

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-532114

(P2021-532114A)

(43) 公表日 令和3年11月25日 (2021.11.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Z N A N 4 C O 8 5
A 6 1 P 39/00 (2006.01)	A 6 1 P 39/00	4 H O 4 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	G
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2021-503581 (P2021-503581)	(71) 出願人	518126074
(86) (22) 出願日	令和1年7月23日 (2019.7.23)		シワ コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	令和3年3月16日 (2021.3.16)		アメリカ合衆国, イリノイ州 60601
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/043071		, シカゴ, # 3913, 400 イースト
(87) 国際公開番号	W02020/023532		ランドルフ
(87) 国際公開日	令和2年1月30日 (2020.1.30)	(74) 代理人	100107984
(31) 優先権主張番号	62/702, 229		弁理士 廣田 雅紀
(32) 優先日	平成30年7月23日 (2018.7.23)	(74) 代理人	100182305
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 廣田 鉄平
		(74) 代理人	100096482
			弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100131093
			弁理士 堀内 真
		(74) 代理人	100150902
			弁理士 山内 正子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 放射線曝露及び化学物質曝露の慢性影響を治療するための方法及び組成物

(57) 【要約】

放射線曝露又は化学物質曝露の慢性影響を治療する方法は、抗AGE抗体を含む組成物を、対象に投与するステップを含む。放射線曝露又は化学物質曝露の慢性影響を治療するための組成物は、第1の抗AGE抗体、第2の抗AGE抗体、及び薬学的に許容される担体を含む。第1の抗AGE抗体は、第2の抗AGE抗体と異なる。放射線曝露又は化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防する方法は、それを必要とする対象を、細胞のAGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対して免疫化するステップを含む。

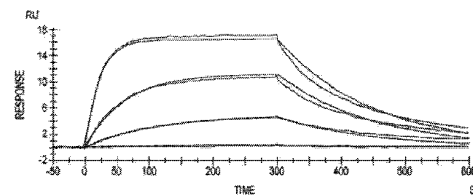


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

放射線曝露の慢性影響を治療又は予防する方法であって、抗 A G E 抗体を含む組成物を、対象に投与するステップを含む、前記方法。

【請求項 2】

放射線曝露の慢性影響の発症を治療又は予防する方法であって、第 1 の抗 A G E 抗体と、第 2 の抗 A G E 抗体とを含む組成物を、対象に投与するステップを含み；
前記第 2 の抗 A G E 抗体が、前記第 1 の抗 A G E 抗体と異なる、
前記方法。

【請求項 3】

放射線曝露の慢性影響を受ける対象を治療する方法であって、
抗 A G E 抗体を、第一に投与するステップ；その後、
放射線曝露の前記慢性影響の治療における、前記第 1 の投与の有効性について、前記対象を調べるステップ；その後、
前記抗 A G E 抗体を、第二に投与するステップ；
を含む、前記方法。

【請求項 4】

放射線曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための医薬の製造のための、抗 A G E 抗体の使用。

【請求項 5】

放射線曝露の慢性影響の発症の治療又は予防における使用のための、抗 A G E 抗体を含む組成物。

【請求項 6】

放射線曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための組成物であって、
(a) 第 1 の抗 A G E 抗体、
(b) 第 2 の抗 A G E 抗体、及び
(c) 薬学的に許容される担体
を含み、
前記第 1 の抗 A G E 抗体が、前記第 2 の抗 A G E 抗体と異なる、
前記組成物。

【請求項 7】

放射線曝露の慢性影響の発症を治療又は予防する方法であって、それを必要とする対象を、細胞の A G E 修飾タンパク質又は A G E 修飾ペプチドに対して免疫化するステップを含む、前記方法。

【請求項 8】

放射線曝露の慢性影響を受ける対象を治療する方法であって、
第 1 の A G E 抗原を含む第 1 のワクチンを投与するステップ；及び
任意で、第 2 の A G E 抗原を含む第 2 のワクチンを投与するステップ；を含み、
前記第 2 の A G E 抗原が、前記第 1 の A G E 抗原と異なる、
前記方法。

【請求項 9】

放射線曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための医薬の製造のための、A G E 抗原の使用。

【請求項 10】

放射線曝露の慢性影響の発症の治療又は予防における使用のための、A G E 抗原を含む組成物。

【請求項 11】

化学物質曝露の慢性影響を治療又は予防する方法であって、抗 A G E 抗体を含む組成物を、対象に投与するステップを含む、前記方法。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防する方法であって、第 1 の抗 A G E 抗体と、第 2 の抗 A G E 抗体とを含む組成物を、対象に投与するステップを含み；
前記第 2 の抗 A G E 抗体が、前記第 1 の抗 A G E 抗体と異なる、
前記方法。

【請求項 1 3】

化学物質曝露の慢性影響を受ける対象を治療する方法であって、
抗 A G E 抗体を、第 1 に投与するステップ；その後、
化学物質曝露の前記慢性影響の治療における、前記第 1 の投与の有効性について、前記対象を調べるステップ；その後、
前記抗 A G E 抗体を、第 2 に投与するステップ；
を含む、前記方法。

10

【請求項 1 4】

化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための医薬の製造のための、抗 A G E 抗体の使用。

【請求項 1 5】

化学物質曝露の慢性影響の発症の治療又は予防における使用のための、抗 A G E 抗体を含む組成物。

【請求項 1 6】

化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための組成物であって、

- (a) 第 1 の抗 A G E 抗体、
- (b) 第 2 の抗 A G E 抗体、及び
- (c) 薬学的に許容される担体

を含む、

前記第 1 の抗 A G E 抗体が、前記第 2 の抗 A G E 抗体と異なる、
前記組成物。

20

【請求項 1 7】

化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防する方法であって、それを必要とする対象を、細胞の A G E 修飾タンパク質又は A G E 修飾ペプチドに対して免疫化するステップを含む、前記方法。

【請求項 1 8】

化学物質曝露の慢性影響を受ける対象を治療する方法であって、
第 1 の A G E 抗原を含む第 1 のワクチンを投与するステップ；及び
任意で、第 2 の A G E 抗原を含む第 2 のワクチンを投与するステップ；を含み、
前記第 2 の A G E 抗原が、前記第 1 の A G E 抗原と異なる、
前記方法。

30

【請求項 1 9】

化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための医薬の製造のための、A G E 抗原の使用。

【請求項 2 0】

化学物質曝露の慢性影響の発症の治療又は予防における使用のための、A G E 抗原を含む組成物。

40

【請求項 2 1】

組成物が、薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 1 ～ 2 0 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 2 2】

対象が、ヒト、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ラクダ、アルパカ、イヌ、及びネコからなる群から選択される、請求項 1 ～ 2 1 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 2 3】

対象が、ヒトである、請求項 1 ～ 2 2 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

50

【請求項 24】

抗 A G E 抗体が、ヒト、ネコ、イヌ、ウマ、ラクダ、アルパカ、ウシ、ヒツジ、ブタ、及びヤギからなる群から選択される種に対して非免疫原性である、請求項 1～23 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 25】

抗 A G E 抗体が、静脈内投与される、請求項 1～24 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 26】

抗 A G E 抗体が、局所投与される、請求項 1～25 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

10

【請求項 27】

抗 A G E 抗体が、F F I、ピラリン、A F G P、A L I、カルボキシメチルリシン、カルボキシエチルリシン、及びペントシジンからなる群から選択される A G E 修飾を呈する少なくとも 1 つのタンパク質又はペプチドを含む A G E 抗原に結合する、請求項 1～26 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 28】

抗 A G E 抗体が、カルボキシメチルリシン修飾タンパク質又はカルボキシメチルリシン修飾ペプチドに結合する、請求項 1～27 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 29】

抗 A G E 抗体が、カルボキシエチルリシン修飾タンパク質又はカルボキシエチルリシン修飾ペプチドに結合する、請求項 1～28 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

20

【請求項 30】

第 1 の抗 A G E 抗体及び第 2 の抗 A G E 抗体が、F F I、ピラリン、A F G P、A L I、カルボキシメチルリシン、カルボキシエチルリシン、及びペントシジンからなる群から選択される異なる A G E 修飾を呈する少なくとも 1 つのタンパク質又はペプチドを含む A G E 抗原に結合する、請求項 1～29 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 31】

組成物が、単位投与量形態である、請求項 1～30 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 32】

組成物が、複数回投与量形態である、請求項 1～31 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

30

【請求項 33】

組成物が、滅菌されている、請求項 1～32 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 34】

免疫化するステップが、A G E 抗原を含むワクチンを投与するステップを含む、請求項 1～33 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 35】

ワクチンが、
(a) A G E 抗原、
(b) アジュバント、
(c) 任意で保存剤、及び
(d) 任意で賦形剤
を含む、請求項 1～34 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

40

【請求項 36】

ワクチンが、A G E 修飾タンパク質又は A G E 修飾ペプチドを有する細胞に対する抗体を産生する免疫系を引き起こすのに有効な量で投与される、請求項 1～35 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 37】

50

A G E 抗原が、A G E－R N アーゼ、A G E－ヒトヘモグロビン、A G E－アルブミン、A G E－B S A、A G E－ヒト血清アルブミン、A G E－オボアルブミン、A G E－低密度リポタンパク質、A G E－コラーゲンIV、A G E－抗トロンビンIII、A G E－カルモジュリン、A G E－インスリン、A G E－セルロプラスミン、A G E－コラーゲン、A G E－カテプシンB、A G E－アルブミン、A G E－クリスタリン、A G E－プラスミノゲン活性化因子、A G E－内皮細胞膜タンパク質、A G E－アルデヒドレダクターゼ、A G E－トランスフェリン、A G E－フィブリン、A G E－銅／亜鉛S O D、A G E－a p o B、A G E－フィブロネクチン、A G E－腓リボース、A G E－a p o A－I 及びII、A G E－ヘモグロビン、A G E－N a⁺／K⁺－A T P アーゼ、A G E－プラスミノゲン、A G E－ミエリン、A G E－リゾチーム、A G E－免疫グロブリン、A G E－赤血球G l u 輸送タンパク質、A G E－β－N－アセチルヘキソミナーゼ、A G E－a p o E、A G E－赤血球膜タンパク質、A G E－アルドースレダクターゼ、A G E－フェリチン、A G E－赤血球スペクトリン、A G E－アルコールデヒドロゲナーゼ、A G E－ハプトグロビン、A G E－チューブリン、A G E－甲状腺ホルモン、A G E－フィブリノーゲン、A G E－β₂－マイクログロブリン、A G E－ソルビトールデヒドロゲナーゼ、A G E－α₁－抗トリプシン、A G E－炭酸デヒドラターゼ、A G E－R N アーゼ、A G E－低密度リポタンパク質、A G E－ヘキソキナーゼ、A G E－a p o C－I、A G E－K L H、及びこれらの混合物からなる群から選択される、A G E 修飾タンパク質又はA G E 修飾ペプチドである、請求項1～36のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

10

【請求項38】

20

A G E 抗原が、カルボキシメチルリシン、カルボキシエチルリシン、ペントシジン、ピラリン、F F I、A F G P、及びA L I からなる群から選択されるA G E 修飾を呈する少なくとも1つのタンパク質又はペプチドを含む、請求項1～37のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項39】

A G E 抗原が、カルボキシメチルリシン修飾タンパク質又はカルボキシメチルリシン修飾ペプチドを含む、請求項1～38のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項40】

A G E 抗原が、カルボキシエチルリシン修飾タンパク質又はカルボキシエチルリシン修飾ペプチドを含む、請求項1～39のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

30

【請求項41】

ワクチンが、滅菌されている、請求項1～40のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項42】

ワクチンが、単位投与量形態である、請求項1～41のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項43】

ワクチンが、複数回投与量形態である、請求項1～42のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項44】

40

医薬が、

(a) A G E 抗原、

(b) アジュバント、

(c) 任意で保存剤、及び

(d) 任意で賦形剤

を含む、請求項1～43のいずれかに記載の使用。

【請求項45】

組成物が、ワクチンを含む、請求項1～44のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項46】

50

- ワクチンが、
(a) A G E 抗原、
(b) アジュバント、
(c) 任意で保存剤、及び
(d) 任意で賦形剤

を含む、請求項 1～45 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 47】

治療するステップが、ワクチンを、A G E 修飾タンパク質又は A G E 修飾ペプチドを発現する細胞に対する抗体を産生する免疫系を引き起こすのに有効な量で、対象に投与するステップを含む、請求項 1～46 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

10

【請求項 48】

患者を調べて、慢性影響が改善されたかどうかを判定するステップ、及び
必要な場合に、免疫化を反復するステップ

をさらに含む、請求項 1～47 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 49】

抗 A G E 抗体が、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 60、及び配列番号 61 からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも 90 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 98 % の配列同一性を有する少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むタンパク質又はペプチドを含む、請求項 1～48 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

20

【請求項 50】

抗体が、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、及び配列番号 28 からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも 90 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 98 % の配列同一性を有する少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むタンパク質又はペプチドを含む、請求項 1～49 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 51】

抗体が、
重鎖、及び
軽鎖
を含み、

30

前記重鎖が、配列番号 1、配列番号 17、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、及び配列番号 51 からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも 90 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又は

前記軽鎖が、配列番号 3、配列番号 19、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 60、及び配列番号 61 からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも 90 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1～50 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

40

【請求項 52】

抗体が、
重鎖、及び
軽鎖
を含み、

前記重鎖が、配列番号 1、配列番号 17、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、及び配列番号 51 からなる群から選択され

50

るアミノ酸配列と、少なくとも 90 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、

前記軽鎖が、配列番号 3、配列番号 19、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 60、及び配列番号 61 からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも 90 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 98 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1～51 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 53】

抗体が、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、及び配列番号 28 からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも 90 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 98 % の配列同一性を有する少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む相補性決定領域を含み、かつ、抗体が、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ラクダ、アルパカ、イヌ、及びネコからなる群から選択される種に対して、実質的に非免疫原性である、請求項 1～52 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 54】

抗体が、AGE 修飾細胞の破壊を引き起こす薬剤にコンジュゲートされている、請求項 1～53 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 55】

抗体が、ヒト化抗体である、請求項 1～54 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 56】

抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1～55 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 57】

抗体が、ヒトに対して、実質的に非免疫原性である、請求項 1～56 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 58】

抗体が、 9×10^{-3} / 秒以下の解離速度 (k_d) を有する、請求項 1～57 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 59】

薬剤が、毒素、細胞毒性剤、磁気ナノ粒子、及び磁気スピンドルディスクからなる群から選択される、請求項 1～58 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 60】

抗体が、対象の免疫系による、標的とする細胞の破壊を可能とする定常領域を含む、請求項 1～59 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 61】

抗体が、二重特異性抗体である、請求項 1～60 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 62】

放射線曝露の慢性影響が、白髪、しわ、フレイル、白内障、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化、アルツハイマー病、パーキンソン病、サルコペニア、脂肪組織の減少、前彎後彎症、がん、早発閉経、心血管疾患、認知症、II 型糖尿病、内分泌障害、心機能障害、骨粗相症、骨関節炎、肺線維症、腎疾患及び肝疾患、代謝障害、リポジストロフィー、聴覚低下、視覚低下、並びに記憶障害からなる群から選択される、早期老化を模倣する少なくとも 1 つの症状を含む、請求項 1～61 のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項 63】

化学物質曝露の慢性影響が、白髪、しわ、フレイル、白内障、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化、アルツハイマー病、パーキンソン病、サルコペニア、脂肪組織の減少、前彎

10

20

30

40

50

後彎症、がん、早発閉経、心血管疾患、認知症、II型糖尿病、内分泌障害、心機能障害、骨粗相症、骨関節炎、肺線維症、腎疾患及び肝疾患、代謝障害、リポジストロフィー、聴覚低下、視覚低下、並びに記憶障害からなる群から選択される、早期老化を模倣する少なくとも1つの症状を含む、請求項1～62のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項64】

A G E 抗原が、C M L - K L H (carboxymethyllysine conjugated with keyhole limpet hemocyanin) を含む、請求項1～63のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項65】

放射線が、アルファ線、ベータ線、ガンマ線、X線、及び中性子線からなる群から選択される少なくとも1つの種類の放射線を含む、請求項1～64のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

10

【請求項66】

化学物質曝露が、化学兵器、化学療法剤、H A A R T (高活性抗レトロウイルス療法) 剤、毒物、又は酸化剤への曝露を含む、請求項1～65のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項67】

化学兵器が、塩素ガス、ホスゲンガス、マスタードガス、G剤、V剤、ノビチョク剤、カルバメート、及び殺虫剤からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤を含む、請求項1～66のいずれかに記載の方法、使用、又は組成物。

【請求項68】

早期老化を受ける対象を治療する方法であって、抗A G E 抗体を含む組成物を、前記対象に投与するステップを含み、

前記対象が、早老症候群に罹患していると診断されており、

前記早老症候群が、ハッチソンーギルフォード早老症候群ではない、

前記方法。

20

【請求項69】

早老症候群が、ウェルナー症候群、ブルーム症候群、ロスムンドートムソン症候群、コケイン症候群、色素性乾皮症、硫黄欠乏性毛発育異常症、色素性乾皮症ーコケイン症候群の組合せ、及び拘束性皮膚障害からなる群から選択される1又は2以上の早老症候群を含む、請求項1～68のいずれかに記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

早期老化又は老化の加速化は、生物が、実年齢が進んだ類似する生物において典型的に観察される生理学的変化を呈する場合に生じる。早期老化は、全生物に影響を及ぼす全身 (whole-body又はsystemic) 状態である。一部の変化は、白髪又はしわの進行 (development) など、純粋に美容上の変化であり、健康に対して、負の影響を及ぼさない。他の変化は、白内障、動脈硬化症、又はアルツハイマー病の進行など、身体健康に重度の影響を与えうる。その最も重度の形態では、早期老化は、寿命の短縮を結果としてもたらしうる。

40

【0002】

早期老化は、早老症候群として公知の遺伝障害のクラスの一般的症状である。大半の早老症候群は、D N A 修復機構の欠損、又はラミンA / C タンパク質の欠損をもたらす、単一遺伝子の変異により引き起こされる (“Progeroid syndromes”, available online at en.wikipedia.org/wiki/Progeroid_syndromes (November 29, 2017))。早老症候群の例は、ハッチソンーギルフォード早老症候群 (また、早老症としても公知である)、ウェルナー症候群、ブルーム症候群、ロスムンドートムソン症候群、コケイン症候群、色素性乾皮症、硫黄欠乏性毛発育異常症、色素性乾皮症ーコケイン症候群の組合せ、及び拘束性皮膚障害を含む。具体的機構は変動しうるが、これらの遺伝障害は、寿命の短縮を結果としてもたらすことが多い。例えば、ハッチソンーギルフォード早老症候群は、血管老化の加

50

速化を引き起こし、これは、典型的に、心血管疾患に起因する若齢死を結果としてもたらす (Ribas, J. et al., “Biomechanical strain exacerbates inflammation on a progeria-on-a-chip model”, *Small*, Vol. 13 (2017))。

【0003】

早期老化を模倣する症状は、ある特定の物質への曝露の慢性影響でありうる。これらの症状は、環境への曝露、とりわけ、放射線への曝露、及び多様な化学物質への曝露から生じうる。早期老化と異なり、早期老化を模倣する症状は、典型的に、曝露領域に局在化される。

【0004】

放射線曝露、特に、イオン化放射線への曝露、及び紫外 (UV: ultraviolet) 線は、早期老化を模倣する症状の、公知の原因である。イオン化放射線曝露は、1940年代以来、早期老化を模倣する症状と関連しており、がん、心血管疾患、認知症、及びII型糖尿病の増大を引き起こすことが公知である (Richardson, R. B., “Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea”, *Aging*, Vol. 1, No. 11, pp. 887-902 (2009))。放射線療法 (RT: radiotherapy) は、がん治療レジメンの一部として含まれることが多く、胸部領域腫瘍のための放射線療法を施される患者における肺線維症の進行など、健常組織に対して、憂慮すべき、長期的な損傷を引き起こすことが公知である (Haddadi, G. H. et al., “Hesperidin as radioprotector against radiation-induced lung damage in rat: a histopathological study”, *Journal of Medical Physics*, Vol. 42, No. 1, pp. 25-32 (2017))。紫外線への曝露が、長期にわたり、保護されないと、皮膚において、弾力性の喪失、色素の喪失、及び皮膚組織の分解を含む、早期老化を模倣する症状が引き起こされる (Flament, F. et al., “Effect of the sun on visible clinical signs of aging in Caucasian skin”, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, Vol. 6, pp. 221-232 (2016))。火傷、爆風損傷、創傷、爆傷、及び感染性合併症など、損傷の他の形態と組み合わさった放射線曝露、とりわけ、放射線と火傷との組合せは、身体的危害の増大を結果としてもたらす (Palmer, J. L. et al., “Combined radiation and burn injury results in exaggerated early pulmonary inflammation”, *Radiation Research*, Vol. 180, No. 3, pp. 276-283 (2013))。

【0005】

ある特定の疾患及び障害のための治療経過の一部としての、化学物質への曝露もまた、早期老化を模倣する症状を引き起こしうる。化学療法の公知の副作用は、早期老化を模倣する症状の進行である。がんの生存者は、一般集団と比較して、内分泌障害、心機能障害、骨粗相症、肺線維症、続発がん、及びフレイル (frailty) の早期発症 (onset) 及び高罹患率を示す (Cupit-Link, M. C. et al., “Biology of premature ageing in survivors of cancer”, *ESMO Open*, Vol. 2, No. e000250, pp. 1-9 (2017))。HAART (高活性抗レトロウイルス療法: highly active antiretroviral therapy) として公知のヒト免疫不全ウイルス (HIV: human immunodeficiency virus) 治療レジメンは、HIV感染患者の寿命を、非治療HIV感染患者と比較して、著明に延長する。しかし、HAART治療患者は、平均余命が、正常集団と比較して短縮されるほか、心血管疾患、糖尿病、骨粗相症、腎疾患及び肝疾患、代謝障害、リポジストロフィー、アルツハイマー病、並びにパーキンソン病の有病率も増大している (Smith, R. L. et al., “Premature and accelerated aging: HIV or HAART?”, *Frontiers in Genetics*, Vol. 3, Article 328, pp. 1-10 (2013))。

【0006】

早期老化を模倣する症状はまた、化学兵器 (また、化学兵器物質又はCWA: chemical warfare agentとしても公知である) 又は毒物など、危害を引き起こす化学物質への曝露の副作用でもある。化学兵器の例は、塩素ガス、ホスゲンガス、マスタードガス (また、硫黄マスタードと称されるか、又はH、HD、HT、HL、若しくはHQなど、その製剤名により言及される)、GA (タブン)、GB (サリン)、GD (ソマン)、及びGF (シクロサリン) を含むG剤、VE、VG、VM、VR、及びVXを含むV剤、ノビチョク

剤、カルバメート、並びに殺虫剤を含む。硫黄マスタード（マスタードガス）曝露の生存者は、神経障害性合併症、肺性合併症、心臓性合併症、発がん性合併症、及び血液合併症の増大を受けることが見出されている（Rohani, A. et al., “A case control study of cardiovascular health in chemical war disabled Iranian victims”, *Indian Journal of Critical Care Medicine*, Vol. 14, No. 3, pp. 109-112 (2010)）。ビクトル・ユシチェンコは、心血管疾患、がん、糖尿病、及び早期月経閉止を含む、早期老化を模倣する症状を引き起こす、ダイオキシン中毒の周知の症例であった（White, S. S. et al., “An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology”, *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, Vol. 27, No. 4, pp. 197-211 (2009)）。鉛中毒及びカドミウム中毒は、心血管疾患、慢性腎疾患、及び他の老化関連疾患をもたらさう（Zota, A. R. et al., “Associations of cadmium and lead exposure with leukocyte telomere length: findings from national health and nutrition examination survey, 1999-2002”, *American Journal of Epidemiology*, Vol. 181, No. 2, pp. 127-136 (2015)）。酸化物質への曝露もまた、早期老化を模倣する症状を結果としてもたらさう。過酸化水素によるヒト軟骨細胞の治療は、インビトロにおいて、老化過程を加速化させる（Brandl, A. et al., “Oxidative stress induces senescence in chondrocytes”, *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 29, pp. 1114-1120 (2011)）。

【0007】

細胞レベルでは、早期老化は、細胞の老化の早期発症として考えられうる。老化細胞は、部分的に機能的であるか、又は非機能的な細胞であり、増殖停止の状態にある。老化とは、細胞の独特な状態をいい、バイオマーカー $p16^{INK4a}$ の活性化、及び β -ガラクトシダーゼの発現などのバイオマーカーと関連する。複製老化は、DNA損傷応答をもたらす、テロメアの短縮から生じる。老化はまた、細胞の損傷又はストレス（増殖因子による過剰刺激などのストレス）によっても引き起こされうる。

