

(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2014-506883

(P2014-506883A)

(43) 公表日 平成26年3月20日(2014.3.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/54 (2006.01)	C07K 7/54	2G045
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00 ZNA	4H045
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	
C07K 1/10 (2006.01)	C07K 1/10	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-552699 (P2013-552699)	(71) 出願人	513315422
(86) (22) 出願日	平成24年2月3日 (2012.2.3)		インディ モレキュラー, インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成25年10月1日 (2013.10.1)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/023873		アメリカ合衆国 90230 カリフォル
(87) 国際公開番号	W02012/106671		ニア州, カルバーシティ, プリストル パ
(87) 国際公開日	平成24年8月9日 (2012.8.9)		ークウェイ 6162
(31) 優先権主張番号	61/439, 362	(74) 代理人	100107766
(32) 優先日	平成23年2月3日 (2011.2.3)		弁理士 伊東 忠重
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100070150
			弁理士 伊東 忠彦
		(74) 代理人	100091214
			弁理士 大貫 進介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P S A 捕捉剤、組成物、方法及びその製造

(57) 【要約】

新規な合成前立腺特異的抗原 (P S A) - ターゲット捕捉剤が開示され、これは P S A に特異的に結合する。ある実施態様では、これらの捕捉剤は、バイリガンド又はトリリガンド捕捉剤であり、それぞれ 2 又は 3 のターゲット結合部分を持つ。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

マルチリガンド前立腺特異的抗原 (P S A) ターゲット捕捉剤を含む合成検出剤であり、前記捕捉剤が血清中で特異的に P S A に結合する検出剤。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の検出剤であり、前記捕捉剤が、タンパク質分解に抵抗性の環状トリリガンドであり、前記環状トリリガンドが、アンカーリガンド、第 2 リガンド及び第 3 リガンドを含む、検出剤。

【請求項 3】

請求項 1 の検出剤であり、前記捕捉剤が、凍結乾燥粉末として保存に安定である、検出剤。 10

【請求項 4】

請求項 1 に記載の検出剤であり、前記捕捉剤が、約 - 8 0 から 4 0 の温度で保存に安定である、検出剤。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の検出剤であり、前記捕捉剤が、室温で保存に安定である、検出剤。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の検出剤であり、前記捕捉剤が、ヒト血清中で少なくとも 2 4 時間安定である、検出剤。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の検出剤であり、前記捕捉剤が、p H が 3 . 0 から 8 . 0 の範囲で安定である、検出剤。 20

【請求項 8】

請求項 1 に記載の検出剤であり、前記捕捉剤が、銅 - D O T A でラベル化されている、検出剤。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の検出剤であり、前記捕捉剤が、ビオチンでラベル化されている、検出剤。

【請求項 1 0】

請求項 1 に記載の検出剤であり、前記捕捉剤が、タンパク質の非正規のエピトープへ結合する、検出剤。 30

【請求項 1 1】

請求項 1 に記載の検出剤であり、前記捕捉剤が、免疫療法剤である、検出剤。

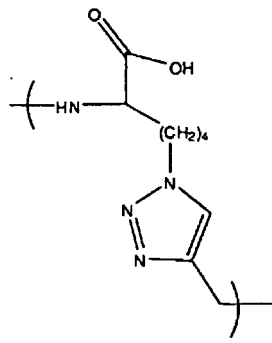
【請求項 1 2】

請求項 1 に記載の検出剤であり、前記捕捉剤が、診断剤である、検出剤。

【請求項 1 3】

請求項 1 に記載の検出剤であり、前記アンカーリガンド、第 2 リガンド及び第 3 リガンドの 1 つ又は複数の間の結合が、以下の、1、5 - 置換 - 1、2、3 - トリアゾール残基 (T z 5) 又は 1、4 - 置換 - 1、2、3 - トリアゾール残基 (T z 4) を含む、検出剤。 40

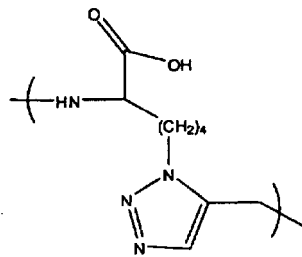
【化 7】



10

T z 4

【化 8】



20

T z 5

【請求項 1 4】

請求項 2 に記載の検出剤であり、前記アンカーリガンドが、環状 L - ペプチドであり、前記第 2 リガンドが D - ペプチドであり、及び前記第 3 のリガンドが D - ペプチドである、検出剤。

30

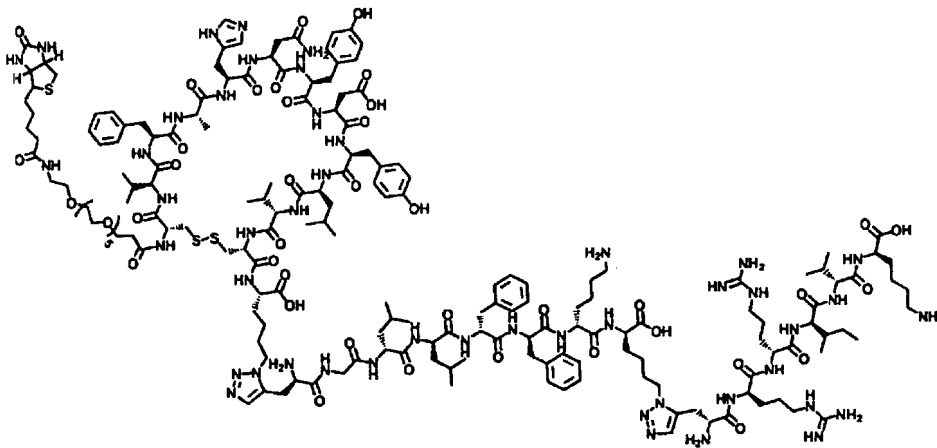
【請求項 1 5】

請求項 2 に記載の検出剤であり、前記アンカーリガンドと前記第 2 リガンドとの結合、及び前記第 2 リガンドと前記第 3 リガンドとの結合が、T z 5 である、検出剤。

【請求項 1 6】

請求項 2 に記載の検出剤であり、以下の、T z 4 - トリリガンド及び T z 5 - トリリガンドからなる群から選択される構造を含む、検出剤。

【化 9】

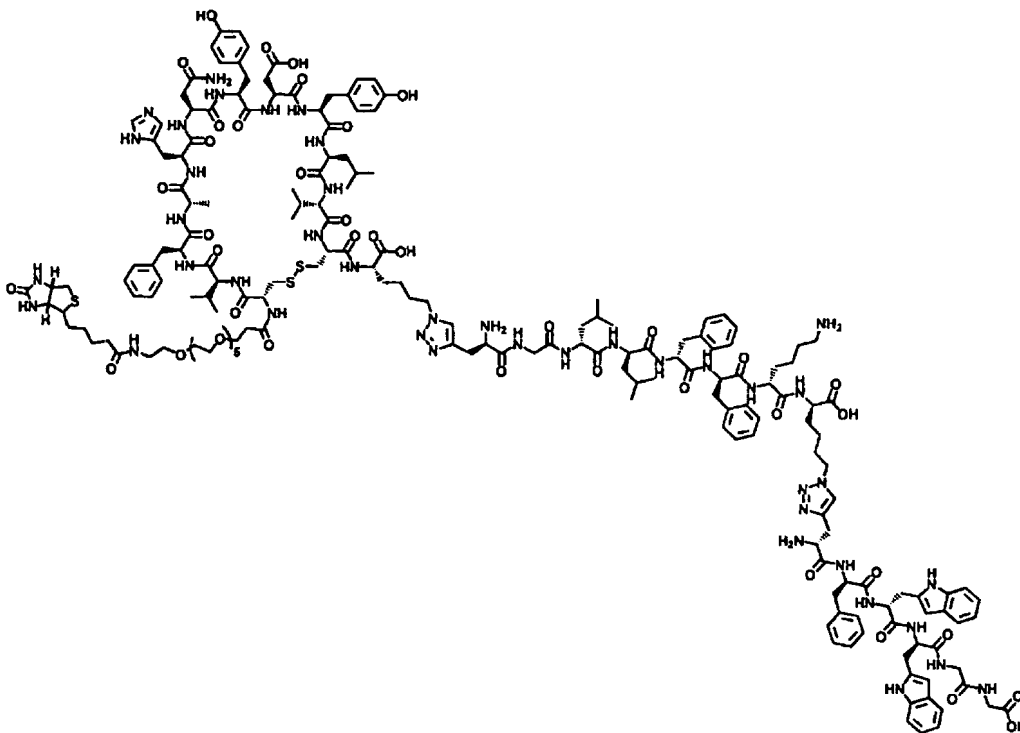


10

T z 5 - トリリガンド

【化 10】

20



30

40

T z 4 - トリリガンド

【請求項 17】

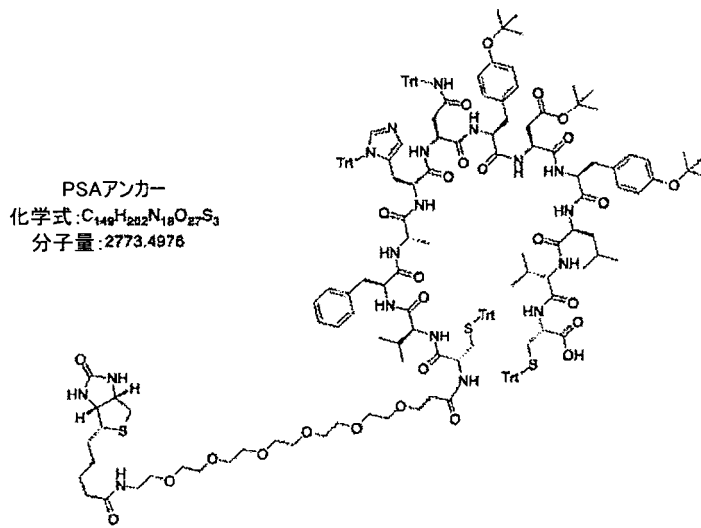
請求項 16 に記載の前記 T z 5 - トリリガンドの製造方法であり、前記方法は：

- (a) 側鎖 - 保護ビオチン - PEG₅ - CVFAHNYDYLV C (側鎖 - 保護ビオチン - PEG₅ アンカー合成ブロック (I))、
- 側鎖 - 保護 T z 5 - G l l f f k (側鎖 - 保護第 2 合成ブロック (I))、及び

50

側鎖 - 保護 Tz5 - r r i v k (側鎖 - 保護第3合成ブロック (I)) の合成を含み、これらはそれぞれ以下の構造

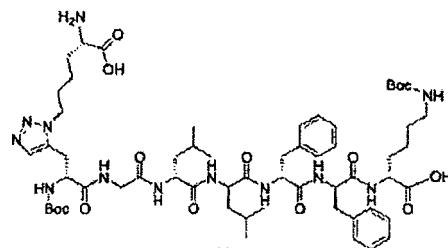
【化11】



10

20

【化12】

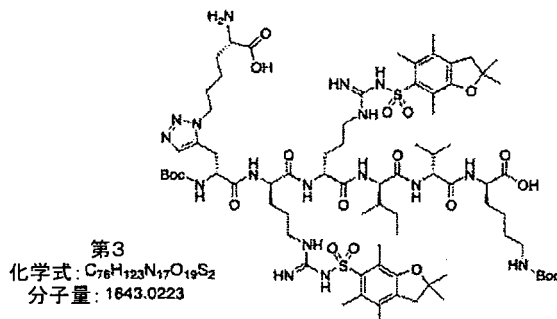


第2

化学式: $C_{59}H_{90}N_{12}O_{14}$
分子量: 1191.4179

30

【化13】



第3

化学式: $C_{76}H_{123}N_{17}O_{19}S_2$
分子量: 1643.0223

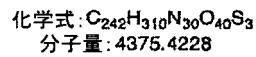
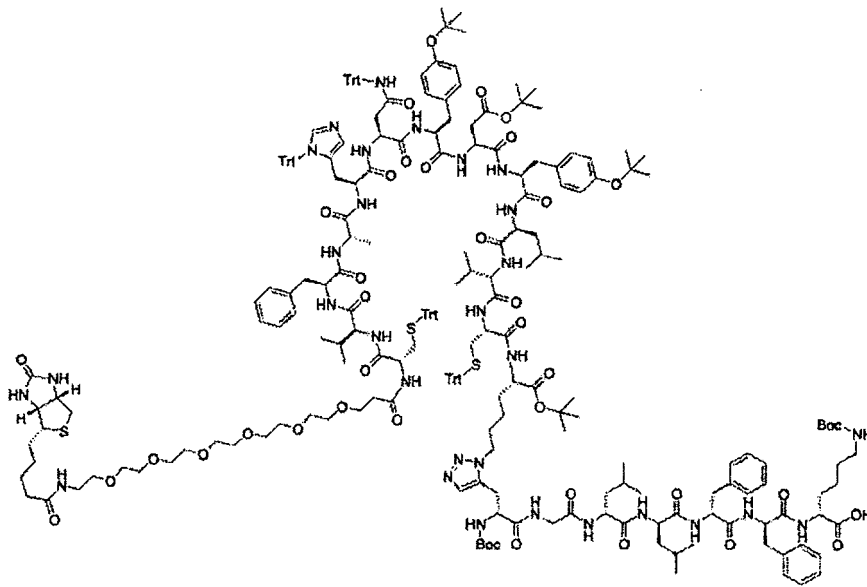
40

を持ち：

(b) 前記側鎖 - 保護ピオチン - PEG₅ アンカー合成ブロック (I) と前記側鎖 - 保護第2合成ブロック (I) とをカップリングさせて、以下の構造を持つ、側鎖 - 保護ピオチン - PEG₅ - CVFAHNYDYLVK - Tz5 - Tz5 - G11ffk (側鎖 - 保護

50

ビオチン - PEG₅ - PSATz5 - パイリグンド合成ブロック (I)
【化14】



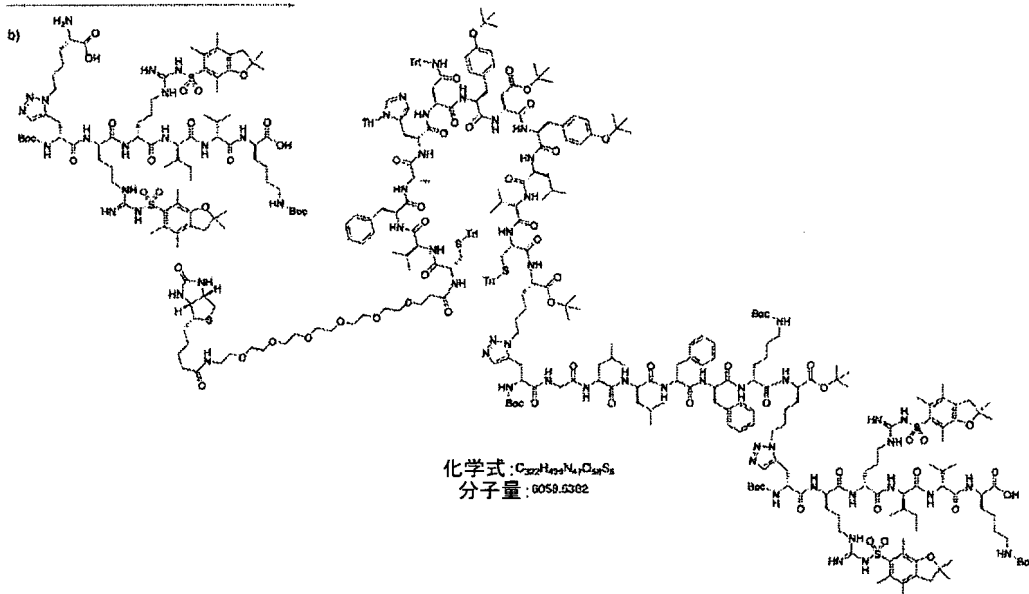
10

20

を形成し:

