

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-540799

(P2009-540799A)

(43) 公表日 平成21年11月26日(2009.11.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
A61K 47/42 (2006.01)	A61K 47/42	4B064
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C076
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-514526 (P2009-514526)
 (86) (22) 出願日 平成19年6月7日(2007.6.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年2月5日(2009.2.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/070587
 (87) 国際公開番号 W02007/143711
 (87) 国際公開日 平成19年12月13日(2007.12.13)
 (31) 優先権主張番号 60/811, 618
 (32) 優先日 平成18年6月7日(2006.6.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 390023641
 ウィスコンシン アラムナイ リサーチ
 フォンデーション
 WISCONSIN ALUMNI RE
 SEARCH FOUNDATION
 アメリカ合衆国 53705 ウィスコン
 シン マデイソン ノース ウォルナツト
 ストリート 614
 (74) 代理人 100070002
 弁理士 川崎 隆夫
 (74) 代理人 100076439
 弁理士 飯田 敏三

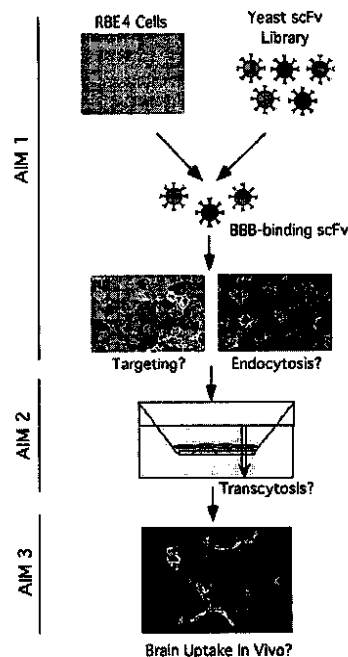
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液脳関門標的化抗体

(57) 【要約】

本発明は、受容体及び結合リガンドのエンドサイトーシス/トランスサイトーシスをもたらす脳内皮細胞受容体と結合する抗体を提供する。実施形態によっては、リガンドは、薬学的に活性な化合物と抗体を含み、抗体は、血液脳関門(BBB)を通る化合物の送達に関する。本発明は、培養細胞単層からライブラリを選抜することによって、内皮細胞特異的抗体を特定する方法も提供する。さらに本発明は、抗体と結合する内皮細胞受容体を特定することによって、さらなる同族リガンド及びそれらに関連した輸送系を単離し、且つ抗体によって標的化されたトランスサイトーシス輸送体を特定する標的受容体を提供することを可能にする。

【選択図】 図4



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 ~ 3 4 のいずれかで表わされるアミノ酸配列を有する抗体断片を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

前記抗体断片が、配列番号 1 ~ 5 のいずれかで表わされるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

前記抗体断片が、配列番号で表わされるアミノ酸配列を有する、請求項 2 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 4】

前記抗体断片が、脳内皮細胞と結合し且つ脳内皮細胞により内在化される、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 5】

前記抗体断片が、配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列を有する、請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 6】

前記抗体断片が、一本鎖可変領域 (scFv) 抗体である、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号 1 ~ 3 4 のいずれかで表わされるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

【請求項 8】

薬学的に活性な化合物と組み合わせて、配列番号 1 ~ 3 4 のいずれかで表わされる単離された抗体断片を含む組成物。

【請求項 9】

前記抗体断片が、配列番号 1 ~ 5 のいずれかで表わされる、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記抗体断片が、配列番号 1 で表わされる、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

配列番号 1 ~ 3 4 のいずれかで表わされるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む精製及び単離された発現ベクター。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の発現ベクターを含む精製及び単離された宿主細胞。

【請求項 13】

脳内皮細胞受容体と結合可能な抗体断片を発現する方法であって、

(a) 酵母細胞上に抗体断片を提示する工程、

(b) 脳内皮細胞培養物又は脳血管単離物から前記抗体を提示する酵母細胞を選抜する

(panning) 工程、

(c) 脳内皮細胞受容体と特異的に結合する提示された抗体断片を特定する工程、

(d) 発現ベクターにおいて工程 (c) で特定された前記抗体断片をコードする単離された核酸を挿入する工程、及び

(e) 宿主細胞を前記発現ベクターで形質転換すること、

を含む、脳内皮細胞受容体と結合可能な抗体断片を発現する方法。

【請求項 14】

前記宿主細胞が、サッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 又は大腸菌 (*E. coli*) である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

脳内皮細胞特異的抗体を特定する方法であって、

(a) 酵母細胞の表面上に抗体断片を提示する工程、

10

20

30

40

50

(b) 脳内皮細胞培養物又は脳血管単離物から前記抗体を提示した酵母細胞を選抜する工程、及び

(c) 脳内皮細胞特異的抗体を特定する工程、
を含み、

前記抗体が脳内皮細胞と特異的に結合する、脳内皮細胞特異的抗体を特定する方法。

【請求項 16】

前記脳内皮細胞培養物が単層である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

エンドサイトーシス又はトランスサイトーシスで機能する内皮細胞受容体を特定する方法であって、

(a) 培養内皮細胞単層を調製する工程、

(b) 前記内皮細胞単層から酵母提示された抗体ライブラリを選抜する工程、

(c) 抗体結合内皮細胞を単離する工程、及び

(d) 前記抗体が前記内皮細胞と結合する同族受容体を特定する工程、

を含む、エンドサイトーシス又はトランスサイトーシスで機能する内皮細胞受容体を特定する方法。

【請求項 18】

無傷の脳毛細血管で発現する、非還元条件下でヒト scFv A で免疫沈降した際の分子量が約 124 kDa である精製 scFv A 抗原。

【請求項 19】

抗体 - 血液脳関門輸送系であって、

(a) 無傷の脳毛細血管で発現する、非還元条件下でヒト scFv A で免疫沈降した際の分子量が約 124 kDa である抗原、及び

(b) 配列番号 1 ~ 5 のいずれかで表わされるアミノ酸配列を有する、前記抗原と結合する精製抗体、

を含む、抗体 - 血液脳関門輸送系。

【請求項 20】

前記抗原と結合する前記精製抗体が、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する、請求項 19 に記載の抗体 - 血液脳関門輸送系。

【請求項 21】

前記精製抗体が、薬学的に活性な化合物と組み合わせて与えられる、請求項 19 に記載の抗体 - 血液脳関門輸送系。

【請求項 22】

血液脳関門を通して、薬学的に活性な化合物を被験体の脳に送達する方法であって、配列番号 1 ~ 5 のいずれかで表わされるアミノ酸配列を有する精製抗体と組み合わせて、薬学的に活性な化合物を被験体に投与する工程を含み、該抗体が、該血液脳関門を通る、該薬学的に活性な化合物の前記被験体の脳への送達に関する、前記血液脳関門を通して、薬学的に活性な化合物を被験体の脳に送達する方法。

【請求項 23】

前記精製抗体が、配列番号 1 で表わされる配列を有する、請求項 22 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

この本出願は、2006年6月7日に提出された米国特許仮出願第60/811,618号(全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に援用される)の利益を主張する。

【0002】

(連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載)

本研究は一部、米国立衛生研究所から助成金番号 NS052649 の援助を受けている

10

20

30

40

50

。米国政府は、本発明において一定の権利を有し得る。

【0003】

(発明の技術分野)

本発明は概して、内皮細胞表面受容体を認識する抗体、及びこのような抗体を特定する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

脳及び神経系の疾患に対する治療法は、脳の血管が血流中に運ばれるほとんどの物質に対して不浸透性であるために極めて制限されている。血液脳関門(BBB)と総称される脳の血管は、身体の末梢部で見出される血管に比べて特殊である。BBB内皮細胞(EC)と、星状膠細胞、周皮細胞及びニューロン等の神経細胞との密接な付着(apposition)が、観察された不浸透性に寄与する表現型特性を誘導する。BBBを含むEC間の密着結合が傍細胞輸送を制限する一方で、飲小胞及び空間の欠如は非特異的な細胞輸送を制限する。これらの要因が合わさって、血液から脳への分子流出を500ダルトン未満に制限すると共に、脂溶性である分子に制限する。したがって、所望の薬理学的特性を有する薬物が偶発的に血管を自由に通るサイズ及び親油性特質を備えるような状況を除いてほとんどの場合、輸送ビヒクルとして、大量の輸送表面積(ヒト脳の毛細血管400マイルで 21 m^2 を超える)の血流を用いることはできない。このような制限のために、全ての小分子の調合薬の98%超、並びに新興群のタンパク質及び遺伝子治療薬のほぼ100%がBBBを通過しないことが推測される。

10

20

【0005】

BBBによって与えられた物理的障壁に加えて、p-糖タンパク質(MDR1)等の排出輸送体及び多剤耐性関連タンパク質ファミリー(MRP)成員は、小さくて脂溶性の小分子の脳への取り込みをさらに制限するのに働く。図1Aは、血管におけるホースラディッシュペルオキシダーゼの隔離を示すラットの脳(V=脳室)断片の顕微鏡写真であり、BBBを欠く毛細血管によって灌流された脳の小領域では、タンパク質が脳組織に容易に拡散する。また、図2AはBBBの不浸透性を示す：ヒスタミン(111Da)は血管内に隔離されたままであり、脳内部には侵入しない。

【0006】

脳腫瘍、アルツハイマー病、パーキンソン病、及び脳卒中等の神経系の疾患が世界中の人々を苦しめ続けているが、このような疾患を治療する新規の治療法は不足している。治療法の不足は一部、効果的な脳輸送戦略の不足に起因している可能性がある。この治療法不足のために、さらに米国立衛生研究所の腫瘍及び脳卒中進行の検討グループは、研究の最優先事項として脳血管関門を通して標的化する薬物又は遺伝子に対する革新的戦略の探求を確認した。米国立衛生研究所(NIH)のガイドラインは、基礎神経科学のこのような躍進が診療所に伝えられ得ることを指示しており、「薬剤送達戦略及び/又は脳の特定領域を標的化する能力を要求している」。したがって、標的化及び経BBB輸送に適切なビヒクルの非存在下では、新規のCNS薬のパイプラインが神経障害を患う人々に不適であり続けると考えられる。近年、脳卒中の保護能、ヒト被験体の脳への直接注入後のパーキンソン病症状の好転、並びにパーキンソン病、及びアルツハイマー病、ハンチントン病及び多発性硬化症等の他の神経変性疾患の潜在的治療に対する神経幹細胞の直接的に特殊分化する能力に対して、例えば、ニューロトロフィンとして知られるタンパク質治療薬が研究されている。極めて有望な治療薬ではあるが、これらの栄養素はBBBを通ることは容易ではなく、広範囲に及ぶ効果的な投与には非侵襲性の送達系が必要である。

30

40

【0007】

現在の脳送達戦略は特に侵襲性であり、BBBを避ける必要がある。薬物を注入したポリマー粒子の埋め込みに、神経外科を必要とする戦略が用いられるが、脳組織中の細胞外液が静止しているために、治療容積は制限されており、単純な分子拡散によって、2~3mmというわずかな距離しか浸透できない。同様の方法は、薬物の脳室への直接注射であるが、脳脊髄液が迅速に除去され、1日に4~5回入れ替わるので、このような脳室内注

50

射に関しても、脳組織への浸透は制限される。さらに、タンパク質治療薬（例えば、パーキンソン病に対するグリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF））が、渦流ポンプによる連続薬物注入を用いた神経外科的に埋め込まれたカテーテルを通して送達している。高浸透圧溶液、並びに血液から脳へと分子を自由に通過させるセロトニン及びブラジキニンペプチド等の血管作用剤を用いて、BBBの破壊を研究している。BBBの変化によって、通常脳から排除される溶質及び免疫因子が自由にアクセスするために毒性作用を引き起こす可能性があるため、この方法は主に臨床的に末期の患者のみに用いられる。

【0008】

上述の侵襲性戦略は、治療容積が制限された疾患（例えば局在化した非転移性の脳腫瘍）で成功することができる。しかし、反復治療計画を必要とする慢性症状、又はアルツハイマー病等の脳の大部分に存在する疾患に対して、非侵襲性の薬物送達戦略は実質的により好ましく、且つ実用的である。

【0009】

広範囲に及ぶ薬物分布を与えるのに脳血管網を利用する、多種多様な非侵襲性の脳薬物送達法が研究されている。脳の毛細血管網は、毛細血管間の平均間隔がちょうど40 μmであり、且つ、原則的にそれぞれの脳細胞が自身の血管を栄養供給のために有するほど十分高密度である（図2）。さらに、BBBの脳側に薬物が蓄積するようなBBBの内皮障壁を乗り越えることができる場合、拡散距離は、それぞれの脳細胞が薬物にアクセス可能であるくらい十分短い。結果として侵襲性的方法に比べて、広範囲の治療容積を得ることができる。これらの非侵襲性輸送系/機構は一般的に、以下の3つの群にまとめることができる：1、非特異的な取り込み；2、担体媒介性輸送；及び3、受容体媒介性輸送（図3）。

【0010】

非特異的な取り込み機構はBBBを通る或る程度の輸送を可能にするが、感受性及び特異性を欠いている。カチオン性タンパク質形質導入ドメインは非特異的な担体領域（realm）に分けられ、HIV-TATペプチドが、腹腔内注射後に脳間質にアクセスすることを示したが、その後の薬物動態解析によって、迅速な除去及び幅広い組織取り込みには、薬理学的効果を得るために非常に高い用量が必要となることが示された。別の非特異的な取り込み機構は、ポリソルベート80によるナノ粒子の界面活性剤被覆である。脳取り込み機構は未だに解明されていないが、*in vivo*での粒子の不安定性によって、短期間の薬理学的効果及び可能なBBB浸透性が導かれる。これらの非特異的な方法は双方とも選択的な標的化の欠如があり、全身的作用と共に、身体にわたって活性化化合物を幅広く分布させる。

【0011】

担体媒介性薬物輸送は、選択的で且つ小分子溶質に対して立体特異的な内因性膜貫通タンパク質の存在に依存する。例えば、パーキンソン病を治療するのに投与されるL-ドーパは、大きなアミノ酸輸送体（LAT-1）を用いることによって脳に入る。血液脳関門を通る輸送の成功は、L-ドーパがフェニルアラニンの芳香環上で2つのヒドロキシル基が置換されただけのフェニルアラニン構造に似ていた結果である。ビオチン化薬物の送達に飽和ビオチン輸送系を用いることも試みられてきた。さらに、AIDS薬物AZTの排出が担体媒介性で進行すると考えられる。しかし、これらの選択膜孔によって受けられる立体特異的及び立体的な制約のために、適用は潜在的に制限される。

【0012】

受容体媒介性輸送は、細胞表面受容体の外表面エピトープの結合、及びトランスサイトosisとして知られるエネルギー集約型細胞輸送プロセスの誘発を伴う（図3）。天然リガンド、又はトランスサイトosisプロセスを誘発することができる抗体と結合した場合、薬物をこれらの門脈を利用して送達することができる。この方法は、サイズが最大100 nmの小分子、タンパク質、遺伝子、ナノ粒子及びリボソームを非侵襲性輸送することに成功している。トランスサイトosisに対して一般的に標的となる受容体は、低密度リポタンパク質（LDL）受容体、トランスフェリン受容体、及びインスリン受容体であ

10

20

30

40

50

る。吸収媒介性トランスサイトシスを伴う同様の特異性の低いプロセスは、受容体クラスター化及びトランスサイトシス経路の活性化を促進するカチオン化タンパク質と共に用いられている。内因性リガンドの正常な輸送を破壊しないような方法では、戦略として細胞表面受容体を標的とすることが多い。したがって、正常な代謝経路に及ぶ影響が制限される。さらに、トランスサイトシスは小胞輸送系を利用するので、この戦略は、担体媒介性輸送のサイズ及び形状の制約による制限を全くというほど受けない。

