

(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2006-502409

(P2006-502409A)

(43) 公表日 平成18年1月19日(2006.1.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 I O 5	4 C O 8 5
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	4 H O 4 5
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-543246 (P2004-543246)	(71) 出願人	502045699
(86) (22) 出願日	平成15年8月18日 (2003.8.18)		リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成17年5月23日 (2005.5.23)		オブ カリフォルニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/025994		アメリカ合衆国, カリフォルニア 946
(87) 国際公開番号	W02004/033628		07-5200, オークランド, フランク
(87) 国際公開日	平成16年4月22日 (2004.4.22)		リンストリート 1111, トゥエルフス
(31) 優先権主張番号	60/417,886		フロア
(32) 優先日	平成14年10月10日 (2002.10.10)	(71) 出願人	505133939
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ハインリッヒ ハイン ユニバーシティ
			オブ デュッセルドルフ
			ドイツ国 デュッセルドルフ ユニベルシ
			タストラッセ 1 アベティラング 4.
			1
		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオコンフォーマティック (bioconformatic) 分析のためのモノクローナル抗体

(57) 【要約】

関心対象のタンパク質の1つの配座異性体に識別的に結合するモノクローナル抗体を製造する方法を記載する。これらの抗体を使用する受動免疫および疾患の予後(outcome)、薬物の有効性または薬物感受性に関する患者集団を層別化する目的のための診断試薬としての配座異性体特異的抗体の用途並びにタンパク質の配座異性体による能動免疫も開示されている。スクリーニング技法において、検出は、例えば、組織免疫染色ウェスタンブロット法または溶液IPによってもよい。pHおよび銅濃度の特定のアクセシ条件下において神経変性を誘導するプリオンタンパク質配座異性体である、CtmPrPに立体配座特異性を示す7V Cと名づけられる特異的なmabを記載する。19B10と名づけられる第2の特異的な抗体は、総PrP発現をダウンレギュレーションし、細胞分化を実施させるプリオンタンパク質配座異性体である、NtMPrPに立体配座特異性を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中のプリオン疾患を検出する方法であって、
インサイチューにおいてPrP^{CTM}に結合する能力によって特徴付けられる診断上有効な量の抗体を試料に接触させる段階と、

プリオン疾患に関連するPrPアイソフォームに対する抗体の識別的な結合が生じる条件下において、抗体が試料中の任意の物質に特異的に結合するかどうかを判定する段階であって、抗体結合がプリオン疾患を示す段階とを含む方法。

【請求項2】

試料が組織または体液である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

条件に、識別的な結合を促進する量の局所Cu²⁺イオン濃度が含まれる、請求項1記載の方法。

【請求項4】

局所濃度が約1μM~約50μMである、請求項3記載の方法。

【請求項5】

条件にpH約7.8が含まれる、請求項1記載の方法。

【請求項6】

PrpCTMおよびPrPNTMからなる群より選択されるPrPの1つの配座異性体に特異的に結合し、PrPの第2の配座異性体との交差反応性はないかまたは低いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞培養物を含む組成物。

【請求項7】

モノクローナル抗体が7VCまたは19B10と命名される、請求項6記載の組成物。

【請求項8】

神経芽細胞腫細胞の表面のPrP配座異性体の抗原決定基に結合し、PrP配座異性体の細胞表面以外の抗原決定基との交差反応性はないかまたは低いモノクローナル抗体を含む組成物。

【請求項9】

モノクローナル抗体7VCまたは19B10の抗原特異性と同じ抗原特異性を有するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ。

【請求項10】

請求項9記載のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体。

【請求項11】

請求項10記載のモノクローナル抗体の結合特性を有するモノクローナル抗体由来のモノクローナル抗体断片。

【請求項12】

検出可能な信号を提供することができる物質で標識した、請求項10記載のモノクローナル抗体。

【請求項13】

細胞分化を促進するための方法であって、

PrPNTMの抗原決定基に結合するが、成熟PrPの他の配座異性体には結合しないモノクローナル抗体の十分量を細胞に提供し、それによって細胞が分化を起こす段階を含む方法。

【請求項14】

細胞が幹細胞または癌細胞である、請求項13記載の方法。

【請求項15】

細胞のPrP発現を阻害する方法であって、

PrPNTMの抗原決定基に結合するが、成熟PrPの他の配座異性体には結合しないモノクロー

10

20

30

40

50

ーナル抗体の十分量を細胞に提供し、それによって細胞のPrP発現が阻害される段階を含む方法。

【請求項 16】

PrPがPrP^{Sc}である、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

配座異性体特異的なモノクローナル抗体を入手するための方法であって、無細胞翻訳系を使用して作製した配座異性体濃縮翻訳産物に、1つ以上のモノクローナル抗体を含む組成物を接触させる段階と、

配座異性体の1つ以上へのモノクローナル抗体の結合を溶液免疫沈降法で検出する段階と

10

を含む方法。

【請求項 18】

小胞体由来のミクロソーム膜の存在下において合成した放射性標識翻訳産物の溶液免疫沈降法を使用してハイブリドーマをスクリーニングして配座異性体特異的なmabを識別し、1つの配座異性体を他に対して濃縮するための方法。

【請求項 19】

放射性標識翻訳産物の配座異性体濃縮が、シグナル配列のスワッピングにより実施される、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

放射性標識翻訳産物の配座異性体濃縮が、リボソーム-膜結合の変更によって実施される、請求項18記載の方法。

20

【請求項 21】

放射性標識翻訳産物の配座異性体濃縮が、糖タンパク質枯渇ミクロソーム膜による翻訳によって実施される、請求項18記載の方法。

【請求項 22】

配座異性体濃縮が、形質移入した哺乳類細胞においてシグナル配列をスワッピングしたcDNAを発現することによって実施される、請求項18記載の方法。

【請求項 23】

銅依存的な様式でプリオンタンパク質を認識する特異抗体(7VC)。

【請求項 24】

SecPrPを認識する特異抗体(19B10)。

30

【請求項 25】

PrPのシグナル配列を認識する特異抗体(SS)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、タンパク質の立体配座アイソフォームを識別して、特定の立体配座アイソフォームに関連する疾患を診断し、治療するための方法および組成物に関する。本発明は、プリオン疾患に関連するプリオンタンパク質アイソフォームに識別的に結合するモノクローナル抗体の作製およびプリオン疾患を検出および/または阻止する際のそれらの用途によって例示される。

40

【背景技術】

【0002】

背景

分泌経路におけるタンパク質生合成は、ポリペプチド鎖合成に合わせて重複するいくつかの過程に係る。第一に、新生ポリペプチド鎖は、小胞体(ER)膜を正しく標的とする必要がある。次いで、ER内腔への転位が開始される。ポリペプチド鎖の折りたたみは転位の初期に開始される必要がある。転位中および転位直後に、翻訳後修飾が生じ、細胞質に戻ることおよびプロテアソームによる分解を含む望ましくない鎖の分解に関する細胞の決

50

定が下される。転位と同時期の過程のうち、タンパク質の折りたたみがおそらく最も顕著である。その理由は、それはゲノム情報の解読の重大な段階だからである。誤って折り畳まれたタンパク質は、そのタンパク質がないのと同じくらい悪いかまたはそれよりも悪い場合がある。タンパク質が、別個の機能を有する多数の折り畳み状態を有する場合には、正確な折り畳み経路およびその調節がどの機能が正確にどの程度発現されるかを決定する。

【0003】

最新の生物学の基本教義は、一次構造が二次構造を決定し、二次構造が、ジスルフィド結合形成などの適当な翻訳後修飾と共に、三次(および四次)タンパク質構造を決定するというものである。一次構造から二次構造、三次構造というこの組織化がタンパク質折り畳みの「一次」組織化原則を構成する。「構造」という用語には、独自の安定した実体という概念が含まれるが、タンパク質の構造は統計学的な概念である。未変性のタンパク質の立体配座は、折り畳まれていない変性した形態の同じ鎖よりエネルギー的には好ましいが、エネルギー的な優先値は中程度(10 kcal/mole)であり、タンパク質は動的な変動性の実体であり、「安定な」タンパク質でさえもある程度一過的に折り畳まれていないことを意味する。

10

【0004】

転位はタンパク質の折り畳みと重複しており、従って進化の経過中に、これら2つの過程は互いに影響しあったと予想される。折り畳み経路は転位の必要性に対応するように改良されている可能性がある；転位経路は折り畳みの必要性に対応するように改良されている可能性がある。数多くの文献がこれらの可能性の両方の裏づけを提供している。折り畳みに密接に関係する転移の調節に関する今までの最も目覚ましい例は、プリオンタンパク質(PrP)の生合成に見られる。PrPの場合には、新生鎖の同種集団により3つの形態的な形態を生ずる。それらの1つ、secPrPは、ER膜を通過して完全に転位(分泌)され、C-末端糖脂質アンカーによって繋ぎ止められると思われる；これは正常な脳に観察される形態である。secPrPの機能は不明であるが、他の糖脂質固定されたタンパク質から類推して、神経系において信号伝達機能を有する可能性があると思われる。最近実証された抗アポトーシス機能はこの役割と一致していると思われる。他の2つの形態のPrPは、アミノ酸約112±130の膜貫通鎖で膜を反対方向に1回貫通する。一方、他の2つの形態のPrPは、N-またはC-末端がER内腔に存在して、反対方向に1回膜を貫通するタンパク質として作製される(それぞれ、^{Ntm}PrPおよび^{Ctm}PrPと名づけられる)。^{Ctm}PrPは、過剰発現されると、自然発症的な神経変性を誘発する。さらに、感染性プリオン疾患では、CtmPrPは、臨床徴候発症直前に誘導されると思われ、神経変性に至る最終的な共通経路を開始することを示唆している。他の研究は、ER膜の今のところは未知の糖タンパク質を、SecPrPに至る経路に新生PrP鎖を誘導することによって、CtmPrPの発現から正常な脳を「保護する」転位性補助因子(TrAF)に関係があるとしている。

20

30

【0005】

SecPrPとCtmPrPの識別は、通常、形態的な根拠に基づいてなされる。しかし、同じ配列のこれら2つのポリペプチドは立体配座も異なる。これは、非変性性界面活性剤溶液におけるプロテアーゼ限定消化に対する感度の違いによって実証された。従って、転位の調節は、立体配座および機能の両方が異なる多数の形態のPrPを作製する手段であると思われる。新生PrP鎖にCtmPrPではなくSecPrPを作製するように誘導する機構(すなわち、TrAF)自体も、脳内で検出可能なCtmPrP量を増加させるスクレイピー感染の能力に基づいて調節することができる。PrPは、現在のところ、転位性調節の最もよい例であるが、広範囲なタンパク質が利用する同様の原理の証拠がある。同時に、これらの観察は新たな原理に至る：タンパク質の立体配座はアミノ酸の一次配列によって決定されるだけでなく、2つ以上の異なる機能的な立体配座の成果のどれが実際に生ずるまたは優位であるかに影響を与えるTrAFなどのタンパク質によって決定される。

40

【0006】

従って、複雑な分泌または内在性膜タンパク質が多数の別個の機能的な折りたたみ状態

50

を有することができるかどうかを判定することは興味深い。現在では、立体配座制御のこれらの仮説および他の仮説を試験する大きな制限は、機能的タンパク質の立体配座の異種性を認識するツールがないことである。しかし、PrPでは、立体配座の異種性は形態的な異種性として現れたという偶然の一致のために、それは検出されていない可能性がある。新たに合成されるタンパク質のサブ集団の相対的な反応性を判定することができると思われる、それによって立体配座の差を規定する立体配座特異的なモノクローナル抗体の一団などのすぐれたツールが必要とされている。この方法は、健康な状態および疾患への進行中並びに疾患を阻止するための手段として所定のタンパク質によって使用される立体配座状態集を可能にすると思われる。

