

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-256541

(P2013-256541A)

(43) 公開日 平成25年12月26日(2013.12.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/20 (2006.01)	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/20	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
審査請求 有 請求項の数 22 O L (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-208202 (P2013-208202)	(71) 出願人	501259101
(22) 出願日	平成25年10月3日 (2013.10.3)		ザ フリンダーズ ユニバーシティ オブ
(62) 分割の表示	特願2000-592017 (P2000-592017)		サウス オーストラリア
原出願日	平成11年12月24日 (1999.12.24)		オーストラリア国、サウス オーストラリ
(31) 優先権主張番号	PP 8033		ア 5042、ベッドフォード パーク、
(32) 優先日	平成11年1月5日 (1999.1.5)	(74) 代理人	100082005
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 熊倉 禎男
(31) 優先権主張番号	PQ 3305	(74) 代理人	100084663
(32) 優先日	平成11年10月7日 (1999.10.7)		弁理士 稲田 篤
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)	(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 眼障害を治療及び診断するための新規な薬物及び方法

(57) 【要約】

【課題】全身投与ではなく局所適用により角膜等に浸入し抗原を無効としうる物質を用いる眼障害治療法及び眼状態の診断法を開発すること。

【解決手段】本発明は、眼障害の治療が必要な患者に、該障害と関連のある標的抗原と免疫的に相互作用しうるサブ - 免疫グロブリン抗原結合分子の有効量を投与する工程を含む眼障害治療法及び眼状態の診断法である。該サブ - 免疫グロブリン抗原結合分子は免疫グロブリンの F c 部分を含まず、合成された F v 分子を含む。該標的抗原は M H C 分子、補助的刺激分子、接着分子、受容体関連分子、サイトカイン受容体及びウイルス表面抗原から成る群より選択されるものである。本発明はこのサブ - 免疫グロブリン抗原結合分子を含む組成物でもある。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

眼障害と関連のある標的抗原と免疫的に相互作用し、角膜を通して前眼房へ浸透する、免疫グロブリンのFcを含まない免疫グロブリン断片の、該眼障害の治療用の医薬の調製のための使用であって、前記免疫グロブリン断片が局所投与用に製剤化されている、前記使用。

【請求項 2】

眼障害の指標となる標的抗原と免疫的に相互作用し、角膜を通して前眼房へ浸透する、免疫グロブリンのFcを含まない免疫グロブリン断片またはミニボディの、該眼障害の診断用の医薬の調製のための使用であって、前記免疫グロブリン断片またはミニボディが局所投与用に製剤化されている、前記使用。

10

【請求項 3】

免疫グロブリン断片が、合成されたFv断片、合成され安定化されたFv断片、一本鎖Fv断片を含む、請求項 1 または 2 記載の使用。

【請求項 4】

標的抗原が、MHC分子、補助的刺激分子、接着分子、受容体関連分子、サイトカイン受容体及びウイルス表面抗原から成る群より選択される、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 5】

補助的刺激分子がCD80、CD86及びCD152から成る群より選択される、請求項 4 記載の使用。

20

【請求項 6】

接着分子が、CD11、CD18、CD54及びCD62Lから成る群より選択される、請求項 4 または 5 記載の使用。

【請求項 7】

受容体関連分子が、CD3、CD4、CD8、CD28、CD40、CD40L及びCTLA4から成る群より選択される、請求項 4～6 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 8】

サイトカイン受容体が、インターロイキン2受容体、インターロイキン2受容体のサブユニット、及びインターフェロンγ受容体から成る群より選択される、請求項 4～7 のいずれか 1 項記載の使用。

30

【請求項 9】

ウイルス表面抗原がヘルペスウイルス表面抗原を含む、請求項 4～8 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 10】

ヘルペスウイルス表面抗原がgD2又はgB2である、請求項 9 記載の使用。

【請求項 11】

免疫グロブリン断片がその半減期を延長するために修飾されている、請求項 1～10 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 12】

免疫グロブリン断片がポリエチレングリコールで化学的に修飾されている、請求項 11 記載の使用。

40

【請求項 13】

医薬が、眼または角膜上皮への免疫グロブリン断片の浸透を改良するために浸透増強剤と共に製剤化される、請求項 1～12 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 14】

浸透増強剤が、カプリン酸、DMSO、ジヒドロサイトカラシンB、ジギトニン、界面活性剤及びそれらの任意の組合せから成る群より選択される、請求項 13 記載の使用。

【請求項 15】

医薬がイオン導入法用に製剤化される、請求項 1～14 のいずれか 1 項記載の使用。

50

【請求項 16】

医薬が目薬またはコラーゲン・シールドの形態である、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 17】

免疫グロブリン断片が前記断片に結合した検出可能な標識を有する、請求項 2 ~ 16 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 18】

標識が蛍光色素を含む、請求項 17 記載の使用。

【請求項 19】

蛍光色素がフルオレセインである、請求項 18 記載の使用。

10

【請求項 20】

眼障害が、角膜移植拒絶反応、ブドウ膜炎、炎症性または感染性疾患、および自己免疫疾患からなる群より選ばれる、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 21】

炎症性または感染性疾患がウイルス性、細菌性若しくはクラミジア性結膜炎若しくは角膜炎、眼腫瘍、新生血管形成増殖病、新生血管形成黄斑症、リュウマチ性角膜融解疾患からなる群より選ばれる、請求項 20 記載の使用。

【請求項 22】

自己免疫疾患が眼類天疱瘡である、請求項 20 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、一般的に、眼障害の治療及び診断に関する。より具体的には、本発明はサブ - 免疫グロブリン抗原結合分子を用いる眼障害の治療方法及び診断方法に関する。

【背景技術】

【0002】

種々の眼障害が知られているが、これらの多くについての利用可能な治療方法又は診断方法は最適というには程遠い。例えば、急性前部ブドウ膜炎、すなわち虹彩及び毛様体の炎症は、一般的集団において 0.4% の生涯累積発生率を有する普通に見られる状態である (ロトバラ, 1987, Am. J. Ophthalmol. 103: 137-145)。この病気は小児期又は若い成人で始まる傾向があり、しばしば両側性であり、一般に再発する。急性前部ブドウ膜炎は苦痛が激しく、ほとんど常に何らかの病的状態と関連し、そして盲目ともなりうる。この病気は、Tリンパ球が制御する抗原により誘導される、遅延型過敏症応答である (スミスら, 1998, Immunol. Cell Biol. 76: 497-512)。炎症を制御するため局所的コルチコステロイド類が使用されるが、それ自体白内障、ステロイド誘導性緑内障及び感染などの重大な合併症と関連する。

30

【0003】

角膜移植拒絶反応は有効な治療の不足に悩まされるもう一つの眼障害である。オーストラリアにおける角膜移植の成功率は 10 年で 62% である (ウィリアムズら, 1993, Aust. NZ. J. Ophthalmol. 21: 1-48)。不可逆的拒絶反応は角膜移植失敗の主な原因であり、全ての症例の少なくとも 30 ~ 50% の原因であり、そして局所的糖質副腎皮質ステロイドの普遍的使用にもかかわらず起こっている (ウィリアムズら, 1993, Aust. NZ. J. Ophthalmol. 21: 1-48)。シクロスポリン A などの全身的免疫抑制剤を用いる補助的治療が時には用いられるが、おそらく移植生存には殆ど利益を与えないであろうし、深刻な病的状態と関連し得る (ウィリアムズら, 1993, Transplantation Reviews, 7: 44-64)。

40

【0004】

ヘルペス性の角膜炎は三叉神経神経節の単純ヘルペスウイルス感染により惹起される (ストライラインら, 1997, Immunol. Today, 18: 443-9、ヘンドリクス, アール. エル. 1997, Cornea 16: 503-6)。ヘルペス性眼病は先進国における最も普通の感染性盲目原因

50

であり（ストライラインら，1997，*Immunol. Today* 18: 443-9）、そして苦痛、虹彩炎、細菌重複感染、角膜穿孔及び盲目などの深刻な後遺症が感染した個体の3%に生ずる。上皮のヘルペス性疾患（例えば、樹枝状角膜潰瘍）は、中でもポリメラーゼ連鎖反応（PCR）系テストにより容易に診断され、抗ウイルス剤でかなりの成功率で治療できる。眼ヘルペスを患う患者の5分の1で生ずる円板状の内皮炎、又は間質病（stromal disease）（例えば、円板状角膜炎、不整間質角膜炎、角膜-ブドウ膜炎）の診断及び治療は遙かに困難である。間質の生検標本中でウイルス粒子を発見することは通常はなく、このような標本からウイルスを培養することは極めて困難である。診断は通常臨床的根拠に基づき、そして排除によってなされる。局所的アシクロビルの適用はヘルペス性角膜炎に対する第一選択の治療であり（薬物耐性株の出現は懸念材料であるが）、長期間の経口予防により再発の頻度は半減する（ヘルペス性眼病研究グループ，1998，*N. Engl. J. Med.* 339: 300-6）。しかしながら、角膜損傷はアシクロビルでは防止されない。上皮疾患の病因は、角膜上皮細胞の増殖性の、溶解性の感染から生ずる。対照的に、間質細胞又は上皮細胞のヘルペス性疾患の病因は、角膜細胞上で発現した又は間質へ放出されたウイルス抗原に対する免疫反応から生ずる（ストライラインら，1997，*Immunol. Today* 18: 443-9、ヘンドリクス，アール．エル．1997，*Cornea* 16: 503-6）。

10

【0005】

アカントアメーバ角膜炎についても言及しうる。これは感染した眼の視力喪失を生じ得る極めて深刻な、苦痛を伴う病気である。普通の、自由に生きている土壌又は淡水のアメーバ（アカントアメーバ）によって惹起されるこの状態は、かつては稀であると考えられたが、過去5～10年の間に報告された症例の数は指数関数的に増加した。症例の90%以上が、推奨されたレンズ洗浄や殺菌操作を守らなかったコンタクトレンズ使用者に生じた。良好な、目に見える成果を挙げるには、初期診断が最も重要である。感染の初期段階では、アメーバは角膜上皮で見出され、しばしば抗微生物薬の必要もなしに、デブリドマン（創からの異物の除去）により除去され得る（ブルックスら，1994，*Cornea* 13, 186-189）。不幸にも、臨床図は感染性角膜炎、殊にヘルペス性角膜炎の他の形態に類似しうるので、この診断は遅れ勝ちである。これはこの微生物の角膜間質への浸入を許し、そこで角膜実質細胞を攻撃することを許し（パデノッホら，1995，*Int. J. Parasitol.* 25: 229-239）、不可逆的な組織破壊を惹起することを許すことになる。この状態では、角膜削り取りによる研究室診断を行う試みは通常不成功に終わり、それ自体が損傷を与える深い生検は信頼性がない。

20

30

【0006】

免疫グロブリンは様々な医学分野で広汎な診断及び治療の適用を獲得してきた。例えば、全長のモノクローナル抗体及び／又はポリクローナル抗体は移植拒絶反応の抑制に、異なる自己免疫疾患の調節に、腫瘍形成の治療に、そして感染性疾患の防止及び治療に使用されてきた。これらの目的のために抗体の全身投与が要求されるのが典型的であり、これは深刻な全身性副作用を惹き起こしうる。これらの副作用のため、眼のような絶対に必要とはいえない器官に影響する病気を治療するために抗体を全身投与することは妨げられてきた。しかしながら、上記のように、抗体治療が有利な多数の眼疾患が存在する。

40

【0007】

上記の見地から、ホイットカップら（WO93/06865）は眼の炎症を治療するため細胞接着分子に対するモノクローナル抗体の使用を開示する。とりわけ、ホイットカップらは、静脈内注射により、眼房内又は眼周囲注射により、貯蔵物の外科移植により、そして目薬又は眼軟膏を用いる局所投与により、眼へのこのような抗体の投与を意図する。ホイットカップらは動物モデルで抗細胞接着分子抗体の非経口投与を可能にする方法を提供する。しかしながら、彼らはこのような抗体の局所的投与を可能にする方法を提供しておらず、そしてこのような方法の有用性を確立するためのデータについては全く沈黙している。実際、本発明者らは、通常の全長抗体のみでは局所的経路により角膜又は眼の強膜に浸入することはできないことを発見した。

【0008】

50

眼に関する種々の解剖学的障壁が全長抗体の眼内浸入の困難さの根底に横たわっている。この点で、角膜は異物の浸入に対する主要な障壁である。それは二つの異なる浸入障壁を持っている。角膜上皮と角膜間質である（バースティン及びアンダーソン，1985，J. Ocul. Pharmacol. 1(3): 309-26、モーリス，ディー・エム．，1980，Int. Ophthalmol. Clin. 20(3): 7-20、ミシマ，エス．，1981，Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.，21(4): 504-41)。角膜上皮は親水性物質に対する主要な障壁である。350 Da よりも小さい親水性分子は細胞側路を経て浸入することができるが、それより大きな親水性分子は実質的に阻止される。この障壁機能は浸透増強剤の使用によりある程度まで調節することができる。第二の障壁である角膜間質は親油性薬物及び大きな親水性薬物の浸入を妨害する。角膜間質は500 kDa までの親水性分子に対して「透過性」であると同様に引用されている（パートレット及びヤヌス，Clinical Ocular Pharmacology）。この数値は、しかし、オルソンら（1995，Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.，36(9): 1893-1903)の研究とは矛盾する。オルソンらはヒトの強膜の透過性が約40 kDa までは親水性化合物の分子量の増加と共に直線的に減少し、その後その透過性は急速に減少することをイン・ビトロで明らかにした。ウシ及びウサギの間質と強膜での比較研究は、間質は僅かに透過性が高いが類似していることを示唆する（モーリス及びボルガー，1977，Exp. Eye Res. 25: 577-582)。従って、オルソンらの発見（1995，上掲）はヒトの角膜間質に当てはまると期待されよう。

10

【0009】

適用が局所（プレーヤーら、1995，Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36(1):52-6）、結膜下（オススキーら、1993，Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 231(2):122-128）又は全身（ベルハーゲンら、1990，Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 31(8):1519-1525）であるか否かにかかわらず、全長のIgGによる無傷の目の強膜又は間質への浸入は起きるにしても非常に緩慢である。例えばリボソーム内などの脂質環境への全長のIgGの製剤化は、角膜上皮を横切る移送を促進し得るが（プレーヤーら、1995，上掲）、このサイズの分子についての間質又は強膜への緩慢な通過の問題は解決しない。

20

【0010】

リボソームの被包を用いるプレーヤーら（1995，上掲）の励みになるデータにも関わらず、本発明者らはモノクローナル抗体の眼房内注射が前眼房における有害なフィブリン反応を惹起することを示した（ウィリアムズら、1992，Transplantation，54: 38-43）。この前炎症性副作用は、該抗体のFc部分による局所性補体活性を反映しているかもしれない。この眼は、このような炎症性副作用により不可逆的に損傷される多数の非再生構造を含む。少なくとも一つの報告症例では、眼内抗体の炎症性副作用により患者が盲目となる結果が生じた（エム・ベンケ，バーンによる報告例、角膜移植についての国際会議での発表、ハイデルバーク、1994年9月）。

30

【0011】

上記から、長年痛感されている眼内免疫治療戦略の必要性にも関わらず、抗体は眼障害の有効な治療に対する臨床潜在能力は限られていたようである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明により、サブ-免疫グロブリン抗原結合分子の局所適用により眼障害を治療する方法が提供される。また、本発明により、サブ-免疫グロブリン抗原結合分子の局所適用により眼状態を診断する方法が提供される。

40

本発明より、眼障害を治療又は診断するためのサブ-免疫グロブリン抗原結合分子を含む局所適用のための組成物が提供される。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、Fv免疫グロブリン断片、ミニボディ等のサブ-免疫グロブリン抗原結合分子が、角膜に浸入し、副作用の著しく低減した眼障害の有効な治療及び/又は診断を提供できることを発見した。

50

【 0 0 1 4 】

従って、一つの側面において、本発明は、眼障害を治療する方法であって、このような治療を必要とする患者に、該障害と関連のある標的抗原と免疫的に相互作用するサブ - 免疫グロブリン抗原結合分子の有効量を投与する工程を含む方法を提供する。