【0008】

終末糖化反応最終産物（AGE: advanced glycation end-product; また、AGE修飾タンパク質又は糖化反応最終産物とも称される）は、糖とタンパク質側鎖との非酵素反応から生じる（Ando, K. et al., *Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products during Aging in the Circulation*, *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol. 258, 123, 125 (1999)）。この過程は、還元糖とアミノ基との可逆反応で開始して Schiff 塩基を形成し、これが進行して、共有結合性のアマドリ再配列産物を形成する。形成されると、アマドリ産物は、さらなる再配列を経て、AGEを産生する。糖尿病（DM: diabetes mellitus）及び酸化ストレスにより引き起こされる高血糖症は、膜タンパク質の、この翻訳後修飾を促進する（Lindsey JB, et al., “Receptor For Advanced Glycation End-Products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): Cardiovascular Implications,” *Diabetes Vascular Disease Research*, Vol. 6(1), 7-14, (2009)）。AGEはまた、他の方法からも形成されうる。例えば、終末糖化反応最終産物である、 N^ϵ -（カルボキシメチル）リシンは、脂質の過酸化反応及び糖化反応の両方の産物である。AGEは、糖尿病性合併症、炎症、網膜症、腎症、アテローム性動脈硬化、脳卒中、内皮細胞機能障害、及び神経変性障害を含む、複数の病理学的状態と関連している（Bi erhaus A, “AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept,” *Cardiovasc Res*, Vol. 37(3), 586-600 (1998)）。

【0009】

AGE修飾タンパク質はまた、老化細胞のマーカーでもある。当技術分野では、この糖化反応最終産物と老化との関連が周知である。例えば、Gruber, L.（国際公開第2009/143411号パンフレット、2009年11月26日）、Ando, K. et al.（*Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Produ*

cts during Aging in the Circulation, Biochem Biophys Res Commun., Vol. 258, 123, 125 (1999))、Ahmed, E.K. et al. (“Protein Modification and Replicative Senescence of WI-38 Human Embryonic Fibroblasts” Aging Cells, vol. 9, 252, 260 (2010))、Vlassara, H. et al. (Advanced Glycosylation Endproducts on Erythrocyte Cell Surface Induce Receptor-Mediated Phagocytosis by Macrophages, J. Exp. Med., Vol. 166, 539, 545 (1987))；及びVlassara et al. (“High-affinity-receptor-mediated Uptake and Degradation of Glucose-modified Proteins: A Potential Mechanism for the Removal of Senescent Macromolecules” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, 5588, 5591 (1985))を参照されたい。さらに、Ahmed, E.K. et al.は、糖化反応最終産物が、「細胞内タンパク質及び細胞外タンパク質に対する自発的損傷の主要原因のうちの1つ」であることを指し示す(Ahmed, E.K. et al.、上記、353頁を参照されたい)。したがって、糖化反応最終産物の蓄積は、老化及び機能の欠如と関連する。

10

【0010】

細胞の老化を引き起こす損傷又はストレスはまた、細胞内のミトコンドリアDNAに負の影響も与えて、これらにフリーラジカルを産生させ、これが、細胞内の糖と反応して、メチルグリオキサール(MG:methyl glyoxal)を形成する。続いてMGは、タンパク質又は脂質と反応して、終末糖化反応最終産物を発生させる。タンパク質成分であるリシンの場合、MGは、AGEであるカルボキシメチルリシンを形成するように反応する。

【0011】

ミトコンドリアDNAに対する損傷又はストレスはまた、細胞周期をブロックするタンパク質を産生するように細胞を誘導するDNA損傷応答も誘発する。これらのブロックするタンパク質は、細胞分裂を阻害する。損傷又はストレスの持続は、mTORの産生を引き起こし、今度はこれが、タンパク質の合成を活性化させ、タンパク質の分解を不活化させる。細胞のさらなる刺激は、プログラムされた細胞死(アポトーシス)をもたらす。

20

【0012】

p16とは、S期(合成期)を阻害することにより、細胞周期の調節に関与するタンパク質である。p16は、老化時に活性化される場合もあり、又はDNA損傷、酸化ストレス、若しくは薬物への曝露など、多様なストレスに応答して活性化される場合もある。p16は、典型的に、細胞を、DNA損傷に応答して老化させ、細胞が過剰増殖状態に入ることを不可逆的に防止する腫瘍抑制タンパク質であると考えられている。しかし、一部の腫瘍は、p16の過剰発現を示すが、他の腫瘍は、発現の下方調節を示すので、この点には、ある程度の両義性が存在している。一部の腫瘍におけるp16の過剰発現が、不全性網膜芽細胞腫タンパク質(「Rb」:retinoblastoma protein)の結果生じることを示唆する証拠がある。p16は、S期を阻害するように、Rbに作用し、Rbは、p16を下方調節し、負のフィードバックを創出する。不全性Rbは、S期の阻害及びp16の下方調節のいずれにも失敗するので、過剰増殖細胞内の、p16の過剰発現を結果としてもたらず(Romagosa, C. et al., p16^{Ink4a} overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors, Oncogene, Vol. 30, 2087-2097 (2011))。

30

【0013】

老化細胞は、炎症促進性因子を含む、細胞間シグナル伝達に関与する多くの因子の分泌と関連し；これらの因子の分泌は、老化関連分泌現象又はSASP(senescence-associated secretory phenotype)と称されている(Freund, A. “Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences” Trends Mol Med. 2010 May;16(5):238-46)。クローン病及び関節リウマチなどの自己免疫疾患は、慢性炎症と関連する(Ferraccioli, G. et al. “Interleukin-1 β and Interleukin-6 in Arthritis Animal Models: Roles in the Early Phase of Transition from Acute to Chronic Inflammation and Relevance for Human Rheumatoid Arthritis” Mol Med. 2010 Nov-Dec; 16(11-12): 552-557)。慢性炎症は、病理部位近傍における、ベースラインより高レベルであるが、急性炎症において見出されるレベルより低レベルの炎症促進性因子の存在により特徴づけ

40

50

られうる。これらの因子の例は、TNF、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-23、CD2、CD3、CD20、CD22、CD52、CD80、CD86、C5補体タンパク質、BAFF、APRIL、IgE、 α 4 β 1インテグリン、及び α 4 β 7インテグリンを含む。老化細胞はまた、IL-1 β 、IL-8、ICAM1、TNFAP3、ESM1、及びCCL2を含む、炎症において役割を伴う遺伝子も上方調節する (Burton, D.G.A. et al., "Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: a link to atherosclerosis and vascular calcification", *Experimental Gerontology*, Vol. 44, No. 10, pp. 659-665 (October 2009))。

【0014】

老化細胞は、SASPの一部として、反応性酸素分子種 (「ROS」: reactive oxygen species) を分泌する。ROSは、細胞の老化の維持において、重要な役割を果たすと考えられる。ROSの分泌は、老化細胞が、近隣細胞内の老化を誘導するバイスタンダー効果を創出する: ROSは、p16の発現を活性化させ、老化をもたらすことが公知である、細胞の損傷そのものを創出する (Nelson, G., A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence, *Aging Cell*, Vol. 11, 345-349 (2012))。p16/Rb経路は、ROSの誘導をもたらし、これは、タンパク質キナーゼCデルタを活性化させ、ROSをさらに増強する正のフィードバックループを創出し、細胞周期の不可逆的な停止の維持の一助となり; がん細胞を、ROSに曝露すれば、過剰増殖細胞内の細胞期の停止を誘導することにより、がんを治療するのに効果的でありうることを示唆されてさえる (Rayess, H. et al., Cellular senescence and tumor suppressor gene p16, *Int J Cancer*, Vol. 130, 1715-1725 (2012))。

【0015】

近年の研究は、老化細胞を除去することの治療的利益を裏付けている。Mayo Clinic in Rochester, Minnesotaにおけるインビボ動物研究は、老化細胞の消失についてのバイオマーカーを保有するトランスジェニックマウスにおける老化細胞の消失は、細胞の老化と関連する老化関連障害を遅延させることを見出した。脂肪組織内及び筋肉組織内の老化細胞の消失は、サルコペニア及び白内障の発症を実質的に遅延させ、骨格筋及び眼における老化指標を低減した (Baker, D. J. et al., "Clearance of p16^{Ink4a}-positive senescent cells delays ageing-associated disorders", *Nature*, Vol. 479, pp. 232-236, (2011))。老化細胞の消失を誘導するように治療されたマウスは、筋繊維の直径が、非治療マウスと比較して大きいことを見出された。トレッドミル運動試験は、治療がまた、筋肉の機能も保存することも指し示した。老化細胞の除去のための、トランスジェニックマウスの持続的治療は、負の副作用を及ぼさず、細胞に依存する老化関連現象を、選択的に遅延させた。このデータは、老化細胞の除去が、有益な治療効果をもたらすことを裏付け、これらの利益が、有害作用を伴わずに達成されうることを示す。

【0016】

マウスにおける、さらなるインビボ動物研究は、老化細胞溶解剤を使用する、老化細胞の除去が、老化関連障害、アテローム性動脈硬化、及び肺線維症を治療することを見出した。高齢マウス又は早老マウスにおける、老化細胞溶解剤による短期治療は、複数の老化関連現象を緩和した (Zhu, Y. et al., "The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs", *Aging Cell*, Vol. 14, pp. 644-658 (2015))。老化細胞溶解剤による長期治療は、アテローム性動脈硬化が確立されたマウスにおいて、血管運動機能を改善し、血管内膜プラークの石灰化を低減した (Roos, C.M. et al., "Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice", *Aging Cell* (2016))。老化細胞溶解剤の投与による、老化細胞の除去は、マウスにおける放射線誘導性肺線維症を回復させた (Pan, J. et al., "Inhibition of Bcl-2/xl with ABT-263 selectively kills senescent type II pneumocytes and reverses pulmonary fibrosis induced by ionizing radiation in mice", *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, Vol. 99, No. 2, pp

10

20

30

40

50

． 353-361 (2017))。このデータは、老化細胞を除去することの利益を、さらに裏付けている。

【 0 0 1 7 】

ワクチンは、エドワード・ジェンナーによる、1770年代における、それらの導入以来、広範にわたる疾患及び罹病に対して免疫を付与するのに、広く使用されている。ワクチン調製物は、抗原に対して、免疫を刺激することが可能な、選択された免疫原性作用物質を含有する。典型的に、抗原は、例えば、死滅させるか、又は弱毒化させたウイルス、及び精製したウイルス構成要素など、ワクチン中の免疫原性作用物質として使用される。がんワクチンの作製において使用される抗原は、例えば、腫瘍関連炭水化物抗原 (T A C A : tumor-associated carbohydrate antigen)、樹状細胞、全細胞、及びウイルスベクターを含む。所望される量及び種類の、求められる抗原を産生するのに、異なる技法が用いられる。例えば、病原性ウイルスを、卵内又は細胞内で増殖させる。ワクチンのための弱毒化ウイルスを作出するのに、組換えDNA技術が利用されることが多い。

10

【 0 0 1 8 】

したがって、体内の抗体の産生を刺激し、抗原に対する免疫をもたらすのに、ワクチンが使用されうる。抗原が、ワクチン接種され、この抗原に対する免疫が発達した対象に導入されると、免疫系は、抗原を発現する細胞を、破壊又は除去しうる。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 9 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 0 9 / 1 4 3 4 1 1 号パンフレット

【 非特許文献 】

【 0 0 2 0 】

【 非特許文献 1 】 “ Progeroid syndromes ”, available online at en.wikipedia.org/wiki/Progeroid_syndromes (November 29, 2017)

【 非特許文献 2 】 Ribas, J. et al., “ Biomechanical strain exacerbates inflammation on a progeria-on-a-chip model ”, Small, Vol. 13 (2017)

【 非特許文献 3 】 Richardson, R. B., “ Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea ”, Aging, Vol. 1, No. 11, pp. 887-902 (2009)

【 非特許文献 4 】 Haddadi, G. H. et al., “ Hesperidin as radioprotector against radiation-induced lung damage in rat: a histopathological study ”, Journal of Medical Physics, Vol. 42, No. 1, pp. 25-32 (2017)

30

【 非特許文献 5 】 Flament, F. et al., “ Effect of the sun on visible clinical signs of aging in Caucasian skin ”, Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, Vol. 6, pp. 221-232 (2016)

【 非特許文献 6 】 Palmer, J. L. et al., “ Combined radiation and burn injury results in exaggerated early pulmonary inflammation ”, Radiation Research, Vol. 180, No. 3, pp. 276-283 (2013)

【 非特許文献 7 】 Cupit-Link, M. C. et al., “ Biology of premature ageing in survivors of cancer ”, ESMO Open, Vol. 2, No. e000250, pp. 1-9 (2017)

40

【 非特許文献 8 】 Smith, R. L. et al., “ Premature and accelerated aging: HIV or HAART? ”, Frontiers in Genetics, Vol. 3, Article 328, pp. 1-10 (2013)

【 非特許文献 9 】 Rohani, A. et al., “ A case control study of cardiovascular health in chemical war disabled Iranian victims ”, Indian Journal of Critical Care Medicine, Vol. 14, No. 3, pp. 109-112 (2010)

【 非特許文献 1 0 】 White, S. S. et al., “ An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology ”, Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews, Vol. 27, No. 4, pp. 197-211 (2009)

【 非特許文献 1 1 】 Zota, A. R. et al., “ Associations of cadmium and lead exposure

50

e with leukocyte telomere length: findings from national health and nutrition examination survey, 1999-2002 ”, American Journal of Epidemiology, Vol. 181, No. 2, pp. 127-136 (2015)

【非特許文献 1 2】Brandl, A. et al., “Oxidative stress induces senescence in chondrocytes”, Journal of Orthopaedic Research, Vol. 29, pp. 1114-1120 (2011)

【非特許文献 1 3】Ando, K. et al., Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products during Aging in the Circulation, Biochem Biophys Res Commun., Vol. 258, 123, 125 (1999)

【非特許文献 1 4】Lindsey JB, et al., “Receptor For Advanced Glycation End-Products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): Cardiovascular Implications,” Diabetes Vascular Disease Research, Vol. 6(1), 7-14, (2009)

【非特許文献 1 5】Bierhaus A, “AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept,” Cardiovasc Res, Vol. 37(3), 586-600 (1998)

【非特許文献 1 6】Ahmed, E.K. et al., “Protein Modification and Replicative Senescence of WI-38 Human Embryonic Fibroblasts” Aging Cells, vol. 9, 252, 260 (2010)

【非特許文献 1 7】Vlassara, H. et al., Advanced Glycosylation Endproducts on Erythrocyte Cell Surface Induce Receptor-Mediated Phagocytosis by Macrophages, J. Exp. Med., Vol. 166, 539, 545 (1987)

【非特許文献 1 8】Vlassara et al., “High-affinity-receptor-mediated Uptake and Degradation of Glucose-modified Proteins: A Potential Mechanism for the Removal of Senescent Macromolecules” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, 5588, 5591 (1985)

【非特許文献 1 9】Romagosa, C. et al., p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors, Oncogene, Vol. 30, 2087-2097 (2011)

【非特許文献 2 0】Freund, A. “Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences” Trends Mol Med. 2010 May;16(5):238-46

【非特許文献 2 1】Ferraccioli, G. et al. “Interleukin-1 β and Interleukin-6 in Arthritis Animal Models: Roles in the Early Phase of Transition from Acute to Chronic Inflammation and Relevance for Human Rheumatoid Arthritis” Mol Med. 2010 Nov-Dec; 16(11-12): 552-557

【非特許文献 2 2】Burton, D.G.A. et al., “Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: a link to atherosclerosis and vascular calcification”, Experimental Gerontology, Vol. 44, No. 10, pp. 659-665 (October 2009)

【非特許文献 2 3】Nelson, G., A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence, Aging Cell, Vol. 11, 345-349 (2012)

【非特許文献 2 4】Rayess, H. et al., Cellular senescence and tumor suppressor gene p16, Int J Cancer, Vol. 130, 1715-1725 (2012)

【非特許文献 2 5】Baker, D. J. et al., “Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders”, Nature, Vol. 479, pp. 232-236, (2011)

【非特許文献 2 6】Zhu, Y. et al., “The Achilles’ heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs”, Aging Cell, Vol. 14, pp. 644-658 (2015)

【非特許文献 2 7】Roos, C.M. et al., “Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice”, Aging Cell (2016)

【非特許文献 2 8】Pan, J. et al., “Inhibition of Bcl-2/xl with ABT-263 selectively kills senescent type II pneumocytes and reverses pulmonary fibrosis induced

10

20

30

40

50

by ionizing radiation in mice”, International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, Vol. 99, No. 2, pp. 353-361 (2017)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0021】

第1の態様では、本発明は、放射線曝露の慢性影響（chronic effect）の発症（onset）を治療又は予防する方法であって、抗A G E抗体を含む組成物を、対象に投与するステップを含む方法である。

【0022】

第2の態様では、本発明は、放射線曝露の慢性影響の発症を治療又は予防する方法であって、第1の抗A G E抗体と、第2の抗A G E抗体とを含む組成物を、対象に投与するステップを含む方法である。第2の抗A G E抗体は、第1の抗A G E抗体と異なる。

【0023】

第3の態様では、本発明は、放射線曝露の慢性影響を受ける対象を治療する方法であって、抗A G E抗体を、第1に投与するステップ；これに続く、対象を、放射線曝露の慢性影響の治療における、第1の投与の有効性について調べるステップ；及びこれに続く、抗A G E抗体を、第2に投与するステップを含む方法である。

【0024】

第4の態様では、本発明は、放射線曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための医薬の製造のための、抗A G E抗体の使用である。

【0025】

第5の態様では、本発明は、放射線曝露の慢性影響の発症の治療又は予防における使用のための、抗A G E抗体を含む組成物である。

【0026】

第6の態様では、本発明は、放射線曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための組成物であって、第1の抗A G E抗体、第2の抗A G E抗体、及び薬学的に許容される担体を含む組成物である。第1の抗A G E抗体は、第2の抗A G E抗体と異なる。

【0027】

第7の態様では、本発明は、放射線曝露の慢性影響の発症を治療又は予防する方法であって、それを必要とする対象を、細胞のA G E修飾タンパク質又はA G E修飾ペプチドに対して免疫化するステップを含む方法である。

【0028】

第8の態様では、本発明は、放射線曝露の慢性影響を受ける対象を治療する方法であって、第1のA G E抗原を含む第1のワクチンを投与するステップ、及び任意の、第2のA G E抗原を含む第2のワクチンを投与するステップを含む方法である。第2のA G E抗原は、第1のA G E抗原と異なる。

【0029】

第9の態様では、本発明は、放射線曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための医薬の製造のための、A G E抗原の使用である。

【0030】

第10の態様では、本発明は、放射線曝露の慢性影響の発症の治療又は予防における使用のための、A G E抗原を含む組成物である。

【0031】

第11の態様では、本発明は、化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防する方法であって、抗A G E抗体を含む組成物を、対象に投与するステップを含む方法である。

【0032】

第12の態様では、本発明は、化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防する方法であって、第1の抗A G E抗体と、第2の抗A G E抗体とを含む組成物を、対象に投与するステップを含む方法である。第2の抗A G E抗体は、第1の抗A G E抗体と異なる。

【0033】

10

20

30

40

50

第13の態様では、本発明は、化学物質曝露の慢性影響を受ける対象を治療する方法であって、抗AGE抗体を、第1に投与するステップ；これに続く、対象を、化学物質曝露の慢性影響の治療における、第1の投与の有効性について調べるステップ；及びこれに続く、抗AGE抗体を、第2に投与するステップを含む方法である。

【0034】

第14の態様では、本発明は、化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための医薬の製造のための、抗AGE抗体の使用である。

【0035】

第15の態様では、本発明は、化学物質曝露の慢性影響の発症の治療又は予防における使用のための、抗AGE抗体を含む組成物である。

10

【0036】

第16の態様では、本発明は、化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための組成物であって、第1の抗AGE抗体、第2の抗AGE抗体、及び薬学的に許容される担体を含む組成物である。第1の抗AGE抗体は、第2の抗AGE抗体と異なる。

【0037】

第17の態様では、本発明は、化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防する方法であって、それを必要とする対象を、細胞のAGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対して免疫化するステップを含む方法である。

【0038】

第18の態様では、本発明は、化学物質曝露の慢性影響を受ける対象を治療する方法であって、第1のAGE抗原を含む第1のワクチンを投与するステップ、及び任意の、第2のAGE抗原を含む第2のワクチンを投与するステップを含む方法である。第2のAGE抗原は、第1のAGE抗原と異なる。

20

【0039】

第19の態様では、本発明は、化学物質曝露の慢性影響の発症を治療又は予防するための医薬の製造のための、AGE抗原の使用である。

【0040】

第20の態様では、本発明は、化学物質曝露の慢性影響の発症の治療又は予防における使用のための、AGE抗原を含む組成物である。

【0041】

30

定義

「早期老化」という用語は、実年齢が進んだ、類似する生物において、典型的に観察される生理学的変化の進行又は発症を意味する。早期老化は、全生物に影響を及ぼす全身（whole-body又はsystemic）状態である。

【0042】

「放射線」という用語は、アルファ線、ベータ線、ガンマ線、X線、及び中性子線を含む。

【0043】

「慢性影響」という用語は、早期老化を模倣する症状により特徴づけられる影響を意味する。

40

【0044】

「ペプチド」という用語は、2～50アミノ酸から構成される分子を意味する。

【0045】

「タンパク質」という用語は、51アミノ酸以上から構成される分子を意味する。

【0046】

「終末糖化反応最終産物」、「AGE」、「AGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチド」、及び「糖化反応最終産物」という用語は、糖が、さらに再配列され、不可逆的架橋を形成するタンパク質側鎖と反応する結果として形成される、修飾タンパク質又は修飾ペプチドを指す。この過程は、還元糖とアミノ基との可逆反応であって、 Schiff塩基を形成する可逆反応で始まり、これが進行して、共有結合性のアマドリ再配列産物を形成する

50

。形成されると、アマドリ産物は、さらなる再配列を経て、AGEを産生する。AGE修飾タンパク質、及びAGE修飾タンパク質に対する抗体については、Bucalaによる米国特許第5,702,704号明細書（「Bucala」）、及びAl-Abed et al.による米国特許第6,380,165号明細書（「Al-Abed」）において記載されている。糖化アルブミン上で見出されるN-デオキシフルクトシルリシンなど、AGEを形成するのに必要な再配列を経ない、糖化タンパク質又は糖化ペプチドは、AGEではない。AGEは、2-(2-フルオイル)-4(5)-(2-フラニル)-1H-イミダゾール（「FFI」：2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole）；5-ヒドロキシメチル-1-アルキルピロール-2-カルバルデヒド（「ピラリン」）；非蛍光性のモデルAGEである、1-アルキル-2-ホルミル-3,4-ジグリコシルピロール（「AFGP」：1-alkyl-2-formyl-3,4-diglycosyl pyrrole）；カルボキシメチルリシン；カルボキシエチルリシン；及びペントシジンなどのAGE修飾（また、AGEエピトープ又はAGE部分とも称される）の存在により同定されうる。別のAGEである、ALIについては、Al-Abedにおいて記載されている。

【0047】

「AGE抗原」という用語は、細胞のAGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対する免疫応答を誘発する物質を意味する。細胞のAGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対する免疫応答は、AGEが修飾されていないタンパク質又はペプチドに対する抗体の産生を含む。

【0048】

「細胞上のAGE修飾タンパク質に結合する抗体」、「抗AGE抗体」、又は「AGE抗体」とは、好ましくは、抗体の定常領域を含み、AGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドが、通常、細胞、好ましくは、哺乳動物細胞、より好ましくは、ヒト細胞、ネコ細胞、イヌ細胞、ウマ細胞、ラクダ科動物細胞（例えば、ラクダ細胞又はアルパカ細胞）、ウシ細胞、ヒツジ細胞、ブタ細胞、又はヤギ細胞の表面上に結合していることが見出される、タンパク質又はペプチドである、AGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに結合する、抗体、抗体断片、又は他のタンパク質若しくはペプチドを意味する。「細胞上のAGE修飾タンパク質に結合する抗体」、「抗AGE抗体」、又は「AGE抗体」は、AGEが修飾されたタンパク質又はペプチド、及びAGEが修飾されていない、同じタンパク質又はペプチドの両方に、同じ特異性及び選択性で結合する（すなわち、AGE修飾の存在は、結合を増大させない）、抗体又は他のタンパク質を含む。AGE修飾アルブミンは、アルブミンは、通常、細胞の表面上に結合していることが見出されるタンパク質ではないため、細胞上のAGE修飾タンパク質ではない。「細胞上のAGE修飾タンパク質に結合する抗体」、「抗AGE抗体」、又は「AGE抗体」は、細胞の除去、破壊、又は死をもたらす抗体だけを含む。また、例えば、毒素、薬物、又は他の化学物質若しくは粒子にコンジュゲートした抗体も含まれる。好ましくは、抗体は、モノクローナル抗体であるが、ポリクローナル抗体もまた、可能である。

【0049】

「老化細胞」という用語は、増殖停止の状態にあり、p16^{Ink4a}の活性化、又は老化に関連するβ-ガラクトシダーゼの発現など、1又は2以上の、老化のバイオマーカーを発現する細胞を意味する。また、ALS患者の筋肉内で見出される、一部のサテライト細胞など、インビボでは増殖しないが、ある特定の条件下にあるインビトロでは増殖しうる、1又は2以上の、老化のバイオマーカーを発現する細胞も含まれる。

【0050】

「老化細胞溶解剤」という用語は、老化細胞を破壊する、分子量900ダルトン未満の低分子を意味する。「老化細胞溶解剤」という用語は、抗体、抗体コンジュゲート、タンパク質、ペプチド、又は生物療法を含む。

【0051】

「バリエーション」という用語は、特異的に同定された配列と異なり、1又は2以上のヌクレオチド、タンパク質又はアミノ酸の残基が、欠失するか、置換されるか、又は付加され

10

20

30

40

50

た、ヌクレオチド配列、タンパク質配列、又はアミノ酸配列を意味する。バリエーションは、天然に存在する対立遺伝子バリエーションの場合もあり、天然に存在しないバリエーションの場合もある。同定された配列のバリエーションは、同定された配列の機能的特徴の、一部又は全部を保持しうる。

