチドとは対照的に、DSPがペプチドの複合的混合物であるため、複雑である。この出願は、DSP組成物を検出する及び評価する改良された方法、DSP組成物の検出及び定量化のための方法、特定の捕捉ペプチドのサブセットとの相互作用に基づくDSP組成物におけるペプチドのサブセットを決定する及び富化するための手段、及びそれらを必要とする対象にDSP組成物を投与するための方法、ここで、投与計画及び量は、検出及び定量化のための上述の方法に基づいて決定又は評価され得る、を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

R S P 組成物を検出するための方法であって、以下のステップ：

- a . 一つ又は複数の捕捉ポリペプチドの実質的に純粋な調製物を提供すること；
- b . R S P 組成物を定量的に検出するための手段の一つ又は複数の捕捉ポリペプチドを付着させること；
- c . R S P 組成物と一つ又は複数の捕捉ポリペプチドとの結合を測定すること、を含む、方法。

【請求項 2】

R S P 組成物の設計を改良するための方法であって、以下のステップ：

- a . 一つ又は複数の捕捉ポリペプチドの実質的に純粋な調製物を提供すること；
- b . R S P 組成物を定量的に検出するための手段の一つ又は複数の捕捉ポリペプチドを付着させること；
- c . R S P 組成物と一つ又は複数の捕捉ポリペプチドとの結合を測定すること；
- d . 一つ又は複数の捕捉ポリペプチドとの結合を増大させる、又は減少させる、いずれかのために前記 R S P 組成物の設計を調節すること；
- e . ステップ (c) を繰り返すこと；
- f . 任意でステップ (c ~ e) を繰り返すこと、

ここで、R S P 組成物の設計を調節することは、任意の一つ又は複数の以下：増加した生物学的利用性、毒性の減少、及び有効性の増加をもたらす、

を含む、方法。

【請求項 3】

R S P 組成物中の種類を検出するための方法であって、以下：

- a . 一つ又は複数の捕捉ポリペプチドの実質的に純粋な調製物を提供すること；
 - b . 固体支持体の一つ又は複数の捕捉ポリペプチドを付着させること；
 - c . 固体支持体と R S P 組成物とを接触させること；及び
 - d . R S P 組成物の個別の種類と固体支持体との結合を測定すること、
- を含む、方法。

【請求項 4】

R S P 組成物中の種類の設計を改良するための方法であって、以下：

- a . 一つ又は複数の捕捉ポリペプチドの実質的に純粋な調製物を提供すること；
- b . 固体支持体の一つ又は複数の捕捉ポリペプチドを付着させること；
- c . 固体支持体と R S P 組成物とを接触させること；
- d . R S P 組成物中の個別の種類と固体支持体との結合を測定すること；
- e . (c) において一つ又は複数の捕捉ポリペプチドとの結合を増大させる、又は減少させる、いずれかのために R S P 組成物の設計を調節すること；
- f . ステップ (d) を繰り返すこと；
- g . 任意でステップ (d ~ f) を繰り返すこと、

ここで、R S P 組成物の種類の設計を調節することは、任意の一つ又は複数の以下：増加した生物学的利用性、毒性の減少、及び有効性の増加をもたらす、

【請求項 5】

(a) の一つ又は複数の捕捉ポリペプチドが、以下：

- i . R S P 組成物を固体支持体に付着させること；
- i i . (i) における前記固体支持体とタンパク質を含む生体液とを接触させること；
- i i i . (i) における固体支持体と特異的に結合した (i i) からタンパク質を

同定すること；

により同定され、

ここで、(i i) において同定されたタンパク質は捕捉ポリペプチドである、請求項 1 ~

10

20

30

40

50

4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

捕捉ポリペプチドが、補体成分C3、アポリタンパク質A-1プレプロタンパク質、アポリタンパク質A-IIプレプロタンパク質(アポリタンパク質D)、補体成分C4A、トリプシン阻害剤、インター-アルファ-トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質(IHRP)、アルファ-1-B-糖タンパク質、アルファ-1-抗トリプシン、アポリタンパク質A-IV、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物(NCBIローカス/登録番号CAA34971)、アポリタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリタンパク質C-III、アルファ2-HS糖タンパク質、アポリタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子II(トロンピン)、IgC_μ鎖V-III(KAU寒冷凝集素)、アポリタンパク質J前駆体、IgA1Bur、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ-2-HS-糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物(NCBIローカス/登録番号CAA28659)、及びIgJ鎖から選択される、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項7】

RSP組成物の存在を測定するための方法であって、以下のステップ：

a. 補体成分C3、アポリタンパク質A-1プレプロタンパク質、アポリタンパク質A-IIプレプロタンパク質(アポリタンパク質D)、補体成分C4A、トリプシン阻害剤、インター-アルファ-トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質(IHRP)、アルファ-1-B-糖タンパク質、アルファ-1-抗トリプシン、アポリタンパク質A-IV、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物(NCBIローカス/登録番号CAA34971)、アポリタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリタンパク質C-III、アルファ2-HS糖タンパク質、アポリタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子II(トロンピン)、IgC_μ鎖V-III(KAU寒冷凝集素)、アポリタンパク質J前駆体、IgA1Bur、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ-2-HS-糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物(NCBIローカス/登録番号CAA28659)、及びIgJ鎖から選択される一つ又は複数のタンパク質をサンプル中の前記RSP組成物を定量的に検出するための手段に付着させること；及び

20

30

b. 前記サンプル中の前記RSP組成物のレベルを測定すること、を含む、方法。

【請求項8】

捕捉ポリペプチドが、補体成分C3、アポリタンパク質A-1プレプロタンパク質、アポリタンパク質A-IIプレプロタンパク質(アポリタンパク質D)、補体成分C4A、トリプシン阻害剤、インター-アルファ-トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質(IHRP)、アルファ-1-B-糖タンパク質、アルファ-1-抗トリプシン、アポリタンパク質A-IV、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物(NCBIローカス/登録番号CAA34971)、アポリタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリタンパク質C-III、アルファ2-HS糖タンパク質、アポリタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子II(トロンピン)、IgC_μ鎖V-III(KAU寒冷凝集素)、アポリタンパク質J前駆体、IgA1Bur、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ-2-HS-糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物(NCBIローカス/登録番号CAA28659)、及びIgJ鎖から選択される、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項9】

生体サンプル中のRSP組成物の存在を検出するための方法であって、以下：

a. 生体サンプルと、正常ヒト血清、正常非ヒト霊長類血清、正常ウサギ血清、正常

50

マウス血清、正常ラット血清、正常フェレット血清、正常ブタ血清、正常イヌ血清、正常ウマ血清、正常ヒツジ血清、正常ウシ血清に含まれる少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること；及び

b. 捕捉ポリペプチドとR S P組成物との結合の存在又は不存在を検出すること、ここで、結合の存在は、生体サンプル中のR S P組成物の存在を示す、を含む、方法。

【請求項10】

捕捉ポリペプチドが、H D Lプロテオーム、L D Lプロテオームの少なくとも一つの成分、又は少なくとも一つの血清タンパク質を含むポリペプチドから選択される、請求項9に記載の方法。

10

【請求項11】

R S P組成物が、Y F A Kペプチドを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

R S P組成物が、Y E A Kペプチドを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項13】

生体サンプル中においてY F A K又はY E A Kペプチドを含むR S P組成物の存在を検出するための方法であって、以下：

a. 生体サンプルと、以下：補体成分C 3、アポリタンパク質A - 1プレプロタンパク質、アポリタンパク質A - I Iプレプロタンパク質（アポリタンパク質D）、補体成分C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質（I H R P）、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリタンパク質A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物（N C B Iローカス / 登録番号C A A 3 4 9 7 1）、アポリタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリタンパク質C - I I I、アルファ2 - H S糖タンパク質、アポリタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子I I（トロンピン）、I gカッパ鎖V - I I I（K A U寒冷凝集素）、アポリタンパク質J前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物（N C B Iローカス / 登録番号C A A 2 8 6 5 9）、及びI g J鎖から選択されるペプチドを含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること；及び

20

30

b. 捕捉ポリペプチドとR S P組成物との結合の存在又は不存在を検出すること、ここで、結合の存在は、生体サンプル中のY F A K又はY E A Kペプチドの存在を示す、を含む、方法。

【請求項14】

生体サンプル中においてY F A K又はY E A Kペプチドを含むR S P組成物の量を測定するための方法であって、以下：

a. 生体サンプルと、補体成分C 3、アポリタンパク質A - 1プレプロタンパク質、アポリタンパク質A - I Iプレプロタンパク質（アポリタンパク質D）、補体成分C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質（I H R P）、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリタンパク質A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物（N C B Iローカス / 登録番号C A A 3 4 9 7 1）、アポリタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリタンパク質C - I I I、アルファ2 - H S糖タンパク質、アポリタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子I I（トロンピン）、I gカッパ鎖V - I I I（K A U寒冷凝集素）、アポリタンパク質J前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物（N C B Iローカス / 登録番号C A A 2 8 6 5 9）、及びI g J鎖から選択されるペプチドを含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること；

40

50

b. 捕捉ポリペプチドとR S P組成物との結合のレベルを定量すること、
ここで、結合のレベルは、生体サンプル中のR S P組成物の量を示す、
を含む、方法。

【請求項15】

哺乳動物においてY F A K又はY E A Kペプチドを含むR S P組成物の生物学的利用性を測定するための方法であって、以下：

- a. R S P組成物を含む組成物の用量を哺乳動物に投与すること；
- b. 対象から生体サンプルを取り除くこと；及び
- c. 生体サンプルと、補体成分C 3、アポリタンパク質A - 1プレプロタンパク質、アポリタンパク質A - I Iプレプロタンパク質（アポリタンパク質D）、補体成分C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質（I H R P）、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリタンパク質A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物（N C B Iローカス / 登録番号C A A 3 4 9 7 1）、アポリタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリタンパク質C - I I I、アルファ2 - H S糖タンパク質、アポリタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子I I（トロンピン）、I g カッパ鎖V - I I I（K A U寒冷凝集素）、アポリタンパク質J前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物（N C B Iローカス / 登録番号C A A 2 8 6 5 9）、及びI g J鎖から選択されるペプチドを含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること；その結果、生体サンプル中のR S P組成物の生物学的利用性を測定すること、を含む、方法。

【請求項16】

それを必要とする対象に投与するために、Y F A K又はY E A Kペプチドを含むR S P組成物の好適な用量を決定するための方法であって、以下：

- a. R S P組成物の用量を対象に投与すること；
- b. 対象から生体サンプルを取り除くこと；
- c. 生体サンプルと、補体成分C 3、アポリタンパク質A - 1プレプロタンパク質、アポリタンパク質A - I Iプレプロタンパク質（アポリタンパク質D）、補体成分C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質（I H R P）、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリタンパク質A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物（N C B Iローカス / 登録番号C A A 3 4 9 7 1）、アポリタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリタンパク質C - I I I、アルファ2 - H S糖タンパク質、アポリタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子I I（トロンピン）、I g カッパ鎖V - I I I（K A U寒冷凝集素）、アポリタンパク質J前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物（N C B Iローカス / 登録番号C A A 2 8 6 5 9）、及びI g J鎖から選択されるペプチドを含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること；
- d. 生体サンプル中の捕捉ポリペプチドのレベルを測定すること；
- e. 様々な用量を用いて、任意でステップ（a）～（d）を繰り返すこと；及び
- f. そのレベルを生体サンプル中のR S P組成物の所定の好適なレベルと比較すること；

ここで、好適な用量は、生体サンプル中のR S P組成物の所定の好適なレベルをもたらす用量である、
を含む、方法。

【請求項17】

対象において望ましくない免疫反応を治療する又は予防するための方法であって、以下

10

20

30

40

50

:

a. Y E A K又はY F A Kペプチドを含むR S P組成物の好適な用量を対象に投与すること、ここで、そのような好適な用量は以下：

(i) R S P組成物の用量を対象に投与すること；

(i i) 実験対象から生体サンプルを取り除くこと；

(i i i) 生体サンプルと、補体成分C 3、アポリポタンパク質A - 1プレプロタンパク質、アポリポタンパク質A - I Iプレプロタンパク質（アポリポタンパク質D）、補体成分C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質（I H R P）、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物（N C B Iローカス / 登録番号C A A 3 4 9 7 1）、アポリポタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリポタンパク質C - I I I、アルファ2 - H S糖タンパク質、アポリポタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子I I（トロンピン）、I gカッパ鎖V - I I I（K A U寒冷凝集素）、アポリポタンパク質J前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物（N C B Iローカス / 登録番号C A A 2 8 6 5 9）、及びI g J鎖から選択される少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること；

(i v) 生体サンプル中の捕捉ポリペプチドのレベルを測定すること；

(v) 様々な用量を用いて、任意でステップ(i) ~ (i v)を繰り返すこと；及び

(v i) そのレベル（単数又は複数）と生体サンプル中のR S P組成物の所定の好適なレベルとを比較すること；

ここで、好適な用量は、前記生体サンプル中のR S P組成物の所定の好適なレベルをもたらす用量である、

により決定される、

を含む、方法。

【請求項18】

捕捉ポリペプチドが標識化される、請求項13～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

捕捉ポリペプチドが固体支持体に付着される、請求項13～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

R S P組成物と結合した捕捉ポリペプチドを含む複合体を単離することをさらに含む、請求項13～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

捕捉ポリペプチドに対する抗体を用いて、捕捉ポリペプチドとR S P組成物との結合を検出することをさらに含む、請求項13～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

組成物が皮下に投与される、請求項13～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

生体サンプルにおいてY E A K又はY F A Kペプチドを含むR S P組成物を検出するための組成物であって、補体成分C 3、アポリポタンパク質A - 1プレプロタンパク質、アポリポタンパク質A - I Iプレプロタンパク質（アポリポタンパク質D）、補体成分C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質（I H R P）、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物（N C B Iローカス / 登録番号C A A 3 4 9 7 1）、アポリポタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリポタンパク質C - I I I、アルファ2 - H S糖タンパク質、アポリポタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子I I（ト

10

20

30

40

50

ロンピン)、I g カッパ鎖 V - I I I (K A U 寒冷凝集素)、アポリポタンパク質 J 前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物 (N C B I ロークラス / 登録番号 C A A 2 8 6 5 9)、及び I g J 鎖から選択されるペプチドを含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチドを含む組成物。

【請求項 2 4】

Y F A K 又は Y E A K ペプチドを含む R S P 組成物を含むサンプルからペプチドを単離するための方法であって、以下：

a . サンプルと、補体成分 C 3、アポリポタンパク質 A - 1 プレプロタンパク質、アポリポタンパク質 A - I I プレプロタンパク質 (アポリポタンパク質 D)、補体成分 C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質 (I H R P)、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質 A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物 (N C B I ロークラス / 登録番号 C A A 3 4 9 7 1)、アポリポタンパク質 E、補体因子 B、プレアルブミン、アポリポタンパク質 C - I I I、アルファ 2 - H S 糖タンパク質、アポリポタンパク質 J 前駆体、鎖 C、免疫グロブリン M、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子 I I (トロンピン)、I g カッパ鎖 V - I I I (K A U 寒冷凝集素)、アポリポタンパク質 J 前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物 (N C B I ロークラス / 登録番号 C A A 2 8 6 5 9)、及び I g J 鎖から

10

20

b . 混合物から捕捉ペプチドに結合するペプチドを分離すること、を含む、方法。

【請求項 2 5】

捕捉ポリペプチドが固体支持体上に固定化される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

捕捉ポリペプチドがエピトープでタグ付けされる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

捕捉ポリペプチドから結合したペプチドを分離することをさらに含む、請求項 2 4 に記載の方法。

30

【請求項 2 8】

単離されたペプチドの特徴を決定することをさらに含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 9】

特徴を決定することが、結合したペプチドのアミノ酸配列を決定すること、又は結合したペプチド中のアミノ酸の相対比を決定することを含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

対象において Y F A K 又は Y E A K ペプチドを含む R S P 組成物中の生物学的に利用可能なペプチドを同定するための方法であって、以下：

a . 第一に、対象に R S P 組成物を投与すること；及び

b . 第二に、投与後、患者から組織サンプルを取り除くこと；及び

40

c . 補体成分 C 3、アポリポタンパク質 A - 1 プレプロタンパク質、アポリポタンパク質 A - I I プレプロタンパク質 (アポリポタンパク質 D)、補体成分 C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質 (I H R P)、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質 A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物 (N C B I ロークラス / 登録番号 C A A 3 4 9 7 1)、アポリポタンパク質 E、補体因子 B、プレアルブミン、アポリポタンパク質 C - I I I、アルファ 2 - H S 糖タンパク質、アポリポタンパク質 J 前駆体、鎖 C、免疫グロブリン M、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子 I I (トロンピン)、I g カッパ鎖 V - I I I (K A U 寒冷凝集素)、アポリポタンパク質 J 前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、

50

ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物（NCBIローカス/登録番号CAA28659）、及びIgJ鎖から選択されるペプチドを含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチドと結合するサンプル中でペプチドを同定すること、
を含む、方法。

【請求項31】

減少した毒性を有するYFAK又はYEAKペプチドを含むRSP組成物を製造するための方法であって、以下：

a. RSP組成物と、補体成分C3、アポリポタンパク質A-1プレプロタンパク質、アポリポタンパク質A-IIプレプロタンパク質（アポリポタンパク質D）、補体成分C4A、トリプシン阻害剤、インター-アルファ-トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質（IHRP）、アルファ-1-B-糖タンパク質、アルファ-1-抗トリプシン、アポリポタンパク質A-IV、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物（NCBIローカス/登録番号CAA34971）、アポリポタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリポタンパク質C-III、アルファ2-HS糖タンパク質、アポリポタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子II（トロンピン）、Igカッパ鎖V-III（KAU寒冷凝集素）、アポリポタンパク質J前駆体、IgA1Bur、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ-2-HS-糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物（NCBIローカス/登録番号CAA28659）、及びIgJ鎖から選択されるペプチドを含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること；及び

b. 混合物から捕捉ペプチドに結合するペプチドを分離すること；
c. 分離されたペプチドの特徴を決定すること；及び
d. 分離されたペプチドの特徴を用いてペプチドのセットを調製すること、
を含む、方法。

【請求項32】

増大した有効性を有するYFAK又はYEAKペプチドを含むRSP組成物を製造するための方法であって、以下：

a. RSP組成物と、補体成分C3、アポリポタンパク質A-1プレプロタンパク質、アポリポタンパク質A-IIプレプロタンパク質（アポリポタンパク質D）、補体成分C4A、トリプシン阻害剤、インター-アルファ-トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質（IHRP）、アルファ-1-B-糖タンパク質、アルファ-1-抗トリプシン、アポリポタンパク質A-IV、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物（NCBIローカス/登録番号CAA34971）、アポリポタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリポタンパク質C-III、アルファ2-HS糖タンパク質、アポリポタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子II（トロンピン）、Igカッパ鎖V-III（KAU寒冷凝集素）、アポリポタンパク質J前駆体、IgA1Bur、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ-2-HS-糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物（NCBIローカス/登録番号CAA28659）、及びIgJ鎖から選択されるペプチドを含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること；及び

b. 混合物から捕捉ペプチドに結合するペプチドを分離すること；
c. 分離されたペプチドの特徴を決定すること；及び
d. 分離されたペプチドの特徴を用いてペプチドのセットを調製すること、
を含む、方法。