【 0 0 1 5 】

本発明の別の側面において、眼状態を診断する方法であって、

眼の一部と、該状態を示す標的抗原と免疫的に相互作用するサブ - 免疫グロブリン抗原結合分子とを接触させる工程、及び

該抗原結合分子と該標的抗原を含む複合体の存在を検出する工程、を含む方法が提供される。

10

【 0 0 1 6 】

本発明のさらなる別の側面において、眼障害を治療又は診断するための組成物であって、担体と共に該障害と関連のある標的抗原と免疫的に相互作用するサブ - 免疫グロブリン抗原結合分子を含む組成物が提供される。

【 0 0 1 7 】

さらなる側面において、本発明は、眼の中の標的抗原と免疫的に相互作用するサブ - 免疫グロブリン抗原結合分子を含む眼科用組成物にある。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 図 1 は、プリュックツンら（1996、抗体工学：実践アプローチ、203～252）から引用した、大腸菌での機能的な高レベルの発現並びに本発明の使用に適したサブ - 免疫グロブリン抗原に結合する分子の図式的表示である。

20

【 図 2 】 図 2 は、角膜灌流チャンパーを図示するものである。即ち、角強膜ボタンは解剖され該灌流チャンパー内に堅く固定される。細糸により組織損傷の危険性なくクランピング調整できる。この「受容」角膜側上の流体は連続的に循環している。この流体の全体積は3.5～4 mLである。該容器内へのチャンパーの流出が増大すると、チャンパー内の絶対圧力は生理的な眼の状態に近くなる。

【 図 3 】 図 3 は、ヒト又はブタの全眼への薬物の浸透を測定するよう順応されたチャンパーを図示するものである。無傷の結膜組織をもつ全眼は、該角膜がテフロン（登録商標）ブロック内に形成されたウェル内に留まるようテフロン（登録商標）ブロック上に配置される。このウェルは、該角膜が該薬物と接触する唯一の組織となるように該薬物で充填されている。この全眼は伏せたプラスチック容器で覆われ湿潤なチャンパーを形成し、並びにこの一式は35～37 °Cの温度で該眼を保持するため水浴上に配置される。

30

【 図 4 】 図 4 は、フローサイトメトリー検定で測定された抗原結合活性を示すグラフである。この s c F v はその標的抗原に対して濃度依存性の結合を示し、全長の抗体で得られるパターンと類似している。

【 図 5 】 図 5 は、ブタの角膜間質（上皮障壁は除去される）を通る p H 7.0 での s c F v の浸透を示すグラフである。

【 図 6 】 図 6 は、p H 8.0、p H 7.0 及び p H 3.5 におけるブタの角膜間質（上皮障壁は除去される）を通る s c F v の浸透を示すグラフである。7.0 から 3.5 に p H を下げることにより、浸透に逆効果を及ぼす。無傷の上皮をもつ角膜において、3.5 の p H で s c F v の浸透は検出できなかった。

40

【 図 7 】 図 7 は、上皮障壁のないネコの角膜において純粋な s c F v が迅速に浸透し 3 時間後に受容側上での結合活性が増大することを示すグラフである。ネコの角膜はブタの角膜より 20～40 % 厚く、これはより迅速な浸透の説明となる。全長の抗体（m A b）は 8 時間の観察時間内に浸透しなかった。

【 図 8 】 図 8 は、該灌流チャンパー内において無傷のブタの角膜を通るフルオレセインナトリウムの浸透を示すグラフである。ブタの角膜の受容側上で、フルオレセインナトリウムは僅か 3 時間後に検出可能となり、続いて残りの実験中に指数的に増加した。

【 図 9 】 図 9 は、角膜灌流における s c F v の浸透と全眼球の浸透実験との関係を示すグ

50

ラフである。矢印は全眼（上皮なし）の前房における s c F v 結合活性を示す。

【図 1 0】図 1 0 は、0.5% のカプリン酸の存在下及び不在下において灌流チャンバー 内での無傷のブタの角膜を通る O X 3 8 s c F v の浸透を示すグラフである。

【図 1 1】図 1 1 は、灌流チャンバー内でのブタの角膜間質を通るミニ抗体及び全長の I g G 抗体の浸透を示すグラフである。

【図 1 2】図 1 2 は、ブタの全眼における角膜間質及び無傷の角膜を通るミニ抗体の浸透を示すグラフである。

【図 1 3】図 1 3 は、全眼浸透の一式における無傷のヒトの角膜を通る O X 3 8 ミニ抗体の浸透を示すグラフである。

【図 1 4】図 1 4 は、目薬中のミニ抗体の結合活性及び前房内での浸透後のミニ抗体の結合活性の滴定を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

1. 定義

他に定義しない限り、本明細書で用いられる全ての専門用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の熟練者に通常理解されているものと同一の意味を有する。本明細書に記載されるものと類似又は等価の任意の方法及び材料が本発明の実施又は試験において使用できるが、好ましい方法及び材料が記述される。本発明のために、下記の用語が以下に定義される。

【0020】

「親和性」は、免疫反応性分子上にある個々の抗原結合部位と該抗原上にあるその対応部位との間の相互作用の強さを意味する。

【0021】

「該障害と関連のある」とは、該標的抗原が該障害と直接的に又は間接的に結びつきうることを意味する。例えば、該標的抗原は、該眼障害を間接的に惹起する、又は該眼障害の一因となる、又は該眼障害を示すシグナル分子のエピトープでありうる。

【0022】

「診断」という用語は、本明細書中、最も広い意味で用いられ、サブ - 免疫グロブリン抗原結合分子に反応する抗原の検出を包含する。眼障害と関連のある障害機構の分析もその範囲内に包含される。従って、「診断」という用語は、眼障害と関連のある機構を検出し、理解するための道具として研究目的用にサブ - 免疫グロブリン抗原結合分子を使用することを包含する。

【0023】

本明細書で用いられるとき「有効量」という用語は、サブ - 免疫グロブリン抗原結合分子の眼障害を治療又は予防する量である。該有効量は、該サブ - 免疫グロブリン抗原結合分子が反応する標的抗原の作用を阻害できる量でありうる。作用を阻害する方法には、眼の中の標的抗原をサブ - 免疫グロブリン抗原結合分子で飽和することにより該標的抗原を無効にする工程を含みうる。

【0024】

本明細書中の「免疫的に相互作用する」という言及には、とりわけ該分子の一つが免疫系の構成要素又はその疑似物質である場合の分子間の任意の相互作用、反応、又は他の形の会合についての言及が含まれる。

【0025】

「眼状態」という用語は、眼の任意の状態を記載するために本明細書中で使用される。これは健康な状態又は眼の障害（眼障害）などの不健康な状態を含みうる。

【0026】

「患者」という用語は、ヒト又は他の動物血統の患者を指し、本発明の方法を用いて検査又は治療することが望まれる任意の個体を含む。しかしながら、「患者」は症状があることを意味するものではないことが理解されよう。

【0027】

10

20

30

40

50

「薬学的に許容しうる担体」とは、全身投与で安全に使用されうる固体若しくは液体の充填剤、希釈剤又は被包物質を意味する。

【0028】

「サブ-免疫グロブリン抗原結合分子」は、免疫グロブリン分子より小さく且つ標的抗原に対して結合親和性を有する分子を意味する。この用語は抗原結合活性を呈し且つ非免疫グロブリンに由来するタンパク質の枠組みにまで及ぶことが理解されよう。この用語は、該抗原結合分子をコードする任意のヌクレオチド配列がそれから得られる供給源又は該抗原結合分子がそれから発現する若しくは単離される供給源によって制限されるものではないことも理解されよう。

【0029】

「標的抗原」とは、治療又は診断が求められる眼障害と関連のある抗原を意味する。

【0030】

「治療する」という用語は、本明細書中では最も広い意味で用いられ、該眼障害を改善することを意図した治療処置及び予防（即ち、防止）処置の両方を含む。

【0031】

この明細書を通して、文脈が他の意味を要求しない限り、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」及び「含む(comprising)」は、明記した完全体又は完全体の群を包含するが任意の他の完全体又は完全体の群を排除しないことを意味するものであることが理解されよう。

【0032】

2. サブ-免疫グロブリン抗原結合分子

本発明は、サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が眼に局所的に適用された場合相当のレベルまで角膜に浸入できるという予期せぬ発見に由来する。この発見に基づき、本発明者らは、このような分子の眼への浸入が非経口投与及び眼周囲注射を含む代替経路によっても達成できると考える。

【0033】

眼障害を治療するためには、本発明のサブ-免疫グロブリン抗原結合分子が下記の条件を満たすことが好ましい。第一に、何らかの全身性副作用を回避又は少なくとも部分的に軽減するように該分子を眼に適用することが望ましい。第二の条件は、これらの結合分子が眼の内部に如何なる潜在的に有害な前炎症性副作用をも惹起してはならないことである。

【0034】

適切なサブ-免疫グロブリン抗原結合分子は、F_v、F_{ab}、F_{ab}' 及び F_{(ab)'} 2の免疫グロブリン断片を含むが、これらに限定されない。該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子は免疫グロブリン分子のFc部分を含まないことが好ましい。

【0035】

該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子は合成されたF_v断片を含むことが好ましい。この合成されたF_v断片は安定化されていることが好ましい。合成され安定化されたF_v断片の例には、ペプチドリンカーを用いてV_HドメインのN末端又はC末端とV_LドメインのC末端又はN末端とをそれぞれ架橋した一本鎖F_v断片が含まれる（sF_v、しばしばs c F_vと称する）。S c F_vは全長の抗体の定常部を全て欠き補体を活性化できない。V_HドメインとV_Lドメインを連結するための適切なペプチドリンカーは、該F_v断片が由来する全長の抗体の抗原結合部位のものと類似した三次元構造の抗原結合部位を有する一本鎖ポリペプチド鎖になるように、V_HドメインとV_Lドメインを折りたためるリンカーである。所望の性質を有するリンカーは米国特許第4,946,778号に開示されている方法によって得てもよい。この開示は参照により本明細書に取り込まれる。しかしながら、リンカーが存在しない場合もある。合成されたF_v断片の例は図1に示される。

【0036】

s c F_vは、例えばクレーバーら（クレーバーら、1997、J. Immunol. Methods; 201(1):35-55）で略述される方法に従って調製されうる。この開示は参照により本明細書に取

10

20

30

40

50

り込まれる。または、 $s c F v$ は、米国特許第5,091,513号、欧州特許第239400号、又はウィンターとミルスタイン(1991、Nature 349:293)及びブリュックツンら(1996、In Antibody engineering: A practical approach 203-252)による論文に記載されている方法により調製されうる。これらは参照により本明細書に取り込まれる。

【0037】

または、合成され安定化された該 $F v$ 断片は、完全に折りたたまれた $F v$ 分子においてこれら二つのシステイン残基が該ドメイン間でジスルフィド結合を形成するようにシステイン残基が V_H ドメインと V_L ドメインに導入されている、ジスルフィド安定化された $F v$ ($d s F v$)を含む。 $d s F v$ を作製する適切な方法は、例えば(グロックスクーザーら、Biochem. 29:1363-1367; ライターら、1994、J. Biol. Chem. 269: 18327-18331; ライターら、1994、Biochem. 33: 5451-5459; ライターら、1994、Cancer Res. 54:2714-2718; ウェバーら、1995、Mol. Immunol. 32:249-258)に記載されている。これらは参照により本明細書に取り込まれる。

【0038】

例えば(ヴァードら、1989、Nature 341:544-546; ハーマス - キャスターマンら、1993、Nature. 363:446-448; デービス&リーッチマン、1994、FEBS Lett. 339:285-290)に開示されたような一本鎖可変領域ドメイン($d A b s$ と称される)もサブ-免疫グロブリン抗原結合分子として意図されている。これらは参照により本明細書に取り込まれる。

【0039】

該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子は「ミニボディ」であることが好ましい。この点において、ミニボディは全長の抗体の小型版であり、全長の抗体の必須要素を一本鎖の中にコードしている。該ミニボディは、例えば参照により本明細書に取り込まれる米国特許第5,837,821号で開示されたように、ヒンジ領域と融合した天然抗体の V_H ドメイン及び V_L ドメイン並びに該免疫グロブリン分子の $C H 3$ ドメインを含む。

【0040】

代替の実施態様において、該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子は非免疫グロブリンに由来するタンパク質枠組みを含みうる。例えば、抗原結合について選択された相補性決定領域($C D R$)を生み出すため無作為抽出された二つのループを有する4ヘリックス束タンパク質であるチトクローム $b 5 6 2$ を開示する(クー&シュルツ、1995、Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 92:652-6556)を参照してもよい。

【0041】

該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子は修飾部分を含んでもよい。一つの形態において、該修飾部分は該分子のエフェクター機能を可変しうる。例として、該修飾部分は、例えば免疫検定法における該抗原結合分子の検出用のペプチドを含みうる。または、該修飾部分は該抗原結合分子の精製を促進しうる。この場合、該修飾部分は、アフィニティークロマトグラフィーによる該抗原結合分子の単離に特に有用なグルタチオン-S-トランスフェラーゼ($G S T$)、マルト-ス結合タンパク質($M B P$)及びヘキサヒスチジン($H I S_6$)を含むが、これらに限定されない。アフィニティークロマトグラフィーにより精製するために、アフィニティークロマトグラフィー用に適切な媒体は、当分野でよく知られているようにグルタチオン、アミロース、及びニッケル又はコバルトにそれぞれ結合した樹脂である。該修飾部分は、少なくとも眼の一部を標的とする治療剤を含みうる。または、該修飾部分は、例えばフィブリン溶解酵素(ホルボエットら、1991、J. Biol. Chem. 366:19717-19724; ヤングら、1994、Biochem.33:606-612)又はプロドラッグ活性化剤(ボスレットら、1992、Br. J. Cancer, 65: 234-238; ゴスホーンら、1993、Cancer Res., 53:2123-2127; ロッドリギュースら、1995、Cancer Res., 55:63-70)等の潜在的な治療上の利点をもつ酵素及び免疫検定法で用いるために比色検定を可能とする酵素などの酵素類を含みうる。他の形態において、該修飾部分は該抗原結合分子の眼内浸入を増加させる。この場合、該修飾部分は、例えばパールら(1998、Adv. Drug Delivery Reviews 32: 247-271、参照により本明細書に取り込まれる)により記述されているような脂質部分又は脂質尾部を含みうる。または、該修飾部分は、例えば、参照により本明細書に取り込

まれるシュヴァルゼら (1999, Science 285: 1569-1572) により記載されているような H I V ・ t a t タンパク質を含みうる。

【 0 0 4 2 】

該サブ - 免疫グロブリン抗原結合分子が、非経口的に若しくは局所的に投与される際に、又は結膜下、眼球周囲若しくは眼球後のスペースに注射される際に、又は眼に直接注射される際に、それが眼へ浸入できるならば、多価 (即ち、一つ以上の抗原結合部位を有する) であってもよい。このような多価分子は一つ以上の抗原に対して特異的でありうる。この型の多価分子は、例えば、参照により本明細書に取り込まれる (アダムスら、1993, Cancer Res. 53:4026-4034 ; カンバーら、1992, J. Immunol. 149:120-126) により開示されているようにシステイニルを含むペプチドを介する二つの抗体断片の二量体化により調製されうる。または、二量体化は、自然に二量体化する両親媒性ヘリックスへの該抗体断片の融合 (バック・パイ・ブリュンクツム、1992, Biochem. 31:1579-1584、参照により本明細書に取り込まれる) により又は好ましくはヘテロ二量体化するドメイン (ロイシン・ジッパーの j u n 及び f o s 等の) の使用 (コステルニーら、1992, J. Immunol. 148: 1547-1553、参照により本明細書に取り込まれる) により促進されうる。代替の実施態様において、該多価分子は、ペプチドリンカーにより互いに連結された少なくとも二つの s c F v を含む多価の一本鎖抗体 (多価 - s c F v) を含みうる。この点において、「ジアボディズ (diabodies)」と称される非共有結合で又は共有結合で連結した s c F v 二量体が使用されてもよい。多価 s c F v は、異なる抗原結合特異性を有する s c F v の使用数に応じて二以上の特異性を有しうる。多価 s c F v は、例えば、参照により本明細書に取り込まれる米国特許第5,892,020号に開示されている方法により調製されうる。

10

20

【 0 0 4 3 】

3 . 組成物

本発明は眼障害の治療又は診断で使用するための組成物にも及び、該組成物は該障害と関連のある標的抗原と免疫的に相互作用するサブ - 免疫グロブリン抗原結合分子を担体と共に含む。

