

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年8月6日(06.08.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/115331 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 15/02 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/051856
- (22) 国際出願日: 2015年1月23日(23.01.2015)
- (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 2014-014911 2014年1月29日(29.01.2014) JP
- (71) 出願人: 一般財団法人化学及血清療法研究所
(THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊本市北区
大窪一丁目6番1号 Kumamoto (JP). 国立大学法
人 熊本大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPOR-
ATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒
8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目3番
1号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者: 細井 亜樹彦(HOSOI, Akihiko); 〒8691298
熊本県菊池市旭志川辺1314番地1 一般財
団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内
Kumamoto (JP). 鳥飼 正治(TORIKAI, Masaharu);
〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314番地
1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研
究所内 Kumamoto (JP). 竹尾 智予(TAKEO, To-
moyo); 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314
番地1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊
池研究所内 Kumamoto (JP). 上野 真代(UENO,
Masayo); 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺131
4番地1 一般財団法人化学及血清療法研究所
菊池研究所内 Kumamoto (JP). 樋口 浩文(HIGU-
CHI, Hirofumi); 〒8691298 熊本県菊池市旭志川
辺1314番地1 一般財団法人化学及血清療法
研究所菊池研究所内 Kumamoto (JP). 副島 見事
(SOEJIMA, Kenji); 〒8691298 熊本県菊池市旭志
川辺1314番地1 一般財団法人化学及血清療
法研究所菊池研究所内 Kumamoto (JP). 中島 敏
博(NAKASHIMA, Toshihiro); 〒8691298 熊本県菊池

市旭志川辺1314番地1 一般財団法人化学
及血清療法研究所菊池研究所内 Kumamoto (JP).
安東 由喜雄(ANDO, Yukio); 〒8608555 熊本県熊
本市中央区黒髪二丁目3番1号 国立大学法
人熊本大学内 Kumamoto (JP). 城野 博史(JONO,
Hirofumi); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二
丁目3番1号 国立大学法人熊本大学内
Kumamoto (JP). 蘇 宇(SU, Yu); 〒8608555 熊本県熊
本市中央区黒髪二丁目3番1号 国立大学法
人熊本大学内 Kumamoto (JP).

- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.);
〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅
田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所
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, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: ANTI-TRANSTHYRETIN HUMANIZED ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗トランスサイレチンヒト化抗体

(57) Abstract: A humanized antibody including an H chain complementarity determining region comprising an amino acid sequence shown by SEQ ID NOS: 1-3 and an L chain complementarity determining region comprising an amino acid sequence shown by SEQ ID NOS: 4-6. This humanized antibody is suited to use in humans, and exhibits activity for binding specifically to trans-thyretin (TTR) which has undergone a structural change and activity for inhibiting fibrosis of TTR.

(57) 要約: 配列番号1~3で示されるアミノ酸配列からなるH鎖の相補性決定領域と、配列番号4~6で示されるアミノ酸配列からなるL鎖の相補性決定領域とを含む、ヒト化抗体。本発明のヒト化抗体は、構造変化を起こしたトランスサイレチン(TTR)へ特異的に結合する活性やTTRの線維化を阻害する活性を有し、人体への適用に適したヒト化抗体である。



WO 2015/115331 A1

明 細 書

発明の名称：抗トランスサイレチンヒト化抗体

技術分野

[0001] 本発明は、トランスサイレチン（TTR: transthyretin）のアミロイド線維の形成や組織への沈着を効果的に抑制する抗体ならびに、当該抗体を用いた治療法を提供する。本抗体療法は、正常型TTRには作用せず、異常型TTRのアミロイド形成のみを抑えるという新たな治療戦略に基づくものであり、安全性に優れた新規治療法になりうると期待される。

背景技術

[0002] アミロイドーシスは、線維構造を形成したタンパク質が全身の臓器に沈着することによって機能障害を引き起こす一連の疾患群であり、アルツハイマー型認知症やプリオン病などの様々な疾患が含まれる（非特許文献1）。

[0003] 家族性アミロイドポリニューロパチー（Familial Amyloidotic Polyneuropathy: FAP）は、TTR、アポリポタンパク質A1、ゲルソリンなどの遺伝子の点変異や欠失が原因となって起こる常染色体優性の遺伝性全身性アミロイドーシスである（非特許文献2）。この中で、TTRの遺伝的な変異によって起こるFAPが最も多い。変異型のTTRがアミロイド線維を形成し、通常、中年期以降に末梢神経や心臓、腎臓、消化管、眼、脳、髄膜といった、ほぼ全身の組織に沈着して機能不全を起こすことが知られている。患者の予後は非常に悪く、発症から10年程度で死に至る難病である。

[0004] 現在までに100を超えるTTR遺伝子の点変異や欠失が報告されている。中でも、TTRの30番目のバリンがメチオニンに変異したVal30Met変異（以下V30Mのように表記）が最も多く、患者はポルトガル、スウェーデン、日本に多い。ポルトガルに6,000人以上のFAP患者が確認されていること、未だFAPが調べられていないと考えられる地域も少なくなく、今後もFAP患者群の世界的な発見が続くことが予想されていることから、全世界には1万人をゆうに上回る患者がいると考えられている。最近の研究から、FAPの臨床像（発症年齢や沈着

臓器特異性など)はTTR遺伝子の変異の種類に大きく影響されることがわかってきている(非特許文献3)。例えばFAPの発症年齢に関しては、L55P変異は10代に発症する劇症型の臨床像をきたすが、V122I変異は60歳以降に発症する。一方でV30M変異では、若年で発症する病型と高齢で発症する病型の両方が存在することが知られている。沈着する臓器の特異性に関しては、D18G変異は脳や髄膜に沈着して中枢神経障害を引き起こす一方で、V30M変異は全身の組織に沈着し、末梢神経障害や心筋障害を引き起こす(非特許文献3、4)。

[0005] TTRは、127個のアミノ酸からなる分子量14 kDaのタンパク質であり、内部に存在する8つの β -ストランドが2つの逆平行 β -シートを形成した構造を有する(非特許文献5) TTRの主な産生場所は肝臓であるが、脳室脈絡叢、網膜の網膜色素上皮細胞、脾臓などにおいても産生されている。TTRは通常、血中で分子量55 kDaの四量体を形成して安定な構造をとり、主に血中および髄液中で、ビタミンA-レチノール結合タンパク質複合体、および甲状腺ホルモンT₄の輸送担体として機能している。その血中濃度は200-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と高いものの、半減期は2日と短い(非特許文献2~6)。TTR四量体の中心部には2つの相同なT₄結合部位が存在し、T₄が結合することにより四量体構造は安定化されることが知られている(非特許文献3)。その他の機能として、インスリン分泌促進作用、脳神経保護作用、脂質代謝に関わる作用など様々な報告がなされている(非特許文献2)。一方で、TTR遺伝子をノックアウトしたマウスでは、血中のレチノールや甲状腺ホルモン濃度は低下するものの、生存率や繁殖能といった表現型に大きな変化は見られなかったことから(非特許文献7)、TTRが実際の生命活動の維持において直接必須なものであるかどうかは不明なままである。

[0006] TTRのアミロイド形成には、四量体から単量体への解離と、単量体の構造変化が非常に重要なステップである(非特許文献3)。中でも、四量体から単量体への解離が反応の律速段階であることが明らかにされている。一方、TTRがアミロイドを形成して組織に沈着し、全身の臓器に障害を及ぼす過程で、

組織に対して毒性を発揮する分子形態は完全には明らかにされていない。単量体、二量体などの低分子量オリゴマーが細胞毒性を有し、一方で100 kDa以上のTTRアミロイドは細胞毒性を有していないという報告もあり（非特許文献5）、毒性と分子形態との関連性の解明が待たれる。

[0007] TTRの遺伝子異常に起因するFAPの治療戦略は主に以下の4種類に分類される。

- (1) 変異型TTRの産生レベルを抑制する
- (2) 変異型TTRを含むTTR四量体構造を安定化させる
- (3) 四量体から解離したTTRのアミロイド化を阻止する
- (4) 組織に沈着したTTRアミロイドを除去する

[0008] 血中TTRのほとんどが肝臓で産生されることから（非特許文献2）、この中で現在最も一般的な治療法は（1）に分類される肝移植である。肝移植を行うことで病態進行の遅延が見られるものの、免疫抑制剤を終生使用しなければならず、ドナーや患者への負担も大きい。更に、眼や心臓を含むいくつかの臓器での沈着は継続するため、これら臓器の症状が増悪する例が少なくないなど（非特許文献8）、問題点も多く、有効な治療法の開発が切望されている。

[0009] 肝移植以外の治療法として、（1）の戦略では、siRNAやアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた治療法が臨床開発段階にあるが、いずれも変異型のみならず野生型TTRの産生も抑制してしまうため、長期にわたり使用した場合の安全性の評価は慎重になされるべきであろう。（2）の戦略では、TTR四量体のT4結合部位に結合することで四量体構造を安定化させる薬剤が開発されている。同戦略で開発された新薬Vyndaque^l®が2011年にEUで、2013年には日本国内で承認された。30ヵ月に及ぶ臨床試験の結果、Vyndaque^l®はFAP患者の末梢神経障害を遅らせる効果を示しているものの、症状の進行を完全に抑えるには至っていない（非特許文献9）。その他（3）や（4）の戦略においても、複数種類の薬剤が臨床開発段階にあるものの、いずれの治療法も根治療法にはなりえていないのが現状である。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：国際公開W02010030203号公報

特許文献2：国際公開W003004647号公報

特許文献3：特許公開2010-195710号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Glenner, G.G.: Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-amyloid fibrilloses (second of two parts).: N Engl J Med, 302:1333-1343, 1980

非特許文献2：Ando, Y. & Jono, H.: Pathogenesis and therapy for transthyretin related amyloidosis.: Rinsho Byori, 56:114-120, 2008

非特許文献3：関島良樹：TTRアミロイド沈着の分子機構とその制御.: 医学のあゆみ, 229:349-356, 2009

非特許文献4：本崎裕子, 山田正二：家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の分子疫学.: 医学のあゆみ, 229:357-362, 2009

非特許文献5：Hou, X., Aguilar, M.I. & Small, D.H.: Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration.: FEBS J, 274:1637-1650, 2007

非特許文献6：Araki, S. & Ando, Y.: Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy -Progress in Kumamoto, Japan (1967-2012)-.: Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 86:694-706, 2010

非特許文献7：Episkopou, V., Maeda, S., Nishiguchi, S., Shimada, K., Gaitanaris, G.A., Gottesman, M.E. & Robertson, E.J.: Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone.: Proc Natl Acad Sci U S A, 90:2375-2379, 1993

非特許文献8：安東由喜雄：家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)の肝

移植とその他の治療.: 医学のあゆみ, 229:363-368, 2009

非特許文献9 : Said, G., Gripon, S. & Kirkpatrick, P.: Tafamidis.: Nat Rev Drug Discov, 11:185-186, 2012

非特許文献10 : Goldsteins, G., Persson, H., Andersson, K., Olofsson, A., Dacklin, I., Edvinsson, A., Saraiva, M.J. & Lundgren, E.: Exposure of cryptic epitopes on transthyretin only in amyloid and in amyloidogenic mutants.: Proc Natl Acad Sci U S A, 96:3108-3113, 1999

非特許文献11 : Terazaki, H., Ando, Y., Fernandes, R., Yamamura, K., Maeda, S. & Saraiva, M.J.: Immunization in familial amyloidotic polyneuropathy: counteracting deposition by immunization with a Y78F TTR mutant.: Lab Invest, 86:23-31, 2006

非特許文献12 : Bergstroem, J., Engstroem, U., Yamashita, T., Ando, Y. & Westermark, P.: Surface exposed epitopes and structural heterogeneity of in vivo formed transthyretin amyloid fibrils.: Biochem Biophys Res Commun, 348:532-539, 2006

非特許文献13 : Episkopou, V., Maeda, S., Nishiguchi, S., Shimada, K., Gaitanaris, G.A., Gottesman, M.E. & Robertson, E.J.: Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone.: Proc Natl Acad Sci U S A, 90:2375-2379, 1993.

非特許文献14 : Matsubara, K., Mizuguchi, M. & Kawano, K.: Expression of a synthetic gene encoding human transthyretin in Escherichia coli.: Protein Expr Purif, 30:55-61, 2003.

非特許文献15 : Ueda, M., Ando, Y., Hakamata, Y., Nakamura, M., Yamashita, T., Obayashi, K., Himeno, S., Inoue, S., Sato, Y., Kaneko, T., Takamune, N., Misumi, S., Shoji, S., Uchino, M. & Kobayashi, E.: A transgenic rat with the human ATTR V30M: a novel tool for analyses of ATTR metabolisms.: Biochem Biophys Res Commun, 352:299-304, 2007.

非特許文献16 : Senju, S., Haruta, M., Matsumura, K., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Ikeda, T., Takamatsu, K., Irie, A. & Nishimura, Y.: Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy.: Gene Ther, 18:874-883, 2011.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 近年、免疫療法によるFAPの治療に注目が集まっている。TTRアミロイドが形成される過程で、TTRの構造変化に伴って新たなエピトープ（クリプティックエピトープ、Cryptic Epitope）が分子表面に露出することが明らかになってきた（非特許文献10）。

[0013] そこでTerazakiらは、Cryptic Epitopeの露出する変異として知られていたTTR Y78F変異体で、FAPのモデル動物であるヒトTTR V30M トランスジェニックマウス（hTTR Tgマウス）を免疫し、マウス組織へのTTRアミロイド沈着に対する影響を評価した（非特許文献11）。その結果、TTR Y78F変異体で免疫したマウス群で、有意に抗TTR抗体の抗体価の上昇が確認され、それに伴って食道、胃および腸におけるTTR沈着量の減少が見られた。また、既にTTR沈着が見られる生後18ヵ月齢のhTTR Tgマウスを用いた同様の試験においても、Y78F免疫群で有意にTTRアミロイド沈着量の減少が見られた。以上の結果から、Cryptic Epitopeが露出するTTR変異体でマウスを免疫することにより、TTRに対する抗体がマウス体内で産生され、その結果TTRアミロイドの沈着が抑制された可能性が示唆された。

[0014] 一方でBergstroemらは、Cryptic Epitopeの1つであるTTR 115-124部位のペプチドでウサギを免疫し、抗TTR115-124 ポリクローナル抗体を調製した（非特許文献12）。このポリクローナル抗体をhTTR V30Mトランスジェニックラットに投与し、ラット組織へのTTR沈着に及ぼす影響を評価したところ、ラット腸管におけるTTRの沈着量は、ポリクローナル抗体を投与した群で有意に減少していた（特許文献3）

[0015] これらの結果から、TTRのCryptic Epitopeを特異的に認識する抗体が、TTR

アミロイド（あるいはTTRアミロイドを構成する、構造変化を起こしたTTR）に特異的に結合し、TTRアミロイドの、形成阻害または除去の促進をしている可能性が考えられる。つまり、TTRのCryptic Epitopeを特異的に認識する抗体は、FAPの新規治療薬になりうる可能性が示唆される。

[0016] こうしたコンセプトに基づく抗TTR抗体の研究は、BIOCODEX社により報告されている。同社はアミロイド形成性のTTRに特異的なマウスモノクローナル抗体AD7F6を、TTRノックアウトマウスを用いて作製し、FAP病態モデルであるTgマウス（ATTR V30M）を用いてTTRの組織沈着を抑制することを示した（特許文献1）。BIOCODEX社の特許はマウス抗体のアミノ酸配列をクレームしており、ヒトへの投与は困難である。また、本抗体に関しては、四量体構造をとったV30M変異体に対する反応性の有無については明言されていない。V30M変異を有するFAP患者においては、血中に存在するV30M変異体は四量体構造をとっているが、単量体に解離後その一部が構造変化を起こしてアミロイドを形成すると考えられている。よって、四量体構造をとったV30M変異体には反応せず、アミロイド化した（或いはアミロイドを形成する途中段階の）V30M変異体にのみ反応する抗体であることが、より効果的で安全な抗体療法を実現する上では必要な要件と考えられる。また、本抗体の反応性については、臨床サンプルとしてはV30Mキャリアの血清を用いているのみであるため、患者の体内に存在する組織沈着性のアミロイドとの反応性は不明である。

[0017] 同様なコンセプトに基づく抗TTR抗体の研究は、ポルトガルのPorto大学のグループからも報告されている（非特許文献10）。構造変化を起こしたTTRに特異的なマウスモノクローナル抗体mAb 39-44及びmAb 56-61を作製したこと、これらが生体由来のV30M変異体のアミロイドと反応することが報告されている。しかし、これらはアミロイド形成に対して阻害作用を示さなかったことが明記されており、FAPの診断に利用できる可能性について言及されているのみである。

