

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4625461号
(P4625461)

(45) 発行日 平成23年2月2日(2011.2.2)

(24) 登録日 平成22年11月12日(2010.11.12)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K	16/28	(2006.01)	C O 7 K 16/28
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 D

請求項の数 16 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-530124 (P2006-530124)	(73) 特許権者	506355442
(86) (22) 出願日	平成16年10月8日(2004.10.8)		アフィムド テラポリティクス アクチュ ンゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2008-502303 (P2008-502303A)		ドイツ国 6 9 1 2 0 ハイデルベルク
(43) 公表日	平成20年1月31日(2008.1.31)		イム ノイエンハイマー フェルド 5 8
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/011268		2 テクノロジーパーク
(87) 国際公開番号	W02005/035580	(74) 代理人	100072051
(87) 国際公開日	平成17年4月21日(2005.4.21)		弁理士 杉村 興作
審査請求日	平成18年7月6日(2006.7.6)	(74) 代理人	100119530
(31) 優先権主張番号	10346627.4		弁理士 富田 和幸
(32) 優先日	平成15年10月8日(2003.10.8)	(72) 発明者	ステファン ナックマス
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		ドイツ国 6 8 7 2 3 プランクシュタッ ト アーランドシュトラーセ 1 3
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 37kDa/67kDaラミニン受容体に対する単鎖抗体で、プリオン疾病及び癌の診断及び治療のためのツールとしてのもの、その生産及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

LRP/LR に対して特異的に指向し、およびアミノ酸配列の配列番号2を備える、単鎖抗体分子。

【請求項2】

アミノ酸配列の配列番号2を持つ、請求項1記載の単鎖抗体分子。

【請求項3】

ヌクレオチド配列の配列番号1を備える、cDNA。

【請求項4】

ヌクレオチド配列の配列番号1を含む、cDNA。

【請求項5】

請求項3または4記載のcDNAを運ぶ、複製ベクターまたは発現ベクター。

【請求項6】

組換えアデノ関連ウイルス(AAV)である、請求項5記載のベクター。

【請求項7】

請求項5または6記載の複製ベクターまたは発現ベクターを用いて形質転換される、宿主細胞。

【請求項8】

それが哺乳類細胞である、請求項7記載の宿主細胞。

【請求項9】

それがタイプ C 2 . 7 の筋肉細胞である、請求項 8 記載の宿主細胞。

【請求項 1 0】

それが仔ハムスター腎細胞である、請求項 8 記載の宿主細胞。

【請求項 1 1】

それがタイプ P C 1 2 の神経細胞である、請求項 8 記載の宿主細胞。

【請求項 1 2】

それがタイプ N 2 a の神経細胞である、請求項 8 記載の宿主細胞。

【請求項 1 3】

それがタイプ G T 1 の神経細胞である、請求項 8 記載の宿主細胞。

【請求項 1 4】

それが N I H 3 T 3 細胞である、請求項 8 記載の宿主細胞。

10

【請求項 1 5】

請求項 6 記載の宿主細胞を、本発明に従う抗体分子の発現に有効な条件下に培養する工程を含む、請求項 1 または 2 記載の抗体分子の生産をするための方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 または 2 記載の本発明に従う抗体分子を、薬学的に許容される希釈剤および / または媒体との組合せにおいて備える、診断上の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、抗体の分野に関わり、それは、プリオンタンパク質の細胞表面受容体、37kDa a/67kDa ラミニン受容体に対して向けられる。特に、本発明は、単鎖(single-chain、1本鎖)抗体に関し、これは、双方の37kDaの前駆体形態のラミニン受容体(37kDa LRP)及び67kDaの高-親和性形態のラミニン受容体(67kDa LR)を特異的に認識する。

【背景技術】

【0002】

プリオンタンパク質は、ヒツジ、マウス及びハムスターにおけるスクレピー、ウシの伝達性海綿状脳疾患(übertragbare spongiforme Encephalopathie von Rindern、BSE)、ミンクにおける伝達性海綿状脳疾患(TME)、クールー、ゲルスマン・ストロイスラー・シェインカー症候群(Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome、GSS)、人類におけるクロイツフェルト-ヤコブ疾病(CJD)及び致死性家族性不眠症(FFI)のような極めて異なる形態の伝達性海綿状脳疾患(TSEs)の発生に関与し、完全にではないにしても、PrP^{Sc}、遍在性細胞性プリオンタンパク質PrP^Cの異例なイソ形態から主として構成される(例えば、Aguzzi(アガジ)及びWeissmann(ワイスマン)、1998年;Lasmezas(ラスメザス)及びWeiss(ワイス)、2000年;Prusiner(プルシナー)等、1998年を参照)。

30

【0003】

PrP^Cが、プリオンタンパク質の細胞表面受容体、37kDa LRP/67kDa LRに対し特異的に結合することは、国際公開第98/53838号パンフレット(WO 98/53838号)から、及びRieger(リーガー)等(Rieger et al., 1997年)から知られる。WO 98/53838号から、及び欧州特許出願公開(EP-A-)第1 127 894号明細書から、及びRieger等(Rieger等、1997年)から、ラミニン受容体の、ハムスター及びマウスのような、スクレピーに感染した動物の組織におけるレベルが増加することが、知られる。

40

【0004】

Gauczynski(ガウクチンスキ)等、2001bは、37kDa LRP/67kDa LRが、PrP^Cについて受容体として機能することを示す。双方の分子上の結合部位がマッピングされ(Hundt(フント)等、2001年)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPGs)がPrP^Cについての補因子又は共同受容体(Corezeptoren)として識別された(Hundt等、2001年)。

【0005】

37kDaのラミニン受容体前駆体(37kDa LRP、p40、LBP)は、67kDaの高親和性ラミニン受容体(67kDa LR)の前駆体タンパク質である(Rao(ラオ)等、1989年;Yow(ヨウ)等、1988年)

50

。67kDaの形態は、最初に腫瘍細胞から分離されたもので(Lesot(レソト)等、1983年; Malinoff(マリノフ)及びWicha(ウィチャ)、1983年;Rao等、1983年)、そこでは、タンパク質がラミニンに対して高い親和性を持つ。

【 0 0 0 6 】

37kDa/67kDaのラミニン受容体は、更に腫瘍組織において過剰発現される(Lesot等、1983年;Malinoff及びWicha、1983;Rao等、1983年)。

【 0 0 0 7 】

ラミニンは、細胞外基質の糖タンパク質であり、そこでは、それは、細胞の付着、運動、分化及び成長に關与する(Beck(ベック)等、1990年)。双方の形態のラミニン受容体は、哺乳類細胞において一緒に存在しており、それは、膜画分(フラクション)の免疫学的調査によって示すことが可能であった(Gauczynski等、2001b)。

10

【 0 0 0 8 】

37kDaの形態はまた、細胞質ゾルにおいても生じ、そこでは、それは、リボソームに關連し、及びタンパク質翻訳において務めを引き受けることができる(Auth(オウス)及びBrawermann(ブラウマン)、1992年;Sato(サトウ)等、1999年)。核におけるこのタンパク質の存在もまた議論されており、そこでは、それは、構造の維持にも關与しているはずである(Kinoshita(キノシタ)等、1998年;Sato等、1996年)。

【 0 0 0 9 】

LRP/LRは、多機能性タンパク質であり、これは、遺伝子産物p40からのものであり、2種の異なる形態をとり得、種々の細胞区画で生じ、及びそこで異なる機能を發揮する。37kDa/67kDaのラミニン受容体のアミノ酸配列は、哺乳類において、高い相同性を持ちながら、高度に保存される(Rao等、1989年)。アミノ酸配列の進化分析(Evolutionsanalyse)を用いることで、回文配列(palindromische Sequenz)LMWWMLがラミニンに結合する能力に關与することを示すことが可能となった。この配列は37kDa LRPのPrP-結合領域に位置する(Ardini(アーディニ)等、1998年;Hundt等、2001年;Rieger等、1997年)。

20

【 0 0 1 0 】

リボソームタンパク質p40は、最初にはラミニンと結合する能力を所有していなかったが(Auth及びBrawermann、1992年)、進化(Evolution)の過程において、アミノ酸の交換、及びエラスチン(Hinek(ハインク)等、1988年;Salas(サラス)等、1992年)及び糖質(Kohlenhydratketten)鎖(例えば、Ardini等、1998年;Mecham(メカム)、1991年;Rieger等、1999年を参照)にも結合し得るラミニン-結合細胞表面タンパク質への翻訳後の変化の導入によって発展したと考えられる。

30

【 0 0 1 1 】

ラミニン受容体ファミリーは、多くの真核細胞において高度に保存され(Keppel(ケッペル)及びSchaller(シャラー)、1991年;Wewer(ヴェーヴェ)等、1986年)、及びまた、古細菌(Archaea)においても見出すことができる(Ouzonis(ウーゾニス)等、1995年)。37kDa LRPは、蚊の細胞上のベネズエラウマ脳炎ウイルスについての受容体として機能し(Ludwig(ラドヴィグ)等、1996年)、その一方、67kDaの形態は、シンドビスウイルスについての受容体として明らかに用いることできる(Wang(ワン)等、1992年)。

【 0 0 1 2 】

37kDaの形態から67kDaのタンパク質への転換の基礎をなす処理に關し、双方のタンパク質が37kDaの成分から構成され、多数の提案が成熟タンパク質のより一層大きな質量を説明してきたことが既知である。37kDaのタンパク質のホモ二量体化、及びまた別の成分への結合も議論されている(Castronovo(カストロノボ)等、1991年;Landowski(ランドフスキ)等、1995年)。しかし、他の調査は、脂肪酸によって安定化されるヘテロ二量体を提案する(Buto(プト)等、1998年)。最近、67kDaのラミニン受容体もまた、活性化ヒトTリンパ球上で生じ、及びそこでインテグリンと一緒に、ラミニンに対して強い親和性を持つことが示された(Canfield(キャンフィールド)及びKhakoo(ハクー)、1999年)。

40

【 0 0 1 3 】

しかし、現在、37kDa/67kDaの多型が終局的に説明されてないことを強調すべきである

50

【 0 0 1 4 】

37kDa/67kDaのラミニン受容体は、哺乳類のゲノムにおける多数の遺伝子によって表現される。人類において、26種の、マウスでは6種のコピーがある(Fernandez(フェルナンデス)等、1991年; Jackers(ジャッカーズ)等、1996b)。遺伝子は、7種のエキソン及び6種のイントロンから構成され、ほとんどの遺伝子のコピーはおそらく偽遺伝子である(Jackers、1996b)。マウスにおいて、6種の遺伝子の少なくとも2種は、活性であり、及び染色体9上に位置付けられる徴候がある(Douville(ドゥーヴィル)及びCarbonetto(カルボネット)、1992年; Fernandez等、1991年)。TRIBE-MCL、タンパク質ファミリーの検出のためのアルゴリズムの援助により(Enright(エンライト)等、2002年)、5種のLRP遺伝子が、関連のあるマウスゲノムの配列データバンク(www.ensembl.org)の選別(スクリーニング)用のプログラムを用いるときに識別された。驚くべきことに、最近、染色体9上に、マウスにおけるプリオン疾病の潜伏期間(Inkubationszeit)に影響する遺伝子座が位置付けされることが示された(Stephenson(ステファンソン)等、2000年)。

10

【 0 0 1 5 】

37kDa LRPについてコードする遺伝子は、Saccharomyces cerevisiae(サッカロミセス・セレビシエ、出芽酵母)(Davis(デイビス)等、1992年)、Arabidopsis thaliana(シロイヌナズナ)(Garcia-Hernandez(ガルシア-エルナンデス)等、1994年)、Drosophila melanogaster(キイロショウジョウバエ)(Melnick(メリ尼克)等、1993年)、ウニのUrechis caupo(ウレヒス・カウポ)(Rosenthal(ローゼンタール)及びWordeman(ウォードマン)、1995年)、Chlorohydra veridissima(クロロヒデラ・エルディシマ)(Keppel及びSchaller、1991年)、Candida albicans(カンジダ・アルピカンス)(Lopez-Ribot(ロベズ-リボー)等、1994年)、及び古細菌のHaloarcula marismortui(ハロアルキュラ・マリスモルトイ)(Ouzonis(ウーゾニス)等、1995年)、及び哺乳類(例えば、Gauczynski等、2001a; Leucht(ロイヒ)及びWeiss(ワイス)、2002年; Rieger等、1999年を参照)のような、多くの異なる種で識別されている。

20

【 0 0 1 6 】

WO 98/53838号から、そして(sowie)後の刊行物(Leucht等、2003年)から、多クローン性LRP抗体のW3が、培養された神経細胞におけるPrP^{Sc}の複製を妨げることが知られている。一般に、これは、37kDa LRP/67kDa LRに対する抗体が、完全に、プリオンの複製を少なくとも細胞培養物において抑え得ることを示す。興味深いことに、次いで、細胞はまた、追加の2週間の更なる培養の後、LRP/LR抗体が添加されない場合、PrP^{Sc}がないままであった(Leucht等、2003年)。一般に、これは、LRP/LR抗体が、プリオン-感染した細胞培養物のプリオン感染を完全に直すことができることを示す。

30

【 0 0 1 7 】

さらに、EP-A-1 127 894号明細書から、LRP/LR抗体を、プリオン疾病の認識のために診断上で採用することができ、その理由は、LRP/LRのレベルがスクレピーに感染した齧歯類の組織において増加するからであることが知られている。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

40

【 0 0 1 8 】

LRP/LRに対する多クローン性抗体は、WO 98/53838号及びEP-A-1 127 894号明細書に記載されているが、しかし、欠点を所有しており、それは、それらが、困難を伴って選定されるしかないことで、非常に大きく、及び高い免疫原性を見せる。単鎖抗体に比し、それらは大腸菌(*E. coli*)において大量に合成され得るが、これらの抗体は、制限された範囲について利用されるに過ぎない。

【 0 0 1 9 】

したがって、本発明の目的は、LRP/LRを特異的に認識する、利用可能で新しい単クローン性抗体を作製することを目的とし、それは、選定するのに簡易で、小さな寸法によって区別され、及び低い免疫原性を持つ。

50

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明の第1の局面の対象は、単鎖抗体分子であり、それは、LRP/LRに対して特異的に向けられ、及びそれは、アミノ酸配列の配列番号2、そしてその同族体(Homologe)又はその断片(Fragmente、フラグメント)、そしてその断片の同族体を備える。

【0021】

本発明の更なる局面の対象は、単鎖抗体分子であり、それは、LRP/LRに対して特異的に向けられ、及びそれは、アミノ酸配列の配列番号4、そしてその同族体又はそのフラグメント、そしてその断片の同族体を備える。

【0022】

アミノ酸配列の配列番号2又は4を備える抗体分子の同族体は、通例、アミノ酸配列の配列番号2又は4を備える抗体分子に対し、少なくとも60、80又は100個の又はそれよりも多くの数の隣接するアミノ酸の領域にわたって、少なくとも70%まで、好ましくは80又は90%まで及び特に好ましくは95%まで相同性である。

【0023】

概して、アミノ酸配列の配列番号2又は4を備える本発明に従う抗体分子の断片、又はその同族体は、少なくとも30、40、50又は60のアミノ酸のアミノ酸長さを持つ。

【0024】

本発明の更なる局面の対象は、名称S18を持つ抗体分子についてコードするcDNAであり、それは、LRP/LRに対して向けられ、及びそれは、ヌクレオチド配列の配列番号1、そしてcDNAに選択的にハイブリダイズする断片のcDNAを備える。

【0025】

本発明の更なる局面の対象は、名称N3を持つ抗体分子についてコードするcDNAであり、それは、LRP/LRに対して向けられ、及びそれは、ヌクレオチド配列の配列番号3、そしてcDNAに選択的にハイブリダイズする断片cDNAを備える。

【0026】

ヌクレオチド配列の配列番号1又は3を備えるcDNAへの選択的なハイブリダイゼーションについての能力を持つcDNAは、通例、ヌクレオチド配列の配列番号1又は3を備えるcDNAに対し、少なくとも60、80又は100個又はそれよりも多い数の隣接するヌクレオチドの領域にわたり、少なくとも70%まで、好ましくは80又は90%まで、及び特に95%まで相同性である。

【0027】

本発明の更なる局面の対象は、本発明に従うcDNAを運ぶ複製又は発現のベクターである。ベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス又はファージのベクターであってよく、これらは、複製起点、及び随意にcDNAの発現のためのプロモータ、及び随意にプロモータの調節因子(Regulator)を備える。ベクターは、1種又はそれよりも多い種類の選定可能なマーカー遺伝子、例えば、アンピシリン耐性遺伝子を含むことができる。ベクターは、インビトロで、例えば、cDNAに対応するRNAの生産のために、又は宿主細胞の形質移入(トランスフェクション)のために用いることができる。適切なベクターは、例えば、ウイルスベクター(レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ-随伴(関連)ウイルス(Adeno-associated Viren, AAV))である。

【0028】

本発明の更なる局面の対象は、本発明に従うcDNAの複製及び発現のためのベクターで形質転換される宿主細胞であり、ヌクレオチド配列の配列番号1又は3又はその読み枠を備えるcDNAが含まれる。細胞は、それらがベクターと適合性であるように選ばれる。これらの例としては、細菌、酵母、昆虫細胞又は哺乳類細胞であり、特にE. coli細胞又は哺乳類細胞である。

【0029】

本発明の更なる局面の対象は、抗体分子を生産するための処理であり、それには、本発明に従う宿主細胞を、本発明に従う抗体分子の発現に有効な条件下に培養する工程を含む

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

本発明の更なる局面の対象は、本発明に従う抗体分子を、薬学的に許容される希釈剤及び/又は媒体(Trager、担体、賦形剤)と組み合わせて備える、薬学的組成物である。

