(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-500115
(P2024-500115A)
(43)公表日　令和6年1月4日(2024.1.4)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/87　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/87	Ｚ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ　15/864(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ	４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ　16/00　(2006.01)		Ｃ０７Ｋ	16/00	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｎ　1/04　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	1/04		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全78頁）

(21)出願番号　特願2023-536496(P2023-536496)
(86)(22)出願日　令和3年12月17日(2021.12.17)
(85)翻訳文提出日　令和5年8月8日(2023.8.8)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/086645
(87)国際公開番号　WO2022/129609
(87)国際公開日　令和4年6月23日(2022.6.23)
(31)優先権主張番号　20215823.4
(32)優先日　令和2年12月18日(2020.12.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　519353651
エイシー イミューン ソシエテ アノニム
スイス ツェーハー－１０１５ ローザンヌ イーピーエフエル イノベーション パーク ビルディング ビー
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田 憲史
(74)代理人　100157956
弁理士　稲井 史生
(74)代理人　100170520
弁理士　笹倉 真奈美
(74)代理人　100221545
弁理士　白江 雄介
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗体デリバリー

(57)【要約】
ベクターは、対象における中枢神経系（ＣＮＳ）の疾患または障害を処置する方法に使用するための抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含み、ベクターは血液脳関門（ＢＢＢ）の細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされたＢＢＢ細胞は、抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす。このようなベクターにおいて有用な発現カセットは、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含み、さらに、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前にＩＲＥＳ、または抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に操作可能に連結されている第１のプロモーター、抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む。このようにして産生された抗体および抗体断片は、より高品質であり、より低いレベルの凝集および望ましくない免疫原性を示すことができる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における中枢神経系（ＣＮＳ）の疾患または障害を処置する方法に使用するための抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターであって、ベクターは血液脳関門（ＢＢＢ）の細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされたＢＢＢ細胞は、抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす、ベクター。
【請求項２】
抗体または抗体断片が脳実質内にデリバリーされ、適宜、抗体または抗体断片が脳実質内に分泌される、請求項１に記載の使用するためのベクター。
【請求項３】
ＢＢＢの内皮細胞に形質導入またはトランスフェクトする、請求項１または請求項２に記載の使用するためのベクター。
【請求項４】
ＢＢＢの周皮細胞もしくは星状細胞に形質導入またはトランスフェクトする、請求項１～３のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項５】
野生型ウイルスベクターまたは操作されたウイルスベクターを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項６】
向神経性ベクターを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項７】
ベクター表面上に、ベクターをＢＢＢの細胞に標的化するペプチド、小分子、抗体もしくはその抗体断片、タンパク質、ナノ粒子、脂質、オリゴヌクレオチド、アプタマーまたはカチオン性分子を発現する、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項８】
ベクター表面上に、ベクターをＢＢＢの細胞に標的化する修飾を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項９】
有機ナノ材料、例えばリポソーム、エキソソーム、デンドリマー、ミセル、無機ナノ材料、例えば金ナノ粒子、シリカナノ粒子またはカーボンナノチューブを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項１０】
アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レトロウイルス、ライノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）または任意のウイルス様粒子から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項１１】
ＡＡＶ血清型１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ血清型２（ＡＡＶ２）、ＡＡＶ血清型８（ＡＡＶ８）、ＡＡＶ血清型９（ＡＡＶ９）およびＡＡＶ血清型１０（ＡＡＶ１０）から選択されるＡＡＶである、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項１２】
ベクターが、操作されたＡＡＶベクターであり、適宜、
（ｉ）操作されたＡＡＶベクターが、操作されたＡＡＶ２ベクター、好ましくはＡＡＶ－ＢＲ１であるか；または
（ｉｉ）操作されたＡＡＶベクターが、操作されたＡＡＶ９ベクター、例えばＡＡＶ－Ｓ、ＡＡＶ－Ｆ、ＡＡＶ－ＰＨＰ．ｅＢ、ＡＡＶ９－ＰＨＰ－Ｖ１であるか；または
（ｉｉｉ）操作されたＡＡＶベクターが、操作されたＡＡＶ１ベクター、例えばＡＡＶ１ＲＸ、ＡＡＶ１Ｒ６またはＡＡＶ１Ｒ７であるか；または

（ｉｖ）操作されたＡＡＶベクターが、操作されたＡＡＶ１０ベクターである、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項１３】
ベクターが、ＡＡＶ－ＢＲ１またはＡＡＶ９－ＰＨＰ－Ｖ１である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項１４】
ＣＮＳの疾患または障害が、アミロイド－ベータタンパク質、ＴＤＰ－４３－プロテイノパチー、アルファ－シヌクレイノパチー、タウオパチー、ポリグルタミン障害を含むトリヌクレオチドリピート障害、例えばハンチントン病、脳関連がんおよび腫瘍、てんかん、精神疾患、神経炎症性疾患、神経筋疾患、ウイルス誘発性脳炎、およびミクログリア機能不全によって特徴付けられる疾患に関連する疾患から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項１５】
ＣＮＳの疾患または障害が、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、パーキンソン病（ＰＤ）、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、辺縁系優位型年齢関連ＴＤＰ－４３脳症（ＬＡＴＥ）、および多発性硬化症から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項１６】
抗体または抗体断片が、抗ＥｒｂＢ２、抗ＴＤＰ－４３（ＮＩ－２０５）、抗Ａｂｅｔａ（例えばバピネズマブ、ソラネズマブ、レカネマブ、アズカヌマブ、ドナネマブ、ガンテネルマブまたはクレネズマブ）、抗ＡｐｏＥ４（アポリポタンパク質Ｅ４）および抗ＤＤＸ３Ｘ（ＡＴＰ依存性ＲＮＡヘリカーゼ）、抗Ｔａｕ（チラボネマブ、ゴスラネマブ、ザゴテネマブ、セモリネマブ、ベプラネマブ、ＢＩＩＢ０７６、ＪＮＪ－６３７３３６５７、Ｌｕ　ＡＦ８７９０８、ＰＮＴ００１、Ｅ－２８１４）、抗ＬＩＮＧＯ－１（例えばオピシヌマブ）、抗アルファ－シヌクレイン（シンパネマブ、プラシネズマブ、ＭＥＤＩ－１３４１、Ｌｕ　ＡＦ８２４２２、ＢＡＮ０８０５）、抗ＡＳＣ（ＩＣ－１００）、抗ＮＬＲＰ３、抗Ｃ５（ラブリズマブ、エクリズマブ）、抗Ｃ１ｑ（ＡＮＸ－００５）、抗Ｃ３、抗ハンチンチン（Ｃ－６１７、ＮＩ－３０２）、抗プリオン、抗ＣＤ２０（例えばオファツムマブ、オクレリズマブ、リツキシマブ、ＢＣＤ－１３２、ウブリツキシマブ、ＢＡＴ－４４０６Ｆ、ＡＬ－０１４）、抗ＰＤ－１（ＩＢＣ－Ａｂ００２）または抗ＶＥＧＦ－Ａ（ベバシズマブ、ラニビズマブ、ブロルシズマブ、ファリシマブ、バヌシズマブ）抗体または抗体断片から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項１７】
非経口的に対象に投与される、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項１８】
静脈内注射または静脈内注入によって対象に投与される、請求項１７に記載の使用するためのベクター。
【請求項１９】
ポリヌクレオチドが、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、ＥＦ１Ａ（ヒト真核生物翻訳伸長因子１アルファ１）、ＣＡＧ（修飾されたニワトリβ－アクチンプロモーターに融合されたＣＭＶ初期エンハンサー）、ＣＢｈ（修飾されたニワトリβ－アクチンプロモーターに融合されたＣＭＶ初期エンハンサー）、ＳＶ４０（シミアンウイルス４０エンハンサー／初期プロモーター）、ＧＦＡＰ（ヒトグリア線維性酸性タンパク質プロモーター）、ＡＴＰ１Ａ２＿１（Ｎａ、Ｋ　ＡＴＫアーゼ　α２）、ＣＬＤＮ＿５（クローディン５）、ＡＤＲＢ２＿１（アドレナリン受容体ベータ２）、ＴＮＦＲＳＦ６Ｂ＿１（ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー６ｂ）、ＰＤＹＮ＿１（プロダイノルフィン）、ＧＨ１＿１（ヒト成長ホルモン）、ＯＰＡＬＩＮ＿１（オパリン）、ＳＹＮ１＿１（シナプシン１）、ＣＡＭＫ２Ａ＿１（カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナ

ーゼＩＩアルファ）、ＮＥＦＨ＿１（ニューロフィラメント重鎖ポリペプチド）、ＮＥＵＲＯＤ６＿１（ニューロン分化因子６）もしくはＯＬＩＧ２＿１（オリゴデンドロサイト転写因子２）、ＧＦＡＰ、ＡＴＰ１Ａ２＿１、ＣＬＤＮ＿５、ＡＤＲＢ２＿１、ＴＮＦＲＳＦ６Ｂ＿１、ＰＤＹＮ＿１、ＧＨ１＿１、ＯＰＡＬＩＮ＿１、ＳＹＮ１＿１、ＣＡＭＫ２Ａ＿１、ＮＥＦＨ＿１、ＮＥＵＲＯＤ６＿１もしくはＯＬＩＧ２＿１プロモーターのいずれかに融合したＣＭＶ初期エンハンサーから選択される少なくとも１つのプロモーター、好ましくはサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターまたはＣＢｈプロモーターを含み、少なくとも１つのプロモーターが抗体または抗体断片をコードする配列に作動可能に連結されている、前記請求項のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項２０】

少なくとも１つのプロモーターが、ＡＴＰ１Ａ２＿１（Ｎａ、Ｋ　ＡＴＰアーゼα２）、ＣＬＤＮ＿５（クローディン５）、ＡＤＲＢ２＿１（アドレナリン受容体ベータ２）およびＴＮＦＲＳＦ６Ｂ＿１（ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー６ｂ）から選択され、適宜、少なくとも１つのプロモーターが、エンハンサー、例えばＣＭＶ初期エンハンサーに作動可能に連結されている、請求項１９に記載の使用するためのベクター。

【請求項２１】

対象におけるＢＢＢに抗体または抗体断片をデリバリーさせる方法であって、方法は、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを対象に投与することを含み、ＢＢＢの細胞の形質導入またはトランスフェクションをもたらし、形質導入またはトランスフェクションされた細胞が抗体または抗体断片を発現する、方法。

【請求項２２】

対象におけるＣＮＳに抗体または抗体断片をデリバリーさせる方法であって、方法は、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを対象に投与することを含み、ＢＢＢの細胞の形質導入またはトランスフェクションをもたらし、形質導入またはトランスフェクトされた細胞が抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす、方法。

【請求項２３】

対象におけるＣＮＳの疾患または障害を処置する方法であって、方法は、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを対象に投与することを含み、ＢＢＢの細胞の形質導入またはトランスフェクションをもたらし、形質導入またはトランスフェクトされた細胞が抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす、方法。

【請求項２４】

対象におけるＣＮＳの疾患または障害を処置するための医薬を製造するための抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターの使用であって、ベクターが血液脳関門（ＢＢＢ）の細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされた細胞が抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす、使用。

【請求項２５】

抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを対象のＢＢＢにデリバリーさせるための抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターの使用であって、ベクターが血液脳関門（ＢＢＢ）の細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされた細胞が抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす、使用。

【請求項２６】

請求項２～２０のいずれか一項に記載の特徴に従ってさらに定義される、請求項２１～２５のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項２７】

対象における中枢神経系（ＣＮＳ）の疾患または障害を処置する方法に使用するための、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体また

は抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットを含むベクターであって、血液脳関門（ＢＢＢ）またはＣＮＳの細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされた細胞が抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす、ベクター。

【請求項２８】

対象における中枢神経系（ＣＮＳ）の疾患または障害を処置する方法に使用するための、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットを含むベクターであって、血液脳関門（ＢＢＢ）またはＣＮＳの細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされた細胞が抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす、ベクター。

【請求項２９】

抗体または抗体断片が脳実質内にデリバリーされ、適宜、前記抗体または抗体断片が脳実質内に分泌される、請求項２７または請求項２８に記載の使用するためのベクター。

【請求項３０】

ベクターがＣＮＳの細胞に形質導入またはトランスフェクトし、細胞が脳内皮細胞、ニューロン、周皮細胞、星状細胞、オリゴデンドロサイト、ミクログリアおよび上衣細胞から選択される、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項３１】

ＢＢＢの内皮細胞に形質導入またはトランスフェクトする、請求項２７～３０のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項３２】

ＢＢＢの周皮細胞または星状細胞に形質導入またはトランスフェクトする、請求項２７～３１のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項３３】

抗体または抗体断片がＣＮＳ内に分泌され、好ましくは脳実質内に分泌される、請求項２７～３２のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項３４】

ベクター表面上に、ベクターをＢＢＢの細胞に標的化する修飾を含む、請求項２７～３３のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項３５】

ベクター表面上に、ベクターをＢＢＢまたはＣＮＳの細胞に標的化するペプチド、小分子、抗体もしくはその抗体断片、タンパク質、ナノ粒子、脂質、オリゴヌクレオチド、アプタマーまたはカチオン性分子を発現する、請求項２７～３４のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項３６】

向神経性ベクターを含む、請求項２７～３５のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項３７】

有機ナノ材料、例えばリポソーム、エキソソーム、デンドリマーおよびミセル、または無機ナノ材料、例えば金ナノ粒子、シリカナノ粒子およびカーボンナノチューブを含む、請求項２７～３６のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項３８】

野生型ウイルスベクターまたは操作されたウイルスベクターを含む、請求項２７～３７のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項３９】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レトロウイルス、ライノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）またはウイルス様粒子から選択される

、請求項２７～３８のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項４０】
ＡＡＶ血清型１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ血清型２（ＡＡＶ２）、ＡＡＶ血清型８（ＡＡＶ８）、ＡＡＶ血清型９（ＡＡＶ９）およびＡＡＶ血清型１０（ＡＡＶ１０）から選択されるＡＡＶである、請求項２７～３９のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項４１】
ベクターが、操作されたＡＡＶベクターであって、適宜、
（ｉ）操作されたＡＡＶベクターが、操作されたＡＡＶ２ベクター、好ましくはＡＡＶ－ＢＲ１であるか；または
（ｉｉ）操作されたＡＡＶベクターが、操作されたＡＡＶ９ベクター、例えばＡＡＶ－Ｓ、ＡＡＶ－Ｆ、ＡＡＶ－ＰＨＰ．ｅＢ、ＡＡＶ９－ＰＨＰ－Ｖ１であるか；または
（ｉｉｉ）操作されたＡＡＶベクターが、操作されたＡＡＶ１ベクター、例えばＡＡＶ１ＲＸ、ＡＡＶ１Ｒ６もしくはＡＡＶ１Ｒ７であるか；または
（ｉｖ）操作されたＡＡＶベクターが、操作されたＡＡＶ１０ベクターである、請求項２７～４０のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項４２】
ＣＮＳの疾患または障害が、アミロイド－ベータタンパク質、ＴＤＰ－４３－プロテイノパチー、アルファ－シヌクレイノパチー、タウオパチー、ポリグルタミン障害を含むトリヌクレオチドリピート障害、例えばハンチントン病、脳関連がんおよび腫瘍、てんかん、精神疾患、神経炎症性疾患、神経筋疾患、ウイルス誘発性脳炎、およびミクログリア機能不全によって特徴付けられる疾患に関連する疾患から選択される、請求項２７～４１のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項４３】
ＣＮＳの疾患または障害が、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、パーキンソン病（ＰＤ）、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、辺縁系優位型年齢関連ＴＤＰ－４３脳症（ＬＡＴＥ）、および多発性硬化症から選択される、請求項２７～４２のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項４４】
抗体または抗体断片が、抗ＥｒｂＢ２、抗ＴＤＰ－４３（ＮＩ－２０５）、抗Ａｂｅｔａ（例えばバピネズマブ、ソラネズマブ、レカネマブ、アズカヌマブ、ドナネマブ、ガンテネルマブまたはクレネズマブ）、抗ＡｐｏＥ４（アポリポタンパク質Ｅ４）および抗ＤＤＸ３Ｘ（ＡＴＰ依存性ＲＮＡヘリカーゼ）、抗Ｔａｕ（チラボネマブ、ゴスラネマブ、ザゴテネマブ、セモリネマブ、ベプラネマブ、ＢＩＩＢ０７６、ＪＮＪ－６３７３３６５７、Ｌｕ　ＡＦ８７９０８、ＰＮＴ００１、Ｅ－２８１４）、抗ＬＩＮＧＯ－１（例えばオピシヌマブ）、抗アルファ－シヌクレイン（シンパネマブ、プラシネズマブ、ＭＥＤＩ－１３４１、Ｌｕ　ＡＦ８２４２２、ＢＡＮ０８０５）、抗ＡＳＣ（ＩＣ－１００）、抗ＮＬＲＰ３、抗Ｃ５（ラブリズマブ、エクリズマブ）、抗Ｃ１ｑ（ＡＮＸ－００５）、抗Ｃ３、抗ハンチンチン（Ｃ－６１７、ＮＩ－３０２）、抗プリオン、抗ＣＤ２０（例えばオファツムマブ、オクレリズマブ、リツキシマブ、ＢＣＤ－１３２、ウブリツキシマブ、ＢＡＴ－４４０６Ｆ、ＡＬ－０１４）、抗ＰＤ－１（ＩＢＣ－Ａｂ００２）または抗ＶＥＧＦ－Ａ（ベバシズマブ、ラニビズマブ、ブロルシズマブ、ファリシマブ、バヌシズマブ）から選択される、請求項２７～４３のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項４５】
非経口的に対象に投与される、請求項２７～４４のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。
【請求項４６】
静脈内注射または静脈内注入によって対象に投与される、請求項４５に記載の使用するためのベクター。
【請求項４７】
発現カセットが、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、

抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）またはフーリン－２Ａ切断部位のいずれかをさらに含む、請求項２７～４６に記載の使用するためのベクター。

【請求項４８】

ＩＲＥＳが脳心筋炎ウイルスに由来し、適宜、配列番号１または配列番号８を含む、請求項４７に記載の使用するためのベクター。

【請求項４９】

抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子が分泌ペプチドをさらに含み、および／または抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子が分泌ペプチドをさらに含む、請求項２７～４８のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項５０】

少なくとも１つのプロモーターおよび／または第１のプロモーターおよび／または第２のプロモーターが、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、ＥＦ１Ａ（ヒト真核生物翻訳伸長因子１アルファ１）、ＣＡＧ（修飾されたニワトリβ－アクチンプロモーターに融合されたＣＭＶ初期エンハンサー）、ＣＢｈ（修飾されたニワトリβ－アクチンプロモーターに融合されたＣＭＶ初期エンハンサー）、ＳＶ４０（シミアンウイルス４０エンハンサー／初期プロモーター）、ＧＦＡＰ（ヒトグリア線維性酸性タンパク質プロモーター）、ＡＴＰ１Ａ２＿１（Ｎａ、Ｋ　ＡＴＫアーゼ　α２）、ＣＬＤＮ＿５（クローディン５）、ＡＤＲＢ２＿１（アドレナリン受容体ベータ２）、ＴＮＦＲＳＦ６Ｂ＿１（ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー６ｂ）、ＰＤＹＮ＿１（プロダイノルフィン）、ＧＨ１＿１（ヒト成長ホルモン）、ＯＰＡＬＩＮ＿１（オパリン）、ＳＹＮ１＿１（シナプシン１）、ＣＡＭＫ２Ａ＿１（カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼＩＩアルファ）、ＮＥＦＨ＿１（ニューロフィラメント重鎖ポリペプチド）、ＮＥＵＲＯＤ６＿１（ニューロン分化因子６）もしくはＯＬＩＧ２＿１（オリゴデンドロサイト転写因子２）、ＣＢｈ、ＧＦＡＰ、ＡＴＰ１Ａ２＿１、ＣＬＤＮ＿５、ＡＤＲＢ２＿１、ＴＮＦＲＳＦ６Ｂ＿１、ＰＤＹＮ＿１、ＧＨ１＿１、ＯＰＡＬＩＮ＿１、ＳＹＮ１＿１、ＣＡＭＫ２Ａ＿１、ＮＥＦＨ＿１、ＮＥＵＲＯＤ６＿１もしくはＯＬＩＧ２＿１プロモーターのいずれかに融合したＣＭＶ初期エンハンサーから選択される少なくとも１つのプロモーター、好ましくはサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターまたはＣＢｈプロモーターから選択され、少なくとも１つのプロモーターが抗体または抗体断片をコードする配列に作動可能に連結されている、請求項２７～４９のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項５１】

少なくとも１つのプロモーターおよび／または前記第１のプロモーターおよび／または第２のプロモーターが、ＡＴＰ１Ａ２＿１（Ｎａ、Ｋ　ＡＴＰアーゼα２）、ＣＬＤＮ＿５（クローディン５）、ＡＤＲＢ２＿１（アドレナリン受容体ベータ２）およびＴＮＦＲＳＦ６Ｂ＿１（ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー６ｂ）から選択され、適宜、少なくとも１つのプロモーターおよび／または第１のプロモーターおよび／または第２のプロモーターが、エンハンサー、例えばＣＭＶ初期エンハンサーに作動可能に連結されている、請求項５０に記載の使用するためのベクター。

【請求項５２】

発現カセットが、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９もしくは配列番号１０から選択される配列、またはそれらと少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％もしくは９９％の同一性を有する配列を含む、請求項２７～５１のいずれか一項に記載の使用するためのベクター。

【請求項５３】

抗体もしくは抗体断片の凝集を減少させ、抗体もしくは抗体断片の成熟および／または質を改善する方法であって、方法は、

（ｉ）５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗

体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットであって、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含む発現カセット；または５’から３’に、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで細胞を形質転換すること；ならびに

（ｉｉ）抗体または抗体断片の産生に適した条件下で形質転換細胞を維持すること

を含む方法。

【請求項５４】

抗体または抗体断片の力価を増加させる方法であって、方法は、

（ｉ）５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットであって、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）または自己（例えばフーリン－２Ａ）切断部位のいずれかをさらに含む発現カセット；あるいは５’から３’に、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで細胞を形質転換すること；ならびに

（ｉｉ）抗体または抗体断片の産生に適した条件下で形質転換細胞を維持すること

を含む方法。

【請求項５５】

抗体または抗体断片療法に関連する望ましくない抗体もしくは抗体断片の免疫原性および／または有害作用を減少させる方法であって、方法は、

（ｉ）５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットであって、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含む発現カセット；または５’から３’に、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで細胞を形質転換すること；ならびに

（ｉｉ）抗体または抗体断片の産生に適した条件下で形質転換細胞を維持すること

を含む方法。

【請求項５６】

抗体または抗体断片が自己切断エレメントを含まない、請求項５３～５５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５７】

発現カセットがベクターに含まれ、方法が、請求項２９～５２のいずれか一項に記載の特徴に従ってさらに定義される、請求項５３～５６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５８】

請求項５３～５７のいずれか一項に記載の方法によって得られる抗体または抗体断片。

【請求項５９】

操作されたＡＡＶ２ベクター、好ましくはＡＡＶ－ＢＲ１、または操作されたＡＡＶ９ベクター、例えばＡＡＶ－Ｓ、ＡＡＶ－ＡＦ、ＡＡＶ－ＰＨＰ．ｅＢもしくはＡＡＶ９－ＰＨＰ－Ｖ１、または操作されたＡＡＶ１ベクター、例えばＡＡＶ１ＲＸ、ＡＡＶ１Ｒ６、ＡＡＶ１Ｒ７、または操作されたＡＡＶ１０ベクターを含むウイルスベクターであって

、操作されたウイルスベクターが、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットを含み、さらに、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、ＩＲＥＳを含む、ウイルスベクター。

【請求項６０】

操作されたＡＡＶ２ベクター、好ましくはＡＡＶ－ＢＲ１、または操作されたＡＡＶ９ベクター、例えばＡＡＶ－Ｓ、ＡＡＶ－ＡＦ、ＡＡＶ－ＰＨＰ．ｅＢもしくはＡＡＶ９－ＰＨＰ－Ｖ１、または操作されたＡＡＶ１ベクター、例えばＡＡＶ１ＲＸ、ＡＡＶ１Ｒ６もしくはＡＡＶ１Ｒ７、または操作されたＡＡＶ１０ベクターを含むウイルスベクターであって、操作されたウイルスベクターが、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットを含む、ウイルスベクター。

【請求項６１】

操作されたウイルスベクターがＡＡＶ－ＢＲ１またはＡＡＶ９－ＰＨＰ－Ｖ１である、請求項５９または６０に記載の操作されたウイルスベクター。

【請求項６２】

請求項２９～５２のいずれか一項にさらに定義される、請求項５９～６１のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、特に、ウイルスベクターなどのベクターを介して、抗体または抗体断片をコードする遺伝子を、血液脳関門（ＢＢＢ）または中枢神経系（ＣＮＳ）からの細胞、例えば脳内皮細胞に効果的にデリバリーし、ＣＮＳに、好ましくは脳実質に放出される、細胞に抗体分子（複数可）を産生する手段および方法に関する。抗体遺伝子をＢＢＢまたはＣＮＳ、特に脳内皮細胞にデリバリーすることによって、本発明はまた、中枢神経系（ＣＮＳ）における抗体濃度を増加させる方法に関する。このアプローチによる治療抗体のデリバリーは、ＣＮＳに起因する種々の疾患または障害、例えば、神経変性疾患または障害、運動疾患または障害、脳関連腫瘍、精神病およびＣＮＳ神経炎症を処置するのに有用である。一態様では、本発明は、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターなどのベクターによるインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）での脳内皮細胞の形質導入が、大量の高品質抗体の側底空間への分泌をもたらすという予期せぬ発見に由来する。本発明はまた、驚くほど高い抗体発現収率、および異なる分泌ペプチドを用いて、鎖位置を交互に変え、上流、中部および下流の（ｉｎｔｒａ－　ａｎｄ　ｄｏｗｎ－ｓｔｒｅａｍ）調節エレメントをカスタマイズすることによる改善されたタンパク質品質を記載する。本発明は、十分な治療用量で血液脳関門を通過する必要性による、脳への治療抗体のデリバリーに関連する困難を回避する。本発明は、任意の哺乳動物、特にヒト対象に適用可能であり、脳への治療抗体のデリバリーを改善することを目的とする。したがって、本発明は、限定されないが、アミロイド－ベータタンパク質、ＴＤＰ－４３－プロテイノパチー、アルファ－シヌクレイノパチー、タウオパチー、ポリグルタミン障害を含むトリヌクレオチドリピート障害、例えばハンチントン病、脳関連がんおよび腫瘍、てんかん、精神疾患、神経炎症性疾患、神経筋疾患、ウイルス誘発性脳炎、およびミクログリア機能不全によって特徴付けられる疾患に関連する疾患を含むＣＮＳの疾患または障害に罹患している患者の疾患、障害または状態の処置に用いることができる。

【背景技術】

【０００２】

血液脳関門（ＢＢＢ）は、血液を媒介する病原体および毒素から脳を保護するが、中枢神経系（ＣＮＳ）への適切なニューロン機能に必要な厳密に調節された微小環境を維持す

る構造的および機能的関門である［１，２］。ＢＢＢは、血流と脳の間の物理的バリアを形成する内皮細胞（ＥＣ）と、ＥＣ層の管腔外表面に位置する２つの壁細胞である周皮細胞と星状細胞の３種類の細胞から構成される［３］。内皮細胞はＢＢＢの主要な機能に寄与しているが、これら３種類の細胞はほとんどの脊椎動物の血液脳関門全体を構成している。それらの相互作用および情報伝達は、厳密に制御されたＣＮＳの恒常性を維持するために重要である。

【０００３】

脳内皮細胞は、内皮細胞と比較して固有の性質を有し、それらは、傍細胞空間と考えられる化合物の拡散を制限する多タンパク質結合ネットワークであるタイトジャンクション（ＴＪ）によってひとまとめに保持されている。水、酸素および小さな脂溶性物質のような小さな分子は血液から脳へ容易に通過できるが、タイトジャンクションは抗体を含む大型分子の脳への拡散を妨げる［４］。

【０００４】

この厳密に制御された脳への侵入は、中枢神経系（ＣＮＳ）を伴う疾患に対する生物製剤の開発における主要な課題の１つである。実際、末梢投与により、注射抗体の約０．１～０．３％が脳に到達することが報告されている［５］［６］。たとえ高用量を注射しても、治療反応を引き起こすのに十分な濃度の抗体を脳内で得ることはしばしば困難である。この欠点は、臨床試験中の受動免疫療法の失敗の、可能性のある原因の１つであると記載されている（［７］）。

【０００５】

過去数十年の間に、受容体媒介性トランスサイトーシス（［８］）、ナノ粒子デリバリー［９］［１０］、鼻腔内デリバリー［１１，１２］、または細胞ベース技術（［１３，１４］）のような代替の非侵襲的アプローチが、脳における巨大分子の浸透を増加させるために開発されてきた。しかしながら、主に製造上の課題［１５］、インビボ（ｉｎ ｖｉｖｏ）標的媒介薬物動態［１６］［１７］、または修飾タンパク質の抗原性が疑われること［１８］に関連して、限られた有効性が報告されている。

【０００６】

最近の研究［１４］では、著者らは、ＢＢＢにホーミングし、治療抗体を発現することができる、エクスビボ（ｅｘ ｖｉｖｏ）トランスフェクトされた自己内皮前駆細胞（ＥＰＣ）からなる細胞標的化デリバリーシステムを報告した。しかしながら、エクスビボトランスフェクションの成功が観察されたにもかかわらず、静脈内移植後の操作されたＥＰＣの限定的なホーミングが期待され［１９］、このようなアプローチの治療可能性が減少する。動脈内注射は適切な代替法となり得るが、細胞用量、注入速度、および細胞型を注意深く評価し、最適化しなければならないため、依然として困難である［２０］。

【０００７】

ウイルスベクターを用いた遺伝子治療によれば、目的の遺伝子は、それらのゲノム中に目的の導入遺伝子を含むように修飾されたウイルスを用いて、特定の臓器、組織、または細胞型への治療遺伝子の導入に基づいて、ＣＮＳ内に直接デリバリーされ得る。遺伝子デリバリー療法に使用されてきたウイルスベクターは、限定されないが、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスに基づく。

【０００８】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、最近の承認によって証明される遺伝子デリバリーのための効率的で臨床的に安全なプラットフォームを提供する：Ｌｕｘｔｕｒｎａ（登録商標）（ｖｏｒｅｔｉｇｅｎｅ ｎｅｐａｒｖｏｖｅｃ－ｒｚｙｌ）は、最初の承認されたＡＡＶ２ベースの療法であり、ＲＰＥ６５遺伝子の両コピーにおける突然変異による遺伝性網膜疾患の患者にＲＰＥ６５遺伝子の機能的コピーをデリバリーし、Ｚｏｌｇｅｎｓｍａ（登録商標）（ｏｎａｓｅｍｎｏｇｅｎｅ ａｂｅｐａｒｖｏｖｅｃ－ｘｉｏｉ）は、ＡＡＶ９ベクターデータであり、脊髄筋萎縮症（ＳＭＡ）患者の運動ニューロンにＳＭＮ１遺伝子の機能的コピーをデリバリーする。

【０００９】

ＡＡＶはまた、遺伝子発現、ノックダウン、遺伝子編集を可能にする神経系への遺伝子導入の媒体としても使用されている［２１］。しかしながら、これらの応用のほとんどは、１）血液脳関門を回避するため、および２）導入遺伝子発現を時間的および空間的に制限するために、ＡＡＶベクターの侵襲的局所注射（脳室内、髄腔内または槽内投与）に依存する。