【発明の開示】

10

【0007】

発明の概要

立体配座特異的なモノクローナル抗体に基づいた新規組成物並びに特定のタンパク質の配座異性体に関連する疾患を診断および治療するためのそれらの用途を提供する。モノクローナル抗体を作製するためには、関心対象のタンパク質の少なくとも1つの配座異性体を含む抗原および任意にアジュバントで動物を免疫化する。免疫化した宿主のB細胞を使用して、共通のエピトープを共有する関心対象のタンパク質の1つ以上の配座異性体に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製する。次いで、モノクローナル抗体をスクリーニングして、関心対象のタンパク質の個々の配座異性体に対して識別的な結合を示すものを同定する。モノクローナル抗体は、配座異性体媒介性疾患および能動または受動免疫化を介する疾患の治療のための検出アッセイに用途を見出している。特異的な配座異性体を選択的であるが、おそらく弱く結合するモノクローナル抗体を同定するために、個々のハイブリドーマを用いる規定の配座異性体の溶液免疫沈降法に關係する従来でないスクリーニング方法を提供する。次いで、これらのモノクローナル抗体を特徴づけ、血清を含む患者試料をスクリーニングするために使用し、疾患および疾患の病因の配座異性体特異的な特徴および関連を同定するおよび/またはPrPを発現する細胞の分化を促進するまたはPrP発現を阻害する。

20

【0008】

具体的な態様の説明

本発明によると、関心対象のタンパク質の個々の配座異性体とそれに対するモノクローナル抗体である組成物が提供される。好ましくは、配座異性体は、少なくとも1つのエピトープを共有する可能性のある配座異性体を識別することができるように、1つの配座異性体に識別的に結合するモノクローナル抗体を同定することができるように、関心対象のタンパク質の1つの配座異性体の選択的な合成を可能にする無細胞翻訳系などの系を使用して作製される。「配座異性体」という用語は、少なくとも実質的に同じアミノ酸配列を有するが、構造(物理的トポロジーまたはトポグラフィー)および機能に異種性を有する2つ以上のタンパク質をいう。トポロジーは、特定の細胞成分コンパートメントのタンパク質の特定の部分の異なる配置、例えば、N-細胞質ゾルに対してC-細胞質ゾルを意図しており、トポグラフィーは外側の立体配座または空間の形状の変化(すなわち、折畳み/立体配座の差による異なる三次元的形状)を意図しており、他のタンパク質との安定および/または一過的な結合を含む。本明細書において使用する実質的に同じアミノ酸配列のポリペプチドは、タンパク質の立体配座またはトポロジーを変更しない同類アミノ酸置換を有するもの(すなわち、それぞれ、小型もしくは大型側鎖と小型もしくは大型側鎖またはそれぞれ、酸性、塩基性、極性もしくは疎水性側鎖と酸性、塩基性、極性もしくは疎水性側鎖)である。タンパク質の立体配座の変化は折畳みの差または翻訳後修飾によるものであり、アミノ酸配列の差の結果ではない。

30

40

【0009】

関心対象のタンパク質の特定の疾患関連立体配座の影響を診断および/または治療および/または阻害するためのヒトを含む動物は、関心対象のタンパク質の疾患関連立体配座に特異的に結合する抗体を含有する抗血清を作製するために免疫化される。免疫化した動

50

物宿主のB細胞は、同じ特異性スペクトルを有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するために使用することができる。組換え免疫グロブリン軽鎖および/または重鎖並びにそれらの機能的な断片は、モノクローナル抗体の軽鎖および重鎖またはそれらの機能的な部分をコードする核酸を単離し、大腸菌(*E. coli*)などの原核宿主細胞または酵母もしくは哺乳類細胞などの真核宿主細胞においてそれを発現することによって組換えにより作製することができる。組換え抗体は、望ましい特徴を提供するためにアミノ酸配列の変更を含んでもよく、例えば、抗原結合特徴の改善を提供するために可変領域に変更が加えられてもよい。好ましくは、関心対象のタンパク質の特定の疾患関連立体配座の影響を治療するために使用するために産生および/または投与される抗体は中和抗体である。本明細書において使用する抗体という用語は、重鎖および軽鎖を含む完全長の抗体分子だけでなく、個々のタンパク質配座異性体に結合する望ましい特異性を保持する(Fab)₂、Fab、Fv断片およびScFv断片などの抗体の任意の断片もいう。本明細書において使用する「中和する」という用語は、抗体をいう場合には、特定のタンパク質配座異性体に関連する疾患を有する被験者の体液に見られる個々のタンパク質配座異性体にこのようなタンパク質が結合することを意味する。いくつかの例において、抗体は、細胞受容体に対するタンパク質の結合を妨害する作用をすることがある；好ましくは、このような抗体は、配座異性体が受容体に結合するとき、受容体から受容体結合配座異性体を除去することができるほど十分なタンパク質配座異性体親和性を有する。

10

【0010】

モノクローナル抗体は、機能的アッセイ結果を裏付けるために作製することができ、エピトープマッピングに基づいて、(i)同じエピトープに対する抗体は、本質的に同じアミノ酸配列を有するタンパク質に結合しないことおよび(ii)タンパク質の別の折畳みはエピトープをマスクまたは暴露し、それらを免疫学的に、従って構造的に別個にすることを示す。クローニングされたと思われる配座異性体の配列決定は、タンパク質が本質的に同じアミノ酸配列を有することを実証するために実施される。従って、マッピングしたエピトープに対するモノクローナル抗体を使用して、特異的な薬物標的として使用することができる構造的およびおそらく機能的特徴が異なる配座異性体を同定することができ、従って生じる可能性のある副作用を低下することができる。モノクローナル抗体は、形質移入した細胞またはプログラムされた無細胞系の未精製の細胞溶菌液と共に使用することができる。

20

30

【0011】

本発明は、既存の技術を上回るいくつかの利点を提供する。生物試料における異種性を検出する問題はいくつかの問題が絡む：第一に、異種性は、1つの配座異性体を別の配座異性体と識別する試薬(例えば、モノクローナル抗体)でしか検出することができない。しかし、ほとんどの配座異性体は多数のエピトープを共有しており、従って、所定の配座異性体に対して形成した小サブセットのモノクローナル抗体だけが絶対的または相対的に配座異性体特異的であり、多数のモノクローナル抗体は異なる配座異性体との反応性において識別不可能である。本発明により「干草の中の針」を識別する、すなわち、絶対的または相対的に配座異性体特異的であり、おそらくその配座異性体特異性すなわち、配座異性体の表面の小部分にエピトープが限定されているために低親和性である、レアなモノクローナル抗体を配座異性体特異的でない他のモノクローナルから識別することができる。第二に、新たなハイブリドーマが配座異性体特異的であるかどうかを判定する時間は、ハイブリドーマがクローンを競合することによって死滅するまたは過剰増殖される前の数日に限定される。本発明は、関連するモノクローナル抗体の同定のこれらの障壁を克服する方法を提供する。これらの有用であるが、レアなモノクローナルは、例えば、スクリーニングアッセイに使用すると、血液試料などの患者試料中の配座異性体混合物中の個々の配座異性体を識別することができるという利点を提供する。さらに、それらは、プロテアーゼ消化並びに立体配座およびトポロジーの他の従来のプロープで生じるとと思われる条件の混乱を小さくして、迅速且つ極めて高い感度および特異性で配座異性体を識別する手段を提供するという利点を提供する。

40

50

【0012】

免疫化に使用する抗原は配座異性体の混合物を含んでもよいが、好ましくは関心対象のタンパク質の個々の配座異性体である。個々の配座異性体抗原を作製するために使用することができる方法には、インビトロ翻訳系が挙げられる(例えば、Hayら、1987 Mol. Cell Biol. 7: 914-919; Hegdeら(1998) Science 279, 827-834およびHegdeら(1999) Nature 402, 822-826を参照されたい)。合成した立体配座混合物を歪める試みがなされており、マイナーで一過的な配座異性体を拡大し、安定化させることができ、従ってより容易に検出および特徴づけることができ、結果としてそれらは通常優性な配座異性体から識別される。これは、切断されるシグナル配列をスワッピングすることまたはイントランスにおける作用(またはそれらの欠如)、TrAF欠如または他の手段によって未処理の配座異性体混合物を改変する分画化され、再構成された系においてタンパク質を発現することを含む種々の方法で実施することができる。

10

【0013】

免疫化は、当業者に既知の任意の方法を使用することができる。少量の抗原しか利用可能でない場合には、(Blachereら、(1997) J Exp Med 186, 1315-1322)および(Castellinoら、(2000) J Exp Med 191, 1957-1964)によって記載されているものなどのプロトコールを使用することができる。ヒートショックタンパク質(HSP)などの少量(マイクログラム量)のタンパク質および関心対象のタンパク質の配座異性体を組み合わせ、次いで宿主動物の免疫化に使用する。投与経路は皮内、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内経路であってもよく、投与方法は当業者に既知の標準的なプロトコールによる。任意に、フロイントの完全アジュバント、RIBIもしくは水酸化アルミニウムまたはインターロイキン-2などの組換えサイトカインなどのアジュバントを抗原と共に使用することができる。

20

【0014】

モノクローナル抗体は当業者に既知の任意の数の方法で作製することができる(例えば、Kohlerら、Nature, 256: 495-497(1975)およびEur. J. Immunol. 6: 511-519(1976); Milsteinら、Nature 266: 550-552(1977)、Koprowskiら、米国特許第4,172,124号; Harlow, EおよびD. Lane、1988年: Antibodies: A Laboratory Manual、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York(1989); Current Protocols in Molecular Biology、2巻(Supplement 27、'94年夏号)、Ausubel, F. M.ら、編、(John Wiley & Sons: New York, N. Y.)、11章、(1991年)を参照されたい)。この方法では、抗原を注射した動物の脾細胞またはリンパ球を腫瘍細胞系統と融合させ、それによって不死で、B細胞の遺伝的にコードされた抗体を産生することができるハイブリッド細胞または「ハイブリドーマ」を作製する。このように形成されたハイブリッドは、選択、希釈および再増殖によって単一の遺伝株に分離され、各株は単一遺伝系統を示す。従って、それらは、望ましい抗原に対する免疫反応性の均一な抗体を産生する。ハイブリドーマ技術は、一般に、マウス系統の融合を使用するが、ヒト-ヒトハイブリドーマ(Olsson, L.ら、Proc. Natl. Acad. Sci.(USA), 77: 5429(1980)); ヒト-マウスハイブリドーマ(Schlom, J.ら(同書)77: 6841(1980))およびいくつかの他の異種間のハイブリッド組み合わせも報告されている。望ましい結合特性を有する抗体を産生する細胞は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を含む血清学的アッセイなどの好適なアッセイによって選択される。

30

40

【0015】

モノクローナル抗体の機能的な結合断片も、例えば、酵素的切断または組換え技法によって作製することができる。酵素的な切断方法には、FabまたはF(ab')₂断片をそれぞれ作製するパインまたはペプシン切断が挙げられる。抗体は、1つ以上の停止コドンが天然の停止コドンの上流に導入されている抗体遺伝子を使用して、種々の切断型でも作製することができる。例えば、F(ab')₂重鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、CH₁ドメインおよび重鎖のヒンジ領域をコードするDNA配列を含むように設計することができる。モノクローナル抗体の機能的な断片は、それらが誘導される完全長の抗体の少なくとも1つの結合機能および/または調節機能を保持する。好ましい機能的な断片は、対応する完全長の抗体の抗原結合機能を保持する(例えば、配座異性体のエピトープに結合する能力を保持す

50

る)。別の態様において、機能的な断片は、結合活性、信号伝達活性および/または細胞応答の刺激などのタンパク質またはペプチド配座異性体に特徴的な1つ以上の機能を阻害する能力を保持する。例えば、一態様において、機能的な断片はHIVキャプシドの構築を阻害することができる。

