

(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2005-524601

(P2005-524601A)

(43) 公表日 平成17年8月18日(2005.8.18)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00 Z T D	2 G O 4 5
A 6 1 K 9/127	A 6 1 K 9/127	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 C O 7 6
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 2
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-526826 (P2002-526826)	(71) 出願人	593052785
(86) (22) 出願日	平成13年9月17日 (2001. 9. 17)		ザ スクリップス リサーチ インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月16日 (2003. 5. 16)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ノース トーリー
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/029165		パインズ ロード 10550
(87) 国際公開番号	W02002/022573	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成14年3月21日 (2002. 3. 21)		弁理士 青山 稜
(31) 優先権主張番号	60/232, 702	(74) 代理人	100086405
(32) 優先日	平成12年9月15日 (2000. 9. 15)		弁理士 河宮 治
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100072730
(31) 優先権主張番号	60/235, 475		弁理士 小島 一晃
(32) 優先日	平成12年9月26日 (2000. 9. 26)	(74) 代理人	100067035
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 岩崎 光隆
(31) 優先権主張番号	60/315, 906		
(32) 優先日	平成13年8月29日 (2001. 8. 29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体による過酸化水素およびスーパーオキシド生成に関する方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、広く免疫学の分野に関連する。より具体的には、本発明は、抗体が一重項酸素からのスーパーオキシドおよび過酸化水素を生じ得るという知見に関する。従って、酸化ストレスの増加または低下させ得る方法および組成物が提供される。また、提供されるものは、抗体の能力を調節し、スーパーオキシドおよび過酸化水素を生成する剤を同定するためのスクリーニングアッセイである。かかる剤は、必要な患者を処置するために治療的に使用され得る。さらに、本発明は、免疫アッセイにおいて抗体を使用するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞を抗オキシダントと接触させることを含む、細胞を処理する方法（抗オキシダントが、細胞中でスーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成を低下するのに有効である）。

【請求項 2】

抗オキシダントが、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、 γ -グルタミルシステイニルグリシン、 β -グルタミルトランスぺプチダーゼ、 α -リポ酸、ジヒドロリポエート、N-アセチル-5-メトキシトリプタミン、フラボン、フラボネン、フラバノール、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、メタロチオネンまたはブチル化ヒドロキシルエンである、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

抗オキシダントがリポソームに含まれる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

細胞が、内皮、間質、上皮、筋肉、ファゴソーム、白血球、樹状、結合組織または神経系細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

ファゴソームが好中球またはマクロファージである、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

筋肉細胞が、平滑筋細胞、骨格筋細胞または心筋細胞である、請求項 4 記載の方法。

20

【請求項 7】

医薬的に許容され得る賦形剤中の抗オキシダントを対象に投与することを含む、対象を処置する方法（対象の細胞中でスーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成を低下するのに有効である）。

【請求項 8】

スーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成が対象において酸化ストレスを生じる、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

酸化ストレスが、癌、炎症性疾患、虚血疾患、ヘモクロマトーシス、後天性免疫不全症、気腫、臓器移植、胃潰瘍、高血圧、子癇前症、神経疾患、アルコール中毒および喫煙関連疾患について疾患症状を有する対象に存在する、請求項 8 記載の方法。

30

【請求項 10】

炎症性疾患が、関節炎、血管炎、糸球体腎炎、全身性エリテマトーデスおよび成人呼吸困難症である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

虚血疾患が、心臓疾患、脳卒中、腸管虚血および再灌流障害である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 12】

神経疾患が、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化(症)および筋ジストロフィーである、請求項 9 記載の方法。

40

【請求項 13】

スーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成が、対象における組織障害を生じる、請求項 7 記載の方法。

【請求項 14】

組織が、筋肉、神経、皮膚、腺、間葉、脾臓、硬化、上皮および内皮の組織からなる群から選択される、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

スーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成が、対象における炎症性症状と関連する、請求項 7 記載の方法。

【請求項 16】

50

炎症性症状が肺の炎症である、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

スーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成が、異常型平滑筋機能から生じる障害と関連する、請求項 7 記載の方法。

【請求項 18】

異常型平滑筋機能が、肺気管または脈管構造において存在する、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

スーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成が、対象における臓器移植と関連する、請求項 7 記載の方法。

【請求項 20】

抗オキシダントが、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、 γ -グルタミルシステイニルグリシン、 α -グルタミルトランスペプチダーゼ、 α -リポ酸、ジヒドロリポエート、 α -アセチル-5-メトキシトリプタミン、フラボン、フラボネン、フラバノール、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、メタロチオネインおよびブチル化ヒドロキシルエンからなる群から選択される、請求項 7 記載の方法。

【請求項 21】

組成物が、静脈的に、局所的に、経口的に、吸入によって、挿管によって、腹腔内に、筋肉内に、経皮的および皮下に、対象へ送達される、請求項 7 記載の方法。

【請求項 22】

組成物が抗オキシダントを含有するリポソームを含む、請求項 7 記載の方法。

【請求項 23】

抗原を、一重項酸素からスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成し得る抗体と接触させることを含む、抗原をスーパーオキシドまたは過酸化水素に曝露する方法。

【請求項 24】

一重項酸素が感作剤によって誘導される、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

感作剤が抗体に接合される、請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

感作剤が、プテリン、フラビン、ヘマトポルフィリン、テトラキス(4-スルホナトフェニル)ポルフィリン、ピピリジルルテミウム(II)複合体、ローズベンガル染料、キノン、ローダミン染料、フタロシアニンおよびハイポクレリンからなる群から選択される、請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

抗原が脂肪酸または低密度リポタンパク質である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 28】

抗原が細胞上に存在する、請求項 23 記載の方法。

【請求項 29】

細胞が、内皮、間質、上皮、筋肉、ファゴソーム、白血球、樹状、結合組織または神経系細胞である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 30】

ファゴソームが好中球またはマクロファージである、請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】

筋肉細胞が平滑筋細胞、骨格筋細胞または心筋細胞である、請求項 29 記載の方法。

【請求項 32】

一重項酸素が細胞の照射から生じる、請求項 23 記載の方法。

【請求項 33】

細胞の照射が紫外線、赤外線光または可視光による、請求項 32 記載の方法。

【請求項 34】

抗体が Fab、Fv、sFv または完全な免疫グロブリン分子である、請求項 23 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 35】

抗体が抗原に対して免疫特異性である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 36】

抗体が抗原に対して免疫特異性でない、請求項 23 記載の方法。

【請求項 37】

細胞表面での抗体濃度が 1 - 5 μ M である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 38】

癌細胞を、一重項酸素からスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成し得る抗体に関する有効増殖-阻害量を含む組成物と接触させることを含む、癌細胞の増殖阻害方法。

【請求項 39】

抗体の量が癌細胞を殺すのに十分である、請求項 38 記載の方法。

【請求項 40】

癌細胞表面での抗体濃度が 1 - 5 μ M である、請求項 38 記載の方法。

【請求項 41】

抗体が、Fab、Fv、sFv または完全な免疫グロブリン分子である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 42】

抗体が、癌細胞上で発現した抗原を認識し、免疫反応する、請求項 38 記載の方法。

【請求項 43】

癌細胞が癌にかかった対象に存在する、請求項 38 記載の方法。

【請求項 44】

対象が、肺癌、前立腺癌、大腸癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、膀胱癌、骨髄性白血病、リンパ腫または脳腫瘍を有する、請求項 43 記載の方法。

【請求項 45】

癌細胞が、癌にかかった対象から取り出され、体外で培養される、請求項 43 記載の方法。

【請求項 46】

体外細胞が、紫外線、赤外線または可視光に曝露され、そして対象に戻される、請求項 43 記載の方法。

【請求項 47】

組成物が体内で送達される、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 48】

イン・ビボ送達が、静脈的、局所的、経口的、吸入によって、挿管によって、腹腔内、筋肉内、経皮のおよび皮下に行われる、請求項 47 記載の方法。

【請求項 49】

組成物が抗体を含有するリポソームを含む、請求項 38 記載の方法。

【請求項 50】

抗体が組換え体抗体である、請求項 49 記載の方法。

【請求項 51】

組換え体抗体が、細胞に送達された発現ベクターから発現する、請求項 50 記載の方法。

【請求項 52】

発現ベクターがさらに感作剤分子を発現する、請求項 51 記載の方法。

【請求項 53】

組成物が感作剤分子をさらに含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 54】

感作剤分子が、プテリン、フラビン、ヘマトポルフィリン、テトラキス(4-スルホナトフェニル)ポルフィリン、ピピリジルルテニウム(II)複合体、ローズベンガル染料、キノロン、ローダミン染料、フタロシアニンおよびハイポクレリンからなる群から選択される、請求項 53 記載の方法。

【請求項 55】

10

20

30

40

50

感作剤分子が抗体に接合される、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 6】

患者において癌細胞を標的化および殺傷する方法であって、癌細胞を、医薬的に許容され得る賦形剤中の抗体の有効殺傷量を含む組成物と接触させることを含む方法（抗体は一重項酸素からスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成することができ、そして抗体は癌細胞上で発現した抗原を認識し、免疫反応をなす）。

【請求項 5 7】

細胞表面での抗体濃度が 1 - 5 μ M である、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 8】

高圧チャンバー内に患者を置くことをさらに含む、請求項 5 6 記載の方法。

10

【請求項 5 9】

組成物がさらに感作剤分子を含む、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 6 0】

感作剤分子が、プテリン、フラビン、ヘマトポルフィリン、テトラキス(4-スルホナトフェニル)ポルフィリン、ピピリジルルテニウム(II)複合体、ローズベンガル染料、キノロン、ローダミン染料、フタロシアニンおよびハイポクレリンからなる群から選択される、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 6 1】

医薬的に許容され得る賦形剤中に治療上有効量の抗体を含む組成物を対象に投与することを含む、対象を処置するための方法（抗体が一重項酸素からスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成し得る）。

20

【請求項 6 2】

スーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成が、対象中の好中球介在性炎症に關与する、請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 3】

対象が自己免疫疾患である、請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 4】

スーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成が、対象におけるファゴソームの殺菌有効性を増強する、請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 5】

スーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成が、開口損傷部を有する対象における損傷回復を増進する、請求項 6 1 記載の方法。

30

【請求項 6 6】

スーパーオキシドまたは過酸化水素が繊維芽細胞増殖を刺激する、請求項 6 1 記載の方法。

【請求項 6 7】

スーパーオキシドまたは過酸化水素が免疫応答を刺激する、請求項 6 5 記載の方法。

【請求項 6 8】

免疫応答がリンパ球増殖を包含する、請求項 6 7 記載の方法。

【請求項 6 9】

スーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成が細胞増殖を刺激する、請求項 6 1 記載の方法。

40

【請求項 7 0】

細胞増殖が対象における損傷部において繊維芽細胞を含む、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

細胞増殖が対象上の損傷部においてリンパ球を含む、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

リンパ球が B 細胞を含む、請求項 7 1 の方法。

【請求項 7 3】

接触することが、対象に対する損傷部への局所適用を含む、請求項 6 9 の方法。

50

【請求項 7 4】

局所適用が抗体を含有する包帯を含む、請求項 7 3 記載の方法。

【請求項 7 5】

抗体介在性スーパーオキシドまたは過酸化水素生成によって生成した過酸化水素の生成を調節する剤を同定するための方法であって、下記ステップ：

- a) 一重項酸素からスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成し得る抗体を含む組成物を、剤と接触させ、分子酸素存在下にアッセイ溶液中の混合物を形成すること、
- b) 混合物を照射し、分子酸素から一重項酸素を生成すること（ここで、該一重項酸素が抗体により過酸化水素またはスーパーオキシドに還元され、スーパーオキシドジスムターゼが酸化水素を形成する）、
- c) 形成された過酸化水素を検出すること、そして
- d) 検出された過酸化水素を適当なコントロールと比較し、それによって、どのように剤が過酸化水素の生成を調節するかを測定すること、を含む方法。

10

【請求項 7 6】

調節が過酸化水素生成の阻害である、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 7 7】

調節が過酸化水素生成の生成である、請求項 7 5 の方法。

【請求項 7 8】

照射が紫外線による、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 7 9】

照射が可視光による、請求項 7 5 記載の方法。

20

【請求項 8 0】

可視光照射が感作剤と抗体組成物とを混合することをさらに含む、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 8 1】

形成された過酸化水素の検出が、過酸化水素について蛍光基質を持つ蛍光手段による、請求項 7 5 の方法。

【請求項 8 2】

蛍光手段が蛍光顕微鏡または蛍光分光計である、請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 8 3】

蛍光分光計が、E L I S A を基にしたものであるか、標準キュベットを用いるものである、請求項 8 2 記載の方法。

30

【請求項 8 4】

ステップが実施例 I に記載のように実施される、請求項 7 5 の方法。

【請求項 8 5】

抗原を用いて抗体免疫活性を検出するために免疫アッセイを実施するための方法であって、下記ステップ：

- a) 一重項酸素生成媒質中で、抗原または抗体を含む第一試薬を含む組成物が固定化されている基質を、第一試薬と反応性である抗原または抗体を含む第二組成物と接触させ、固定化された抗原-抗体複合体を形成すること（抗体が、酸素存在下に一重項酸素からスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成する）、そして、
- b) 抗体生成スーパーオキシドまたは過酸化水素を検出すること、それによって、抗原との抗体免疫活性を検出すること、を含む方法。

40

【請求項 8 6】

形成された複合体を照射することをさらに含む、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 8 7】

照射が紫外線による、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 8 8】

照射が可視光による、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 8 9】

50

可視光照射が、感作剤と抗体とを混合することを含む、請求項 8 8 記載の方法。

【請求項 9 0】

形成された過酸化水素の検出が、過酸化水素について蛍光基質を有する蛍光手段による、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 9 1】

蛍光手段が蛍光顕微鏡または蛍光分光計である、請求項 9 0 記載の方法。

【請求項 9 2】

蛍光分光計が E L I S A を基にするか、もしくは標準キュベットを有する、請求項 9 1 記載の方法。

【請求項 9 3】

第一組成物が抗原であり、第二組成物が抗体である、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 9 4】

第一組成物が抗体であり、第二組成物が抗原である、請求項 8 5 の方法。

【請求項 9 5】

ステップ (b) がスーパーオキシドを検出する、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 9 6】

ステップ (b) が過酸化水素を検出する、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 9 7】

設計された抗体分子が、2 つ以下の還元中心を持ち、還元中心によって還元された一重項酸素からのスーパーオキシドまたは過酸化水素の生成が減少すること、を含む治療用抗オキシダント。

【請求項 9 8】

医薬的に許容され得る賦形剤をさらに含む、請求項 9 7 の治療用抗オキシダント。

【請求項 9 9】

抗体分子が還元中心を実質的に含まず、還元中心によって還元される一重項酸素からのスーパーオキシドの生成が実質的に起こらない、請求項 9 7 記載の治療用抗オキシダント。

【請求項 1 0 0】

還元中心がインドールを含む、請求項 9 7 記載の治療用抗オキシダント。

【請求項 1 0 1】

インドールが分子中のアミノ酸分子に存在する、請求項 1 0 0 記載の治療用抗オキシダント。

【請求項 1 0 2】

インドールがトリプトファン残基に存在する、請求項 1 0 1 記載の治療用抗オキシダント。

【請求項 1 0 3】

抗体が組換え体抗体である、請求項 9 7 記載の治療用抗オキシダント。

【請求項 1 0 4】

抗オキシダントが請求項 1 または 7 に従って使用される、請求項 9 7 記載の治療用抗オキシダント。

【請求項 1 0 5】

抗オキシダントが請求項 9 7 の治療用抗オキシダントである、請求項 1 または 7 記載の方法。

【請求項 1 0 6】

一重項酸素をスーパーオキシドまたは過酸化水素に還元し得る 2 つ以上の還元中心を含む、設計された治療用分子。

【請求項 1 0 7】

医薬的に許容され得る賦形剤をさらに含む、請求項 1 0 6 の設計された治療用分子。

【請求項 1 0 8】

還元中心がインドールを含む、請求項 1 0 6 の設計された治療用分子。

【請求項 1 0 9】

10

20

30

40

50

分子がアミノ酸残基を含む、請求項 106 の設計された治療用分子。

【請求項 110】

インドールが分子中のアミノ酸残基に存在する、請求項 109 の該設計された治療用分子。

【請求項 111】

インドールがトリプトファン残基に存在する、請求項 110 の設計された治療用分子。

【請求項 112】

トリプトファン残基が抗体に存在する、請求項 111 の設計された治療用分子。

【請求項 113】

抗体が組換え体抗体である、請求項 106 の該設計された治療用分子。

10

【請求項 114】

組換え体抗体が抗原に結合し得る、請求項 113 の設計された治療用分子。

【請求項 115】

組換え体抗体が融合接合体として発現される、請求項 113 の設計された治療用分子。

【請求項 116】

融合接合体が感作剤を含む、請求項 115 の設計された治療用分子。

【請求項 117】

トリプトファン残基がオボアルブミン中に存在する、請求項 112 の設計された治療用分子。

【請求項 118】

分子が化学的に合成される、請求項 106 の設計された治療用分子。

20

【請求項 119】

抗体が請求項 7、38 または 61 記載の方法に従って使用される、請求項 112 の設計された治療用分子。

【請求項 120】

抗体が、請求項 106 に従って設計された治療用抗体である、請求項 7、38 または 61 記載の方法。

【請求項 121】

スーパーオキシドまたは過酸化水素に一重項酸素を還元し得る少なくとも 1 つの還元中心と、医薬的に許容され得る賦形剤とを含む、設計された治療用抗体。

30

【請求項 122】

還元中心がインドールを含む、請求項 121 の設計された治療用抗体。

【請求項 123】

インドールが抗体中のアミノ酸残基に存在する、請求項 122 の設計された治療用抗体。

【請求項 124】

インドールがトリプトファン残基に存在する、請求項 123 の設計された治療用抗体。

【請求項 125】

抗体が抗原に結合し得る、請求項 121 の設計された治療用抗体。

【請求項 126】

還元中心が抗体の可変性結合ドメインと隣接して位置する、請求項 121 の設計された治療用抗体。

40

【請求項 127】

抗体が 3 つのトリプトファン残基である、請求項 121 の設計された治療用抗体。

【請求項 128】

抗体が組換え体抗体である、請求項 121 の設計された治療用抗体。

【請求項 129】

組換え体抗体が融合接合体として発現される、請求項 128 記載の設計された治療用抗体。

【請求項 130】

組換え体抗体が抗原に結合し得、融合接合体が感作剤を含む、請求項 129 記載の設計さ

50

れた治療用抗体。

【請求項 1 3 1】

抗体が請求項 7、3 8 または 6 1 の方法に従って使用される、請求項 1 2 1 記載の設計された治療用抗体。

【請求項 1 3 2】

抗体が請求項 7、3 8 または 6 1 の方法に従って使用される、請求項 1 2 5 記載の設計された治療用抗体。

【請求項 1 3 3】

組換え体接合抗体が請求項 8 6、9 1、9 3 または 9 4 の方法に従って使用される、請求項 1 3 0 記載の設計された治療用抗体。

10

【請求項 1 3 4】

抗体が抗原に結合し得る、請求項 3 8 記載の方法。

【請求項 1 3 5】

一重項酸素が、一重項酸素を生成し得るプロドラッグを投与することによって生成される（プロドラッグが適当な時間の後に投与され、抗体が抗原に結合し、抗体-抗原複合体を形成することを可能にする）、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 3 6】

プロドラッグがエンドペロキシドである、請求項 1 3 5 記載の方法。

【請求項 1 3 7】

エンドペロキシドが、形成された抗体-抗原複合体に近接して、約 1 0 μ l の濃度で存在する、請求項 1 3 6 記載の方法。

20

【請求項 1 3 8】

抗体およびプロドラッグが筋肉内、静脈内または皮下的に投与される、請求項 1 3 5 記載の方法。

【請求項 1 3 9】

抗体が請求項 1 2 1 の設計された治療用抗体である、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 4 0】

紫外線、赤外線または可視光による照射（抗体が請求項 1 2 1 の設計された治療用抗体であり、融合接合体が感作剤を含む）をさらに含む、請求項 1 3 4 記載の方法。

【請求項 1 4 1】

体液中の抗原の存在を検出するための方法であって、下記ステップ：

30

a) 抗原とスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成し得る抗体との複合体を固定化すること、そして、

b) 抗体によって生成されたスーパーオキシドまたは過酸化水素を検出すること、を含む方法。

【請求項 1 4 2】

抗原が剤である、請求項 1 4 1 記載の方法。

【請求項 1 4 3】

抗原がホルモンである、請求項 1 4 1 記載の方法。

【請求項 1 4 4】

体液が血液または尿である、請求項 1 4 1 記載の方法。

40

【請求項 1 4 5】

過酸化水素を生成し得る T 細胞受容体を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

（技術分野）

本発明は、一重項酸素からスーパーオキシドフリーラジカルの抗体介在性生成のための方法に関する。また、本発明は、一重項酸素からの過酸化水素の生成に関する。治療方法は、これらのプロセスを増強すること、および阻害することの両方に基づく。スクリーニング方法は、検出可能な過酸化水素もしくはスーパーオキシドにおける各々の増減によって

50

、過酸化水素およびスーパーオキシドフリーラジカルに関する抗体介在性生成のモジュレーターを同定することに関する。本発明は、さらに、過酸化水素を検出することを基にした簡便な免疫アッセイに関する。また、本発明は、過酸化水素およびスーパーオキシドフリーラジカルの生成を増加させるように設計された治療用組成物、およびこの生成を防止するために設計される組成物に関する。

【0002】

(技術背景)

様々な疾病メカニズムおよび条件を変化させることに関連する適切な生物学的基準は、細胞代謝への利益と不利益の両方が逆説的に存する酸化ストレスおよび連続的フリーラジカルの生成である。ヒトの代謝は酸素を基にしている。同様に、酸化プロセスに関する化学反応は、細胞ホメオスタシスの中心的役割を担う。

10

【0003】

酸素カスケードにおいて、酸素の不完全な還元から生じる反応性酸素種は、1以上の不対電子を持つ、フリーラジカル、スーパーオキシドラジカル(O_2^-)およびヒドロキシラジカル(OH^\cdot)を含む。スーパーオキシドは、酸化と還元の同時反応中に、それ自身と自然に反応して、過酸化水素(H_2O_2)を形成する。一定の状況下、例えば、カタラーゼ非存在下において、形成された過酸化水素(H_2O_2)は、フリーラジカルではないが、ヒドロキシラジカルおよび次亜塩素酸($HOCl$)の形成により細胞毒性の酸化剤となる(McCord, Amer. J. Med., 108:652-659(2000))。細胞内では、殆どのスーパーオキシドは、ミトコンドリアの呼吸系の結果として生成される(McCord, Amer. J. Med., 108:652-659(2000))。スーパーオキシド低濃度では、過酸化水素への変換はスーパーオキシドジスムターゼによって触媒され、このプロセスはスーパーオキシドの低い定常濃度を維持するのに助けとなる(Babior et al., Amer. J. Med., 109:33-34(2000))。

20

【0004】

酸素カスケードに関与する他の高反応性分子は、一重項酸素(1O_2)である。一重項酸素は、ポルフィリン症患者の皮膚に存在する金属を含まないポルフィリン前駆体の光による照射から生じる。一重項酸素は、またニュートロフィルによって生じ、それらの標的に対するファゴソームによって引き起こされる損傷に関与すると考えられる(Babior et al., Amer. J. Med., 109:33-34(2000))。生物分子とのその高い反応性を根拠として、一重項酸素は、一般的に、酸素スカベンジャー剤のカスケードにおける終点であると考えられてきた。

30

【0005】

遊離ラジカルの反応性質により、細胞および全生物体に対して正および負の効果の両方を引き起こすようになる。これら反応性種の負の効果は阻害する方法は、多くの症状に関する処理において驚くべき利点となるだろう。また、これら反応性種の正の効果を利用するための方法は、細胞増殖および感染などのかかる事象を制御するために有益であろう。従って、遊離ラジカルおよび他の反応性種の生成を調節する方法および剤が必要である。

【0006】

(発明の要旨)

本発明は、一重項酸素をスーパーオキシドに還元するための、抗体の新規に発見された能力を利用する方法を提供する。この触媒反応は、最終的に過酸化水素の形成をもたらす。また、本発明は、水の酸化により、一重項酸素から過酸化水素を生成するために抗体を利用する方法を提供する。ある生物学的条件下では、過酸化水素は、それ自身が反応性分子を生成する。即ち、本発明は、一般的に、所望の結果に応じて、これらプロセスを阻害したり、促進するための方法を提供する。さらに、本発明は、新規に発見された抗体介在性プロセスを調節する剤を同定するためのスクリーニング方法にも関する。本発明は、さらに、抗体が触媒した水の酸化によって生成された過酸化水素を直接的に検出することを基にした改良された免疫アッセイ形式を意図する。本発明は、一重項酸素の存在において抗体による生成スーパーオキシドから生成した過酸化水素を基にした改良された免疫アッセイを提供する。また、本発明は、増加もしくは低下した酸化機能を示すように設計された

40

50

治療用組成物、好ましくは、抗体組成物を意図する。

【0007】

図面の簡単な説明

図1は、ファゴソームの酸素依存性殺菌剤作用を示す。 1O_2 、 O_2^- の相互変換が存在し、抗体に対する内因性能力である。

【0008】

図2は、amplex red assayを示す。

図3は、ネズミのモノクローナルIgG E P 2 - 1 9 G 2 (20 μ M)の存在下または非存在下のPBS (pH 7.4)中での H_2O_2 生成の初期タイムコースを示す。エラーバーは、平均値からのデータ範囲を示す。

10

【0009】

図4は、UV照射後のネズミ抗体1D4Fabフラグメントの単一結晶に関する蛍光顕微鏡写真、そしてAmplex red assay試薬を用いる H_2O_2 検出を示す。