【請求項33】

対象において望ましくない免疫反応を治療する又は予防するための方法であって、以下：

10

20

30

40

50

- a . Y F A K 又は Y E A K ペプチドを含む R S P 組成物を提供すること ;
 - b . 試験対象に R S P 組成物を投与すること ;
 - c . 試験対象から生体サンプルを取り除くこと ;
 - d . 生体サンプルと、補体成分 C 3、アポリポタンパク質 A - 1 プレプロタンパク質、アポリポタンパク質 A - I I プレプロタンパク質 (アポリポタンパク質 D)、補体成分 C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質 (I H R P)、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質 A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物 (N C B I ロークラス / 登録番号 C A A 3 4 9 7 1)、アポリポタンパク質 E、補体因子 B、プレアルブミン、アポリポタンパク質 C - I I I、アルファ 2 - H S 糖タンパク質、アポリポタンパク質 J 前駆体、鎖 C、免疫グロブリン M、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子 I I (トロンビン)、I g カッパ鎖 V - I I I (K A U 寒冷凝集素)、アポリポタンパク質 J 前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物 (N C B I ロークラス / 登録番号 C A A 2 8 6 5 9)、及び I g J 鎖から選択されるペプチド配列を含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること ;
 - e . 混合物から捕捉ペプチドに結合するペプチドを分離すること ;
 - f . 分離されたペプチドの特徴を決定すること ;
 - g . 分離されたペプチドの特徴を用いてペプチドのセットを調製すること、及び
 - h . 対象に新規のペプチドのセットを投与すること、
- を含む、方法。

【請求項 3 4】

ペプチドが対象に複数回投与される、請求項 3 0 又は 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

ペプチドが、1、2、3、4、6、12、18、24、36、48、又は 72 時間の間隔で対象に投与される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

Y F A K 又は Y E A K ペプチドを含む R S P 組成物の様々な調製物を比較するための方法であって、以下 :

- a . 第一の R S P 組成物と、正常ヒト血清、正常非ヒト霊長類血清、正常ウサギ血清、正常マウス血清、正常ラット血清、正常フェレット血清、正常ブタ血清、正常イヌ血清、正常ウマ血清、正常ヒツジ血清、正常ウシ血清に含まれる少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること ; 及び

- b . 第二の R S P 組成物と、以下 : 正常ヒト血清、正常非ヒト霊長類血清、正常ウサギ血清、正常マウス血清、正常ラット血清、正常フェレット血清、正常ブタ血清、正常イヌ血清、正常ウマ血清、正常ヒツジ血清、正常ウシ血清から選択されるペプチドを含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること ; 及び

- c . 必要に応じてステップ (b) を繰り返すこと ; 及び

- d . ステップ (a ~ c) から、捕捉ペプチドに結合するペプチドを混合物から分離すること ;

- e . ステップ (d) から分離されたペプチドの特徴を決定すること ; 及び

- f . 前記の分離されたペプチドのセットと、ステップ (d) から分離されたペプチドの特徴を比較すること、

を含む、方法。

【請求項 3 7】

対象において標的組織に対する治療薬剤を調製するための方法であって、以下 :

- a . Y F A K 又は Y E A K ペプチドを含む R S P 組成物を提供すること ; 及び

- b . 治療薬剤と R S P 組成物とを結合させ、複合体を形成すること、

を含む方法。

10

20

30

40

50

【請求項 38】

対象において特定の組織に治療薬剤を送達するための方法であって、以下：

a. 以下：

(i) Y F A K 又は Y E A K ペプチドを含む R S P 組成物と、補体成分 C 3、アポリポタンパク質 A - 1 プレプロタンパク質、アポリポタンパク質 A - I I プレプロタンパク質 (アポリポタンパク質 D)、補体成分 C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質 (I H R P)、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質 A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物 (N C B I ロークラス / 登録番号 C A A 3 4 9 7 1)、アポリポタンパク質 E、補体因子 B、プレアルブミン、アポリポタンパク質 C - I I I、アルファ 2 - H S 糖タンパク質、アポリポタンパク質 J 前駆体、鎖 C、免疫グロブリン M、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子 I I (トロンピン)、I g カッパ鎖 V - I I I (K A U 寒冷凝集素)、アポリポタンパク質 J 前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物 (N C B I ロークラス / 登録番号 C A A 2 8 6 5 9)、及び I g J 鎖から選択されるペプチドを含む組織特異的ペプチドとを接触させること；及び

(i i) 混合物から組織特異的なペプチドと結合するペプチドを分離すること；
によりペプチドタグを単離すること、

b. ペプチドタグと治療薬剤とを結合させること；及び

c. 対象に複合体を投与すること、
を含む、方法。

【請求項 39】

ペプチドタグが結合した治療薬剤を含む複合体であって、ペプチドタグが、Y E A K 又は Y F A K ペプチドを含む、複合体。

【請求項 40】

ペプチドが、補体成分 C 3、アポリポタンパク質 A - 1 プレプロタンパク質、アポリポタンパク質 A - I I プレプロタンパク質 (アポリポタンパク質 D)、補体成分 C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連蛋白質 (I H R P)、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質 A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物 (N C B I ロークラス / 登録番号 C A A 3 4 9 7 1)、アポリポタンパク質 E、補体因子 B、プレアルブミン、アポリポタンパク質 C - I I I、アルファ 2 - H S 糖タンパク質、アポリポタンパク質 J 前駆体、鎖 C、免疫グロブリン M、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子 I I (トロンピン)、I g カッパ鎖 V - I I I (K A U 寒冷凝集素)、アポリポタンパク質 J 前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物 (N C B I ロークラス / 登録番号 C A A 2 8 6 5 9)、及び I g J 鎖に対する結合親和性に基づいて R S P 組成物から単離される、請求項 39 に記載の複合体。

【請求項 41】

治療薬剤が小有機分子又は生体高分子である、請求項 37 若しくは 38 に記載の方法、又は請求項 39 に記載の複合体。

【請求項 42】

組織が脳、肺、又は肝臓組織である、請求項 37 若しくは 38 に記載の方法、又は請求項 39 に記載の複合体。

【請求項 43】

ペプチドタグが、Y E A K 又は Y F A K ペプチドを含む、請求項 37 若しくは 38 に記載の方法、又は請求項 39 に記載の複合体。

【請求項 44】

ペプチドタグが共有結合、包接錯体、イオン結合、又は水素結合により治療薬剤と結合

10

20

30

40

50

する、請求項 37 若しくは 38 に記載の方法、又は請求項 39 に記載の複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2009年11月17日に提出された、米国仮出願第61/281,470号、及び2010年9月27日に提出された、米国仮出願第61/386,909号の利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

単純なペプチドを検出する方法は、当該技術分野に存在する。しかしながら、複合的なペプチド混合物を検出及び測定するのに好適な方法はわずかである。群としてペプチドの混合物の有効血漿濃度を測定するための方法は、画定されたアミノ酸配列を有する個別のアミノ酸より、検出されるペプチドの不均質により、複雑である。例えば、ランダム配列ポリマー(RSP)組成物は、ペプチド鎖にランダムに取り込まれたアミノ酸の複合的な混合物を含む。RSP組成物は、アミノ酸の同一性及び比に従って画定され、画定された配列に従って画定されない。この多様性が与えられた場合、複数の製造方法を通して、これらのRSP組成物の普遍性及び組成を評価するための改良された方法が必要とされている。RSP組成のインピボにおける状態を測定することは、投与の経路及び/又は頻度、及びRSPに結合する血清タンパク質に応じて、混合物は、第一の炎症(TH1型)、又は第一の調節(TH2型)反応を引き起こし得、対象において薬物動態学的及び薬力学的効果におけるバリエーションを導くので、免疫学的重要性を有する。RSPのより厳格な設計及び一貫した投与は、治療効果を増加させ、有害な炎症反応についての可能性を減少させ得る。

【0003】

従って、例えば、そのような混合物のインピボにおける評価を支援するための、及び治療目的のための好適な量及び投与の手段を決定するための、RSP組成物の定量分析の方法についての必要性が存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

発明の概要

この出願は、RSP組成物を検出及び評価する改良された方法を提供する。本発明は、RSP組成物の検出及び定量のための方法を提供する。本発明は、特定の捕捉ポリペプチドとのサブセットの相互作用に基づくRSP組成物において、ペプチドのサブセットを決定する及び富化するための手段を提供する。本発明は、それらを必要とする対象にRSP組成物を投与するための方法をさらに提供し、ここで、投与計画及び量は、検出及び定量のための上述の方法に基づいて決定され又は評価され得る。

【0005】

本開示はまた、以下のステップ：(a)前記RSP組成物を固体支持体に付着させること；(b)(a)における前記固体支持体と、タンパク質を含む生体液とを接触させること；(c)(a)において固体支持体に特異的に結合した(b)からタンパク質を同定すること；(d)(c)において結合したタンパク質の実質的に純粋な調製物を得ること；(e)(c)における前記タンパク質を、前記RSP組成物を定量的に検出するための手段に付着させること、及び；(f)前記RSP組成物と(e)におけるそれぞれの個別の前記タンパク質との結合を測定することを含む、RSP組成物を検出するための方法を提供する。

【0006】

この開示はまた、以下のステップ：(a)前記RSP組成物を固体支持体に付着させること；(b)(a)における固体支持体と、タンパク質を含む生体液とを接触させること

10

20

30

40

50

; (c) (a)において固体支持体に特異的に結合した(b)からタンパク質を同定すること; (d) (c)において結合したタンパク質の実質的に純粋な調製物を得ること; (e) (c)における前記タンパク質を、前記RSP組成物を定量的に検出するための手段に付着させること、; (f)前記RSP組成物と(e)におけるそれぞれ個別の前記タンパク質との結合を測定すること; (g) (e)における一つ又は複数のタンパク質との結合を増大又は減少させるために前記RSP組成物の設計を調節すること; (h)ステップ(f)を繰り返すこと; (i)任意でステップ(f~h)を繰り返すこと、ここで、前記RSP組成物の設計への調節は、以下: 増加した生物学的利用性、毒性の減少、及び有効性の増加を含む任意の一つ又は複数の群をもたらす、を含む、RSP組成物の設計を改良するための方法を提供する。

10

【0007】

さらに、この出願は、以下のステップ: (a)前記RSP組成物を固体支持体に付着させること; (b) (a)における固体支持体と、タンパク質を含む生体液とを接触させること; (c) (a)における固体支持体に特異的に結合した(b)からタンパク質を同定すること; (d) (c)において結合したタンパク質の実質的に純粋な調製物を得ること; (e) (c)における前記タンパク質を固体支持体に付着させること、; (f) (e)における前記固体支持体と前記RSP組成物とを接触させること、及び; (g)前記RSP組成物の個別の種類と(f)における前記固体支持体との結合を測定することを含む、RSP組成物中の種類を検出するための方法を提供する。

20

【0008】

加えて、この出願は、以下のステップ: (a)前記RSP組成物を固体支持体に付着させること; (b) (a)における固体支持体と、タンパク質を含む生体液とを接触させること; (c) (a)において固体支持体に特異的に結合した(b)からタンパク質を同定すること; (d) (c)において結合したタンパク質の実質的に純粋な調製物を得ること; (e) (c)における前記タンパク質を、固体支持体に付着させること、; (f) (e)における前記固体支持体と、前記RSP組成物とを接触させること、; (g)前記RSP組成物の個別の種類と、(f)における前記固体支持体との結合を測定すること; (h) (f)における一つ又は複数のタンパク質との結合を増大、又は減少させるために、前記RSP組成物の設計を調節すること; (i)ステップ(g)を繰り返すこと、及び; (j)任意でステップ(g~i)を繰り返すこと、ここで、前記RSP組成物の種類の設計への調節は、以下: 増加した生物学的利用性、毒性の減少、及び有効性の増加を含む任意の一つ又は複数の群をもたらす、を含む、RSP組成物中の種類の設計を改良するための方法を提供する。

30

【0009】

本出願の方法を用いて、研究者らは、少量のRSP組成物の成分をより確実に検出することができるのみならず、また、例えば、毒性、又は有効性などの対象の生物学的活性に対して関与する、又は貢献するRSP組成物中の種類を特異的に検出することができる。

【0010】

本発明の基礎となる発見は、特定のタンパク質性物質によるRSP組成物中の単一のペプチド又は非常に複数のペプチドの特異的な結合である。反対に、一旦、本明細書において「捕捉ポリペプチド」と称されるそのようなタンパク質性物質である「捕捉ペプチド」が同定されると、一つ又は複数の捕捉ペプチドは、RSP組成物のペプチドを定量的に分析するために、RSP組成物中のペプチドの機能的に優れたサブセットを単離するために、又は結合特異性に基づくRSP組成物の成分を分類するために用いられ得る。本発明を実施するために、ペプチドと結合する捕捉ポリペプチドは同定され、本発明を実施するために有用な形態に調製され、すなわち、ペプチドとのその結合が、他の成分の存在により損なわれないのに十分な程度まで、単離され、精製される。

40

【0011】

本発明の一つの態様は、異なる製造調製物の製品におけるパーシジョンを評価する又は決定するための方法、製造の様々な方法、又はRSP組成物の様々な製造後加工方法を提

50

供する。本発明の特定の方法は、調製物間の類似性及び／又は差異を決定するために、R S P組成物の様々な調製物と捕捉ペプチドとの結合を比較することである。

【0012】

本発明のさらなる態様は、R S P組成物又はR S P組成物を含むサンプルにおいて発見されるペプチドを定量的に分析するための方法を提供する。本発明のいくつかの実施形態は、投与されたR S P組成物のインビボにおける（例えば、血漿濃度）生物学的に利用可能な量又は濃度を決定するための方法である。

【0013】

本発明の方法は、対象の組織においてR S P組成物の存在を検出すること、ここで、前記対象は事前にR S P組成物と接触させ、又はR S P組成物で処理されており、ここで、方法は、そのような接触のすぐ後、又はそのような接触後少なくとも約10、20、30、若しくは45分後、又は1、2、4、6、12、24、36、若しくは48時間後、又は3、4、5、6、7、若しくは10日後、又は2、3、4、6、8、若しくは12週間後に、一回又は複数回行われる。本発明の特定の方法は、哺乳動物の血清又は血漿中のR S P組成物の成分の存在を検出することであり、ここで、前記哺乳動物は、上述の期間内に前記方法を実行する前に、事前に前記R S P組成物で処理されている。特定の実施形態では、前記哺乳動物はヒトである。

10

【0014】

特定の実施形態では、本方法は、R S Pと一つ又は複数の所定の捕捉ペプチドとを結合させること、続く検出方法、例えば、免疫学的検出方法により、R S P組成物の存在、及び任意でR S P組成物の量を測定することを含む。従って、本発明の一つの態様は、優先的にR S P組成物に結合する血清タンパク質を選択する又は同定することを含む。特定の実施形態では、一つ又は複数の血清タンパク質を同定する方法は、R S P組成物と血清を含む生体サンプルとを接触させること、R S P組成物中のペプチドと血清の一つ又は複数の成分との結合を、もしあれば、検出すること、結合成分を単離すること、及び一つ又は複数の結合成分を同定することを含む。いくつかの実施形態では、結合成分は、サンプルとR S P組成物のペプチドと結合するために設計されたアフィニティーカラムとを接触させ、続いて結合画分を溶出させ、続いて結合成分（単数又は複数）を同定することにより、単離され得る。

20

【0015】

R S P組成物のペプチドに結合する任意の血清結合タンパク質は、上記の方法に用いられ得る。好適な検出方法は、直接競合的酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫フローサイトメトリー検出、ラジオイムノアッセイ（RIA）、又は任意の他の特異的抗原の定量的検出を可能にする免疫学的検出方法を含む。

30

【0016】

本発明の一つの態様は、生体サンプル中のR S P組成物の存在を検出するための方法であり、以下：生体サンプルと少なくとも一つの捕捉ポリペプチドを接触させること；及び捕捉ポリペプチドとR S P組成物との結合の存在又は不存在を検出することを含み、ここで、結合の存在は、生体サンプル中のR S P組成物のペプチド成分の存在を示す。さらに、そのような方法は、サンプル中のR S P組成物の量又は濃度を測定するために拡張され得る。

40

【0017】

本発明の別の態様は、哺乳動物中のR S P組成物の生物学的利用性を測定するための方法であり、以下：R S P組成物の用量を哺乳動物に投与すること；対象から生体サンプルを取り除くこと；及び生体サンプルと少なくとも一つの捕捉ペプチドとを接触させること；それにより生体サンプル中のR S P組成物の生物学的利用性又は生物学的利用性の程度を決定することを含む。

【0018】

本発明の別の態様は、哺乳動物対象にR S P組成物を投与する方法を提供し、ここで、そのような量は、上述の方法又は本明細書で記述される他の方法により決定されるような

50

投与される量の生物学的利用可能な部分に基づいて決定される。特定の実施形態では、本方法は、対照サンプルを含むこと、二つの結果を比較することによる対照サンプルと試験サンプルの間の生理学的マーカー、例えば、ホルモン、酵素、血清タンパク質、サイトカイン、免疫調節物質、又は任意のこれらの機能性タンパク質のエフェクター又はレギュレーターの変化を測定するために薬力学的試験を行うこと、及び薬力学的パラメーターの所望の変化を誘導するために効果的な用量を決定することさらに含む。特定の実施形態では、対象により報告されるような行動変化、自覚的变化、例えば、疼痛若しくは疾患の症状の改善、又は間接的な効果の他の証言は、観察される。特定の実施形態では、前記哺乳動物対象は、齧歯動物、例えば、マウス又はラットである。他の実施形態では、前記対象はヒトである。

10

【0019】

本発明のこの態様の特定の実施形態は、それらを必要とする対象に投与するためのRSP組成物の好適な用量を決定するための方法であって、以下：(a)対象にRSP組成物の用量を投与すること；(b)対象から生体サンプルを取り除くこと；(c)生体サンプルと少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること；(d)生体サンプル中のRSP組成物の成分のレベルを測定すること；(e)様々な用量を用いてステップ(a)～(d)を任意で繰り返すこと；及び(g)そのレベルと生体サンプル中のRSP組成物の所定の好適なレベルとを比較すること、ここで好適な用量は、生体サンプル中のRSP組成物の所定の好適なレベルをもたらす用量である、を含む方法を提供する。

20

【0020】

本発明のいくつかの実施形態は、RSP組成物の生物学的利用可能な画分の部分を予測するための方法を提供する。そのような方法は、RSP組成物を含むサンプルと、インサイチュにおいて、そのようなRSP組成物の投与及び送達期待される部位で、発見される所定の捕捉ポリペプチドとを接触させること、及びRSP組成物と捕捉ポリペプチドとの結合を測定することを含む。RSP組成物の大部分による結合は、治療的及び/又は生理学的に関連のあるペプチドの大部分を示し、強力な結合(解離定数決定につき)は、インピボでのそれらのペプチドの半減期を延長する保護効果を示し得る。