【0013】

特に、そのリガンドに対して高い親和性及び特異性が与えられるBBB受容体媒介性トランスサイトシス系を標的化するのに、抗体が十分適している。例として、インスリン及びトランスフェリン受容体の細胞外エピローブを認識する適切に標的化された抗体は、BBBを通して効果的に輸送されると共に経内皮経路を介して脳間質に蓄積される人工輸送体物質として作用することができる。さらに、様々なサイズ及び組成の薬物又は薬物担体と結合する場合、BBB標的化抗体は、セラピューティックカーゴ(therapeutic cargo)の脳取り込みを媒介する。抗トランスフェリン受容体抗体を用いて、メトトレキサート等の小分子の非侵襲性輸送が達成されている。抗トランスフェリン受容体抗体を用いることによって、静脈内投与後に、神経成長因子、脳由来神経栄養因子、及び塩基性線維芽細胞成長因子等のタンパク質が脳に送達された。後の2つの場合、ラットの中大脳動脈閉塞モデルにおける1回排出量(stroke volume)の減少が促進された。また、抗トランスフェリン受容体抗体を用いて、*in vivo*でリボソーム及び遺伝子を含むリボソームが送達されている。特に、遺伝子含有抗体標的化リボソームが、パーキンソン病の実験モデルにおけるチロシンヒドロキシラーゼ活性の回復に関してラット脳、及びヒト化抗インスリン受容体抗体を用いて霊長類の脳へと標的化している。さらに、ペグ化免疫リボソームを介する新規の群のRNA干渉薬物の脳送達によって、ヒト脳腫瘍の実験モデルを埋め込んだマウスの生存率が増大したことが実証されている。さらに、抗トランスフェリン受容体結合ナノ粒子が産生されている。最終的に、抗体が脳の微小血管(microvasculature)と結合するか、又は完全にはトランスサイトシスせずには内在化するとしても、薬物送達の利点を有し得る。脂溶性小分子薬物を充填したリボソーム又はナノ粒子と結合する場合、薬物の局所BBB濃度が上がり、脳排出系の回避を補助することによって、脳取り込みを促進する可能性があり得る。最終的に、トランスサイトシス又はさらには内在化せずに結合が起こる場合、BBB特異的抗体受容体又はリガンドの特定が、輸送体系の成分を特徴付けて特定するのを助け、さらに内在化及びトランスサイトシスを行う抗体を最適化するのを助ける。総合的に、これらの結果は、薬物の脳への非侵襲性の輸送に対する抗体標的化トランスサイトシス系の潜在的有用性を示している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

先の研究において抗体媒介性輸送に関する展望が示されたにもかかわらず、現在の抗体標的化試薬は、特異性及び輸送効率を欠いている。受容体媒介性トランスサイトシスプロセスから導かれた初期結果は、多くの形式での薬物又は薬物担体の送達が堅固であるために有望であるが、一般的な臨床的成功のために取り組む必要がある深刻な欠点も幾つかある。本方法は、トランスフェリン及びインスリン受容体等を普遍的に発現する受容体に依存する。このことによって、脳以外の組織で不要な副作用も有し得る潜在的に高価な薬剤が誤って標的化される。さらに、本方法では概して、悪い標的化、及び理想的ではないBBB浸透性の結果として実際に標的とする脳に達するのは、注射量のわずかな割合(1%~4%)である。この投与治療薬の96%~99%の喪失が、特に、臨床試験の様々な段階で、現在700個近くの薬物を含むタンパク質及び遺伝子ベースの医薬品に対して薬物製造コストがかかるので、これらの送達アプローチの開発の障害となる可能性がある。最終的に、上述の概念立証(proof-of-concept)実験に用いられる抗体は、マウス由来のものであるか、又は一部ヒト化されたもののいずれかであり、これによって、ヒト患者における望ましくない免疫反応が引き起こされる可能性がある。したがって、脳内皮受容体

10

20

30

40

50

を特異的に認識する完全なヒト抗体の特定によって、薬物送達の標的化及び効率が大いに向上され、副作用が最小限に抑えられる。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、受容体及び結合リガンドのエンドサイトーシスをもたらす内皮細胞受容体と結合する抗体を提供する。1つの例示的な実施の形態では、本発明は、配列番号1～34のいずれかで表わされるアミノ酸配列を有する単離された抗体断片を含む。別の実施の形態では、本発明は、配列番号1～34のいずれかで表わされるアミノ酸をコードする配列を有する単離された核酸を提供する。好ましい変形によっては、単離された抗体断片は一本鎖可変領域(scFv)断片である。他の好ましい変形では、単離された抗体は、Fab、IgG、又は内皮細胞受容体に特異的な任意の他のリガンドである。

10

【0016】

別の好ましい実施の形態において、本発明は、血液脳関門(BBB)を通して薬学的に活性な化合物を運ぶのに有用な薬学的に活性な化合物と結合する抗体を含む薬学的組成物である。

【0017】

別の例示的な実施の形態において、本発明は、配列番号1～34のいずれかで表わされるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む単離された発現ベクターである。他の実施の形態では、本発明は、配列番号1～34のいずれかで表わされるアミノ酸配列をコードする単離された核酸を含有する発現ベクターを含む精製及び単離された宿主細胞を含む。宿主細胞は、抗体を発現可能な任意の細胞(例えば菌類、チャイニーズハムスター卵巣細胞を含む哺乳動物細胞;例えばバキュロウイルス発現系を用いた昆虫細胞;植物細胞(例えばトウモロコシ、イネ及びシロイヌナズナ等))であり得ることを理解すべきである。

20

【0018】

さらに別の例示的な実施の形態において、本発明は、脳内皮細胞受容体と結合可能な抗体断片を発現する方法であって、(a)酵母細胞上に抗体断片を提示する工程、(b)脳内皮細胞培養物から抗体を提示する酵母細胞を選抜する工程、(c)脳内皮細胞受容体と特異的に結合する提示された抗体断片を特定する工程、(d)発現ベクターにおいて工程(c)で特定された抗体断片をコードする単離された核酸を挿入する工程、及び(e)宿主細胞を前記発現ベクターで形質転換する工程を含む、脳内皮細胞受容体と結合可能な抗体断片を発現する方法を含む。この実施の形態の変形(versions)によっては、宿主細胞は、酵母、細菌及びこれらの組合せから成る群から選択される。好ましい実施の形態としては、宿主細胞はサッカロマイセス・セレヴィシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)又は大腸菌(*E. coli*)である。

30

【0019】

別の例示的な実施の形態において、本発明は、脳内皮細胞特異的抗体を特定する方法である。この実施の形態は、酵母細胞表面上に抗体断片を提示する工程、脳内皮細胞培養物から提示された抗体を選抜する工程、脳内皮細胞上における膜受容体との特異的な結合体を単離する工程、及び特異的な結合体を特定する工程によって、内皮細胞特異的抗体を特定することを含む。好ましい実施の形態によっては、内皮細胞培養物が細胞単層とされている。

40

【0020】

さらに別の例示的な実施の形態において、本発明は、エンドサイトーシス及びトランスサイトーシスで機能しこれらに関連する内皮細胞受容体を特定する方法であって、培養内皮細胞単層を調製し該内皮細胞単層から酵母提示された抗体ライブラリを選抜する工程、抗体結合内皮細胞を単離する工程、及び同族受容体を特定する工程を含む、エンドサイトーシス及びトランスサイトーシスで機能しこれらに関連する内皮細胞受容体を特定する方法を含む。

【0021】

50

B B B 輸送系を標的化する新規のヒト抗体は多大な有用性を有する。トランスフェリン及びインスリン系等の十分に研究された系を利用した抗体送達戦略とは違い、これらのリガンドがこれから特定される膜タンパク質である場合、新規の受容体媒介性輸送系を特定することは非常に困難である。したがって、本発明者らは、B B B 結合の要求される機能性を有する完全なヒト抗体を特定する新規の選択方法を開発している。この技法の効力 (power) によって、いずれの成分の起源であるかに関する予備知識がない、潜在的な薬物送達ベクター及びその同族の細胞表面受容体 (受容体媒介性担体系) が同時選択される。図 4 は、本発明によるこのような抗体の選択に対する一般的なスキームを示す。

【0022】

本発明の別の態様は、血液脳関門での抗体標的、特に内在化 (エンドサイトーシス) 及びトランスサイトーシスに関する分子機構を表す標的に関する。したがって、本発明は、非還元条件下でヒト scFv A で免疫沈降した際の分子量が約 124 kDa の精製 scFv A 抗原に関する。本発明者らは、この抗原が無傷脳毛細血管で発現されることを特定し実証している。

【0023】

したがって、本発明は、抗体 - 血液脳関門輸送体系をさらに包含する。このような系は、(a) 無傷の脳毛細血管で発現する、非還元条件下でヒト scFv A で免疫沈降した際の分子量が約 124 kDa である抗原、及び (b) scFv A 抗原と結合する精製抗体を含む。精製抗体は、配列番号 1 ~ 5 のいずれかで表わされるアミノ酸配列を有し、より好ましくは前記抗体は、配列番号 1 で表わされるアミノ酸配列を有する scFv A である。或る特定の実施の形態では、精製抗体は、薬学的に活性な化合物と組み合わせて与えられる。

【0024】

開示の抗体 - 血液脳関門輸送体系に基づいて、本発明は、血液脳関門を通過して、被験体の脳に薬学的に活性な化合物を送達する方法も考慮する。このような方法は、抗体が血液脳関門を通過して被験体の脳に薬学的に活性な化合物を送達することに関するように、配列番号 1 ~ 5 のいずれかで表わされるアミノ酸配列を有する精製抗体と組み合わせて、薬学的に活性な化合物を被験体に投与することを含む。

【0025】

本発明による物及び方法の様々な例示的な実施形態のこれらの及び他の特徴及び利点が、以下の本発明による方法の様々な例示的な実施形態の詳細な説明で記載されるか、又はそれから明らかである。

【0026】

本発明の方法の様々な例示的な実施形態は、添付の図面を参照して詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図 1】図 1 A 及び図 1 B は、血液脳関門の不浸透性を示す顕微鏡写真である。図 1 A は、B B B を欠く小さい脳室周囲器官を除いて、ホースラディッシュペルオキシダーゼは脳血管に隔離されており、実質組織にアクセスしていないことを示す (上記の正中隆起)。図 1 B は、B B B の有効性を示す。わずか 111 Da の放射標識ヒスタミンは、マウスの脳又は脊髄に侵入することができない。

【図 2】血管網の広がり状態 (extent) を示すヒト小脳皮質の血管鑄型の電子顕微鏡写真である。スケールバーは 40 μ m である。

【図 3】様々な B B B 輸送オプションの模式図である。

【図 4】抗体媒介性脳内皮細胞のトランスサイトーシスの一態様のフローチャート図である。

【図 5】可変領域の位置及び一本鎖抗体可変断片 (scFv) の起源を示す免疫グロブリン分子の図である。可変の軽鎖領域及び重鎖領域はフレキシブルなポリペプチドリンカーで連結され、無傷抗体の最小結合サブユニットを含む。

【図 6】図 6 A ~ 図 6 D は、抗原がフルオレセインである scFv 構築物 (4 - 4 - 20) の酵母表面提示の模式図である。scFv タンパク質は、酵母粒子の表面上でフルオレセインと

10

20

30

40

50

積極的に結合するscFvタンパク質を表面提示させる自己集合化接合アグルチニンタンパク質 (A g a 1 p 及び A g a 2 p) と融合する。図 6 A は 4 - 4 - 2 0 を提示する酵母の位相差画像である。図 6 B はフルオレセイン - デキストラン (F I T C - デキストラン) と結合した 4 - 4 - 2 0 を提示する酵母の蛍光画像である。図 6 C は、無関係のscFvを提示する酵母 (D 1 . 3) の位相差画像である。図 6 D は、 F I T C - デキストランと結合しない D 1 . 3 酵母の蛍光画像である。

【図 7】 4 - 4 - 2 0 scFvを提示する酵母と、 F I T C 標識 R B E 4 細胞との間の特異的な相互作用を示す位相差画像である。 4 - 4 - 2 0 酵母細胞と、ビオチン化されニュートラアビジン - F I T C (N A F I T C) 標識された (上の列)、又は非標識 (下の列) の R B E 4 細胞との結合。酵母細胞及び R B E 4 細胞は、それぞれ 4 μ m 及び 2 0 μ m のサイズで区別することができる。各洗浄工程の前後で、同じ顕微鏡視野の画像を撮影した。スケールバー： 5 0 μ m。示されるように、 F I T C 標識細胞は、 3 回の洗浄後でも酵母との結合の継続を示すが、非 F I T C 標識細胞は示さない。

10

【図 8】 複数回の濃縮に対するscFv親和性の効果を示す棒グラフである。 4 - 4 - 2 0、 4 M 5 . 3 及び D 1 . 3 酵母 (1 : 1 : 1 $\times 10^5$) を含有する混合物を N A F I T C 標識 R B E 4 細胞単層から選抜した。各回後、混合物中の 4 - 4 - 2 0 及び 4 M 5 . 3 の割合をフローサイトメトリで評価した。黒塗りの棒グラフ (solid bars) は 4 - 4 - 2 0 の割合に対応し、斜線の棒グラフは 4 M 5 . 3 の割合に対応する。点線は、フローサイトメトリ分析の検出限界を示す。

【図 9】 B B B 結合及び内在化するscFvを特定する生物選抜の全体的な戦略を示す模式図である。

20

【図 1 0】 生物選抜を介した R B E 4 結合scFvの濃縮を示す図である。

【図 1 1】 図 1 1 A ~ 図 1 1 G は、細胞単層選抜及びハイスループット酵母クローンプロファイリング戦略の模式図である。図 1 1 A は 9 6 ウェルプレートでの酵母増殖；図 1 1 B は酵母の R B E 4 培養物への添加；図 1 1 C は誘導された酵母；図 1 1 D は非誘導；図 1 1 E は最初の P C R 又は結合体；図 1 1 F は結合体の「フィンガープリント」を与え、生殖細胞系ファミリーを特定する制限消化；図 1 1 G は特有のscFvクローンのシーケンシング、をそれぞれ示す。

【図 1 2】 scFv変異体の結合を要約する表である。(a) 特有のscFvは相同性でまとめられた。各クラスのscFv抗体は、最低でも 1 つの C D R 3 で全ての他のクラスと異なる (2 0 % アミノ酸相同性)。 C D R 1 及び C D R 2 の多様性を制限するライブラリに関する非免疫基礎、並びに V H 及び V L の C D R 3 は、結合特異性及び親和性を求めるのに主要な役割を果たすという事実を考慮して、クラスを定義するのに C D R 3 領域に焦点が当てられた。クラスの中で、 V H 及び V L の C D R 1、 C D R 2、 及び C D R 3 (* 8 5 % アミノ酸相同性) は全て、相同性が高い。(b) アミノ酸配列及び B s t N I 消化パターンによって、scFvが特有であると見なされた。(c) 推定scFvアミノ酸配列を I g B L A S T (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) にかけることによって、生殖細胞系抗体の遺伝子使用を求めた。(d) 小さい縮尺のスクリーンにおける発生頻度に基づき、scFv A 又はscFv D のいずれかの総数で、 V H C D R 2 酵母のノーザンプロット実験で差し引かれたクローンを計数し、その推定値を示す。

30

【図 1 3】 クローンscFv A との配列相同性を示すscFvクローン B、 G、 C 及び K の配列アラインメントを示す図である。 V H は可変重鎖領域； V L は可変軽鎖領域； C D R は相補性決定領域、をそれぞれ示す。

40

【図 1 4】 配列相同性を共有するscFvクローン D、 I 及び H の配列アラインメントを示す図である。 V H は可変重鎖領域； V L は可変軽鎖領域； C D R は相補性決定領域、をそれぞれ示す。

【図 1 5】 クローン F は、可変軽鎖 (V L) ドメインは同様の相同性があるが、可変重鎖 (V H) ドメインとは相同性がないことを示す、scFvクローン A、 C、 B、 G、 K 及び F の配列アラインメントを示す図である。 V H は可変重鎖領域； V L は可変軽鎖領域； C D R は相補性決定領域、をそれぞれ示す。

50

【図16】分泌タンパク質がscFvに適切な重量を有することを示すポリアクリルアミドゲル(上のパネル)、並びにRBE4細胞によるscFvの結合及び内在化を要約する表(下のパネル)を示す図である。

【図17】RBE4細胞によるscFvAの特異的な結合及び内在化を示すが、scFvDでは示されない、RBE4結合scFvの二重蛍光染色を示す顕微鏡写真の集合である。

【図18】scFvA及びscFvDの平衡結合性を示す図である。左側のパネルは生RBE4細胞とのscFvA相互作用に対する結合等温線を示す。プロットは、適合単量体平衡結合関数及び2つの別個の実験の実験データを示す。右側のパネルはRBE4細胞との二量体化scFvD相互作用に対する結合等温線を示す。プロットは、見かけの親和性(結合力)を生じるのに用いられた適合単量体平衡結合関数及び2つの別個の実験の実験データを示す。挿入図は、結合曲線を作成するのに用いられた生のフローサイトメトリヒストグラムを示す。

10

【図19】scFvA(A)、scFvD(D)、scFvJ(J)及びOX26scFv(O)に対する抗原の酵母提示免疫沈降を示す図である。無関係の抗ニワトリ卵リゾチームscFv(N)をネガティブコントロールとして用いた。免疫沈降産物は、非還元(NR)又は還元(R)いずれかのゲル電気泳動によって分離され、抗ビオチン抗体又は抗トランスフェリン受容体抗体(OX26)で標識した。

