

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5810413号

(P5810413)

(45) 発行日 平成27年11月11日(2015.11.11)

(24) 登録日 平成27年10月2日(2015.10.2)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46

C O 7 K 16/18 (2006.01)

C O 7 K 16/18

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 25 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-541231 (P2011-541231)
 (86) (22) 出願日 平成21年12月21日(2009.12.21)
 (65) 公表番号 特表2012-512634 (P2012-512634A)
 (43) 公表日 平成24年6月7日(2012.6.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/009186
 (87) 国際公開番号 W02010/069603
 (87) 国際公開日 平成22年6月24日(2010.6.24)
 審査請求日 平成24年12月20日(2012.12.20)
 (31) 優先権主張番号 08022188.0
 (32) 優先日 平成20年12月19日(2008.12.19)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/139, 253
 (32) 優先日 平成20年12月19日(2008.12.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 511148880
 バイオジェン インターナショナル ニュ
 ーロサイエンス ゲーエムベーハー
 スイス国 ツェーハー 8 9 5 2 シュリ
 ーレン, ヴァギシュトラーセ 1 3
 (73) 特許権者 507324681
 ユニバーシティ・オブ・チューリッヒ
 UNIVERSITY OF ZURIC
 H
 スイス国、ツェーハー 8 0 0 6 チュー
 リッヒ、レーミシュトラーセ 7 1、プロ
 レクトラート・フォルシュンク
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト抗アルファシヌクレイン自己抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 9 の残基 3 1 ~ 3 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 ; 配列番号 9 の残基 5 0 ~ 6 8 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2 ; 配列番号 9 の残基 1 0 1 ~ 1 0 2 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 ; 配列番号 1 2 の残基 2 3 ~ 3 3 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 ; 配列番号 1 2 の残基 4 9 ~ 5 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2 ; および配列番号 1 2 の残基 8 8 ~ 9 8 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 ; を含む、ヒトモノクローナル抗 α シヌクレイン抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント。

【請求項 2】

直接 E L I S A アッセイで高密度被覆された α シヌクレインに優先的に結合し得る、請求項 1 に記載のヒトモノクローナル抗 α シヌクレイン抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のヒトモノクローナル抗 α シヌクレイン抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントであって、

(i) 天然モノマー型の α シヌクレインに特異的に結合する能力がある ;

(i i) 天然モノマー型の α シヌクレインと比較して、オリゴマー型または凝集型の α シヌクレインに優先的に結合する能力がある ;

(i i i) β シヌクレインまたは γ シヌクレインと比較して、 α シヌクレインに特異的

に結合する能力がある；および

(iv) α シヌクレインのN末端₁₋₆₀フラグメントに特異的に結合する能力があるが、アミノ酸1～20、21～40、41～60、11～30または31～50からなる α シヌクレインフラグメントにほとんど結合することができない；ヒトモノクローナル抗 α シヌクレイン抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント。

【請求項4】

請求項1に記載のヒトモノクローナル抗 α シヌクレイン抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントであって、ヒト α シヌクレインA53T遺伝子導入マウスにおいて運動能力または高架十字迷路行動を改善する能力がある、ヒトモノクローナル抗 α シヌクレイン抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント。

10

【請求項5】

請求項1に記載のヒトモノクローナル抗 α シヌクレイン抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントであって、ヒト α シヌクレインA53T遺伝子導入マウスにおいてヒト α シヌクレインA53Tの血漿レベルの上昇を誘導する能力がある、ヒトモノクローナル抗 α シヌクレイン抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント。

【請求項6】

VH領域およびVL領域を含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントであって、該VH領域は、配列番号9および10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、該VL領域は、配列番号12および13からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント。

20

【請求項7】

α シヌクレインへの特異結合について請求項6に記載の抗体と競合する、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであって、該モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、

配列番号9の残基31～35のアミノ酸配列を含むVH CDR1；配列番号9の残基50～68のアミノ酸配列を含むVH CDR2；配列番号9の残基101～102のアミノ酸配列を含むVH CDR3；配列番号12の残基23～33のアミノ酸配列を含むVL CDR1；配列番号12の残基49～55のアミノ酸配列を含むVL CDR2；および配列番号12の残基88～98のアミノ酸配列を含むVL CDR3；

30

を含む、

モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項9】

請求項8に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項10】

請求項9に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。

【請求項11】

40

抗 α シヌクレイン抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントを調製するための方法であって、該方法は、

(a) 請求項10に記載の細胞を培養することであって、該細胞はヒトの中では培養されないことと、

(b) 該抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントを該培養物から単離することと、を含む、方法。

【請求項12】

請求項8に記載のポリヌクレオチドによってコードされるか、または請求項11に記載の方法によって入手される、抗 α シヌクレイン抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント。

50

【請求項 1 3】

請求項 1 ～ 7 および 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントであって、該抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントは、

(i) 検出可能に標識化されており、該検出可能な標識が、酵素、放射性同位元素、蛍光色素分子、および重金属から成る群から選択されるか、または

(i i) 薬物に付着されている、

抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント。

【請求項 1 4】

請求項 1 ～ 7、1 2 および 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント、請求項 8 に記載のポリヌクレオチド、請求項 9 に記載のベクター、または請求項 1 0 に記載の細胞を含む、組成物であって、該組成物は、

(i) 薬学的に許容される担体をさらに含む薬学的組成物；または

(i i) 1 以上の免疫または核酸ベースの診断試薬をさらに含む診断用組成物；

である、組成物。

【請求項 1 5】

対象におけるシヌクレイノパチー疾患を治療または予防するための医薬の調製における抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントの使用であって、該シヌクレイノパチー疾患は、パーキンソン病 (P D)、パーキンソン病認知症 (P D D)、レビー小体を伴う認知症 (D L B)、アルツハイマー病のレビー小体変異型 (L B V A D)、多系統萎縮症 (M S A)、純粋自律神経不全症 (P A F)、脳鉄蓄積 1 型を伴う神経変性 (N B I A - I)、アルツハイマー病、ピック病、若年発症全身性神経軸索ジストロフィー (ハラーフォルデンシュパッツ病)、筋萎縮性側索硬化症、外傷性脳損傷、およびダウン症から成る群から選択され、

該モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、V H 領域および V L 領域を含み、該 V H 領域は、配列番号 9 および 1 0 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、該 V L 領域は配列番号 1 2 および 1 3 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、使用。

【請求項 1 6】

シヌクレイノパチー疾患の診断のためのキットであって、該キットは、試薬および / もしくは使用説明書を伴って、請求項 1 ～ 7、1 2 および 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその α シヌクレイン結合フラグメント、請求項 8 に記載のポリヌクレオチド、請求項 9 に記載のベクター、または請求項 1 0 に記載の細胞を含む、キット。

【請求項 1 7】

ヒトまたは動物体において、 α シヌクレインをインビボで検出するため、または治療薬および / もしくは診断薬を α シヌクレインに標的化するための医薬の調製のための、治療薬または診断薬に結合された、請求項 1 ～ 7、1 2 および 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントの使用であって、 α シヌクレインが、陽電子放出断層撮影 (P E T)、単一光子放出断層撮影 (S P E C T)、近赤外 (N I R) 光学的画像法、磁気共鳴画像法 (M R I) またはその組み合わせによって検出される、使用。

【請求項 1 8】

対象におけるシヌクレイノパチー疾患を治療または予防するための組成物であって、該組成物は抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントを含み、該シヌクレイノパチー疾患は、パーキンソン病 (P D)、パーキンソン病認知症 (P D D)、レビー小体を伴う認知症 (D L B)、アルツハイマー病のレビー小体変異型 (L B V A D)、多系統萎縮症 (M S A)、純粋自律神経不全症 (P A F)、脳鉄蓄積 1 型を伴う神経変性 (N B I A - I)、アルツハイマー病、ピック病、若年発症全身性神経軸索ジストロフィー (ハラーフォルデンシュパッツ病)、筋萎縮性側索硬化症、外傷性脳損傷、およびダウン症から成る群から選択され、

10

20

30

40

50

該モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、V H領域およびV L領域を含み、該V H領域は、配列番号9および10からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、該V L領域は配列番号12および13からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、組成物。

【請求項19】

ヒトまたは動物体において、 α シヌクレインをインビボで検出するため、または治療薬および/もしくは診断薬を α シヌクレインに標的化するための組成物であって、治療薬または診断薬に結合された、請求項1～7、12および13のいずれか1項に記載の抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントを含み、 α シヌクレインが、陽電子放出断層撮影(PET)、単一光子放出断層撮影(SPECT)、近赤外(NIR)光学的画像法、磁気共鳴画像法(MRI)またはその組み合わせによって検出される、組成物。

10

【請求項20】

対象におけるシヌクレイノパチー疾患の進行をモニターおよび診断するための、請求項1～7、12および13のいずれか1項に記載の抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントを含む組成物であって、該シヌクレイノパチー疾患は、パーキンソン病(PD)、パーキンソン病認知症(PDD)、レビー小体を伴う認知症(DLB)、アルツハイマー病のレビー小体変異型(LBV AD)、多系統萎縮症(MSA)、純粋自律神経不全症(PAF)、脳鉄蓄積1型を伴う神経変性(NBIA-I)、アルツハイマー病、ピック病、若年発症全身性神経軸索ジストロフィー(ハラーフォルデンシュパッツ病)、筋萎縮性側索硬化症、外傷性脳損傷、およびダウン症から成る群から選択される、組成物。

20

【請求項21】

パーキンソン病の処置において使用するための薬学的組成物であって、請求項1～7、12および13のいずれか1項に記載の抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、組成物。

【請求項22】

パーキンソン病の処置のための医薬の製造における、請求項1～7、12および13のいずれか1項に記載の抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメントの使用。

【請求項23】

パーキンソン病の処置のための医薬の製造における請求項21に記載の組成物の使用。

30

【請求項24】

パーキンソン病の処置のための医薬の製造における、配列番号10に示されるアミノ酸配列を含むV H領域と、配列番号13に示されるアミノ酸配列を含むV L領域とを含む抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント、の使用。

【請求項25】

前記V H領域が配列番号10に示されるアミノ酸配列を含み、前記V L領域が配列番号13に示されるアミノ酸配列を含む、請求項6に記載の抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

発明の分野

本発明は、概して、新規 α シヌクレイン特異結合分子、特にヒト抗体、ならびにそれぞれ、 α シヌクレインおよび α シヌクレインの凝集型を認識するそのフラグメント、誘導体、および変異体に関する。加えて、本発明は、血漿およびCSFにおける α シヌクレインの有毒種を特定するための診断用手段として、またパーキンソン病(PD)、レビー小体を伴う認知症(DLB)、およびアルツハイマー病のレビー小体変異型(AD)、ならびに他のシヌクレイノパチー疾患等の α シヌクレインの凝集体に関連する疾患を治療するための受動的ワクチン接種戦略においての両方で有益である、そのような結合分子、抗体、およびその模倣物を含む薬学的および診断用組成物に関する。

50

【背景技術】

【0002】

発明の背景

タンパク質ミスフォールディングおよび凝集は、多数の神経変性疾患の病理学的側面である。αシヌクレインの凝集体は、パーキンソン病（PD）と関連するレビー小体およびレビー神経突起の主要な成分である。天然ではフォールドされていないタンパク質、αシヌクレインは、オリゴマー、前原線維、および原線維を含む異なる凝集形態を採択することができる。小さいオリゴマー凝集体は、特に有毒であると示されている。

【0003】

αシヌクレインに対する自然発生自己抗体が、健常人において検出されており、患者におけるレベルの変化は、特定の神経変性疾患と関連付けられた。総説として、非特許文献1を参照されたい。したがって、特に健常患者において、自然発症的に、またはワクチン接種時のどちらか一方で、パーキンソン病に罹患する患者の自然発生抗体は、シヌクレイン凝集に対して保護的役割を果たし得る。例えば、非特許文献2および非特許文献3を参照されたい。これまで、自己抗体の治療的有意性を評価するのが困難であった。これは主に、インビトロでのそれらの単離およびその後の特徴付けのための率直な実験的アプローチの欠如による。

【0004】

近年、αシヌクレインのオリゴマー種は、血漿およびCSF中の細胞外で報告されており（非特許文献4）、PDのマウスモデルにおける免疫研究は、αシヌクレインに対する細胞外のマウスモノクローナル抗体が、細胞内のαシヌクレイン凝集体の蓄積を減少させることができ（非特許文献5）、モノマーαシヌクレインの有益な機能を妨害することなく、神経毒性凝集体を中和する抗体が有用な治療であり得るという考えを支持する。しかしながら、ヒトにおけるマウススペースの抗体の治療的有用性は、それらの非ヒト起源を考慮して、ヒト抗マウス抗体（HAMA）反応によって妨害される。

【0005】

非特許文献6は、αシヌクレインに対するヒト配列に基づくファージディスプレイ抗体ライブラリからの単鎖抗体フラグメント（scFv）の単離を説明しており、これは、αシヌクレインのオリゴマー型にのみ結合し、インビトロでαシヌクレインの凝集および毒性の両方を阻害するものである。しかしながら、ファージディスプレイからのscFvの産生はむしろ簡単であるが、そのように産生される抗体が、自己抗原に対する望まれない交差反応性の危険性を有し、ヒト免疫システムから産生される進化的最適化天然ヒト抗体の特性を欠くので、この手法は深刻な弱点を有する。さらに、そのような抗体は、通常の生理環境および機能を有する背景において、他のタンパク質および/または標的タンパク質との交差反応性のせいで、十分に特異的ではないかもしれない。パーキンソン病が発症した場合、例えば、αシヌクレインの生理学的誘導体とも交差反応する抗体は、生理学的標的構造の正常な機能に関連する副作用を引き起こす潜在性を有する。この点において、望まれない自己免疫疾患が徹底的に誘発され、これは、変異体形態で生理学的に発生もするタンパク質構造を採用する能動免疫実験の概念設計においても、ほぼ計算不可能な危険性である。

【0006】

より最近になって、非特許文献7は、異なる免疫グロブリン溶液および単一供血者の試料からの親和性クロマトグラフィーを介する抗αシヌクレインポリクローナル自己抗体の単離を報告した。しかしながら、このアプローチが所望の抗体のほんの限られた量を提供するという事実に加えて、ポリクローナル抗体は、例えば、それらの不均一性、および望まれない副作用を有する他のαシヌクレイン関連分子で汚染されている危険性のせいで、治療的適用に対しては、わずかに限定的な有用性しか持たない。同様に、抗体の組成物の可変性が、全体の特異性および反応性に影響を与えるため、ポリクローナル抗体の診断価値は減少する。これら全ては、ミスフォールディングによる凝集および沈着の対象であるタンパク質に対する抗体により当てはまる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Neff et al., Autoimmun. Rev. 7 (2008), 501-507

【非特許文献2】Woulfe et al., Neurology 58 (2002), 1435-1436

【非特許文献3】Papachroni et al., J. Neurochem. 101 (2007), 749-756

【非特許文献4】El-Agnaf et al., FASEB J. 20 (2006), 419-425 10

【非特許文献5】Masliah et al., Neuron, 46 (2005), 857-868

【非特許文献6】Emadiら, J. Mol. Biol. 368 (2007), 1132-1144

【非特許文献7】Seitzら, 81. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie Hamburg 10. - 13. 09. 2008

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0008】

したがって、上述の制限を打開し、 α シヌクレインに対する治療的および診断的ヒト抗体を提供する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の開示

本発明は、天然 α シヌクレイン特異的ヒトモノクローナル抗体の単離のために、高齢の健常対照対象および神経疾患を有する患者の α シヌクレイン特異的免疫反応を利用する。特に、本発明に従って実行された実験は、パーキンソン症の徴候のない高齢対象の集団からの、 α シヌクレインに対して特異的なモノクローナル抗体の単離に成功した。 30

【0010】

本発明は、したがって、ヒト抗体、抗原結合フラグメント、および α シヌクレインを特異的に認識することができる同様の抗原結合分子を対象とする。「 α シヌクレインを特異的に認識する」、「 α シヌクレインにノに対して特異的な抗体」、および「抗 α シヌクレイン抗体」とは、具体的に、一般的に、および集合的に、 α シヌクレインの天然型に対する、またはミスフォールドもしくはオリゴマーもしくは凝集もしくは翻訳後に修飾された α シヌクレインに対する抗体を指す。天然モノマー、全長型、切り詰め型、および凝集型に対して選択的なヒト抗体が本明細書にて提供される。

【0011】

本発明の特に好ましい実施形態では、ヒト抗体またはその抗原結合フラグメントは、図1に説明される、可変領域 V_H およびノまたは V_L に特徴付けられる抗体の免疫学的結合特性を実証する。 40

【0012】

抗体の抗原結合フラグメントは、単鎖 F_v フラグメント、 $F(ab')$ フラグメント、 $F(ab)$ フラグメント、および $F(ab')_2$ フラグメント、または任意の他の抗原結合フラグメントであり得る。以下の特定の実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、ヒトIgGイソタイプ抗体である。あるいは、抗体は、キメラヒトマウスまたはマウス化抗体であり、後者は、動物における診断法および研究に特に有用である。

【0013】

さらに、本発明は、本発明の抗体もしくはその活性フラグメント、またはアゴニストお 50

よび同種分子、あるいは、同一のアンタゴニストを含む組成物、ならびにシヌクレイノパチー疾患の予防、診断、もしくは治療においてそのような組成物を使用する免疫治療的および免疫診断法に関し、組成物の有効量がそれを必要とする患者に投与される。

【0014】

当然ながら、本発明は、不死化ヒトBメモリーリンパ球およびB細胞に及び、それぞれ、以下に定義される明確に異なり、独特の特性を有する抗体を産生する。

【0015】

本発明はまた、本発明の抗体の免疫グロブリン鎖の少なくとも可変領域をコードするポリヌクレオチドにも関する。好ましくは、該可変領域は、図1に示す、可変領域の V_H および/または V_L の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含む。

10

【0016】

したがって、本発明はまた、該ポリヌクレオチドを含むベクターおよびそれで形質転換される宿主細胞、ならびに α シヌクレインに対して特異的な抗体および同等の結合分子の産生のためのそれらの使用を包含する。抗体およびその模倣物の組換え産生のための手段および方法、ならびに抗体であってもなくてもよい競合する結合分子をスクリーニングする方法は、当技術分野で知られている。しかしながら、本明細書に説明されるように、特にヒトでの治療適用に関して、本発明の抗体は、該抗体の適用が、さもなければキメラおよびさらにはヒト化抗体に観察されるHAMMA反応を実質的に示さないという意味において、ヒト抗体である。

【0017】

20

さらに、試料中の α シヌクレインを特定するために使用することができる組成物および方法が、本明細書に開示される。開示される抗 α シヌクレイン抗体は、例えば、ELISAベースまたは表面適応アッセイを使用することによって、試料中の α シヌクレインの存在に関して、ヒト血液、CSF、および尿をスクリーニングするために使用することができる。本明細書に開示される方法および組成物は、パーキンソン病診断等のシヌクレイノパチー疾患に役立ち、疾患の進行および治療の有効性を監視するために使用することができる。

【0018】

実施例4に実証されるように、本発明の抗 α シヌクレイン抗体は、パーキンソン病の遺伝子導入マウスモデルにおける運動能力および高架十字迷路行動を改善することができる。これらの結果は、本発明のヒト由来抗 α シヌクレイン抗体の予期される治療的価値を確認する。

30

【0019】

ゆえに、パーキンソン病(PD)、パーキンソン病認知症(PDD)、レビー小体を伴う認知症(DLB)、アルツハイマー病のレビー小体変異型(LBVA)、多系統萎縮症(MSA)、純粋自律神経不全症(PAF)、脳鉄蓄積1型を伴う神経変性(NBIA-I)、アルツハイマー病、ピック病、若年発症全身性神経軸索ジストロフィー(ハラーフォルデンシュパッツ)、筋萎縮性側索硬化症、外傷性脳損傷、およびダウン症等のシヌクレイノパチー疾患を治療または予防するための方法を提供することが、本発明の特別な目的である。方法は、抗体が α シヌクレインを標的とする対象に、ヒト抗体または抗体誘導体の有効濃度を投与することを含む。

40

【0020】

本発明のさらなる実施形態は、以下の記述および実施例から明らかとなる。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

ヒトモノクローナル抗 α シヌクレイン抗体。

(項目2)

天然モノマー型の α シヌクレインに特異的に結合する能力がある、項目1に記載の抗体

。

(項目3)

50

オリゴマー型または凝集型の α シヌクレインに結合する能力がある、項目 1 または 2 に記載の抗体。

(項目 4)

前記抗体は、 β シヌクレインまたは γ シヌクレインと比較して、 α シヌクレインに特異的に結合する、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 5)

α シヌクレインの N 末端₁₋₆₀ フラグメントまたは C 末端₉₆₋₁₄₀ フラグメントを認識する、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 6)

α シヌクレインの切り詰め型を認識しない、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 7)

図 1 に示される少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) を可変領域に含む、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその α シヌクレイン結合フラグメント。

(項目 8)

図 1 に示される V_H および / または V_L 領域のアミノ酸配列を含む、項目 7 に記載の抗体または結合フラグメント。

(項目 9)

α シヌクレインへの特異結合のために、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体と競合する、抗体または抗原結合分子。

(項目 10)

キメラマウス / ヒト抗体またはマウス化抗体である、項目 9 に記載の抗体。

(項目 11)

単鎖 F_v フラグメント ($scFv$)、 $F(ab')$ フラグメント、 $F(ab)$ フラグメント、および $F(ab')$ ₂ フラグメントから成る群から選択される、項目 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 12)

少なくとも項目 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の抗体の免疫グロブリン鎖の結合ドメインまたは可変領域をコードする、ポリヌクレオチド。

(項目 13)

項目 12 に記載のポリヌクレオチドを含むベクターであって、前記抗体のもう一方の免疫グロブリン鎖の可変領域をコードする項目 12 に記載のポリヌクレオチドと任意で組み合わせられる、ベクター。

(項目 14)

項目 10 に記載のポリヌクレオチドまたは項目 13 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

(項目 15)

抗 α シヌクレイン抗体またはその免疫グロブリン鎖を調製するための方法であって、前記方法は、

(a) 項目 14 に記載の細胞を培養することと、

(b) 前記抗体またはその免疫グロブリン鎖を前記培養物から単離することと、を含む、方法。

(項目 16)

項目 12 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるか、または項目 15 に記載の方法によって入手可能である、抗体またはその免疫グロブリン鎖。

(項目 17)

検出可能に標識化される、項目 1 ~ 11 または 16 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 18)

前記検出可能な標識は、酵素、放射性同位元素、蛍光色素分子、および重金属から成る群から選択される、項目 17 に記載の抗体。

(項目 19)

10

20

30

40

50

薬物に付着される、項目 1 ~ 1 1 または 1 6 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 2 0)

項目 1 ~ 1 1 または 1 6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗体、項目 1 2 に記載のポリヌクレオチド、項目 1 3 に記載のベクター、または項目 1 4 に記載の細胞を含む、組成物。

(項目 2 1)

薬学的組成物であり、薬学的に許容される担体をさらに含む、項目 2 0 に記載の組成物。

(項目 2 2)

ワクチンである、項目 2 1 に記載の組成物。

(項目 2 3)

シヌクレイノパチー疾患を治療するのに有用な追加的薬剤をさらに含む、項目 2 1 または 2 2 に記載の薬学的組成物。

(項目 2 4)

診断用組成物であって、免疫または核酸ベースの診断法で慣習的に使用される試薬を任意で含む、項目 2 0 に記載の組成物。

(項目 2 5)

対象におけるシヌクレイノパチー疾患の進行またはシヌクレイノパチー疾患治療に対する応答を監視する、シヌクレイノパチー疾患の予防的および治療的治療のための薬学的組成物または診断用組成物の調製のための、項目 1 ~ 1 1 もしくは 1 6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗体、またはそれらのうちのいずれか 1 つと実質的に同一の結合特異性を有する α シヌクレイン結合分子、項目 1 2 に記載のポリヌクレオチド、項目 1 3 に記載のベクター、または項目 1 4 に記載の細胞の使用。

(項目 2 6)

対象において、シヌクレイノパチー疾患を診断する方法であって、前記方法は、

(a) 項目 1 ~ 1 1 または 1 6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗体、その α シヌクレイン結合フラグメント、またはそれらのうちのいずれか 1 つと実質的に同一の結合特異性を有する α シヌクレイン結合分子を用いて、診断される前記対象からの試料中の α シヌクレインのレベルを評価することと、

(b) 1 人以上の対照対象における前記 α シヌクレインの前記レベルを示す参照基準と、前記 α シヌクレインの前記レベルを比較することと、を含み、前記 α シヌクレインの前記レベルと前記参照基準との間の相違点または類似点は、前記対象がパーキンソン病を有することを示す、方法。

(項目 2 7)

前記シヌクレイノパチー疾患は、パーキンソン病 (PD)、パーキンソン病認知症 (PDD)、レビー小体を伴う認知症 (DLB)、アルツハイマー病のレビー小体変異型 (LBVAD)、多系統萎縮症 (MSA)、純粋自律神経不全症 (PAF)、脳鉄蓄積 1 型を伴う神経変性 (NBIA-I)、アルツハイマー病、ピック病、若年発症全身性神経軸索ジストロフィー (ハラールフォルデンシュパッツ病)、筋萎縮性側索硬化症、外傷性脳損傷、およびダウン症から成る群から選択される、項目 2 5 に記載の使用または項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

シヌクレイノパチー疾患の診断のためのキットであって、前記キットは、試薬および / もしくは使用説明書を任意で伴って、項目 1 ~ 1 1 もしくは 1 6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗体、またはそれらのうちのいずれか 1 つと実質的に同一の結合特異性を有するシヌクレイン結合分子、項目 1 2 に記載のポリヌクレオチド、項目 1 3 に記載のベクター、または項目 1 4 に記載の細胞を含む、キット。

(項目 2 9)

ヒトまたは動物体において、 α シヌクレインをインビボで検出するための、または治療薬および / もしくは診断薬を α シヌクレインに標的化するための組成物の調製のための、項目 1 ~ 1 1 または 1 6 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗体の少なくとも 1 つの CDR を

10

20

30

40

50

含む α シヌクレイン結合分子の使用。

(項目30)

前記インビボ画像法は、陽電子放出断層撮影(PET)、単一光子放出断層撮影(SPECT)、近赤外(NIR)、光学的画像法、または磁気共鳴画像法(MRI)を含む、
項目29に記載の使用。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1-1】可変領域のアミノ酸およびヌクレオチド配列、すなわち、ヒト抗体NI-202.3G12(A)、NI-202.12F4(B)、およびNI-202.3D8(C)の重鎖およびカッパ/ラムダ軽鎖。ヒト抗体NI-202.3D8に関して、2つの可変軽鎖配列VKa1(C)およびVKc1(D)はクローン化され、それらの各々は、可変重鎖配列VHE1(C)と対になり得る。フレームワーク(FR)および相補性決定領域(CDR)は、下線が引かれたCDRで示される。重鎖連結領域(JH)および軽鎖連結領域(JK)も同様に示される。クローン化戦略により、重鎖および軽鎖のN末端におけるアミノ酸配列は、FR1でプライマー誘発変形を潜在的に含有し得るが、それは抗体の生物活性に実質的に影響を及ぼさない。コンセンサスヒト抗体を提供するために、原クロンのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、データベースの関連のヒト生殖細胞系可変領域配列と整列し、それに従って調整され、例えば、MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK)によって主催されたVbase(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)を参照されたい。コンセンサス生殖細胞系配列から潜在的に逸脱すると見なされ、したがって、PCRプライマーによるものであり得るそれらのアミノ酸は、太字で示される。

【図1-2】可変領域のアミノ酸およびヌクレオチド配列、すなわち、ヒト抗体NI-202.3G12(A)、NI-202.12F4(B)、およびNI-202.3D8(C)の重鎖およびカッパ/ラムダ軽鎖。ヒト抗体NI-202.3D8に関して、2つの可変軽鎖配列VKa1(C)およびVKc1(D)はクローン化され、それらの各々は、可変重鎖配列VHE1(C)と対になり得る。フレームワーク(FR)および相補性決定領域(CDR)は、下線が引かれたCDRで示される。重鎖連結領域(JH)および軽鎖連結領域(JK)も同様に示される。クローン化戦略により、重鎖および軽鎖のN末端におけるアミノ酸配列は、FR1でプライマー誘発変形を潜在的に含有し得るが、それは抗体の生物活性に実質的に影響を及ぼさない。コンセンサスヒト抗体を提供するために、原クロンのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、データベースの関連のヒト生殖細胞系可変領域配列と整列し、それに従って調整され、例えば、MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK)によって主催されたVbase(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)を参照されたい。コンセンサス生殖細胞系配列から潜在的に逸脱すると見なされ、したがって、PCRプライマーによるものであり得るそれらのアミノ酸は、太字で示される。

【図1-3】可変領域のアミノ酸およびヌクレオチド配列、すなわち、ヒト抗体NI-202.3G12(A)、NI-202.12F4(B)、およびNI-202.3D8(C)の重鎖およびカッパ/ラムダ軽鎖。ヒト抗体NI-202.3D8に関して、2つの可変軽鎖配列VKa1(C)およびVKc1(D)はクローン化され、それらの各々は、可変重鎖配列VHE1(C)と対になり得る。フレームワーク(FR)および相補性決定領域(CDR)は、下線が引かれたCDRで示される。重鎖連結領域(JH)および軽鎖連結領域(JK)も同様に示される。クローン化戦略により、重鎖および軽鎖のN末端におけるアミノ酸配列は、FR1でプライマー誘発変形を潜在的に含有し得るが、それは抗体の生物活性に実質的に影響を及ぼさない。コンセンサスヒト抗体を提供するために、原クロンのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、データベースの関連のヒト生殖細胞系可変領域配列と整列し、それに従って調整され、例えば、MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK)によって主催されたVbase(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)

