

(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2008-528060

(P2008-528060A)

(43) 公表日 平成20年7月31日 (2008.7.31)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z C C A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/12 (2006.01)	C O 7 K 16/12 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 125 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-500705 (P2008-500705)
 (86) (22) 出願日 平成18年1月26日 (2006.1.26)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年9月21日 (2007.9.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/003070
 (87) 国際公開番号 W02007/094754
 (87) 国際公開日 平成19年8月23日 (2007.8.23)
 (31) 優先権主張番号 60/648, 256
 (32) 優先日 平成17年1月27日 (2005.1.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592130699
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 The Regents of The
 University of Calif
 ornia
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
 07, オークランド, フランクリン スト
 リート 1111, 12 ティーエイチ フ
 ロア
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ボツリヌス神経毒素を中和する治療的モノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明は、ボツリヌス神経毒素 A 型 (B o N T / A) に特異的に結合し、そしてそれを中和する抗体およびそれらの抗体によって結合されるエピトープを提供する。上記抗体および尾の誘導体ならびに／または本明細書中に提供される中和エピトープに特異的に結合する他の抗体は、ボツリヌス神経毒素を中和するために使用され得、したがってまたボツリヌス中毒の処置に有用である。本発明において、ボツリヌス神経毒素 (B o N T) 血清型の特にな有効な中和は、特定の神経毒素血清型の 2 種以上のサブタイプを、高親和性で結合する中和抗体の使用によって達成され得ることが見出された。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物においてボツリヌス神経毒素を中和する方法であって、該方法は、該哺乳動物に、B o N T 血清型に対する少なくとも 2 種の異なる中和抗-抗体を投与する工程を包含し、該 2 種の抗体のうちの少なくとも 1 種は、該 B o N T 血清型のうちの少なくとも 2 種の異なるサブタイプを、約 1 0 n M より大きい親和性で結合する、方法。

【請求項 2】

前記 B o N T 血清型は、B o N T / A、B o N T / B、B o N T / C、B o N T / D、B o N T / E、および B o N T / F からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 B o N T 血清型は、B o N T / A または B o N T / B である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 B o N T 血清型は、B o N T / A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体のうちの少なくとも 1 種は、B o N T / A 1、B o N T / A 2、および B o N T / A 3 からなる群より選択される少なくとも 2 種の異なるサブタイプを、それぞれ、約 1 0 n M より大きい親和性で結合する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体のうちの少なくとも 1 種は、B o N T / A 1 および B o N T / A 2 を、それぞれ、約 1 0 n M より大きい親和性で結合する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗体は、1 m g の抗体あたり少なくとも 1 0, 0 0 0 マウス L D 5 0 を中和する、請求項 1、2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 8】

両方の抗体は、前記サブタイプのうちの少なくとも 1 種を同時に結合する、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体は、1 m g の抗体あたり少なくとも 1 0, 0 0 0 マウス L D 5 0 を中和する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体は、それぞれ、R A Z 1 V L C D R 1、R A Z 1 V L C D R 2、R A Z 1 V L C D R 3、R A Z 1 V H C D R 1、R A Z 1 V H C D R 2、R A Z 1 V H C D R 3、1 D 1 1 V L C D R 1、1 D 1 1 V L C D R 2、1 D 1 1 V L C D R 3、1 D 1 1 V H C D R 1、1 D 1 1 V H C D R 2、1 D 1 1 V H C D R 3、2 G 1 1 V L C D R 1、2 G 1 1 V L C D R 2、2 G 1 1 V L C D R 3、2 G 1 1 V H C D R 1、2 G 1 1 V H C D R 2、2 G 1 1 V H C D R 3、5 G 4 V L C D R 1、5 G 4 V L C D R 2、5 G 4 V L C D R 3、5 G 4 V H C D R 1、5 G 4 V H C D R 2、5 G 4 V H C D R 3、3 D 1 2 V L C D R 1、3 D 1 2 V L C D R 2、3 D 1 2 V L C D R 3、3 D 1 2 V H C D R 1、3 D 1 2 V H C D R 2、3 D 1 2 V H C D R 3、C R 1 V L C D R 1、C R 1 V L C D R 2、C R 1 V L C D R 3、C R 1 V H C D R 1、C R 1 V H C D R 2、C R 1 V H C D R 3、C R 2 V L C D R 1、C R 2 V L C D R 2、C R 2 V L C D R 3、C R 2 V H C D R 1、C R 2 V H C D R 2、C R 2 V H C D R 3、I N G 1 V L C D R 1、I N G 1 V L C D R 2、I N G 1 V L C D R 3、I N G 1 V H C D R 1、I N G 1 V H C D R 2、I N G 1 V H C D R 3、I N G 2 V L C D R 1、I N G 2 V L C D R 2、I N G 2 V L C D R 3、I N G 2 V H C D R 1、I N G 2 V H C D R 2、および I N G 2 V H C D R 3 からなる群より選択される少なくとも 1 種の C D R を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記抗体は、それぞれ、RAZ1 VL CDR1、RAZ1 VL CDR2、RAZ1 VL CDR3、RAZ1 VH CDR1、RAZ1 VH CDR2、RAZ1 VH CDR3、1D11 VL CDR1、1D11 VL CDR2、1D11 VL CDR3、1D11 VH CDR1、1D11 VH CDR2、1D11 VH CDR3、2G11 VL CDR1、2G11 VL CDR2、2G11 VL CDR3、2G11 VH CDR1、2G11 VH CDR2、2G11 VH CDR3、5G4 VL CDR1、5G4 VL CDR2、5G4 VL CDR3、5G4 VH CDR1、5G4 VH CDR2、5G4 VH CDR3、3D12 VL CDR1、3D12 VL CDR2、3D12 VL CDR3、3D12 VH CDR1、3D12 VH CDR2、3D12 VH CDR3、CR1 VL CDR1、CR1 VL CDR2、CR1 VL CDR3、CR1 VH CDR1、CR1 VH CDR2、CR1 VH CDR3、CR2 VL CDR1、CR2 VL CDR2、CR2 VL CDR3、CR2 VH CDR1、CR2 VH CDR2、CR2 VH CDR3、ING1 VL CDR1、ING1 VL CDR2、ING1 VL CDR3、ING1 VH CDR1、ING1 VH CDR2、ING1 VH CDR3、ING2 VL CDR1、ING2 VL CDR2、ING2 VL CDR3、ING2 VH CDR1、ING2 VH CDR2、およびING2 VH CDR3からなる群より選択される少なくとも3種のCDRを含む、請求項1に記載の方法。

10

20

【請求項 1 2】

前記抗体は、それぞれ、VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含み、該VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3は全て、RAZ1 VHドメイン、CR1 VHドメイン、CR2 VHドメイン、ING1 VHドメイン、ING2 VHドメイン、1D11 VHドメイン、2G11 VHドメイン、3D12 VHドメイン、および5G4 VHドメインからなる群より選択されるVHドメインより選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記抗体は、それぞれ、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含み、該VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3は全て、RAZ1 VLドメイン、CR1 VLドメイン、CR2 VLドメイン、ING1 VLドメイン、ING2 VLドメイン、1D11 VLドメイン、2G11 VLドメイン、3D12 VLドメイン、および5G4 VLドメインからなる群より選択されるVLドメインより選択される、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 1 4】

前記抗体は、それぞれ、

VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3、ならびに

VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含み、

該VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3は全て、RAZ1 VHドメイン、CR1 VHドメイン、CR2 VHドメイン、ING1 VHドメイン、ING2 VHドメイン、1D11 VHドメイン、2G11 VHドメイン、3D12 VHドメイン、および5G4 VHドメインからなる群より選択されるVHドメインより選択され、

40

該VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3は全て、RAZ1 VLドメイン、CR1 VLドメイン、CR2 VLドメイン、ING1 VLドメイン、ING2 VLドメイン、1D11 VLドメイン、2G11 VLドメイン、3D12 VLドメイン、および5G4 VLドメインからなる群より選択されるVLドメインより選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、RAZ1、CR1、CR2、ING1、ING2

50

、1 D 1 1、2 G 1 1、3 D 1 2、および5 G 4からなる群より選択される抗体より選択されるVH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2、およびVL CDR 3を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、単鎖Fv (s c F v)である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、Ig Gである、請求項15に記載の方法。

【請求項18】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、Fabである、請求項15に記載の方法。

10

【請求項19】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、(Fab')₂である、請求項15に記載の方法。

【請求項20】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、(s c F v')₂である、請求項15に記載の方法。

【請求項21】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、RAZ 1、CR 1、CR 2、ING 1、ING 2、1 D 1 1、2 G 1 1、3 D 1 2、および5 G 4からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項22】

前記抗体のうちの少なくとも2種は、RAZ 1、CR 1、CR 2、ING 1、ING 2、1 D 1 1、2 G 1 1、3 D 1 2、および5 G 4からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

ボツリヌス神経毒素 (BoNT) を中和するための組成物であって、該組成物は、BoNT血清型に対する少なくとも2種の異なる中和抗体を含み、該2種の抗体のうちの少なくとも1種は、該BoNT血清型の少なくとも2種の異なるサブタイプを、約10 nMより大きい親和性で結合する、組成物。

30

【請求項24】

前記BoNT血清型は、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/C、BoNT/D、BoNT/E、およびBoNT/Fからなる群より選択される、請求項23に記載の組成物。

【請求項25】

前記BoNT血清型は、BoNT/AまたはBoNT/Bである、請求項23に記載の組成物。

【請求項26】

前記BoNT血清型は、BoNT/Aである、請求項23に記載の組成物。

【請求項27】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、BoNT/A 1、BoNT/A 2、およびBoNT/A 3からなる群より選択される少なくとも2種の異なるサブタイプを、それぞれ、約10 nMより大きい親和性で結合する、請求項23に記載の組成物。

40

【請求項28】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、BoNT/A 1およびBoNT/A 2を、それぞれ、約10 nMより大きい親和性で結合する、請求項23に記載の組成物。

【請求項29】

両方の抗体は、前記サブタイプのうちの少なくとも1種を同時に結合する、請求項23または26に記載の組成物。

【請求項30】

前記抗体は、それぞれ、RAZ 1 VL CDR 1、RAZ 1 VL CDR 2、RA

50

Z1 VL CDR3、RAZ1 VH CDR1、RAZ1 VH CDR2、RAZ1 VH CDR3、1D11 VL CDR1、1D11 VL CDR2、1D11 VL CDR3、1D11 VH CDR1、1D11 VH CDR2、1D11 VH CDR3、2G11 VL CDR1、2G11 VL CDR2、2G11 VL CDR3、2G11 VH CDR1、2G11 VH CDR2、2G11 VH CDR3、5G4 VL CDR1、5G4 VL CDR2、5G4 VL CDR3、5G4 VH CDR1、5G4 VH CDR2、5G4 VH CDR3、3D12 VL CDR1、3D12 VL CDR2、3D12 VL CDR3、3D12 VH CDR1、3D12 VH CDR2、3D12 VH CDR3、CR1 VL CDR1、CR1 VL CDR2、CR1 VL CDR3、CR1 VH CDR1、CR1 VH CDR2、CR1 VH CDR3、CR2 VL CDR1、CR2 VL CDR2、CR2 VL CDR3、CR2 VH CDR1、CR2 VH CDR2、CR2 VH CDR3、ING1 VL CDR1、ING1 VL CDR2、ING1 VL CDR3、ING1 VH CDR1、ING1 VH CDR2、ING1 VH CDR3、ING2 VL CDR1、ING2 VL CDR2、ING2 VL CDR3、ING2 VH CDR1、ING2 VH CDR2、およびING2 VH CDR3からなる群より選択される少なくとも1種のCDRを含む、請求項23に記載の組成物。

10

【請求項31】

前記抗体は、それぞれ、RAZ1 VL CDR1、RAZ1 VL CDR2、RAZ1 VL CDR3、RAZ1 VH CDR1、RAZ1 VH CDR2、RAZ1 VH CDR3、1D11 VL CDR1、1D11 VL CDR2、1D11 VL CDR3、1D11 VH CDR1、1D11 VH CDR2、1D11 VH CDR3、2G11 VL CDR1、2G11 VL CDR2、2G11 VL CDR3、2G11 VH CDR1、2G11 VH CDR2、2G11 VH CDR3、5G4 VL CDR1、5G4 VL CDR2、5G4 VL CDR3、5G4 VH CDR1、5G4 VH CDR2、5G4 VH CDR3、3D12 VL CDR1、3D12 VL CDR2、3D12 VL CDR3、3D12 VH CDR1、3D12 VH CDR2、3D12 VH CDR3、CR1 VL CDR1、CR1 VL CDR2、CR1 VL CDR3、CR1 VH CDR1、CR1 VH CDR2、CR1 VH CDR3、CR2 VL CDR1、CR2 VL CDR2、CR2 VL CDR3、CR2 VH CDR1、CR2 VH CDR2、CR2 VH CDR3、ING1 VL CDR1、ING1 VL CDR2、ING1 VL CDR3、ING1 VH CDR1、ING1 VH CDR2、ING1 VH CDR3、ING2 VL CDR1、ING2 VL CDR2、ING2 VL CDR3、ING2 VH CDR1、ING2 VH CDR2、およびING2 VH CDR3からなる群より選択される少なくとも3種のCDRを含む、請求項23に記載の組成物。

20

30

【請求項32】

前記抗体は、それぞれ、VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含み、該VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3は全て、RAZ1 VHドメイン、CR1 VHドメイン、CR2 VHドメイン、ING1 VHドメイン、ING2 VHドメイン、1D11 VHドメイン、2G11 VHドメイン、3D12 VHドメイン、および5G4 VHドメインからなる群より選択されるVHドメインより選択される、請求項23に記載の組成物。

40

【請求項33】

前記抗体は、それぞれ、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含み、該VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3は全て、RAZ1 VLドメイン、CR1 VLドメイン、CR2 VLドメイン、ING1 VLドメイン、ING2 VLドメイン、1D11 VLドメイン、2G11 VLドメイン、3D12

50

V Lドメイン、および5 G 4 V Lドメインからなる群より選択されるV Lドメインより選択される、請求項23に記載の組成物。

【請求項34】

前記抗体は、それぞれ、

R A Z 1 V Hドメイン、C R 1 V Hドメイン、C R 2 V Hドメイン、I N G 1 V Hドメイン、I N G 2 V Hドメイン、1 D 1 1 V Hドメイン、2 G 1 1 V Hドメイン、3 D 1 2 V Hドメイン、および5 G 4 V Hドメイン；ならびに

V L C D R 1、V L C D R 2、およびV L C D R 3を含み、

該V L C D R 1、V L C D R 2、およびV L C D R 3は全て、R A Z 1 V Lドメイン、C R 1 V Lドメイン、C R 2 V Lドメイン、I N G 1 V Lドメイン、I N G 2 V Lドメイン、1 D 1 1 V Lドメイン、2 G 1 1 V Lドメイン、3 D 1 2 V Lドメイン、および5 G 4 V Lドメインからなる群より選択されるV Lドメインより選択される、請求項23に記載の組成物。

10

【請求項35】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、R A Z 1、C R 1、C R 2、I N G 1、I N G 2、1 D 1 1、2 G 1 1、3 D 1 2、および5 G 4からなる群より選択される抗体より選択されるV H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、およびV L C D R 3を含む、請求項23に記載の組成物。

【請求項36】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、単鎖F v (s c F v)である、請求項35に記載の組成物。

20

【請求項37】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、I g Gである、請求項35に記載の組成物。

【請求項38】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、F a bである、請求項35に記載の組成物。

【請求項39】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、(F a b')₂である、請求項35に記載の組成物。

【請求項40】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、(s c F v')₂である、請求項35に記載の組成物。

30

【請求項41】

前記抗体のうちの少なくとも1種は、R A Z 1、C R 1、C R 2、I N G 1、I N G 2、1 D 1 1、2 G 1 1、3 D 1 2、および5 G 4からなる群より選択される、請求項23に記載の組成物。

【請求項42】

前記抗体のうちの少なくとも2種は、R A Z 1、C R 1、C R 2、I N G 1、I N G 2、1 D 1 1、2 G 1 1、3 D 1 2、および5 G 4からなる群より選択される、請求項23に記載の組成物。

【請求項43】

前記抗体は、薬学的に受容可能な賦形剤中にある、請求項23に記載の組成物。

40

【請求項44】

前記組成物は、単位投薬処方物である、請求項43に記載の組成物。

【請求項45】

ボツリヌス神経毒素(B o n t A)を中和する抗体であって、該抗体は、少なくとも2種の異なるB o n t Aサブタイプを、各サブタイプに対して約10 n Mより大きい親和性で結合する、抗体。

【請求項46】

前記抗体は、前記B o n t A 1サブタイプおよび前記B o n t A 2サブタイプの両方を、それぞれ、約10 n Mより大きい親和性で結合する、請求項45に記載の抗体。

50

【請求項 47】

前記抗体は、RAZ1 VL CDR1、RAZ1 VL CDR2、RAZ1 VL CDR3、RAZ1 VH CDR1、RAZ1 VH CDR2、RAZ1 VH CDR3、1D11 VL CDR1、1D11 VL CDR2、1D11 VL CDR3、1D11 VH CDR1、1D11 VH CDR2、1D11 VH CDR3、2G11 VL CDR1、2G11 VL CDR2、2G11 VL CDR3、2G11 VH CDR1、2G11 VH CDR2、2G11 VH CDR3、5G4 VL CDR1、5G4 VL CDR2、5G4 VL CDR3、5G4 VH CDR1、5G4 VH CDR2、5G4 VH CDR3、3D12 VL CDR1、3D12 VL CDR2、3D12 VL CDR3、3D12 VH CDR1、3D12 VH CDR2、3D12 VH CDR3、CR1 VL CDR1、CR1 VL CDR2、CR1 VL CDR3、CR1 VH CDR1、CR1 VH CDR2、CR1 VH CDR3、CR2 VL CDR1、CR2 VL CDR2、CR2 VL CDR3、CR2 VH CDR1、CR2 VH CDR2、CR2 VH CDR3、ING1 VL CDR1、ING1 VL CDR2、ING1 VL CDR3、ING1 VH CDR1、ING1 VH CDR2、ING1 VH CDR3、ING2 VL CDR1、ING2 VL CDR2、ING2 VL CDR3、ING2 VH CDR1、ING2 VH CDR2、およびING2 VH CDR3からなる群より選択される少なくとも1種のCDRを含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項 48】

前記抗体は、RAZ1 VL CDR1、RAZ1 VL CDR2、RAZ1 VL CDR3、RAZ1 VH CDR1、RAZ1 VH CDR2、RAZ1 VH CDR3、1D11 VL CDR1、1D11 VL CDR2、1D11 VL CDR3、1D11 VH CDR1、1D11 VH CDR2、1D11 VH CDR3、2G11 VL CDR1、2G11 VL CDR2、2G11 VL CDR3、2G11 VH CDR1、2G11 VH CDR2、2G11 VH CDR3、5G4 VL CDR1、5G4 VL CDR2、5G4 VL CDR3、5G4 VH CDR1、5G4 VH CDR2、5G4 VH CDR3、3D12 VL CDR1、3D12 VL CDR2、3D12 VL CDR3、3D12 VH CDR1、3D12 VH CDR2、3D12 VH CDR3、CR1 VL CDR1、CR1 VL CDR2、CR1 VL CDR3、CR1 VH CDR1、CR1 VH CDR2、CR1 VH CDR3、CR2 VL CDR1、CR2 VL CDR2、CR2 VL CDR3、CR2 VH CDR1、CR2 VH CDR2、CR2 VH CDR3、ING1 VL CDR1、ING1 VL CDR2、ING1 VL CDR3、ING1 VH CDR1、ING1 VH CDR2、ING1 VH CDR3、ING2 VL CDR1、ING2 VL CDR2、ING2 VL CDR3、ING2 VH CDR1、ING2 VH CDR2、およびING2 VH CDR3からなる群より選択される少なくとも3種のCDRを含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項 49】

前記抗体は、VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含み、該VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3は全て、RAZ1 VHドメイン、CR1 VHドメイン、CR2 VHドメイン、ING1 VHドメイン、ING2 VHドメイン、1D11 VHドメイン、2G11 VHドメイン、3D12 VHドメイン、および5G4 VHドメインからなる群より選択されるVHドメインより選択される、請求項45に記載の抗体。

【請求項 50】

前記抗体は、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含み、該VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3は全て、RAZ1 VLドメイン、

CR1 VLドメイン、ING1 VLドメイン、ING2 VLドメイン、1D11 VLドメイン、2G11 VLドメイン、3D12 VLドメイン、および5G4 VLドメインからなる群より選択されるVLドメインより選択される、請求項45に記載の抗体。

【請求項51】

前記抗体は、

RAZ1 VHドメイン、CR1 VHドメイン、CR2 VHドメイン、ING1 VHドメイン、ING2 VHドメイン、1D11 VHドメイン、2G11 VHドメイン、3D12 VHドメイン、および5G4 VHドメイン；ならびに

VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含み、

該VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3は全て、RAZ1 VLドメイン、CR1 VLドメイン、CR2 VLドメイン、ING1 VLドメイン、ING2 VLドメイン、1D11 VLドメイン、2G11 VLドメイン、3D12 VLドメイン、および5G4 VLドメインからなる群より選択されるVLドメインより選択される、請求項45に記載の抗体。

【請求項52】

前記抗体は、RAZ1、CR1、CR2、ING1、ING2、1D11、2G11、3D12、および5G4からなる群より選択される抗体より選択されるVH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項53】

前記抗体は、RAZ1 VHおよびRAZ1 VLを含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項54】

前記抗体は、CR1 VHおよびCR1 VLを含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項55】

前記抗体は、CR2 VHおよびCR2 VLを含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項56】

前記抗体は、ING1 VHおよびING1 VLを含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項57】

前記抗体は、ING2 VHおよびING2 VLを含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項58】

前記抗体は、1D11 VHおよび1D11 VLを含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項59】

前記抗体は、2G11 VHおよび2G11 VLを含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項60】

前記抗体は、5G4 VHおよび5G4 VLを含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項61】

前記抗体は、3D12 VHおよび3D12 VLを含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項62】

前記抗体は、単鎖Fv (scFv) である、請求項45に記載の抗体。

【請求項63】

前記抗体は、IgGである、請求項45に記載の抗体。

【請求項64】

前記抗体は、Fabである、請求項52に記載の抗体。

【請求項65】

前記抗体は、(Fab')₂ である、請求項45に記載の抗体。

【請求項66】

前記抗体は、(scFv')₂ である、請求項45に記載の抗体。

【請求項67】

前記抗体は、RAZ1、CR1、CR2、ING1、ING2、3D12、1D11、

10

20

30

40

50

2 G 1 1、および 5 G 4 からなる群より選択される、請求項 4 5 に記載の抗体。

【請求項 6 8】

ボツリヌス神経毒素 (B o n t A) を結合する抗体であって、該抗体は、AR 2 VL CDR 1、AR 2 VL CDR 2、AR 2 VL CDR 3、AR 2 VH CDR 1、AR 2 VH CDR 2、AR 2 VH CDR 3、AR 3 VL CDR 1、AR 3 VL CDR 2、AR 3 VL CDR 3、AR 3 VH CDR 1、AR 3 VH CDR 2、AR 3 VH CDR 3、AR 4 VL CDR 1、AR 4 VL CDR 2、AR 4 VL CDR 3、AR 4 VH CDR 1、AR 4 VH CDR 2、および AR 4 VH CDR 3 からなる群より選択される少なくとも 1 種の CDR を含む、抗体。

10

【請求項 6 9】

前記抗体は、AR 2 VL CDR 1、AR 2 VL CDR 2、AR 2 VL CDR 3、AR 2 VH CDR 1、AR 2 VH CDR 2、AR 2 VH CDR 3、AR 3 VL CDR 1、AR 3 VL CDR 2、AR 3 VL CDR 3、AR 3 VH CDR 1、AR 3 VH CDR 2、AR 3 VH CDR 3、AR 4 VL CDR 1、AR 4 VL CDR 2、AR 4 VL CDR 3、AR 4 VH CDR 1、AR 4 VH CDR 2、および AR 4 VH CDR 3 からなる群より選択される少なくとも 3 種の CDR を含む、請求項 6 8 に記載の抗体。

【請求項 7 0】

前記抗体は、VH CDR 1、VH CDR 2、および VH CDR 3 を含み、該 VH CDR 1、VH CDR 2、および VH CDR 3 は全て、AR 2 VH ドメイン、AR 3 VH ドメイン、および AR 4 VH ドメインからなる群より選択される VH ドメインより選択される、請求項 6 8 に記載の抗体。

20

【請求項 7 1】

前記抗体は、VL CDR 1、VL CDR 2、および VL CDR 3 を含み、該 VL CDR 1、VL CDR 2、および VL CDR 3 は全て、AR 2 VL ドメイン、AR 3 VL ドメイン、および AR 4 VL ドメインからなる群より選択される VL ドメインより選択される、請求項 6 8 に記載の抗体。

【請求項 7 2】

前記抗体は、
VH CDR 1、VH CDR 2、および VH CDR 3、ならびに
VL CDR 1、VL CDR 2、および VL CDR 3 を含み、
該 VH CDR 1、VH CDR 2、および VH CDR 3 は全て、AR 2 VH ドメイン、AR 3 VH ドメイン、および AR 4 VH ドメインからなる群より選択される VH ドメインより選択され、

30

該 VL CDR 1、VL CDR 2、および VL CDR 3 は全て、AR 2 VL ドメイン、AR 3 VL ドメイン、および AR 4 VL からなる群より選択される VL ドメインより選択される、請求項 6 8 に記載の抗体。

【請求項 7 3】

前記抗体は、AR 2、AR 3 および AR 4 からなる群より選択される抗体より選択される VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2、および VL CDR 3 を含む、請求項 6 8 に記載の抗体。

40

【請求項 7 4】

前記抗体は、単鎖 F v (s c F v) である、請求項 6 8 に記載の抗体。

【請求項 7 5】

前記抗体は、I g G である、請求項 6 8 に記載の抗体。

【請求項 7 6】

前記抗体は、F a b である、請求項 6 8 に記載の抗体。

【請求項 7 7】

前記抗体は、(F a b ')₂ である、請求項 6 8 に記載の抗体。

50

【請求項 78】

前記抗体は、 $(scFv')_2$ である、請求項 68 に記載の抗体。

【請求項 79】

前記抗体は、AR2、AR3 および AR4 からなる群より選択される、請求項 68 に記載の抗体。

【請求項 80】

請求項 45～79 のいずれかに記載の抗体をコードする核酸。

【請求項 81】

請求項 45～79 のいずれかに記載の抗体をコードする核酸を含む細胞。

【請求項 82】

ボツリヌス神経毒素を中和するためのキットであって、該キットは、
請求項 23～44 のいずれかに記載の組成物；および
ボツリヌス神経毒素を中和するための該組成物の使用を教示する指示資料；
を備える、キット。

【請求項 83】

前記組成物は、使い捨て可能な注射器中に保存される、請求項 82 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の参照)

本願は、米国特許出願第 60/648,256 号 (2005 年 1 月 27 日出願) (これは、全ての目的のためにその全体が本明細書中に参考として援用される) に基づく優先権およびその利益を主張する。

【0002】

(政府支援の研究および開発の下でなされた発明に対する権利についての記述)

本発明は、National Institutes of Health によって授与された助成金番号：AI53389 および AI56493、ならびに Department of Defense Grants DAMD17-03-C-0076 および DAMD17-98-C-8030 による政府支援によってなされた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0003】

(発明の分野)

本発明は、ボツリヌス神経毒素 (例えば、BoNT/A) を中和する抗体、およびボツリヌス中毒の処置におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0004】

(発明の背景)

ボツリヌス中毒は、クロストリジウム属のメンバーによって分泌されるボツリヌス神経毒素によって引き起こされ、そしてボツリヌス中毒は、弛緩性麻痺によって特徴付けられ、直ちに致命的でない場合、ボツリヌス中毒は、集中治療室および機械換気における長期の入院を必要とする。天然に存在するボツリヌス中毒は、胃腸管がクロストリジウム属の細菌によってコロニー形成される乳児または成人 (乳児ボツリヌス中毒または腸管ボツリヌス中毒)、汚染された食品の摂取後 (食物ボツリヌス中毒)、あるいは嫌気性の創傷感染 (創傷ボツリヌス中毒) に見出される (非特許文献 1: 「www.bt.cdc.gov/agent/Botulism/index.asp」にてダウンロード可能)。ボツリヌス神経毒素 (BoNT) はまた、それらの極度の効力および死亡率、生産および輸送の容易性、ならびに長期の集中治療の必要性 (非特許文献 2) に起因して、Centers for Disease Control (CDC) によって、生物テロリズムに関して最も高い危険性を有する 6 種の脅威因子 (threat agent) (「Category A agent」) のうちの 1 種として分類される。イラクおよびかつての

10

20

30

40

50

ソビエト連邦の両方は、兵器として使用するためにB o N Tを生産し（非特許文献3；非特許文献4）、そして日本のカルトであるオウム真理教は、生物テロリズムにB o N Tを使用することを試みた（Arnonら（2001）前出）。これらの脅威の結果として、特定の薬学的因子は、中毒の予防および処置に必要とされる。

【0005】

ボツリヌス中毒の予防または処置のための特定の低分子薬物は、存在しないが、研究的な五価トキソイドワクチンは、CDCから利用可能であり（非特許文献5）、そして組換えワクチンが、開発中である（非特許文献6）。それにもかかわらず、多くの民間人または軍人のワクチン接種は、疾患または曝露の希少性、およびワクチン接種がB o N Tのその後の医学的使用を妨げるという事実に起因して行われない。曝露後のワクチン接種は、疾患の迅速な発症に起因して役に立たない。毒素中和抗体（Ab）は、曝露前または曝露後の予防のためか、あるいは処置のために使用され得る（非特許文献7）。少量のウマ抗毒素およびヒトボツリヌス免疫グロブリンの両方が、存在し、そして現在、それらは、それぞれ、成人ボツリヌス中毒（非特許文献8；非特許文献9）および乳児ボツリヌス中毒（非特許文献10）を処置するために使用される。

【0006】

組換えモノクローナル抗体（mAb）は、感染症の危険性を含まず、かつ血漿瀉血にヒトドナーを必要としない抗毒素の無制限の供給を提供し得る。B o N Tの極度の死亡率を鑑みて、mAbは、妥当なコストにおける適切な数の用量を提供するために、高い効力でなければならない。このようなmAbの開発は、National Institute of Allergy and Infectious Diseasesの最優先の研究目標となった。現在までに、単一の非常に強力なmAbは記載されていないが、本発明者らは、最近、2種～3種のmAbを組み合わせて非常に強力B o N T中和をもたらし得ることを報告した（非特許文献11）。

【0007】

ボツリヌス中毒に対するmAb治療の開発は、あっても抗体交差反応性をほとんど示さない少なくとも7種のB o N T血清型（A～G）が存在するという事実によって企図される（非特許文献12）。B o N T血清型のうちの4種だけが、決まってヒト疾患を引き起こし（A、B、E、およびF）、一方で、B o N T Cによって引き起こされる乳児ボツリヌス中毒の1つの報告された事例（非特許文献13）、B o N T Dに関連する食物媒介性ボツリヌス中毒の1つの流行（非特許文献14）、およびB o N T Gが単離された異常死の数種の事例（非特許文献15）が存在している。エアロゾル化したB o N T／C、D、およびGはまた、霊長類において吸入経路によってボツリヌス中毒をもたらすことが示されている（非特許文献16）、そしてそれらは、ヒトに最も影響しやすい。したがって、7種のB o N T血清型のうちのいずれか1種が、生命を脅かす因子として使用され得る可能性がある。

【0008】

血清型内のB o N T遺伝子配列およびB o N Tタンパク質配列の相違もまた、報告されており、そしてこのような相違がB o N T／Aに対するモノクローナル抗体の結合に影響し得るという証拠が存在する（非特許文献17；非特許文献18）。現在、異なる血清型内のこのような毒素変異性の程度も、モノクローナル抗体パネルの結合能および中和能に対するその影響も、明確ではない。

【非特許文献1】Center for Disease Control、(1998)、Botulism in the United States, 1899-1998, Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers, Atlanta, Georgia U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service

【非特許文献2】Arnonら、JAMA、2001年、第285巻、p. 1059-1070

10

20

30

40

50

- 【非特許文献3】United Nations Security Council、(1995)、Tenth report of the executive committee of the special commission established by the secretary-general pursuant to paragraph 9 (b) (I) of security council resolution 687 (1991)、and paragraph 3 of resolution 699 (1991) on the activities of the Special Commission
- 【非特許文献4】Bozheyeval、(1999)、Former soviet biological weapons facilities in Kazakhs 10
tan: past、present、and future. Center for Nonproliferation Studies、Monterey Institute of International Studies
- 【非特許文献5】Siegel、J. Clin. Microbiol.、1988年、第26巻、p. 2351-2356
- 【非特許文献6】Smith、Toxicon、1998年、第36巻、p. 1539-1548
- 【非特許文献7】Franzら、Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Neurotransmission and Biomedical Aspects、B. R. DasGupta (編)、Plenum Press、New York、1993年、p. 473-476、 20
- 【非特許文献8】BlackおよびGunn、Am. J. Med.、1980年、第69巻、p. 567-570
- 【非特許文献9】Hibbsら、Clin. Infect. Dis.、1996年、第23巻、p. 337-340
- 【非特許文献10】Arnon、Clinical trial of human botulism immune globulin.、B. R. DasGupta (編)、Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Neurotransmission and Biomedical Aspects、Plenum Press、New York、1993年、p. 477-482. 30
- 【非特許文献11】Nowakowskiら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A、2002年、第99巻、p. 11346-50
- 【非特許文献12】Hatheway、Curr. Top. Microbio. Immunol、1995年、第195巻、p. 55-75
- 【非特許文献13】Ogumaら、Lancet、1990年、第336巻、p. 1449-1450
- 【非特許文献14】Demarchiら、Bull. Acad. Nat. Med.、1958年、第142巻、p. 580-582
- 【非特許文献15】Sonnabendら、J. Infect. Dis.、1981年、第143巻、p. 22-27 40
- 【非特許文献16】MiddlebrookおよびFranz、Botulinum Toxins、第33章、Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. TMM publications、Washington、D. C.、1997年、F. R. Sidell、E. T. Takafuji、D. R. Franz (編)
- 【非特許文献17】Kozakiら、Infect. Immun.、1998年、第66巻、p. 4811-4816
- 【非特許文献18】Kozakiら、Microbiol. Immunol.、1995年、第39巻、p. 767-774
- 【発明の開示】 50

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、ボツリヌス神経毒素に結合し、かつボツリヌス神経毒素を中和する抗体に関する。本発明者らは、ボツリヌス神経毒素（BoNT）血清型の特により有効な中和は、特定の神経毒素血清型の2種以上のサブタイプを、高親和性で結合する中和抗体の使用によって達成され得ることを見出した。これは、上記サブタイプの各々に対する2種以上の異なる抗体を使用することによって達成され得るが、特定の実施形態において、各々の抗体が少なくとも2種のBoNTサブタイプと交差反応性である場合、よりさらに効率的な中和が、1種以上の抗体の使用によって達成される。特定の実施形態において、本発明は、2

10

【0010】

したがって、1つの実施形態において、本発明は、哺乳動物（例えば、ヒト）においてボツリヌス神経毒素を中和する方法を提供する。この方法は、代表的に、上記哺乳動物にBoNT血清型に対する少なくとも2種の異なる中和抗体を投与する工程を包含し、上記2種の抗体のうちの少なくとも1種は、上記BoNT血清型（例えば、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/C、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/Fなど）のうちの少なくとも2種の異なるサブタイプを、約10nMより大きい親和性で結合する。特定の実施形態において、上記抗体のうちの少なくとも1種は、BoNT/A1、BoNT/A2、BoNT/A3、およびBoNT/A4からなる群より選択される少なくとも2種の異なるサブタイプを、それぞれ、約10nMより大きい親和性で結合する。特定の実施形態において、上記抗体のうちの少なくとも1種は、BoNT/A1およびBoNT/A2を、それぞれ、約10nMより大きい親和性で結合する。特定の実施形態において、両方の抗体は、上記サブタイプのうちの少なくとも1種、好ましくは上記サブタイプのうちの少なくとも2種を、同時に結合する。特定の実施形態において、上記抗体は、それぞれ、RAZ1 VL CDR1、RAZ1 VL CDR2、RAZ1 VL CDR3、RAZ1 VH CDR1、RAZ1 VH CDR2、RAZ1 VH CDR3、1D11 VL CDR1、1D11 VL CDR2、1D11 VL CDR3、1D11 VH CDR1、1D11 VH CDR2、1D11 VH CDR3、2G11 VL CDR1、2G11 VL CDR2、2G11 VL CDR3、2G11 VH CDR1、2G11 VH CDR2、2G11 VH CDR3、5G4 VL CDR1、5G4 VL CDR2、5G4 VL CDR3、5G4 VH CDR1、5G4 VH CDR2、5G4 VH CDR3、3D12 VL CDR1、3D12 VL CDR2、3D12 VL CDR3、3D12 VH CDR1、3D12 VH CDR2、3D12 VH CDR3、CR1 VL CDR1、CR1 VL CDR2、CR1 VL CDR3、CR1 VH CDR1、CR1 VH CDR2、CR1 VH CDR3、CR2 VL CDR1、CR2 VL CDR2、CR2 VL CDR3、CR2 VH CDR1、CR2 VH CDR2、CR2 VH CDR3、ING1 VL CDR1、ING1 VL CDR2、ING1 VL CDR3、ING1 VH CDR1、ING1 VH CDR2、ING1 VH CDR3、ING2 VL CDR1、ING2 VL CDR2、ING2 VL CDR3、ING2 VH CDR1、ING2 VH CDR2、およびING2 VH CDR3（例えば、図18および図26、表2および/または表13を参照のこと）からなる群より選択される少なくとも1種のCDR、少なくとも2種のCDR、少なくとも3種のCDR、少なくとも4種のCDR、少なくとも5種のCDR、または少なくとも6種のCDRを含む。種々の実施形態において、上記抗体は、それぞれ、VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含み、このVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3は全て、RAZ1 VHドメイン、CR1 VHドメイン、ING1 VHドメイン、ING2 VHドメイン、1D11 VHドメイン、2G11 V

20

30

40

50

Hドメイン、3D12 VHドメイン、および5G4 VHドメインからなる群より選択されるVHドメインより選択される。種々の実施形態において、上記抗体は、それぞれ、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含み、このVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3は全て、RAZ1 VLドメイン、CR1 VLドメイン、CR2 VLドメイン、ING1 VLドメイン、ING2 VLドメイン、1D11 VLドメイン、2G11 VLドメイン、3D12 VLドメイン、および5G4 VLドメインからなる群より選択されるVLドメインより選択される。特定の実施形態において、上記抗体は、それぞれ、VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3、ならびにVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含み、このVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3は全て、RAZ1 VHドメイン、CR1 VHドメイン、CR2 VHドメイン、ING1 VHドメイン、ING2 VHドメイン、1D11 VHドメイン、2G11 VHドメイン、3D12 VHドメイン、および5G4 VHドメインからなる群より選択されるVHドメインより選択され、このVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3は全て、RAZ1 VLドメイン、CR1 VLドメイン、CR2 VLドメイン、ING1 VLドメイン、ING2 VLドメイン、1D11 VLドメイン、2G11 VLドメイン、3D12 VLドメイン、および5G4 VLドメインからなる群より選択されるVLドメインより選択される。特定の実施形態において、上記抗体のうちの少なくとも1種は、RAZ1、CR1、ING1、およびING2からなる群より選択される抗体より選択されるVH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含む。種々の実施形態において、上記抗体のうちの少なくとも1種は、単鎖Fv (scFv)、IgG、IgA、IgM、Fab、(Fab')₂、または(scFv')₂である。特定の実施形態において、上記抗体のうちの少なくとも1種は、RAZ1、CR1、CR2、ING1、ING2、2G11、3D12、および5G4からなる群より選択される。

【0011】

種々の実施形態において、本発明は、C25、1C6、3D12、B4、1F3、Hu C25、AR1、AR2、AR3、AR4、WR1(V)、WR1(T)、3-1、3-8、3-10、ING1、CR1、CR2、RAZ1、および／またはING2からなる群より選択される抗体によって特異的に結合されるエピトープに特異的に結合する単離された抗体を提供する。特定の実施形態において、上記抗体は、1種または好ましくは2種以上のボツリヌス神経毒素サブタイプ（例えば、BoNT/A1、BoNT/A2、BoNT/A3など）に結合し、そしてそれを中和する。上記抗体は、実質的に任意の哺乳動物の動物型（例えば、マウス、ヒト、ヤギ、ウサギ）の抗体またはキメラ（例えば、ヒト化）の抗体であり得るが、この抗体は、最も好ましくは、ヒト抗体またはヒト化抗体である。

【0012】

1つの実施形態において、上記抗体は、表2および／または表6、および／または表9および／または表13、および／または図26に記載される重鎖可変領域(V_H)の相補性決定領域(CDR)あるいはその保存的置換体のうちの少なくとも1種（より好ましくは少なくとも2種、および最も好ましくは少なくとも3種）を含む。別の実施形態において、上記抗体は、表2および／または表6、および／または表9および／または表13、および／または図26に記載される軽鎖可変領域(V_L)の相補性決定領域(CDR)あるいはその保存的置換体のうちの少なくとも1種（より好ましくは少なくとも2種、および最も好ましくは少なくとも3種）を含む。なお別の実施形態において、上記抗体は、表2および／もしくは表6、および／もしくは表9および／もしくは表13、および／もしくは図26に記載される重鎖可変領域(V_H)の相補性決定領域(CDR)またはその保存的置換体のうちの少なくとも1種（より好ましくは少なくとも2種、および最も好ましくは少なくとも3種）、および表2および／もしくは表6、および／もしくは表9および／もしくは表13、および／もしくは図26に記載される軽鎖可変領域(V_L)の相補性

10

20

30

40

50

決定領域（CDR）またはその保存的置換体のうちの少なくとも1種（より好ましくは少なくとも2種、および最も好ましくは少なくとも3種）、ならびに／あるいは表2および／もしくは表6、および／もしくは表9および／もしくは表13、および／もしくは表26に記載されるVLフレームワーク領域またはVHフレームワーク領域のうちの1種、2種もしくは3種を含む。特定の好ましい抗体としては、C25、1C6、3D12、B4、1F3、HuC25、AR1、AR2、AR3、AR4、WR1（V）、WR1（T）、3-1、3-8、3-10、ING1、CR1、RAZ1、ING2、1D11、2G11、3D12、および／または5G4が挙げられるが、これらに限定されない。特定の好ましい抗体としては、IgG、単鎖Fv（scFv）が挙げられる一方で、他の好ましい抗体としては、IgG、IgA、IgM、Fab、（Fab'）₂、（scFv'）₂などが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、上記抗体は、多価であり得る。上記抗体は、2種のscFvフラグメントから構成される融合タンパク質を含み得る。

【0013】

本発明はまた、薬理学的賦形剤中に本明細書中に記載されるボツリヌス神経毒素-中和抗体の1種以上を含む組成物を提供する。

【0014】

本発明はまた、BoNT-中和エピトープを提供する。特定の好ましいエピトープとしては、C25、1C6、3D12、B4、1F3、HuC25、AR1、AR2、AR3、AR4、WR1（V）、WR1（T）、3-1、3-8、3-10、ING1、CR1、CR2、RAZ1、ING2、1D11、2G11、3D12、および／または5G4によって特異的に結合されるBoNT/A_{H_C}エピトープが挙げられる。特定の好ましいポリペプチドは、完全長BoNTではなく、そしてより特に好ましいポリペプチドは、完全長BoNT_{H_C}フラグメントではない。したがって、最も好ましいエピトープは、少なくともアミノ酸4、好ましくは少なくとも6アミノ酸、より好ましくは少なくとも8アミノ酸、そして最も好ましくは少なくとも10アミノ酸、12アミノ酸、14アミノ酸、または15アミノ酸さえもの長さを有する好ましい下位配列を有するBoNT/A_{H_C}の下位配列またはフラグメントである。この関連において、HuC25およびその誘導体（AR1、AR2、AR3、AR4、およびCR1）が、N末端であるHCDドメインを結合する一方で、3D12/RAZ1は、C末端であるHCDドメインを結合することに、留意する。これらのエピトープは、いずれも直鎖ではない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

（定義）

「BoNTポリペプチド」とは、ボツリヌス神経毒素ポリペプチド（例えば、BoNT/Aポリペプチド、BoNT/Bポリペプチド、BoNT/Cポリペプチドなど）をいう。BoNTポリペプチドとは、完全長ポリペプチドまたはそのフラグメントをいい得る。したがって、例えば、用語「BoNT/Aポリペプチド」とは、完全長BoNT/A（A型の血清型のClostridium botulinumによって産生される神経毒素）またはそのフラグメント（例えば、Hcフラグメント）のいずれかをいう。H_Cフラグメントは、BoNT/Aの約50DaのC末端フラグメント（残基873～1296）である（LacyおよびStevens（1999）J. Mol. Biol.、291：1091-1104）である。

【0016】

「BoNT」血清型とは、標準的な公知のBoNT血清型（例えば、BoNT/A、BoNT/C、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/Fなど）のうちの1種をいう。BoNT血清型は、アミノ酸レベルにて約35%程度の低さ（例えば、BoNT/EとBoNT/Fとの間で）から最大でアミノ酸レベルにて約66%（例えば、BoNT/A対BoNT/CまたはBoNT/Dについて）で互いに異なる。したがって、BoNT血清型は、アミノ酸レベルにて約35～66%で互いに異なる。

【0017】

用語「B o N Tサブタイプ」（例えば、B o N T / A 1 Aサブタイプ）とは、示差的な抗体結合をもたらすのに互いに十分に異なる、特定の血清型（例えば、A、C、D、Fなど）のボツリヌス神経毒素遺伝子配列をいう。特定の実施形態において、上記サブタイプは、アミノ酸レベルにて、少なくとも2.5%、好ましくは少なくとも5%、または10%、より好ましくは少なくとも15%または20%で互いに異なる。特定の実施形態において、上記サブタイプは、アミノ酸レベルにて、35%以下、好ましくは31.6%以下、より好ましくは30%以下または25%以下、より好ましくは約20%未満または約16%未満で互いに異なる。特定の実施形態において、B o N Tサブタイプは、アミノ酸レベルにて、少なくとも2.6%、より好ましくは少なくとも3%、そして最も好ましくは少なくとも3.6%で互いに異なる。B o N Tサブタイプは、代表的に、アミノ酸レベルにて、約31.6%未満、より好ましくは約16%未満で互いに異なる。

10

【0018】

「中和」とは、ボツリヌス神経毒素（例えば、B o N T / A）の毒性の測定可能な減少をいう。

【0019】

用語「高親和性」は、抗体に関連して使用される場合、少なくとも約 10^{-8} M、好ましくは少なくとも約 10^{-9} M、より好ましくは少なくとも約 10^{-10} M、そして最も好ましくは少なくとも約 10^{-11} Mの親和性（ K_D ）でその標的に特異的に結合する抗体をいう。特定の実施形態において、「高親和性」抗体は、約1 nM～約5 pMの範囲の K_D を有する。

20

【0020】

以下の略語が、本明細書中で使用される：AMP、アンピシリン；BIG、ボツリヌス免疫グロブリン；B o N T、ボツリヌス神経毒素；B o N T / A、B o N T A型；CDR、相補性決定領域；ELISA、酵素結合イムノソルベントアッセイ；GLU、グルコース；HBS、HEPES緩衝化生理食塩水（10mM HEPES、150mM NaCl [pH7.4]）；H_c、B o N T重鎖のc末端ドメイン（結合ドメイン）；H_N、B o N T重鎖のN末端ドメイン（トランスロケーションドメイン）；IgG、免疫グロブリンG；IMAC、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー；IPTG、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド；KAN、カナマイシン；K_d、平衡定数；k_{off}、解離速度定数；k_{on}、会合速度定数；MPBS、PBS中の脱脂粉乳；NTA、ニトリロ三酢酸；PBS、リン酸緩衝化生理食塩水（25mM NaH₂PO₄、125mM NaCl [pH7.0]）；RU、共鳴単位（resonance unit）；scFv、単鎖Fv抗体フラグメント；TPBS、PBS中の0.05%（容量／容量）Tween 20；TMPBS、MPBS中の0.05%（容量／容量）Tween 20；TU、形質導入単位（transducing unit）；V_H、免疫グロブリン重鎖可変領域；V_K、免疫グロブリンκ軽鎖可変領域；V_L免疫グロブリン軽鎖可変領域；wt、野生型。

30

【0021】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、または「タンパク質」は、隣接する残基のα-アミノ基とカルボキシ基との間のペプチド結合によって互いに連結されたアミノ酸残基の線系列を示すために、本明細書中で交換可能に使用される。アミノ酸残基は、好ましくは、天然において「L」異性体形態である。しかし、「D」異性体形態の残基は、所望の機能特性がそのポリペプチドによって維持される限り、任意のL-アミノ酸残基を置換し得る。さらに、20種の「標準的な」アミノ酸に加えて、アミノ酸は、改変されたアミノ酸および異常（unusual）なアミノ酸を含み、それらのアミノ酸としては、37 CFR（1.822（b）（4））に列挙されるものが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、アミノ酸残基配列の始まりまたは終わりにおけるダッシュが、個以上のアミノ酸残基からなるさらなる配列に対するペプチド結合、またはカルボキシル末端基またはヒドロキシル末端基に対する共有結合のいずれかを示すことに留意すべきである。

40

50

【0022】

本明細書中で使用される場合、「抗体」とは、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによって実質的にコードされる1種以上のポリペプチドからなるタンパク質をいう。認識された免疫グロブリン遺伝子としては、 κ 定常領域遺伝子、 λ 定常領域遺伝子、 α 定常領域遺伝子、 γ 定常領域遺伝子、 δ 定常領域遺伝子、 ϵ 定常領域遺伝子および μ 定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は、 κ または λ のいずれかとして分類される。重鎖は、 γ 、 μ 、 α 、 δ 、または ϵ として分類され、それらは、次に、免疫グロブリンのクラスであるIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEを、それぞれ、規定する。

【0023】

代表的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、テトラマーを構成することが公知である。それぞれのテトラマーは、ポリペプチド鎖の2つの同一の対から構成され、各対は、1個の「軽」鎖（約25kD）および1個の「重」鎖（約50～70kD）を有する。それぞれの鎖のN末端は、主に抗原認識を担う約100～110アミノ酸またはそれ以上のアミノ酸からなる可変領域を規定する。用語「可変軽鎖（ V_L ）」および「可変重鎖（ V_H ）」とは、それぞれ、これらの軽鎖および重鎖をいう。

【0024】

抗体は、インタクトな免疫グロブリン、または種々のペプチダーゼによる分解によってもたらされる十分に特徴付けられた多くのフラグメントとして存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域におけるジスルフィド連結より下流で抗体を分解してF（ ab ）'₂をもたらし、Fabのダイマーそれ自体は、ジスルフィド結合によって $V_H - C_H1$ に結合される軽鎖である。F（ ab ）'₂は、温和な条件下で還元されて、ヒンジ領域におけるジスルフィド連結が破壊され得、それによって、（Fab'）₂ダイマーは、Fab'モノマーへと変換される。そのFab'モノマーは、本質的に、ヒンジ領域の部分をも有するFabである（他の抗体フラグメントのより詳細な説明については、Fundamental Immunology、W. E. Paul、編、Raven Press、N. Y.（1993）を参照のこと）。種々の抗体フラグメントが、インタクトな抗体の分解の用語において定義される一方で、当業者は、このようなFab'フラグメントは、化学的か、または組換えDNA方法論を利用することによるかのいずれかで、デノボで合成され得ることを認識する。したがって、本明細書中で使用される場合、用語「抗体」はまた、完全な抗体の改変によって産生される抗体フラグメント、または組換えDNA方法論を使用してデノボで合成される抗体フラグメントを含む。好ましい抗体としては、Fab'₂、IgG、IgM、IgA、および単鎖抗体（より好ましくは、単鎖Fv（scFv）抗体）が挙げられ、ここで可変重鎖および可変軽鎖は、（直接的か、またはペプチドリンカーを介して）一緒に連結されて、連続したポリペプチドを形成する。