【図20】scFvの結合及び内在化特性を評価する蛍光顕微鏡写真である。RBE4細胞は、細胞表面標識に関して4で精製された前二量体化scFvA、scFvD、無関係のscFv4-4-20又はOX26モノクローナル抗体で充填してから、37にシフトし、細胞輸送を促進した。その後、サポニン(SAP)処理で細胞を透過化しながら又は透過化しないで、細胞を4でAlexaFluor555結合抗マウスIgG、その後AlexaFluor488結合抗マウスIgGで標識した。AlexaFluor標識画像のマージ画像が示される。スケールバー:20µm。

20

【図21】scFvAが、in vivoで発現された脳内皮抗原を認識することを示す蛍光顕微鏡写真である。凍結ラット脳切片を、scFvA(1)又は4-4-20(4)及び脳内皮細胞マーカーGSA-FITC(2,5)で同時に標識した。(3,6)は、scFvとGSA-FITC標識との重複を示すマージ画像である。scFvAに対して、無関係のscFv4-4-20は全く標識が得られなかった。マウス脳切片及び新たに単離した毛細血管で、同様の結果が観察された。最終的に、RBE4培養物に関する抗原密度の序列に酷似して、定性的な標識強度は、in vivoでのscFvA抗原密度が、トランスフェリン受容体のそれより高かったことを示した(データ図示せず)。スケールバー:50µm。

30

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、細胞機構が、血液脳関門(BBB)を通して薬物及び/又は治療薬を輸送するのに最も効率的且つ効果的な方法であり得るという見解に基づいている。多種多様な細胞輸送体及び受容体機構が特定されているが、これらは内皮受容体に対するリガンドの特異性、並びに受容体に対するリガンドの親和性及び結合力(avidity)の両方によって制限される。さらに、今までのところ特定されていない抗体リガンド及び受容体の特定によって、BBBを通して化合物を輸送するより良好なツールが与えられる。

40

【0029】

本発明者らは、脳内皮細胞膜と結合する一本鎖抗体断片(scFv)に対するヒトscFvライブラリを探索している。脳内皮細胞と結合するとして特定されたscFvサブセットもこれらの細胞に取り込まれ、これはBBBトランスサイトシス系に関する基質であり得ることを示している。またscFvは、内皮由来の輸送系を表すパターンで脳組織片において全てのサイズの血管を特異的に標識する。他の脳細胞では標識は検出されない。このクラスのscFv及びその関連のBBB輸送系は、脳への非侵襲性薬物送達に関して新規の機構を表す。

【0030】

本発明を説明する前に、記載される特定の方法、プロトコル及び試薬に限定されず、これらを変えることができることが理解される。本明細書で用いられる用語は、特定の実施

50

形態を説明するためだけのものであり、本発明の範囲（添付の特許請求の範囲によってのみ限定される）の限定を意図しないことも理解されるべきである。

【0031】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で用いられる場合、単数形「或る(a)」、「或る(an)」、及び「その(the)」は、他に文脈上ではっきりと示されない限り、複数形を含むことに留意すべきである。したがって、例えば「或る細胞(a cell)」への言及は、複数のこのような細胞及び当業者に既知のその同意語等を含む。さらに、「或る(a)」(又は「或る(an)」)、「1つ又は複数」及び「少なくとも1つ」という用語は本明細書で交換可能に用いることができる。「含む」、「包含する」、及び「有する」という用語が交換可能に用いることができることにも留意すべきである。

10

【0032】

他で定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で記載されるものと同様又は同等の任意の方法及び材料を本発明の実施又は試験に用いることができるが、ここでは好ましい方法及び材料が記載される。本明細書で言及される全ての刊行物は、本発明に関連して用いられ得る刊行物で報告される化学物質、細胞株、ベクター、動物、機器、総計分析及び方法を記載及び開示する目的で、参照により本明細書に援用される。本発明が、従来の特許のためにこのような開示を先行する権利がないことを認めるものと解釈されることは本明細書には存在しない。

【0033】

本明細書で用いられるような「被験体」は、哺乳動物及び非哺乳動物を意味する。「哺乳動物」は、ヒト、チンパンジー及び他の類人猿及びサル種等の非ヒト霊長類；ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、及びブタ等の家畜；ウサギ、イヌ、及びネコ等の飼育動物；ラット、マウス、及びテンジクネズミ等の齧歯類を含む研究動物等を含む（が、これらに限定されない）哺乳類の任意の成員を意味する。非哺乳動物の例としては、鳥類等が挙げられるが、これに限定されない。「被験体」という用語は特定の年齢又は性別を示さない。

20

【0034】

本明細書で用いられるような「投与すること」又は「投与」は、本発明の組成物を身体に、好ましくは体循環に導入する任意の手段を含む。例としては、経口；頬、舌下、肺、経皮、経粘膜、並びに皮下注射、腹腔内注射、静脈注射、及び筋肉内注射が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0035】

本明細書で用いられる場合、「薬学的組成物」は、好適な希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤及び補助剤と共に、治療的に有効な量のBBBトランスサイトシス化合物（「薬学的に活性な化合物」とも称される）を意味し、集合的には「薬学的に許容可能な担体」と呼ばれる。本明細書で用いられる場合、「有効量」及び「治療的に有効な量」という用語は、毒性、放射線、又はアレルギー反応等の過度な副作用もなく、所望の治療反応を得るのに十分な活性のある治療剤（単数又は複数）の量を表す。具体的な「有効量」は、治療される特定状態、被験体の健康状態、治療される動物の種類、治療期間、（もしあれば）併用療法の性質、並びに用いられる具体的な製剤設計及び化合物及びその誘導体の構造等の因子によって明らかに変わる。この場合、(a)神経学的な又は脳の疾患（例えばアルツハイマー病、パーキンソン病及び/又は癌）の予防、及び(b)神経学的な又は脳の疾患（例えばアルツハイマー病、パーキンソン病及び/又は癌）の好転又は安定化の1つ又は複数を得られた場合、治療的に有効な量であると推測される。所定の実験を通じて当業者は、最適な有効量を容易に求めることができる。

40

【0036】

薬学的組成物は液体、又は凍結乾燥若しくはそうでなければ乾燥した製剤であり、pH及びイオン強度等の様々な緩衝用希釈剤（例えば、トリスHCl、酢酸塩、リン酸塩）、表面への吸着を防ぐ添加剤（例えばアルブミン又はゼラチン）、洗浄剤（例えばTween 20、Tween 80、Pluronic F68、胆汁酸塩）、可溶化剤（例えばグリ

50

セロール、ポリエチレングリセロール)、抗酸化剤(例えばアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム)、保存剤(例えばチメロサル、ベンジルアルコール、パラベン)、増量物質又は張性修飾剤(例えばラクトース、マンニトール)、ポリエチレングリコール等のポリマーとタンパク質との結合剤、金属イオンとの錯体化剤、或いはポリ乳酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲル等の重合化合物の粒子調製物内への若しくは上への、又はリポソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単膜(milamellar)小胞若しくは多重膜小胞、赤血球ゴースト、又はスフェロプラスト上への物質の取り込みを含む。このような組成物は物理的状态、可溶性、安定性、in vivo放出速度、及びin vivoクリアランス速度に影響する。制御又は持続放出組成物には、脂溶性デポー(例えば脂肪酸、ワックス、オイル)中の製剤が含まれる。

10

【0037】

さらに、本明細書で用いられる「薬学的に許容可能な担体」は当業者に既知であり、0.01M~0.1M、及び好ましくは0.05Mのリン酸緩衝液又は0.9%生理食塩水が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、このような薬学的に許容可能な担体は、水溶性又は非水溶性の溶液、懸濁液及び乳濁液であり得る。非水溶性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイル等の植物油、及びオレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルである。水溶性担体としては、生理食塩水及び緩衝媒体を含む、水、アルコール/水溶液、乳濁液又は懸濁液が挙げられる。

【0038】

本発明における「治療すること」又は「治療」は、疾患、症状、又は障害に対抗する目的での被験体の管理及び治癒を意味する。この用語は、予防治療(すなわち予防的治療及び緩和的治療)並びに治癒治療の両方を包含する。治療は、症状若しくは合併症の発症を予防するための本発明の化合物の投与、症状若しくは合併症の緩和、又は疾患、症状若しくは障害の排除を含む。

20

【0039】

1つの例示的な実施形態において、本発明は配列番号1~34のいずれかで表わされるアミノ酸配列を有する単離された抗体断片を含む。好ましい変型によっては、単離された抗体断片は一本鎖可変領域(scFv)断片である。

【0040】

別の例示的な実施形態において、本発明は、受容体及び結合リガンドのエンドサイトーシスをもたらす内皮細胞受容体と結合する抗体を提供する。実施形態によっては、本発明は、血液脳関門(BBB)を通して薬学的に活性な化合物を運ぶのに有用な薬学的に活性な化合物と結合する抗体を含む薬学的組成物である。

30

【0041】

別の例示的な実施形態において、本発明は、配列番号1~34のいずれかで表わされるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターである。他の実施形態では、本発明は、配列番号1~34のいずれかで表わされるアミノ酸配列をコードする単離された核酸を含有する発現ベクターを含む精製及び単離された宿主細胞を含む。宿主細胞は、抗体を発現可能な任意の細胞(例えば菌類、チャイニーズハムスター卵巣細胞を含む哺乳動物細胞;例えばバキュロウイルス発現系を用いた昆虫細胞;植物細胞(例えばトウモロコシ、イネ及びシロイヌナズナ等))であり得ることを理解するべきである。概して例えば、Verma, R.他, J Immunol Methods, 1998 Jul 1;216(1-2): 165-81を参照されたい。

40

【0042】

さらに別の例示的な実施形態において、本発明は、脳内皮細胞受容体と結合可能な抗体断片を発現する方法であって、(a)酵母細胞上に抗体断片を提示する工程、(b)脳内皮細胞培養物から抗体を提示する酵母細胞を選抜する工程、(c)脳内皮細胞受容体と特異的に結合する提示された抗体断片を特定する工程、(d)発現ベクターにおいて工程(c)で特定された抗体断片をコードする単離された核酸を挿入する工程、及び(e)宿主細胞を発現ベクターで形質転換する工程を含む、脳内皮細胞受容体と結合可能な抗体断片

50

を発現する方法を含む。この実施形態の変形によっては、宿主細胞は、酵母、細菌及びこれらの組合せから成る群から選択される。好ましい実施形態によっては、宿主細胞はサッカロマイセス・セレヴィシエ (Saccharomyces cerevisiae) 又は大腸菌 (E. coli) である。

【0043】

別の例示的な実施形態において、本発明は、脳内皮細胞特異的抗体を特定する方法である。この実施形態は、酵母細胞表面上に抗体断片を提示する工程、脳内皮細胞培養物から提示された抗体を選抜する工程、脳内皮細胞上の膜受容体との特異的な結合体を単離する工程、及び特異的な結合体を特定する工程によって、内皮細胞特異的抗体を特定することを含む。好ましい実施形態によっては、内皮細胞培養物が細胞単層である。

10

【0044】

さらに別の例示的な実施形態において、本発明は、エンドサイトーシス及びトランスサイトーシスで機能する、又はそれらに関連する内皮細胞受容体を特定する方法であって、培養内皮細胞単層を調製し内皮細胞単層から酵母提示された抗体ライブラリを選抜する工程、抗体結合内皮細胞を単離する工程、及び同族受容体を特定する工程を含む、エンドサイトーシス及びトランスサイトーシスで機能する、又はそれらに関する内皮細胞受容体を特定する方法を含む。

【0045】

B B B 輸送系を標的化する新規のヒト抗体は多大な有用性を有する。トランスフェリン系及びインスリン系等の十分に研究された系を利用した抗体送達戦略とは違い、これらのリガンドがこれから特定されねばならない膜タンパク質である場合、新規の受容体媒介性輸送系を特定することは非常に困難である。したがって、本発明者らは、B B B 結合の要求される機能性を有する完全なヒト抗体を特定する新規の選択方法を開発している。この技法の効力によって、いずれの成分の同一性に関する予備知識がない、潜在的な薬物送達ベクター及びその同族の細胞表面受容体（受容体媒介性担体系）が同時選択される。図4は、本発明によるこのような抗体の選択に対する一般的なスキームを示す。

20

【0046】

B B B で受容体媒介性輸送系を標的化するのに抗体を用いる場合、B B B 内皮細胞を通過して脳組織に薬物分子及び薬物担体を効率的にトランスサイトーシスすることができる。血液から脳へのこのような非侵襲性送達は、内因性輸送系に関する代理リガンドとして作用する抗体の結果である。現在知られている抗体標的化脳送達系には、トランスフェリン系及びインスリン受容体系が含まれる。これらの受容体は、身体全体に遍在的に発現され、これによって高価な調合薬が誤って標的化される。

30

【0047】

標的となる神経障害によっては、本発明による抗体ベースの標的化を用いて、in vivo で多種多様な脳薬物荷 (drug cargoes) (例えば薬理化合物又は同様に薬学的に活性化化合物) を首尾よく送達することができる。本明細書で用いられる「薬学的に活性化化合物」及び「薬理化合物」という用語は、疾患又は障害の影響を治療又は緩和するのに有用な任意の化合物を表すものとする。例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS、ルー・ゲーリック病) 及び多発性硬化症等の神経変性病を含む疾患は、神経栄養因子 (神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、グリア細胞株神経栄養因子 (GDNF) 及びインスリン様成長因子 (IGF) を含むが、これらに限定されない) 等の薬物の使用によって標的化することができる。さらに、治療的潜在性があることが示され、且つ本発明の抗体によって送達され得る他の化合物は、神経ペプチド (P物質、神経ペプチドY、血管活性腸管ペプチド (VIP)、 β -アミノ酪酸 (GABA)、ドーパミン、コレシストキニン (CCK)、エンドルフィン、エンケファリン及びサイトロロピン放出ホルモン (TRH) を含むが、これらに限定されない) である。さらに、治療薬としては、サイトカイン、抗不安薬、鎮痙剤、ポリヌクレオチド、導入遺伝子 (例えば、神経障害 (不安症、うつ病、統合失調症、及び睡眠障害等の精神病、並びに癲癇、発作性障害、脳卒中及び

40

50

脳血管障害、脳炎及び髄膜炎、記憶及び認知障害、疼痛及び身体外傷を含むが、これらに限定されない)等に用いられ得る小分子干渉RNAを含む)が挙げられ得る。

【0048】

特に、そのリガンドに対する高い親和性及び特異性を与えるBBB受容体媒介性トランスサイトシス系を標的化するのに、抗体が十分適している。例として、インスリン及びトランスフェリン受容体の細胞外エピトープを認識する適切に標的化された抗体は、BBBを通して効果的に輸送され、且つ経内皮経路を介して脳間質に蓄積される人工輸送体物質として作用することができる。さらに、様々なサイズ及び組成の薬物又は薬物担体と結合する場合、BBB標的化抗体は、治療荷の脳取り込みを媒介する。抗トランスフェリン受容体抗体を用いて、メトトレキサート等の小分子の非侵襲性輸送が達成されている。抗トランスフェリン受容体抗体を用いることによって、静脈内投与後に、神経成長因子、脳由来神経栄養因子、及び塩基性線維芽細胞成長因子等のタンパク質が脳に送達された。後の2つの場合、ラットの中大脳動脈閉塞モデルにおける1回排出量の低減が促進された。また、抗トランスフェリン受容体抗体を用いて、*in vivo*でリポソーム及びリポソームが含有する遺伝子が脳に送達されている。特に、遺伝子含有抗体標的化リポソームが、パーキンソン病の実験モデルにおけるチロシンヒドロキシラーゼ活性の回復に関してラット脳、及びヒト化抗インスリン受容体抗体を用いて霊長類の脳へと標的化している。さらに、ペグ化免疫リポソームを介する新規の群のRNA干渉薬物の脳送達によって、ヒト脳腫瘍の実験モデルを埋め込んだマウスの生存率が増大したことが実証されている。さらに、抗トランスフェリン受容体結合ナノ粒子が産生されている。最終的に、抗体が脳の微小血管と結合するか、又は完全にはトランスサイトシスせずに内在化するとしても、薬物送達の利点を有し得る。脂溶性小分子薬物を充填したリポソーム又はナノ粒子と結合する場合、薬物の局所BBB濃度が上がり、脳排出系を補助することによって、脳取り込みを促進する可能性があり得る。さらに、内在化せずに、又は完全にはトランスサイトシスしないが、内在化して結合する能力によって、輸送体系の特徴付け及び特定、並びに内在化及び/又はトランスサイトシスする抗体の最適化を可能にすることが以前から知られていたBBB内皮受容体又はリガンドが特定される。総合的に、これらの結果は、薬物の脳への非侵襲性の輸送に対する抗体標的化トランスサイトシス系の有用性を示している。

