

(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2012-519190

(P2012-519190A)

(43) 公表日 平成24年8月23日(2012.8.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18 ZNA	4B064
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C12P 21/08	4B065
<b>C07K 5/087 (2006.01)</b>	C07K 5/087	4C084
<b>C12N 5/10 (2006.01)</b>	C12N 5/00 1O2	4C085
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395 D	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-552289 (P2011-552289)  
 (86) (22) 出願日 平成22年3月2日 (2010.3.2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成23年10月17日 (2011.10.17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2010/000303  
 (87) 国際公開番号 W02010/099612  
 (87) 国際公開日 平成22年9月10日 (2010.9.10)  
 (31) 優先権主張番号 61/156,807  
 (32) 優先日 平成21年3月2日 (2009.3.2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 PCT/CA2009/001413  
 (32) 優先日 平成21年10月6日 (2009.10.6)  
 (33) 優先権主張国 カナダ (CA)

(71) 出願人 502087932  
 ザ ユニヴァーシティ オブ ブリティッシュ  
 シュ コロンビア  
 カナダ国 ブイ6ティー 1ゼット3 ブ  
 リティッシュ コロンビア, バンクーバー  
 , アグロノミー ロード 103-619  
 O  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 誤って折り畳まれたプリオンタンパク質に特異的な抗体およびエピトープ

(57) 【要約】

本発明は、誤って折り畳まれたプリオンタンパク質 (PrP、例えば、PrP<sup>Sc</sup>) に特異的な抗体および免疫原性ペプチドならびにその使用に関する。免疫原性ペプチドは、アミノ酸配列チロシン - メチオニン - ロイシン (YML) を含む。この抗体またはペプチドは、癌を始めたとした、誤って折り畳まれたPrPに関連する疾患または障害を処置または予防するために用いることができる。詳細には、ヒトPrPの残基126~132に対応する、配列GGYMLGS (すなわち、配列番号8) からなるペプチドを用いて、「1A1」と命名されたIgMモノクローナル抗体を作出した。1A1は、誤って折り畳まれたPrPを認識するが正常なPrPを認識しない。

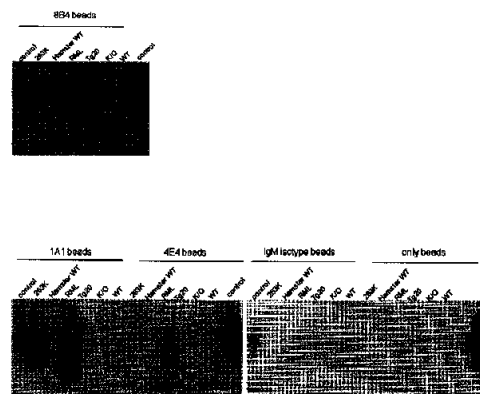


FIGURE 1

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】  
誤って折り畳まれた PrP の YML エピトープに結合する抗体またはその断片。
- 【請求項 2】  
PrP<sup>S<sup>c</sup></sup> に選択的に結合する、請求項 1 に記載の抗体。
- 【請求項 3】  
PrP<sup>C</sup> に特異的に結合しない、請求項 1 または 2 に記載の抗体。
- 【請求項 4】  
前記エピトープが、GGYMLGS、GGYMLG、GYMLGS、GGYML、YMLGS、GYML および YMLG (配列番号 8 ~ 14) からなる群のうちの 1 つまたはそれより多くから選択される配列に存在する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体。
- 【請求項 5】  
モノクローナル抗体である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体。
- 【請求項 6】  
ポリクローナル抗体である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体。
- 【請求項 7】  
IgG、IgM、IgE、IgD または IgA である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体。
- 【請求項 8】  
受託番号 260210-01 の下で International Depository Authority of Canada に寄託されているハイブリドーマを培養することによって産生される、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体。
- 【請求項 9】  
請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体、ならびにそれとコンジュゲートしている、検出可能な標識および細胞毒のうちの 1 つまたはそれより多くから選択される作用物質を含むイムノコンジュゲート。
- 【請求項 10】  
誤って折り畳まれた PrP に選択的に結合する抗体に対する免疫原性ペプチドであって、YML 配列を含む、免疫原性ペプチド。
- 【請求項 11】  
配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13 または配列番号 14 の配列からなる群のうちの 1 つまたはそれより多くから選択される、請求項 10 に記載のペプチド。
- 【請求項 12】  
前記ペプチドの免疫原性を増強するための免疫原性担体をさらに含む、請求項 10 に記載のペプチド。
- 【請求項 13】  
請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物。
- 【請求項 14】  
請求項 9 に記載のイムノコンジュゲートを含む組成物。
- 【請求項 15】  
請求項 10 から 12 のいずれか一項に記載のペプチドを含む組成物。
- 【請求項 16】  
医薬組成物である、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の組成物。
- 【請求項 17】  
医薬用担体をさらに含む、請求項 16 に記載の組成物。
- 【請求項 18】  
誤って折り畳まれた PrP に関連する疾患または障害の処置のための、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 9 に記載のイムノコンジュゲート、請求項 10 から

10

20

30

40

50

12のいずれか一項に記載のペプチド、または請求項13から17のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項19】

誤って折り畳まれたPrPに関連する疾患または障害の処置のための、請求項10から12のいずれか一項に記載のペプチドまたは請求項9に記載のイムノコンジュゲートを含むワクチンの使用。

【請求項20】

PrP<sup>Sc</sup>に関連する疾患または障害の処置のための、請求項18または請求項19に記載の使用。

【請求項21】

前記疾患または障害が、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病(GSS)、家族性クロイツフェルトヤコブ病、散発性クロイツフェルトヤコブ病、医原性クロイツフェルトヤコブ病、変異型クロイツフェルトヤコブ病、致死性家族性不眠症、スクレイピー、クールー、海綿状脳症、伝達性ミンク脳症、慢性消耗病、ネコ海綿状脳症および外来性有蹄類脳症から選択される、請求項18から20のいずれか一項に記載の使用。

【請求項22】

誤って折り畳まれたPrPを発現する腫瘍形成性細胞を含む腫瘍の処置のための、請求項18または請求項19に記載の使用。

【請求項23】

前記腫瘍がYML+表現型を有する、請求項22に記載の使用。

【請求項24】

誤って折り畳まれたPrPに関連する疾患または障害を処置または予防する方法であって、請求項1から8のいずれか一項に記載の抗体、請求項9に記載のイムノコンジュゲート、請求項10から12のいずれか一項に記載のペプチド、または請求項13から17のいずれか一項に記載の組成物の治療有効量を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法。

【請求項25】

誤って折り畳まれたPrPに関連する疾患または障害を有するかまたはその危険性がある被験体を免疫する方法であって、請求項10から12のいずれか一項に記載のペプチドを含むワクチンの治療有効量を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法。

【請求項26】

前記疾患または障害がPrP<sup>Sc</sup>に関連する、請求項24または25に記載の方法。

【請求項27】

前記疾患または障害が、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病(GSS)、家族性クロイツフェルトヤコブ病、散発性クロイツフェルトヤコブ病、医原性クロイツフェルトヤコブ病、変異型クロイツフェルトヤコブ病、致死性家族性不眠症、スクレイピー、クールー、海綿状脳症、伝達性ミンク脳症、慢性消耗病、ネコ海綿状脳症および外来性有蹄類脳症から選択される、請求項24から26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

誤って折り畳まれたPrPを発現する腫瘍形成性細胞を含む腫瘍の処置のための、請求項24または請求項25に記載の方法。

【請求項29】

前記腫瘍がYML+表現型を有する、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

誤って折り畳まれたPrPのYMLEピトープに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系。

【請求項31】

前記誤って折り畳まれたPrPがPrP<sup>Sc</sup>である、請求項30に記載のハイブリドーマ細胞系。

【請求項32】

10

20

30

40

50

受託番号 260210-01 の下で International Depository Authority of Canada に寄託されているハイブリドーマ、ならびにその後代および派生物である、請求項 30 に記載のハイブリドーマ細胞系。

【請求項 33】

前記 YML エピトープが配列 GGYMLGS (配列番号 8) に存在する、請求項 30 に記載のハイブリドーマ細胞系。

【請求項 34】

生体試料中の誤って折り畳まれた PrP を検出する方法であって、

(a) 生体試料を、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 9 に記載のイムノコンジュゲートと、該抗体または該イムノコンジュゲートと該誤って折り畳まれた PrP との複合体の形成を可能にする条件下で接触させること、および

(b) 該複合体を、誤って折り畳まれた PrP が該生体試料に存在することの指標として検出すること、を含む方法。

【請求項 35】

前記複合体がイムノプロットングによって検出される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記誤って折り畳まれた PrP が PrP<sup>Sc</sup> である、請求項 34 または 35 に記載の方法。

【請求項 37】

誤って折り畳まれた PrP の YML エピトープに結合する抗体を産生する方法であって

(a) 請求項 30 から 33 のいずれか一項に記載のハイブリドーマ細胞系を、培養上清に該抗体を放出する条件下で培養すること、および

(b) 該上清から該抗体を単離すること、を含む方法。

【請求項 38】

前記培養されるハイブリドーマが受託番号 260210-01 を有するハイブリドーマである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

誤って折り畳まれた PrP の YML エピトープに結合する抗体を産生する方法であって

(a) 請求項 10 から 12 のいずれか一項に記載のペプチドで被験体を免疫すること、および

(b) 該被験体の組織から、または該組織から調製されるハイブリドーマから、該抗体を単離すること、を含む方法。

【請求項 40】

生体試料中の誤って折り畳まれた PrP の存在を検出するためのキットであって、

(a) 誤って折り畳まれた PrP の YML エピトープに特異的に結合する 1 つまたはそれより多くの抗体または抗血清、および

(b) その使用のための説明書、を含むキット。

【請求項 41】

1 つまたはそれより多くの検出試薬をさらに含む、請求項 40 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、誤って折り畳まれたプリオンタンパク質に特異的な抗体およびエピトープに関する。より具体的には、本発明は、誤って折り畳まれたプリオンタンパク質の YML エピトープに特異的な抗体およびエピトープを提供する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

### 発明の背景

プリオン疾患（例えば、クロイツフェルトヤコブ病、牛海綿状脳症、ヒツジスクレイパーならびにシカおよびエルク（elk）の慢性消耗病）は、正常な細胞プリオンタンパク質（PrP<sup>C</sup>）から異常なプロテアーゼ耐性アイソフォーム（PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>）への鑄型誘導変換（template-directed conversion）を一般に特徴とする。一部のプリオン疾患は遺伝することがあり、PNRP遺伝子の突然変異を含むことがあるが、他は散発性または感染性である。遺伝性の形の様々な突然変異が同定されており、突然変異は、PrP<sup>C</sup>を、異常で疾患関連のPrP<sup>S<sup>C</sup></sup>の形への変化をより受けやすくすることがある。

#### 【0003】

PNRP遺伝子の翻訳産物は、一般にヒトでは253アミノ酸、ハムスターおよびマウスでは254、またはヒツジでは256アミノ酸からなり、いくつかの翻訳後修飾を経ることがある（例えば、非特許文献1）。例えば、ハムスターでは、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーの添加により、22アミノ酸のシグナルペプチドがN末端で切断され、23アミノ酸がC末端から除去され、アスパラギン連結オリゴ糖が、ジスルフィド結合によって形成されるループの残基181および197に結合する（例えば、非特許文献2；非特許文献3）。プリオン関連の脳症では、PrP<sup>C</sup>（正常な細胞性アイソフォーム）は、例えば以下の特性の1つまたはそれより多くに基づいてPrP<sup>C</sup>から実験的に区別することができる、PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>と命名される変化した形に変換される：（1）PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>は生理的溶媒に不溶であり、凝集体を形成する；（2）PrP<sup>C</sup>が完全に分解され、PrP<sup>27-30</sup>として公知のN末端が切断された形になる条件下で、プロテイナーゼK消化によってN末端の約67アミノ酸だけが除去される点で、PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>は、プロテイナーゼKによるタンパク分解性分解に部分的に耐性である；（3）PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>は、PrP<sup>C</sup>のらせんから、シート二次構造に富む変化した形への、タンパク質立体構造の変化を有する（例えば、非特許文献4）。

#### 【0004】

構造がPrP<sup>C</sup>からPrP<sup>S<sup>C</sup></sup>アイソフォームへの変換に役割を果たすことは周知であるが、可溶化に関する困難およびPrP<sup>S<sup>C</sup></sup>凝集体の不規則構造に一部起因して、PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>アイソフォームの構造の詳細を得るのには時間がかかっている。ヒトPrP<sup>C</sup>では、構造エレメントには、鎖1（残基128～131）、らせん1（残基144～154）、鎖2（残基161～164）、らせん2（残基173～194）およびらせん3（残基200～228）が含まれる（非特許文献5；非特許文献6）。非特許文献7は、いくつかの構造エレメントの相互作用および再配列を通したプリオンタンパク質のオリゴマー化の可能な機構を記載することによって、この知識体系を拡張した。

#### 【0005】

PrP<sup>C</sup>アイソフォームとPrP<sup>S<sup>C</sup></sup>アイソフォームとは同じアミノ酸配列を共有するので、健康な個体で免疫応答を刺激すること、または両方のアイソフォームと相互作用する治療薬を提供することは、よくても無効果であり、場合によっては被験体に有害となり得る。プリオンタンパク質の正常な細胞性アイソフォーム（PrP<sup>C</sup>）は、免疫原性が不十分であると報告されている。さらに、PrP<sup>C</sup>に対して優先的に反応性である抗体は*in vitro*および*in vivo*でプリオン伝播を妨害することができるが、この事実上遍在する細胞表面タンパク質の免疫認識が有害になるかもしれないことが報告されている。

#### 【0006】

疾患におけるプリオンタンパク質の変換は、特定の分子表面エピトープの喪失、および他のものの獲得に関連する。非特許文献8は、トリペプチドモチーフYYRを記載している。特許文献1は、哺乳動物プリオンタンパク質のYYRエピトープに対する抗体を記載し、YYXエピトープについて述べている。特許文献2は、ウシPrPの断片に対する抗体を記載している。特許文献3は、ファージディスプレイ方法によって産生される、天然のPrP<sup>S<sup>C</sup></sup>タンパク質に特異的な抗体を記載している。

10

20

30

40

50

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0007】

【特許文献1】米国特許第7041807号明細書

【特許文献2】米国特許第6765088号明細書

【特許文献3】米国特許第5846533号明細書

## 【非特許文献】

## 【0008】

【非特許文献1】P u c k e t , C . 5、Am . J . Hum . 49巻：320～329頁（1991年）

10

【非特許文献2】S t a h l , N . 5、B i o c h e m i s t r y 29巻：5405～5412頁（1990年）

【非特許文献3】S a f a r , J . 5、P r o c . Natl . Acad . Sci . U S A 87巻：6377頁（1990年）

【非特許文献4】C o h e n 5、S c i e n c e 264巻：530～531頁（1994年）

【非特許文献5】R i e k 5、1996年、N a t u r e 382巻：180頁

【非特許文献6】Z a h n、2000年、P r o c . Natl Acad . Sci 97巻：145～150頁

【非特許文献7】K n a u s 5、2001年、N a t u r e S t r u c t u r a l B i o l o g y 8巻：770～774頁