【００１０】

ＡＡＶ２を含む様々な野生型血清型はＢＢＢに形質導入するが、ＢＢＢを通過しないため、脳へのデリバリーには侵襲的な手術が必要である［２２，２３］。対照的に、静脈内投与されたＡＡＶ９血清型はＢＢＢを克服し、ＣＮＳに入り、脳および脊髄への遺伝子導入をもたらす［２４，２５］。

【００１１】

限定されないが、ＡＡＶ－Ｓ、ＡＡＶ－Ｆ［２６］またはＡＡＶ９に基づくＡＡＶ－ＰＨＰ．ｅＢ（［２７－２９］）などの最近報告された操作されたカプシドベクターは、良好な脳形質導入を提供し、成体マウスの多くの領域にわたるニューロンおよび星状細胞の大部分が、静脈内投与経路を用いて形質導入された。同様に、ＡＡＶ２に基づくＡＡＶ－ＢＲ１（本明細書ではＡＡＶ２－ＢＲ１と同義的に言及される）カプシド［３０］、またはより最近、ＡＡＶ９－ＰＨＰ．Ｖ１［３１］は、神経血管疾患を処置する可能性を有し、長期間持続する導入遺伝子発現を有する脳内皮細胞に選択的に形質導入することが報告された。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１２】

ＡＡＶを介した全免疫グロブリン（ＩｇＧ）またはＦｃドメインを欠く抗体断片の発現は、ＣＮＳ内で種々の適応症［３２－４４］で実証されたが、両フォーマットに固有の限界も報告された［３２，４５，４６］。実際、ＡＡＶ発現カセットのパッケージングサイズは、重鎖および軽鎖遺伝子の両方を含む転写および翻訳に必要な全てのエレメントが４．７ｋｂ未満であることが必要である、ＩｇＧ遺伝子全体にとっての設計上の制約を課す。今日まで、大部分のコンストラクトは単一プロモーターからなり、したがって、抗体重鎖遺伝子（ＨＣ）と軽鎖（ＬＣ）の間のフーリン－２Ａ（Ｆ２Ａ）などの自己プロセシング配列の使用を必要とする［４７－４９］。研究者らは、高い発現力価、小さなＦ２Ａ配列サイズ（わずか６０～８０塩基対）、および抗体鎖発現における等モル濃度のために、このコンストラクトを大いに好む。しかしながら、ほとんどの場合、Ｆ２Ａペプチドは重鎖または軽鎖のいずれかに結合したままであり、発現タンパク質または抗体発現細胞の望ましくない免疫原性を引き起こす可能性がある［４５］。二シストロン性抗体発現のための内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）は、自己切断配列の代替として記載されているが、一般的には、重鎖および軽鎖発現の不均衡のために、より低いタンパク質発現が得られる。ｓｃＦｖまたは単一ドメイン抗体などの抗体断片は、単シストロン性発現のために、全ＩｇＧ分子と比較してより高いタンパク質力価などのいくつかの利点を示すが、上記断片は、Ｆｃエフェクター機能を欠き、ＦｃＲｎ結合能力を有さず、これは、インビボでより短い半減期をもたらす。次に、Ｆｃドメインを欠く断片は、脳実質内の病的複合体を除去するためにエフェクター細胞を動員することができず、逆トランスサイトーシスを介して脳から血液への結合抗原の流出が減少する［３２，５０－５２］。このような分子の一価結合能力のために、ＩｇＧ対応物と比較して低い親和性が観察される。このようにして、細胞外プロテイノパチーを標的化し、除去するための分泌された全ＩｇＧは、断片と比較して好ましい選択肢であり得るが、現在の限界を回避し、高品質の発現を可能にして、抗体曝露を増加させ、エフェクター細胞を動員し、インサイチュ（ｉｎ　ｓｉｔｕ）産生ＩｇＧの望ましくない免疫原性のリスクを低下させる方法を開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【００１３】

ここでは、ウイルスベクターなどのベクター、またはリポソームなどの別のベクター、

またはナノ粒子を用いて抗体または抗体断片をコードする遺伝子を血液脳関門（ＢＢＢ）由来の細胞、例えば、限定されないが、脳内皮細胞にデリバリーして、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質内に治療抗体分子を局所的に産生することによって、中枢神経系（ＣＮＳ）における（治療）抗体または抗体断片の濃度を増加させるデリバリー方法を初めて記載する。この新規アプローチによって産生される抗体は、ＣＮＳ関連障害を処置するために使用され得る。このようなシナリオでは、ＢＢＢの細胞（脳内皮細胞および／または周皮細胞および／または星状細胞）は、ＣＮＳ内、特に脳実質内への高品質抗体の長期発現を提供する。

【００１４】

この新しい戦略は、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質内に十分な治療用量の抗体に到達するために血液脳関門を通過する必要がある従来の受動免疫戦略の障害を回避する。

【００１５】

本発明はまた、異なる分泌ペプチドを用いて、先行技術において以前に報告された戦略に関して、中部および下流の調節エレメントをカスタマイズすることによる、鎖位置を交互に変えることによって、予期せぬ高い抗体発現収率および改善されたタンパク質品質を生成する抗体および抗体断片を産生するための改善された発現カセットに関する。

【００１６】

本発明は、部分的には、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド（複数可）を血液脳関門（ＢＢＢ）の細胞にデリバリーするためにベクターを使用することができるという発見に基づく。ＢＢＢの細胞による抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド（複数可）の発現は、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす。この発見は、ＣＮＳの疾患または障害を処置するために、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質内への十分な治療用量の抗体に到達するために、ＢＢＢを通過する治療抗体に依存する従来の戦略の限界を回避する新規な戦略を提示する。

【００１７】

したがって、一態様では、本発明は、対象における中枢神経系（ＣＮＳ）の疾患または障害を処置する方法において使用するための抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド（複数可）を含むベクターを提供し、ベクターは血液脳関門（ＢＢＢ）の細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされたＢＢＢ細胞は、抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす。

【００１８】

本明細書に記載される抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターをＢＢＢに標的化することによって、対象への抗体または抗体断片の直接デリバリーに依存する従来の抗体治療薬と比較して、ＣＮＳ、好ましくは脳実質内にデリバリーされる抗体または抗体断片の量が増加する。他の箇所で記載されるように、注射された抗体の約０．１％～０．３％のみが末梢投与後に脳に到達することが報告されている。対照的に、本発明者らは、抗体（ＭＡＢ１）をコードするポリヌクレオチド（複数可）を脳内皮細胞株に導入するためにＡＡＶベクターを用いると、ＭＡＢ１の非分極性分泌が生じることを発見した。これは、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質内への抗体または抗体断片の発現にこの技術を用いることができることを意味する。

【００１９】

ＣＮＳは、脳と脊髄の２つの主要な構成要素からなる。感覚インパルスはＣＮＳに伝達され、運動インパルスはＣＮＳから伝わる。ＣＮＳはまた、神経系全体の活動を調整する。一実施形態では、本発明に従って使用するためのベクターは、血液脳関門（ＢＢＢ）の細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされたＢＢＢ細胞は、抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす。ＣＮＳは、複数の細胞型を含み、一実施形態では、抗体または抗体断片は、ＣＮＳにおける少なくとも１つの（最大で全部の）細胞型にデリバリーされる。一実施形態では、抗体または抗体断片は、脳内皮細胞、ニューロン、周皮細胞、星状細胞、オリゴ

デンドロサイト、ミクログリアおよび上衣細胞にデリバリーされ得る。したがって、デリバリーは、ＣＮＳのニューロンおよび非ニューロン（グリア）細胞に対し得る。一実施形態では、抗体または抗体断片は、ＢＢＢ細胞からＣＮＳ内に分泌される。例えば、ＢＢＢ細胞に発現された抗体または抗体断片の少なくとも２０％がＣＮＳ内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞に発現された抗体または抗体断片の少なくとも３０％がＣＮＳ内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞に発現された抗体または抗体断片の少なくとも４０％がＣＮＳ内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞に発現された抗体または抗体断片の少なくとも５０％がＣＮＳ内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞に発現された抗体または抗体断片の少なくとも６０％がＣＮＳ内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞に発現された抗体または抗体断片の少なくとも７０％がＣＮＳ内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞に発現された抗体または抗体断片の少なくとも８０％がＣＮＳ内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ発現された抗体または抗体断片の少なくとも９０％がＣＮＳ内にデリバリーされる。

【００２０】

好ましい実施形態では、抗体または抗体断片は、脳実質内にデリバリーされる。本明細書で使用される場合、「脳実質」とは、ニューロンおよびグリア細胞で構成される脳の機能組織を指す。本発明に従って使用するためのベクターは、血液脳関門（ＢＢＢ）の細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされたＢＢＢ細胞は、抗体または抗体断片を発現し、脳実質内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす。一実施形態では、抗体または抗体断片は、ＢＢＢ細胞から脳実質内に分泌される。例えば、ＢＢＢ細胞において発現された抗体または抗体断片の少なくとも２０％が脳実質内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞において発現された抗体または抗体断片の少なくとも３０％が脳実質内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞において発現された抗体または抗体断片の少なくとも４０％が脳実質内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞において発現された抗体または抗体断片の少なくとも５０％が脳実質内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞において発現された抗体または抗体断片の少なくとも６０％が脳実質内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞において発現された抗体または抗体断片の少なくとも７０％が脳実質内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞において発現された抗体または抗体断片の少なくとも８０％が脳実質内にデリバリーされる。一実施形態では、ＢＢＢ細胞において発現された抗体または抗体断片の少なくとも９０％が脳実質内にデリバリーされる。

【００２１】

すでに他の箇所で記載されるように、ＢＢＢは、血液を介した病原体や毒素から脳を保護する構造的および機能的な障壁である。ＢＢＢは、内皮細胞、周皮細胞および星状細胞の３種類の細胞で構成される。本発明者らの所見は主としてＢＢＢの内皮細胞に関するが、それらの観察はＢＢＢの他の細胞にも同様に適用可能である。したがって、一実施形態では、ベクターは、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド（複数可）を内皮細胞、周皮細胞および星状細胞から選択される細胞型に形質導入またはトランスフェクトする。ベクターは、ＢＢＢの１つの特定の細胞型に形質導入またはトランスフェクトすることができる。例えば、ベクターは、ＢＢＢの周皮細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。さらなる例において、ベクターは、ＢＢＢの星状細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。上述のように、形質導入またはトランスフェクション後に、抗体または抗体断片が発現される。

【００２２】

好ましい実施形態では、ベクターは、ＢＢＢの内皮細胞をトランスフェクトまたは形質導入する。本明細書に記載されるポリヌクレオチドによるＢＢＢ内皮細胞のトランスフェクションまたは形質導入は、ＢＢＢ内皮細胞がゆっくりとしたターンオーバー速度を有し、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質内への抗体または抗体断片のインビボでの長期発現に最適であり得ることが証明され得るため、好ましい。

【００２３】
あるいは、ベクターは、ＢＢＢの複数の細胞型に形質導入またはトランスフェクトすることができる。例えば、ベクターは、ＢＢＢの内皮細胞および星状細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。あるいは、ベクターは、ＢＢＢの内皮細胞および周皮細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。さらなる選択肢として、ベクターは、ＢＢＢの星状細胞および周皮細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。別の選択肢において、ベクターは、ＢＢＢの内皮細胞、星状細胞および周皮細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。上述のように、形質導入またはトランスフェクション後に、抗体または抗体断片が発現される。

【００２４】
一部の実施形態では、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド（複数可）を含むベクターは、ＢＢＢの細胞を選択的に標的化し得る。ＢＢＢの特定の細胞への標的化は、例えば、向神経性ベクターを用いることによって達成することができる。向神経性ベクターは、ウイルスベクターであり得、この用語は、操作されたバージョンを含む。ウイルスベクターは、典型的には複製不能である。ポリヌクレオチド（複数可）はＢＢＢの細胞のゲノム内に組み込まれ得る。向神経性ベクターの一例は単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）である。本明細書で使用される場合、「向神経性ベクター」とは、非ＢＢＢ細胞および／または非ＣＮＳ細胞と比較して、それぞれＢＢＢ細胞および／またはＣＮＳ細胞に優先的に形質導入またはトランスフェクトするベクターを指す。したがって、一実施形態では、ベクターは向神経性ベクターを含む。別の実施形態では、ベクターは修飾されたＨＳＶを含む。

【００２５】
ＢＢＢの細胞を選択的に標的化する代替の経路は、ベクター表面上に、ベクターをＢＢＢの細胞に標的化するペプチド、小分子（ＳＭＥ）、抗体もしくはその抗体断片、タンパク質、ナノ粒子、脂質、オリゴヌクレオチド、アプタマーまたはカチオン性分子を発現するかまたは（特に、ウイルスカプシド中のような表面上に）含むベクターを利用することである。

【００２６】
一実施形態では、ベクターは、ベクター表面上に、ベクターをＢＢＢの細胞に標的化するペプチドを発現する。換言すれば、ベクター表面上に発現されるかまたは構成されるペプチド、小分子、抗体もしくはその抗体断片、タンパク質、ナノ粒子、脂質、オリゴヌクレオチド、アプタマー、またはカチオン性分子は、ＢＢＢの細胞に対する標的化の特異性を付与する。別の実施形態では、ベクター表面上に発現または含まれるペプチドまたは他の列挙された分子は、ベクターをＢＢＢの特定の細胞型（複数可）に標的化する。適切なペプチドの例、ならびにファージディスプレイ法を含むこのようなペプチドを生成および試験する方法は、当該技術分野において公知である。例えば、ペプチドは、細胞トランスサイトーシスに関与するリガンドまたは受容体標的化ペプチドを含み得る。このようなペプチドは、受容体媒介トランスサイトーシスを用いて、ＢＢＢの細胞へのベクターの取り込みを可能にする。一実施形態では、ペプチドは、トランスフェリン受容体、インスリン受容体および低密度リポタンパク質受容体から選択される受容体を標的化する。さらなる実施形態では、ペプチドは、トランスフェリンペプチドを含む。例示的なＢＢＢ標的化ペプチドは、ＡＡＶ２株に含まれるＮＲＧＴＥＷＤ（配列番号１５）ペプチドであり、これらのようなＡＡＶ－ＢＲ１ペプチドは、一部の実施形態では非ウイルスベクターに取り込まれ得る。

【００２７】
したがって、ベクターは、ＢＢＢの細胞へのベクターの標的化をもたらす、ウイルスカプシドタンパク質などのベクター表面タンパク質における挿入、欠失または置換などの突然変異を担持することができる。特定の実施形態では、ベクターは、ＢＢＢの細胞にベクターを標的化する突然変異を含み得る。

【００２８】

代わりにまたは追加して、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド（複数可）を含む向神経性ウイルスベクターを用いて、ＢＢＢの細胞を選択的に標的化することができる。

【００２９】

用語「ベクター」は当該技術分野において周知であり、本発明の文脈において、宿主細胞へのポリヌクレオチド（複数可）を輸送（形質導入またはトランスフェクションによる）するために適切に使用される。この定義には、非ウイルスベクターとウイルスベクターの両方が含まれる。ウイルスまたは非ウイルスベクターは、限定されないが、脳内皮細胞などのＢＢＢまたはＣＮＳ由来の細胞を標的化し、治療抗体分子をＣＮＳ内、好ましくは脳実質内に局所的に産生することができる。この新規アプローチによって産生される抗体、特に治療抗体は、ＣＮＳ関連疾患の処置に使用され得る。このようなシナリオにおいて、脳内皮細胞および／または周皮細胞および／または星状細胞は、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質内への抗体の高品質であり、長期の発現を提供するためのリザーバーとして作用する。

【００３０】

非ウイルスベクターは、限定されないが、有機ナノ材料、例えばリポソーム、エキソソーム、デンドリマー、およびミセル、または無機ナノ材料、例えば金ナノ粒子、シリカナノ粒子およびカーボンナノチューブが含まれる。一実施形態では、非ウイルスベクターは、ベクター表面上に、ベクターをＢＢＢの細胞に標的化するペプチド、小分子（ＳＭＥ）、抗体またはその抗体断片、タンパク質、ナノ粒子、脂質、オリゴヌクレオチド、アプタマーまたはカチオン性分子を発現する。

【００３１】

ウイルスベクターには、限定されないが、野生型ウイルスおよび操作された（例えば、修飾された）ウイルスが含まれる。ウイルスベクターの例としては、限定されないが、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アデノウイルス、レトロウイルス、ライノウイルス、レンチウイルス、肝炎、ＨＳＶおよび任意のウイルス様粒子が挙げられる。当該技術分野において公知であるように、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）は、真正の天然ウイルスの構成およびコンホメーションを模倣するが、ウイルスゲノムを欠く多タンパク質構造である。本発明は、ＡＡＶベクターによる脳内皮細胞の形質導入が、脳内皮細胞による高品質であり、大量の抗体の分泌をもたらすという予期せぬ発見に由来する。したがって、一実施形態では、ウイルスベクターはＡＡＶである。ＡＡＶは、任意の適切な血清型であり得、その例としては、限定されないが、ＡＡＶ血清型１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ血清型２（ＡＡＶ２）、ＡＡＶ血清型３（ＡＡＶ３）、ＡＡＶ血清型４（ＡＡＶ４）、ＡＡＶ血清型５（ＡＡＶ５）、ＡＡＶ血清型６（ＡＡＶ６）、ＡＡＶ血清型７（ＡＡＶ７）、ＡＡＶ血清型８（ＡＡＶ８）、ＡＡＶ血清型９（ＡＡＶ９）、ＡＡＶ血清型１０（ＡＡＶ１０）、ＡＡＶ血清型１１（ＡＡＶ１１）、もしくはＡＡＶ血清型１２（ＡＡＶ１２）、または任意の他の野生型血清型または操作されたＡＡＶが挙げられる。より具体的には、ＡＡＶは、ＡＡＶ血清型１（ＡＡＶ１）、ＡＡＶ血清型２（ＡＡＶ２）、ＡＡＶ血清型８（ＡＡＶ８）、ＡＡＶ血清型９（ＡＡＶ９）およびＡＡＶ血清型１０（ＡＡＶ１０）から選択することができる。別の実施形態では、ウイルスベクターは、ＡＡＶ２、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９およびＡＡＶｒｈ．１０（ＡＡＶアカゲザル分離株１０）から選択される。

【００３２】

さらなる実施形態では、ウイルスベクターは、操作されたＡＡＶである。操作されたＡＡＶは、操作されたＡＡＶ２、操作されたＡＡＶ９、操作されたＡＡＶ１または操作されたＡＡＶ１０であり得る。好ましい実施形態では、操作されたＡＡＶ２は、ＡＡＶ－ＢＲ１である。別の好ましい実施形態では、操作されたＡＡＶ９は、ＡＡＶ－Ｓ、ＡＡＶ－Ｆ、ＡＡＶ－ＰＨＰ．ｅＢまたはＡＡＶ９－ＰＨＰ－Ｖである。さらに好ましい実施形態では、操作されたＡＡＶ１は、ＡＡＶ１ＲＸ、ＡＡＶ１Ｒ６またはＡＡＶ１Ｒ７である。操作されたＡＡＶ１のさらなる詳細は、参照により本明細書に組み込まれるＡｌｂｒｉｇｈｔ　ＢＨら［５３，５４］に提供される。最も好ましい実施形態では、ベクターは、ＢＢ

Ｂ内皮細胞に特異的であるＡＡＶ－ＢＲ１またはＡＡＶ９－ＰＨＰ－Ｖ１である。

【００３３】

さらなる実施形態では、ベクターは、ウイルスエレメントおよび非ウイルスエレメントを含む。ビロソームは、ウイルスエレメントと非ウイルスエレメントの両方を含むベクターの例である。さらなる例は、カチオン性脂質と混合されたウイルスベクターである。

【００３４】

本明細書に記載される全てのベクターは、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド（複数可）を含む。ポリヌクレオチドは、ＤＮＡまたはＲＮＡを含み得る。ポリヌクレオチドは、例えば、ＢＢＢの細胞における抗体または抗体断片をコードする配列の発現（例えば、翻訳）を補助するためのさらなる成分を含み得る。例えば、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドは、発現カセット内に含まれる。一実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列を含むか、それから本質的になるかまたはそれらからなる。

【００３５】

さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも８５％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９１％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９２％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９３％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９４％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９５％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９６％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９７％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９８％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、配列番号１

、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも９９％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【００３６】

本明細書で使用される場合、「同一性％」は、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列などの２つの配列間の配列類似性を記載するために使用される。これは、最適な方法でアラインメントされた２つの配列を比較することによって決定することができ、比較されるヌクレオチド配列が、２つの参照配列間で最適なアライメントになるように、参照配列に対して付加または欠失を含むことができる。同一性のパーセンテージは、残基が２つの配列間で同一である同一位置の数を決定し、これら２つの配列間の同一性のパーセンテージを得るために、この同一位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で除し、得られた結果に１００を掛けることによって計算される。例えば、https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgiサイトで利用可能なＢＬＡＳＴプログラム「ＢＬＡＳＴ２配列」（Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250）を使用することができ、使用されるパラメータは、デフォルトで与えられたもの（具体的には、パラメータ「オープンギャップペナルティ」：５、および「拡張ギャップペナルティ」：２、選択されるマトリクスは、例えば、プログラムによって提案されるマトリクス「ＢＬＯＳＵＭ　６２」である）であり、比較される２つのシーケンス間の同一性のパーセンテージは、プログラムによって直接的に計算される。

【００３７】

発現カセットは、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されているプロモーター、リボソーム結合部位、開始コドン、停止コドン、および転写終結配列のうちの１つ以上、好ましくは全てを提供するかまたはコードする配列を含み得る。好ましくは、発現カセットは、転写後調節エレメントをコードする核酸をさらに含み得る。適切には、発現カセットは、ポリＡ（ポリアデニル化）エレメントをコードする核酸をさらに含むことができる。

【００３８】

本明細書で使用する場合、語句「プロモーター」とは、一般的には、転写が起こるのに必要な、例えば転写を開始する、転写されるポリヌクレオチド配列（例えば、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド配列）の上流に位置するＤＮＡの領域を指す。一部の実施形態では、プロモーターは、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、ＥＦ１Ａ（ヒト真核生物翻訳伸長因子１アルファ１）、ＣＡＧ（修飾されたニワトリβ－アクチンプロモーターに融合されたＣＭＶ初期エンハンサー）、ＣＢｈ（修飾されたニワトリβ－アクチンプロモーターに融合されたＣＭＶ初期エンハンサー）、ＳＶ４０（シミアンウイルス４０エンハンサー／初期プロモーター）、ＧＦＡＰ（ヒトグリア線維性酸性タンパク質プロモーター）、ＡＴＰ１Ａ２＿１（Ｎａ、Ｋ　ＡＴＰアーゼα２）、ＣＬＤＮ＿５（クローディン５）、ＡＤＲＢ２＿１（アドレナリン受容体ベータ２）、ＴＮＦＲＳＲ６Ｂ＿１（ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー６ｂ）、ＰＤＹＮ＿１（プロダイノルフィン）、ＧＨ１＿１（ヒト成長ホルモン）、ＯＰＡＬＩＮ＿１（オパリン）、ＳＹＮ１＿１（シナプシン１）、ＣＡＭＫ２Ａ＿１（カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼＩＩアルファ）、ＮＥＦＨ＿１（ニューロフィラメント重鎖ポリペプチド）、ＮＥＵＲＯＤ６＿１（ニューロン分化因子６）またはＯＬＩＧ２＿１（オリゴデンドロサイト転写因子２）から選択される。好ましい実施形態では、プロモーターは、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、ＣＢｈ、ＧＦＡＰ、ＡＴＰ１Ａ２＿１、ＣＬＤＮ＿５、ＡＤＲＢ２＿１、ＴＮＦＲＳＦ６Ｂ＿１、ＰＤＹＮ＿１、ＧＨ１＿１、ＯＰＡＬＩＮ＿１、ＳＹＮ１＿１、ＣＡＭＫ２Ａ＿１、ＮＥＦＨ＿１、ＮＥＵＲＯＤ６＿１またはＯＬＩＧ２＿１プロモーターのいずれかに融合されたＣＭＶ初期エンハンサーである。より好ましい実施形態では、プロモーターは、ＣＢｈ、ＣＭＶ、またはＧＦＡＰもしくはＯＬＩＧ２のいずれかに融合されたＣＭＶ初期エンハンサーである。さらにより好ましい実

施形態では、プロモーターはＣＭＶプロモーターまたはＣＢｈプロモーターである。

【００３９】

用語「プロモーター」とは、合成プロモーターを含む。本明細書で使用される用語「合成プロモーター」は、天然に存在しないプロモーターに関する。例えば、天然に存在するプロモーターの機能的変異体を本発明に従って使用することができる。本発明の文脈におけるプロモーターの「機能的変異体」は、参照プロモーターと同じ方法で機能する能力を保持する参照プロモーターの変異体である。さらなる実施形態では、天然に存在するプロモーターの切断された形態が使用される。好ましい実施形態では、プロモーターは、ＣＭＶ初期エンハンサーなどのエンハンサーに作動可能に連結されている。切断されたまたは修飾された天然に存在するプロモーターを用いて、ベクター、特にウイルスベクターへの比較的大きな抗体コード配列の挿入を容易にすることができる。

【００４０】

他の箇所で詳細に記載されるように、ベクターは、ＢＢＢ（および／またはＣＮＳ）の細胞を特異的に標的化し得る。しかしながら、他の例では、ベクターはＢＢＢ（および／またはＣＮＳ）を特異的に標的化しない。例えば、多くの野生型ウイルスベクターは、任意の組織または細胞型を標的化する。このような場合、ＢＢＢ特異的またはＣＮＳ特異的プロモーターを使用して、他の組織と比較して優先的または優勢な方法で、ＢＢＢまたはＣＮＳの細胞における抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドの発現を駆動することができる。

【００４１】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されているＧＦＡＰ（ヒトグリア線維性酸性タンパク質）プロモーターを含む。さらなる実施形態では、ＧＦＡＰプロモーターは、ＣＭＶ初期エンハンサーに作動可能に連結されている。この場合、星状細胞中の抗体または抗体断片の優先的または優勢な発現が存在する。

【００４２】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されている、ＡＴＰ１Ａ２＿１（Ｎａ、Ｋ　ＡＴＰアーゼα２）、ＣＬＤＮ＿５（クローディン５）、ＡＤＲＢ２＿１（アドレナリン受容体β２）およびＴＮＦＲＳＦ６Ｂ＿１（ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー６ｂ）から選択されるプロモーターを含む。さらなる実施形態では、プロモーターは、ＣＭＶ初期エンハンサーに作動可能に連結されている。この場合、ＢＢＢの内皮細胞における抗体または抗体断片の優先的または優勢な発現が存在する。

【００４３】

一実施形態では、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されているポリヌクレオチドは、ＰＤＹＮ＿１（プロダイノルフィン）、ＧＨ１＿１（ヒト成長ホルモン）およびＯＰＡＬＩＮ＿１（オパリン）から選択されるプロモーターを含む。さらなる実施形態では、プロモーターは、ＣＭＶ初期エンハンサーに作動可能に連結されている。この場合、脳細胞において、抗体または抗体断片の優先的または優勢な発現が存在する。

【００４４】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されている、ＳＹＮ１＿１（シナプシン１）、ＣＡＭＫ２Ａ＿１（カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼＩＩα）、ＮＥＦＨ＿１（ニューロフィラメント重鎖ポリペプチド）、ＮＥＵＲＯＤ６＿１（ニューロン分化因子６）から選択されるプロモーターを含む。さらなる実施形態では、プロモーターは、ＣＭＶ初期エンハンサーに作動可能に連結されている。この場合、ニューロンにおける抗体または抗体断片の優先的または優勢な発現が存在する。

【００４５】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオ

チドに作動可能に連結されているＯＬＩＧ２＿１（オリゴデンドロサイト転写因子２）プロモーターを含む。さらなる実施形態では、ＯＬＩＧ２＿１プロモーターは、ＣＭＶ初期エンハンサーに操作可能に連結されている。この場合、オリゴデンドロサイトにおける抗体または抗体断片の優先的または優勢な発現が存在する。

【００４６】

本明細書で使用される用語「作動可能に連結されている」とは、エレメントが機能的に接続されており、意図された様式で互いに相互作用することができるような、各々に対する種々のポリヌクレオチドエレメントの構成を指す。このようなエレメントは、限定されないが、プロモーター、エンハンサーおよび／または調節エレメント、ポリアデニル化配列、１つ以上のイントロンおよび／またはエキソン、および発現される目的の遺伝子のコード配列を含み得る。ポリヌクレオチドエレメントは、適切に配向されているかまたは機能的に連結されている場合、互いの活性をモジュレートするために一緒に作用し、最終的に、産物（例えば、抗体または抗体断片）の発現レベルに影響し得る。「モジュレートする」とは、特定のエレメントの活性レベルを増加、低下、または維持することを意味する。当業者に理解されるように、作動可能に連結されているものは、機能的活動を含み、必ずしも自然な位置的連結に関連するものではない。

【００４７】

上述したように、発現カセットは、リボソーム結合部位（ＲＢＳ）を提供するかまたはコードする配列を含み得る。好ましい実施形態では、ＲＢＳは内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）である。一実施形態では、ＩＲＥＳは脳心筋炎ウイルスに由来する。さらなる実施形態では、ＩＲＥＳは、配列番号１または配列番号８を含む。ＩＲＥＳは、抗体または抗体断片をコードする１を超える遺伝子を含む発現カセットにおいて特に有利である。例えば、発現カセットが、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする遺伝子を含む。

【００４８】

本発明の全ての態様によれば、発現カセットは、図１の最上部のコンストラクトにおいてジグラマティックに表されるように、コンストラクトの３’末端に、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）を提供するかまたはコードする配列をさらに含むことができる。ＷＰＲＥ配列は、ウイルスベクターによってデリバリーされる遺伝子の発現を増加させるために日常的に使用される。理論に拘束されることを望まないが、発現カセットにこの配列を含めることにより、ｍＲＮＡの安定性を増加させ、したがって、タンパク質収率を増加させることができる。

【００４９】

代わりに、発現カセットは、自己切断ペプチドをコードする配列を含み得る。上記自己切断ペプチドは、抗体または抗体断片をコードする１を超える遺伝子を含む発現カセットにおいて使用することができる。例えば、発現カセットが、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする遺伝子に作動可能に連結されている単一のプロモーターを含む。このような場合、自己切断ペプチドをコードする配列は、第１の遺伝子（例えば、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする遺伝子）の後であって、第２の遺伝子（例えば、抗体または抗体断片の重鎖をコードする遺伝子）の前に位置する。このようなシステムは、リボソームスキッピング（例えば、単一のｍＲＮＡ転写物からの抗体または抗体断片の重鎖および軽鎖ポリペプチドの分離をもたらす）を介して、ペプチドの自己切断が共翻訳的に起こることを可能にし得る。自己切断ペプチドの１つの特定のクラスは、ＤｘＥｘＮＰＧＰ（配列番号１６）のコア配列モチーフを共有する２Ａペプチドファミリー（口蹄疫ウイルス由来のＦ２Ａペプチドを含む）である。したがって、一実施形態では、発現カセットは、２Ａファミリー由来の自己切断ペプチドをコードする配列を含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、自己切断部位の上流のフーリン切断部位をコードする配列をさらに含む。換言すれば、発現カセットは、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする遺伝子に作動可能に連結されている単一のプロモーターを含み、フーリン切断ペプチドをコ

ードする配列および自己切断ペプチドは、第１の遺伝子の後であって、第２の遺伝子の前に位置する。フーリン切断部位の付加は、自己切断後に上流タンパク質（例えば、抗体または抗体断片の軽鎖）に結合したままである自己切断ペプチドのさらなるアミノ酸を除去するために行うことができる。しかしながら、自己切断ペプチドの上流にフーリン切断部位がある場合でさえ、さらなるアミノ酸がいくつかの上流タンパク質（例えば、抗体または抗体断片の軽鎖）中に残ることがあり、これが上流タンパク質に対する免疫応答（例えば、免疫原性）を導くことがあることは注目に値する。さらに、本発明者らは、自己切断を可能にするために、フーリンおよび２Ａを含有するコンストラクトの凝集が増加することを驚くことに観察した。したがって、好ましい実施形態では、発現カセットは、第１の遺伝子の後であって、第２の遺伝子の前に自己切断ペプチドをコードする配列を含まない。