[0018] 上述のように、TTRのCryptic Epitopeをマウス（又はラット）へ免疫して得られたポリクローナル抗体やモノクローナル抗体が、TTRの沈着を抑制する

ことは報告されているが、構造変化を起こしたTTRへ特異的に結合する活性、TTRの線維化を阻害する活性を有する抗体や、人体への投与に適したヒト化抗体やヒト抗体は報告されていない。

課題を解決するための手段

[0019] 本発明者らは、TTRアミロイドーシスでは、一部の四量体TTRが単量体へ解離後、単量体TTRが構造変化を起こし、アミロイドを形成する、その一方で、正常に機能する四量体TTRも存在すると考えた。そこで、本発明者らは、構造変化を起こしたTTRへ特異的に結合し、TTRの線維化を阻害する活性を有する抗体について検討を行った。また、最終的にTTRアミロイドーシスに対する抗体医療を目標として、上記の活性を有するヒト化抗体について鋭意検討を重ね、本発明を完成させるに至った。

[0020] すなわち、本発明は、

- (1) トランスサイレチン (T T R) の線維化を阻害する活性を持つヒト化抗体；
- (2) 構造変化を起こしたT T Rを特異的に認識する、(1)に記載のヒト化抗体；
- (3) T T Rアミロイドと特異的に結合する、(1)又は(2)に記載のヒト化抗体；
- (4) 2種類以上の変異T T Rに由来するT T Rアミロイドと結合する、(1)から(3)のいずれか一項に記載のヒト化抗体；
- (5) 変異T T Rが、D 1 8 G、V 3 0 M、E 5 4 K、L 5 5 P、Y 1 1 4 C、Y 1 1 6 SおよびV 1 2 2 Iからなる群から選択される変異を有するT T Rである、(4)に記載のヒト化抗体；
- (6) T T Rアミロイドの除去を促進する、(1)から(5)のいずれか一項に記載のヒト化抗体；
- (7) T T Rアミロイドに対するマクロファージ貪食能を促進する、(1)から(6)のいずれか一項に記載のヒト化抗体；
- (8) エピトープがT T Rの1 1 8位から1 2 2位を含む配列である、(1

) から (7) いずれか一項に記載のヒト化抗体；

(9) エピトープが TTR の 118 位から 122 位である、(8) に記載のヒト化抗体；

(10) TTR アミロイドーシスに対する治療効果及び／又は予防効果を有する、(1) から (9) のいずれか一項に記載のヒト化抗体；

(11) TTR アミロイドーシスが家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) である、(10) に記載のヒト化抗体；

(12) TTR アミロイドーシスが老人性全身性アミロイドーシス (SSA) である、(10) に記載のヒト化抗体；

(13) 以下の (a) 又は (b) のポリペプチドからなる H 鎖の相補性決定領域と、(c) 又は (d) のポリペプチドからなる L 鎖の相補性決定領域とを含む、(1) から (12) のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

(a) 配列番号 1～3 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号 1～3 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、TTR に対する H 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

(c) 配列番号 4～6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号 4～6 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、TTR に対する L 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド；

(14) 以下の (e) 又は (f) のポリペプチドからなる H 鎖可変領域と、

(g) 又は (h) のポリペプチドからなる L 鎖可変領域とを含む、(1) から (13) のいずれか一項に記載のヒト化抗体

(e) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、TTR に対する H 鎖可変領域となるポリペプチド。

(g) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する L 鎖可変領域となるポリペプチド；

(15) 以下の (a) 又は (b) のポリペプチドからなる H 鎖の相補性決定領域を含む H 鎖可変領域断片

(a) 配列番号 1～3 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 1～3 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する H 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド；

(16) 以下の (c) 又は (d) のポリペプチドからなる L 鎖の相補性決定領域を含む L 鎖可変領域断片

(c) 配列番号 4～6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(d) 配列番号 4～6 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する L 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド；

(17) 以下の (e) 又は (f) のポリペプチドからなる、H 鎖可変領域断片

(e) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する H 鎖可変領域となるポリペプチド；

(18) 以下の (g) 又は (h) のポリペプチドからなる、L 鎖可変領域断片；

(g) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(h) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する L 鎖可変領域となるポリペプチド；

(19) (15) に記載の H 鎖の相補性決定領域を含む H 鎖可変領域断片ま

たは（１７）に記載のＨ鎖可変領域断片と、（１６）に記載のＬ鎖の相補性決定領域を含むＬ鎖可変領域断片または（１８）に記載のＬ鎖可変領域断片とを連結してなる、ＴＴＲに対する抗体の１本鎖可変領域断片；

（２０）（１５）に記載のＨ鎖の相補性決定領域を含むＨ鎖可変領域断片または（１７）に記載のＨ鎖可変領域断片、及び／又は、（１６）に記載のＬ鎖の相補性決定領域を含むＬ鎖可変領域断片または（１８）に記載のＬ鎖可変領域断片に、ヒト由来の定常領域を連結してなる、（１）から（１２）に記載のヒト化抗体又はその断片；

（２１）（１）から（２０）のいずれか一項に記載の抗体又はその断片をコードする遺伝子；

（２２）（２１）に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター；

（２３）（２１）に記載の遺伝子又は（２２）に記載の発現ベクターが導入された形質転換体；

（２４）（１）から（２０）のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む、ＴＴＲアミロイドを検出する器具；

（２５）（１）から（２０）のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む、ＴＴＲアミロイドを除去する担体；

（２６）（１）から（２０）のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む、ＴＴＲアミロイドを検出する試薬；

（２７）（１）から（２０）のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む、ＴＴＲアミロイドーシス診断薬；

（２８）ＴＴＲアミロイドーシスが家族性アミロイドポリニューロパチー（ＦＡＰ）である、（２７）に記載の診断薬；

（２９）ＴＴＲアミロイドーシスが老人性全身性アミロイドーシス（ＳＳＡ）である、（２７）に記載の診断薬；

（３０）（１）から（２０）のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む、ＴＴＲの線維化阻害剤；

（３１）（１）から（２０）のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む

む、TTRアミロイドーシスを予防及び／又は治療するための医薬組成物；
（32）TTRアミロイドーシスが家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）である、（31）に記載の医薬組成物；
（33）TTRアミロイドーシスが老人性全身性アミロイドーシス（SSA）である、（31）に記載の医薬組成物
に関する。

発明の効果

[0021] 本発明者らは、構造変化を起こしたTTRを特異的に認識するモノクローナル抗体を創出し、FAPの治療を可能にする抗体医薬開発への道を開くことに成功した。本発明の抗体は、TTRのアミロイド線維の形成や組織への沈着を効果的に抑制し、更に血中で機能する正常なTTRとは反応しないことから、安全性に優れた抗体医薬となることが期待される。また、作用メカニズムとして、（1）TTRのアミロイドの形成と組織沈着を抑制する、更には、（2）組織に沈着しているTTRアミロイドにも作用してクリアランスを促す、すなわち、一旦蓄積したアミロイドを減少させる、という2つの効果を期待することができる。そのような効果は、従来技術や先行開発品では成しえないものであり、TTRアミロイドーシスに対する新規治療戦略としての本抗体療法に期待が持たれる。

[0022] 本発明の抗体は、上述のとおり、FAPに対して肝移植以外の新たな治療法を提供することが期待出来るだけでなく、老人性全身性アミロイドーシス（SSA）治療薬としての可能性も有する。TTRアミロイドーシスには、TTR遺伝子の変異が原因となって起こるFAPの他にも、野生型TTRが主に心臓にアミロイド沈着を起こすことにより発症するSSAが知られている。心臓におけるアルツハイマー病とも位置付けられている。アミロイド沈着は肺や血管壁、腎髄質などにも認められる。患者は、無症状であるか、心症状（緩徐進行性の心不全）を呈することが多く、手根管症候群を呈することもある。60歳代から発症が認められ、80歳以上ではおよそ4人に1人が発症しているとも言われている。米国のみで40万人を超える患者推計値も報告されている。本疾患にも有

効な治療法は確立されていない。本発明の抗体は野生型TTRの線維化を阻害する活性を有するため、SSAへの適用も期待される。

[0023] 本抗体製剤にはFAPのみならずTTRに起因する各種臓器に対するアミロイド形成性の疾患への適用が期待され、現在治療方法がない多くのこれらの疾患患者への治療貢献ができるものと期待される。

図面の簡単な説明

[0024] [図1] (a) マウスT24抗体H鎖発現ベクターpKMA010-T24-mCg1、および (b) マウスT24抗体L鎖発現ベクターpKMA009-T24-mCkのマップを示す。

[図2] エピトープ解析の結果を示す。

[図3] 表面プラズモン共鳴法を用いた反応特異性解析の結果を示す。(a) はRT24抗体、(b) はDako社製ポリクローナル抗体、(c) は陰性コントロール抗体での結果をそれぞれ示す。

[図4] 患者血清への反応性解析の結果を示す。

[図5a] 患者組織への反応性解析の結果を示す(パラフィン切片)。

[図5b] 患者組織への反応性解析の結果を示す(凍結切片)。

[図6] TTR線維への反応性解析の結果を示す。(a) は銀染色、(b) はウエスタンブロッティングの結果をそれぞれ示す。

[図7] TTR線維化阻害試験の結果を示す。(a) はRT24抗体、(b) はRT24-a抗体およびRT24-b抗体の結果をそれぞれ示す。

[図8] マクロファージ貪食能試験の結果を示す。(a) は未処理の精製V30M、(b) はTTR線維での結果をそれぞれ示す。

[図9] V30M Tgラットを用いた薬効評価試験の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0025] 本発明の具体的態様について説明すれば、以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

1. 本発明の抗体およびその断片

本発明では、TTRの115-124位は正常型(四量体)TTRでは分子表面に出ていないが、TTRが線維化した場合に表面に露出してくることに着目し、TTR115-1

24を抗体作製の抗原として選択し、当該抗原をTTRノックアウトマウスへ免疫した後にマウス抗体を作製し、マウス抗体のアミノ酸配列をヒト化することでヒト化抗体を作製した。

[0026] TTR115-124を作製する方法は、化学合成でもよく、大腸菌などで発現させたものを精製してもかまわない。後者の場合には、ヒトTTRの塩基配列を鋳型として、115-124に相当する塩基配列が増幅されるよう設計したプライマーDNAを用いて、当該塩基配列を増幅する。そして、発現ベクターへ組み込んで、宿主（大腸菌など）へ導入する。宿主を用いてTTR115-124を発現させた後に精製し、抗原とする。化学合成や発現法で得られたTTR115-124は、担体タンパク質（KLH、BSAなど）と結合させた後にマウスへ免疫しても構わない。担体タンパク質を結合させる方法としては、Immunogen EDC Kit with mcKLH and BSA(Thermo)を用いた方法が例示される。TTR115-124は担体タンパク質へ一分子結合させても、二分子以上結合させても構わない。TTR115-124を担体タンパク質に結合される部位は、N末、C末、分子内のいずれの部位であっても構わない。

[0027] 次に、マウス抗体を作製する方法を例示する。TTR115-124をTTRノックアウトマウスへ免疫する。TTRノックアウトマウスは、非特許文献13に記載された方法で作製しても構わない。TTR115-124を免疫する回数は2回以上が好ましく、各免疫は3週間程度空けることが好ましい。免疫回数や期間は、TTRに対する抗体価の上昇程度を確認しながら、適宜変更しても構わない。そして、マウスの脾臓から抗体産生細胞を回収し、定法のハイブリドーマ法によって抗体産生細胞とミエローマ細胞を融合させ、ハイブリドーマを作製する。そして、ハイブリドーマを限界希釈した後に培養し、培養上清を回収する。培養上清に含まれるマウス抗体を精製し、TTR115-124との反応性をELISA試験で検証する。ELISA試験の一例としては、TTR115-124を直接又は間接的にELISAプレート上へ固相化する。TTR115-124をプレートへ固相化する場合には、TTR115-124のN末端側、C末端側のどちらであっても構わない。次に、マウス抗体をプレートへ添加し、反応させる。そして、酵素標識された抗マウス抗体、

基質の順にプレートへ添加し、基質を検出する方法が例示される。そうしたELISA試験を指標にして、TTR115-124に対する抗体を選抜する。

[0028] 次に、TTRアミロイドに対して特異的に結合する抗体を選抜するステップを設けても構わない。TTRアミロイドへの結合性を検証する方法を例示する。TTRペプチドを酸性条件下で線維化を形成する期間で静置し、TTRアミロイドを形成させる。酸性条件や線維化を形成する期間は、TTRペプチドの種類によって適宜変更して構わない。TTRの線維化の有無は、チオフラビンTアッセイによって確認することが可能である。酸性条件として好ましくは、pH5.0以下、さらに好ましくはpH3.0-pH4.0である。線維化を形成する期間は好ましくは一晩である。そして、酸処理したTTR（TTRアミロイド）又は未処理のTTR（正常型TTR）をELISAプレートへ結合させ、次いでマウス抗体を反応させる。正常型TTRと比較して、TTRアミロイドに対する結合性が高い抗体を選抜しても構わない。

[0029] 次に、マウス抗体からヒト化抗体を作製する方法を例示する。マウス抗体を産生するハイブリドーマからmRNAを回収した後に逆転写を行い、cDNAを作製する。cDNAを鋳型にしてVH領域とVL領域を増幅し、当該領域を適当なプラスミドへ導入した後、VH領域又はVL領域の塩基配列を解析する。そして、VH領域またはVL領域のうち、CDRに相当する部分（CDR1-3）を特定する。次に、マウス抗体におけるCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVH領域又はVL領域のアミノ酸配列へ移植するために、CDRの移植に適したヒト抗体を選択する。そして、ヒト抗体におけるVH領域又はVL領域のアミノ酸配列に対して、マウス抗体におけるCDR 1-3のアミノ酸配列を挿入したアミノ酸配列を設計する。当該アミノ酸配列を塩基配列へ変換し、化学合成する。当該塩基配列をH鎖またはL鎖の定常領域をコードする塩基配列を含む発現ベクターへ挿入した発現ベクターを作製する。当該発現ベクターを適当な宿主（動物細胞）へ導入し、宿主を用いてヒト化抗体を発現させる。

[0030] 本発明では、当該ヒト化抗体において、VH領域又はVL領域のフレームワーク部分についてアミノ酸配列を改変させたアミノ酸配列を設計し、改変アミ

ノ酸配列に基づく塩基配列を化学合成した。そうして、上記の同様の方法で改変型のヒト化抗体を作製した。

[0031] 上記のマウス抗体やヒト化抗体（それらを纏めて抗体と称する場合がある）についてエピトープを解析する方法を例示する。ヒトTTRの115-124位のアミノ酸配列のうち、1アミノ酸を改変させたヒトTTR改変体を作製する。定法のsite-directed mutagenesis法により改変体の遺伝子を作製し、発現ベクターに挿入後、適当な宿主（好ましくは大腸菌）を用いて発現させ精製する。そうした改変体としては、Y114C、S115A、Y116A、S117A、T118A、T119A、A120S、V121A、V122A、V122I、T123A、N124Aが例示される。定法のウェスタンブロットリング法を用いて、当該改変体をSDS-PAGEで電気泳動させた後、解析対象の抗体と反応させ、当該改変体と抗体の反応性を検出する。抗体との結合性が低下した改変体が存在する場合、改変した部分を抗体のエピトープ部分と考えても構わない。本発明の抗体は118-122位にエピトープ部分が存在していた。

[0032] 上記のマウス抗体やヒト化抗体は、構造変化を起こしたTTRに対する特異的反応性、線維化したTTRとの反応性、TTR患者由来の組織に対する免疫染色、変異TTRの線維化に対する阻害活性、TTRアミロイドに対するマクロファージ貪食作用の促進活性、FAPモデル動物を用いた薬効評価を行ってもかまわない。

[0033] 構造変化を起こしたTTRに対する特異的反応性を解析する方法として、表面プラズモン共鳴法を用いた方法が例示される。野生型TTR四量体、変異TTR（V30Mなど）四量体、又は変異TTRアミロイドを作製する。野生型TTR四量体や変異TTR四量体を作製する方法としては、Matsubaraらの方法（非特許文献14）が例示される。変異TTRアミロイドを作製する方法としては、上記の四量体のTTRペプチドを3mg/mLに調整した後、等量の200mM酢酸バッファーと100mM NaClの溶液と混合し、37°Cで16時間反応させる方法が例示される。反応後のTTRについては、ThioflavinT assay(励起波長 440 nm, 蛍光波長 480 nm)によって蛍光強度を測定し、線維が形成されていることを確認しても構わない。

