

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 5 月 4 日 (04.05.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/046344 A1

(51) 国際特許分類: C07K 16/18, A61K 38/00, 39/395, 48/00, A61P 25/28, 43/00, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 15/09, C12P 21/08, G01N 33/53, 33/577

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/015121

(22) 国際出願日: 2005 年 8 月 19 日 (19.08.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2004-316220
2004 年 10 月 29 日 (29.10.2004) JP
特願 2005-142960 2005 年 5 月 16 日 (16.05.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 鹿児島大学 (KAGOSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目 2 1 番 2 4 号 Kagoshima (JP). 財団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉村 和久 (SUGIMURA, Kazuhisa) [JP/JP]; 〒8910103 鹿児島県鹿児島市皇徳寺台 5-20-5 Kagoshima (JP). 中島 敏博 (NAKASHIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, 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.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HUMAN ANTI-PRION ANTIBODY AND FRAGMENT OF THE ANTIBODY

(54) 発明の名称: ヒト抗プリオン抗体及び該抗体フラグメント

(57) Abstract: It is intended to provide a human anti-prion antibody, a fragment of this antibody and a method of using the same. By using the phage antibody method, a human anti-prion antibody being capable of binding to a prion protein and recognizing a difference in stereostructure between a normal prion and an abnormal infective prion and a fragment of this antibody are obtained. It is expected that the antibody and the antibody fragment thus obtained contribute to the inhibition of the formation or accumulation of the abnormal infective prion and are usable as diagnostics and remedies for prion diseases seemingly caused thereby.

(57) 要約: ヒト抗プリオン抗体、該抗体フラグメント及びその利用方法を提供する。ファージ抗体法を用いて、プリオン蛋白質に結合し、正常型プリオンと異常感染型プリオンの立体構造の違いを識別するヒト抗プリオン抗体及び該抗体フラグメントを得た。得られた抗体及び該抗体フラグメントは、異常感染型プリオンの生成または蓄積の抑制と、それらが原因とされるプリオン病の診断及び治療薬として期待される。

WO 2006/046344 A1

明 細 書

ヒト抗プリオン抗体及び該抗体フラグメント

技術分野

- [0001] 本発明は、プリオン蛋白質に結合し、正常型プリオンと異常感染型プリオンの立体構造の違いを識別するヒト抗プリオン抗体及び該抗体フラグメントに関する。当該抗体及び抗体フラグメントは、異常感染型プリオンの生成または蓄積の抑制と、それらが原因とされるプリオン病の診断及び治療薬として期待される。

背景技術

- [0002] プリオン病は、プリオン蛋白質を病原因子とする神経変性疾患であり、正常個体に発現している α ヘリックスリッチな正常型プリオン蛋白質 (cellular isoform of prion protein: PrP^{C}) に、 β シートリッチで感染性を有する異常感染型プリオン蛋白質 (scrapie isoform of prion protein: PrP^{Sc}) が作用して、将棋倒し式に立体構造変換を起こすことで病気を発症すると考えられている。
- [0003] 正常型プリオンは多くの細胞で細胞表面に発現しており、特に中枢及び末梢神経系のニューロンにおいて高レベルで発現している。正常型プリオンはプリオン病の発症に必須であり、プリオンノックアウトマウスではプリオン病であるスクレイピーに耐性となることが報告されている(非特許文献1)。
- [0004] PrP^{C} と PrP^{Sc} との間の違いについては、1)アミノ酸配列上の差異は認められないが、蛋白質分解酵素に対する部分抵抗性、界面活性剤への不溶性及び感染性の有無に違いがあること、2) PrP^{C} の β シート型構造が3%以下であるのに対し、 PrP^{Sc} では40%以上と増加しており、蛋白質の高次構造が大きく異なっていること、が明らかになっている。
- [0005] プリオン複製機構の説明としては、1)シード説と2)ヘテロ二量体説が提唱されているが、いずれも「 PrP^{Sc} を鋳型とする PrP^{C} の高次構造変換による PrP^{Sc} の複製機構」という概念であることには変わりない。
- [0006] プリオン病には、1)原因不明の孤発性クロイツフェルトーヤコブ病(CJD)、2)ゲルストマン症候群(GSS)、家族性致死性不眠症(FFI)といった遺伝性を有する家族性

、あるいは、3) 感染性に分類される食人習慣に伴うクールーや医療行為による医原性プリオン病(乾燥硬膜移植後CJDなど)、ウシ海綿状脳症(BSE)に由来するとされるvariant CJD(vCJD)が挙げられる。ヒト以外の動物においても、前述のBSE以外に、200年以上前からその存在が知られていたヒツジのスクレイピー、北米大陸で懸念されている野生のシカのプリオン病であるchronic wasting disease(CWD)などが挙げられる。

- [0007] これらのプリオン病は、致死性の神経変性疾患であり、治療法は確立されていない。イギリスでは人口の相当数がBSE関連のプリオン株に暴露されており、vCJD発症のリスクにさらされていると言われている。
- [0008] 感染の機序としては、異常感染型プリオンPrP^{Sc}は消化管でも分解されないため、小腸上皮から腸管のリンパ組織であるパイエル板や末梢神経を経て、腹腔神経節経由で脊髄に到達すると考えられている。腸管の神経叢は、PrP^{Sc}への感染に必要なPrP^Cが多く発現されていることや、腸管粘膜下のパイエル板にある濾胞性樹状細胞が補体を用いてPrP^{Sc}を捕捉することが原因で、腸管のリンパ系組織にもPrP^{Sc}の感染が拡大するとの解釈もある。
- [0009] そこで、免疫療法によるプリオン病の予防または治療の試みが検討されている。
- [0010] プリオンに対する液性免疫応答が、プリオン感染に対して防御的に機能することが報告されているが、特に、正常型プリオンの立体構造を認識する抗体が重要であることが示唆されている(非特許文献2)。
- [0011] 試験管内での検討から、PrP^{Sc}への親和性を有しない抗PrPモノクローナル抗体が、PrP^CのPrP^{Sc}への変換を阻害することが示されている(非特許文献3及び非特許文献4)。
- [0012] また、マウススクレイピーモデルにおいて、抗PrPモノクローナル抗体が生体内でもプリオンの増殖を抑えるか否かが検討され、末梢のPrP^{Sc}濃度のレベルとプリオン感染性が著しく抑えられることが示された。更に、これらの抗体投与群は、未処理群がその病のために死んだ後300日以上も健康体で生存した(非特許文献5)。
- [0013] これらの発見は、ヒトのプリオン病に免疫療法が有効であることを強く示唆している。しかしながら、プリオンのワクチンとしての使用については、野生型マウスを用いた検

討では、これまでに大きな成果は得られていない(非特許文献6)。野生型マウスでは正常型プリオンを発現していることから、正常型プリオンに対してトレランスを獲得しているためと考えられる。

[0014] このことから、ヒトにおいても健常者にワクチンを接種することで、プリオンに対する免疫応答を惹起することは、現状では困難であると考えられる。

[0015] 更に最近、PrP^{Sc}に対する抗体の方が、PrP^Cに対する抗体よりもより効果的に、培養細胞中でのPrP^{Sc}の増幅を抑制するとの報告がなされ、正常型プリオン及び異常感染型プリオンのいずれに対する抗体もプリオン病治療薬になりうる可能性が示唆された(非特許文献7)。

[0016] 以上のことから、抗プリオン抗体による受動免疫療法は、現時点においては最も効果的かつ現実的な、プリオン病に対する治療または予防法であると考えられる。

[0017] 非特許文献1: Bueler, H. R. et al., Cell, 73, 1339-1347 (1993)

非特許文献2: Polymenidou, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 101, 14670-14676 (2004)

非特許文献3: Enari, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 98, 9295-9299 (2001)

非特許文献4: Peretz, D. et al., Nature, 412, 739-743 (2001)

非特許文献5: White, A. R. et al., Nature, 422, 80-83 (2003)

非特許文献6: Heppner, F. L. et al., Curr. Opin. Immunol., 16, 594-598 (2004)

非特許文献7: Beringue, V. et al., J. Biol. Chem., 279, 39671-39676 (2004)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0018] 正常型プリオンと異常感染型プリオンをダイレクトに見分ける抗体、つまりコンフォメーションを識別するモノクローナル抗体を開発することができれば、プリオン病の治療や診断に有用であることが期待される。

[0019] 現在取得されている、正常型プリオンと異常感染型プリオンを識別するとされているモノクローナル抗体は、構造変化したときに表面に提示されるYYRモチーフを認識するもののみで、またこの抗体も、YYRペプチドを免疫して得られた抗体であるため、表面にチロシン(Y)やアルギニン(R)を提示する他の蛋白質と相互作用する可能

性があるなど、様々な問題点が残っていた。また、従来の抗原蛋白を直接免疫するハイブリドーマ法では、そのコンフォメーションをコントロールできないと考えられるため、ダイレクトに立体構造を認識する抗体を取得するには、従来法では困難であることが予想されていた。

[0020] また、従来の抗プリオン抗体に、プリオン病に対する治療または予防効果が確認されたとしても、これらの抗体は非ヒト由来のため、その高い免疫原性によって、ヒトに対して投与した場合、異物として認識・排除される。したがって、それらを疾患の治療薬剤として用いることは困難である。この問題を解決する方法として、プリオンに対するマウスモノクローナル抗体を、蛋白工学的手法を用いてヒト化することが考えられるが、マウスモノクローナル抗体由来の配列を一部含むため、反復投与や長期投与により、投与するヒト化抗プリオン抗体の活性を阻害するような抗体が作られ、その効果を著しく減弱するだけでなく、重篤な副作用を招く可能性がある。また、ヒト化により活性が低下することも多く、構築には多大な労力とコストを要する。