10

20

【0049】

理解され得るように、本発明の一態様は、血液脳関門での抗体標的、特に内在化(エンドサイトシス)及びトランスサイトシスに関する分子機構を表す標的に関する。したがって、本発明は、非還元条件下でヒトscFvAで免疫沈降した際の分子量が約124kDaの精製抗原に関する。本発明者らは、この抗原が無傷脳毛細血管で発現されることを特定し実証している。さらに、本発明者らは、scFvB、scFvC、scFvG、及びscFvKがそれぞれ、scFvAで免疫沈降した約124kDaの抗原を認識し、且つ免疫沈降することができることを実証している。したがって、scFvA、scFvB、scFvC、scFvG及びscFvK(それぞれ、配列番号1~5)はそれぞれ、本発明の血液脳標的化抗体として有用である。

30

【0050】

したがって、本発明は、抗体-血液脳関門輸送系をさらに包含する。このような系は、(a)無傷の脳毛細血管で発現する、非還元条件下でヒトscFvAで免疫沈降した際の分子量が約124kDaである抗原、及び(b)配列番号1~5のいずれかで表わされるアミノ酸配列を有する、上記抗原と結合する精製抗体を含む。好ましくは精製抗体は、scFvA抗体(配列番号1)であり、さらにより好ましくはscFvA抗体は、薬学的に活性な化合物と組み合わせて与えられる。

40

【0051】

開示の抗体-血液脳関門輸送体系に基づいて、本発明は、血液脳関門を通して、被験体の脳に薬学的に活性な化合物を送達する方法も意図する。このような方法は、抗体が血液脳関門を通して被験体の脳に薬学的に活性な化合物を送達することに関するよう、配列番号1~5のいずれかで表わされる1つに記載のアミノ酸配列を有する精製抗体と組み合わせて、薬学的に活性な化合物を被験体に投与することを含む。好ましくは精製抗体は、

50

配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有するscFv A抗体である。

【0052】

概して、抗体を薬学的に活性な化合物と結合、接続及び連結させる方法が当該技術分野で既知である。例えば、Wu AM, Senter PD著「武装抗体：免疫抱合体に対する保護及び攻撃 (Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates)」, Nat Biotechnol. 2005 Sep;23(9): 1137-46、及びTrail PA, King HD, Dubowchik GM著「癌の標的治療に関するモノクローナル抗体の薬物免疫抱合体 (Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer)」, Cancer Immunol Immunother. 2003 May;52(5):328-37; Saito G, Swanson JA, Lee KD著「可逆的なジスルフィド結合を介する結合を利用した薬物送達戦略：細胞活性低減の役割及び部位 (Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities)」, Adv Drug Deliv Rev. 2003 Feb 10;55(2): 199-215を参照されたい。さらに、本発明の抗体は、リポソーム、ナノ粒子、又は薬学的に活性な化合物を充填した他の類似の担体と組み合わせて与えられ得る。このような組成物を調製する方法は当該技術分野で既知である(例えばSugano他「ドキシソルピシンを充填したりポソームの抗体標的化は、重症複合免疫不全の確立したヒト肺腫瘍異種移植片の増殖及び転移拡散を抑制する (Antibody Targeting of Doxorubicin-loaded Liposomes Suppresses the Growth and Metastatic Spread of Established Human Lung Tumor Xenografts in Severe Combined Immunodeficient)」Mice Cancer Research 60, 6942-6949, December 15, 2000、及びMartin他著「分析化学におけるナノ材料 (Nanomaterials in Analytical Chemistry)」, Analytical Chemistry News & Features, May 1, 1998; pp. 322 A-327 Aを参照されたい)。本明細書で用いられる「薬学的に活性な化合物と組み合わせた抗体」という語句は、製造方法によって限定されないものとし、このような組成物は、当該技術分野で既知の結合、接続、連結及び装飾の技法(これらに限定されない)によって作製され得る。

【0053】

以下に記載の実施例は、疾患ベースの適用に必須の成分である抗体送達ベクターを開示する。このようなベクターの特定は、革新的なコンビナトリアルな抗体スクリーニング技術とBBB及び脳の薬物送達分野の専門的技術とを組み合わせる複雑な送達課題に対処する。

【実施例】

【0054】

概して上記のように得られた化合物及び本発明による方法の様々な例示的な実施形態が、以下の実施例を参照してより容易に理解されるであろう。これらの実施例は例示として与えられ、いかようにも本発明を限定することを意図しない。

【0055】

(実施例1)

大きいscFvライブラリを用いた脳内皮細胞表面のin vitroプロファイリング

脳内皮細胞表面タンパク質(潜在的なBBB固有輸送系)及び抗体標的化試薬(薬物送達ベクター)の両方を同時に特定するために、本発明者らは、新規の細胞表面プロファイリング又は「選抜」技法の検証を行った。この技法は、酵母の表面上で提示されたナイーブ一本鎖抗体(scFv、図5)のコンビナトリアルライブラリを用いて、内皮細胞表面をプローブする。抗体ライブラリは、 10^9 個までの異なるscFvを含有し、この多様な集合体が「in vitro免疫系」であると考えられることができる。これに関して、抗体-細胞表面抗原対は、ハイスループット様式で特定することができる。酵母表面提示は、抗体及びT細胞受容体の直接評価の技術として十分に確立されている。提示系は、ポリペプチドリンカーを介した、一本鎖抗体と、内因性酵母接合(mating)アグルチニンとの繫留を伴う(図6)。このプラットフォームは、細胞外環境をサンプリングする主な位置にある場合、酵母細胞表面上の所定のscFvの $10^4 \sim 10^5$ コピーの提示をもたらす。単一の酵母クロー

ンは、抗体のライブラリから単離されると、「モノクローナル」scFv産生因子として作用する。内皮細胞表面標的化の有効性のプロファイリングのために、酵母細胞 - 内皮細胞スクリーニングを行うことが可能であることを確認する実験をモデルリガンド系で行った。それから、同様のスクリーニングを行い、脳内皮細胞表面の構成成分のエンドサイトーシスを認識するscFvを特定した。

【0056】

(実施例2)

モデルリガンドでの酵母細胞 - 内皮細胞標的化

初めに、モデルscFv表面リガンド系を用いて、選抜方法の有効性を研究した(Wang, X. 及びShusta, E. V. 著「哺乳動物の細胞表面選抜におけるscFv提示酵母の使用(The use of scFv-displaying yeast in mammalian cell surface selections)」. J Immunol Methods 2005, 304, 30-42)(その全体が全ての目的のために本明細書に援用される)。要するに、ハプテンフルオレセインを表面リガンドとして用い、抗フルオレセインscFv(4-4-20)を酵母提示された抗体として用いた。この系によって、選抜の成功に関する因子を詳しく研究した。酵母提示4-4-20は、フルオレセイン化されたラット脳内皮細胞(RBE4細胞株、Roux, F.他著「不死化ラット脳の微小血管内皮細胞におけるγ-グルタミルトランスぺプチダーゼ活性及びアルカリホスファターゼ活性の調節(Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells)」. J Cell Physiol 1994, 159, 101-13.)との特異的な相互作用を示し(図7)、ちょうど3回で、大きいバックグラウンドの非結合の無関係酵母(1/10⁶)から回収することができた。これらの高効率の選抜には、低存在量の膜タンパク質(輸送体)に対する感受性及び適用性を示す細胞1つ当たり1700個と少ないフルオレセインリガンドが必要であった。遊離フルオレセインの競合因子の添加によって、酵母-EC相互作用を完全に取り除くことが可能であり、これによって相互作用の特異性が確認された。

【0057】

ナイーブ酵母ライブラリがナノモル範囲の親和性を有する抗体を含有するので、抱合体形成に対するscFv親和性の効果を調べた。様々な細胞表面FITC強度で、4-42-0(Kd = 1.3 nM)及び高親和性変異型4M5.3(Kd = 270 fM)の両方を含有する希釈混合物に関して、濃縮度を分析した。要するに、1:1:10⁵の4-4-20:4M5.3:非結合体混合物を、様々なフルオレセインリガンド密度を有するNAFITC標識単層に適用した。4で2時間のインキュベーション後、ウェルを洗浄し、非特異的な結合体を除去した。3回の連続濃縮にわたって、4-4-20及び4M5.3の同時濃縮を分析した(図7)。細胞1つ当たり1700個のリガンドで、両方のscFvがほぼ等しい効率で濃縮し、中間のリガンド密度では、4M5.3はより迅速に濃縮した。これらの場合、3ラウンド後の最終産物は、高親和性の4M5.3 scFvとバランスを保ちながら、15%~25%の4-4-20を含有した(図8)。この結果は、単一細胞表面標的に対して複数のscFvクローンを抽出することが可能であることを示し、またこの方法を用いて、複数の抗原に対するscFvを同時に濃縮することができることを示唆している。したがって、次の工程は、真の内皮抗原に対する選抜選抜を完了させることであった。図9で示されるように、酵母提示ライブラリの細胞培養物選抜に関する最初の戦略を展開した。

【0058】

(実施例3)

血液脳関門結合及び内在化scFvの特定に関する全体的な戦略

フェージ提示の限界を考慮して、脳内皮細胞と結合するscFvの特定のためのより強力な分析として、図9で示された戦略を展開した。要するに、図9で模式的に表されるように、scFvライブラリを脳内皮細胞のin vitro培養物と混合した。酵母細胞が内皮細胞上でタンパク質表面に対する抗体を有する場合、酵母細胞は、適切な条件下で内皮細胞と結合することができる。タンパク質表面が高レベルで存在する場合、結合はより強固になり

10

20

30

40

50

得る。これによって、酵母結合体を回収し、さらなる結合及び精製を行うことができた。特定の結合体を機能性試験にかけ、これらが内皮細胞によってエンドサイトーシス及びトランスサイトーシスを行うことができるか否かを試験し、さらに脳 - エピトープ特異性を確認した。これは、全細胞でスクリーニングした酵母提示された抗体の最初の例である。ファージ提示の代わりに酵母提示 (YSD) を用いて抗体のスクリーニングを行うことには多くの利点がある。YSD は、scFvライブラリを発現する酵母のフロクリン (flocculin) 欠損株のために、バックグラウンド結合が非常に低く、これに対してファージ粒子は、哺乳動物の標的細胞と非特異的に結合することによって、擬陽性結合体を与える傾向がある。さらに、YSD における低バックグラウンドが、シグナル対ノイズ比を増大させることによって、結合クローンを迅速に濃縮し、低い親和性で結合するクローンを特定する能力ももたらす。酵母は、その表面上で 50000 個 ~ 100000 個の scFv を発現するのに対し、ファージ提示された抗体ライブラリは 0 ~ 5 Ab / ファージしか発現しない。この多数の発現された表面 scFv によって、比較的低い親和性の Ab とその抗原との間の強い相互作用を蓄積させることができる結合力の効果のために、弱い結合体のさらなる特定が可能になる。さらに、scFv 発現カセットを分泌発現ベクターにシャトルすることによって、酵母表面上で提示される scFv を可溶性タンパク質として容易に産生することができる。このようにして、scFv の内在化研究を行うことができる。

【0059】

(実施例 4)

脳内皮細胞結合クローンに関するヒト非免疫 scFv ライブラリのスクリーニングの成功

本発明者らは、実施例 1 に記載された研究で用いたのと同じの酵母提示様式でヒト非免疫 scFv ライブラリを保有する。このようなライブラリを作製する方法は当該技術分野で既知であり、例えば、Feldhaus 他. at Nat Biotechnol. 21(2): 163-70 (2003) (参照により本明細書に援用される) で記載されている。ライブラリは、*in vivo* ヒト抗体の重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子の多様性のほとんどを表す約 1×10^9 個の scFv から成る。ライブラリがナープであるので、抗原に対して事前にスクリーニングを行わず、これによって広く多様な範囲の抗原と結合する抗体を提供することができる。高い親和性 ($K_d = 1 \text{ nM} \sim 1000 \text{ nM}$) で、ハプテン抗原 (フルオレセイン)、リン酸化状態が異なるペプチド抗原 (p53)、タンパク質抗原 (リゾチーム)、及び細胞表面受容体 (上皮成長因子受容体) の細胞外部分と結合する scFv のパネルを単離するのに、ライブラリを用いることに成功した。scFv ライブラリを用いた RBE4 ラットの脳内皮細胞のプロファイリングに、実施例 1 に記載された酵母 - EC 標的化方法を用いた。要するに、酵母ライブラリを 100 cm^2 の RBE4 細胞に適用し、結合する酵母クローンを回収及び増幅した (図 9)。 20 cm^2 、 10 cm^2 、及び 10 cm^2 の RBE4 細胞それぞれで 3 回以上、このプロセスを繰り返した。ライブラリの多様性が低下するので、内皮細胞の表面積は、それぞれのラウンドで段階的に低下する必要がある。したがって、濃縮プールを網羅的にカバーするのに調べる酵母クローンを少なくする必要がある。ちょうど 4 回目の選択の後、回収した酵母の数は、RBE4 細胞に適用された酵母の数とほぼ同じであり、このことはほとんど全プールが、内皮細胞結合酵母クローンから成っていたことを示す (図 10)。次に、回収された酵母プール由来の個々のクローンをハイスループット基礎で分析し、scFv 媒介性の酵母 - RBE4 細胞結合の同一性を決定した。

【0060】

(実施例 5)

生物選抜 (Biopanning) を介した RBE4 結合 scFv の特定及び濃縮の有効性

本発明者らは、実施例 2 で記載されたモデル系に基づき、生物選抜抗体ライブラリスクリーニング法を開発した。このモデルを YSD scFv ライブラリに適用し、BBB 結合及び内在化抗体を特定した。ライブラリの調製は、本明細書で言及された参照と共に、Wang 他 at Nat. Methods, 4(2): 143-5 (2007) (参照により本開示に援用される) に記載されている。図 10 は、この方法を用いる複数回の濃縮の効果を示す。図 10 に示されるように、3 回目の後に比べると、4 回目の選抜後で、RBE4 細胞で保持される酵母

10

20

30

40

50

細胞が多く存在していた。さらに、5回目の後、ほとんど全ての投入酵母集団が回収され、このことは4回のスクリーニングが、RBE4結合体を「取り出す(pull out)」のに明らかに十分であり、脳の特異性に関してスクリーニングするのに、他の細胞型又は内皮に対する前減算(presubtraction)実験を利用することができることを示している。ライブラリの回収率は、図10の下のパネルの表に列記されている。複数回の漸進的選抜後、増大するライブラリの回収率によって、この方法の有効性が示される。これに対して、ネガティブコントロールである4-4-20酵母の値は同じままであった。

【0061】

(実施例6)

RBE4結合競合酵母クローンのハイスループット分析

本発明の毛細血管選抜系が図10で示される結果で例示されたが、依然として本発明者らにはライブラリでクローンを迅速に再検討する方法が必要であった。したがって、本発明者らは、結合クローンのハイスループットスクリーニング及びシーケンシングを可能にする方法を開発した。要するに、scFv発現を酵母クローンの表面上で誘導するように、96ウェルフォーマットで酵母クローンを増殖した(図11A)。次いで、RBE4細胞単層が入った96ウェルプレートに酵母を直接移した(図11B)。適切な洗浄後、96ウェルプレートを光学顕微鏡でスキャンした。RBE4細胞単層上の酵母の保持によって、結合を正確に媒介する酵母クローンを簡単に特定した(図11C)。内皮細胞の結合が、単に酵母株における擬似的な遺伝子突然変異の結果ではないことを確認するために、scFv発現を誘導しない炭素源で培養した酵母を用いて、平行プレートを試験した(図11D)。インキュベーション工程及び洗浄工程後、誘導された結合体クローン(図11C)は、多くの酵母を遊離させたが、非誘導酵母では比較的少なかった(図11D)。非結合体クローンは、誘導群及び非誘導群の両方でほとんどの酵母を遊離しなかった。この特定のスクリーニングでは酵母の突然変異は特定されず、全ての結合がscFv媒介性であった。酵母結合体が特定されたら、コロニーPCRを行い、それぞれのscFvクローンのオープンリーディングフレームを増幅した(図11E)。要するに、制限酵素BstNIを用いて、酵母細胞から直接、scFvをコードするプラスミドを増幅した。この酵素はDNAを頻りに切断するため、異なるDNAが、異なる消化パターン又はフィンガープリントを示す(図11F)。概して、特有のscFvクローンは、5ヌクレオチドBstNIの認識部位が多く存在するために異なる制限プロファイルを示す。特有のBstNI消化を有するscFvをシーケンシングにかけた。特有の制限パターンを示すそれぞれのクローンのPCR産物を直接シーケンシングし、生殖細胞系起源をIgGLASTで特定した(図11G)。特有のクローンの概要が図12で示される表で与えられる。

【0062】

(実施例7)