【0021】

本発明のさらなる態様は、実験対象から得られたデータに基づいて、対象(例えば、ヒト対象)に投与されるためのRSP組成物の治療的有効量を予測するための方法を提供する。特定の実施形態では、本方法は、ヒトでない実験哺乳動物対象にRSP組成物を投与すること、投与された量の生物学的利用可能な部分を決定すること(例えば、本明細書で記述される定量的検出の方法を用いて)、機能的読み出し(read-out)を測定すること、並びに実験哺乳動物対象について得られたデータ及び治療と実験対象間の相関比に基づいて、治療対象に送達されるRSP組成物の治療的有効量を予測することを含む。本発明の目的について、「機能的読み出し(read-out)」は、対象の表現型若しくは機能、対象由来の細胞物質の表現型若しくは機能、又は対象由来の一つ又は複数の液体の組成物である。機能的読み出しは、一つ又は複数の生合成又は代謝成分、例えば、ホルモン、酵素、血清タンパク質、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、免疫調節物質、及び前記機能的読み出しのエフェクター又はレギュレーターの測定をさらに又は代わりに含み得る。特定の実施形態では、検出ステップは、生物学的利用性、代謝、及び/又は投与後のクリアランスの時間経過を測定するための、様々な規則的な又は不規則的な時間で繰り返され得る。特定の実施形態では、群としてのRSP組成物の血漿半減期は、この方法で決定され得る。さらなる実施形態では、RSP組成物中の種の半減期は、この方法で決定され得る。特定の実施形態では、実験対象は、齧歯動物、例えば、マウス又はラットである。

30

40

【0022】

本発明のさらなる別の態様は、RSP組成物を投与することにより患者を治療する効率的で効果的な方法であって、以下：ペプチドを合成することによりRSP組成物を調製すること(例えば、その後、単独で複数のペプチドをプールすることにより、又は伸長のそ

50

れぞれのサイクルでアミノ酸モノマーのプールを用いることにより同時に)、前記RSP組成物の医薬的に許容される製剤を調製すること、前記RSP組成物を対象に投与すること、前記対象から組織サンプルを得ること、前記組織サンプル中のRSP組成物の量及び/又は濃度を測定すること、機能的読み出しを測定すること、機能的読み出しに対してRSP組成物の量を関連づけること、及び機能的読み出しを改良するために対象に対してRSP組成物の用量を調節することを含む、方法を提供する。

【0023】

本発明の別の態様は、対象にRSP組成物の好適な用量を投与することを含む、対象において望ましくない免疫反応を治療又は予防するための方法であり、ここで、そのような好適な用量は、以下：(i)対象にRSP組成物の用量を投与すること；(ii)実験対象から生体サンプルを取り除くこと；(iii)生体サンプルと少なくとも一つの捕捉ポリペプチドを接触させること；(iv)生体サンプル中の捕捉ポリペプチドのレベルを測定すること；(v)様々な用量を用いてステップ(i)~(iv)を任意で繰り返すこと；(vi)そのレベル(単数又は複数)と生体サンプル中のRSP組成物の所定の好適なレベルと比較すること、ここで、好適な用量は、前記生体サンプル中のRSP組成物の所定の好適なレベルをもたらす用量である、により決定される。

10

【0024】

いくつかの前述の態様及び実施形態では、捕捉ポリペプチドは標識される。いくつかの実施形態では、捕捉ポリペプチドは、固体支持体に付着される。いくつかの実施形態では、捕捉ポリペプチド及びRSP組成物の一つ又は複数のペプチド成分を含む複合体は、検出され及び/又は単離される。特定の実施形態では、捕捉ペプチド又はRSP組成物のペプチド成分に対してではなく、複合体に対して特異的な抗体により、複合体は検出され及び/又は単離される。

20

【0025】

本発明のさらなる別の態様は、RSP組成物を構成するペプチドの選択されたサブセットを単離するための方法を提供する。特定の例では、サブセットは、一つ又は複数のアミノ酸配列を有するペプチドからなり得る。他の場合では、捕捉ポリペプチドは、結合特異性に基づいてRSP組成物の成分を分類するために用いられ得る。

【0026】

特定の実施形態では、RSP組成物を含むサンプルからペプチドを単離するための方法は、以下：(a)サンプルと少なくとも一つの捕捉ペプチドとを接触させること；及び(b)混合物から捕捉ポリペプチドに結合するペプチドを分離することを含む。特定のそのような実施形態では、捕捉ポリペプチドは、固体支持体に付着される。いくつかの実施形態では、捕捉ポリペプチドは、エピトープタグ付けられ、又は標識される。いくつかの実施形態では、方法は、ペプチドを単離するために、捕捉ポリペプチドから結合したペプチドを分離することをさらに含む。特定の実施形態では、方法は単離されたペプチドの特徴、例えば、単離されたペプチドのプールのアミノ酸組成、及び/又は単離されたペプチドのアミノ酸配列を決定することをさらに含む。

30

【0027】

特定の実施形態では、対象におけるRSP組成物中の生物学的に利用可能なペプチドを同定する方法は、以下：(a)RSP組成物を対象に投与すること；(b)ステップ(a)を行った後、対象から組織サンプルを取り除くこと；及び(c)少なくとも一つの捕捉ペプチドと結合するサンプル中のペプチドを同定することを含む。

40

【0028】

特定の実施形態では、捕捉ポリペプチドと結合するペプチドのサブセットを同定する方法は、プロトコールに従ってRSP組成物を調製すること、前記RSP組成物と所定の捕捉ポリペプチド(例えば、それはインビボ標的又は担体として望ましい)とを接触させること、RSP組成物中のペプチドの結合を測定すること、結合しないペプチドから結合するペプチドを識別する特徴を特定すること、及び一つ又は複数の識別する特徴を反映した改良されたRSP組成物を調製することを含む。

50

【0029】

本発明の別の態様は、R S P組成物を含む組成物の製造プロセスを改良する方法である。いくつかの実施形態では、R S P組成物は、捕捉ポリペプチドと結合するペプチドのサブセットを同定する前述の方法に基づいて設計される。いくつかの実施形態では、R S P組成物は、アミノ酸組成物及び/又はアミノ酸配列が、捕捉ポリペプチドを結合するペプチドのサブセットのそれに近似するように設計される。いくつかの実施形態では、R S P組成物は、参照R S P組成物と比較して増大した有効性を有する、ここで、参照R S P組成物は、捕捉ポリペプチドと接触された元のR S P組成物と同じ、又は実質的に同じである。他の実施形態では、R S P組成物は、参照R S P組成物と比較して低い毒性を有する。

10

【0030】

代わりの実施形態では、方法は、プロトコールに従ってR S P組成物を調製すること、R S Pを含む組成物を製剤化すること、機能的読み出しのレベル又は程度を検出することにより前記組成物中のR S Pの生物学的に利用可能な量を決定すること、そのような読み出しを標準と比較すること、及び所望の生物学的利用性を得るために組成物のプロトコール又は製剤化を調節することを含む。

【0031】

本発明のさらに別の態様は、R S P組成物（例えば、参照R S P組成物又は本明細書で開示される方法により生成された改良されたR S P組成物）又はR S P組成物の成分と目的の治療薬剤とを結合させることにより特定の組織に対して治療薬剤の標的化することであり、ここで、前記R S P組成物又はそれらの成分は、組織特異的な標的化特性を有する捕捉ポリペプチドと結合する。そのような結合した薬剤は、対応する捕捉ポリペプチドに結合する組織に対して薬剤を標的化するために、患者に投与され得る。

20

【0032】

本発明のこの態様のいくつかの実施形態は、対象において特定の組織に治療薬剤を送達するための方法を提供し、そのような方法は以下：(a) R S P組成物と組織特異的ペプチドを接触させ、組織特異的ペプチドと結合するペプチドを混合物から分離することによりペプチドタグを単離すること；(b) ペプチドタグと治療薬剤とを結合させること；及び(c) 対象に複合物を投与することを含む。本発明の他の実施形態は、上述の方法のステップ(a)及び(b)により、そのような標的化された治療薬剤を調製する方法、及びそれによって調製された標的化された治療を含む。

30

【0033】

本発明のさらなる態様は、任意の上述の方法に用いられる、有用な組成物である。本発明のこの態様の実施形態は、少なくとも一つの捕捉ポリペプチドを含む、生体サンプル中のY E A K又はY F A Kペプチドを含むR S P組成物を検出するための組成物である。特定の実施形態では、捕捉ポリペプチドは、正常ヒト血清、正常非ヒト霊長類血清、正常ウサギ血清、正常マウス血清、正常ラット血清、正常フェレット血清、正常ブタ血清、正常イヌ血清、正常ウマ血清、正常ヒツジ血清、正常ウシ血清、の成分、哺乳動物由来H D Lプロテオームの成分、哺乳動物由来L D Lプロテオームの成分、補体成分C 3、アポリポタンパク質A - 1プレプロタンパク質、アポリポタンパク質A - I Iプレプロタンパク質（アポリポタンパク質D）、補体成分C 4 A、トリプシン阻害剤、インター - アルファ - トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質（I H R P）、アルファ - 1 - B糖タンパク質、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質A - I V、セルロプラスミン、無名のタンパク質生成物（B L A S T s e a r c h I Dでは、I g M 重鎖）、アポリポタンパク質E、補体因子B、プレアルブミン、アポリポタンパク質C - I I I、アルファ2 - H S糖タンパク質、アポリポタンパク質J前駆体、鎖C、免疫グロブリンM、免疫グロブリンラムダ軽鎖、凝固因子I I（トロンピン）、I gカップ鎖V - I I I（K A U寒冷凝集素）、アポリポタンパク質J前駆体、I g A 1 B u r、ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体、アルファ - 2 - H S - 糖タンパク質、ゲルゾリンアイソフォーム前駆体、クニッツ型プロテアーゼ阻害剤、無名のタンパク質生成物（N C B I L o c u s

40

50

/登録番号C A A 2 8 6 5 9)、及びI g J鎖から選択される。

【0034】

任意の前述の実施形態及び態様では、R S P組成物は、Y E A Kペプチド又はY F A Kペプチドのいずれかを含み得る。Y F A K又はY E A Kペプチドは、当該技術分野において知られており、下記に記述されており、R S P組成物を含むペプチド、すなわちY F A K R S P組成物又はY E A K R S P組成物である。さらに、Y F A K又はY E A Kペプチドの選択とは無関係に、特定の実施形態では、捕捉ポリペプチドは、血清結合タンパク質でもよい。より特定の実施形態では、捕捉ポリペプチドは、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質A - I、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アポリポタンパク質A - I V、アポリポタンパク質D、及びプレアルブミンから、又はこの段落の直前の段落に列挙された捕捉ポリペプチドから、又は本明細書で開示される血清ポリペプチドから選択される。

10

【0035】

さらに、いずれかの前述の実施形態では、R S P組成物中のペプチドと捕捉ポリペプチド、例えば、血清タンパク質との結合は、さらなる生理学的に関連する成分の存在下で行われ得る。特定の実施形態では、さらなる成分は、脂質、例えば、コレステロール、又はトリグリセリドである。特定の実施形態では、さらなる成分は、捕捉ポリペプチド以外の実質的に遊離の任意のタンパク質成分であるH D L又はL D L複合体である。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1は、R S P組成物と支持体が結合した血清結合タンパク質との結合を検出するために用いられるアッセイの概略図である。血清タンパク質が同定された後、それらは固体支持体上に結合する。R S P組成物は、単独又は血清中に含まれて、支持体に添加される。R S P組成物（又はR S P組成物と血清タンパク質の複合体に対する）に対する一次抗体は添加され、一次抗体とその標的（単数又は複数）との結合は、二次抗体及び検出試薬により検出される。

20

【0037】

【図2】図2は、抗体がそれらの標的と結合した後、抗Y F A K及び抗Y E A K抗体と結合したH R PのA 4 5 0比色吸収を示す。標的は、正常ヒト血清中に含まれる（又はそれに添加された）血清タンパク質に結合したY E A K又はY F A Kペプチドを含む複合ペプチド混合物を含む。複合ペプチド混合物の高濃度では、抗Y E A K又は抗Y F A K抗体による複合体の検出は、低濃度の複合ペプチド混合物より高くなる。1 2 . 5 n g / m Lは、ヒト患者における約2 m gの用量に相当する。

30

【0038】

【図3 - 1】図3 - 1は、P I - 2 3 0 1又はC o p a x o n eと結合する血清タンパク質のリストを示す。血清タンパク質の由来は、示されるように、正常マウス血清又は正常ヒト血清のいずれかである。P I - 2 3 0 1は、アセチル化又は非アセチル化され得る。P I - 2 3 0 1又はC o p a x o n eの結合複合体は、抗Y F A K又は抗Y E A K抗体により認識され、二次抗体及び検出試薬で検出される。血清タンパク質は、複合体から溶出され、同定される。タンパク質は、検出試薬のA 4 5 0吸収に基づいてスコアが割り当てられる。p = 0 . 0 0 1に相当する7 0のスコアは、バックグラウンド吸収と比較して、統計学的に有意であると考えられる。

40

【図3 - 2】図3 - 2は、P I - 2 3 0 1又はC o p a x o n eと結合する血清タンパク質のリストを示す。血清タンパク質の由来は、示されるように、正常マウス血清又は正常ヒト血清のいずれかである。P I - 2 3 0 1は、アセチル化又は非アセチル化され得る。P I - 2 3 0 1又はC o p a x o n eの結合複合体は、抗Y F A K又は抗Y E A K抗体により認識され、二次抗体及び検出試薬で検出される。血清タンパク質は、複合体から溶出され、同定される。タンパク質は、検出試薬のA 4 5 0吸収に基づいてスコアが割り当てられる。p = 0 . 0 0 1に相当する7 0のスコアは、バックグラウンド吸収と比較して、統計学的に有意であると考えられる。

50

【図3-3】図3-3は、PI-2301又はCopaxoneと結合する血清タンパク質のリストを示す。血清タンパク質の由来は、示されるように、正常マウス血清又は正常ヒト血清のいずれかである。PI-2301は、アセチル化又は非アセチル化され得る。PI-2301又はCopaxoneの結合複合体は、抗YFAK又は抗YEAK抗体により認識され、二次抗体及び検出試薬で検出される。血清タンパク質は、複合体から溶出され、同定される。タンパク質は、検出試薬のA450吸収に基づいてスコアが割り当てられる。p = 0.001に相当する70のスコアは、バックグラウンド吸収と比較して、統計学的に有意であると考えられる。

【0039】

【図4】図4は、YEAKが正常ヒト血清に含まれる血清タンパク質と結合したYEAKペプチドからなるその標的と結合した後、HRP結合抗YEAK抗体のA450比色吸収を用いた、4mg/kgのYEAKでIV、又は21mg/kgでSC投与されたマウスの血清中のYEAKを示す。図は、GA(酢酸グラチラマー)フラグメントが投与後約15分で、1800ng/mLの最大血清濃度に達することを示す。SC投与されたCopaxone(登録商標)の見積もられた生物学的利用性は、IV投与されたCopaxone(登録商標)と比較して、12%である。GA画分は、投与の2時間後における血清中でもまだ検出される。

10

【0040】

【図5】図5は、MDCとしてもまた知られるこのCCL22の場合において、マウスにおける、YEAK投与に対する応答における血清又は血漿中の可溶性画分の急性放出の例を示す。図に見られるように、マウスにSC投与されたYEAKの用量と観察された最大CCL22血漿濃度間に線形相関が存在する。

20

【0041】

【図6】図6は、CNBr-Sephカラム上に固定されたYEAKフラグメントから溶出された血清タンパク質からのLC-MSにより観察されたペプチドパターンを示す。ペプチド配列は、検索エンジンであるMascootを用いて同定される。手短に言えば、トリプシン酵素消化により生成したYEAKフラグメントは、Cyanogen Bromide Sepharose(CNBr-Seph)4bと結合され、ヒト又はマウス血清のいずれかで、室温で2時間インキュベートされる。YEAKフラグメントと結合した血清タンパク質は、0.1Mグリシン-HCL、pH2.8の溶液を用いて溶出され、50%メタノール/50mM重炭酸アンモニウム中トリプシンで消化され、乾燥され、液体クロマトグラフィー(LC)を用いて分離され、脱溶媒和され、イオン化され、質量分析計(MS)にスプレーされ、視覚化され、Mascoot検索エンジンを用いて同定される。

30

【0042】

【図7】図7は、図1に表される本発明の方法を用いたELISAアッセイを示し、ここで、YEAKは、男性及び女性正常ヒト血清及びプールされた男性及び女性正常ヒト血清に添加される。アッセイは、1~100ng/mLの血清中でYEAKを検出する線形範囲を示す。このアッセイは、マウス由来の血清を用いて、再現されることができず、無関係の対照、例えば、抗キーホールリンペットヘモシニアン(KLH)ポリ血清が用いられた場合もできなかった。

40

【0043】

【図8】図8は、同様のプロファイルを有することが示された分子量を有するCopaxone(登録商標)(YEAK)ロットP53218、及び119142のSE-HPLCプロファイルを示す。

【0044】

【図9】図9は、図1に表された本発明の方法に用いられる図8に示されるCopaxone(登録商標)の二つのロットを示す。

【0045】

【図10】図10は、YEAKに曝露された単球細胞株RAW264.7が濃度依存的方法

50

法において C C L 2 2 を放出したバイオアッセイにおける図 8 及び 9 に用いられる C o p a x o n e (登録商標)の二つのロットを示す。

【0046】

【図 1 1】図 1 1 は、M A L D I - T O F を用いて、様々な所定の長さの Y E A K の共ポリマーの実際と理論的平均分子量との厳格な線形の関係性を示す。理論値は、アミノ酸の共ポリマーの長さ、すなわち、20、40、60 及び 80 に、一つの水の分子を加えた一つの理論的なアミノ酸の平均分子量を掛けることにより計算された。一つの理論的なアミノ酸の重量は、アミノ酸結合の際に喪失する一つの水の分子を引いた Y、E、A 及び K のそれぞれの質量、及び 1.0、1.5、4.5、3.6 のアミノ酸比を用いることにより計算された。

10

【0047】

【図 1 2】図 1 2 は、アミノ酸分析、及び図 8、9、及び 10 に見られる C o p a x o n e (登録商標)の二つのロットで行われた同様の分析により決定される固相合成により製造される様々な長さの Y E A K 共ポリマーの 100 のアミノ酸に標準化されるようなアウトプット比を示す。

【0048】

標準曲線は、20、40、60 及び 80 個のアミノ酸の Y E A K 共ポリマーを用いて生成された。比較のために、C o p a x o n e を用いた標準曲線はまた、生成された。図 1 2 は、Y E A K 共ポリマーのサイズと、競合的 E L I S A に基づく P K アッセイによる検出との関係性を示す。20mer の Y E A K 共ポリマーは、わずかな阻害効果を有したが、しかし 80mer の Y E A K 共ポリマーを用いて生成された標準曲線は、C o p a x o n e で得られた曲線に重ね合わされる。

20

【0049】

【図 1 3】図 1 3 は、ウサギポリ血清の I g 画分が C o p a x o n e (登録商標)と強く相互作用する E L I S A アッセイを示し、固相合成された Y E A K 共ポリマーの長さの増加するにつれて増加する認識を示す。

【0050】

【図 1 4】図 1 4 は、固相合成された Y E A K 共ポリマーを用いた前述の P K 法(その全体において参照により本明細書に援用される P C T 出願 W O 2 0 0 9 / 0 7 5 8 5 4 に記述されるように)を用いた E L I S A アッセイを示し、Y E A K 共ポリマーのサイズと前述のアッセイシステムの方法による検出との関係性を示す。

30

【0051】

【図 1 5】図 1 5 は、図 1 2、1 3、及び 1 4 に見られる様々なサイズの固相合成された共ポリマーで培養された単球細胞株 R A W 2 6 4 . 7 は、共ポリマーの長さが増加するにつれて、C C L 2 2 の増加した量を産生することを示す。