[0034] 次に、これらの調整物をセンサーチップへ結合させる。そして、解析対象の抗体を流して、センサーチップと反応させることで、TTRと抗体の結合性がレスポンスユニット（RU）として表される。この場合に、変異TTRアミロイドに対するRUが、野生型TTR四量体や変異TTR四量体に対するRUよりも優位に高い抗体は、構造変化を起こしたTTRを特異的に認識していると考えられる。そうした四量体TTRと比較して、四量体以上の分子構造を有するTTR（例えば、TTRアミロイド）を特異的に認識する抗体を、構造変化を起こしたTTRを特異的に認識する抗体としても構わない。

[0035] 変異TTRの線維化を阻害する活性を解析する方法を例示する。TTR及び評価抗体を含有する溶液に対して界面活性剤を終濃度0.01-1%となるように混合し、TTRが線維を形成する温度と時間静置する。そして、ThioflavinT assay（励起波長 440 nm, 蛍光波長 480 nm）で蛍光強度を測定し、TTR線維化の程度を評価する。界面活性剤の種類は塩化ベンザルコニウム、デオキシコール酸ナトリウム、Zwittergent3-16、NP-40が例示される。特にデオキシコール酸が好ましい。終濃度0.01-1%が例示されるが、0.1%が特に好ましい。時間と温度は37°Cで3~4日間が例示されるが、時間や温度の組み合わせに応じて適宜変更しても構わない。本解析方法は中性付近のpHで解析を行えるため、評価抗体の変性を抑えた優れた評価系である。

[0036] TTRアミロイドに対するマクロファージ貪食作用を解析する方法を例示する。FAP患者由来の皮膚組織から、定法に従ってヒトiPS細胞を作製し、更に定法に従ってiPS細胞をマクロファージに分化させる。TTR線維と分化させたマクロファージ 5×10^4 個を混合し、評価抗体を添加して、一定期間（例えば、3日間）培養する。培養後のTTR残量をELISA法で定量し、マクロファージによる貪食能を評価する。

[0037] 本発明の抗体とTTRアミロイドとの反応性を解析する方法を例示する。野生型TTRや変異TTRをTTRが線維化する時間、酸性条件で処理し、TTR線維を作製する。線維化の時間は、pHやTTRの種類によって適宜選択することが可能である。酸処理後のサンプルをNative PAGEで泳動し、銀染色を行った後に、60kD

aより高い位置にブロードなバンドが確認された場合には、TTRが線維化していることの指標としても構わない。そして、定法のウェスタンブロット法を用いて、TTRアミロイドをSDS-PAGEにて泳動し、解析対象の抗体を反応させ、検出する。酸処理していないTTR（線維化していないTTR）と比較して、TTRアミロイドに対する反応性が高い抗体を、TTRアミロイドに対する結合作用を有する抗体としても構わない。

[0038] FAPモデル動物を用いた薬効評価の方法を例示する。V30M Tgラット（非特許文献15、TTRのアミノ酸配列において30位をバリンからメチオニンに変異させたヒトTTRの遺伝子を導入したトランスジェニックラット）を用いて、一定量の評価抗体を（例えば、10mg/kg）、一定期間に亘り（例えば、6ヶ月間）、一定頻度で投与する（例えば、週1回）。投与後に剖検して大腸を採取し、ホルマリン固定を行う。固定した大腸組織をパラフィンブロックに包埋し、組織切片を作製する。組織切片をPolyclonal Rabbit Anti-Human Prealbumin(Dako)、HRP標識Goat anti-Rabbit IgG(Dako)を用いて免疫染色し、大腸の筋層におけるTTR沈着の程度を数値化して群間での比較を行う。

[0039] 本発明のヒト化抗体はTTRの線維化を阻害する活性、構造変化したTTRに対する特異な結合活性、マクロファージによるTTRアミロイドの貪食作用を促進する効果、TTRアミロイドに対する結合作用、FAPモデル動物に対する効果を有する。また、本発明の抗体についてエピトープを解析した結果、TTR118-122に存在していた。そのため、本発明には下記のヒト化抗体が含まれる。

- (1) TTRの線維化を阻害する活性を持つ抗体。
- (2) 構造変化を起こしたTTRを特異的に認識し、かつ四量体の機能性TTRを認識しない抗体。
- (3) TTRアミロイドと特異的に結合する抗体。
- (4) TTRアミロイドの除去を促進する抗体。
- (5) TTRアミロイドに対するマクロファージ貪食能を促進する抗体。
- (6) TTRアミロイドーシスに対する治療効果及び／又は予防効果を有する抗体。

(7) TTR118-122をエピトープとするヒト化抗体。

上記の(1)から(7)の抗体は、(1)から(7)に記載される通り、一つの特徴を有してもよく、他の(1)から(7)に記載される特徴をあわせ持っていてかまわない。

[0040] 本発明のヒト化抗体ではVH領域又はVL領域上のCDR1-3のアミノ酸配列や塩基配列は下表となる。

[0041] [表1]

VH領域	CDR1	RYWIT	配列番号1
		aggtactggataacc	配列番号17
	CDR2	DIYPGSGRTNYNEKFKN	配列番号2
		gatatttatectggtagtggtagaactaattacaatgagaagtcaagaac	配列番号18
	CDR3	YGSTYFYV	配列番号3
		tactacggtagtacctacttctatgtc	配列番号19
VL領域	CDR1	RSSKSLLYKDGKTYLN	配列番号4
		aggtctagtaagagtctcctgtataaggacgggaagacatacttgaa t	配列番号20
	CDR2	LMSTRAS	配列番号5
		ttgatgtccaccagagcatca	配列番号21
	CDR3	QQLVEYPRT	配列番号6
		cagcaacttgtggagtatcctcggacc	配列番号22

[0042] そのため、本発明にはアミノ酸配列において下記の特徴を有するヒト化抗体が含まれる。

(8) 以下の(a)又は(b)のポリペプチドからなるH鎖の相補性決定領域と、(c)又は(d)のポリペプチドからなるL鎖の相補性決定領域とを含む、ヒト化抗体。

(a) 配列番号1～3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号1～3に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、TTRに対するH鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

(c) 配列番号4～6に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号4～6に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミ

ノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、TTRに対するL鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

また、当該ヒト化抗体は、(1)から(7)に記載される特徴を併せ持っても構わない。

[0043] 本発明ではVH領域やVL領域のフレームワーク領域におけるアミノ酸配列を変異させたヒト化抗体を複数種類作製した。そうしたヒト化抗体の一例としては、下記のアミノ酸配列や塩基配列によってコードされたVH領域又はVL領域が例示される。

[0044] [表2]

VH領域	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYWITWVRQRPGQGLEWMGDIYPGSGRT NYNEKFKNRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANYYGSTYFYVWGQGTITVTV SS	配列番号7
	caggtgcagctggcagctctggggctgaggtgaagaagcc tggggcctcagtgaagg tctectgcaagcttctggatacaccttcactaggtactggataacctgggtgcgcca gcgccccggacaaggacttgagtggatgggagatatttatcctggtagtggtagaact aattacaatgagaattcaagaacagagtcaccattaccgtggacacatccgcgagcac agcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgag aattactacggtagtacctacttctatgtctgggggcaaggaccacgggtcacctctc ctca	配列番号23
VL領域	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSKSLLYKDGKTYLNWFQQRPGQSPQLLIYLMST RASGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGVVYCOQLVEYPRTFGGGTKVEIK	配列番号8
	gatgttgatgaccagctctccactctccctgcccgtcaccttggacagccggcct ccatctcctgcaggtctagtaagagctcctgtataaggacgggaagacatacttgaa ttggttccagcagaggccagggcagctccacagctcctgactatattgatgtccacc agagcatcaggagtcaccagacaggttcagtggcagtggtcaggcactgattcacac tgaaaatcagcaggggtggagctgaggatgttgagtttat tactgccagcaacttgt ggagtatcctcggaccttcggtggaggaccaaggtggaaatcaaa	配列番号24

[0045] そのため、本発明には、下記のヒト化抗体が含まれる。

(9) 以下の(e)又は(f)のポリペプチドからなるH鎖可変領域と、
(g)又は(h)のポリペプチドからなるL鎖可変領域とを含む、ヒト化抗体。

(e) 配列番号7に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号7に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、

T T R に対する H 鎖可変領域となるポリペプチド。

(g) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する L 鎖可変領域となるポリペプチド。

当該ヒト化抗体は、(1) から (8) に記載される特徴を併せ持っていないも構わない。

[0046] 本発明には下記の H 鎖の CDR を含む H 鎖可変領域断片が含まれる。

(10) 以下の (a) 又は (b) のポリペプチドからなる H 鎖の相補性決定領域を含む H 鎖可変領域断片

(a) 配列番号 1 ～ 3 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号 1 ～ 3 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する H 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

[0047] 本発明には下記の L 鎖の CDR を含む L 鎖可変領域断片が含まれる。

(11) 以下の (c) 又は (d) のポリペプチドからなる L 鎖の相補性決定領域を含む L 鎖可変領域断片。

(c) 配列番号 4 ～ 6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号 4 ～ 6 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する L 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

[0048] 本発明には下記の H 鎖可変領域断片が含まれる。

(12) 以下の (e) 又は (f) のポリペプチドからなる、H 鎖可変領域断片。

(e) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する H 鎖可変領域となるポリペプチド。

[0049] 本発明には下記のL鎖可変領域断片が含まれる。

(13) 以下の(g)又は(h)のポリペプチドからなる、L鎖可変領域断片。

(g) 配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、TTRに対するL鎖可変領域となるポリペプチド。

[0050] 本発明には下記の1本鎖可変領域断片が含まれる。

(14) (10)に記載のH鎖の相補性決定領域を含むH鎖可変領域断片または(12)に記載のH鎖可変領域断片と、(11)に記載のL鎖の相補性決定領域を含むL鎖可変領域断片または(13)に記載のL鎖可変領域断片とを連結してなる、TTRに対する抗体の1本鎖可変領域断片。

[0051] 1本鎖可変領域断片において、H鎖可変領域断片とL鎖可変領域断片とを連結する場合、通常、適当なペプチドリンカーなどによって連結される。このペプチドリンカーとしては、例えば、10~25アミノ酸残基からなる任意の1本鎖ペプチドが用いられる。

[0052] 本発明には、下記のH鎖可変領域断片及び/又はL鎖可変領域断片にヒト由来の定常領域を連結した抗体またはその断片が含まれる。

(15) (10)に記載のH鎖の相補性決定領域を含むH鎖可変領域断片または(12)に記載のH鎖可変領域断片、及び/又は、(11)に記載のL鎖の相補性決定領域を含むL鎖可変領域断片または(13)に記載のL鎖可変領域断片に、ヒト由来の定常領域を連結してなる、TTRに対するヒト由来の抗体またはその断片。

[0053] 上記のヒト由来の定常領域を連結した抗体又はその断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂や、少なくとも一部のFc部を有したscAb、またはscFvFc、さらには完全抗体であってもよい。なお、scAbとはscFvにL鎖またはH鎖の定常領域の一部のドメイン(Cドメイン)が結合したもので、scFvFcとはscFvにH鎖の定常領域の一部(Fc領域)が結合したものである。

- [0054] また、上記抗体は、抗体と構造的に関連したタンパク質も包含し、免疫グロブリンの意味である。さらに、本発明の抗体は、IgA、IgD、IgE、IgG又はIgMの何れのクラスでもよい。言い換えると、単量体であってもよいし、2量体、3量体、4量体、5量体といった多量体であってもよい。
- [0055] ここで、上記「1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加された」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。したがって、例えば、上記 (b) のポリペプチドは、上記 (a) のポリペプチドの変異ペプチドであり、ここにいう「変異」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。
- [0056] なお、上記「変異」は、後述のように本発明の抗体またはその断片を、医薬組成物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、検出器具や診断薬などとして利用する場合（ヒトに投与しない場合）には、特に制限されない。また、本発明の抗体またはその断片を、ヒトに投与する場合、抗原を認識するCDRの高次構造を維持する範囲で、変異を行うことが好ましい。
- [0057] 本発明の抗体およびその断片は、付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。このようなポリペプチドが付加される場合としては、例えば、HisやMyc、Flag等によって本発明のタンパク質がエピトープ標識されるような場合が挙げられる。
- [0058] さらに、本発明の抗体およびその断片には、安定性や抗体価を向上させるために、修飾剤が結合されていてもよい。すなわち、本発明の抗体およびその断片は、修飾抗体であってもよい。この修飾剤としては、例えば、糖鎖や高分子などが挙げられる。糖鎖修飾を行った場合には、その糖鎖が何らかの生理活性を有する可能性があるが、ポリエチレングリコール（PEG）などの単純な高分子修飾を行った場合にはそれ自体生理活性を示さない。さらに、PEG

化によって肝臓での吸収を抑制したり、血中での安定性を向上したりする可能性がある。つまり、修飾剤としては、PEGなどの単純高分子が好ましい。

[0059] なお、本発明の抗体およびその断片の修飾剤による修飾は、前述の変異ペプチドの作製と同様に、治療薬として利用する場合には、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利用する場合には、特に制限されない。また、本発明の抗体またはその断片を、ヒトに投与する場合、抗原を認識するCDRの高次構造を維持する範囲で、修飾することが好ましい。

[0060] 2. 本発明の遺伝子

本発明には、上記1の抗体またはその断片をコードする遺伝子が含まれる。例えば、下記の塩基配列をオープンリーディングフレーム（ORF）領域として有する遺伝子、およびその塩基配列の一部を改変した改変遺伝子などが含まれる。

(1) 配列番号1~3、及び／又は、配列番号4~6を含む塩基配列

(2) 配列番号7、及び／又は、配列番号8を含む塩基配列

[0061] 上記の遺伝子は、本発明の抗体またはその断片をコードしているので、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断片を発現させることができる。

[0062] さらに、上記の遺伝子は、上記1の抗体またはその断片をコードする塩基配列以外に、非翻訳領域（UTR）の配列やベクター配列（発現ベクター配列を含む）などの配列を含むものであってもよい。例えば、配列番号7又は8に記載の配列をベクター配列につないで本発明の遺伝子を構成し、これを適当な宿主で増幅させることにより、本発明の遺伝子を所望に増幅させることができる。また、本発明の遺伝子の一部配列をプローブに用いてもよい。

[0063] 本発明の遺伝子は、TTRアミロイドが関与する疾患において、遺伝子治療剤として利用しても構わない。この遺伝子治療剤は投与後に本発明の抗体またはその断片を体内で発現するように設計することによって、該治療剤を摂取後に体内で本発明の抗体またはその断片を形成させ、上記阻害剤と同様の効

果を持たせても構わない。

[0064] 3. 本発明の組換え発現ベクター

本発明には、前記2の遺伝子、すなわち、上記1の抗体またはその断片をコードする遺伝子を含む組換え発現ベクターが含まれる。例えば、配列番号7又は8に示される塩基配列を有するcDNAが挿入された組換え発現ベクターが挙げられる。組換え発現ベクターの作製には、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどを用いることができるが特に限定されるものではない。

[0065] ベクターの具体的な種類は特に限定されるものではなく、宿主細胞中で発現可能なベクターを適宜選択すればよい。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、確実に遺伝子を発現させるために適宜プロモーター配列を選択し、これと本発明に係る遺伝子を各種プラスミド等に組み込んだものを発現ベクターとして用いればよい。

[0066] 本発明の遺伝子が宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実に発現しているか否かを確認するために、各種マーカを用いてもよい。例えば、宿主細胞中で欠失している遺伝子をマーカーとして用い、このマーカーと本発明の遺伝子とを含むプラスミド等を発現ベクターとして宿主細胞に導入する。これによってマーカー遺伝子の発現から本発明の遺伝子の導入を確認することができる。あるいは、本発明に係る抗体またはその断片とマーカータンパク質を融合タンパク質として発現させてもよく、例えば、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質GFP (Green Fluorescent Protein) をマーカーとして用い、本発明に係る抗体またはその断片をGFP融合タンパク質として発現させてもよい。

[0067] 上記宿主細胞は、特に限定されるものではなく、従来公知の各種細胞を好適に用いることができる。具体的には、ヒト又はマウス由来の細胞をはじめとして、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞、各種哺乳動物 (ラット、ウサギ、ブタ、サル等) の培養細胞、あるいは、キイロショウジョウバエ、カイコガ等の昆虫の培養細胞等などの動物細胞、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等の細菌、酵母 (出芽酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*) や分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) などを用いることができるが、特に限定されるものではない。