【 0 0 4 4 】

該担体は薬学的に許容しうる担体が好ましい。具体的な投与経路に応じて、当分野で周知の種々の薬学的に許容しうる担体を使用されうる。これらの担体は、糖、澱粉、セルロース及びその誘導体、麦芽、ゼラチン、タルク、硫酸カルシウム、植物油、合成油、ポリオール、アルギン酸、燐酸緩衝溶液、乳化剤、等張食塩水、及びバイロジェン・フリーの水を含む群から選択されうる。

30

【 0 0 4 5 】

本発明の組成物を患者に投与するために任意の適切な投与経路が使用されうる。例えば、経口、直腸、非経口、舌下、頬、静脈内、関節内、筋肉内、皮内、皮下、吸入、眼内、腹腔内、脳室内、経皮等が使用されうる。非経口的経路又は局所的経路を用いることが好ましい。または、該組成物は結膜下、眼球周囲、又は眼球後のスペースへの注射により投与されることが好ましい。

【 0 0 4 6 】

投与剤形には、錠剤、分散液、懸濁液、注射液、溶液、シロップ、トローチ、カプセル、及び座薬、エアロゾル、コーラゲンシールド、経皮貼付薬等が含まれる。これらの投与剤形は、この目的のため特に設計された注射若しくは移植用の制御放出装置又はさらにこの様式で作用するよう修飾された移植片の他形態も含みうる。該抗原結合分子の制御放出は、例えば、アクリル樹脂、ワックス、高級脂肪族アルコール、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びヒドロキシプロピルメチルセルロースなどの幾つかのセルロース誘導体で上記のものを被覆することにより達成されうる。さらに、制御放出は、他のポリマーマトリックス、リポソーム及び / 又は微小球の使用により達成されうる。

40

【 0 0 4 7 】

経口投与又は非経口投与に適した本発明の医薬組成物は、各々が予め決められた量の一つ以上の本発明の治療薬を含んでいるカプセル、サシェ若しくは錠剤などの個別の単位と

50

して、粉末若しくは顆粒として、又は水溶液、非水溶液、水中油乳濁液、若しくは油中水乳濁液の溶液若しくは懸濁液として提供されうる。このような組成物は任意の製薬方法により調製されうるが、全ての方法には上記の一つ以上の免疫原薬物と一つ以上の必要成分から成る担体とを混合する工程が含まれる。一般的に、該組成物は、本発明の抗原結合分子を液体の担体若しくは微細に粉碎された固体の担体若しくはそれら両方と均一によく混合した後、必要ならば該産物を所望の体裁に形状化することにより調製される。

【0048】

上記の組成物は、投与製剤に適合する様式で、そして患者の眼障害を軽減するために治療上有効な量で投与されうる。患者に投与される用量は、本発明の文脈において、血液流失の減少又は停止などの有益な応答を患者に長期間にわたって生じさせるのに十分なものであるべきである。投与される該抗原結合分子（単数又は複数）の量は、治療される患者の年齢、性別、体重及びその一般健康状態を含め、該患者に応じて決定されうる。この点で、投与のための該抗原結合分子の正確な量は、開業医の判断によって決まる。眼障害の治療で投与される該抗原結合分子の有効量を決定する際に、医師は長期間にわたる該障害の経過を評価してもよい。いずれにしても、当業者は、本発明の該抗原結合分子の適切な用量を容易に決定しうる。このような用量は該抗原結合分子のナノグラムからミリグラムのオーダーでありうる。

10

【0049】

該組成物は、7.0から8.0までpHを高める、塩化ベンザルコニウム、ジギトニン、ジヒドロサイトカラシンB、カプリン酸などの浸透増強剤を含むことが好ましい。該浸透増強剤は、角膜上皮を通り抜ける該抗原結合分子の浸入を増強させるものであることが好ましい。

20

【0050】

該組成物は、本発明の抗原結合分子が被包されているリボソームを含むことが好ましい。活性物をリボソーム被包する任意の適切な手法が意図される。この点で、例となる方法は、フラスたら（1999, J. Pharm. Pharmacol. 51(5):565-576）及びマスダら（1996, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37(9): 1914-1920）によって開示されており、これらは参照により本明細書に取り込まれる。

【0051】

本発明の抗原結合分子の半減期は、所望ならば任意の適切な手法により延長されうる。このような分子は、例えば、参照により本明細書に取り込まれるチャップマンら（1999, Nature Biotechnology 17: 780-783）により開示されているように、モノメトキシ-ポリエチレングリコールを含むポリエチレングリコール（PEG）で化学的に修飾されていることが好ましい。

30

【0052】

適切な標的抗原には、クラスI又はクラスIIに限定されるMHC分子を含むMHC分子、補助的刺激分子（例えばCD80、CD86及びCD152）、接着分子（例えば、CD11b/e、CD18、CD54及びCD62L）、受容体関連分子（例えば、CD3、CD4、CD8、CD28、CD40、CD40L及びCTLA4）、サイトカイン受容体（例えば、インターロイキン2受容体（IL-2R）、又はCD25などのそのサブユニット、及びインターフェロンγ受容体（IFN-γR）、並びにウイルス表面抗原（例えば、ヘルペス単純ウイルスのgD2抗原及びgB2抗原又はヘルペス性角膜炎を惹起するヘルペスウイルスの表面抗原）が含まれることが好ましいが、これらに限定されない。

40

【0053】

本発明は、眼の中の標的抗原と免疫的に相互作用するサブ-免疫グロブリン抗原結合分子を含む眼科用組成物も提供する。

【0054】

4 投与方法

本発明のさらなる特徴は、眼障害を治療する方法であって、このような治療を必要とする患者に、該障害と関連のある標的抗原と免疫的に相互作用するサブ-免疫グロブリン抗

50

原結合分子の有効量を投与する工程を含む方法である。

【0055】

該眼障害は、眼と関連のある任意の病気又は障害でありうる。一般的に、該障害は、眼に直接影響を及ぼす眼の病気である。眼と関連のある病気又は障害は、他の身体部分に起因し、且つ、主となる病気若しくは障害の副作用として間接的に眼に影響を及ぼす病気又は障害でありうる。

【0056】

典型的な病気又は障害には、角膜移植拒絶反応、ブドウ膜炎、任意の眼の感染、ウイルス性（ヘルペス性角膜炎及びアデノウイルス性）、細菌性若しくはクラミジア性結膜炎などの炎症性及び感染性疾患、眼腫瘍、糖尿病網膜症などの新生血管形成増殖病、新生血管形成黄斑症、リュウマチ性角膜融解疾患及び眼類天疱瘡などの自己免疫障害が含まれる。

10

【0057】

本方法は、有効量の該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子を患者に投与する工程を含む。該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子は、局所的に眼の一部に投与するか、又は、例えば結膜下、眼球周囲若しくは眼球後のスペースなどの眼内に若しくは直接眼内に注射する。あるいは、該抗原結合分子を非経口的投与（parental administration）により全身に投与してもよい。

【0058】

該抗原結合分子は局所的に且つ目薬として眼に適用することが最も好ましい。この目薬は角膜（眼の中心にある透明な部分）に適用されることにより該分子が眼内に浸入できる。眼の後部に影響を及ぼす病気の治療のためには、該抗原結合分子を結膜の下に又は眼球の周囲に注射する際に該分子が強膜に浸入することがおそらく最も望ましい。

20

【0059】

該抗原結合分子の投与は、該分子の浸入を改良するため眼の表面を調節する予備工程後に実施されうる。角膜上皮などの上皮層は、例えば上記の分子を十分に且つ迅速に浸入させるために、浸透増強剤により調節されることが好ましい。

【0060】

または、該投与工程は、該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が所望の眼内領域に浸入するよう眼の少なくとも一部をイオン電気導入法に付す工程により特徴付けられる。この点で使用されうる適切な方法には、例えば、参照により本明細書に取り込まれるベハール・コーエンら（1998, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39(6): 897-904）及びフルヒト・ペリーら（1996, Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 234(12): 765-9）により開示されているものが含まれる。

30

【0061】

該抗原結合分子を投与するのに好ましい眼内部分又は眼上部分は、該抗原結合分子が浸入できる部分である。上述したように、投与は角膜上及び結膜上に施されることが好ましく、又は該物質は結膜下、眼球周囲若しくは眼球後のスペース内に注射され、強膜を通して浸入した後に眼の内側に到達しうる。

【0062】

5 診断方法

本発明は、眼状態を診断する方法であって、該状態を示す抗原と免疫的に相互作用するサブ-免疫グロブリン抗原結合分子と眼の一部を接触させる工程、及び該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子と該抗原を含む複合体の存在を検出する工程を含む方法にも及ぶ。

40

【0063】

好ましい側面において、本発明は、眼障害を診断する方法であって、該障害と関連のある抗原と免疫的に相互作用するサブ-免疫グロブリン抗原結合分子と眼の一部を接触させる工程、及び該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子と該抗原を含む複合体の存在を検出する工程を含む方法を提供する。

【0064】

該状態を示す抗原は、該眼状態と直接的又は間接的に関連のある抗原でありうる。これ

50

は標的抗原又は該眼状態の副産物として生じる分子の抗原でありうる。

【0065】

眼の中に標的抗原が存在するか否かは、例えば上記の第4節に記載されているように該抗原結合分子を眼に投与することにより決定されうる。該抗原結合分子は目薬として又は眼周囲注射により眼に投与されることが好ましい。

【0066】

続いて、該複合体の検出が行われる。該複合体の形成を測定するために任意の適切な技法が使用されうる。例えば、標的抗原のインビボ検出に適用できる免疫検定において、検出可能な標識を有する本発明のサブ-免疫グロブリン抗原結合分子が利用されうる。免疫検定は、当分野で理解されるような競合検定を含みうる。

10

【0067】

該抗原結合分子と結合した標識は、下記のものを含みうる：

- (i) 該抗原結合分子への該標識の直接的な付着；
- (ii) 該抗原結合分子への該標識の間接的な付着、即ち、他の検定試薬に該標識を付着させた後、該試薬を該抗原結合分子に結合させる；
- (iii) 該抗原結合分子の後の反応生産物への付着。

該標識は、色素原、触媒、酵素、蛍光色素、化学発光分子、ユーロピウム (Eu^{3+}) などのランタニドイオン、放射性同位元素、及び直接的可視標識を含む群から選択されうる。

【0068】

直接的可視標識の場合、コロイド金属粒子若しくは非金属粒子、色素粒子、酵素若しくは基質、有機ポリマー、ラテックス粒子、リボソーム、又はシグナルを生じる基質等を含む他の小胞が使用されうる。

20

【0069】

標識としての使用に適した多数の酵素が合衆国特許明細書U.S.4,366,241、U.S.4,843,000及びU.S.4,849,338に開示されており、これらは全て参照により本明細書に取り込まれる。本発明に適した有用な酵素標識には、アルカリ性ホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ等が含まれる。この酵素標識は、単独で又は溶液中に存在する第二の酵素と組合わせて使用されうる。

【0070】

該蛍光色素は、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITL) 又はR-フィコエリスリン (RPE) を含む群から選択されることが好ましい。

30

【0071】

画像適用に好ましい同位元素は、その物理的性質、入手費用及び安全性から ^{99m}Tc である。この放射金属による標識を促進するために、 scFv などの抗原結合分子を、 N_3S 配位部位内で ^{99m}Tc とキレートするように設計された短鎖ペプチドと融合する (フストンら、1996, Quarterly Journal of Nuclear Medicine, 印刷中; ジョージら、1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:8358-8363)。得られる分子は一工程反応で容易に標識され、元の scFv の免疫原性を保持する極めて安定な生産物を生じる。

40

【0072】

本発明の実施態様の例を以下に列挙する。

- (1) 眼障害を治療する方法であって、このような治療を必要とする患者に、該障害と関連のある標的抗原と免疫的に相互作用するサブ-免疫グロブリン抗原結合分子の有効量を投与する工程を含む方法。
- (2) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が免疫グロブリン分子のFc部分を含まないものである、(1)記載の方法。
- (3) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が合成されたFv断片を含むものである、(1)記載の方法。
- (4) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が合成され安定化されたFv断片を含むも

50

のである、(1)記載の方法。

(5) 該合成され安定化されたFv断片が一本鎖Fv断片である、(4)記載の方法。

(6) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がミニボディ(minibody)である、(1)記載の方法。

(7) 該標的抗原が、MHC分子、補助的刺激分子(co-stimulatory molecule)、接着分子、受容体関連分子、サイトカイン受容体及びウイルス表面抗原から成る群より選択されるものである、(1)記載の方法。

(8) 該補助的刺激分子がCD80、CD86及びCD152から成る群より選択されるものである、(7)記載の方法。

(9) 該接着分子が、CD11、CD18、CD54及びCD62Lから成る群より選択されるものである、(7)記載の方法。 10

(10) 該受容体関連分子が、CD3、CD4、CD8、CD28、CD40、CD40L及びCTLA4から成る群より選択されるものである、(7)記載の方法。

(11) 該サイトカイン受容体が、インターロイキン2受容体、インターロイキン2受容体のサブユニット、及びインターフェロンγ受容体から成る群より選択されるものである、(7)記載の方法。

(12) 該ウイルス表面抗原がヘルペスウイルス表面抗原である、(7)記載の方法。

(13) 該ヘルペスウイルス表面抗原がgD2又はgB2である、(12)記載の方法。

(14) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がその半減期を延長するために修飾されているものである、(1)記載の方法。 20

(15) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がポリエチレングリコールで化学的に修飾されているものである、(14)記載の方法。

(16) 所望の眼球内領域への該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子の浸透を改良するため眼の表面を調節する工程をさらに含む、(1)記載の方法。

(17) 上記の眼の角膜上皮が浸透増強剤により調節されるものである、(16)記載の方法。

(18) 上記の眼の角膜上皮が、塩化ベンザルコニウム、カプリン酸、DMSO、ジヒドロサイトカラシンB、ジギトニン、界面活性剤及びそれらの任意の組合せから成る群より選択される浸透増強剤により調節されるものである、(16)記載の方法。

(19) 所望の眼球内領域に該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が浸透するように、眼の少なくとも一部をイオン電気導入法に付する工程をさらに含む、(1)記載の方法。 30

(20) 該眼障害が、角膜移植拒絶反応、ブドウ膜炎、ウイルス性、細菌性若しくはクラミジア性結膜炎又は角膜炎などの炎症性及び感染性疾患、眼腫瘍、新生血管形成増殖病、新生血管形成黄斑症、リュウマチ性角膜融解疾患及び眼類天疱瘡などの自己免疫障害から成る群より選択されるものである、(1)記載の方法。

(21) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が、非経口的若しくは局所的投与により又は結膜下、眼球周囲若しくは眼球後のスペースに注射により投与されるものである、(1)記載の方法。

(22) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が、目薬の形で局所的に投与されるものである、(21)記載の方法。 40

(23) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が、コラーゲン・シールドの形で局所的に投与されるものである、(21)記載の方法。

(24) 眼状態を診断する方法であって、

眼の一部と、該状態を示す標的抗原と免疫的に相互作用するサブ-免疫グロブリン抗原結合分子とを接触させる工程、及び

該抗原結合分子と該標的抗原を含む複合体の存在を検出する工程、を含む方法。

(25) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が免疫グロブリン分子のFc部分を含まないものである、(24)記載の方法。

(26) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が合成されたFv断片を含むものである 50

、(24)記載の方法。

(27) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が合成され安定化されたFv断片を含むものである、(24)記載の方法。

(28) 該合成され安定化されたFv断片が一本鎖のFv断片である、(27)記載の方法。

(29) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がミニボディである、(24)記載の方法。

(30) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がそれと関連する検出可能な標識を有するものである、(24)記載の方法。

(31) 該標識が蛍光色素である、(30)記載の方法。

(32) 該蛍光色素がフルオレセインである、(31)記載の方法。

(33) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がその半減期を長くするために修飾されているものである、(24)記載の方法。

(34) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がポリエチレングリコールで化学的に修飾されているものである、(33)記載の方法。

(35) 該接触させる工程が、該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子を非経口的若しくは局所的投与により又は結膜下、眼球周囲、若しくは眼球後のスペースに注射により該部分に送達する点に特徴を有するものである、(24)記載の方法。

(36) 該接触させる工程が該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子を目薬の形で局所投与することにより該部分に送達する点に特徴を有するものである、(35)記載の方法。