【0052】

【図 1 6】図 1 6 は、2.5mg/kg の C o p a x o n e (登録商標)を用いて 3 週間免疫付与されたマウス由来の脾臓細胞のエクスピボ増殖を誘導するための、図 8、9、10、及び 12 に用いられた C o p a x o n e (登録商標)の二つのロット、及び図 1 2、1 3、1 4、及び 1 5 に用いられた様々な長さの固相合成された Y E A K 共ポリマーの能力を示す。最後の S C 投与の一週間後、脾臓は回収され、細胞懸濁液は作られ、細胞は様々な濃度の様々な共ポリマーと 4 日間培養された。脾臓細胞増殖は、当該技術分野においてよく知られた方法を用いた重水素化したチミジン取り込みを測定することにより測定された。

40

【発明を実施するための形態】

【0053】

発明の詳細な説明

ランダム配列ポリマー(RSP)組成物

本発明を記述する目的のためのランダム配列ポリマー(RSP)組成物は、様々な割合で二つ又はそれ以上のランダムに配列されたアミノ酸残基を含む、アミノ酸ポリマー(典

50

型的に、ペプチド結合を介して連結される)の任意の混合物であり得、哺乳動物に投与された場合に特定の免疫的及び他の反応を引き起こすことについて有用である。配列混合物のランダムな多様性のために、多数のペプチド配列が混合物中に存在する。ペプチド配列の多様性は、多様性の低い組成物よりも増加した有効性を与える。

【0054】

RSP組成物は、ポリマー配列のアミノ酸のセット及びそれらのアミノ酸の相対的なモル比により画定される。例えば、YFAKは、チロシン(Y)、フェニルアラニン(F)、アラニン(A)、及びリジン(K)からなるRSP組成物を示すが、ポリマーはその順番でアミノ酸配列Y-F-A-Kを有することを示さず；これらのアミノ酸残基は、ランダムな配列に取り込まれ、従って、RSP組成物は、Y、F、A、及びKの様々な配列を有するペプチドを含み、他のアミノ酸から自由又は実質的に自由である。相対的なモル比は、二つの方法：モルインプット比及びモルアウトプット比で表現され得る。「モルインプット比」とは、RSPを合成するための用いられたアミノ酸のモル比を意味する。例えば、RSPが固相合成により合成する際に、Y:F:A:Kの1:1:10:6のモルインプット比を有することが言われた場合、伸長のそれぞれのサイクルについて、1:1:10:6のモル比において保護されたアミノ酸Y、F、A、及びKの混合物は、ペプチド鎖を伸長するために反応される。他方で、「モルアウトプット比」とは、それらが生成物であるRSPペプチドに現れるようなアミノ酸のモル比を意味する。モルアウトプット比は、RSP組成物のアミノ酸含量を分析することにより測定される。インプット及びアウトプット比は、取り込み効率におけるアミノ酸間の違いのために同一ではない。

10

20

【0055】

好適なRSPは、国際PCT公開WO00/05250、WO00/05249；WO02/59143、WO0027417、WO96/32119に、米国特許出願公開US2008/0021192、2004/003888、2002/005546、2003/0004099、2003/0064915、及び2002/0037848に、米国特許第6,514,938号、同第5,800,808号、及び同第5,858,964号に記述されたもの、及びPCT出願PCT/US05/06822に記述されたものを含む。これらの参考文献は、RSPを合成する方法、RSPを含む組成物、RSPの治療剤、RSP組成物を対象に投与する方法、RSPで治療され得る疾患、及びRSPを含む対象に共投与され得るさらなる治療的に有効な薬剤を記述する。本発明に使用のためのさらなるRSP、及びそれらを合成する方法は、文献、例えば、Shukaliak Quandt, J. et al. (2004) Mol. Immunol. 40(14-15): 1075-87；Montaudou, MS (2004) J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15(3): 374-84；Takeda, N. et al. (2004) J. Control Release 95(2): 343-55；Pollino, JM et al. (2004) J. Am. Chem. Soc. 126(2): 563-7；Fridkis-Hareli, M et al. (2002) J. Clin Invest. 109(12): 1635-43；Williams, DM et al. (2000) J. Biol. Chem. 275(49): 38127-30；Tselios, T. et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. 8(8): 1903-9；and Cady, CT et al. (2000) J. Immunol. 165(4): 1790-8.において発見され得る。これらの全ての特許、出願、及び公表物の技術は、それらの全体において、特にそれらの中で記述されるRSPの構造、調製、及び機能に関して、参照により本明細書に援用される。

30

40

【0056】

特定のRSPは、フィルターとして役に立つ、負電荷(好ましくは少ない量で)を有するアミノ酸、例えば、グルタミン酸、又はアスパラギン酸との組み合わせで、任意で電氣的に中性のアミノ酸、例えば、アラニン、又はグリシンとの組み合わせで、正電荷のアミノ酸、例えば、リジン、又はアルギニンの好適な量を含み、共ポリマーに免疫原性特性を与えるために適合させたアミノ酸、例えば、チロシン又はトリプトファンなどの芳香族アミ

50

ノ酸を任意でさらに含み得る。そのような組成物は、W O O O / 0 0 5 2 5 0 に開示される任意のもの、ここでその中で開示された R S P の構造、調製、及び機能を議論する部分に対する特別な注意とともに、その全体の内容は参照により本明細書に援用される、を含み得る。本発明の特定の実施形態では、R S P 組成物は、ランダム又は部分的にランダムなアミノ酸配列を有し、以下の4つの群：(a) 正に荷電したアミノ酸、すなわち、リジン及びアルギニン；(b) 負に荷電したアミノ酸、すなわち、グルタミン酸及びアスパラギン酸；(c) 小さい中性のアミノ酸、すなわち、アラニン、スレオニン、セリン、及びグリシン；及び(d) 嵩高いアミノ酸、すなわち、ロイシン、イソロイシン、バリン、チロシン、フェニルアラニン、及びトリプトファン、からアミノ酸を含むポリマーの混合物である。そのような R S P の特定の実施形態は、Y E A K (下記に記述される C o p - 1 を含む)、V E A K、及び F E A K である。他の実施形態では、R S P は、3つのアミノ酸、それは4つの先の群の中の3つの群のそれぞれから選択される、からなるターポリマーである。特定の実施形態は、さらに下記で記述される Y A K、Y E K、K E A、及び Y E A である。

10

【0057】

本発明の他の実施形態では、R S P 組成物は、ランダム又は部分的にランダムなアミノ酸配列有し、(a) グルタミン酸、(b) アスパラギン酸、並びに以下の群：(c) 小さい中性のアミノ酸、すなわち、アラニン、スレオニン、セリン、及びグリシン；並びに(d) 疎水性アミノ酸、すなわち、バリン、ロイシン、及びイソロイシンのそれぞれからアミノ酸を含むポリマーの混合物である。そのような R S P の特定の実施形態は、D A L E、D A I E、D A V E、D G L E、D G I E、及び D G V E である。本発明がそれに有用である R S P の他の実施形態は、疎水性アミノ酸を含まないものである。特定の実施形態は、D A S E、D A T E、D G S E、及び D G T E である。

20

【0058】

他の好適な R S P は、ランダム又は部分的にランダムなアミノ酸配列有し、以下の4つの群：(a) 負に荷電したアミノ酸、すなわち、グルタミン酸及びアスパラギン酸；(b) 小さい脂肪族アミノ酸、すなわち、アラニン及びグリシン；(c) 疎水性、脂肪族アミノ酸、すなわち、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン；及び(d) 小さい親水性側鎖を有するアミノ酸(例えば、セリン、システイン、スレオニン)のそれぞれのアミノ酸を含む、加えて、共ポリマーは、プロリン残基を含み得る、ポリマーの混合物である。一つの実施形態では、共ポリマーは、アミノ酸であるグルタミン(E)及び/又はアスパラギン酸(D)、ロイシン(L)、セリン(S)、及びアラニン(A)を用いて生成され、本明細書で「E L S A」共ポリマーとして称される。

30

【0059】

特定の他の実施形態では、R S P は、ランダム又は部分的にランダムなアミノ酸配列有し、以下の4つの群：(a) 負に荷電したアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)；(b) 疎水性、脂肪族アミノ酸、すなわち、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン；(c) 嵩高い疎水性アミノ酸、すなわちチロシン、フェニルアラニン；及び(d) 小さい中性側鎖を有するアミノ酸、すなわち、セリン、スレオニン、アラニン、グリシン；からアミノ酸を含み、加えて、共ポリマーは、プロリン残基を含み得る、配列である。典型的な共ポリマーは、アミノ酸残基であるグルタミン(E)及び/又はアスパラギン酸(D)、ロイシン(L)、チロシン(Y)、及びバリン(V)を用いて生成され、本明細書で「D L Y V」共ポリマーとして称される。

40

【0060】

R S P の他の特定の実施形態は、V Y A K、V W A K、及び Y F A K であり、それはさらに後述される。さらなる他の実施形態では、本発明で使用のために好適な R S P は、アミノ酸残基 K、E、A、S、V、及び任意で P を含む。より好ましくは、K : E : A : S : V の比が 0 . 3 : 0 . 7 : 9 : 0 . 5 : 0 . 5 : 0 . 3 である。好ましくは、R S P は、約 1 0 ~ 1 0 0 個のアミノ酸残基長、より好ましくは、2 0 ~ 8 0 個のアミノ酸残基長、さらに好ましくは 4 0 ~ 6 0 個のアミノ酸残基長、及びより好ましくは約 5 0 個のアミ

50

ノ酸残基長である。R S Pの典型的な調製物は、様々な長さのペプチドの混合物であり、その大部分は、所望の長さであるが、特定の短い又は長いペプチドを含み得る。

【0061】

本明細書で記述される組成物及び方法に好適な特定のR S Pは、Y E A Kであり、それは、L - アラニン (A)、L - グルタミン酸 (E)、L - リジン (K)、及びL - チロシン (Y) の組み合わせを含み、正味で全体として正の電荷を有する。一つの特定の例は、酢酸グラチマーとも称される共ポリマー1 (Cop - 1) である。Cop - 1 は、商標名COPAXONE (登録商標) (Teva Pharmaceuticals Ltd . , Petah Tikva , Israel の商標) の下で、多発性硬化症 (MS) の治療のために、いくつかの国において承認されている。Cop - 1 は、ランダムポリペプチドの混合物であるので、それは含まれるペプチドの全て又はサブセットのみが「活性」であり得る。目的のCop - 1 R S Pは、約2,000 ~ 約40,000ダルトン、特により好ましくは、約2,000 ~ 約13,000ダルトンの分子量を有する。Cop - 1 は、約4,700 ~ 約13,000ダルトンの平均分子量を有するが、小さい及び大きいペプチドも含む。Cop - 1 について最も興味のある平均分子量は、約5,000 ~ 約9,000ダルトンである。従って、Cop - 1 R S Pは、約15 ~ 約100個のアミノ酸残基、好ましくは、約40 ~ 約80個のアミノ酸残基長からのポリペプチドでもよい。特定の実施形態では、Cop - 1 R S Pの長さは、35 ~ 75個のアミノ酸残基である。より好ましくは、Cop - 1 R S Pの長さは、35 ~ 65個のアミノ酸残基である。特定の実施形態では、Cop - 1 の長さは、約50個のアミノ酸である。別の特定の実施形態では、Cop - 1 R S Pの長さは、約52個のアミノ酸である。特定の実施形態では、当該技術分野でよく知られている液相又は固相化学のいずれかにより合成され、Cop - 1 は、Y : E : A : Kそれぞれについて、約1.0 : 2.0 : 6.0 : 5.0の平均モルアウトプット比を有する。従来のペプチド合成及び同様の他のR S Pの調製と対照的に、Cop - 1 の合成は、それぞれのサイクルについて、単一のアミノ酸よりもむしろ、画定の割合で適切に保護されたY、E、A、及びKの混合物を添加することにより行われる。アウトプット比の変性は、様々なアミノ酸間で約10%の範囲を含む。分子量範囲及びCop - 1 の好ましい形態を作るためのプロセスは、米国特許第5,800,808号に記述され、その内容は、全体及び特に記述されたR S Pの構造、調製、及び機能に関して本明細書に援用される。

【0062】

約52個のアミノ酸残基のCop - 1 R S Pの特定の実施形態では、アミノ酸部位31 ~ 52におけるアラニン成分の割合が、アミノ酸部位11 ~ 30においてよりも多く、アミノ酸部位11 ~ 30におけるアラニン成分の割合は、アミノ酸部位1 ~ 10においてよりも多い。特定の実施形態では、Cop - 1 R S P配列の残基1 ~ 10は、約1.0 : 2.0 : 5.5 : 5.0のモルアウトプット比を有し、残基11 ~ 30は、約1.0 : 2.0 : 6.0 : 5.0のモルアウトプット比を有し、残基31 ~ 52は、約1.0 : 2.0 : 6.5 : 5.0のモルアウトプット比を有し、全ての比は順番にY、E、A、K間のモル比について示された。

【0063】

本発明の目的について、語句「Cop - 1又はCop - 1関連ペプチド若しくはポリペプチド」とは、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) と機能的に交差反応する任意のペプチド又はポリペプチドを含むことを意図し、抗原提示におけるMHC クラスIIに対して、MBPと競合することができる。本明細書で開示される実用性についてのCop - 1の活性は、一つ又は複数の以下の置換：グルタミン酸 (E) についてアスパラギン酸 (D)、アラニン (A) についてグリシン (G)、リジン (K) についてアルギニン (R)、及びチロシン (Y) についてトリプトファン (W) がされる場合、維持することが予測される。

【0064】

他の実施形態では、R S P組成物は、以下の群：(a) 負に荷電したアミノ酸 (例えば

、アスパラギン酸、グルタミン酸)；(b)疎水性の、脂肪族アミノ酸、すなわち、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン；(c)嵩高い、疎水性のアミノ酸、すなわち、チロシン、フェニルアラニン；及び(d)小さい中性側鎖を有するアミノ酸、すなわち、セリン、スレオニン、アラニン、グリシン、から3つの異なるアミノ酸を含み、さらに共ポリマーはプロリン残基を含み得る。これらの共ポリマーは、本明細書で「ターポリマー」として称される。平均分子量は、約2,000～約40,000ダルトン、好ましくは、約3,000～約35,000ダルトンである。より特定の実施形態では、平均分子量は、約5,000～約25,000ダルトンである。典型的なターポリマーは、下記の表に示される。これらのターポリマーにおけるアミノ酸の平均モル画分は、変更され得、一般的な範囲として示される。

10

【0065】

【表1】

表A：本発明に使用のための好適なターポリマー

アミノ酸組成	モル分率範囲 (アウトプット)	特定の実施形態比	参考文献及び備考
チロシン アラニン 及びリジン ("YAK")	Y:約0.005～約0.250 A:約0.3～約0.6 K:約0.1～約0.5	Y:約0.10 A:約0.54 K:約0.35	Fridkis-Hareli M., Hum Immunol. 2000;61(7):640-50.
チロシン グルタミン酸 及びリジン ("YEK")	Y:約0.005～約0.250 E:約0.005～約0.300 K:約0.3～約0.7	Y:約0.26 E:約0.16 K:約0.58	バリエーション Y→W; E→D;及び/又は K→R.
リジン、グルタミン酸 及びアラニン ("KEA")	K:約0.2～約0.7 E:約0.005～約0.300 A:約0.005～約0.600	K:約0.36 E:約0.15 A:約0.48	
チロシン、 グルタミン酸、 及びアラニン ("YEA")	Y:約0.005～約0.250 E:約0.005～約0.300 A:約0.005～約0.800	Y:約0.21 E:約0.14 A:約0.65	バリエーション Y→W; E→D;及び/又は A→G.
参照のため チロシン グルタミン酸 アラニン、リジン ("YEA; Cop-1")		Y:約0.10 E:約0.14 A:約0.43 K:約0.34	

20

30

【0066】

特定の実施形態では、ターポリマーのアミノ酸のモル画分は、Cop-1について好ましいもの、例えば、グルタミン酸約0.14、アラニン約0.43、チロシン約0.10、及びリジン約0.34と同様である。

40

【0067】

他の好適なRSPは、L-アラニン(A)、L-フェニルアラニン(F)、L-リジン(K)、及びL-チロシン(Y)の組み合わせを含み、本明細書では、YFAKとして称される。任意のそのようなRSPの長さは、約25～300個のアミノ酸残基である。治療組成物における使用に好ましいYFAK RSPは、約35～75個のアミノ酸残基である。より好ましくは、RSPの長さは、約35～65個のアミノ酸残基である。好ましいRSPは、約50又は52個のアミノ酸の長さを有する。

50

【 0 0 6 8 】

Y F A K (L - チロシン、 L - フェニルアラニン、 L - アラニン、 及び L - リジン) の特定の組成物は、それぞれ約 1 . 0 : 1 . 2 : X_A : 6 . 0 のモルアウトプット比を有し、ここで、X_Aは、1 1 . 0 よりも大きく、3 0 . 0 より小さく、より好ましくは、2 0 . 0 よりも大きく、3 0 . 0 より小さく、アウトプット比における可変性は、様々なアミノ酸の間で約 1 0 % の範囲を含む。治療的使用のために好ましいランダムポリマーの Y F A K のモルアウトプット比は、下記の表 B に示される。

【 0 0 6 9 】

【 表 2 】

10

表 B : YFAK RSPのアミノ酸組成比

Y	F	A	K
1.0:	1.2:	11.0<30.0:	6.0
1.0:	1.2:	18.0:	4.0
1.0:	1.2:	18.0:	5.0
1.0:	1.2:	18.0:	6.0
1.0:	1.2:	18.0:	7.0
1.0:	1.2:	18.0:	8.0
1.0:	1.2:	20.0:	4.0
1.0:	1.2:	20.0:	5.0
1.0:	1.2:	20.0:	6.0
1.0:	1.2:	20.0:	7.0
1.0:	1.2:	20.0:	8.0
1.0:	1.2:	20.0<30.0:	6.0
1.0:	1.2:	22.0:	6.0
1.0:	1.2:	24.0:	6.0
1.0:	1.2:	26.0:	6.0
1.0:	1.2:	28.0:	6.0
1.0:	1.2:	30.0:	6.0
(Y+F=2.2):		18.0:	6.0
1.0:	1.3:	24.0:	6.0
0.66:	1.54:	18.0:	6.0
0.88:	1.32:	18.0:	6.0

20

30

【 0 0 7 0 】

特定の Y F A K 組成物は、約 1 . 0 : 1 . 3 : 2 4 . 0 : 6 . 0 (それぞれ、 Y、 F、 A、 K) の平均モルアウトプット比を有し、当該技術分野において知られるような固相合成により調製され得る。

40

【 0 0 7 1 】

治療的使用のために好ましい別の Y F A K 組成物は、約 1 . 0 : 1 . 2 : X_A : 6 . 0 のモルアウトプット比を有し、ここで、X_Aは、2 0 . 0 よりも大きく、アラニンの割合は共ポリマーの長さと共に増加する。特定の組成物では、そのような R S P の長さは、約 5 2 個のアミノ酸残基であり、アミノ酸部位 3 1 ~ 5 2 におけるアラニンの割合は、アミノ酸部位 1 1 ~ 3 0 においてよりも多く、アミノ酸部位 1 1 ~ 3 0 におけるアラニンの割合は、アミノ酸部位 1 ~ 1 0 においてよりも多い。