【0016】

配座異性体特異的な抗体を形成する一方法は、関心対象のタンパク質の機能的遺伝子を欠損するノックアウトマウスを関心対象のタンパク質の推定配座異性体で免疫化することである。ノックアウトマウスは当業者に既知の標準的な技法を使用して作製することができる(Capecci, Science(1989) 244: 1288; Kollerら Annu Rev Immunol(1992) 10: 705-30; Dengら Arch Neurol (2000) 57: 1695-1702); モノクローナル抗体を形成する予定のタンパク質に対応する遺伝子がノックアウトされている、例えば、HP68。ノックアウトされている遺伝子の断片を含有する以外に、一般に、相同組換えを選択するための抗生物質耐性遺伝子、好ましくはネオマイシンおよびウイルスチミジンキナーゼ(TK)遺伝子を含有する標的ベクターを構築する。または、ジフテリア毒素(DTA)をコードする遺伝子を使用して、ランダム挿入に対して選択することができる。相同組換えが生じる場合には、ネオマイシン耐性遺伝子がゲノムに組込まれるが、TKまたはDTA遺伝子は常に欠損されるベクターを設計する。マウス胚性幹(ES)細胞に鎖状標的ベクターを形質移入し、相同組換えにより、ノックアウトされている標的遺伝子座において組換わる。ネオマイシンおよびTKによって代謝されて、致死的な産物を産生する薬物であるガンシクロビル(TK用)の存在下においてマウスES細胞を増殖させる。従って、相同組換えを受けた細胞はネオマイシンおよびガンシクロビル耐性である。DTAを含有するベクターは、その遺伝子をコードする任意の細胞を死滅させ、従って細胞培養培地に追加の薬物を必要としない。当業者に既知の技法であるサザンブロットハイブリダイゼーションおよびPCRを使用して、相同組換え事象を証明する。

10

20

【0017】

切断型標的遺伝子を保有するマウスを作製するために、陽性ES細胞を培養で増殖させて分化させ、得られた胚盤胞(blastocyte)を偽妊娠雌マウスに植込む。または、ES細胞を、植え込み前のマウス胚の胞腔(blastocoelic)腔に注射し、次いで胚盤胞を外科的に植込む。形質移入したES細胞およびレシピエント胚盤胞は、被毛色が異なるマウス由来とすることができるので、結果としてキメラ子孫を容易に同定することができる。繁殖技法により、同型接合型のノックアウトマウスが作製される。例えば、PCRおよびサザンブロットハイブリダイゼーションを使用して、これらのマウスの組織を試験して、標的遺伝子の同型接合型ノックアウトを証明する。

30

【0018】

別の方法において、アンチセンス技術を使用するジーンターゲットングを使用することができる(Bergotら、JBC (2000) 275: 17605-17610)。同型接合型ノックアウトマウスを精製宿主タンパク質ペプチド、未処理および変性組換えタンパク質で免疫化する。免疫原によるその後の追加免疫後の3および6週目に、マウスを犠牲にし、脾臓を摘出し、骨髄腫細胞との融合を実施する(Korthら Methods in Enzymol. (1999) 309: 106)。個々のハイブリドーマからの抗体を立体配座特異性、すなわち、1つの配座異性体と実質的な特異性で結合することについてスクリーニングする。スクリーニング過程は、1つの配座異性体を別の配座異性体に対して濃縮するように選択した無細胞翻訳系または放射性標識培地または細胞抽出物中で産生された放射性標識タンパク質産物を用いて実施する。

40

【0019】

これらの産物は、ハイブリドーマ上清を使用して免疫沈降させ、SDS-PAGEゲルで操作する。形質移入した細胞を使用することにより、抗体が特異的なエピトープに結合するのを遮断し、それによって可能な配座異性体を隠蔽すると思われるタンパク質-タンパク質相互作用が生じるとされる可能性のために、好ましくは、無細胞抽出物を使用する。放射性標識した翻訳産物を用いる免疫沈降選別の使用、(例えば、シグナル配列のスイッチングによって)歪められている立体配座および弱いレスポンドのスクリーニングは、本発

50

明の選別を従来のモノクローナル抗体産生方法と識別するキーである。

【0020】

識別的な結合を示すモノクローナル抗体をスクリーニングする方法のバリエーションは、pH、アッセイのイオン組成および/または血清もしくは血清タンパク質または関心対象のタンパク質が結合する銅などの金属イオンの存在などの他の条件を変更することである。これらの条件は抗体によって変更してもよい。特異的な配座異性体に対してモノクローナル抗体を識別的結合させる他の手段を使用してもよい。一例として、種々のサイズのコード領域を工作して他の標的タンパク質を作製することによって、このようなモノクローナル抗体によって規定される特異的な立体配座エピトープを、立体配座変化のタグまたはレポーターとして使用する。従って、イオン条件を変更することによってタグは「オン」または「オフ」にすることができ、立体配座変化は、イオンまたは他の条件の変更によって誘導または抑制することができる。スクリーニングのために96ウェルプレートを使用することによりこの過程は合理化され、1人の技術者が1日に1000の個別のハイブリドーマをスクリーニングすることができる。

10

【0021】

抗体は組換え手段によっても作製することができる。重鎖または軽鎖をコードするメッセージャーRNAは、標準的なRNA単離技法、およびポリA mRNAを分離するためにオリゴdTセルロースクロマトグラフィーを使用して望ましい特異性の抗体を産生する成熟B細胞またはハイブリドーマ培養物などの起源から単離される。ポリA mRNAは、望ましい抗体の軽鎖または重鎖のアミノ酸配列をコードする上で十分なサイズの配列を入手するために分割することができる。次いで、好適なプライマー、好ましくは望ましいcDNAに特徴的な核酸配列を使用してmRNAの混合物からcDNAライブラリーを作製する。このようなプライマーは、配列が既知である場合には、抗体のアミノ酸配列に基づいて仮定し、合成することができる。または、望ましい抗体またはポリdTを産生する細胞系統の未分割ポリA mRNAのcDNAを使用することもできる。得られたcDNAを含有するクローニングを作製し、好適な宿主細胞株、典型的には大腸菌を形質転換するために使用する。形質転換が成功した形質転換体は、例えば、クローニングベクタープラスミドに残存するテトラサイクリン耐性または他の表現型の特徴によって同定される。次いで、cDNAの望ましい配列に相補的であることが既知の塩基を含有する好適なヌクレオチド配列を用いて形質転換培養物を探索する。ハイブリダイゼーションが成功しているクローンのプラスミドを当該技術分野において既知の手段で単離し、配列決定して、遺伝子の望ましい部分が存在することを証明する。望ましい遺伝子断片を切断し、好適な発現ベクターに挿入したとき、制御セグメントを有する適当なリーディングフレームを確実にするように作製する。次いで、作製した遺伝子配列を、遺伝子のリーディングフレームにプロモーターを含有し、提唱されている宿主細胞に適合性のベクターに位置づける。適当なプロモーター、制御配列、リボソーム結合部位および転写停止部位並びに便利なマーカーをすでに含む数多くのプラスミドが当業者に既知である。

20

30

【0022】

また、改変された抗体を産生するように遺伝子を作製することもできる。例えば、哺乳類の重鎖は1つの起源または1つの種から完全に誘導されるのではなく、マウス-マウスハイブリドーマ、ヒト-マウスハイブリドーマまたは一連の抗原投与にตอบสนองして分化されるB細胞などの異なるプールのmRNAから回収することができる。上記のプロープおよび分析技法を使用して各場合の配列の望ましい部分を回収し、発現ベクターに組換えることができる。任意の望ましい鎖長のこのようなキメラ鎖を構築することができ；このように、例えば、完全長の重鎖またはFab領域の配列だけを構築することができる。

40

【0023】

例えば、可変配列が定常配列とは別個に誘導されるキメラ抗体の構築は、好適な異なる起源の重鎖および軽鎖の一部をコードする遺伝子の望ましい部分を回収し、次いでライゲーションして各鎖をコードする遺伝子を再構築する。例えば、マウスハイブリドーマ培養物によって産生される抗体の可変配列をコードする重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子の部分を

50

クローニングし、ヒト抗体の重鎖および軽鎖の定常領域をコードする遺伝子断片を、例えば、ヒト骨髄腫細胞からクローニングする。次いで、2本の鎖の各々について、マウス遺伝子の可変部分をヒト遺伝子の定常領域にライゲーションする。鎖の一部をスプライシングするのではなく、突然変異などの利用可能な技法を使用して好適なアミノ酸の変更、欠損または追加を実施して望ましい特徴を提供する。

【0024】

軽鎖をコードする遺伝子および重鎖をコードする遺伝子は、各々が好適なプロモーターおよび翻訳制御下にある限り、別個の発現プラスミドに挿入してもまたは同じプラスミドと一緒に挿入してもよく、望ましいタンパク質の産生に適切な条件下で増殖される好適な細胞を形質転換するために使用することができる。このような条件は、主に、望ましいタンパク質の性質ではなく、発現ベクターに使用するプロモーターおよび制御系の種類に支配される。このように産生されたタンパク質を、当技術分野において既知の方法によって細胞培養物から回収し、その選択は、タンパク質が発現される形態に必然的に依存する。重鎖および軽鎖が同一宿主において同時発現される場合には、単離手法は、再構成された抗体を回収するように設計される。これは、当業者に既知の方法を使用して実施することができる。

10

【0025】

特定のタンパク質配座異性体に対する特異性が保存されている(Fab)₂、FabおよびFv断片などの本発明の特異的な抗体断片は、既知の方法により完全長の抗体の化学的切断によって得ることができる(例えば、Weir(1986年). Handbook of Experimental Immunology, 第4版. Blackwell, Oxford, 1巻. Immunochemistryを参照されたい)。(Fab)₂、Fab、FvおよびScFv断片はまた、重鎖および/または軽鎖抗体鎖の可変領域をコードする遺伝子もしくは特定のタンパク質配座異性体の特異的に認識する抗体領域をコードする配列を保有するそれらの一部をクローニングすることによって組換え技術によっても入手することができる、または特異的な組換えFabもしくはScFv断片を入手するために組換え形態であってもよい。

20

【0026】

ペプチド配座異性体が関与する疾患を理解し、治療するために、配座異性体に実質的に特異的である1つ以上の抗体を同定することは有用である。この方法は、数多くの配座異性体に数多くの抗体または特異的な抗体由来の結合断片を接触させる段階に関係する。次いで、個々の配座異性体に対する抗体または断片の結合の特異性を評価する。種々の配座異性体の各々に実質的に特異的である抗体または断片をこのように同定することができる。

30

【0027】

本発明の薬学的組成物は、非経口投与、例えば、静脈内、皮下、皮内、腹腔内または筋肉内を含む、ヒトに投与するための種々の送達系に使用するのに好適である。抗原製剤は、当業者に既知の植込み式ミニポンプを使用して送達することができる。組成物は、1つ以上の精製抗原と、関心対象のタンパク質配座異性体の特異的な抗体を含む製剤を含む。抗体は、関心対象のタンパク質配座異性体に対する抗体を形成することができる任意の動物の血清から精製することができる。好ましくは、抗体はヒト化される。ヒト化抗体は、ヒト抗体を産生する遺伝子組換え動物において産生することができる。ヒト化抗体はまた、非ヒト抗体、例えば、マウスモノクローナル抗体の生化学的改変によっても作製することができる、マウスモノクローナル抗体の抗原結合またはFab部分にヒト抗体の非結合またはFc領域を融合する段階を含むことができる。これらの方法および他の方法によって作製されるヒト化抗体は、一般に抗体自体に対する望ましくない免疫応答を生じないで、望ましい抗原結合特異性を保持する。

40

【0028】

本発明の組成物に使用するための薬学的に許容されうる担体および製剤の例は、参照として本明細書に組み入れられている、RemingtonのPharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Philadelphia、PA、第17版(1985年)に見られる。薬物を送達する方法は