【0010】

図5は、(A)HP感作アッセイを示す。31127(ウマIgG、20 μ M)の存在下()もしくは非存在下()において、HP(40 μ M)および可視光による、PBS (pH 7.4)中の H_2O_2 形成のタイムコース。(B)PBS (pH 7.4)に添加物を含まない()か、PBS (pH 7.4)の NaN_3 (、100 μ M)またはPBS (pH 7.4)の D_2O ()溶液と共に、31127(ウマIgG、6.7 μ M)の存在下、HP(40 μ M)および可視光を用いる H_2O_2 の初期タイムコース。(C) H_2O_2 の形成速度に対するタンパク質濃度(31127、ウマIgG)。(D)31127(ウマIgG、6.7 μ M)による H_2O_2 生成の速度に対する酸素濃度。全ての点は、少なくとも2回の実験測定の実験値の平均値である。エラーバーは、平均からの実験的な測定値の範囲である。

20

【0011】

図6は、タンパク質のパネルに対する H_2O_2 形成の測定した初期速度、および抗体との比較を示す棒グラフ(表1からのデータ)である。全ての点は、少なくとも2回の実験測定の実験値の平均値である。エラーバーは、平均からの実験的な測定値の範囲である。OVA、チキン-卵のオボアルブミン; SOD、スーパーオキシドジスムターゼ。

【0012】

図7は、(A)PBS (pH 7.4)中、ウマIgG(6.7 μ M)のUV照射による H_2O_2 形成の速度、(B)326nm(励起=280nm)で測定されたウマIgGの同時性蛍光放出を示す。

30

【0013】

図8は、 H_2O_2 生成を示す。(A)免疫グロブリンと非免疫グロブリンによる H_2O_2 の生成。アッセイは、20、有気条件下で、トランスイルミネーター(Fischer Biotech)上に密閉したガラスバイアル中のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)[10mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl (pH 7.4)]中、個々のタンパク質試料(100 μ 、6.7 μ M)の近-UV照射(312nm、800 μ W cm^{-2})によって行われた。アリコート(10 μ L)はこのアッセイの間に取り出される。 H_2O_2 濃度はamplex red方法によって測定された。各データの点は、少なくとも2回の測定値:[ポリクローナル(ポリ)免疫グロブリン(Ig)G、ヒト; ポリIgG、ウマ; ポリIgG、ヒツジ; モノクローナル(m)IgG(WD1-6G6)、ネズミ; ポリIgM、ヒト; mIgG(92H2)、ネズミ; -ガラクトシダーゼ(-gal); ヒヨコオボアルブミン(OVA); -ラクトアルブミン(-lac); ウシ血清アルブミン(BSA)]の平均値 \pm SEMとして記載される。(B)ヒツジポリIgG(6.7 μ M, 200 μ L)による H_2O_2 の長時間生成。96-ウェル石英プレートの封をしたウェルにおける、PBS中、8時間の近-UV照射。 H_2O_2 濃度は(A)に記載のように測定された。(C)PCP-21H3、mIgG(ネズミ)(6.7 μ M, 200 μ L)溶液は、510分間、96-ウェル石英プレートの密閉ウェルにおけるPBSで照射された。 H_2O_2 は、amplex redアッセイによってアッセイされ、ついでEupergit C上に固定されたカタラーゼ(10m

40

50

g、288 mU)の添加によって分解される。カタラーゼを濾過によって除去され、抗体溶液は420分間、再び照射された。速度(0 - 510分) = 0.368 μ M/分 ($r^2 = 0.998$); 速度(511 - 930分) = 0.398 μ M/分 ($r^2 = 0.987$)。 (D) ウマポリ Ig Gによる H_2O_2 の光生成に対する H_2O_2 の IC_{50} の測定。ウマ Ig G (6.7 μ M)の溶液は、 H_2O_2 の濃度(0 - 450 μ M)を変化させてインキュベートされ、 H_2O_2 形成の初期速度は、(A)に記載のように測定された。グラフは、 H_2O_2 濃度対 H_2O_2 形成のプロットであり、225 μ Mの IC_{50} を示す。(E) H_2O_2 による H_2O_2 の抗体光生成の長時間阻害および完全な活性の再確立。アッセイは、 H_2O_2 (450 μ M)の存在下に360分間、ウマ Ig G (PBS (pH 7.4)中6.7 mM)の初期UV照射を含む。

10

【0014】

次いで、 H_2O_2 はカタラーゼ(Eupergit Cに固定された)によって除かれ、ポリ Ig G試料はさらに480分間、UV光で再照射された。アッセイ中の H_2O_2 形成は、amplex red アッセイによって測定された。(F) -TCR (6.7 μ M、200 μ L)の溶液は、360、367および389分間、(C)に記載のように照射された。各照射中に生じた H_2O_2 がアッセイされ、(C)に記載のように分解された。速度(0 - 360分) = 0.693 μ M/分 ($r^2 = 0.962$)。200 μ Mを超える進行曲線における曲率により、 H_2O_2 による予測された阻害が確認された(下記参照); 速度(361 - 727分間) = 0.427 μ M/分 ($r^2 = 0.987$); 速度(728 - 1117分間) = 0.386 μ M/分 ($r^2 = 0.991$)。

20

【0015】

図9は、元々の4C6 Fab(カラー写真中の青色光とピンク光)と、 H_2O_2 の存在下での4C6 Fab(カラー写真中の暗青色と赤色)のスーパーポジションを示す。(A)元々の4C6結晶は、3分間、4 mM H_2O_2 に浸漬され、SSRL BL 9-1でデータ収集のためにすぐさま急速凍結(flash frozen)された。二次および三次構造の全体的な構造の完全性は、 H_2O_2 (RMSDC = 0.33、側鎖 = 0.49)の存在下に明確に保存される。RMSDCがCNSで計算された。(B)高度解像度のX線構造は、Fab4C6が安息香酸と交差反応であることを示す。 H_2O_2 の存在下と H_2O_2 の非存在下との4C6組合せ部位のスーパーポジションは、結合部位の側鎖であってもコンフォメーションが保存されていることを示す(各々+と-の H_2O_2 に対応するカラー写真における明および暗彩色された側鎖)。さらに、安息香酸に対する明確な電子密度は、Fab4C6の結合特性が4 mM H_2O_2 中で変化せずに残っていることを強調する。電子密度マップは、1.5で輪郭を示した2fo-fc 比重マップであり、図はB obscriptで作成された。

30

【0016】

図10は、ダイオードアレイHP842A吸光度計、Abs_{max} 280 nm (A)で測定したウマポリクローナル抗体 Ig Gの吸収スペクトルを示す。(B) 280 nmで H_2O_2 形成の最高値を示す260 ~ 320 nmのウマポリクローナル抗体 Ig Gの作用スペクトル。このアッセイは2回行い、そして、xenon arcランプおよびSLM吸光度計のモノクロメーターによって生じる光線に位置させた石英キュベットに、抗体溶液[PBS (pH 7.4)中で6.7 μ M]を添加することが含まれる。 H_2O_2 濃度はamplex red アッセイによって測定された。

40

【0017】

図11は、 H_2O_2 の生成を示す。(A)トリプトファン(20 μ M)による H_2O_2 の生成。条件およびアッセイ方法は図8Aに記載のように行われた。(B) H_2O_2 の抗体介在性光生成に対する塩化物イオンの効果。ヒツジポリ Ig G (6.7 μ M、200 μ L)またはウマポリ Ig G (6.7 μ M、200 μ L)の溶液は、乾燥のために凍結乾燥し、次いで、塩化物イオンの最終濃度が0 - 160 mMであるような、脱イオン水またはNaCl(水溶液)のいずれかに溶解された。次いで、試料は、有気条件下、20 で、トランスイルミネーター(800 μ W cm⁻²)上の密閉したガラスバイアル中で2回照射された。アリコート(10 μ L)はアッセイの間に取り出して、 H_2O_2 濃度は、amplex red アッセ

50

イによって測定された。H₂O₂形成の速度は、各抗体試料について、[NaCl]対平均±S.E.Mとしてプロットされた。(C)H₂O₂の抗体介在性光生成へのEDTA含有緩衝液における透析の効果。2つの抗体調製物(マウスモノクローナル抗体PCP21H3およびウマポリクローナルIgG)によるH₂O₂の光生成が、EDTA(20mM)含有PBSにおける透析前後が比較された。条件およびアッセイ方法は図8Aに記載のように行われた。各データ点は、少なくとも2回の測定値の平均±SEMとして示される[透析前のネズミのmlgGPCP21H3; 透析後のネズミのmlgGPCP21H3; 透析前のウマのポリIgG; 透析後のウマのIgG]。

【0018】

図12は、TCPEP[(M-H)⁻249]およびH₂O₂による酸化によって生成されるその酸化物[(M-H)⁻265(¹⁶O)および(M-H)⁻267(¹⁸O)]のESI(負極性)マスペクトルを示す。(A)H₂¹⁸O(98%¹⁸O)PB中、ヒツジのポリIgG(6.7μM)の照射後の¹⁶O₂の有気的条件下におけるTCPEPおよびその酸化物のMS。(B)H₂¹⁸OPB中、¹⁸O₂(90%¹⁸O)に富む¹⁶O₂の有気的条件下における、ヒツジのポリIgG(6.7μM)の照射後のTCPEPおよびその酸化物のMS。(C)H₂¹⁶OPB中の¹⁶O₂有気的濃度下で行ったポリIgGの照射後のTCPEPおよびその酸化物のMS。アッセイ条件および方法は、H₂¹⁶OがH₂¹⁸Oに代わる以外は、方法および材料(実施例II)に記載したようなものであった。(D)H₂¹⁸OPB中、8時間、20で、有気的条件下(脱ガスおよびアルゴン下)で、ヒツジのポリIgG(6.7μM)およびH₂¹⁶O₂(200μM)の照射後のTCPEPおよびその酸化物のMS。(E)H₂¹⁸OPB中、¹⁶O₂有気的条件下で、3-メチルインドール(500μM)の照射後のTCPEPおよびその酸化物のMS。アッセイ条件および方法は、3-メチルインドールは低分子量すぎるためにサイズ排除濾過を行わないということを除いて、方法および材料(実施例II)に記載のようなものである。そのため、TCPEPは、3-メチルインドール含有PB溶液に添加される。(F)H₂¹⁸OPB中、¹⁶O₂有気条件下で、-gal(50μM)の照射後のTCPEPおよびその酸化物のMS。アッセイ条件および方法は、方法および材料(実施例II)に記載されている。

【0019】

図13は、方法および材料(実施例II)に記載のような抗体4C6中のXe結合部位を示す。(A)カラー写真において、ピンクである軽鎖およびブルーである重鎖を有するFab4C6のCトレースの標準的な側面図。3つの結合手ゼノン原子(カラー写真において緑色)は、5で輪郭をとる初期F_o-F_c電子密度地図で示される。(B)Fab4C6および2CTCR(PDB/TCR)のオーバーレイは、保存されたゼノン部位1を取り巻く。V_L(カラー写真においてピンク)のバックボーンCトレースおよび側鎖(カラー写真において黄色)そして対応する2CTCR(カラー写真における赤および金)のV_Hが重ねられる(Insight 2000を用いて作成された図)。

【0020】

(発明の詳細な説明)

本発明は、抗体が、分子のクラスとして、一重項酸素を遮断し、スーパーオキシドまたは過酸化水素のいずれかに一重項酸素を変換する固有の能力を持つという発見に関する。このプロセスは、特にファゴソーム介在性プロセス中において酸素を奪い、再循環し、それにより免疫システムの抗菌作用に寄与する。これらの特性は、全ての抗体に共通し、本発明以前には知られていなかった。一重項酸素をスーパーオキシドもしくは過酸化水素に変換する共通の能力は、起源または抗原特異性に関わらず、抗体について以前から知られている認識特性を殺傷事象に結びつけるものと考えられる。

【0021】

本発明は、一重項酸素を(¹O₂)スーパーオキシドラジカル(O₂⁻)および過酸化水素に還元する抗体の能力に関する方法を提供する。有気性生物体における酸素代謝の臨界的性質と役割の観点において、この生物学的プロセスの同定は明細書中に記載のような複

数の変法を提供する。一重項酸素の抗体介在性還元の詳細な決定および特徴分析は、実施例 I および実施例 I I に記載されている。

実施例に示したように、これらの特性は、全抗体の普遍的な能力である。

【 0 0 2 2 】

抗体によるスーパーオキシド生成

スーパーオキシドを一重項酸素から生成する能力は、無傷の免疫グロブリン、F ab および F (a b ')₂ フラグメント (実施例を参照されたい) の両方に存在する。この能力は、酸化され得る (表 I および実施例 I) 分子 (R Nase A、スーパーオキシドジスムターゼ、Bowman-Birk 阻害剤タンパク質を含む) 中には存在しない。また、この活性は、ジスルフィドが酸化され得るそれらが十分に電子に富むものであっても、分子中のジスルフィドの存在とは関連しない (Bent et al., J. Am. Chem. Soc., 87: 2612-2619 (1975))。むしろ、活性は、電子転移を介する一重項酸素によって酸化され得るトリプトファンなどの芳香族アミノ酸に存在する (Grossweiner, Curr. Top. Radiat. Res. 0., 11: 141-199 (1976))。この活性は、さらに、トリプトファン残基のインドール成分にある。即ち、インドールは、酸化還元反応との関連における還元中心として作用する。インドール部は、酸化されて、一重項酸素をスーパーオキシドフリーラジカルに還元する経緯においてラジカルカチオンを形成する。同じ意味で、抗体は、電子を一重項酸素に提供して酸化されるので、還元剤と呼ばれる。イン・ピボの抗オキシダントにより酸化された抗体相互作用は、触媒サイクルを完了し、抗体を中性に変えらる。一重項酸素からスーパーオキシドを生成する抗体の能力は、抗体が変性した場合に消滅する。これは、抗体の反応中心の酸化された分子の位置が、スーパーオキシドを生成するのに使用される還元プロセスに関連することを示す。特に、一重項分子酸素の還元は、第一には、溶媒に曝露したものよりも分子中に埋もれた 2 つのトリプトファン残基による (実施例 I)。一般的に、かかるタンパク質における埋もれた芳香族残基は、抗体を含めて、構造的安定性に寄与すると考えられる (Burly, et al., Science, 229: 23-28 (1985))。さらに、T R P - 3 6 および T R P - 4 7 として参照される、2 つの芳香族のトリプトファン残基は保存されており、両方とも深部に埋もれている (Kabat, et al., Sequences of proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。このようにして、一重項酸素をスーパーオキシドアニオンに還元するタンパク質のクラスとしての抗体の能力は、保存された埋もれた芳香族トリプトファン残基の存在に基づいている。

10

20

30

【 0 0 2 3 】

抗体による過酸化水素の生成

一重項酸素から効率的かつ長期プロセスにおける過酸化水素を生成する能力は、免疫グロブリンおよび T 細胞受容体中に存在する (実施例 I I、図 1 F)。T 細胞受容体は、抗体と免疫グロブリン結合ドメインの類似の配列を共有する (Garcia et al., Science, 274: 209 (1996))。しかし、この構造モチーフの所有は、タンパク質に対する過酸化水素生成能を付与するのに必要あるようにはみえない。この構造モチーフを持つ免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーである γ_2 -マクログロブリンは、過酸化水素を生成しない (Welinder et al., Mol. Immunol., 28: 177 (1991))。構造的な研究から、T 細胞受容体および抗体の両方で見出される保存されたトリプトファン残基が、水の酸化における役割を担うことが示唆される。抗体および T 細胞受容体中の保存されたトリプトファンの触媒的役割は、さらに、 γ_2 -マクログロブリンが、保存残基に加えて触媒的活性を欠くという所見によって支持される。さらに、保存されたトリプトファン残基を取り巻く配列および構造は、抗体および T 細胞受容体との間に高度に保存されており、一重項酸素の過酸化水素への触媒反応を可能にする役割を担い得ることを示している。

40

【 0 0 2 4 】

その構造を免疫グロブリンおよび T 細胞受容体の機能に関連づける情報により、水の酸化を触媒するように分子が設計されることが可能となる。また、この情報は、存在する分子をもとに利用され得る、多くの新規方法および多様なスキームを提供する。

50

【 0 0 2 5 】

定義

略語：(HP)ヘマトポルフィリン；(PBS)リン酸緩衝生理食塩水；(OVA)トリ-卵のオボアルブミン；(SOD)スーパーオキシドジスムターゼ；(PO)ペルオキシダーゼ酵素；(ホックス)ファゴソームオキシダーゼ；(HRP)ホースラディッシュペルオキシダーゼ；(MS)マスペクトル；(AES)ICP-原子発光スペクトル；(MS)マスペクトル；(QC)量子化学。

【 0 0 2 6 】

「剤」なる用語は、化学化合物、化学化合物の混合物、生物学的マクロ分子、または、生物学的物質、例えばバクテリア、植物、菌類もしくは動物（特に、哺乳類）から作られた抽出物を示すために用いられる。剤は、本明細書中に記載のようなスクリーニングアッセイの際に包含されることによって、抗体調節剤として潜在的活性について評価される。 10

【 0 0 2 7 】

本明細書中で使用されるような用語「抗体」は、本来の分子、およびそのフラグメント、例えば、Fab、F(ab')₂、Fvなどエピトープを結合することができる分子を包含する。これらの抗体フラグメントは、その抗原もしくは受容体と選択的に結合するいくらかの能力を保持し、下記のように定義される：

(1) Fabとは、抗体分子の一価の抗原結合フラグメントを含有し、パパイン酵素により全抗体の分解によって生成されて、無傷の軽鎖と一つの重鎖の一部をもたらし得るフラグメントである； 20

(2) Fab'とは、ペプシンによる全抗体の処理、続く還元によって得られ、無傷の軽鎖および重鎖の一部をもたらし得る抗体のフラグメントである；抗体分子あたり2つのFab'フラグメントが得られる；

(3) (Fab')₂とは、酵素ペプシンにより全抗体を処理し、これに続く還元を行わないで得られる抗体のフラグメントである；F(ab')₂は、2つのジスルフィド結合によって共に保持された2つのFab'フラグメントのダイマーである；

(4) Fvとは、2つの鎖として表現される、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域を含有する遺伝子的に設計されたフラグメントとして定義される；そして

(5) 1本鎖抗体(「sFv」)、遺伝子的に融合された一本鎖分子として適当なポリペプチドリンカーによって結合された、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域を含有する遺伝子的に設計分子として定義される。 30

【 0 0 2 8 】

ポリクローナル抗体の調製は、当業者には周知である。例えば下記を参照されたい：Green, et al., Production of Polyclonal Antisera, in: Immunochemical Protocols (Manson, ed.), pages 1-5 (Human Press); Coligan, et al., Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats Mice and Hamsters, in: Current Protocols in Immunology, section 2.4.1 (1992)。これらは出典明示により本明細書の一部とする。

【 0 0 2 9 】

モノクローナル抗体の調製もまた通常的である。例えば下記を参照されたい：Kohler & Milstein, Nature, 256:495 (1975); Coligan, et al., sections 2.5.1-2.6.7; and Harboer Pub. (1988)。これは出典明示により本明細書の一部とする。モノクローナル抗体は、十分に確立された様々な技術によってハイブリドーマー培養物から単離および精製され得る。このような単離技術は、プロテインAセファロース、サイズ排除クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーを用いるアフィニティークロマトグラフィーを包含する。参照例として、Coligan, et al., section 2.7.1.-2.7.12およびsection 2.9.1.-2.9.3; Barnes, et al., Purification of Immunoglobulin G (IgG), in Method in Molecular Biology, Vol.10, pages 79-104, Humana Press (1992)。 40

【 0 0 3 0 】

モノクローナル抗体のイン・ビトロおよびイン・ビボの操作方法は、当業者には周知である。ある特定の操作は、ヒトの特異的かつ認識配列を含有する抗体を生成するためにモノ 50

クローナル抗体を組換え手段によって人体に適應させる方法を包含する。参照例として；Holmes, et al., J. Immunol., 158: 2192 - 2201 (1997)。

【0031】

抗体フラグメントを作成する方法は、当業者には周知である（参照例、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harboe Laboratory, New York(1988)、出典明示により本明細書中の一部とする）。本発明の抗体フラグメントは、抗体のタンパク質加水分解、もしくは、そのフラグメントをコードするDNAをE.coliにおける発現によって調製され得る。抗体フラグメントは、ペプシンもしくはパパイン消化により従来法で得られる。例えば、抗体フラグメントは、ペプシンを用いる酵素開裂によって生成され、F(ab')₂と表示される5Sフラグメントを提供され得る。このフラグメントは、チオール還元剤を用いてさらに開裂され、所望により、ジスルフィド結合の開裂により生じるスルフィドリル基に対するブロッキング基が得られ、3.5S Fab'-価フラグメントが得られた。一方、ペプシンを用いる酵素的開裂は、2つの一価のFab'フラグメントおよびFcフラグメントを直接生成する。これらの方法は、例えば、下記に挙げる参考文献に含まれる；U.S.特許出願番号4,036,945およびU.S.特許出願番号4,331,647。これらの特許文献は出典明示により本明細書の一部とする。

10

【0032】

抗体を開裂する他の方法、例えば、一価の軽鎖フラグメントを形成するための重鎖の分離、別のフラグメントの開裂、またはそのフラグメントが元々の抗体によって認識される抗原に結合する限り、別の酵素的、化学的、もしくは遺伝子的技術を用いてもよい。例えば、FvフラグメントはV_HおよびV_L鎖の会合を含む。この会合は、非共有で有り得るか、または可変鎖が、分子内ジスルフィド結合によって結合され得るかまたは化学物質、例えばグルタルアルデヒドによって架橋されてもよい。好ましくは、Fvフラグメントは、ペプチドリンカーによって連結されるV_HおよびV_L鎖を包含する。これらの一本鎖抗原結合タンパク質(sFv)は、オリゴヌクレオチドによって連結されるV_HおよびV_LドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。構造遺伝子は、発現ベクター中に挿入され、これは、順に宿主細胞、例えばE.Coli中に導入される。組換え体宿主細胞は、2つのVドメインをつなぐリンカーペプチドとともに1本のポリペプチド鎖を合成する。sFv_sを生成する方法が記載されている、例えば、Whitlow, et al., Methods: a Companion to method in Enzymology. Vol.2, page 97(1991);Bird, et al., Science . 242:423-426(1988);Ladner, et al, US Patent No. 4,946,778;and Pack, et al., Bio/Technology, 11:1271-77(1993)である。

20

30

【0033】

抗体フラグメントの別の形態は、1本の相補的な相補性決定領域(CDR)をコードするペプチドである。CDRペプチド(「最小認識部位」)は、目的の抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得られ得る。かかる遺伝子は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を用いることによって調製され、抗体生成細胞のRNAからの可変領域を合成する。例えば、Larrick, et al., Methods: a companion to method in Enzymology, Vol.2, page 106(1991)を参照されたい。

【0034】

本明細書中で使用される「有効量」、「有効な低下量」、「有効な改善量」、「有効な組織損傷阻害量」、「治療上有効量」などの用語は、所望の生理学上の効果、例えば、症状、障害、疾患などの処理、または症状、障害、疾患などの兆候の軽減を得るのに十分な量とみなす語である。治療方法において、かかる抗オキシダントの有効量は、還元、逆転、改善、阻害などの改良傾向、抗体によって生成されたオキシダント(酸化体)の効果を生じる量である。

40

【0035】

「設計分子(設計された分子)」、組換え技術から生成したポリペプチドである。かかる分子は、一重項酸素からのスーパーオキシドまたは過酸化水素の生成を触媒し得る反応中心を包含し得る。かかる設計分子は、ポリペプチド構造中に含まれる反応性インドールを持

50

ち得る。かかる分子のインドールはトリプトファン残基として存在し得る。設計分子は、また、非天然アミノ酸およびリンケージに加えて偽ペプチドを含有し得る。また、設計分子は、スーパーオキシドまたは過酸化水素を生じ得ないように、反応中心を排除するように修飾された抗体を包含する。

【0036】

本明細書中に使用される、「エピトープ」なる用語は、抗体のパラトープに結合する抗原上の全ての抗原性決定因子を意味する。通常、エピトープ決定因子は、分子、例えば、アミノ酸または糖側鎖の化学的に活性な表面群からなり、通常特異的な3次元構造特性、さらに特定の帯電特性を持つ。抗原は、ポリペプチド、脂肪酸、リポタンパク質、脂質、化学物質、ホルモンなどを包含し得る。いくつかの態様において、抗原は、ウイルス、例えば、ヒト免疫欠損ウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、パピローマウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルスなど由来のタンパク質を包含する。別の態様において、抗原は、下記に限定するものではないが、癌細胞、例えば、肺癌、前立腺癌、大腸癌、頸部癌、子宮内膜癌、膀胱癌、骨癌、白血病、リンパ腫、脳腫瘍などの癌細胞で発現されたタンパク質を包含する。本発明の抗原は、化学物質、例えば、エタノール、テトラヒドロカナビノール、LSD、ヘロイン、コカインなどを包含する。

10

【0037】

「調節する」なる用語は、本発明の抗体もしくは設計分子の機能特性、例えば、スーパーオキシドまたは過酸化水素の生成を増強または阻害することに及ぶ。

【0038】

「非天然」アミノ酸は、D-アミノ酸、天然に存在しないアミノ酸を包含し、例えば、4-ヒドロキシプロリン、 β -カルボキシグルタメート、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジンおよびその他のかかるアミノ酸およびイミノ酸を包含する。