【 0 0 7 2 】

50

R S Pは、アミノ酸組成及びそれらの比に直接的に由来する、それらの優先的な結合標的、及びそれらの生理学的機能に従って分類され得る。任意の利用可能な方法は、R S P組成物が候補の又は既知の標的タンパク質と結合するかどうかを解明するために用いられ得る。例えば、ポリペプチドは、レポーター分子（例えば、放射性核種又はビオチン）で標識され、標的タンパク質の粗製の又は純粋な調製物と混合され、未結合のポリペプチドの除去後、レポーター分子が標的タンパク質に付着した場合、結合は検出される。

【0073】

R S Pは、任意の割合で任意のアミノ酸残基を含み、潜在的に様々な生理学的効果を有し得るが、特定のR S Pは認識される免疫学的活性を有する。特定のR S Pは、それらが優先的に特異的T細胞エピトープと相互作用するように設計され、そのいくつかは、病理学的障害に直接的に関連し得る。本発明が有用であるR S Pの一つの種類はT細胞に特異的であり、それは可溶性メディエーター、例えば、サイトカインを分泌し得る。好ましくは、そのようなR S Pは、アミノ酸の2～8種類を含むペプチドの混合物であり、優先的に特異的T細胞エピトープと相互作用し、そのいくつかは、可溶性メディエーター、例えば、サイトカインの異常な生産により深刻化する病理学的障害と直接的に関連する、又は関連していると考えられる。

10

【0074】

R S Pの別のクラスは、MHC分子、好ましくはMHCクラスII分子による提示を介した数千、好ましくは数十万、より好ましくは数百万のT細胞エピトープと機能的に相互作用する潜在力を有する。ヒトにおけるMHCクラスII対立遺伝子は、HLA-DR、HLA-DQ、又はHLA-DP分子からなる。これらのHLA分子のそれぞれの種類をコードする多数の対立遺伝子はまた、存在する。クラスII MHC分子は、Bリンパ球、及び抗原提示細胞、例えば、マクロファージの表面に主に発現される。クラスII MHCタンパク質は、ほぼ同じ大きさの及びサブユニットからなり、その双方は、膜貫通タンパク質である。ペプチド結合クレフトは、及びサブユニットの双方のアミノ末端の部分により形成される。このペプチド結合クレフトは、T細胞に対する抗原の提示の部位である。MHCクラスIIタンパク質の特定の対立遺伝子変異体は、自己免疫及び他の異常な免疫学的障害に関連する。

20

【0075】

一つの特定のそのような障害は、多発性硬化症(MS)である。MS関連HLA-DR2(DRB1*1501)分子は、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)と高い親和性で結合し、それはT細胞にミエリン鞘を攻撃させる。上述のCop-1は、高い親和性で、且つペプチド特異的な方法で、精製されたHLA-DR2(DRB1*1501)、HLA-DR1(DRB1*0101)、及びHLA-DR4(DRB1*0401)と結合する。他のR S P、例えばYFAKはまた、そのようなMHCクラスIIタンパク質の抗原結合溝について、Cop-1が有するのと同様の、又はより高い親和性を有し得る。それ故、これらのR S Pは、MHCクラスIIタンパク質からミエリン自己抗原の結合を阻害し、又は結合を置き換え得る。

30

【0076】

同様に、本明細書で記述される方法に用いられるR S P組成物は、関節炎疾患、例えば、関節リウマチ(RA)、又は変形性関節症(OA)を治療するのに有用であり得る。Cop-1と結合するHLA-DR1(DRB1*0101)、又はHLA-DR4(DRB1*0401)は、関節リウマチ(RA)に関連する。この発明が有用なCop-1、YFAK、及び他のR S Pは、そのようなHLAの抗原結合溝について、関節リウマチ病理の標的であるII型コラーゲン261～273ペプチドが有するよりも高い親和性を有し得る。それ故、これらのR S Pは、MHCクラスIIタンパク質の抗原結合溝からII型コラーゲン261～273ペプチドの結合を阻害し、又は置き換え得る。

40

【0077】

発明の方法の特定の実施形態が有用である他のR S Pは、HLA-DQA1分子、よりさらに好ましくは、対立遺伝子であるDQA1*0501-DQB1*0201、DQA1

50

*0301、DQB1*0401、及びDQA1*03-DQB1*0302にコードされている一つ又は複数のHLA分子と結合するRSPである。

【0078】

特定の実施形態では、RSPは、HLA-DR分子及び/又は他のDQアイソタイプと結合するための共ポリマーの解離定数(K_d) K_d よりも少なくとも10倍未満の K_d を有し、そのような分子の担体を自己免疫関連疾患、例えば、I型糖尿病及びセリアック病に係りやすくする特定のHLA-DQ分子と結合する。そのようなHLA-DQ分子は、DQB1*0201、DQB1*0302、DQB1*0304、DQB1*0401、DQB1*0501、DQB1*0502;及びDQA1*0301、DQA1*0302、DQA1*0303、及びDQA1*0501として知られる特異的なHLA-DQB1及びDQA1対立遺伝子の組み合わせられたタンパク質生成物である。これらの対立遺伝子は、同じハプロタイプ(「シス」対立遺伝子)、例えば、DQB1*0201-DQA1*0501-DRB1*0301、及びDQB1*0302-DQA1*0301-DRB1*0401上にコードされ得る。「シス」対立遺伝子のポリペプチド生成物を含む得られたHLA分子は、「シスダイマー」として称される。あるいは、対立遺伝子は、異なるハプロタイプ(「トランス」対立遺伝子)上にコードされ得る。「トランス」対立遺伝子のポリペプチド生成物を含むHLA分子は、「トランス」ダイマーとして称される。「トランス」対立遺伝子の例は、DQB1*0201-DQA1*0501-DRB1*0301上のDQB1*0201、及びDQB1*0301-DQA1*0301-DRB1*0404上のDQA1*0301の組み合わせである。

10

20

【0079】

特定の実施形態では、本発明に有用なRSP組成物は、 1μ 以下の平均 K_d で、より好ましくは100nM、10nM、又は1nM未満の平均 K_d で、一又は複数のDQアイソタイプと結合する。好ましい共ポリマーを同定するための別の方法は、例えば、Sidney et al., 2002, J. Immunol. 169:5098、それは IC_{50} 値として表現される、に記述されている競合的結合アッセイにおいて、別のものに置き換えるための共ポリマーの測定に基づく。本発明の好ましいRSPは、 1μ M未満、より好ましくは、500nM未満、さらには100nM未満の IC_{50} を有する。HLA-DQに対して特異性を有するいくつかのRSPは、ELSA及びVLYVである。

30

【0080】

特定の他の実施形態では、本発明の方法は、疾患と関連するエピトープに基づくAPLの特定の特徴を有するRSPに関連する。

【0081】

特定の実施形態では、本発明に有用なRSPは、25,000未満、より好ましくは、10000、5000、1000、500、100、50未満、又はさらには10未満の多分散性を有するように、医薬として使用のために製剤化される。

【0082】

薬物動態的方法

いくつかの実施形態では、RSP組成物の吸収及び分布は測定され得る。RSP組成物の変化をもたらすその速度、及びその効果の存続、並びにRSP組成物の組成に対する化学的变化はまた、測定され得る。

40

【0083】

特定のRSP組成物は、他の混合物よりも、血清及び他の生体液において、より長く存続する。例えば、YFAK、PI-2301の調製物は、同じ初期重量/体積濃度で投与されたCop-1と比較して10倍の血清濃度で発見された(米国出願公開2009-0275496)。いくつかの例では、投与されたペプチドは、インサイチュでいくつかのインピボ成分と結合され、結合することにより捕捉され、その結果は、生物学的利用性の増大を含む又は含まない、その環境において長い半減期である。特定の実施形態では、環境は、血漿又はリンパ液である。代替の実施形態では、環境は、脊髄又は脳脊髄液である。さらに他の実施形態では、環境は、RSP組成物からペプチドが送達される任意の組

50

織又は臓器の場所である。

【0084】

R S P 組成物からのアミノ酸ポリマーに結合する生理学的ポリペプチド及びタンパク質の同定

本発明の一つの態様は、R S P 組成物に結合する捕捉ポリペプチドの同定である。用語「捕捉ポリペプチド」とは、任意のポリペプチド、タンパク質、タンパク質フラグメント、タンパク脂質、又は正常な組織及び臓器に見られるタンパク質性物質を含む他の分子を意味するために本明細書で用いられる。それは、単一のポリペプチド、又は複数のポリペプチド及び/又はサブユニットを含むタンパク質、又は他の物質、例えば、脂質と結合した（共有結合的に又は非共有結合的に）タンパク質を含む複合体であってもよく、それは、R S P 組成物に結合するための捕捉ポリペプチドのための望ましい又は必須の画定された構造をさらに有し得る。しばしば、捕捉ポリペプチドは、一過性でなく、すなわち、誘導された又は増大された一時的な存在があるかにかかわらず、全ての時間において見つかるベースで安定的な量が存在する。好ましくは、捕捉ポリペプチドはタンパク質である。より好ましくは、捕捉ポリペプチドは生体液中で発見されるタンパク質、例えば血清タンパク質である。

10

【0085】

本発明のこの態様のいくつかの実施形態は、R S P 組成物を構成するペプチドと結合する捕捉ポリペプチドを同定する方法であって、本方法は、以下：R S P 組成物の量を含むサンプルと正常組織サンプルとを接触させること；及びR S P 組成物のペプチドと正常組織サンプルの任意の成分との結合を検出することを含む。特定の実施形態では、R S P 組成物のペプチドは、レジン（ペプチドと活性化されたレジンとを反応させることにより共有結合を通して）、又は固体支持体、例えばポリスチレン上のいずれかに固定化される。例えば、組織サンプルは、固定化されたペプチドと接触され、インキュベートされ、非特異的な結合を取り除くために洗浄され得、組織サンプル中のペプチドと結合した物質は同定される。結合した物質は、任意の好適な方法により、例えば、物質を特異的抗体のパネルに供すること；そのような物質がポリペプチド又はヌクレオチドであることが疑わしい場合、物質のマイクロ配列解析を行うこと；そのような物質が多糖であることが疑わしい場合、そのような物質を特異的な色素に供して、トリプシン消化に続く質量分析計と直列に結合された液体クロマトグラフィー（LC - MS / MS）；又は十分に高い感度を有する任意の分析方法により、同定され得る。

20

30

【0086】

上述の同定の非限定的な例として、P I - 2301又はC o p - 1は、Y E A K又はY F A Kペプチドを含むR S P 組成物に結合する血清タンパク質を同定するために、直接E L I S Aアッセイ（物質及び方法を参照のこと）に用いられ得る。下記の表Cは、正常ヒト血清中でY E A K及び/又はY F A Kペプチドと結合することが実験的に示された血清タンパク質を一覧にする。Y E A K及びY F A Kペプチドが異なる結合特異性を有し；反対に、血清タンパク質は様々な特異性でY E A K及びY F A Kペプチドに結合すると言われ得ることは観察される。表D及びEは、それぞれH D L及びL D Lと結合する血清タンパク質を一覧にする。任意の血清タンパク質は、親和性及び選択性を変えることにより本明細書で記述されたR S P 組成物と結合し得る。

40

【0087】

一旦R S P 組成物を構成するペプチドと結合する捕捉ポリペプチドが同定されると、同様のペプチドに対する、又は完全にランダムなペプチドに対する結合の特異性は、測定され得る。同定され、特徴付けられた捕捉ポリペプチド（実際に同定された同じ分子、又は様々な起源から得られた同様の分子のいずれか）は従って、順番に、結合するここが分かっているR S P 組成物を定量的に分析するために用いられ得る。

【0088】

血清タンパク質

いくつかの実施形態では、R S P 組成物と血清タンパク質との結合は、それらの生物学

50

的活性の重要な態様を構成する。R S P 組成物と血清タンパク質との結合は、それらの組織分布、及び抗原提示細胞、例えば、単球及びマクロファージによる捕捉を容易にし得る。上述のように、ペプチドと血清タンパク質との結合は、分解及び/又は代謝回転からそれらを保護し得る。例えば、P I - 2 3 0 1 (プロバマー (p l o v a m e r)、Y F A K R S P) 及び C o p - 1 (酢酸グラチラマー、Y E A K R S P) は、皮下投与の数時間後、ヒトを含む様々な種の血清において検出され得るのに対し、対照 R S P は短時間で血清から消失した (米国特許出願公開第 2 0 0 9 - 0 2 7 4 9 6 号)。

【 0 0 8 9 】

従って、血清タンパク質は、R S P 組成物からの一つ又は複数のペプチドを捕捉する及び/又は同定するために用いられ得る。全体として、R S P 組成物は、多数の様々な別々のペプチドを含み、その一つ又は複数のサブフラクションは、他のサブフラクションがそうでないのに対し、血清タンパク質結合特性について関与し得る。これは、R S P 組成物の異なるロットが、血清タンパク質に結合することができるペプチドの百分率においてバリエーションを含み得る、液相ペプチド合成により作られた混合物に特に当てはまる。例えば、異なるロットの R S P 組成物に亘って、血清タンパク質結合画分が定量的に及び定性的に同等であることを実証するために、変異体の生物学的同等性を実証するために、血清中の酢酸グラチラマーの一般的な変異体を観察することは重要であり得る。

10

【 0 0 9 0 】

血清タンパク質は、R S P 組成物から結合パートナーを選択する及び/又は特徴付けるためにインビトロで用いられ得る。血清タンパク質はまた、血清タンパク質と結合するペプチドを選択する、測定する、及び/又はさもなければ特徴付けるためにインビトロで用いられ得、従って、血清タンパク質とのそれらの結合及び/又はインビボでのそれらの残存に基づいて、特異的なペプチド又はペプチドのサブセットを識別する方法を提供する。血清タンパク質と結合するペプチドの特定の特徴は、特定のアミノ酸配列、混合物中のアミノ酸の割合、構造、独特のモチーフ、荷電残基の配置を含み得る。例えば、P I - 2 3 0 1 と H D L 又は L D L において複合体で発見されるリポタンパク質との結合は、正のリジンとリポタンパク質の外部上の負に荷電した残基との相互作用、及びアラニン及びフェニルアラニンとリポタンパク質の疎水性部分との相互作用のために、可能であり得る。

20

【 0 0 9 1 】

【表 3】

表C：ヒト血清中のYEAK及びYFAKと結合することが実験的に示された血清タンパク質の例

タンパク質	NCBIローカス/登録番号
アルファ-1-抗トリプシン (配列番号 1)	AAA51546 (CAJ15161)
アルファ-1-B糖タンパク質 (配列番号 3)	OMHU1B
アルファ2-HS糖タンパク質	BAA22651
アルファ-2-HS糖タンパク質	P02765
アポリポタンパク質A-1 プレプロタンパク質 (配列番号 4)	AAA51747
アポリポタンパク質A-I (配列番号 2)	Q9Z2L4 (AAS68227)
アポリポタンパク質A-II プレプロタンパク質 (アポリポタンパク質D)	NP_001634 (AAB32200)
アポリポタンパク質A-IV	AAA51744
アポリポタンパク質C-III	AAB59372
アポリポタンパク質D (配列番号 5)	AAB35919
アポリポタンパク質E	AAB59518
アポリポタンパク質J前駆体	AAA51765
セルロプラスミン	AAA51975
鎖C、免疫グロブリンM	2RCJ_C
凝固因子II (トロンビン)	3F68_H
補体成分3	NP_058690
補体成分C3	AAA85332
補体成分C4A	AAA51855
補体因子B	AAA16820
ゲルゾリンアイソフォーム前駆体	NP_000168
ヒスチジンリッチ糖タンパク質前駆体	NP_000403
IgA1 Bur	763134A
IgJ鎖	AAA58902
Igカッパ鎖V-III (KAU寒冷凝集素)	A23746
免疫グロブリンラムダ軽鎖	CAA40939
クニッツ型プロテイナーゼ阻害剤	0511271A
インター-アルファトリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連蛋白質 (IHRP)	BAA07602
インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖H 1	Q61702
インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖H 2	Q61703
ルミカン	AAB35361
プレアルブミン (配列番号 6)	BAA00059
トリプシン阻害剤	CAA30160
無名のタンパク質生成物 (推定上IgM重鎖)	CAA34971
無名のタンパク質生成物 (推定上ビトロネクチン)	CAA28659
ビトロネクチン	AAA40558

10

20

30

40

【 0 0 9 2 】

【表4】

表D：HDLと結合する血清タンパク質

タンパク質	登録番号
アポA-I	P02647
アポA-II	P02652
アポA-IV	P06727
アポC-II	P02655
アポC-III	P02656
アポD	P05090
アポE	P02649
アポJ	P10909
アポL1	Q14791
アポM	gi 13645390
LPL	gi 3293305
CETP	P11597
C-RP	P02741
セロプラスミン (ceroplasmin)	gi 13645230
補体成分3	gi 13649325,
ハプトグロビン	gi 1212947, P00738
SAA	P35542
SAP	P02743
トランスチレチン	P02766
トランスフェリン	gi 4557871, P02787
PON	P27169
補体成分1阻害剤	P05155
マクロファージ刺激因子1	gi 10337615
リンパ球抗原	gi 553540
髄膜腫発現抗原5	gi 11024698
HLA-Aタンパク質	gi 13620230
NOTCH1	gi 11275980
シアル酸結合Ig様レクチン5	gi 13633818
C型レクチンスーパーファミリーメンバー1	gi 5031637
H因子1 (補体)	gi 4504375
補体成分3	gi 13649325,
インスリノーマ関連タンパク質 I A-6	gi 14211925
潜在型形質転換増殖因子ベータ	gi 3327808
LTBP-2	gi 1272664
増殖停止特異的遺伝子-6	gi 4557617
受容体 リアノジン受容体2	gi 13638463
POU5ドメインタンパク質	gi 12382246
血漿カリクレインB1	gi 11436257
TFPI	P10646/P48307
無名のタンパク質生成物	gi 10435007
未詳のタンパク質	gi 12653035
未詳のタンパク質	gi 12802992
KIAA1095	gi 5689527
KIAA1730タンパク質	gi 12698005
KIAA0675遺伝子産物	gi 13643803

10

20

30

40

【表 5】

タンパク質	登録番号
CIP相互作用ジンクフィンガータンパク質	gi 12643326
dj675G8.1 (新規のジンクフィンガータンパク質)	gi 11137825
dj733D15.1	gi 3702137
TAT相互作用タンパク質, 72kDa	gi 1427566
dj758N20.1 (タンパク質キナーゼ)	gi 11493357
タンパク質チロシンホスファターゼ	gi 13645209
仮定のタンパク質 dj1057B20.2	gi 11034845
デスモコリン	gi 13435361
凝固因子VIIII関連タンパク質	gi 13652210
IgG	gi 10334541, P99007
HSA	gi 178345, P02728
α -1 β -糖タンパク質	P04217

10

【 0 0 9 4 】

【表 6】

表 E : LDLと結合する血清タンパク質

20

タンパク質	
アポE (5つのアイソフォーム)	
アポL-I (7つのアイソフォーム)	
アポC-IV (3つのアイソフォーム)	
アポA-IV	
アポA-I	
アポM	
アポC-III	
b-アクチン	
フィブリノーゲン-g (2つのアイソフォーム)	
アルブミン (3つのアイソフォーム)	
プレニルシステインリアーゼ (2つのアイソフォーム)	