[0021] 本発明は、in vitroで様々なコンフォメーションのプリオンを作成し、ダイレクトにヒト抗体を提示した抗体ファージライブラリを反応させることにより、 α ヘリックス型(正常型)プリオン及び β シート型(異常感染型)プリオンそれぞれに特異的で、かつ安全性と治療効果を兼ね備えたヒト抗プリオン抗体およびその断片を提供するとともに、それらの利用方法を提案するものである。

課題を解決するための手段

[0022] 本発明では以上の知見にもとづき、各種コンフォメーションを有するプリオン作成技術及びヒト抗体ファージディスプレイライブラリーを用いることにより、 α ヘリックス型(正常型)プリオンに特異的に結合するヒト一本鎖可変領域(scFv)を5種類、及び β シート型(異常感染型)プリオンに特異的に結合するヒト一本鎖可変領域(scFv)を2種類単離することに成功した。

[0023] すなわち、本発明は、医学上または産業上有用な方法・物質として下記1)～25)の発明を含むものである。

[0024] 1)プリオンに結合性を有するヒト抗プリオン抗体。

[0025] 2)当該プリオンが正常型プリオンまたは異常感染型プリオンである上記1)に記載

のヒト抗プリオン抗体。

[0026] 3) 以下の(a)または(b)のポリペプチドからなるH鎖の相補性決定領域(CDR)と、(c)または(d)のポリペプチドからなるL鎖の相補性決定領域(CDR)とを含む上記1)または2)に記載のヒト抗プリオン抗体。

(a) CDR1として配列番号2、12、22、32、42、52または62のいずれか一つ、CDR2として配列番号3、13、23、33、43、53または63のいずれか一つ、CDR3として配列番号4、14、24、34、44、54または64のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号2～4、12～14、22～24、32～34、42～44、52～54または62～64に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するH鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

(c) CDR1として配列番号7、17、27、37、47、57または67のいずれか一つ、CDR2として配列番号8、18、28、38、48、58または68のいずれか一つ、CDR3として配列番号9、19、29、39、49、59または69のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号7～9、17～19、27～29、37～39、47～49、57～59または67～69に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するL鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

[0027] 4) H鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号2～4、配列番号12～14、配列番号22～24、配列番号32～34、配列番号42～44、配列番号52～54、配列番号62～64のいずれかの組み合わせから選択されるアミノ酸配列であり、L鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号7～9、配列番号17～19、配列番号27～29、配列番号37～39、配列番号47～49、配列番号57～59、配列番号67～69のいずれかの組み合わせから選択されるアミノ酸配列である上記1)から3)のいずれかに記載のヒト抗プリオン抗体。

[0028] 5) H鎖のCDR1～3及びL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ、配列番号

2～4及び配列番号7～9、配列番号12～14及び配列番号17～19、配列番号22～24及び配列番号27～29、配列番号32～34及び配列番号37～39、配列番号42～44及び配列番号47～49、配列番号52～54及び配列番号57～59、配列番号62～64及び配列番号67～69のいずれか一つの組み合わせである上記1)から4)のいずれかに記載のヒト抗プリオン抗体。

[0029] 6)以下の(e)または(f)のポリペプチドからなるH鎖可変領域と、(g)または(h)のポリペプチドからなるL鎖可変領域とを含む上記1)から5)のいずれかに記載のヒト抗プリオン抗体。

(e)配列番号1、11、21、31、41、51または61のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f)配列番号1、11、21、31、41、51または61に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するH鎖可変領域となるポリペプチド。

(g)配列番号6、16、26、36、46、56または66のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h)配列番号6、16、26、36、46、56または66に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するL鎖可変領域となるポリペプチド。

[0030] 7)H鎖可変領域及びL鎖可変領域の組み合わせが、配列番号1と配列番号6、配列番号11と配列番号16、配列番号21と配列番号26、配列番号31と配列番号36、配列番号41と配列番号46、配列番号51と配列番号56、配列番号61と66に示されるアミノ酸配列のいずれか一つから選択される上記1)から6)のいずれかに記載のヒト抗プリオン抗体。

[0031] 8)以下の(a)または(b)のポリペプチドからなるH鎖の相補性決定領域(CDR)を含むポリペプチドからなる、プリオンに対するヒト由来の抗体のH鎖可変領域フラグメント。

(a)CDR1として配列番号2、12、22、32、42、52または62のいずれか一つ、CDR2として配列番号3、13、23、33、43、53または63のいずれか一つ、CDR3として配

列番号4、14、24、34、44、54または64のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号2～4、12～14、22～24、32～34、42～44、52～54または62～64に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するH鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

[0032] 9) CDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号2～4、配列番号12～14、配列番号22～24、配列番号32～34、配列番号42～44、配列番号52～54、配列番号62～64のいずれかの組み合わせから選択されるアミノ酸配列である上記8)に記載のH鎖可変領域フラグメント。

[0033] 10) 当該H鎖のCDRを含むポリペプチドが、以下の(e)または(f)のポリペプチドである上記8)または9)に記載のH鎖可変領域フラグメント。

(e) 配列番号1、11、21、31、41、51または61のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号1、11、21、31、41、51または61に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するH鎖可変領域となるポリペプチド。

[0034] 11) 以下の(c)または(d)のポリペプチドからなるL鎖の相補性決定領域(CDR)を含むポリペプチドからなる、プリオンに対するヒト由来の抗体のL鎖可変領域フラグメント。

(c) CDR1として配列番号7、17、27、37、47、57または67のいずれか一つ、CDR2として配列番号8、18、28、38、48、58または68のいずれか一つ、CDR3として配列番号9、19、29、39、49、59または69のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号7～9、17～19、27～29、37～39、47～49、57～59または67～69に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するL鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

- [0035] 12) CDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号7～9、配列番号17～19、配列番号27～29、配列番号37～39、配列番号47～49、配列番号57～59、配列番号67～69のいずれかの組み合わせから選択されるアミノ酸配列である上記11)に記載のL鎖可変領域フラグメント。
- [0036] 13) 当該L鎖のCDRを含むポリペプチドが、以下の(g)または(h)のポリペプチドである上記11)または12)に記載のL鎖可変領域フラグメント。
- (g) 配列番号6、16、26、36、46、56または66のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (h) 配列番号6、16、26、36、46、56または66に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するL鎖可変領域となるポリペプチド。
- [0037] 14) 上記8)から10)に記載のH鎖可変領域フラグメントと、上記11)から13)に記載のL鎖可変領域フラグメントとを連結してなる、プリオンに対するヒト由来の抗体の一本鎖可変領域フラグメント。
- [0038] 15) 上記8)から10)に記載のH鎖可変領域フラグメント、及び／または、上記11)から13)に記載のL鎖可変領域フラグメントに、ヒト由来の抗体定常領域を連結してなる、プリオンに対するヒト由来の抗体またはその抗体フラグメント。
- [0039] 16) 当該抗体フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')₂、scAb、またはscFv-Fcである上記15)に記載の抗体フラグメント。
- [0040] 17) 上記1)から16)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントとペプチド或いは他のタンパク質と融合させた融合抗体。
- [0041] 18) 上記1)から17)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントに修飾剤が結合されてなる修飾抗体。
- [0042] 19) 上記1)から17)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントをコードする遺伝子。
- [0043] 20) 上記19)に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。
- [0044] 21) 上記19)に記載の遺伝子が導入された形質転換体。
- [0045] 22) 上記19)に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、ヒト抗プリオン抗体

またはその断片を生産する方法。

[0046] 23) 上記1)から16)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または上記17)に記載の融合抗体、または上記18)に記載の修飾抗体を用いた正常型プリオンまたは異常感染型プリオンの検出試薬及び／または診断薬。

[0047] 24) 上記19)に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。

[0048] 25) 上記1)から18)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントを用いた異常感染型プリオンの増幅抑制剤。

[0049] 26) 上記1)から18)のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントを用いたプリオン病の予防または治療剤。

[0050] これらの抗プリオン抗体及び抗体フラグメントはscFvという小さな分子形態でもプリオンの高次構造を認識して特異的な結合を示した。この抗体は分子量がきわめて小さいので脳血管関門を通過できるように抗体エンジニアリングすることができる。例えば、トランスフェリン受容体を介して脳血管関門を通過できるようにトランスフェリンとの融合体や二重特異性抗体などもこの範疇に入る。

[0051] また、P糖蛋白に対する抗体や脳血管関門の薬剤輸送に関わる受容体と相互作用し得るタンパク質、ペプチドまたは低分子との融合体も可能である。また、さらに、McCaffertyら(J. McCaffertyら、Nature, 348: 552-554, 1990)が報告したように、膜透過性に優れ、抗原性の少ない繊維状ファージの上にこれらの抗体フラグメントを提示させ、脳内に移行させることも可能である。

[0052] 本発明による抗体は完全ヒト抗体であるので、診断薬としての利用が可能であると共に、プリオン病の予防または治療法の開発への道が開ける。それらの医療への貢献は多大である。

発明の効果

[0053] 本発明のヒトモノクローナル抗体及び該抗体フラグメント分子は、ヒト由来抗プリオン抗体の可変領域を有し、それぞれ α ヘリックス型(正常型)プリオンまたは β シート型(異常感染型)プリオンに対して特異的かつ高親和性の反応を示す。このことから、本発明の抗体及び該抗体フラグメントについては、プリオン病の診断、予防または治療薬への利用が期待できる。

図面の簡単な説明

- [0054] [図1]調製した α formプリオンのCDスペクトルを示す図。
- [0055] [図2]調製した β formプリオンのCDスペクトルを示す図。
- [0056] [図3]分離クローンのscFvの β 型プリオンへの特異性を評価したELISAの結果を示す図。
- [0057] [図4]発現scFv-E-tagの発現を抗E-tag抗体を用いてウエスタンブロッティングで確認した図。
- [0058] [図5]分離クローンのscFvの α 型プリオンへの特異性を評価したELISAの結果を示す図。
- [0059] [図6]分離クローンのscFvの β 型プリオン及び α 型プリオンへの特異性を評価したELISAの結果を示す図。
- [0060] [図7]分離クローンのscFvの β 型プリオンへの反応性について、pH依存性及び抗原濃度依存性を評価したELISAの結果を示す図。