を参照されたい。コンセンサス生殖細胞系配列から潜在的に逸脱すると見なされ、したがって、PCRプライマーによるものであり得るそれらのアミノ酸は、太字で示される。

【図1-4】可変領域のアミノ酸およびヌクレオチド配列、すなわち、ヒト抗体NI-202.3G12(A)、NI-202.12F4(B)、およびNI-202.3D8(C)の重鎖およびカッパ/ラムダ軽鎖。ヒト抗体NI-202.3D8に関して、2つの可変軽鎖配列VKa1(C)およびVKc1(D)はクローン化され、それらの各々は、可変重鎖配列VHE1(C)と対になり得る。フレームワーク(FR)および相補性決定領域(CDR)は、下線が引かれたCDRで示される。重鎖連結領域(JH)および軽鎖連結領域(JK)も同様に示される。クローン化戦略により、重鎖および軽鎖のN末端におけるアミノ酸配列は、FR1でプライマー誘発変形を潜在的に含有し得るが、それは抗体の生物活性に実質的に影響を及ぼさない。コンセンサスヒト抗体を提供するために、原クローンのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、データベースの関連のヒト生殖細胞系可変領域配列と整列し、それに従って調整され、例えば、MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK)によって主催されたVbase(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)を参照されたい。コンセンサス生殖細胞系配列から潜在的に逸脱すると見なされ、したがって、PCRプライマーによるものであり得るそれらのアミノ酸は、太字で示される。

【図2】組換えヒトαシヌクレイン抗体は、明確に異なるエピトープを対象とする。組換え全長および切り詰め型αシヌクレインは、同等の被覆濃度(20 μg/ml)で、ELISAプレート上に被覆された。(A)組換えヒトαシヌクレイン抗体NI-202.3G12は、直接ELISAで全長αシヌクレインに結合するが、αシヌクレイン切り詰め型には結合せず、NI-202.3G12の構造認識エピトープを示す。(B)組換えNI-202.12F4は、直接ELISAにおいて、全長αシヌクレインおよびアミノ酸(aa)1-60を含有するαシヌクレイン切り詰め型に結合し、アルファシヌクレインのN末端両親媒性反復領域内のNI-202.12F4のエピトープを指す。(C)LB509抗体は、すでに決定されたエピトープ(aa115-122)を確認するC末端αシヌクレインフラグメントに結合する。値は、平均値±平均標準誤差(n=2-3)である。

【図3】組換えヒトαシヌクレイン抗体は、直接ELISAにおいてαシヌクレインに結合するが、βおよびγシヌクレインには結合しない。同等の被覆濃度(2 μg/ml)でELISAプレート上に被覆された組換えα、β、およびγシヌクレインは、組換えヒトαシヌクレイン抗体または汎シヌクレイン抗体とインキュベートされた。(A)後者は、3つ全てのシヌクレインタンパク質を検出し、組換えヒトαシヌクレイン抗体(B)NI-202.3G12および(C)NI-202.12F4(C)は、αシヌクレインに選択的に結合する。値は、平均値±平均標準誤差(n=2-3)である。

【図4】組換えヒトαシヌクレイン抗体NI-202.12F4は、ウエスタンブロット分析でαシヌクレインに結合するが、βおよびγシヌクレインには結合しない。組換えα、β、およびγシヌクレイン(各750 ng)を、SDS-PAGEに供し、その後、ウエスタンブロット分析に供した。(A)クーマシー染色は、SDS-PAGEで同等のタンパク質濃度を示す。(B)NI-202.12F4は、αシヌクレインと強く相互作用するが、ベータまたはガンマシヌクレインとは相互作用しない。(C)一次抗体なしではシグナルは検出されなかった。

【図5】(A)非遺伝子導入およびヒトアルファシヌクレイン遺伝子導入マウスからの脳抽出物のNI-202.12F4免疫ブロット分析は、ヒトαシヌクレインへの優先結合を示す。野生型およびヒトαシヌクレイン遺伝子導入マウスからの脳抽出物は、ヒト特異的αシヌクレイン抗体LB509、ヒトおよびマウスαシヌクレイン反応性抗体クローン42、ならびにNI-202.12F4を用いる免疫ブロット法で分析された。クローン42がマウスおよびヒトαシヌクレインに対応する顕著なバンドを検出する一方で、LB509およびNI-202.12F4は、ヒトαシヌクレインへの強い優先度を示す。(B)脳抽出物のNI-202.12F4免疫ブロット分析は、ヒトαシヌクレイン凝集体

への優先結合を示す。健常対照対象およびレビー小体を伴う認知症（DLB）患者からの皮質脳抽出物、ならびに野生型マウスおよびヒトA30P α シヌクレイン遺伝子導入マウスからの脳抽出物は、ウエスタンブロット法で分析された。NI-202.12F4は、DLBならびにA30P α シヌクレイン遺伝子導入脳抽出物における α シヌクレイン凝集体のオリゴマーおよび原線維型を高感度で検出する。最小結合が、ヒトまたは野生型マウス組織の α シヌクレインのモノマー型に対して観察され、および中程度の結合が、 α シヌクレインを非常に過剰発現するA30P α シヌクレイン遺伝子導入脳抽出物で観察される。対照的に、クローン42抗体は、高感度でモノマー型および α シヌクレインフラグメントを検出し、凝集 α シヌクレイン種に不十分に結合する。

【図6】組換えNI-202.12F4は、ヒト α シヌクレインの野生型および疾病を引き起こす変異体への高親和性結合を示す。組換え野生型（●）、A53T（■）、A30P（*）、およびE64K（○）ヒト α シヌクレインは、ELISAプレート上へ被覆され（2 μ g/mL）、様々な濃度のNI202.12F4で精査された。最大半量の有効濃度（EC50）は、野生型 α シヌクレインでは321 pM、A53Tでは293 pM、A30Pでは228 pM、およびE64K変異体ヒト α シヌクレインでは483 pMであった。

【図7】NI-202.12F4の免疫組織化学結合分析。NI-202.12F4は、ヒトA53T（A）またはA30P α シヌクレイン（B）を発現する遺伝子導入マウスからの浮遊切片、ならびにパーキンソン病（C）およびレビー小体を伴う認知症（D）のヒト脳組織において、レビー小体およびレビー神経突起様封入物、ならびに小さい細胞体樹状突起およびシナプス性 α シヌクレイン蓄積を含む、 α シヌクレイン病態の顕著な染色を示す。抗体Syn211は、ヒトA30P α シヌクレイン遺伝子導入マウスにおいて高感度で生理学的シナプス性 α シヌクレインを検出する（E）一方で、NI-202.12F4は、病理学的 α シヌクレイン凝集体（B）に優先的に結合する。NI-202.12F4の結合は、二次抗体のみの対照染色（G）と同様に、野生型マウス（F）の脳切片からは事実上不在である一方で、クローン42抗体は、マウス α シヌクレインタンパク質（H）の顕著なシナプス染色を示す。

【図8】組換えNI-202.12F4は、高密度被覆された α シヌクレインへの優先結合を示す。組換え全長または切り詰め型 α シヌクレインは、指示濃度でELISAプレート上に被覆され、直接ELISAによりNI-202.12F4またはSyn211抗体の様々な濃度で精査された（組換え全長または1-60 α シヌクレインの○20 μ g/mL、▲2 μ g/mL、▼1 μ g/mL、u250 ng/mL、□100 ng/mL被覆濃度）。抗体の力価を示す最大半量の有効濃度（EC50）が決定された。（A） α シヌクレインに対する組換えNI-202.12F4の高親和性結合は、 α シヌクレインタンパク質の高い被覆密度を必要とする。111 pMのEC50が、20 μ g/mL濃度で被覆された α シヌクレインに対して観察される一方で、EC50値は、被覆濃度の減少に従って急激に増加し、 α シヌクレインのより低い被覆濃度での親和性の目覚ましい低下を示している。これらの特徴は、 α シヌクレインの高い被覆濃度で優先的に形成されるNI-202.12F4の立体構造エピトープを示している。（B）Syn211の結合は、被覆濃度によって影響を及ぼされない。より低い被覆密度において、市販のSyn211抗体の親和性の減少は観察されず、EC50は α シヌクレインの被覆密度20 μ g/mLに対する335 pMから100 ng/mLに対する99 pMまでの範囲であり、線状非立体構造エピトープへの結合を示唆している。（C）アミノ酸1～60個を含むN末端 α シヌクレインフラグメントへの組換えNI-202.12F4の高親和性結合は、高い被覆密度を必要とする。NI-202.12F4は、全長ならびに切り詰め型 α シヌクレインに対して同等かつする被覆濃度依存的な結合を示し、 α シヌクレインタンパク質のアミノ酸1～60内に含有されるNI-202.12F4の立体構造エピトープへの結合を示す。（D） α シヌクレインのN末端の60個のアミノ酸に及ぶ、重複する20個のアミノ酸フラグメントを含むピオチン化ペプチドを、アビジンプレート上に被覆し、NI-202.12F4またはaa21～40内でエピトープを検出する汎シヌクレイン対照抗体で精査し

10

20

30

40

50

た。したがって、対照抗体は、ペプチド 21 ~ 40 に強力に結合し、ペプチド 11 ~ 30 および 31 ~ 50 により低い程度で結合する。対照的に、試験されたペプチドのいずれに対しても、NI - 202 . 12F4 の結合は観察されず、N 末端フラグメントはどれも、NI - 202 . 12F4 エピトープとして十分ではなく、より大きなフラグメントが、構造 NI - 202 . 12F4 エピトープの最適な結合および形成に必要とされ得ることを示唆している。

【図 9】NI - 202 . 12F4 を用いての慢性治療は、 α シヌクレイン A53T 遺伝子導入マウスにおける運動能力を改善する。10 . 5 月齢の α シヌクレイン A53T 遺伝子導入マウスを、NI - 202 . 12F4 または PBS で毎週治療した (5 mg / kg、腹腔内適用)。ポール試験で、2 ヶ月間の治療の後に運動能力を評価した。(A) NI - 202 . 12F4 で治療された動物は、下向きになるのに有意に少ない時間を必要とした (t - turn、 1.7 ± 0.3 対 4.6 ± 0.6 秒、 $p = 0.0002$ 、両側スチューデントの t 検定)。(B) NI - 202 . 12F4 で治療された動物はまた、ホームケージに下降するのに有意に少ない時間 (t - total) を使用した (7.3 ± 0.9 対 10.4 ± 0.7 秒、 $p = 0.012$ 、両側スチューデントの t 検定)。

【図 10】NI - 202 . 12F4 での α シヌクレイン A53T 遺伝子導入マウスの慢性治療は、高架十字迷路行動の回復に導く。10 . 5 月齢の α シヌクレイン A53T 遺伝子導入マウスを、5 mg / kg の NI - 202 . 12F4 または PBS で毎週腹腔内治療した。2 ヶ月間の治療の後、動物を高架十字迷路行動のために試験した。NI - 202 . 12F4 で治療された動物は、媒体治療された対照動物と比較して、壁のないアームにおいて有意に少ない時間を費やし、著しく低い距離に及び、正常な行動の回復を示した。

【図 11】NI - 202 . 12F4 での α シヌクレイン A53T 遺伝子導入マウスの慢性治療は、ヒト A53T α シヌクレインの血漿レベルの上昇をもたらす。5 mg / kg の NI - 202 . 12F4 または PBS で 2 ヶ月間、毎週腹腔内治療されていた 12 . 5 月齢の α シヌクレイン A53T 遺伝子導入マウスから、血漿試料を調製した。最終の適用の 24 時間後に血液を採取した。(A) 血漿における NI - 202 . 12F4 レベルを、直接 α シヌクレイン ELISA を使用して決定した。(B) 血漿におけるヒト A53T α シヌクレインレベルを、ヒト - 特異的 α シヌクレインサンドイッチ ELISA を使用して決定した。NI - 202 . 12F4 で治療された動物は、対照動物と比較して、血漿においてヒト α シヌクレインの著しく上昇したレベルを有する (24.9 ± 4.1 対 1.9 ± 1.2 ng / mL、 $p = 0.0002$)。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細記述

I . 定義

シヌクレイノパチー疾患またはシヌクレイン病は、神経細胞および膠細胞の選択的に脆弱性の集団での不溶性 α シヌクレインタンパク質の凝集体から成る、共通の病変を共有する神経変性疾患の多様な群である。これらの疾患は、パーキンソン病 (PD)、パーキンソン病認知症 (PDD)、レビー小体を伴う認知症 (DLB)、若年発症全身性神経軸索ジストロフィー (ハラーフォルデンシュパッツ)、純粹自律神経不全症 (PAF)、多系統萎縮症 (MSA)、および脳鉄蓄積 1 型を伴う神経変性 (NBI A - I) を含む。臨床的に、それらは、運動、認識、行動、ならびに自律機能の慢性および進行性の低下に特徴付けられ、病変の分布に依存する。

【0023】

パーキンソン病は、未知の病因を伴う年齢依存性神経変性疾患である。散発性パーキンソン病は、遺伝的脆弱性および環境障害の組み合わせに由来すると考えられる。異種機構によって誘発されたものであっても、パーキンソン病 (PD) は共有の病態生理学的経路に従うとさらに考えられる。1 つの共有の節点は、 α シヌクレインの関与である。パーキンソン病発病とのこのタンパク質の関連は、家族性症例における遺伝子の点突然変異および三倍体化の両方の特定、パーキンソン病の顕著な病理学的特徴の 1 つであるレビー小体

に対する α シヌクレインの局在性、ならびにパーキンソン病の神経毒性モデルにおける α シヌクレイン発現および疾病病理学の相関関係によって確立されている。さらなる証拠は、 α シヌクレインの特定の型（例えば、ミスフォールドした、および α シヌクレイン結合したドーパミン）が、散発性疾病に関与することを示す。

【0024】

シヌクレインは、神経組織およびある腫瘍で主に発現される小さい可溶性タンパク質である。ファミリーは、3つの知られているタンパク質： α シヌクレイン、 β シヌクレイン、および γ シヌクレインを含む。全てのシヌクレインは、交換可能なアポリポタンパク質のクラスA2脂質結合ドメインに対して類似性のある高度に保存された α 螺旋脂質結合モチーフを持つという共通点がある。シヌクレインファミリーメンバーは脊椎動物以外では見出されないが、それらは、植物の「後期胚豊富な」タンパク質とのある程度の保存構造類似性を有する。 α および β シヌクレインタンパク質は、主として脳組織内で見出され、その中では主にシナプス前末端で見られる。 γ シヌクレインタンパク質は、主として末梢神経系および網膜で見出されるが、乳房の腫瘍でのその発現は、腫瘍進行のマーカーである。正常な細胞機能は、シヌクレインタンパク質のいずれに対しても決定されていないが、ある資料は、膜安定性および/または代謝回転の調節の役割を示す。 α シヌクレインにおける変異は、早発型のパーキンソン病の稀な家族性症例と関連し、タンパク質は、パーキンソン病、アルツハイマー病、およびいくつかの他の神経変性疾患で異常に蓄積する。総説として、例えば、2001年12月20日にオンラインで発行され、その表1が、GenBankに現在収載されるシヌクレインファミリーの独特のメンバーを列挙し、その開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる、George, Genome Biol. 3(2002), reviews 3002.1-reviews 3002.6を参照されたい。

【0025】

α シヌクレインは、アルツハイマー病(AD)斑の(NAC)の非 β アミロイド成分の前駆タンパク質として、ヒト脳内に最初に特定され、例えば、Ueda et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(1993), 1282-1286を参照されたい。ADアミロイドの非A β 成分前駆体(NACP)とも称される α シヌクレインは、140個のアミノ酸のタンパク質である。 α シヌクレインは、ランダムコイルとしてその天然型で存在するが、しかしながら、pH、分子密集、重金属含有量、およびドーパミンレベルにおける変化は全て、タンパク質構造に影響を及ぼす。オリゴマー、プロト原線維、原線維、および凝集体成分への構造変化は、タンパク質毒性を調節すると考えられる。増加する証拠は、ドーパミン付加された α シヌクレインは、非付加タンパク質と比較して、原線維形成へのより速い経時変化を有することを示す。さらに、 α シヌクレイン過剰発現の背景におけるドーパミンは、有毒である。

【0026】

本明細書において、「 α シヌクレイン」、「アルファシヌクレイン」、「 α -シヌクレイン」、および「 α Syn」という用語は、互換的に使用され、特に α シヌクレインの天然モノマー型を指す。「 α シヌクレイン」という用語は、 α シヌクレイン、例えば、ドーパミンキノン(DAQ)と結合した α シヌクレインおよび α シヌクレインのオリゴマーまたは凝集体の他の配座異性体を概して特定するためにも使用される。「 α シヌクレイン」という用語は、 α シヌクレインの全ての種類と型を集散的に指すためにも使用される。ヒト α シヌクレインのタンパク質配列は、MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA(配列番号1)である。 α シヌクレインのアミノ酸配列は、文献および関連データベースから検索することができ、例えば、例えば、Uedaら(同書)、GenBank swissprot:ローカスSYUA_HUMAN、受託番号P37840を参照されたい。ADアミロイドの非A β 成分(NAC)は、 α シヌクレインに由来する。 α シヌクレイン内

の高疎水性ドメイン、NACは、少なくとも28個のアミノ酸残基(残基60~87)および任意で35個のアミノ酸残基(残基61~95)から成るペプチドである。NACは、ベータシート構造を形成する傾向を示す(Iwai, et al., Biochemistry, 34(1995)10139-10145)。NACのアミノ酸配列は、Jensen et al., Biochem. J. 310(1995), 91-94、GenBank受託番号S56746およびUeda et al., PNAS USA 90(1993), 1282-11286に記載される。

【0027】

非凝集 α シヌクレインまたはNACを含むそのフラグメントは、モノマーペプチドユニットを意味する。非凝集 α シヌクレインまたはそのフラグメントは、通常可溶性であり、自己凝集して可溶性オリゴマーを形成する能力がある。 α シヌクレインおよびそのフラグメントのオリゴマーは、通常可溶性であり、主に α 螺旋体として存在する。モノマー α シヌクレインは、超音波処理を伴う純DMSOに凍結乾燥ペプチドを溶解することによって、インビトロで調製され得る。得られた溶液を、任意の不溶性微粒子を除去するために遠心分離する。凝集 α シヌクレインまたはNACを含むそのフラグメントとは、不溶性 β シート集合体に会合した α シヌクレインまたはそのフラグメントのオリゴマーを意味する。凝集 α シヌクレインまたはNACを含むそのフラグメントはまた、原線維ポリマーを意味する。原線維は通常不溶性である。ある種の抗体は、可溶性 α シヌクレインもしくはそのフラグメント、または凝集 α シヌクレインもしくはそのフラグメントのどちらか一方に結合する。ある種の抗体は、モノマー型または原線維型によりも強く、 α シヌクレインのオリゴマーに結合する。ある種の抗体は、可溶性および凝集 α シヌクレインまたはそのフラグメントの両方に、任意でオリゴマー型にも同様に結合する。

【0028】

本明細書に開示されるヒト抗 α シヌクレイン抗体は、 α シヌクレインおよびそのエピトープ、ならびに α シヌクレインおよびそのエピトープの様々な構造に特異的に結合する。例えば、 α シヌクレイン、その天然モノマー型の α シヌクレイン、全長および切り詰め型 α シヌクレイン、ならびに α シヌクレイン凝集体に特異的に結合する抗体が、本明細書に開示される。本明細書で使用される、 α シヌクレインに「特異的に結合する」、「選択的に結合する」、または「優先的に結合する」抗体への言及は、他の非関連タンパク質に結合しない抗体を指す。1つの例では、本明細書に開示される α シヌクレイン抗体は、 α シヌクレインまたはそのエピトープに結合することができ、他のタンパク質に対して、自然界の約1.5倍を超えて結合を示さない。 α シヌクレイン配座異性体に「特異的に結合する」または「選択的に結合する」抗体は、 α シヌクレインの全ての構造に結合するわけではない、すなわち、少なくとも1つの他の α シヌクレイン配座異性体に結合しない抗体を指す。例えば、 α シヌクレイン、ヒトおよびマウス α シヌクレイン、全長の α シヌクレインおよび切り詰め型、ならびにヒト α シヌクレイン対 β および γ シヌクレインのモノマーおよび凝集型の中で区別することができる抗体が、本明細書に開示される。本発明のヒト抗 α シヌクレイン抗体は、パーキンソン症の徴候がなく、 α シヌクレイン特異的免疫反応を示している高齢対象の集団から単離されているため、本発明の抗 α シヌクレイン抗体は、それらの抗体が実際に対象によって発現され、例えば、これまでヒト様の抗体を提供するために試みるための1つの一般的な方法を代表するものであった、ヒト免疫グロブリンを発現するファージライブラリから単離されたものではないことを強調するために、「ヒト自己抗体」とも呼ばれ得る。

【0029】

「1つの(a)」または「1つの(an)」実体という用語は、その実体の1つ以上を指すことに注目されたく、「1つの抗体(an antibody)」は、1つ以上の抗体を示すと理解されたい。したがって、「1つの(a)」(または「1つの(an)」)、「1つ以上」、および「少なくとも1つ」という用語は、本明細書で互換的に使用され得る。

【0030】

本明細書で使用される、「ポリペプチド」という用語は、単数形の「ポリペプチド」、ならびに複数形の「ポリペプチド」を包含することが意図され、アミド結合（ペプチド結合としても知られている）によって線状に連結されるモノマー（アミノ酸）から成る分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意の鎖または複数の鎖を指し、生成物の特定の長さを指さない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または2つ以上のアミノ酸の1本の鎖または複数の鎖を指すために使用される任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語の任意の代わりに、または互換的に使用され得る。

【0031】

「ポリペプチド」という用語は、ポリペプチドの発現後修飾の生成物を指すことも意図され、限定なしに、グリコシル化、アセチル化、リン酸化反応、アミド化、周知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解的切断、または非自然発生アミノ酸による修飾を含む。ポリペプチドは、天然生物学的起源に由来し得る、または組換え技術によって産生され得るが、必ずしも指定された核酸配列から翻訳されない。それは、化学合成を含む任意の様式で産生され得る。

【0032】

本発明のポリペプチドは、約3個以上、5個以上、10個以上、20個以上、25個以上、50個以上、75個以上、100個以上、200個以上、500個以上、1,000個以上、または2,000個以上のアミノ酸の大きさであり得る。ポリペプチドは、必ずしもそのような構造を有するとは限らないが、確定した三次元構造を有し得る。確定した三次元構造を有するポリペプチドは、フォールドと称され、確定した三次元構造を有さないが、むしろ多数の異なる構造を採用することができるポリペプチドは、アンフォールドと称される。本明細書で使用される、糖タンパク質という用語は、アミノ酸残基、例えば、セリン残基またはアスパラギン残基の酸素含有もしくは窒素含有側鎖を介してタンパク質に結合される少なくとも1つの炭水化物成分に結合するタンパク質を指す。

【0033】

「単離」ポリペプチドまたはそのフラグメント、変異体、または誘導体は、その自然環境に存在しないポリペプチドを指す。精製の特定のレベルは必要とされない。例えば、単離ポリペプチドは、その天然または自然環境から除去され得る。組換え技術によって産生されるポリペプチドおよび宿主細胞で発現されるタンパク質は、任意の適切な手法で、分離、分画、または部分的もしくは十分に精製された天然または組換えポリペプチドのように、本発明の目的のために単離されたと見なされる。

【0034】

本発明のポリペプチドには、前述のポリペプチドのフラグメント、誘導体、類似体、または変異体、およびそれらの任意の組み合わせも含まれる。「フラグメント」、「変異体」、「誘導体」、および「類似体」という用語は、本発明の抗体または抗体ポリペプチドを参照するとき、対応する天然結合分子、抗体、またはポリペプチドの抗原結合特性の少なくともいくつかを保持する任意のポリペプチドを含む。本発明のポリペプチドのフラグメントは、本明細書の他の箇所で説明される特異的抗体フラグメントに加えて、タンパク質分解フラグメント、ならびに欠失フラグメントを含む。本発明の抗体および抗体ポリペプチドの変異体は、上で説明されたフラグメント、ならびにアミノ酸置換、欠失、または挿入による変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドも含む。変異体は、自然に発生し得るか、または非自然的に生じている場合もある。非自然発生変異体を、当技術分野で知られている突然変異誘発技術を使用して産生し得る。変異体ポリペプチドは、保存もしくは非保存アミノ酸置換、欠失、または添加を含み得る。 α シヌクレイン特異結合分子の誘導体、例えば本発明の抗体および抗体ポリペプチドは、天然ポリペプチドで見出されない付加的特徴を示すように変えられたポリペプチドである。実施例は、融合タンパク質を含む。変異体ポリペプチドはまた、「ポリペプチド類似体」と本明細書にて称される場合もある。本明細書で使用される、結合分子もしくはそのフラグメント、抗体、または抗体

10

20

30

40

50

ポリペプチドの「誘導体」は、官能側基の反応によって化学的に誘導体化される１つ以上の残基を有する対象のポリペプチドを指す。「誘導体」には、２０個の標準アミノ酸の１つ以上の自然発生アミノ酸誘導体を含むそれらのペプチドも含まれる。例えば、４-ヒドロキシプロリンはプロリンに対して置換され得、５-ヒドロキシリジンはリジンに対して置換され得、３-メチルヒスチジンはヒスチジンに対して置換され得、ホモセリンはセリンに対して置換され得、およびオルニチンはリジンに対して置換され得る。

【００３５】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単数の核酸、ならびに複数の核酸を包含することを意図し、単離核酸分子またはコンストラクト、例えば、メッセンジャーRNA (mRNA) またはプラスミドDNA (pDNA) を指す。ポリヌクレオチドは、従来のリン酸ジエステル結合または非従来の結合（例えば、ペプチド核酸 (PNA) で見出されるもの等のアミド結合）を含み得る。「核酸」という用語は、任意の１つ以上の核酸断片、例えば、ポリヌクレオチドで存在するDNAまたはRNAフラグメントを指す。「単離」核酸またはポリヌクレオチドは、核酸分子、DNA、またはRNAを指し、それは、その天然環境から除去されている。例えば、ベクターに含有される抗体をコードする組換えポリヌクレオチドは、本発明の目的のために単離されたと見なされる。単離ポリヌクレオチドのさらなる例は、異種宿主細胞内で維持される組換えポリヌクレオチド、または溶液中（部分的または十分に）精製されるポリヌクレオチドを含む。単離RNA分子は、本発明のポリヌクレオチドのインビボまたはインビトロRNA転写物を含む。本発明に記載の単離ポリヌクレオチドまたは核酸は、合成的に産生されるそのような分子をさらに含む。加えて、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネータ等の調節要素であり得るか、またはそれらを含み得る。

【００３６】

本明細書で使用される、「コーディング領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンから成る核酸の一部である。「終止コドン」(TAG、TGA、またはTAA) は、アミノ酸に翻訳されないが、コーディング領域の一部と見なされ得、任意の隣接配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネータ、イントロン等は、コーディング領域の一部ではない。本発明の２つ以上のコーディング領域は、単一ポリヌクレオチドコンストラクト、例えば、単一ベクター上、または分離ポリヌクレオチドコンストラクト内、例えば、分離（異なる）ベクター上に存在することができる。さらに、任意のベクターは、単一コーディング領域を含むし得、２つ以上のコーディング領域を含み得、例えば、単一ベクターは、免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を別々にコードし得る。加えて、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、もしくは核酸は、結合分子、抗体、またはそのフラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードする核酸に融合されるか、または融合されなくてもよい、異種コーディング領域をコードし得る。異種コーディング領域は、制限なく、分泌シグナルペプチドまたは異種機能ドメイン等の特殊成分またはモチーフを含む。

【００３７】

ある実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸はDNAである。DNAの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、１つ以上のコーディング領域に操作可能に付随するプロモーターおよび/または他の転写もしくは翻訳制御要素を含む。操作可能な付随は、遺伝子産物、例えば、ポリペプチド、に対するコーディング領域が、調節配列の影響または制御下に遺伝子産物の発現が置かれるような形で、１つ以上の調節配列に付随される場合である。２つのDNAフラグメント（ポリペプチドコーディング領域およびそれに付随されるプロモーター等）は、プロモーター機能の誘導が、所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写をもたらす場合、および２つのDNAフラグメントの間の連鎖の性質が、遺伝子産物の発現を指示するための発現調節配列の能力を妨害しない、またはDNA鋳型の転写される能力を妨害しない場合、「操作可能に付随される」または「操作可能に連結される」。したがって、プロモーター領域は、プロモーターがその核酸の転写をもたらすことができた場合、ポリペプチドをコードする核酸と操作可能に

付随されるであろう。プロモーターは、所定細胞内でのみ、DNAの実質的な転写を指示する細胞特異的プロモーターであり得る。プロモーターに加えて、他の転写制御要素、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、および転写終結シグナルを、細胞特異的転写を指示するために、ポリヌクレオチドと操作可能に付随することができる。適切なプロモーターおよび他の転写制御領域は、本明細書に開示される。

【0038】

多種多様の転写制御領域が当業者に知られている。これらは、制限なく、サイトメガロウイルス（イントロンAと協同する、前初期プロモーター）、シミアンウイルス40（初期プロモーター）、ならびにレトロウイルス（ラウス肉腫ウイルス等）からのプロモーターおよびエンハンサー断片等であるが、それらに限定されない脊椎動物細胞内で機能する転写制御領域を含む。他の転写制御領域は、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、およびウサギβ-グロビン等の脊椎動物遺伝子、ならびに真核細胞内で遺伝子発現を制御することができる他の配列に由来するものを含む。さらなる適切な転写制御領域は、組織特異的プロモーターおよびエンハンサー、ならびにリンフォカイン誘導性プロモーター（例えば、インターフェロンまたはインターロイキンによって誘導可能なプロモーター）を含む。

10

【0039】

同様に、多種多様の翻訳制御要素が当業者に知られている。これらは、リボソーム結合部位、翻訳開始および終結コドン、ならびにピコルナウイルスに由来する成分（特に、CITE配列としても参照される内部リボソーム侵入部位、またはIRES）を含むが、それらに限定されない。

20

【0040】

他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、RNA、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）の形である。

【0041】

本発明のポリヌクレオチドおよび核酸コーディング領域は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を指示する分泌またはシグナルペプチドをコードする付加的なコーディング領域に付随され得る。シグナル仮説によると、哺乳類細胞によって分泌されるタンパク質は、いったん粗面小胞体を越えて成長タンパク鎖の搬出が開始されると、成熟タンパク質から切断されるシグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有する。当業者は、通常、脊椎動物細胞によって分泌されるポリペプチドは、ポリペプチドのN末端に対してシグナルペプチド融合を有し、それはポリペプチドの分泌または「成熟」形態を産生するために、完全なまたは「全長」ポリペプチドから切断されることを承知している。ある実施形態では、天然シグナルペプチド、例えば、免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖シグナルペプチド、またはそれに操作可能に付随されるポリペプチドの分泌を指示する能力を保持するその配列の機能誘導体が使用される。あるいは、異種哺乳類シグナルペプチド、またはその機能誘導体を使用され得る。例えば、野生型リーダー配列は、ヒト組織プラスミノゲンアクチベーター（TPA）またはマウスβ-グルクロニダーゼのリーダー配列で置換され得る。