【００５０】

発現カセットは、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドの５’末端に分泌ペプチドをさらに含み得る。本発明の文脈において、分泌ペプチドは、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質内への抗体または抗体断片のデリバリーを補助する。抗体または抗体断片をコードする複数の遺伝子が存在する場合、全ての遺伝子は、分泌ペプチドをコードする配列をさらに含み得る。

【００５１】

本発明は、特定の抗体または抗体断片をコードする特定のポリヌクレオチドに限定されない。しかしながら、典型的には、抗体または抗体断片は、治療抗体または抗体断片である。治療抗体または抗体断片は、ＣＮＳ、特に脳においてその活性を有効に発揮するものである。したがって、治療抗体または抗体断片は、ＣＮＳ、特に脳または脊髄において発現される標的抗原に結合し得る。

【００５２】

一般に、用語「抗体」は、本明細書で最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限り、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異的抗体（例えば、二重特異的抗体）、完全ヒト抗体および抗体断片などの種々の抗体構造を包含する。抗体はまた、キメラ抗体（特に、ヒト定常ドメインと融合したマウスＶＨおよびＶＬ領域）、組換え抗体、組換え抗体の抗原結合断片、ヒト化抗体であり得る。

【００５３】

抗体の「抗体断片」とは、無傷の抗体の一部を含み、無傷の抗体が結合する抗原に結合する無傷の抗体以外の分子を指す。一実施形態では、抗体断片は、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）２；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ、好ましくはｓｃＦｖ）；および抗体断片から形成される多特異的抗体である。この用語はまた、単一ドメイン抗体（例えば、ＶＨＨ、ＶＮＡＲまたはヒトの単一ドメイン抗体）を包含する。本発明による１つの好ましい抗体断片は、ｓｃＦｖ－Ｆｃであり、ｓｃＦｖ（典型的には約１０～２５アミノ酸の短いリンカーペプチドと連結されているＶＨおよびＶＬドメインの融合タンパク質）が、断片結晶化可能（Ｆｃ）領域と連結されている。ｓｃＦｖ－ＦｃはＣＨ１ドメインとＣＬドメインを欠いている。

【００５４】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用される場合、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体、すなわち、集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能性のある天然に存在する突然変異を除いて、同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対する指向性を有する。修飾された「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団の中にあるとしての抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法による抗体の産生を必要とするものと解釈されるべきではない。本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler, Nature 256 (1975), 495に記載されたハイブリドーマ法によって作製することができる。

【００５５】

したがって、本発明の文脈において、用語「抗体」とは、完全な免疫グロブリン分子、

ならびにこのような免疫グロブリン分子の部分（すなわち、「抗体断片」）を指す。さらに、この用語は、上記で検討したように、修飾および／または改変された抗体分子に関する。この用語はまた、組換えまたは合成により生成／合成された抗体に関する。用語はまた、分離された軽鎖および重鎖、Ｆａｂ、Ｆｖ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）２のような、無傷の抗体ならびにそれらの抗体断片に関する。用語「抗体」はまた、限定されないが、完全ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ＣＤＲ移植抗体、および一本鎖Ｆｖｓ（ｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖ－Ｆｃｓまたは抗体融合タンパク質のような抗体コンストラクトを含む。

【００５６】

ヒト化抗体は、再形成されたヒト抗体とも呼ばれる修飾された抗体である。ヒト化抗体は、免疫化された動物に由来する抗体のＣＤＲをヒト抗体の相補性決定領域に移すことによって構築される。このような目的のための従来の遺伝子組換え技術は公知である（欧州特許出願公開第２３９４００号；国際公開第９６／０２５７６号；Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856；国際公開第９９／５１７４３を参照されたい）。

【００５７】

本明細書で使用される用語「ＣＤＲ」は、当該技術分野において周知である「相補的決定領域」に関する。ＣＤＲは、上記分子の特異性を決定し、特定のリガンドと接触する免疫グロブリンの一部である。ＣＤＲは分子の中で最も可変的な部分であり、これらの分子の多様性に寄与している。各Ｖドメインには３つのＣＤＲ領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３が存在する。ＶＨ－ＣＤＲ、またはＣＤＲ－Ｈは可変重鎖のＣＤＲ領域を示し、ＶＬ－ＣＤＲ、またはＣＤＲ－Ｌは可変軽鎖のＣＤＲ領域に関する。ＶＨは可変重鎖を意味し、ＶＬは可変軽鎖を意味する。Ｉｇ由来領域のＣＤＲ領域は、Kabat “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5th edit. NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services (1991); Chothia J., Mol. Biol. 196 (1987), 901-917 or Chothia, Nature 342 (1989), 877-883に記載されるように決定することができる。

【００５８】

「Ｆｃ」領域は、抗体のＣＨ２およびＣＨ３ドメインを含む２つの重鎖断片を含む。２つの重鎖断片は、２つ以上のジスルフィド結合とＣＨ３ドメインの疎水性相互作用によって結合している。

【００５９】

「Ｆａｂ’断片」は、ＶＨドメインとＣＨ１ドメイン、ならびにＣＨ１ドメインとＣＨ２ドメインの間の領域を含む１つの軽鎖および１つの重鎖の一部を含み、その結果、２つのＦａｂ’断片の２つの重鎖間に鎖間ジスルフィド結合が形成されてＦ（ａｂ’）２分子を形成することができる。

【００６０】

「Ｆ（ａｂ’）２断片」は、２つの軽鎖、およびＣＨ１ドメインとＣＨ２ドメインの間の定常領域の一部を含む２つの重鎖を含み、その結果、２つの重鎖の間に鎖間ジスルフィド結合が形成される。したがって、Ｆ（ａｂ’）２断片は、２つの重鎖の間のジスルフィド結合によってひとまとめに保持される２つのＦａｂ’断片から構成される。

【００６１】

「Ｆｖ領域」は、重鎖と軽鎖の両方からの可変領域を含むが、定常領域を欠く。

【００６２】

「ｓｃＦｖ－Ｆｃ」は、抗体のＣＨ２およびＣＨ３ドメインを含む２つの重鎖断片を含む「Ｆｃ」領域に融合された、重鎖および軽鎖の両方からの「Ｆｖ」可変領域を含む。２つの重鎖断片は、２つ以上のジスルフィド結合とＣＨ３ドメインの疎水性相互作用によって結合している。

【００６３】

したがって、本発明の文脈において、ヒト化され、少なくとも２つの抗体分子またはそ

の抗体断片の混合物を含む薬学的組成物に使用することができる抗体分子またはその抗体断片が提供される。

【００６４】

タンパク質の規定された領域内の「エピトープに結合する抗体」とは、タンパク質に結合するためにその領域内の１つ以上のアミノ酸の存在を必要とする抗体である。

【００６５】

特定の実施形態では、タンパク質の規定された領域内の「エピトープに結合する抗体」は、突然変異分析によって同定され、タンパク質のアミノ酸が突然変異され、得られた改変されたタンパク質（例えば、エピトープを含む改変されたタンパク質）への抗体の結合は、改変されていないタンパク質への結合の少なくとも２０％であると決定される。一部の実施形態では、タンパク質の定義された領域内の「エピトープに結合する抗体」は、突然変異分析によって同定され、タンパク質のアミノ酸が突然変異され、得られた改変されたタンパク質（例えば、エピトープを含む改変されたタンパク質）への抗体の結合は、改変されていないタンパク質への結合の少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％であると決定される。特定の実施形態では、抗体の結合は、ＦＡＣＳ、ＷＢ、またはＥＬＩＳＡなどの適切な結合アッセイによって決定される。

【００６６】

本発明に従って使用するための抗体または抗体断片は、好ましくは、ＣＮＳのエピトープに結合する抗体または抗体断片である。より具体的には、抗体または抗体断片は、ＣＮＳの疾患または障害に関連するＣＮＳのエピトープに結合する。好ましい実施形態では、抗体または抗体断片は、抗ＥｒｂＢ２、抗ＴＤＰ－４３（ＮＩ－２０５）、抗Ａｂｅｔａ（例えばバピネズマブ、ソラネズマブ、レカネマブ、アズカヌマブ、ドナネマブ、ガンテネルマブまたはクレネズマブ）、抗ＡｐｏＥ４（アポリポタンパク質Ｅ４）および抗ＤＤＸ３Ｘ（ＡＴＰ依存性ＲＮＡヘリカーゼ）、抗Ｔａｕ（チラボネマブ、ゴスラネマブ、ザゴテネマブ、セモリネマブ、ベプラネマブ、ＢＩＩＢ０７６、ＪＮＪ－６３７３３６５７、Ｌｕ　ＡＦ８７９０８、ＰＮＴ００１、Ｅ－２８１４）、抗ＬＩＮＧＯ－１（例えばオピシヌマブ）、抗アルファ－シヌクレイン（シンパネマブ、プラシネズマブ、ＭＥＤＩ－１３４１、Ｌｕ　ＡＦ８２４２２、ＢＡＮ０８０５）、抗ＡＳＣ（ＩＣ－１００）、抗ＮＬＲＰ３、抗Ｃ５（ラブリズマブ、エクリズマブ）、抗Ｃ１ｑ（ＡＮＸ－００５）、抗Ｃ３、抗ハンチンチン（Ｃ－６１７、ＮＩ－３０２）、抗プリオン、抗ＣＤ２０（例えばオファツムマブ、オクレリズマブ、リツキシマブ、ＢＣＤ－１３２、ウブリツキシマブ、ＢＡＴ－４４０６Ｆ、ＡＬ－０１４）、抗ＰＤ－１（ＩＢＣ－Ａｂ００２）または抗ＶＥＧＦ－Ａ（ベバシズマブ、ラニビズマブ、ブロルシズマブ、ファリシマブ、バヌシズマブ）から選択される。

【００６７】

本明細書の実験セクションで説明するように、ヒト脳内皮細胞株ｈＣＭＥＣ／Ｄ３は、抗ＴＤＰ－４３抗体ＭＡＢ１（キメラヒトＩｇＧ１）、抗ＥｒｂＢ２抗体（ハーセプチン）ＭＡＢ２またはｅＧＦＰ（増強緑色蛍光タンパク質）のうちの１つをコードする遺伝子をデリバリーするＡＡＶ２、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９およびＡＡＶｒｈ．１０（ＡＡＶアカゲザル分離株１０）によって形質導入された。これは、抗体の質が高く、長期にわたる発現をもたらした。本発明者らはまた、マウス細胞株およびヒト初代脳内皮細胞におけるそれらの観察を確認した。デリバリーシステムは、様々な抗体フォーマット（全長抗体および抗体断片を含む）において正しく折り畳まれた抗体の産生をもたらした。重要なことに、これらの実験において、分泌された抗体は、頂端側と側底側の両側で検出され、このモデルにおいて、ＢＢＢの脳実質側へのデリバリーが確認された。したがって、実施例に含まれるデータは、本明細書に記載される方法およびベクターが、正しく折り畳まれた抗体または抗体断片（例えば、治療抗体）をＣＮＳにデリバリーするために使用され得ることを示す。

【００６８】

本発明の目的は、ＣＮＳおよび／またはＢＢＢにおける細胞に抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド（複数可）をデリバリーすることによって、ＣＮＳ関連疾患または障害を処置するために、ＣＮＳ中の抗体濃度を増加させる方法を初めて提供することである。この新規アプローチは、ＣＮＳに起因する種々の疾患または障害を処置するのに有用である。

【００６９】

疑義を避けるために、本明細書で使用される場合、用語「処置」は、治療的処置、ならびに対症的処置および状態の予防を含む。用語「処置」、「処置する」、または「の処置」（およびその文法上の多様性）の使用は、対象の状態の重症度が減少され、少なくとも部分的に改善され、または軽減され、および／または少なくとも１つの臨床症状におけるある程度の緩和、軽減もしくは低下が達成され、および／または疾患もしくは障害の進行が遅延されることを意味する。

【００７０】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、個体、例えば、ヒトなどの哺乳動物、ＣＮＳ内に存在する特定の状態、障害または症状を有するかまたは有するリスクがある個体を指す。対象は、本発明に従う処置を必要とする対象であり得る。対象は、状態、障害または症状に対する処置を受けていた場合がある。あるいは、対象は、本発明に従う処置の前に処置されていない。

【００７１】

本発明は、ヒト対象を含む任意の哺乳動物に用いることができ、ＣＮＳの疾患または障害に罹患している対象に関連する疾患または障害の処置に用いることができる革新的戦略に関する。治療抗体遺伝子を脳内皮細胞にデリバリーすることにより、これらはＣＮＳ内への抗体の高品質であり、長期的な発現を提供するためのリザーバーとして作用する。

【００７２】

一実施形態では、疾患または障害は神経変性障害である。

【００７３】

さらなる実施形態では、疾患または障害は、限定されないが、アミロイド－ベータタンパク質、ＴＤＰ－４３－プロテイノパチー、アルファ－シヌクレイノパチー、タウオパチー、ハンチントン病などのポリグルタミン障害を含むトリヌクレオチドリピート障害、脳関連がんおよび腫瘍、てんかん、精神疾患、神経炎症性疾患、神経筋疾患、ウイルス誘発性脳炎、およびミクログリア機能不全によって特徴付けられる疾患を含むＣＮＳと関連する。

【００７４】

別の実施形態では、アミロイド－ベータタンパク質、ＴＤＰ－４３－プロテイノパチー、アルファ－シヌクレイノパチー、タウオパチー、ハンチントン病などのポリグルタミン障害を含むトリヌクレオチドリピート障害、脳関連がんおよび腫瘍、てんかん、精神疾患、神経炎症性疾患、神経筋疾患、ウイルス誘発性脳炎、およびミクログリア機能不全によって特徴付けられる疾患に関連する患者の疾患または障害または状態。

【００７５】

一部の実施形態では、本発明によるアミロイド－ベータ関連疾患、障害または状態は、軽度の認知障害（ＭＣＩ）、ダウン症候群（ＤＳ）、ダウン症候群関連アルツハイマー病、脳アミロイド血管症（ＣＡＡ）、多発性硬化症、パーキンソン病（ＰＤ）、認知症を伴うパーキンソン病（ＰＤＤ）、レビー小体を伴う認知症、ＡＬＳ（筋萎縮性側索硬化症）を含む。これらの病態の多くは、認知記憶能力の喪失を特徴とするか、またはそれに関連している。したがって、本発明による認知記憶能力の喪失、またはそれに関連する状態には、ＡＤ、軽度認知障害（ＭＣＩ）、ダウン症候群（ＤＳ）、ダウン症候群関連アルツハイマー病、脳アミロイド血管症（ＣＡＡ）、多発性硬化症、パーキンソン病、認知症を伴うパーキンソン病（ＰＤＤ）、レビー小体を伴う認知症、ＡＬＳ（筋萎縮性側索硬化症）が含まれる。

【００７６】

特に、アミロイド－ベータ関連疾患、障害または状態は、アルツハイマー病（ＡＤ）、ダウン症候群（ＤＳ）、ダウン症候群関連アルツハイマー病、脳アミロイド血管症（ＣＡＡ）、またはレビー小体認知症から選択され得る。

【００７７】

一部の実施形態では、ＴＤＰ－４３－プロテイノパチーには、頭側頭葉型認知症（ＦＴＤ、例えば、孤発性または家族性であって、運動ニューロン疾患（ＭＮＤ）を伴うかまたは伴わず、プログラニュリン（ＧＲＮ）突然変異を有し、Ｃ９ｏｒｆ７２突然変異を有し、ＴＡＲＤＢＰ突然変異を有し、バロシン含有タンパク質（ＶＣＰ）突然変異を有し、染色体９ｐに関連し、大脳皮質基底核変性症、ユビキチン陽性ＴＤＰ－４３封入体を伴う前頭側頭葉変性症（ＦＴＬＤ）、嗜銀顆粒病、ピック病、意味型原発性進行性失語症（ｓｖＰＰＡ）、行動的変異型ＦＴＤ（ｂｖＦＴＤ）、非流暢性型原発性進行性失語症（ｎｆｖＰＰＡ）など）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ、例えば、孤発性ＡＬＳ、ＴＡＲＤＢＰ突然変異を伴う、アンジオゲニン（ＡＮＧ）突然変異を有する）、アレクサンダー病（ＡｘＤ）、辺縁系優位性加齢関連ＴＤＰ－４３脳症（ＬＡＴＥ）、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、ペリー症候群、アルツハイマー病（ＡＤ、散発性および家族性型ＡＤを含む）、ダウン症候群、家族性英国型認知症、ポリグルタミン病（ハンチントン病および脊髄小脳失調症３型（ＳＣＡ３；マシャド・ジョセフ病としても公知である））、海馬硬化症認知症および筋障害（散発性封入体筋炎、バロシン含有タンパク質に突然変異を有する封入体ミオパシー（ＶＣＰ；また骨パジェット病および前頭側頭型認知症））、外傷性脳損傷（ＴＢＩ）、レビー小体型認知症（ＤＬＢ）またはパーキンソン病（ＰＤ）が含まれる。

【００７８】

特に、ＴＤＰ－４３－プロテイノパチー、疾患または状態は、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、パーキンソン病（ＰＤ）、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、辺縁系優位型年齢関連ＴＤＰ－４３脳症（ＬＡＴＥ）および多発性硬化症（ＭＳ）から選択され得る。

【００７９】

一部の実施形態では、シヌクレイノパシーは、パーキンソン病（散発性、アルファ－シヌクレイン突然変異を伴う家族性、アルファ－シヌクレイン以外の突然変異を伴う家族性、純粋自律神経不全およびレビー小体型嚥下障害）、レビー小体認知症（ＬＢＤ；レビー小体認知症（ＤＬＢ）（「純粋な」レビー小体型認知症）、パーキンソン病認知症（ＰＤＤ））、または、びまん性レビー小体病、散発性アルツハイマー病、ＡＰＰ突然変異を伴う家族性アルツハイマー病、ＰＳ－１、ＰＳ－２または他の突然変異を伴う家族性アルツハイマー病、家族性英国型認知症、アルツハイマー病のレビー小体型変異型、多系統萎縮症（シャイ・ドレーガー症候群、線条体黒質変性症およびオリーブ橋小脳萎縮症）、外傷性脳損傷、慢性外傷性脳症、鞭打ち認知症、タウオパチー（ピック病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、第１７染色体に関連するパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症およびニーマン・ピックＣ１型病）、ダウン症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン病、運動ニューロン疾患、筋萎縮性側索硬化症（散発性、家族性、グアムのＡＬＳ－認知症複合体）、神経軸索ジストロフィー、脳鉄蓄積を伴う神経変性１型（ハラーフォルデン・スパッツ症候群）、プリオン病、ゲルストマン・シュトラウスラー・シャインカー病、毛細血管拡張性失調症、メージュ症候群、亜急性硬化性全脳炎、ゴーシェ病、クラッベ病、ならびに他のリソソーム蓄積症（クフォー・ラケブ症候群およびサンフィリッポ症候群を含む）、または急速眼球運動（ＲＥＭ）睡眠行動障害である。

【００８０】

特に、シヌクレイノパシーは、パーキンソン病、多系統萎縮症、レビー小体認知症（ＬＢＤ；レビー小体認知症症（ＤＬＢ）（「純粋な」レビー小体型認知症）、パーキンソン病認知症（ＰＤＤ）またはびまん性レビー小体型認知症を含む）から選択され得る。

【００８１】

一部の実施形態では、タウオパチーは、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パー

キンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、拳闘家認知症、ダウン症、ゲルストマン・シュトラウスラー・シャインカー病、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳損傷、グアムの筋萎縮性側索硬化症／パーキンソン病－認知症複合体、神経原線維変化を伴う非グアム人運動ニューロン疾患、好銀性穀物認知症、皮質基底核変性、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化、前頭側頭型認知症、１７番染色体に関連するパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症、ハラーフォルデン・スパッツ病、多系統萎縮症、ニーマン・ピック病Ｃ型、淡蒼球橋黒質変性症、ピック病、進行性皮質下神経膠症、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、神経原線維変化型老年期認知症、後脳炎性パーキンソニズム、および筋強直性ジストロフィーから選択される。

【００８２】

特に、タウオパチーは、アルツハイマー病または進行性核上性麻痺から選択することができる。

【００８３】

一部の実施形態では、神経炎症性疾患、障害または異常は、アルツハイマー病、パーキンソン病、前頭側頭型認知症、大脳辺縁系優勢型加齢関連ＴＤＰ－４３脳症、筋萎縮性側索硬化症、運動ニューロン疾患、ポリグルタミン障害を含むトリヌクレオチドリピート障害、例えば、ハンチントン病、多発性硬化症、脱髄、ウイルス性脳炎、てんかん、虚血性脳卒中、出血性脳卒中、外傷性脳損傷、慢性外傷性脳症、クリオピリン関連周期性症候群（ＣＡＰＳ）、マックル・ウェルズ症候群（ＭＷＳ）、家族性風邪自己炎症症候群（ＦＣＡＳ）、新生児発症多系統炎症性疾患（ＮＯＭＩＤ）、周期性発熱症候群（ＨＩＤＳ）、Ｂ細胞免疫不全を伴う鉄芽球性貧血、周期性発熱、発達遅延（ＳＩＦＤ）、ベーチェット病、シェーグレン症候群、脳性マラリア、肺炎球菌性髄膜炎による脳損傷、チクングニヤウイルス、ロスリバーウイルス、インフルエンザ、ＨＩＶ、コロナウイルス、デング熱、ジカウイルス、蠕虫感染症、細菌感染、うつ病、心理的ストレス、ＨＩＶ関連の神経認知障害、コロナウイルス関連の炎症性病状から選択される。

【００８４】

一部の実施形態では、神経炎症性疾患、障害または異常は、好ましくは、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、多発性硬化症、脱髄、ウイルス性脳炎、てんかん、脳卒中、クリオピリン関連周期性症候群（ＣＡＰＳ）、抗好中球細胞質抗体関連血管炎、ループス、乾癬性関節炎、および遺伝性再発性発熱（ＨＲＦ）から選択される。

【００８５】

一部の実施形態では、神経炎症疾患、障害または異常は、より好ましくは、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、多発性硬化症、脱髄、ウイルス性脳炎、脳卒中、クリオピリン関連周期性症候群（ＣＡＰＳ）から選択される。

【００８６】

一部の実施形態では、神経筋疾患は、脳血管事故、パーキンソン病、多発性硬化症、ハンチントン病およびクロイツフェルト・ヤコブ病、脊髄筋萎縮症および筋萎縮性側索硬化症を含み得る。別の実施形態では、ＣＮＳの疾患または障害は神経変性障害である。

【００８７】

好ましい実施形態では、ＣＮＳの疾患または障害は、前頭側頭型認知症（ＦＴＤ）、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、アルツハイマー病（ＡＤ）、パーキンソン病（ＰＤ）、慢性外傷性脳症（ＣＴＥ）、および辺縁系優位型年齢関連ＴＤＰ－４３脳症（ＬＡＴＥ）および多発性硬化症（ＭＳ）から選択される。

【００８８】

本発明に従って処置することもできる脳およびＣＮＳのがんならびに腫瘍には、星状細胞腫（小脳および大脳を含む）、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、悪性神経膠腫、上衣腫、膠芽腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍、視覚経路および視床下部神経膠腫、原発性中枢神経系リンパ腫、上衣腫、脳幹神経膠腫、視覚路および視床下部神経膠腫、頭蓋外胚細胞

腫瘍、髄芽腫、骨髄異形成症候群、希突起膠腫、骨髄異形成／骨髄増殖性疾患、骨髄性白血病、骨髄球性白血病、多発性骨髄腫、骨髄増殖性疾患、神経芽腫、形質細胞腫瘍／多発性骨髄腫、中枢神経系リンパ腫、内因性脳腫瘍、星状細胞性脳腫瘍、神経膠腫、および中枢神経系における転移性腫瘍細胞浸潤が含まれる。

【００８９】

本明細書に記載されるベクターは、注射を含む任意の慣用的な経路によって、または経時的に徐々に注入することによって、対象に投与することができる。投与は、非経口投与を介することができる。投与は、例えば、注入または髄腔内、槽内、脳室内、実質内、鼻腔内、硝子体内、皮下、または筋肉内経路によることができる。一実施形態では、ベクターは、静脈内注射または静脈内注入によって投与される。さらなる例として、非経口注射に適した形態（皮下、筋肉内、血管内または輸液を含む）は、滅菌溶液、懸濁液またはエマルジョンを含む。静脈内注射が望ましい。

【００９０】

本発明の組成物の適切な投薬量の同定は、当業者の通常の能力の範囲内にある。例えば、所与の対象に対する適切な投薬量は、本発明による使用のためにベクターの作用を改変することが知られている種々の因子を考慮して決定される。例えば、ＣＮＳの疾患または障害の重症度およびタイプ、体重、性別、食事、時間および投与経路、他の薬物、および他の関連する臨床的因子。投薬量およびスケジュールは、対象の全体的な状態に応じて、特定の状態、障害または症状に応じて変化させることができる。また、所定の疾患の処置のために受け入れられる単回用量が存在しないが、ある範囲の用量が適切であると考えられる場合もある。有効な投薬量は、インビトロまたはインビボのいずれかの方法によって決定することができる。

【００９１】

また、本明細書には、対象におけるＣＮＳの疾患または障害を処置するための方法が提供される。本方法は、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを対象に投与することを含む。上記方法は、ＢＢＢの細胞の形質導入またはトランスフェクションをもたらし、有利には、形質導入またはトランスフェクションされた細胞は、抗体または抗体断片を産生し（例えば、発現する）、抗体または抗体断片は、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質内にデリバリーされる。

【００９２】

別の態様では、本発明は、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを対象に投与することを含む、対象におけるＢＢＢへの抗体または抗体断片のデリバリー方法を提供し、方法は、ＢＢＢの細胞の形質導入またはトランスフェクションをもたらし、形質導入またはトランスフェクションされた細胞は、抗体または抗体断片を発現する。

【００９３】

さらなる態様では、本発明は、抗体または抗体断片を対象におけるＣＮＳへデリバリーするための方法を提供し、方法は、対象に抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを投与することを含み、方法は、ＢＢＢの細胞の形質導入またはトランスフェクションをもたらし、形質導入またはトランスフェクションされた細胞は、抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす。

【００９４】

なおさらなる態様では、本発明は、対象におけるＣＮＳの疾患または障害を処置する方法を提供し、方法は、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを対象に投与することを含み、方法は、ＢＢＢの細胞の形質導入またはトランスフェクションをもたらし、形質導入またはトランスフェクションされた細胞は、抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす。

【００９５】

別の態様では、本発明は、対象におけるＣＮＳの疾患または障害を処置するための医薬を製造するための抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターの使

用を提供し、ベクターは、血液脳関門（ＢＢＢ）の細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされた細胞は、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす抗体または抗体断片を発現する。

【００９６】

さらなる態様では、本発明は、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを対象のＢＢＢにデリバリーするための抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターの使用を提供し、ベクターは血液脳関門（ＢＢＢ）の細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされた細胞は、抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす。

【００９７】

本発明の先行する態様による使用のためのベクターに関連して本明細書に記載される全ての実施形態は、本発明のこれらのさらなる態様に等しく適用可能である。

【００９８】

本発明者らは、特定の発現カセットコンストラクトが産生される抗体の品質を改善することを発見した。これは、抗体をインビボでデリバリーする場合に重要である。したがって、本発明の発現カセット（本明細書中の種々の態様および実施形態で詳細に説明される）を使用することにより、ＣＮＳへの抗体および抗体断片の有利なデリバリーが得られ、これは、ＣＮＳへの直接デリバリーによるか、またはＢＢＢ細胞を介したデリバリーによる（本明細書中に定義される本発明に従う）ものであり得る。したがって、以下の態様は、細胞がＢＢＢ細胞、特に脳内皮細胞、またはより一般的にはＣＮＳの細胞であるインビボで行うことができる。したがって、抗体または抗体断片は、本明細書に記載されるように、一般に、治療抗体または抗体断片である。下記の態様はまた、一部の実施形態では、抗体産生のために、エクスビボまたはインビトロで行うことができる。これらの実施形態では、任意の適切な細胞型を利用することができる。ここでも、抗体または抗体断片は、一般に、治療抗体または抗体断片である。

【００９９】

したがって、本発明は、５’から３’に、対象における中枢神経系（ＣＮＳ）の疾患または障害を処置する方法に使用するための、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットを含むベクターを提供し、ベクターは、血液脳関門（ＢＢＢ）もしくはＣＮＳの細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされた細胞は、抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす。本発明者らは、このようなコンストラクトにおいて重鎖の前に軽鎖を順序付けることが著しく有利であることを発見した。好ましくは、ＩＲＥＳは、第１の遺伝子と第２の遺伝子の間に配置される。

【０１００】

さらなる態様では、本発明は、５’から３’に、対象における中枢神経系（ＣＮＳ）の疾患または障害を処置する方法に使用するための、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットを含むベクターを提供し、ベクターは、血液脳関門（ＢＢＢ）もしくはＣＮＳの細胞に形質導入またはトランスフェクトし、形質導入またはトランスフェクトされた細胞は、抗体または抗体断片を発現し、ＣＮＳ内、好ましくは脳実質への抗体または抗体断片のデリバリーをもたらす。このようなコンストラクトでは、ＩＲＥＳは必要とされない。

【０１０１】

ＣＮＳは、ＢＢＢと同様に、複数の細胞型を含み、一実施形態では、ベクターは、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド（複数可）をＣＮＳにおける少なくとも１つの（最大で全部の）細胞型に形質導入またはトランスフェクトする。例えば、ベクター

は、脳内皮細胞、ニューロン、周皮細胞、星状細胞、オリゴデンドロサイト、ミクログリアおよび上衣細胞から選択されるＣＮＳの細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。したがって、ベクターは、ＣＮＳのニューロン細胞および非ニューロン（グリア）細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。あるいは、ベクターは、ＣＮＳの特定の細胞型に形質導入またはトランスフェクトすることができる。例えば、ベクターは、ＣＮＳの脳内皮細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。別の例では、ベクターは、ＣＮＳのニューロンに形質導入またはトランスフェクトすることができる。さらなる例では、ベクターは、ＣＮＳの星状細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。なお別の例では、ベクターは、オリゴデンドロサイトに形質導入またはトランスフェクトすることができる。なおさらなる例では、ベクターは、ＣＮＳのミクログリアに形質導入またはトランスフェクトすることができる。あるいは、ベクターは、ＣＮＳの上衣細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。

【０１０２】

さらなる実施形態では、ベクターは、ＢＢＢとＣＮＳの両方から複数の細胞型に形質導入またはトランスフェクトする。

【０１０３】

上述したように、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド（複数可）を含むベクターは、特にＢＢＢおよび／またはＣＮＳの細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。他の箇所で記載されるＢＢＢへの標的化について記載されているものと同じ技術が、ＣＮＳへ直接的にターゲティングするベクターに等しく適用可能である。一実施形態では、ベクターは、ベクター表面上に、ベクターをＢＢＢまたはＣＮＳの細胞に標的化するペプチドを発現する。言い換えると、ベクター表面に発現されたペプチドは、ＢＢＢおよび／またはＣＮＳへの標的化の特異性を付与する。別の実施形態では、ベクター表面上に発現されたペプチドは、ベクターをＢＢＢおよび／またはＣＮＳの特定の細胞型（複数可）に標的化する。適切なペプチドの例、ならびにファージディスプレイ法を含むこのようなペプチドを生成および試験する方法は、当該技術分野において公知である。

