

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6412871号
(P6412871)

(45) 発行日 平成30年10月24日 (2018.10.24)

(24) 登録日 平成30年10月5日 (2018.10.5)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/28 (2006.01)
G O 1 N 33/53 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 P 31/00 (2006.01)
A 6 1 P 37/06 (2006.01)

C O 7 K 16/28 Z N A
 G O 1 N 33/53 V
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 37/06

請求項の数 12 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-536167 (P2015-536167)
 (86) (22) 出願日 平成25年10月11日 (2013.10.11)
 (65) 公表番号 特表2015-535217 (P2015-535217A)
 (43) 公表日 平成27年12月10日 (2015.12.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/071367
 (87) 国際公開番号 W02014/057129
 (87) 国際公開日 平成26年4月17日 (2014.4.17)
 審査請求日 平成28年9月23日 (2016.9.23)
 (31) 優先権主張番号 12188179.1
 (32) 優先日 平成24年10月11日 (2012.10.11)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 509237767
 ナショナル ユニバーシティー オブ ア
 イルランド, ゴールウェイ
 アイルランド国 ゴールウェイ, ユニバ
 ーシティー ロード
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直
 (74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遊離型およびタンパク質結合型の非ヒトGal-α-(1→3)-Galエпитープの検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Gal-α-(1→3)-Galエピトープに選択的に結合できる抗体であって、配列番号2、3または4を有する断片から選択される、抗体。

【請求項 2】

モノクローナル抗体またはs c F v断片である、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

配列番号2を有するs c F v断片である、請求項1に記載の抗体。

【請求項 4】

組織もしくは細胞中またはタンパク質上のGal-α-(1→3)-Galモチーフの存在の決定または定量的ためのアッセイキットであって、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗体を少なくとも1種含む、アッセイキット。

【請求項 5】

E L I S Aアッセイ、競合/阻害E L I S A、サンドイッチE L I S Aアッセイ、マイクロアレイに基づくアッセイ、官能化ナノ粒子アッセイ、量子ドット、蛍光タグおよび電気センサなどの他の迅速なアッセイプラットフォーム、免疫組織化学アッセイ、またはフローサイトメトリーアッセイにおいて使用される、請求項4に記載のアッセイキット。

【請求項 6】

ヒトの体外における組織もしくは細胞中またはタンパク質上のGal-α-(1→3)-Galモチーフの存在の決定または定量的の方法であって、請求項1～3のいずれかに記

10

20

載の抗体の前記組織、細胞またはタンパク質への結合の程度を決定することを含む方法。

【請求項 7】

薬学的に許容される担体または賦形剤と共に請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 8】

G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l モチーフの相互作用を介して起こる感染症および病状の治療に使用するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗体の使用。

【請求項 9】

疾患検出のためのおよびアナフィラキシーのモニタリングアッセイとしての、ヒト血清中を循環している G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l 特異的抗体の競合形式での決定における、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗体の使用であって、但しヒトの体内における使用は除外される、使用。

10

【請求項 10】

免疫染色および可視化のための G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l モチーフ染色および検出剤としての、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗体の使用であって、但しヒトの体内における使用は除外される、使用。

【請求項 11】

天然および組換え生物調製物の両方から G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l モチーフ含有分子を精製および単離するための親和性試薬としての、病害防除のために G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l モチーフ含有生物を精製および単離するための親和性試薬としての、または哺乳類細胞系からの治療用糖タンパク質生産物の生産中に G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l モチーフの評価および監視のための場所で試験するための親和性試薬としての、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗体の使用であって、但しヒトの体内における使用は除外される、使用。

20

【請求項 12】

タンパク質に結合している、または天然に放出されたもしくは酵素処理によって糖タンパク質から特異的に放出された遊離形態にある、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l モチーフ含有グリカンの検出のためのアッセイにおける、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗体の使用であって、但しヒトの体内における使用は除外される、使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l エピトープに選択的に結合可能な抗体断片を提供することに関する。このエピトープは、ヒトへの移植用のブタ組織上でしばしば見出される。本発明はさらに、起こり得る拒絶合併症について移植組織を試験するのに用いるためのこれらの抗体断片を含むアッセイシステムに関する。エピトープはまたバイオ医薬品およびいくつかの感染性病原体上でも見出され、したがって、本発明はこれらのアプリケーションのためのアッセイ系も提供する。

40

【背景技術】

【0002】

非ヒト G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l エピトープの免疫学的重要性は、最初はブタの臓器異種移植片の超急性拒絶 (H A R) におけるその直接的な関与によって強調された。異種移植はヒトのドナー臓器の決定的な不足を克服する直接的手段と広く考えられており、特に、ブタ臓器を用いる方法が最も適しているとみなされている。しかし、ブタ組織は高い割合の G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l エピトープを発現し、ヒトへのブタ異種移植片の移植後に活発な抗 G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l 抗体反応を誘発する。このエピトープに対する望ましくない免疫反応はまた、細胞組織マトリックスの移植後の準最適な臨床転帰に関与すると考えられている。G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l エピトープに対す

50

る天然に存在するヒト抗体はヒトで広く見出されており、ヒト血清中で免疫グロブリン (I g) (主に I g G 2 サブクラス) の最高 3 % までを占める。環境刺激、共生細菌および / または寄生虫相互作用によってそれらの抗体が誘導されると考えられており、それらが天然のバリア機能を発揮すると推定される。H A R への関与だけでなく、この抗原性グリカン部分の存在は、組換えモノクローナル抗体製剤のエルピタックス (セツキシマブ) を服用している患者で観察される I g E 媒介性アレルギー / 過敏性反応にも関与すると考えられている。アナフィラキシーを誘発するのに必要な G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l エピトープのレベルは決定されておらず、生産物特異的かつ患者依存性であり得る。

【 0 0 0 3 】

近年のバイオシミラー生産プラントの増加によって証明されるように、組換え抗体および関連するバイオ医薬品の生産は、現在、十分に確立されかつ日常的に行われる工業プロセスと見なされている。グリコシル化の制御は、タンパク質機能、アレルギー性および免疫原性の特性、血漿クリアランス率および有効性へのその計り知れない影響のため、組換え治療薬生産中の重要な要因である。現在、特定のグリカン構造がこれらの組換え生産物の安全性に悪影響を与えることが認められている。生産に利用される哺乳類細胞株の、最も一般的なマウス由来の細胞株 S P 2 / 0 および N S 0 またはチャイニーズハムスター卵巣細胞 (C H O) は、「ヒト様」のグリコシル化が起きるのを可能にする。しかし、これらの細胞株のシステムは、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l および N - グリコリルノイラミン酸 (N e u 5 G c) 部分を含む非ヒトグリカン構造を標的タンパク質に組み込む分子機構を有し、ヒトの中でそれらを免疫原性にさせる。G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l 部分 20
を有する糖タンパク質を合成する生合成機構の欠如を詳しく述べている以前に受け入れられた報告に反して、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l グリカンを合成する C H O システムの能力についてごく最近報告された。B o s q u e s らは、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l 部分を合成する C H O 細胞の能力および C H O 作製抗体融合タンパク質である市販の治療用タンパク質アバタセプト (オレンシア) 上におけるその部分の存在の両方を立証した。しかし、C H O システムで生産されるタンパク質上で検出される G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l のレベルは、マウス細胞株由来の生産物上で一般的に観察されるものよりも低かった (B o s q u e s ら、2 0 1 0) 。現在市販されている組換えタンパク質上の G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l の同定と共に、ヒトに使用するための既存のおよび将来の組換え治療薬上の G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l のレベルを監視ならびに定量するための簡便で迅速な分析的アプローチが必要とされている。 30

【 0 0 0 4 】

さらに、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l エピトープ / 天然ヒト抗体システムを利用して自家ワクチンの効力を改善する可能性が最近注目されつつあり、このシステムもまた簡便なアッセイツールを必要とする。

【 0 0 0 5 】

質量分析 (M S) と一体になった高速液体クロマトグラフィー (H P L C) およびエンドグリコシダーゼ消化の組み合わせは、N - グリカンの同定および測定のための十分な分解能ならびに感度を提供する。さらに、レーザー誘起蛍光検出 (C E - L I F) を有するキャピラリー電気泳動も、そのスループットおよび高分解能の分離能力のために、蛍光標 40
識された N - グリカンのプロファイリングに使用されてきた。8 - アミノピレン - 1 , 3 , 6 - トリスルホネート (A P T S) での蛍光標識後の C E - L I F による多数の糖タンパク質および組換え m A b の N - グリカンの構造解析も報告されている。これらの方法の問題点は、それらが厄介で、実行するのに時間がかかり、かつ専門設備および機器の専門知識を必要とすることである。

【 0 0 0 6 】

トリパノソーマ・クルージ、シャーガス病の病原体、アメリカのリーシュマニア属、真菌植物病原体であるコレトリカム属およびナイセリア髄膜炎菌などのいくつかの病原性生物も、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l エピトープを発現する。したがって、抗 G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l 抗体またはその断片は、これらの疾患の診断またはそれらの治 50

療のいずれかで使用できる。このエピトープは、赤肉に見られるオリゴ糖に対するアナフィラキシー反応にも関与しており、したがって、本発明の抗体は、そのような反応の予防または予測に使用できる。

【 0 0 0 7 】

高親和性および特異的な結合剤が検体に対して利用可能になると、特異的結合アッセイは、堅牢な分析プラットフォームを提供する。高品質の抗体の利用可能性が限られていることから、抗体にあまり依存せず、レクチンは炭水化物に最も広く使用される親和性試薬である。2種類のレクチンが、Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galモチーフの検出のために一般的に使用される。Griffonia simplicifolia イソレクチンB4 (GS-I-B4) は、末端のGal- α -1-R (アルファ-Galまたは α Galと呼ばれるアルファ-ガラクトシル残基) エピトープを検出するが、末端ガラクトースが炭水化物鎖の最後から2番目のガラクトースの異なる炭素原子に結合している構造体(例えば、Gal- α -1 $\rightarrow$ 2、Gal- α -1 $\rightarrow$ 3またはGal- α -1 $\rightarrow$ 4)を区別できない。GS-I-B4の結合は、多数のグリカン認識分子について報告されているように、Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galが細胞表面上または単離された糖タンパク質上にあるかどうかにも依存し得る。Marasmius oreades凝集素(Marasmius oreades agglutinin) (MOA) も、Gal- α -1-Rで終わる構造体と結合することが知られている。多数の抗Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal抗体について説明されているが、ヒヒで作製されたポリクローナル抗体およびM86マウスIgMモノクローナル抗体を含むほんの少数しか市販されておらず、それらの適用はこれまでのところ限られている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

炭水化物モチーフを標的にする高品質な抗体は、それらの免疫原性が低いため、それらの作製において重要な課題が残っている。しかし、ヒト血清および多くの動物の血清は、広範な天然の抗炭水化物抗体を含んでいる。未処理であろうと免疫負荷された宿主システムであろうと、免疫グロブリンcDNAから作製された改変一本鎖抗体断片(scfv)ライブラリーは、これらの抗体へのアクセスを提供することができる。ニワトリは、ヒトと同じく、Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galエピトープを生産しないので、このモチーフへの暴露に対する強い免疫反応を発症しない。ニワトリ抗体ライブラリーの作製は、鳥類における免疫グロブリン遺伝子多様化の特有のメカニズムにより、哺乳類種由来のライブラリーよりも単純であることが示されている。ニワトリは単一の機能的な免疫グロブリン重鎖可変領域(V_H) および軽鎖可変領域(V_L) 遺伝子を有しており、嚢におけるB細胞増殖の間に連続的に動作する高頻度遺伝子変換機構によって遺伝子に多様性が生じる。本明細書では、Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal標的化ファージディスプレイ-scfvライブラリーの作製およびこのエピトープに対するニワトリscfv抗体断片の単離について説明する。これらのscfvは、関連するネオ複合糖質(NGC)群に対し直接ELISA形式で試験した場合に、Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galモチーフの検出に非常に特異的であることが示された。本発明の抗体断片は、Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galモチーフに対して高親和性および特異性を有することが実証され、このように公知の抗Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal抗体よりも効果的で、したがって、はるかに商業的に有用であることが証明された。本発明のscfvは競合ELISA形式でも使用され、それらが糖タンパク質の表面上に存在する場合に、自由溶液中でのGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galの濃度決定が可能になった。発明者の知る限り、これは、非ヒト炭水化物Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galモチーフに対する改変scfv群の最初の報告であり、最も重要なことには糖タンパク質上のこのモチーフの検出に便利な競合ELISAの最初の報告である。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

非ヒトGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal炭水化物エピトープは、多数の組換え治療用タンパク質上に存在することが近年報告されている。この抗原性炭水化物エピトープは、ヒトにおけるこのエピトープに対する自然抗体の存在により、ブタの臓器異種移植片の超急性拒絶反応の主な要因であることが知られている。組換え糖タンパク質上のエピトープの数は組織全体と直接比較すると少ないかもしれないが、循環している抗Gal- α -R免疫グロブリンの免疫反応は、依然としてアナフィラキシーを誘発できる。したがって、バイオ医薬品中の、および組換え哺乳類システムで生産される組換え治療薬中のこのエピトープのレベルの検出、監視ならびに定量のための抗体断片を提供することが本発明の目的である。特定の目的は、Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galエピトープに対して高い親和性を有する抗体断片を提供することである。さらなる目的は、組換えタンパク質上または移植予定の組織中のGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galエピトープの検出および測定のためのアッセイシステムを提供することである。このようなアッセイシステムは、迅速で、かつ実行するのに好都合であるべきである。さらなる目的は、ポイントオブケアアッセイシステムを提供することである。さらなる目的は、自家ワクチンの有効性の改善を可能にするためのアッセイツールを提供することである。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、可変軽鎖配列および可変重鎖配列を有する抗体が提供され、可変軽鎖配列は配列：

(1) SGG - x^1 - x^2 - x^3 - x^4 - x^5 - x^6 - x^7 - Y

(式中、 x^1 はNもしくはGであるかまたは存在せず； x^2 はSであるかまたは存在せず； x^3 はYであるかまたは存在せず； x^4 はGGであるかまたは存在せず； x^5 はSであるかまたは存在せず； x^6 はYもしくはGであるかまたは存在せず、かつ x^7 はNまたはYである)

(2) SN - x^8 - x^9 - RPS

(式中、 x^8 はNまたはDであり、かつ x^9 はKmNまたはQである)、または

(3) G - x^{10} - YD - x^{11} - x^{12} - x^{13} - x^{14} - Y - x^{15} - GV

(式中、 x^{10} はA、TまたはSであり； x^{11} はSまたはNであり； x^{12} はSであるかまたは存在せず、 x^{13} はNであるかまたは存在せず、 x^{14} はTまたはSであり、かつ x^{15} はVまたはAである)、または

(4) 配列(1)～(3)のうちのいずれかと少なくとも80%の相同性を有する配列のうちの少なくとも2つを含み、

可変重鎖配列は配列：

(5) GFTFS S Y S M Q

(6) x^{16} - SD - x^{17} - Y T Y F G P A V K G

(式中、 x^{16} はYまたはNであり、かつ x^{17} はSまたはRである)

(7) S - x^{18} - D - x^{19} - G C T H P W C S A D N I - x^{20} - A

(式中、 x^{18} はAまたはGであり、 x^{19} T I YまたはS G Nであり、 x^{20} はDまたはNである)、または

(8) 配列(5)～(7)のうちのいずれかと少なくとも80%の相同性を有する配列のうちの少なくとも2つを含む。

【0011】

本抗体は、配列(1)～(3)もしくは(5)～(7)またはこれらの配列のいずれかと少なくとも80%の相同性を有する配列の全てを含んでもよい。

【0012】

本抗体は、以下の式のリンカー配列：

(9) G O S S R S S - x^{21} - G G G S S G G G S

(式中、 x^{21} はSであるかまたは存在しない)、

または配列(7)と少なくとも80%の相同性を有する配列をさらに含んでもよい。

【 0 0 1 3 】

s c F V 抗体断片は、以下の一般配列を有してもよい：

Q A A L T Q P S S V S T N P G G T V K I T C S G [S / -] [Y / -] [G / -] [G / -] [S / -] [G / Y] [N / H / Y] Y G W Y Q Q K S P G S A P V T V I Y S N [N / D] [K / Q / N] R P S [D / G] I P S R F S G S [T / K] S [G / D] S T [A / G / S] T L T I T G V Q V D D E A V Y [F / Y] C G [A / S / T] Y D [N / S] [S / -] [N / -] [T / S] Y [V / A] G [V / I] F G A G T [T / A] L T V L G Q S S R S S [S / -] G G G S S G G G G S A V T L D E S G G L Q T P G G [G / A] L S L V C K A S G F T F S S Y S M Q W V R Q [T / A] P G K G L E F V A G I G [Y / N] S D [S / R] Y T Y F G P A V K G R A T I S R D N G Q [N / S] T V R L Q L N N L R A E D T A T Y [Y / F] C A R S [A / G] D [T / S] [I / G] [Y / N] G C T H P W C S A D N I [D / N] A W G H G T E V I V S S T S G Q A G Q

式中、[] は可変アミノ酸を示し、- はアミノ酸の欠失を示す。したがって、[] が示される場合には、アミノ酸は括弧内に記載されたもののいずれかであってよく、ダッシュが示される場合には、アミノ酸が欠失していてもよい。

【 0 0 1 4 】

アミノ酸は以下のように省略される：

略語	1 文字略語	アミノ酸名	
A l a	A	アラニン	20
A r g	R	アルギニン	
A s n	N	アスパラギン	
A s p	D	アスパラギン酸（アスパラギン酸塩）	
C y s	C	システイン	
G l n	Q	グルタミン	
G l u	E	グルタミン酸（グルタミン酸塩）	
G l y	G	グリシン	
H i s	H	ヒスチジン	
I l e	I	イソロイシン	
L e u	L	ロイシン	30
L y s	K	リジン	
M e t	M	メチオニン	
P h e	F	フェニルアラニン	
P r o	P	プロリン	
S e r	S	セリン	
T h r	T	スレオニン	
T r p	W	トリプトファン	
T y r	Y	チロシン	
V a l	V	バリン	
A s x	B	アスパラギン酸またはアスパラギン	40
G l x	Z	グルタミンまたはグルタミン酸	

【 0 0 1 5 】

本抗体は、モノクローナル抗体、s c F v 断片または F a b 断片であり得る。s c F v 抗体断片は、本明細書で定義される配列番号 2、3 または 4 のいずれか 1 つの配列を有していてもよい。特に好ましいのは配列番号 2 である。

【 0 0 1 6 】

2 以上のポリペプチド配列の文脈において、「相同性」またはパーセント「同一性」という用語は、コンピュータプログラムもしくは手動アラインメントおよび目視検査によって測定されるように、比較ウィンドウまたは特定領域にわたって最大一致のために比較ならびに整列させた場合に、同じであるかまたは指定領域にわたって同じである特定の割合

10

30

40

50

のアミノ酸残基（すなわち、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれより高い同一性）を有する2以上の配列または部分配列を指す。このような配列は、その後、「実質的に同一」または「実質的に相同」とであると言われる。定義には、欠失および/または付加を有する配列、ならびに置換を有するものも含まれる。好ましいアルゴリズムは、ギャップなどを明らかにできる。好ましくは、同一性は長さが少なくとも約5個のアミノ酸である領域にわたって、またはより好ましくは長さが10～15個のアミノ酸である領域にわたって存在する。

【0017】

配列比較では、典型的には1つの配列が、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを用いる場合には、試験配列および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じてサブ配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。好ましくは、デフォルトプログラムパラメータを使用できるか、または別のパラメータを指定できる。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列のパーセント配列相同性を算出する。本発明は、上記で定義した少なくとも1つの抗体を含む、組織もしくは細胞中またはタンパク質上のGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galモチーフの存在の決定または定量のためのアッセイキットも提供する。アッセイは、ELISAアッセイ、競合もしくは阻害ELISA、サンドイッチELISAアッセイ、マイクロアレイに基づくアッセイ、官能化ナノ粒子アッセイ(functionalised DNA nanoparticle assay)、Qドット(QDot)、F1タグおよび電気センサなどの他の迅速なアッセイプラットフォーム、免疫組織化学アッセイ、またはフローサイトメトリー分析を含むがこれらに限定されない免疫アッセイの任意の形態であってよい。本発明の抗体は、表面がアレイ、ナノ粒子もしくは膜上に提示されるアッセイフォーマット、および/または懸濁液の形態で提示されるアッセイフォーマットで用いることができる。本発明の抗体は、特定の糖タンパク質の検出のためのサンドイッチELISA法において他の抗体と組み合わせて使用することもできる。本抗体は、マイクロアレイ上の印刷成分として機能できる。

【0018】

別の態様において、本発明は、上記で定義したような組織、細胞またはタンパク質に対する抗体または抗体断片の結合の程度を決定することを含む、組織もしくは細胞中またはタンパク質上のGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galモチーフの存在を決定する方法またはその量を定量化する方法を提供する。

【0019】

本発明の抗体はGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galモチーフの相互作用を介して生じる感染症および病状に対する治療薬としても使用でき、ヒト血清中を循環しているGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal特異的抗体の競合形式での決定において、疾患検出のためおよびアナフィラキシーのモニタリングアッセイとして、免疫染色(IHC、IFC、FACSなど)および可視化のためのGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galモチーフ染色および検出剤として、天然および組換え生物調製物の両方からGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galモチーフ含有分子を精製および単離するための親和性試薬として、病害防除のためのGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galモチーフ含有生物を精製および単離するための親和性試薬として、哺乳類細胞系からの治療用糖タンパク質生産物の生産中にGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Galモチーフの評価および監視のための場所で試験するための親和性試薬としても使用できる。

【0020】

さらに別の態様において、本発明は、薬学的に許容される担体または賦形剤と共に、本明細書に定義される抗体断片を含む医薬組成物を提供する。

【0021】

本抗体は、タンパク質に結合している標的グリカンの検出、およびまた自然に放出されるかまたは酵素処理によって糖タンパク質から特異的に放出された遊離形態の標的グリカ

10

20

30

40

50

ンの検出のためのアッセイにも適する。

【 0 0 2 2 】

本抗体は、例えば、少量の分子のみが標的モチーフを保有すると予想される生物医薬品生成において、グリコフォームの混合物から標的モチーフを保有する糖タンパク質を除去することにも使用できる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 3 】

【図 1】(A) 直接 E L I S A (血清希釈 1 : 2 0 , 0 0 0) によって決定した時の、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - B S A による免疫化に対するニワトリ血清反応。(B) (i) s c F v コード断片の挿入および (i i) 制限消化によって調べた無作為選択クローン間でのこの s c F v 断片内の多様性を示す写真である。(C) バイオパニングラウンド 2 で産出されたファージ粒子の G a l - α - (1 , 3) - G a l - B S A への結合を示すグラフである。

10

【図 2】G a l - α - (1 , 3) - G a l - B S A に対する直接 E L I S A における 9 6 個の個々の s c F v ファージ粒子の評価。この集団からさらなる分析のために選択された 6 つの s c F v を青で示す。

【図 3】アミノ酸変異を示す、3 種類の配列決定 s c F v クローンからの V L および V H 領域の C D R アラインメントの概略図。(A) 融合 s c F v の一般的概略図および (B) s c F v C D R のアラインメント。

【図 4】(A) 細菌培地からの可溶性 s c F v の I M A C 精製。2 8 0 n m での吸光度 m A U (青)、流速 (m L / 分、黒)、および勾配の傾き (緑) を示す、勾配溶出を用いた F P L C 出力画像である。(B) アフィニティー精製 s c F v 画分の 4 ~ 1 2 % B i s - T r i s N u P a g e ゲルでのクマシー染色を用いた S D S - P A G E。

20

【図 5】直接 E L I S A での 3 種類の抗 G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l s c F v の特異性プロファイル。以下のようにウェルをコーティングした：1 . G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - B S A ; 2 . G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - β - (1 $\rightarrow$ 4) - G l c N A c - H S A ; 3 . G a l - α - 1 - O - スペーサー - I T C - B S A ; 4 . G a l - β - 1 - O - スペーサー - I T C - B S A ; 5 . G a l - α - (1 $\rightarrow$ 2) - G a l - B S A ; 6 . G a l - β - (1 $\rightarrow$ 4) - G a l - B S A ; 7 . β - x y l - 4 A P - B S A ; 8 . F u c - α - 4 A P - B S A ; 9 . F u c - β - 4 A P - B S A ; 1 0 . N e u 5 A c - 4 A P - B S A ; 1 1 . G l c N A c - B S A ; 1 2 . L A C - β - 4 A P - B S A ; 1 3 . L a c N A c - B S A ; 1 4 . H S A ; 1 5 . B S A および 1 6 . B S A - 4 A P 。エラーバーは、3 回の測定の平均値の標準誤差を示す。

30

【図 6】s c F v クローン G 1 2、A 4、および A 1 1 によって与えられる競合 E L I S A の標準曲線。プレートを固定化 G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - B S A [1 0 μ g / m l] でコーティングし、濃度を増加させた遊離 G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l の存在下で 2 . 5 μ g / m l の s c F v とインキュベートした。エラーバーは、3 回の測定の平均値の標準誤差を示す。

【図 7】9 回の独立した実行からの s c F v - A 4 によって与えられる複合標準曲線。

【図 8】 α - G a l 残基に対し高度に特異的であると考えられるレクチン G S - 1 - B 4 の特異的結合パターンと直接比較した、選択された s c F v 断片 A 4、A 1 1 および G 1 2 の関連 N G C 群に対する特異性の比較。

40

【図 9】可溶性タンパク質として発現されエピトープの認識のために提示される、選択された s c F v 断片 A 4、A 1 1 および G 1 2 の融合軽鎖および重鎖アミノ酸配列のアラインメント。