(37) 該接触させる工程が該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子をコーゲン・シールドの形で局所投与することにより該部分に送達する点に特徴を有するものである、(35)記載の方法。

(38) 該接触させる工程が、該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子の浸透を改良するため眼の表面を調節することにより、該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子を該部分に送達する点に特徴を有するものである、(24)記載の方法。

(39) 該角膜上皮が浸透増強剤により調節されるものである、(38)記載の方法。

(40) 該眼の角膜上皮が、塩化ベンザルコニウム、カプリン酸、DMSO、ジヒドロサイトカラシンB、ジギトニン、界面活性剤及びそれらの任意の組合せから成る群より選択される浸透増強剤により調節されるものである、(38)記載の方法。

(41) 該接触させる工程が、眼の少なくとも一部をイオン電気導入法に付すことにより、該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子を該部分に送達する点に特徴を有するものである、(24)記載の方法。

(42) 該眼障害が、角膜移植拒絶反応、ブドウ膜炎、ウイルス性、細菌性若しくはクラミジア性結膜炎若しくは角膜炎などの炎症性及び感染性疾患、眼腫瘍、新生血管形成増殖病、新生血管形成黄斑症、リュウマチ性角膜融解疾患及び眼類天疱瘡などの自己免疫疾患から成る群より選択されるものである、(24)記載の方法。

(43) 眼障害を治療又は診断するための組成物であって、担体と共に該障害と関連のある標的抗原と免疫的に相互作用するサブ-免疫グロブリン抗原結合分子を含む組成物。

(44) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が免疫グロブリン分子のFc部分を含まないものである、(43)記載の組成物。

(45) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が合成されたFv断片を含むものである、(43)記載の組成物。

(46) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が合成され安定化されたFv断片を含むものである、(43)記載の組成物。

(47) 該合成され安定化されたFv断片が一本鎖Fv断片である、(46)記載の組成物。

(48) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がミニボディである、(43)記載の組成物。

(49) 該標的抗原が、MHC分子、補助的刺激分子、接着分子、受容体関連分子、サ

10

20

30

40

50

イトカイン受容体及びウイルス表面抗原から成る群より選択されるものである、(43)記載の組成物。

(50) 該補助的刺激分子が、CD80、CD86及びCD152から成る群より選択されるものである、(49)記載の組成物。

(51) 該接着分子が、CD11、CD18、CD54及びCD62Lから成る群より選択されるものである、(49)記載の組成物。

(52) 該受容体関連分子が、CD3、CD4、CD8、CD28、CD40、CD40L及びCTLA4から成る群より選択されるものである、(49)記載の組成物。

(53) 該サイトカイン受容体が、インターロイキン2受容体、インターロイキン2受容体のサブユニット、及びインターフェロン γ 受容体から成る群より選択されるものである、(49)記載の組成物。

(54) 該ウイルス表面抗原がヘルペスウイルス表面抗原である、(49)記載の組成物。

(55) 該ヘルペスウイルス表面抗原がgD2又はgB2である、(54)記載の組成物。

(56) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がその半減期を延長するために修飾されているものである、(43)記載の組成物。

(57) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がポリエチレングリコールで化学的に修飾されているものである、(56)記載の組成物。

(58) 浸透増強剤をさらに含む(43)記載の組成物。

(59) 該浸透増強剤が、塩化ベンザルコニウム、カプリン酸、DMSO、ジヒドロサイトカラシンB、ジギトニン、界面活性剤及びそれらの任意の組合せから成る群より選択されるものである、(58)記載の組成物。

(60) 目薬の形態である(43)記載の組成物。

(61) コラーゲンシールドの形態である(43)記載の組成物。

(62) 眼の中の標的抗原と免疫的に相互作用するサブ-免疫グロブリン抗原結合分子を含む眼科用組成物。

(63) 眼障害を治療するための医薬の製造におけるサブ-免疫グロブリン抗原結合分子の使用であって、該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が該障害と関連する標的抗原と免疫的に相互作用するものである使用。

(64) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が免疫グロブリン分子のFc部分を含まないものである、(63)記載の使用。

(65) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が合成されたFv断片を含むものである、(63)記載の使用。

(66) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子が合成され安定化されたFv断片を含むものである、(63)記載の使用。

(67) 該合成され安定化されたFv断片が一本鎖Fv断片である、(66)記載の使用。

(68) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がミニボディである(63)記載の使用。

(69) 該標的抗原が、MHC分子、補助的刺激分子、接着分子、受容体関連分子、サイトカイン受容体及びウイルス表面抗原から成る群より選択されるものである、(63)記載の使用。

(70) 該補助的刺激分子が、CD80、CD86及びCD152から成る群より選択されるものである、(69)記載の使用。

(71) 該接着分子が、CD11、CD18、CD54及びCD62Lから成る群より選択されるものである、(69)記載の使用。

(72) 該受容体関連分子が、CD3、CD4、CD8、CD28、CD40、CD40L及びCTLA4から成る群より選択されるものである、(69)記載の使用。

(73) 該サイトカイン受容体がインターロイキン2受容体、インターロイキン2受容

10

20

30

40

50

体のサブユニット、及びインターフェロン γ 受容体から成る群より選択されるものである、(69)記載の使用。

(74) 該ウイルス表面抗原がヘルペスウイルス表面抗原である、(69)記載の使用。

(75) 該ヘルペスウイルス表面抗原がgD2又はgB2である、(74)記載の使用。

(76) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がその半減期を延長するために修飾されているものである、(63)記載の使用。

(77) 該サブ-免疫グロブリン抗原結合分子がポリエチレングリコールで化学的に修飾されているものである、(76)記載の使用。

(78) 該医薬がサブ-免疫グロブリン抗原結合分子の眼中への浸透を改良するため浸透増強剤と共に製剤化されるものである、(63)記載の使用。

(79) 該医薬がサブ-免疫グロブリン抗原結合分子の角膜上皮中への浸透を改良するため浸透増強剤と共に製剤化されるものである、(63)記載の使用。

(80) 該浸透増強剤が、塩化ベンザルコニウム、カプリン酸、DMSO、ジヒドロサイトカラシンB、ジギトニン、界面活性剤及びそれらの任意の組合せから成る群より選択されるものである、(78)又は(79)記載の使用。

(81) 該医薬がイオン電気導入法用に製剤化されるものである、(63)記載の使用。

(82) 該眼障害が、角膜移植拒絶反応、ブドウ膜炎、ウイルス性、細菌性若しくはクラミジア性結膜炎若しくは角膜炎などの炎症性及び感染性疾患、眼腫瘍、新生血管形成増殖病、新生血管形成黄斑症、リュウマチ性角膜融解疾患及び眼類天疱瘡などの自己免疫障害から成る群より選択されるものである、(63)記載の使用。

(83) 該医薬が、非経口的若しくは局所的投与、及び結膜下、眼球周囲若しくは眼球後のスペースへの注射から成る群より選択される投与のために製剤化されるものである、(63)記載の使用。

(84) 該医薬が目薬の剤形での局所投与用に製剤化されるものである、(83)記載の使用。

(85) 該医薬がコラーゲンシールドの剤形での局所投与用に製剤化されるものである、(83)記載の使用。

【0073】

本発明は以下の実施例を参照してより詳細に記述される。しかしながら、下記の記述は単に説明上のものであり、いかなる意味でも、上述した本発明の一般性を限定するものと解釈されるべきでないことを理解すべきである。

【実施例1】

【0074】

実施例1

scFv抗体断片及び二価ミニ抗体の眼内浸入

scFv抗体断片及び二価ミニ抗体の工学及び発現

該抗体工学用の出発材料はOX38であった。これはラットのCD4抗原に対して特異的に結合する全長の抗体を生産するハイブリドーマ細胞系統であった。該scFv抗体断片のための工学工程は、クレーパーら(1997, J Immunol Methods 201(1):35-55)及びブリュックツンら(大腸菌における抗体の生産:PCRから発酵まで、マックカフェリー・ジェイ、フーゲンブーム・エイチ、チスウェル・ディ編、抗体工学:実践的アプローチ、オックスフォード:オックスフォードユニバーシティプレス、1996年:203-252(ハーメス・ビー編、実践的アプローチシリーズ))により記載されている技法通りに行った。要するに、mRNAを増殖中のハイブリドーマ細胞系統から抽出し、該mRNAをcDNAに逆転写した。該抗体の軽鎖及び重鎖の可変部についての遺伝情報は、クレーパーら(上掲)及びブリュックツンら(上掲)によって記載されているように、伸長されたプライマー対を用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により個別に増幅した。両鎖

10

20

30

40

50

のDNA生産物は共にスプライシングしpAK100ベクターに挿入した。該ベクターは大腸菌JM83（エイ・プリュックツンから贈与された）を形質転換するために使用した。scFv断片を大腸菌中で発現し培養上清から回収した。これらの断片は、ラットCD4抗原の供給源としてラットの胸腺細胞を用いてフローサイトメーターでそれらの結合活性について試験した。

【0075】

大規模生産のため、機能的scFvをコードする挿入物を該pAKI100ベクターから切り出しpHB400ベクターに組込んだ。このpHB400ベクターは、pHB110ベクター（ボスマンら、1998, Nat. Biotechnol. 16(4):376-80）から得られるskp共発現カセットをpAK400ベクター（クレーバーら、上掲）に組込んで誘導した。該pHB400ベクターは、scFv発現を最適化するための強力な翻訳開始領域（シャイン・ダルガーノSDT7g10配列）、固定化金属イオン・アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）による精製のための6-ヒスチジン標識、及びskpの共発現用のカセットを含む。skpは細胞周辺腔における正しいscFvの折りたたみを改良するシャペロンである。

【0076】

二価ミニ抗体としてのscFv断片の発現のため、scFv配列をもつ該挿入物をpHB540ベクターに連結した。該ベクターはpAK500（クレーバーら、上掲）から得られるscFv二量体化カセットをpHB400ベクターに添加することにより構築した。この手段により、二つの一価断片を非共有結合的に二量体化して66kDaのサイズをもつ二価ミニ抗体を形成させる抗体のヒンジ領域に由来するさらなる二重らせんモチーフを備えたscFv断片を発現させることができる。

【0077】

大腸菌の発酵

scFv又はミニ抗体を発現させるため、上記ベクターを用いて大腸菌HB2151又は大腸菌BL21を形質転換した。細菌培養物は、非常に良いブロス複合培地を用いてプリュックツンら（上掲）により記載されているものと類似した20L容のベンチトップ型発酵槽中で培養した。培養物は、25℃で、20の光学密度（OD_{600nm}）で、0.1mMのIPTG（イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド）の添加によりタンパク質の発現を誘導した。3から4時間の発現の後、培養物をベックマンJ21遠心分離機（4000×g、4℃で25分間）で回収し、細菌ペレットは即座に処理するか又は-70℃で保存した。

【0078】

scFv及びミニ抗体の精製

正しく折りたたまれ且つ機能的なscFv又はミニ抗体を得るために、該細菌ペレットを、1グラムのペレットにつき2mLの抽出緩衝液を用いて50mMのホウ酸ナトリウム（NaBo）、0.15MのNaCl、pH8.0に再懸濁し、細菌をマントン・ガウリン・フロースルーホモジナイザーでの超音波処理により破碎した。溶菌液は4℃で30分間13,000×gで遠心分離した後、該scFv又はミニ抗体を含む上清を0.2μmのフィルターを通し、そして1%のトリトンX-100、1%のトゥイーン-20及び20mMのイミダゾールで補足した。清澄化された溶菌液をニッケル-ニトリロトリ酢酸（Ni-NTA）樹脂（キアーゲン社、キアイクスプレッション、キアーゲン、ドイツ、1999年）で充填したIMACカラムにかけた。このカラムを20カラム容量（CV）の平衡緩衝液（50mMのNaBo、1%のトリトンX-100、1%のトゥイーン-20、20mMのイミダゾール、pH8.0）及び5CVの50mMのNaBo、20mMのイミダゾール、pH8.0で洗浄した。結合タンパク質は20～500mMのイミダゾールの直線勾配を用い10CV以上でカラムから溶出した。タンパク質を含む画分をプールし、Q-セファローズ-HP陰イオン交換カラムにかけ、20mMのヘプス緩衝液（N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[4-ブタンスルホン酸]）pH8.0で平衡化した。非結合タンパク質を3CVの平衡緩衝液で洗浄した後、結合タンパク質を0～1MのNaCl

の直線勾配を用い7 C V以上の20 mMのヘペス、pH 8.0中に溶出した。精製された s c F v又はミニ抗体を含む画分をプールし、滅菌濾過しそして4 で2 × 150容量の20 mMのヘペス、pH 8.0、0.15 mMのNaClに対して透析した。試料は精製工程間で採取しSDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動）を用いて分析した。好ましい実施態様においては、この精製分子は、その半減期を延長するためにチャップマンら（1999, Nature Biotechnology 17: 780-783）の手法を用いてモノメトキシ-ポリエチレングリコール（PEG）で化学的に修飾される。

【0079】

抗原結合について s c F vを試験する

抗原結合についての s c F v断片に関する全ての試験は、ラットの胸腺細胞を基にフローサイトメトリーにより実施した。胸腺細胞の懸濁液を、採取したばかりのラットの胸腺組織を基にして標準的な実施要綱により調製した。50 µLのRPMI培養液に懸濁された胸腺細胞（ 5×10^5 ）を検定チューブごとに使用した。高感受性フローサイトメリー検定は、s c F v（50 µLの試料）、抗ポリHisマウス抗体（50 µL、200倍に希釈、シグマ社）、ビオチン化ヤギ抗マウス抗体（50 µL、50倍に希釈、ベクター社）及びストレプトアビジンR-フィコエリスリン複合体（50 µL、50倍に希釈、シグマ社）について30分間のインキュベーション工程を用いて4 で実施した。細胞はインキュベーションの間に30容量のPBS-アジドで洗浄した。検定は50 µLの固定液（PBS、0.5%のホルムアルデヒド）を添加することにより固定し、フローサイトメーターで読み取った。

【0080】

角膜浸透実験

角膜組織

s c F v、ミニ抗体及び全長のIgG抗体の浸透は、実験の2～5時間前に地方の食肉処理場で食用に屠殺された正常な8～14月齢のブタの眼で試験した。移植の臨床用途に適さなかったヒトの眼1個を地方のアイバンクから入手し、摘出後2時間以内に使用した。他の実験上の理由で医学及び獣医学研究所（アデレード、南オーストラリア）の動物小屋で飼育され屠殺されたネコから得た四つの角膜を摘出の3時間以内に使用した。

【0081】

角強膜ボタンは標準的なアイバンク技法を用いて解剖した。組織の調製又はチャンバー上への載積の間の角膜変形を防ぐために格別の注意が払われた。なぜなら、これは障壁機能の無傷状態に悪影響を及ぼしうるからである。間質浸透のみを研究するため使用した眼において、この角膜上皮は角強膜ボタンの調製前にno.11の外科用メス及び乾燥した綿棒を用いて慎重に取出した。

【0082】

角膜浸透の実験設定

角膜灌流チャンバー

ネコ及びブタの角膜を通過する s c F vのインピトロの浸透を角膜灌流チャンバーで研究した（図2）。該灌流チャンバーは、本体、クランピングスリーブ（clamping sleeve）及び固定リングの三つの部分から構成される。全ての部分がポリカーボネートから作製される（生物医学工学センターで製造された、フリンドース・メディカル・セントレ、アデレード）。該クランプの後側部を形成する該本体の「肩」は、ヒト、ブタ及びネコなどの異なる種から得られる角膜の元々の湾曲を支持するため30°曲げられている。載せられた角膜と共に受容側上のチャンバーを形成する中心腔は直径12 mmで深さ3 mmである。本体には灌流の流入及び流出のためのチャンネルもある。上皮側から本体へ角膜を留める該クランピングスリーブは、ねじれのない垂直移動を指示するためそして組立て中に起こりうる角膜へのせん断応力及び角膜の縁の損傷を防ぐために二つのステンレス製のガイドピンを有する。該クランピングスリーブは、涙液排水を模倣して適用された目薬を吸収し得る流体チャンネルをも含む。その表面上にある角膜及びクランピングスリーブは固定リングにより本体のチャンバーに押しつけられており、該リングは非常に精確な固定力