30

【0042】

別途提示されない限り、「疾患」および「疾病」という用語は、本明細書で互換的に使用される。

40

【0043】

本発明の文脈で使用される「結合分子」は、主として抗体、およびそのフラグメントに関するが、ホルモン、受容体、リガンド、主要組織適合複合体（MHC）分子、熱ショックタンパク質（HSP）等のシャペロン、ならびにカドヘリン、インテグリン、C型レクチン、および免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーのメンバー等の細胞間接着分子を含むが、それらに限定されないαシヌクレインに結合する他の非抗体分子を指す場合もある。したがって、明瞭さの目的のみで、本発明の範囲を制限することなく、以下の実施形態の大部分は、治療および診断薬の開発への好ましい結合分子を代表する抗体および抗

50

体様の分子に関して説明される。

【0044】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、本明細書で互換的に使用される。抗体または免疫グロブリンは、少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、通常少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む α シヌクレイン結合分子である。脊椎動物システムの基本的な免疫グロブリン構造は、比較的良好に理解されており、例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988)を参照されたい。

【0045】

以下でより詳しく説明される、「免疫グロブリン」という用語は、生化学的に識別することができるポリペプチドの様々な広範のクラスを含む。当業者は、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはエプシロン(γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ)、およびそれらの間のいくつかのサブクラス(例えば、 $\gamma 1 - \gamma 4$)に分類されることを理解する。それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgG、またはIgEとして抗体の「クラス」を決定するのはこの鎖の性質である。免疫グロブリンサブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等は、よく特徴付けられており、機能分化を与えることで知られている。これらのクラスおよびアイソタイプの各々の修正版は、本開示を考慮すると当業者にとって容易に認識可能であり、したがって、本発明の範囲内である。全ての免疫グロブリンクラスは、明らかに本発明の範囲内であり、以下の説明は、通常免疫グロブリン分子のIgGクラスに向けられる。IgGに関して、標準免疫グロブリン分子は、分子量約23,000ダルトンの2つの同一の軽鎖ポリペプチド、および分子量53,000~70,000ダルトンの2つの同一の重鎖ポリペプチドを含む。4つの鎖は、典型的には「Y」配置で、ジスルフィド連結によって連結され、軽鎖が「Y」配置の口で始まり、可変領域を通して続く重鎖を一括する。

【0046】

軽鎖は、カッパまたはラムダ(κ 、 λ)のいずれか一方に分類される。各重鎖クラスは、カッパまたはラムダ軽鎖のいずれか一方と結合され得る。通常、軽鎖および重鎖は、相互に共有結合的に結合され、2つの重鎖の「尾」部分は、免疫グロブリンが、ハイブリドーマ、B細胞、または遺伝子改変宿主細胞のいずれかによって産生されるときに、共有結合ジスルフィド連鎖または非共有結合連鎖によって相互に結合される。重鎖において、アミノ酸配列は、Y配置のフォーク状末端におけるN末端から、各鎖の下部におけるC末端まで及ぶ。

【0047】

軽鎖および重鎖の両方ともに、構造的および機能的相同性の領域に分割される。「定常」および「可変」という用語は、機能的に使用される。この点において、軽(V_L)および重(V_H)鎖部分の両方の可変ドメインが、抗原認識および特異性を決定することを理解されたい。逆に、軽鎖(C_L)および重鎖(C_H1 、 C_H2 、または C_H3)の定常ドメインは、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合等の重要な生物学的特性を与える。慣習によって、定常領域ドメインの番号付けは、抗原結合部位または抗体のアミノ末端から離れるにつれて増加する。N末端部分は可変領域であり、C末端部分では定常領域であり、 C_H3 および C_L ドメインは、実際にそれぞれ、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端を含む。

【0048】

上に示すように、可変領域は、抗体が抗原上でエピトープを選択的に認識し、特異的に結合することを許す。つまり、抗体の V_L ドメインおよび V_H ドメイン、または相補性決定領域(CDR)のサブセットは、三次元抗原結合部位を定義する可変領域を形成するために結合する。この四次抗体構造は、Yの各アームの末端で存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位は、 V_H 鎖および V_L 鎖の各々上の3つのCDRによって定義される。 α シヌクレインに特異的に結合するために十分な構造を含有する任意

10

20

30

40

50

の抗体または免疫グロブリンフラグメントは、「結合フラグメント」または「免疫特異的フラグメント」として互換的に本明細書に示される。

【0049】

自然発生抗体において、抗体は、各抗原結合ドメインに存在する「相補性決定領域」または「CDR」と時々呼ばれる6つの超可変領域を含み、それらは、抗体が水性環境中でその三次元構造であると想定すると、抗原結合ドメインを形成するために特異的に配置されるアミノ酸の、短い非近接配列である。「CDR」は、分子間可変性がより低い4つの相対的に保存される「フレームワーク」領域または「FR」によって隣接される。フレームワーク領域は、βシート立体構造を主として採択し、CDRはβシート構造に連結し、場合によってはβシート構造の一部を形成するループを形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合相互作用により、正しい配向でCDRを配置させる足場を形成する役割を果たす。配置されるCDRによって形成される抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに対して相補的な面を定める。この相補的な面は、その同種エピトープに対して、抗体の非共有結合を促進する。CDRおよびフレームワーク領域を含むアミノ酸は、それらは正確に定義されているので、それぞれ、いかなる重鎖または軽鎖可変領域に関しても、当業者によって容易に特定されることができ、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」Kabata, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983)、およびChothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917を参照されたく、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0050】

当技術分野内で使用および/または承認される用語の2つ以上の定義が存在する場合、本明細書で使用される用語の定義は、明確に反論されない限り、全てのそのような意味を含むことを意図する。具体的な例は、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内で見出される非近接抗原結合部位を説明するための「相補性決定領域」(「CDR」)という用語の使用である。この特定の領域は、Kabata et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」(1983)およびChothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917によって説明されており、それらは、参照により本明細書に組み込まれ、これらの定義は、相互に比較される場合、アミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。それでもなお、抗体またはその変異体のCDRを指すためのいずれか一方の定義の適用は、本明細書で定義および使用される用語の範囲内にあることを意図する。上で引用された参考文献の各々によって定義される、CDRを包含する適切なアミノ酸残基は、比較として以下の表1に示される。特定のCDRを包含する正確な残基数は、CDRの配列および大きさによって変化する。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を考えれば、どの残基が、抗体のヒトIgGサブタイプの特定の超可変領域またはCDRを含むかを日常的に決定することができる。

【0051】

【表 1】

表 1：CDR 定義¹

	カバット	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹表 1 における全ての CDR 定義番号付けは、カバットらによって示される番号付け慣習に準じている（以下を参照されたい）。

10

【0052】

カバットらは、任意の抗体に適用できる可変ドメイン配列のための番号付けシステムも定義した。当業者は、配列自体を超えるいずれの実験資料にも依存することなく、任意の可変ドメイン配列に対する「カバットの番号付け」のこのシステムを明確に割り当てることができる。本明細書で使用される、「カバットの番号付け」は、Kabata et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」(1983)によって示される番号付けシステムを指す。別途特定されない限り、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは

20

【0053】

本発明の抗体またはその抗原結合フラグメント、免疫特異的フラグメント、変異体、または誘導体は、ポリクローナル、モノクローナル、多特異的、ヒト、ヒト化、霊長類化、マウス化、またはキメラ抗体、単鎖抗体、エピトープ結合フラグメント、例えば、Fab、Fab'、および F(ab')₂、Fd、Fv、単鎖 Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド連鎖 Fv(sdFv)、V_L または V_H ドメインのいずれか一方を含むフラグメント、Fab 発現ライブラリによって産生されるフラグメント、および抗イディオタイプ(抗 Id)抗体(例えば、本明細書に開示される抗体に対する抗 Id 抗体を含む)を含むが、それらに限定されない。ScFv 分子は、当技術分野で知られており、例えば、米国特許第 5,892,019 号で説明される。本発明の免疫グロブリンまたは抗体分子は、任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、および IgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、および IgA2)、または免疫グロブリン分子のサブクラスであり得る。

30

【0054】

1つの実施形態では、本発明の抗体は、五価構造を有する IgM またはその誘導体ではない。特に、本発明の特定の適用、特に治療的使用において、IgM は、IgG および他の二価抗体または対応する結合分子より有用でなく、それらの五価構造および親和性成熟の欠如により、IgM はしばしば、非特異的交差反応性および非常に低い親和性を示す。

40

【0055】

特に好ましい実施形態では、本発明の抗体は、ポリクローナル抗体ではなく、すなわち、それは実質的には、血漿免疫グロブリン試料から得られる混合物ではなくむしろ、1つの特定の抗体種から成る。

【0056】

単鎖抗体を含む抗体フラグメントは、単独のまたは以下の全てまたは一部と組み合わせた可変領域を含むことができる。ヒンジ領域、CH1、CH2、および CH3 ドメイン。また、可変領域とヒンジ領域、CH1、CH2、および CH3 ドメインとの任意の組み合わせも含む α シヌクレイン結合フラグメントは、本発明に含まれる。本発明の抗体またはその免疫特異的フラグメントは、トリおよび哺乳類を含む任意の動物起源であることがで

50

きる。好ましくは、抗体は、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、またはニワトリ抗体である。別の実施形態において、可変領域は、起源が、コンドリクトイド (condri c t h o i d) である可能性がある (例えば、サメから)。

【0057】

一態様において、本発明の抗体は、ヒトから単離されたヒトモノクローナル抗体である。任意で、ヒト抗体のフレームワーク領域は、データベース中の関連ヒト生殖細胞系可変領域配列に従って整列され、採択される；例えば、MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK) によって主催された Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) を参照されたい。例えば、真の生殖細胞系配列から潜在的に逸脱すると見なされるアミノ酸は、クローンプロセス中に、組み込まれた PCR プライマー配列の結果である可能性がある。ファージディスプレイ抗体ライブラリまたは異種マウスからの単鎖抗体フラグメント (scFv) 等の人工的に産生されたヒト様の抗体と比較して、本発明のヒトモノクローナル抗体は、(i) 動物の代理のものよりもヒト免疫反応を使用して得られる、すなわち、抗体が、その人体に関連する立体構造内の天然 α シヌクレインに応じて産生されることと、(ii) 個々を保護するまたは α シヌクレインの存在に対して少なくとも重要であることと、(iii) 抗体が、ヒト由来であるため、自己抗原に対する交差反応性の危険性は最小限にされることに特徴付けられる。したがって、本発明に従って「ヒトモノクローナル抗体」、「ヒトモノクローナル自己抗体」、「ヒト抗体」等の用語は、すなわち、B 細胞またはそのハイブリドーマ等のヒト細胞またはヒト細胞の mRNA、例えば、ヒトメモリー B 細胞から直接クローン化された cDNA から単離された、ヒト由来のものである α シヌクレイン結合分子を示すために使用される。ヒト抗体は、アミノ酸置換が、例えば、結合特性を改善するために、抗体内で作製されても、それでも「ヒト」である。

【0058】

ヒト免疫グロブリンライブラリにまたは 1 つ以上のヒト免疫グロブリンに対する動物遺伝子導入に由来し、内因性免疫グロブリンを発現しない、以下に、および例えば、Kuchera 氏らによる米国特許第 5,939,598 号内に説明される抗体は、本発明の真のヒト抗体から識別するために、ヒト様の抗体と示される。

【0059】

本明細書で使用される、「マウス化抗体」または「マウス化免疫グロブリン」という用語は、本発明のヒト抗体から 1 つ以上の CDR を含む抗体ならびにアミノ酸置換および/または欠失および/またはマウス抗体配列を基にした挿入を含有するヒトフレームワーク領域を指す。CDR を提供するヒト免疫グロブリンは、「親」または「受容体」と称され、フレームワーク変更を提供するマウス抗体は、「ドナー」と称される。定常領域は、存在する必要はないが、存在する場合、それらは、マウス抗体の定常領域と、通常実質的に同一である、すなわち、少なくとも約 85 ~ 90 %、好ましくは約 95 % 以上同一である。ゆえに、いくつかの実施形態において、全長マウス化したヒト重または軽鎖免疫グロブリンは、マウス定常領域、ヒト CDR、および多くの「マウス化する」アミノ酸置換を有する実質的にヒトフレームワークを含有する。典型的に、「マウス化抗体」は、マウス化した可変軽鎖および/またはマウス化した可変重鎖を含む抗体である。例えば、マウス化抗体は、例えば、キメラ抗体の全可変領域が、非マウスのため、典型的なキメラ抗体を含まないであろう。「マウス化」のプロセスによって「マウス化した」修飾した抗体は、CDR を提供する親抗体と同じ抗原に結合し、通常親抗体と比較して、マウス内で低い免疫原性である。

【0060】

本明細書で使用される、「重鎖部分」という用語は、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列を含む。重鎖部分を含むポリペプチドは、CH1 ドメイン、ヒンジ (例えば、上方、中間、および/または下方ヒンジ領域) ドメイン、CH2 ドメイン、CH3 ドメイン、または変異体またはそのフラグメントのうちの少なくとも 1 つを含む。例えば、本発

明で使用するための結合ポリペプチドは、C H 1 ドメインを含むポリペプチド鎖、C H 1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびC H 2 ドメインを含むポリペプチド鎖、C H 1 ドメインおよびC H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖、C H 1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびC H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖、またはC H 1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、C H 2 ドメイン、およびC H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖を含むことができる。別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、C H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。さらに、本発明において使用するための結合ポリペプチドは、C H 2 ドメインの少なくとも一部（例えば、C H 2 ドメインの全てまたは一部）が、欠如する可能性がある。上記に示すように、これらのドメイン（例えば、重鎖部分）が、それらが自然発生免疫グロブリン分子からのアミノ酸配列が変化するように修飾され得ることが、当業者によって理解されるであろう。

10

【 0 0 6 1 】

本明細書に開示される特定の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体において、多量体の1つのポリペプチド鎖の重鎖部分は、多量体の第2のポリペプチド鎖上のものと同じである。あるいは、重鎖部分を含有する本発明のモノマーは、同一ではない。例えば、それぞれのモノマーは、例えば、二特異的抗体または二重特異性抗体を形成する異なる標的結合部位を含むことができる。

【 0 0 6 2 】

別の実施形態において、本明細書に開示される抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、s c F v等の単一ポリペプチド鎖からなり、潜在的インビボ治療的および診断的適用に対して細胞内に（細胞内抗体）発現される。

20

【 0 0 6 3 】

本明細書に開示される診断的および治療方法で使用する結合ポリペプチドの重鎖部分は、異なる免疫グロブリン分子に由来することができる。例えば、ポリペプチドの重鎖部分は、I g G 1 分子に由来するC H 1 ドメインおよびI g G 3 分子に由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例において、重鎖部分は、I g G 1 分子の一部およびI g G 3 分子の一部由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例において、重鎖部分は、I g G 1 分子の一部、およびI g G 4 分子の一部由来するキメラヒンジを含むことができる。

【 0 0 6 4 】

本明細書で使用される、「軽鎖部分」という用語は、免疫グロブリン軽鎖に由来するアミノ酸配列を含む。好ましくは、軽鎖部分は、少なくとも1つのV_LまたはC_Lドメインを含む。

30

【 0 0 6 5 】

抗体のペプチドまたはポリペプチドエピトープの最小サイズは、約4～5つのアミノ酸であると考えられる。ペプチドまたはポリペプチドエピトープは、好ましくは、少なくとも7個、より好ましくは、少なくとも9個、および最も好ましくは、少なくとも約15～約30個のアミノ酸を含有する。C D Rが、その三次形態において、抗原性ペプチドまたはポリペプチドを認識することができるため、エピトープを含むアミノ酸は、近接する必要はなく、場合によっては、同じペプチド鎖上にさえもない可能性がある。本発明において、本発明の抗体によって認識されるペプチドまたはポリペプチドエピトープは、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、より好ましくは少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、または約15～約30個のαシヌクレインの近接するまたは非近接アミノ酸の配列を含有する。

40

【 0 0 6 6 】

本明細書において互換的に使用される「特異的に結合する」、または「特異的に認識する」とは、通常、結合分子、例えば、抗体が、その抗原結合ドメインを通してエピトープに結合すること、および結合が、抗原結合ドメインとエピトープとの間のいくつかの相補性を伴うことを意味する。この定義によると、抗体は、無作為の、無関係のエピトープに結合するよりもより簡単にその抗原結合ドメインを通してそのエピトープに結合する時に

50

、エピトープに「特異的に結合する」といわれる。「特異性」という用語は、特定の抗体が特定のエピトープに結合する相対的親和性を限定するために、本明細書において使用される。例えば、抗体「A」は、抗体「B」よりも、あるエピトープに対して、高い特異性を有すると見なされ得る、または抗体「A」は、関係するエピトープ「D」に対して有する特異性よりも高いものでエピトープ「C」に結合すると言われる可能性がある。

【0067】

存在する際、「免疫学的結合特性」という用語または抗原との抗体のその他の結合特性は、その全ての文法の形式で、特異性、親和性、交差反応性、および抗体の他の結合特性を指す。

【0068】

「優先的に結合する」とは、結合分子、例えば抗体が、関係する、同様の、相同の、または類似のエピトープに結合するよりもより簡単エピトープに特異的に結合することを意味する。したがって、あるエピトープに「優先的に結合する」抗体が関係するエピトープと交差反応することができるともかかわらず、かかる抗体は、関係するエピトープよりもそのエピトープに結合する可能性が高い。

【0069】

限定しない例として、結合分子、例えば抗体は、第2のエピトープに対して抗体の解離定数(K_D)よりも低い K_D で第1のエピトープを結合する場合、優先的に該第1のエピトープに結合すると見なされ得る。別の限定しない例において、第2のエピトープに対する抗体の K_D よりも少なくとも1オーダー分少ない親和性で第1のエピトープに結合する場合、抗体は、優先的に第1の抗原を結合すると見なされ得る。別の限定しない例において、第2のエピトープに対する抗体の K_D よりも少なくとも2つのオーダー分少ない親和性で第1のエピトープを結合する場合、抗体は、優先的に第1のエピトープと結合すると見なされ得る。

【0070】

別の限定しない例において、結合分子、例えば抗体は、第2のエピトープに対する抗体の $k(off)$ よりも低いオフ率($k(off)$)で第1のエピトープを結合する場合、優先的に第1のエピトープに結合すると見なされ得る。別の限定されない例において、第2のエピトープに対する抗体の $k(off)$ よりも少なくとも1オーダー分低い親和性で第1のエピトープを結合する場合、抗体は、優先的に第1のエピトープに結合すると見なされ得る。別の限定されない例において、第2のエピトープに対する抗体の $k(off)$ よりも少なくとも2つのオーダー分低い親和性で第1のエピトープを結合する場合、抗体は、優先的に第1のエピトープに結合すると見なされ得る。

【0071】

本明細書に開示される結合分子、例えば、抗体、または抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、 $5 \times 10^{-2} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-2} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ 、もしくは 10^{-3} 秒^{-1} 未満、または同等のオフレート($k(off)$)で、 α シヌクレインまたはそのフラグメントもしくは変異体に結合すると考え得る。さらに好ましくは、本発明の抗体は、 $5 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-4} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{ 秒}^{-1}$ 、もしくは 10^{-5} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-6} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{ 秒}^{-1}$ もしくは 10^{-7} 秒^{-1} 未満、または同等のオフレート($k(off)$)で、 α シヌクレインまたはそのフラグメントもしくはその変異体に結合すると考え得る。

【0072】

本明細書に開示される結合分子、例えば抗体、または抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、もしくは $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ を上回るか、または同等のオンレート($k(on)$)で、 α シヌクレインまたはそのフラグメントもしくは変異体に結合すると考えられ得る。さらに好ましくは、本発明の抗体は、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、もしくは $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、もしくは $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ を上回るか、または同等のオンレート($k(on)$)で、 α シヌクレインまたはそのフラグ

10

20

30

40

50

メントもしくは変異体に結合すると考えられ得る。

【0073】

結合分子、例えば、抗体は、抗体が優先的に、エピトープへの参照抗体の結合をある程度に遮断する範囲で、そのエピトープへ結合する場合、所与のエピトープへの参照抗体の結合を競合的に阻害すると考えられる。競合的な阻害は、例えば、競合ELISAアッセイ等の当技術分野で既知の任意の方法によって決定され得る。抗体は、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%で、競合的に参照抗体の所与のエピトープへの結合を阻害すると考えられ得る。

【0074】

本明細書で使用される、用語「親和性」は、結合分子、例えば、免疫グロブリン分子等のCDRを有する個々のエピトープ結合の強度の程度を指す。Harlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) 27~28ページを参照されたい。本明細書で使用される、用語「結合活性」は、免疫グロブリンと抗原の集団間の複合体の総合的な安定性、すなわち、免疫グロブリンと抗原の混合物の機能的な結合強度を指し、例えば、Harlow 29~34ページを参照されたい。結合活性は、特異的エピトープを有する集団中の個々の免疫グロブリン分子の親和性、また免疫グロブリンおよび抗原の結合価の双方に関連する。例えば、二価モノクローナル抗体とポリマー等の高度な反復エピトープ構造を供なう抗原間の相互作用は、高い結合活性の1つである。抗原への抗体の親和性または結合活性は、実験的に任意の適切な方法を使用して決定し得、例えば、Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press New York, NY (1984)、Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company New York, NY (1992)、および本明細書で説明される方法を参照されたい。抗体の抗原への親和性を測定する一般的手法は、ELISA、RIA、および表面プラズモン共鳴法を含む。特定の抗体抗原の相互作用の測定された親和性は、例えば、塩分濃度、pH等の異なる条件下で測定された場合、変動し得る。したがって、例えば、親和性および K_D 、 IC_{50} 等の他の抗原結合のパラメータの測定は、好ましくは抗体および抗原の標準化された溶液、ならびに標準化された緩衝液で行われることが好ましい。

【0075】

結合分子、例えば、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体も、それらの交差反応性に関して説明され得るか、特定され得る。本明細書で使用される、用語「交差反応性」は、1つの抗原に対して特異的な抗体の第二の抗原と反応する能力、つまり2つの異なる抗原物質間の関連性の尺度を指す。したがって、抗体は、その形成を誘発したものの以外のエピトープへ結合した場合、交差反応性である。交差反応性のエピトープは、誘発しているエピトープと同一の相補的な構造特徴を通常多く含有し、いくつかの事例においては、実際に本来のものよりも適合し得る。

【0076】

例えば、ある抗体は、それらが、関連するが同一ではないエピトープ、例えば、参照エピトープに対して、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、および少なくとも50%の同一性（当技術分野で既知であり、本明細書で説明される方法を使用して算出された場合）を有するエピトープに結合するという点において、ある程度の交差反応性を有する。抗体は、参照エピトープに対して、95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、および50%未満の同一性（当技術分野で既知であり、本明細書で説明される方法を使用して算出された場合）を有するエピトープに結合しない場合、交差反応性をほとんどまたは全く有さないと考えられ得る。抗体は、そのエピトープのいず

れの他の類似体、相同分子種、または相同体に結合しない場合、あるエピトープに対して「高い特異性」があると見なされ得る。

【0077】

結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメント、変異体もしくは誘導体はまた、 α シヌクレインへのそれらの結合親和性に関しても、説明されるか、または特定され得る。好ましい結合親和性には、 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、または 10^{-15} M未満の解離定数またはKdを有するものが含まれる。

【0078】

前述に示したように、様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造および三次元構造は既知である。本明細書で使用される、用語「V_Hドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端の可変ドメインを含み、用語「CH1ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖の第1（ほとんどのアミノ末端）定常領域ドメインを含む。CH1ドメインは、V_Hドメインに隣接し、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域へのアミノ末端である。

【0079】

本明細書で使用される、用語「CH2ドメイン」は、従来の番号付けスキームを使用して、例えば、抗体の約残基244から残基360まで延長する（残基244から360、カバット番号付けシステム、および残基231～340、EU番号付けシステム、カバットE Aら（前掲書）を参照されたい）重鎖分子の部分を含む。CH2ドメインは、他のドメインと密接に対ではないという点において、独特である。むしろ、2つのN結合型分岐糖鎖は、無処置の天然IgG分子の2つのCH2ドメイン間に挿入される。CH3ドメインが、CH2ドメインからIgG分子のC末端へ延長し、約108個の残基を含むということも、十分に立証されている。

【0080】

本明細書で使用される、用語「ヒンジ得領域」は、CH1ドメインとCH2ドメインを連結する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域は、約25個の残基を含み、可動性であり、したがって、2つのN末端の抗原に結合する領域を独立的に移動することを可能にする。ヒンジ領域は、3つの明確なドメインへ細区画され得る。：上位、中位、および下位のヒンジドメイン、Roux et al., J. Immunol. 161 (1998), 4083を参照されたい。

【0081】

本明細書で使用される用語、「ジスルフィド連結」は、2つの硫黄原子間に形成される共有結合を含む。アミノ酸システインは、ジスルフィド連結または第2のチオール基と共に架橋を形成し得るチオール基を含む。ほとんどの自然発生IgG分子において、CH1およびCL領域は、ジスルフィド連結により結合され、2つの重鎖は、2つのジスルフィド連結により、カバット番号付けシステムを使用して、239および242に対応する位置で、結合される（位置226または229、EU番号付けシステム）。

【0082】

本明細書で使用される、用語「結合される」「融合される」、または「融合」は、互換的に仕様される。これらの用語は、さらに2つの要素または成分を、化学的結合または組換え手段を含む何らかの方法で、結合することを指す。「インフレームの融合」は、本来のORFの正確な翻訳の読み取りフレームを維持する方法で、持続的により長いORFを形成するための2つ以上のポリヌクレオチド翻訳領域（ORF）の結合を指す。したがって、組換え融合タンパク質は、本来のORFでコードされるポリペプチドに対応する2つ以上の断片を含有する、単一タンパク質である（その断片は、通常それほど自然に結合されない）。読み取りフレームは、このように、融合した断片を通して持続的とされるが、

10

20

30

40

50

断片は、物理的または空間的に、例えば、インフレームのリンカー配列によって分離し得る。例えば、免疫グロブリン可変領域のCDRをコードする、ポリヌクレオチドはインフレームで融合し得るが、「融合」したCDRが、持続性のポリペプチドの一部として、同時翻訳される限り、少なくとも1つの免疫グロブリンフレームワーク領域または付加的なCDR領域をコードするポリヌクレオチドにより分離し得る。

【0083】

本明細書で使用される用語「発現」は、遺伝子がそれによって生化学物質、例えばRNAまたはポリペプチドを産生するプロセスを指す。本プロセスは、制限なく、遺伝子ノックダウン、ならびに一過性発現および安定発現を含む細胞内の遺伝子の機能的な存在のいずれの顕在化を含む。それは、制限なく、メッセンジャーRNA(mRNA)、転移RNA(tRNA)、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)またはいずれの他のRNA産物への遺伝子の転写、およびmRNAのポリペプチドへの翻訳等を含む。最終の所望の産物が生化学物質である場合、発現は、その生化学物質およびいずれの前駆物質の創造を含む。遺伝子の発現は、「遺伝子産物」を産生する。本明細書で使用される、遺伝子産物は、核酸、例えば、遺伝子の転写によって産生されるメッセンジャーRNA、または転写物から翻訳されるポリペプチドのいずれか1つになり得る。本明細書で説明される遺伝子産物は、例えばポリアデニル化等の転写後修飾を伴う核酸、または、例えばメチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの関連、タンパク質分解等の翻訳後修飾を伴う、ポリペプチドをさらに含む。

【0084】

本明細書で使用される、用語「試料」は、対象または患者から取得されるいずれの生物学的材料をも指す。1つの態様では、試料は、血液、脳脊髄液(「CSF」)、または尿を含み得る。他の態様では、試料は、全血液、血漿、血液試料から濃縮されるB細胞、および培養された細胞を含み得る(例えば、対象からのB細胞)。試料は、神経組織を含む生検または組織試料をも含み得る。さらに他の態様では、試料は、全細胞および/または細胞の可溶化液を含み得る。血液試料は、当技術分野で既知の方法によって採取され得る。1つの態様では、ペレットは、4で200 μ lの緩衝液(20mMのトリス、pH. 7.5、0.5%のノニデット(Nonidet)、1mMのEDTA、1mMのPMSF、0.1Mの塩化ナトリウム、IX Sigmaプロテアーゼ阻害剤、およびIX Sigmaホスファターゼ阻害剤1および2)をボルテックスすることで、再懸濁され得る。懸濁液は、断続的にボルテックスすることで氷上で20分間保ち得る。約4で5分間15,000 $\times$ gで回転させた後、上清の一定分量は約-70で保存され得る。

【0085】

本明細書で使用される、用語「治療する」または「治療」は、治療的治療および予防的または予防する手段の双方を指し、目的はパーキンソン症の発症等、望まれない生理学的変化または疾患を阻止するか、または遅らせる(和らげる)ためのものである。有益または所望の結果には、検出可能であるか検出不可能であるかにかかわらず、症状の軽減、疾病の程度の縮小、安定化した(すなわち、悪化していない)状態の疾病、疾病の進行の遅延または遅らせること、疾病状態の寛解または緩和、および緩解(部分的であるか総合的であるかにかかわらず)が含まれるが、それらに限定されない。「治療」は、治療を受けない場合に予想される生存と比較して、延長している生存をも意味する。治療の必要としては、疾病または疾患をすでに有するもの、ならびに疾病または疾患を有する傾向があるもの、疾病または疾患が現れることを予防するためのものが含まれる。

【0086】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」、または「哺乳動物」は、いずれの対象をも意味し、特に、哺乳類の対象、例えば、診断、予後、予防、または治療を所望する、ヒト患者を意味する。

【0087】

II. 抗体

本発明は、概して、ヒト抗 α シヌクレイン抗体およびその抗原結合フラグメントに関し

、好ましくは、実施例で図示される抗体に関する概略のように、免疫学的結合特性および/または生物学的特性を実証する。本発明に従って、 α シヌクレインに対して特異的なヒトモノクローナル抗体は、高齢の対象のプールからクローン化した。