【0025】

「抗原結合部位」または「結合部分」とは、抗原結合に関与する免疫グロブリン分子の部分を用いる。抗原結合部位は、重鎖（「H」）および軽鎖（「L」）のN末端の可変領域（「V」）のアミノ酸残基によって形成される。重鎖のV領域内および軽鎖のV領域内の3個の高度に分岐（divergent）したストレッチは、「超可変領域」と称され、それは、「フレームワーク領域」または「FR」として公知である、より保存された隣接するストレッチの間におかれる。したがって、用語「FR」とは、免疫グロブリン中の超可変領域の間であり、かつ免疫グロブリン中の超可変領域に隣接して天然に見出されるアミノ酸配列をいう。抗体分子において、軽鎖の3個の超可変領域および重鎖の3個の超可変領域は、三次元空間において互いに相対的に配置されて、抗原結合「表面」を形成する。この表面は、標的の抗原の認識およびそれに対する結合を媒介する。重鎖および軽鎖の各々の3個の超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」と称され、そしてそれらの超可変領域は、例えば、Kabatら、Sequences of proteins of immunological interest、第4版、U. S. Dept. Health and Human Services、Public Health

10

20

30

40

50

S e r v i c e s、B e t h e s d a、M D (1 9 8 7) によって特徴付けられる。

【0026】

S 2 5 抗体とは、クローン S 2 5 によって発現される抗体、またはクローン s 2 5 によって発現される抗体と同一の C D R を有し、そして好ましくはクローン 2 5 によって発現される抗体と同一のフレームワーク領域を必ずしも有することはない他の様式において合成される抗体をいう。同様に、抗体 C 2 5、1 C 6、3 D 1 2、B 4、1 F 3、H u C 2 5、A R 1、A R 2、A R 3、A R 4、W R 1 (V)、W R 1 (T)、3 - 1、3 - 8、3 - 1 0、I N G 1、C R 1、R A Z 1、または I N G 2 とは、対応するクローンによって発現される抗体、および／または参照された抗体と同一の C D R を有し、そして好ましくは参照された抗体と同一のフレームワーク領域を必ずしも有することはない他の様式において合成される抗体をいう。

10

【0027】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫学的結合」および「免疫学的結合特性」とは、免疫グロブリン分子と、その免疫グロブリンが特異的である抗原との間に生じる非共有結合的相互作用の型をいう。免疫学的結合の相互作用の強度および親和性は、その相互作用の解離定数 (K_d) に関して表され得、ここでより小さい K_d は、より大きい親和性を示す。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性は、当該分野で周知の方法を使用して定量され得る。1つのこのような方法は、抗原結合部位／抗原複合体の形成および解離の速度を測定することを伴い、ここでこの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および両方向における速度に等しく影響する幾何学的パラメータに依存する。したがって、「会合速度 (o n r a t e) 定数」 ($K_{o n}$) および「解離速度 (o f f r a t e) 定数」 ($K_{o f f}$) の両方は、濃度ならびに会合および解離の実際の速度を計算することによって決定され得る。 $K_{o f f} / K_{o n}$ の比は、親和性に関連しない全てのパラメータの消去を可能にし、したがって、解離定数 K_d に等しい。一般に、D a v i e s ら、A n n . R e v . B i o c h e m .、5 9 : 4 3 9 - 4 7 3 (1 9 9 0) を参照のこと。

20

【0028】

「B o N T - 中和抗体」とは、1 種以上のボツリヌス神経毒素 (例えば、B o N T / A 1、B o N T / A 2 など) に結合し、かつその結合によって B o N T 神経毒素の毒性を減少させる抗体をいう。したがって、例えば、用語「B o N T / A - 中和抗体」は、本明細書中で使用される場合、B o N T / A ポリペプチド (例えば、B o N T / A 1 ポリペプチド) (特定の実施形態において、B o N T / A ポリペプチドの H_C ドメイン) に特異的に結合し、かつその結合によって B o N T / A ポリペプチドの毒性を減少させる抗体をいう。減少した毒性は、麻痺が発生した回数の増加および／または本明細書中に記載されるような致死投薬量 (例えば、 $L D_{50}$) として測定され得る。B o N T - 中和抗体に由来する抗体としては、その配列が本明細書中で明確に提供される抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0029】

B o N T - 中和抗体に由来する抗体は、好ましくは、約 1.6×10^{-8} またはそれより良好な結合親和性を有し、そしてその抗体は、ボツリヌストキソイド、ボツリヌス毒素、または B o N T フラグメントによって免疫化された哺乳動物 (マウスおよびヒトが挙げられる) から得られた重鎖可変領域 (V_H) 遺伝子および軽鎖可変領域 (V_L) 遺伝子から構築された、ファージまたは酵母上に提示される単鎖 F v フラグメントのライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーまたは酵母ディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得、このライブラリーにおいて、公知の B o N T - 中和可変重鎖 (V_H) が、多様な可変軽鎖 (V_L) と組み合わせて発現されるか、または逆に、公知の B o N T - 中和可変軽鎖が、多様な可変重鎖 (V_H) と組み合わせて発現される。B o N T - 中和抗体としてはまた、本明細書中に記載されるような可変重鎖または可変軽鎖の相補性決定領域 (C D R 1、C D R 2 または C D R 3) に変異を導入することによってもたらされる抗体が挙げられ

40

50

る。最終的に、B o N Tー中和抗体としては、本明細書中に記載されるB o N Tー中和抗体およびそれらの誘導体に適用されるようなこれらの改変方法の任意の組み合わせによってもたらされる抗体が挙げられる。

【0030】

中和エピトープとは、中和抗体によって特異的に結合されるエピトープをいう。

【0031】

単鎖F_v（「s c F_v」または「s c F_v」）ポリペプチドは、直接連結されたかまたはペプチドをコードするリンカーによって連結されたかのいずれかであるV_Hーコード配列とV_Lーコード配列とを含む核酸から発現され得る、共有結合したV_H：：V_Lヘテロダイマーである。H u s t o nら、（1988）P r o c . N a t . A c a d . S c i . U S A、85：5879－5883。天然に集合するが化学的に分離した抗体V領域由来の軽ポリペプチド鎖および重ポリペプチド鎖を、三次元構造に折り畳まれるs c F_v分子に変換するための多くの構造は、実質的に、抗原結合部位の構造に類似する。例えば、米国特許第5, 091, 513号および同第5, 132, 405号および同第4, 956, 778号を参照のこと。

【0032】

1つの分類の実施形態において、組換え体設計方法は、抗体可変領域由来の2つの天然に結合するが化学的に分離した重ポリペプチド鎖および軽ポリペプチド鎖を、ネイティブな抗体構造に実質的に類似する三次元構造に折り畳まれるs c F_v分子に変換するのに適した化学構造（リンカー）を開発するために使用され得る。

【0033】

設計の基準は、一方の鎖のC末端と他方の鎖のN末端との間に距離を空ける適切な長さの決定を含み、ここでリンカーは、一般に、コイルする傾向にないか、または二次構造を形成する傾向にない小さい親水性アミノ酸残基から形成される。このような方法は、当該分野において記載されている。例えば、H u s t o nらに対する米国特許第5, 091, 513号および同第5, 132, 405号；ならびにL a d n e rらに対する米国特許第4, 946, 778号を参照のこと。

【0034】

この関連で、リンカーの設計の第1の一般的な工程は、連結されるのにふさわしい部位の同定を包含する。V_HポリペプチドドメインおよびV_Lポリペプチドドメインの各々における適切な連結部位としては、そのポリペプチドドメインからの残基の最小限の損失を生じる部位、分子の安定性に対する必要性と一致する最小限の数の残基を含むリンカーを必要とする部位が挙げられる。部位の対は、連結される「ギャップ」を定義する。1つのドメインのC末端を次のドメインにN末端に対する連結するリンカーは、一般に、非構造立体配置を仮定する生理学的溶液中の疎水性アミノ酸を含み、そして好ましくはV_H鎖およびV_L鎖の適切な折り畳みを妨げ得る大きな側鎖を有する残基を含まない。したがって、本発明における適切なリンカーは、一般に、グリシン残基およびセリン残基の交互のセットのポリペプチド鎖を含み、そして可溶性を増強するために挿入されるグルタミン酸残基およびリジン残基を含み得る。本発明における1つの特定のリンカーは、アミノ酸配列〔（G l y）₄ S e r〕₃（配列番号1）を有する。別の特に好ましいリンカーは、〔（S e r）₄ G l y〕（配列番号2）の2回または3回の繰り返しを含むアミノ酸配列（例えば、〔（S e r）₄ G l y〕₃（配列番号3）など）を有する。このようなリンカー部分をコードするヌクレオチド配列は、当該分野で公知の種々のオリゴヌクレオチド合成技術を使用して容易に提供され得る。例えば、S a m b r o o k、前出を参照のこと。

【0035】

抗体に関する場合、語句「タンパク質に特異的に結合する」または「と特異的に免疫反応性」とは、タンパク質および他の生物製剤の不均一な集団の存在下において上記タンパク質の存在を決定する結合反応をいう。したがって、設計されたイムノアッセイ条件下において、特定の抗体は、特定のタンパク質に結合し、そしてサンプル中に存在する他のタンパク質に顕著な量で結合しない。このような条件下におけるタンパク質に対する特異的

な結合は、特定のタンパク質に対するその特異性について選択される抗体を必要とし得る。例えば、BoNT/A中和抗体は、BoNT/Aタンパク質に対して惹起され得、BoNT/Aタンパク質に特異的に結合し、そして組織サンプル中に存在する他のタンパク質に結合しない。種々のイムノアッセイ形式は、特定のタンパク質と特異的に免疫反応性である抗体を選択するために使用され得る。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質と特異的に免疫反応性であるモノクローナル抗体を選択するために慣用的に使用される。特異的免疫反応性を決定するために使用され得るイムノアッセイ形式およびイムノアッセイ条件の記載については、HarlowおよびLane、(1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参照のこと。

10

【0036】

用語「保存的置換」は、分子の活性（特異性または結合親和性）を実質的に変化させないアミノ酸置換を反映するために、タンパク質またはペプチドに対する参照において使用される。代表的に、保存的アミノ酸置換は、1つのアミノ酸の同様の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する別のアミノ酸での置換を含む。以下の6種の群は、それぞれ、互いに対する代表的な保存的置換であるアミノ酸を含む：1) アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T)；2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；4) アルギニン (R)、リジン (K)；5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；および6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

20

【0037】

(詳細な説明)

本発明は、ボツリヌス神経毒素A型（特定の実施形態において、他のボツリヌス神経毒素血清型（例えば、B、C、D、E、Fなど））に特異的に結合し、そしてそれを中和する新規の抗体を提供する。ボツリヌス神経毒素は、嫌気性細菌 *Clostridium botulinum* によって産生される。ボツリヌス神経毒素中毒（ボツリヌス中毒）は、多くの状況（context）において生じ、その状況としては、食中毒（食物媒介性ボツリヌス中毒）、感染した創傷（創傷ボツリヌス中毒）、ならびに芽胞の摂取および乳児の腸管における毒素の産生に由来する「乳児ボツリヌス中毒」が挙げられるが、これらに限定されない。ボツリヌス中毒は、代表的に脳神経の関与によって始まり、そして四肢を含んで末端に進行する麻痺性疾患である。急性の場合において、ボツリヌス中毒は、致命的であり得る。

30

【0038】

ボツリヌス神経毒素 (BoNT) はまた、ボツリヌス神経毒素 (BoNT) はまた、これらの極度の効力および死亡率、生産および輸送の容易性、ならびに長期の集中治療の必要性 (Arnonら、(2001) *JAMA* 285:1059-1070) に起因して、Centers for Disease Control (CDC) によって、生物テロリズムに関して最も高い危険性を有する6種の脅威因子（「Category A agent」）のうちの1種として分類される。イラクおよびかつてのソビエト連邦の両方は、兵器として使用するためにBoNTを生産し (UN Security Council (1995)、前出；Bozheeva (1999)、前出)、そして日本のカルトであるオウム真理教は、生物テロリズムにBoNTを使用することを試みた (Arnonら (2001)、前出)。これらの脅威の結果として、特定の薬学的因子は、中毒の予防および処置に必要とされる。

40

【0039】

最近、種々のBoNT血清型の複数のサブタイプが存在することが見出されている。さらに、本発明者らは、例えば、BoNT/A1サブタイプを結合する多くの抗体がBoNT/A2サブタイプを結合しないことなどが、さらに見出した。

【0040】

本発明者らは、ボツリヌス神経毒素 (BoNT) のサブタイプの特に効率的な中和が、

50

特定の B o N T 血清型の 2 種以上のサブタイプを高親和性で結合する中和抗体の使用によって達成されることを見出した。これは、上記サブタイプの各々に対する 2 種以上の異なる抗体を使用することによって達成され得る一方で、これは、より低い有効性であり、効率的ではなく、そして実用的ではない。B o N T 治療は、B o N T の高い毒性を鑑みると、望ましくは、非常に強力である。所与の B o N T 血清型を、必要とされる効力（以下ならびに図 5、6、16、および 17 を参照のこと）によって中和するために複数の抗体を使用することが、一般的には必要であるので、必要とされる抗体の数は、各サブタイプに対して異なる抗体を使用することが必要である場合、製造の観点から、非常に大きいものである。混合物中の抗体の数の増加はまた、効力を減少させる。したがって、例えば、4 種の抗体（2 種が A 1 毒素を中和し、そして 2 種が A 2 毒素を中和する）の混合物の場合、それらの抗体の 50 % のみが、所与の毒素を中和する。対照的に、2 種の抗体（その両方が、A 1 毒素および A 2 毒素を中和する）の混合物は、いずれの毒素に対しても 100 % の活性を有し、そして製造がより簡単である。例えば、2 種の B o N T / A サブタイプ（A 1、A 2）に対して、強力な中和は、2 種～3 種の抗体によって達成され得る。異なる抗体が、B o N T / A 1 と B o N T / A 2 との中和に必要とされる場合、4 種～6 種の抗体が、必要とされる。その複雑性は、さらなるサブタイプに対してさらに増大する。したがって、特定の実施形態において、本発明は、2 種以上の B o N T サブタイプ（例えば、B o N T / A 1、B o N T / A 2 など）を高親和性で結合する中和抗体を含む組成物を提供する。

10

【0041】

20

B o N T / A 1 および B o N T / A 2 の両方を高親和性で結合する抗体の例としては、本明細書中に記載される C R 1、R A Z 1、I N G 1、および I N G 2 が挙げられるが、これらに限定されない。

【0042】

中和抗体を組み合わせ始めるときに、上記抗体の組み合わせの効力が劇的に増大することもまた、驚くべき発見であった。この増大は、治療用途に必要とされる効力のボツリヌス抗体をもたらすことを可能にする。2 種のモノクローナル抗体および 3 種のモノクローナル抗体を組み合わせ始める場合、認識される特定の B o N T エピトープは、重要ではなくなることもまた、驚くべきことであった。したがって、例えば、実施例 5 に示されるように、B o N T のトランスロケーションドメインおよび／または触媒ドメインに結合する抗体が、中和活性を有し、互いと組み合わせた場合、または B o N T レセプター結合ドメイン（H C）を認識する m A b と組み合わせた場合のいずれかが、B o N T 活性の中和に有効であった。したがって、特定の実施形態において、本発明は、B o N T 上の重複しないエピトープを結合する少なくとも 2 種（より好ましくは、少なくとも 3 種）の高親和性抗体を含む組成物を企図する。

30

【0043】

したがって、特定の実施形態において、本発明は、3 D 1 2、R A Z 1、C R 1、I N G 1、I N G 2、および／またはこれらの抗体由来の 1 種以上の C D R を含む抗体、および／またはこれらの抗体の変異体（例えば、I N G 1 の 1 D 1 1 変異体、2 G 1 1 変異体、および 5 G 4 変異体）（例えば、図 19 B を参照のこと）を含む 1 種以上の抗体からなる群より選択される、2 種以上（好ましくは、3 種以上）の異なる抗体を含む組成物を企図する。

40

【0044】

上に示されるように、特定の実施形態において、本発明によって提供される抗体は、1 種以上のボツリヌス神経毒素 A 型（B o N T / A）サブタイプに結合し、そしてそれを中和する。この文脈において、中和とは、B o N T / A の毒性の測定可能な減少をいう。毒性のこのような減少は、当業者に周知の多くの方法によってインビトロで測定され得る。1 つのこのようなアッセイは、片側横隔膜調製物における単収縮張力の減少の所与の %（例えば、50 %）までの時間を測定することを包含する。毒性は、例えば、1 種以上の推定上の中和抗体の存在下での試験動物（例えば、マウス）のボツリヌス神経毒素 A 型にお

50

けるLD₅₀としてインビボで決定され得る。上記中和抗体は、投与前にボツリヌス神経毒素と組み合わせられ得るか、あるいは上記動物は、その神経毒素の投与前か、その神経毒素の投与と同時に、またはその神経毒素の投与後に上記抗体を投与され得る。

【0045】

本発明の抗体が、ボツリヌス神経毒素A型を中和するように作用する場合、それらの抗体は、ボツリヌス神経毒素中毒に関連する病理の処置において有用である。上記処置は、本質的に、中毒になった生物体（例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物）に、BoNT中毒の症状を中和（例えば、緩和または排除）するのに十分な1種以上の中和抗体の量を投与することを包含する。

【0046】

このような処置は、最も所望され、かつ急性症例（例えば、肺活量が、30～40%未満であり、そして／あるいは麻痺が、迅速に進行しており、そして／あるいは絶対的または相対的な高炭酸ガス血症を伴う低酸素血症が、存在する場合）において有効である。これらの抗体はまた、示されるよりも穏やかな症状を伴う初期症例を処置するため（進行を予防するため）に使用されえるか、または予防的（軍隊が危険な状況に向かう兵士について想定する使用）にさえ使用され得る。上記中和抗体による処置は、他の治療（例えば、抗生物質による処置）に対する補助として提供され得る。

【0047】

本発明によって提供される抗体は、ボツリヌス中毒（A型毒素）の迅速な検出／診断のために使用され得、そしてそれによって、先の検査室診断を補完および／または置換し得る。

【0048】

別の実施形態において、本発明は、ボツリヌス神経毒素A型中和抗体によって特異的に結合されるエピトープを提供する。これらのエピトープは、他の抗体（本明細書中に記載されるようなBoNT/A中和抗体）を、単離および／または同定および／またはスクリーニングするために使用され得る。

【0049】

（I. ボツリヌス神経毒素（BoNT）中和抗体の効力）

特定の理論に拘束されることはないが、ボツリヌス中毒（ウマおよびヒト）を処置するために使用される現在の抗毒素は、約5000マウスLD₅₀/mg（ヒト）の効力および55,000マウスLD₅₀mg（ウマ）の効力を有すると考えられる。

【0050】

本発明者らの計算に基づいて、本発明者らは、商業的に望ましい抗毒素は約10,000～100,000LD₅₀/mgより大きい効力を有すると考える。本明細書中に記載される抗体の組み合わせ（例えば、2種または3種の抗体）は、この効力を満たす。したがって、特定の実施形態において、本発明は、1mgの抗体あたり少なくとも約10,000マウスLD₅₀、好ましくは1mgの抗体あたり少なくとも約15,000マウスLD₅₀、より好ましくは1mgの抗体あたり少なくとも約20,000マウスLD₅₀、そして最も好ましくは1mgの抗体あたり少なくとも約25,000マウスLD₅₀を中和する抗体および／または抗体の組み合わせを提供する。

【0051】

（II. ボツリヌス神経毒素（BoNT）中和抗体）

特定の好ましい実施形態において、1種（しかし、より好ましくは少なくとも2種）のBoNTサブタイプに結合するBoNT中和抗体が、選択される。多くのサブタイプが、各BoNT血清型に関して公知である。したがって、例えば、BoNT/Aサブタイプとしては、BoNT/A1、BoNT/A2、BoNT/A3などが挙げられるが、これらに限定されない（例えば、図11を参照のこと）。例えば、BoNT/A1サブタイプとしては、62A、NCTC 2916、ATCC 3502、およびHall hyper（Hall Allergan）が挙げられるが、これらに限定されないこと、ならびにBoNT/A1サブタイプは、同一（アミノ酸で99.9～100%の同一性）である

10

20

30

40

50

こと、ならびに B o N T / A 1 サブタイプは、サブタイプ A 1 として分類されていることもまた、示される（図 1 2 A）。B o N T / A 2 配列（K y o t o - F および F R I - A 2 H）（W i l l e m s ら、（1 9 9 3）R e s . M i c r o b i o l . 1 4 4 : 5 4 7 - 5 5 6）は、アミノ酸レベルで 1 0 0 % 同一である。（本発明者らが A 3 と称している）別の B o N T / A サブタイプは、スコットランドにおける感染で多くの者を殺した L o c h M a r e e と称される株によって産生される。本発明者らは、A 1 毒素および A 2 毒素の両方と交差反応する本明細書中に記載される 3 種の抗体（表 1 を参照のこと）がまた A 3 毒素と交差反応するというデータを有する（これらは、C R 1、I N G 1、および R A Z 1 である）。別の B o N T / A 毒素（本発明者らがを同定した）を、本発明者らは、A 4 と称する。それは、B 毒素および A 毒素の両方を産生するクロストリジウム属の二価の株によって産生される。

10

【0052】

同様に、図 1 1 に示されるように、多くのサブタイプはまた、血清型 B、C、E、および F に関して公知である。本明細書中に記載される方法を使用して、血清型内の 2 種以上のサブタイプと交差反応性である（例えば、選択された／操作された）高親和性抗体が産生され得ることが、見出された。さらに、特定の理論に拘束されることはないが、これらの交差反応性である抗体は、実質的に、ボツリヌス神経毒素の中和においてより効率的である（1 種以上の異なる中和抗体を組み合わせて使用した場合）ことが、明らかである。

【0053】

多くの原始的に「交差反応性」である抗体についての可変重（V H）ドメインの配列および可変軽（V L）ドメインの配列は、表 2 ならびに図 1 8 および図 1 9 に示される。上に示されるように、抗体 C R 1、R A Z 1、I N G 1、および I N G 2 が、B o N T / A 1 サブタイプおよび B o N T / A 2 サブタイプに対して交差反応性である一方で、抗体 C R 1、I N G 1、および R A Z 1 は、さらに、B o N T / A 3 サブタイプに対して交差反応性である。

20

【0054】

抗体 C R 1 は、例えば、実施例 4 に記載されるように、ヒト化 C 2 5（H u C 2 5）の変異および選択によって産生された（A R 2 の誘導体）。上記抗体は、A 1 サブタイプおよび A 2 サブタイプの両方に対して変異ならびに選択された。同様に、抗体 3 D 1 2 の変異（例えば、実施例 2 を参照のこと）は、R A Z 1 をもたらした。酵母における免疫性 s c F v ライブラリーの選択は、I N G 1 および I N G 2 をもたらした。

30

【0055】

（表 1．操作した抗体についての結合データ）

【0056】

【表 1】

mAb	KD BoNT/A1 ($\times 10^{-12}$ M)	KD BoNT/A2 ($\times 10^{-12}$ M)
HuC25	45	>100,000
AR2	7.2	>100,000
CR1	6.2	1700
3D12	61	152
RAZ1	1.7	3.7
B4	96	結合せず
ING1	560	750
ING2	16.7	15.4

40

表 2 ならびに図 1 8 および図 1 9 は、交差反応性である抗体 R A Z 1、C R 1、I N G 1、および I N G 2 の V H 領域ならびに V L 領域についてのアミノ酸配列情報を提供する。同様の情報が、B o N T / A 1 サブタイプに特異的に結合する抗体 A R 2 および A R 3 について提供される。さらに、配列情報が、S 2 5、C 2 5、C 3 9、1 C 6、3 D 1 2、B 4、1 F 3、H u C 2 5、A R 1、A R 2、W R 1（V）、W R 1（T）、3 - 1、

50

3-8、および／または3-10について本明細書中で提供される（例えば、表6ならびに／または表11および／もしくは表13を参照のこと）。

【0057】

（表2．成熟した親和性であり、交差反応性であり、かつ／または改変された抗体についてのアミノ酸配列）

【0058】

【表2-1】

重鎖				
クローン	フレームワーク 1	CDR1	フレームワーク 2	CDR2
AR3	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFG (配列番号 24)	EHYMY (配列番号 25)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 26)	TISDGGSYTYYP SVEG (配列番号 27)
AR4	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFE (配列番号 28)	EHYMY (配列番号 29)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 30)	TISDGGSYTYYP SVEG (配列番号 31)
CR1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFK (配列番号 32)	YDYM (配列番号 33)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 34)	TISDGGSYTYYS SVEG (配列番号 35)
CR2				
RAZ1	QVQLVQSGGGLVHPGRSLKLS AGSGFTFS (配列番号 36)	DYDMH (配列番号 37)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 38)	VMWFDGTEKYS SVKG (配列番号 39)
ING1	QVQLQSGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFS (配列番号 40)	NYAMT (配列番号 41)	WVRQAPGKGLEW VS (配列番号 42)	SISVGGSDIYY SVKG (配列番号 43)
ING2	QVQLVQSGAEEVKKPGSSVKVSC KASGDTFN (配列番号 44)	RNAIA (配列番号 45)	WVRQAPGQGLEW MG (配列番号 46)	RIIPNLRTHYAO KFQG (配列番号 47)
2G11	QVQLQSGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFS (配列番号 48)	NYAMT (配列番号 49)	WVRQAPGKGLEW VS (配列番号 50)	SISVGGSDIYY SVKG (配列番号 51)
5G4	QVQLQSGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFS (配列番号 52)	NYAMT (配列番号 53)	WVRQAPGKGLEW VS (配列番号 54)	SISVGGSDIYY SVKG (配列番号 55)
重鎖(続き)				
	フレームワーク 3	CDR3	フレームワーク 4	
AR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAIYYCSR (配列番号 56)	YRYDDAMDY (配列番号 57)	WGQGTIVTVSS (配列番号 58)	
AR4	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAIYYCSR (配列番号 59)	YRYDDAMDY (配列番号 60)	WGQGTIVTVSS (配列番号 61)	
CR1	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAIYYCSR (配列番号 62)	YRYDDAMDY (配列番号 63)	WGQGTIVTVSS (配列番号 64)	
CR2				
RAZ1	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRA DDTAVYYCAR (配列番号 65)	EPDWLLWGDRG ALDV (配列番号 66)	WGQGTIVTVSS (配列番号 67)	
ING1	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAK (配列番号 68)	VRKYCSSLSC FAGFDS (配列番号 69)	WGQGTIVTVSS (配列番号 70)	
ING2	RVAITADKHTNTVFMESSLRS EDTAVYYCAR (配列番号 71)	DPYYYSYMDV (配列番号 72)	WGKGTIVTVSS (配列番号 73)	

【0059】

【表 2 - 2】

2G11	RFTVSRDNSKNTLLQLMNSLRA EDTAVYYCAK (配列番号 74) NO:	VRTKYCSSLSC FAGFDS (配列番号 75)	WGQGTRVTVSS (配列番号 76)	
5G4	RFTVSRDNSKNTLLQLMNSLRA EDTAVYYCAK (配列番号 77) NO:	VRTKYCSSLSC FAGFDS (配列番号 78)	WGQGTRVTVSS (配列番号 79)	
軽鎖 :				
クローン	フレームワーク 1	CDR1	フレームワーク 2	CDR2
AR3	EIVLTQSPATLSLSPGERATIS C (配列番号 80)	RASESVDSYGH SFMQ (配列番号 81)	WYQQKPGQAPRL LIY (配列番号 82)	RASNLEP (配列番号 83)
AR4	EIVLTQSPATLSLSPGERATIS C (配列番号 84)	RASESVDSYGH SFMQ (配列番号 85)	WYQQKPGQAPRL LIY (配列番号 86)	RASNLEP (配列番号 87)
CR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATIS C (配列番号 88)	RASESVDSYGH SFMQ (配列番号 89)	WYQQKPGQAPRL LIY (配列番号 90)	RASNLEP (配列番号 91)
RAZ1	DIVMTQSPSTLSASVGDRTIT C (配列番号 92)	WASQSISSRLA (配列番号 93)	WYQQKPGKAPKL LMY (配列番号 94)	EATSLGS (配列番号 95)
ING1	DIVMTQSPSSLSASVGDRTIT C (配列番号 96)	RASQSISSYLN (配列番号 97)	WYQQKPGKAPKL LIY (配列番号 98)	AASSLQS (配列番号 99)
ING2	EIVLTQSPDSLAVSLGERATIN C (配列番号 100)	KSSRSVLYSSN NNNYLA (配列番号 101)	WYQQKPGQPPKL LIY (配列番号 102)	WASTRES (配列番号 103)
2G11	DVVMTQSPSSLSASVGDRTIT C (配列番号 104)	RASQSISSYLH (配列番号 105)	WYQQKPGKAPTL LIS (配列番号 106)	DASSSQS (配列番号 107)
5G4	EIVLTQSPSSLSASVGDRTIT C (配列番号 108)	RASQGISNYLA (配列番号 109)	WYQQKPGKVPKL LIY (配列番号 110)	AASILQS (配列番号 111)
軽鎖(続き)				
クローン	フレームワーク 3	CDR3	フレームワーク 4	
AR3	GIPARFSGSGSGTDFLTISL EPEDFAVYYC (配列番号 112) NO:	QQGNEVPFT (配列番号 113)	FGQGIKVEIKR (配列番号 114)	
AR4	GIPARFSGSGSGTDFLTISL EPEDFAVYYC (配列番号 115) NO:	QQGNEVPFT (配列番号 116)	FGQGIKVEIKR (配列番号 117)	
CR1	GIPARFSGSGSGTDFLTISL EPEDFAVYYC (配列番号 118) NO:	QQGNEVPFT (配列番号 119)	FGQGIKVEIKR (配列番号 120)	
RAZ1	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFAVYYC (配列番号 121) NO:	QHYDTYPYT (配列番号 122)	FGQGTKLEIKR (配列番号 123)	
ING1	GVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFAVYYC (配列番号 124) NO:	QQSYSTPRTI (配列番号 125)	FGGGTKVDIKR (配列番号 126)	
ING2	GVPSRFSGSGSGTDFLTISL QAEDFAVYYC (配列番号 127) NO:	QQYYSIPFT (配列番号 128)	FGGGTKVEIKR (配列番号 129)	
2G11	GVPSRFSGSRFGTDFLTISL QPEDFAVYYC (配列番号 130) NO:	QQSYSTRALT (配列番号 131)	FGGGTKVEIKR (配列番号 132)	
5G4	GVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFAVYYC (配列番号 133) NO:	QQSYSTLMCS (配列番号 134)	FGQGTKLEIKR (配列番号 135)	

*完全な重鎖についての配列は、重鎖フレームワーク 1 + 重鎖 C D R 1 + 重鎖フレームワーク 2 + 重鎖 C D R 2 + 重鎖フレームワーク 3 + 重鎖 C D R 3 + 重鎖フレームワーク 4 である。

完全な軽鎖についての配列は、軽鎖フレームワーク 1 + 軽鎖 C D R 1 + 軽鎖フレームワーク 2 + 軽鎖 C D R 2 + 軽鎖フレームワーク 3 + 軽鎖 C D R 3 + 軽鎖フレームワーク 4 である。

【0060】

本明細書中に提供される教示および配列情報を用いて、可変軽鎖および可変重鎖は、単鎖 F v 抗体を形成するために、直接的か、またはリンカー（例えば、(Gly₄Ser₃

10

20

30

40

50

、配列番号181))を介して連結され得る。種々のCDR領域および／またはフレームワーク領域は、完全ヒト抗体、キメラ抗体、抗体フラグメント、多価抗体などを形成するために使用され得る。

【0061】

(III. BoNT中和抗体の調製)

(A. BoNT中和抗体の組換え発現)

本明細書中に提供される情報を用いて、本発明のボツリヌス神経毒素中和抗体は、当業者に周知の標準的な技術を使用して調製される。

【0062】

例えば、本明細書中に提供されるポリペプチド配列（例えば、表2および／または表6および／または表9および／または表13を参照のこと）は、BoNT/A-中和抗体をコードする適切な核酸配列を決定するために使用され得、次いでその核酸配列は、1種以上のBoNT-中和抗体を発現するために使用される。上記核酸配列は、当業者に周知の標準的な方法にしたがって、種々の発現系に対して「好ましい」特定のコドンを反映するために最適化され得る。

【0063】

提供される配列情報を用いて、上記核酸は、当業者に公知の多くの標準的な方法にしたがって合成され得る。オリゴヌクレオチド合成は、好ましくは、市販の固相オリゴヌクレオチド合成機において実施される（Needham-Vandevanterら、(1984) Nucleic Acids Res. 12:6159-6168）か、またはオリゴヌクレオチドは、Beaucageらによって記載される固相ホスホラミダイトリエステル法（Beaucageら、(1981) Tetrahedron Letts. 22(20):1859-1862）を使用して手動で合成される。

【0064】

一旦BoNT/A-中和抗体をコードする核酸が合成されると、その核酸は、標準的な方法にしたがって増幅および／またはクローニングされ得る。これらの目的を達成するための分子クローニング技術は、当該分野において公知である。組換え核酸の構築に適した広範な種々のクローニング法およびインビトロ増幅法は、当業者に公知である。多くのクローニング実行により当業者を導くのに十分なこれらの教示および説明の例は、BergerおよびKimmel、Guide to Molecular Cloning Techniques、Methods in Enzymology、第152巻、Academic Press, Inc.、San Diego, CA (Berger); Sambrookら、(1989) Molecular Cloning-A Laboratory Manual (第2版)、第1巻～第3巻、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press、NY、(Sambrook); ならびにCurrent Protocols in Molecular Biology、F. M. Ausubelら編、Current Protocols、Greene Publishing Associates, Inc. とJohn Wiley & Sons, Inc. との間の共同企業体、(1994、補遺) (Ausubel)に見出される。組換え免疫グロブリンを産生する方法はまた、当該分野において公知である。Cabilly、米国特許第4,816,567号; およびQueenら、(1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033を参照のこと。

【0065】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、Q β -レプリカーゼ増幅および他のRNAポリメラーゼを媒介する技術を含むインビトロ増幅法により当業者を導くのに十分な技術の例は、Berger、Sambrook、およびAusubel、ならびにMullisら、(1987)米国特許第4,683,202号; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innisら編) Academic Press Inc. San Diego

o、CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (1990年10月1日) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3、81-94; Kwohら、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、1173; Guatelliら、(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87、1874; Lomelliら、(1989) J. Clin. Chem 35、1826; Landegrenら、(1988) Science 241、1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8、291-294; WuおよびWallace、(1989) Gene 4、560; ならびにBarringerら、(1990) Gene 89、117に見出される。インビトロで増幅された核酸をクローニングする改良された方法は、Wallaceら、米国特許第5, 426, 039号に記載される。

10

【0066】

一旦BoNT/A-中和抗体についての核酸が単離およびクローニングされると、当業者に公知である種々の組換え的に操作された細胞においてその遺伝子を発現し得る。このような細胞の例としては、細菌、酵母、糸状真菌、(特に、バキュロウイルスベクターを利用する) 昆虫、および哺乳動物細胞が挙げられる。当業者はBoNT/A-中和抗体の発現に利用可能な多くの発現系に精通していることが、予想される。

【0067】

簡単にまとめると、BoNT/A-中和抗体をコードする天然の核酸または合成の核酸の発現は、代表的に、その抗体をコードする核酸をプロモーター(これは、構成的または誘導性のいずれかである)に作動可能に連結し、そしてこの構築物を発現ベクターに組み込むことによって達成される。上記ベクターは、原核生物、真核生物、またはその両方における複製および組込みに適切であり得る。代表的なクローニングベクターは、転写ターミネーターおよび翻訳ターミネーター、開始配列、ならびにBoNT/A-中和抗体をコードする核酸の発現の調節に有用なプロモーターを含む。上記ベクターは、必要に応じて、一般的な発現カセットを含有し、その発現カセットは、少なくとも1つの独立したターミネーター配列、真核生物および原核生物の両方においてそのカセットの複製を可能にする配列(すなわち、シャトルベクター)、ならびに原核生物系および真核生物系の両方に対する選択マーカーを含む。Sambrookを参照のこと。

20

【0068】

クローニングされた核酸の高い発現レベルを得るために、代表的には転写を指揮する強力なプロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位、および転写/翻訳ターミネーターを含む発現プラスミドを構築することが、一般的である。E. coliにおいてこの目的に適した調節領域の例は、Yanofsky (1984) J. Bacteriol.、158:1018-1024によって記載されるようなE. coliトリプトファン合成経路のプロモーター領域およびオペレーター領域、ならびにHerskowitzおよびHagen (1980) Ann. Rev. Genet.、14:399-445によって記載されるようなλファージの左方向プロモーター(leftward promoter) (P_L)である。E. coli中に形質転換されたDNAベクター中に選択マーカーを含むこともまた、有用である。このようなマーカーの例としては、アンピシリン、テトラサイクリン、またはクロラムフェニコールに対する耐性を特定する遺伝子が挙げられる。例えば、E. coliにおいて使用するための選択マーカーに関する詳細については、Sambrookを参照のこと。

30

40

【0069】

BoNT/A-中和抗体を発現するための発現系は、E. coli、バシラス種(Palvaら、(1983) Gene 22:229-235; Mosbachら、Nature、302:543-545) およびサルモネラ属を使用して利用可能である。E. coli系が、好ましい。

【0070】

原核生物細胞によって産生されるBoNT/A-中和抗体は、適切な折り畳みのために

50

、カオトロピック剤への曝露を必要とし得る。例えば、E. coliからの精製の間に、発現したタンパク質は、必要に応じて、変性され、次いで復元される。これは、例えば、上記細菌によって産生された抗体をカオトロピック剤（例えば、グアニジンHCl）において可溶化することによって達成される。次いで上記抗体は、緩徐な透析またはゲル濾過のいずれかによって復元される。米国特許第4, 511, 503号を参照のこと。

【0071】

哺乳動物細胞中に遺伝子をトランスフェクトし、そして哺乳動物細胞中で発現させる方法は、当該分野において公知である。核酸を用いて細胞を形質導入することは、例えば、ベクターの宿主範囲内の細胞によってBoNT/A-中和核酸を含むウイルスベクターを培養（incubate）することを含み得る。例えば、Goeddel（1990）Methods in Enzymology、第185巻、Academic Press, Inc.、San Diego、CAまたはKrieger（1990）Gene Transfer and Expression—A Laboratory Manual, Stockton Press、New York、N. Y. およびその中に引用される参考文献を参照のこと。

【0072】

組織サンプルまたは血液サンプル由来の細胞株および培養細胞を含む本発明において使用される細胞の培養は、当業者に周知である（例えば、Freshney（1994）Culture of Animal Cells、a Manual of Basic Technique、第3版、Wiley-Liss、N. Y. およびその中に引用される参考文献を参照のこと）。

【0073】

抗体を使用および操作するための方法は、Coligan、（1991）Current Protocols in Immunology Wiley/Greene、NY；HarlowおよびLane（1989）Antibodies：A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press、NY；Stitesら（編）Basic and Clinical Immunology（第4版）Lange Medical Publications、Los Altos、CA、およびその中に引用される参考文献；Goding（1986）Monoclonal Antibodies：Principles and Practice（第2版）Academic Press、New York、NY；ならびにKohlerおよびMilstein（1975）Nature 256：495-497に見出される。ボツリヌス神経毒素A型に対して特異的であるBoNT/A-中和抗体は、 1×10^{-8} Mまたはそれより良好な K_D を有し、好ましい実施形態では、1 nMまたはそれより良好な K_D を有し、そして最も好ましい実施形態では、0.1 nMまたはそれより良好な K_D を有する。

【0074】

1つの好ましい実施形態において、BoNT/A-中和抗体遺伝子（例えば、BoNT/A-中和scFv遺伝子）は、発現ベクターpUC119mycHis（Tomlinsonら、（1996）J. Mol. Biol.、256：813-817）または発現ベクターpSYN3中にサブクローニングされ、これらの発現ベクターは、そのscFvのC末端にヘキサヒスチジンタグの付加をもたらし、精製を容易にする。BoNT/A-中和抗体のクローニングおよび精製のための詳細なプロトコルは、実施例1に提供される。

【0075】

（B. 全ポリクローナル抗体または全モノクローナル抗体の調製）

本発明のBoNT中和抗体は、個体、対立遺伝子、株、または種の改変体、およびそのフラグメント（それらの天然に存在する（完全長）形態および組換え形態の両方において）を含む。特定の実施形態において、好ましくは抗体は、本明細書中に記載される抗体（例えば、S25、C25、C39、1C6、3D12、B4、1F3、HuC25、AR

1、AR 2、WR 1 (V)、WR 1 (T)、3-1、3-8、3-10、CR 1、RA Z 1、1D 1 1、2G 1 1、5G 4、ING 1、および／またはING 2)によって結合される1種以上のエピトープを結合するために選択される。特定の好ましい抗体は、2種以上のBoNTサブタイプ(例えば、BoNT/A 1、BoNT/A 2、BoNT/A 3など)と交差反応性である。上記抗体は、それらのネイティブな構造またはネイティブではない構造において生じ得る。抗イデオタイプ抗体もまた、産生され得る。特定のエピトープに特異的に結合する抗体を作製する多くの方法は、当業者に公知である。以下の考察は、利用可能な技術の一般的な外観として存在する；しかし、当業者は、以下の方法における多くのバリエーションが公知であることを認識する。

【0076】

1) ポリクローナル抗体の産生

ポリクローナル抗体を産生する方法は、当業者に公知である。簡単にいうと、免疫原(例えば、BoNT/A 1もしくはBoNT/A 2、BoNT/A 1 H_cもしくはBoNT/A 2 H_c、またはBoNT/A 1下位配列もしくはBoNT/A 2下位配列(本明細書中に開示されるクローンS 25、C 25、C 39、1C 6、3D 1 2、B 4、1F 3、HuC 25、AR 1、AR 2、WR 1 (V)、WR 1 (T)、3-1、3-8、3-10、および／もしくはCR 1、RA Z 1、1D 1 1、2G 1 1、5G 4、ING 1、ならびに／またはING 2によって発現される抗体によって特異的に結合されるエピトープを含む下位配列が挙げられるが、これに限定されない))、好ましくは精製されたポリペプチド、適切なキャリア(例えば、GST、キーホールリンペットヘモシアニンなど)とカップリングされたポリペプチド、または組換えワクシニアウイルス(米国特許第4, 722, 848号を参照のこと)などの免疫化ベクターに組み込まれるポリペプチドは、アジュバントと混合され、そして動物は、その混合物によって免疫化される。上記免疫原調製物に対する哺乳動物の免疫応答は、試験採血(test bleed)を行い、そして目的のポリペプチドに対する反応性の力価を決定することによってモニタリングされる。免疫原に対して適切に抗体の高い力価が得られる場合、血液が動物から回収され、そして抗血清が調製される。さらに上記BoNT/Aポリペプチドに対して反応性である抗体を濃縮するために、上記抗血清の分別が、行われる(例えば、Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY;ならびにHarlowおよびLane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NYを参照のこと)。

【0077】

本明細書中に記載される中和エピトープに特異的に結合する抗体は、本明細書中に記載される選択技術を使用してポリクローナル血清から選択される。

【0078】

2) モノクローナル抗体の産生

いくつかの場合において、種々の哺乳動物宿主(例えば、マウス、げっ歯類、霊長類、ヒトなど)からモノクローナル抗体を調製することが、望ましい。このようなモノクローナル抗体を調製するための技術の説明は、例えば、Stitesら(編)Basic and Clinical Immunology (第4版) Lange Medical Publications, Los Altos, CA、およびその中に引用される参考文献; HarlowおよびLane、前出; Goding、(1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (第2版) Academic Press, New York, NY;ならびにKohlerおよびMilstein、(1975) Nature 256: 495-497に見出される。

【0079】

簡単にまとめると、モノクローナル抗体の産生は、免疫原(例えば、BoNT/A、BoNT/A H_c、またはBoNT/A下位配列(本明細書中に開示されるクローンS 2

10

20

30

40

50

5、C 2 5、C 3 9、1 C 6、3 D 1 2、B 4、1 F 3、H u C 2 5、A R 1、A R 2、W R 1 (V)、W R 1 (T)、3-1、3-8、3-10、および／もしくはC R 1、R A Z 1、1 D 1 1、2 G 1 1、5 G 4、I N G 1、ならびに／またはI N G 2によって発現される抗体によって特異的に結合されるエピトープを含む下位配列が挙げられるが、これに限定されない))を動物に注射することによって進行する。次いで動物は、屠殺され、および細胞が、その脾臓から採取され、その細胞は、骨髄腫細胞と融合される。その結果は、インビトロで再生可能であるハイブリッド細胞または「ハイブリドーマ」である。次いでそのハイブリドーマの集団は、個々のクローン(その各々は、上記免疫原に対して単一の抗体種を分泌する)を単離するためにスクリーニングされる。この様式において、得られた個々の抗体種は、免疫原性物質において認識される特定の部位に依拠して得られる免疫動物由来の、不死化されかつクローニングされた単一のB細胞の産物である。

10

【0080】

不死化の代替方法は、エプスタインバーウイルス、癌遺伝子、もしくは、レトロウイルス、または当該分野で公知の他の方法を用いた形質転換を含む。単一の不死化細胞から生じるコロニーは、B o N T 抗原に対する所望の特異性および親和性の抗体の産生についてスクリーニングされ、そしてこのような細胞によって産生されるモノクローナル抗体の収量は、脊椎動物(好ましくは、哺乳動物)宿主の腹膜腔への注入を含む種々の技術によって向上する。本発明の抗体は、改変を伴ってか、または改変を伴わずに使用され、そしてその抗体は、キメラ抗体(例えば、ヒト化マウス抗体)を含む。

20

【0081】

(I V. B o N T 中和抗体の改変)

(A. ファージディスプレイは抗体の親和性を増大させるために使用され得る)

より高い親和性の抗体を作製するために、結合 s c F v (例えば、表2、および／または表6、および／または表9および／または13)の配列に基づく変異 s c F v 遺伝子レパートリーが、作製され得、そしてファージの表面上に発現され得る。細菌に感染するウイルス(バクテリオファージまたはファージ)の表面上での抗体フラグメントの提示は、広範な親和性および動態特性を有するヒトまたは他の哺乳動物の抗体(例えば、s c F v)を産生することを可能にする。ファージの表面上に抗体フラグメントを提示する(ファージディスプレイ)ために、抗体フラグメント遺伝子は、ファージ表面タンパク質(例えば、p I I I)をコードする遺伝子中に挿入され、そして抗体フラグメント-p I I I 融合タンパク質は、そのファージ表面上に発現される(M c C a f f e r t y ら、(1990) N a t u r e、348:552-554; H o o g e n b o o m ら、(1991) N u c l e i c A c i d s R e s.、19:4133-4137)。

30

【0082】

上記ファージの表面上の抗体フラグメントは機能的であるので、抗原結合性抗体フラグメントを有するファージは、抗原親和性クロマトグラフィーによって、結合しないファージまたはより低い親和性のファージから分離され得る(M c C a f f e r t y ら、(1990) N a t u r e、348:552-554)。ファージの混合物は、アフィニティマトリックスに結合され得、結合しないファージまたはより低い親和性のファージは、洗浄することによって除去され、そして結合したファージは、酸またはアルカリを用いた処理によって溶出される。抗体フラグメントの親和性に依存して、20倍~1,000,000倍の濃縮係数が、単一のラウンドの親和性選択によって得られる。

40

【0083】

溶出したファージまたは下に記載されるような溶出したファージの改変された改変体を細菌に感染させることによって、より多くのファージが、増殖し得、そしてそのファージは、別のラウンドの選択に供され得る。この方法において、1ラウンドにおける1000倍の濃縮は、2ラウンドの選択において1,000,000倍になる(M c C a f f e r t y ら、(1990) N a t u r e、348:552-554)。したがって、各ラウンドにおける濃縮が低い場合でも、複数のラウンドの親和性選択は、稀なファージ、および結合性抗体の配列をコードする含まれる遺伝子材料の単離をもたらす(M a r k s ら、(

50

1991) J. Mol. Biol., 222:581-597)。ファージディスプレイによって提供される遺伝子型と表現型との間の物理的関連は、100,000,000クローン程度の大きさのライブラリーを用いた場合でさえ、抗原に対する結合について抗体フラグメントライブラリーの全てのメンバーを試験することを可能にする。例えば、抗原に対する複数のラウンドの選択の後、30,000,000クローンあたり1クロンのみの頻度で生じた結合性scFvは、回収された(I d.)。

【0084】

1) 鎖のシャッフリング

変異scFv遺伝子レパートリーを作製するための1つのアプローチは、結合性scFv由来のV_H遺伝子またはV_L遺伝子のいずれかをV_H遺伝子のレパートリーまたはV_L遺伝子のレパートリーで置換すること(鎖シャッフリング)を包含する(Clacksonら、(1991) Nature, 352:624-628)。このような遺伝子レパートリーは、結合性scFvと同じであるが、点変異を有する生殖系列遺伝子に由来する多くの変異する遺伝子を含む(Marksら、(1992) Bio/Technology, 10:779-783)。軽鎖シャッフリングまたは重鎖シャッフリングおよびファージディスプレイを使用して、例えば、BoNT/A1/BoNT/A2-中和抗体フラグメントの結合アビディティは、劇的に増大され得る(例えば、Marksら、(1992) Bio/Technology, 10:779-785 (ハプテンフェニルオキサゾロン(phox)を結合したヒトscFv抗体フラグメントの親和性が、300nMから15nM(20倍)に増大した)を参照のこと)。

【0085】

したがって、BoNT-中和抗体の親和性を変化させるために、公知のBoNT-中和抗体(例えば、CR1、RAZ1、ING1、ING2)のV_H遺伝子とV_L遺伝子レパートリー(軽鎖シャッフリング)とを含む変異scFv遺伝子レパートリーが、作製される。あるいは、公知のBoNT-中和抗体(例えば、CR1、RAZ1、ING1、ING2)のV_L遺伝子と、V_H遺伝子レパートリー(重鎖シャッフリング)とを含むscFv遺伝子レパートリーが、作製される。上記scFv遺伝子レパートリーは、ファージディスプレイベクター中にクローニングされ(例えば、pHEN-1、Hoogenboomら、(1991) Nucleic Acids Res., 19:4133-4137)、そして形質転換後に、形質転換体のライブラリーが、得られる。ファージは、調製および濃縮され、そして選択は、実施例に記載される通りに行われる。

【0086】

抗原の濃度は、選択の各ラウンドにおいて減少され、選択の最後のラウンドで所望のK_dより低い濃度に達する。これは、親和性に基づくファージの選択をもたらす(Hawkinsら、(1992) J. Mol. Biol., 226:889-896)。

【0087】

2) 位置指定突然変異誘発によるBoNT中和抗体の親和性の増大

抗原に接触するアミノ酸側鎖の大部分は、相補性決定領域(CDR)(V_Hにおいて3個(CDR1、CDR2、およびCDR3)およびV_Lにおいて3個(CDR1、CDR2、およびCDR3))に位置する(Chothiaら、(1987) J. Mol. Biol., 196:901-917; Chothiaら、(1986) Science, 233:755-8; Nhanら、(1991) J. Mol. Biol., 217:133-151)。これらの残基は、抗原に対する抗体の親和性を担う大部分の結合エネルギー論に寄与する。他の分子において、リガンドに接触するアミノ酸を変異させることは、1つのタンパク質分子の、その結合パートナーに対する親和性を増大させる有効な手段であることが、示されている(Lowmanら、(1993) J. Mol. Biol., 234:564-578; Wells(1990) Biochemistry, 29:8509-8516)。したがって、CDRの変異(ランダム化)、およびBoNT/A、BoNT/A_{H_C}または本明細書中で同定されるそれらのエピトープに対するスクリーニングは、改良された結合親和性を有するBoNT/A-中和抗体を産生するために使用され

得る。

【0088】

特定の実施形態において、各CDRは、例えば、テンプレートとしてS25 ($K_d = 7.3 \times 10^{-8} \text{ M}$)を使用して、別個のライブラリーにおいてランダム化される。親和性の測定を単純化するために、より高い親和性のscFvよりもむしろ、S25または他のより低い親和性のBoNT/A-中和抗体が、テンプレートとして使用される。各CDRライブラリー由来の最も高い親和性の変異体のCDR配列は、親和性の相加的な増大を得るために組み合わせられる。同様のアプローチは、ヒト成長ホルモン(hGH)の成長ホルモンレセプターに対する親和性を、増大(1500倍を上回る(3.4×10^{-10} から $9.0 \times 10^{-13} \text{ M}$))させるために使用されている(Lowmanら、(1993) J. Mol. Biol.、234:564-578)。

10

【0089】

BoNT-中和抗体の親和性を増大させるために、1個以上のCDRに位置するアミノ酸残基(例えば、V_L CDR3に位置する9個のアミノ酸残基)は、「混ぜられた(doped)」オリゴヌクレオチドを合成することによって部分的にランダム化され、このオリゴヌクレオチドにおいて、野生型ヌクレオチドが、例えば、49%の頻度で生じた。上記オリゴヌクレオチドは、BoNT-中和scFv遺伝子の残部を、PCRを用いて増幅するために使用される。