の調整ができる細い系（1 mmのピッチ）を有する。一度、該角膜を適切に載せると、全チャンバーは暖水が水浴から循環している熱交換ブロックに連結される。

【0083】

角膜組織の評価

組織の生存能力は、角膜の厚さを携帯型厚度計（BVIポケット厚度計、B・V・インターナショナル、63100クラーモント・フェランド、フランス）で測定することにより全実験中30分ごとに機械的に評価した。各実験の初めに、該角膜を一時間灌流し、次の30分間で3以上の個別の測定により角膜の厚さの基線値を確立した。次の実験中に基線値から10%以上の厚さの増加があれば、上皮の機能障害とみなされ、この角膜は廃棄された。

10

【0084】

s c F v、ミニ抗体、全長のI g G抗体又はフルオレセインなどの実験用の薬物は、純粋な形で又は異なる浸透増強剤を補足して、該角膜の上皮側に20から30分ごとに目薬として投与した。該灌流チャンバーは、該角膜の受容側上に、B S S - プラス（アルコン社）で充填された人工眼内スペースを形成した。該人工眼及び該貯蔵庫を連続的に循環するB S S - プラス溶液の総容量は4 mLであった。該人工眼のレベルより25 cm上まで該溶液貯蔵庫を上昇させるとチャンバー内に12 mm H gの陽圧を生じ、生理状態を刺激した（図2）。

【0085】

薬剤浸透を評価するために、一時間ごとに100 μ Lの試料を該受容側上の該循環液から採取し同容量の新鮮なB S S - プラスと置き換えた。s c F v、ミニ抗体及び全長のI g G抗体の浸透は、C D 4抗原の供給源としてのラットの胸腺細胞及びマウスの抗ポリH I S標識第二抗体（シグマ社）を用いて標準的なフローサイトメトリー（ゾラら、1990, J Immunol Methods 135(1-2):247-55）法により測定した。フルオレセインナトリウムの浸透は、適切なフィルターを備えたE L I S A読み取り機を用いて493 nmの吸収を測定することにより評価した。

20

【0086】

全眼浸透の実験設定

無傷の結膜組織をもつヒト又はブタの眼全体を、ウエル中で角膜が下方に向くように置くためにテフロン（登録商標）の表面に造形されたくぼみを備えるテフロン（登録商標）ブロック上に配置した（図3）。このウエルは100 μ Lのs c F v又はミニ抗体で部分的に満たされていた。角膜を除く他の組織が該薬物と接触しないよう注意を払った。全眼は湿潤チャンバーを形成するように伏せたプラスチックの容器で覆い、この実験設定全体を35～37の温度に該眼を保つよう水浴上に配置した。インキュベーション期間の最後に、全眼球をB S Sで数回洗浄し、ティッシュペーパーで乾燥し、そして再度洗浄した。前眼房液の試料は、角膜から前眼房へ通り抜ける27 Gの注射針を用いて回収した。浸透したs c F v及びミニ抗体の濃度は、灌流チャンバー実験設定の場合と同様にF A C S検定で評価した。

30

【0087】

全実験の最後に、角膜を緩衝ホルマリン（P B S中10%のホルマリン）で固定し、パラフィンに包埋した。標準的な10 μ mの切片はP A Sで染色し、顕微鏡の下で調べた。

40

【0088】

結果

s c F v及びミニ抗体の精製

ニッケル - N T A精製カラムから得られた溶出液は、O X 38 s c F vについては52%の純度で0.5 mg / mLのタンパク質濃度を、そしてO X 38ミニ抗体については21%の純度で0.74 mg / mLのタンパク質濃度をそれぞれ有した。Q - Sepharose(商標)陰イオン交換カラムでの次の精製により、98%の純度で3.98 mg / mLの最終濃度のs c F v及び75%の純度で1.83 mg / mLの濃度のミニ抗体を得た。ニッケルカラム及び次のイオン交換カラムの二工程精製計画により、内毒素のレベルがわずか1.08

50

内毒素単位 (E U) / m g の s c F v 及び 3 6 E U / m g のミニ抗体という臨床グレードの純度を得た。

【 0 0 8 9 】

ニッケルカラムでの第一精製工程の後、s c F v バッチ内の主な夾雑物はロタマーゼ (ペプチジル - プロピルシス - トランスイソメラーゼ、S L Y D) 及びヒストン様タンパク質の H L P 1 であった。ロタマーゼはヒスチジンの豊富なタンパク質であり、ニッケルカラム上の s c F v 断片とは無関係に共精製されるらしい。これは次の Q - セファロースカラムでの精製により効率よく除去された。第二の夾雑物である H L P 1 はヒスチジン、システインを含まず、トリプトファンも含まない。そのため、H L P 1 は該 s c F v か又はロタマーゼに付着してニッケルカラムで共精製されたと仮定した。H P L 1 が 9.5 の等電点を有することに基づき、本発明者らはこの夾雑物を p H 8 . 0 の Q - Sepharose (商標) 陰イオン交換クロマトグラフィーにより除去できると予測した。しかしながら、H L P 1 はこのクロマトグラフィー工程後の最終産物中にも見出された。このことは、H L P 1 が精製工程で O X 3 8 s c F v 断片の一部に結合して運ばれたに違いないことを示している。H L P 1 は 15 . 6 k D a のサイズを有し、夾雑 s c F v 分子の有効サイズを 4 3 k D a まで増大する。

10

【 0 0 9 0 】

本研究において浸透実験に使用した s c F v 断片はニッケルカラムのみで精製し、0 . 2 ~ 0 . 25 m g / m L の最終 s c F v 濃度を有していた。浸透実験に使用したミニ抗体は完全な二工程精製プロトコルを受け、1 . 8 m g / m L の最終ミニ抗体濃度を有していた。

20

【 0 0 9 1 】

ラットの C D 4 抗原に対する s c F v の特異性

ラットの C D 4 抗原への s c F v の結合は、ラットの胸腺細胞を用いてフローサイトメトリー検定で試験した。全長のモノクローナル抗体である O X 3 8 を用いたフローサイトメトリー検定で示されるように、全胸腺細胞の 9 5 % 以上がその表面上に C D 4 抗原を発現した。O X 3 8 はラットの C D 4 に特異的に結合する。この C H R I - r 4 - F v 1 . s c F v は同一の様式で全ての胸腺細胞に結合した。C H R I - r 4 - F v 1 . s c F v の試料の最大蛍光強度は O X 3 8 で見られた該強度の約三分の二であった。しかしながら、希釈系列での該蛍光強度は、O X 3 8 抗体及び C H R I - r 4 - F v 1 . s c F v において同一様式で低下した。このことは、両者が類似の結合特性を持つことを示している (図 4) 。

30

【 0 0 9 2 】

細胞膜への C H R I - r 4 - F v 1 . s c F v の C D 4 非依存的又は非特異的な結合を排除するために、J u r k a t 細胞 (ヒトの T 細胞系統) 及び J 5 . C D 4 (その表面上にラットの全長 C D 4 を発現するトランスフェクションされた J u r k a t 細胞系統) を用いるフローサイトメトリー検定を実施した。C H R I - r 4 - F v 1 . s c F v は、J u r k a t 細胞を用いるフローサイトメトリー検定が負であったことによって示されるように、非特異的な結合を全く示さなかった。ラット C D 4 に対する結合特異性は、トランスフェクションされた J 5 . C D 4 についてのフローサイトメトリー検定で証明された。該検定では、s c F v が O X 3 8 と同様に結合した。

40

【 0 0 9 3 】

s c F v (2 8 k D a) の角膜浸透

角膜間質を通る s c F v の浸透は、該角膜灌流チャンバーを用いる最初の一連の実験で試験した。該角膜上皮はこの実験前に除去した。図 5 に示すように、この s c F v はブタの角膜間質を首尾よく透過しその特異的な抗原結合活性を保持していた。供与側上での s c F v の最初の一滴と受容チャンバー側上での明確な結合活性の検出との間に 4 時間の間隔があった。

【 0 0 9 4 】

薬物が溶解している緩衝液の p H は、しばしば薬物の溶解度及び角膜浸透に影響を及ぼし得る。O X 3 8 s c F v は 6 . 1 の等電点を有し、この p H では s c F v の浸透は最も低

50

いと予想される。したがって、本発明者らは、8.0、7.0及び3.5のpHにおいてブタの角膜間質を横切るOX38sCFv断片の浸透を調べた。7.0から8.0までのpHの上昇は浸透を促進したが、一方、等電点から3.5までのpHの低下は浸透の減少を惹起した(図6)。

【0095】

種に無関係な間質の浸透を証明するために、正常なネコの角膜を用いて該実験を反復した。該灌流チャンバーから得られた結果は、ネコでもブタと同様なsCFvの浸透を示した。25%薄いネコの角膜を横切る浸透後のsCFvの結合活性は2時間後に検出可能になった(図7)。

【0096】

これらの陽性の浸透結果が、間質浸透と類似の効果を生じるであろう該角膜の固定端における組織の損傷又は載積された角膜周囲からの漏出により惹起されたものではないことを立証するために、全長のOX38IgG抗体を負の対照として使用した。全長の抗体は、約150kDaの分子サイズであるため該間質を浸透しないと推測される。これは明らかに間質浸透のための60~90kDaの分子遮断範囲を上回る。200万分の1の希釈で陽性検出ができる濃度のモノクローナル抗体を20分毎に目薬として投与した。14時間までの試料採取期間には受容側に結合活性は見出されなかった(図6及び図10)。

【0097】

灌流チャンバーの浸透実験は、浸透プロセスの動力学を評価するために受容側の試料採取を反復しながら、より長い期間にわたって個々の角膜を研究できる。しかしながら、角膜を横切って灌流チャンバーへ浸透した該断片は大容量(4mL)中で希釈されるので、その結果は、前房容積が0.3~0.5mLである本物の眼で到達できるsCFv及びミニ抗体の濃度より過小評価してしまう。灌流チャンバー実験で得られる浸透結果と生きているヒトの眼での推定値とを大雑把に比較するために、フルオレセインナトリウムの目薬を用いて灌流チャンバーでの更なる浸透実験を実施した。フルオレセインナトリウムは332Daの分子であり、ヒトの眼内へのその浸透はインビボで広く研究されてきた。2%(w/v)フルオレセインを一滴投与した後、該薬物は30分後にヒトの眼の中で検出可能になる(アライエら、1983, Jpn J Ophthalmol 27(3): 421-33)。フルオレセインの投与を反復することにより、前房に見出される量の相当の増加をさらに惹起する(アドラーら、1971, Exp Eye Res 11(1):34-42)。ブタの眼で得られた該sCFv浸透結果を比較可能にするために、正常な上皮をもつブタの角膜を14時間の間20分毎に2%フルオレセインの目薬で処理した。100マイクロリットルの試料を、sCFv及びミニ抗体の実験と同様な様式で該チャンバー容器から取り出した。フルオレセインナトリウム濃度は、100万分の2の検出閾値をもつELISA読取り機で492nmで測定した。ブタの角膜受容側上において、フルオレセインナトリウムはわずか3時間後に検出可能になり、図8に示すように残りの実験時間で指数的な増加が続いて起きた。

【0098】

正常な眼で得られうるsCFv濃度をよりよく評価するために、sCFv浸透を全眼モデルでも試験した。このモデルでは、個々の眼は一回しか試料採取できないので、何らかの動力学的情報を得るために異なる曝露時間を与えた多数の眼を必要とする。しかしながら、生理学的な意味で、眼の前房部分は残りの本体と最低限の薬理的相互作用しかもたない明確に規定された構造であるため、このような全眼実験から得られる結果はインビボで得られうる浸透量により近いものを反映している。

【0099】

この実験では、ブタの全眼の角膜上皮を除去し、この角膜をOX38sCFvを含むテフロン(登録商標)ウェルに7時間浸漬した。該表面を完全に洗浄した後、100µLの前房液の試料を27Gの針をつけた注射器により採取した。この結合活性は2千分の1の検出閾値をもつラットの胸腺細胞上でのFACS検定で試験した。7時間後に試料採取された前房液は、250分の1のsCFv濃度と等価な強力な結合活性を示した(図9)。

【0100】

10

20

30

40

50

角膜上皮を通る s c F v 浸透の動力学は、無傷の角膜を用いる灌流チャンバー内で、より詳細に研究した。純粋な P B S 溶液 (p H 7.2 ~ 7.4) 中の s c F v が目薬として適用された場合、8 時間の浸透期間にわたって結合活性は検出できなかった。s c F v / P B S 溶液が目薬用の保存剤として通常用いられる 0.01 % の塩化ベンザルコニウムを補足した場合、ブタの角膜において 8 時間の試料採取期間の最後に弱い結合活性が観察された (データ示さず) 。

【 0 1 0 1 】

(1 M の N a O H で調整した) p H 8.0 の P B S 中の s c F v を用いて同一実験を繰り返した。これらの条件下において、s c F v は浸透増強剤がないときでさえ、健常な上皮及び間質を通して浸透し、8 時間後に受容側上で結合活性の増大を示した。0.5 % のカプリン酸の添加により、角膜浸透が促進され、6 時間後に検出可能な結合活性が増大した (図 1 0) 。

10

【 0 1 0 2 】

O X 3 8 ミニ抗体 (66.8 k D a) の角膜浸透

66.8 k D a の分子サイズをもち角膜間質を通る O X 3 8 ミニ抗体の浸透を、該灌流チャンバー内での一価 s c F v 断片と同じ方法で試験した。負の対照として使用された全長の O X 3 8 I g G 抗体の浸透は、1 4 時間の全実験期間の間検出できなかった。対照的に、O X 3 8 ミニ抗体の結合は 3 時間後に陽性となり、フローサイトメーター検定が 8 時間以降の試料で飽和に達するまで更に指数的に増加した (図 1 1) 。

20

【 0 1 0 3 】

無傷の上皮障壁をもつブタの角膜を通る O X 3 8 ミニ抗体の浸透は、浸透増強剤がないと、はるかに遅くなり 1 1 時間後にのみ微弱に検出できた。

【 0 1 0 4 】

一価の s c F v と同様に、正常な眼の前房内における達成可能なミニ抗体濃度を全眼モデルで研究した。角膜上皮が除去されたブタの眼の場合は、まず 3 時間後の試料採取で最大シグナル強度の半値を既に呈した。ミニ抗体と接触させた 5 時間後及び 7 時間後の試料は最大の試験シグナルの範囲内の結合活性を示した。次に、正常な上皮障壁をもつ六つのブタの眼を、0.5 % のカプリン酸を補足した ミニ抗体に曝した。ミニ抗体の結合活性は 5 時間の接触時間の後に試料採取された眼で明らかに検出可能であり、7 時間後及び 8 時間後の活性は上皮障壁のない眼よりもごく僅かに低かった (図 1 2) 。

30

【 0 1 0 5 】

上記の全ての実験で最も難しい条件は、比較的大きなミニ抗体が無傷の上皮障壁をもつ角膜を通して浸透することであった。これらの全結果は、ヒトの角膜より 2 5 % 厚い間質を有する若いブタの眼から得られた。しかしながら、最も重要な浸透障壁は上皮表面であり、ブタの眼でのこの障壁の微細構造についての知識は限られている。ブタとネコの眼で得られた上記の浸透結果とヒトの角膜を通るサブ - 免疫グロブリン断片の潜在的な浸透とを比較するために、得られたばかりのヒトの眼で最も難しい実験条件を用いた。無傷の上皮をもつこの眼を、全眼の実験設定において O X 3 8 ミニ抗体で処理した。該角膜は p H 8.0 の 0.5 % カプリン酸を補足した 1.8 m g / m L の標準濃度のミニ抗体 1 0 0 μ L に 5 時間接触させた。5 時間後に得られた眼内試料はフローサイトメーターで最大のシグナル強度を呈し、1 m L 当たり 1.5×10^6 個の胸腺細胞を完全に飽和した。この試料における結合活性の滴定は、実験したこのヒトの眼の前房で 0.8 μ g / m L のミニ抗体濃度を示した (図 1 3 及び図 1 4) 。

40

【 0 1 0 6 】

考察

本研究は、遺伝子工学的組換え抗体断片が目薬として局所的に投与された後に該角膜に首尾よく浸透して眼の内側に到達できたことを証明する。さらに、これらの断片は十分な抗原結合活性を保持し、抗体に基づく眼の治療介入及び診断介入の可能性を提供する。同時に、本研究は、以前の多数の人たち (ベルハーゲンら、1990, Invest Ophthalmol Vis Sci 31(8): 1519-25 ; オススキーら、1993, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 231(2):