50

、参照として本明細書に組み入れられている、Langer、(1990年) Science 249: 1527-1533を参照されたい。ワクチンの用途および製造は、参照として本明細書に組み入れられている、Plotkinら(編)(1999年) Vaccines、第3版、W. B. Saunders、PhiladelphiaおよびZegersら(編)(1995年) Immunological Recognition of Peptides in Medicine and Biology、CRC Press、Boca Raton、Floridaを参照されたい。粘膜ワクチン送達は、参照として本明細書に組み入れられている、Ryanら、(2001) Trends Biotechnol 19: 293-304およびOgraら、(2001) Clin. Microbiol Rev 14:430-445を参照されたい。アジュバントの例は、参照として本明細書に組み入れられている、Gregoriadis、G.編(1990年) Immunological Adjuvants and Vaccines(NATO Asi Series A, Life Sciences、179巻)を参照されたい。

10

【0029】

本発明の薬学的組成物を製造する際には、本発明の組成物を修飾して免疫原性および体内分布を変更することが望ましい場合がある。薬理学の一般的な考察は、RemingtonのPharmaceutical Sciences、上記、37~39章を参照されたい。薬理学、免疫原性および体内分布を変更するための数多くの方法が当業者に既知である(例えば、Langer、上記、Gregoriadis、(1990年)、上記を参照されたい)。このような方法の例には、タンパク質、脂質(例えば、リポソーム)、炭水化物または合成ポリマーなどの物質を含む小胞内への薬剤の保護が挙げられる。例えば、本発明のワクチンは、免疫原性および体内分布特性を増強するために、リポソームに組み入れることがある。ワクチン抗原をマイクロカプセルに封入し、次いでポリマーコーティングされているリポソームは、非経口投与および経口投与されるワクチンの放出速度、従って有効性を制御するのに有用である。全て参照として本明細書に組み入れられている、例えば、Szokaら、(1980) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467、米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号および同第4,837,028号に記載されているように、リポソームを製造するために種々の方法が利用可能である。抗原封入および送達アジュバントまたは免疫調節部室としてのリポソームの用途に関する簡単な総説は、参照として本明細書に組み入れられている、Gregoriadis(1999) Methods 19: 156-162およびRogersら(1998) Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 15: 421-480を参照されたい。ポリ(D, L-ラクチド)の沈降によって製造されるポリマー層状基質粒子(polymeric lamellar substrate particle)は、抗原吸着のためのポリマー系を形成する。この手法はpH変化、有機溶媒への接触を回避するので、抗原の完全性を保持することができる。鼻腔内ワクチン化のため

20

30

【0030】

注射用製剤を調製するためには、組成物の溶液を許容されうる担体、好ましくは水性担体に溶解または懸濁させる。種々の薬学的に許容されうる水性担体、例えば、水、緩衝液、0.4%生理食塩液、0.85%生理食塩液、0.3%グリシン、ヒアルロン酸等を使用することができる。結合体制剤も、抗原に対する活発な免疫応答を刺激するためのアジュバントを含むことがある。アジュバントの例は当技術分野において既知であり、例えば、水酸化アルミニウム(Spectrum Chem. Mtg. Corp.、New Brunswick、N.J.)またはリン酸アルミニウム(Spectrum)、リン酸カルシウム、サポニン、モノホスホリル脂質A、フロイントのアジュバント、リポソーム、ポリマーコーティングリポソーム、ポリマー層状基質粒子およびインターロイキン-2などのサイトカインが挙げられる。

40

【0031】

組成物は、薬学的に許容されうる担体として、pH調節剤および緩衝剤、等張化剤、湿潤剤等、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン等並びに例えば、チメロサル(thimerisol)を含む保存剤および例えば、ヒト血清アルブミンまたは動物血清を含むタンパク質担体などの、生理学的条件に近づけるために必要な物質を含有することができる。組成物は、滅菌ろ過を含む従来の既知の滅菌技法で滅菌することができる。得られる水溶液または懸濁液はそのまま使用するために包装されても、または凍結乾

50

燥されてもよく、凍結乾燥した製剤は投与前に滅菌溶液と合わせる。固体の組成物は、例えば、薬学用のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウム等を含む従来の無毒性の薬学的に許容されうる担体を使用することができる。

【0032】

モノクローナル抗体が形成されるタンパク質配座異性体の配列決定は、配座異性体タンパク質は、未処理のタンパク質と本質的に同じアミノ酸配列を含有することを示す。従って、鎖状ペプチドに基づいたエピトープマップを形成する必要はないが、変わりにタンパク質は、好ましくは立体配座または不連続的エピトープについてマッピングされる。モノクローナル抗体の特異性の違いは、同じアミノ酸配列の折畳みの違いによって誘導される。従って、立体配座エピトープマッピングは、モノクローナル抗体が制限されたエピトープに結合していることを示すのに有用である。不連続エピトープは、関心対象のタンパク質の配座異性体に結合した抗体の制限タンパク質分解を使用し、次いで質量分析法(MS)またはNMR分光分析法もしくは結晶学による三次元画像形成を使用して溶菌液を分析して同定することができる。モノクローナル抗体(MAb)を固体支持体に結合し、配座異性体タンパク質を含有する溶菌液を固定したMabと共にインキュベーションする。未結合のタンパク質を除去後、選択したプロテアーゼの希釈液を固定したMab-配座異性体複合体に添加し、未結合の産物を除去する。結合した配座異性体タンパク質を適当な条件下で溶出し、LC-MSで分析する。配座異性体タンパク質の配列決定および分子モデリングは、一般に、立体配座エピトープを十分に同定するのに必要である。

10

20

【0033】

疾患の重症度または他の特徴に関連する配座異性体の集団プロファイルは、配座異性体に関連する疾患を有する個体の体液または個体の感染細胞に、疾患に関連する配座異性体に特異的な1つ以上のモノクローナル抗体を接触させることによって形成することができる。体液は、血液、血清、血漿、リンパ液、尿、痰、脳脊髄液または化膿性試料を含む任意の体液であってもよい。宿主タンパク質および/または配座異性体に特異的なモノクローナル抗体から誘導される結合断片も使用することができる。モノクローナル抗体または結合断片は、検出可能な標識例えば、放射性標識または酵素標識で標識される。抗体に結合することができる酵素標識の例には、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼおよびウレアーゼが挙げられ、酵素と抗体を結合する方法は当技術分野において既知である。ラジオグラフィーまたはELISAもしくはプロット法を含む血清学的方法などの当業者に既知の方法を使用して標識を検出することができる。標識の存在は、個体における少なくとも1つのタンパク質またはペプチド配座異性体の存在を示しており、疾患過程に役割を果たす配座異性体プロファイルを同定するために使用することができる。体液における標識の検出は、個体における少なくとも1つのタンパク質および/またはペプチド配座異性体の存在を示す。複数のモノクローナル抗体またはそれらの結合断片を、個体の疾患状態に関連する複数の配座異性体を検出するために同様に使用することができる。

30

【0034】

母集団における数多くの個体において疾患に関連する配座異性体を検出し、特徴づけることによって、疾患に関連する種々の配座異性体のプロファイルを作製することができる。このような母集団において配座異性体プロファイルを確立することは、母集団内のデータを蓄積し、次いで母集団の個々のメンバーの配座異性体プロファイルと個人の疾患の具体的な特徴の関係を確立することを含む、個人の任意の所定の疾患に関連する配座異性体を検出し、特徴づけることによって実施される。これらの具体的な特徴は、疾患およびタンパク質またはペプチド配座異性体の性質に依存し、確定診断だけでなく、予後の判定および個々の患者の適当な治療の開発に使用することができる。例えば、種々のペプチド配座異性体が疾患の重症度の大小に関連している場合がある。別の例として、ペプチド配座異性体が疾患の抵抗性の大小に関連している場合がある。種々の疾患治療に対する母集団内の個人の反応は、個人の配座異性体プロファイルと個人の反応性の関係をプロファイリ

40

50

ングする際の重要な因子である。例えば、治療に対する反応が悪い個人は、治療に対する反応が良好な個人のタンパク質またはペプチドの立体配座型と比較して、治療に対する標的として劣っている、疾患経過に關与するタンパク質またはペプチドの立体配座型を有する場合がある。母集団検討は、配座異性体と反応性のこのような関係を妥当な程度の重要性で確立するために実施することができる。

【0035】

配座異性体プロファイルと治療効果の關係が母集団において確立されたら、任意の所定の患者の治療の選択は、例えば、上記の抗体または抗体断片に基づいた方法を使用して、個々の患者の配座異性体プロファイルを決定することによって改善することができる。当面の患者の配座異性体プロファイルと実質的に同様の配座異性体プロファイルを有する個人にとって成功と確立されているような治療法が効果的であるとわかる可能性が最も高い。開発することができる母集団プロファイルの例には、薬物感受性、有効性および副作用、疾患または治療の合併症が挙げられる。mAbを母集団に基づいた患者プロファイルと併用して使用して、そのような母集団に基づいたプロファイルのサブセット内に特定の時点において任意の個々の患者を局在化し、個々の患者の配座異性体混合物、従って予測的な母集団に基づいたコホートにおけるメンバーシップの変化を年齢、薬物治療、食餌および生活様式の変化の関数としてモニターすることができることも興味深い。

10

【0036】

本明細書に記載する方法および組成物は数多くの用途を有する。例えば、無細胞翻訳/アセンブリーシステムを使用して、大量の特異的なタンパク質配座異性体を作製することができる。このように作製されたタンパク質は、例えば、免疫化またはワクチンの製造に使用することができる。所定のタンパク質の1つの立体配座に対して(液性)免疫応答を選択的に誘発するが、別の立体配座に対しては誘発しない抗原の免疫原となる量をヒトまたは動物に適用する。立体配座選択的な液性免疫応答は、立体配座のある抗体の表面エピトープに模倣している「最小ペプチド」による免疫化または液性免疫応答を1つの立体配座エピトープに対して生じさせるが、別の立体配座エピトープに対しては生じさせないように生化学的手段および/または追加の分子成分の負荷によって処理されている完全な抗原による免疫化(「単一特異的な立体配座抗体応答」)によって誘発される。最小ペプチドは、特異的な抗体または誘導されるリガンドと抗原の三次元的な表面接触に関する正確な知識が得られると構築される。次いで、エピトープを構成するアミノ酸残基を、鎖状ペプチド断片の環化および/または他の化学的改変によって1つの分子に工作する。

20

30

【0037】

または、標的対象の抗原は、生体組織、体液または組換え発現系の実験試料から特定の立体配座で単離される。次いで、この調製物を、分子内または分子間架橋などの化学的改変によって固定する；立体配座を「凍結する」他の生化学的手段は、第2、第3または多数の分子による固定化である。次いで、問題のタンパク質の異なる配座異性体中では識別しないと思われる他のエピトープを抑制することによって、立体配座特異的な液性免疫応答が生ずるように、これらの複合体をさらに最適化する。これは、他の免疫原性エピトープを特異的なプロテアーゼの助けで消化することによっておよび/または他のエピトープを化学的修飾によって保護することによって達成することができる。次いで、ペプチドから合成された「最小エピトープ」分子または生化学的に調製した「凍結」配座異性体を試験動物に適用して、立体配座特性を確認し、副作用を試験する。最終的に、「最小エピトープ」分子を標準的な薬学的免疫化製剤で投与し、特異的な配座異性体が病理学的過程の原因となっている疾患を有する動物またはヒトを治療するために使用する。一般に、従来の免疫化技法では、各用量は約1~1000 μ gの総免疫原を含み、好ましくは約2~100 μ g、さらに好ましくは約1~40 μ g、最も好ましくは約1~5 μ gの総免疫原を含むことが予想される。または、Blachereら、(1997年)上記およびCastellioら、(2000年)上記による技法を使用する場合には、量はナノグラム範囲である。この場合には、ワクチン中の配座異性体の純度は最高に重要である。特定のワクチンの最適量は、抗体力価および被験者における他の反応の觀察に關係する標準的な検討によって確かめることができる。一次ワクチン過