【0090】

例えば、1つの実施形態において、V_H CDR3がランダム化されるライブラリーを作製するために、BoNT-中和抗体のV_Hフレームワーク3にアニーリングし、そしてBoNT-中和抗体のV_H CDR3とフレームワーク4の一部とをコードするオリゴヌクレオチドが合成される。ランダム化される4つの位置において、配列NNsが、使用され得、Nは、任意の4個のヌクレオチドであり、そしてSは、「C」または「T」である。このオリゴヌクレオチドは、BoNT/A-中和抗体のV_H遺伝子を、PCRを使用して増幅するために使用され、このことは、変異BoNT-中和抗体V_H遺伝子レパートリーを作製する。PCRは、BoNT-中和抗体軽鎖遺伝子によってV_H遺伝子レパートリーをスプライシングするために使用され、そして得られたscFv遺伝子レパートリーは、ファージディスプレイベクター(例えば、pHEN-1またはpCANTAB5E)中にクローニングされる。ライゲーションされたベクターDNAは、エレクトロコンピテン

20

30

【0091】

より高い親和性の変異scFvを選択するために、ファージ抗体ライブラリーの選択の各ラウンドは、実施例に記載されるように、1種以上のBoNTサブタイプの漸減量に対して行なわれる。代表的に、選択の第3ラウンドおよび第4ラウンドから得た96個のクローンは、96ウェルプレートにおけるELISAによって、所望の抗原(例えば、BoNT/A1および/またはBoNT/A2)に対する結合についてスクリーニングされ得る。例えば、10ml培養において、例えば、20個~40個のELISAポジティブクローンからscFvが、発現され、ペリプラズムが、回収され、そしてscFvのk_{off}が、BIAcoreによって決定される。最も遅いk_{off}を有するクローンは、配列決定され、そしてそれぞれ固有のscFvは、適切なベクター(例えば、pUC119mycHis)中にサブクローニングされる。そのscFvは、培養において発現され、そして本明細書中に記載されるように精製される。精製されたscFvの親和性は、BIAcoreによって決定される。

40

【0092】

3) BoNT中和(scFv')₂ホモダイマーの作製

BoNT-中和(scFv')₂抗体を作製するために、2種のBoNT-中和scFvが、リンカー(例えば、炭素リンカー、ペプチドなど)または例えば、2つのシステインの間のジスルフィド結合のいずれかを介して連結される。したがって、例えば、ジスルフィド結合したBoNT/A-中和scFvを作製するために、システイン残基が、Bo

50

N T/A-中和 s c F v のカルボキシ末端における m y c タグとヘキサヒスチジンタグとの間の位置指定突然変異誘発によって導入され得る。正しい配列の導入は、DNA 配列決定によって検証される。好ましい実施形態において、上記構築物は、p e l B リーダーが発現した s c F v をペリプラズムに指向させ、かつ B o N T/A-中和変異 s c F v を導入するためのクローニング部位 (N c o l および N o t I) が存在するような p U C 1 1 9 中にある。発現した s c F v は、その C 末端に m y c タグを有し、その後ろに 2 個のグリシン、システイン、次いで I M A C による精製を容易にする 6 個のヒスチジンを有する。2 つのシステイン残基の間のジスルフィド結合の形成後、2 つの s c F v は、互いから 2 6 アミノ酸 (2 つの 1 1 アミノ酸の m y c タグおよび 4 個のグリシン) によって隔てられる。この構築物から発現され、I M A C によって精製された s c F v は、モノマーの s c F v を優勢に含み得る。(s c F v')₂ ダイマーを産生するために、そのシステインは、1 M M β-メルカプトエタノールと一緒にインキュベートすることによって還元され、そしてその s c F v の半分は、D T N B の添加によってブロックされる。ブロックされた s c F v およびブロックされていない s c F v は、一緒にインキュベートされて (s c F v')₂ を形成し、そして得られた物質は、必要に応じて、ゲル濾過によって分析され得る。B o N T-中和 s c F v' モノマーおよび B o N T-中和 (s c F v')₂ ダイマーの親和性は、必要に応じて、本明細書中に記載されるように B I A c o r e によって決定され得る。

10

【0093】

特に好ましい実施形態において、上記 (s c F v')₂ ダイマーは、リンカー (より好ましくは、ペプチドリンカー) を介して上記 s c F v フラグメントを連結することによって作製される。これは、当業者に周知の広範な種々の手段によって達成され得る。例えば、1 つの好ましいアプローチは、H o l l i g e r ら、(1993) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、90:6444-6448 によって記載される (W O 94/13804 もまた参照のこと)。

20

【0094】

代表的に、リンカーは、P C R クローニングによって導入される。例えば、5 アミノ酸のリンカー (G₄S、配列番号 4) をコードする合成オリゴヌクレオチドが、B o N T/A-中和抗体 V_H 遺伝子および B o N T/A-中和抗体 V_L 遺伝子を P C R 増幅するために使用され得、次いでこれらの遺伝子は、B o N T/A-中和ダイアボディ (d i a b o d y) 遺伝子を作製するために一緒にスプライシングされる。次いでこれらの遺伝子は、適切なベクター中にクローニングされ、発現され、そして当業者に周知の標準的な方法によって精製される。

30

【0095】

4) B o N T 中和 (s c F v)₂ 分子、B o N T 中和 F a b 分子、および B o N T 中和 (F a b')₂ 分子の調製

B o N T-中和抗体 (例えば、B o N T/A 1-A 2-中和 s c F v) またはより高い親和性を有する改変体は、サイズおよび価についての改変体を作製するのに適したテンプレートである。例えば、B o N T/A 1-A 2-中和 (s c F v')₂ は、上に記載されるような親 s c F v (例えば、C R 1、R A Z 1、I N G 1、I N G 2 など) から作製され得る。s c F v 遺伝子は、適切な制限酵素を使用して切除され得、そして本明細書中に記載されるような別のベクター中にクローニングされ得る。

40

【0096】

1 つの実施形態において、発現した s c F v は、その C 末端に m y c タグを有し、その後ろに 2 個のグリシン、システイン、次いで I M A C による精製を容易にする 6 個のヒスチジンを有する。2 つのシステイン残基の間のジスルフィド結合の形成後、2 つの s c F v は、互いから 2 6 アミノ酸 (2 つの 1 1 アミノ酸の m y c タグおよび 4 個のグリシン) によって隔てられるはずである。

【0097】

(s c F v')₂ ダイマーを産生するために、そのシステインは、1 m M β-メルカ

50

プトエタノールと一緒にインキュベートすることによって還元され、そしてその s c F v の半分は、D T N B の添加によってブロックされる。ブロックされた s c F v およびブロックされていない s c F v は、一緒にインキュベートされて (s c F v ')₂ を形成し、その (s c F v ')₂ は、精製される。より高い親和性の s c F v が単離される場合、それらの遺伝子は、同様に、(s c F v ')₂ を構築するために使用される。

【0098】

B o N T / A - 中和 F a b は、B e t t e r ら、(1 9 8 8) S c i e n c e 、 2 4 0 : 1 0 4 1 - 1 0 4 3 によって記載されるベクターと同様の発現ベクターを使用して、E . c o l i において発現される。B o N T / A - 中和 F a b を作製するために、その V_H 遺伝子および V_L 遺伝子は、P C R を使用して s c F v から増幅される。その V_H 遺伝子は、I g G C_H 1 ドメインを V_H 遺伝子の下流かつ V_H 遺伝子とインフレームで提供する発現ベクター（例えば、細菌発現ベクターに基づく P U C 1 1 9 ）中にクローニングされる。そのベクターはまた、l a c プロモーター、発現した V_H - C_H 1 ドメインをペリプラズムに指向させる p e l b リーダー配列、発現した軽鎖をペリプラズムに指向させる遺伝子 3 リーダー配列、および軽鎖遺伝子のためのクローニング部位を含む。正しい V_H 遺伝子を含むクローンは、例えば、P C R フィンガープリントによって同定される。上記 V_L 遺伝子は、P C R を使用して C_L 遺伝子に対してスプライシングされ、そして V_H C_H 1 遺伝子を含むベクター中にクローニングされる。

【0099】

(B . 中和抗体の選択)

好ましい実施形態において、B o N T - 中和抗体の選択（ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、免疫法、ハイブリドーマ技術などによって産生されたかにかかわらず）は、得られた抗体を、適切な抗原に対する特異的結合についてスクリーニングすることを包含する。簡単な場合において、適切な抗原としては、B o N T / A 1、B o N T / A 2、B o N T / A 3 H_C、B o N T 重鎖の C 末端ドメイン（結合ドメイン）、B o N T / A 3 ホロ毒素、または組換え B o N T ドメイン（例えば、H C（結合ドメイン）、H N（輸送ドメイン）、または L C（軽鎖））が挙げられるが、これらに限定されない。特に好ましい実施形態において、上記中和抗体は、1 種以上の本明細書中に記載される抗体によって認識されるエピトープの特異的結合に関して選択される。

【0100】

選択は、当業者に周知の多くの方法のうちのいずれかによるものであり得る。好ましい実施形態において、選択は、所望の標的（例えば、B o N T / A または B o N T / A H_C）に対する（例えば、イムノチューブ（M a x i s o r p、N u n c）を使用した）免疫クロマトグラフィーによるものである。別の実施形態において、選択は、表面プラズモン共鳴システム（例えば、B I A c o r e、P h a r m a c i a）単独、または 1 種以上の本明細書中に記載される抗体によって特異的に結合されるエピトープに結合する抗体との組み合わせのいずれかにおける、B o N T H_C に対するものである。選択はまた、酵母ディスプレイライブラリーに対してフローサイトメトリーを使用して行われ得る。1 つの好ましい実施形態において、酵母ディスプレイライブラリーは、B o N T / A の両方のサブタイプに高親和性で結合する抗体を得るために、最初に B o N T / A 1、次いで B o N T / A 2 に対して連続的に選択される。このことは、他のサブタイプについて繰り返され得る。

【0101】

ファージディスプレイに関して、結合の分析は、抗体フラグメント遺伝子と抗体フラグメント遺伝子 I I I との間にアンバーコドンを含めることによって単純化され得る。これは、単に宿主細菌株を変化させることによって、提示された抗体フラグメントと可溶性抗体フラグメントとの間で容易に切り換えることを可能にする。ファージが E . c o l i の s u p E サプレッサ株中で増殖される場合、抗体遺伝子と抗体遺伝子 I I I との間のアンバー終止コドンは、グルタミンとして読み取られ、そして抗体フラグメントは、ファージの表面上に提示される。溶出したファージが非サプレッサ株に感染させるために使用され

10

20

30

40

50

る場合、上記アンバーコドンは、終止コドンとして読み取られ、そして可溶性抗体は、その細菌からペリプラズムおよび培養培地中に分泌される (H o o g e n b o o m ら、(1991) N u c l e i c A c i d s R e s .、19:4133-4137)。抗原に対する可溶性 s c F v の結合は、E L I S A (例えば、その s c F v における C 末端の m y c ペプチドタグを認識するマウス I g G モノクローナル抗体 (例えば、9 E 1 0) を使用し、例えば、次いで検出可能な標識 (例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ) と結合体化したポリクローナル抗マウス F c と一緒にインキュベートする) によって、検出される (E v a n ら、(1985) M o l . C e l l B i o l .、5:3610-3616; M u n r o ら、(1986) C e l l、46:291-300)。

【0102】

上に示されるように、B o N T-中和抗体の精製は、s c F v 遺伝子を、その s c F v の C 末端の端における m y c ペプチドタグ (その後にヘキサヒスチジンタグを伴う) の付加を生じる発現ベクター (例えば、発現ベクター p U C 1 1 9 m y c H I S) 中にクローニングすることによって容易にされ得る。上記ベクターはまた、好ましくは、上記 s c F v の発現を細菌のペリプラズム (リーダー配列が、切断される) に指向させるペクチン酸リアーゼリーダー配列をコードする。これは、ネイティブの適切に折り畳まれた s c F v を細菌のペリプラズムから直接回収することを可能にする。次いで上記 B o N T-中和抗体は、発現され、そして固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを使用して細菌の上清から精製される。

【0103】

(C. 1 種以上の B o N T サブタイプに対する B o N T 中和抗体の親和性の増大)

上で説明される通り、増大したアビディティについての選択は、目的とする 1 種以上の標的 (例えば、B o N T / A サブタイプまたはそのドメイン (例えば、H c または他のエピトープ) に対する B o N T-中和抗体 (または改変された B o N T-中和抗体) の親和性を測定することを包含する。このような測定を行なう方法は、本明細書中に提供される実施例において詳細に記載される。簡潔には、例えば、B o N T / A-中和抗体の K_d および B o N T / A に対する結合の動態は、B I A c o r e (表面プラズモン共鳴に基づくバイオセンサー) において決定される。この技術に関して、抗原は、質量における変化を検出し得る誘導体化されたセンサーチップにカップリングされる。抗体が上記センサーチップ上に通される場合、抗体は、定量可能である質量の増加を生じる抗原に結合する。抗体濃度の関数としての会合速度の測定が、会合速度定数 (k_{on}) を計算する為に使用され得る。会合相の後、緩衝液が、上記チップ上に通され、そして抗体の解離の速度 (k_{off}) が決定される。 K_{on} は、代表的に、 $1.0 \times 10^2 \sim 5.0 \times 10^6$ の範囲で測定され、そして k_{off} は、 $1.0 \times 10^{-1} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ の範囲で測定される。次いで平衡定数 K_d が、 k_{off} / k_{on} として算出され、したがって平衡定数 K_d は、代表的に、 $10^{-5} \sim 10^{-12}$ の範囲で測定される。この様式で測定された親和性は、蛍光消光滴定によって溶液において測定された親和性と良好に相関する。

【0104】

ファージディスプレイおよび選択は、一般に、より高い親和性の変異 s c F v の選択をもたらす (M a r k s ら、(1992) B i o / T e c h n o l o g y、10:779-783; H a w k i n s ら、(1992) J. M o l. B i o l. 226:889-896; R i e c h m a n n ら、(1993) B i o c h e m i s t r y、32:8848-8855; C l a c k s o n ら、(1991) N a t u r e、352:624-628) が、それらは恐らく、親和性において 6 倍未満の差を有する変異体の分離をもたらさない (R i e c h m a n n ら、(1993) B i o c h e m i s t r y、32:8848-8855)。したがって、迅速な方法、選択後に単離された変異 s c F v の相対的親和性を推定するために必要とされる。増大した親和性は、主に k_{off} の減少から生じるので、 k_{off} の測定は、より高い親和性の s c F v を同定するはずである。 k_{off} は、細菌のペリプラズム中の精製されていない s c F v に対する B I A c o r e において測定され得る。なぜなら発現レベルは、適当な結合シグナルを与えるのに十分高く、そして k_{off}

k_{ff} は、濃度とは無関係であるからである。ペリプラズムの s c F v と精製された s c F v とについての k_{ff} の値は、代表的に、ほぼ一致する。

【0105】

(V. ヒト抗体またはヒト化 (キメラ) 抗体の産生)

上に示されるように、本発明の B o N T ー中和抗体は、治療目的 (例えば、ボツリヌス中毒の処置) のために、生物体 (例えば、ヒト患者) に投与され得る。それらが惹起された種以外の生物体に投与された抗体は、免疫原性であり得る。したがって、例えば、ヒトに繰り返し投与されたマウス抗体は、しばしばその抗体に対する免疫学的応答 (例えば、ヒト抗マウス抗体 (H A M A) 応答) を誘導する。これは、代表的に、それらの抗体が繰り返し利用されないので、本発明の非ヒト抗体に関して問題ではないが、その抗体の免疫原特性は、その抗体の一部または全部を、特徴的に、ヒト配列へと変え、それによってそれぞれキメラ抗体またはヒト抗体を産生することによって減少される。

【0106】

(A. キメラ抗体)

キメラ抗体は、ヒト部分と非ヒト部分とを含む免疫グロブリン分子である。より具体的に、キメラ抗体の抗原結合領域 (または可変領域) は、非ヒト供給源 (例えば、マウス) に由来し、そして (生物学的エフェクター機能を免疫グロブリンに与える) そのキメラ抗体の定常領域は、ヒト供給源に由来する。上記キメラ抗体は、非ヒト抗体分子の抗原結合特異性とヒト抗体分子によって与えられるエフェクター機能とを有するべきである。抗体をもたらす多数の方法は、当業者に周知である (例えば、米港特許第 5, 502, 167 号、同第 5, 500, 362 号、同第 5, 491, 088 号、同第 5, 482, 856 号、同第 5, 472, 693 号、同第 5, 354, 847 号、同第 5, 292, 867 号、同第 5, 231, 026 号、同第 5, 204, 244 号、同第 5, 202, 238 号、同第 5, 169, 939 号、同第 5, 081, 235 号、同第 5, 075, 431 号、および同第 4, 975, 369 号を参照のこと)。

【0107】

一般に、キメラ抗体を産生するために使用される手順は、以下の工程 (いくつかの工程の順序は、交換され得る) からなる: (a) 抗体分子の抗原結合部分をコードする正しい遺伝子セグメントを同定およびクローニングする工程; この遺伝子セグメント (V D J として公知の、重鎖についての可変性であり、多様性であり、そして連結性の領域、または V J、軽鎖についての可変性であり、結合性である領域 (あるいは単純に V 領域または可変領域)) は、c D N A 形態またはゲノム形態のいずれかであり得る; (b) 定常領域またはその所望の部分をコードする遺伝子セグメントをクローニングする工程; (c) 完全なキメラ抗体が転写可能な形態および翻訳可能な形態でコードされるように、可変領域をその定常領域にライゲーションする工程; (d) この構築物を、選択マーカーおよび遺伝子制御領域 (例えば、プロモーター、エンハンサーおよびポリ (A) 付加シグナル) を含むベクター中にライゲーションする工程; (e) 宿主細胞 (例えば、細菌) 中でこの構築物を増幅する工程; (f) その D N A を真核生物細胞 (ほとんどの場合、哺乳動物のリンパ球) 中に導入する工程 (トランスフェクション); ならびにキメラ抗体の発現に適した条件下で宿主細胞を培養する工程。

【0108】

いくつかの異なる抗原結合特異性の抗体は、キメラタンパク質を産生するためにこれらのプロトコルによって操作された (例えば、抗 T N P : B o u l i a n n e ら、(1984) N a t u r e、312:643; および抗腫瘍抗原: S a h a g a n ら、(1986) J. I m m u n o l.、137:1066)。同様に、数種の異なるエフェクター機能は、新しい配列をその抗原結合領域をコードする配列に結合することによって達成された。これらのうちのいくつかは、酵素 (N e u b e r g e r ら、(1984) N a t u r e 312:604)、別の種由来の免疫グロブリン定常領域、および別の免疫グロブリン鎖の定常領域 (S h a r o n ら、(1984) N a t u r e 309:364; T a n ら、(1985) J. I m m u n o l. 135:3565-3567) を含む。

【0109】

1つの好ましい実施形態において、組換えDNAベクターは、B o N T / A -中和抗体を産生する細胞株をトランスフェクトするために使用される。新規の組換えDNAベクターは、上記細胞株において免疫グロブリン定常領域をコードする遺伝子の全部または一部を置換するために「置換遺伝子」（例えば、置換遺伝子は、ヒト免疫グロブリンの定常領域、特定の免疫グロブリンのクラス、または酵素、毒素、生物学的に活性なペプチド、増殖因子、インヒビター、または薬物、毒素、もしくは他の分子などへの結合体化を容易にするリンカーペプチドの全部あるいは一部をコードし得る）、および抗体産生細胞内での免疫グロブリン配列に関する標的化された相同組換えを可能にする「標的配列」を含む。

【0110】

別の実施形態において、組換えDNAベクターは、所望のエフェクター機能（例えば、ヒト免疫グロブリンの定常領域）を有する抗体を産生する細胞株をトランスフェクトするために使用され、この場合において、その組換えベクター中に含まれる置換遺伝子は、B o N T / A -中和抗体の領域の全部または一部をコードし得、そして組換えベクター中に含まれる標的配列は、抗体産生細胞内での相同組換えおよび標的化された遺伝子改変を可能にする。いずれかの実施形態において、可変領域または定常領域の一部のみが置換される場合、得られたキメラ抗体は、同じ抗原を規定し得、そして／あるいは変更または改良されたにもかかわらず同じエフェクター機能を有し、その結果、そのキメラ抗体は、より大きい抗原特異性、より大きい親和性結合定数、増大したエフェクター機能、またはトランスフェクトされた抗体産生細胞株による増大した分泌および産生などを示し得る。

【0111】

実施される実施形態に関係なく、（選択マーカーによる）組み込まれたDNAについての選択の工程、キメラ抗体産生についてのスクリーニングの工程、および細胞クローニングの工程は、そのキメラ抗体を産生する細胞のクローンを得るために使用され得る。

【0112】

したがって、モノクローナル抗体に対する改変をコードするDNAの一部は、B細胞株またはハイブリドーマ細胞株内で、発現される免疫グロブリン遺伝子の部位を直接的に標的化し得る。任意の特定の改変についてのDNA構築物は、任意のモノクローナル細胞株またはハイブリドーマのタンパク質産物を変化させるために使用され得る。このような手順は、重鎖可変領域遺伝子および軽鎖可変領域遺伝子の両方を、有用な抗原特異性を発現する各B細胞クローンからクローニングするという、コストと時間の掛かる作業を回避する。可変領域遺伝子をクローニングする工程を回避することに加えて、キメラ抗体の発現のレベルは、その遺伝子が、ランダムな位置にある場合よりもむしろ、その天然の染色体の場所にある場合に、より高いはずである。キメラ（ヒト化）抗体の調製のための詳細な方法は、米国特許第5, 482, 856号に見出され得る。

【0113】

（B. ヒト抗体およびヒト化抗体）

別の実施形態において、本発明は、ヒト化抗B o N T -中和抗体または完全ヒト抗B o N T -中和抗体（例えば、H u C 2 5、R A Z 1、C R 1、I N G 1、I N G 2など）を提供する。ヒト抗体は、全体的に、特徴としてヒトポリペプチド配列からなる。本発明のヒトB o N T -中和抗体は、広範な種々の方法を使用して産生され得る（概説については、例えば、L a r r i c kら、米国特許第5, 001, 065号を参照のこと）。

【0114】

特定の好ましい実施形態において、本発明の完全ヒトs c F v抗体は、完全ヒト単鎖（例えば、s c F v）ライブラリーの改変およびスクリーニングによって得られる。したがって、特定の実施形態において、完全ヒト抗体は、本明細書中に記載されるようなファージディスプレイ法および／または酵母ディスプレイ法を使用して産生される。完全ヒト遺伝子ライブラリーを産生する方法は、当業者に周知である（例えば、V a u g h nら、（1996）N a t u r e B i o t e c h n o l o g y、14（3）：309-314、M a r k sら、（1991）J. M o l. B i o l.、222：581-597、および

10

20

30

40

50

PCT/US96/10287を参照のこと）。

【0115】

別の実施形態において、本発明のヒトB o N Tー中和抗体は、トリオーマ細胞において産生され得る。次いで上記抗体をコードする遺伝子は、クローニングされ、そして他の細胞（特に、非ヒト哺乳動物細胞）において発現される。

【0116】

トリオーマ技術によってヒト抗体を産生するための一般的アプローチは、O s t b e r gら、(1983) H y b r i d o m a 2:361-367; O s t b e r g、米国特許第4,634,664号;およびE n g e l m a nら、米国特許第4,634,666号によって記載されている。この方法によって得られた抗体産生細胞株は、トリオーマと称される。なぜならそれらは、3種の細胞;2種のヒト細胞および1種のマウス細胞に由来するからである。トリオーマは、ヒト細胞から作製された通常のハイブリドーマよりも安定に抗体を産生することが見出されている。

【0117】

トリオーマ細胞の調製は、最初に、マウス骨髄腫細胞株と免疫化されていないヒト末梢Bリンパ球との融合を必要とする。この融合は、ヒト染色体およびマウス染色体の両方を含む外因性ハイブリドーマ細胞をもたらす(E n g e l m a n、前出を参照のこと)。抗体を分泌する能力を失った外因性細胞が、選択される。好ましくは、8-アザグアニンに耐性である外因性細胞が、選択される。このような細胞は、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン(H A T)培地またはアザセリン-ヒポキサンチン(A H)培地において増殖できない。

【0118】

抗体を分泌する能力は、上記外因性細胞と、B o N Tポリペプチド(例えば、B o N T/A、B o N T/A H_c、B o N T/A下位配列(本明細書中に記載される抗体によって特異的に結合されるエピトープを含む下位配列などが挙げられるが、これらに限定されない))に対して免疫化されたBリンパ球との間のさらなる融合によって与えられる。上記Bリンパ球は、ヒトドナーの脾臓、血液またはリンパ節から得られる。特定の抗原またはエピトープに対する抗体が所望される場合、免疫原として、ポリペプチド全体よりもむしろ抗原またはそのエピトープを使用することが、好ましい。あるいは、Bリンパ球は、免疫化されていない個体から得られ、そしてそのBリンパ球は、インビトロでB o N Tポリペプチド、またはそのエピトープによって刺激される。さらなるバリエーションにおいて、Bリンパ球は、感染した個体、またはそうでなければ免疫化された個体から得られ、次いでBリンパ球は、約7日間~14日間にわたるB o N Tポリペプチドに対する曝露によってインビトロで超免疫化される。

【0119】

上記手順のうちの1つによって調製された免疫化されたBリンパ球は、周知の方法によって外因性ハイブリッド細胞と融合される。例えば、その細胞は、40~50%のM W 1000~4000のポリエチレングリコールによって約37℃にて約5~10分間処理される。細胞は、上記融合混合物から分離され、そして所望のハイブリッドに対して選択的な培地中で増殖される。上記外因性ハイブリッド細胞が8-アザグアニンに対して耐性である場合、不死化トリオーマ細胞は、H A T培地またはA H培地における継代によって簡便に選択される。他の選択手順は、当然に、融合に使用された細胞の性質に依存して可能である。必要とされる結合特異性を有する抗体を分泌するクローンは、B o N Tポリペプチドまたはそのエピトープに結合する能力について、トリオーマ培養培地をアッセイすることによって同定される。所望の特異性を有するヒト抗体を産生するトリオーマは、限界希釈技術によってサブクローニングされ、そしてそのトリオーマは、培養培地中でインビトロで増殖されるか、または選択された宿主動物中に注射され、そしてインビボで増殖される。

【0120】

次いで得られたトリオーマ細胞株は、B o N Tポリペプチドまたはそのエピトープを結

合する能力について試験される。抗体は、得られた培養培地または体液から、従来の抗体分別手順（例えば、硫酸アンモニウム沈殿、DEAEセルロースクロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィー）によって分離される。

【0121】

トリオーマは、遺伝的に安定であるが、それらは、非常に高いレベルで抗体を産生しない。発現レベルは、そのトリオーマ由来の抗体遺伝子を1つ以上の発現ベクター中にクローニングし、そしてそのベクターを、細胞株（例えば、組換え免疫グロブリンまたはヒト化免疫グロブリンの発現に代表的に使用される細胞株）に形質転換することによって増大し得る。抗体の収量の増加とともに、この戦略は、免疫グロブリンが、ヒトの成分を有ず、それによってヒト細胞株のために必要とされる特に大規模なウイルススクリーニングに供される必要がない細胞株から得られるというさらなる利点を提供する。

10

【0122】

トリオーマ細胞株によって分泌される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をコードする遺伝子は、当該分野で公知であるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が挙げられるが、これに限定されない方法によってクローニングされる（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor, N. Y.、1989；BergerおよびKimmel、Methods in Enzymology、第152巻：Guide to Molecular Cloning Techniques、Academic Press, Inc.、San Diego, Calif.、1987；Coら、（1992）J. Immunol.、148：1149を参照のこと）。例えば、重鎖および軽鎖をコードする遺伝子は、トリオーマのゲノムDNAまたは上記トリオーマのRNAの逆転写によって産生されたcDNAからクローニングされる。クローニングは、クローニングされるべき遺伝子もしくは遺伝子のセグメントと隣接（flank）するかまたは重複する配列とハイブリダイズする、PCRプライマーの使用を含む従来の技術によって達成される。

20

【0123】

代表的に、組換え構築物は、トリオーマ細胞株によって発現される免疫グロブリンの完全なヒト免疫グロブリン重鎖および／または完全なヒト免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAセグメントを含む。あるいは、一次抗体遺伝子の一部のみをコードするDNAセグメントが、産生され、その部分は、結合活性および／またはエフェクター活性を有する。他の組換え構築物は、他の免疫グロブリン遺伝子のセグメント（特に、他のヒト定常領域配列（重鎖および／または軽鎖）のセグメント）に融合されたトリオーマ細胞株免疫グロブリン遺伝子のセグメントを含む。ヒト定常領域配列は、種々の参照供給源から選択され得、その供給源としては、Kabatら、（1987）Sequences of Proteins of Immunological Interest、U. S. Department of Health and Human Servicesに列挙される供給源が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0124】

BONT/A-中和免疫グロブリンまたはそのフラグメントをコードするDNAセグメントに加えて、他の実質的に同種の改変された免疫グロブリンは、当業者に公知の種々の組換えDNA技術（例えば、位置指定突然変異誘発）を利用して容易に設計および製造され得る（GillmanおよびSmith、（1979）Gene、8：81-97；Robertsら、（1987）Nature 328：731-734）。このような改変されたセグメントは、通常、抗原結合能および／またはエフェクター機能を保持する。さらに、上記改変されたセグメントは、通常、ストリンジェントな条件下でこれらの配列に対するハイブリダイゼーションを妨げるために、本来のトリオーマゲノム配列からそれほど違わずに変えられる。なぜならば、多くの遺伝子のように、免疫グロブリン遺伝子は、分離した機能的領域（各々が、1つ以上の異なる生物学的活性を有する）を含み、その遺伝子は、新規の特性または特性の新規の組み合わせを有する融合タンパク質（例えば、

40

50

免疫毒素)を産生するために、他の遺伝子由来の機能的領域に融合され得る。

【0125】

上記ゲノム配列は、本明細書中に記載されるような標準的な方法によってクローニングおよび発現され得る。

【0126】

抗体産生のための他のアプローチは、ヒト血液のインビトロでの免疫化を含む。このアプローチにおいて、ヒト抗体を産生し得るヒト血液リンパ球が、産生される。ヒト末梢血液が、患者から収集され、そしてそのヒト末梢血液は、単核細胞を回収するために処理される。次いでサプレッサT細胞が、除去され、そして残りの細胞は、組織培養培地に懸濁され、その組織培養培地は、抗原および自己血清、ならびに好ましくは、非特異的なリンパ球活性化因子を添加される。次いで細胞は、それらが所望の特異的抗体を産生するような時間の期間にわたってインキュベートされる。次いで細胞は、その細胞株を不死化し、それによって抗体の継続的な産生を可能にするためにヒト骨髓腫細胞に融合され得る(米国特許第4,716,111号を参照のこと)。

【0127】

別のアプローチにおいて、ヒトB o N T-中和抗体を産生するマウス-ヒトハイブリドーマが、調製される(例えば、米国特許第5,506,132号を参照のこと)。他のアプローチとしては、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するように形質転換されたマウスの免疫化、およびファージディスプレイのスクリーニングが挙げられる(V a u g h a nら、前出)。

【0128】

(V I. 中和エпитープにおける交差反応性についてのアッセイ)

好ましい実施形態において、本発明の抗体は、本明細書中に記載される抗体(例えば、S 2 5、C 2 5、C 3 9、1 C 6、1 F 3、C R 1、3 D 1 2、R A Z 1、I N G 1、I N G 2など)によって認識される1種以上のエпитープに特異的に結合する。換言すれば、特に好ましい抗体は、これらの抗体のうちの1種以上と交差反応性である。交差反応性についてアッセイする手段は、当業者に周知である(例えば、D o w b e n k oら、(1988) J. V i r o l. 62:4703-4711を参照のこと)。

【0129】

これは、固体支持体に結合した1種以上の単離された標的B o N Tポリペプチド(例えば、B o N T/A 1および/またはB o N T/A 2、またはその毒素の組換えドメイン(例えば、H_c))を提供し、そして標的B o N Tペプチドに対する結合について、試験抗体の、例えば、S 2 5、C 2 5、C 3 9、1 C 6、1 F 3、C R 1、3 D 1 2、R A Z 1、I N G 1、および/またはI N G 2などと競合する能力をアッセイすることによって確認され得る。したがって、競合結合形式のイムノアッセイは、好ましくは、交差反応性の決定のために使用される。例えば、1つの実施形態において、B o N T/A 1および/またはB o N T/A 2 H_cポリペプチドは、固体支持体に固定化される。上記アッセイに加えられる試験されるべき抗体(例えば、ファージディスプレイライブラリーからの選択によってもたらされる)は、S 2 5、C 2 5、C 3 9、1 C 6、1 F 3、C R 1、3 D 1 2、R A Z 1、I N G 1、I N G 2などの、固定化されたB o N Tポリペプチドに結合する抗体と競合する。上記固定化されたタンパク質に対するS 2 5、C 2 5、C 3 9、1 C 6、1 F 3、C R 1、3 D 1 2、R A Z 1、I N G 1、および/またはI N G 2などの抗体の結合と競合する試験抗体の能力が、比較される。次いで上記タンパク質の交差反応性の%が、標準的な計算法を使用して算出される。

【0130】

試験抗体が、S 2 5、C 2 5、C 3 9、1 C 6、1 F 3、C R 1、3 D 1 2、R A Z 1、I N G 1、および/またはI N G 2などの抗体のうちの1種以上と競合し、そして約 1×10^{-8} Mに匹敵するかまたはそれ以上の、同じ標的との結合親和性を有する場合、その試験抗体は、B o N T-中和抗体であると予想される。

【0131】

特に好ましい実施形態において、交差反応性は、B I A c o r eにおいて表面プラズモン共鳴を使用して行なわれる。B l A c o r eフローセルにおいて、上記B o N Tポリペプチド（例えば、B o N T / A 1および／またはB o N T / A 2 H_c）は、実施例に記載されるようなセンサーチップ（例えば、C M 5）にカップリングされる。5 μ l / 分の流速を用いて、1 0 0 n M ~ 1 μ Mの抗体の滴定が、ほぼ飽和した表面を生じる抗体濃度を決定するために、約5分間にわたってフローセル表面上に注入される。次いでエピトープマッピングまたは交差反応性が、完全に近い飽和および少なくとも1 0 0 R Uの結合された抗体を生じる濃度にて、抗体の対を使用して評価される。結合された抗体の量は、対の各メンバーについて決定され、次いでその2種の抗体は、個々の抗体の測定のために使用された濃度と等しい最終濃度を与えるように一緒に混合される。異なるエピトープを認識する抗体は、一緒に注入された場合に、R U結合において本質的に相加的な増加を示す一方で、同一のエピトープを認識する抗体は、R Uの最小限の増加のみを示す（実施例を参照のこと）。特に好ましい実施形態において、抗体は、一緒に「注入された」ときに、それらが本質的に相加的な増加（好ましくは、少なくとも約1.4の因数による増加、より好ましくは、少なくとも約1.6の因数による増加、および最も好ましくは、少なくとも約1.8または2の因数による増加）を示す場合、交差反応性であるといわれる。

10

【0132】

所望のエピトープにおける交差反応性は、多くの他の標準的な技術によって確認され得る（例えば、G e y s e n ら、(1987) J. Immunol. Meth. 102, 259-274を参照のこと）。この技術は、多数の重複するB o N Tペプチドの合成を包

20

【0133】

エピトープマッピングのためのペプチドは、「マルチピン (M u l t i p i n)」ペプチド合成技術を使用して好都合に調製され得る（例えば、G e y s e n ら (1987)、S c i e n c e、235:1184-1190）。1種以上のB o N Tサブタイプの公知の配列（例えば、A t a s s i ら、(1996) J. Prot. Chem.、7:691-700およびその中に引用される参考文献を参照のこと）を使用して、重複するB o N Tポリペプチド配列は、1つ以上の96ウェル微量試験プレートのアレイ中のプラスチックピン上に、連続的な様式で個別に合成され得る。

30

【0134】

このマルチピンペプチドシステムを使用したエピトープマッピングのための手段は、米国特許第5,739,306号に記載される。簡潔には、上記ピンは、最初に、P B S中に2%のウシ血清アルブミンおよび0.1%のT w e e n 20を含むプレコーティング緩衝液を用いて、室温にて1時間処理される。次いで上記ピンは、プレコーティング緩衝液中の抗体（例えば、2 μ g / m l）を含む96ウェル微量試験プレートの個々のウェルに挿入される。インキュベーションは、好ましくは、室温にて約1時間である。上記ピンは、P B S T中で洗浄（例えば、10分間ごとに3回のリンス）され、次いで1:4, 000希釈にて100 μ lのH R P結合体化ヤギ抗マウスI g G (F c) (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s)を含む96ウェル微量試験プレートのウェル中で、室温にて1時間インキュベートされる。上記のようにピンが洗浄された後、そのピンは、呈色反応のために、ジアンモニウム2,2'-アジノービス[3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホネート] (A B T S) とH₂O₂とのペルオキシダーゼ基質溶液 (K i r k e g a a r d & P e r r y L a b o r a t o r i e s I n c.、G a i t h e r s b u r g、M d.)を含むウェル中に室温にて30分間置かれる。そのプレートは、492 nmのバックグラウンド吸収波長に対して、405 nmにてプレートリーダー（例えば、B i o T e k E L I S Aプレートリーダー）によって

40

50

読み取られる。発色を示すウェルは、S 2 5 抗体、C 2 5 抗体、C 3 9 抗体、1 C 6 抗体、または 1 F 3 抗体を含むこのようなウェルにおける B o N T / A H_C ペプチドの反応性を示した。

【0135】

(V I I . 抗 B o N T 抗体の中和活性についてのアッセイ)

本発明の好ましい抗体は、ボツリヌス神経毒素 A 型の毒性を中和（減少または排除）するために、個別かまたは組み合わせで作用する。中和は、インビボまたはインビトロで評価され得る。インビボ中和測定は、単純に、B o N T 神経毒素の投与に起因する死亡率（例えば、L D₅₀ または他の標準的な測定基準）における、中和活性について試験される 1 種以上の抗体の存在に起因する変化を測定することを包含する。上記神経毒素は、試験生物体（例えば、マウス）に直接投与され得るか、またはその生物体は、ボツリヌス中毒感染を有し得る（例えば、C l o s t r i d i u m b o t u l i n u m に感染する）。上記抗体は、B o N T 神経毒素の感染もしくは試験動物の感染の前、その間、またはその後投与され得る。進行の速度、または死亡率の減少は、上記抗体が中和活性を有すること示す。

10

【0136】

中和活性についての 1 つの適切なインビトロアッセイは、片側横隔膜調製物を用いる（D e s h p a n d e ら、（1995）T o x i c o n、33:551-557）。簡潔には、左右の横隔神経の片側横隔膜調製物は、生理的溶液中に懸濁され、そして一定温度（例えば、36℃）に維持される。横隔神経は、（例えば、0.2ms 持続時間の四角波で 0.05Hz にて）超最大に刺激される。等尺性単収縮張力が、チャートレコーダーに接続された力変位変換器（例えば、G r a s s M o d e l F T 0 3）によって測定される。

20

【0137】

精製された抗体は、精製された B o N T（例えば、B o N T / A 1、B o N T / A 2、B o N T / B など）と一緒に室温にて 30 分間インキュベートされ、次いで組織のバス（t i s s u e b a t h）に添加され、約 2.0×10^{-8} M の抗体最終濃度および約 2.0×10^{-11} M の B o N T 最終濃度を生じる。研究された各抗体について、50% の単収縮張力減少までの時間が、決定される（例えば、B o N T 単独に対して 3 回および抗体 + B o N T に対して 3 回）。所定（a r b i t r a r y）の %（例えば、50%）単収縮の減少までの時間の間の差が、標準的なレベルの有意性（例えば、0.05 未満の P 値が、有意と見なされる）における標準的な統計分析（例えば、両側 t 検定）によって決定される。

30

【0138】

(V I I I . 診断アッセイ)

上で説明されるように、本発明の抗 B o N T 抗体は、B o N T 毒素（例えば、B o N T / A 1 毒素）のインビボ検出またはインビトロ検出に使用され得、したがって、本発明の抗 B o N T 抗体は、ボツリヌス中毒の診断（例えば、確認診断）において有用である。生物体から得られた生物学的サンプル中の B o N T の検出および／または定量は、その生物体の C l o s t r i d i u m b o t u l i n u m 感染を示す。

40

【0139】

B o N T 抗原は、患者から得られた生物学的サンプル（例えば、細胞）、または患者から得られた組織サンプルにおいて定量され得る。本明細書中で使用される場合、生物学的サンプルは、B o N T 濃度を含む生物学的組織または生物学的流体のサンプルであり、その B o N T 濃度は、C l o s t r i d i u m b o t u l i n u m 感染と相関し得、そして C l o s t r i d i u m b o t u l i n u m 感染を示し得る。好ましい生物学的サンプルとしては、血液、尿、唾液、および組織生検が挙げられる。

【0140】

上記サンプルは、代表的に、ヒト患者から採取されるが、上記アッセイは、一般には哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシおよびブタ）、ならびに最も具体的には霊長

50

類（例えば、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、マカク、およびヒヒ）およびげっ歯類（例えば、マウス、ラット、およびモルモット）に由来する細胞中の B o N T 抗原を検出するために使用され得る。

【0141】

組織サンプルまたは流体サンプルは、当業者に周知の標準的な方法（最も代表的には、生検または静脈穿刺）によって患者から単離される。上記サンプルは、必要に応じて、適切な緩衝溶液中に希釈することによって前処理（必要な場合）されるか、または濃縮される（所望される場合）。種々の緩衝剤（例えば、リン酸塩、T r i s など）のうちの1つを生理的 pH において用いる任意の多くの標準的な緩衝水溶液が、使用され得る。

【0142】

（A. 免疫学的結合アッセイ）

B o N T ポリペプチド（例えば、B o N T / A 1、B o N T / A 2 など）は、本発明の抗 B o N A 抗体のうちの1種以上をその B o N T ポリペプチドに特異的に結合する捕捉因子として利用するイムノアッセイにおいて検出され得る。

【0143】

本明細書中で使用される場合、イムノアッセイは、分析物（例えば、B o N T / A）を特異的に結合する抗体（例えば、B o N T / A-中和抗体）を利用するアッセイである。上記イムノアッセイは、他の物理的特性または化学的特性とは対照的に標的（例えば、1種以上の B o N T / A サブタイプ）に対する1種以上の抗 B o N T 抗体の結合によって特徴付けられて、その B o N T 分析物を単離し、標的とし、そして定量する。

【0144】

B o N T マーカーは、多くの十分に認識される任意の免疫学的結合アッセイ（例えば、米国特許第4,366,241号；同第4,376,110号；同第4,517,288号；および同第4,837,168号などを参照のこと）を使用して、検出および定量され得る。一般的なイムノアッセイの概説については、Methods in Cell Biology 第37巻：Antibodies in Cell Biology、Asai編、Academic Press, Inc. New York (1993)；Basic and Clinical Immunology 第7版、Stites および Terr 編、(1991)も参照のこと。

【0145】

本発明のイムノアッセイは、任意の多くの構成において行われ得る（例えば、Maggio (編) (1980) Enzyme Immunoassay CRC Press, Boca Raton, Florida; Tijan (1985) 「Practice and Theory of Enzyme Immunoassays」、Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology、Elsevier Science Publishers B. V.、Amsterdam; Harlow および Lane、前出；Chan (編)、(1987) Immunoassay: A Practical Guide Academic Press, Orlando, FL; Price および Newman (編)、(1991) Principles and Practice of Immunoassays Stockton Press, NY; ならびに Ngo (編)、(1988) Non isotopic Immunoassays Plenum Press, NY に概説されるものを参照のこと）。

【0146】

イムノアッセイは、しばしば、捕捉因子と分析物とによって形成された結合性複合体（例えば、B o N T / A-中和抗体 / B o N T / A 複合体）に特異的に結合し、そしてそれを標識する標識因子を利用する。上記標識因子は、それ自体、抗体 / 分析物複合体を含む部分の1つであり得る。したがって、例えば、上記標識因子は、標識された B o N T / A ポリペプチドまたは標識された抗 B o N T / A 抗体であり得る。あるいは、上記標識因子は、必要に応じて、B o N T 抗体、B o N T ペプチド、抗体 / ポリペプチド複合体、ま

10

20

30

40

50

たはB o N Tポリペプチドもしくは抗B o N T抗体に共有結合される改変された捕捉基（例えば、ビオチン）に特異的に結合する第3の部分（例えば、別の抗体）である。

【0147】

1つの実施形態において、上記標識因子は、抗B o N T抗体に特異的に結合する抗体である。このような因子は、当業者に周知であり、そしてこの因子は、最も代表的に、抗B o N T抗体が得られる特定の動物種の抗体を特異的に結合する標識された抗体（例えば、抗種抗体）を含む。したがって、例えば、上記捕捉因子がヒト由来のB o N T/Aー中和抗体である場合、上記標識因子は、マウス抗ヒトIgG（すなわち、ヒト抗体の定常領域に特異的な抗体）であり得る。

【0148】

免疫グロブリン定常領域を特異的に結合し得る他のタンパク質（例えば、連鎖球菌性プロテインAまたは連鎖球菌性プロテインG）もまた、上記標識因子として使用される。これらのタンパク質は、連鎖球菌の細胞壁の通常の構成成分である。それらは、多様な種由来の免疫グロブリン定常領域との強力な非免疫原性の反応性を示す（一般に、K r o n v a lら、（1973）J. Immunol.、111:1401-1406、およびA k e r s t r o mら、（1985）J. Immunol.、135:2589-2542などを参照のこと）。

【0149】

上記アッセイ全体を通して、インキュベーション工程および／または洗浄工程は、試薬の各組み合わせの後に必要とされ得る。インキュベーション工程は、約5秒間～数時間（好ましくは約5分間～約24時間）で変動し得る。しかし、インキュベーション時間は、アッセイ形式、分析物、溶液の容量、濃度などに依存する。通常、上記アッセイは、周囲温度にて実施されるが、そのアッセイは、5℃～45℃のような温度の範囲にわたって行われ得る。

【0150】

1) 非競合的アッセイ形式

B o N T神経毒素（例えば、B o N T血清型および／またはB o N Tサブタイプ）を検出するためのイムノアッセイは、特定の実施形態において、競合的かまたは非競合的かのいずれかである。非競合的イムノアッセイは、捕捉された分析物（この場合において、B o N Tポリペプチド）の量が直接測定されるアッセイである。1つの好ましい「サンドイッチ」アッセイにおいて、例えば、上記捕捉因子（例えば、抗B o N T抗体）は、その捕捉因子が固定化される固体基材に、直接的かまたは間接的に結合される。これらの固定化された抗B o N T抗体は、試験サンプル（例えば、血液サンプル）中に存在するB o N Tポリペプチドを捕捉する。そのようにして固定化されたB o N Tポリペプチドは、次いで、標識因子（例えば、標識を有するB o N T/Aー中和抗体）によって結合される。あるいは、二次抗体は、標識を欠き得るが、その二次抗体は、次に、第2の抗体が得られる種の抗体に特異的な標識された第3の抗体によって結合され得る。遊離の標識された抗体は、洗い流され、そして残りの、結合され、標識された抗体が、検出される（例えば、その標識が放射性である場合、γ線検出器を使用する）。

【0151】

2) 競合的アッセイ形式

競合的アッセイにおいて、サンプル中に存在する分析物（例えば、B o N T/A）の量は、そのサンプル中に存在する分析物によって捕捉因子（例えば、B o N T/Aー中和抗体）から置換された（または追い出された（c o m p e t e d a w a y））、添加された（外因性）分析物の量を測定することによって間接的に測定される。例えば、1つの競合的アッセイにおいて、既知の量のB o N T/Aが、定量されていない量のB o N T/Aを含む試験サンプルに添加され、そしてそのサンプルは、捕捉因子（例えば、B o N T/Aを特異的に結合するB o N T/Aー中和抗体）と接触される。B o N T/Aー中和抗体に結合する添加されたB o N T/Aの量は、試験サンプル中に存在するB o N T/Aの濃度に反比例する。

10

20

30

40

50

【0152】

上記 B o N T / A - 中和抗体は、固体基材上に固定化され得る。上記 B o N T / A - 中和抗体に結合された B o N T / A の量は、B o N T / A - B o N T / A - 中和抗体複合体に存在する B o N T / A の量を測定すること、あるいは残りの複合体形成していない B o N T / A の量を測定することのいずれかによって決定される。

【0153】

(B. 非特異的結合の減少)

当業者は、イムノアッセイ中および分析物の精製の間に非特異的結合を減少させることがしばしば望ましいということを、認識する。上記アッセイが、例えば、B o N T / A ポリペプチド、B o N T / A - 中和抗体、または固体基材上に固定化された他の捕捉因子を含む場合、その基材の非特異的結合の量を最小限にすることが、望ましい。このような非特異的結合を減少させる手段は、当業者に周知である。代表的に、これは、上記基材をタンパク質様組成物によってコーティングすることを包含する。特に、タンパク質組成物（例えば、ウシ血清アルブミン（B S A）、脱脂粉乳、およびゼラチン）が、広く使用される。

【0154】

(C. 基材)

上述の通り、上記アッセイに依存して、B o N T ポリペプチド、抗 B o N T 抗体などを含む種々の成分は、必要に応じて、固体表面に結合される。種々の固体表面に生体分子を固定化するための多くの方法は、当該分野で公知である。例えば、上記固体表面は、膜（例えば、ニトロセルロース）、マイクロタイターディッシュ（例えば、P V C、ポリプロピレン、またはポリスチレン）、試験管（ガラスまたはプラスチック）、ディップスティック（d i p s t i c k）（例えば、ガラス、P V C、ポリプロピレン、ポリスチレン、ラテックスなど）、微量遠心管、またはガラス、シリカ、プラスチック、金属ビーズもしくはポリマービーズであり得る。所望の成分は、非特異的結合によって、共有結合されても、非共有結合的に連結されてもよい。

【0155】

広範な種々の有機ポリマーおよび無機ポリマー（天然および合成の両方）は、上記固体表面のための材料として用いられ得る。例示のポリマーとしては、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（４－メチルブテン）、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ（エチレンテレフタレート）、レーヨン、ナイロン、ポリ（ビニルブチレート）、ポリニフッ化ビニリデン（P V D F）、シリコン、ポリホルムアルデヒド、セルロース、セルロースアセテート、ニトロセルロースなどが挙げられる。用いられ得る他の材料としては、紙、ガラス、セラミック、金属、半金属、半伝導性材料、セメントなどが挙げられる。さらに、ゲルを形成する物質（例えば、タンパク質（例えば、ゼラチン）、リポ多糖類、ケイ酸塩、アガロースおよびポリアクリルアミド）が、使用され得る。いくつかの水相を形成するポリマー（例えば、デキストラン、ポリアルキレングリコールまたは界面活性剤（例えば、リン脂質、長鎖（１２～２４個の炭素原子）のアルキルアンモニウム塩など））もまた、適切である。固体表面が有孔である場合、種々の孔径が、その系の性質に依存して用いられ得る。

【0156】

上記表面の調製において、複数の異なる材料が、例えば、種々の特性を得るために積層（l a m i n a t e）として用いられ得る。例えば、タンパク質コーティング（例えば、ゼラチン）は、非特異的結合を回避するため、共有結合による結合体化を容易にするため、シグナル検出を増強するためなどに使用され得る。

【0157】

化合物と上記表面との間に共有結合が望まれる場合、その表面は、通常、多官能性（p o l y f u n c t i o n a l）であるか、または多官能性にされ得る。上記表面上に存在しかつ連結のために使用され得る官能基としては、カルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカプト基などが挙げられ得る。広範な種々

の化合物を種々の表面に連結する様式は、周知であり、そして文献において十分に例示される。例えば、Immobilized Enzymes、Ichiro Chibata、Halsted Press、New York、1978、およびCuatrecasas、(1970) J. Biol. Chem. 245 3059を参照のこと。

【0158】

共有結合に加えて、アッセイ成分を非共有結合するための種々の方法が、使用され得る。非共有結合は、代表的に、上記表面への化合物の非特異的吸着である。代表的に、上記表面は、標識されたアッセイ成分の非特異的結合を防止するために、第2の化合物によってブロックされる。あるいは、上記表面は、その表面が、1つの成分を非特異的に結合するが、別の成分を顕著に結合しないように設計される。例えば、レクチン（例えば、コンカナバリンA）を有する表面は、炭水化物含有化合物を結合するが、糖化を欠く標識されたタンパク質を結合しない。アッセイ成分の非共有結合に使用するための種々の固体表面は、米国特許第4,447,576号および同第4,254,082号に概説される。