【0052】

「配列同一性パーセント (%)」という用語は、最大の配列同一性パーセントを達成するように、配列をアライメントし、必要な場合に、ギャップを導入し、保存的置換を、配列同一性の一部と考えずにおいた後で、参照ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一な、候補配列のアミノ酸残基の百分率として規定される。アミノ酸配列の同一性パーセントを決定することを目的とするアライメントは、BLASTソフトウェア、BLAST-2ソフトウェア、ALIGNソフトウェア、又はMegalign (DNASTAR社製) ソフトウェアなど、公開されているコンピュータソフトウェアを使用して、多様な方式で達成されうる。好ましくは、配列同一性%の値は、配列比較コンピュータプログラムである、ALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. 社 (South San Francisco, CA) から公開されているか、又は米国著作権局において、ユーザー文書と共に保管され、米国著作権登録番号第TXU510087号の下に登録されている、ソースコードからコンパイルされうる。ALIGN-2プログラムは、デジタル式のUNIX V4.0Dを含む、UNIXオペレーティングシステム上の使用のためにコンパイルされるものとする。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムにより設定され、変動しない。

【0053】

ALIGN-2が、アミノ酸配列比較のために用いられる状況において、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bに照らした、これとの、又はこれに対する配列同一性% (これは、代替的に、所与のアミノ酸配列Bに照らした、これとの、又はこれに対する、ある特定のアミノ酸配列の同一性%を有するか、又は含む、所与のアミノ酸配列Aとしても言及される) は、以下: $100 \times \text{比} X/Y$ [式中、Xは、配列アライメントプログラムALIGN-2により、このプログラムのAとBとのアライメントにおいて、同一なマッチとして評価されたアミノ酸残基の数であり、Yは、B内のアミノ酸残基の総数である] の通りに計算される。アミノ酸配列Aの長さが、アミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、Aの、Bに照らした、アミノ酸配列の同一性%は、Bの、Aに照らした、アミノ酸配列の同一性%と等しくない。そうでないことが具体的に言明されない限りにおいて、本明細書で使用される、全てのアミノ酸配列の同一性%値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して得られる。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】 抗体結合時間の時間と対比した応答についてのグラフである。

【図2A】 β -ガラクトシダーゼ老化染色キットによる染色の後における、非治療細胞を例示する図である。

【図2B】 GFPにコンジュゲートした抗AGE抗体による染色の後における、非治療細胞を例示する図である。

【図2C】 GFP-DAPIにコンジュゲートした抗AGE抗体による染色の後における、非治療細胞を例示する図である。

【図2D】 β -ガラクトシダーゼ老化染色キットによる染色の後における、エトポシド治療細胞を例示する図である。

【図2E】 GFPにコンジュゲートした抗AGE抗体による染色の後における、エトポシド治療細胞を例示する図である。

【図2F】 GFP-DAPIにコンジュゲートした抗AGE抗体による染色の後における、エトポシド治療細胞を例示する図である。

【図3A】 細胞を、0 μ Mのドキソルビシンで、3日間にわたり治療する結果を例示する図である。

【図3B】 細胞を、0.01 μ Mのドキソルビシンで、3日間にわたり治療する結果を例

示する図である。

【図 3 C】細胞を、0.1 μ M のドキソルビシンで、3 日間にわたり治療する結果を例示する図である。

【図 3 D】細胞を、1 μ M のドキソルビシンで、3 日間にわたり治療する結果を例示する図である。

【図 3 E】細胞を、0 μ M のドキソルビシンで、6 日間にわたり治療する結果を例示する図である。

【図 3 F】細胞を、0.1 μ M のドキソルビシンで、6 日間にわたり治療する結果を例示する図である。

【図 3 G】細胞を、1 μ M のドキソルビシンで、6 日間にわたり治療する結果を例示する図である。

【発明を実施するための形態】

【0055】

近年の研究は、炎症と、早期老化を模倣する症状など、放射線曝露又は化学物質曝露の慢性影響との関連を明らかにしている。ダイオキシン中毒は、サイトカインである TNF α 、IL-6、及び IL-1 β の発現を含む炎症を誘導し、その産物が、酸化ストレスに
関与する遺伝子の発現の増大を引き起こす (White, S. S. et al., “An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology”, Journal of Environmental Science and Health . Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews, Vol. 27, No. 4, pp. 197-211 (2009))。紫外光は、サイトカインのカスケードを引き起こす皮膚の炎症を
誘導し、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、及びヒドロキシルラジカルを含む反応性酸素分子種を発生させる (D’Orazio, J. et al., “UV radiation and the skin”, International Journal of Molecular Sciences, Vol. 14, pp. 12222-12248 (2013))。
イオン化放射線、HAART 療法に関与する抗レトロウイルス薬、カドミウム曝露、及び鉛曝露は、全て、酸化ストレス及び炎症の両方を促進することにより、早期老化を模倣する
症状に寄与する (Zota, A. R. et al.; Smith, R. L. et al., “Premature and accelerated aging: HIV or HAART?”, Frontiers in Genetics, Vol. 3, Article 328, pp. 1-10 (2013); Richardson, R. B., “Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea”, Aging, Vol. 1, No. 11, pp. 887-902 (2009); Haddadi, G. H. et al., “Hesperidin as radioprotector against radiation-induced lung damage in rat: a histopathological study”, Journal of Medical Physics, Vol. 42, No. 1, pp. 25-32 (2017))。これは、炎症と、早老症候群から生じる早期老化との関連を見出した研究と符合
する。例えば、早老症の生体機能チップモデルは、生体力学的歪みに応答して炎症マーカーのレベルが増大することを示した (Ribas, J. et al., “Biomechanical strain exacerbates inflammation on a progeria-on-a-chip model”, Small, Vol. 13 (2017))。

【0056】

放射線曝露又は化学物質曝露の慢性影響において炎症及び酸化ストレスが役割を担うことから、細胞の老化の関与が示唆される。老化細胞は、老化関連分泌現象 (SASP) の一部として、炎症因子及び反応性酸素分子種を分泌することが公知である。これらの特徴は、細胞の老化が、早期老化を模倣する症状の進行又は発症など、放射線曝露又は化学物質曝露の慢性影響における原因因子であることを示唆する。この関係を裏書きする証拠は、化学療法薬及びイオン化放射線が、細胞の老化の直接的な原因であることを示す複数の研究において見出されうる (Cupit-Link, M. C. et al., “Biology of premature ageing in survivors of cancer”, ESMO Open, Vol. 2, No. e000250, pp. 1-9 (2017); Richardson, R. B., “Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea”, Aging, Vol. 1, No. 11, pp. 887-902 (2009); Roninson, I. B., “Tumor cell senescence in cancer treatment”, Cancer Research, Vol. 63, pp. 2705-2715 (2003); Meng, A. et al., “Ionizing radiation and Bisulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells”, Cancer Research, Vol. 63, pp. 5414-5419 (2003))

）。

【0057】

老化細胞溶解剤の投与による、老化細胞の除去は、イオン化放射線曝露から生じる、早期老化を模倣する症状を治療することが示されている (Zhu, Y. et al., “The Achilles’ heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs”, *Aging Cell*, Vol. 14, pp. 644-658 (2015); Pan, J. et al., “Inhibition of Bcl-2/xl with ABT-263 selectively kills senescent type II pneumocytes and reverses pulmonary fibrosis induced by ionizing radiation in mice”, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, Vol. 99, No. 2, pp. 353-361 (2017))。細胞の老化と、放射線曝露又は化学物質曝露の慢性影響との間の、一般的連関の同定は、炎症及び酸化ストレスの発生源をターゲティングする、同様の治療可能性を可能とする。本発明は、AGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドを発現する細胞 (AGE修飾細胞) のクリアランスの増強を使用して、早期老化を模倣する症状など、放射線曝露又は化学物質曝露の慢性影響の発症を治療、改善、又は予防する。これは、抗AGE抗体を、対象に投与することにより達成され得る。

10

【0058】

細胞のAGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対するワクチン接種もまた、対象における、AGE修飾細胞の存在を制御するのに使用されうる。ワクチン接種に反応して、体内の免疫系によりなされる、持続的で、事実上ユビキタスな監視は、体内のAGE修飾細胞を低レベルに維持することを可能とする。細胞のAGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対するワクチン接種は、老化細胞を除去するか、又は死滅させる。老化細胞の除去又は破壊の過程は、細胞のAGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対するワクチン接種を、早期老化を模倣する症状など、放射線曝露又は化学物質曝露の慢性影響の発症の治療又は予防に使用することを可能とする。

20

【0059】

早期老化は、実年齢が進んだ生物において、典型的に呈される、生理学的変化、疾患、障害、及び／又は状態の発症により特徴づけられる。早期老化の徴候は、白髪、しわ、フレイル、白内障、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化、アルツハイマー病、パーキンソン病、サルコペニア、脂肪組織の減少、前彎後彎症、がん、早発閉経、心血管疾患、認知症、II型糖尿病、内分泌障害、心機能障害、骨粗相症、骨関節炎、肺線維症、腎疾患及び肝疾患、代謝障害、リポジストロフィー、聴覚低下、視覚低下、並びに記憶障害の進行を含む。早期老化は、1又は2以上の早老症候群から生じうる。早期老化を模倣する症状は、放射線への曝露、又は化学療法薬、HAART薬、化学兵器、毒物、若しくは酸化剤などの化学物質への曝露など、環境への曝露の慢性影響でありうる。

30

【0060】

当技術分野では、抗AGE抗体が公知であり、市販されている。例は、米国特許第5,702,704号明細書 (Bucala)、及び米国特許第6,380,165号明細書 (Al-bed et al.) において記載されている例を含む。抗体は、FFI、ピラリン、AFGP、ALI、カルボキシメチルリシン (CML: carboxymethyllysine)、カルボキシエチルリシン (CEL: carboxyethyllysine)、及びベントシジンなど、AGE修飾を有する、1又は2以上のAGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチド、及びこのような抗体の混合物に結合しうる。好ましくは、抗体は、ヒト；ネコ、イヌ、及びウマを含む愛玩動物；並びにラクダ (又はアルパカ)、ウシ (ウシ)、ヒツジ、ブタ、及びヤギなど、商業的に重要な動物に対して非免疫原性であるなど、それが使用される動物に対して非免疫原性である。より好ましくは、抗体は、ヒト化抗体 (ヒトに対する)、ネコ化抗体 (ネコに対する)、イヌ化抗体 (イヌに対する)、ウマ化抗体 (ウマに対する)、ラクダ科動物化抗体 (ラクダ又はアルパカに対する)、ウシ化抗体 (ウシに対する)、ヒツジ化抗体 (ヒツジに対する)、ブタ化抗体 (ブタに対する)、又はヤギ化抗体 (ヤギに対する) など、抗体に対する免疫応答を低減するように、動物の抗体と同種の定常領域を有する。最も好ましくは、抗体は、ヒト抗体、ネコ抗体、イヌ抗体、ウマ抗体、ラクダ抗体、ウシ抗体、ヒツ

40

50

ジ抗体、ブタ抗体、又はヤギ抗体など、それが使用される動物の抗体と同一（可変領域を除き）である。これらの動物に対する抗体の定常領域及び他の部分の詳細については、下記に記載される。抗体は、モノクローナル抗体の場合もあり、ポリクローナル抗体の場合もある。好ましくは、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0061】

好ましい抗AGE抗体は、カルボキシメチルリシンAGE修飾又はカルボキシエチルリシンAGE修飾を呈する、タンパク質又はペプチドに結合する抗AGE抗体を含む。カルボキシメチルリシン（また、N（イプシロン）-（カルボキシメチル）リシン、N（6）-カルボキシメチルリシン、又は2-アミノ-6-（カルボキシメチルアミノ）ヘキサ酸としても公知である）、及びカルボキシエチルリシン（また、N-イプシロン-（カルボキシエチル）リシンとしても公知である）は、酸化ストレス及び化学物質の糖化反応の結果として、タンパク質又はペプチド及び脂質において見出される。CML改変タンパク質又はCML改変ペプチド及びCEL改変タンパク質又はCEL改変ペプチドは、様々な細胞上で発現される受容体である、RAGEにより認識される。CML及びCELについては、十分に研究されており、CML関連製品及びCEL関連製品は市販されている。例えば、Cell Biolabs, Inc.社は、CML-BSA抗原、CMLポリクローナル抗体、CML免疫プロットキット、及びCML競合ELISAキット（www.cellbiolabs.com/cml-assays）のほか、CEL-BSA抗原及びCEL競合ELISAキット（www.cellbiolabs.com/cel-n-epsilon-carboxyethyl-lysine-assays-and-reagents）を販売している。好ましい抗体は、キーホールリンペットヘモシアニンをコンジュゲートしたカルボキシメチルリシンに対して惹起された、市販のマウス抗糖化反応最終産物抗体であって、R&D Systems, Inc.社から入手可能であり（Minneapolis, MN；型番：MAB3247）、ヒト定常領域（又はそれが投与される動物の定常領域）を有するように修飾された抗体であるカルボキシメチルリシンMAb（クローン：318003）の可変領域を含む。R&D Systems, Inc.社の型番：MAB3247に対応するカルボキシメチルリシン抗体など、市販の抗体は、診断目的で対象となる場合があり、動物又はヒトにおける使用に適さない材料を含有しうる。好ましくは、市販の抗体は、毒素又は他の潜在的に有害な材料を除去するように、動物又はヒトにおける使用の前に、精製及び／又は単離される。

【0062】

抗AGE抗体は、好ましくは、抗体-抗原複合体からの解離速度又は k_d （また、 $k_{b_{ack}}$ 又はオフ速度とも称される）が小さい、好ましくは、 9×10^{-3} 、 8×10^{-3} 、 7×10^{-3} 、 6×10^{-3} （1/秒）以下である。抗AGE抗体は、好ましくは、細胞のAGE修飾タンパク質に対する高アフィニティーを有し、これは、低解離定数である、 9×10^{-6} 、 8×10^{-6} 、 7×10^{-6} 、 6×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 4×10^{-6} 、 3×10^{-6} （M）以下の K_D として表されうる。好ましくは、抗AGE抗体結合特性は、図1に例示される、R&D Systems, Inc.社（Minneapolis, MN；型番：MAB3247）から市販されているカルボキシメチルリシンMAb（クローン：318003）と、同等であるか、同じであるか、又はこれより優れている。

【0063】

抗AGE抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC：antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）を介して、AGE修飾細胞を破壊しうる。ADCCとは、免疫系のエフェクター細胞が、膜表面抗原に特異的抗体が結合した標的細胞を、能動的に溶解する、細胞媒介性免疫防御のメカニズムである。ADCCは、ナチュラルキラー（NK：natural killer）細胞、マクロファージ、好中球、又は好酸球により媒介されうる。エフェクター細胞は、結合した抗体のFc部分に結合する。抗AGE抗体はまた、補体依存性細胞毒性（CDC：complement-dependent cytotoxicity）を介して、AGE修飾細胞も破壊しうる。CDCでは、免疫系の補体カスケードは、標的抗原に結合した抗体により誘発される。

【0064】

抗AGE抗体は、AGE修飾細胞の破壊を引き起こす薬剤にコンジュゲートされうる。

このような薬剤は、毒素、細胞毒性剤、磁気ナノ粒子、及び磁気スピンドットディスクでありうる。

【0065】

A G E 修飾細胞を、選択的にターゲティングし、除去するように、抗 A G E 抗体にコンジュゲートした小孔形成毒素 (P F T : pore-forming toxin) (Aroian R. et al., "Pore-Forming Toxins and Cellular Non-Immune Defenses (CNIDs)," Current Opinion in Microbiology, 10:57-61 (2007)) などの毒素が、患者に注射されうる。抗 A G E 抗体は、A G E 修飾細胞を認識し、これらに結合する。次いで、毒素が、細胞表面にポア形成を引き起こし、浸透圧溶解によって、細胞を除去する。

【0066】

抗 A G E 抗体にコンジュゲートした磁気ナノ粒子を、患者に注射して、A G E 修飾細胞をターゲティングし、除去することができる。A G E 修飾細胞を、選択的に除去するために、磁場を印加することにより、磁気ナノ粒子は加熱されうる。

【0067】

代替法として、血管を遮断しうる自己凝集を回避するために、磁場が印加されたときだけ磁化される磁気スピンドットディスクは、磁場が印加されると、スピンし始め、標的細胞の膜破壊を引き起こす。抗 A G E 抗体にコンジュゲートした磁気スピンドットディスクは、他の細胞の除去を伴わずに、A G E 修飾細胞型を、特異的にターゲティングする。

【0068】

抗体は、2つの重鎖と、2つの軽鎖とから構成される Y 字形タンパク質である。Y 字形の2つアームが、抗体の抗原結合性断片 (F a b : fragment antigen-binding) 領域を形成するのに対し、Y 字形の基部又はテール部は、抗体の F c (結晶性断片 : fragment crystallizable) 領域を形成する。抗原への結合は、相補性決定領域 (また、C D R 又は超可変領域としても公知である) のセットである、パラトープと称される場所にある、抗原結合性断片領域 (Y 字形のアームの先端部分) の末端部分で生じる。相補性決定領域は、異なる抗体間で異なり、所与の抗体に、所与の抗原との結合のための特異性を与える。抗体の F c (結晶性断片) 領域は、抗原への結合の結果を決定し、補体カスケードを誘発するか、又は抗体依存性細胞媒介性細胞毒性 (A D C C) を誘起することなどにより、免疫系と相互作用しうる。抗体が、組換えにより調製される場合、2つの異なる抗原に結合する可変領域 (又は相補性決定領域) を有する単一抗体を有することも可能であり、Y 字形の各先端部分が、いずれかの抗原に特異的である。これらは、二重特異性 (bi-specific) 抗体と呼ばれている。

【0069】

本発明に従うヒト化抗 A G E 抗体は、配列番号 22 に示されるアミノ酸のヒト定常領域配列を有しうる。ヒト化抗 A G E 抗体の重鎖相補性決定領域は、配列番号 23 (C D R 1 H)、配列番号 24 (C D R 2 H)、及び配列番号 25 (C D R 3 H) に示されるタンパク質配列のうちの 1 又は 2 以上を有しうる。ヒト化抗 A G E 抗体の軽鎖相補性決定領域は、配列番号 26 (C D R 1 L)、配列番号 27 (C D R 2 L)、及び配列番号 28 (C D R 3 L) に示されるタンパク質配列のうちの 1 又は 2 以上を有しうる。

【0070】

ヒト化抗 A G E 抗体の重鎖は、配列番号 1 のタンパク質配列を有しうるか、又は含むうる。重鎖の可変ドメインは、配列番号 2 のタンパク質配列を有しうるか、又は含むうる。重鎖可変ドメインの相補性決定領域 (配列番号 2) は、配列番号 41、配列番号 42、及び配列番号 43 に示される。ヒト化抗 A G E 抗体のカッパ軽鎖は、配列番号 3 のタンパク質配列を有しうるか、又は含むうる。カッパ軽鎖の可変ドメインは、配列番号 4 のタンパク質配列を有しうるか、又は含むうる。配列番号 4 の 128 位におけるアルギニン (A r g 又は R) 残基は、省かれてもよい。軽鎖可変ドメインの相補性決定領域 (配列番号 4) は、配列番号 44、配列番号 45、及び配列番号 46 に示される。可変領域は、コドンが最適化され、合成され、ヒト免疫グロブリン G 1 定常領域を含有する発現ベクターにクロ

10

20

30

40

50

ーニングされうる。加えて、可変領域は、非ヒト抗A G E抗体の調製において使用されうる。

【0071】

抗体の重鎖は、マウス抗A G E抗体免疫グロブリンG 2 b重鎖のD N A配列である、配列番号1 2によりコードされうる。配列番号1 2によりコードされるマウス抗A G E抗体免疫グロブリンG 2 b重鎖のタンパク質配列は、配列番号1 6に示される。マウス抗体の可変領域は、配列番号1 6の2 5～1 4 2位に対応する、配列番号2 0に示される。抗体の重鎖は、代替的に、キメラ抗A G E抗体ヒト免疫グロブリンG 1重鎖のD N A配列である、配列番号1 3によりコードされうる。配列番号1 3によりコードされる、キメラ抗A G E抗体ヒト免疫グロブリンG 1重鎖のタンパク質配列は、配列番号1 7に示される。キメラ抗A G E抗体ヒト免疫グロブリンは、配列番号2 0の2 5～1 4 2位における、マウス可変領域を含む。抗体の軽鎖は、マウス抗A G E抗体カップ軽鎖である配列番号1 4のD N A配列によりコードされうる。配列番号1 4によりコードされるマウス抗A G E抗体カップ軽鎖のタンパク質配列は、配列番号1 8に示される。マウス抗体の可変領域は、配列番号2 1に示され、これは配列番号1 8の2 1～1 3 2位に対応する。抗体の軽鎖は、代替的に、キメラ抗A G E抗体ヒトカップ軽鎖である配列番号1 5のD N A配列によりコードされうる。配列番号1 5によりコードされるキメラ抗A G E抗体ヒトカップ軽鎖のタンパク質配列を、配列番号1 9に示される。キメラ抗A G E抗体ヒト免疫グロブリンは、配列番号2 1の2 1～1 3 2位におけるマウス可変領域を含む。

【0072】

本発明に従うヒト化抗A G E抗体は、1又は2以上のヒト化重鎖又はヒト化軽鎖を有しうるか、又は含む。ヒト化重鎖は、配列番号3 0、3 2、又は3 4のD N A配列によりコードされうる。配列番号3 0、配列番号3 2、及び配列番号3 4によりコードされるヒト化重鎖のタンパク質配列は、それぞれ、配列番号2 9、配列番号3 1、及び配列番号3 3に示される。ヒト化軽鎖は、配列番号3 6、配列番号3 8、又は配列番号4 0のD N A配列によりコードされうる。配列番号3 6、配列番号3 8、及び配列番号4 0によりコードされるヒト化軽鎖のタンパク質配列は、それぞれ、配列番号3 5、配列番号3 7、及び配列番号3 9に示される。好ましくは、ヒト化抗A G E抗体は、元の抗体特異性を保持しながら、ヒト配列の量を最大化する。配列番号2 9、配列番号3 1、及び配列番号3 3から選出されるタンパク質配列を有する重鎖、並びに配列番号3 5、配列番号3 7、及び配列番号3 9から選出されるタンパク質配列を有する軽鎖を含有する、完全ヒト化抗体が構築されうる。

【0073】

特に好ましい抗A G E抗体は、マウス抗A G E抗体モノクローナル抗体をヒト化することにより得られうる。マウス抗A G E抗体モノクローナル抗体は、配列番号4 7に示される重鎖タンパク質配列（可変ドメインのタンパク質配列は、配列番号5 2に示される）と、配列番号5 7に示される軽鎖タンパク質配列（可変ドメインのタンパク質配列は、配列番号6 2に示される）とを有する。好ましいヒト化重鎖は、配列番号4 8、配列番号4 9、配列番号5 0、又は配列番号5 1に示されるタンパク質配列（ヒト化重鎖の可変ドメインのタンパク質配列は、それぞれ、配列番号5 3、配列番号5 4、配列番号5 5、及び配列番号5 6に示される）を有しうる。好ましいヒト化軽鎖は、配列番号5 8、配列番号5 9、配列番号6 0、又は配列番号6 1に示されるタンパク質配列（ヒト化軽鎖の可変ドメインのタンパク質配列は、それぞれ、配列番号6 3、配列番号6 4、配列番号6 5、及び配列番号6 6に示される）を有しうる。好ましくは、ヒト化抗A G E抗体モノクローナル抗体は、配列番号4 8、配列番号4 9、配列番号5 0、及び配列番号5 1からなる群から選択されるタンパク質配列を有する重鎖、並びに配列番号5 8、配列番号5 9、配列番号6 0、及び配列番号6 1からなる群から選択されるタンパク質配列を有する軽鎖から構成される。これらのタンパク質配列から構成されたヒト化抗A G E抗体モノクローナル抗体は、良好な結合及び／又は免疫系の活性化の改善を有する結果として、効能の増大をもたらしうる。

【0074】

非ヒト種に由来する抗体のタンパク質配列は、配列番号2に示される配列を有する重鎖、又は配列番号4に示される配列を有するカップ軽鎖の可変ドメインを含むように修飾されうる。非ヒト種は、飼いネコ又は飼いイヌなどの愛玩動物の場合もあり、ウシ、ウマ、又はラクダなどの家畜の場合もある。好ましくは、非ヒト種は、マウスではない。ウマ (*Equus caballus*) 抗体免疫グロブリンガンマ4の重鎖は、配列番号5のタンパク質配列 (EMBL/GenBank受託番号: AY445518) を有しうるか、又は含みうる。ウマ (*Equus caballus*) 抗体免疫グロブリンデルタの重鎖は、配列番号6のタンパク質配列 (EMBL/GenBank受託番号: AY631942) を有しうるか、又は含みうる。イヌ (*Canis familiaris*) 抗体免疫グロブリンAの重鎖は、配列番号7のタンパク質配列 (GenBank受託番号: L36871) を有しうるか、又は含みうる。イヌ (*Canis familiaris*) 抗体免疫グロブリンEの重鎖は、配列番号8のタンパク質配列 (GenBank受託番号: L36872) を有しうるか、又は含みうる。ネコ (*Felis catus*) 抗体免疫グロブリンG2の重鎖は、配列番号9のタンパク質配列 (DDBJ/EMBL/GenBank受託番号: KF811175) を有しうるか、又は含みうる。