30

【 0 0 9 5 】

血清タンパク質とRSP組成物との結合

理論により縛られることを望まないで、構造的に、RSP組成物（例えば、PI-2301及びCop-1）中のペプチドと血清タンパク質、例えば、HDL及びLDLと結合して発見されるリポタンパク質との結合は、受容体、例えば、SR-BI又はABCA1を通して単球によるそれらの捕捉を容易にし得る。この結合は、単球の活性化、及び炎症性細胞へのそれらの分化を誘導し得る。PI-2301とCop-1は、血清タンパク質との結合において異なる（図3を参照のこと）。違いについての一つの理由は、Cop-1及び酢酸グラチマーの一般的な変異体が液相ペプチド合成により作られ、従って、組成物中の有意なバリエーションは、ロットからロットまで観察され得ることである。対照的に、PI-2301は固相合成により製造される。PI-2301は、双方の方法により狭いガウス分布を有するSEC-HPLC及びMALDI-TOFにより実証されるように大変狭い分子量分布を有する。従って、混合物中のPI-2301 52merペプチドの大部分は、機能的であると見られる。Cop-1は、より広い分子量分布を有し、それは混合物のいくつかの種類、例えば、混合物中の小さいペプチド種類は効果が無いと見られる。その考えと一致して、PI-2301は、多発性硬化症及びクローン病の前

40

50

臨床モデルにおける有効性に関して Cop - 1 より強力であり、優れた血清曝露を達成する。

【 0 0 9 6 】

PI - 2301 又は Cop - 1 と結合する血清タンパク質についてのアッセイでは、血清タンパク質の異なるサブセットは Y F A K 及び Y E A K ペプチドと結合する（図 3 を参照のこと）。

【 0 0 9 7 】

血清タンパク質は、コレステロール複合体、例えば、HDL 又は LDL 複合体の一部として、及び / 又は生理的条件下で血清タンパク質との結合で発見される他のタンパク質及びポリペプチド（そのいずれかはまた、捕捉ポリペプチドとして個別に機能し得る）との複合体で、RSP 組成物と結合し得る。従って、本発明の方法は、RSP 組成物と血清タンパク質とが結合する場合、血清中で発見されるさらなる成分を有することを予期する。

10

【 0 0 9 8 】

生体サンプルにおける RSP 組成物の検出：生物学的利用性の測定

本発明の一つの態様は、生体サンプル中の RSP 組成物の存在を検出するための方法であって、以下：生体サンプルと少なくとも一つの捕捉ポリペプチドとを接触させること；及び捕捉ポリペプチドと RSP 組成物との結合の存在又は不存在を検出すること、ここで、結合の存在は生体サンプル中の RSP 組成物のペプチド成分の存在を示す、を含む。さらに、そのような方法は、サンプル中の RSP 組成物の量又は濃度を測定するために拡張され得る。

20

【 0 0 9 9 】

いくつかの実施形態では、RSP 組成物（例えば、Y F A K 又は Y E A K ペプチドを含む）の存在は、生体サンプルと少なくとも一つの捕捉ポリペプチド（例えば、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質 A - I、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アポリポタンパク質 A - I V、アポリポタンパク質 D、及びプレアルブミンから選択されるペプチドを含む）と接触させること；及び捕捉ポリペプチドと RSP 組成物との結合の存在又は不存在を検出することにより、生体サンプルにおいて検出され得る。このアッセイでは、結合の存在は、生体サンプル中の Y F A K 又は Y E A K ペプチドの存在を示す。さらに、本発明は、生体サンプルと少なくとも一つの捕捉ポリペプチド（例えば、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質 A - I、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アポリポタンパク質 A - I V、アポリポタンパク質 D、及びプレアルブミンから選択されるペプチドを含む）とを接触させること；及び捕捉ポリペプチドと RSP 組成物との結合のレベルを定量することにより、生体サンプル中の Y F A K 又は Y E A K ペプチドを含む RSP 組成物の量を測定する方法を提供する。

30

【 0 1 0 0 】

本発明の他の実施形態は、対象において RSP 組成物（例えば、Y F A K 又は Y E A K ペプチドを含む）の生物学的利用性を測定する方法であって、RSP 組成物を含む組成物の用量を対象に投与すること；対象から生体サンプルを取り除くこと；及び生体サンプルと少なくとも一つの捕捉ポリペプチド（例えば、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質 A - I、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アポリポタンパク質 A - I V、アポリポタンパク質 D、及びプレアルブミンから選択されるペプチドを含む）とを接触させることを含む方法を提供する。RSP 組成物のペプチドがインビボにおいて捕捉ポリペプチドと広く結合することは予期される。それにもかかわらず、さらなる特徴化のために、RSP 組成物のペプチド及び捕捉ペプチドを含む複合体に対する特異的な抗体は、それらそれぞれが単独ではなく、生物学的に利用可能な RSP 組成物の検出のために用いられ得る。

40

【 0 1 0 1 】

投与の用量及び方法の改良

本発明の別の態様は、上述の方法又は本明細書に記述される他の方法により決定される

50

ような投与量の生物学的利用可能な部分に基づいて決定される量において、哺乳動物対象に R S P 組成物を投与する方法を提供する。特定の実施形態では、方法は、対照サンプルを含むこと、対照サンプルと試験サンプルの二つの結果を比較することにより生理学的マーカー、例えば、ホルモン、酵素、血清タンパク質、サイトカイン、免疫調節物質、又は任意のそれらの機能性タンパク質のエフェクター又はレギュレーターの変化を測定するための薬力学的試験を行うこと、及び薬力学的パラメーターの所望の変化を誘導するために有効な用量を決定することをさらに含む。特定の実施形態では、行動変化、対象により報告されるような自覚的变化、例えば、疼痛又は疾患の症状の改善、又は間接的効果の他の証拠は観察される。特定の実施形態では、前記哺乳動物対象は、齧歯動物、例えば、マウス又はラットである。他の実施形態では、前記対象はヒトである。

10

【0102】

より一般的には、対象における望ましくない免疫反応を治療する又は予防するための方法は、R S P 組成物（例えば、Y F A K 又は Y E A K ペプチドを含む）を提供すること；R S P 組成物を試験対象に投与すること；試験対象から生体サンプルを取り除くこと；生体サンプルと少なくとも一つの捕捉ポリペプチド（例えば、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質 A - I、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アポリポタンパク質 A - I V、アポリポタンパク質 D、及びプレアルブミンから選択されるペプチド配列を含む）とを接触させること；捕捉ポリペプチドと結合したペプチドを混合物から分離すること；分離されたペプチドの特徴を決定すること；分離されたペプチドの特徴を有するペプチドのセットを調製すること、及び対象にペプチドの調製されたセットを投与することを含み得る。

20

【0103】

これらの方法では、R S P 組成物は、一回以上対象に投与され得る。R S P 組成物は、例えば、1、2、3、4、6、12、18、24、36、48 又は 72 時間の間隔で、対象に投与され得る。

【0104】

従って、本発明のいくつかの実施形態は、それを必要とする対象に好適な用量の R S P 組成物（例えば、Y F A K 又は Y E A K ペプチドを含む）を投与する方法であり、ここで、好適な用量は、R S P 組成物に第一の用量を対象に投与すること；対象から生体サンプルを取り除くこと；生体サンプルと少なくとも一つの捕捉ポリペプチド（例えば、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質 A - I、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アポリポタンパク質 A - I V、アポリポタンパク質 D、及びプレアルブミンから選択されるペプチドを含む）とを接触させること；生体サンプル中の捕捉ポリペプチドのレベルを測定すること；第二の異なる用量を用いて任意で前述のステップを繰り返すこと；及びそのレベルと生体サンプル中の R S P 組成物の所定の好適なレベルとを比較することにより決定される。これらの条件下では、好適な用量は、生体サンプル中の R S P 組成物の所定の好適なレベルをもたらす用量である。生体サンプル中の R S P 組成物の好適なレベルは、所望の機能的読み出し又は代理のマーカー変化が得られるレベルである。機能的読み出しは、対象の表現型又は機能、対象由来の細胞物質の表現型又は機能、又は対象由来の液体の組成物であり得る。特定の実施形態では、検出ステップは、投与後の生物学的利用性の時間経過を測定するための特定の時間間隔後、繰り返される。特定の実施形態では、群としての R S P 組成物の半減期は、そのような時間経過から決定される。Y F A K 又は Y E A K の場合における機能的読み出し及び免疫反応増強又は抑制についての例は、以下：望ましくない免疫刺激の指標としての T N F α 、I L - 6、C X C L 1、C X C L 2、及び I L - 1 2 p 7 0 の増加又は検出、及び所望の好ましい変化の指標としての I L - 1 r α 、C X C L 1 3、及び C C L 2 2 の増加又は検出である。これらのマーカーにおける変化は、当該技術分野において知られており、容易に入手可能である技術及び物質により容易に測定される。

30

40

【0105】

本発明の特定の実施形態は、種に亘る有効用量の比較を容易にする。ヒトと実験動物、

50

例えば、マウス又はラットにおける有効用量の比較は、体の大きさの違い及び一般的な代謝における違いによるだけでなく、薬物の生物学的利用性が動物種間で異なることが観察されているので困難である。R S P組成物の生物学的利用性が、成分ペプチドと血清タンパク質との結合により部分的に補正されることは、本発明の一つの態様であり、それは、長い半減期及び特定の組織分布を許容し得る。従って、本発明のいくつかの実施形態は、対象におけるR S P組成物の好適な用量を決定する方法であり、そのような方法は、実験動物モデルにおいてR S P組成物の第一の好適な用量を決定すること、ここで第一の好適な用量は、好ましい読み出しを与え、インビボで血清タンパク質と結合したR S P組成物のレベルに相当するそのような用量である、及び対象におけるインビボで血清タンパク質と結合したR S P組成物のレベルが実験動物に第一の好適な用量を投与することにより達成されるレベルと同様又は一致するように、対象に投与することにより対象においてR S P組成物の第二の好適な用量を決定することを含む。

10

【0106】

特定の実施形態では、R S P組成物（例えば、対象において望ましくない免疫反応を治療する又は防ぐために用いられるY F A K又はY E A K R S Pペプチドを含む）の投与は、本発明の方法を用いて高められ得る。一つの方法は、好適な用量のR S P組成物（例えば、Y E A K又はY F A K R S P組成物を含む）を対象に投与すること、ここで、そのような好適な用量はR S P組成物の用量を対象に投与することより決定される；実験対象から生体サンプルを取り除くこと；生体サンプルと少なくとも一つの捕捉ポリペプチド（例えば、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリボタンパク質A - I、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アポリボタンパク質A - I V、アポリボタンパク質D、及びプレアルブミンから選択される）を接触させること；生体サンプル中の捕捉ポリペプチドのレベルを測定すること；任意で全ての前述のステップを繰り返すこと、及びそのレベル（単数又は複数）と生体サンプル中のR S P組成物の所定の好適なレベルとを比較することを含む。好適な用量は、好ましい読み出しに基づいて、上述のように決定される。

20

【0107】

ペプチドは、任意の好適な方法、例えば、蛍光部分を付着させること、放射性標識、化学複合体の形成、ビオチン化、エピトプタグ、又は検出を容易にする任意の他の部分の付与により標識され得る。上述のように検出用ポリペプチドとして作用する血清タンパク質は、固体支持体に付着され得る。血清タンパク質がR S P組成物からの一つ又は複数のペプチドと結合後、R S P組成物と結合した捕捉ポリペプチドを含む結合した複合体は、単離され得る。

30

【0108】

結合複合体を単離するための方法は、免疫沈降、E L I S A、免疫検出、又は標識捕捉ポリペプチドの検出を含み得る。捕捉ポリペプチドとR S P組成物との結合の検出は、捕捉ポリペプチドに対する抗体、R S P組成物に対する抗体（例えば、抗Y F A K又は抗Y E A Kポリクローナル抗体）、又は結合複合体を認識するために生成された抗体を用いて行われ得る。

【0109】

R S P組成物は、皮下に、筋肉内に、静脈内に、鼻腔内に、又は任意のオリフィス若しくは粘膜を介して投与され得る。

40

【0110】

いくつかの実施形態では、生体サンプル中のY E A K又はY F A Kペプチドを含むR S P組成物を検出するための組成物は、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリボタンパク質A - I、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アポリボタンパク質A - I V、アポリボタンパク質D、及びプレアルブミンから選択されるペプチドを含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチドを含み得る。

【0111】

R S P組成物中からの特定のペプチドの選択

本発明の一つの態様は、R S P組成物からペプチド又はペプチドのサブセットを同定す

50

ること及び単離することにおけるその使用である。もっとも、単一種類又はいくつかの特定のペプチドサンプルと比較したR S P組成物の一つの有利な特徴は、その不均一性であるが、混合物を構成するペプチドのサブセットが別のサブセットよりもより有効的であること、又はサブセットが実際望ましくないものであることが考えられる。従って、本発明は、ペプチドを特定の捕捉ポリペプチドに対するペプチドの親和性に基づくR S P組成物を含むサンプルから同定する及び/又は単離するための方法を提供する。特定の例では、サブセットは、一つ又は複数の様々なアミノ酸配列を有するペプチドを含み得る。他の例では、捕捉ポリペプチドは、結合特異性に基づいたR S P組成物の成分を分類するために用いられ得る。

【0112】

いくつかの実施形態では、捕捉ポリペプチドと結合するペプチドのサブセットを同定する方法は、プロトコールに従ってR S P組成物を調製すること、R S P組成物と所定の捕捉ポリペプチド(例えば、それはインビボにおいて標的又は担体として望ましい)とを接触させること、ペプチドとR S P組成物との結合を測定すること、結合しないペプチドから結合するペプチドを識別する特徴を同定すること、及び一つ又は複数の識別する特徴を反映する改良されたR S P組成物を調製することを含む。

【0113】

特定の実施形態では、R S P組成物を含むサンプルは、捕捉ポリペプチドと捕捉ポリペプチドと接触され、捕捉ポリペプチドが結合するR S P組成物を構成するペプチドは、単離され及び同定される。いくつかの実施形態では、R S P組成物は、Y F A K R S P組成物であり、特定の実施形態では、混合物は、P I - 2 3 0 1である。他の実施形態では、R S P組成物は、Y E A K R S P組成物であり、特定の実施形態では、混合物は、C o p 1である。特定の実施形態では、R S P組成物は、捕捉ポリペプチドとして作用する少なくとも一つの血清タンパク質と接触される。より特定の実施形態では、そのような血清タンパク質は、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質A - I、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アポリポタンパク質A - I V、アポリポタンパク質D、及びプレアルブミン捕捉ポリペプチドから選択される。

【0114】

捕捉ポリペプチドは、固体支持体に固定化され得、及び/又は当該技術分野において知られている方法により標識され得る。固定化及び標識化は、捕捉ポリペプチドから結合したペプチドを分離する、及び/又は単離されたペプチドの特徴を決定するさらなるステップに用いられ得る。そのような特徴は、結合したペプチドのアミノ酸配列、結合したペプチド中のアミノ酸の相対比率、配列中の荷電した残基の配置又は性質、ペプチドの構造、電荷、又は任意の他の好適な特徴を含み得る。

【0115】

R S P組成物と血清タンパク質との結合はまた、R S P組成物中の生物学的利用可能なペプチド、例えば、対象中のY F A K又はY E A Kペプチドを含む生物学的利用可能なペプチドを同定するために用いられ得る。本明細書では、R S P組成物は、第一に対象に投与され得;その後、投与後第二に、組織サンプルは患者から取り除かれ得る。組織サンプルでは、少なくとも一つの捕捉ポリペプチド、例えば、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質A - I、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アポリポタンパク質A - I V、アポリポタンパク質D、及びプレアルブミンから選択されるペプチドを含む、と結合するサンプル中のペプチドは同定され得る。

【0116】

R S P組成物の改良された調製

本発明の別の態様は、R S P組成物を含む組成物の製造プロセスを改良する方法である。いくつかの実施形態では、R S P組成物は、捕捉ポリペプチドと結合するペプチドのサブセットを同定する前述の方法に基づいて設計される。いくつかの実施形態では、R S P組成物は、アミノ酸組成物及び/又はアミノ酸配列が捕捉ポリペプチドと結合するペプチドのサブセットのそれと近くなるように、設計される。

10

20

30

40

50

【0117】

特定の実施形態では、減少した毒性を有するRSP組成物（例えば、YFAK又はYEAKペプチドを含む）を製造する方法は、RSP組成物と少なくとも一つの捕捉ポリペプチド（例えば、アルファ-1-抗トリプシン、アポリボタンパク質A-I、アルファ-1-B-糖タンパク質、アポリボタンパク質A-IV、アポリボタンパク質D、及びプレアルブミンから選択されるペプチドを含む）とを接触させること；混合物から捕捉ペプチドに結合するペプチドを分離すること；分離されたペプチドの特徴を決定すること；及び分離されたペプチドの特徴を用いてペプチドのセットを調製することを含み得る。

【0118】

同様に、増大した有効性を有するRSP組成物（例えば、YFAK又はYEAKペプチドを含む）を製造する方法は、RSP組成物と、ペプチドを含む少なくとも一つの捕捉ポリペプチド（例えば、アルファ-1-抗トリプシン、アポリボタンパク質A-I、アルファ-1-B-糖タンパク質、アポリボタンパク質A-IV、アポリボタンパク質D、及びプレアルブミンから選択される）を接触させること；及び混合物から捕捉ペプチドに結合するペプチドを分離すること；分離されたペプチドの特徴を決定すること；及び分離されたペプチドの特徴を用いてペプチドのセットを調製することを含み得る。

10

【0119】

いつかの実施形態では、RSP組成物の所望のサブセットは、予備的スケールにおいて固定化された捕捉ポリペプチドを用いることにより得られ得る。RSP組成物は、事前に熟考、及びは記述されたように調製され、所望の改良に関連する固定化された捕捉ポリペプチドと接触される。未結合のペプチドは、サンプルを洗浄することにより取り除かれ、RSP組成物の結合した部分は、適切な分離条件、例えば変化させたpH、塩濃度、又は有機溶媒の添加、を用いて溶出される。プールされた結合した部分は、濃縮するために、及び蒸発により、又は適切なクロマトグラフィー又は結晶化又は他の精製方法を経たさらなる精製により、治療的に望ましくない成分、例えば、有機溶媒を取り除くために処理される。そのようにして調製されたRSP組成物のサブセットは、治療薬剤として用いられる。

20

【0120】

さらに、本発明のこの態様は、用量及び投与における上述の改良と組み合わせられ得る。優れた適合したRSP組成物が調製された場合、投与の用量及び方法は、適宜調節され得ることが予期される。従って、代替の実施形態では、本発明は、プロトコールに従ってRSP組成物を調製すること、RSP組成物を含む組成物を製剤化すること、機能的読み出しのレベル又は程度を検出することにより前記組成物中のRSP組成物の生物学的利用可能な量を決定すること、標準とそのような読み出しを比較すること、所望の生物学的利用性を得るためにプロトコール又は組成物の製剤化を調節することを含む。

30

【0121】

治療薬剤の組織特異的標的化

RSP組成物と血清タンパク質の関係性の別の可能性のある使用は、治療薬剤の組織特異的標的化である。一つの実施形態では、対象の標的組織に対する治療薬剤を調製するための方法は、RSP組成物（例えば、YFAK又はYEAKペプチドを含む）を提供すること；及び治療薬剤とRSP組成物とを結合させ、複合体を形成することを含み得る。