【０１０４】

代わりにまたは追加して、抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド（複数可）を含む向神経性ベクターを用いて、特に、ＨＳＶなどのＢＢおよび／またはＣＮＳの細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができる。したがって、一実施形態では、ベクターは、向神経性ベクターを含む。別の実施形態では、ベクターは修飾されたＨＳＶを含む。

【０１０５】

本発明の前述の態様による使用のためのベクターに関連して本明細書に記載される全ての実施形態は、本発明のこれらのさらなる態様に等しく適用可能である。

【０１０６】

一実施形態では、発現カセットは、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む。発現カセットは、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含み得る。換言すれば、発現カセットは、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、ＩＲＥＳ、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む。さらなる実施形態では、発現カセットは、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む。発現カセット内の各エレメントの位置は、他のエレメントに対して相対的であり、慣例通り、５’末端から３’末端に向かって移動する順に表される。

【０１０７】
本発明はまた、予期しない高い抗体発現効率、および異なる分泌ペプチドを用いて、鎖位置を交互に変え、先行技術において以前に報告された戦略に関して、中部および下流の調節エレメントをカスタマイズすることによる改善されたタンパク質品質を記載する。
【０１０８】
したがって、本発明は、抗体または抗体断片の凝集を減少させる方法を提供し、方法は、
（ｉ）５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットであって、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含む発現カセット；または５’から３’に、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで細胞を形質転換すること；ならびに
（ｉｉ）抗体または抗体断片の産生に適した条件下で形質転換細胞を維持すること
を含む。
【０１０９】
また、同じコンストラクトは、他のコンストラクトが使用される方法（本明細書で検討されるように、特に、カセットにおける軽鎖の前の重鎖を有するもの、および／またはフーリン／２Ａペプチドなどの自己切断ペプチドを取り込むもの）と比較して、改善された抗体の質をもたらす。したがって、本発明はまた、抗体または抗体断片の成熟および／または質を改善する方法を提供し、方法は、
（ｉ）５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットであって、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含む発現カセット；または５’から３’に、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで細胞を形質転換すること；ならびに
（ｉｉ）抗体または抗体断片の産生に適した条件下で形質転換細胞を維持すること
を含む。
【０１１０】
換言すれば、本発明に従う１つの方法は、抗体または抗体断片の天然構成と同じ三次元構造を有する抗体または抗体断片の割合の増加をもたらす。これは、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥなどの電気泳動を用いて測定することができる。試料はまた、還元され得（例えば、ＤＴＴを用いる）、次に、ゲル上で泳動され、正確なジスルフィド結合形成、および軽鎖と重鎖の両方が予想される分子量で移動することを確認し得る。
【０１１１】
本発明者らは驚くべきことに、抗体または抗体断片の重鎖をコードする遺伝子に対する抗体または抗体断片の軽鎖をコードする遺伝子の位置が、観察された凝集の割合に影響することを観察した。実際、軽鎖をコードする遺伝子が発現カセット内の第１の遺伝子であり、重鎖をコードする遺伝子がそれに続く場合、逆配向と比較して、発現抗体の凝集が減少する（例えば、重鎖をコードする遺伝子が発現カセット内の第１の遺伝子であり、軽鎖をコードする遺伝子がそれに続く場合）。
【０１１２】
一実施形態では、細胞は、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１

の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットで形質転換され、発現カセットは、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含み、５’から３’に、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットで形質転換された細胞と比較して、抗体凝集が減少し、発現カセットは、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含む。本明細書の他の箇所にさらに詳細に記載されるように、発現カセットは、適宜、図１の最上部コンストラクトにおいて図式的に表されるように、コンストラクトの３’末端にＷＰＲＥを提供するかまたはコードする配列を含み得る。したがって、一実施形態では、発現カセットは、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の後にＷＰＲＥを提供するかまたはコードする配列を含む。これは、本発明の全ての関連するコンストラクトおよび方法に適用される。

【０１１３】

さらなる実施形態では、細胞は、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで形質転換され、５’から３’に、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで形質転換された細胞と比較して、抗体または抗体断片の凝集が減少する。

【０１１４】

例えば、抗体または抗体断片の凝集において少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％が減少する。

【０１１５】

本発明者らはまた、自己切断を可能にするために、フーリンおよび２Ａを含有するコンストラクト（例えば、口蹄疫ウイルス、Ｆ２Ａに由来する２Ａペプチド）の凝集の増加を、驚くことに観察した。したがって、発現カセットは、好ましくは自己切断ペプチドを含まず、特に、フーリン／２Ａを含まない。

【０１１６】

本発明者らはまた、抗体または抗体断片の重鎖をコードする遺伝子に対する抗体または抗体断片の軽鎖をコードする遺伝子の位置が抗体力価に影響を与えることを観察した。実際、軽鎖をコードする遺伝子が発現カセット内の第１の遺伝子であり、重鎖をコードする遺伝子がそれに続く場合、逆配向と比較して、発現抗体または抗体断片の力価が増加する（例えば、重鎖をコードする遺伝子が発現カセット内の第１の遺伝子であり、軽鎖をコードする遺伝子がそれに続く場合）。

【０１１７】

さらなる態様では、本発明は、抗体または抗体断片の力価を増加させる方法を提供し、方法は、

（ｉ）５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットであって、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）または自己（例えばフーリン－２Ａ）切断部位のいずれかをさらに含む発現カセット；あるいは５’から３’に、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、

および抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで細胞を形質転換すること；ならびに
（ｉｉ）抗体または抗体断片の産生に適した条件下で形質転換細胞を維持すること
を含む。

【０１１８】

この観察は、自己切断部位、特にフーリン－２Ａ含有コンストラクトに適用されるが、これらは、本明細書において検討される凝集および免疫原性の問題のために含まれないことが好ましい。

【０１１９】

一実施形態では、細胞は、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットで形質転換され、発現カセットは、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含む。したがって、５’から３’に、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットで形質転換された細胞と比較して、抗体力価が増加し、発現カセットは、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含む。本明細書の他の箇所にさらに詳細に記載されるように、発現カセットは、適宜、図１の最上部コンストラクトにおいて図式的に表されるように、コンストラクトの３’末端にＷＰＲＥを提供するかまたはコードする配列を含み得る。したがって、一実施形態では、発現カセットは、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の後にＷＰＲＥを提供するかまたはコードする配列を含む。

【０１２０】

別の（あまり好ましくない）実施形態では、細胞は、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットで形質転換され、発現カセットは、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、自己（例えば、フーリン－２Ａ）切断部位をさらに含み、５’から３’に、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットで形質転換された細胞と比較して、抗体力価が増加し、発現カセットは、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、自己（例えば、フーリン－２Ａ）切断部位をさらに含む。本明細書の他の箇所にさらに詳細に記載されるように、発現カセットは、適宜、図１の最上部コンストラクトにおいて図式的に表されるように、コンストラクトの３’末端にＷＰＲＥを提供するかまたはコードする配列を含み得る。したがって、一実施形態では、発現カセットは、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の後にＷＰＲＥを提供するかまたはコードする配列を含む。

【０１２１】

さらなる実施形態では、細胞は、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで形質転換され、５’から３’に、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで形質転換された細胞と比較して、抗体力価が増加する。

【０１２２】
例えば、抗体または抗体断片の力価において少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％が増加する。
【０１２３】
理論に拘束されることを望まないが、本発明者らはまた、フーリン－２Ａなどの自己切断部位を利用しない発現カセットを使用して産生された抗体は、フーリン－２Ａなどの自己切断部位を利用する発現カセットを使用して産生された抗体と比較して、免疫原性が減少していると考える。これは、抗体が、中和抗体応答および／または抗体に対する細胞性免疫を促進することが公知であるフーリン－２Ａペプチドなどの自己切断部位の残基をいずれも欠いているためである。結果として、自己切断部位（例えば、フーリン－２Ａ）を利用しない発現カセットを用いて産生された抗体は、望ましくない免疫原性の減少をもたらすと考えられる。本明細書で使用される用語「望ましくない免疫原性」は、中和抗体および／または細胞性免疫の産生をもたらす抗体（特に、発現カセットに含まれる自己切断ペプチドのペプチドレムナントに対する指向性を有する）に対する動物（例えば、ヒト）による免疫応答を指し、インビボでの治療抗体の活性を低下させる。さらに、上記望ましくない免疫原性は、インビボでの抗体または抗体断片療法に関連する有害事象の原因となり得る。
【０１２４】
したがって、さらなる態様では、本発明は、望ましくない抗体または抗体断片の免疫原性を減少させる方法を提供し、方法は、
（ｉ）５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットであって、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含む発現カセット；または５’から３’に、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで細胞を形質転換すること；ならびに
（ｉｉ）抗体または抗体断片の産生に適した条件下で形質転換細胞を維持すること
を含む。
【０１２５】
本発明の別の態様は、抗体または抗体断片療法に関連する有害事象を低減する方法を提供し、方法は、
（ｉ）５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットであって、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含む発現カセット；あるいは５’から３’に、抗体もしくは抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体もしくは抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットで細胞を形質転換すること；ならびに
（ｉｉ）抗体または抗体断片の産生に適した条件下で形質転換細胞を維持すること
を含む。
【０１２６】
これらの態様による一実施形態では、細胞は、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットで形質

転換または形質導入され、発現カセットは、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）をさらに含み、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットで形質転換された細胞と比較して、望ましくない免疫原性が減少し、発現カセットが、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、フーリン－２Ａ切断部位をさらに含む。

【０１２７】

例えば、抗体もしくは抗体断片の免疫原性における少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％の減少、および／または抗体もしくは抗体断片療法に関連する有害事象の対応する減少が存在する。

【０１２８】

比較器の文脈において、当業者は、同じ細胞および同じ条件が使用されることを理解する。

【０１２９】

さらなる実施形態では、抗体または抗体断片は、自己切断エレメントを含まない。別の実施形態では、抗体または抗体断片は、フーリン－２Ａペプチドまたはその断片を含まない。

【０１３０】

別の態様では、本発明は、本発明による方法によって得られる抗体または抗体断片を提供する。本発明による方法によって得られる抗体または抗体断片は、抗体または抗体断片の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子の間の自己切断部位を含む発現カセットを用いる方法によって生成される抗体または抗体断片と比較して、対象における望ましくない免疫原性（炎症を含むことができる）を減少するために使用することができる。さらなる実施形態では、本発明の方法によって産生される抗体または抗体断片はまた、抗体または抗体断片の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子の間の自己切断部位を含む発現カセットを使用する方法によって産生された抗体に関連するいずれの毒性も減少させることができる。

【０１３１】

本発明はまた、このような方法において用いることができる対応する発現カセットを提供する。したがって、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットが提供され、発現カセットは、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前にＩＲＥＳをさらに含む。発現カセットの細胞への導入は、５’から３’に、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーター、ならびに抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前のＩＲＥＳを含む発現カセットが同一の細胞に導入される場合に生成される抗体力価と比較して、より高い抗体力価を生成する。本明細書の他の箇所にさらに詳細に記載されるように、発現カセットは、適宜、図１の最上部コンストラクトにおいて図式的に表されるように、コンストラクトの３’末端にＷＰＲＥを提供するかまたはコードする配列を含み得る。したがって、一実施形態では、発現カセットは、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の後にＷＰＲＥを提供するかまたはコードする配列を含む。

【０１３２】

同様に、本発明は、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセ

ットを提供する。発現カセットの細胞への導入は、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットが同一の細胞に導入される場合に生成される抗体力価と比較して、より高い抗体力価を生成する。

【０１３３】

これらの発現カセットは、好ましくは、このようなコンストラクトは、発現された抗体のより高い凝集（すなわち、より低い品質）およびさらに免疫原性の増加をもたらすため、フーリン／２Ａ切断部位などの自己切断部位を含まない。

【０１３４】

本発明はまた、本明細書に記載される本発明の発現カセットを含む、血液脳関門（ＢＢＢ）またはＣＮＳの細胞に形質導入またはトランスフェクトするベクターに関する。このようなベクターは、ベクターで細胞を形質転換し、抗体または抗体断片の産生に適した条件下で形質転換細胞を維持することを含む、抗体または抗体断片の産生方法において有用である。

【０１３５】

本明細書に記載される発現カセットは、ウイルスベクターを介したデリバリーを念頭に置いて設計された。このようなベクターでは、パッケージングすることができる遺伝物質の量に限界がある。したがって、本発明は、ウイルスベクター、特に向神経性ウイルスベクター、または本発明の発現カセットを含むＢＢＢもしくはＣＮＳの細胞に形質導入またはトランスフェクトすることができるウイルスベクターを提供する。ウイルスベクターは、操作されたＡＡＶ２ベクター、好ましくはＡＡＶ－ＢＲ１、または操作されたＡＡＶ９ベクター、例えばＡＡＶ－Ｓ、ＡＡＶ－ＡＦ、ＡＡＶ－ＰＨＰ．ｅＢもしくはＡＡＶ９－ＰＨＰ－Ｖ１、または操作されたＡＡＶ１ベクター、例えばＡＡＶ１ＲＸ、ＡＡＶ１Ｒ６もしくはＡＡＶ１Ｒ７を含み得る。ウイルスベクターは、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている少なくとも１つのプロモーターを含む発現カセットを含み、さらに、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子の後であって、抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子の前に、ＩＲＥＳを含む。ウイルスベクターは、５’から３’に、抗体または抗体断片の軽鎖をコードする第１の遺伝子に作動可能に連結されている第１のプロモーター、および抗体または抗体断片の重鎖をコードする第２の遺伝子に作動可能に連結されている第２のプロモーターを含む発現カセットを含み得る。

【０１３６】

これらのベクターおよび発現カセットは、本発明に従う方法のいずれにも使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【０１３７】

【図１】ｐＡＡＶ由来抗体、連結誘導体および他のタンパク質を産生するために調べられた異なるコンストラクトの表現。曲がった矢印は、発現カセットの軽鎖と重鎖の位置が交互になっていることを示す。ＳＰ：分泌ペプチド、ＩＲＥＳ：内部リボソームエントリー部位、ＦＳＧ２Ａ：フーリン／２Ａ自己切断性ペプチド、ＷＰＲＥ：ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント、ｐＡ：ポリＡ。重鎖または軽鎖は、任意の抗体配列であり得る。プロモーターは、好ましくは、ＣＭＶ（ヒトサイトメガロウイルス）または他のプロモーター、例えば、限定されないが、ＥＦ１Ａ（ヒト真核生物翻訳伸長因子１アルファ１）、ＣＡＧ（ニワトリβ－アクチンプロモーターに融合されたＣＭＶ初期エンハンサー）、ＣＢｈ（修飾されたニワトリβ－アクチンプロモーターに融合されたＣＭＶ初期エンハンサー）、ＳＶ４０（シミアンウイルス４０エンハンサー／初期プロモーター）、ＧＦＡＰ（ヒトグリア線維性酸性タンパク質プロモーター）＊：３’調節エレメントは含まれない。

【図２】図２Ａ．ｐＡＡＶトランスフェクション後のＭＡＢ１　ＩｇＧおよびｓｃＦｖ－ＦｃのＣＨＯ細胞上清力価。ＢＬＩ　Ｏｃｔｅｔシステム、プロテインＡ被覆バイオセンサー。矢印は、重鎖遺伝子がコンストラクト（ＨＣ／ＬＣ）中の軽鎖の前にそれらのそれぞれのＬＣ／ＨＣ対応物と比較して配置された場合、発現の明らかな低下を示す。クローンコンストラクトは、図に詳述される図１のオプションに従う。　図２Ｂ．ｐＡＡＶトランスフェクション後のＭＡＢ１　ＦａｂのＣＨＯ細胞上清力価。ＢＬＩ　Ｏｃｔｅｔシステム、抗Ｈｉｓ被覆バイオセンサー。矢印は、重鎖遺伝子がコンストラクト（ＨＣ／ＬＣ）中の軽鎖の前方にそれらのそれぞれのＬＣ／ＨＣ対応物と比較して配置されている場合、再び明確な下方発現を示す。

【図３】クマシーブルー染色による精製されたＭＡＢ１　ＩｇＧのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分離。試料は、指示される場合、５ｍＭのジチオスレイトール（ＤＴＴ）の存在下で還元された。矢印はより大きな分子量へのシフトを示す。

【図４】クマシーブルー染色による精製されたＭＡＢ１　ｓｃＦｖ－ＦｃのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分離。試料は、指示される場合、５ｍＭのジチオスレイトール（ＤＴＴ）の存在下で還元された。

【図５】ＴＰ－６２ペプチドへのＭＡＢ１　ＩｇＧ結合。Ｏｃｔｅｔ－Ｋｉｎｅｔｉｃｓは、１００ｎＭ結合剤タンパク質候補から開始し、２倍連続希釈する。上部パネルは、異なるプロモーターおよびフーリンＨＣ／ＬＣ　ＩｇＧコンストラクトで２プロモーターＭＡＢ１　ＩｇＧをカバーする。下部パネルは、フーリンＨＣ／ＬＣおよびＬＣ／ＨＣ　ＭＡＢ１　ＩｇＧコンストラクト、ＩＲＥＳ　ＬＣ／ＨＣおよびＨＣ／ＬＣ　ＩｇＧコンストラクト、ならびにｓｃＦｖ－Ｆｃ　ＩｇＧコンストラクトをカバーする。各コンストラクトの詳細は、図に見出される。各パネルは、５００ｎＭ　ＴＰ－６２ペプチドを用いたバイオセンサー負荷から開始する。

【図６】Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００　Ｉｎｃｒｅａｓｅ　１０／３００ＧＬカラムを用いた関連精製ｐＡＡＶ由来ＩｇＧのサイズ排除クロマトグラフィー分析。分離はＰＢＳ緩衝液、４℃で行い、個々のコンストラクトの詳細を図に示す。

【図７】関連する精製されたｐＡＡＶ由来ＩｇＧのサイズ排除クロマトグラム重ね合わせ。図６に記載されるのと同じ条件。

【図８】フーリンＭＡＢ２　ＩｇＧコンストラクトのＣ末端部分の分析は、コンストラクト上に残されたフーリン／Ｆ２Ａペプチドを確認し、それによってコンストラクト上の第１の抗体鎖の質量を増加させる。ゲル内トリプシン消化後、続いてＬＣ／ＭＳ。

【図９】ＡＡＶ２、８、９および１０のＣＨＯ形質導入から得た培養ｍＬあたりの精製されたＭＡＢ１　ＩｇＧおよびｓｃＦｖ－Ｆｃをトランスフェクションと比較した。１ｍＬあたりの精製されたタンパク質の量を、それらの対応する消光係数を用いてＯＤ２８０ｎｍによって定量した。各コンストラクトの詳細は、図に見出される。

【図１０】クマシーブルー染色による精製されたＭＡＢ１　ＩｇＧのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分離。試料は、示される場合、５ｍＭのジチオスレイトール（ＤＴＴ）の存在下で還元された。

【図１１】ＣＨＯ、分化ニューロンおよびＢＢＢ細胞にＡＡＶ２、８、９および１０ベクター化抗体コンストラクトを用いて形質導入した後のＩｇＧ力価の比較。左側パネル、ＣＨＯ形質導入；中央パネルは分化ヒト神経芽細胞腫細胞株形質導入；右側パネル、分化血液脳関門（ＢＢＢ）細胞形質導入。各コンストラクトの詳細は、図に見出される。

【図１２】ＡＡＶ２、８、９および１０ベクター化ＭＡＢ１　ＩｇＧおよびｓｃＦｖ－Ｆｃコンストラクトを用いたラット脳初代細胞の形質導入後のＩｇＧ力価の比較。各コンストラクトの詳細は、図に見出される。

【図１３】異なるＷＴ　ＡＡＶ血清型による形質導入の３日後、ＯｒｇａｎｏＰｌａｔｅ（登録商標）３Ｄ　ＢＢＢモデルの頂端上清内のｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞によって分泌されたＭＡＢ１（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ）の検出。ＭＡＢ１の発現はＣＭＶプロモーターによって駆動された。ＩＲＥＳエレメントをＬＣとＨＣの間で使用して、二シストロン性抗体産生を達成した。要約すると、試験したコンストラクトは、以下の構成：５’－ＣＭ

Ｖプロモーター－軽鎖をコードする遺伝子と分泌ペプチド－ＩＲＥＳ－重鎖をコードする遺伝子と分泌ペプチド－３’をコードする配列を有した。ｈＴＤＰ－４３全長（ＦＬ）タンパク質へのＥＬＩＳＡ結合によって測定された抗体の存在は、Ｏ．Ｄ．（光学濃度）で表される。対照ＡＡＶ２－ｅＧＦＰ形質導入に対して結合は観察されなかった。予想されたように、２つの対照、ｍＩｇＧ　ＭＡＢ１およびｈＩｇＧ　ＭＡＢ２については、抗ヒト二次抗体が検出に使用され、ＭＡＢ２はｈＴＤＰ－４３　ＦＬタンパク質と結合できないため、抗体結合は検出されなかった。

【図１４】ＡＡＶ２コンストラクトによる形質導入の３日後、ＯｒｇａｎｏＰｌａｔｅ（登録商標）３Ｄ　ＢＢＢモデルの頂端コンパートメントと基底コンパートメントの両方におけるｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞によって分泌されるＭＡＢ１（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ）の検出。ＣＭＶプロモーターによって駆動されるＭＡＢ１の二シストロン性発現は、ＬＣとＨＣの間のＩＲＥＳエレメントを用いて達成された。要約すると、試験したコンストラクトは、以下の構成：５’－ＣＭＶプロモーター－軽鎖をコードする遺伝子と分泌ペプチド－ＩＲＥＳ－重鎖をコードする遺伝子と分泌ペプチド－３’をコードする配列を有した。ＴＤＰ－４３全長タンパク質へのＥＬＩＳＡ結合によって測定した抗体の存在。対照ＡＡＶ２－ｅＧＦＰ形質導入に対して結合は観察されなかった。データはＯ．Ｄ．で表される。

【図１５】異なるＭＯＩ（感染の多重度）でのＡＡＶ２コンストラクトによる形質導入の３日後、２４ウェル培養プレートの上清内におけるｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞により分泌されたＭＡＢ１（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ）の検出。ＣＭＶプロモーターによって駆動されるＭＡＢ１の二シストロン性発現は、ＬＣとＨＣの間のＩＲＥＳエレメントを用いて達成された。要約すると、試験したコンストラクトは、以下の構成：５’－ＣＭＶプロモーター－軽鎖をコードする遺伝子と分泌ペプチド－ＩＲＥＳ－重鎖をコードする遺伝子と分泌ペプチド－３’をコードする配列を有した。ＴＤＰ－４３全長タンパク質へのＥＬＩＳＡ結合によって測定した抗体の存在。データは、標準曲線から計算された濃度で表される。

【図１６】ＡＡＶ２コンストラクトによる形質導入の３日後、トランスウェルＢＢＢモデルの頂端コンパートメントと基底コンパートメントの両方におけるｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞によって分泌されたＭＡＢ１（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ）の検出。ＣＭＶプロモーターによって駆動されるＭＡＢ１の二シストロン性発現は、ＬＣとＨＣの間のＩＲＥＳエレメントを用いて達成された。要約すると、試験されたコンストラクトは、以下の構成：５’－ＣＭＶプロモーター－軽鎖をコードする遺伝子と分泌ペプチド－ＩＲＥＳ－重鎖をコードする遺伝子と分泌ペプチド－３’をコードする配列を有した。ｈＴＤＰ－４３全長タンパク質へのＥＬＩＳＡ結合によって測定した抗体の存在。対照のＡＡＶ２－ｅＧＦＰ形質導入について結合は観察されなかった（データは示さず）。データは、存在する抗体の相対パーセンテージで表される。

【図１７】（Ａ）ｂ．Ｅｎｄ３およびｂ．Ｅｎｄ５マウス脳内皮腫細胞株、および（Ｂ）ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞において、ＡＡＶ２、ＡＡＶ－ＢＲ１およびＡＡＶｒｈ１０コンストラクトによる形質導入６日後、細胞上清中のＭＡＢ１　ｈＩｇＧ１およびｓｃＦｖ－Ｆｃの検出。ＣＭＶプロモーターによって駆動されるＭＡＢ１の二シストロン性発現は、ＬＣとＨＣの間のＩＲＥＳエレメントを用いて達成された。要約すると、試験したコンストラクトは、５’から３’への以下の構成：ＣＭＶプロモーター－分泌ペプチド－軽鎖－ＩＲＥＳ－分泌ペプチド－重鎖－ＷＰＲＥ－ｐｏｌｙＡを有した。抗ｈＦｃキット（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ｃｉｓｂｉｏ）を用いてＨＴＲＦ（ホモジニアス時間分解蛍光）によって測定した抗体の存在。標準曲線から内挿した濃度で表したデータで、平均値±ＳＤをプロットした単一の実験内で３～６回の生物学的反復から作成したもの。

【図１８】市販の３ＤヒトインビトロＢＢＢモデル（Ｎｅｕｒｏｍｉｃｓ）からの初代ヒト脳微小血管内皮細胞によって分泌されるＭＡＢ１　ｈＩｇＧ１またはｍＩｇＧ２ａの検出。ＭＯＩが１００’０００で、ＡＡＶ２およびＡＡＶ－ＢＲ１ベクターによる形質導入の７日後、頂端コンパートメントと基底コンパートメントの両方での検出。ＣＭＶまたはＣＢｈプロモーターによって駆動されるＭＡＢ１の二シストロン性発現は、ＬＣとＨＣの

間のＩＲＥＳエレメントを用いて達成された。要約すると、試験されたコンストラクトは、５’から３’への以下の構成：ＣＭＶまたはＣＢｈプロモーター－分泌ペプチド－軽鎖－ＩＲＥＳ－分泌ペプチド－重鎖－ＷＰＲＥ－ｐｏｌｙＡを有した。抗ｈＦｃキット（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ｃｉｓｂｉｏ）を用いてＨＴＲＦによって測定した抗体の存在。それぞれの頂端コンパートメントと基底コンパートメントの標準曲線から内挿された（Ａ）濃度または（Ｂ）量で表されたデータ。評価した条件間の直接比較を可能にするために、平均値±ＳＤをプロットした単一実験内で２～３個の生物学的複製を行った。

【発明を実施するための形態】

【０１３８】

本発明は、以下の実施例においてさらに説明される。実施例は、本発明を例示するためにのみ役立ち、本発明の範囲をいかなる方法でも限定することを意図しない。

【実施例】

【０１３９】

［実施例１］

ベクター化抗体コンストラクト：

１．ベクター化に最適なクローンの選択

１．１．導入

ＡＡＶカプシドにおける一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）ベクター化の使用に関する主な課題の１つは容量である。発現カセットサイズは、ａ）プロモーター、ｂ）オープンリーディングフレーム（典型的には重鎖および軽鎖を含む抗体または抗体断片をコードする）、およびｃ）下流調節エレメントを含む。ＤＮＡが一本鎖に変換され、ＡＡＶカプシド中でベクター化されると、推奨されるサイズは、５’ＩＴＲおよび３’ＩＴＲを含む４．７ｋｂ以下である。より大きなサイズのコンストラクトは、ＡＡＶウイルスカプシド複合体にはほとんど入らず、それによって産生収率が低下する。自己相補的コンストラクトは、５’ＩＴＲおよび３’ＩＴＲ内でさらに小さい容量、すなわち、２．３ｋｂ以下を有する。

【０１４０】

一般的に使用される抗体プラスミドＡＡＶ（ｐＡＡＶ）設計は、より小さいサイズであり、ａ）抗体一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）［４４，５５］、ｂ）ＩｇＧ　ＦｃドメインにｓｃＦｖ［５６，５７］、またはｃ）サメおよび／またはラクダ抗体などの単一ドメイン抗体［５８－６２］のような単一プロモーターによって駆動される発現カセットに適合する抗体断片を用いて作製される。

【０１４１】

完全な抗体の場合、発現カセットの前述のサイズ制限のために、軽鎖と重鎖遺伝子の両方を適合させることは困難である。今日まで、ほとんどの学術および産業研究者は、自己プロセシングタンパク質融合で翻訳されたオープンリーディングフレームからなるｐＡＡＶコンストラクトに依存している。ほとんどの場合、それぞれのコード順序は、１）抗体重鎖、２）ＰＡＣＥ（対塩基性アミノ酸切断酵素［６３］、３）としても公知であるフーリンプロテアーゼ認識部位フーリン切断を促進する自己切断２Ａペプチド［４７－４９］であり、洗浄プロセスを促進することが期待されるもの、すなわちＥ２Ａ、Ｆ２Ａ、Ｐ２ＡまたはＴ２Ａ、および４）抗体軽鎖からなる。研究者らは、得られた高発現力価および抗体鎖発現における等モル濃度のために、このコンストラクトを有意に優先する。しかしながら、ほとんどの場合、発現タンパク質に含まれるフーリンおよび２Ａ融合ペプチドのレムナント［６４］では、タンパク質が適切に成熟しないため、それにより、発現タンパク質の望ましくない免疫原性を利用することができる［４５］。異なる２Ａペプチドは、自己切断の効率が異なり、Ｔ２ＡとＰ２Ａが最も効率が高く、Ｆ２Ａは最も効率が低い［６５］。したがって、Ｆ２Ａ結合タンパク質の最大５０％が融合タンパク質として細胞内にとどまる可能性があり、機能獲得などの予期せぬ結果を引き起こす可能性がある［６６］。２Ａ部位は、約６０％の時間でリボソームをポリヌクレオチドから離脱させる。Ｐ２ＡおよびＴ２Ａについて約１０％のリボソーム読み取りとともに、これは、下流ペプチド鎖の発現を約７０％減少させる［４７］。さらに、２Ａペプチドは、ウイルスに由来する

ことに留意することが重要であり、すなわち、Ｆ２Ａは口蹄疫ウイルス１８に由来し、Ｅ２Ａは馬鼻炎ウイルスＡに由来し、Ｐ２Ａはブタテシオウイルス１－２Ａに由来し、Ｔ２Ａはトセアシグナウイルス２Ａに由来する。したがって、重鎖または軽鎖のいずれかに残った２Ａペプチド残基は、哺乳動物およびヒトの免疫系によって非自己であるとみなされ得る。

【０１４２】

抗体発現のためのフーリン／２Ａ融合に代わるより一般的でないｐＡＡＶコンストラクトは、１）重鎖および軽鎖抗体鎖を駆動する２つのプロモーター、または２）１つのプロモーターを使用し、２つの抗体遺伝子鎖間に内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ、脳心筋炎ウイルス由来のＤＮＡ配列）を位置させることである。第１に、ｐＡＡＶ設計における制約が増大するが、これは、一般にプロモーターのサイズが大きいためであり、それにより、重鎖および軽鎖抗体遺伝子を制御し、タンパク質力価を大幅に増加させることができる３’ＩＴＲ調節エレメントを除去するために、小さなプロモーターの使用を必要とする。第２に、ＩＲＥＳコンストラクトは、今日まで、不十分なタンパク質発現体であると考えられており［５６，６７－６９］、したがって、多くのｐＡＡＶコンストラクト（ここで、ＩＲＥＳコンストラクトは、２Ａまたはフーリン２Ａコンストラクトよりもはるかに低い力価を発現する）について無視される。