40

50

程は、1~2ヶ月の間隔をおいてワクチンを2または3回投与することを含むことができるが、遺伝的因子または他の因子により、任意のワクチン製剤に対する抗体応答が製剤間および個体間で変動する可能性がある。ワクチン化に対する応答は、短期的および長期的なワクチン効果を判定するためにモニターされ、前者は結合物製剤を評価するために使用することができ、後者は「追加免疫投与」ワクチン化の必要性に関して個人を評価するために使用することができる。ワクチン化後の抗体力価を測定するためには、ワクチン化した動物の血液試料を、ELISAなどの当業者に既知の標準的な技法を使用して分析する。好ましくは、血液試料は、ワクチン化前(すなわち、陰性対照)およびワクチン後約4週間、その後は約2~6ヶ月の間隔の各患者の試料を含む。適宜、追加ワクチンを投与することができる。

10

【0038】

配座異性体は、1つのタンパク質配座異性体だけに識別的に結合し、プリオン関連疾患などの感染性因子に関係する疾患の診断物としても使用することができるモノクローナル抗体のスクリーニングアッセイの試薬としての用途も見出している。アッセイは数多くの様式のいずれかにより開始することができる。疾患関連配座異性体をスクリーニングするためには、モノクローナル抗体を直接使用する。疾患関連配座異性体の生物試料の高スループットスクリーニング。例えば、疾患関連配座異性体の1つ以上に特異的な抗体をコーティングした固相免疫捕獲部位に生物試料を添加する；結合は、生物試料中に疾患関連配座異性体が存在することを示す。このような情報を使用して、感染性因子に対して可能な治療または併用療法を同定することができる。配座異性体比の変化を評価する疾患関連タンパク質には、インスリン、インスリン受容体およびグルコース輸送体(糖尿病)、前立腺の酸性ホスファターゼ(前立腺癌)、レプチン(満腹障害および肥満)、nogo-a/b(神経再生阻害物質)、hp68(HIV)などのウイルスキャプシド分子シャペロン並びにプリオンタンパク質が挙げられる。

20

【0039】

特定の疾患関連配座異性体に特異的なモノクローナル抗体は、特定の自然経過、疾患のアウトカムまたは他の臨床的な疫学的所見を有する患者集団に関連させる場合には、診断目的として使用することができ、または生物学的応答の配座異性体特異性を改良することができる。後者を達成するためには、特定の疾患関連立体配座に特異的なモノクローナル抗体またはこれの組換え型を精製して、任意の発熱性夾雑物または毒性の製造副産物を除去し、薬学的組成物に製剤化し、配座異性体に関連する疾患の治療を必要としているヒトまたはヒト以外の動物に投与する。一般に、組成物は静脈内投与される。疾患経過の特定の病態生理学および疾患を生じている配座異性体への到達性に応じて、別の適用経路は局所適用、例えば、創傷または粘膜組織適用を含む。受動免疫化は確立されている薬理的治療法である；例えば、トラスツズマブ(Herceptin(登録商標)、Roche)、ダクリズマブ、アブシキシマブ等の投与に関する製造業者の情報を参照されたい。

30

【0040】

便利なことに、医師がバイアルを直接使用することができるように、製剤は、滅菌バイアルに入れた1回量キットの形態で提供することができ、この場合、バイアルは望ましい量および濃度の製剤を有する。バイアルが直接使用用の製剤を含有する場合には、通常、本発明の方法に使用する他の試薬の必要性はない。本発明の組成物は、本発明の組成物がヒトにおけるタンパク質の配座異性体に関連する疾患を治療するために使用することができることを示す表示を含む包装材料に含ませることができる。

40

【0041】

以下の実施例は本発明を例示するために提供されており、限定するものではない。

【0042】

実施例

材料と方法：

使用する緩衝液：

50

ホモジネーション緩衝液：

0.25 M スクロース (Sigma、米国)
 50 mM HEPES (Sigma、米国)
 100 mM 酢酸カリウム (Merck、ドイツ)
 5 mM 塩化マグネシウム (Sigma、米国)

【 0 0 4 3 】

試料ロード用緩衝液：

50 mM Tris-Cl (pH 6.8) (Merck、ドイツ)
 2% SDS (w/v) (Sigma、米国)
 0.1% ブロモフェノールブルー (bromophenol blue) (Sigma、米国) 10
 10% グリセロール (Sigma、米国)
 2% -メルカプトエタノール (Sigma、米国)
 12% SDSゲルを、Sambrook&Russell(2001) Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York、米国が記載するように注いだ；
 BioRad(米国)製の試薬：アクリルアミド、TEMEDまたはSigma(米国)：過硫酸アンモニウム、SDS；Biometra Inc.、ドイツ製の装置。

【 0 0 4 4 】

ゲル泳動緩衝液：

25 mM Tris塩基 (Merck、ドイツ)
 250 mM Glycine pH 8.3 (Sigma、米国) 20
 0.1% SDS (w/v) (Sigma、米国)

【 0 0 4 5 】

ゲル転移緩衝液：

200 mAにおいてフッ化ポリビニリデン (PVDF) 膜 (Millipore、米国) に12時間転移
 48 mM Tris塩基 (Merck、ドイツ)
 39 mM グリシン (Sigma、米国)
 20% メタノール (Merck、ドイツ)

【 0 0 4 6 】

任意のボンソー染色：

1g ボンソーS (Sigma、米国) の5% 酢酸 (Merck、ドイツ) 溶液 30

【 0 0 4 7 】

Tween 20を含有するTris-緩衝生理食塩液 (TBS-T)：

8g 塩化ナトリウム (Merck、ドイツ)
 0.2g 塩化カリウム (Merck、ドイツ)
 3g Tris塩基 (Merck、ドイツ)
 を1000 mlのH₂Oに加え、500 μl Tween 20 (0.05%) (Boehringer Ingelheim、ドイツ) を添加し、pHを7.8に調節する

【 0 0 4 8 】

ブロッキング緩衝液：

5% 低脂肪乳 (Oxoid、英国) 40
 をTBS-Tに加える

【 0 0 4 9 】

銅ストック液：

500 mM または25 mM 硫酸銅 (II) 五水和物 (Merck、ドイツ)
 を超純水に加え、滅菌ろ過する

【 0 0 5 0 】

実施例1

プリオンタンパク質に対する配座異性体特異的モノクローナル抗体の作製および結合特性の分析

抗体作製：

7VCハイブリドーマ細胞を、75 ml組織培養フラスコ中でOptiMAb(#11910-031Gibco/Invitrogen、米国)を含有する無タンパク質ハイブリドーマ培地(PFHM II; #12040-051 Gibco/Invitrogen、米国)で増殖させた。最大抗体濃度であるが、細胞死を最小にするために、インキュベーション培地が黄色が濃い色調に変色し始めたらすぐにそれらを回収した。次いで、ウェスタンブロット法によって上清のmAB濃度を既知のものと比較することによって抗体濃度を測定した。それは約100 µg/mlであった。

【0051】

実験プロトコール：

以下のプロトコールを使用して全てのウェスタンブロット法を実施した：

1. 明記するように、ハムスターまたは遺伝子組換えマウスの0.5%脳ホモジネートと同じ量ずつ12% SDSゲルにロードし(35 mAの電流で泳動)、定電流200 mAで12時間浸漬(湿式)ブロット法(immersion(wet)Blotting)によってPVDF膜に移した。 10
2. 次いで、膜を任意にボンソーSのTBS-T溶液で染色して、個々のレーンおよび対照のタンパク質の移動を可視化した。
3. TBS-T中で洗浄後、膜を5%低脂肪乳のTBS-T溶液で1時間ブロッキングした。
4. 「通常の洗浄」は、Millipore-産生水(1分)およびTBS-T(5分間)における3回の交互の洗浄サイクルを含む；「集中洗浄」は、Millipore-産生水(1分、3倍のすすぎ)および最初は5分、次いで10分のサイクルに増加するTBS-T洗浄段階における4回の交互洗浄サイクルを含む。
5. ブロッキング後、膜を集中洗浄し、最終的に個々のストリップに切断した。小さいストリップを15 mlのFalcon管(Greiner、ドイツ)中でインキュベーションした。 20
6. 抗体を、TBS-T中で最終濃度10 µg/mlまで添加し、規定した濃度の硫酸銅または100 mM EDTAをストック溶液から添加した。一次抗体をオービタルシェーカーで室温において2時間インキュベーションした。
7. ブロットを集中洗浄した。
8. 5000倍希釈の二次抗体(ヤギ抗マウスIgG H/L-ペルオキシダーゼ標識；#31444 Pierce、米国)を1時間インキュベーションした。
9. ブロットを集中洗浄した。水で最後の洗浄を行ってから、高感度化学発光(ECL；Amersham Pharmacia、米国)基質を添加し、Hyperfilm(Amersham Pharmacia、米国)で現像した。 30

【0052】

識別的な結合の範囲：

pH 7.8のTBS-Tインキュベーション緩衝液において、PrPCTM(Tg(KH>II)マウス脳におけるPrP免疫反応性)対PrP分泌(Tg(7BH0Z)マウス脳におけるPrP免疫反応性)を検出するために識別的な結合プロファイルを確立した。Tg(KH>II)の識別的な免疫反応性が1 µM ~ 50 µMのCuSO₄濃度において存在することが見出された。これより高い濃度は免疫反応性を有意に弱くし、最終的に完全にプロットから抗体を除去した。これより低い濃度は一貫性のない結果を生じ、明白な差がなかった；従って、100 mM EDTAを添加して、プロットおよび緩衝液に無作為に存在する金属イオンをキレート結合して除去した。

【0053】

一定の抗体濃度(10 µg/ml)および銅濃度(25 µM)において、TBS-TのpHを変化させると、pH5では、全ての免疫反応性がなくなり、pH7.8では免疫反応性はTg(KH>II)とTg(7BH0Z)脳の間で識別的であり、pH9では陽性であるが、識別的でないことが見出された。

【0054】

実施例2

NTM PrPに結合するモノクローナル抗体の同定

インビトロにおいて翻訳されたPrPアイソフォームを、開示内容が参照として本明細書に組み入れられている、2000年12月15日に提出され、2002年9月26日にUS-2002-0137915-A1として公開されたUSPN09/739,179号に記載されているように作製した。作製した立体配座アイソフォームは、当業者に既知の方法を使用して作製し、PrPと相互作用することが 50

以前に示されている(例えば、上記実施例1の結果を参照されたい)モノクローナル抗体による免疫沈降によってスクリーニングした。PrPアイソフォームのインビトロ翻訳を図8(一番左のレーン)並びに7VC(レーン2および3)および19B10(レーン4および5)のクローンによる免疫沈降を示す。19B10は分泌またはCTM PrPを認識しないが、NTM PrPおよび前駆体PrPだけ認識する。

【0055】

実施例3

スクレイピー感染神経芽細胞腫細胞におけるPrPアイソフォームの局在化

神経芽細胞腫細胞(N2a細胞; ATCC#CRL131)にRML株のマウス馴化スクレイピー(Chandlerら、1961 The Lancet i: 1378-1379)を感染させ、その後サブクロニング(BosqueおよびPrusiner, J. Virology 74: 4377-4386)して誘導した永久的にスクレイピー感染させた神経芽細胞腫細胞(ScN2a)を使用した。細胞の免疫染色は、Korthら、(2000) Journal of General Virology 81: 2555に記載されているように実施した。7VCおよび19B10に使用した抗体懸濁液は、リン酸緩衝生理食塩液で1:1の濃度にしたHT培地(10%FCS(PAA Laboratories, Linz, オーストリア)および最終濃度、それぞれ、100U/100 μ g/mlのペニシリン/ストレプトマイシンを添加し、ヒポキサンチンおよびチミジン(共にSigma製、米国)をそれぞれ最終濃度1.36および0.76mg/100mlまで添加した最小必須培地(Invitrogen/Gibco#21090-022))の細胞培養上清であった。結果を図9に示す。