40

【0122】

従って、本発明のいくつかの実施形態は、RSP組成物（例えば、YFAK又はYEAKペプチドを含む）と組織特異的ペプチド（例えば、アルファ-1-抗トリプシン、アポリボタンパク質A-I、アルファ-1-B-糖タンパク質、アポリボタンパク質A-IV、アポリボタンパク質D、及びプレアルブミンから選択されるペプチドを含む）とを接触させること；及び混合物から組織特異的ペプチドに結合するペプチドを分離すること；ペプチドタグと治療薬剤とを結合させること；及び(c)対象に複合体を投与することにより、ペプチドタグを単離することにより、対象において特定の組織に治療薬剤を送達する方法である。

50

【 0 1 2 3 】

本発明の他の実施形態は、ペプチドタグと結合した治療薬剤を含む複合体、及び得られた複合体それら自体を調製する方法を含む。本明細書で熟考されるペプチドタグは、例えば、Y E A K又はY F A Kペプチドでもよい。そのようなペプチドは、アルファ - 1 - 抗トリプシン、アポリポタンパク質 A - I、アルファ - 1 - B - 糖タンパク質、アポリポタンパク質 A - I V、アポリポタンパク質 D、及びプレアルブミンに対する結合親和性に基づいて R S P 組成物から単離され得る。

【 0 1 2 4 】

治療薬剤は、小有機分子又は生体高分子でもよく、特異的な組織は、脳、肺又は肝臓組織でもよい。ペプチドタグは、Y E A K又はY F A Kペプチドを含んでもよい。ペプチドタグは、共有結合、包接錯体、イオン結合、又は水素結合により治療薬剤と結合し得る。この発明の実施に有用な治療薬剤の例は、代謝拮抗物質、サイトカイン、及び増殖因子阻害剤、キナーゼ阻害剤、血管新生阻害剤、抗炎症剤、疾患特異的抗体、ワクチン、及び抗生物質を含む抗腫瘍剤である。

10

【 0 1 2 5 】

標準的な免疫学、生化学、及び / 又は分子生物学的方法は、本明細書で用いられ得、当該技術分野において知られている。標準的なプロトコルの例は、例えば、J o h n W i l e y 及び S o n s により公開されている C u r r e n t P r o t o c o l s シリーズに見ることができ、現在入手可能な全ては更新され、分子生物学、免疫学、細胞生物学、タンパク質化学、薬理学等における C u r r e n t P r o t o c o l s を含む。本明細書で引用される全ての参考文献、及び特許、及び特許出願は、それらの全体において参照により援用される。

20

【 実施例 】

【 0 1 2 6 】

実施例 1

正常ヒト血清中の P I - 2 3 0 1 及び C o p - 1 の検出

R S P 組成物である P I - 2 3 0 1 (Y F A K) 又は C o p - 1 (Y E A K) は、5 0 0 n g / m L の濃度にされ、P B S 中 5 % 正常ヒト血清に、1 0 0 n g / m L、5 0 n g / m L、2 5 n g / m L、又は 1 2 . 5 n g / m L の濃度まで希釈され、正常ヒト血清に添加された。R S P 組成物と正常ヒト血清に含まれる血清タンパク質との結合は、ウサギ抗 Y F A K 又はウサギ抗 Y E A K 抗体の添加により検出された。

30

【 0 1 2 7 】

未コート of E L I S A プレートは、P B S / 0 . 1 % T w e e n 2 0 で、室温で 2 時間ブロックされた。P I - 2 3 0 1 又は C o p - 1 サンプルは、P B S / 5 % 正常ヒト血清で段階的に希釈され、ブロック及び洗浄された E L I S A プレートのウェルに添加された。正常ヒト血清中の P I - 2 3 0 1 又は C o p - 1 サンプルはプレートに結合され、未結合の P I - 2 3 0 1 又は C o p - 1 は、P B S / 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 でプレートを洗浄することにより取り除かれた。力価に基づいて好適な濃度に希釈されたタンパク質 A - 精製された抗ウサギ抗 P I - 2 3 0 1、又は抗ウサギ抗 C o p - 1 は、室温で 1 時間添加された。未結合のウサギ抗 2 3 0 1、又はウサギ抗 C o p - 1 抗体を取り除くための別の洗浄ステップ後、二次抗体であるヤギ抗ウサギ I g G - H R P (ウサギ I g G に対するセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗体) はウェルに添加される。任意の未結合の二次抗体を洗い流した後、H R P の基質は、ウェルに添加され、1 5 分間インキュベートされ、それはストップ溶液が添加されると黄色に変化する青色を生じ、その色の強度はウェル中の全 P I - 2 3 0 1 又は C o p - 1 の量と相関する。光学濃度は、E L I S A プレートリーダーを用いて 4 5 0 n m で測定され、力価曲線は、それぞれ P I - 2 3 0 1 及び C o p - 1 が添加された血清サンプルのそれぞれのセットについて生成された。血清 P I - 2 3 0 1 又は血清 C o p - 1 検出の限界は、バックグラウンドよりも 3 倍高い A 4 5 0 n m 吸収をもたらす濃度として画定される。バックグラウンドを決定するために用いられた E L I S A プレートウェルは、R S P 組成物からのペプチドが除かれたことを除いて、上述

40

50

のように処理される。

【0128】

結果は図2にプロットされる。X軸上で、RSP組成物の濃度が示される。Y軸上で、HRP結合二次抗体のA450比色吸収が示される。RSP組成物の高い濃度において、抗PI-2301又は抗Cop-1抗体による複合体の検出は、低い濃度のRSP組成物よりも高かった。12.5 ng/mLは、ヒト患者における約2 mgの用量に相当する。

【0129】

実施例2

カラム上での複合体の捕捉

固定化されたRSP組成物は、ペプチドとCNBr-activated Sepharose (登録商標)である、臭化シアン法を用いて1級アミンを含むリガンド(タンパク質、ペプチド、核酸)を固定化するために用いられる事前に活性化された大孔性クロマトグラフィーメディアとを反応させることにより調製された。手短に言えば、所望の量を検量後、凍結乾燥されたCNBr-Sepharose (登録商標)は、冷却された1 mM HCl (約200 mL 1 mM HCl/グラム乾燥セファローズを使用)で、10 X 15分、その後、結合バッファーで2 X 洗浄された。リガンドは、所望の濃度まで結合バッファーに溶解され、1:2の比(2容量の洗浄されたCNBr-Sepharose (登録商標)ゲルに対して1容量のリガンドを使用)でCNBr-Sepharose (登録商標)と合わされ、その後、ロッキングプラットフォーム(rocking platform)上で、4 で一晩インキュベートされた。ゲル上の任意の残っている活性部位は、ブロックされ、その後、任意の過剰のリガンドを取り除くために洗浄された。リガンド特異的タンパク質を精製するために、結合したゲルは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2 X 洗浄され、所望の試薬(血清、細胞上清)は、1:2の比(2容量の洗浄されたCNBr-Sepharose (登録商標)ゲルに対して1容量の試薬を使用)で添加され、その後、ロッキングプラットフォーム(rocking platform)上で、4 で一晩インキュベートされた。ゲル/試薬懸濁液は、使い捨てカラムに充填され、未結合の試薬を取り除くために洗浄され、その後、リガンド特異的タンパク質は低pHバッファーで溶出された。pH中和後、溶出した画分の280 nmでの吸収は、リガンドを含む画分を同定するために測定される。カラムは洗浄され、繰り返しの使用のために4 で保管された。

【0130】

実施例3

PI-2301又はCop-1に結合したタンパク質の同定

PI-2301結合タンパク質、又はCop-1結合タンパク質を含むサンプルは、実施例1又は実施例2の方法により得られた。これらのサンプルは、PI-2301又はCop-1に結合するタンパク質を同定する目的のために、酵素的に消化され、液体クロマトグラフィータンデム質量分析計(LC-MS/MS)により分析された。手短に言えば、それぞれのサンプルの一定量は、配列特異的プロテアーゼであるトリプシンで消化された。消化後、タンパク質ペプチド混合物は、LC-MS/MSにより分析された。ペプチドは、放出相カラムに対するそれらの保持時間に基づいて分離され、その後質量分析計にスプレーされた。ペプチドが+2又は+3の電荷を受け取るスプレープロセスの間、質量分析計は質量電荷比を観察する。ペプチドが有意な質量電荷比を有する場合、それは従って、気体との衝突によりフラグメント化され、フラグメントパターンは記録される。これらのフラグメントパターンは、その後、全ての既知のタンパク質の理論的なフラグメントパターンと比較され得る。理論的フラグメントパターンへの実験的フラグメントパターンのこの成形は、HDL及びLDL複合体からいくつかのリポタンパク質の同定をもたらした。これらのリポタンパク質は、PI-2301サンプル及びCop-1サンプルの双方において見られた。Cop-1サンプルはまた、補体タンパク質、例えば、C3及びC4Aを含むいくつかの独特のタンパク質を有した。

【0131】

10

20

30

40

50

図3は、P I - 2 3 0 1又はC o p - 1と結合することにより同定された正常マウス血清又は正常ヒト血清中の血清タンパク質を要約する。P I - 2 3 0 1は、アセチル化又は非アセチル化され得る。サンプルタンパク質は、実施例1のものと同様の方法において得られ、ここでR S P組成物のペプチドが混合され、血清中の成分と結合された。P I - 2 3 0 1又はC o p - 1の結合複合体は、抗Y F A K又は抗Y E A K抗体により認識され、二次抗体及び検出試薬で検出された。血清タンパク質は、複合体から溶出され、同定された。タンパク質は、検出試薬のA 4 5 0吸収に基づいたスコアを割り当てられる。70のスコアは、バックグラウンド吸収と比較して、 $p < 0.001$ の有意な値に対応し、統計学的に有意であると考えられる。

【0132】

10

実施例4

R S P組成物の様々な長さ及びロットに亘るペプチド組成物の比較

例えば、固相合成又は液相合成による、様々な長さのR S P組成物の合成に続いて、同様の製造プロセスにより作られた個別のロット又はバッチ、及び様々なプロセスにより製造された混合物の個別のバッチは、試験され、バイオアッセイ、例えば、単球細胞株R A W 2 6 4 . 7による、エクスピボ増殖アッセイによる、及び血清タンパク質とR S P組成物中のペプチドとの結合を測定することによるC C L 2 2の放出、を用いたバリエーションと比較され、ペプチドのサブセット又は任意の所定のプロセス若しくはロットにおいて存在する個別のペプチドを決定することが可能である。R S P組成物のプロセス及びロットは、ペプチドの同様のサブセット及び/又はペプチドの種類が様々なプロセス及びロットに亘って一貫して繰り返されているかどうかを決定するために比較される。

20

【0133】

多数の同定するレジンは、固体支持体上に血清タンパク質の選択物を固定化することにより調製される。C o p - 1又はP I - 2 3 0 1の分析のために、血清タンパク質は、C o p - 1又はP I - 2 3 0 1のそれぞれと結合するとして実施例1(図3を参照のこと)において同定された一つ又は複数のこれらのタンパク質でもよい。C o p - 1又はP I - 2 3 0 1と結合するとしてさらに同定された他のタンパク質は、必要に応じて用いられ得る。それぞれの固体支持体は、少なくとも一つの血清タンパク質を含み、一以上の血清タンパク質が固体支持体に結合した場合、従って、所定の固体支持体と結合した個別の血清タンパク質の割合は、それぞれの同定するレジンに亘って一致する。C o p - 1又はP I - 2 3 0 1のそれぞれのロットからの一定量は、C o p - 1ペプチド又はP I - 2 3 0 1のサブセットと血清タンパク質とを結合させる条件下で、その自らの固体支持体に適用される。未結合ペプチドを洗い流した後、結合ペプチドは溶出される。この方法で単離されたC o p - 1ペプチドは、(1)独特なC o p - 1ペプチドの存在、(2)互いに対するペプチドの割合、(3)全R S P組成物と比較した血清結合タンパク質と結合するペプチドの割合、(4)結合モチーフ及びペプチド配列の存在、(5)アミノ酸組成、及びアミノ酸の割合、及び/又はペプチドの他の特徴について、さらに特徴付けられる。それぞれのロットから単離されたC o p - 1ペプチドの特徴は、互いに比較される。

30

【 図 1 】

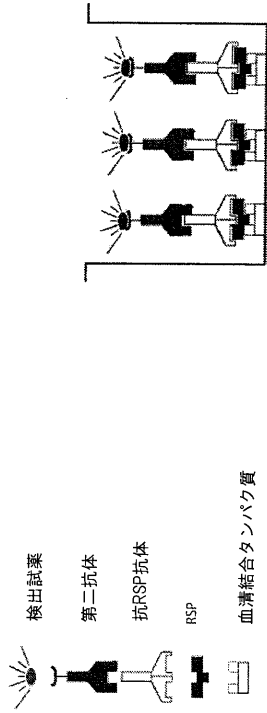


FIGURE 1

【 図 2 】

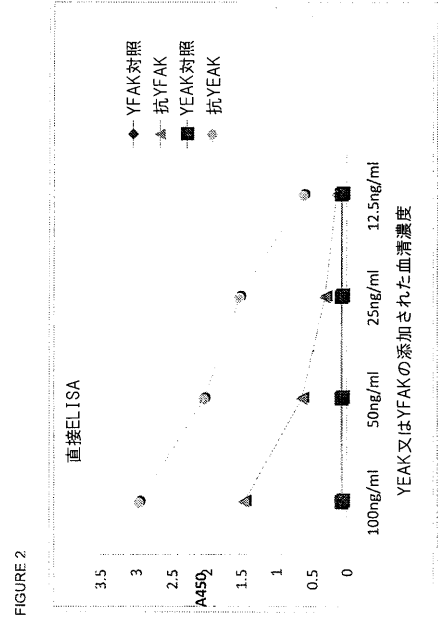


FIGURE 2

【 図 3 - 1 】

正常マウス血清を含むPI-2301 ロット U0517		タンパク質スコア (3つの重要なIDの平均)
アポリポタンパク質A-I	登録番号	118
ビトロネクチン	CAA40568	101
ルミカン	AAB8581	73
正常マウス血清を含むCopaxone		タンパク質スコア (3つの重要なIDの平均)
アポリポタンパク質A-I	登録番号	125
インタリン	GF2L4	109
補体成分C3	GF1702	87
インタリン	NP_058680	99
ビトロネクチン	GF1703	89
	AAA40558	87
正常ヒト血清を含むCopaxone		タンパク質スコア (3つの重要なIDの平均)
補体成分C3	登録番号	397
アポリポタンパク質A-I	AAA85332	279
アポリポタンパク質A-II	AAA51747	208
補体成分C4A	NP_001834 (AAB32200)	193
トリプシン阻害剤	AAA51855	183
インタリン	CAA30160	175
アルブミン	AAA07602	160
アルブミン	OMHU1B	156
アポリポタンパク質A-I	AAA51546	147
	AAA51744	

FIGURE 3

【 図 3 - 2 】

正常ヒト血清を含むCopaxone		タンパク質スコア (3つの重要なIDの平均)
セルロブラミン	登録番号	142
無名のタンパク質生成物(BLAST search IDでは、IgM重鎖)	AAA51975	134
アポリポタンパク質E	CAA34971	129
アポリポタンパク質E	AAB95818	127
アポリポタンパク質E	AAA16820	120
アポリポタンパク質E	BPAA0059	105
アポリポタンパク質E	2RCJ_C	104
アポリポタンパク質E	CAA40939	103
アポリポタンパク質E	3F68_H	97
アポリポタンパク質E	A23746	97
アポリポタンパク質E	763134A	92
アポリポタンパク質E	AAA51765	91
アポリポタンパク質E	NP_000403	82
アポリポタンパク質E	P02765	78
アポリポタンパク質E	NP_000168	74
アポリポタンパク質E	GF11271A	72
アポリポタンパク質E	CAA28659	67
アポリポタンパク質E	AAA58902	67
正常ヒト血清を含むPI-2301 ロット U0517		タンパク質スコア (3つの重要なIDの平均)
アポリポタンパク質A-I	登録番号	495
アポリポタンパク質A-I	AAA51747	179
アポリポタンパク質A-I	BAA00059	103
アポリポタンパク質A-I	AAA51744	102
アポリポタンパク質A-I	AAA51546	84
アポリポタンパク質A-I	NP_001834 (AAB32200)	86
アポリポタンパク質A-I	AAB5372	85
アポリポタンパク質A-I	OMHU1B	

FIGURE 3 (continued)

アポリポタンパク質A-II (アポリポタンパク質D) プレロタンパク質(アポリポタンパク質D)

【 図 3 - 3 】

アポリポタンパク質A-II プレプロタンパク質(アポリポタンパク質D)

FIGURE 3 (continued)

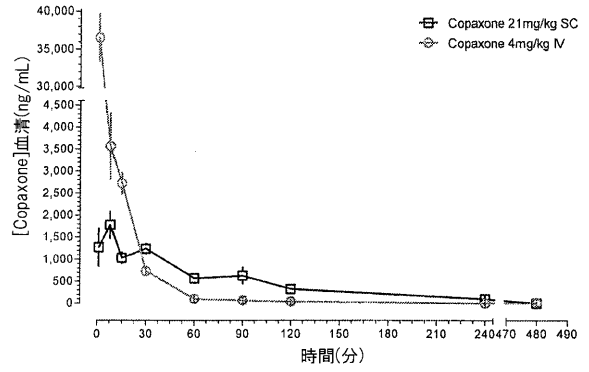
正常ヒト血清でアセチル化されたインハンハウスPI-2301		タンパク質スコア (3つの重要なIDの平均)
タンパク質同定	NOBIローカス/ 登録番号	
アポリポタンパク質A-I	AA451747	615
アポリポタンパク質A-II	BA400939	170
アポリポタンパク質A-III	NP_001064 (AA52200)	123
アポリポタンパク質A-IV	AA451546	128
アポリポタンパク質A-V	AA451744	143
アポリポタンパク質A-VI	BA400946	100
アポリポタンパク質A-VII	NP_001064 (AA52200)	88
アポリポタンパク質A-VIII	GM4118	79
アポリポタンパク質A-IX	AA451785	72

正常ヒト血清でアセチル化されていないインハンハウスPI-2301		タンパク質スコア (3つの重要なIDの平均)
タンパク質同定	NOBIローカス/ 登録番号	
アポリポタンパク質A-I	AA451747	471
アポリポタンパク質A-II	AA451546	209
アポリポタンパク質A-III	BA400946	159
アポリポタンパク質A-IV	AA451744	177
アポリポタンパク質A-V	NP_001064 (AA52200)	116
アポリポタンパク質A-VI	GM4118	122
アポリポタンパク質A-VII	BA400939	84
アポリポタンパク質A-VIII	AA451785	86

アポリポタンパク質A-II プレプロタンパク質(アポリポタンパク質D)