【０１４３】

１．２．選択アプローチ

本発明者らは、オープンリーディングフレームコンポーネント位置、プロモーター強度、分泌ペプチドおよび融合ペプチドに依存して、産生され、発現について調査された５５以上のｐＡＡＶコンストラクトをスクリーニングした。異なるタイプのコンストラクトを図１に示す。本発明者らの知る限り、文献で報告されているＡＡＶベクターを用いた完全なＩｇＧ発現には、軽鎖の前に重鎖が配置されたフーリン／２Ａコンストラクトがある（図１、２番目のコンストラクトを参照されたい）。本発明者らのアプローチはまた、このタイプのコンストラクトの他の軽鎖および重鎖位置、ならびに二シストロン性コンストラクトの異なるプロモーター強度も調べた（図１、４番目のコンストラクト）。さらに、本発明者らは、異なる分泌ペプチドを用いて、また、中部および下流の調節エレメントをカスタマイズすることにより、鎖位置を交互に変えることによって、報告されているＩＲＥＳ二シストロン性コンストラクトの低発現に挑戦した（図１、３番目のコンストラクト）。最後に、２つの完全抗体クローンおよびｓｃＦｖ－Ｆｃ、ＦａｂおよびｓｃＦｖなどの対応する抗体断片、すなわちＭＡＢ１（抗ＴＤＰ－４３抗体）およびＭＡＢ２（抗ＥｒｂＢ２抗体）を試験した（図１、１番目のコンストラクト）。さらに、増強緑色蛍光タンパク質（ｅＧＦＰ）を発現するクローンを含めた。

【０１４４】

本発明者らの研究では、最良のｐＡＡＶコンストラクトを同定するための選択基準を以下のように定義した：１）高タンパク質力価、２）低い凝集レベル、３）正確な成熟とフォールディング、および４）標的への結合。

【０１４５】

１．３．チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞トランスフェクションおよび上清力価

簡単に説明すると、ＣＨＯ細胞（ＥｘｐｉＣＨＯ－Ｓ（商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、ｃａｔ：Ａ２９１２７））を、製造業者の推奨に従って、コンストラクトあたり１μｇ／ｍＬプラスミドで三連でトランスフェクトした。細胞は、最適化された合成培地を用いて、３７℃で２４時間、ディープウェルマイクロプレート中で増殖させ、次に、３２℃に温度シフトし、その後、約３．５ｍＬ培地の最終容量中で１１日間増殖させた。次に、Ｏｃｔｅｔシステムおよびバイオセンサーチップに、ａ）全長抗体およびｓｃＦｖ－Ｆｃsのいずれかを被覆したＢｉｏ－Ｌａｙｅｒ　Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｍｅｔｒｙ（ＢＬＩ）、またはｂ）モノクローナル抗体結合Ｈｉｓタグ付きタンパク質（ここではＦａｂｓ、ｓｃＦｖｓおよびＥＧＦＰ）を用いて、各上清を三連で力価を推定した。全ての測定に対

して、対応し、以前に精製されたタンパク質を用いて、標準曲線を行った。抗体およびｓｃＦｖ－Ｆｃについての結果を図２Ａ、およびＦａｂについての図２Ｂに示す。

【０１４６】

観察。ＭＡＢ１　ＩｇＧの場合、各々の２プロモーターコンストラクトは、約３０～１００μｇ／ｍＬの範囲の有意な力価を産生した。驚くべきことに、１５０～３５０μｇ／ｍＬの範囲の約２～１０倍高い力価が、但し注目すべきことに、軽鎖遺伝子が、２プロモーターＩｇＧコンストラクトと比較して、コンストラクト（ＬＣ／ＨＣ）中の重鎖の前に配置された場合にのみ、フーリンおよびＩＲＥＳコンストラクトで得られた。ＩＲＥＳＩｇＧコンストラクトＬＣ／ＨＣ中の高タンパク質レベルは、フーリンＩｇＧコンストラクトと同等であった。これは予期せぬことであり、本発明者らの知る限りでは、最新技術は反対のことを述べているので、初めての報告であった［５６，６７－６９］。図２ＢのＭＡＢ１　Ｆａｂコンストラクトについて同様の観察がなされ、これは、フーリンおよび２プロモーターコンストラクトと同様の力価を示す。さらに、ＩＲＥＳ　Ｆａｂコンストラクト中の軽鎖の先行する重鎖（ＬＣ／ＨＣ）の位置は、それらのＨＣ／ＬＣコンストラクトの対応物よりも有意に高い発現力価を有する。収集されたデータは、フーリンおよびＩＲＥＳを使用するＩｇＧまたはＦａｂ構築体において、重鎖の前に位置する軽鎖が力価を増加させることを示す。力価はＨＣ／ＬＣ対応物よりも有意に高い。最後に、中強度プロモーターＳＶ４０が２つのプロモーターＩｇＧコンストラクト中の２つのプロモーターのうちの１つとして含まれる場合、発現は低下するようである。

【０１４７】

１．４．ＳＤＳ－ＰＡＧＥにおけるタンパク質精製および分析

この実験に続いて、細胞を回収し、上清を三連で分離し、クローンごとに合わせた。全長抗体およびｓｃＦｖ－Ｆｃクローンの場合、タンパク質を市販のプロテインＡレジンを用いて捕捉し、１００ｍＭのＮａＣｌを補充した１００ｍＭのグリシンｐＨ２．８緩衝液でそれらを溶出した。次に、タンパク質を、それらの対応する消光係数を用いて、分光光度ＯＤ２８０ｎｍにより定量した。ＦａｂｓおよびｓｃＦｖｓコンストラクトの場合、Ｈｉｓタグ付きタンパク質について市販のアフィニティーカラムを使用した。

【０１４８】

次に、タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥ１２－４％で分離し、クマシーブルーで染色した。タンパク質濃度とは独室して、１試料あたり１３μＬをゲルウェルあたりロードし、ａ）精製力価の２回目の推定値を得、ｂ）考えられる分解生成物を確認した。さらに、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）の非存在下、およびジチオスレイトールの存在下での軽鎖および重鎖の放出下で、１５０ｋＤａでの鎖間ジスルフィド結合形成および適切な錯体の検証を行った。精製ＭＡＢ１　ＩｇＧ　ｐＡＡＶクローンについて得られたゲルを図３に示す。

【０１４９】

観察。全ての試料は適切なジスルフィド結合配置を有し、抗体は対応する１５０ｋＤａの分子量で移動した。還元されると、両方のコンストラクト、２プロモーターおよびＩＲＥＳ　ＩｇＧが、それぞれ約２５および約５０ｋＤａの予想される軽鎖および重鎖分子量で分離された。しかしながら、フーリン／２Ａ　ＩｇＧコンストラクトの最初の鎖は分子量が大きく、すなわち、ＨＣ／ＬＣコンストラクト配置中の重鎖およびＬＣ／ＨＣ配置中の軽鎖が大きいことに注目した。各フーリン／２Ａ　ＩｇＧ鎖コンストラクトのサイズを、ペプチド精度についてＬＣ／ＭＳによりさらに調べた。これにより、フーリン／２Ａペプチドの全部または一部が、ＨＣ／ＬＣコンストラクトのためのＬＣ／ＨＣコンストラクトまたは重鎖のいずれかのＣ末端に付加されることが確認された（図３、７および８を参照されたい）。対照的に、第２の抗体コンストラクト鎖は適切に処理され、Ｎ末端でのＬＣ／ＭＳによってペプチドレムナントは観察されなかった。全体的に、全てのクローンは、適用された細胞培養条件下で低いレベルの分解を示した。２プロモーターとＩＲＥＳタンパク質は、最も正確な成熟品質を有するようである。最後に、異なるＩｇＧ抗体であるクローンＭＡＢ２についても同様の観察を行った。ここでも、フーリン／２Ａコンストラクトは第１コンストラクト鎖に対してより大きな分子量を有し、フーリン／２Ａペプチド

の付加はＬＣ／ＭＳによって確認されたが、２プロモーターとＩＲＥＳ　ＩｇＧは最も正確な成熟を示した。精製されたＭＡＢ１　ｓｃＦｖ－Ｆｃ試料も同じＳＤＳ－ＰＡＧＥ条件で分離した。結果を図４に示す。

【０１５０】

観察。精製されたＭＡＢ１試料によれば、ｓｃＦｖ－Ｆｃは適切な鎖間ジスルフィド結合形成を有し、タンパク質はその予想分子量約１００ｋＤａで移動する。試料を５ｍＭのＤＴＴで還元し、５０ｋＤａの予想分子量で移動させると、単一鎖が放出される。全体的に、全てのクローンは、使用された細胞培養条件において低いレベルの分解を示した。

【０１５１】

１．５．ＢＬＩによるトランスフェクション由来タンパク質の結合親和性の解析

ｐＡＡＶシステム生成タンパク質が機能的であることを実証するために、本発明者らはＯｃｔｅｔシステムを用いたＢＬＩによりＴＡＲ　ＤＮＡ結合タンパク質４３（ＴＤＰ－４３）Ｃ末端ペプチドに対するそれらの結合親和性を測定した。簡単に説明すると、ストレプトアビジンバイオセンサーチップは、ＴＰ－６２と呼ばれる５００ｎＭのＴＤＰ－４３　Ｃ末端ペプチドで被覆された。次に、０．１％ウシ血清アルブミンおよび０．０２％Ｔｗｅｅｎを補充したＰＢＳからなる反応緩衝液を用いて測定を行った。反応を３０℃で行った。試料は１００ｎＭ濃度から２倍連続希釈で分析した。ＯＤ２８０ｎｍにおける対応する消光係数を用いてタンパク質モル濃度を計算した。ＴＰ－６２ペプチドへの試料会合を反応緩衝液中で９００秒間放置し、続いて同じ緩衝液中で６００秒解離させた。バイオセンサーを１０ｍＭグリシンｐＨ２．０で再生し、各試料の測定前に反応緩衝液中で中和した。収集したデータは、関連する精製された試料について図５に示される。

【０１５２】

観察。全体として、全てのＭＡＢ１クローンは機能的であり、約１～６ｎＭの範囲の同等のK_DでＴＤＰ－４３　Ｃ末端ペプチドと結合する。２プロモーターおよびＩＲＥＳコンストラクトは、約２．５～３ｎｍの範囲の類似したＲｍａｘを有した。重要なことに、２プロモーターコンストラクトのK_D親和性は、プロモーターまたは分泌ペプチド（それぞれ、ＣＭＶ／ＣＭＶ、ＣＭＶ／ＳＶ４０またはＳＶ４０／ＣＭＶプロモーターコンストラクト、およびＩｇｋまたはＧＨ１分泌ペプチド）に応じて変化しなかった。対照的に、フーリンＩｇＧ　ＨＣ／ＬＣコンストラクトは、２プロモーターおよびＩＲＥＳコンストラクトよりも約２倍のＲｍａｘを有するタンパク質を産生し、それぞれ約５～６ｎｍ対約２．５～３ｎｍであった。さらに、フーリンＩｇＧ　ＬＣ／ＨＣコンストラクトは、その２プロモーターおよびＩＲＥＳ対応物よりそれほど顕著ではないが、より大きなＲｍａｘを有し、それぞれ約２．５ｎｍ対約２．５～３ｎｍである。ＢＬＩシステムによれば、データは、その２プロモーターおよびＩＲＥＳ対応物、例えばアッセイ条件下のフーリンＩｇＧ　ＨＣ／ＬＣタンパク質と比較して、等モル濃度でのフーリン／２Ａコンストラクトに対するより大きな分子量タンパク質を示す。この観察は、サイズ排除クロマトグラフィー分離を用いた次の分析ステップで確認された（１．６を参照されたい）。最後に、データは、機能的ＩｇＧおよびｓｃＦｖタンパク質がｐＡＡＶ発現系で得られることを実証する。さらなるＯｃｔｅｔ解析については後述する（１．６を参照されたい）。

【０１５３】

１．６．サイズ排除クロマトグラフィーおよびＬＣ／ＭＳによるタンパク質分析

精製されたタンパク質をサイズ排除クロマトグラフィーで分離し、分解、凝集、および単量体として１５０ｋＤａの分子量で分離した適切なタンパク質折り畳みの存在を監視した。このため、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００　Ｉｎｃｒｅａｓｅ　１０／３００ＧＬカラム上で、Ｇ＆Ｅ　ＨｅａｌｔｈｃａｒｅからＰＢＳ緩衝液を用いて４℃で１００μＬの精製試料を分離した。得られた分離を図６に示す。

【０１５４】

観察。全てのコンストラクトについて、ＩｇＧモノマーを、約１１．７ｍＬの溶出体積で予想通り分離した。対照的に、フーリンＩｇＧコンストラクトは、凝集体のレベルが大きく、ＬＣ／ＨＣコンストラクトでは２６％、ＨＣ／ＬＣコンストラクトでは３８％であ

った。さらに、フーリンコンストラクトのモノマーピークは、ＩＲＥＳおよび２プロモーターＩｇＧコンストラクトと整列せず（重ね合わせた図７を参照されたい）、分離においてわずかに大きい分子量を有し、より早期に溶出する。明らかに、０．２５ｍＬ前に溶出するフーリンＩｇＧ　ＬＣ／ＨＣコンストラクトの場合がこれに該当する。フーリン／２Ａコンストラクト（図６、７および８）の凝集レベルが大きいことは、この種のタンパク質の予期せぬ転帰と毒性が報告されていることを反映している可能性がある［６６］。これらのデータは、より大きな分子量のフーリン／２Ａ由来ＩｇＧを示す上記のＢＬＩ測定を確認する。反対に、ＩＲＥＳ　ＩｇＧコンストラクトタンパク質は２％凝集レベルが非常に低く、９８％の豊富な単量体タンパク質を示し、より高い品質を実証した。２プロモーターＩｇＧタンパク質は１３％の低い凝集レベル（ＩＲＥＳコンストラクトよりも高いが）を有した。これらの結果は、より良好な品質、発現収率、安定性、および潜在的に望ましくない免疫原性および／または毒性を有するコンストラクトとして、ＩｇＧ　ＩＲＥＳ　ＬＣ／ＨＣおよび２プロモーターＬＣ／ＨＣを同定した。

【０１５５】

２．ＭＡＢ１およびＭＡＢ２リード候補のベクター化

２．１．細胞形質導入のためのＡＡＶカプシドの選択

上述のように、最高品質のタンパク質を提供するＭＡＢ１およびＭＡＢ２最良のコンストラクト、すなわち、ａ）ＭＡＢ１　ＩｇＧ　ＩＲＥＳ　ＬＣ／ＨＣおよび２プロモーターＩｇＧ　ＬＣ／ＨＣコンストラクト、ｂ）ＭＡＢ２　２プロモーターＩｇＧ　ＬＣ／ＨＣ、およびｃ）ＭＡＢ１　ｓｃＦｖ－Ｆｃをベクター化のために選択した。形質導入された遺伝子デリバリーのために、目的の異なる細胞のパネル、すなわち、チャイニーズ卵巣ハムスター細胞（ＣＨＯ）、ニューロンおよび脳内皮細胞株（ｈＣＭＥＣ／Ｄ３）で分化したヒト神経芽細胞腫細胞株を選択した。このために、上記の最良のｐＡＡＶコンストラクトを、ＡＡＶ２、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９およびＡＡＶ１０カプシドにおいてベクター化した。得られた低エンドトキシンの超精製カプシドを用いて細胞に形質導入した。

【０１５６】

２．２．ＣＨＯ細胞形質導入、タンパク質精製およびトランスフェクトされた同一クローンとの力価比較

簡単に説明すると、ベクター化されたリードコンストラクトを用いて、ＣＨＯ細胞培養物を１００Ｋ　ｇｃ（ゲノムコピー）／ＣＨＯ細胞で三連でトランスフェクトし、次に、上記のように最適化された合成培地中で、３７℃で２４時間、ディープウェルマイクロプレート中で増殖させ、次に、３２℃に温度シフトし、次に、ウェルあたり３．５ｍＬの最終体積で１１日間増殖させた。細胞増殖はＡＡＶ存在の影響を受けなかった。その後、細胞を回収し、上清を三連で分離し、クローンごとに合わせた。完全長抗体およびｓｃＦｖ－Ｆｃクローンを、プロテインＡレジンを用いて上記のように捕捉し、１００ｍＭ　ＮａＣｌを補充した１００ｍＭグリシンｐＨ２．８緩衝液で溶出した。次に、タンパク質を、それらの対応する消光係数を用いて、分光光度ＯＤ２８０ｎｍにより定量した。得られた力価を図９に示す。

【０１５７】

観察。形質導入された全てのリード遺伝子コンストラクトを、各試験されたＡＡＶカプシドを用いて発現させた。発現レベルは、ベクター化に使用されるカプシドの関数として変化するが、精製プラスミドでトランスフェクトされた同じコンストラクトと全体的に類似している。

【０１５８】

２．３．ＭＡＢ１抗原ＥＬＩＳＡを用いたラット初代脳細胞の形質導入および抗体力価

簡単に説明すると、ラット初代細胞をラットの仔の脳から解剖して、Ｂ２７（商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、ｃａｔ：１７５０４０４４）を補充した１００μＬの神経基底培地中で、ウェルあたり５０Ｋの初代細胞を含む９６ウェルマイクロプレート中で３７℃で増殖させた。ベクター化されたリードコンストラクトを用いて、ラット初代脳細胞に１００Ｋ　ｇｃ／ラット初代細胞で三連で形質導入し、次に、３７℃で７日間Ｂ２７を補

充した神経基底培地中で増殖させた。顕微鏡的形態評価は、細胞がＡＡＶ存在に影響されないことを示した。次に、三連の形質導入細胞上清を収集し、ＥＬＩＳＡによりｈＴＤＰ－４３全長タンパク質に対する抗体力価を定量した。簡単に説明すると、９６ウェルマイクロプレートを、４℃のＰＢＳ緩衝液中で１μｇ／ｍｌヒト全長ＴＤＰ－４３で一晩被覆した。次に、プレートを０．０５％Ｔｗｅｅｎを補充したＰＢＳで３回洗浄し、次に、１％ウシ血清アルブミンを補充したＰＢＳ、０．０５％Ｔｗｅｅｎを３７℃で１時間ブロックした。採取した抗体含有上清をブロッキング緩衝液で希釈し、２０、４０、８０倍に希釈し、マイクロプレートに試料５０μＬを加え、１時間、３７℃でインキュベートした。次に、プレートを上記のように洗浄し、ブロッキング緩衝液で１／１００００希釈したヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ－ＨＲＰ（ａｂ　ｃａｍ、＃９８６２４）で１時間、３７℃でインキュベートした。プレートを上記のように洗浄し、ウェルに１００μＬのＴＭＢ基質を補充し、室温で数分間インキュベートした。その後、ＨＲＰ反応を５０μＬのH_2SO_4　０．１６Ｍでブロックした。最後に、得られた溶液をマイクロプレートリーダー（ＢｉｏＴｅｋ）を用いて４５０ｎｍで赤色にした。対応する抗体力価を図１２に示す。データは、ＡＡＶ２中でベクター化されたＭＡＢ１　ＩｇＧおよびｓｃＦｖ－Ｆｃクローンが、細胞上清の５～５０ｎｇ／ｍＬの範囲の有意に低い発現力価を有することを示す。対照的に、他のＡＡＶ８、９および１０ベクター化候補は、力価約１８０ｎｇ／ｍＬの２つのＣＭＶプロモーター下で発現されるＡＡＶ９にベクター化されたＭＡＢ１を除き、発現駆動系（ＩＲＥＳまたは２プロモーター）にかかわらず、約５００～２０００ｎｇ／ｍＬの範囲の細胞上清の、はるかに大きいＩｇＧおよびｓｃＦｖ－Ｆｃ力価を有する。

【０１５９】

観察。形質導入された全てのリード遺伝子コンストラクトを、各試験されたＡＡＶカプシドを用いて発現させた。上記のように、発現レベルは、ベクター化に使用されるカプシドの関数として変化するが、精製されたプラスミドでトランスフェクトされた同じコンストラクトと全体的に類似している。

【０１６０】

２．４．ＳＤＳ－ＰＡＧＥによるタンパク質成熟の分析

精製されたリードタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥ　１２－４％で分離し、クマシーブルーで染色した。上記のように、ＯＤ２８０ｎｍによる測定量を検証するために、ロード量を調和させることなく、タンパク質試料を等量（１３μＬ／試料）ロードした。得られた分離を、ＭＡＢ１　ｐＡＡＶクローンについて図１０に示す。

【０１６１】

観察。全ての試料は、適切なジスルフィド結合配置を有し、抗体は、図１０に示されるように、対応する１５０ｋＤａの分子量で移動した。還元された場合、両方のコンストラクト、２プロモーターおよびＩＲＥＳ　ＩｇＧが、それぞれ約２５および約５０ｋＤａの予想される軽鎖および重鎖分子量で分離された。ｓｃＦｖ－Ｆｃは適切な鎖間ジスルフィド結合を形成し、タンパク質は予想される分子量約１００　ｋＤａで移動する。試料を５ｍＭのＤＴＴで還元し、５０ｋＤａの予想分子量で移動させると、単一鎖が放出される。全体的に、以前のスクリーニング実験から予想されたように、全てのクローンは、採用された細胞培養条件において低いレベルの分解を示した。

【０１６２】

２．５．ＢＬＩによるトランスフェクション－、形質導入－由来タンパク質の結合親和性の解析

ｐＡＡＶシステムを用いて生成されたタンパク質が機能的であることを実証するために、本発明者らは、上記と同じ条件でＯｃｔｅｔシステムを用いてＢＬＩによりＴＡＲ　ＤＮＡ結合タンパク質４３（ＴＤＰ－４３）Ｃ末端ペプチドに対するそれらの結合親和性を測定した。簡単に説明すると、ストレプトアビジンバイオセンサーチップを、ＴＰ－６２と呼ばれる５００ｎＭのＴＤＰ－４３　Ｃ末端ペプチドで被覆した。次に、０．１％ウシ血清アルブミンおよび０．０２％Ｔｗｅｅｎを補充したＰＢＳからなる反応緩衝液を用いて測定を行った。反応を３０℃で行った。試料は１００ｎＭ濃度から２倍連続希釈で分析

した。収集したデータを以下の表１に示す。

【０１６３】

【表１】

MAB1抗体	K_D (nM)
IgG標準	5.7
トランスフェクトされたIgG IRES pAAV	4.7
ベクター化されたIgG IRES pAAV	5.7
トランスフェクトされたIgG 2プロモーターpAAV	4.7
ベクター化されたIgG 2プロモーターpAAV	4.3
scFv-Fc標準	12.3
トランスフェクトされたscFv-Fc pAAV	4.0
ベクター化されたscFv-Fc pAAV	21.25

表１．

【０１６４】

観察。データは、ＩＲＥＳまたは２プロモーターｐＡＡＶコンストラクトからのいずれかのＩｇＧクローンが、使用される基準と同等のK_Dを有することを示す（表１）。さらに、K_Dは、約４～６ｎＭの範囲で、トランスフェクトされたかベクター化されたかのいずれかのコンストラクトタイプ間で同等であり、したがって、ベクター化により生成された高品質タンパク質が、標的ＴＤＰ－４３抗原に対する予想される結合親和性を有することを実証する。ｓｃＦｖ－Ｆｃタンパク質についても同じことが言えるが、おそらくわずかな変異がある。

【０１６５】

２．６ヒト神経芽細胞腫細胞株およびＢＢＢ細胞の形質導入ならびに細胞上清中のタンパク質力価

次の工程は、ＣＨＯ以外の細胞型に、陰性対照ＭＡＢ２　ＩｇＧ　２プロモーターＬＣ／ＨＣと同様に、ＡＡＶ２、８、９および１０ベクター化ＭＡＢ１　ＩｇＧおよびｓｃＦｖ－Ｆｃコンストラクトで効率的に形質導入することができるかどうかを検証することであった。このために、１０μＭのレチノイン酸および２％ウシ胎児血清を補充した濃縮合成培地を用いて、５％CO_2下で３７℃でニューロンに分化したヒト神経芽細胞腫細胞に形質導入した。約２００Ｋ細胞に三連で形質導入し、ウェルあたり５００μＬ培地で２４ウェルマイクロプレート中でインキュベートした。約１００Ｋゲノムコピー／細胞を加えて形質導入を行った。ベクター化ＭＡＢ１　ＩｇＧおよびｓｃＦｖ－ＦＣ力価は両方ともＥＬＩＳＡにより測定した。同様の実験が、血液脳関門微小血管で分化したｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞を用いて行われた（以下の実施例の手順を参照されたい）。ここで、血液脳関門細胞を、５０Ｋまたは１００Ｋ／ウェル、３７℃、５％CO_2で増殖させ、ＡＡＶベクター化ＭＡＢ１　ＩｇＧ　ＩＲＥＳ　ＬＣ／ＨＣコンストラクトの細胞あたり５０Ｋゲノムコピー（ｇｃ）によって形質導入した。両方の細胞型の場合も、培地を３日ごとに交換した。簡単に説明すると、９６ウェルマイクロプレートを全長ＴＤＰ－４３タンパク質で被覆し、次に１％ウシ血清アルブミンおよび０．０５％Ｔｗｅｅｎを補充したＰＢＳ緩衝液で飽和した。その後、マイクロプレートウェルに試料を添加し、１時間、３７℃でインキュベートした。同時に、対応する試料標準品を２μｇ／ｍＬ濃度で開始し、試料と同じ緩衝液（１％ウシ血清アルブミンおよび０．０５％Ｔｗｅｅｎを補充したＰＢＳ緩衝液）を用いて２倍連続希釈した。プレートを０．０５％Ｔｗｅｅｎを補充したＰＢＳ緩衝液で洗浄した。この後、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ抗体を、１％ウシ血清アルブミンおよび０．０５％Ｔｗｅｅｎを補充したＰＢＳ緩衝液中のプレートに添加し、１時間、３７℃でインキュベートした。上記のようにしてプレートを洗浄し、

西洋ワサビペルオキシダーゼ基質（ＴＭＢと呼ばれる３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン）をウェルに添加し、室温で約５～１０分間インキュベートし、０．５Ｍ H_2SO_4 を用いて反応を停止した。次に、試料をＯＤ４５０ｎｍでマイクロプレートリーダー中で個別に読み取った。収集されたデータを図１１に示し、ＭＡＢ１リードコンストラクトを用いた同じベクター化ＣＨＯ形質導入で得られた上記精製力価と比較する。

【０１６６】

観察。形質導入された市販の細胞型、ヒト神経芽細胞腫細胞株由来の分化ニューロン、および脳内皮細胞株（ｈＣＭＥＣＤ／３）はいずれも、全長ＴＤＰ－４３タンパク質に結合することができる機能的ＭＡＢ１　ＩｇＧおよびｓｃＦｖ－Ｆｃを産生した（図１１）。全体的に、抗体および誘導体は大量に経時的に産生される（分化型ヒト神経芽細胞腫細胞株については１８日目の中央のパネルを参照されたい）。それらは、約０．５～４ｐｇ／細胞／日を発現するより高い細胞密度（約１０００万／ｍＬ）で増殖したＣＨＯ細胞について報告されたものと類似して、頑強な細胞発現である約０．２～１ｐｇ抗体／細胞／日の平均を表す。これらの実験において、得られた力価は、ＡＡＶ２ベクター化ＭＡＢ１ＩｇＧおよびｓｃＦｖ－Ｆｃでより高い。さらに、ｓｃＦｖ－Ｆｃ力価は、ベクター化されたＩｇＧ対応物と比較して、各ＡＡＶ８、９および１０ベクター化においてより高い。ＩＲＥＳコンストラクトの分化ヒト神経芽細胞腫細胞株力価は、ベクター化に使用したカプシドの関数として、２プロモーターコンストラクト対応物よりも高かった。最後に、ベクター化ＭＡＢ２　ＩｇＧ　２プロモーターＬＣ／ＨＣは、ＴＤＰ－４３以外の特異的抗原と結合するその特性のために検出されなかった（中央のパネルを参照されたい）。結論として、収集されたデータは、ＩｇＧ　ＩＲＥＳコンストラクトがＬＣ／ＨＣ配置を用いて２プロモーターよりも高い発現力価に達することを示す初期の観察を確認した。

【０１６７】

表２：ベクター化抗体コンストラクトにおいて使用される核酸配列：

【表２－１】

配列の説明	核酸配列
内部リボソーム侵入部位(IRES)配列	GCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGG AATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCG TCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGA GCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTT GAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACA ACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGAC AGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAG GCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGA GTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCC CAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACA TGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGA ACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCA CAACC (配列番号 1)
マウス MAB2, プロモーター-LC-IRES-HC-WPRE	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTT CTAGACAACTTTGTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTACG GGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTAC GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGAC GTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG CGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG GGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGC ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATT GACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG AGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GCCACCATGGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGG GTGCCAGGATCTACAGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCACAAGTTC ATGAGCACCAGCGTGGGCGACAGAGTGTCCATCACATGCAAGGCCAGC CAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAT TCTCCTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTTCAGATACACCGGCGTGC CCGATAGATTCACCGGCAACAGAAGCGGCACCGACTTCACCTTCACCAT CAGCTCTGTGCAGGCCGAGGATCTGGCCGTGTACTACTGTCAGCAGCA CTACACCACACCTCCAACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAA GAGAGCTGACGCCGCTCCTACCGTGTCTATCTTCCCACCTAGCAGCGA GCAGCTGACATCTGGCGGAGCCTCTGTCGTGTGCTTCCTGAACAACTTC TACCCCAAGGACATCAACGTGAAGTGGAAGATCGACGGCAGCGAGAGA CAGAACGGCGTGCTGAACTCTTGGACCGACCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCATGAGCAGCACCCTGACACTGACCAAGGACGAGTACGAG AGACACAACAGCTACACATGCGAGGCTACCCACAAGACCAGCACAAGC CCCATCGTGAAGTCCTTCAACAGAAACGAGTGCTGAACCCAGCTTTCTT GTACAAAGTGGGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG AAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCC ACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCT GTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAA TGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTC TTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCC CCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGA TACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGAT

【表２－２】

	AGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGG CTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGG CCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTC TAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGAT GATAATATGGCCACAACCATGGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTG CTGCTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCCAGGTTCAGCTGCAGCAG TCTGGACCTGAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCTCTCTGAAGCTGAGCTGT ACCGCTTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTCAAGC AGAGGCCTGAGCAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCTACCCCACCA ACGGCTACACCAGATACGACCCCAAGTTCCAGGACAAGGCCACCATCA CAGCCGACACCAGCAGCAACACAGCCTATCTCCAGGTGTCCAGGCTGA CCAGCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCTCTAGATGGGGAGGCGACG GCTTCTACGCCATGGATTATTGGGGACAGGGCGCCAGCGTGACAGTGT CTAGTGCCAAGACAACAGCCCCTAGCGTGTACCCTCTGGCTCCTGTGT GTGGCGACACAACAGGCAGCTCTGTGACACTGGGCTGTCTGGTCAAGG GCTACTTCCCCGAACCAGTGACACTGACCTGGAACAGCGGCTCTCTGT CTAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACA CACTGTCCTCTAGCGTGACCGTGACCAGCTCTACATGGCCCAGCCAGA GCATCACCTGTAACGTGGCCCATCCTGCCAGCAGCACCAAGGTGGACA AGAAGATCGAGCCTAGAGGCCCTACCATCAAGCCCTGTCCTCCATGCA AGTGCCCCGCTCCTAATCTGCTCGGAGGCCCAAGCGTGTTCATCTTCC CACCTAAGATCAAGGACGTGCTGATGATCTCTCTGAGCCCCATCGTGAC CTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTGAGGACGACCCTGACGTGCAGATCAG TTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTGCACACAGCCCAGACACAGACCCA CAGAGAGGACTACAACAGCACCCTGAGAGTGGTGTCTGCCCTGCCTAT CCAGCACCAGGATTGGATGAGCGGCAAAGAATTCAAGTGCAAAGTGAA CAACAAGGACCTGCCTGCTCCTATCGAGAGAACCATCAGCAAGCCCAA GGGCTCTGTCAGGGCTCCTCAGGTGTACGTTCTGCCACCTCCTGAGGA AGAGATGACCAAGAAACAAGTGACCCTCACCTGTATGGTCACCGACTTC ATGCCCGAGGACATCTACGTGGAATGGACCAACAACGGCAAGACCGAG CTGAACTACAAGAACACCGAGCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTAC TTCATGTACAGCAAGCTGCGCGTCGAGAAGAAGAACTGGGTCGAGAGA AACAGCTACAGCTGCTCCGTGGTGCACGAGGGACTGCACAACCACCAC ACCACCAAGAGCTTCAGCAGAACCCCTGGCAAGTGACAACTTTATTATA CATAGTTGGAATTCCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAG ATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACG CTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATT TTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTG GCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGC AACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGG GACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCC TGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAAT TCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCC TGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTT CGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTC TGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCT CCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGGGAATTCCTAGAGCTCGCTGATC AGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCC CCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCT AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG AGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGC GACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号 2)

