

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-529657

(P2009-529657A)

(43) 公表日 平成21年8月20日(2009.8.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2GO45
A6 1 K 39/395 (2006.01)	A6 1 K 39/395 X	4CO85
A6 1 P 31/00 (2006.01)	A6 1 P 31/00	
A6 1 P 7/02 (2006.01)	A6 1 P 7/02	
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 123 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-555179 (P2008-555179)	(71) 出願人	506088610 クロスベータ、バイオサイエンス、ベス ローテン、フェンノートシャップ CROSSBETA BIOSCIENC ES B. V. オランダ国3594、シーエックス、ユト レヒト、ハイデルベルグラーン、100
(86) (22) 出願日	平成19年2月16日 (2007.2.16)	(74) 代理人	100075812 弁理士 吉武 賢次
(85) 翻訳文提出日	平成20年10月16日 (2008.10.16)	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(86) 国際出願番号	PCT/NL2007/050063	(74) 代理人	100094640 弁理士 紺野 昭男
(87) 国際公開番号	W02007/094668	(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修孝
(87) 国際公開日	平成19年8月23日 (2007.8.23)		
(31) 優先権主張番号	06075355.5		
(32) 優先日	平成18年2月16日 (2006.2.16)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフィニティ領域

(57) 【要約】

本発明は、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造のエピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる少なくとも1種の I g I V 分子を I g I V 分子のコレクションから選択するための方法を提供し、該方法では I g I V 分子のコレクションをミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と接触させ、該ミスフォールドタンパク質および/またはエピトープと相互作用するアフィニティ領域を含んでなる少なくとも1種の I g I V 分子を集める。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ミスフォールドタンパク質のエピトープおよび/またはクロス 構造のエピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる少なくとも 1 種の I g I V 分子を、I g I V 分子のコレクションから選択するための方法であって、

I g I V 分子のコレクションを、ミスフォールドタンパク質、クロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と接触させ、上記エピトープと相互作用するアフィニティ領域を含んでなる少なくとも 1 種の I g I V 分子を集めることを含んでなる、方法。

10

【請求項 2】

エピトープがタンパク質のクロス 構造の少なくとも一部である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

エピトープが、クロス 構造を含んでなるタンパク質で露出されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ミスフォールドタンパク質、クロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質が、固体支持体に結合されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ミスフォールドタンパク質、クロス 構造のエピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと、相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる I g I V 分子で富化された、I g I V 分子のコレクション。

20

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法により選択された、請求項 5 に記載の I g I V 分子のコレクション。

【請求項 7】

ミスフォールドタンパク質、クロス 構造のエピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる、少なくとも 5 種、好ましくは少なくとも 8 種、更に好ましくは少なくとも 10 種の単離、合成および/または組換え分子を含んでなる組成物。

30

【請求項 8】

ミスフォールドタンパク質、クロス 構造のエピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる少なくとも 1 種の I g I V 分子の機能性部分、誘導体および/またはアナログを含んでなる、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

分子の少なくとも 1 種がクロス 構造結合分子を更に含んでなる、請求項 7 または 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

分子の少なくとも 1 種がエフェクター分子を更に含んでなる、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 11】

エフェクター分子がプロテアーゼまたはそのクロス 構造結合部分である、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

エフェクター分子が免疫増強化合物、好ましくはサイトカインである、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 13】

エフェクター分子が補体活性化因子である、請求項 10 に記載の組成物。

50

【請求項 14】

エフェクター分子がクリアランスシグナル、好ましくはFcドメインの少なくとも一部である、請求項10に記載の組成物。

【請求項 15】

エフェクター分子が炎症抑制化合物、好ましくは補体阻害因子である、請求項10に記載の組成物。

【請求項 16】

エフェクター分子がクロス 構造結合増強因子である、請求項10に記載の組成物。

【請求項 17】

エフェクター分子がオプソニン化化合物である、請求項10に記載の組成物。

10

【請求項 18】

単離、合成および/または組換え分子がオプソニン化化合物である、請求項7～17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

ミスフォールドタンパク質、クロス 構造のエピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうる少なくとも1種のIgIV分子のアフィニティ領域のアミノ酸配列を決定し、該アミノ酸配列を含んでなる単離、合成および/または組換え分子を作製することを含んでなる、請求項7～18のいずれか一項に記載の組成物を作製するための方法。

【請求項 20】

20

請求項5または6に記載のIgIV分子のコレクションまたは請求項7～18のいずれか一項に記載の組成物から、ミスフォールドタンパク質またはクロス 構造のエピトープと相互作用する際におよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用する際に、食細胞により該クロス 構造および/またはタンパク質のオプソニ化を誘導しうるアフィニティ領域を含んでなる分子を選択するための方法であって：

請求項5または6に記載のIgIV分子のコレクションまたは請求項7～18のいずれか一項に記載の組成物を、ミスフォールドタンパク質、クロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と接触させ；

IgIV分子および/または単離、合成および/または組換え分子に結合されたミスフォールドタンパク質、クロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質

30

を含んでなる複合体を食細胞と接触させ；および
該ミスフォールドタンパク質、クロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質の食細胞による食作用を誘導または増強しうるIgIV分子および/または単離、合成および/または組換え分子を集める；

ことを含んでなる、方法。

【請求項 21】

薬剤として用いるための、請求項5または6に記載のIgIV分子のコレクション、および/または請求項7～18のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造関連および/または関係疾患、血液凝固障害、敗血症および/または微生物/病原体/細菌/寄生虫/ウイルス感染症の少なくとも部分的な予防および/または治療のための薬剤の製造のための、請求項5または6に記載のIgIV分子のコレクションおよび/または請求項7～18のいずれか一項に記載の組成物の使用。

40

【請求項 23】

微生物/病原体/細菌/寄生虫/ウイルス感染症がHIV関連日和見感染症を含んでなる、請求項22に記載の使用。

【請求項 24】

請求項5または6に記載のIgIV分子のコレクションおよび/または請求項7～18のいずれか一項に記載の組成物を個体に投与することを含んでなる、個体で細胞外タンバ

50

ク質分解および/またはタンパク質クリアランスを増強させるための方法。

【請求項 25】

請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび/または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物の有効量を個体へ投与することを含んでなる、個体でミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造媒介効果を少なくとも一部阻害するための方法。

【請求項 26】

請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび/または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物を個体へ投与することを含んでなる、個体におけるミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造関連および/または関係疾患、血液凝固障害、敗血症および/または微生物/病原体/細菌/寄生虫/ウイルス感染症の少なくとも部分的な予防および/または治療のための方法。

10

【請求項 27】

請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび/または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物を個体へ投与することを含んでなる、個体で H I V 関連日和見感染症の少なくとも部分的な予防および/または治療のための方法。

【請求項 28】

請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクション、および/または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物、および適切なキャリア、希釈物および/または賦形剤を含んでなる組成物。

20

【請求項 29】

クロス 構造結合化合物を更に含んでなる、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

クロス 構造結合増強化合物を更に含んでなる、請求項 28 または 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

補体活性化化合物を更に含んでなる、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 32】

免疫増強化合物、炎症抑制化合物および/または補体阻害化合物を更に含んでなる、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 33】

タンパク質誘導血小板凝集を阻害するための、請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび/または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 34】

ミスフォールドタンパク質、クロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなる分子への組織型プラスミノゲンアクチベーター (t P A) の結合と競合させるための、請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび/または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

40

【請求項 35】

サンプルからミスフォールドタンパク質、クロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質を少なくとも一部除去するための方法であって、

サンプルを請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび/または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物と接触させ、I g I V 分子および/または単離、合成および/または組換え分子に結合されたミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質の複合体を該サンプルから除去することを含んでなる方法。

【請求項 36】

サンプルが流体サンプルである、請求項 35 に記載の方法。

50

【請求項 37】

流体が体液を含んでなる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

流体が製薬またはその成分のいずれかを含んでなる、請求項 35 または 36 に記載の方法。

【請求項 39】

流体が食品物質を含んでなる、請求項 35 または 36 に記載の方法。

【請求項 40】

I g I V 分子のコレクションおよび / または組成物が固体支持体へ結合されている、請求項 35 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 41】

ミスフォールドタンパク質、クロス 構造および / またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と相互作用しうる、請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションの少なくとも 1 種のアフィニティ領域、および / または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも 1 種のアフィニティ領域、および

該ミスフォールドタンパク質および / または該クロス 構造および / または該タンパク質と該アフィニティ領域との相互作用の視覚化の手段、を含んでなる診断キット。

【請求項 42】

ミスフォールドタンパク質および / またはクロス 構造が疾患関連ミスフォールドタンパク質および / またはクロス 構造を含んでなる、請求項 41 に記載の診断キット。

20

【請求項 43】

ミスフォールドタンパク質および / またはクロス 構造を含んでなるタンパク質および / またはペプチドが、タンパク質を含んでなる水溶液中に存在しているかどうかを調べるための方法であって：

該水溶液を請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび / または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物と接触させ、および

結合ミスフォールドタンパク質および / またはクロス 構造を含んでなるタンパク質および / またはペプチドが存在しているかどうかを検出する、ことを含んでなる方法。

30

【請求項 44】

水溶液が、洗剤、食物製品、食物サプリメント、細胞培地、リサーチ目的に用いられる市販タンパク質溶液、血液、血液製剤、脳脊髄液、滑液、リンパ液、化粧品、細胞、タンパク質を含んでなる医薬組成物またはその成分のいずれか、またはこれらのいずれかの組合せを含んでなる、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

タンパク質を含んでなる医薬組成物またはその成分のいずれかからミスフォールドタンパク質、クロス 構造および / またはクロス 構造を含んでなるタンパク質を除去するための方法であって：

タンパク質を含んでなる該医薬組成物またはその成分のいずれかを請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび / または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物と接触させ；

該 I g I V 分子のコレクションおよび / または組成物への該ミスフォールドタンパク質および / またはクロス 構造を含んでなるタンパク質および / またはペプチドの結合を行わせ；および

タンパク質を含んでなる該医薬組成物またはその成分のいずれかから、クロス 構造を含んでなる結合タンパク質および / またはペプチドを分離する；ことを含んでなる、方法。

40

【請求項 46】

医薬組成物の望ましくない副作用を減少させるおよび / または防止するおよび / または

50

タンパク質グラム当たりの比活性を増加させるための方法であって、

請求項 4 5 に記載の方法を用いて、該医薬組成物またはその成分のいずれかから、アンフォールドタンパク質、アンフォールドペプチド、ミスフォールドタンパク質、変性タンパク質、凝集タンパク質、凝集ペプチド、マルチマー化タンパク質および/またはマルチマー化ペプチド、および/またはクロス 構造を含んでなるペプチドを除去することを含んでなる、方法。

【請求項 4 7】

請求項 4 5 または 4 6 に記載の方法により得られる、タンパク質を含んでなる医薬組成物またはその成分。

【請求項 4 8】

ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質の蓄積を減少させるための、請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび/または請求項 7 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 4 9】

ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造がコンホメーション疾患に關与している、請求項 4 8 に記載の使用。

【請求項 5 0】

疾患が、アミロイドーシス型疾患、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、出血、血栓症、癌、敗血症および他の炎症疾患、リウマチ様関節炎、伝染性海綿状脳症、多発性硬化症、自己免疫疾患、記憶の喪失を伴う疾患またはパーキンソン病および他の神経疾患（癲癇）

【請求項 5 1】

好ましくはコンホメーション疾患に關与する、蓄積沈着ミスフォールドタンパク質またはクロス 構造のタンパク質の存在を調べるための、請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび/または請求項 7 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 5 2】

請求項 3 5 ~ 4 0 または 4 5 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法を実施するための分離装置であって、

（循環）流体を輸送するためのシステムを含んでなり、該システムがフロー流体、好ましくは個体の循環へ接続するための、該システムへの流体のエントリーと該システムから好ましくは個体の循環への流体のリターンのための手段を備え、該システムが更に固相を含んでなり、該固相が請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび/または請求項 7 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の組成物を含んでなる装置。

【請求項 5 3】

透析装置である、請求項 5 2 に記載の分離装置。

【請求項 5 4】

請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび/または請求項 7 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物を血液へ供することを含んでなる、血液の凝固を妨げるための方法。

【請求項 5 5】

組成物中、好ましくは薬剤および/またはワクチン中におけるミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造の量を調べるための方法であって：

該組成物を請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび/または請求項 7 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物と接触させ、および

結合ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造の量を該組成物中に存在するクロス 構造の量と関連づける、ことを含んでなる、方法。

【請求項 5 6】

10

20

30

40

50

タンパク質のクロス 構造含有率に影響を有すると予想される処理に試験サンプルが付されていた、試験サンプル中タンパク質のクロス 構造含有率と比較したリファレンスサンプル中タンパク質のクロス 構造含有率との差異を調べるための方法であって：

請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび / または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物を用いてリファレンスサンプルでタンパク質のクロス 構造含有率を調べ；

該タンパク質のクロス 構造含有率に影響を有すると予想される処理に該タンパク質を付し、こうして試験サンプルを得；

請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび / または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物を用いて、得られた試験サンプル中における該タンパク質のクロス 構造含有率を調べ；および

該リファレンスサンプル中該タンパク質のクロス 構造含有率が該試験サンプル中該タンパク質のクロス 構造含有率と有意に異なるかどうかを調べることを含んでなる、方法。

【請求項 5 7】

タンパク質を含んでなるサンプルでミスフォールドタンパク質、クロス 構造またはクロス 構造を含んでなるタンパク質の同一性の決定のための方法であって：

該サンプルを請求項 5 または 6 に記載の I g I V 分子のコレクションおよび / または請求項 7 ~ 18 のいずれか一項に記載の組成物と接触させて、結合ミスフォールドタンパク質、クロス 構造および / またはクロス 構造を含んでなる結合タンパク質を得、および

結合ミスフォールドタンパク質、結合クロス 構造および / またはクロス 構造を含んでなる結合タンパク質を同定する、ことを含んでなる、方法。

【請求項 5 8】

サンプルが、水溶液、好ましくは体液を含んでなる、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

健康な個体からの体液とクロス 構造の存在と関連および / または関係する疾患に罹患したまたは罹患していると疑われる個体からの体液が用いられる、請求項 5 7 または 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

A L アミロイドーシスおよび / または関節炎に罹患しているまたは罹患するリスクのある個体からのサンプルが用いられる、請求項 5 7 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 1】

薬剤として、表 9 で示された化合物と特異的に結合しうる、および / または表 9 で示された化合物の量および / または活性を減少させうる、化合物。

【請求項 6 2】

ミスフォールドタンパク質関連および / または関係疾患、血液凝固障害、敗血症および / または微生物 / 病原体 / 細菌 / 寄生虫 / ウイルス感染症に対する薬剤の製造のための、表 9 で示された化合物と特異的に結合しうる、および / または表 9 で示された化合物の量および / または活性を減少させうる化合物の使用。

【請求項 6 3】

疾患が A L アミロイドーシスおよび / または関節炎を含んでなる、請求項 5 1 または 6 2 に記載の使用。

【請求項 6 4】

表 9 で示された化合物と特異的に結合しうる、および / または表 9 で示された化合物の量および / または活性を減少させうる化合物を個体へ投与することを含んでなる、ミスフォールドタンパク質関連および / または関係疾患、血液凝固障害、敗血症および / または微生物 / 病原体 / 細菌 / 寄生虫 / ウイルス感染症に罹患しているまたは罹患するリスクのある対象者を治療するための方法。

10

20

30

40

50

【請求項 65】

疾患が A L アミロイドーシスおよび / または関節炎を含んでなる、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

エフェクター分子がミスフォールディングのインヒビターである、請求項 10 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

本発明は、生化学、分子生物学、構造生物学および医学の分野に関する。

10

【0002】

免疫グロブリン静脈注射 (I g I V) は外見上健康な動物またはヒトの免疫グロブリンであり、該免疫グロブリンはその血清または血液から集められる。I g I V は抗体の欠乏を有する動物およびヒトに処方される。該抗体欠乏の原因は、免疫系に罹患する病気、例えばエイズ、あるいは完全または部分無 グロブリン血症または低 グロブリン血症を引き起こす先天性異常、例えば原発性免疫不全症候群または重症複合免疫不全症候群 (S C I D S) である。ヒト血清または血液から集められた免疫グロブリンは、例えば “ 静脈注射ヒト免疫グロブリン ” (I g I V または I V I g) のような多くの異なる名称で市販されている。I g I V が上記免疫不全者の免疫グロブリン置換療法で 1981 年に初めて導入されて以来、それらは様々な疾患に罹患した患者へもオフラベルで適用され、いくつかの症例では、I g I V での実験的治療が成功に終わった。

20

【0003】

作用のメカニズムはこれまでに解明されていなかったため、I g I V によるオフラベル治療の多くは試行錯誤実験であり、結末はどちらかという予測不能であった。

【0004】

I g I V による治療はリスクなしではない。1981 年以来、食品医薬品局 (F D A) はこれら製品の投与に伴う腎機能不全および / または急性腎不全の有害事象報告を世界中で 114 例以上 (U . S . で約 83 例) 受けていた。急性腎不全は症例の大多数でうまく管理されたが、死亡が世界において 17 例の患者で報告された。死亡した患者の多くは重度の根底状態を有していた。患者で I g I V の投与に関連して更に報告された副作用に関しては、表 1 参照。

30

【0005】

結論として、I g I V によるヒトの治療は特定の病状に明らかに限定されないが、作用様式の明確な理解が欠けており、新疾患自体における I g I V 治療の結末は予測不能である。多量の I g I V の投与は有害副作用のリスクを伴う。したがって、現行 I g I V 治療の改善について必要性がある。

【0006】

I g I V 療法を改善するための手段および方法を提供することが、本発明の目的である。疾患または疾患群の治療に適した、I g I V と比較して少なくとも 1 つの改善点、例えば有害副作用のリスク減少および / または治療作用の改善を有する、免疫グロブリンまたはその相当物を得るために、I g I V プールから免疫グロブリンのグループの選択および / または精製法と、免疫グロブリンまたはその機能相当物の別な製造方式を提供することが、別な目的である。これまでに、当業者はどのように開始してどれを選択すべきか知らなかった。

40

【0007】

本発明は、ミスフォールドタンパク質 (ミスホールドタンパク質 (misfolded protein)) のエピトープ、クロス 構造のエピトープおよび / またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうる I g I V 分子で富化された I g I V の選択が、現在使用の I g I V と比較して改善された性質を有している、という洞察を与える。有害副作用が少なくとも一部防止されおよび / または治療作用が改善されることから、上記の

50

選択は現在使用の I g I V よりとりわけ好ましい。

【 0 0 0 8 】

ミスフォールドタンパク質は、天然、非アミロイド、非クロス 構造以外の構造をとるタンパク質として、ここでは定義される。そのため、ミスフォールドタンパク質は非天然三次元構造および/またはクロス 構造および/またはアミロイド構造を有するタンパク質である。タンパク質ミスフォールディングは多数の疾患にとり病因学上重要であり、多くの場合に老化（例えばアミロイド疾患）と関連している。ミスフォールディング疾患はコンホメーション疾患とも称されている。現在、局在性および全身性アミロイドーシス、例えばアルツハイマー病、透析関連アミロイドーシス、パーキンソン病およびハンチントン病に限定されないが、それらを含めた30種を超えるミスフォールディング疾患がそのように記載されている。これらの既知ミスフォールディング疾患に加えて、（自己）免疫疾患およびアテローム性動脈硬化症を含めた多くの他の疾患が、そのうちいくつかはなお一部または大部分未知の病因であるが、タンパク質ミスフォールディングと関連している、と我々は以前に開示した（特許W O 2 0 0 4 / 0 0 4 6 9 8（E P 1 5 3 6 7 7 8）および関連特許）。これら疾患の多くで、適切な治療または療法が行われていない。寿命の最後に廃退タンパク質の体からのクリアランス、血液凝固、血小板凝集およびフィブリン溶解のような他のプロセスも、そのうちいくつかは疾患関連であるが、タンパク質ミスフォールディングと関連している、と我々は開示した。

10

【 0 0 0 9 】

疾患開始および/または疾患進行におけるミスフォールドタンパク質の役割のほかに、タンパク質ミスフォールディングはタンパク質製剤の使用に伴う自己抗体の有害形成、アナフィラキシー応答および他の炎症またはアレルギー反応のような合併症も引き起こす。この理由から、タンパク質ミスフォールディングがタンパク質ベース薬物の生産、保存および使用に際する主要問題である。

20

【 0 0 1 0 】

最後に、ミスフォールドタンパク質は免疫の導入に寄与し、ミスフォールドタンパク質は、例えばワクチンの使用で、免疫応答を誘発および/または増強するために用いられる。

【 0 0 1 1 】

ミスフォールドタンパク質はマルチマー化しやすく、フィブリル化を始めることがある。これは、サイズが著しく異なる無定形凝集物の形成につながる。ある場合には、ミスフォールドタンパク質の方が性質上規則的でフィブリル性である。アミロイドという用語は、ミスフォールドタンパク質から形成され、包括的にアミロイドーシスと称される様々な既知ミスフォールディング疾患を有する患者の器官および組織で見られる、フィブリルを規定するために当初採り入れられた。通常、アミロイドは不定の長さおよび平均径10nmのフィブリルとして出現し、細胞外に沈着し、色素コンゴレッドおよびチオフラビンT（ThT）で染色すると、コンゴレッドが結合されたとき偏光下で特徴的な緑色複屈折を示し、シート二次構造を含み、X線線維回折解析で調べると特徴的クロスベータコンホメーション（下記参照）を含んでいる。しかしながら、タンパク質ミスフォールディングがより一般的な現象であるとわかってきたため、しかもミスフォールドタンパク質の多くの特徴がアミロイドと共有されていることから、アミロイドという用語がより広範囲で用いられてきた。今では、アミロイドという用語は細胞内フィブリルおよびインビトロで形成されたフィブリルを規定するためにも用いられている。しかも、アミロイド様（amyloid-like）およびアミログ（amylog）という用語が、アミロイドと共有される性質を有するが、前記のようなアミロイドに関するすべての基準を満たすわけではない、ミスフォールドタンパク質を示すために用いられている。

30

40

【 0 0 1 2 】

結論として、ミスフォールドタンパク質は、モノマーミスフォールドタンパク質から、時々プロトフィブリルと称される小さなオリゴマー種、無定形外形の大きな凝集物、大きな高秩序フィブリルまで、性質上高度に異質であり、それらすべての外形がアミロイドを

50

連想させる構造的特徴を共有しうる。ここで用いられている“ミスフォールドーム”(misfoldome)という用語はミスフォールドタンパク質のあらゆるコレクションを包含している。

【0013】

アミロイドと同定される上ですべての基準を満たすわけではないアミロイドおよびミスフォールドタンパク質は、アミロイドおよび/または他のミスフォールドタンパク質と構造的および機能的特徴を共有しうる。これらの共通特徴は、様々なミスフォールドタンパク質の中で、それらの多様なアミノ酸配列とは無関係に共有されている。共有される構造的特徴には、例えば色素の蛍光増強を伴うコンゴレッド、ThT、チオフラビンSのようなある色素との結合性、マルチマー化、および組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)、前進性グリケーション終末産物のレセプター(RAGE)およびシャペロン、例えばBiP(gp78または免疫グロブリン重鎖結合タンパク質)などの熱ショックタンパク質のようなあるタンパク質との結合性がある。共有される機能活性には、tPAの活性化および細胞応答、例えば炎症応答の誘導、および細胞毒性の誘導がある。

【0014】

例えばアミロイドのようなミスフォールドタンパク質のサブセットに特有のホールマークは、クロスベータコンホメーションまたはクロスベータコンホメーションの前駆体の存在である。

【0015】

クロス構造は、ペプチドおよびタンパク質における二次構造要素である。クロス構造(“クロス”、“クロス・ベータ”または“クロスベータ”構造とも称される)は、タンパク質またはペプチドの一部、またはペプチドおよび/またはタンパク質のアセンブリーの一部として定義され、それは単一鎖(段階1)および/または鎖の(n次)グループ(段階2)、および/または典型的にはシートで配列された鎖のグループ(段階3)、および/または特に“アミロイド”とも称される積重ねシートのグループ(段階4)を含んでなる。クロスベータ構造は、タンパク質ミスフォールディング、例えば変性、タンパク質分解またはタンパク質のアンフォールディングで、クロスベータ構造前駆体の形成後に形成される。クロスベータ構造前駆体は、クロスベータ構造の前記構造段階のいずれかの形成に先立つ、いずれかのタンパク質コンホメーションとして定義される。クロスベータ構造(前駆体)に存在するこれらの構造要素は、典型的にはタンパク質(の天然部分)の球状領域に不在である。クロスベータ構造の存在は、例えばX線線維回折または色素の蛍光増強を伴うチオフラビンTの結合もしくはコンゴレッドの結合で証明される。クロスベータ構造前駆体の典型的な形は、部分的または完全ミスフォールドタンパク質である。ミスフォールドタンパク質の典型的な形は、部分的または完全アンフォールドタンパク質、部分的リフォールドタンパク質、部分的または完全凝集タンパク質、オリゴマー化またはマルチマー化タンパク質、または部分的または完全変性タンパク質である。クロスベータ構造またはクロスベータ構造前駆体はモノマー分子、分子のダイマー、トリマー、オリゴマーまでのアセンブリーとして出現したり、分子のマルチマー構造および/またはアセンブリーとして出現したりする。

【0016】

前記段階のいずれかにおけるクロスベータ構造(前駆体)は、水溶液および/または有機溶媒および/またはいずれか他の溶液中に可溶性で出現しうる。クロスベータ構造(前駆体)は、溶液中固体状態物質として、例えば不溶性凝集物、フィブリル、粒子として、例えば懸濁物としても存在するか、または固体クロスベータ構造相および溶媒相に分離される。

【0017】

タンパク質ミスフォールディング、クロスベータ構造前駆体の形成、凝集物またはマルチマーおよび/またはクロスベータ構造の形成は、少なくとも2アミノ酸のペプチドおよび/またはタンパク質を含んでなる何らかの組成物で生じうる。“ペプチド”という用語はオリゴペプチドおよびポリペプチドを含めた意味であり、“タンパク質”という用語は

10

20

30

40

50

グリコシル化およびグリケーションのような翻訳後修飾を受けたおよび受けていない、ペプチドを含めたタンパク質分子を含む。それは、リポタンパク質およびタンパク質部分を含んでなる複合体、例えばタンパク質 核酸複合体 (RNA および / または DNA)、膜タンパク質複合体なども含む。ここで用いられている“タンパク質”という用語は、タンパク質分子、ペプチド、オリゴペプチドおよびポリペプチドも包含する。このように、この出願で“タンパク質”または“タンパク質および / またはペプチド”の使用は同じ意味を有する。