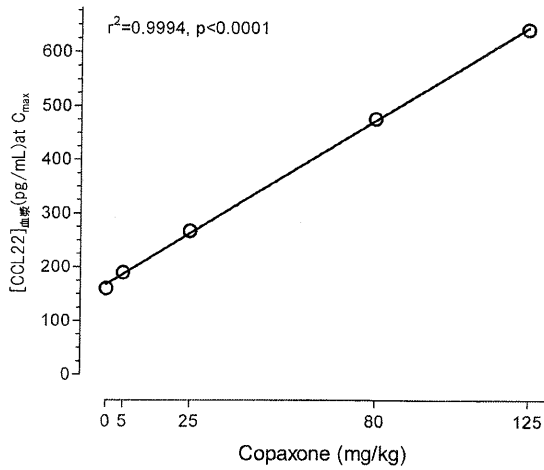
【 図 4 】

FIGURE 4. マウスにおけるYEAK生物学的利用性



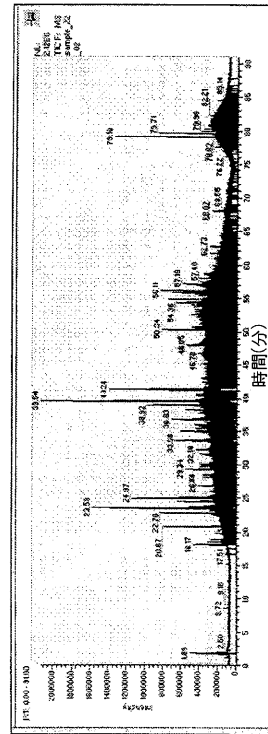
【 図 5 】

FIGURE 5. 最大CCL22血漿濃度とマウスにSC投与された Copaxone(登録商標)の用量の線形相関



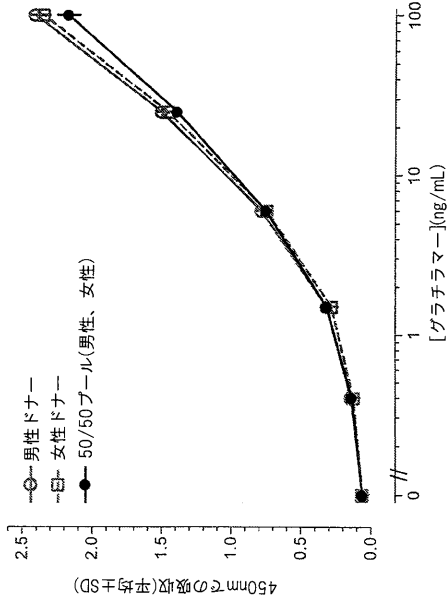
【 図 6 】

FIGURE 6. CNBr-SepHカラム上に固定化されたYEAKフラグメントから抽出された血清タンパク質からLC-MSにより観察された代表的なペプチドパターン



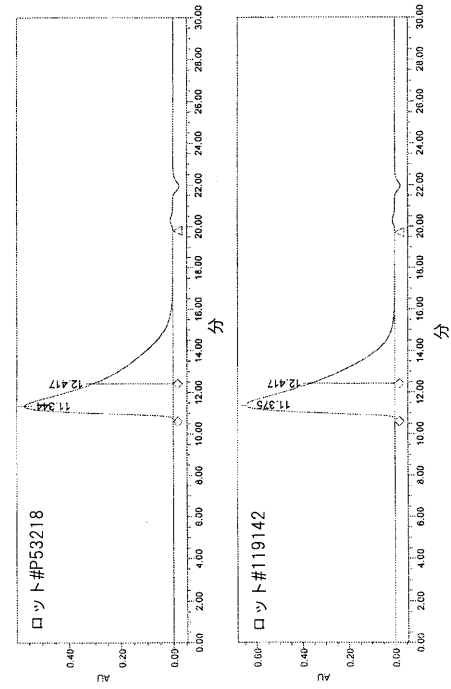
【 図 7 】

FIGURE 7. 新規のELISAアッセイを用いた標準曲線、及び酢酸グラチラマールの男性、女性、又は男性/女性のプールのプールの正常なヒト血清への添加



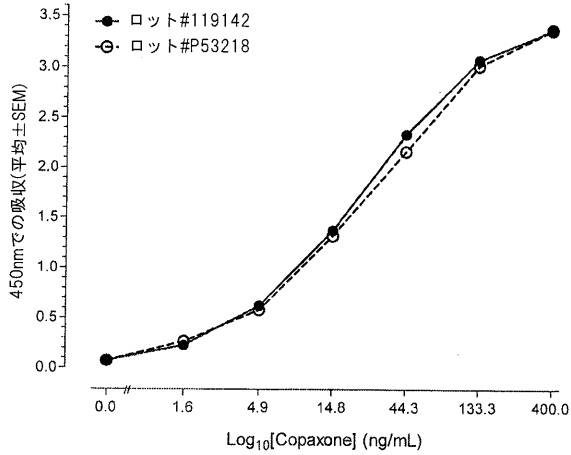
【 図 8 】

FIGURE 8. Copaxone(登録商標)ロット#P53218及び#119142のSE-HPLCプロファイル



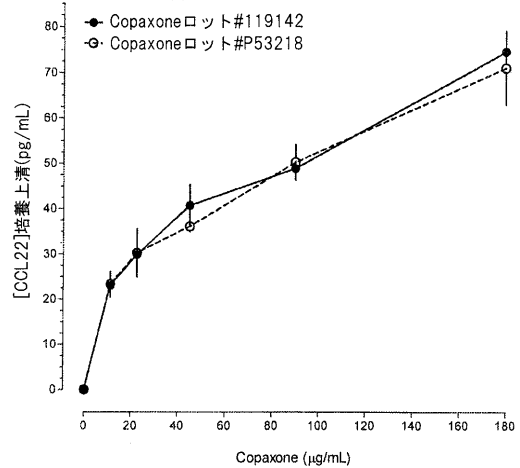
【 図 9 】

FIGURE 9. 新規のELISAアッセイを用いた標準曲線、及びCopaxone(登録商標)ロット#P53218と#119142との比較



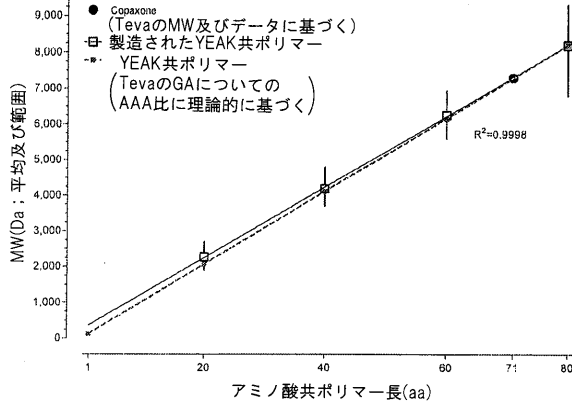
【 図 10 】

FIGURE 10. Copaxone(登録商標)ロット#P53218及び#119142で培養された単球の培養培地におけるCCL22放出

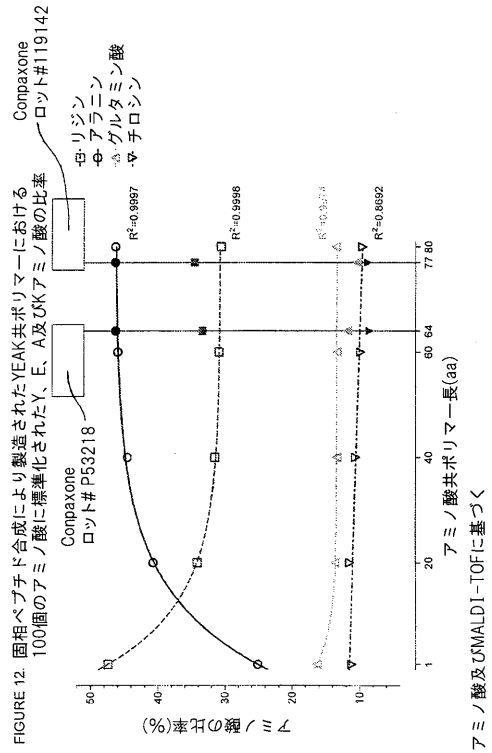


【 図 1 1 】

FIGURE 11. 固相ペプチド合成により製造されたYEAK共ポリマーのアミノ酸長と平均分子量との直線性

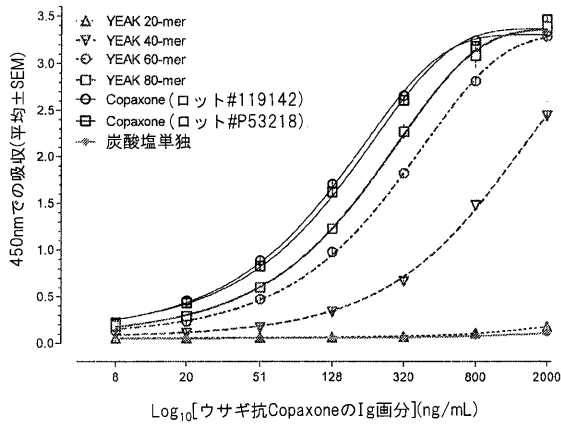


【 図 1 2 】



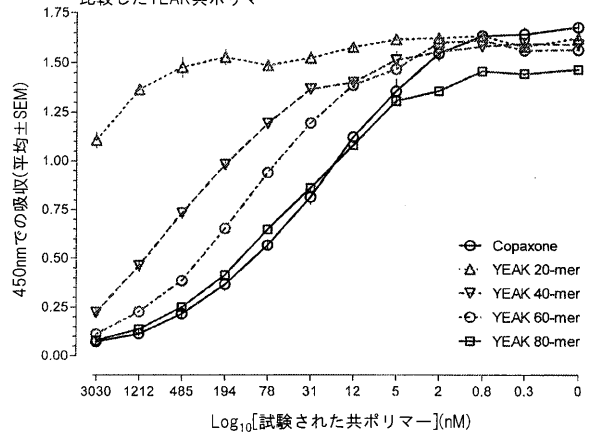
【 図 1 3 】

FIGURE 13. 固相ペプチド合成により製造されたYEAKアミノ酸共ポリマーに対する抗GAウサギ血清の免疫グロブリン画分の反応性



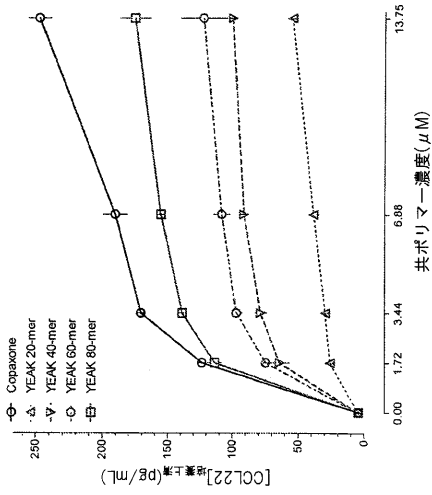
【 図 1 4 】

FIGURE 14. 先のPK法を用いた標準曲線及び先のPKCopaxone(登録商標)と比較したYEAK共ポリマー



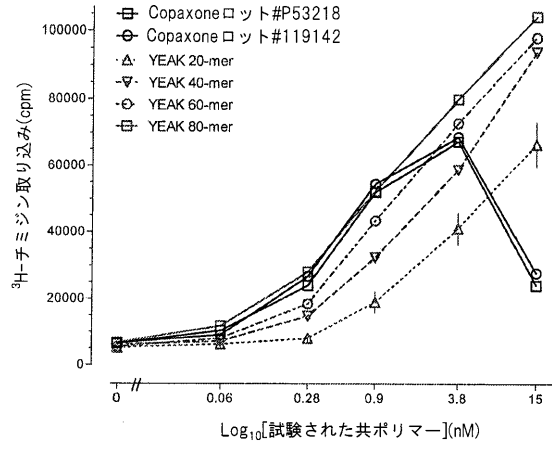
【 図 1 5 】

FIGURE 15. 単球細胞株RAW264.7によるCCL22放出に対するYEAH共ポリマーの効果



【 図 1 6 】

FIGURE 16. マウス脾臓細胞記憶応答に対するYEAH共ポリマーの効果



【 配 列 表 】

2013511725000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2010/057108
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl.		
G01N 33/53 (2006.01) C07K 4/00 (2006.01)		
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)		
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 practicable, search terms used) EPODOC, WPI (IPC: A61K, A61F, C07K, C12Q, G01N 33/50/low), CA, Medline, BIOSIS: keywords: randomd sequence polymer, random sequence peptide, YEAK, YFAK, copaxone, COP1, copolymer1, glatiramer, blood, serum, bind, capture, ligand assay, detect, isolate, purify, antitrypsin, alpha 1 beta glycoprotein, apolipoprotein, HS glycoprotein, ceruloplasmin, antibody, complement component, trypsin inhibitor, lumican, preambulin, vitronectin and similar terms		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/0275496 A1 (BALDWIN et al) 5 November 2009 abstract, paragraphs [0027], [0052], [0056] to [0085], [0095] to [0108]	1, 3, 5-30, 34-36
X	US 2002/0182210 A1 (RODRIGUEZ et al) 5 December 2002 abstract, pages 8 to 10	1, 3, 5-14, 18-29
A	WO 2005/074579 A2 (MIXTURE SCIENCES, INC) 18 August 2005 whole of document	1, 3, 5-36
A	WO 2008/157697 A2 (MOMENTA PHARMACEUTICALS, INC) 24 December 2008 whole of document	1, 3, 5-36
<input 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 March 2011		Date of mailing of the international search report 09 MAR 2011
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer: GARETH COOK AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No.: +61 3 9935 9629

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/057108

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 Supplemental Box

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 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, 3, 7 and 9 to 36 (completely) and 5, 6, and 8 (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/US2010/057108

Supplemental Box

(To be used when the space in any of Boxes I to IV is not sufficient)

Continuation of Box No: III

This International Searching Authority has found that there are different inventions as follows:

- Claims 1, 3, 7 and 9 to 36 (completely) and claims 5, 6 and 8 (partially) are directed to the use of blood sera proteins as capture molecules for random sequence polypeptides (RSPs) in assays. It is considered that the use of blood sera proteins as capture molecules for RSPs in assays involves a first distinguishing feature. (Note: while claims 1 and 3 do not make reference to the blood sera proteins, the claim 1 is not novel and claim 3 not inventive over the prior art, so have been included as part of this invention.)
- Claims 2 and 4 (completely) and claims 5, 6 and 8 (partially) are directed to a method for improving the design of a RSP composition or species with the steps as set out in claims 2 and 4. It is considered that the method for improving the design of a RSP composition or species comprises a second distinguishing feature.
- Claim 37 to 44 (completely) are directed to methods of delivering a therapeutic agent to a target tissue involving coupling the therapeutic agent to a RSP derived from a RSP composition. It is considered that tissue targeted delivery of a therapeutic agent through coupling the therapeutic agent to a RSP derived from a RSP composition comprises a fourth distinguishing feature.

The only feature common to all of the inventions is the DSP composition. However this concept is not novel in the light of:

US 2009/0275496 A1 (BALDWIN et al) 5 November 2009

This means that the common feature can not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, since it makes no contribution over the prior art.

The first two inventions also have the common feature of assays involving the use of capture polypeptides to bind to polypeptides within a RSP composition. However such assays are also disclosed in the above document.

While claims 1 and 3 involve the use of any capture ligand, rather than being limited to the capture ligand being a blood serum protein, the search and examination has been limited to the capture ligand being a blood serum protein.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/057108

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
US	2009275496	AU	2005244814	AU	2005251686	AU	2006315284
		AU	2006333437	BR	PI0510738	CA	2565703
		CA	2565819	CA	2630323	CA	2630364
		CN	101052409	EP	1750741	EP	1750742
		EP	1962880	EP	1962881	KR	20070036062
		MX	PA06012864	NO	20065653	NZ	551236
		US	2006189527	US	7655221	US	2006194725
		US	2010316714	WO	2005112972	WO	2005120542
		WO	2007059342	WO	2007078443	WO	2009075854
US	2002182210	AU	72956/01	CA	2413324	EP	1301206
		HU	0301235	PL	365458	US	6800285
		US	2005019322	WO	0197846	WO	02076503
		ZA	200210240				
WO	2005074579	AU	2005211424	CA	2556152	EP	1725099
		US	2009214580				
WO	2008157697	AU	2008265692	CA	2690402	CN	101743470
		EP	2174130				

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
C 0 7 K 1/22 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
	C 0 7 K 1/22	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100166165

弁理士 津田 英直

(72)発明者 エリック ザネリ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 1 7 7 6, サドベリー, ウッドサイド ロード 1 6 0

(72)発明者 ジェフ クリーガー

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 4 6 0, ニュートンビル, ネバダ ストリート 1 5 2

(72)発明者 ジョー コノリー

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 4 4, メドフォード, ガーフィールド アベニュー 1 7

(72)発明者 キャスリン エイチ・コリンズ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 3 6 0, プリマス, ウェスト ポンド ロード 3 8

Fターム(参考) 4C084 AA02 BA03 NA14 ZA962 ZB072 ZB152

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 EA20 EA50 GA26

专利名称(译)	通过检测基于血清蛋白的随机序列聚合物组合物来改善随机序列聚合物组合物的设计，生物利用度和功效的方法		
公开(公告)号	JP2013511725A	公开(公告)日	2013-04-04
申请号	JP2012540020	申请日	2010-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	阿雷斯贸易股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	战神贸易兴业ANONYME		
[标]发明人	エリックザネリ ジェフクリーガー ジョーコノリー キャスリンエイチコリンズ		
发明人	エリック ザネリ ジェフ クリーガー ジョー コノリー キャスリン エイチ.コリンズ		
IPC分类号	G01N33/566 G01N33/531 G01N33/543 A61K38/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/00 C07K1/22		
CPC分类号	A61P3/10 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/16 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/06 C07K1/00 C07K1/22 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/566.ZNA G01N33/531.A G01N33/543.541.Z G01N33/543.501.D A61K37/02 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P37/00 C07K1/22		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/BA03 4C084/NA14 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB152 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/GA26		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎		
优先权	61/281470 2009-11-17 US 61/386909 2010-09-27 US		
其他公开文献	JP2013511725A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本领域存在检测简单肽的方法。然而，测量定向序列聚合物 (DSP) 的有效血浆浓度的方法是复杂的，因为DSP是肽的复杂混合物，而不是具有确定的氨基酸序列的单个肽。一。本申请涉及检测和评估DSP组合物的改进方法，用于检测和定量DSP组合物的方法，基于与特定捕获肽组的相互作用的DSP组合物中肽的子集。，以及将DSP组合物给予有需要的受试者的方法，其中给药方案和量基于上述用于检测和定量的方法。哪个可以确定或评估。

アミノ酸組成	モル分率範囲 (アウトプット)	特定の実施形態比	参考文献及び備考
チロシン アラニン 及びリジン ("YAK")	Y: 約0.005~約0.250 A: 約0.3~約0.6 K: 約0.1~約0.5	Y: 約0.10 A: 約0.54 K: 約0.35	Fridkis-Hareli M., Hum Immunol. 2000; 61 (7) : 640-50.
チロシン グルタミン酸 及びリジン ("YEK")	Y: 約0.005~約0.250 E: 約0.005~約0.300 K: 約0.3~約0.7	Y: 約0.26 E: 約0.16 K: 約0.58	バリエーション Y->W; E->D; 及び/又は K->R.
リジン, グルタミン酸 及びアラニン ("KEA")	K: 約0.2~約0.7 E: 約0.005~約0.300 A: 約0.005~約0.600	K: 約0.36 E: 約0.15 A: 約0.48	
チロシン, グルタミン酸, 及びアラニン ("YEA")	Y: 約0.005~約0.250 E: 約0.005~約0.300 A: 約0.005~約0.800	Y: 約0.21 E: 約0.14 A: 約0.65	バリエーション Y->W; E->D; 及び/又は A->G.
参照のため チロシン グルタミン酸 アラニン, リジン ("YEA: Cop-1")		Y: 約0.10 E: 約0.14 A: 約0.43 K: 約0.34	