発明を実施するための最良の形態

- [0061] 本発明の抗体及び抗体フラグメントに使用されるscFv等は以下のようにして得られた。
- [0062] 健常者20名分の末梢血リンパ球より、RT-PCR法にて、免疫グロブリン重(H)鎖、軽(L)鎖cDNAを増幅、更に両者をlinker DNAで結合し、健常者リンパ球由来のH鎖可変領域(VH鎖またはVH)とVL鎖のランダムな組み合わせによるscFv DNAを作製した。
- [0063] このscFv DNAをファージミドベクターpCANTAB5Eに組込み、 10^9 クローンからなる健常者由来scFvディスプレイファージライブラリーを作製した。
- [0064] 次に、抗原とするプリオン蛋白質を調製した。市販のプリオン蛋白質(aa#90-230)をPBSに溶解することにより α formプリオンを、また、組換え型プリオン(aa#23-230)を発現させ、既知の最終pH4に調製する方法で β formプリオンをそれぞれ調製した。ここで、調製したサンプルについては、CDスペクトルを測定することにより、それぞれ目的とした立体構造を保持しているかどうかを調べることができる。また、以降の β formを用いる実験を行う際にはコンフォメーション維持のため、常にpH4の条件で行っ

た。

- [0065] 上記のライブラリーを、 α formプリオンまたは β formプリオンと結合させて回収、濃縮し、抗プリオンscFvディスプレイファージクローンをスクリーニングした。その結果、スクリーニングされた各クローンは、プリオンと結合するscFvを産生した。
- [0066] scFvの発現方法としては、例えば、大腸菌で発現させることができる。大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列等、発現させるscFvを機能的に結合させて発現させることが出来る。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーター等を挙げることができる。scFvの分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに発現させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, SP., et al, J. Bacteriol., 1987, 169 : 4379-4383)を用いるとよい。培養上清中に分泌させるにはM13ファージのg3蛋白のシグナル配列を用いることもできる。
- [0067] 発現されたscFvは細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本願発明で発現されるscFvは、そのC末端にE tag配列が付加されているので、抗E tag抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、容易に短時間で精製することができる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を組み合わせることも可能である。例えば、限外濾過、塩析、ゲル濾過／イオン交換／疎水クロマト等のカラムクロマトグラフィーを組み合わせれば抗体を分離・精製することができる。
- [0068] 得られた抗体や抗体フラグメントのプリオンに対する結合活性を測定する方法としては、ELISA、BIAcore等の方法がある。例えばELISAを用いる場合、プリオンを直接またはcapture抗体を介して固相化した96穴プレートに目的の抗体や抗体フラグメントを含む試料、例えば大腸菌の培養上清や精製抗体を加える。次にパーオキシダーゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、発色基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することが出来る。また、BIAcoreを用いる場合、センサーチップにプリオンを直接またはcapture抗体を介して固定化して、目的の試料の結合解離定数を測定することが出来る。
- [0069] 上記の方法により、抗プリオンscFvを分離し評価した結果、それぞれ α ヘリックス型(正常型)プリオンまたは β シート型(異常感染型)プリオンに対して特異的かつ高

親和性の反応性を有することが示された。従ってこれらの抗体については、生体内でも同様の効果を示し、プリオン病の診断、予防または治療薬への利用が期待できる。

[0070] 上記結合活性を有する7種類のscFv(huPrP-18、huPrP-39、boPrP-2、boPrP-15、boPrP-20、 β PrP-7、 β PrP-30)のVH鎖及びVL鎖のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列は、下記の通りである。

[0071] (1)クローンhuPrP-18

クローンhuPrP-18のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号1に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号2～4に示した。すなわち、配列番号1に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号2)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号3)、99番目～110番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号4)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号5に示した。

[0072] また、クローンhuPrP-18のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号6に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号7～9に示した。すなわち、配列番号6に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号7)、51番目～57番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号8)、90番目～100番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号9)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号10に示した。

[0073] (2)クローンhuPrP-39

クローンhuPrP-39のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号11に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号12～14に示した。すなわち、配列番号11に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号12)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号13)、99番目～107番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号14)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号15に示した。

[0074] また、クローンhuPrP-39のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号16に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号17～19に示した。すなわち、配列番号16に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～33番目のアミノ酸配列がCDR1(配

列番号17)、49番目～55番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号18)、88番目～96番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号19)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号20に示した。

[0075] (3)クローンboPrP-2

クローンboPrP-2のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号21に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号22～24に示した。すなわち、配列番号21に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号22)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号23)、99番目～108番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号24)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号25に示した。

[0076] また、クローンboPrP-2のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号26に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号27～29に示した。すなわち、配列番号26に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～36番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号27)、52番目～58番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号28)、91番目～103番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号29)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号30に示した。

[0077] (4)クローンboPrP-15

クローンboPrP-15のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号31に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号32～34に示した。すなわち、配列番号31に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号32)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号33)、99番目～113番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号34)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号35に示した。

[0078] また、クローンboPrP-15のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号36に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号37～39に示した。すなわち、配列番号36に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～36番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号37)、52番目～58番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号38)、91番目～100番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号39)に対応している。また、当該VL鎖を

コードする遺伝子の塩基配列を配列番号40に示した。

[0079] (5) クローンboPrP-20

クローンboPrP-20のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号41に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号42～44に示した。すなわち、配列番号41に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号42)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号43)、99番目～111番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号44)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号45に示した。

[0080] また、クローンboPrP-20のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号46に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号47～49に示した。すなわち、配列番号46に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号47)、51番目～57番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号48)、90番目～100番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号49)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号50に示した。

[0081] (6) クローン β PrP-7

クローン β PrP-7のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号51に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号52～54に示した。すなわち、配列番号51に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号52)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号53)、99番目～112番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号54)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号55に示した。

[0082] また、クローン β PrP-7のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号56に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号57～59に示した。すなわち、配列番号56に示すVL鎖のアミノ酸配列において、23番目～34番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号57)、50番目～56番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号58)、89番目～97番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号59)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号60に示した。

[0083] (7) クローン β PrP-30

クローン β PrP-30のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号61に示した。当該VH鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号62～64に示した。すなわち、配列番号61に示すVH鎖のアミノ酸配列において、31番目～35番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号62)、50番目～66番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号63)、99番目～107番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号64)に対応している。また、当該VH鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号45に示した。

[0084] また、クローン β PrP-30のVL鎖のアミノ酸配列を配列番号66に示した。当該VL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を配列番号67～69に示した。すなわち、配列番号66に示すVL鎖のアミノ酸配列において、24番目～34番目のアミノ酸配列がCDR1(配列番号67)、50番目～56番目のアミノ酸配列がCDR2(配列番号68)、89番目～98番目のアミノ酸配列がCDR3(配列番号69)に対応している。また、当該VL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号70に示した。

[0085] 本発明により得られたクローン毎にアミノ酸配列及び塩基配列について上述したが、配列表に記載された各アミノ酸配列情報(VH鎖、VL鎖、各CDR1～3)をもとに、単独または複数の配列を適宜組み合わせ使用することも可能である。

[0086] 本発明の抗体およびその抗体フラグメントは、上記VH鎖及びVL鎖、並びにそれらのCDRとして、上記配列番号に示される配列に限定されるものではなく、それらの一部が改変された変異ポリペプチドであってもよい。

[0087] すなわち、各配列番号に記載されたアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつプリオンに対するH鎖またはL鎖の相補性決定領域、H鎖またはL鎖の可変領域となるポリペプチドも含まれる。

[0088] ここで、「1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加された」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法により置換、欠失、挿入、及び／又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されることを意味する。このような「変異」としては、主として、公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然(例えばヒト)に存在する同様の変異ポリペプチドを単離精製したものであってもよい。

- [0089] なお、上記「変異」は、本発明の抗体またはその抗体フラグメントを、治療薬として利用する場合（ヒトに投与する場合）には、ヒト由来の構造またはヒトが免疫反応を起こさない範囲で行い、検出器具や診断キットなどとして使用する場合（ヒトに投与しない場合）には、特に制限されない。
- [0090] 本発明で開示されるVH鎖及び／またはVL鎖は、ファージ抗体法を用いて主としてscFvの形で得られたものであるが、原則としてその適用はscFvに限定されることはない。例えば、開示したVH鎖及び／またはVL鎖をヒト免疫グロブリンの定常領域と連結した完全分子型、またヒト免疫グロブリンの定常領域の一部と組み合わせたFab、Fab'またはF(ab')₂、さらにscFvをヒト免疫グロブリンのL鎖の定常領域と結合させた一本鎖抗体(scAb)や、scFvをヒト免疫グロブリンのH鎖の定常領域と結合させたscFv-Fcなどの他の抗体フラグメントもその適用範囲に含まれる。
- [0091] また、本発明の抗体またはそのフラグメントは、当該抗体またはフラグメントにペプチド或いは他のタンパク質と融合させた融合抗体であってもよい。
- [0092] また、これらの抗体及び抗体フラグメント蛋白分子に、ポリエチレングリコールなどの高分子修飾剤を結合させた修飾蛋白分子も同様である。
- [0093] H鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたscFvを調製する場合、ペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸10～25残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。
- [0094] 本発明の抗体または抗体フラグメントは、配列番号5、15、25、35、45、55または65及び配列番号10、20、30、40、50、60または70にそれぞれ示した本発明により得られた各クローンのVH鎖及びVL鎖をコードする遺伝子配列情報をもとに、適当な宿主（例えば、細菌、酵母）に導入して、本発明の抗体またはそのフラグメントを発現させることができる。
- [0095] 本発明の抗体、その抗体フラグメント、またはそれらの誘導体は、正常型プリオン及び異常感染型プリオンの検出試薬及び診断薬として利用可能である。
- [0096] 本発明の抗体、その抗体フラグメント、またはそれらの誘導体は、異常感染型プリオンの増幅抑制剤として利用可能である。
- [0097] さらに、本発明の抗体、その抗体フラグメント、またはそれらの誘導体は、プリオン病