【 0 0 3 1 】

さらに、好適例において、上述の薬学的組成物はプリオン疾病の処置のために適切である。

【 0 0 3 2 】

本発明の更なる局面の対象は、本発明に従う抗体分子を、許容される希釈剤及び/又は媒体と組み合わせて備える、診断上の組成物である。

10

【 0 0 3 3 】

上述する抗体分子はまた、それらのアミノ酸配列の一部が失われている(欠失している)もの(即ち、配列番号2又は4において表されるアミノ酸配列の生物学的活性の表示(Entfaltung)について本質的な配列を備えるだけの抗体分子)、それらのアミノ酸配列の一部が他のアミノ酸によって置き換えられているもの(即ち、アミノ酸が同様の特性のアミノ酸によって置き換えられているもの)、及び他のアミノ酸が、それらのアミノ酸配列の一部においてそれに加えられるか、又は挿入されているものを備える。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 3 4 】

図1は、単鎖(単鎖抗体)scFvの概略的描写を、全長を持つFab及びFc部分から構成される抗体と比較して示す。そのscFvは、重鎖(V_H)の1部分及び軽鎖(V_L)の1部分から構成される。双方の部分は、抗原認識に關与する抗体のFab部分から起因する。 V_H 及び V_L はリンカー(YOL)によってつながれる。

20

【 0 0 3 5 】

図2は、GST::LRPに対して向けられるscFv抗体の選別のために用いた未処理(naive)のscFvバンクを概略的に示す。未処理バンクは、およそ 2×10^9 個のクローンを含み、及び脾臓又はPBLs(末梢血リンパ球)からのそれぞれのcDNAのPCR増幅後に、重鎖(V_H)及び軽鎖(V_L)についてのコード領域の組合せによって生じた。

【 0 0 3 6 】

図3は、良好な折り畳み特性及び高い発現率を持つ選定した枠組み(フレームワーク)から構成され、及びそれらのCDR3領域において無作為化(ランダム化)された配列を備える合成scFvバンクを概略的に示す。バンクは、およそ 1×10^9 個のクローンを含む。

30

【 0 0 3 7 】

図4は、ファージ提示法(Phage-Display)を用いる選別処理を概略的に示す。この処理において、図2及び図3に示す未処理又は合成のscFvバンクを採用する。WO 98/53838号に記述の抗原GST::LRPを、ポリスチレン管上に不動化(immobilisiert)した。GST::LRPに結合するscFvが存在するファージだけを選定する。非特異的に結合するファージを洗い流す。これらのファージの増幅に続いて、これらを3種の連続的な選定ラウンドを用いることで濃縮する(angereichert werden)。

【 0 0 3 8 】

図5は、3種の選定ラウンドの後に未処理のscFvバンクから得られるクローンのペリプラズマ性粗抽出物(periplasmatischen Rohextrakten)のELISAを示す。抽出物を、組換えGST::LRP融合タンパク質上で試験した。結果を、図7において表の形態で示す。K=二次抗体だけ。

40

【 0 0 3 9 】

図6は、3種の選定ラウンドの後に合成scFvバンクから得られるクローンのペリプラズマ性粗抽出物のELISAを示す。抽出物を、組換えGST::LRP融合タンパク質上で試験した。結果を、図7に表の形態で示す。K=二次抗体だけ。

【 0 0 4 0 】

図7は、図5及び図6からのELISAsの結果を概略的に編集する。未処理バンクの場合(図5)

50

における48種のクローンの32種(66%)、及び合成バンクからの47種のクローンの25種(53%)が、陽性のシグナルを示した。さらに、未処理バンクからの13種のクローン及び合成バンクからの6種のクローンの、GST(融合相手(Fusionspartner)を伴わない)上での再試験を遂行した。GSTは認識されなかったが、それは、scFvsだけが融合タンパク質のLRP部分を認識することを結論付けさせる。未処理バンクからの13種のクローンのcDNAsの、BstNIを用いる制限分析(Restriktionsanalyse)は、10種のクローンが同じであったことを示した(10/13)。更なるクローンを2回識別した(2/13)。1種のクローン(N37)は個々の制限パターンを示した。

【 0 0 4 1 】

図8は、合成(S)及び未処理(N)のscFvバンクから選定される個々のクローンによる組換えGST::LRPの検出を示す。ELISA(図5及び図6)を用いることで識別された選定クローンを、ウェスタンブロットにおいて試験した。各トラックにおいて、rec.(組換え)GST及びバキュロウイルス系(システム)において発現するGST::LRPの混合物を、12%強度(igen、濃度)のSDS-PAゲル上で分離させた。タンパク質を、ニトロセルロース膜上にブロットした。ブロットの個々のトラックを切り離し、及び個々の細条を、未処理及び合成のバンクからの選定した個々のscFvsのペリプラズマ性抽出物又はそれぞれの対照と共に温置(インキュベーション)した。WO 98/53838号から既知の多クローン性抗-LRP抗血清W3を、多クローン性ヤギ抗-ラビット(野ウサギ)HRP-複合体(Konjugat)(Dianova(ダイアノバ社))を用いて検出した。scFvsを、単クローン性マウス抗-ペンタ-ヒスチジン抗体(Qiagen(キアゲン社))を用い、次いでヤギ抗-マウスHRP複合体(Dianova)によって検出した。抗-ラビット-HRP:ヤギ抗-野ウサギ複合体だけ。抗-His:更なるヤギ抗-マウスHRP複合体を伴う単クローン性マウス抗-ヒスチジン抗体。抗-マウスHRP:ヤギ抗-マウスHRP複合体だけ。MIuC5:単クローン性抗-LRP抗体、これは、ウェスタンブロット分析において機能しない。

それらのscFvsのN3、及びS18及びS23は強いシグナルを生成した。いずれのscFv抗体もrec.GSTを認識しなかったが、これはすべてのscFvsがLRP部分を認識することを示す。

【 0 0 4 2 】

図9は、N2a細胞の表面上及び細胞内でのLRP/LRの検出を示す。

表面:細胞を、100 µg/mLの抗-LRP抗血清W3(WO 98/53838号)と共に、次いでFITC-複合化ヤギ抗-野ウサギIgGと共に温置した。

scFv抗-LR/LRP N3及びS18を、各場合において18 µg/mLで採用し、及び単クローン性抗-His抗体(1:20;Dia900)を用い、次にFITC-複合化ヤギ抗-マウスIgGによって検出した。

細胞内:細胞を、3%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、及び以下の修飾を伴う上述の抗体で染色する前に、50mM NH₄Cl/20mMグリシンを用いて温置した:すべての洗浄及び温置の工程は、室温で0.1%サポニン-含有緩衝剤(緩衝液)において遂行した。これらのscFvの抗体を、各場合において9 µg/mLまでの濃度で採用した。

【 0 0 4 3 】

図10は、ジャーカット(Jurkat)細胞(ヒト、末梢血白血病T細胞)の表面上及び細胞内でのLRP/LRの検出を示す。抗体、用いる二次及び三次抗体は、図9の説明文に記載するものに対応する。用いる方法は、図9に記載するものに対応するが、ジャーカット細胞が用いられた事実は別である。

【 0 0 4 4 】

図11は、組換えLRP::FLAG又は内因性LRP/LRの、SFV1-huLRP-FLAG又はSFV1-moLRP::FLAGを用いて形質移入された仔ハムスター腎細胞(BHK)における検出を示す。BHK細胞を、いずれかで、形質移入しないか(n.t.)、又はこの技術において専門的に熟練した者(当業者)に既知の様式においてrec.セムリキ森林ウイルス(Semliki-Forest-Virus、SFV)のRNAs SFV1-huLRP-FLAG又はSFV1-moLRP::FLAGを用いて形質移入した。rec.SFV RNAの調製、形質移入、そしてウェスタンブロット又は免疫蛍光法(図12)又はFACS(図13)による分析の方法は既に記載されている(Gauczynski等、2002年;Gauczynski等、2001b)。形質移入の24時間後、全体の細胞抽出物をウェスタンブロットによって分析した。全体の細胞抽出物を、12%強度のPAゲル上で分離し、次にタンパク質をPVDF膜上でブロットした。一次抗体として、sc

10

20

30

40

50

Fvs S18(C)及びN3(A) (希釈は各場合において1:1000)を採用し、二次抗体のマウス抗-c-myc(1:1000)として、三次抗体の抗-マウスHRP(セイヨウペルオキシダーゼ)として接合した。用いる対照は、抗-LRP抗体mLRP43512(A)、そして抗-マウスIgG-HRP-接合二次抗体であった。負荷対照(Ladungskontrolle)として、 α -アクチンレベルを定めた。この目的のため、抗- α -アクチン抗体(Chemicon(ケミコン社))を採用した。検出を、化学発光(Chemiluminescence)(Western Lightning(ウエスタン・ライトニング社)、NEN)によって遂行した。scFvS18及びN3は特異的にrec.LRP::FLAGを認識する。S18及びN3は内因性LRP(B、C)を認識する。N3は内因性LR(67kDa)(B)を認識する。

【 0 0 4 5 】

図12は、組換えSFV RNAを用いて形質移入したBHK細胞におけるLRP/LRの免疫蛍光分析である。BHK細胞を、図11に記載するように、形質移入しないか、又はrec.SFVのRNAs SFV-1-muLRP-FLAG及びSFV-1-huLRP-FLAGを用いて形質移入した。これらのscFv抗体のS18及びN3、そしてW0 98/53838号から既知のW3抗体を、各場合において1:100で採用した。S18及びN3について、抗-c-myc-FITC-接合二次抗体を、各場合において1:500で採用した。W3について、抗-ラビットCy2-接合抗体(1:500)を採用した。対照として、二次抗体の抗-c-myc FITC(1:500)だけを採用した。核をDAPIで染色した。この染色は図においては見れない。細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した。細胞を透過性にしなかったが、それが細胞表面染色を保証する。図は、scFvのS18及びN3が形質移入された細胞の表面上でLRP::FLAGを検出することを示す。双方のscFv S18及びN3はまた、内因性LRPを検出することができる(上から2番目及び3番目の左側図)。

【 0 0 4 6 】

図13は、形質移入してないか、又は組換えSFVのRNAs SFV-1-huLRP-FLAG又はSFV-1-muLRP-FLAGを用いて形質移入したBHK細胞のFACS分析を示す。scFvS18及びN3を、濃(Konz.)18 μ g/mLにおいて採用したが、W3抗体及び抗-ガレクチン-3抗体は100 μ g/mLである。二次抗体:S18及びN3についての抗-c-myc FITC-接合化、W3についての接合した抗-ラビットCy2、及び抗-ガレク(gal)3抗体についての抗-マウスCy2-接合化(二次抗体の希釈1:500)。細胞を透過性にしなかったが、それが細胞表面染色を保証する。図は、scFv S18及びN3が生細胞の細胞表面上でLRP::FLAGを検出できることを示す。

【 0 0 4 7 】

図14は、BSEを患うウシの血液の白血球画分における増加したLRレベルの、scFv S18によるウェスタンブロットにおける検出を示す。BSEを患うウシ、そして健康なウシの血液試料(500 μ L)を、1 \times SSCを用い1:1で混合し、及び4000rpm/10分で遠心分離した。上清(浮遊物)の除去は、1 \times SSCで沈殿物(ペレット)を再懸濁し、再び遠心分離し、及び上清を取り除く。沈殿物が白くなるまで沈殿物を洗浄する。白色白血球の沈殿物を100 μ LのTBS中で再懸濁する。白血球を12.5%強度のPAゲル上で分析する。対照として、パキキュロウイルス発現系からのGST::LRPを適用する。タンパク質を、PVDF膜上に、そしてscFv抗体S18(1:1000;およそ2 μ g/mL)を用いてプロットし、そして α -アクチンレベルの検出の対照として、抗- α -アクチン抗体(Chemicon)を用いて測り分ける。scFv S18について:二次抗体、抗-c-myc(1:1000)、三次抗体のヤギ抗-ラビットIgG-HRP-接合化(1:5000)。GST::LRPを、W3抗体、sec.(二次)抗体の抗-ラビットIgG-HRPを介して接合した。図は、BSEを患うウシの白血球画分の増加したLRRレベルを示す。

【 0 0 4 8 】

図15は、BSEを患う動物の脳脊髄液(CSF)における増加したLRレベルの検出を、健康な対照動物と比較して示す。同じ量のタンパク質を適用した。陽性対照として、GST::LRP(パキキュロウイルス系からのrec.)を適用した。全体の脳脊髄液を、12.5%強度のPAゲル上で分離し、及びPVDF膜上にプロットした。scFv S18及びN3を各場合において1:1000に希釈し(各々約2 μ g/mL)、二次抗体のマウス抗-c-myc(1:1000)、三次抗体のヤギ抗-マウスIgG-HRP-接合である。化学発光を介して検出する。図は、scFv S18及びN3によって、BSEを患うウシのCSFにおける増加したLRレベルを示す。

【 0 0 4 9 】

図16は、scFv S18及びN3が外因的にタグ(標識)付けされたPrP^Cの結合及び内面化(Internalisierung)を妨げ得ることを概略的に示す。図は、scFv S18及びN3の作用の可能性ある機構、はっきり言うと、プリオンタンパク質の細胞性形態の取込みの阻止(ブロッキング)を示す。

【0050】

図17は、スクレピーに感染した細胞に加えられたscFv抗体S18及びN3が、スクレピーに感染した細胞を直し得ることを概略的に示す(治療上の作用の機構)。

【0051】

図18は、scFv S18及びN3の予防上の作用の機構を概略的に示す。双方の抗体を非-感染細胞に添加する場合、それらは細胞がスクレピーに感染するのを妨げる(予防上の作用の機構)。

10

【0052】

図19は、動物におけるscFv抗体S18及びN3の生体内(インビボ)での治療上の適用を概略的に示す(受動的抗体運搬(Passiver Antibody Transfer))。(A)抗体を、最初に、好ましくは腹腔内に、抗体の可能性のある特異な、及び非特異(即ち、炎症反応)な副作用を検出するために、健康な動物、好ましくはハムスター又はマウス中に注入(注射)する。(B)次いで、scFv抗体S18及びN3を、PrP^{Sc}接種後の種々の時間、-好ましくはPrP^{Sc}接種後の1日に、腹腔内投与を始める。さらに、抗体を、次のプロトコルに従って繰り返し投与する: 各場合における200 µgのscFv抗体S18及びN3の初期の投与量を、腹腔内(i.p.)に、好ましくはC57/BL6マウス中に、プリオン株、好ましくはBSE株6PB1での腹腔内接種後の1日に投与する。100 µgのscFv S18/N3の週2回の腹腔内注入を、好ましくは更に8週間続ける。いく種かの動物を、90日のp.i.で犠牲にし、PrP^{Sc}の存在について生化学的に検討する。他の動物を、TSE疾病の末期で検討するか、又は徴候が生じない場合は、それらの寿命の最後で検査する。

20

【0053】

図20は、遺伝子療法及びscFv抗体S18及びN3の援助を用いるプリオン疾病の処置のための細胞の治療上の取り組み(アプローチ)を示す。遺伝子療法の取り組みは、S18及びN3についてコードする遺伝子を動物又は人類に対して運搬するために、ウイルスベクター、好ましくはAAVを用いる。細胞の治療の取り組みは、scFv抗体S18及びN3を分泌するカプセル化(encapsulierten、被包性)細胞を移植することによって遂行する。双方の取り組みを、次の図においてより一層詳細に説明する。

30

【0054】

図21は、スクレピーに感染した細胞上でscFv S18/N3を発現し得る組換えAAVウイルスの使用を示す。スクレピーに感染した神経細胞の、組換えS18/N3-発現AAVウイルスを用いる感染は、これらの細胞のスクレピーを直すべきである。

【0055】

図22は、哺乳類(人類を含む)、好ましくはマウスにおける、生体内でS18/N3を発現する組換えAAVウイルスを用いる遺伝子療法の取り組みを示す。(A)組換えAAVウイルスを健康な動物の脳中に直接注入した後、scFv抗体S18及びN3の発現を、脳画分のウェスタンブロット分析によって検査する。(B)マウスが、PrP^{Sc}の接種の前、その間、又はその後に、組換えS18/N3発現AAVウイルスを用いて注入される。マウスのTSE疾病の激増(Ausbruchs)の遅れを、精神運動試験及び脳の組織学的及び免疫組織化学的分析によって定める。

40

【0056】

図23は、神経細胞から、及び概略的に筋肉細胞からのscFv抗体S18及びN3のクローン化、発現/分泌を示す。(A)S18及びN3をコードするcDNAを、制限部位(制限酵素認識部位)HindIII/NotIを介して、分泌ベクターpSecTag2B中にクローン化する。(B)神経細胞を、rec.pSecTag2Bを用いて形質移入し、それはS18及びN3をコードする。(C)形質移入の24時間後(p.t.)、形質移入した細胞は、ウェスタンブロットによってS18とN3の発現及び分泌を示す(一次抗体:抗-c-myc;二次抗体:抗-マウスIgG-HRP-複合化。化学発光を介する検出)。図は、scFv S18及びN3が、N2a細胞から分泌され得ることを示す。

50

【 0 0 5 7 】

図24は、S18/N3-分泌性ScN2a細胞の投与を示す。スクレピ-増殖性細胞の形質移入後、これらはPrP^{Sc}が直されるはずである。

【 0 0 5 8 】

図25は、scFv S18/N3-分泌性細胞、好ましくは筋肉細胞又は神経細胞、BHK細胞又はNIH 3T3細胞による細胞治療を概略的に示すもので、それらはカプセル化され、及び人類を含む哺乳類の脳中に移植される。scFv S18/N3の分泌を用いて、有機体の脳におけるプリオンの増殖を止めるべきである。

【 0 0 5 9 】

図26は、scFv S18/N3抗体のエピトープマッピングを示す。

10

【 0 0 6 0 】

図27は、scFv S18/N3抗体のエピトープマッピングの概略的描写を示す。

【 0 0 6 1 】

(略号のリスト)