【0018】

積重ね シートの典型的な形は、シートがフィブリルの軸の方向にまたはフィブリルの軸の方向と垂直に積み重ねられた、フィブリル様構造をとる。クロス構造でシートの積重ねの方向は、長い繊維軸と垂直である。クロス構造コンホメーションは、廃退タンパク質またはペプチドのクリアランスおよび分解を誘導する事象のカスケードを誘発するシグナルである。クリアランスが不十分であると、望ましくないタンパク質および / またはペプチドが凝集して、可溶性オリゴマーから沈降フィブリルおよび無定形プラークまでの毒性構造を形成する。凝集物を含んでなるこのようなクロス構造コンホメーションが、様々な疾患、例えばハンチントン病、アミロイドーシス型疾患、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、出血、血栓症、癌、敗血症および他の炎症疾患、リウマチ様関節炎、伝染性海綿状脳症、例えばクロイツフェルト・ヤコブ病、多発性硬化症、自己免疫疾患、記憶の喪失を伴う疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病および他の神経疾患 (癩癩)、脳症および全身性アミロイドーシスの根源にある。

10

20

【0019】

クロス構造は、例えばタンパク質およびペプチドのアンフォールディングおよびリフォールディングに際して形成される。ペプチドおよびタンパク質のアンフォールディングは生物内で規則的に生じる。例えば、ペプチドおよびタンパク質はそれらのライフサイクルの最後で多くが自然にアンフォールドおよびリフォールドされる。更に、アンフォールディングおよび / またはリフォールディングは、例えば pH、グリケーション、酸化ストレス、熱、放射線、機械的ストレス、タンパク質分解などのような環境要因で誘導される。ここで用いられている“クロス構造”という用語は、たとえミスフォールドタンパク質がクロスベータ構造を必ずしも含んでいないとしても、あらゆるクロスベータ構造前駆体およびあらゆるミスフォールドタンパク質も包含する。“クロスベータ結合分子”または“クロスベータ構造と特異的に結合しうる分子”という用語は、何らかのミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうる分子も包含する。

30

【0020】

アンフォールディング (unfolding)、リフォールディング (refolding) およびミスフォールディングという用語は、タンパク質またはペプチドの三次元構造に関する。アンフォールディングとは、タンパク質またはペプチドがその三次元構造の少なくとも一部を失うことを意味する。リフォールディングという用語は、ある種の三次元構造へ戻るラセン化に関する。リフォールディングにより、タンパク質またはペプチドはその天然立体配置を取り戻すか、または不正確なリフォールディングが生じうる。“不正確なリフォールディング”という用語は、天然立体配置以外の三次元構造が形成されるときに状況に関する。不正確なリフォールディングもミスフォールディングと称される。タンパク質およびペプチドのアンフォールディングおよびリフォールディングは、クロス構造形成のリスクを伴う。クロス構造の形成は、正確にフォールドされたタンパク質中間体なしに、タンパク質合成後も時々直接生じる。

40

【0021】

クロスベータ経路：ミスフォールドタンパク質への応答

我々は、ミスフォールドタンパク質の出現を感知し、ミスフォールドタンパク質の分解およびクリアランスをもたらす、クロスベータ経路と称される生物学的メカニズムについて以前に開示した (特許 W O 2 0 0 4 / 0 0 4 6 9 8)。我々は、クロスベータ構造またはクロスベータ構造前駆体を含んでなるタンパク質と共通した構造的特徴の、ミスフォー

50

ルドタンパク質を認識する、t P A および密接関連タンパク質因子XII、肝細胞成長因子アクチベーター (H G F A) およびフィブロンectinを含めた、いくつかのタンパク質を実験で同定した。我々は、文献の解析に基づき、細胞表面レセプターを含めたいくつかの追加タンパク質が、ミスフォールドタンパク質のクリアランスを含めた、ミスフォールドタンパク質への体の応答に関与し、そのためクロスベータ経路の一部であることも開示した。我々は、これらタンパク質のいくつか、例えばt P A およびその関連物が、ミスフォールドタンパク質を直接認識しうることを開示した。上記のタンパク質は、3 D 構造および/またはアミノ酸配列の点で関連性がないと思われる、多数のリガンドと結合することが知られていた。これらのタンパク質リガンドは多くが疾患と関連しているが、認識の共通構造または配列様式の存在は当初特定されていなかった。包括的に、ミスフォールドタンパク質を認識するt P A、その関連物および他のタンパク質はそのため、ミスフォールドタンパク質のクリアランスを促進するメカニズム、即ちクロスベータ経路の一部である。クロスベータ経路が関与する生理学的プロセスの例は、長期増強、先天性免疫、適応免疫、血管形成、血液凝固、血栓形成およびフィブリン溶解である。クロスベータ経路の機能不全は、例えばクロスベータコンホメーションの凝集物またはフィブリルのような、アミロイドで通常みられる構造的特徴を伴うまたは伴わない、危険なミスフォールドタンパク質を形成するタンパク質をもたらす。上記と以前に特許出願W O 2 0 0 4 / 0 0 4 6 9 8 で述べられているように、ミスフォールドタンパク質は、一部がタンパク質ミスフォールディングと既に関連づけられた様々な健康問題および疾患と、そのようには未だ関連づけられていないその他について、根源に存在している。これらの健康問題および疾患には、ハンチントン病、局在性アミロイドーシス、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、出血、血栓症、癌、敗血症、炎症疾患、リウマチ様関節炎 (R A)、多発性硬化症 (M S)、他の自己免疫疾患、記憶の喪失を伴う疾患、例えばアルツハイマー病 (A D)、パーキンソン病および他の神経疾患、例えば癲癇、脳症、脳炎、白内障、全身性アミロイドーシス、伝染性海綿状脳症、例えばクロイツフェルト・ヤコブ病、および腎不全に罹患した患者で透析に関連したアミロイドーシスがある。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

結論として、クロスベータ経路は、ミスフォールドタンパク質の感知、分解および/またはクリアランスに寄与する、クロスベータ構造結合化合物またはクロスベータ結合化合物またはミスフォールドタンパク質結合化合物と称される分子を含んでなり、そのうち一部はミスフォールドタンパク質と直接結合する。クロスベータ経路はタンパク質の非天然3 D フォールドを感知し、様々な様式で応答する。クロスベータ経路は、フォールディングおよび/またはリフォールディングを助けるため、ミスフォールドタンパク質の凝集物、フィブリルおよび/または沈降物の蓄積を防ぐために、ミスフォールドタンパク質と相互作用しうる、シャペロンのような分子も含んでなる。

【 0 0 2 3 】

例えば、t P A はミスフォールドタンパク質との直接結合に応答して活性化されるセリンプロテアーゼである。1つのこのようなミスフォールドタンパク質は、血餅に存在するフィブリンである。活性化で、t P A はチモーゲンプラスミノーゲンからプラスミンを生成する。セリンプロテアーゼプラスミンは次いで多くの基質、例えばプロコラゲナーゼのようなプロ酵素、およびフィブリンのような細胞外マトリックスタンパク質を開裂する。t P A 自体は、血餅のようなミスフォールドタンパク質の凝集物を分解させる事象のカスケードを開始させる。

【 0 0 2 4 】

他の例はR A G Eである。このレセプターはグリケート化タンパク質、アミロイドおよびアミロイド性を含んでなる他のリガンドとの結合に関与し、多くの疾患、例えばアミロイドーシス、糖尿病および自己免疫疾患の病理に関係している。このレセプターの可溶性の投与は、前記タンパク質ミスフォールディング疾患のうちいくつかの動物モデルで有益な効果を有する。

【 0 0 2 5 】

クロスベータ経路に關与するミスフォールドタンパク質結合分子の更に他の例は、シャペロン、または熱ショックタンパク質（HSP）またはストレスタンパク質である。例えばハプトグロビンおよびクラスタリンのようなシャペロンがATP非依存的にミスフォールドタンパク質の凝集物の形成の防止を助けるという事実は、それらをクロスベータ経路で重要な役割を果たす候補にしている。タンパク質コンホメーションの見本となる一連のタンパク質が協同で作用しているらしい。クロスベータ経路で協同作用するこれらのタンパク質の中には、シャペロン、例えばHSP60、HSP90、DNAK、クラスタリン、ハプトグロビン、gp96、BiP、他の（細胞外局在）HSP、プロテアーゼ、例えばHGF A、tPA、プラスミノゲン、因子XII、IVIgおよび細胞表面レセプターがある。クロスベータ経路に關与する細胞表面レセプターには、低密度リポタンパク質レセプター関連タンパク質（LRP、CD91）および関連物、CD36、スカベンジャーレセプターA、スカベンジャーレセプターB I、包括的にマルチリガンドレセプターとも文献で称されているRAGEがある。

10

【0026】

要するに、クロスベータ経路は、例えばアミロイドクロスベータ構造オリゴマーおよびフィブリルのような毒性構造を形成しないようにミスフォールドタンパク質を防止でき、ミスフォールドタンパク質（の凝集物）の分解およびクリアランスをなしうる。クロスベータ経路の一部として、ミスフォールドタンパク質はマルチリガンドミスフォールドタンパク質結合レセプターと結合して、エンドサイトーシスとその後でタンパク質分解を行う。

20

このように、クロスベータ経路の調節はタンパク質ミスフォールディング疾患の治療機会をもたらす。

【0027】

ミスフォールディング疾患

上記のように、タンパク質ミスフォールディング疾患、ミスフォールドタンパク質疾患、タンパク質ミスフォールディング障害、コンホメーション疾患、ミスフォールドタンパク質関連および/または関係疾患またはタンパク質フォールディング障害と称されるタンパク質ミスフォールディングと関連した疾患にはアミロイドーシス(amyloidoses)を含み、タンパク質ミスフォールディングは必ずしもアミロイドーシスまたはタンパク質ミスフォールディング障害という用語で規定されない多くの他の疾患および健康問題および生理学的プロセスとも関連しており、そのうちいくつかは前記されている。

30

【0028】

本発明によると、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造のエピトープおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるIgIV分子で富化されたIgIVの選択は、現在使用のIgIVと比較して少なくとも1つの改善された性質を有している。本発明はしたがって、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造のエピトープおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうる少なくとも1種のIgIV分子をIgIV分子のコレクションから選択するための方法を提供する。これは、好ましくは、IgIV分子のコレクションをミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と接触させ、該タンパク質および/またはエピトープと相互作用するアフィニティ（親和性）領域を含んでなる少なくとも1種のIgIV分子を集めることにより行われる。したがって、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造のエピトープおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる少なくとも1種のIgIV分子をIgIV分子のコレクションから集めるための方法が提供され、該方法ではIgIV分子のコレクションをミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と接触させ、該エピトープと相互作用するアフィニティ領域を含んでなる少なくとも1種のIgIV分子を集める。

40

【0029】

50

アフィニティ（親和性（affinity region））領域はタンパク質またはペプチドがエピトープと結合する親和性に影響を与え、エピトープと特異的に結合しうる抗体の少なくとも一部としてここでは定義される。該アフィニティ領域は、例えば免疫グロブリン（例えばIgG IV）の少なくとも一部、モノクローナル抗体の少なくとも一部および/またはヒト化抗体の少なくとも一部を含んでなる。該アフィニティ領域は、好ましくは抗体の重鎖の少なくとも一部および/または軽鎖の少なくとも一部を含んでなる。一態様において、該アフィニティ領域は二重F（ab）₂または単一形Fabフラグメントを含んでなる。

【0030】

通常、アフィニティ領域はT細胞、B細胞または他の免疫細胞のような細胞の表面で生じ、その場合にそれらは多くが細胞レセプターの一部である。アフィニティ領域はファージディスプレイライブラリーに合成形でも生じる。

【0031】

本発明の一態様では、IgG IV溶液の免疫グロブリンのコレクションをミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造の集合体と、好ましくは所定の選択クロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質、好ましくはクロス構造を含んでなる所定の選択タンパク質と接触させる。アフィニティ領域により認識されるエピトープは、一態様においてクロス構造自体に存在している。したがって、本発明の一態様は、エピトープがタンパク質のクロス構造の少なくとも一部である、クロス構造のエピトープおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる少なくとも1種のIgG IV分子をIgG IV分子のコレクションから選択するための、本発明による方法を提供する。他の態様において、該エピトープはクロス構造を含んでなる該タンパク質で露出されている。該エピトープは該クロス構造に必ずしも存在していない。通常、クロス構造はタンパク質の異なるフォールディングを誘導し、これは多くがこれまで未知のエピトープの誘導および/または露呈、または該タンパク質の既知エピトープの変化または欠失につながる。したがって、クロス構造がミスフォールディングに際して形成されたタンパク質は、クロス構造の存在に関連したエピトープを呈示することも可能である。一態様において、このような誘導および/または露呈エピトープと特異的に結合しうるIgG IV分子が選択される。

【0032】

前記のように、ミスフォールドタンパク質、クロス構造および/またはクロス構造を含んでなる（ミスフォールド）タンパク質は、多くの疾患の症状の根本原因である。クロス構造の存在と関連した該症状は、本発明によるIgG IV分子のコレクションの投与により、少なくとも一部軽減される。本発明によるIgG IV分子のコレクションは、例えば体液または組織サンプルのようなサンプルから、好ましくは疾患に関連および/または関係した、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質またはペプチドを除去し、それにより（循環）ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質またはペプチドの量を減少させるために特に適している。ここで用いられている“ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質またはペプチドを除去する”という用語は、サンプルから該タンパク質および/またはペプチドを分離し、並びにミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質またはペプチドのいずれか他の部分を結合、被覆、遮蔽および/または中和し、それにより該ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質またはペプチドと他の結合分子との相互作用を少なくとも一部妨げることを含んでなる。こうして、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造の存在および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質またはペプチドの存在に関連した有害作用、例えばエイズにおける感染および/または炎症、および/または例えばリウマチ様関節炎および多発性硬化症のような痛くて激しい疾患の症状は、少なくとも一部軽減される。同原理は、タンパク質がクロス構造（体により生成されるまたは病原体により生成および/

10

20

30

40

50

または誘導されるクロス 構造)の存在で変えられた炎症状態にも適用される。

【0033】

ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と反応する抗体の低濃度および多様性のせいで、ポジティブな結果を達成するためには比較的少量のIgIVが投与されねばならず、そのことが有害副作用のリスクを増やしている。更に、現行IgIV治療では、それらが投与される疾患で機能を有しない多種のタンパク質の投与により、不必要なストレスが体に加えられる。したがって、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と特異的に結合しうるIgIV分子について、IgIVのプールから本発明による方法で選択が行われることは、大きな利点である。ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と特異的に結合しうる免疫グロブリンの富化フラクションを含んでなる本発明によるIgIV製剤は、クロス 構造関連疾患に罹患するリスクのあるまたは既に罹患している非ヒト動物またはヒトへの投与に特に適している。ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と特異的に反応しうるIgIV分子を含んでなるIgIVの富化セレクションが投与されることから、現行IgIV治療より低い総濃度のIgIV分子を用い、現在使用のIgIVと同様のまたはそれより一層良い治療効果をなお有することが可能になった。

10

【0034】

ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造のエピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなるIgIV分子は、様々な手法でIgIV分子のコレクションから選択される。例えば、該IgIV分子はIgIV分子のプールをミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と接触させることにより選択される。その後で、結合IgIV分子が集められる。一態様において、該クロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質が疾患と関連している。例えば、ミエリン、ミエリン塩基性タンパク質および/またはミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質が、好ましくは、多発性硬化症を少なくとも一部治療および/または予防する際に使用のIgIV分子を選択するために用いられる。同様に、コラーゲンおよび/またはリウマトイド因子が、好ましくは、リウマチ様関節炎を少なくとも一部治療および/または予防する際に使用のIgIV分子を選択するために用いられる。ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造のエピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるIgIV分子を選択するための様々な代替法が当業界で利用可能であり、それは本発明による方法で使用に適している。

20

30

【0035】

本発明の1つの好ましい態様において、対象のいずれか所定のミスフォールドタンパク質および/または対象のいずれか所定のクロス 構造エピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質の対象のいずれか所定のエピトープと相互作用しうるIgIV分子は、いずれかの種類のミスフォールドタンパク質、クロス 構造エピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープを用いて選択される。本発明によると、ミスフォールドタンパク質および/またはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質またはアミロイドを含んでなる1種または数種のアフィニティマトリックスの使用で、ミスフォールドタンパク質および/またはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質と優先的、選択的にかつ高親和性で結合しうる、選択に用いられる一連のアフィニティ領域に必ずしも含まれていなかったアフィニティ領域が、アフィニティ領域のいずれかの組成物から選択される。選択ミスフォールドタンパク質が固定された固体支持体の使用で、事実上いかなるミスフォールドタンパク質とも親和性を有するアフィニティ領域が単離されることを、実施例が証明している。

40

【0036】

加えて、本発明によると、フィブリル外形のミスフォールドタンパク質およびフィブリ

50

ル特徴を欠くミスフォールドタンパク質凝集物の双方で、ミスフォールドタンパク質および/またはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質に広域特異性を示すアフィニティ領域が選択される。例えば、A フィブリル アフィニティマトリックスで、例えばミスフォールド B S A A G E の非フィブリルマルチマー、A および d O V A の凝集物に親和性を示すアフィニティ領域が選択される。他方、非フィブリル H b A G E マトリックスまたは非フィブリルミスフォールド I g I V マトリックスの使用で、A フィブリルと効率的に結合するアフィニティ領域が選択される。

【0037】

実施例では、ウシ血清アルブミン A G E マトリックスの使用で、ヒトA、ヒトアルブミンおよびニワトリオボアルブミンと親和性をもつアフィニティ領域が選択された。ヒトA マトリックスの使用で、グリケート化ウシ血清アルブミンおよびニワトリオボアルブミンと結合しうるアフィニティ領域が選択された。グリケート化ヒトHb マトリックスで、ミスフォールドマウス I g Gと結合しうるアフィニティ領域が選択された。このように、本発明によると、1種に由来するミスフォールドタンパク質で、他種に由来するミスフォールドタンパク質と親和性を有するアフィニティ領域が選択されうる。

10

【0038】

更に、本発明によると、ヒト I g I V アフィニティ領域のコレクションから、広範囲のタンパク質に結合性を示す、I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 イソタイプを産生する少なくとも4種の異なるB細胞クローンに由来するアフィニティ領域が選択されるが、ここで該タンパク質は様々な種に由来し、実質的アミノ酸配列相同性も、類似のアミノ酸配列長さも、それらの天然フォールドで重複または類似3D構造も有する必要がないが、それらはミスフォールドタンパク質と共通した構造的特徴を有している。ミスフォールドタンパク質および/またはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質に特異性をもつ選択されたアフィニティ領域は、様々な適用例に有用である。以下では、タンパク質ミスフォールディング疾患に対する療法に用いられる富化アフィニティ領域が更に詳細に記載されている。

20

【0039】

本発明による方法は、タンパク質ミスフォールディングに関連する疾患の療法および/または診断で適用しうるアフィニティ領域について、中でも選択を可能にする。本発明による方法の概略的な好ましい態様が図26で示されている。選択のいかなるミスフォールドタンパク質(ミスフォールドーム(Misfoldome))を表わす図26のミックスXおよびY)もアフィニティ領域を選択するための使用に適するが、好ましくは疾患に関連したミスフォールドタンパク質(図26のミックスA)が用いられる。ミスフォールドタンパク質は一般的に共通の特性を有しているため、2種以上の特定ミスフォールドタンパク質と結合するアフィニティ領域が選択される。しかしながら、この出願で開示されているように、ミスフォールドタンパク質のサブセットまたは単一タイプと優先的に結合するアフィニティ領域を選択することも可能である。一連のカラムを組み合わせることにより、当業者であれば、一般的にミスフォールディングの療法および/または診断に適用しうる、または選択のミスフォールドタンパク質が関与する特定の疾患または一連の疾患へ優先的に適用しうる、対象のアフィニティ領域を選択することができる。図26で示されているように、カラムI(疾患と必ずしも関連しないミスフォールドタンパク質のミックス)の適用は、一般的なミスフォールドタンパク質、即ちミスフォールドームに親和性をもつアフィニティ領域(調製物1)をもたらす。このようなアフィニティ領域は診断と療法にも適する。しかしながら、疾患関連ミスフォールドタンパク質(望ましい治療効果)のみならず存在する他のミスフォールドタンパク質(療法の予測不能な副作用)とも結合するアフィニティ領域が患者に導入されるという事実のせいで、療法目的にこのようなアフィニティ領域の使用は副作用の潜在的リスクを伴う。カラムIおよびIII、更に好ましくはカラムIIおよびIVを組み合わせることにより、疾患または一連の疾患に特異的なミスフォールドタンパク質と優先的に相互作用するアフィニティ領域が選択される。カラムIVは、選択の標的疾患と関連しないミスフォールドタンパク質と相互作用するアフィニティ領域を除去す

30

40

50

るために用いられる。このように、調製物 3 および 4 は特定療法目的で優先的に選択される。

【0040】

このように、対象の疾患と関連したミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうるアフィニティ領域を選択するために、2本のカラムが好ましくは用いられる。1本のカラム（“一般的カラム”）は、該疾患と必ずしも関連しないミスフォールドタンパク質を含んでなる。他のカラム（“特異的カラム”）は、一般的カラムと比較して、該疾患と関連するミスフォールドタンパク質を多く含んでなる。好ましくは、該特異的カラムのミスフォールドタンパク質は、本質的に該疾患と関連するミスフォールドタンパク質からなる。

【0041】

一態様において、一般的カラムが最初に用いられる。このステップでは、いずれのミスフォールドタンパク質とも特異的に結合しうるアフィニティ領域が単離される。その後で、この態様によると、特異的カラムが用いられる。このステップでは、アフィニティ領域を含んでなる組成物が対象の疾患と関連するミスフォールドタンパク質に特異的なアフィニティ領域で富化される。

【0042】

他の態様では、上記のカラムが逆の順序で用いられる。最初に、対象の疾患と関連するミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうるアフィニティ領域を単離するために、特異的カラムが用いられる。實際上、得られる組成物は対象の疾患と関連しないミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうるアフィニティ領域も含んでなる。したがって、一般的カラムが好ましくはその後で用いられる。この第二カラムの重要な特性は、それが対象の疾患と関連するミスフォールドタンパク質を含まないかまたは少ない程度で含むにすぎないことである。該第二カラムは対象の疾患と関連しないミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうるアフィニティ領域を結合させるが、それは対象の疾患と関連するミスフォールドタンパク質に特異的なアフィニティ領域を結合させないかまたは少ない程度で結合させるにすぎない。こうして、フロースルーフラクションが対象の疾患と関連するミスフォールドタンパク質に特異的なアフィニティ領域で富化される。

【0043】

一態様において、選択された Ig I V 分子は、上記疾患に罹患したヒトまたは動物の体サンプルで、対象の所定タンパク質および/またはペプチドとのそれらの反応性について試験される。体サンプルからの対象の特異的タンパク質と結合しうる、本発明による選択 Ig I V コレクションの能力は、例えば血小板凝集試験、オプソニン食作用試験および/または補体活性化または阻害試験で測定される。

【0044】

別な一態様は、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造であるエピトープまたはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープが、選択の効率を高めるために、例えばラテックス、アガロース、セファロース、ガラス、プラスチック、金属またはいずれか他の適切な材料、化合物、物質または分子の球体、粒子、ビーズ、シートまたはストランドのような支持体、例えば磁気ビーズに付着される、本発明による選択法を提供する。したがって、該ミスフォールドタンパク質および/または該エピトープが固体支持体に結合される、ここで記載されているような方法を本発明は提供する。

【0045】

本発明は更に、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造のエピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと特異的に相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる Ig I V 分子で富化された、Ig I V 分子のコレクションを提供する。上記のように、Ig I V 分子の該コレクションは現在使用の Ig I V と比較して少なくとも1つの改善された性質を有している。本発明による Ig I V 分子のコレクションは、好ましくは、本発明による選択法で現在使用の Ig I V から選択される。本発明の方法で、熟練者であれば、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造のエピトープおよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと特異的

10

20

30

40

50

に結合しうるアフィニティ領域を含んでなる I g I V 分子で富化された I g I V 分子の小コレクションを、I g I V の大コレクションから選択することができる。したがって、一態様は、本発明による方法で選択された、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造のエピトープおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる I g I V 分子で富化された、I g I V 分子のコレクションを提供する。本発明による I g I V 分子の富化コレクションは、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造のエピトープおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうる上記富化コレクション中におけるアフィニティ領域の相対的増加のおかげで、現在使用の I g I V 製剤より少量でこのような薬剤の必要な患者への投与に適している。

10

【0046】

本発明は更に、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造のエピトープおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる、少なくとも5種の単離、合成および/または組換え分子を含んでなる組成物を提供する。好ましくは、該組成物は少なくとも8種、更に好ましくは少なくとも10種の上記単離、合成および/または組換え分子を含んでなる。1つの好ましい態様では、合成および/または組換え分子が用いられる。合成および/または組換え分子の組成物の利点は、I g I V の必要性が除かれるという事実である。とりわけ、I g I V の供給および入手が十分でなく、ヒト血液から得られる生物学的製剤の投与に伴いあるリスク（例えば、プリオン疾患および肝炎ウイルスまたはHIVのような病原体に感染のリスク）があることから、これは有利である。本発明は本発明による I g I V の富化セレクションを提供していたことから、必ずしも量ではなく、種類の点で I g I V 分子の該富化セレクションと同様の少なくとも1つの性質を有する合成および/または組換え分子を作製することが可能になった。I g I V のある免疫グロブリンの富化セレクションが作製されたら、熟練者であれば該免疫グロブリンのまたは該免疫グロブリンの少なくともアフィニティ領域のアミノ酸配列を当業界で公知の方法（例えば、限定されないが、Maldi-Toff法）により決定することができる。該アミノ酸配列は次いで好ましくは、本発明による選択 I g I V 分子の少なくとも1種のアフィニティ領域と、必ずしも量ではなく種類の点で同様の結合特性を有する合成または部分的合成分子を選択または作製するために用いられる。合成または部分的合成分子の非制限例は、ペプチド、タンパク質または他の分子の組換えまたは化学合成により得られる生成物である。ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質または該タンパク質のエピトープでファージディスプレイライブラリーを選別して、該ミスフォールドタンパク質、クロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と反応するアフィニティ領域を有する結合分子を選択することでさえ可能である。したがって、一態様は、ミスフォールドタンパク質、クロス構造のエピトープおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうる少なくとも1種の I g I V 分子のアフィニティ領域のアミノ酸配列を決定し、該アミノ酸配列を含んでなる合成および/または組換え分子を作製することを含んでなる、本発明による組成物を作製するための方法を提供する。他の態様において、本発明はミスフォールドタンパク質、クロス構造のエピトープおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる合成または組換え分子も提供し、該分子は前記のような方法に従い作製される。