の予防または治療剤として利用可能である。

- [0098] 以下、本願発明を実施例に基づき詳細に説明するが、本願発明は何らこれらに限定されるものではない。

実施例

- [0099] 《実施例1:健常者からのファージライブラリーの構築》

ファージライブラリーの構築は、J. D. Marksら(J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991)により報告されている方法を参考に、健常者20名由来末梢血由来リンパ球を出発材料に、構築したVH(γ)-V κ 、VH(γ)-V λ 、VH(μ)-V κ 、VH(μ)-V λ の各サブライブラリーはそれぞれ 1.1×10^8 、 2.1×10^8 、 8.4×10^7 、 5.3×10^7 クローンの多様性を有すると評価された。

- [0100] 《実施例2:抗原の調製》

InPro社より購入したプリオン蛋白質(aa#90-230)をPBSに溶解してすぐにCDスペクトル解析した結果を図1に示す。200nmから250nmまでのCDを25°Cで、G. Jacksonらの報告(Science, 283: 1935-1937, 1999)に従って測定した。

- [0101] 約220nmに負の吸収が認められるため、この蛋白質は α ヘリックスリッチなコンフォメーションをとっていることが考えられた。

- [0102] この α ヘリックスリッチなプリオンを α formプリオンとし、 α formを特異的に認識するヒト抗体の単離を試みた。

- [0103] また、 β formプリオンの調製に関しては、組換え型プリオン(aa#23-230)及び発現ベクター(長崎大学片峰先生より供与)を用い、1999年のScience誌で報告されたCollingeらによるプロトコールに従って行った。

- [0104] ここで、注目すべき点は透析する最終pHが4であるという点で、今後 β formを用いる実験をする際には β のコンフォメーション維持のため、常にpH4の条件で行った。

- [0105] 調製した β formのプリオンのCDスペクトルを上記と同様に解析した結果を図2に示す。予想通り、215nmに負のピークがあるため、 β シートが形成されていることが推定された。

- [0106] この β シートリッチなプリオンを β formプリオンとし、 β formのコンフォメーションを特異的に認識するヒト抗体の単離を試みた。

[0107] 《実施例3:パンニング》

(1) α formを用いたパンニング

5 μ gのヒト α formプリオン及びウシ α formプリオンを0.1M NaHCO₃で希釈し、ヒトプリオンはイムノチューブに、ウシプリオンは35mmペトリ皿にそれぞれコートした。固定化は4°Cで一晩行った。

[0108] 0.5%ゼラチン/PBSで2時間ブロックし、PBST(0.1%Tween20含有PBS)でプレートを10回洗浄した。ファージディスプレイライブラリー(1×10^{12} TU)を加え、1時間反応させ、PBSTで7回洗浄した。

[0109] 1mg/mL BSAを含む0.1Mグリシン/HCl(pH2.3) 1mlを加え、5分間インキュベートし、ファージを溶出した。溶出液を1M Tris-Cl (pH9.1)と混ぜ、中和した後、TG1に感染させ、増幅させた。

[0110] このパンニングはヒト及びウシPrPの両方に対して上記の同じ手法で行った。なお、同じ条件で2ndパンニングまで行い、ヒトPrPに対するパンニングでは64クローンのパージを、ウシPrPに対するパンニングでは46クローンのパージを単離した。

[0111] (2) β formを用いたパンニング

コンフォメーションを認識する抗体の単離が目的であるため、タンパク質が本来のコンフォメーションを常に保つように、直接プレートに β formプリオンを固定化せず、いくつかのトリックを施してパンニングを行った。まず、この蛋白にはHis-tagがついているのでこのtagを利用すること、及び、前述したように β formを調製するリフォールディングの最終pHが4であるので、このpHを保つことがポイントである。

[0112] まず、10 μ g/mlのanti-His tag mAb (Amersham Pharmacia Biotech)をプレート5枚にコートした。希釈は0.1M NaHCO₃で行い、4°Cで一晩インキュベートした。0.25%BSA/pH4 bufferでプレートを2時間ブロックし、PBSTで10回洗浄した。

次に、ファージディスプレイライブラリーのサブトラクションを行った。ファージディスプレイライブラリー(5×10^{11} TU)を一枚目のプレートに反応させた。ファージの希釈は0.25%BSA/pH4 bufferで行った。室温で40分間インキュベートして、その上澄みを2枚目のプレートに反応させた。室温で40分間インキュベートし、その上澄みを3枚目のプレートに反応させた。室温で40分間インキュベートして、その上澄みを別のチュ

ープに回収した(1ml)。このライブラリーの溶液に5 μ gの β form PrPを加え、4°Cで一時間インキュベートした。その溶液を2つに分け、4枚目と5枚目のプレートにそれぞれ反応させた。室温で30分間インキュベートし、His-tagを介してファージ/プリオンのコンプレックスをキャプチャーさせた後、PBSTで7回洗浄した。1mg/mL BSAを含む0.1Mグリシン/HCl(pH2.3)を1ml加え、5分間インキュベートし、ファージを溶出させた。その溶出液を1M Tris-HCl(pH9.1)と混ぜ、中和した後、TG1に感染させ、増幅させた。

[0113] このパンニングはヒトの β form PrPに対してだけ行い、2ndパンニングまで行った。その結果、15クローン回収し、それらについてELISAを行った。

[0114] 《実施例4:ファージ抗体のELISAによる反応性解析》

α formに対する反応性をファージELISAにより解析した。

ELISAプレート(Nunc)にヒトPrP、ウシPrP(いずれもInPro)及びヒトIgGを60ng/40 μ L/wellで、4°C16時間固定化した。洗浄後、ファージクローン(10^{12} virions/40 μ L/well)を反応させた。ビオチン化anti-M13 mAb(Pharmacia)とアルカリフォスファターゼ(AP)標識ストレプトアビジン(Vector Lab.)とを組み合わせで検出した。405nmにおける吸光度を、マイクロプレートリーダーNJ-2300(Nunc)を用いて測定した。反応性が確認されたクローンについて、以後の解析を行った。

[0115] 次に、 β formに対する反応性をファージELISAにより解析した。

ファージクローンを5 μ gの β form PrPとpH4で混合し、4°Cでインキュベートした。反応時間に関しては、pH4でファージを長時間インキュベートすることにより、ファージの表面タンパク質が変化し、非特異的な結合をもたらす可能性が懸念されるので、オーバーナイト、及び1時間の条件で検討した。ELISAプレート(Nunc)にanti-His tag mAb(Amersham Pharmacia Biotech)を40ng/40 μ L/wellで、4°C16時間固定化した。洗浄後、上記のファージクローンと β form PrPとの混合液をアプライし、反応させた。ビオチン化anti-M13 mAb(Pharmacia)とAP標識ストレプトアビジン(Vector Lab.)とを組み合わせで検出した。405nmにおける吸光度を、マイクロプレートリーダーNJ-2300(Nunc)を用いて測定した。また、特異性確認のため、ファージを α formプリオン、または同じHis-tagをもつコントロール蛋白としてTim1と反応させて、ELISAを行った。

。結果を図3示す。ファージと β formプリオンをpH4の条件で反応させた場合のみ結合活性があることから、これら2種のファージクローンは α formプリオンに結合せず、 β formプリオンを特異的に認識していることが分かった。また、懸念されたpH4がファージに与える影響であるが、一時間とオーバーナイトの反応性に変化はなく、pH4でファージは β formプリオンに特異性を示すことが分かった。

[0116] 《実施例5:クローンの配列分析》

単離した α form及び β formに対するクローンのscFv遺伝子のVH及びVLのDNA塩基配列をDye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction kit (Applied Biosystems)を用いて決定した。ELISA及び配列分析の結果、単離したクローンは、ヒトプリオン結合性のクローンが2種(huPrP-18、huPrP-39)と、ウシプリオン結合性のクローンは3種(boPrP-2、boPrP-15、boPrP-20)、そして β プリオン結合性のクローンは2種(β PrP-7、 β PrP-30)に分類された。

[0117] 《実施例6:ヒト由来抗プリオンscFvの発現と精製》

上記のscFvクローンからプラスミドDNAを回収して、常法に従って大腸菌HB2151を形質転換した。2%グルコース及び100 μ g/mLのアンピシリンを含む2×YT培地でこれら的大腸菌を一夜前培養後、グルコースフリーの2×YT培地に一部移植し、終濃度1mM IPTG、100 μ g/mLのアンピシリンを加えて更に一夜培養してscFvの発現誘導を行った。培養終了後菌体を遠心回収し、0.5mM EDTA及び0.5M Sucroseを含む0.2M Tris-HClに懸濁して氷中に30分菌体を放置した。次いで8,900×gで30分間遠心し、上清を回収して0.45 μ mフィルター濾過後、ペリプラズム画分からのscFvの精製出発材料とした。

[0118] このようにして調製した精製の出発材料を、抗E tag抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで常法に従って精製した。PBSで透析後、分子量カット10,000のCentri-con (Amicon社)で濃縮し、0.45 μ mフィルター濾過して精製標品とした。

[0119] 《実施例7:scFv精製品の分子量解析》

12.5% SDS-PAGEとウエスタンブロッティングを、M. Kajiらの報告(J. Biochem., 129: 577-583, 2001)に従って行った。

[0120] Semidry electroblotter (Sartorius)を用いてトランスファーしたPVDF膜 (Applied Bios

systems)をanti-E-tag mAbと反応させた。ECL (Amersham Pharmacia Biotech)により増感させ、luminoimage analyzer LAS-1000 (Fuji Film)で検出した。マーカーには、NEB prestained protein marker (NE Biolabs)を使用した。その結果、図4に示すように、約30Kdaのバンドが確認された。