10

20

30

40

50

【表２－３】

マウス MAB2-2 プロモーターIgG，プロモーター1 (CMV)-LC-ポリ A-プロモーター2 (CMV)-HC-WPRE-ポリ A からなる	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTT CTAGACAACTTTGTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTACG GGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTAC GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGAC GTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG CGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG GGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGC ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATT GACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG AGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GCCACCATGGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGG GTGCCAGGATCTACAGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCACAAGTTC ATGAGCACCAGCGTGGGCGACAGAGTGTCCATCACATGCAAGGCCAGC CAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAT TCTCCTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTTCAGATACACCGGCGTGC CCGATAGATTCACCGGCAACAGAAGCGGCACCGACTTCACCTTCACCAT CAGCTCTGTGCAGGCCGAGGATCTGGCCGTGTACTACTGTCAGCAGCA CTACACCACACCTCCAACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAA GAGAGCTGACGCCGCTCCTACCGTGTCTATCTTCCCACCTAGCAGCGA GCAGCTGACATCTGGCGGAGCCTCTGTCGTGTGCTTCCTGAACAACTTC TACCCCAAGGACATCAACGTGAAGTGGAAGATCGACGGCAGCGAGAGA CAGAACGGCGTGCTGAACTCTTGGACCGACCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCATGAGCAGCACCCTGACACTGACCAAGGACGAGTACGAG AGACACAACAGCTACACATGCGAGGCTACCCACAAGACCAGCACAAGC CCCATCGTGAAGTCCTTCAACAGAAACGAGTGCTGACAGACATGATAAG ATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAAT GCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAA GCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAG GTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACA AATGTGGTATAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA GCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC TGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTA TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTG GCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTAC ATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTA CATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTC CACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGG ACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGG TAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAA CCGTCAGATCACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGCCACCATGGAGACA GATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACA GGCCAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTTAAGCCTGGC GCCTCTCTGAAGCTGAGCTGTACCGCTTCCGGCTTCAACATCAAGGACA CCTACATCCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGAGCAGGGACTCGAGTGGA TCGGCAGAATCTACCCCACCAACGGCTACACCAGATACGACCCCAAGTT CCAGGACAAGGCCACCATCACAGCCGACACCAGCAGCAACACAGCCTA TCTCCAGGTGTCCAGGCTGACCAGCGAGGACACAGCCGTGTACTACTG CTCTAGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCCATGGATTATTGGGGACA GGGCGCCAGCGTGACAGTGTCTAGTGCCAAGACAACAGCCCCTAGCGT

10

20

30

40

50

【表２－４】

	GTACCCTCTGGCTCCTGTGTGTGGCGACACAACAGGCAGCTCTGTGAC ACTGGGCTGTCTGGTCAAGGGCTACTTCCCCGAACCAGTGACACTGAC CTGGAACAGCGGCTCTCTGTCTAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGT GCTGCAGAGCGACCTGTACACACTGTCCTCTAGCGTGACCGTGACCAG CTCTACATGGCCCAGCCAGAGCATCACCTGTAACGTGGCCCATCCTGC CAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAGATCGAGCCTAGAGGCCCTACCAT CAAGCCCTGTCCTCCATGCAAGTGCCCCGCTCCTAATCTGCTCGGAGG CCCAAGCGTGTTCATCTTCCCACCTAAGATCAAGGACGTGCTGATGATC TCTCTGAGCCCCATCGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTGAGGAC GACCCTGACGTGCAGATCAGTTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTGCAC ACAGCCCAGACACAGACCCACAGAGAGGACTACAACAGCACCCTGAGA GTGGTGTCTGCCCTGCCTATCCAGCACCAGGATTGGATGAGCGGCAAA GAATTCAAGTGCAAAGTGAACAACAAGGACCTGCCTGCTCCTATCGAGA GAACCATCAGCAAGCCCAAGGGCTCTGTCAGGGCTCCTCAGGTGTACG TTCTGCCACCTCCTGAGGAAGAGATGACCAAGAAACAAGTGACCCTCAC CTGTATGGTCACCGACTTCATGCCCGAGGACATCTACGTGGAATGGAC CAACAACGGCAAGACCGAGCTGAACTACAAGAACACCGAGCCTGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTACTTCATGTACAGCAAGCTGCGCGTCGAGAA GAAGAACTGGGTCGAGAGAAACAGCTACAGCTGCTCCGTGGTGCACGA GGGACTGCACAACCACCACACCACCAAGAGCTTCAGCAGAACCCCTGG CAAGTGACAACTTTATTATACATAGTTGGAATTCCTAGAGCTCGCTGATC AGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCC CCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCT AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG AGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGG AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGC GACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号 3)
マウス MAB1, プロモーター-LC-IRES 短い-HC-WPRE	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTT CTAGACAACTTTGTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTACG GGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTAC GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGAC GTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG CGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG GGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGC ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATT GACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG AGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GCCACCATGGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGG GTGCCAGGATCTACAGGCGACGTGGTCATGACACAGACCCCTCTGACA CTGAGCGTGACCATCGGACAGCCTGCCAGCATCAGCTGCAAGAGCAGT CAGAGCCTGCTGCACAGCGACGGCAAGACCTACCTGAACTGGCTGCTG CAAAGACCCGGCCAGTCTCCTAAGAGGCTGATCTACCTGGTGTCCAAG CTGGACAGCAGAATCCCCGACAGATTCACAGGCAGCGGCTCTGGCACA GACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACCTGGGCGTG TACTACTGTTGGCAGGGCACACACTTCCCTCACACATTCGGCGCTGGCA CAAAGCTGGAACTGAAGAGAGCTGACGCCGCTCCTACCGTGTCTATCTT CCCACCTAGCAGCGAGCAGCTGACATCTGGCGGAGCCTCTGTCGTGTG

【表２－５】

	CTTCCTGAACAACTTCTACCCCAAGGACATCAACGTGAAGTGGAAGATC
	GACGGCAGCGAGAGACAGAACGGCGTGCTGAACTCTTGGACCGACCA
	GGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTGACACTGAC
	CAAGGACGAGTACGAGAGACACAACAGCTACACATGCGAGGCTACCCA
	CAAGACCAGCACAAGCCCCATCGTGAAGTCCTTCAACAGAAACGAGTG
	CTGAGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGC
	TTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATT
	GCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTT
	GACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGG
	TCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGA
	CAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCT
	GGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCT
	GCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTG
	GAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAG
	GATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGG
	TGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCC
	CCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATA
	TGGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAG
	GATCTACAGGCGAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTTA
	AGCCTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCAAGACAAGCGGCTTCACCT
	TCACCGAGTACAGCATGCACTGGGTCAAGCAGAGCCACGGCAAGAGCC
	TGGAATGGATCGGCGGCATCAACCCTAACAACGGCGGCACCAGCTACA
	ACCAGAAGTTCAAGGGCAAAGCCACACTGACCGTGGACAAGAGCAGCA
	GCACCGCCTACATGGAACTGAGAAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCC
	GTGTACTACTGTGCCAGAGAGTCTTGGGGCCAGGGCACAACCCTGACA
	GTCTCTTCTGCCAAGACAACAGCCCCTAGCGTGTACCCTCTGGCTCCTG
	TGTGTGGCGACACAACAGGCAGCTCTGTGACACTGGGCTGTCTGGTCA
	AGGGCTACTTCCCCGAACCAGTGACACTGACCTGGAACAGCGGCTCTC
	TGTCTAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGT
	ACACACTGTCCTCTAGCGTGACCGTGACCAGCTCTACATGGCCCAGCC
	AGAGGATCACCTGTAACGTGGCCCATCCTGCCAGCAGCACCAAGGTGG
	ACAAGAAGATCGAGCCTAGAGGCCCTACCATCAAGCCCTGTCCTCCAT
	GCAAGTGCCCCGCTCCTAATCTGCTCGGAGGCCCAAGCGTGTTCATCT
	TCCCACCTAAGATCAAGGACGTGCTGATGATCTCTCTGAGCCCCATCGT
	GACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTGAGGACGACCCTGACGTGCAGAT
	CAGTTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTGCACACAGCCCAGACACAGAC
	CCACAGAGAGGACTACAACAGCACCCTGAGAGTGGTGTCTGCCCTGCC
	TATCCAGCACCAGGATTGGATGAGCGGCAAAGAATTCAAGTGCAAAGTG
	AACAACAAGGACCTGCCTGCTCCTATCGAGAGAACCATCAGCAAGCCC
	AAGGGCTCTGTCAGGGCTCCTCAGGTGTACGTTCTGCCACCTCCTGAG
	GAAGAGATGACCAAGAAACAAGTGACCCTCACCTGTATGGTCACCGACT
	TCATGCCCGAGGACATCTACGTGGAATGGACCAACAACGGCAAGACCG
	AGCTGAACTACAAGAACACCGAGCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCT
	ACTTCATGTACAGCAAGCTGCGCGTCGAGAAGAAGAACTGGGTCGAGA
	GAAACAGCTACAGCTGCTCCGTGGTGCACGAGGGACTGCACAACCACC
	ACACCACCAAGAGCTTCAGCAGAACCCCTGGCAAGTGAACCCAGCTTT
	CTTGTACAAAGTGGGAATTCCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTG
	TGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTG
	GATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCT
	TTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGA
	GTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGC
	TGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCT
	TTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATC
	GCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCAC
	TGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTG
	CTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTAC
	GTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTG

【表２－６】

	CCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGT CGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGGGAATTCCTAGAGCTC GCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTG CCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGT CCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTC ATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGAT TGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTA GTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号 4)
MAB1 プロモーター-LC-IRES-HC-WPRE-ポリ A	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTT CTAGACAACTTTGTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTACG GGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTAC GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGAC GTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG CGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG GGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGC ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATT GACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG AGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GCCACCATGGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGG GTGCCAGGATCTACAGGCGACGTGGTCATGACACAGACCCCTCTGACA CTGTCCGTGACCATCGGACAGCCTGCCTCCATCTCCTGCAAGTCCTCTC AGTCCCTGCTGCACTCTGACGGCAAGACCTACCTGAACTGGCTGCTGC AGAGGCCTGGCCAGAGTCCTAAGAGACTGATCTACCTGGTGTCCAAGC TGGACTCTCGGATCCCTGACAGATTCACCGGCTCTGGCTCTGGCACCG ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACCTGGGCGTGT ACTACTGTTGGCAGGGCACCCACTTTCCACACACCTTTGGCGCTGGCA CAAAGCTGGAACTGAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTT CCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCGTGTG CCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT GGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCA GGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTC CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCA TCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTG TTGAACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCC CTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTG TCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCC CGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCC CTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGT TCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGC AGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAA GCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCA CGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGC GTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATG GGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGA GGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCC TTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGAGACAGATACAC TGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCGAGG

【表２－７】

	TTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCTCCG TGAAGATCTCCTGCAAGACCTCTGGCTTCACCTTCACCGAGTACTCCAT GCACTGGGTCAAGCAGTCCCACGGCAAGTCCCTGGAATGGATCGGCG GCATCAACCCTAACAACGGCGGCACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAGG GCAAAGCTACCCTGACCGTGGACAAGTCCTCCTCCACCGCCTACATGG AACTGCGGTCCCTGACCTCTGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCTA GAGAGTCTTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTCTCTTCTGCTTCTA CCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCT CTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTG AGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGC ACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCAGCGGCCTGTACTCTCTGTCCTC CGTCGTGACCGTGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACACAGACCTACATCTGC AATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAA CCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCA GAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGG ACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG ATGTGTCTCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACA ACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATT GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC CTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGG AACCCCAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGAAGAGATGACCAAGAA CCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACA ACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGC TGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCT CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGT CTCTGAGCCCCGGCAAGTAGCAACTTTATTATACATAGTTGGAATTCCG ATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTT AACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTT GTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATA AATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCA ACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTG GGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCC CTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGC TGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCG GGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGG ATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAG CGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGC GTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCT CCCCGCATCGGGAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCC TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTG ACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT GGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATG CTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCC CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGCTGCCTGCAGG (配列番号 5)
MAB1 - 2 プロモーター IgG，プロモーター1 (CMV)-LC-ポリ A-プロモー	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTT CTAGACAACTTTGTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTACG GGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTAC GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGAC

【表２－８】

ター2 (CMV)-HC-WPRE-ポリAからなる	GTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG CGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG GGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGC ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATT GACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG AGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GCCACCATGGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGG GTGCCAGGATCTACAGGCGACGTGGTCATGACACAGACCCCTCTGACA CTGTCCGTGACCATCGGACAGCCTGCCTCCATCTCCTGCAAGTCCTCTC AGTCCCTGCTGCACTCTGACGGCAAGACCTACCTGAACTGGCTGCTGC AGAGGCCTGGCCAGAGTCCTAAGAGACTGATCTACCTGGTGTCCAAGC TGGACTCTCGGATCCCTGACAGATTCACCGGCTCTGGCTCTGGCACCG ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACCTGGGCGTGT ACTACTGTTGGCAGGGCACCCACTTTCCACACACCTTTGGCGCTGGCA CAAAGCTGGAACTGAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTT CCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCGTGTG CCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT GGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCA GGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTC CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCA TCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTG TTGACAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTA GAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCT TTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTG CATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAA GCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATAGTTATTAATAGTAATCAATTA CGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATT GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC CATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA CGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGA CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG TGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTC ACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTT TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCC CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCACCCAGCTTTCTTGTACAAA GTGGGCCACCATGGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCT CTGGGTGCCAGGATCTACAGGCGAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACC TGAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCCTGCAAGACCTC TGGCTTCACCTTCACCGAGTACTCCATGCACTGGGTCAAGCAGTCCCAC GGCAAGTCCCTGGAATGGATCGGCGGCATCAACCCTAACAACGGCGGC ACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAAGCTACCCTGACCGTGGAC AAGTCCTCCTCCACCGCCTACATGGAACTGCGGTCCCTGACCTCTGAG GACTCCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGAGTCTTGGGGCCAGGGCACC ACACTGACAGTCTCTTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTC TGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTC TGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATC CAGCGGCCTGTACTCTCTGTCCTCCGTCGTGACCGTGCCTTCTAGCTCT CTGGGCACACAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACA CCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACA

10

20

30

40

50

【表２－９】

	CCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTT CCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCT GAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAAGTG AAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCA AGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACACCTTGCCTCCAT CTCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGA AGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCC AGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACG GCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCA GCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA TCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAGTAGCAACTT TATTATACATAGTTGGAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGT GCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCC TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGG AAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGG GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGC ATGCTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC GCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号 6)
MAB1，プロモーター-scFv-Fc-WPRE	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgac ctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggg gttccttctagacaactttgtatagaaaagttgtagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatag cccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccc cgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgg gtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccccctatt gacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttgg cagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggat agcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaa atcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtac ggtgggaggtctatataagcagagctggtttagtgaaccgtcagatccaagtttgtacaaaaaagcaggc tgccaccatggagacagatacactgctgctgtgggtgctgctcctctgggtgccaggatctacaggcgag gttcagctgcagcagtctggacctgagctggttaagcctggcgcctccgtgaagatctcctgcaagacctc tggcttcaccttcaccgagtactccatgcactgggtcaagcagtcccacggcaagtccctggaatggatc ggcggcatcaaccctaacaacggcggcacctcctacaaccagaagttcaagggcaaagctaccctga ccgtggacaagtcctcctccaccgcctacatggaactgcggtccctgacctctgaggactccgccgtgta ctactgcgctagagagtcttggggccagggcaccacactgacagtctcttctggaggcggaggatctgg cggaggtggaagtggcggaggcggatctgacgtggtcatgacacagacccctctgacactgtccgtga ccatcggacagcctgcctccatctcctgcaagtcctctcagtccctgctgcactctgacggcaagacctac ctgaactggctgctgcagaggcctggccagagtcctaagagactgatctacctggtgtccaagctggact ctcggatccctgacagattcaccggctctggctctggcaccgacttcaccctgaagatctccagagtgga agccgaggacctgggcgtgtactactgttggcagggcacccactttccacacacctttggcgctggcaca aagctggaactgaagggaggcggaggatctgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgctccaga actgctcggcggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatctctcggacccct gaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtctcacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacg gcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagaggaggaacagtacaactccacctacagagtgg tgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaaca aggccctgcctgctcctatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcctagggaaccccaggtt tacaccttgcctccatctcgggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaaggctt ctaccctccgatatcgccgtggaatgggagtctaatggccagcctgagaacaactacaagacaaccc ctcctgtgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtccagatggcag cagggcaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaatcactacacccagaagtccctgt

【表２－１０】

	ctctgagccccggcaagtagacccagctttcttgtacaaagtgggaattccgataatcaacctctggatta caaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgc ctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgagg agttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggg gcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccctccctattgccacggcggaactcat cgccgcctgccttgcccgctgctggacagggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcgg ggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgcta cgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcctcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcg tcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctcccttgggccgcctccccgcatcgggaattcctagagct cgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgacc ctggaaggtgccactcccactgtccttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtc attctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagagaatagcaggca tgctggggagggccgcaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctca ctgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagc gagcgcgcagctgcctgcagg (配列番号 7)
内部リボソーム侵入部位短い配列 (IRES 短い)	GCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGG AATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCG TCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGA GCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTT GAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACA ACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGAC AGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAG GCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGA GTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCC CAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACA TGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGA ACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAAT (配列番号 8)
MAB1 FAB プロモーター-LC-IRES-HC-WPRE-ポリ A	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctt tggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagggttcc ttctagacaactttgtatagaaaagttgtagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagccc atatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcc cattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtgg agtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacg tcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagt acatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagc ggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatc aacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtg ggaggtctatataagcagagctggtttagtgaaccgtcagatccaagtttgtacaaaaaagcaggctgcc accatggagacagatacactgctgctgtgggtgctgctcctctgggtgccaggatctacaggcgacgtggt catgacacagaccccctctgacactgtccgtgaccatcggacagcctgcctccatctcctgcaagtcctctca gtccctgctgcactctgacggcaagacctacctgaactggctgctgcagaggcctggccagagtcctaaga gactgatctacctggtgtccaagctggactctcggatccctgacagattcaccggctctggctctggcaccg acttcaccctgaagatctccagagtggaagccgaggacctgggcgtgtactactgttggcagggcacccac tttccacacacctttggcgctggcacaaagctggaactgaagcggacagtggccgctccttccgtgttcatc ttcccaccttccgacgagcagctgaagtccggcacagcttctgtcgtgtgcctgctgaacaacttctaccctc gggaagccaaggtgcagtggaaggtggacaatgccctgcagtccggcaactcccaagagtctgtgaccg agcaggactccaaggacagcacctacagcctgtcctccacactgaccctgtccaaggccgactacgagaa gcacaaggtgtacgcctgcgaagtgacccatcagggcctgtctagccctgtgaccaagtctttcaaccggg gcgagtgttgaacccagctttcttgtacaaagtgggcccctctccctcccccccccctaacgttactggccg aagccgcttggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaatg

【表２－１１】

	tgagggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctgccaaaggaa tgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaagacaaacaacgtctgta gcgaccctttgcaggcagcggaacccccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtat aagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaa atggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgcccagaaggtaccccattgtatgggatctg atctggggcctcggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaaacgtctaggccccccgaacc acggggacgtggttttccttgaaaaacacgatgataatatggccacaaccatggagacagatacactgct gctgtgggtgctgctcctctgggtgccaggatctacaggcgaggttcagctgcagcagtctggacctgagct ggttaagcctggcgcctccgtgaagatctcctgcaagacctctggcttcaccttcaccgagtactccatgca ctgggtcaagcagtcccacggcaagtccctggaatggatcggcggcatcaaccctaacaacggcggcacc tcctacaaccagaagttcaagggcaaagctaccctgaccgtggacaagtcctcctccaccgcctacatgga actgcggtccctgacctctgaggactccgccgtgtactactgcgctagagagtcttggggccagggcacca cactgacagtctcttctgcttctaccaagggacccagcgtgttccctctggctccttccagcaagtctacctct ggcggaacagctgctctgggctgcctggtcaaggactactttcctgagcctgtgaccgtgtcttggaactct ggcgctctgacatccggcgtgcacaccttccagctgtgctgcaatccagcggcctgtactctctgtcctccg tcgtgaccgtgccttctagctctctgggcacacagacctacatctgcaatgtgaaccacaagccttccaaca ccaaggtggacaagaaggtggaacccaagtcctgcggctcccaccaccatcaccatcattagcaactttat tatacatagttggaattccgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaac tatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgccttgtatcatgctattgcttcccgtatggctt tcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtg gcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttc cgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggaca ggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctc gcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggacc ttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggat ctccctttgggccgcctccccgcatcgggaattcctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagtt gccagccatctgttgtttgcccctccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttcc taataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtggggtggggca ggacagcaagggggaggattgggaagagaatagcaggcatgctggggagggccgcaggaaccctagt gatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgac gcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (配列番号 9)
MAB1 Fab - 2 プロモーターIgG，プロモーター1 (CMV)-HC-ポリ A-プロモーター2 (CMV)-LC-WPRE-ポリ A からなる	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctt tggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagggttcc ttctagacaactttgtatagaaaagttgtagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagccc atatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcc cattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtgg agtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccccctattgacg tcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagt acatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagc ggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatc aacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtg ggaggtctatataagcagagctggtttagtgaaccgtcagatccaagtttgtacaaaaaagcaggctgcc accatggagacagatacactgctgctgtgggtgctgctcctctgggtgccaggatctacaggcgaggttca gctgcagcagtctggacctgagctggttaagcctggcgcctccgtgaagatctcctgcaagacctctggctt caccttcaccgagtactccatgcactgggtcaagcagtcccacggcaagtccctggaatggatcggcggca tcaaccctaacaacggcggcacctcctacaaccagaagttcaagggcaaagctaccctgaccgtggacaa gtcctcctccaccgcctacatggaactgcggtccctgacctctgaggactccgccgtgtactactgcgctag

【表２－１２】

	agagtcttggggccagggcaccacactgacagtctcttctgcttctaccaagggacccagcgtgttccctct ggctccttccagcaagtctacctctggcggaacagctgctctgggctgcctggtcaaggactactttcctga gcctgtgaccgtgtcttggaactctggcgctctgacatccggcgtgcacacctttccagctgtgctgcaatcc agcggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgtgccttctagctctctgggcacacagacctacatctgca atgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaagaaggtggaacccaagtcctgcggctcccacc accatcaccatcattagcagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagt gaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaaca agttaacaacaacaattgcattcatttttatgtttcaggttcaggggggaggtgtgggaggttttttaaagcaa gtaaaacctctacaaatgtggtatagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatat atggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccatt gacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagt atttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtca atgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtaca tctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtt tgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacg ggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggag gtctatataagcagagctggtttagtgaaccgtcagatcacccagctttcttgtacaaagtgggccaccatg gagacagatacactgctgctgtgggtgctgctcctctgggtgccaggatctacaggcgacgtggtcatgac acagacccctctgacactgtccgtgaccatcggacagcctgcctccatctcctgcaagtcctctcagtccct gctgcactctgacggcaagacctacctgaactggctgctgcagaggcctggccagagtcctaagagactg atctacctggtgtccaagctggactctcggatccctgacagattcaccggctctggctctggcaccgacttc accctgaagatctccagagtggaagccgaggacctgggcgtgtactactgttggcagggcacccactttcc acacacctttggcgctggcacaaagctggaactgaagcggacagtggccgctccttccgtgttcatcttccc accttccgacgagcagctgaagtccggcacagcttctgtcgtgtgcctgctgaacaacttctaccctcgggа agccaaggtgcagtggaaggtggacaatgccctgcagtccggcaactcccaagagtctgtgaccgagca ggactccaaggacagcacctacagcctgtcctccacactgaccctgtccaaggccgactacgagaagcac aaggtgtacgcctgcgaagtgacccatcagggcctgtctagccctgtgaccaagtctttcaaccggggcga gtgttgacaacttttattatacatagttggaattccgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagatt gactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctatt gcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggccc gttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccacc acctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgcct tgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaagctgacgt ccttccatggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggcc ctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgcc ctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcatcgggaattcctagagctcgctgatcagcctc gactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccgtgccttccttgaccctggaaggtgcca ctcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggg gggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagagaatagcaggcatgctggggagggcc gcaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgac caaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgca gg (配列番号 10)

［実施例２］

【０１６８】

細胞培養

ヒト脳微小血管内皮ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞は、キットに含まれる全ての因子を補充したＥｎｄｏＧＲＯ－ＭＶ増殖培地（Ｍｅｒｃｋ、ＳＣＭＥ００４）中の１００μｇ／ｍＬラット尾部コラーゲンタイプＩ（０８－１１５、Ｍｅｒｃｋ）および１ｎｇ／ｍＬ　ｂＦＧＦ（Ｍｅｒｃｋ、ＧＦ００３）で予め被覆した７５ｃｍ^{2}フラスコ中で、５％CO_2を含む加湿雰囲気中、３７℃で維持された。

【０１６９】

Ｂ．Ｅｎｄ３およびｂ．Ｅｎｄ５マウス脳内皮腫細胞株は、Ｐｅｎ／ｓｔｒｅｐおよび１０％　ＦＢＳ（増殖培地）を補充したＤＭＥＭ培地中で培養された。細胞をＴＣ処理した７５ｃｍ^{2}フラスコ中で培養し、トリプシン－ＥＤＴＡ溶液で分離し、継代培養のために１：１０の比率で継代した。細胞を５％CO_2を含む加湿雰囲気中、３７℃でインキュベートした。

［実施例３］

【０１７０】

ＯｒｇａｎｏＰｌａｔｅ（登録商標）３レーンインビトロＢＢＢモデル

３ＤインビトロＢＢＢモデリングに使用されるＯｒｇａｎｏＰｌａｔｅ（登録商標）３レーンシステムは、標準的な３８４ウェルマイクロタイタープレートフォーマットに埋め込まれた４０のマイクロ流体細胞培養構造を包含する。各組織チップは、マイクロ流体培養にアクセスするための入口および出口として機能するマイクロタイタープレートの対応するウェルに接続された３つのレーンから構成される。最初に、４ｍｇ／ｍＬコラーゲン－Ｉ（ラット尾部、Ｍｅｒｃｋ）の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）ゲルを、１Ｍ　ＨＥＰＥＳ、３７ｇ／Ｌ　$NaHCO_3$、および５ｍｇ／ｍＬコラーゲン－Ｉを混合して調製し、中央レーンに導入した。位相ガイドを用いて、メニスカスピンニングにより中心レーンのＥＣＭゲルを選択的にパターン化した。ＥＣＭゲル化（３７℃、５％CO_2で一晩または週末の間）後、ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞を、頂部レーンのチップあたり４００００細胞の密度で１ｎｇ／ｍＬ　ｂＦＧＦを補充したＥｎｄｏＧＲＯ－ＭＶ増殖培地に播種した。いったん細胞を付着させると、プレートは、貯蔵器間の往復上下（ｒｅｃｉｐｒｏｃａｌ　ｌｅｖｅｌｉｎｇ）により流れを誘導するインターバルロッカー上に水平に置き、３７℃、５％CO_2で少なくとも３日間インキュベートして、尿細管の形成を可能にした。透過性アッセイによって、各形質導入またはトランスサイトーシス実験の前に制御された最適なバリア完全性を維持するために、約３日ごとに培地交換を行った。障壁機能は、チューブ内腔を通して培地中で０．５ｍｇ／ｍＬのＦＩＴＣ－デキストラン（Ｓｉｇｍａ　４６９４６、平均１５０ｋＤａ；ＦＤ２０Ｓ、平均２０ｋＤａ、およびＳｉｇｍａ　ＦＤ１０Ｓ、平均１０ｋＤａ）を用いて潅流し、次に、管腔内の蛍光に対して正規化した基底ゲル領域における蛍光レベルを決定することによって評価した。蛍光測定は、Ｉｎｃｕｃｙｔｅ生細胞リーダーを用いて、１時間の間、５分ごとに行った。

［実施例４］

【０１７１】

トランスウェルインビトロＢＢＢモデル

トランスウェルに基づくインビトロＢＢＢモデルでは、孔径０．４μｍ（０．３３ｃｍ^{2}培養面積、Ｓｉｇｍａ）のＣｏｒｎｉｎｇトランスウェル膜を含む２４ウェルプレートの頂端側を、加湿インキュベーター中でラット尾部コラーゲン－Ｉ（Ｍｅｒｃｋ）で最初に１時間被覆した。次に、ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞を、１０００００細胞／ｃｍ^{2}の密度で１ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを補充したＥｎｄｏＧＲＯ－ＭＶ増殖培地に播種した。約２～３日ごとに培地交換を行い、常に頂端体積を１００μＬおよび基底体積を６００μＬに維持した。内皮細胞播種後４日目から透過性および経内皮電気抵抗（ＴＥＥＲ）測定を行い、細胞単層が播種後１５日目まで適切なバリア特性を維持することを見出した。透過性測定のために、内皮細胞培地を基底側近コンパートメントの６００μＬの新鮮培地に置き換えた。次に、培地中の０．２５ｍｇ／ｍＬ　ＦＩＴＣ（Ｓｉｇｍａ　４６９４６、平均１５０ｋＤａ；ＦＤ２０Ｓ、平均２０ｋＤａおよびＳｉｇｍａ　ＦＤ１０Ｓ、平均１０ｋＤａ）１００μＬを上部コンパートメントに添加し、細胞を加湿インキュベーター中で１時間インキュベートした。次に、１００μＬ画分を側底コンパートメントから収集し、Ｔｅｃａｎ　Ｓｐａｒｋマイクロプレートリーダーを用いて蛍光測定のためにＧｒｅｉｎｅｒブラック９６ウェルプレートに移した。見かけの透過性は、式$P_{app}=(\Delta Q/\Delta t)\times(1/AC0)$に従って計算した。ここで、$P_{app}$は見かけの透過係数（ｃｍ／分）、ΔＱ／Δｔは内皮細胞層を横切るデキストランの透過速度（μｇ／分）、Ａは細胞層の表面積（ｃｍ^2）、Ｃ０は頂端細胞表面に適用される初期デキストラン濃度（μｇ／ｍｌ）

である。ＴＥＥＲ測定のために、内皮細胞培地を下部コンパートメントでは１０５０μＬの新鮮培地に、上部コンパートメントでは３２５μＬに置き換えた。ＥＶＯＭ－３上皮電圧計（ＷＰＩ）を用いてＴＥＥＲを測定した。

［実施例５］

【０１７２】

ｈＢＭＥＣ／ｈＢＭＥＣのＡＡＶ形質導入および標的結合による抗体検出－ＯｒｇａｎｏＰｌａｔｅ（登録商標）ＢＢＢモデルを用いたｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞による抗体分泌