【0088】

本発明に従って実施された実験の過程で、最初の試みは、 α シヌクレイン特異抗体をクローン化することに失敗したが、ほぼ毎回偽陽性クローンをもたらした。これらのクローンのさらなる研究は、クローンが、大腸菌のタンパク質を認識している抗体を産生したということを示す。この問題を回避するため、ヒト記憶B細胞培養物の条件培地中の抗体は、被覆した全長のアルファシヌクレインモノマーに結合するため、ならびに大腸菌タンパク質およびウシ血清アルブミン(BSA)に結合しないため、並行してスクリーニングされた。特に、B細胞の条件培地は、大腸菌タンパク質で、ヒト抗体に結合する α シヌクレインのスクリーニングのためのELISAアッセイに晒す前に、事前に再吸収した。

10

【0089】

特異抗体を単離するための最初の試みは、 α シヌクレイン抗体血漿の循環の上昇したレベルを示す、 α シヌクレインへの高い血漿結合活性を有するヒト対象のプールに焦点を絞った。予想外に、これらの試みは、 α シヌクレイン特異的ヒト記憶B細胞を産生することに失敗し、当該の発明で説明される抗体は、 α シヌクレインへ低い血漿反応性を持つ対象のプールから単離した。

【0090】

この手段によって、いくつかの抗体は単離し得た。選択した抗体は、クラスおよび軽鎖サブクラス決定のため、さらに分析した。記憶B細胞培養物からの選択した関連抗体メッセージは、次に、RT-PCRによって転写し、クローン化し、組換え産生のための発現ベクターへ結合し、添付の実施例を参照されたい。HEK293またはCHO細胞でのヒト抗体の組換え発現、ならびにその後のウェスタンブロット(図4)での、全長 α シヌクレインおよびその切り詰め型(図2)、ならびに β および γ シヌクレイン(図3)へのこれらの結合特異性の特徴付けによって、初めて、 α シヌクレインに対して高度に特異的であり、 α シヌクレインタンパク質中の異なるエピトープを認識するヒト抗体がクローン化されたことが確認された。

20

【0091】

したがって、本発明は概して、単離した自然発生ヒトモノクローナル抗 α シヌクレイン抗体およびその結合フラグメント、誘導体、ならびにその変異体に関する。実施例で実証され、図3に示されるように、本発明のヒトモノクローナル抗 α シヌクレイン抗体は、好ましくは、 β シヌクレインおよび γ シヌクレインと比較して、 α シヌクレインに特異的に結合することに特徴付けられる。有利には、抗体は天然モノマー型および/もしくはオリゴマー型または凝集型の α シヌクレインに特異的に結合する能力がある。加えて、本発明のヒト抗 α シヌクレイン抗体は、ウェスタンブロット法で、 α シヌクレインを認識するその能力により、さらに特徴付けられ、図4を参照されたい。

30

【0092】

1つの実施形態では、本発明は、抗体が、NI-202.3G12、NI-202.12F4またはNI202.3D8からなる群から選択される参照抗体と同一の α シヌクレインのエピトープに特異的に結合する、抗 α シヌクレイン抗体、またはその抗原結合フラグメント、その変異体もしくは誘導体を対象とする。実施例で図示されるように、抗体NI-202.3G12は、直接ELISAアッセイで、NI-202.3G12の構造エピトープを示し、野生型(wt) α シヌクレインに結合するが、 α シヌクレイン切り詰め型に結合しない、図2Aを参照されたい。対照的に、抗体NI-202.12F4は、直接ELISAアッセイで、NI-202.12F4のN末端エピトープを示し、N末端両親媒性反復領域(アミノ酸番号1~60)を含有する α シヌクレイン切り詰め型に結合し、図2Bを参照されたい。加えて、抗体NI202.3D8で実施した直接ELISAアッセイの予備結果は、NI202.3D8は、特異的に、 α シヌクレインのC末端、好ましくは、アミノ酸番号96~140を認識することを示した。

40

50

【0093】

さらに、最初の実験的観察に束縛されることを意図するものではないが、さらなる予備実験は、抗体NI-202.12F4およびNI-202.3G12が、優先的に、 α シヌクレインのモノマー型よりもシヌクレイン凝集体または原線維に結合する一方で、抗体NI202.3D8は、直接ELISA抗体アッセイで、優先的に、原線維よりも α シヌクレインモノマーに結合するという推測をもたらす。ゆえに、本発明は、異なる特異性を有する一連のヒト抗 α シヌクレイン抗体を提供し、それらは、したがって、診断および治療目的に特に有用である。

【0094】

1つの実施形態では、本発明の抗体は、実施例1から5のいずれか1つに説明されるような例示的なNI-202.12F4抗体の結合特性を示す。例えば、1つの実施形態、特に実施例3に従って分析した際に、本発明の抗 α シヌクレイン抗体は、マウス α シヌクレインよりもヒト α シヌクレインを優先的に認識する。加えて、または代替えとして、特に実施例3に従って分析した際に、本発明の抗 α シヌクレイン抗体は、生理学的モノマー型よりも凝集またはミスフォールドした型の α シヌクレインを優先的に認識する。加えて、または代替えとして、本発明の抗 α シヌクレイン抗体は、特に実施例3で説明されるように、疾病を引き起こすヒト α シヌクレインの変異体に結合する。この状況で、結合特異性は、図5に示されるような例示的なNI-202.12F4抗体の範囲内であり得、すなわち、約100から1000 pMの最大半量の有効濃度(EC50)を有し、野生型 α シヌクレインまたは疾病を引き起こすその変異体に対しては約100から500 pMのEC50であることが好ましい。

【0095】

ゆえに、本発明の抗 α シヌクレイン抗体は、脳で α シヌクレインの病的型、例えば、実施例3で説明されるウエスタンブロットおよび免疫組織化学染色により例証される α シヌクレインの病的凝集体等に優先的に結合することが好ましい。したがって、他の付加的なまたは代替えの実施形態で、本発明の抗 α シヌクレイン抗体は、ヒト α シヌクレインの立体構造エピトープに優先的に結合し、アミノ酸番号1~20、21~40、41~60、11~30、または31~50からなる α シヌクレインのN末端に由来するフラグメントにほとんど結合しない。

【0096】

本発明は、抗体が、NI-202.3G12、NI202.12F4、またはNI202.3D8からなる群から選択される抗体のものと同一の抗原結合ドメインを含む、抗体またはその抗原結合フラグメント、その変異体、もしくは誘導体にも関する。

【0097】

本発明は、さらにいくつかのそのような結合分子、例えば、抗体およびその結合フラグメント等を例証し、例えば、図1で示されるアミノ酸配列の任意の1つを含む、V_Hおよび/またはV_L可変領域の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を、それらの可変領域、例えば、結合ドメインに含むことにより特徴付けられ得る。上記の特定した可変領域をコードする対応するヌクレオチド配列は、添付の配列リストで示す。図1に示されるV_Hおよび/またはV_L領域の上記のアミノ酸配列の例示的な一連のCDRも、添付の配列リストで示す。しかしながら、以下で説明されるように、当業者は、加えて、または代替えとして、CDR2およびCDR3の場合、1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアミノ酸で、それらのアミノ酸配列が図1で示されるものと異なるCDRを使用し得るという事実を熟知している。

【0098】

1つの実施形態では、本発明の抗体は、図1に示されるV_Hおよび/またはV_L領域のアミノ酸配列を含む任意の1つの抗体である。あるいは、本発明の抗体は、図1に示されるようなV_Hおよび/またはV_L領域を有する少なくとも1つの抗体と α シヌクレインへの結合について競合する、抗体またはその抗原結合フラグメント、誘導体、もしくは変異体である。それらの抗体は、特に治療的適用のためには、ヒト抗体でもあり得る。あるい

は、抗体は、マウス、マウス化した抗体、およびキメラマウス/ヒト抗体であり、診断法および動物での研究に特に有用である。

【0099】

上記に述べられるように、ヒト免疫反応におけるその產生によって、本発明のヒトモノクローナル抗体は、特定の生理学的関連があり、例えば、マウスモノクローナル抗体の產生のための免疫処理の場合、およびファージディスプレイライブラリのインビトロのスクリーニングの場合、それぞれ到達不可能であるか、より少ない免疫原性である、エピトープを認識するであろう。したがって、本発明のヒト抗 α シヌクレイン抗体のエピトープは独特であり、本発明のヒトモノクローナル抗体で認識されるエピトープに結合する能力がある他の抗体は存在しないことを明記することは賢明である。故に、本発明はまた、概して、 α シヌクレインへの特異結合のため本発明のヒトモノクローナル抗体と競合する抗 α シヌクレイン抗体および α シヌクレイン結合分子にも及ぶ。本発明は、より明確には、抗体が、NI-202.3G12、NI-202.12F4またはNI202.3D8からなる群から選択される参照抗体と同一の α シヌクレインのエピトープに特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体を対象とする。

【0100】

抗体間の競合は、試験下の免疫グロブリンが、参照抗体が α シヌクレイン等の一般的な抗原へ特異結合することを阻害するアッセイで決定する。多種の競合的な結合アッセイは、既知であり、例えば、：固相直接型または非直接型放射免疫アッセイ(RIA)もしくは、固相直接型または非直接型酵素免疫アッセイ(EIA)、サンドイッチ競合アッセイ：Stahli et al., Method in Enzymology 9(1983)を参照されたい、固相直接型ピオチンアビジンEIA、Kirkland et al., J. Immunol. 137(1986), 3614-3619およびCheung et al., Virology 176(1990), 546-552を参照されたい、固相直接型標識アッセイ、固相直接型標識サンドイッチアッセイ、Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press(1988)を参照されたい、I¹²⁵標識を使用する固相直接型標識RIA、Morel et al., Molec. Immunol. 25(1988), 7-15およびMoldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32(1990), 77-82を参照されたい。典型的に、そのようなアッセイには、固体表面に結合した精製した α シヌクレインもしくはその凝集体、またはそのいずれか一方を有する細胞、非標識の試験用免疫グロブリン、および標識化した参照免疫グロブリン、すなわち、本発明のヒトモノクローナル抗体、の使用が含まれる。競合的な阻害は、試験用の免疫グロブリンの存在下で固体表面または細胞に結合する標識の量を決定することで、測定される。通常、試験用免疫グロブリンは、過度に存在する。競合的な結合アッセイは、好ましくは、ELISAアッセイに関する添付の実施例で説明されるような条件下で実施される。競合アッセイ(競合抗体)により特定された抗体は、参照抗体と同一のエピトープに結合する抗体、および立体障害を発生させるために、参照抗体によって結合されるエピトープの十分に近位にある、隣接するエピトープに結合する抗体を含む。通常、競合抗体が、過度に存在する場合、参照抗体の一般的な抗原への特異結合を、少なくとも50%または75%阻害するであろう。ゆえに、本発明は、さらに、抗体が競合して、NI-202.3G12、NI-202.12F4またはNI202.3D8からなる群から選択される参照抗体の α シヌクレインへの結合を阻害する、抗体またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体に関する。

【0101】

他の実施形態では、本発明は、重鎖可変領域の少なくとも1つのV_H-CDRまたは重鎖可変領域の少なくとも2つのV_H-CDRの少なくとも80%、85%、90%、または95%が、本明細書に開示される抗体からの参照重鎖V_H-CDR1、V_H-CDR2、またはV_H-CDR3アミノ酸配列と同一である、免疫グロブリン重鎖可変領域(V_H)を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる単離されたポリペプチド

を提供する。あるいは、 V_H の $V_H - CDR1$ 、 $V_H - CDR2$ 、または $V_H - CDR3$ の領域の少なくとも80%、85%、90%、または95%が、本明細書に開示される抗体からの、参照重鎖 $V_H - CDR1$ 、 $V_H - CDR2$ 、または $V_H - CDR3$ アミノ酸配列と同一である。故に、この実施形態にしたがって、本発明の重鎖可変領域は、図1に示される群に関連する $V_H - CDR1$ 、 $V_H - CDR2$ 、および $V_H - CDR3$ ポリペプチド配列を有する。図1は、カバットシステムで定義される $V_H - CDR$ を示す一方、他のCDR定義、例えば、Chothiaシステム等で定義される、 $V_H - CDR$ もまた本発明に含まれ、図1に提示される資料を使用して、当業者により簡単に定義され得る。

【0102】

他の実施形態では、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域(V_H)を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり、 $V_H - CDR1$ 、 $V_H - CDR2$ 、および $V_H - CDR3$ 領域は、図1で示される $V_H - CDR1$ 、 $V_H - CDR2$ 、および $V_H - CDR3$ 群と同一であるポリペプチド配列を有する、単離されたポリペプチドを提供する。

10

【0103】

他の実施形態では、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域(V_H)を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり、 $V_H - CDR1$ 、 $V_H - CDR2$ 、および $V_H - CDR3$ 領域は、いずれかの1つの $V_H - CDR$ での1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアミノ酸置換を除いては、図1で示される $V_H - CDR1$ 、 $V_H - CDR2$ 、および $V_H - CDR3$ 群と同一であるポリペプチド配列を有する、単離したポリペプチドを提供する。ある実施形態では、アミノ酸置換は保存される。

20

【0104】

他の実施形態では、本発明は、軽鎖可変領域の少なくとも1つの $V_L - CDR$ または軽鎖可変領域の少なくとも2つの $V_L - CDR$ の少なくとも80%、85%、90%、または95%が、本明細書に開示される抗体からの参照軽鎖 $V_L - CDR1$ 、 $V_L - CDR2$ 、または $V_L - CDR3$ アミノ酸配列と同一である、免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L)を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる単離したポリペプチドを提供する。あるいは、 V_L の $V_L - CDR1$ 、 $V_L - CDR2$ 、または $V_L - CDR3$ の領域の少なくとも80%、85%、90%、または95%が、本明細書に開示される抗体からの参照軽鎖 $V_L - CDR1$ 、 $V_L - CDR2$ 、または $V_L - CDR3$ アミノ酸配列と同一である。故に、この実施形態にしたがって、本発明の軽鎖可変領域は、図1に示される群に関連する $V_L - CDR1$ 、 $V_L - CDR2$ 、および $V_L - CDR3$ ポリペプチド配列を有する。図1は、カバットシステムで定義される $V_L - CDR$ を示す一方で、他のCDR定義、例えば、Chothiaシステム等で定義される、 $V_L - CDR$ もまた本発明に含まれる。

30

【0105】

他の実施形態では、本発明は、 $V_L - CDR1$ 、 $V_L - CDR2$ 、および $V_L - CDR3$ 領域は、図1で示される $V_L - CDR1$ 、 $V_L - CDR2$ 、および $V_L - CDR3$ 群と同一であるポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L)を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる単離されたポリペプチドを提供する。

【0106】

40

他の実施形態では、本発明は、 $V_L - CDR1$ 、 $V_L - CDR2$ 、および $V_L - CDR3$ 領域は、いずれかの1つの $V_L - CDR$ での1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアミノ酸置換を除いては、図1で示される $V_L - CDR1$ 、 $V_L - CDR2$ 、および $V_L - CDR3$ 群と同一であるポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L)を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる単離されたポリペプチドを提供する。ある実施形態では、アミノ酸置換は保存される。

【0107】

免疫グロブリンまたはそのコードするcDNAは、さらに修飾し得る。したがって、さらなる実施形態では、本発明の方法は、キメラ抗体、マウス化抗体、単鎖抗体、Fabフラグメント、二重特異的抗体、融合抗体、標識された抗体、またはこれらのうち任意の1

50

つの類似体を産生する任意の1つのステップを含む。対応する方法は、当業者に既知であり、例えば、Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988)に説明される。該抗体の誘導体が、ファージディスプレイ手法で取得される際、BIAcoreシステムで用いられるような表面プラズモン共鳴法は、本明細書で説明されるいずれか1つの抗体のものと同一のエピトープに結合する、ファージ抗体の効率を上げるために使用し得る(Schier, ヒト抗体ハイブリドーマ7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13)。キメラ抗体の産生は、例えば、国際出願第WO89/09622号に説明される。ヒト化抗体の産生のための方法は、欧州出願第EP-A1 0239400号および国際出願第WO90/07861号に説明される。さらなる本発明に従って利用される抗体の源は、いわゆる異種抗体である。マウスでのヒト様の抗体等の異種抗体の産生のための一般的な原理は、例えば、国際出願第WO91/10741号、第WO94/02602号、第WO96/34096号、および第WO96/33735号に説明される。上記に説明されたように、本発明の抗体は、完全抗体に加え、例えば、Fv、Fab、およびF(ab)₂、ならびに単一鎖を含む、多種多様の型で存在し得、例えば、国際出願第WO88/09344号を参照されたい。

【0108】

本発明の抗体またはそれらの対応する免疫グロブリン鎖は、当技術分野で既知の従来の手法を使用して、例えば、アミノ酸欠失、挿入、置換、付加、および/もしくは組換え、ならびに/または当技術分野で既知のいずれかの他の修飾を、それ単独または組み合わせて使用することでさらに修飾し得る。免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列の基礎をなすDNA配列でそのような修飾を導入するための方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. および Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994)を参照されたい。本発明の抗体の修飾は、1つ以上の構成アミノ酸での、アセチル化、ヒドロキシル化、メチル化、アミド化、および糖鎖または脂鎖の付着、ならびに補助因子等を含む、側鎖修飾、主鎖修飾、NおよびC末端の修飾を含む、化学および/または酵素誘導体化を含む。同様に、本発明は、カルボキシ末端の免疫賦活性リガンド等の、異種分子に融合されるアミノ末端にある説明された抗体またはそのいくつかのフラグメントを含む、キメラタンパク質の産生を包含し、例えば、対応する手法の詳細に関して、国際出願第WO00/30680号を参照されたい。

【0109】

加えて、本発明は、上記の説明されたように結合分子を含有するもの、例えば、上記の抗体の任意の1つの可変領域のCDR3領域を含有するもの、重鎖CDR3(HCDR3)が抗原抗体相互作用においてより大きな度合いの可変性および主な関与を有する領域であることが頻繁に観察されているため、特に重鎖のCDR3を含有するものを含む、ペプチドを包含する。そのようなペプチドは、本発明に記載の有用な結合剤を産生するため、組換え手段で簡単に合成または産生し得る。そのような方法は、当業者には既知である。ペプチドは、例えば、商業的に入手可能な自動ペプチド合成機を使用して、合成し得る。ペプチドは、ペプチドを産生するため、ペプチドを発現するDNAを発現ベクターに取り入れること、および発現ベクターで細胞を形質転換することによる組換え手法で産生し得る。

【0110】

ゆえに、本発明は、本発明のヒト抗 α シヌクレイン抗体に対して方向付けられる例えば抗体またはその結合フラグメント等の任意の結合分子に関し、上記の特性、すなわち、 α シヌクレインを特異的に認識する特性を表示する。そのような抗体および結合分子は、そ

これらの結合特異性および親和性を、E L I S A およびウエスタンブロットならびに本明細書で説明される免疫組織化学的検査で試験し得る。例えば、実施例を参照されたい。さらに、本発明に従って実施されたその後の実験予備結果は、本発明のヒトアリ α シヌクレイン抗体は、特に、抗体N I - 2 0 2 . 1 2 F 4 は、レビー小体を伴う認知症 (D L B) またはパーキンソン病 (P D) を罹患する患者のヒト脳切片で存在する、 α シヌクレイン封入物体を認識することを示す。したがって、本発明の特定の好ましい実施形態では、ヒト抗体またはその結合フラグメント、誘導体、もしくは変異体は、ヒトD L B またはP D の脳切片で α シヌクレインを認識する。

【 0 1 1 1 】

不死化B細胞またはB記憶細胞の培養物から直接的に免疫グロブリンを取得するための代替えとして、不死化細胞は、その後の発現および/または遺伝子操作のために再編成された重鎖および軽鎖座位の供給源として使用し得る。再編成された抗体遺伝子は、c D N A を産生するため、適切なm R N A から逆転写し得る。所望する場合、重鎖定常領域は、異なるアイソタイプのものに交換するか、または全て除去し得る。可変領域は、単鎖F v 領域をコードするため、連結し得る。複数のF v 領域は、採用し得る1つ以上の標的またはキメラ重鎖および軽鎖の組み合わせに結合能力を与えるため、連結し得る。遺伝子材料が取得可能になった時点で、所望の標的に結合するそれらの能力の双方を保持する上記に説明された類似体の設計は容易である。抗体可変領域および組換え抗体の産生クローン化のための方法は、当業者に既知であり、例えば、G i l l i l a n d . , e t a l . , T i s s u e A n t i g e n s 4 7 (1 9 9 6) , 1 - 2 0 、D o e n e c k e e t a l . , L e u k e m i a 1 1 (1 9 9 7) , 1 7 8 7 - 1 7 9 2 、に説明される。

【 0 1 1 2 】

適切な遺伝子材料を取得し、所望の場合、類似体をコードするために修飾する時点で、重鎖および軽鎖の可変領域を最小でもコードするものを含むコード配列は、標準の組換え宿主細胞へトランスフェクトされ得るベクターで含有される、発現システムへ挿入し得る。そのような多種の宿主細胞を、効率的な処理のため使用し得るが、哺乳類細胞は好ましい。この目的のために有用な典型的な哺乳類細胞株はC H O 細胞、H E K 2 9 3 細胞、またはN S O 細胞を含むが、それらに限定されない。

【 0 1 1 3 】

抗体または類似体の産生は、次に、宿主細胞の成長およびコード配列の発現に適切な培養条件下で、修飾した組換え宿主を培養することで実行する。抗体を、次に、培養物からそれらを単離することで回収する。発現システムは、好ましくはシグナルペプチドを含むように設計し、そのため結果の抗体は、培地内に分泌されるが、細胞内の産生もまた可能である。

【 0 1 1 4 】

上記に従って、本発明は、本発明の抗体または相当する結合分子をコードし、抗体の場合は、好ましくは少なくとも上記に説明される抗体の免疫グロブリン鎖の可変領域をコードする、ポリヌクレオチドにも関する。典型的に、ポリヌクレオチドでコードされた該可変領域は、該抗体の可変領域のV_H および/またはV_L の少なくとも1つの相補性決定領域 (C D R) を含む。

【 0 1 1 5 】

当業者は、上述の可変ドメインを有する抗体の可変ドメインは、所望の特異性および生物学的機能を持つ他のポリペプチドまたは抗体のコンストラクトに使用し得るということを容易に理解するだろう。したがって、本発明は上述の可変ドメインの少なくとも1つのC D R を含み、有利にも添付した実施例に説明される抗体と、同一または同様の結合特性を実質的に有するポリペプチドおよび抗体も含有する。結合親和性を、C D R 内、またはカバットによって定義されたC D R と部分的に重複する超可変ループ内 (C h o t h i a n d L e s k , J . M o l . B i o l . 1 9 6 (1 9 8 7) , 9 0 1 - 9 1 7) でアミノ酸置換を作ることによって増強することができることは、当業者に既知である。例えば、R i e c h m a n n , e t a l , N a t u r e 3 3 2 (1 9 8 8) , 3 2 3 - 3 2 7

10

20

30

40

50

を参照されたい。したがって、本発明は、1つ以上の上述のCDRが、1つ以上、好ましくは2つ以下のアミノ酸置換を含む、抗体にも関する。好ましくは、本発明の抗体は、図1に示されるように、1つまたは双方のその免疫グロブリン鎖で、可変領域の2つまたは3つ全てのCDRを含む。

【0116】

当業者に既知であるように、結合分子、例えば、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、1つ以上のエフェクター機能を媒介する定常領域を含み得る。例えば、抗体定常領域への補体のC1成分の結合は、補体システムを活性化し得る。補体の活性化は、細胞病原体のオプソニン作用および溶解で重要である。補体の活性化は、炎症反応をも刺激し、自己免疫性過敏症にも関与し得る。さらに、抗体は、細胞でFc受容体(FcR)に結合する抗体Fc領域のFc受容体結合部位を伴って、Fc領域を通じて、様々な細胞で受容体に結合する。IgG(ガンマ受容体)、IgE(エプシロン受容体)、IgA(アルファ受容体)、およびIgM(ミュー受容体)を含む、抗体の異なるクラスに対して特異的な多数のFc受容体がある。細胞表面上での抗体のFc受容体への結合は、抗体で被覆した粒子の貪食および破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体で被覆した標的細胞の溶解(抗体依存性細胞傷害、またはADCC)、炎症性メディエーターの遊離、胎盤通過、免疫グロブリン産生の制御を含む、多数の重要で多様な生物学的反応を誘発する。

【0117】

したがって、本発明のある実施形態は、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体を含み、1つ以上の定常領域ドメインの分画は、ほぼ同一の免疫原性の変化させていない全抗体と比較した場合、低下したエフェクター機能、非共有結合的二量体化への能力、αシヌクレイン凝集および沈着の部位で局在化するための能力の増加、減少した血清半減期、または血清半減期の増加等の所望の生化学的特性を提供するように、除去されるかまたは、さもないと、変質される。例えば、本明細書に説明される診断方法および治療方法のため使用される、ある抗体は、免疫グロブリン重鎖と同様のポリペプチド鎖を含むが、少なくとも1つ以上の重鎖ドメインの部分を不足する、ドメイン欠失抗体である。例として、ある抗体では、修飾した抗体の定常領域の1つの全ドメインが除去される。例えば、CH2ドメインの全てまたは一部分が除去される。他の実施形態では、本明細書に説明される診断方法および治療方法のために使用されるある抗体は、例えば、グリコシル化を排除するように変質される、本明細書の他の箇所でアグリコシル化または「アグリ」抗体と称される、IgG重鎖定常領域等の定常領域を有する。そのような「アグリ」抗体は、酵素的ならびに定常領域で、コンセンサスグリコシレーション部位を操作することによって調製し得る。理論に束縛されるものではないが、「アグリ」抗体は、インビボで改善された安全性および安定性を有し得ると考えられる。所望のエフェクター機能を有する非グリコシル化抗体を産生する方法は、例えば、国際出願第WO2005/018572号で見られ、参照によりその全体が組み込まれる。

【0118】

本明細書で説明される、ある抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体では、当技術分野で既知の手法を使用して、Fc部分を、エフェクター機能を減少させるために変異し得る。例えば、定常領域ドメインの欠失または不活性化(点突然変異または他の方法を通して)は、循環する修飾した抗体のFc受容体結合を減少し、よって、αシヌクレイン局在性を増加し得る。他の事例では、本発明と一致する定常領域の修飾は、補体結合を緩和し、したがって抱合型細胞毒の血清半減期および非特異的対合を減少させる。しかし、定常領域の他の修飾は、増加した抗原特異性または抗体可動性によって、増強した局在性を可能にするジスルフィド連鎖またはオリゴ糖部分を修飾するために使用し得る。得られる生理学的特性、生物学的利用率、ならびにαシヌクレイン局在性、体内分布、および血清半減期等の他のこの修飾による生理学的効果は、過度な実験を行うことなく、既知の免疫学的手法を使用することで、簡単に測定し、定量化し得る。

【0119】

本明細書で説明される、ある抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体において、Fc部分は、抗体の細胞の取り込みを増加させるため、例として、抗体の受容体で媒介したエンドサイトーシスを、Fcγ受容体、LRP、またはThy1受容体を通して増強させるか、もしくは抗体を損傷することなく生細胞内へ送り込むことを可能にするとされる「Super Antibody Technology」によって、変異するか、または代替のタンパク質配列に交換し得る(Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241)。例えば、抗体結合領域の融合タンパク質および細胞面受容体の同種タンパク質リガンド、もしくはαシヌクレインに結合する特異的配列を伴う二重または多特異抗体、ならびに細胞面受容体の産生は、当技術分野で既知の手法を使用して操作し得る。

10

【0120】

本明細書で説明される、ある抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体では、Fc部分は、変異するか、または代替のタンパク質配列に交換し得、もしくは、抗体はその血液脳障壁透過を増加させるため化学的に修飾し得る。

【0121】

本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体の修飾型は、当技術分野で既知の手法を使用して、全前駆体または親抗体から作り得る。例示的な手法は、本明細書で詳細に説明される。本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、当技術分野で既知の手法を使用して、作り得るか、または製造し得る。ある実施形態では、抗体分子またはそのフラグメントは、「組換え技術」によって産生する。すなわち、組換えDNA技術を使用して産生する。抗体分子またはそのフラグメントを作るための例示的な手法は、本明細書の他の箇所で詳細に説明される。

20

【0122】

本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体には、例えば、共有結合の付着が、抗体がその同種エピトープへ特異的に結合することを阻止しないような、いずれの分子型の抗体への共有結合の付着で修飾された誘導体をも含む。例えば、限定するものではないが、抗体誘導体は、既知の保護/ブロック基による、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、誘導体化、タンパク質分解の切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連鎖等により、修飾されていた抗体を含む。多数の化学的修飾のいずれも、特定の化学分解、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成等を含むが限定されない既知の手法によって実行し得る。加えて、誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含有し得る。

30

【0123】

特に好ましい実施形態では、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、治療する動物、例えばヒトで、有害な免疫反応を誘発しないだろう。ある実施形態では、結合分子、例えば、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントは、患者、例えば、ヒト患者に由来し、その後それらを、それらが由来する同一の種、例えばヒトに使用して、有害な免疫反応の発生を軽減または最小化する。

【0124】

脱免疫化もまた、抗体の免疫原性を減少させるために使用することができる。本明細書で使用される、用語「脱免疫化」は、T細胞エピトープを修飾するための抗体の変質を含み、例えば、国際出願第WO98/52976号および第WO00/34317号を参照されたい。例えば、出発抗体からのV_HおよびV_L配列を分析し、各V領域からのヒトT細胞エピトープ「マップ」は、配列内の相補性決定領域(CDR)および他の鍵となる残基との関連で、エピトープの位置を示す。T細胞エピトープマップからの個々のT細胞エピトープは、最終の抗体の活性を変化する低い危険性で、代替のアミノ酸の置換を特定するために分析する。代替のV_HおよびV_L配列の範囲は、アミノ酸置換の組み合わせを含んで設計され、これらの配列は、その後、結合するポリペプチド、例えば、本明細書に開示される診断方法および治療方法での使用のためのαシヌクレイン特異抗体またはその免疫特異的フラグメントの範囲へ取り込まれ、次に機能を試験される。典型的に、12

40

50

から24の変異体抗体を、産生し、試験する。修飾したVおよびヒトC領域を含む、完全重鎖および軽鎖遺伝子を次に、発現ベクターにクローン化し、その後、プラスミドを、全抗体の産生のため細胞株へ導入する。抗体を次に適切な生化学的および生物学的アッセイで比較し、最適な変異体を特定する。

