

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成21年3月12日 (2009.3.12)

【公表番号】特表2008-528060(P2008-528060A)

【公表日】平成20年7月31日 (2008.7.31)

【年通号数】公開・登録公報2008-030

【出願番号】特願2008-500705(P2008-500705)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 16/12 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z C C A

C 0 7 K 16/12 Z N A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 A

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 43/00 1 1 1

C 1 2 P 21/08

【手続補正書】

【提出日】平成21年1月21日 (2009.1.21)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 9 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 9 4】

代表的に、リンカーは、PCR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1 3 6）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 PCR 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。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 8 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0182】

(B. ベクターの構築)

ベクター pSYN3 を構築するために、1.5 kb のスタッパー (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 E-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 137)) 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、SfiI および NotI を用いて設計し、ゲル濾過し、そして SfiI および NotI に

よって消化した pCANTAB5E にライゲーションした。ライゲーションした DNA を、Escherichia coli TG1 (Gibson、(1991) Studies on the Epstein-Barr virus genome. University of Cambridge、Cambridge、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 scFv を、E. coli のペリプラズムに C 末端 E エピトープタグ (その後ヘキサヒスチジンタグを伴う) を有するネイティブな scFv として分泌させるための SfiI-NotI フラグメントまたは McoI-NotI 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。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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ーニングされる。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択は、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を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s c F v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、B o N T / A H_Cに結合されたs c F v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s c F v (C 2 5およびC 9)を示す。一緒に注入された2種のs c F vの結合された量 (C 9 / C 2 5、点c₂)は、単独で注入されたその2種のs c F v (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s c F v (C 3 9およびC 2 5)を示す。一緒に注入された2種のs c F vの結合された量 (C 2 5 / C 3 9; 点c)は、単独で注入されたその2種のs c F v (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、s c F v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B o N T / Aのs c F v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 B o N T / A (コントロール)、20 pMのB o N T / A + 20 nMのs c F v S 2 5、s c F v C 2 5、s c F v 1 C 6、もしくはs c F v 1 F 3 (それぞれ、エピトープ1~4を代表する)、または各20 nMの最終濃度におけるS 2 5とC 2 5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。s c F v 1 C 6およびs c F v 1 F 3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、s c F v C 2 5およびs c F v S 2 5は、それを顕著に延長する。S 2 5とC 2 5との組み合わせは、C 2 5単独またはS 2 5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、m A bによるインビトロ毒素中和、m A bの対によるインビトロ毒素中和、およびオリゴクロナルA b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m A b (C 2 5、S 2 5、または3 D 1 2)、m A bの対 (C 2 5 + S 2 5、C 2 5 + 3 D 1 2、または3 D 1 2 + S 2 5)、およびオリゴクロナルA b (C 2 5 + 3 D 1 2 + S 2 5) について繰り返された。単一のm A b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。m A bの対は、単一のm A b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5 Aおよび図5 Bは、m A bによるインビボ毒素中和 (図5 A) およびm A bの対によるインビボ毒素中和 (図5 B) を示す。50マイクログラムの全A b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m A b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、m A bの任意の対を与えた場合、生存した。

【図6】図6は、m A bによるインビボ毒素中和、m A bの対によるインビボ毒素中和、およびオリゴクロナルA b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m A b、m A bの対、およびオリゴクロナルA bについて決定された。単一のm A bは、顕著な保護を示さなかった。対照的に、全てのm A b対は、少なくとも100LD₅₀を中和し、最も強力な対 (C 2 5 + 3 D 1 2) 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。オリゴクロナルA bは、よりさらに強力であり、20, 000LD₅₀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。

【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m A b C 2 5およびm A b 3 D 1 2の溶液におけるK_dは、漸増性のB o N T H_C毒素の関数として存在する遊離のA b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C 2 5 m A bと3 D 1 2 m A bとを組み合わせるで、C 2 5 K_dが、100倍より大きく減少した。第3のA b (S 2 5) 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8 Aおよび図8 Bは、可溶性s c F v抗体のE L I S A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 B o N T 血清型、B o N T / A H C および B o N T / A H N を固定化することによって行なわれた。図 8 A : 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 s c F v 抗体は、ペルオキシダーゼ結合体化 m A b 抗 E 抗体 (1 : 2 5 0 0) を用いて検出された。図 8 B : 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 s c F v 抗体は、9 E 1 0 抗体 (1 : 5 0 0) を用い、次いでペルオキシダーゼ結合体化抗マウス F c 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 4 0 5 n m における吸光度として示される。