結合するscFv変異体の要旨

図12は、scFv変異体の結合を要約する表である。図12に示されるように、今日までに全2000個のクローンがスクリーニングされている。2000個のクローンの中で、1760個がRBE4細胞と結合した。結合クローンは図12で列記される。同じ生殖細胞系を使用したscFvが1つにまとまるように、クローンを編成した。それぞれのサブセットのscFvは高い配列相同性を共有する。しかし、この相同性にもかかわらず、1つのアミノ酸だけが変わったCDRが異なる抗原と結合することができ、このことからそれぞれが特有の結合体であり得る。さらに、クローンが同じ抗原と結合した場合であっても、これらは異なる親和性で結合し得る。さらに、scFvの幾つかは、スクリーニングされた全てのクローンの中のわずか1回で現れることに留意するべきである。このことによって、他にこのような珍しい結合体が検出されていないために、開発されたハイスループットなスクリーニング方法の効力が示される。

【0063】

(実施例8)

scFv生殖細胞系ファミリーの特定

これらのクローンに対する生殖系列ファミリの使用は図 1 2 に要約される。特有の scFv は相同性によってまとめられた。各クラスの scFv 抗体は、最低でも 1 つの C D R 3 で全ての他のクラスと異なる (2 0 % 未満のアミノ酸相同性)。C D R 1 及び C D R 2 の多様性を制限するライブラリに関する非免疫基礎、並びに V H 及び V L の C D R 3 は、結合特異性及び親和性を求めるのに主要な役割を果たすという事実を考慮して、クラスを定義するのに C D R 3 領域に焦点が当てられた。クラスの中で、V H 及び V L の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 (8 5 % 超のアミノ酸相同性) は全て、相同性が高い。図 1 2 は、scFv A 及び scFv D が分析クローンで優勢であることも示す。このため、本発明者らが、初めに scFv A 及び scFv D を特定してから、ハイスループット方法を用いて非 A クローン又は非 D クローンを分析する *in situ* ノーザンプロット法を開発したので、より多くのクローンを分析することが回避される。

10

【 0 0 6 4 】

この方法を用いて、4 回の選抜由来の総数約 2 0 0 0 個のクローンを分析している。これまで特定された 3 4 個の特有の scFv の中で、統計的考察に基づき、複数回でわずか数個のクローンしか回収されず、4 回濃縮プールでは多くの特有のクローンが残る。回収されるクローンに関する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の生殖細胞系起源を図 1 2 に示し、2 つのクローン (E 及び J) は、重鎖可変領域のみから成る。完全な方法によって、1 0 0 0 個の B B B 結合 scFv クローンの迅速な分析が可能になる。scFv A 様クローンの配列アラインメントが図 1 3 で与えられ、scFv D 様クローンのアラインメントが図 1 4 で与えられ、scFv A 様クローンを有する scFv F のアラインメントが図 1 5 で与えられる。

20

【 0 0 6 5 】

(実施例 9)

R B E 4 による scFv の結合及び内在化

酵母ライブラリの有効性に関する試験は、結合クローンの特定から開始したが、トランスサイトーシスにおけるこれらの使用には、scFv が内在化し得ることがさらに必要である。したがって、scFv が R B E 4 で内在化し得るか否かを調べるのに、scFv も試験した。酵母は内在化させるには大きすぎるので、酵母細胞培養物中で scFv を可溶性タンパク質として産生した。これを行うために、Y S D プラスミド中の scFv 遺伝子を分泌プラスミドにサブクローニングし (実施例 1 0 の下部に記載)、それから scFv を酵母細胞培養培地に分泌した。要するに、図 1 2 における幾つかの scFv に関する scFv オープンリーディングフレームを、m g / L レベルの活性のある精製 scFv を得る酵母発現系にサブクローニングした (Shusta, E.V. 他「T 細胞受容体操作に関する安定足場の直接評価 (Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering)」. Nat Biotechnol 2000, 18, 754-9; Shusta, E. V. 他「一本鎖抗体断片の産生に関するサッカロマイセス・セレヴィシエの分泌能の増大 (Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments)」. Nat Biotechnol 1998, 16, 773-7; Shusta, E.V. 他「酵母ポリペプチド融合表面の提示レベルは、熱安定性及び可溶性分泌効率を予測する (Yeast polypeptide fusion surface display levels predict thermal stability and soluble secretion efficiency)」. J Mol Biol 1999, 292, 949-56)。この系は、ガラクトース誘導性 G A L 1 - 1 0 プロモータによって調節され、精製のために、c 末端の c - m y c エピトープ及び 6 ヒスチジンエピトープタグを含む。

30

40

【 0 0 6 6 】

図 1 6 は、ポリアクリルアミドゲル上での可溶性 scFv の電気泳動の結果を示し (上のパネル)、全てが scFv に関して 2 8 k D a ~ 3 5 k D a の範囲の適切なサイズを示し、発現レベルが 1 ~ 4 m g / m l の範囲である。図 1 7 で示されるように、R B E 4 細胞がこれらの可溶性 scFv で標識された場合、A 群は R B E 4 細胞の強い標識を示し、内在化することもできた。一方で、D 群の scFv 及び scFv F は、R B E 4 細胞との結合は示したが、内在化しなかった。これらの実験の結果は、図 1 6 の下のパネル及び以下で要約される。

【 0 0 6 7 】

50

細胞内在化を媒介する能力に関して、クラス1、2、及び3のscFvの幾つかを評価した。scFvを抗cmycエピトープタグ抗体と前二量体化(predimerized)して、受容体クラスター化及びエンドサイトーシスに必要であることが多い二価性を与えた。次いで、4で二量体化scFvを生RBE4細胞に適用して、細胞表面標識を得た。続いて、30分間、RBE4細胞を37に移し、細胞輸送(cellular trafficking)を可能にした(図17及び図20)。クラス1のscFvAはRBE4細胞内の血管構造に迅速に内在化したが、クラス2のscFvD及びクラス3のscFvFは、RBE4細胞表面と結合したが、内在化を促進しなかった。コントロールの抗フルオレセイン抗体(4-4-20)は結合も取り込みも示さなかった。異なる内在化パターンによって示唆されるように、scFvA及びOX26は、同じ輸送系で競合しない。さらに、結合及び内在化前のRBE4細胞の脱グリコシル化(マンノシダーゼ及びノイラミニダーゼ)には、観察可能な効果がなかったので、輸送体-scFvA相互作用は、グリコシル化状態に感受性ではない。さらに、図12で示されるscFvAのクローンB、C、G及びKの高い相同性によって、このファミリーの成員が、内在化を促進するのに等しく効果的であり得ることが示される。

10

【0068】

さらに具体的には、細胞表面標識のために4で、RBE4細胞を前二量体化scFvA、scFvD、scFv4-4-20(エンドサイトーシスに必要であることが多い受容体クラスター化を促進するのに二量体化した)、又はOX26モノクローナル抗体で標識してから、37にシフトし、細胞輸送を促進した。次いで、サポニン(SAP)処理で細胞を透過化しながら又は透過化しないで、細胞を4でAlexaFluor555結合抗マウスIgG、その後AlexaFluor488結合抗マウスIgGで標識した。AlexaFluor標識画像のマージ画像は図20で示される。(サポニン処理をした(上段左)及びサポニン処理をしない(中央上)scFvA標識に比べて)scFvAは表面及び細胞内の両方の標識を示した。これに対して、scFvD(上段右)は、サポニン処理下で表面標識のみを示した。4-4-20対照scFvでは標識されなかった(下段右)。これらの結果は、scFvAがRBE4細胞内で血管構造に迅速に内在化したが、scFvD及びscFvFは、RBE4表面と結合したが、内在化を促進しなかったことを示す。参考値として、OX26MAb(図20の下段左)によって、in vitro及びin vivoで脳内皮細胞を通るエンドサイトーシス及びトランスサイトーシスが実証されている。述べられたように、図17は、RBE4細胞によるscFvAの特異的な結合及び内在化を示すが、scFvDでは示されないRBE4結合scFvの二重蛍光染色を示す顕微鏡写真さらに示した類似のデータを提示する。

20

30

【0069】

本発明者らは、クラス1のscFvが、3~4µg/mLの上清又は精製材料のいずれかで、はっきりした結合シグナルを示したが、クラス2のscFv(scFvD)及びクラス3のscFv(scFvF)には、細胞表面免疫標識を得るのに、約10倍高い20~80µg/mLの精製濃度を必要としたことを実証した。生RBE4細胞の結合親和性に関して、クラス1のscFvAは、 $K_d = 82 \pm 15$ nMの親和性を保有する一方で、この方法を用いては、単量体タンパク質としてのクラス2のscFvDの親和性を求めることができなかった。代わりに、本発明者らは、エピトープタグ抗体との前二量体化後のscFvDの結合特性を評価した(結合力= 2.0 ± 0.1 nM)。比較すると、ファージミド選抜を用いて単離した抗トランスフェリン受容体の親和性は、135 nMと測定され、本発明者らの酵母選抜系で単離したscFvAと同程度の親和性であった。

40

【0070】

図18は、scFvA及びscFvDの平衡結合性を提示する。図18の左側のパネルは、生RBE4細胞とのscFvA相互作用に関する結合等温線を示す。プロットは、適合単量体平衡結合関数及び2つの独立実験の実験データを示す。図18の右側のパネルは、RBE4細胞との二量体化scFvD相互作用に対する結合等温線を提示する。プロットは、見かけの親和性(結合力)を生じるのに用いられた適合単量体平衡結合関数及び2つの独立実験の実験データを示す。挿入図は、結合曲線を作成するのに用いられた生のフローサイトメトリヒストグラムを示す。

50

【 0 0 7 1 】

したがって、本明細書で開示された結果は、M A bの供給源としてハイブリドーマ調整培地 (hybridoma-conditioned medium) を用いるアプローチと類似の簡易な生化学試験に、酵母培養上清を直接用いることができる。さらに、実施例 1 1 で記載されるように、c 末端の 6 ヒスチジンエピトープを用いて、標識及び輸送試験のために scFv を精製することができる。

【 0 0 7 2 】

(実施例 1 0)

scFvに関する抗原の免疫沈降

scFvで認識される抗原の性質を評価するために、本発明者らは、新規の酵母免疫沈降手順を開発した。本発明者らは、洗浄剤が可溶化したビオチン化 R B E 4 溶解物から同族の原形質膜抗原を直接的に免疫沈降するのに scFv を提示した酵母を用いた。好都合なことに、免疫沈降粒子として酵母を使用することによって、従来の免疫沈降法で必要となるさらなる任意の scFv タンパク質のサブクローニング、産生又は固定化をすることなく、抗原をサイジングさせた。本発明者らは、抗ビオチンウェスタンブロッティングによって免疫沈降産物を評価し (図 1 9)、このようなプロットにおける少量のバックグラウンドは、免疫沈降プロセスの特異性の直接的な指標であった。クラス 1 の scFv A (1 2 4 k D a が非還元で、幾つかの高分子量バンドが還元されている)、クラス 2 の scFv D (1 0 4 k D a が非還元で、1 1 7 k D a が還元されている) 及びクラス 6 の scFv J (1 2 2 k D a が非還元で、1 2 7 k D a が還元されている) で免疫沈降された抗原は異なっていた (図 1 9)。相同性ベースの scFv のクラス割り当てによって予測されるように、他のクラス 1 の scFv (scFv B、scFv C、scFv G 及び scFv K) は、scFv A に対して見られたものと同一の免疫沈降産物が得られ、クラス 2 の scFv I は、クラス 2 の scFv D で見られたものと同様であった (データ図示せず)。還元 scFv A サンプルで現れる複数のバンドは、scFv A で特異的に認識された抗原と共に、タンパク質複合体又は場合によっては複数の特異的抗原の他のビオチン化成員の同時免疫沈降が行われ得ることを示唆している。したがって、薬物送達の基礎を形成する新規の抗体 - 血液脳関門輸送体の組合せを示す scFv 抗原系が特定された。

【 0 0 7 3 】

(実施例 1 1)

精製 scFv A が *in vivo* で脳血管系を標識する

これまでに記載されたハイスルーブット方法によって、R B E 4 細胞と特異的に結合し、且つ培養物中でエンドサイトーシスし得る scFv クローンを特定した。しかし、本発明者らは、また培養物中で特定されたクローンが、*in vivo* で脳内皮細胞と結合することを確認することを望んでいた。したがって、培養物中で scFv A で標的化された抗原が、*in vivo* で内皮細胞にも存在することを最初に確認する必要がある。図 2 1 は、scFv A 標的抗原密度及び脳の局在化の評価を示す。具体的には、左側のパネルは、R B E 4 細胞に対する抗原密度のフローサイトメトリ評価を示す。抗トランスフェリン受容体モノクローナル抗体 (O X 2 6)、I g G 2 a アイソタイプコントロール (図示せず)、前二量体化 scFv A、前二量体化 scFv D、及び前二量体化コントロール用 4 - 4 - 2 0 scFv を抗原飽和濃度で用い、抗原密度の直接的な比較をするために R B E 4 細胞を標識した。次いで、フローサイトメトリによって、R B E 4 細胞上に存在する抗原部位の相対数を評価した。scFv A 抗原は、scFv D で見られたものより約 3 倍高いレベルで、トランスフェリン受容体で見られたものより 5 . 5 倍多く存在していた。また、O X 2 6 モノクローナル抗体は、免疫標識実験で scFv A と競合せず、また結合前の R B E 4 細胞の脱グリコシル化 (マンノシダーゼ及びノイラミニダーゼ) には、観察可能な効果がなかった。輸送体 - scFv A 相互作用は、グリコシル化状態に感受性でもなかった。

【 0 0 7 4 】

図 2 1 の右側のパネルは、scFv A が脳血管系を選択的に認識していることを示す。脳毛細血管特異性が高いレクチンであるグリフォニア・シンプリシフォリア (*Griffonia simplicifolia*) アグルチニン (G S A) での scFv A 標識の共局在化が完了し、全ての脳血管

がscFv A 抗原を発現することを示した。scFv A (画像1)又は4-4-20 (画像4)と、脳内皮細胞マーカーGSA-FITC (画像2、画像5)とで凍結ラット脳切片を同時に標識した。画像3及び画像6は、scFv及びGSA-FITCの標識の重複を示すマージ画像である。scFv Aとは対照的に、無関係のscFv 4-4-20は全く標識をもたらさなかった。マウスの脳切片及び新たに単離した毛細血管で、同様の結果が観察された。最終的に、RBE4培養物に関する抗原密度の序列に酷似して、定性的な標識強度は、*in vivo*でのscFv A 抗原密度が、トランスフェリン受容体に関するそれより高かったことを示した(データ図示せず)。画像3に示すスケールバーは50 μ mの長さである。したがって、scFv Aは、*in vivo*で脳組織の血管成分を特異的に標識し、その抗原は内皮由来のものである。

10

【0075】

(実施例12)

材料及び方法

以下で、上記の実施例の項で用いられる材料及び方法の詳細な説明を行う。

【0076】

scFvライブラリの増殖及び誘導

SD-CAA (20.0 g/Lのデキストロース、6.7 g/Lの酵母窒素塩基、5.0 g/Lのカザミノ酸、10.19 g/Lの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8.56 g/Lの $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、加えて50 μ g/mLのカナマイシン中で、EBY100酵母8(a、GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2 1 his3 ·200 pep4::HIS2 prb1 ·1 .6R can1 GAL)における非免疫ヒトscFvライブラリを30で24時間増殖した(OD600~10)。続いて、RBE4単層から選抜する前に、20で22時間、10倍過剰のライブラリ多様性で酵母(5×10^9)を、SG-CAA培地(デキストロースがガラクトースに置き換わったことを除いてSD-CAAと同じ)500 mL中で誘導した。