[0068] 組換え発現ベクターを宿主細胞に導入する方法、すなわち形質転換方法も特に限定されるものではなく、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。

[0069] 本発明の形質転換体は、前記 2 の遺伝子、すなわち、上記 1 の抗体またはその断片をコードする遺伝子が導入された形質転換体である。ここで、「遺伝子が導入された」とは、公知の遺伝子工学的手法（遺伝子操作手技）により、対象細胞（宿主細胞）内に発現可能に導入されることを意味する。また、上記「形質転換体」とは、細胞・組織・器官のみならず、動物個体を含む意味である。対象となる動物は、特に限定されるものではないが、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどの哺乳動物が例示される。特に、マウスやラット等の齧歯目動物は、実験動物・病態モデル動物として広く用いられており、なかでもマウスは近交系が多数作出されており、受精卵の培養、体外受精等の技術が整っており、実験動物・病態モデル動物として好ましい。

[0070] なお、上記 1 の抗体またはその断片は、本発明の組換え発現ベクターを用いて作製した、本発明の形質転換体によっても生産することが可能である。

[0071] 4. 本発明のヒト化抗体およびその断片の利用方法

本発明の抗体は、構造変化を起こした TTR（例えば、TTR アミロイド）を特異的に認識し、TTR の線維化を阻害し、FAP に対する予防効果を発揮する。そのため、本発明は、TTR の構造変化を検出する器具、TTR アミロイドーシス（特に FAP）診断薬、TTR の線維化を阻害する薬剤、TTR アミロイドーシス（特に FAP）に対する予防及び／又は治療するための医薬組成物を含む。

[0072] 本発明には、(1) の抗体またはその断片を含む、TTR の構造変化を検出する器具（TTR アミロイド検出器具）が含まれる。本発明の検出器具としては、例えば、構造変化した TTR へ特異的に結合する抗体またはその断片を基盤（担

体)上に固定化した抗体チップや抗体カラム等が挙げられる。本発明の検出器具は、例えば、血液や尿などの試料中に含まれる構造変化したTTR(例えばTTRアミロイド)を検出する用途に用いても構わない。さらに、構造変化したTTR(TTRアミロイド)が関与する疾患の判定や治療効果を評価するための診断用途、治療用途で利用しても構わない。

[0073] また、本発明には、(1)の抗体またはその断片を含む、TTRアミロイドを除去する用途で使用される担体(TTRアミロイド除去担体)が含まれる。当該除去担体は、クロマトグラフィーにおいて通常使用される担体に対して、一般的な方法で抗体等を結合させることによって作成しても構わない。上記の除去用担体は、TTRアミロイドが原因となるアミロイドーシス患者から血液を採取し、その血液を除去用担体が充填されたカラムを通して、血中のTTRアミロイドを除去するといった用途が例示される。

[0074] さらに、本発明には、上記1の抗体またはその断片を含む、TTRアミロイドを検出するための試薬(TTRアミロイド検出用試薬)が含まれる。すなわち、これらの抗体またはその断片によるラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、蛍光イムノアッセイなどの標識イムノアッセイを適用するときには、被検試料中のTTRを迅速且つ正確に定性又は定量分析することができる。この標識イムノアッセイでは、上記抗体またはその断片は、例えば、放射性物質、酵素及び/又は蛍光物質により標識して用いられる。また、これらの抗体およびその断片は、TTRアミロイドに特異的に反応し、免疫反応を呈するので、その免疫反応について標識物質を指標に測定すれば、被検試料中のごく微量のTTRアミロイドを精度良く検出することができる。標識イムノアッセイは、バイオアッセイと比較して、一度に数多くの被検試料を分析できるうえに、分析に要する時間と労力が少なく済み、しかも、分析が高精度であるという特徴がある。

[0075] 本発明には、上記1の抗体またはその断片を含む、TTRアミロイドーシス診断薬が含まれる。本発明の診断薬による疾患を診断する方法は、被検試料(血液や体液、組織など)中のTTRアミロイド量を測定し、その測定結果に応じ

て疾患の診断を行うものである。なお、疾患は、TTRアミロイドが原因となる疾患が含まれる。そうした疾患としては、老人性全身性アミロイドーシス（SSA）、家族性アミロイドーシス（FAP）が例示される。

[0076] 本発明の抗体はTTRの線維化を抑制する効果が確認された。そのため、本発明には、上記1の抗体またはその断片を含む、TTRの線維化を阻害する薬剤（線維化阻害剤）が含まれる。線維化阻害剤には、1種類以上の賦形剤、1種類以上の結合剤、1種類以上の崩壊剤、1種類以上の滑沢剤、1種類以上の緩衝剤などのように、医薬品として許容される添加物が含まれていてもよい。

[0077] 本発明の抗体は、TTRアミロイドーシスのモデル動物へ投与した場合に、効果が確認された。そのため、本発明は上記1の抗体またはその断片を含む、TTRアミロイドーシスに対する予防及び／又は治療を行うための医薬組成物が含まれる。当該医薬組成物は、1種類以上の賦形剤、1種類以上の結合剤、1種類以上の崩壊剤、1種類以上の滑沢剤、1種類以上の緩衝剤などのように、医薬品として許容される添加物が含まれていてもよい。

[0078] 以下、本発明を実施例に基づき詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

市販のキットあるいは試薬を用いた部分については、特に断りの無い限り添付のプロトコールにしたがって実験を行った。

実施例 1

[0079] TTRペプチドのコンジュゲーション

ヒトTTR115-124ペプチド（配列番号9）に対してN末端あるいはC末端にシステインを付加したペプチドを化学合成によって作製した（SIGMA-ALDRICH社へ外注）。以下、N末端にシステインを付加させたTTR115-124ペプチドをTTR02ペプチド、C末端にシステインを付加させたTTR115-124ペプチドをTTR03ペプチドと呼ぶ。Immunogen EDC Kit with mcKLH and BSA(Thermo)を用いて、KLHあるいはBSAをTTR02/TTR03ペプチドのN末端又はC末端のシステインへコンジュゲートさせた。

実施例 2

[0080] TTRペプチドのビオチン化

Biotin-PE-maleimide(同仁化学)を用いて、実施例1で合成した2種のTTR02、TTR03ペプチドをビオチン化した。ビオチン化後のTTR02、03ペプチドを、Superdex peptide (GE Healthcare)を用いてPBS(SIGMA)下でゲルろ過精製を行い、ビオチン化TTRペプチドとした。

実施例 3

[0081] 抗ヒトTTRモノクローナル抗体の調製

TTRノックアウトマウス(非特許文献13、熊本大学より分与)に、KLHコンジュゲートTTR02ペプチド100 μ g/mLとFreund's Complete Adjuvant(DIFCO)を1:1で混合し、200 μ Lでマウスを免疫した。1回目の免疫から2週間以上間隔を空け、KLHコンジュゲートしたTTR02ペプチドとFreund's InComplete Adjuvant(DIFCO)を混合し、マウスを免疫した。免疫後、1~2週間おきに採血を実施し、抗体価が十分に上昇するまで上述と同じ条件でマウスを免疫した。抗体価はELISA法によって確認した。

[0082] 抗体価が十分に上昇したのを確認した後、マウスから脾細胞を摘出し、マウスミエローマ細胞P3U1とPEG法で細胞融合を行った。融合後の細胞をHAT培地に懸濁し、96well Plateに播種した。HAT培地下で培養を継続することによりハイブリドーマのみを選択した。播種後7日~11日目に、以下に示す方法で培養上清中に含まれる抗体の、ヒトTTRへの結合活性を評価した。

実施例 4

[0083] 抗TTR抗体の結合活性試験

取得したハイブリドーマが産生した抗体の抗原結合活性をELISA法で評価した。実施例1で作製したBSAコンジュゲートしたTTR02、03ペプチドをPBS(SIGMA)で2 μ g/mLに希釈し、Maxisorp Plate(Nunc)に各ウェル当り100 μ L入れ、1時間室温でインキュベートすることによってTTRペプチドを固相化した。固相化したプレートに1%BSA-PBSを各ウェル当り300 μ L入れ、1時間室温でインキュベートすることによってプレートのブロッキングを行った。取得したハイブリドーマの培養上清をプレートの各ウェルに100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cでイン

キュベーションした。1時間後、PBSTでウェルを洗浄し、1%BSA-PBSで5000倍希釈した検出抗体anti-mouse IgG(H+L)/HRP(Zymed)をプレートの各ウェルに100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションした。1時間後、PBSTで洗浄し、TMB(SIGMA)をプレートの各ウェルに100 μ Lずつ加えることによって発色させた。30分後に1N 硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)で発色値(O.D. 450nm/650nm)を測定した。

[0084] その結果、ハイブリドーマT24においてTTRペプチドに対して優れた結合活性が見られた。

実施例 5

[0085] 抗TTR抗体遺伝子の取得

TTRペプチドへの結合活性を有する抗体を発現するハイブリドーマT24について、限界希釈法によってハイブリドーマのクローニングを行った。クローニング後のハイブリドーマ 1×10^7 cellsを出発材料とし、TRIzol(Invitrogen)を用いてtotal RNAを抽出した。total RNAを鋳型として、random primer (Invitrogen)、Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads(GE Healthcare)を用いて、First-strand cDNAを調製した。次に、このcDNAを鋳型として用い、KabatらによるV領域及びJ領域の配列の分類(Sequences of Proteins of Immunological Interest 4th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1987)を参照してデザインしたリーダー領域に対するプライマーとJ領域に対するプライマーを用い、Ex-Taq(Takara)でVHおよびVL遺伝子断片を増幅した。増幅したVH領域やVL領域のDNAはpCR2.1-TOPO(Invitrogen)にTAクローニングを行い、抗TTR抗体の遺伝子配列を取得した。クローニングしたT24抗体のDNA塩基配列をBig Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems)およびGenetic analyzer ABI Prism 3100 (Applied biosystems)を用いて決定した。

実施例 6

[0086] マウスT24抗体発現ベクターの構築

実施例 5 で取得した配列を元に、T24抗体発現ベクターを構築した。VH領域

に関しては、実施例5で構築したT24VH挿入ベクターを鋳型として、T24VH-Fwプライマー（配列番号10）およびT24VH-Rvプライマー（配列番号11）を用いて、primestar GXL（Takara）を利用してPCR法によりVH領域を増幅した。VL領域に関しては、同様にT24VL挿入ベクターを鋳型として、T24VL-Fwプライマー（配列番号12）およびT24VL-Rvプライマー（配列番号13）を用いて増幅し、QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN）で精製した。VH領域増幅断片については、XhoI, NruI処理したpKMA010-mCg1ベクターに、VL領域増幅断片については、XhoI, BamHI処理したpKMA009-mCkベクターにそれぞれIn-fusion Enzyme（Clontech）を用いて導入し、マウス定常領域を持つT24抗体（以下マウスT24抗体）を発現するベクター（H鎖発現ベクターpKMA010-T24-mCg1及びL鎖発現ベクターpKMA009-T24-mCk）を構築した（図1）。pKMA010-T24-mCg1ベクターはCAGプロモーターの下流にマウスT24抗体H鎖の配列が挿入されており、薬剤耐性遺伝子としてDhfr遺伝子を有している。pKMA009-T24-mCkベクターは、CAGプロモーターの下流にマウスT24抗体L鎖の配列が挿入されたベクターである。pKMA010-T24-mCg1ベクター及びpKMA009-T24-mCkベクターを総じてマウスT24抗体発現ベクターと呼ぶ。

実施例 7

[0087] T24抗体のヒト化

取得した抗TTR抗体をCDR Grafting法を用いてヒト化し、RT24抗体を作製した。T24抗体のVH領域又はVL領域におけるCDR1～3はKabatのナンバリング法により決定した。当該CDR1～3のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号1～6に示す。ヒト抗体のVH領域又はVL領域のアミノ酸配列に対して、T24のCDR1～3のアミノ酸配列を移植したアミノ酸配列を設計した。また、設計後のVH領域又はVL領域のフレームワーク領域において、数個のアミノ酸を改変させたアミノ酸配列もあわせて設計した。それらのアミノ酸配列をコードする塩基配列を化学合成した（タカラバイオ社へ外注）。それらの抗体の一つをRT24抗体とし、そのVH領域又はVL領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号7、8に示す。ヒト定常領域を持つRT24抗体（以下ヒトRT24抗体）を発現する

ベクターを以下0の方法で構築した。化学合成したRT24の含まれたプラスミドをHindIIIおよびBamHIで消化し、RT24抗体のVH領域およびVL領域をコードする配列が含まれた領域を切り出した。切り出したRT24抗体のVH配列を、同じくHindIIIおよびBamHI消化処理したpUC-hC γ 1(発現ベクターpUC19にヒトC γ 1遺伝子が挿入されたもの。ヒトC γ 1遺伝子上流には、制限酵素サイトSalI、HindIII及びBamHIサイトが、下流には制限酵素サイトSalIが挿入されている)に導入し、pUC-RT24-hC γ 1を得た。同様に、切り出したRT24抗体のVL配列を、HindIII、BamHI処理したpUC-hC κ (発現ベクターpUC19にヒトC κ 遺伝子が挿入されたもの。ヒトC κ 遺伝子上流には、制限酵素サイトSalI、HindIII及びBamHIサイトが、下流には制限酵素サイトSalIが挿入されている)に導入し、pUC-RT24-hC κ を得た。pUC-RT24-hC γ 1をSalIで処理し、同様にSalI処理した発現ベクターpCAGG-S1(Sal).dhfr.neo(特許文献2)に導入し、ヒトRT24抗体H鎖発現ベクターpCAGGS1.dhfr.neo-RT24-hC γ 1を構築した。pUC-RT24-hC κ をSalIで処理し、同様にSalI処理した発現ベクターpCAGG-S1(Sal)(特許文献2)に導入し、ヒトRT24抗体L鎖発現ベクターpKMA009-RT24-hC κ を構築した。pCAGGS1.dhfr.neo-RT24-hC γ 1ベクターはCAGプロモーターの下流にヒトRT24抗体VH領域の配列及びヒトC γ 1遺伝子が挿入されており、薬剤耐性遺伝子としてDhfr遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子を有している。また、pKMA009-RT24-hC κ ベクターは、CAGプロモーターの下流にヒトRT24抗体VL領域の配列及びヒトC κ 遺伝子が挿入されたベクターである。pCAGGS1.dhfr.neo-RT24-hC γ 1ベクター、及びpKMA009-RT24-hC κ ベクターを総じてヒトRT24抗体発現ベクターと呼ぶ。

[0088] 引き続き、マウス定常領域を持つRT24抗体(以下キメラRT24抗体)を発現するベクターの構築を行った。VH領域に関しては、pCAGGS1.dhfr.neo-RT24-hC γ 1を鋳型として、pCAG-Fwプライマー(配列番号14)、およびT24VH-Rvプライマーを用いて、primestar GXL(Takara)を利用してPCR法によりVH領域を増幅した。VL領域に関しては、pKMA009-RT24-hC κ をXbaI、BamHI処理し、RT24のVL領域を含む断片を切り出した。VH領域増幅断片については、XbaI、NruI処

理したpKMA010-mCg1ベクターに、VL領域断片については、XbaI、BamHI処理したpKMA009-mCkベクターにそれぞれIn-fusion Enzyme (Clontech)を用いて導入し、キメラRT24抗体H鎖発現ベクターpKMA010-RT24-mCg1、およびキメラRT24抗体L鎖発現ベクターpKMA009-RT24-mCkを構築した。pKMA010-RT24-mCg1ベクターは、CAGプロモーターの下流にヒトRT24抗体VH領域の配列及びマウスC γ 1遺伝子が挿入されており、薬剤耐性遺伝子としてDhfr遺伝子を有している。pKMA009-RT24-mCkベクターは、CAGプロモーターの下流にヒトRT24抗体VL領域の配列及びマウスC κ 遺伝子が挿入されたベクターである。pKMA010-RT24-mCg1ベクター、及びpKMA009-RT24-mCkベクターを総じてキメラRT24抗体発現ベクターと呼ぶ。

[0089] マウスT24抗体発現ベクター、キメラRT24抗体発現ベクター、ヒトRT24抗体発現ベクターをそれぞれFreestyle293F細胞(Invitrogen)にNeofection(アステック)を用いて遺伝子導入し、37°C 8%CO₂環境下において125rpmで振とう培養し、マウスT24抗体、キメラRT24抗体、又はヒトRT24抗体を分泌発現させた。培養5日目に上清を回収し、HiTrap rProteinA FF(GE Healthcare)を用いたクロマトグラフィー精製を行った。マウスT24抗体、キメラRT24抗体、又はヒトRT24抗体が含まれた溶出画分をPBS(SIGMA)に対して透析し、マウスT24抗体、キメラRT24抗体、又はヒトRT24抗体の抗体精製品とした。