【0159】

(D. 他のアッセイ形式)

B o N Tポリペプチドまたは抗B o N T抗体（例えば、B o N T/A中和抗体）はまた、当業者に周知である任意の多くの他の手段によって検出および定量され得る。これらとしては、分析に関する生化学的方法（例えば、分光測光法、ラジオグラフィー、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、超拡散（hyperdiffusion）クロマトグラフィーなど）、および種々の免疫学的方法（例えば、流体沈降反応またはゲル沈降反応、免疫拡散法（一次元または二次元）、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合イムノソルベント（ELISA）、免疫蛍光アッセイなど）が挙げられる。

【0160】

ウェスタンブロット分析および関連する方法もまた、サンプル中のB o N Tポリペプチドの存在を検出および定量するために使用され得る。上記技術は、一般に、ゲル電気泳動によって、分子量に基づいてサンプル産物を分離すること、分離した産物を適切な固体支持体（例えば、ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター、または誘導体化ナイロンフィルター）に転写すること、およびいずれかのB o N Tポリペプチドを特異的に結合する抗体と一緒にそのサンプルをインキュベートすることを包含する。その抗体は、固体支持体上の目的とする生物学的因子に特異的に結合する。これらの抗体は、直接標識されるか、あるいはこれらの抗体は、B o N Tポリペプチドを結合する抗体に特異的に結合する標識された抗体（例えば、マーカー遺伝子に対する抗体がヒト抗体である標識されたヒッジ抗ヒト抗体）を使用して、続いて検出される。

【0161】

他のアッセイ形式としては、リボソームイムノアッセイ（LIA）が挙げられ、リボソームイムノアッセイは、特定の分子（例えば、抗体）を結合し、かつ封入した試薬またはマーカーを放出するように設計されたリボソームを使用する。放出された化学物質は、次いで、標準的な技術によって検出される（Monroeら、(1986) Amer. Clin. Prod. Rev. 5:34-41を参照のこと）。

【0162】

(E. 抗B o N T（例えば、B o N T/A中和）抗体の標識化)

抗B o N T抗体は、当業者に公知である任意の多くの方法によって標識され得る。したがって、例えば、上記標識因子は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、タンパク質もしくは複合体（例えば、本明細書中に記載されるもの）、またはポリマー（例えば、親和性マトリックス、炭水化物または脂質）であり得る。検出は、任意の公知の方法によって進行し、その方法としては、免疫ブロット法、ウェスタン分析、ゲル易動度シフトアッセイ、放射性マーカーまたは生物発光マーカーの追跡、核磁気共鳴、電子常磁性共鳴、ストップフロー分光法、カラムクロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、またはサイズおよび/または電荷の変化に基づいて分子を追跡する他の方法が挙げられる。

上記アッセイにおいて使用される特定の標識または検出可能な群は、本発明の重要な局面ではない。上記検出可能な群は、検出可能な物理特性または化学特性を有するあらゆる材料であり得る。このような検出可能な標識は、イムノアッセイの分野において十分に開発されており、そして一般に、このような方法において有用な任意の標識は、本発明に適用され得る。したがって、標識は、分光器的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段または化学的手段によって検出可能なあらゆる組成物である。本発明において有用な標識としては、磁性ビーズ（例えば、DynabeadsTM）、蛍光色素（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド（Texas red）、ローダミンなど）、放射性標識（例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P）、酵素（例えば、LacZ、CAT、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびマーカー遺伝子産物としてかまたはELISAにおいてのいずれかで検出可能な酵素として一般に使用される他の酵素）、および比色定量標識（例えば、金コロイドまたは有色ガラスビーズまたはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズが挙げられる。

10

【0163】

上記標識は、当該分野で周知の方法によって、直接的かまたは間接的に上記アッセイの所望の成分にカップリングされ得る。上に示されるように、広範な種々の標識が、使用され得、標識の選択は、必要とされる感度、化合物の結合体化の容易さ、安定性の必要条件、利用可能な器械使用、および廃棄の規定に依存する。

【0164】

非放射性ラベルは、しばしば、間接的手段によって連結される。一般に、リガンド分子（例えば、ビオチン）は、分子に共有結合される。次いでそのリガンドは、固有に検出可能であるか、または検出可能な酵素、蛍光化合物、もしくは化学発光化合物などのシグナル系に共有結合されるかのいずれかである抗リガンド（例えば、ストレプトアビジン）分子に結合する。多くのリガンドおよび抗リガンドが、使用され得る。リガンドが天然の抗リガンド（例えば、ビオチン、チロキシン、およびコルチソール）を有する場合、そのリガンドは、標識された天然に存在する抗リガンドと関連して使用され得る。あるいは、任意のハプテン化合物または抗原化合物は、抗体と組み合わせて使用され得る。

20

【0165】

上記分子はまた、例えば、酵素またはフルオロフォアとの結合体化によってシグナルを発生する化合物に直接的に結合体化され得る。標識として目的の酵素は、主に、ヒドロラーゼ（特に、ホスファターゼ、エステラーゼおよびグリコシダーゼ）、またはオキシドレダクターゼ（特に、ペルオキシダーゼ）である。蛍光化合物としては、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンなどが挙げられる。化学発光化合物としては、ルシフェリン、および2,3-ジヒドロフタラジンジオン（例えば、ルミノール）が挙げられる。使用され得る種々の標識化システムまたはシグナル生成システムの概説については、米国特許第4,391,904号（これは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

30

【0166】

標識を検出する手段は、当業者に周知である。したがって、例えば、上記標識が放射性標識である場合、検出のための手段は、シンチレーション計数器または写真フィルム（オートラジオグラフィーなどの場合）を含む。上記標識が蛍光標識である場合、それは、光の適切な波長を用いてその蛍光色素を励起し、そして得られた蛍光を、例えば、顕微鏡、視診、写真フィルム、電子的検出器（例えば、電子結合素子（CCD）または光電子倍增器など）の使用により検出することによって検出され得る。同様に、酵素標識は、その酵素に対して適切な基質を提供し、そして得られた反応生成物を検出することによって検出され得る。最後に、単純な比色定量標識は、その標識に付随する色を観察することによって簡単に検出され得る。したがって、種々のディップスティックアッセイにおいて、結合体化された金は、しばしば、桃色を示すが、種々の結合体化されたビーズは、そのビーズの色を示す。

40

50

【0167】

いくつかのアッセイ形式は、標識された成分の使用を必要としない。例えば、凝集アッセイは、B o N T ペプチドの存在を検出するために使用され得る。この場合において、抗原でコーティングされた粒子は、標的抗体を含むサンプルによって凝集される。この形式において、その成分は、標識される必要がなく、そして上記標的抗体の存在は、単純な視診によって検出される。

【0168】

(IX. 薬学的組成物)

本発明のB o N T 中和抗体は、例えば、内因性の疾患プロセスによってか、または化学的／生物学的な兵器によってもたらされたボツリヌス中毒の進行を緩和するのに有用である。代表的に、1種の抗体または好ましくは2種以上の異なる抗体を含む組成物は、その必要がある哺乳動物（例えば、ヒト）に投与される。

【0169】

本発明者らは、ボツリヌス神経毒素（B o N T）のサブタイプの特に効率的な中和が、特定のB o N T 血清型の2種以上のサブタイプを高親和性で結合する中和抗体の使用によって達成されることを見出した。これは、上記サブタイプの各々に対する2種以上の異なる抗体を使用することによって達成され得る一方で、これは、より低い有効性であり、効率的ではなく、そして実用的ではない。B o N T 治療は、B o N T の高い毒性を鑑みると、望ましくは、非常に強力である。所与のB o N T 血清型を、必要とされる効力（以下ならびに図5、6、16、および17を参照のこと）によって中和するために複数の抗体を使用することが、一般的には必要であるので、必要とされる抗体の数は、各サブタイプに対して異なる抗体を使用することが必要である場合、製造の観点から、非常に大きいものである。混合物中の抗体の数の増加はまた、効力を減少させ、したがって4種の抗体（2種がA1毒素を中和し、そして2種がA2毒素を中和する）の混合物の場合、それらの抗体の50%のみが、所与の毒素を中和する。対照的に、2種の抗体（その両方が、A1毒素およびA2毒素を中和する）の混合物は、いずれの毒素に対しても100%の活性を有し、そして製造がより簡単である。例えば、2種のB o N T / A サブタイプ（A1、A2）に対して、強力な中和は、2種～3種の抗体によって達成され得る。異なる抗体が、B o N T / A1 と B o N T / A2 との中和に必要とされる場合、4種～6種の抗体が、必要とされる。その複雑性は、さらなるサブタイプに対してさらに増大する。したがって、特定の実施形態において、本発明は、2種以上のB o N T サブタイプ（例えば、B o N T / A1、B o N T / A2、B o N T / A3 など）を高親和性で結合する中和抗体を含む組成物を提供する。

【0170】

中和抗体を組み合わせて始めたとき、上記抗体の組み合わせの効力が劇的に増大することでもまた、驚くべき発見であった。これはこの増大は、治療用途に必要とされる効力のボツリヌス抗体をもたらしことを可能にする。2種のモノクローナル抗体および3種のモノクローナル抗体を組み合わせて始める場合、認識される特定のB o N T エピトープは、重要ではなくなることもまた、驚くべきことであり、したがって、例えば、実施例5に示されるように、B o N T のトランスロケーションドメインおよび／または触媒ドメインに結合する抗体が、中和活性を有し、互いと組み合わせた場合、またはB o N T レセプター結合ドメイン（HC）を認識するmAbと組み合わせた場合のいずれかが、B o N T 活性の中和に有効であった。したがって、特定の実施形態において、本発明は、B o N T 上の重複しないエピトープを結合する少なくとも2種（より好ましくは、少なくとも3種）の高親和性抗体を含む組成物を企図する。

【0171】

特定の実施形態において、本発明は、3D12、RAZ1、CR1、ING1、ING2、および／またはこれらの抗体由来の1種以上のCDRを含む抗体、および／またはこれらの抗体の変異体（例えば、ING1の1D11変異体、2G11変異体、および5G4変異体）を含む1種以上の抗体からなる群より選択される、2種以上（好ましくは、3

10

20

30

40

50

種以上)の異なる抗体を含む組成物を企図する。

【0172】

本発明のB o N Tー中和抗体は、予防的処置および／または治療的処置について、非経口投与、局所(t o p i c a l)投与、経口投与、または局所(l o c a l)投与(例えば、エアロゾルによるか、または経皮的である)に有用である。薬学的組成物は、投与の方法に依存して、種々の単位投薬形態で投与され得る。例えば、経口投与に適した単位投薬形態としては、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤およびロゼンジが挙げられる。本発明の薬学的組成物を含む抗体は、経口で投与される場合、好ましくは分解から保護される。これは、代表的に、抗体を組成物と複合体形成させて酸による加水分解および酵素による加水分解に対して抵抗性にする、または適切に抵抗性であるキャリア(例えば、リポソーム)中にその抗体をパッケージ化することのいずれかによって達成される。分解からタンパク質を保護する手段は、当該分野において周知である。

10

【0173】

本発明の薬学的組成物は、非経口投与(例えば、静脈内投与あるいは体腔または器官の管腔への投与)に関して特に有用である。投与のための組成物は、一般的に、薬学的に受容可能なキャリア(好ましくは、水性キャリア)に溶解された1種以上のB o N Tー中和抗体の溶液を含む。種々の水性キャリアが、使用され得る(例えば、緩衝化した生理食塩水など)。これらの溶液は、無菌であり、そしてその溶液は、一般に、望まれない溶液を含まない。これらの組成物は、従来の周知である滅菌技術によって滅菌され得る。その組成物は、生理学的組成物に近づけるために必要とされるような薬学的に受容可能な補助的な物質(例えば、pHを調整しかつ緩衝化する薬剤、毒性を調整する薬剤など(例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなど))を含み得る。これらの処方物中のB o N T／Aー中和抗体の濃度は、広範に変動し得、そしてその濃度は、選択させた特定の投与様式および患者のニーズに従って、主に流体容量、粘度、体重などに基づいて選択される。

20

【0174】

したがって、静脈内投与のための代表的な薬学的組成物は、1日に患者1個体あたり約0.1~10mgである。1日に患者1個体あたり約1mgから最大で約200mgの投薬量が、使用され得る。非経口投与が可能な組成物を調製する方法は、当業者にとって公知であるか、または当業者にとって明らかであり、そしてRemington's Pharmaceutical Science、第15版、Mack Publishing Company、Easton、Pennsylvania(1980)のような刊行物においてより詳細に記載される。

30

【0175】

本発明のB o N Tー中和抗体またはそのカクテルを含む組成物は、一般に、治療的処置のために投与される。好ましい薬学的組成物は、B o N T毒素を中和(緩和または排除)するのに十分な投薬量で投与される(すなわち、B o N T中毒(ボツリヌス中毒)の症状を減少させるか、または排除する)。このことを達成するのに適した量は、「治療有効量」として定義される。この用途に有効な量は、疾患の重症度および患者の健康の一般的状態に依存する。

40

【0176】

上記組成物の単回投与または複数回投与は、患者に必要とされかつ許容されるような投薬量および頻度に依存して投与され得る。あらゆる事象において、上記組成物は、患者を有効に処置するために、本発明の抗体の十分な定量を提供するべきである。

【0177】

(X. 診断または処置のためのキット)

別の実施形態において、本発明は、ボツリヌス中毒の処置またはClostridium botulinum感染の検出／確認のためのキットを提供する。キットは、代表的に、本発明の1種以上の抗B o N T抗体(例えば、薬学的用途のためのB o N Tー中和抗体)を含む。診断用途に関して、抗体は、必要に応じて、標識され得る。さらに、上記キ

50

ットは、代表的に、ボツリヌス中毒の症状の処置においてB o N Tー中和抗体を使用する手段を開示する指示資料を備える。上記キットはまた、そのキットが設計される特定の用途を容易にするために、さらなる成分を含み得る。したがって、例えば、キットがB o N Tサブタイプの診断の検出のために1種以上の抗B o N T抗体を含む場合、その抗体は標識され得、そしてそのキットはその標識を検出する手段（例えば、酵素標識に対する酵素基質、蛍光標識を検出するためのフィルターセット、適切な二次標識（例えば、ヒツジ抗ヒト抗体）など）をさらに含み得る。上記キットは、特定の方法の実施のために慣用的に使用される緩衝液および他の試薬をさらに含み得る。このようなキットおよび適切な内容物は、当業者に周知である。

【0178】

特定の実施形態において、ボツリヌス中毒の処置のために提供されるキットは、1種以上のB o N T中和抗体を含む。上記抗体は、別個に提供されても、一緒に混合されてもよい。代表的に、抗体は、無菌の薬学的に受容可能な賦形剤中に提供される。特定の実施形態において、上記抗体は、送達デバイス（例えば、使い捨て可能な注射器）に予め充填されて提供され得る。

【0179】

上記キットは、必要に応じて、抗体の使用、推奨される投薬量、禁忌（c o n t e r i n d i c a t i o n）などを教示する指示資料を備え得る。

【実施例】

【0180】

以下の実施例は、例示のみを目的として提供され、そして限定を目的として提供されない。当業者は、本質的に同様の結果を生じるように変更または改変され得る種々の決定的ではないパラメータを容易に認識する。

【0181】

（実施例1：ボツリヌス神経毒素中和抗体）

（材料および方法）

（A．オリゴヌクレオチドの設計）

科特異的なマウスV_HおよびマウスV_Kのプライマーを、再配列した完全長V遺伝子を増幅するために、ヒトV遺伝子プライマーについて先に記載（Marksら、（1991）J. Mol. Biol. 222：581-597；Marksら、Eur. J. Immunol. 21：985-991）されるように設計した。簡潔には、マウスV_H DNA配列およびV_K DNA配列を、Kabat（Kabatら、（1991）Sequences of proteins of immunological interest、U. S. Department of Health and Human Services、U. S. Government Printing Office、Bethesda、MD）およびGenBankデータベースから収集し、アライメントし、そして科によって分類し、そして科特異的プライマーを、フレームワーク1を含む第1の23ヌクレオチドにアニーリングするように設計した。同様に、J_H遺伝子セグメントに特異的なプライマーおよびJ_K遺伝子セグメントに特異的なプライマーを、4種のJ_H遺伝子セグメントおよび5種のJ_K遺伝子セグメント（Kabatら、前出）の各々を含む最後の24ヌクレオチドにアニーリングするように設計した。

【0182】

（B．ベクターの構築）

ベクターpSYN3を構築するために、1.5kbのスタッファー（stuffer）フラグメントを、プライマーLMB3（Marksら、（1991）Eur. J. Immunol. 21：985-991）、およびエータグバック（tagback）（5'-ACC ACC GAA TTC TTA TTA ATG GTG ATG ATG GTG GAT GAC CAG CCG GTT CCA GCG G-3'、（配列番号5））を用いたPCRを使用して、pCANTAB5E（Pharmacia Biotech、Milwaukee、WI.）から増幅した。上記DNAフラグメントを、

S f i I および N o t I を用いて設計し、ゲル濾過し、そして S f i I および N o t I によって消化した p C A N T A B 5 E にライゲーションした。ライゲーションした DNA を、E s c h e r i c h i a c o l i T G I (G i b s o n、(1 9 9 1) S t u d i e s o n t h e E p s t e i n - B a r r v i r u s g e n o m e . U n i v e r s i t y o f C a m b r i d g e、C a m b r i d g e、U . K .) を形質転換するために使用し、そして正しい挿入物を含むクローンを、DNA 配列決定することによって同定した。得られたベクターは、ファージに提示された s c F v を、E . c o l i のペリプラズムに C 末端 E エピトープタグ（その後にヘキサヒスチジンタグを伴う）を有するネイティブな s c F v として分泌させるための S f i I - N o t I フラグメントまたは M c o l - N o t I フラグメントとしてサブクローニングすることを可能にする。

10

【0183】

(C. 免疫法)

ライブラリー1の構築のために、B A L B / c マウス (1 6 g ~ 2 2 g) を、純粋な B o N T / A H_c (O p h i d i a n P h a r m a c e u t i c a l s、M a d i s o n、W I .) を用いて、0 週間目、2 週間目、および 4 週間目に免疫化した。各動物に、ミョウバンに吸着された材料の 1 μ g (P i e r c e C h e m i c a l C o .、R o c k f o r d、I L .) を、0 . 5 m l の容量で皮下に与えた。マウスを、第 2 の免疫化の 2 週間後に、純粋な B o N T / A の 1 0 0、0 0 0 の 5 0 % 致死量によってチャレンジし、そしてその 1 週間後に屠殺した。

【0184】

20

ライブラリー2の構築のために、C D - 1 マウス (1 6 g ~ 2 2 g) を、純粋な B o N T / A H_c を用いて、0 週間目、2 週間目、および 4 週間目に免疫化し、そして第 3 の免疫化の 2 週間後に屠殺した。両方のライブラリーに関して、脾臓を、屠殺の直後に取り出し、そして全 RNA を、C a t h a l a ら、(1 9 9 3) D N A 2 : 3 2 9 の方法によって抽出した。

【0185】

(D. ライブラリーの構築)

第 1 の c D N A 鎖を、免疫グロブリン m R N A をそれぞれ 1 0 p m o l のオリゴヌクレオチド M I g G 1、M I g G 3、および M C_K (表 3) と特異的にプライミングさせたことを除いて、M a r k s ら、(1 9 9 1) J . M o l . B i o l . 2 2 2 : 5 8 1 - 5 9 7 において先に記載される通りに約 1 0 μ g の全 RNA から合成した。ライブラリー1の構築のために、再配列した V_H 遺伝子および V_K 遺伝子を、市販の V_H 逆方向プライマーおよび V_K 逆方向プライマーならびに J_H 順方向プライマーおよび J_K 順方向プライマー (R e c o m b i n a n t P h a g e A n t i b o d y S y s t e m ; P h a r m a c i a B i o t e c h) を使用することによって第 1 の c D N A 鎖から増幅した。ライブラリー2のために、科特異的な V_H 逆方向プライマーと V_K 逆方向プライマーとの等モル混合物を、ライブラリーの多様性を増大させる試みにおいて、J_H 遺伝子セグメントに特異的なプライマーまたは J_K 遺伝子セグメントに特異的なプライマーの等モル混合物と組み合わせて使用した (上記の「オリゴヌクレオチドの設計」を参照のこと) 。再配列した V_H 遺伝子および再配列した V_K 遺伝子を、5 μ l の第 1 の c D N A 鎖反応混合物、適切な逆方向プライマーの 2 0 p m o l の等モル混合物、適切な順方向プライマーの 2 0 p m o l の等モル混合物、(各) 2 5 0 μ m のデオキシヌクレオチド三リン酸、1 . 5 m m の M g C l₂、1 m l あたり 1 0 μ g のウシ血清アルブミン、および 1 μ l (5 U) の製造業者によって供給される緩衝液中の T h e r m u s a q u a t i c u s (T a q) D N A ポリメラーゼ (P r o m e g a) を含む 5 0 μ l の反応混合物中で、別々に増幅した。その反応混合物に、パラフィン油 (S i g m a) を積層 (o v e r l a y) し、そしてそれを、(9 5 ° C にて 1 分間、6 0 ° C にて 1 分間、および 7 2 ° C にて 1 分間で) 3 0 回のサイクルに供した。反応生成物を、ゲルで精製し、D E A E 膜を使用することによってそのゲルから単離し、高塩濃度の緩衝液を用いてその膜から溶出させ、エタノール沈殿し、そして 2 0 μ L の水に再懸濁した (S a m b r o o k ら、(1 9 8 9) M o l e c u l

30

40

50

ar cloning; a laboratory manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N. Y.)。

【0186】

(表3. マウス免疫グロブリン遺伝子のPCRのために使用されたオリゴヌクレオチドプライマー)

【0187】

【表 3 - 1】

プライマー ID	配列	配列番号
A. 第1cDNA鎖の合成 マウス重鎖定常領域プライマー		
MIgG1/2 順方向	5' CTG GAC AGG GAT CCA GAG TTC CA 3'	138
MIgG3 順方向	5' CTG GAC AGG GCT CCA TAG TTC CA 3'	139
マウス κ 定常領域プライマー		
MC _K 順方向	5' CTC ATT CCT GTT GAA GCT CTT GAC 3'	140
B. 一次 PCR マウス V _H 逆方向プライマー		
VH1 逆方向	5' GAG GTG CAG CTT CAG GAG TCA GG 3'	141
VH2 逆方向	5' GAT GTG CAG CTT CAG GAG TCR GG 3'	142
VH3 逆方向	5' CAG GTG CAG CTG AAG SAG TCA GG 3'	143
VH4/6 逆方向	5' GAG GTY CAG CTG CAR CAR TCT GG 3'	144
VH5/9 逆方向	5' CAG GTY CAR CTG CAG CAG YCT GG 3'	145
VH7 逆方向	5' GAR GTG AAG CTG GTG GAR TCT GG 3'	146
VH8 逆方向	5' GAG GTT CAG CTT CAG CAG TCT GG 3'	147
VH10 逆方向	5' GAA GTG CAG CTG KTG GAG WCT GG 3'	148
VH11 逆方向	5' CAG ATC CAG TTG CTG CAG TCT GG 3'	149
マウス V _H 逆方向プライマー		
VH1 逆方向	5' GAC ATT GTG ATG WCA CAG TCT CC 3'	150
VH2 逆方向	5' GAT GTI KTG ATG ACC CAA ACT CC 3'	151
VH3 逆方向	5' GAT ATT GTG ATR ACB CAG GCW GC 3'	152
VH4 逆方向	5' GAC ATT GTG CTG ACM CAR TCT CC 3'	153
VH5 逆方向	5' SAA AWT GIK CTC ACC CAG TCT CC 3'	154
VH6 逆方向	5' GAY ATY VWG ATG ACM CAG WCI CC 3'	155
VH7 逆方向	5' CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CC 3'	156
VH8 逆方向	5' TCA TTA TTG CAG GTG CTT GTG GG 3'	157
マウス J _H 順方向プライマー		
JH1 順方向	5' TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC 3'	158
JH2 順方向	5' TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT GCC 3'	159
JH3 順方向	5' TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT CCC 3'	160
JH4 順方向	5' TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT TCC 3'	161
マウス J _K 順方向プライマー		
JK1 順方向	5' TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC TCC 3'	162
JK2 順方向	5' TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC CCC 3'	163
JK3 順方向	5' TTT TAT TTC CAG TCT GGT CCC ATC 3'	164
JK4 順方向	5' TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC CGA 3'	165
JK5 順方向	5' TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC AGC 3'	166
C. 制限酵素部位を含む再増幅プライマー マウスVH Sfi 逆方向プライマー		
VH1 Sfi	5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTT CAG GAG TCA GG 3'	167
VH2 Sfi	5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAT GTG CAG CTT CAG GAG TCR GG 3'	168

【表 3 - 2】

VH3 Sfi	5'	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG	169
CAG CTG AAG SAG TCA GG	3'		
VH4/6 Sfi	5'	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTY	170
CAG CTG CAR CAR TCT GG	3'		
VH5/9 Sfi	5'	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTY	171
CAR CTG CAG CAG YCT GG	3'		
VH7 Sfi	5'	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAR GTG	172
AAG CTG GTG GAR TCT GG	3'		
VH8 Sfi	5'	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTT	173
CAG CTT CAG CAG TCT GG	3'		
VH10 Sfi	5'	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAA GTG	174
CAG CTG KTG GAG WCT GG	3'		
VH11 Sfi	5'	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG ATC	175
CAG TTG CTG CAG TCT GG	3'		
D マウス JK Not 順方向プライマー			
JK1 Not	5'	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT GAT TTC CAG CTT	176
GGT GCC TCC	3'		
JK2 Not	5'	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT TAT TTC CAG CTT	177
GGT CCC CCC	3'		
JK3 Not	5'	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT TAT TTC CAG TCT	178
GGT CCC ATC	3'		
JK4 Not	5'	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT TAT TTC CAA CTT	179
TGT CCC CGA	3'		
JK5 Not	5'	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT CAG CTC CAG CTT	180
GGT CCC AGC	3'		
R = A/G, Y = C/T, S = G/C, K = G/T, W = A/T, M = A/C, V = C/G/A, B = G/C/T, および H = C/A/T.			

10

20

ScFv 遺伝子レパートリーを、オーバーラップ伸長によるスプライシングを使用することによって、精製したV_H 遺伝子レパートリーおよび精製したV_K 遺伝子レパートリーならびにリンカーDNAから組み立てた。リンカーDNAは、ペプチド配列 (Gly₄ Ser₃、(配列番号181) (Houstonら、(1988)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)) をコードし、そしてそのリンカーDNAは、再配列したV_H 遺伝子の3' 末端および再配列したV_L 遺伝子の5' 末端に相補的であった。そのV_H DNAおよびV_K DNA (各1.5 μg) を、(各) 250 μmのデオキシヌクレオチド三リン酸を含む25 μlのPCR混合物、1.5 mMのMgCl₂、1 mlあたり10 μgのウシ血清アルブミン、および1 μl (5 U) の製造業者によって供給された緩衝液中のTaq DNAポリメラーゼ (Promega) を含む混合物中で、500 ngのリンカーDNA (Recombinant Phage Antibody System; Pharmacia Biotech) と合わせ、そしてその混合物を、これらのフラグメントを連結するために、(94 °Cにて1分間、62 °Cにて1分間、および72 °Cにて1分間で) 10回のサイクルに供した。フランキング (flanking) オリゴヌクレオチドプライマー (RS、ライブラリーIについては、Recombinant Phage Antibody Systemキットにおいて提供され、そしてライブラリー2については、V_H SfiプライマーとJKNotプライマー [表3] との等モル混合物において提供される) を、添加し、そしてその反応混合物を、(94 °Cにて1分間、55 °Cにて1分間、および72 °Cにて1分間で) 33サイクルに供して制限酵素部位を付与した。

30

40

【0189】

ScFv 遺伝子レパートリーを、上に記載したようにゲルで精製し、SfiおよびNot Iを用いて消化し、そして電気溶出によって精製し、そして1 μgの各レパートリーを、SfiおよびNot Iを用いて消化した1 μgのpCANTAB5Eベクター (Pharmacia Biotech) (ライブラリー1) または1 μgのpHEN-1 (Hoogenboomら、(1991) Nucleic Acids Res. 19:4133-4137) (ライブラリー2) のいずれかにライゲーションした。そのライゲーション混合物をフェノールクロロホルム抽出によって精製し、エタノール沈殿し、20

50

μl の水に再懸濁し、そして2.5 μl のサンプルを、50 μl のE. coli TGI (Gibson、(1984)、Studies on the Epstein-Barr virus genome. University of Cambridge, Cambridge, U. K.) にエレクトロポレーションした(Dowerら、(1988) Nucleic Acids Res. 16:6127-6145)。細胞を、1 mlのSOC (Sambrookら、前出) 中で30分間増殖させ、次いで1 mlあたり100 μg のAMPおよび1% (重量/容量) のGLU (TYE-AMP-GLU) を含むTYE (Miller、(1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.) 培地上にプレーティングした。コロニーを、 -70°C にて保存するために、上記プレートから、100 μg のAMP/ml、1% GLU (2 $\times$ TY-AMP-GLU)、および15% (容量/容量) のグリセロールを含む5 mlの2 $\times$ TYブロス (Miller、(1972)、前出) 中にこすり落とした。ライブラリーのクロニング効率および多様性を、Marksら、(1991) Eur. J. Immunol.、21:985-991によって記載されるように、PCRスクリーニング (Gussowら、(1989)、Nucleic Acids Res. 17:4000) によって決定した。

【0190】

(E. ファージの調製)

上記ライブラリーからプラスミド粒子をレスキュー (rescue) するために、10 mlの2 $\times$ TY-AMP-GLUに、上記ライブラリーストック由来の適切な容量の細菌 (約50~100 μl) を接種して0.3~0.5のA₆₀₀を与え、そして細菌を、 37°C にて振盪しながら30分間増殖させた。約 10^{12} PFUのVCS-M13 (Stratagene) 粒子を、添加し、そしてその混合物を、 4°C にて一晩インキュベートした。チューブを、2% MPBSを用いて 37°C にて1時間ブロックし、そして選択、洗浄、および溶出を、 5.0×10^{12} TU/mlの濃度にてファージを使用することにより、参考文献35に記載される通りに正確に行った。溶出したファージの3分の1を使用して対数増殖期のE. coli TGIの10 mlに感染させ、そのE. coli TGIを、上に記載したようにTYE-AMP-GLU上にプレーティングした。

【0191】

レスキュー-選択-プレーティングの周期を、3回繰り返し、その後、クローンを、ELISAによって結合について分析した。ライブラリーをまた、可溶性BoNT/A H_cに対して選択した。ライブラリー1について、1.0 mgのBoNT/A H_c (700 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を、ビオチン化 (Recombinant Phage Selection Module; Pharmacia) し、そして製造業者によって推奨される通りに精製した。選択の各ラウンドについて、1 mlのファージ (約 10^{13} TU) を、4%の脱脂粉乳、0.05%のTween 20、および1 mlあたり10 μg のビオチン化BoNT/A H_cを含む1 mlのPBSと混合した。室温にて1時間おいた後、抗原に結合したファージを、Schierら、(1996) J. Mol. Biol.、255:28-43によって記載されるように、ブロックされたストレプトアビジンによってコーティングしたM280磁性ビーズ (ダイナビーズ (Dynabeads); Dynal) 上に捕捉した。ダイナビーズを、合計で10回 (TPBS中で3回、TMPBS中で2回、PBS中で2回、MPBS中で1回、およびPBS中で2回以上) 洗浄した。結合したファージを、100 μl の100 mMトリエチルアミンと一緒に5分間インキュベートすることによってダイナビーズから溶出させ、そしてそのファージを、1 MのTris-HCl (pH 7.5) によって中和し、そしてその溶出物の3分の1を使用して、対数増殖期のE. coli TGIに感染させた。

【0192】

ライブラリー2について、親和性によって駆動する選択 (Hawkinsら、(1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Schierら、(1996)、

10

20

30

40

50

前出))を、選択のために使用される可溶性BoNT/A H_cの濃度を減少させる(ラウンド1については10 μg/ml、ラウンド2については1 μg/ml、およびラウンド3については10 ng/ml)ことによって行なった。可溶性BoNT/A H_cを、C末端のヘキサヒスチジンタグを介して200 μlのNi²⁺-NTA (Qiagen)に捕捉した。捕捉後、そのNi²⁺-NTA樹脂を、合計で10回(TPBS中で5回およびPBS中で5回)洗浄し、結合したファージを、上に記載したように溶出させ、そしてその溶出物を、対数増殖期のE. coli TGIに感染させるために使用した。

【0193】

(F. 結合物(binder)の初回の特徴付け)

BoNT/A、BoNT/A H_c、およびBoNT/A H_Nに対する結合についての初回分析(Chenら、(1997) Infect. Immun. 65:1626-1630)を、発現したscFvを含む細菌の上清を使用したELISAによって行なった。scFvの発現(De Bellisら、(1990) Nucleic Acids Res. 18:1311)を、marksら、(1991) J. Mol. Biol.、222:581-597によって記載される通りに、96ウェルマイクロタイタープレートにおいて行なった。ELISAのために、マイクロタイタープレート(Falcon 3912)を、PBS(10 μg/ml)中のBoNT/A、BoNT/A H_c、またはBoNT/A H_Nのいずれかによって4℃にて一晚コーティングし、次いで2% MPBSを用いて室温にて1時間ブロックした。発現したscFvを含む細胞の上清を、ウェルに添加し、そして室温にて1.5時間インキュベートした。プレートを、6回(TPBSで3回およびPBSで3回)洗浄し、そしてscFvの結合を、Marksら、(1991) J. Mol. Biol.、222:581-597およびSchierら、(1996) Gene 169:147-155によって記載される通りに、抗mycタグ抗体(9E10; Santa Cruz Biotechnology)または抗E抗体(Pharmacia Biotech)およびペルオキシダーゼ結合体化抗マウスFc抗体(Sigma)のいずれかを使用することによってそれらのC末端ペプチドタグ(pCANTAB5E中のライブラリー1については、Eエピトープタグ、およびpHEN-1中のライブラリー2については、mycエピトープタグ[Munro、ら、(1986) Cell 46:291-300])によって検出した。固有に結合するscFvの数を、BstNIのフィンガープリントおよびDNA配列決定によって決定した。

【0194】

(G. scFvのサブクローニング、発現、および精製)

精製を容易にするために、scFv遺伝子を、上記scFvのC末端の端におけるヘキサヒスチジンタグの付加を生じる発現ベクターpUC119mycHis(Schierら、(1995) J. Mol. Biol.、263:551-567)またはpSYN3中にサブクローニングした。適切なファージミドのうちの1つを有するE. coli TGIの200ミリリットル培養物を、増殖させ、scFvの発現を、IPTG(De Bellis、ら、(1990)、Nucleic Acids Res. 18:1311)を用いて誘導し、そしてその培養物を、25℃にて一晚増殖させた。scFvを、ペリプラズムから回収し(Breitling、ら、(1991) Gene 104:147-153)、IMACローディング緩衝液(50 mMのリン酸ナトリウム[pH 7.5]、500 mMのNaCl、20 mMのイミダゾール)に対して4℃にて一晚透析し、次いで0.2 μm孔径のフィルターを通して濾過した。scFvを、Schierら、(1995)、前出によって記載される通りに、IMAC(Hochuliら、(1988) Bio/Technology 6:1321-1325)によって精製した。

【0195】

ダイマーでありかつ凝集したscFvからモノマーのscFvを分離するために、サンプルを、遠心濃縮器(Centricon 10; Amicon)において1 ml未満の容量まで濃縮し、そしてHBSを使用することによってSuperdex 75カラム(Pharmacia)上で分画した。最終調製物の純度を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポ

リアクリルアミドゲル電気泳動によってアリコートを実行することによって評価した。タンパク質バンドを、クマーシーブルー染色によって検出した。濃度を、 1.0 の A_{280} が 0.7 mg/ml のs c F v濃度に対応すると仮定して分光測光法によって決定した。

【0196】

(H. 親和性および結合動態の測定)

精製したs c F vの K_d を、B I A c o r e (P h a r m a c i a B i o s e n s o r A B)における表面プラズモン共鳴を使用することによって決定した。B I A c o r eフローセルにおいて、約 600 RU のB o N T/A H_c (10 mM 酢酸ナトリウム [$\text{pH } 4.5$] 中に $15\text{ }\mu\text{g/ml}$)を、N-ヒドロキシスクシニミド-N-エチル-N'- (ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド化学 (J o h n s o n ら、(1991) A n a l . B i o c h e m . 198: 268-277)を使用することによってCM5センサーチップにカップリングした。このカップリングしたB o N T/A H_cの量は、 $100\sim 175$ の最大RUの結合されたs c F vをもたらした。s c F vの結合後の表面の再生のために、 $5\text{ }\mu\text{l}$ の 4 M M g C l₂を注入し、ベースラインへの回帰をもたらした。上記表面を、これらの再生条件下で $20\sim 30$ 回再使用した。会合を、 $50\sim 1,000\text{ nM}$ の範囲の濃度で $5\text{ }\mu\text{l/分}$ の連続的な流れにおいて測定した。 k_{on} を、 $\ln(dR/dt)/t$ 対濃度のプロットから決定した。ここでRは、応答であり、そしてtは、時間である (K a r l s s o n ら、(1991) J . I m m u n o l . M e t h o d s 145: 229-240)。 k_{off} を、 $30\text{ }\mu\text{l/分}$ の流速を使用することによって、分析したs c F vの最も高い濃度におけるセンサーグラムの解離部分から決定した (K a r l s s o n ら、(1991) J . I m m u n o l . M e t h o d s 145: 229-240)。 K_d を、 k_{off}/k_{on} として算出した。

【0197】

(I. エピトープマッピング)

エピトープマッピングを、B I A c o r eにおける表面プラズモン共鳴を使用することによって行なった。B I A c o r eフローセルにおいて、約 $1,200\text{ RU}$ のB o N T/A H_cを、上に記載したようにCM5センサーチップにカップリングさせる。 $5\text{ }\mu\text{l/分}$ の流速を用いて、 $100\text{ nM}\sim 1\text{ }\mu\text{M}$ のs c F vの滴定を、ほぼ飽和した表面を生じる抗体濃度を決定するために、約5分間にわたってフローセル表面上に注入した。エピトープマッピングを、完全に近い飽和および少なくとも 100 RU の結合された抗体を生じる濃度にて、s c F vの対を使用して行った。結合されたs c F vの量を、対の各メンバーについて決定し、次いでその2種のs c F vを、個々のs c F vの測定のために使用した濃度と等しい最終濃度を与えるように一緒に混合した。異なるエピトープを認識するs c F vは、一緒に注入した場合に、RU結合において相加的な増加を示し (図2 パネルA)、一方で、同一のエピトープを認識するs c F vは、RUの最小限の増加のみを示した (図2 パネルB)。

【0198】

(J. インビトロ中和研究)

適切なインビトロ中和研究はを、D e s h p a n d e ら、(1995) T o x i c o n 33: 551-557によって記載されるように、マウス片側横隔膜調製物を使用することによって行なった。簡潔には、左右の横隔神経の片側横隔膜調製物を、雄CD/1マウス ($25\sim 33\text{ g}$)から切除し、そして生理的溶液 (135 mM N a C l、 5 mM K C l、 15 mM N a H C O₃、 1 mM N a₂H P O₄、 1 mM M g C l₂、 2 mM C a C l₂、および 11 mM G L U)に懸濁した。インキュベーションバスを、 $95\% \text{ O}_2 - 5\% \text{ CO}_2$ を用いて泡立て、そして 36°C の一定温度に維持した。横隔神経を、 0.2 ms 持続時間の四角波で 0.05 Hz にて超最大に刺激した。等尺性単収縮張力を、チャートレコーダーに接続した力変位変換器 (M o d e l F T 03; G r a s s)によって測定した。精製したs c F vを、精製したB o N T/Aと一緒に室温にて 30 分間インキュベートし、次いで組織のバスに添加し、 $2.0 \times 10^{-8}\text{ M}$ のs c F v最終

濃度および 2.0×10^{-11} M の B o N T / A 最終濃度をもたらした。研究した各 s c F v について、50 % の単収縮張力減少までの時間を、B o N T / A 単独について3回測定し、そして s c F v + B o N T / A について3回測定した。S 2 5 と C 2 5 との組み合わせを、各 2.0×10^{-8} M の最終濃度にて研究した。50 % の単収縮減少までの時間の間の差を、有意と見なされる 0.05 未満の P 値を用いて両側 t 検定によって決定した。

【0199】

(表4. ファージ抗体ライブラリー由来のクローンの結合の頻度)

【0200】

【表4】

10

選択に使用される抗原	選択ランドにおける ELISA ポジティブクローン ^a の頻度		
	1	2	3
ライブラリー ^b			
B o N T / A : イムノチューブ ^c	20/184	124/184	ND
B o N T / A H _c : イムノチューブ	7/92	86/92	88/92
B o N T / A H _c : ビオチン化 ^d	7/90	90/90	90/90
	14/48	48/48	ND
ライブラリー ^e			
B o N T / A : イムノチューブ	ND	81/92	ND
B o N T / A H _c : イムノチューブ	ND	ND	76/92
B o N T / A H _c : Ni ²⁺ -NTA ^f	ND	ND	67/92

20

^a ポジティブクローンの数/クローンの総数として表される。B o N T / A および B o N T / A H_c に対する選択について、E L I S A を、それぞれ、固定化した B o N T / A および固定化した B o N T / A H_c に対して行った。ND、行った選択から決定されなかったデータ。

^b B o N T / A H_c で2回、かつ B o N T / A で1回免疫化したマウスに由来する。

^c イムノチューブ選択を、イムノチューブ上に吸着させた抗原を用いて行った。

^d ビオチン化選択を、ストレプトアビジン磁性ビーズ上の捕捉を用いて、溶液中で行った。

^e B o N T / A H_c で3回免疫化したマウスに由来する。

^f Ni²⁺-NTA選択を、Ni²⁺-NTA上の捕捉を用いて、溶液中で行った。

30

【0201】

(結果)

(A. ファージ抗体ライブラリーの構築および特徴付け)

2つのファージ抗体ライブラリーを、免疫化したマウスの V_H 遺伝子および V_K 遺伝子から構築した(図1)。ライブラリー1について、マウスを、B o N T / A H_c を用いて2回免疫化し、そして100,000の B o N T / A の50%致死量を用いた第2の免疫化の2週間後にチャレンジした。B o N T / A チャレンジで生存したマウスを、1週間後に屠殺した。その脾臓を、屠殺直後に取り出し、そして全RNAを、調製した。ライブラリー構築のために、I g G 重鎖mRNAおよびκ軽鎖mRNAを、特異的にプライムし、第1のcDNA鎖を、合成した。V_H 遺伝子レパートリーおよび V_K 遺伝子レパートリーを、PCRによって増幅し、そして V_H プライマー、J_H プライマー、V_K プライマー、および J_K プライマーを、ファージ抗体システムにおいて提供した。

40

【0202】

V_H 遺伝子レパートリーおよび V_K 遺伝子レパートリーを、15アミノ酸のペプチドリンカー (G₄S)₃ (配列番号182) をコードする合成DNAを使用することによって、s c F v 遺伝子レパートリーを作製するためにランダムに一緒にスプライシングした。各 s c F v 遺伝子レパートリーを、ファージディスプレイベクター p C A N T A B 5 E (Pharmacia) 中に別個にクローニングした。形質転換後、 2.1×10^6 メンバーのライブラリーを得た。上記クローンのうちの90%は、PCRスクリーニングによって決定したところ、s c F v 遺伝子に関して適切なサイズの挿入物を有し、そしてそのク

50

ローンされた s c F v 遺伝子は、P C R フィンガープリントによって決定したところ、多様性であった。ライブラリー 1 からの 10 個の非選択的なクローンの D N A 配列決定は、全ての V_H 遺伝子が、マウス V_H 2 ファミリーに由来すること、ならびに全ての V_K 遺伝子がマウス V_K 4 ファミリーおよびマウス V_K 6 ファミリーに由来することを示した (K a b a t ら、(1991)、前出)。この観察された V 遺伝子の偏りに基づいて、科特異的 V_H プライマーおよび科特異的 V_K プライマーを、J_H 遺伝子セグメント特異的プライマーおよび J_K 遺伝子セグメント特異的プライマーと一緒に設計した (表 3)。次いでこれらのプライマーを、第 2 のファージ抗体ライブラリーを構築するために使用した。

【0203】

ライブラリー 2 について、マウスを、B o N T / A H_c で 3 回免疫化し、そして第 3 の免疫化の 2 週間後に屠殺した。そのマウスは、脾臓を回収される前に B o N T / A によってチャレンジされなかった。なぜならこれは、非 H_c 結合抗体の産生を生じるからである (以下の「ファージ抗体の選択および最初の特徴付け」を参照のこと)。上記脾臓を回収し、そしてファージ抗体ライブラリーを、V_H 特異的プライマー、J_H 特異的プライマー、V_K 特異的プライマー、および J_K 特異的プライマーを使用したことを除いて、上に記載したように構築した。形質転換後、 1.0×10^6 メンバーのライブラリーを得た。95% のクローンは、P C R スクリーニングによって決定したところ、s c F v 遺伝子についての適切なサイズの挿入物を有し、そして上記クローンした s c F v 遺伝子は、P C R フィンガープリントによって決定したところ多様性であった (データ示さず)。ライブラリー 2 由来の 10 種の選択されていないクローンの D N A 配列決定は、ライブラリー 1 において観察されるよりも大きい多様性を示し; V_H 遺伝子は、V_H 1、V_K 2 ファミリー、および V_K 3 ファミリーに由来し、そして V_K 遺伝子は、V_K 2 ファミリー、V_K 3 ファミリー、V_K 4 ファミリー、および V_K 6 ファミリー (K a b a t ら、(1991) 前出) に由来した。

【0204】

(B. ファージ抗体の選択および最初の特徴付け)

B o N T / A 結合ファージ抗体を単離するために、ファージを、上記ライブラリーからレスキューし、そして精製した B o N T / A または精製した B o N T / A H_c のいずれかに対して選択した。選択を、H_c に加えてホロ毒素に対して行った。なぜなら組換え毒素 H_c ホロ毒素における H_c の立体構造を模倣する程度が明確でなかったからである。B o N T / A バインダーおよび B o N T / A H_c バインダーについての選択を、ポリスチレンに吸着させた抗原に対して行った。さらに、H_c 結合ファージを、ビオチン化 H_c について、ストレプトアビジン磁性ビーズに対する捕捉 (ライブラリー 1 について) またはヘキサヒスチジンタグ化 H_c に対する捕捉、N i²⁺ - N T A アガロースに対する捕捉 (ライブラリー 2 について) を用いて溶液中で選択した。溶液中の選択を、ポリスチレンに吸着されたタンパク質に対する選択がネイティブなタンパク質を認識しないファージ抗体をもたらし得るという本発明者らの先の観察 (S c h i e r ら、(1995) I m m u n o t e c h n o l o g y、1:73-81) に基づいて利用した。溶液中の選択を、本発明者らが上記毒素を、交差反応性を破壊せずに首尾よくビオチン化できなかったことに起因して、ホロ毒素に対して行わなかった。

【0205】

2~3 ラウンドの選択後、少なくとも 67% の分析した s c F v は、選択のために使用した抗原に結合した (表 2)。固有の s c F v の数を、D N A フィンガープリント、その後の D N A 配列決定によって決定し、そして各 s c F v の特異性を、純粋な B o N T / A および組換え B o N T / A H_c に対する E L I S A によって決定し、そして B o N T / A に結合するが、H_c または H N に結合しない H N s c F v を、その軽鎖 (触媒ドメイン) に結合すると仮定した。合計で 33 種の固有の s c F v を、H_c によって免疫化し、かつ B o N T / A によってチャレンジしたマウスから単離した (表 5、ライブラリー 1)。ライブラリー 1 をホロ毒素について選択した場合、25 種の固有の s c F v が、単離された。しかし、これらお s c F v のうちの 2 種のみが、H_c を結合し、軽鎖を結合し、か

つH_Nを結合する部分を有した(Hatthawayら、(1984) J. Infect. Dis. 150:407-412)。上記2種のH_C結合scFvは、同様のエピトープを認識する他のscFvと同じく発現せず、したがってそれらは、親和性または中和能に関して特徴付けられなかった(以下を参照のこと)。

【0206】

H_Cについてのライブラリー1の選択は、8種のさらなる固有のscFvをもたらした(表3および4)。全体として、しかし、H_Cについて選択されたscFvの50%だけがまた、ホロ毒素を結合した。この結果は、H_C表面のかなりの部分がホロ毒素に到達できない可能性があることを示唆する。あるいは、scFvは、ホロ毒素に存在しないH_C立体構造を結合し得る。H_Cのみによって免疫化したマウス由来(ライブラリー2)の、ホロ毒素について選択した全てのscFvはまた、H_Cを結合した。しかし、ライブラリー1に関するように、H_Cについて選択したscFvの50%だけが、ホロ毒素を結合した。全てにおいて、18種の固有のH_C結合scFvを、ライブラリー2から単離し、合計で28種の固有のH_C結合scFvをもたらした(表5および6)。同一の配列または関連した配列のscFvを、溶液中で、ポリスチレンおよびH_Cに対して固定化したH_Cの両方について単離した。したがって、H_Cの場合において、選択の方法は、重要ではなかった。

【0207】

(表5. ファージ抗体ライブラリーから選択されたBoNT結合scFvの特異性)

【0208】

【表5】

scFv 特異性	固有のscFvの数	
	ライブラリー 1	ライブラリー 2
BoNT/A H _C	10	18
BoNT/A H _N	2	0
BoNT/A 軽鎖	21	0
合計	33	18

(C. エピトープマッピング)

全28種の固有のH_C結合scFvを、BIAcoreにおける表面プラズモン共鳴を使用してエピトープマッピングした。エピトープマッピングを、チップ表面のほぼ完全な飽和および少なくとも100RUの結合されたscFvを生じる濃度にてscFvの対を用いて行った。結合されたscFvの量を、対の各メンバーについて決定し、次いでその2種のscFvを、個々のscFvの測定のために使用した濃度と等しい最終濃度を与えるように一緒に混合した。異なるエピトープを認識するscFvは、一緒に注入した場合に、RU結合において相加的な増加を示し(図2パネルA)、一方で、同一のエピトープを認識するscFvは、RUの最小限の増加のみを示した(図2パネルB)。この技術によって、28種のscFvのマッピングは、H_Cに対して認識される4種の重複しないエピトープをもたらした(表6)。エピトープ1およびエピトープ2のみを認識するscFvを、ライブラリー1から得たが、全4種のエピトープを認識するscFvを、ライブラリー2から得た。

【0209】

同じエピトープを認識するscFv(C1およびS25; C9およびC15; 1E8および1G7; 1B6および1C9; C25およびC39; 2G5、3C3、3F4、および3H4; 1A1および1F1; 1B3および1C6; 1G5および1H6; 1F3および2E8)の多くは、V_HCDR3およびV_H遺伝子セグメントの高レベルの相同性によって証明されるような、同じV-D-J再配列に由来するV_Hドメインを有した(表6)。これらのscFvは、体細胞超変異またはPCRエラーによって導入される置換によってのみ異なる。エピトープ1およびエピトープ2について、同じエピトープを認識するscFvの大部分または全ては、同一か、または非常に類似したV_H遺伝子セグメントに由来するが、V_HCDR3の長さおよび配列に関して著しく異なる(エピトープ1については9種のscFvのうちの5種; エピトープ2については8種のscFvのうちの8種)

(表6)。これらは、異なるマウス由来の s c F v を含む。主要なレパートリーにおける V_H CDR 2 配列中の多様性の大きな程度 (Tomlinsonら、(1996) J. Mol. Biol.、256:813-817) に鑑みて、特定の V_H 遺伝子セグメントは、特定の病原性の抗原性形状を認識し得る結合部位を形成するそれらの能力に関して進化した可能性がある。対照的に、より大きい構造のバリエーションは、再配列した V_K 遺伝子において生じるようである。例えば、3種の異なる生殖系列遺伝子および CDR 1 主鎖の立体構造 (Chothiaら、(1987) J. Mol. Biol. 196:901-917) は、全ての V_H 遺伝子が同じ生殖系列遺伝子に由来するエピトープ 21 について観察される。鎖の対形成におけるこのような「乱雑」は、以前に報告されている (Clacksonら、(1991) Nature 352:624-628)。

10

【0210】

(D. 親和性、結合動態、およびインビトロ毒素中和)