(c) 前記側鎖 - 保護 - ビオチン - PEG₅ - Tz5 - パイリグンド合成ブロック (I) を、前記側鎖 - 保護第3合成ブロック (I) とカップリングさせて、次の構造の、側鎖 - 保護ビオチン - PEG₅ - CVFAHNYDYLCV - Tz5 - G11ffk - Tz5 - rrvk (側鎖 - 保護ビオチン - PEG₅ - PSATz5 - トリリグンド合成ブロック (I))
【化15】

PSA PCC
パイリグンド



30

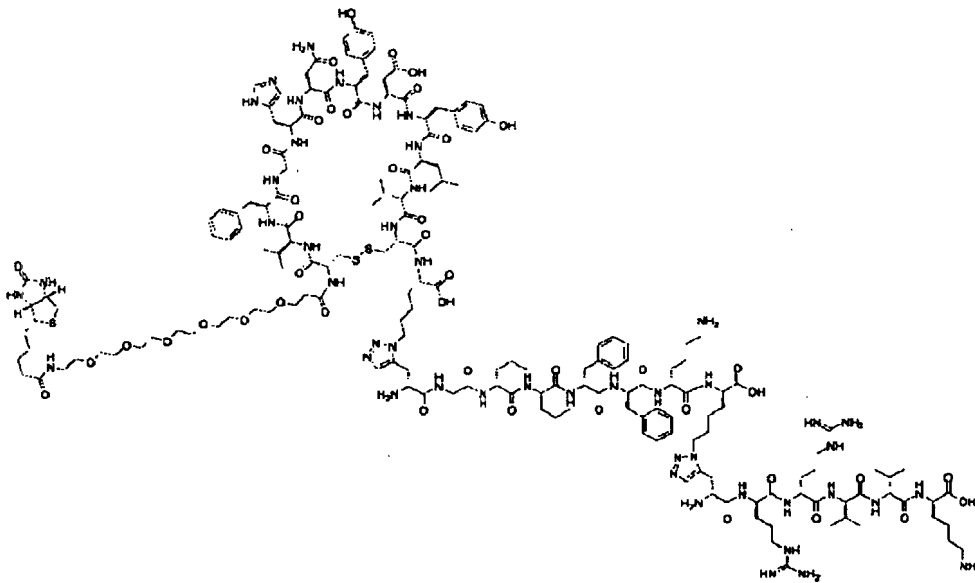
40

を形成し:

(d) 前記側鎖 - 保護ビオチン - PEG₅ - PSATz5 - トリリグンド合成ブロック (I) を脱保護基して、ビオチン - PEG₅ - CVFAHNYDYLCV - Tz5 - G11

50

f f k - T z 5 - r r i v k を形成し：及び
 (e) ジスルフィド結合を形成して、次の構造：
 【化 1 6】



10

20

を持つ、ビオチン - PEG₅ - シクロ (C V F A H N Y D Y L V C) - T z 5 - G l l f f k - T z 5 - r r i v k (ビオチン - PEG₅ - P S A T z 5 - トリリガンド (I)) を与えることを含む、方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 に記載の P S A - ターゲット捕捉剤を開発する方法であり、前記方法は：

(a) P S A をビオチン - PEG₅ - シクロ (C V F A H N Y D Y L V C) - A z 4 (「アジド - 変性 P S A - P C C アンカー選択ブロック (I) 」) と接触させて P S A - アンカー複合体を与えるステップ；

30

(b) 前記アンカー複合体を第 1 の複数の候補ペプチドと接触させて、P S A - P C C 第 2 リガンドを選択するステップを含み、前記ペプチドが D - プロパルギルグリシンとその N 末端で結合されており；

(c) 前記 P S A - P C C アンカー選択ブロックと前記 P S A P C C 第 2 リガンドとの間に 1、2、3 - トリアゾール結合を形成することで P S A - P C C バイリガンドを与えるステップを含み、前記アンカー選択ブロックと前記第 2 リガンドのアジド基とアルキル基が、前記ターゲットタンパク質と結合することで緊密位置にもたらされて、前記 P S A - P C C バイリガンドで変性されたビーズを与え；

(d) 前記 P S A - P C C バイリガンドで変性された前記ビーズを選択するステップ；
 前記 P S A - P C C バイリガンドを、前記 P S A - P C C バイリガンドで変性された前記ビーズから除去するステップ；

40

(e) 前記 P S A - P C C バイリガンドの前記 P S A - P C C 第 2 リガンドの配列決定するステップ；

(f) ビオチン - PEG₅ - シクロ (C V F A H N Y D Y L V C) - P S A 第 2 リガンド - A z 4 (「アジド変性 P C C バイリガンド選択ブロック (I) 」) を製造するステップ；及び望ましい抗体 - 様性質がスクリーニングされるまでステップ (a) から (f) を繰り返すステップ、を含む方法であり、ここで

PEG₅ は - (N H - (C H₂ H₄ - O -)₅ - C (O)) - であり、A z 4 は L - アジドリジンである。

50

【請求項 19】

免疫アッセイにおいて請求項 1 に記載の前記 P S A 捕捉剤を用いて P S A を検出する方法であり、前記 P S A 捕捉剤が、前記免疫アッセイにおいて抗体又はその等価物と交換される、方法。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法であり、前記免疫アッセイが、ウェスタンブロット、プルダウンアッセイ、ドットブロット及び E L I S A からなる群から選択される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は P S A 捕捉剤、組成物、方法及びその製造に関する。本出願は、米国仮特許出願第 61 / 439362 号 (2011 年 2 月 3 日出願) に基づく優先権を主張するものであり、この全内容は参照されて本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

前立腺癌は通常男性で診断される癌であり、癌死亡の原因となる。初期段階で検出されると、前立腺癌は治癒され得る。残念ながら、多くの場合原発腫瘍の転移が既に発生した最終段階で診断される。前立腺癌スクリーニングで陽性と診断される全ての個人が必ずしも癌を発症するものではない、ということから、早期診断はいまだに議論の余地がある。

【0003】

前立腺特異抗原 (P S A) は、腺カリクレイン遺伝子ファミリーの血清糖タンパク質成分である。 P S A は、制限キモトリプシン様酵素活性を持ち、 P S A の天然基質であるセメノゲリン I の C - 末端をチロシン及びロイシン残基に切断する。 P S A の前記組織特異性は、能動的免疫治療のための診断ターゲット及び可能な治療ターゲットの両方として有用なものとする。前立腺特異抗原は、前立腺癌の臨床的証拠がなくとも健康な男性の血清中で低レベルで検出され得る。腫瘍状態となると、しかしながら、 P S A の循環濃度は飛躍的に増加する。この増加はしばしばこの疾患の臨床段階と関連付けられている。従って、 P S A は、前立腺癌のスクリーニング及び階層化の両方のためのマーカーとして広く使用され、4 ng / mL よりも多い濃度で、前立腺癌の信頼出来る指標と考えられている (Jeong 2007)。血清中で、2つの P S A の異なる形が免疫学的に検出可能であり：遊離型 (MW = 30 kDa)、及び 1 - アンチキモトリプシンとの結合型 (A C T - P S A、MW = 100 kDa) である。当モル合計 P S A 測定 (遊離 P S A + A C T - P S A)、合計 P S A 及び遊離 P S A 間の比率、デジタル直腸診 (D R E)、及び生検が、多重前立腺癌診断アルゴリズムに含まれる。合計 P S A 及び遊離 P S A の比率はまた、癌と、通常の誤診である前立腺肥大症 (B P H) 間の識別情報を与える。診断又は、フォローアップ目的のための合計 P S A 測定は、広い範囲の濃度を検出するアッセイを必要とする (Acevedo 2002)。

【0004】

現在の P S A スクリーニング試験は、血液サンプル中の P S A を検出するために、捕捉剤としてモノクローナル抗体 (mAb) を利用する。これらの試験は、モノクローナル抗体技術に本来的に伴われるいくつかの制限を持つ。第一に、モノクローナル抗体の不安定性により、費用が高くなり、配送、取扱い及び保存が制限されるという結果となる。第二に、モノクローナル抗体とは、厳密な化学構造ではなく、これらは組成物について製造バッチ間での大きな変動を示し得る、ということである。これは、バッチ間で捕捉親和性と選択制に変化を生じさせ、タンパク質アッセイの定量性において問題を生じさせる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】 Acevedo et al., Clin Chem Acta 317: 55 - 63 (2002)

10

20

30

40

50

【非特許文献2】Agnew et al., Angew Chem Int Ed 48:4944-1948(2009)

【非特許文献3】Boren et al., J Am Chem Soc 130:8923-8930(2008)

【非特許文献4】Fields & Noble, Int J Pept Protein Res 35:161-214(1990)

【非特許文献5】Jeong & Lee, J Microbiol Biotechnol 17:840-846(2007)

【非特許文献6】Lee et al., J Comb Chem 10:807(2008)

【非特許文献7】Lee et al., Anal Chem 82:672-679(2010)

【非特許文献8】Pakkala et al., J Pept Sci 13:348-353(2007)

【非特許文献9】Wu et al., Eur J Biochem 267:6212-6220(2000)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、前立腺癌のスクリーニング及び治療の両方のための、モノクローナル抗体を置き換える改善されたPSA捕捉剤の技術への要求が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

ここである実施態様で、PSAの特異的に結合する合成PSA捕捉剤が提供される。ある実施態様では、これらの捕捉剤は、1つ又は複数のターゲット-結合部分を含み、さらにこれらのある実施態様では、ターゲット結合部分がペプチドである。ある実施態様では、前記捕捉剤は、バイリガンド(biligand)又はトリリガンド(triligand)捕捉剤であり、これは2又は3のターゲット-結合部分を含むことを意味する。これらのある実施態様では、前記捕捉剤は環状バイリガンド又はトリリガンドである。ある実施態様では、捕捉剤の前記ターゲット-結合部分は、お互いに共有結合、例えばアミド結合又は1、4-又は1、5-二置換-1、2、3-トリアゾール結合(リンケージ)を介して結合され(リンクされ)、及びある実施態様では前記ターゲット-結合部分が共にTz5又はTz4結合(リンケージ)で結合されて(リンクされて)いる。ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、広い範囲の温度、pH、保存期間、保存状態及び反応条件において安定であり、及びある実施態様では、前記捕捉剤は、同等の抗体よりもこれらの1つ又は複数の条件下でより安定である。

【0008】

ある実施態様では、ここで提供されるPSA捕捉剤は、配列表の配列番号1、2、3で示されるアミノ酸配列を含むアンカーリガンド、第2リガンド及び第3リガンドを含む、Tz5-トリリガンドであり、次の構造を持つ。

【0009】

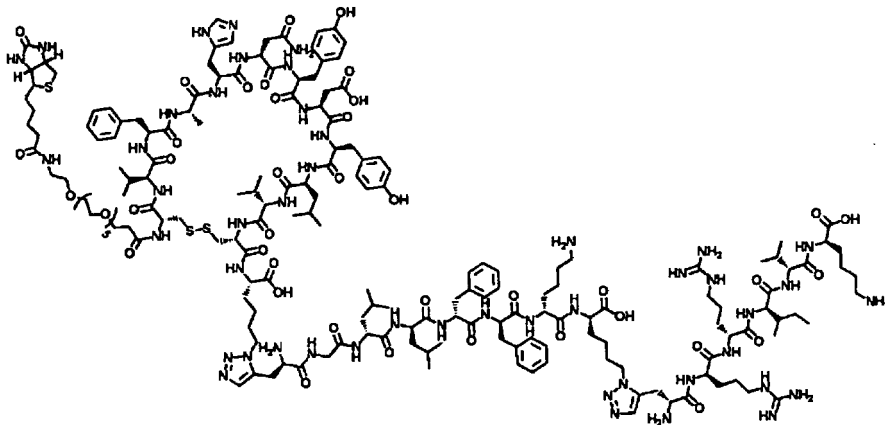
10

20

30

40

【化 1】



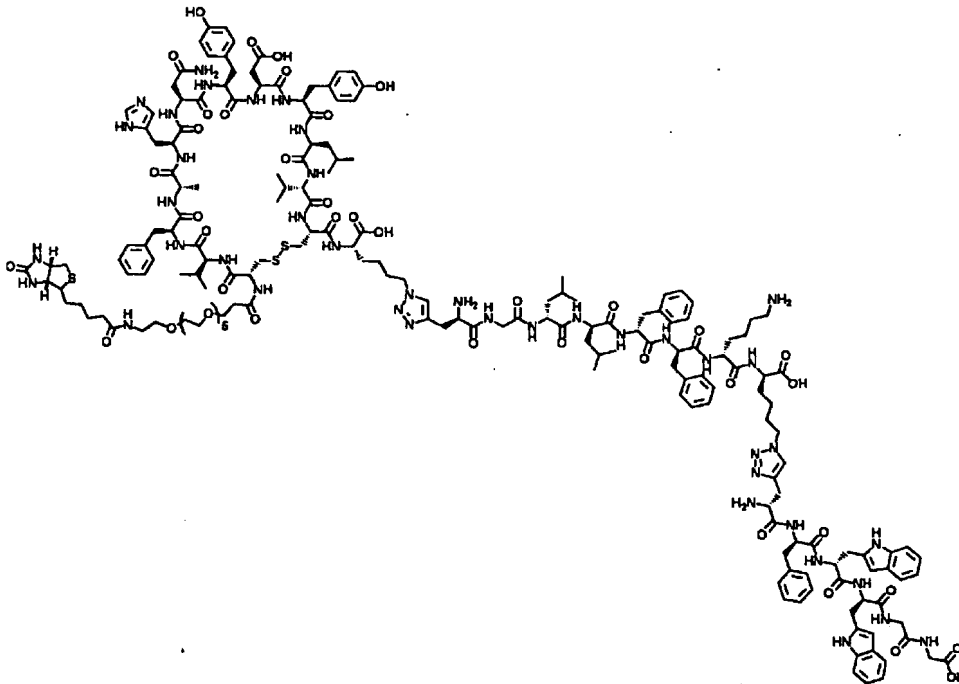
10

ある実施態様では、ここで提供される P S A 捕捉剤は、配列表の配列番号 1、2、4 で示されるアミノ酸配列を含むアンカーリガンド、第 2 リガンド及び第 3 リガンドを含む、T z 4 - トリリガンドであり、次の構造を持つ。

【 0 0 1 0】

20

【化 2】



30

40

ここである実施態様では、ここで提供される捕捉剤を用いる、サンプル中の P S A を検出又は定量する方法が提供される。ある実施態様では、これらの方法は、免疫アッセイを含み、前記捕捉剤は抗体の代替物であり、これらのある実施態様では前記免疫アッセイはウェスタンブロット、プルダウンアッセイ、ドットプロット又は E L I S A である。

【 0 0 1 1】

ここである実施態様において、ここで提供される捕捉剤において使用のための、ターゲット - 結合部分のスクリーニング方法が提供される。

50

【 0 0 1 2 】

ここである実施態様では、ここで提供される捕捉剤の合成方法が提供される。

【 0 0 1 3 】

ここである実施態様では、ここで提供される捕捉剤をスクリーニングする方法が提供される。

【 0 0 1 4 】

ここである実施態様では、ここで提供される捕捉剤を用いる、対象体の増加 P S A 濃度に伴う前立腺癌又はある症状の診断及び / 又は階層化の方法が提供される。

【 0 0 1 5 】

ここである実施態様では、ここで提供される捕捉剤を用いる、対象体の増加 P S A 濃度に伴う前立腺癌又は症状を治療する方法が提供される。これらのある実施態様では、前記捕捉剤はここで、免疫療法としての機能が提供される。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 6 】

【 図 1 】 図 1 は、一般的な捕捉剤選択スキームを示す。

【 図 2 】 図 2 は、タンパク質捕捉剤ターゲット P S A の選択スキームを示す。

【 図 3 a 】 図 3 a は、タンパク質捕捉剤ターゲット P S A の化学構造を示し、P S A アンカーリガンド (配列番号 1) 選択ブロックを示す。