20

【非特許文献8】P a r a m i t h i o t i s 5、N a t M e d 2003年、9巻：893～899頁

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

## 発明の概要

本発明は、一部、誤って折り畳まれたプリオンタンパク質に特異的な抗体およびエピトープ、例えば、誤って折り畳まれたプリオンタンパク質のYMLエピトープに特異的な抗体およびエピトープを提供する。

30

## 【0010】

一態様では、本発明は、誤って折り畳まれたPrPのYMLエピトープに結合する抗体またはその断片を提供する。

## 【0011】

代替実施形態では、抗体はPrP<sup>S</sup>に選択的に結合する。

## 【0012】

代替実施形態では、抗体はPrP<sup>C</sup>に特異的に結合しない。

## 【0013】

代替実施形態では、エピトープは、GGYMLGS、GGYMLG、GYMLGS、GGYML、YMLGS、GYMLおよびYMLG（配列番号8～14）からなる群のうち

40

## 【0014】

の1つまたはそれより多くから選択される配列に存在する。

## 【0015】

代替実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

## 【0016】

代替実施形態では、抗体はIgG、IgM、IgE、IgDまたはIgAである。

## 【0017】

代替実施形態では、抗体は、受託番号260210-01の下でInternational Depositary Authority of Canadaに寄託されて

50

いるハイブリドーマを培養することによって産生することができる。

【0018】

別の態様では、本発明は、誤って折り畳まれたPrPのYMLエピトープに結合する抗体またはその断片、ならびにそれとコンジュゲートしている、検出可能な標識および細胞毒のうちの1つまたはそれより多くから選択される作用物質(agent)を含むイムノコンジュゲートを提供する。

【0019】

別の態様では、本発明は、誤って折り畳まれたPrPに選択的に結合する抗体に対する、免疫原性ペプチドであって、YML配列を含む免疫原性ペプチドを提供する。

【0020】

代替実施形態では、ペプチドは、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13または配列番号14の配列からなる群のうちの1つまたはそれより多くから選択される誤って折り畳まれたPrPに選択的に結合する抗体を生成するのに役立つことができる。

【0021】

代替実施形態では、ペプチドは完全長PrPタンパク質でない。

【0022】

代替実施形態では、ペプチドは、前記ペプチドの免疫原性を増強するための免疫原性担体をさらに含むことができる。

【0023】

別の態様では、本発明は、誤って折り畳まれたPrPのYMLエピトープに結合する抗体またはその断片を含む組成物を提供する。

【0024】

別の態様では、本発明は、誤って折り畳まれたPrPのYMLエピトープに結合する抗体またはその断片、ならびにそれとコンジュゲートしている、検出可能な標識および細胞毒のうちの1つまたはそれより多くから選択される作用物質を含むイムノコンジュゲートを含む組成物を提供する。

【0025】

別の態様では、本発明は、誤って折り畳まれたPrPに選択的に結合する抗体に対するペプチドであってYML配列を含むペプチドを含む組成物を提供する。代替実施形態では、このペプチドは、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13または配列番号14の配列からなる群のうちの1つまたはそれより多くから選択することができる。

【0026】

代替実施形態では、このペプチドは、前記ペプチドの免疫原性を増強するための免疫原性担体をさらに含むことができる。

【0027】

代替実施形態では、組成物は医薬組成物であってよい。

【0028】

代替実施形態では、組成物は医薬用担体をさらに含むことができる。

【0029】

別の態様では、本発明は、誤って折り畳まれたPrPに関連する疾患または障害の処置のための、抗体もしくはその断片、イムノコンジュゲート、ペプチドまたは組成物の使用を提供する。

【0030】

別の態様では、本発明は、誤って折り畳まれたPrPに関連する疾患または障害の処置のための、ペプチドまたはイムノコンジュゲートを含むワクチンの使用を提供する。

【0031】

別の態様では、本発明は、PrP<sup>Sc</sup>に関連する疾患または障害の処置のための、抗体もしくはその断片、イムノコンジュゲート、ペプチドまたは組成物の使用を提供する。

10

20

30

40

50

## 【0032】

別の態様では、本発明は、PrP<sup>Sc</sup>に関連する疾患または障害の処置のための、ペプチドまたはイムノコンジュゲートを含むワクチンの使用を提供する。

## 【0033】

代替実施形態では、疾患または障害は、ゲルストマン - ストロイスラー - シャインカー病 (GSS)、家族性クロイツフェルトヤコブ病、散発性クロイツフェルトヤコブ病、医原性クロイツフェルトヤコブ病、変異型クロイツフェルトヤコブ病、致死性家族性不眠症、スクレイピー、クールー、海綿状脳症、伝達性ミンク脳症、慢性消耗病、ネコ海綿状脳症および外来性有蹄類脳症から選択することができる。

## 【0034】

別の態様では、本発明は、誤って折り置まれたPrPを発現する腫瘍形成性細胞を含む腫瘍の処置のための、抗体もしくはその断片、イムノコンジュゲート、ペプチドまたは組成物の使用を提供する。

## 【0035】

別の態様では、本発明は、誤って折り置まれたPrPを発現する腫瘍形成性細胞を含む腫瘍の処置のための、ペプチドまたはイムノコンジュゲートを含むワクチンの使用を提供する。

## 【0036】

代替実施形態では、腫瘍はYML+表現型を有することがある。

## 【0037】

別の態様では、本発明は、誤って折り置まれたPrPに関連する疾患または障害を処置または予防する方法であって、抗体もしくはその断片、イムノコンジュゲート、ペプチドまたは組成物の治療有効量を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法を提供する。

## 【0038】

別の態様では、本発明は、誤って折り置まれたPrPに関連する疾患または障害を有するかまたはその危険性がある被験体を免疫する方法であって、ペプチドを含むワクチンの治療有効量を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法を提供する。

## 【0039】

代替実施形態では、疾患または障害は、PrP<sup>Sc</sup>に関連する。

## 【0040】

代替実施形態では、疾患または障害は、ゲルストマン - ストロイスラー - シャインカー病 (GSS)、家族性クロイツフェルトヤコブ病、散発性クロイツフェルトヤコブ病、医原性クロイツフェルトヤコブ病、変異型クロイツフェルトヤコブ病、致死性家族性不眠症、スクレイピー、クールー、海綿状脳症、伝染ミンク脳症、慢性消耗病、ネコ海綿状脳症および外来性有蹄類脳症から選択される。

## 【0041】

別の態様では、本発明は、誤って折り置まれたPrPを発現する腫瘍形成性細胞を含む腫瘍の治療のための方法であって、抗体もしくはその断片、イムノコンジュゲート、ペプチドまたは組成物の治療有効量を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法を提供する。

## 【0042】

代替実施形態では、腫瘍はYML+表現型を有することがある。

## 【0043】

別の態様では、本発明は、誤って折り置まれたPrPのYMLエピトープに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系を提供する。

## 【0044】

代替実施形態では、誤って折り置まれたPrPはPrP<sup>Sc</sup>である。

## 【0045】

代替実施形態では、ハイブリドーマ細胞系は、受託番号260210-01の下でIn

10

20

30

40

50

ternational Depository Authority of Canada に寄託されているハイブリドーマ、ならびにその後代および派生物である。

【0046】

代替実施形態では、YMLエピトープは、配列GGYMLGS、GGYMLG、GYMLGS、GGYML、YMLGS、GYMLおよびYMLG（配列番号8～14）に存在する。

【0047】

別の態様では、本発明は、生体試料中の誤って折り畳まれたPrPを検出する方法であって、(a)生体試料を、抗体もしくはその断片、またはイムノコンジュゲートと、前記抗体または前記イムノコンジュゲートと前記誤って折り畳まれたPrPとの複合体の形成を可能にする条件下で接触させること、および(b)前記複合体を、誤って折り畳まれたPrPが前記生体試料に存在する指標として検出すること、を含む方法を提供する。

10

【0048】

代替実施形態では、複合体はイムノプロットティングによって検出される。

【0049】

代替実施形態では、誤って折り畳まれたPrPはPrP<sup>Sc</sup>である。

【0050】

別の態様では、本発明は、誤って折り畳まれたPrPのYMLエピトープに結合する抗体を産生する方法であって、(a)誤って折り畳まれたPrPのYMLエピトープに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系を、培養上清に前記抗体を放出する条件下で培養すること、および(b)前記上清から前記抗体を単離すること、を含む方法を提供する。

20

【0051】

代替実施形態では、培養されるハイブリドーマは、受託番号260210-01を有するハイブリドーマである。

【0052】

別の態様では、本発明は、誤って折り畳まれたPrPのYMLエピトープに結合する抗体を産生する方法であって、(a)ペプチドで被験体を免疫すること、および(b)前記被験体の組織から、または前記組織から調製されるハイブリドーマから前記抗体を単離すること、を含む方法を提供する。

30

【0053】

別の態様では、本発明は、生体試料中の誤って折り畳まれたPrPの存在を検出するためのキットであって、(a)誤って折り畳まれたPrPのYMLエピトープに特異的に結合する1つまたはそれより多くの抗体または抗血清、および(b)その使用のための説明書、を含むキットを提供する。

【0054】

代替実施形態では、キットは1つまたはそれより多くの検出試薬をさらに含むことができる。

【0055】

本発明のこの概要は、必ずしも本発明のすべての特徴を記載するわけではない。本発明の他の態様、特徴および利点は、本発明の具体的な実施形態の以下の記載の精査により、当業者に明らかになる。

40

【0056】

本発明のこれらの特徴および他の特徴は、添付の図を参照する以下の記載からより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】図1は、磁気ビーズ結合PrP特異的モノクローナル抗体および対照（プリオンタンパク質の両方のアイソフォームを認識する抗体およびプリオンタンパク質のいずれのアイソフォームも認識しない他の抗体を含む）を用いるマウスおよびハムスターの脳ホモ

50

ジネートの免疫沈降、続く、PrP<sup>C</sup>およびPrP<sup>Sc</sup>の両方を認識するモノクローナル抗体（ビオチンに結合している6D11）を用いる検出を示す。ハムスターWT：正常なハムスター脳のホモジネート、RML：RMLマウス順応プリオンに感染させたマウスからの脳ホモジネート、Tg20：PrP<sup>C</sup>を過剰発現するマウス株からの脳ホモジネート、K/O：PrP<sup>C</sup>-/-マウス株からの脳ホモジネート、WT：野生型（未感染、正常）マウスからの脳ホモジネート、263K：263Kハムスター順応プリオンに感染させたハムスターからの脳ホモジネート、対照：PrP<sup>Sc</sup>タンパク質。8B4ビーズ：8B4抗体結合ビーズ（PrP<sup>C</sup>およびPrP<sup>Sc</sup>の両方を認識する）で免疫沈降させた脳ホモジネート、1A1ビーズ：1A1抗体結合ビーズ（PrP<sup>Sc</sup>タンパク質を認識する）で免疫沈降させた脳ホモジネート、4E4ビーズ：4E4抗体結合ビーズ（無関係なタンパク質を認識する）で免疫沈降させた脳ホモジネート、IgMアイソタイプビーズ：IgMアイソタイプ陰性対照抗体で免疫沈降させた脳ホモジネート、ビーズだけ：ビーズだけ（無抗体）で免疫沈降させた脳ホモジネート。

10

【図2】図2は、A)ヒト、B)ヒツジ、C)マウス、D)ハムスター、E)ウシおよびF)エルクプリオンタンパク質のアミノ酸配列（配列番号1～6）を示す。

【図3】図3は、図2のヒト、ヒツジ、マウス、ハムスターおよびウシの配列のCluster Wアラインメントを示す。

【図4A】図4Aは、アイソタイプ対照抗体（濃い陰影）、またはPrP抗体6D11もしくはYML特異的抗体1A1（黒線、示す通り）で探索した正常細胞および腫瘍細胞の結果のフローサイトメトリーヒストグラムを提供する。

20

【図4B】図4Bは、アイソタイプ対照抗体（濃い陰影）、またはPrP抗体6D11もしくはYML特異的抗体1A1（黒線、示す通り）で探索した正常細胞および腫瘍細胞の結果のフローサイトメトリーヒストグラムを提供する。

【図5】図5は、B16-F10腫瘍を抱えるマウスに及ぼす、1A1抗体による処置の効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0058】

詳細な説明

以下の記載では、いくつかの用語が広く用いられ、以下の定義は、本発明の様々な態様の理解を容易にするために提供される。用語の例を含む、本明細書での例の使用は、例示目的だけのためであり、本明細書の本発明の実施形態の範囲および意味を限定するものではない。数値範囲は、その範囲を定義する数を含む。本明細書では、単語「含んでいる」は限定なしの用語として用いられ、句「含むが、これに限定されない」に実質的に同等であり、単語「含む」は対応する意味を有する。

30

【0059】

「プリオン」は、単一のタンパク質、「プリオンタンパク質」または「PrP」で大部分かつおそらく単独で構成される作用物質を指す。誤って折り畳まれたプリオンタンパク質（誤って折り畳まれたPrP）は、様々な疾患と関連付けられている。正常な細胞性プリオンタンパク質は一般にPrP<sup>C</sup>と呼ばれ、誤って折り畳まれたプロテアーゼ耐性アイソフォームはPrP<sup>Sc</sup>と呼ばれる。PrPは、哺乳動物および鳥類の種を含むいくつかの種で同定されている。例示的な哺乳動物のPrPは、配列番号1～6に記載されている。

40

【0060】

用語「エピトープ」は、タンパク質中のアミノ酸の配列、またはそれへの修飾（例えばグリコシル化）を指す。アミノ酸は、タンパク質の一次配列などのように線状に配列することができ、またはタンパク質が部分的もしくは完全に構成されると、近接したアミノ酸の二次または三次配列であってもよい。エピトープは、抗体、抗体断片、ペプチド、ペプチド模倣物などが特異的に結合することができるか、またはリガンドが特異的に結合することができる。エピトープは様々なサイズを有することができ、例えば、線状エピトープは2アミノ酸のように小さくてもよく、または約3アミノ酸から約20アミノ酸まで、よ

50

り大きくてもよい。一部の実施形態では、エピトープは、長さが約5アミノ酸から約10または約15アミノ酸までであってよい。アミノ酸の二次または三次配列のエピトープは、わずか2つのアミノ酸を含むことができるか、または約3アミノ酸から約20アミノ酸まで、より大きくてもよい。一部の実施形態では、二次または三次エピトープは、エピトープの中の一部または他に近接する約5アミノ酸から約10または約15アミノ酸までであってよい。