20

30

40

【0047】

このように、I g I V から単離されたものと相似したアフィニティ領域は、例えば、タンパク質配列解析、DNAクローニングおよび発現技術を含めた、当業者に公知の標準技術を適用することにより、組換えまたは合成で作製される。本発明の一態様は下記ステップを含んでなる：(1) 少なくとも重および軽鎖双方の可変領域からの、または少なくとも相補性決定領域1~3(CDR)からの、または少なくとも単離アフィニティ領域の重鎖(HC)のCDR3からのアミノ酸配列が、タンパク質配列解析により得られる。(

50

2) 特定されたアミノ酸配列をコードする核酸配列、好ましくはDNA配列が合成で作製される。タンパク質解析で決定された正確な配列の代替物として、改変された親和性、好ましくは増加したおよび/またはより特異的な親和性をもつアフィニティ領域を作製するために、1以上の突然変異が、好ましくはCDR3、更に一層好ましくは重鎖(HC)のCDR3に導入された配列が作製される。(3)核酸が適切な発現ベクターへクローニングされる。このようなベクターは、好ましくは、例えばIgG1、IgG2a、IgG2b、IgM、IgA、IgEなどを得るために、望ましいタイプの免疫グロブリンの定常領域をコードする配列を既に含有している。(4)該ベクターが選択の発現系、好ましくは哺乳動物細胞へ何らかの手法で導入される。(5)アフィニティ領域を発現する細胞が選択される。(6)組換え産生アフィニティ領域が該細胞または細胞由来培養上澄から精製される。突然変異が親和性を最適化するように原アフィニティ領域配列へ導入されていれば、新たに作製されたアフィニティ領域が、好ましくは本発明による方法を用いて、場合により再選択される。好ましくは相補性決定領域、好ましくはCDR3、更に一層好ましくはHCのCDR3における、アフィニティ領域のレパートリーが更に増加した、半合成アフィニティ領域のこのような作製は、好ましくは半合成ライブラリー、例えばファージディスプレイライブラリーの作製により行われる(下記参照)。

10

20

30

40

50

【0048】

血液から得られるIVIgのようなヒト免疫グロブリンのコレクションのほかに、コンビナトリアルライブラリーもいずれか他の一連のアフィニティ領域、好ましくは一連の組換えアフィニティ領域、例えばファージディスプレイライブラリーに存在するものから得られる(Winter et al. 1994; Hoogenboom, 1992, 1997, 2000, 2002, 2005)。好ましくは、このようなライブラリーは哺乳動物アフィニティ領域、好ましくはヒトアフィニティ領域、例えば免疫グロブリンに関連した配列から構成されている。1つの好ましい態様において、アフィニティ領域のコレクションを含んでなるこのようなファージディスプレイライブラリーは次のように作製される(Winter et al. 1994, de Kruif et al. 1995a, 1995b) : 最初に、B細胞からまたはB細胞を含んでなる組織からRNAが抽出される。その後で、cDNAが作製される。次いで、可変領域をコードするcDNAが増幅され、適切なファージミドベクターへクローニングされ、例えばEscherichia coli株のような適切な宿主へトランスフォームされる。こうしてアフィニティ領域が発現され、即ち繊維状バクテリオファージの表面で融合タンパク質としてファージにより呈示される。ファージディスプレイライブラリーは、例えば、健康な哺乳動物、好ましくはヒト、マウス、ラットまたはラマから、または代わりにミスフォールドタンパク質で免疫された哺乳動物から得られるB細胞から作製される。一態様において、ファージディスプレイライブラリーは、特定の疾患、好ましくはミスフォールディング疾患、例えばRAに罹患した哺乳動物、好ましくはヒトのB細胞から作製される。こうして、アフィニティ領域のコレクションが、ミスフォールドタンパク質に特異的なアフィニティ領域を含むように、特別な目的で作製される。例えば、一態様では、マウスが(実施例20の場合のように)ミスフォールドタンパク質の1種またはセレクションで1回または数回免疫され、B細胞が脾臓から単離され、ファージディスプレイライブラリーを作製するために用いられる。他の態様では、B細胞が特定の疾患、例えば(リウマチ様)関節炎のヒトから単離される。これらのB細胞から作製されたcDNAが次いで、好ましくはファージディスプレイライブラリーを作製するために用いられる。こうして、ファージディスプレイライブラリーが選択ミスフォールディング疾患に関するミスフォールドタンパク質に特異的なアフィニティ領域を含むように作製される。例えば、IgのFcドメインにアフィニティ領域、即ちリウマトイド因子(RF)のようなアフィニティ領域をもつライブラリーが作製される(van Esch et al. 2003, Clin Exp. Immunol)。上記手法で、当業者であれば、特定の疾患または適用例に力点を置いたアフィニティ領域のコレクションをもつファージディスプレイライブラリーをデザインおよび作製することができる。

【0049】

一態様において、レパートリーが増加したアフィニティ領域のこのようなコレクション

をもつファージディスプレイライブラリーが合成で作製される (Hoogenboom, 1992, 1997, 2000, 2002, 2005 ; de Kruif et al, 1995a, 1995b)。このように、当業者であれば、顕著な追加多様性のアフィニティ領域を含んでなるライブラリーをデザインすることができる。好ましくは、抗原と相互作用するCDR、超可変領域に追加配列を入れることにより、可変ドメインを作り直して追加のアフィニティ領域が作られる。ヒト配列から得られるアフィニティ領域のほかに、ラマ、ラクダ、アルパカまたはカメリド (camelid) のようないずれか他の種から作製されたアフィニティ領域のコレクションも、これらの種に関連した性質をもつ、ナノボディとも称される、ラマ抗体のようなアフィニティ領域を得るために、一態様として存在する。こうして、ファージディスプレイライブラリーおよび/またはアフィニティ領域のコレクションが多くの手法で、例えば1種または一連のミスフォールドタンパク質で免疫された哺乳動物から作製される。特に好ましい態様において、ファージディスプレイライブラリーおよび/またはアフィニティ領域のコレクションが、疾患、好ましくはミスフォールディング疾患の哺乳動物から作製される。ミスフォールドタンパク質に特異的なアフィニティ領域は、好ましくはファージを単離するための標準操作と組み合わせ、好ましくは本発明による手段および方法を用いてファージディスプレイライブラリーから選択される。最も率直には、好ましい態様において、好ましくはこの出願で開示された操作のいずれか1つに従い、ミスフォールドタンパク質が作製および固定され、その後でファージと結合させられる。徹底洗浄後、結合ファージが回収され、宿主の再感染により増幅される。特異的ファージのみの回収を行うために、選択操作が好ましくは数回繰り返される。最後に、ミスフォールド標的と特異的に結合しうるファージが単離される。特に好ましい態様において、ミスフォールドタンパク質は疾患の個体または個体の組合せから得られた組織サンプルから単離される。例えば、ミスフォールドタンパク質は、クロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうるタンパク質、例えば(リウマチ様)関節炎の患者の滑液からのtPA、RAGEまたはその機能相当物(表4参照)を用いて単離される。同様に、いずれか他のサンプルも用いられる。

10

20

30

40

50

【0050】

上記のようなアプローチを用いて、ミスフォールドタンパク質に関して組換え産生されたアフィニティ領域が得られる。

【0051】

適切なファージの選択後、単離アフィニティ領域の可変領域をコードするDNAが、好ましくは完全抗体を作製するためにファージミドDNAから単離される。これは標準操作に従い容易に行われる。該DNAが、好ましくは重および軽鎖の定常領域をコードするベクターへクローニングされる。いかなるベクターおよびいかなる望ましいタイプの定常領域も用いられる。ベクターは、選択の発現系、好ましくは哺乳動物細胞へ、好ましくはいずれか公知の手法で導入される。アフィニティ領域を発現する細胞が好ましくは選択される。組換え産生されたアフィニティ領域は、好ましくは細胞または細胞由来培養上澄から精製される。こうして、ミスフォールドタンパク質に関するいかなる免疫グロブリンアフィニティ領域も作製される (Bloemendal et al 2004 ; Huls et al 1999a, 1999b ; Boel et al 2000)。

【0052】

ヒトで使用の場合は、“キメラ”または“ヒト化”組換えアフィニティ領域が好ましくは作製される。好ましくは、非ヒト配列が可能であればどこでもヒト配列と置き換えられて、アフィニティ領域の結合性が好ましくは過度に影響されないように、他の種から得られたアフィニティ領域が修飾される。一態様において、好ましくはマウスまたはラットを用いて、更に一層好ましくはヒト免疫グロブリンをコードするトランスジェニックマウスを用いて、アフィニティ領域が古典的免疫化戦略に際して作製される。免疫後、モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞系が、好ましくは標準操作によりおよび/または上記のファージディスプレイ技術を適用することにより作製される。ミスフォールドタンパク質と特異的に相互作用しうるモノクローナル抗体が好ましくは選択される。このようなアフィニティ領域の“キメラ”または“ヒト化”バージョンは、正常マウスまたはラ

ットを用いて作製されるとき、例えば非ヒト定常領域および関連非ヒト可変領域を関連ヒト相同性領域で置き換えることにより作製される (Morrison et al 1984 ; Jones et al. 1986)。更に、所望であれば異なる定常領域が導入される。

【0053】

1つの好ましい態様において、本発明による組成物は、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造のエピトープおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用しうるアフィニティ領域を含んでなる少なくとも1種のIgIV分子の機能性部分、誘導体および/またはアナログを含んでなる。IgIV分子の機能性部分は、必ずしも量ではなく種類の点で同様の免疫学的結合性を有する化合物として定義される。該機能性部分はミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と結合しうるが、必ずしも該IgIV分子と同程度ではない。IgIV分子の機能性誘導体は、得られる化合物のミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と結合する能力が必ずしも量ではなく種類の点で本質的に同様であるように改変されたIgIV分子として定義される。誘導体は多くの手法で、例えば保存的アミノ酸置換で得られ、それにより全体的機能がさほど影響されないかまたは変更されないように、通常類似した性質(サイズ、疎水性など)の他の残基でアミノ酸残基が置換される。

10

【0054】

当業者であれば、IgIV分子の相似化合物をうまく作製することができる。これは例えばペプチドライブラリーのスクリーニングにより行える。このようなアナログはミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と結合しうるが、必ずしも該IgIV分子と同程度ではない。

20

【0055】

ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造のエピトープおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のエピトープと特異的に結合しうるアフィニティ領域を含んでなる選択IgIV分子および/または単離、合成または組換え分子は、インビトロでミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と反応および結合させるために用いられる本発明の一態様として存在する。該分子は、好ましくはミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質を含んでなる体液または組織、食物、流体または医薬組成物のサンプルと反応して、結合物質が好ましくは除去される。本発明による分子の他の適用例は、インビボでミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と反応および結合させることである。

30

【0056】

1つの好ましい態様は、上記分子の少なくとも1種がミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造結合化合物を更に含んでなる、本発明による組成物を提供する。ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造結合化合物とは、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造と特異的に結合しうる化合物である。ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造結合分子は、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造またはクロス構造を含んでなるタンパク質と特異的に結合しうる本発明による組成物の分子の能力を高めることにより、エフェクター分子として働くことができる。該クロス構造結合分子に起因したミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造の結合性増強は、例えば、循環および/または体からミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造複合体の形成および除去を高めるために望まれる。一方または加えて、アミロイドプラークに存在するようなミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造の局所蓄積が減らされる。

40

【0057】

ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造結合分子の非制限例は、組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)、肝細胞成長因子アクチベーター(HGFA

50

)、因子XII、フィブロネクチンまたはマルチリガンドレセプターファミリーのメンバー、例えば前進性グリケーション終末産物のレセプター (R A G E)、低密度リポタンパク質レセプター関連タンパク質 (L R P) または C D 3 6 のフィンガードメイン (フィブロネクチン I 型ドメインとも称される) である。このようなミスフォールドタンパク質および / またはクロス 構造結合分子は、例えば色素 (コンゴレッドまたはチオフラビン) のような非タンパク質分子であってもよい。

【 0 0 5 8 】

一態様において、エフェクター分子が本発明の単離、合成および / または組換え分子および / または本発明の選択 I g I V 免疫グロブリンに供される。分子の少なくとも 1 種がエフェクター分子を更に含んでなる、本発明による I g I V 分子の組成物およびコレクシ
 ョンも、したがって提供される。1つの好ましい態様において、該エフェクター分子は例
 えばコンゴレッドのようなミスフォールディングのインヒビターを含んでなる。他の好
 ましい態様において、該エフェクター化合物は、望ましくないクロス 構造 (を含んでな
 るタンパク質) の除去を高めるために、動物 (好ましくはヒト) の補体系および / または
 食細胞系を増強しうる。このように、1つの好ましい態様において、該エフェクター化
 合物は、限定されないが、例えばいずれかの補体タンパク質、補体活性化サイトカイン、C
 反応性タンパク質、血清アミロイド P 成分、ペントラキシン-3、免疫グロブリンの F c
 領域 (C 1 q のリガンド)、補体制御タンパク質、補体制御タンパク質の補体活性化活
 性を高められる分子、および / または補体制御タンパク質の阻害活性を阻害しうる分子のよ
 うな補体活性化因子を含んでなる。補体制御タンパク質の非制限例は、C 1 インヒビタ
 ー、C 4 結合タンパク質、因子 H、因子 I、プロペルジン、S タンパク質、補体レセプ
 ター I 型、膜補因子タンパク質、崩壊促進因子、C 8 結合タンパク質および C D 5 9 である
 。別な好ましい態様において、該エフェクター化合物はミスフォールドタンパク質および
 / またはクロス 構造および / またはクロス 構造を含んでなるタンパク質の分解を促進
 しうる。該エフェクター化合物の他の好ましい性質は、ミスフォールドタンパク質および
 / またはクロス 構造および / またはクロス 構造を含んでなるタンパク質の細胞取込み
 を促進させる能力である。一態様は、該単離、合成および / または組換え分子、または該
 選択 I g I V 分子が、プロテアーゼまたはそのミスフォールドタンパク質および / または
 クロス 構造結合部分であるエフェクター化合物を含んでなる、本発明による組成物を提
 供する。該エフェクターは、ミスフォールドタンパク質および / またはクロス 構造およ
 び / またはクロス 構造を含んでなる望ましくないタンパク質を結合および / または分解
 させるために特に適している。別な好ましい態様において、該エフェクター化合物は、ミ
 スフォールドタンパク質および / またはクロス 構造および / またはクロス 構造を含ん
 でなるタンパク質に対する免疫応答を高めるために、免疫増強化合物を含んでなる。該免
 疫増強化合物は好ましくはサイトカインを含んでなる。

【 0 0 5 9 】

別な態様において、該エフェクター化合物はミスフォールドタンパク質および / または
 クロス 構造結合増強因子を含んでなる。これは、ミスフォールドタンパク質および / ま
 たはクロス 構造および / またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と結合する、本発
 明による分子の能力を高められる因子である。このような因子の非制限例はチオフラビン
 T およびチオフラビン S である (例えば、実施例 4 参照) 。

【 0 0 6 0 】

別な態様において、該エフェクター化合物は、本発明の分子および / または I g I V 分
 子がミスフォールドタンパク質および / またはクロス 構造および / またはクロス 構造
 を含んでなるタンパク質と結合した後で、得られる複合体の除去を助けるクリアランスシ
 グナルを含んでなる。クリアランスシグナルは当業界で周知である。クリアランスシグナ
 ルの好ましい例は、F c 領域、更に好ましくは F c レセプター (好ましくは、F c 11 b
 レセプター) と相互作用しうる F c 領域の少なくとも一部である。該クリアランスシグ
 ナルは、動物 (好ましくはヒト) の循環および / または体からミスフォールドタンパク質
 および / またはクロス 構造またはクロス 構造を含んでなるタンパク質に結合された本

10

20

30

40

50

発明による分子を含んでなる複合体の除去を高められる。

【 0 0 6 1 】

補体系の活性化は、炎症、細胞破壊および組織損傷を含めた反応のカスケードをもたらす。一部の環境では、有害副作用を鈍らせるために、補体系に対抗することが望まれる。このような環境の非制限例は、補体系の過剰および/または未制御活性化、または適正に機能する負のフィードバックメカニズムのない補体系の(持続的)活性化、または例えば炎症、アミロイドーシスおよび/またはリウマチ様関節炎のような、例えばアクチベーターの持続的および/または過剰発現レベルによる、補体系の過剰刺激が存在する状況である。一態様において、炎症抑制化合物、好ましくは補体阻害因子、例えば免疫グロブリン、または補体タンパク質の重要な機能性を少なくとも一部阻害または遮蔽しうるおよび/または補体系刺激能力を含んでなる何らかのタンパク質または化合物の重要な機能性を少なくとも一部阻害または遮蔽しうる化合物である、エフェクター化合物がしたがって用いられる。補体阻害因子の非制限例は、可溶性 T N F レセプター、I L - 1 レセプターアンタゴニストおよび抗炎症サイトカインである。

10

【 0 0 6 2 】

更に他の態様において、該エフェクター化合物はオプソニン化化合物を含んでなる。加えてまたは一方、本発明の該単離、合成および/または組換え分子はそれ自体がオプソニン化化合物である。オプソニン化は、マクロファージ、多形核細胞などのような食細胞による物質の食作用を誘導および/または増強するプロセスとして、ここでは定義される。一部の物質は、例えばそれら表面の性質のせいで、食作用を耐えられるおよび/または免れる。このような場合、食作用は、好ましくは、物質へ付着すると、マクロファージ、多形核細胞などのような食細胞による該物質の取込みを促進する、オプソニン化結合化合物により誘導および/または増強される。

20

【 0 0 6 3 】

一態様において、本発明による選択 I g I V 分子および/または単離、合成および/または組換え分子がオプソニン化能力を有しているかどうか、食細胞を用いて調べられる。この態様によると、本発明による I g I V 分子の富化セレクションが用意されたら、該セレクションがミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と好ましくはインキュベートされ、その後で、I g I V 分子が該ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質の食作用を誘導および/または増強しうるかどうかを調べるために、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質に結合された I g I V 分子の複合体が食細胞と接触させられる。もちろん、本発明による単離、合成および/または組換え分子と同種の試験を行うことも可能である。更には、したがって、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造のエピトープと相互作用する際におよび/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のエピトープと相互作用する際に、食細胞により該ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質のオプソニン化を誘導しうるアフィニティ領域を含んでなる分子を、本発明による I g I V 分子のコレクションまたは本発明による組成物から選択するための方法が提供され、該方法では：

30

40

本発明による I g I V 分子のコレクションおよび/または本発明による組成物を、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と接触させ；

I g I V 分子および/または単離、合成および/または組換え分子に結合されたミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質を含んでなる複合体を食細胞と接触させ；および

該ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質の食細胞による食作用を誘導または増強しうる I g I V 分子および/または単離、合成および/または組換え分子を集める。

【 0 0 6 4 】

50

該試験は好ましくはインビトロで行われる。食作用を誘導または増強しうる選択 I g I V 分子および/または単離、合成および/または組換え分子は、好ましくは、食作用を耐えられるおよび/または免れるミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質のオプソニン化を誘導および/または増強するために用いられる。食作用を耐えられるおよび/または免れるこのようなミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質は、例えば食作用を誘導または増強しうる分子が低(機能性)レベルで不在または存在する病状、例えばエイズ、S C I D S および無グロブリン血症と、例えばミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の形成が増す病状、例えば T S E、アミロイドーシス、糖尿病、血栓症および炎症で生じる。

10

【0065】

前記のように、ミスフォールドタンパク質および/またはタンパク質中のクロス構造は、例えばハンチントン病、アミロイドーシス型疾患、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、出血、血栓症、癌、敗血症および他の炎症疾患、リウマチ様関節炎、伝染性海綿状脳症、例えばクロイツフェルト・ヤコブ病、多発性硬化症、自己免疫疾患、記憶の喪失を伴う疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病および他の神経疾患(癲癇)、脳症および全身性アミロイドーシスのような疾患のリスクおよび/または存在と、多くが関連および/または関係している。ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と特異的に結合しうる、本発明による I g I V 分子の富化コレクションおよび本発明による単離、合成および/または組換え分子のコレクションは、このようなミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造関連および/または関係疾患を少なくとも一部予防および/または治療するために特に適している。一態様はしたがって、薬剤および/または予防剤としての使用向けに、本発明による I g I V 分子のコレクションおよび/または本発明による組成物を提供する。本発明は更に、薬剤および/または予防剤の製造のための、本発明による I g I V 分子のコレクションおよび/または組成物の使用を提供する。該薬剤および/または予防剤は、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造の出現と関連および/または関係する疾患、血液凝固障害、敗血症、炎症および/または微生物、病原体、細菌、寄生虫および/またはウイルスによる感染症を少なくとも一部予防、治療および/または安定化するために特に適している。更には、したがって、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造関連および/または関係疾患、血液凝固障害、敗血症、炎症および/または微生物/病原体/寄生虫/細菌/ウイルス感染症の少なくとも部分的な予防および/または治療のための薬剤の製造のための、本発明による I g I V 分子のコレクションおよび/または本発明による組成物の使用が提供される。本発明による I g I V 分子のコレクションおよび/または本発明による組成物を個体へ投与する、個体におけるミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造関連および/または関係疾患、血液凝固障害、敗血症、炎症および/または微生物/病原体/寄生虫/細菌/ウイルス感染症の少なくとも部分的な予防および/または治療のための方法も、合わせて提供される。

20

30

【0066】

1つの好ましい態様において、該微生物/病原体/寄生虫/細菌/ウイルス感染症は日和見感染症を含んでなる。これは、通常疾患を引き起こさないが、ある環境下(例えば免疫系障害)で病原性になる、例えば病原体および/またはウイルスのような生物による感染症である。免疫系障害は、例えば化学療法のような薬物治療で引き起こされる。特に好ましい態様において、該微生物/病原体/寄生虫/細菌/ウイルス感染症はH I V 関連日和見感染症を含んでなる。日和見感染症はH I V 患者で主要な死因であるため、このような感染症に対する薬剤および/または予防剤を提供することが高度に望まれる。多くの日和見感染症はミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造の存在を伴う。例えば、アミロイド構造が真菌、酵母および細菌のような微生物の表面で生じる。該アミロイド様構造は、真菌でヒドロフォピン、グラム陽性菌でチャプリン(chaplin)およびグ

40

50

ラム陰性菌でカーリ (curli)、タフィ (tafi) または凝集ふさと通常称されている。本発明による I g I V 分子の富化コレクションおよび本発明による単離、合成および / または組換え分子のコレクションはこのようなミスフォールドタンパク質および / またはクロス構造および / またはクロス構造を含んでなるタンパク質と結合させるために特に適しているため、本発明の該コレクションは H I V 関連日和見感染症に対抗および / またはそれを少なくとも一部予防するために特に適している。本発明はしたがって、本発明による I g I V 分子のコレクションおよび / または本発明による組成物を個体へ投与する、個体で H I V 関連日和見感染症の少なくとも部分的な予防および / または治療のための方法を提供する。

【 0 0 6 7 】

本発明による I g I V 分子のコレクションおよび / または本発明による組成物と適切なキャリア、希釈物および / または賦形剤を含んでなる組成物も、合わせて提供される。該組成物は好ましくは医薬組成物を含んでなる。治療の必要な患者へ本発明による薬剤を投与しうるために、該薬剤は製薬上許容される処方のための要件を満たさねばならない。これは、医薬グレードであって生理学上許容され異物に関して試験された、本発明による I g I V 分子の富化コレクションおよび / または本発明による単離、合成および / または組換え分子のコレクションを、本発明による薬剤が含んでなることを意味する。本発明による I g I V 分子の富化コレクションおよび / または本発明による単離、合成および / または組換え分子のコレクションと製薬上許容されるキャリア、希釈物および / または賦形剤を含んでなる医薬組成物も、合わせて提供される。好ましくは、該組成物は、該医薬組成物とミスフォールドタンパク質および / またはクロス構造および / またはクロス構造を含んでなるタンパク質との相互作用を高めるために、ミスフォールドタンパク質および / またはクロス構造結合化合物を含んでなる。したがって、本発明はミスフォールドタンパク質および / またはクロス構造結合化合物を更に含んでなる本発明による組成物を提供する。本発明の別な好ましい態様において、ミスフォールドタンパク質および / またはクロス構造および / またはクロス構造を含んでなるタンパク質への本発明による組成物の結合は、そのミスフォールドタンパク質および / またはクロス構造結合増強特性について知られた化合物、例えばチオフラビン T またはチオフラビン S のような色素分子の添加により、更に向上または増強される。したがって、本発明はミスフォールドタンパク質および / またはクロス構造結合増強化合物を更に含んでなる本発明による組成物について開示している。

【 0 0 6 8 】

他の好ましい態様において、体からミスフォールドタンパク質および / またはクロス構造および / またはクロス構造を含んでなるタンパク質の除去は、補体活性化を高められる補体増強シグナルを本発明による組成物へ加えることにより高められる。したがって、本発明は、更に補体増強化合物を含んでなる、本発明による組成物を提供する。

【 0 0 6 9 】

補体系の活性化は炎症、細胞破壊および組織損傷を含めた反応のカスケードをもたらすため、補体活性化に少なくとも一部対抗することが時には望まれる。一部の場合に、ミスフォールドタンパク質および / またはクロス構造のクリアランスに関する補体系の活性化は、それ自体が病気を引き起こす。このような場合に、本発明による組成物は補体阻害化合物を好ましくは更に含んでなる。一態様において、本発明による組成物は炎症抑制化合物を含んでなる。

【 0 0 7 0 】

本発明は更に、個体で細胞外タンパク質分解および / またはタンパク質クリアランスを増すための手段および方法を提供する。自然状況において、ミスフォールドタンパク質および / またはクロス構造の形成は、例えばミスフォールドタンパク質、アポトーシス細胞または更には病原体のような望ましくない分子の除去を取り扱う、事象の生理学的カスケードを開始させるおよび / またはに關与する。この経路は、小胞体での合成に際するタンパク質ミスフォールディング、フィブリン溶解、神経シナプスネットワークの形成、使

10

20

30

40

50

用済み、望ましくないおよび/または破壊された(変性された)タンパク質のクリアランス、アポトーシスの誘導およびアポトーシス細胞、壊死細胞、老化細胞および/または病原体のクリアランスを含めたいくつかのプロセスに際して、望ましくない生体分子の除去を調節する。本発明によるIgIV分子のコレクションおよび本発明による組成物はミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造およびクロス構造を含んでなるタンパク質と結合させるために特に適しているため、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスが増加される。更には、したがって、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物を個体へ投与する、個体で細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させるための方法が提供される。

【0071】

ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造およびクロス構造を含んでなるタンパク質を結合および除去することにより、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物は、個体でミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造媒介効果に少なくとも一部対抗しうる。更には、したがって、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物の有効量を個体へ投与する、個体でミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造媒介効果を少なくとも一部阻害するための方法が提供される。