【 図 3 b 】 図 3 b は、タンパク質捕捉剤ターゲット P S A の化学構造を示し、P S A T z 5 - バイリガンド (配列番号 1 及び 2) 選択ブロックを示す。

20

【 図 3 c 】 図 3 c は、タンパク質捕捉剤ターゲット P S A の化学構造を示し、P S A T z 5 - トリリガンド (配列番号 1、2、及び 3) 選択ブロックを示す。

【 図 3 d 】 図 3 d は、タンパク質捕捉剤ターゲット P S A の化学構造を示し、P S A T z 4 - バイリガンド (配列番号 1 及び 2) 選択ブロックを示す。

【 図 3 e 】 図 3 e は、タンパク質捕捉剤ターゲット P S A の化学構造を示し、P S A T z 4 - トリリガンド (配列番号 1、2 及び 4) を示す。

【 図 4 】 図 4 は、配列番号 1 を含む P S A アンカーリガンド (P S A - アンカー)、配列番号 2 を含む P S A T z 5 - 第 2 リガンド (1、5 - T z - 第 2 リガンド)、配列番号 3 を含む P S A T z 5 - 第 3 リガンド (1、5 - T z - 第 3 リガンド)、配列番号 2 を含む P S A T z 4 - 第 2 リガンド (1、4 - T z - 第 2 リガンド)、配列番号 4 を含む P S A T z 4 - 第 3 リガンド (1、4 - T z - 第 3 リガンド)、の化学構造を示し、それぞれのリガンドは、A A P P T E C T i t a n 3 5 7 合成装置上で、F m o c 系固相ペプチド合成 (S P P S) の側鎖保護生成物である。

30

【 図 5 】 図 5 は、配列番号 1 及び 2 を含む P S A T z 5 - バイリガンドの、P S A アンカーを P S A T z 5 - 第 2 リガンドと結合させることによる合成を示す。それぞれの側鎖は保護されている。

【 図 6 】 図 6 は、配列番号 1、2 及び 3 を含む P S A T z 5 - トリリガンドの、P S A T z 5 - バイリガンドを P S A T z 5 - 第 3 リガンドと結合させることによる合成を示す。それぞれの側鎖は保護されている。

【 図 7 】 図 7 は、配列番号 1、2 及び 3 を含む P S A T z 5 - トリリガンドの合成を示す。

40

【 図 8 】 図 8 は、開示のひとつの実施態様による、完全に保護されたアルキン含有アミノ酸の合成を示す。

【 図 9 】 図 9 は、開示のひとつの実施態様による、完全に保護されたアジド含有アミノ酸の合成を示す。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、開示のひとつの実施態様による保護 1、5 - トリアゾール結合ジペプチドを提供するために、完全に保護されたアルキン含有アミノ酸と完全に保護されたアジド含有アミノ酸との間のルテニウム触媒アジド / アルキン環化付加 (R U A A C) 反応を示す。

【 図 1 1 】 図 1 1 は、開示のひとつの実施態様による保護された 1、5 - トリアゾール結

50

合ジペプチドのベンジルエステル保護基を選択的に脱保護基する反応を示す。

【図12】図12は、開示のひとつの実施態様による、保護1、4-トリアゾール結合ジペプチドを与えるために、完全に保護されたアルキン含有アミノ酸と完全に保護されたアジド含有アミノ酸との間の、銅触媒アジド/アルキン環化付加(CUAAC)反応を示す。

【図13】図13は、開示のひとつの実施態様による、PSA捕捉剤トリリガンドTz5-rrivk、PSA捕捉剤バイリガンドTz5及び市販のモノクローナル抗体抗-ヒトPSA(PS1mAb)のサンドイッチELISAの結果を示す。

【図14】図14は、開示のひとつの実施態様により、PSA捕捉剤トリリガンドTz5-rrivk、及び市販のモノクローナル抗体抗-ヒトPSA(PS1mAb)のサンドイッチELISAの結果を示し、これは4ng/mLの遊離PSAのカットオフ濃度の範囲での定量化限界を示す。

【図15】図15は、PSA捕捉剤(アンカーリガンド、バイリガンド、トリリガンド)及び市販PSA抗体(抗-PSAmAb、PS1、PS2及びPS6、IgG1)のドットプロットアッセイを示す。

【図16】図16は、開示のひとつの実施態様による、ビオチン化PSA捕捉剤トリリガンド及びビオチン化市販PSA抗体(PS2mAb)のプルダウンアッセイの結果を示し：(a)銀染色でSDS-PAGE可視化したプルダウンアッセイの結果；及び(b)PSAのウェスタンプロットを示す。

【図17】図17は、PSA捕捉剤トリリガンドの血清安定性アッセイを示し、ヒト血清とインキュベートしたPSA捕捉剤トリリガンドのHPLC分析により示される。

【図18】図18は、PSA捕捉剤トリリガンドの長期安定性アッセイを示し、室温(RT)又は-80℃でそれぞれ3週間及び6週間、凍結乾燥粉末として保存された。

【図19】図19は、PSA捕捉剤により強化されたPSAの酵素活性アッセイを示し；(a)PSAアンカーリガンド；(b)PSA捕捉剤バイリガンド；及び(c)ネガティブコントロール塩化亜鉛を示す。

【図20】図20は、ビオチン化PSA捕捉剤のスク্যাッチャードプロットを示し；(a)PSA捕捉剤リガンド；及び(b)解離定数(K_D)の決定を示す。

【図21】図21は、PSA捕捉剤の位置異性体のドットプロットアッセイを示す。PSA捕捉剤1、4Tz-バイリガンド及び1、5Tz-バイリガンドはトリアゾール位置異性体でのみ異なる。PSA捕捉剤1、5Tz-バイリガンドは、1、4Tz-バイリガンドよりもより低い検出限界を与える(それぞれ、0.14µg PSA及び0.28µg PSA)。

【発明を実施するための形態】

【0017】

ここで、高親和性、特異性で1つ又は複数のターゲットタンパク質を特異的に結合する、タンパク質-触媒捕捉(PPC)剤(「捕捉剤」)が提供され、同様に、これらの捕捉剤を製造し、スクリーニングする方法、ターゲットタンパク質の識別、検出及び/又は分離においてこれらの捕捉剤の使用の方法、これらの捕捉剤の、種々の症状の診断、分類及び/又は治療において使用する方法が提供される。ある実施態様では、前記ターゲットタンパク質は、前立腺特異抗原(PSA)である。

【0018】

ここで使用される用語「捕捉剤」とは、1つ又は複数のターゲット-結合部分を含み、これはそれらのターゲット-結合部分を介してターゲット-タンパク質と特異的に結合する組成物を意味する。それぞれのターゲット-結合部分は、前記ターゲットタンパク質に対して結合親和性を、個々に、又は他のターゲット-結合部分と組み合わせたいずれかで示す。ある実施態様では、それぞれのターゲット-結合部分は、ターゲットタンパク質に、1つ又は複数の非-共有相互作用を介して結合し、例えば水素結合、疎水性相互作用及びファンデルワールス相互作用などである。捕捉剤は、1つ又は複数の有機分子を含み、これは例えばポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド及びその他の非-ポリマー性分

10

20

30

40

50

子を含む。

【0019】

ある実施態様では、ターゲット - 結合部分は1つ又は複数のポリペプチド又はペプチドを含む。これらの実施態様では、ターゲット - 結合部分は、D - アミノ酸、L - アミノ酸及び/又は、置換及び非置換アルキル、置換及び非置換アジド、置換及び非置換アルキニル、置換及び非置換ビオチニル、置換及び非置換アジドアルキル、置換及び非置換ポリエチレングリコールイル及び置換及び非置換二置換 - 1、2、3 - トリアゾールからなる群から選択される官能基で置換されるアミノ酸を含む1つ又は複数のペプチドを含む。

【0020】

ここで使用される用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、ここで交互に、アミノ酸残基のポリマーを含むアミノ酸配列を意味する。この用語は、1つ又は複数のアミノ酸残基が、対応する天然由来アミノ酸の人工的化学合成物であるアミノ酸ポリマーにも適用され、同じく天然由来のアミノ酸ポリマー及び非天然由来のアミノ酸ポリマーにも適用される。

10

【0021】

用語「アミノ酸」とは、天然由来及び合成アミノ酸、同じくアミノ酸類似物及びアミノ酸模倣物であって天然由来アミノ酸と類似の方法で機能するもの、およびそれらの異性体を意味する。天然由来のアミノ酸は、遺伝子コードで暗号化され、同様に、例えばヒドロキシプロリン、カルボキシグルタメート、O - ホスホセリンなどの後に変化したものと及びそれらの異性体である。用語「アミノ酸類似体」とは、天然由来のアミノ酸と同じ基本化学構造を持つ化合物を意味し、即ち、水素、カルボキシル基、アミノ基及びR基を持つ炭素を持つ化合物であり、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムなどである。かかる類似体は、変性されたR基（例えばノルロイシン）又は変性ペプチド鎖を持つが、なお天然由来のアミノ酸と同じ基本的化学構造を維持する。用語「アミノ酸模倣物」とは、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を持つが、機能的には天然由来のアミノ酸と類似する、化合物を意味する。アミノ酸は、ここでは、共通して知られている3文字記号で、又はIUPAC - IUB生化学命名法委員会による1文字記号のいずれかで参照される。

20

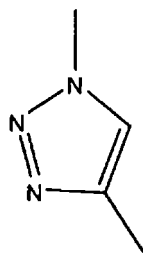
【0022】

2つのターゲット - 結合部分を持つ捕捉剤は、ここでは捕捉剤バイリガンドとして参照される。前記捕捉剤が捕捉剤バイリガンドであるこれらの実施態様では、前記第1のターゲット - 結合部分は、アンカーリガンドと参照され、前記第2のターゲット - 結合部分は第2リガンドとして参照される。ある実施態様では、前記アンカーリガンド及び第2リガンドは共有結合で結合され、これには例えば以下示されるようにアミド結合又は1、4 - 又は1、5 - 二置換 - 1、2、3 - トリアゾール結合が含まれる：

30

【0023】

【化3】

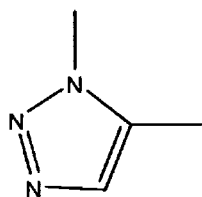


40

1、4 - 二置換 - 1、2、3 - トリアゾール結合

【0024】

【化 4】



1、5 - 二置換 - 1、2、3 - トリアゾール結合

10

前記アンカーリガンド及び第2リガンドが、他と、1、5 - 二置換 - 1、2、3 - トリアゾール結合を介して結合される場合には、前記1、5 - 二置換 - 1、2、3 - トリアゾールは、ルテニウム触媒を用いて単一化学反応で合成され得る。例えば、前記1、5 - 二置換 - 1、2、3 - トリアゾール結合は、ルテニウム - 触媒アジド / アルキン環化付加反応 (RuAAC) を用いて形成され得る (図11に示される)。前記アンカーリガンド及び第2リガンドが、他と、1、4 - 二置換 - 1、2、3 - トリアゾール結合を介して結合される場合には、前記1、4 - 二置換 - 1、2、3 - トリアゾールは、Cu - 触媒アジド / アルキン環化付加反応 (CuAAC) を用いて形成され得る。1、4 - 及び1、5 - 二置換 - 1、2、3 - トリアゾール位置異性体を導き及び / 又は選択的生成のために複数の化学反応を要する他のプロセスも使用され得る。

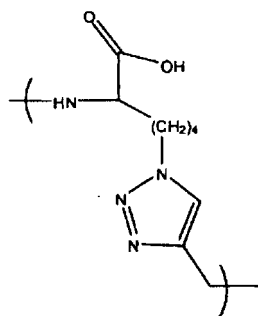
20

【0025】

ある実施態様では、前記アンカー及び第2リガンドは、お互いに、以下の構造を持つ Tz5 又は Tz4 結合により結合される。

【0026】

【化 5】

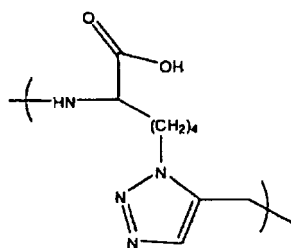


30

Tz 4

【0027】

【化 6】



40

Tz 5

50

3つのターゲット - 結合部分を持つ捕捉剤は、捕捉剤トリリガンドとしてここで参照される。ここで提供される捕捉剤トリリガンドのある実施態様では、捕捉剤トリリガンドは、第3のターゲット - 結合部分に結合される捕捉剤バイリガンドを含み、好ましくは前記捕捉剤バイリガンドの前記第2リガンドで結合される。この実施態様では、前記第3のターゲット - 結合部分は、第3リガンドと参照される。ある実施態様では、前記第3リガンドが、前記バイリガンドと共有結合で結合され、これらのある実施態様では、前記第3リガンドと前記捕捉剤バイリガンドはお互いにTz4又はTz5結合で結合される。

【0028】

1又は複数の前記アンカーリガンド、第2及び第3リガンドがお互いにアミド結合で結合される実施態様では、前記アミド結合は、結合剤（例えば、O - (7 - アザベンゾトリアゾール - 1イル) - N、N、N'、N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフェート (HATU)、N - ヒドロキシ - 7 - アザ - ベンゾトリアゾール (HOAt)、又はDMF中のジイソプロピルエチルアミン (DIEA)) の存在下でカルボキシル基とアミン基により形成され得る。

10

【0029】

ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、ある範囲の反応条件及び/又は保存期間若しくは条件にわたり安定である。ここで使用される「安定」な捕捉剤は、特異的にターゲットタンパク質へ結合する能力を維持するものである。ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、1又は複数の反応及び/又は保存条件下で、同じターゲットタンパク質へ結合する抗体よりもより安定である。例えば、ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、同じターゲットタンパク質に結合する抗体よりもタンパク質分解に対する抵抗性が高い。

20

【0030】

ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、6ヶ月以上の保存期間を持ち、これは6ヶ月よりも長い保存に対して安定であることを意味する。これらの実施態様のある実施態様では、前記捕捉剤は、1年以上、2年以上又は3年よりも長い保存期間を持つ。これらの実施態様のある実施態様では、前記捕捉剤は凍結乾燥粉末として保存される。ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、同じターゲットタンパク質へ結合する抗体よりも長い保存期間を持つ。

30

【0031】

ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、-80 から約120 の範囲の温度で安定である。ある実施態様では、前記捕捉剤は、-80 から -40 ; -40 から -20 ; -20 から0 ; 0 から20 ; 20 から40 ; 40 から60 ; 60 から80 ; 及び/又は80 から120 で安定である。ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、同じターゲットタンパク質に結合する抗体よりも広い範囲の温度にわたり安定であり、及び/又は前記同じターゲットタンパク質に結合する抗体よりも特定の温度でより長い時間安定である。

40

【0032】

ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、pHが約3.0から約8.0で安定である。ある実施態様では、範囲は約7.0から約8.0である。

40

【0033】

ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、12時間を超えてヒト血清中で安定である。このある実施態様では、前記捕捉剤は、ヒト血清中で、18時間、24時間、36時間又は48時間を超えて安定である。ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、同じターゲットタンパク質に結合する抗体よりもヒト血清中でより長い時間安定である。

【0034】

ここで使用される用語「抗体」とは、抗原刺激後の活性化されたB細胞により産生され、前記抗原に特異的に結合でき生物系での免疫応答を促進するタンパク質の種類を意味する。完全抗体は通常、4つのサブユニットからなり、2つの重鎖と2つの軽鎖を持つ。前記抗体は天然及び合成抗体を含み、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ポ