#### 【0061】

「アイソフォーム」は、同じタンパク質のいくつかの異なる形のいずれかである。変異形態は1つまたはそれより多くの一塩基多型（例えば、単一のアミノ酸変化を生じる）から生じることができるか、または、スプライシング変異体の結果、例えば翻訳されたタンパク質にアミノ酸配列を含むかもしくは排除することであってよい。変異体は、あるアイソフォームの3次元構造の中に「埋め込まれている」1つまたはそれより多くのエピトープが、タンパク質の別のアイソフォームで露出するように、タンパク質の折畳みの違いの結果として生じることもある。これらの折畳み変異体は、配列の差、翻訳後修飾または、特定のアイソフォームの存在などの、他の影響によることがある。プリオンタンパク質は、2つの構造的アイソフォーム、PrP<sup>C</sup>（「正常な」、「影響を受けていない」、「天然の」または「野生型の」アイソフォーム）およびPrP<sup>S<sup>C</sup></sup>アイソフォーム（「疾患状態」、「影響を受けている」、「誤って折り畳まれた」または「異常な」アイソフォーム）で提示される同じアミノ酸配列を有するタンパク質の例である。

10

#### 【0062】

プリオンタンパク質の誤った折畳み特異的エピトープの露出は、プリオンタンパク質のPrP<sup>C</sup>と、誤って折り畳まれたアイソフォーム、例えばPrP<sup>S<sup>C</sup></sup>アイソフォームとの識別を可能にする、1つまたはそれより多くのプリオン特異的エピトープを提供する。これらのエピトープは、診断標的として、例えば、プリオン関連の疾患または障害を有する、またはそれが疑われる被験体からの生体試料で実施される、ELISAまたはフローサイトメトリーに基づく診断方法で用いるために用いることができる。これらのエピトープは、治療標的または予防標的として用いることもできる。例えば、プリオン関連疾患または障害で見出されるプリオンの誤った折畳みの伝播を予防するために、1つまたはそれより多くのエピトープを、それが投与される被験体で免疫を誘導するための医薬組成物で用いることができる。別の例として、1つまたはそれより多くのエピトープに、抗体などの免疫分子が特異的に結合することができ、そこで免疫分子は、誤って折り畳まれたプリオンタンパク質を含む細胞または組織に治療薬を運ぶように修飾されている。

20

30

#### 【0063】

Pruisner 1993年(Dev. Biol. Stand. 80巻:31~44頁)は、動物およびヒトのいくつかのプリオンによる疾患および障害(あるいは、伝達性海綿状脳症と呼ばれる;TSE)のレビューを提供している。プリオンタンパク質の誤った折畳みに関連する(「プリオン関連の」、または「プリオンの誤った折畳みに関連する」)ヒトまたは動物で見出される疾患または障害には、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病(GSS)、家族性クロイツフェルトヤコブ病、散発性クロイツフェルトヤコブ病、医原性クロイツフェルトヤコブ病、変異型クロイツフェルトヤコブ病、致死性家族性不眠症、スクレイピー(例えば、ヒツジまたはヤギのスクレイピー)、クールー、牛海綿状脳症(狂牛病)、伝達性ミンク脳症、慢性消耗病(例えばシカ、エルクおよびムースの慢性消耗病)、ネコ海綿状脳症、外来性有蹄類脳症(例えばニアラ、オオカモシカ、大クーズーの)、ダチョウの海綿状脳症が含まれるが、これらに限定されない。プリオンタンパク質の誤った折畳みに関連する疾患または障害には、癌、特にYMLエピトープなどの誤って折り畳まれたPrPに特異に関連する表面エピトープを最終的に提示することができる、PrP+表現型を有する細胞型に関連する癌がさらに含まれる。

40

#### 【0064】

2つの鎖が、PrPの球状ドメインに存在する。1鎖(ヒト配列番号付けを用いて残基128~131)は、YML(配列番号7)配列を含む。天然のPrP<sup>C</sup>アイソフォ

50

ーム（天然構造のPrP<sup>C</sup>）では、鎖1は、PrP<sup>C</sup>アイソフォームの3次元構造内に埋め込まれ、免疫細胞、抗体または他の分子との相互作用のために溶媒アクセス可能でない。任意の特定の仮説に束縛されることなく、誤って折り畳まれた形態をもたらす立体構造シフトの誘導により（例えば、低pH処理、PrP<sup>S</sup>アイソフォームへの曝露、またはPrP<sup>C</sup>をPrP<sup>S</sup>再配列に誘導する他の公知の方法による）、鎖1を溶媒に曝露させることができ、免疫細胞、抗体または他の分子との相互作用に利用することが可能になる。

#### 【0065】

YML配列および哺乳動物のPrPアミノ酸配列の鎖1を含むアミノ酸の一部または全部を含むアミノ酸配列、ならびに一部の実施形態では、鎖1に隣接するさらなるアミノ酸をさらに含むアミノ酸配列の例として、それらに限定されないが、GGYMLGS（配列番号8）、GGYMLG（配列番号9）、GYMLGS（配列番号10）、GGYML（配列番号11）、YMLGS（配列番号12）、GYML（配列番号13）、YMLG（配列番号14）およびYML（配列番号7）が挙げられる。

10

#### 【0066】

したがって、本発明は、配列番号7～14のアミノ酸配列の1つまたはそれより多くを含むペプチドを提供する。より一般的には、本明細書で有用なペプチドは、YMLに選択的に結合する抗体を生成するのに有用なエピトープとしてYML配列を含み、提示するものである。そのようなペプチドには、完全長PrPタンパク質であるが、YMLEピトープが抗体産生宿主に提示されるように必然的に誤って折り畳まれている形のPrPタンパク質が含まれてもよい。実際には、YMLを含有するペプチドは、通常約50アミノ酸残基以下、例えば、約40残基、30残基、20残基または15残基以下からなり、最大残基数の選択は、その産生に関連する費用を最小にしつつ、免疫原性の形でYMLEピトープを提示しようとする要望に基づいて決定される。ペプチドは、YML配列に加えて、抗体を生成することができる免疫原性エピトープとしてYMLを提示するのに十分な、最小数の残基を含む。例えば、YMLを含有するペプチドは、一般的に少なくとも約5残基、6残基または7残基を必要とする。本明細書で指摘されるように、ペプチドは、抗体産生宿主でのその免疫原性を増強するために有用な任意の作用物質に結合してもよい。

20

#### 【0067】

配列番号7～14の1つまたはそれより多くを含むペプチドなどの、YMLEピトープを含む免疫原性ペプチドは、被験体で免疫応答を誘導するのに用いることができ、その免疫応答は、PrP<sup>S</sup>アイソフォームなどの誤って折り畳まれたPrPに特異的である。例えば、そのようなペプチドは、PrP<sup>S</sup>アイソフォームなどの誤って折り畳まれたPrPに特異的なポリクローナル（抗血清）抗体またはモノクローナル抗体の産生のために、マウスまたは別の動物を免疫するために用いることができる。そのような抗体は、例えば免疫学的アッセイで、生体試料中のPrP<sup>S</sup>などの誤って折り畳まれたPrPを検出するために用いることができる。そのようなペプチドは、医薬用製剤で提供されてもよい。

30

#### 【0068】

当業者に公知であるペプチド合成技術および方法の一般原理を示す標準の参考図書には、例えば以下のものが含まれる：Chanら、Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis、Oxford University Press、Oxford、United Kingdom、2005年；Peptide and Protein Drug Analysis、Reid、R.編、Marcel Dekker、Inc.、2000年；Epitope Mapping、Westwoodら編、Oxford University Press、Oxford、United Kingdom、2000年；Sambrookら、Molecular Cloning：A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、NY 2001年およびAusubelら、Current Protocols in Molecu

40

50

lar Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994年。

【0069】

タンパク質またはポリペプチド、あるいはタンパク質またはポリペプチドの断片もしくは一部は、その配列を同じ系統学的種、属、科または目で見出される他のものから識別することができる場合に、特異的に同定される。そのような識別は、配列の比較によって同定することができる。1つまたはそれより多くの配列の比較は、BLASTアルゴリズム (Altschulら1990年。J. Mol Biol 215巻: 403~410頁) を用いて実行することができる。BLAST検索は、特定の配列または配列群との、または配列のより大きなライブラリーもしくはデータベース (例えばGenBankまたはGenPept) とのクエリー配列の比較を可能にし、100%同一性を示す配列だけでなく、より低い程度の同一性を有するものも同定する。複数のアイソフォームを有するタンパク質については、1つのアイソフォームに存在して、1つまたはそれより多くの他のアイソフォームに不在であるかもしくは検出されない構造、配列またはモチーフの特異的検出によって、それが同じであるかまたは異なる種からの他のアイソフォームと識別される場合、アイソフォームを特異的に同定することができる。

10

【0070】

配列中のアミノ酸の任意の数的呼称が特異的配列と関連することは、当業者によって理解される。また、配列が番号付けられ、配列が選択される方法によって、異なる数的呼称を同じ位置に割り当てることができる。さらに、挿入または欠失などの配列変化は、二次または三次構造の部位またはエレメントでの、およびその周辺での特定のアミノ酸の相対位置、および引き続き数的呼称を変えることができる。例えば、配列番号1~6によって表される配列は、すべてヒト、マウス、ヒツジ、ウシ、ハムスターまたはエルクからの哺乳動物プリオンタンパク質のアミノ酸配列を表す。しかし、図3に例示されているように、それらの間に多少の配列差、番号付けの差が、またはそれらの間に配列および番号付けの差が存在することがある。プリオンタンパク質のエピトープ、配列および構造エレメントの相対位置が様々な種で同じであることも、当業者に明らかになる。野生型もしくは正常の、または一部のプリオンの誤った折畳みに関連する疾患もしくは障害に関連する突然変異を有するか有しないプリオンタンパク質配列を表す他の配列は、核酸試料またはタンパク質試料を (例えば、本明細書で引用されるものなどの標準の方法を用いて) 配列決定

20

30

【0071】

本発明のペプチド化合物を記載するために用いられる命名法は、アミノ基が各アミノ酸残基の左に示され、カルボキシ基が右に示される従来 of 慣行に従う。本発明の選択される具体的な実施形態を表す配列では、具体的に示されないが、アミノ末端基およびカルボキシ末端基は、特に明記しない限り、それらが生理的pH値においてとるであろう形であると理解される。各アミノ酸残基は、以下の表1に従って、アミノ酸の慣用名に対応する、1文字または3文字命名によって一般に表すことができる。

40

【0072】

## 【表1】

表1 ペプチド中で通常見出される20種の標準Lアミノ酸の命名法および略語:

完全な名称	3文字略語	1文字略語
アラニン	Ala	A
システイン	Cys	C
アスパラギン酸	Asp	D
グルタミン酸	Glu	E
フェニルアラニン	Phe	F
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
リジン	Lys	K
ロイシン	Leu	L
メチオニン	Met	M
アスパラギン	Asp	N
プロリン	Pro	P
グルタミン	Gln	Q
アルギニン	Arg	R
セリン	Ser	S
スレオニン	Thr	T
バリン	Val	V
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y

10

20

当業者に公知である免疫学の一般原理を示している標準の参考図書には、例えば以下のものが含まれる: HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y. (1999年); HARLOWおよびLANE、Using Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York; COLIGANら編、Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons、New York、NY (1992~2006年)およびRoittら、Immunology、第3版、Mosby - Year Book Europe Limited、London (1993年)。

30

40

## 【0073】

当業者に公知である組換えDNA技術の一般原理を示す標準の参考図書には、例えば以下のものが含まれる: Ausubelら、Current Protocols In Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York (1998年および2001年への補遺); Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Plainville、New York (1989年); Kaufmanら編、Handbook Of Molecular And Cellular Methods In Biology And Medicine、CRC Press、Boca Raton (1995年); McPherson編、Directed Mutagenesis: A Practical Approach、IRL Press、Oxford (1991年)。

## 【0074】

本明細書で用いるように、「抗体」には、任意の天然供給源に由来するポリクローナル

50

抗体、ならびにクラス I g G、I g M、I g A、I g D および I g E の天然または組換えモノクローナル抗体、ハイブリッド派生物、ヒト化またはキメラ抗体、ならびに F a b、F a b' および F ( a b' )<sub>2</sub>、および F a b または他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含む抗体断片が含まれる。抗体は天然に存在するもの、例えば、動物（例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ハムスター、ヒトなど）から単離および/または精製されたものでよい。抗体は、単量体または重合体の形であってよい。抗体またはその抗原結合性部分は、検出可能な標識、例えばビオチン、放射性同位体、フルオロフォア（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、フィコエリトリン（P E））、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、または元素粒子（例えば、金粒子）を含むように修飾されてもよい。

10

## 【0075】

誤った折畳みによって露出させた Y M L エピトープを介して、誤って折り畳まれた P r P に「選択的に」結合する抗体および断片は、それらが天然構造の P r P に結合する親和性よりも少なくとも 1 桁大きな（例えば、少なくとも 2、3、4 または 5 桁大きな）親和性で、誤って折り畳まれた P r P に結合する。例えば、P r P<sup>S<sub>C</sub></sup> に対する Y M L 抗体の結合親和性は、P r P<sup>C</sup> タンパク質に対するその結合親和性よりも好ましくは少なくとも 1 桁大きい。相対的な結合親和性を決定することができ、Y M L 抗体は、一般にこの目的のために当技術分野で十分に確立されているアッセイおよび技術に基づいて、そのように選択される。

## 【0076】

モノクローナル抗体を作製するために、ハイブリドーマ法を用いることができる（K O H L E R ら（1975年）N a t u r e 256 巻：495 頁）。あるいは、モノクローナル抗体は、組換え DNA 法（例えば、米国特許第 4,816,567 号）によって作製することができる。モノクローナル抗体は、例えば、C L A C K S O N ら、（1991年）N a t u r e 352 巻：624~628 頁および M A R L T S ら、1991年 J . M o l . B i o l . 222 巻：581~597 頁に記載される技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。キメラまたはヒト化抗体を作製して、特徴づける方法は、当技術分野で公知であり、例えば、K a s h m i r i ら、2005年。M e t h o d s 36 巻：25~34 頁；G o n z a l e s ら、2005年。T u m o r b i o l o g y 26 巻：31~43 頁に記載されている。誤って折り畳まれた P r P に特異的な、例えば P r P<sup>S<sub>C</sub></sup> に特異的なハイブリドーマの産生では、P r P<sup>0/0</sup> マウス（「ノックアウトマウス」）を使用することが有利であり得る（例えば、米国特許第 676508 号によって提供される方法を参照）。