【図 1 0】相補性決定領域を示す一般的な抗体配列。

【図 1 1】2 0 、p H 7 . 2 の N a P i (1 0 m M) - N a C l (1 5 0 m M) 中での、4 m M のメリピオース (赤) および G a l α (1 , 3) G a l β 1 - O m e (緑) の存在下ならびに非存在下 (黒) で、s c F v G 1 2 (A)、A 4 (B) および A 1 1 (C) について記録された残基あたりのモル楕円率として表される近紫外 C D スペクトル。試

50

料は限外濾過によって調製した。

【図12】20、pH7.2のNaPi(10mM) - NaCl(150mM)中でのscFvの、残基あたりのモル構円率として表される遠紫外CDスペクトル。

【図13】pH7.2のNaPi(10mM) - NaCl(150mM)中での、4mMのGal α (1,3)Gal β 1-OMeの存在下および非存在下におけるscFv G12(A)、A4(B)およびA11(C)の、残基あたりのモル構円率として表される遠紫外CDスペクトル。20での純粋なscFv(黒)、90での純粋なscFv(赤)、20での糖を有するscFv(緑)、90での糖を有するscFv(青)。G12およびA11の試料は限外濾過によって、およびA4の試料は透析によって調製した。

10

【図14】scFv G12(A)、A4(B)およびA11(C)の変性プロファイル。連続線は、テキストに記載されている式を用いる、実験データへのシグモイド関数のフィッティングに対応している。純粋なscFv(黒)、scFv + Gal α (1,3)Gal β 1-OMe(赤)およびscFv + メリビオース(緑)。

【図15】相対発光を示すscFvおよびネオ糖タンパク質のCL-ELISAデータ。

【図16】図15の生データ。

【発明を実施するための形態】

【0024】

材料および方法

ニワトリの免疫化

20

ヒト α -酸性糖タンパク質、ブタのラクトフェリン、ミツバチのホスホリパーゼA2、Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal-BSAおよびCHO細胞培地から採取された可溶性糖タンパク質画分で構成されるプールされた複合糖質調製物を等しい割合で混合した。成体雄レグホンニワトリに、21日間隔で、総体積400 μ lの複合糖質調製物50 μ gを皮下免疫した。最初の用量はフロイント完全アジュバントを用いて調製し、その後の3回の用量は、不完全フロイントアジュバントを用いて投与した。血清抗Gal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal反応を、直接酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)分析により第3の接種後7日目に評価した(図1a)。簡単に述べると、96ウェルイムノアッセイプレート(Maxisorp社; Nunc社)を、10 μ g/mlのGal- α -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal-GlcNAc-HSAを100 μ l/ウェルで、4で一晩コーティングした。次いで、ウェルを0.5%BSA-PBS(PBS-B)を用いて37で1時間ブロッキングした。血清試料を、0.1% Tween 20(PBS-BT)を含有するPBS-Bで連続希釈し、100 μ l/ウェルでプレートに添加した。次いで、プレートを37で1時間インキュベートし、PBS-0.1% Tween 20(PBS-T)で10回洗浄し、PBS-BT中の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)-結合抗ニワトリIgG抗体(Pierce社)を用いて37で1時間プローブした。PBS-Tで洗浄後、ウェルを、100 μ l/ウェルのHRP基質テトラメチルベンジジン(DAKO社)を用いて発色させ、反応を100 μ l/ウェルの1M H₂SO₄で停止させた。全ての分析を3つ組で行った。

30

【0025】

40

ニワトリのscFvライブラリー作製

ライブラリー作製およびファージディスプレイは、Andris-Widhopfらによって記載されているプロトコル(Andris-Widhopfら、2000)を用いて行った。簡単に説明すると、いずれも製造業者のプロトコルに従って、全RNAを各ニワトリの脾臓および1つの大腿骨の骨髓から単離し(トリゾール試薬、Invitrogen社)、一本鎖cDNAを合成した(スーパースクリプトII、Invitrogen社)。scFvライブラリーは2ステップアプローチを用いて作製し、重鎖および軽鎖を最初に増幅し、その後オーバーラップ伸長PCRを行い、ライゲーションによりscFv cDNA産物をpComb3ファージミッド系に導入し(Andris-Widhopfら、2000)、続いてエレクトロコンピテント大腸菌XL1-Blue細胞[F'pr

50

o A B l a c I q Z Δ M 1 5 T n 1 0 (T e t r)] (S t r a t a g e n e 社) に導入した。全ての増幅オリゴヌクレオチドは、A n d r i s - W i d h o p f らによって記載されたとおりであった。全ライブラリーサイズは、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のカルベニシリン (S i g m a 社) を含むルリア - ペルターニ (L B) 寒天上での抗生物質耐性プレート計数により推定した。s c F v 挿入をコロニーPCRによって検証し、ライブラリー配列の多様性をPCR産物 (P r o m e g a 社) のエンドヌクレアーゼ B s t N I 消化を用いて評価してアガロースゲル電気泳動により可視化した (図 1 b) 。完成したライブラリー調製物を X L 1 - B l u e 細胞中で増殖させ、グリセロールストックとして保存した。

【 0 0 2 6 】

s c F v 提示ファージのレスキュー

10

s c F v 提示ファージをレスキューするために、2 % グルコース、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンおよび $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のテトラサイクリンを補足した50mlのスーパーブロス (S B) に、グリセロールストックライブラリーから約 2×10^9 細胞を接種した。次いで、培養物をOD₆₀₀が0.5に達するまで、回転させながら37℃でインキュベートした。この時点で、培養物にV C S M 1 3 ヘルパーファージ (S t r a t a g e n e 社) を 10^{12} コロニー形成単位で同時感染させ、S B で容量を200mlまで増加した。90分間のインキュベーション後、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを添加し、30℃で一晩のインキュベーションを行った。ファージ粒子をP E G / N a C l 沈殿により培養液から精製および濃縮して (A n d r i s - W i d h o p f ら、2000) 、1 % O V A P B S (P B S - O) に再懸濁した。

20

【 0 0 2 7 】

G a l - α - (1 → 3) - G a l - B S A に対する s c F v ファージライブラリーのバイオパニングによる選択

マキシソープイムノチューブ (M a x i s o r p i m m u n o t u b e) (N u n c 社) を用いて、G a l - α - (1 → 3) - G a l - B S A に対してバイオパニングを行った。簡単に説明すると、チューブを4℃で一晩、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のG a l - α - (1 → 3) - G a l - B S A (D e x t r a 社、英国) 1ml でコーティングし、次いでP B S - B でブロッキングした。次いでP B S - O に懸濁した $1 \times 10^{11} \sim 10^{12}$ 個のs c F v 提示ファージを添加して回転により室温で1時間混合した。P B S - T で繰り返し洗浄した後、P B S のみで洗浄した。結合したファージを、p H 2 . 2 の 100mM グリシン - H C l 1ml の10分間の添加により溶出した。溶出ファージを、p H 8 . 8 の 1M T r i s - H C l 500μl を用いて中和した。次いで溶出ファージの増殖およびさらなる操作を、以前に記載された (A n d r i s - W i d h o p f ら、2000) ように行った。洗浄ステップをパニング1での10回からパニング2および3での15回へと漸進的に増加させることにより選択ストリンジェンシーを増強させながら、3ラウンドのパニングを行った。

30

【 0 0 2 8 】

バイオパニングの各ラウンド後の s c F v - ファージ集団プールの E L I S A 分析

各ラウンドのパニングから溶出された s c F v ディスプレイファージ懸濁液を、直接 E L I S A 分析によって G a l - α - (1 → 3) - G a l 結合について評価した。イムノアッセイプレート (M a x i s o r p 社、N u n c 社) を上記のようにコーティングおよびブロッキングし、(P B S - B T 中の) ファージ s c F v 調製物の3倍希釈液をウェルに添加した。B S A および H S A を陰性参照として含めた。37℃で1時間インキュベーションした後、プレートをP B S - T で3回洗浄し、37℃で1時間、P B S - B T 中のH R P 結合抗M 1 3 抗体 (G E H e a l t h c a r e 社) でプローブした。蒸留水で十分に洗浄した後、上記のようにウェルを発色させた。

40

【 0 0 2 9 】

単一 s c F v ファージクローンおよび直接 E L I S A 分析

ラウンド2および3からの産出プレートから96個のランダムクローンを採取し、ディープウェルプレート中で、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のカルベニシリン存在下のスーパーブロス (

50

S B) 中、37、300rpmで6時間培養した。次いで培養物を2mMのIPTGで誘導して一晚増殖させた。細胞を4で15分間、2500gで遠心分離によりペレット化し、上清を除去して4で保存した。PBS 100μlに細胞ペレットを再懸濁して-80および37で凍結融解を2ラウンド行うことにより、ペリプラズムscFvを遊離させた。次いでプレートを上記のように再び遠心分離し、上清を除去してそれぞれの培養上清に添加した。次いで前述のように、PBS-BT中でHRP結合抗M13抗体(GE Healthcare社)を37で1時間用いて、Gal-α-(1→3)-Gal-BSAへの単一scFvファージの結合について直接ELISA分析を行った。蒸留水で十分に洗浄した後、先に詳述したように、これらのウェルを100μl/ウェルでHRP基質(DAKO社)とインキュベートし、反応を1M H₂SO₄で停止させた。

10

【0030】

安定な発現のための個々のscFvクローンの確立

観察されたGal-α-(1→3)-Gal-BSAへの結合に基づいて選択したコロニーを用いて、ファージミド精製を行った(NucleoBond、Macherey-Nagel社)。得られたプラスミド調製物で、大腸菌株TOP 10F'(Invitrogen社)をエレクトロポレーションにより形質転換した。各形質転換アリコートにLBカルベニシリン寒天上にプレーティングし、単一コロニーを得ることで、単一クローンのscFv特性の試験が可能になった。

【0031】

可溶性scFvの発現および精製

20

コロニーを、50μg/mlのカルベニシリンを含むSB 5ml中で一晚培養した(37、250rpmで振盪)。その後、各クローン培養物50μlをSB 50ml(50μg/mlのカルベニシリンおよび20mMのMgCl₂)に添加し、2mMのIPTGの添加によりscFv生産を誘導して一晚培養した。可溶性抗体を単離するために、細菌細胞を遠心分離によりペレット化し、20mMのフェニルメチルスルホニルフルオリドを含有する平衡緩衝液(50mMのNaH₂PO₄、300mMのNaCl、10mMのC₃H₄N₂、pH8.0)に再懸濁した。次いでペリプラズムscFvを超音波処理によって遊離させて細胞破片を遠心分離によって除去し、上清を0.22μmシリンジフィルターを通して濾過した。可溶性scFv抗体を、ニッケルキレートクロマトグラフィー(Ni-NTA Superflow、Qiagen社)により精製した。大規模生産では、培養容量をリットル規模に増加させ、HisTrap HP 1ml(GE Healthcare社)を用い、10カラム容量の洗浄と全ての溶出のために250mMのC₃H₄N₂までの直線勾配を用いるナイーブな条件下で、AKTA purifier FPLC(GE Healthcare社)を用いて精製を行った。精製試料をPBSに対し透析し、膜濾過(5kDaの濾過カラム; Vivascience社)で濃縮した。最終生産物のタンパク質濃度を、BCAアッセイ(Pierce社)により推定した。精製scFvを1mg/mlの濃度で4にて保存した。

30

【0032】

単一scFvクローンのDNA配列決定

プラスミドDNAを、可溶性scFvの発現および精製のために、上記のように細菌のペレットから単離した。複数の読取り配列決定反応を、完全なscFvインサート(Eurofins MWG Operon社)の両方の鎖について行った。CDRの多重配列アラインメント、翻訳および認識を、BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)、EBIのClustalW2(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/MSA/>)および<http://www.bioinf.org.uk/abs>で行われるCDRリポジトリを用いて行った。

40

【0033】

ELISAによる精製scFvの評価

分析前に、準飽和濃度のscFvを、10μg/mlのGal-α-(1→3)-Gal-BSAに対するscFvの濃度勾配を試験することにより決定した。4μg/mlの

50

濃度が最適であると決定され、さらなる試験全体に適用した。精製 s c F v の特異性の直接 E L I S A 分析を、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - B S A、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - β - (1 $\rightarrow$ 4) - G l c N A c - H S A、G a l - α - 1 - O - スペーサー - I T C、G a l - β - 1 - O - スペーサー - I T C、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 2) - G a l - B S A、G a l - β - (1 $\rightarrow$ 4) - G a l - B S A、 β - X y l - B S A、F u c - α - 4 A P - B S A、F u c - β - 4 A P - B S A、N e u 5 A c - 4 A P - B S A、G l c N A c - B S A、L a c - β - 4 A P - B S A、L a c N A c - B S Aを含む13のN G C 群ならびに2つの陰性対照；H S AおよびB S Aを用いて評価した。二次抗体としてH R Pコンジュゲート抗H A抗体(R o c h e 社)を37 で1時間P B S - B T 中で用いたことを除き、説明したようにE L I S Aを行った。蒸留水で十分に洗浄した後、ウェルを100 μ l / ウェルのH R P 基質(D A K O 社)とインキュベートし、反応を1 M H₂ S O₄ で停止させた。ビオチン化G S - I - B 4 レクチン(E y L a b o r a t o r i e s 社、カリフォルニア州サンマテオ、米国)および α - G a l エピトープ(G a l α 1 - 3 G a l β 1 - 4 G l c N A c - R)、m A b (M 8 6) (E n z o L i f e S c i e n c e s 社)をアッセイ評価のための対照参照として使用した。使用した二次抗体は、ストレプトアビジン結合H R P (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社)およびポリクローナルウサギ抗マウスI g H R P (P 0 2 6 0、D A K O 社)であった。