50

リクローナル抗体又はそれらの断片を含む。例示抗体は、I g G、I g D、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g Mなどを含む。断片の例は、F a b F v、F a b ' F (a b ') 2などである。モノクローナル抗体は、「エピトープ」と用語される他の生体分子の単一の特異的空間的及び極性組織に結合する抗体であり、それにより相補的であるとされる。ある形では、モノクローナル抗体はまた、同じ構造を持ち得る。ポリクローナル抗体は、異なるモノクローナル抗体の混合物を意味する。ある形では、ポリクローナル抗体は、異なる抗原性エピトープに結合するモノクローナル抗体の少なくとも2つのモノクローナル抗体の混合物であり得る。異なる抗原性エピトープは、同じターゲット上、異なるターゲット上又は組み合わせたものの上であり得る。抗体は、当該技術でよく知られた技術で調製され、例えば宿主への免疫化及び血清回収により又は連続的なハイブリドーマ細胞株調製と分泌タンパク質(モノクローナル抗体)回収による。

10

【0035】

ここで提供される捕捉剤のある実施態様では、ビオチン-PEG₅-シクロ(C V F A H N Y D Y L V C) - T z 5 - G l l f f k (「P S A - T z 5 B L 1」、図3(b); ビオチン-PEG₅-シクロ(配列番号1)-Tz5-(配列番号2)及びビオチン-PEG₅-シクロ(C V F A H N Y D Y L V C) - T z 4 - G l l f f k 「P S A - T z 4 B L 1」、図3(d); ビオチン-PEG₅-シクロ(配列番号1)-Tz4-(配列番号1)からなる群から選択されるP S A捕捉剤バイリガンドであり、ここでPEG₅は、-(NH-(C₂H₄-O)-)₅-C(O)-を表す。

【0036】

ここで提供される捕捉剤のある実施態様では、ビオチン-PEG₅-シクロ(C V F A H N Y D Y L V C) - T z 5 - G l l f f k - r r i v k (「P S A - T z 5 T L 1」、図3(c); ビオチン-PEG₅-シクロ(配列番号1)-Tz5-(配列番号2)-Tz5-(配列番号3)及びビオチン-PEG₅-シクロ(C V F A H N Y D Y L V C) - T z 4 - G l l f f k - T z 4 - f w w g g 「P S A - T z 4 T L 1」、図3(e); ビオチン-PEG₅-シクロ(配列番号1)-Tz4-(配列番号2)-Tz4-(配列番号4)からなる群から選択されるP S A捕捉剤バイリガンドである。

20

【0037】

ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤の合成方法が提供される。ある実施態様では、これらの方法は：

30

(a) ターゲット-結合部分の合成ブロックを製造し、前記合成ブロックがターゲット-結合部分を持ち、及び他の合成ブロックと望ましい結合を形成し得る少なくとも1つの反応性基を持ち、ここで：(i) 前記結合は、アミド結合、1、4-二置換1、2、3-トリアゾール結合及び1、5-二置換1、2、4-トリアゾール結合からなる群から選択され；及び(ii) 前記ターゲット-結合部分の他の全ての官能基が、望ましくない反応を防止するために保護され；及び

(b) 前記ターゲット-結合部分の合成ブロックを結合させて前記捕捉剤を与えることを含む。

【0038】

ある実施態様では、前記捕捉剤は1又は複数のTz4及び/又はTz5結合を含む。Tz4及びTz5結合は、アミド結合及び二置換1、2、3-トリアゾール結合を含むことから、前記Tz4又はTz5結合捕捉剤の合成ブロックは、アミド結合の形成又は触媒アジド/アルキン環化付加反応により結合され得る。

40

【0039】

ある実施態様では、捕捉剤はさらに望ましい化学的又は生物学的活性を得るために変性され得る。望ましい化学的又は生物学的活性の例は、限定されるものではないが、改善された溶解性、安定性、生物学的利用可能性、検出可能性又は反応性を含む。捕捉剤に導入され得る具体的な変性の例は、限定されるものではないが、ジスルフィド結合形成による捕捉剤の環化；他の官能基又は分子による前記捕捉剤の変性である。同様に捕捉剤は、標準的でないか生物学的でないタンパク質のエピトープに結合するように合成することができ、従

50

って、その利用性を向上させることとなる。ある実施態様では、前記捕捉剤は、前記結合反応の前に前記ターゲット - 結合部分の合成ブロックを変性することで変性させ得る。

【0040】

ここでまた、ターゲット - 結合部分のためのスクリーニング方法及び / 又はこれらのターゲット - 結合部分を含む捕捉剤の製造方法が提供される。これらのある実施態様では、前記スクリーニング / 製造方法は、次のステップ：

(a) 前記ターゲットタンパク質のためのアンカーリガンドを選択するための、第1の複数の候補ペプチドを製造するステップ；

(b) 前記ターゲットタンパク質を前記第1の複数の候補ペプチドと接触させるステップ；

(c) 前記アンカーリガンドとして、前記ターゲットタンパク質に対する親和性を持つ候補ペプチドを選択するステップ；

(d) 前記アンカーリガンドを配列決定するステップ；

(e) 前記アンカーリガンドとアジド基又はアルキン基を含むアンカーリガンド選択ブロックを製造するステップ；

(f) 前記ターゲットタンパク質のための第2リガンドを選択するために第2の複数の候補ペプチドを製造するステップを含み、ここで前記第2の複数のペプチドは、前記アンカーリガンド選択ブロックがアルキン基及びアジド基をそれぞれ持つ場合には、アジド基又はアルキン基を含み；

(g) 前記アンカーリガンド選択ブロックと前記第2の複数のペプチドを前記ターゲットタンパク質と接触させるステップ；

(h) 前記アンカーリガンド選択ブロックと前記第2リガンドとの間に二置換1、2、3 - トリアゾール結合を形成することで捕捉剤パイリガンドを与えるステップを含み、ここで前記アンカーリガンド選択ブロックと前記第2リガンドの前記アジド基及びアルキン基は、前記ターゲットタンパク質への結合により緊密位置とされ；

(i) 前記ターゲットとの親和性を持つ前記捕捉剤パイリガンドを選択するステップ；

(j) 前記第2リガンドの配列を決定するステップ；及び

(k) アジド基又はアルキン基を含むパイリガンド選択ブロックを製造するステップ；及びステップ(f)から(k)を、前記ターゲットタンパク質への望ましい結合親和性を持つ捕捉剤がスクリーニングされるまで繰り返すステップ、を含む。

【0041】

前記スクリーニング工程の1また複数のステップは、1又は複数のリガンドが知られている場合には省略され得る。

【0042】

ある実施態様では、前記第1及び / 又は第2の選択のための複数の候補ペプチドは「1ビーズ1化合物」(OBOC)ペプチドライブラリーであり、前記ペプチドは、5から7のD - アミノ酸残基を持ち、そのN末端でD - プロパルギルグリシンと結合されている。

【0043】

ここで提供されるスクリーニング及び製造方法において、前記方法は知られるアンカーリガンドを利用することができる。この実施態様では、アンカーリガンドスクリーニングのステップが省略され得る。例えば、前記スクリーニングプロセスで使用されるアンカーリガンドは、ピオチン - PEG₅ - シクロ(CVFAHNYDYLV C) (ピオチン - PEG - シクロ(配列番号1))である。

この実施態様では、アジド - 変性アンカーリガンド選択ブロックは、ピオチン - PEG₅ - シクロ(CVFAHNYDYLV C) - Azを意味し、ここでAzは、アジド基を含む変性アミノ酸を表す(例えば、Az4とは、L - アジドリジンを表す)。これらの実施態様では、前記スクリーニング / 製造方法は、次のステップ：

(a) PSAを、ピオチン - PEG₅ - シクロ(CVFAHNYDYLV C) - Az4 (「アジド - 変性PSA捕捉剤アンカーリガンド選択ブロック(I))と接触させてPSA - アンカー複合体を与えるステップ；

10

20

30

40

50

(b) 前記 P S A - アンカー複合体を、第 2 リガンドを選択するための第 1 の複数の候補ペプチドと接触させるステップであり、前記ペプチドはその N 末端で D - プロパルギルグリシンと結合されている；

(c) 前記アンカーリガンド選択ブロックと前記第 2 リガンドとの間に 1、5 - 二置換 - 1、2、3 - トリアゾール結合を形成することで P S A 捕捉剤バイリガンドを与えるステップであり、ここで、前記アンカーリガンド選択ブロックと前記第 2 リガンドを前記アジド及びアルキン基が、前記ターゲットタンパク質に結合することで緊密位置にもたらされ、前記 P S A 捕捉剤バイリガンドで変性されたビーズを与え；

(d) 前記 P S A 捕捉剤バイリガンドで変性された前記ビーズを選択するステップ；

(e) 前記 P S A 捕捉剤バイリガンドで変性された前記ビーズから前記 P S A 捕捉剤バイリガンドを除去するステップ；

(f) 前記 P S A 捕捉剤バイリガンドの前記 P S A 捕捉剤第 2 リガンドの配列決定するステップ；

(g) ビオチン - P E G₅ - サイクル ((C V F A H N Y D Y L V C) - P S A 第リガンド - A z 4 (「アジド - 変性捕捉剤バイリガンド選択ブロック (I) 」) を製造するステップ；及び

(h) 上のステップを、前記性質を持つ P S A 捕捉剤が識別されるまで、繰り返すステップ、を含む。

【 0 0 4 4 】

さらにここで、ここで適用される捕捉剤を用いて P S A 濃度の変化に伴う前立腺癌又は他の疾患を診断及び / 又は段階化する方法が適用される。これらの実施態様では、前記方法は、

(a) 対象体から生体サンプルを得るステップ；

(b) 前記 P S A 捕捉剤で、前記サンプル中の P S A の存在又は不存在を測定するステップ；

(c) 前記 P S A 濃度を、P S A の既定のコントロール範囲と比較するステップ；及び

(d) 前記生体サンプル及び前記既定のコントロールとの間の差に基づいて、前立腺癌又は前立腺障害を診断するステップ、を含む。

【 0 0 4 5 】

ある実施態様では、ここで提供される捕捉剤は、1 つ又は複数の検出ラベルを含み、例えばビオチン、銅 - 1、4、7、10 - テトラアザシクロドデカン - 1、4、7、10 - 四酢酸 (銅 - D O T A)、又は、ガンマ線、プロトン、中性子、陽電子、トリチウム放射を含む放射活性生成物、又はとりわけ他の方法で検出され得るカバータグ (即ちガドリニウム) を含む。

【 0 0 4 6 】

捕捉剤系タンパク質アッセイは、捕捉剤の合成において非常に高い再現性を持つ。

【 0 0 4 7 】

ここで提供される方法で使用される生体サンプルは、器官、組織、体液及び細胞からなる群から選択され得る。他の側面では、前記体液は、血液、血清、血漿、尿、痰、唾液、便、髄液、脳脊髄液、リンパ液、皮膚の分泌物、気道分泌物、腸分泌物、尿生殖路分泌物、涙、およびミルクからなる群から選択される。他の側面では、前記生体サンプルは血液サンプルである。

【 0 0 4 8 】

ここでまた、ここで開示される捕捉剤の 1 つ又は複数を投与することで P S A 濃度の増加に伴う前立腺癌又は症状の治療のための方法が提供される。これらのある実施態様では、捕捉剤は、1 つ又は複数の追加の治療剤であって、例えば化学療法剤に結合され得る。

【 0 0 4 9 】

ある実施態様では、ここで開示された 1 つ又は複数の捕捉剤を含むキットが提供される。ある実施態様では、これらのキットは、P S A 検出及び / 又は定量のために使用され、これらのある実施態様では、前記キットは、P S A 濃度の変化に伴う前立腺癌又は他の障

10

20

30

40

50

害を診断及び／又は段階化するために使用され得る。ある実施態様では、ここで提供されるキットは：(a)吸着材を含む基材を含み、前記吸着材はPSAを結合するために好適であり、及び(b)洗浄液又は洗浄液を作るための装置を含み、前記吸着材と洗浄液の組み合わせでPSA検出を可能にする。他の実施態様では、ここで提供されるキットは、増加PSA濃度に伴う前立腺癌又は症状の治療の際に使用される。

【0050】

ある実施態様では、ここで提供されるキットはさらに、ラベル又は別の挿入物の形で、好適な走査パラメータについての指示を含み得る。例えば、前記キットは、消費者／キット使用者に、血清のサンプル又は他の組織サンプルを前記プローブに接触させた後の洗浄方法について情報を与える標準指示を含み得る。

10

【0051】

他の実施態様では、ここで提供されるキットは(a)特異的にPSAに結合するPSA捕捉剤；及び(b)検出試薬を含む。かかるキットは、ここで記載された材料で製造され得る。

【0052】

ここで提供されるキットは場合により、標準又はコントロール情報及び／又は材料のコントロール量を含み、試験サンプルが、前記コントロール情報標準及び／又はコントロール量と比較して、サンプル中で検出されたPSAの試験量が、前立腺癌又はその他の前立腺症状と整合する診断量であるかどうかを決定することを可能にする。

20

【0053】

以下実施例は、特許請求された発明をよりよく説明するために与えられたものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。具体的な材料の記載は、これは発明を説明するものであり、限定するものではない。当業者であれば、本発明の内容を実施することなく本発明に範囲から離れることなく均等な手段又は試薬を開発することが可能である。

【0054】

実施例

実施例1：PSA捕捉剤トリリガンドのスクリーニング及び製造：

試薬。

Fmoc-D-X-OH (Fmoc、フルオレン-9-イルメトキシカルボニル) (C = Ala、Arg (Pbf、ペンタメチルジヒドロネンゾフラン-5-スルホニル)、Asn (Trt) (Trt、トリチル)、Asp (OtBu) (tBu、tert-ブチル)、Glu (OtBu)、Gln (Trt)、Gly、His (Trt)、OLE. Leu、Lys (Boc) (Boc、tert-ブトキシカルボニル)、Met、Phe、Pro、Ser (tBu)、Thr (tBu)、Trp (Boc)、Tyr (tBu) 及び Val) (Anaspec; San Jose, CA)。アミノ酸カップリング反応は、1-メチル-2-ピロリジノン (NMP、99%) 中で、HBTU (O-ベンゾトリアゾール-N,N,N'-N'-テトラメチル-ウロニウム-ヘキサフルオロ-フォスフェート (AAPTEC) 及びN,N'-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) で実施した。N-Fmoc保護基の除去のためには、NMP中の20%ピペリジン溶液を使用した。前記ペプチドライブラリーの最終脱保護基には、トリフルオロ酢酸 (TFA、最小98%、滴定) 及びトリエチルシラン (TES) を使用した。全ての溶媒及び試薬はSigma-Aldrich (St. Louis, MO) から入手した。

30

40

【0055】

ペプチドライブラリーの構築

ペンタ-からヘプタペプチド(5~7)の無作為OBOCライブラリーは、自動合成装置、Titan357 (AAPTEC) を用いて、ポリエチレングリコール-グラフトポリスチレンビーズ (TentaGel S-NH₂、90 μm、0.29 mmol/g、2.86 × 10⁶ ビーズ/g) に標準スプリット-ミックス方法により合成した。通常のライブラリー構築で、非天然-D-立体異性体を前記ペプチド配列でのそれぞれの位置

50

に使用した。前記カップリングステップでは、Fmoc化学を標準固相ペプチド合成方法に適用した。樹脂は、収集容器(CV)内でNMPで2時間膨潤させた。Fmoc-メチオニンのカップリングは、0.17当量のHATU(2-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルアンモニウムヘキサフルオロフォスフェート; ChemPeep)と2当量のDIEAの添加により開始させた。前記カップリング反応は30分間行った。カップリング反応に次いで、前記ビーズを完全に洗浄(4xNMP)し、NMP中の20%ピペリジンで処理した(15分間、その後新しい脱イオン水で洗浄)。樹脂を完全に洗浄(4xNMP、4xDCM)し、次のカップリングサイクルのためにいくつかの等量区分に分けて反応容器(RV)へ入れた。前記カップリング及びFmoc脱保護基反応が完了して、前記樹脂は収集容器内で一緒にされた。前記手順は、望ましい長さのペプチドが得られるまで繰り返された。前記アミノ酸側鎖保護基は次に、トリフルオロ酢酸(94%)、水(3%)及びトリイソプロピルシラン(3%)で2時間インキュベートすることで除去された。前記ライブラリー樹脂は、ジクロロメタン(DCM; 5x)、メタノール(MeOH; 5x)、水(5x)、MeOH(5x)、DCM(5x)及びジエチルエーテル(5x)で完全に洗浄した。得られた樹脂は、真空乾燥し、4 で保存した。