20

30

## 【0077】

本発明者は、鎖 1 で見出されるアミノ酸を含む配列を含むペプチド（G l y - G l y - T y r - M e t - L e u - G l y - S e r、配列番号 8）を用いて、ハイブリドーマを作出し、1 A 1 と命名される I g M モノクローナル抗体を産生した。この配列は、それらに限定されないが、ヒト（配列番号 1）、マウス（配列番号 3）、ウシ（配列番号 5）、ハムスター（配列番号 4）、ヒツジ（配列番号 2）およびエルク（配列番号 6）を含むプリオン感受性種で保存されている（図 3）。アイソタイプ対照抗体と比較すると、1 A 1 モノクローナル抗体は、プリオンタンパク質の疾患によって誤って折り畳まれたアイソフォームを特異的に認識する（図 1）。

40

## 【0078】

したがって、本発明は、哺乳動物の P r P アミノ酸配列の Y M L 配列を含むエピトープに結合する抗体またはその断片を提供する。

## 【0079】

本発明は、哺乳動物の P r P アミノ酸配列の Y M L 配列を含むエピトープに結合し、天然構造の P r P<sup>C</sup> に特異的に結合しない抗体またはその断片をさらに提供する。

## 【0080】

本発明は、哺乳動物の P r P アミノ酸配列の 鎖 1 の上にその全体または一部が見出さ

50

れるエピトープに特異的に結合する抗体をさらに提供する。

【0081】

本発明は、哺乳動物のPrPアミノ酸配列のYMLエピトープに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系をさらに提供する。

【0082】

具体的な実施形態において、本発明は、2010年2月26日に受託番号260210-01の下で、International Depositary Authority of Canadaにブダペスト条約の条項の下で寄託されたハイブリドーマ、ならびに寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子、またはその相補性決定領域をコードする配列を組み込む派生物を含む、そのすべての後代および派生物を提供する。

10

【0083】

別の具体的な実施形態では、本発明は、上で引用したハイブリドーマの培養による産物として得られる、1A1と命名されるモノクローナル抗体を提供する。1A1抗体のYML結合性断片も提供される。関連の実施形態では、本発明は、YMLエピトープとの結合をめぐって1A1抗体と競合する抗体およびそれらの断片を提供および包含する。

【0084】

本発明の様々な実施形態による抗体は、生体試料中のPrP<sup>S</sup>アイソフォームの存在、不在または相対量を決定するアッセイまたは試験で用いることができる。生体試料は、被験体から得ることができる。同様に、抗体は、それらの膜表面に誤って折り畳まれた形のPrPを提示する腫瘍細胞の存在、不在または相対量を決定するアッセイまたは試験で用いることができる。

20

【0085】

タンパク質またはタンパク質複合体は、当技術分野で公知である様々な方法によって特異的に同定および定量化することができ、単独でまたは組合せで用いることができる。免疫または抗体ベースの技術には、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ウェスタンブロット法、免疫蛍光法、マイクロアレイ、一部のクロマトグラフィー技術(すなわち免疫アフィニティークロマトグラフィー)、フローサイトメトリー、免疫沈降などが含まれる。そのような方法は、目的のタンパク質もしくはタンパク質複合体に関連する特定のエピトープまたはエピトープの組合せに対する1つまたはそれより多くの抗体の特異性に基づく。非免疫的方法には、タンパク質またはタンパク質複合体自体の物理的特性に基づくものが含まれる。そのような方法の例には、電気泳動、一部のクロマトグラフィー技術(例えば高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなど)、質量分析、配列決定、プロテアーゼ消化などが含まれる。そのような方法は、質量、電荷、疎水性または親水性に基つき、それは、タンパク質またはタンパク質複合体のアミノ酸補体、およびアミノ酸の特異的配列に由来する。タンパク質またはタンパク質複合体を同定するため、または特徴づけるために、免疫的および非免疫的方法を組み合わせてもよい。

30

【0086】

本明細書に記載され、関連する分野の技術者に公知である標準の参考図書は、免疫的技術および非免疫的技術の両方、特定の試料型、抗体、タンパク質または分析へのそれらの適合性を記載する。

40

【0087】

本発明の一部の実施形態では、PrP<sup>S</sup>または誤って折り畳まれたPrP<sup>C</sup>の細胞結合形を含む組織抽出物またはホモジネートは、抗体とプリオンタンパク質とによる複合体形成を可能にする条件下で、PrP<sup>S</sup>などのPrPのYML提示形に結合する抗体と組み合わせ、相互作用させることができる。抗体を、支持体マトリックス、例えばプラスチックまたは磁気ビーズに結合させてもよい。結合したタンパク質複合体を収集し(例えば遠心分離、または磁気収集によって)、洗浄し、変性させ、ゲル電気泳動にかける。ゲ

50

ル電気泳動の後、タンパク質をウェスタンブロット法にかけ、1つまたはそれより多くの対照、PrP<sup>C</sup>アイソフォームに特異的な1つまたはそれより多くの抗体、およびPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>アイソフォームに特異的な1つまたはそれより多くの抗体を含むことができる様々な抗体でプロットを探る。PrP<sup>S</sup><sup>C</sup>アイソフォームが試料中に存在する場合、PrP<sup>S</sup><sup>C</sup>特異的抗体は、試料中のPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>アイソフォームの存在を同定する。PrP<sup>C</sup>アイソフォームも試料中に存在する場合、PrP<sup>C</sup>アイソフォームだけを検出する抗体はPrP<sup>C</sup>アイソフォームの存在を同定する。一部の実施形態では、PrP<sup>S</sup><sup>C</sup>およびPrP<sup>C</sup>アイソフォームの検出は定量的または半定量的であり、このように、試料中のPrP<sup>C</sup>およびPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>の相対比の推定を得ることが可能となることができる。

#### 【0088】

実施形態では、検出がPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>関連の神経性疾患または血行性癌の診断を目的とする場合には、YML免疫活性のために調査される生体試料は、血液試料またはそのYML抗体反応性分画である。代替形では、検出が固形癌の診断を目的とする場合には、生体試料は、腫瘍生検材料などの組織試料またはそのホモジネートである。

#### 【0089】

したがって、本発明は、生体試料中のPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>を検出する方法であって、複合体の形成を可能にする条件下で、生体試料をPrP<sup>C</sup>およびPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>に結合する抗体と接触させることと、前記複合体中のPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>アイソフォームの存在を検出することを含む方法を提供する。同様に、本発明は、YML抗体と免疫反応性である、生体試料中のPrPの任意の誤って折り畳まれた形態を検出するための方法を提供する。

#### 【0090】

一般に用語「被験体」または「患者」は、哺乳動物および他の動物、例えばヒトおよび他の霊長類、伴侶動物、動物園および農場の動物、例えば、それらに限定されないがネコ、イヌ、齧歯動物、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、エルクまたは他の有蹄動物、ヤギ、家禽などを指す。被験体には、プリオンタンパク質の誤った折畳みに関連する疾患または障害の予測、調査または診断のために検査される被験体、または検査された被験体が含まれる。被験体は、他の方法、例えば本明細書に記載のものまたは現在の医療で実施されるものを用いて以前に調査または診断されていてもよく、あるいは、一般集団（対照被験体）の一部として選択されてもよい。被験体は、PrP<sup>C</sup>またはPrP<sup>S</sup><sup>C</sup>アイソフォームを含むか、またはプリオンタンパク質の発現を欠く（例えば「ロックアウト」マウス）、遺伝子導入動物、例えばマウスなどの齧歯動物であってよい。例えば、被験体は正常なアイソフォーム（PrP<sup>C</sup>）を過剰発現する遺伝子導入マウスであってもよく、または疾患関連アイソフォーム（PrP<sup>S</sup><sup>C</sup>）に感染した野生型マウスもしくはハムスターであってもよい。

#### 【0091】

「生体試料」または「試料」は、一般に被験体からの体液または組織または器官試料を指す。例えば、生体試料は、脳脊髄液、血液、血漿、リンパ液、血清、尿または唾液などの体液であってよい。固形または半固形の組織または器官から得られるものなどの組織または器官試料は、消化、抽出すること、さもなければ液状にすることができる。そのような組織または器官の例には、培養された細胞、血球、脳、神経組織、皮膚、肝臓、心臓、腎臓、膵臓、ランゲルハンス島、骨髄、血液、血管、心臓弁、肺、腸管、腸、脾臓、膀胱、ペニス、顔、手、骨、筋肉、脂肪、角膜などが含まれ、それらの腫瘍形成性形態も含まれる。複数の生体試料が、一度に収集されてもよい。被験体がプリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害を診断されるかまたはそれを有することが疑われる前、プリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害の症状の処置または改善のための治療レジメンの間、被験体の死亡（原因または疑われる原因に関係なく）の後を含む、いかなる時期に、1つまたはそれより多くの生体試料を被験体から採取することができる。あるいは、生体試料には、集中血液供給組織または施設で治療中に、血液、血漿または血小板などの提供された体液または組織を含めることができる。あるいは、生体試料には、例えば屠殺場での屠殺時にとられる食用動物からの肉、血液または組織を含めることができる。

10

20

30

40

50

## 【0092】

試料には、非限定的に、細胞培養において正常または改変細胞によって（例えば、組換えDNA技術を通して）産生されるPrP<sup>C</sup>またはPrP<sup>S<sup>C</sup></sup>タンパク質アイソフォームを含めることもできる。試料は、被験体から直接に単離されない、実験条件の下で作られる細胞または細胞系であってもよい。試料は、無細胞であっても、人工的に誘導または合成されてもよい。「対照」には、ベースライン、例えば、発現または活性または出現の決定で用いるために得られる、試料または標準が含まれる。したがって、対照は正常な細胞または組織から、例えば、プリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害に罹患していない被験体から、プリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害の危険性が疑われない被験体から、あるいは、そのような被験体に由来する細胞もしくは細胞系、またはその抽出物もしくはホモジネートから得ることができる。対照は、標準、例えばそれ以前に確立された標準であってもよい。したがって、本発明によって行われるいかなる試験またはアッセイも、標準と比較することができ、さらに、比較のたびに対照試料を得る必要がないこともある。

10

## 【0093】

別の例では、本明細書に記載される抗体を、被験体におけるプリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害の処置、予防または改善のための医薬組成物で用いることができる。本発明の一部の実施形態による抗体の治療有効量および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を、プリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害を処置するために、被験体に投与することができる。抗体は、PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>凝集体の形成を阻害すること、誤って折り畳まれたPrPを通しての細胞間通信もしくは細胞内シグナル伝達を阻害すること、またはPrP<sup>S<sup>C</sup></sup>アイソフォームへのPrP<sup>C</sup>のさらなる変換をブロックすることができる。医薬組成物は、例えばPrP<sup>S<sup>C</sup></sup>の形成および/または凝集の神経毒性作用の低減に役立つことができる。医薬組成物は、脳血液関門の透過性を高める添加剤または作用物質をさらに含むことができる（血液中への投与のために）。

20

## 【0094】

本発明の別の実施形態では、プリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害の処置のために、医薬の調製で抗体を用いることができる。抗体、または抗体を含む医薬もしくは医薬組成物は、プリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害を有するかまたはそれが疑われる被験体で、そのような疾患または障害の処置のために用いることができる。

30

## 【0095】

別の例では、配列番号7～14の1つまたはそれより多くを含むペプチドは、被験体で免疫応答を誘導するための医薬用製剤で用いることができ、その免疫応答は、PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>アイソフォームに特異的である。医薬用製剤は、ワクチンとして有用であってもよい。

## 【0096】

本発明の別の実施形態では、プリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害の予防または処置のためのワクチン組成物の調製でペプチドを用いることができる。ペプチド、またはペプチドを含む医薬もしくはワクチン組成物は、プリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害を有するかまたはそれが疑われる被験体で、そのような疾患または障害の予防または処置のために用いることができる。PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>アイソフォームに特異的な、宿主によって産生される抗体は、PrP<sup>S<sup>C</sup></sup>の凝集を阻止することができ、またはPrP<sup>S<sup>C</sup></sup>へのPrP<sup>C</sup>の変換を阻止することができる。

40

## 【0097】

ペプチドに対する宿主の免疫応答を促進または増強するために、ペプチドを担体に結合することができる。担体の例は、例えば本明細書で開示される標準の参考文献に記載されている。ワクチン組成物は、1つまたはそれより多くのアジュバント、賦形剤などをさらに含むことができる。アジュバントおよび賦形剤の例は本明細書に記載され、さらなる例は、例えば本明細書に記載される標準の参考文献に記載されている。

## 【0098】

当業者に公知である医学生理学および薬理学の一般原理を示している標準の参考図書に

50

は、以下のものが含まれる：Fauciら編、Harrison's Principles Of Internal Medicine、第14版、McGraw-Hill Companies, Inc. (1998年)。

【0099】

本明細書で用いる抗体またはペプチドの「有効量」は、(1)レシピエントで誤って折り畳まれたPrPの影響を減少させるために、例えばPrP<sup>Sc</sup>の神経毒性作用を減少させるため、または誤って折り畳まれたPrPに陽性である腫瘍の増殖作用を減少させるために有用な医薬組成物中の抗体の量、および(2)被験体でPrP<sup>Sc</sup>アイソフォームまたは誤って折り畳まれたPrP提示腫瘍細胞に対する免疫応答を誘発する、医薬組成物中のペプチドの量を指す。有効量は質量/質量ベース(例えば被験体1キログラムにつきマイクログラムもしくはミリグラム)で計算してもよく、または質量/容量ベース(例えば濃度、1ミリリットルにつきマイクログラムもしくはミリグラム)で計算してもよい。質量/容量単位を用いると、抗体は、約0.1 μg/mlから約20 mg/mlまでの量、またはその間の任意の量、例えば0.1、0.5、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000、5000、10000、20000 μg/ml、またはその間の任意の量；あるいは、約1 μg/mlから約2000 μg/mlまで、またはその間の任意の量、例えば1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000 μg/ml、またはその間の任意の量；あるいは、約10 μg/mlから約1000 μg/mlまで、またはその間の任意の量、例えば10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 μg/ml、またはその間の任意の量；あるいは、約30 μg/mlから約1000 μg/mlまで、またはその間の任意の量、例えば30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 μg/mlで存在してもよい。

10

20

30

【0100】

量および/または濃度は質量/質量ベース(例えば被験体1キログラムにつきマイクログラムもしくはミリグラム)で計算してもよく、または質量/容量ベース(例えば濃度、1ミリリットルにつきマイクログラムもしくはミリグラム)で計算してもよい。質量/容量単位を用いると、抗体またはペプチドは、約0.1 μg/mlから約20 mg/mlまでの量、またはその間の任意の量、例えば0.1、0.5、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000、5000、10000、20000 μg/ml、またはその間の任意の量；あるいは、約1 μg/mlから約2000 μg/mlまで、またはその間の任意の量、例えば1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000 μg/ml、またはその間の任意の量；あるいは、約10 μg/mlから約1000 μg/mlまで、またはその間の任意の量、例えば10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 μg/ml、またはその間の任意の量；あるいは、約30 μg/mlから約1000 μg/mlまで、またはその間の任意の量、例えば30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 μg/mlで存在してもよい。