【0125】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え型、およびファージディスプレイ技術、またはその組み合わせの使用を含む、当技術分野で既知の多種の手法を使用して調製し得る。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で既知のもの、および、例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)、Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981)で教示されるものを含む、ハイブリドーマ手法を使用して産生することができ、該参考文献は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術を通して産生される抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」は、いずれの真核、原核、またはファージクローンをも含む単一クローンに由来する抗体を指し、それを産生する方法を指さない。したがって、用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術を通して産生される抗体に限定されない。ある実施形態では、本発明の抗体は、本明細書に説明されるように、エプスタインバーウイルスでの形質転換を通して不死化されたヒトB細胞に由来する。

【0126】

周知のハイブリドーマ処理(Kohler et al., *Nature* 256 (1975), 495)において、哺乳類からの相対的に短命な、または致死のリンパ球、例えば、本明細書に説明されるようなヒト対象に由来するB細胞は、不死化腫瘍細胞株に融合し(例えば、骨髓腫細胞株)、したがって、双方とも不死化され、遺伝的にコードされるB細胞の抗体を産生する能力があるハイブリッド細胞または「ハイブリドーマ」を産生する。結果のハイブリッドは、単一抗体の形成のために、特異的遺伝子を含む、各個々の株での選定、希釈、および再成長により、単一の遺伝子株に分離する。それらは、所望の抗原に対して均一である抗体を産生し、それらの純粋な遺伝子の近縁に関連して、抗体は「モノクローナル」と称される。

【0127】

このように調製されたハイブリドーマ細胞は、好ましくは未融合の親骨髓腫細胞の成長または生存を阻害する1つ以上の物質を含有する、適切な培養培地で、播種され、成長する。当業者は、ハイブリドーマの形成、選定、および成長のための試薬、細胞株、および培地が、多数の供給源から商業的に入手可能であり、標準化したプロトコルは十分に確立しているということを理解するだろう。通常、所望の抗原に対するモノクローナル抗体の生産のため、ハイブリドーマ細胞が成長する培地培養は、アッセイされる。ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、本明細書に説明されるように、免疫沈降、放射免疫アッセイ(RIA)または酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)等のインビトロのアッセイで決定する。ハイブリドーマ細胞が、所望の特異性、親和性および/または活性を有する抗体を産生することが特定された後、クローンは、希釈の手順を限定することでサブクローン化し、標準の方法により成長させ、例えば、Golding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp 59-103 (1986)を参照されたい。サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、通常の精製手順、例えば、タンパク質A、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、または親和性クロマトグラフィーによって、培養培地、腹水液、または血清から分離する。

【0128】

他の実施形態では、リンパ球は、顕微操作および単離された可変遺伝子で選択し得る。例えば、末梢血液単核細胞は、免疫化または自然免疫性の動物の、例えば、ヒトから、単離し、インビトロで7日間培養し得る。培養物を、スクリーニング判断基準を満たす特異的IgGのため、スクリーニングし得る。陽性のウェルからの細胞は、単離し得る。個々のIgを産生するB細胞は、FACSによって単離するか、または補体媒介溶血斑アッセイでそれらを特定することによって単離し得る。Igを産生するB細胞は、管内で顕微操作し得、 V_H および V_L 遺伝子は、例えば、PT-PCRを用いて、増幅し得る。 V_H および V_L 遺伝子は、発現のため、抗体発現ベクターにクローン化し、細胞へトランスフェクトし得る（例えば、真核または原核細胞）。

【0129】

10

あるいは、抗体を産生する細胞株は、当業者に周知の手法を使用して、選択し、培養し得る。そのような手法は、多種の実験手引き書および主要な出版物に説明される。この点において、下記に説明される本発明に適切な手法は、Current Protocol in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991) に説明され、本明細書の参照によりその全体が組み込まれる。

【0130】

特異的エピトープを認識する抗体フラグメントは、既知の手法で産生し得る。例えば、Fabおよび $F(ab')_2$ フラグメントは、パパイア等の酵素（Fabフラグメントを産生するため）、またはペプシン（ $F(ab')_2$ フラグメントを産生するため）を使用して、組換えで産生するか、または免疫グロブリン分子のタンパク質分解の切断で産生し得る。 $F(ab')_2$ フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域、および重鎖のCH1ドメインを含有する。そのようなフラグメントは、例えば、免疫グロブリンの免疫特異的部分と放射性同位元素等の検出試薬を結合することを含む、免疫診断手順での使用に十分である。

20

【0131】

本明細書で説明されるような完全なヒト抗体は、特に、ヒト患者の治療的治療への使用が望ましい。本発明のヒト抗体は、例えば、彼らの年齢により、例えば、パーキンソン病等の疾患を進行させる危険性が疑われる高齢対象、または疾患を有するが異常に安定した疾患経過である患者から単離する。しかしながら、高齢健常および症状のない対象は、それぞれ、若い対象と比べてより一様に、発達した保護的な抗 α シヌクレイン抗体を有するということを想定することは賢明であるが、後者も本発明のヒト抗体の入手源として用いてよい。これは特に、それらの免疫システムおよび反応機能が、高齢者のものよりも効率性が高いため、家族型のシヌクレイノパチー疾患を進行させる可能性があるが症状のないままである若い患者に関して正確である。

30

【0132】

1つの実施形態では、本発明の抗体は、抗体分子の少なくとも1つの重または軽鎖CDRを含む。他の実施形態では、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子からの少なくとも2つのCDRを含む。他の実施形態では、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子からの少なくとも3つのCDRを含む。他の実施形態では、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子からの少なくとも4つのCDRを含む。他の実施形態では、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子からの少なくとも5つのCDRを含む。他の実施形態では、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子から少なくとも6つのCDRを含む。対象の抗体に含まれ得る少なくとも1つのCDRを含む、例示的な抗体分子は、本明細書に説明される。

40

【0133】

本発明の抗体は、抗体を合成するための当技術分野で既知のいずれの手法、特に、本明細書に説明される化学合成、または、好ましくは組換え発現手法で産生し得る。

【0134】

1つの実施形態では、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もし

50

くは誘導体は、1つ以上のドメインを、部分的にまたは全体的に、削除した（「ドメインを削除した抗体」）合成定常領域を含む。ある実施形態では、適応性のある修飾した抗体は、全C H 2ドメインを除去した、ドメインを削除したコンストラクトまたは変異体を含む（ΔC H 2コンストラクト）。他の実施形態において、短い結合のペプチドは、可変領域の可動性および移動の自由を提供するため、除去したドメインを置換し得る。当業者は、そのようなコンストラクトは、抗体の異化率に対するC H 2ドメインの調節性のため特に好ましいということを理解するだろう。ドメインを削除したコンストラクトは、I g G₁ ヒト定常ドメインをコードするベクターを使用して、派生し得る。例えば、国際出願第W O 0 2 / 0 6 0 9 5 5号および第W O 0 2 / 0 9 6 9 4 8 A 2号を参照されたい。このベクターを、C H 2ドメインを削除し、ドメインを削除したI g G₁ 定常領域を発現する合成ベクターを提供するように操作する。

10

【0135】

ある実施形態では、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、ミニボディである。ミニボディは、当技術分野で説明される方法を使用して作り得る。例えば、米国特許第5,837,821号または国際出願第W O 9 4 / 0 9 8 1 7号を参照されたい。

【0136】

1つの実施形態では、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、モノマーサブユニットの間の対合が可能な限り、数個または単一のアミノ酸の欠失または置換を伴う免疫グロブリン重鎖を含む。例えば、C H 2ドメインの選択した領域での単一アミノ酸の変異は、F c結合を実質的に減少するために十分であり得、それによってαシヌクレイン局在性を増加する。同様に、エフェクター機能（例えば、補体結合）を制御する1つ以上の定常領域ドメイン部分を単純に削除することが望ましい場合がある。定常領域のそのような部分的欠失は、対象の定常領域ドメインに付随する他の望ましい機能を損なわずに、選択した抗体の特性（血清半減期）を改善し得る。さらに、上記に示したように、本開示される抗体の定常領域は、結果のコンストラクトの特性を増強する1つ以上のアミノ酸の変異または置換を通して、合成であり得る。この観点において、修飾した抗体の配置および免疫特性を実質的に維持する一方で、保存結合部位（例えば、F c結合）により提供された活性を崩壊する可能性がある。さらに他の実施形態には、エフェクター機能等の望ましい特性を増強するため、または細胞毒または炭水化物のより多くの付着を提供するため、定常領域への1つ以上のアミノ酸の付加を含む。そのような実施形態では、選択した定常領域ドメインに由来する特異的配列を、挿入するか、または複写することが望ましい。

20

30

【0137】

本発明は、本明細書に説明される抗体分子（例えば、V_H領域および/またはV_L領域）の変異体（誘導体を含む）を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる抗体を提供し、この抗体またはそのフラグメントは、αシヌクレインに免疫特異的に結合する。当技術分野で既知の標準手法は、抗体をコードするヌクレオチド配列で、変異を導入するために使用し得、アミノ酸置換をもたらす部位特異的変異誘発およびPCRで媒介した変異誘発を含むが、それらに限定されない。好ましくは、参照V_H領域のV_H-C D R 1、V_H-C D R 2、V_H-C D R 3、V_L領域のV_L-C D R 1、V_L-C D R 2、またはV_L-C D R 3と比較して、変異体（誘導体を含む）は、50個未満のアミノ酸置換、40個未満のアミノ酸置換、30個未満のアミノ酸置換、25個未満のアミノ酸置換、20個未満のアミノ酸置換、15個未満のアミノ酸置換、10個未満のアミノ酸置換、5個未満のアミノ酸置換、4個未満のアミノ酸置換、3個未満のアミノ酸置換、または2個未満のアミノ酸置換をコードする。「保存アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の荷電で側鎖を有するアミノ酸残基と交換される置換である。同様の荷電で側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸グルタミン酸）、無荷電の極性側鎖を有するア

40

50

ミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐の側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。あるいは、変異は、飽和変異誘発等によって、コード配列の全てまたは一部に沿って無作為に導入し得、結果としての変異体は、活性（例えば、 α シヌクレインに結合する能力）を保持する変異体を特定するため、生物活性を、スクリーニングし得る。

【0138】

例えば、変異をフレームワーク領域のみ、または抗体分子のCDR領域のみに導入することが可能である。導入した変異は、サイレントまたは中性ミスセンス変異であり得、例えば、抗原に結合する抗体の能力に全く作用しないか、わずかに作用し、実際に、いくつかのそのような変異は、いかなるアミノ酸配列であれ変化しない。これらの変異の種類は、コドンの使用を最適化するか、またはハイブリドーマの抗体産生を改善するために有用であり得る。本発明の抗体をコードするコドンで最適化したコーディング領域は、本明細書の他部分で開示される。あるいは、非中性ミスセンス変異は、抗原に結合する抗体の能力を変化し得る。ほとんどの非中性ミスセンス変異があると予想される位置は、CDR内である一方で、ほとんどのサイレントおよび中性ミスセンス変異があると予想される位置は、フレームワーク領域内である。しかしながら、これは絶対条件ではない。当業者は、抗原結合活性での無変化または結合活性での変化（例えば、抗原結合活性における改善または抗体特異性における変化）等の所望の特性を有する変異体分子を設計し、試験し得る。変異誘発に続いて、コードしたタンパク質は、定期的に発現し得、コードしたタンパク質の機能および/または生物活性（例えば、 α シヌクレインの少なくとも1つのエピトープに免疫に特異的に結合する能力）は、本明細書で説明される手法を使用するか、当技術分野で既知の手法を定期的に修正することで決定し得る。

【0139】

III. 抗体をコードするポリヌクレオチド

抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、未修飾のRNAまたはDNAもしくは修飾したRNAまたはDNAであり得る、いずれのポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドでも構成し得る。例えば、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、単鎖および二重鎖DNA、単鎖および二重鎖領域の混合であるDNA、単鎖および二重鎖RNA、ならびに単鎖および二重鎖領域の混合であるRNA、単鎖または、より典型的には、二重鎖、もしくは単鎖および二重鎖領域の混合であり得る、DNAおよびRNA含むハイブリッド分子、で構成し得る。加えて、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAまたはRNAおよびDNAを含む三重鎖領域で構成し得る。抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、安定化、または他の理由のため修飾した、1つ以上の修飾した塩基、またはDNAもしくはRNA主鎖も含み得る。「修飾した」塩基は、例えば、トリチル化した塩基およびイノシン等の珍しい塩基を含む。DNAおよびRNAに多種の修飾を成し得る。したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的に、酵素的に、または代謝的に修飾した型を包含する。

【0140】

免疫グロブリンに由来するポリペプチドの非天然変異体をコードする単離ポリヌクレオチド（例えば、免疫グロブリン重鎖部分または軽鎖部分）は、1つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失を、コードしたタンパク質へ導入するように、1つ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失を、免疫グロブリンのヌクレオチド配列へ導入することにより作られる。変異は、部位特異的変異誘発およびPCRで媒介した変異誘発等の標準手法によって導入し得る。好ましくは、保存アミノ酸置換は、1つ以上の非必須アミノ酸残基で作られる。

【 0 1 4 1 】

周知のように、RNAは、グアニジウムイソチオシアン酸抽出および沈殿の後、遠心分離またはクロマトグラフィーを行うような標準手法で、本来のB細胞、ハイブリドーマ細胞、または他の形質転換される細胞から単離し得る。所望する場合、mRNAは、オリゴdTセルロース上でのクロマトグラフィー等の標準手法によって総RNAから単離し得る。適切な手法は、当技術分野で良く知られている。1つの実施形態では、抗体の軽および重鎖をコードするcDNAは、周知の方法に従い、同時にかまたは別々のいずれか一方で、逆転写酵素およびDNAポリメラーゼを使用して作り得る。PCRは、コンセンサス定常領域プライマーまたはより特異的なプライマーで、公開された重鎖および軽鎖DNAならびにアミノ酸配列に基づいて、開始し得る。上記に説明されるように、PCRは、抗体軽鎖および重鎖をコードするDNAクローンを単離するために使用し得る。この事例では、ライブラリは、コンセンサスプライマーまたはヒト定常領域等の大きめの同族のプロープでスクリーニングし得る。

10

【 0 1 4 2 】

DNA、典型的には、プラスミドDNAは、当技術分野で既知の手法を使用して細胞から単離し、例えば、組換えDNAの手法に関する前述の参考文献で詳細に示される標準の周知の手法に従って制限酵素マッピング、および配列決定を行い得る。当然、DNAは、単離過程またはその後の分析の間のいずれかの時点で、本発明に従い合成であり得る。

【 0 1 4 3 】

1つの実施形態では、本発明は、少なくとも1つの重鎖可変領域のCDRまたは少なくとも2つの重鎖可変領域のV_H-CDRの少なくとも80%、85%、90%、または95%が、本明細書に開示される抗体からの参照重鎖V_H-CDR1、V_H-CDR2、またはV_H-CDR3アミノ酸配列と同一である免疫グロブリン重鎖可変領域(V_H)をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供する。あるいは、V_HのV_H-CDR1、V_H-CDR2、またはV_H-CDR3の領域の少なくとも80%、85%、90%、または95%が、本明細書に開示される抗体からの、参照重鎖V_H-CDR1、V_H-CDR2、およびV_H-CDR3アミノ酸配列と同一である。故に、この実施形態にしたがって、本発明の重鎖可変領域は、図1に示されるポリペプチド配列に関連するV_H-CDR1、V_H-CDR2、またはV_H-CDR3ポリペプチド配列を有する。

20

30

【 0 1 4 4 】

他の実施形態では、本発明は、少なくとも1つのV_L-CDRの軽鎖可変領域または少なくとも2つのV_L-CDRの軽鎖可変領域の少なくとも80%、85%、90%、または95%が、本明細書に開示される抗体からの参照軽鎖V_L-CDR1、V_L-CDR2、またはV_L-CDR3アミノ酸配列と同一である免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L)をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供する。あるいは、V_LのV_L-CDR1、V_L-CDR2、またはV_L-CDR3の領域の少なくとも80%、85%、90%、または95%が、本明細書に開示される抗体からの、参照軽鎖V_L-CDR1、V_L-CDR2、またはV_L-CDR3アミノ酸配列と同一である。故に、この実施形態にしたがって、本発明の軽鎖可変領域は、図1に示される群に関連するV_L-CDR1、V_L-CDR2、およびV_L-CDR3ポリペプチド配列を有する。

40

【 0 1 4 5 】

他の実施形態では、本発明は、V_H-CDR1、V_H-CDR2、およびV_H-CDR3領域は、図1および添付ので配列リスト示されるV_H-CDR1、V_H-CDR2、およびV_H-CDR3群と同一であるポリペプチド配列を有する免疫グロブリン重鎖可変領域(V_H)をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる、単離ポリヌクレオチドを提供する。

【 0 1 4 6 】

当技術分野で既知のように、2つのポリペプチドまたは2つのポリヌクレオチド間の「

50

配列同一性」は、第二のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列に対して1つのポリペプチドまたはポリヌクレオチドのアミノ酸または核酸配列を比較して、決定する。本明細書で説明される場合、任意の特定のポリペプチドが、別のポリペプチドと少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%同一であるかどうかは、当技術分野で既知の方法およびコンピュータプログラム/ソフトウェア、限定されないが、BESTFITプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix(登録商標), Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)等を使用して決定することができる。BESTFITは、2つの配列間の最高の相同性のセグメントを発見するため、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2(1981), 482-489のローカル相同性アルゴリズムを使用する。BESTFITまたは他のいずれの配列整列プログラムを使用して、特定の配列が、例えば、95%で本発明に記載の参照配列と同一かどうかを決定する場合、パラメータを当然、同一性の割合は、参照ポリペプチド配列の全長にわたって算出されるように、相同性におけるずれは参照配列でのアミノ酸の総数の5%まで許可するように設定する。

【0147】

本発明の好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドは、基本的に配列番号2、5、8、11、14、17、または20で示す、抗 α シヌクレイン抗体のV_HまたはV_L領域のポリヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、本質的にそれらからなるか、それらからなる。この点において、当業者は、少なくとも軽および/または重鎖の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドは、双方の免疫グロブリン鎖または1つのみの可変ドメインをコードし得るということを容易に理解するだろう。

【0148】

本発明は、他の箇所で説明されるように、本発明のポリヌクレオチドフラグメントも含む。加えて、本明細書に説明される融合ポリヌクレオチド、Fabフラグメント、および他の誘導体をコードするポリヌクレオチドもまた本発明で意図される。

【0149】

ポリヌクレオチドは、当技術分野で既知の任意の方法で産生するか、または製造し得る。例えば、抗体のヌクレオチド配列が既知のものである場合、抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成したオリゴヌクレオチドから構築し得、例えば、Kutmeier et al., BioTechniques 17(1994), 242、であり、簡潔に説明すると、抗体をコードする配列部分を含有する重複オリゴヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニールおよび連結、ならびに、次にPCRによる連結したオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【0150】

あるいは、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源からの核酸から産生し得る。特定の抗体をコードする核酸を含有するクローンは使用不可能だが、抗体分子の配列が既知のものである場合、抗体をコードする核酸は、配列3'および5'末端にハイブリッドが可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によってか、または、例えば、抗体をコードするcDNAライブラリからのcDNAクローンを特定するため特定の遺伝子配列に対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローン化によって、適切な供給源(例えば、抗体cDNAライブラリ、または抗体を発現するために選択したハイブリドーマ細胞等の α シヌクレイン特異的抗体を発現する任意の組織または細胞から作り出されたcDNAライブラリ、またはそれから単離された核酸、好ましくはpoly A⁺RNA)から化学的に合成するか取得し得る。PCRで産生した増幅した核酸を、次に当技術分野で周知の任意の方法を使用して、複写可能なクローンベクターへクローン化する。

【0151】

抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体を決定した時点で、異なるアミノ酸配列を有する抗体を産生するため、例えば、アミノ酸置換、欠失および/または挿入を作りだすため、そのヌクレオチド配列を、ヌクレオチド配列の操作のための当技術分野で既知の方法、例えば、組換えDNA手法、部位特異的変異誘発、PCR等を使用して、操作し得る（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)、および Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N

10

【0152】

IV. 抗体ポリペプチドの発現

本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体を提供するための単離した遺伝子材料の操作に続いて、抗体をコードするポリヌクレオチドは、典型的に、所望の量の抗体を産生するために使用し得る宿主細胞への導入のため、発現ベクターに挿入する。抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくは類似体、例えば、標的分子に結合する抗体の重または軽鎖の組換え発現は、本明細書に説明される。本発明の抗体分子、または抗体の重もしくは軽鎖、またはその部分（好ましくは、重または軽鎖可変ド

20

【0153】

メインを含有する）をコードするポリヌクレオチドが取得された時点で、抗体分子の産生のためのベクターは、当技術分野で周知の手法を使用して、組換えDNA技術を使用して、産生し得る。したがって、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドを発現することでタンパク質を調製する方法が本明細書に説明される。当業者に周知の方法は、抗体コード配列、ならびに適切な転写および翻訳の制御シグナルを含有する発現ベクターをコンストラクトするために使用し得る。これらの方法には、例えば、インピトリの組換えDNA手法、合成手法、およびインピボの遺伝子組換えが含まれる。本発明はしたがって、プロモーターに操作可能に連結する、本発明の抗体分子、またはその重もしくは軽鎖、または重もしくは軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む複写可能なベクターを提供する。そのようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含み得、（例えば、国際出願第WO 86/05807号および第WO 89/01036号ならびに米国特許第5,122,464号を参照されたい）抗体の可変ドメインは、全重または軽鎖の発現のためのそのようなベクターへクローン化し得る。

30

本明細書で使用される用語「ベクター」または「発現ベクター」は、宿主細胞へ導入し、宿主細胞で所望の遺伝子を発現するための媒体として、本発明に従って使用するベクターを意味する。当業者には既知のように、そのようなベクターは、容易にプラスミド、ファージ、ウイルスおよびレトロウイルスからなる群から選択し得る。一般的に、本発明に

40

適応するベクターは、選択マーカー、所望の遺伝子のクローン化を促進する適切な制限部位、および真核または原核細胞で侵入および/または複写する能力を含むだろう。この発明の目的のため、多数の発現ベクターシステムを採用し得る。例えば、ベクターの1つのクラスは、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（RSV、SV、MMTV、またはMOMLV）、またはSV40ウイルス等の動物ウイルスに由来するDNA要素を利用する。他は、内部リボソーム結合部位を有するポリシストロニックシステムの使用を含む。加えて、それらの染色体へDNAを組み込んだ細胞は、移入した宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することにより選択し得る。マーカーは、栄養要求宿主に対する原栄養性、殺生物抵抗性（例えば、抗生物質）、または銅等の重金属への抵抗性を提供し得る。選択可能なマーカー遺伝子を、発現するためにDNA配列に直接連結するか、または同時形質転換によって同細胞へ導入するかのどちらかが可能である。mRNAの最適な

50

合成のために付加的な要素も必要であり得る。これらの要素には、シグナル配列、スプライスシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルを含み得る。

【0154】

特に好ましい実施形態では、上記で説明されたように、クローン化した可変領域遺伝子は、重鎖および軽鎖定常領域遺伝子（好ましくはヒト）とともに、発現ベクターへ挿入する。1つの実施形態では、これは米国特許第6,159,730号で開示されるNEOSPLAと称される、Biogen IDEC, Inc., 専売の発現ベクターを使用して行われる。このベクターは、サイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサー、マウスベータグロビン主要プロモーター、複写のSV40起源、ウシ成長ホルモンポリアデニル配列、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼエクソン1およびエクソン2、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、およびリーダー配列を含有する。このベクターは、可変および定常領域遺伝子の取り込み、CHO細胞でのトランスフェクション、その後のG418含有培地での選択、およびメトトレキサート増幅を行うことで、抗体の高いレベルの発現をもたらすことが分かった。当然、真核細胞で発現を誘発する能力があるいずれの発現ベクターも本発明で使用し得る。適切なベクターの例は、プラスミドpCDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、およびpZeoSV2 (Invitrogen, San Diego, CAから入手可能)、およびプラスミドpCI (Promega, Madison, WIから入手可能)を含むが、それらに限定されない。一般的に、適宜に高いレベルの免疫グロブリン重鎖および軽鎖を発現するための多数の形質転換した細胞をスクリーニングすることは、例えば、ロボットシステムによって実行し得る定期的な実験である。ベクターシステムは、米国特許番号第5,736,137号、および第5,658,570号でも教示され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。このシステムは、例えば、30pg/細胞/日を上回る、高い発現レベルを提供する。他の例示的なベクターシステムは、例えば、米国特許第6,413,777号に開示される。

【0155】

他の好ましい実施形態では、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、米国特許出願第2003-0157641 A1号で開示され、その全体が本明細書に組み込まれるポリシストロニックコンストラクト等を使用して、発現し得る。これらの発現システムでは、抗体の重鎖および軽鎖等の複数の対象の遺伝子産物は、単一ポリシストロニックコンストラクトから産生し得る。これらのシステムは、相対的に高いレベルの抗体を提供するため、内部リボソーム侵入部位(IRES)を有利に使用する。適応するIRES配列は、米国特許第6,193,980号に開示され、これも本明細書に組み込まれる。当業者は、そのような発現システムは、本出願で開示される、あらゆる種類の抗体を効果的に産生するために使用し得るということを理解するであろう。

【0156】

より一般的には、抗体のモノマーサブユニットをコードするベクターまたはDNA配列を調製した時点で、発現ベクターは、適切な宿主細胞へ導入し得る。宿主細胞へのプラスミドの導入は、当技術分野で既知の様々な手法で達成し得る。これらは、例えば、Fugeneまたはリポフェクタミンを使用するリポトランスフェクション(lipotransfection)、原形質融合、リン酸カルシウム沈降、エンベロープDNAとの細胞融合、微量注入、および無処置のウイルスへの感染を含むトランスフェクションを含むが、それらに限定されない。典型的に、宿主へのプラスミド導入は、標準のリン酸カルシウム共沈法を用いる。発現コンストラクトを宿主宿主細胞は、重および/または軽鎖タンパク質の産生に適切な条件の下、成長させ、重および/または軽鎖タンパク質合成のためアッセイした。例示的なアッセイ手法は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、または蛍光励起セルソーターアッセイ(FACS)、免疫

組織化学的検査等を含む。

【0157】

発現ベクターは、従来の手法で宿主細胞へ移入し、トランスフェクトされた細胞は、次に、本明細書に説明される方法で用いる抗体を、産生するため従来の手法で培養する。したがって、本発明は、異種プロモーターに操作可能に連結する、本発明の抗体またはその重もしくは軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を含む。二重鎖の抗体の発現のための好ましい実施形態では、重鎖および軽鎖の双方をコードするベクターは、下記に説明されるように、全免疫グロブリン分子の発現のため宿主細胞で同時発現し得る。

【0158】

宿主細胞は本発明の2つの発現ベクターで同時トランスフェクトし得、第1のベクターは重鎖に由来するポリペプチドをコードし、第2のベクターは軽鎖に由来するポリペプチドコードをコードする。2つのベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの同等の発現を可能にする同一の選択可能なマーカ含有し得る。あるいは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの双方をコードする単一ベクターを使用し得る。そのような状態で、軽鎖は、有利に有毒でない重鎖の過多を避けるため、重鎖の前に置かれ、Proudfoot, Nature 322 (1986), 52、Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2917を参照されたい。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含み得る。

【0159】

本明細書で使用される「宿主細胞」は、組換えDNA手法を使用してコンストラクトされるベクターを宿し、少なくとも1つの異種遺伝子をコードする細胞を指す。組換え宿主からの抗体の単離の過程の記述において、用語「細胞」および「細胞培養」は、抗体の源を示すため、明瞭に特定しない限りは、互換的に使用する。言い換えると、「細胞」からのポリペプチドの回収は、全細胞の沈降から、または培地および懸濁した細胞の双方を含有する細胞培養物からの回収を意味し得る。

【0160】

多種の宿主発現ベクターシステムは、本明細書に説明される方法での使用で用いる抗体分子を発現するため利用し得る。そのような宿主発現システムは、対象のコード配列を産生し、その後精製し得る媒体を示すだけでなく、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換するか、またはトランスフェクトする際、インサイチュで本発明の抗体分子を発現し得る細胞を示す。これらは、抗体コード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換される微生物等（例えば、大腸菌、枯草菌）、抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換される酵母（例えば、サッカロミセス、ピチア）、抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染する昆虫細胞システム、組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）、タバコモザイクウイルス（TMV））に感染するか、または抗体コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換する植物細胞システム、または哺乳類細胞のゲノム（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳類ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）に由来するプロモーターを含有する組換え発現コンストラクトを宿す哺乳類細胞システム（例えば、COS、CHO、NSO、BLK、298、3T3細胞）を含むが、それらに限定されない。特に全組換え抗体分子の発現のため、好ましくは、大腸菌等の細菌性細胞、より好ましくは真核細胞を、組換え抗体分子の発現に使用し得る。例えば、ヒトサイトメガロウイルスからの主要な中間初期遺伝子プロモーター要素等のベクターと併用するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞等の哺乳類細胞は、抗体の有効な発現システムであり、例えば、Foecking et al., Gene 45 (1986), 101、Cockett et al., Bio/Technology 8 (1990), 2、を参照されたい。

【0161】

タンパク質発現のため使用される宿主細胞株は、しばしば哺乳類起源のものであり、当業者は、本明細書で発現される所望の遺伝子産物に最適である特定の宿主細胞株を優先的に決定するための能力を有すると考えられる。例示的な宿主細胞株は、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）、DG44およびDUXB11（チャイニーズハムスター卵巣、DHFRマイナス）、HELA（ヒト子宮頸癌）、CVI（サル腎臓線）、COS（SV40T抗原を有するCVIの誘導体）、VERY、BHK（ベビーハムスター腎臓）、MDCK、WI38、R1610（チャイニーズハムスター線維芽細胞）BALBC/3T3（マウス線維芽細胞）、HAK（ハムスター腎臓線）、SP2/O（マウス骨髄腫）、P3x63-Ag3.653（マウス骨髄腫）、BFA-1c1BPT（ウシ内皮細胞）、RAJI（ヒトリンパ球）、および293（ヒト腎臓）を含むが、それらに限定されない。CHO細胞および293細胞が特に好ましい。宿主細胞株は、典型的に商業サービス、American Tissue Culture Collection、または出版された文献から入手可能である。