20

【0077】

RBE4細胞単層からのscFvライブラリ選抜

RBE4細胞が、*in vivo*のBBBで特徴的である多くの特質を示すことがこれまでに実証されているので、脳内皮細胞源として、RBE4ラットの脳内皮細胞株を用いた。RBE4細胞は、非形質転換表現型を示し、典型的な内皮マーカーを発現し、星状膠細胞の合図(cues)に反応し、強固な密着結合タンパク質であるオクルディンの発現及び正確な局在化等のBBBに特異的な性質を示す。さらに、グルコース(GLUT1)、大きい中性アミノ酸(LAT1)、及び鉄(トランスフェリン受容体)を輸送する輸送体、BBBの能動拡散において機能する輸送体(p-糖タンパク質、MDR1)を含む脳内皮細胞で特徴的である原形質膜局在化輸送体をRBE4細胞で発現する。RBE4細胞は、Francoise Roux博士から頂いたものであり、これまでに記載されたように維持した。選抜する前に2日間、25%密集度(confluency)で、I型コラーゲン被覆(Sigma)6ウェルプレート上でRBE4細胞を播種した。1 mMの CaCl_2 、0.5 mMの Mg_2SO_4 及び0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を補充した0.01 MのPBS(pH7.4)(洗浄緩衝液)で、10倍過剰のライブラリサイズで誘導された酵母細胞(5×10^9 個の酵母)を2回洗浄し、100 cm^2 のRBE4細胞単層上に酵母混合物を滴下して、単層にわたるさらなる分布を確実にした。酵母の密度(5×10^7 酵母/ cm^2)は、酵母が完全にRBE4単層を被覆する選抜の上限である。高密度の選抜によって、結合酵母が約30%回収されるが、ライブラリの多様性を適切に過剰サンプリングもする。次いで、単層を4で2時間インキュベートし、酵母-RBE4細胞を接触させた。洗浄方法を最適化し、親和性がナノモルのRBE4細胞と結合するscFvモデルを回収した。得られた方法は、25回ゆっくりとプレートを振盪させることによって氷冷洗浄緩衝液でRBE4層を洗浄すること、5回プレートを循環させること(2回反復)、及び10回プレートを循環させることを伴っていた。それぞれの工程後に洗浄上清を取り除き、新たな洗浄緩衝液で置き換えた。洗浄工程後、洗浄緩衝液1 mLをそれぞれのウェルに添加し、プレートが

30

40

50

ら全てのセルを削り落とし、共にプールした。酵母/RBE4細胞混合物をカナマイシン補充SD-CAA 5 mL中で再懸濁し、30℃で一晩増殖させたあと、20℃で20時間SG-CAA誘導した。並行して、回収した細胞の一部をSD-CAA寒天プレート上で培養し、各回の後、回収された酵母細胞の総数を定量した。1回目の後、プールの多様性が大幅に減少したので、酵母選抜密度が、 5×10^6 酵母/cm²まで下がり、RBE4領域は、2回目で20 cm²、3~5回目で10 cm²まで下がった。2回目の選抜後、回収された酵母クローン数は 8.2×10^4 個で、抗フルオレセインscFv(4-4-20)を提示するコントロール用酵母による並行実験では、選抜戦略が主にRBE4結合酵母クローンを得ていたことを示す同じ洗浄計画を用いても、ほとんどバックグラウンドは示されなかった。酵母-RBE4相互作用がscFvに基づくことを確認するために、Zymo Prep酵母ミニプレップキット(Zymo Research)を用いて、幾つかのRBE4結合酵母クローン(3回目で7個、4回目で12個)に関するscFvコードプラスミドを回収した。次いで、酢酸リチウム法を用いて、scFvをコードするプラスミドを酵母表面提示親株EBY100に再び形質転換し、Trp⁺形質転換体を選択した。再び形質転換したクローンとのRBE4結合が確認された後、Gal1-10(5'-CAACAAAATAATTGTTAATAATACCT-3'、配列番号35)及びターミネータプライマー(5'-GTTACATCTACACTGTTGTTAT-3'、配列番号36)(UW-マディソンバイオテクノロジーセンター(UW-Madison Biotechnology Center))でプラスミドをシーケンシングした。

【0078】

回収した酵母クローンのハイスループット分析

上記のように、最初にSD-CAAで、その後SG-CAAで酵母を通常に増殖し、scFv発現を促進させた。しかし、96ウェルフォーマットを用いた場合、この技法によって、比較的レベルのscFv表面発現レベル、及びscFvを提示する酵母の割合の低下が得られた。したがって、96ウェルプレートに関して、scFv提示方法を最適化し、SG-CAAにおける同時増殖及び誘導によって、従来の酵母提示法を用いて観察されたものと同程度の効率を有するscFv提示が可能になったことを見出した。したがって、ハイスループットスクリーニングに関して、96ウェルプレートで、酵母クローンをSG-CAA(誘導サンプル)及びSD-CAA(対照の非誘導サンプル)200 µLに接種し、30℃で24時間インキュベートした。並行のSG培養物と同程度の総酵母数を確保するためにSD培養物160 µLを取り除いた後、酵母の96ウェルプレートを遠心分離し、上清を慎重に取り除いた。それから、洗浄緩衝液150 µLで酵母を1回洗浄し、洗浄緩衝液150 µL中で再懸濁させた。並行して、96ウェルプレートで密集するまで培養したRBE4細胞を氷冷洗浄緩衝液で1回洗浄した。その後、酵母クローンをRBE4単層の入った対応ウェルに移し、4℃で2時間インキュベートした。洗浄後、光学顕微鏡を用いて、scFv酵母クローンの結合能を評価した。目視検査の後、酵母クローンは、誘導酵母が結合したままであったのに対し、同じクローン由来の非誘導酵母は洗い流されていた。

【0079】

全酵母細胞PCRによって、結合酵母クローンによって包含されるscFv遺伝子を直接増幅した。要するに、少量の新たな非誘導酵母コロニーを0.2%SDS 30 µLに移し、ボルテックスして、-80℃で2分間凍結し、95℃で2分間インキュベートした(温度シフトは1回繰り返した)。その後、PNL6フォワードプライマー(5'-GTACGAGCTAAAAGTACAGTG-3'、配列番号37)及びPNL6リバースプライマー(5'-TAGATACCCATACGACGTTTC-3'、配列番号38)によるPCR反応鑄型として、細胞溶解液1 µLを用いた。続いて、60℃で14時間、PCR産物20 µLをBstNI(New England Biolabs)の制限酵素処理にかけた。特有のscFvクローン特定のために、制限酵素処理産物を3%アガロースゲル上に分離させた。特有のBstNI処理パターンを提示するそれぞれのクローンのPCR産物を、RevSeq P2(5'-CCGCCGAGCTATTACAAGTC-3'、配列番号39)及びForSeq P2(5'-TCTGCAGGCTAGTGGTGGTG-3'、

10

20

30

40

50

配列番号 40) プライマーでシーケンシングした。その後、この配列を I g B L A S T プログラムで分析し、ヒト生殖細胞系起源と特定した (I g B L A S T は N C B I ウェブサイト : www.ncbi.nlm.nih.gov で利用可能である)。

【 0 0 8 0 】

酵母コロニーのノーザンブロッティング

酵母コロニーのノーザンブロッティングを用いて、酵母結合プールからクラス 1 及びクラス 2 の scFv を検出し、事前に差し引いた。R N a s e の汚染を排除するために、標準的なノーザンブロッティング実験に関する試薬及び取扱説明書を準備した。S D - C A A 寒天プレート上で、酵母クローンをを培養し、得られたコロニーをエタノール殺菌したニトロセルロース膜上に移した。次いで、コロニー充填膜を S G - C A A 寒天プレートの上部に細胞側を上にして載せ、30 で 2 日間インキュベートして、scFv 遺伝子の転写を誘導した。ノーザンブロッティングのために誘導された酵母コロニーを調製するために、10 % S D S を染み込ませたワットマン濾紙上に、ニトロセルロース膜を載せ、65 で 30 分間インキュベートした。65 で 30 分間ホルムアルデヒドを染み込ませた濾紙に移すことでフィルタを固定した (3 × S S C、d d H₂O 中の 10 % ホルムアルデヒド)。続いて、真空下で、80 で 2 時間、空気乾燥した膜を焼成した。製造業者の取扱説明書 (IDT) に従って S T A R F I R E キットを用いて、10 残基の 3² P - d A T P で、クラス 1 の V H C D R 2 及びクラス 2 の V H C D R 2 に対応するオリゴヌクレオチドプローブを放射標識し、シンチレーション計測によって、その比放射能を求めた。生殖細胞系の V 領域の一部であるので、V H C D R 2 領域は、クラス 1 とクラス 2 との間で 100 % の相同性を示し、したがってハイブリダーゼーションベースの控除の影響を受けやすかった。この膜は、43 で 2 時間、前ハイブリダイゼーション緩衝液 (50 % ホルムアミド、5 × デンハート溶液、5 × S S P E、1 % S D S、0.1 % サケ精子 D N A) 中で遮断された後、43 で一晩、ハイブリダイズされた (8 × 10⁵ c p m / m l のそれぞれのプローブを有する前ハイブリダイゼーション緩衝液)。ハイブリダイゼーション後、ニトロセルロース膜を以下の通りに洗浄した : 室温で 8 分間、2 × S S C、0.1 % S D S ; 室温で 8 分間、0.5 × S S C、0.1 % S D S ; 室温で 8 分間、0.1 × S S C、0.1 % S D S ; 50 で 30 分間、0.1 × S S C、1 % S D S。次いで、- 80 で 24 時間又は 72 時間、この膜を E C L H y p e r f i l m (Amersham) に曝露した。これらの差し引かれたスクリーニングにおけるプローブとして V H C D R 2 を用いたが、回収された scFv クローンの多様性は、C D R プローブの任意の組合せを用いて差し引かれることによって、回収された scFv クローンの多様性を所望の通りに容易に広げることができる。

【 0 0 8 1 】

scFv の分泌及び精製

N h e I - H i n d I I I 制限消化による B s t N I に用いられた P C R 産物から、scFv に関するオープンリーディングフレームを単離し、scFv 分泌で広範囲に用いられた scFv 酵母分泌ベクター (p R S 3 1 6 - G A L 4 - 4 - 2 0) に組み込んだ。次いで、得られた p R S 3 1 6 - G A L scFv プラスミドを、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを過剰発現する酵母株 Y V H 1 0 に形質転換した。30 で 72 時間、2 × S C A A アミノ酸 (190 m g / L の A r g、108 m g / L の M e t、52 m g / L の T y r、290 m g / L の I l e、440 m g / L の L y s、200 m g / L の P h e、1260 m g / L の G l u、400 m g / L の A s p、480 m g / L の V a l、220 m g / L の T h r、130 m g / L の G l y、20 m g / L のロイシン及びウラシルを欠くトリプトファン) で補充した最小 S D 培地 (2 % デキストロース、0.67 % 酵母窒素塩基) で scFv 分泌ベクターを包含する酵母を増殖した。その後、20 で 72 時間、非特異的担体として、1 m g / m l の B S A を有する S G - S C A A (デキストロースをガラクトースで置換) で、scFv 分泌を誘導した。精製 scFv を必要とする実験のために、N i - N T A カラム (Q i a g e n) を用いて、本明細書で先に記載したように、バッチ 50 m L 又は 1 L から、6 つのヒスチジンタグを付けた scFv を精製した。

【 0 0 8 2 】

4%積層ゲル及び12.5%分離ゲルによるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、その後クーマシーブルー染色によって、scFvのサイズ、純度及び分泌収率を分析した。一連の炭酸脱水酵素標準(31kDa)と比較し、且つBCAタンパク質分析(Pierce)によって、タンパク質濃度を評価した。並行してまた、ウェスタンブロッティングで、SDS-PAGEで分離されたタンパク質をニトロセルロース膜(BioRad)上にプロットした。5%脱脂乳を補充したTBST溶液(8g/LのNaCl、0.1%Tween-20、20mMのトリスでpH7.6に調製)中で4℃で一晩、ニトロセルロース膜を遮断し、1µg/mLの9E10抗c-myc抗体(Covance)、その後抗マウスIgGホースラディッシュペルオキシダーゼ抱合体(Sigma)でプローブした。増感化学発光を用いて検出を行い、定量のために、NIHのImageJソフトウェアでECL hyperfilm(Amersham)への複時点暴露を評価した。

【0083】

親和性測定

RBE4細胞を4℃で様々なscFvA濃度で標識し、抗cmyc(9E10)抗体、その後抗マウスIgG AlexaFluor555の標識によって、結合したscFvを検出した。蛍光強度は、FACSCaliburフローサイトメータによってモニタリングし、わずかの結合リガンドを定量するのに用いた。scFvA結合データを平衡結合モデルに適合させ、一価の親和性の解離定数(Kd)を求めた。細胞標識分析は、scFvDが抗エトープタグ抗体9E10と前二量体化したので、単量体scFvDを用いて結合曲線を作成し、リガンド結合測定に必須の結合力を与えるのに十分な感度がなかった。したがって、scFvD二量体標識細胞を抗マウスIgGのAlexaFluor555抱合体でプローブし、フローサイトメトリで評価した。得られたデータを平衡結合モデルに適合させ、見かけの親和性(結合力)を導いた。抗原密度実験に関して、62.5nMの前二量体化scFvA、scFvD、4-4-20 scFv、OX26モノクローナル抗体、又はIgG2aアイソタイプコントロールによって4℃で生RBE4細胞を標識した。標識強度の定量比較を容易にするのに、それぞれのサンプルで均一な二次抗体(抗マウスIgG AlexaFluor555抱合体)を用いた。これらの抗体標識濃度は、細胞表面の抗原の飽和結合に適切であり、細胞表面の標識は、フローサイトメトリで定量的に評価した。

【0084】

scFv-RBE4免疫細胞化学

scFvの細胞内在化を促進するのに重要な要素であることが多い二価性を与える方法として、9E10抗体によるc-mycエトープタグを介するscFvの前二量体化を利用した。この目的のために、初めにRBE4結合scFvを9E10でインキュベートし、人工二量体を形成した。等量の精製scFv(1mMのCaCl₂、0.5mMのMg₂SO₄で補充したPBS中で40%ヤギ血清を用いて、scFvAでは8µg/mL、又はscFvD及び4-4-20では32µg/mLに希釈した)及び10µg/mLの9E10を混合し、室温で1時間インキュベートして、人工二量体を形成した。約90%の密集度のRBE4細胞を洗浄緩衝液で3回洗浄した。次いで、4℃で30分間、RBE4細胞をscFv人工二量体又はOX26モノクローナル抗体(10µg/mL)(Serotec)でインキュベートした後、さらに30分間、37℃に切り替えた。4℃で30分間、細胞表面結合scFvを標識するのに、AlexaFluor555(Molecular Probes)と結合した抗マウスIgG二次抗体を適用させた。その後、4℃で5分間、洗浄緩衝液で希釈した0.5%サポニン(SigmaAldrich)で細胞を浸透させた後、4℃で30分間、AlexaFluor488(Molecular Probes)と結合した抗マウスIgG抗体で標識して、内在化scFvを検出した。それから、標識細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡(Olympus IX70)を用いて調べた。

【0085】

酵母提示免疫沈降

同族原形質膜抗原を免疫沈降するのに、ヒトscFvライブラリから選択されたscFv提示酵母細胞を直接用いた。抗ニワトリ卵リゾチーム(D1.3)scFvを提示する酵母細胞をネ

10

20

30

40

50

ガティブコントロールとして用いた。N h e I - X h o I 断片として p R S 3 1 6 - G A L O X 2 6 から O X 2 6 scFv オープンリーディングフレームを切断し、p C T - L W H I にライゲートすることによって、ポジティブコントロールとして、抗トランスフェリン受容体 O X 2 6 scFv 酵母提示プラスミドを作製した。酵母クローンを上記のように培地 5 0 m L で培養、誘導した。誘導された酵母を遠心分離で回収し、P B S 中の 3 % (体積 / 体積) ホルマリンで洗浄して固定した。0 . 5 m g / m L のスルホ - N H S - L C - ビオチン (Pierce) を用いて、R B E 4 原形質膜タンパク質をビオチン化した。R B E 4 細胞溶解物を調製するために、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Calbiochem) で充填した、1 % (w / v) n - オクチル - D - グルコピラノシド (scFv A 、 B 、 C 及び J 、 Sigma) 又は 0 . 1 % (w / v) トリトン X - 1 0 0 (scFv D 、 I 、 J 、 及び O X 2 6 、 Sigma) の洗浄 P B S 溶液を用いて、約 5×10^6 個のビオチン化 R B E 4 細胞を溶解した。免疫沈降のために、細胞溶解タンパク質 4 0 0 μ g を約 10^8 個の酵母細胞と混合し、4 で一晩、インキュベートした。1 5 分間、0 . 4 M のトリス (p H 6 . 8) 中の 0 . 5 % S D S 3 0 μ L で酵母細胞を再懸濁することによって、免疫沈降産物の溶出を行った。存在する還元剤 (D T T) を用いて又は用いずに、溶出液を S D S - P A G E (8 % 分離ゲル) で分離し、ニトロセルロース膜 (BioRad) 上でプロットした。その後、上記のように、抗ビオチンモノクローナル抗体 (0 . 5 μ g / m L のクローン B T N . 4 、 Labvision) 、 O X 2 6 モノクローナル抗体 (5 μ g / m L 、 Serotec) 、又は抗インスリン受容体・サブユニットモノクローナル抗体 (1 μ g / m L のクローン C T - 3 、 Labvision) でウェスタンブロッティングを行った。scFv A も scFv D も免疫沈降産物、又は細胞溶解物によるウェスタンブロッティングフォーマットでは活性はなく、生細胞を有する自然条件下で、選択の結果がもたらされたと考えられた。