[0121] 《実施例8:scFv精製品のELISAによる反応性解析1》

上記クローンの α formに対する反応性をELISAにより解析した。実施例4と同様に抗原をプレートに固定化し、精製scFv (400ng/40 μ L/well)を反応させた。anti-E-tag mAb (Pharmacia)とAP標識anti-mouse IgG Ab (Jackson ImmunoResearch)とを組み合わせ検出し、405nmにおける吸光度を測定した。

[0122] このELISAでは、プリオンに対してだけではなく、これらの抗体のアミロイド β (A β)ペプチドに対する交差反応性も検討した。その結果、図5に示すように、いずれの抗体も、ヒトとウシのプリオンに結合し、monomer及びfiber A β に対して結合しないという結果になり、これらの抗体は α formプリオンを特異的に認識する抗体であることが分かった。

[0123] また、huPrP-39に関しては、ヒトとウシのプリオンに対する反応性を比較すると、ウシプリオンに低いことが判った。またその他の抗体のヒトとウシのプリオンの交差反応性に関しては、これらの抗体がプリオンの共通した領域を認識していることが示唆された。

[0124] 《実施例9:scFv精製品のELISAによる反応性解析2》

次に、 β formに対する反応性をELISAにより解析した。

精製scFv (200ng)を1 μ gの β form PrPとpH4で混合し、4°Cで1時間インキュベートした。ELISAプレート(Nunc)にanti-His tag mAb (Amersham Pharmacia Biotech)を80ng/40 μ L/wellで、4°C一夜固定化した。0.25%BSAで、室温、2時間のブロッキングを行い、0.1%Tween20で洗浄した。その後、上記のscFvと β form PrPとの混合液をアプライし、室温で1時間反応させた。ビオチン化anti-E-tag mAb (Pharmacia)とAP標識ストレプトアビジン (Vector Lab.)とを組み合わせ検出した。405nmにおける吸光度を、マイクロプレートリーダーNJ-2300 (Nunc)を用いて測定した。また、特異性確認のため、精製scFvを α formプリオン、または同じHis-tagをもつコントロール蛋白

としてTim-3と反応させて、ELISAを行った。結果を図6に示す。 β PrP-7と β PrP-30については、 α formプリオンに結合せず、 β formプリオンを特異的に認識していることが分かった。また、boPrP-2とboPrP-15に関しては、 β formプリオンに結合せず、 α formプリオンを特異的に認識していることが分かった。

[0125] 《実施例10： β formプリオン特異クローンのELISAによる性状解析》

次に、 β PrP-7と β PrP-30の β formプリオンに対する反応について、pH依存性及び抗原濃度依存性をELISAにより解析した。

β formヒトPrPをELISAプレート(Nunc)に、20, 40, 80, 120, 160ng/wellで、4℃一夜固定化した。0.25%BSA/10mM NaOAc+10mM Tris-acetate(pH4.0)または0.25%BSA/PBS(pH7.0)で2時間ブロッキングした後、scFvを発現させた培養上清画分を40 μ L加え、1時間室温で反応させた。検出は、ビオチン化anti- E-tag mAb (Pharmacia)とAP標識streptavidin (Vector Lab.)とを組み合わせで行った。反応に用いる緩衝液には、pH4の系では10mM NaOAc+10mM Tris-acetate(pH4.0)を、pH7の系ではPBS(pH7.0)を常に使用した。405nmにおける吸光度を、マイクロプレートリーダーNJ-2300 (Nunc)を用いて測定した結果を図7に示す。 β PrP-7については、pH4では抗原濃度依存的な反応を示したが、pH7では反応が認められなかった。 β PrP-30については、pH4及びpH7のいずれにおいても抗原濃度依存的な反応が確認された。

[0126] 《実施例11：scFv精製品のBIAcoreによる反応性解析》

各クローンの精製scFvとヒト及びウシの α formプリオンとの解離定数をBIAcore 200 (BIAcore)を用いて検討した。センサーチップCM5 (Biacore)に10mM sodium acetate (pH4.0)で希釈したヒトPrP及びウシPrPを、amine coupling kit (Pharmacia biotech)を用いて固定化した。続いてエタノールアミンでブロッキングを行った。

[0127] 測定は、HBS buffer (10mM HEPES, pH7.4/0.15M NaCl/3mM EDTA/0.005% Tween20 (Pharmacia biotech))で各scFvサンプルを0~400nMに希釈して、流速は5 μ L/min、温度は20℃で行った。

[0128] 各サンプルの測定後に、200mM NaCl含有200mM Glycine-HCl buffer (pH2.2)によりscFvを溶出し洗浄した。

[0129] 得られたセンサーグラムから、BIAevaluation 2.1ソフトを用いて解析し、結合解離定

数KD値を算出した。その結果、これらの抗体はヒトPrP及びウシPrPに対し、下記の通り 10^{-7} から 10^{-9} Mオーダーという強い結合親和性(KD値)を持つことが分かった。

huPrP-18:ヒトPrP; 2.0×10^{-8} M、ウシPrP; 6.0×10^{-8} M

huPrP-39:ヒトPrP; 3.3×10^{-8} M、ウシPrP; 2.9×10^{-8} M

boPrP-2 :ヒトPrP; 1.1×10^{-7} M、ウシPrP; 4.1×10^{-7} M

boPrP-15:ヒトPrP; 7.8×10^{-9} M、ウシPrP; 4.6×10^{-9} M

boPrP-20:ヒトPrP; 3.6×10^{-8} M、ウシPrP; 3.9×10^{-9} M

請求の範囲

- [1] プリオンに結合性を有するヒト抗プリオン抗体。
- [2] 当該プリオンが正常型プリオンまたは異常感染型プリオンである請求項1に記載のヒト抗プリオン抗体。
- [3] 以下の(a)または(b)のポリペプチドからなるH鎖の相補性決定領域(CDR)と、(c)または(d)のポリペプチドからなるL鎖の相補性決定領域(CDR)とを含む請求項1または2に記載のヒト抗プリオン抗体。
- (a) CDR1として配列番号2、12、22、32、42、52または62のいずれか一つ、CDR2として配列番号3、13、23、33、43、53または63のいずれか一つ、CDR3として配列番号4、14、24、34、44、54または64のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (b) 配列番号2～4、12～14、22～24、32～34、42～44、52～54または62～64に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するH鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。
- (c) CDR1として配列番号7、17、27、37、47、57または67のいずれか一つ、CDR2として配列番号8、18、28、38、48、58または68のいずれか一つ、CDR3として配列番号9、19、29、39、49、59または69のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (d) 配列番号7～9、17～19、27～29、37～39、47～49、57～59または67～69に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するL鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。
- [4] H鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号2～4、配列番号12～14、配列番号22～24、配列番号32～34、配列番号42～44、配列番号52～54、配列番号62～64のいずれかの組み合わせから選択されるアミノ酸配列であり、L鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号7～9、配列番号17～19、配列番号27～29、配列番号37～39、配列番号47～49、配列番号57～59、配列番号67～69のいずれかの組

み合わせから選択されるアミノ酸配列である請求項1から3のいずれかに記載のヒト抗プリオン抗体。

- [5] H鎖のCDR1～3及びL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、それぞれ、配列番号2～4及び配列番号7～9、配列番号12～14及び配列番号17～19、配列番号22～24及び配列番号27～29、配列番号32～34及び配列番号37～39、配列番号42～44及び配列番号47～49、配列番号52～54及び配列番号57～59、配列番号62～64及び配列番号67～69のいずれか一つの組み合わせである請求項1から4のいずれかに記載のヒト抗プリオン抗体。

- [6] 以下の(e)または(f)のポリペプチドからなるH鎖可変領域と、(g)または(h)のポリペプチドからなるL鎖可変領域とを含む請求項1から5のいずれかに記載のヒト抗プリオン抗体。

(e)配列番号1、11、21、31、41、51または61のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f)配列番号1、11、21、31、41、51または61に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するH鎖可変領域となるポリペプチド。

(g)配列番号6、16、26、36、46、56または66のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h)配列番号6、16、26、36、46、56または66に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するL鎖可変領域となるポリペプチド。

- [7] H鎖可変領域及びL鎖可変領域の組み合わせが、配列番号1と配列番号6、配列番号11と配列番号16、配列番号21と配列番号26、配列番号31と配列番号36、配列番号41と配列番号46、配列番号51と配列番号56、配列番号61と66に示されるアミノ酸配列のいずれか一つから選択される請求項1から6のいずれかに記載のヒト抗プリオン抗体。

- [8] 以下の(a)または(b)のポリペプチドからなるH鎖の相補性決定領域(CDR)を含むポリペプチドからなる、プリオンに対するヒト由来の抗体のH鎖可変領域フラグメント。

(a) CDR1として配列番号2、12、22、32、42、52または62のいずれか一つ、CDR2として配列番号3、13、23、33、43、53または63のいずれか一つ、CDR3として配列番号4、14、24、34、44、54または64のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号2～4、12～14、22～24、32～34、42～44、52～54または62～64に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するH鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

[9] CDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号2～4、配列番号12～14、配列番号22～24、配列番号32～34、配列番号42～44、配列番号52～54、配列番号62～64のいずれかの組み合わせから選択されるアミノ酸配列である請求項8に記載のH鎖可変領域フラグメント。

[10] 当該H鎖のCDRを含むポリペプチドが、以下の(e)または(f)のポリペプチドである請求項8または9に記載のH鎖可変領域フラグメント。

(e) 配列番号1、11、21、31、41、51または61のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号1、11、21、31、41、51または61に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するH鎖可変領域となるポリペプチド。

[11] 以下の(c)または(d)のポリペプチドからなるL鎖の相補性決定領域(CDR)を含むポリペプチドからなる、プリオンに対するヒト由来の抗体のL鎖可変領域フラグメント。