10

【0075】

ラクダ (ヒトコブラクダ (*Camelus dromedarius*) 及びフタコブラクダ (*Camelus bactrianus*))、ラマ (*llama*) (ラマ (*Lama glama*)、アルパカ (*Lama pacos* 及び *Lama vicugna*))、アルパカ (*Vicugna pacos*)、及びグアナコ (*Lama guanicoe*) などのラクダ科の動物は、他の哺乳動物では見出されない、固有の抗体を有する。従来の免疫グロブリンG抗体から構成される重鎖及び軽鎖の四量体に加えて、ラクダ科動物はまた、軽鎖を含有せず、重鎖二量体として存在する、重鎖免疫グロブリンG抗体も有する。これらの抗体は、重鎖抗体、HCAb、単一ドメイン抗体、又はs dAbとして公知であり、ラクダ科動物の重鎖抗体の可変ドメインは、VHHとして公知である。ラクダ科動物の重鎖抗体は、重鎖CH1ドメインを欠き、他の種では見出されないヒンジ領域を有する。アラビアラクダ (ヒトコブラクダ) 単一ドメイン抗体の可変領域は、配列番号10のタンパク質配列 (GenBank 受託番号: AJ245148) を有しうるか、又は含みうる。アラビアラクダ (ヒトコブラクダ) の四量体免疫グロブリン重鎖の可変領域は、配列番号11のタンパク質配列 (GenBank受託番号: AJ245184) を有しうるか、又は含みうる。

20

【0076】

ラクダ科動物に加えて、重鎖抗体はまた、サメ、ガンギエイ、及びエイなどの軟骨魚においても見出される。この種類の抗体は、免疫グロブリン新抗原受容体又はIgNARとして公知であり、IgNARの可変ドメインは、VNARとして公知である。IgNARは、各々1つずつの可変ドメイン及び5つずつの定常ドメインから構成される、2つの同一な重鎖二量体として存在する。ラクダ科動物と同様に、軽鎖は存在しない。

30

【0077】

さらなる非ヒト種のタンパク質配列は、International ImMunoGeneTics Information System (www.imgt.org)、European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk)、DNA Databank of Japan (ddbj.nig.ac.jp/arsa)、又はNational Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) などのオンラインデータベース内で、たやすく見出されうる。

40

【0078】

抗AGE抗体又はこのバリエーションは、配列番号1、配列番号16、配列番号17、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、又は配列番号51のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖であって、それらの翻訳後修飾を含みうる。少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する重鎖は、参照配列と比べて、置換 (例えば、保存的置換)、挿入、又は欠失を含有しうるが、この配列を含む抗AGE抗体は、AGEに結合する能力を保持する。

【0079】

50

抗AGE抗体又はこのバリエントは、配列番号2、配列番号20、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、又は配列番号56のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖可変領域であって、それらの翻訳後修飾を含みうる。少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する可変領域は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、又は欠失を含有しうるが、この配列を含む抗AGE抗体は、AGEに結合する能力を保持する。置換、挿入、又は欠失は、可変領域外の領域内で生じうる。

10

【0080】

抗AGE抗体又はこのバリエントは、配列番号3、配列番号18、配列番号19、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、又は配列番号61のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖であって、それらの翻訳後修飾を含みうる。少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する軽鎖は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、又は欠失を含有しうるが、この配列を含む抗AGE抗体は、AGEに結合する能力を保持する。置換、挿入、又は欠失は、可変領域外の領域内で生じうる。

20

【0081】

抗AGE抗体又はこのバリエントは、配列番号4、配列番号21、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、又は配列番号66のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変領域であって、それらの翻訳後修飾を含みうる。少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する可変領域は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、又は欠失を含有しうるが、この配列を含む抗AGE抗体は、AGEに結合する能力を保持する。置換、挿入、又は欠失は、可変領域外の領域内で生じうる。

30

【0082】

代替的に、抗体は、CML-KLH（キーホールリンペットヘモシアニンをコンジュゲートしたカルボキシメチルリシン：carboxymethyl lysine conjugated with keyhole limpet hemocyanin）に対して惹起された、市販のマウス抗糖化反応最終産物抗体であって、R&D Systems, Inc.社から入手可能な抗体（Minneapolis, MN；型番：MAB3247）である、カルボキシメチルリシンMAb（クローン：318003）の相補性決定領域を有しうる。

【0083】

抗体は、対象の免疫系による、標的とする細胞の破壊を可能とする定常領域を有しうるか、又は含みうる。

40

【0084】

AGE型が2以上のAGE修飾タンパク質に結合する抗体の混合物もまた、使用されうる。

【0085】

2つの異なるエピトープに向けられた抗AGE抗体である二重特異性抗体もまた、使用されうる。このような抗体は、1つの抗AGE抗体の可変領域に由来する可変領域（又は相補性決定領域）、及び異なる抗体に由来する可変領域（又は相補性決定領域）を有するであろう。

【0086】

抗体断片は、全抗体の代わりに使用されうる。例えば、免疫グロブリンGは、酵素によ

50

る消化を介して、小型断片に分解されうる。パパイン消化は、重鎖間ジスルフィド架橋のN末端側を切断して、F a b断片をもたらす。F a b断片は、軽鎖と、重鎖の、2つのN末端ドメインのうちの1つとを含む（また、F d断片としても公知である）。ペプシン消化は、重鎖間ジスルフィド架橋のC末端側を切断して、F (a b')₂断片をもたらす。F (a b')₂断片は、軽鎖、及びジスルフィド架橋により連結された、2つのN末端ドメインの両方を含む。ペプシン消化はまた、F v（可変断片：fragment variable）及びF c断片（結晶性断片）も形成しうる。F v断片は、2つのN末端可変ドメインを含有する。F c断片は、細胞上の免疫グロブリン受容体、及び補体カスケードの最初の要素と相互作用するドメインを含有する。ペプシンはまた、重鎖の第3定常ドメイン（C_H3：third constant domain of the heavy chain）の前で、免疫グロブリンGを切断して、大型断片であるF (a b c)と、小型断片であるp F c'をもたらす場合もある。抗体断片は、代替的に、組換えによりもたらされる場合もある。好ましくは、このような抗体断片は、A G E修飾細胞の破壊を引き起こす薬剤にコンジュゲートされうる。

【0087】

さらなる抗体が所望される場合、これらは、周知の方法を使用して作製されうる。例えば、哺乳動物宿主において、ポリクローナル抗体（p A b）は、免疫原と、所望の場合、アジュバントとの、1回又は2回以上の注射により惹起されうる。典型的に、免疫原（及びアジュバント）は、哺乳動物において、皮下注射又は腹腔内注射により注射されうる。免疫原は、A G E-抗トロンビンIII、A G E-カルモジュリン、A G E-インスリン、A G E-セルロプラスミン、A G E-コラーゲン、A G E-カテプシンB、A G E-ウシ血清アルブミン（A G E-B S A）、A G E-ヒト血清アルブミン、及びオボアルブミンなどのA G E-アルブミン、A G E-クリスタリン、A G E-プラスミノゲン活性化因子、A G E-内皮細胞膜タンパク質、A G E-アルデヒドレダクターゼ、A G E-トランスフェリン、A G E-フィブリン、A G E-銅／亜鉛S O D、A G E-a p o B、A G E-フィブ्रोネクチン、A G E-腓リボース、A G E-a p o A-I及びII、A G E-ヘモグロビン、A G E-N a⁺／K⁺-A T Pアーゼ、A G E-プラスミノゲン、A G E-ミエリン、A G E-リゾチーム、A G E-免疫グロブリン、A G E-赤血球G l u輸送タンパク質、A G E-β-N-アセチルヘキソミナーゼ、A G E-a p o E、A G E-赤血球膜タンパク質、A G E-アルドースレダクターゼ、A G E-フェリチン、A G E-赤血球スペクトリン、A G E-アルコールデヒドロゲナーゼ、A G E-ハプトグロビン、A G E-チューブリン、A G E-甲状腺ホルモン、A G E-フィブリノーゲン、A G E-β₂-ミクログロブリン、A G E-ソルビトールデヒドロゲナーゼ、A G E-α₁-抗トリプシン、A G E-炭酸デヒドラターゼ、A G E-R Nアーゼ、A G E-低密度リポタンパク質、A G E-ヘキソキナーゼ、A G E-a p o C-I、A G E-R Nアーゼ、A G E-ヒトヘモグロビンなどのA G E-ヘモグロビン、A G E-低密度リポタンパク質（A G E-L D L）、及びA G E-コラーゲンIVなど、細胞のA G E修飾タンパク質でありうる。A G E修飾全赤血球、A G E修飾溶解赤血球、又はA G E修飾部分消化赤血球などのA G E修飾細胞もまた、A G E抗原として使用されうる。アジュバントの例は、フロイント完全、モノホスホリルリピドA合成トレハロースジコリノミコレート、アルミニウム水酸化物（アラム）、熱ショックタンパク質H S P 7 0又はH S P 9 6、モノホスホリルリピドAを含有するスクアレンエマルジョン、α 2-マクログロブリン、並びに油エマルジョン、プルロニック（pleuronic）ポリオール、ポリアニオン、及びジニトロフェノールを含む表面活性物質を含む。免疫応答を改善するために、免疫原は、K L H（keyhole limpet hemocyanin）、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、コレラ毒素、不安定性エンテロトキシン、シリカ粒子、又はダイズトリプシン阻害剤など、宿主において免疫原性のポリペプチドにコンジュゲートされうる。好ましい免疫原コンジュゲートは、A G E-K L Hである。代替的に、p A bは、I g Y分子を産生するニワトリにおいて作製されうる。

【0088】

モノクローナル抗体（m A b：monoclonal antibody）はまた、宿主又は宿主に由来す

るリンパ球を免疫化し、m A bを分泌する（又はm A bを潜在的に分泌する）リンパ球を採取し、これらのリンパ球を、不死化細胞（例えば、骨髄腫細胞）に融合させ、所望のm A bを分泌する細胞を選択することによっても作製されうる。E B Vハイブリドーマ法など、他の技法も使用されうる。非ヒト抗体は、抗体を、非ヒト抗体の構成要素と、ヒト抗体の構成要素との組合せを含有するように改変することにより、ヒトに対して免疫原性でなくされうる。キメラ抗体は、非ヒト抗体の可変領域を、ヒト定常領域と組み合わせることにより作製されうる。ヒト化抗体は、ヒト抗体の相補性決定領域（C D R：complementarity determining region）を、非ヒト抗体のC D Rで置きかえることにより作製されうる。同様に、抗体は、アミノ酸レベルで、実質的にネコ、イヌ、ウマ、ラクダ又はアルパカ、ウシ、ヒツジ、ブタ、又はヤギなど、所与の動物「化」されることにより、他の種に対して免疫原性でなくされうる。所望の場合、m A bは、プロテインA－セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、硫酸アンモニウム沈殿、又はアフィニティークロマトグラフィーなど、従来の手順により、培養培地又は腹水から精製されうる。加えて、ヒトモノクローナル抗体は、第3のコピーである、ヒトI g Gのトランス遺伝子座と、サイレンシングされた、内因性のマウスI g 遺伝子座とを含有する、トランスジェニックマウスの免疫化により作出される場合もあり、ヒトトランスジェニックマウスを使用することにより作出される場合もある。ヒト化モノクローナル抗体及びその断片の作製はまた、ファージディスプレイ法を介してもなされうる。

10

【0089】

「薬学的に許容される担体」は、医薬の投与に適合性のものなど、任意の溶媒及び全ての溶媒、任意の分散媒及び全ての分散媒、任意のコーティング及び全てのコーティング、任意の抗菌剤及び抗真菌剤並びに全ての抗菌剤及び抗真菌剤、任意の等張剤及び全ての等張剤、並びに任意の吸収遅延剤及び全ての吸収遅延剤を含む。好ましい、このような担体又は希釈剤の例は、水、生理食塩液、リンゲル液、及びデキストロース溶液を含む。補足的な活性化合物もまた、組成物に組み込まれうる。非経口投与のために使用されうる溶液及び懸濁液は、注射用水、生理食塩液溶液、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；酢酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩などの緩衝液、及び塩化ナトリウム又はデキストロースなど、等張性を調整するための薬剤を含みうる。p Hは、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調整されうる。非経口調製物は、ガラス製又はプラスチック製の、アンプル、ディスポーザブルのシリンジ、又は複数回投与用のバイアルに封入されうる。

20

30

【0090】

抗体は、静脈内注射などの注射により投与される場合もあり、関節への関節内注射など、局所投与される場合もある。注射に適切な医薬組成物は、滅菌注射用溶液又は滅菌注射用分散液の即席調製物のための、滅菌水溶液又は水性分散液を含む。注射に適切な抗体による医薬組成物中には、多様な賦形剤が含まれうる。適切な担体は、生理食塩液、静菌水、CREMOPHOR EL（登録商標）（BASF社製；Parsippany, NJ）、又はリン酸緩衝生理食塩液（P B S：phosphate buffered saline）を含む。いずれの場合も、組成物は、滅菌でなければならず、シリンジを使用して投与されるように、流体であるものとする。このような組成物は、製造時及び保管時に、安定であるものとし、細菌及び真菌などの微生物による汚染に対して保護されなければならない。多様な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、及びチメロサルが、微生物汚染を封じ込めうる。組成物中には、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、及び塩化ナトリウムなどの等張剤が含まれうる。吸収を遅延させうる組成物は、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの薬剤を含む。滅菌注射用溶液は、抗体と、他の任意の治療成分とを、適切な溶媒中に、要求される成分のうちの1つ又は組合せと共に、要求量で組み込むことに続き、滅菌を行うことにより調製されうる。滅菌注射用溶液を調製するために、滅菌固体を調製する方法は、固体をもたらす、真空乾燥及び凍結乾燥を含む。

40

50

【0091】

吸入による投与のために、抗体は、噴霧器又は適切な高圧ガス、例えば、二酸化炭素などのガスを含有する高圧容器からのエアゾールスプレーとして送達されうる。抗体はまた、例えば、iSPERSE（商標）吸入型薬物送達プラットフォーム（PULMATRIX社製、Lexington, Mass.）を使用する乾燥粉末として、吸入を介しても送達されうる。ニワトリ抗体（Ig Y）である、抗AGE抗体の使用は、吸入により投与された場合、ヒトを含む、様々な動物において、非免疫原性でありうる。

【0092】

各種の抗体の適切な投与量レベルは、一般に、患者の体重1 kg当たり約0.01～500 mgであろう。好ましくは、投与量レベルは、約0.1～約250 mg/kg；より好ましくは、約0.5～約100 mg/kgであろう。適切な投与量レベルは、約0.01～250 mg/kg、約0.05～100 mg/kg、又は約0.1～50 mg/kgでありうる。この範囲内で、投与量は、0.05～0.5、0.5～5又は5～50 mg/kgでありうる。各種の抗体は、毎日1回又は2回など、毎日1～4回のレジメンで投与されうるが、抗体は、典型的に、長いインビボ半減期を有する。したがって、各種の抗体は、毎日1回、毎週1回、隔週1回、3週間ごとに1回、毎月1回、又は60～90日間ごとに1回投与されうる。

【0093】

抗AGE抗体の投与を施される対象は、投与が、早期老化を伴う症状など、放射線曝露又は化学物質曝露の慢性影響を治療するのに効果的であったのかどうかを決定するために調べられうる。例えば、対象は、後続の測定の間において、又は時間経過にわたり、1又は2以上の、早期老化を模倣する症状の低減を裏付ける場合、効果的な抗体治療を施されたと考えられうる。代替的に、老化細胞の濃度及び／又は数が、時間経過にわたり測定される場合もある。抗体の投与、及び後続の検査は、所望の治療結果が達成されるまで反復されうる。

【0094】

投与及び投与量の均一性を容易とするように、単位投与量形態（Unit dosage forms）が創出されうる。単位投与量形態とは、治療される対象のための、単回の投与量として適し、要求される医薬担体と会合させた、治療有効量の、1種又は2種以上の抗体を含有する、物理的に個別の単位を指す。好ましくは、単位投与量形態は、密封容器に入れられ、滅菌されている。

【0095】

AGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対するワクチンは、AGE抗原、アジュバント、任意の保存剤、及び任意の賦形剤を含有する。AGE抗原の例は、AGE-トロロンビンIII、AGE-カルモジュリン、AGE-インスリン、AGE-セルロプラスミン、AGE-コラーゲン、AGE-カテプシンB、AGE-ウシ血清アルブミン（AGE-BSA）、AGE-ヒト血清アルブミン、及びオボアルブミンなどのAGE-アルブミン、AGE-クリスタリン、AGE-プラスミノゲン活性化因子、AGE-内皮細胞膜タンパク質、AGE-アルデヒドレダクターゼ、AGE-トランスフェリン、AGE-フィブリン、AGE-銅／亜鉛SOD、AGE-apo B、AGE-フィブロネクチン、AGE-腓リボース、AGE-apo A-I及びII、AGE-ヘモグロビン、AGE-Na⁺/K⁺-ATPアーゼ、AGE-プラスミノゲン、AGE-ミエリン、AGE-リゾチーム、AGE-免疫グロブリン、AGE-赤血球Glucose輸送タンパク質、AGE-β-N-アセチルヘキソミナーゼ、AGE-apo E、AGE-赤血球膜タンパク質、AGE-アルドースレダクターゼ、AGE-フェリチン、AGE-赤血球スペクトリン、AGE-アルコールデヒドロゲナーゼ、AGE-ハプトグロビン、AGE-チューブリン、AGE-甲状腺ホルモン、AGE-フィブリノーゲン、AGE-β₂-ミクログロブリン、AGE-ソルビトールデヒドロゲナーゼ、AGE-α₁-抗トリプシン、AGE-炭酸デヒドラターゼ、AGE-RNアーゼ、AGE-低密度リポタンパク質、AGE-ヘキソキナーゼ、AGE-apo C-I、AGE-RNアーゼ、AGE-ヒトヘモグロ

10

20

30

40

50

ピンなどのAGE-ヘモグロビン、AGE-低密度リポタンパク質(AGE-LDL)、及びAGE-コラーゲンIVなどのAGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドを含む。AGE修飾全赤血球、AGE修飾溶解赤血球、又はAGE修飾部分消化赤血球などのAGE修飾細胞もまた、AGE抗原として使用されうる。適切なAGE抗原はまた、カルボキシメチルリシン(CML)、カルボキシエチルリシン(CEL)、ペントシジン、ピラリン、FFI、AFGP、及びALIなどのAGE修飾(また、AGEエпитープ又はAGE部分とも称される)を呈するタンパク質又はペプチドも含む。AGE抗原は、AGE-KLH(AGE conjugated to keyhole limpet hemocyanin)などのAGE-タンパク質コンジュゲートでありうる。これらのAGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチド、及びこれらの調製物の一部についてのさらなる詳細については、Bucalaにおいて記載されている。

10

【0096】

特に好ましいAGE抗原は、カルボキシメチルリシンAGE修飾又はカルボキシエチルリシンAGE修飾を呈する、タンパク質又はペプチドを含む。カルボキシメチルリシン(また、N(イプシロン)-(カルボキシメチル)リシン、N(6)-カルボキシメチルリシン、又は2-アミノ-6-(カルボキシメチルアミノ)ヘキサン酸としても公知である)、及びカルボキシエチルリシン(また、N-イプシロン-(カルボキシエチル)リシンとしても公知である)は、酸化ストレス及び化学物質の糖化反応の結果として、タンパク質又はペプチド及び脂質において見出され、若年性遺伝障害と関連している。CML改変タンパク質又はCML改変ペプチド及びCEL改変タンパク質又はCEL改変ペプチドは、様々な細胞上で発現される受容体である、RAGEにより認識される。CML及びCELについては、十分に研究されており、CML関連製品及びCEL関連製品は市販されている。例えば、Cell Biolabs, Inc.社は、CML-BSA抗原、CMLポリクローナル抗体、CML免疫プロットキット、及びCML競合ELISAキット(www.cellbiolabs.com/cml-assays)のほか、CEL-BSA抗原及びCEL競合ELISAキット(www.cellbiolabs.com/cel-n-epsilon-carboxyethyl-lysine-assays-and-reagents)を販売している。

20

【0097】

AGE抗原は、対象における抗体の産生を増強するように、担体タンパク質にコンジュゲートされうる。単独では、十分に免疫原性でない抗原は、免疫系からの応答を刺激するのに適する、担体タンパク質を要求する場合がある。適切な担体タンパク質の例は、KLH(keyhole limpet hemocyanin)、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、コレラ毒素、不安定性エンテロトキシン、シリカ粒子、及びダイズトリブシン阻害剤を含む。好ましくは、担体タンパク質は、KLH(AGE-KLH)である。KLHは、集中的に研究され、被験がんワクチン中の、効果的な担体タンパク質として同定されている。好ましいAGE抗原-担体タンパク質コンジュゲートは、CML-KLH及びCEL-KLHを含む。

30

【0098】

AGE抗原の投与は、免疫系が、抗原に対する免疫を発生させることを可能とする。免疫は、細胞性免疫応答又は体液性免疫応答である、長期的免疫応答である。細胞性免疫応答は、抗原が提示されたときに活性化され、好ましくは、T細胞を分化させ、サイトカインを産生させるT細胞の共刺激因子とともに、活性化される。細胞性免疫応答の発生に関与する細胞は、ヘルパーT(Th:T-helper)細胞の、2つクラスである、Th1及びTh2である。Th1細胞が、補体カスケードを活性化させ、マクロファージのFc受容体に結合する、IgG2Aアイソタイプの抗体を、主に産生するように、B細胞を刺激するのに対し、Th2細胞は、マウスにおけるIgG1アイソタイプ抗体、ヒトにおけるIgG4アイソタイプ抗体、及びIgEアイソタイプ抗体を産生するように、B細胞を刺激する。ヒトの身体はまた、樹状細胞、マクロファージ、及びB細胞など、「プロフェッショナル」の抗原提示細胞も含有する。

40

【0099】

50

液性免疫応答 (humoral immune response) は、B細胞が、抗原に、選択的に結合し、増殖し始め、この抗原を特異的に認識する抗体を産生し、形質細胞又はメモリーB細胞と称される、抗体分泌細胞に分化しうる細胞のクローン集団の産生をもたらす場合に誘発される。抗体とは、B細胞により産生される分子であって、特異的抗原に結合する分子である。抗原-抗体複合体は、複数の応答、例えば、ナチュラルキラー (NK) 若しくはマクロファージを介する細胞媒介性応答、又は、例えば、標的細胞の溶解を結果としてもたらずカスケードにおいて、逐次的に作用する、複数の血清タンパク質の複合体である、補体系を活性化させることを介する、血清媒介性応答を誘発する。

【0100】

免疫アジュバント (単に、「アジュバント」ともまた称される) とは、免疫原性作用物質に対する免疫応答を強化する、ワクチンの成分 (複数可) である。アジュバントは、マクロファージを、免疫原性作用物質に誘引し、次いで、この作用物質を、所属リンパ節に提示して、効果的な抗原応答を誘発することにより機能する。アジュバントはまた、それ自体、免疫原性作用物質のための担体としても作用しうる。アジュバントは、免疫応答の誘発において重要な役割を果たしうる炎症応答を誘導しうる。

【0101】

アジュバントは、アルミニウム塩などの無機化合物、油エマルジョン、細菌性産物、リポソーム、免疫刺激複合体、及びスクアレンを含む。アルミニウム化合物は、ヒトワクチン及び獣医科ワクチンにおいて、最も広く使用されるアジュバントである。これらのアルミニウム化合物は、リン酸アルミニウム (AlPO_4) 化合物及び水酸化アルミニウム ($\text{Al}(\text{OH})_3$) 化合物などのアルミニウム塩を含み、典型的に、ゲルの形態にあり、ワクチン用免疫アジュバントの分野では、一般に、「アラム」と称される。水酸化アルミニウムは、鉱物である、ペーマイトの構造を有する、低結晶性の水酸化アルミニウムである。リン酸アルミニウムは、非結晶性の、ヒドロキシリン酸アルミニウムである。負に帯電した分子種 (例えば、負に帯電した抗原) が、中性 pH において、水酸化アルミニウムゲルに吸収されるのに対し、正に帯電した分子種 (例えば、正に帯電した抗原) は、中性 pH において、リン酸アルミニウムゲルに吸収される。これらのアルミニウム化合物は、投与部位において、抗原の貯蔵庫をもたらす、これにより、抗体の産生を刺激するように、段階的で持続的な抗原の放出をもたらすと考えられる。アルミニウム化合物は、Th1細胞ではなく、Th2細胞により媒介される細胞応答を、より効果的に刺激する傾向がある。

【0102】

エマルジョンアジュバントは、油中水エマルジョン (例えば、油エマルジョン中の死滅抗酸菌などのフロイントアジュバント) 及び水中油エマルジョン (例えば、MF-59) を含む。エマルジョンアジュバントは、体液性応答の上昇、T細胞増殖、細胞毒性リンパ球、及び細胞媒介性免疫の増大を誘導しうる、免疫原性成分、例えば、スクアレン (MF-59)、又はオレイン酸マンニド (不完全フロイントアジュバント) を含む。