50

122-8)と同様に天然に生じる全長の抗体が該角膜を浸透せず又は治療に有用な程には少なくとも浸透しないことを示し、そして該角膜を通して浸透できる最大分子サイズの遮断がしばしば引用されるが再現されない研究(モリス・ディ、ミシマ・エス、眼の薬物速度論、スプリングー・ベルラゲ、ベルリン、1984年、シアーズ・エム編、眼の薬理学)で見出される500kDaよりはるかに小さいことを明らかにした。

【0107】

該角膜は、表面の角膜上皮と角膜間質という二つの重要な浸透障壁を含んでいる。この角膜上皮は、親油性小分子以外の全てに対して強力な浸透障壁を形成する。より大きな分子は、通常密着結合により遮断される細胞間スペースを通して浸透しなければならない(モリス・ディーエム、1980, *Int Ophthalmol Clin*20(3): 7-20; パースタインら、1985, *J Ocul Pharmacol* 1(3): 309-26)。これらの密着結合内の孔は1~5kDaのサイズまでの分子の浸透を可能とする(エーデルハウザーら、1998, *Adv Exp Med Biol* 438: 265-71)。該角膜上皮の浸透障壁は健全な細胞構造に依存する。ヒトの上皮障壁機能が加齢(チャングら、1993 *Cornea* 12(6): 494-9(コメント参照))及び糖尿病又はドライアイなどの多くの一般病(ゴッベルら、1989, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 227(2): 142-4; ヨコイら、1998, *Br J Ophthalmol* 82(7):797-800)により著しく低下することはよく知られている。これに加えて、幾つかの研究は、緑内障を治療するための角膜移植(シマザキら、1999, *Cornea* 18(5): 559-64; チャングら、1994, *Ophthalmic Res* 26(5):283-9)又は柵状織切除(タニハラら、1997, *Am J Ophthalmol* 123(4): 487-93)などの外科的介入により、何ヶ月間又は何年間もの間該障壁機能が破損することを示した。

【0108】

第二の障壁である角膜間質は、より大きな断片を浸透させることができ、該組織が浮腫になる場合500kDaまでの分子又は更に大きな分子さえも浸透させることができる(パースタインら、1985、上掲)と引用されてきた。しかしながら、500kDaの数値は、同じ専門分野でない総説文献で公表された単独研究(モリスら、1984、上掲)に由来するものである。事実、幾つかの研究は、150kDaのサイズをもつIgG抗体の浸透に取り組んできた。これらの研究は、このサイズの分子が該角膜に浸透しない又は非常に遅い速度でのみ浸透し角膜間質を横切るために1~2週間の時間間隔を要することを繰り返し示した(ベルハーゲンら、1990、上掲; オススキーら、1993、上掲)。該上皮障壁とは対照的に、角膜間質を通る薬物送達を改良するための浸透増強剤は知られていない。

【0109】

上に示したデータは、少なくとも66kDaまでのサイズの組換え抗体断片は迅速に角膜間質に浸透でき、眼の内側で完全な抗原結合能力を保持できることを証明している。浸透はブタ、ネコ及びヒトで報告されているので、これらの抗原断片の浸透は種に無関係であるようである。間質の薬物浸透は、間質の厚さ及び薬物のサイズと間接的な直線的相関関係を有し且つ薬物濃度と直接的相関関係を有する(パースタインら、1985、上掲)。ブタの角膜を通るより25%薄いネコ及びヒトの角膜を通る方がscFvの浸透がより早いことは、上記の発見とよく一致しているように思われる。2.5倍大きいミニ抗体が、scFv小断片と同様な時間間隔の後に該角膜灌流チャンバーの受容側上で検出されたという事実は、おそらく本研究で使用された目薬中の7~8倍高い濃度のミニ抗体によるものであろう。従って、本発明者らが臨床グレード材料について二段階精製工程を用いて証明したように、scFv濃度の増大は本研究で見出されるものよりはるかに高い眼内濃度さえも生ずるように思われる。

【0110】

上述したように、表面の上皮は薬物浸透に対するより強力な障壁であるので、無傷の上皮障壁をもつ角膜を通るscFv断片及びミニ抗体断片の浸透がかなり遅いことは驚くに当たらない。事実、scFv及びミニ抗体が非常に遅い速度ながらも無傷の上皮障壁を通して浸透すると示され得たことの方がむしろ驚きである。しかしながら、この上皮障壁は、現在使用されている大部分の眼科用薬物が幾つかの浸透増強剤形で補足されている程に、はるかに小さい分子でさえ妨げる。これらの浸透増強剤は最上位の上皮細胞の密着結合

を緩めることにより作用する（パースタイン・エヌエル、1985, Trans Ophthalmol Soc U K 104(Pt4): 402-9; アシュトンら、1991, J Pharmacol Exp Ther 259(2): 719-24; グリーンら、1971, Am J Ophthalmol 72(5): 897-905)。最も一般的に使用される浸透増強剤は塩化ベンザルコニウムであり（タンゲら、1994, J Pharm Sci 83(1): 85-90; パースタイン・エヌエルら、1980, Invest Ophthalmol Vis Sci 19(3): 308-13）、これは微生物の混入に対する保存剤としても作用する。それは通常 0.01 ~ 0.05 % の最終濃度まで添加される。目薬の形態での組換え抗体断片の将来的な医薬調製物はそれらの上皮浸透特性に左右されない保存剤を必要とするであろう。そのため、本発明者らは、本研究の s c F v 断片及びミニ抗体断片の幾つかに 0.5 % のカプリン酸を補足した。該カプリン酸は、通常の乳製食品の成分であり、該角膜上皮と同様に腸粘膜での密着結合の透過性を可逆的に増大させる（モリモトラ、1989, Arch Int Pharmacodyn Ther 302: 18-26、ゾーデルホームら、1998, Dig Dis Sci, 43(7): 1547-52、ササキら、1995, Pharm Res 12(8): 1146-50)。カプリン酸は無傷の上皮を通る s c F v 及びミニ抗体の浸透をかなり改良した。塩化ベンザルコニウム、ジギトニン又はトゥィーン 20 などの他の浸透増強剤とは対照的に、0.5 % のカプリン酸で処理された角膜は従来の組織学で調べた場合上皮の変化を示さなかった。

10

20

30

40

50

【0111】

これらの浸透実験用に得られたヒトの1個の眼には、0.5 % のカプリン酸で補足されたミニ抗体を受けさせた。ヒトの前房液中に5時間後に見出されたミニ抗体結合活性は、同時間後のブタの眼で見出される浸透をはるかに上回った。これは、8 ~ 14 月齢のブタの眼と比較してこの77歳のヒトの角膜の浸透障壁が最初から低下していることを反映するのか、又は一般的にヒトの角質におけるカプリン酸の効果がより強いことを反映するものである。しかしながら、これは、より多くのヒトの眼が研究できるまで推論の域を出ない。

【0112】

要するに、本研究は、s c F v 抗体断片が目薬として提供された場合に眼内に浸透できることを示している。このことは、該断片を、多数の眼病の治療、とりわけ以下の本明細書に記載するように角膜移植拒絶反応、炎症性若しくは感染性の角膜炎、結膜炎、及びブドウ膜炎の予防並びに治療のための新規なクラスの薬物の潜在的な候補とする。s c F v は異なるタグで標識できるので、これらも診断の潜在能力を有すると考えられる。

【実施例2】

【0113】

実施例2

実験動物モデル

動物

6 ~ 16 週齢の雌雄のフィッシャー 344、DA、ルイスとウィスター・フルスの同系交配のラット及びポルトンの異系交配のラットを南オーストラリアのフリンダーズ大学（アデレード、オーストラリア）内で飼育する。ラットは 21 及び 50 % の湿度で 12 時間の明期と 12 時間の暗期の周期で飼われ、随意に水と乾燥飼料（ニュー・ジョイント・ストック、リドレー・アグリプロダクツ、ムレー・ブリッジ、南オーストラリア、オーストラリア）を与えられる。成体の雌雄の BALB / c マウス又は OLA マウスは 21 及び 50 % の湿度で 12 時間の明期と 12 時間の暗期の周期で飼育され、水と乾燥飼料（ニュー・ジョイント・ストック、リドレー・アグリプロダクツ、ムレー・ブリッジ、オーストラリア）を与えられる。全ての手順及び安楽死は吸入による全身麻酔（ハロセイン；ゼネカ社、マックレスフィールド、英国）の下で実施される。実験プロトコルはナショナル・ヘルス・アンド・メディカル・リサーチ・カウンシル・オブ・オーストラリアの「研究における動物使用のガイドライン」に従って開発された。該プロトコルは承認のため南オーストラリアのフリンダーズ大学の動物福祉委員会に常に提出する。

【0114】

内毒素誘導性ブドウ膜炎（EIU）の誘導

ラットは、ローゼンバームら（1980, *Nature* 286:611-613）の方法に従って、100マイクログラムの標準食塩水に溶解した200マイクログラムの大腸菌 0 5 5 : B 5 5 リポ多糖類（シグマ・ケミカル社）を片方の後足に注射される。炎症は注射 1 2 時間後に明白となり 2 4 時間で最大となり 4 8 時間までに消散する。動物は検診され 2 4 時間で細隙灯で評点される。本発明者らはこのモデルについて広範な経験を有する（スミスら、1998, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:658-661; *Immunol Cell Biol* 76: 497-512）。

【0115】

実験的メラニン誘導性ブドウ膜炎（E M I U）の誘導

実験的メラニン誘導性ブドウ膜炎（E M I U）は急性前部ブドウ膜炎の確固たる関連モデルである（スミスら、1998, *Immunol. Cell. Biol.* 76:497-512；スミスら、1999, *Clin. Exp. Immunol.* 115:64-71）。眼のメラニンは、ブリュックヒュイゼら（1984, *Curr Eye Res* 3:1405-1412）により記述されたプロトコルに従ってウシの脈絡膜から抽出され、乾燥重量として定量される。E M I U は、百日咳毒素コアジュバントと共に、ハンターのアジュバント中で乳化された 2 5 0 μ g の精製されたウシの脈絡膜メラニンで免疫化することにより、フィッシャー 3 4 4 ラットで誘導する（ブリュックヒュイゼと同僚、1984、上掲；1995, *Ocul Immunol Inflamm* 3: 149-155；1996, *Jpn J Ophthalmol* 40: 459-468）。具体的には、ラットには、滅菌済みでパイロジェン・フリーの 0 . 9 % 標準食塩水とフンターの TitreMax（商標）アジュバント（シグマ・ケミカル社、セントルイス、ミズーリ州、米国）との 1 : 1 乳濁液中の 1 2 5 マイクログラムのウシの眼のメラニンを 6 0 マイクロリットルの総容量で右後足に注射することにより投与する。その直後に、該ラットは、総容量 4 0 マイクロリットルの標準食塩水中の 1 マイクログラムの百日咳毒素（シグマ・ケミカル社）と混合した同量のメラニンで腹腔腔内注射される。ブドウ膜炎は一般的に二側性であり注射後 1 0 ~ 2 0 日で明白となり 2 ~ 3 週後に消散し動物の 2 0 % に再発する。

【0116】

ブドウ膜炎のモニタリング及びブドウ膜炎の眼の収集

動物は毎日細隙灯で検診しブドウ膜炎の発症及び経過を同定する。重篤度は、水溶性の細胞及び発赤、フィブリンの存在、癒着、瞳孔の反応性、虹彩の充血及び蓄膿が全て評点されるよく実証された系に従って記録する。使用する尺度は以下の通りである。

炎症なし： 正常な外観、

軽病： 前部ブドウ膜の腫脹は無いが明白な浸潤、前房若しくは後房における細胞浸出物は ±、

中度の病気：軽症又は中度の前部ブドウ膜の腫脹及び浸潤、前房及び後房における中度の細胞浸出物、

重病： 重度の前部ブドウ膜の腫脹及び浸潤、硝子炎を伴う前房及び後房における大きな細胞浸出物。

動物は麻酔ハロセインの過剰投与により殺し、これらの眼をさらなる工程のため即座に取り出す。

【0117】

角膜移植のラットモデル

本発明者らは、広範に使用されている同系交配ラットの眼科角膜移植モデル（ウィリアムズとコースター、1985, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26:23-30；ウィリアムズら、小動物の角膜移植。小動物の実験的移植モデル、エムケイ・グリーン、ティーイー・マンデル、チュア、スウィッツアーランド編：ハワード・アカディミック・パブリッシャーズ、1995年、5章、107~132頁）を発展させた最初の者となった。同系交配のフィッシャー 3 4 4 ラット（F 3 4 4；主要組織適合遺伝子複合体（MHC）ハプロタイプ R^T）及び同系交配のウィスター・フルス・ラット（WF；MHCハロタイプ R^T）を角膜移植用に用いる。成体の F 3 4 4 ラットは、成体の F 3 4 4 ラット（同種同系移植片）又は成体の WF ラット（同種異系移植片）のいずれかからの角膜移植片の受容動物である。移植片は性差にまたがって実施されないが、同種異系移植片は MHC のクラス I 及びクラス II 及

び少数の抗原障壁にまたがって実施される。

【0118】

片側の右眼に浸透する直径3mmの角膜移植は前述したように全身麻酔の下で実施される。1%のクロラムフェニコール軟膏が術後に該移植片に適用されるが特定の実験で明記する以外は免疫抑制剤は投与されない。移植縫合糸は除去しない。受容動物は、角膜の透明度、前区の炎症、癒着、及び角膜の新性血管形成について毎日細隙灯で検診される。とりわけ、透明度及び浮腫はそれぞれ0～4の尺度で評点する。0は完全に透明（透明度について）又は薄い（浮腫について）、そして4は完全に不透明（透明度について）又は最大限に厚い（浮腫について）である。任意の段階で術後の白内障を発症するか又は術後5日目に角膜が不透明になるラットはいずれも技術的に失敗であると考えられ分析から除かれる。

10

【0119】

拒絶は、元々薄くて透明な角膜移植片において角膜の不透明性が増大するにつれ現れ、常に移植の新性血管形成と関連している。拒絶の日数は、瞳孔の縁が移植された角膜を通してはや明確に見えない日を第一日目として定義する。WFとF344の同系交配株の組合せにおいて、拒絶は中央値で移植後16日目に起きる。透明な移植片をもったまま100日に達するラットは長命な移植片とみなされる。

【0120】

H S V 間質性角膜炎のマウスモデル

BALB/cマウスの角膜を針を用いて乱切し、 10^6 pfuのH S V - 1（臨床的単離物）を含む4 μ Lを局所的に適用する（トマスら、1998, J Immunol 160: 3965-70）。病気は3週間の期間にわたって間質性角膜炎に進行する。臨床的評点システムを細隙灯で病気を追跡するために使用する。0は透明な角膜、1は軽度のかすみ、2は中度の不透明又は傷、3は重度の不透明化だが虹彩の縁は見える、4は虹彩が見えない、5は間質性角膜炎の壊死。よく特徴付けられたN I H / O L Aマウス（ハルランド社）の再発性H S V角膜炎モデルも用いられる（レイコックら、1991, Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 2741-2746）。一つの角膜が乱切され上記のように接種される。同時に、H S Vに対する抗体（ケミコン社、テメキュラ、カリフォルニア州）を含むプールされたヒトの血清0.5 mLを腹腔腔内に投与すると感染の急性期の間損傷から眼を保護する。次いで、潜伏期を確立するため該マウスを5週間放置する。ウイルスの再活性化はU V B トランスイルミネーター（F S 40 ウェスティングハウズランプ）を用いて行う。麻酔されたマウスは該眼だけが照射されるように遮蔽される。55秒間にわたる248 mJ / cm²の線量はH S Vの再活性化に最適である。