10

20

30

40

【 0 0 8 6 】

scFv A によるラット脳切片の免疫組織化学標識

成体の雄スプレイグドローラットの脳から脳組織片を調製した。液体窒素浴を用いて、組織凍結培地 (Triangle Biomedical Sciences) で脳を急速凍結し、7 μ m の環状切片を凍結脳から切断した。室温で 3 0 分間、P B S C M 中の 4 0 % ヤギ血清及び 0 . 2 % トリトン X - 1 0 0 で脳切片を遮断した。4 0 % ヤギ血清で精製 scFv A 又は 4 - 4 - 2 0 を希釈し、室温で 1 時間、等量の 1 0 μ g / m L の 9 E 1 0 でインキュベートして、人工二量体を形成した。次いで、4 で 1 時間、scFv A 人工二量体で脳切片をインキュベートした。4 で 3 0 分間、フィコエリトリン結合抗マウス I g G 及び F I T C 結合グリフォニア・シンプリシフォリアレクチン (1 0 μ g / m L の G S A - F I T C 、 Sigma) から成る二次標識溶液を適用した。洗浄後すぐに、氷上で 1 0 分間、脳切片を 4 % パラホルムアルデヒドで固定して、蛍光顕微鏡で調べた。

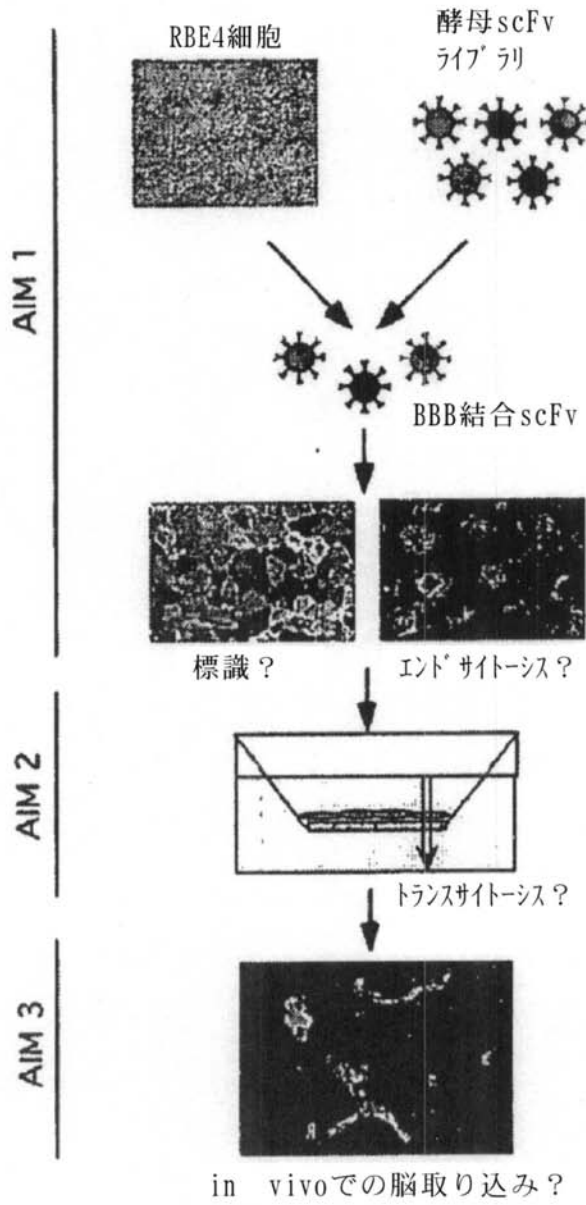
【 0 0 8 7 】

上述の実施例で記載されたように、本発明は、培養内皮細胞から酵母提示された抗体ライブラリを選抜し、同時に 1 つ又は複数の抗原に対して異なる親和性の複数の結合体を単離する方法を提供する。結合クローンを単離し、次いで、内皮細胞を用いて、エンドサイトーシス及びトランスサイトーシスを誘発するこれらの能力を確認した。

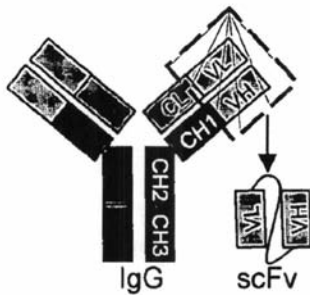
【 0 0 8 8 】

本発明は、上記で概説された様々な例示的な実施形態と共に記載されているが、知られているか、現時点で予測されていないか、又はおそらく予測されないかにかかわらず、様々な変更、修正、変形、改良、及び / 又は同等置換が、当該技術分野において少なくとも通常の技術を有する者 (当業者) にとって明らかになり得る。したがって、上記のような本発明による例示的な実施形態は、限定ではなく例示として意図される。本発明の精神及び範囲を逸脱することなく、様々な変更が為され得る。これによって、本発明は、これらの例示的な実施形態の既知の又は後に開発される変更、修正、変型、改良及び / 又は同等置換を含むように意図される。