(c) CDR1として配列番号7、17、27、37、47、57または67のいずれか一つ、CDR2として配列番号8、18、28、38、48、58または68のいずれか一つ、CDR3として配列番号9、19、29、39、49、59または69のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

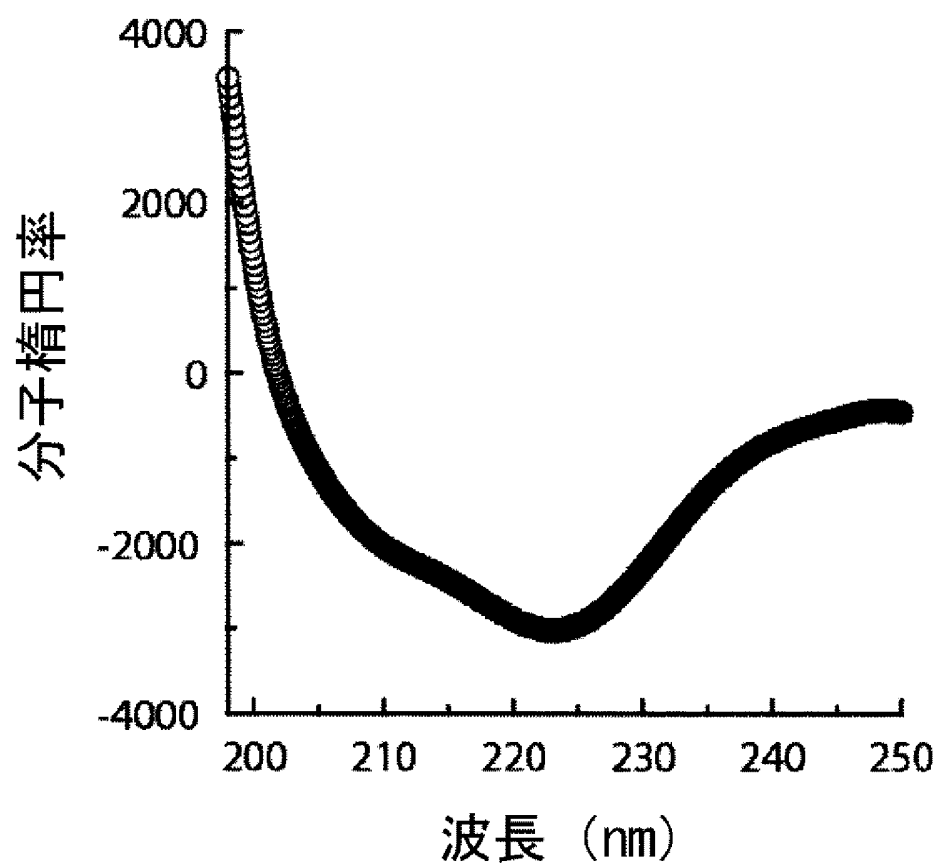
(d) 配列番号7～9、17～19、27～29、37～39、47～49、57～59または67～69に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するL鎖の相補性

決定領域となるポリペプチド。

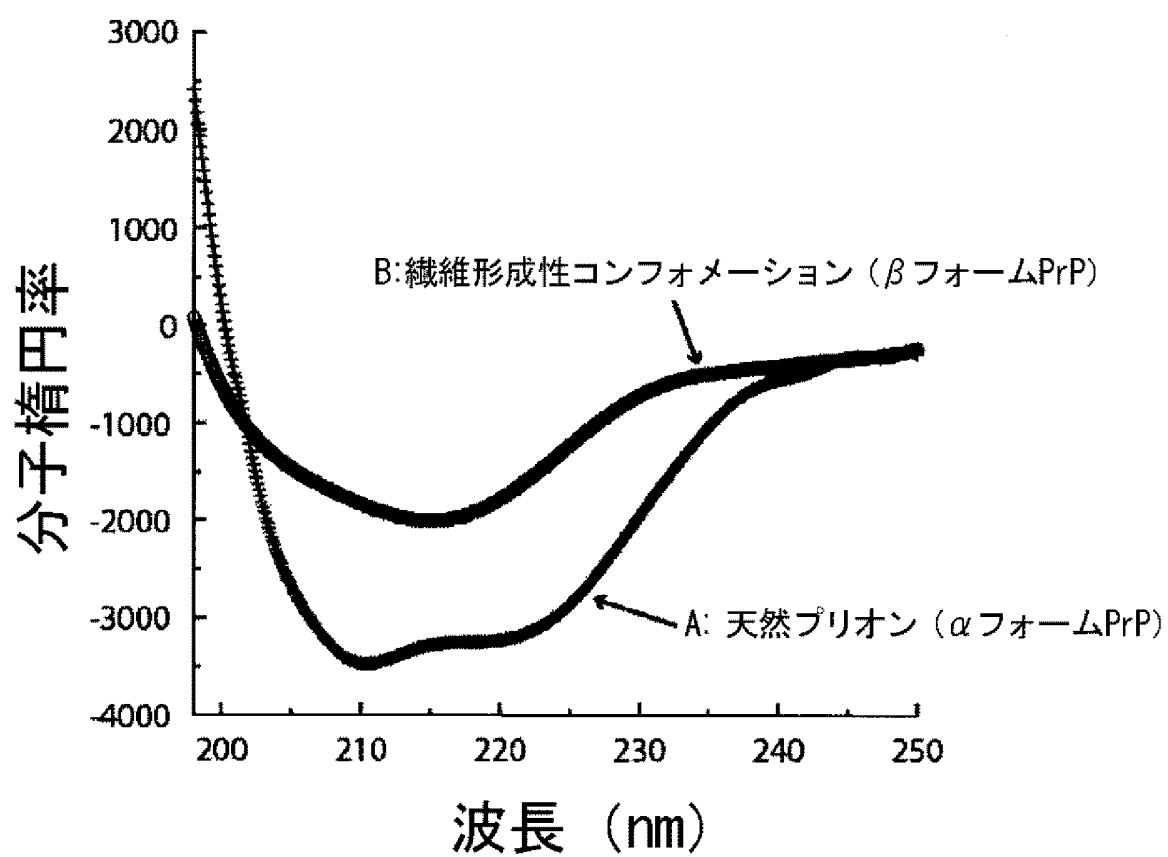
- [12] CDR1～3のアミノ酸配列が、配列番号7～9、配列番号17～19、配列番号27～29、配列番号37～39、配列番号47～49、配列番号57～59、配列番号67～69のいずれかの組み合わせから選択されるアミノ酸配列である請求項11に記載のL鎖可変領域フラグメント。
- [13] 当該L鎖のCDRを含むポリペプチドが、以下の(g)または(h)のポリペプチドである請求項11または12記載のL鎖可変領域フラグメント。
- (g) 配列番号6、16、26、36、46、56または66のいずれか一つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (h) 配列番号6、16、26、36、46、56または66に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、プリオンに対するL鎖可変領域となるポリペプチド。
- [14] 請求項8から10に記載のH鎖可変領域フラグメントと、請求項11から13に記載のL鎖可変領域フラグメントとを連結してなる、プリオンに対するヒト由来の抗体の一本鎖可変領域フラグメント。
- [15] 請求項8から10に記載のH鎖可変領域フラグメント、及び／または、請求項11から13に記載のL鎖可変領域フラグメントに、ヒト由来の抗体定常領域を連結してなる、プリオンに対するヒト由来の抗体またはその抗体フラグメント。
- [16] 当該抗体フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')₂、scAb、またはscFv-Fcである請求項15に記載の抗体フラグメント。
- [17] 請求項1から16のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントとペプチド或いは他のタンパク質と融合させた融合抗体。
- [18] 請求項1から17のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントに修飾剤が結合されてなる修飾抗体。
- [19] 請求項1から17のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントをコードする遺伝子。
- [20] 請求項19に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。
- [21] 請求項19に記載の遺伝子が導入された形質転換体。

- [22] 請求項19に記載の遺伝子を宿主に発現させることによって、ヒト抗プリオン抗体またはその断片を生産する方法。
- [23] 請求項1から16のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項17に記載の融合抗体、または請求項18に記載の修飾抗体を用いた正常型プリオンまたは異常感染型プリオンの検出試薬及び／または診断薬。
- [24] 請求項19に記載の遺伝子を含む遺伝子治療剤。
- [25] 請求項1から18のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントを用いた異常感染型プリオンの増幅抑制剤。
- [26] 請求項1から18のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメントを用いたプリオン病の予防または治療剤。