【0103】

リポソームアジュバント又は小胞アジュバント (パウキラメラによる脂質小胞を含む) は、様々な材料、例えば、抗原を封入及び輸送するのに使用されうる、脂質二重層ドメインと、水性環境とを有する。パウキラメラ小胞 (例えば、米国特許第 6, 387, 373 号明細書において記載されている、パウキラメラ小胞) は、非リン脂質材料 (例えば、両親媒性界面活性剤; 米国特許第 4, 217, 344 号明細書; 同第 4, 917, 951 号明細書; 及び同第 4, 911, 928 号明細書を参照されたい)、任意に、ステロール、及び小胞内に封入される、任意の水非混和性の油性材料 (例えば、スクアレン油などの油、及び油溶性抗原又は油中懸濁性抗原) を含む脂質相と; 水、生理食塩液、緩衝液又は脂質を水和させるのに使用される、他の任意の水溶液などの水性相とを、高压条件又は高せん断条件下で混合することにより調製されうる。リポソームアジュバント又は小胞アジュバントは、例えば、小胞の、免疫細胞膜への融合により、抗原の、免疫細胞との接触を促進し、ヘルパーT細胞のTh1亜集団を、優先的に刺激すると考えられる。

【0104】

他の種類のアジュバントは、ウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) による B C G (カルメット-ゲラン桿菌: *bacillus Calmette-Guerin*)、キラヤサポニン、及び非メチル化 C p G ジヌクレオチド (C p G モチーフ) を含む。さらなるアジュバントについては、米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 2 6 9 3 2 号 (2 0 1 0 年 9 月 9 日) ; 及び Jiang, Z-H . et al. “Synthetic vaccines: the role of adjuvants in immune targeting”, *Curr ent Medicinal Chemistry*, Vol. 10(15), pp. 1423-39 (2003) において記載されている。好ましいアジュバントは、フロイント完全アジュバント及びフロイント不完全アジュバントを含む。

【0105】

ワクチンは、抗酸化剤、抗菌剤、及び抗微生物剤、並びにこれらの組合せなど、1 又は 2 以上の保存剤を含んでもよい。例は、塩化ベンゼトニウム、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (E D T A)、チメロサル、フェノール、2-フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、及びホルマリン; アンホテリシン B、クロルテトラサイクリン、ゲンタマイシン、ネオマイシン、ポリミキシン B、及びストレプトマイシンなどの抗菌剤; ポリオキシエチレン-9、10-ノニルフェノール (Triton N-101、オクトキシノール 9)、デオキシコール酸ナトリウム、及びポリオキシエチル化オクチルフェノール (Triton X-100) などの抗微生物界面活性剤を含む。ワクチンの作製及びパッケージングは、保存剤に対する必要を消失させる。例えば、滅菌され、密封容器内で保管されたワクチンは、保存剤を要求しない場合がある。

【0106】

ワクチンの他の成分は、安定化剤、増粘剤、毒素解毒剤、希釈剤、pH 調整剤、等張性調整剤、界面活性剤、消泡剤、タンパク質安定化剤、色素、及び溶媒など、薬学的に許容される賦形剤を含む。このような賦形剤の例は、塩酸、リン酸緩衝液、酢酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ホウ砂、クエン酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、ポリジメチルシロゾン、ブリリアントグリーン、フェノール red (フェノールスルホンフタレイン)、グリシン、グリセリン、ソルビトール、ヒスチジン、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸カリウム、スクロース、尿素、ラクトース、ゼラチン、ソルビトール、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80、及びグルタルアルデヒドを含む。ワクチン、並びにアジュバントの、これらの様々な成分については、www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/appendices/B/excipient-table-2.pdf; 及び Vogel, F. R. et al., “A compendium of vaccine adjuvants and excipients”, *Pharmaceutical Biotechnology*, Vol. 6, pp. 141-228 (1995) において記載されている。

【0107】

ワクチンは、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、400、800、1000 μ g、又は 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90 mg を含む、1 μ g ~ 100 mg の、少なくとも 1 つの A G E 抗原を含有する。単回の注射のために使用される量は、単位投与量に対応する。

【0108】

ワクチンは、単位投与量形態、又は 2 ~ 100、2 ~ 10 回など、複数回投与量形態 (multidosage form) で提供されうる。単位投与量は、中隔を伴うバイアルにより提供される場合もあり、注射針を伴うか、又は伴わないシリンジにより提供される場合もある。ワクチンは、静脈内投与、皮下投与、又は腹腔内投与されうる。好ましくは、ワクチンは、滅菌されている。

【0109】

ワクチンは、2、3、4、5、6、7、8、9 回を含む、1 ~ 10 回など、1 又は 2 回以上投与される場合があり、1 週間 ~ 1 年間、2 ~ 10 週間、2 ~ 10 カ月間の範囲の期間にわたり投与されうる。さらに、2、5、10、及び 15 年間を含む、1 年間 ~ 20 年

10

20

30

40

50

間の経過にわたり、追加のワクチン接種が所望されうる。

【0110】

細胞のAGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対するワクチンを施される対象は、AGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対する免疫を発生させたのかどうかを決定するために調べられる場合がある。適切な試験は、イムノアッセイなど、抗体の存在を検出するための血液検査、又は抗体力価を検出するための血液検査を含みうる。AGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対する免疫はまた、老化細胞の濃度及び／又は数を、時間経過にわたりモニタリングすることによっても決定されうる。AGE修飾タンパク質又はAGE修飾ペプチドに対する免疫の進行についての検査に加えて、対象はまた、ワクチン接種が、早期老化を模倣する症状など、放射線曝露又は化学物質曝露の慢性影響を治療するのに効果的であったのかどうかを決定するようにも調べられうる。例えば、対象は、後続の測定の間において、若しくは時間経過にわたり、1若しくは2以上の、早期老化を模倣する症状の低減を裏付ける場合、又は老化細胞の濃度及び／若しくは数を測定することにより、効果的なワクチン接種を施されたと考えられうる。ワクチン接種、及び後続の検査は、所望の治療結果が達成されるまで反復されうる。

10

【0111】

ワクチン接種法は、複数のAGE部分に対する免疫をもたらすようにデザインされうる。単一のAGE抗原は、複数のAGE部分に結合することが可能なAGE抗体の産生を誘導しうる。代替的に、ワクチンは、複数のAGE抗原を含有しうる。加えて、対象は、複数のワクチンを施される場合があり、この場合、各ワクチンは、異なるAGE抗原を含有する。

20

【0112】

本明細書に記載される方法により、任意の哺乳動物が治療されうる。ヒトは、治療に好ましい哺乳動物である。治療されうる、他の哺乳動物は、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、及びイヌ又はネコなどの愛玩動物を含みうる。代替的に、上記で同定された、哺乳動物又は対象のうちのいずれも、炎症と関連する疼痛治療を必要とする患者集団から除外されうる。

【0113】

対象は、早期老化を模倣する症状など、放射線曝露又は化学物質曝露の、1又は2以上の慢性影響の存在に基づき、治療を必要とする対象として同定されうる。早期老化を模倣する症状は、白髪、しわ、フレイル、白内障、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化、アルツハイマー病、パーキンソン病、サルコペニア、脂肪組織の減少、前彎後彎症、がん、早発閉経、心血管疾患、認知症、II型糖尿病、内分泌障害、心機能障害、骨粗相症、骨関節炎、肺線維症、腎疾患及び肝疾患、代謝障害、リポジストロフィー、聴覚低下、視覚低下、並びに記憶障害の進行を含む。対象はまた、ハッチソンーギルフォード早老症候群（また、早老症としても公知である）、ウェルナー症候群、ブルーム症候群、ロスムンドートムソン症候群、コケイン症候群、色素性乾皮症、硫黄欠乏性毛発育異常症、色素性乾皮症ーコケイン症候群の組合せ、及び拘束性皮膚障害を含む、1又は2以上の早老症候群を伴う診断に基づいても、治療を必要とする対象として同定されうる。加えて、対象は、例えば、転移性がん、網膜症、腎症、脳卒中、内皮細胞機能障害、又は神経変性障害など、炎症又はAGEと関連する病理学的状態の存在に基づき、治療を必要とする対象として同定されうる。

30

40

【0114】

対象はまた、放射線又は化学物質への、既知の曝露又は予期される曝露に基づいても、治療を必要とする対象として同定されうる。例えば、対象は、塩素ガス、ホスゲンガス、マスタードガス、G剤、V剤、ノビチョク剤、カルバメートなどの化学兵器、又は殺虫剤への曝露の後、又はダイオキシン、鉛、又はカドミウムなどの毒物への曝露の後に、治療を必要とする対象として同定されうる。同様に、化学療法又はHAARTを施された、又はこれらを施され始めようとする対象は、治療を必要とする対象として同定されうる。一般に使用される化学療法剤の例は、ビノレルビン（NAVELBINE（登録商標））、マイトマ

50

イシン（MITOSOL（登録商標））、カンプトテシン、シクロホスファミド（CYTOXAN（登録商標））、メトトレキサート（Trexall（登録商標））、タモキシフェンクエン酸塩（Nolvadex（登録商標））、Soltamox（登録商標）、5-フルオロウラシル（Adrucil（登録商標））、イリノテカン（Onivyde（登録商標））、ドキシソルビシン（Doxil（登録商標））、フルタミド、パクリタキセル（Taxol（登録商標））、Abraxane（登録商標）、ドセタキセル（Docefrez（登録商標））、Taxotere（登録商標）、ビンブラスチン、イマチニブメシル酸塩（Gleevec（登録商標））、アントラサイクリン、レトロゾール（Femara（登録商標））、三酸化ヒ素（Trisenox（登録商標））、アナストロゾール（Arimidex（登録商標））、トリプトレリンパモ酸塩（Trelstar（登録商標））、オゾガマイシン、イリノテカン塩酸塩（Camptosar（登録商標））、B C G 生菌（Theracys（登録商標））、ロイ
 プロリド酢酸塩インプラント（Viadur（登録商標））、ベキサロテン（Targretin（登録商標））、エキセメスタン（Aromasin（登録商標））、トボテカン塩酸塩（Hycamtin（登録商標））、ゲムシタピンHCL（Gemzar（登録商標））、ダウノルビシン塩酸塩、トレミフェンクエン酸塩（Fareston（登録商標））、カルボプラチン（Paraplatin（登録商標））、シスプラチン（Platinol（登録商標））、オキサリプラチン（ELOTAXIN（登録商標））及び他の任意の白金含有がん治療薬、トラスツズマブ（Herceptin（登録商標））、ラパチニブ（Tykerb（登録商標））、ゲフィチニブ（Iressa（登録商標））、セツキシマブ（Erbitux（登録商標））、パニツムマブ（Vectibix（登録商標））、テムシロリムス（Torisel（登録商標））、エベロリムス（Afinitor（登録商標））、バンデタニブ（Caprelsa（登録商標））、ベムラフェニブ（Zelboraf（登録商標））、クリゾチニブ（Xalkori（登録商標））、ボリノスタット（Zolanza（登録商標））、ペバシズマブ（Avastin（登録商標））、放射線療法、温熱療法、遺伝子療法、及び光力学療法を含む。化学療法レジメン又はH A A R T療法レジメンは、化学療法剤又は抗レトロウイルス剤の投与を、抗A G E抗体の投与と組み合わせる場合もあり、A G E修飾タンパク質又はA G E修飾ペプチドに対するワクチン接種と組み合わせる場合もある。

【0115】

配列番号1に対応する、1文字式アミノ酸配列を、下記に示す。

10	20	30	40	50	
MNLLLILTFV	AAAVAQVQLL	QPGAELVKPG	ASVKLACKAS	GYLFTTYWMH	
60	70	80	90		
WLKQRPQGQL	EWIGEISPTN	GRAYYNARFK	SEATLTVDKS		
100	110	120	130		
SNTAYMQLSS	LTSEASAVYY	CARAYGNYEF	AYWGQGTlVT		
140	150	160	170		
VSVASTKGPS	VFPLAPSSKS	TSGGTAALGC	LVKDYFPEPV		
180	190	200	210	220	
TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL	QSSGLYSLSS	VVTVPSSSLG	TQTYICNVNH	
230	240	250	260		
KPSNTKVDKK	VEPKSCDKTH	TCPPCPAPEL	LGGPSVFLFP		
270	280	290	300		
PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK	FNWYVDGVEV		
310	320	330	340		
HNAKTKPREE	QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS		
350	360	370	380	390	
NKALPAPIEK	TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS	LTCLVKGFYP	
400	410	420	430		
SDIAVEWESN	GQPENNYKTT	PPVLDSDGSF	FLYSKLTVDK		
440	450	460			
SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	HYTQKSLSLS	PGK		

【0116】

上記のアミノ酸配列の 16～133 位は、配列番号 2 に対応する。上記のアミノ酸配列の 46～50 位は、配列番号 41 に対応する。上記のアミノ酸配列の 65～81 位は、配列番号 42 に対応する。上記のアミノ酸配列の 114～122 位は、配列番号 43 に対応する。

【0117】

配列番号 3 に対応する、1 文字式アミノ酸配列を、下記に示す。

10	20	30	40	50
MNLLLILTFV	AAAVADVMT	QTPLSLPVSL	GDQASISCRS	RQSLVNSNGN
60	70	80	90	100
TFLQWYLQKP	GQSPKLLIYK	VSLRFSGVPD	RFSGSGSGTD	FTLKISRVEA
110	120	130	140	150
EDLGLYFCSQ	STHVPPTFGG	GTKLEIKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA
160	170	180	190	
SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	
200	210	220	230	
STYSLSSTLT	LSKADYEKKH	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC

10

【0118】

上記のアミノ酸配列の 16～128 位は、配列番号 4 に対応する。配列番号 4 の 128 位におけるアルギニン（Arg 又は R）残基は、省かれてもよい。上記のアミノ酸配列の 39～54 位は、配列番号 44 に対応する。上記のアミノ酸配列の 70～76 位は、配列番号 45 に対応する。上記のアミノ酸配列の 109～117 位は、配列番号 46 に対応する。

20

【0119】

配列番号 12 に対応する DNA 配列を、下記に示す。

ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCCAGGTGCA
GCTGCTGCAGCCAGGTGCCGAGCTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGGCCTGCAAGGCTTCCGGCTACCTGTTCA
CCACCTACTGGATGCACTGGCTGAAGCAGAGGCCAGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCGAGATCTCCCCACCAACGGC
AGAGCCTACTACAACGCCCCGTTCAAGTCCGAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTCCAACACCGCCTACATGCAGCT
GTCCTCCCTGACCTCTGAGGCCTCCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGCTTACGGCAACTACGAGTTTCGCCTACTGGGGCC
AGGGCACCCCTCGTGACAGTGTCTGTGGCTAAGACCACCCCTCCCTCCGTGTACCCTCTGGCTCCTGGCTGTGGCGACACC
ACCGGATCCTCTGTGACCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGGCTACTTCCCTGAGTCCGTGACCGTGACCTGGAACCTCCGGCTC
CCTGTCTCCTCCGTGCACACCTTTCCAGCCCTGTGTGAGTCCGGCCTGTACACCATGTCTCCAGCGTGACAGTGCCCT
CCTCCACCTGGCCTTCCCAGACCGTGACATGCTCTGTGGCCACCCCTGCCTCTTCCACCACCGTGGAACAAGAAGCTGGAA
CCCTCCGGCCCCATCTCCACCATCAACCTTGCCCTCCCTGCAAGAATGCCACAAGTGCCCTGCCCCAACCTGGAAGG
CGGCCCTTCCGTGTTTCATCTTCCACCCAACATCAAGGACGTGCTGATGATCTCCCTGACCCCCAAAGTGACCTGCGTGG
TGGTGGACGTGTCCGAGGACGACCCTGACGTGCAGATCAGTTGGTTTCGTGAACAACGTGGAAGTGACACCGCCCAGACC
CAGACACACAGAGAGGACTACAACAGCACCATCAGAGTGGTGTCTACCCTGCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGTCCGG
CAAAGAATTCAAGTGCAAAGTGAACAACAAGGACCTGCCAGCCCCATCGAGCGGACCATCTCCAAGATCAAGGGCCTCG
TGCGGGCTCCCCAGGTGTACATTCTGCCTCCACCAGCCGAGCAGCTGTCCCGAAGGATGTGTCTCTGACATGTCTGGTC
GTGGGCTTCAACCCCGGCGACATCTCCGTGGAATGGACCTCCAACGGCCACACCGAGGAAAACTACAAGGACACCGCCCC
TGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTACTTCATCTACTCCAAGCTGAACATGAAGACCTCCAAGTGGGAAAAAGACCGACTCCT
TCTCCTGCAACGTGCGGCACGAGGGCCTGAAGAACTACTACCTGAAGAAAACCATCTCCCGGTCCCCCGGCTAG

30

40

【0120】

配列番号 13 に対応する DNA 配列を、下記に示す。

ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCCAGGTGCA
GCTGCTGCAGCCAGGTGCCGAGCTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGGCCTGCAAGGCTTCCGGCTACCTGTTCA
CCACCTACTGGATGCACTGGCTGAAGCAGAGGCCAGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCGAGATCTCCCCACCAACGGC
AGAGCCTACTACAACGCCCCGTTCAAGTCCGAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCTCCAACACCGCCTACATGCAGCT
GTCCTCCCTGACCTCTGAGGCCTCCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGCTTACGGCAACTACGAGTTTCGCCTACTGGGGCC
AGGGCACCCCTCGTGACAGTGTCTGTGGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACC

50

AGCGGCGGAACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGC
TCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTG
GAGCCTAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCT
GTTCCCTCCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGCAACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACG
AGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAG
TACAACTCCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGTGACCGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGTCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCTCAGGTGT
ACACCCTGCCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCGTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAATAACAAGACCACCCCTCCCGTGTGGACAGCGCAGCG
CAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCAGCGTGATGC
ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGATAG

【 0 1 2 1 】

配列番号 1 4 に対応する D N A 配列を、下記に示す。

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCGGCTCCACCGGAGACGTCGTGATGACCCAGAC
CCCTCTGTCCCTGCCTGTGTCTCTGGGCGACAGGCCTCCATCTCCTGCCGGTCTAGACAGTCCCTCGTGAACCTCCAACG
GCAACACCTTCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCCTGCGGTTC
TCCGGCGTGCCCGACAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGGTGGAAGCCGAGGA
CCTGGGCCTGTACTTCTGCAGCCAGTCCACCCACGTGCCCCCTACATTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGG
CAGATGTGCAACCACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTC
TTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTCTGAACAG
TTGGACTGATCAGGACAGCAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGAC
ATAACAGCTATACCTGTGAGGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTGA

【 0 1 2 2 】

配列番号 1 5 に対応する D N A 配列を、下記に示す。

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCGGCTCCACCGGAGACGTCGTGATGACCCAGAC
CCCTCTGTCCCTGCCTGTGTCTCTGGGCGACAGGCCTCCATCTCCTGCCGGTCTAGACAGTCCCTCGTGAACCTCCAACG
GCAACACCTTCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCCTGCGGTTC
TCCGGCGTGCCCGACAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGGTGGAAGCCGAGGA
CCTGGGCCTGTACTTCTGCAGCCAGTCCACCCACGTGCCCCCTACATTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGA
CCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCAGCCAGCGTGGTGTGCCTG
CTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAG
CGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGC
ACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA

【 0 1 2 3 】

配列番号 1 6 に対応する、1 文字式アミノ酸配列を、下記に示す。

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGVQVQLLQPGAELVKPGASVKLACKASGYLFTTYWMHWLKQRPQGLEWIGEISPTNG
RAYYNARFKSEATLTVDKSSNTAYMQLSSLTSEASAVYYCARAYGNIEFAYWGQTLVTVSVAKTTPPSVYPLAPGCGDT
TGSSVTLGCLVKGYFPESVTVWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDDKLE
PSGPISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIIPPNIKDVLMI SLTPKVTCTVVVDVSEDDPDVQISWVFNNVEVHTAQT
QTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLV
VGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSGYSFYISKLNMKTSKWEKTDTSFSCNVRHEGLKNYYLKKTI SRSPG*

【 0 1 2 4 】

上記のアミノ酸配列の 1 2 3 位におけるアラニン残基は、セリン残基で置きかえられてもよい。上記のアミノ酸配列の 1 2 4 位におけるチロシン残基は、フェニルアラニン残基で置きかえられてもよい。上記のアミノ酸配列の 2 5 ~ 1 4 2 位は、配列番号 2 0 に対応する。配列番号 2 0 は、1 2 3 及び 1 2 4 位における置換を含んでもよい。配列番号 2 0 は、末端のバリン残基の後に、1 つのさらなるリシン残基を含有してよい。

【 0 1 2 5 】

配列番号 1 7 に対応する、1 文字式アミノ酸配列を、下記に示す。

10

20

30

40

50

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLLQPGAELVKPGASVKLACKASGYLFTTYWMHWLQKRPQGGLWEIGESPTNG
 RAYYNARFKSEATLTVDKSSNTAYMQLSSLTSEASAVYYCARAYGNYEFAYWGQGLTVTVSVASTKGPSVFPLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
 EPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

【0126】

配列番号18に対応する、1文字式アミノ酸配列を、下記に示す。

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWYLQKPGQSPKLLIYKVSIRF
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCF
 LNNFYPKDIVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK*

10

【0127】

上記のアミノ酸配列の21～132位は、配列番号21に対応する。

【0128】

配列番号19に対応する、1文字式アミノ酸配列を、下記に示す。

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWYLQKPGQSPKLLIYKVSIRF
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
 LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

【0129】

配列番号22に対応する、1文字式アミノ酸配列を、下記に示す。

20

10	20	30	40	50
ASTKGPSVF	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV
60	70	80	90	100
HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSNFGTQT	YTCNVNHHKPS	NTKVDKTVR
110	120	130	140	150
KCCVECPPCP	APPVAGPSVF	LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP
160	170	180	190	
EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	VVSVLTVVHQ	
200	210	220	230	240
DWLNGKEYKC	KVSNKGLPAP	IEKTISKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN
250	260	270	280	290
QVSLTCLVKG	FYPDISVEW	ESNGQPENNY	KTPPMLDSD	GSFFLYSKLT
300	310	320		
VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK	

30

【0130】

配列番号23に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
 SYTMGVS

である。

【0131】

配列番号24に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
 TISSGGGSTYYPDSEK

である。

【0132】

配列番号25に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
 QGGWLPPFAX

[配列中、Xは、任意の、天然に存在するアミノ酸でありうる]

である。

【0133】

配列番号26に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
 RASKSVSTSSRGYSYMH

50

である。

【0134】

配列番号27に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
LVSNLES
である。

【0135】

配列番号28に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
QHIRELTRS
である。

【0136】

配列番号29に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYLFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGEISPTNG
RAYYNQKFQGRVTMTVDKSTNTVYMELSSLRSEDTAVYYCARAYGNFYFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKHTHTCPPCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
である。

【0137】

配列番号30に対応する、DNA配列は、
ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCCCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCCAGGTGCA
GCTGGTGCACTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAGGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCTACCTGTTAC
CACCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCTCCCTACCAACGGCA
GAGCCTACTACAACAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCATGACCGTGGACAAGTCCACCAACACCGTGATACATGGAAGTGT
CCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGCCTACGGCAACTACGATTCGCTACTGGGGCCAGG
GCACCCCTCGTGACAGTGTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGC
GGCGGAACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTG
ACCAGCGGAGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGC
AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCC
TAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCC
TCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGACC
CCGAGGTGAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTACAACT
CCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGTGACCGTGTGCAACAGGACTGGCTGAACGGCAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCA
ACAAGGCCCTGCCCGCTCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTG
CCCCCAGCCGCGACGAGCTGACAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAATAAGACCACCCCTCCCGTGTGACAGCGACGACGAGCTTCTTC
CTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCT
GCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCGGATAGTAA
である。

【0138】

配列番号31に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYLFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGEISPTNG
RAYYNAKFQGRVTMTVDKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAYGNFYFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKHTHTCPPCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
である。

【0139】

配列番号32に対応する、DNA配列は、

10

20

30

40

50

ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCCCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCCAGGTGCA
GCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAGGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCTACCTGTTTAC
CACCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCTCCCTACCAACGGCA
GAGCCTACTACAACCAAAATTCAGGGCAGAGTGACCATGACCGTGAGACAAGTCCACCAACACCGCTTACATGGAAGTGT
CCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGCCTACGGCAACTACGATTGCGCTACTGGGGCCAGG
GCACCTTCGTGACAGTGTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGC
GGCGGAACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTG
ACCAGCGGAGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGC
AGCAGCCTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCC
TAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCC
TCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGCACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGACC
CCGAGGTGAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTACAACCT
CCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCA
ACAAGGCCCTGCCCGCTCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTG
CCCCCAGCCGCGACGAGCTGACAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGCAGCTTCTTC
CTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCT
GCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGATAGTAA

10

である。

【0140】

20

配列番号33に対応する、1文字式アミノ酸配列は、

MDPKGSLSWRIILLFLSLAFELSYQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYLFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGEISPTNG
RAYYNAKFQGRVTMTVDKSLINTAYMELSLRLSDDTAVYYCARAYGNFYAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKHTHTCPPCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

である。

【0141】

配列番号34に対応する、DNA配列は、

30

ATGGACCCCAAGGGCAGCCTGAGCTGGAGAATCCTGCTGTTCCCTGAGCCTGGCCTTCGAGCTGAGCTACGGCCAGGTGCA
GCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAGGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCTACCTGTTTAC
CACCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCTCCCTACCAACGGCA
GAGCCTACTACAACCAAAATTCAGGGCAGAGTGACCATGACCGTGAGACAAGTCCATCAACACCGCTTACATGGAAGTGT
CCAGACTGCGGAGCGATGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGCCTACGGCAACTACGATTGCGCTACTGGGGCCAGG
GCACCTTCGTGACAGTGTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGC
GGCGGAACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTG
ACCAGCGGAGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGC
AGCAGCCTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCC
TAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCC
TCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGCACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGACC
CCGAGGTGAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTACAACCT
CCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCA
ACAAGGCCCTGCCCGCTCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTG
CCCCCAGCCGCGACGAGCTGACAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGCAGCTTCTTC
CTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCT
GCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGATAGTAA

40

である。

【0142】

50

配列番号 35 に対応する、1 文字式アミノ酸配列は、
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDVVMQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVNSNGNTFLQWYQQRPGQSPRLLIYKVSRLRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGYYCSQSTHVPPTFGGGTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
である。

【0143】

配列番号 36 に対応する、DNA 配列は、
ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCCGGCTCCACCGGAGACGTCGTGATGACCCAGTC
CCCTCTGTCCCTGCCTGTGACCCCTGGGACAGCCTGCCTCCATCTCCTCAGATCCTCCAGTCCCTCGTGAAGTCCAAACGG
CAACACCTTTCCTGCAGTGGTATCAGCAGCGGCCCTGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACAAGGTGTCCCTGCGGTTCT
CCGGCGTGCCCGACGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGGGTGGAAGCCGAGGACG
TGGGCGTGTAATACTGCTCCCAGAGCACCCACGTGCCCCCTACATTTGGCGGAGGCACCAAGTGGAATCAAGCGGACCG
TGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG
AACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTG
ACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGACAAG
GTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA
である。

【0144】

配列番号 37 に対応する、1 文字式アミノ酸配列は、
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDVVMQSPSLPVTLGQPASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWYQQRPGQSPRLLIYKVSRLRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGYYCSQSTHVPPTFGGGTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
である。

【0145】

配列番号 38 に対応する、DNA 配列は、
ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCCGGCTCCACCGGAGACGTCGTGATGACCCAGTC
CCCTCTGTCCCTGCCTGTGACCCCTGGGACAGCCTGCCTCCATCTCCTCAGATCCAGGCAGTCCCTCGTGAAGTCCAAACGG
CAACACCTTTCCTGCAGTGGTATCAGCAGCGGCCCTGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACAAGGTGTCCCTGCGGTTCT
CCGGCGTGCCCGACGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGGGTGGAAGCCGAGGACG
TGGGCGTGTAATACTGCTCCCAGAGCACCCACGTGCCCCCTACATTTGGCGGAGGCACCAAGTGGAATCAAGCGGACCG
TGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG
AACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTG
ACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGACAAG
GTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA
である。

【0146】

配列番号 39 に対応する、1 文字式アミノ酸配列は、
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDVVMQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLVNSNGNTFLQWYHQRPGQPPRLLIYKVSRLRF
SGVPDRFSGSGAGKDFTLKI SRVEAEDVGYYCSQSTHVPPTFGQGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
である。

【0147】

配列番号 40 に対応する、DNA 配列は、
ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCCGGCTCCACCGGAGACGTCGTGATGACCCAGTC
CCCTCTGTCCAGTCCCTGTGACCCCTGGGACAGCCTGCCTCCATCTCCTCAGATCCTCCAGTCCCTCGTGAAGTCCAAACGG
CAACACCTTTCCTGCAGTGGTATCACCAGCGGCCCTGGCCAGCCTCCCAGACTGCTGATCTACAAGGTGTCCCTGCGGTTCT
CCGGCGTGCCCGACGATTTTCCGGCTCTGGCGCTGGCAAGGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGGGTGGAAGCCGAGGACG
TGGGCGTGTAATACTGCTCCCAGAGCACCCACGTGCCCCCTACATTTGGCCAGGGCACCAACTGGAATCAAGCGGACCG
TGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTG
AACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTG
である。

ACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGACAAG
GTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTAA
である。

【 0 1 4 8 】

配列番号 47 に対応する、1 文字式アミノ酸配列は、
MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQVQLLQPGAELVKPGASVKLACKASGYLFTTYWMHWLQKQPGQGLEWIGEI SPTNGRAYYN
ARFKSEATLTVDKSSNTAYMQLSSLTSEASAVYYCARSFGNYEFAYWGQGLTVTVSVASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
である。

10

【 0 1 4 9 】

配列番号 48 に対応する、1 文字式アミノ酸配列は、
MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLLESGAEAKKPGASVKLSCKASGYLFTTYWMHWHQAPGQRLEWMGEI SPTNGRAYYN
ARFKSRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSFGNYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
である。

20

【 0 1 5 0 】

配列番号 49 に対応する、1 文字式アミノ酸配列は、
MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYLFTTYWMHWVRQAPGQRLEWIGEI SPTNGRAYYN
ARFKSRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSFGNYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
である。

30

【 0 1 5 1 】

配列番号 50 に対応する、1 文字式アミノ酸配列は、
MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYLFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGEI SPTNGRAYYN
ARFKSRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSFGNYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
である。

40

【 0 1 5 2 】

配列番号 51 に対応する、1 文字式アミノ酸配列は、
MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYLFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGEI SPTNGRAYYN
ARFKSRVTITRDTSTAYMELSRSDDTAVYYCARSFGNYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
である。

【 0 1 5 3 】

配列番号 52 に対応する、1 文字式アミノ酸配列は、

50

QVQLLPGAELVKPGASVKLACKASGYLFTTYWMHWLKQRPQGLEWIGEISPTNGRAYYNARFKSEATLTVDKSSNTAY
MQLSSLTSEASAVYYCARSFGNYEFAYWGQGTILVTVSV

である。

【0154】

配列番号53に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
EVQLLESGAEAKKPGASVKLSCKASGYLFTTYWMHWVHQAPGQRLEWMGEISPTNGRAYYNARFKSRVTITVDKSASTAY
MELSSLRSED TAVYYCARSFGNYEFAYWGQGTILVTVSS

である。

【0155】

配列番号54に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYLFTTYWMHWVRQAPGQRLEWIGEISPTNGRAYYNARFKSRVTITRDTSASTAY
MELSSLRSED TAVYYCARSFGNYEFAYWGQGTILVTVSS

である。

【0156】

配列番号55に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYLFTTYWMHWVRQAPQGQLEWMGEISPTNGRAYYNARFKSRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCARSFGNYEFAYWGQGTILVTVSS

である。

【0157】

配列番号56に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYLFTTYWMHWVRQAPQGQLEWMGEISPTNGRAYYNARFKSRVTITRDTSINTAY
MELSRLRSDDTAVYYCARSFGNYEFAYWGQGTILVTVSS

である。

【0158】

配列番号57に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWYLQKPGQSPKLLIYKVS LRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

である。

【0159】

配列番号58に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQTPLSLPVTLGQPASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWLQQRPGQPPRLLIYKVS LRF
SGVPDRFSGSGAGTDFTLTISRVEAEDVGIYFCSQSTHVPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

である。

【0160】

配列番号59に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWYLQKPGQSPQLLIYKVS LRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDVGVIYCSQSTHVPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

である。

【0161】

配列番号60に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWFLQQRPGQSPRLLIYKVS LRF
SGVPDRFSGSGSDTDFTLRISRVEAEDVGLIYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

である。

【0162】

配列番号61に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWLLQKPGQPPQLLIYKVS LRF

10

20

30

40

50

SGVPNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCSQSTHVPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
である。

【0163】

配列番号62に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
DIVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWYLQKPGQSPKLLIYKVS LRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLGLYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIK
である。

【0164】

配列番号63に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
DIVMTQTPLSLPVT LGQPASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWLQQRPGQPPRLIYKVS LRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLTI
SRVEAEDVG IYFCSQSTHVPPTFGQGTKVEIK
である。

10

【0165】

配列番号64に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWYLQKPGQSPQLLIYKVS LRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEPEDVG VYYCSQSTHVPPTFGGGTKVEVK
である。

【0166】

配列番号65に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
DIVMTQSPLSLPVT LGQPASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWFQQRPGQSPRRLIYKVS LRFSGVPDRFSGSGSDTDFTLRI
SRVEAEDVGLYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK
である。

20

【0167】

配列番号66に対応する、1文字式アミノ酸配列は、
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSRQSLVNSNGNTFLQWLLQKPGQPPQLLIYKVS LRFSGVPNRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGLYYCSQSTHVPPTFGGGTKVEIK
である。

〔実施例〕

【実施例1】

30

【0168】

抗糖化反応最終産物抗体の投与についてのインビボ研究

抗糖化反応最終産物抗体の効果について検討するために、抗体を、老齢CD1（ICR）マウス（Charles River Laboratories社製）に、3週間にわたり、毎週1回（1、8、及び15日目に）、1日に2回、静脈内注射により投与するのにつき、10週間にわたる治療休止期間を設けた。被験抗体は、キーホールリンペットヘモシアニンをコンジュゲートしたカルボキシメチルリシンに対して惹起された、市販のマウス抗糖化反応最終産物抗体である、R&D Systems, Inc.社（Minneapolis, MN；型番：MAB3247）から入手可能なカルボキシメチルリシンMAb（クローン：318003）であった。生理食塩液による対照参照は、対照動物において使用した。

40

【0169】

「若齢」と称されるマウスが、8週齢であったのに対し、「老齢」と称されるマウスは、88週（±2日）齢であった。抗体の投与に由来する有害事象は、認められなかった。研究で利用した異なる動物群を、表1に示す。

【0170】

【表 1】

表 1: 研究で使用した異なる動物群

群 番号	被験物質	マウス	用量レベル(1週 間毎、毎日2 回、1グラム当 たりの μg)	動物数	
				主要研究	非治療
				雌	雌
1	生理食塩液	若齢	0	20	-
2	生理食塩液	老齢	0	20	20
3	抗体	老齢	2.5	20	20
4	なし	老齢	0	20	pre
5	抗体	老齢	5.0	20	20

- = 該当なし, Pre = 脂肪組織の回収のために、治療開始前に安楽死させられた動物のサブセット

10

【0171】

老化細胞についてのマーカーである $P16^{INK4a}$ mRNA を、群の脂肪組織内で、リアルタイム qPCR により定量した。結果を、表 2 に示す。表中、 $\Delta\Delta Ct$ = 対照群における ΔCt 平均値 (2) - 被験群 (1、3、5) における ΔCt 平均値であり；発現倍数 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ である。

20

【0172】

【表 2】

表 2: 脂肪組織内で定量された $P16^{INK4a}$ mRNA

計算(群 4 に照らして 非補正: 5.59)	群 1 と対比した群 2		群 3 と対比した群 2		群 5 と対比した群 2	
	群 2	群 1	群 2	群 3	群 2	群 5
平均値 ΔCt	5.79	7.14	5.79	6.09	5.79	7.39
$\Delta\Delta Ct$	-1.35		-0.30		-1.60	
発現倍数	2.55		1.23		3.03	

30

【0173】

上記の表は、予測される通り、非治療老齢マウス（対照群 2）が、非治療若齢マウス（対照群 1）の 2.55 倍の $p16^{INK4a}$ mRNA を発現することを指し示す。これは、85 日目における回収の終了時に安楽死させられた、群 2 の非治療老齢マウスを、22 日目における治療の終了時に安楽死させられた、群 1 の非治療若齢マウスと比較する場合に観察された。群 2 の非治療老齢マウスからの結果を、85 日目に安楽死させられた、群 3 の治療老齢マウスからの結果と比較したところ、 $p16^{INK4a}$ mRNA は、群 2 において、群 3 の 1.23 倍であることが観察された。したがって、 $p16^{INK4a}$ mRNA の発現レベルは、老齢マウスを、1 週間毎、毎日 2 回、1 グラム当たり 2.5 μg の抗体で治療した場合に低下した。

40

【0174】

群 2（対照）の非治療老齢マウスからの結果を、22 日目に安楽死させられた、群 5（1 グラム当たり 5 μg ）の治療老齢マウスからの結果と比較したところ、 $p16^{INK4a}$ mRNA は、群 2（対照）において、群 5（1 グラム当たり 5 μg ）の 3.03 倍であることが観察された。この比較は、群 5 の動物の $p16^{INK4a}$ mRNA 発現レベルが、1 週間毎、毎日 2 回、1 グラム当たり 5.0 μg で治療した場合に低下することを指し示したことから、若齢非治療マウス（すなわち、群 1）の発現レベルと同等な、 $p16^{INK4a}$ mRNA 発現レベルを提示する。85 日目における回収の終了時に安楽死させられた、群 3（1 グラム当たり 2.5 μg ）のマウスと異なり、群 5 マウスは、22 日目における治療の終了時に安楽死させられた。

50

【0175】

これらの結果は、抗体の投与が、老化細胞の殺滅を結果としてもたらしたことを指し示す。

【0176】

また、抗体投与の、サルコペニアに対する効果を決定するように、腓腹筋量も測定した。結果を、表3に提示する。結果は、抗体の投与が、筋肉量を、対照と比較して増大させたが、これは、1週間毎、毎日2回、1グラム当たり5.0 μ gの高投与量における投与に限られたことを指し示す。

【0177】

【表3】

10

表3: 抗体投与の、腓腹筋量に対する効果

群	概要情報	体内の腓腹筋量と比べた	
		腓腹筋の絶対重量	体重
1	平均値	0.3291	1.1037
	標準偏差	0.0412	0.1473
	例数	20	20
2	平均値	0.3304	0.7671
	標準偏差	0.0371	0.1246
	例数	20	20
3	平均値	0.3410	0.7706
	標準偏差	0.0439	0.0971
	例数	19	19
5	平均値	0.4074	0.9480
	標準偏差	0.0508	0.2049
	例数	9	9

20

30

【0178】

40

これらの結果は、細胞のAGEに結合する抗体の投与が、老化のバイオマーカーである、p16^{Ink4a}を発現する細胞の低減を結果としてもたらしたことを裏付ける。データは、老化細胞の低減が、老齢マウスにおける筋肉量の増大を、直接もたらすことを示す。これらの結果は、サルコペニアの古典的徴候である、筋肉量の減少が、細胞のAGEに結合する抗体の投与により治療されうることを指し示す。結果は、抗体の投与が、老化細胞を除去することにより、早期老化を治療するのに効果的であることを示唆する。

【実施例2】

【0179】

被験抗体のアフィニティー及び反応速度

N α , N α -ビス(カルボキシメチル)-L-リシントリフルオロ酢酸塩 (Sigma-Aldr

50

ich社、St. Louis、MO) を、細胞の A G E 修飾タンパク質についてのモデル基質として使用して、実施例 1 で使用した被験抗体の、アフィニティー及び反応速度を解析した。ブランクとして設定された F c 1、及び被験抗体（分子量を 1 5 0, 0 0 0 D a とする）を固定化した F c 2 を伴う、Series S sensor chip CM5 (GE Healthcare 社、Pittsburgh、PA) を、BIAcore (商標) T200 (GE Healthcare 社、Pittsburgh、PA) 上で使用して、無標識相互作用解析を実行した。ランニング緩衝液は、温度を 2 5 °C とする、H B S - E P 緩衝液 (1 0 m M の H E P E S、1 5 0 m M の N a C l、3 m M の E D T A、及び 0 . 0 5 % の P-20、p H 7 . 4) であった。ソフトウェアは、BIAcore (商標) T200 evaluation software, version 2.0 であった。解析では、二重参照 (F c 2 - 1 及び緩衝液だけの注射) を使用し、データは、ラングミュア 1 : 1 結合モデルに当てはめた。

10

【 0 1 8 0 】

【表 4】

表 4: アフィニティー解析及び反応速度解析についての実験設定

会合及び解離	
流路	Fc1 及び Fc2
流量(μl/分)	30
会合時間(秒)	300
解離時間(秒)	300
試料濃度(μM)	20~5~1.25(2 回)~0.3125~0.078~0

20

30

【 0 1 8 1 】

時間に対する応答のグラフを、図 1 に例示する。以下の値: k_a (1 / M 秒) = 1 . 8 5 7 × 1 0 ³ ; k_d (1 / 秒) = 6 . 7 8 1 × 1 0 ⁻³ ; K_D (M) = 3 . 6 5 1 × 1 0 ⁻⁶ ; R_{max} (RU) = 1 9 . 5 2 ; 及び χ^2 = 0 . 1 1 4 は、解析から決定した。当てはめの χ^2 値が、 R_{max} の 1 0 % 未満であるため、当てはめは信頼できる。

【実施例 3】

【 0 1 8 2 】

マウス抗 A G E 抗体 I g G 2 b 抗体及びキメラ抗 A G E 抗体 I g G 1 抗体の構築及び作製

40

マウス抗 A G E 抗体及びキメラヒト抗 A G E 抗体を調製した。マウス抗 A G E 抗体 I g G 2 b 重鎖の D N A 配列を、配列番号 1 2 に示す。キメラヒト抗 A G E 抗体 I g G 1 重鎖の D N A 配列を、配列番号 1 3 に示す。マウス抗 A G E 抗体カッパ軽鎖の D N A 配列を、配列番号 1 4 に示す。キメラヒト抗 A G E 抗体カッパ軽鎖の D N A 配列を、配列番号 1 5 に示す。遺伝子配列を合成し、高発現哺乳動物ベクターにクローニングした。配列は、コドン最適化した。完成したコンストラクトは、トランスフェクションに進む前に、配列を確認した。

【 0 1 8 3 】

H E K 2 9 3 細胞を、トランスフェクションの 1 日前に、シェークフラスコに播種し、

50

無血清既知組成培地を使用して増殖させた。DNA発現コンストラクトを、0.03リットルの懸濁HEK293細胞に、一過性にトランスフェクトした。20時間後に、細胞を採取して、生存率及び生細胞数を求め、力価を測定した（OCTET（登録商標）QKe、ForteBio社製）。一過性トランスフェクション作製工程によって、さらなる読取りを行った。5日目に、培養物を採取し、各々について、さらなる試料を、細胞密度、生存率、及び力価について測定した。

【0184】

マウス抗AGE抗体及びキメラ抗AGE抗体のための馴化培地を、一過性トランスフェクション作製工程から採取し、遠心分離及び濾過により清澄化させた。上清を、プロテインAカラム上に流過させ、低pH緩衝液で溶出させた。アリコート分割の前に、0.2µm膜フィルターを使用する濾過を実施した。精製及び濾過の後、タンパク質濃度を、OD280及び減衰係数から計算した。収率及びアリコートの概要を、表5に示す。

【0185】

【表5】

表5: 収量及びアリコート

タンパク質	濃度(mg/mL)	容量(mL)	バイアル数	総収量(mg)
マウス抗AGE抗体	0.08	1.00	3	0.24
キメラ抗AGE抗体	0.23	1.00	3	0.69

【0186】

抗体純度は、LabChip（登録商標）GXII（PerkinElmer社）を使用するキャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム（CE-SDS：capillary electrophoresis sodium-dodecyl sulfate）解析により査定した。

【実施例4】

【0187】

マウス（親）抗AGE抗体及びキメラ抗AGE抗体の結合

実施例3で記載された、マウス（親）抗AGE抗体及びキメラ抗AGE抗体の結合を、直接結合ELISAにより探索した。抗カルボキシメチルリシン（CML）抗体（R&D Systems社、MAB3247）を、対照として使用した。CMLを、KLHにコンジュゲートさせ（CML-KLH）、ELISAプレートを、CML及びCML-KLHの両方で、一晚にわたりコーティングした。HRP-ヤギ抗マウスFcを使用して、対照抗体及びマウス（親）抗AGE抗体を検出した。HRP-ヤギ抗ヒトFcを使用して、キメラ抗AGE抗体を検出した。

【0188】

抗原を、pH6.5の、1倍濃度リン酸緩衝液中、1µg/mLに希釈した。96ウェルマイクロ滴定ELISAプレートを、ウェル1つ当たり100µLの希釈抗原でコーティングし、4℃で、一晚にわたり静置した。プレートを、1倍濃度のPBS、2.5%のBSAでブロッキングし、翌朝、室温で、1～2時間にわたり静置した。抗体試料を、1倍濃度のPBS、1%のBSAを伴い、出発濃度を50µg/mLとする系列希釈液中で調製した。二次抗体を、1：5,000に希釈した。100µLの抗体希釈液を、各ウェルにアプライした。プレートを、マイクロプレートシェーカー上、室温で、0.5～1時間にわたりインキュベートした。プレートを、1倍濃度のPBSで、3回にわたり洗浄した。ウェル1つ当たり100µLの、希釈されたHRPコンジュゲートヤギ抗ヒトFc二次抗体を、ウェルにアプライした。プレートを、マイクロプレートシェーカー上で、1時間にわたりインキュベートした。次いで、プレートを、1倍濃度のPBSで、3回にわた

り洗浄した。100 μ LのHRP基質であるTMBを、各ウェルに添加して、プレートを発色させた。3～5分間の経過後、100 μ Lの1N HClを添加することにより、反応を停止させた。次に、直接結合ELISAを、CMLコーティングだけを伴い実施した。マイクロプレートリーダーを使用して、OD450における吸光度を読み取った。

【0189】

CML ELISA及びCML-KLH ELISAについてのOD450吸光度の生データを、下記のプレートマップに示す。ウェルプレート内の96ウェル中48のウェルを使用した。プレートマップ内のブランクウェルは、非使用ウェルを指し示す。

【0190】

【表6】

10

CML ELISA及びCML-KLH ELISAのプレートマップ:

濃度 (ug/mL)	1	2	3	4	5	6	7
50	0.462	0.092	0.42		1.199	0.142	1.852
16.67	0.312	0.067	0.185		0.31	0.13	0.383
5.56	0.165	0.063	0.123		0.19	0.115	0.425
1.85	0.092	0.063	0.088		0.146	0.099	0.414
0.62	0.083	0.072	0.066		0.108	0.085	0.248
0.21	0.075	0.066	0.09		0.096	0.096	0.12
0.07	0.086	0.086	0.082		0.098	0.096	0.098
0	0.09	0.085	0.12		0.111	0.083	0.582

20

R&D社
製の
陽性対
照

親
抗AGE
抗体

キメラ
抗AGE
抗体

CML-KLHコーティング

R&D社
製の
陽性対
照

親
抗AGE
抗体

キメラ
抗AGE
抗体

CMLコーティング

30

【0191】

CMLだけによるELISAについてのOD450吸光度の生データを、下記のプレートマップに示す。ウェルプレート内の96ウェル中24のウェルを使用した。プレートマップ内のブランクウェルは、非使用ウェルを指し示す。

【0192】

【表 7】

CMLだけによるELISAのプレートマップ:

濃度 (ug/mL)	1	2	3	4	5	6	7
50	1.913	0.165	0.992				
16.66667	1.113	0.226	0.541				
5.555556	0.549	0.166	0.356				
1.851852	0.199	0.078	0.248				
0.617284	0.128	0.103	0.159				
0.205761	0.116	0.056	0.097				
0.068587	0.073	0.055	0.071				
0	0.053	0.057	0.06				

R&D社
製の
陽性対
照親
抗AGE
抗体キメラ
抗AGE
抗体

【0193】

対照抗AGE抗体及びキメラ抗AGE抗体は、CML及びCML-KLHの両方への結合を示した。マウス（親）抗AGE抗体はCML又はCML-KLHへの、極めて弱い結合を示し、乃至はCML又はCML-KLHへの結合を示さなかった。反復されたELISAからのデータは、対照抗AGE抗体及びキメラ抗AGE抗体の、CMLへの結合を確認する。全ての緩衝液対照は、負のシグナルを示した。

【実施例5】

【0194】

ヒト化抗体

ヒト化抗体は、親（マウス）抗体配列の選択された部分を、ヒトフレームワーク配列と融合させる、複数のハイブリッド配列を創出することによりデザインした。アクセプターフレームワークは、フレームワークにわたる、全体的な配列同一性、インターフェース位置のマッチング、同様に分類された、カノニカルのCDR位置、及び除去されるN-グリコシル化部位の存在に基づき同定した。3つのヒト化軽鎖、及び3つのヒト化重鎖は、2つの異なる重鎖及び軽鎖の、ヒトアクセプターフレームワークに基づきデザインした。重鎖のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号30、配列番号32、及び配列番号34に示されるDNA配列によりコードされる、配列番号29、配列番号31、及び配列番号33に示す。軽鎖のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号36、配列番号38、及び配列番号40に示されるDNA配列によりコードされる、配列番号35、配列番号37、及び配列番号39に示す。ヒト化配列を、目視及びコンピュータモデル化により、方法に基づいて解析して、抗原への結合を保持する可能性が高い配列を取り出した。目標は、元の抗体特異性を保持しながら、最終的なヒト化抗体内のヒト配列の量を最大化することであった。ヒト化軽鎖とヒト化重鎖とを組み合わせ、9つの完全ヒト化抗体バリエーションを創出することができた。

【0195】

3つの重鎖及び3つの軽鎖を解析して、それらのヒト性を決定した。抗体のヒト性スコアは、Gao, S. H., et al., "Monoclonal antibody humanness score and its applications", BMC Biotechnology, 13:55 (July 5, 2013)において記載されている方法に従い

計算した。ヒト性スコアは、抗体の可変領域配列が、どのくらいヒト配列に似て見えるのかを表す。重鎖スコアについて、79以上は、ヒト配列に似て見えることを指し示し；軽鎖スコアについて、86以上は、ヒト配列に似て見えることを指し示す。3つの重鎖、3つの軽鎖、親（マウス）重鎖、及び親（マウス）軽鎖のヒト性を、下記の表6に示す。

【0196】

【表8】

表6: 抗体のヒト性

抗体	ヒト性(フレームワーク + CDR)
親(マウス)重鎖	63.60
重鎖 1 (配列番号 29)	82.20
重鎖 2 (配列番号 31)	80.76
重鎖 3 (配列番号 33)	81.10
親(マウス)軽鎖	77.87
軽鎖 1 (配列番号 35)	86.74
軽鎖 2 (配列番号 37)	86.04
軽鎖 3 (配列番号 39)	83.57