10

【0162】

加えて、宿主細胞株は、挿入した配列の発現を調節するか、または所望の特異様式で、遺伝子産物を修飾およびプロセッシングするものが選択される。そのようなタンパク質産物の修飾（例えば、グリコシル化）およびプロセッシング（例えば、切断）は、タンパク質の機能において重要である可能性がある。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングおよび修飾に特徴的および特異的機構を有する。適切な細胞株または宿主システムは、発現する外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするように選択し得る。この目的を達成するため、遺伝子産物の一次転写物、グリコシル化、およびリン酸化の適切なプロセッシングのための細胞機構を有する真核宿主細胞を使用し得る。

20

【0163】

長期間においては、組換えタンパク質の高収量産生が好ましい。例えば、抗体分子を安定的に発現する細胞株を操作し得る。複製のウイルス起源を含有する発現ベクターを使用するよりはむしろ、宿主細胞は、適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネータ、ポリアデニル化部位等）、および選択可能なマーカーによって制御されるDNAで形質転換し得る。外来DNAの導入に続いて、操作した細胞は、濃縮した培地で1～2日間成長させ得、次に選択の培地へ切り替え得る。組換えプラスミドでの選択可能なマーカーは、選択物へ抵抗を与え、細胞が、安定的にそれらの染色体へプラスミドが組み込まれること、および次々に株細胞株へクローン化し伸長し得る病巣を形成するように成長させることを可能にする。この方法は、抗体分子を安定的に発現する細胞株を操作するため、有利に使用し得る。

30

【0164】

多数の選択システムは、それぞれ、チミジンキナーゼ、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、またはアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ細胞で採用し得る単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Wigler et al., Cell 111 (1977), 223）、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalska & Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202）、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowy et al., Cell 122 (1980), 817）遺伝子の使用を含むが、それらに限定されない。また、抗代謝物抵抗は次の遺伝子の選択の基準として使用し得る。メトトレキサートに抵抗を与えるdhfr（Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357、O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527）、ミコフェノール酸に抵抗を与えるgpt（Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072）、G-418 Goldspiel et

40

50

al., *Clinical Pharmacy* 12 (1993), 488-505に抵抗を与えるneo、Wu and Wu, *Biotherapy* 3 (1991), 87-95、Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* 32 (1993), 573-596、Mulligan, *Science* 260 (1993), 926-932、およびMorgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62 (1993), 191-217、TIB TECH 11 (1993), 155-215、およびハイグロマイシン (Santerre et al., *Gene* 30 (1984), 147、に抵抗を与えるhygro。使用し得る当技術分野で一般的に知られる組換えDNA技術の方法は、Ausubel et al (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993)、Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)、およびChapters 12 and 13, Dracopoli et al (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994)、Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981)に説明され、参照によってそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0165】

20

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅で増加し得る。再考察のため、Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNE cloning*, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987)、を参照されたい。抗体を発現するベクターシステムでのマーカーが、増幅可能な場合、宿主細胞の培養に存在する阻害物質のレベルの増加は、マーカー遺伝子の複写物の数を増加させるだろう。増幅した領域が抗体遺伝子に付随するため、抗体の産生もまた増加するだろう。Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.* 3 (1983), 257を参照されたい。

30

インビトロの産生は、大量の所望のポリペプチドを与えるようにスケールアップすることを可能にする。組織培養条件下の哺乳類細胞培養の手法は当技術分野で既知であり、例えば、気泡ポンプリアクタまたは持続型かくはん器等の均一懸濁液培養、もしくは、例えば、中空繊維内、マイクロカプセル内、アガロースマイクロビーズまたはセラミックカートリッジ上等での固定化または捕捉化細胞培養を含む。必要および/または所望であれば、ポリペプチドの溶液は、通例のクロマトグラフィー法、例えば、本明細書に説明される合成ヒンジ領域ポリペプチドの優先的生合成後またはHICクロマトグラフィーステップの前後に、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAEセルロースでのクロマトグラフィー、または(免疫)親和性クロマトグラフィーによって精製し得る。

【0166】

40

本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント変異体、もしくは誘導体をコードする遺伝子は、細菌もしくは昆虫もしくは酵母もしくは植物細胞等の非哺乳類細胞でも発現し得る。核酸を容易に吸収する細菌は、大腸菌またはサルモネラ株、枯草菌、肺炎球菌、連鎖球菌、およびインフルエンザ菌等の腸内細菌科のメンバーを含む。細菌中で発現した場合、異種ポリペプチドは、典型的に封入体の一部になるということが理解されるだろう。異種ポリペプチドは、必ず単離し、精製し、次に機能分子へ構築する必要がある。抗体の四価型を所望する場合、サブユニットは次に四価抗体へ自己構築し、例えば、国際出願第W002/096948号を参照されたい。

【0167】

細菌システムにおいて、多数の発現ベクターは、発現された抗体分子を目的とした使用

50

次第で、有利に選択し得る。例えば、抗体分子の薬学的組成物の産生のため、大量のタンパク質等を産生する場合、容易に精製し得る高いレベルの融合タンパク質産物の発現を指示するベクターが望ましい。そのようなベクターは、抗体コード配列がlacZコーディング領域での枠内で個々にベクターに連結し得、それによって融合タンパク質が産生される大腸菌発現ベクターpUR278 (Rutherford et al., EMBO J. 2 (1983), 1791); pINベクター (Inouye & Inouye, Nucleic Acid Res. 13 (1985), 3101-3109、Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509)等を含むが限定されない。pGEXベクターもまた、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) を有する融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するために使用し得る。一般的に、そのような融合タンパク質は、可溶性であり、遊離型グルタチオンの存在下での吸着およびグルタチオンアガロースビーズのマトリクスへの結合、次に続く溶出により容易に、溶解した細胞から精製し得る。pGEXベクターは、トロンピンまたは活性化第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、そのため、クローン化した標的遺伝子産物は、GST成分から遊離し得る。

10

【0168】

原核生物に加えて、真核微生物も使用し得る。例えば、ピキア・パストリス等、他の多数の株も一般的に入手可能であるが、出芽酵母または一般のパン酵母は、真核微生物の中で最も一般的に使用される。サッカロミセスでの発現において、プラスミドYRp7、例えば、(Stinchcomb et al., Nature 282 (1979), 39、Kingsman et al., Gene 7 (1979), 141、Tschemper et al., Gene 10 (1980), 157)が一般的に使用される。このプラスミドは、トリプトファンで成長する能力に欠ける酵母の変異株のための選択マーカーを提供するTRP1遺伝子をすでに含有している。例えば、ATCC No. 44076またはPEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12)。酵母宿主細胞ゲノムの特性としてのtrp1病変の存在は、次に、トリプトファンの非存在で、成長による形質転換を検出するための有効な環境を提供する。

20

【0169】

昆虫システムでは、キンウワバ科核多角体病ウイルス (AcNPV) が外来遺伝子を発現するためのベクターとして、典型的に使用される。ウイルスは、ヨトウガ細胞で成長させる。抗体コード配列を、それぞれ、ウイルスの非必須領域 (例えば、ポリヘドリン遺伝子) へクローン化し、AcNPVプロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の制御下に配置し得る。

30

【0170】

本発明の抗体分子が、組換え技術によって発現した時点で、全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖、および重鎖、または本発明の他の免疫グロブリン型は、当技術分野の、例えば、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換、親和性、特にタンパク質Aの後の特異的抗原に対する親和性、およびふるいカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、硫酸塩析等の吸収率較差溶解度、またはタンパク質の精製のための他の任意の標準手法によるものを含む、当技術分野の標準手順に従って精製し得、例えば、Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982)を参照されたい。あるいは、本発明の抗体の親和性を増加させるために好ましい方法は、米国特許出願第2002-0123057A1号に開示される。

40

【0171】

V. 融合タンパク質および抱合体

ある実施形態では、抗体ポリペプチドは、通常抗体に付随しないアミノ酸配列または1つ以上の部分を含む。例示的な修飾は以下でより詳しく説明される。例えば、本発明の単鎖fv抗体フラグメントは、可動性のリンカー配列を含むか、機能成分 (例えば、PEG、薬物、毒素、または蛍光性、放射性、酵素、核磁気、および重金属等の標識) を付加するために修飾し得る。

50

【 0 1 7 2 】

本発明の抗体ポリペプチドは、融合タンパク質を含むか、本質的にそれからなるか、それからなることを特徴とする。融合タンパク質は、例えば、少なくとも1つの標的結合部位、および少なくとも1つの異種部分、すなわち、自然に連結しない部分を有する免疫グロブリン α シヌクレイン結合ドメインを含む、キメラ分子である。アミノ酸配列は通常、融合ポリペプチドに集まる別々のタンパク質に存在し得るか、または融合ポリペプチドの新しい配列に配置されるが、通常同一のタンパク質に存在し得る。例えば、化学合成、またはペプチド領域が所望の関係でコードされるポリヌクレオチドの作製および翻訳により、融合タンパク質を作り得る。

【 0 1 7 3 】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに適用される用語「異種」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、比較される他の実体の残りの部分とは異なる実体に由来するということの意味する。例えば、本明細書で使用される、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは類似体に融合させるための「異種ポリペプチド」は同種の非免疫グロブリンポリペプチド、もしくは異なる種の免疫グロブリンまたは非免疫グロブリンポリペプチドに由来する。

【 0 1 7 4 】

本明細書の他の部分で詳細に説明されるように、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、さらなる組換え技術によって、NまたはC末端で異種ポリペプチドに融合するか、または化学的にポリペプチドまたは他の組成物に抱合し得る（共有結合および非共有結合抱合体を含む）。例えば、抗体は、組換え技術によって、検出するアッセイの標識で有用な分子、および異種ポリペプチド、薬物、放射性、または毒素等のエフェクター分子に融合または抱合し得、例えば、国際出願第WO 92 / 08495号、第WO 91 / 14438号、第WO 89 / 12624号、米国特許番号5,314,995、および欧州特許出願公開第0 396387号を参照されたい。

【 0 1 7 5 】

本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、ペプチド結合または修飾したペプチド結合、すなわちペプチドアイソスターにより相互に連結するアミノ酸からなり得、20個の遺伝子でコードしたアミノ酸以外にも、アミノ酸を含有する。抗体は、当技術分野で周知の翻訳後プロセッシング等の自然なプロセッシング、または化学的修飾手法によって修飾し得る。そのような修飾は、本文および詳細な論文、ならびに膨大な数の研究文献により詳細に説明される。修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖、およびアミノまたはカルボキシル終端、もしくは炭水化物等の部分を含む、抗体のいかなる場所でも生じ得る。同一の修飾型は、所与の抗体のいくつかの部位で、同一または異なる程度に、存在し得るということが理解されるだろう。また、所与の抗体は、多くの修飾型を含有し得る。抗体は、例えば、ユビキチン化の結果として分岐し得、それらは分岐または非分岐で環状であり得る。環状の、分岐した、および分岐した環状の抗体は、翻訳後自然プロセッシングからもたらされるか、合成方法により作り得る。修飾には、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド連結の形成、脱メチル化、共有結合架橋結合の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化等のアミノ酸の転移RNAで媒介したタンパク質への付加、およびユビキチン化を含み、例えば、Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993)、Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson

10

20

30

40

50

, Ed., Academic Press, New York, pgs 1 - 12 (1983), Seifter et al., Meth. Enzymol. 182 (1990), 626 - 646, Rattan et al., Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992), 48 - 62) を参照されたい。

【0176】

本発明は抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体、および異種ポリペプチドを含む融合タンパク質も提供する。1つの実施形態では、本発明の融合タンパク質は、本発明の抗体、またはそのフラグメントもしくは変異体の V_H 領域のうちの任意の1つ以上のアミノ酸配列、あるいは本発明の抗体、またはそのフラグメントもしくは変異体の V_L 領域のうちの任意1つ以上のアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに異種ポリペプチド配列を含むか、それらから本質的になるか、それらからなる。他の実施形態では、本明細書に開示される診断および治療方法での使用のための融合タンパク質は、抗体、またはそのフラグメント、変異体、もしくは誘導体の V_H -CDRのうちのいずれか1つ、2つ、3つのアミノ酸配列、あるいは抗体、またはそのフラグメント、変異体、もしくは誘導体の V_L -CDRのうちのいずれか1つ、2つ、3つのアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに異種ポリペプチド配列を含むか、それらから本質的になるか、それらからなる。1つの実施形態では、融合タンパク質は、本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体、もしくは変異体の V_H -CDR3のアミノ酸配列、および異種ポリペプチド配列を有するポリペプチドを含み、この融合タンパク質は、 α シヌクレインに特異的に結合する。他の実施形態では、融合タンパク質は、本発明の抗体またはそのフラグメント、誘導体、もしくは変異体の少なくとも1つの V_H 領域のアミノ酸配列、および本発明の抗体またはそのフラグメント、誘導体、もしくは変異体の少なくとも1つの V_L 領域のアミノ酸配列、および異種ポリペプチド配列を有するポリペプチドを含む。好ましくは、融合タンパク質の V_H および V_L 領域は、 α シヌクレインに特異的に結合する単一源抗体（またはscFvまたはFabフラグメント）に対応する。さらに他の実施形態では、本明細書に開示される診断および治療方法での使用のための融合タンパク質は、抗体、またはそのフラグメント、もしくは変異体の任意の数量の、1つ、2つ、3つまたはそれ以上の V_H CDRのアミノ酸配列、抗体、またはそのフラグメント、もしくは変異体の任意の数量の、1つ、2つ、3つまたはそれ以上の V_L CDRのアミノ酸配列、および異種ポリペプチド配列を有するポリペプチドを含む。好ましくは、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上の V_H -CDRまたは V_L -CDRは本発明の単一源抗体（またはscFvまたはFabフラグメント）に対応する。これらの融合タンパク質をコードする核酸も、また本発明に包含する。

【0177】

文献に報告される例示的な融合タンパク質は、T細胞受容体 (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 2936 - 2940, CD4 (Capon et al., Nature 337 (1989), 525 - 531, Traunecker et al., Nature 339 (1989), 68 - 70, Zettmeissl et al., DNE Cell Biol. USA 9 (1990), 347 - 353およびByrn et al., Nature 344 (1990), 667 - 670)、Lセレクトリン (ホーミング受容体) (Watson et al., J. Cell. Biol. 110 (1990), 2221 - 2229およびWatson et al., Nature 349 (1991), 164 - 167)、CD44 (Aruffo et al., Cell 61 (1990), 1303 - 1313)、CD28およびB7 (Linsley et al., J. Exp. Med. 173 (1991), 721 - 730)、CTLA-4 (Linsley et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 561 - 569)、CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66 (1991), 1133 - 1144)、TNF受容体 (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991),

10535 - 10539、Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883 - 2886およびPeppel et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 1483 - 1489 (1991)、およびIgE受容体(Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), Abstract No. 1448)、の融合を含む。

【0178】

本明細書の他の箇所の説明されるように、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、ポリペプチドのインピボの半減期を増加するため、または当技術分野で既知の方法を使用して免疫アッセイでの使用のために、異種ポリペプチドに融合し得、例えば、Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106 - 119、Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531、またはWeir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512を参照されたい。

【0179】

さらに、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、または誘導体は、それらの精製または検出を促進するため、ペプチド等のマーカー配列に融合し得る。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)で提供されるタグ等のヘキサヒスチジンペプチド(HIS)であり、とりわけ、それらの多くは商業的に入手可能である。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821 - 824で説明されるように、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質(Wilson et al., Cell 37 (1984), 767)および「flag」タグに由来するエピトープに相当する、「HA」タグを含むが、それらに限定されない。

【0180】

融合タンパク質は、当技術分野で周知の方法を使用して調製し得、例えば、米国特許番号第5,116,964号および第5,225,538号を参照されたい。融合がなされる正確な部位は、融合タンパク質の分泌または結合特性を最適化するため経験的に選択し得る。融合タンパク質をコードするDNAは、発現のため次に宿主細胞へトランスフェクトする。

【0181】

本発明の抗体は、例えば、分子の治療的特性を改善するため、標的検出を促進するため、または患者のイメージングまたは治療のため、非抱合の型で使用し得るか、または少なくとも1つの様々な分子に抱合し得る。本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、精製を実施した場合、精製の前または後のいずれかに標識化し得るか、抱合し得る。特に、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、治療的薬剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物学的反応修飾因子、薬学的薬剤、またはPEGに抱合し得る。

【0182】

従来の抗体を含む免疫毒素である抱合は、当技術分野で広く説明される。毒素は従来の結合手法によって抗体に結合し得るか、またはタンパク質毒素部分を含有する免疫毒素は、融合タンパク質として産生し得る。本発明の抗体は、免疫毒素等を取得するため、対応する方法で、使用し得る。そのような免疫毒素の図解は、Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59 - 70およびFanger, Immunol. Today 12 (1991) 51 - 54に説明される。

【0183】

当業者は、抱合は、抱合するため選択した薬剤次第で、多種の手法を使用しても構築し得るということを理解するだろう。例えば、ビオチンでの抱合は、例えば、シヌクレイン結合ポリペプチドをビオチンN-ヒドロキシサクシニミドエステル等のビオチンの活性化

したエステルで反応させることによって調製する。同様に、蛍光マーカ－での抱合は、例えば、本明細書に挙げられるもの等の結合薬剤の存在下で調製するか、イソチオシアン酸、好ましくはフルオレセインイソチオシアン酸での反応によって調製し得る。本発明の抗体、または抗原その結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体の抱合は、類似の方法で調製し得る。

【0184】

本発明は、診断または治療的薬剤と抱合される、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をさらに包含する。抗体は、例えば、神経疾患の存在を実証するため、神経疾患を患う危険性を示すため、例えば所与の治療および/または予防療法の有効性を決定するための臨床試験手順の一部として、神経疾患、すなわち、シヌクレイノパチー疾患の発症または進行を監視するため、診断で使用し得る。検出は、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体の結合を検出可能な物質へ結合することによって、促進し得る。検出可能な物質の例は、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、様々なポジトロン放射組織分布を用いるポジトロン放射金属、および非放射性常磁性金属イオンを含み、例えば、本発明に記載の診断のような使用のため、抗体に抱合し得る金属イオンに関して、米国特許第4,741,900号を参照されたい。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼを含み、適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを含み、適切な蛍光材料の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアン酸、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンを含み、発光材料の例には、ルミノールを含み、生物発光材料の例には、ルシフェラーゼルシフェリンおよびエクオリンを含み、適切な放射性材料の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In または ^{99}Tc を含む。

【0185】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、化学発光の化合物に結合させることによって検出可能に標識化し得る。化学発光でタグをつけた抗体は次に、化学反応の経過中に生じる発光の存在を検出することで決定する。特に有用な、化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマティックアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、およびシュウ酸エステルである。

【0186】

抗体またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体が、検出可能に標識化し得る1つの方法は、同一のものを酵素に連結すること、および酵素免疫アッセイ(EIA)(Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2(1978), 1-7)、Voller et al., J. Clin. Pathol. 31(1978), 507-520、Butler, Meth. Enzymol. 73(1981), 482-523、Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980)、Ishikawa, E. et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo(1981)で連結した産物を使用することである。抗体に結合する酵素は、適切な基質と、好ましくは発色基質と、例えば分光光度法、蛍光定量法、または視覚的手段によって、検出可能な化学成分を産生するような方法で、反応するだろう。抗体を検出可能に標識化するために使用し得る酵素は、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイド異性化酵素、酵母アルコール脱水素酵素、アルファグリセロリン酸、脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコース酸化酵素、ベータガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸

脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼを含むが、それらに限定されない。加えて、検出は、酵素に比色物質を採用する比色法によって達成し得る。検出は、同様に調製した基準と比較して、物質の酵素反応の程度の視覚的比較によっても達成し得る。

【0187】

検出は、任意の多種多様の他の免疫アッセイを使用しても達成し得る。例えば、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体を放射性に標識化することによって、放射免疫アッセイ(RIA)(例えば、本明細書で参照によって組み込まれる Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassay, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986))を参照されたい。)の使用で抗体を検出することが可能である。放射性同位元素は、ガンマカウンター、シンチレーションカウンター、またはオートラジオグラフィーを含む、手段によって検出し得るが、限定されない。

【0188】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、 ^{152}Eu 、または他のランタニド系等の蛍光放射金属を使用しても検出可能に標識化し得る。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)のような金属キレート群を使用して抗体に付着し得る。

【0189】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体への様々な成分を包含するための手段は、既知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985)、Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987)、Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy, A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)、"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158を参照されたい。

【0190】

上述したように、ある実施形態では、例えば結合ポリペプチド、例えば、抗体またはその免疫特異的フラグメント等の結合分子の安定性または有効性を増強する成分を包含し得る。例えば、1つの実施形態では、本発明のPEGは、それらのインビボでの半減期を増加させるため結合分子に包含し得る。Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106、Adv. in Drug Deliv. Rev. 5

10

20

30

40

50

4 (2 0 0 2) , 5 3 1、またはWeir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2 0 0 2) , 5 1 2 .

【 0 1 9 1 】

VI. 使用の組成物および方法

本発明は、例えば、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、もしくはその誘導体または変異体等の上述の α シヌクレイン結合分子、または本発明のポリヌクレオチド、ベクター、もしくは細胞を含む組成物に関する。本発明の組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含み得る。さらに、本発明の薬学的組成物は、インターロイキンまたはインターフェロン等のさらなる薬剤を、目的とする薬学的組成物の使用次第で、含み得る。例えば、パーキンソン病の治療のための使用において、付加的な薬剤は、小さい有機体分子、抗 α シヌクレイン抗体、およびその組み合わせからなる群から選択し得る。ゆえに、特定の好ましい実施形態では、本発明は、シヌクレイノパチー疾患の予防的および治療的治療のための薬学的または診断用組成物の調製のため、対象のシヌクレイノパチー疾患の進行またはシヌクレイノパチー疾患の治療への応答を観察するため、またはシヌクレイノパチー疾患を発症する対象の危険性を決定するための、 α シヌクレイン結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメント、もしくはそのうちの任意の1つと同一の結合特異性を実質的に有する結合分子、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、または細胞の使用に関する。

10

【 0 1 9 2 】

ゆえに、1つの実施形態では、本発明は、脳および中枢神経系のそれぞれでの、 α シヌクレインの異常な蓄積および/または堆積に特徴付けられる神経性疾患を治療する方法に関し、その方法は、上述の本発明の α シヌクレイン結合分子、抗体、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞の任意の1つの治療的有効量をその必要性に応じて、対象に投与することを含む。用語「神経性疾患」は、パーキンソン(PD)、パーキンソン病認知症(PDD)、レビー小体を伴う認知症(DLB)、アルツハイマー病のレビー小体変異型(LBVA)、多系統萎縮症(MSA)、純粋自律神経不全症(PAF)を伴う神経変性脳鉄蓄積1型(NBIA-I)、アルツハイマー病、ピック病、若年発症全身性神経軸索ジストロフィー(ハラールフォルデンシュパッツ)、筋萎縮性側索硬化症、外傷性脳損傷等のシヌクレイノパチー疾患、およびダウン症、ならびに他の運動障害、および中枢神経システム(CNS)の疾病全般を含むがこれらに限定されない。別途提示されない限り、神経変性、神経性、または精神神経性の用語は、本明細書で、互換的に使用される。

20

30

【 0 1 9 3 】

本発明の治療的アプローチの特定の利点は、本発明の抗体が、パーキンソン症の兆候のない高齢対象からのB細胞またはB記憶細胞に由来し、したがって、いくらかの確率で、臨床的に顕性のシヌクレイノパチー疾患を予防するか、または臨床的に顕性の疾病を発生させる危険性を減少させるか、または臨床的に顕性の疾病の発症または進行を遅らせる能力があるということにある。典型的に、本発明の抗体は、すでに、体細胞成熟、すなわち、抗体の可変領域の体細胞の変動手段による標的の α シヌクレイン分子への高親和性結合における、選択性および有効性に対する最適化に成功している。

【 0 1 9 4 】

40

インビボでのそのような細胞、例えば、ヒトの細胞は、関連のまたは他の生理学的タンパク質、または自己免疫性またはアレルギー性反応の細胞構造の手段によって活性化されないという知識も、これが、臨終試験を通して成功的に生存の可能性を大幅に増加することを示すため、医学的に非常に重要である。いわば、有効性、許容性、および耐容性は、少なくとも1つのヒト対象で予防的または治療的抗体の前臨床および臨床開発の以前に実証されている。したがって、本発明のヒト抗 α シヌクレイン抗体は、その臨床的成功の可能性を著しく増加させる治療的薬剤としての標的構造のその特異的有効性およびその副作用を減少する可能性の双方を想定し得る。

【 0 1 9 5 】

本発明は、1つ以上の上述の成分、例えば本発明の抗 α シヌクレイン抗体、その結合フ

50

ラグメント、誘導体もしくは変異体、ポリヌクレオチド、ベクター、または細胞で満たされる1つ以上の容器をそれぞれ含む医薬用および診断用のパックまたはキットも提供する。そのような容器には、薬学的または生物学的産物の使用または販売を監督する行政機関が規定する形態の通知を付随させることができ、その通知はヒトへの投与のための製造、使用または販売のその機関による許可を反映する。加えて、または代替えとして、キットには、適切な診断アッセイでの使用のため試薬および/または説明書を含む。組成物、例えば、本発明のキットは、当然、 α シヌクレインの存在を伴う疾患の危険性評価、診断、予防および治療のため特に適しており、パーキンソン病(PD)、パーキンソン病認知症(PDD)、レビー小体を伴う認知症(DLB)、およびアルツハイマー病のレビー小体変異型(LBVAD)に特に適用できる。

10

【0196】

本発明の薬学的組成物は、当技術分野で周知の方法によって形成し得、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. を参照されたい。適切な薬学的担体の例は、当技術分野で周知であり、リン酸緩衝食塩水、水、油/水乳濁液等の乳濁液、様々な種類の湿潤剤、無菌溶液等を含む。そのような担体を含む組成物は、従来の周知の方法によって形成し得る。これらの薬学的組成物は、適切な用量で対象へ投与し得る。適切な組成物の投与は、異なる方法、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻腔内、局所的、もしくは皮内投与、または脊髄もしくは脳送達によって行い得る。点鼻剤等のエアロゾル剤は、保存剤および等張剤を有する活性剤の精製した水溶液または他の溶液を含む。そのような薬剤は、好ましくは鼻粘膜に相当するpHおよび等張状態に調整し得る。直腸または腔への投与のための薬剤は、適切な担体を有する坐薬で提供し得る。

20

【0197】

さらに、本発明が、本発明の薬物を投与するために頭蓋骨に小さな穴を開ける *now standard* (幸いにもまれであるが) 手順を含むのに対して、好ましい態様では、結合分子、特に本発明の抗体または抗体ベースの薬物は、血液脳障害を越えることができ、静脈内または経口内投与を可能にする。

【0198】

30

用量計画は、担当の医師および臨床学的因子により決定されるだろう。医学分野で周知のように、任意の一人の患者への用量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、時間、投与の経路、一般的な健康状態、および同時に投与する他の薬物を含む多くの因子次第である。典型的な用量は、例えば、0.001から1000 μg (またはこの範囲で、発現させるかまたは発現を阻害するための核酸の量) であるが、この例示的な範囲を下回るか、または上回る用量は、特に上述の因子を考慮して想定する。通常、用量は、例えば、ホストの体重に対して0.0001から100 mg/kg であり、より一般的には0.01から5 mg/kg (例えば、0.02 mg/kg 、0.25 mg/kg 、0.5 mg/kg 、0.75 mg/kg 、1 mg/kg 、2 mg/kg 等) である。例えば、用量は、1 mg/kg 体重または10 mg/kg 体重、または1~10 mg/kg の範囲内であり得、好ましくは、少なくとも1 mg/kg であり得る。上記の中間の用量もまた本発明の範囲内にあることを意図する。対象は、毎日のように投与するか、または隔週もしくは実証的分析により決定される他のスケジュールに従う。例示的な治療は長期にわたる、例えば、少なくとも6ヶ月の複数回投与を伴う。付加的な例示的な治療法は、2週間に一度または1ヶ月に一度、または3から6ヶ月に一度の投与を伴う。例示的な用量スケジュールは、連日の1~10 mg/kg または15 mg/kg 、隔日の30 mg/kg 、または隔週の60 mg/kg を含む。いくつかの方法では、投与した各抗体の用量が示した範囲内に収まる場合、異なる結合特異性を有する2つ以上のモノクローナル抗体は、同時に投与する。経過は、定期的評価により監視され得る。非経口投与のための調製は、水または非水溶液、懸濁液および乳濁液を含む。非水溶液溶剤の例は、プロピレ

40

50

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性油、およびエチルオレイン酸等の注射可能な有機エステルである。水溶液担体は、水、アルコール／水溶液、生理食塩水および緩衝媒体を含む、乳濁液および懸濁液を含む。非経口媒体は、塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖、ブドウ糖および塩化ナトリウム溶液、乳酸リンゲル、または固定化した油を含む。静脈内媒体は、液体および栄養補充薬、電解質補充薬等（リンゲルブドウ糖を基礎とするもの等）を含む。例えば、抗菌薬、抗酸化剤、キレート化剤、および不活性ガス等の保存料および他の添加物も存在し得る。さらに、本発明の薬学的組成物は、ドーパミンまたは精神薬理学的薬物等のさらなる薬剤を、その薬学的組成物の意図する使用次第で含み得る。

【0199】

さらに、本発明の好ましい実施形態では、薬学的組成物は、受動免疫のため、抗 α シヌクレイン抗体またはその結合フラグメント、誘導体もしくは変異体を含む場合、ワクチンとして、例えば、本発明の薬学的組成物を処方し得る。背景技術部分で述べられたように、 α シヌクレインのオリゴマー種は、血漿およびCSF (El-Agnaf et al., FASEB J. 20(2006), 419-425)の細胞外に報告され、パーキンソン病のマウスモデルでの受動免疫の研究は、 α シヌクレインに対する細胞外のマウスモノクローナル抗体は、細胞内の α シヌクレイン凝集体の蓄積を減少し得るということを示す(Masliah et al., Neuron, 46(2005), 857-868)。従って、本発明のヒト抗 α シヌクレイン抗体および相当する α シヌクレイン結合分子は、PD、DLBおよびLBVAD等のシヌクレイノパチー疾患の阻止または回復のためのワクチンとして特に有用であるということを想定することは賢明である。