40

50

## 【0101】

治療組成物を含む本発明の様々な実施形態による組成物は、抗体またはペプチドの有効量を含む用量として投与することができる。用量は、約0.1 μg/kgから約20 mg/kg（被験体の質量に基づく）までの量、例えば0.1、0.5、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000、5000、10000、20000 μg/kg、またはその間の任意の量；あるいは、約1 μg/kgから約2000 μg/kgまで、またはその間の任意の量、例えば1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000 μg/kg、またはその間の任意の量；あるいは、約10 μg/kgから約1000 μg/kgまで、またはその間の任意の量、例えば10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 μg/kg、またはその間の任意の量；あるいは、約30 μg/kgから約1000 μg/kgまで、またはその間の任意の量、例えば30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 μg/kgを含むことができる。

10

## 【0102】

当業者は、被験体の質量、医薬組成物の濃度、個々の成分もしくはその組合せ、または医薬組成物、個々の成分もしくはその組合せの容量を考慮して、必要に応じて単位を所望の適用に適するフォーマットに相互変換することが容易に可能になる。

20

## 【0103】

それが投与される場合、投与される組成物の量、投与の方法およびそれが投与される時間枠は、観察される効果にすべて寄与することができる。例えば、組成物は、例えば静脈内投与で全身に投与され、有害または望ましくない影響を及ぼすことがあるが、皮下投与される同じ組成物が、同じ望ましくない影響を及ぼさないことがある。一部の実施形態では、皮下注射部位の近くのリンパ節の免疫細胞の局所刺激が有利なことがあるが、全身性の免疫刺激がそうではないことがある。

30

## 【0104】

本発明の様々な実施形態による医薬組成物は、しばしば注射用蒸留水、乳酸リンゲル液、等張性生理食塩水などの水性媒体で、様々な生理的または薬学的に許容される賦形剤のいずれかと一緒に製剤化することができる。そのような賦形剤には、例えば、塩、緩衝剤、抗酸化剤、錯化剤、張性剤、凍結保護物質、溶媒保護剤、懸濁剤、乳化剤（emulsifying agent）、抗微生物剤、保存剤、キレート化剤、結合剤、界面活性剤、湿潤剤、抗接着性剤、崩壊剤（disintegrant）、コーティング、滑走剤、解膠剤、抗核化剤、界面活性剤、安定化剤、非水性ビヒクル、例えば揮発性油、持続性もしくは制御された放出のためのポリマーまたは封入剤、軟膏基材、脂肪酸、クリーム基材、緩和薬、乳化剤（emulsifier）、増粘剤、保存剤、可溶化剤、湿潤剤、水、アルコールなどを含めることができる。例えば、Bergeら（1977年、J. Pharm Sci. 66巻：1～19頁）またはRemington - The Science and Practice of Pharmacy、第21版、Gennaroら編、Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia（その両方は、参照により本明細書に組み込まれている）を参照。

40

## 【0105】

本発明の様々な実施形態による抗体またはペプチドを含む組成物は、それらに限定されないが例えば、クモ膜下投与、皮下注射、腹腔内注射、筋肉内注射、静脈内注射、表皮もしくは経皮投与、粘膜投与、経口、経鼻、直腸、局所、または経膈を含むいくつかの経路のいずれかによって投与することができる。あるいは、そのような組成物は、腫瘍に直接

50

に、または腫瘍の近くのリンパ節に、または腫瘍の近くの器官もしくは組織に、または腫瘍細胞を含む器官もしくは組織に注入することができる。例えば、Remington - The Science and Practice of Pharmacy、第21版、Gennaroら編、Lippincott Williams & Wilkins Philadelphiaを参照。担体制剤は、投与経路によって選択または改変することができる。

【0106】

本発明の様々な実施形態による組成物は、上皮表面に適用されてもよい。いくつかの上皮表面は、粘膜、例えば口内、歯肉、鼻、気管、気管支、胃腸、直腸、尿道、膣、子宮頸部、子宮などを含むことができる。いくつかの上皮表面は、角質化細胞、例えば、皮膚、舌、歯肉、口蓋などを含むことができる。

10

【0107】

本発明の様々な実施形態による組成物は、単位投薬量剤形で、または使用時の調合もしくは希釈に適するバルク形態で提供されてもよい。

【0108】

本発明の様々な実施形態による組成物は、単一用量で、または経時的に投与されるいくつかの用量で被験体に投与することができる。投与計画は、例えば、被験体の状態、年齢、性別、体重、投与経路、製剤または健康状態によって決めることができる。投与計画は被験体における吸着、分布、代謝、排出および毒性の測定から計算することができ、またはヒト被験体で使用するために、ラットまたはマウスなどの実験動物での測定から推定されてもよい。投薬および処置レジメンの最適化は、例えばGoodman & GilmanのThe Pharmacological Basis of Therapeutics第11版、2006年、LL Brunton編、McGraw-Hill、New York、またはRemington - The Science and Practice of Pharmacy、第21版、Gennaroら編、Lippincott Williams & Wilkins Philadelphiaに述べられている。

20

【0109】

本発明の様々な実施形態によるワクチン組成物として用いる医薬組成物は、アジュバントをさらに含むことができ、記載のように投与することができる。例えば、ワクチン組成物に用いられるペプチドは、アジュバントと組み合わせることができ、アジュバントの例には、水酸化アルミニウム、ミョウバン、Alhydrogel (商標) (アルミニウム三水和物) または他のアルミニウム含有塩、ピロゾーム、CpGモチーフを含む核酸、スクアレン、油、MF59、QS21、様々なサポニン、ウイルス様粒子、モノホスホリル-脂質Aノトレハロースジコリノミコレート、tol1様受容体アゴニスト、ポリオキシプロピレンおよびポリオキシエチレンなどのコポリマーなどが含まれる。

30

【0110】

本発明との関連で、本明細書で用いる用語「処置」、「処置すること」、「治療的使用」または「処置レジメン」は、互換的に用いることができ、本発明の組成物の投与の予防的、緩和的および治療的な様式を包含するものとし、炎症に基づく病状、感染性の疾患、アレルギー応答、過免疫応答または処置すべき他の疾患もしくは障害によって引き起こされる疾患状態、状態、症状、徴候または障害を治し、あるいは、それに関連する症状、徴候、状態または障害の進行を予防するか、妨げるか、遅らせるかまたは逆転させる、ここで特許請求される化合物のあらゆる使用を含む。

40

【0111】

他の実施形態

別の実施形態では、本発明は、プリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害の処置のための化合物を同定する方法を提供する。PrP<sup>S</sup>Cアイソフォームまたは誤って折り畳まれたPrPの他の形によって提示されるYMLエピトープに特異的な抗体は、試験化合物の存在下および非存在下で、標的抗原、例えば本明細書に記載のPrP<sup>S</sup>Cを含む

50

試料と組み合わせられる。結合した抗体およびPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の複合体は収集され、複合体中のPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の相対量について本明細書に記載のように分析される。試験化合物の非存在下での結合レベルよりも低い、試験化合物の存在下でのPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>特異的抗体の結合レベルは、試験化合物が、プリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害の処置または改善のための可能性のある治療化合物であるかもしれないことを示す。一部の実施形態では、抗体は、配列番号7を含むエピトープに結合する。

#### 【0112】

別の実施形態では、本発明は、被験体への移植、経口摂取もしくは投与を目的とする組織または組成物からPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を除去する方法を提供する。例えば、PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>アイソフォームが複体内で抗体と結合するように、組成物または組織は、哺乳動物のPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>アイソフォームに特異的な1つまたはそれより多くの抗体と組み合わせられる。結合したアイソフォームおよび抗体の複合体は組織または組成物からその後切り離され、組織または組成物は意図した通りに使用することができる。

10

#### 【0113】

##### 製造物

包装材料、および哺乳動物のPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>などの誤って折り置かれたPrPに特異的な抗体または抗血清を含む組成物を含む製造物も提供される。組成物は、生理的または薬学的に許容される賦形剤を含み、包装材料は、組成物の有効成分（例えば抗血清または抗体）を示す表示を含むことができる。表示は、例えば本明細書に示すキットで用いられる診断試薬としての、組成物の使用目的をさらに含むことができる。

20

#### 【0114】

包装材料、および本明細書で提供される1つまたはそれより多くのペプチドによるペプチドを含む組成物を含む製造物も提供される。組成物は、生理的または薬学的に許容される賦形剤を含むことができ、包装材料は、組成物の有効成分（例えばペプチド）を示す表示を含むことができる。表示は、例えば治療試薬もしくは予防試薬としての、または本明細書に示すキットで用いられる、哺乳動物のPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>に特異的な抗血清もしくは抗体を産生する目的で、被験体で免疫応答を誘発する組成物としての組成物の使用目的をさらに含むことができる。

#### 【0115】

##### キット

本明細書で提供される1つまたはそれより多くのペプチドを含む組成物を含むキットは、YML特異的抗体または抗血清の同定のための抗体の産生またはスクリーニングのための、化合物または組成物の使用説明書と共に提供される。キットはYML特異的抗体または抗血清の産生および/または同定のために役立つことができ、説明書は、例えば、投与濃度、投与間隔、好ましい投与方法、免疫学的スクリーニングまたは試験の方法などを含むことができる。

30

#### 【0116】

別の実施形態では、本明細書で提供される1つまたはそれより多くのペプチドを含む組成物をその使用のための説明書と一緒に含む、医薬の調製のためのキットが提供される。説明書は、医薬の調製のための一連の工程を含むことができ、医薬は、それが投与される被験体で治療的または予防的な免疫応答を誘導するのに有用である。キットは、プリオンの誤った折畳みに関連するか、またはプリオンの誤った折畳みが関連付けられる疾患または障害の1つまたはそれより多くの症状の処置、予防または改善のための、処置における医薬の使用説明書をさらに含むことができ、例えば、投与濃度、投与間隔、好ましい投与方法などを含む。

40

#### 【0117】

別の実施形態では、プリオンの誤った折畳みに関連する疾患または障害を診断するためのキットが提供される。キットは、本明細書に記載の1つまたはそれより多くのYML抗体または抗血清を、その使用のための説明書と共に含む。抗体は、検出試薬にさらに結合させることができる。検出試薬の例には、抗マウス抗体、抗ウサギ抗体などの二次抗体が

50

含まれる。そのような二次抗体は、適する基質を備える場合、検出可能な比色反応または化学発光反応を提供する酵素と結合させることができる。キットは、プロテイナーゼKなどの酵素、ブロッキング緩衝剤、ホモジナイゼーション緩衝剤、抽出緩衝剤、希釈緩衝剤などを含む、検出反応を実施するための試薬をさらに含むことができる。

#### 【0118】

別の実施形態では、生体試料中のPrP<sup>Sc</sup>の存在を検出するためのキットが提供される。キットは、本明細書に記載の哺乳動物のPrPのPrP<sup>Sc</sup>アイソフォームに特異的に結合する1つまたはそれより多くの抗体または抗血清を、その使用のための説明書と共に含む。抗体は、検出試薬にさらに結合させることができる。検出試薬の例には、抗マウス抗体、抗ウサギ抗体などの二次抗体が含まれる。そのような二次抗体は、適する基質を備える場合、検出可能な比色反応または化学発光反応を提供する酵素と結合させることができる。キットは、プロテイナーゼKなどの酵素、ブロッキング緩衝剤、ホモジナイゼーション緩衝剤、抽出緩衝剤、希釈緩衝剤などを含む、検出反応を実施するための試薬をさらに含むことができる。

10

#### 【0119】

YMLエピトープは、癌セラノスティクス(cancer theranostics)の標的としても有用である。本明細書で例示されるように、特定の腫瘍細胞系は、このエピトープに対して生成される抗体に反応性である抗原を提示する。これらは、YML抗体によって認識される誤って折り畳まれた形のPrPを明らかに提示し、またPrP+である細胞系である。したがって、本発明の抗体は、YML+腫瘍細胞の検出および治療的ターゲティングのために、それ自体、またはイムノコンジュゲートとして有用である。YMLを含有するワクチンも、癌処置のために同様に有用である。腫瘍細胞は、固形腫瘍および液性腫瘍を含む。本明細書で例示されるように、腫瘍標的はYMLエピトープを提示するものであり、したがって、それらの表面にPrPを提示するが、YMLエピトープを露出させる誤って折り畳まれた形のものである。そのような腫瘍は、「YML+」と、またはYML+表現型を有するかもしくは含むと記載することができる。YMLを提示することが分かった腫瘍には、細胞系MOLT-4によって表される、リンパ系組織から生じるもの、および細胞系MO3.13によって表されるオリゴデンドログリア系統、ならびに細胞系B16によって表される黒色腫細胞から生じるものが含まれる。当然、YML抗体によって標的にすることができるさらに他の腫瘍は、上でおよび本明細書の実施例で記載されるYML抗体スクリーニングを用いて先ず明らかにすることができる。

20

30

#### 【0120】

用語「腫瘍細胞」は、本明細書では癌細胞、および無秩序な細胞成長を特徴とする、そのような細胞を含む腫瘍に関して用いられる。したがって腫瘍細胞は、悪性であろうが良性であろうが新生物性細胞の成長および増殖を特徴とし、液性および固形の腫瘍を含むすべての前癌性および癌性の細胞、ならびにそのような細胞を含む組織が含まれる。用語「腫瘍細胞」には、ヒト癌細胞、ならびにペット、およびウマ、ヒツジ、ウシおよび有蹄動物を含む家畜を含む他の哺乳動物からの癌細胞が含まれる。

#### 【0121】

本処置方法は、YMLエピトープを提示する癌細胞の「成長または増殖」の阻害をもたらす。in vitroレベルで、そのような成長または増殖の阻害は、未処置の対照試料と比較して、処置される癌細胞の数、サイズ、生存度、成長速度、増殖速度または代謝活性の低減によって明らかにされる。in vivoレベルで、成長または増殖のそのような阻害は、標的エピトープを提示する癌細胞を抱える腫瘍の成長速度、サイズ、数または転移状態の低減としてさらに明らかにすることができる。これらのエンドポイントのすべては、この目的のための腫瘍学分野で十分に確立されているアッセイおよび手順を用いて、ならびに、本発明によって提供され、本明細書でさらに詳述される、標的エピトープを検出する作用物質の援用によって容易に決定することができることは理解されよう。