10

【0034】

G a l - α - (1 , 3) - G a l のためのs c F v ベースの競合E L I S Aの開発
各s c F v を、遊離G a l - α - (1 , 3) - G a l を標準物質として用いて競合E L I S A 形式で評価した。前述のように、マイクロタイタープレートのウェルをコーティングおよびブロッキングした。標準溶液を、P B S (p H 7 . 2) 中2 μ g / m l (5 . 8 4 μ M) ~ 2 0 m g / m l (5 8 . 4 m M) の濃度範囲で調製した。アッセイでは、各標準物質および緩衝液ブランク50 μ l を指定したウェルに3つ組で添加し、その後、準飽和濃度の適切なs c F v (1 μ g / m l) 50 μ l を添加して、アッセイ中の最終標準濃度を1 μ g / m l (2 . 9 2 μ M) ~ 1 0 m g / m l (2 9 . 2 m M) とした。プレートを振盪しながら37 で1時間インキュベートした。洗浄後、結合したs c F v を前述のように検出した。ブランクのO D に対する各標準物質のO D の比(B / B O) を標準濃度に対してプロットし、標準曲線をS i g m a P l o t (v 1 1、S y s t a t S o f t w a r e 社)を用いてプロットした。検出限界を、ゼロ標準の平均反応マイナス3回の標準偏差(S D) に対応する濃度として決定した。

20

30

【0035】

遊離糖の群によるs c F v の阻害

G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - B S A へのs c F v 結合を、以下の21種類の遊離型糖の群に対して決定した；D - セロピオース、メリピオース、D - ラフィノース、ラクチュロース、パラチノース、 β - ゲンチオピオース、D + トレハロース、D + ツラノース、L - フルクトース、D + グルコース、スクロース、ガラクト - N - ピオース、4 β - ガラクトピオース、G a l - (1 , 3) - G a l - β - (1 , 4) - G a l、G a l - α - (1 , 3) - G a l - β - (1 , 4) - g l c、G a l - α - (1 , 3) - G a l - β - (1 , 4) - G a l - α - (1 , 3) - G a l、ラミナリピオース、 β 1 - 4 - D - キシロピオース、N - アセチル - D - グルコサミン(G l c N A c)、ガラクトース、N - アセチル - D - ラクトサミン(L a c N A c)、(S i g m a A l d r i c h 社および英国のD e x t r a 社から供給される)。阻害は、全体を通して用いるG a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - B S A に対するE L I S A に先立ち、遊離糖を連続希釈し準飽和濃度のs c F v を各希釈物に添加して37 で60分間ブレインキュベートすることにより行った。使用した阻害濃度範囲を表1に提供する。s c F v の結合の割合を遊離G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - B S A 濃度に対してプロットし、50%有効量(E D₅₀；s c F v の50%置換を引き起こす遊離糖の用量)を決定した。

40

【0036】

50

結果

免疫反応およびライブラリー構築

G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - B S Aで免疫後の血清抗体反応の分析は、免疫した両方のニワトリでの標的グリカンモチーフに対する強い反応を示した(図1 a)。線状ファージ上に提示されるs c F vライブラリーを、各ニワトリの脾臓および骨髄から抽出したRNAを組み合わせて作製した(Andris - Widhopfら、2000)。コロナPCRにより、試験した全ての個々のクローンがフルサイズのインサートを有していることが明らかになり、増幅産物のB s t N 1制限マッピングによって配列多様性が確認された(図1 b)。各ライブラリーの初期サイズは、約 5×10^7 形質転換体と推定された。ライブラリーを組み合わせて、単一s c F vファージライブラリーとしてパニングした。

10

【0037】

抗G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l s c F vファージ粒子の単離

3ラウンドのバイオパニングを、同一条件下でG a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - B S Aに対して室温で行い、結合したファージを低pHで溶出した。第2ラウンドのパニング後に、G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - B S Aへの結合を示すファージディスプレイs c F vの濃縮集団の存在を、直接E L I S Aにより確認した(図1 c)。さらなる濃縮は、第3ラウンド後には観察されなかった。最小の交差反応性が、キャリアタンパク質のB S AまたはH S Aに対して観察された。第2および第3のパニングラウンドの産出ファージから、96個の個々のファージクローンをランダムに選択し、個別に培養して特異的結合活性について分析した。試験した96個のクローンのうちの74個は、バックグラウンドの3倍を超える固定化N G Cへの結合を示した(図2)。より高い結合クローン(A 4、A 1 1、D 9、F 1、G 1 2およびH 3)の6個を配列決定のために選択し、その後のアフィニティー精製のための可溶性s c F vの誘導発現および作製のために、それらをコードするファージミドでT O P 1 0細胞を形質転換した。

20

【0038】

単離クローンの配列分析

6個のs c F vのV_HおよびV_L領域のヌクレオチド配列解析は、生殖細胞系のニワトリV_HおよびV_L領域との高度なコンセンサスを示した。全てのクローンは、V_L相補性決定領域1(C D R 1)、C D R 2およびC D R 3領域においてかなりの相違を示したが、V_H領域での相違は少なかった。実際、V_H C D R 1は、全てのクローンにわたって保存されていた(図3)。配列データは、単離s c F vが未処理の抗体配列であるよりもむしろ、特にV_L領域に関して抗原駆動型反応で作製されたことを示唆している。クローンA 1 1 / D 9、F 1 / G 1 2、H 3およびA 4を示す4つの固有の配列を同定した(図3)。V_L C D R内において、以下のいくつかの位置で単一転移が生じた；(i)チロシン(Y)からヒスチジン(H)、チロシン(Y)からアスパラギン(N)、チロシン(Y)からリジン(K)に変化する4つのコドンが同定されたV_L C D R 1；(ii)アスパラギン(N)からグルタミン(Q)、アスパラギン(N)からリジン(K)への変換が生じているV_L C D R 2および(iii)スレオニン(T)からセリン(S)、スレオニン(T)からグリシン(G)、スレオニン(T)からアラニン(A)への変換が観察されたV_L C D R 3。対照的に、V_H領域にわたって多型部位はそれほど観察されず、A 1 1 / D 9、H 3およびA 4はC D R 1、C D R 2およびC D R 3にわたってコンセンサスを示した。F 1 / G 1 2は、C D R 3領域において他のクローンとは異なっていた。リンカー領域にわたって、A 1 1 / D 9のリンカー領域を短縮させる2つのセリン(S)欠失と共に、生殖細胞系配列からの2つの置換(セリン(S)からグルタミン(Q)およびグリシン(G)からセリン(S))が観察された。このようなリンカー領域の変化の観察は同様のライブラリー内で以前に報告されており、ライブラリーの効率に影響を与えない(F i n l a y ら、2006)。

30

40

【0039】

可溶性s c F vの発現および精製

50

A 4、A 1 1、G 1 2およびH 3によって示される4つの固有のs c F vクローン配列を、可溶性s c F vの発現および精製に進めた。3つ(A 4、A 1 1およびG 1 2)が細菌培養物内でうまく発現し、N i - N T Aアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製され、ゲル電気泳動により純度が確認された(図4)。精製s c F vの収量は約6.5 mg / L細菌培養地であった。全ての精製s c F vは、P B S中で最高6ヶ月間、4で安定性を示した。クローンの1つであるH 3は、未処理および変性条件下のいずれでも精製できなかった。

【0040】

直接E L I S Aによるs c F v特異性評価

精製したs c F vクローンA 4、A 1 1およびG 1 2の特異性を、様々なG a l - α - R関連のネオ複合糖質(N G C)に対する直接E L I S A形式で試験した。3種類の全てのs c F vはG a l - α - (1 → 3) - G a l - B S Aに特異的であり、G a l - α - (1 → 3) - G a l - B S Aと比較してG a l - α - (1 → 3) - G a l - β - (1 → 4) - G l c N A c - H S Aにわずかに高い強度で結合した(図5)。この違いは、おそらく部分的には、アルブミン1分子当たりのグリカンモチーフの異なるモル置換比(二糖および三糖のN G Cそれぞれについて16および23)によるものであり、違いは予想したほどは大きくなかったが、s c F vが三糖と比較してG a l - α - (1 → 3) - G a l二糖に対してわずかにより高い親和性を有することを示唆している。単糖(G a l - α - 1 - O - スペーサー - I T C)またはG a l - α - (1 → 2) - G a l - B S AおよびG a l - α - (1 → 4) - G a l - B S A構造へではなく、二糖および三糖のエピトープへ結合することは、α - (1 → 3)結合がこの結合のための必要条件であることを示している。G a l - α - (1 → 3) - G a lエピトープに対する同様の結合特異性は、C D R領域における配列多様性に関係なく、試験した全3種類のs c F vによって示された(図3)。直接E L I S Aで試験した他の構造(G a l - α - 1 - O - スペーサー - I T C - B S A、G a l - β - 1 - O - スペーサー - I T C - B S A、G a l - α - (1 → 2) - G a l - B S A、G a l - α - (1 → 4) - G a l - B S A、D - キシロース - β - B S A、F u c - α - 4 A P - B S A、F u c - β - 4 A P - B S A、N e u 5 A c - 4 A P - B S A、G l c N A c - B S A、L A C - β - 4 A P - B S A、L a c N A c - B S A)への結合またはキャリアタンパク質であるH S A、B S AおよびB S A - 4 A Pへの結合は観察されなかった。比較すると、レクチンG S - 1 - B 4は、以前の報告と一致して、二糖N G Cと比較して三糖N G Cに著しく高い結合を示し、かつ全てのG a l - α - 1 - R含有N G Cにも結合した(図5)。したがって、作製したs c F vは、G a l - α - (1 → 3) - G a lに対し、G S - 1 - B 4レクチンよりも高い特異性を示す。レクチンG S - 1 - B 4およびモノクローナルM 8 6と同様に、全てのs c F vは、直接E L I S Aにおいて天然の糖タンパク質のマウスラミニン上の標的モチーフを検出できた(データ示さず)。マウスラミニンは、G a l - α - (1 → 3) - G a lモチーフを提示することが知られている。

【0041】

s c F vの素晴らしい特異性は、50を超える異なる構造を含むN G Cマイクロアレイ分析によっても決定されている。図8に示すように、本発明の抗体断片A 4、G 1 2およびA 1 1は、先行技術のレクチンG S - 1 - B 4よりもG a l - α - (1 → 3) - G a lエピトープに対してはるかに高い特異性を有する。

【0042】

S c F vベースの競合E L I S A

0.001 ~ 10000 μ g / m l (2.93 n M ~ 29.3 m M)の濃度範囲の遊離G a l - α - (1 → 3) - G a l二糖を標準物質として用いて、試験した3種類のs c F vのそれぞれについて競合的E L I S Aを確立した。s c F v G 1 2およびA 4によって与えられる曲線は非常に類似しており、それぞれ158 μ g / m lおよび311 μ g / m l (0.46および0.91 m M)のE D₅₀値を有した(図6)。S c F v A 1 1については、より感度の低い標準曲線が得られた(E D₅₀ = 1225 μ g / m l、3.