【0072】

好ましい態様において、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物は、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質により誘導される血小板凝集を阻害するために用いられる。このような使用の例が実施例2で示されている。したがって、本発明はタンパク質誘導血小板凝集を阻害するための本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物の使用を提供する。

【0073】

他の好ましい態様において、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物は、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質へのセリンプロテアーゼ組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)の結合と競合させるために用いられる。tPAはプラスミノゲンの開裂でプラスミンの形成を誘導する。プラスミンはフィブリンを開裂し、これは血餅の溶解時に生じる。マウスではフィブリン溶解に必須でないが、tPAはフィブリン溶解でのその役割についてずっと認識されてきた。tPAによるプラスミノゲンの活性化はフィブリンまたはフィブリンフラグメントにより刺激されるが、その前駆体、フィブリノーゲンによるものではない。tPAはミスフォールドタンパク質およびクロス構造結合タンパク質、マルチリガンドレセプターおよびクロス構造経路のメンバーである。tPAはミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造誘導細胞機能障害および/または細胞毒性を媒介する。tPAはプラスミノゲンの活性化で細胞機能障害および/または毒性を少なくとも一部媒介する。プラスミノゲン依存効果は、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物で阻害される。病状に際する過剰または未制御tPA/プラスミノゲン活性化がこうして治療される。このような病状の非制限例はアルツハイマー病、感染症、子癩前症、狭心症、炎症および非炎症関節疾患、糖尿病である。

【0074】

1つの好ましい態様は、サンプルからミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の少なくとも部分的な除去のための、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または組成物の使用を提供する。ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の除去は、様々な適用例で望まれている。例えば、個体がミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造の存在と関連および/または関係する障害に罹患している、または罹患するリスクがあるならば、体からこのようなミスフォル

10

20

30

40

50

ドタンパク質および/またはクロス 構造の除去は、このような障害に対抗するおよび/または有害副作用を軽減するために有益である。更に、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造の取込みを少なくとも一部避けるためには、(ヒト)消費向けの製品からミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質を除去することが有利である。一態様はしたがってサンプルからミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質を少なくとも一部除去するための方法を提供し、該方法ではサンプルを本発明による I g I V 分子のコレクションおよび/または本発明による組成物と接触させ、I g I V 分子および/または単離、合成および/または組換え分子に結合されたミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質の複合体を該サンプルから除去する。該サンプルは好ましくは流体サンプルを含んでなる。一態様において、該流体は食品物質を含んでなる。

10

【0075】

1つの好ましい態様において、該サンプルは体液を含んでなる。この態様は、動物、好ましくはヒト個体のミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造関連および/または関係障害を少なくとも一部予防および/または治療するために特に適している。1つの好ましい態様では、体外透析が適用される。例えば、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造関連および/または関係障害に罹患した患者が血液の透析に付される。本発明による I g I V 分子のコレクションおよび/または組成物は、例えば、透析に用いられるキャリアまたは支持体および/またはチューブの内側にカップリングされる。こうして、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造およびクロス 構造を含んでなるタンパク質が患者の血流から除去され、それにより該ミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質と関連および/または関係するネガティブ効果の患者を少なくとも一部救済する。他の例として、このような使用は腎臓患者の血液透析で適用される。本発明による方法を実施するための分離装置も提供される。一態様はこうして本発明による方法を実施するための分離装置を提供し、該装置は(循環)流体を輸送するためのシステムを含んでなり、該システムはフロー流体、好ましくは個体の循環へ接続するための手段、該システムへの流体のエントリーと該システムから好ましくは個体の循環への流体のリターンのための手段を備え、該システムは更に固相を含んでなり、該固相は本発明による I g I V 分子のコレクションおよび/または本発明による組成物を含んでなる。該分離装置は好ましくは透析装置を含んでなる。

20

30

【0076】

他の好ましい態様は、製薬またはその成分のいずれかからミスフォールドタンパク質および/またはクロス 構造および/またはクロス 構造を含んでなるタンパク質の少なくとも部分的な除去のための、本発明による I g I V 分子のコレクションおよび組成物の使用を提供する。活性物質としてタンパク質またはタンパク質化合物を含んでなる現今医薬組成物の重要なカテゴリーとして、ホルモン、酵素、ワクチンおよび抗原、サイトカインおよび抗体があるが、それらに限定されない。上記タンパク質医薬組成物に加えて、多数の医薬組成物がタンパク質を含んでなる生産および/または精製ステップの助けで製造されている。例えば、多くの医薬組成物は安定剤として1種以上のタンパク質を含んでなる。医薬組成物の使用と関連した健康問題は、例えば血液学、フィブリン溶解および免疫学の分野に関する。医薬組成物の投与後に観察される副作用の不完全リストは、例えば、致死性のこともある、発熱、アナフィラキシー応答、(自己)免疫応答、止血の障害、炎症、フィブリン溶解問題、例えば敗血症および汎発性血管内凝固(DIC)を含んでなる。該副作用は、例えば、該医薬組成物に存在するタンパク質またはタンパク質化合物の変化により、あるいは該医薬組成物の追加希釈物またはキャリア物質により引き起こされる。医薬組成物のタンパク質化合物の変化は、例えば変性、マルチマー化、タンパク質分解、アセチル化、グリケーション、酸化、タンパク質のアンフォールディングまたはミスフォールディングを含んでなる。最初適正にフォールドされた天然タンパク質のアンフォール

40

50

ディングまたはミスフォールディングは、該タンパク質で毒性構造の形成に至る。医薬組成物の毒性構造は、多くがミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなる。該毒性構造は、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または組成物で少なくとも一部除去される。

【0077】

したがって、タンパク質を含んでなる医薬組成物またはその成分のいずれかからミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質を除去するための方法が提供され、該方法では：

タンパク質を含んでなる該医薬組成物またはその成分のいずれかを本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物と接触させ；

該IgIV分子のコレクションおよび/または組成物への該ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の結合を行わせ；および

タンパク質を含んでなる医薬組成物またはその成分のいずれかから、結合ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなる結合タンパク質を分離する。

【0078】

医薬組成物からミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質を除去することにより、望ましくない副作用が少なくとも一部減少および/または防止される。したがって、医薬組成物の望ましくない副作用を減少させるおよび/または防止するおよび/またはタンパク質グラム当たりの比活性を増加させるための方法も提供され、該方法では、本発明による方法を用いて、該医薬組成物またはその成分のいずれかから、アンフォールドタンパク質、アンフォールドペプチド、ミスフォールドタンパク質、変性タンパク質、凝集タンパク質、凝集ペプチド、マルチマー化タンパク質および/またはマルチマー化ペプチド、および/またはクロス構造を含んでなるペプチドを除去する。

【0079】

本発明による方法で得られる、タンパク質を含んでなる医薬組成物またはその成分のいずれかも、合わせて提供される。該医薬組成物は、未処理医薬組成物と比較して、望ましくない副作用のリスクが低下している。

【0080】

一態様において、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質は、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または単離、合成および/または組換え分子の組成物を用いてサンプルから除去され、ここで該コレクションおよび/または組成物は固体支持体に結合されている。これは連続プロセスが可能となる利点を呈し、ここでは該固体支持体がサンプルとインキュベートされる。その後で、該サンプルおよび該固体支持体は互いに容易に分離され、該固体支持体は(間接的に)結合されたミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質を含んでなり、一方得られたサンプルはミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の低下濃度を有している。

【0081】

更に他の態様では、本発明による選択IgIV免疫グロブリンおよび/または単離、合成および/または組換え分子が診断キットを作製するために用いられる。該診断キットは、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造の存在と関連および/または関係する疾患の診断に特に適している。該キットは、好ましくは、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と相互作用しうる、本発明によるIgIV分子のコレクションの少なくとも1種のアフィニティ領域、および/または本発明による組成物の少なくとも1種のアフィニティ領域と、該ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/または該タンパク質と該

アフィニティ領域との相互作用の視覚化の手段を含んでなる。

【0082】

このような診断キットでは、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造の存在と通常関連および/または関係する疾患のみならず、より詳しい診断も、キットにおけるアフィニティ領域の特異性に依りて可能である。障害の1種を特異的に診断しうる診断キットは、例えば、該障害の1種に特異的な所定のミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなる所定のタンパク質、例えばリウマチ様関節炎、SLEまたは他の自己免疫疾患、または炎症反応に関連するタンパク質と特異的に結合しうるアフィニティ領域を該キットに備えることにより作製される。したがって、一態様において、本発明は、該ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造が疾患関連ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造である、上記のような診断キットを提供する。

10

【0083】

ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造およびクロス構造を含んでなるタンパク質は本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物と効果的に結合されるため、それらはサンプルおよび/または動物またはヒトの体から効果的に分離および/または単離され、その後で同定される。更に他の態様では、したがって、本発明による選択IgIV免疫グロブリンおよび/または単離、合成および/または組換え分子がミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質を単離するために用いられる。好ましくは、例えば血液、血清、血漿、脳脊髄液、滑液、痰および/または尿のような体液に存在するミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質が同定される。例えば、健康な個体のミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の存在および/または同一性が、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と関連および/または関係する疾患のある個体からのミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の存在および/または同一性と比較される。ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の同一性および相対濃度が、限定されないが、例えば2Dゲル電気泳動および/または質量スペクトル分析のような、当業者に知られたいずれかの方法を用いて調べられる。健康な個体からのサンプルと患者からのサンプルとの結果が、好ましくは比較される。こうして、例えば特定の病状時にミスフォールドするおよび/またはクロス構造コンホメーションをとる傾向があるタンパク質の同一性および/または感受性に関する情報が得られる。この得られた情報はその後で、例えば病状をモニターする、療法の有効性をモニターする、疾患の発生をモニターするための診断ツールとして役立ち、好ましくは特定の疾患に特異的なミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質を標的とする療法の開発のために有益な手がかりを提供する。

20

30

【0084】

本発明はしたがって、タンパク質を含んでなるサンプル中におけるミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造またはクロス構造を含んでなるタンパク質の同一性の決定のための方法を提供し、該方法では：

40

該サンプルを本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物と接触させて、結合ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなる結合タンパク質を得、および

結合ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなる結合タンパク質を同定する。該結合ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造またはクロス構造を含んでなる結合タンパク質は、好ましくは、当業界で知られているいずれかの方法を用いて、該ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも一部を解析すること

50

により同定される。該サンプルは好ましくは水溶液、更に好ましくは体液を含んでなる。1つの好ましい態様において、健康な個体（好ましくはヒト）からの体液とミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造の存在と関連および/または関係する疾患に罹患したまたは罹患していると疑われる個体からの体液が、健康状態を病状（または疾患のリスクが高められた状態）と比較するために用いられる。

【0085】

本発明は、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質と相互作用しうるアフィニティ領域を有した免疫グロブリンをIgIV分子のコレクションから選択する手法を提供することから、熟練者であれば、ミスフォールドされたおよび/またはクロス構造を含んでなるタンパク質またはペプチドがサンプル中に存在しているかどうかを調べるために、本発明による該IgIVおよび/または単離、合成および/または組換え分子を用いることもできる。したがって、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質および/またはペプチドがタンパク質を含んでなる水溶液中に存在しているかどうかを調べるための方法が提供され、該方法では：

該水溶液を本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物と接触させ、および

結合ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなる結合タンパク質および/またはペプチドが存在しているかどうかを検出する。該タンパク質および/またはペプチドは、好ましくは、該水溶液を本発明のコレクションおよび/または組成物と接触させ、結合ペプチドおよび/またはタンパク質を検出することにより、水溶液中で検出される。このように、タンパク質を含んでなる水溶液中でミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質および/またはペプチドを検出するための方法が提供され、該方法では、該水溶液を本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物と接触させて、結合ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造またはクロス構造を含んでなる結合タンパク質および/またはペプチドを得、結合ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質および/またはペプチドを検出する。本発明の該コレクションおよび/または組成物とミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造との結合は、好ましくは、例えば蛍光染色または酵素もしくは比色検出によるような視覚化反応で、または熟練者に利用されるいずれか他の視覚化系で検出される。

【0086】

該水溶液は、好ましくは、洗剤、食物製品、食物サプリメント、細胞培地、リサーチ目的に用いられる市販タンパク質溶液、血液、血液製剤、体液、例えば尿、脳脊髄液、滑液、リンパ液および/または痰、化粧品、細胞、タンパク質を含んでなる医薬組成物またはその成分のいずれか、またはこれらのいずれかの組合せを含んでなる。

【0087】

蓄積沈着ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造のタンパク質の存在を調べるための、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物の使用も、合わせて提供される。好ましくは、コンホメーション疾患に関連するミスフォールドタンパク質の存在が検出される。コンホメーション疾患は、タンパク質のミスフォールディングおよび/またはタンパク質のコンホメーション変化に関連および/または関係して引き起こされる疾患として定義される。

【0088】

一態様は更に、組成物中におけるミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の量の検出を含んでなる。これは例えば、疾患の経過を調べるために行われる。更には、したがって、組成物を本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物と接触させ、結合ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の量を該組成物中に存在するクロス構造および/またはクロス構造を

含んでなるタンパク質の量と関連づけることを含んでなる、組成物中、好ましくは薬剤および/またはワクチン中におけるミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の量を調べるための方法が提供される。

【0089】

ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質は本発明によるIgIV分子のコレクションおよび本発明による組成物と効果的に結合されることから、それらはサンプルおよび/または動物の体(好ましくは、ヒトの体)から効果的に除去される。こうして、ミスフォールドタンパク質の蓄積が減らされる。更には、したがって、ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質の蓄積を減少させるための、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物の使用が提供される。該ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質は、好ましくはコンホメーション疾患に關与している。このようなタンパク質の蓄積減少は、該コンホメーション疾患の症状の軽減および/または疾患の少なくとも部分的な治療および/または進行の防止をもたらす。このようなコンホメーション疾患は、好ましくはアミロイドーシス型疾患、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、出血、血栓症、癌、敗血症および他の炎症疾患、リウマチ様関節炎、伝染性海綿状脳症、多発性硬化症、自己免疫疾患、記憶の喪失を伴う疾患またはパーキンソン病および他の神経疾患(癲癇)、脳症および/またはリウマチを含んでなる。

10

20

【0090】

血液の凝固および血小板凝塊形成もミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造の存在を伴う。ミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造を含んでなる(ミスフォールド)タンパク質の役割の例は、血小板の活性化、血小板凝集および凝結の誘導、組織因子発現および血液への暴露をもたらす、血液凝固をもたらす内皮の活性化、および因子XIIの活性化による血液凝固の接触系の活性化である。加えて、血液凝固に際して、クロス構造コンホメーションのフィブリンポリマーが形成される。フィブリンネットワークのクロス構造ビルディングブロックはその後で、フィブリン溶解活性が必要とされる部位にtPAを局在させる、tPAの結合部位として働く。本発明によるコレクションおよび組成物はミスフォールドタンパク質および/またはクロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質を特異的に結合および/または除去しうることから、該コレクションおよび組成物は血液の凝固および/または血餅形成および/または組織因子の活性化を妨げるために特に適している。更には、したがって、本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物を血液に供することを含んでなる、血液の凝固および/または血餅形成を妨げるための方法が提供される。

30

【0091】

タンパク質のクロス構造含有率に影響を有すると予想される処理に試験サンプルが付されていた、試験サンプル中タンパク質のクロス構造含有率と比較したリファレンスサンプル中タンパク質のクロス構造含有率の差異を調べるための方法も提供され、該方法では：

40

本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物を用いてリファレンスサンプルでタンパク質のクロス構造含有率を調べ；

該タンパク質のクロス構造含有率に影響を有すると予想される処理に該タンパク質を付し、こうして試験サンプルを得；

本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物を用いて、得られた試験サンプル中における該タンパク質のクロス構造含有率を調べ；および

該リファレンスサンプル中該タンパク質のクロス構造含有率が該試験サンプル中該タンパク質のクロス構造含有率と有意に異なるかどうかを調べる。

【0092】

この態様は、ある環境および/または処理がタンパク質のクロス構造含有率に影響を有するかどうかを調べるために特に適している。これが調べられたら、クロス構造コン

50

ホメーションを誘導および/または増強する低い能力を有した環境および/または処理を選択することが可能である。もちろん、具体的適用例に応じて、クロス 構造コンホメーションをよく誘導および/または増強しうる環境および/または処理を選択することも可能である。

【0093】

本発明は下記実施例で更に説明されているが、それらに限定されることはない。

【実施例】

【0094】

材料および方法

材料

‘ 静脈注射 I g ’ (‘ I V I g ’ または ‘ I g I V ’)、 ‘ ガンマグロブリン ’、 ‘ 静脈注射用免疫グロブリン ’、 ‘ 静脈注射イムノグロブリン ’ またはその他と称されるヒト広域免疫グロブリン G (I g G) 抗体を地元の University Medical Center Utrecht 調剤部から得た。OctapharmaからのOctagam (Octapharma International Services N.V., Brussels, Belgium; 50 mL 中用量 2.5 g, ロット 4270568431, 期限 05 2006, 以下 I g I V ‘ 製造業者 I ’、 I g I V (I) または I g I V I と称される) およびBaxterからのHyland Immuno Gammagard S/D I V I g (Baxter B.V., Utrecht, オランダ; 96 mL 再調製溶液で用量 5 g, ロット L E 0 8 E 0 4 4 A L, 期限 04 2007, 以下 I g I V ‘ 製造業者 II ’、 I g I V (II) または I g I V II と称される) を用いた。96 mL 給水を加え、室温でローラー装置上に該溶液を30分間置くことにより、Gammagardを無菌条件下で再調製した(最終 I g G 濃度 52 mg / mL)。透明溶液を泡形成なしで得た。再調製溶液を等分し、-20 で保存した。再調製後、Gammagard溶液は0.06 g 低温殺菌ヒトアルブミン、0.45 g グリシン、0.175 g NaCl、0.43 g グルコースー水和物および0.04 g ポリエチレングリコール 3, 350 を含有している。Octagamは、50 mg / mL I g I V を含んでなる即使用溶液として供給されている。他の成分は100 mg / mL マルトースおよび5 μg / mL 未満 Triton X 100 および1 μg / mL 未満 トリ n プチルホスフェートである。それは4 で保存する。製造業者によると、Octagamは主 I g G (95%) と副 I g A フラクシオン (0.4%) からなる。4種の I g G イソタイプの分布は: I g G 1, 62.6%; I g G 2, 30.1%; I g G 3, 6.1%; I g G 4, 1.2% である。Gammagard および Octagam は室温で用いる。溶液を使用前に少なくとも30分間室温で保った。Gammagardの凍結アリコートを最初に約0 へ急速解凍し、次いで室温で置いた。第三のヒト免疫グロブリン源はUniversity Medical Center Utrechtで調製された、外見上健康なドナー約40例の正常プール加クエン酸血漿であった。この血漿を採血後に直接混ぜ、直接等分し、-80 で凍結した。使用前、アリコートを37 水浴中で10分間解凍し、室温で30分間保った。ピペットで攪拌および/または再懸濁することにより血漿を混ぜた; 用いられた I g I V 調製物およびその他すべてのタンパク質溶液で行われていたため、ボルテックスは避けた。

【0095】

E L I S A では、Microlon高結合性プレート (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany; カタログ番号 655092, ロット 05130103, 期限 03 2009) を用いた。用いられた抗体は、ヤギ抗ヒト I g G アルカリ性ホスファターゼ (Biosource Int., Camarillo, CA, USA; カタログ番号 A H I 0 3 0 5, ロット 7602)、ヤギ抗ヒト I g M アルカリ性ホスファターゼ (Biosource Int.; カタログ番号 A H I 0 6 0 5, ロット 3903)、ペルオキシダーゼ複合化ウサギ抗マウス免疫グロブリン (RAMP O, カタログ番号 P 0 2 6 0, D A K O Cytomation, Glostrup, Denmark)、ペルオキシダーゼ複合化ブタ抗ウサギ免疫グロブリン (S W A R P O, カタログ番号 P 0 2 1 7, D A K O Cytomation)、ウサギポリクローナル抗ヒトアルブミン抗体 A 0001 (D A K O Cytomation)、ウサギポリクローナル抗ヒトヘモグロビン抗体 A 0118 (D A K O Cytomation; ロット 122 (021))、マウスモノクローナル抗ヒトアミロイド 抗体 M 0

10

20

30

40

50

872 (DAKO Cytomation; クローン 6F/3D, ロット 00003503, 期限 082006)、ウサギポリクローナル抗ヒトフィブリノーゲン抗体 A0080 (DAKO Cytomation; ロット 097(701), 期限 082006) およびネズミモノクローナルハイブリドーマ抗グルコース 6 リン酸グリケート化ヒトフィブロネクチン抗体 4B5 (ロット 2, コード 100901BB, ref. (Bouma et al., 2003)) であった。ELISA において、アルカリ性ホスファターゼ複合化抗体の結合性は p ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム塩 $6 \cdot H_2O$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; ホスファターゼ基質カタログ番号 104, ロット 120K6008) を用いて評価し、ペルオキシダーゼ複合化抗体の結合性は 1, 2 フェニレンジアミン ('OPD', Merck, Darmstadt, Germany; カタログ番号 1.07243.0050, ロット L937543844) を用いて評価した。

10

【0096】

ELISA セットアップを用いた阻害研究は、コンゴレッド (Aldrich, Milwaukee, WI, USA; カタログ番号 86, 0956)、チオフラビン T (Sigma, St. Louis, MO, USA; カタログ番号 T3516, ロット 80K3444)、チオフラビン S (Sigma, カタログ番号 T1892)、組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA, Actilyse, Boehringer-Ingelheim, Alkmaar, オランダ)、またはフィブロネクチン I 型ドメインを含む、または代わりにフィンガー (F) ドメインとも表示される、3つのアミノ末端ドメインを欠く tPA のトランケート形 (K2P tPA, RapiLysin, Boehringer-Ingelheim, Alkmaar, オランダ) の濃度シリーズを用いて行った。

20

【0097】

IgIV 結合 ELISA で用いられた抗原は、K157G 突然変異を有する合成ヒトフィブリンペプチド 148 KRLEVDIDIGIRS 160 (配列番号 1)、合成ヒトアミロイド ペプチド 1 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV 40 (配列番号 2) (A (140))、合成ヒト A (140) E22Q Dutch1 型 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAQDVGSNKGAIIGLMVGGVV 40 (配列番号 3) (Peptide facility, Dutch Cancer Institute, Amsterdam, オランダ)、ウシ血清アルブミン (BSA, フラクシオン V, カタログ番号 A7906, 熱ショックによる初期分画, 純度 98% (電気泳動), 残部はほぼグロブリン, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、ヒトヘモグロビン (Hb, Sigma-Aldrich; カタログ番号 H7379) およびそれらの前進性グリケート化終末産物修飾対応物 BSA AGE および Hb AGE (下記参照) であった。

30

【0098】

方法

タンパク質のグリケーション

アルブミンおよび Hb のグリケーション (glycation) を次のように行った。BSA AGE の調製の場合、100 mg/mL のアルブミンを、1 M の D グルコース 6 リン酸二ナトリウム塩水和物 (無水) (g6p, ICN, Aurora, Ohio, USA) および 0.05 % m/v NaN_3 を含有するリン酸緩衝液 (PBS, 140 mM 塩化ナトリウム, 2.7 mM 塩化カリウム, 10 mM リン酸水素二ナトリウム, 1.8 mM リン酸二水素カリウム, pH 7.3) と暗所中 37 でインキュベートした。溶液を 70 週間にわたりグリケート化させた。100 mg/mL のヒト Hb を、1 M の g6p および 0.05 % m/v NaN_3 を含有する PBS と 37 で 75 週間インキュベートした。インキュベート後、アルブミンおよび Hb 溶液を蒸留水に対して徹底透析し、その後で等分し、-20 で保存した。タンパク質濃度を Advanced タンパク質アッセイ試薬 ADV01 (Cytoskeleton, Denver, CO, USA) で調べた。

40

【0099】

熱変性タンパク質の調製

熱変性ミスフォールドタンパク質を次のように調製した。67 mM NaP_i 緩衝液 pH 7.0、100 mM NaCl 中 1 mg/mL のエンドスタチン (組換え産生コラーゲ

50

ンXVIIIフラグメント,EntreMed,Inc.,Rockville,MD;溶液)、BSA(Sigma-Aldrich;凍結乾燥,カタログ番号A7906)、ネズミ血清アルブミン(MSA,Calbiochem,EMD Biosciences,Inc.,San Diego,CA;凍結乾燥,カタログ番号126674)、ニワトリ卵白リゾチーム(ICN,Irvine,CA,USA;凍結乾燥,カタログ番号100831)、ヒトグルカゴン(Glucagon,Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark;凍結乾燥,カタログ番号PW60126)、精製ニワトリオボアルミブン(OVA,Sigma;カタログ番号A7641,ロット071k7094)またはヒト₂糖タンパク質I(2gpi,インハウス精製,新鮮血漿から,ref.(Horbach et al.,1996))をPTC 200サーマルサイクラー(MJ Research,Inc.,Waltham,MA,USA)でPCRカップ中5サイクルにわたり加熱した。各サイクルにおいて、タンパク質を30から85^oC/5minの割合で加熱した。加えて、エンドスタチン、MSA、オボアルミブンおよびリゾチームを、1回のみ熱インキュベーションサイクルを用いて、同様に1mg/mLで熱変性させた。7.9mg/mLのエンドスタチンをH₂Oで1mg/mLに希釈し、MSAおよびオボアルミブンをPBS pH7.4で1mg/mLとし、リゾチームを10 μ M HCl添加のPBSに1mg/mL濃度で溶解させた。コントロールタンパク質は熱サイクリング操作に付されない。アミロイド様構造へのタンパク質のミスフォールディングを確認するために、チオフラビンT(ThT)の増強を熱処理タンパク質およびコントロールタンパク質で評価した。ThTアミロイド様タンパク質/ペプチド付加物の蛍光を次のように測定した。25 μ g/mLのタンパク質またはペプチド調製物の溶液を25 μ M ThT含有の50mMグリシン緩衝液pH9.0で調製した。蛍光を435nmで励起時に485nmで測定した。緩衝液、ThT含有緩衝液および無ThTのタンパク質/ペプチド溶液のバックグラウンドシグナルを、ThTとインキュベートされたタンパク質溶液での対応測定値から差し引いた。規定どおりに、Aの蛍光を陽性コントロールとして用い、合成ヒトフィブリンフラグメントFP10(148KRLVDIDIK157(配列番号4);Peptide Facility,Dutch Cancer Institute,Amsterdam,オランダ)、非アミロイドフィブリンフラグメント(Kranenburg et al.,2002)および緩衝液の蛍光を陰性コントロールとして用いた。蛍光をHitachi F4500蛍光分光光度計(Hitachi,Ltd.,Tokyo,Japan)で三重に測定した。一方、コンゴレッド蛍光も同様に解析した。今回は、励起および発光波長は550および590nmであった。再び、25 μ g/mLの試験タンパク質を25 μ Mコンゴレッド溶液で解析した。