【0200】

1つの実施形態では、本発明の抗体の組換えFab(rFab)および単鎖フラグメント(scFv)を使用することは有益であり、これらは容易に細胞膜を浸透する可能性がある。例えば、先にインターネット上で公開されたRobert et al., Protein Eng. Des. Sel. (2008) Oct 16, S1741-0134は、 $A\beta$ のN末端領域でエピトープを認識する、モノクローナル抗体WO-2のキメラ組換えFab(rFab)および単鎖フラグメント(scFv)の使用に関して説明する。操作したフラグメントは、全IgG分子と同じ有効性で、(i)アミロイド原線維化を阻止、(ii)予め形成された $A\beta$ 1~42原線維の脱凝集、および(iii)インビトロでの $A\beta$ 1~42オリゴマーで媒介した神経毒性の阻害、を行うことが可能であった。エフェクター機能に欠ける抗体型を操作される小さいFabおよびscFvを使用することにおける認知された利点には、より血液脳障害を越える効果的な経路および、炎症性の副反応を引き起こす可能性を最小化することを含む。さらに、scFvおよび単ドメイン抗体が、全長の抗体の結合特異性を保持することに加えて、それらは、それらの標的の折り畳み、相互作用、修飾、細胞内の局在性の変化の可能性を伴って、単一遺伝子として、および哺乳類細胞の細胞内で細胞内抗体として発現し得、例えば、再考察のため、Miller and Messer, Molecular Therapy 12(2005), 394-401を参照されたい。

【0201】

異なるアプローチでは、Muller et al., Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241は、「Super Antibody Technology」と称される技術プラットフォームを説明し、これは、抗体を損傷することなく生細胞へ送り込むことを可能にするとされる。そのような細胞浸透性抗体は、新しい診断的および治療的機会を開く。用語「TransMabs」は、これらの抗体のために作られた。

【0202】

さらなる実施形態において、シヌクレイノパチー疾患を治療するため有用な他の神経保護剤の同時投与または連続投与が望ましい。1つの実施形態では、本発明の薬学的組成物に付加的な薬剤を含む。対象を治療するために使用し得る神経保護剤の実施例は、グルタ

ミン酸作動性の受容体アンタゴニスト、キナーゼ阻害剤、HDAC阻害剤、抗炎症剤、ジバルプロエクスナトリウム、またはその任意の組み合わせを含むが、それらに限定されない。本発明の薬学的組成物との併用で使用し得る他の神経保護剤の実施例は、例えば、国際出願第WO2007/011907号を参照されたい。1つの実施形態では、付加的な薬剤は、ドーパミンまたはドーパミン受容体アゴニストである。

【0203】

本発明のさらなる実施形態では、 α シヌクレイン結合分子、特に本発明の抗体は、同時投与か、シヌクレイノパチー疾患を治療するために有用な神経移植または幹細胞治療を伴う移植治療の前後に投与し得る。胚中脳神経細胞の移植を伴うそのようなアプローチは、疾病で失われた神経細胞を交換すること、および線条体でのドーパミン系神経伝達を元通りにすることを目的としてパーキンソン病を有する患者で実施されてきた。移植後11から16年後、移植された神経細胞は、レビー小体およびレビー神経突起を含有するように発見された。このホストからの移植した組織への α シヌクレイン病体の広がり、 α シヌクレイン結合分子、特に本発明の抗体の同時投与によって阻止し得る。

10

【0204】

治療的に有効用量または量は、症状または疾病を回復させるために十分な活性成分の量を指す。そのような組成物の治療的有効性および毒性は、細胞培養物または実験的動物で標準薬学的手順、例えば、ED₅₀（集団の50%で治療的に有効な用量）およびLD₅₀（集団の50%へ致死的な量）によって決定し得る。治療的と有毒的な効果の間の用量割合は、治療的指標であり、LD₅₀/ED₅₀の割合として表すことができる。好ましくは、組成物での治療的薬剤は、PD、DLBまたは他のシヌクレイノパチー疾患の場合、正常な行動および/または認識を回復するか保存するため十分な量で存在する。

20

【0205】

前述から、本発明は、上記に説明される特にシヌクレイノパチー疾患の診断および/または治療、特にパーキンソン病で、上記に説明された抗体の少なくとも1つのCDRを含む α シヌクレイン結合分子の任意の使用を含有する。好ましくは、該結合分子は、本発明の抗体またはその免疫グロブリン鎖である。加えて、本発明は、本明細書で前記に説明される任意の1つの上述の抗体の抗イディオタイプ抗体に関する。これらは、抗原結合部位付近の抗体の可変領域上に位置する独特の抗原性ペプチド配列に結合する抗体または他の結合分子であり、例えば、対象の試料で抗 α シヌクレイン抗体を検出するために有用である。

30

【0206】

他の実施形態では、本発明は、上記に説明した本発明の α シヌクレイン結合分子、抗体、抗原結合フラグメント、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞の任意の1つを含み、任意で免疫または核酸ベースの診断法で従来使用される試薬のような検出のため任意の適切な手段を含む、診断用組成物に関する。本発明の抗体は、例えば、液相で利用されるか、または固相担体に結合し得る免疫アッセイでの使用に適している。本発明の抗体を利用し得る免疫アッセイの例は、直接型または非直接型のどちらか一方での、競合的および非競合的免疫アッセイである。そのような免疫アッセイの例は、放射免疫アッセイ（RIA）、サンドイッチ（免疫アッセイ）、フローサイトメトリーおよびウエスタンブロットアッセイである。本発明の抗原および抗体は、多くの異なる担体に結合し、それらに特異的に結合する細胞を単離するために使用し得る。周知の担体の例は、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾したセルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、およびマグネタイトを含む。担体の性質は、本発明の目的のため、可溶性または不溶性のどちらか一方であり得る。当業者に知られている多くの異なる標識および標識化の方法がある。本発明で使用され得る標識の種類は、酵素、放射性同位元素、コロイド金属、蛍光性化合物、化学発光性化合物、および生物発光性化合物を含み、本明細書上部で説明された実施形態も参照されたい。

40

【0207】

50

さらなる実施形態で、 α シヌクレイン結合分子、特に本発明の抗体は、血液試料、リンパ試料または他の任意の体液試料になり得る試験された個体から体液試料を取得し、抗体抗原複合体の形成を可能にする条件下で本発明の抗体とその体液試料とを接触させることにより、個体での疾患の診断方法でも使用し得る。そのような複合体のレベルは、次に当技術分野で既知の方法により決定され、対象試料で形成されたものよりも著しく高いレベルは、試験した個体に疾病があることを示す。同様の方法で、本発明の抗体により結合した特異的抗原も使用し得る。したがって、本発明は、結合分子、例えば、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む、インビトロの免疫アッセイに関する。

【0208】

この前後関係において、本発明は、この目的のため特異的に設計される手段にも関する。例えば、 α シヌクレインを特異的に認識する本発明の抗体または相当する抗原結合分子が添加された抗体ベースのアレイを使用し得る。マイクロアレイ免疫アッセイの設計は、Kusnezow et al., Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696で要約される。したがって、本発明は、本発明に従って特定される α シヌクレイン結合分子が添加されたマイクロアレイにも関する。

【0209】

1つの実施形態では、本発明は、対象のシヌクレイノパチー疾患を診断する方法に関し、方法は、

(a) 本発明の抗体、その α シヌクレイン結合フラグメント、またはそのいずれとも実質的に同じ特異性を有する α シヌクレイン結合分子を用いて、診断する対象からの試料中の α シヌクレインレベルを評価すること、

(b) 1つ以上の対照対象で α シヌクレインのレベルを示す参照基準に対する α シヌクレインのレベルを比較することを含み、

α シヌクレインと参照基準のレベルの違いまたは類似性は、対象がパーキンソン病を有することを示す。

【0210】

診断される対象は、疾病に対して無症状か前臨床であり得る。好ましくは、対照対象は、例えばPD、DLBまたはLBVA等のシヌクレイノパチー疾患を有し、 α シヌクレインのレベルと参考基準のレベルの類似性は、診断される対象はシヌクレイノパチー疾患を有することを示す。あるいは、または追加的に第2対照として、対照対象が、シヌクレイノパチー疾患を有さない場合、 α シヌクレインのレベルと参考基準のレベルの相違性は、診断する対象はシヌクレイノパチー疾患を有することを示す。好ましくは、診断される対象および対照対象は、年齢が一致している。分析される試料は、 α シヌクレインを含有する疑いのある任意の体液、例えば、血液、CSF、または尿試料であり得る。

【0211】

α シヌクレインのレベルは、例えば、ウエスタンブロット、免疫沈殿、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、蛍光標示細胞分取(FACS)、二次元ゲル電気泳動、質量分析(MS)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析/飛行時間型MSのイオン化(MALDI-TOF)、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(SELDI-TOF)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)、多次元的液体クロマトグラフィー(LC)、次に続く続タンデム質量分析(MS/MS)、およびレーザードンシトメトリーから選択される1つ以上の手法によって α シヌクレインを分析することを含む、当技術分野で既知の任意の適切な方法により評価され得る。好ましくは、 α シヌクレインの該インビボ画像は、陽電子放出断層撮影(PET)、単一光子放出断層撮影(SPECT)、近赤外(NIR)光学的画像、または磁気共鳴画像(MRI)を含む。

【0212】

本発明に従って適応し得る抗体および関連する手段を用いて、パーキンソン病またはレビー小体疾病等のシヌクレイノパチー疾患を診断する方法、シヌクレイノパチー疾患の進行を監視する方法、ならびにシヌクレイノパチー疾患の治療を監視する方法は、国際出願

10

20

30

40

50

第2007/011907号にも説明される。同様に、 α シヌクレインのための抗体ベースの検出方法は、国際出願第WO99/50300号、WO2005/047860号、WO2007/021255号、およびWO2008/103472号に説明され、本開示の全ての内容は参照により本明細書に組み込まれる。それらの方法は、説明されたように適用されるが、本発明の α シヌクレイン特異的抗体、結合フラグメント、誘導体、または変異体を用いる。

【0213】

これらおよび他の実施形態は、本発明の記述および実施例によって開示され、包含される。本発明に従って、採用される任意の1つの材料、使用、化合物に関するさらなる文献は、公開ライブラリ、および例えば、電子機器を使用してデータベースから回収し得る。例えば、公開データベース「Medline」は、利用され得、それは国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)および/または国立保健研究機構(National Institutes of Health)の国立医学図書館(National Library of Medicine)により主催される。欧州分子生物学研究所(European Molecular Biology Laboratory)(EMBL)の一部である欧州バイオインフォマティクス研究所(European Bioinformatics Institute)(EBI)等のもののようなさらなるデータベースおよびウェブアドレスは、当業者に既知であり、またインターネットの検索エンジンを使用して取得可能である。遡及的な探究および現状の認識のため有用な生物学での特許情報の概要および関連する特許情報の供給源に関する調査は、Berk s, T I B T E C H 12(1994), 352-364に与えられる。

【0214】

上記の開示は、一般的に本発明を説明する。示されない限り、本明細書で使用する用語は、Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revised 2000 and reprinted 2003, ISBN 0 19 850673 2.で提供されるように定義する。全ての書誌の引用は、請求項の直前の明細書の終わりで見られる。全ての参考文献に示される内容(公開された特許、本出願を通して示された公表された特許出願、および製造者の仕様書、説明書を含む)は、参照により、明確に組み込まれるが、示されるいかなる文書は、真に本発明に関する従来技術であるということは認められない。

【0215】

より完全な理解は、図示するためのみに本明細書で提供され、本発明の範囲を制限することがない以下の特定の実施例への参照により得られる。

【実施例】

【0216】

以下の実施例は、本発明をさらに解説するが、いずれにおいても本発明の範囲を制限するためではない。実施例1および2の以下の実験は、クローン化した際のNI-202.3G12、NI-202.12F4、およびNI202.3D8に関して図示し、説明し、すなわち、まさにフレームワークIg可変領域のN末端でプライマー誘発変異を有し、ヒト可変重鎖および軽鎖の生殖系列(GL)に対する適合はされておらず、図1を参照されたい。しかしながら、NI-202の他の抗体系は、特に、適応されたGL配列を有する抗体系は、構造的に同様であり、したがって比較可能な結果を提供することを想定し得る。これらの抗体は、ヒトIgG分子として発現した。実施例3および4の実験は、ヒト可変重鎖および軽鎖の生殖系列(GL)に適応されたIg可変領域のN末端でプライマー誘発変異を有する抗体NI202.12F4に関して、図示し、説明する、図1を参照されたい。本抗体は、マウス抗ヒト免疫反応をマウス誘発することなく、遺伝子導入マウスモデルでの長期間の研究を可能にするため、適応したヒト可変ドメインがIgG2a定常領域に融合された、キメラ分子として発現した。

【0217】

材料および方法

本明細書で採用されたもの等の従来の方法の詳細な記述は、示された文献で見られ得る。下記に示されない限り、それらの組換え発現および機能的特徴付けならびに関心の特異性を表示する α シヌクレイン特異的B細胞および α シヌクレイン抗体の分子クローニングの特定は、第WO2008/081008号として公開されたExample and Supplementary Methods section of international application PCT/EP2008/000053に説明され、それらの開示の内容は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0218】

抗原の精製

組換えHis- α シヌクレインは、大腸菌内での組換え発現、およびその後の、熱誘発沈殿、ニッケル親和性クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、および分子ふるいクロマトグラフィーを使用しての精製によって取得した。

【0219】

例えば、T7プロモーターの制御下で α シヌクレインをコードするcDNAを含むDNAコンストラクトは、BL21(DE3)等の適切な大腸菌株を形質転換するために使用し、200ml細胞培養の発現は、イソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)の付加によって誘発した。細胞は、37で誘導し4時間後に採集し、次に20ml、50mMのTris、pH8の150mMのNaCl、で再懸濁し、その後超音波処理を行った。15分間煮沸した後、耐熱性の17000gの上清を収集した。同様に、偽の大腸菌からの耐熱性の17000gの上清を収集した。Hisでタグをつけた α シヌクレインを発現する大腸菌からの耐熱性の17000gの上清を50mMのTris、300mMのNaCl、20mMのイミダゾール、pH8に調整した後、HisTrap HP 1ml(GE Life Science)カラムに添加し、HIS- α シヌクレインは、30~500mMのイミダゾール勾配で溶出した。HIS- α シヌクレインを含有する分画は、プールし、次にpH8の50mMのTrisで1:10に希釈した。希釈し、プールした分画を、HiTrap Q HP 1ml(GE Life Science)カラムに加え、結合したタンパク質は、30~1000mMのNaCl勾配で溶出した。最後に、HIS- α シヌクレインを含有する溶出物を、高性能のゲル濾過(Superdex 200 10/300GL)を使用してさらに精製した。この精製手順は、SDS-PAGEおよびクーマシー染色により推定されたように約99%の純度でHIS- α シヌクレインを産生した。精製したタンパク質の濃度は、BCAアッセイを使用して決定した(Pierce)。

【0220】

 α シヌクレイン抗体スクリーニング

96 well half area Microplates(Corning)は、4で一晩、被覆する緩衝液(pH9.6のPBS)中で2 μ g/mlの標準濃度で、精製HIS- α シヌクレインまたは α シヌクレイン(rペプチド)で被覆した。プレートは、pH7.6のPBS-Tで洗浄し、非特異結合は、1時間、2%のBSA(Sigma, Buchs, Switzerland)を含有するPBS-Tを用いて、室温で遮断した。B細胞条件培地を、1時間、室温で1%のBSA中で10%の耐熱性大腸菌タンパク質を用いて事前吸収した。この事前吸収ステップは、いくつかの以前のELISAスクリーニングの試みがヒト α シヌクレイン特異抗体を特定することに失敗した後で開発された。したがって、幸いにも、耐熱性大腸菌タンパク質を用いるELISAプレートの事前吸収は、精製された組換え α シヌクレイン試料に存在する可能性のある粘着性の抗体および大腸菌タンパク質に向けられる抗体の混入等の偽陽性的中のスクリーニングを除外することが判明した。事前吸収した培地は、次に記憶B細胞培養プレートからELISAプレートに移され、2時間室温でインキュベートした。ELISAプレートは、PBS-Tで洗浄し、次に西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で抱合したロバ抗ヒトIgG

10

20

30

40

50

(F c γ フラグメント特異性) ポリクローナル抗体でインキュベートした。 P B S - T で洗淨した後、ヒト抗体の結合は、標準の比色アッセイによる H R P の測定により決定した。

【 0 2 2 1 】

α シヌクレイン抗体の分子クローン化

記憶 B 細胞を含有する試料は、 6 0 歳を上回る志願者から取得した。全ての志願者には、共通してパーキンソン症のいずれの兆候も見られなかった。選択した記憶 B 細胞の生 B 細胞を採集し、 m R N A を調製した。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖配列は、次に 5 ' プライマーのような全てのヒト可変重鎖および軽鎖ファミリーに対する I g - フレームワーク 1 特異的プライマーと、 3 ' プライマーのような全てのヒト J セグメント (重およびカ

10

ップ軽鎖) および C セグメント (ラムダ軽鎖) に対して特異的なプライマーとの組み合わせを使用して取得した (M a r k s e t a l . , M o l . B i o l . 2 2 2 (1 9 9 1) , 5 8 1 - 5 9 7 , d e H a a r d e t a l . , J . B i o l . C h e m . 2 6 (1 9 9 9) , 1 8 2 1 8 - 1 8 2 3 0) 。

【 0 2 2 2 】

所望の特異性を有する抗体クローンの特定は、完全抗体の組換え発現において E L I S A を再スクリーニングすることで実施する。完全ヒト I g G 1 抗体またはキメラ I g G 2 a 抗体の組換え発現は、「正しい読み枠内」の可変重鎖および軽鎖配列を、適切な定常ドメインをコードする配列を伴って、 5 ' 末端および 3 ' 末端で、リーダーペプチドをコードする配列を有する可変領域配列を補完する発現ベクターへ挿入することで達成する。そのために、プライマーには、可変重鎖および軽鎖配列の抗体発現ベクターへのクローン化が促進されるように設計された制限部位を含有させた。重鎖免疫グロブリンは、免疫グロブリン重鎖 R T - P C R 産物を、シグナルペプチドおよびヒト免疫グロブリンガンマ 1 またはマウス免疫グロブリンガンマ 2 a の定常ドメインを有する重鎖発現ベクターへ枠内で挿入することによって発現させる。カッパ軽鎖免疫グロブリンは、 N I - 2 0 2 . 3 D 8 のカッパ軽鎖 R T - P C R 産物を、シグナルペプチドおよびヒトカッパ軽鎖免疫グロブリンの定常ドメインを提供する軽鎖発現ベクターへ枠内で挿入することによって発現させる。 N I - 2 0 2 . 1 2 F 4 および N I - 2 0 2 . 3 G 1 2 のラムダ軽鎖免疫グロブリンは、ラムダ軽鎖 R T - P C R 産物を、シグナルペプチドおよびヒトまたはマウスラムダ軽鎖免疫グロブリンの定常ドメインを提供するラムダ軽鎖発現ベクターに枠内で挿入することによって発現させる。

20

30

【 0 2 2 3 】

機能的組換えモノクローナル抗体は、 I g 重鎖発現ベクターおよびカッパまたはラムダ I g 軽鎖発現ベクターの H E K 2 9 3 または C H O 細胞 (またはヒトまたはマウス起源の任意の他の適切なレシピエント細胞株) への同時トランスフェクションによって得る。組換えヒトモノクローナル抗体は、その後標準タンパク質 A カラム精製を使用して条件培地から精製する。組換えヒトモノクローナル抗体は、一過性または安定性のいずれか一方のトランスフェクトした細胞を使用して制限のない数量で産生し得る。細胞株化した産生組換えヒトモノクローナル抗体は、 I g 発現ベクターを直接的に使用するか、または I g 可変領域を異なる発現ベクターに再クローン化のいずれかによって確立することができる。 F (a b) 、 F (a b) ₂ 、および s c F V 等の誘導体もこれらの I g 可変領域から産生し得る。

40

【 0 2 2 4 】

抗体

ウサギポリクローナル汎シヌクレイン抗体 (A b c a m) 、マウスモノクローナル L B 5 0 9 α シヌクレイン特異的抗体 (I n v i t r o g e n) 、抗体 S y n 2 1 1 (S i g m a) および C l o n e 4 2 (B D B i o s c i e n c e s) は、製造者のプロトコルに従って使用した。組換えヒト α シヌクレイン抗体 N I 2 0 2 . 3 G 1 2 、 N I 2 0 2 . 1 2 F 4 、および N I - 2 0 2 . 3 D 8 はこの発明の抗体である。それらは、 H E K 2 9 3 または C H O 細胞で発現し、次に調整した培地は示されない限り、その後の処理に直接

50

使用した。実施例3から5では、本発明の精製した組換え抗体を使用した。

【0225】

直接ELISA

抗原は、指示濃度で、pH9.6のPBS中で、96 well half area Microplates (Corning)上で4で一晩被覆した。プレートは、pH7.6のPBS-Tで洗浄し、非特異結合部位は、2%のBSA (Sigma)を含有するPBS-Tを用いて、室温で1時間遮断した。プローブ(一次抗体)を次にウェルへ移し、室温で2時間インキュベートした。pH7.6のPBS-Tで洗浄した後、ウェルは、次に西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で抱合したポリクロナル抗ヒト(組換えヒト抗体のため)、抗ウサギ(汎シヌクレイン抗体のため)または抗マウス(LB509またはSyn211)二次抗体で、室温で1時間インキュベートした。PBS-Tで厳密に洗浄した後、プローブの結合を、3,3',5,5'-テトラメチルピフェニル-4,4'-ジアミン(Sigma)を発色基質として使用して、標準の比色アッセイでのHRPの活性の測定によって判定した。

10

【0226】

ウエスタンブロット法およびクーマシータンパク質染色

ヒトおよびマウス α シヌクレインへの結合を評価するため、凍結した野生型または α シヌクレイン遺伝子導入マウスの脳をPBS中(10ml/g湿重量)で、加圧型細胞破碎装置を使用して均質化した。抽出物は、100'000gでスピンド、上清は可溶性分画とした。可溶性分画または組換えタンパク質(750ng)は、添加する色素と混合し、65で10分間熱し、0.75 μ gをレーンごとに添加し、4~20%のTris-Glycine SDS-PAGE上で分離した。ゲルは、0.025%のクーマシーブリリアントブルーR250(Fluka)溶液で染色するか、またはニトロセルロース転写膜へエレクトロブロットした。ブロットは次に一次抗体で2時間インキュベートした。一次抗体の結合を、HRPに抱合した二次抗ヒト抗体を使用して示した。ブロットをECLプラスウエスタンブロット検出試薬(GE Healthcare)を使用して発色させた。

20

【0227】

α シヌクレインモノマーおよび凝集体への結合を評価するため、脳抽出物を、0.5%のトリトンX100を含有するPBS中で調製し、次に5分間、1000gで遠心分離した。上清は4~12%のBis-Tris NuPAGEゲル電気泳動によって分離し、WBで分析した。

30

【0228】

ポール試験

マウスを、それらが最も活発な暗期の始まりに試験する。ポールは、登ることを促進するため布で被服し、長さ50cmで幅1cmの木で作る。マウスの檻にポールの基礎を設置する。マウスは、ポールの頂点に配置し、下へ向かうための時間、檻へ下るための時間は、30分間隔で5回を上回る回数の試行を記録する。最高成績の試行を分析する。

【0229】

高架式十字迷路試験

マウスは、それらが最も活発な暗記の始まりに試験する。試験は、薄暗い明かり(40lux)で実施する。高架式十字迷路試験は、2つの壁のないアームおよび2つの壁の付いたアームからなる。(アームの長さ:30cm、幅:5cm)。壁のないアームは小さい1cmの端を有し、壁の付いたアームは、15cmの壁によって仕切られている。任務の始めに、マウスを壁のないアームに対面する高架式十字迷路の中心に配置する。マウスは、迷路を探索している間、5分間ビデオで追跡する。壁のないアームおよび壁の付いたアームで過ごした時間、ならびに動いた距離は測定し、分析する。

40

【0230】

遺伝子導入マウス

B6;C3-Tg(Prnp-SNCA* A53T)83Vle/J(Giasson

50

et al., Neuron. 34 (2002), 521-533) 遺伝子導入αシヌクレインマウスおよび対応する野生型マウスは、12時間ずつ明/暗の周期を反転し、餌および水の場所へ自由に行けるように、標準の小屋の条件下で維持した。治療群の年齢および性別はバランスよく調整した。

【0231】

マウス血漿中のNI-202.12F4およびαシヌクレインレベルの決定

NI-202.12F4の血漿レベルを、基準として既知の濃度の組換えNI-202.12F4を使用する直接型αシヌクレインELISAを用いて決定した。血漿中のヒトαシヌクレインレベルの決定のため、サンドイッチELISAを適用した(Invitrogen, USA)。

10

【0232】

実施例1：異なるエピトープ特異性を有するヒトαシヌクレイン特異抗体の特定

αシヌクレインは、3つのドメインからなる140アミノ酸(aa)長の天然変性タンパク質である。これらは、N末端両親媒性反復領域(1~60aa)、中心領域は(61~95aa)、および酸性のC末端領域(96~140)である。組換えヒトαシヌクレイン抗体のさらなる特異性を理解するため、認識配列を含有するαシヌクレインのドメインを決定した。αシヌクレイン切り詰め型である1~60aa、1~95aa、61~140aa、および96~140aaを、ELISAプレート上で同等の濃度で被覆し、組換えヒトαシヌクレイン自己抗体NI-202.3G12およびNI202.12F4は、次にこれらの切り詰め方に結合するためにプローブした。

20

【0233】

興味深いことに、NI-202.3G12は、被覆した全長のαシヌクレインのみ結合し、4つの試験した切り詰め型(図2A)のいずれにも結合しない。これは、NI-202.3G12の認識エピトープは、線状一次認識配列というよりむしろ構造モチーフであるということを示す。

【0234】

一方で、NI-202.12F4は、aa1~60を含む(図2B)αシヌクレインフラグメントに結合するが、アミノ酸番号61~140または番号96~140を含むN末端を切り詰めたフラグメントに結合しない。これはエピトープがN末端内に局在していることを示す。特に、選択的に病的封入物でαシヌクレインに結合するマウスモノクローナル抗体の特徴付けは、まさにN末端部分内にそれらのエピトープがあることを示した(Waxman et al., Acta Neuropathol. 116 (2008), 37-46)。

30

【0235】

加えて、抗体NI-202.3D8を用いて実施した直接ELISAアッセイの予備結果は、NI-202.3D8がαシヌクレインのC末端、特にアミノ酸96~140を特異的に認識することを示した。C末端ドメイン内の鍵となるアミノ酸125~140の欠失は、αシヌクレイン凝集を大きく変化させ、レビー小体疾病(LBD)を伴う認知症を有する患者の脳、ならびに遺伝子導入動物モデルにおいて、C末端αシヌクレインフラグメントの蓄積が大量に存在する。これらの研究は、C末端領域を認識する能力がある抗体は、潜在的な治療的効果を有することを示し、Masliah et al., Neuron, 46 (2005), 857-868を参照されたい。

40

【0236】

ELISAプレート上で効率的に被覆しない切り詰め型を含むC末端αシヌクレインを除外するため、マウスモノクローナルアルファシヌクレイン抗体LB509のエピトープマッピング(Baba et al., Am. J. Pathol. 152 (1998), 879-884)を実施した。LB509は、C末端エピトープに結合する(Jakes et al., Neuroscience Letters 269 (1999), 13-16)。図2Cで示すように、この研究は、LB509のC末端エピトープを確認し、したがって、C末端αシヌクレインフラグメントの効率的な被覆を確認する。結

50

果として、本発明に従って実施した実験における組換えヒト α シヌクレイン抗体のエピトープマッピングは、これらの抗体は、N末端およびC末端で、立体構造エピトープおよび潜在的な病的構造を含む異なるエピトープに対して方向付けられる、ということを示す。

【0237】

実施例2：ヒト抗体は、 α シヌクレインに対して特異的である

α シヌクレイン、 β シヌクレイン、および γ シヌクレインは、神経系、骨格筋、および心臓で主に発現する高度な相同体のタンパク質である。しかしながら、 β シヌクレインが α シヌクレイン凝集の阻害剤であることを示す一方で異常な α シヌクレインのみがCNS疾病の広域スペクトルに連結し、 α シヌクレインの神経毒性効果から中枢神経系を保護し得る。したがって病的 α シヌクレイン変異体に対する（治療）抗体は、 β および γ シヌクレインに優先的に交差反応しない。特異性および組換えヒト抗 α シヌクレイン抗体の潜在的な治療的使用を支持するため、候補抗体は、直接ELISAアッセイで、ウェスタンブロット法（WB）により α シヌクレイン、 β シヌクレイン、および γ シヌクレイン結合に対してプローブした。始めに、組換え α 、 β および γ シヌクレインは、同等の被覆濃度（ $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ）で、ELISAプレート上で被覆し、次に、汎シヌクレイン対照抗体または組換えヒト α シヌクレイン抗体のどちらか一方でインキュベートした。汎シヌクレイン抗体は、ELISAプレート上で被覆した全ての3つのシヌクレインタンパク質に反応した（図3A）。次に、組換えヒト α シヌクレイン抗体は特異的 α シヌクレイン結合に対して、プローブした。NI-202.3g12およびNI-202.12F4の双方は、被覆した α シヌクレインに反応するが、 β および γ シヌクレインに反応しない（図3Aおよび3B）。

【0238】

同様に、組換え抗体の特異性もWB分析を使用して調査した。クーマシータンパク質染色は、同等の濃度の3つの全てのシヌクレインタンパク質が、SDSPAGE分析（図4A）に加えられたことを確認する。一次抗体なしで、シグナルが検出されなかったのに対し（図4C）、WB分析は、次にNI202.12F4が、選択的に α シヌクレインに結合する（図4B）ということを示した。WB上での α シヌクレインへのNI202.3G12結合は、検出されなかった。これは、NI202.3G12の線状認識配列というよりむしろ構造的エピトープに一致する。これらの調査結果は、本発明で説明される組換えヒトアルファシヌクレイン抗体が、高い特異性であり得ることを実証する。