10

20

30

【0197】

まず、可変領域配列を合成することにより、全長抗体遺伝子を構築した。配列を、哺乳動物細胞内の発現について最適化した。次いで、これらの可変領域配列を、ヒトFcドメインを、既に含有する発現ベクターにクローニングし、重鎖には、IgG1を使用した。

【0198】

小スケールのヒト化抗体の作製は、既知組成培地を、血清の非存在下で使用して、懸濁HEK293細胞に、重鎖及び軽鎖のためのプラスミドをトランスフェクトすることにより実行した。MabSelect SuRe Protein A培地（GE Healthcare社製）を使用して、馴化培地中の全抗体を精製した。

【0199】

配列番号29、配列番号31、及び配列番号33に示されるアミノ酸配列を有する、3つの重鎖と、配列番号35、配列番号37、及び配列番号39に示されるアミノ酸配列を有する、3つの軽鎖との各組合せから、9つのヒト化抗体を作製した。比較のためのキメラ親抗体もまた調製した。抗体及びそれらのそれぞれの力価を、下記の表7に示す。

【0200】

40

50

【表 9】

表 7: 抗体力価

抗体	力価(mg/L)
キメラの親	23.00
配列番号 29 + 配列番号 35	24.67
配列番号 29 + 配列番号 37	41.67
配列番号 29 + 配列番号 39	29.67
配列番号 31 + 配列番号 35	26.00
配列番号 31 + 配列番号 37	27.33
配列番号 31 + 配列番号 39	35.33
配列番号 33 + 配列番号 35	44.00
配列番号 33 + 配列番号 37	30.33
配列番号 33 + 配列番号 39	37.33

10

20

30

【0201】

ヒト化抗体の結合は、例えば、用量依存的結合 E L I S A アッセイ又は細胞ベースの結合アッセイにより査定することができる。

【実施例 6】

【0202】

ヒト対象における、A G E - R N アーゼを含有するワクチン。

A G E - R N アーゼは、R N アーゼを、0.1～3 M のグルコース、グルコース-6-リン酸、果糖、又はリボースを含有するリン酸緩衝液中で、10～100 日間にわたりインキュベートすることにより調製する。A G E - R N アーゼ溶液を透析し、タンパク質含量を測定する。アジュバントとしての水酸化アルミニウム又はリン酸アルミニウムを、100 μg の A G E - R N アーゼに添加する。ホルムアルデヒド又はホルマリンを、保存剤として、調製物に添加する。アスコルビン酸を、抗酸化剤として添加する。ワクチンはまた、pH を調整するためのリン酸緩衝液、及びタンパク質安定化剤としてのグリシンも含む。組成物は、早老症を伴う対象に、静脈内注射する。

【実施例 7】

40

50

【0203】

ヒト対象における、AGE-RNアーゼを含有するワクチンのための注射レジメン。

実施例6で記載されたワクチンと同じワクチンを、早期発症アルツハイマー病の診断に基づき、早期老化を受ける対象として同定された対象に、静脈内注射することができる。AGE-RNアーゼに対する抗体の力価は、ELISAにより、2週間後に決定される。さらなる注射を、それぞれ、3週間後及び6週間後に実施する。さらなる力価の決定を、各回の注射の2週間後に実施する。

【実施例8】

【0204】

ヒト対象における、AGE-ヘモグロビンを含有するワクチン。

AGE-ヘモグロビンは、ヒトヘモグロビンを、0.1～3Mのグルコース、グルコース-6-リン酸、果糖、又はリボースを含有するリン酸緩衝液中で、10～100日間にわたりインキュベートすることにより調製する。AGE-ヘモグロビン溶液を透析し、タンパク質含量を測定する。全てのワクチン成分は、AGE-ヘモグロビンで、AGE-RNアーゼを置きかえる点を除き、実施例6の場合と同じである。投与は、実施例6又は実施例7の場合と同様に実行する。

【実施例9】

【0205】

ヒト対象における、AGE-ヒト血清アルブミンを含有するワクチン。

AGE-ヒト血清アルブミンは、ヒト血清アルブミンを、0.1～3Mのグルコース、グルコース-6-リン酸、果糖、又はリボースを含有するリン酸緩衝液中で、10～100日間にわたりインキュベートすることにより調製する。AGE-ヒト血清アルブミン溶液を透析し、タンパク質含量を測定する。全てのワクチン成分は、AGE-ヒト血清アルブミンで、AGE-RNアーゼを置きかえる点を除き、実施例6の場合と同じである。投与は、実施例6又は実施例7の場合と同様に実行する。

【実施例10】

【0206】

ヒト対象のためのカルボキシメチルリシン修飾タンパク質ワクチン

ワクチンは、カルボキシメチルリシン修飾タンパク質、AGE抗原として、アジュバントとしての水酸化アルミニウム、保存剤としてのホルムアルデヒド、抗酸化剤としてのアスコルビン酸、ワクチンのpHを調整するリン酸緩衝液、及びタンパク質安定化剤としてのグリシンを組み合わせることにより調製する。ワクチンは、イオン化放射線療法を施された後、心血管疾患が進行した対象へ、皮下注射する。

【実施例11】

【0207】

ヒト対象のためのカルボキシエチルリシン修飾ペプチドワクチン

ワクチンは、KLHにコンジュゲートしたカルボキシエチルリシン修飾ペプチド、AGE抗原として、アジュバントとしての水酸化アルミニウム、保存剤としてのホルムアルデヒド、抗酸化剤としてのアスコルビン酸、ワクチンのpHを調整するリン酸緩衝液、及びタンパク質安定化剤としてのグリシンを組み合わせることにより調製する。ワクチンは、ダイオキシンの曝露されて慢性腎疾患を伴う対象に、皮下注射する。

【実施例12】

【0208】

カルボキシメチルリシンモノクローナル抗体の投与についてのインビボ研究

カルボキシメチルリシン抗体の、腫瘍増殖、転移可能性、悪液質に対する効果を探索した。マウス乳がん腫瘍モデルを使用して、マウスにおいて、インビボ研究を実行した。雌BALB/cマウス(BALB/cAnNCr1、Charles River社)は、研究の1日目において、11週齢であった。

【0209】

4T1マウス乳腺腫瘍細胞(ATCC CRL-2539)を、10%のウシ胎仔血清、2mMのグ

10

20

30

40

50

ルタミン、 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ のゲンタマイシン、 100 単位/mL のペニシリンG Na、及び $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ のストレプトマイシン硫酸塩を含有するRPMI 1640培地中で培養した。腫瘍細胞を、5%の CO_2 及び95%の空気による雰囲気中、 37°C の加湿型インキュベーター内の、組織培養フラスコ中で維持した。

【0210】

次いで、培養された乳がん細胞を、マウスに植え込んだ。4T1細胞を、対数増殖期に採取し、インプラント日において、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)中に、 1 mL 当たりの細胞 1×10^6 個の濃度で再懸濁させた。腫瘍は、4T1細胞 1×10^5 個(0.1 mL の懸濁液)を、各被験動物の、右脇腹に、皮下インプラントすることにより誘発した。それらの体積が、 $80\sim 120\text{ mm}^3$ の目標範囲に近づくのに伴い、腫瘍をモニタリングした。腫瘍体積は、式：腫瘍体積=(腫瘍幅)²(腫瘍長さ)/2を使用して決定した。腫瘍重量は、 1 mm^3 の腫瘍体積が、 1 mg の重量を有するという仮定を使用して近似した。研究の1日目と名付ける、移植の13日後に、マウスを、個々の腫瘍体積の範囲を、 $108\sim 126\text{ mm}^3$ とし、腫瘍体積の群平均値を、 112 mm^3 とする、4つの群(群1つ当たりの $n=15$)に区分した。4つの治療群を、下記の表8に示す。

【0211】

【表10】

表 8: 治療群

群	記載	薬剤	投与($\mu\text{g/g}$)
1	対照	リン酸緩衝生理食塩液(PBS)	該当なし
2	低用量	カルボキシメチルリシンモノクローナル抗体	5
3	高用量	カルボキシメチルリシンモノクローナル抗体	10
4	観察だけ	なし	該当なし

【0212】

抗カルボキシメチルリシンモノクローナル抗体を、治療剤として使用した。 250 mg のカルボキシメチルリシンモノクローナル抗体を、R&D Systems社(Minneapolis, MN)から得た。カルボキシメチルリシンモノクローナル抗体の投与液を、媒体(PBS)中に、1及び 0.5 mg/mL で調製して、 10 mL/kg の投与容量中、それぞれ、10及び $5\text{ }\mu\text{g/g}$ の活性投与量をもたらした。投与液は、光から保護して、 4°C で保管した。

【0213】

全ての治療は、マウスに1回の投与を行った、研究の1日目を除き、毎日2回、21日間静脈内(i.v.)投与した。研究の19日目に、尾静脈分解のために、i.v.投与できない動物には、i.v.投与を、腹腔内(i.p.)投与に変更した。投与容量は、体重 20 g 当たり 0.200 mL の(10 mL/kg)であり、各個別の動物の体重

に照らしてスケーリングした。

【0214】

研究は、23日間にわたり続いた。腫瘍は、毎週2回、キャリパーを使用して測定した。動物は、1～5日目に毎日秤量し、次いで毎週2回ずつ、研究が完了するまで秤量した。マウスはまた、任意の副作用についても観察した。許容可能な毒性は、研究中の体重減少の群平均値が20%未満であり、治療関連死が10%以下であることとして規定した。治療の有効性は、研究の最終日（23日目）からのデータを使用して決定した。

【0215】

抗カルボキシメチルリシン抗体が、腫瘍の増殖を阻害する能力は、腫瘍体積中央値（MTV）を、群1～3について比較することにより決定した。腫瘍体積は、上記で記載した通りに測定した。腫瘍増殖の阻害パーセント（TGI%）は、対照群（群1）のMTVと、薬物治療群のMTVとの差として規定し、対照群のMTVに対する百分率として表す。TGI%は、式： $TGI\% = (1 - MTV_{treated} / MTV_{control}) \times 100$ に従い計算することができる。

【0216】

抗カルボキシメチルリシン抗体が、がんの転移を阻害する能力は、肺がん病巣を、群1～3について比較することにより決定した。阻害パーセント（阻害%）は、対照群の転移性病巣の平均値カウントと、薬物治療群の転移性病巣の平均値カウントとの差として規定し、対照群の転移性病巣の平均値カウントに対する百分率として表す。阻害%は、以下の式： $阻害\% = (1 - \text{病巣}_{treated} \text{の平均値カウント} / \text{病巣}_{control} \text{の平均値カウント}) \times 100$ に従い計算することができる。

【0217】

抗カルボキシメチルリシン抗体が、悪液質を阻害する能力は、肺及び腓腹筋の重量を、群1～3について比較することにより決定した。組織重量はまた、体重100gに照らしても正規化した。

【0218】

治療の有効性はまた、研究中に観察された退縮応答の発生率及び大きさによっても査定した。治療は、動物において、腫瘍の部分退縮（PR：partial regression）又は完全退縮（CR：complete regression）を引き起こすことができる。PR応答では、腫瘍体積は、研究の経過中に、3回の測定で、連続して、その1日目の体積の50%以下であり、これらの3回の測定のうちの、1又は2回以上において、 13.5 mm^3 以上であった。CR応答では、腫瘍体積は、研究の経過中に、3回の測定で、連続して、 13.5 mm^3 未満であった。

【0219】

統計学的解析は、Windows 6.07用のPrism（GraphPad社製）を使用して実行した。2つの群の、23日目における平均値腫瘍体積（MTV）の間の差違についての統計学的解析は、マン・ホイットニーのU検定を使用して達した。転移性病巣の比較は、ANOVAーダネットにより評価した。正規化された組織重量は、ANOVAにより比較した。両側の統計学的解析は、 $P = 0.05$ の有意水準で行った。結果は、統計学的に有意であるか、又は統計学的に有意でないとして分類した。

【0220】

研究の結果を、下記の表9に示す。

【0221】

10

20

30

40

【表 1 1】

表 9: 結果

群	MTV (mm ³)	%TGI	肺病巣	阻害%	PR	CR	正規化腓腹筋 重量(mg)	正規化肺重量 (mg)
1	1800	該当 なし	70.4	該当なし	0	0	353.4/19.68	2799.4/292.98
2	1568	13%	60.3	14%	0	0	330.4/21.62	2388.9/179.75
3	1688	6%	49.0	30%	0	0	398.6/24.91	2191.6/214.90

10

【0 2 2 2】

治療関連死を伴わない場合、全ての治療レジメンは、許容可能に忍容された。唯一の動物死は、転移に起因する非治療関連死であった。TGI%は、5 μ g/g 治療群（群 2）及び 10 μ g/g 治療群（群 3）について、有意性への傾向（マン・ホイットニーによる P は、0.05 を超える）を示した。阻害%は、5 μ g/g 治療群について、有意性への傾向（ANOVA-ダネットによる P は、0.05 を超える）を示した。阻害%は、10 μ g/g 治療群について、統計学的に有意（P は 0.01 以下、ANOVA-ダネット）であった。カルボキシメチルリシン抗体が、悪液質を治療する能力は、肺及び腓腹筋の臓器重量の、治療群と、対照群との間における比較に基づき、有意性への傾向（ANOVA による P は、0.05 を超える）を示した。結果は、抗カルボキシメチルリシンモノクローナル抗体の投与が、がん転移を低減することが可能であることを指し示す。このデータは、抗 AGE 抗体のインビボ投与が、治療利益を、安全かつ効果的に提供しうることの、さらなる証拠を提示する。

20

【実施例 1 3】

30

【0 2 2 3】

イオン化放射線に起因する、早期老化の発生を模倣する症状の進行についての研究

マウスにおいて、インビボ研究を実行して、抗 AGE 抗体による治療、及び AGE-KLH によるワクチン接種の、イオン化放射線曝露により誘導される、早期老化を模倣する症状に対する効果について研究する。骨関節炎の局在化した進行についてモニタリングする。雄 C57/BL6 マウスは、研究の 1 日目において、8～10 週齢とする。マウスを、5 つの治療群：（1）対照；（2）静脈内投与される媒体だけ；（3）10 μ g/g の用量で、静脈内投与される、抗 AGE 抗体；（4）10 μ g/g の用量で、関節内投与される、抗 AGE 抗体；及び（5）ワクチンとして、腹腔内投与される、10 μ g の AGE-KLH に分ける。

40

【0 2 2 4】

骨関節炎は、群 2～5 において、右後脚内側を、イオン化放射線に曝露することにより誘導する。群 1 は、右後脚が照射されない対照である。

【0 2 2 5】

投与は、手術の 1 週間後に始まる。群 2～5 について、投与容量は、体重 20 グラム当たり 0.200 mL の（10 mL/kg）であり、各個別の動物の体重に照らしてスケールリングする。群 2 は、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）を静脈内送達される。群 3 は、毎日 2 回、21 日間にわたり、10 μ g/g の抗 AGE 抗体を静脈内送達される。群 4 は、毎日 2 回、21 日間にわたり、右後膝に、10 μ g/g の抗 AGE 抗体を関節内送達される。群 5 には、イオン化放射線への曝露の 1 週間前に、フロイントの完全アジュバント中

50

の、 $10\mu\text{g}$ のAGE-KLHを、腹腔内に投与するのにつき、照射の4週間後に、 $10\mu\text{g/g}$ のワクチンの追加注射を施す。

【0226】

全ての群を、罹患率／死亡率について、毎日モニタリングし、運動及び歩行の変化に対する影響について、毎日査定する。骨関節炎を、全ての群において、動的体重負荷（DMB：dynamic weight bearing）試験により測定する。

【0227】

群1及び5における動物を、16週目に屠殺する。群5については、抗AGE抗体に特異的なマウスにおける抗体の力価を決定する、THERMOFISHER（登録商標）EASY-TITER（登録商標）Mouse IgG Assayなどの抗体力価アッセイのために、血液を回収する。群2～4における、同数の動物を、4、8、及び16週目に屠殺する。各屠殺群内のマウスの半数を、組織学について解析し、半数を、p16INK4a qRT PCRについて解析する。p16INK4aを、屠殺された動物の関節軟骨（軟骨細胞）内で測定する。p16INK4a qRT PCRを、qRT PCR解析のために保存する。

【0228】

骨関節炎はまた、膝関節試料を査定することによっても測定する。全てのマウスに由来する、右及び左の全膝関節試料を回収し、10%のNBF中で固定し、次いで、脱灰し、パラフィンワックス中に包埋する。各染色のために、3枚の非連続冠状断面を、右膝関節について採取し、別の3枚の非連続冠状断面を、左膝関節について採取し、各染色のために、動物1匹当たりのスライド6枚が得られ、動物1匹当たりの合計のスライド12枚が得られる。断面は、半定量的分級システムを使用する、有資格の獣医科病理医により、疾患の重症度（骨棘及び滑膜を伴う軟骨／骨）について評定される。スコアは、統計学的解析と共に報告する。

【0229】

抗AGE抗体は、老化細胞に特異的に結合し、免疫系が、これらの細胞を破壊することを可能とする。同様に、AGE-KLH抗原によるワクチン接種は、マウス免疫系が、老化細胞をターゲティングし、これらを除去することを可能とするであろう。老化細胞の殺滅及び除去は、イオン化放射線への曝露から生じる、骨関節炎及び他の早期老化を模倣する症状の進行を防止するであろう。

【実施例14】

【0230】

イオン化放射線に起因する早期老化を模倣する症状の進行及び火傷についての研究

マウスにおいて、インビボ研究を実行して、抗AGE抗体の投与、及びAGE抗原に対するワクチン接種の、イオン化放射線曝露により誘導される、早期老化を模倣する症状及び火傷に対する効果について研究する。肺炎の局在化した進行についてモニタリングする。

【0231】

40匹のマウスを、群1つ当たりのマウス10匹ずつの4つの群、A、B、C、及びDに編成する。群A内の各マウスを、損傷の直前に、フロイントの完全アジュバント（Sigma Aldrich社製）と、滅菌内毒素非含有PBS中、1ミリリットル当たり $400\mu\text{g}$ に希釈された、CMLを付加したキーホールリンペットヘモシアニン（Biosynthesis社製）のアリコート $600\mu\text{L}$ との、1：1のエマルジョン $200\mu\text{L}$ で、皮下免疫化する。群Bのマウス10匹には、創傷閉止後に、内毒素非含有PBS溶液 $800\mu\text{L}$ の皮下注射を施す。群Cには、1グラム当たりの抗CML抗体 $10\mu\text{g}$ の注射を施す。群D内のマウスには、内毒素非含有PBSの皮内注射を施す。

【0232】

全てのマウスを、 74.3cGy の放出率における、 ^{137}Cs 線源への曝露により、 5Gy の総体内イオン化放射線に曝露する（さらなる詳細については、Palmer, J. L. et al., “Combined radiation and burn injury results in exaggerated early pulmonary inflammation”, Radiation Research, Vol. 180, No. 3, pp. 276-283 (2013)を参照さ

10

20

30

40

50

りたい)。放射線損傷の1時間後、全てのマウスに、ケタミン(1kg当たり100mg)とキシラジン(10mg/kg)との混合物により、腹腔内において麻酔をかける。マウスの背面を、動物用バリカンで剃毛する。次いで、各マウスを、それらの背部上の、全体表面積のうちの15%の曝露を可能とする開口部を伴う、プラスチック製の鋳型に入れる。熱傷は、動物を、摂氏95度の水浴中に、7秒間にわたり浸漬することにより達成する。マウスは、さらなる熱傷を防止するように、熱湯への曝露の直後に乾燥させる。全てのマウスに、火傷の直後に、体液の喪失を補償するように、0.9%の温熱生理食塩液1.0mlを、腹腔内において投与し、マウスが、麻酔から回復する間、マウスのケージを、温熱パッド上に置くことにより、体内温度を維持する。損傷の48時間後、全てのマウスを屠殺する。火傷部位及び非創傷皮膚に由来する皮膚の試料を採取し、10%の緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィン中で処理及び包埋する。パラフィン切片を、マッソントリクローム染色処理にかけ(さらなる詳細については、Wilgus, T. A. et al., "Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor", Laboratory Investigation, Vol. 88, pp. 579-590 (2008)を参照されたい)、対物ミクロメーターを使用して、各瘢痕の幅を測定する。各マウスの肺に由来する切片を、ヘマトキシリン/エオシンで染色し、肺胞1つ当たりの好中球の存在及び計量について評定する。

10

【0233】

群A及びCにおけるマウスは、群B及びDにおけるマウスより、50%少ない瘢痕化及び50%少ない好中球を呈するであろう。AGE抗原(群A)による免疫化は、マウス免疫系が、老化細胞をターゲティングし、除去することを可能とするであろう。同様に、抗AGE抗体の投与(群C)は、老化細胞に特異的に結合し、免疫系が、これらの細胞を破壊することを可能とするであろう。老化細胞の殺滅及び除去は、イオン化放射線への曝露及び火傷から生じる、肺炎及び他の早期老化を模倣する症状の発生を防止するであろう。

20

【実施例15】

【0234】

放射線誘導性老化、並びにダサチニブ及びケルセチンによる治療

被験群は、放射線誘導性老化、並びに老化細胞溶解剤ダサチニブ及びケルセチンを使用する、老化細胞の除去について探索した(Zhu, Y. et al., "The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs", Aging Cell, Vol. 14, pp. 644-658 (2015))。結果を、下記にまとめる。

30

【0235】

インビトロ研究は、イオン化放射線への曝露が、老化細胞内の遺伝子発現を変化させることを裏付けた。前脂肪細胞(脂肪細胞の前駆細胞)を、ヒト対象から単離し、10Gyのイオン化放射線に曝露するか、又は偽照射する。遺伝子発現は、放射線曝露の25日後に測定した。老化細胞は、非老化細胞と比較して、実質的に異なる遺伝子発現であって、アポトーシスの負の調節因子、及び抗アポトーシス性遺伝子セットの上方調節を含む遺伝子発現を呈した。

【0236】

マウスモデルにおけるインビボ研究は、老化細胞溶解剤が、老化細胞を消失させ、長期的な利益をもたらしうることを裏付けた。マウスの体内の残余を遮蔽しながら、一方の脚を、10Gyの放射線に曝露する一方、対照マウスには、偽照射した。放射線曝露の12週間後、照射された後肢上の体毛は、グレーに変わり、動物は、トレッドミル運動能の低減を呈したが、これらは、放射線曝露により誘導される早期老化の徴候である。次いで、マウスに、ダサチニブ及びケルセチン(D+Q)の単回投与を行うか、又は媒体だけの対照を投与した。D+Qの単回投与を施されたマウスは、投与の5日後に、トレッドミル上で、消耗までになされた、運動時間、距離、及び総仕事量の増大を呈した。治療されたマウスはまた、筋肉中及び鼠径部脂肪中の老化マーカーも低減された。D+Q投与の7カ月後、照射され、D+Qの単回投与で治療されたマウスは、媒体治療対照と比較して、著明に良好なトレッドミル運動能を呈し、偽照射対照と本質的に同一な持久力を有した。偽照射対照への、D+Qの単回投与は、投与の7カ月後において、媒体治療対照と比較して、

40

50

持久力に対する効果を及ぼさなかった。

【0237】

これらの結果は、放射線曝露が、インビトロ及びインビボのいずれにおいても、老化をもたらすことを確認する。インビボ研究は、放射線曝露から生じる早期老化の症状が、D + Qを使用する、老化細胞の除去により改善されうることを見付ける。

【実施例16】

【0238】

化学物質曝露誘導性老化、及び遺伝子改変機構又はABT-263を使用する、老化細胞の消失による治療

被験群は、トランスジェニックマウスモデル (Demaria, M., et al., “Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse”, *Cancer Discovery*, Vol. 7, No. 2, pp. 165-176 (2017)) における化学療法剤及び老化細胞の除去から生じる治療誘導性老化 (T I S : therapy-induced senescence) について探索した。全てのインビボ実験は、生物発光による老化細胞の検出、及び他の点では非毒性の抗ウイルス薬である、ガンシクロビル (G C V : ganciclovir) の投与による老化細胞の消失を容易とするように、特異的に改変されたトランスジェニックマウスモデルである、p16-3MRを伴った。結果を、下記にまとめる。

【0239】

インビトロ研究及びインビボ研究は、化学療法剤への曝露が、細胞の老化を誘導することを裏付けた。インビトロ研究では、マウス胎仔性線維芽細胞、マウス皮膚線維芽細胞、及びヒト皮膚線維芽細胞を、ドキソルビシン又はパクリタキセルで治療した。細胞は、老化関連β-ガラクトシダーゼ (S A - β - g a l : senescence-associated β-galactosidase) 活性の増大、DNA合成の低減、p^{16INK4a}をコードするmRNAレベルの上昇、老化関連分泌現象 (S A S P) 成分レベルの上昇、p21レベルの上昇、及びL a m i n B 1発現の低減を含む、細胞老化の症状を呈した。インビボ研究では、マウスに、ドキソルビシン、パクリタキセル、テモゾロミド、又はシスプラチンを投与した。化学療法剤の投与は、角化細胞、内皮細胞、線維芽細胞、及び平滑筋細胞を含む、多様な細胞型における老化を誘導した。パクリタキセル、テモゾロミド、及びシスプラチンは、皮膚内の、p^{16INK4a}発現の上昇を結果としてもたらすことが見出された。