【0056】

抗体が存在しない場合(図9の一番左のパネル)、mAB 6H4(左から2番目のパネル)、mAB 19B10(左から3番目のパネル)およびmAB 7VC(一番右のパネル)によるScN2a細胞の免疫染色である。免疫染色は細胞表面(上のパネル)または細胞内染色(下のパネル)のためにサポニン(Sigma、米国)で透過性にした後に実施した。結果が示すように、mAB 7VCは、ScN2a細胞の細胞表面および細胞内コンパートメントの両方を染色する。MAB 19B10はScN2a細胞の細胞表面を染色し、NTMPrPがこれらの細胞の細胞表面に存在することを示している。MAB 19B10は、細胞をサポニンで透過性にしたとき、細胞内コンパートメントを染色しない; これは、サポニンによるNTMPrP立体配座の変性によると思われる。

【0057】

実施例4

19B10によるスクレイピー感染神経芽細胞腫の識別

ScN2a細胞は、集密化した10cmの細胞培養皿から取り、60 mmの皿に分割した(1滴)N2a細胞である。それらは、上記のように、10%FCSおよびペニシリン/ストレプトマイシンを添加した最小必須培地で増殖させる。異なる濃度のハイブリドーマ細胞培養培地上清(HT培地、上記を参照されたい)を添加した(0.5%、1%、5%、10%、50%および対照としてHT培地単独)。培地および添加したHT培地上清は1週間1日おきに換えた。7日の処理後、添加した狭い濃度範囲の5~10% HT培地(2~4 μ g/ml細胞培養培地の最終mAB濃度に相当する)においてだけ、大量の細胞死が生じていたが、残りのScN2a細胞は巨細胞に分化していた(図10の上のパネルの左と右の写真を比較)ことが観察されたが、処理前は観察されなかった。これは、Korthら(2000) Journal of General Virology 81: 2555に記載されているように実施したmAB 6H4による細胞内PrP染色によって見られるように、いくつかの核のアポトーシス様小胞形成(図10、中央のパネル)および総PrP発現のダウンレギュレーション(図10、下のパネル)を伴った。

【0058】

mAB 19B10によるScN2a細胞(およびN2a細胞、データは示していない)の処理により、細胞死および残りの細胞の分化を含む用量依存的な影響が生じる。理由はまだ不明であるが、mAB 19B10濃度 \geq 50%(\geq 10 μ g/ml)はこの影響を生じない。影響は約1週間の処理後に突然であるが、信頼性がある理由も不明である。他の抗体(例えば、7VCまたは6H4)によるPrP標的化はこのような影響を生じない。極めて独自なことであるが、mAB 19B10によるNTM PrP標的化は(免疫染色で見られるように)PrPの全体的なダウンレギュレーションを生ずる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

実施例5

配座異性体特異的モノクローナル抗体によるプリオン複製の阻害

ScN2a細胞を、上記の実施例4に記載するように処理した。1週間後、細胞を溶解し、Korthら(2001) PNAS 98:9836の記載と全く同じに処理した。図11に示すように、mAB 7VCはScN2a細胞においてプリオン複製を阻害する(図11、上のパネル)。MAB 19B10は、10%(約4 μ g/ml)の濃度においてだけScN2a細胞におけるプリオン複製を阻害するが、 \geq 50%(10 μ g/ml)または5%(2 μ g/ml)未満の濃度では阻害しない。mAB 19B10の抗プリオン作用は、7VCを含む他のmABの作用と対照的である。「従来の」mABは、PrPC(分泌型と思われる)が変換されるのをシールドするが(Peretzら、(2001) Nature 412: (6848): 739-43)、19B10はPrP発現をダウンレギュレーションすることによって作用する。

10

【 0 0 6 0 】

実施例6

異なるPrP種の種々の銅依存性

Dounceホモジナイザーを用いて、脳を0.25Mスクロース、150 mM酢酸カリウムおよび5 mM塩化マグネシウム(「緩衝液A」)中でホモジネートして10%ホモジネートを得た。次いで、ホモジネートを1%に希釈し、テーブルトップ遠心分離器で1000 rpmで1分間遠心分離して事前除去処理(precleared)した。次いで、事前除去処理した1%ホモジネート1.5 mlおよび無血清培地で増殖させた約5 μ gのmAB 7VCおよびプロテインAアガロースを4 mlにおいて終夜インキュベーションした。次いで、プロテインA結合7VCおよび免疫沈降させたPrPを含有するアガロースをテーブルトップ遠心分離器において1000rpmの回転で短時間(約10秒)遠心分離して沈降させ、緩衝液Aで3回洗浄した。濃度を増加させた硫酸銅(Cu₂SO₄)を含有する50 μ lの滅菌水によるその後の溶出を採取し、SDSゲルで泳動した。7BH0Z脳ホモジネート(シリアンハムスターPrPを発現する遺伝子組換えマウス; 図12a、上のパネル)またはF1198脳ホモジネート(CTM PrPが高い突然変異型シリアンハムスターPrPを発現する遺伝子組換えマウス; 図12a、下のパネル)の免疫沈降後の異なる銅濃度による溶出物を示すウェスタンブロットである。示すように、mAB 7VCは、銅依存的に溶液中の異なるPrP種に結合する。CTMPrPが存在するホモジネートでは、高い濃度の銅でもPrPを完全に溶出することができず(「ゲル」レーン); さらに、CTMPrPを含有するホモジネートでは高い濃度の銅で溶出するPrP種があるが、正常なホモジネートでは見られない。

20

30

【 0 0 6 1 】

上記の実施例1に記載するように調製したプロテアーゼ未消化の正常なシリアンハムスター脳ホモジネート、スクレイピー感染(Sc237株)シリアンハムスター脳ホモジネートおよびプロテアーゼ消化したスクレイピー感染シリアンハムスター脳ホモジネートのウェスタンブロットを図12bに示す。膜にブロットした異なる脳ホモジネートのPrPは、mAB 7VCに対する銅依存的な異なる親和性を有する。特に、正常な脳のPrPの免疫反応性は、スクレイピー感染した脳と比較して、銅によって容易になくなる。両方のホモジネートはゲル電気泳動前にSDS中で煮沸したので、この変性手法を「生存する」ことができ、膜上でのある程度の再折畳みを生じ、記載されている差を表すPrPの特徴がある。本発明の手法を使用すると、mAB 7VCはスクレイピー感染脳を非感染脳から銅依存的に識別することができる。

40

【 0 0 6 2 】

実施例7

異なる脳ホモジネートに対する配座異性体特異的抗体の結合

上記に記載するように調製した緩衝液A中の10%脳ホモジネートのウェスタンブロットを使用して、mAB 7VC、19B10および6H4と共にインキュベーションした。結果を図13に示す。mAB 7VCはオクタリピートに結合する、従って、それは、オクタリピートが欠損しているmoPrPを免疫学的に認識することができない(図13、下のパネルの右側、レーン7と8を比較)。mAB 19B10は、一般に、免疫反応性が弱い。最も強力な免疫反応性は、PrP発現が、テトラサイクリンプロモーターの制御下の発現によって抑制されている遺伝子組換えマウ

50

スの脳ホモジネートにおいてである；テトラサイクリンプロモーターが除去されると、PrP発現が誘導され、マウスは、神経疾患の徴候を有する疾患になる。これらのマウスは、CTMPPrPおよびNTMPPrPを含むとおもわれる、異常なアイソフォームのPrPを作製すると思われる。

【0063】

実施例8

配座異性体特異的なモノクローナル抗体の作製および患者プロファイリングにおけるそれらの用途

変性または未変性抗原を使用してマウスを免疫化し、脾細胞と骨髄腫細胞を融合することによってハイブリドーマを作製した。得られたハイブリドーマは、高配座異性体無細胞翻訳産物の溶液IPによってスクリーニングし、または配座異性体を含有する組織スライスもしくは細胞を免疫染色もしくはウェスタンブロットによってスクリーニングし、純水に立体配座特異的である数が少なく、弱いことが多い反応物質を同定する。次いで、患者の血清または抗凝固処理し、遠心分離した血液試料から単離し、溶解した「軟膜」を、既知の無細胞翻訳配座異性体を基準にした「未知」として使用し、溶液IP、ウェスタンブロットまたは免疫染色によって、異なる配座異性体に特異的な抗体に対する相対的な反応性についてスクリーニングし、その特定の患者血清の採血時における1つの配座異性体の他に對する相対的な比を反映する配座異性体指数プロファイルを作製する。プロファイルの変化は、母集団および回顧的な臨床疫学的相関によって決定され、時間、薬物治療、食餌および生活様式または他の変化の関数としてモニターすることができ、任意の所定の患者の先見的な状態を大規模コホートに相関させることができる。

【0064】

実施例9

プリオン疾患に対する免疫化

Hayら、1987 Mol. Cell Biol. 7: 914-919；Hegdeら(1998年)上記およびHegdeら(1999年)上記に記載されているようにインビトロ翻訳系を用いてPrP^C™を合成する。個々のPrP配座異性体が好まれるように、突然変異型PrP配座異性体を使用した。免疫化手法は、Srivastavaらが開発した方法を使用した(Blachereら、(1997年)上記およびCastellinoら、(2000年)上記を参照されたい)。簡単に説明すると、組換え(マウスまたは他の種)HSP70(1~10μg)および抗原、インビトロ翻訳されたPrP^C™(できるだけ大量であるが、少なくとも50ng)を、1mM KCl、2mM MgCl₂および100μM ATPを含有するPBSと共に適当な容量で室温において60分間インキュベーションする；最後に、1mM ADPを添加し、30分間インキュベーションする。これは抗原である。次いで、標準的なプロトコールにより、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内経路によって望ましい動物を免疫化するために抗原を使用する。任意に、フロイントの完全アジュバント、RIBIまたは水酸化アルミニウム(全てSigma社製、米国)、またはインターロイキン-2などの組換えサイトカインなどのアジュバントを使用する。

【0065】

実施例10

配座異性体特異的な抗体による受動免疫化

受動免疫化は、タンパク質の疾患関連配座異性体の事前の同定に関係する。望ましい識別的結合特異性を有するモノクローナル抗体またはそれらの誘導体を、上記に記載されているように作製した。これらのモノクローナル抗体は、生理学的に許容され、投与の適当な薬理的な基準を満たすように処理される。通常、抗体は高度に精製され、発熱物質が除去され、モノクローナル抗体の可能な免疫原性エピトープは、モノクローナル抗体を遺伝的に改変することによって抑制されている(例えば、「ヒト化抗体」)。次いで、疾患の表現型および疾患の位置により、必要としている動物に抗体の薬学的調製物を静脈内、皮下、筋肉内、脳質内、腹腔内または皮膚もしくは粘膜組織に局所的に提供する。疾患の症状が持続する限りこの処理を反復し、防御を確立する。

【0066】

10

20

30

40

50

実施例11

立体配座感受性抗体チップの製造

高スループット診断のための、患者組織または体液試料をプロファイリングするための立体配座感受性抗体チップを以下のように製造する。上記に詳細に記載する方法により形成した立体配座特異的抗体団を特定のマイクロアレイ、好ましくはアドレス可能なマイクロアレイに共有結合する。個々の抗体(一定量)とそれぞれの組織または体液試料との反応性の個々の差をモニターし、記録するので、使用する立体配座特異的抗体の数の制限はない。使用される抗体の数が多いほど、プロファイリングの有用性は高くなる。マイクロアレイは標準的な手法で製造され(例えば、AffymetrixまたはCiphergenの製造業者の取扱説明書を参照されたい)、マイクロ～ナノスケールで作動するので、数百のモノクローナル抗体が使用される。適当な緩衝溶液中の組織試料または体液をチップに接触させ、洗浄して任意の未結合の物質を除去する。結合は、例えば、生物物理学的手段(例えば、レーザースキニングおよび/またはプラズモン(plamon)共鳴測定、蛍光消光)または免疫学的に検出される。検出手法の例には、抗体チップに使用されるものが挙げられる(Becton& Dickinson、Ciphergen等)。特定の配座異性体の存在は、チップに固定されたモノクローナル抗体への結合の検出によって明らかにされる。次いで、特定の配座異性体の有無を使用して、患者のプロファイルを形成する。