10

【0056】

選択はインシチュクリック化学技術で行い、前記ターゲットタンパク質がアジドをアルキン候補リガンドに共役させる触媒として作用する。スクリーニングのために、N末端にD-プロパルギルグリシンで結合されたOBOLライブラリーの200mg部分を、8-mL容量Alltech容器内に移動し、PBS緩衝液(pH7.4)中の0.05%NaN₃、0.1%Tween20及び0.1%BSAからなるブロッキング溶液で、1時間、25 で360°回転装置上でプレインキュベーションした。別に、ブロッキング溶液中に希釈した50nMのヒトPSA(遊離PSA、Scrips研究所#P0725)の3mLを、L-アジドリジン-変性アンカーリガンドピオチン-(PEG)₅-シクロ(CVFAHNYDYLV)-Az4(ピオチン-(PEG)₅-シクロ(配列番号1)-Az4; PEG=5xポリエチレングリコール、Az4=L-アジドリジン)(Wu2000)と、2時間、25 で360°回転装置上でプレインキュベーションした。前記アンカーリガンドを、前記タンパク質の2000倍過剰量で供給した。前記OBOLライブラリーから前記ブロッキング溶液を捨てた後、前記50nM遊離PSA及びアンカーリガンドのプレインキュベーション溶液を前記ライブラリーに添加し、4時間25 で360°回転装置上でインキュベーションした(図1)。スクリーニング物を3x5mLのブロッキング溶液で洗浄し、及び3mLの0.1µg/mLの抗-ヒトPSAマウスモノクローナル抗体(PS6、Abcam)を添加した。25 での1時間インキュベーション後、前記スクリーニング物を5x3mLのブロッキング溶液で洗浄した。次に、PSAの検出のためのPS6モノクローナル抗体とペアを作る捕捉剤バイリガンド選択のために、3mLの1:25000抗-マウスIgG AP-結合抗体(#7056、Cell Signaling)を前記スクリーニング物に提示して1時間25 でインキュベーションした。非特異的結合タンパク質を除去するために、前記スクリーニング物を5x3mLのブロッキング溶液、5x3mLの洗浄1緩衝液(25mM Tris-Cl、10mM MgCl₂、700mMのNaCl、pH7.5)で洗浄し、続いて5x3mLの洗浄2緩衝液(25mM Tris-Cl、pH7.5)で洗浄し、真空で吸引除去した。BCIP:NBT(Promega#S3771)、新たに調製したアルカリフォスファターゼ緩衝液(100mM Tris-HCl[pH9.0]、150mM NaCl、1mM MgCl₂)が、前記スクリーニング物を現像するために使用した。最も強く着色した紫色ビーズ(「イニシャルヒット」)を手動で選択した。選択されたビーズを、7.5Mグアニン塩酸(pH2.0)で脱色して、結合タンパク質及び抗体を除去し、続いてNMPで処理した。

20

30

40

【0057】

次に、選択されたビーズとブロッキング溶液でプレインキュベートしてスクリーニング

50

の第2段階のために準備した。前記選択されたビーズからブロッキング溶液を捨ててから、3 mLの1:1000 AP-結合ストレプトアビジン (Promega) と45分間25 でインキュベートした。AP-結合ストレプトアビジンはビオチンラベルを含むビーズを識別し、それによりPSA-テンプレートインシチュクリックバイリグンド共役の生成物を識別した。非特異的結合タンパク質を除去するために、前記スクリーニング物を5 x 3 mLブロッキング溶液、5 x 3 mL洗浄1緩衝液、次いで5 x 3 mL洗浄2緩衝液で洗浄し、真空吸引除去した。アルカリフォスファターゼ緩衝液中で新たに調製したBCIP:NBTを前記スクリーニング物を現像するために使用した。最も強く着色したビーズ(「プロダクトヒット」)を手動で選択した。選択されたビーズは、7.5 Mグアニジン塩酸 (pH 2.0) で脱色して結合タンパク質を除去した。脱色の後NMPで処理した。イニシアルスクリーニング及びプロダクトスクリーニング両方の後、抗-スクリーニングを別々に実施して、スクリーニング物を可視化するために使用される試薬への非特異的結合を示したビーズを除去した。この際調節に続いて、オーセンティックヒットの配列決定を、MALDI-TOF/TOF及び半自動アルゴリズムを用いて行った (Lee 2010)。

10

【0058】

前記インシチュクリック化学スクリーニングの際に形成されるバイリグンドのトリアゾールの異性体 (1、4-対1、5-) を決定するために、1、4-及び1、5-置換-1、2、3-トリアゾールを含むバイリグンドをそれぞれ合成した (実施例2)。生物アッセイを、より高い親和性及び選択性を持つバイリグンドを決定するために実施した (実施例3から9)。質量スペクトル分析 (例えば、MALDI-TOF/TOF、LC/MSなど) をさらに、好ましいトリアゾール置換体を確認するために行った。

20

【0059】

インシチュクリックスクリーニングによる捕捉剤トリリグンドの選択

スクリーニングのために、N末端にD-プロパルギルグリシンで結合されたOBCライブラリーの200 mg部分を、8-mL容量Alitech容器内に移動し、PBS緩衝液 (pH 7.4) 中の0.05% NaN₃、0.1% Tween 20及び0.1% BSAからなるブロッキング溶液で、1時間、25 で360°回転装置上でプレインキュベーションした。別に、ブロッキング溶液で希釈された10 nM遊離PSAの3 mLを、L-アジドリジン-変性捕捉剤バイリグンドビオチン-(PEG)₅-シクロTz (1、5)-G11ffk-Az4 [ビオチン-(PEG)₅-シクロ(配列1)-Tz (1、5)-配列2-Az4; Tz (1、5) = 二置換1、2、3-トリアゾール] と、2時間25 で、360°回転装置上でプレインキュベートした。捕捉剤バイリグンドは、タンパク質の5000倍過剰で供給された。OBCライブラリーからブロッキング溶液を除去した後、前記10 nM遊離PSAと捕捉剤バイリグンドとのプレインキュベーション溶液をライブラリー樹脂へ添加して、4時間25°で360°回転装置上でインキュベートした。抗-ヒトPSAマウスモノクローナル抗体 (PS6) と抗-マウスIgGAP-抗体でブロッキングして、記載されたようにイニシアルヒットが選択された。記載差されたように、AP-結合ストレプトアビジンで第2回スクリーニングが実施された。抗-スクリーニングもまた別々に実施された。これらの調節に続いて、オーセンティックヒットの配列決定を、MALDI-TO/TOF及び半自動アルゴリズムを用いて行った (Lee 2000)。

30

40

【0060】

インシチュクリック化学で形成されるトリアゾールの異性体 (1、4-対1、5-) の決定のために、1、4-置換-1、2、3-トリアゾールを含むトリリグンドをそれぞれ合成した (実施例2参照)。生物アッセイを実施して、より高い親和性と選択性を持つトリリグンドを決定した (実施例3から9)。質量スペクトル分析 (例えば、MALDI-TOF/TOF、LC/MSなど) がさらに、好ましいトリアゾール置換を確認するために実施された。

【0061】

50

アンカーリガンド、バイリガンド及びトリリガンド、ビオチン - (P E G)₅ - シクロ (C V F A H N Y D Y L V C) - T z (1 , 5) - G l l f f k - T z (1 , 5) - r r i v k、(ビオチン - (P E G)₅ - シクロ (配列 1) - T z (1 , 5) - 配列 2 - T z (1 , 5) - 配列 3、の構造は図 3 に示される。

【 0 0 6 2 】

単一ビーズからペプチドの C N B r 開裂

単一ビーズを純粋を含むマイクロ遠心チューブに移した (1 0 μ l)。C N B r (0 . 2 N の H C l 溶液中の 0 . 5 0 M、1 0 μ l) 添加後、反応容器をアルゴンで 1 5 分間パージして、1 分間電子レンジ内に置く (L e e 2 0 0 0)。さらに 2 5 分間アルゴンでパージして、得られる溶液を、1 0 分間 4 5 ° C、次いで 6 0 ° C で 5 0 分間遠心真空下して濃縮した。

10

【 0 0 6 3 】

単一ビーズから開裂したペプチドの M A L D I - M S 及び M S / M S 分析

それぞれのチューブに、- シアノ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸 C H C A を添加した (1 0 μ l、アセトニトリル / 水 (7 0 : 3 0) 中の 0 . 5 % マトリクス溶液)、及びアセトニトリル / 水 (1 0 μ l、0 . 1 % トリフルオロ酢酸 (体積 / 体積) 含有 7 0 : 3 0)。前記混合溶液の 2 μ l を取り出して、3 8 4 ウェル M A L D I プレート上にスポットし、これを自然乾燥させるために約 1 5 分間放置した。

【 0 0 6 4 】

実施例 2 : P S A 捕捉剤トリリガンドの大量合成 :

前記インシチュクリック化学手順から前記 P S A トリリガンドを選択した後、さらなる生体評価のために材料の大量合成が必要である。まとめると、前記それぞれのペプチドリガンド (図 4) は、A A P T E C T i t a n 3 5 7 合成装置で、F m o c 系固相ペプチド合成を用いて 2 - クロロトリチル塩化物 (C T C) 樹脂上で製造された。それぞれのアミノ酸カップリング反応は、4 当量の F m o c - アミノ酸、3 . 9 当量の H B T U (O - ベンゾチトリアゾール - N、N、N'、N' - テトラメチル - ウロニウム - ヘキサフロロ - フォソフェート) 及び 1 0 当量の D I E A を取り込んだ。F m o c 基の脱保護基には 2 0 % ピペリジン / N M P を要した。ビオチン、P E G - 鎖 (n = 5) 及び 1、5 - トリアゾールリンカーは、樹枝上の前記ペプチド断片の手動でカップリングさせた。前記ペプチドは、側鎖保護基は変化させることなく、樹脂から開裂させ [ジクロロメタン / トリフロロエタノール / 酢酸 (7 : 3 : 1)]、望ましくない副反応や副生成物がなく、続くバイリガンド及びトリリガンドの効果的な合成を保証した。

20

30

【 0 0 6 5 】

図 5 に示されるように、H A T U / H O A t 条件下で前記ビオチン - P E G - P S A アンカーの C 末端カルボン酸の活性化は、第 2 リガンド (1、5 - T z - G l l f f k) の N 末端へカップリングさせることを可能にした。この反応からの粗生成物は図 6 に示される次のステップに移された。再び、P S A バイリガンドの C 末端の H A T U / H O A t 活性化が、第 3 リガンド (1、5 - T z - r r i v k) とのカップリングのために適用された。全体の側鎖脱保護基、ジスルフィド形成及び精製 (図 7) により、最終 P S A トリリガンドが得られ、さらなる評価し使用される。

40

【 0 0 6 6 】

1、5 - トリアゾールリンカーの製造は図 8 から 1 1 に記載される。

【 0 0 6 7 】

1、4 - トリアゾールリンカーの製造は図 1 2 に示される。

【 0 0 6 8 】

P S A トリリガンド合成の実験手順

ペプチドは、F m o c 化学を用いた標準固相メリフィールドペプチド合成により合成された。F m o c - L - アジゾリジン t - ブチルエステル及び B o c - D - P r a - O H を含む二置換 1、2、3 - トリアゾールリンカーが、上で説明したように、R u - 触媒アジド - アルキン環化付加反応 (R u A A C) で合成された。

50

【0069】

PSA捕捉剤トリアゾール断片の合成。

【0070】

側鎖保護アンカーリガンド、第2リガンド及び第3リガンド(図3)は、AAPPTEC Titan 357合成装置で、Fmoc系固相ペプチド合成(SPPS)を用いて合成された。それぞれのカップリング反応では、4当量のFmoc-アミノ酸、3.9当量のHBTU(O-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチル-ウロニウム-ヘキサフルオロ-フォスフェート)、及び10当量のDIEAが取り込まれた。ピオチン、PEG-鎖(n=5)及び1、5-トリアゾールリンカーは、前記ペプチド断片に手でカップリングさせた。

10

【0071】

試薬(略語)

Fmoc = フルオレン-9-イルメトキシカルボニル、Pbf = ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル、Trt = トリチル、tBu = tert-ブチル、Boc = tert-ブチルオキシカルボニル、Bn = ベンジル、HATU = (2-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルアンモニウムヘキサフルオロフォスフェート(AK Scientific; Union City, CA)、HOAt = (7-アザ-1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)(AK Scientific; Union City, CA)、DMF = ジメチルホルミアミド、DIEA = N,N'-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)、TFA = トリフルオロ酢酸、TES = トリエチルシラン。全ての溶媒及び試薬は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)から購入した。

20

【0072】

側鎖保護PSATz5-バイリガンドの合成(図5)：

0の氷冷浴中で冷却されたDMF中のピオチン-PRG₅-(保護)PSAアンカーの20mM溶液中に、1当量のO-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフェート(HATU)をDMF中の0.4M溶液として添加し、続いて1当量のジイソプロピルエチルアミン(DIEA)をDMF中0.4M溶液として添加した。DMF中のFmoc保護第2リガンドの20mM溶液を調製し、これを前記反応混合物中に滴下した。反応物を室温で16時間撹拌した。カップリングしたバイリガンドをH₂Oでチューブ内に沈殿させ、遠心分離した。上澄みを除去し、残る白色固体を乾燥し、そのまま次にステップで使用した。

30

【0073】

側鎖保護PSATz5-トリリガンドの合成(図6)：

0の氷冷浴で冷却されたDMF中のピオチン-PEG₅-(保護)PSAバイリガンドの20mM溶液に、1当量のHATUをDMF中の0.4M溶液として添加し、次に1当量のHOAtをDMF中の0.4M溶液として添加し、次いで1当量のDIEAをDMF中0.4Mの溶液として添加した。DMF中のFmoc保護第3リガンドの20mM溶液を調整し、これを前記反応混合物中に滴下した。反応物を16時間室温で撹拌した。カップリングしたトリリガンドはチューブ内でH₂Oで沈殿させ、遠心分離した。上澄みを捨て残る白色固体を乾燥しそのまま次にステップで使用した。

40

【0074】

側鎖脱保護及びPSATz5-トリリガンドへのジスルフィド環化反応(図7)。

【0075】

側鎖保護トリリガンドの粗生成物を、トリフルオロ酢酸/H₂O/トリエチルシラン(94:3:3)中に溶解し、室温で3時間撹拌した。溶媒を真空で除去した。脱保護基されたトリリガンドはエーテルを添加して沈殿させた。遠心分離して上澄みを除去後、残る白色固体を乾燥し、次のステップに使用した。

【0076】

脱保護基トリリガンドを最小量のDMSOに溶解し、これに、EtOH/H₂O(4:

50

1) 中の銅 (II) フェナンスロリン [Cu(phen)₃] を添加した。反応混合物を室温で 24 時間攪拌し、次いで、C18 カラムを用いて、120 分で 25 から 40 % への B の直線勾配 (ここで A は H₂O + 0.1 % TFA で B は ACN + 0.1 % TFA) を用いて半 - 分取 HPLC 精製を行った。