40

#### 【0122】

それ自体を細胞毒としてのそれらの使用を可能にするために、YMLエピトープを提示

50

する癌細胞の成長または増殖を直接に阻害するために、抗体は、補体媒介細胞傷害（C D C）および/または抗体依存性細胞傷害（A D C C）などの内因機構を通してそれらの抗癌活性を発揮することができる。この目的のために、Y M L 抗体は、最適にはI g G 1 アイソタイプである。変化したエフェクター機能を有するように抗体を工学的に改変し、または選択して、癌の処置における有効性を増強することができることは理解されよう。鎖間ジスルフィド結合を形成させるために、例えばシステイン残基をF c 領域に導入することができる。生じるホモ二量体抗体は向上した内在化能力を有することができ、より重要なことに、増大された補体依存性細胞傷害（C D C）および/またはA D C C 活性を有することができる。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体は、W o l f f ら、C a n c e r R e s e a r c h 5 3 巻：2 5 6 0 ~ 2 5 6 5 頁（1 9 9 3 年）に記載のヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製することもできる。あるいは、二重のF c 領域を有し、増強されたC D C およびA D C C 活性を有する抗体を工学的に改変することができる。

10

## 【0123】

本発明で有用な抗体断片には、F a b、F a b'、F ( a b' ) 2 およびF v 断片を含む抗Y M L 抗体のY M L 結合性断片、抗体断片から形成されるダイアボディ、線状抗体、単鎖抗体分子および多重特異的抗体が含まれる。F c 領域を組み込む抗体断片は、変化したエフェクター機能を提供するように上記の通り工学的に改変し、またはコンジュゲートして、それによってA D C C および/またはC D C 活性を増強することもできる。癌処置のために、Y M L 抗体およびその結合性断片を、抗体または断片が細胞毒に結合しているイムノコンジュゲートとして提供し、用いることもできる。

20

## 【0124】

抗体を含むイムノコンジュゲートは、画像化で有用なものを含む検出可能な標識および細胞毒を含む薬物を含む、上記の様々な作用物質にコンジュゲートすることができる。実施形態では、コンジュゲートは、Y M L エピトープに選択的に結合する細胞毒および作用物質を含む。「細胞毒」は、癌細胞の生存度を低下させるために、例えば癌細胞の成長および/または増殖を阻害するために治療的に有用である、化学療法または放射線治療の化合物などを含む化合物を指す。

## 【0125】

Y M L 抗体および細胞毒は、非共有相互作用を通してコンジュゲートすることができるが、より望ましくは、共有結合によって直接に、またはより好ましくは、適するリンカーを通して結合する。好ましい実施形態では、コンジュゲートは、細胞毒およびY M L 抗体を含み、イムノコンジュゲートを形成する。抗体および細胞毒のイムノコンジュゲートは、N - スクシンイミジル - 3 - ( 2 - ピリジルジチオール ) プロピオネート、イミノチオランなどの様々な二官能基のタンパク質結合剤、ジメチルアジピミデートH C L などのイミドエステルの二官能基誘導体、ジスクシンイミジルスベレートなどの活性エステル、グルタルアルデヒドなどのアルデヒド、ビス - ( p - ジアゾニウムベンゾイル ) - エチレンジアミンなどのビス - アジド化合物、トリエン 2 , 6 - ジイソシアネートなどのジイソシアネート、およびビス活性フッ素化合物 ( 1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼンなど ) を用いて作製される。炭素 1 4 標識 1 - イソチオシアノベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 ( M X - D T P A ) は、抗体への放射性ヌクレオチドのコンジュゲーションに適するキレート化剤である。

30

40

## 【0126】

イムノコンジュゲートの細胞毒成分は、化学療法剤、毒素、例えば細菌、真菌、植物または動物起源の酵素活性毒素、またはその断片、または小分子毒素、あるいは<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>111</sup>In、<sup>90</sup>Y および<sup>186</sup>Re などの放射性同位体、あるいは癌細胞の成長または増殖を阻害するのに有用な他の任意の作用物質であってよい。

## 【0127】

そのようなイムノコンジュゲートの作出に有用な化学療法剤には、アドリアマイシン、ドキソルピシン、エピルピシン、5 - フルオロウラシル、シトシンアラビノシド ( 「A r a - C」 )、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン ( c y t o x

50

in)、タキソイド、例えばパクリタキセル、およびドセタキセル、タキソテール (toxotere)、メトトレキサート (methotrexate)、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、プレオマイシン、エトポシド、イホスファミド (ifosfamide)、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルピン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン、5-FU、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、アクチノマイシンD、VP-16、クロラムブシル、メルファランおよび他の関連するナイトロジェンマスタードが含まれる。また、タモキシフェンおよびオナプリストンなどの、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害する作用をするホルモン剤も含まれる。

10

## 【0128】

用いることができる毒素およびその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、コレラトキシン、ボツリヌス毒素、外毒素A鎖 (Pseudomonas aeruginosaから)、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデッシンA鎖、アルファ-サルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ダイアンシタンパク質、Phytolacca americanaタンパク質 (PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、Momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、Sapaonaria officinalis阻害剤、ゲロニン、サポリン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコスセンが含まれる。小分子毒素には、例えば、カリケアマイシン、マイタンシノイド、パリトキシンおよびCC1065が含まれる。

20

## 【0129】

YML + 腫瘍を示す被験体の処置のために、投薬は、PrP<sup>S</sup>C障害の処置について上で述べたように実施することができる。処置に適する被験体を特定するために、そのYML + 表現型を確認するためにまた上に記載のように、腫瘍細胞を含む生体試料をスクリーニングすることができる。あるいは、YML抗体がテクネチウム同位体 (例えば、Tc<sup>99</sup>)、ガドリニウム同位体などの造影剤に結合しているイムノコンジュゲートの投与および蓄積の後、局所または全身の画像化によって被験体の画像をとることができる。

## 【0130】

YML + 腫瘍を示す被験体の良好な処置は、YML + 腫瘍負荷の減少として、例えばYML + 腫瘍の数もしくは分布の減少、または特定のYML + 腫瘍のサイズの減少として、および/あるいは全体的な患者生存期間の増加によって明らかにされる。

30

## 【0131】

他の治療レジメンを、本発明の抗癌剤、例えばワクチン、抗体またはコンジュゲートの投与と組み合わせてもよい。例えば、そのような抗癌剤で処置される患者は、外部ビーム放射線などの放射線療法も投与されてよい。あるいは、またはさらに、化学療法剤が患者に投与されてもよい。そのような化学療法剤のための調製および投薬スケジュールは、製造業者の説明書によって、または、熟練臨床医により経験的に決定される通りに用いることができる。そのような化学療法のための調製および投薬スケジュールは、Chemotherapy Service, M. C. Perry編、Williams & Wilkins、Baltimore、Md. (1992年)にも記載されている。化学療法剤は、抗腫瘍剤、例えば抗体の投与の前後でもよく、またはそれと同時に投与されてもよい。抗体は、タモキシフェンなどの抗エストロゲン化合物またはオナプリストンなどの抗プロゲステロンと (欧州特許第616812号を参照)、そのような分子で公知である投薬量で組み合わせることができる。

40

## 【0132】

他の腫瘍関連抗原に対して、ErbB2、EGFR、ErbB3、ErbB4または血管内皮因子 (VEGF) に結合する抗体などの抗体またはコンジュゲートを投与することが望ましい場合もある。あるいは、またはさらに、本明細書で開示されるその同じまたは2つ以上の異なる抗原に結合する2つ以上の抗体を、患者に同時投与することができる。

50

時には、患者に1つまたはそれより多くのサイトカインを投与することも、有益なことがある。好ましい実施形態では、本明細書の抗体は、増殖阻害剤と同時投与される。例えば、増殖阻害剤を先ず投与し、続いて本発明の抗体を投与することができる。しかし、本発明の抗体の同時投与または先行投与も企図される。増殖阻害剤の適する投薬量は、現在用いられているものであり、増殖阻害剤および本明細書の抗体の組合せ作用（相乗効果）のために低下させることができる。さらに、YML抗体または断片は、YML抗体を生成するためのワクチンと組み合わせて投与されてもよく、レシピエントに能動および受動の免疫療法を提供する。

【0133】

本発明の配列番号一覧を、表2に示す。

【0134】

【表2】

表2 配列番号一覧

配列番号	説明	参考図面 (適切な場合)
1	ヒトプリオンタンパク質アミノ酸配列	2a
2	ヒツジプリオンタンパク質アミノ酸配列	2b
3	マウスプリオンタンパク質アミノ酸配列	2c
4	ハムスタープリオンタンパク質アミノ酸配列	2d
5	ウシプリオンタンパク質アミノ酸配列	2e
6	エルクプリオンタンパク質アミノ酸配列	2f
7	YML	
8	GGYMLGS	
9	GGYMLG	
10	GYMLGS	
11	GGYML	
12	YMLGS	
13	GYML	
14	YMLG	

本発明は、以下の実施例でさらに例示される。しかし、これらの実施例は例示だけが目的であり、いかなる方法でも本発明の範囲を限定するために用いるべきでないことを理解すべきである。

【実施例】

【0135】

(実施例1)

方法

一般参考文献：263Kハムスター順応プリオンは、Kimberlinら、1978年によって記載されている。RMLマウス順応プリオンは、Chandler, R. L. (1961年) (Lancet 1巻、1378~1379頁)によって記載されている。これらは、当技術分野で公知の方法、例えばBueler Hら、1993年 (Cell 73巻：1339~1347頁)、Oldstoneら、2002年、またはMeade-Whiteら、2009年のものを用いて、マウスまたはハムスターを感染させる

10

20

30

40

50

ために用いることができる。Boltonら、1987年は、スクレイピー因子の単離および精製のために用いることができる方法を記載している。Carlsonら、1986年(Cell、46巻:503~511頁)は、マウスおよびハムスターでのスクレイピーの臨床診断のために用いることができる方法を記載している。PrPを過剰発現するか、部分的に発現するか、または発現しない様々な遺伝子導入マウスが、Fischerら、1996年(EMBO J 15巻:1255~1264頁)およびWeissmannら、2003年(British Medical Bulletin 66巻:43~60頁)によって記載されている。

#### 【0136】

##### 脳および脾臓ホモジネートの調製

脳組織(正常およびスクレイピー感染マウスまたはハムスター)を、Fischerら2000年(Nature 408巻:479~483頁)によって改変された通りに処理し、分析した。簡潔には、PBS、0.5%デオキシコル酸(Sigma)、0.5%NP-40中で10%ホモジネートを作製した。ホモジネート中の総タンパク濃度をBCAアッセイ(Pierce)で決定し、ホモジナイゼーション緩衝液で5mg/mlに調節した。PK耐性物質の検出のために、ホモジネート1.5μlを0.15μgのPK(Sigma)と一緒に、またはそれなしで、37℃で60分間インキュベートした。20mMのPMSF(Sigma)の添加によって消化を停止した。

#### 【0137】

##### 磁気ビーズ抗体コンジュゲーションおよび免疫沈降

Paramithiotis、2003年によって改変された通りに、抗体を磁気ビーズにコンジュゲートさせ、免疫沈降実験に用いた。簡潔には、 $7 \times 10^8$ 個の磁気ビーズ(1mlのPBS中)(Dyna1; Lake Success, New York)を、製造業者の説明書に従って1A1、8B4、4E4またはIgMアイソタイプ対照に結合した。製造業者の推奨に従ってコンジュゲートしたビーズを洗浄およびブロックし、1mlのPBSに次に再懸濁させた。

#### 【0138】

抗体結合ビーズ10μLを、6%洗剤(PBS中に3%Tween 20および3%NP40)中の10%脳ホモジネート1μLと一緒に、室温で3時間インキュベートした。磁石によって捕捉された免疫複合体を4%洗剤(PBS中に2%Tween 20および2%NP40)で3回洗浄し、還元剤なしで4%SDS中にて沸騰させ、15%トリスグリシンまたは4~12%ビス-トリスアクリルアミドゲル(Invitrogen)上で分解した。

#### 【0139】

##### イムノプロットティング

記載されている通りに(Paramithiotisら、2003年)、イムノプロットティングを実施した。タンパク質を、PVDF膜(Invitrogen)に移した。5%(w/v)乾燥脱脂乳で膜をブロックした。TBST(25mMトリス-HCl、0.2M NaCl、0.5%Tween 20)中ですべてのインキュベーションを実行した。化学発光、増強ECL(Amersham)またはスーパーWest Dura(Pierce; Rockford, Illinois)によってペルオキシダーゼ活性を検出した。

#### 【0140】

##### (実施例2)

##### 抗体作出

ヒトプリオンタンパク質のアミノ酸126~132に対応するKLH結合ペプチドGGYMLGS(配列番号8)でBalb/cマウスを免疫することによって、抗体を作出した。このペプチドは最初の鎖に位置しており、誤って折り畳まれたPrP<sup>Sc</sup>では折り畳まれておらずにアクセスしやすいが、天然のPrP<sup>C</sup>ではそうでないと予想されている。モノクローナル抗体は、標準のハイブリドーマ法によって作出した。BSAに結合した

10

20

30

40

50

免疫原ペプチドへの結合 (ELISAによる) に基づいて抗体を選択した。

【0141】

より詳細には、周知の技術を用いてアミノ酸配列アセチル - C y s - G G Y M L G S - N H 2 を有するペプチドを合成し、K L H にコンジュゲートさせ、ウサギに筋内注射した。ペプチドとタンパク質担体とのコンジュゲーションを可能にするために、N 末端システイン残基を加えた。ペプチドのアミノ基をアセチル化によってブロックし、ペプチドのカルボキシル基をアミド化によってブロックした。ペプチドは、固相ペプチド合成方法を用いて手動または自動 (M P S 3 9 6 ペプチドシンセサイザー、A d v a n c e d C h e m T e c h) で合成した。アミノ酸残基の結合は、F m o c ペプチド合成化学 (F i e l d s ら、1 9 9 0 年、I J P P R 3 5 巻、1 6 1 頁) を用いて達成した。アミノ酸の完全な側鎖保護により、W a n g またはアミド R i n k 樹脂の上で合成を実施した。合成の後、試薬 K を切断混合物、すなわち水 ( 2 . 5 % )、T I S ( 2 . 5 % )、E D T ( 2 . 5 % )、T F A ( 9 2 . 5 % ) と用いて、ペプチドを樹脂から切断した。次に、冷たいジエチルエーテルでペプチドを沈殿させた。沈殿物を遠心分離し、ジエチルエーテルで 3 回洗浄し、2 0 % ~ 5 0 % A c C N / 水混合液に溶解し、凍結乾燥した。粗生成物の分析は、分析 R P - H P L C およびエレクトロスプレー M S を用いて実施した。未精製のペプチドは、アセトニトリルの 1 0 ~ 5 0 % 水溶液の直線濃度勾配を 0 . 0 6 % T F A と用いて、V y d a c C 1 8 カラム 2 . 5 x 2 5 c m 上で、R p - H P L C ( 逆相高速液体クロマトグラフィー) によって精製し ( 1 % / 分間勾配、1 0 m l / 分間流速)、2 1 5 n m および 2 5 4 n m の UV でモニタリングした。ペプチドを担体に、この場合キーホールリンペットヘモシアニン ( K L H ) に結合した。そのような結合に有用な他の担体には、それらに限定されないが、アルブミンもしくはオボアルブミン、8 m a p またはリゾチームが含まれる。結合は、システインのメルカプト基へのチオエーテル結合を通して達成された。K L H への結合は、以下の通りに実施した。ペプチド 1 0 m g を 2 m l のリン酸緩衝液 ( 1 x P B S ) に溶解した。1 m l の K L H ( p i e r c e 製品 # 7 7 1 0 0 ) をペプチド溶液に加えて攪拌した ( ペプチド 1 モル / 5 0 アミノ酸 )。K L H 濃度は、1 0 m g / m l であった。2 0 μ l のグルタルアルデヒド ( 2 5 % 水溶液 ) を一定の攪拌の下でペプチド / 担体溶液に加え、1 時間インキュベートし、その後、グリシン停止液を加えた。ペプチド / 担体コンジュゲートは、P B S に対する透析によってペプチドから分離した。