10

【0067】

上記に示すように、PrPCTM(PrP^{Sc}にも関係する)の独自の分子構造が、この分子構造を識別的に認識することができるモノクローナル抗体を使用して同定されている。PrPCTMおよびPrP^{Sc}に関連するこの独自の分子要素は、mAB 7VCの結合部位付近に存在する過剰量の規定の銅イオンの条件下においてmAB7VCで染色することができる。pH7.8のTBS-Tインキュベーション緩衝液において、PrPCTM(Tg(KH>11)マウス脳におけるPrP免疫反応性)対PrP分泌(Tg(7BH0Z)マウス脳におけるPrP免疫反応性)を検出するために識別的な結合プロファイルを確立した。Tg(KH>11)の識別的な免疫反応性は、1 μM ~ 50 μMのCuSO₄濃度において存在することが見出された。これより高い濃度は免疫反応性を有意に弱くし、最終的に完全にプロットから抗体を除去した。これより低い濃度は一貫性のない結果を生じ、明白な差がなかった;従って、100 mM EDTAを添加して、プロットおよび緩衝液に無作為に存在する金属イオンをキレート結合して除去した。一定の抗体濃度(10 μg/ml)および銅濃度(25 μM)において、TBS-TのpHを変化させた。pH5では、全ての免疫反応性がなくなり、pH7.8では免疫反応性はTg(KH>11)とTg(7BH0Z)脳の間で識別的であり、pH9では陽性であるが、識別的でないことが見出された。この分子的要素は、タンパク質の共有結合的修飾もしくは極めて密な折り畳みまたは両方である。この構造に対するmAB 7VCの分子的な標的化により、今やPrPCTMまたはPrP^{Sc}を他のPrP種から識別して認識することができる。

20

30

【0068】

PrPNTMに識別的に結合して、ScN2a細胞の細胞表面を染色する19B10である、2番目のmABが同定された。培養中のN2aまたはSc2a細胞にこの抗体を添加すると、約25 ~ 250 μg/mlの中間の濃度における1週間の処理後に生存細胞の細胞数および分化を低下する。処理後の細胞は大きくなり、軸索が伸長し、PrP発現(全ての立体配座アイソフォーム)はダウンレギュレーションされる。処理は可逆的である。N2a細胞は処理により感受性であり、ScN2a細胞の影響の回復は早い。19B10 mABが未グリコシル化および一グリコシル化型のPrPに結合することは本発明の仮定である。

40

【0069】

本明細書に記載されている全ての文献および特許出願は、本発明が属する分野の当業者の技術レベルを示す。全ての文献および特許出願は、個々の文献または特許出願各々が具体的且つ個別に参照として組み入れられていることが示されているのと同じ程度で参照として本明細書に組み入れられている。

【0070】

本発明は本明細書において十分に記載されているが、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく、多数の変更および修正を加えることができることは当業者

50

に明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】プロテイナーゼK(Merck、ドイツ) 100 µg/mlによるプロテアーゼ消化を37 °Cにおいて1時間実施し、5 mM フェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF; Sigma、米国)で停止した。

【図2】腹水由来のmAB 13A5を1:5000希釈で使用した。

【図3】mAB 13A5およびRo73抗血清を1:5000希釈で使用した。

【図4】PNGase FおよびEndo HはNew England Biolabs(NEB、米国)から購入し、製造業者のプロトコールにより使用した。

【図5】ペプチド結合の酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を以下のように実施した: ストレプトアビジンをコーティングしたELISAプレート(96ウェルフォーマット; Roche、米国)に、示す配列のN-末端ピオチン化ペプチド1 µg/ウェルを37 °Cにおいて2時間コーティングした。次いで、ELISAプレートをリン酸緩衝生理食塩液で洗浄し、5%ウシ血清アルブミンで37 °Cにおいて1時間ブロッキングした。洗浄後、未希釈およびTBS-Tで希釈した一連のmAB 7VC上清または対照抗体をコーティングしたウェルと共に37 °Cにおいて2時間インキュベーションした。洗浄後、アルカリ性ホスファターゼ標識した二次ヤギ抗マウスIgG(Pierce、米国)をTBS-Tで1:1000濃度で室温において45分間インキュベーションした。洗浄後、基質(p-ニトロフェニルホスフェート; Sigma、米国)をウェルに添加し、黄変をELISAリーダーでモニターした。

【図6】インビトロにおいて翻訳し、放射性 S^{35} -標識したPrPをHayら、1987年、Hegdeら、1988 Science 279, 827-834およびHegdeら、1999年に記載されているように作製した。次いで、総産物をmAB 7VC上清または対照抗体および15 µlプロテインA(Gibco/Invitrogen、米国)と共にインキュベーションし、4 °Cにおいて3時間回転ホイールでインキュベーションした。次いで、産物をホモジネーション緩衝液で3回洗浄し、試料緩衝液中で煮沸し、15% SDSゲルにロードした。ゲルを乾燥し、ハイパーフィルム(Amersham Pharmacia、米国)に露出した。

【図7】放射性標識した無細胞翻訳産物を示し、ほぼ等量の各PrPトポロジー型および前駆体を使用して、1500の個々のハイブリドーマ上清をスクリーニングしたことを示す。レーン1~13は、選択したクローンで免疫沈降させた。レーン1は、立体配座特異性がない条件下における「強力な反応物」を示す。レーン13は、抗体を添加していない結果を示す。レーン2~12に使用する抗体は、高いNtm-特異性(レーン10)から主に分泌(レーン3)およびCtm(レーン10)の範囲の種々の程度の立体配座特異性を示す。ほとんどの場合において前駆体に対する反応性が観察されたが、前駆体は、インビボにおいて観察されない無細胞翻訳のアーティファクトであるので(標的化の効率のために)、存在は無視することができる。この融合の免疫原は変性組換えPrPである。未処理のCtmおよびSec PrPを免疫原として使用すると、提唱されているように、さらに指向性のある立体配座特異的応答が得られると思われる。

【図8】PrP(一番左のレーン)のインビトロ翻訳並びに7VC(レーン2および3)および19B10(レーン4および5)のクローンによる免疫沈降を示す。

【図9】抗体が存在しない場合のScN2a細胞(一番左のパネル)、mAB 6H4(左から2番目のパネル)、mAB 19B10(左から3番目のパネル)およびmAB 7VC(一番右のパネル)の免疫染色を示す。免疫染色は、細胞表面(上のパネル)またはサポニン(Sigma、USA)による透過処理後細胞内染色(下のパネル)で実施した。

【図10】19B10で1週間処理後のScN2a細胞分化を示す。

【図11】mAB 7VCおよび19B10がプリオン複製を阻害することを実証するウェスタンブロットを示す。

【図12A】7BHOZ脳ホモジネート(シリアンハムスターPrPを発現する遺伝子組換えマウス; 上のパネル)またはF1198脳ホモジネート(CTMPPrPが増加している突然変異型シリアンハムスターPrPを発現する遺伝子組換えマウス; 下のパネル)の免疫沈降後の異なる銅濃度

10

20

30

40

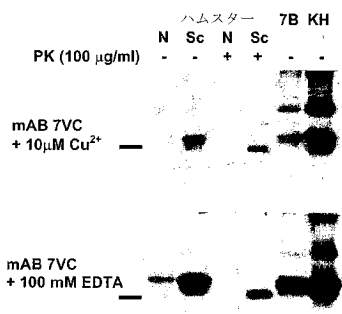
50

による溶出物の影響を実証するウェスタンブロットを示す。

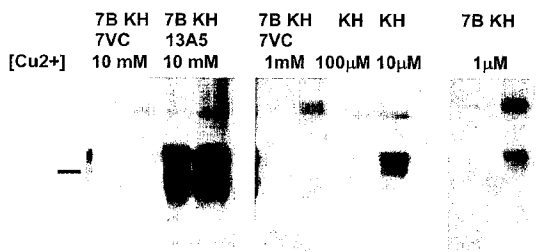
【図12B】プロテアーゼ未消化の正常なシリアンハムスター脳ホモジネート、スクレイピー感染(Sc237株)したシリアンハムスター脳ホモジネートおよびプロテアーゼ消化したスクレイピー感染シリアンハムスター脳ホモジネートのウェスタンブロットを示す。

【図13】mAB 7VC、19B10および6H4を含有する異なる脳ホモジネートのウェスタンブロットを示す。

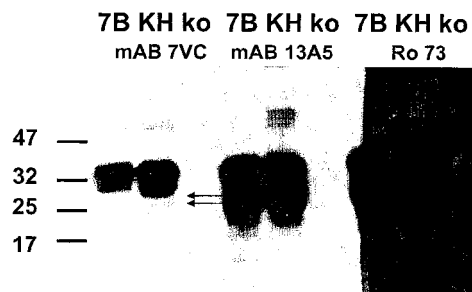
【図1】



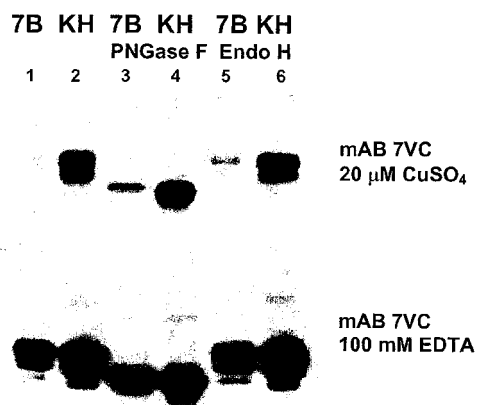
【図2】



【図3】



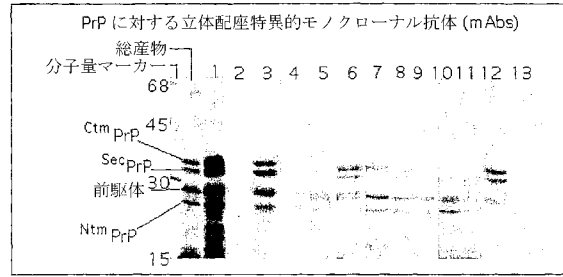
【図4】



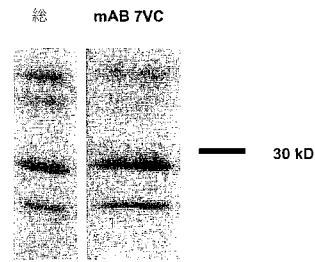
【 図 5 】

haPrP由来のペプチド	IR	配列
haPrP 23-98	++	
haPrP 90-114	-	
haPrP 171-231	-	
ha PrP 214-231	-	
haPrP 51-65	-	PQGGGTWGQPFGGGW
haPrP 65-79	+	WGQPFGGGWGQPFGG
haPrP 72-86	++	GWGQPFGGGWGQPF
haPrP 86-100	++	GGGWGQGGGTFNQWN