58 mM ; 図 6)。同じ濃度範囲内ではレクチン G S - 1 - B 4 またはモノクローナル M 8 6 のいずれにおいても標準曲線は作成できなかった (データ示さず)。21 種類の関連糖の群を、s c F v ベースの競合アッセイにおいて試験した (表 1)。試験した糖のうち、G a l - α - (1 , 3) - G a l エピトープを有するもののみが検出可能なレベルで阻害を示した。全 3 種類の s c F v は、三糖のより低い阻害活性によって示されるように、G a l - α - (1 , 3) - G a l 含有三糖よりも二糖に対してより高い反応性を示し、直接 E L I S A で得られた結果を支持している。また、s c F v A 4 および A 1 1 は、三糖 (G a l - α - (1 , 3) - G a l - β - (1 , 4) - G a l または G a l - α - (1 , 3) - G a l - β - (1 , 4) - G l c) と比較して、遊離の四糖 (G a l - α - (1 , 3) - G a l - β - (1 , 4) - G a l - α - (1 , 3) - G a l) が提示された場合にわずかに高い (3 ~ 10 %) 阻害を示した。示される範囲内の単糖の存在下では阻害は観察されず、単糖構造は s c F v の G a l - α - (1 , 3) - G a l 構造への結合を阻害できないという直接アッセイの結論を支持している (表 1)。

【 0 0 4 3 】

S c F v A 4 が最も一貫した測定値を与え、さらなる評価のために選択された。図 7 は A 4 複合標準曲線を示し、E D ₅₀ は 327 μ g / ml [0.95 mM] であり検出限界は 3.9 ng / ml [約 10 nM] である。このアッセイは、タンパク質が N G C の形態でマウス糖タンパク質ラミニン上に結合している場合に G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l モチーフを検出できた。0.25 ~ 1 mg / ml の濃度範囲にわたり得られる反応の並行性によって示されるように、二糖 N G C は遊離糖と同様に s c F v と相互作用した。アッセイの結果は、1 mg / ml の G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l 含有 N G C が、42 μ g / ml の二糖を含んだことを示した。これは、9.4 : 1 の二糖 : タンパク質のモル比に相当した。M A L D I トレースによって決定される範囲は 10 ~ 25 残基であり、アルブミンあたり平均 16 : 1 である。同様に、グリカン : タンパク質のモル比の範囲が 15 ~ 31 であり、M A L D I による平均が 23 : 1 である G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l - β - (1 , 4) - G a l 含有 N G C は、競合 E L I S A によって 19.7 : 1 のモル取り込み率を有すると決定された。天然ラミニンは、競合 E L I S A で分析するにはあまりにも粘性が高かった。しかし、熱処理が粘性を低下させ、アッセイ結果は、マウスラミニン 1 モル当たりの G a l - α - (1 $\rightarrow$ 3) - G a l 残基が 39 モルであることを示した。

【 0 0 4 4 】

親和性の値

s c F v の解離定数 (K d) を、表面プラズモン共鳴 (S P R) B I A c o r e 機器およびソフトウェア (G E) を用いて測定した結合 (k o n) 速度定数および解離 (k o f f) 速度定数から計算した。s c F v について決定した K d は、以下のとおりである :

A 4 : 5.73 $\times 10^{-8}$ M

G 1 2 : 1.80 $\times 10^{-8}$ M

A 1 1 : 8.04 $\times 10^{-9}$ M

【 0 0 4 5 】

同じ条件下では、先行技術のレクチン G S - 1 - B 4 または先行技術のモノクローナル抗体 M 8 6 との結合は観察されなかった。一般的に、レクチン - 炭水化物相互作用は抗原 - 抗体相互作用よりも弱いことが認められており、レクチンはグリカンに対して K d = 10⁻³ ~ 10⁻⁶ M の範囲の低い親和定数を有する。したがって、s c F v は、既存の結合剤よりも、それらの標的グリカンに対してより高い親和性を有する。

【 0 0 4 6 】

(S P R において定常状態の平衡で決定された) K d = 10⁻⁵ ~ 10⁻⁸ M の範囲の親和定数を有する多数のグリカンエピトープに対する既報の抗糖質抗体と共に、本明細書で特定した s c F v は、S P R によって定義されるように、グリカンエピトープに対して報告される最高親和性抗体断片であることが示された。

【 0 0 4 7 】

配列情報

配列番号 1 : 本発明の断片の一般的配列 :

Q A A L T Q P S S V S T N P G G T V K I T C S G [S / -] [Y / -] [G / -] [G / -] [S / -] [G / Y] [N / H / Y] Y G W Y Q Q K S P G S A P V T V I Y S N [N / D] [K / Q / N] R P S [D / G] I P S R F S G S [T / K] S [G / D] S T [A / G / S] T L T I T G V Q V D D E A V Y [F / Y] C G [A / S / T] Y D [N / S] [S / -] [N / -] [T / S] Y [V / A] G [V / I] F G A G T [T / A] L T V L G Q S S R S S [S / -] G G G S S G G G S A V T L D E S G G L Q T P G G [G / A] L S L V C K A S G F T F S S Y S M Q W V R Q [T / A] P G K G L E F V A G I G [Y / N] S D [S / R] Y T Y F G P A V K G R A T I S R D N G Q [N / S] T V R L Q L N N L R A E D T A T Y [Y / F] C A R S [A / G] D [T / S] [I / G] [Y / N] G C T H P W C S A D N I [D / N] A W G H G T E V I V S S T S G Q A G Q

10

[] は転移を示す ; - は欠失を示す。

【 0 0 4 8 】

各クローンについての固有の個々の配列配列番号 2 : s c F v - A 4

Q A A L T Q P S S V S T N P G G T V K I T C S G G N G N Y G W Y Q Q K S P G S A P V T V I Y S N N K R P S D I P S R F S G S K S G S T A T L T I T G V Q V D D E A V Y F C G A Y D N T Y V G V F G A G T T L T V L G Q S S R S S S G G G S S G G G S A V T L D E S G G G L Q T P G G G L S L V C K A S G F T F S S Y S M Q W V R Q T P G K G L E F V A G I G Y S D S Y T Y F G P A V K G R A T I S R D N G Q N T V R L Q L N N L R A E D T A T Y Y C A R S A D T I Y G C T H P W C S A D N I D A W G H G T E V I V S S T S G Q A G Q

20

【 0 0 4 9 】

配列番号 3 : s c F v - G 1 2

Q A A L T Q P S S V S A N P G E T V K I T C S G G S Y H Y G W Y Q Q K S P G S A P V T V I Y S N N Q R P S G I P S R F S G S T S D S T G T L T I T G V Q A D D E A V Y F C G S Y D S S N T Y A G I F G A G T T L T V L G Q S S R S S S G G G S S G G G S A V T L D E S G G G F Q T P G G A L S L V C K A S G F T F S S Y S M Q W V R Q A P G K G L E F V A G I G N S D R Y T Y F G P A V K G R A T I S R D N G Q S T L R L Q L N N L R A E D T A T Y F C A R S G D S G N G C T H P W C S A D N I N A W G H G T E V I V S S T S G Q A G Q

30

【 0 0 5 0 】

配列番号 4 : s c F v - A 1 1

Q A A L T Q P S S V S A N P G E T V K I T C S G G G S Y G G S Y Y Y G W Y Q Q K S P G S A P V T V I Y S N D N R P S D I P S R F S G S T S G S T S T L T I T G V Q V D D E A V Y Y C G T Y D S S Y V G I F G A G T A L T V L G Q S S R S S G G G S S G G G S A V T L D E S G G G L Q T P G G G L S L V C K A S G F T F S S Y S M Q W V R Q T P G K G L E F V A G I G Y S D S Y T Y F G P A V K G R A T I S R D N G Q N T V R L Q L N N L R A E D T A T Y Y C A R S A D T I Y G C T H P W C S A D N I D A W G H G T E V I V S S T S G Q A G Q

40

【 0 0 5 1 】

s c F v : 円偏光二色性による相互作用研究

s c F v A 4、A 1 1 および G 1 2 を用いて、G a l α (1 , 3) G a l β 1 - O M e (C a r b o s y n t h 社) および陰性対照のメリピオースとの相互作用を確認した。

【 0 0 5 2 】

2 種類の実験を行った : 第 1 に、4 m M の両方の二糖の非存在下および存在下で s c F v の近紫外円偏光二色性 (C D) スペクトルを比較した。第 2 に、s c F v の熱安定性に対する二糖の効果を研究した。

【 0 0 5 3 】

50

実験手順：

試料をNaPi (10 mM) - NaCl (150 mM) pH 7.2中に希釈し、2回の限外濾過により濃縮するか(少量の場合)または徹底的に透析した。1 nmの帯域幅、20 nm/分の走査速度および4秒の応答時間、0.2 nm毎のデータ収集および各スペクトルにつき3つの蓄積を使用して、ペルチェ温度制御システムを備えたJ-810分光偏光計でCDスペクトルを20℃にて取得した。近紫外スペクトルは約1.0 mg/mlのタンパク質濃度にて1 cm経路長のセル内で記録し、一方、遠紫外スペクトルは約0.2 mg/mlのタンパク質濃度にて0.1 cm経路長の石英セル内で記録した。全CDスペクトルについて、対応するバッファベースラインを差し引いた。熱安定性を、40℃/hの一定速度で20～90℃まで昇温しながら、208 nmでの楕円率変化を測定することにより評価した。楕円率変化を0.2℃ごとに収集し、スペクトルを10℃毎に収集した。熱変性プロファイルを、以下の式を用いてシグモイド関数にフィットさせた：

【0054】

【数1】

$$\Theta(T) = \Theta_N + \sum_{i=1}^n \Delta\Theta_i \left\{ \exp\left[-HD_i(T_{mi}-T)/R \cdot T_{mi} \cdot T\right] / \left\{1 + \exp\left[-HD_i(T_{mi}-T)/R \cdot T_{mi} \cdot T\right]\right\} \right\}$$

式中、それぞれ、 $\Theta(T)$ は温度T(ケルビン)での楕円率を表し、 Θ_N は天然タンパク質の楕円率であり、nは転移の数であり、 $\Delta\Theta_i$ は転移iの楕円率増分であり、Rは気体定数、ならびに T_{mi} および HD_i はそれぞれ、転移中間点の温度(融解温度)および対応する転移の協同性(傾き)を表すパラメータである。

【0055】

結果：

一般的に、近CDにおいて残基あたりのモル楕円率の値は、3種類のscFvについて-80～-40 g·rad/cm²/dmolであり、これはタンパク質の通常の値からすると低い傾向である。G12を始めとして、スペクトル(黒、図1A)は250～280 nm(PheおよびTyrの電子転移によって支配される領域)で負の楕円率を示し、かつ292 nm(Trp電子転移によって支配される領域)では小さい正のバンドを示した。メリビオースは、スペクトルの形状/強度に著しい変化をもたらさなかったが(赤色のスペクトル、図1A)、明確な変化がGalα(1,3)Galβ1-OMeの存在下で検出された。292 nmでのバンドは消滅する傾向があったが、より高い負の値が250～290 nm領域で観察された(緑色のスペクトル、図1A)。したがって、Galα(1,3)Galβ1-OMeの存在下でのスペクトルは、スペクトルに寄与する芳香族残基の環境における変化を示すように思われる。

【0056】

A4の場合には、CDスペクトル(黒、図1B)はまた250～290 nmで負であり、291 nmにもバンドが存在する(G12よりも低い強度)。さらに、300 nmに(Trpに割り当てられる)明確な負のバンドが存在する。G12については、メリビオースの効果は変わらなかった(赤色のスペクトル、図1B)。しかし、残基あたりのモル楕円率は、一般的に、Galα(1,3)Galβ1-OMeの存在下、特に260～280 nmで減少し、より低い負の値を生じた(緑色のスペクトル、図1B)。300 nmでのバンドもまた強度の減少を示したが、291 nmのバンドはほとんど変化しなかった。

【0057】

A11に関しては、CDスペクトル(黒、図1C)はscFv G12およびA4のスペクトルと類似しており、250～290 nmにおける残基あたりのモル楕円率が負の値であり、2本のバンドが存在し、1つ目は292 nmにおける正のバンドおよび2つ目は302 nmにおける負のバンドであった。メリビオース(赤色のスペクトル、図1C)またはGalα(1,3)Galβ1-OMe(緑色のスペクトル、図1C)のいずれの存在下でも著しい変化は観察されなかった。これは、糖との相互作用が存在する場合には、タンパク質の芳香族基の環境は著しく影響されないことを示している。

【0058】

第2セットの実験では、二糖の非存在下および存在下での $s c F v$ の熱安定性を調べた。この種の実験で、発明者らは以下のものを得ることができた：1) 加熱時のタンパク質の二次構造の変化についての情報を与える、昇温での遠紫外CDスペクトル、および2) 転移温度 (T_m) の計算を可能にする、昇温しながらの特定波長での楕円率変化のプロファイル。糖の非存在下および存在下での T_m の直接比較は、熱安定化 (すなわち、糖の存在下での T_m の増加) を相互作用の指標として、 $s c F v$ に対する糖の影響についての情報をもたらした。

【0059】

20 における全 $s c F v$ の遠紫外CDスペクトルは、短波長 (208 nm未満) でのモル楕円率の正の値および208 ~ 240 nmでの負のバンドを示し、これらは β 二次構造に典型的な特徴である (図2および図3の黒色のスペクトル)。図2は、3種類の $s c F v$ のスペクトルの良好な重ね合わせを示し、それらの3つが類似の二次構造を有することを示す。Gal α (1, 3) Gal β 1 - OMe (図3、緑色のスペクトル) のまたはメリビオース (図示せず) のいずれの存在下でもスペクトルの変化は観察されなかった。

90 で加熱した後、陽性バンドは消失し、かつスペクトルは波長のほぼ全範囲でより高い負の値の楕円率になる傾向があり (図3、赤色のスペクトル)、それらの天然の β 二次構造の損失を示している。G12 (図3A) およびA4 (図3B) について20 ~ 90

でのスペクトルのグローバルな変化は、糖の非存在下または存在下で同様であった。しかし、A11の加熱後の最終的な種は、Gal α (1, 3) Gal β 1 - OMeの非存在下および存在下で異なっている (図3、青色のスペクトル)。この違いはメリビオースの存在下では観察されなかった。

【0060】

所定の波長での昇温に伴う楕円率変化のプロファイル比較 (図4) は、Gal α (1, 3) Gal β 1 - OMeが3種類の $s c F v$ の重要な安定化 (7.7 ~ 10.2) を誘導したことを明らかに示した (表1)。逆に、メリビオースの存在は、G12またはA11のいずれでも顕著な安定化をもたらさなかった (約0.2) (A4についてはチェックしなかった)。