【0100】

一方、熱変性アミロイドペプチドを次のように調製した。ヒトフィブリンペプチドNH₂IDIKIRCOOH(配列番号6,FP6)を1:1容量比の1,1,1,3,3,3ヘキサフルオロ₂プロパノールおよびトリフルオロ酢酸に約10mg/mLで溶解させた。有機溶媒を気流下で蒸発させた。FP6を蒸留水に1mg/mLの最終濃度まで溶解し、37^oCで72時間保った。溶液をその後で室温で保存した。クロスベータ構造コンホメーションの存在をアミロイド特異的色素ThTおよびコンゴレッドの蛍光の増強測定とX線線維回折解析(パーソナルコミュニケーション,L.Kroon-Batenburg,Bijvoet Center for Biomolecular Research,Dept.of Crystal & Structural Chemistry,University of Utrecht,オランダ)により確認した。更に、プラスミノゲン/プラスミン/クロモゲン基質変換アッセイでtPAを活性化するFP6の性質を評価したところ、陽性であることがわかった(他所で示されたデータ)。

【0101】

アミロイド様コンホメーションをとる酵母プリオンペプチドオリゴマーの調製

酵母プリオンタンパク質のペプチドフラグメントNH₂GNNQQNYCOOH(配列番号5)をthe Peptide Facility of the Netherlands Cancer Institute(H.Hilkman,NKI-Amsterdam,オランダ;ロット5LKB12081)から購入した。該ペプチドの純度は逆相HPLCを行い解析したところ、~90%であった。該ペプチドをH₂Oで1および10mg/mLの最終濃度まで溶解させた。透明溶液をローラーバンクにて4^oCで72時間または無運動下室温で5時間インキュベートした。コンゴレッド蛍光の増

強をアミロイド様コンホメーションの存在に関する尺度として調べた(前記参照)。加えて、このバッチのペプチドでクロスベータ構造の形成が、 H_2O 中 10 mg/mL の溶液を用いてX線線維回折解析で確認された(パーソナルコミュニケーション, L.Kroon-Batenburg, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Dept. of Crystal & Structural Chemistry, University of Utrecht, The Netherlands)(ここではデータ示さず)。

【0102】

酸化タンパク質の調製

$CuSO_4$ への溶液中タンパク質の長期暴露を用いてタンパク質の酸化を行った。用いられたタンパク質は、外見上健康者のヒト正常プール加クエン酸血漿、調合エンドスタチン(EntreMed, Inc., Rockville, MD; 7.9 mg/mL 溶液)、ニワトリ卵白リゾチーム(ICN, カタログ番号100831, ロット98032)、ヒトヘモグロビン(Sigma-Aldrich; カタログ番号H7379, ロット039H7605)、ヒトグルカゴン(Novo Nordisk Farma B.V.のGlucagen, ロットRW60038)、ウシアルブミン(Sigma-Aldrich, A7906, ロット81K1813)、ヒト グロブリン(Sigma-Aldrich, G4386, ロット21K7600)、ニワトリ卵白オボアルミブン(Sigma-Aldrich, A7641, ロット071K7094)であった。凍結乾燥タンパク質をPBSに 2 mg/mL で溶解し、血漿を40倍希釈し、エンドスタチンをPBSで 2 mg/mL に希釈した。 $2\% \text{ m/v}$ の NaN_3 ストック溶液を 0.02% の最終濃度まで加えた。 H_2O 中 1 M の $CuSO_4$ ストック溶液を 10 mM の最終濃度まで加えた。コントロールタンパク質溶液では、 H_2O を $CuSO_4$ の代わりに加えた。すべてのタンパク質溶液を攪拌により混ぜ、ボルテックスは避けた。溶液をローラーバンクにて4 で72時間保った。ThTの増強を測定した(前記参照)。

【0103】

一方、溶液に $10\text{ }\mu\text{M}$ $CuSO_4$ を導入することによりタンパク質を酸化させた。こうして、オボアルミブン、アルミブン、エンドスタチン、リゾチーム、 グロブリンをすべて 2.5 mg/mL およびグルカゴンを 1 mg/mL でPBS中37 で144時間インキュベートした。コントロールタンパク質溶液では、 $CuSO_4$ を省いた。チオフラビンT蛍光をクロスベータ構造コンホメーションをもつミスフォールドタンパク質の存在に関する尺度として調べた。ThT蛍光増強を示したタンパク質溶液とそれらの非酸化コントロールをPBSに対して透析した。

【0104】

オランダ血液バンクから得られた、10 で保たれた新鮮(<24 時間)ヒト血漿から低密度リポタンパク質(LDL)を単離した。LDLを本質的に先に記載されたように単離した(4)。血漿を続く3サイクルにわたり超遠心機で遠心した。LDLフラクションを単離し、 N_2 下4 で保存した。実験前、天然LDL(nLDL)を $0.9\% \text{ w/v}$ NaClに対して4 で一夜透析した。様々な酸化の程度で酸化LDL(oxLDL)を得るために、天然LDLを最初に4 で一夜 1 mM $NaNO_3$ を含有する 0.15 M NaCl溶液に対して透析した。次いで、nLDLを $3\sim5\text{ mg/mL}$ に希釈し、 $CuSO_4$ を $25\text{ }\mu\text{M}$ の最終濃度まで加え、37 でインキュベートした。同様に、 $CuSO_4$ の代わりに $FeSO_4$ を用いてLDLを酸化した。 $FeSO_4$ での酸化も透析ステップで先行させた。次いで、LDLを 150 mM NaClおよび 1 mM NaN_3 , pH7.2添加のPBS中 $5\text{ }\mu\text{M}$ $FeSO_4$ に対して透析した。酸化の程度は、ある回数の酸化緩衝液リフレッシュサイクルを選択することにより制御する。緩衝液中 $FeSO_4$ が10~12時間毎に多く入れ換えられるほど、酸化の程度は高くなる。酸化を止めるために、LDLサンプルを 150 mM NaCl、 1 mM NaN_3 、 1 mM EDTAの緩衝液に対して4 で4時間透析する。酸化の程度を $=234\text{ nm}$ でジエン形成の測定により追跡した(Ultrospec 3000 Spectrophotometer(Pharmacia Biotech))。酸化反応を止めるために、LDLを 0.15 M NaCl、 1 mM $NaNO_3$ および 1 mM EDTAに対して透析した。LDL溶液を N_2 下4 で保存した。LDLのApoBタンパク質部分におけるクロスベータ構造コンホメーションの存在を、チオフラビンT蛍光アッセイを用いて解

析した（前記参照）。

【0105】

変性表面を用いるミスフォールドタンパク質の調製

マルチマー分子から構成される表面への暴露でミスフォールドタンパク質を調製するために、 $21.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ でCpG ODN (Coley Pharmaceutical Group, MA, USA) または $600 \mu\text{g}/\text{mL}$ でリポ多糖 (LPS, Escherichia coli血清型011:B4から, #L2630, ロット104K4109, Sigma-Aldrich) を $1 \text{mg}/\text{mL}$ のニフトリ卵白リゾチーム (凍結乾燥, Fluka, Sigma-Aldrich; カタログ番号62971)、BSA、エンドスタチンおよびオボアルミブんと混ぜ、ローラーバンクにて4でo/nインキュベートまたは室温で1時間インキュベートした。この目的のために、凍結乾燥タンパク質をHEPES緩衝液 (HBS, 10mM HEPES, 4mM KCl, 137mM NaCl, pH 7.2) に $2 \text{mg}/\text{mL}$ の最終濃度まで溶解させ、 $7.9 \text{mg}/\text{mL}$ のエンドスタチンをHBSで $2 \text{mg}/\text{mL}$ に希釈した。タンパク質をローラーバンクにて室温で10分間、37および室温で10分間かけて穏やかに溶解させた。 $2 \text{mg}/\text{mL}$ のタンパク質溶液を次いで使用前に $100,000 \times g$ で1時間超遠心し、その後で $42.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ CpG ODNまたは $1200 \mu\text{g}/\text{mL}$ LPS含有のHBSで1:1希釈した。アミロイド様クロスベータ構造の形成を、変性表面が省かれたコントロールタンパク質溶液に対するチオフラビンT蛍光の増強を測定することにより評価した。この目的のために、タンパク質を $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、アッセイ用緩衝液またはアッセイ用緩衝液中 $25 \mu\text{M}$ チオフラビンTとインキュベートした（アッセイ詳細に関しては前記参照）。

10

20

【0106】

一方、（負電荷）（リン）脂質、例えばホスファチジルセリンおよびカルジオリピン、デキストラン硫酸 (500,000 Da)、ミョウバン、エラグ酸、ガラスまたはカオリンのような変性分子へのタンパク質の暴露後にミスフォールドタンパク質を得る。IgIV作用の作動メカニズムを解明するために行われる試験に、これらのミスフォールドタンパク質を含める。

【0107】

ミスフォールドタンパク質へのIgIV結合性の試験のための酵素結合イムノソルベントアッセイ

正常プール血漿中IgIVまたは免疫グロブリンの結合性を酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) セットアップを用いて調べた。この目的のためには $50 \mu\text{L}$ /ウェルのポテンシャルリガンドを指示濃度で、またはコントロールおよびバックグラウンド測定目的には被覆用緩衝液のみを、 50mM NaHCO₃ pH 9.6中運動下4で一夜被覆した。グリケート化アルブミンおよびHb (BSA AGEおよびHb AGE)、コントロールBSAおよびコントロールHbは $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ で被覆した。AおよびFP13は $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ で被覆した。ピペティングに続いてローラーバンクにて室温で30分間にわたる再懸濁で、PBSに $1 \text{mg}/\text{mL}$ で凍結乾燥タンパク質を溶解させることにより、BSAおよびHbコントロールを新たに調製した。タンパク質溶液を $16,000 \times g$ で10分間遠心し、被覆用緩衝液で希釈した。被覆コントロールは抗グリケート化タンパク質抗体、抗アルブミン抗体、抗Hb抗体および抗A抗体で行った。FP13はポリクローナル抗フィブリノーゲン抗体で認識されなかった。IgIVを被覆し、それらを二次抗体で覆うことにより、アルカリ性ホスファターゼ複合化抗ヒトIg抗体を制御した。被覆後、プレートを 50mM Tris HCl pH 7.3、 150mM NaCl、 0.1% v/v Tween 20で2回洗浄し、運動下室温で1時間かけて $175 \mu\text{L}$ /ウェル遮蔽試薬 (Roche Diagnostics, Almere, オランダ; カタログ番号111125890001) で遮蔽した。プレートを2回洗浄し、結合用緩衝液; PBS/0.1% v/v Tween 20中 $50 \mu\text{L}$ /ウェルで推定インヒビターの不在または存在下、指定の抗体希釈シリーズ、血漿希釈シリーズまたは結合用緩衝液のみを含むコントロールと三重に室温で1時間一定運動下にてインキュベートした。4洗浄サイクル後に、二次抗体

30

40

50

を運動下室温で45分間かけて50 μ L/ウェルでウェルへ加えた。RAMPOおよびSWARPOを2000倍希釈で用い、ヤギ抗ヒトIgG抗体を3000倍で希釈し、ヤギ抗ヒトIgM抗体を1000倍で希釈した。洗浄緩衝液で5回洗浄、次いでPBSで2回洗浄後、抗体の結合性を評価した。アルカリ性ホスファターゼ複合化二次抗体の場合、DEA緩衝液pH9.8(HClでpH調整された、240 μ M MgCl₂・6H₂O含有の、H₂O中10%v/vジエタノールアミン)中p-ニトロフェニルホスフェート(600 μ g/mL)を100 μ L/ウェルで~5分間用いた。50 μ L/ウェルのH₂O中2.4M NaOHを加えることにより反応を止めた。5分間後、吸光度を405nmで読んだ。ペルオキシダーゼ複合化RAMPOおよびSWARPOの場合は、50mMクエン酸/100mM Na₂HPO₄/0.06%v/v H₂O₂ pH5中OPD(1.3mg/mL)を100 μ L/ウェルで~5分間用いた。50 μ L/ウェルのH₂O中2M H₂SO₄を加えることにより反応を止めた。5分間後、吸光度を490nmで読んだ。各実験を少なくとも2回行った。アミロイド様クロスベータ構造結合化合物およびコントロール(ref.(Bouma et al.,2003)および特許出願P57716EP00)がクロスベータ構造リガンドと結合するIgIVを妨げるかどうかを試験するために、ポテンシャルインヒビターの濃度シリーズを準最適IgIV濃度の存在下で試験した。この目的のために、tPA、K2P tPA、コンゴレッド、チオフラビンS(ThS)およびチオフラビンT(ThT)の用いられたストック溶液は各々3.7mg/mL、1.1mg/mL、10mM、10mMおよび10mMであった。リシン およびアルギニン残基へのtPAおよびK2P tPAのクリングル2ドメインの結合を避けるために、tPAおよびK2P tPAの影響を10mM アミノカプロン酸の存在下で試験した(アミロイド様構造へのtPA結合は、トランケートK2P tPAで欠くそのフィンガードメインにより媒介される;クリングル2ドメインはリシンおよびアルギニンの露出側鎖と結合する)。結合用緩衝液およびK2P tPAはこれらの阻害研究でネガティブコントロールとして働く。別に、同様の阻害研究を固定A またはBSA AGE、準最適濃度のtPA(ref.(Bouma et al.,2003;Kranenburg et al.,2002))および濃度シリーズのコンゴレッドまたはThTで行った。データ処理は次のように行った。三重データを平均化し、標準偏差を計算した。緩衝液被覆ウェルで得られたバックグラウンドシグナル(空ウェルへの一次抗体の結合)、および一次抗体が省かれたウェルで得られたバックグラウンドシグナル(被覆リガンドへの二次抗体の結合)を差し引いた。

【0108】

別シリーズの実験では、酵母プリオンペプチドNH₂ GNNQQNY COOH(配列番号5)を25 μ g/mLの濃度でELISAプレートへ被覆した。4 で73時間インキュベートされた1mg/mLのストック溶液を用いた。コントロールウェルでは、5 μ g/mL Hb AGEまたは被覆用緩衝液を被覆した。希釈シリーズIgIV(I)の結合性を解析し、濃度シリーズのtPAおよびK2P tPAの結合性と比較した。加えて、ミスフォールドタンパク質に親和性を有する5種モノクローナル抗体の混合物も、固定リガンドとの結合性に関して試験した(モノクローナル詳細に関しては下記参照)。この目的のため、5種抗体の各々336 μ g/mLを含んでなる混合物をPBSで調製し、1.83mg/mL総抗体のストック溶液を得た。

【0109】

ネズミモノクローナル抗ミスフォールドタンパク質抗体の調製

免疫化をABC-Hybridoma facility(P.van Kooten & M.Smits,Utrecht University,オランダ)で行った。マウス(Balb/c)を100 μ L H₂Oおよび100 μ L完全フロイントアジュバント中100 μ g A で免疫した。3週間後、H₂O-Specol(ID DLO,Lelystad,オランダ)中50 μ g A の一次ブースト、一次ブースト後30日目に二次ブーストを行った。二次ブースト後36および37日目に、マウスをPBS中50 μ g A で2回(静脈内)追加ブーストした。A で免疫化の開始後約44週~48週目に、マウスは病気になったが、回復した。49週後、マウスをH₂O-Specol中50 μ g 組換えニワトリ血清アミロイドAで免疫した。この抗原はDr.H.Toussaint(Dept

.of Veterinary Medicine, University of Utrecht, The Netherlands) の贈与であった。

4週間後、マウスを50 µg Hb A G Eで免疫した。最後に、31および32日後、マウスをPBS中50 µg F P 6 (配列番号6)で2回静脈内ブーストした。最終ブースト後3日目に、マウスを屠殺し、ハイブリドーマを作製するために脾臓を用いた。融合用培地をPEG 4000 (Merck, カタログ番号9727)で富化させた。脾臓は比較的高い存在量の浸潤線維芽細胞と共に例外的に高い数の細胞、即ち 7×10^8 細胞からなっていた。 2×10^8 細胞を融合用の 4×10^7 Sp 2 / 0 形質細胞腫細胞と混ぜた。融合後、10% Fetalclone 1 (Hyclone)、4 µM アミノプテリンおよび1% Glutamax I 含有のOptiMEM I からなる選択ハイブリドーマ培地を用いた。脾臓B細胞と形質細胞腫細胞との融合を可能にするインキュベート時間後、Accudropソフトウェア装備のFacsVantage装置を用いて、細胞を1細胞/ウェルで96ウェルプレートに移した。約2週間後、ハイブリドーマを抗クロス 構造抗体の推定産生についてスクリーニングした。最初に、96ウェルプレート中768クローンを免疫化F P 1 3 K 1 5 7 G アミロイドおよびアミロイド グロブリンと結合する抗体の存在についてスクリーニングした。この目的のために、F P 1 3 K 1 5 7 G およびアミロイド グロブリンをH₂O中で一緒に各ポリペプチド5 µg / mLに希釈した。Microlon高結合性E L I S Aプレート (Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) をこの溶液50 µLで満たし、37 °Cで一夜風乾した。プレートを遮蔽試薬 (カタログ# 11112589001, Roche Applied Science, Basel, Switzerland) で遮蔽し、水道水で洗浄した。10% v / v 胎児ウシ血清を含有する100 µLのハイブリドーマ細胞培養上澄を被覆プレートへ移し、振盪しながら室温 (RT) で1時間インキュベートした。プレートを0.1% Tween 20 (洗浄緩衝液) 含有のTris 緩衝液 pH 7.3 (TBS, 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl) で洗浄し、その後で振盪しながらRTで30分間にわたりPBS / 0.1% Tween 20 中2000x希釈ペルオキシダーゼ複合化ウサギ抗マウス免疫グロブリン (RAMPO, # P 0 2 6 0, D A K O, Denmark) で覆った。徹底洗浄後、結合RAMPOをテトラメチルベンジジン (TMB, # 45.01.20 / # 45.014.01, Biosource, Nivelles, Belgium) で視覚化した。反応を5分後にH₂O中1% H₂SO₄で止めた。プレートを450 nmで読んだ。シグナルが少なくとも1.5xバックグラウンドレベルに達したとき、クローンを更なるスクリーニング試験に含めた。再び、推定抗クロス 構造抗体の存在を免疫化F P 1 3 K 1 5 7 G およびアミロイド グロブリンで解析した。そのとき、35クローンが陽性であった。それらのクローンを細胞培養フラスコへ移し、更なる解析に付した。この目的のため、再び、今回は別々にF P 1 3 K 1 5 7 G およびアミロイド グロブリンと、A およびHb A G EをE L I S Aプレートに固定した。加えて、新鮮溶解A、F P 1 3 K 1 5 7 G、Hb および グロブリンをImmobilizerプレート (Exiqon, Vedbaek, Denmark) に被覆した。これらの新鮮溶解コントロールを振盪しながらRTで1時間かけてPBS中20、12.5、50および50 µg / mLで各々被覆した。存在しうる不溶性凝集物を除去するために、各々20、12.5、50および50 µg / mLのA、F P 1 3 K 1 5 7 G、Hb および グロブリンストック溶液を最初に $238 \times 10^3 \times g$ で30分間遠心した。緩衝液を追加陰性コントロールとしてGreiner (H₂O) およびExiqon (PBS) プレートに被覆した。Greinerプレートは768クローンで初回スクリーン時に遮蔽しなかった。細胞培地中10% FCSがE L I S Aプレートで細胞上澄のインキュベート時における効果的遮蔽剤である。細胞上澄を加える前に、100 µLのPBS / 1% Tween 20をExiqonプレートのウェルに加えた。濃度0.1%のTween 20がImmobilizerプレート用の効果的即席遮蔽剤である。100 µLのハイブリドーマ上澄をプレートへ移した。培地を陰性コントロールとして用いた。シグナルは、10% FCS含有の新鮮培地が様々な固定抗原およびコントロールでインキュベートされたときに得られたシグナルの倍数として計算した。シグナルは、新鮮培地で得られたバックグラウンド値x 2.0を超えたときに、陽性とみなした。その後で35クローン中21のスクリーニングを上記のように調製されたGreinerプレートで行った。プレートを今回は最初に遮蔽試薬で遮蔽し、洗浄した。50 µLの各ハイブリドーマクローン上

10

20

30

40

50

澄を配列非依存性だが構造特異的な抗体の存在について二重に試験し、新鮮培地をコントロールとして四重に試験した。モノクローナルハイブリドーマを得るために、原21クローンから6つを更なる単一細胞サブクロニング用に選択した。6クローンを1細胞/96ウェル培養プレートのウェルに接種し、10% v/v FCSで富化された培地で培養した。クローンを2種の被覆アミロイドとの結合性についてすべて試験した。6クローンの各々について、後に25 cm² 培養フラスコで培養するために、2種のアミロイドと結合した5サブクローンを特定した。蛍光標識されたイソタイプ特異的抗体を用いる30サブクローンのイソタイプ分類は製造業者(Luminex, Austin, TX, USA)の推奨に従いABC-Hybridoma facility (M. Smits)により行われた。通常のコロマトグラフィー精製技術を用いて抗体を細胞培地から精製した。Econoカラム(Biorad, Veenendaal, The Netherlands)にAFFI-Tゲルマトリックス(KemEnTEC, Biozym, Landgraaf, The Netherlands)を用いて、サンプルを親オ性コロマトグラフィーに付した。精製抗体をPBS中-20で保存した。

10

【0110】

モノクローナル抗体を得るために、マウスをその後でヒトアミロイドA(140)E22Q、組換えニワトリ血清アミロイドAおよびアミロイド様性質のグリケート化ヒトヘモグロビンで免疫し、次いでアミロイドヒトフィブリンペプチドFP6で最終ブーストした。ハイブリドーマが形成されたら、免疫に用いられた抗原と無関係なアミノ酸組成のいずれかのポリペプチドにクロス構造コンホメーションが存在するときのみ認識されるエピトープを特異的に認識する抗体の存在についてそれらの細胞培養上澄をスクリーニングした。768クローンのうち、免疫に用いられた抗原以外で広範囲のアミロイド様凝集物に親和性を示す6クローン、2E2、4F4、7H1、7H2、7H9および8F2を選択した。数ラウンドの選択およびサブクロニング後、最後に下記5種のモノクローナル抗体がクロスベータ構造コンホメーションのミスフォールドタンパク質と不変的結合性を示した：2E2B3D12、7H2H2、7H1C6A7、7H9B9、8F2G7H7。7H2H2クローンのみが様々なミスフォールド形の免疫グロブリンと特異的に結合したため、我々はこのクローンを‘リウマトイド因子様抗体’と分類した。個別抗体の最終濃度が2E2B3D12、7H2H2、7H1C6A7、7H9B9および8F2G7H7について各々1.5、0.37、0.4、0.45および0.47 mg/mLであり、3.2 mg/mLの全抗体濃度を示す5種の掲載モノクローナル抗体の混合物を調製した。一方、すべての抗体をPBSで1.83 mg/mLに希釈し、1:1:1:1:1で混合して、336 μg/mLの個別抗体で1.83 mg/mLの全抗体濃度とした。ネズミ抗ミスフォールドタンパク質抗体のこれら混合物を更なる血小板凝集アッセイにストック溶液として用いた(実施例参照)。

20

30

【0111】

血小板凝集

アミロイド様クロスベータ構造コンホメーションのミスフォールドグリケート化Hbの凝集物により誘導された血小板凝集に及ぼすIgIVの影響を凝集測定アッセイにおいて洗浄血小板で試験した。凝固を避けるために、新鮮採取ヒトアスピリンフリー血液をクエン酸緩衝液と穏やかに混ぜた。血液を20にて150* gで15分間スピンスさせ、上澄を集めた；多血小板血漿(PRP)。2.5%クエン酸三ナトリウム、1.5%クエン酸および2%グルコース含有のpH6.5緩衝液を1:10(緩衝液PRP)の最終容量比まで加えた。20にて330* gで15分間の遠心で血小板を沈降させた後、ペレットをHEPES-Tyrode緩衝液pH6.5に再懸濁した。プロスタサイクリンを10 ng/mLの最終濃度まで加え、溶液をソフトブレーキ下20にて330* gで15分間遠心した。最終血小板数が200,000~250,000血小板/μLに調整されるように、ペレットをHEPES-Tyrode緩衝液pH7.2に再懸濁した。血小板が静止状態にあるよう保証するために、アッセイで使用前、それらを37で少なくとも30分間保った。ドナー5例の血小板を異なる3日間(2, 2, 1)で別々に単離した。

40

【0112】

50

凝集測定アッセイのために、270、280または300 μ L血小板溶液をガラス管へ加え、37 に予熱した。攪拌磁石を加え、回転を900 rpmに設定し、装置(全血凝集計,Chrono-log,Havertown,PA,USA)をブランクにした。HEPES-Tyrode緩衝液pH7.2で前希釈された対象のアゴニストおよび/または対象のプレミックスアンタゴニストを含有する30、30または33.3 μ Lの最終容量を加えた。血小板凝集で経時的に減少する溶液の吸光度を測定することにより、凝集を経時的に追跡した。陽性コントロールとして、10 μ g/mLのコラーゲン(Kollagenreagens Horm,NYCOMED Pharma GmbH,Linz,Austria;ロット502940)または5 μ Mの合成トロンビンレセプター活性化ペプチドTRAP(NH₂SFLLRNCOOH,配列番号7)を用いた。凝集を15分間記録し、透過光のパーセンテージ(0~100%)として表示した。

10

【0113】

ミスフォールドタンパク質と結合するタンパク質を捕捉するためのクロスベータ構造アフィニティマトリックスの調製

IgIV中Igのサブセットがミスフォールドタンパク質と結合するかどうかを更に調べられるように、我々はミスフォールドタンパク質結合のアフィニティマトリックスを調製した。この目的のために、我々は製造業者の推奨に従いCNBr-セファロース(GE Healthcare-Amersham,Roosendaal,The Netherlands)へグリケート化Hbをカップリングさせた。ローラーバンクにて4 で一夜カップリングのために、250 μ gのHCl洗浄およびカップリング用緩衝液洗浄された吸引ビーズ(乾燥重量)を125 μ Lカップリング用緩衝液のみ(コントロールビーズ)(100 mM NaHCO₃, pH8.3, 50 mM NaCl)または3.33 mg/mL Hb AGE含有のカップリング用緩衝液とインキュベートした。徹底洗浄後、我々はHb AGEがセファロースとカップリングされたかどうかと、調製されたアフィニティマトリックスがクロスベータ構造コンホメーションのミスフォールドタンパク質に親和性を有するタンパク質を実際に捕捉しうるかどうかを調べた。Hb AGE出発物質の濃度をカップリング反応後のHb AGE上澄と比較することにより、カップリング効率を調べた。希釈シリーズをADV01タンパク質染色剤(Cytoskelton)で調製し、吸光度を590 nmで読んだ。吸光シグナルの比較から、Hb AGEの50%が250 μ gビーズ(乾燥重量)でセファロース、即ち約200 μ g Hb AGEと結合していることがわかった。