親和性、結合動態、およびインビトロ毒素中和を、各エピトープに対する1つの代表的な s c F v 結合について決定した。各エピトープに関して、さらなる研究のために選択した s c F v は、エピトープマッピング研究の間に決定したように、高い発現レベルと緩徐な k_{off} との最適な組み合わせを有した。研究した4種の s c F v についての K_d は、 $7.3 \times 10^{-8} M$ と $1.1 \times 10^{-9} M$ との間の範囲であり(表7)、ハイブリドーマから産生されたモノクローナル IgG について報告されたもの (Footera、(1991) Nature 352:530-532) に匹敵する値であった。C25は、抗ボツリヌス毒素抗体について報告された最も高い親和性 ($K_d = 1.1 \times 10^{-9} M$) を有する。s c F v の間で、 k_{on} は、84倍を上回って異なり、そして k_{off} は、33倍を上回って異なった(表7)。インビトロ毒素中和を、マウス片側横隔膜調製物を使用し、そして BoNT/A 単独および $2.0 \times 10^{-8} M$ の s c F v の存在下において、50%の単収縮張力減少までの時間を測定することによって決定した。値を、50%の単収縮減少までの時間において報告する。エピトープ1 (S25) およびエピトープ2 (C25) に対する s c F v の結合は、神経麻痺までの時間を著しく延長させた: それぞれ、1.5倍 (152%) および 2.7倍 (270%) (表7および図3)。対照的に、エピトープ3およびエピトープ4に対する s c F v の結合は、神経麻痺までの時間に対する有意な効果を有さなかった。S25とC25との混合物は、神経麻痺までの時間に対して有意な相加的効果を有し、50%の単収縮減少までの時間を 3.9倍 (390%) 増大させた。

20

30

【0211】

(表6. 認識したエピトープによって分類した BoNT/A H_C 結合 s c F v の V_H および V_L の推定タンパク質配列)

【0212】

表・認識されるエピソードによって分類される、BoNT/A Hc 結合 scFv の V_H および V_L の推定されるタンパク質配列[illegible]

¹⁰ Lib. ライブラリー

"Lib. ライブラリー"

中白全尾配刻付

【 0 2 1 3 】

【表 7】

scFv クローン	エピトープ	K_d^a (M)	k_{on} ($10^4 M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} ($10^{-3} s^{-1}$)	麻痺の時間 b
S25	1	7.3×10^{-8}	1.1	0.82	85 ± 10^c
C25	2	1.1×10^{-9}	30	0.33	151 ± 12^c
C39	2	2.3×10^{-9}	14	0.32	139 ± 8.9^c
IC6	3	2.0×10^{-8}	13	2.5	63 ± 3.3
IF3	4	1.2×10^{-8}	92	11	52 ± 1.4
C25 + S25 の組み合わせ					$218 \pm 22^c, d$
BoNT/A 純粋毒素(コントロール)					56 ± 3.8

^a k_{on} および k_{off} を、表面プラズモン共鳴によって測定し、そして K_d を、 k_{off} / k_{on} として算出した。

^b $20 nM$ $scFv + 20 pM$ $BoNT/A$ を使用したマウス片側横隔膜アッセイにおける、 $BoNT/A$ 単独についての時間と比較した 50% の単収縮減少までの時間 (分)。 $C25 + S25$ 組み合わせに関して、各 $20 nM$ の $scFv$ を使用した。各値は、少なくとも 3 回の観察の平均 $\pm$ SEM である。

^c $BoNT/A$ と比較して $p < 0.01$ 。

^d $C25$ と比較して $p < 0.05$ 。

【0214】

(考察)

$BoNT$ は、単一のジスルフィド結合によって連結した重鎖および軽鎖からなる。その毒素のそのカルボキシ末端半部は、特定の膜レセプターに結合して内部移行をもたらす一方で、そのアミノ末端半部は、エンドソームからサイトゾルへの毒素のトランスロケーションを媒介する。その軽鎖は、シナプス伝達の不全および麻痺を生じる、必須のシナプトソームタンパク質を切断する亜鉛エンドペプチダーゼである。有効な免疫療法は、そのレセプターに対する毒素の結合を阻害しなければならない。なぜならば他の 2 つの毒素分画は、細胞内で発生するからである。結合を媒介する H_c 上のエピトープの同定は、受動免疫療法のためのより良好なワクチンの設計および高力価の中和モノクローナル抗体 (または中和抗体) の開発の両方のために、必須の第 1 工程である。

【0215】

この研究のために、本発明者らは、組換え $BoNT/A$ H_c を用いた免疫化によって中和エピトープに対する免疫応答を導くことを試みた。これは、その細胞レセプターに対する毒素の結合を妨げる抗体の産生をもたらすべきである。このアプローチの 1 つの制限は、組換え H_c がホロ毒素における H_c の立体構造を模倣する程度である。 H_c について選択された抗体の 50% がホロ毒素を認識するという事実は、その分子の大部分に対する著しい構造的相同性を示唆する。 H_c について選択された抗体の 50% は、ホロ毒素を結合しないが、これは、他の毒素ドメインに対する H_c 表面のかなりの部分のパッキング (packing) から生じ得る。しかし、本発明者らの結果は、これらの抗体のいくつかはホロ毒素に存在しない H_c 立体構造を結合しているという可能性、またはホロ毒素中に存在する立体構造的なエピトープが組換え H_c に存在しないという可能性を除外しない。これは、特定の立体構造的なエピトープに対する抗体の産生の失敗を生じ得る。それにもかかわらず、 H_c を用いた免疫化および選択は、ホロ毒素を結合するモノクローナル抗体の大きなパネルの単離をもたらした。対照的に、ホロ毒素またはトキシイドを用いた免疫化後に単離されたモノクローナル抗体は、他の毒素ドメイン (H_N または軽鎖)、または粗毒素調製物およびトキシイド中に存在する非毒素タンパク質に結合する (上記のライブラリー 1 からの結果、および Emanuel ら、(1996) *J. Immunol. Meth.*、193:189-197 を参照のこと)。

【0216】

最も大きい数の可能なモノクローナル抗体を産生および特徴付けするために、本発明者らは、ファージディスプレイを使用した。このアプローチは、結合に関して、数百万の抗

体の作製およびスクリーニングを可能にする。得られた抗体フラグメントは、既にクローニングされ、そして固有の抗体の数を同定するために容易に配列決定され得る。E. coli における発現レベルは、代表的に、C末端にヘキサヒスチジンタグを付与するベクター中にサブクローニングした後、IMACによって容易に精製され得るミリigramの量のscFvを産生するのに適切である。最終的に、V_H遺伝子およびV_L遺伝子は、完全なIgG分子を構築するためにサブクローニングされ得、ヒト化抗体を構築するためにグラフトされるか、または超高親和性の抗体を作製するために変異させられる。このアプローチによって、28種の固有のモノクローナル抗BoNT/A_{H_c}抗体を、産生および特徴付けした。

【0217】

10

上記抗体の配列は、様々であり、3種の異なるV_H遺伝子ファミリー、少なくとも13種の固有のV-D-J再配列、および3種のV_K遺伝子ファミリーからなる。BoNT/A_{H_c}抗体のこの大きなパネルの産生は、免疫化および選択に使用した抗原(BoNT/A_{H_c})の選択の結果であった。例えば、五価トキソイドによって免疫化したマウスのV遺伝子から構築したFabファージ抗体ライブラリーは、純粋な毒素(この場合では、BoNT/B)を結合する2種のためのFabをもたらした。そのFabの大部分は、トキソイド中に存在する非毒素タンパク質(Emanuelら、J. Immunol. Methods 193:189-197 (1996))を結合した。

【0218】

20

上記抗体の配列多様性にかかわらず、エピトープマッピングは、4種のみの重複しないエピトープを示した。エピトープ1およびエピトープ2は、免疫優勢であり、28種の上記抗体のうちの21種(75%)によって認識された。興味深いことに、免疫優勢なBoNT/A_{H_c}ペプチドの(非立体構造的な)エピトープのほぼ同じ数(3種~5種)が、五価トキソイドによる免疫化後のマウスポリクローナル抗体およびヒトポリクローナル抗体、ならびにホルムアルデヒドで不活化したBoNT/Aによる免疫化後のウマポリクローナル抗体(Atassi、(1996) J. Protein Chem.、15:691-699)によって認識される。

【0219】

30

scFv結合エピトープ1およびscFv結合エピトープ2は、マウス神経筋接合部における毒素誘導性の神経麻痺の部分的拮抗をもたらした。一緒に投与した場合、上記2種のscFvは、神経麻痺までの顕著に増加する時間を伴う相加的效果を有した。これらの結果は、BoNT/A_{H_c}上の2つの固有のレセプター結合部位の存在と一致する。BoNT/Aレセプターは、正式に同定されていなかったが、この結果は、リガンド結合研究の結果と一致し、この結果はまた、毒素上のレセプター結合部位の2つのクラス(高親和性および低親和性)を示し、そして毒素結合についての「二重レセプター」モデル(Montecucco、(1986) Trends Biochem. Sci. 11:314-317)をもたらした。しかし、これらの部位の両方がH_c上にあるか否かは、議論の余地がある。2つの研究において、BoNT/A_{H_c}は、結合および神経筋麻痺を阻害(Blackら、(1986) J. Cell Biol. 103:521-534; Blackら、(1980) Am. J. Med. 69:567-570)したのに対して、Daniels-Holgateら、(1996) J. Neurosci. Res. 44:263-271は、BoNT/A_{H_c}は運動神経末端における結合を阻害したが、マウス神経筋接合部における毒素誘導性の神経麻痺に対する拮抗作用を有さなかったことを示した。本発明者らの結果は、毒素の内部移行および毒性をもたらすH_c上の2つの「生産的な」レセプター結合部位の存在と一致する。scFvの効力における差は、レセプター結合部位に対するH_cの親和性における差を反映し得るか、またはH_cに対するscFvの親和性における10倍より大きい差を反映し得る。最後に、本発明者らは、任意の上記scFvが細胞表面に対する毒素の結合を実際にブロックすることを正式に示さなかった。神経麻痺までの時間において観察された効果は結合後の事象の妨害によって生じることが、考えられる。

40

50

【0220】

マウス片側横隔膜アッセイにおける毒素誘導性の神経麻痺の s c F v 拮抗は、 2.0×10^{-9} M のポリクローナルウマ抗毒素 (Per Immune Inc.) について観察されたもの (神経麻痺までの時間の 7.5 倍の延長) より低かった。この差は、さらなる結合部位をブロックする必要性、抗体の親和性もしくはアビディティにおける差、または結合できない凝集した毒素をもたらす交差反応効果に起因し得る。抗体結合の親和性はまた、重要な因子であるようである。なぜならば、上記毒素は、高親和性でそのレセプターに結合し (Williams ら、(1983) Eur. J. Biochem.、131: 437-445)、そして内部移行によって細胞の内側に濃縮され得るからである。注目すべきは、最も強力な s c F v が H_c に対する最も高い親和性を有することである。同じ中和エピトープを認識するが、異なる K_d を有する本明細書に記載される他の s c F v の有用性は、親和性の重要性を規定することに役立つはずである。しかし、これらの s c F v は、多くのアミノ酸によって異なり、そしてまた良好な特異性において異なり得、それは、結果の解釈を困難にする。あるいは、ファージディスプレイと組み合わせた突然変異誘発は、配列中の数個のアミノ酸のみによって異なるが、親和性において数桁で変動する s c F v の産生をもたらし得る (Schier ら、(1996) J. Mol. Biol.、263: 551-567)。同じアプローチは、抗体親和性をピコモル範囲 (Id.) に増大させるために使用され得る。

10

【0221】

中和についての「判断基準 (gold standard)」は、抗体と同時注入した毒素の致死的效果に対するマウスの保護である。インビトロ保護とインビボ保護との間の関係は、正式に確立されていないが、ウマ抗毒素は、両方の型のアッセイにおいて毒素を強力に中和する (上記、および Hatheway ら、(1984) J. Infect. Dis.、150: 407-412 を参照のこと)。この関係は本明細書中で報告される s c F v に関して保たれると考えられ、そしてこれは、実験的に検証され得る。

20

【0222】

このような研究は、小さい (25 kDa) s c F v 抗体フラグメントによって可能ではない。小さいサイズの s c F v は、迅速な再分布 (相における半減期は 2.4 ~ 12 分間である)、およびクリアランス (β 相における半減期は、1.5 ~ 4 時間である)、および迅速に検出不可能になる抗体レベルをもたらす (Huston ら、(1996) J. Nucl. Med. 40: 320; Schier ら、(1995) Immunotechnology、1: 73-81)、一方で、毒素レベルは、おそらく高いままである (Hildebrand ら、(1961) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107-284-289)。インビボ研究の実施は、s c F v の V_H 遺伝子および V_L 遺伝子から完全な IgG 分子を構築することによって容易にされる。ヒト定常領域の使用は、マウスモノクローナルよりも低い免疫原性であり、かつ現在使用されるウマ抗毒素よりもずっと低い免疫原性であるキメラ抗体をもたらす。免疫原性は、ヒト化抗体を産生するために、CDR グラフティングによってさらに減少され得る。

30

【0223】

(実施例 2: 組換えオリゴクローナル抗体によるボツリヌス神経毒素の強力な中和)

40

芽胞形成細菌 *Clostridium botulinum* は、ボツリヌス神経毒素 (BoNT) (公知である最も有毒な物質 (Gill、(1982) Microbiol. Rev. 46: 86-94)) を分泌する。上記タンパク質毒素は、3つの機能的ドメインを含む重鎖および軽鎖からなる (Simpson、(1980) J. Pharmacol. Exp. Ther. 212: 16-21; Montecucco および Schiavo (1995) Q. Rev. Biophys. 28: 423-472; Lacy ら、(1998) Nat. Struct. Biol. 5: 898-902)。重鎖の末端部分 (HC) は、シナプス前ニューロン上のシアログングリオシドレセプターおよび推定上のタンパク質レセプターに結合する結合ドメインを含み、その結合は、毒素のエンドサイトーシスを生じる (Dolby ら、(1984) Nature (London) 307: 457

50

－460; Montecucco, (1986) Trends Biochem. Sci. 11:315-317)。重鎖のN末端部分(H_N)は、毒素にエンドソームを回避させるトランスロケーションドメインを含む。軽鎖は、血清型に依存してSNARE複合体の異なるメンバーを切断する亜鉛エンドペプチダーゼであり、その切断は、神経筋伝達のブロックをもたらす(Schiavoら、(1992) Nature (London) 359:832-835; Schiavoら、(1993) J. Biol. Chem. 268:23784-23787)。

【0224】

7種のBoNT血清型(A~G; LacyおよびStevens、(1999) J. Mol. Biol. 291:1091-1104)が存在し、そのうちの4種(A、B、E、およびF)は、ヒト疾患のボツリヌス中毒を引き起こす(Arnonら、(2001) J. Am. Med. Assoc. 285:1059-1070)。ボツリヌス中毒は、弛緩性麻痺によって特徴付けられ、直ちに致命的でない場合、ボツリヌス中毒は、集中治療室および機械換気における長期の入院を必要とする。上記毒素の強力な麻痺性能は、頸部ジストニア、脳性麻痺、外傷後の脳傷害、および脳卒中後の痙攣を含む過剰活性筋の状態の範囲を処置するための医薬としての低用量での使用をもたらしている(Mahantら、(2000) J. Clin. Neurosci. 7:389-394)。BoNTはまた、それらの極度の効力および死亡率、生産および輸送の容易性、ならびに長期の集中治療の必要性(Arnonら、(2001) J. Am. Med. Assoc. 285:1059-1070)に起因して、Centers for Disease Control (CDC)によって、生物テロリズムに関して最も高い危険性を有する6種の脅威因子(threat agent) (「Category A agent」)のうちの1種として分類される。イラクおよびかつてのソビエト連邦の両方は、兵器として使用するためにBoNTを生産し(United Nations Security Council (1995) Tenth report of the executive committee of the special commission established by the secretary-general pursuant to paragraph 9 (b) (I) of security council resolution 687 (1991), and paragraph 3 of resolution 699 (1991) on the activities of the Special Commission (United Nations Security Council, New York); Bozhevaら(1999) Former soviet biological weapons facilities in Kazakhstan: past, present, and future. (Center for Nonproliferation Studies, Monterey Institute of International Studies, Monterey, CA))、そして日本のカルトであるオウム真理教は、生物テロリズムにBoNTを使用することを試みた(Arnonら、(2001) J. Am. Med. Assoc. 285:1059-1070)。これらの脅威の結果として、特定の薬学的因子は、中毒の予防および処置に必要とされる。

【0225】

ボツリヌス中毒の予防または処置のための特定の低分子薬物は、存在しないが、研究的な五価トキソイドワクチンは、CDCから利用可能であり(Siegel (1988) J. Clin. Microbiol. 26:2351-2356)、そして組換えワクチンが、開発中である(ByrneおよびSmith、(2000) Biochimie 82:955-966)。それにもかかわらず、多くの民間人または軍人のワクチン接種は、疾患または曝露の希少性、およびワクチン接種がBoNTのその後の医学的使用を妨げるという事実に起因して行われない。曝露後のワクチン接種は、疾患の迅速な発症に起因して役に立たない。毒素中和抗体(Ab)は、曝露前または曝露後の予防のためか、あるいは処置のために使用され得る(Franzら、(1993) Pp. 473-476、B

. R. Das Gupta (編)、Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Neurotransmission and Biomedical Aspects、編、Das Gupta、B. R. Plenum、New York)。少量のウマ抗毒素およびヒトボツリヌス免疫グロブリンの両方が、存在し、そして現在、それらは、それぞれ、成人ボツリヌス中毒 (BlackおよびGunn、(1980) Am. J. Med.、69:567-570; Hibbsら、(1996) Clin. Infect. Dis. 23:337-340) および乳児ボツリヌス中毒 (Arnon、(1993) Pp. 477-482、Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Neurotransmission and Biomedical Aspects、編、Das Gupta、B. R. Plenum、New York) を処置するために使用される。組換えモノクローナル抗体 (mAb) は、感染症の危険性を含まず、かつ血漿滲血にヒトドナーを必要としない抗毒素の無制限の供給を提供し得る。このようなmAbは、妥当なコストにおける適切な数の用量を提供するために、高い効力でなければならない。いくつかの場合において、ポリクローナルAbの効力は、単一のmAbにおいて再利用され得る (Langら、(1993) J. Immunol. 151:466-472)。

BoNTの場合において、強力な中和mAbは、依然としてもたらされていない：単一のmAbは、マウスにおける毒素の50%致死量 (LD50) の多くても10倍~100倍にて中和する (Plessら、(2001) Infect. Immun. 69:570-574; Hallisら、(1993) Pp. 433-436、Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Neurotransmission and Biomedical Aspects、編、Das Gupta、B. R. Plenum、New York)。この例において、本発明者らは、BoNT血清型A (BoNT/A) が、2種または3種のmAbを組み合わせることによってインビトロおよびインビボで非常に強力に中和され得、このことがボツリヌス中毒ならびに他の病原体および生物学的脅威因子によって引き起こされる疾患を予防および処置するための薬物への手段を提供すること示す。

【0226】

(方法)

(IgGの構築)

C25単鎖可変フラグメント (scFv)、S25単鎖可変フラグメント、および3D12単鎖可変フラグメントのV_H遺伝子を、プライマー対 (GTC TCC TGA GCT AGC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT (配列番号183)、およびGTA CCA ACG CGT GTC TTG TCC CAG GTC CAG CTG CAG GAG TCT (C25、配列番号184)、GTA CCA ACG CGT GTC TTG TCC CAG GTG AAG CTG CAG CAG TCA (S25、配列番号185)、またはGTA CCA ACG CGT GTC TTG TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT (3D12、配列番号186) のいずれか) を用いてPCRを使用することによって各ファージミドDNAから増幅した。DNAを、MluIおよびNheIで消化し、N5KG1Val-Lark (Mitch Reff、IDEC Pharmaceuticals、San Diegoの贈呈) にライゲーションし、正しいV_Hを含むクローンを、DNA配列決定によって同定した。C25 scFv、S25 scFv、および3D12 scFvのV_L遺伝子を、プライマー対 (TCA GTC GTT GCA TGT ACT CCA GGT GCA CGA TGT GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT (配列番号187) およびCTG GAA ATC AA A CGT ACG TTT TAT TTC CAG CTT GGT (C25、配列番号188)、TCA GTC GTT GCA TGT ACT CCA GGT GCA CGA TGT GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT (配列番号189) およびCTG GAA ATC AAA CGT ACG TTT GA

T T T C C A G C T T G G T (S 2 5、配列番号 1 9 0)、または T C A G T
C G T T G C A T G T A C T C C A G G T G C A C G A T G T G A
C A T C G T G A T G A C C C A G T C T (配列番号 1 9 1) および C T G
G A A A T C A A A C G T A C G T T T T A T C T C C A G C T T
G G T (3 D 1 2、配列番号 1 9 2)) を用いて各ファージミド DNA から増幅し、p
C R-T O P O (I n v i t r o g e n) 中にクローニングし、そして正しい V_{__} を含む
クローンを、DNA 配列決定によって同定した。V_{__} 遺伝子を、D r a I I I および B s
i W I を用いて p C R-T O P O から切り出し、そして適切な V_H 遺伝子を含む D r a I
I I 消化および B s i W I 消化を行った N 5 K G 1 V a l-L a r k DNA にライゲー
ションした。正しい V_H 遺伝子と正しい V_K 遺伝子とを含むクローンを、DNA 配列決定
によって同定し、そしてベクター DNA を、エレクトロポレーションによって C H O D
G 4 4 細胞をトランスフェクトするために使用した。安定な細胞株を、G 4 1 8 中で選択
することによって確立し、そして 1 L スピナーフラスコ中に拡大培養した。I g G を含む
上清を、回収し、限外濾過によって濃縮し、そしてプロテイン G (P h a r m a c i a)
に対して精製した。

10

【0227】

(I g G 親和性および I g G 結合動態の測定)

I g G 結合動態を、B I A c o r e (P h a r m a c i a B i o s e n s o r) にお
ける表面プラズモン共鳴を使用して測定し、そして K_d を算出するために使用した。約 2 0 0
~ 4 0 0 応答単位 (r e s p o n s e u n i t) の精製した I g G (1 0 m M アセテ
ート中の 1 0 ~ 2 0 μ g / m l、p H 3. 5 ~ 4. 5) を、N-ヒドロキシスクシニミド-
N-エチル-N'- (ジメチルアミノプロピル) -カルボジイミド化学を使用すること
によって C M 5 センサーチップにカップリングさせた。精製した B o N T / A H_C につい
ての会合速度定数を、5 0 ~ 8 0 0 n M の範囲の濃度を使用して、1 5 μ l / 分の連続的な
流れにおいて測定した。その会合速度定数 (k_{on}) を、 $(\ln(dR/dt)) / t$ 対
濃度のプロットから決定した。解離速度定数 (k_{off}) を、再結合を防止するために 3
0 μ l / 分の流速を使用することによって、分析した s c F v の最も高い濃度におけるセ
ンサーグラムの解離部分から決定した。 K_d を、 k_{off} / k_{on} として算出した。

20

【0228】

(インビトロ毒素中和の測定)

横隔神経片側横隔膜調製物を、雄 C D-1 マウス (2 5 ~ 3 3 g) から切除し、そして
1 3 5 m M N a C l、5 m M K C l、1 m M N a₂ P O₄、1 5 m M N a H C O₃、1 m M M g C l₂、2 m M C a C l₂、および 1 1 m M グルコースに懸濁した。
。インキュベーションバスを、9 5 % O₂、5 % C O₂ を用いて泡立て、そして 3 6
°C に維持した。横隔神経を、0. 2 m s 持続時間の四角波で 0. 0 5 H z にて刺激した。
等尺性単収縮張力を、力変位変換器 (M o d e l F T 0 3、G r a s s) を用いて測定
した。精製した I g G 抗体を、B o N T A と一緒に室温にて 3 0 分間インキュベートし
、次いで組織のバスに添加し、6. 0 $\times 10^{-8}$ M (S 2 5 単独および 3 D 1 2 単独) ま
たは 2. 0 $\times 10^{-8}$ M (C 2 5 単独) の I g G 最終濃度および 2. 0 $\times 10^{-11}$ M の
B o N T / A 最終濃度をもたらした。I g G の対に関して、各 I g G の最終濃度を、5 0
% 減少させ、そして全 3 種の I g G の混合物の研究に関して、各 I g G の濃度を、6 7 %
減少させた。

30

40

【0229】

(インビボ毒素中和の測定)

5 0 マイクログラムの適切な I g G を、0. 5 m l (総容量) のゼラチンリン酸緩衝液
中の B o N T / A 神経毒素 (H a l l 株) の示された数のマウス L D₅₀ に添加し、そし
て R T にて 3 0 分間インキュベートした。A b の対に関して、2 5 μ g の各 A b を添加し
、そして 3 種の A b の組み合わせに関して、1 6. 7 μ g の各 A b を添加した。次いでそ
の混合物を、雌 C D-1 マウス (1 6 ~ 2 2 g) に対して i. p. に注射した。マウスを
、1 0 の群において研究し、そして少なくとも毎日観察した。死亡の最終集計を、注射の

50

5日後に決定した。

【0230】

(mAbの溶液親和性の測定)

平衡結合研究を、抗体と抗原との反応混合物中の占有されていない結合部位を有する抗体を定量するためにKinExAフロー蛍光光度計を使用して行った。1種、2種、または3種の異なる抗体から構成される反応混合物を用いた研究を、それぞれ、342 pM、17.2 pM、および17.2 pMの抗体の総濃度を含むHepes緩衝化生理食塩水(pH 7.4)において行った。全ての場合において、可溶性の毒素の濃度を、0.1未満から10倍を超える見かけの K_d の値まで変化させた(12の濃度、最小)。1種、2種、または3種の異なる抗体から構成される反応混合物を、平衡が達成されたこと確保するために、25°Cにて、それぞれ0.5時間、3時間、および17時間インキュベートした。

10

【0231】

(結果)

BoNT/Aを中和し得るmAbを産生するために、本発明者らは、先に、組換えBoNT/A結合ドメイン(H_C)によって免疫化したマウス由来のscFvファージ抗体ライブラリー、および五価ボツリヌストキソイド(Amersdorferら、(1997) Infect. Immun. 65:3743-3752; Amersdorferら、(2002) Vaccine 20:1640-1648)によって免疫化したヒト由来のscFvファージ抗体ライブラリーを産生した。これらのライブラリーから100種より多い固有のmAbをスクリーニングした後、BoNT/A H_C 上の重複しないエピトープを結合し、かつインビトロで毒素を中和する(マウス片側横隔膜モデルにおいて神経麻痺までの時間を延長する; Amersdorferら、(1997) Infect. Immun. 65:3743-3752; Amersdorferら、(2002) Vaccine 20:1640-1648)、scFvの3つの群を、同定した。インビトロ毒素中和は、重複しないエピトープを結合する2種のscFvを組み合わせた場合、顕著に増大した。インビボ毒素中和は、血清からの25 kDaのscFvの迅速なクリアランス(Colcherら、(1990) J. Natl. Cancer Inst. 82:1191-1197)に起因して決定できなかった。

20

【0232】

インビボBoNT神経毒素中和を評価するために、IgGを、インビトロで毒素を中和した3種のBoNT/A scFvの V_H 遺伝子および V_L 遺伝子から構築した。 V_H 遺伝子および V_L 遺伝子を、哺乳動物発現ベクター中に連続的にクローニングし、 V_L へのヒト C_L 遺伝子の融合および V_H へのヒト $\gamma 1$ 遺伝子の融合をもたらした。安定に発現する細胞株を確立し、そしてIgGを、マウス V -ドメインおよびヒト C -ドメインを有するキメラIgG(マウスscFv C25およびマウスscFv S25について)、ならびに完全ヒトIgG(ヒトscFv 3D12について)を産生する上清から精製した。IgGの平衡結合定数(K_d)を測定し、そしてその平衡結合定数は、それらが由来したscFvの結合定数に少なくとも匹敵することが見出された(表8)。上記IgGのうちの2種(S25および3D12)の抗原結合親和性は、概して会合速度定数(k_{on})の増大に起因して、対応するscFvについての抗原結合親和性よりも顕著に高かった(より低い K_d)。本発明者らは、これは上記分子の安定性の増大を反映し、機能的な抗体の濃度が増加すると仮定する。

30

40

【0233】

(表8. BoNT/A IgGならびに上記IgGが由来したscFvについての、会合速度定数(k_{on})および解離速度定数(k_{off})ならびに平衡解離定数(K_d))

【0234】

【表 8】

Ab	IgG				scFv		
	K_d	k_{on}	k_{off}		K_d	k_{on}	k_{off}
C25	1.69×10^{-9}	1.32×10^6	2.24×10^{-3}		1.10×10^{-9}	3.00×10^5	3.30×10^{-4}
S25	3.90×10^{-9}	1.46×10^6	5.70×10^{-3}		7.30×10^{-8}	1.10×10^4	8.10×10^{-4}
3D12	5.62×10^{-11}	2.26×10^6	1.27×10^{-4}		3.69×10^{-8}	1.30×10^4	5.00×10^{-4}

IgGによるインビトロ毒素中和を、マウス片側横隔膜アッセイ（Desphandera、（1995）Toxicon 33：551－557）において決定した。毒素単独と比較して、3種のIgGの各々は、神経麻痺までの時間を顕著に増大させ、C25は、最も強力であった（図4）。毒素中和における顕著な相乗効果が、IgGの対を研究した場合に観察された。これらの研究のために、その高い効力および片側横隔膜調製物が8時間の寿命を有するという事実に起因して、研究したC25 IgGの濃度を3倍～20nMに減少させる必要があった。IgGの各対は、いずれかの単一のIgGについての時間と比較して、神経麻痺までの時間を顕著に増大させた（図4）。全3種のIgGの混合物は、神経麻痺までの時間をさらに増大させたが、この差は、研究した横隔膜の少ない数に起因して、抗体の対と比較した場合に統計的有意性に到達しなかった。

【0235】

インビボ毒素中和を、マウスアッセイを使用して研究し、このアッセイにおいて、毒素およびAbを予め混合し、そしてi.p.に注射し、そして死亡までの時間および生存するマウス数を決定した（Sheridanら、（2001）Toxicon 39：651－657）。50マイクログラムの単一の各mAbは、死亡までの時間を延長したが、20LD₅₀によってチャレンジしたマウスを保護できなかった（図5A）。対照的に、mAbの任意の対は、100LD₅₀の毒素によってチャレンジしたマウスを完全に保護した（図5B）。500LD₅₀において、mAbの対のうちの2種（S25+3D12またはC25+S25）を受容したマウスの大部分が、死亡したのに対し、C25+3D12の対を受容したマウスの80%は、生存した（図3）。全3種のmAb（オリゴクロナルAb）の混合物を受容した全てのマウス（500LD₅₀の毒素によってチャレンジした）は、生存した（図6）。これらの研究において、投与したAbの総量を、マウス1匹あたり50μgにて一定に保った。効力を決定するために、mAb対およびオリゴクロナルAbを、漸増用量の毒素において研究した（図6）。最も強力なmAb対（C25+3D12）は、2, 500LD₅₀によってチャレンジしたマウスの生存を伴わずに、1, 000LD₅₀によってチャレンジしたマウスの90%を保護した。対照的に、オリゴクロナルAbは、20, 000LD₅₀の毒素によってチャレンジした10匹のマウスのうちの5匹の生存を伴って、5, 000LD₅₀の毒素によってチャレンジした全てのマウスを完全に保護した。上記オリゴクロナルAbの効力を、標準的なマウス中和バイオアッセイ（HathewayおよびDang、（1994）Pp. 93－107、Therapy with Botulinum Toxin、編、Jankovic, J., Dekker、New York）の改変を使用して滴定し、そして乳児ボツリヌス中毒を処置するために使用されるヒトボツリヌス免疫グロブリン（Arnon、（1993）Pp. 477－482、Botulinum and Tetanus Neurotoxins：Neurotransmission and Biomedical Aspects、編、DasGupta、B. R. Plenum、New York）よりも90倍強力である45国際単位（IU）/mgのAbであると決定した。定義によれば、1IUは、10, 000 LD₅₀のBoNT/A毒素を中和する（Bowmer（1963）Bull. W. H. O. 29：701－709）。

【0236】

2つの可能な機構が、mAbを組み合わせた場合に観察される効力の増大を説明し得る：毒素に対するAb混合物の機能的結合親和性の増大および／または細胞レセプターに結

合する毒素表面のブロックの増大。機能的結合親和性に対する抗体を組み合わせることの効果を決定するために、見かけの K_d を、フロー蛍光光度計を使用して溶液の反応混合物中に残存する遊離の抗体を定量することによって、単一の各mAb、mAbの対、および全3種のmAbの混合物について決定した。単一のmAbについて、均一な溶液において測定した抗原結合親和性（溶液中の抗原および抗体の両方；図7）は、BIACoreにおける表面プラズモン共鳴（抗体が固定化され、そして抗原のみが溶液中にある）によって測定したものよりも低かった（より高い K_d ）（表8）。最も大きいインビトロでの効力を示した抗体C25を、抗体3D12と等モル量で混合し、得られたAbの組み合わせは、上記毒素に65 pMの見かけの K_d （個々の抗体単独を用いて観察されたものよりも200倍および10倍高い親和性（より低い K_d ））で結合した。その混合物に対する等モル量の第3のmAb（S25）の添加は、見かけの親和性を18 pMまでさらに増大させた。C25とS25との等モル混合物は、親和性のより小さい2倍の増大をもたらし、このことは、この対がC25と3D12との組み合わせよりもインビボで強力でない理由を説明し得る。複数のmAbによって観察された機能的親和性の増大は、第2のmAbおよび第3のmAbのより高い親和性での結合をもたらす、第1のmAbの結合において生じる毒素の立体構造の変化、または一価抗原から多価抗原へと毒素を変化させるmAb結合のいずれかに起因し得る（Moyl eら、（1983）J. Immunol. 131: 1900-1905）。これは、「アビディティ効果」、および親和性の増大をもたらす。アビディティ効果は、多価抗原（例えば、細胞表面）に対するIgG結合に関して十分に認識および特徴付けされている（CrothersおよびMetzger、（1972）Immunoch emistry 9: 341-357）が、溶液中で生じるものとしては十分に理解されていない。

【0237】

測定した K_d の増大は、mAb対およびオリゴクローナルAbについて観察されたインビボでの効力の増大と一致する。平衡結合方程式の再構成：

遊離の毒素／結合した毒素 = K_d ／[血清抗体]

2 mlのマウス血液容量を仮定すると、その血清抗体濃度は、マウスが50 μ gのAbを受容する場合、160 nMである。毒素の投与される量は、LD₅₀の高倍数である（結合した毒素～投与される毒素）。したがって、上記方程式は、

遊離の毒素／投与される毒素 = K_d ／160 nM

へと単純化される。50%のマウスの死亡をもたらす投与される毒素の量を決定するために、遊離の毒素の量を1 LD₅₀に置換し、そして投与される毒素について解き、方程式：

投与される毒素（LD₅₀） = 1 LD₅₀ × 160 nM／ K_d

を得る。C25について解 K_d を使用して、50%のマウスが生存する推定される毒素用量は、16 LD₅₀である（投与される毒素 = 1 LD₅₀ × 160 nM／10 nM）。この計算がC25 Abと3D12 Abとの対、およびオリゴクローナルAbに適用される場合、抗体を組み合わせることにおける効力の増大の大きさは、機能的親和性の増大と平行する（表9）。

【0238】

（表9．組換え抗体による、観察された毒素中和および予測される毒素中和）

【0239】

【表9】

抗体	予想された毒素中和	観察された毒素中和
C25	16 LD ₅₀ s	<20 LD ₅₀ s
C25 + 3D12	2,500 LD ₅₀ s	1,500 LD ₅₀ s
C25 + 3D12 + S25	8,900 LD ₅₀ s	20,000 LD ₅₀ s

オリゴクローナルAbによる強力な毒素中和のための第2の可能な機構は、細胞レセプ

ターに結合する毒素結合ドメイン表面上の複数のエピトープをブロックする必要性である。毒素は、毒素結合ドメイン上の少なくとも2つの部位を介して細胞レセプターに結合すると仮定されている(Dollyら、(1984) Nature (London) 307: 457-460; Montecucco、(1986) Trends Biochem. Sci. 11: 315-317)。これらとしては、ガングリオシド結合部位および推定上のタンパク質レセプター結合部位が挙げられる。実際に、空間的に離れた2つのガングリオシド結合部位は、類似の破傷風毒素の共結晶構造において観察されており(Fotinouら、(2001) J. Biol. Chem. 276: 32274-32281)、そして重複しない破傷風毒素エピトープを結合するmAbは、GT1bガングリオシドに対する毒素の結合をブロックし得る(Fitzsimmonsら、(2000) Vaccine 19: 114-121)。本発明者らの先のエピトープマッピング研究は、BoNT結合ドメイン(HC)の広い部分をブロックする複数のmAbと一致する(Mullaneyら、(2001) Infect. Immun. 69: 6511-6514)。上記mAbのうちの2種(S25および3D12)は、BoNT HCのC末端サブドメインを結合する。C25 mAbは、BoNT HCのN末端サブドメイン由来の配列およびC末端サブドメイン由来の配列からなる立体構造的なエピトープを結合する。上記エピトープマッピングと一致する1つのモデルは、上記3種のmAbエピトープを、同じHCの面上に配置し、そしてその面は、推定上の細胞ガングリオシドレセプターGT1bに対する公知のドッキング部位と重なる(Mullaneyら、(2001) Infect. Immun. 69: 6511-6514)。

【0240】

(考察)

結論として、本発明者らは、6種のクラスA細菌兵器のうちの1種であるBoNT/Aが3種のみmAbからなるオリゴクローナルAbによって強力に中和され得ることを示した。オリゴクローナルAbは、超免疫ヒトグロブリンよりも90倍強力であり、そして超免疫モノ血清型ウマA型抗毒素の効力に近づく(Sheridanら、(2001) Toxicon 39: 651-657)。したがって、ポリクローナル血清の効力は、3種のみ重複しないエピトープを結合するmAbに逆重畳(decconvolute)し得るか、またはそのmAbに戻り得る。この相乗効果は、上記3種のmAbに対し、任意の単一のmAbの効力と比較して20,000倍よりも大きい効力の増大をもたらす。他のものは、破傷風毒素またはHIV感染の中和におけるモノクローナル抗体の間の相乗作用を、先に示した。破傷風毒素の場合において、3種~4種のモノクローナル抗体の組み合わせは、インビボ毒素中和の効力を、200倍まで増大させた(Volkら、(1984) Infect. Immun. 45: 604-609)。HIVの場合において、3種または4種のmAbの組み合わせは、個々のmAbと比較して、ウイルス中和の効力を10倍に増大させた(Zwickら、(2001) J. Virol. 75: 12198-12208)。したがって、本発明者らの観察は、多くのシステムにおいて一般的であると分かっているようである。しかし、本発明者らは、増大した効力が、毒素中和の場合において、混合抗体の機能的親和性の大きな増大によって生じるようであることを示す。このような機構がウイルス中和について真実のままであるか否かは、不明確である。

【0241】

毒素に対するポリクローン性の体液性免疫応答が、数種のみ重複しないエピトープを結合するAbによって機能的に優勢になると、仮定し得る。効力の増大は、個々のmAbと比較して、オリゴクローナルAbの K_d の大きな減少から主に生じるようであり、そしてまた細胞レセプターと相互作用する毒素表面のより大きいブロックを表す。このような機構は、溶液中で多くの抗原に対して一般的に適用可能であり得、このことは、オリゴクローナルAbがmAbよりも強力な抗原中和のための一般的手段を提供し得ることを示唆する。C25 mAbの K_d をほぼpMに操作することによって同様の効力を達成することは、可能であり得るが、オリゴクローナルAbは、強力な抗毒素への、より単純であり、より迅速な手段を提供する。

【0242】

オリゴクローナルAbはまた、BoNT/A中毒の予防および処置のための薬物の安全かつ無制限な供給を提供する。上記Abは、キメラIgGまたはヒトIgGのいずれかからなるので、生産は、安全な抗毒素の備蓄をもたらすために直ぐに拡大され得る。あるいは、本発明者らは、既に、キメラS25 IgGを完全ヒトIgGによって置換しており、そしてオリゴクローナルAbの効力を2倍よりも大きく増大させた。研究は、キメラC25を完全ヒトホモログによって置換するために行なわれている。キメラmAb、ヒト化mAb、およびヒトmAbは、治療因子（その産生の手段が公知である）のさらに重要になっているクラスを代表する。10種のmAbが、FDAによって、ヒトの治療について認可されており、そして70種より多い他のmAb治療薬が、臨床試験中である（Reichert、（2001）Nat. Biotechnol. 19:819-822）。4週間までの排泄半減期によって、Abは、毒素からの数ヶ月間の保護を提供し得るか、または処置のために使用され得る。オリゴクローナルAbは、他のBoNT毒素血清型、および他のクラスA因子に適用可能である。炭疽は、毒素媒介性疾患であり、そしてAbがこの因子に関して保護的であることを、示している（Littleら、（1997）Infect. Immun. 65:5171-5175; Beedhamら、（2001）Vaccine 19:4409-4416）。ワクシニア免疫グロブリンは、痘瘡または免疫無防備状態の宿主のワクチン接種から生じる合併症を、予防または処置するために使用され得る（Feery、（1976）Vox Sang. 31:68-76）。Abはまた、出血熱ウイルスによって引き起こされる悪疫および疾患に対して有用であり得る（Hillら、（1997）Infect. immun. 65:4476-4482; Wilsonら、（2000）Science 287:1664-1666）。本発明者らのデータは、BoNTならびに細菌戦および生物テロリズムの他の因子に対抗するためのオリゴクローナルAbの迅速な開発および評価を支援する。

【0243】

（実施例3）

（免疫性ヒトファージライブラリーおよび非免疫性ヒトファージライブラリー由来の抗ボツリヌスA型抗体の遺伝的比較ならびに免疫学的比較）

ボツリヌス中毒における抗体応答を理解することは、ワクチン設計および受動的予防のために重要である。この活性を調査するために、本発明者らは、ファージディスプレイを使用して、分子レベルでBoNT/A（ボツリヌス神経毒素血清型A）結合ドメイン（HC）に対する免疫応答を研究した。上記scFv抗体を、（a）五価ボツリヌストキソイドによって免疫化したヒトボランティア、ならびに（b）非免疫のヒト末梢血リンパ球およびヒト脾臓細胞から調製したV遺伝子レパートリーから単離した。ボツリヌス結合scFvを発現する血清型特異的ファージの大きなパネルを、両方のライブラリーから選択し得る。BoNT/A HCに対する免疫scFvバインダー（binder）のエピトープマッピングは、驚くべきことに、2つの異なる群（クラスターIおよびクラスターII）に対応した立体構造的なエピトープを認識する限定された数のscFvを示した。クラスターI由来のscFvのみが、マウス片側横隔膜アッセイにおいて中和活性を示した。非免疫性ライブラリーに由来する抗BoNT/A HCクローンは、便宜的に、クラスターIII～XIにグループ分けされ得、そして重複するエピトープを、クラスターIまたはクラスターIIと共有しないようであった。さらに、それらは、生物学的に顕著な濃度で毒素を中和しないことを示した。したがって、本発明者らは、五価ボツリヌストキソイドに基づくワクチンが結合ドメインHC上に露出した限定された数の免疫優勢なエピトープに対する体液性免疫応答を導くことを、示唆する。

【0244】

（導入）

ボツリヌス毒素は、Clostridium属に属する多くの細菌種によって産生される7種の異なる血清型（A～G）として存在する麻痺性神経毒素である（Hatheway、（1989）Pp. 3-24、Simpson LL、編集者、Botulinum

neurotoxin and tetanus toxin. San Diego: Academic Press)。それらは、単鎖タンパク質(Mr:150,000)として産生され、そしてジスルフィド結合および非共有結合によって1つに保たれる2つの鎖(重鎖(M_r:100,000)および軽鎖(Mr:50,000))の形成をもたらす限定的なタンパク質分解によって完全に活性化される(Niemann、(1991) Pp. 303-348、Alouf JE、Freer JH、編集者、Source book of bacterial protein toxins. New York: Academic Press; Simpson、(1990) J Physiol. 84:143-151)。中毒は、クロストリジウム属に汚染された食物の摂取(食物媒介性ボツリヌス中毒)、乳児の腸管感染(乳児ボツリヌス中毒)、および創傷の深部皮下の感染(創傷ボツリヌス中毒)によって生じる。ヒトボツリヌス中毒は、A型、B型、およびE型によって最も頻繁に引き起こされ、そして稀にFによって引き起こされる(Dowell、(1984) Rev Infect Dis.、6(第1補遺):202-207; Botulism in the United States. Handbook for epidemiologists, clinicians and laboratory workers. Atlanta, Center for Disease Control、1980)。BoNT(ボツリヌス神経毒素血清型)は、コリン作動性神経終末に対して優先的に作用して、アセチルコリンの放出をブロックする(Habermannら、(1986) Curr Top Microbiol Immunol.、129:93-179; Montecuccoら、(1994) Mol Microbiol.、13:1-8)。BoNTの作用は、3つの工程を包含する(Simpson、(1986) Ann Rev Pharmacol Toxicol.、26:427-453): (1) 重鎖のC末端HCを介したシナプス前膜上のレセプターに対する結合; (2) 重鎖のN末端HNを介した、軽鎖のサイトゾル中へのトランスロケーション; および (3) 軽鎖の亜鉛プロテアーゼ活性による、シナプス小胞のドッキングおよび融合タンパク質複合体における1つ以上の重要な成分の切断(Montecuccoら、(1994) Mol Microbiol.、13:1-8; Schiavo、(1992) J Biol Chem.、267:23479-23483; Schiavoら、(1995) Curr Top Microbiol Immun. 195:257-275)。受動免疫療法は、ヒトの病原体およびそれらの毒素に対する有益な予防的アプローチならびに治療的アプローチとして確立されている(概説については、Gronskiら、(1990) Mol Immunol. 28:1321-1332およびCross(1997) P. 97、Cryz SJ、編集者、Immunotherapy and vaccines. Weinheim, Germany: VCH Verlagsgesellschaftを参照のこと)。ボツリヌス中毒の場合において、BoNT重鎖のC末端ドメイン(HC)を認識する抗体調製物は、その細胞レセプターに対するその毒素の結合を妨げる得ると考えられる。組換えHCによるマウスの免疫化は、1,000,000マウスi. p. LD₅₀までのチャレンジ用量に対して、インビボでの良好な保護を提供した(Claytonら、(1995) Infect Immun.、63:2738-2742; Byrneら、(1998) Infect Immun.、66:10)。ウマ血漿由来のポリクローナル抗ボツリヌス抗体調製物(ウマHIG)は、過去において、80%より多い成人ボツリヌス中毒患者に投与されてきた(MiddlebrookおよびBrown、(1995) Curr Top Microbiol Immun.、195:89-122; Tacketら、(1984) Am J Med.、76:794-798; Morris(1981) P. 15 In: Lewis GE jr、編集者、Biomedical aspects of botulism. New York: Academic Press)。ポリクローナル抗体調製物によって認識される多数の異なるエピトープは、通常、保護的な抗体の存在を確実にし、その存在は、通常、全抗体の小さい亜集団である。予防に関して、ウマ抗体は、曝露前に投与された場合に最も有効であるが、曝露後24時間まで、疾患を予防し得る(Middlebrook

and Brown (1995) Curr Top Microbiol Immun., 195: 89-122)。しかし、ウマ抗毒素の投与は、症例のうちの9%において血清病およびアナフィラキシーなどの有害作用を引き起こし得る (BlackおよびGunn, (1980) Am J Med. 69: 567-570)。最近の努力は、免疫化したボランティアドナーの血清から調製したヒト免疫グロブリン (ヒトBIG) の産生に集中している (Arnon, (1993) Pp. 477-482, Das Gupta BR, 編集者, Botulinum and tetanus neurotoxins, neurotransmission and biomedical aspects. New York: Plenum Press)。中和モノクローナル抗体 (特に、ヒト起源のものである場合) は、抗体の無制限の供給源を提供し、そしてヒトまたはウマからの抗体の調製を置換する。

10

【0245】

本発明者らは、BoNTを中和し得るモノクローナル抗体を産生するために、抗体ファージディスプレイを使用した (Hoogenboomら, (1991) Nucleic Acids Res., 19: 4133-4137; McCaffertyら, (1990) Nature, 348: 552-554; SkerraおよびPluckthun, (1988) Science, 240: 1038-1041)。免疫化したマウスから構築したファージ抗体ライブラリーを使用して、本発明者らは、BoNT/A HC上の2つの重複しない中和エピトープを結合するモノクローナルの2種のセットを同定した (Amersdorferら, (1997) Infect. Immun., 65: 3743-3752)。本発明の例において、本発明者らは、五価ボツリヌストキソイド (A~E) によって免疫化したヒトボランティアから構築したファージ抗体ライブラリーから選択したモノクローナル抗体の特徴付けを記載する。これらのモノクローナル抗体の親和性、およびこれらのモノクローナル抗体によって認識されるエピトープを、非免疫性ヒトファージライブラリーから選択したモノクローナル抗体の親和性および非免疫性ヒトファージライブラリーから選択したモノクローナル抗体によって認識されるエピトープと比較した。その結果は、さらなる中和エピトープを同定し、そしてボツリヌス中毒の予防および処置のために完全ヒト抗体を産生する経路を提供する。

20

【0246】

(材料および方法)

30

(免疫性V遺伝子抗体ライブラリーおよび非免疫性V遺伝子抗体ライブラリー)

免疫性ファージ抗体ライブラリーの構築のために、ヒトボランティアは、五価ボツリヌストキソイドA型~五価ボツリヌストキソイドE型 (Michigan Department of Public Health) による免疫化を受容した。上記ボランティアを、0週間目、2週間目および12週間目において、0.5mlの五価トキソイドによって免疫化し、そして1年後に0.5mlのトキソイドによって追加免疫した。BoNT/Aに対する中和の力価を、マウス血清中和バイオアッセイを使用して測定した (Hathewayら, (1984) J Infect Dis., 150: 407-412)。PBLを、Histopaque 1077における遠心分離によって単離し、そしてRNAを、改変したCathalaらの方法 (Cathalaら, (1983) DNA, 2: 329-335) を使用して調製した。第1のcDNA鎖を、重鎖についてのIgG定常領域プライマー、または軽鎖についてのκ定常領域プライマーおよびλ定常領域プライマーを使用して、 1.0×10^8 個のB細胞から調製したRNAから作製した [26]。VH遺伝子、Vκ遺伝子およびVλ遺伝子を、記載 (Marksら, (1991) J Mol Biol., 222: 581-597) される通りに、第1のcDNA鎖から増幅した。PCR産物を、ゲルで精製し、そのゲルからの抽出後にエタノール沈殿し、そして先に記載される通りに、scFv遺伝子レパートリーを構築するために使用した (Id.)。そのscFv遺伝子レパートリーを、ゲルで精製し、次いで付与した制限酵素部位を含むフランキングオリゴヌクレオチドによって再度増幅するために、テンプレートとして使用した (Id.)。scFv遺伝子レパートリー (VH-Vκ、VH-Vλ) を、ゲル

40

50

で精製し、S f i IおよびN o t Iを用いて消化し、フェノール／クロロホルムを用いて抽出し、そしてS f i IおよびN o t Iを用いて消化したベクターp C A N T A B - 5 E (Pharmacia Biotech、Milwaukee、WI)にライゲーションした(Sambrookら、(1991) New York: Cold Spring Harbor Laboratory)。そのライゲーション混合物を、フェノール／クロロホルムを用いて抽出し、エタノール沈殿し、そして50 μ lのE. coli TG1細胞中にエレクトロポレーションした(Gibson、(1984) University of Cambridge: studies on the Epstein-Barr virus genome)。細胞を、100 μ g/mlのアmpiシリンと1% (w/v) グルコースとを含むTYEプレート上にプレーティングした。コロニーを、-70 $^{\circ}$ Cにて保存するために、そのプレートから、100 μ g/mlのアmpiシリンと、1% (w/v) グルコースと15% (v/v) グリセロールとを含む2 mlの2 $\times$ TY中にこすり落とした。4種の形質転換体由来の産物は、 7.7×10^5 個の個別の組換え体からなるライブラリーをもたらした。非免疫性ライブラリーに関して、 6.7×10^9 個のメンバーを含む先に報告されたファージ上に提示されたヒト単鎖抗体ライブラリーを、利用した(Sheetsら、(1997) Proc Natl. Acad Sci USA、95: 6157-6162)。

【0247】

(ファージの調製および選択)