Ab=抗体

AAV=アデノ随伴ウイルス

BHK=仔ハムスター腎細胞

BSE=ウシ海綿状脳症疾患

BSE+=BSEを患うウシ(カウ)

BSE-=健康なウシ(カウ)

20

CDR1/2/3=相補性決定領域1/2/3

(s/f/nv)CJD=(散発性/家族性/新しい変異体)クロイツフェルド-ヤコブ病

c-myc=対応する癌遺伝子からのエピトープ

CMV=サイトメガロウイルス

CWD=慢性消耗病

cy2=4'-6-ジアミジン-2-フェニリンドール(phenylindole)

dsRed=赤色蛍光タンパク質

eGFP=強化(enhanced)緑色蛍光タンパク質

ELISA=酵素結合免疫吸着測定法

F_{ab}=抗体の抗原結合部位

30

F_c=抗体の定常部位

FFI=致死性家族性不眠症

FITC=フルオレセインイソチオシアネート

FLAG=8個のアミノ酸DYKDDDDKから構成されるポリペプチド

GSS=ゲルスマン・ストロイスラー・シェインカー症候群

GST=グルタチオンS-トランスフェラーゼ

GST::LRP=GST(N-末端)及びLRP(C-末端)の融合体

Ig =免疫グロブリンの鎖

i.p.=腹腔内

ジャーカット細胞 = ヒトの、末梢血白血病T細胞

40

N1-47=未処理scFvバンクから選ばれるscFv抗体

His=ヒスチジン

HRP=セイヨウワサビペルオキシダーゼ

リンカー=2種のタンパク質ドメイン(領域)に接続するアミノ酸配列

LR=67kDa形態のラミニン受容体(高親和性ラミニン受容体)

LRP=ラミニン受容体前駆体

Mr(K)=kDaにおける分子量標準

pIII=ファージコートタンパク質

polyHis=6つのヒスチジン残基から構成されるポリペプチド

PrP^C=細胞性形態のプリオンタンパク質

50

PrP^{Sc}=スクレピー形態のプリオンタンパク質
 S1-47=合成scFvバンクから選ばれるscFv抗体
 (Sc)GT1=(スクレピー-感染)視床下部神経細胞
 (Sc)N2a=(スクレピー-感染)神経芽細胞腫細胞
 W3=LRP/LR、多クローン性に対して向けられる抗体W3
 scF_v=リンカーによって接続されるV_L及びV_Hから構成される可変領域の単鎖抗体
 scF_v N3=未処理scF_vバンクから選ばれる単鎖抗体N3
 scF_v S18=合成scF_vバンクから選ばれる単鎖抗体S18
 SFV=セムリキ森林ウイルス
 TSE=伝達性海綿状脳疾患
 V_L=抗体の可変領域の軽鎖
 V_H=抗体の可変領域の重鎖

10

【0062】

本発明の第1の局面の対象は、単鎖抗体分子であり、それは、LRP/LRに対して特異的に向けられ、及びそれは、アミノ酸配列の配列番号2(SEQ ID NO:2)、そしてその同族体又はその断片、そして断片の同族体を備える。

【0063】

本発明の更なる局面の対象は、単鎖抗体分子であり、それは、LRP/LRに対して特異的に向けられ、及びそれは、アミノ酸配列の配列番号4(SEQ ID NO:4)、そしてその同族体又はその断片、そして断片の同族体を備える。

20

【0064】

アミノ酸配列の配列番号2又は4を備える抗体分子の同族体は、通例、アミノ酸配列の配列番号2又は4を備える抗体分子に対し、少なくとも60、80又は100個の又はそれよりも多くの数の隣接するアミノ酸の領域にわたって、少なくとも70%まで、好ましくは80又は90%まで及び特に95%まで相同性である。

【0065】

概して、アミノ酸配列の配列番号2又は4、又はその同族体を備える本発明に従う抗体分子の断片は、少なくとも30、40、50又は60個のアミノ酸の配列長さを持つ。

【0066】

好適例において、本発明に従う抗体分子は名称S18を持つものであり、それは、アミノ酸配列の配列番号2を持つ。

30

【0067】

更なる好適例において、本発明に従う抗体分子は、名称N3を持つものであり、それは、アミノ酸配列の配列番号4を持つ。

【0068】

本発明に従う単鎖抗体(scFv)は、抗体分子の可変性重鎖(V_H)と可変性軽鎖(V_L)の融合体から構成される。双方の鎖はペプチドリinker(YOL)を介して接続する。scFvライブラリから由来するscFvsは、C-末端ヒスチンタグを運び、それは、scFvの検出のため、及びIMACを用いるその純化のための双方に用いることができる(図1及び図2)。

【0069】

LRP/LRに対する抗体はまた、癌の診断についての有用なツール(道具)としても役立つ、癌の治療法として採用することもできる。本願において記載する単鎖抗体、好ましくは名称S18及びN3を持つ抗体分子はまた、癌の診断及び治療のために採用することもできる。

40

【0070】

図10は、単鎖抗体S18及びN3によるジャーカット細胞(ヒト、末梢血白血病T細胞)上のLRP/LRの細胞表面認識及び細胞内認識を示す。例は、本発明に従う抗体分子S18及びN3が白血病の診断に適切であり得ることを示す。この知見から、S18及びN3はまた、他の癌の診断にも適切であり得る。

【0071】

かかる抗体は、伝達性海面状脳疾患(TSE)の診断のため及び治療のための双方に極めて

50

適切である。したがって、本明細書に初めて記載する単鎖抗体はまた、プリオン疾病の診断にも適切である。

【 0 0 7 2 】

名称S18又はN3を持つ本発明に従う好適な抗体分子は、WO 98/53838号に選定抗原として記載されたGST::LRP融合タンパク質を用いるファージ-提示技術の援助を用いて複合体の合成及び未処理の抗体バンクから得られた。

【 0 0 7 3 】

scFv抗体の選択のために用いる複合体のscFvバンクは、互いに、およそ 3×10^9 個の個々のクローンを含んでいた(未処理のバンクはおよそ 2×10^9 個のクローンを、合成バンクはおよそ 1×10^9 個のクローンを含んだ)。未処理のIgMバンクは、脾臓又はPBLs(末梢血リンパ球)からのそれぞれのcDNAのPCR増幅後、可変性重鎖及び軽鎖のためのコード領域の組合せによって生じた。合成ライブラリの生産のために、ヒトscFv枠組みを選定したが、それは良好な折り畳み及び発現特性によって区別される。 V_H 鎖のCDR3配列を無作為化した。

10

【 0 0 7 4 】

親和性の選定を、各々の2種のバンクを用い、バキュロウイルス系において発現されるGST::LRP融合タンパク質上で遂行した。GST::LRP融合タンパク質の生産をWO 98/53838号において記載する。

【 0 0 7 5 】

図2は、 2×10^9 個の異なるクローンの発生を未処理のバンクについて概略的に要約する。図3は、合成scFv抗体バンクの発生を要約し、それは、 1×10^9 個のクローンの複雑性を持つ。

20

【 0 0 7 6 】

図4は、GST::LRPに対する特定の結合のためのscFv抗体の選定を概略的に要約する。

【 0 0 7 7 】

第3の選定ラウンドの後、各場合における各バンクの48個の個々のクローンの粗ペリプラズマ性抽出物を、ELISAにおいて、組換え融合タンパク質GST::LRPの認識に関して試験した(図5及び6)。未処理のバンクの場合における66%の個々のクローン、及び合成バンクの場合における53%が、ELISAにおいて陽性シグナルを示した(図7)。

【 0 0 7 8 】

組換えGST上での繰返し試験は、GST::LRP融合タンパク質が抗原として用いられたにも関わらず、全ての抗体がGSTを認識しなかったことを示した(図7)。

30

scFvをコードするDNAsのBstNIを用いる制限分析は、未処理のバンクからのあるクローンを高度に濃縮されたと識別した(図7)。合成バンクから濃縮されたクローンのCDR3配列は、2種の異なる共通配列を示した。すべてのクローンを、ウェスタンブロット分析において、組換えGST::LRP融合タンパク質の認識に関して試験した(図8)。対照として、GSTを各痕跡(Spur)に加えたが、それは、いずれのクローンもGSTを認識しなかったことを示した(図8)。

【 0 0 7 9 】

名称N3を持つ2種のクローン(未処理バンクからの)及びS18(合成バンクからの)を、更なる親和性の純化のために、 Cu^{2+} キレートカラム上で選定した。

40

【 0 0 8 0 】

名称S18を持つ単鎖抗体は、DNA配列の配列番号1(SEQ ID NO:1)からのcDNAレベルで暗号化される。

【 0 0 8 1 】

DNAは、プラスミドpEX/HAM/LRP-S18において含まれる。プラスミドを、DSMZ、Mascheroder(マスケローダ) Weg(ウェグ) 1b, D-38124 Brunswick(ブランズウィック)において、番号DSM15962の下に2003年2月10日に寄託した。E. coli XL1-Blue(ブルー)において形質転換した後、scFv抗体S18の生産が可能である。

【 0 0 8 2 】

名称S18を持つ単鎖抗体は、タンパク質レベルで配列の配列番号2(SEQ ID NO:2)を示す

50

。

【 0 0 8 3 】

名称N3を持つ単鎖抗体は、cDNAレベルでDNA配列の配列番号3(SEQ ID NO:3)から暗号化される。

【 0 0 8 4 】

DNAは、プラスミドpEX/HAM/LRP-N3において含まれる。プラスミドを、DSMZ、Mascheroder Weg 1b, D-38124 Brunswicにおいて、番号DSM 15961の下で2003年2月10日に寄託した。E. coli XL1-Blueに形質転換した後、scFv抗体N3の生産が可能である。

【 0 0 8 5 】

名称N3を持つ抗体は、タンパク質レベルで、配列の配列番号4(SEQ ID NO:4)を示す。

10

【 0 0 8 6 】

本発明に従う更なる具体例において、本発明に従う抗体分子を、更に、1種又はそれよりも多い種類の位置で、安定性を増加させるため、及び/又はそれらの生化学的及び/又は生理解物理学的特性を変化させるために、修飾する。

【 0 0 8 7 】

2種の単鎖抗体S18及びN3を、種々の生化学的及び細胞生物学的系において、特定のLRP/LR認識に関して試験した。

【 0 0 8 8 】

ネズミ神経芽細胞腫細胞(N2a)を、蛍光標示式細胞走査(Fluorescence-Activated Cell Scanning、FACS)によって、WO 98/53838号からのLRP/LR-特異性抗体W3(多クローン性)、及びLRP/LRの細胞表面発現のためのscFv抗体S18及びN3の援助を用いて、試験した。N2a細胞はプリオンの増殖について理想的な細胞系である。図9は、scFv抗体S18及びN3によるN2a細胞の表面上でのLRP/LRの検出を示す。これは、双方のscFv抗体S18及びN3が、N2a細胞の表面上で特異的にLRP/LRを認識することを示す。

20

【 0 0 8 9 】

37kDa/67kDa LRP/LRは、腫瘍組織上で強く発現される。例えば、転移性腫瘍細胞の表面上である(Coggin(コギン)等、1999年;Rohrer(ローラー)等、2001年)。図10は、ジャーカット細胞内及びその表面上での、37kDa/67kDa LRP/LRの、scFv抗体S18及びN3を用いる検出を示す。ジャーカット細胞は、ヒトの、末梢血白血球T細胞である。これは、本明細書に記載する単鎖抗体が、腫瘍細胞上でLRP/LRを認識し得、及び本発明に従う名称S18及びN3を持つ好適な抗体が、癌の診断に適切であることを示す。

30

【 0 0 9 0 】

本明細書に記載する名称S18及びN3を持つscFv抗体は、組換えセムリキ森林ウイルスRNAで形質移入された仔ハムスター腎細胞におけるLRPのカルボキシ-末端に付加されたFLAGタグとの融合体において、組換えヒト及びネズミの37kDa/67kDa LRP/LRを、ウェスタンブロット、免疫蛍光法、及び蛍光標示式細胞走査(FACS)によって認識することができる。これらの方法は、この技術において関連して専門的に熟練した者に既知である。図11は、ネズミ及びヒトの37kDa LRP::FLAGsの、及び67kDaの形態のscFv N3による認識、及び37kDa LRP::FLAGsの形態の、scFv S18によるBHK細胞における認識を、ウェスタンブロットによって示す。図12は、ヒト及びネズミのLRP/LR-発現BHK細胞の、scFv抗体S18及びN3の援助を用いる表面染色を示す。WO 98/53838号に記述の多クローン性抗体W3は、この点において同様であり得る。双方のscFv抗体S18及びN3は、同様に、双方のネズミ及びヒトのLRP/LR分子を、形質移入されたBHK細胞の表面上で、FACS分析において認識する(図13)。例は、scFv抗体S18及びN3が、LRP/LR分子を高度に特異的に認識することを実証する。N3及びS18の種々のLRP/LR種が認識されるという事実は、進化の間のタンパク質の極めて強力な保存によるものである(Ardini等、1998年)。

40

【 0 0 9 1 】

本発明の更なる局面の対象は、本発明に従う抗体分子を、許容される希釈剤及び/又は媒体と併用して備える診断上の組成物である。

【 0 0 9 2 】

50

本発明に従う名称S18及びN3を持つ好適なscFv抗体を、伝達性海綿状脳疾患の認識のための診断上のツールとして採用することができる。名称S18を持つ抗体分子は、血液の白血球画分において、ラミニン受容体の67kDa形態の増加したレベルを認識し、名称S18及びN3を持つ抗体分子は、BSEを患うウシの脳脊髄液において、それを認識する(図14、15)。双方のscFv抗体は、BSEの認識のための“代用マーカー-テスト(Surrogatmarker-Test)”用のツールとして役立つ。

【0093】

WO 98/53838号に記述のLRP/LR抗体W3と対照的に、本発明に従って好適に用いられる単鎖抗体S18及びN3は、LRに対してより一層特異的であり、及び単クローン性の起源の理由によってより一層高い特異性によって区別される。さらに、双方のscFvsは、E. coliにおいて制限されない量で生産することができるが、多クローン性抗体W3は限られた量でしか入手されない。

10

【0094】

同様の様式で、本発明に従い好適に用いられる名称S18及びN3を持つ抗体分子は、ヒツジにおけるスクレピー、シカ科動物における慢性消耗病(CWD)、nvCJD、sCJD、fCJD、クーラー、ゲルスマン・ストロイスラー・シェインカー(GSS)症候群及び人類における致死性家族性不眠症(FFI)のような、BSE以外のTSEsの診断のために用いることができる。

【0095】

本発明の更なる局面の対象は、本発明に従う抗体分子を、薬学的に許容される希釈剤及び/又は媒体と併用して備える薬学的組成物である。

20

【0096】

本発明に従う薬学的組成物は、伝達性海綿状脳疾患(TSEs)の治療に適切である。TSEsは、すべての既知の形態のTSEsを意味するとして理解される。本発明に従う抗体分子の利点は、WO 98/53838号に記述の多クローン性W3抗体、又は他の同じ特異性の単クローン性ネズミ抗体と比較して、本発明に従う抗体分子のヒト起源、及びそれに関連する低免疫原性にある。Fc部分を伴わない、及びヒト起源のscFvは、TSEを患う患者の治療を考慮して、潜在的により一層低い免疫原性のために、多大な利点がある。

【0097】

本発明に従う抗体分子は、プリオンタンパク質の、37kDa/67kDaラミニン受容体への結合及び内面化の防止のために採用することができる(図16参照)。

30

【0098】

さらに、本発明に従う抗体分子は、ScGT1、ScN2a、及びスクレピーに感染し得る他の脳細胞のような、スクレピーに感染する細胞の処置のために採用することができる(図17)。さらに、本発明に従う抗体分子はまた、予防のためにも採用することができる(図18)。この具体例において、それらは、細胞培養物におけるプリオン疾病の激増を妨げるべきである。

【0099】

更なる具体例において、本発明に従う抗体分子は、動物における生体内で、プリオン感染のか、又は伝達性海綿状脳疾患の齧歯類(ハムスター、マウス)を直すために、採用することができる。初めに、図19に詳述するように、本発明に従う抗体分子の可能性のある副作用を、本発明に従う抗体分子を健康なマウス又はハムスター中に注入することによって評価する。注入は、皮下にか、又は直接的に脳中に遂行する。哺乳類における抗体の注入の種々の可能性は、この技術における熟練した者によく知られている。抗体の副作用は、注入後の一定の後、マウスの寿命の最後まで(約800日)監視する。図19において示すような更なる具体例において、本発明に従う抗体を、PrP^{Sc}を用いた齧歯類の接種後の一定の時間に、齧歯類中に注入する。TSEの激増における可能性のある遅延又はTSEの激増の防止は、PrP^{Sc}蓄積(脳+脾臓)の不感時間(Todeszeitpunktes)の分析によって、及び精神運動試験の遂行によって観察される。これらの方法は、この技術において関連して専門的に熟練した者に既知である。

40

【0100】

50

本発明の更なる局面の対象は、本発明に従う抗体の、遺伝子治療及び細胞治療の関連での使用である(図20)。遺伝子治療の取り組みは、本発明に従う抗体分子についてコードする遺伝子を、処置すべき有機体中に導入する。これまで、多数の戦略が、神経細胞へのウイルスベクター(レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV))を用いる遺伝子運搬について監視されてきた。この場合、アデノ随伴ウイルス(AAV)系は最も期待できた。AAVは、非病原性で、及びニューロンのような非分裂性細胞に感染することができる。中枢神経系(CNS)中へのAAVを用いる遺伝子運搬は、効率的であり、及び細胞性のか、又は体液性の免疫反応を活性化することなしに起こる。AAVを用いる遺伝子運搬は、パーキンソン疾病(Kirik(キリク)等、2002年;Mandel(マンデル)等、1997年)、アルツハイマー疾病(Klein(クライン)等、2002年)、脱髄疾病(demyelinating disease)(多発性硬化症)(Guy(ガイ)等、1998年)のような、種々の動物系の神経学的機能障害において達成され、及びまた、脳腫瘍の処置のために好首尾であった(Ma(マー)等、2002年)。