実施例 8

[0090] ヒトTTR遺伝子のクローニング

ヒトTTR発現ベクターを構築するにあたり、ヒトTTR遺伝子のクローニングを行った。Human Liver Marathon-Ready cDNA(Clontech)を鋳型に、成熟型TTRの5'末端又は3'末端に設定したプライマー (TTR-F2: 配列番号15、およびTTR-R: 配列番号16)、及びEx-Taq(Takara)を用いてPCRを行った。PCR産物をpCR2.1-TOPOにTAクローニングした後、シーケンス解析によってヒトTTR遺伝子の塩基配列を確認した。配列が正しいことを確認した後、TTR遺伝子が挿入されたpCR2.1-TOPOをBamHIおよびHindIII処理して、TTR遺伝子をコードする配列が含まれた領域を切り出した。切り出した配列をBamHIおよびHindIII

処理したpQE-30(QIAGEN)に導入し、野生型ヒトTTR発現ベクターを構築した。

実施例 9

[0091] ヒトTTR変異体発現ベクターの構築

実施例8で構築した野生型ヒトTTR発現ベクターを鋳型に、site-directed mutagenesis法を用いてアミノ酸の点変異導入を行った。アミノ酸の点変異導入は、D18G、V30M、E54K、L55P、Y114C、S115A、Y116S、S117A、T118A、T119A、A120S、V121I、V122A、V122I、T123A、N124Aの16種類についてそれぞれ実施した。上記16種類のTTR変異体をコードする配列をpQE-30にそれぞれ導入した。

実施例 10

[0092] RT24抗体のエピトープ解析

RT24抗体のエピトープを更に詳しく解析するために、本抗体の創出に用いたTTR115-124ペプチド領域のアラニン置換変異体を用いて、RT24抗体の反応性解析を行った。実施例9で構築したTTR変異体発現ベクターを大腸菌株M15に形質転換し、20mLのLB / Ampicilin(50 μ g/mL) / Kanamycin(25 μ g/mL)で、37°Cで培養した。O.D. 600nm=0.5になった時点でIPTGを終濃度10mMになるように添加し、一晚培養した。培養液を遠心し、沈殿画分をBugbuster(Merck)によって、可溶化した。可溶化した菌体液を8-16%SDS-PAGEゲルに泳動し、ゲルからImmobilon-P(Millipore)へ転写した。転写した膜に2%Skimmilk-PBSTを加え、室温で1時間振とうすることで膜のブロッキングを行った。キメラRT24抗体を2%Skimmilk-PBSTで1 μ g/mLの濃度に希釈し、10mLを膜へ添加して室温で1時間振とうした。PBSTで洗浄し、検出抗体HRP標識anti-mouse IgG(H+L)(AMERICAN QUALEX INTERNATIONAL)を2%Skimmilk-PBSTで5000倍希釈した後に膜へ添加し、室温で1時間振とうした。PBSTで洗浄した後、Ez West Blue(ATT0)で発色させた。

[0093] その結果、図2に示すように、RT24抗体は、TTR115-124部位の中でも特に118-122部位をエピトープとして認識することが明らかになった。

実施例 11

[0094] 組換えTTR精製品の調製

Matsubaraらの方法（非特許文献14）を参考に、組換えTTR精製品の調製を行った。実施例8および9で構築した野生型TTR、又はD18G、V30M、E54K、L55P、Y114C、Y116S、V122I TTR変異体を発現する発現ベクターを大腸菌株M15に形質転換し、20mLのLB / Ampicilin(50 μ g/mL) / Kanamycin(25 μ g/mL) で、37°Cで培養した。O.D.600nm=0.5になった時点でIPTGを終濃度10mMになるように添加し、一晩培養した。培養液から菌体を遠心で回収し、BufferA(50mM PB + 0.3M NaCl + 10mM Imidazole + 20mM 2-Mercaptoethanol)に懸濁した。懸濁液を15分間ソニケーションし、更に遠心を行い、上清を回収した。上清をNi-NTA Agarose(QIAGEN)を用いてHis-tag精製を行い、組換えTTRの含まれた溶出画分を20mM NaHCO₃に対して透析した。透析後の組換えTTRを、10 mM PB (pH7.5)下でSuperdex75(GE Healthcare)を用いてゲルろ過精製し、4量体TTR画分を組換えTTR精製品とした。

実施例 12**[0095] RT24抗体の反応特異性解析**

RT24抗体のTTR 4量体に対する反応性を解析するため、表面プラズモン共鳴法を用いた反応特異性解析を行った。実施例11で調製したV30M TTR精製品を3 mg/mLになるように10mM PB (pH7.5)で希釈し、等量の200 mM 酢酸バッファ + 100 mM NaCl (pH3.0)と混合して1.5mg/mLの濃度になるように調製し、37°C恒温槽で16時間反応させることでV30M TTR線維を調製した。反応後のTRについては、ThioflavinT assayによって線維が形成されていることを確認した。ThioflavinT assayは、ThioflavinTが20 μ M、TTRが30~60 μ g/mLになるように、50mM Glycine-NaOH Buffer(pH9.5)で希釈し、分光蛍光光度計FP-6500(JASCO)によって蛍光強度を測定することにより行った（励起波長 440 nm、蛍光波長 480 nm）。

[0096] Biacore2000(GE Healthcare)を用い、Sensorchip CM5(GE Healthcare)にWT TTR4量体、V30M TTR4量体、V30M TTR線維（いずれも組換え体）を1000RU程度固相化した。リガンドの固相化は10mM 酢酸バッファ（pH6.0）で行った。

HBS-EP Bufferで10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したPolyclonal Rabbit Anti-Human Prealbumin(Dako)、RT24抗体、陰性コントロール抗体を20 $\mu\text{L}/\text{min}$ で2分間泳動した。泳動後に解離を60分間行い、10 mM Gly-NaOH (pH9.0)で30秒間再生を行った。

[0097] その結果、図3に示すように、RT24抗体は、WT TTRおよびV30M 4量体TTRには反応せず、V30M 線維を特異的に認識することが明らかとなった (a)。Dako社製ポリクローナル抗体ではWT TTRおよびV30M TTRと強く反応し、V30M TTR線維への反応性は弱く (b)、陰性コントロール抗体ではいずれのTTRに対しても反応を示さなかった (c)。

実施例 13

[0098] T24抗体の患者血清への反応性解析

T24抗体がFAP患者由来の血清に対して反応性を示すかどうかについて解析を行った。投与した抗体が患者血清中のヒトTTRを認識しないことが、FAP治療用の抗体として望ましい特性である。実施例1で調製したTTR02およびTTR03ペプチドのBSAコンジュゲート、健常人の血清、及びV30M TTR変異を有するFAP患者由来の血清を2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、実施例12と同様にpH3.0処理を行った血清由来の野生型TTRの線維、及びFAP患者の腎臓から抽出したTTRアミロイドを約4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、Maxisorp plate(Nunc)に各ウェル当り100 μL 添加し、抗原の固相化を行った。固相化したプレートに1%BSA-PBSを各ウェル当り300 μL 入れ、1時間室温でインキュベートすることによってプレートのブロッキングを行った。T24抗体を1%BSA-PBSで段階希釈し、プレートの各ウェルに100 μL ずつ加え、37°Cでインキュベーションした。1時間後、PBSTでウェルを洗浄し、検出抗体anti-mouse IgG(H+L)/HRP(Zymed)をプレートの各ウェルに100 μL ずつ加え、37°Cでインキュベーションした。1時間後、PBSTで洗浄し、TMB(SIGMA)をプレートの各ウェルに100 μL ずつ加えることによって発色させた。30分後、1 N 硫酸で反応を停止させ、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)で発色値(O.D. 450nm)を測定した。

[0099] その結果、図4に示すように、T24抗体は、TTRペプチドやFAP患者由来のTT

Rアミロイド、血清由来の野生型TTRを酸処理によりアミロイド化させたものには明らかな濃度依存的反応性を示したのに対し、健常者及びFAP患者由来の血清には明確な反応性を示さなかった。

実施例 14

[0100] T24抗体およびキメラRT24抗体の患者組織への反応性解析

V30M TTR保有FAP患者の心臓を採取し、ホルマリン固定を行った。固定した心臓組織をパラフィンブロックに包埋し、組織切片を作製した。組織切片を4 μm の厚さにスライスしてスライドガラスに接着させた後、脱パラフィン処理を行った。PBSで洗浄した後、0.1% 過よう酸二水和物に10分間浸透し、更にPBSで洗浄した。0.5% BSA-PBSで50倍希釈したRabbit serum (Dako)に室温で1時間浸漬し、ブロッキング処理を行った。PBSで洗浄した後、一次抗体としてT24抗体/キメラRT24抗体/陰性コントロール抗体をそれぞれ0.5%BSA-PBSで10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、4°Cで一晩浸漬した。二次抗体としてHRP標識Rabbit anti-mouse IgG(Dako)を0.5%BSA-PBSで100倍希釈し、室温で1時間浸漬した。PBSで洗浄し、DABを用いて発色させた。ヘマトキシリン染色もあわせて行った。陽性コントロールでは、一次抗体にPolyclonal Rabbit Anti-Human Prealbumin (Dako)を、二次抗体にHRP標識Goat anti-Rabbit IgG(Dako)を用いて同様な処理を行った。また、ホルマリン固定によりTTRが変性し、立体構造が変化してしまう可能性を考慮し、V30M TTR保有FAP患者の心臓の凍結組織切片についても、同様に免疫染色を行った。さらに、アミロイド線維の存在を確認するために、Congo red染色も行った。Congo redはアミロイド線維に定着して短波長シフトを起こすことが知られている。

[0101] これらの解析の結果、図5に示すように、T24抗体およびRT24抗体はパラフィン切片(図5a)と凍結切片(図5b)のいずれにおいても、FAP患者由来の心臓に沈着したTTRを特異的に認識することが確認された。

実施例 15

[0102] RT24抗体のTTR線維への反応性解析

実施例11で調製したD18G、V30M、E54K、L55P、Y114C、Y116S、V122Iの7

種類の変異TTR精製品、および野生型TTR精製品を、実施例12に示した方法でpH3.0環境下、37°Cで一晩静置し、各種組換えTTR線維を調製した。組換えTTRを1.5 μ gずつ8-16%SDS-PAGEで泳動し（2枚）、1枚はSilver stain KANTO II I（関東化学）を用いて銀染色を行った。残りの1枚はImmobilon-P(Millipore)に転写した。転写した膜に2%Skimmilk-PBSTを加え、室温で1時間振とうすることで膜のブロッキングを行った。キメラRT24抗体を2%Skimmilk-PBSTで1 μ g/mLの濃度に希釈し、10mLを膜へ添加して室温で1時間振とうした。PBSTで洗浄し、検出抗体HRP標識anti-mouse IgG(H+L)(AMERICAN QUALEX INTERNATIONAL)を2%Skimmilk-PBSTで5000倍希釈し、室温で1時間振とうした。PBSTで洗浄した後、Ez West Blue(ATT0)で発色させた。

[0103] その結果、図6に示すように、RT24抗体は、各種TTR線維を認識し、一方で線維化させていない野生型TTR精製品を認識しないことが明らかになった。

実施例 16

[0104] V30M TTR線維化阻害活性測定系の構築

組換えV30M TTRを375 μ g/mLになるようにPBS(-)で希釈し、4種類の界面活性剤を終濃度が0.1%、0.01%、0.001%になるように混合した。使用する界面活性剤として、（1）塩化ベンザルコニウム(山善)、（2）デオキシコール酸ナトリウム(ナカライ)、（3）Zwittergent3-16(Carbiochem)、（4）NP-40(Wako)を用いた。37°Cで4日間静置し、ThioflavinT assay(励起波長 440 nm, 蛍光波長 480 nm)で蛍光強度を測定し、TTR線維化の程度を評価した。

[0105] ThioflavinT assayの結果いずれの界面活性剤でも、0.1%の濃度で用いた際にTTRの線維化が進行していた。中でも、デオキシコール酸ナトリウムを用いた時が、TTRの線維化が一番早く進行することを見出した。続いて、デオキシコール酸ナトリウムの最適な濃度について検討した。

[0106] 組換えV30M TTRを375 μ g/mLになるようにPBS(-)で希釈し、デオキシコール酸ナトリウムの濃度が1%、0.5%、0.2%、0.1%、0.01%になるように混合した。37°Cで静置し、4日後、7日後にThioflavinT assayを行ってTTR線維化の程度を評価した

[0107] その結果、デオキシコール酸ナトリウム濃度は0.1%が最適であることが明らかになった。これまで、中性pH環境下でV30M TTRの線維化が進行する条件に関する報告はなされておらず、pH3.0といった酸性環境下にTTRを置くことで、TTRの線維化を進行させていた。一方で、抗体を酸性環境下に曝してしまうと抗体が変性し、その活性を失ってしまうことから、抗TTR抗体のTTR線維化阻害能を評価することは困難であった。今回デオキシコール酸を系に導入することで中性環境下でも V30M TTRの線維化が進行することを新たに見出し、抗TTR抗体の線維化阻害能を評価できる系の構築に成功した。

実施例 17

[0108] RT24抗体のV30M TTR線維化阻害試験

V30M TTR精製品、及びRT24抗体又は陰性コントロール抗体のモル比が $10 \mu\text{M} : 0.01 \sim 2 \mu\text{M}$ になるように両者を混合し (TTR: $550 \mu\text{g/mL}$ 、抗体: $1.5 \sim 300 \mu\text{g/mL}$)、PBS+0.1%デオキシコール酸ナトリウム環境下で 37°C 3日間静置した。静置後のサンプルを用いてThioflavinT assay(励起波長 440 nm, 蛍光波長 480 nm)を行い、蛍光強度を測定した。

[0109] その結果、図7に示すように、RT24抗体は抗体濃度依存的にV30M TTRの線維化を阻害する活性を有していることが明らかになった。更に、RT24抗体を元にフレームワーク領域のアミノ酸を数個改変した抗体RT24-a、RT24-bについても同様に線維化阻害試験を実施したところ、RT24と同様にV30M TTRの線維化阻害活性を有していた。抗TTR抗体のTTR線維化阻害活性を評価できる系はこれまで報告されていなかったことから、RT24抗体はV30M TTRの線維化を阻害する活性を持つ初めての抗体であるといえる。

実施例 18

[0110] マクロファージ貪食能試験

マクロファージがTTR線維を貪食する際、RT24抗体がその能力を促進するかどうかについて、マクロファージ貪食能試験を行った。本試験は、TTR患者組織内に沈着しているTTRをマクロファージが除去する過程を模倣しており、RT24抗体の添加によってマクロファージの貪食活性が促進されれば、RT24抗体

はヒト組織内でTTR沈着の除去を促進する活性を有していると期待される。

[0111] FAP患者由来の皮膚組織から、非特許文献17に記載の方法に従ってヒトiPS細胞を作製し、更にマクロファージ(iPS-MP)に分化させた。1~2×10⁶個のiPS-MPを10cm dishにて、50ng/mL hGM-SCF及び25pg/mL M-CSF存在下で24時間前培養した。iPS-MPをPBS洗浄後、20μg/mLマイトマイシンCを含む培地にて37°Cで10分間インキュベートし、細胞増殖能を停止させ、96wellプレートに5×10⁴個/100μL/wellになるように加えた。未処理あるいは24時間の酸処理を行なったV30M TTRを3.2μg/mLになるように培地で希釈後、50μLずつ添加した。さらに、PBS/RT24抗体/陰性コントロール抗体をそれぞれ40μg/mLになるように希釈し、50μLずつ添加した。37°C、5%CO₂下で3日間培養した後、培養上清を回収した。

[0112] 培養後のTTR残量を以下に記すELISA法で定量し、マクロファージによる貪食能を評価した。培養上清を5μLずつ96wellプレートに加え、さらにコーティング溶液(25mMの炭酸ナトリウムバッファー)を100μL加えた後、4°Cで一晩静置した。PBSTで洗浄後、ブロッキング溶液(コーティング溶液に0.5%ゼラチンを溶かしたもの)を250μL加え、室温で1時間インキュベートした。PBSTで洗浄後、Polyclonal Rabbit Anti-Human Prealbumin(Dako)を0.05%ゼラチン-PBSTで1000倍希釈し、100μLずつ添加して室温で1時間インキュベートした。PBSTで洗浄後、HRP標識Goat anti-Rabbit IgG(Dako)を0.05%ゼラチン-PBSTで5000倍希釈し、100μLずつ添加して室温で1時間インキュベートした。PBSTで洗浄後、100μLのSureBlue(KPL)で5分間発色し、100μLの1M塩酸で発色を停止させた。xMARK マイクロプレートリーダー(Bio-Rad Laboratories)にて450nmの波長を測定した。