10

20

30

【0142】

モノクローナル抗体の作出は、以下の通りに実施した。完全フロイントアジュバントにマウス P r P - A P 融合タンパク質を含むバキュロウイルス上清でマウスを免疫し、次に不完全フロイントアジュバント中の同じ抗原で 2 週後にブーストした。その免疫の 2 週後に、1 0 0 μ g の K L H - C G G Y M L G S コンジュゲートをプラスした P r P - A P 上清の混合液でマウスをブーストした。特異的ハイブリドマクローンを作出するために、これらのマウスからの脾細胞を、F O マウス B 細胞系 ( A T C C C R L - 1 6 4 6 ) に融合させた。

【0143】

マウスモノクローナル抗体を腹水として産生し、プロテイン A カラムキット ( P i e r c e ) を製造業者の説明書に従って用いて精製した。簡潔には、腹水の試料を 1 : 1 の最終比で結合緩衝液により希釈した。次に試料を、事前に結合緩衝液で平衡させたカラムの上に加え、マトリックスを通過させた。パススルー物質を収集し、カラムを 5 容の結合緩衝液で洗浄した。結合抗体をマトリックスから放出させるために、緩和な溶出緩衝液をカラムに加えた。すべての抗体を 1 m l 分画で収集し、それを、総タンパク質含量を決定するために B C A によって、および抗体純度を決定するために S D S - P A G E 電気泳動で分析した。所望の抗体を含む分画を、D 塩カラム ( P i e r c e ) に通すことによって脱塩した。抗体分画を振り分け、P B S 中に - 8 0 °C で保存した。

40

【0144】

1 A 1 と命名された、マウスのモノクローナル抗体を産生するハイブリドマは、I n

50

ternational Depositary Authority of Canadaのブダペスト条約の条項の下、2010年2月26日に受託番号260210-01の下に寄託された。

【0145】

類似の方法で、抗体およびそれらを産生するハイブリドーマが、配列番号7および9~14を有するものを含む他のYML含有ペプチドに対して生成される。

【0146】

(実施例3)

PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の免疫沈降

免疫沈降させた試料は、6D11-ビオチンを一次抗体(1:5000)として、およびStrept-HRPを二次抗体(1:5000)として、ウェスタンブロット法(図1)によって分析した。8B4ビーズは陽性対照として働き、PrPノックアウトマウス(K/O)を除くすべての脳ホモジネート試料からPrPを免疫沈降させることができた。ビーズのみ、IgMアイソタイプビーズおよび4E4ビーズは陰性対照として働き、4E4によって免疫沈降したRMLおよび263Kのレーンの2つの非常にかすかなバンドを除き、PrPは予想通り免疫沈降しなかった。1A1、PrPの-1鎖に対して生成されたIgM抗体は、スクレイピータンパク質をRML(マウススクレイピー株)および263K(ハムスタースクレイピー株)の両方から免疫沈降させることができた。おそらく過剰発現PrPマウス脳における誤って折り畳まれたPrPの小さな発現のために、Tg20レーンにかすかなバンドがある。我々のデータは、マウスおよびハムスターの両方の脳で、1A1がスクレイピーPrPだけを認識することができ、野生型PrPはできなかったことを示した。

10

20

【0147】

(実施例4)

YML腫瘍標的

1A1抗体を、正常細胞および腫瘍細胞の両方に結合するその能力について試験した。対照として、各細胞型でのPrPの発現レベルを特定するために、抗PrP<sup>C</sup>抗体6D11を用いた。細胞に結合する抗体の能力は、正常細胞型としてHUVEC(ヒト臍静脈内皮細胞)を用いて、フローサイトメトリーによって観察した。8つの型の腫瘍細胞への結合についてのデータを示す。試験した癌細胞の5つは、マウス(B16-黒色腫、NSC34-モーターニューロン/神経芽細胞腫ハイブリッド)およびヒト(HL60-前骨髄球白血病、MO3.13-オリゴデンドロサイト/筋肉ハイブリッド、SiHa-子宮頸癌腫)に由来する不死化細胞系である。試験した残りの癌細胞は、British Columbia Cancer AgencyのLiving Tumor Laboratory(LTL)によって増殖された一次腫瘍細胞である。一次ヒト腫瘍は、免疫不全マウスの腎被膜下で増殖される。これは、当初の腫瘍構造および表現型が、当初収集された腫瘍との一貫性を維持することを可能にする。1A1抗体への結合について試験された3つの腫瘍は、LTL-013(びまん性大細胞型B細胞リンパ腫)、LTL-257(結腸直腸肉腫)およびLTL-323(黒色腫)である。

30

40

【0148】

結果を、図4に示す。暗いヒストグラムは、アイソタイプ対照抗体で観察される染色であり、黒線として示されるヒストグラムは、特異的抗体6D11または1A1(示す通り)による染色である。PrPは、示す9つの細胞型すべてで発現される。1A1抗体は、正常なHUVEC細胞および白血病細胞(HL60)の両方に最小限の結合を示す。1A1抗体は、示す他の7つの腫瘍細胞に対して検出可能な結合を示す。

【0149】

(実施例5)

腫瘍モデルでの効力

雌C57B1/6マウスにおけるマウスの黒色腫(B16)の成長を変更するその能力について、1A1抗体を試験した。試験の0日目に、 $3 \times 10^5$ 個の腫瘍細胞をマウス1