20

30

【0121】

アカントアメーバ角膜炎のラットモデル

アカントアメーバ角膜炎は、本発明者らの研究室で開発されたモデル（バデノックら、1990, Arch Ophthalmol 108: 107-112）に従って、異系交配ラットの角膜にアカントアメーバ及びコリネバクテリウム・エスピイを接種することにより誘導される。成体の雌のポートンラットに麻酔をかける。縁から約1mmの角膜周辺に、メス刃を用い、2mmの部分厚で切開した。手術用顕微鏡の下で、31ゲージの針を固定した微量注射器を用いて、 10^6 個のコリネバクテリウム・ゼロシスと混合した 10^4 個のアカントアメーバ・キャステラニイ（>90%栄養型、>90%生存能）1 μ L容積を接種する。この針を該傷を通して中心の角膜薄膜内に挿入する。全ての動物は接種後毎日観察される。アカントアメーバ角膜炎は全動物で発症し、5日目に白血球の浸潤が見え、7日目までに化膿性角膜炎が十分に確立される。

40

【0122】

統計分析

実験群は10匹の動物を含む。移植片の生存及び病気の発症率のデータを、つなぎ線について補正されたマン・ウィットニーU試験を用いて分析する。明確なデータ（例えば、病気の重篤度の評点）を二元フィッシャーの直接確立検定を用いて分析する。

50

【 0 1 2 3 】

角膜の写真撮影、免疫細胞化学、組織病理学及びフローサイトメトリー

手術用顕微鏡に連結されたワイルド・ヒールブルグ・フォトオートマツトM P S 4 5 カメラを用いて、麻酔をかけた動物の角膜の写真撮影を実施する（ラット、マウスについて）。免疫組織化学は、P L Pで固定された組織の凍結切断切片について、免疫ペルオキシダーゼ技法を用いて実施する。即ちラット及びマウスの白血球に対するモノクローナル抗体及び角膜の白血球浸潤物の組成を正確に同定させる他の細胞表面マーカーに対する広範囲のモノクローナル抗体を用いる。組織病理学的相関関係はホルマリン固定され、パラフィン包埋された全眼のH & E切片について行う。フローサイトメトリーは標準的な単色間接的免疫蛍光法及び高感度法を用いて実施する。

10

【 0 1 2 4 】

抗体工学に使用される追加の抗体

抗ラットB 7 - 1 (C D 8 0 : 3 H 5 ; I g G 1) 及び抗B 7 - 2 (C D 8 6 : 2 4 F ; I g G 1) のハイブリドーマはエイチ・ヤギタ博士（順天堂大学、東京、日本）から恵与された。抗C D 2 8 ハイブリドーマ（J J 3 1 9 ; I g G 1 ）はティ・フニグ博士（インスティテュート・フォ・ヴァイロロジー・アンド・イミュノロジー、ヴルツブルグ大学、ドイツ）から恵与された。抗 - ポリ - ヒスチジン抗体（H I S - 1 ; マウス ; I g G 2 a ）はシグマ・ケミカル社（セントルイス、ミズーリ州、米国）から購入した。F I T C 結合ヤギ抗 - マウス免疫グロブリンはシレナス・ラボラトリーズ（メルボルン、V I C ）から購入した。ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン及びビオチン化ヤギ抗 - マウス免疫グロブリンはD A K O コーポレーション（カルピンテリア、カリフォルニア州、米国）から購入した。

20

【 0 1 2 5 】

抗体試薬の投与

全身投与は、担体として加えられた1 %の牛胎児血清（F C S ）とともに緩衝化生理食塩水中の抗体を腹腔内（i p ）注射することにより実施され得る。注射の計画は実験に応じて決定する。局所投与は、1 %のF C S 及び一つ以上の浸透増強剤で補足され且つ眼科用バランスド・ソルト・ソリューション中の抗体を直接角膜に適用することにより実施され得る。

30

【 0 1 2 6 】

腹水の生産

モノクローナル抗体を腹水として作製するために、標準的な方法に従ってプリスタン処理した個々のB A L B / c マウス群にハイブリドーマ細胞を腹腔内投与する。腹水は該マウスを安楽死させた後に無菌的に回収する。得られる腹水は1 % v / v の牛胎児血清を含み且つ滅菌済みでパイロジェン・フリーのP B S で希釈する。

40

【 0 1 2 7 】

免疫組織化学に使用されるモノクローナル抗体

ラット又はマウスの細胞表面抗原の免疫組織化学的同定に使用されるマウスのモノクローナル抗体は、定常期のハイブリドーマから得られる無希釈の上清として生産される。ハイブリドーマX 6 3 （特異性は未知、I g G 1 イソ型の負の対照）、O X - 1 （抗 - C D 4 5 [白血球に共通の抗原]、I g G 1 イソ型）、O X - 3 5 及びO X - 3 8 （抗C D 4 、それぞれI g G 1 及びI g G 2 a イソ型）、O X - 8 （抗C D 8 、I g G 1 イソ型）、N D S 6 1 （抗C D 2 5 [インターロイキン - 2 受容体（I L - 2 R ）]、I g G 1 イソ型）、R 7 3 （抗T細胞受容体（T C R ））、I g G 1 イソ型）、O X - 2 6 （抗C D 7 1 [トランスフェリン受容体]、I g G 2 a イソ型）、O X - 4 2 （抗C D 1 1 b / C D 1 8 [C 3 b 受容体]、I g G 2 a イソ型）、E D - 1 （抗ラット単球、マクロファージ及び樹状細胞の細胞質抗原、I g G 1 イソ型）並びにO X - 6 （抗M H C 単形態クラスII 決定基、I g G 1 イソ型）はヨーロピアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャーズから入手し、ハイブリドーマS A L 5 （抗サルモネラ抗原、I g G 2 a イソ型の負の対照）はエル・アシュマン博士（アデレード大学、アデレード、オーストラリア）か

50

ら恵与された。種々のマウスの表面マーカー（マウスのCD4（GK1.5）、CD8（TIB150）、CD11b/c（TIB213、HB8466）及びIL-2受容体（PC61））に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマは両方とも、フリンダーズ大学のピー・マカドル博士とパイエイチ・ハート博士から恵与された。

【0128】

細胞表面抗原の免疫組織化学染色

ラット又はマウスの安楽死の後、眼は毛様体輪の後部に穴をあけ、2%重量/容量(w/v)パラホルムアルデヒド-0.075Mリシン-0.0375M燐酸ナトリウム-0.01M過ヨウ素酸ナトリウムに4で4時間浸漬することにより前固定し、ダルベッコのA燐酸緩衝化生理食塩水(PBS)中に7%と15%w/vのショ糖の逐次変化で脱水し、OCT化合物(マイルス、エルクハート、インディアナ州、米国)中に包埋し、そして液体窒素中ですばやく凍結した。眼の横断面を5~8ミクロンの厚さで低温装置により切断した。切片はダルベッコA燐酸緩衝化生理食塩水(PBS)中10%v/vの正常なブタの血清(カモンウェルス・シーラム・ラボラトリーズ、メルボルン、オーストラリア)と室温で10分間インキュベートした後、該第一抗体と18時間インキュベートした。この時点及びその後に、該切片を0.2%w/vのゼラチンを含むPBSで洗浄した。これらを、1%v/vの正常なラットの血清を含むPBSで1:500の割合に希釈されたビオチン化親和性で単離されたヤギ抗マウス免疫グロブリン(DAKOコーポレーション、カルピンテリア、カリフォルニア州、米国)と30分間インキュベートし、洗浄した後、PBSで1:1000の割合に希釈されたホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(DAKOコーポレーション)と共にさらに30分間インキュベートした。切片を洗浄し、40mMのアジ化ナトリウム、20mMの3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド、9mMのイミダゾール、及び0.07%v/vの過酸化水素(シグマ・ケミカル社)を加えたpH7.6の9mMトリス-塩酸緩衝液中で5分間呈色させた。抗体の反応性及び特異性は、免疫組織化学で使用する前に適切なラット又はマウスの標的細胞(正常細胞及び/又はトランスフェクタント)上で、及び眼で使用する前に眼以外の組織の固定切片上で、フローサイトメトリーにより確認した。

【0129】

ラット及びマウスの眼の組織学的評価

摘出した眼を、10%の緩衝ホルマリン中で最低24時間固定し、100%エタノールにより脱水し、さらにクロロホルム中で18時間固定し、そしてパラフィンワックスに包埋する。組織横断面を5ミクロンの厚さに切断しヘマトキシリンとエオシンで染色する。

【0130】

インビボにおけるラットの末梢T細胞部分集合のモニタリング

末梢T細胞の部分集合を尾の血液調製物のフローサイトメトリーにより監視した。試料は、該第一抗体の注射の直前並びに疾患誘導の7日、14日及び28日後にラットから採取した。1mL以下の末梢血をリチウムヘパリン被覆したチューブ内に採取し、100IU/mLのペニシリン、100マイクログラム/mLの硫酸ストレプトマイシン、2mMのグルタミン及び10%v/vの牛胎児血清を含むヘパス緩衝化RPMI1640培地(ICNバイオメディカル社、オーロラ、オハイオ州、米国)で5mLまで希釈した。リンパ球は、Lymphoprep(商標)(ニコムド・ファーマ・アズ、オスロ、ノルウェイ)の比重を1.09に調整するために、40mMのメグルミンジアトリゾエート(アンジオグラフィン、シェーリング・エイジイ・ベルリン、ドイツ)を使用した以外は、製造業者の記載通りにリンフォプレップを用いて単離した。回収した細胞を 1×10^7 細胞/mLでPBS-0.02Mアジ化ナトリウム(PBS-アジド)中に懸濁し、そしてリンパ球懸濁液のこの50マイクロリットルに50マイクロリットルのモノクローナル抗体を添加した。この混合物を30分間氷上でインキュベートした後、PBS-アジドで洗浄し、4で5分間400×gで遠心分離した。そのペレットを25マイクロリットルの正常なラットの血清及びPBS-アジドで50倍に希釈した50マイクロリットルのFITC結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン(シレナス・ラボラトリーズ、メルボルン、オーストラリア)に再

懸濁した。氷上で30分間インキュベートした後、連続して二回洗浄した。この細胞ペレットを、PBS中に10mMのグルコース、5%v/vのホルムアルデヒド及び5mMのアジ化ナトリウムを含む50mLの固定液に再懸濁した。抗体結合は標準的な蛍光フィルターセット（FACScan（商標）、ベクトン・ディッキンソン、マウンテン・ビュー、カリフォルニア州、米国）を用いてフローサイトメトリーにより測定した。

【0131】

内毒素の検定

内毒素のレベルは、製造業者の説明書に従ってマルチ・テスト・リムラス・アマーボサイト・ライセート・アッセイ（ウィッタッカー・バイオプロダクツ、ウォーカーズビル、ミズーリ州、米国）（感度 = 0.125 EU/mL）により測定した。

10

【0132】

タンパク質の評価

試薬中の全タンパク質量は、製造業者の説明書に従って市販のタンパク質評価キット（シグマ・ダイアグノスティクス、セントルイス、ミズーリ州、米国）を用いて改変ラウリー法により測定した。吸光度は750nmで測定した。

【0133】

ラットの混合リンパ球の反応

単核細胞画分は、リンフォブレップ（ニコメド・ファーマ、オスロ、ノルウェイ）上での密度遠心分離により単離した。2万個の生きた応答者である脾細胞を、96穴の丸底マイクロタイタープレート内の最終容量250μLの全RPMI培地（20%v/vFCS、100IU/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール）中、 2×10^5 のマイトマイシンC（250ng/mL、37、30分間、協和発酵工業株式会社、協和、日本）で不活性化された刺激物質とインキュベートした。モノクローナル抗体試薬又は断片を添加し、培養物を5%CO₂の湿潤大気中で37で6日間インキュベートした。細胞増殖を測定するため、1μCiのトリチウム化チミジン（アマシャム、バッキンガムシャー、英国）を合計18時間該培養物に添加した。採取後、しみ込ませたグラスファイバー紙をマスク内に置き、20μLのシンチレーション液を各ウェルに添加した。紙をTopcount（商標）カウンター中で算定した。全ての培養は三連で実施した。

20

【実施例3】

30

【0134】

実施例3

インビトロにおける工学抗体断片の評価

インビトロにおける一価又は二価の抗体の機能的活性を、親の全長モノクローナル抗体及び関連のない対照のscFvと比較する。断片は単独で及び組合わせて試験されうる。scFvが「タグ」配列のポリ-Hisを含む場合、フローサイトメトリー及び免疫組織化学での検出は該タグに対するモノクローナル抗体（HIS-1、シグマ社）の使用により達成できる。しかしながら、他の同定用タグが同様に使用できることは理解されよう。工学構築物の適切な特異性を確認するため、結合を、未固定の正常なラット細胞又はトランスフェクタントについてのフローサイトメトリーにより、及び/又は固定されたトランスフェクタント、ラット又はマウスの正常細胞、分裂促進因子で刺激されたラットの脾細胞、HSVに感染したHe p-2細胞及びMRC-5線維芽細胞、若しくは培養したアカントアメーバ細胞の細胞遠心分離調製物についての免疫組織化学により、評価する。適切ならば活性はフローサイトメトリーにより滴定する。組織の結合は、PLP固定され低温装置で5~8μmに切断された正常なラットの眼、リンパ節、脾臓、腎臓、心臓及び肝臓の切片について免疫ペルオキシダーゼ染色により評価する。尾の静脈から採取された末梢血についてのフローサイトメトリーは、断片がインビボscFv投与で循環細胞に結合したか否かを決定するために使用される。scFv親和性のオン/オフ率は精製された抗原を固相として用いて光学バイオセンサー（BIAcore（商標））で試験される。

40

【実施例4】

50

【 0 1 3 5 】

実施例 4

s c F v による E M I U の調節

本発明者らは全長の抗 C D 4 (C D 8 ではない) モノクローナル抗体が E M I U における新たな病気の発症を遮断し、病気の再発を遮断しうることを既に示したので (スミスら、1999, Clin. Exp. Immunol. 115: 64-71)、本発明者らは、まず、抗 C D 4 ・ s c F v を試験する。次いで、抗 I C A M - 1 ・ s c F v が試験される。対照は、病気の誘導、病気の誘導と負の対照の s c F v、及び病気の誘導と全長のモノクローナル抗体以外の治療を受けない群を含む。全身投与のために、ラットには、病気誘導の 3 日前、0 日並びに 3、5、7、9、及び 11 日後に、1 m g / m L 未満の s c F v タンパク質 (1 m L 容量) を腹腔内に注射し、細隙灯試験によりブドウ膜炎の発症率及び重篤度を測定した。適切な治療用量を決定するための実験を実施する必要がある。予備実験において、総タンパク質量 1 m g / m L の抗 C D 4 ・ s c F v を全身投与することにより試験動物の 30 % 以上で E M I U が防止された (表 1 参照)。

【 0 1 3 6 】

表 1

抗体	ブドウ膜炎の発症率
対照	27/28 (96%)
抗CD8全長Mab	8/8 (100%)
抗CD4全長Mab	8/20 (40%)
抗CD4・scFv	16/23 (70%)

【 0 1 3 7 】

s c F v の局所投与は病気誘導の当日に開始し 28 日間続行する。両実験において、メラニンで免疫した後、特定の時点で幾匹かの動物を屠殺し、組織学及び免疫組織化学用に眼を摘出し、細胞浸潤物の組成及びそれが治療により変化したか否かを決定する。どちらかが s c F v が有意にブドウ膜炎の発症率を低下させることを示すときは、メラニンでさらに免疫することにより病気の再誘導を試み、無応答性が誘導されたか否かを決定することになる。本発明者らは、細胞及び発赤が後眼房に観察された第一日目、及びその後五日間毎日 s c F v を投与することにより既存の病気に対する治療効果を試験することになる。細隙灯でラットの経過を追いつかの眼を組織学用に採取することになる。

【 実施例 5 】

【 0 1 3 8 】

実施例 5

s c F v による角膜同種異系移植片拒絶の調節

W F から F 3 4 4 への同種異系移植における角膜移植拒絶の予防において C D 4、C D 5 4、I L - 2 R、C D 2 8、C D 8 0 及び C D 8 6 に対する s c F v の有効性が試験される。補助的刺激分子 (co-stimulatory molecule) の C D 8 0 及び C D 8 6 に対して、s c F v の混液が使用される。対照には、無治療のラット、関連する特異性をもたない s c F v による治療、抗 C D 8 ・ s c F v による治療、及び全長の抗体による治療を受けるラットが含まれる。少数の同種同系移植が毒性又は他の副作用を確認するために実施される。全長の抗体に関して有効であることが知られている実験計画を用いて全身投与を試験する。移植の 3 日前、当日、3、5、及び 7 日後にラットに腹腔内注射する。インビボでの効果に必要な工学断片量の見積りは、s c F v 活性の滴定とともに、同様な効果に必要な全長の抗体量に基づいて予備実験で確立する。次いで、拒絶開始を防止する能力 (移植の日から 28 日間毎日該移植片に直接適用する) 及び進行中の拒絶反応を治療する能力 (角膜の血管が移植片 - 宿主接合部を最初に交差した第一日目から又は前部節の炎症の兆候が観察された日から、どちらが最初に起ころうと 5 日間毎日直接適用する) について、s c F v を局所的に試験する。移植後特定の時点で幾匹かの動物を屠殺し、組織学用及び免