[0113] 結果を図8に示す。未処理の精製V30Mに対しては、いずれの検体でもTTR残量に統計学的有意差は見られなかったのに対し(a)、TTR線維に対しては、PBS(none)と比較してRT24では統計学的に有意なTTR残量の減少が認められ(b)、RT24抗体はヒトiPS細胞分化マクロファージのTTR線維貪食作用を促進する活性を有していることが明らかになった。

実施例 19

[0114] V30M Tgラットを用いた薬効評価試験

3ヶ月齢のV30M Tgラット（非特許文献15、TTRのアミノ酸配列において30位をバリンからメチオニンに変異させたヒトTTRの遺伝子を導入したトランスジェニックラット）を用いて、マウスT24抗体 10mg/kg あるいはPBSを各群4匹ずつ、3～9ヶ月齢の6ヶ月間に亘り、週1回ずつ26回投与した。投与後に剖検して大腸を採取し、ホルマリン固定を行った。固定した大腸組織をパラフィンブロックに包埋し、組織切片を作製した。組織切片を一次抗体にPolyclonal Rabbit Anti-Human Prealbumin(Dako)を、二次抗体にHRP標識Goat anti-Rabbit IgG(Dako)を用いて免疫染色し、大腸の筋層におけるTTR沈着の程度を数値化して群間で比較した。

[0115] その結果、図9に示すように、PBS投与群と比較してT24抗体投与群では有意にTTR沈着が抑制されていた。

産業上の利用可能性

[0116] 本発明のヒト化抗トランスサイレチン抗体は、活性（TTR線維化阻害活性、マクロファージ貪食能促進活性等）および／または特異性（構造変化を起こしたTTR、TTR線維を特異的に認識する）に優れているため、TTRの構造変化や線維化が関与する様々な疾患に対して有効な薬剤として有用である。

請求の範囲

- [請求項1] トランスサイレチン（TTR）の線維化を阻害する活性を持つヒト化抗体。
- [請求項2] 構造変化を起こしたTTRを特異的に認識する、請求項1に記載のヒト化抗体。
- [請求項3] TTRアミロイドと特異的に結合する、請求項1又は請求項2に記載のヒト化抗体
- [請求項4] 2種類以上の変異TTRに由来するTTRアミロイドと結合する、請求項1から請求項3のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
- [請求項5] 変異TTRが、D18G、V30M、E54K、L55P、Y114C、Y116SおよびV122Iからなる群から選択される変異を有するTTRである、請求項4に記載のヒト化抗体。
- [請求項6] TTRアミロイドの除去を促進する、請求項1から請求項5のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
- [請求項7] TTRアミロイドに対するマクロファージ貪食能を促進する、請求項1から請求項6のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
- [請求項8] エピトープがTTRの118位から122位を含む配列である、請求項1から請求項7いずれか一項に記載のヒト化抗体。
- [請求項9] エピトープがTTRの118位から122位である、請求項8に記載のヒト化抗体。
- [請求項10] TTRアミロイドーシスに対する治療効果及び／又は予防効果を有する、請求項1から請求項9のいずれか一項に記載のヒト化抗体。
- [請求項11] TTRアミロイドーシスが家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）である、請求項10に記載のヒト化抗体。
- [請求項12] TTRアミロイドーシスが老人性全身性アミロイドーシス（SSA）である、請求項10に記載のヒト化抗体
- [請求項13] 以下の（a）又は（b）のポリペプチドからなるH鎖の相補性決定領域と、（c）又は（d）のポリペプチドからなるL鎖の相補性決定

領域とを含む、請求項 1 から請求項 1 2 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

(a) 配列番号 1～3 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号 1～3 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する H 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

(c) 配列番号 4～6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) 配列番号 4～6 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する L 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

[請求項14]

以下の (e) 又は (f) のポリペプチドからなる H 鎖可変領域と、(g) 又は (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 から請求項 1 3 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

(e) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する H 鎖可変領域となるポリペプチド。

(g) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する L 鎖可変領域となるポリペプチド。

[請求項15]

以下の (a) 又は (b) のポリペプチドからなる H 鎖の相補性決定領域を含む H 鎖可変領域断片

(a) 配列番号 1～3 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

。

(b) 配列番号 1～3 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する H 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

[請求項16]

以下の (c) 又は (d) のポリペプチドからなる L 鎖の相補性決定領域を含む L 鎖可変領域断片。

(c) 配列番号 4～6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

。

(d) 配列番号 4～6 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する L 鎖の相補性決定領域となるポリペプチド。

[請求項17]

以下の (e) 又は (f) のポリペプチドからなる、H 鎖可変領域断片。

(e) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(f) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する H 鎖可変領域となるポリペプチド。

[請求項18]

以下の (g) 又は (h) のポリペプチドからなる、L 鎖可変領域断片。

(g) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(h) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、T T R に対する L 鎖可変領域となるポリペプチド。

[請求項19]

請求項 15 に記載の H 鎖の相補性決定領域を含む H 鎖可変領域断片または請求項 17 に記載の H 鎖可変領域断片と、請求項 16 に記載の L 鎖の相補性決定領域を含む L 鎖可変領域断片または請求項 18 に記

載のL鎖可変領域断片とを連結してなる、TTRに対する抗体の1本鎖可変領域断片。

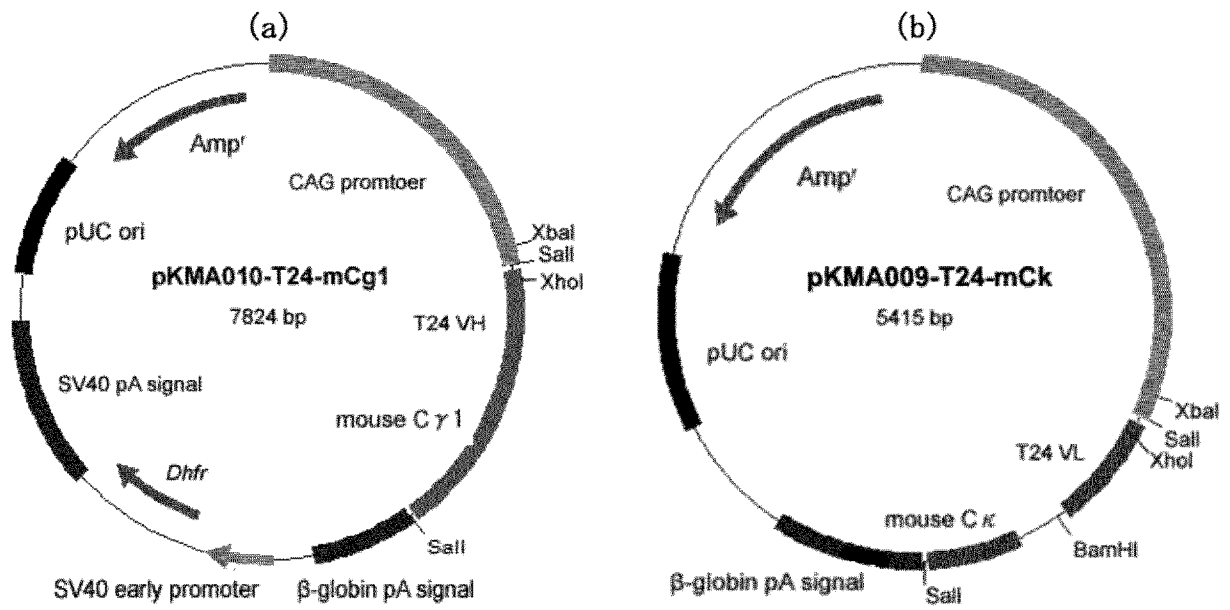
- [請求項20] 請求項15に記載のH鎖の相補性決定領域を含むH鎖可変領域断片または請求項17に記載のH鎖可変領域断片、及び／又は、請求項16に記載のL鎖の相補性決定領域を含むL鎖可変領域断片または請求項18に記載のL鎖可変領域断片に、ヒト由来の定常領域を連結してなる、請求項1から請求項12に記載のヒト化抗体又はその断片。
- [請求項21] 請求項1から請求項20のいずれか一項に記載の抗体又はその断片をコードする遺伝子。
- [請求項22] 請求項21に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。
- [請求項23] 請求項21に記載の遺伝子又は請求項22に記載の発現ベクターが導入された形質転換体。
- [請求項24] 請求項1から請求項20のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む、TTRアミロイドを検出する器具。
- [請求項25] 請求項1から請求項20のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む、TTRアミロイドを除去する担体。
- [請求項26] 請求項1から請求項20のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む、TTRアミロイドを検出する試薬。
- [請求項27] 請求項1から請求項20のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む、TTRアミロイドーシス診断薬。
- [請求項28] TTRアミロイドーシスが家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）である、請求項27に記載の診断薬。
- [請求項29] TTRアミロイドーシスが老人性全身性アミロイドーシス（SSA）である、請求項27に記載の診断薬。
- [請求項30] 請求項1から請求項20のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む、TTRの線維化阻害剤。
- [請求項31] 請求項1から請求項20のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含む、TTRアミロイドーシスを予防及び／又は治療するための医

薬組成物。

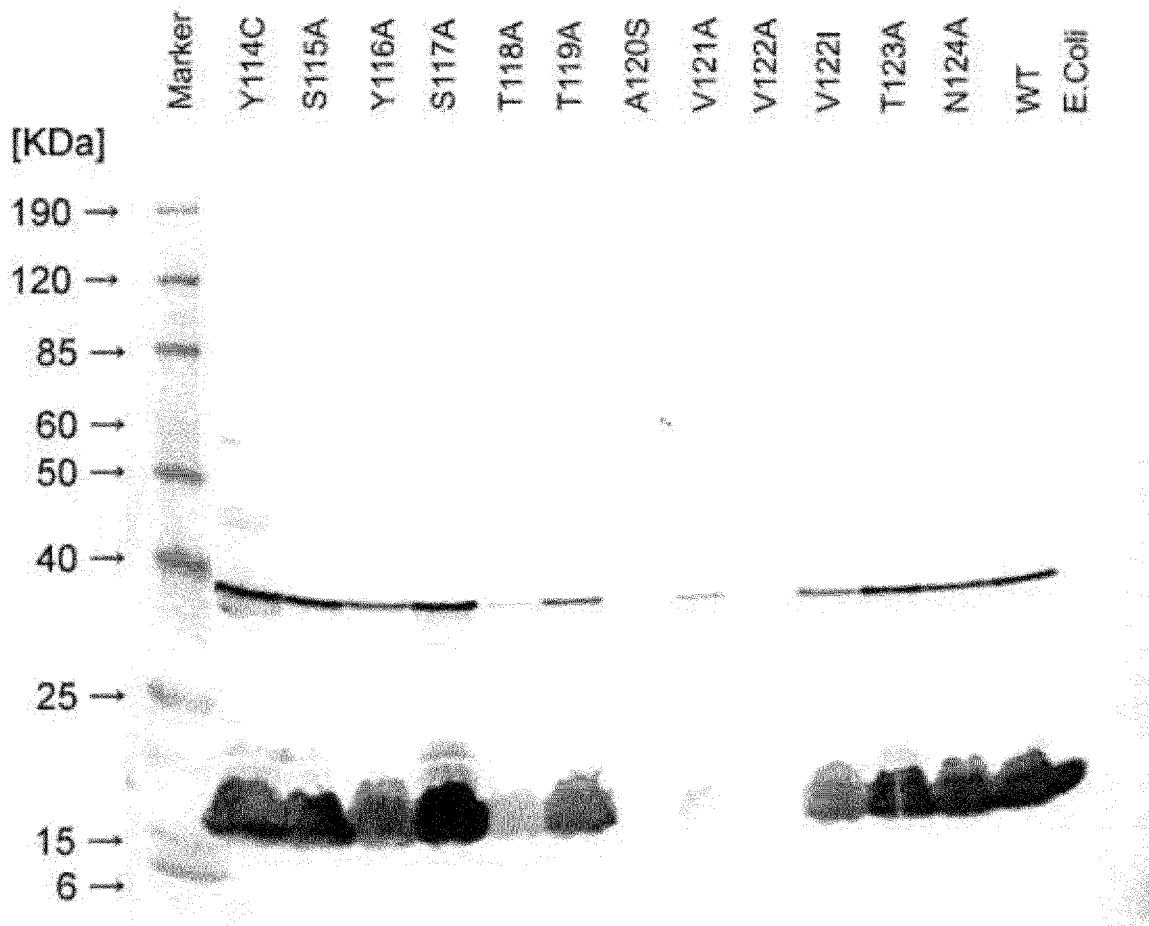
[請求項32] TTRアミロイドーシスが家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）である、請求項31に記載の医薬組成物。

[請求項33] TTRアミロイドーシスが老人性全身性アミロイドーシス（SSA）である、請求項31に記載の医薬組成物。

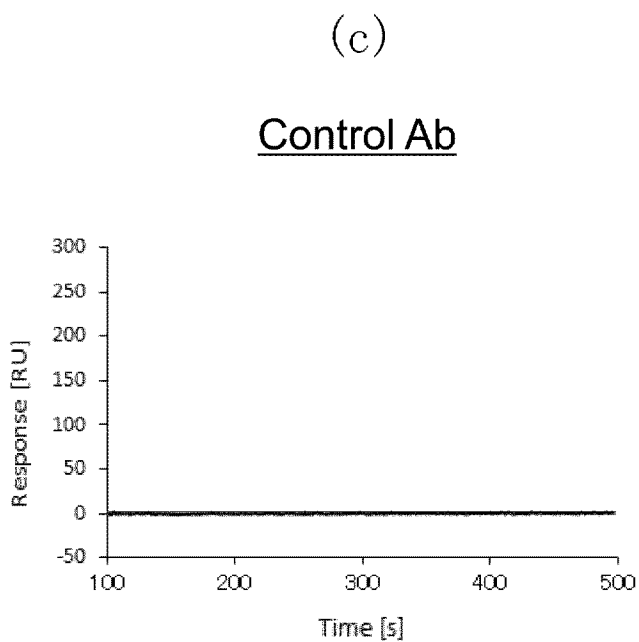
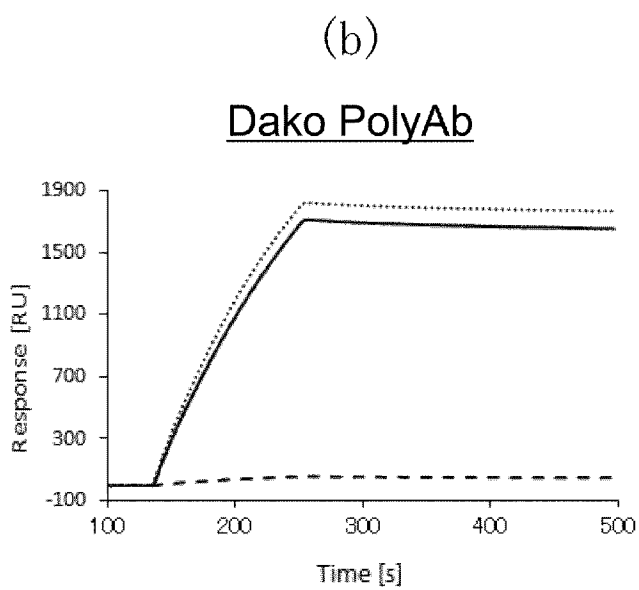
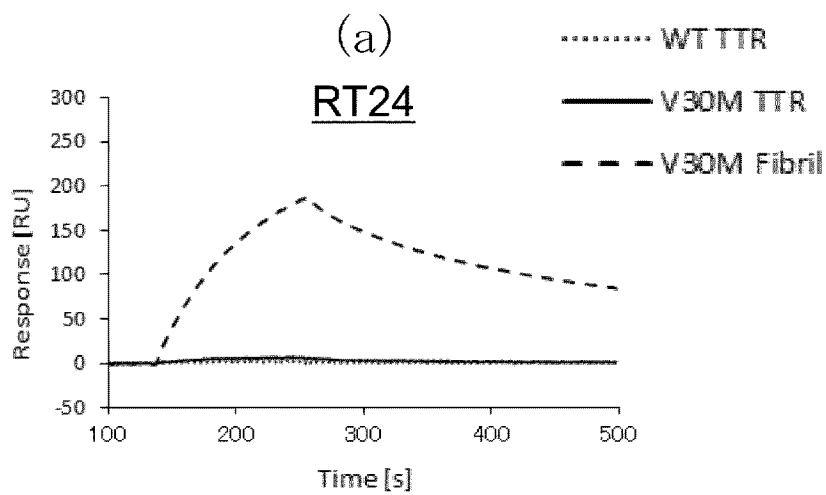
[圖1]