20

【0039】

「偽ペプチド」、「偽似ペプチド」なる用語は、ペプチドアナログ、例えば、鑄型ペプチドに類似の特性を有する非ペプチド薬として医薬産業で広く使用されるようなペプチドである (Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29(1986) and Evans et al., J. Med. Chem., 30:1229(1987))。一般的に、偽ペプチドは、パラダイムポリペプチドに構造的に類似 (即ち、生物化学的特性または医薬的活性を持つポリペプチド) しているが、所望により、当業者には既知の方法によって、例えば、 $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ (シスおよびトランス)、 $-COCH_2-$ 、 $-CH(CO)CH_2-$ および $-CH_2SO-$ などのリンケージによって置換された1以上のペプチドリンケージを持つ。天然のポリペプチドの実施態様をこえる偽ペプチドの利点は、大きな経済的生成、大きな化学的安定性、変更される特異性、低下される抗原性、増強される医薬的特性、例えば、ハーフライフ、吸収、有効性および効率などを包含し得る。

30

【0040】

本明細書中に使用される「医薬的に許容され得る」、「生理学的に許容される」なる用語、そしてそれらの文法的バリエーションは、組成物、担体、希釈剤および物質 (試薬) にそれらを引用する場合、互換的に使用され、その材料は、望ましくない生理学的効果、例えば、吐気、眩暈、胃の不快感を生じないで哺乳類に投与され得ることを示す。

40

【0041】

用語、「タンパク質」、「ポリペプチド」は、本来のタンパク質、フラグメントまたはポリペプチド配列のアナログを記述するのに使用される。これらの用語は、互換的に使用され得る。

【0042】

抗体

本発明は、治療用の抗体を提供する。全ての抗体分子は、いわゆる免疫グロブリンと呼ばれる血漿タンパク質のファミリーに属する。それらの基本的なビルディングブロックである、免疫グロブリンの折り畳み (立体構造) またはドメインが、免疫システムおよび他の

50

生物学的認識システムに関する多くの分子において、様々な形態で使用されている。通常の免疫グロブリンは、4つのポリペプチド鎖を持ち、可変領域として知られる抗原結合領域を含有し、そして定常領域として知られる非可変領域を含有する。本発明における使用を意図された抗体は、免疫グロブリン、Fv、Fab、他のフラグメント、可変ドメイン相補性決定領域(CDR)を包含する一本鎖抗体を包含する全ての多様な形態、または他の形態で存在し得る。これら用語の全ては、本明細書で使用されるような「抗体」の広い意味の下で使用される。本発明は、抗体、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の任意の特異性の使用を意図し、特異的な抗原により認識され、かつ免疫反応をおこす抗体に限定するものではない。好ましい実施態様において、本明細書中で治療方法およびスクリーニング方法の両方において、それらの抗体またはフラグメントは、抗原に対して免疫特異性であるものが使用される。

10

【0043】

本発明の治療用抗体の調製は、組換え体発現技術、タンパク質合成、当分野の技術者には既知の方法によって達成され得る。組換え体アプローチには、それらの抗体またはフラグメントをコードする核酸の変異が、多様な手段によって行われ得るが、予想される部位、即ち発現した分子において変化したアミノ酸配列をコードする、部位で変異を導入するように構築された変異されたオリゴヌクレオチドを用いてもっとも簡単に行われる。かかる変更は、コードされたアミノ酸残基の配列の置換、付加、および/または欠失を類似的にコードする特定のヌクレオチド配列の置換、付加、および/または欠失を包含する。部位指向的突然変異誘発体は、オリゴヌクレオチド指向的突然変異誘発およびそれらの変異体とよび、変化した遺伝子の連続的なクローニングは、既知の技術である(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Chapter 15, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))。別の組換え体アプローチは、連続的にアニーリングされ、そしてクローニングおよび発現するのに適当な2本鎖DNAに変換された長いオリゴヌクレオチド鎖を組み合わせて、本発明の治療用分子をコードする遺伝子を合成することを包含する(Ausebel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, Unit 10 and 15, Wiley and Sons, Inc.(2000))。かかる技術を用いて、還元中心を含み、一重項酸素から過酸化水素またはスーパーオキシドを生成しうる設計分子を作成することができる。このような設計分子が、過酸化水素の場合では、抗体構造およびT細胞受容体を基にして設計され得ることを意図する。

20

30

【0044】

即ち、本発明は、所望の位置において、スーパーオキシドフリーラジカルまたは過酸化水素を生成するために設計された抗体を意図する。抗体は、本明細書中の実施例IおよびIIに記載の追加の還元中心を含有し、スーパーオキシドフリーラジカルまたは過酸化水素への一重項酸素の還元を増加するように設計される。また、本発明は、一重項酸素から、スーパーオキシドフリーラジカルまたは過酸化水素を生成する能力を少なくとも減少させるように設計した抗体も意図する。明細書中、この抗体は、少なくとも1つのその還元中心を欠き、好ましくは、還元中心を実質的にふくまない。かかる抗体組成物は、当分野の技術者には既知の方法によって容易に調製される。

【0045】

所望により、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、治療上の組成物として使用するために調製されるか、本発明の方法では、さらに精製されてもよい。例えば、精製方法は、抗体を生じたポリペプチドもしくはペプチドへの結合と、またはマトリックスからの溶出物が結合することにより精製され得る。ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の精製および濃縮のための免疫学的方法における一般的な多様な方法は、当業者には既知である(Coligan, et al., Unit 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, (1991))。

40

【0046】

1. 治療方法

有気的生物は、酸素毒性およびそれらの代謝物が最大の結果である化学的環境における酸

50

素代謝に依存するので、これらの生物体は、生物体のホメオスタシスと健康全体を維持するために、多数のメカニズムを進化させてきた。酸素の毒性の可能性は、イン・ビボでの反応性のフリーラジカルの形成による。毒性となるには、酸素は、一重項酸素生成を生じる光活性化によって、または還元続く過酸化水素およびヒドロキシラジカルの形成のいずれかによって生じるプロセスを活性化されねばならない。後者のプロセスは、遷移金属、例えば、鉄および銅および/またはモノオキシゲナーゼなどの特異的酵素の存在によって促進される。これらのプロセスは、ミトコンドリア、ミクロソーム、ペルオキシソームおよび細胞膜を含む細胞区分で起こる (Sahnoun et al., Therapie, 52:251-270(1997)を参照されたい)。

【0047】

酸素の活性化から生じるフリーラジカルは、1または数個の不对電子を持つ明確な化学種による。フリーラジカルは、一つの電子が、分子中から除去された場合に生じる。これは、他の電子と対をなさない少なくとも1つのその電子を持つ分子内で生じる。得られるフリーラジカルは、それが他の分子から利用し得る電子を見つけ出すので反応性であり、そのプロセスは、第2の反応性分子を創出し、それにより連鎖反応を開始することができる。

【0048】

また、本明細書中のオキシダントとして引用されるフリーラジカルは、スーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、ハロゲン化酸素類および窒素含有分子を包含する。一重項酸素の抗体介在還元から生じたスーパーオキシドラジカルは、それ自身、オキシダントであり、また過酸化水素の生成をも提供する。後者は、即ち、それ自身オキシダントもしくは反応性分子でないが、ヒドロキシラジカル、その二次的生成物、例えば、炭素、酸素、窒素もしくは硫黄を包含する反応性酸素種を生成することができ、これは別の化合物と反応してフリーラジカル連鎖反応を創出するまた別のフリーラジカルを生成することができる (Babior et al., Am. J. Med., 109:33-44(2000))。酸素カスケードの結果である他の反応性種は、酸化ハロゲン (例えば、次亜塩素酸 (HOCl)、HOCl生成反応性種クロラミン (NH₂Cl) およびアルデヒド) および反応性窒素種を包含する。

【0049】

フリーラジカルの制御不能な反応性に関する潜在的結果は、DNA、RNA、膜脂質、リポタンパク質または酵素への損傷であり、体に根本的な悪影響を与える。最終的な結果は、疾患およびさらなる組織死に導く不十分な細胞機能である。逆説的にフリーラジカルは、望ましくない細菌またはウイルスに感染するプロセスから助ける。しかし、ラジカル種の生成が、過剰であったり、誤った場所である場合、急性および慢性的な細胞および組織損傷が生じ得る。

【0050】

これらの反応を中和するために、有気性生物は、制御の際に酸素代謝の平衡化を保つために一定の本来的メカニズムを進化させてきた。これらのメカニズムは、酸素活性化プロセスの阻害に加えて、すでに形成された遊離ラジカルの中和を広く包含する。中和プロセスは、1) ペルオキシダーゼと一緒に生成する酵素、例えばスーパーオキシドジスムターゼおよびカタラーゼ、2) 細胞成分を損傷せずにフリーラジカルに提供される電子源として機能する分子、例えば、トコフェロール、カロテノイド、ユビキノン、フラボノイド、アスコルビン酸、尿酸および類似分子を包含する。かかるプロセスは、生物体の良好な生存に有益であると考えられる。例えば、最近の論文の著者らは、スーパーオキシドジスムターゼ/カタラーゼ擬体への曝露によって、動物の寿命の増加と相関づけている (Melov et al., Science, 289:1567-1569(2000))。本発明において、過酸化水素の形成が、最終的に過酸化水素形成へと導く過酸化水素またはスーパーオキシドの抗体介在性生成を阻害する全ての分子が、抗オキシダントと呼ばれる。本発明のかかる好ましい抗オキシダントは、下記に記載する。

【0051】

オキシダントの抗オキシダントに対するバランスが、前者の方に傾く場合、この酸化状態

10

20

30

40

50

は一般的に「酸化ストレス」として示される。この状況は、オキシダントまたはフリーラジカルの過剰生成と低下した制御抗オキシダントメカニズムの存在下で生じる。本発明の利点は、酸素カスケードにおけるオキシダント生成における抗体の役割に関する発見が、所望の結果によって、酸素バランスと酸素代謝の制御を維持する際に有用である治療方法に対する基本を提供することである。いいかえると、本発明の方法は、1) オキシダントの生成が正当である場合、例えば、損傷治癒の増強、細菌の溶菌、ウイルスの除去、癌細胞のオキシダント誘導性分解のための標的化および類似プロセスの際に、オキシダントの生成、および2) 抗体生成オキシダントの阻害が正当である場合、例えば、炎症、心臓疾患、糖尿病および望ましくない細胞増殖の際に、抗オキシダントの曝露による抗体生成オキシダントの阻害、を提供する。例えば、1つには、損傷部分における細菌感染を防御するファゴソーム好中球によって生じた局所濃度を補足するためにスーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成を用いることが望まれ得る。ここで、NADPHオキシダーゼを含有する好中球は、分子酸素の存在下でスーパーオキシドラジカルを生成する。スーパーオキシドは、プロセス中に細菌および最後に好中球を分解する殺菌剤として有効に作用する。即ち、このプロセスを増強するために、一つには、本発明の方法を用いて、スーパーオキシドの局所濃度の増加を引き起こすためにその箇所へ抗体組成物を提供する。一方で、好中球生成スーパーオキシドは、炎症を起こした接合部、例えば、同時に内包性体液性抗体介在性免疫応答を進行させる慢性関節リウマチを患っている患者においては有害である。そのような症状では、一つには、局所環境において、好中球と抗体の両方によって生成された障害オキシダントの生成を制御するために抗オキシダントを提供するという本発明に関して反対の治療方法を用いることが望まれる。スーパーオキシドおよび過酸化水素およびそれらの誘導体(即ち、それらから誘導される分子)生成物の抗体介在性生成および/またはそれらの効果を阻害または増進するために、本発明の方法を用いるための決定は、即ち所望の結果に依存する。

10

20

【0052】

A. 抗体活性の阻害

本発明に従って、「過酸化水素の抗体介在性生成」に影響するある治療方法が開発される。「過酸化水素の抗体介在性生成」なる用語は、過酸化水素の生成に対する前駆体および誘導体の両方である反応性種を包含する。

【0053】

過酸化水素の抗体介在性生成物を有効にする分子の使用は、抗体によって生成された、望ましくない、悪影響の障害を与える反応性オキシダント種の生成にある全ての状況に適用し得る。このような状況において有用である分子は、一般的に、オキシダントに対するアンタゴニスト効果を持つ全ての分子として定義される「抗オキシダント」として引用される。そのように定義された抗オキシダントは、1) 抗体の阻害剤、それによりスーパーオキシド生成を阻害すること、2) 過酸化水素生成の阻害剤、3) 過酸化水素を誘導性反応性オキシダントに変換する反応の阻害剤、そして4) 反応性オキシダントそれ自身の阻害剤を包含する。好ましい抗オキシダントは、反応性オキシダントを生成する酸素の活性化を阻害するものに加えてすでに形成されたものを中和するものを包含する。抗オキシダント効果は、触媒を包含する全てのメカニズムで生じ得る。カテゴリーとしての抗オキシダントは、酸素スカベンジャーまたはフリーラジカルスカベンジャーを包含する。抗オキシダントは、それらが必要とされるなら(場合には)、それらが利用できるような種々の型のものでよい。有気的生物全体による酸素の存在の観点で、抗オキシダントは、様々な細胞性、組織性、器官性および細胞外区分において利用され得る。後者は、細胞外液体スペース、細胞内液、滑液、脳脊髄、胃腸内分泌物、間質性液体、血液およびリンパ液を包含する。抗オキシダントは、生物体内でも存在するが、食事の補充および本発明の方法によって提供される。特に好ましい抗オキシダントは、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、 γ -グルタミルシステイニルグリシン、 α -グルタミルトランスペプチダーゼ、 α -リポ酸、ジヒドロリポエート、 α -アセチル-5-メトキシトリプタミン、フラボン、フラボネン、フラバノール、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、メ

30

40

50

タロチオネインおよびブチル化ヒドロキシトルエンを含むが、これに限定されるものではない。本発明の方法の範囲内で抗オキシダントとしての機能に対する能力を持つ別の好ましい分子は、設計された抗体であり、これは、一重項酸素を還元してスーパーオキシドフリーラジカルを生成する能力が減少されるか、好ましくは全くないように設計された抗体である。かかる抗体分子は、本明細書中に記載されている。

【0054】

抗オキシダントの使用は、抗オキシダントがオキシダントによる障害を、保護、コントロール、最小化、低下もしくは阻害することを必要とする状況に向けられる。即ち、本発明は、細胞内の過酸化水素の抗体介在性生成物を低下するための抗オキシダントの使用を意図する。このような状況では、介入なしに、細胞の損傷があまりに強いので、組織損傷、例えば、炎症性症状、トラウマ症状、外傷症状、臓器移植などを生じる。設計された抗体を抗オキシダントとして用いる意味において、その抗体は、一重項酸素を還元する還元中心を欠くためにスーパーオキシドまたは過酸化水素の生成能を消失させるか、実質的に消失させて過剰なスーパーオキシドの生成から生じるさらなる組織損傷を誘導することなく、所望の免疫応答を促進する治療上の価値を提供する。好ましく設計された治療用抗体組成物は、その抗原結合部位を保持し、特定抗原への標的化が所望の治療上の価値と関連して達成される。

10

【0055】

本発明は、徴候がオキシダントの生成と関連する場合、患者における酸化ストレスに加えて、患者における緩和徴候を改善する方法をさらに意図する。本発明の抗オキシダントによる過酸化水素の抗体介在性生成を阻害する治療方法の例示は、下記に限定するものではないが、異常平滑筋障害を阻害すること、肝臓疾患、癌細胞の増殖を阻害すること、放射線治療を受ける癌患者における炎症を阻害すること、炎症性疾患（関節炎、脈管炎、糸球体腎炎、全身性エリテマトーデス、成人呼吸促迫症候群）、虚血疾患（心臓疾患、脳卒中、腸管虚血、再灌流障害）、血色(素)症、免疫不全症、気腫、臓器移植、胃潰瘍、高血圧、子癇前症、神経病学上疾患（多発性硬化、アルツハイマー病、パーキンソン病、萎縮性側索硬化症および筋ジストロフィー）、アルコール中毒症および喫煙関連疾患を阻害することを包含する。

20

【0056】

酸化ストレスが有害である細胞には、下記に限定するものではないが、内皮細胞、間質性細胞、上皮細胞、筋肉(平滑、骨格のまたは心臓)、ファゴソーム（好中球およびマクロファージを包含する）、白血球、樹状突起、結合組織および神経系細胞を包含する。影響のある組織は、筋肉、神経、皮膚、腺、間充織、脾臓、硬化、内皮および上皮組織が含まれる。

30

【0057】

文献および特許発明には、本発明に記載のような抗体によってオキシダントの生成に関連するもの以外で、酸化ストレスにより誘導される多様な症状を処置するために、抗オキシダントと酸素スカベンジャーの使用を記載している。即ち、US特許5,362,492; 5,599,712; 5,637,315; 5,647,315; 5,747,026; 5,848,290; 5,994,339; 6,030,611および6,040,611の刊行物は、治療的使用を支持するものである。

40

【0058】

本発明のオキシダントおよび酸素スカベンジャーは、多様な許容し得る組成物に処方され得る。化合物が、安定な非毒性の酸性または塩基性塩を形成するのに十分な塩基性または酸性である場合に、塩として化合物を投与するのが適当であり得る。医薬的に許容され得る塩の例示は、薬理的に許容され得るアニオン、例えば、トシル酸塩、メタンサルホン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、マロン酸塩、スクシン酸塩、安息香酸塩、アスコルビン酸塩、 α -ケトグルタル酸塩および β -グリセロホスフェートを形成する酸と形成された有機酸の付加塩である。適当な無機塩も形成され得る、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、重炭酸塩および炭酸塩を包含する。

50

【0059】

医薬的に許容され得る塩は、通常の当業者には既知の方法、例えば、生理学的に許容し得るアニオンを与える適当な酸と、アミンのような十分な塩基性化合物との反応による方法を用いて得られる。カルボン酸のアルカリ金属（例えば、ナトリウム、カリウムまたはリチウム）またはアルカリ土類金属（例えば、カルシウム）塩も作られる。

【0060】

オキシダントおよび酸素スカベンジャーは、医薬的組成物として処方され、哺乳類宿主、例えばヒト患者に、投与の選択ルート、即ち、経口的もしくは非経口的、静脈内、筋肉内、局所的または皮下経路に適合された多様な形態で投与され得る。

【0061】

即ち、本化合物は、全身的、例えば、経口的に、医薬的に許容され得るピークル、例えば、不活性稀釈剤または同化性食用担体などを組み合わせて、投与され得る。それらは、硬質もしくは軟質の殻のゼラチンカプセルで封入されてもよく、錠剤に加圧されてもよく、または患者の食物と共に直接導入されてもよい。経口用治療的投与に関して、オキシダントおよび酸素スカベンジャーは、1以上の賦形剤と組み合わせることができ、摂取し得る、錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハなどの形態で使用され得る。かかる組成物および調製物は、少なくとも0.1%の活性化化合物を含有するべきである。組成物および調製物のパーセンテージは、もちろん変化し、適切には、提供される単位用量形態の約2~60重量%の間で存在する。かかる治療上有用な組成物中のオキシダントおよび酸素スカベンジャーの量は、有効な用量レベルが得られる量である。

10

20

【0062】

また、錠剤、トローチ、ピル、カプセルなどは以下を含有する；賦形剤、例えばリン酸二カルシウム；コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸およびその他；潤沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム；および甘味料、例えば、スクロース、フルクトース、ラクトースまたはアスパルテム、または香味料、例えば、ペパーミント、冬緑油またはチェリー香料が添加され得る。単位用量形態がカプセルである場合、カプセルは、さらに上記のタイプの物質に加えて、液体担体、例えば、植物油またはポリエチレングリコールを含み得る。多様なその他の物質が、被覆剤として存在してもよく、また一方で、固体単位用量形態の物理形態を修飾するために存在してもよい。例えば、錠剤、ピルまたはカプセルは、ゼラチン、ワックス、セラックまたは糖などで被覆され得る。シロップまたはエリキシルは、活性化化合物、甘味料としてスクロースまたはフルクトース、保存剤としてメチルおよびプロピルパラベン、染料およびチェリーまたはオレンジフレーバーなどの香味料を含有する。もちろん、全ての単位用量形態を調製する際に使用される全ての物質は、用いた量で医薬的に許容され得るかつ実質的に非毒性であるべきである。さらに、活性化化合物は、徐放性剤および装置に導入されてもよい。

30

【0063】

また、活性化化合物は、点滴または注射によって、静脈的もしくは腹膜的に投与され得る。活性化化合物またはその塩の溶液は、水で調製され得る、所望により、非毒性界面活性剤と混合され得る。また、分散剤は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、およびそれらの混合物中、および油中で調製され得る。貯蔵および使用に関する通常の条件下で、これらの調製物は、微生物の増殖を防御するために保存剤を含有する。

40

【0064】

点滴または注射のために適当な医薬的用量形態は、注射または点滴し得る滅菌溶液または分散剤の即席調製物に適合され、所望によりリポソームで封入された活性成分をふくむ滅菌水性溶液または分散剤または滅菌粉末を包含する。全てのケースにおいて、最終的な用量形態は、製造および貯蔵の条件下で、無菌、液状および安定であるべきである。液体担体またはピークルは、溶剤または液体分散媒質、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステルおよびそれらの適当な混合物であり得る。適当な液体

50

性は、例えば、リポソームの形成によって、分散剤の場合において所望の粒子サイズの維持によってまたは界面活性剤の使用によって得る。微生物の作用を防止することは、多様な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロザールなどによって得られる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、緩衝液または塩化ナトリウムを包含するのが好ましい。注射し得る組成物の長期吸収は、吸収を遅延する剤、ステアリン酸アルミニウム(I)およびゼラチンの組成物における使用によってもたらされ得る。

【0065】

滅菌性注射し得る溶液は、上記列挙された多様な他の成分と共に適当な溶媒中に、所望の量でオキシダントおよび酸素スカベンジャーを導入することによって製造され、必要であれば、滅菌濾過され得る。滅菌注射可能な溶液を調製するための滅菌粉末の場合では、調製のための好ましい方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、これは、オキシダントおよび酸素スカベンジャーに加えて、先の滅菌濾過溶液中に存在する全て所望の成分の粉末を与える。

10

【0066】

経口投与のために、オキシダントおよび酸素スカベンジャーは、純粋な形態で適用され得る（即ちそれらが液体である場合）。しかし、広く、それらは、組成物または配合物として、皮膚化学的に許容し得る担体と組み合わせ、皮膚に投与することが望まれ、これは固体または液体で存在してもよい。

【0067】

有用な固体担体は、細かく分割された固体、例えば、タルク、クレイ、微小結晶性セルロース、シリカ、アルミナなどを包含する。有用な液体担体は、水、アルコールまたはグリコールまたは水-アルコール/グリコール混合物を包含し、この中で現化合物は、有効レベルで、所望により、非毒性界面活性剤の助けによって、溶解され得るか、分散され得る。フレグランスなどのアジュバンドおよび追加の抗菌剤は、与えられる使用に対して特性を最適化するために添加される。得られる液体組成物は、包帯およびその他の外傷用医薬材料を浸透するために使用して吸収パッドから適用されるか、または、ポンプタイプまたはエアゾールスプレーを用いて罹患箇所へ噴霧され得る。

20

【0068】

濃縮装置、例えば、合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩およびエステル、脂肪アルコール、修飾されたセルロースまたは修飾された鉱物は、使用者の皮膚に直接適用するために、散布可能なペースト、ゲル、軟膏、石鹸などを形成するように液体担体と一緒に用いられてもよい。

30

【0069】

本発明のオキシダントおよび酸素スカベンジャーを皮膚へ射出するのに使用され得る有用な皮膚科学組成物の例示は、当業者には既知である；例えば、Jacquet et al., (U.S. Pat. No. 4,608,392), Geria(U.S. Pat. No. 4,992,478)、Smith et al.,(U.S. Pat. No. 4,559,157)およびWotzman(U.S. Pat. No. 4,820,508)。

【0070】

本発明のオキシダントおよび酸素スカベンジャーの有用な用量は、動物モデルにおけるこれらのイン・ビボ活性とイン・ビトロ活性とを比較することによって決定され得る。マウスおよび他の動物における有効用量のヒトへの外挿法が、当業者には知られている；例えば、U.S. Pat. No. 4,938,949。

40

【0071】

一般的に、ローションなどの液体組成物中の、本発明のオキシダントおよび酸素スカベンジャーの濃度は、約0.1~25重量%、好ましくは約0.5~10重量%である。ゲルまたは粉末などの半固体または固体組成物中の濃度は、約0.1~5重量%、好ましくは約0.5~2.5重量%である。

【0072】

処置において、使用するのに必要な、オキシダントおよび酸素スカベンジャーまたはそれ

50

らの活性な塩または誘導体の量は、選択される特定の塩によってだけでなく、投与の経路、処理される症状の特性および患者年齢および症状によっても変化し、そして最終的には内科医すなわち臨床医の裁量による。

【0073】

しかし、一般的には、適当な用量は、1日あたり、体重の約0.5～約100mg/kg、例えば、1日あたり、患者の体重の約10～約75mg/kg、例えば3～約50mg/kg、好ましくは6～90mg/kg/日、最も好ましくは15～60mg/kg/日の範囲である。

【0074】

オキシダントおよび酸素スカベンジャーは、単位用量形態で投与されるのが便利である；例えば、単位用量形態あたり、活性成分が5～1000mg、有利には10～750mg、最も有利には50～500mg存在する。

10

【0075】

理想的には、オキシダントおよび酸素スカベンジャーは、活性化合物、約0.5～約75μM、好ましくは約1～50μM、最も好ましくは、約2～約30μMのピーク血漿濃度を達成するために投与されるべきである。これは、例えば、0.05～5%のオキシダントおよび酸素スカベンジャー溶液、所望により生理食塩水の静脈注射によって達成されるか、または約1～100mgのオキシダントおよび酸素スカベンジャーを含有する丸薬として経口的に投与され得る。所望の血液レベルは、約0.01～5.0mg/kg/時間を供する連続注射によって維持されるか、約0.4～15mg/kgのオキシダントおよび