【0101】

更なる具体例において、本発明に従う抗体分子を、脳において組換えAAVウイルスによって発現させることができる。AAV血清型の中で、AAV2は最も高度に適合され、及び優先的に神経細胞を変換する(transduziert)。AAVベクター、優先的には本発明に従う抗体分子についてコードするAAV-2を、Grimm(グリム)の方法(Grimm等、1998年)に従う高-力価ウイルス粒子を生産するために用いる。293細胞(ヒト胚性腎細胞株)を、AAVベクターであって、それが本発明に従う抗体分子についてコードするものを、AAVヘルパープラスミド(pDG)であって、それがAAVコートタンパク質遺伝子を発現するもの、及び更にアデノ随伴ウイルス遺伝子であって、それがパッケージングにおいてヘルパー機能について必要なものと一緒を用いて、形質移入する。スクレピーに感染した神経細胞(ScGT1、ScN2a、及び更にスクレピーに感染した脳細胞)を、組換えAAVウイルスに感染させ、それは本発明に従う抗体分子を発現し、それらのウイルスがスクレピーの細胞を直し得ることを示すためである(図21)。次に、組換えAAVウイルスを、マウス、好ましくはC57B16の脳中に注入する(図22)。本発明に従う抗体分子の発現を、感染後に種々の時間で脳画分のウェスタンブロット分析を用いることで点検する(図22A)。組換えAAVウイルスを、PrP^{Sc}での接種の前後の種々の時間に注入する(図22B)。マウスのTSE疾病の激増における遅延は、精神運動試験及び脳の組織学的及び免疫組織化学的分析によって定める。

【0102】

本発明の更なる具体例の対象は、本発明に従う抗体分子を生産する細胞を備える薬学的組成物であり、薬学的組成物は、哺乳類の脳中に直接導入されるのに適切である。例えば、これらの薬学的組成物は、本発明に従う抗体-生産細胞を含むカプセルでよい。これらの組成物は、TSEを患う、人類を含む哺乳類を処置するのに用いることができる。この戦略は、タンパク質、本発明の場合においては本発明に従う抗体分子を分泌し得る遺伝学的に修飾された細胞を使用することを包含する(図20)。これらの細胞は、免疫保護高分子(immunoprotektives Polymer)、例えば、硫酸セルロースにおいてカプセル化され、その細孔によってそれが大分子、本発明の場合での抗体のようなものを放出する。この処理において、細胞は、長期間にわたって生存したままである。この技術の概要としては、Pelegrin(プレグラン)等、1998年による論文も参照。この戦略は既に、ネズミウイルス疾病(Pelegrin等、2000年)、及び霊長類におけるパーキンソン疾病(Date(デイト)等、2000年)及びラットにおけるハンチントン疾病(Emerich(エメリヒ)等、1996年)のような動物モデルにおけるヒトの疾病の処置について好首尾に採用されている。

【0103】

この処理は次の工程を求める:神経芽細胞腫細胞又は他の神経細胞(PC12)を、一時的にか、又は安定的に、例えば、pSecTag2のような発現ベクターを用いて形質移入する(図23)。分泌のために、Ig-鎖リーダ配列を用いる。神経細胞における発現のために、CMV(サイトメガロウイルス)のような、プロモータを用いる。N2a細胞からの本発明に従う抗体の分泌は既に検出されているが(図23)、それはその処理が本発明に従う抗体と共に機能することを実証する。スクレピー-感染神経細胞と共に、本発明に従う分泌ベクターを用いて更

に形質移入を遂行する。これらの細胞からの双方の抗体の分泌により、細胞はスクレピーを直すことができる(図24)。

【0104】

TSEsの治療のための人類を含む哺乳類の脳中へのカプセル化細胞の移植用に、筋肉細胞(好ましくはC2.7細胞)を用いるが、その理由は、これらをマウス中に移植する場合、これらが長期の時間にわたって抗体を分泌することができるからである。筋原細胞又は分化した筋肉細胞(好ましくはC2.7細胞)を、発現ベクターを用いて安定的に形質移入し、それが、本発明に従う抗体を筋肉細胞-特異的プロモータの調節の下に発現する(図23)。あるいはまた、神経細胞(PC12細胞)又は仔ハムスター腎(BHK)細胞又はNIH3T3細胞もまた、用いることができ、それらは、更にカプセル化及び移植のために、本発明に従う抗体を分泌することができる。本発明に従う抗体分子を発現する細胞を、この技術において関連して専門的に熟練した者に既知の様式で、カプセル化する。この処理は、Pelegriin等、1998年のサマリーに記述されている(Pelegriin等、1998年)。ここで用いる物質は、例えば、硫酸セルロースでよい(Pelegriin等、1998年)。

10

【0105】

カプセル化細胞を、この技術において関連して専門的に熟練した者に既知の様式で、マウスの脳中に移植する。AAVウイルスを用いる上述の遺伝子治療の取り組みの場合におけるように、最初に単鎖抗体の発現を試験する。TSE疾病に対する本発明に従う抗体の治療上の効果を点検するために、実験動物、好ましくはマウス又はハムスターに、本発明に従う抗体分子を発現する細胞を移植し、PrPScを接種する。マウスのTSE疾病の激増における遅延を、精神運動試験、及び脳の組織学的及び免疫組織化学的分析によって定める。

20

【実施例】

【0106】

本発明を、図を参照して非制限的例の援助を用いて、以下により一層詳細に説明する。
(例)

【0107】

(例1)

(合成及び未処理のscFvバンクからのscFv S18及びN3の選定(バイオパニング))

単鎖scFv断片の選定用に用いる抗原は、WO 98/53838号に記載のGST::LRP融合タンパク質であった。

30

【0108】

scFv抗体の選定用に、2種の複合体scFvバンクを用いたが、これらには、およそ 3×10^9 個の個々のクローンが含まれる(未処理バンクはおよそ 2×10^9 個のクローン、合成バンクはおよそ 1×10^9 個のクローンを含む)。未処理のIgMバンクを、脾臓又はPBLs(末梢血リンパ球)からのそれぞれのcDNAのPCR増幅後に可変性重鎖及び軽鎖についてのコード領域の組合せによって生じさせた。合成ライブラリの調製のために、ヒトscFv枠組みを選定したが、それらは良好な折り畳み及び発現特性によって区別された。 V_H 鎖のCDR3配列を無作為化した。

【0109】

選定を、バキュロウイルス系において発現するGST::LRP融合タンパク質上での各々の2種のバンクを用いて遂行した。GST::LRP融合タンパク質の生産は、WO 98/53838号に記載されている。

40

【0110】

図2は、未処理バンクについての 2×10^9 個の異なるクローンの発生を概略的にまとめる。図3は、合成scFv抗体バンクの発生をまとめたもので、それは 1×10^9 個のクローンの複雑性を示す。

図4は、GST::LRPへの特定の結合に対するscFv抗体の選定を概略的にまとめる。

【0111】

第3の選定ラウンドの後、各々の場合の各バンクにおいて、48種の個々のクローンのペリプラズマ性粗抽出物を、ELISAにおいて組換え融合タンパク質GST::LRPの認識に関して

50

試験した(図5及び6)。未処理バンクの場合においては個々のクローンの66%が、合成バンクの場合には53%が、ELISAにおいて陽性シグナルを示した(図7)。

【0112】

組換えGST上での反復試験は、すべての抗体がGSTを認識しなかったが、用いる抗原がGST:LRP融合タンパク質であったことを示した(図7)。

ScFvについてコードするDNAsの、BstNIを用いる制限分析は、未処理バンクからのあるクローンを高度に濃縮されたものとして示した(図7)。合成バンクから分離されたクローンの V_H -CDR3配列は、2種の異なる共通配列を示す。すべてのクローンを、ウェスタンブロット分析において、rec.GST:LRP融合タンパク質の認識に関して試験した(図8)。採用した対照はGSTであり、それはいずれのクローンもGSTを認識しなかったことを示した(図8)

10

【0113】

名称N3(未処理バンクからの)及び名称S18(合成バンクからの)を持つ2種のクローンを、 Cu^{2+} キレートカラム上での更なる親和性純化のために最も強い濃縮の理由から選定した。

【0114】

単鎖抗体S18は、cDNAレベルで、DNA配列の配列番号1によって暗号化される。

【0115】

DNAはプラスミドpEX/HAM/LRP-S18において含まれる。プラスミドは、DSMZ、Mascherode r Weg 1b、D-38124 Brunswickにおいて、番号DSM 15962の下で2003年2月10日に寄託した。E. coli XL1-Blueにおける形質転換の後、scFv抗体S18の生産が可能である。

20

【0116】

タンパク質レベルで、S18抗体は配列の配列番号2を示す。

【0117】

単鎖抗体N3は、cDNAレベルで、DNA配列の配列番号3によって暗号化される。

【0118】

DNAはプラスミドpEX/HAM/LRP-S18において含まれる。プラスミドは、DSMZ、Mascherode r Weg 1b、D-38124 Brunswickにおいて、番号DSM 15961の下で2003年2月10日に寄託した。E. coli XL1-Blueにおける形質転換の後、scFv抗体N3の生産が可能である。

【0119】

タンパク質レベルで、N3抗体は配列の配列番号4を示す。

30

【0120】

この技術において関連して専門的に熟練した者は、scFv抗体S18及びN3を、それ自体既知の様式において、XL1-BlueのようなE. coli株におけるプラスミドpEX/HAM/LRP-S18及びpEX/HAM/LRP-N3の形質転換によって大量に発現させることができる。この技術において関連して専門的に熟練した者は、発現したタンパク質S18及びN3を、IMAC(固定化金属親和性クロマトグラフィー)によって、それ自体既知の様式で精製することができる。

【0121】

代わりに、scFv抗体S18及びN3を、E. coli株RV308において発現させることができる。この目的のため、S18及びN3についてコードするプラスミドpEX/HAM/LRP-S18及びpEX/HAM/LRP-N3からのcDNAを、ベクターpSKK-2においてNcoI/NotIを用いることでクローン化し、それは発現プラスミドpSKK-2-18及びpSKK-2-N3を導いた。

40

【0122】

pSKK-2からのscFv抗体S18及びN3の発現には、PIII融合タンパク質がもはや生産されないという利点が包含される。さらに、シャペロンSKPがpSKK-2によって発現され、それがタンパク質の折り畳みの改善に貢献する。その上、追加のc-mycタグをC末端で導入し、それは付加的に、抗-c-myc抗体を用いることで代替りの検出を可能にする。XL1-Blueと比較したRV308の利点は、そのより一層迅速な成長である。

【0123】

scFv抗体S18及びN3の発現のために、E. coli RV308の一昼夜培養物を、pSKK-S18/N3で形質転換する(100 μ g/mLのアmpiシリン及び50mMのグルコースを含有する2YT培地)。100

50

μg/Lのアンピシリン及び50mMのグルコースを有する2YT培地における培養物の1:10の希釈、及び0.6-0.8のOD₆₀₀に達するまでの培養を続ける(26、160rpm、約2時間)。培養物を7500rpm、20、20分間で遠心分離する。100 μg/mLのアンピシリン、0.2mMのIPTGを含有するYTBSの1vol(容量)において、沈殿物を再懸濁する。21、160rpmでの一昼夜の温置を続ける。次いで、9000rpm、4、20分間の遠心分離を続ける。沈殿物を、1/20 volにおいて冷TES緩衝液を用いて再懸濁する。1時間の温置を、氷上で随時振盪させながら続ける。9000rpmでの遠心分離を、4で1時間行う。上清を、PBS(4)に対して一昼夜透析する。透析した抗体溶液を、9000rpm、4、1時間で遠心分離する。抗体S18及びN3を、IMAC(固定化金属親和性クロマトグラフィー)を用いることで精製する。抗体S18及びN3を、“キレート化セファロース”のビーズに、一昼夜4で結合する。ビーズを、透析緩衝液を用い、4で洗浄し、及び洗浄緩衝液を用いるビーズの洗浄を4で続ける。scFv S18及びN3を、溶離緩衝液(イミダゾール)を用いて4で溶出させる。クーマシーブルーで染色した12%強度のSDS PAゲル上での、scFv抗体S18及びN3の分析は、およそ30kDaのレベルでバンドを示す。PVDF膜上でのバンドをプロットした後、双方のscFv抗体を、抗-c-myc及び抗-His抗体を用いることで検出することが可能となった。

【0124】

このようにして、生産したscFv抗体S18及びN3を、次の例における更なる適用のために採用することができる。

【0125】

(例2)

(培養細胞上でのscFv抗体S18及びN3の、FACS、IF及びウェスタンブロットによる特徴付け-腫瘍細胞(ジャーカット細胞)上での増加したLRP/LRレベルの検出)

ネズミ神経芽細胞腫細胞(N2a)を、LRP/LRの細胞表面発現について、蛍光標示式細胞走査(FACS)によって、WO 98/53838号からのLRP/LR特定抗体W3(多クローン性)及びscFv抗体S18及びN3の援助を用いて試験した(図9)。N2a細胞はプリオンの増殖にとって理想的な細胞系である。図9は、N2a細胞上でのscFv抗体S18及びN3によるLRP/LRの検出を示す。これは、双方の単鎖抗体S18及びN3が、N2a細胞の表面上でLRP/LRを特異的に認識することを示す。技術的な詳細を図9に対する説明文から推測することができる。

【0126】

37kDa/67kDa LRP/LRは、腫瘍組織上、例えば、転移性腫瘍細胞の表面上で、強く発現される(Coggin(コギン)等、1999年;Rohrer等、2001年)。図10は、scFv抗体S18及びN3を用いる、ジャーカット細胞における及びその表面上での37kDa/67kDa LRP/LRの検出を示す。ジャーカット細胞は、ヒト、末梢血白血球T細胞である。これは、本明細書に記載する単鎖抗体が、腫瘍細胞上でLRP/LRを認識し得ることを示し、抗体S18及びN3が、癌の診断に適切であることを実証する。技術的な詳細を図10に対する説明文から推測することができる。

【0127】

本明細書に記載のscFv抗体S18及びN3は、組換えヒト及びネズミ37kDa/67kDa LRP/LRを、rec.セムリキ森林ウイルスRNAで形質移入された仔ハムスター腎細胞でLRPのカルボキシ末端に付加したFLAGタグとの融合体において、ウェスタンブロット、免疫蛍光法及び蛍光標示式細胞走査(FACS)によって、認識することができる。これらの方法は、この技術において関連して専門的に熟練した者に既知である。図11は、ネズミ及びヒトの37kDa LRP::FLAGsの、そして67kDaの形態のscFv N3による認識、及び37kDa LRP::FLAGsの形態の、scFv S18によるBHK細胞における認識を、ウェスタンブロットによって示す。図12は、ヒト及びネズミのLRP/LR-発現BHK細胞の、scFv抗体S18及びN3の援助を用いる表面染色を示す。WO 98/53838号に記述の多クローン性抗体W3は、同様に、これを行い得る。双方のscFv抗体S18及びN3は、同様に、双方のネズミ及びヒトのLRP/LR分子を、形質移入されたBHK細胞の表面上で、FACS分析において認識する(図13)。例は、scFv抗体S18及びN3がLRP/LR分子を高度に特異的に認識することを実証する。N3及びS18の種々のLRP/LR種が認識されるという事実は、進化の間のタンパク質の極めて強い保存に起因する(Ardini等、1998年)。

10

20

30

40

50

技術的な詳細を図11、12及び13に対する説明文から推測することができる。

【0128】

(例3)

(BSE診断におけるscFv抗体S18及びN3適用)

scFv抗体S18及びN3は、伝達性海綿状脳疾患の認識のための診断上のツールとして採用されてよい。ここでは、BSEを患うウシの血液の白血球画分におけるscFv S18、及びその脳脊髄液におけるscFv S18及びN3が、上昇したレベルの67kDaの形態のラミニン受容体を認識し得ることを実証する(図14及び15)。双方のscFv抗体は、BSEの認識のための“代用マーカテスト”用のツールをして役に立つ。WO 98/53838号に記述のLRP/LR抗体W3と対照的に、単鎖抗体S18及びN3は、LRについてより一層特異的であり、及びそれらの単クローン性起源の理由から、より一層高い特異性によって区別される。さらに、双方のscFvを、E. coliにおいて制限されない量で生産することができるが、多クローン性抗体W3は限られた量でしか入手されない。実験動物からの単クローン性抗体と比較した大きな利点は、ヒト起源の単離されたscFv分子に存する。

10

技術的な詳細を図14及び15に対する説明文から推測することができる。

【0129】

(例4)

(TSE治療におけるscFv抗体S18及びN3の適用)

単鎖抗体scFv S18及びN3を伝達性海綿状脳疾患(TSEs)の治療用に用いるべきことを請求する。TSEsは、すべての既知の形態のTSEsを意味するものと理解される。scFv S18及びN3の利点は、WO 98/53838号に記述の多クローン性W3抗体又は他の同じ特異性の単クローン性ネズミ抗体と比較して、ヒト起源のscFvで、及びそれと関連する低免疫原性にある。TSEを患う患者の治療を考慮して、Fc部分を伴わず、及びヒト起源のscFvは、潜在的により一層低い免疫原性のために、多大な利点がある。さらに、W3と対照的に、scFvは大量に生産することができる。