【0239】

その後の実験の全ては、NI202.12F4マウスキメラ抗体で実施した。

【0240】

実施例3：抗体NI202.12F4の結合特異性

凝集 α シヌクレイン種への優先度を有するヒト α シヌクレインへの特異結合

ヒトおよびマウス α シヌクレインへのNI202.12F4の結合を評価するため、脳抽出物を野生型および α シヌクレインA53T遺伝子導入マウスから調製し、抗体結合は、ウェスタンブロット法で分析した。NI202.12F4は、そのようなバンドが、実質的に野生型マウスからの脳抽出物に存在しないの（図5A）に対して、ヒトA53T α シヌクレイン遺伝子導入マウスからの脳抽出物で α シヌクレインに対応する顕著なバンドを検出し、このことは、マウスではなくヒト α シヌクレインへの特異結合を示している。同様の結果は、商業的に入手可能なヒト α シヌクレインに対して特異的なエピトープに対して方向付けられるLB509抗体（Jakes et al., Neuroscience Letters 269 (1999), 13-16）で得られた。対照的に、商業的に入手可能な、双方の種の α シヌクレインに結合すると報告された抗体クローン42（van der Putten et al., J. Neurosci. 20 (2000), 6021-6029）を、ヒトならびにマウス α シヌクレインタンパク質で検出した。これらの資料はNI-202-12F4が優先的にヒト α シヌクレインに結合するということを示す。

【0241】

ヒト α シヌクレインの生理型ならびに病的凝集体へのNI 202 . 12 F 4の結合を評価するため、健常対照対象およびレビー小体を伴う認知症(DLB)患者からの皮質脳抽出物、ならびに野生型マウスおよびヒトA30P α シヌクレイン遺伝子導入マウスの脳からの抽出物(Kahle et al., J. Neurosci., 20(2000), 6365-73)を調製し、SDSゲル電気泳動で分離し、ウエスタンブロット法で分析した。NI 202 . 12 F 4は、高感度で、DLBおよびA30P α シヌクレイン遺伝子導入脳抽出物で、顕著なスミアを反映するオリゴマーおよび α シヌクレイン凝集体原線維型を検出したが、健常対照および野生型対照の抽出物では検出しなかった(図5B)。対照的に、最小の結合が、ヒトまたは野生型マウス組織で α シヌクレインのモノマー型に対して観察され、 α シヌクレインタンパク質を過剰発現するA30P α シヌクレイン遺伝子導入脳抽出物での中度の結合が観察された。対照的に、クローン42抗体は、ウエスタンブロット分析で、モノマー型および α シヌクレインフラグメントを高感度で検出し、凝集した α シヌクレイン種に不十分に結合しながら、対照的な結合様式を示した。これらの結果はNI 202 . 12 F 4が生理学的 α シヌクレインモノマーよりも優先的にオリゴマーおよび原線維等の α シヌクレインの病的凝集体に結合することを示す。

10

【0242】

NI - 202 . 12 F 4は、ヒトアルファシヌクレインの野生型および疾病を引き起こす変異体に高親和性で結合する。

【0243】

野生型、ならびに疾病を引き起こすヒト α シヌクレイン変異体の最大半量の有効濃度(EC50)を、直接 α シヌクレインELISAを使用して決定した。高親和性結合は、野生型ならびにヒト α シヌクレインのA30P、E46K、およびA53Tの変異体において観察された(図6)。

20

【0244】

組換えNI - 202 . 12 F 4は、脳で優先的に、 α シヌクレインの病的型に結合する。

【0245】

α シヌクレインへのNI - 202 . 12 F 4の結合はシヌクレイン遺伝子導入マウスおよび神経病理学的にパーキンソン病またはレビー小体を伴う認知症が確認された患者からの脳切片の免疫組織化学染色にさらに特徴付けられた。NI - 202 . 12 F 4は、ヒトA53T(図7A)またはA30P α シヌクレイン(図7B)のどちらか一方を発現する遺伝子導入マウスからの浮遊切片、ならびにパーキンソン病およびレビー小体を伴う認知症のヒト脳組織(図7C、D)での、レビー小体およびレビー神経突起様封入物、ならびに小さい細胞体樹状突起およびシナプス性 α シヌクレイン蓄積を含む、 α シヌクレイン病態の顕著な染色を示す。高感度で生理学的シナプス性 α シヌクレインも検出する商業的に入手可能なSyn211抗体(Giaison et al., J. Neurosci. Res., 59(2000), 528-33)(図7E)と対照的に、NI - 202 . 12 F 4は、ヒトA30P α シヌクレイン遺伝子導入マウス免疫組織化学染色(図7B)によって例証されるように、 α シヌクレインの病的凝集体に優先的に結合する。NI - 202 . 12 F 4の結合は、野生型マウス(図7F)の脳切片に実質的に存在せず、これは二次抗体のみの対照染色(図7G)と同等であり、このことから、ウエスタンブロット分析で観察された(図5)ように、ヒト対マウス α シヌクレインへの優先的な結合が確認される。対照的に、ヒト、ならびにマウス起源の α シヌクレインの結合を報告した商業的に入手可能なクローン42抗体(van der Putten et al., J. Neurosci., 20(2000), 6021-6029)は、野生型マウスの脳切片でマウス α シヌクレインタンパク質の顕著なシナプス染色を示した(図7H)。

30

40

【0246】

NI - 202 . 12 F 4は、立体構造エピトープを示す、高い被覆濃度でのヒト α シヌクレインへの優先的な結合を示す。

【0247】

50

抗体の力価を示している最大半量の有効濃度 (EC50) は、直接 α シヌクレイン ELISA を使用して、組換え α シヌクレインの低いおよび高い被覆濃度のために決定した。約 100 pM の EC50 を用いた組換え NI-202.12F4 の高親和性結合を、 α シヌクレインタンパク質 (20 μ g/ml) の高い被覆密度のため観察した。 α シヌクレインの低めの被覆濃度で、100 倍に近い EC50 の増加に対応する、親和性の急落を観察した (図 8A)。対照的に、シヌクレイン C 末端内の線状エピトープに対して方向付けられる商業的に入手可能な Syn211 抗体 (Giasson et al., J. Neurosci. Res. 59 (2000), 528-33) は、アルファシヌクレインの低い被覆密度で、結合親和性に減少を示さなかった (図 8B)。これらの結果は、NI-202.12F4 は、優先的に高い濃度の α シヌクレインで形成される α シヌクレインの構造的なエピトープを狙いとすることを示唆している。結果は、 α シヌクレイン原線維またはオリゴマー等の α シヌクレイン凝集体の病的構造に対する優先度を示す NI-202.12F4 の免疫組織化学の結合特性と一致している。全長 α シヌクレインにおいて観察されたように、切り詰め型 α シヌクレイン番号 1~60 に結合する NI-202.12F4 は、同等の被覆濃度への依存を示し、このことは、 α シヌクレインタンパク質のアミノ酸番号 1~60 に含有される立体構造エピトープを指し示す (図 8C)。しかしながら、 α シヌクレインの 60~140 のアミノ酸は、N 末端エピトープの形成に影響を与え得るということを排除してはならない。特に、A53T 変異体を含む番号 1~60 のヒト α シヌクレインは、マウス α シヌクレインの N 末端と 100% 同一である。したがって、マウスオルソログに対するヒト α シヌクレインの観察された優先度は、N 末端で好ましい NI-202.12F4 のエピトープの到達性または形成におけるシヌクレインの C 末端の影響によるものであり得る。小さめの α シヌクレインの N 末端に由来するフラグメント (アミノ酸番号 1~20、番号 21~40、番号 41~60、番号 11~30、番号 31~50) を用いたエピトープマッピング研究は、いずれのペプチドへの NI-202.12F4 抗体の結合もなかったことを明らかにしており、このことは、これらの領域は NI-202.12F4 の結合に十分ではないことを示唆している (図 8D)。

【0248】

実施例 4：アルファシヌクレインに対する組換えヒト由来抗体は、パーキンソン病の遺伝子導入マウスモデルの運動能力および高架十字迷路行動を改善する。

【0249】

NI-202.12F4 治療の薬理学的有効性を評価するため、年齢 10.5 ヶ月のヒト A53T α シヌクレイン導入遺伝子 (Giasson et al., Neuron 34 (2002), 521-533) を過剰発現する遺伝子導入マウスを、5 mg/kg の組換えキメラ NI-202.12F4 抗体または媒体の隔週の腹腔内投与で、合計 4 ヶ月間治療した。治療の 2 ヶ月後、ポール試験で、運動能力を評価した。NI-202.12F4 で治療したマウスは、図 9 で示されるように、ポール上で下向きになる時間 (Turn, $p < 0.001$, $n = 17 \sim 19$ 動物/群) ならびに檻へ降りるまでの合計時間 (Total, $p < 0.05$, $n = 17 \sim 19$ 動物/群) が著しく減少し、媒体で治療した群と比較して著しい運動能力の改善を示した。二次の行動試験では、高架十字迷路動作に有効である治療を分析した。 α シヌクレイン A53T 遺伝子導入マウスは、野生型対照と比較して壁のないアームでより時間を過ごし、低下した高架十字迷路行動を示すと過去に報告された (George et al., Exp. Neurol. 210 (2008), 788-92)。図 10 で示されるように、NI-202.12F4 による慢性治療は、 α シヌクレイン A53T 遺伝子導入動物における高架十字迷路行動で、著しい改善へ導いた。抗体で治療したマウスは、双方の群の活動レベルは一致していたが、媒体で治療した動物 ($p < 0.05$, $n = 17 \sim 19$ 動物/群) と比較して、壁のないアームで著しく少ない時間を過ごし、著しく短い距離を動いた。これらの結果は、NI-202.12F4 を用いた慢性治療が、運動能力の著しい改善を導き、パーキンソン病の α シヌクレイン遺伝子導入マウスモデルの異常な高架十字迷路行動を更正するということを実証した。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 0 】

実施例 5：N I - 2 0 2 . 1 2 F 4 抗体は、パーキンソン病のシヌクレイン遺伝子導入マウスモデルで血漿シヌクレインレベルを増加させる。

【 0 2 5 1 】

年齢 1 0 . 5 ヶ月の遺伝子導入 A 5 3 T の α シヌクレイン遺伝子導入マウスを、を、5 m g / k g の組換えキメラ N I - 2 0 2 . 1 2 F 4 抗体または P B S の隔週の腹腔内投与で、合計 2 ヶ月間治療した。注射の 2 4 時間後、血漿試料を調製し、治療抗体およびヒト α シヌクレイン血漿濃度を、E L I S A で決定した (図 1 1)。ヒト α シヌクレインの血漿レベルは媒体で治療した動物と比較して 1 0 倍を超えて著しく増加し、N I - 2 0 2 . 1 2 F 4 での治療における α シヌクレインの薬理的調節を実証した ($25 \pm 4 . 1$ n g / m l の N I - 2 0 2 . 1 2 F 4 治療群対 $1 . 9 \pm 1 . 2$ n g / m l の P B S 群、 $p = 0 . 0 0 0 2$)。同様の有効性が、A 3 0 P の α シヌクレイン遺伝子導入マウスの急性抗体治療において観察された。A 5 3 T および A 3 0 P の α シヌクレイン遺伝子導入モデルのヒト α シヌクレインは主に脳で発現するため、ヒト α シヌクレインの循環における増加は、脳から末梢への α シヌクレインの N I - 2 0 2 . 1 2 F 4 で媒介した正味流束によるものであり得る。

10

【 図 1 - 1 】

【図 1】

A

NI-202.3G12-VHBI(可変重鎖配列 VHBI、配列番号 3)

```
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
EVQLVQSGAEVKKPGASVRLSCRASGYNFIDPHIHWVRQAPGEGLEWMGMSNPQSGHSSSAQ  
-----FR3-----CDR3-----JH-----  
RFQGQFVIMTTDTSTMSAAYMDLNLWLTLDPTAVYYCTRFHGGAGHYRFDTWGGQTLVTVSS
```

NI-202.3G12-VHBI-GL(生殖細胞系配列と整列した可変重鎖配列 VHBI、配列番号 4)

```
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
QVQLVQSGAEVKKPGASVRLSCRASGYNFIDPHIHWVRQAPGEGLEWMGMSNPQSGHSSSAQ  
-----FR3-----CDR3-----JH-----  
RFQGQFVIMTTDTSTMSAAYMDLNLWLTLDPTAVYYCTRFHGGAGHYRFDTWGGQTLVTVSS
```

NI-202.3G12-VLcI(可変軽鎖配列 VLcI、配列番号 6)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
QSVLTQPPSVSVAPGQTARITCSGDALFKHYAHWYQKPGQVPVIVVYKDTERRPSGIIPERFS  
-----CDR3-----JK-----  
GSTSGTTTTLTISGVQAEDEAHYYCQSDVSSSTYVVPFGGQTKLTVL
```

NI-202.3G12-VLcI-GL(生殖細胞系配列と整列した可変軽鎖配列 VLcI、配列番号 7)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
SYELTQPPSVSVAPGQTARITCSGDALFKHYAHWYQKPGQVPVIVVYKDTERRPSGIIPERFS  
-----CDR3-----JK-----  
GSTSGTTTTLTISGVQAEDEAHYYCQSDVSSSTYVVPFGGQTKLTVL
```

【 図 1 - 2 】

【図 1】(続き)

B

NI-202.12F4-VHA1b(可変重鎖配列 VHA1b、配列番号 9)

```
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
EVQLVQSGGGLVFPQGLRLSCAVSGPDFEKAHMSWVRQAPGQGLQWVARIESADGGITTY  
-----FR3-----CDR3-----JH-----  
AAPEVEGRFIIISRDDSRNMLYLQWMSLKTEDTAVYYCTSAHWGQGTGLVTVSS
```

NI-202.12F4-VHA1b-GL(生殖細胞系配列と整列した可変重鎖配列 VHA1b、配列番号 10)

```
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
EVQLVQSGGGLVFPQGLRLSCAVSGPDFEKAHMSWVRQAPGQGLQWVARIESADGGITTY  
-----FR3-----CDR3-----JH-----  
AAPEVEGRFIIISRDDSRNMLYLQWMSLKTEDTAVYYCTSAHWGQGTGLVTVSS
```

NI-202.12F4-VLaI(可変軽鎖配列 VLaI、配列番号 12)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
QSVLTQPPSVSVAPGQTARITCSGDALFKHYAHWYQKPGQVPVIVVYKDSRRPSGVPERFS  
-----CDR3-----JK-----  
GSSSGTTATLTITGVQAEDEADYYCQSPDSTNTYVFPFGGQTKLTVL
```

NI-202.12F4-VLaI-GL(生殖細胞系配列と整列した可変軽鎖配列 VLaI、配列番号 13)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----  
SYELTQPPSVSVAPGQTARITCSGDALFKHYAHWYQKPGQVPVIVVYKDSRRPSGVPERFS  
-----CDR3-----JK-----  
GSSSGTTATLTITGVQAEDEADYYCQSPDSTNTYVFPFGGQTKLTVL
```

【図 1 - 3】

【図 1】(続き)

C

NI-202.3D8-VHE1(可変重鎖配列 VHE1、配列番号 15)

```

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
EVOLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSTYAIISWVRQAPGKGLEWVAIISNDGSRKYYAD
-----FR3-----CDR3-----JH-----
SVKGRFTISRDNISRDITLDLENNISLRDEDTAVYYCAKRGITYASRCKAFDFMGQGTLTIVSS
    
```

NI-202.3D8-VHE1-GL(生殖細胞系配列と整理した可変重鎖配列 VHE1、配列番号 16)

```

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSTYAIISWVRQAPGKGLEWVAIISNDGSRKYYAD
-----FR3-----CDR3-----JH-----
SVKGRFTISRDNISRDITLDLENNISLRDEDTAVYYCAKRGITYASRCKAFDFMGQGTLTIVSS
    
```

NI-202.3D8-VKa1(可変軽鎖配列 VKa1、配列番号 18)

```

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
DIQLTQSPSTLSASVQDRVTITCRASQSIGSWLAWTQOKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SGSGSGTFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDHYMTFGQGTKEIK
    
```

NI-202.3D8-VKa1-GL(生殖細胞系配列と整理した可変軽鎖配列 VKa1、配列番号 19)

```

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
DIQMTQSPSTLSASVQDRVTITCRASQSIGSWLAWTQOKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SGSGSGTFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDHYMTFGQGTKEIK
    
```

【図 1 - 4】

【図 1】(続き)

D

NI-202.3D8-VKc1(可変軽鎖配列 VKc1、配列番号 21)

```

FR1-----CDR1-----FR2-----FR3---
EIVMTQSPSSLSASIGDRVITFCRASGHSNLYLAWFRQPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SASGSGTFTLTISSLQPDDFATYYCYQYRTPYLPFGQGTRELK
    
```

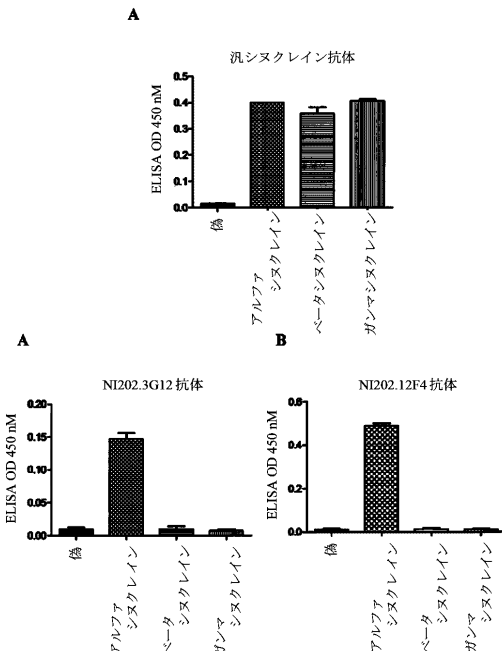
NI-202.3D8-VKc1-GL(生殖細胞系配列と整理した可変軽鎖配列 VKc1、配列番号 22)

```

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
DIQMTQSPSSLSASIGDRVITFCRASGHSNLYLAWFRQPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SASGSGTFTLTISSLQPDDFATYYCYQYRTPYLPFGQGTRELK
    
```

【図 3】

【図 3】

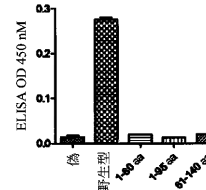


【図 2】

【図 2】

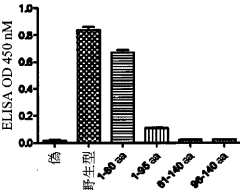
A

NI202.3G12 抗体



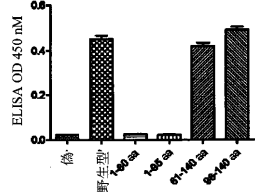
B

NI202.12F4 抗体



C

LB509 抗体



【図 6】

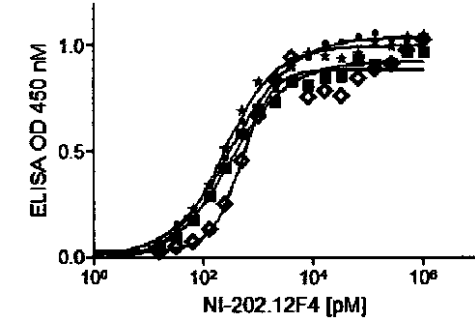


Fig. 6

【図 7】

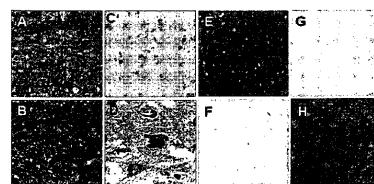
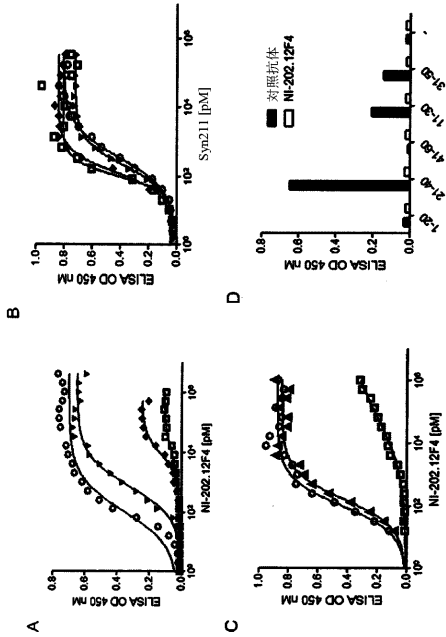


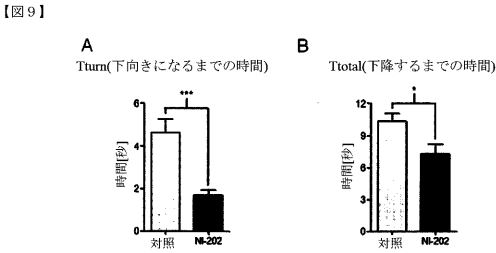
Fig. 7

【図8】



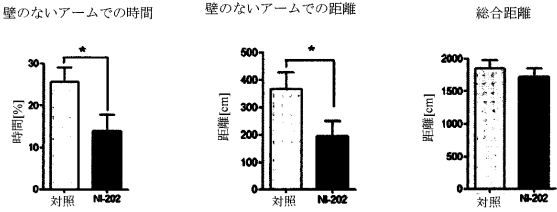
【図8】

【図9】



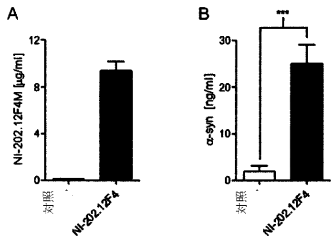
【図10】

【図10】



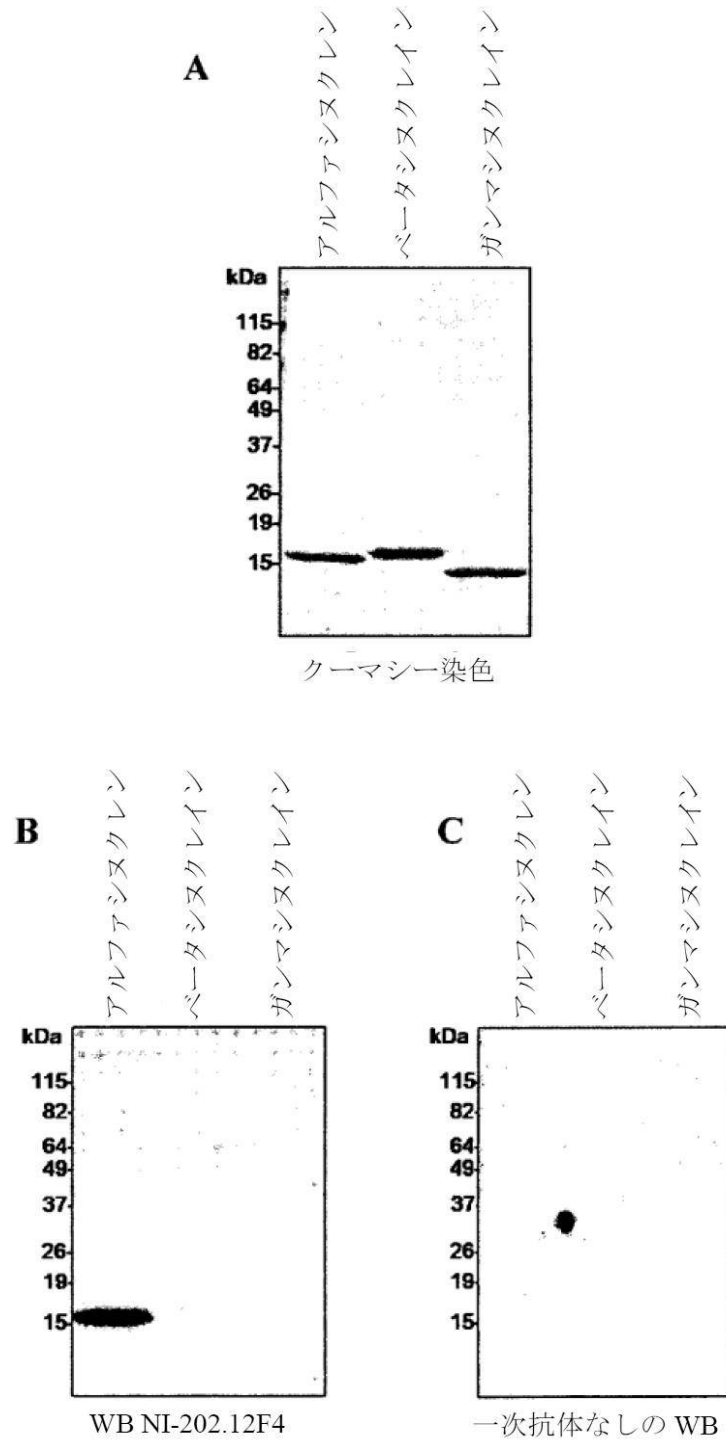
【図11】

【図11】



【図4】

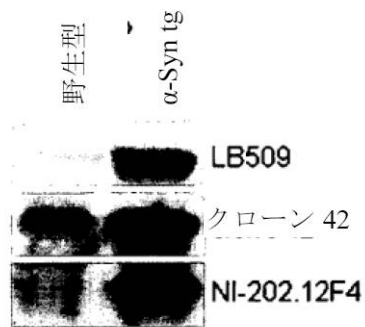
【図4】



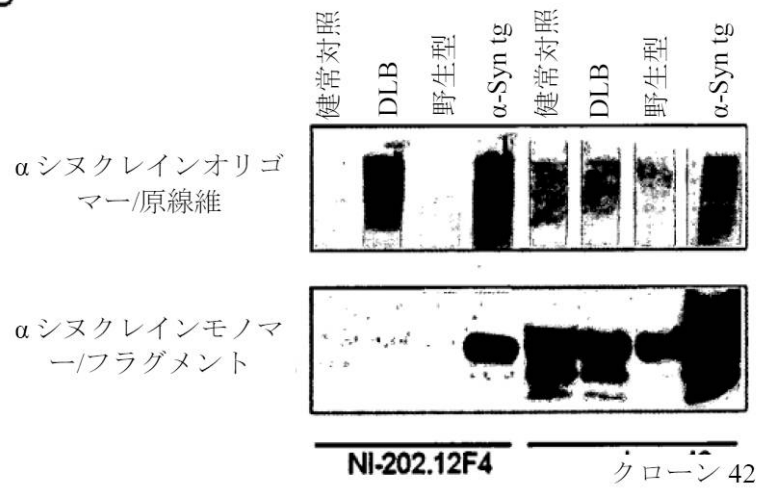
【図 5】

【図 5】

A



B



【配列表】

[0005810413000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
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 1 0 1
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/02
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00 A
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	21/02 (2006.01)	A 6 1 P	21/02
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/02 C
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	49/00 C
G 0 1 N	33/532 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
G 0 1 N	33/577 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D
		G 0 1 N	33/532 A
		G 0 1 N	33/577 B

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ヴァイホーフェン, アンドレアス

スイス国 ツェーハー - 8 0 3 7 チューリッヒ, トウルヴィセンシュトラッセ 1 5 アー

(72)発明者 グリム, ヤン

スイス国 ツェーハー - 8 6 0 0 デューベンドルフ, ビュルクリシュトラッセ 1 6

(72)発明者 ニッチ, ローガー

スイス国 ツェーハー - 8 1 2 6 ツミコン, ランクヴィスシュトラッセ 2 7

(72)発明者 ホック, クリストフ

スイス国 ツェーハー - 8 7 0 3 エルレンバッハ, リートシュトラッセ 4 3

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 Autoimmun. Rev., (2008), 7, [6], p.501-507

J. Neurochem., (2007), 101, [3], p.749-756

J. Mol. Biol., (2007), 368, [4], p.1132-1144

J. Mol. Biol., (2008), 377, [1], p.136-147

Biochemistry, (2004), 43, [10], p.2871-2878

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d

专利名称(译)	人抗α突触核蛋白自身抗体		
公开(公告)号	JP5810413B2	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	JP2011541231	申请日	2009-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	聚苯胺马制药股份公司 苏黎世大学		
申请(专利权)人(译)	Panima制药公司 苏黎世大学		
当前申请(专利权)人(译)	生物遗传神经科学国际有限公司 苏黎世大学		
[标]发明人	ヴァイホーフエンアンドレアス グリムヤン ニッチローガー ホッククリストフ		
发明人	ヴァイホーフエン, アンドレアス グリム, ヤン ニッチ, ローガー ホック, クリストフ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/46 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395 A61K51/00 A61K49/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/00 A61P21/02 A61P43/00 G01N33/53 G01N33 /532 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P21/00 A61P21/02 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P43/00 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/92 A61K39/3955 A61K45/06 A61K49/16 C07K2317/14 C07K2317/30 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N33/6896 G01N2333/4703 G01N2800/2814 G01N2800/2821 G01N2800/2835		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/46 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 A61K39/395.N A61K49/02 A61K49/00.A A61P25/16 A61P25/28 A61P25/00 A61P21/02 A61K49/02.C A61K49/00.C A61P43/00.121 G01N33/53.D G01N33/532.A G01N33/577.B		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	2008022188 2008-12-19 EP 61/139253 2008-12-19 US		
其他公开文献	JP2012512634A JP2012512634A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了人α突触核蛋白特异性自身抗体及其片段，衍生物和变体，以及与其相关的方法。还公开了与α突触核蛋白特异性抗体相关的测定，试剂盒和固体支持物。抗体，免疫球蛋白链及其结合片段，衍生物和变体可分别用于α突触核蛋白靶向免疫疗法和诊断的药物和诊断组合物中。

(21) 出願番号	特願2011-541231 (P2011-541231)	(73) 特許権者	511148880
(86) (22) 出願日	平成21年12月21日 (2009.12.21)		バイオジェン インターナショナル ニュ
(65) 公表番号	特表2012-512634 (P2012-512634A)		ーロサイエンス ゲーエムベーパー
(43) 公表日	平成24年6月7日 (2012.6.7)		スイス国 ツェーハー 8952 シュリ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/009186		ーレン, ヴァギシュトラッセ 13
(87) 国際公開番号	W02010/069603	(73) 特許権者	507324681
(87) 国際公開日	平成22年6月24日 (2010.6.24)		ユニバーシティ・オブ・チューリッヒ
審査請求日	平成24年12月20日 (2012.12.20)		UNIVERSITY OF ZURICH
(31) 優先権主張番号	08022188.0		H
(32) 優先日	平成20年12月19日 (2008.12.19)		スイス国、ツェーハー 8006 チュー
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		リッヒ、レーミシュトラッセ 71、プロ
(31) 優先権主張番号	61/139, 253		レクタート・フォルシュンク
(32) 優先日	平成20年12月19日 (2008.12.19)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
最終頁に続く			