【0061】

$s c F v$ G12について、変性を2つの異なる波長で監視した (表1)。糖の非存在下および存在下で218 nmでの楕円率の変化を測定することによる、G12の熱安定性に対する糖の効果の比較分析により、4 mMのメリビオースの添加はアンフォールディングプロセスの T_m も (協同性を説明する) HDも変化させないが、一方で4 mMのGal α (1, 3) Gal β 1 - OMeの存在は両方のパラメータを増加させたことが示されている。208 nmで得られたデータは、 T_m における8.8 の増加およびGal α (1, 3) Gal β 1 - OMeの存在下でのわずかにより協同的なアンフォールディング (+6.8 Kcal/mol) も明らかにした。明確にするために、Gal α (1, 3) Gal β 1 - OMeの非存在下および存在下で208 nmにて収集した変性プロファイルのみを図4Aに示す。

【0062】

【表 1】

表 1. 4 mM のメリビオースまたは $\text{Gal } \alpha (1, 3) \text{ Gal } \beta 1 - \text{OMe}$ の非存在下および存在下での s c F v の熱変性の転移温度 (T_m) ならびに協同パラメータ (HD)

	λ	s c F v G 1 2		s c F v A 4		s c F v A 1 1	
		T_m (°C)	HD (K c a l / モル)	T_m (°C)	HD (K c a l / モル)	T_m (°C)	HD (K c a l / モル)
純粋	218	66.4 ±	116 ± 2	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	208	0.4 *	1	64.6 ±	57 ± 3	61.3	134 ± 7
		64.7 ± 0.2 **	64 ± 4	0.2 **		± 0.1 *	
+メリ ビオース	218	66.5 ±	116 ± 1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	208	0.3 *	6	n. d.	n. d.	61.1	141 ± 7
		n. d.	n. d.			± 0.1 *	
+G a l α (1, 3) G a l β 1 - O M e	218	74.3 ±	137 ± 2	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	208	0.4 *	4	74.8 ±	52 ± 3	69.0	95 ± 6
		73.5 ± 0.3 **	71 ± 5	0.3 **		± 0.2 *	

n. d. は決定していないことを示す。*は限外濾過により調製した試料を示す。**は透析により調製した試料を示す。

【0063】

G 1 2 について 208 nm でのモル楕円率の変化が 218 nm の場合よりも著しく大きかったので (図 3 参照)、 s c F v の残りについて 208 nm での監視を選択した。A 4 の場合には、プロセスの協同性 (表 1 に示され、図 4 B における変性曲線の傾きによって証明される) は著しく変化しなかったが (-4.7 K c a l / モル)、 T_m は 4 mM の $\text{Gal } \alpha (1, 3) \text{ Gal } \beta 1 - \text{OMe}$ の存在下で約 10 増加した。最後に、A 1 1 につ

いて、発明者らは T_m の値だけでなくプロセスの協同性にも違いを観察し、これは G 1 2 および A 4 よりも明らかに高く (表 1)、かつ変性の終わりにモル楕円率の値の違いも観察した (表 1 および図 4 C)。メリビオースの存在下または非存在下で得られた曲線間に著しい違いはないが、 $\text{Gal } \alpha (1, 3) \text{ Gal } \beta 1 - \text{OMe}$ が存在する場合には抗体の T_m は 7.7 増加し、興味深いことに、この二糖の非存在下での同じ s c F v と比較すると協同性は大きく減少した (-38.5 K c a l / モル)。G a l α (1, 3) G a l β 1 - O M e の存在下での G 1 2 および A 4 のプロセスの協同性と比較した場合、3 種類のタンパク質の値は、この二糖の非存在下の場合よりも近くなる。

【0064】

要約すると、得られた結果は、3 種類の s c F v 、A 4、A 1 1 および G 1 2 と G a l α (1, 3) G a l β 1 - O M e との間の相互作用の存在を明瞭に証明する。さらに、メリビオースとの相互作用の欠如は、認識における特異性を証明する。G 1 2 は、近紫外 C D スペクトルにおいて著しい変化を示し、このことは二糖の結合が芳香族残基の環境に著しく影響を与えることを示している。さらに、熱変性実験は、3 種類の s c F v に対する G a l α (1, 3) G a l β 1 - O M e の安定効果を明白に示し、A 4 の安定化は 10.2、G 1 2 については 8.8 および A 1 1 については 7.7 であった。

【0065】

考察

30 年以上にわたって知られているが、二糖の合成に関与する酵素を欠くヒトおよびニワトリを除く、広範な種での糖タンパク質および糖脂質上の末端モチーフとしてよく見ら

れるGal- α -(1,3)-Galモチーフに依然としてかなりの関心がある。このグリカン構造は異種移植努力に依然として関連したままであり、癌免疫療法における免疫原性を増加させるために、ヒト血清中に存在する比較的大量の天然の抗Gal- α -(1,3)-Gal抗体を活用する可能性が広く調査されてきた。癌細胞またはムチンなどの癌関連分子のGal- α -(1,3)-Galエピトープでの修飾は、抗原提示細胞による取り込みを増加させ、かつ免疫反応を増強することが示されている。細胞上のモチーフの負荷を測定する能力はこの研究にとって重要であるが、患者に有害反応をもたらす、最近報告された糖タンパク質バイオ医薬品上でのこの免疫原性モチーフの出現は、Gal- α -(1,3)-Galに対する特異的結合剤および便利な分析法の必要性を特に強調している。

10

【0066】

Gal- α -(1,3)-Galエピトープの検出およびプロファイリングのために最も一般的に利用される生体分子は、 α -Gal残基に非常に特異的であるレクチンGS-1-B4である。異なる α -Gal炭水化物に対するGS-1-B4の親和性は、Gal- α -(1,3)-Galの信頼できるマーカーとしてこのレクチンを使用することにおける欠点である。キノコMarasmius oreades(MOA)のレクチンは、Gal- α -(1,3)-GalおよびGal- α -(1,3)-Gal- β -(1,4)-GlcNAcエピトープにより特異的であると報告されているが、還元末端でGalと結合したL-Fuc- α -(1,2)を含むB型の血液型抗原に強く結合する。これおよび他の非ヒトグリカンエピトープに対する天然に存在する血清中のヒト抗体は、分析ツールとして確実に使用されてはいない。従来の免疫化アプローチは、特定の炭水化物部分に対する高親和性抗体の作製にそれほど信頼性がなく、多くの場合、アッセイ開発に好適な特性を有する抗体を生じない。組換え抗体断片のライブラリーとファージディスプレイ技術の使用はより有望であり、寛容化のため通常は得られない抗自己抗体を含む抗体の大きなレパートリーへとアクセスできる。しかし、これまでにほんの少ししか成功例が公開されていない。炭水化物部分に対する抗体の作製は、その親和性の低さのためこれまで困難であり、ほとんど成功例が公開されていない。最初のライブラリー源の選択および可能性のある免疫化計画は、慎重な思考およびデザインを必要としており、自然条件下で発生するグリカン提示の模倣を可能にする。免疫化ニワトリのライブラリーを利用する本明細書の選択は、固有の機能的V_HおよびV_L遺伝子に隣接する保存領域を標的にするシングルプライマーが増幅して、scFvとして融合するのを可能にした。これは、より複雑なシステムとは対照的に、非常に多様性のあるニワトリ免疫グロブリンレパートリーのその後のクローニングにより、再編成された可変断片の完全なスペクトルを可能にする。

20

30

【0067】

マウスまたはヒト由来の抗体のように、ニワトリ組換え抗体は様々な形態(FabまたはscFv)で発現させることができ、多数のグループが様々なタンパク質標的に対するニワトリ組換え抗体の構築を報告している。パニング条件の最適化は炭水化物標的に対するファージディスプレイの成功のための鍵であり、炭水化物-タンパク質相互作用がタンパク質-タンパク質相互作用と比べ親和性がより低いこと考慮する。

【0068】

40

競合結合アッセイは、実行可能な代替手段がない場合が多いため、複雑な試料中の低分子量化合物の決定に広く使用されている。それらは、多用途の堅牢なアッセイ構成を示し、ハイスループットまたは使い捨て、ポイント・オブ・ケアの形式に適応可能である。しかし、競合アッセイは結合剤に関する要求が厳しく、アッセイ感度は検体に対する結合剤の親和性に直接依存している。発明者らは、精製した全3種類のscFvがGal- α -(1,3)-Galの競合アッセイにおいて使用でき、低いng/mlレベルでの(検出限界は3.9 ng/ml [約10 nM]と見積もられる)二糖の検出を可能にすることを実証し、これは、類似のプレートアッセイで試験した場合に一般的に μ g/mlレベルである、報告されたほとんどのレクチンの検出限界を超えている。scFvの例外的な特異性もこの形式で保持された。発明者らは、アッセイが糖タンパク質との関連でモチーフを

50

検出でき、かつタンパク質上のこのモチーフの取り込みレベルを決定するために用いることができることを示した。したがって、このアッセイは、関心のある糖タンパク質上のモチーフの直接分析または例えば、ウェルシュ菌由来の酵素のエンド-β-ガラクトシダーゼCによる放出後の二糖の測定のいずれかの選択を提供する。

【0069】

最もよく特徴付けられた3種類のscFv (scFv-G12、scFv-A4およびscFv-A11)間のCDR配列において観察された差異は、それぞれの個々の動物中のGal-α-(1→3)-Gal特異的B細胞の様々なインビボ集団またはおそらくライブラリーを作製するために使用した2種類の動物のプールしたcDNAに起因したのかもしれない。いくつかのアミノ酸変化(S→Q; G→S)および欠失(一般的にセリン)が、配列決定された断片のそれぞれのリンカー配列で生じた。リンカー領域内の変更は、リンカーの安定性または機能に著しく影響を与えるようには見えなかった。単一のscFvクローンは、細菌培養物中で誘導され、Ni-NTAクロマトグラフィーにより容易に精製される可溶性scFvを生産した。最適化しなくとも、可溶性scFvの収率は満足できるものであり、かつ再現性があった。scFvの安定性および提示は、他の要因とともに濃度、pHおよび温度によって影響され得る。scFvの個々の調製物は、機能的に二価であり観察される反応速度に変化をもたらし得る二量体抗体を、未知の割合で含んでいる可能性がある。

【0070】

精製および試験されたscFv抗体(A4、A11およびG12)は、Gal-α-(1→3)-Galエпитープに対する高い特異性を示し、それらがこのエпитープに対する優れた特異性試薬として将来使用され得ることを示している。

【0071】

【表2】

遊離糖	最高濃度 μ (mg/mL)	観察された阻害 (Y/N)	最高濃度における 最大阻害の割合 (%)		
			A11	A4	G12
gal-α(1,3)-gal-BSA (NGC)	at 1 mg/ml	Y	51.06	36.4	33.93
gal-α(1,3)-gal-β-(1,4)-gal	1	Y	76.83	68.18	64.43
gal-α(1,3)-gal-β-(1,4)-glc	1	Y	73.88	66.20	83.03
gal-α(1,3)-gal-β-(1,4)-gal-α(1,3)-gal	1	Y	78.41	73.48	73.54
ガラクトー-N-ビオース	1	N	/	/	/
4-β-ガラクトビオース	1	N	/	/	/
ラミナリビオース	1	N	/	/	/
β1-4-D-キシロビオース	1	N	/	/	/
N-アセチル-D-ラクトサミン (LacNAc)	1	N	/	/	/
D-セロビオース	10	N	/	/	/
メリビオース	10	N	/	/	/
D-ラフィノース	10	N	/	/	/
ラクチュロース	10	N	/	/	/
バラチノース	10	N	/	/	/
β-ゲンチオビオース	10	N	/	/	/
D+トレハロース	10	N	/	/	/
D+ツラノース	10	N	/	/	/
L-フルクトース	10	N	/	/	/
D+グルコース	10	N	/	/	/
スクロース	10	N	/	/	/
N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc)	10	N	/	/	/
ガラクトース	10	N	/	/	/

【0072】

本発明に関連して本明細書で使用される場合、単語「含む/含んでいる」および単語「有する/含めた」は、述べられた特徴、整数、ステップまたは構成要素の存在を特定するために使用されるが、1以上の他の特徴、整数、ステップ、構成要素またはそれらのグループの存在または追加を排除しない。