20

【0076】

所望の用量は、単回用量、または適切な間隔、例えば1日あたり、2、3、4以上の下位用量として投与される分割用量として、適切に与えられ得る。下位用量それ自身は、さらなる分割、例えば、多くの不連続な間隔をおいての投与；吸入器からの複数回吸入または眼への複数回滴の用途によって、であってもよい。

【0077】

好ましい実施態様においては、抗オキシダントは細胞に入り、そして過酸化水素またはその前駆体酵素分子と反応し、それによって、細胞中の過酸化水素濃度が低下する。別の態様において、抗オキシダントは細胞に入り、または取り巻く外部細胞環境中に存在し、過酸化水素から生成したオキシダントと反応する。

30

【0078】

本発明の治療用組成物、本明細書中に記載のオキシダント、抗体（設計された抗体、および抗体活性を増進するために本明細書に記載のような付加的還元中心を含有する他の分子の両方を含む）は、投与製剤と相溶し得る方法で、そして治療上有効量で投与される。投与される量およびタイミングは、治療される対象、活性成分を利用する対象の許容量、および望まれる治療効果の程度に依存する。投与されるのに必要な活性成分の正確な量は、医師の判断に依存し、各々個体に対して独特である。しかし、様々なタイプの適用に関する適当な用量範囲は、投与経路による。投与についての適当な様式は、変えることが可能であるが、治療用処置の所望の結果を生じるように初期投与に続く間隔をおいての反復投与によって類型化される。

40

【0079】

本発明における使用に対して意図された抗オキシダントは、例えばリポソームのような組成物の形で、所望の結果を仲介するために目的の部位に送達されるが、その調製物はリポソーム-介在性送達に関する当分野の技術者には既知である。別の送達手段は、静脈的に、局所的に、経口的に、吸入によって、挿管によって、腹腔内に、筋肉内に、経皮的および皮下的に投与することを包含するが、これに限定するものではない。

【0080】

本発明の治療用組成物は、組成物中に活性成分として組成物中で溶解するかまたは分散して抗体活性を提供するために、本明細書に記載のような抗オキシダント、または本明細書

50

に記載のような抗体と共に、生理学的に許容できる担体を含有する。好ましい実施態様において、治療用組成物は、哺乳類またはヒト患者に医療目的のために投与される場合、免疫原性でない。

【0081】

組成物中で溶解されるかまたは分散された活性成分を含有する医薬組成物の調製は、当分野では十分に理解されており、処方書を基に限定されない必要がある。通常、かかる組成物は、液体溶液または懸濁液として、注入し得るように調製されるが、しかし、使用前に液体、溶液または懸濁液に適した固体形態が調製され得る。また、該調製物は乳化され得る。

【0082】

活性成分は、本明細書中に記載の治療方法において使用するために適切な量で、医薬上許容し得るか活性成分と相溶し得る賦形剤と共に混合され得る。適当な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールまたは類似物、およびそれらの組み合わせ物である。さらに、所望により、組成物は、活性成分の有効性を増強する少量の補助的物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤および類似物を含有し得る。

【0083】

本発明の治療用組成物は、組成物中の成分の医薬的に許容され得る塩を包含し得る。医薬的に許容され得る塩は、無機酸（例えば、塩化水素またはリン酸）、有機酸（酢酸、酒石酸、マンデリン酸および類似物）と形成される酸付加塩（ポリペプチドの遊離アミノ基で形成される）を包含する。また、遊離カルボキシル基と形成された塩は、無機塩（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは鉄水酸化物）、有機塩（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインおよび類似物）から誘導され得る。

【0084】

医薬的に許容され得る担体は当分野では既知である。液体担体の例示は、活性成分および水、または緩衝溶液、例えば、生理的pH値でリン酸ナトリウム、生理食塩水または両方、例えばリン酸緩衝生理食塩水以外に全く物質を含まない滅菌水性溶液である。また、さらに、水性担体は、1以上の緩衝用塩、例えば、ナトリウムおよびカリウムの塩化物の塩、デキストロース、ポリエチレングリコールおよび他の溶質を含有し得る。

【0085】

また、液体組成物は、さらに水を含まない液体相を含有し得る。かかる追加的な液体相の例示は、グリセリン、植物油（例えば、綿実油）、水-油エマルジョンである。

【0086】

細胞中、組織または器官に加えて細胞外区画において、抗体介在性オキシダント生成の抗オキシダントによる阻害が利益となる他の治療上症状は、当分野の技術者には既知であり、そしてMcCord, *Am. J. Med.*, 108:652-659 (2000)およびBabior et al., *Am. J. Med.*, 109:33-44 (2000)にも概説されている（出典明示により本明細書の一部とする）。

【0087】

B. 抗体活性の提示

一般的に、本発明は、スーパーオキシドまたは過酸化水素の生成が認められる場合の状況において、スーパーオキシドラジカルまたは過酸化水素を生成する全ての抗体の使用を意図するものである。また、本発明は、還元中心を含むように変えて設計された抗体を包含する設計分子の使用を意図するものであり、この存在により、このような生成が望まれる場合、一重項酸素からスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成する可能性が提供される。スーパーオキシドの場合において、2つの保存されたトリプトファン残基を持つ設計されていない抗体と比較して2以上の還元中心を持つ設計分子の使用が、スーパーオキシドの生成が必要とされる場合に許容される。即ち、スーパーオキシドとも呼ばれるスーパーオキシドフリーラジカルの生成に価値がある治療方法について、本発明は、天然の隠れたトリプトファン残基を含有する上記定義の抗体、および本明細書中に記載の設計された抗

10

20

30

40

50

体などの分子の使用を意図するものである。過酸化水素の場合において、更なる還元中心を持つ設計分子の使用が、過酸化水素の増強した生成が必要とされる場合に正当化される。即ち、水素の生成に価値がある治療方法について、本発明は、天然トリプトファン残基を含有する抗体、および本明細書中に記載の設計された抗体などの分子の使用を意図する。

【0088】

過酸化水素またはスーパーオキシドラジカルおよびその連続的過酸化水素の生成が抗体によって生じる症状は、実施例 I および II により完全に記載される。過酸化水素またはスーパーオキシドを生成するための最小要件は、酸素、即ち、有気性状態の存在である。一重項酸素の過酸化水素またはスーパーオキシドラジカルへの生物学的還元は、過酸化水素を生成するが、可視光および紫外線照射条件の両方で生成する。前者において、過酸化水素の生成は、光感作剤分子、例えば、ヘマトポルフィリンの存在において増強される。さらに、紫外線照射は、抗体介在性還元事象に対して必須ではない。光の非存在下において、有気性条件が、光感作剤のスーパーオキシドまたは過酸化水素生成量と共に存在する場合、スーパーオキシドまたは過酸化水素の抗体介在性生成が起こる。

10

【0089】

過酸化水素生成を生じる、過酸化水素またはスーパーオキシドの抗体介在性生成に対する最小要件において、本発明は、抗体が存在しないか、すでに存在する抗体を高めるスーパーオキシドまたは過酸化水素環境をつくりだすための抗体の治療的使用を意図する。このような症状は、本明細書中に記載のような所望の価値のある結果を提供する酸素カスケード化学およびオキシダント生成の分野において医師にはよく知られている。

20

【0090】

ある態様において、本発明は、抗原が一重項酸素から過酸化水素またはスーパーオキシドを生成し得る抗体を包含する組成物と接触される場合、抗原がスーパーオキシドおよび過酸化水素に曝露されるための方法を意図するものである。前記記載のように、該方法は、非特異的または免疫特異的（抗原指向性）本来の抗体、それらから誘導されたフラグメントを用いて成功し、そして一本鎖抗体、さらに本明細書中に記載された設計分子および抗体をさらに包含する。細胞表面での抗体の例示的な濃度は、1 ~ 5 μ M の範囲である。しかし、該濃度は、所望の生理学的効果（即ち、酸化ストレスを生じる過酸化水素またはスーパーオキシドラジカルおよびその誘導体のオキシダントの生成）を得るために十分な抗体の量である場合、所望の結果によって変化しうる。提供された抗体の量は、所望の生理学的効果を得るために十分な抗体の量を提供する。抗体組成物を用いる治療処置の投与量およびタイミングは、上記抗オキシダントに記載のものと適合する。抗原は、細胞上で提示されるが、そのように制限されないのが好ましい。抗原は、それを生成するスーパーオキシドおよび抗体介在性方法が保証される場合、細胞外液を包含する、細胞、組織または器官中に存在する全ての抗原であり得る。好ましい実施態様において、抗原は、脂肪酸、低密度リポタンパク質、炎症と関連した抗原、癌細胞抗原、細菌性抗原または類似の分子である。

30

【0091】

会合される抗原上の細胞は、内皮、間質、上皮、筋肉、ファゴソーム、血液、樹状突起、結合組織および神経組織細胞を包含するが、これに限定されるものではない。本発明の治療上のアプローチに対して特に好ましい標的 T 細胞は、好中球またはマクロファージである。

40

【0092】

本発明は、標的細胞が、抗体を生成するスーパーオキシドまたは過酸化水素の方法において、紫外線、赤外線または可視光の照射に曝露されることをさらに意図する。

【0093】

スーパーオキシドまたは過酸化水素の生成を高めるために、スーパーオキシドまたは過酸化水素生成量の感作剤もまた感作剤として引用され、本明細書中に記載の治療方法において用いられる。本明細書で定義されたように、感作剤は、一重項酸素の濃度を誘導するか

50

、増加する全ての分子である。一般的に、感作剤は照射存在下で使用され、このプロセスは感作剤を活性化するために十分な期間紫外線、赤外線または可視光に曝露することを包含する。例示的曝露は、実施例 I および I I に記載されている。スーパーオキシドまたは過酸化水素生成量の感作剤は、スーパーオキシドまたは過酸化水素が存在し、かつそれらの誘導体が保証される全ての状況において、所望の生理学的効果、例えば、抗体によって媒介される一重項酸素からのスーパーオキシドまたは過酸化水素の生成を得るために十分である感作剤の量である。好ましい実施態様において、感作剤は抗体に接合される。特に好ましい態様において、感作剤接合抗体は抗原に結合し得る、即ち、活性な抗原結合部位を保持し、抗原認識および錯化を発生させ得る。例示的な感作剤は、プテリン、フラビン、ヘマトポルフィリン、テトラキス(4-スルホナトフェニル)ポルフィリン、ビピリジルルルテミウム(ruthemium)(I I) 錯体、ローズベンガル染料、キノン、ローダミン染料、フタロシアニンおよびハイポクレリンを包含するが、これに限定されるものではない。

10

【0094】

さらなる態様において、スーパーオキシドまたは過酸化水素の生成は、一重項酸素の生成を増強するための手段を供することによって増強する。還元された一重項酸素は、以前に説明したようなスーパーオキシドまたは過酸化水素の起源である。かかる還元は、2つ以上の還元中心を含有する抗体または分子の作用によって生じ得る。ある好ましい手段は、一重項酸素を生じるのに有用なすべての分子、化合物、試薬およびその類似物であるプロドラッグとして示される。好ましいプロドラッグは、エンドペロキシドであり、一度に投与され、続いて、抗体を投与するか、または下記に説明したように、抗体と、所望の標的細胞、組織または器官とを接触させる。この意味において、エンドペロキシドは、スーパーオキシドまたは過酸化水素生成抗体または分子が、抗体-抗原複合体を形成するその標的抗原と免疫反応した後に、送達されるのが好ましい。抗体-抗原複合体部位で達成されるためのエンドペロキシドの好ましい濃度は、約10 μm である。この実施態様は、特別な利点を持つ。例えば一重項酸素の高い局所的蓄積を創出する能力は、所望の部位または局所で治療上所望のスーパーオキシドまたは過酸化水素に還元される必要な反応体を提供する。

20

【0095】

一重項酸素からのスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成するための還元中心を持つ設計された抗体または分子を包含する抗体の使用を基にした好ましい治療方法は、癌細胞が一重項酸素からスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成し得る抗体を包含する組成物と接触する、癌細胞を殺傷するための方法を包含する。好ましい実施態様において、抗体は、認識され、癌細胞上で発現した抗原と免疫反応する。このような方法は、肺癌、前立腺癌、大腸癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、膀胱癌、骨腫、白血病、リンパ腫または脳腫瘍に罹った対象に対して治療上有効である。ある態様において、癌細胞は、癌に罹った対象から取り出され、抗体に曝露するためにエクソ・ビボ培養され、さらに、紫外線、赤外線または可視光に曝露され、そして対象に戻される。

30

【0096】

別の態様において、抗体組成物は、癌に罹った患者にイン・ビボ送達される。好ましいイン・ビボ送達方法は、静脈的に、局所的に、経口的に、吸入によって、挿管によって、腹腔内に、筋肉内に、経皮的および皮下にまたは抗体を含有するリポソームによる投与を包含する。

40

【0097】

さらに別の態様において、抗体は、組換え体抗体であり、これは、上記のように提供されるか、または代わりに、発現ベクターから発現され、細胞に送達される。また、本発明中の発現ベクターは感作剤分子を発現し得る。

【0098】

抗オキシダント含有組成物について記載したような医薬的に許容され得る賦形剤および医薬上有効量の治療用組成物は、抗体含有組成物の使用に適用される。

【0099】

50

一重項酸素からスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成し得る抗体を用いることを基にしたさらなる治療方法は、1) 癌細胞の増殖を阻害すること、2) 抗体が癌細胞で発現された抗原を認識し、免疫反応を起こす、患者の癌細胞を標的化し、殺すこと、3) 対象中の好中球介在性炎症と関連した組織障害を阻害すること、例えば、該炎症が細菌感染を生じるまたは対象が自己免疫疾患を有する場合、4) 対象におけるファゴソームの殺菌有効性を増強すること、5) スーパーオキシドまたは過酸化水素が、リンパ球増殖をさらに包含する繊維芽細胞の増殖および/または免疫応答を増進する場合の開口損傷部を有する対象における損傷回復を増進すること、6) 細胞増殖を刺激すること、例えば、対象における損傷中で繊維芽細胞をおよび類似状況を刺激すること、である。損傷回復のために、対象への損傷に対する局所適用は、好ましい送達アプローチ、例えば、抗体を含有する包帯

10

【0100】

2. スクリーニング方法

本発明は、一重項酸素の過酸化水素またはスーパーオキシドラジカルへの新規に発見した抗体還元を基にしたスクリーニング方法をさらに包含する。

【0101】

即ち、ある態様において、本発明は、過酸化水素またはスーパーオキシドの抗体介在性生成を調節する剤を同定するための方法を意図する。モデュレーターは、スーパーオキシドまたは過酸化水素の生成を阻害または増進する分子である。モデュレーターのいずれかの型は、同様の方法で同定し得る。好ましい実施態様において、該方法は下記ステップを包含する：

20

a) スーパーオキシドまたは過酸化水素を生成し得る抗体を含む組成物を、剤と接触させ、分子酸素存在下でアッセイ溶液中の混合物を形成すること、

b) 混合物を照射し、分子酸素から一重項酸素を生成すること（一重項酸素が抗体によって過酸化水素またはスーパーオキシドに還元され、スーパーオキシドジスムターゼが過酸化水素を形成する）、

c) 形成された過酸化水素を検出すること、そして

30

d) 検出された過酸化水素を適切なコントロールと比較し、それによってどのように剤が過酸化水素またはスーパーオキシドの生成を調節するかを測定する。

【0102】

照射ステップは、紫外線または可視光で実施される。可視光と共に、以前に記載されているような感作剤が抗体組成物と共に添加され得る。

【0103】

形成された過酸化水素は、反応した基質が蛍光手段、例えば、蛍光顕微鏡または蛍光分光計で検出される、過酸化水素との直接的な反応によって検出される。蛍光分光計において、検出は、標準キュベットを用いるか、または基にしたELISAである。例示したアッセイ方法は、実施例IおよびIIに記載のように行った。

40

【0104】

本発明の別のスクリーニング方法において、抗体免疫活性を抗原と検出するために免疫アッセイを実施する方法は、抗体生成スーパーオキシドまたは過酸化水素の発見を基に意図される。該方法は、下記のステップを含む：

a) 一重項酸素生成媒質中で、抗原または抗体を含む第一試薬を含む組成物が固定化されている基質を、第一試薬と反応性である抗原または抗体を含む第二組成物と接触させ、固定化された抗原-抗体複合体を形成すること（抗体が、酸素存在下において、一重項酸素からスーパーオキシドまたは過酸化水素を生成する）、そして、

b) 抗体生成スーパーオキシドまたは過酸化水素を検出し、それによって、抗原との抗体免疫活性を検出する。

50

【0105】

反応および検出手段は、本明細書に記載のような方法である。ある態様において、第一組成物は抗原であり、第二組成物は抗体である。逆の実施態様において、第一組成物は抗体であり、第二組成物は抗原である。

【0106】

本発明は、抗原が固定化され、抗体組成物と接触される、抗原との抗体免疫活性を検出するために免疫アッセイを行う別の類似方法を意図する。

【0107】

かかる免疫アッセイ方法は、抗原-抗体免疫活性を評価するため、そして抗原および/または抗体を同定するための方法として十分に知られた方法の改良方法である。以前の別の免疫アッセイ方法を超越する本方法の利点は、少なくとも1つの方法ステップの排除および/または2次的に標識された免疫反応性分子の導入にあり、該ラベルは放射活性または酵素的化合物である。

【0108】

本発明において、最小要件は、酸素、抗体試薬、抗原試薬であり、抗体から生成される過酸化水素と反応する検出し得る反応体である。好ましい反応体は、発蛍光団基質である。実施例IおよびIIに記載したように使用されるこのような特定の反応体は、AMPLIXTM Redと呼ばれる。それは、免疫アッセイにおいて抗体生成過酸化水素を反応するために、Molecular Probes (Eugene, Oregon)から販売される入手可能な試薬である。それは、検出するための蛍光マイクロプレートまたは蛍光計を用いる過酸化水素を測定するために、1-ステップの蛍光団的方法を提供するキットで販売される。アッセイは、過酸化水素に対して高い感受性かつ安定なプローブである、10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジンを用いて過酸化水素の検出に準じる。ホースラディッシュペルオキシダーゼの存在において、AMPLIXTM Red 試薬は、過酸化水素と1:1の化学量で反応し、高い蛍光レゾルフィンを生成し、200ml容量で10ピコモル程度の少量の過酸化水素を検出するための検出メカニズムを提供する。

【0109】

対照的に、放射線免疫アッセイ(RIA)、酵素免疫アッセイ(EIA)および伝統的な酵素結合免疫吸着剤アッセイ(ELISA)を包含する以前の免疫アッセイ技術は、RIAでは放射活性的に標識された免疫反応性分子、または別の標識された免疫反応性分子の使用を全て必要とする。本発明は、分子を標識するために潜在的に有害な放射活性アイソトープまたは、通常、一次抗体と抗原とで形成された複合体の検出を可能にする酵素と接合される2次抗体として広く引用される追加の免疫反応性試薬のどちらも必要としない。後者のアッセイにおいて、形成された抗原-抗体複合体と二次抗体の反応(一般的に、抗一次抗体特異的免疫活性による)は、接合した酵素に特異的な発色基質溶液から検出される。要約すると、本発明において、過酸化水素の抗体介在性生成は、放射活性試薬、別の試薬および/または混合ステップを用いなくて高度な検出能によって検出される。例えば、US Patents 3,905,767; 4,016,043; USRE032696; および4,376,110(出典明示により、本明細書の一部とする)に教示される。

【0110】

3. 治療用組成物

本発明は、上記記載のような治療方法を実施する際に有用な治療用組成物を意図する。抗体は、タンパク質のクラスとして、一重項分子酸素(本明細書では一重項酸素としても引用される)を還元する際の還元剤として作用し、スーパーオキシドフリーラジカル(本明細書中ではスーパーオキシドとしても引用されている)を生成することがわかった。酸化還元反応の結果として、抗体は酸化されるようになる。抗体の酸化は、実施例Iでさらに説明するように2つの埋められたトリプトファン残基でおこることがわかった。活性は、トリプトファン残基のインドール成分にさらに与えられる。即ち、一重項分子酸素をスーパーオキシドフリーラジカルに還元する反応において、インドール部分が酸化されるようになりラジカルカチオンを形成する酸化還元反応を考えると、インドールは還元中心とし

10

20

30

40

50

て引用される。本発明で定義されたような還元中心は、一重項酸素をスーパーオキシドに還元する能力を持ち、かつプロセス中で酸化されるようになるものである。好ましくは、還元中心は、溶媒曝露されない場合、即ち、還元中心が本明細書中で定義された治療用組成物中に埋められる場合にさらに有効である。

【0111】

また、治療用組成物は、水の酸化により過酸化水素を生成する抗体および設計分子を用いる上記記載の治療方法に従って、生成および使用され得る。タンパク質のクラスとしての抗体は、水の酸化を触媒し、過酸化水素を生成することがわかった。この活性は保存されたトリプトファン残基に帰する。

【0112】

従って、本発明は、過酸化水素またはスーパーオキシド生成の局所濃度を低下するように作用するのに有用であるか、または別の有用性においてそれを増強するように作用するのに有用である治療用組成物を意図する。かかる組成物は、本明細書中で定義された「設計された」ものとして広く引用される物質を含み、物質、例えば本明細書中に定義したようなそれらの抗体またはフラグメント、または本明細書中で定義したような還元中心の数を増加または低下するようにいくつかの形態に変化された別の分子を含む。

【0113】

従って、本発明は、一重項酸素から過酸化水素またはスーパーオキシドフリーラジカルを生成する能力の少なくとも低下を示すように設計された抗体を意図する。その意味において、この抗体は、少なくとも1つのその還元中心を欠き、そして好ましくは還元中心を実質的に含まない。かかる抗体組成物は、当分野における技術者には既知の組換え体発現方法を用いて容易に調製される。好ましい実施態様において、この抗体は、同一のアミノ酸残基数を保持するが、しかし、還元中心は、一重項酸素を還元する能力を欠く成分で、置換すなわち代用されている。かかる態様において、還元中心は、埋められたインドール、好ましくは、スーパーオキシドの場合では2つの埋められたインドールを包含する。特に好ましい実施態様において、還元中心は、還元能を持たない別のアミノ酸によって置換されたトリプトファン残基上のインドールを含む。このような好ましい置換基は、アミノ酸のフェニルアラニンおよびアラニンを包含する。別の態様において、本発明は、所望の抗体活性、特に抗原結合活性が悪影響を与えられない限り、それらの置換または代用をせずにトリプトワンの削除を意図する。前述のように、抗原標的化能を保持しながら、還元中心の低下を示すかまたは還元中心持たない設計された抗体は、過酸化水素またはスーパーオキシド、および細胞および組織をさらに損傷するその副産物の望ましくない生成を全体として低下または消失している特別な状況において、所望の免疫応答を促進する抗体を提供する治療上の利点をもたらす。本明細書中に記載の治療方法において抗オキシダントとして機能する設計された抗体を作る方法は、当分野では既知であり、例えば、前記したように目的の抗体をコードするヌクレオチド配列の部位 - 指向性突然変異である。

【0114】

本発明の方法に従って抗オキシダントとしての機能する設計された抗体は、本明細書に記載の全ての方法を意図する。

【0115】

また、本発明は、治療分子がスーパーオキシドまたは過酸化水素の十分な生成を有効にするために不十分な量で存在する場合、または治療分子が分子または抗体において自然に発生する多くの過剰物に対して還元中心の数を増加する必要がある場合、還元中心を含有するように変更されている設計された抗体を包含する設計された治療分子も意図する。設計分子または抗体における還元中心の導入は、当分野で通常の方法を持った技術者には既知の方法によって達成される。組換え体発現方法やタンパク質合成方法を包含する好ましい手段は以前に説明されている。方法の選択は、設計される分子の長さに必然的に依存する。用いた方法にかかわらず、位置決定、即ち、設計された還元中心のロケーションは、設計分子が一重項酸素に対する還元活性を示す能力を基にされる。還元中心の導入は、それらがスーパーオキシドまたは過酸化水素の生成を含まずに構造的な能力の保持を可能にする

10

20

30

40

50

折りたたまれた分子中に深く埋められるように位置づけられのが好ましい。ある実施態様において、抗原結合機能を保持することが望まれる抗体では、設計された還元中心の位置は可変結合ドメインに隣接している。ある特定の態様において、1つの還元中心が意図される。別の態様においては2つの還元中心が意図される。さらに別の態様において、3つ以上の還元中心が意図される。好ましくは、還元中心はインドールを含む。また、意図されるものは、トリプトファン残基中に存在するインドールを含む還元中心である。分子または抗体中にそのような還元中心を設計するための全ての技術が、本発明中で使用されると意図される。好ましい実施態様において、還元中心は、置換されたヌクレオチドがコードされた分子中に予め決定された位置でトリプトファン残基をコードするように、設計された抗体をコードするヌクレオチド配列の部位 - 指向性突然変異によって導入される。

10

【0116】

所望の還元中心を包含するように設計分子、例えば抗体などを調製する実施態様において、組換え体技術によって生成されたかか分子は、接合体が本明細書に記載の治療方法における使用のために前記のように感作分子を与える場合に、融合接合体の形態で存在することも意図される。

【0117】

設計された抗体または別の分子は、それらが本発明の方法に従って機能する還元中心を含有するような全てのタンパク質またはペプチドであり、本明細書に記載のような全ての方法を意図される。

【0118】

本発明は、下記の実施例を非限定的に引用してさらに詳細に説明される。本発明はそれらの好ましい特定の実施態様を引用して詳細に説明されるものであるが、修飾および変法は明細書中に記載の精神および範囲内であると解されるべきである。