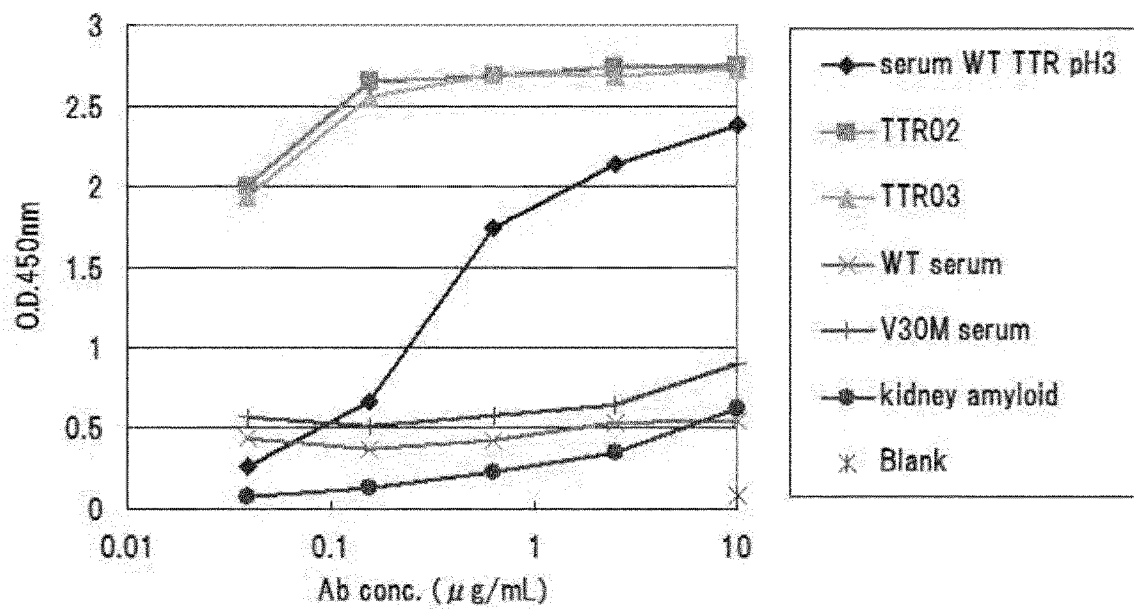
[圖2]




[3]

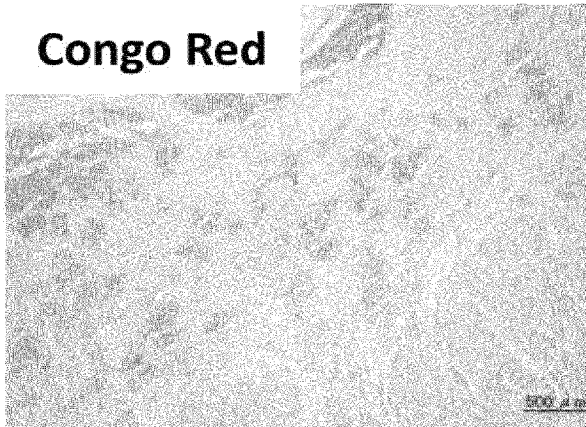


[図4]

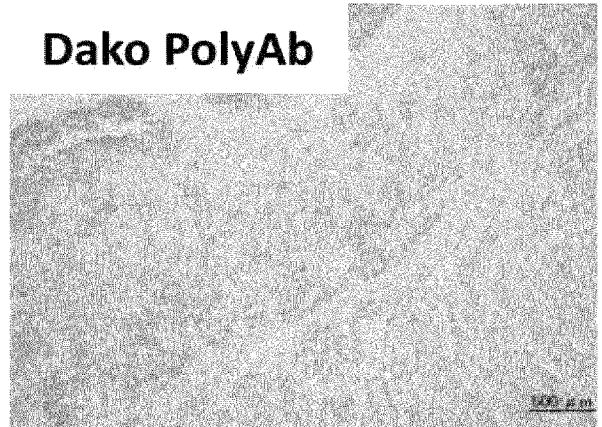


[5a]

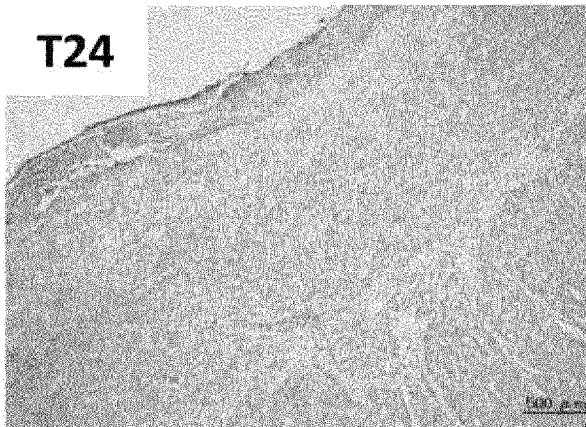
Congo Red



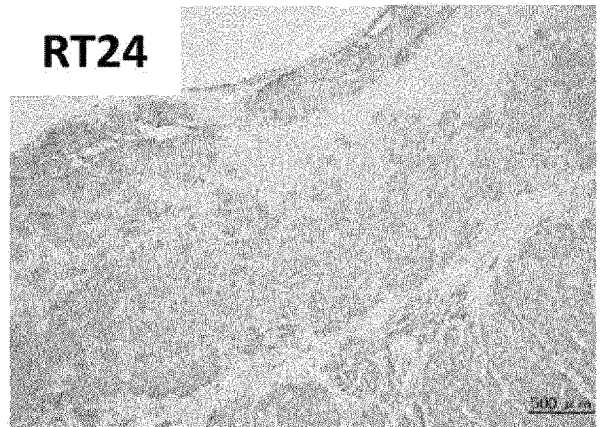
Dako PolyAb



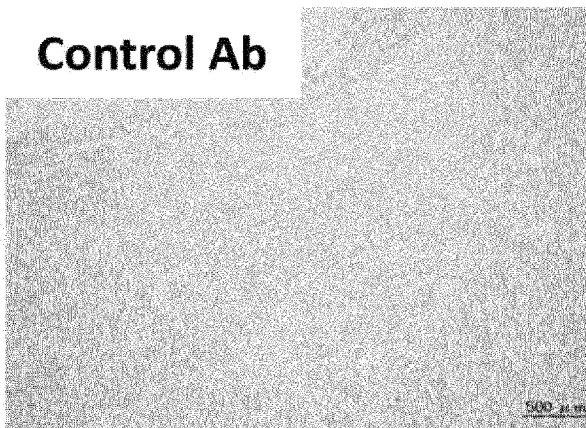
T24



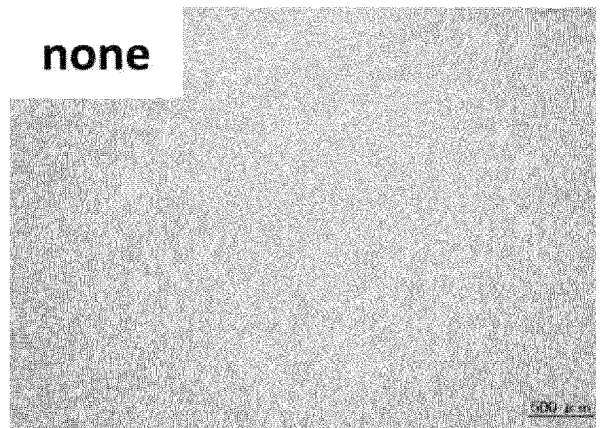
RT24



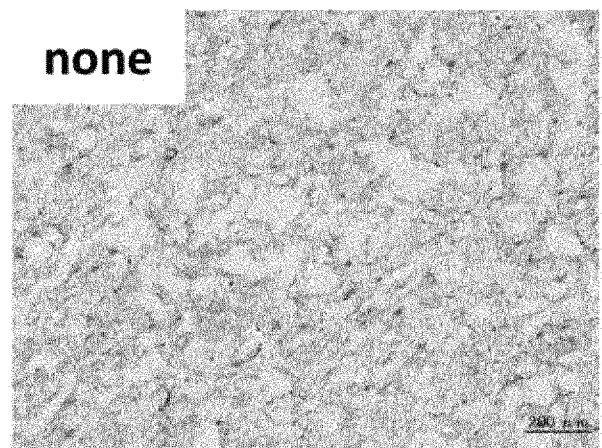
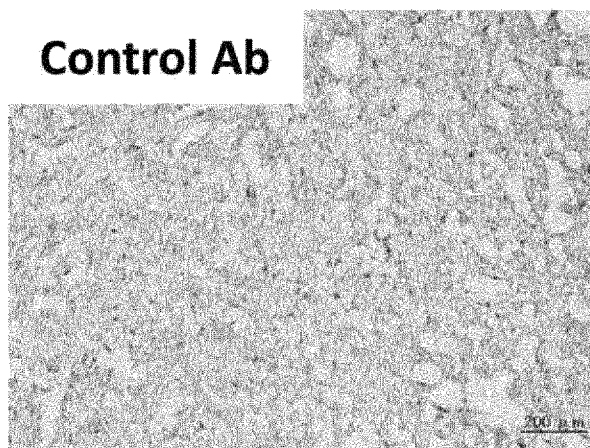
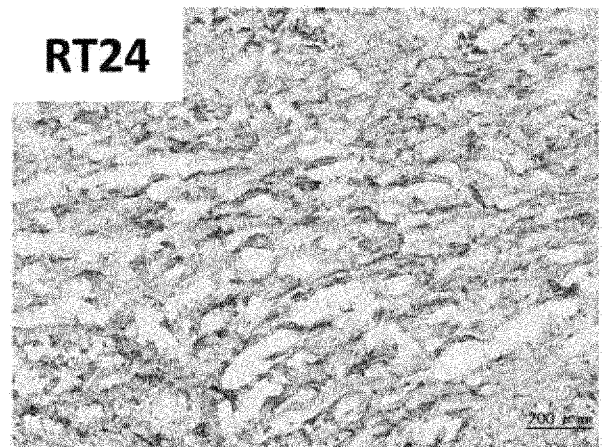
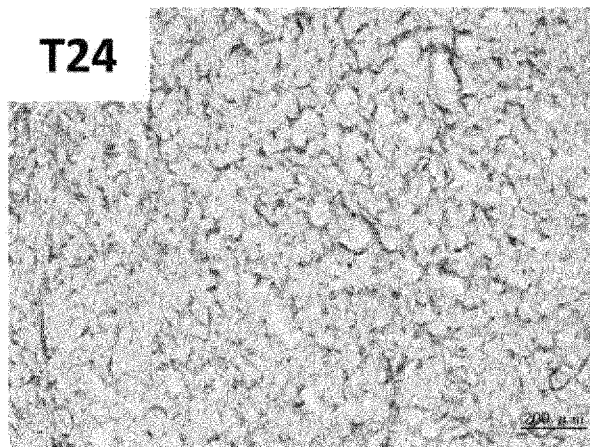
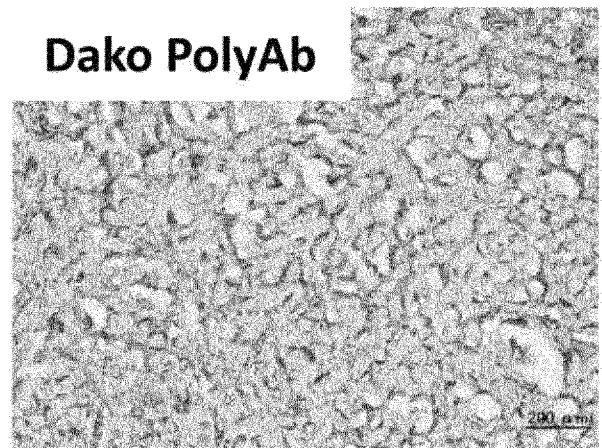
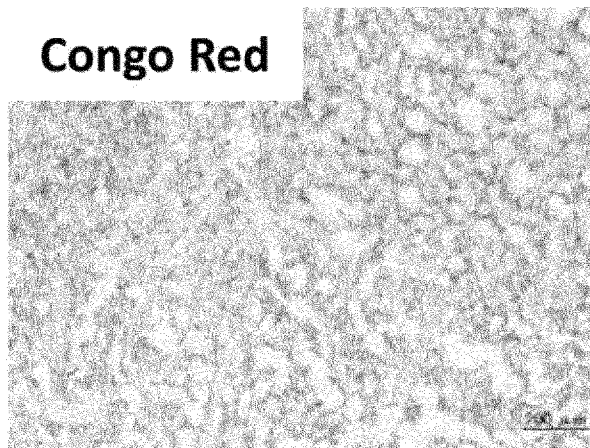
Control Ab



none

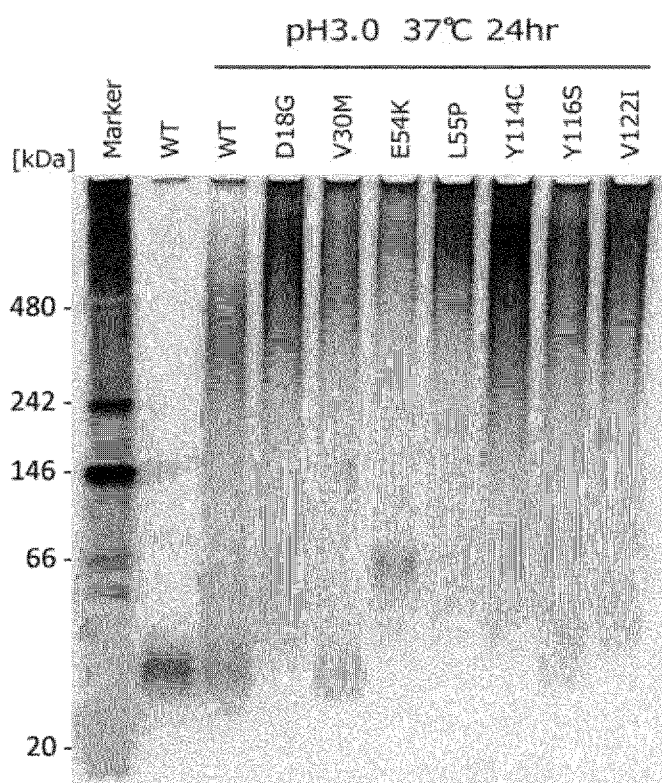


[図5b]

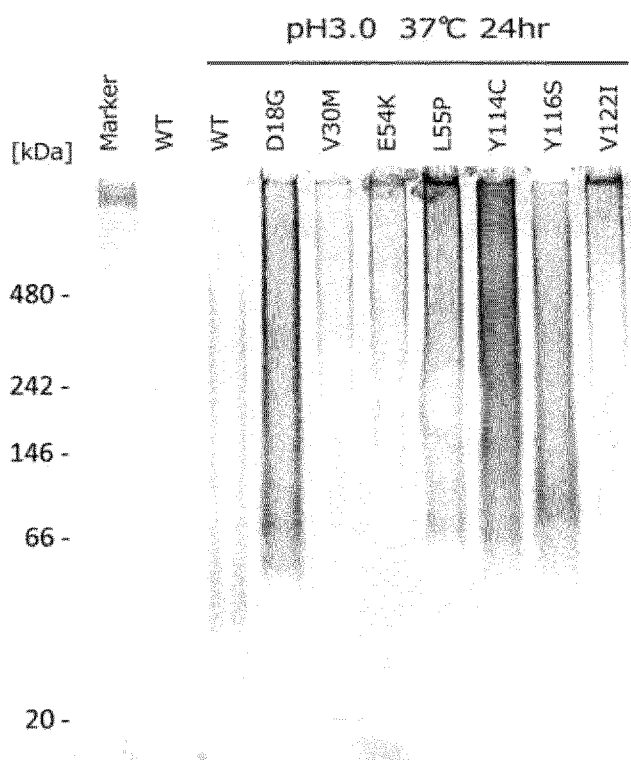


[6]