20

【0114】

以前に、我々は、組織型プラスミノゲンアクチベーターが、グリケート化タンパク質を含めたクロスベータ構造コンホメーションのミスフォールドタンパク質に親和性をもつ酵素であることを証明した(Bouma et al.,2003;Kranenburg et al.,2002)。tPAと結合しうるHb AGE アフィニティマトリックスの能力を試験するために、HBS中Hb AGE セファロースまたはコントロールセファロースの1:1懸濁物20 μ Lを、二重に、ローラーバンクにて4 で一夜のインキュベートにより、6 μ M tPA(0~10 μ M濃度シリーズを試験した後の最適化濃度)とインキュベートした。8000 * gで2分間遠心して上澄の廃棄後、ビーズをHBSで5回洗浄した。20 μ L溶出用緩衝液(10 mM HEPES pH7.4,1140 mM NaCl,10 mM アミノカプロン酸,4.5 mM CaCl₂,0.005% Tween20)と共にマトリックスを室温で1時間インキュベートすることにより、結合tPAを溶出させた。溶出物をtPA含有率について解析し、これをHb AGE セファロースまたはコントロールセファロースとの接触前および後におけるインキュベート混合液のtPA含有率と比較した。クロモゲンtPA基質S2765(Chromogenix,Instrumentation Laboratory SpA,Milano,Italy)を用いて相対tPA濃度を調べた。この目的のため、1~5 μ Lの試験サンプル(tPA出発溶液,Hb AGE セファロースと接触後の上澄,溶出用緩衝液とのHb AGE セファロースのインキュベート後における溶出物)を10 μ L 5 mM S2765および5 μ Lの10倍HBSストック溶液と混ぜ、H₂Oで50 μ Lの最終容量に調整した。無色剤から黄色基質へのtPAによる基質の変換を吸光度測定96ウェルカイネティックプレートリーダーで37 にて経時的に記録した。

30

40

50

【0115】

次いで、120 μ L または 20 μ L の親和性 Hb A G E セファロースマトリックスあるいは120 μ L または 20 μ L の無カップリングタンパク質のコントロールセファロースを200 μ L の50 mg/mL I g I V (Octagam) ストック溶液とインキュベートした(室温で4時間)。次いで、インキュベート用緩衝液で徹底洗浄後に溶液に残留した I g I V の濃度およびマトリックスへの結合 I g I V の量を調べた。I g I V 標準希釈シリーズを用いて280 nmで吸光度を測定することにより、および A D V 0 1 (Cytoskeleton) で染色後に I g I V サンプルの590 nmにおける吸光度を I g I V 標準希釈シリーズの染色と比較することにより、タンパク質濃度を調べた。Hb A G E セファロースまたはコントロール セファロースと結合した I g I V を約2倍容量の H B S (結合用緩衝液) で6回洗浄した。次いで、結合 I g I V を1 M N a C l および10 mM アミノカブロン酸含有の200 μ L H B S で溶出させた(室温で30分間、攪拌下)。E L I S A プレートに固定された Hb A G E との結合性を、未処理 I g I V の希釈シリーズ、Hb A G E セファロースと接触後の I g I V、コントロール セファロースと接触後の I g I V、Hb A G E セファロースからの溶出 I g I V、コントロール セファロースからの溶出 I g I V で解析した。この目的のために、5 μ g/mL Hb A G E または熱変性 B S A を攪拌しながら室温で1時間被覆した(Greiner Microlon高結合性プレート)。プレートを遮蔽試薬(Roche)で遮蔽した。I g I V 調製物の希釈シリーズの結合性を前記のように評価した。Hb A G E セファロースからの溶出 I g I V およびコントロール セファロースからの溶出 I g I V 中における I g I V の相対量を I g I V ストックに関して計算した。この目的のために、Hb A G E と結合したまたは熱変性 B S A と結合した I g I V の希釈シリーズの標準曲線を作製した。被覆 Hb A G E との結合性に関する Hb A G E セファロースからの溶出 I g I V の富化は、120 μ L セファロースとインキュベートされた I g I V を用いて評価した。熱変性 B S A との結合性に関する富化は、20 μ L セファロースとインキュベートされた I g I V で評価した。

【0116】

I g I V およびモノクローナル抗ミスフォールドタンパク質抗体の混合物による故クロイツフェルト・ヤコブ病患者の脳切片の免疫組織化学染色

散发性 C J D または新変種 C J D の故クロイツフェルト・ヤコブ病(C J D)患者の脳切片の免疫組織化学染色のために、パラフィン切片を作製した(Dept.of Pathology, University Medical Center Utrecht, The Netherlands)。切片を次のステップからなる標準染色操作に適用した: 1. 固定切片を遮蔽緩衝液で遮蔽し、2. クロスベータ構造コンホメーションのミスフォールドタンパク質に親和性をもつ I g I V またはモノクローナル抗体とインキュベートし、結合用緩衝液で希釈し、3. 洗浄し、4. 抗ヒト I g G 抗体および抗ネズミ I g G / I g M 抗体と各々インキュベートし、5. 洗浄し、6. Powervision とインキュベートし、7. 洗浄し、8. D A B で染色し、および9. 封入およびマウントし、顕微鏡検査およびスコアリング前に酸処理で除染した。U M C Utrecht (オランダ) に所在の、T S E 汚染物質の作業用に整備された公認カテゴリーIII研究所で、有資格者により操作が行われた。コントロールとして、切片を t P A、ネズミモノクローナル抗 t P A 抗体および Powervision と連続インキュベートし、次いで D A B 染色した。染色操作のコントロールとして、故アルツハイマー病患者の脳切片も I g I V または t P A とインキュベートし、次いで同操作を上記のように行った。

【0117】

結果 & 考察

実施例1: I g I V (ヒト免疫グロブリン I g G 抗体) はクロスベータ構造コンホメーションを含んでなるミスフォールドタンパク質と結合する

炭水化物によるタンパク質の非酵素修飾、グリケーションと称されるプロセスは、アミロイドクロスベータ構造の形成に伴いタンパク質ミスフォールディングを誘導する(Bouma et al., 2003)。固定グリケート化タンパク質 Hb A G E および B S A A G E と非

グリケート化 H b および B S A への I g I V の結合性を、E L I S A セットアップを用いて確かめた (図 1 A ~ C)。アルカリ性ホスファターゼ標識抗ヒト I g G または I g M 抗体を用いて I g I V の結合を検出した。I g I V (I) および I g I V (II) は双方ともクロスベータ構造を含んでなるグリケート化タンパク質と高親和性で結合したが、一方それらは固定天然アルブミンおよび天然ヘモグロビンとは弱く結合した (図 1 A ~ C)。固定タンパク質への I g I V (I) の親和性は I g I V (II) より高かった。H b A G E への I g I V (I) の親和性は B S A A G E の場合より高かった。アルブミンまたはヘモグロビン調製物に応じて、おそらくミスフォールドタンパク質に親和性をもつ I g I V 抗体に結合部位を曝す非天然コンホメーションの分子の量が様々であるため、やや変動量の I g I V がこれらの ' 天然 ' タンパク質と結合したのであろう。

10

【 0 1 1 8 】

組織型プラスミノゲンアクチベーターは、クロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質と特異的に相互作用する、フィンガードメインと称されるモジュールを含有したセリンプロテアーゼである (Kranenburg et al., 2002; Gebbink et al., 2005)。被覆グリケート化タンパク質へ 15 μ g / mL の準最適濃度での I g I V (I) の結合性は t P A の濃度シリーズで効果的に減少するが、一方トランケート K 2 P t P A は I g I V (I) 結合性に影響を有しない (図 1 D)。t P A は、グリケート化タンパク質と比較的高い親和性 (約 500 pM の k D) で、およびクロスベータ構造を含んでなるアミロイド様タンパク質コンホメーションの他の多くのミスフォールドタンパク質とやや低い親和性で、おそらく K 2 P t P A で欠いているそのフィブロンectin I 型ドメインを介して結合することが知られている。t P A と同様に、アミロイド特異的色素コンゴレッドも被覆グリケート化タンパク質への 15 μ g / mL I g I V (I) の結合を効果的に遮蔽する (図 4 A)。

20

【 0 1 1 9 】

クロスベータ構造をもつタンパク質のアミノ酸配列に限定されることなく、いかなるミスフォールドタンパク質とも I g I V が広範囲特異性を有するかどうかを評価するために、熱変性 M S A、オボアルブミンおよびグルカゴンと、酸化オボアルブミン、グルカゴン、ヘモグロビンおよび L D L、およびコントロール非酸化または非熱変性対応物を I g I V 結合性について解析した。この目的のために、すべてのタンパク質を 50 mM N a H C O₃ 中 25 μ g / mL 濃度 (グルカゴン: 12.5 μ g / mL) で Greiner microlon 高結合性プレートに固定させ、I g I V (I) の濃度シリーズ、P B S / 0.1% v / v T w e e n 20 中 0 / 1 / 3 / 9 / 27 / 81 / 243 / 729 μ g / mL で覆った。

30

【 0 1 2 0 】

結論として、これらの結果は、クロスベータ構造コンホメーションを含んでなる固定ミスフォールドタンパク質と I g I V が結合することを証明している。これらの発見を更に確証するために、一連のミスフォールドタンパク質との結合性を評価する。例えば、酸化タンパク質、熱変性タンパク質、(生体適合性)表面、例えば体外循環装置へ暴露時に変性されたタンパク質、疾患関連ミスフォールドタンパク質 (例えば、アミロイド (アルツハイマー病); 2 ミクログロブリン (透析)) への I g I V の結合性を取り扱う。

40

【 0 1 2 1 】

実施例 2 : 血小板凝集はアミロイド様ミスフォールドタンパク質により誘導され、ヒト I g I V およびネズミモノクローナル抗体により阻害される

外見上健康なヒトボランティアの新鮮採取加クエン酸血液から単離された血小板は、H b A G E で異なる個体 3 例 (ドナー ' A ', ' B ', ' C ') からの血小板について示されているように、ミスフォールドグリケート化タンパク質へ曝されたとき直ちに凝集する (図 2)。ミスフォールドタンパク質 H b A G E または B S A A G E を、I g I V (I) (図 2 A, C) またはクロスベータ構造コンホメーションを含んでなるミスフォールドタンパク質に親和性をもつ 5 種モノクローナル抗体の混合物 (2 E 2 B 3 D 1 2、7 H 2 H 2、7 H 1 C 6 A 7、7 H 9 B 9、8 F 2 G 7 H 7) (図 2 E, F) とブレインキ

50

ュベートしたとき、血小板凝集が阻害される。コラーゲンまたはT R A Pによる血小板凝集の誘導はI g I V (I)または混合モノクローナル抗体によりほとんど影響されず(図2 B , D)、このことはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質により媒介される効果をモノクローナル抗体が特異的に阻害することを示している。

【 0 1 2 2 】

ヒトドナーDおよびEの血小板を用いた別シリーズの実験において、血小板凝集を50 μ g / mL A により誘導した(図3)。アミロイド誘導凝集に及ぼす2 . 5 mg / mL I g I V (I)またはモノクローナル抗体混合物の影響を取り扱った(図3)。I g I V (I)およびモノクローナル混合物は双方とも、異なるドナー2例(DおよびE)の血小板でアミロイド誘導血小板凝集を阻害する。ドナーDはA による刺激でドナーEより高い最終凝集%を示す。両ドナーで、I g I V (I)は血小板凝集の開始を約2分間遅らせる。A およびI g I V 双方とインキュベートされたドナーDの血小板は、A とのインキュベートと比較したとき、最終的に同程度で凝集する。ドナーEの血小板では、A へのI g I Vの添加が血小板凝集の強い阻害をもたらす。4 μ M T R A Pを陽性コントロールとして適用した。コントロール実験では、血小板のT R A P活性化に及ぼすI g I Vまたはモノクローナル抗体の影響を、T R A Pストックをモノクローナル抗体の混合物とブレインキュベートすることにより解析した。これらの凝集実験は、I g I Vまたはモノクローナル抗体がT R A P誘導性凝集に影響を与えないことを示した(示さず)。

10

【 0 1 2 3 】

これらの結果は、グリケート化タンパク質およびクロスベータ構造を含んでなるA により誘導される血小板凝集を阻害する抗体をヒトI g I Vが含有していることを示している。モノクローナル抗ミスフォールドタンパク質抗体の混合物は、ヒトI g I V治療溶液中で抗ミスフォールドタンパク質抗体の存在を示唆する類似阻害活性を示す。様々なミスフォールドタンパク質が、血小板凝集を誘導しうるそれらの能力に関して今回は試験される。その後で、ヒトI g I Vまたはネズミ抗ミスフォールドタンパク質抗体の影響が、現発見を確認するために取り扱われる。血小板凝集を誘導するために用いられる別なミスフォールドタンパク質は、酸化タンパク質、(熱)変性タンパク質、グリケート化タンパク質、変性表面または変性分子、例えばC p G O D Nに曝されたタンパク質、リポ多糖、デキストラン硫酸、カオリン、ガラス、脂質、またはアミロイドペプチド、例えばF P 6、アミロイド、F P 13であるが、それらに限定されない。

20

30

【 0 1 2 4 】

実施例3：チオフラビンTおよびチオフラビンSによる、ミスフォールドタンパク質へのI g I Vおよびt P Aの結合性の増強

2種のアミロイド特異的色素、チオフラビンTおよびチオフラビンSは比較的低い色素濃度でI g I V グリケート化タンパク質相互作用をある程度阻害し、一方比較的高い色素濃度では両色素は固定ミスフォールドタンパク質へのI g I Vの結合を促進するようである(図4 B , C)。これは、ミスフォールドタンパク質へのアミロイド特異的色素の結合がミスフォールドタンパク質への結合に親和性をもつタンパク質のそれに続く結合を促進している、という事実により説明される。チオフラビンTおよびチオフラビンS結合は、I g I Vとの結合部位を表象するクロスベータ構造コンホメーションの周辺分子または分子の一部を比較的固定された状態で安定化させる。低色素濃度のとき、これらの力は、クロスベータ構造を曝すより均一なI g I V結合部位への固定化を引き起こすにはまだ弱すぎる。今回は、色素結合がI g I V結合部位と直接競合する。高色素濃度では、結合色素分子は協同して周辺クロスベータ構造へそれらの安定化力を発揮し、それによりI g I Vへの易アクセス性結合部位を生み出している。固定B S A A G EまたはA への準最適濃度のt P Aの結合が考えられるとき、コンゴレッドおよびチオフラビンTの類似効果がみられる(図4 D ~ G)。ある条件下でクロスベータ構造へのアミロイド特異的分子の結合がミスフォールドタンパク質に特異的のある他の分子の結合を促進するという観察は、抗体のような薬物の効力を改善し、アミロイドーシスのようなタンパク質ミスフォールディング疾患を治療するために用いられる。

40

50

【 0 1 2 5 】

実施例 4 : アミロイド様クロスベータ構造コンホメーションのリガンドに親和性をもつタンパク質と結合するためのミスフォールドタンパク質 セファロースアフィニティマトリックス

C N B r セファロースマトリックスへの徹底グルコース 6 リン酸グリケート化ヘモグロビン、H b A G E の固定化は、溶液から t P A を捕捉するために効率的なアフィニティマトリックスをもたらした (図 5) 。 t P A はミスフォールドタンパク質アフィニティマトリックスと特異的に結合することが示されている (図 5 A) 。 t P A インキュベート H b A G E ミスフォールドタンパク質親和性セファロースマトリックスまたはカップリングタンパク質のない t P A インキュベートコントロールマトリックスとの洗浄緩衝液のインキュベート後に洗浄緩衝液の t P A 含有率を解析することにより、これは更に解明される (図 5 B) 。 t P A セリンプロテアーゼ活性は H b A G E セファロース洗浄後に洗浄緩衝液でほとんど回収されず、少しの t P A 活性が t P A インキュベートコントロールピーズ洗浄後に洗浄緩衝液で見られる。溶出用緩衝液との t P A インキュベートアフィニティマトリックスとコントロールマトリックスのインキュベート後、溶出用緩衝液中 t P A 活性の回収の解析では H b A G E セファロースが t P A の効率的および選択的アフィニティマトリックスであることを示している (図 5 C) 。

10

【 0 1 2 6 】

次シリーズの実験では、ミスフォールドタンパク質と結合するタンパク質用の H b A G E セファロースアフィニティマトリックスを、ミスフォールドタンパク質と特異的に結合する I g I V 中のフラクションを捕捉するために用いた。H b A G E セファロースと特異的に結合した I g I V を固定 H b A G E および熱変性 B S A との結合性について E L I S A で試験した。最初に、希釈シリーズの I g I V ストックの標準曲線を、タンパク質染色剤 A D V 0 1 を用いて作製した (図 5 D) 。アフィニティマトリックスと接触後およびアフィニティマトリックスから結合タンパク質の溶出後における I g I V 濃度を、I g I V 標準曲線を用いて調べた。同様に、固定 H b A G E または熱変性 B S A への希釈シリーズの I g I V ストックの結合性に関する標準曲線を作製した (図 5 E , H) 。アフィニティマトリックスまたはコントロールマトリックスと接触後の I g I V および溶出物中における相対 I g I V 濃度を、標準曲線を用いて I g I V 濃度を計算することにより調べた。これらの計算 I g I V 濃度を、A D V 0 1 染色剤を用いて直接調べられた I g I V 濃度と比較した。これらの値で、ミスフォールドタンパク質への I g I V の特異的結合性に関する富化ファクターを計算する。

20

30

【 0 1 2 7 】

図 5 F では、被覆 H b A G E への 1 0 0 0 倍希釈 I g I V ストック (5 0 μ g / m L) および H b A G E セファロースまたはコントロール セファロースと接触させた I g I V の結合性が示されている。H b A G E 結合性は I g I V を H b A G E マトリックスと接触させた後で約 5 0 % 減少し、一方 I g I V をコントロールマトリックスと接触させた後でシグナルの減少は観察されない。H b A G E マトリックスまたはコントロールマトリックスと接触後の全タンパク質濃度は 5 5 および 6 0 m g / m L であった。5 0 m g / m L の最大予測値 (出発物質) からのこれら偏差は、標準曲線の非直線性に起因している。H b A G E セファロースおよびコントロールマトリックスから溶出した I g I V フラクションには、A D V 0 1 タンパク質染色剤で調べると、各々 1 2 0 および 7 μ g / m L I g I V が存在していた。固定 H b A G E への 1 0 0 倍希釈溶出物の結合性を評価したとき、観察されたシグナルは約 7 5 および 0 . 3 m g / m L I g I V ストックの結合後に得られたシグナルに相当した (図 5 G) 。したがって、結論として、1 2 0 μ g / m L の H b A G E セファロースアフィニティマトリックス富化 I g I V は、約 7 5 m g / m L の原 I g I V ストックに相当する効力で H b A G E と結合する。これは約 7 5 , 0 0 0 / 1 2 0 = 6 0 0 倍の富化ファクターに相当する。図 I では、I g I V と H b A G E セファロースまたはコントロールマトリックスとの接触が、出発物質と比較したとき、固定熱変性 B S A への I g I V 結合性の評価後に得られたシグナルを減少さ

40

50

せていないことがわかる。しかしながら、Hb A G Eマトリックスから溶出された120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ I g I Vが熱変性B S Aとの結合性に関して試験されたとき、シグナルが1.7 mg/mL 出発物質(原I g I Vストック)の結合後に得られたシグナルに相当した(図5 J)。これは、I g I Vとミスフォールドタンパク質アフィニティマトリックスとの接触が熱変性B S Aへの親和性を約 $1700/120 = 14$ 倍で増加させていることを示している。

【0128】

アフィニティマトリックスの選択性、親和性、能力および/または安定性を改善するために、Hb A G Eに代わる他のミスフォールドタンパク質がマトリックスへ固定される。固定される代わりにミスフォールドタンパク質は、酸化タンパク質、(熱)変性タンパク質、グリケート化タンパク質、変性表面または変性分子、例えばC p G O D Nに曝されたタンパク質、リポ多糖、デキストラン硫酸、カオリン、ガラス、脂質、またはアミロイドペプチド、例えばF P 6、アミロイド、F P 13であるが、それらに限定されない。C N B r セファロースの代わりに、他のマトリックスまたは固体支持体がミスフォールドタンパク質リガンドの固定化に適用される。好ましくは、固体支持体はgood manufacturer practice (G M P) 条件下で作製され、好ましくは、ヒトの医療用に適合したマトリックスの安全面に関して、マトリックスは'バイオプロセス培地'と表示されている。他のマトリックス/固体支持体は、N H S セファロース、ストレプトアビジン セファロース、ラテックスビーズ、エポキシ活性化固体支持体、例えば架橋ポリメタクリレート、活性化チオールセファロース、カルボキシリンク、プロフィニティエポキシドであるが、それらに限定されない。

10

20

【0129】

特定疾患に關与するミスフォールドタンパク質を用いてアフィニティマトリックスが作製される。このアフィニティマトリックスで、クロスベータ構造コンホメーションの疾患関連ミスフォールドタンパク質と結合するI gが選択的に単離される。このI gフラクションの回収後、ミスフォールディング疾患用療法として用いられたときに、疾患特異的I g I Vが高度に特異的な有益的成果で得られる。I g Gを単独で含んでなるI g I Vがこの操作に適用されるのみならず、あらゆるI gフラクションが有益サブセットの抗体、例えばI g Mサブクラスの抗体の存在について試験される。I g I V富化アフィニティマトリックスの作製に適用される、病状と関連した数例のミスフォールドタンパク質は、アミロイド(アルツハイマー病)、グリケート化タンパク質(透析、糖尿病)、 α_2 ミクログロブリン(透析)、トランスチレチン(全身性アミロイドーシス)である。ミスフォールドクロスベータ構造リッチ分子を形成し、疾患特異的富化操作に用いられるタンパク質の別な例に関しては、表4および5参照。

30

40

【0130】

ミスフォールドタンパク質への高特異性および親和性をクリアランスシグナル：ミスフォールドタンパク質結合タンパク質とI gのF cドメインとのキメラと組み合わせた新規構築物

I g I V中のI g G分子とネズミモノクローナルI g G 1 / I g M / I g G 2 a抗体がクロスベータ構造コンホメーションのミスフォールドタンパク質と結合するという発見に基づき、F cレセプターとの相互作用でクリアランスしやすい能力と組み合わせられた、ミスフォールドタンパク質に更に高い特異性および/または親和性を有する新規分子がデザインされる。この目的のために、クロスベータ構造に親和性をもつフィンガードメイン(F)またはいずれか他のタンパク質ドメイン、例えば前進性グリケーション終末産物のレセプターのI gドメイン、低密度リポタンパク質レセプター関連タンパク質(のクラスターII、クラスターIV)のドメイン、スカベンジャーレセプターA、B IまたはC D 3 6のドメインが、I g分子のF c部分とD N Aレベルまたはアミノ酸レベルで融合される。事実、ミスフォールドタンパク質に親和性を有するタンパク質はいずれも、F cドメインをもつ複合体構築物にクロスベータ構造親和性を導入する上で適したドメインを供する(表4、5)。t P A、因子XII、肝細胞成長因子アクチベーターおよびフィブロネクチ

40

50

ンのフィンガードメインはすべてクロスベータ構造コンホメーションのミスフォールドタンパク質と結合し、したがってキメラ構築物のデザインにすべて用いられる。フィンガードメインのいずれかの組合せまたはマルチフィンガードメインのストレッチまたはフィンガードメインおよび他のミスフォールドタンパク質結合ドメインの組合せも、Fcドメインのあるキメラ構築物の開発に適用される。キメラ遺伝子は融合および合成され、例えば酵母細胞、植物細胞、細菌、真核細胞、例えばヒト胚腎臓細胞、ベビーハムスター腎臓細胞へ発現目的に適した発現ベクターでクローニングされる。例えば組換えFcキメラタンパク質の精製後、それはIgIVが用いられてきた疾患のいずれかで治療剤として適用される。一方、クロスベータ構造またはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質に親和性をもつアフィニティ領域または合成分子またはタンパク質（の一部）が、タンパク質（フラグメント）の（非）共有結合について当業者に知られたいずれかの方法で、例えばFc領域に融合される。更に、クロスベータ構造および/またはクロスベータ構造を含んでなる分子に親和性をもつ非タンパク質分子（表3）も、同様にFc領域へ融合される。

10

【0131】

実施例5

IgIV、アフィニティ精製富化IgIVまたはミスフォールドタンパク質結合タンパク質または分子とFcドメインとのキメラ構築物を投与する防御および/または有益効果を試験するためのモデル

IgIV、ミスフォールドタンパク質カップリングマトリックスでアフィニティ精製後の富化IgIVフラクション、（ヒト化）抗ミスフォールドタンパク質抗体、または例えばフィンガードメインとIgG分子のFcドメインとのキメラ構築物の有益効果を試験するために、病状のいくつかのインビトロ細胞ベースモデルおよびインビボ動物またはヒトモデルが、このようなモダリティが全IgIVの投与よりまたは現標準療法より顕著な有益効果を有するかどうかを調べるために適用される。

20

【0132】

インビトロネズミ樹状細胞アッセイ

（自己）免疫は、樹状細胞のような抗原提示細胞による（自己）抗原の提示に依存する。培養ネズミ樹状細胞（DC）がそのため（自己）免疫原性のモデルとして適用される。この目的のため、DCを例えば8～12週齢Black-6マウスの後肢から単離する。骨を摘出し、70%エタノールでリンスし、25mM HEPES、10%胎児ウシ血清、ペニシリンおよびストレプトマイシン含有のRPMI 1640培地でリンスする。次いで骨をこの緩衝液で両方向にフラッシングする。（地元のUMC Utrecht Pharmacy Dept.から得られた、カタログ番号97932329）赤血球特異的溶解用緩衝液を加えることにより、赤血球から溶出物を回収する。溶出物を細胞培養プレートで培養することにより、それらを生存細胞について解析する。この段階で、培地を10ng/mL GM-CSFで富化させる。DCをマクロファージ細胞の懸濁液または層で増殖させる。FACSおよび特異的抗体を用いて、DCが存在して活性化されるかどうか調べる。好ましくは、いわゆる補助刺激分子、例えばB7.1、B7.2、MHCクラスII、CD40、CD80、CD86のレベルを、好ましくはCD11c陽性細胞で調べる。一方、NF- κ Bの活性化および/またはサイトカインの発現を、免疫原に関連する細胞、例えばAPCおよびDCの活性化の指標として用いる。好ましくは、次のサイトカインを定量する：TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-6および/またはIFN- γ 。好ましくは、サイトカインレベルをELISAで定量する。一方、mRNAレベルを定量する。当業者であれば、APCおよびDCの機能も試験されることが明らかである。