50



【 図 1 】

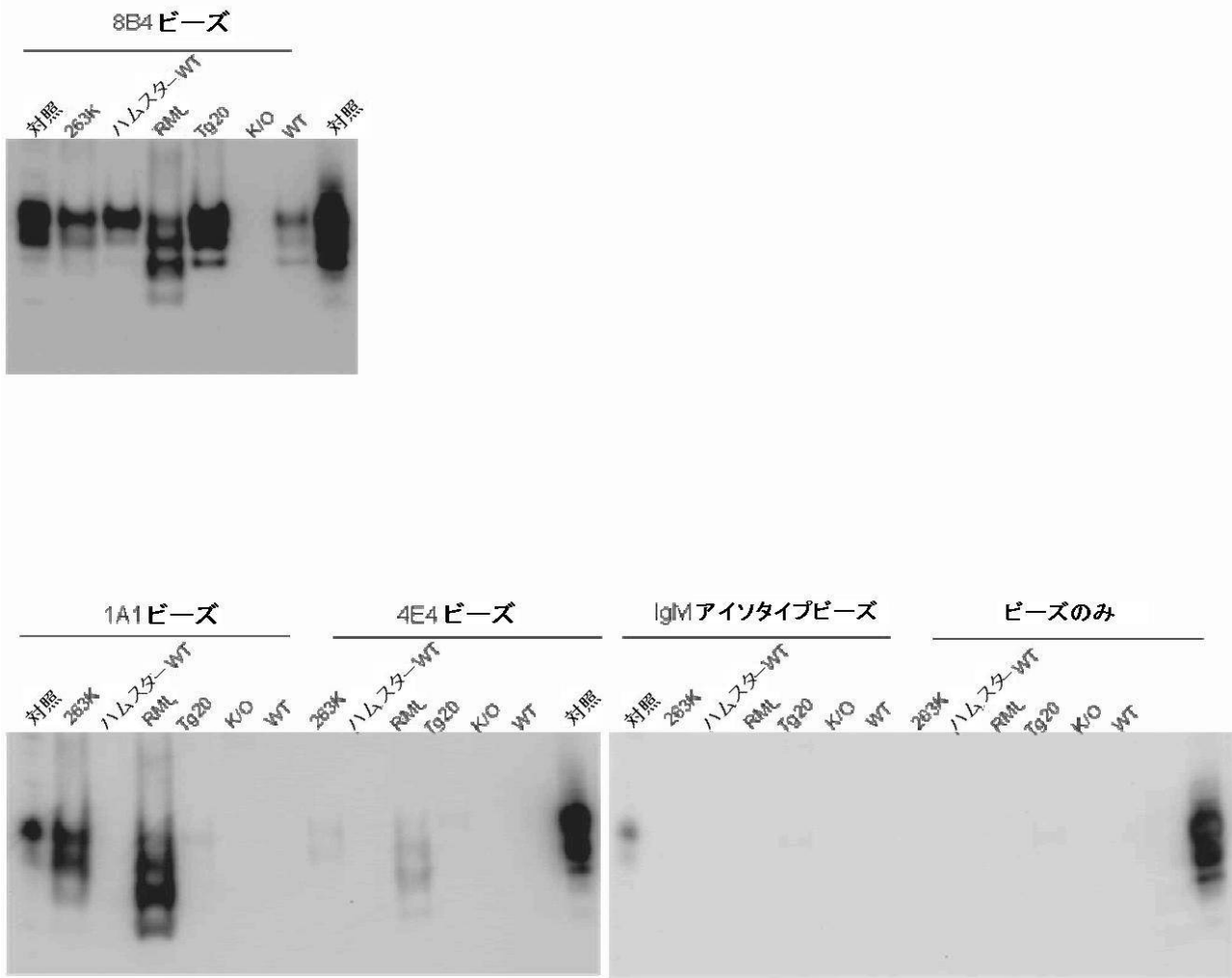


FIGURE 1

【 図 4 A 】

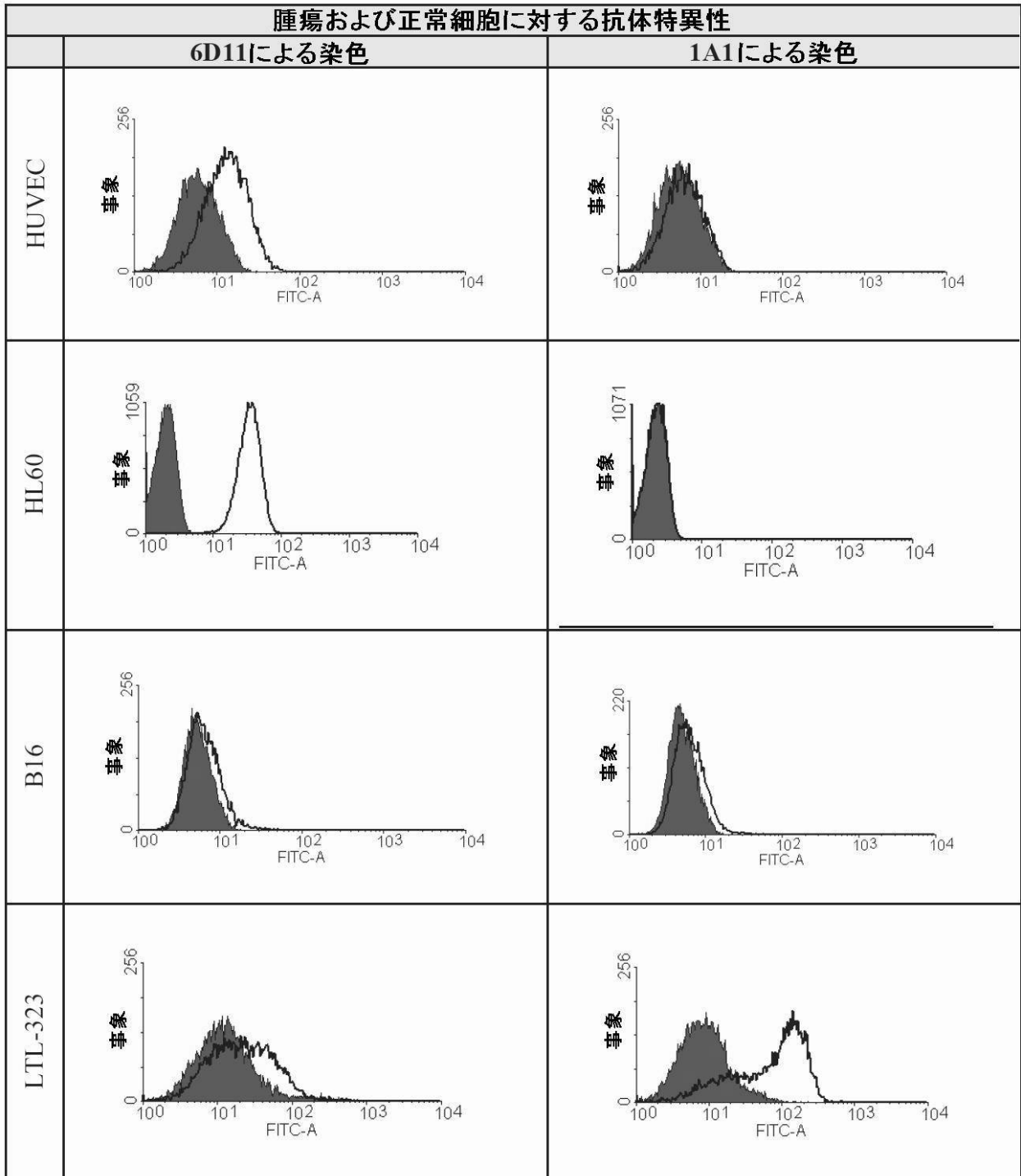


FIGURE 4A

【 図 4 B 】

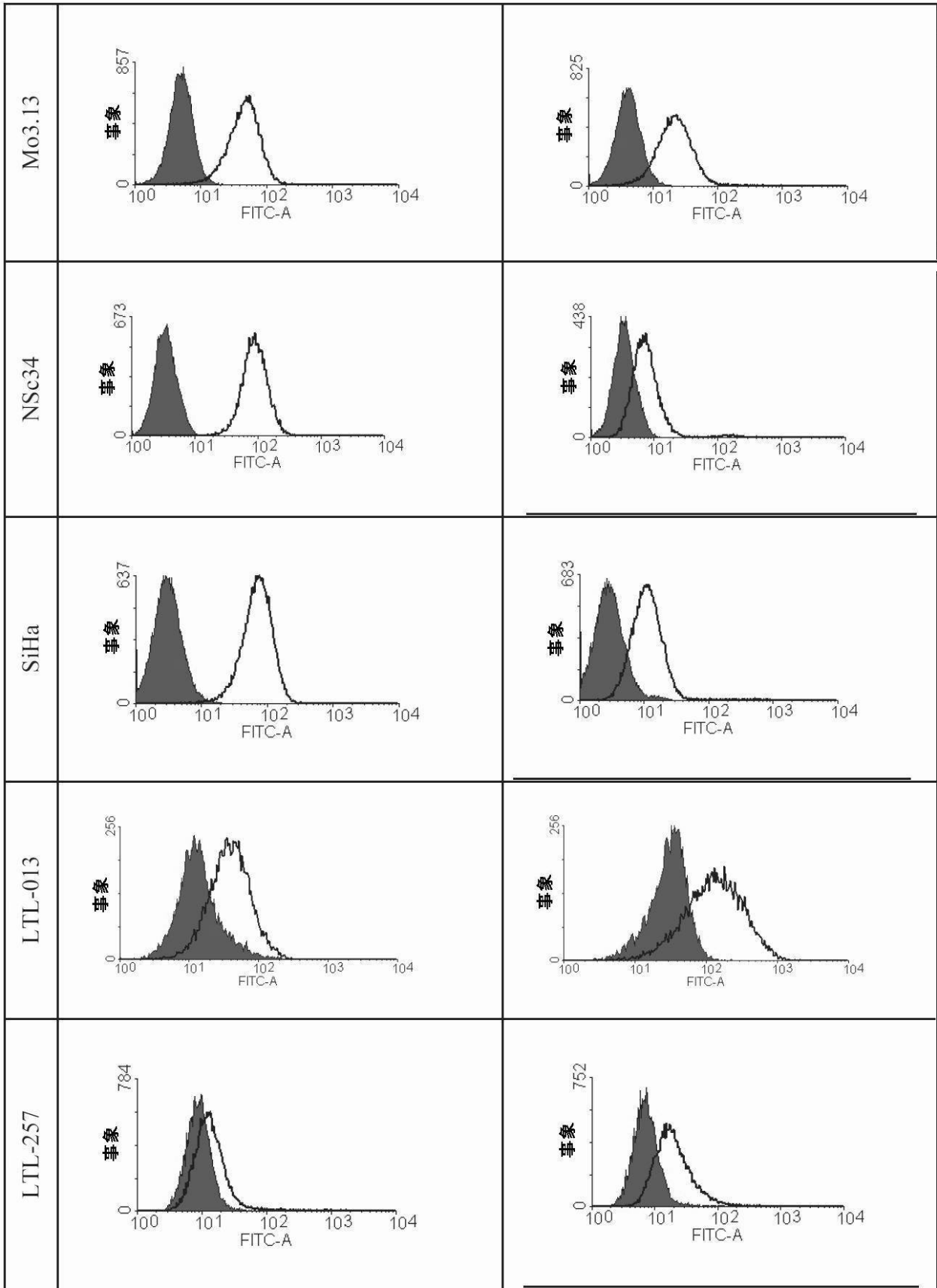


FIGURE 4B

【 図 5 】

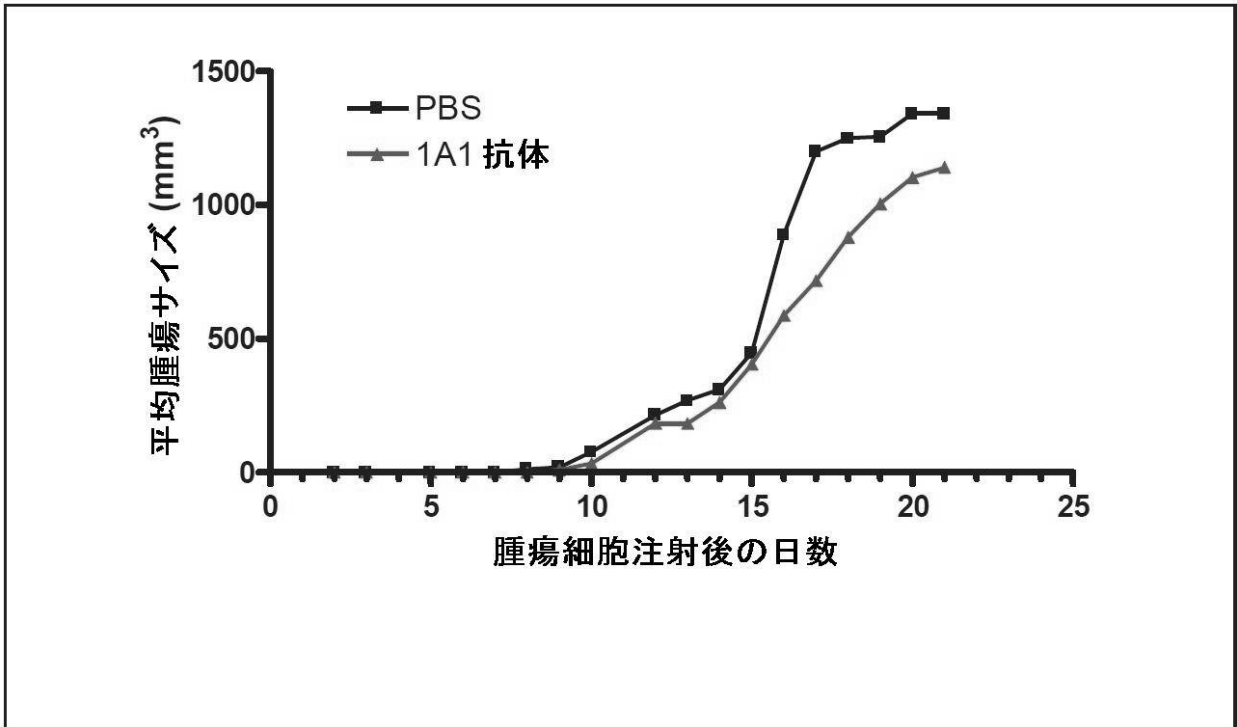


FIGURE 5

【 配 列 表 】

[2012519190000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CA2010/000303

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 14/47</i> (2006.01), <i>A61K 39/00</i> (2006.01), <i>A61K 39/385</i> (2006.01), <i>A61K 39/39</i> (2006.01), <i>A61P 25/28</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) 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) <i>C07K 14/47</i> , <i>A61K 39/00</i> , <i>A61K 39/385</i> , <i>A61K 39/39</i> , <i>A61P 25/28</i> , <i>A61P 35/00</i> , <i>A61P 37/04</i> , <i>C07K 16/18</i> , <i>C07K 7/06</i> , <i>C12N 5/16</i> , <i>C12P 21/08</i> , <i>G01N 33/53</i> , <i>G01N 33/68</i>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) GenomeQuest, PubMed, Canadian Patent Database, TotalPatent, Epoque. Search terms: prion, PrPSc, PrP Sc, PrP-Sc, PrP(Sc), PrP (Sc), antibody, epitope, immunogen, monoclonal, tumour, cancer, SEQ ID NO: 7-14.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHOI, J.-K. et al. Generation of monoclonal antibody recognized by the GXXXG motif (glycine zipper) of prion protein. <i>Hybridoma</i> , October 2006, vol. 25, no. 5, pp. 271-7, ISSN: 1554-0014. *whole document*	1-3, 5, 7, 10, 13, 15, 16, 18, 20, 21, 24, 26, 27, 30, 31, 34-37, 39-41 22, 23, 28, 29
Y		
X	EP1213301A2 (KURANO, Y. et al.) 12 June 2002 (12-06-2002) *paragraph 0018; SEQ ID NO: 3*	1, 4, 10-12, 39
X	WO03/080665A2 (RAVEN, N.D.H. et al.) 2 October 2003 (02-10-2003) *whole document; SEQ ID NO: 5*	1, 2, 6, 7, 9, 10, 12-21, 24-27, 34-36, 39-41 22, 23, 28, 29
Y		
Y	WO2009/018625A1 (McEWAN, J.F. et al.) 12 February 2009 (12-02-2009) *summary of invention; examples 5, 7-10*	22, 23, 28, 29
P, Y	US2009/0175884A1 (CASHMAN, N.R.) 9 July 2009 (09-07-2009) *whole document*	22, 23
[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.		[ x ] See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12 May 2010 (12-05-2010)		Date of mailing of the international search report 02 June 2010 (02-06-2010)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer  <b>Sabrina Kim</b> 819-994-8822

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CA2010/000303**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
  - a. (means)
    - on paper
    - in electronic form
  - b. (time)
    - in the international application as filed
    - together with the international application in electronic form
    - subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments :

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/CA2010/000303**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

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

1.  Claim Nos. : 24-29  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :  
  
Claims 24-29 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the product defined in claims 24-29.
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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim 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 claim Nos. :

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CA2010/000303

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO97/37227A1 (SCHREUDER, B.E. et al.) 9 October 1997 (09-10-1997)	1-41
A	WO93/11155A1 (FISHLEIGH, R.V. et al.) 10 June 1993 (10-06-1993)	1-41
A	PAN, T. et al. An aggregation-specific enzyme-linked immunosorbent assay: detection of conformational differences between recombinant PrP protein dimers and PrP <sup>Sc</sup> aggregates. <i>Journal of Virology</i> , October 2005, vol. 79, no. 19, pp. 12355-64, ISSN: 0022-538X.	1-41

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CA2010/000303

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
EP1213301A2	12-06-2002	AU785062B2	14-09-2006
		AU9713801A	11-07-2002
		BR0116007A	25-02-2004
		CA2364760A1	08-06-2002
		CN1479748A	03-03-2004
		EP1213301A3	19-06-2002
		KR20020046200A	20-06-2002
		NZ515982A	26-09-2003
		US2003148374A1	07-08-2003
		WO0246236A1	13-06-2002
WO03080665A2	02-10-2003	AU2003226513A1	08-10-2003
		CA2479576A1	02-10-2003
		EP1487875A2	22-12-2004
		GB0206584D0	01-05-2002
		GB0216098D0	21-08-2002
		JP2006501142T	12-01-2006
		US2005163776A1	28-07-2005
		WO03080665A3	08-01-2004
WO2009018625A1	12-02-2009	CA2694434A1	12-02-2009
		EP2175879A1	21-04-2010
US2009175884A1	09-07-2009	none	
WO9737227A1	09-10-1997	AT236407T	15-04-2003
		AU2180897A	22-10-1997
		AU713529B2	02-12-1999
		BR9708421A	03-08-1999
		CA2250800A1	09-10-1997
		CA2250800C	17-02-2004
		DE69720433D1	08-05-2003
		DE69720433T2	11-03-2004
		DE69720433T3	30-07-2009
		DK0891552T3	21-07-2003
		DK0891552T4	04-05-2009
		EP0891552A1	20-01-1999
		EP0891552B1	02-04-2003
		EP0891552B2	31-12-2008
		JP2000505559T	09-05-2000
		JP333213B2	15-10-2002
		NO984602D0	01-10-1998
		NO984602A	03-12-1998
		NO321571B1	06-06-2006
		NZ332132A	28-02-2000
US6972177B1	06-12-2005		
US2005048582A1	03-03-2005		
US7211401B2	01-05-2007		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CA2010/000303

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO9311155A1	10-06-1993	AT177754T	15-04-1999
		AU675053B2	23-01-1997
		AU3089292A	28-06-1993
		CA2124953A1	10-06-1993
		CA2124953C	05-02-2008
		DE69228701D1	22-04-1999
		DE69228701T2	29-07-1999
		DK616613T3	27-09-1999
		EP0616613A1	28-09-1994
		EP0616613B1	17-03-1999
		ES2128362T3	16-05-1999
		GB9125747D0	29-01-1992
		GB9214663D0	19-08-1992
		GR3029740T3	30-06-1999
		JP4233604B2	04-03-2009
		JP7501798T	23-02-1995
		NZ246059A	28-08-1995
		US5773572A	30-06-1998
		US6379905B1	30-04-2002
		US2003199013A1	23-10-2003
ZA9209392A	27-07-1993		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/CA2010/000303

*A61P 37/04* (2006.01), *C07K 16/18* (2006.01), *C07K 7/06* (2006.01), *C12N 5/16* (2006.01),  
*C12P 21/08* (2006.01), *G01N 33/53* (2006.01), *G01N 33/68* (2006.01)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 K	39/39	
G 0 1 N 33/577	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/577	B

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

(72) 発明者 キャッシュマン, ニール アール.

カナダ国 ブイ 6 エス 1 エム 8, プリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウェスト  
キング エドワード アベニュー 3 7 9 3

F ターム(参考) 4B064 AG26 AG27 CA19 CA20 CC24 DA01  
4B065 AA90X AA90Y AB02 AC14 BA08 CA24 CA25 CA44 CA45  
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 BA01 BA08 BA16 BA17 DA39 MA16  
MA52 MA55 MA56 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA012  
ZB262  
4C085 AA03 AA08 AA13 AA14 AA19 AA38 BB07 BB31 BB33 BB34  
BB35 BB36 BB37 BB41 BB43 CC02 CC22 CC23 DD21 DD86  
EE01 EE06 FF02 FF17 FF18 FF21 FF24 GG01 GG02 GG03  
GG06 GG08 GG10  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA12 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012519190A5</a>	公开(公告)日	2013-04-18
申请号	JP2011552289	申请日	2010-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	英属哥伦比亚大学		
申请(专利权)人(译)	盐湖城不列颠哥伦比亚		
[标]发明人	キャッシュマンニールアール		
发明人	キャッシュマン, ニール アール.		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 C07K5/087 C12N5/10 A61K39/395 A61P25/00 A61P35/00 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/55566 A61K2039/6081 A61P25/00 A61P25/20 A61P25/28 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/2872 C07K16/30 C07K16/3053 C07K2317/34 C07K2317/73 C12N2799/026 G01N33/6896 G01N2800/2828		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 C07K5/087 C12N5/00.102 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/00 A61P35/00 A61K37/02 A61K39/00.H A61K39/39 G01N33/53.D G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA16 4C084/BA17 4C084/DA39 4C084/MA16 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/AA08 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/AA38 4C085/BB07 4C085/BB31 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD21 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/FF17 4C085/FF18 4C085/FF21 4C085/FF24 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA12 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/156807 2009-03-02 US PCT/CA2009/001413 2009-10-06 WO		
其他公开文献	JP2012519190A		

#### 摘要(译)

本发明涉及对错误折叠的朊病毒蛋白 ( PrP , 例如PrPSc ) 特异的抗体和免疫原性肽及其用途。免疫原性肽包含氨基酸序列酪氨酸 - 蛋氨酸 - 亮氨酸 ( YML ) 。抗体或肽可用于治疗或预防与错误折叠的PrP相关的疾病或病症, 包括癌症。特别地, 使用由序列GGYMLGS ( 即SEQ ID NO 8 ) 组成的肽产生命名为“1A1”的IgM单克隆抗体, 其对应于人PrP 1A1的残基126-132识别错误折叠的PrP, 但不识别正常的PrP。