20

【0119】

実施例 1

抗体が抗原を破壊する固有の能力を有する材料および方法

抗体：下記的全抗体を PharMingen から入手した。49.2 (マウス Ig G_{2b})、G155-178 (マウス Ig G_{2a})、107.3 (マウス Ig G₁)、A95-1 (ラット Ig G_{2b})、G235-2356 (ハムスター Ig G)、R3-34 (ラット Ig G)、R35-95 (ラット Ig G_{2a})、27-74 (マウス Ig E)、A110-1 (ラット Ig G₁)、145-2C11 (ハムスター Ig G グループ1)、M18-254 (マウス Ig A)、MOPC-315 (マウス Ig A)。下記を Pierce から入手した：31243 (ヒツジ Ig G)、31154 (ヒト Ig G)、31127 (ウマ Ig G)、31146 (ヒト Ig M)。

30

【0120】

下記 F(ab')₂ フラグメントを Pierce から入手した：31129 (ウサギ Ig G)、31187 (ウサギ Ig G)、31214 (ヤギ Ig G)、31165 (ヤギ Ig G)、31203 (マウス Ig G)。タンパク質 A、タンパク質 G、トリプシン-キモトリプシン阻害剤 (Bowman-Birk 阻害剤)、 α -ラクトグロブリン A、 α -ラクトアルブミン、ミオグロブリン、 α -ガラクトシダーゼ、チキンエッグ・アルブミン、アプロチニン、トリプシノゲン、レクチン (ピーナッツ)、レクチン (Jacalin)、BSA、スーパーオキシドディムスターゼ、カタラーゼを Sigma から入手した。リボヌクレアーゼ IA を Amersham Pharmacia から入手した。下記の免疫グロブリンをハイブリドーマ法により社内で作成した：OB2-34C12 (マウス Ig G₁)、SHO1-41G9 (マウス Ig G₁)、OB3-14F1 (マウス Ig G_{2a})、DMP-15G12 (マウス Ig G_{2a})、AD1-19G1 (マウス Ig G_{2b})、NTJ-92C12 (マウス Ig G₁)、NBA-5G9 (マウス Ig G₁)、SPF-12H8 (マウス Ig G_{2a})、TIN-6C11 (マウス Ig G_{2a})、PRX-1B7 (マウス Ig G_{2a})、HA5-19A11 (マウス Ig G_{2a})、EP2-19G2 (マウス Ig G₁)、GNC

40

50

-92H2 (マウスIgG₁)、WD1-6G6 (マウスIgG₁)、CH2-5H7 (マウスIgG_{2b})、PCP-21H3 (マウスIgG₁)、TM1-87D7 (マウスIgG₁)。DRBポリクローナル(ヒトIgG)およびDRB-b12 (ヒトIgG)をDennis R. Burton (The Scripps Research Insutitute) から供給を受けた。1D4Fab (結晶)をIan A. Wilson (The Scripps Research Insutitute) から供給を受けた。

【0121】

すべてのアッセイをPBS (10 mMリン酸 / 160 mM塩化ナトリウム、pH 7.4) で実施した。市販のタンパク質溶液は必要に応じてPBS中に透析した。Amplex Red 過酸化水素アッセイキット(A-12212)をMolecular Probes から入手した。

10

【0122】

抗体 / タンパク質照射：別に述べない限り、アッセイ溶液 (100 μl、6.7 μMタンパク質のPBS液、pH 7.4) をガラスバイアルに入れ、スクリュウキャップで密封し、UV (312 nm、8000 μW cm⁻² Fischer-Biotech トランスイルミネーター) または可視光線を照射した。

【0123】

過酸化水素についての定量アッセイ：タンパク質溶液のアリコート (20 μl) を取り、反応緩衝液 (80 μl) を含有する96-ウェルマイクロタイタープレート (Costar) のウェルに加えた。作業溶液 (100 μl / 400 μM Amplex Red 試薬 1 / 2 単位 / ml ホースラディッシュ・スーパーオキシダーゼ) を加え、プレートを暗所で30分間インキュベートした。ウェル成分の蛍光をCytoFluoru Multiwell Plate Reader (Series 4000, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA; Ex/Em: 530/580 nm) で測定した。過酸化水素濃度を標準曲線で決定した。すべての実験を2回行い、率を少なくとも2回の測定の平均で表す。

20

【0124】

感作および反応停止アッセイ：31127 (100 μlのウマIgG、6.7 μM) のPBS (pH 7.4、4%ジメチルホルムアミド) 溶液およびヘマトポルフィリンIX (40 μM) を裸光の近くに置いた。過酸化水素濃度を記載のように測定した。アッセイをD₂O中でNaN₃ (100 mM) またはPBSの存在で行った。

【0125】

酸素依存性：31127 (1.6 mlのウマIgG、6.7 μM) のPBS (pH 7.4) 溶液について、アルゴン下で凍結 / 氷解法で激しくガス抜きを行った。アリコート (100 μl) を、O₂ / Ar大略混合物 (0 - 100%) を予め通した各ウェル密封ガラスバイアルにシリンジを介して導入した。溶解酸素濃度をOrion 862 A溶解酸素計で測定した。溶液を激しく攪拌し、20分間置いて、再び攪拌した。必要なO₂ / Ar混合物を含有するシリンジを用いて、実験中、大気圧を保持した。アリコート (20 μl) をガス密封シリンジで取りだし、過酸化水素濃度を記載のように測定した。3つの別個の実験からのデータを整理し、Enzyme Kinetics v1.1 コンピューター・プログラムで分析した (V_{max} およびK_m パラメーターの決定のために)。

30

【0126】

化学的¹O₂源を用いる暗所における過酸化水素の抗体調製：ヒツジIgG31243 (100 μl、20 μM) のPBS溶液 (pH 7.4) および3,3'- (1,4-ナフチリデン) ジプロピオン酸ジナトリウムのエンドスーパーオキシドを、温かい部屋 (37 °C) において30分間暗所に置いた。過酸化水素濃度を記載のように測定した。

40

【0127】

Fab1D4結晶による過酸化水素の形成：1D4のFabフラグメント結晶の懸濁液 (2 μl) をPBS (198 μl、pH 7.4) に希釈し、緩やかに攪拌した。遠心後、上澄み液を除去し、洗浄を2回さらに繰り返した。残る結晶懸濁液をPBS、pH 7.4 (100 μl) に希釈し、石英ELISAプレートのウェルに加えた。UV照射を30分間行った後、Amplex Red 作業溶液 (100 μl) を加え、混合物を蛍光顕微鏡で観察した

50

。

【0128】

抗体蛍光と過酸化水素形成：31127 (1.0 ml のウマ IgG、6.7 μM) の PBS 溶液 (pH 7.4) を石英キュベットに入れ、UV 光で 40 分間照射した。10 分間隔で、溶液の蛍光を SPF-500C 蛍光分析計 (SLM-Aminco, Urbana, IL; Ex/EM, 280/320) で測定した。同じ時点で、溶液のアリコート (20 μl) を取りだし、過酸化水素濃度を記載のように測定した。

【0129】

カタラーゼによる過酸化水素の消費：EP2-19G12 の溶液 (100 μl のマウス IgG、20 μM の PBS 溶液、pH 7.4) を UV 光で 30 分間照射し、ついで過酸化水素濃度をスティック試験 (EM Quant Peroxide Test Sticks) で測定すると、2 mg/L であった。カタラーゼ [1 μl、Sigma、3.2 M (NH₄)₂SO₄、pH 6.0] を加え、1 分後で H₂O₂ 濃度が 0 mg/L であった。

10

【0130】

変性：IgG19G12 (100 μl、6.7 μM) をエッペンドルフ管中で 2 分間 100 に加熱した。得た溶液をガラスのスクリーキャップバイアルに移し、UV 光で 30 分間照射した。H₂O₂ 濃度を 30 分後に測定した。

【0131】

結果と考察

前世紀末の研究からして、免疫系の液素性成分についての戦略に共通の認識が持たれている。その基本は、殺すために、抗体分子が抗体-抗原結合に応答する追加の系を活性化することである。免疫系が抗体分子自体に本質的な、かつて知られていなかった化学ポテンシャルを有することをここに報告する。試験したすべての抗体は、源または抗原特異性にもかかわらず、分子酸素を過酸化水素に換え、それでもって、同じ分子中で認識および殺略を強力に整える。免疫系に新しい化学的武器をもたらすことを別にしても、これらの結果は、ヒトの疾患において、抗体がいかに発達しいかなる役割を演じるかを理解するのに重要であると思われる。

20

【0132】

抗体は顕著なアダプター分子であり、外来侵入物に対する脊椎動物の防禦前線に分子を置く標的およびエフェクターの両機能を発達せしめる (Burton, D. R., Trends Biochem. Sci., 15, 64-69 (1990))。エフェクターのメカニズムにおいて、中心的な考えは、抗体自体が破壊能を有さずに、補体カスケードおよび/または食作用による除去のために外来物を認識することである (Arlaud et al., Immunol. Today, 8, 106-111(1987); Sim & Reid, Immunol. Today, 12, 307-311 (1991))。

30

【0133】

抗体触媒作用の出現によると、抗体は簡単な結合よりもさらに複雑な複合をなし得る (Wentworth & Janda, Curr. Opin. Chem. Biol., 2, 138-144 (1998))。このことは必然的に、さらに精密な化学的メカニズムが抗体分子自体についての戦略部分かどうかの問題に導く。現在まで、この考えを支持する証拠はなかったが、抗体が複合化学で有り得ることからして、抗体が宿主防衛において複合体を用いていることを意味しないとの考えに委ねる。しかし、分子酸素を過酸化水素に転換する抗体のいままで知られていなかった能力により、認識と殺略を効果的に結びつけ得ることをここに報告する。

40

【0134】

食作用的酸化突発における予備的工程は、スーパーオキシドアニオン (O₂⁻) をつくる NADPH 依存の膜貫通性食作用オキシダーゼ酵素系による基底状態の分子酸素 (³O₂) の単一電子還元である (図 1) (Klebanoff, S. J. in Encyclopedia of Immunology, eds. Delves, P. J. & Roitt, I. M. (Academic, San Diego), pp. 1713-1718 (1998); Rosen, H. & Klebanoff, S. J., J. Biol. Chem., 252, 4803-4810 (1997))。

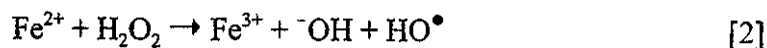
【0135】

スーパーオキシドアニオンは、インビボでの酸素依存性殺微生物剤のサイクリングにおい

50

て重要な位置を占める。これ自体が細胞毒性と考えられないが (Fee, J. A. in International Conference on Oxygen and Oxygen-Radicals eds. Rodgers, M. A. J. & Powers, E. L. (Academic, San Diego, and University of Texas at Austin), pp. 205-239 (1981))、これは、過酸化水素の直接の前駆物であり、毒性の誘導体、ヒドロキシル基 (HO^\cdot) や次亜ハロゲン酸 (HOCl) をつくるからである。さらに、イオン濃度が限られているとき、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ は、 Fe^{2+} を再生成する活性還元剤であり、イオン触媒 Haber-Weiss 反応、または HO^\cdot をつくる、いわゆるスーパーオキシド駆動 Fenton 反応を促進する (式 1 および 2)。従って、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の生成を促進する方法は、最終的に酸素依存性殺微生物作用を起こし促進する。

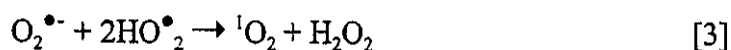
【化 1】



【0136】

酸化スカベンジャーカスケードの他の重要な要素は、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) である。この特に反応性の種は、両外側殻電子がスピン対である分子酸素の励起状態にある (Keans, D. R., Chem. Rev., 71, 395-427 (1971))。これは、病理的生物系において重要であり、インピボで非常に存在が短い (約 μ 秒) (Foote, C. S. in Free Radicals in Biology, ed. Pryor, W. A. (Academic, New York), pp. 85-133 (1976))。殺微生物プロセスにおける $^1\text{O}_2$ 生成は、フラボタンパク質オキシダーゼの作用を介して直接的であるか (Allen R. C., Stjernholm, R. L., Benerito, R. R. & Steele, R. H., eds. 498-499 (1973); Klebanoff, S. J. in The Phagocytic Cell in Host Resistance (National Institute of Child Health and Human Development, Orlando FL) (1974))、食胞中に見られるような、低 pH での $\text{O}_2^{\cdot-}$ 溶液の非酵素的不均衡を介して間接的である (Stauff, J., Sande r, U. & Jaeschke, W., Chemiluminescence and Bioluminescence, eds., Williams, R. C. & Fudenberg, H. H. (Intercontinental Medical Book Corp., New York), pp. 131-141 (1973); Allen, R. C. Yevich, S. J., Orth, R. W. & Steele, R. H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 909-917 (1974))。

【化 2】



【0137】

$^1\text{O}_2$ の生物分子との高い反応性は、このものが酸素スカベンジャー剤のカスケードにおける終末点であると一般的に考えられることを意味していた。しかし、抗体が、ひとつのクラスのタンパク質として、 $^1\text{O}_2$ を遮りそれを $\text{O}_2^{\cdot-}$ に効果的に還元する本来の能力を有し、食作用中に酸素が救済されて再循環されるメカニズムを提供し、それによって免疫系の微生物作用を強化することを見出した。

【0138】

元々の免疫グロブリンおよび抗体フラグメントのパネルによる過酸化水素の形成の初速度についての測定値を表 1 にまとめる。Ig 生成 $\text{O}_2^{\cdot-}$ が自動的に H_2O_2 に不均化し、これがホースラジッシュスーパーオキシダーゼについて N-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェナジン 1 (Amplex Red) と補基質として利用され、高度の蛍光レソルフィン 2 (励起最大 563 nm、放出最大 587 nm) をつくる (図 2) (Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N. & Haugland, R. P., Anal. Biochem., 253m 162-168 (1997))。緩衝液の照射が $\text{O}_2^{\cdot-}$ をつくらないこと、および抗体がタンパク質ジスムターゼとして簡単に作用しないこと (Petyacev, I. M. & Hunt, J. V., Redox Report, 2, 365-372 (1996)) を確認するために、酵素スーパーオキシドキシダーゼを PBS 中で照射した。これらの条件で、

10

20

30

40

50

過酸化水素生成の速度はPBS単独の照射と同じである。

【0139】

表1. 免疫グロブリンによる過酸化水素の生成

【表1】

表1. 免疫グロブリンによる過酸化水素の産生

番号	クローン	生物起源	アイソトープ	速度, nmol/min/mg
1	CH25H7	マウス	IgG2b, κ	0.25
2	WD16G6	マウス	IgG1, κ	0.24
3	SHO-141G9	マウス	IgG1, κ	0.26
4	OB234C12	マウス	IgG1, κ	0.22
5	OB314F1	マウス	IgG2a, κ	0.23
6	DMP15G12	マウス	IgG2a, κ	0.18
7	AD19G1	マウス	IgG2b, κ	0.22
8	NTJ92C12	マウス	IgG1, κ	0.17
9	NBA5G9	マウス	IgG1, κ	0.17
10	SPF12H8	マウス	IgG2a, κ	0.29
11	TIN6C11	マウス	IgG2a, κ	0.24

10

20

【表2】

番号	クローン	生物起源	アイソトープ	速度, nmol/分/mg	
12	PRX1B7	マウス	IgG2a, κ	0.22	
13	HA519A4	マウス	IgG1, κ	0.20	
14	92H2	マウス	IgG1, κ	0.41	
15	19G2	マウス	IgG1, κ	0.20	
16	PCP-21H3	マウス	IgG1, κ	0.97	
17	TM1-87D7	マウス	IgG1, κ	0.28	10
18	49.2	マウス	IgG2b, κ	0.24	
19	27-74	マウス	IgE, std. イソタイプ	0.36	
20	M18-254	マウス	IgA, κ	0.39	
21	MOPC-315	マウス	IgA, λ	0.39	
22	31203	マウス	F(ab') ₂	0.21	
23	b12	ヒト	IgG	0.45	
24	ポリクローナル	ヒト	IgG	0.34	
25	31154	ヒト	IgG	0.18	
26	31146	ヒト	IgM	0.22	20
27	R3-34	ラット	IgG1, κ	0.27	
28	R35-95	ラット	IgG2a, κ	0.17	
29	A95-1	ラット	IgG2b	0.15	
30	A110-1	ラット	IgG1, λ	0.34	
31	G235-2356	ハムスター	IgG	0.24	
32	145-2C11	ハムスター	IgG, gp 1, κ	0.27	
33	31243	ヒツジ	IgG	0.20	
34	31127	ウマ	IgG	0.18	30
35	ポリクローナル	ウマ	IgG	0.34	
36	31229	ラビット	F(ab') ₂	0.19	
37	31189	ラビット	F(ab') ₂	0.14	
38	31214	ヤギ	F(ab') ₂	0.24	
39	31165	ヤギ	F(ab') ₂	0.25	

* アッセイ条件は、材料および方法の項に記載する。

† 少なくとも2測定の平均値。H₂O₂形成のバックグラウンド速度は、PBS中で0.005 nmol/min、SODを含むPBS中で0.003 nmol/minである。

【0140】

過酸化水素形成の速度は、環境条件でのPBS中の酸素濃度(275 μM)に関して反応の10%以上について直線的であった。十分な酸素の利用性をもって、抗体は、タンパク質分子に対し少なくとも40等量のH₂O₂を、活性や構造的フラグメント化の有意な低下なしに生成する。抗体19G2の存在および不存在での過酸化水素形成の初時間過程の例を図3Aに示す。この活性は加熱によるタンパク質の変性後にはなくなる。

【0141】

表1中のデータは、抗体が¹O₂からH₂O₂をつくる一般的な能力を表す。この機能は種の範囲にしたがって共有され、調べた重鎖または軽鎖の組成や抗原の特異性に独立的なようである。元々の抗体についての過酸化水素形成の初速度は高く保持され、すべてのパ

40

50

ネルを通して $0.15 \text{ nmol} / \text{min} / \text{mg}$ [クローン A95-1 (ラット IgG2b)] から $0.97 \text{ nmol} / \text{min} / \text{mg}$ (クローン PCP-21H3、ネズミモノクローナル IgG) の間にある。利用可能な情報が成分抗体フラグメントについて限定されているが、その活性は Fab および $F(ab')_2$ フラグメントの両方に存在するようである。

【0142】

もしこの活性が汚染物によるのであれば、様々な源から得たすべての抗体およびそのフラグメント中に存在するはずである。しかし、汚染を除外するために、高分解 X 線構造が得られている (1.7 で) ネズミ抗体 1D4 Fab の結晶について、 H_2O_2 をつくる能力を調べた (図 4)。 $^1\text{O}_2$ の還元をこれらの結晶において明らかに認める。

【0143】

この抗体の変換形成についての検査は、還元される中間体としての一重項酸素を支持する。過酸化水素の形成は、抗体でもって嫌気条件で UV 照射の存在または不存在のいずれにおいても起きない。さらに、過酸化水素の生成は環境有気性条件で照射なしで起きない。 $^3\text{O}_2$ の既知光感作剤水溶液の存在における可視光線での抗体の照射 (Kreitner, M., Alth, G., Koren, H., Loew, S. & Ebermann, R., Anal. Biochem., 213, 63-67 (1993)) は、過酸化水素の形成をもたらす (図 5 A)。観察された速度での曲線は、アッセイ混合物中からの酸素の消費による。光励起 HP と酸素との相互作用が O_2 形成をもたらすとの懸念 (Beauchamp, C & Fridovich, I., Anal. Biochem., 44, 276-287 (1971); Srinivasan, V. S., Podolski, D., Westrick, N. J. & Neckers, D. C., J. Am. Chem. Soc., 100, 6513-6515 (1978)) は、感作剤のみの適当なバックグラウンド実験によってほとんどなくすることができる (データを図 5 A に示す)。HP および可視光線の両方での過酸化水素の効率的な形成は $^1\text{O}_2$ の仲介を意味し、Ig がこの還元をなすのに UV 照射が必要でないことを表す。

【0144】

さらに、ヒツジ抗体 31243 を暗所 37 で $^1\text{O}_2$ の化学源 [3',3'-(1,4-ナフチリデン)ジプロピオン酸のエンドスーパーオキシド] とともにインキュベートすると、過酸化水素が形成する。

【0145】

可視光線において HP ($40 \mu\text{M}$) でウマ IgG による H_2O_2 の形成速度は、 D_2O の存在で増加し、 $^1\text{O}_2$ 失活剤 NaN_3 (40 mM) で減少する (図 5 B) (Hasty, N., Merkel, P. B., Radilick, P. & Kearns, D. R. Tetrahedron Lett., 49-52 (1972))。 H_2O を D_2O で置換すると $^1\text{O}_2$ 仲介プロセスを促進してその存在を約 10 倍増加することが知られている (Merkel, P. B., Nillson, R. & Kearns, D. R., J. Am. Chem. Soc., 94, 1030-1031 (1972))。

【0146】

過酸化水素の形成速度は、IgG 濃度に 0.5 から $20 \mu\text{M}$ の間で比例するが、より高い濃度で曲線となり始める (図 5 C)。タンパク質溶液における $^1\text{O}_2$ の寿命は、反応機会からして純水では低いと思われる。したがって、観測された湾曲は抗体との反応による $^1\text{O}_2$ 寿命の低下に起因するのであろう。

【0147】

明らかに、 H_2O_2 生成の観測速度に対する酸素濃度の作用は、約 $200 \mu\text{M}$ の酸素の有意の飽和を示す (図 5 D)。従って、還元メカニズムは、抗体分子中に 1 以上の酸素結合部位を含み得る。速度の素データを非直線的退行分析で処理し、Michaelis-Menten の式に適合させると、 $K_{m \text{ app}}(\text{O}_2) 187 \mu\text{M}$ および $V_{m \text{ ax}} \text{ app } 0.4 \text{ nmol} / \text{min} / \text{mg}$ を得る。この抗体速度はインピボで分子酸素を還元するミトコンドリア酵素について観測されるものと等しい。

【0148】

抗体が $^1\text{O}_2$ を還元するメカニズムはすでに観測されている。しかし、金属仲介酸化還元プロセスの関与は、EDTA 含有の PBS (4 mM) での完全透析後も抗体の酸度が変化せずに留まるので、ほとんど除外されている。これは、抗体自体のアミノ酸組成物の固有

10

20

30

40

50

の能力を残す。加えて、ジスルフィドも酸化され得るのに十分な電子に富んでいる (Bent, D. V. & Hayon, E., J. Am. Chem. Soc., 87, 2612-2619 (1975))。トリプトファン (Trp) などの芳香族アミノ酸は電子転移を介して $^1\text{O}_2$ により酸化され得る (Grossweiser, L. I., Curr. Top. Radiat. Res. O., 11, 141-199 (1976))。従って、Trp が存在し、および/またはすべての抗体に相同の細胞内または細胞間のジスルフィド結合が $^1\text{O}_2$ 還元の原因である可能性がある。この抗体の能力が他のタンパク質にどの程度共有されているか、還元メカニズムをプローブするかを検討するために、他のタンパク質のパネルを調べた (図 6)。

【0149】

他のタンパク質は $^1\text{O}_2$ を O_2 に転換できるが、抗体と異なり、これは決して普遍的な性質ではない。RNase A およびスーパーオキシドディムスターゼは、Trp 残基を保持しないが、いくつかのジスルフィド結合を有し、 $^1\text{O}_2$ を還元しない。同様に、いくつかのジスルフィド結合を有し、Trp 残基のない Bowman-Birk 阻害タンパク質 (Voss, R.-H., Ermler, U., Essen, L.-O., Wenzl, G., Kim, Y.-M. & Flecker, P., Eur. J. Biochem., 242, 122-131 (1996); Baek, J. & Kim, S., Plant. Physiol., 102., 687 (1993)) は、 $^1\text{O}_2$ を還元しない。一方、チキン・オボアルブミンは、2 Trp 残基のみを有し (Feldhoff, R. & Peters, T. J., Biochem. J., 159, 529-533 (1976))、 $^1\text{O}_2$ の還元における最も効率的なタンパク質のひとつである。

10

【0150】

変性時の抗体活性の損失からして、タンパク質における要の残基の位置がその絶対数よりも重要なようである。タンパク質における芳香族残基の大部分が一般的に埋没して構造的安定性を促進するので (Burley, S. K. & Petsko, G.A., Science, 229, 23-28 (1985))、還元過程の本質を、蛍光停止実験により表面および埋没残基の相対的関与について調べた。タンパク質中の芳香族アミノ酸は紫外線の吸収により改変される。特に分子酸素やオゾンなどの感作剤の存在で改変される (Foote, C.S., Science, 162, 963-970 (1968); Foote, C.S., Free Radicals Biol., 2, 85-133 (1976); Gollnick, K., Adv. Photochem., 6, 1-122 (1968))。Trp は $^1\text{O}_2$ と [2 + 2] シクロ付加を介して反応し、N-ホルミルキヌレニンまたはキヌレニンをつくる。この両者は、埋没 Trp 残基の放出を有意に停止することが知られている (Mach, H., Burke, C.J., Sanyal, G., Tsai, P.-K., BVolkin, D.B. & Middangh, C.R. in Formulation and Delivery of Proteins and Peptides, eds. Cleland, J.L. & Langer, R. (American Chemical Society, Denver, CO) (1994))。ウマ Ig G の固有の蛍光は 40 分間の照射中に元の値の 30% に速やかに停止する。一方、過酸化水素の生成は直線的である ($k^2 = 0.998$) (図 7)。

20

30

【0151】

一重項酸素の還元が抗体 Trp 残基によると、溶媒曝露 Trp が埋没のものより低い程度で関与しているようである。この因子は、なぜこの能力が抗体中に非常に高く保存されているのかを説明するのに役立つ。既知抗体の 99% 以上において 2 保存 Trp 残基: Trp-36 および Trp-47 が存在し、両者とも深く埋没している (Kabat, E.A., Wu, T. T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. & Foeller, C., Sequences of Proteins of Immunological Interest (U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) (1991))。