両方のライブラリー由来のプラスミド粒子を、先に記載される通り、VCS-M13ヘルパーファージ(Stratagene)を用いたレスキューによって調製した(Marksら、(1991) J Mol Biol.、222: 581-597)。ファージ粒子を、精製し、そして2回のPEG沈殿によって濃縮し(Sambrookら、(1991) New York: Cold Spring Harbor Laboratory)、2 mlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS: 25 mM NaH₂PO₄、125 mM NaCl、pH 7.4)中に再懸濁し、そして0.45 μ mフィルター(Nalgen)を通して濾過して、約 10^{13} 形質導入単位(TU)/mlの力価を達成した。

【0248】

ライブラリーを、PBS (pH 7.4)中の、2 mlのBoNT血清型A、B、C、およびE (各50 μ g/ml)、またはBoNT/A HC (50 μ g/ml)によって4 $^{\circ}$ Cにて一晩コーティングした75 mm $\times$ 12 mmイムノチューブ(Nunc、Maxisorb)を使用して選択した(Emanuelら、(1996) J Immunol Meth.、193: 189-97)。チューブを、PBS中の2%脱脂粉乳によってRTにて1時間ブロックし、次いで選択手順、洗浄手順および溶出手順を、先に記載される通り、 5.0×10^{12} TU/mlの濃度にてファージを使用して行った(Marksら、(1991) J Mol Biol.、222: 581-597)。500 μ lのその溶出したファージを使用して、2 $\times$ TY-AMP-Gluプレート上にプレーティングした10 mlの対数増殖するE. coli TG1に感染させた。ファージを、レスキューし、上に記載したように濃縮し、そして次の選択ラウンドのために使用した。レスキュー選択-プレーティングの周期を、代表的に、4ラウンド繰り返した。

【0249】

(ELISAスクリーニングおよびフィンガープリント)

選択の各ラウンド後、単一のアmpiシリン耐性コロニーを使用して、150 μ lの2 $\times$ TY-AMP-0.1%グルコースを含むマイクロタイタープレートウェルに接種した。その細菌を、約0.9のA600を与えるように増殖させ、そしてscFv発現を、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を1 mMの最終濃度まで添加することによって誘導した(De BellisおよびSchwartz、(1990) Nuc Acids Res. 18: 1311)。細菌を、25 $^{\circ}$ Cにて振盪しながら一晩増殖させ、その細胞を、遠心分離によってペレットにし、そして可溶性のscFvを含む上清を、回収した。BoNTおよびBoNT/A HCに対する結合についてのscF

10

20

30

40

50

vのスクリーニングを、PBS (pH 7.4) 中の $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原を用いてコーティングした96ウェルマイクロタイタープレート (Falcon 3912) において行なった。非免疫性ライブラリーに由来するscFvを、記載 (GriffithsおよびMalmqvist、(1993) EMBO J. 12:725-734) 通りに、その後ペルオキシダーゼ結合体化抗マウスFc抗体 (Sigma) を伴うC末端mycタグ (MunroおよびPelham、(1986) Cell、46:291-300) を認識するマウスモノクローナル抗体9E10 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Santa Cruz Biotechnology、CA) を使用して検出した。免疫性ライブラリーに由来するscFvを、ペルオキシダーゼ結合体化モノクローナル抗体抗E ($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Pharmacia Biotech) を使用して検出した。その反応を、30分後にNaF ($3.2 \text{mg}/\text{ml}$) を用いて停止させ、そして 405nm を、測定した。固有のクローンの数を、PCRフィンガープリント (Marksら、(1991) J Mol Biol. 222:581-597) を行い、次いで各フィンガープリントパターンからの少なくとも2つのクローンの V_H 遺伝子および V_L 遺伝子のDNA配列決定を行なうことによって決定した。抗体の特異性を、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のBoNT/A、BoNT/B、BoNT/C、BoNT/E、BoNT/A_{HC} および血清型Aの組換えトランスロケーションドメイン (BoNT/A_{HN}) を用いてコーティングしたウェルを使用して、上記の通りに行ったELISAによって決定した。クローンを、それらがバックグラウンドよりも少なくとも5倍高いシグナルを与えた場合、選択した抗原に対して特異的であるものとして同定した。

【0250】

(scFvのサブクローニング、発現および精製)

ELISAによって決定したところのBoNT/AおよびBoNT/A_{HC}を結合するscFv抗体を、そのscFvのC末端にてヘキサヒスチジンタグの融合を生じる発現ベクターpUC119 Sfi-NotmycHis中にサブクローニングした (Schierら、(1995) Immunotech.、1:73-81)。そのscFvを、発現させ、そして先に記載される通りに固定化金属アフィニティークロマトグラフィーによって精製し (Schierら、(1996) J Mol Biol.、255:28-43)、そして精製したモノマーのscFvの濃度を、 1.0 の 280nm が $0.7 \text{mg}/\text{ml}$ のscFv濃度に相関すると仮定して分光測光法によって決定した。

【0251】

(エピトープマッピングおよび親和性の決定)

エピトープマッピング研究および動態研究を、BIAcore (Pharmacia Biosensor) における表面プラズモン共鳴を使用して行なった。BIAcore フローセルにおいて、約600共鳴単位 (RU) のBoNT/A_{HC} (10mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) 中の $15 \mu\text{g}/\text{ml}$) を、NHS-EDC化学 (Johnsonら、(1991) Anal Biochem.、198:268-277) を使用して、CM5センサーチップにカップリングさせた。カップリングしたBoNT/A_{HC}のこの量は、 $100 \sim 175 \text{RU}$ のscFv RU_{max} をもたらした。その表面を、scFvの結合後に 4M MgCl_2 を使用して再生した。エピトープマッピング研究のために、対の各メンバーに結合されたscFvの量 (RU) を決定し、次いでその2種のscFvを、個々のscFvの測定のために使用した濃度と等しい最終濃度を与えるように一緒に混合した (Amersdorferら、(1997) Infect. Immun.、65:3743-3752)。scFvの K_d を、BIAcoreにおいて決定した会合速度定数 (k_{on}) および解離速度定数 (k_{off}) から算出した ($K_d = k_{off}/k_{on}$)。会合を、 $50 \sim 1000 \text{nM}$ のscFvの濃度範囲を使用して、 $5 \mu\text{l}/\text{分}$ の連続的な流れにおいて測定した。その k_{on} を、 $\ln(dR/dt)/t$ 対濃度のプロットから決定した (Karlssonら、(1991) J Immunol Meth.、145:229-240)。その k_{off} を、再結合を防止するために $30 \mu\text{l}/\text{分}$ の流速を使用することによって、分析したscFvの最も高い濃度におけるセンサーグラムの解離

部分から決定した。

【0252】

(インビトロバイオアッセイ)

インビトロ中和研究を、先に記載される通り、マウス片側横隔膜調製物を使用して行なった(Desphande、(1995)Toxicol、33:551-557)。横隔膜神経一片側横隔膜調製物を、雄CD/1マウス(25~33g)から切除し、そして135mM NaCl、5mM KCl、1mM Na_2PO_4 、15mM NaHCO_3 、1mM MgCl_2 、2mM CaCl_2 、および11mM グルコースに懸濁した。インキュベーションバスを、95% O_2 、5% CO を用いて泡立て、そして36℃に維持した。横隔膜神経を、0.2ms持続時間の四角波で0.05Hzにて刺激した。等尺性単収縮張力を、チャートレコーダーに接続した力変位変換器(Model FT03、Grass)を用いて測定した。精製したscFv抗体を、BoNT/Aと一緒にRTにて30分間インキュベートし、次いで組織のバスに添加し、 2.0×10^{-8} MのscFv最終濃度および 2.0×10^{-11} MのBoNT/A最終濃度をもたらした。毒素誘導性の麻痺を、最初の筋肉単収縮の50%の減少として規定した。延長の比を、上記抗体による50%の減少をBoNT/Aの50%の減少で除算した値から算出した。3D12とC25との組み合わせを、各 2.0×10^{-8} Mの最終濃度において研究した。50%の単収縮減少までの時間の間の差を、有意である0.05未満のP値を用いて両側t検定を使用して決定した。

【0253】

(ボツリヌス毒素およびボツリヌス毒素ドメインの調製)

精製したボツリヌス毒素血清型A、B、CおよびE(150kDa)を、USAMRIIDから得た。ボツリヌス毒素A型の結合ドメイン(BoNT/A HC)を、E. coliで発現させ、そしてC末端の(His₆)タグを利用した固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)(Ophidian Pharmaceuticals, Inc.)によって精製した。ボツリヌス毒素A型のトランスロケーションドメイン(BoNT/A HN)は、Dr. R. Stevens(UC-Berkeley, CA)からの贈呈であった。

【0254】

(表10. 免疫性ファージディスプレイライブラリーおよび非免疫性ファージディスプレイライブラリーから選択したBoNT結合scFvの特異性)

【0255】

【表10】

scFv 特異性	固有のscFvの数	
	免疫性ライブラリー (五価トキソイド)	非免疫性ライブラリー
BoNT/A	23	14
HC(結合ドメイン)	6	10
HN(トランスロケーションドメイン)	4	1
軽鎖(触媒ドメイン)	13	3
BoNT/B	16	5
BoNT/C	6	5
BoNT/E	3	3

(結果)

(免疫性ファージディスプレイライブラリーの合成のためのストラテジー)

五価ボツリヌストキソイドによって免疫化したヒトボランティア由来のPBLを、scFvファージ抗体ライブラリーを産生するために使用した。上記ドナーのポリクローナル血清は、マウス中和バイオアッセイ(Hathewayら、(1984)J Infect Dis、150:407-412)において、2.56IU(国際単位)の力価でBoNT/Aに対して保護的であった。V_H遺伝子およびV_L遺伝子を、RNAから増幅し、スプライシングしてscFv遺伝子レパートリーを作製し、そしてそれを、pCANTAB-5E中にクローニングして 7.7×10^5 個の形質転換体のファージ抗体ライブ

ラリーを作製した。15個のランダムに選択したクローンのPCRスクリーニングは、全てが、生殖系列遺伝子特異的な軽鎖プライマーによって決定したところ、完全長の挿入物（66%がV κ 軽鎖を有し、そして34%がV λ 軽鎖を有する）を保有することを示した（データ示さず）。

【0256】

（ファージ抗体ライブラリーの選択およびELISAスクリーニング）

免疫性ライブラリーおよび大きな非免疫性ヒトファージ抗体ライブラリーの両方（Sheetzら、（1997）Proc Natl Acad Sci USA、95:6157-6162）を、BoNT血清型A、B、C、EおよびBoNT/A HCに対して選択した。BoNT/AまたはBoNT/A HCに対する3ラウンドの選択後、上記免疫性ライブラリー由来のELISAポジティブクローンの頻度は、それぞれ、79%および100%であった。ELISA陽性の同様の頻度が、他の血清型について観察された。BoNT/AまたはBoNT/A HCに対する3ラウンドの選択後、上記非免疫性ライブラリー由来のELISAポジティブクローンの頻度は、それぞれ、28%および94%であった。ELISA陽性の同様の頻度が、他の血清型について観察された。固有のscFvの数を、DNAフィンガープリントを行ない、次いでDNA配列決定を行なうことによって決定し、そして各scFvの特異性を、ELISAによって決定した。各選択からの100個のクローンのスクリーニングにおいて、48種の固有の抗体（23種のBoNT/A、16種のBoNT/B、6種のBoNT/Cおよび3 BoNT/E）を、上記免疫性ライブラリーから同定し、そして27種の固有の抗体（14種のBoNT/A、5種のBoNT/B、5種のBoNT/Cおよび3種のBoNT/E）を、上記非免疫性ライブラリーから同定した（表10）。

【0257】

各BoNT/A scFvの詳しい特異性を、組換えBoNT/A HCドメインおよび組換えBoNT/A HNドメインに対するELISAによって決定した（図8）。毒素に対する選択後に単離された23種の免疫性BoNT/A抗体のうち、6種（3A6、3D12、2A1、3B8、3F10、2B11）が、BoNT/A HCに結合し、4種（3D4、3A11、4A4、3G4）が、BoNT/A HNに結合し（図8A）、そして残りの13種の抗体は、おそらく、上記軽鎖（Chenら、（1997）Infect Immun、65:1626-1630）結合した。これらの知見は、ボツリヌスストキソイドによる免疫化が、HCドメインまたはHNドメインに対する数種の抗体によって上記軽鎖に対する免疫応答を導くことを示唆する。

【0258】

BoNT/A HCに対する上記ライブラリーの選択は、単一の固有の抗体（2A1）のみをもたらし、この抗体は、毒素で選択したクローン3D12および3D6とクローンに関連した（表11）。6個の抗HCクローンのVL遺伝子使用を分析した場合、全てが、V κ 1遺伝子ファミリーを使用することを見出した（表11）が、上記ライブラリーは、2/3のV κ 軽鎖遺伝子および1/3のV λ 軽鎖遺伝子を含んだ。BoNT/Aホロ毒素に対する非免疫性ライブラリーの選択は、4種の抗体をもたらししたが、これらは、いずれもBoNT/A HCを結合しなかった。BoNT/A HCに対する上記ライブラリーの選択は、10種の固有のscFvをもたらし、それらは、V κ 軽鎖遺伝子またはV λ 軽鎖遺伝子の両方を使用した（表11）。全体として、これらのscFvのうちの50%のみが、ホロ毒素を結合し、HC表面のかなりの部分が上記ホロ毒素に埋められるという観察（Lacyら、（1998）Nat Struct Biol、5:898-902）と一致した。全てのscFv抗体は、血清型特異的かつドメイン特異的であり、ELISAによって決定したところ、BoNT/A HCドメインおよびBoNT/A HNドメインに結合した非免疫性ライブラリー由来の2B11を除いて、交差反応性は、観察されなかった（図8B）。

【0259】

（表11. BoNT/AおよびBoNT/A HCに対して選択した免疫性ライブラリ

ーならびに非免疫性ライブラリーから単離されたヒト s c F v 抗体についての C D R 3
ー配列および親和性^{a)}

【 0 2 6 0 】

【 表 1 1 - 1 】

非免疫性ライブラリー 重鎖				V _H CDR3
クローン	ファミリー	セグメント	ゲノムとの相違	
2A9 ^b	V _H 3	DP54	5	GRGVN (配列番号 193)
2B1 ^b	V _H 3	DP46	0	NGDPEAFDY (配列番号 194)
2H6 ^b	V _H 3	DP47	6	ALQSDSPYFD (配列番号 195)
3C2 ^b	V _H 3	DP46	2	DLAIFAGNDY (配列番号 196)
2B6 ^b	V _H 3	DP47	3	VGVDRWYPADY (配列番号 197)
3F6 ^c	V _H 3	DP47	2	DLLDGSGAYFDY (配列番号 198)
2A2 ^b	V _H 3	DP46	0	DLDYGGNAGYFDL (配列番号 199)
2B10 ^b	V _H 3	DP46	0	DLDYGGNAGYFDL (配列番号 200)
2E6 ^b	V _H 3	DP46	0	DYTANYYYYGMDV (配列番号 201)
3D1b	V _H 3	DP47	7	DLGYGSGTSSYYLDY (配列番号 202)
非免疫性ライブラリー 軽鎖				V _L CDR3
2A9 ^b	V _K 1	L12A	6	QQANSFPRT (配列番号 203)
2B1 ^b	V _K 1	L1	11	LQDYNGWT

【 0 2 6 1 】

10

20

【表 1 1 - 2】

				(配列番号 204)
2H6 ^b	Vλ3	DPL16	7	NSRDSSGNHVV (配列番号 205)
3C2 ^b	Vλ3	DPL16	9	KSRDSRGNHLAL (配列番号 206)
2B6 ^b	Vκ1	L12A	5	QQYHTISRT (配列番号 207)
3F6 ^c	Vλ3	DPL16	3	NSRDSSGNHVV (配列番号 208)
2A2 ^b	Vλ3	DPL16	10	HSRDSSVTNLD (配列番号 209)
2B10 ^b	Vλ3	DPL16	4	NSRDSSGNHVV (配列番号 210)
2E6 ^b	Vλ2	DPL12	14	NSRDSSGVV (配列番号 211)
3D1 ^b	Vλ3	DPL16	5	NSRDSSGNHVV (配列番号 212)
免疫性ライブラリー 重鎖				
クローン	ファミリー	セグメント	ゲノムとの相 違	V _H CDR3
3B8 ^c	V _H 1	V1-2	10	LATYYFGLDV (配列番号 213)
3F10 ^c	V _H 1	V1-2	10	LATYYFGLDV (配列番号 214)
2B11 ^c	V _H 1	DP10	11	GPWELVGYFDS (配列番号 215)
3A6 ^c	V _H 3	DP50	18	EPDWLLWGDRGALDV (配列番号 216)
3D12 ^c	V _H 3	DP50	13	EPDWLLWGDRGALDV (配列番号 217)
2A1 ^b	V _H 3	DP50	14	EPDWLLWGDRGALDV (配列番号 218)
免疫性ライブラリー 軽鎖				
クローン	ファミリー	セグメント	ゲノムとの相 違	V _L CDR3
3B8 ^c	Vκ1	DPK7	12	QQYNSYVYT (配列番号 219)
3F10 ^c	Vκ1	DPK8	10	QQLNSYPLT (配列番号 220)
2B11 ^c	Vκ1	L12	11	QQLISYPLT (配列番号 221)
3A6 ^c	Vκ1	L12	8	QHYNTYPYT (配列番号 222)
3D12 ^c	Vκ1	L12	10	QHYNTYPYT (配列番号 223)
2A1 ^b	Vκ1	L12	4	QHYNTYPYT (配列番号 224)

10

20

30

40

50

^a ヒト生殖系列のV_Hセグメント、V_κセグメントおよびV_λセグメントは、V-BAS Eデータベース(MRC Centre for Protein Engineering、Cambridge、UK)において詳述されるように割り当てられている。列挙したクローン(同一のV_H CDR 3領域またはV_L CDR 3領域を有する)は、生殖系列遺伝子とのそれらの相違によって示されるように、異なるCDR 1領域、CDR 2領域およびフレームワーク領域を示した；アクセッションは、番号AF090405～AF090420を伴ってGenBankによって行われ得る。

^b B o N T / A に対して選択したライブラリー。

^c B o N T / A H C に対して選択したライブラリー。

【0 2 6 2】

(B o N T / A H C 特異的抗体フラグメントのエピトープマッピング)

B o N T / A H C 結合 s c F v を、認識された重複しないエピトープの数を決定するためにエピトープマッピングした。エピトープマッピングを、チップ表面のほぼ完全な飽和および少なくとも100RUの結合されたs c F vを生じる濃度にて、s c F vの対を

研究する B I A c o r e T M における表面プラズモン共鳴を使用して行なった。結合された s c F v の量を、対の各メンバーについて決定し、次いでその 2 種の s c F v を、個々の s c F v の測定のために使用した濃度と等しい最終濃度を与えるように一緒に混合した。同一のエピトープを認識する抗体は、一緒に注入した場合に、結合された R U の最小限の増大を示し (図 9 A)、一方で、異なるエピトープを認識する s c F v は、R U の相対的な増大を示した (図 9 B)。表 2 および表 3 に示したように、クラスター I と称される s c F v 3 A 6、s c F v 3 D 1 2 および s c F v 2 A 1 は、V H 遺伝子セグメントおよび V L 遺伝子セグメント (それぞれ、D P 5 0 および L 1 2) の高い相同性を共有し、そして重複するエピトープを認識する。それらは、体細胞変異によって導入される重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子における変異によってのみ、配列において異なる。クラスター I I と称される s c F v 3 B 8 および s c F v 3 F 1 0 は、クラスター I と比較して、異なるエピトープに結合する抗体の第 2 のセットを形成する。可能な固有のエピトープを示すクローン 2 B 1 1 は、乏しい発現レベルに起因して分析できなかった。上記非免疫性ライブラリーに由来する s c F v 抗体を分析したとき、本発明者らは、全てが、表 3 に示したような、クラスター I I I ~ クラスター X I と称される固有のエピトープに結合したことを見出した。上記非免疫性ライブラリーのメンバー (クラスター I I I ~ クラスター X I) は、上記免疫性ライブラリーのメンバー (クラスター I およびクラスター I I) と重複しない結合を示した。上記免疫性 s c F v および非免疫性 s c F v の両方によって認識されるエピトープは、2 種の先に報告されたマウス s c F v (C 2 5 および S 2 5) (A m e r s d o r f e r ら、(1997) I n f e c t . I m m u n . 、65:3743-3752) によって結合されるエピトープと重複しない。

10

20

【0263】

(反応速度測定および中和アッセイ)

k o n および k o f f を、B I A c o r e における表面プラズモン共鳴を使用して測定し、そしてそれらを、平衡解離定数を算出するために使用した。上記免疫性ライブラリーから選択した s c F v は、 3.69×10^{-8} M および 7.8×10^{-9} M の K_d を有し、ハイブリドーマから産生されたモノクローナル I g G について報告されたもの (F o o t e および M i l s t e i n、(1991) N a t u r e、352:530-532) に匹敵する値であった (表 1 2)。非免疫性 s c F v は、 4.6×10^{-7} M ~ 2.61×10^{-8} M の範囲の、より低い K_d を有した。毒素誘導性の神経麻痺を中和する s c F v の能力を決定するために、インビトロ研究を、横隔神経一片側横隔膜調製物を使用して、各エピトープクラスター由来の 1 つの代表的なメンバーについて行なった。値を、B o N T / A 単独および 2.0×10^{-8} M の s c F v の存在下における 50 % の単収縮減少までの時間で報告した。表 1 2 ならびに図 10 A および図 10 B に示した通り、異なる抗 B o N T / A H c s c F v の中和における有意な差が、使用したライブラリーに依存して見出された。上記免疫性ライブラリーから、3 D 1 2 (クラスター I) が、神経麻痺までの時間を有意に 1.5 倍延長したのに対して、3 F 1 0 (クラスター I I) は、毒素中和に対する効果を示さなかった。上記非免疫性ライブラリーのうちの代表的なもの (クラスター I I I ~ クラスター X I) は、 1.8×10^{-7} M の最終濃度におけるクラスター I I I ~ クラスター X I の全てのメンバーの組み合わせの後でさえも、上記片側横隔膜アッセイにおいて保護的效果を示さなかった。3 D 1 2 (クラスター I) と先に単離されたマウス s c F v (C 2 5) (A m e r s d o r f e r ら、(1997) I n f e c t . I m m u n . 、65:3743-3752) との組み合わせを使用する場合、麻痺までの時間は、3.2 倍まで有意に増大し、このことは、毒素中和に対する相乗効果を示した。本発明者らは、マウス s c F v S 2 5 とマウス s c F v 3 D 1 2 とによる同様の相乗作用を観察した (データ示さず)。

30

40

【0264】

(表 1 2. ファージ抗体ライブラリーから選択した s c F v の、親和性、結合動態、およびインビトロ毒素中和の結果)

【0265】

50

【表 1 2】

クローン	クラスター	K_d (M) ^a	k_{on} ($\times 10^5$ (Ms) ⁻¹)	k_{off} ($\times 10^{-3}$ s ⁻¹)	麻痺の時間 ^b
免疫性ライブラリー					
3D12 ^c	I	3.69×10^{-8}	0.13	0.50	85 ± 5.0^d
3F10 ^c	II	7.80×10^{-9}	0.80	0.62	55 ± 5.0^e
非免疫性ライブラリー					
2B10 ^f	III	1.29×10^{-7}	5.57	71.6	62.3 ± 6.7^e
2E6 ^f	IV	1.93×10^{-7}	1.19	23.0	60.9 ± 8.2^e
2H6 ^f	V	3.86×10^{-8}	2.20	8.50	63.0 ± 5.0^e
2B1 ^f	VI	1.07×10^{-7}	0.83	8.88	58.4 ± 4.0^e
2A9 ^f	VII	2.61×10^{-8}	0.25	0.66	71.0 ± 3.0^e
2B6 ^f	VIII	7.15×10^{-8}	1.09	7.80	61.9 ± 5.0^e
3D1 ^f	IX	4.60×10^{-7}	1.31	60.3	58.3 ± 3.8^e
3F6 ^e	X	6.60×10^{-8}	4.69	30.9	60.4 ± 3.6^e
3C2 ^f	XI	3.90×10^{-8}	2.10	82.0	61.9 ± 4.8^e
マウスライブラリー					
S25	XII	7.30×10^{-8}	0.11	0.82	85 ± 10^d
C25	XIII	1.10×10^{-9}	3.0	0.33	151 ± 12^d
組み合わせ					
C25 + S25					218 ± 22^g
C25 + 3D12					179 ± 2.3^d
非免疫性 scFv (クラスター III-XI)					
BoNT/A 純粋毒素 (コントロール)					65 ± 2.3^g
					56 ± 3.8

^a 変動する k_{on} および k_{off} を、表面プラズモン共鳴によって測定し、そして K_d を、 k_{off}/k_{on} として算出した。

^b 20 nM scFv + 20 pM BoNT/A を使用したマウス片側横隔膜アッセイにおける 50% の単収縮減少までの時間 (分) を、BoNT/A 単独についての時間と比較した。各値は、少なくとも 3 回の観察の平均 $\pm$ S. E. M. である。

^c BoNT/A に対して選択したライブラリー。

^d BoNT/A と比較して $P < 0.01$ 。

^e 有意ではない。

^f BoNT/A HC に対して選択したライブラリー。

^g BoNT/A HC と比較して $P < 0.01$ 。

【0266】

(考察)

本発明者らは、BoNT/A HC の組換え結合ドメインを用いたマウスの免疫化が、免疫応答を、シナプス前毒素レセプターに対する HC 結合に関与するエピトープを結合する抗体の産生に導くことを、先に示した (Amersdorfer ら、(1997) Infect. Immun.、65:3743-3752)。これらの実験は、scFv による毒素の中和が、レセプター結合部位に関して上記ホロ毒素と競合する scFv の親和性および能力の両方に相関し得ることを示した。ここで、本発明者らは、BoNT/A に対するヒト体液性免疫応答および非免疫応答をマッピングするために、免疫性ファージディスプレイライブラリーおよび非免疫性ファージディスプレイライブラリーを使用することによって、より系統的なアプローチを実施した。上記 2 種の抗体ライブラリーのための抗体遺伝子の供給源は、(a) 五価トキソイド (A~E) によって免疫化したヒトボランティアの PBL、ならびに (b) 非免疫性の末梢血リンパ球および脾臓細胞であった。このアプローチの 1 つの制限は、これらの研究のために用いる 1 人のヒトドナーが、ボツリヌス中毒に対する曝露の際にもたらされる広範な遺伝的多様性を示す程度である。マウスおよびヒトにおける体液性免疫応答がむしろ限定された数の保護的エピトープをもたらしたという事実は、保護を与える抗原性エピトープの顕著な保存を示唆する。選択手順は、4 種の固定化されたボツリヌス神経毒素 (血清型 A、B、C、および E) に対して両方のコンビナトリアルライブラリーをパニングすることを包含する。3 回~4 回のパニング周期

の後、この順序（B o N T / A、B o N T / B、B o N T / C および B o N T / E）で漸減する頻度で、各血清型に対する抗体を両方のライブラリーから得た。バインダーの同様の頻度はまた、B o N T / Bを除いて、非免疫性ライブラリーについて観察された。これらの結果は、S i e g e l（S i e g e l、（1989）J C l i n M i c r o b i o l.、26：2351-2356）の知見と相関し、S i e g e lは、ボツリヌス五価トキシソイドの25人のヒトレシピエントからの血清標本を研究した。種々の血清型の免疫原性を、マウス血清中和バイオアッセイによって決定した一血清型Aは、5.7 IU/mlと51.6 IU/mlとの間の範囲であり、次いで血清型Bは、0.78 IU/ml～18 IU/mlであり、そして血清型Eは、0.61 IU/ml～10 IU/mlであった。

10

【0267】

トキシソイドを用いたヒトの免疫化は、HCを結合するより少ない抗体と共に、概して上記毒素軽鎖に対する抗体の産生をもたらした。同様の結果が、B o N T / A HCを用いてマウスを免疫化し、次いでホロ毒素によって追加免疫した後に観察された。抗体の中和活性は、概して、HCによる細胞レセプター結合をブロックすることによって生じるので、これらの分析は、HCワクチンが毒素ベースのワクチンよりも保護的である（より多くのHC抗体が、産生されるからである）ことを示す。ヒト免疫性HC s c F vは、少なくとも2種の重複しないエピトープを認識した。これらのエピトープ（クラスターI）のうちの1種を結合するs c F vは、インビトロで毒素を中和し得た。毒素中和の効力は、クラスターIを結合するs c F vを、2種の重複しないHCエピトープのうちのいずれか1種を結合する免疫性マウスs c F vと組み合わせた場合、増大した。この結果は、HCが、複数の細胞レセプターのいずれかとドッキングすること、またはドッキングが、広範な表面領域にわたって起きることを示唆する（M u l l a n e y ら、（2001）I n f e c t I m m u n.、69：6511-6514）。

20

【0268】

HCを認識するヒトs c F vのレパートリーを、B o N T / Aに対する大きな非免疫性ライブラリーを選択することによって他のエピトープ（クラスターI I I～クラスターX I）の範囲に拡大した。興味深いことに、この結果は、一次免疫レパートリーは、溶媒が接近可能な抗原の領域の多くを認識し得る抗体を含むが、免疫化は、限定された数の免疫優勢なエピトープに対するこの認識を導くという概念と一致する。しかし、非免疫性ライブラリーから得られた抗体の全ては、非中和エピトープを指向した（または少なくとも、毒素をインビトロで中和しなかった）。中和の不全に関する1つの説明は、そのレセプターに対する上記毒素の高親和性（0.3～2.3 nM（S c h e n g r u n d、（1999）J T o x i c o l T o x i n R e v.、18：35-44））での相互作用と比較して、上記HCドメインに対する抗体（例えば、2 B 1 0、2 E 6、2 B 1、3 D 1）の低い親和性（107～460 nMの範囲である）に起因し得た。

30

【0269】

結論として、本発明者らは、ここで、ボツリヌス神経毒素およびそれらのサブドメインに対して特異的なヒト抗体の、免疫性ヒトドナーおよび非免疫性ヒトドナーから調製したコンビナトリアルライブラリーを使用した首尾よい単離を報告する。感染症または病原体を有する任意の者の抗体レパートリーをスクリーニングするためのファージディスプレイの使用は、治療的潜在性および調査における潜在性を有するヒトモノクローナル抗体の非常に大きなプールの利用を可能にする。

40

【0270】

（実施例4）

（より高い親和性に関して進化した中和抗体）

ボツリヌス中毒の検出および処置を改良するために、分子進化および酵母ディスプレイを、B o N T 血清型A（B o N T / A）を結合する2種の中和単鎖F v（s c F v）抗体（H u C 2 5 および 3 D 1 2）の親和性を増大させるために使用した。

【0271】

50

(mAb HuC25の親和性の成熟)

B o N T / A に対する H u C 2 5 の親和性を、一連の変異酵母ディスプレイライブラリーを使用して連続的に増大させた (図 2 0) 。第 1 に、H u C 2 5 遺伝子を、N c o I - N o t I フラグメントとして酵母ディスプレイベクター p Y D 2 中にサブクローニングした。上記 s c F v 遺伝子は、酵母表面上に首尾よく提示され、そして提示された s c F v の純粋な B o N T / A に対する K D を、フローサイトメトリーによって決定し、その K D は、 8.44×10^{-10} M であった (図 2 1) 。これは、B I A c o r e における S P R を使用して先に測定したような、組換え B o N T / A - H C に対する精製した H u C 2 5 - s c F v の結合について測定した K_D (1.4×10^{-9} M) に匹敵する。次いで H u C 2 5 - s c F v 遺伝子を、誤りを起こしやすい条件を使用した P C R によってランダムに変異させ、そして得られた遺伝子レパートリーをギャップ修復を使用して p Y D 2 中にクローニングして、 2.0×10^5 個の形質転換体のライブラリーを作製した (図 2 0) 。上記ライブラリーを、増殖させ、インキュベーションし、次いで s c F v ディスプレイの頻度 (27%) および抗原結合の頻度 (3.65%) についてフローサイトメトリーによって分析した。

【0272】

次いで上記ライブラリーを、漸減濃度の純粋な B o N T / A を使用して 4 ラウンドの選択に供した。上記 s c F v 遺伝子を、選別の最終ラウンド後に得られた 6 種の個々のクローンから P C R で増幅し、それは、1 種の固有の配列 (A R 1) の存在を示した (図 1 8) 。s c F v ディスプレイに含まれる A R 1 クローンを、増殖させ、そして B o N T / A に対する提示された s c F v の K D を、測定し、その K D は、 1.69×10^{-10} M (H u C 2 5 からの 5 倍の改良) であった (図 2 1) 。

【0273】

親和性をさらに増大させるために、2 つの変異酵母ディスプレイライブラリーを、A R 1 の配列に基づいて構築した。一方のライブラリーについて、A R 1 - s c F v 遺伝子を、誤りがちの P C R を使用することによってランダムに変異させた；第 2 のライブラリーについて、位置指定突然変異誘発を、L 3 における 4 アミノ酸 (S N E D) を多様化するために使用した。このループを、突然変異誘発のために選択した。なぜならば、これは、ここで変異が親和性を増大させ得ることが A R 1 の選択から示され、そして誤りを起こしやすい方法がこのループにおいて完全にサンプリングされた変異を有さなかった可能性があったからである。4 ラウンドの選択を、各ライブラリーに対して行い、最終ラウンドの解離速度選択 (o f f o f f r a t e s e l e c t i o n) を、精製した B o N T / A を用いて標識化し、次いで再結合を防止するために B o N T / A 結合ドメイン (H C) の存在下において 12 時間の解離を行なうことによって実施した。次いで B o N T / A 標識化酵母を、その毒素の触媒ドメインを結合する m A b (7 C 1) を使用して選別した。選別の最終ラウンド由来の個々のクロンのスクリーニングは、その位置指定型ライブラリーに対して野生型 A R 1 配列のみを示し、これは、L 3 が既に最適化されたことを示唆した。上記誤りを起こしやすいライブラリーから、単一の固有のクロンを、単離し (A R 2、図 1 8)、酵母が提示した s c F v としてのその K D を、決定し、その K D は、 6.14×10^{-11} M (親 A R 1 からの 2.8 倍の増大) であった (図 2 1) 。

【0274】

さらなる酵母ディスプレイライブラリーを、A R 2 の親和性をさらに増大させるために作製した。これらは、ランダム変異を A R 2 遺伝子に導入し、かつ 2 つの位置指定型ライブラリーが H 1 における 5 アミノ酸または L 2 における 4 アミノ酸のいずれかを多様化した A R 2 の配列に基づくライブラリーを含んだ。ライブラリーを、A R 1 の選択について記載したストラテジーを使用して純粋な B o N T / A に対して選択し、個々のコロニーを、配列決定し、そして酵母が提示した固有の s c F v の親和性を、測定した。より高い親和性のクローンは、誤りを起こしやすいライブラリーまたは L 2 変異体のライブラリーから同定されなかった。より高い親和性の 2 種のクローン (A R 3 および A R 4 (1.9×10^{-11} M の K D および 2.3×10^{-11} M の K D (A R 2 からの親和性の約 3 倍の

増大)、図21))を、H1ライブラリーから同定した(図18)。

【0275】

(mAb 3D12の親和性の成熟)

親和性の成熟のために、3D12 scFv遺伝子を、ファージミドベクターpCAN TAB5Eから、NcoI-NotIフラグメントとして酵母ディスプレイベクターpYD2中にクローニングした。次いでランダム変異を、誤りを起こしやすい条件下でPCRを使用して3D12 scFv遺伝子に導入し、そして得られた遺伝子レポトリを、ギャップ修復を使用してpYD2中にクローニングして、 2.1×10^6 個の形質転換体のライブラリーを作製した。上記ライブラリーを、増殖させ、インキュベーションし、次いでscFvディスプレイの頻度(27%)および抗原結合の頻度(3.65%)についてフローサイトメトリーによって分析した。次いで上記ライブラリーを、漸減濃度の純粋なBoNT/Aを使用して5ラウンドの選択に供した。次いで最終ラウンドの解離速度選択を、精製したBoNT/Aを用いて標識化し、次いで再結合を防止するためにBoNT/A結合ドメイン(HC)の存在下において15時間の解離を行なうことによって実施した。次いでBoNT/A標識化酵母を、その毒素の触媒ドメインを結合するmAb(7C1)を使用して選別した。上記scFv遺伝子を、選別の最終ラウンド後に得られた6種の個々のコロニーからPCRで増幅し、これは、3種の固有の配列の存在(表13、クローン3-1(RAZ1としても公知である、図19A)、クローン3-8、およびクローン3-10)を示した。固有の各クローンを、増殖させ、scFvディスプレイを、誘導し、そしてBoNT/Aに対する提示されたscFvのKDを、野生型3D12 scFvと一緒に、フローサイトメトリーを使用して測定した、全3種の変異scFvは、野生型3D12 scFvよりも高い親和性を有した。最も高い親和性のscFv(RAZ1、図21におけるKD)に関して、変異は、そのVL内でCDR1、CDR2、およびCDR3中に全体的に位置した(図19A)。

【0276】

(表13. 成熟した親和性の抗体および/または改変した抗体についてのアミノ酸配列)

【0277】

10

20

【表 1 3 - 1】

重鎖				
クローン	フレームワーク1	CDR1	フレームワーク2	CDR2
HuC25	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFS (配列番号 225)	DYYMY (配列番号 226)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 227)	TISDGGSYTYYPD SVKG (配列番号 228)
AR1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFS (配列番号 229)	DYYMY (配列番号 230)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 231)	TISDGGSYTYYPD SVKG (配列番号 232)
AR2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFS (配列番号 233)	DHYMY (配列番号 234)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 235)	TISDGGSYTYYPD SVKG (配列番号 236)
WR1(V)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTSS (配列番号 237)	DHYMY (配列番号 238)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 239)	TISDGGSYTYYPD SVKG (配列番号 240)
WR1(T)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTSS (配列番号 241)	DHYMY (配列番号 242)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 243)	TISDGGSYTYYPD SVKG (配列番号 244)
3D12	QVQLVQSGGGVHPGRSLKLS AGSGFTFS (配列番号 245)	DYDMH (配列番号 246)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 247)	VMWFDGTEKYS AE SVKG (配列番号 248)
RAZ1	QVQLVQSGGGVHPGRSLKLS AGSGFTFS (配列番号 249)	DYDMH (配列番号 250)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 251)	VMWFDGTEKYS AE SVKG (配列番号 252)
3-8	QVQLVQSGGGVHPGRSLKLS AGSGFTFS (配列番号 253)	DYDMH (配列番号 254)	WVRQAPGKGLEW VA (配列番号 255)	VIWFDGTEKYS AE SVKG (配列番号 256)
3-10	QVQLVQSGGGVHPGRSLKLS AGSGFTFS (配列番号 257)	DYDMH (配列番号 258)	WVRQAPGKGF EW VA (配列番号 259)	VMWFDGTEKYS AE SVKG (配列番号 260)
ING1	QVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFS (配列番号 40)	NYAMT (配列番号 41)	WVRQAPGKGLEW VS (配列番号 42)	SISVGGSDTY YAD SVKG (配列番号 43)
重鎖(続き)				
	フレームワーク3	CDR3	フレームワーク4	
HuC25	RFTISRDNKNTLYLQMN SLRA EDTAMYCSR (配列番号 261)	YRYDDAMDY (配列番号 262)	WGQGTILVTVSS (配列番号 263)	
AR1	RFTISRDNKNTLYLQMN SLRA EDTAIYYCSR (配列番号 264)	YRYDDAMDY (配列番号 265)	WGQGTILVTVSS (配列番号 266)	
AR2	RFTISRDNKNTLYLQMN SLRA EDTAIYYCSR (配列番号 267)	YRYDDAMDY (配列番号 268)	WGQGTILVTVSS (配列番号 269)	

【 0 2 7 8 】

【表 1 3 - 2】

WR1(V)	RFTVSRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAIYYCSR (配列番号 270)	YRYDDAMDY (配列番号 271)	WGQGTILVTVSS (配列番号 272)	
WR1(T)	RFTTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAIYYCSR (配列番号 273)	YRYDDAMDY (配列番号 274)	WGQGILVTVSS (配列番号 275)	
3D12	RFTISRDNKNTLFLQMNSLRA DDTAVYYCAR (配列番号 276)	EPDWLLWGDRG ALDV (配列番号 277)	WGQGTIVTVSS (配列番号 278)	
RAZ1	RFTISRDNKNTLFLQMNSLRA DDTAVYYCAR (配列番号 279)	EPDWLLWGDRG ALDV (配列番号 280)	WGQGTIVTVSS (配列番号 281)	
3-8	RFTISRDNKNTLFLQMNSLRA DDTAVYYCAR (配列番号 282)	EPDWLLWGDRG ALDV (配列番号 283)	WGQGTIVTVSS (配列番号 284)	
3-10	RFTISRDNKNTLFLQMNSLRA DDTAVYYCAR (配列番号 285)	EPDWLLWGDRG ALDV (配列番号 286)	WGQGTIVTVSS (配列番号 287)	
ING1	RFTVSRDNSKNTLLQMNSLRA EDTAVYYCAK (配列番号 68)	VRTKYCSSLSC FAGFDS (配列番号 69)	WGQGTIVTVSS (配列番号 70)	
軽鎖				
クローン	フレームワーク1	CDR1	フレームワーク2	CDR2
HuC25	EIVLTQSPATLSLSPGERATIS C (配列番号 288)	RASESVDSYGH SFMQ (配列番号 289)	WYQQKPGQAPRL LIY (配列番号 290)	RASNLEP (配列番号 291)
AR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATIS C (配列番号 292)	RASESVDSYGH SFMQ (配列番号 293)	WYQQKPGQAPRL LIY (配列番号 294)	RASNLEP (配列番号 295)
AR2	EIVLTQSPATLSLSPGERATIS C (配列番号 296)	RASESVDSYGH SFMQ (配列番号 297)	WYQQKPGQAPRL LIY (配列番号 298)	RASNLEP (配列番号 299)
WR1(V)	EIVLTQSPATLSLSPGERATIS C (配列番号 300)	RASESVDSYGH SFMQ (配列番号 301)	WYQQKPGQAPRL LIY (配列番号 302)	RASNLEP (配列番号 303)
WR1(T)	EIVLTQSPATLSLSPGERATIS C (配列番号 304)	RASESVDSYGH SFMQ (配列番号 305)	WYQQKPGQAPRL LIY (配列番号 306)	RASNLEP (配列番号 307)
3D12	DIVMTQSPSTLSASVGDRVTIT C (配列番号 308)	RASQSISSWLA (配列番号 309)	WYQQKPGKAPKL LMY (配列番号 310)	EASSLES (配列番号 311)
RAZ1	DIVMTQSPSTLSASVGDRVTIT C (配列番号 312)	WASQSISSRLA (配列番号 313)	WYQQKPGKAPKL LMY (配列番号 314)	EATSLGS (配列番号 315)
3-8	DIVMTQSPSTLSASVGDRVTIT C (配列番号 316)	RASQSISSWLA (配列番号 317)	WYQQKPGKAPKL LMY (配列番号 318)	GASSLGS (配列番号 319)
3-10	DIVMTQSPSTLSASVGDRVTIT C (配列番号 320)	RASQSISSWLA (配列番号 321)	WYQQKPGKAPKL LMY (配列番号 322)	EASSLGR (配列番号 323)
ING1	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTIT	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKL	AASSLQS (配列番号 324)

【 0 2 7 9 】

【表 1 3 - 3】

	C (配列番号 96)	(配列番号 97)	LIY (配列番号 98)	配列番号 99)
軽鎖(続き)				
クローン	フレームワーク3	CDR3	フレームワーク4	
HuC25	GIPARFSGSGSGTDFLTISL EPEDFAVYYC (配列番号 324)	QQSNEDPFT (配列番号 325)	FGQGTKVEIKR (配列番号 326)	
AR1	GIPARFSGSGSGTDFLTISL EPEDFAVYYC (配列番号 327)	QQGNEVPFT (配列番号 328)	FGQGTKVEIKR (配列番号 329)	
AR2	GIPARFSGSGSGTDFLTISL EPEDFAVYYC (配列番号 330)	QQGNEVPFT (配列番号 331)	FGQGTKVEIKR (配列番号 332)	
WR1(V)	GIPARFSGSGSGTDFLTISL EPEDFAVYYC (配列番号 333)	QQGNEVPFT (配列番号 334)	FGQGTKVEIKR (配列番号 335)	
WR1(T)	GIPARFSGSGSGTDFLTISL EPEDFAVYYC (配列番号 336)	QQGNEVPFT (配列番号 337)	FGQGTKVEIKR (配列番号 338)	
3D12	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFAAAYC (配列番号 339)	QHYNTYPYT (配列番号 340)	FGQGTKLEIKR (配列番号 341)	
RAZ1	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFAAAYC (配列番号 342)	QHYDTPYT (配列番号 343)	FGQGTKLEIKR (配列番号 344)	
3-8	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISL HPDDFAAAYC (配列番号 345)	QHYNTYPYT (配列番号 346)	FGQGTKLEIKR (配列番号 347)	
3-10	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFAAAYC (配列番号 348)	QHYSTYPYT (配列番号 349)	FGQGTKLEIKR (配列番号 350)	
ING1	GVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYC (配列番号 124)	QQSYSTPRTT (配列番号 125)	FGGGTKVDIKR (配列番号 126)	

* 完全な重鎖についての配列は、重鎖フレームワーク 1 + 重鎖 C D R 1 + 重鎖フレームワーク 2 + 重鎖 C D R 2 + 重鎖フレームワーク 3 + 重鎖 C D R 3 + 重鎖フレームワーク 4 である。

完全な軽鎖についての配列は、軽鎖フレームワーク 1 + 軽鎖 C D R 1 + 軽鎖フレームワーク 2 + 軽鎖 C D R 2 + 軽鎖フレームワーク 3 + 軽鎖 C D R 3 + 軽鎖フレームワーク 4 である。

【0280】

(酵母が提示した s c F v の I g G への変換の、親和性に対する影響)

多くの免疫学的アッセイ、およびインビボ中和研究のために、I g G を利用する必要がある。したがって、本発明者らは、二重 C M V プロモーターによって駆動する哺乳動物発現ベクター中に V H 遺伝子および V k 遺伝子を連続的にクローニングすることによって、Hu C 2 5、AR 1、AR 2、AR 3、AR 4、3 D 1 2、および R A Z 1 を、ヒト γ 1 定常領域およびヒト κ 定常領域からなる完全長 I g G に変換した。安定な C H O D G 4 4 細胞株を、7 種の抗体の各々について確立し、そして I g G を、上記 7 種の抗体のうちの 6 種について 5 ~ 2 0 m g / L の収量で細胞培養上清から精製した。本発明者らは、顕著な量の AR 3 I g G を、全く発現させることができなかった。

【0281】

各 I g G の親和性を、反応速度排除分析 (k i n e t i c e x c l u s i o n a n a l y s i s) (K i n e x a) によって測定した。Hu C 2 5 ファミリーの変異体の親和性および R A Z 1 の親和性は、酵母が提示した s c F v よりも、I g G として顕著に高かったが、その I g G の親和性の相対的増大は、酵母が提示した s c F v に対して決定し

た相対的親和性と一致した（表 1 4）。例えば、AR 4 s c F v は、酵母ディスプレイによる Hu C 2 5 s c F v よりも 3 7 倍高い親和性を有し、そして AR 4 I g G は、K i n e x a によって測定したところ、Hu C 2 5 I g G よりも 3 4 倍高い親和性を有した。RA Z 1 s c F v は、酵母ディスプレイによる 3 D 1 2 s c F v よりも 4 5 倍高い親和性を有し、そして RA Z 1 I g G は、K i n e x a によって測定したところ、3 D 1 2 I g G よりも 3 5 倍高い親和性を有した。

【0 2 8 2】

（表 1 4．A 1 毒素および A 2 毒素に対する抗体の親和性）

【0 2 8 3】

【表 1 4】

抗体	Hall (A1) 毒素に対する K_D	Honey (A2) 毒素に対する K_D
HuC25	1.24 nM	250 nM
AR1	200 pM	100 nM
AR2	47 pM	ND
WR1 (V)	450 pM	9.0 nM
WR1 (T)	310 pM	3.7 nM
3D12	940 pM	2.2 nM
3D12.3-1 (RAZ1)	17 pM	70 pM
3D12.3-8	21 pM	67 pM
3D12.3-10	28 pM	81 pM

（フローサイトメトリーによる B o N T / A の検出における親和性の影響）

酵母上に提示されたより高い親和性の s c F v は、酵母が提示したより低い親和性の s c F v と比較して、顕著により低い濃度の B o N T / A を検出できた（図 2 2）。最も高い親和性の s c F v（AR 4）は、0. 1 p M（他の増幅されない B o N T 検出システムについて報告されたものよりも低い値）程度に低い B o N T / A を検出できた。したがって、その結果は、検出感度を増加させるための漸増する抗体親和性の有用性を立証する。

【0 2 8 4】

（B o N T / A の中和に対する親和性の影響）

野生型抗体およびより高い親和性の抗体を、インビボマウス中和アッセイにおいて研究した。単一の抗体に関して、より高い親和性は、腹腔内に B o N T / A をチャレンジしたマウスの保護の小さい増大（約 2 倍）をもたらした（図 2 3）、最も高い親和性の AR 抗体は、1 0 0 マウス L D 5 0 の毒素に対する完全な保護を提供したが、2 0 0 L D 5 0 に対しては完全な保護を提供しなかった。2 種の抗体を組み合わせた場合、保護は、顕著に増大し、AR 4 + 3 D 1 2 の組み合わせは、保護の約 2 倍（2 5 0 0 L D 5 0 から 5 0 0 0 L D 5 0）までの増加を提供した。RA Z 1 を、その抗体の対において 3 D 1 2 に対して置換した場合、保護は、AR 4 と RA Z 1 との組み合わせについて、1 0, 0 0 0 マウス L D 5 0 を超えて見られた。したがって、そのデータは、抗体の組み合わせにおいてより高い親和性の抗体を使用することがより強力な毒素中和を生じることを示す。これは、3 種の抗体の組み合わせについて、よりさらに明確である（表 1 5）。

【0 2 8 5】

（表 1 5．抗体の組み合わせの中和の効力）

【0 2 8 6】

【表 15】

	1000 LD ₅₀	2500 LD ₅₀	5000 LD ₅₀	10,000 LD ₅₀	20,000 LD ₅₀	40,000 LD ₅₀
HuC25:B4:3D12, 50 µg					10/10	20/20
HuC25:B4:3D12, 10 µg	10/10	10/10	1/10	0/10		
HuC25:B4:RAZ1, 10 µg					8/10	
CR1:RAZ1:ING1, 5 µg				10/10		
CR1:RAZ1:ING1, 2 µg				18/20		
CR1:RAZ1:ING1, 1 µg				8/10		
CR1:RAZ1:ING1, 0.5 µg				3/10		

ここで、HuC25/B4/3D12またはRAZ1の組み合わせにおける、より高い親和性のRAZ1による3D12の置換は、10,000 LD₅₀チャレンジ用量の毒素における完全な保護を提供する。上記組み合わせにおける野生型3D12に関して、10,000 LD₅₀にてチャレンジしたマウスは、生存しない。より高い親和性のING1によるB4の置換、およびより高い親和性のCR1によるHuC25の置換は、10,000 LD₅₀チャレンジ用量の毒素における80%の生存を依然として伴いつつ、抗体用量の50 µgから1 µgまでの減少を可能にする。したがって、抗体の組み合わせにおいて使用される単一の抗体の親和性を増大させることは、効力を増大させ、かつ抗体用量の減少を可能にする。

【0287】

(実施例5)

(ボツリヌス神経毒素血清型内の配列バリエーションは、抗体結合および中和に影響する)

(材料および方法)

(毒素遺伝子配列)

NCBIデータベースおよびMedlineを、ボツリヌス神経毒素遺伝子またはボツリヌス神経毒素タンパク質の公開された配列あるいは記録された配列を同定するために検索した。クロストリジウム属の株FRI-A2Hの神経毒素遺伝子を、この研究のために配列決定した(調製における書き写し)。Clostridial株の神経毒素遺伝子配列は、Michael Peckからの贈呈であった。遺伝子配列を、ベクターNTI (Invitrogen, San Diego, CA) 中に入れ、翻訳させ、血清型によって分類し、そして整列した。系統樹を、ClustalWを使用して構築した。

【0288】

(毒素および抗体)