【0077】

1、5 - トリアゾールリンカーの合成

Boc - (D) - プロパルギルグリシンベンジルエステルの合成 (図 8)。

【0078】

ジクロロメタン (28.0 mL) 中の Boc - (D) - プロパルギルグリシン (2.13 g、10.0 mmol) 溶液を氷冷浴で 0 °C の冷却した。この溶液に、1 - エチル - 3 - [3 - ジメチルアミノプロピル] カルボジイミド塩酸 [EDAC] (2.25 g、1.14 mmol) を添加し、次いで、ベンジルアルコール (2.9 mL、19.3 mmol)、次にジメチルアミノピリジン (125 mg、1.0 mmol) を添加した。反応混合物を攪拌し、氷冷浴を室温まで戻した。3 時間後、TLC (DCM 中 5 % MeOH、ニンヒドリン染色) にて、Boc - (D) - プロパルギルグリシン出発物質がないことが示された。反応物を H₂O (10 mL) 及びジクロロメタン (10 mL) で希釈した。有機層を分離し、飽和炭酸ナトリウム水溶液で洗浄し (2 x 10 mL) その後塩水で洗浄した (10 mL)。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した後濃縮した。フラッシュクロマトグラフ (9 : 1 後 3 : 1 の Hex / EtOAc) で望ましいベンジルエステル生成物 1.9 g (6.3 mmol、63 % 収率) を油状物として得た。

10

20

【0079】

Fmoc - (L) - アジドリジン t - ブチルエステルの合成 (図 9)。

【0080】

Fmoc - (L) - アジドリジン (2.23 mg、5.65 mmol) をジクロロメタン (28 mL) に溶解した。この溶液に、4 Å モレキュラーシーブを添加し、次に t - ブチル - 2, 2, 2 - トリクロロアセトイミデート (1.52 mL、8.49 mmol) を添加した。反応混合物を 50 °C に加熱し、20 分間攪拌し、次に追加の 1.52 mL (8.49 mmol) の t - ブチル - 2, 2, 2 - トリクロロアセトイミデートを添加した。反応物を 50 °C で 16 時間攪拌した。不均一溶液を 0 °C に冷却し、次にろ過して前記シーブと白色沈殿を除いた。冷却ジクロロメタンを用いて前記固体を洗浄した。得られた溶液を飽和炭酸水素ナトリウム及び塩水で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し濃縮した。フラッシュクロマトグラフ (2 % MeOH / DCM) により、望ましい t - ブチルエステル誘導体 1.21 g (2.69 mmol) を油状物として得た。

30

【0081】

1、5 - Tz リンカーのためのルテニウム - 触媒 - アジド / アルキン環化付加反応 (RuAAC) 手順 (図 10)。

【0082】

Boc - (D) - プロパルギルグリシンベンジルエステル (596 mg、1.96 mmol) を無水 1, 4 - ジオキサン (3 mL) にアルゴン雰囲気下で溶解した。この溶液に、クロロ (1, 5 - シクロオクタジエン) (ペンタメチル - シクロペンタジエニル) ルテニウム (II) [65 mg、0.17 mmol] を添加し、反応混合物が暗赤褐色に変化した。無水 1, 4 - ジオキサン (3 mL + 2 mL 洗浄) 中の Fmoc - Lys (N₃) - Ot - Bu (798 mg、1.77 mmol) を添加し、反応物を密閉した。前記赤褐色混合物を 65 °C のオイルバスで加熱し、16 時間攪拌した。(密閉容器中の溶液に加熱には注意する)。TLC (1 : 1 Hex / EtOAc) では、1, 5 - トリアゾールを示したが、アジド出発物はなかった。反応混合物を室温に冷却し、濃縮することで暗褐色粗生成物を得、これをすぐにフラッシュクロマトグラフ (1 : 1、Hex / EtOAc) で精製して、灰色がかった白色固体 (1.02 g、1.4 mmol、68 収率) を得た。

40

【0083】

ベンジルエスエル脱保護基 (図 11)。

50

【0084】

エタノール(6.9 mL)中に1、5-トリアゾールベンジルエステル(442 mg、0.586 mmol)の溶液に、10%パラジウム/炭素(580 mg、0.058 mmol)を添加し、次に1、4-シクロヘキサジエン(0.5 mL、5.3 mmol)を添加した。反応物を室温で16時間攪拌し、次にセライトパッドを用いてろ過した。濾液を濃縮し、得られた粗生成油状物をフラッシュクロマトグラフ(DCM中5% - 10% MeOH)で精製して灰色がかかった白色固体(350 mg、0.53 mmol、90%収率)を得た。

【0085】

1、4-Tzリンカーのための銅触媒アジド/アルキン環化付加反応(CuAAC)手順(図12):

Fmoc-(L)-Ot-Bu(950 mg、2.1 mmol)及びBoc-(D)-プロパルギルグリシン(451 mg、2.1 mmol)を9:1のDMG/H₂O混合物(7 mL)に溶解した。ヨウ化銅(I)(42 mg、0.22 mmol)を添加し、次にジイソプロピルエチルアミン(36 µL、0.22 mmol)を添加した。アスコルビン酸ナトリウム(87 mg、0.44 mmol)をH₂O(0.5 mL)に溶解し、この水溶液を反応混合物に添加した。反応物を16時間攪拌した。TLC(DCM中10% MeOH)で、1、4-トリアゾール生成物を確認し、プロパルギルグリシン出発物は残っていないことが示された。反応混合物をEtOAc(35 mL)及び飽和NaHCO₃水溶液で希釈した。水層をEtOAcで抽出した(3 x 10 mL)。有機層をまとめて、0.1 Mクエン酸アンモニウム(20 mL)で洗浄し、次に塩水(10 mL)で洗浄し、MgSO₄で乾燥して濃縮し、油状固体を得た。フラッシュクロマトグラフによる精製(DCM中10% MeOH 5% - 10%)で、白色残渣を得た(1.3 g、1.9 mmol、93%収率)。

【0086】

実施例3: 合成PSA捕捉剤と、市販PSA抗体との比較(ELISA):

材料と方法。

MAXISORP(商標)マイクロタイタープレートを、pH7.4でPBS中10 µg/mLでの抗-ヒトPSA(PS6、Abeam)で2時間コーティングした。それぞれのマイクロウェルをPBSで洗浄後(3x)、TBS(25 mM Tris、150 mM NaCl、pH7.25)中5%脱脂乾燥乳で前記プレートを充填し、2時間室温でブロッキングした。TBS中1%BSAで連続希釈した遊離PSA(Scripps Laboratories #P0725)を、室温で2時間、前記マイクロタイタープレート全体でインキュベートした。前記プレートをTBS中1%BSAで洗浄し(5x)、次にTBS中1%BSA+0.1%DMSO(体積/体積)中の2 µMビオチン化捕捉剤で室温1時間インキュベートした。全てのマイクロウェルをTBS中1%BSAで洗浄(5x)した後、TBS中1%BSAの0.1 µg/mLのストレプトアビジンPoly-HRP共役(Pierce、IL)でインキュベートした。前記プレートをTBS中1%BSAで洗浄(10x)後、さらにTBSで洗浄し(2x)、次いで、QuantaRed(商標)強化化学発光HRP基質(Pierce、IL)を添加することで発色させた。励起波長535 nmを用いて、595 nmでの蛍光発光を、Beckman Coulter DTX880分光光度計(Brea、CA)で、ターゲット濃度の関数として記録した。滴定曲線を、4パラメータ回帰曲線フィッティングプログラム(Origin 8.5、Northampton、MA)を用いてフィッティングした。アッセイは3回繰り返した。

【0087】

結果と議論

この結果は、合成PSA捕捉剤は、サンドイッチELISAを用いる市販の抗体と比較する際に検出抗体として使用され得ることを示す。好適な捕捉抗体(例えば抗-ヒトPSA(PS6))とのペアの場合、前記アッセイは、10から200 ng/mLの範囲にわた

10

20

30

40

50

り直線性を持つ(図13)。前記PSA捕捉剤トリリガンドは、4 ng/mL遊離PSAのカットオフ濃度の範囲で定量限界(LOQ)を示したが、これは研究用モノクローナル抗体(抗-ヒトPSA(PS1)、Abeam)と類似する(図14)。LOQ又は最小の統計的に信頼性のある定量的測定は、前記アッセイシステムの感度、精度(変動)及びノイズレベルに依存する(～2.5 ng/mL)。捕捉剤トリリガンドとバイリガンドについてアッセイ間変動(%CV)は、前記研究用モノクローナル抗体と類似しており、これは遊離PSAの3 ng/mLの濃度になる。前記PSA捕捉剤トリリガンドは、前記PSA捕捉剤バイリガンドよりも感度が強化(2倍を超える)されているが；このことは、前記タンパク質ターゲットが触媒であるインシチュクリック選択プロセスにおいてより高い特異性から予測されることである。このPSA捕捉剤ELISAの分析性能特性は、この合成PSA捕捉剤が、ヒト血清中のPSA検出において臨床的に有用である、ということを示唆した。

10

【0088】

実施例4：合成PSA捕捉剤と市販PSA抗体との比較(ドットプロット)：

材料と方法。

pH7.4PBS中で連続希釈された遊離PSA(Scripps Laboratories #P0725)をマイクロピペットによりニトロセルロース膜へ適用された。前記膜を、TBS(25mM Tris、150mM NaCl、pH7.25)中の5%脱脂乾燥乳で42時間ブロックした。前記膜をTBSで洗浄した(3x)。ビオチン化PSA捕捉剤を、TBS+0.03%DMSO(体積/体積)中0.5%乳の0.1 μLで調製して、前記膜上で4で一晚インキュベートした。TBSで洗浄(3x)後、前記膜をさらに、0.02%Tween20(体積/体積)を含むTBS中の0.1 μg/mLHRP-共役ストレプトアビジン(Abeam)で4で30分間処理した。0.02%Tween20(体積/体積)を含むTBSで洗浄(5x)後、TBSで洗浄(2x)して、前記膜を、SuperSignal West Picoの化学発光強化及び基質溶液(Pierce、IL)で発色させ、次いで直にHyBlot CLARFILMに暴露した。

20

【0089】

結果と議論

PSA捕捉剤は、遊離PSAの2.2 μgから0.14 μgの範囲で検出された。PSA捕捉剤は、アンカーリガンドから、バイリガンド、トリリガンドへと親和性増加を示し、PSA捕捉剤トリリガンドについては、0.14 μgの遊離PSAの検出下限であった。前記PSA捕捉剤トリリガンドは、抗-ヒトPSAモノクローナル抗体(PS1)よりも優れた性能を示し、市販PSAモノクローナル抗体(PS2、PS6)よりも低感度であった。前記PSA捕捉剤とモノクローナル抗体アッセイとの間の強度の差は、ビオチン化(1ビオチン/捕捉剤対10ビオチン/モノクローナル抗体(平均して))での差によると考えられる。

30

【0090】

PSA捕捉剤の位置異性体(PSA捕捉剤1、4Tz-バイリガンド及びPSA捕捉剤1、5Tz-バイリガンド)は、PSA捕捉剤1、5Tz-バイリガンドが、PSA捕捉剤1、4Tz-バイリガンドに比較して、改善された検出限界を持つことを示した。

40

【0091】

実施例5：ブルダウンアッセイ及びウェスタンプロット：

概要

ブルダウンアッセイは、緩衝液又はヒト血清溶液中の前記タンパク質に結合した複合媒体から1つのタンパク質を精製する能力を測定することでPSA捕捉剤の特異性を評価した。前記PSA捕捉剤複合体は次いで、固相親和性樹脂で前記サンプルから物理的に分離された。前記捕捉されたサンプルを、ウェスタンプロット分析のためにSDS-PAGEで分離した。

【0092】

50

材料と方法

P S A のプルダウン検出は、抗体の代わりに P S A 捕捉剤を取り込んだ免疫沈降技術を修正したものをを用いた。最初に、ビオチン化 P S A 捕捉剤 (0 . 3 - 0 . 5 μ g / m L) を、T B S 中の 2 5 % ヒト A B 雄血清 (# H S - 2 0 、 O m e g a S c i e n t i f i c 、 T a r z a n a 、 C A) の 2 m L と 4 でインキュベートとした。別に、ビオチン化 P S A 捕捉剤 (0 . 3 - 0 . 5 μ g / m L) を、遊離 P S A 1 μ g 含む T B S 中の 2 5 % ヒト A B 雄血清 (# H S - 2 0 、 O m e g a S c i e n t i f i c 、 T a r z a n a 、 C A) の 2 m L と 4 でインキュベートとした。ビオチン化 P S A 捕捉剤 (0 . 3 - 0 . 5 μ g / m L) と 2 m L T B S 中に 1 μ g の遊離 P S A を含む第 3 のサンプルを同様に 4 で一晩インキュベートした。

10

【 0 0 9 3 】

タンパク質は、B S A - ブロック化ダイナビーズ (登録商標) M - 2 8 0 ストレプトアビジン (I n v i t r o g e n 、 # 1 1 2 - 0 5 D) により、4 4 時間回転させて捕捉させた (プルダウン条件ごとに 5 0 μ L の 5 0 % スラリー) 。タンパク質をビーズから L a e m m l i 緩衝液により溶出させ、ビーズを D y n a M a g (商標) - S p i n m a g n e t (I n v i t r o g e n 、 # 1 2 3 - 2 0 D) により血清又は緩衝液から分離した。サンプルを、4 - 2 0 % S D S - P A G E 分離で処理し、1 0 0 V で 4 5 分間電気泳動的に、2 0 % (体積 / 体積) メタノールを含む、2 5 m M T r i s 、 1 9 2 m M グリシン、p H 8 . 3 中のニトロセルロース膜に移動させた。移動の後、ニトロセルロース膜を、T B S 中 5 % 脱脂乾燥乳中の 4 で 2 時間ブロックした。前記膜を T B S (3 x) で洗浄し、T B S 中 0 . 5 % 脱脂乾燥乳の 0 . 4 μ g / m L ビオチン化ヤギ抗 - ヒトカリクレイン 3 / P S A 抗体 (R & D S y s t e m s 、 M N) と 4 で一晩インキュベートする。T B S 含有 0 . 0 2 % T w e e n 2 0 (体積 / 体積) で洗浄後 (5 x) 、T B S 中 0 . 5 % 脱脂乾燥乳中のヤギ I g G (H + L) (A b e a m) への、0 . 2 μ g / m L H R P - 共役ロバポリクローナル第 2 抗体を前記膜に添加する (4 で 1 時間インキュベート) 。0 . 0 2 % T w e e n 2 0 (体積 / 体積) を含む T B S で洗浄 (5 x) 後、T B S で洗浄し (2 x) 、前記膜を S u p e r S i g n a l W e s t P i c o 化学発光強化及び基質溶液 (P i e r c e 、 I L) で発色させ、次いで直に H y B l o t C L A R フィルムに暴露した。

20

【 0 0 9 4 】

別に、二重の 4 - 2 0 % ゲルを、全タンパク質含有量のために銀染色で可視化 (B i o - R a d L a b o r a t o r i e s 、 H e r c u l e s 、 C A) して、ウェスタンプロット結果との比較において P S A 捕捉剤の特異性を評価した。

30

【 0 0 9 5 】

結果と議論

P S A 捕捉剤トリリガンドは緩衝液中に遊離 P S A を検出した (図 1 6) 。前記 P S A 捕捉剤配列 / 構造への追加の変性は、ヒト血清からの高い特異的なプルダウンに寄与するものと予想される。

【 0 0 9 6 】

実施例 6 : 血清安定性 :

概要

タンパク質文化への安定性は、インビボ用途でのペプチドの使用及び血清タンパク質診断の重要な要素のひとつである。大抵の天然ペプチドは酵素分解を防止するために変性される必要がある。D - アミノ酸、非天然アミノ酸及び環化の使用を含むいくつかの研究が捕捉剤安定性を完全するために使用されている。