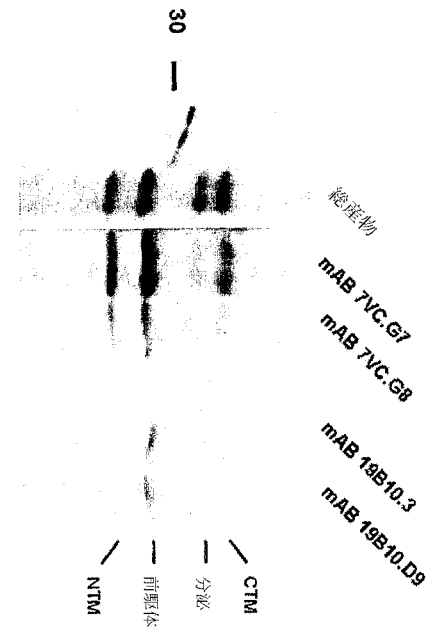
【 図 7 】



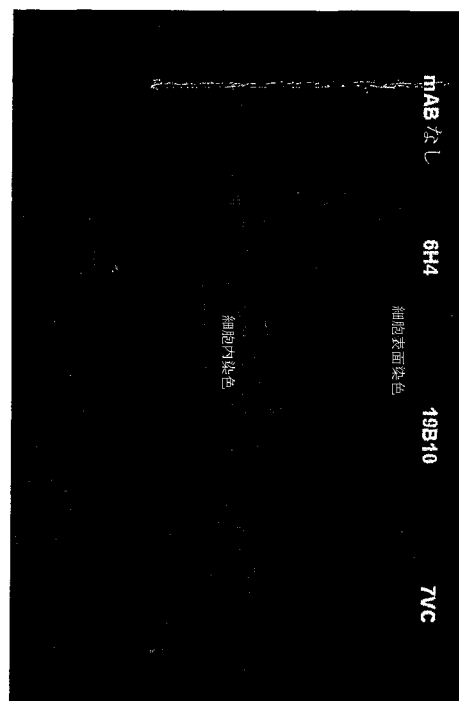
【 図 6 】



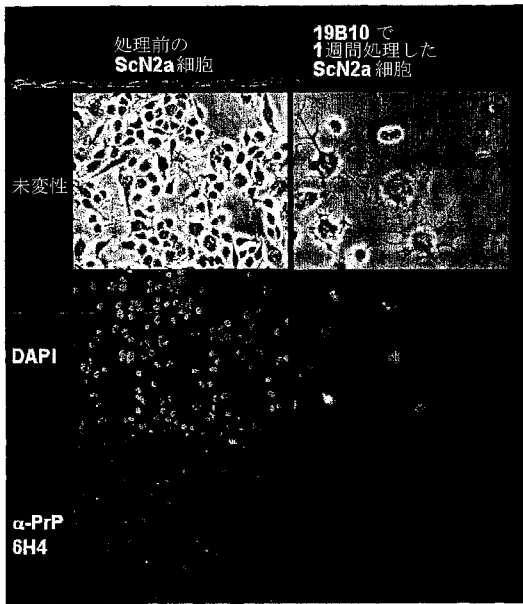
【 図 8 】



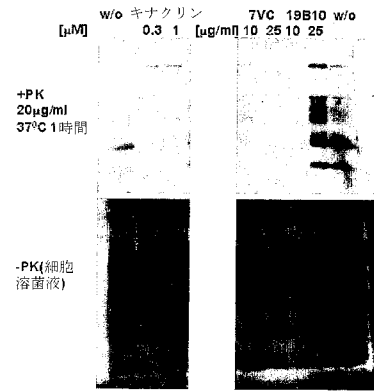
【 図 9 】



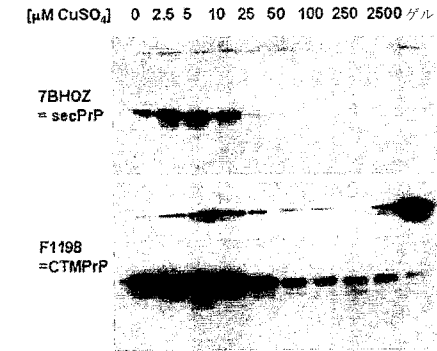
【 図 1 0 】



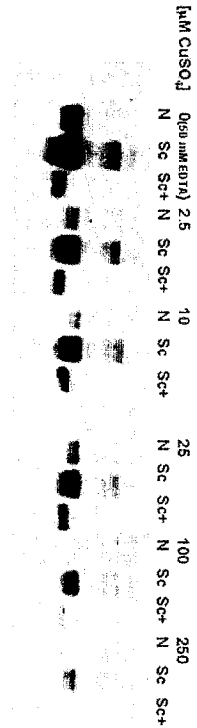
【 図 1 1 】



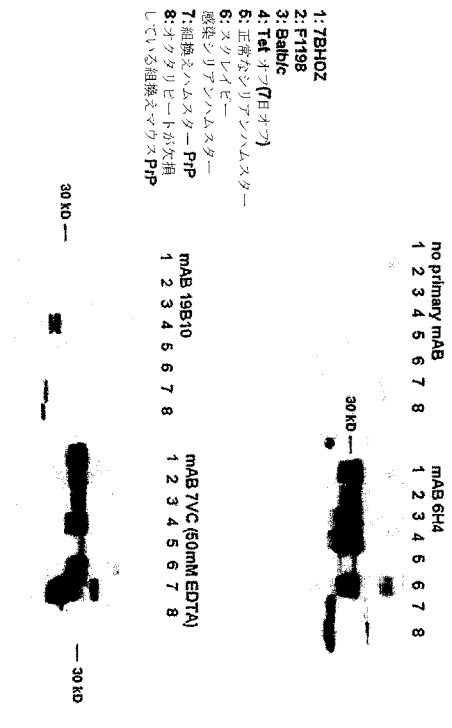
【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】



【 図 1 3 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/25994	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC(7) : G01N 33/53 US CL : 435/7.1			
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. : 435/7.1, 7.21; 530/350, 388.1			
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) Please See Continuation Sheet			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X --- Y	KORTH et al. Prion (PrP ^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. Nature. 06 November 1997, Vol. 390, No. 6655, pages 74-77, see 6H4 Ab, figure 1 and 2.	1, 2, 5 ----- 3, 4, 6-12	
X --- Y	US 2002/0137915 A1(LINGAPPA et al.) 26 September 2002 (26.09.2002), see claims 23-25.	1 ----- 2-22	
Y	HEGDE et al. Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. Nature. 16 December 1999, Vol. 402, No. 6763, pages 822-826, see materials and methods and page 824, column 2, 3rd paragraph.	1, 17-22	
Y --- A	LAFFLING et al. A monoclonal antibody that enables specific immunohistological detection of prion protein in bovine spongiform encephalopathy cases. Neuroscience Letters. March 2001, Vol. 300, No. 2, pages 99-102 entire document.	1, 2, 5 ----- 23-25	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.			
* Special categories of cited documents:			
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 16 May 2004 (16.05.2004)		Date of mailing of the international search report 10 JUN 2004	
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 Ulrike Winkler Telephone No.	

PCT/US03/25994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y --- A	HARDT et al. A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. Journal of Comparative Pathology. January 2000, Vol. 122, No. 1, pages 43-53, entire document.	1, 2, 5-12 ----- 3, 4, 23-25
Y --- A	BODEMER, W. The use of monoclonal antibodies in human prion disease. Naturwissenschaften. May 1999, Vol. 86, No. 5, pages 212-220, entire document.	1, 2, 5-12 ----- 3, 4, 23-25
Y --- A	HARMEYER et al. Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. Journal of General Virology. April 1998 Vol. 79, No. 4, pages 937-945, entire document.	1, 2, 5-12 ----- 3, 4, 23-25
A	KRASEMANN et al. Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP ⁰ /0 mice. Molecular Medicine. November 1996, Vol. 2, No. 6, pages 725-734, entire document.	6-12
Y	PERETZ et al. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. Nature. 16 August 2001, Vol. 412, No. 6848, pages 739-743, entire document.	13-16
Y	GRANER et al. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. FEBS Letters. October 2000, Vol. 482, No. 3, pages 257-260, entire document.	13-16
Y	SHYNG et al. Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrP ^C , in cultured cells. Journal of Biological Chemistry. 15 December 1995, Vol. 270, No. 50, pages 30221-30229, entire document.	15-16
Y	RUTKOWSKI et al. Substrate-specific regulation of the ribosome- translocon junction by N-terminal signal sequences. Proceeding of the National Academy of Science U S A. 03 July 2001, Vol. 98, No. 14, pages 7825-7828, entire document.	17-22
Y	HEGDE et al. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. Science. 06 February 1998, Vol. 279, No. 5352, pages 827-834, entire document.	17-22
Y --- A	HORNEMANN et al. Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. FEBS Letters. August 1997, Vol. 413, No. 2, pages 277-281, entire document.	17, 18, 22 ----- 19-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/25994

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.:
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.:
- 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/US03/25994

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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

Group I, claim(s) 1-5, drawn to a method to detect prion disease in animal using an antibody that recognizes the PrP^{CTM} conformer.

Group II, claim(s) 6-12, 23 (partial), drawn to an antibody that recognizes the PrP^{CTM} conformer.

Group III, claim(s) 6-12, 24, 25 (partial), drawn to an antibody that recognizes the PrP^{NTM} conformer.

Group IV, claim(s) 13-16, drawn to a method of promoting cell differentiation or inhibiting cellular expression of PrP by treating cells with a PrP^{NTM} antibody.

Group V, claim(s) 17-22, drawn to a method of for obtaining a conformer-specific antibody, by contacting a conformer enriched translation product with monoclonal antibodies.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general 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:

According to PCT rule 13.2, unity of invention exists only when the shared same or corresponding technical feature is a contribution over the prior art. The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept because they lack the same or corresponding special technical feature. The technical feature of Group I is an antibody that has the ability to bind to PrP^{CTM} conformer, the 6H4 antibody has the ability to bind the PrP^{CTM} conformer, which is shown by Korh et al. [Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody, Nature (1997) Vol. 390; Lingappa et al. US 2002/0137915 A1] to lack novelty or an inventive step because the prior art antibody 6H4 recognize the PrP^{CTM} conformer and does not make it a contribution over the prior art.

The technical feature of Group II is an antibody that specifically recognizes PrP^{CTM}.

The technical feature of Group III is an antibody that specifically recognizes the PrP^{NTM} conformer.

The technical feature of Group IV is a method of utilizing the PrP^{NTM} specific antibody.

The technical feature of Group V is a method of screening hybridoma cell lines using a PrP *in vitro* translation product.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/25994

WEST, DERWENT, STN-BIOSIS, EMBASE, MEDLINE
inventor search, prion, disease, conformer, PrPCTM, PrPNTM, antibody.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	Z N A B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(72) 発明者 リンガッパ ビシュワナス アール .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン フランシスコ パチェコ ストリート 6 2 6

(72) 発明者 コース カルステン

ドイツ国 デュッセルドルフ ポストファッハ 1 0 1 0 0 7 ジーイービー . 1 4 . 7 9 / 3

モーレンストラッセ 5 ハイน์リッヒ ハイน์ ユニバーシティ オブ デュッセルドルフ

インスティテュート フォー ニューロパソロジー

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CG24 DA01 DA13

4B065 AA91X AA92X AB05 BA08 CA25 CA46

4C085 AA03 AA14 BB11 DD22 DD23 EE01 FF24 GG01 GG08

4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	用于生物信息学分析的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2006502409A	公开(公告)日	2006-01-19
申请号	JP2004543246	申请日	2003-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会 杜塞尔多夫海因里希·海涅大学		
申请(专利权)人(译)	加州大学校董会 杜塞尔多夫海因里希·海涅大学		
[标]发明人	リンガツパビシユワナスアール コースカルステン		
发明人	リンガツパ ビシユワナス アール. コース カルステン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P43/00 C07K16/18 G01N33/531 G01N33/577 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/28		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P43/00 C07K16/2872 C07K2317/34		
FI分类号	G01N33/53.D A61K39/395.N A61P43/00.105 C07K16/18 G01N33/531.B G01N33/577.B C12N5/00. ZNA.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065 /AA92X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/EE01 4C085/FF24 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045 /CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/417886 2002-10-10 US		
其他公开文献	JP2006502409A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了制备差异结合目的蛋白质的单一构象异构体的单克隆抗体的方法。还公开了使用这些抗体的被动免疫以及使用构象异构体特异性抗体作为诊断试剂，以便在疾病结果，药物功效或药物敏感性方面对患者群体进行分层，以及用蛋白质构象异构体进行主动免疫。在筛选技术中，检测可以是例如组织免疫染色，蛋白质印迹或溶液IP。描述了一种特定的mab，称为7VC，其显示对CtmPrP的构象特异性，CtmPrP是在pH和铜浓度的特定测定条件下触发神经变性的朊病毒蛋白构象异构体。称为19B10的第二种特异性抗体显示NtmPrP的构象特异性，NtmPrP是一种朊病毒蛋白构象异构体，其下调总PrP表达并影响细胞分化。