精製した純粋でありかつ複合体形成したボツリヌス神経毒素A1 (Hall hyper) およびA2 (FRI-A2H) を、Metabio Inc (Madison, WI) から購入した。抗体S25およびC25を、免疫化されたマウス (Amersdorferら、(1997) Infect. Immun. 65:3743-3752; Nowakowskiら、(2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A、99:11346-50) のV遺伝子から構築した単鎖Fvファージディスプレイライブラリーから得た。抗体3D12を、免疫化されたヒトボランティアドナー (Amersdorferら、(2002) Vaccine 20:1640-1648; Amersdorferら、(1997) Infect. Immun. 65:3743-3752) のV遺伝子から構築した単鎖Fvファージディスプレイライブラリーから得た。抗体B4を、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の免疫化されたトランスジェニックマウス (X

enoマウス) (I. GerenおよびJ. D. Marksが考案した) のV遺伝子から構築した単鎖Fvファージディスプレイライブラリーから得た。これら4種の抗体の各々のV遺伝子を、先に記載される通りに、ヒトIgG1定常領域およびヒトκ定常領域を含む哺乳動物発現ベクター中にクローニングした (Nowakowskiら、(2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A、99:11346-50)。安定なCHO-DG44細胞株を確立し、そしてIgGを、先に記載される通りに、プロテインGを使用して精製した (Nowakowskiら、(2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A、99:11346-50)。抗体の純度および濃度を、SDS-PAGEおよび280nmにおける吸光度によって決定した。抗体9D8 (マウスIgG1/κ) および7C1 (マウスIgG1/κ) を、rBoNT/A_{H_C}によって免疫化し、そしてBoNT/A毒素によって追加免疫したマウスから産生したハイブリドーマから得た。IgGを、プロテインGを使用してハイブリドーマ上清から精製し、そして純度および濃度を、SDS-PAGEおよびBCAアッセイ (Pierce Chemical Co.) によって決定した。次なる研究のために、IgG抗体を、約1~3mg/mlにてPBS (pH7.4) 中に保存した。

【0289】

(毒素捕捉ELISA)

毒素捕捉ELISAのために、96ウェルマイクロタイタープレート (Immuno 2、Dynatech) を、2μg/mlの抗体を用いて4℃にて一晚コーティングした。5%脱脂乳-PBSにおいて30分間ブロックした後、毒素を、100nMから1pMまで、二連で3.2倍希釈 (half-log dilution) に適用し、そして37℃にて90分間インキュベートした。プレートを、洗浄し、そしてウマ抗BoNT抗体 (PerImmune) と一緒にインキュベートし、0.2IU/mlまで希釈し (60分間)、次いで洗浄し、そして1:1000希釈の西洋ワサビペルオキシダーゼ (KPL) に結合体化したヤギ抗ウマ抗体と一緒に60分間インキュベートした。プレートを、ABTS (KPL) によって発色させた。バックグラウンドコントロールの減算後の405nmにおける平均吸光度を、毒素濃度に対してプロットした。

【0290】

(毒素に対する抗体親和性の測定)

精製したBoNT/A1毒素または精製したBoNT/A2毒素についてのIgG会合速度定数およびIgG解離速度定数を、BIAcore 1000 (Pharmacia Biosensor) における表面プラズモン共鳴を使用して測定し、そしてそれらを使用して、先に記載される通りにKDを算出した (Nowakowskiら、(2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A、99:11346-11350)。簡潔には、約100~400RUの精製したIgG (10mMアセテート (pH3.5~4.5) 中の10~20μg/ml) を、NHS-EDC化学を使用してCM5センサーチップにカップリングさせた。精製したBoNT/A1神経毒素または精製したBoNT/A2神経毒素についての会合速度定数を、50~800nMの範囲の毒素濃度を使用して、15μl/分の連続的な流れにおいて測定した。その会合速度定数 (kon) を、(ln(dR/dt))/t対濃度のプロットから決定した。解離速度定数 (koff) を、再結合を防止するために30μl/分の流速を使用して、分析した毒素の最も高い濃度におけるセンサーグラムの解離部分から決定した。KDを、k_{off}/konとして算出した。

【0291】

(インビボ毒素中和の測定)

50μgの適切なIgGを、0.5ml (総容量) のゼラチンリン酸緩衝液中のBoNT/A1神経毒素複合体 (Hall株) の示された数のマウスLD₅₀ またはBoNT/A2神経毒素複合体 (FRI-A2H株) の示された数のマウスLD₅₀ に添加し、そしてRTにて30分間インキュベートした。mAbの対に関して、25μgの各mAbを添加し、そして3種のmAbの組み合わせに関して、16.7μgの各mAbを添加した。

次いでその混合物を、雌CD-1マウス（受領時に16～22g）に対して腹腔内に注射した。マウスを、10の群において研究し、そして少なくとも毎日観察した。死亡の最終集計を、注射の5日後に決定した。マウスを使用した研究を、動物保護法および他の連邦法令ならびに動物および動物に関する実験に関する規制に従って行い、そしてこの研究は、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals、National Research Council、1996に記述される原則を遵守する。この調査が行われた施設は、Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care Internationalによって完全に認定される。

10

【0292】

（結果）

（ボツリヌス神経毒素血清型内の配列バリエーション）

毒素血清型内の配列変異性の程度を決定するために、60種の公開された神経毒素配列を示す文献を、検索した。このデータは、49種の完全な毒素遺伝子配列および11種の部分的な毒素遺伝子配列を含んだ（表16）。上記49種の完全な配列を、血清型によって分類し、整列し、そして配列同一性の程度を決定した（表17および図11）。分析した49種の配列のうち、7種のBoNT/A、9種のBoNT/B、6種のBoNT/C、5種のBoNT/D、17種のBoNT/E、4種のBoNT/F、および1種のBoNT/Gが存在した。血清型内で、2つの型の毒素遺伝子配列が、観察された；互いに実質的に同一である配列（下記参照）およびアミノ酸レベルで少なくとも2.6%異なる配列。このような配列変異性は、1種より多い毒素遺伝子が配列決定されている全6種の血清型（BoNT A、BoNT B、BoNT C、BoNT D、BoNT E、およびBoNT F）内で観察された。血清型内で、変異性は、高くてBoNT/Fについての32%～低くてBoNT/Eについての2.6%の範囲であった（表17）。3種のBoNT C/Dモザイク株および2種のBoNT D/Cモザイク株を、配列決定した。これらの株は、代表的に、それらの親血清型に対応した軽鎖およびN末端の重鎖を含み、その神経毒素配列の末端の3分の1は、そのモザイク株の代わりの血清型との強力であるが、絶対的ではない同一性を有する（表16）。

20

【0293】

（表16．配列分析において使用したクロストリジウム属の株：アクセッション番号は、NCIヌクレオチドデータベースからのものである）

30

【0294】

【表 16-1】

血清型	サブタイプ	株	アクセッション番号	参考文献
A	A1	NCTC 2916 62A ATCC 3502 Hall hyper Hall Allergan	X52066 M30196 AF461540 AF488749	Thompson, 1990 [1] Binz, 1990b [2] (Dr. Michael Peck, 未公開) Dineen, 2003 [3] Zhang, 2003 [4]
	A2	Kyoto-F FRI-A2II	X73423	Willems, 1993 [5] (Bradshaw ら, 未公開)
B	B1	Danish BGB okra	M81186	Whelan, 1992 [6] Kirma, 2004 [7] Ihara, 2003 [8]
	B2	strain 111	AB084152	Ihara, 2003 [8]
	非タンパク質分解性 B	Eklund 17B	X71343	Hutson, 1994 [9]
	二価 B	CDC 588 CDC 593 CDC 1436 CDC 3281	AF300465 AF300466 AF295926 Y13630	Kirma, 2004 [7] Kirma, 2004 [7] Kirma, 2004 [7] Santos-Buelga, 1998
C	C1	Stockholm C 468 Yoichi	X66433 X62389 X72793 AB061780	Hauser, 1990; Kimura, 1990 [10, 11] Hauser, 1994 [12] Sagane, 2001 [13]
	C/D	6813 6814 TW/2003	D49440 AB037166 AY251553	Moriishi, 1996 [14]
D	D	BVD/3 CB-16 1873	X54254 S49407 AB012112	Binz, 1990 [15] Sunagawa, 1992 [16] Nakajima, 1998 [17]
	D/C	South Africa D 4947	D38442 AB037920	Moriishi, 1996 [14] Kouguchi, 2002 [18]
E	E boulinum	NCTC 11219 Beluga 35396	X62683 X62089 AB082519	Whelan, 1992 [19] Poulet, 1992 [20] Tsukamoto, 2002 [21]
	E butyricum	BL5262, BL6340 BL5520 KZ 1886 KZ 1887 KZ 1889 KZ 1890 KZ 1891 KZ 1897 KZ 1898 KZ 1899 LCL 063 LCL 095 LCL 155	X62088 X62088 Q9FAR6 AB037708 AB037709 AB037710 AB037711 AB037712 AB037706 AB037707 AB037705 AB037713 AB037714 AB037704	Poulet, 1992 [20] Wang, 2000 [22] Wang, 2000 [22] Wang, 2000 [22] Wang, 2000 [22] Wang, 2000 [22] Wang, 2000 [22] Wang, 2000 [22] Wang, 2000 [22] Wang, 2000 [22] Wang, 2000 [22] Wang, 2000 [22] Wang, 2000 [22]

【0295】

【表 16-2】

F	タンパク質分解性 F	Langeland	X81714 L35496	Hutson, 1994 [9]; Elmore, 未公開
	非タンパク質分解性 F	Eklund 202F	M92906	East, 1992 [23]
	F baratii	ATCC 43756	X68262	Thompson, 1993 [24]
	二価 F	CDC 3281 (Bf)	Y13631	Santos-Buelga, 1998 [25]
G	G	113/30	X74162	Campbell, 1993 [26]

【0296】

【化 1】

1. Thompson ら、 (1990) *Eur. J. Biochem.*, 189(1): 73-81.
2. Binz ら、 (1990) *J. Biol. Chem.*, 265(16): 9153-9158.
3. Dineen ら、 (2003) *Curr. Microbiol.*, 46(5): 345-352.
4. Zhang ら、 (2003) *Gene*, 315: 21-32.
5. Willems ら、 (1993) *Res. Microbiol.*, 144(7): 547-556.
6. Whelan ら、 (1992) *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(8): 2345-2354.
7. Kirma ら、 (2004) *FEMS Microbiol. Lett.*, 231(2): 159-164. 10
8. Ihara ら、 (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, 1625(1): 19-26.
9. Hutson ら、 (1994) *Curr. Microbiol.*, 28(2): 101-110.
10. Hauser ら、 (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18(16): 4924.
11. Kimura ら、 (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171(3): 1304-1311.
12. Hauser ら、 (1994) *Mol. Gen. Genet.*, 243(6): 631-640.
13. Sagane ら、 (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288(3): 650-657.
14. Moriishi ら、 (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1307: 123-126. 20
15. Binz *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18(18): 5556.
16. Sunagawa ら、 (1992) *J. Vet. Med. Sci.*, 54(5): 905-913.
17. Nakajima ら、 (1998) *Microbiol. Immunol.*, 42(9): 599-605.
18. Kouguchi ら、 (2002) *J. Biol. Chem.*, 277(4): 2650-2656.
19. Whelan ら、 (1992) *Eur. J. Biochem.*, 204(2): 657-667.
20. Poulet ら、 (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183(1): 107-113.
21. Tsukamoto ら、 (2002) *Microb. Pathog.*, 33(4): 177-184. 30
22. Wang ら、 (2000) *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(11): 4992-4997.
23. East ら、 (1992) *FEMS Microbiol. Lett.*, 75(2-3): 225-230.
24. Thompson ら、 (1993) *FEMS Microbiol. Lett.*, 108(2): 175-182.
25. Santos-Buelga ら、 (1998) *Curr. Microbiol.*, 37(5): 312-318.
26. Campbell ら、 (1993) *Biochim Biophys Acta*, 1216(3): 487-491.

90%より多くのヒトボツリヌス中毒を引き起こす2種の毒素血清型 (BoNT/AおよびBoNT/B (Control、(1998) *Botulism in the United States, 1899-1998. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. Atlanta, Georgia U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service: downloadable at www.bt.cdc.gov/agent/botulism/index.aspにてダウンロード可能である))を、より詳細に分析した。7種の公開されたBoNT/A毒素配列のうち、5種 (62A、NCTC 2916、ATCC 3502、およびHall hyper (Hall Allergan))は、実質的に同一 (99.9~100%の同一性)であり、そしてそれらは、サブタイプA1として分類されている (図12A)。他の2種のBoNT/A配列 (Kyoto-FおよびFRI-A2H)は、100%同一であり、そしてサブタイプA 40 50*

2として分類されている（図12A）。A1毒素は、A2毒素と10.1%異なり、これは、レセプター結合ドメイン（C末端重鎖、HC）中の配列における最も大きな相違である（表18）。数かより多いことに加えて、HCアミノ酸の相違は、毒素表面上に露出した溶媒が接近可能なアミノ酸に存在する傾向にあった（図12B）。多くのこれらの相違は、推定上のガングリオシド結合部位の周りに集まっていた（図12B）。触媒ドメイン（軽鎖）の配列は、より保存されており（表18）、1は、より埋められるようである相違を有する（図12B）。

【0297】

（表17．クロストリジウム属のボツリヌス神経毒素遺伝子配列の分類：サブタイプを、アミノ酸レベルにて少なくとも2.6%異なるものとして規定した）

【0298】

【表17】

血清型	完全配列	部分配列	サブタイプ	血清型内のアミノ酸の最小の相違および最大の相違
A	7		2	10.1%
B	9	3	4	3.6-7.7%
C	6		2	24.0-24.2%
D	5		2	23.7-23.9%
E	17	6	3	2.6-5.1%
F	4	2	4	10.7-31.6%
G	1		1	
合計	49	11	18	

（表18．BoNT A1株とBoNT A2株との間の%アミノ酸同一性）

【0299】

【表18】

	ホ口毒素	軽鎖	重鎖	H _N	H _C
BoNT A1 対 BoNT A2	89.9	95.1	87.1	87.1	87.2

9種の公開されたBoNT/B配列は、DNAの相同性およびタンパクの質相同性に基づいて4種のサブタイプにグループ分けされ得た（図13）。これらの群は、二価BoNT/B（BoNT Ab 1436、BoNT Ab 588、BoNT Ab 593、およびBoNT Bf 3281）、BoNT/B1（BoNT/B Danish）、BoNT/B2（BoNT/B株111）、および非タンパク質分解性BoNT/B（BoNT/B Eklund）を含んだ。これらの毒素は、その軽鎖と比較して、その重鎖においてより大きい相違を伴って、アミノ酸レベルにて互いと3.6%~7.7%異なる（表19）。

【0300】

（表19．BoNT B株の間の%アミノ酸同一性）

【0301】

【表19】

	ホ口毒素	軽鎖	重鎖	H _N	H _C
BoNT B1 対					
BoNT B2	95.7	99.5	93.6	95.8	91.8
BoNT B np	92.8	97.7	90.2	92.5	88.2
BoNT B 二価	96.0-96.4	98.9-99.1	94.6-94.9	94.3-95.0	94.7-94.9

（BoNT/A毒素配列バリエーションおよび抗体結合の影響）

免疫の認識に対するBoNT/A毒素配列変異性の影響を決定するために、本発明者ら

は、捕捉 E L I S A によって、B o N T / A 1 に対して惹起された 6 種のモノクローナル抗体の B o N T / A 1 および B o N T / A 2 に結合する能力を測定した。純粋な神経毒素および神経毒素複合体の両方に対する結合を、決定した。4 種の m A b (3 D 1 2、C 2 5、B 4、および S 2 5) は、組換え H C に対する E L I S A によって決定したところ、B o N T / A H C 上の重複しないエピトープを結合した。3 D 1 2 および S 2 5 は、先に、B o N T / A H C の C 末端サブドメインに対してエピトープマッピングされており、一方で、C 2 5 は、2 つの H C サブドメインによって形成された複合体エピトープを認識する (M u l l a n e y ら、(2 0 0 1) I n f . I m m u n .、6 9 : 6 5 1 1 - 6 5 1 4) 。1 種の m A b (9 D 8) は、組換え H N に対する E L I S A によって決定したところ、B o N T / A トランスロケーションドメイン (H N) を結合した (データ示さず) 。1 種の m A b (7 C 1) は、組換え軽鎖に対する E L I S A によって決定したところ、B o N T / A 軽鎖を結合した。

【 0 3 0 2 】

B o N T / A H C を結合した 4 種の抗体のうちの 3 種は、B o N T / A 2 毒素と比較して、B o N T / A 1 毒素に対する結合において著しい減少を示した (図 1 4) 。対照的に、非 H C 結合 m A b は、かなりの E L I S A シグナルを、A 1 毒素および A 2 毒素の両方において示した (図 1 5) 。A 1 毒素および A 2 毒素に対する結合における差を定量するために、平衡解離定数および結合速度動態を、精製した A 1 毒素および精製した A 2 毒素に対する各 m A b の結合について測定した (表 1 7) 。全ての m A b は、A 1 毒素を高親和性 (6 n M と 0 . 1 7 n M との間の範囲の K D) で結合した。A 2 毒素に対する減少した結合を示した (捕捉 E L I S A による) 3 種の m A b (C 2 5、S 2 5、および B 4) は、A 1 毒素と比較して、A 2 毒素に対する親和性の 5 5 3 倍 ~ 1 2 0 0 より大きい減少を示した。B o N T / A 2 に対する B 4 m A b 結合についての K D することは、非常に低い親和性結合に起因して不可能であった。親和性の減少の大部分は、会合速度定数の大きな減少に起因した (表 2 0) 。対照的に、3 種の m A b (3 D 1 2、9 D 8 および 7 C 1) は、A 1 毒素および A 2 毒素の両方に対するかなりの高親和性を示した。

【 0 3 0 3 】

(表 2 0 . B o N T / A 1 および B o N T / A 2 に対する B o N T / A I g G 結合についての、会合速度定数 (k_{on}) および解離速度定数 (k_{off}) ならびに平衡解離定数 (K_d) : 会合速度定数および解離速度定数を、B I A c o r e における表面プラズモン共鳴によって決定しそして K_D を、 k_{off} / k_{on} として算出した)

【 0 3 0 4 】

【 表 2 0 】

抗体	BoNT/A1			BoNT/A2		
	$K_d (M^{-1})$	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_d (M^{-1})$	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$
C25	2.98×10^{-10}	1.5×10^6	4.47×10^{-4}	1.65×10^{-7}	2.09×10^4	3.63×10^{-3}
S25	1.69×10^{-9}	4.82×10^5	8.15×10^{-4}	2.14×10^{-6}	1.34×10^3	2.87×10^{-3}
3D12	1.68×10^{-10}	1.45×10^6	2.44×10^{-4}	1.04×10^{-9}	3.48×10^5	3.62×10^{-4}
B4	1.8×10^{-9}	7.2×10^5	1.31×10^{-3}	NM	NM	NM
7C1	5.9×10^{-9}	2.89×10^5	1.71×10^{-3}	5.1×10^{-9}	3.38×10^5	1.73×10^{-3}
9D8	1.21×10^{-9}	1.73×10^5	2.11×10^{-4}	1.3×10^{-9}	2.08×10^5	2.73×10^{-4}

N M = 測定不能

(A 1 神経毒素および A 2 神経毒素の中和に対する抗体結合の影響)

本発明者らは、先に、本明細書で記載した 3 種の m A b (3 D 1 2、S 2 5、および C 2 5) の B o N T / A 1 毒素に対するインビボ中和能を研究した。B o N T / A 1 の顕著なインビボ中和を示すにもかかわらず、これら 3 種の m A b は、5 0 u g の抗体を受容し、かつ 2 0 マウス L D 5 0 の B o N T / A 1 によってチャレンジしたマウスの顕著なインビボ保護を示さなかった (1 0 ~ 2 0 % のみの生存 (N o w a k o w s k i ら、(2 0 0 2) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、9 9 : 1 1 3 4 6 - 1 1 3

50))。同様に、本明細書で報告した残りの3種のmAbは、マウスを20マウスLD₅₀のBoNT/A1によってチャレンジした場合に、顕著なインビボ保護を示さなかった(10~20%のみの生存、データ示さず)。本発明者らは、mAbを組み合わせた場合のインビボ保護における顕著な相乗作用を先に報告したので、本発明者らは、mAbの対およびトリプレットのインビボで毒素を中和する能力を研究した。先に観察した通り、抗体の対は、単一のmAbよりも顕著に大きいBoNT/A1中和を示し、さらに大きい効力が、3種のmAbの組み合わせについて観察された(図16および17A)。相乗効果は、1種のみ結合ドメイン抗体を含んだmAb対(C25+9D8)または非結合ドメイン抗体を含んだmAb対(9D8+7C1)(図16)、または1種のみ結合ドメイン抗体を含んだ3種のmAbの組み合わせ(C25+9D8+7C1)(図17A)について観察された。BoNT/A2毒素の中和に関して、BoNT/A2を高親和性で結合したmAbを含むmAbの対またはトリプレットのみが、中和について顕著な相乗作用を示した(図17B)。最も強力なmAbのトリプレット(3D12+9D8+7C1)は、10,000マウスLD₅₀のA1毒素またはA2毒素のチャレンジからマウスを完全に保護できた。この組み合わせ(3D12+9D8+7C1)は、A1毒素の中和について3種の結合ドメインmAbの組み合わせ(C25+3D12+B4)ほど強力ではなく、一方で、1種のみ結合ドメインmAbは、A2毒素を任意の親和性で結合し、そして結果として、C25+3D12+B4のトリプレットは、200マウスLD₅₀未満のA2毒素を中和した。

【0305】

(考察)

49種の公開された完全なボツリヌス神経毒素配列の分析は、毒素遺伝子配列が、血清型内で、実質的に同一であるかまたはアミノ酸レベルで互いと少なくとも3.6%異なるかのいずれかであったことを示した。本発明者らは、この最小限の相違(3.6%)を有するそれらの毒素を、所与の血清型のサブタイプであると称している。このような分析は、1種より多くの毒素遺伝子が配列決定されている6種の血清型について、平均で2.8個のサブタイプを示した(1種の血清型あたり2個~4個の範囲のサブタイプ)。この分析は、おそらく、最も頻繁な毒素サブタイプを示す一方で、さらなる毒素サブタイプが、同定され続ける(比較的少数の配列決定された毒素遺伝子を与えられる(1種の血清型あたり平均で8種の毒素遺伝子))ようである。

【0306】

毒素サブタイプの重要性は、診断的検査および毒素の治療の開発に対するそれらの影響である。明確には、ヌクレオチド多型性のこのレベルは、DNAプローブベースのアッセイ(例えば、PCR)に影響し得る。重要なことに、アミノ酸置換の程度は、ELISAおよび他の免疫学ベースの診断的試験に使用されるモノクローナル抗体の結合に影響し得る。本発明者らは、BoNT/A1サブタイプとBoNT/A2サブタイプとの間の10%のアミノ酸の相違が、分析した6種のモノクローナル抗体のうちの3種の結合親和性およびELISAシグナルに対して劇的な影響を有することを明確に示した。興味深いことに、mAb親和性の減少についての動態の基礎は、概して、解離速度定数の増加よりもむしろ会合速度定数の減少に起因する。毒素アミノ酸配列における相違のポリクローナル抗体の結合に対する影響は、未知である。明確には、免疫学的認識に基づく毒素アッセイは、異なる毒素サブタイプを使用して検証される必要がある。

【0307】

結合親和性の差は、インビボ毒素中和の効力の顕著な差へと変化する。本発明者らは、単一のmAbによる強力なインビボ毒素中和を観察しなかったので、本発明者らは、mAbの組み合わせの効力に対する毒素配列のバリエーションの影響を研究した。結合研究と同様に、A1サブタイプおよびA2サブタイプの両方に強固に結合するmAbの組み合わせのみが、インビボで強力に毒素を中和した。したがって、効力に対するサブタイプ変異性の影響は、抗体ベースの毒素治療の開発において、このような治療がオリゴクローナル性であるかポリクローナル性であるかにかかわらず評価されなくてはならない。同様に、

単一のサブタイプに基づく毒素ワクチンは、関連するサブタイプから保護するそれらの能力について評価される必要があり得る。

【0308】

これらの研究における予想外の発見は、BoNTのトランスロケーションドメインおよび／または触媒ドメインに対するmAb結合が、互いと組み合わせたか、またはBoNTレセプター結合ドメイン(HC)を認識するmAbと組み合わせたかのいずれかの場合に、中和活性を有したことであった。中和活性はまた、破傷風毒素の触媒ドメイン(Kozakiら、(1995) Microbiol. Immunol.、39:767-774)を結合するmAbおよびリシン(Langら、(1993) J. Immunol. 151:466-472)を結合するmAbについて報告されている。BoNTレセプター結合ドメインに結合しないmAbは、細胞レセプターに対するBoNT結合ドメインエピトープの相互作用、およびその後のBoNTのエンドサイトーシスを厳密にブロックできないので、それらが中和に寄与する機構は、未知のままである。可能性としては、複数のmAbの結合の際の循環からのBoNTのクリアランスの上昇(Montero-Julianら、(1995) Blood 85:917-924)、立体化学的な効果によるレセプター結合の妨害、必要とされる細胞内の毒素プロセス(エンドソーム脱出または触媒活性)の妨害(KoriazovaおよびMontal、(2003) Nat. Struct. Biol.、10:13-18)、および／またはBoNT細胞内輸送の変化が挙げられる。上記機構にかかわらず、非結合ドメインmAbの毒素を中和する能力は、中和mAbの産生に利用可能なエピトープの数を顕著に増加させ、全てのBoNTサブタイプを結合および中和するmAbの発見の尤度を増加させる。

【0309】

本発明者らは、抗体結合および単一の血清型(BoNT/A)についての中和に対する配列変異性の影響のみを研究したが、3種の血清型(BoNT/C、BoNT/D、およびBoNT/F)は、BoNT/A1とBoNT/A2との間の10%より大きい相違(10.7%~31.6%)で互いと異なるサブタイプを有する。これらの3種の血清型に関して、免疫の認識に対する配列変異性の影響は、BoNT/Aの影響より大きいようである。2種の血清型(BoNT/BおよびBoNT/E)について、配列変異性は、BoNT/Aについて観察されるものより低い(2.6%~7.6%)。このレベルの配列変異性の影響は、評価される必要があるが、それは、BoNT/B毒素に結合するmAbの以前の評価(Gibsonら、(1988) J. Appl. Bacteriol.、64:285-291; Kozakiら、(1998) Infect. Immun.、66:4811-4816)およびBoNT Eに結合するmAbの以前の評価(Kozakiら、(1986) Infect. Immun.、52:786-791)において示される通り、明確に、mAb結合に影響し得る範囲にある。

【0310】

結論として、本発明者らは、7種のボツリヌス神経毒素血清型のうちの6種内でかなりの配列変異性が存在することを報告し、そしてこのレベルの変異性が抗体結合および中和に著しく影響し得ることを示す。このような毒素の多様性の完全な範囲を決定することは、ボツリヌス毒素の免疫学的なアッセイ、治療およびワクチンの開発において重要な工程である。一旦配列変異性が規定されると、いくつかのこれらの毒素改変体は、検出アッセイ、治療、およびワクチンの確認のために生産される必要があるようである。

【0311】

(実施例6)

(BoNT/AサブタイプA1、A2、およびA3の交差中和(cross neutralization)のために選択され、そして進化させた中和抗体)

ボツリヌス神経毒素(BoNT/Aが挙げられる)の異なるサブタイプの発見は、診断的抗体および治療的抗体の開発に対する挑戦をもたらす。理想的には、mAbまたはmAbの混合物は、異なるBoNTサブタイプの大部分または全てに結合し、そしてそれらを検出／中和する。これは、いくつかのサブタイプの検出に失敗しなかった検出システムを

もたらず。治療的抗体について、交差反応性は、その抗体が上記サブタイプの１種以上を中和し損なわないことを確実にする。

【０３１２】

（ＢｏＮＴ／Ａ１およびＢｏＮＴ／Ａ２に結合する抗体の選択）

ＢｏＮＴ／Ａ１およびＢｏＮＴ／Ａ２を結合し得るモノクローナル抗体を産生するために、免疫性ファージｓｃＦｖ抗体ライブラリーまたは免疫性酵母ｓｃＦｖ抗体ライブラリーを、最初はＢｏＮＴ／Ａ１に対し、次いでＢｏＮＴ／Ａ２に対して連続的に選択した。複数のラウンドの選択後、ファージ抗体または酵母抗体を、両方のＢｏＮＴサブタイプに対する結合についてスクリーニングした。２種のｓｃＦｖ抗体を、ＢｏＮＴ／Ａ１およびＢｏＮＴ／Ａ２の両方を匹敵する親和性で結合した抗体を同定した（ＩＮＧ１、ｓｃＦｖ
 K_D 　ＢｏＮＴ／Ａ１＝ 1.17×10^{-9} M；ｓｃＦｖ　 K_D 　ＢｏＮＴ／Ａ２＝ 1.18×10^{-9} M；およびＩＮＧ２、ｓｃＦｖ　 K_D 　ＢｏＮＴ／Ａ１＝ 4.17×10^{-10} M；ｓｃＦｖ　 K_D 　ＢｏＮＴ／Ａ２＝ 4.5×10^{-10} M。ＩＮＧ１およびＩＮＧ２の配列については、表１３を参照のこと。インビボ研究のために、これら２種のｓｃＦｖを、ＩｇＧに変換した。そのＩｇＧは、Ａ１　ＢｏＮＴおよびＡ２　ＢｏＮＴの両方に対して、高親和性の結合を維持した（表２１）。

10

【０３１３】

（表２１．ＢｏＮＴ／Ａ１およびＢｏＮＴ／Ａ２の両方を高親和性で結合する交差反応性であるＩｇＧの親和性：親和性および結合動態を、フロー蛍光定量法によって決定した）

20

【０３１４】

【表２１】

抗体	抗原	Kd	会合速度	解離速度
CR-1	A1	2.96 pM	$3.54e^6$	$1.06e^{-5}$
CR-1	A2	1.73 nM	$1.62e^7$	$2.81e^{-2}$
ING-1	A1	314 pM	$2.02e^5$	$6.35e^{-5}$
ING-1	A2	719 pM		
ING-2	A1	9.57 pM	$1.09e^6$	$1.05e^{-5}$
ING-2	A2	7.42 pM	$9.78e^5$	$7.26e^{-6}$

（ＢｏＮＴ／Ａ１およびＢｏＮＴ／Ａ２の両方を高親和性で結合し得るＨｕＣ２５改変体の産生）

30

ＨｕＣ２５もそのより高い親和性の誘導体も、ＢｏＮＴ／Ａ２を高親和性で結合する（ＢｏＮＴ／Ａ１およびＢｏＮＴ／Ａ２に対するＡＲ２の親和性については、表２２を参照のこと）。ＢｏＮＴ／Ａ２に対する親和性を増大させるために、本発明者らは、より高い親和性の改変体ＡＲ２を用いて開始した。ＩｇＧとしてのこの抗体は、１０，０００より多い、ＢｏＮＴ／Ａ１よりも低い親和性をＢｏＮＴ／Ａ２に対して有し、そしてＢｏＮＴ／Ａ２に対する 2.0×10^{-7} Mの非常に低い親和性を有する（表２２）。

【０３１５】

（表２２．ＢｏＮＴ／Ａ１およびＢｏＮＴ／Ａ２に対するＡＲ２　ＩｇＧならびに酵母が提示したｓｃＦｖの親和性および結合動態）

40

【０３１６】

【表 2 2】

方法		BoNT/A1			BoNT/A2		
	$K_d (M^{-1})$	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$ $1)_{c}$	$K_d (M^{-1})$	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	
BIACoreにおける IgG/SPR	1.46×10^{-11}	1.09×10^6	1.6×10^{-5}	1.7×10^{-7}	2.0×10^4		3.4×10^{-3}
IgG/Kinexa	6.8×10^{-12}	3.69×10^6	2.66×10^{-5}	2.01×10^{-7}			
scFv酵母ディスプレイ	6.1×10^{-11}			1.08×10^{-7}			

10

AR2変異体のライブラリーを、スパイクオリゴヌクレオチド (spiked oligonucleotide) または誤りがちのPCRを使用して産生し、そしてその変異体は、scFvとして酵母の表面上に提示された。ライブラリーを、最初はBoNT/A1に対し、そしてBoNT/A2に対して連続的に選択し、変異体WR1(T) (K_D BoNT/A2 = 3.7 nM)、WR1(V) (K_D BoNT/A2 = 9.0 nM) およびCR1 (K_D BoNT/A2 = 850 pM) を産生した (配列については表20)。

最も高い親和性のscFvであるCR1を、IgGに変換し、そのIgGは、親AR2 IgGと比較して、約80倍の、より高い親和性をBoNT/A2毒素に対して有し、一方でBoNT/A1に対するその親和性もまた約10倍増大した (表23)。BoNT/A2に対する親和性をさらに増大させるために、CR1 scFv遺伝子を、ランダムに変異させ、酵母上に提示させ、そしてより高い親和性のscFvを、BoNT/A1およびBoNT/A2に対して連続的に選択し、変異体CR2をもたらした (配列については、配列表または表13を参照のこと)。IgGへの変換後、CR2は、CR1よりも約6倍高い親和性をBoNT/A2に対して有し、そしてBoNT/A1に対して高親和性の結合を維持した (表23)。

20

【0317】

(表23. フロー蛍光定量法によって決定した場合の、BoNT/A1およびBoNT/A2に対するAR2 IgG、CR1 IgG、ならびにCR2 IgGの親和性および結合動態)

【0318】

【表 2 3】

方法		BoNT/A1			BoNT/A2		
	$K_d (M^{-1})$	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_d (M^{-1})$	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	
AR2	6.8×10^{-12}	3.69×10^6	2.66×10^{-5}	2.01×10^{-7}			
CR1	2.96×10^{-12}	3.54×10^6	1.06×10^{-5}	1.73×10^{-9}	1.62×10^7		2.81×10^{-2}
CR2				2.9×10^{-10}			

(BoNT/A2に対するより高い親和性を有する抗体は、BoNT/A2を高い効力で中和する)

40

実施例5において、抗体HuC25と、B4と、3D12との組み合わせの50ugが40,000マウスLD50のBoNT/A1 (しかし、200LD50未満のBoNT/A2) を中和し得ることを示した。B4もHuC25も、BoNT/A2を高親和性で結合した。したがって、本発明者らは、HuC25に由来するがBoNT/A1およびBoNT/A2に対して高親和性を有するCR1抗体 (RAZ1、およびING1またはING2のいずれかと組み合わせた) の、BoNT/A1およびBoNT/A2を中和する能力を研究した。50ug (全抗体) の抗体用量を使用して、CR1+RAZ1+ING1またはING2のいずれかの組み合わせは、40,000マウスLD50のBoNT/A1によってチャレンジしたマウスを完全に保護した。同用量の抗体は、BoNT/A2によってチャレンジしたマウスの顕著な保護を示し、組み合わせCR1+RAZ1+IN

50

G 1 が、最も強力であり、それは、40,000 マウス LD 50 の B o N T / A 2 によってチャレンジしたマウスを完全に保護した（図 25）。したがって、本発明者らは、複数の B o N T サブタイプ（この場合において、B o N T / A 1 および B o N T / A 2）を高親和性で結合し得る抗体を産生し、そして進化させることが可能であること、およびこれが、抗体が組み合わせられる場合に強力な中和をもたらすことを示した。

【0319】

本明細書中に記載される実施例および実施形態は例示をのみを目的としていること、ならびにそれらを考慮した種々の改変および変更は当業者に対して示唆され、かつ本願の精神および全範囲ならびに添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれることが、理解される。本明細書中に引用される全ての刊行物、特許、および特許出願は、全ての目的のためにその全体が本明細書に参考として援用される。

【0320】

【化 2】

配列表

RAZ1 VH 配列 (配列番号 351 核酸 , 配列番号 352, タンパク質):
配列範囲 : 1 ~ 372

```

      10      20      30      40      50      60
CAGGTGCAGC TGGTGCAGTC TGGGGGAGGC GIAGTCCACC CTGGGAGGTC CCTGAAACTC
Q V Q L V Q S G G G V V H P G R S L K L>

      70      80      90     100     110     120
TCCTGTGCAG GGAGTGGATT CACTTTCAGT GATTATGACA TGCACTGGGT CCGCCAGGCI
S C A G S G F T F S D Y D M H W V R Q A>

     130     140     150     160     170     180
CCAGGCAAGG GCCTGGAATG GGTGGCGGTT ATGTGGTTTG ATGGAAGTGA AAAAIACTCT
P G K G L E W V A V M W F D G T E K Y S>

     190     200     210     220     230     240
GCAGAGTCCG TGAAGGGCCG ATTACCATC TCCAGAGACA AITCCAAGAA CACATTGTTT
A E S V K G R F T I S R D N S K N T L F>

     250     260     270     280     290     300
TTGCAAAATG ACAGCCIGAG AGCCGACGAC ACGGCTGIGT ATTACTGTGC GAGAGAGCCT
L Q M N S L R A D D T A V Y Y C A R E P>

     310     320     330     340     350     360
GATTGTTTAT TATGGGGGGA CAGGGGTGCT CTGGACGTCT GGGGCCAAGG GACCACGGIC
D W L L W G D R G A L D V W G Q G T T V>

     370
ACCGTCTCCT CA
T V S S>

```

10

20

30

40

RAZ1 V1 配列 (配列番号 353 核酸 , 配列番号 354, タンパク質):

配列範囲 : 1 ~ 324

```

      10      20      30      40      50      60
GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCTTCCACT CTGTCTGCAI CTGTAGGAGA CAGAGTCACC
D I V M T Q S P S T L S A S V G D R V T>

      70      80      90     100     110     120
ATCACTTGCI GGGCCAGTCA GAGTATTAGT AGCCGGITGG CCTGGTATCA GCAGAAACCA
I T C W A S O S I S S R L A W Y Q Q K P>

     130     140     150     160     170     180
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATGTATGAG GCGACTAGTT TAGGAAGTGG GGTCCCATCA
G K A P K L L M Y E A T S L G S G V P S>

     190     200     210     220     230     240
AGGTTTCAGC GCAGTGGATC CGGGACAGAA TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGUCI
R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P>

     250     260     270     280     290     300
GATGATTTTG CAGCTTATTA CTGCCAACAT TATGACACTT ACCCGTACAC TTTTGGCCAG
D D F A A Y Y C Q H Y D T Y P Y T F G Q>

     310     320
GGGACCAAGC TGGAGATCAA ACGT
G T K L E I K R>

```

【0321】

【化 3】

ING1 VH 配列 (配列番号 355 核酸, 配列番号 356, タンパク質)

配列範囲 : 1 ~ 378

```

      5      10      15      20      25      30      35      40      45
CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GGG GGA GGC CTG GTG CAG CCT GGG GGG
GTC CAT GTC GAC GTC GTC AGT CCC CCT CCG GAC CAC GTC GGA CCC CCC
Q V Q L Q Q S G G G L V Q P G G>

50      55      60      65      70      75      80      85      90      95
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AAC TAT
AGG GAC TCT GAG AGG ACA CGT CGG AGA CCT AAG TGG AAA TCG TTG AIA
S L R L S C A A S G F T F S N Y>

100     105     110     115     120     125     130     135     140
GCC AIG ACC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC
CGG TAC TGG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCC GAC CTC ACC CAG
A M T W V R Q A P G K G L E W V>

145     150     155     160     165     170     175     180     185     190
TCA TCT ATC AGT GTT GGT GGI AGT GAC ACA TAC TAC GCA GAC ICC GTG
AGT AGA TAG TCA CAA CCA CCA TCA CTG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC
S S I S V G G S D T Y Y A D S V>

195     200     205     210     215     220     225     230     235     240
AAG GGC CGG TTC ACC GTC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG CTT
TTC CCG GCC AAG TGG CAG AGG ICT CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC GAA
K G R F T V S R D N S K N T L L>

245     250     255     260     265     270     275     280     285
CTG CAG ATC AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT
GAC GTC TAC TTG TCG GAC TCT CGG CTC CTG TGC CGG CAT AIA ATG ACA
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C>

290     295     300     305     310     315     320     325     330     335
GCG AAA GIT CGC ACA AAA TAT TGT AGT AGT TTA AGT TGC TTC GCC GGA
CGC TTT CAA GCG IGT TTT ATA ACA TCA TCA AAT TCA ACG AAG CGG CCI
A K V R T K Y C S S L S C F A G>

340     345     350     355     360     365     370     375
TTT GAC TCC TGG GGC CAG GGA ACC CGG GTC ACC GTC TCC TCA
AAA CTG AGG ACC CCG GTC CCT TGG GCC CAG TGG CAG AGG AGT
F D S W G Q G T R V T V S S>

```

10

20

【0 3 2 2】

30

【化 4】

ING1 VL 配列 (配列番号 357 核酸 , 配列番号 358, タンパク質)
 配列範囲 : 1 ~ 327

```

      5      10      15      20      25      30      35      40      45
GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GGA GGA
CTG TAG CAC TAC TGG GTC AGA GGT AGG ACG GAC AGA CGT AGA CAT CCT
D I V M T Q S P S S L S A S V G>

      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95
GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT
CIG TCT CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC TCG TAA TCG TCG ATA
D R V T I T C R A S Q S I S S Y>

     100     105     110     115     120     125     130     135     140
TIG AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC
AAC TTA ACC ATA GTC GTC TTT GGT CCC TTT CGG GGA TTC GAG GAC TAG
L N W Y Q Q K P G K A P K L L I>

    145    150    155    160    165    170    175    180    185    190
TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC
ATA CGA CGT AGG TCA AAC GTT TCA CCC CAG GGT AGT TCC AAG TCG CCG
Y A A S S L Q S G V P S R F S G>

    195    200    205    210    215    220    225    230    235    240
AGT GGA ICT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT
TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG TCG TCA GAC GTT GGA
S G S G T D F T L T I S S L Q P>

    245    250    255    260    265    270    275    280    285
GAA GAT TTT GCA ACT TAC IAC TGT CAA CAG AGC TAC AGT ACC CCT CGC
CTT CTA AAA CGT TGA ATG ATG ACA GTT GTC TCG ATG TCA TGG GGA GCG
E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P R>

    290    295    300    305    310    315    320    325
ACC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA CGT
TGG TGA AAG CCG CCT CCC TGG TTT CAC CTA TAG TTT GCA
T T F G G G T K V D I K R>

```

10

20

【 0 3 2 3 】

【化 5】

ING2 VH 配列 (配列番号 359 核酸, 配列番号 360, タンパク質)
配列範囲 : 1 ~ 357

```

      10      20      30      40      50
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCGGGGTCCCTC
GTCCACGTCGACCCAGTCAGTCCCGACTCCACTTCTTCGGCCCCAGGAG
Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S>

      60      70      80      90     100
GGTGAAGGTCCTGCAAGGCTTCTGGAGACACCTTCAACAGGAACGCTA
CCACTTCCAGAGGACGTCCGAAGACCTCTGTGGAAGTTGTCCTGCGAT
V K V S C K A S G D T F N R N A>

     110     120     130     140     150
TCGCCTGGGTGCGACAGCCCCCTGGACAGGGGCTTGAGTGGATGGGACGG
AGCGGACCCACGCTGTCCGGGACCTGTCCCGAAGTACCTACCCCTGCC
I A W V R Q A P G Q G L E W M G R>

     160     170     180     190     200
ATCATCCCTAATCTTCGAACAACACACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAG
TAGTAGGGATTAGAAGCTTGTGTGTGATGCGTGTCTTCAAGGTCCCGTC
I I P N L R T T H Y A Q K F Q G R>

     210     220     230     240     250
AGTCGCGATAACCGCGGACAAACACACGAACACAGTCTTCATGGAGCTGA
TCAGCGCTATTGGCGCCTGTTTGTGTGCTTGTGTCAGAAGTACCTCGACT
V A I T A D K H T N T V F M E L>

     260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGACCCCT
CGTCGGACTCTAGACTCCTGTGCCGGCACAAATGACACGCTCTCTGGGA
S S L R S E D T A V Y Y C A R D P>

     310     320     330     340     350
TAITACTACTCCTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGT
ATAATGATGAGGATGTACCTGCAGACCCCGTTTCCTGGTGCCAGTGGCA
Y Y Y S Y M D V W G K G T T V T V>

CTCCTCA
GAGGAGT
S S>
```

10

20

【0 3 2 4】

【化 6】

ING2 VL 配列 (配列番号 361 核酸 , 配列番号 362, タンパク質)
配列範囲 : 1 ~ 342

```

      10      20      30      40      50
GAAATTGTGCTGACTCAGTCICCACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGA
CTTTAACACGACTGAGTCAGAGGCTCTGAGGGACCGACACAGAGACCCGCT
E I V L T Q S P D S L A V S L G E>

      60      70      80      90     100
GAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCGAGTGTTTATACAGCTCCA
CTCCCGGTGGTAGITGACGTTTCAAGTCCGCGCTCACAAAATATGTCGAGGT
R A T I N C K S S R S V L Y S S>

     110     120     130     140     150
ACAATAACAACTACTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCT
TGTTATGTGTGATGAATCGAACCATGGTCGTCTTTGGTCTGTGCGAGGA
N N N N Y L A W Y Q Q K P G Q P P>

     160     170     180     190     200
AAGCTGCTCAATTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCG
TTCGACGAGTAAATGACCCGTAGAIGGGCCCTTAGGCCCCAGGGACTGGC
K L L I Y W A S T R E S G V P D R>

     210     220     230     240     250
ATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCC
TAAGTCACCGTCGCCCAGACCCCTGTCTAAAGTGAGAGTGGTAGTCGTCCG
F S G S G S G T D F T L T I S S>

     260     270     280     290     300
TGCAGGCTGAAGAIGTGGCAGTITATTACIGTCACCAATATTATAGTACT
ACGTCCGACTTCTACACCGTCAAAATGACAGTCGTTATAATATCATGA
L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T>

     310     320     330     340
CCTTTCACITTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGG
GGAAAGTGAAAGCCGCTCCCTGGTTCACCTCTAGTTTGCC
P F T F G G G T K V E I K R>

```

10

20

【0325】

【化 7】

CR1-VH (配列番号 363 核酸 , 配列番号 364, タンパク質)
配列範囲 : 1 ~ 354

```

      5      10      15      20      25      30      35      40      45
CAG GTC CAG CTG CAG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG CAG CCT GGA GGG
GTC CAG GTC GAC GTC CTC AGA CCC CCT CCG AAT CAC GTC GGA CCT CCC
Q   V   Q   L   Q   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G>

      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95
TCC CTG CGC CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACG TTC AAG TAC GAC
AGG GAC GCG GAG AGG ACA CGT CGG AGA CCT AAG TGC AAG TTC ATG CTG
S   L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   K   Y   D>

     100     105     110     115     120     125     130     135     140
TAC ATG TAI TGG GIT CGC CAG GCT CCG GGC AAG GGC CTG GAG TGG GTC
ATG TAC ATA ACC CAA GCG GTC CGA GGC CCG TTC CCG GAC CTC ACC CAG
Y   M   Y   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V>

    145     150     155     160     165     170     175     180     185     190
GCA ACC ATI AGT GAT GGT GGT AGT TAC ACC TAC TAT TCA GAC AGT GTG
CGT TGG TAA TCA CTA CCA CCA TCA ATG TGG ATG ATA AGT CTG TCA CAC
A   T   I   S   D   G   G   S   Y   T   Y   Y   S   D   S   V>

     195     200     205     210     215     220     225     230     235     240
GAG GGG CGA TTC ACC ACC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACC CTG TAT
CTC CCC GCI AAG TGG TGG AGG TCT CTG TTA AGG TTC TTG TGG GAC ATA
E   G   R   F   T   T   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y>

     245     250     255     260     265     270     275     280     285
CTG CAA ATG AAC AGT CTG CGC GCT GAG GAC ACA GCC ATA TAT TAC TGT
GAC GTT TAC TTG TCA GAC GCG CGA CTC CTG TGT CGG TAT ATA ATG ACA
L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D   T   A   I   Y   Y   C>

    290     295     300     305     310     315     320     325     330     335
TCA AGG TAT AGG TAC GAC GAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC
AGT TCC ATA TCC ATG CTG CTA CGA TAC CTG ATG ACC CCG GTT CCG TGG
S   R   Y   R   Y   D   D   A   M   D   Y   W   G   Q   G   T>

     340     345     350
CTG GTC ACC GTC TCC TCA
GAC CAG TGG CAG AGG AGT
L   V   T   V   S   S>

```

10

20

【 0 3 2 6 】

30

【化 8】

CR1 VK
配列範囲

: 1 ~ 336 (配列番号 365 核酸, 配列番号 366, タンパク質)

```

      5      10      15      20      25      30      35      40      45
GAG ATC GTG CTC ACT CAG TCT CCA GCT ACC TTG TCC CTG TCT CCA GGG
CTC TAG CAC GAG TGA GTC AGA GGT CGA TGG AAC AGG GAC AGA GGT CCC
E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G>

      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95
GAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC AGT GAA AGT GTT GAT AGT TAT
CTC TCC CGG TGG TAT AGG ACG TCT CGG TCA CTT TCA CAA CTA TCA ATA
E   R   A   T   I   S   C   R   A   S   E   S   V   D   S   Y>

     100     105     110     115     120     125     130     135     140
GGC CAT AGT TTT ATG CAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA CAG GCT CCC
CCG GTA TCA AAA TAC GTC ACC ATG GTC GTC TTT GGT CCT GTC CGA GGG
G   H   S   F   M   Q   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P>

    145     150     155     160     165     170     175     180     185     190
CGC CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAA CCT GGG ATC CCT GCC
GGG GAG GAG TAG ATA GCA CGT AGG TTG GAT CTT GGA CCC TAG GGA CGG
R   L   L   I   Y   R   A   S   N   L   E   P   G   I   P   A>

    195     200     205     210     215     220     225     230     235     240
AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATT TCC
TCC AAA TCA CCG TCA CCC AGA CCC TGT CIG AAG TGG GAG TGG TAA AGG
R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T   L   I   I   S>

     245     250     255     260     265     270     275     280     285
TCC CTG GAG CCA GAG GAT TTC GCA GTG TAT TAC TGT CAG CAA GGT AAT
AGG GAC CTC GGT CTC CTA AAG CGT CAC ATA ATG ACA GTC GTT CCA TTA
S   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q   Q   G   N>

    290     295     300     305     310     315     320     325     330     335
GAG GTT CCA TTC ACG TTC GGC CAG GGG ACC AAG GTG GAA ATA AAA CGI
CTC CAA GGT AAG TGC AAG CCG GTC CCC TGG TTC CAC CTT TAT TTT GCA
E   V   P   F   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K   R>

```

10

20

CR2 VH
配列範囲

: 1 ~ 354 (配列番号 367 核酸, 配列番号 368, タンパク質)

```

      10      20      30      40      50      60
CAGGTCACAGC TGCAGCAGTC TGGGGGAGGC TTAGTGACAGC CCGGAGGGTC CCTGCGCCTC
Q   V   Q   L   Q   Q   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L   R   L>

      70      80      90     100     110     120
TCCTGTGCAG CCCTCTGGATT CACGTTCAAG TACCACTACA TGTATTGGAT TCGCCAGGCT
S   C   A   A   S   G   F   T   F   K   Y   D   Y   M   Y   W   T   R   Q   A>

     130     140     150     160     170     180
CCGGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTCGCAACC ATTAGTGATG GGGGTAGTGA CACCTACTAT
P   G   K   G   L   E   W   V   A   T   I   S   D   G   G   S   Y   T   Y   Y>

     190     200     210     220     230     240
TCAGACAGTG TGGAGGGGCG ATTCACCACC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACCCGTGTAT
S   D   S   V   E   G   R   F   T   T   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y>

     250     260     270     280     290     300
CIGCAATGA ACAGICTGCG CGCTGAGGAC ACAGCCAIAT ATTACTGTTC AAGGTACAGG
L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D   T   A   I   Y   Y   C   S   R   Y   R>

     310     320     330     340     350
TACGACGACG CTATGGACTA CTGGGGCCAA GGCACCCTGG TCACCSTCTC CTCA
Y   D   D   A   M   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S>