20

【0130】

scFv S18及びN3は、プリオンタンパク質の、それらの37kDa/67kDaラミニン受容体に対する結合及び内面化を妨げるべきである-図16に記載するように。

【0131】

scFv S18及びN3は、ScGT1、ScN2a及び他のスクレピ-感染性の脳細胞のような、スクレピ-感染細胞の処置のために用いるべきである(図17)。さらに、scFv S18及びN3抗体はまた、防止のために用いることもできる(図18)。この具体例において、それらはまた、細胞培養物において、プリオン疾病の激増を妨げるべきである。

30

【0132】

scFv S18及びN3は、生体内で動物において、齧歯類(ハムスター、マウス)のような動物をプリオン感染又は伝達性海綿状脳疾患から直すために用いるべきである。最初に、図19に詳述するように、scFv抗体S18及びN3の可能性のある副作用を、健康なマウス又はハムスター中にscFv抗体S18及びN3を注入することによって評価する。注入を腹腔内で遂行する。哺乳類への抗体の注入の種々の可能性は、その技術において熟練した者によく知られている。抗体の副作用は、注入後の一定の時間の後、マウスの寿命の最後まで(約800日)監視する。図19に示すような更なる具体例において、scFv抗体を、PrP^{Sc}での齧歯類の腹腔内への接種の後、一定の時間に齧歯類中に腹腔内注入する。プロトコル:各場合において、200 µgのS18及びN3抗体の初期投与量を、腹腔内(i.p.)に、好ましくは、プリオン株、好ましくはBSE株6PB1での腹腔内接種後の1日にC57/BL6マウスの腹腔内に注入する。i.p.注入は週に2回、100 µgのscFv S18/N3を用いて、更に好ましくは8週の間続ける。若干の動物を、注入後(p.i.)90日で犠牲にし、PrP^{Sc}の存在を生化学的に研究する。他の動物を、末期のTSE疾病について研究するか、又は何も徴候が現れなければ、それらの寿命の最後を迎えるかのいずれかである。TSEの激増の可能性のある遅延、又はTSE激増の防止を、死亡の時間、PrP^{Sc}の蓄積(脳+脾臓)の分析によって、及び精神運動試験の遂行によって観察する。これらの方法は、この技術において関連して専門的に熟練した者に既知である。

40

50

【 0 1 3 3 】

scFv抗体S18及びN3は、生体内で、遺伝子治療及び細胞治療を用いることで運搬されるべきである(図20)。遺伝子治療の取り組みは、scFvsについてコードする遺伝子を、処置されるべき有機体中に導入する。これまで多数の戦略が、神経細胞へのウイルス因子(レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV))を用いる遺伝子運搬について監視されてきた。この場合に、アデノ随伴ウイルス(AAV)系は最も期待できた。AAVは、非病原性で、及びニューロンのような非分裂性細胞に感染することができる。中枢神経系(CNS)中へのAAVを用いる遺伝子運搬は、効率的であり、及び細胞性のが、又は体液性の免疫反応を活性化することなしに起こる。AAVを用いる遺伝子運搬は、パーキンソン疾病(Kirik等、2002年;Mandel等、1997年)、アルツハイマー疾病(Klein等、2002年)、脱髄疾病(多発性硬化症)(Guy等、1998年)のような、種々の動物系の神経学的機能障害において達成され、及びまた、脳腫瘍の処置のために好首尾であった(Ma等、2002年)。

10

【 0 1 3 4 】

scFv S18及びN3は、脳においてrec.AAVウイルスによって発現されるべきである。AAV血清型の中で、AAV2は最も高度に適合され、及び優先的に神経細胞を変換する。AAVベクター、優先的にはAAV-2は、scFv S18及びN3についてコードし、Grimmの方法(Grimm等、1998年)に従う高-カバレッジウイルス粒子を生産するために用いる:293細胞(ヒト胚性腎細胞株)を、AAVベクターであって、それがS18及びN3についてコードするものを、AAVヘルパープラスミド(pDG)であって、それがAAVコートタンパク質遺伝子を発現するもの、及び更にアデノ随伴ウイルス遺伝子であって、それがパッケージングにおいてヘルパー機能について必要なものと一緒に用いて、形質移入する。スクレピ-感染神経細胞(ScGT1、ScN2a、及び更にスクレピ-感染脳細胞)を、組換えAAVウイルスに感染させ、それはscFv S18及びN3を発現し、それらのウイルスがスクレピーの細胞を直し得ることを示す(図21)。次いで、組換えAAVウイルスを、マウス、好ましくはC57B16の脳中に注入する(図22)。scFvs S18及びN3の発現を、感染後に種々の時間で脳画分のウェスタンブロット分析を用いることで点検する(図22A)。rec.AAVウイルスを、PrP^{Sc}での接種の前後の種々の時間に注入する(図22B)。マウスにおけるTSE疾病の激増での遅延は、精神運動試験及び脳の組織学的及び免疫組織化学的分析によって定める。

20

【 0 1 3 5 】

scFv抗体S18及びN3は、哺乳類の脳中に、抗体-生産細胞を含むカプセルを移植することによって、直接導入されるべきである。この具体例は、同様に、TSEを患う、人類を含む哺乳類を処置するのに役立つ。この戦略には、タンパク質、本発明の場合においてはscFv抗体S18及びN3を分泌し得る遺伝学的に修飾された細胞の使用が包含される(図20)。これらの細胞は、免疫保護重合体、例えば、硫酸セルロースにおいてカプセル化され、その細胞孔によってそれが大分子、本発明の場合での抗体のようなものを放出する。この場合において、細胞は、長時間にわたって生存したままである。この技術の概要を参照(Pelegrin等、1998年)。この戦略は既に、ネズミウイルス疾病(Pelegrin等、2000年)、及び霊長類におけるパーキンソン疾病(Date等、2000年)及びラットにおけるハンチントン疾病(Emerich等、1996年)のような動物モデルにおけるヒトの疾病の処置について好首尾に採用されている。

30

40

【 0 1 3 6 】

この処理は次の工程を必要とする:神経芽細胞腫細胞又は他の神経細胞(PC12)を、一時的にか、又は安定的に、例えば、pSecTag2のような発現ベクターを用いて形質移入する(図23)。分泌のために、Ig-鎖リーダ配列を用いる。神経細胞における発現のために、CMV(サイトメガロウイルス)のような、プロモータを用いる。N2a細胞からの抗体S18及びN3の分泌は既に検出されているが(図23)、それはその処理がscFv抗体S18及びN3と共に機能することを実証する。スクレピ-感染神経細胞を、S18/N3分泌ベクターを用いて形質移入する。これらの細胞からの双方の抗体の分泌を用いることで、細胞がスクレピーを直される(図24)。

【 0 1 3 7 】

50

TSEsの治療のための人類を含む哺乳類の脳中へのカプセル化細胞の移植用に、筋肉細胞(好ましくはC2.7細胞)を用いるが、その理由は、これらをマウス中に移植するとき、これらが長期の時間にわたって抗体を分泌することができるからである。筋原細胞又は分化した筋肉細胞(好ましくはC2.7細胞)を、発現ベクターを用いて安定的に形質移入し、それが、scFv抗体S18及びN3を筋肉細胞-特異的プロモータの調節の下に発現する(図23)。代わりに、抗体S18/N3を分泌し得る神経細胞(PC12細胞)又は仔ハムスター腎(BHK)細胞又はNIH3T3細胞もまた、更にカプセル化及び移植のために、用いることができる。scFv S18/N3-発現細胞を、この技術において関連して専門的に熟練した者に既知の様式で、カプセル化する。この処理は、Pelegriin等、1998年のサマリーに記述されている(Pelegriin等、1998年)。ここで用いる物質は、例えば、硫酸セルロースでよい(Pelegriin等、1998年)。

10

【0138】

カプセル化細胞を、この技術において関連して専門的に熟練した者に既知の様式で、マウスの脳中に移植する。上述のAAVウイルスを用いる遺伝子治療の取り組みの場合におけるように、最初に単鎖抗体の発現を試験する。TSE疾病に対するscFv抗体の治療上の効果を点検するために、scFv S18/N3を用いて移植した実験動物は、好ましくはPrPScで接種されたマウス又はハムスターである。マウスでのTSE疾病の激増における遅延を、精神運動試験、及び脳の組織学的及び免疫組織化学的分析によって定める。

【0139】

この技術において関連して専門的に熟練した者は、例4での詳細についての技術をよく知っている。

20

【0140】

(例5)

(scFv S18及びN3のエピトープマッピング)

この技術を用い、scFv S18及びN3によって認識されるLRP上のエピトープを識別する。この目的のため、92種の異なるペプチドを合成したが、それらは、各場合において、15個のアミノ酸の長さを持っていた。各ペプチドのN-末端を、前のペプチドに関して3個のアミノ酸によって置換したが、その結果、各ペプチドが前のペプチドと12個のアミノ酸によって重複した。ペプチドの合成をセルロース膜上で遂行した。

【0141】

図26に示すように、3種の強いシグナルが抗体S18を用いて検出された。これらは、ペプチドEKAVTKEEFQGEWTA、VTEEFQGEWTAPAP、及びEEFQGEWTAPAPEFTに対応する。共通のエピトープは、EEFQGEWTA(AA225-234)である。これは、この技術において熟練した者にとって、scFv S18についてのLRP上のエピトープが、アミノ酸225から243までラミニン受容体上で伸長し得る(erstreckenkonnte)ことを意味する。これを図27に概略的に例証する。

30

【0142】

抗体N3を使用して、図26に示すように、4種のシグナルを視覚化した：

PSVPIQQFPTEDWSA、PIQQFPTEDWSAAPT、QFPTEDWSAAPTAQA、及びTEDWSAAPTAQATEW。ここでは、共通のエピトープは、TEDWSA(AA261-266)である。これは、この技術において熟練した者にとって、scFv N3についてのLRP上のエピトープが、アミノ酸261から266までラミニン受容体上で伸長し得ることを意味する(図27参照)。

40

【0143】

例5における詳細についての技術は、それが、この技術において関連して専門的に熟練した者によく知られており、以下に詳細に説明する。

【0144】

抗体結合試験を、抗体scFv S18及びN3によるLRP検出のためのウェスタンブロットと同様に遂行した(図11と比較)。この場合において、92個のペプチドと結合した膜を、scFv抗体S18及びN3と共に温置した(希釈1:5000)。抗体(S18)を除去するために(二次抗体(N3)を用いて検出するために)、膜を、3回、20分間、“ストリッピング”緩衝液(8M尿素、0.5%-メルカプトエタノール)を用いて60 で温置した。

【0145】

50

(文献):

(1) Aguzzi, A.及びWeissmann, C. (1998年) Prion diseases(プリオン疾病). *Haemophilia*(ヘモフィリア), 4, 619-627.

(2) Ardini, E., Pesole(ペゾーレ), G., Tagliabue(タリアブーレ), E., Magnifico(マグニフィコ), A., Castronovo(カストロノボ), V., Sobel(ソーベル), M.E., Colnaghi(コルナギ), M.I. 及びMenard(メナール), S. (1998年) The 67-kDa laminin receptor originated from a ribosomal protein that acquired a dual function during evolution(進化の間に二重機能を取得するリボソームタンパク質起源の67-kDaラミニン受容体). *Mol. Biol. Evol.*(モレキュラー・バイオロジー・アンド・エボリューション), 15, 1017-1025.

10

(3) Auth, D.及びBrawerman, G. (1992年) A 33-kDa polypeptide with homology to the laminin receptor: component of translation machinery(ラミニン受容体に対して相同性を有する33-kDaポリペプチド:翻訳の仕組みの成分). *Proc Natl Acad Sci U S A*(プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ), 89, 4368-4372.

(4) Beck, K., Hunter(ハンター), I.及びEngel(エンゲル), J. (1990年) Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein(ラミニンの構造及び機能:多ドメイン糖タンパク質の生体構造). *FASEB J.*(FASEBジャーナル), 4, 148-160.

(5) Buto, S., Tagliabue, E., Ardini, E., Magnifico, A., Ghirelli(ギレリ), C., van den Brule(ファン・デン・ブリュレ), F., Castronovo, V., Colnaghi, M.I., Sobel, M.E.及びMenard, S. (1998) Formation of the 67-kDa laminin receptor by acylation of the precursor(前駆体のアシル化による67-kDaラミニン受容体の形成). *J. Cell. Biochem.*(ジャーナル・オブ・セルラー・バイオケミストリー), 69, 244-251.

20

(6) Canfield, S.M.及びKhakoo, A.Y. (1999年) The nonintegrin laminin binding protein (p67 LBP) is expressed on a subset of activated human T lymphocytes and, together with the integrin very late activation antigen-6, mediates avid cellular adherence to laminin(非インテグリンのラミニン結合タンパク質(p67 LBR)を活性化ヒトTリンパ球のサブセット上で発現させ、及びインテグリン最晩期活性化抗原-6と一緒に、ラミニンへの貪欲な細胞性付着を媒介する). *J Immunol*(ジャーナル・オブ・イムノロジー), 163, 3430-3440.

30

(7) Castronovo, V., Claysmith(クレイスミス), A.P., Barker(バーカー), K.T., Cioce(チオース), V., Krutzsch(クルーズ), H.C.及びSobel, M.E. (1991年) Biosynthesis of the 67 kDa high affinity laminin receptor(67 kDa高アフィニティ・ラミニン受容体の生合成). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ), 177, 177-183.

(8) Coggin, J.H., Jr., Barsoum(バルソム), A.L.及びRohrer, J.W. (1999年) 37 kilodalton oncofetal antigen protein and immature laminin receptor protein are identical, universal T-cell inducing immunogens on primary rodent and human cancers(37キロダルトンの癌胎児性抗原タンパク質及び未熟ラミニン受容体タンパク質を識別し、普遍的T-細胞が原発性のげっ歯類及びヒト癌上の免疫原を誘導する). *Anticancer Res*(アンチキャンサー・リサーチ), 19, 5535-5542.

40

(9) Date, I., Shingo(シンゴ), T., Yoshida(ヨシダ), H., Fujiwara(フジワラ), K., Kobayashi(コバヤシ), K.及びOhmoto(オオモト), T. (2000年) Grafting of encapsulated dopamine-secreting cells in Parkinson's disease: long-term primate study(パーキンソン病におけるカプセル化ドーパミン-分泌細胞の移植術:長期霊長類調査). *Cell Transplant*(セル・トランスプランテーション), 9, 705-709.

(10) Davis, S.C., Tzagoloff(ツァゴーロフ), A.及びEllis(エリス), S.R. (1992年) Characterization of a yeast mitochondrial ribosomal protein structurally related to the mammalian 68-kDa high affinity laminin receptor(哺乳類68-kDa高親和性ラミニン受容体に構造的に関連する酵母ミトコンドリアリボソームタンパク質の特徴付け). *J*

50

Biol Chem(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリ), 267, 5508-5514.

(11) Douville, P.J.及びCarbonetto, S. (1992年) Genetic linkage analysis in recombinant inbred mice of P40, a putative clone for the high-affinity laminin receptor(P40の組換え近交系マウス、高-親和性ラミニン受容体についての推定上のクローンにおける遺伝的連鎖分析). Mamm. Genome(マーマリアン・ゲノム), 3, 438-446.

(12) Emerich, D.F., Lindner(リントナー), M.D., Winn(ウィン), S.R., Chen(チェン), E.Y., Frydel(フリュデル), B.R.及びKordower(コルドバー), J.H. (1996年) Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease(カプセル化ヒトCNTF-産生線維芽細胞の移植片がハンチントン疾病のげっ歯類モデルにおける行動の欠陥及び線条体変性(変質)を妨げる). J Neurosci(ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス), 16, 5168-5181.

10

(13) Enright, A.J., Van Dongen(ファン・ドンゲン), S.及びOuzounis(ウーゾウニス), C.A. (2002年) An efficient algorithm for large-scale detection of protein families(タンパク質ファミリーの大規模検出用の効率的アルゴリズム). Nucleic Acids Res(ヌクレイック・アシズ・リサーチ), 30, 1575-1584.

(14) Fernandez, M.-T., Castronovo, V., Rao, C.N.及びSobel, M.E. (1991年) The high affinity murine laminin receptor is a member of a multicopy gene family(高親和性ネズミラミニン受容体は多コピー遺伝子ファミリーの一員である). Biochem. Biophys. Res. Commun., 175, 84-90.

20

(15) Garcia-Hernandez, M., Davies(デービス), E.及びStaswick(スターズウィック), P.E. (1994年) Arabidopsis p40 homologue(アラビドプシsp40相同体). A novel acidic protein associated with the 40 S subunit of ribosomes(リボソームの40Sサブユニットに関連する新しい酸性タンパク質). J. Biol. Chem., 269, 20744-20749.

(16) Gauczynski, S., Hundt, C., Leucht, C.及びWeiss, S. (2001a) Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones and other molecules(プリオンタンパク質の、細胞表面受容体、分子シャペロン及び他の分子との相互作用). Adv. Prot. Chem.(アドバンシーズ・イン・プロテイン・ケミストリ), 57, 229-272.

(17) Gauczynski, S., Krasemann(クラシェマン), S., Bodemer(ボーデマー), W.及びWeiss, S. (2002年) Recombinant human prion protein mutants huPrP D178N/M129 (FFI) and huPrP+90R (fCJD) reveal proteinase K resistance(組換えヒトプリオンタンパク質変異体huPrP D178N/M129 (FFI)及びhuPrP+90R (fCJD)は耐プロテイナーゼK性を明らかにする). J Cell Sci(ジャーナル・オブ・セル・サイエンス), 115, 4025-4036.

30

(18) Gauczynski, S., Peyrin(ペイリン), J.M., Haik(ハイク), S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys(デリス), J.P., Dormont(ドーモン), D., Lasmezas, C.I.及びWeiss, S. (2001b) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein(37-kDa/67-kDaラミニン受容体が細胞性プリオンタンパク質についての細胞-表面受容体として働く). EMBO J(EMBOジャーナル), 20, 5863-5875.