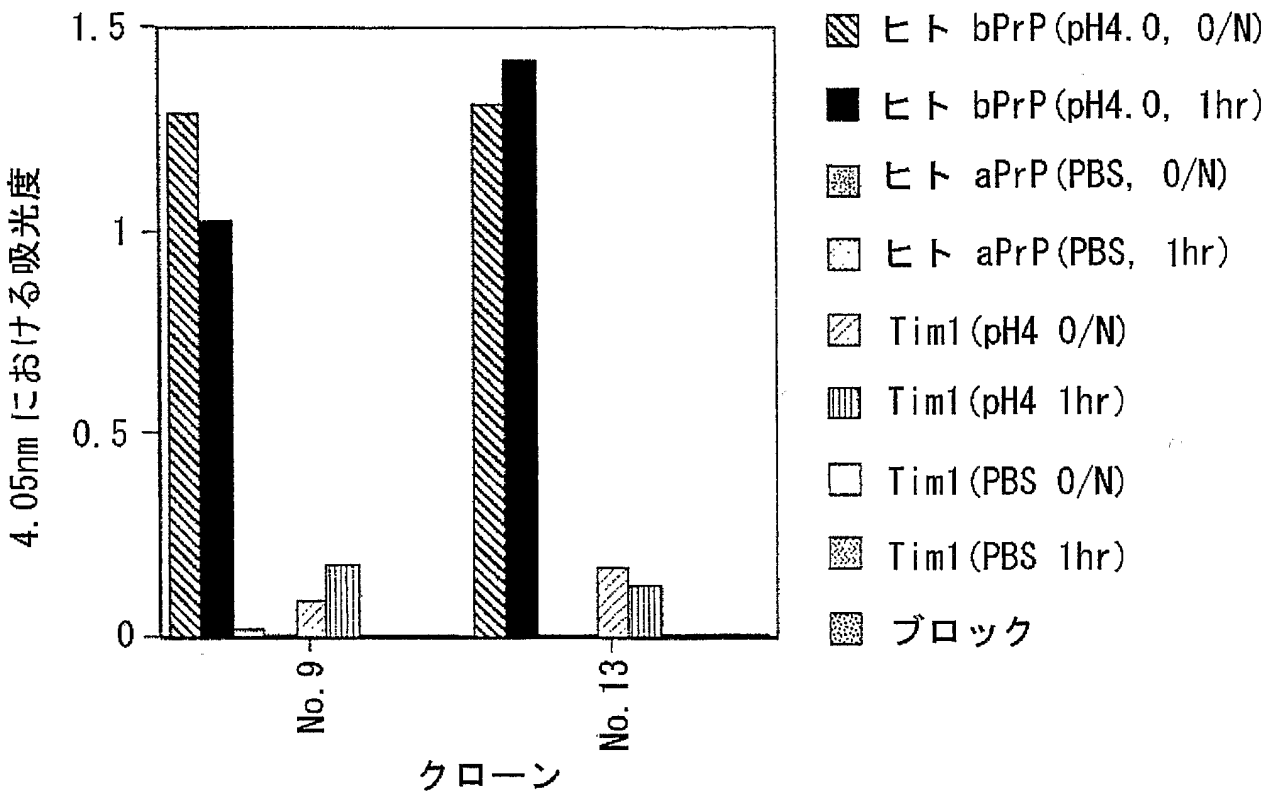
[図1]



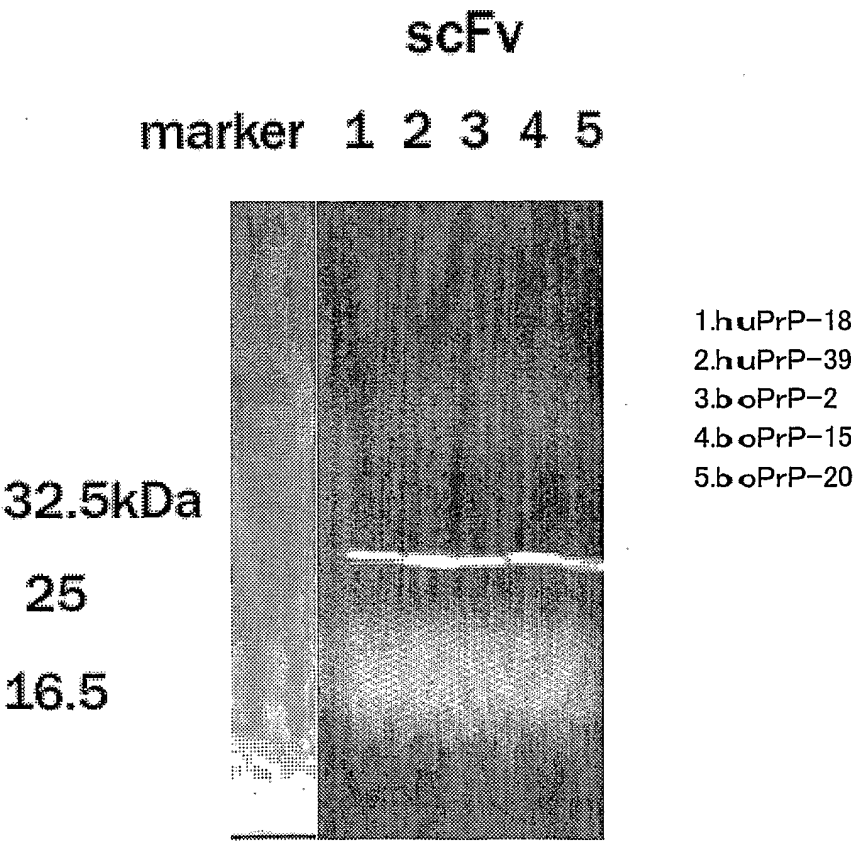
[図2]



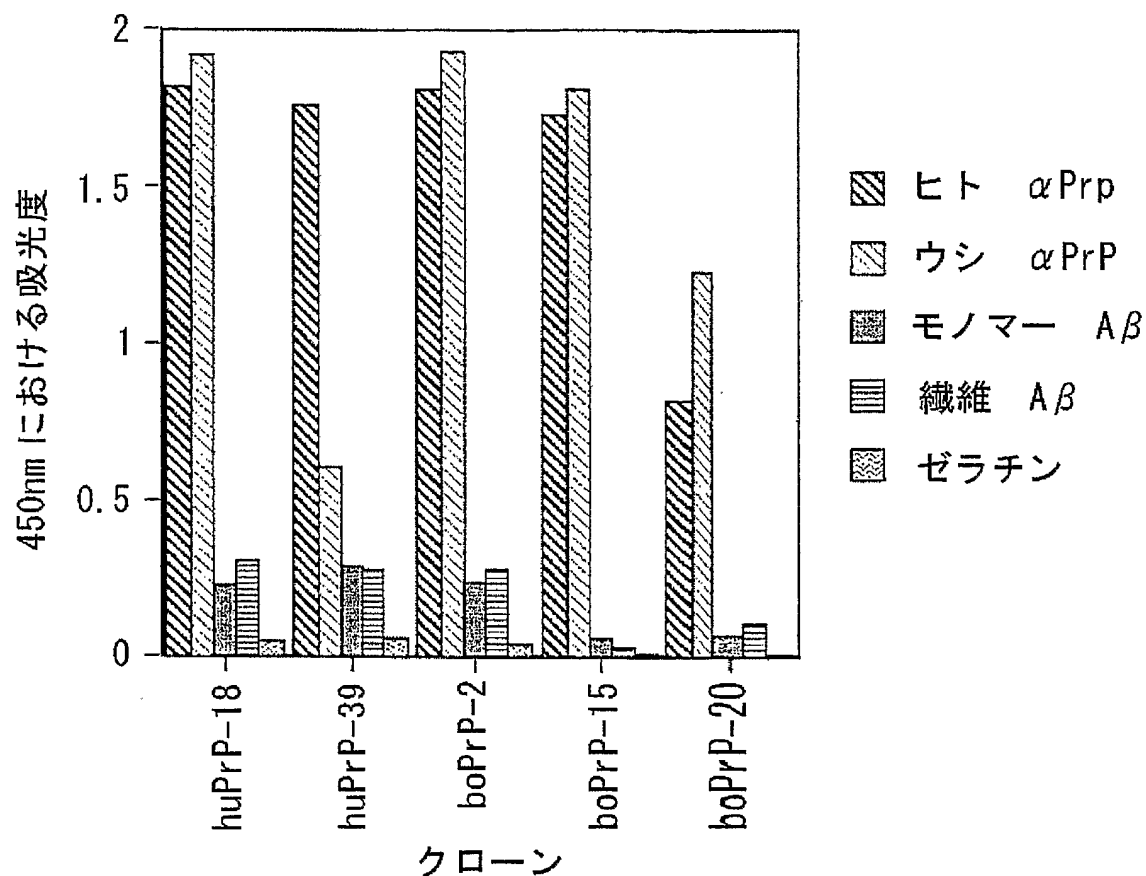
[図 3]



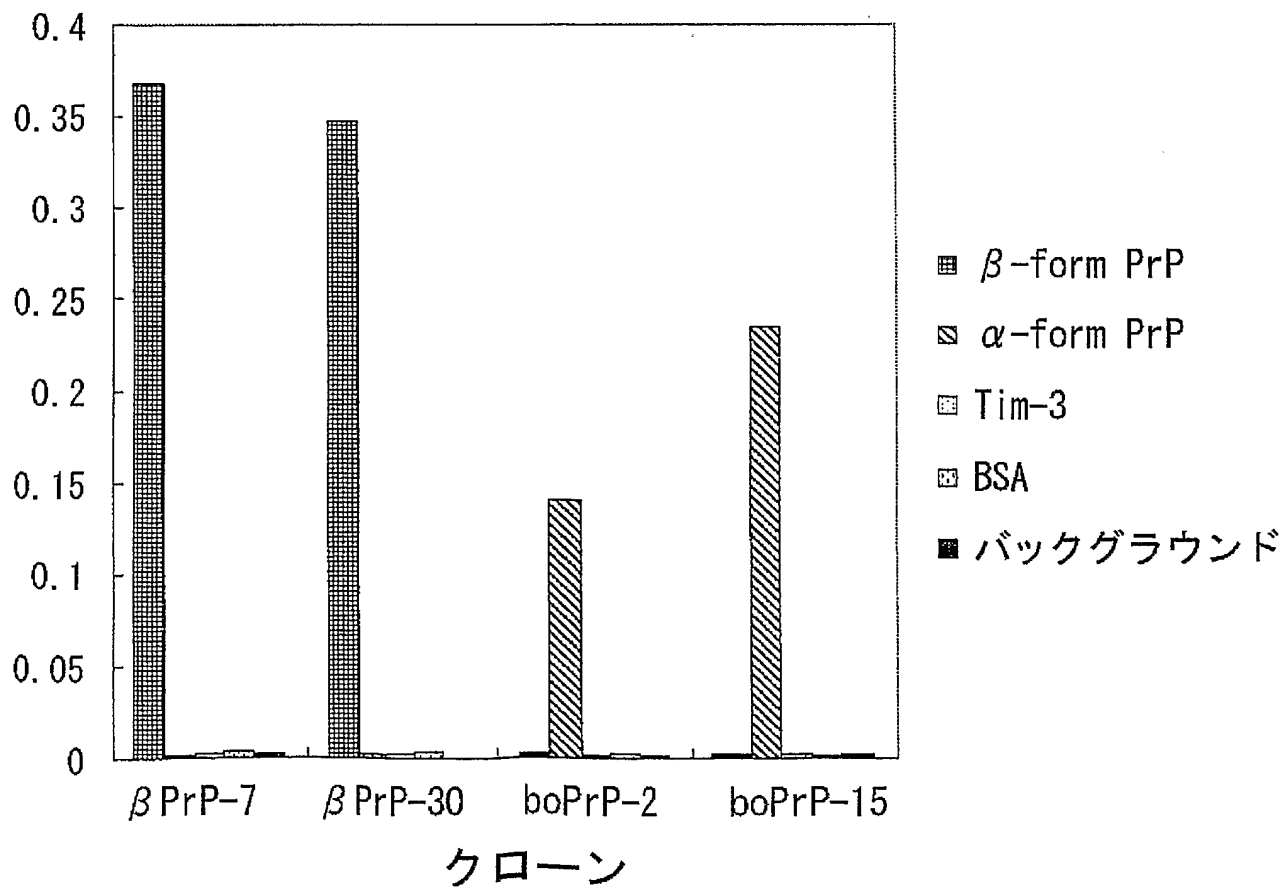
[図 4]