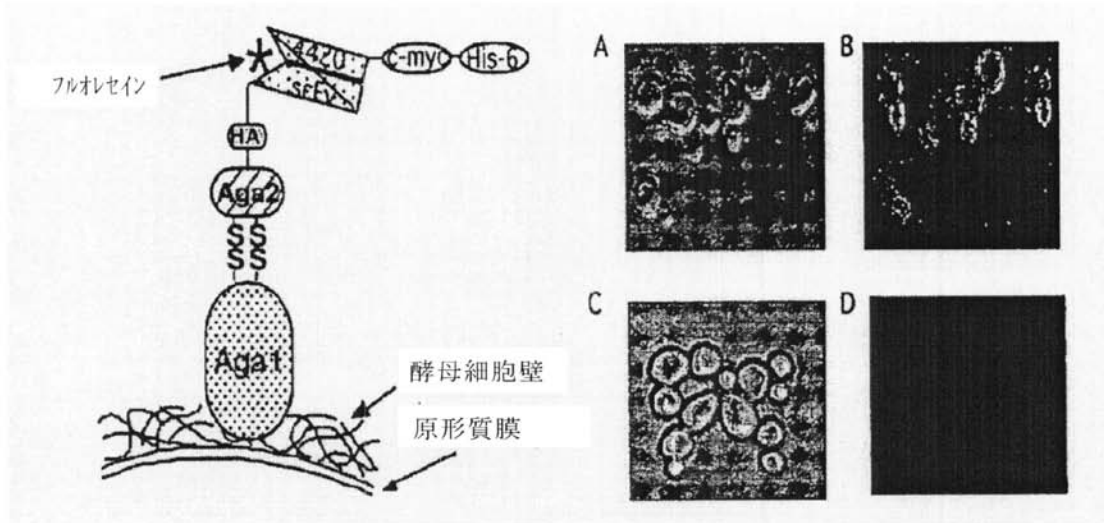
【 図 4 】



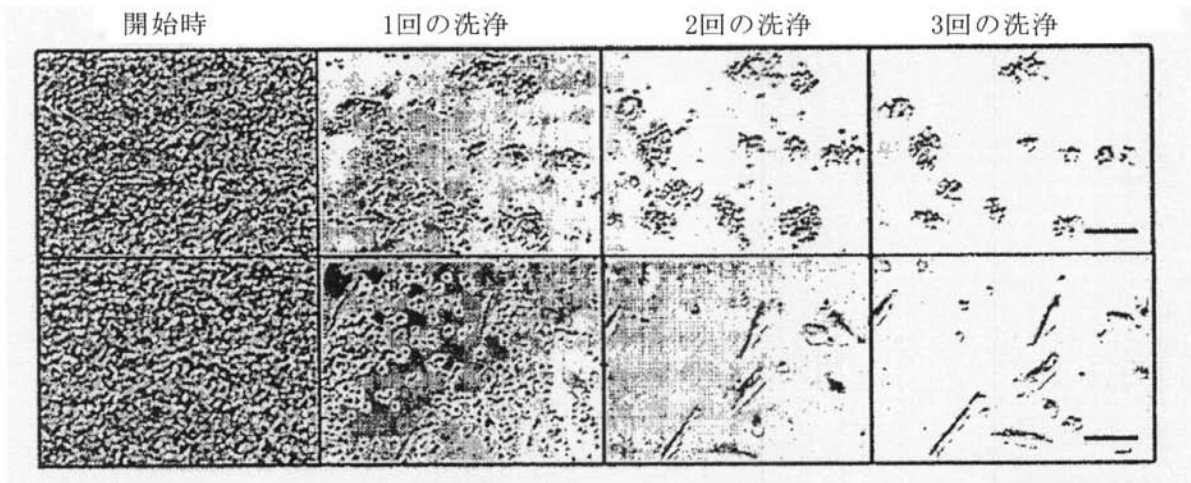
【 図 5 】



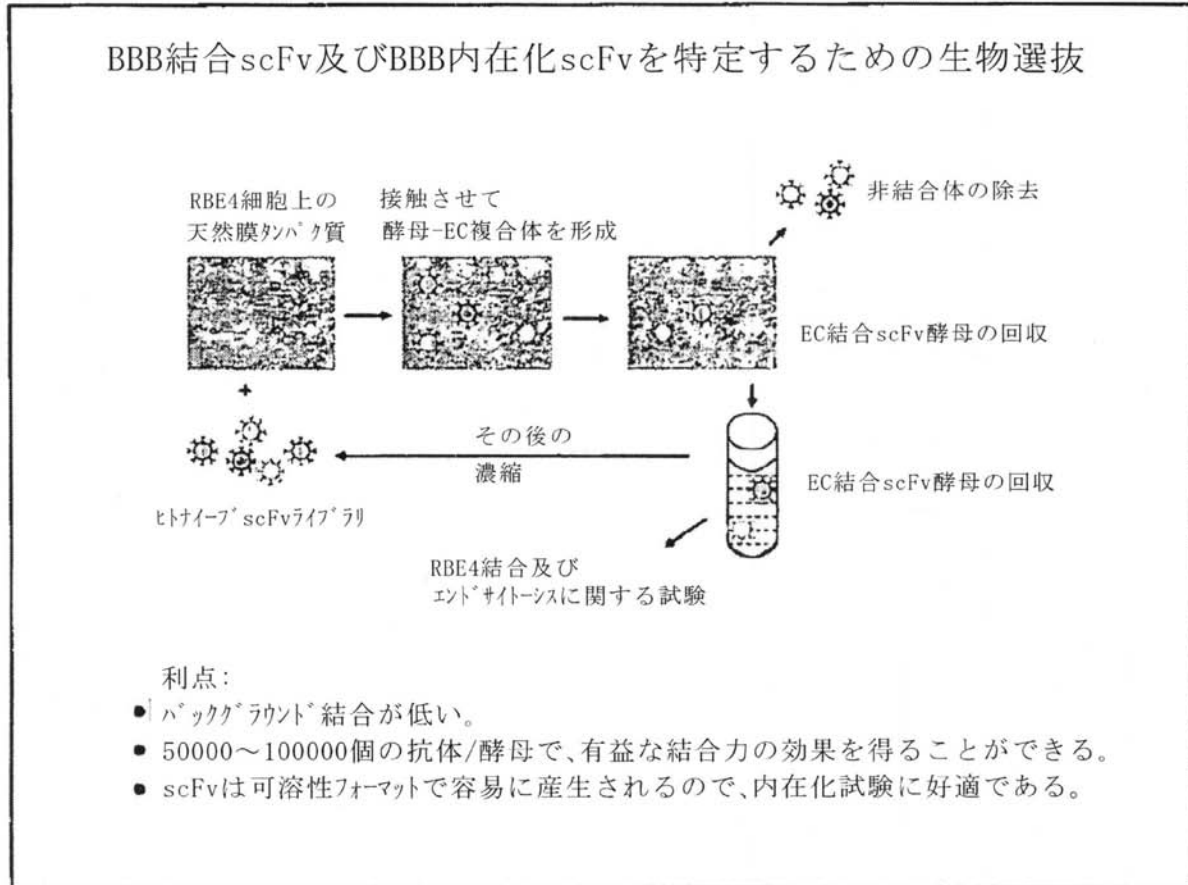
【 図 6 】



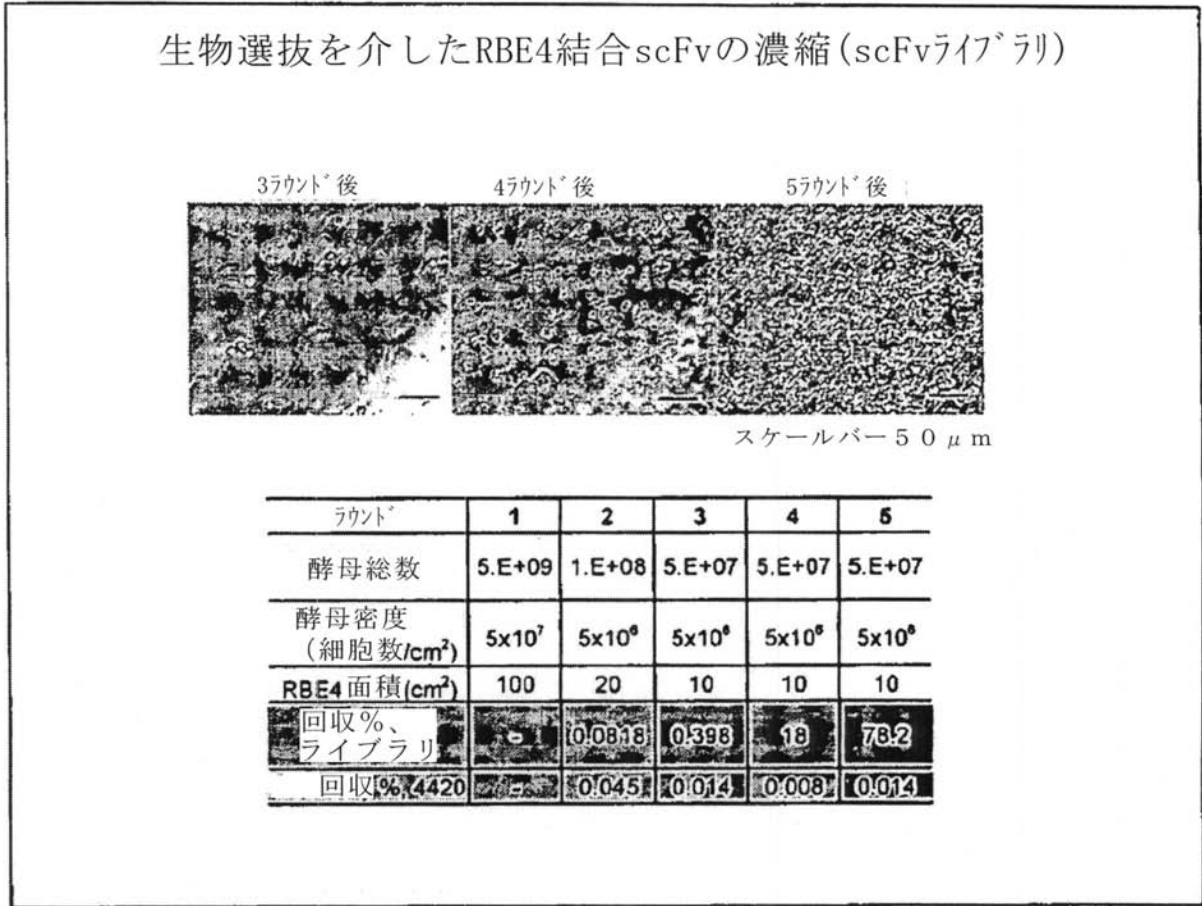
【 図 7 】



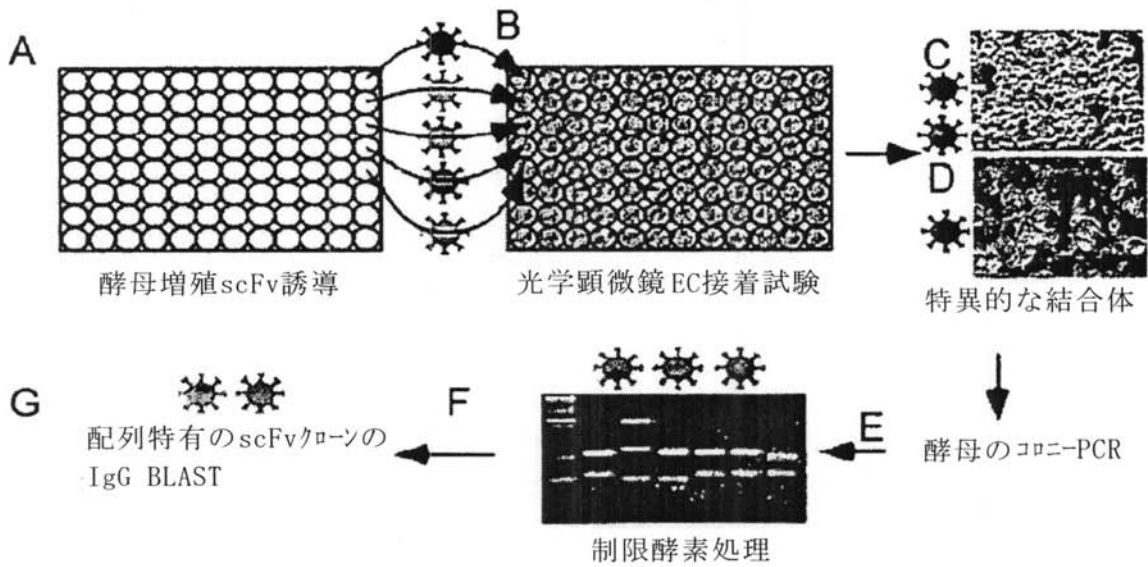
【図9】



【図10】

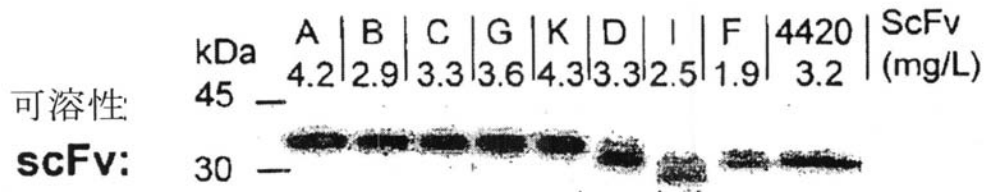


【図11】



【図16】

RBE4によるscFvの結合及び内在化

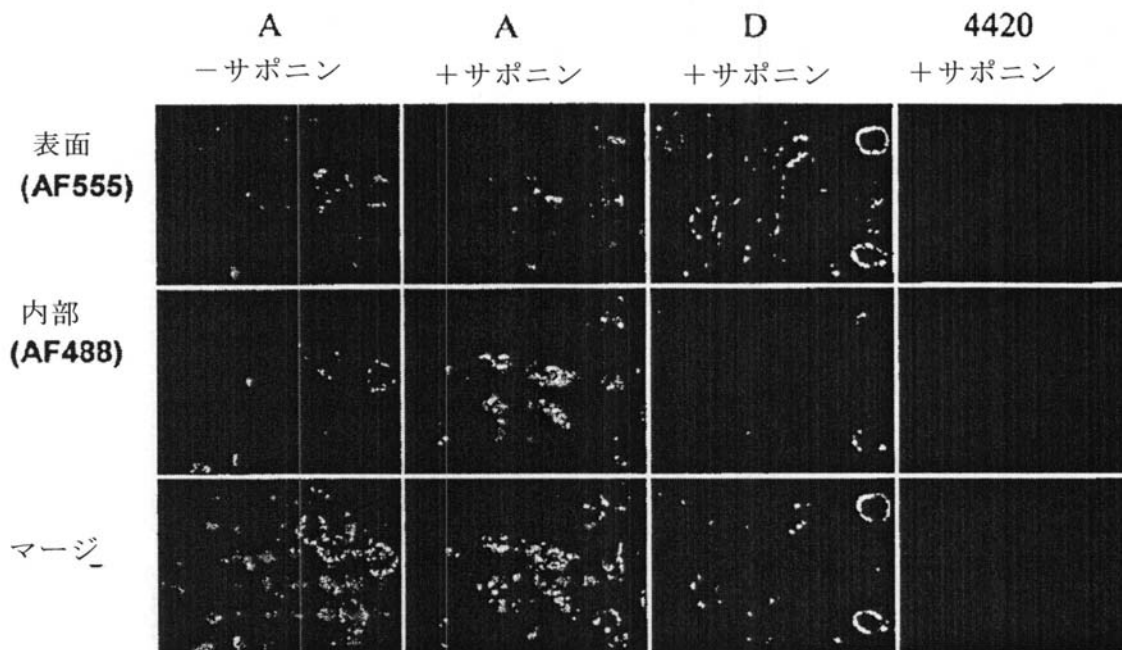


scFv クローン	RBE4 結合	RBE4 内在化
A	Yes	Yes
B	Yes	ND
C	Yes	ND
G	Yes	ND
K	Yes	ND
D	Yes	No
I	Yes	ND
H	ND	ND
F	Yes	No

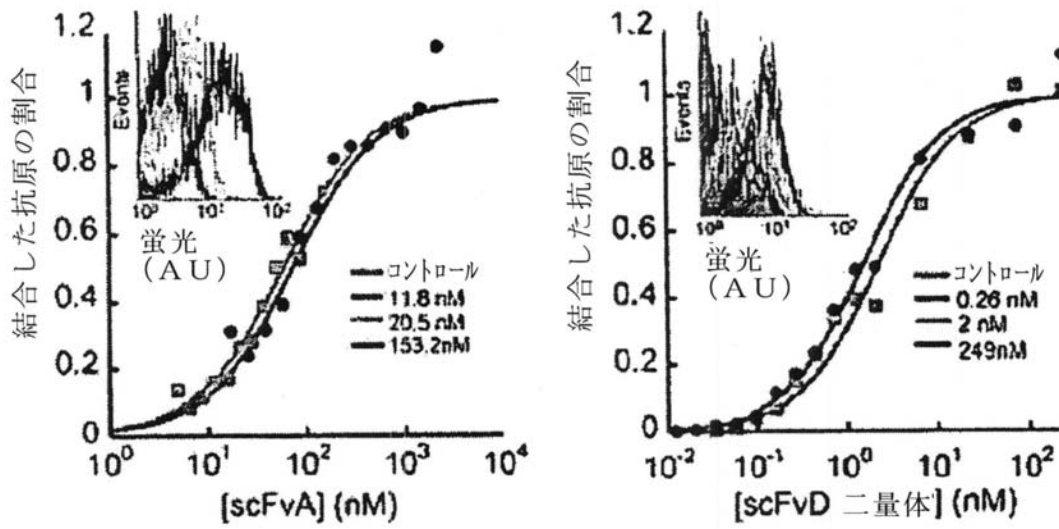
ND: 検出されず

【図17】

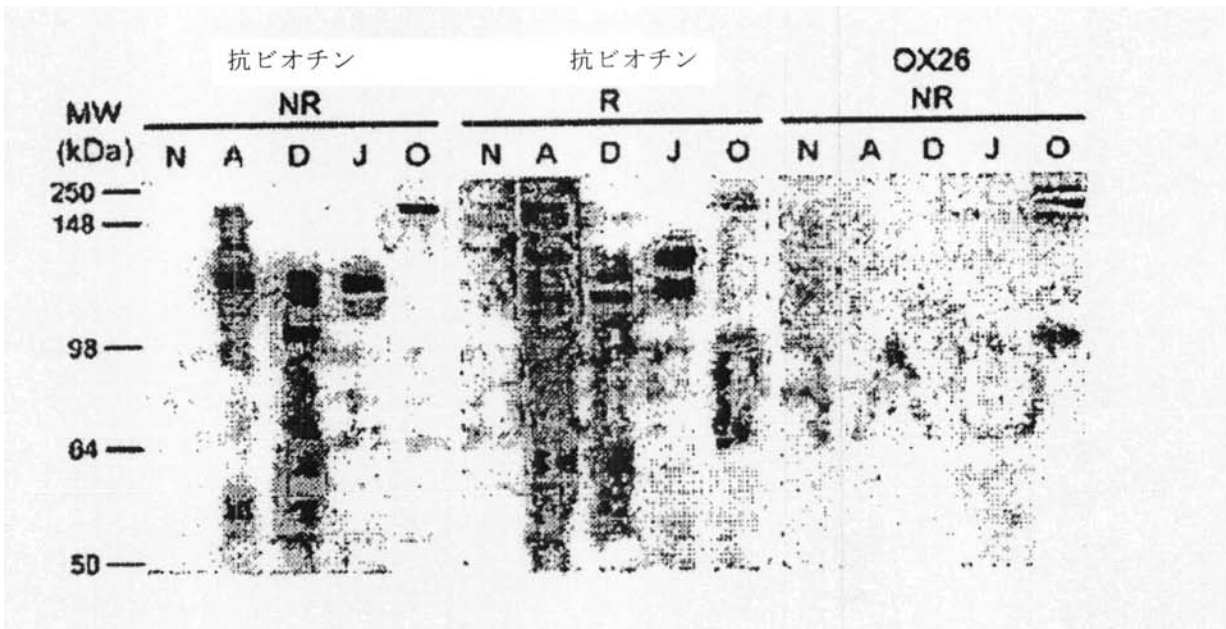
RBE4細胞によるscFv Aの特異的内在化



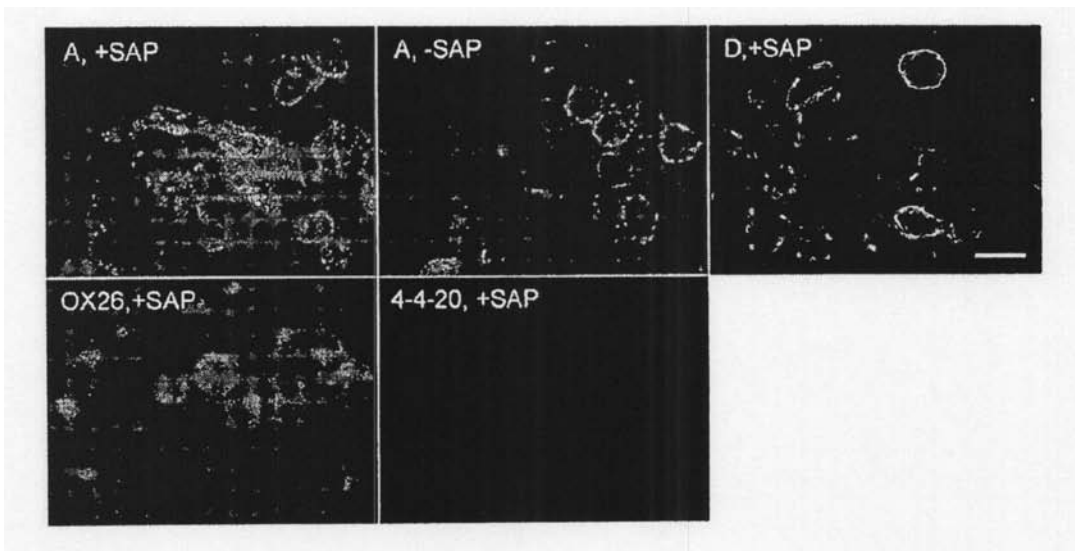
【 図 1 8 】



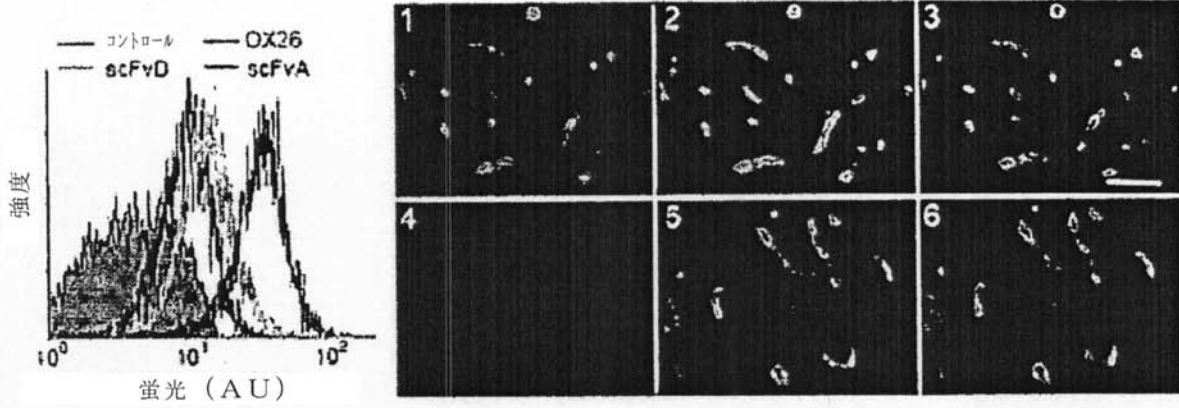
【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 配列表 】

[2009540799000001.xml](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2007/070587
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 C07K16/28 A61K39/395 G01N33/53		
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) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG ET AL: "The use of scFv-displaying yeast in mammalian cell surface selections" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 304, no. 1-2, September 2005 (2005-09), pages 30-42, XP005065135 ISSN: 0022-1759 cited in the application the whole document ----- -/-	13-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 document 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 14 December 2007		Date of mailing of the international search report 14/01/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentleer 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bumb, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2007/070587

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>STADDON J M ET AL: "P120, A P120-RELATED PROTEIN (P100), AND THE CADHERIN/CATENIN COMPLEX" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, NEW YORK, US, US, vol. 130, no. 2, July 1995 (1995-07), pages 369-381, XP000892283 ISSN: 0021-9525 figure 1A</p>	18
X	<p>DIXELIUS J ET AL: "Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 95, no. 11, 1 June 2000 (2000-06-01), pages 3403-3411, XP002959879 ISSN: 0006-4971 page 3408</p>	18
X	<p>NOVAK S ET AL: "A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 17 MAY 1996, vol. 271, no. 20, 17 May 1996 (1996-05-17), pages 11732-11736, XP002462483 ISSN: 0021-9258 figure 3 page 111732</p>	18
X	<p>YAMAMOTO T ET AL: "THE HUMAN LDL RECEPTOR: A CYSTEINE-RICH PROTEIN WITH MULTIPLE ALU SEQUENCES IN ITS MRNA" CELL, MIT PRESS, CAMBRIDGE, MA., US, vol. 39, 1 November 1984 (1984-11-01), pages 27-38, XP000650714 ISSN: 0092-8674 page 27, right-hand column, line 4</p>	18
X	<p>DUFFY K R ET AL: "Human blood-brain barrier insulin-like growth factor receptor." METABOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL FEB 1988, vol. 37, no. 2, February 1988 (1988-02), pages 136-140, XP002462484 ISSN: 0026-0495 figure 5</p>	18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/070587

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BENJAMIN J HACKEL ET AL: "Production of Soluble and Active Transferrin Receptor-Targeting Single-Chain Antibody using <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 23, no. 4, 25 March 2006 (2006-03-25), pages 790-797, XP019405238 ISSN: 1573-904X	
P,X	WANG XIN XIANG ET AL: "Mining a yeast library for brain endothelial cell-binding antibodies." NATURE METHODS FEB 2007, vol. 4, no. 2, February 2007 (2007-02), pages 143-145, XP008086824 ISSN: 1548-7091 the whole document	1-23

International Application No. PCT/US2007 /070587

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 22-23 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 19-21 relate to components of the human body in situ (124 kDA antigen) the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/070587**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	N	

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

(72)発明者 シュスタ, エリック ブイ.
アメリカ合衆国 5 3 7 1 5 ウィスコンシン州 マディソン チャンドラー ストリート 1 0
2 3

(72)発明者 ワン, シン エックス.
アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州 ゲイザースバーグ マーケット ストリート イ
ースト 3 4 8 アpartment 3 8 2

(72)発明者 チョー, ヨングク ピー.
アメリカ合衆国 5 3 7 1 5 ウィスコンシン州 マディソン ミルトン ストリート 1 0 1 9
アpartment 2 0 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA02 DA12 GA11
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA80X AB01 BA02 CA25 CA44
4C076 AA95 CC01 EE41
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA21 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2009540799A5	公开(公告)日	2011-11-17
申请号	JP2009514526	申请日	2007-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	威斯康星校友研究基金会		
申请(专利权)人(译)	威斯康星校友研究休恩庸日		
[标]发明人	シュスタエリックブイ ワンシンエックス チョーヨングクピー		
发明人	シュスタ, エリック ブイ. ワン, シン エックス. チョー, ヨングク ピー.		
IPC分类号	C12N15/09 A61K47/42 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/28 A61K47/6849 C07K2317/21 C07K2317/622 C07K2317/77 G01N33/6854		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K47/42 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/08 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA43 4B024/CA02 4B024/DA12 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA80X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076/AA95 4C076/CC01 4C076/EE41 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	川崎孝雄 Toshizo饭		
优先权	60/811618 2006-06-07 US		
其他公开文献	JP2009540799A		

摘要(译)

本发明提供了结合脑内皮细胞受体的抗体，其导致受体和结合配体的胞吞/转胞吞作用。在一些实施方案中，配体包含药物活性化合物和抗体，其中抗体涉及通过血脑屏障（BBB）递送化合物。本发明还提供了通过从培养的细胞单层选择文库来鉴定内皮细胞特异性抗体的方法。本发明进一步涉及分离其他同源配体及其相关转运系统的方法，并通过鉴定与抗体结合的内皮细胞受体鉴定抗体靶向的转胞吞转运蛋白，可以提供身体。