30

40

【0133】

一方、クロスベータ構造のミスフォールドタンパク質の枯渇または中和の有益効果を試験するために、安定DC系、ヒト血液から集められた単球から得られた培養樹状細胞または他の抗原提示細胞が用いられる（Citterio et al., 1999）。

【0134】

DCで行われる更なる実験は、リポ多糖（LPS）への細胞の暴露、次いで前記活性化

50

マーカーのレベルの読み取りである。DCへのLPSの暴露前または中におけるLPSと(富化)IgIVおよび/または他のアフィニティ領域とのプレおよび/またはインキュベートの効果も試験する。これらの実験はヒトで細菌感染症および敗血症のモデルとしてみられる。

【0135】

インビトロヒト臍静脈内皮細胞アッセイ

クロスベータ構造を含んでなるグリケート化タンパク質は、糖尿病性ネフロパシーを含めたある疾患の発病に関与すると考えられている、炎症応答を誘導する。一般的に、ミスフォールドタンパク質は炎症シグナルの高発現または活性化で細胞機能障害を誘導する。内皮細胞機能(障害)に及ぼすミスフォールドタンパク質の効果は、例えばミスフォールドタンパク質に応答した反応性酸素種のレベルを調べることにより測定される。標準プロトコールに従い単離および培養されたヒト臍静脈内皮細胞、または他の内皮細胞、例えばbEnd.3内皮細胞を用いる。反応性酸素種(ROS)のレベルはCM-H₂DCF-DAのような蛍光プローブを用いてモニターする。一方、細胞生存はMTTアッセイによりモニターする。培養一次細胞は、ある病状のモデル系として研究界で受け入れられたインビトロ細胞アッセイを行う機会を提供する。再度、IgIV、その単離フラクション、機能的相当物または我々の抗クロスベータ抗体の能力がこれらの系に適用される。

10

【0136】

汎発性血管内凝固のインビボネズミモデル

クロスベータ構造は汎発性血管内凝固(DIC)を誘導する。DICのモデルとして、雌性C57B1/6マウスで全身性シュワルツマン反応を誘発させる。この目的のため、マウスを0日目に足蹠で5μgリポ多糖(LPS)およびt=24hで静脈内に300μg LPSで注射する。経時的に、タンパク質、例えばサイトカインのいくつかの血漿レベルと一緒に、生存をモニターする。

20

【0137】

インビボマウス/ラット実験的自己免疫脳脊髄炎モデル

抗ミスフォールドタンパク質抗体が多発性硬化症(MS)再発時に有益効果を発揮するかどうかを試験するために、MSのインビボマウスモデル、実験的自己免疫(またはアレルギー)脳脊髄炎(EAE)モデルを用いる。この目的のため、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)またはミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質ペプチド35-55(MOG35-55)をマイコバクテリア含有の不完全フロイントアジュバント(IFA)で乳化させる。チオフラビンTおよびコンゴレッド蛍光アッセイ並びにtPA結合および活性化アッセイを用いて、ミスフォールドタンパク質の存在を調べる。乳化MBPまたはMOG35-55へのIgIVまたはアフィニティ精製後IgIVの富化フラクションの結合性を評価する。マウスまたはラットでEAEを誘導するために、乳化MBPまたはMOG35-55を例えば後足蹠に注射する。マウスでは、皮下注射量のMOG35-55に好ましくはBordetella pertussis毒素の腹腔内注射を付随させ、これを48時間後に繰り返す。例えば、Lewis雌性ラットまたは雌性Balb/cマウスを用いる。臨床疾患の尺度は例えば次のようにスコアリングする: 0, 正常; 1, だらんとした尾; 2, 立直り反射の障害; 3, 後肢の不全麻痺; 4, 後肢の完全麻痺; 5, 死亡。EAE誘導後に1以上の時点で薬物を投与することにより、あらゆる(キメラ)抗体調製物の効果を解析する。試験される調製物の1つは、固定変性/ミスフォールドMBPまたはMOG35-55含有のアフィニティマトリックスでアフィニティ精製されたIgIVであり、それに応じて2種のタンパク質が疾患を誘導するために用いられる。

30

40

【0138】

インビボコラーゲン誘導関節炎モデル

インビボコラーゲン誘導関節炎モデルでは、酢酸に溶解されてIFAで乳化されたII型(ウシ)コラーゲンでラットの尾の付け根および各肢の裏側に皮下注射する。腫脹および紅斑をモニターすることにより、徴候についてラットを毎日検査する。試験される調製物の1つは、IFA中固定変性/ミスフォールドコラーゲン含有のアフィニティマトリックス

50

スでアフィニティ精製された I g I V である。

【 0 1 3 9 】

インビボマウス敗血症モデル

敗血症はクロスベータ構造により媒介される。I g I V、モノクローナル抗体または関連薬物の効果を試験するために適用されるインビボマウス敗血症モデルの1つは、'盲腸結紮および穿刺'モデルである。この目的のために、雌性 B a l b / c マウスを麻酔してから、盲腸を腹部外に取り出すために腹部切開を行う。盲腸を穿刺した後、ある量の管腔内容物を穿孔から外に移してから、盲腸を腹部に戻し、開口部を閉じる。体温を測定し、マウスの動きをスコアリングすることにより、感染の進行をモニターする。マウスが低体温 ($T < 33$) であるとき、およびマウスが自ら立直りできないときは、マウスを致死的に感染したとみなす。クロスベータ構造コンホメーションのミスフォールドタンパク質に親和性の抗体を投与する効果は、盲腸の穿刺後に、未処置マウスのグループと(富化) I g I V、モノクローナル抗体またはキメラ構築物を受けたマウスのグループをモニターすることにより評価する。

10

【 0 1 4 0 】

インビボラット敗血症モデル

マウス敗血症モデルの代わりとして、ラット敗血症モデルを用いる。例えば、15 mg / kg Escherichia coli 内毒素の静脈内注射により、約 150 g の Fischer ラットで内毒素ショックを誘導する。疾患進行の尺度として、E L I S A で血中組織壊死因子およびインターロイキン 1 のレベルをモニターする。アンフォールドタンパク質に親和性をもつ I g I V または抗体またはキメラ構築物のいずれかの調製物による治療の効果をこうして評価する。

20

【 0 1 4 1 】

インビボマウス再活性化 Streptococcus 細胞壁誘導関節炎モデル

再活性化 Streptococcus 細胞壁誘導関節炎のインビボマウスモデルでは、Streptococcus pyogenes T 1 2 生物の細胞壁の膝関節における関節内注射で、C 5 7 B L / 6 マウスを誘導する。注射は1週間隔で5回繰り返す。疾患進行は、例えば注射膝関節の腫脹を測定することで、約 40 日間追跡する。マウスを殺した後、膝関節から皮膚を切除した後で、関節炎の程度を肉眼でスコアリングする。抗クロスベータ構造抗体またはキメラを投与した効果は、治療を受けなかったコントロール、および緩衝液で注射されたコントロールマウスと比較する。

30

【 0 1 4 2 】

インビボマウス実験的リウマチ様関節炎モデル

実験的コラーゲン誘導リウマチ様関節炎のインビボマウスモデルにおいて、例えば D B A / 1 株の雄性マウスおよび/または C 5 7 B L / 6 株の雄性マウスを天然ウシコラーゲン II 型で侵襲する。Mycobacterium tuberculosis 含有の完全フロイントアジュバントで乳化されたコラーゲンを尾の付け根で皮下注射することにより、関節炎を誘導する。I F A で乳化されたコラーゲンで 21 日目にマウスをブーストする。マウスを関節炎の徴候についてモニターし、標準スコアリング操作を用いて疾患の程度をスコアリングする。関節炎のコントロールマウスおよび緩衝液のみで 2 回注射されたコントロールマウスを関節炎誘導後の I g I V / モノクローナル抗体 / キメラ構築物処置マウスと比較することにより、抗体ベース療法の効果を評価する。

40

【 0 1 4 3 】

インビボヒト炎症 / 免疫原性モデル : グリケート化タンパク質 + / - I g I V の投与

クロスベータ構造を含んでなるグリケート化タンパク質は、糖尿病性ネフロパシーを含めたある疾患の発病に関与する、炎症応答を誘導する。一般的に、ミスフォールドタンパク質は炎症シグナルの高発現または活性化で細胞機能障害を誘導する。ミスフォールドタンパク質の炎症効果および抗クロスベータ構造試薬、例えば I g I V、そのフラクション、または機能相当炎症をマウスおよびヒトで研究する。クロスベータ構造を含んでなるタンパク質を静脈内投与により注入する。異なる時間間隔で、急性期タンパク質、例えば C

50

反応性タンパク質、血清アミロイド A (SAA)、血清アミロイド P 成分 (SAP) または補体因子 3 (C3) のレベルに及ぼす効果を測定する。一方、炎症の他のマーカー、例えば IL-6、IL-8、D-ダイマーまたはプロトロンビン F1+2 レベルに及ぼす効果を調べる。最後に、(自己)抗体形成のレベルを ELISA で調べる。

【0144】

化合物の炎症性または免疫原性の測定のための全血アッセイ

クロスベータ構造コンホメーションのタンパク質による免疫系の細胞の活性化がクロスベータ構造結合化合物、例えば IgIV、モノクローナル抗クロスベータ構造抗体、キメラ構築物を用いて遮蔽されるかどうかを評価する 1 手法は、'全血'アッセイの使用による。この目的のため、1 日目に新鮮採血ヒト EDTA 血液を 37 で予熱された RPMI 1640 培地 (HEPES 緩衝化, L-グルタミン, Gibco, Invitrogen, Breda, オランダ) へ 1:1 比で加える。その後で、クロスベータ構造コンホメーションを含んでなるタンパク質を、クロスベータ構造結合化合物と共にまたはそれなしで加える。好ましくは、陽性コントロール、好ましくは LPS を含める。LPS に用いられるインヒビターは、5 µg/mL 最終濃度のポリミキシン B である。試験される標準クロスベータ構造コンホメーションリッチポリペプチドは、A、アミロイド グロブリン、グリケート化タンパク質、FP13、熱変性OVA、熱変性BSA、熱変性MSA、熱変性リゾチームおよびカルジオリピンに曝された 2 g pi である。陰性コントロールは、天然 グロブリン、天然アルブミン、天然Hb、新鮮溶解A またはFP13、天然OVA、他の天然タンパク質である。コントロールとして、推定内毒素汚染のせいでみられる効果を排除するために、すべてのタンパク質サンプルを 5 µg/mL ポリミキシン B の不在または存在下で試験する。加えて、単独のまたは変性アジュバント、例えば LPS および CpG ODN、または他の変性化合物または変性条件 (例えば、Cu²⁺ 酸化) に事前暴露された天然タンパク質を、免疫原活性について試験する。すべての前記試験化合物を炎症または免疫原性応答のポテンシャルインヒビター、例えば IgIV、モノクローナル抗クロスベータ抗体の濃度シリーズの不在および存在下で試験する。血液 培地混合物へ加えられるアクチベーター、コントロールおよびポテンシャルインヒビターの最終容量は全容量の約 1/200 である。より高濃度のアクチベーターおよび推定インヒビターは、前希釈ステップに濃縮 RPMI 1640 培地 (RPMI 1640 Medium 粉末, Gibco, Invitrogen; カタログ番号 51800-035) を用いることで得られる。血液および培地を慎重に混ぜ、CO₂ の取込みを行う蓋付きの CO₂ インキュベーターで一夜インキュベートする。2 日目に培地を室温にて 1000 * g で 10 分間のスピニング後に集める。細胞ペレットを凍結保存する。培地を再び室温にて 2000 * g で 20 分間スピンさせる。免疫応答のマーカー、例えば組織壊死因子 (TNF)、サイトカイン、ケモカインの濃度に関しては ELISA を用いて上澄を解析する。例えば、市販 TNF アルファ / TNF SF1A ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Human TNF アルファ Quantikine HS PharmPak) を用いることにより、試験化合物への全血の暴露後における TNF レベルを評価する。陽性および陰性コントロールと信頼しうる滴定曲線が確立されたら、免疫原性のマーカーの濃度に及ぼすクロスベータ構造負荷に関していずれの溶液も試験する。更に、免疫応答の推定インヒビターを試験する。例えば、IgIV およびモノクローナル抗クロスベータ抗体はミスフォールドタンパク質溶液への添加で免疫応答を妨げる。

【0145】

クロス 構造含有部分の食作用

クロス 構造含有タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドと細胞または細胞粒子の取込み、並びに IgIV またはその機能相当物の効果を、培養細胞、好ましくは単球、樹状細胞、マクロファージまたは類似細胞、例えば U937 または THP-1 細胞を用いてインピトロで研究する。好ましくは、クロス 構造含有分子を、好ましくは 125I または蛍光標識、好ましくはリンカー分子、好ましくは ULS (universal Linkage system) または類似カップリング方法で分子に共有結合された FITC で標識する。細胞は

、好ましくはメパクリンまたは他の蛍光標識、例えばローダミンで標識する。食細胞を標識クロス 構造含有分子の存在下で、または細胞をクロス 構造結合化合物、例えば I g I V またはその機能相当物の存在または不在下でインキュベートする。インキュベート後、好ましくは数時間中に、好ましくはシンチレーションカウンター（125I の場合）を用いてまたは F A C S 解析（蛍光プローブで）または免疫蛍光顕微鏡検査により、標識分子または細胞の取込みを測定する。細胞の取込みは、細胞の目視染色により光学顕微鏡下でもカウントされる。

【0146】

実施例 6 ~ 20

実施例 6 ~ 20 の一般的物質および方法

クロスベータ構造をもつミスフォールドタンパク質の調製

ヒト I g I V のミスフォールディング

I g I V Gammagard R F (I g I V R F)

リウマトイド因子 (R F) の抗原を調製するために用いられた操作に従い、I g I V Gammagard (天然 I g I V) をミスフォールドさせた。I g I V Gammagard を無菌条件下でグリシン緩衝液 (100 m M グリシン , 17 m M N a C l p H 8 . 2) 中 1 m g / m L に溶解させた。それを 65 °C で 5 分間加熱し、- 80 °C で保存した。

【0147】

I g I V Gammagard の熱変性 (I g I V 65 , I g I V 69 , I g I V 76 など)

I g I V Gammagard を無菌条件下 20 m M リン酸ナトリウム p H 5 . 0 で 5 m g / m L に溶解し、25 °C から指示温度まで 5 °C / m i n の温度ステップで熱変性させた。最終温度は 65 °C 、 69 °C 、 76 °C 、 80 °C 、 83 °C および 86 °C であった。熱変性後、タンパク質を - 80 °C で直ちに保存し、下記のような様々なアッセイを用いてそれらの構造を解析した。天然コントロールとして、新鮮溶解 I g I V Gammagard を 20 m M リン酸ナトリウム p H 5 . 0 中 5 m g / m L の濃度で室温にて 10 分間保ち、- 80 °C で保存した。

【0148】

I g I V Gammagard の H F I P / T F A 変性 (I g I V H F I P / T F A)

I g I V Gammagard を無菌条件下 1 , 1 , 1 , 3 , 3 , 3 -ヘキサフルオロ 2 -プロパノール (H F I P) およびトリフルオロ酢酸 (T F A) の 1 : 1 (v / v) 混合液で 5 m g / m L に溶解した。その後で、それをボルテックスにて室温で 5 分間よく混ぜた。有機溶媒を N₂ ガス下で蒸発させ、乾燥物質を H₂O で 1 m g / m L に溶解し、37 °C で 7 日間インキュベートし、- 20 °C で保存した。

【0149】

I g I V Gammagard の酸または塩基変性 (I g I V 酸 , I g I V 塩基)

I g I V Gammagard を P B S で 5 m g / m L に溶解し、ローラー装置にて室温で 10 分間インキュベートした。次いで、pH を H₂O 中 15 % H C l ストックのある容量の添加により p H 2 へ下げ (酸変性) 、または H₂O 中 5 M N a O H ストックのある容量で p H 11 へ上げ (塩基変性) 、37 °C で 30 分間インキュベートした。次いで、pH を各々 5 M N a O H または 15 % H C l の添加でその初期生理的値に調整し、- 80 °C で保存した。

【0150】

Octagam I g I V のミスフォールディング

Octagam I g I V (Octapharma , Brussel , Belgium , ロット 5024018434 , 期限 12 / 2006) を用いた。I g I V 中の内毒素濃度は低く、即ち標準化 Limulus Amebocyte Lysate (L A L) アッセイ (Cambrex) を用いて調べると 50 m g / m L Octagam ストック中 0 . 13 E . U . / m L であった。I g I V を 10 m M N a P i 緩衝液 (p H 8 . 1) で 1 , 2 . 5 , 5 , 10 および 20 m g / m L に希釈し、25 °C から 65 °C へ段階的に加熱し (0 . 5 °C / m i n) 、室温で 1 時間 40 分保ち、その後で - 80 °C で保存した。一方、I g I V を 10 m M H C l p H 2 . 0 で希釈し、65 °C で 6 時間インキュ

10

20

30

40

50

ベートした。このインキュベート後に、pHをNaOHで7.3に調整した。

【0151】

マウスIgGの組成物の酸または塩基変性 (dmIgG酸, dmIgG塩基)

マウスIgG (m グロブリン, cohn画分II,III約99%から, Sigma, ロット090k7680) をPBSで1mg/mLに溶解し、ローラー装置にて室温で20分間インキュベートした。IgIV酸およびIgIV塩基に関して前記された方法に従いIgGをミスフォールドさせた。ミスフォールドm グロブリンはdmIgGまたはdm グロブリンと称される。

【0152】

熱によるマウスIgGのミスフォールディング (dmIgG85)

マウスIgG組成物をPBSで1mg/mLに溶解し、ローラー装置にて室温で20分間インキュベートした。次いで、それを25 から85 へ5 /minのステップで加熱し、その後で-80 で保存した。

【0153】

ヒトIgGの組成物のミスフォールディング

ヒトIgG (グロブリン, Sigma, G4386) をHEPES緩衝液 (20mM HEPES, 137mM NaCl, 4mM KCl, 3mM CaCl₂) で5mg/mLに溶解した。次いで、pHを5M NaOHストックからある容量を加えることにより上げ、37 で40分間保った。次いでpHをその初期値へ調整するために5M HClストックから等量を加え、-80 で保存した。大凝集物を色素で観察した。

【0154】

アポリポタンパク質A Iの酸および熱変性

10mM NH₄HCO₃ および100mMまで加えられたHCl中アポリポタンパク質A I (ApoA I, 2.15mg/mL, ヒト血漿から, Sigma, A0722, ロット116K1408) を37、75 または100 で30分間加熱することにより変性させた。その後で、pHを初期値へ変えるために相当量のNaOH (100mM最終濃度) を加えた。

【0155】

塩基および熱変性アポリポタンパク質A I

再び、今回は100mMまで加えられたNaOH含有の10mM NH₄HCO₃ 中2.15mg/mLアポリポタンパク質A Iを37、75 または100 で30分間加熱することにより変性させた。その後で、pHを初期値へ変えるために相当量のHCl (100mM最終濃度) を加えた。

【0156】

熱変性アポリポタンパク質A I

10mM NH₄HCO₃ 中2.15mg/mLアポリポタンパク質A I (ApoA I) ストックを75 または100 で30分間かけて熱変性させた。

【0157】

オボアルブミンの熱変性 (dOVA std)

オボアルブミン (OVA, ニワトリ卵白から, Sigma, A5503グレード, ロット07147094) を1mg/mLの濃度でPBSに溶解し、PCRマシンにおいて5 /minの温度ステップで30 から85 へ5サイクル加熱した。このミスフォールドOVAはdOVAまたはdOVA標準 (std) と称される。

【0158】

フィブリルアミロイドベータ1 42 (fA 42) の調製

凍結乾燥合成ヒトアミロイド (1 42) ペプチド (DAEFRHDSGYEVH HQKLVFFAEDEVGSNKGAIIGLMVGGVVIA; NKI Amsterdam, オランダ; 配列番号9) (A 1 42) を最初にHFIP中1mMで溶解することによりモノマー化し、無菌ミクロ遠心管に等分した。HFIPを窒素ガスで除去し、ペプチドフィルムを5mMの濃度まで乾燥ジメチルスルホキシド (DMSO, Pierce, 20684)

10

20

30

40

50

に再懸濁し、液体窒素でスナップ凍結させ、 -80°C で保存した (モノマー化 A_{1-42} 2ストック)。DMSO中解凍モノマー化 A_{1-42} ストックを $400\ \mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度で $10\ \text{mM HCl}$ に溶解し、 37°C で24時間インキュベートし、その後で -80°C で保存した。

【0159】

PBSに溶解されて $t = 0$ で -80°C に直接凍結された A_{1-42} ($A_{42 t=0}$)
DMSO中解凍モノマー化 A_{1-42} ストックをフィルター滅菌 ($0.22\ \mu\text{m}$) されたPBSで $100\ \mu\text{M}$ の濃度に溶解し、 -80°C で保存した。

【0160】

HBSに溶解されて 4°C で24時間インキュベートされた A_{1-42} ($A_{42 HBS}$)

DMSO中解凍モノマー化 A_{1-42} ストックをHBS (HEPES緩衝液, $137\ \text{mM NaCl}$, $4\ \text{mM KCl}$, $10\ \text{mM HEPES}$, $\text{pH}7.3$) で $100\ \mu\text{M}$ の濃度に溶解した。緩衝液は使用前に $0.22\ \mu\text{m}$ シリンジフィルターで濾過する。サンプルを調製後 -80°C で保存した。

【0161】

フィブリルアミロイドベータ 1_{40} (fA_{40}) の調製

A_{1-42} と同様に、モノマー化合成ヒト A_{1-40} ペプチド (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV, NKI Amsterdam, オランダ) のストックを調製し、 -80°C で保存した。DMSO中解凍モノマー化 A_{1-40} をPBSで $100\ \mu\text{M}$ の濃度に溶解し、室温で168時間インキュベートし、その後で -80°C で保存した。

【0162】

PBSに溶解されて $t = 0$ で -80°C に直接凍結された A_{1-40} ($A_{40 t=0}$)
DMSO中解凍モノマー化 A_{1-40} をPBSで $100\ \mu\text{M}$ の濃度に溶解し、直接 -80°C で保存した。

【0163】

$10\ \text{mM HCl}$ に溶解されて 37°C で24時間インキュベートされた A_{1-40} ($A_{40 HCl}$)

DMSO中解凍モノマー化 A_{1-40} を $10\ \text{mM HCl}$ で $100\ \mu\text{M}$ の濃度に溶解し、 37°C で24時間インキュベートした。その後で、それを過剰PBS1 ($140\ \text{mM NaCl}$, $10\ \text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1.8\ \text{mM KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH}7.4$; PBS1は使用前に $0.22\ \mu\text{m}$ シリンジフィルターを用いて濾過する) で中和し、 -80°C で保存した。

【0164】

ヒト血清アルブミン (HSA, Cealb, Sanquin, オランダ, ロット05C29H120A) のミスフォールディング

1、2.5、5、10および $20\ \text{mg}/\text{mL}$ 、($5\ \text{M HCl}$ ストックからある容量で下げた) $\text{pH}2$ のHSAを 65°C で6時間加熱し、次いで $5\ \text{M NaOH}$ ストックからある容量で中和し、その後 -80°C で保存した。

【0165】

透過型電子顕微鏡検査 (TEM)

Jeol 1200 EX透過型電子顕微鏡 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) を用いて $80\ \text{kV}$ の励起電圧でTEM像を集めた。各サンプルについて、formvarと $100\ \mu\text{m}$ メッシュ銅またはニッケルグリッドの炭素被覆サイドを $5\ \mu\text{L}$ 滴のタンパク質溶液に5分間置いた。その後で、それを $100\ \mu\text{L}$ 滴のPBSに2分間置き、次いで $100\ \mu\text{L}$ 滴の蒸留水と2分間インキュベートを3回行った。グリッドを次いで 0.4% 酢酸ウラニル $\text{pH}4$ 含有の 2% (m/v) メチルセルロースの $100\ \mu\text{L}$ 滴で2分間染色した。グリッドのサイドを濾紙にストリークすることにより過剰の流体を除去し、グリッドをその後ランプ下で乾燥させた。サンプルを $10\ \text{K}$ の倍率で解析した。

10

20

30

40

50

【0166】

コンゴレッド (CR) 蛍光アッセイ

コンゴレッド蛍光の増強は、クロスベータコンホメーションのタンパク質に共通した構造的特徴を含んでなる、ミスフォールドタンパク質の特性である。コンゴレッド (CR) (Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, WI, USA, 86, 095 6) の蛍光をブラック96ウェルプレートにおいてThermo Fluoroskan Ascent 2.5マイクロプレート蛍光光度計 (Vantaa, Finland) で590 nmの発光波長および544 nmの励起波長にてデュプロ (in duplo) 測定した。タンパク質およびペプチドストックをPBS中25 μM CRでdOVAおよびIgIVサンプルの場合100 μg/mLに、A サンプルの場合40 μg/mLに希釈し、室温で5分間インキュベートした。CRなしの緩衝液およびタンパク質溶液と緩衝液中CRからのバックグラウンド蛍光を、CRとインキュベートされたタンパク質溶液の対応測定値から差し引いた。測定の陽性コントロールは100 μg/mL dOVAであった (dOVA std)。

10

【0167】

チオフラビンT (ThT) 蛍光増強アッセイ

ThT蛍光の増強は、クロスベータコンホメーションのミスフォールドタンパク質に共通した構造的特徴を含んでなる、ミスフォールドタンパク質の特性である。チオフラビンT (ThT (Sigma, St. Louis, MO, USA, T 3516) の蛍光をCRに関して記載された操作と同様に測定した。発光波長は今回485 nmおよび励起波長は435 nmであった。タンパク質およびペプチドストックを50 mMグリシン緩衝液pH9.0中25 μM ThTで希釈した。

20

【0168】

8 アニリノ 1 ナフタレンスルホン酸 (ANS) 蛍光アッセイ

疎水性アミノ アシル残基のクラスターへ結合されたとき、ANS蛍光は高められる。タンパク質の溶媒暴露疎水性領域への結合で、発光波長 (λ_{EM}) は380 nmの波長 (λ_{EX}) で励起されたとき514 nmから460 nmにシフトし、蛍光強度の劇的増強を伴う。ANS (Sigma, A 1028) の蛍光を460 nmの発光波長および380 nmの励起波長で測定した。様々な試験タンパク質およびペプチドストック溶液をPBS中40 μM ANSに溶解し、室温で5分間インキュベートした。ANSなしの緩衝液およびタンパク質溶液からのおよび緩衝液中ANSのバックグラウンド蛍光を、ANSとインキュベートされたタンパク質溶液の対応測定値から差し引いた。測定の陽性コントロールは100 μg/mL dOVA (dOVA std) であった。