40

(19) Grimm, D., Kern(カーン), A., Rittner(リトナー), K.及びKleinschmidt(クラインシュミット), J.A. (1998年) Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors(組換えアデノ随伴ウイルスベクターの生産及び精製のための新しいツール). Hum Gene Ther(ヒューマン・ジーン・セラピー), 9, 2745-2760.

(20) Guy, J., Qi(キー), X.及びHauswirth(ハウスウィルト), W.W. (1998年) Adeno-associated viral-mediated catalase expression suppresses optic neuritis in experimental allergic encephalomyelitis(アデノ-関連ウイルス-媒介カタラーゼ発現が実験上のアレルギー性脳脊髄炎における視神経炎を抑制する). Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 13847-13852.

50

(21) Hinek, A., Wrenn(レン), D.S., Mecham, R.P.及びBarondes(パロンデス), S.H. (1988年) The elastin receptor: a galactoside binding protein(エラスチン受容体:ガラクトシド結合タンパク質). *Science(サイエンス)*, 239, 1539-1541.

(22) Hundt, C., Peyrin, J.M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley(ライリ), M.L., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I.及びWeiss, S. (2001年) Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor(プリオンタンパク質のドメインのその37-kDa/67-kDaラミニン受容体との相互作用の同定). *EMBO J*, 20, 5876-5886.

(23) Jackers, P., Clause(クラウセ), N., Fernandez, M., Berti(バーティ), A., Princen(プリンセン), F., Wewer, U., Sobel, M.E.及びCastronovo, V. (1996a) Seventeen copies of the human 37 kDa laminin receptor precursor/p40 ribosome-associated protein gene are processed pseudogenes arisen from retropositional events(ヒト37kDaラミニン受容体前駆体/p40リボソーム-関連タンパク質遺伝子の17種のコピーはレトロポジショナル事象から生じる処理された偽遺伝子である). *Biochim. Biophys. Acta(バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ)*, 1305, 98-104. 10

(24) Jackers, P., Minoletti(ミノレティ), F., Belotti(ベロッティ), D., Clause, N., Sozzi(ソツツイ), G., Sobel, M.E.及びCastronovo, V. (1996b) Isolation from a multigene family of the active human gene of the metastasis-associated multifunctional protein 37LRP/p40 at chromosome 3p21.3(染色体3p21.3での転移-関連多機能性タンパク質37LRP/p40の活性ヒト遺伝子の多重遺伝子ファミリーからの単離). *Oncogene(オンコジーン)*, 13, 495-503. 20

(25) Keppel, E.及びSchaller, H.C. (1991年) A 33 kDa protein with sequence homology to the 'laminin binding protein' is associated with the cytoskeleton in hydra and in mammalian cells('ラミニン結合タンパク質' に配列相同性を有する33kDaタンパク質がヒドラにおける及び哺乳類細胞における細胞骨格と関連する). *J. Cell. Science(ジャーナル・オブ・セル・サイエンス)*, 100, 789-797.

(26) Kinoshita, K., Kaneda(カネダ), Y., Sato, M., Saeki(サエキ), Y., Wataya(ワタヤ), K.M.及びHoffmann(ホフマン), A. (1998年) LBP-p40 binds DNA tightly through associations with histones H2A, H2B, and H4(LBP-p40がヒストンH2A、H2B、及びH4との関連を通じてしっかりとDNAを結合する). *Biochem Biophys Res Commun*, 253, 277-282 30

(27) Kirik, D., Georgievska(ゲオルギエフスカ), B., Burger(バーガー), C., Winkler(ウインクラー), C., Muzyczka(ムジクツカ), N., Mandel, R.J.及びBjorklund(ビョルクランド), A. (2002年) Reversal of motor impairments in parkinsonian rats by continuous intrastriatal delivery of L-dopa using rAAV-mediated gene transfer(rAAV-媒介遺伝子運搬を用いるL-ドーパの連続的線条体内送達によるパーキンソン症候群のラットにおける運動不全の逆転). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4708-4713.

(28) Klein, R.L., Hirko(ヒルコ), A.C., Meyers(マイヤース), C.A., Grimes(グライムス), J.R., Muzyczka, N.及びMeyer(マイヤー), E.M. (2000年) NGF gene transfer to intrinsic basal forebrain neurons increases cholinergic cell size and protects from age-related, spatial memory deficits in middle-aged rats(内因性前脳基底核ニューロンへのNGF遺伝子運搬が、コリン作用性細胞寸法を増加させ、及び年齢-関連性の、中年ラットにおける空間的記憶欠損から保護する). *Brain Res(ブレイン・リサーチ)*, 875, 144-151. 40

(29) Landowski, T.H., Dratz(ドラッツ), E.A.及びStarkey(スターキー), J.R. (1995年) Studies of the structure of the metastasis-associated 67 kDa laminin binding protein: fatty acid acylation and evidence supporting dimerization of the 32 kDa gene product to form the mature protein(転移-関連67kDaラミニン結合タンパク質の構造の検討:脂肪酸アシル化及び証拠が成熟タンパク質の形成のための32kDa遺伝子産物の二量体化を支持する). *Biochemistry(バイオケミストリー)*, 34, 11276-11287. 50

(30) Lasmezas, C.I.及びWeiss, S. (2000年) Molecular Biology of Prion Diseases(プリオン疾病の分子生物学). Cary(ケアリー), J.W., Linz(リンズ), J.E.及びBhatnagar(バトナーガル), D. (eds.(編))において、Microbial Foodborne Diseases(微生物性食品媒介疾病). Mechanisms of Pathogenicity and Toxin Synthesis(病原性及び毒素合成の機構). Technomic Publishing CO., INC(テクノミック・パブリッシング社), Lancaster(ランカスター)(USA(米国)), pp. 495-537.

(31) Lesot, H., Kuhl(クール), U.及びvon der Mark(フォン・デア・マーク), K. (1983年) Isolation of a laminin binding protein from muscle cell membranes(筋肉細胞膜からのラミニン結合タンパク質の単離). EMBO J., 2, 861-865.

(32) Leucht, C., Simoneau(シモノー), S., Rey(レイ), C., Vana(バナ), K., Rieger, R., Lasmezas, C.I.及びWeiss(ウエイス), S. (2003年) The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells(37 kDa/67 kDaラミニン受容体がスクレイピ-感染神経細胞におけるPrP(Sc)増殖に必要である). EMBO Rep(EMBOレポート), 4, 290-295.

(33) Leucht, C.及びWeiss, S. (2002年) Der Prion Protein Rezeptor(プリオンタンパク質受容体). Nova Acta Leopoldina(ノバ・アクタ・レオポルジナ), 87, 39-54.

(34) Lopez-Ribot, J.L., Casanova(カサノバ), M., Monteagudo(モンテアグド), C., Sepulveda(スプルベダ), P.及びMartinez(マルチネーゼ), J.P. (1994年) Evidence for the presence of a high-affinity laminin receptor-like molecule on the surface of Candida albicans yeast cells(カンジダ・アルビカンス酵母細胞の表面上の高親和性ラミニン受容体-様分子の存在についての証拠). Infect Immun(インフェクション・アンド・イムニティ), 62, 742-746.

(35) Ludwig, G.V., Kondig(コンディグ), J.P.及びSmith(スミス), J.F. (1996年) A putative receptor for Venezuelan equine encephalitis virus from mosquito cells(カ細胞からのベネズエラウマ脳炎ウイルスについての推定上の受容体). J Virol(ジャーナル・オブ・バイロロジー), 70, 5592-5599.

(36) Ma, H.L., Lin(リン), S.Z., Chiang(チャン), Y.H., Li(リー), J., Chen, S.L., Tsao(ツァオ), Y.P.及びXiao(シャオ), X. (2002年) Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector(アデノ-関連ウイルス(AAV)ベクターによって送達されるアンジオスタチンを用いる、ラットモデルにおける悪性脳腫瘍の腫瘍内遺伝子治療). Gene Ther(ジーン・セラピー), 9, 2-11.

(37) Malinoff, H.L.及びWicha, M.S. (1983年) Isolation of a cell surface receptor for laminin from murine fibrosarcoma cells(ネズミ線維肉腫細胞からのラミニンについての細胞表面受容体の単離). J. Cell. Biol.(ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー), 96, 1475-1479.

(38) Mandel, R.J., Spratt(スプラット), S.K., Snyder(スナイダー), R.O.及びLeff(レフ), S.E. (1997年) Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats(ラットグリア細胞株-由来神経栄養因子を暗号化する組換えアデノ-関連ウイルスの中脳注入がラットにおけるパーキンソン疾病の進行性6-ヒドロキシドーパミン-誘発変性モデルでの黒質ニューロンを保護する). Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 14083-14088.

(39) Mecham, R.P. (1991年) Receptors for laminin on mammalian cells(哺乳類細胞上のラミニンについての受容体). FASEB J., 5, 2538-2546.

(40) Melnick, M.B., Noll(ノル), E.及びPerrimon(ペリモン), N. (1993年) The Drosophila stubarista phenotype is associated with a dosage effect of the putative ribosome-associated protein D-p40 on spineless(ドロソフィラ・スタバリスタの表現型は無脊椎の際の推定上のリボソーム-関連タンパク質D-p40の投与量効果と関連する). Gen

10

20

30

40

50

etics(ジェネティックス), 135, 553-564.

(41) Ouzonis, C., Kyrpides(キルパイデス), N.及びSander(サンダー), C. (1995年) Novel protein families in archaean genomes(始生代のゲノムにおける新しいタンパク質ファミリー). *Nucleic Acids Res*, 23, 565-570.

(42) Pelegrin, M., Marin(マラン), M., Noel(ノエル), D., Del Rio(デル・リオ), M., Saller(サーラー), R., Stange(シュタンゲ), J., Mitzner(ミツナー), S., Gunzburg(ギュンツブルク), W.H.及びPiechaczyk(ピーヒアクツィク), M. (1998年) Systemic long-term delivery of antibodies in immunocompetent animals using cellulose sulphate capsules containing antibody-producing cells(抗体-産生細胞含有硫酸セルロースカプセルを用いる免疫適格性動物における抗体の体系的長-期間送達). *Gene Ther*, 5, 828-834. 10

(43) Pelegrin, M., Marin, M., Oates(オーツ), A., Noel, D., Saller, R., Salmons(サーモンズ), B.及びPiechaczyk, M. (2000年) Immunotherapy of a viral disease by in vivo production of therapeutic monoclonal antibodies(治療上のモノクローナル抗体のインビボ生産によるウイルス性疾病の免疫療法). *Hum Gene Ther*, 11, 1407-1415.

(44) Prusiner, S.B., Scott(スコット), M.R., DeArmond(デアーモン), S.J.及びCohen(コーエン), F.E. (1998年) Prion protein biology(プリオンタンパク質の生物学). *Cell*(セル), 93, 337-348.

(45) Rao, C.N., Castronovo, V., Schmitt(シュミット), M.C., Wewer, U.M., Claysmith, A.P., Liotta(リオッタ), L.A.及びSobel, M.E. (1989年) Evidence for a precursor of the high-affinity metastasis-associated murine laminin receptor(高-親和性転移-関連ネズミラミニン受容体の前駆体についての証拠). *Biochemistry*, 28, 7476-7486. 20

(46) Rao, N.C., Barsky(バルスキー), S.H., Terranova(テラノーバ), V.P.及びLiotta, L.A. (1983年) Isolation of a tumor cell laminin receptor(腫瘍細胞ラミニン受容体の単離). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111, 804-808.

(47) Rieger, R., Edenhofer(イーデンホーファ), F., Lasmezas, C.I.及びWeiss, S. (1997年) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells(ヒト37-kDaラミニン受容体前駆体が真核細胞におけるプリオンタンパク質と相互作用する). *Nat Med*(ネイチャー・メディシン), 3, 1383-1388. 30

(48) Rieger, R., Lasmezas, C.I.及びWeiss, S. (1999年) Role of the 37 kDa laminin receptor precursor in the life cycle of prions(プリオンの生活環における37kDaラミニン受容体前駆体の役割). *Transfus Clin Biol*(トランスフュージョン・クリニク・エト・バイオロジーク), 6, 7-16.

(49) Rohrer, J.W., Barsoum, A.L.及びCoggin, J.H., Jr. (2001年) The Development of a New Universal Tumor Rejection Antigen expressed on Human and Rodent Cancers for Vaccination, Prevention of Cancer, and Anti-Tumor Therapy(ワクチン接種、癌の予防、及び抗-腫瘍療法のための、ヒト及びげっ歯類の癌上で発現する新しい普遍的腫瘍拒否抗原の開発). *Mod Asp Immunobiol*(モダン・アспект・イムノバイオロジーク), 1, 191-195. 40

(50) Rosenthal, E.T.及びWordeman, L. (1995年) A protein similar to the 67 kDa laminin binding protein and p40 is probably a component of the translational machinery in *Urechis caupo* oocytes and embryos(67kDaラミニン結合タンパク質及びp40に類似するタンパク質はおそらくユレキス・カウポの卵母細胞及び胚における翻訳の仕組みの成分である). *J. Cell. Sci.*, 108, 245-256.

(51) Salas, P.J., Ponce(ポンセ), M.I., Brignoni(ブリノニ), M.及びRodriguez(ロドリゲス), M.L. (1992年) Attachment of Madin-Darby canine kidney cells to extracellular matrix: role of a laminin binding protein related to the 37/67 kDa laminin receptor in the development of plasma membrane polarization(マディン-ダービーのイヌ腎細胞の細胞外基質への付着:形質膜分極の発達における37/67kDaラミニン受容体 50

に関連するラミニン結合タンパク質の役割). *Biol Cell*(バイオロジー・オブ・ザ・セル), 75, 197-210.

(52) Sato, M., Kinoshita, K., Kaneda, Y., Saeki, Y., Iwamatsu(イワマツ), A.及びTanaka(タナカ), K. (1996年) Analysis of nuclear localization of laminin binding protein precursor p40 (LBP/p40)(ラミニン結合タンパク質前駆体の核局在化の分析). *Biochem Biophys Res Commun*, 229, 896-901.

(53) Sato, M., Saeki, Y., Tanaka, K.及びKaneda, Y. (1999年) Ribosome-associated protein LBP/p40 binds to S21 protein of 40S ribosome: analysis using a yeast two-hybrid system(リボソーム-関連タンパク質LBP/p40は40SリボソームのS21タンパク質に結合する:酵母二重ハイブリッド系を用いる分析). *Biochem Biophys Res Commun*, 256, 385-390. 10

(54) Stephenson, D.A., Chiotti(キオティ), K., Ebeling(エーベリング), C., Groth(グロス), D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B.及びCarlson(カールソン), G.A. (2000年) Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice(マウスにおけるプリオンの潜伏時間に影響を及ぼす量的形質遺伝子座). *Genomics*(ゲノミックス), 69, 47-53.

(55) Wang, K.S., Kuhn(クーン), R.J., Strauss(シュトラウス), E.G., Ou(オウ), S.及びStrauss, J.H. (1992年) High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells(高-親和性ラミニン受容体は哺乳類細胞におけるシンドビスウイルスについての受容体である). *J Virol*, 66, 4992-5001. 20

(56) Wewer, U.M., Liotta, L., Jaye(ジャエ), M., Ricca(リッカー), G.A., Drohan(ドロハン), W.N., Claysmith, A.P., Rao, C.N., Wirth(ウィルト), P., Coligan(コリガン), J.E., Albrechtsen(アルブレヒツセン), R., Mudry(ムドライ), M.及びSobel, M.E. (1986) Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells that have different abilities to bind laminin(ラミニンに結合する異なる能力を持つ種々のヒト癌腫細胞におけるラミニン受容体mRNAの変化水準). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 7137-7141.

(57) Yow, H., Wong(ウォン), J.M., Chen, H.S., Lee(リー), C., Steele(スチール), G.D.J.及びChen, L.B. (1988年) Increased mRNA expression of a laminin-binding protein in human colon carcinoma: complete sequence of a full-length cDNA encoding the protein(ヒト大腸癌腫におけるラミニン-結合タンパク質の増加したmRNA発現:そのタンパク質を暗号化する全-長cDNAの完全な配列). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6394-6398. 30

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

Anmelder:

Name: Prof. Dr. Stefan Weiss 10
 Strasse: Elisabethstr. 30
 Ort: München
 Land: Deutschland
 Postleitzahl: 80796

(A) Name: Prof. Dr. Melvyn Little
 (B) Strasse: Fritz-von-Briesen-Str. 10
 (C) Ort: Neckargemünd 20
 (D) Land: Deutschland
 Postleitzahl: 69151

Erfinder:

(A) Name: Dr. Stefan Knackmuss
 (B) Strasse: Uhlandstr. 13 30
 (C) Ort: Plankstadt
 (D) Land: Deutschland
 (E) Postleitzahl: 68723

(A) Name: Clémence Rey
 (B) Strasse: Landsbergerstr. 111
 (C) Ort: München
 (D) Land: Deutschland 40
 (E) Postleitzahl: 80339

(A) Name: Claudia Büttner
 (B) Strasse: Mittelgewann 42

- (C) Ort: Schwetzingen
- (D) Land: Deutschland
- (E) Postleitzahl: 68723

10

- (A) Name: Dr. Peter Röttgen
- (B) Strasse: Stahlbühlring 129
- (C) Ort: Ladenburg
- (D) Land: Deutschland
- (E) Postleitzahl: 68526

- (A) Name: Dr. Uwe Reusch
- (B) Strasse: Dieterwiesenstr. 13
- (C) Ort: Maikammer
- (D) Land: Deutschland
- (E) Postleitzahl: 67487

20

Single Chain Antikörper gegen den 37 kDa/67 kDa Lamininrezeptor als Werkzeuge zur Diagnose und Therapie von Prionerkrankungen, Herstellung und Verwendung

30

Zahl der Sequenzen: 4

Computerlesbare Fassung:

- (A) Datenträger: CD
- (B) Computer: IBM PC kompatibel
- (C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: WinWord 6.0

40

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID Nr. 1

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) Länge: 816 Basenpaare

50

- (B) Art: Nucleinsäure
- (C) Strangform: Doppelstrang
- (D) Topologie: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Nucleinsäure

10

(A) Beschreibung: DNA kodiert für single chain Antikörper scFv S18. Die DNA ist im Plasmid pEX/HAM/LRP-S18 enthalten. Dieses Plasmid wurde bei der DSMZ, Mascheroder Weg 1b, D-38124 unter der Accession Nummer xxxx hinterlegt. Nach Transformation des Plasmids in E.coli XL1 Blue ist die Produktion des scFv Antikörpers S18 möglich.