確立されたＯｒｇａｎｏＰｌａｔｅ（登録商標）ｈＣＭＥＣ／Ｄ３のインビトロＢＢＢモデルを用いて、ＡＶＶ　ＷＴカプシドにおけるベクター化抗体がｈＣＭＥＣによって効率的に分泌されるかどうかを評価した。ＭＡＢ１（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ）抗体をＡＡＶ２、ＡＡＶ８；ＡＡＶ９、およびＡＡＶｒｈ１０カプシドにベクター化し、５０’０００のＭＯＩでＯｒｇａｎｏＰｌａｔｅ（登録商標）３レーンに播種後２４時間でｈＣＭＥＣ／Ｄ３単層に形質導入した。上部レーン（頂端）および下部レーン（基底）の上清を形質導入後３日目に採取し、頂端および側底コンパートメントにおける抗体濃度を、間接ＥＬＩＳＡを用いてヒト全長（ＦＬ）ＴＤＰ－４３への結合によって決定した。簡単に説明すると、１μｇ／ｍｌのヒトＦＬ　ＴＤＰ－４３によるＥＬＩＳＡプレート被覆を４℃の炭酸塩緩衝液中で行った。プレートを０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０／ＰＢＳで洗浄し、次に、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０／ＰＢＳ中の１％　ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）で３７℃で１時間ブロックし、次に、収集された抗体含有上清をプレートに添加し、３７℃で２時間インキュベートした後、プレートを洗浄した。ＡＰコンジュゲートした抗マウスＩｇＧ二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ、１１５－０５５－２０６）を０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０／ＰＢＳで１／１０００希釈したものを３７℃で添加し１時間おいた。最終洗浄後、プレートをｐＮＰＰ溶液とともにインキュベートし、プレートリーダー（ＢｉｏＴｅｋ）を用いて１時間後に４０５ｎｍで読み取った。ＭＡＢ１（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ）は、図１３に示されるように、評価され、ＴＤＰ－４３への結合を保持した全てのＷＴ　ＡＶカプシドによって形質導入されたｈＣＭＥＣ／Ｄ３単層の頂端上清において検出された。頂端コンパートメントにおけるＭＡＢ１力価は、ＡＡＶ２について約４０ｎｇ／ｍＬ、ＡＡＶ８；ＡＡＶ９；およびＡＡＶｒｈ１０血清型について約４ｎｇ／ｍＬと推定された。関連する陰性対照（ＡＡＶ２－ｅＧＦＰ）は、ＴＤＰ－４３　ＥＬＩＳＡアッセイにおいていかなるシグナルも誘導しなかった。ＡＡＶ２によって形質導入されたＭＡＢ１（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ）は、ＯｒｇａｎｏＰｌａｔｅ（登録商標）の高密度ＥＣＭ層を横切って観察された限られた拡散（データは示さない）に従って、頂端側と比較して２０分の１のレベルで基底コンパートメントにおいても検出された（図１４）。ＭＡＢ１（ヒトＩｇＧ１アイソタイプ）ＡＡＶ２コンストラクトは、図１５に示されるように、５’０００～１６０’０００の間のＭＯＩでｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞において形質導入した場合に、用量依存的に抗体力価を生成した。トランスウェルインビボＢＢＢモデルを用いて、ベクター化抗体のデリバリーをさらに検証した。ｈＣＭＥＣ／Ｄ３単層は、ＭＡＢ１　ＡＡＶ２コンストラクトを用いて２４ウェルトランスウェル挿入物に播種後２４時間に形質導入された。形質導入後３日目に、頂端側と基底側の両側から上清を採取し、先に記載したように間接ＥＬＩＳＡを用いて、ヒトＦＬ　ＴＤＰ－４３に結合することにより、頂端側および基底側のコンパートメントにおける抗体濃度を決定した。この予備的評価は、図１６に示されるように、頂端側と基底側の両側への抗体の比較的均一な分泌、したがって、ベクター化ＭＡＢ１抗体の非分極分泌を示唆した。

［実施例６］

【０１７３】

マウスおよびヒト脳微小血管内皮細胞株による抗体分泌

不死化ｈＣＭＥＣ／Ｄ３、ｂ．Ｅｎｄ３およびｂ．Ｅｎｄ５細胞株を用いて、脳内皮細胞が高品質の抗体を産生できるかどうかを評価した。ＡＡＶ２、ＡＡＶ－ＢＲ１、およびＡＡＶｒｈ１０などの異なるＡＡＶベクターは、ヒトおよびマウス細胞株にＭＡＢ１抗体導入遺伝子をデリバリーする能力について評価された。全ての抗体（ｈＩｇＧ１およびｓ

ｃＦｖ－Ｆｃなど）の発現は、ＣＭＶプロモーターによって駆動され；ＩＲＥＳエレメントは、二シストロン性抗体産生を達成するために、ｈＩｇＧ１のＬＣおよびＨＣをコードする遺伝子の間で使用された。細胞を９６ウェル培養プレート中で１００’０００細胞／ｃｍ^{2}で播種した。次に、内皮細胞株に、増殖培地中で１００’０００のＭＯＩで播種後４時間から１６時間に形質導入した。細胞を３７℃で一晩インキュベートし、５％CO_2および培地を翌日に交換してＡＡＶ粒子を除去した。形質導入後７日後に細胞培養上清を採取し、製造者の指示に従ってｈＦｃキット（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、Ｃｉｓｂｉｏ、６２ＨＦＣＰＥＨ）を用いてホモジニアス時間分解蛍光（ＨＴＲＦ）により分泌抗体力価を測定した。この定量法により、分泌抗体および正しく折り畳まれた抗体の検出が可能となった。精製された組換えＭＡＢ１　ｈＩｇＧ１を、培養培地中の抗体定量の標準として使用した。蛍光シグナルは、Ｔｅｃａｎ　Ｓｐａｒｋ（登録商標）マイクロプレートリーダー（Ｅｍ：３１７ｎｍ；Ｅｘ：６２０ｎｍおよび６６５ｎｍ；７５回の閃光；４００μｓの積分時間；１００μｓの遅延時間）を用いて読み取った。内挿した分泌抗体力価を図１７に示す。ＡＡＶ２によってデリバリーされたＭＡＢ１　ｈＩｇＧ１を、（Ａ）ｂ．Ｅｎｄ３およびｂ．Ｅｎｄ５マウス内皮腫細胞株上清中２０ｎｇ／ｍＬ、および（Ｂ）ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞上清中２００ｎｇ／ｍＬで定量した。ｂ．Ｅｎｄ３／ｂ．Ｅｎｄ５およびｈＣＭＥＣ／Ｄ３について、それぞれＭＡＢ１　ｓｃＦｖ－Ｆｃコンストラクトを生成し、上清中で５０／１００ｎｇ／ｍＬおよび２５００ｎｇ／ｍＬで定量した。３つの細胞株全てにおいて、ＡＡＶｒｈ１０およびＡＡＶ－ＢＲ１血清型により、１０ｎｇ／ｍＬ未満のＭＡＢ１　ｈＩｇＧ１が得られた。得られた抗体レベルは、脳内皮細胞が、使用されるＡＡＶカプシドまたは抗体のフォーマットとは独立して、正しく折り畳まれた抗体を産生することを示す。発現力価は評価した条件に依存し、ヒトｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞株では、両マウス細胞株と比較して高い力価が観察された（図１７ＡおよびＢ）。また、ＭＡＢ１　ｓｃＦｖ－Ｆｃについては、ＡＡＶ２によってデリバリーされた場合、ＭＡＢ１　ＩｇＧ１対応物全体と比較して、常に高い抗体力価が観察された。この実験において、ＡＡＶ２は、ＡＡＶ－ＢＲ１と比較して、導入遺伝子をデリバリーするのにより強力であった。

［実施例７］

【０１７４】

３ＤヒトＢＢＢモデルにおけるヒト初代脳微小血管内皮細胞による抗体分泌

ＢＢＢ細胞による抗体産生は、Ｎｅｕｒｏｍｉｃｓ（３Ｄ４５００２）から購入したヒト初代脳内皮微小血管系細胞、星状細胞および周皮細胞で構成される市販のＴｒａｎｓｗｅｌｌに基づくモデルを用いて評価された。モデルは製造業者の指示に従って培養された。簡単に説明すると、２４ウェルプレートを０日目に解凍し、凍結培地を温増殖培地（培地１）に置き換えた。加湿インキュベーター中で３時間インキュベートした後、培地１を除去し、第２のメンテナンス培地（培地２）に置き換えた。さらなる培地交換は行わず、細胞を解凍後１１日目まで培養に維持した。ＡＡＶ２およびＡＡＶ－ＢＲ１ベクターは、ＭＡＢ１抗体導入遺伝子のヒト（ｈＩｇＧ１）およびマウス（ｍＩｇＧ２ａ）バージョンをデリバリーするために評価された。抗体の発現は、ＣＭＶまたはＣＢｈプロモーターのいずれかによって駆動され；ＩＲＥＳエレメントは、二シストロン性抗体産生を達成するためにＬＣとＨＣの間で使用された。細胞培養インサートに存在する内皮細胞は、解凍後４日目に、ＡＡＶコンストラクトで前述したように、増殖培地中で１００’０００のＭＯＩで形質導入された。形質導入後７日後に頂端コンパートメントと基底コンパートメントの上清を採取し、ヒトＦｃおよびマウスＦｃキット（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ　Ｃｉｓｂｉｏ、６２ＨＦＣＰＥＨおよび６ＦＭＩＧＰＥＨ）を用いてＨＴＲＦにより、製造者の指示に従って、分泌抗体力価を測定した。ｈＩｇＧ１またはｍＩｇＧ２ａフォーマットとしての精製された組換えＭＡＢ１を、それぞれ抗体定量の標準として使用し、モデルの維持に使用したのと同じ培地で滴定した。蛍光シグナルは、Ｔｅｃａｎ　Ｓｐａｒｋ（登録商標）マイクロプレートリーダー（Ｅｍ：３１７ｎｍ；Ｅｘ：６２０ｎｍおよび６６５ｎｍ；７５回の閃光；４００μｓの積分時間；１００μｓの遅延時間）を用いて読み取った。

内挿した分泌抗体力価を図１８に示す。同様のＭＡＢ１　ｈＩｇＧ１力価がＡＡＶ２およびＡＡＶ－ＢＲ１血清型について得られ、頂端コンパートメント（細胞培養インサート）で約５０ｎｇ／ｍＬ、基底側で１０～２０ｎｇ／ｍＬであった。ＣＭＶまたはＣＢｈプロモーターのいずれかで発現されたＭＡＢ１　ｍＩｇＧ２ａアイソタイプのＡＡＶ－ＢＲ１デリバリーは、ｈＩｇＧ１対応物と比較して２分の１～３分の１の力価を示した。初代ヒト脳微小血管内皮細胞からのデータと比較した場合、ｈＣＭＥＣ／Ｄ３細胞株（図１７Ａ、ＭＡＢ１　ｈＩｇＧ１発現は検出されない）において、ＡＡＶ－ＢＲ１で指向性の差が観察された（図１８ＡおよびＢ）。インビトロ細胞株データはインビボ効果を予測するが、初代細胞データはインビボでのＡＡＶ指向性の好ましい予測因子である。図１８Ｂは、各ＡＡＶベクターについて頂端コンパートメント（２００μＬ）および基底コンパートメント（５００μＬ）において決定された抗体の相対量を示す。抗体の再分配は、内皮細胞層からの抗体の両側性分泌を示唆する。

【０１７５】

要約すると、得られた抗体力価は、初代脳内皮細胞が、使用されるＡＡＶカプシドとは独立して、また抗体のフォーマットに無関係に、正しく折り畳まれた抗体を産生することを示した。重要なこととして、抗体は、脳実質を模倣する後者の観察である、頂端側と基底側の両方で検出された。生成されたデータにより、本明細書に記載された革新的な方法が検証され、この新規なデリバリー戦略によって高品質のＩｇＧ力価が達成されたことが確認される。

【０１７６】

本明細書の説明および特許請求の範囲を通して、用語「含む」および「含有する」、ならびにそれらの変形は、「限定されないが、含む」を意味し、それらは、他の部分、添加剤、成分、整数または工程を除外することを意図しない（および除外しない）。

【０１７７】

本明細書の記載および特許請求の範囲を通して、文脈上他に要求されない限り、単数形は複数形を包含する。特に、不定物品が使用される場合、文脈上他に要求されない限り、本明細書は、複数および単数を意図するものとして理解されるべきである。

【０１７８】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に具体的に言及されている全ての刊行物および特許は、本発明に関連する全ての目的のために、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【０１７９】

本発明は、本明細書に記載される特定の実施形態によって範囲が限定されるものではない。実際、本明細書に記載されるものに加えて、本発明の種々の修飾は、上述の説明および付随する図面から当業者に明らかになる。このような修飾は、添付の特許請求の範囲内に含まれることを意図している。さらに、本明細書に記載される本発明の全ての態様および実施形態は、幅広く適用可能であり、適宜、本発明の他の態様（単独を含む）から採取されるものを含め、任意のおよび全ての他の一貫した実施形態と組み合わせることができると考えられる。

【０１８０】

参考文献：

【表３】

1. Villabona-Rueda, A., et al., *The Evolving Concept of the Blood Brain Barrier (BBB): From a Single Static Barrier to a Heterogeneous and Dynamic Relay Center.* Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 405.
2. Daneman, R. and A. Prat, *The blood-brain barrier.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(1): p. a020412.
3. Pachter, J.S., H.E. de Vries, and Z. Fabry, *The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system.* J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(6): p. 593-604.
4. Sweeney, M.D., et al., *The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders.* Nat Neurosci, 2018. **21**(10): p. 1318-1331.
5. St-Amour, I., et al., *Brain bioavailability of human intravenous immunoglobulin and its transport through the murine blood-brain barrier.* J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(12): p. 1983-92.
6. Pardridge, W.M., *Blood-Brain Barrier and Delivery of Protein and Gene Therapeutics to Brain.* Front Aging Neurosci, 2019. **11**: p. 373.
7. Thom, G., et al., *Isolation of blood-brain barrier-crossing antibodies from a phage display library by competitive elution and their ability to penetrate the central nervous system.* MAbs, 2018. **10**(2): p. 304-314.
8. Zhang, W., et al., *Differential expression of receptors mediating receptor-mediated transcytosis (RMT) in brain microvessels, brain parenchyma and peripheral tissues of the mouse and the human.* Fluids Barriers CNS, 2020. **17**(1): p. 47.
9. Gao, H., *Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery.* Acta Pharm Sin B, 2016. **6**(4): p. 268-86.
10. Teleanu, D.M., et al., *Blood-Brain Delivery Methods Using Nanotechnology.* Pharmaceutics, 2018. **10**(4).
11. Chen, H., et al., *Focused ultrasound-enhanced intranasal brain delivery of brain-derived neurotrophic factor.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 28599.
12. Ahmad, E., et al., *Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: cargoes but not vehicles.* Nanoscale, 2017. **9**(3): p. 1174-1183.
13. Henchcliffe, C. and M. Parmar, *Repairing the Brain: Cell Replacement Using Stem Cell-Based Technologies.* J Parkinsons Dis, 2018. **8**(s1): p. S131-S137.
14. Heller, L., et al., *Secretion of proteins and antibody fragments from transiently transfected endothelial progenitor cells.* Journal of cellular and molecular medicine, 2020. **24**(15): p. 8772-8778.
15. Desai, N., *Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics.* AAPS J, 2012. **14**(2): p. 282-95.
16. Kariolis, M.S., et al., *Brain delivery of therapeutic proteins using an Fc fragment blood-brain barrier transport vehicle in mice and monkeys.* Sci Transl Med, 2020. **12**(545).
17. Ullman, J.C., et al., *Brain delivery and activity of a lysosomal enzyme using a blood-brain barrier transport vehicle in mice.* Sci Transl Med, 2020. **12**(545).
18. Pothin, E., D. Lesuisse, and P. Lafaye, *Brain Delivery of Single-Domain Antibodies: A Focus on VHH and VNAR.* Pharmaceutics, 2020. **12**(10).

【表４】

19. Guo, X.-b., X. Deng, and Y. Wei, *Homing of Cultured Endothelial Progenitor Cells and Their Effect on Traumatic Brain Injury in Rat Model.* Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 4164.
20. Guzman, R., M. Janowski, and P. Walczak, *Intra-Arterial Delivery of Cell Therapies for Stroke.* Stroke, 2018. **49**(5): p. 1075-1082.
21. Tervo, D.G., et al., *A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons.* Neuron, 2016. **92**(2): p. 372-382.
22. Olanow, C.W., et al., *Trophic factors for Parkinson's disease: To live or let die.* Mov Disord, 2015. **30**(13): p. 1715-24.
23. Tuszynski, M.H., et al., *Nerve Growth Factor Gene Therapy: Activation of Neuronal Responses in Alzheimer Disease.* JAMA Neurol, 2015. **72**(10): p. 1139-47.
24. Merkel, S.F., et al., *Trafficking of adeno-associated virus vectors across a model of the blood-brain barrier; a comparative study of transcytosis and transduction using primary human brain endothelial cells.* J Neurochem, 2017. **140**(2): p. 216-230.
25. Foust, K.D., et al., *Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes.* Nat Biotechnol, 2009. **27**(1): p. 59-65.
26. Hanlon, K.S., et al., *Selection of an Efficient AAV Vector for Robust CNS Transgene Expression.* Mol Ther Methods Clin Dev, 2019. **15**: p. 320-332.
27. Mathiesen, S.N., et al., *CNS Transduction Benefits of AAV-PHP.eB over AAV9 Are Dependent on Administration Route and Mouse Strain.* Mol Ther Methods Clin Dev, 2020. **19**: p. 447-458.
28. Huang, Q., et al., *Delivering genes across the blood-brain barrier: LY6A, a novel cellular receptor for AAV-PHP.B capsids.* PLoS One, 2019. **14**(11): p. e0225206.
29. Chan, K.Y., et al., *Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems.* Nat Neurosci, 2017. **20**(8): p. 1172-1179.
30. Korbelin, J., et al., *A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases.* EMBO Mol Med, 2016. **8**(6): p. 609-25.
31. Ravindra Kumar, S., et al., *Multiplexed Cre-dependent selection yields systemic AAVs for targeting distinct brain cell types.* Nat Methods, 2020. **17**(5): p. 541-550.
32. Elmer, B.M., et al., *Gene delivery of a modified antibody to Aβ reduces progression of murine Alzheimer's disease.* PLoS One, 2019. **14**(12): p. e0226245.
33. Sudol, K.L., et al., *Generating differentially targeted amyloid-beta specific intrabodies as a passive vaccination strategy for Alzheimer's disease.* Mol Ther, 2009. **17**(12): p. 2031-40.
34. Ryan, D.A., et al., *Abeta-directed single-chain antibody delivery via a serotype-1 AAV vector improves learning behavior and pathology in Alzheimer's disease mice.* Mol Ther, 2010. **18**(8): p. 1471-81.
35. Levites, Y., et al., *Intracranial adeno-associated virus-mediated delivery of anti-pan amyloid beta, amyloid beta40, and amyloid beta42 single-chain variable fragments attenuates plaque pathology in amyloid precursor protein mice.* J Neurosci, 2006. **26**(46): p. 11923-8.
36. Kou, J., et al., *Anti-Amyloid-β Single-Chain Antibody Brain Delivery Via AAV Reduces Amyloid Load But May Increase Cerebral Hemorrhages in an Alzheimer's Disease Mouse Model.* J Alzheimers Dis, 2011. **27**(1): p. 23-38.
37. Liu, W., et al., *Vectored Intracerebral Immunization with the Anti-Tau Monoclonal Antibody PHF1 Markedly Reduces Tau Pathology in Mutant Tau Transgenic Mice.* J Neurosci, 2016. **36**(49): p. 12425-12435.
38. Vitale, F., et al., *Intramuscular injection of vectorized-scFvMC1 reduces pathological tau in two different tau transgenic models.* Acta Neuropathol Commun, 2020. **8**(1): p. 126.
39. Vitale, F., et al., *Anti-tau conformational scFv MC1 antibody efficiently reduces pathological tau species in adult JNPL3 mice.* Acta Neuropathol Commun, 2018. **6**(1): p. 82.

【表５】

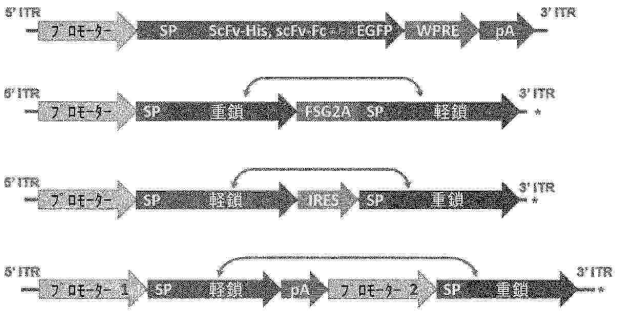
40. Bell, R.D. and M.D. Ehlers, *Breaching the blood-brain barrier for drug delivery.* Neuron, 2014. **81**(1): p. 1-3.
41. Sacramento, C.B., et al., *Anti-Phospho-Tau Gene Therapy for Chronic Traumatic Encephalopathy.* Hum Gene Ther, 2020. **31**(1-2): p. 57-69.
42. Goodwin, M.S., et al., *Utilizing minimally purified secreted rAAV for rapid and cost-effective manipulation of gene expression in the CNS.* Mol Neurodegener, 2020. **15**(1): p. 15.
43. Goodwin, M.S., et al., *Anti-tau scFvs Targeted to the Cytoplasm or Secretory Pathway Variably Modify Pathology and Neurodegenerative Phenotypes.* Mol Ther, 2020.
44. Pozzi, S., et al., *Virus-mediated delivery of antibody targeting TAR DNA-binding protein-43 mitigates associated neuropathology.* J Clin Invest, 2019. **129**(4): p. 1581-1595.
45. Saunders, K.O., et al., *Broadly Neutralizing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody Gene Transfer Protects Nonhuman Primates from Mucosal Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection.* J Virol, 2015. **89**(16): p. 8334-45.
46. Ho, S.C., et al., *IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines.* J Biotechnol, 2012. **157**(1): p. 130-9.
47. Liu, Z., et al., *Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2193.
48. Yang, S., et al., *Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition.* Gene Ther, 2008. **15**(21): p. 1411-23.
49. Sharma, P., et al., *2A peptides provide distinct solutions to driving stop-carry on translational recoding.* Nucleic Acids Res, 2012. **40**(7): p. 3143-51.
50. Zhang, Y. and W.M. Pardridge, *Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood-brain barrier.* J Neuroimmunol, 2001. **114**(1-2): p. 168-72.
51. Boado, R.J., et al., *Fusion antibody for Alzheimer's disease with bidirectional transport across the blood-brain barrier and abeta fibril disaggregation.* Bioconjug Chem, 2007. **18**(2): p. 447-55.
52. Deane, R., et al., *IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor.* J Neurosci, 2005. **25**(50): p. 11495-503.
53. Albright, B.H., et al., *Mapping the Structural Determinants Required for AAVrh.10 Transport across the Blood-Brain Barrier.* Mol Ther, 2018. **26**(2): p. 510-523.
54. Albright, B.H., et al., *Modulation of Sialic Acid Dependence Influences the Central Nervous System Transduction Profile of Adeno-associated Viruses.* J Virol, 2019. **93**(11).
55. Fukuchi, K., et al., *Anti-Abeta single-chain antibody delivery via adeno-associated virus for treatment of Alzheimer's disease.* Neurobiol Dis, 2006. **23**(3): p. 502-11.
56. Elmer, B.M., et al., *Gene delivery of a modified antibody to Abeta reduces progression of murine Alzheimer's disease.* PLoS One, 2019. **14**(12): p. e0226245.
57. Hay, C.E., et al., 2019.
58. Johnson, P.R., et al., *Vector-mediated gene transfer engenders long-lived neutralizing activity and protection against SIV infection in monkeys.* Nat Med, 2009. **15**(8): p. 901-6.
59. Fuchs, S.P. and R.C. Desrosiers, *Promise and problems associated with the use of recombinant AAV for the delivery of anti-HIV antibodies.* Mol Ther Methods Clin Dev, 2016. **3**: p. 16068.
60. Fuchs, S.P., et al., *AAV-Delivered Antibody Mediates Significant Protective Effects against SIVmac239 Challenge in the Absence of Neutralizing Activity.* PLoS Pathog, 2015. **11**(8): p. e1005090.
61. Martinez-Navio, J.M., et al., *Long-Term Delivery of an Anti-SIV Monoclonal Antibody With AAV.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 449.
62. Martinez-Navio, J.M., et al., *Adeno-Associated Virus Delivery of Anti-HIV Monoclonal Antibodies Can Drive Long-Term Virologic Suppression.* Immunity, 2019. **50**(3): p. 567-575 e5.

【表６】

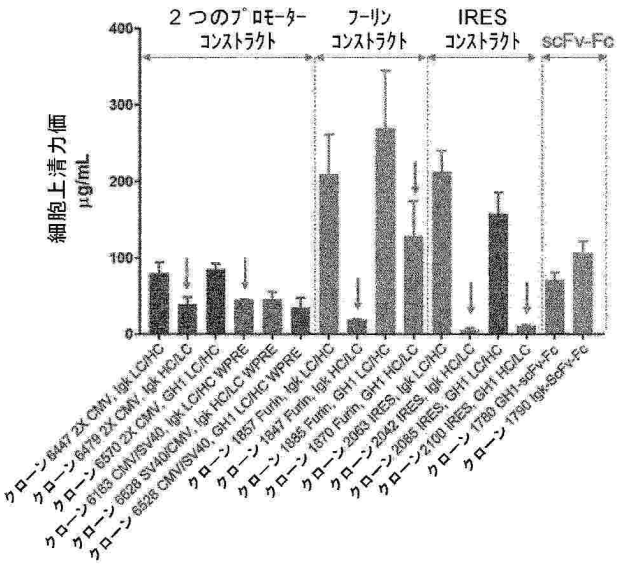
63. Thomas, G., *Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(10): p. 753-66.
64. Chng, J., et al., *Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells.* MAbs, 2015. **7**(2): p. 403-12.
65. Kim, J.H., et al., *High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice.* PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18556.
66. Velychko, S., et al., *Fusion of Reprogramming Factors Alters the Trajectory of Somatic Lineage Conversion.* Cell Rep, 2019. **27**(1): p. 30-39 e4.
67. Fang, J., et al., *Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide.* Nat Biotechnol, 2005. **23**(5): p. 584-90.
68. Mizuguchi, H., et al., *IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector.* Mol Ther, 2000. **1**(4): p. 376-82.
69. Fuchs, S.P., et al., *Recombinant AAV Vectors for Enhanced Expression of Authentic IgG.* PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0158009.

【図面】

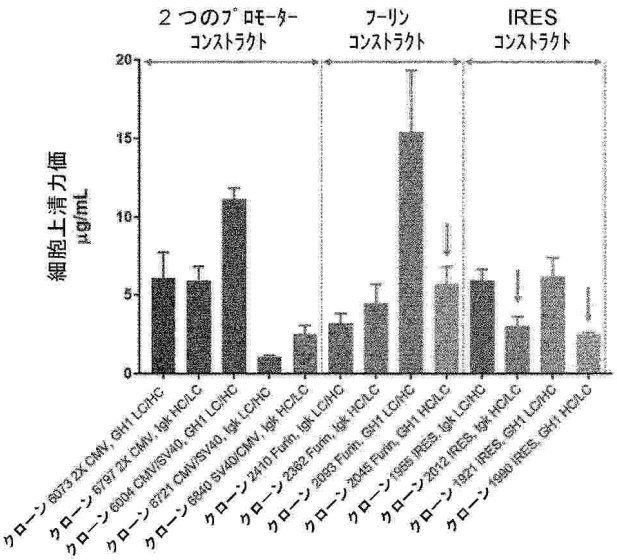
【図１】



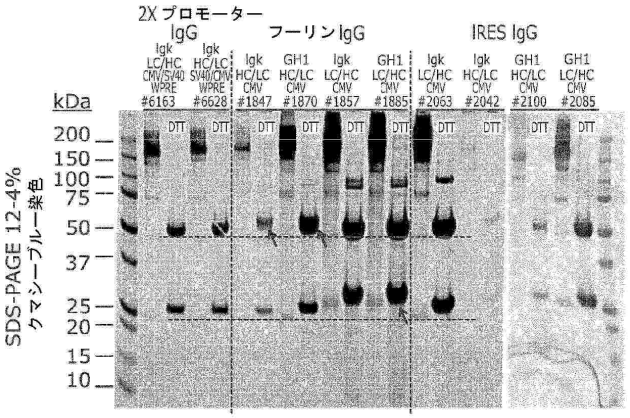
【図２Ａ】



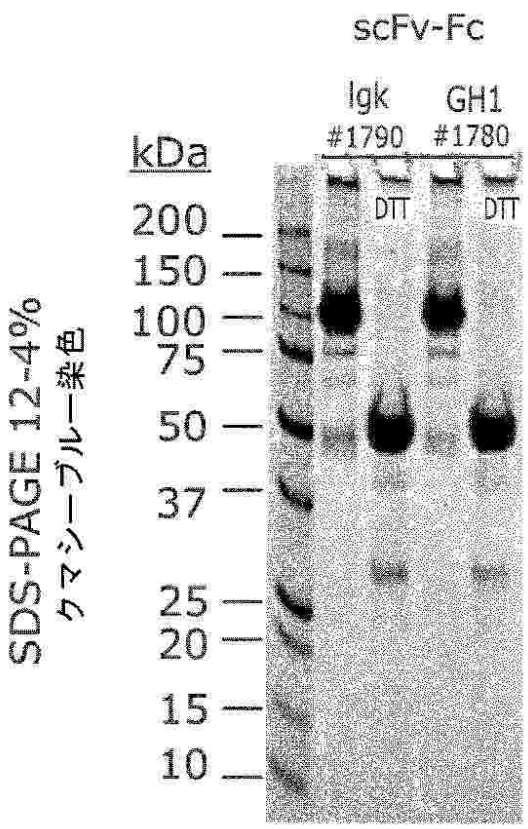
【図２Ｂ】


２つのプロモーター コンストラクト
フーリン コンストラクト
IRES コンストラクト
細胞上清力価 μg/mL
20
15
10
5
0
クローン 6073 2X CMV, GH1 LC/HC
クローン 6797 2X CMV, Igk HC/LC
クローン 6004 CMV/SV40, GH1 LC/HC
クローン 6721 CMV/SV40, Igk HC/LC
クローン 6940 SV40/CMV, Igk HC/LC
クローン 2410 Furin, Igk HC/LC
クローン 2382 Furin, Igk LC/HC
クローン 2093 Furin, Igk HC/LC
クローン 2045 Furin, GH1 LC/HC
クローン 1955 IRES, Igk HC/LC
クローン 2012 IRES, Igk LC/HC
クローン 1921 IRES, GH1 LC/HC
クローン 1990 IRES, GH1 HC/LC

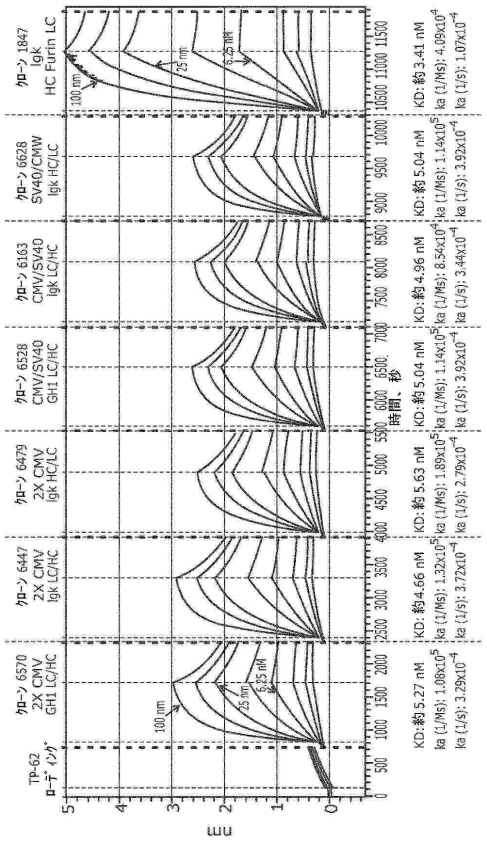
【図３】


2X プロモーター
IgG
フーリン IgG
IRES IgG
Igk LC/HC CMV/SV40 WPRE #6163
Igk HC/LC SV40/CMV WPRE #6628
Igk HC/LC CMV #1847
GH1 HC/LC CMV #1870
Igk LC/HC CMV #1857
GH1 LC/HC CMV #1885
Igk LC/HC CMV #2063
Igk HC/LC CMV #2042
GH1 HC/LC CMV #2100
GH1 LC/HC CMV #2085
DTT
kDa
200
150
100
75
50
37
25
20
15
10
SDS-PAGE 12-4% クマシーブルー染色