【図 9】図 9 A および図 9 B は、B o N T / A H C に結合する s c F v 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 s c F v の量。点 b と点 c との間の R U の差は、s c F v と泳動緩衝液との間の屈折率の差に起因する。図 9 A : s c F v 3 A 6 および s c F v 3 D 1 2 は、その 2 種の s c F v が混合された場合に結合された R U 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 9 B : s c F v 2 A 9 および s c F v 2 A 1 は、その 2 種の s c F v が混合された場合に結合された R U 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 1 0】図 1 0 A および図 1 0 B は、B o N T / A H C ドメインを標的とする s c F v 抗体の個々の効果および組み合わせた効果を示す。図 1 0 A : 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、2 0 p M の B o N T / A (コントロール)、2 0 p M の B o N T / A + 2 0 n M のクラスター I のメンバー (3 D 1 2)、クラスター I I のメンバー (3 F 1 0)、C 2 5 または S 2 5 の添加前 (- 3 0 分 ~ 0 分)、および添加後に測定された。s c F v 3 F 1 0 が、5 0 % 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、s c F v C 2 5、s c F v S 2 5 または s c F v 3 D 1 2 は、5 0 % の単収縮減少までの時間を顕著に延長する。図 1 0 B : C 2 5 と、S 2 5 または 3 D 1 2 (クラスター I) との組み合わせは、5 0 % の単収縮減少までの時間を顕著に延長する。

【図 1 1】図 1 1 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、V e c t o r N T I 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 D N A 配列から構築された。

【図 1 2】図 1 2 A および図 1 2 B は、B o N T / A 遺伝子配列の分析を示す。図 1 2 A : B o N T / A 遺伝子の系統樹は、2 つのクラスター (A 1 および A 2) を示す。図 1 2 B : B o N T / A 1 と B o N T / A 2 との間のアミノ酸側鎖の相違のモデル。B o N T / 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。B o N T A 1 毒素と B o N T A 2 毒素との間の側鎖の相違は、緑色で示される。

【図 1 3】図 1 3 は、B o N T / B 遺伝子配列の分析を示す。B o N T / B 遺伝子の系統樹は、4 つのクラスターを示す：B o N T / B 1、B o N T / B 2、非タンパク質分解性 B o N T / B、および二価 B o N T / B。クラスターの間の相違の % は、3 . 6 % ~ 7 . 7 % の範囲である。B o N T / A と同様に、最も大きい相違は、重鎖において見られる。

【図 1 4】図 1 4 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 H C モノクローナル抗体 (C 2 5、B 4、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 1 5】図 1 5 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 1 4 について記載される通りであった。

【図 1 6】図 1 6 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 D ₅₀ の範囲の B o N T / A 1 毒素複合体は、5 0 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 1 7 A】図 1 7 A および図 1 7 B 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 D ₅₀ の範囲の B o N T / A 1 毒素複合体（図 1 7 A）または B o N T / A 2 毒素複合体（図 1 7 B）は、5 0 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 1 7 B】図 1 7 A および図 1 7 B 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 D ₅₀ の範囲の B o N T / A 1 毒素複合体（図 1 7 A）または B o N T / A 2 毒素複合体（図 1 7 B）は、5 0 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 1 8】図 1 8。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 4）、A R 1（配列番号 5）、A R 2（配列番号 6）、A R 3（配列番号 7）、A R 4（配列番号 8）、C R 1（配列番号 9）。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 1 9 A】図 1 9 A および図 1 9 B。変異され、そして選択された抗体についての配列。図 1 9 A：3 D 1 2（配列番号 10）、および R A Z 1（配列番号 11）。図 1 9 B：I N G 1（配列番号 12）、1 D 1 1（配列番号 13）、2 G 1 1（配列番号 14）、5 G 4（配列番号 15）、I N G 2（配列番号 16）。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 1 9 B】図 1 9 A および図 1 9 B。変異され、そして選択された抗体についての配列。図 1 9 A：3 D 1 2（配列番号 10）、および R A Z 1（配列番号 11）。図 1 9 B：I N G 1（配列番号 12）、1 D 1 1（配列番号 13）、2 G 1 1（配列番号 14）、5 G 4（配列番号 15）、I N G 2（配列番号 16）。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 2 0】図 2 0 A および図 2 0 B は、H u C 2 5（図 2 0 A）および 3 D 1 2（図 2 0 B）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 2 1 - 1】図 2 1 A ~ 図 2 1 D 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 2 1 A：H u C 2 5 および A R 1；図 2 1 B：A R 1 および A R 2；図 2 1 C：A R 2 および A R 4；図 2 1 D：3 D 1 2 および R A Z 1。

【図 2 1 - 2】図 2 1 A ~ 図 2 1 D 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 2 1 A：H u C 2 5 および A R 1；図 2 1 B：A R 1 および A R 2；図 2 1 C：A R 2 および A R 4；図 2 1 D：3 D 1 2 および R A Z 1。

【図 2 2】図 2 2 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 2 3】図 2 3 A および図 2 3 B 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 2 3 A：1 0 0 マウス L D ₅₀ チャレンジ。図 2 3 B：2 0 0 マウス L D ₅₀ チャレンジ。

【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 ₅₀ チャレンジ。図 2 4 B：5 0 0 0 マウス L D ₅₀ 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 7）、A R 1（配列番号 1 8）、A R 2（配列番号 1 9）、A R 3（配列番号 2 0）、A R 4（配列番号 2 1）、C R 1（配列番号 2 2）、および C R 2（配列番号 2 3））のアライメントを示す。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2008528060000001.app