(iii) Hypothetisch: nein

20

(iv) Antisense: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 1:

```

5' CAGG TGCAGCTGCA GGAGTCTGGG GGAGGCTTGG TACAGCCTGG
GGGGTCCCTG AGACTCTCCT GTGCAGCCTC TGGATTCATG TTTAGCAGGT
ATGCCATGAG CTGGGTCCGC CAGGCTCCAG GGAAGGGGCC AGAGTGGGTC
TCAGGTATTA GTGGTAGTGG TGGTAGTACA TACTACGCAG ACTCCGTGAA
GGGCCGGTTC ACCGTCTCCA GAGACAATTC CAAGAACACG CTGTATCTGC
AAATGAACAG CCTGAGAGCC GAGGACACGG CCGTATATTA CTGTGCGAGA
CATCCGGGTT TTTGGCATT TGGACTACTGG GGCCAGGGAA CTCTGGTCAC
CGTCTCCTCA GGGAGTGCAT CCGCCCCAAA GCTTGAAGAA GGTGAATTTT
CAGAAGCACG CGTATCTGAA CTGACTCAGG ACCCTGCTGT GTCTGTGGCC
TTGGGACAGA CAGTCAGGAT CACATGCCAA GGAGACAGCC TCAGAAACTT
TTATGCAAGC TGGTACCAGC AGAAGCCAGG ACAGGCCCTT ACTCTTGTC
TCTATGGTTT AAGTAAAAGG CCCTCAGGGA TCCCAGACCG ATTCTCTGCC
TCCAGCTCAG GAAACACAGC TTCCTTGACC ATCACTGGGG CTCAGGCGGA
AGATGAGGCT GACTATTACT GTAACCTCCG GGACAGAAGT GGTAATCATG
TAAATGTGCT ATTCGGCGGA GGGACCAAGC TGACCGTCCT ACGTCAGCCC

```

30

40

50

AAGGCTGCCC CCTCGGTCAC TCTGTTCCCG CCCTCTTCTG CGGCCGCTGG
ATCCCATCAC CATCACCATC AC 3'

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 2

10

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

Länge: 268 Aminosäuren

Art: Protein

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

20

MOLEKÜLTYP: Protein

(A) Beschreibung: Dieses Protein entspricht dem single chain Antikörper S18. Er kann nach Transformation des Plasmids pEX/HAM/LRP-S18 in E.coli XL1 Blue synthetisiert werden.

Hypothetisch: nein

Antisense: nein

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 2:

Amino-Terminus QVQLQESG GGLVQPGGSL RLSCAASGFM FSRYAMSWVR
QAPGKGPEWV SGISGSGGST YYADSVKGRF TVSRDNSKNT LYLQMNSLRA
EDTAVYYCAR HPGFWHFDYW GQGTLVTVSS GSASAPKLEE GEFSEARVSE
LTQDPAVSVA LGQTVRITCQ GDSLRNFYAS WYQQKPGQAP TLVIYGLSKR
PSGIPDRFSA SSSGNTASLT ITGAQAEDEA DYICNSRDRS GNHVNVLFGG
GTKLTVLRQP KAAPSVTLFP PSSAAAGSHH HHHH Carboxy-Terminus

40

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID Nr. 3

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

50

- (A) Länge: 834 Basenpaare
- (B) Art: Nucleinsäure
- (C) Strangform: Doppelstrang
- (D) Topologie: linear

10

(ii) MOLEKÜLTYP: Nucleinsäure

(A) Beschreibung: DNA kodiert für single chain Antikörper scFv N3. Die DNA ist im Plasmid pEX/HAM/LRP-N3 enthalten. Dieses Plasmid wurde bei der DSMZ, Mascheroder Weg 1b, D-38124 unter der Accession Nummer xxxx hinterlegt. Nach Transformation des Plasmids in E.coli XL1 Blue ist die Produktion des scFv Antikörpers N3 möglich.

(iii) Hypothetisch: nein

20

(iv) Antisense: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr:3:

```

5' GAAG TGCAGCTGGT GGAGTCTGGG GGAGGCGTGG TCCAGCCTGG
GAGGTCCCTG AGACTCTCCT GTGCAGCGTC TGGATTCACC TTCAGTAGCT
ATGGCATGCA CTGGGTCCGC CAGGCTCCAG GCAAGGGGCT GGAGTGGGTG
GCAGTTATAT GGTATGATGG AAGTAATAAA TACTATGCAG ACTCCGTGAA
GGGCCGATTC ACCATCTCCA GAGACAATTC CAAGAACACG CTGTATCTGC
AAATGAACAG CCTGAGAGCC GAGGACACGG CTGTGTATTA CTGTGCGACT
ATACCGCGCT CGTCTTTCTA CTACGGTATG GACGTCTGGG GCCAAGGGAC
CACGGTCACC GTCTCCTCAG GGAGTGCATC CGCCCCAACC CTTAAGCTTG
AAGAAGGTGA ATTTTCAGAA GCACGCGTAC AGCCTGTGCT GACTCAGCCA
CCCTCAGCGT CTGGGACCCC AGGGCAGAGG GTCACCATCT CTTGTTCTGG
AAGCAGATCC AACATCGGAA GTAATACTGT AAACTGGTAC CAGCAGCTCC
CAGGAACGGC CCCCAAACCT CTCATCTATG GTAATAATCA GCGGCCCTCA
GGGGTCCCTG AGCGATTCTC TGGCTCCAAG TCTGGCACCT CAGCCTCCCT
GGCCATCAGT GGGCTCCAGT CAGAGGATGA GGCTGATTAT TACTGTGCAG
CGTGGGATGA CAGCCTGACT GGTGTGCTTT TCGGCGGAGG GACCAAGCTG

```

30

40

50

ACCGTCCTAG GTCAGCCCAA GGCTGCCCC TCGGTCACTC TGTTCCCGCC
 CTCTTCTGCG GCCGCTGGAT CCCATCACCA TCACCATCAC 3'

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 4

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

Länge: 278 Aminosäuren

Art: Protein

Strangform: Einzelstrang

Topologie: linear

MOLEKÜLTYP: Protein

(A) Beschreibung: Dieses Protein entspricht dem single chain Antikörper N3. Er kann nach Transformation des Plasmids pEX/HAM/LRP-N3 in E.coli XL1 Blue synthetisiert werden.

Hypothetisch: nein

(iv) Antisense: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 4:

Aminotermminus EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVVRQA
 PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED
 TAVYYCATIP RSSFYYGMDV WGQGTTVTVS SGSASAPTLK LEEGEFSEAR
 VQPVLTPPPS ASGTPGQRTV ISCSGSRNSI GSNTVNWYQQ LPGTAPKLLI
 YGNNQRPSGV PERFSGSKSG TSASLAISGL QSEDEADYYC AAWDDSLTGV
 LFGGGTKLTV LGQPKAAPSV TLFPPSSAAA GSHHHHHH Carboxyterminus

【 0 1 4 6 】

【 図 1 】 単鎖のscFvの概略的描写を示す。

【 図 2 】 GST::LRPに対して向けられるscFv抗体の選別のために用いた未処理のscFvバンクを概略的に示す。

【 図 3 】 良好な折り畳み特性及び高い発現率を持つ選定した枠組みから構成され、及びそれらのCDR3領域において無作為化された配列を備える合成scFvバンクを概略的に示す。

【 図 4 】 フェージ提示法を用いる選別処理を概略的に示す。

【 図 5 】 3種の選定ラウンドの後に未処理のscFvバンクから得られるクローンのペリプラズマ性粗抽出物のELISAを示す。

【 図 6 】 3種の選定ラウンドの後に合成scFvバンクから得られるクローンのペリプラズマ性粗抽出物のELISAを示す。

【 図 7 】 図5及び図6からのELISAsの結果を編集する。

【 図 8 】 合成(S)及び未処理(N)のscFvバンクから選定される個々のクローンによる組換えGST::LRPの検出を示す。

【 図 9 】 N2a細胞の表面上及び細胞内でのLRP/LRの検出を示す。

【 図 1 0 】 ジャーカット細胞の表面上及び細胞内でのLRP/LRの検出を示す。

【 図 1 1 】 組換えLRP::FLAG又は内因性LRP/LRの、SFV1-huLRP-FLAG又はSFV1-moLRP::FLAGを用いて形質移入された仔ハムスター腎細胞における検出を示す。

【 図 1 2 】 組換えSFV RNAを用いて形質移入したBHK細胞におけるLRP/LRの免疫蛍光分析である。

【 図 1 3 】 形質移入していないか、又は組換えSFVのRNAs SFV-1-huLRP-FLAG又はSFV-1-moLRP-FLAGを用いて形質移入したBHK細胞のFACS分析を示す。

【 図 1 4 】 BSEを患うウシの血液の白血球画分における増加したLRレベルの、scFv S18によるウェスタンブロットにおける検出を示す。

【 図 1 5 】 BSEを患う動物の脳脊髄液における増加したLRレベルの検出を、健康な対照動物と比較して示す。

【 図 1 6 】 scFv S18及びN3が外因的にタグ付けされたPrP^Cの結合及び内面化を妨げ得ることを概略的に示す。

【 図 1 7 】 スクレピーに感染した細胞に加えられたscFv抗体S18及びN3が、スクレピーに感染した細胞を直し得ることを概略的に示す。

【 図 1 8 】 scFv S18及びN3の作用の予防上の機構を概略的に示す。

【 図 1 9 】 動物におけるscFv抗体S18及びN3の生体内での治療上の適用を概略的に示す。

【 図 2 0 】 遺伝子療法及びscFv抗体S18及びN3の援助を用いるプリオン疾病の処置のための細胞の治療上の取り組みを示す。

【 図 2 1 】 スクレピーに感染した細胞上でscFv S18/N3を発現し得る組換えAAVウイルスの使用を示す。

【 図 2 2 】 哺乳類、好ましくはマウスにおける、生体内でS18/N3を発現する組換えAAVウイルスを用いる遺伝子療法の取り組みを示す。

【 図 2 3 】 神経細胞から、及び概略的に筋肉細胞からのscFv抗体S18及びN3のクローン化、発現/分泌を示す。

【 図 2 4 】 S18/N3-分泌性ScN2a細胞の投与を示す。

【 図 2 5 】 scFv S18/N3-分泌性細胞、好ましくは筋肉細胞又は神経細胞、BHK細胞又はNIH 3T3細胞による細胞療法を概略的に示す。

【 図 2 6 】 scFv S18/N3抗体のエピトープマッピングを示す。

【 図 2 7 】 scFv S18/N3抗体のエピトープマッピングの概略的描写を示す。

10

20

30

40

【 図 1 】

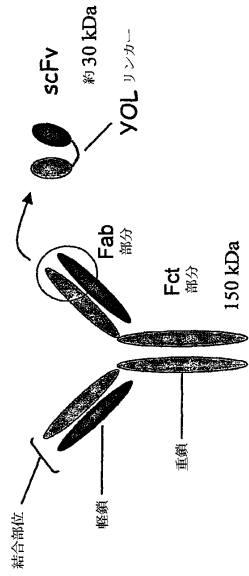


Fig. 1. scFvを全長抗体と比較した概略的描写

【 図 2 】

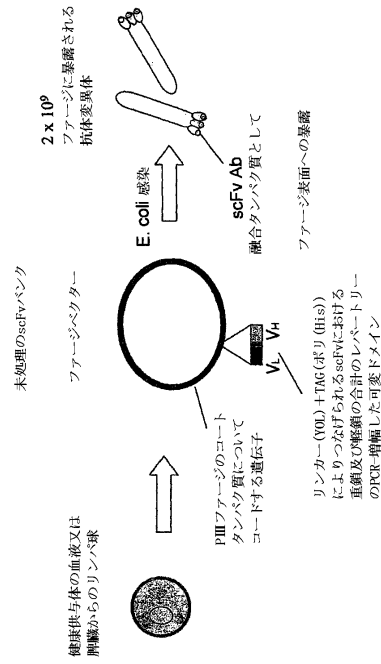


Fig. 2. 未処理のscFvバンクの、血液又は腫瘍由来のリンパ球からの生成の概略的描写

【 図 3 】

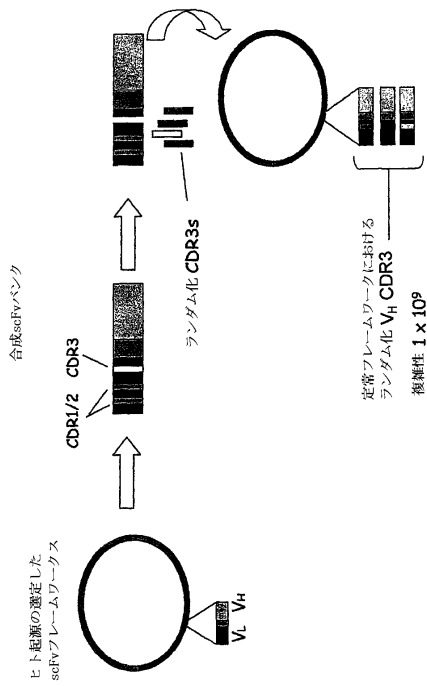


Fig. 3. 合成scFvバンクの概略的描写

【 図 4 】

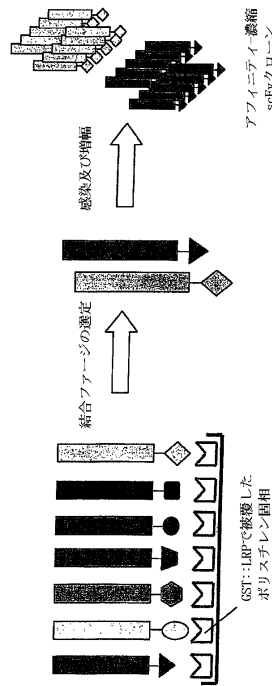


Fig. 4. GST::LRPに対する抗-LRP scFv抗体の、図1及び図2に示す未処理又は合成scFvバンクを用いる“ファージ提示”による選別の概略的描写

【 図 5 】

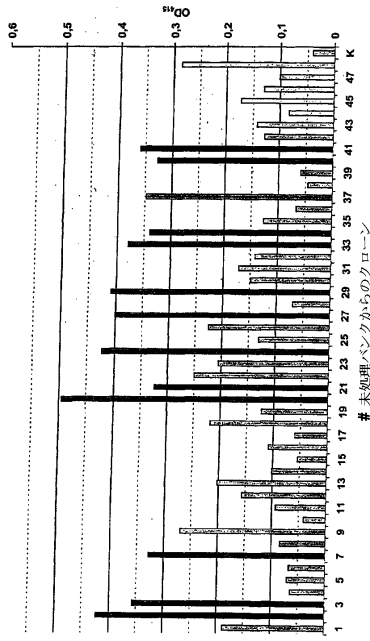


Fig. 5 3種の選定ラウンド後に未処理scFvバンクから得られる個々のクローンのペリプラズマ性粗抽出物のELISA

【 図 6 】

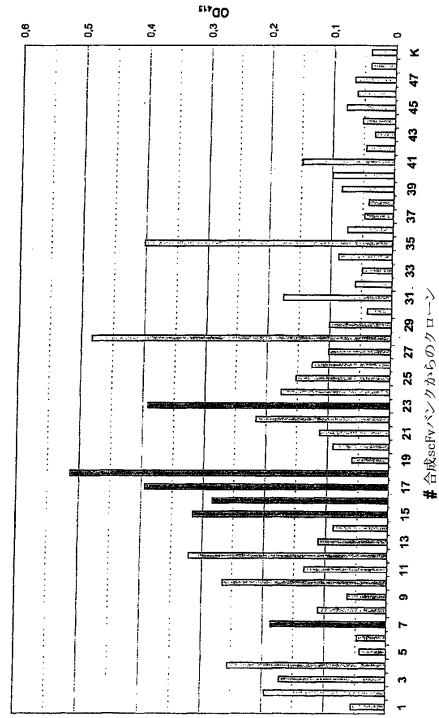


Fig. 6 合成scFvバンクから得られる個々のクローンのペリプラズマ性粗抽出物のELISA

【 図 7 】

- 固相に直接結合した可溶性GST::LRP上での3種のバニリングラウンド
 - 個々に陽性のクローンのELISAにおける識別

- GST::LRP融合用, αHis-TRPを伴う
- GST特異性の排除に対するGSTについての陽性に識別されたクローンの新鮮な試験

ELISA 陽性	N	GST::LRP	GST
	S	66%	-
選定クローン	N	53%	-
	S	13	陰性
	S	6	陰性
B&NI 群	N	10/13	2/13
	N	1/13	-