40

【 0 0 9 7 】

材料と方法

安定性は、8 0 0 μ L の全体積中の 2 5 % (体積 / 体積) ヒト A B 血清 (H S - 2 0 、 O m e g a S c i e n t i f i c 、 T a r z a n a 、 C A) を含む T B S 中の 2 0 0 μ g 捕捉剤を混合することで研究された (例えば P a k k a l a 2 0 0 7 参照) 。ペ

50

プチドは、37 でインキュベートされ、及び100 µL部分が時間 = 0分、30分後、及びその後は最大4時間までの1時間毎に取り出された。最終部は24時間後であった。前記ペプチドは、血清タンパク質から、Microcon遠心ろ過フィルタ装置 (Microcon YM-10、MWCO = 10 kDa、Millipore、Bedford、MA) で、Beckman Coulter冷却ミクロ遠心 (Brea、CA) により12000 rpmで20分間遠心して分離された。ろ過物を分析用HPLC (C18カラムで、0から50% Bの勾配で30分間溶出。A = H₂O + 0.1% TFA及びB = ACN + 0.1% TFA) で試験され、次いで、Bruker Ultraflex Xtreme MALDI質量分析スペクトル装置で分析された。

【0098】

2つのコントロールアッセイが並行して実施され、上と同じ条件で行われた：(1) TBS中及び(2) 25% (体積/体積) ヒトAB雄血清を含むTBSでの捕捉剤。

【0099】

結果と議論

ヒト血清と4時間37でのインキュベーション後、前記PSA捕捉剤トリリガンドは変化なしであった。24時間後、HPLCではなんらの断片も観察されなかった(図17)。このデータは、前記PSA捕捉剤トリリガンドは、ヒト血清中では生理的温度及び緩衝液では24時間を超えてタンパク質分解に対して安定であることを示唆する。この結果は、環化は、(天然) - L - アミノ酸を含む配列部分にタンパク質分解に対して抵抗性を改善する方法であり、及びD - アミノ酸及び非天然アミノ酸は本来的に安定な要素であることを示す。配列を変化させることのない、この方法はインビボ研究のためのペプチド設計のために有用となり得る。

【0100】

実施例7：合成PSA捕捉剤の長期安定性：

合成PSA捕捉剤の長期安定性は、凍結乾燥粉末として捕捉剤を、空气中で室温と-80で、3ヶ月間保存することで評価された。一部分を周期的に取り出し、分析用HPLC (C18カラムで、0から50% Bの勾配を用いた。ここでA = H₂O + 0.1% TFA、B = ACN + 0.1% TFAである) で分析し、次いで、Bruker Ultraflex Xtreme MALDI質量分析スペクトルで分析した。HPLC分析は、捕捉剤トリリガンドは、保存温度によらず凍結乾燥粉末として6週間を超えて安定であることを示した(図18)。

【0101】

実施例8：活性アッセイ：

材料と方法

遊離PSAの酵素安定性は、捕捉剤とキモトリプシン基質Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (AnaSpec、San Jose、CA) (例えば、Wu 2000参照) の存在下研究された。PSA (333 nM) を、1-100倍過剰モルのTBS (25 mM Tris、150 mMのNaCl) 緩衝液中捕捉剤と、pH 7.8で1時間23でインキュベートした。別に、PSAの酵素活性へのZn²⁺の阻害効果が、コントロールとして前記反応緩衝液中に1-200 µM ZnCl₂を含ませることで研究された。最終濃度0.14 mMとなる基質の添加後、吸光度をBeckman Coulter DTX 880 分光光度計 (Brea、CA) で、5分間隔で80分間405 nmでモニターした。PSAの酵素活性は、本来の活性を測定するためにZn及び捕捉剤の不在下で試験された。全てのアッセイは3回繰り返した。

【0102】

結果と議論

PSAの酵素活性は、PSA捕捉剤により強化され、発色基質に対して約3倍のPSA活性を刺激した。この効果は、捕捉剤の濃度に依存し、及び半最大刺激はマイクロモルの濃度範囲で検出された。活性に影響を与える最小ペプチド濃度は、アンカーリガンドで0.250 µM (図19A)、及び捕捉剤バイリガンドで0.159 µM (図19B)の間を変

10

20

30

40

50

動した。示唆されたことは、アンカーリガンドは活性サイトの近くで結合し、前記活性サイトの立体構造を変化させて、前記合成基質よりもより近づきやすい触媒ポケットを形成し得る、ということである (Wu 2000)。本発明で識別された捕捉剤が、また、天然基質に対して P S A の活性を増加する場合、これらは、前立腺病理学及び生理学において P S A の生体内役割を研究するために有用であり得るものである。興味あることに、これらのいずれのペプチドも酵素活性を阻害しなかったことである。Zn²⁺ は、これに比べて P S A の酵素活性の阻害を示し、比較のために図 19 C に示される挙動に寄与する。

【0103】

実施例 9：スキッチャードプロット：

概要

スキッチャード分析は、捕捉剤について平衡解離定数 (k_D) を決定するために実施された。

【0104】

材料と方法

MAXISORP (商標) マイクロタイタープレートを、P B S pH 7.4 中の 2 μg / mL 遊離 P S A (Scripps Laboratories # P 0 7 2 5) で室温で 2 時コーティングした。それぞれのウェルを P B S で洗浄 (x 3) 後、プレートを、T B S (25 mM Tris、1.50 mM NaCl) 中 5% の脱脂乾燥乳で充填し、1 時間室温でブロックした。前記プレートを T B S 中の 1% B S A で洗浄し (5 x)、T B S + 0.1% DMSO (体積 / 体積) 中 1% B S A 内で連続希釈されたビオチン化捕捉剤を室温で 2 時間インキュベートした。T B S 中 1% B S A で全てのマイクロウェルを洗浄後、T B S 中 1% B S A 内の 0.1 μg / mL のストレプトアビジン Poly - HRP 共役 (Pierce、IL) でインキュベートした。前記プレートを吸引して、T B S 中 1% B S A で洗浄され (10 x)、次に T B S で洗浄し (2 x)、及びその後 Quant a Red (商標) 強化化学発光 HRP 基質 (Pierce、IL) で発色させた。励起波長 535 nm を用いて、595 nm の蛍光発光を、捕捉剤濃度の関数として、Beckman Coulter DTX 880 分光光度計 (Brea、CA) で記録した。アッセイは 3 回繰り返した。

【0105】

飽和結合データは、スキッチャード方法により、K_D を決定するために可視化された。結合ビオチン化捕捉剤は、1 : 1 ビオチン : ストレプトアビジンを仮定して、ストレプトアビジン Poly - HRP 共役の一連の滴定から評価された。

【0106】

実施例 10：マイクロPET / CT イメージング及び生体内分布分析：

DOTA - ラベル化 1、5 - Tz - パイリガンドは、64Cu でラベル化され、マウスに 100 μg I.V. 尾部注射により投与される。全身イメージングが、2 時間の動的スキャンを用いてマイクロPET、続いてマイクロCT イメージングで実施される。10 分間のマイクロPET スキャンはまた、4 及び 6 時間で実施され得る。種々の器官 (例えば腎臓、胆嚢、肝臓、脳及び血液) の間のラベル化捕捉剤の生体内分布が、クリアランス及び蓄積を評価するために分析され得る。

【0107】

実施例 11：MRM アッセイ：

多重反応モニター (MRM) は、質量スペクトル系アッセイであり、急速に開発されてきた高多重アッセイを可能にする。アッセイパラメータと質量スペクトル装置に依存して最大 100 のタンパク質アッセイが、単一の MRM サンプル分析で多重でなされ得る。数百のタンパク質アッセイが、サンプルの一部を取り出すことで単一の血液で実施され得る。

【0108】

P S A のための MRM アッセイが開発され得る。P S A 捕捉剤は、特定の P S A ペプチドを富化するために使用される 100 ナノリットル ナノアフィニティカラムに、同じ配列の

10

20

30

40

50

安定 - 同位体スパイクされたラベル化内部標準と共に固定化される。前記抗 - ペプチド P S A 捕捉剤支持体からの溶出の際に、質量スペクトルが、前記ペプチド（天然及びラベル化）を定量化するために使用される。

【0109】

通常は、アッセイごとに、4つのデータ点を与えるそれぞれのタンパク質について、2つのペプチドとペプチドごとの2つの遷移がモニターされる。合成ペプチドは、MRMのアッセイを開発し、それによりペプチドの保持時間をと遷移質量を決定するために使用され得る。タンパク質の数により（100を超える）、タンパク質アッセイは、別のMRM試験について2か3のバッチにグループ化され得る。

【0110】

MRMアッセイに含まれるPSAに加えて、他の癌又は前立腺疾患が、タンパク質パネルの一部分としてMRMアッセイに含まれ得る。これらのマーカーは、文献又は専用のデータベースから得られる。

【0111】

サンプル試験

それぞれのサンプルは、MRM試行のために2又は3の区分に分けられ得る。サンプルは、サンプル試験にわたり定量を標準化するためのペプチド標準物でスパイクされ得る。それぞれの集団からのサンプルは、臨床データ（性、年齢、収集位置など）に基づきマッチングされ、及びマッチングされたサンプルは、分析バイアスを最小化するためにMRMアッセイを連続的に実施する。タンパク質アッセイ測定は、それぞれのサンプル中のそれぞれのタンパク質について得られる。

【0112】

評価

それぞれのタンパク質について、統計学的試験（偽発見率調整片側検定ペア t - テストなど）が、あるスポットサイズ（例えば10mm）を超える癌性サンプルと非癌性サンプルとを識別するかどうかを決定するために使用される。統計的試験でのサンプルのペアリングは、上で記載されたサンプルのマッチングにより決定され得る。タンパク質ごとに4つのデータが存在することから、4つの点の少なくとも3つは、有意な統計的差を示す必要がある。

【0113】

タンパク質の具体的なパネルが、集合的に、あるスポットサイズ（例えば10mm）を超える癌性サンプルと非癌性サンプルとを識別する診断用パネルであることを検証するために、次に分析が実施され得る。前記パネルのタンパク質の全てのデータ点は、単一のタンパク質からのデータ点であり、ペア統計テストで試験されるものとして扱われる。このテストの偽発見率調整 p - 値が有意（例えば5%未満）であれば前記パネルは診断的として検証される。偽発見率は、全ての集団からのサンプルが反復的に無作為化されて偽発見率の評価を与える場合には順列テストを含む多くの方法を用いて評価され得る。

【0114】

上で説明したように、これまでの記載は本発明の種々の実施態様を説明するためのものである。従って、上で説明された具体的な変更などは本発明の範囲を限定するものではない。当業者に明らかなことは、種々の均等、変更、修正は、本発明の範囲から離れることなくなされるものであり、理解されるべきことは、かかる均等な実施態様もここで本発明に含まれる、ということである。ここで参照される全ての参照文献は、その全体が参照されてここに援用される。

【0115】

参照文献

1. Acevedo et al., Clin Chem Acta 317: 55 - 63 (2002)、
2. Agnew et al., Angew Chem Int Ed 48: 4944 ^ 1948 (2009)、

10

20

30

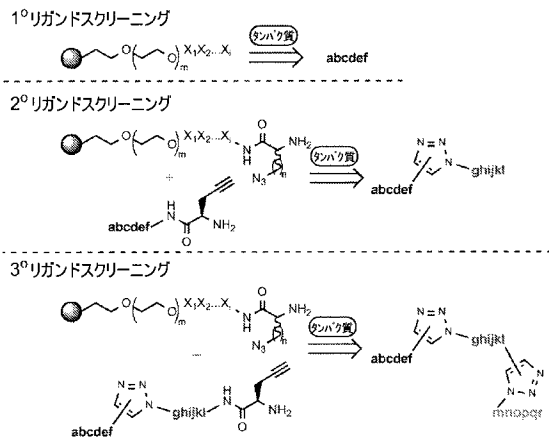
40

50

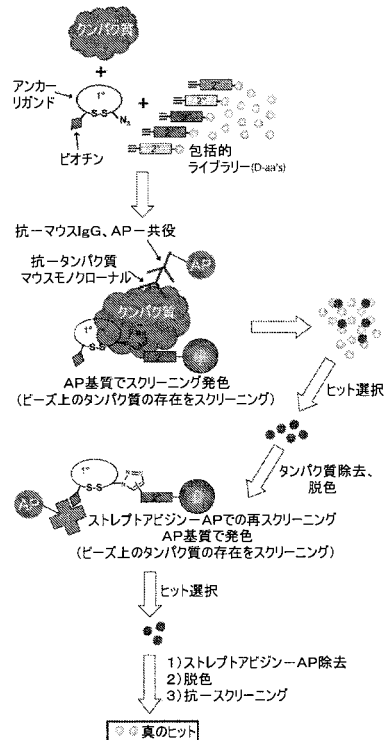
- 3. Boren et al., J Am Chem Soc 130:8923 - 8930 (2008)
- 4. Fields & Noble, Int J Pept Protein Res 35:161 - 214 (1990)
- 5. Jeong & Lee, J Microbiol Biotechnol 17:840 - 846 (2007)
- 6. Lee et al., J Comb Chem 10:807 (2008)
- 7. Lee et al., Anal Chem 82:672 - 679 (2010)
- 8. Pakkala et al., J Pept Sci 13:348 - 353 (2007)
- 9. Wu et al., Eur J Biochem 267:6212 - 6220 (2000)

10

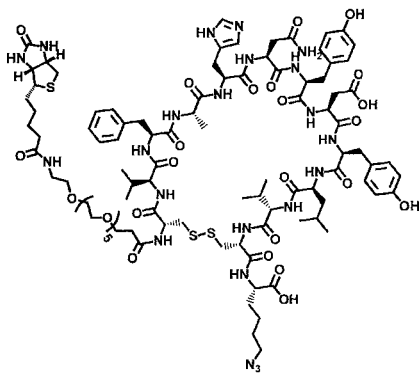
【 図 1 】



【 図 2 】

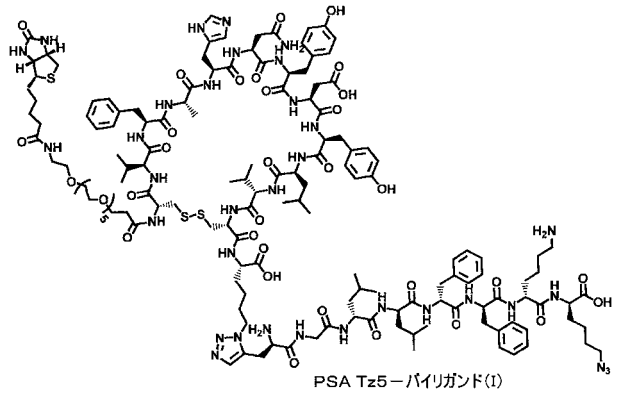


【 図 3 a 】



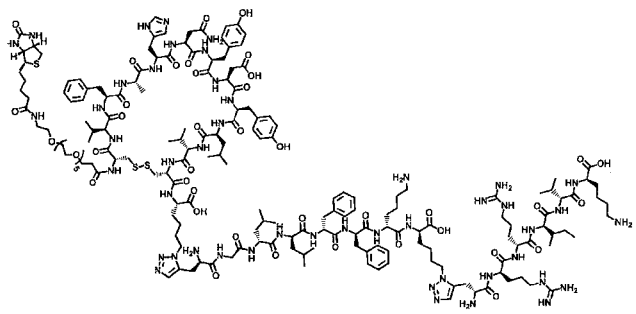
PSA アンカーリガンド(I)

【 図 3 b 】



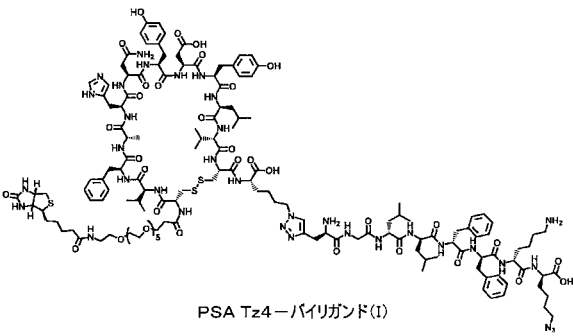
PSA Tz5-バイリガンド(I)