【0073】

明確にするため、別々の実施形態との関連で記載されている本発明の特定の特徴は、単一の実施形態において組み合わせても提供できることを理解されたい。逆に、簡潔にする

ために、単一の実施形態との関連で記載されている本発明の様々な特徴は、別個にまたは任意の適切なサブコンビネーションでも提供され得る。

【0074】

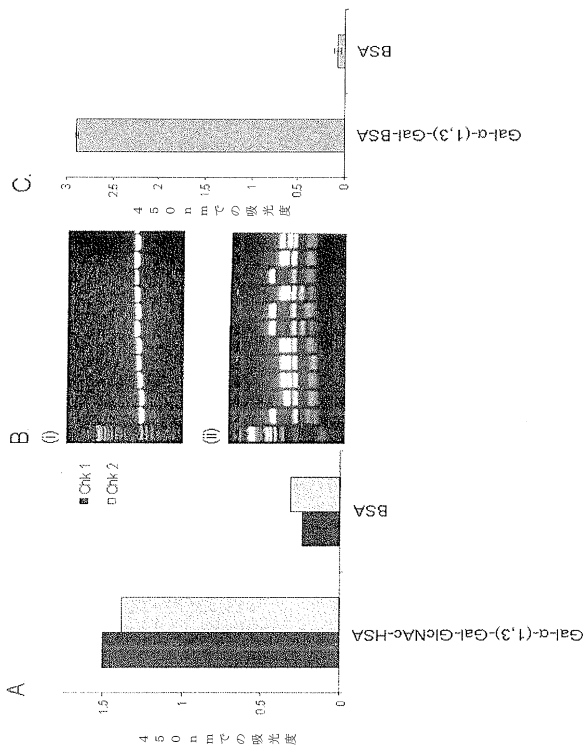
参考文献

Andris - Widhopf J, Rader C, Steinberger P, Fuller R, Barbas CF (2000) Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. J. Immunological Methods 242:159-81; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10986398>で利用できる。

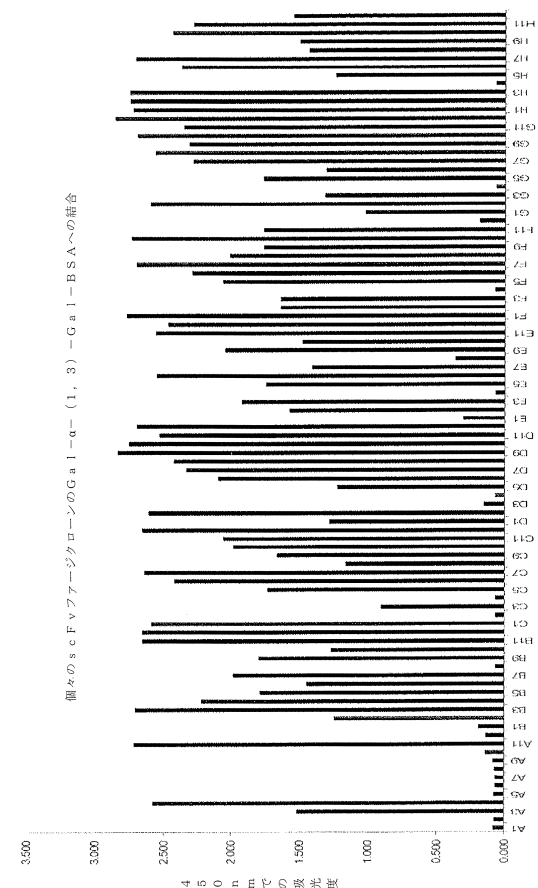
Bosques CJ, Collins BE, Meador JW, Sarvaiya H, Murphy JL, Dellorusso G, Bulik D a, Hsu I-H, Washburn N, Sipsy SF, Myette JR, Raman R, Shriver Z, Sasisekharan R, Venkataraman G (2010) Chinese hamster ovary cells can produce galactose- α -1,3-galactose antigens on proteins. Nature biotechnology 28:1153-6; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057479> [2011年8月12日にアクセスした]で利用できる。

10

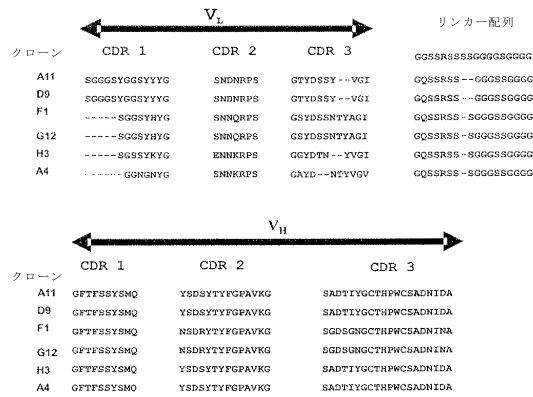
【図1】



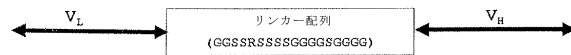
【図2】



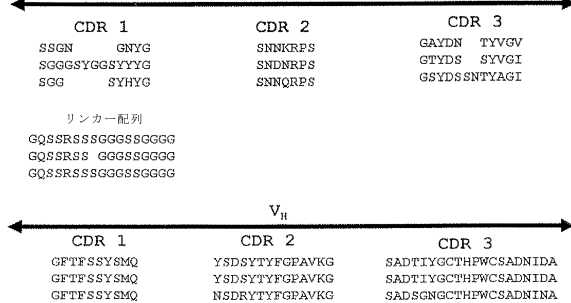
【図 3】



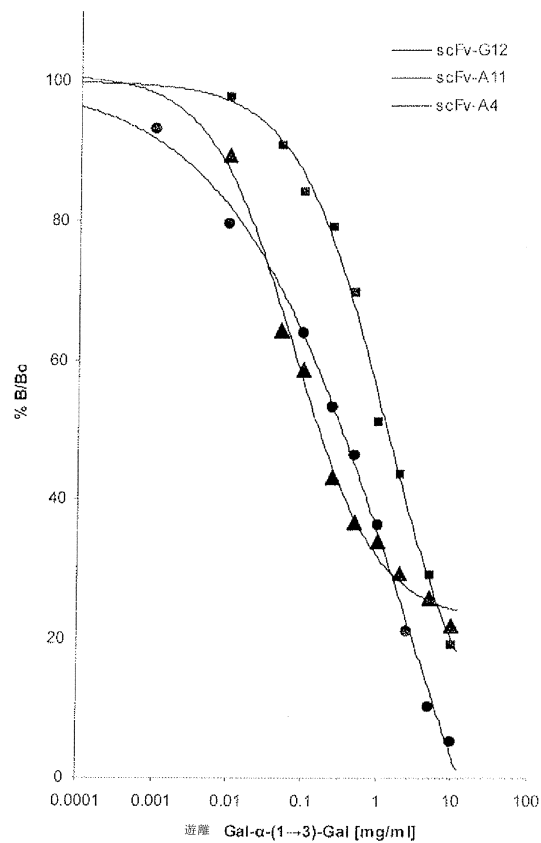
(A)



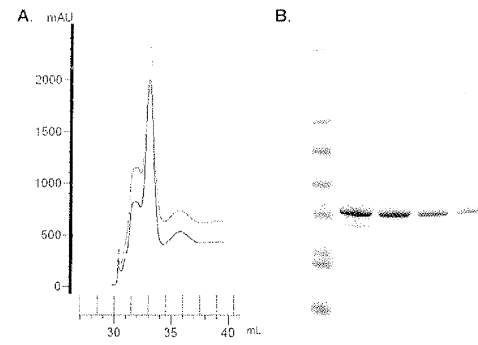
(B)



【図 6】

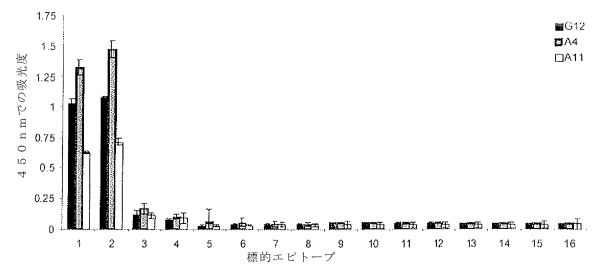


【図 4】



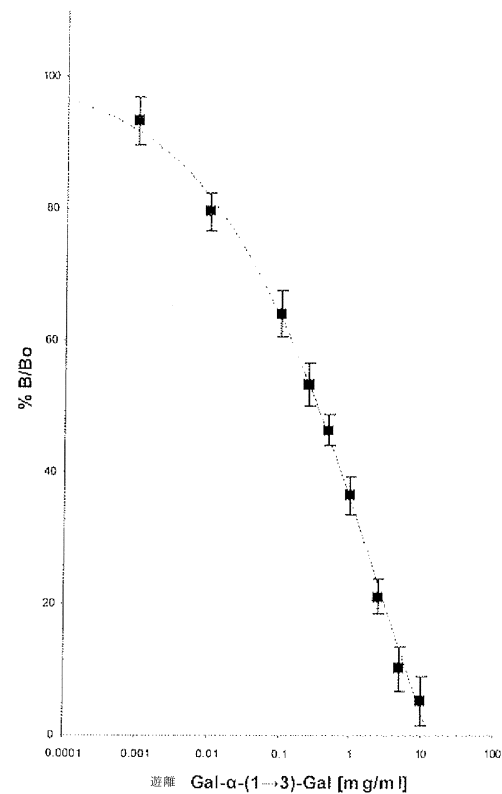
【図 5】

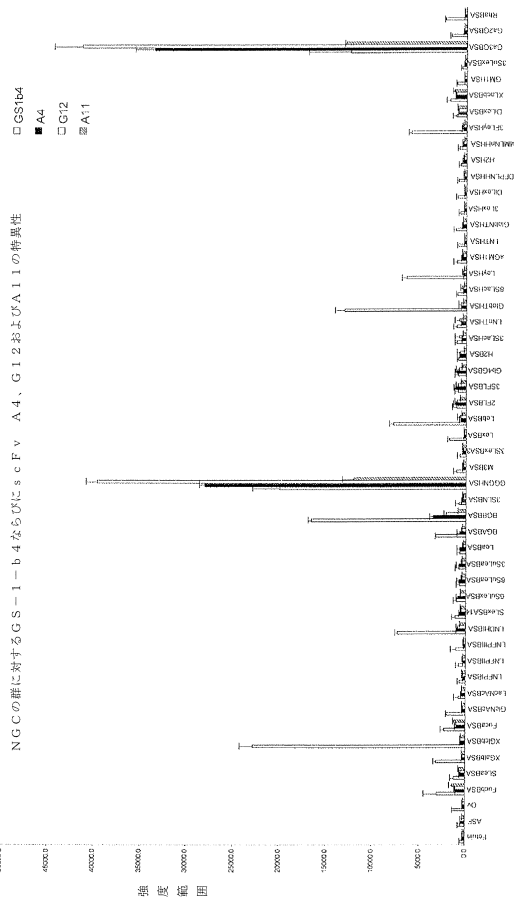
NGCの群に対する精製scFv抗体 (G12、A4およびA11) のELISA



【図 7】

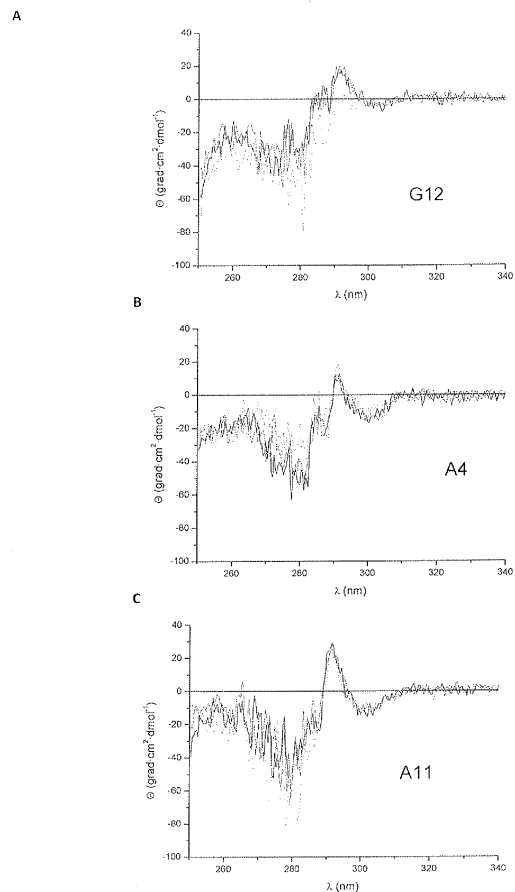
Gal-α-(1,3)-Gal-BSA
NGCへのscFv-A4結合の遊離Gal-α-(1,3)-Gal阻害