Fig. 7 3種の選定ラウンドの後のGST::LRP融合タンパク質上の図5及び図6からのELISAの結果

【 図 8 】

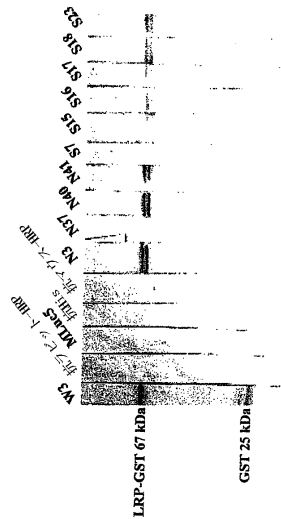


Fig. 8 未処理及び合成のscFvバンクからのscFvsを用いて検出した粗換えGST::LRP/GSTのウェスタンブロット分析

【 図 9 】

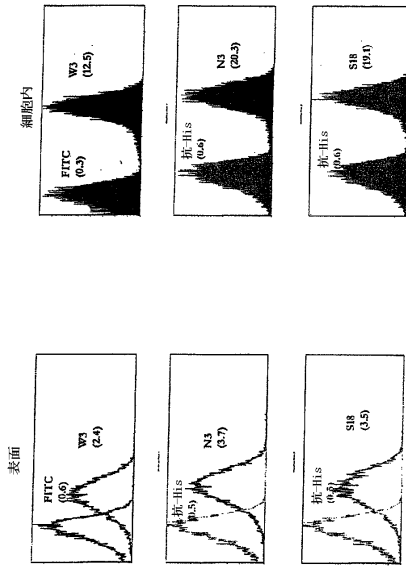


Fig. 9. 抗体W3, S18及びN3は、N2a細胞における及びその上でのLRP/LRPを認識する

【 図 10 】

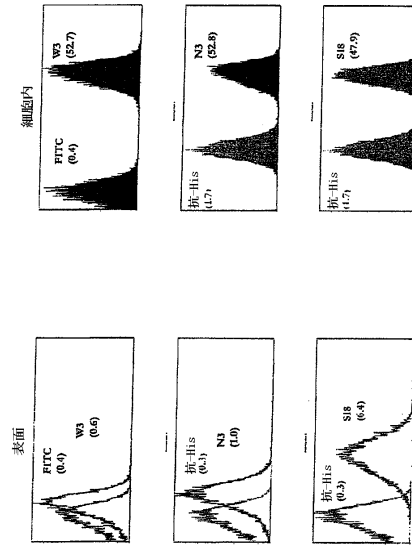


Fig. 10. 抗体W3, S18及びN3は、ジャーカット細胞における及びその上でのLRP/LRPを認識する

【 図 11 】

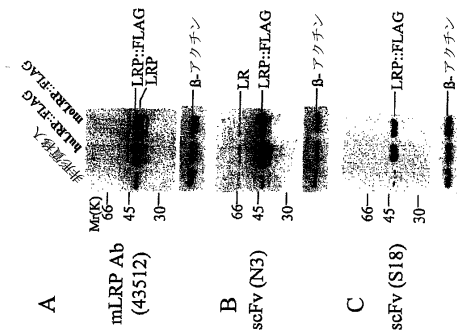


Fig. 11. rec. LRP: FLAG及びN内因性LRP/LRPの、rec. セムリキ森林ウイルスRNAを用いて形質移入したBHK細胞におけるウエスタンブロット分析

【 図 12 】

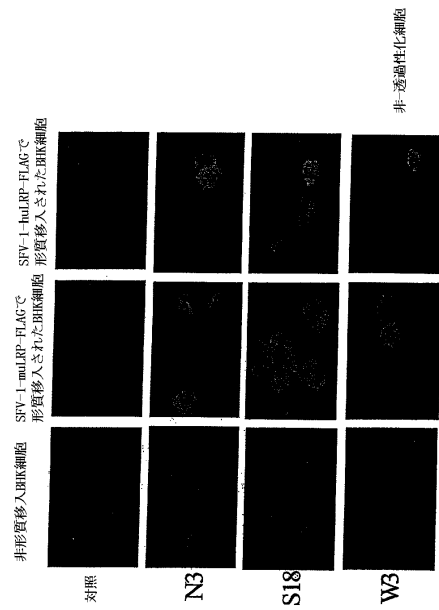


Fig. 12. rec. LRP: FLAG及びN内因性LRP/LRPの、rec. セムリキ森林ウイルスRNAを用いて形質移入されたBHK細胞の表面上でのIF分析

【 図 1 3 】

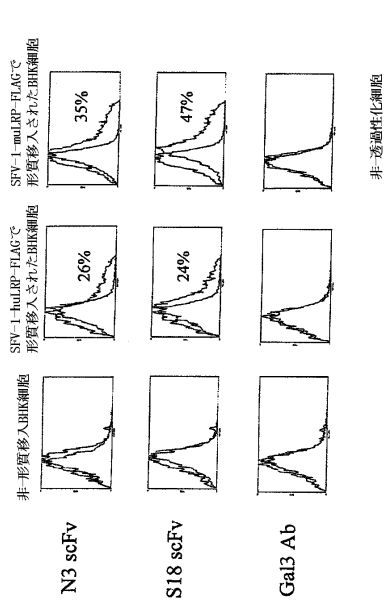


Fig. 13. rec. LRP::FLAG及び内因性LRP/LRの、rec.セムリキ森林ウイルスRNAsを用いて形質移入されたBHK細胞の表面上でのFACS分析

【 図 1 4 】

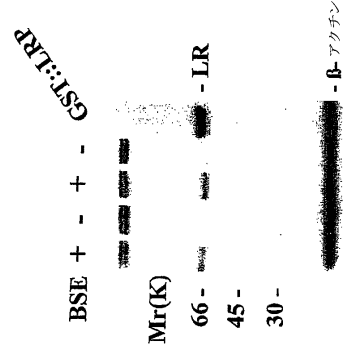


Fig. 14. BSEを患うウシの血液の白血球画分における、ラミニン受容体の67kDa LR形態の抗体S18による認識
+BSE罹患ウシ; -健康ウシ

【 図 1 5 】

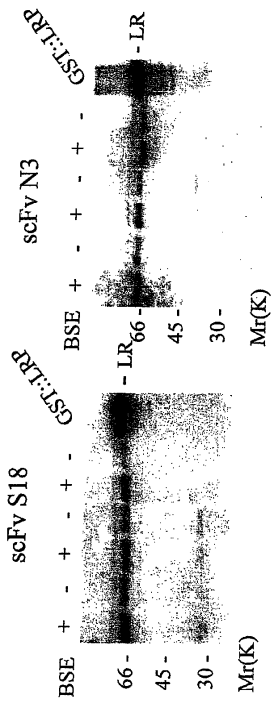


Fig. 15. BSEを患うウシ及び健康なウシの脳脊髄液における、ラミニン受容体の67kDa LR形態の抗体S18及びON3による認識
+BSE罹患ウシ; -健康ウシ

【 図 1 6 】

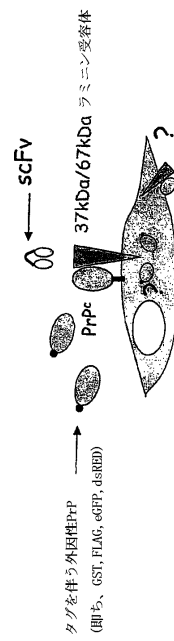


Fig. 16. scFvs S18及びON3は外因性タグ付けPrP^cの結合及び内面化を助ける

【 図 1 7 】

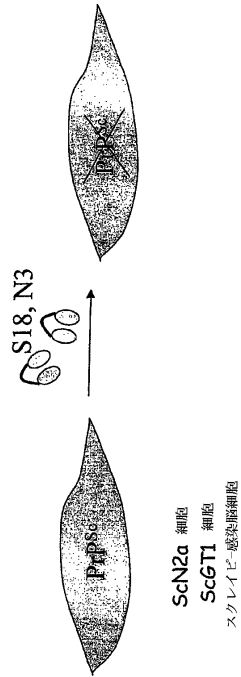


Fig. 17. scFvs S18及ON3は、PrP^{Sc}-増殖細胞を直す

【 図 1 8 】

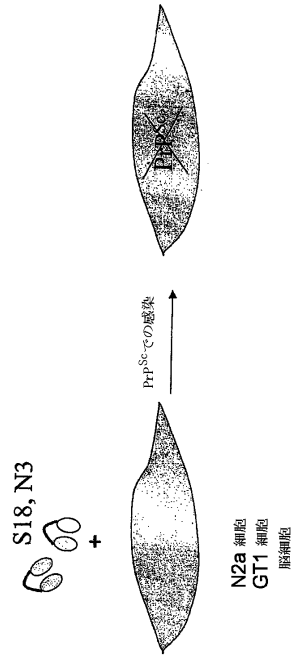


Fig. 18. scFvs S18及ON3のスクレイビ-感染性細胞上での予防効果

【 図 1 9 】

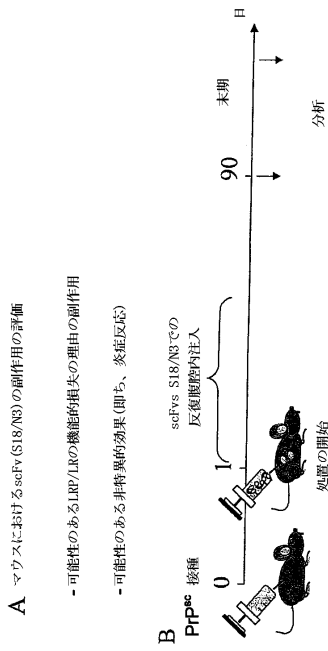


Fig. 19. PrP^{Sc}での移植後のマウスにおけるscFv抗体S18及びON3のインビボ効果
不感時間の分析、PrP^{Sc}蓄積(脳+脾臓)、精神運動試験の性能

【 図 2 0 】

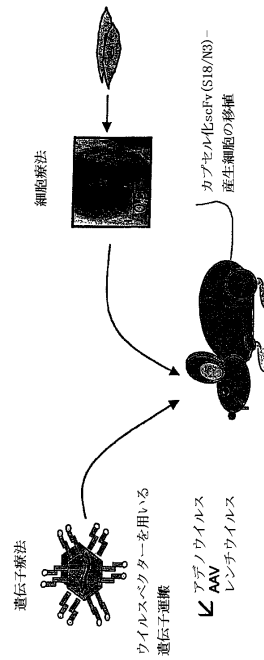


Fig. 20. マウスにおけるTSEsの処置のための遺伝子療法及び細胞療法

【 図 2 1 】

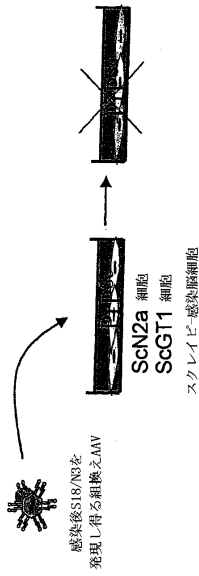


Fig. 21. scFvs S18及ひN3を発現するrec.AAVsの援助での遺伝子療法
Rec.AAVは感染後のスクレイビドのスクレイビド-感染細胞を直す

【 図 2 2 】

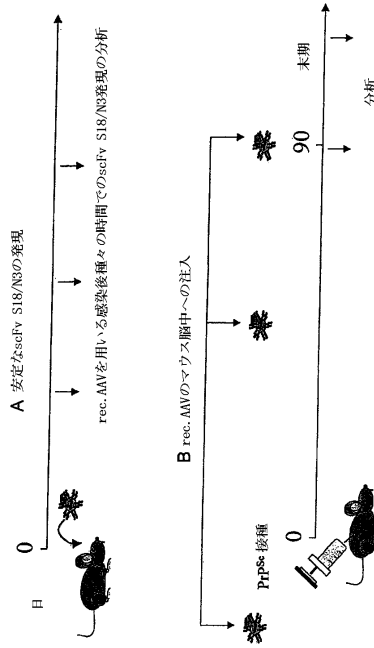


Fig. 22. scFvs S18及ひN3を発現するrec.AAVsの援助を用いる遺伝子療法
(A) マウスの脳におけるscFvs S18及ひN3の安定な発現
(B) S18/N3を発現するrec.AAVのPTPase-核種前及びその後の種々の時間での注入

【 図 2 3 】

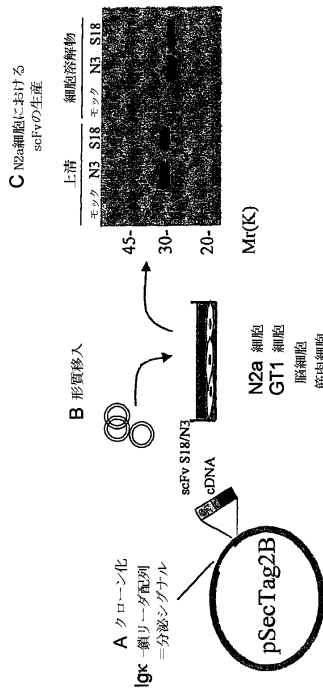


Fig. 23. マウスにおけるTSEsの処置のための細胞療法
(A) pSecTag2BにおけるscFv S18/N3 cDNAのクローニング
(B) 哺乳類細胞における形質移入
(C) N2a細胞の培養におけるscFvs S18及ひN3の分泌

【 図 2 4 】

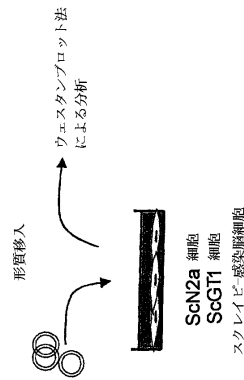


Fig. 24. マウスにおけるTSEsの処置のための細胞療法
ScN2a/ScGT1細胞からのscFv S18/N3の分泌は、スクレイビドの
ScN2a/ScGT1細胞を直す

【 図 25 】

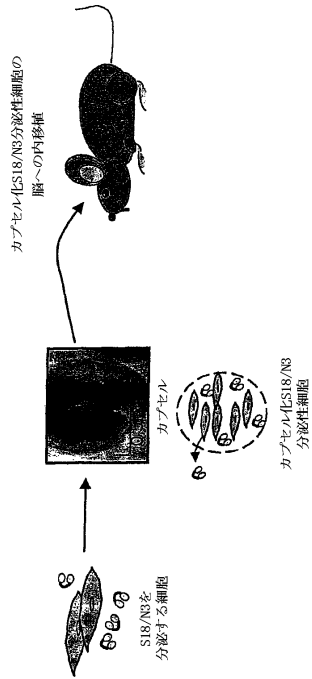


Fig. 25. カプセル化細胞 (即ち、神経細胞 (PC12, N2a, GT1)), 筋肉細胞, BHK, NIH3T3で、scFv S18/N3を分泌するものを用いる細胞療法

【 図 26 】

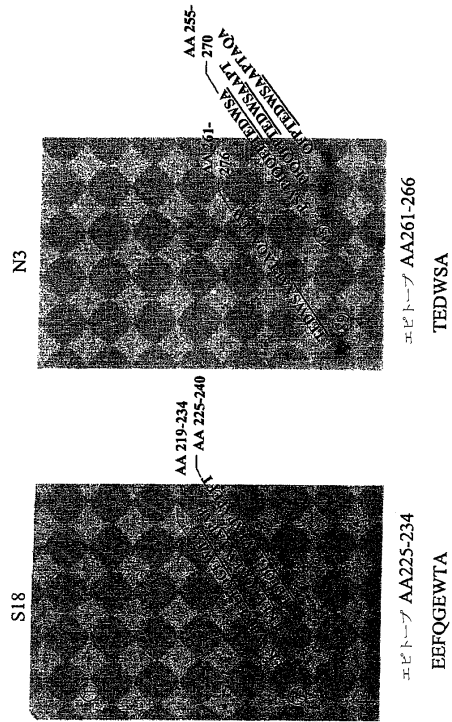


Fig. 26. scFv抗体S18及N3のエピトープマッピング

【 図 27 】

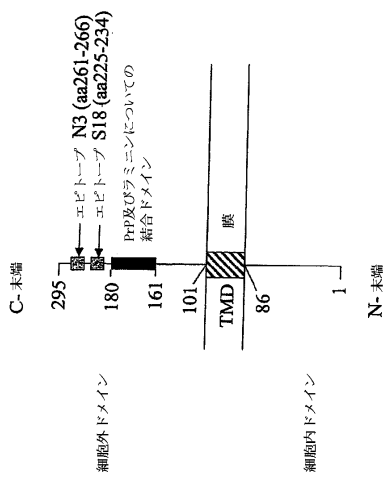


Fig. 27. scFv抗体S18及N3のエピトープマッピングの概略的描写。エピトープaa261-266を示すが、それはN3に結合し、及びエピトープaa225-234は、それはS18に結合する

【配列表】

0004625461000001.xml

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 A 6 1 K 39/395 (2006.01) A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 P 25/00 (2006.01) A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
- (72)発明者 クレメンス レイ
 ドイツ国 8 0 3 3 9 ミュンヘン ランズベルガーシュトラッセ 1 1 1
- (72)発明者 ピーター ロットゲン
 ドイツ国 6 8 5 2 6 ランデンブルク シタービューリング 1 2 9
- (72)発明者 クラウディア ビュットナー
 ドイツ国 6 8 7 2 3 シュベッツツインゲン ミッテルゲワン 4 2
- (72)発明者 ウベ ロイシュ
 ドイツ国 6 7 4 8 7 マイカマー ディーターウィーゼンシュトラッセ 1 3

審査官 神谷 昌男

- (56)参考文献 特表2002-501385(JP,A)
 特表平10-504458(JP,A)
 特表平07-502167(JP,A)
 特表2001-519643(JP,A)
 J.Cell.Biochem., 1998年, Vol.69, No.3, Page.244-251
 J.Biol.Chem., 1998年, Vol.273, No.25, Page.15854-15859
 J.Biol.Chem., 1997年, Vol.272, No.45, Page.28590-28595,
 Cancer Res., 1985年, Vol.45, No.6, Page.2713-2719,
 J.Cell.Biochem., 1996年, Vol.60, No.2, Page.226-234
 J.Virol., 1992年, Vol.66, No.8, Page.4992-5001

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N15/00-15/90
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq
 PubMed