【 図 3 c 】



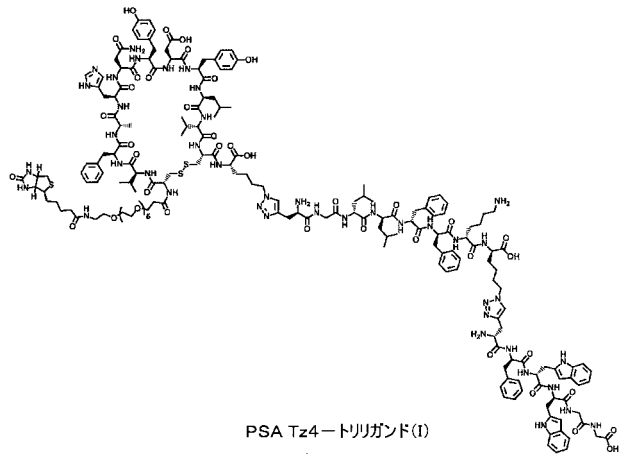
PSA Tz5-トリリガンド(I)

【 図 3 d 】



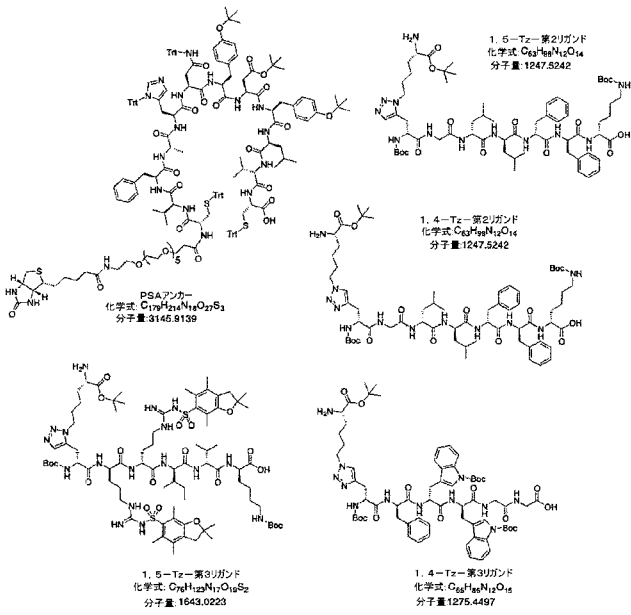
PSA Tz4-バイリガンド(I)

【 図 3 e 】

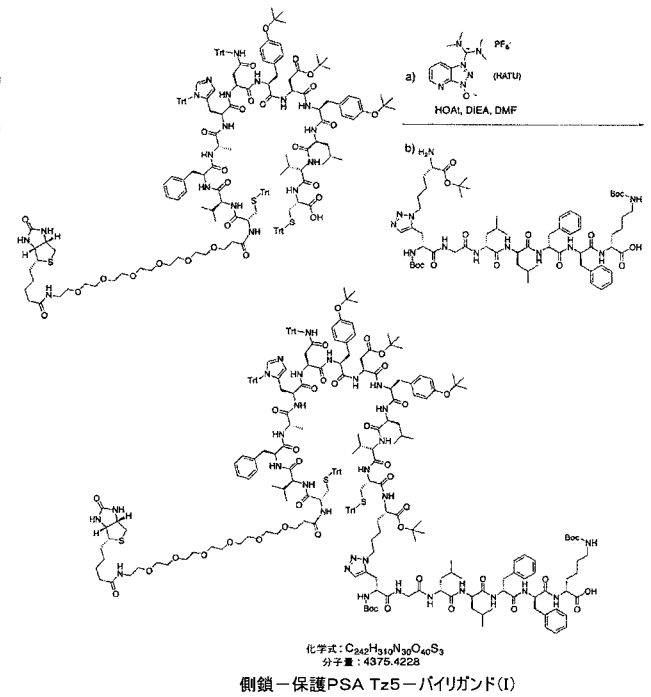


PSA Tz4-トリリガンド(I)

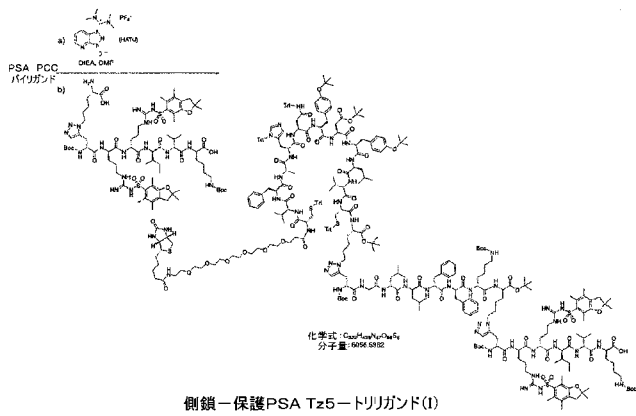
【 図 4 】



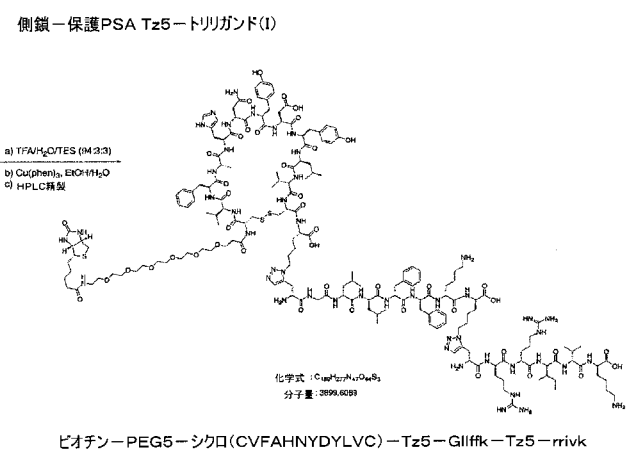
【 図 5 】



【 図 6 】

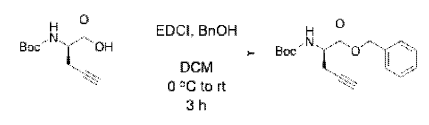


【 図 7 】



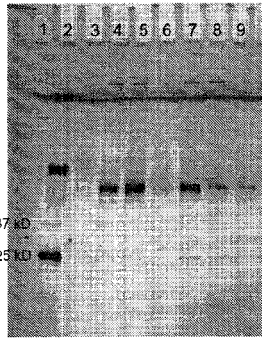
【 図 8 】

Figure 8



【 図 1 6 】

(a)

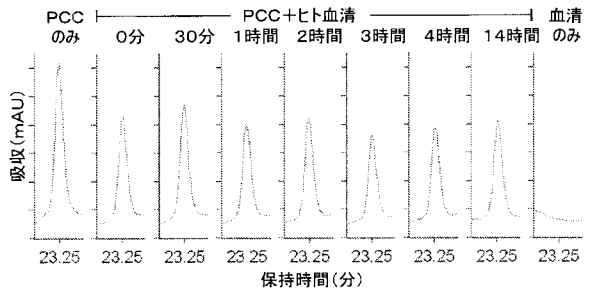


- 1) ブランク
- 2) MWラダー
- 3) ブランク
- 4) 50%ヒト血清中0 μg/mL PSA
- 5) 50%ヒト血清中1 μg/mL PSA
- 6) PBS緩衝液中1 μg/mL PSA
- バイオニル化PS2 mAbとのプルダウン
- 7) 50%ヒト血清中0 μg/mL PSA
- 8) 50%ヒト血清中1 μg/mL PSA
- 9) PBS緩衝液中1 μg/mL PSA
- バイオニル化PCCトリグランドとのプルダウン

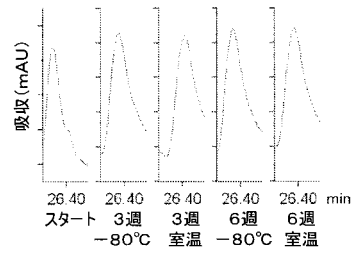
(b)



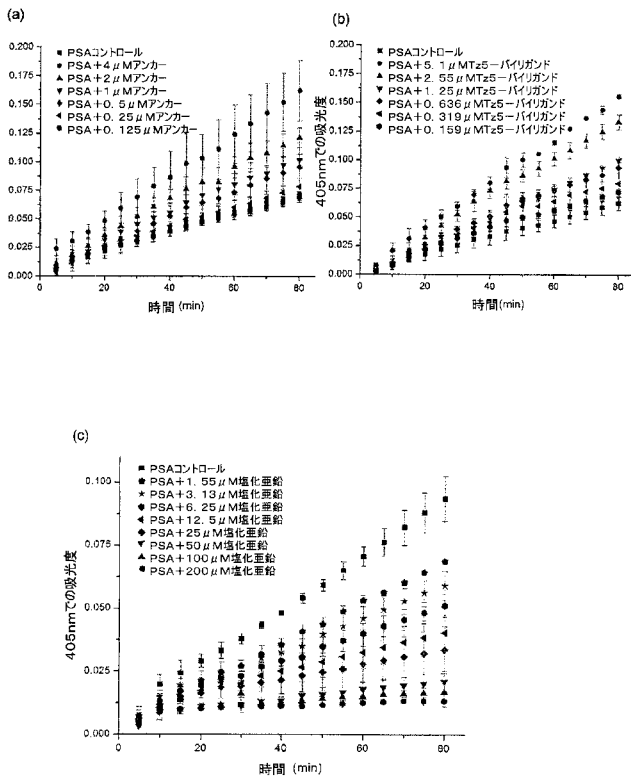
【 図 1 7 】



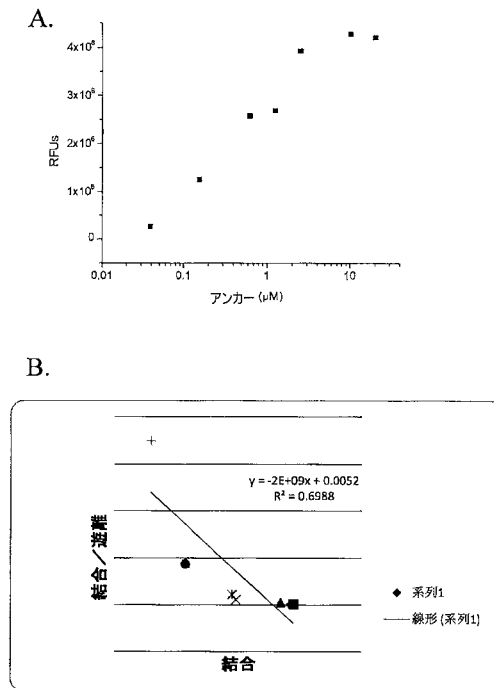
【 図 1 8 】



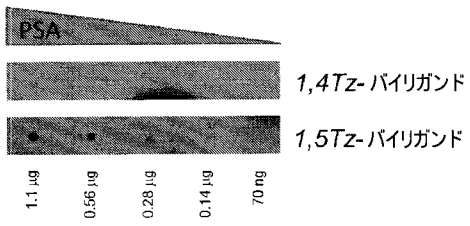
【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 配列表 】

2014506883000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

2012/023873-02-07-2012

International application No.

PCT/US 12/23873

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/10; A61K 38/00; A61P 35/00; A61K 38/12 (2012.01) USPC - 514/21.5 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) IPC(8): A61K 38/10; A61K 38/00; A61P 35/00; A61K 38/12 (2012.01) USPC: 514/21.5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8): A61K 38/10; A61K 38/00; A61P 35/00; A61K 38/12 (2012.01) USPC: 514/19.5, 317 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST;PGPB, USPT, EPAB, JPAB, GoogleScholar, Dialog prostate cancer, Prostate specific antigen (PSA), multi-ligand, biligand, triligand, CVFAHNYDYLVLC, GLLFFK, RRIVK, proteolytic digestion, stable, lyophilized powder, DOTA, biotin		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Agnew. RAPID CONSTRUCTION OF PROTEIN CAPTURE AGENTS WITH CHEMICALLY DESIGNED STABILITY AND ANTIBODY-LIKE RECOGNITION PROPERTIES. http://thesis.library.caltech.edu/5583/1/1/Thesis.pdf . (2010) Retrieved 2 May 2012 page 38. Fig. 2.4, page 65-68, page 89, page 111, Fig. 4.5, page 112-113	1, 3-5, 9-10, 12-13 and 18-20
Y		2, 6-8, 11 and 14-15
A		16-17
Y	Kodadek. Development of protein-detecting microarrays and related devices. Trends in Biochemical Sciences Vol 27. No. 6 June 2002 page 297, col 2	2 and 14-15
Y	US 2008/0312141 A1 (STENMAN et al.) 18 December 2008 (18.12.2008) para[0009], para[0115]	6-7 and 11
A		16-17
Y	Chen et al. microPET and Autoradiographic Imaging of GRP Receptor Expression with ⁶⁴ Cu-DOTA-[Lys3]Bombesin in Human Prostate Adenocarcinoma Xenografts. J Nud Med 2004; 45:1390-1397 Abstract	8
Y	Huhtinen et al. Immunoassay of total prostate-specific antigen using europium(III) nanoparticle labels and streptavidin-biotin technology. Journal of Immunological Methods Volume 294, November 2004, Abstract, Pages 111-122	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 2 May 2012 (02.05.2012)		Date of mailing of the international search report 02 JUL 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/553 (2006.01)		G 0 1 N 33/553	
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)		G 0 1 N 33/543	5 0 1 D
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, 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, R O, 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, H U, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72) 発明者 アニュー, ヒーサー, ダウン

アメリカ合衆国 9 0 2 3 0 カリフォルニア州, カルヴァーシティ, カンタベリー・ドライブ
5 9 0 1, ユニット # 3

(72) 発明者 ピットラム, シュアシュ, マーク

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラジヨラ, ヴィア・ソノマ 8 4 4 0 ユニッ
ト 7 5

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA26 AA40 CA25 CA26 CB01 CB02 CB03
CB04 CB07 CB08 CB26 DA36 FA20 FB01 FB02 FB03 FB13
FB15 GC15
4H045 AA10 AA20 BA01 BA05 BA09 BA13 BA14 BA16 BA32 BA41
EA51 FA50 FA51

专利名称(译)	PSA捕获剂，其组合物，方法和制造		
公开(公告)号	JP2014506883A	公开(公告)日	2014-03-20
申请号	JP2013552699	申请日	2012-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	印分子公司		
申请(专利权)人(译)	印地分子公司		
[标]发明人	アニューヒーサーダウン ピットラムシュアシュマーク		
发明人	アニュー,ヒーサー,ダウン ピットラム,シュアシュ,マーク		
IPC分类号	C07K7/54 C07K19/00 C07K7/06 C07K1/10 G01N33/53 G01N33/553 G01N33/566 G01N33/543 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	A61K47/545 A61K47/551 A61P35/00 C07K7/08 C12N9/6424 G01N33/57434 C07K14/001 G01N2333 /96455		
FI分类号	C07K7/54 C07K19/00.ZNA C07K7/06 C07K1/10 G01N33/53.D G01N33/553 G01N33/566 G01N33/543. 501.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045 /CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045/CB26 2G045/DA36 2G045/FA20 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GC15 4H045 /AA10 4H045/AA20 4H045/BA01 4H045/BA05 4H045/BA09 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA16 4H045/BA32 4H045/BA41 4H045/EA51 4H045/FA50 4H045/FA51		
代理人(译)	伊藤忠彦		
优先权	61/439362 2011-02-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了特异性结合PSA的新型合成前列腺特异性抗原 (PSA) 靶向捕获剂。在某些实施方案中，这些PSA捕获剂是分别含有两个或三个靶结合部分的双配位体或三配位体捕获剂。