40

【0152】

本質を通して、生体は自分自身を比較的単一の化学物質の生成により保護している。単一分子レベルで、このメカニズムは、脊椎動物の免疫系に出現するとほぼ放棄されると考えられている。標的デバイスが発達すると、殺メカニズムが他所に移動すると思われる。この結果は同じ分子内での殺作用を有する認識を再編する。ある意味で、この化学的免疫系は低級生物の純粋に化学的な防禦メカニズムに匹敵する。ただ、さらに精密な種々の標的エレメントが加わる点異なる。

【0153】

理想的な殺作用系が自己障害を最小にしながら局所的に宿主分子を利用せねばならないと

50

の拘束からして、 $^1\text{O}_2$ 以上の妥当な選択を考え得ない。すでにこのような活性分子を有しているので、抗体によるそのさらなる転換の利点がなにであるかを問うことが重要である。要の問題は、一時的な一重項酸素分子（寿命 $4\ \mu\text{s}$ ）のさらに安定な O_2 への転換により、それが生成する過酸化水素およびすべての毒性産物に到達したことである。さらに、スーパーオキシドが、酸素スカベンジャーカスケードの終了時点で残存する唯一の等価の分子酸素である。従って、この「リサイクリング」が殺微生物プロセスの強化のため主要なメカニズムとして役立つであろう。一重項分子酸素の他の利点は、この分子が、宿主が攻撃されたときに存在するのみであり、それによってこの分子を「事象誘発の」基質となし得ることである。また、補助系を用いて防禦する別の方法があるので、免疫系のこの化学的武器は多くの環境で沈黙しているであろう。しかし、抗体および一重項酸素が自体を並列的にみて、細胞および組織の障害の起さる疾患状態があり得る。ヒトにおける様々な事象が一重項酸素の生成をもたらすことから、抗体によるその活性化は、自己免疫から再灌流損傷および動脈硬化症に至るまでの種々の疾患を起こし得る (Skepper et al., *Microsc. Res. Tech.*, 42, 369-385 (1998))。 10

【0154】

実施例 2

抗体が水の酸化を触媒する

方法および材料

結晶学：IgG4C6をパイピンで消化し、Fab'フラグメントを標準的プロトコール (Harlow and Lane) で精製した。Fab'を13-18%PEG8K, 0.2MのZnAc、0.1Mカコジル酸塩、pH6.5で結晶化した。結晶にキセノン気体200psiで2分間加圧し (Soltis et al., *J. Appl. Cryst.*, 30, 190, (1997))、液体窒素で急激に冷やした。データをSSRLBL9-2での2.0 分解まで収集した。構造を、元の4C6構造からの協調体を用いる分子置換により解明し、キセノン原子部位を異なるフリーエ・マップ中の強いピークから同定した。構造の純化をCNS (Bruenger et al., *Acta Crystallogr.*, D54, 905 (1998)) において、最終 $R = 23.1\%$ および $R_{free} = 25.7\%$ まで行った。2キセノン原子の占有を、そのB値を直周辺のタンパク質のB因子より50%高く設定した後に純化した。図を Bobscrip (R.M. Esnouf, *Acta Crystllog.*, D55, 938 (1999)) 中に作成した。 20

【0155】

Kabatデータベースの走査：ヒトおよびマウスの配列のKabatデータベースを分析して、その構造中のTrp、Tyr、Cys、Metの数を決定した。残基欠失または欠損フラグメントが多すぎるときは、配列を除いた。このことで利用可能な3894配列のうち2068について高度の分析が可能になった。この値を、挿入 C_H 、 V_H 、 C_L 、 V_L (および) 領域をもつ全平均として報告する：Trp15.5 (14-31)、Tyr30.4 (13-47)、Cys19.3 (15-29)、Met (7-32)、His13.3 (8-28)、全種 $t_{total} = 90.1$ (49-167)。 30

【0156】

誘導的カップル・プラズマ原子発光分光分析：mAb PCP21H3の誘導的カップル・プラズマ原子発光分光分析 (ICP-AES) を、Varian, Axial Viata Simultaneous ICP-AES 分光分析計で行った。マウスモノクローナル抗体 (PCP21H3) をリン酸緩衝液 (PBS、50mM、pH7.4) 中に20mM EDTAで完全に透析した。典型的なアッセイにおいて、300 μL の10.5% HNO_3 溶液を100 μL の10mg/mL抗体溶液に加え、70 で14時間インキュベートした。この溶液をMQH₂Oで2mLに希釈し、標準との比較により解析した。ICP-AES分析結果を百万についての部 ($\mu\text{g/mL}$) で報告する：Ag0.0026 (抗体分子当り0.0072原子)；Al0.0098 (抗体分子当り0.113原子)；As0.0062 (抗体分子当り0.025原子)；Ba検出レベル以下；Ca0.0355 (抗体分子当り0.266原子)。高いCa濃度はこのアッセイで用いたリン酸緩衝液の汚染による。 40

【0157】

抗体介在 H_2O_2 の速度に対する $Ca(II)$ の作用を調べるために、抗体サンプルの照射を行った。それには、図 8 A で概略説明したアッセイ法を用い、種々の濃度の $CaCl_2$ (0 - 100 μM) を加えた。このプロセスは $Ca(II)$ 濃度に独立であることがわかった： Cd 0.0007 (抗体分子当り 0.0187 原子)； Ce 0.0012 (抗体分子当り 0.003 原子)； Co 0.0013 (抗体分子当り 0.007 原子)； Cr 0.0010 (抗体分子当り 0.006 原子)； Cu 0.0014 (抗体分子当り 0.007 原子)； Fe 0.0089 (抗体分子当り 0.048 原子)； Gd 0.0008 (抗体分子当り 0.001 原子)； K 0.0394 (抗体分子当り 0.302 原子)； La 0.0007 (抗体分子当り 0.002 原子)； Li 0.0013 (抗体分子当り 0.056 原子)； Mg 0.0027 (抗体分子当り 0.033 原子)； Mn 0.0007 (抗体分子当り 0.004 原子)； Mo 0.0023 (抗体分子当り 0.007 原子)； Na 102.0428 (抗体分子当り 1332 原子)； Ni 0.0007 (抗体分子当り 0.004 原子)； P 14.3521 (抗体分子当り 138.9 原子)； Pb 検出レベル以下； Rb 0.0007 (抗体分子当り 0.002 原子)； Se 検出レベル以下； V 0.0109 (抗体分子当り 0.019 原子)； W 0.0119 (抗体分子当り 0.019 原子)； Zn 0.0087 (抗体分子当り 0.040 原子)。

【0158】

酸素同位体実験：典型的な実験において、抗体 (6.7 μM 、100 μL) または非免疫グロブリンタンパク質 (50 μM 、100 μL) の PB 溶液 (160 mM リン酸塩； pH 7.4) を乾固まで凍結乾燥し、ついで H_2O_2 (100 μL 、98%) 中に溶解した。塩化ナトリウムを除外して、 MS 中のシグナル抑制を最小にした。高濃度の非免疫グロブリンタンパク質が MS アッセイのため検出可能量の H_2O_2 をつくるのに必要であった。このタンパク質溶液に UV ライトボックスで飽和 $^{16}O_2$ 気条件下、密封石英キュベット中で 8 時間 20 で照射した。 H_2O_2 濃度を 8 時間後に $Amplex$ Red アッセイ (Zhou et al., Anal. Biochem., 253, 162 (1997)) で測定した。ついでサンプルを遠心分離でマイクロコン (サイズ除外フィルター) を介してろ過して、タンパク質を除外し、 H_2O_2 濃度を再度測定した。 $TCEP$ (新たに調製した $H_2^{18}O$ 中の 20 mM ストック) を加え (H_2O_2 に関して約 2 モルに等しい)、溶液を 37 に 15 分間置くと、すべての H_2O_2 が反応した。 $TCEP$ の $H_2^{18}O$ 溶液をすべてのアッセイ前に新たに調製した。 ^{18}O が $TCEP$ のカルボン酸に徐々にとりこまれるからである (数日をかけて)。アッセイ過程では、その経路からしての ^{18}O 取り込みは起きない。さらに、 $H_2^{18}O$ からの ^{18}O の $H_2^{16}O$ ホスフィン酸化物への取り込みもない。249 m/z でのピークは $TCEP$ の $(M-H)^-$ である。249 m/z でのピークは、 H_2O_2 に対して過剰の $TCEP$ (2 倍) をアッセイで使用するので、すべての MS で認める。

【0159】

一緒に凍結乾燥されたタンパク質サンプルからの $^{16}O / ^{18}O$ 比の再現性は合理的である ($\pm 10\%$)。しかし、凍結乾燥過程中的タンパク質結合水分子の除去についての問題は、観測された比率が異なる凍結乾燥バッチ由来のサンプル間で 2.1 - 4.1 と大きく変り得ることを意味する。従って、厳格な凍結乾燥および脱気工程をついで行うことが大切である。この点について、 $^{18}O_2$ および $H_2^{16}O$ 実験が、タンパク質結合水分子の除去の相対的事例によりアッセイ間のはるかに少ない多様性を示す。

【0160】

異なる種からの抗体が次に詳記する実験拘束内で類似の比率を与える： $^{16}O / ^{18}O$ 比： $WD1-6G6mIgG$ (ネズミ) 2.1 : 1； $ポリIgG$ (ウマ) 2.2 : 1； $ポリIgG$ (ヒツジ) 2.2 : 1； $EP2-19G2mIgG$ (ネズミ) 2.1 : 1； $CH2-5H7mIgG$ (ネズミ) 2.0 : 1； $ポリIgG$ (ヒト) 2.1 : 1。比率は 2 回の測定の平均値である。ただし、 $ポリIgG$ (ウマ) は 10 回の測定の平均値である。すべてのアッセイおよび条件は上述のとおり。

【0161】

典型的な実験において、ヒツジまたはウマの $ポリIgG$ (6.7 μM 、100 μL) の PB (160 mM リン酸塩； pH 7.4) 溶液をアルゴン気中で 30 分間脱気した。この溶

液を $^{18}\text{O}_2$ (90%) で飽和し、上記のように照射した。アッセイおよび手法をここに記す。

【0162】

ヘマトポルフィリンIXでの $^3\text{O}_2$ 感作による $^1\text{O}_2$ 形成の効率の関数としての H_2O_2 生成についてのアッセイ：このアッセイは、H. Sakai ら (Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng., 2371, 264 (1995)) により開発された手法の改変である。簡単にいうと、ウマポリ IgG (1 mg/mL) の PBS 液 (50 mM、pH 7.4) およびヘマトポルフィリンIXを発光計からの白色光で刺激する。アリコートを取りだし (50 μL)、 H_2O_2 および3-アミノフタル酸の濃度を同時に測定する。 H_2O_2 濃度を amplex red アッセイ (Zhou et al., Anal. Biochem., 253, 162 (1997)) で測定した。3-アミノフタル酸の濃度は、逆相 HPLC により吸収層-C18カラムを持つ Hitachi D4000 系機器、254 nm での UV 検出計、1 mL/分でアセトニトリル/水の18:82の流動相 (0.1% TFA) (停留時間、ルミノール = 7.4分、3-アミノフタル酸 = 3.5分) で測定した。ルミノールと3-アミノフタル酸の濃度を対照サンプルに対するピークの高さと面積により決定した。実験データは、ヘマトポルフィリンIX (形成された3-アミノフタル酸の量に直接比例する) により形成された $^1\text{O}_2$ の量および抗体 N.B. により形成された H_2O_2 の量を表す。白色光中でヘマトポルフィリンIXなしで抗体により形成された $^1\text{O}_2$ は有意の量でない。

10

【0163】

amplex red アッセイが H_2O_2 に加えてタンパク質-過酸化水素誘導体を検出するかもしれないとの懸念は、この方法で測定された明白な濃度が、照射されたタンパク質がサンプルから除外されるかどうかにかかわらず、差し引かれている。

20

【0164】

量子化学法：すべてのQC計算を、密度関数理論 (DFT) [J.C. Slater in Quantum Theory of Molecules and Solids, Vol. 4: The Self-Consistent Field of Molecules and Solids, McGraw Hill, New York, (1974)] の B3LYP フレイバーを用いて、Jaguar (Jaguar 4.0, Schroedinger, Inc. Portland, Oregon, 1998. 参照、B.H. Greeley, T.V. Russo, D.T. Mainz, R.A. Frisner, J.-M. Langlois, W.A. Goddard III, R.E. Donnelly, J. Chem. Phys., 101, 4028 (1994)) で行った。これには、一般化された勾配近似および正確な交換を含む。6-31G**基本セットをすべての原子に使用した。すべての幾何形態を完全に最適化した。振動周波数を計算して、各最小が真の局所最小 (陽性周波数のみ) であり、各転移状態 (TS) が単一の仮想の周波数 (Hessian の陰性固有値) のみを有することを確認した。各QC計算は、単一の有機分子について ~ 3 kcal/mol の精度を有する。 O_2 や $^3\text{O}_2$ などの非閉シェル分子は、大きいエラーを有するを予測される。しかし、このようなエラーは、QC結果の機械的包含が正しくあるべきようにシステムのと思われる。すべてのエネルギーは、0点エネルギーまたは温度の補正なしに、kcal/mol で報告する。

30

【0165】

結果および考察

抗体が一重項分子酸素 ($^1\text{O}_2$) から過酸化水素 (H_2O_2) を作り得る。しかし、現在まで、本明細書で報告するように、このプロセスが触媒的で電子源であることは、知られていなかった。抗体が、速度の減少なしに、いかなる判別可能な補因子および電子供与体の不存在で、 $^1\text{O}_2$ から500モル等量の H_2O_2 を作り得るタンパク質クラスとして唯一のものであるを示す。同位体取り込み実験および反応速度データを基にして、 H_2O の $^1\text{O}_2$ への非先行の付加を促進し、 H_2O_2 を後にもたらず反応カスケードにおいて最初の間体として H_2O_3 を形成し得ると提言する。キセノンでのX線結晶学的試験が、保存された酸素結合部位を、この化学物を開始し得るであろう抗体の折り畳み中に明らかにする。この知見は、免疫グロブリンの $^1\text{O}_2$ に対する唯一の保護機能を示唆し、 $^1\text{O}_2$ を解毒する必要が免疫グロブリンの折り畳みの展開に決定的な役割を演じるかどうかの問題を提示する。

40

50

【0166】

抗体は、源または抗原特異性にかかわらず、一重項分子酸素 ($^1\text{O}_2$) から過酸化水素 (H_2O_2) をつくり、それによって同分子中で認識および殺作用 (Wentworth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 10930 (2000)) を潜在的に整理する。この発見の可能性ある化学的および生物学的意味からして、この過程の抗体内での機械的基本および構造的位置を検討した。これらの組合せ試験からして、他のタンパク質と異なり、水と一重項酸素との化学反応の非先行セットを触媒できる。

【0167】

反応速度試験：長時間UV照射試験からして、抗体介在 H_2O_2 生成が非免疫グロブリンタンパク質よりも非常に効率的である (図8A)。典型的に抗体は40モル等量もまでの形成を直線的に示し、その後、速度は非特徴的に低下し始める (図8B)。一方、非免疫グロブリンタンパク質は H_2O_2 の短い激しい生成をもたらし、光酸化が起きるにつれて停止する (図8A)。

【0168】

他のタンパク質と異なり、抗体は、アッセイ中につくられた H_2O_2 が、ネズミモノクローナル IgG PCP21H3 について示すように、カタラーゼで除外されると、実験の開始と同じ開始速度で H_2O_2 の光生成を再開できる。 H_2O_2 のカタラーゼ仲介破壊後の H_2O_2 の継続的直線的生成について、このプロファイルは、アッセイしたすべての抗体で保持された。このように、この過程に蓄積するが自体の形成を逆に阻害する。明白な IC_{50} を $225\ \mu\text{M}$ で認めた。基質、転移状態アナログまたは反応産物のいずれかによる酵素の触媒機能の阻害は、しばしば活性部位現象についての強力な証拠となる。 H_2O_2 の抗体介在光-生成が分子酸素 ($K_{\text{mapp}}\text{O}_2\ 187\ \mu\text{M}$) で飽和され得ることは、すでに知られている (Wentworth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 10930 (2000))。 H_2O_2 のこの外形上の産物阻害は、かかる結合部位現象についてさらなる証拠を提供する。

【0169】

抗体による H_2O_2 の光-生成に関する以前の報告は、作られ得る H_2O_2 の最大量を明確にしていない (Wentworth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 10930 (2000))。この問題を、抗体サンプルのUV照射の繰り返しサイクルにより、ついでカタラーゼによる生成 H_2O_2 の除去により検査した (図8Cがこの2サイクルを示す)。ひとつの実験において、UV照射およびカタラーゼ添加のサイクルを10サイクルまで実施した (ウマポリ IgG の PBS 液、 $\text{pH}\ 7.4$)。これらの実験において > 500 モル等量の H_2O_2 を得た。初期速度はわずかしか低下しなかった。抗体以外に、このような効率的で長時間に H_2O_2 をつくるものとして見出した唯一のタンパク質は、T細胞受容体 (TCR) であった (図8F)。興味深いことに、TCRは、抗体と免疫グロブリンの折り畳みドメインの類似の整列を共有する (Garcia et al., Sciences, 274,209 (1996))。しかし、この構造モチーフの保持は、 H_2O_2 をつくらない γ_2 -ミクログロブリンによって示されるように、これが免疫グロブリン・スーパーファミリーのメンバーであるにもかかわらず、タンパク質に対して H_2O_2 生成能力を付与するのに必要とみえない。

【0170】

抗体構造は、 H_2O_2 の酸化作用に対して明らかに活性でない。標準的なUV照射に6時間の H_2O_2 存在で (H_2O_2 生成を完全に阻害するのに十分高い濃度で) 曝露するとき、阻害 H_2O_2 がカタラーゼで破壊されると、ポリクローナルウマ IgG 抗体サンプルが完全な活性となる (図8E)。長時間一定の速度で H_2O_2 生成を続ける能力は、 H_2O_2 への曝露後ですら、他のタンパク質によりこうむる化学的および光-酸化改変に対する抗体構造の折り畳みの、いままで知られていない顕著な抵抗を表す。標準条件での8時間UV照射後の抗体サンプルについての SDS-PAGE ゲル分析では、抗体分子の有意のフラグメント化または凝縮もなかった。タンパク質構造に H_2O_2 の存在で (H_2O_2 の明白な阻害作用に寄与し得る) 側鎖位置レベルで変化がないことを確認するために、Fab4C6のX線結晶構造を H_2O_2 の存在および不存在で調べた。Fab4C6は、その元

の結晶が他の公表抗体よりも高い分解に回析するので (~ 1.3)、選択した。要の構造パラメーターのルート平均平方差 (RMSD) を、4C6 構造について 3 mM の H_2O_2 でのソーク実験の前後に比較した。すべての原子の RMSD = 0.412、C 原子の RMSD = 0.327、主要鎖原子の RMSD = 0.328、側鎖原子の RMSD = 0.488。ネズミ Fab4C6 の重ね合わせた本来および H_2O_2 処理の構造は、非常にはっきりとしており、 H_2O_2 に対する抗体の折り畳みの安定性についての証拠を補強する (図 9)。

【0171】

H_2O_2 の抗体介在光-生成の作用スペクトルおよび同じ波長範囲 (260 - 320 nm) での抗体タンパク質の対応吸収スペクトルを図 10 に併記した。2 スペクトルが、タンパク質中のトリプトファンの最大 UV 吸収に一致する励起波長で観測される H_2O_2 生成の最大効率で非常にはっきりしている。

【0172】

ウマ IgG による H_2O_2 生成の効率をヘマトポリフィリン IX での 3O_2 感作による 1O_2 形成効率の関数として ($\phi_A = 0.22$) リン酸緩衝液 pH 7.0 および可視光線において調べることで、感作によりつくられる各 275 ± 25 モル等量の 1O_2 について、1 モル等量の H_2O_2 が抗体分子によりつくられる (Wilkinson et al., J. Phys. Chem. Ref. Data, 22, 113 (1993); Sakai et al., Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng., 2371, 264 (1995))。

【0173】

電子源の問題：一重項酸素からの抗体介在 H_2O_2 生成により生じるメカニズム問題は、2 つのサブ問題に明確に区別しなければならない：ひとつはプロセスについての電子源であり、他のひとつはプロセスの化学的メカニズムに関する。 1O_2 の H_2O_2 への転換に 2 モル等量の電子を要することから、抗体が等量の抗体分子につき > 500 等量の H_2O_2 をつくる事実が急性電子の詳細な問題を提起する。この電子源についての研究は非常に明白な可能性をもって始まる。タンパク質を通しての電子移行が最も容易にまた非常に大きい距離で起こり得るので (Winkler et al., Pure & Appl. Chem., 71, 1753 (1999); Winkler Curr. Opin. Chem. Biol., 4, 192 (2000))、最初に考慮することは、正常なタンパク質光-酸化プロセスに挙げられる電子ドナーとして関わる残基の収集を含め得ることであった。抗体によるほぼ一定速度の H_2O_2 生成および照射およびカタラーゼ処置の繰り返しサイクル中の -TCR (図 8C および 8E) は、このようなメカニズムに反した。なぜなら、速度の顕著な低下が、酸化され得る残基が尽きるにしたがって、 H_2O_2 の生成を伴わねばならないであろうからである。この速度の低下は、残る未酸化の基の酸化還元ポテンシャルが、タンパク質が陽性に電荷を帯びるにしたがって、上昇しなければならぬであろうから、さらに悪化するであろう。

【0174】

正常なタンパク質光-酸化は、 1O_2 および他の酸素種 (ROS)、例えば、スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$)、パーオキシラジカル (HO_2^{\cdot})、 H_2O_2 の生成をもたらすプロセスの複雑なカスケードである (Foote, Science, 162, 963 (1968))。現在のメカニズムについての考えは、タンパク質の光-酸化に対する感作性を 5 アミノ酸に結びつける：トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、システイン (およびシスチン)、メチオニン (Met)、ヒスチジン (His) (Straight and Spikes, in Singlet O_2 , A.A. Frimer, Ed. (CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1985), vol IV 9, pp. 91-143; Michaeli and Feitelson, Photochem, Photobiol., 59, 284 (1994))。Tyr および分子酸素による H_2O_2 の光-生成は、よく特徴解明されたプロセスであって、少なくとも部分的に、同時に H_2O_2 および 3O_2 への相互変換する 1O_2 から O_2 への形成および還元を含む (McMormick and Thompson, J. Am. Chem. Soc., 100, 312 (1978))。トリプトファンは、個々のアミノ酸としても、またタンパク質の構成成分としても、UV 近辺の照射 (300 - 375 nm) に好気性条件で特に感作性である。これは、特に効果的な UV 近辺 ($\lambda_{max} 320$ nm) 光感作剤である N'-ホルミルキムレニンへのその転

10

20

30

40

50

換による (Walrant and Santus, Photochem, Photobiol., 19, 411 (1974))。しかし、T r y 光-酸化は、U V 近辺の照射における H_2O_2 のサブ化学量論的生成をともなっており (図 1 1 A) (McMormick and Thompson, J. Am. Chem. Soc., 100, 312 (1978))、 H_2O_2 光-生成時での最も効果的な非免疫グロブリンである γ -ガラクトシダーゼが、その 3 9 T r p 残基からわずかに 5.9 モル等量の H_2O_2 しかつくらない (図 8 A) (Fowler and Zabin, J. Biol. Chem. 253, 5521 (1978))。

【0175】

ヒトおよびマウス抗体の重鎖および軽鎖配列の Kabat データベースについての走査によると (3894のうち2068を分析した)、抗体がその全構造中に15を越える T r p 残基をほとんどもたない (14 - 31 T r p 残基範囲で平均値 = 15.5) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH, ed. 5th, 1991); Martin, PROTEINS: Structure, Funct. and Genet., 25, 130 (1996))。事実、タンパク質光-酸化プロセスに関するすべてのアミノ酸 (参照、前出) が抗体介在 H_2O_2 生成に総合的に関与しても、なお、つくられる500モル等量の H_2O_2 を説明するのに、これらの残基の数は不十分である (49 - 167 活性残基範囲で平均値 = 90.1)。

【0176】

還元等量としての塩化物イオンのポテンシャル (P B S 中 150 mM で存在) を、塩化物イオンがアントラキノンの三重項励起状態による H_2O_2 の光生成についての適切な電子源であることが知られているので (Scharf and Weitz, Symp. Quantum Chem. Biochem. Jerusalem vol. 12 (Catal. Chem. Biochem.: Theory Exp.), pp. 355-365 (1979))、調べた。この可能性は、免疫グロブリンによる H_2O_2 生成の速度が塩化物イオン濃度と独立であることがわかったときに、すぐに割り引いた。

【0177】

金属イオンの可能な役割を調べた。このようなイオンは抗体中に、電子源として働き得るような量でほとんど存在し得ないが、その微量が触媒的酸化還元中心として主要な役割を演じるのかも知れない。すべての実際的な目的のために、このプロセスにおける微量の金属の影響を除外し得る実験を行った。 H_2O_2 の抗体介在光-生成速度は、E D T A 含有緩衝液での抗体サンプルの微細分析の前後で、変化しない (図 1 1 C)。抗体サンプルの E D T A 処理後、I C P 原子放出分光法 (A E C) で、百万分の1よりはるかに低い量で残存する微量の金属イオンの存在が明らかになった。これは、この反応に影響する微量の金属について、すべての抗体に共通に違いない。なぜならアッセイしたすべての抗体がこの固有の能力を有するからである。金属結合が抗体の内在的特性でないこと、また抗体結晶および Brookhaven データベースで利用可能な約 300 抗体構造についてのわれわれの分析と一致することは一般的に受け入れられる。