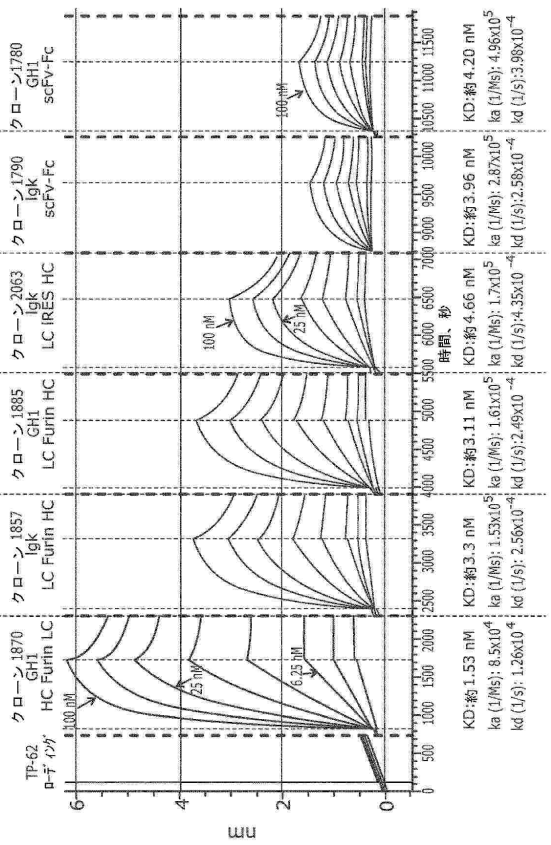
【図４】


scFv-Fc
Igk
GH1
#1790
#1780
DTT
kDa
200
150
100
75
50
37
25
20
15
10
SDS-PAGE 12-4% クマシーブルー染色

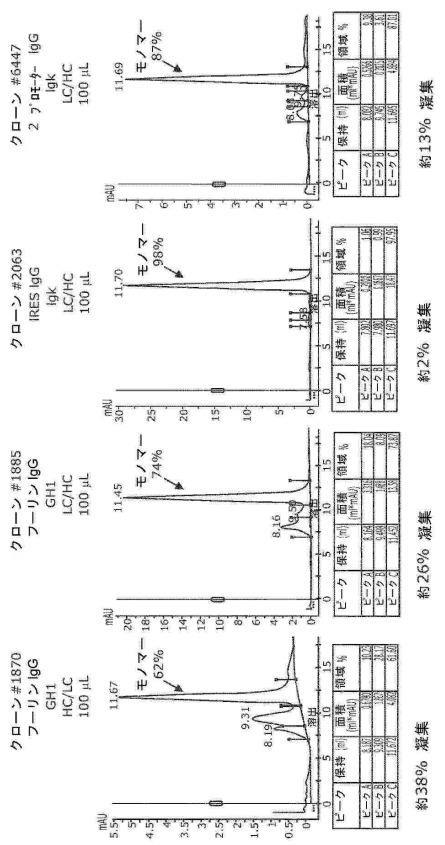
【図５－１】


クローン 1847 Igk HC Furin LC
クローン 6628 SV40/CMV Igk HC/LC
クローン 6163 CMV/SV40 Igk LC/HC
クローン 6528 CMV/SV40 GH1 LC/HC
クローン 6479 2X CMV Igk HC/LC
クローン 6447 2X CMV Igk LC/HC
クローン 6570 2X CMV GH1 LC/HC
TP-62 ローディング
100 nM
25 nM
6.25 nM
KD: 約 3.41 nM
KD: 約 5.04 nM
KD: 約 4.96 nM
KD: 約 5.04 nM
KD: 約 5.63 nM
KD: 約 4.66 nM
KD: 約 5.27 nM
時間、秒
nm

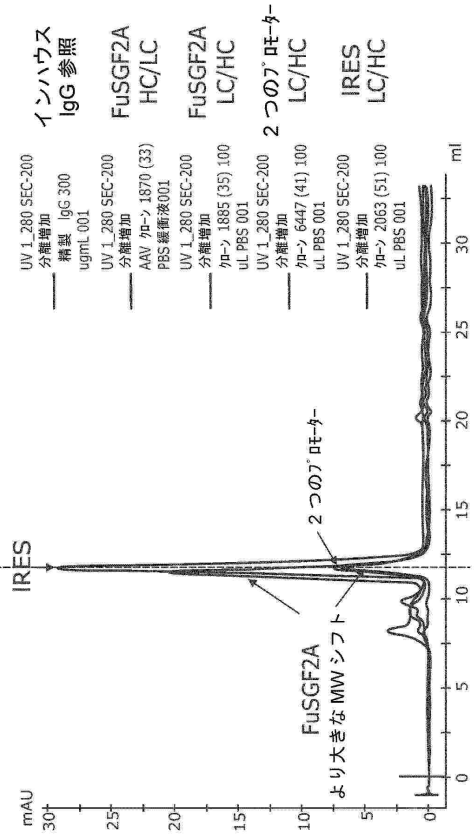
【図５－２】


TP-62
ローディング
クローン1870
GH1
HC Furin LC
KD:約1.53 nM
ka (1/Ms): 8.5x10^4
kd (1/s): 1.26x10^-4
クローン1857
IgK
LC Furin HC
KD:約3.3 nM
ka (1/Ms): 1.53x10^5
kd (1/s): 2.56x10^-4
クローン1885
GH1
LC Furin HC
KD:約3.11 nM
ka (1/Ms): 1.61x10^5
kd (1/s):2.49x10^-4
クローン2063
IgK
LC IRES HC
KD:約4.66 nM
ka (1/Ms): 1.7x10^5
kd (1/s):4.35x10^-4
クローン1790
IgK
scFv-Fc
KD:約3.96 nM
ka (1/Ms): 2.87x10^5
kd (1/s):2.58x10^-4
クローン1780
GH1
scFv-Fc
KD:約4.20 nM
ka (1/Ms): 4.96x10^5
kd (1/s):3.98x10^-4
100 nM
25 nM
6.25 nM
RU
時間、秒

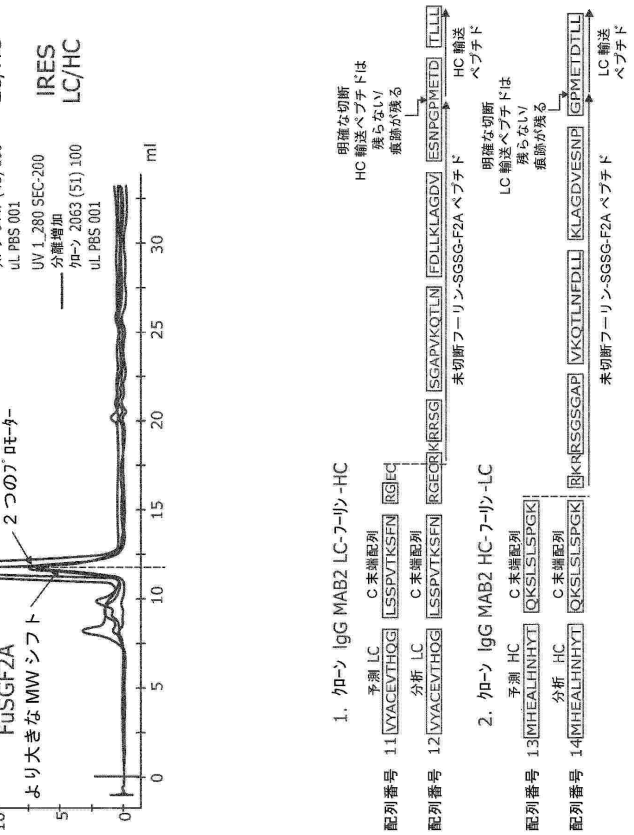
【図６】


クローン#1870
ファーリンIgG
GH1
HC/LC
100 μL
モノマー
62%
約38% 凝集
クローン#1885
ファーリンIgG
GH1
LC/HC
100 μL
モノマー
74%
約26% 凝集
クローン#2063
IRES IgG
IgK
LC/HC
100 μL
モノマー
98%
約2% 凝集
クローン#6447
2プロモーター IgG
IgK
LC/HC
100 μL
モノマー
87%
約13% 凝集
mAU
分

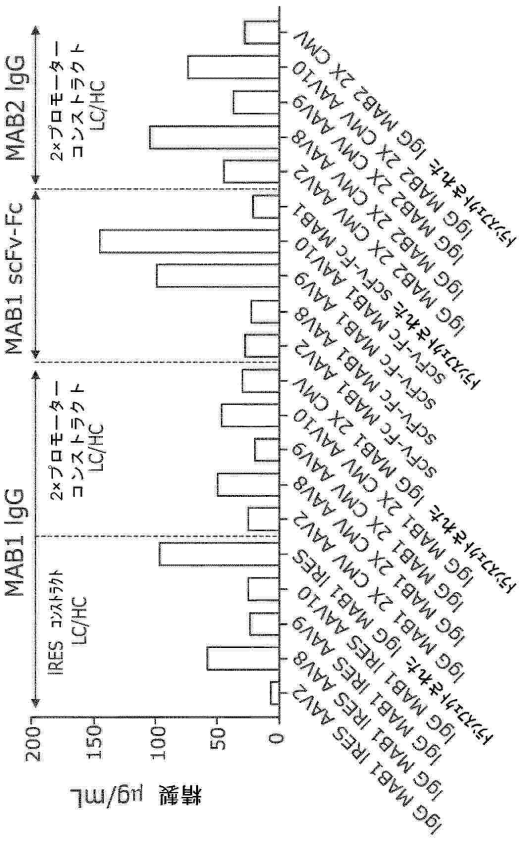
【図７】


IRES
2つのプロモーター
FuSGF2A
より大きなMWシフト
mAU
ml
UV 1_280 SEC-200
分離増加
精製 IgG 300
ugmL 001
インハウス
IgG 参照
AAV クローン 1870 (33)
PBS 緩衝液001
FuSGF2A
HC/LC
クローン 1885 (35) 100
uL PBS 001
FuSGF2A
LC/HC
クローン 6447 (41) 100
uL PBS 001
2つのプロモーター
LC/HC
クローン 2063 (51) 100
uL PBS 001
IRES
LC/HC

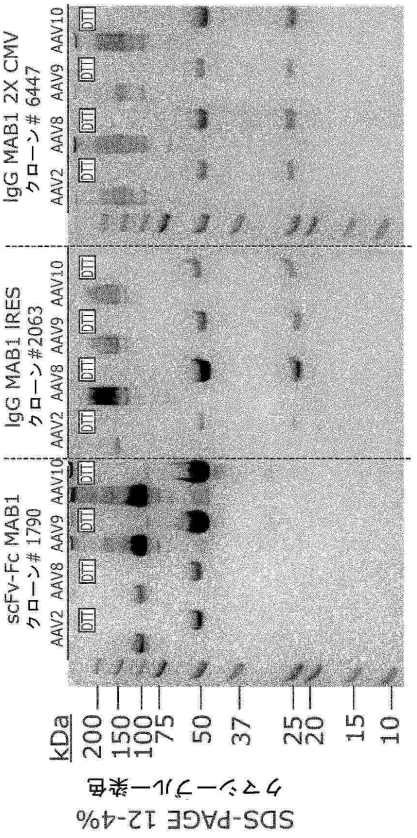
【図８】


1. クローン IgG MAB2 LC-ファージ-HC
予測 LC
配列番号 11 VYACEVTHQG
分析 LC
配列番号 12 VYACEVTHQG
C末端配列
LSSPVTKSFN
RGEC
RGEQRKRRSG
SGAPVKQTLN
FDLLKLAGDV
ESNPGPMETD
TLLL
明確な切断
HC 輸送ペプチドは
残らないV
痕跡が残る
HC 輸送
ペプチド
未切断ファージ-SGSG-F2A ペプチド
2. クローン IgG MAB2 HC-ファージ-LC
予測 HC
配列番号 13 MHEALHNHYT
分析 HC
配列番号 14 MHEALHNHYT
C末端配列
QKSLSLSPGK
RKNRSGSGAP
VKQTLNFDLL
KLAGDVESNP
GPMETDTLL
明確な切断
LC 輸送ペプチドは
残らないV
痕跡が残る
LC 輸送
ペプチド
未切断ファージ-SGSG-F2A ペプチド

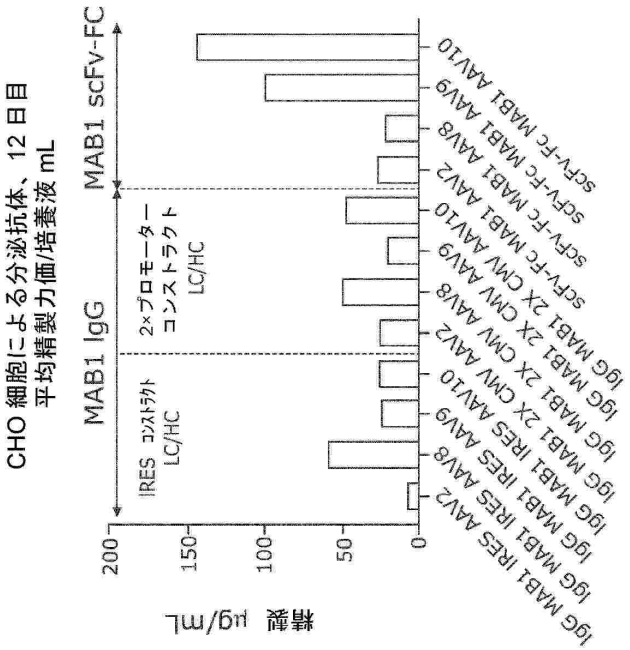
【図９】



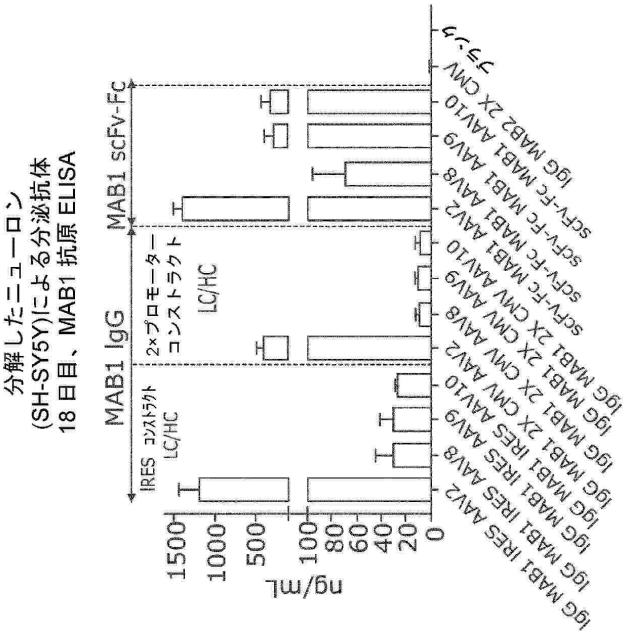
【図１０】



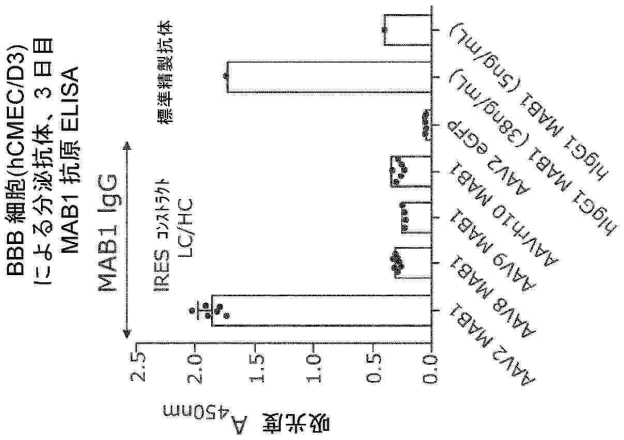
【図１１－１】



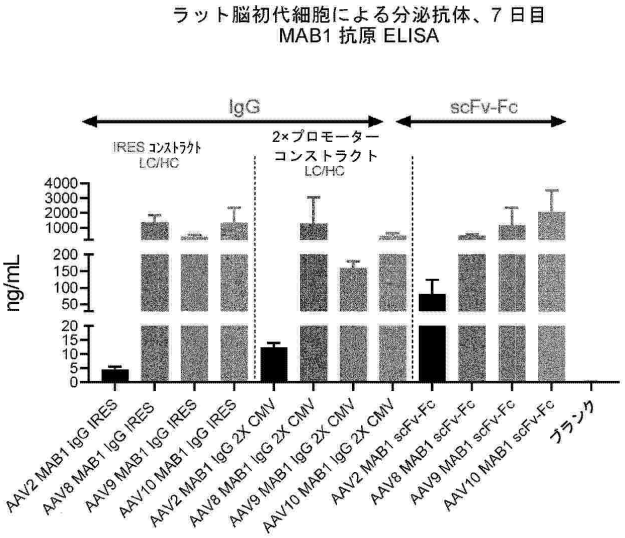
【図１１－２】



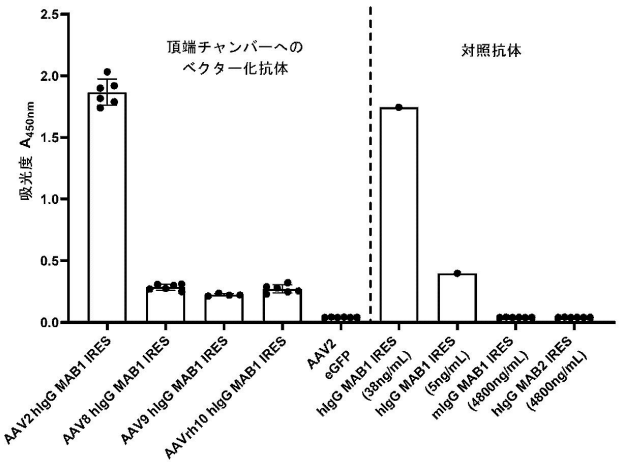
【図１１－３】



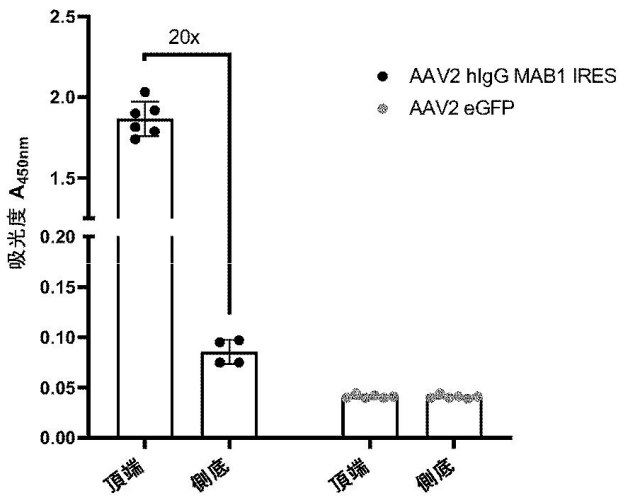
【図１２】



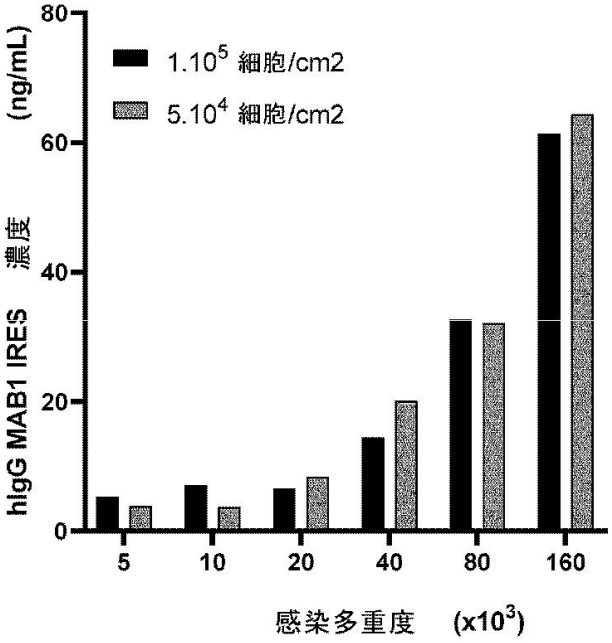
【図１３】



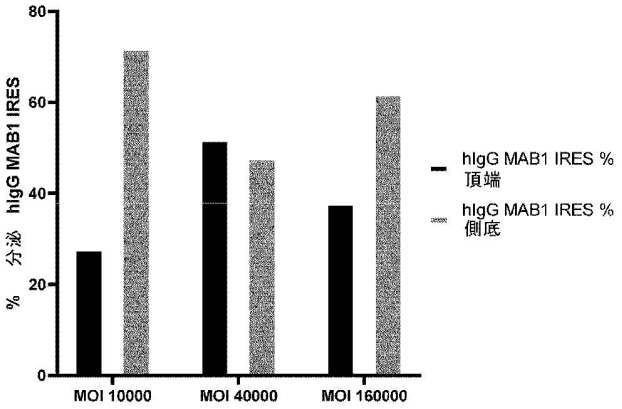
【図１４】



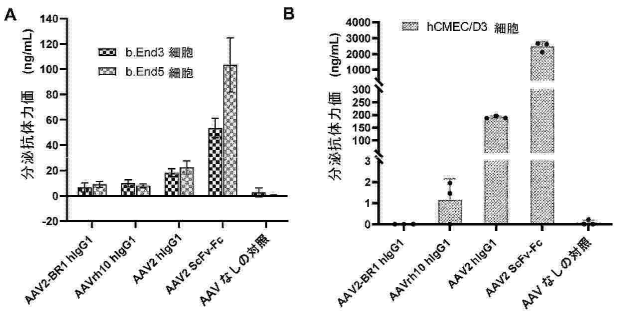
【図１５】



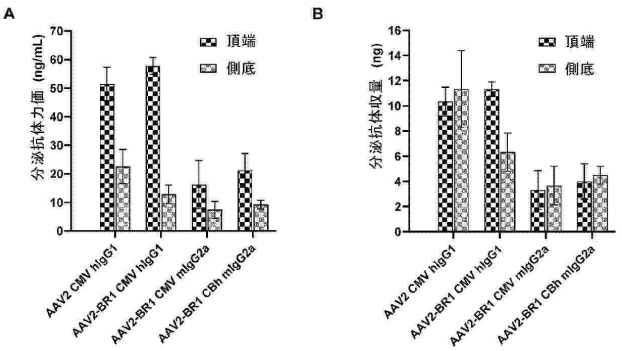
【図１６】



【図１７】



【図１８】



【配列表】

<u>20245001150000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/086645

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/005 A61P25/00 C07K16/00 C12N15/86
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Machado M E: "Vectored immunoprophylaxis to produce anti-BACE1 nanobodies for treatment of Alzheimer's disease", Master Thesis, Universidade de Lisboa, PT, 2019, pages 1-44, XP055910161, Retrieved from the Internet: URL:https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/40536/1/ulfc125260_tm_Maria_Eugénia_Machado.pdf [retrieved on 2022-04-07]	1-8,10, 12,14, 15, 17-19, 21-26,58
Y	page 17 - page 25	1-52,57, 58,62
	----- -/--	

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 August 2022	19/08/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sommer, Birgit

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/086645

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/028306 A2 (VOYAGER THERAPEUTICS INC [US]) 7 February 2019 (2019-02-07)	1-8,10, 12, 14-18, 21-26,58
Y	claims; examples 10, 14, 15	1-52,57, 58,62

X	VITALE F ET AL: "Intramuscular injection of vectorized-scFvMC1 reduces pathological tau in two different tau transgenic models", ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 8, no. 1, 6 August 2020 (2020-08-06), pages 1-19, XP021280235, DOI: 10.1186/S40478-020-01003-7 cited in the application	1-8, 10-12, 14-17, 19, 21-26,58
Y	abstract, methods, results, discussion;	1-52,57, 58,62

X	WO 2016/086320 A1 (UNIVERSITÉ LAVAL [CA]) 9 June 2016 (2016-06-09)	1-8, 10-12, 14-16, 19, 21-26,58
Y	claims; examples	1-52,57, 58,62

Y	WO 2020/210655 A1 (CALIFORNIA INST OF TECHN [US]) 15 October 2020 (2020-10-15) paragraph [00169]; claims; examples	1-59,61, 62

Y	KUMAR S ET AL: "Multiplexed Cre-dependent selection yields systemic AAVs for targeting distinct brain cell types", NATURE METHODS, NATURE PUBLISHING GROUP US, NEW YORK, vol. 17, no. 5, 20 April 2020 (2020-04-20) , pages 541-550, XP037112784, ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/S41592-020-0799-7 [retrieved on 2020-04-20] cited in the application abstract, results, discussion, figures;	1-59,61, 62

	-/--	

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/086645

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KÖRBELIN J ET AL: "Multiplexed Cre-dependent selection yields systemic AAVs for targeting distinct brain cell types", EMBO MOLECULAR MEDICINE (ONLINE), vol. 8, no. 6, 22 April 2016 (2016-04-22), pages 609-625, XP055535166, DE ISSN: 1757-4684, DOI: 10.15252/emmm.201506078 abstract, results, discussion;	1-59,61, 62
Y	PIPERNO G M ET AL: "Recombinant AAV-mediated in vivo long-term expression and antitumour activity of an anti-ganglioside GM3(Neu5Gc) antibody", GENE THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 22, no. 12, 16 July 2015 (2015-07-16) , pages 960-967, XP037771289, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/GT.2015.71 [retrieved on 2015-07-16] abstract, results, discussion, figure 1	1-59,61, 62
X	WO 2015/016786 A1 (AGENCY SCIENCE TECH & RES [SG]) 5 February 2015 (2015-02-05)	53-56,58
Y	claims; figures; examples	1-59,61, 62
X	HO S ET AL: "IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 157, no. 1, 19 September 2011 (2011-09-19), pages 130-139, XP028395739, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2011.09.023 [retrieved on 2011-10-17] cited in the application	53-56,58
Y	abstract, materials and methods, results, discussion, fig. 1(c)	1-59,61, 62
X	WO 2017/189963 A1 (VOYAGER THERAPEUTICS INC [US]) 2 November 2017 (2017-11-02)	1-12, 14-19, 21-27, 29-50, 53-59,62
Y	claims; figures; examples	1-59,61, 62

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/086645

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/181021 A1 (REGENXBIO INC [US]) 19 October 2017 (2017-10-19)	53-56,58
Y	paragraphs [0050], [0071], [00123], [00147],; claims; examples 1-4	1-59,61, 62

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/086645

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-52, 59(completely); 53-58, 61, 62(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;, it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2021/086645

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-52(completely); 57, 58, 62(partially)

a vector comprising a polynucleotide encoding an antibody or antibody fragment for use in a method for treatment of a disease or disorder of the CNS, wherein the vector transduces or transfects cells of the blood brain barrier (BBB) and the transduced or transfected BBB cells express the antibody or antibody fragment resulting in delivery of the antibody or antibody fragment into the CNS as well as subject-matter related thereto;

---

2. claims: 53-58(partially)

a method of modulating antibody aggregation, maturation, quality, titer, immunogenicity and/or adverse effects comprising transforming cells with an expression cassette comprising from 5' to 3' at least one promoter operably linked to a light chain gene of an antibody, an IRES and a heavy chain gene of an antibody as well as subject-matter related thereto;

---

3. claims: 53-58(partially)

a method of modulating antibody aggregation, maturation, quality, titer, immunogenicity and/or adverse effects comprising transforming cells with an expression cassette comprising from 5' to 3' a first promoter operably linked to a light chain gene of an antibody, and a second promoter operably linked to a heavy chain gene of an antibody as well as subject-matter related thereto;

---

4. claims: 54, 56-58(all partially)

a method of modulating antibody aggregation, maturation, quality, titer, immunogenicity and/or adverse effects comprising transforming cells with an expression cassette comprising from 5' to 3' at least one promoter operably linked to a light chain gene of an antibody, a self-cleavage site and a heavy chain gene of an antibody as well as subject-matter related thereto;

---

5. claims: 59(completely); 61, 62(partially)

an AAV vector comprising an expression cassette comprising from 5' to 3' at least one promoter operably linked to a light chain gene of an antibody, an IRES and a heavy chain gene of an antibody as well as subject-matter related thereto

International Application No. PCT/EP2021/086645

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

6. claims: 60(completely); 61, 62(partially)

an AAV vector comprising an expression cassette comprising from 5' to 3' a first promoter operably linked to a light chain gene of an antibody, and a second promoter operably linked to a heavy chain gene of an antibody as well as subject-matter related thereto

---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/086645

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019028306 A2	07-02-2019	AU 2018311069 A1	20-02-2020
		CA 3071978 A1	07-02-2019
		CN 111448308 A	24-07-2020
		EP 3662060 A2	10-06-2020
		EP 3808849 A1	21-04-2021
		JP 2020533959 A	26-11-2020
		KR 20200044793 A	29-04-2020
		TW 201919714 A	01-06-2019
		TW 202133888 A	16-09-2021
		US 2021163985 A1	03-06-2021
		WO 2019028306 A2	07-02-2019
WO 2016086320 A1	09-06-2016	AU 2015358266 A1	29-06-2017
		AU 2021250947 A1	11-11-2021
		CA 2874083 A1	05-06-2016
		EP 3227330 A1	11-10-2017
		JP 6882172 B2	02-06-2021
		JP 2018502561 A	01-02-2018
		US 2017355756 A1	14-12-2017
		WO 2016086320 A1	09-06-2016
WO 2020210655 A1	15-10-2020	AU 2020271108 A1	11-11-2021
		CA 3136658 A1	15-10-2020
		CN 114127090 A	01-03-2022
		EP 3953371 A1	16-02-2022
		JP 2022526018 A	20-05-2022
		KR 20220007056 A	18-01-2022
		SG 11202111249Y A	29-11-2021
		US 2022220502 A1	14-07-2022
		WO 2020210655 A1	15-10-2020
WO 2015016786 A1	05-02-2015	SG 11201600565V A	26-02-2016
		US 2016244746 A1	25-08-2016
		WO 2015016786 A1	05-02-2015
WO 2017189963 A1	02-11-2017	EP 3448875 A1	06-03-2019
		US 2019224339 A1	25-07-2019
		US 2022096657 A1	31-03-2022
		WO 2017189963 A1	02-11-2017
WO 2017181021 A1	19-10-2017	AU 2017250797 A1	25-10-2018
		CA 3019665 A1	19-10-2017
		EP 3442577 A1	20-02-2019
		IL 262277 A	29-11-2018
		JP 2019515027 A	06-06-2019
		KR 20190003556 A	09-01-2019
		SG 102020008378U A	29-10-2020
		SG 11201808440Y A	30-10-2018
		US 2019127455 A1	02-05-2019
		US 2019211091 A1	11-07-2019
		WO 2017181021 A1	19-10-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

(72)発明者　デル バル，グレゴリオ
スイス１０１５ローザンヌ、イーピーエフエル・イノベイション・パーク、ビルディング・ビー、エイシー・イミューン・ソシエテ・アノニム内
(72)発明者　ネヴォルトリ，ダミアン
スイス１０１５ローザンヌ、イーピーエフエル・イノベイション・パーク、ビルディング・ビー、エイシー・イミューン・ソシエテ・アノニム内

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AB01 CA43 CA44
4H045　AA11 AA20 AA30 DA76 FA74