(a)
Silver Stain

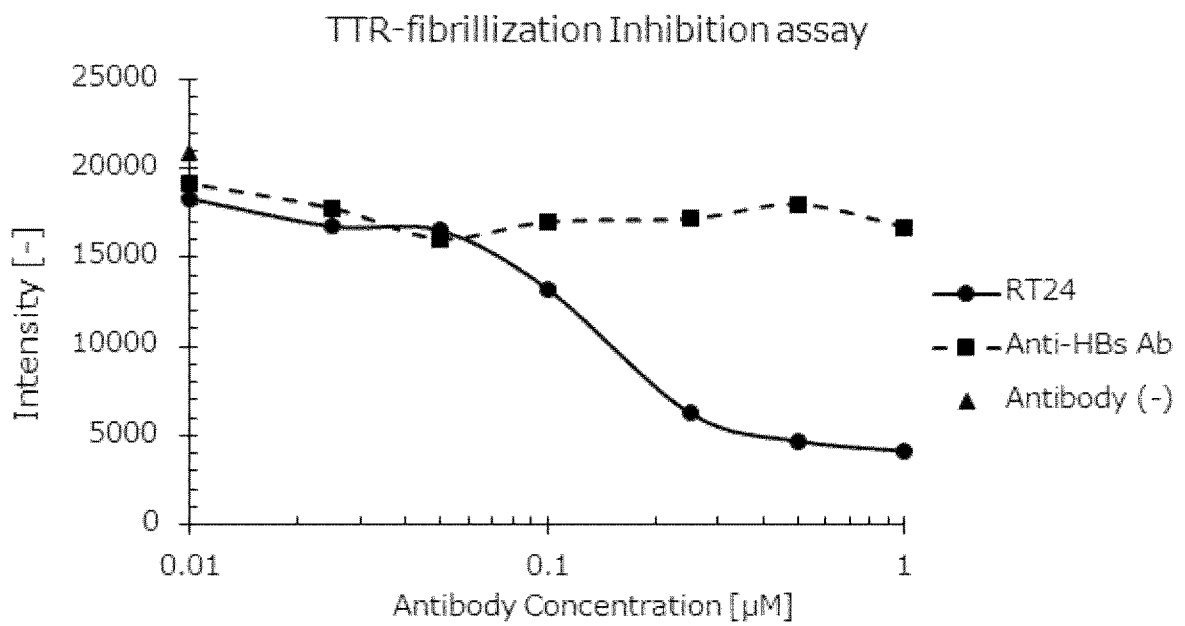


(b)
Western Blot

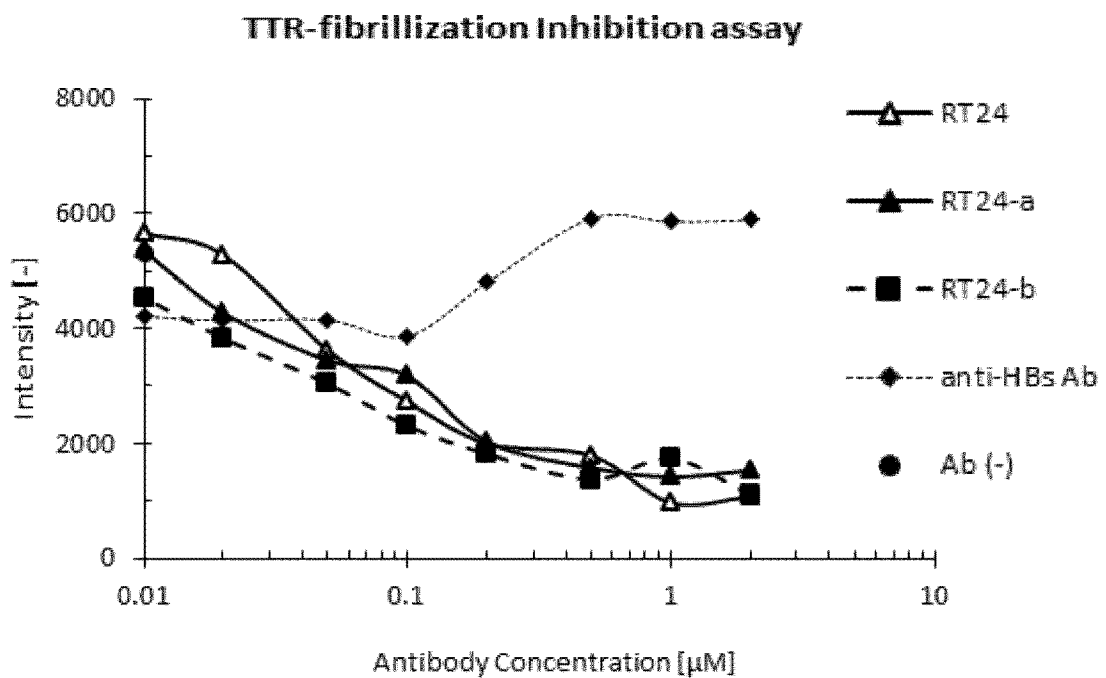


[図7]

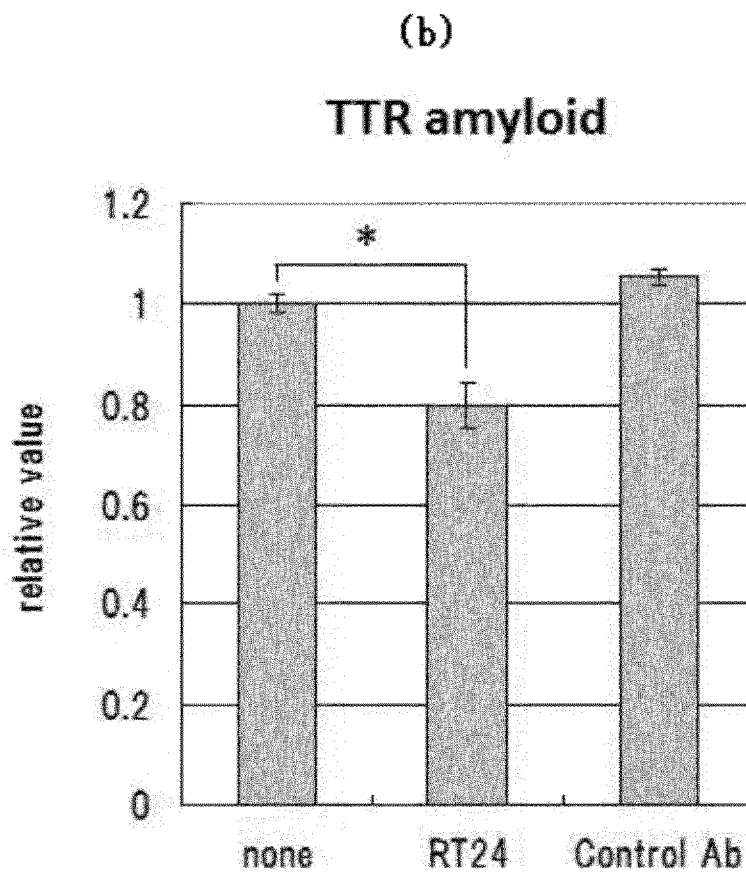
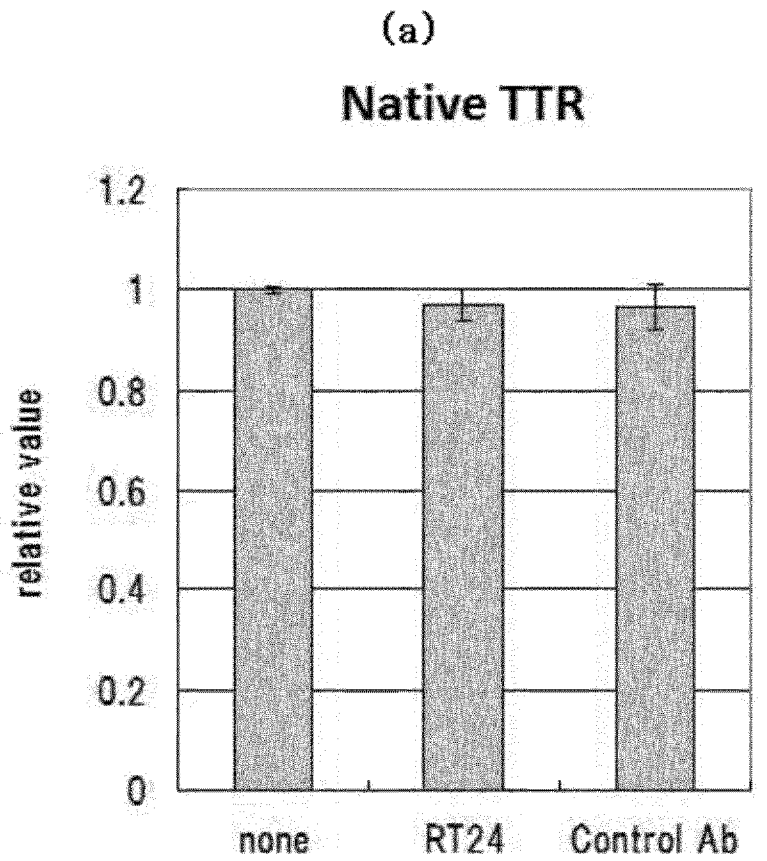
(a)



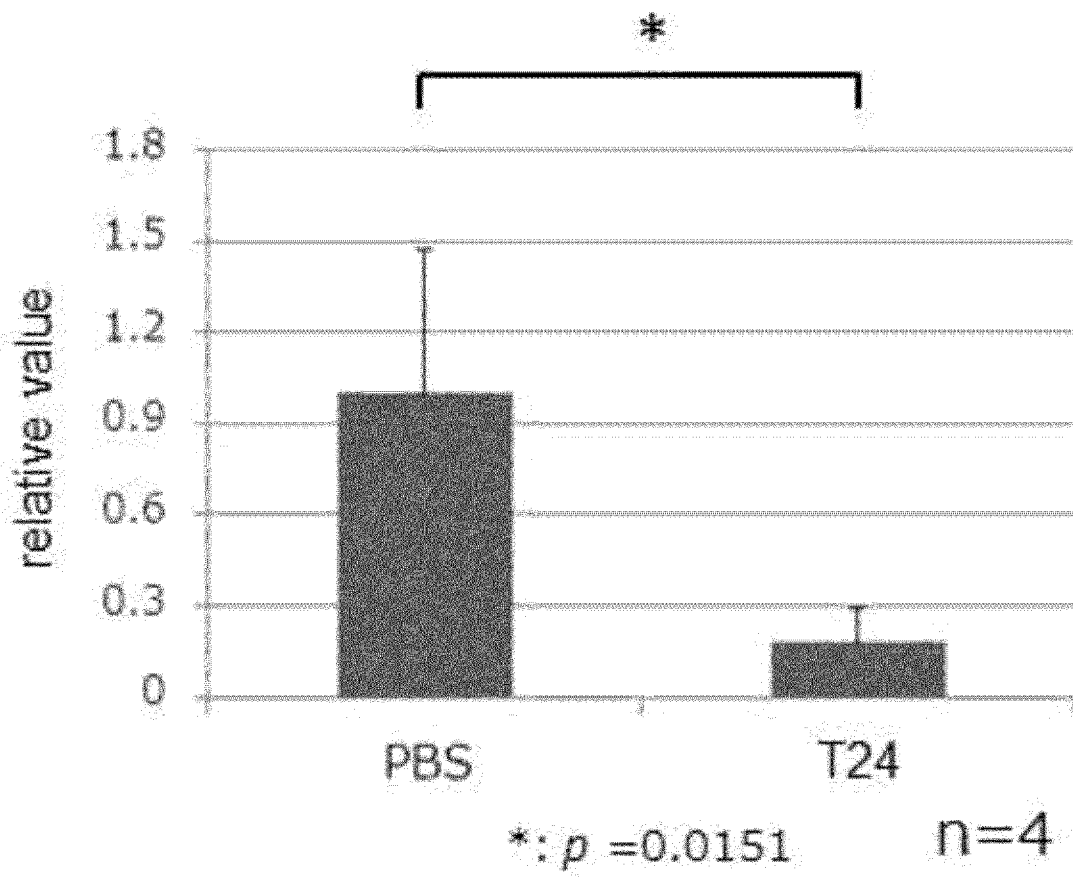
(b)



[図8]

*: $p = 0.0271$

[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/051856

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n, G01N33/53(2006.01)n</i> 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) <i>C12N15/09, A61K39/395, A61P25/28, C07K16/18, C12M1/34, C12N15/02, C12P21/08, G01N33/53</i>														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table border="0"> <tr> <td>Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1922-1996</td> <td>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</td> <td>1996-2015</td> </tr> <tr> <td>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1971-2015</td> <td>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1994-2015</td> </tr> </table>			Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015	Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015				
Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015											
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)</i>														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	JP 2010-195710 A (National University Corporation Kumamoto University), 09 September 2010 (09.09.2010), entire text; particularly, claims 1 to 7; examples (Family: none)	1-33												
Y	Akihiko HOSOI, "Kazokusei Amyloid Polyneuropathy no Kotai Ryoho", Reimei, 2012, vol.21, pages 47 to 51, entire text, particularly, pages 49 to 50	1-33												
Y	Mitsuharu UEDA et al., "Saishin no Shinkei Nanbyo Chiryō to Kōgo no Tenbo 6. Amyloidosis", Medicine and Drug Journal, 2012, vol.48, no.5, pages 1307 to 1314, entire text, particularly, fig. 1	1-33												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	"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	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"&" document member of the same patent family	"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	
* Special categories of cited documents:	"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													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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													
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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													
"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)	"&" document member of the same patent family													
"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														
Date of the actual completion of the international search 02 April 2015 (02.04.15)		Date of mailing of the international search report 14 April 2015 (14.04.15)												
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/051856

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yukio ANDO, "Kazokusei Amyloid Polyneuropathy (FAP) no Kan Ishoku to Aratana Chiryō no Kaihatsu", Annual Review Shinkei 2011, 2011, pages 310 to 317, entire text, particularly, pages 313 to 314	1-33
Y	Hiroyoshi OBA, "Jinko Kotai Library ni yoru Kotai Iyaku Kaihatsu", Kotai Iyaku no Saizensen, 2007, pages 157 to 169, entire text, particularly, pages 158 to 161	1-33

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n, G01N33/53(2006.01)n</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61P25/28, C07K16/18, C12M1/34, C12N15/02, C12P21/08, G01N33/53</p>														
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2015年													
日本国実用新案登録公報	1996-2015年													
日本国登録実用新案公報	1994-2015年													
<p>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)</p> <p>CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2010-195710 A (国立大学法人 熊本大学) 2010.09.09, 全文、特に請求項1-7、実施例 (ファミリーなし)</td> <td>1-33</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>細井重樹彦, 家族性アミロイドポリニューロパチーの抗体療法, 黎明, 2012, Vol.21, p.47-51, 全文、特に p.49-50</td> <td>1-33</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>植田光晴他, 最新の神経難病治療と今後の展望 6. アミロイドーシス, 医薬ジャーナル, 2012, Vol.48 No.5, p.1307-1314, 全文、特に図1</td> <td>1-33</td> </tr> </tbody> </table>			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 請求項の番号	Y	JP 2010-195710 A (国立大学法人 熊本大学) 2010.09.09, 全文、特に請求項1-7、実施例 (ファミリーなし)	1-33	Y	細井重樹彦, 家族性アミロイドポリニューロパチーの抗体療法, 黎明, 2012, Vol.21, p.47-51, 全文、特に p.49-50	1-33	Y	植田光晴他, 最新の神経難病治療と今後の展望 6. アミロイドーシス, 医薬ジャーナル, 2012, Vol.48 No.5, p.1307-1314, 全文、特に図1	1-33
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 請求項の番号												
Y	JP 2010-195710 A (国立大学法人 熊本大学) 2010.09.09, 全文、特に請求項1-7、実施例 (ファミリーなし)	1-33												
Y	細井重樹彦, 家族性アミロイドポリニューロパチーの抗体療法, 黎明, 2012, Vol.21, p.47-51, 全文、特に p.49-50	1-33												
Y	植田光晴他, 最新の神経難病治療と今後の展望 6. アミロイドーシス, 医薬ジャーナル, 2012, Vol.48 No.5, p.1307-1314, 全文、特に図1	1-33												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>02.04.2015</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>14.04.2015</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>松原 寛子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>	<table border="1"> <tr> <td>4N</td> <td>4154</td> </tr> </table>	4N	4154										
4N	4154													

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 請求項の番号
Y	安東由喜雄, 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の肝移植 と新たな治療の開発, Annual Review 神経 2011, 2011, p. 310-317, 全文、特に p. 313-314	1-33
Y	大場浩美, 人工抗体ライブラリーによる抗体医薬開発, 抗体医薬の 最前線, 2007, p. 157-169, 全文、特に p. 158-161	1-33