[図 5]

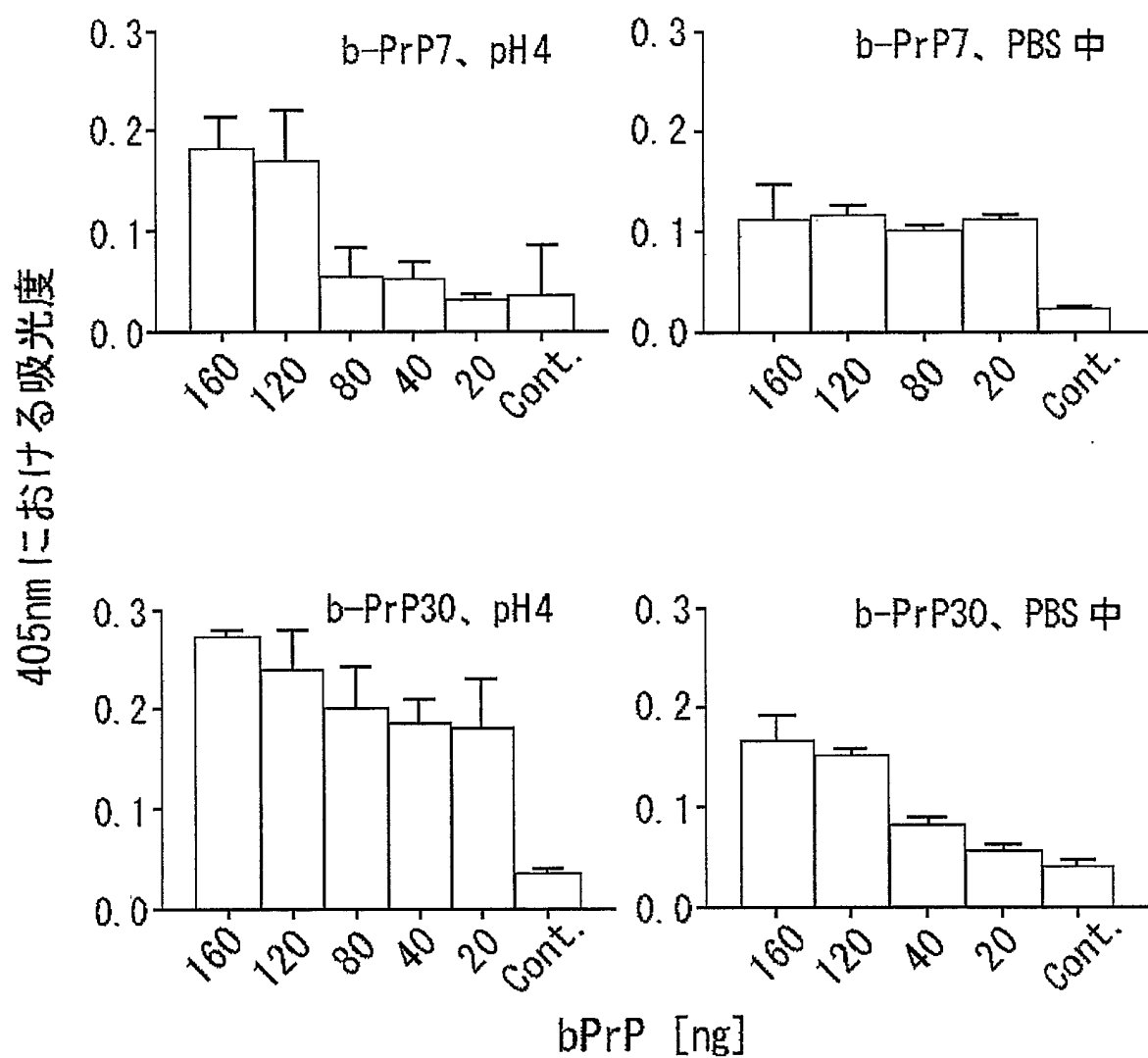


[図 6]



4/4

[図 7]



VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 杉村 和久 SUGIMURA, Kazuhisa は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のよう に開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1(i)	開示の種類:	刊行物
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2004年 08月 25日 (25. 08. 2004)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	第 7 7 回日本生化学会大会発表抄録
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	
VIII-5-1(v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	国内特許又は広域特許のための JP の指定

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07K16/18, A61K38/00, 39/395, 48/00, A61P25/28, 43/00, C12N1/15
1/19, 1/21, 5/10, 15/09, C12P21/08, G01N33/53, 33/577

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)

Int.Cl.⁷ C07K16/18, A61K38/00, 39/395, 48/00, A61P25/28, 43/00, C12N1/15
1/19, 1/21, 5/10, 15/09, C12P21/08, G01N33/53, 33/577

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN), JSTPlus (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C.A. WUERTZER et al., "Single-Chain Antibodies for Viral-Based Passive Immuno-Therapy for Prion Disease: Linear Epitope Mapping and Clearance from Thalamic Injection", Molecular Therapy, May 2004, Vol.9, Supple.1, S208,552	1-26
X Y	LECLERC E. et al., "Selection and characterization of single chain Fv fragments against murine recombinant prion protein from a synthetic human antibody phage display library.", Hum.Antibodies., 2000, Vol.9, No.4, p.207-14	1,2,17-26 1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 September, 2005 (13.09.05)

Date of mailing of the international search report
27 September, 2005 (27.09.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015121

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/033628 A2 (Regents Of The University Of California), 22 April, 2004 (22.04.04), p.1,1.1-4,1.5 & CA 2502281 AA & DE 20320429 U1 & EP 1495324 A2	1-26
Y	JP 2004-002396 A2 (Regents Of The University Of California), 08 January, 2004 (08.01.04), Par. Nos. [0012] to [0024] & US 5846533 A & CA 2231409 AA & EP 1416280 A2	1-26
Y	J.D. MARKS et al., "By-passing Immunization Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage", J.Mol.Biol., 1991, Vol.222, pages 581 to 597	1-26
P,X	ASCIONE A. et al., "Application of a synthetic phage antibody library (ETH-2) for the isolation of single chain fragment variable (scFv) human antibodies to the pathogenic isoform of the hamster prion protein (HaPrPsc).", Hybridoma (Larchmt)., 2005 Jun, Vol.24, No.3, p.127-32, abstract	1-26
A	Kazuhisa SUGIMURA, "Phage Display to Kotai Engineering", DOJIN NEWS, 23 January, 2004 (23.01.04), No.109, page 1 to 7	1-26

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C07K16/18, A61K38/00, 39/395, 48/00, A61P25/28, 43/00, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 15/09, C12P21/08, G01N33/53, 33/577

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C07K16/18, A61K38/00, 39/395, 48/00, A61P25/28, 43/00, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 15/09, C12P21/08, G01N33/53, 33/577

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CAPLUS(STN), JSTPLUS(JOIS)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	C. A. WUERTZER et. al., "Single-Chain Antibodies for Viral-Based Passive Immuno-Therapy for Prion Disease: Linear Epitope Mapping and Clearance from Thalamic Injection" Molecular Therapy, May 2004, Vol. 9, Supple. 1, S208, 552	1-26
X Y	LECLERC E., et. al., "Selection and characterization of single chain Fv fragments against murine recombinant prion protein from a synthetic human antibody phage display library." Hum Antibodies., 2000, Vol. 9, No. 4, p. 207-14.	1, 2, 17-26 1-26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.09.2005

国際調査報告の発送日

27.9.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 晴絵

4N

9739

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2004/033628 A2 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2004. 04. 22 , p. 1, l. 1 - p. 4, l. 5 & CA 2502281 AA & DE 20320429 U1 & EP 1495324 A2	1-26
Y	JP 2004-002396 A2 (ザ レジェンツ オフ ザ ユニバーシティー オフ カリフォルニア) 2004. 01. 08, 【0012】 - 【0024】 段落 & US 5846533 A & CA 2231409 AA & EP 1416280 A2	1-26
Y	J. D. MARKS, et. al., " By-passing Immunization Human Antibodies from V- gene Libraries Displayed on Phage" J. Mol. Biol., 1991, Vol. 222, p. 581-597	1-26
PX	ASCIONE A., et. al., " Application of a synthetic phage antibody library (ETH-2) for the isolation of single chain fragment variable (scFv) human antibodies to the pathogenic isoform of the hamster prion protein (HaPrPsc). " Hybridoma (Larchmt)., 2005 Jun, Vol. 24, No. 3, p. 127-32. abstract	1-26
A	杉村和久, ファージディスプレイと抗体エンジニアリング, DOJIN NEWS, 2004. 01. 23, No. 109, p. 1-7	1-26