疫組織化学用に眼を摘出し任意の細胞浸潤物の組成を決定する。

【 0 1 3 9 】

上述したように約 0 . 2 m g / m L で全身投与された場合、ラットの C D 4 に対する全長のモノクローナル抗体は、下記の表 2 及びアイリフェら (1992, Brit J Ophthalmol 76 : 602-6) 及びヒーら (1991, Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 2723-8) に示されるように角膜移植片の生存を延長できる。

【 0 1 4 0 】

表 2

抗体	移植片生存 (日)
対照	13, 14, 17, 23
W3/25	9, 12, 20, >100
OX35 + OX38	29, 29, >100, >100

10

【実施例 6】

【 0 1 4 1 】

実施例 6

抗体断片によるヘルペス性角膜炎の診断及び治療

間質のヘルペス性角膜炎に対する治療薬としての s c F v の可能性を調べるために、病気の壊死モデル及び再発性モデルの両方を用いる。マウスに、目薬として s c F v (抗 - C D 4、C D 8、C D 1 1 b / c、I L - 2 R 又は H S V g p D 抗原) 又は関係のある特異性をもたない s c F v を、毎日 1 滴ずつ四回、局所適用する。追加の対照群には、0 . 5 % の眼科用燐酸プレドニソロン及び 3 % のアシクロビル眼科用軟膏 (ゾビラックス、グラクソ - ウェルカム) を局所的に毎日四回与える。壊死病の動物は接種後 1 4 日から 2 1 日まで治療し、再発性の動物は再活性化後 2 日から 4 日まで治療する。s c F v の全身投与も調査する。有効性は細隙灯で臨床的に測定し、終点の免疫組織化学及び組織学により白血球の湿潤物の組成を決定する。診断目的で、H S V g p D に対する s c F v をフルオレセインに結合する。フルオレセインは局所的な眼科用調製物で既に使用されている蛍光色素で、細隙灯で青の光源を用いて容易に視覚化できる。蛍光色素で標識化された s c F v を目薬として感染した角膜に投与した後、本発明者らは、直接的試験によりそして青色フィルターを備えた細隙灯の写真撮影によりインサイチュで角膜内におけるウイルス抗原の存在を検出することを試みる。壊死する H S V 角膜炎モデルにおいて、s c F v による迅速診断の可能性が接種後三週間目に調べられる。再発性の角膜炎モデルにおいて、再活性化後 3 日目に目薬を与える。直接的試験の結果は組織病理学及びウイルス培養の結果と相関する。

20

30

【実施例 7】

【 0 1 4 2 】

実施例 7

抗体断片によるアカントアメーバ角膜炎の診断及び治療

栄養型及び嚢の両方の表面上に存在することが知られている 4 0 k D a のタンパク質に対する蛍光色素標識された s c F v 及び二量化断片が作製される。適切な I g G ハイブリドーマを A T C C から入手する。ポートン・ラットに、アカントアメーバ・キャストラン・ネフを接種し、その 4、7 又は 1 0 日後に s c F v の目薬を与える。この段階で、これらの角膜は、それぞれ、大半が栄養型、栄養型と嚢、又は大半が嚢である。毎日、種々の濃度の該結合 s c F v を含む目薬を与え、細隙灯を用いて眼を調べ写真を撮影する。その後、動物を屠殺し組織学用に眼を処理する。これによって病理学と細隙灯の観察とを相関づけることができる。断片の潜在的な治療用途を調べるため、感染したラットに接種 6 日後から 1 0 日後にかけて毎時間非結合二量体断片を用いて局所的に治療する。他のラットには、対照の断片のみ、又はアメーバ角膜炎の現在の第一選択の治療であるプロパミジンとポリヘキサメチレンピグアニドの組合わせを与える。治療効果は臨床評点、組織病理学

40

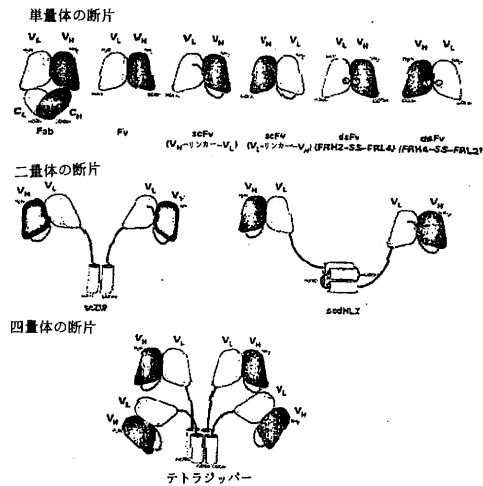
50

、及びホモジナイズされた角膜の限界希釈による生存アメーバの定量により評価される。

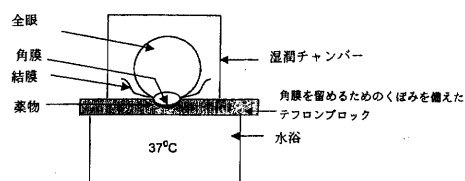
【 0 1 4 3 】

本明細書を通して、目的は、本発明を任意の一実施態様又は特定性質の集合に限定することなく本発明の好ましい実施態様を記載することであった。従って、当業者は、本開示に照らし、本発明の範囲を逸脱することなく例示した特定の実施態様に種々の修飾及び変更が施され得ることを理解するであろう。このような全ての修飾及び変更は添付の請求の範囲内に含まれることが意図される。

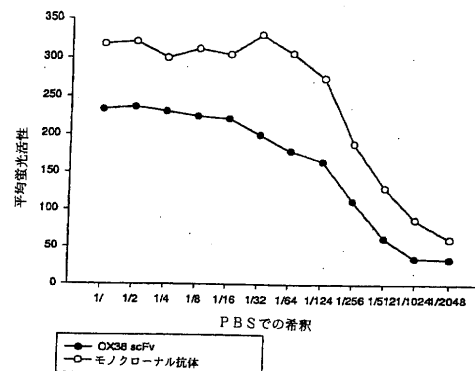
【 図 1 】



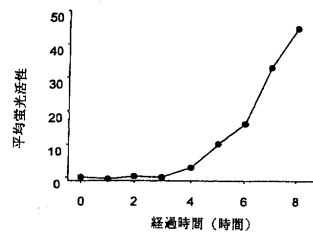
【 図 3 】



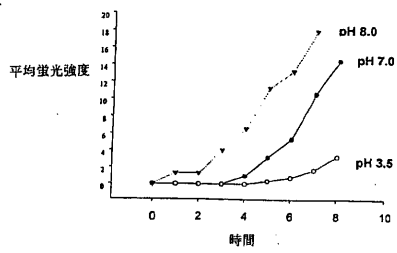
【 図 4 】



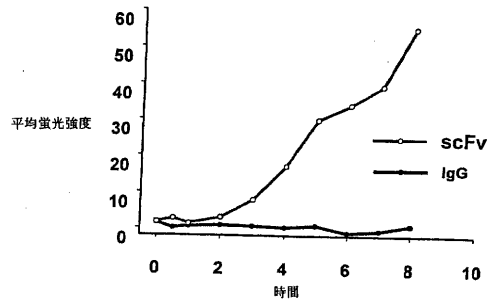
【 図 5 】



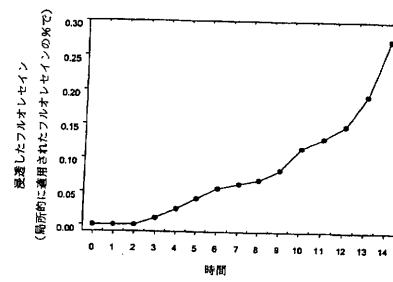
【図 6】



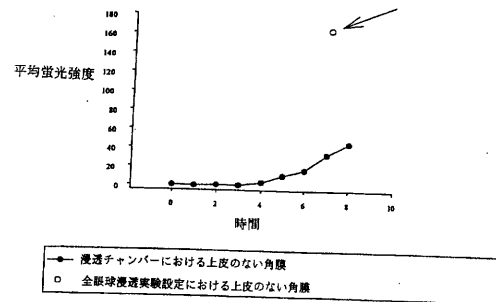
【図 7】



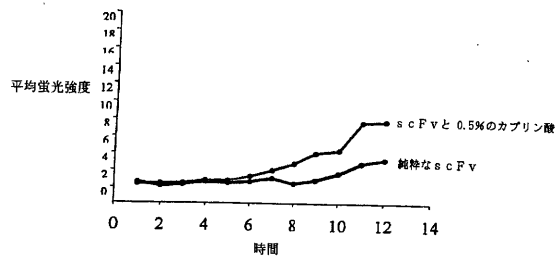
【図 8】



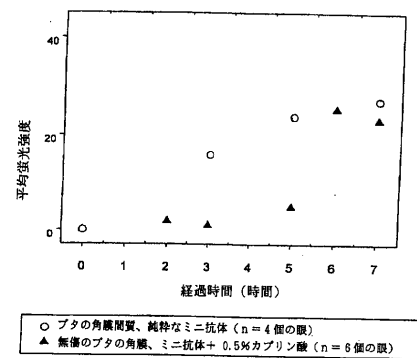
【図 9】



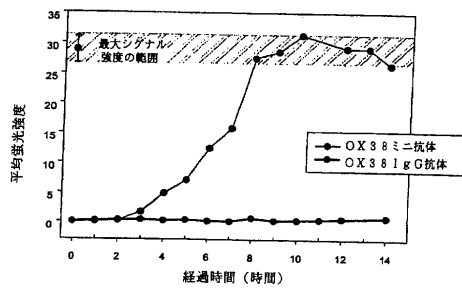
【図 10】



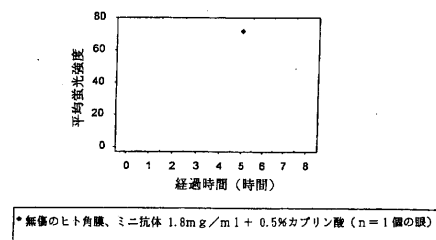
【図 12】



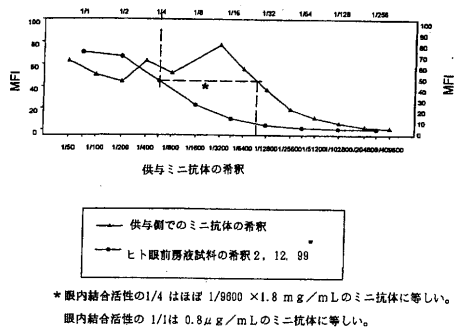
【図 11】



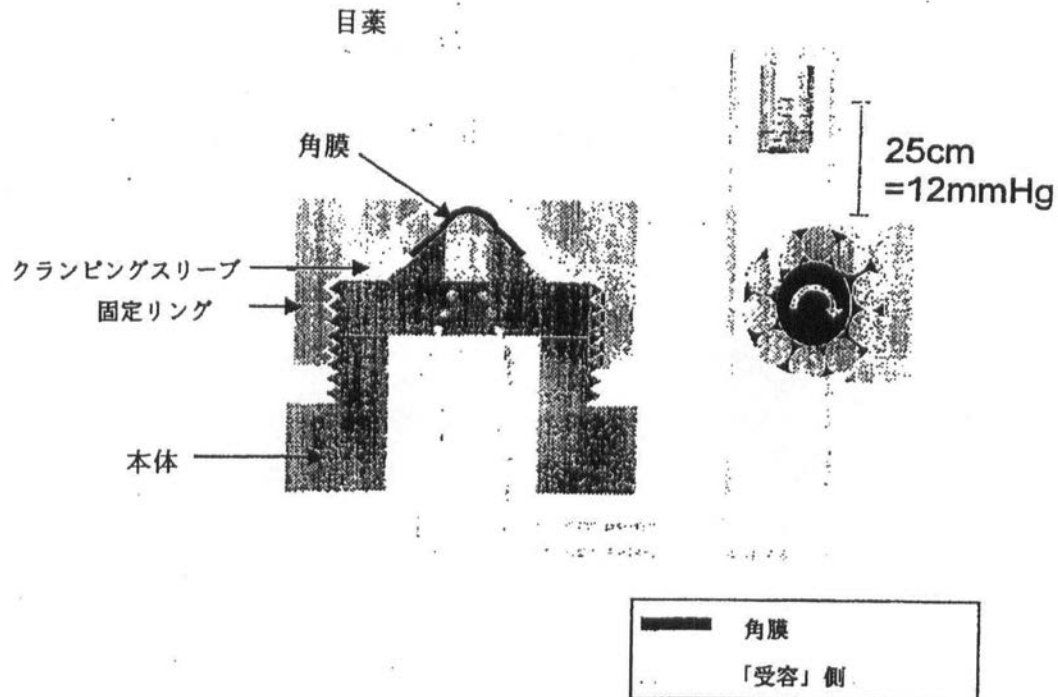
【図 13】



【図 1 4】



【図 2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
	A 6 1 K 47/48	
(72)発明者 シール, マイケル, アレキサンダー		
オーストラリア国、サウス オーストラリア 5 0 4 8、ホーヴ、キーズ コート 1 エイ番地		
(72)発明者 ソラ, ヘディ		
オーストラリア国、サウス オーストラリア 5 0 4 9、シークリフ、ワラター ストリート 1 5 ビー番地		
(72)発明者 コスター, ダグラス, ジョン		
オーストラリア国、サウス オーストラリア 5 0 6 8、ヒースプール、ニューカースル ストリート 3 番地		
(72)発明者 ウイリアムズ, ケリー, アン		
オーストラリア国、サウス オーストラリア 5 0 6 2、キングズウッド、イースト パレード 1 7 番地		
F ターム(参考) 4C076 AA09 AA12 BB24 CC10 CC41 EE23 EE59 FF31 FF34		
4C085 AA13 BB44 EE01 GG10		

专利名称(译)	用于治疗 and 诊断眼病的新型药物和方法		
公开(公告)号	JP2013256541A	公开(公告)日	2013-12-26
申请号	JP2013208202	申请日	2013-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	南澳大利亚的弗林德斯大学		
申请(专利权)人(译)	南澳大利亚的弗林德斯大学		
[标]发明人	シールマイケルアレキサンダー ゾラヘディ コスターダグラスジョン ウィリアムズケリーアン		
发明人	シール,マイケル,アレキサンダー ゾラ,ヘディ コスター,ダグラス,ジョン ウィリアムズ,ケリー,アン		
IPC分类号	A61K39/395 A61K47/12 A61K47/20 A61K47/22 A61K47/42 A61P27/02 A61K47/34 A61K47/48 G01N33/50 A61K9/38 A61K47/06 A61K47/18 A61K47/28 A61K49/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/28 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 C07K16/28 C07K16/2812 C07K2317/53 C07K2317/622 C07K2317/624		
FI分类号	A61K39/395.Y A61K39/395.D A61K47/12 A61K47/20 A61K47/22 A61K47/42 A61P27/02 A61K47/34 A61K47/48 A61K47/50 A61K47/54 A61K47/60		
F-TERM分类号	4C076/AA09 4C076/AA12 4C076/BB24 4C076/CC10 4C076/CC41 4C076/EE23 4C076/EE59 4C076/FF31 4C076/FF34 4C085/AA13 4C085/BB44 4C085/EE01 4C085/GG10		
优先权	1999PP8033 1999-01-05 AU 1999PQ3305 1999-10-07 AU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种治疗眼病的方法，包括给需要这种治疗的患者施用有效量的亚免疫球蛋白抗原结合分子，其与与该病症相关的靶抗原免疫相互作用。本发明还涉及包含该亚免疫球蛋白抗原结合分子的组合物和使用这种分子诊断眼病的方法。

表 2

抗体	移植片生存 (日)
对照	13, 14, 17, 23
W3/25	9, 12, 20, >100
OX35 + OX38	29, 29, >100, >100