【0178】

すべての観察が、タンパク質触媒の不活化に関与しないであろう電子源、および高回転数そして電子の準非限定源を説明できる電子源を同定する必要を強く示唆した。 1O_2 の化学ポテンシャルについて、さらに広く考慮した。抗体介在メカニズムにおける分子酸素のこのエネルギー形態の関与は、以前の報告から明確に推量した (Wentworth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 10930 (2000))。簡単にいうと、 H_2O_2 光-生成の抗体介在速度は D_2O 中で増加し、 1O_2 失活剤であるアジドナトリウムの存在で減少する。さらに、可視光線中でヘマトポリフィリン I X および暗所での 3,3'-(1,4-ナフチリデン)ジプロピオン酸ジナトリウムのエンドスーパーオキシドでの 3O_2 の感作により、抗体が H_2O_2 をつくることが示されている。 1O_2 の関与はまた、抗体介在 H_2O_2 生成の作用スペクトルおよび抗体一致トリプトファンの吸収スペクトルに非常に類似している。

【0179】

1O_2 についての既知化学をスーパー求電子性「ジオキサ-エン」についての化学として概念化できることから (Foote, Acc. Chem. Res., 1, 104 (1968))、水の分子が抗体の存

在で $^1\text{O}_2$ に求核性を加え、中間体としての H_2O_3 を形成するような今まで未知の可能性を考慮した。すなわち、 H_2O_2 に酸化される水が電子源の役割を果たし得る。

【0180】

酸素同位体実験を、 H_2O_2 中に見られる酸素源の測定を通じて $^1\text{O}_2$ による H_2O の抗体触媒光-酸化についての仮説を調べるために行った。 H_2O_2 中の $^16\text{O}/^18\text{O}$ を、標準的 H_2O_2 検出法(Han et al., Anal. Biochem., 234, 107 (1996))の改変により測定した。簡単にいうと、この方法は、トリス-カルボキシエチルホスフィン(TCEP)での還元、つづく対応ホスフィン酸化物の質量分析法(MS)を含む(図12)。

【0181】

これらの実験によって、抗体のUV照射が酸素の存在で水から H_2O_2 への酸素取りこみをもたらしことが明らかになった(図12Aおよび12B)。 H_2O_2 中の ^18O (98% ^18O)ホスフィン緩衝液(PB)溶液において飽和 $^16\text{O}_2$ 濃度条件下でのヒツジポリIgGの照射後に、ホスフィン酸化物のMS中に観測される $^16\text{O}/^18\text{O}$ 比の相対存在量は、 $2.2 \pm 0.1 : 1$ である。 H_2O_2 中の ^18O に富む分子酸素混合物(98% ^18O)での逆実験を行うとき、逆比(1 : 2.2 ± 0.1)を観測する(図12B)。比率についてのこれらの値は、優れた再現性(+10%、 $n = 10$)を表し、試験したすべての抗体について認める。

【0182】

下記の対照試験を実施した。最初に、 $^16\text{O}_2$ と H_2O の条件下で、ポリIgG(ウマ)の照射が H_2O_2 をつくった(図12C)。 H_2O_2 自体(400 μM 、PB中、pH7.0)を4時間 H_2O_2 中で照射するとき、 ^18O の取りこみはない。この結果は、 ^18O の H_2O_2 への取り込みが、水との酸触媒交換によるか、または H_2O_2 の同種溶解性解裂および水から H_2O_2 の再結合に關与するメカニズムにより起きるかもしれないとの懸念を軽減する。抗体が H_2O_2 の生成および H_2O_2 との酸触媒交換の両方を触媒する可能性を調べるために、不活性気体下でUV照射後にヒツジポリIgG(6.7 μM)の存在で、 H_2O_2 (98% ^18O)PBにおける H_2O_2 (200 μM)の同位体交換を調べた。 ^18O の H_2O_2 への取り込みは微量に過ぎなかった(図12D)。

【0183】

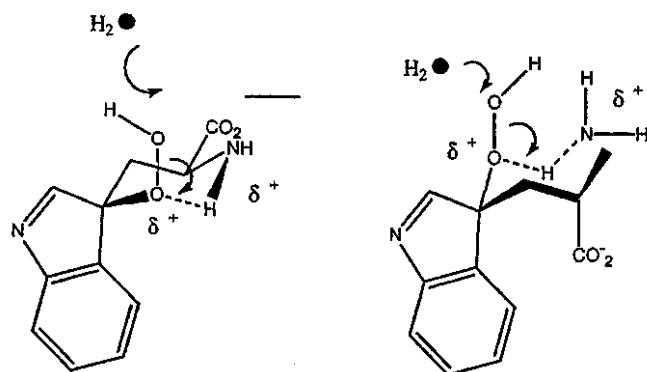
同位体実験をまた、 H_2O_2 をつくる際に最も効率的な非免疫グロブリンである α -ガラクトシダーゼおよび3-メチルインドールで実施した。両事例とも、光-酸化が H_2O_2 への ^18O の取り込みを無視できる程度であり(図12Eおよび12F)、このタンパク質におけるインドール環自体およびトリプトファン残基が $^1\text{O}_2$ の還元剤としてのみ挙動することを示した。

【0184】

この見解は、3-メチルインドールの照射が、 H_2O_2 からの酸素取り込みを含まない H_2O_2 をつくることから、さらに支持される。トリプトファンで行った同じ実験は $^16\text{O}/^18\text{O}$ 比1.2 : 1の交換をもたらす。この結果は、分子内一般酸として作用するアンモニウム官能性によるものであって、3'-ハイドロスーパーオキシドのジアステレオマー混合物の内部酸素にプロトン付加すると思われる。注目すべきは、これは化学的な観点から興味深い、抗体による H_2O_2 の触媒的生成を説明できないことである。なぜなら、これは化学量論的プロセスであり、またタンパク質中のTrpが遊離のアンモニウム基を有していないからである。

【0185】

【化3】

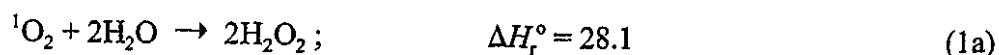


10

化学的メカニズム：すべての抗体が一量項酸素により水の酸化を触媒できる。¹O₂によるH₂Oの酸化について反応物と産物との熱力学的均衡（反応熱、 $\Delta H_r = +28.1 \text{ kcal/mol}$ ）(D.R. Lide, in handbook of Chemistry and Physics, 73rd ed. (CRC, 1992))は、¹O₂の1以上の分子が、酸化された水の分子ごとにH₂O₂の2分子へのその転換の際に関与する化学量を必要とする。この化学量からして、三量項から一量項酸素への生成に関与する前にさらなる光エネルギーがプロセスに参加しない。仮定的メカニズム経路についての定性的化学的理論が、熱力学的考察とともに、式1 bまたはcのいずれかのようにほぼすべての化学量論を形つくる（すべてのエネルギーを形成の気相実験熱から計算し、 kcal/mol で報告する）：

20

【化4】



【0186】

テルリウム仲介酸化還元プロセスによる¹O₂および水の過酸化水素への一時的金属触媒転換についての最近の報告 (Detty and Gibson, J. Am. Chem. Soc., 112, 4086 (1990))が、¹O₂およびH₂OがH₂O₂へ転換され得るプロセス、およびそこでの本プロセスのエネルギー需要が克服され得ることについて実験的証拠を提供する。抗体介在光-酸化プロセスについてのメカニズムが¹O₂分子への水分子への添加を含み、H₂O₂への経路において最初の間体として三酸化二水素を形成すると思われる。触媒としての抗体の機能は、可逆的生成についての重要な中間体を安定にし、そのH₂O₂への転換を経路つけて中間体の消費を促進する特異的な分子環境の供給であらねばならない。このような環境の基本的な特徴は、抗体特異的周辺により条件つけられる活性部位での組織された水分子の特異的な集合体からなるのであろう。

30

【0187】

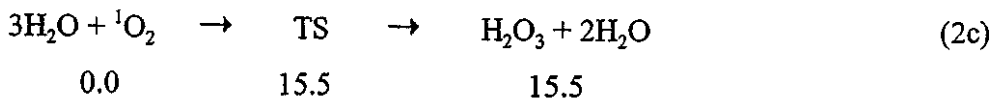
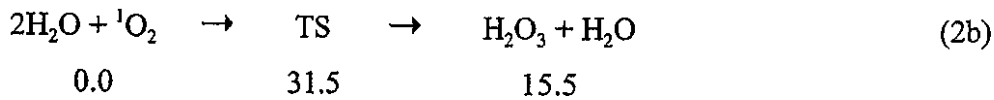
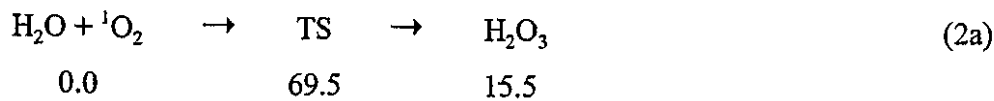
H₂O₃は生物系で未だ検出されていないが、そのインピボでの化学はかなりの推測の源であり、インピトロでの性質は種々の実験および理論の対象となってきた (C. Deby, La Recherche, 228, 378 (1991); Sawyer, in Oxygen Chemistry (Oxford University Press, Oxford, 1991); Cerkovnik and Plesnicar, J. Am. Chem. Soc., 115, 12169 (1993); Vincent and Hillier, J. Phys. Chem., 99, 3109 (1995); Plesnicar et al., Chem. Eur. J., 6, 809 (2000); Corey et al., J. Am. Chem. Soc., 108, 2472 (1986); Koller and Plesnicar, J. A. Chem. Soc., 118, 2470 (1996); Cacace et al., Scienc, 285, 81 (1999)). Plesnicar およびその共同研究者によると、H₂O₃はオゾンから還元的につくられ、H₂Oおよび¹O₂に分解される (Koller and Plesnicar, J. A. Chem. Soc., 118, 2470 (1996)). 顕微鏡的可逆性の原則を適用して、要約すると、可逆反応も1以上の水分子で触媒されるはずである。このようなプロセスのもっともらしい反応経路および

40

50

エネルギーを描くために、記載のように第1原則量子化学(GC)法を用いた(B3LYP密度機能理論)。結果を式2a-cに示す(すべてのエネルギーはkcal/molである)：

【化5】



【0188】

水と ${}^1\text{O}_2$ が H_2O_3 をもたらす直接反応は、 70 kcal/mol の活性化バリアーで全く不利である(式2a)。しかし、第2および第3の水分子の付加で、夫々 31.5 および 15.5 kcal/mol まで活性化バリアーを減少する共鳴のプロセスを認める。実際、これらの付加水が触媒の役割を演じる(式2bにおいて、第2の水のHが産物 HO_2H に行き、第1の水のHと同時にそれに代わる)。これらのバリアーは、水の第1のHのエネルギー(119 kcal/mol)および ${}^1\text{O}_2$ の結合エネルギー(96 kcal/mol)に比べると小さい。注意すべきは、式2bおよび2cでの逆反応がそれぞれ 15.5 または 0 kcal/mol のバリアーしか持たず、 H_2O_3 がバルク水または水に富む系において安定でないことを示唆する。こうように、 H_2O_3 をつくり利用するために抗体構造中の最良部位が、水のない疎水性領域に近接の局所水および水二量体の存在する部位であると考えられる。

【0189】

水の抗体触媒光-酸化から誘導されるホスフィン酸化物中の ${}^{16}\text{O}/{}^{18}\text{O}$ 比が、この主要な中間体 H_2O_3 が最終産物に転換するであろう反応経路の選択に有意の拘束を課する。この比率は、2モルの H_2O から2モルの H_2O_2 の生成に化学的に関与する分子の数により、およびこのプロセスのメカニズム詳細により主に定まる。比率 $2.2:1$ は、2分子の ${}^1\text{O}_2$ と2分子の H_2O が2分子の H_2O_2 と1分子の分子酸素(熱力学的理由から ${}^3\text{O}_2$ あるべき)に転換される特定のメカニズムについて予測される値に厳密に一致する。このようなメカニズムの例は、2分子 H_2O_3 の H_2O_4 および H_2O_2 への $\text{S}_\text{N}2$ 型不均衡化であり、続く前者の H_2O_2 および ${}^3\text{O}_2$ への分解である。 ${}^1\text{O}_2$ の関与の有無での H_2O_3 の H_2O_2 への転換についての理論的に適合する反応経路を定義するという複雑な問題は、量子化学(B3LYP密度機能論)を用いる系統的な方法で取り組んできた。これらの研究は、 H_2O_3 の拡大的ドッキング計算およびその形成と H_2O_2 への転換のための一時的状態をタンパク質の数について示す。抗体(および-T細胞受容体)の領域においてこれらの種を安定にする独特の部位が単離水を有する領域および疎水性領域に近接して存在する。この拡大的試験は、 H_2O_3 の H_2O_2 への転換についての理論的に適合する化学的経路の全スペクトルについて可能な存在を表した。

【0190】

抗体と結合するキセノンについての構造的な研究：抗体の保存能からして、源または抗原特異性にもかかわらず、またこの反応を仲介する-T-CRにもかかわらず、X線構造試験を行って、これらの免疫グロブリンの折り畳みタンパク質内の可能な保存反応部位を調べた。いずれの可能な場所についても要の拘束は、分子酸素(${}^1\text{O}_2$ または可能な感作残

10

20

30

40

50

基を近辺に持つ三量項、好ましくはトリプトファン)および水が共存しなければならないこと、および経路に沿う一時的状態および中間体はその部位または非常な近辺内で安定化されねばならないことである。

【0191】

タンパク質内での同じ腔においてXeとO₂が共存しているとの考えを支持する強力な証拠がある(Tilson et al., J. Mol. Biol., 199, 195 (1988); Schoenborn et al., Nature, 207, 28 (1965))。従って、キセノンガスを重い原子トレーサーとして用いて、分子酸素に到達し得るネズミのモノクローナル抗体4C6(Li et al., J. Am. Chem. Soc., 117, 3308 (1995))内で腔の位置を調べた。

【0192】

3キセノン部位を同定した(図13A)。タンパク質における他のXe結合部位において見られるように(Scott and Gibson, Biochemistry, 36, 11909 (1997); Prange et al., PROTEINS: Struct., Funct. and Genet., 30, 61 (1998))、すべて疎水性腔を占めている。純化された元の構造とXe誘導の構造を重ねると、キセノンの付加を別にして、タンパク質骨格または側鎖のコンフォメーションにおいて、または結合の水分子の位置において、識別できるような変化がほとんどない。

【0193】

キセノンI結合部位(Xe1部位)をここではさらに詳細に分析した。これはすべての抗体およびTCRにおいて保存されているからである(図13B)。Xe1は、不変のTrpから7のV_Lのシート間にある高度に保存された領域の中間に存する。Xe1部位は、外側分子表面から約5のV_Lの免疫グロブリンの折り畳みを含む2シート間に挟まれている。キセノン部位2(Xe2)は、抗体の重鎖と軽鎖との間に構造的に保存された面を形成するいくつかの高度に保存された残基の直上での抗原結合ポケットの基底に存在する(図13A)。V_LV_H面における残基は主に疎水性であり、Trp^{H109}などの保存された芳香族側鎖を含む。

【0194】

Fab4C6中のXe1についての接触側鎖は、Ala^{L19}、Ile^{L21}、Leu^{L73}、Ile^{L75}であり、これらは、すべての抗体における高度に保存された脂肪族側鎖である(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH, ed. 5th, 1991))。加えて、調べたすべての抗体において、わずかな構造的変化のみをこの領域で認めた。とりわけ、いくつかの他の高度に保存され不変の残基がこのキセノン部位の直近辺に存し、Trp^{L35}、Phe^{L62}、Tyr^{L86}、Leu^{L104}およびCys^{L23}とCys^{L88}との間のジスルフィド橋を含む。Trp^{L35}がジスルフィド橋に積み重なり、キセノン原子からわずか7にある。この構造内容において、Trp^{L35}は、Xe1に最も近いTrpであるので、推測の分子酸素感作剤であり得る。2C TCR構造およびすべての利用可能なTCR配列との比較からすると、このXe1疎水性ポケットもTCR中に高度に保存されている(図5B)(Garcia, Science, 274, 209 (1996))。

【0195】

ヒト₂-ミクログロブリンは、H₂O₂をつくらないで、その全体的免疫グロブリンの折り畳みにもかかわらず、抗体Xe1結合ポケットを明確にする同じ詳細な構造的特徴を有さない。また、₂-ミクログロブリンは、抗体およびTCRの両方で起きる保存Trp残基を含有しない。Trp^{L35}(抗体)またはTrp³⁴(TCR)が酸素感作剤であると、₂-ミクログロブリン中の対応Trpの欠如が、これが水の酸化を触媒しないとの知見に関係するのであろう。

【0196】

このように、キセノン実験は、分子酸素にアクセス可能であり、かつ不変のTrpに近接の保存領域(V_L)中にある少なくとも1つの部位を同定した。等価の保存部位もV_Hの折り畳みで可能である。Xe1部位周辺の構造および配列は、V_Hドメインにおいて、V_LをV_Hに結びつけるプソイド2-折り畳み(立体構造)回転軸により正確に再製される。

10

20

30

40

50

キセノン結合部位がこのドメインに位置していなかったが、分子酸素はV_H中の対応腔になお到達し得ると考えられる。この提案の重鎖キセノン部位を見つけ得なかった。このことは、結晶が完全な平衡状態を形成するのに不十分な時間である2分間しか圧をかけられなかったこと、または単に、キセノンが側上の対応腔についての酸素に比較してまたは結晶パッキングからして大きすぎることによる。他の抗体実験において、Xe結合部位は、結晶パッキングが結晶中のXeアクセスを調節できることを示唆する不斉単位の2分子のうち1分子でのみで認めた。これらの部位は、その周りの配列および構造についての分析からして、抗体およびTCRの両方で高度に保存されている。このことは、なぜ抗体およびTCRにおけるIgの折り畳みがこの通常でない化学に関与できるのかについて可能な理解を提供する。

10

【0197】

抗体は、タンパク質中、¹O₂をH₂O₂に触媒的に転換する能力において特殊である。あるいは、このプロセスがの事象関連生成による殺略に参加すると考えられる。抗体は¹O₂から生体を防禦する機能を満たすことができる。これは、カタラーゼによる過酸化水素の水と三重項酸素へのさらなるプロセスを必要としよう。

【0198】

参考文献

- Burton, D. R., Trends Biochem. Sci., **15**, 64-69 (1990).
- Arlaud, G. J., Colomb, M. G. & Gagon, J., Immunol. Today, **8**, 106-111 (1987).
- Sim, R. B. & Reid, K. B., Immunol. Today, **12**, 307-311 (1991).
- Wentworth, P., Jr. & Janda, K. D., Curr. Opin. Chem. Biol., **2**, 138-144 (1998).
- Klebanoff, S. J. in Encyclopedia of Immunology, eds. Delves, P. J. & Roitt, I. M. (Academic, San Diego), pp. 1713-1718 (1998).
- Rosen, H. & Klebanoff, S. J., J. Biol. Chem., **252**, 4803-4810 (1997).
- Fee, J. A. in International Conference on Oxygen and Oxygen-Radicals, eds. Rodgers, M. A. J. & Powers, E. L. (Academic, San Diego, and University of Texas at Austin), pp. 205-239 (1981).
- Kearns, D. R., Chem. Rev., **71**, 395-427 (1971).
- Foot, C. S. in Free Radicals in Biology, ed. Pryor, W. A. (Academic, New York), pp. 85-133 (1976).
- Allen, R. C., Stjernholm, R. L., Benerito, R. R. & Steele, R. H., eds. Cormier, M. J., Hercules, D. M. & Lee, J. (Plenum, New York), pp. 498-499 (1973).
- Klebanoff, S. J. in The Phagocytic Cell in Host Resistance (National Institute of Child Health and Human Development, Orlando, FL) (1974).
- Stauff, J., Sander, U. & Jaeschke, W., Chemiluminescence and Bioluminescence, eds. Williams, R. C. & Fudenberg, H. H. (Intercontinental Medical Book Corp., New York), pp. 131-141 (1973).
- Allen, R. C., Yevich, S. J., Orth, R. W. & Steele, R. H., Biochem. Biophys. Res. Commun., **60**, 909-917 (1974).
- Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N. & Haugland, R. P., Anal. Biochem., **253**, 162-168 (1997).
- Petyaev, I. M. & Hunt, J. V., Redox Report, **2**, 365-372 (1996).
- Kreitner, M., Alth, G., Koren, H., Loew, S. & Ebermann, R., Anal. Biochem., **213**, 63-67 (1993).
- Beauchamp, C. & Fridovich, I., Anal. Biochem., **44**, 276-287 (1971).
- Srinivasan, V. S., Podolski, D., Westrick, N. J. & Neckers, D. C., J. Am. Chem. Soc., **100**, 6513-6515 (1978).
- Hasty, N., Merkel, P. B., Radlick, P. & Kearns, D. R. Tetrahedron Lett., 49-52 (1972).
- Merkel, P. B., Nilsson, R. & Kearns, D. R., J. Am. Chem. Soc., **94**, 1030-1031 (19

50

72).

- Grossweiner, L. I., Curr. Top. Radiat. Res. Q., 11, 141-199 (1976).
- Bent, D. V. & Hayon, E., J. Am. Chem. Soc., 87, 2612-2619 (1975).
- Voss, R.-H., Ermler, U., Essen, L.-O., Wenzl, G., Kim, Y.-M. & Flecker, P., Eur. J. Biochem., 242, 122-131 (1996).
- Baek, J. & Kim, S., Plant Physiol., 102, 687 (1993).
- Feldhoff, R. & Peters, T. J., Biochem. J., 159, 529-533 (1976).
- Burley, S. K. & Petsko, G. A., Science, 229, 23-28 (1985).
- Gollnick, K., Adv. Photochem., 6, 1-122 (1968).
- Mach, H., Burke, C. J., Sanyal, G., Tsai, P.-K, Volkin, D. B. & Middaugh, C. R. 10
in Formulation and Delivery of Proteins and Peptides, eds. Cleland, J. L. & Lan-
ger, R. (American Chemical Society, Denver, CO) (1994). Skepper, J., Pierson, R.,
Young, V., Rees, J., Powell, J., Navaratnam, V., Cary, N., Tew, D., Bacon, P.,
Wallwork, J. et al., Microsc. Res. Tech., 42, 369-385 (1998).
- A.D. Wentworth, L. H Jones, P. Wentworth, Jr., K. D. Janda, R. A. Lerner, Proc.
Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 10930 (2000).
- M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, Anal. Biochem., 253, 162
(1997).
- K. C. Garcia et al., Science, 274, 209 (1996).
- K. G. Welinder, H. M. Jespersen, J. W.-Rasmussen, K. Skoedt, Mol. Immunol., 28, 20
177 (1991).
- T. Li, S. Hilton, K. D. Janda, J. Am. Chem. Soc., 117, 3308 (1995).
- F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross, J. Phys. Chem. Ref. Data, 22, 113 (1993)
.
- J. R. Winkler, A. J. Di Bilio, N. A. Farrow, J. H. Richards, H. B. Gray, Pure &
Appl. Chem., 71, 1753 (1999).
- J. R. Winkler, Curr. Opin. Chem. Biol., 4, 192 (2000).
- C. S. Foote, Science, 162, 963 (1968).
- R. C. Straight, J. D. Spikes, in Singlet O₂, A. A. Frimer, Ed. (CRC Press, Inc.,
Boca Raton, Florida, 1985), vol. IV9, pp. 91-143. 30
- A. Michaeli, J. Feitelson, Photochem. Photobiol., 59, 284 (1994).
- J.P. McCormick, T. Thomason, J. Am. Chem. Soc., 100, 312 (1978).
- P. Walrant, R. Santus, Photochem. Photobiol., 19, 411 (1974).
- A. V. Fowler, I. Zabin, J. Biol. Chem., 253, 5521 (1978).
- E. A. Kabat, T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, C. Foeller, Sequences of Pr
oteins of Immunological Interest (US Department of Health and Human Services, Pu
blic Health Service, NIH, ed. 5th, 1991).
- A. C. R. Martin, PROTEINS: Struct., Funct. and Genet., 25, 130 (1996).
- H.D. Scharf, R. Weitz, Symp. Quantum Chem. Biochem., Jerusalem vol. 12 (Catal. C
hem. Biochem.: Theory Exp.), pp. 355-365 (1979). 40
- C. S. Foote, Acc. Chem. Res., 1, 104 (1968).
- J. Han, S. Yen, G. Han, P. Han, Anal. Biochem., 234, 107 (1996).
- D.R. Lide, in Handbook of Chemistry and Physics, 73rd ed. (CRC, 1992).
- M. Detty, S. L. Gibson, J. Am. Chem. Soc., 112, 4086 (1990).
- C. Deby, La Recherche, 228, 378 (1991).
- D.T. Sawyer, in Oxygen Chemistry (Oxford University Press, Oxford, 1991).
- J. Cerkovnik, B. Plesnicar, J. Am. Chem. Soc., 115, 12169 (1993).
- M.A. Vincent, I. A. Hillier, J. Phys. Chem., 99, 3109 (1995).
- B. Plesnicar, J. Cerkovnik, T. Tekavec, J. Koller, Chem. Eur. J., 6, 809 (2000).
- E.J. Corey, Mehrotra, M. M.; Khan, A. U., J. Am. Chem. Soc., 108, 2472 (1986). 50

- J. Koller, B. Plesnicar, J. Am. Chem. Soc., **118**, 2470 (1996).
 F. Cacace, G. de Petris, F. Pepi, A. Troiani, Science, **285**, 81 (1999).
 B. H. Greeley, T. V. Russo, D. T. Mainz, R. A. Friesner, J.-M. Langlois, W. A. G
 oddard III, R. E. Donnelly, J. Chem. Phys., **101**, 4028 (1994)
 J. C. Slater in Quantum Theory of Molecules and Solids, Vol. 4: The Self-Consist
 ent Field of Molecules and Solids, McGraw Hill, New York, (1974)R. F. Tilson Jr.
 , U. C. Singh, I. D. Kuntz Jr. P. A. Kollman, J. Mol. Biol., **199**, 195 (1988).
 B. P. Schoenborn. H. C. Watson, J. C. Kendrew, Nature, **207**, 28 (1965).
 E.E. Scott, Q. H. Gibson, Biochemistry, **36**, 11909 (1997).
 T. Prange et al., PROTEINS: Struct., Funct. and Genet., **30**, 61 (1998). S. M. Sol 10
 tis, M. A. B. Stowell. M. C. Wiener, G. N. Phillips Jr, D. C. Rees, J. Appl. Cry
 st., **30**, 190, (1997)
 A. T. Briuenger et al., Acta Crystallogr., **D54**, 905 (1998)
 R.M. Esnouf, Acta Crystallogr., **D55**, 938 (1999)].
 J. R. Kanowsky, Chem. Biol. Interactions, **70**, 1 (1989).
 V. Cannac-Caffrey, et al., Biochimie, **80**, 1003 (1998).