```

30

40

【0 3 2 7】

【化 9】

CR2 VL (配列番号 369 核酸 , 配列番号 370, タンパク質)
 配列範囲 : 1 ~ 336

```

      10      20      30      40      50      60
GAGATCGTCC TCACICAGTC TCCAGCTACC TTGICCCCTGT CTCCAGGGGA GAGGGCCACC
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T>

      70      80      90     100     110     120
ATATCCTGCA GAGCCAGTGA AAGTGTGAC AGTTATCGCC ATAGTTTAT GCAGIGGTAC
I S C R A S E S V D S Y G H S F M Q W Y>

     130     140     150     160     170     180
CAGCAGAAAC CAGGACAGGC TCCCGCCTC CTCATCTATC GIGCATCCAA CCTAGAACCT
Q Q K P G Q A P R L L I Y R A S N L E P>

     190     200     210     220     230     240
GGGATCCCTG CCAGGTITAG TGGCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTACCCT CACCATITCC
G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S>

     250     260     270     280     290     300
TCCCTGGAGC CAGAGGATTT CGCAGTGTAT TACTGTGAGC AAGGTAATGA GGTTCATTTC
S L E P E D F A V Y Y C Q Q G N E V P F>

     310     320     330
ACGTCGGGCC AGGGGACCAA GGTGGAATA AAACGG
T F G Q G T K V E I K R>

```

10

【 0 3 2 8 】

【化 10】

CR2 scFv (配列番号 371 核酸 , 配列番号 372, タンパク質)
配列範囲 : 1 ~ 735

```

      10      20      30      40      50      60
CAGGTCCAGC TGCAGCAGTC TGGGGGAGGC TTAGTGAGC CCGGAGGGTC CCTGCGCCTC
Q V Q L Q Q S G G G L V Q P G G S L R L>

      70      80      90     100     110     120
TCCTGIGCAG CCTCTGGATT CACGTTCAAG TACGACTACA TGTATTGGAT TCGCCAGGCT
S C A A S G F T F K Y D Y M Y W I R Q A>

     130     140     150     160     170     180
CCGGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGCAACC ATTAGTGATG GTGGTAGITA CACCTACTAT
P G K G L E W V A T I S D G G S Y T Y Y>

     190     200     210     220     230     240
TCAGACAGTG TGGAGGGGCG ATTCACCACC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACCCIGTAT
S D S V E G R F T T S R D N S K N T L Y>

     250     260     270     280     290     300
CTGCAAATGA ACAGTCTGCG CGCTGAGGAC ACAGCCATAT ATTACTGTTC AAGGTACAGG
L Q M N S L R A E D T A I Y Y C S R Y R>

     310     320     330     340     350     360
TACGACGACG CTATGGACTA CTGGGGCCAA GGCACCCTGG TCACCGTCTC CTCAGGTGGA
Y D D A M D Y W G Q G T L V T V S S G G>

     370     380     390     400     410     420
GGCGGTTTCA GCGGAGGTGG CTCTGTCGGT GGCGGGTCGG AGATCGTCTC CACTCAGICT
G G S G G G G S V G G G S E I V L T Q S>

     430     440     450     460     470     480
CCAGCTACCT TGTCCTGTGC TCCAGGGGAG AGGGCCACCA TAICCTGCAG AGCCAGTGAA
P A I L S L S P G E R A T I S C R A S E>

     490     500     510     520     530     540
AGTGTGACGA GTTAATGGCCA TAGTTTATG CAGTGGTAAC AGCAGAAACC AGGACAGGCT
S V D S Y G H S F M Q W Y Q Q K P G Q A>

     550     560     570     580     590     600
CCCCGCTTCC TCATCTATCG TGCATCCAAC CTAGAACCTG GGATCCCTGC CAGGTTIAGT
P R L L I Y R A S N L E P G I P A R F S>

     610     620     630     640     650     660
GGCAGTGGGT CTGGGACAGA CTTCACCCCTC ACCATITCCT CCCTGGAGCC AGAGGATTTC
G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F>

     670     680     690     700     710     720
GCAGTGTATT ACTGTCAGCA AGGTAATGAG GTTCCATTCA CGTICGGCCA GGGGACCAAG
A V Y Y C Q Q G N E V P F T F G Q G T K>

      730
GTGGAAATAA AACGG
V E I K R>

```

【図面の簡単な説明】

【0329】

【図 1】図 1 は、ファージライブラリーを使用したインビトロ抗体産生のためのストラテジーを示す。mRNA は、脾臓細胞から調製され、第 1 の cDNA 鎖が、調製され、そして抗体 V_H 遺伝子および抗体 V_L 遺伝子は、PCR によって増幅される。V_H 遺伝子および V_L 遺伝子は、scFv 遺伝子のレパートリーを作製するために PCR を使用して 1 つにランダムにスプライシングされる。上記 scFv 遺伝子レパートリーは、ファージミドベクター中にファージミドマイナーコートタンパク質 (pIII) をコードする遺伝子 (gIII) と一緒にインフレームでクロニングされる。得られたファージ抗体ライブラリー中の各ファージは、その表面上に scFv-pIII 融合タンパク質を発現し、そして scFv をコードする遺伝子を内部に含む。特異的抗原を結合するファージ抗体は、固定化された抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって結合しないファージ抗体から分離され得る。単一のラウンドの選択は、その抗体の親和性に依存して、20 ~ 10,000 の範囲の因数によって抗原結合ファージ抗体の数を増加させる。溶出したファージ抗体は、E. coli に感染させる為に使用され、その E. coli は、次いで、次のラウンドの選択のためのさらなるファージ抗体を産生する。ラウンドを繰り返した選

扱は、本来10億分の1未満の頻度で存在した抗原結合ファージ抗体の単離を可能にする。

【図2】図2のパネルAおよびパネルBは、BoNT/A_{H_C}に結合するscFvをエピトープマッピングするために使用される技術为例示するセンサーグラムを示す。エピトープマッピングは、対において研究されるscFvを用いて、BIACoreにおける表面プラズモン共鳴を使用することによって行なわれた。各scFvは、上記BIACoreに注入され、そして飽和が達成されるまで、センサーチップ表面にカップリングされたBoNT/A_{H_C}に結合し得る。各scFv単独についての結合された量(RU)は、上記2種のscFvが、混合され、そして一緒に注入された場合に結合された量と比較された。点aは、その後に注入の始まりが続くベースラインを示す。点b₁および点b₂は、最初の会合相を示す。点c₁および点c₂は、解離の始まりを示す。点aと点cとの間のRUの差は、BoNT/A_{H_C}に結合されたscFvの量に等しい。パネルAは、異なるエピトープを認識する2種のscFv(C25およびC9)を示す。一緒に注入された2種のscFvの結合された量(C9/C25、点c₂)は、単独で注入されたその2種のscFv(c₁)の合計である。パネルBは、エピトープを認識する2種のscFv(C39およびC25)を示す。一緒に注入された2種のscFvの結合された量(C25/C39;点c)は、単独で注入されたその2種のscFv(c)と同じである。点b₁と点c₁との間、点b₂と点c₂との間、および点b₁と点cとの間のRUの大きな差は、scFvと泳動緩衝液との間の屈折率の差に起因する。

【図3】図3は、マウス片側横隔膜モデルにおけるBoNT/AのscFv中和の評価を示す。マウス片側横隔膜の電気刺激後に発生した単収縮張力は、20のpM BoNT/A(コントロール)、20pMのBoNT/A+20nMのscFv S25、scFv C25、scFv 1C6、もしくはscFv 1F3(それぞれ、エピトープ1~4を代表する)、または各20nMの最終濃度におけるS25とC25との組み合わせの添加前(-30分~0分)、および添加後に測定された。結果は、定常状態における単収縮張力(0分における)対時間の分数として表される。scFv 1C6およびscFv 1F3が、50%の単収縮減少までの時間を変化させないのに対して、scFv C25およびscFv S25は、それを顕著に延長する。S25とC25との組み合わせは、C25単独またはS25単独と比較して、神経麻痺までの時間を顕著に延長した。

【図4】図4は、mAbによるインビトロ毒素中和、mAbの対によるインビトロ毒素中和、およびオリゴクローナルAbによるインビトロ毒素中和を示す。50%の単収縮減少までの時間は、単離されたマウス片側横隔膜において測定され、そして毒素のみのコントロール、単一のmAb(C25、S25、または3D12)、mAbの対(C25+S25、C25+3D12、または3D12+S25)、およびオリゴクローナルAb(C25+3D12+S25)について繰り返された。単一のmAbは、毒素のみと比較して、神経麻痺までの時間を顕著に延長した。mAbの対は、単一のmAbと比較して、神経麻痺までの時間を顕著に延長した。

【図5】図5Aおよび図5Bは、mAbによるインビボ毒素中和(図5A)およびmAbの対によるインビボ毒素中和(図5B)を示す。50マイクログラムの全Abは、20マウスLD₅₀の毒素または100マウスLD₅₀の毒素と混合され、そしてi.p.に注入された。死亡までの時間および生存するマウス数が、決定された。単一のmAbは、20LD₅₀からの顕著な保護を示さなかった。100LD₅₀によってチャレンジされた全てのマウスは、mAbの任意の対を与えた場合、生存した。

【図6】図6は、mAbによるインビボ毒素中和、mAbの対によるインビボ毒素中和、およびオリゴクローナルAbによるインビボ毒素中和を示す。インビボ毒素中和は、漸増性の毒素チャレンジ用量におけるmAb、mAbの対、およびオリゴクローナルAbについて決定された。単一のmAbは、顕著な保護を示さなかった。対照的に、全てのmAb対は、少なくとも100LD₅₀を中和し、最も強力な対(C25+3D12)に対して1,500LD₅₀の毒素によってチャレンジされたマウスの約50%が、生存した。オリゴクローナルAbは、よりさらに強力であり、20,000LD₅₀の毒素によってチ

10

20

30

40

50

チャレンジされたマウスの約50%が、生存した。

【図7】図7は、抗体の溶液における平衡解離定数 (K_d) を示す。単一の mAb C25 および mAb 3D12 の溶液における K_d は、漸増性の BoNT/H_C 毒素の関数として存在する遊離の Ab の量を測定することによって、フロー蛍光光度計において決定した。等モル量で C25 mAb と 3D12 mAb とを組み合わせるで、C25 K_d が、100倍より大きく減少した。第3の Ab (S25) を加えることで、その K_d が、18 pM までさらに4倍減少した。

【図8】図8Aおよび図8Bは、可溶性 scFv 抗体の ELISA による特徴付けを示す。アッセイは、ポリスチレンプレート上にコーティングされたそれぞれの示された BoNT 血清型、BoNT/A_{H_C} および BoNT/A_{H_N} を固定化することによって行なわれた。図8A：細菌によって発現された、コーティングした抗原と反応性である免疫性ライブラリーに由来する scFv 抗体は、ペルオキシダーゼ結合体化 mAb 抗 E 抗体 (1:2500) を用いて検出された。図8B：細菌によって発現された、コーティングした抗原と反応性である非免疫性ライブラリーに由来する scFv 抗体は、9E10 抗体 (1:500) を用い、次いでペルオキシダーゼ結合体化抗マウス-Fc 抗体を用いて検出された。そのアッセイの結果は、タンパク質濃度に対して正規化されていない 405 nm における吸光度として示される。

【図9】図9Aおよび図9Bは、BoNT/A_{H_C} に結合する scFv のエピトープマッピングのセンサーグラムを示す。点「a」：注入の始まり、点「b」：注入の終わり、および点「c」：結合された scFv の量。点bと点cとの間の RU の差は、scFv と泳動緩衝液との間の屈折率の差に起因する。図9A：scFv 3A6 および scFv 3D12 は、その2種の scFv が混合された場合に結合された RU が増加しないことによって示されるように、同じエピトープを認識する。図9B：scFv 2A9 および scFv 2A1 は、その2種の scFv が混合された場合に結合された RU のほぼ相加的な増加によって示されるように、異なるエピトープを認識する。

【図10】図10Aおよび図10Bは、BoNT/A_{H_C} ドメインを標的とする scFv 抗体の個々の効果および組み合わせた効果を示す。図10A：マウス片側横隔膜の電気刺激後に発生した単収縮張力は、20 pM の BoNT/A (コントロール)、20 pM の BoNT/A + 20 nM のクラスター I のメンバー (3D12)、クラスター I I のメンバー (3F10)、C25 または S25 の添加前 (-30分~0分)、および添加後に測定された。scFv 3F10 が、50%の単収縮減少までの時間を変化させなかったのに対して、scFv C25、scFv S25 または scFv 3D12 は、50%の単収縮減少までの時間を顕著に延長する。図10B：C25 と、S25 または 3D12 (クラスター I) との組み合わせは、50%の単収縮減少までの時間を顕著に延長する。

【図11】図11は、公開されたボツリヌス神経毒素遺伝子の系統樹を示す。その系統樹は、Vector NTI ソフトウェアを使用して、公開されたクロストリジウム属の神経毒素遺伝子の DNA 配列から構築された。

【図12】図12Aおよび図12Bは、BoNT/A 遺伝子配列の分析を示す。図12A：BoNT/A 遺伝子の系統樹は、2つのクラスター (A1 および A2) を示す。図12B：BoNT/A1 と BoNT/A2 との間のアミノ酸側鎖の相違のモデル。BoNT/A 重鎖結合ドメインは、この図の上部における白色であり、青色の推定上のガングリオシド結合残基および赤色のガングリオシドを有する。重鎖トランスロケーションドメインは、橙色であり、そして軽鎖は、この図の下部における白色である。BoNT/A1 毒素と BoNT/A2 毒素との間の側鎖の相違は、緑色で示される。

【図13】図13は、BoNT/B 遺伝子配列の分析を示す。BoNT/B 遺伝子の系統樹は、4つのクラスターを示す：BoNT/B1、BoNT/B2、非タンパク質分解性 BoNT/B、および二価 BoNT/B。クラスターの間の相違の%は、3.6%~7.7%の範囲である。BoNT/A と同様に、最も大きい相違は、重鎖において見られる。

【図14】図14は、捕捉 ELISA によって決定された場合の、BoNT/A1 毒素および BoNT/A2 毒素に対する BoNT/A_{H_C} モノクローナル抗体 (C25、B4

10

20

30

40

50

、S 2 5、および3 D 1 2) の結合を示す。ウェルは、示されたm A bによってコーティングされ、次いで純粋かまたは複合体のB o N T / A 1またはB o N T / A 2の濃度の変動が行なわれた。毒素結合は、ポリクローナルウマB o N T / A抗血清を使用して検出された。A 1毒素は、塗りつぶした四角によって示される；A 2毒素は、中抜きの円によって示される。純粋な毒素は、実線であり；毒素複合体は、破線である。

【図15】図15は、捕捉E L I S Aによって決定された場合の、B o N T / A 1毒素およびB o N T / A 2毒素に対する、B o N T / Aトランスロケーションドメインおよび軽鎖モノクローナル抗体の結合を示す。方法は、図14について記載される通りであった。

【図16】図16は、m A b対のB o N T / A 1毒素によってチャレンジされたマウスを保護する能力を示す。マウスL D₅₀の範囲のB o N T / A 1毒素複合体は、50 u gの等モル比の示されたm A bと混合され、そしてその混合物は、腹腔内に注射された。生存するマウスの数対チャレンジ用量が、示される。

【図17A】図17Aおよび図17Bは、m A bトリプレットのB o N T / A 1毒素またはB o N T / A 2毒素によってチャレンジされたマウスを保護する能力を示す。マウスL D₅₀の範囲のB o N T / A 1毒素複合体(図17A)またはB o N T / A 2毒素複合体(図17B)は、50 u gの等モル比の示されたm A bと混合され、そしてその混合物は、腹腔内に注射された。生存するマウスの数対チャレンジ用量が、示される。

【図17B】図17Aおよび図17Bは、m A bトリプレットのB o N T / A 1毒素またはB o N T / A 2毒素によってチャレンジされたマウスを保護する能力を示す。マウスL D₅₀の範囲のB o N T / A 1毒素複合体(図17A)またはB o N T / A 2毒素複合体(図17B)は、50 u gの等モル比の示されたm A bと混合され、そしてその混合物は、腹腔内に注射された。生存するマウスの数対チャレンジ用量が、示される。

【図18】図18。変異され、そして選択された抗体についての配列(H U - C 2 5(配列番号6)、A R 1(配列番号7)、A R 2(配列番号8)、A R 3(配列番号9)、A R 4(配列番号10)、C R 1(配列番号11))。ダッシュは、保存された残基を示す。文字は、変異された残基を示す。

【図19A】図19Aおよび図19B。変異され、そして選択された抗体についての配列。図19A：3 D 1 2(配列番号12)、およびR A Z 1(配列番号13)。図19B：I N G 1(配列番号14)、1 D 1 1(配列番号15)、2 G 1 1(配列番号16)、5 G 4(配列番号17)、I N G 2(配列番号18)。ダッシュは、保存された残基を示す。文字は、変異された残基を示す。

【図19B】図19Aおよび図19B。変異され、そして選択された抗体についての配列。図19A：3 D 1 2(配列番号12)、およびR A Z 1(配列番号13)。図19B：I N G 1(配列番号14)、1 D 1 1(配列番号15)、2 G 1 1(配列番号16)、5 G 4(配列番号17)、I N G 2(配列番号18)。ダッシュは、保存された残基を示す。文字は、変異された残基を示す。

【図20】図20Aおよび図20Bは、H u C 2 5(図20A)および3 D 1 2(図20B) s c F vの酵母ディスプレイを使用した親和性の成熟のために使用されたスキームを示す。

【図21-1】図21A~図21Dは、野生型の親和性および酵母が提示した親和性が成熟したs c F vの親和性を示す。図21A：H u C 2 5およびA R 1；図21B：A R 1およびA R 2；図21C：A R 2およびA R 4；図21D：3 D 1 2およびR A Z 1。

【図21-2】図21A~図21Dは、野生型の親和性および酵母が提示した親和性が成熟したs c F vの親和性を示す。図21A：H u C 2 5およびA R 1；図21B：A R 1およびA R 2；図21C：A R 2およびA R 4；図21D：3 D 1 2およびR A Z 1。

【図22】図22は、野生型抗体および親和性が成熟した抗体を使用したフローサイトメトリーによるB o N T / Aの検出を示す。

【図23】図23Aおよび図23Bは、野生型および親和性が成熟した抗体によるB o N T / Aの中和の効力を示す。図23A：100マウスL D₅₀チャレンジ。図23B：200マウスL D₅₀チャレンジ。

10

20

30

40

50

【図 2 4】図 2 4 A、図 2 4 Bは、野生型抗体と親和性が成熟した抗体との対による B o N T / A の中和の効力を示す。図 2 4 A：5 0 0 マウス L D _{5 0} チャレンジ。図 2 4 B：5 0 0 0 マウス L D _{5 0} チャレンジ。

【図 2 5】図 2 5は、抗体の組み合わせによる B o N T / A 2 の中和を示す。

【図 2 6】図 2 6は、H u - C 2 5 系統の抗体（H U - C 2 5（配列番号 1 9）、A R 1（配列番号 2 0）、A R 2（配列番号 2 1）、A R 3（配列番号 2 2）、A R 4（配列番号 2 3）、C R 1（配列番号 2 4）、および C R 2（配列番号 2 5））のアライメントを示す。

【図 1】

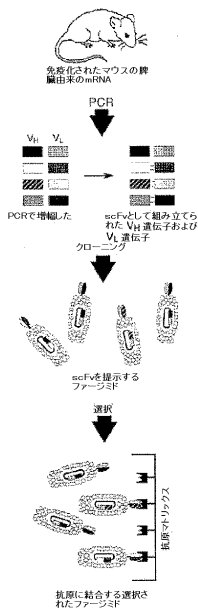


Fig. 1

【図 2】

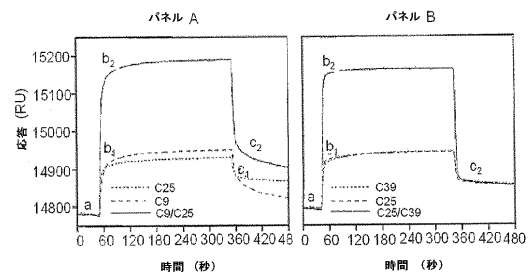


Fig. 2

【図 3】

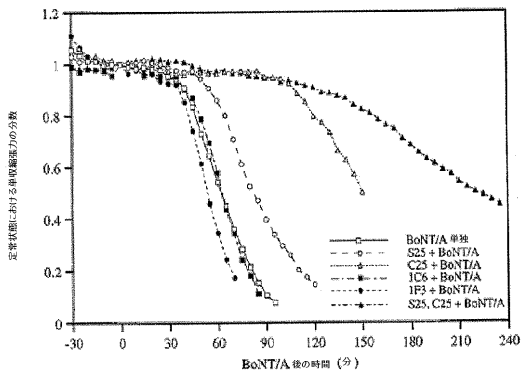


Fig. 3

【図 4】

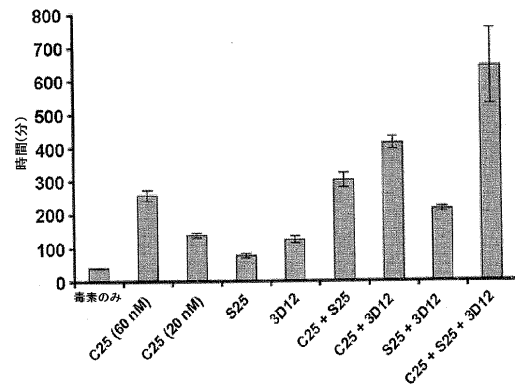


Fig. 4

【図 5】

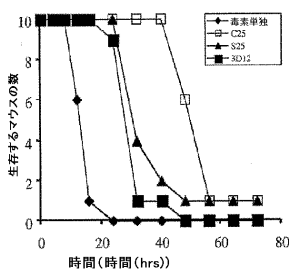


Fig. 5A

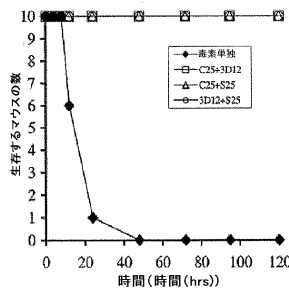


Fig. 5B

【図 6】

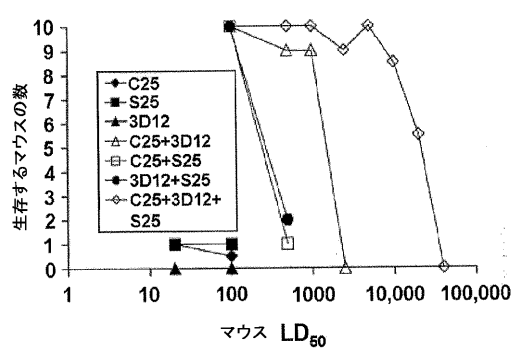


Fig. 6

【図 7】

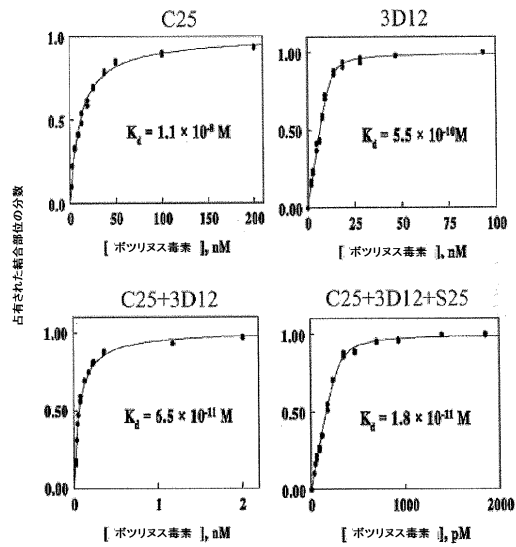


Fig. 7

【図 8】

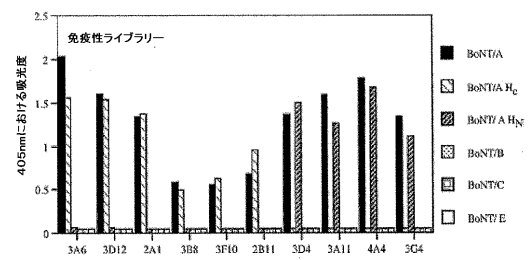


Fig. 8A

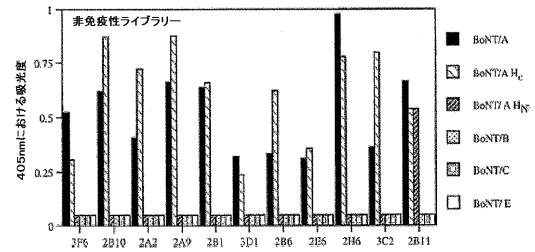


Fig. 8B

【図 9】

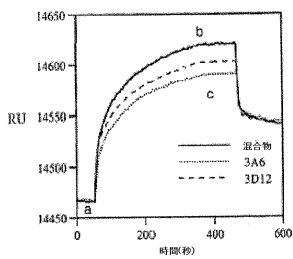


Fig. 9A

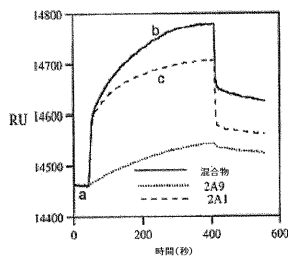


Fig. 9B

【図 10】

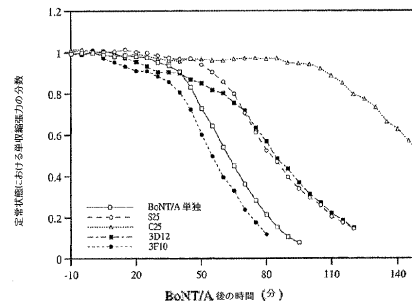


Fig. 10A

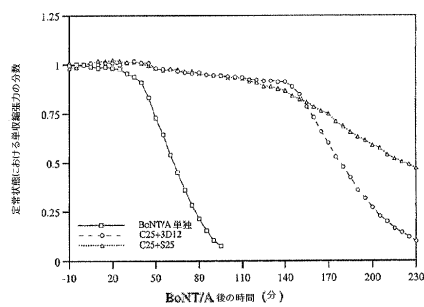


Fig. 10B

【図 1 1】

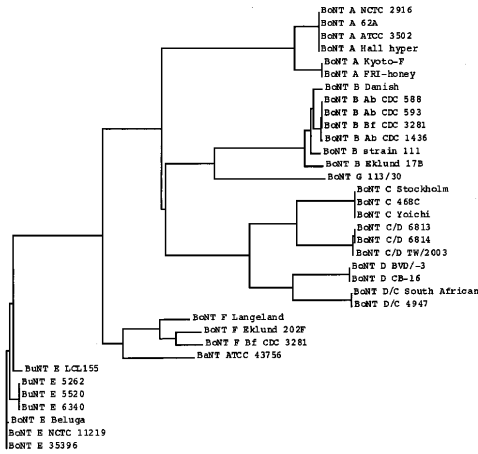


Fig. 11

【図 1 2】

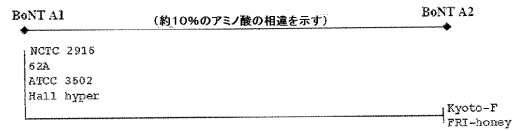


Fig. 12A

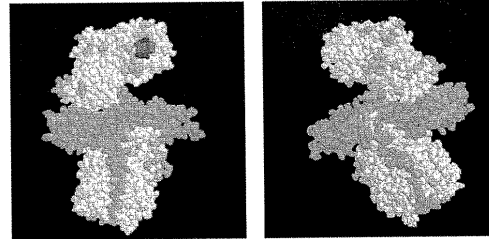


Fig. 12B

【図 1 3】

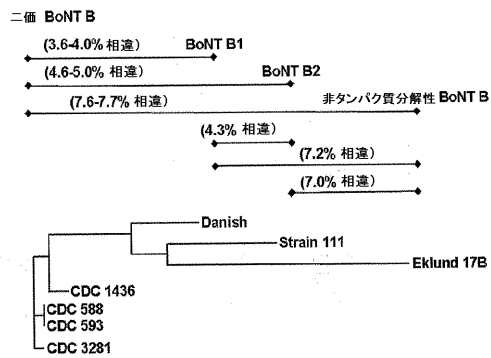


Fig. 13

【図 1 4】

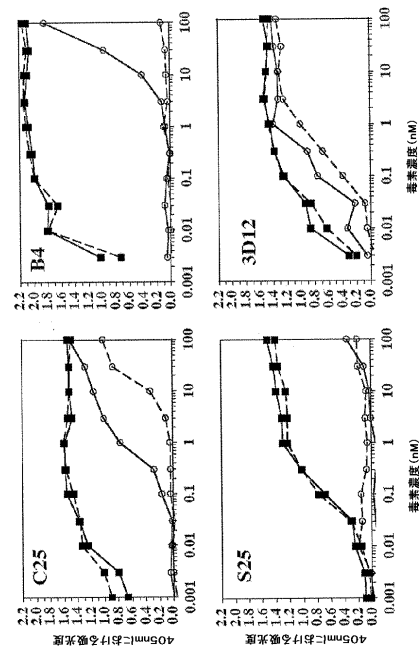


Fig. 14

【図 15】

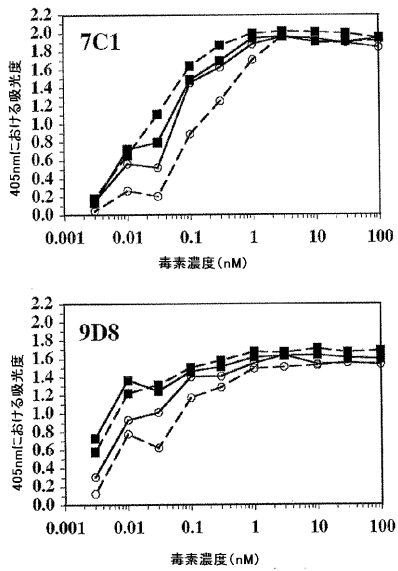


Fig. 15

【図 16】

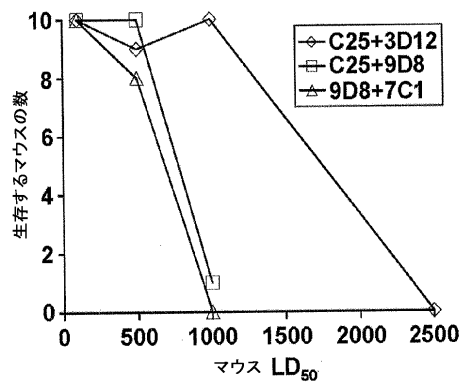


Fig. 16

【図 17 A】

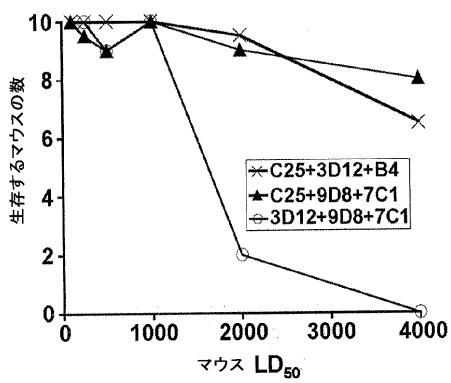


Fig. 17A

【図 17 B】

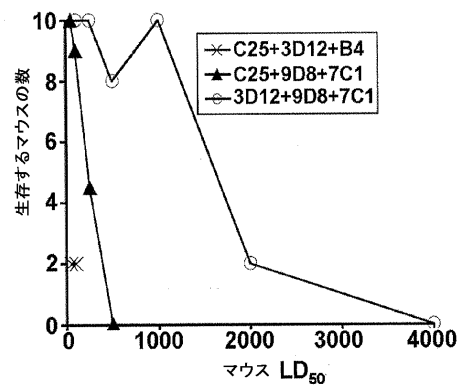


Fig. 17B

【 図 1 8 】

[illegible]

Fig. 18

【図 19 A】

[illegible]

Fig. 19A

【図 19 B】

ING1、ING1+ekクローンはおよびING2の重鎖可変領域に及びに軽鎖可変領域の指定されるタンパク質配列：

(A) 重鎖およびA2重鎖のハイナード）

重鎖

クローニン	クローニン	クローニン	クローニン	クローニン	クローニン	クローニン	クローニン	クローニン	クローニン
ING1	ING1	ING1	ING1	ING1	ING1	ING1	ING1	ING1	ING1
ING2	ING2	ING2	ING2	ING2	ING2	ING2	ING2	ING2	ING2
ING3	ING3	ING3	ING3	ING3	ING3	ING3	ING3	ING3	ING3
ING4	ING4	ING4	ING4	ING4	ING4	ING4	ING4	ING4	ING4
ING5	ING5	ING5	ING5	ING5	ING5	ING5	ING5	ING5	ING5
ING6	ING6	ING6	ING6	ING6	ING6	ING6	ING6	ING6	ING6
ING7	ING7	ING7	ING7	ING7	ING7	ING7	ING7	ING7	ING7
ING8	ING8	ING8	ING8	ING8	ING8	ING8	ING8	ING8	ING8
ING9	ING9	ING9	ING9	ING9	ING9	ING9	ING9	ING9	ING9
ING10	ING10	ING10	ING10	ING10	ING10	ING10	ING10	ING10	ING10
ING11	ING11	ING11	ING11	ING11	ING11	ING11	ING11	ING11	ING11
ING12	ING12	ING12	ING12	ING12	ING12	ING12	ING12	ING12	ING12
ING13	ING13	ING13	ING13	ING13	ING13	ING13	ING13	ING13	ING13
ING14	ING14	ING14	ING14	ING14	ING14	ING14	ING14	ING14	ING14
ING15	ING15	ING15	ING15	ING15	ING15	ING15	ING15	ING15	ING15
ING16	ING16	ING16	ING16	ING16	ING16	ING16	ING16	ING16	ING16
ING17	ING17	ING17	ING17	ING17	ING17	ING17	ING17	ING17	ING17
ING18	ING18	ING18	ING18	ING18	ING18	ING18	ING18	ING18	ING18
ING19	ING19	ING19	ING19	ING19	ING19	ING19	ING19	ING19	ING19
ING20	ING20	ING20	ING20	ING20	ING20	ING20	ING20	ING20	ING20
ING21	ING21	ING21	ING21	ING21	ING21	ING21	ING21	ING21	ING21
ING22	ING22	ING22	ING22	ING22	ING22	ING22	ING22	ING22	ING22
ING23	ING23	ING23	ING23	ING23	ING23	ING23	ING23	ING23	ING23
ING24	ING24	ING24	ING24	ING24	ING24	ING24	ING24	ING24	ING24
ING25	ING25	ING25	ING25	ING25	ING25	ING25	ING25	ING25	ING25
ING26	ING26	ING26	ING26	ING26	ING26	ING26	ING26	ING26	ING26
ING27	ING27	ING27	ING27	ING27	ING27	ING27	ING27	ING27	ING27
ING28	ING28	ING28	ING28	ING28	ING28	ING28	ING28	ING28	ING28
ING29	ING29	ING29	ING29	ING29	ING29	ING29	ING29	ING29	ING29
ING30	ING30	ING30	ING30	ING30	ING30	ING30	ING30	ING30	ING30
ING31	ING31	ING31	ING31	ING31	ING31	ING31	ING31	ING31	ING31
ING32	ING32	ING32	ING32	ING32	ING32	ING32	ING32	ING32	ING32
ING33	ING33	ING33	ING33	ING33	ING33	ING33	ING33	ING33	ING33
ING34	ING34	ING34	ING34	ING34	ING34	ING34	ING34	ING34	ING34
ING35	ING35	ING35	ING35	ING35	ING35	ING35	ING35	ING35	ING35
ING36	ING36	ING36	ING36	ING36	ING36	ING36	ING36	ING36	ING36
ING37	ING37	ING37	ING37	ING37	ING37	ING37	ING37	ING37	ING37
ING38	ING38	ING38	ING38	ING38	ING38	ING38	ING38	ING38	ING38
ING39	ING39	ING39	ING39	ING39	ING39	ING39	ING39	ING39	ING39
ING40	ING40	ING40	ING40	ING40	ING40	ING40	ING40	ING40	ING40
ING41	ING41	ING41	ING41	ING41	ING41	ING41	ING41	ING41	ING41
ING42	ING42	ING42	ING42	ING42	ING42	ING42	ING42	ING42	ING42
ING43	ING43	ING43	ING43	ING43	ING43	ING43	ING43	ING43	ING43
ING44	ING44	ING44	ING44	ING44	ING44	ING44	ING44	ING44	ING44
ING45	ING45	ING45	ING45	ING45	ING45	ING45	ING45	ING45	ING45
ING46	ING46	ING46	ING46	ING46	ING46	ING46	ING46	ING46	ING46
ING47	ING47	ING47	ING47	ING47	ING47	ING47	ING47	ING47	ING47
ING48	ING48	ING48	ING48	ING48	ING48	ING48	ING48	ING48	ING48
ING49	ING49	ING49	ING49	ING49	ING49	ING49	ING49	ING49	ING49
ING50	ING50	ING50	ING50	ING50	ING50	ING50	ING50	ING50	ING50
ING51	ING51	ING51	ING51	ING51	ING51	ING51	ING51	ING51	ING51
ING52	ING52	ING52	ING52	ING52	ING52	ING52	ING52	ING52	ING52
ING53	ING53	ING53	ING53	ING53	ING53	ING53	ING53	ING53	ING53
ING54	ING54	ING54	ING54	ING54	ING54	ING54	ING54	ING54	ING54
ING55	ING55	ING55	ING55	ING55	ING55	ING55	ING55	ING55	ING55
ING56	ING56	ING56	ING56	ING56	ING56	ING56	ING56	ING56	ING56
ING57	ING57	ING57	ING57	ING57	ING57	ING57	ING57	ING57	ING57
ING58	ING58	ING58	ING58	ING58	ING58	ING58	ING58	ING58	ING58
ING59	ING59	ING59	ING59	ING59	ING59	ING59	ING59	ING59	ING59
ING60	ING60	ING60	ING60	ING60	ING60	ING60	ING60	ING60	ING60
ING61	ING61	ING61	ING61	ING61	ING61	ING61	ING61	ING61	ING61
ING62	ING62	ING62	ING62	ING62	ING62	ING62	ING62	ING62	ING62
ING63	ING63	ING63	ING63	ING63	ING63	ING63	ING63	ING63	ING63
ING64	ING64	ING64	ING64	ING64	ING64	ING64	ING64	ING64	ING64
ING65	ING65	ING65	ING65	ING65	ING65	ING65	ING65	ING65	ING65
ING66	ING66	ING66	ING66	ING66	ING66	ING66	ING66	ING66	ING66
ING67	ING67	ING67	ING67	ING67	ING67	ING67	ING67	ING67	ING67
ING68	ING68	ING68	ING68	ING68	ING68	ING68	ING68	ING68	ING68
ING69	ING69	ING69	ING69	ING69	ING69	ING69	ING69	ING69	ING69
ING70	ING70	ING70	ING70	ING70	ING70	ING70	ING70	ING70	ING70
ING71	ING71	ING71	ING71	ING71	ING71	ING71	ING71	ING71	ING71
ING72	ING72	ING72	ING72	ING72	ING72	ING72	ING72	ING72	ING72
ING73	ING73	ING73	ING73	ING73	ING73	ING73	ING73	ING73	ING73
ING74	ING74	ING74	ING74	ING74	ING74	ING74	ING74	ING74	ING74
ING75	ING75	ING75	ING75	ING75	ING75	ING75	ING75	ING75	ING75
ING76	ING76	ING76	ING76	ING76	ING76	ING76	ING76	ING76	ING76
ING77	ING77	ING77	ING77	ING77	ING77	ING77	ING77	ING77	ING77
ING78	ING78	ING78	ING78	ING78	ING78	ING78	ING78	ING78	ING78
ING79	ING79	ING79	ING79	ING79	ING79	ING79	ING79	ING79	ING79
ING80	ING80	ING80	ING80	ING80	ING80	ING80	ING80	ING80	ING80
ING81	ING81	ING81	ING81	ING81	ING81	ING81	ING81	ING81	ING81
ING82	ING82	ING82	ING82	ING82	ING82	ING82	ING82	ING82	ING82
ING83	ING83	ING83	ING83	ING83	ING83	ING83	ING83	ING83	ING83
ING84	ING84	ING84	ING84	ING84	ING84	ING84	ING84	ING84	ING84
ING85	ING85	ING85	ING85	ING85	ING85	ING85	ING85	ING85	ING85
ING86	ING86	ING86	ING86	ING86	ING86	ING86	ING86	ING86	ING86
ING87	ING87	ING87	ING87	ING87	ING87	ING87	ING87	ING87	ING87
ING88	ING88	ING88	ING88	ING88	ING88	ING88	ING88	ING88	ING88
ING89	ING89	ING89	ING89	ING89	ING89	ING89	ING89	ING89	ING89
ING90	ING90	ING90	ING90	ING90	ING90	ING90	ING90	ING90	ING90
ING91	ING91	ING91	ING91	ING91	ING91	ING91	ING91	ING91	ING91
ING92	ING92	ING92	ING92	ING92	ING92	ING92	ING92	ING92	ING92
ING93	ING93	ING93	ING93	ING93	ING93	ING93	ING93	ING93	ING93
ING94	ING94	ING94	ING94	ING94	ING94	ING94	ING94	ING94	ING94
ING95	ING95	ING95	ING95	ING95	ING95	ING95	ING95	ING95	ING95
ING96	ING96	ING96	ING96	ING96	ING96	ING96	ING96	ING96	ING96
ING97	ING97	ING97	ING97	ING97	ING97	ING97	ING97	ING97	ING97
ING98	ING98	ING98	ING98	ING98	ING98	ING98	ING98	ING98	ING98
ING99	ING99	ING99	ING99	ING99	ING99	ING99	ING99	ING99	ING99
ING100	ING100	ING100	ING100	ING100	ING100	ING100	ING100	ING100	ING100
ING101	ING101	ING101	ING101	ING101	ING101	ING101	ING101	ING101	ING101
ING102	ING102	ING102	ING102	ING102	ING102	ING102	ING102	ING102	ING102
ING103	ING103	ING103	ING103	ING103	ING103	ING103	ING103	ING103	ING103
ING104	ING104	ING104	ING104	ING104	ING104	ING104	ING104	ING104	ING104
ING105	ING105	ING105	ING105	ING105	ING105	ING105	ING105	ING105	ING105
ING106	ING106	ING106	ING106	ING106	ING106	ING106	ING106	ING106	ING106
ING107	ING107	ING107	ING107	ING107	ING107	ING107	ING107	ING107	ING107
ING108	ING108	ING108	ING108	ING108	ING108	ING108	ING108	ING108	ING108
ING109	ING109	ING109	ING109	ING109	ING109	ING109	ING109	ING109	ING109
ING110	ING110	ING110	ING110	ING110	ING110	ING110	ING110	ING110	ING110
ING111	ING111	ING111	ING111	ING111	ING111	ING111	ING111	ING111	ING111
ING112	ING112	ING112	ING112	ING112	ING112	ING112	ING112	ING112	ING112
ING113	ING113	ING113	ING113	ING113	ING113	ING113	ING113	ING113	ING113
ING114	ING114	ING114	ING114	ING114	ING114	ING114	ING114	ING114	ING114
ING115	ING115	ING115	ING115	ING115	ING115	ING115	ING115	ING115	ING115
ING116	ING116	ING116	ING116	ING116	ING116	ING116	ING116	ING116	ING116
ING117	ING117	ING117	ING117	ING117	ING117	ING117	ING117	ING117	ING117
ING118	ING118	ING118	ING118	ING118	ING118	ING118	ING118	ING118	ING118
ING119	ING119	ING119	ING119	ING119	ING119	ING119	ING119	ING119	ING119
ING120	ING120	ING120	ING120	ING120	ING120	ING120	ING120	ING120	ING120
ING121	ING121	ING121	ING121	ING121	ING121	ING121	ING121	ING121	ING121
ING122	ING122	ING122	ING122	ING122	ING122	ING122	ING122	ING122	ING122
ING123	ING123	ING123	ING123	ING123	ING123	ING123	ING123	ING123	ING123
ING124	ING124	ING124	ING124	ING124	ING124	ING124	ING124	ING124	ING124
ING125	ING125	ING125	ING125	ING125	ING125	ING125	ING125	ING125	ING125
ING126	ING126	ING126	ING126	ING126	ING126	ING126	ING126	ING126	ING126
ING127	ING127	ING127	ING127	ING127	ING127	ING127	ING127	ING127	ING127
ING128	ING128	ING128	ING128	ING128	ING128	ING128	ING128	ING128	ING128
ING129	ING129	ING129	ING129	ING129	ING129	ING129	ING129	ING129	ING129
ING130	ING130	ING130	ING130	ING130	ING130	ING130	ING130	ING130	ING130
ING131	ING131	ING131	ING131	ING131	ING131	ING131	ING131	ING131	ING131
ING132	ING132	ING132	ING132	ING132	ING132	ING132	ING132	ING132	ING132
ING133	ING133	ING133	ING133	ING133	ING133	ING133	ING133	ING133	ING133
ING134	ING134	ING134	ING134	ING134	ING134	ING134	ING134	ING134	ING134
ING135	ING135	ING135	ING135	ING135	ING135	ING135	ING135	ING135	ING135
ING136	ING136	ING136	ING136	ING136	ING136	ING136	ING136	ING136	ING136
ING137	ING137	ING137	ING137	ING137	ING137	ING137	ING137	ING137	ING137
ING138	ING138	ING138	ING138	ING138	ING138	ING138	ING138	ING138	ING138
ING139	ING139	ING139	ING139	ING139	ING139	ING139	ING139	ING139	ING139
ING140	ING140	ING140	ING140	ING140	ING140	ING140	ING140	ING140	ING140
ING141	ING141	ING141	ING141	ING141					

Fig. 19B

【 図 2 0 】

HuC25 KD = 8.44×10^{-10} M

*全scFvの誤りがちのPCRによって構築されたライブラリー
 *3個の変異, 1 VH FMW1および2 VL CDR3
 *親和性の5倍の増大

AR1 $K_D = 1.69 \times 10^{-10} \text{ M}$

- *全scFvの誤りがちのPCRによって構築されたライブラリー
- *1個の変異 VH CDR1
- *親和性の2.8倍の増大

AR2 $K_D = 6.14 \times 10^{-10} \text{ M}$

*VH CDR1は、スパイクオリゴヌクレオチドによって多様化された
*3個の変異, 2 VH CDR1および 1 VH CDR2
*親和性の2.5倍の増大

AR4 KD = 2.26 x 10⁻¹⁰ M

Fig. 20A

3D12 $\text{KD} = 6.43 \times 10^{-10} \text{ M}$

*全scFvの誤りがちのPCRによって構築されたライブラリー
 *5個の変異, 2 VL CDR1, 2 VL CDR2, および 1 VL CDR3
 *親和性の45倍の増大

RAZ1 KD = 2.1×10^{-11} M

Fig. 20B

【図 2 1 - 1】

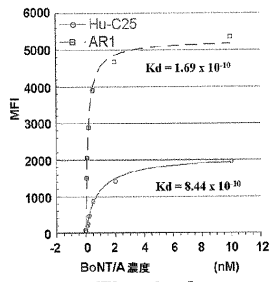


Fig. 21A

【図 2 1 - 2】

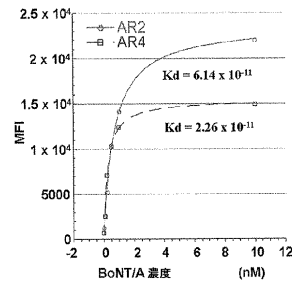


Fig. 21C

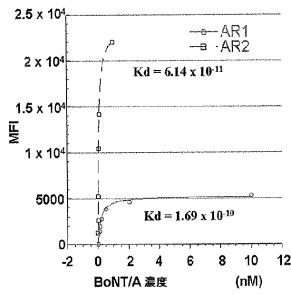


Fig. 21B

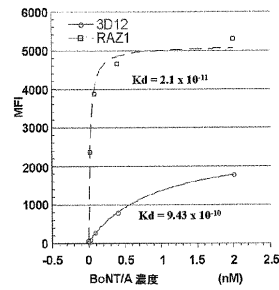


Fig. 21D

【図 2 2】

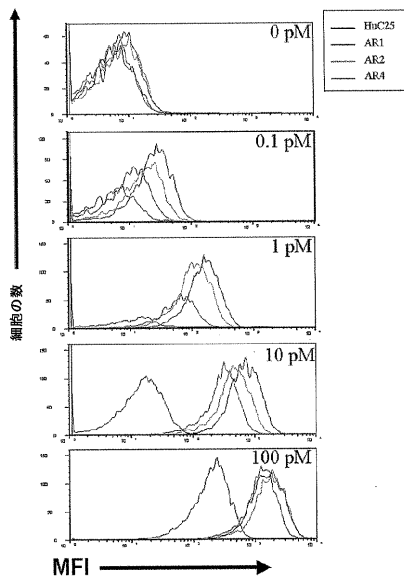


Fig. 22

【図 2 3】

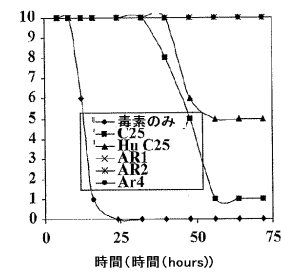


Fig. 23A

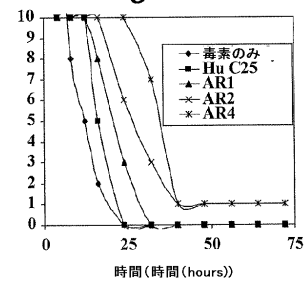


Fig. 23B

【図 25】

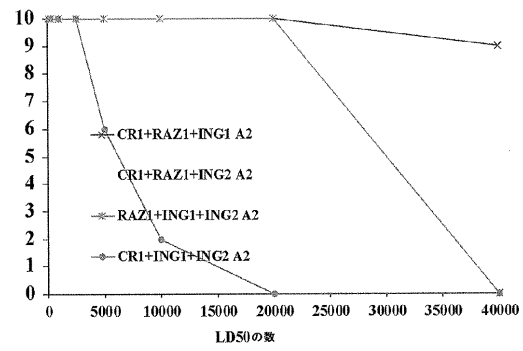


Fig. 24A

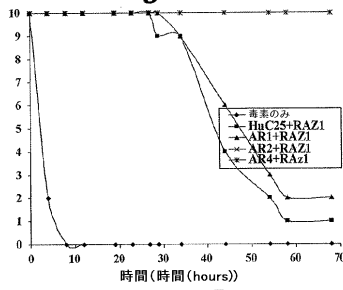


Fig. 24B

【图 2 6】

[illegible]

Fig. 26

ダッシュは、保存された残基を示す。文字は、変異された残基を示す。

【配列表】

2008528060000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成19年10月18日(2007.10.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008528060000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/03070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IP(8)C: A61K 39/40(2006.01);G01N 33/554(2006.01);G01N 33/569(2006.01) USPC: 424/164.1;435/007.32,530/388.4 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) U.S. : 424/164.1; 435/007.32, 530/388.4 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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AMSTERDORFER et al. Molecular characterization of murine humoral immune response to botulinum neurotoxin type A binding domain as assessed by using phage antibody libraries. Infection and Immunity. September 1997, volume 65, pages 3743-3752.	1
---		1
X	CHEN et al. Antibody mapping to domains of botulinum neurotoxin serotype A in the complexed and uncomplexed forms. Infection and Immunity. May 1997, volume 65, pages 1626-1630.	
X	AMSTERDORFER et al. Genetic and immunological comparison of anti-botulinum type A antibodies from immune and non-immune human phage libraries. Vaccine. February 2002, volume 20 pages 1640-1648.	1
---		1-83
X	Bavari et al. Identifying the principal protective antigenic determinants of type A botulinum neurotoxin. Vaccine. February 2002, volume 20, pages 1640-1648.	
☐ 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
09 July 2007 (09.07.2007)		03 AUG 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Parithosh K. Tungathurthi Telephone No. (571) 272-0600

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

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

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 マークス, ジェームス ディー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 0 7, ケンジントン, アードモア ロード 1 0 7

(72)発明者 アマースドローファー, ピーター

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0, サン ディエゴ, ミコノス レーン 3 8 0
2, ナンバー 2 3

(72)発明者 ゲレン, イシン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 0, サンフランシスコ, アラバマ ストリート
5 6 0, ナンバー 3 0 3

(72)発明者 ルー, チアンロン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 6, サン ブルノ, シェルター クリーク レーン
5 1 2 7

(72)発明者 ラザイ, アリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 5, サンフランシスコ, ターク ストリート 1
3 6 6 ナンバー 3 エー

(72)発明者 ガルシア, マリア コンスエロス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 0, サンフランシスコ, 2 4 ティーエイチ ストリート
2 5 1 5 ナンバー 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA50 BA61 CA01 DA01 DA02 DA05 DA06 DA11 EA04

GA11 HA08

4B064 AG26 AG27 CA02 CA05 CA10 CA11 CA19 CA20 CC24 DA01

4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AB02 BA02 CA44

4C085 AA14 AA16 BB36 BB41 BB43 BB44 CC04 CC23 EE01 GG02

GG08

4H045 AA11 AA30 BA09 CA40 DA75 DA76 EA29 FA74