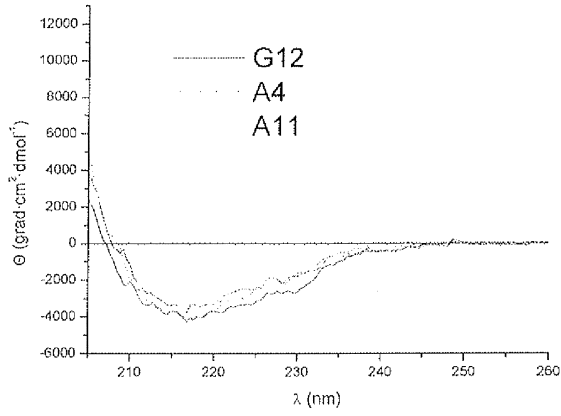


		10	20	30	40	
scFv-A4/1-259		1	QAALTQFSVSVSNPGETVKITCSGG	-----	GYHWYQQKSPGS83	
scFv-G12/1-261		1	QAALTQFSVSVSNANPGETVKITCSG	-----	SYHWYQQKSPGS83	
scFv-A11/1-263		1	QAALTQFSVSVSNANPGETVKITCSGGGGSGYGGSYHWYQQKSPGS44			
		50	60	70	80	
scFv-A4/1-259		40	APVTVIYSNMRKPSDIFSRFSGSSRSTSTLTITIGVGVDDAEAV93			
scFv-G12/1-261		40	APVTVIYSNMRKPSDIFSRFSGSSRSTSTLTITIGVGVDDAEAV93			
scFv-A11/1-263		45	APVTVIYSNMRKPSDIFSRFSGSSRSTSTLTITIGVGVDDAEAV98			
		90	100	110	120	130
scFv-A4/1-259		84	ECGADVDV--SYVSGFAGATLTVLVCGSSRSSGGGGSGGGGSAV125			
scFv-G12/1-261		84	ECGADVDV--SYVSGFAGATLTVLVCGSSRSSGGGGSGGGGSAV127			
scFv-A11/1-263		89	YCGADVDV--SYVSGFAGATLTVLVCGSSRSSGGGGSGGGGSAV129			
		140	150	160	170	
scFv-A4/1-259		126	TLDESGGGGLTPGGGLSLVCKASGFTTSSYSMWRRTPGKGLE169			
scFv-G12/1-261		128	TLDESGGGGLTPGGGLSLVCKASGFTTSSYSMWRRTPGKGLE171			
scFv-A11/1-263		130	TLDESGGGGLTPGGGLSLVCKASGFTTSSYSMWRRTPGKGLE173			
		180	190	200	210	
scFv-A4/1-259		170	FVAGIGGSDSYTYFGPAVKGRATISRDNGQNTLRQLNNLRAED213			
scFv-G12/1-261		172	FVAGIGGSDSYTYFGPAVKGRATISRDNGQNTLRQLNNLRAED215			
scFv-A11/1-263		174	FVAGIGGSDSYTYFGPAVKGRATISRDNGQNTLRQLNNLRAED217			
		230	240	250	260	
scFv-A4/1-259		214	TATYTCARSDTITGCTHFWCSADNDIAWGHGTEVIVSSTGGQ257			
scFv-G12/1-261		216	TATYTCARSDTITGCTHFWCSADNDIAWGHGTEVIVSSTGGQ259			
scFv-A11/1-263		218	TATYTCARSDTITGCTHFWCSADNDIAWGHGTEVIVSSTGGQ261			
		258 GQ				259
scFv-A4/1-259		258 GQ				259
scFv-G12/1-261		260 GQ				261
scFv-A11/1-263		262 GQ				263

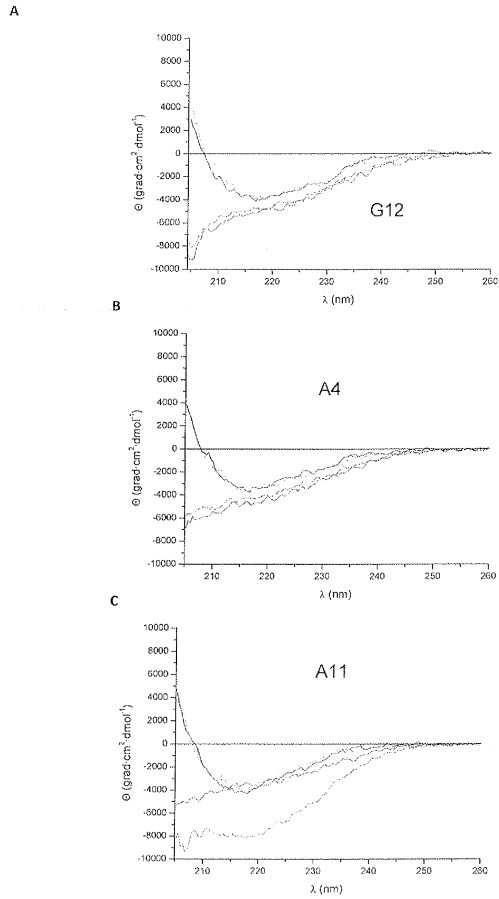
		V _H CDR 1		V _H CDR 2	
1	QAALTQPSVV SAMPGGTVKI TCGSGNGSTGG SYNTGWYQK SPGSAPVTVI	T	TSNRKRSPDI	60	
2	T	N**** *GR	NK	D	60
3	A	GSTGG STY	NH	D	60
4	A	***** SIH	NQ	G	60
		V _L CDR 3		Linker -	
61	PSRFGSGTSG STATLITIGV QVDEAVYFC GATGSSNIVY GVFGAGTLTI VLQGSSRSKS			120	
61	K G A V F A N** V T S	S		120	
61	T G S V Y T S** V A A	S		120	
6?	T D G A F S SSNT A T	S		120	
		V _H CDR 1			
sequence					
121	GGGSSGGGG AVTLDESGGG LQTPTGGGLSL VKCRASPTFS SYSMWVRQT PGKGLEFVAG			180	
121	G	T		180	
121	G	T		180	
121	A	A		180	
		V _H CDR 2		V _H CDR :	
181	IQSYSDTYTF GPAAVGKRAITI SRDNGQNTVR LQLNLRAED TATTYCASA DTIIYGCTHPW			240	
191	N Y S N V Y A TI I			240	
191	Y S N V Y A TI I			240	
191	N R S L F C SGH			240	
241	CSADRIDAWG HGTEVIVSST SQGAQG			266	
241	D			266	
241	D			266	
241	N			266	



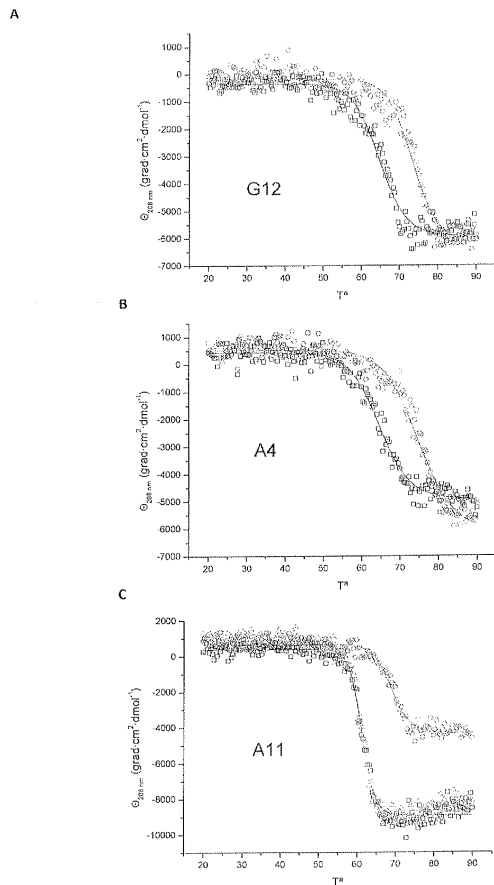
【図 12】



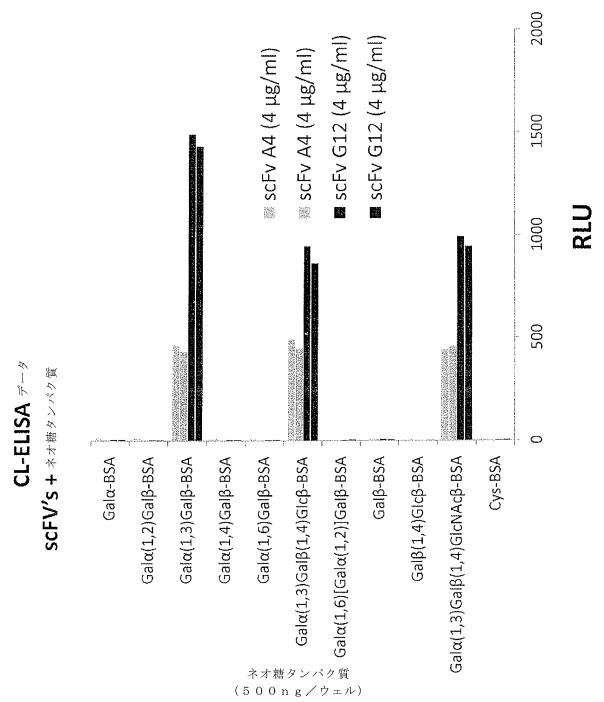
【図 13】



【図 14】



【図 15】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01) C 1 2 N 15/13

- (72)発明者 カンニングハム, ステファン
アイルランド国, ゴールウェイ, ナショナル センター フォー バイオメディカル エンジニア
リング サイエンス ナショナル ユニバーシティ オブ アイルランド ゴールウェイ
- (72)発明者 スター, エミリー
アイルランド国, ゴールウェイ, ナショナル センター フォー バイオメディカル エンジニア
リング サイエンス ナショナル ユニバーシティ オブ アイルランド ゴールウェイ
- (72)発明者 ショー, イアイン
アイルランド国, ゴールウェイ, ナショナル センター フォー バイオメディカル エンジニア
リング サイエンス ナショナル ユニバーシティ オブ アイルランド ゴールウェイ
- (72)発明者 グラヴィン, ジョン
アイルランド国, ゴールウェイ, ナショナル センター フォー バイオメディカル エンジニア
リング サイエンス ナショナル ユニバーシティ オブ アイルランド ゴールウェイ
- (72)発明者 ケイン, マリアン
アイルランド国, ゴールウェイ, ナショナル センター フォー バイオメディカル エンジニア
リング サイエンス ナショナル ユニバーシティ オブ アイルランド ゴールウェイ
- (72)発明者 ジョシ, ロケシュ
アイルランド国, ゴールウェイ, ナショナル センター フォー バイオメディカル エンジニア
リング サイエンス ナショナル ユニバーシティ オブ アイルランド ゴールウェイ

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 Ann. Conf. Soc. Glycobiol. (Conf. Abst.), 2010年, p.1519(No.216)
Immunol. Cell Biol., 2007年, vol.85, no.8, pp.623-632

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S /
W P I D S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
P u b M e d

专利名称(译)	检测游离的和蛋白质结合的非人Gal-α- (1→3) -Gal表位		
公开(公告)号	JP6412871B2	公开(公告)日	2018-10-24
申请号	JP2015536167	申请日	2013-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	爱尔兰国立大学,戈尔韦		
申请(专利权)人(译)	爱尔兰国立高威大学		
当前申请(专利权)人(译)	爱尔兰国立高威大学		
[标]发明人	カンニングハムステファン スターエミリー ショーイアイン グラヴィンジョン ケインマリアン ジョシロケシュ		
发明人	カンニングハム,ステファン スター,エミリー ショー,イアイン グラヴィン,ジョン ケイン,マリアン ジョシ,ロケシュ		
IPC分类号	C07K16/28 G01N33/53 A61K39/395 A61P31/00 A61P37/06 C12N15/13		
CPC分类号	A61P31/00 A61P37/06 C07K16/18 C07K16/44 C07K2317/23 C07K2317/33 C07K2317/622 C07K2317/92 G01N33/6842 G01N2400/02 G01N2800/245		
FI分类号	C07K16/28.ZNA G01N33/53.V A61K39/395.N A61P31/00 A61P37/06 C12N15/13		
优先权	2012188179 2012-10-11 EP		
其他公开文献	JP2015535217A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6412871号 (P6412871)
	(45) 発行日 平成30年10月24日 (2018. 10. 24)	(24) 登録日 平成30年10月5日 (2018. 10. 5)	
本発明涉及提供能够选择性结合Gal-α- (1→3) -Gal表位の抗体片段。本 发明进一步涉及包含这些抗体片段的测定系统，用于测试移植组织中可 能的排斥并发症。该表位通常在猪组织上发现，用于人类移植。在生物 药物和一些感染性病原体上也发现了表位，因此本发明还提供了用于这 些应用的测定系统。背景技术	(51) Int. Cl. F I C O 7 K 16/28 (2006. 01) C O 7 K 16/28 Z N A G O 1 N 33/53 (2006. 01) G O 1 N 33/53 V A 6 1 K 39/395 (2006. 01) A 6 1 K 39/395 N A 6 1 P 31/00 (2006. 01) A 6 1 P 31/00 A 6 1 P 37/06 (2006. 01) A 6 1 P 37/06 請求項の数 12 (全 27 頁) 最終頁に続く		
	(21) 出願番号 特願2015-536167 (P2015-536167) (86) (22) 出願日 平成25年10月11日 (2013. 10. 11) (65) 公表番号 特表2015-535217 (P2015-535217A) (43) 公表日 平成27年12月10日 (2015. 12. 10) (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/071367 (87) 国際公開番号 W02014/057129 (87) 国際公開日 平成26年4月17日 (2014. 4. 17) 審査請求日 平成28年9月23日 (2016. 9. 23) (31) 優先権主張番号 12188179. 1 (32) 優先日 平成24年10月11日 (2012. 10. 11) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP) (73) 特許権者 509237767 ナショナル ユニバーシティ オブ ア イルランド、 ゴールウェイ アイルランド国 ゴールウェイ、 ユニバ ーシティ ロード (74) 代理人 100114775 弁理士 高岡 亮一 (74) 代理人 100121511 弁理士 小田 直 (74) 代理人 100191086 弁理士 高橋 香元 最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 遊離型およびタンパク質結合型の非ヒトGal-α- (1→3) -Galエпитープの検出			