【 0 1 9 9 】

全ての刊行物、特許文献および特許出願は、出典明示により本明細書中の一部とする。上
 述の明細書において、本発明は、それらの特定の好ましい態様に関連して説明されてきた
 が、多くの詳述は説明を目的として記載している。当業者にとっては、本発明がさらなる 20
 態様を示唆すること、そして、本明細書中に記載の詳述が本発明の基本原理から逸脱せず
 に十分に变化され得ることは明らかである。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図 1 は、ファゴソームの酸素依存性殺菌剤作用を示す。

【 図 2 】 図 2 は、amplex red assayを示す。

【 図 3 】 図 3 は、ネズミのモノクローナル I g G E P 2 - 1 9 G 2 (2 0 μ M) の存在
 下または非存在下の P B S (p H 7 . 4) 中での H₂O₂ 生成の初期タイムコースを示す。

【 図 4 】 図 4 は、UV 照射後のネズミ抗体 1 D 4 F ab フラグメントの単一結晶に関する
 蛍光顕微鏡写真、そして Amplex red assay 試薬を用いる H₂O₂ 検出を示す。

【 図 5 】 図 5 は、(A) H P 感作アッセイを示す。 30

【 図 6 】 図 6 は、タンパク質のパネルに対する H₂O₂ 形成の測定された初期速度、およ
 び抗体との比較を示す棒グラフ(表 1 からのデータ)である。

【 図 7 】 図 7 は、P B S (p H 7 . 4) 中、ウマ I g G (6 . 7 μ M) の UV 照射による
 H₂O₂ 形成の速度を示す。

【 図 8 】 図 8 は、H₂O₂ 生成を示す。

【 図 9 】 図 9 は、元々の 4 C 6 F ab (カラー写真中の青色光とピンク光) と、H₂O₂ の
 存在下での 4 C 6 F ab (カラー写真中の暗青色と赤色) のスーパーポジションを示す。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、ダイオードアレイ H P 8 4 2 A 吸光度計、A b s m a x 2 8 0 n
 m (A) で測定したウマポリクローナル抗体 I g G の吸収スペクトルを示す。

【 図 1 1 】 図 1 1 は、H₂O₂ の生成を示す。 40

【 図 1 2 】 図 1 2 は、T C E P [(M - H) ⁻ 2 4 9] および H₂O₂ による酸化によって
 生成されるその酸化物 [(M - H) ⁻ 2 6 5 (^{1 6} O) および (M - H) ⁻ 2 6 7 (^{1 8} O)] の E S I (負極性) マススペクトルを示す。

【 図 1 3 】 図 1 3 は、方法および材料(実施例 I I)に記載のような抗体 4 C 6 中の X e
 結合部位を示す。

【 図 1 】

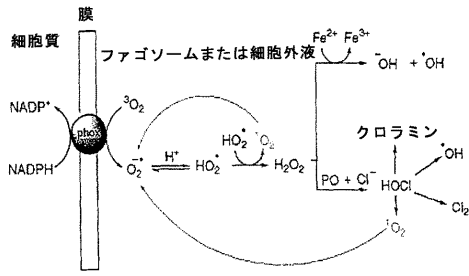


FIG. 1

【 図 2 】

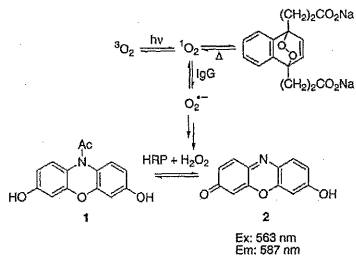


FIG. 2

【 図 4 】

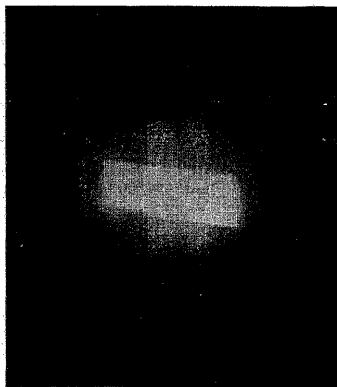


FIG. 4

【 図 3 】

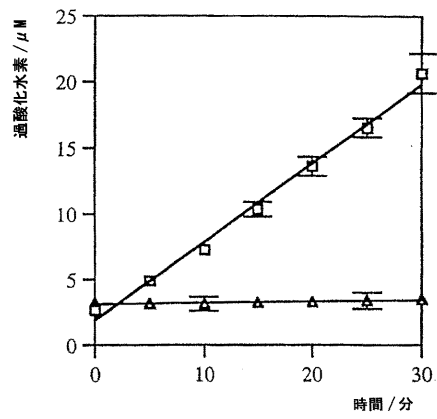


FIG. 3

【 図 5 】

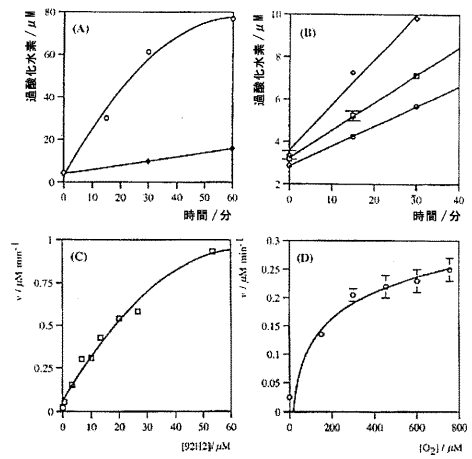


FIG. 5

【 図 6 】

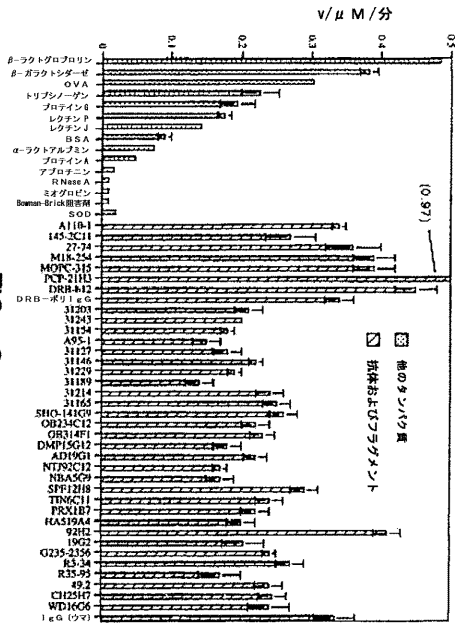


FIG. 6

【 図 7 】

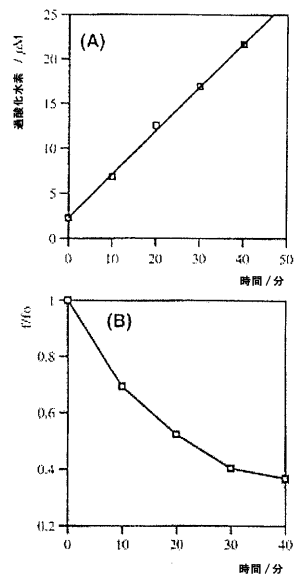


FIG. 7

【 図 8 】

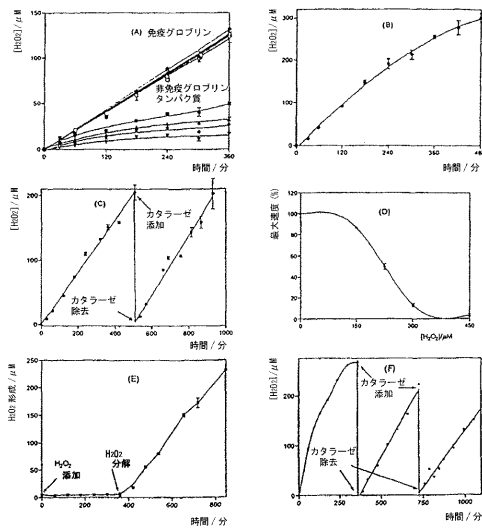


FIG. 8

【 図 9 A 】

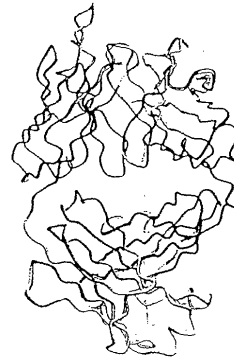


FIG. 9A

【 図 9 B 】

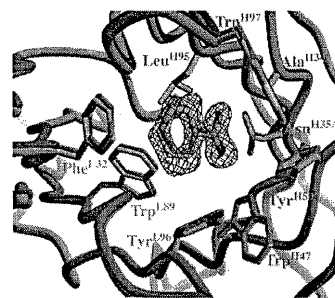


FIG. 9B

【 図 1 0 】

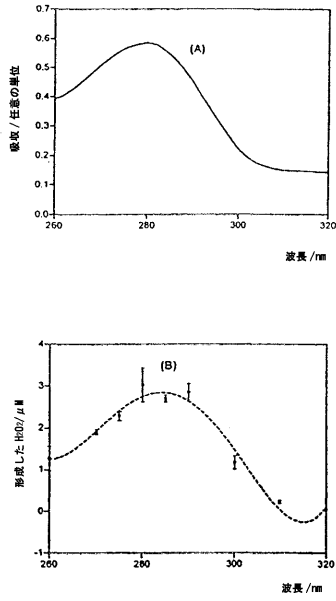


FIG. 10

【 図 1 1 】

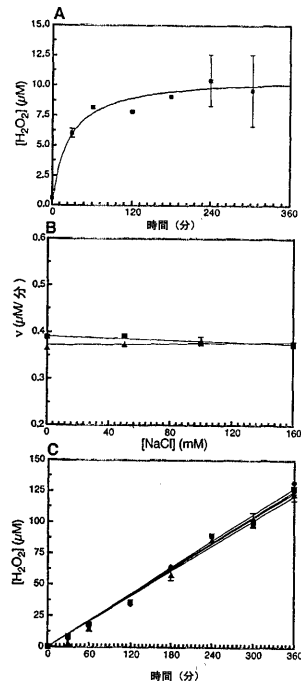


FIG. 11

【 図 1 2 】

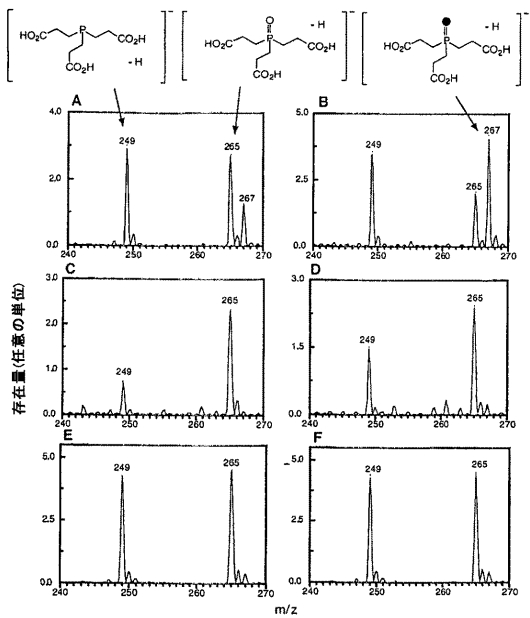


FIG. 12

【 図 1 3 】

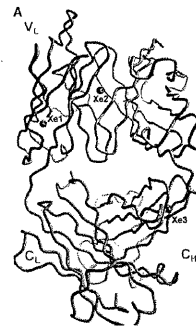


FIG. 13



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/29165		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : A61K 9/127, 31/355, 38/44 US CL : 424/94.3, 94.4, 450; 514/458				
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) U.S. : 424/94.3, 94.4, 450; 514/458				
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)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	US 5,162,217 A (HARTMAN et al) 10 November 1992. See column 4, lines 3-13; column 20, lines 28-46; column 41, line 21-column 42, line 26.	1-2,4,6-9,11,13-14,19-21		
X	US 5,362,492 A (SCHUETTLER et al) 08 November 1994. See abstract and column 1, line 65-column 2, line 11.	1-2,7-8,11,13-14,20-21		
X	US 5,472,691 A (MARKLUND et al) 05 December 1995. See abstract and column 13, line 54-column 21, line 18; column 40, lines 1-54.	1-11,13-17,19-22		
X	US 5,637,315 A (ZERN et al) 10 June 1997. See abstract and column 3, line 31-column 4, line 6; column 4, line 56-column 5, line 37.	1-5,7-9,11,13-14,20-22		
X	US 5,747,026 A (CRAPO et al) 05 May 1998. See column 1, line 15-column 2, line 15; column 3, line 66-column 4, line 21; column 8, line 64-column 9, line 13.	1-4,6-9,11,13-15,17-18,20-22		
X	US 5,994,339 A (CRAPO et al) 30 November 1999. See column 2, lines 50-65; column 4, lines 17-50; column 18, line 16-column 19, line 43.	1-2,4,6-18,20-21		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed.</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed.</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed.</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>			
Date of the actual completion of the international search 02 July 2003 (02.07.2003)		Date of mailing of the international search report 28 JUL 2003		
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. (703)305-3230		Authorized officer David A Saunders, PhD Telephone No. 703-308-0196		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/29165

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim 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. Claim Nos.: 119-120, 131-133 and 139-140
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
 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.: 1-22
- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US01/29165

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

1. This International Search Authority has found 10 inventions claimed in the International Application covered by the claims indicated below:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-22 and 131-132, drawn to methods of treating cells/subjects with an antioxidant.

Group II, claim(s) 23-37 and 134-140, drawn to methods of exposing antigens to superoxide or hydrogen peroxide.

Group III, claim(s) 38-60 and 131-132, drawn to methods of treating cancer cells/patients.

Group IV, claim 61-74 and 131-132, drawn to methods of treating inflammation, autoimmune diseases, wounds, etc.

Group V, claim 75-84, drawn to methods of identifying agents that modulate production of hydrogen peroxide.

Group VI, claims 85-96 and 133, drawn to immunoassays wherein an antibody generates superoxide or hydrogen peroxide from singlet oxygen.

Group VII, claim 97-105 and 121-130, drawn to engineered antibodies having less than two reductive centers.

Group VIII, claim 106-130, drawn to engineered therapeutic molecules (e.g. antibodies) having greater than two reductive centers.

Group IX, claims 141-144, drawn to immunoassays wherein an antigen-antibody complex generates superoxide or hydrogen peroxide.

Group X, claim 145, drawn to a T-cell receptor.

In the event that only one of Groups VII and VIII is paid for claims 121-130 will only be examined for the limitations of the elected group. Likewise claims 131-132 will only be examined for the embodiment(s) of the paid for of group(s) I, III and IV.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US01/29165

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack Unity of Invention because they are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for more than one species to be searched, the appropriate additional search fees must be paid. The species to be elected are as follows:

In Group I applicant must elect a single species of disease (e.g. as recited in claims 9-12) and a single species of antioxidant (e.g. as recited in claims 2 and 20).

In Group II applicant must elect a single species of antigen/cell to be treated (e.g. as recited in claims 29-31)2.

In Group III applicant must elect a single species of cancer (e.g. as recited in claim 44).

In Group IV applicant must elect a single condition to be treated (e.g. inflammation, autoimmune disease, etc.).

and it considers that the International Application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below:

The inventions listed as Groups I-X do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The method claimed in group I is old --e.g treating the various diseases of claims 9-12 with antioxidants is well known in the art. See applicant's admissions at page 22. Applicant's contribution is merely a recognition of an additional benefit that would have inherently been effected in any treatment of disease with an antioxidant. Recognition of an underlying mechanism providing such benefit, however, does not render the known method of treatment any different from the prior art. Applicant has thus provided no contribution that defines over the prior art that provides for unity of invention as required by PCT Rule 13.1.

In like manner the methods of groups II-IV are old. It is well known in the art to treat various disease states (e.g. cancer, inflammation) with antibodies. Applicant has admitted (e.g. page 8) that known antibodies have the recited property of generating superoxide or hydrogen peroxide. Applicant's contribution is merely a recognition of an additional benefit that would have inherently been effected in any treatment with of disease with an antibody. Recognition of an underlying mechanism providing such benefit, however, does not render the known method of treatment any different from the prior art. Applicant has thus provided no contribution that defines over the prior art that provides for unity of invention as required by PCT Rule 13.1.

The engineered molecules/antibodies of Groups VII or VIII would have inherently existed in various humanized antibodies, single chain fragment antibodies, etc., depending upon the number of tryptophan residues inherently present in the antibody. See admissions at page 8 and in the examples. Mere recognition of properties inherent to an old composition(s) does not render the composition(s) new. Applicant has thus provided no contribution that defines over the prior art that provides for unity of invention as required by PCT Rule 13.1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US01/29165

In like manner the method claimed in Group IX is old. Immunoassays that use a glucose oxidase conjugated antibody to generate hydrogen peroxide, which is then detected by virtue of a product formed from peroxidase, would operate in the manner recited. Applicant has thus provided no contribution that defines over the prior art that provides for unity of invention as required by PCT Rule 13.1.

The Groups are further separable as follows:

The method of Group I versus those of Groups II-IV uses a different agent -- i.e. an antioxidant versus an antibody capable of generating superoxide/hydrogen peroxide. These groups lack unity of invention, because they use different agents and achieve different ends. Likewise the methods of groups II-IV achieve different ends.

The identifying method of group V and the immunoassay methods of Groups VI and IX do not use common reagents and achieve different ends. Further each of Groups V, VI and IX uses different reagents and employs different steps and achieves different ends from any of the treating methods of Groups I-IV.

The assay methods of Groups VI and IX differ as to their recited limitations, or lack thereof, upon the source of the generated superoxide or hydrogen peroxide.

The products of Groups VII and VIII differ in the number of reductive centers present in the engineered molecule/antibody. These products would thus be used in different methods for the purpose of achieving different ends.

The T-cell receptor product of Group X is not used in any of the methods of groups I-VI and IX. It is a different composition from those of either of Groups VII and VIII, having a different structure and different binding properties.

The species listed above do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

In group I the various diseases recited have been treated in the prior art with various of the antioxidants recited. Applicant has therefore made no contribution that defines over the prior art. Applicant must therefore elect a single combination of i) a particular disease wherein antibody reduction of singlet oxygen plays an exacerbating role and ii) a particular antioxidant appropriate for the disease condition elected.

In Groups II-IV, it is well established in the art to treat various immune system disorders, various cancers, autoimmune diseases, inflammatory disorders, etc. with antibodies or with antibodies conjugated to sensitizers, which would inherently have the properties recited. Numerous monoclonal antibodies and engineered derivatives thereof have been developed to treat such conditions; each of these antibodies would inherently have the recited reducing activity. Applicant has therefore made no contribution that defines over the prior art. Applicant must therefore elect, for each group, a particular cell type/cancer type/inflammatory or autoimmune condition, etc. to be treated.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 39/395	N 4 C 0 8 5
A 6 1 M 35/00	A 6 1 K 39/395	Y 4 C 0 8 7
A 6 1 N 5/06	A 6 1 K 48/00	4 C 1 6 7
A 6 1 P 1/00	A 6 1 N 5/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 13/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 13/00	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/32	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/34	A 6 1 P 25/32	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 25/34	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N 33/15	A 6 1 P 37/04	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	E
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/53	Z
// C 0 7 K 16/32	G 0 1 N 33/53	G
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/53	Y
	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A
	A 6 1 M 35/00	Z
	C 1 2 N 15/00	A
	C 0 7 K 16/32	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ポール・ウェントワース
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、ナンバー 1 2 1、ノベル・ドライブ 4
 3 4 3 番

- (72)発明者 アニータ・ディ・ウェントワース
アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、ナンバー 1 2 1、ノベル・ドライブ 4
3 4 3 番
- (72)発明者 リン・エイチ・ジョーンズ
イギリス、シーティ 2・7 ディキュー、ケント、カンタベリー、ローパー・ロード 1 4 番、フラッ
ト 6、ザ・マルティンゲズ
- (72)発明者 キム・ディ・ジャンダ
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州ラ・ジョラ、ラ・ジョラ・コロナ 5 7 8 7 番
- (72)発明者 リチャード・エイ・ラーナー
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州ラ・ジョラ、ローズランド・ドライブ 2 3 番

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CA25 CB01 CB02 CB03 DA54 DB21 FA25 FA26
FA27 FB03 GC15 JA01
4B024 AA01 AA11 BA61
4C076 AA19 BB01 BB13 BB15 BB16 BB21 BB27 BB31 CC03 CC27
FF68
4C082 PA01 PA02 PA03 PC10
4C084 AA13 AA17 MA24 MA52 MA56 MA63 MA65 NA14 ZA011 ZA012
ZA151 ZA152 ZA161 ZA162 ZA361 ZA362 ZA421 ZA422 ZA591 ZA592
ZA661 ZA662 ZA681 ZA682 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZA941 ZA942
ZA961 ZA962 ZB071 ZB072 ZB091 ZB092 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262
ZB271 ZB272 ZC391 ZC392
4C085 AA13 AA14 AA33 BB01 BB41 BB43 EE01 EE05 GG02 GG03
GG04 GG06 GG08
4C087 AA02 BB63 BC83 MA24 MA52 MA56 MA63 MA65 NA14 ZA01
ZA15 ZA16 ZA36 ZA42 ZA59 ZA66 ZA68 ZA81 ZA89 ZA94
ZA96 ZB07 ZB09 ZB11 ZB26 ZB27 ZC39
4C167 AA80 CC01 GG16
4H045 AA30 CA41 DA75 EA28 EA50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005524601A5	公开(公告)日	2008-10-16
申请号	JP2002526826	申请日	2001-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	斯克里普斯研究学院		
申请(专利权)人(译)	斯克里普斯研究所		
[标]发明人	ポールウェントワース アニータディウエントワース リンエイチジョーンズ キムディジャンダ リチャードエイラーナー		
发明人	ポール・ウエントワース アニータ・ディ・ウエントワース リン・エイチ・ジョーンズ キム・ディ・ジャンダ リチャード・エイ・ラーナー		
IPC分类号	A61K45/00 A61K9/127 A61K35/12 A61K35/76 A61K39/395 A61K48/00 A61N5/06 A61P1/00 A61P1/04 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P13/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/02 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P25/34 A61P29/00 A61P31 /18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 A61M35/00 C12N15/09 C07K16/32		
CPC分类号	A61K31/05 A61K31/19 A61K31/352 A61K31/355 A61K31/375 A61K31/385 A61K31/4045 A61K38/06 A61K38/44 A61K38/446 A61K38/45 A61K45/06 A61P1/00 A61P1/04 A61P11/00 A61P13/00 A61P13 /08 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/02 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P25/34 A61P29/00 G01N33/53		
FI分类号	A61K45/00.ZTD A61K9/127 A61K35/12 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.Y A61K48/00 A61N5/06 A61P1/00 A61P1/04 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P13/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/02 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25 /28 A61P25/32 A61P25/34 A61P29/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 G01N33/15.Z G01N33/50.E G01N33/50.Z G01N33/53.G G01N33/53.Y G01N33/543.545.A A61M35/00. Z C12N15/00.A C07K16/32		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/DA54 2G045 /DB21 2G045/FA25 2G045/FA26 2G045/FA27 2G045/FB03 2G045/GC15 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4C076/AA19 4C076/BB01 4C076/BB13 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076 /BB21 4C076/BB27 4C076/BB31 4C076/CC03 4C076/CC27 4C076/FF68 4C082/PA01 4C082/PA02 4C082/PA03 4C082/PC10 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/MA24 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084 /MA63 4C084/MA65 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA012 4C084/ZA151 4C084/ZA152 4C084 /ZA161 4C084/ZA162 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZA421 4C084/ZA422 4C084/ZA591 4C084 /ZA592 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA681 4C084/ZA682 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084 /ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZA941 4C084/ZA942 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZB071 4C084 /ZB072 4C084/ZB091 4C084/ZB092 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084 /ZB271 4C084/ZB272 4C084/ZC391 4C084/ZC392 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA33 4C085 /BB01 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/EE01 4C085/EE05 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C087/AA02 4C087/BB63 4C087/BC83 4C087/MA24 4C087/MA52 4C087 /MA56 4C087/MA63 4C087/MA65 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA15 4C087/ZA16 4C087/ZA36		

4C087/ZA42 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA68 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA94 4C087/ZA96 4C087/ZB07 4C087/ZB09 4C087/ZB11 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZC39 4C167/AA80 4C167/CC01 4C167/GG16 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA50

代理人(译)

小岛 一晃

优先权

60/232702 2000-09-15 US

60/235475 2000-09-26 US

60/315906 2001-08-29 US

其他公开文献

JP2005524601A

摘要(译)

本发明一般涉及免疫学领域。更具体地，本发明涉及抗体可以从单线态氧产生超氧化物和过氧化氢的发现。因此，提供了能够增加或降低氧化应激的方法和组合物。还提供了筛选测定以鉴定调节抗体产生超氧化物和过氧化氢的能力的试剂。这些药剂可以治疗性地用于治疗需要的患者。此外，本发明提供了在免疫测定中使用抗体的方法。