【0240】

複数のインビボ研究は、遺伝子改変マウスモデルにおける老化細胞の消失の誘導、又は老化細胞溶解剤であるABT-263の投与による老化細胞の消失が、化学療法剤への曝露から生じる症状を、効果的に治療することを裏付けた。1つのインビボ研究は、炎症、骨髄の回復、及び心機能について検討した。遺伝子改変マウスを、老化を誘導するドキソルビシンで治療するのにつき、G C V (老化細胞の消失を誘導する) で治療した。ドキソルビシンの投与は、炎症、造血前駆細胞 (H P C : hematopoietic progenitor cell) 機能の低減、及び心機能の低減と関連する、S A S P因子遺伝子発現の増大を結果としてもたらした。老化細胞の消失は、循環炎症性因子を低減し、H P Cの機能的回収を促進し、心機能障害を予防した。

【0241】

第2のインビボ研究は、がんの拡大及び再発について検討した。遺伝子改変マウスを、乳がん細胞の注射の後 (M M T V - P y M T) に、ドキソルビシンで治療した。ドキソルビシンにつき、G C V (老化細胞の消失を誘導する) を施されたマウスは、ドキソルビシンにつき、媒体だけの投与を施されたマウスと比較して、生存の延長及びがん転移の低減を呈した。他の被験対象は、治療の前に、触知可能な腫瘍の、手術による除去を施された。G C V (老化細胞の消失を誘導する) 施された、手術治療マウスは、ドキソルビシンにつき、媒体だけの投与を施された手術治療マウスと比較して、腫瘍増殖が低下し、がん転移が低減され、転移性病巣が減少した。同様の結果は、老化細胞を、ABT-263の投与により消失させた場合にも得られた。

【0242】

第3のインビボ研究は、化学療法誘導性疲労（無力症）について検討した。遺伝子改変マウスを、老化を誘導するドキソルビシン又はパクリタキセルに続き、GC V（老化細胞の消失を誘導する）又はABT-263の投与で治療した。ドキソルビシン又はパクリタキセルの投与は、走行活力及び筋力の減退により測定される、化学療法誘導性疲労を結果としてもたらしめた。老化細胞の消失は、走行活力の減退を、ほぼ回復させ、筋力の低下を改善した。

【0243】

これらの結果は、化学療法剤への曝露が、インビトロ及びインビボのいずれにおいても、老化をもたらすことを確認する。インビボ研究は、化学物質への曝露から生じる早期老化の症状が、老化細胞の消失により改善されうることを見付ける。インビボ研究はまた、

10

【実施例17】

【0244】

化学物質曝露誘導性老化についての、蛍光顕微鏡研究

膵臓がんPANC-1細胞株に由来する細胞を、化学療法剤である、 $12.5\mu\text{M}$ のエトポシドで、24時間にわたり治療して、老化を誘導した。対照細胞を、ジメチルスルホキシド（DM SO : dimethylsulfoxide）媒体で、24時間にわたり治療した。次いで、細胞を、 β -ガラクトシダーゼ老化染色キット、緑色蛍光タンパク質（GFP : green fluorescent protein）にコンジュゲートした抗AGE抗体、又はGFP及び4',6-ジ

20

【0245】

図2Aは、 β -ガラクトシダーゼ老化染色キットによる染色の後における、非治療細胞を例示する。図2Bは、GFPにコンジュゲートした抗AGE抗体による染色の後における、非治療細胞を例示する。図2Cは、GFP-D APIにコンジュゲートした抗AGE抗体による染色の後における、非治療細胞を例示する。図2B及び2Cは、輝度を増大させて、対比を増強している。非治療細胞は、比較的均一のサイズ及び形状を呈し、稠密に充填されている。

30

【0246】

図2Dは、 β -ガラクトシダーゼ老化染色キットによる染色の後における、エトポシド治療細胞を例示する。図2Eは、GFPにコンジュゲートした抗AGE抗体による染色の後における、エトポシド治療細胞を例示する。図2Fは、GFP-D APIにコンジュゲートした抗AGE抗体による染色の後における、エトポシド治療細胞を例示する。図2E及び2Fは、輝度を増大させて、対比を増強している。エトポシド治療細胞は、不規則な外観を呈し、サイズが大きく、疎に充填されている。

【0247】

結果は、化学療法剤の投与が、PANC-1細胞内の老化を誘導することを裏付ける。結果はまた、抗AGE抗体が、化学療法剤への曝露後に老化した細胞に結合することも確認する。

40

【実施例18】

【0248】

化学物質曝露誘導性老化についての、蛍光顕微鏡研究

ヒト組織球性リンパ腫U937細胞株に由来する細胞を、化学療法剤であるドキソルビシンで治療して、老化を誘導した。細胞を、 $0\mu\text{M}$ 、 $0.01\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、若しくは $1\mu\text{M}$ のドキソルビシンで、3日間にわたり治療するか、又は $0\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、若しくは $1\mu\text{M}$ のドキソルビシンで、6日間にわたり治療した。老化は、蛍光顕微鏡イメージングを介して、老化関連 β -ガラクトシダーゼアッセイにより測定した。

【0249】

50

図 3 A～3 D は、細胞を、0 μ M (図 3 A)、0.01 μ M (図 3 B)、0.1 μ M (図 3 C)、1 μ M (図 3 D) のドキソルビシンで、3 日間にわたり治療した結果を例示する。0 μ M のドキソルビシンでは、細胞のうちの 1 % 未満が、弱く蛍光発光する。0.01 μ M のドキソルビシンでは、細胞のうちの約 85 % が、蛍光発光する。0.1 μ M のドキソルビシンでは、細胞のうちの約 65 % が蛍光発光する。1 μ M のドキソルビシンでは、細胞のうちの約 60 % が蛍光発光する。図 3 E～3 G は、細胞を、0 μ M (図 3 E)、0.1 μ M (図 3 F)、1 μ M (図 3 G) のドキソルビシンで、6 日間にわたり治療した結果を例示する。0 μ M のドキソルビシンでは、細胞のうちの約 1 % が、弱く蛍光発光する。0.1 μ M のドキソルビシンでは、細胞のうちの約 85 % が蛍光発光する。1 μ M のドキソルビシンでは、細胞のうちの約 85 % が蛍光発光する。1 μ M のドキソルビシンによる治療は、著明な細胞死を引き起こした。老化誘導のピークは、3～6 日間にわたる、0.1 μ M のドキソルビシン治療であると考えられる。

【0250】

結果は、化学療法剤の投与が、U937 細胞内の老化を誘導することを裏付ける。

【0251】

(参考文献)

1. “Progeroid syndromes”, available online at en.wikipedia.org/wiki/Progeroid_syndromes (November 29, 2017)
2. Richardson, R. B., “Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea”, *Aging*, Vol. 1, No. 11, pp. 887-902 (2009)
3. Meng, A. et al., “Ionizing radiation and Bisulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells”, *Cancer Research*, Vol. 63, pp. 5414-5419 (2003)
4. Flament, F. et al., “Effect of the sun on visible clinical signs of aging in Caucasian skin”, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, Vol. 6, pp. 221-232 (2016)
5. Smith, R. L. et al., “Premature and accelerated aging: HIV or HAART?”, *Frontiers in Genetics*, Vol. 3, Article 328, pp. 1-10 (2013)
6. Cupit-Link, M. C. et al., “Biology of premature ageing in survivors of cancer”, *ESMO Open*, Vol. 2, No. e000250, pp. 1-9 (2017)
7. White, S. S. et al., “An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology”, *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, Vol. 27, No. 4, pp. 197-211 (2009)
8. Ribas, J. et al., “Biomechanical strain exacerbates inflammation on a progeria-on-a-chip model”, *Small*, Vol. 13 (2017)
9. D’Orazio, J. et al., “UV radiation and the skin”, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 14, pp. 12222-12248 (2013)
10. Roninson, I. B., “Tumor cell senescence in cancer treatment”, *Cancer Research*, Vol. 63, pp. 2705-2715 (2003)
11. Zhu, Y. et al., “The Achilles’ heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs”, *Aging Cell*, Vol. 14, pp. 644-658 (2015)
12. Formenti, S. C. et al., “Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift”, *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 105, No. 4, pp. 256-265 (2013)
13. Pan, J. et al., “Inhibition of Bcl-2/xl with ABT-263 selectively kills senescent type II pneumocytes and reverses pulmonary fibrosis induced by ionizing radiation in mice”, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, Vol. 99, No. 2, pp. 353-361 (2017)
14. Palmer, J. L. et al., “Combined radiation and burn injury results in exagge

10

20

30

40

50

rated early pulmonary inflammation”, Radiation Research, Vol. 180, No. 3, pp. 276-283 (2013)

15. Wilgus, T. A. et al., “Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor”, Laboratory Investigation, Vol. 88, pp. 579-590 (2008)

16. Shaw, J. N. et al., “N ϵ -(carboxymethyl)lysine (CML) as a biomarker of oxidative stress in long-lived tissue proteins”, Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols, Chapter 15, Humana Press, pp. 129-137 (2002)

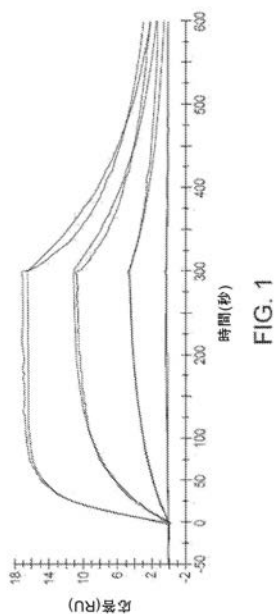
17. Leeman, K. T. et al., “Lung stem and progenitor cells in tissue homeostasis and disease”, Current Topics in Developmental Biology, Vol. 107, pp. 207-233 (2014)

18. Haddadi, G. H. et al., “Hesperidin as radioprotector against radiation-induced lung damage in rat: a histopathological study”, Journal of Medical Physics, Vol. 42, No. 1, pp. 25-32 (2017)

19. Brandl, A. et al., “Oxidative stress induces senescence in chondrocytes”, Journal of Orthopaedic Research, Vol. 29, pp. 1114-1120 (2011)

10

【図 1】



【図 2 A】

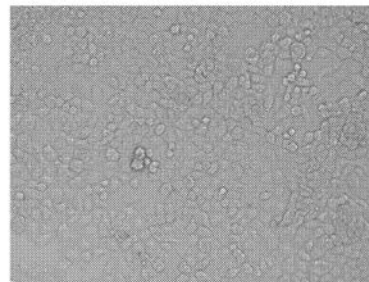


FIG. 2A

【図 2 B】

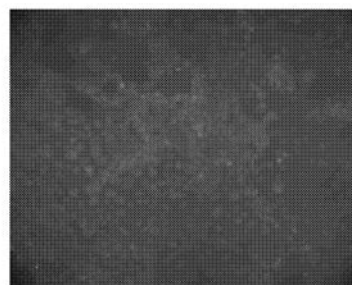


FIG. 2B

【図 2 C】

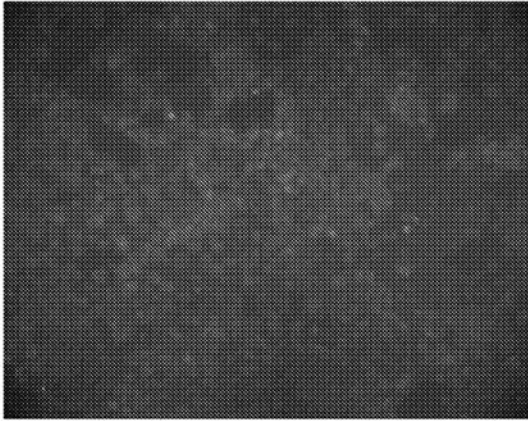


FIG. 2C

【図 2 D】

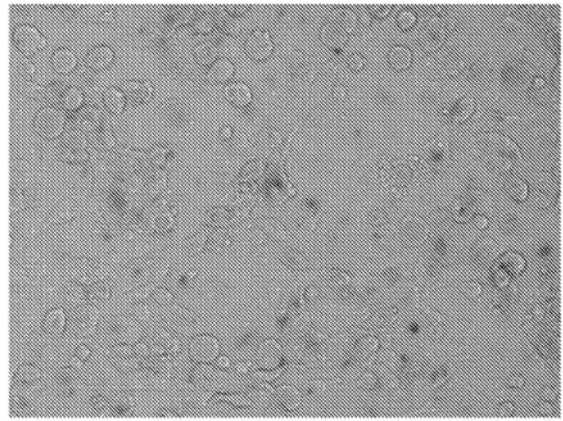


FIG. 2D

【図 2 E】

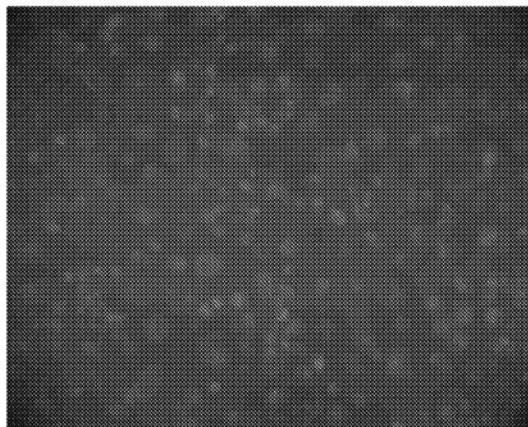


FIG. 2E

【図 2 F】

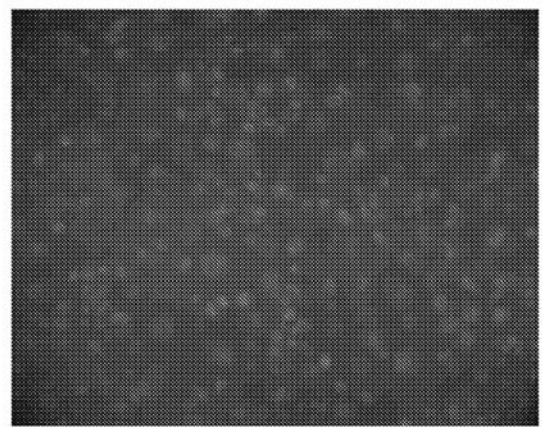


FIG. 2F

【図 3 A】

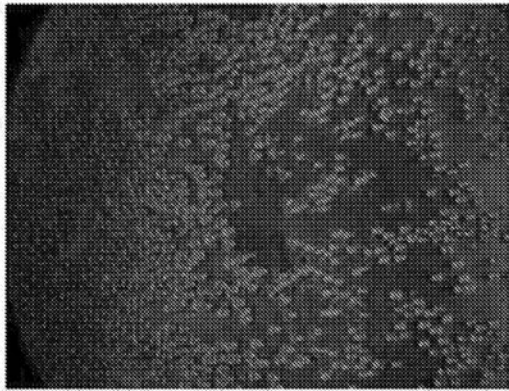


FIG. 3A

【図 3 B】

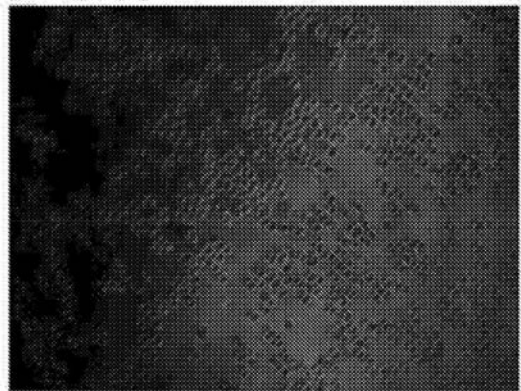


FIG. 3B

【図 3 C】

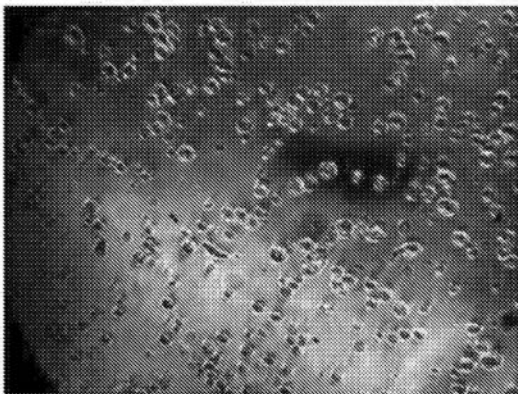


FIG. 3C

【図 3 D】

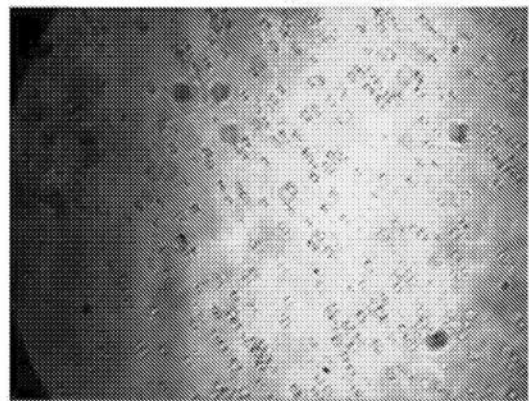


FIG. 3D

【図 3 E】

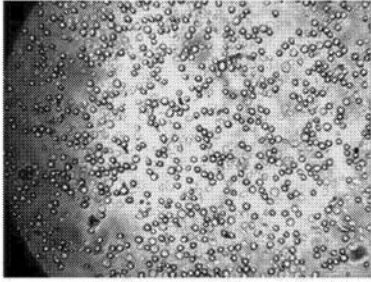


FIG. 3E

【図 3 F】

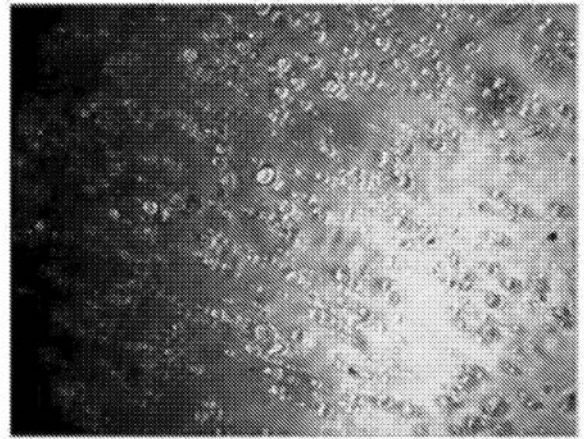


FIG. 3F

【図 3 G】

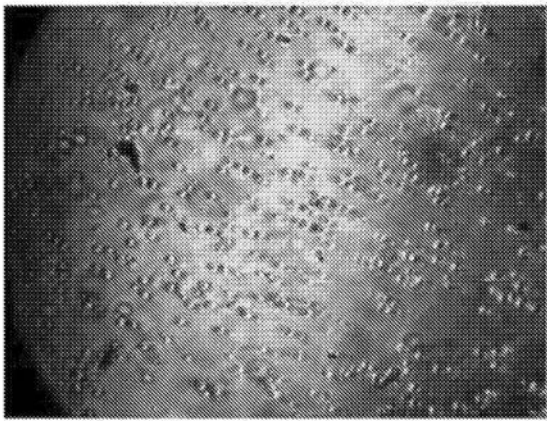


FIG. 3G

【配列表】

2021532114000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/043071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/04 C07K14/44
C07K16/44

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)

A61K C07K A61P

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, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/047629 A2 (SIWA CORP [US]; GRUBER LEWIS [US]) 12 April 2012 (2012-04-12) paragraphs [0006], [0007] paragraphs [0001], [0011] -----	11-17, 21-69
X	WO 2016/044252 A2 (SIWA CORP [US]) 24 March 2016 (2016-03-24) abstract paragraphs [0010], [0018] paragraph [0004] paragraph [0063] - paragraph [0065]; example 3 ----- -/--	11-17, 21-69

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 November 2019

Date of mailing of the international search report

27/11/2019

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

Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/043071

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 2017/222535 A1 (SIWA CORP [US]) 28 December 2017 (2017-12-28) abstract claim 5 paragraph [0021] claim 2 -----	7-10, 21-67
X	W0 2017/143073 A1 (SIWA CORP [US]) 24 August 2017 (2017-08-24) abstract paragraph [0008] paragraphs [0009], [0013] paragraphs [0020], [0034] paragraph [0034] - paragraph [0048] example 5 paragraph [0173] - paragraph [0187]; example 6 claims 1-39 -----	1-7, 21-69
X	W0 2017/065837 A1 (SIWA CORP [US]) 20 April 2017 (2017-04-20) abstract paragraphs [0033], [0034]; claims 13, 16, 18 paragraphs [0023], [0035] paragraph [0044] - paragraph [0047]; example 5 paragraph [0056] -----	1-7, 21-69
X	LIN ZHU ET AL: "Immunization with advanced glycation end products modified low density lipoprotein inhibits atherosclerosis progression in diabetic apoE and LDLR null mice", CARDIOVASCULAR DIABETOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 13, no. 1, 13 November 2014 (2014-11-13), page 151, XP021204122, ISSN: 1475-2840, DOI: 10.1186/S12933-014-0151-6 abstract -----	17-67
X	MUSTHIKA WIDA MASHITAH ET AL: "Immunization of AGE-modified albumin inhibits diabetic nephropathy progression in diabetic mice", DIABETES, METABOLIC SYNDROME AND OBESITY: TARGETS AND THERAPY, 1 August 2015 (2015-08-01), page 347, XP55319784, DOI: 10.2147/DMS0.S86332 abstract page 350, right-hand column, paragraph 5 - page 354, right-hand column, paragraph 2 -----	17-67
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/043071

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LINETSKY MIKHAIL ET AL: "UVA Light-excited Kynurenines Oxidize Ascorbate and Modify Lens Proteins through the Formation of Advanced Glycation End Products IMPLICATIONS FOR HUMAN LENS AGING AND CATARACT FORMATION", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 289, no. 24, 13 June 2014 (2014-06-13), pages 17111-17123, XP002794838, abstract -----	1-69
A	CHAUDHARY MANOJ KUMAR ET AL: "Redox imbalance in a model of rat mimicking Hutchinson-Gilford progeria syndrome", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 491, no. 2, 16 September 2017 (2017-09-16), pages 361-367, XP002794849, figure 3 page 365, right-hand column -----	68,69
A	HAUSE FRANK ET AL: "Accumulation of glycosylated proteins suggesting premature ageing in lamin B receptor deficient mice", BIOGERONTOLOGY, KLUWER, AMSTERDAM, NL, vol. 19, no. 1, 28 October 2017 (2017-10-28), pages 95-100, XP036402595, ISSN: 1389-5729, DOI: 10.1007/S10522-017-9733-5 [retrieved on 2017-10-28] abstract -----	68,69
X,P	W0 2018/191718 A1 (SIWA CORP [US]) 18 October 2018 (2018-10-18) paragraph [0049]; claim 19 -----	1-68
X,P	W0 2018/204679 A1 (SIWA CORP [US]) 8 November 2018 (2018-11-08) paragraphs [0058], [0060]; claims 12, 31, 33 -----	1-68

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/043071

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012047629 A2	12-04-2012	EP 2621534 A2 EP 3511017 A1 ES 2725852 T3 US 2013243785 A1 US 2017216435 A1 US 2019328876 A1 WO 2012047629 A2	07-08-2013 17-07-2019 27-09-2019 19-09-2013 03-08-2017 31-10-2019 12-04-2012
WO 2016044252 A2	24-03-2016	AU 2015318036 A1 BR 112017005517 A2 CA 2961603 A1 CN 107001459 A EP 3194439 A2 JP 2017529363 A KR 20170054460 A RU 2017113349 A US 2017247472 A1 WO 2016044252 A2	06-04-2017 05-12-2017 24-03-2016 01-08-2017 26-07-2017 05-10-2017 17-05-2017 19-10-2018 31-08-2017 24-03-2016
WO 2017222535 A1	28-12-2017	EP 3475306 A1 JP 2019518763 A US 2019328873 A1 WO 2017222535 A1	01-05-2019 04-07-2019 31-10-2019 28-12-2017
WO 2017143073 A1	24-08-2017	AU 2017219749 A1 CA 3021150 A1 CN 109071675 A EP 3337829 A1 JP 2019511469 A KR 20180110090 A US 2019031781 A1 WO 2017143073 A1	23-08-2018 24-08-2017 21-12-2018 27-06-2018 25-04-2019 08-10-2018 31-01-2019 24-08-2017
WO 2017065837 A1	20-04-2017	AU 2016336959 A1 BR 112018007422 A2 CA 3000815 A1 CN 108431044 A EP 3362483 A1 JP 2018535953 A KR 20180056689 A WO 2017065837 A1	12-04-2018 30-10-2018 20-04-2017 21-08-2018 22-08-2018 06-12-2018 29-05-2018 20-04-2017
WO 2018191718 A1	18-10-2018	AU 2018251183 A1 CA 3059803 A1 US 2018298087 A1 WO 2018191718 A1	31-10-2019 18-10-2018 18-10-2018 18-10-2018
WO 2018204679 A1	08-11-2018	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	27/12 (2006.01)	A 6 1 P	27/12
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	19/10 (2006.01)	A 6 1 P	19/10
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 P	27/16 (2006.01)	A 6 1 P	27/16
A 6 1 P	27/10 (2006.01)	A 6 1 P	27/10
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13

(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, 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. U N I X
2. プルロニック
3. T R I T O N

(74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100221958
弁理士 篠田 真希恵

(74)代理人 100192441
弁理士 渡辺 仁

(72)発明者 グルバー ルイス エス.

アメリカ国 6 0 6 0 1 イリノイ シカゴ イーストランドルフ 4 0 0 # 3 9 1 1

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA13 AA14 CC22 CC23 EE01 EE03 FF24 GG01 GG02

4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 EA31 FA74