30

【0169】

4, 4 ジアニリノ 1, 1 ビナフチル 5, 5 ジスルホン酸二カリウム塩 (Bis ANS) 蛍光増強アッセイ

CR、ThTおよびANSと同様に、Bis ANS (Sigma) 蛍光の増強を測定した。発光波長は485 nmおよび励起波長は435 nmであった。タンパク質およびペプチドストックをPBS中25 μM Bis ANSで希釈した。

【0170】

チオフラビンS (ThS) 蛍光増強アッセイ

ThS蛍光の増強は、クロスベータコンホメーションのタンパク質に共通した構造的特徴を含んでなる、ミスフォールドタンパク質の特性である。ThS (Sigma, 033k1076) の蛍光をCRおよびThTに関して記載された操作に従い測定した。発光波長は542 nmおよび励起波長は435 nmであった。タンパク質およびペプチドストックをPBS中25 μM ThSで希釈した。

40

【0171】

内在トリプトファン 蛍光アッセイ

内在トリプトファン (Trp) 蛍光測定を、ブラック96ウェルプレート中の100 μLサンプルについて、283 nmの励起波長で、Softmax pro v5.01ソフトウェアを用いてGemini Spectramax XPS (Molecular Devices) で行った。発光スペクトルを3

50

60 ~ 850 nm 範囲で室温にて集めた。天然フォールドタンパク質は、そのミスフォールド対応物と比較して、増加または減少した蛍光を示す。Trp 蛍光強度の絶対値はさほど情報性のあるものではない。しかしながら、大きさの変化はタンパク質フォールドの摂動をモニターするためのプロービングパラメーターとして働く。蛍光発光波長のシフトは、Trp 発光団の環境中における局所変化の良い指標である。溶媒暴露 Trp 残基は 340 ~ 350 nm で最大蛍光を示し、一方全体的に埋蔵された残基は約 330 nm で蛍光を発する。

【0172】

tPA / プラスミノゲン活性化アッセイ

ミスフォールドタンパク質への2種セリンプロテアーゼの暴露による tPA / プラスミノゲン活性化の増強を、標準化クロモゲンアッセイ (例えば、特許出願 WO 2006 101387、パラグラフ [0195] および Kranenburg et al., 2002, Curr. Biology 12(2), pp.1833 参照) を用いて調べた。tPA および プラスミノゲンは双方ともクロスベータ経路で作用する (表4参照)。クロスベータ結合プロテアーゼの活性の増強は、クロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質の存在に関する尺度である。

10

【0173】

ミスフォールドタンパク質と結合する組換えフィブロネクチンフィンガードメイン

今回は C 末端 FLAG タグおよび His タグ付きの、組換えヒトフィブロネクチンフィンガードメイン 4₅ (Fn F4₅) のクローニング、発現および精製の記載に関して、特許出願 WO 2006 101387 (パラグラフ [0137] [0165] および [0192 0194]) 参照。ヒト胚腎臓細胞のタンパク質発現および精製を ABC-Expression Facility (University of Utrecht, オランダ) の助けで行った。5% グリセロールを含有する PBS 中 288 μg / mL の精製 Fn F4₅ を -80 °C で保存する。

20

【0174】

tPA およびフィブロネクチンフィンガー 4₅ ELISA

様々なヒト血漿 ApoA I 調製物への Fn F4₅ および tPA の結合性の解析のために、標準 ELISA を上記のように適用した。tPA 結合性の解析では、10 mM アミノカプロン酸を結合用緩衝液 (PBS / 0.1% Tween 20) に含有させた。Fn F4₅ FLAG His の結合性は抗 FLAG 抗体 (マウス抗体, M2, ペルオキシダーゼ複合体; Sigma, A 8592) を用いて調べた。

30

【0175】

結果

dOVA 標準の TEM 解析

指定のアッセイで標準ミスフォールドタンパク質として用いられる熱変性オボアルブミン (dOVA std) の TEM 解析では、ミスフォールドタンパク質が非フィブリルマルチマーに凝集することを示している (示さず)。上記の全蛍光増強アッセイおよび tPA / プラスミノゲン活性化アッセイで、最大蛍光増強または最大 tPA / プラスミノゲン活性化を各々呈する dOVA std 濃度が特定された。蛍光増強アッセイでは、この濃度が 100 μg / mL に設定された。tPA / プラスミノゲン活性化アッセイでは、40 μg / mL dOVA std がリファレンスとして用いられる。適宜に、dOVA std により誘導される蛍光増強および tPA / プラスミノゲン活性化が、比較目的のため任意に 100% に設定された。

40

【0176】

グリケート化 BSA および Hb の TEM 解析

図6は、グリケーションによる BSA およびヘモグロビンのミスフォールディングが非フィブリル無定形凝集物を誘導することを示している。

【0177】

IgIV Octagram

図7は、Octagram (オクタグラム) IgIV の変性がクロスベータ構造を誘導すること

50

を示している。様々なミスフォールディング条件がTEMおよびチオフラビンT特性の変化したミスフォールドタンパク質をもたらすことがわかる。フィブリルは観察されない。ミスフォールディングに際して比較的高いIgIV濃度のときIgIV分子のアセンブリーのサイズが増加する、と結論づけられる。これはThT蛍光と相関しない。

【0178】

IgIV Gammagard

チオフラビンT、コンゴレッド、ANS、BisANSおよびチオフラビンSの蛍光増強が、天然IgIVと比較して、様々なミスフォールドIgIV Gammagard(ガンマガード)サンプルで観察された(図8A~E)。一般的に、様々な蛍光色素での蛍光の増加が変性に際する温度の増加に比例して観察される。Trp蛍光が測定されるときに類似の特性が観察された(図8F)。天然IgIV Gammagardと比較したとき、蛍光の上昇が塩基および酸変性IgIV Gammagardでも観察される。IgGでRFのエピトープを作製するための条件は、クロスベータマーカで比較的小さな増加を導くことがわかった。hIgG塩基37で、ThT、CRおよびTrp蛍光を測定した。天然IgIVおよび別な処理でミスフォールドされたIgGと比較して、ThT蛍光の増加は中度であるが、CRおよびTrp蛍光の増加は高い。

10

【0179】

10Kの倍率のときTEM像は、天然IgIV Gammagardが凝集物をほとんど保有せず、存在する凝集物が無定形かつサイズが小さいことを示している(図9)。変性温度が高まると、凝集物の凝集サイズおよび存在量が増す。TEM像における酸変性IgIV Gammagardの外観は、76の温度における熱変性IgIV Gammagardと最も類似性を有している。塩基変性IgIV Gammagardは500nmの平均径の無定形凝集物を示す(図9J)。ミスフォールドIgIV HFIP/TF Aおよび塩基変性ヒトγグロブリンは、IgIV塩基でみられるような類似特徴をもつ凝集物として出現する(図9K, L)。IgIV塩基と比較して、凝集物の数はしかしながら多く、マルチマーアセンブリーの平均径はやや大きい。特に塩基変性ヒトγグロブリン(hIgG塩基37)では、IgIV塩基と比較してマルチマーの平均径が約2倍である。IgIV RFは低密度でゆるいアセンブリーとして出現する(図9B)。

20

【0180】

tPA媒介プラスミン生成アッセイでtPA/プラスミノゲンを活性化しうるIgIV Gammagardのミスフォールド調製物の効力を試験した(図9M)。tPA/プラスミノゲン活性化は天然IgIV Gammagardで観察されなかった。様々な変性IgIV Gammagard調製物のtPA/プラスミノゲン活性化効力に基づき、3つのグループ、即ち中度アクチベーター(IgIV RF、IgIV 65、IgIV 69およびIgIV塩基)、強度アクチベーター(IgIV 76、IgIV 80、IgIV 83およびIgIV 86)および非常に強度なアクチベーター(IgIV酸およびIgIV HFIP/TF A)に分類される。ミスフォールディング温度が69から76に上げられたとき、IgIV構造の顕著な差異がみられる。TEM像は、69のときいくつかの緻密な凝集物が形成され(図9D)、一方76のとき比較的大きく非常に緻密なアセンブリーがみられ、ミスフォールディング温度が更に上がるとサイズが増すことを示している(図9E~H)。

30

40

【0181】

A調製物

様々なA42およびA40調製物が高いThT、CRおよびANS蛍光レベルを示す(図10)。A42HClおよびA40PBS1はTEM像でフィブリル凝集物として出現する(図11C, F)。A40t=0、A42t=0、A40HClおよびA42PBSは無定形凝集物として出現する(図11A, B, D, E)。注目すべきことに、A40PBS1フィブリルはA40HClおよびA40t=0と比較した

50

ときに類似のThT蛍光レベルを呈し、一方A₄₂HClはThTおよびCR蛍光を強く増加させている。

【0182】

ヒト血清アルブミン

図12Aでみられるように、変性HSAは20mg/mLの濃度のときThT蛍光を強く高め、一方他の濃度では天然HSAと比較して増加がみられない。天然HSAまたは1mg/mLで変性されたHSAのTEM解析によると凝集物は観察されなかった(図12B, C)。サイズ約500nmの無定形凝集物が2.5、5および10mg/mLのとき変性HSAで観察された(図12D~F)。凝集物サイズおよび凝集物の相対数は、HSAが20mg/mLで変性されたとき大きく増加する(図12G)。

10

【0183】

マウスIgG

天然マウスIgGと比較して、様々な方法を用いてミスフォールドされたマウスIgG調製物でThTおよびCRの蛍光増強が観察された(図13)。チオフラビンTおよびコンゴレッド蛍光が次の順序で高められている：

ThT：天然IgG < IgG塩基 < IgG酸 IgG85

コンゴレッド：天然IgG << IgG塩基 < IgG酸 < IgG85

ThTシグナルに関してIgG85と比較したIgG塩基およびIgG酸との差異は、コンゴレッド蛍光シグナルより顕著である。全部で3つのミスフォールディング方法がクロスベータ構造の形成を伴うIgGのミスフォールディングをもたらした、と結論づけられる。

20

【0184】

アポリポタンパク質A_I

100mM NaOH含有の緩衝液中100 で熱変性されたApoA_Iは、天然ApoA_Iと比較したとき、ThT蛍光シグナルおよびCR蛍光シグナルでやや減少を呈した(図14AおよびB)。ThTおよびCR蛍光で観察される減少は、A₂₈₀nmで測定したところ、タンパク質の喪失のせいではなかった(図14C)。図14Bは、100mM NaOH含有の緩衝液(高pH)中37 変性ApoA_IのCR蛍光が天然ApoA_Iと比較してやや増加したことを示している。明確に知覚しうる差異はThTまたはCR蛍光強度で観察されないが、tPA媒介プラスミノーゲン活性化アッセイでtPA/プラスミノーゲンを活性化しうるミスフォールドApoA_I調製物の効力には有意差が観察される。37 または75 で加熱されたApoA_I調製物は、tPA/プラスミノーゲンの比較的中度~強度アクチベーターである(図14D)。100 のミスフォールドApoA_IはtPA/プラスミノーゲンの非常に強度なアクチベーターである。図14EおよびFでは、ヒト血漿ApoA_Iの様々な調製物におけるクロスベータ構造および/またはクロスベータ誘導コンホメーションの存在の測定に関するELISA研究の結果が示されている。天然ApoA_Iと、100mM NaOHを天然ApoA_Iストックへ加えて37、75 または100 に30分間加熱したApoA_Iが、研究に含まれている。FnF₄₋₅の半最大結合へは、110μg/mL(天然ApoA_I)、73μg/mL(75 ミスフォールドApoA_I)、48μg/mL(100 ミスフォールドApoA_I)および5.2μg/mL(HbAGE)で達した。37 ミスフォールドApoA_Iの場合、飽和結合が計算されなかった。これらの数値および曲線は、ApoA_Iのミスフォールディングにより、結合部位の総数(M_{max})の増加と共に、FnF₄₋₅結合への親和性が75または100 でミスフォールドされたApoA_Iで増加することを示している。加えて、ApoA_I調製物へのtPAの結合性を評価する。tPAへの結合部位の最高数(M_{max})が、ミスフォールドApoA_I調製物と比較して、天然ApoA_Iに存在する。tPAは高pHで100に加熱されたApoA_Iとほとんど結合しない(飽和結合検出せず)。天然ApoA_I、37 ミスフォールドApoA_I、75 ミスフォールドApoA_IおよびHbAGEの場合、半最大結合へは各々4.3、3.1、1.6および3.5nMのtPA濃

30

40

50

度で達し、このことは天然 A p o A I と比較して t P A が高親和性で相互作用する t P A 結合部位の露出を塩基性条件下 37 または 75 のミスフォールディングがもたらししていることを示している。t P A が比較的高い親和性で天然 A p o A I と結合するという観察は、H b A G E でも匹敵する測定がみられることから、クロスベータ構造および/またはクロスベータ誘導コンホメーションの分子が天然 A p o A I で既に存在していることを示している。この発見は、天然 A p o A I が高いコンゴーレッド蛍光およびチオフラビン T 蛍光を示すという観察で更に確認される。

【0185】

実施例で用いられたサンプル中の内毒素レベル

実施例 6 ~ 20 で記載された実験に用いられた様々な溶液中の内毒素レベルを Limulus Amebocyte Lysate (L A L) キット (Cammbrex, Q C L 1000) で調べた。キットは製造業者のプロトコールに従い用いたが、但し今回の測定は記載されたアッセイ容量の半分を用いて行った。リファレンスとして、リポ多糖 (L P S, Sigma, 2.5 mg / mL L 2630 クローン 011 : B4) を数回の測定に含めた。L P S 標準曲線で得られたシグナルから、質量 / 容量で内毒素含有量の概算値を未知サンプルで得られた内毒素単位 (E U) のシグナルで計算した。表 6 では、E U の内毒素レベルがストック溶液について掲載されている。

【0186】

実施例 6

‘クロス富化’ : クロスベータタンパク質 ‘A’ への高親和性に向けたヒト I g I V の富化はクロスベータタンパク質 ‘B’、‘C’、‘D’、... にも高親和性の富化 I g I V をもたらず

B S A A G E マトリックスで富化された Octagam I g I V も A 40、H b A G E および d O V A のような他のミスフォールドタンパク質に高親和性を有することを、我々は先に示した (実施例 4 参照)。今回、我々は A 40 / A 42 フィブリル マトリックス、B S A A G E マトリックス、d I g I V マトリックスまたは d H S A マトリックスで I g I V を富化させ、様々なミスフォールドクロスベータタンパク質への富化 I g I V の結合性を試験することにより、この実験を拡張させた。ミスフォールドタンパク質を N H S セファロースへ固定させた。アフィニティマトリックスの各々からの溶出 I g I V の富化ファクターを、E L I S A で A 40 / A 42 フィブリル、A 凝集物、H S A、d H S A、B S A A G E、d O V A、m グロブリンおよび d m グロブリンとの結合性について特に調べた。

【0187】

材料および方法

N H S セファロース (G E -Healthcare) で固定前に、H S A (Cealb, Sanquin, オランダ, ロット 05C29H120A) および I g I V (Octagam, Octapharma, ロット 50244018432) を 1、2.5、5、10 または 20 mg / mL でミスフォールドさせた。H S A は、p H 2 (H C l) にて 65 で 6 時間加熱し、次いで N a O H で中和することによりミスフォールドさせた。I g I V は、10 mM N a P i 緩衝液 (p H 8.1) 中で 25 から 65 へ段階的に加熱 (0.5 / min) することによりミスフォールドさせた。N H S セファロースを使用前に Amicon フィルターカップ (Millipore, U F C 30 S V 00) 中 1 mM H C l で 12 回洗浄した。固定化目的で、5 種のミスフォールド H S A 調製物または I g I V 調製物を混ぜ (5 : 4 : 3 : 2 : 1 (V : V : V : V : V) の比率で 1 : 2.5 : 5 : 10 : 20 mg / mL)、固定用緩衝液 (0.5 M N a C l ; 0.2 M N a H C O₃) で 3 x 希釈した。B S A A G E (10.25 mg / mL) および A 40 / A 42 フィブリル (0.28 mg / mL) を同様に固定させた。フィブリルは物質セクションに記載されているように作製した。簡単に言えば、A 40 を 37 で 186 時間インキュベートし、A 42 を H C l 中で 24 時間インキュベートした。これらのフィブリルを固定用緩衝液中 1 : 1 で混ぜた。マトリックスを固定用緩衝液中で一夜インキュベートし、0.1 M T r i s p H 8.5 で遮蔽した。マトリッ

10

20

30

40

50

クスを 0.1 M Tris pH 8.5 で 3 回および 0.1 M NaOAc ; 0.5 M NaCl で 3 回洗浄した。これらの洗浄ステップを 4 回繰り返した。マトリックスを Octagam IgIV (50 mg/mL) と 4 時間または一夜インキュベートした。IgIV フロースルー (' FT ') を集め、マトリックスを溶出 (1.140 M NaCl , 10 mM HEPES , 45 mM CaCl₂ , 0.005 % Tween 20 , pH 7.4 で 2 × 1 時間 ; ' 溶出物 ') 前に HBS (HEPES 緩衝液 , 140 mM NaCl , 10 mM HEPES , 45 mM CaCl₂ , 0.005 % Tween 20 , pH 7.4) で 12 回洗浄した。更なる解析前に溶出物を HBS に対して透析した。

【 0188 】

ELISA を用いて様々な固定タンパク質 : A₄₀ / A₄₂ フィブリル、A₄₀ / A₄₂ 非フィブリル凝集物、HSA、dHSA、BSA AGE、nOVA および dOVA との結合性について FT および溶出物を試験した。4 種の異なる A₄₀ / A₄₂ 非フィブリル凝集物を物質セクションで記載されたように作製し、400 μg/mL の濃度で 1 : 1 : 1 : 1 混合した。簡単に言えば、A₄₀ を PBS 1 に溶解し、-80 で直接凍結し、A₄₀ を HCl 溶液中で 24 時間インキュベートし、A₄₂ を PBS 1 に溶解し、-80 で直接凍結し、A₄₂ を HBS に溶解し、37 で 24 時間インキュベートした。富化ファクターを実施例 4 で記載されたように計算した。BCA アッセイキット (Pierce, カタログ番号 23223) を用い、標準曲線に Octagam IgIV を用いて、FT および溶出物中のタンパク質濃度を調べた。

10

【 0189 】

結果

図 15 は、ミスフォールドクロスベータタンパク質アフィニティマトリックスを用いた IgIV 富化実験の典型的結果を示している。以下で記載され、表 7 で要約されているように、ミスフォールドタンパク質 X および固定タンパク質 Y、Z、... 含有のマトリックスを用いて、富化 IgIV の別な組合せについて類似データを得た。実例では、A フィブリルアフィニティマトリックスを用いて選択されたアフィニティ領域が、異なるアミノ酸配列および配列長さの様々な他のミスフォールドタンパク質、例えば BSA AGE と結合することが示されている (図 15)。加えて、BSA AGE マトリックスで富化された IgIV は、出発物質 (Octagam IgIV) と比較して、A₄₀ / A₄₂ フィブリルとの結合性に関して約 6 の富化ファクターを有している。2 つの類似実験で、我々は A₄₀ / A₄₂ フィブリルへの BSA AGE マトリックス富化 IgIV の結合性に関してより高い富化ファクター (25 および 53) を得た。A₄₀ / A₄₂ フィブリルマトリックスで富化された IgIV は、A₄₀ / A₄₂ フィブリルとの結合性に関して 3 の富化ファクターを有している。BSA AGE マトリックスでは、A₄₀ / A₄₂ フィブリルマトリックスで観察される富化と比較し、IgIV は A₄₀ / A₄₂ との結合性に関して効率的に富化されている。

30

【 0190 】

BSA AGE との結合性に関する富化ファクターは、BSA AGE セファロースで富化された IgIV の場合に平均して最高である。BSA AGE への A₄₀ / A₄₂ フィブリルマトリックスで富化された IgIV の結合性に関する富化ファクターは、3 回の別々な実験で調べたところ約 5 である (図 15)。BSA AGE セファロースの IgIV 溶出物は dOVA との結合性に関して富化される (富化ファクター 3)。類似実験では、dIgIV セファロースおよび A₄₀ / A₄₂ フィブリル セファロースの IgIV 溶出物も各々富化ファクター 1.5 および 6 で dOVA との結合性に関して富化された。この後者の富化ファクターは 3 回の連続研究のうち 1 回でみられなかった。富化は nOVA との結合性に関して観察されなかったが、このことはタンパク質のミスフォールド対応物と特異的に結合する IgIV サブ集団が富化操作で得られることを示している。

40

【 0191 】

追加ミスフォールドタンパク質の富化ファクターを調べた。Octagam IgIV 出発物質

50

の濃度シリーズは固定 H S A、m グロブリンおよび d m グロブリンとほとんど結合しない。d H S A への Octagam I g I V の結合性増加が、H S A との結合性と比較したときみられる。全ミスフォールドタンパク質マトリックスの I g I V 溶出物が d H S A との結合性に関して富化された。A 40 / A 42 ミスフォールド非フィブリル凝集物との結合性が、A 40 / A 42 フィブリルマトリックスおよび B S A A G E セファロースで富化された I g I V の場合に最も富化された(約 10 の富化ファクター)。B S A A G E セファロースの I g I V 溶出物はミスフォールドマウス グロブリン (d m グロブリン) との結合性に関して富化される。

【 0 1 9 2 】

一緒にすると、ミスフォールドクロスベータタンパク質 ' A ' を含んでなるアフィニティマトリックスで富化された Octagam I g I V がミスフォールドクロスベータタンパク質 ' B '、' C ' などとの結合性に関して富化されていることを我々は示した。A 40 / A 42 フィブリルまたは B S A A G E を含んでなるアフィニティマトリックスでは、ミスフォールドクロスベータタンパク質に対して、比較的最高の富化ファクターとして表現される、最広域特異性の富化 I g I V が得られた(表 7)。最も面白いことに、アフィニティマトリックスの調製のために 3 種の非フィブリルミスフォールドクロスベータタンパク質、即ち B S A A G E、d H S A および d I g I V が研究に含まれている(TEM 像に関する一般的物質および方法セクションで図 6、7、12 参照)。

【 0 1 9 3 】

ここで記載された結果に基づき、ある疾患の病理へ特に関与するクロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質と特異的に結合するアフィニティ領域をアフィニティ領域の組成物から選択するための操作が提供される(図 26 も参照)。このために、一態様では、ミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうるアフィニティ領域に親和性をもつ 2 種の別々なクロスベータマトリックスの組合せが連続適用される。以下で更に詳細に記載されているように、2 つの可能な順序で、クロスベータ構造および / または非天然 3 D 構造および / またはクロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質および / またはアミロイド、即ちミスフォールドドームと特異的に相互作用しうるアフィニティ領域を選択するためのマトリックス I と、治療用アフィニティ領域が治療目的のものであり、疾患関連ミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうるアフィニティ領域を選択するための、対象の疾患の病理に関与する 1 種以上の選択ミスフォールドタンパク質をもつマトリックス II が用いられる。マトリックスが順序 I II で適用されるとき、クロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導コンホメーションの広範囲な可能な出現を含み、および / または標的タンパク質ミスフォールディング疾患の病理に関与するミスフォールドタンパク質を含んでなるまたは含まない完全ミスフォールドドームを表象するタンパク質の何らかのセットが、アフィニティマトリックス I の作製に用いられる。マトリックスが順序 II I で適用されるとき、クロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導コンホメーションの広範囲な可能な出現を含んでなるタンパク質、および / または完全ミスフォールドドームを表象するタンパク質のセットは、アフィニティマトリックス II のデザインに含意された標的タンパク質ミスフォールディング疾患の病理に関与するミスフォールドタンパク質を含まない。もちろん、熟練者であれば別な態様もデザインしうる。

【 0 1 9 4 】

実施例 7

様々なミスフォールドクロスベータタンパク質のアフィニティマトリックスを用いたミスフォールドクロスベータタンパク質に親和性の I g I V の特異的かつ飽和性富化

実施例 4 では、Octagam I g I V からミスフォールドクロスベータタンパク質に親和性をもつ免疫グロブリン (I g) のサブ集団の単離に H b A G E マトリックスを用いた。我々は、様々なクロスベータタンパク質との結合性に関して、富化 Octagam I g I V および ' フロースルー ' (F T) と称される枯渇残留物の結合性について試験した。我々は、アフィニティマトリックスから溶出された I g I V が H b A G E との結合性に関して実際に富化され (6 0 0 の富化ファクター)、F T が H b A G E との結合性に関して枯渇され

10

20

30

40

50

ている（0.5の富化ファクターまたはそれとは別に2.0の枯渇ファクター）ことを観察した。マトリックスにではなく、ミスフォールドクロスペータタンパク質（前記実施例ではHbAGE）に特異的親和性をもつIg分子のサブ集団についてIgIVがミスフォールドクロスペータタンパク質セファロースで特異的に富化されるかどうかを試験するために、本実験ではIgIVとBSAAGEマトリックスとのインキュベート後におけるFTをBSAAGEマトリックスの新たな部分と再び接触させ、これを3連続ステップで繰り返した。BSAAGEマトリックスへのIgIVの結合性が非特異的であれば、IgIVは各連続ステップで飽和せずに枯渇され、最終的にはもはやFT中にIgが存在せずに終わる。結合性が特異的であれば、FTと新たな量のBSAAGEマトリックスとのインキュベートでますます非富化されたIgIVが得られる。

10

【0195】

材料および方法

BSAAGEの被覆前に、10mL NHSセファロースマトリックスを10mL 1mM HClで12回洗浄した。2.5mL固定用溶液（5.1mg/mL BSAAGE, 0.2M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH 8.3）を加えてローラー装置にて4で一夜、次いで0.1M Tris pH 8.5で4時間の遮蔽ステップにより被覆を行った。未被覆タンパク質を除去するために、数回の洗浄ステップを0.1M Tris pH 8.5で3回、次いで酸性緩衝液（0.1M 酢酸, 0.5M NaCl, pH 4.2）で3回行った。これらの洗浄ステップを4回繰り返した。0.1%アジ化ナトリウムで補充されたHBS中でビーズを保存した。Octagam（チャージ5024018434）の結合前に、アジドを除去するためにマトリックスをHBSで6回洗浄した。2200μLビーズの一部へ、1100μL Octagam IgIV（50mg/mL）を加えた。ビーズをOctagamと1時間インキュベートし、FTフラクション（FT1）を集めた。このFTの200μLを保管し、残留容量をBSAAGEマトリックスの新鮮部分へ適用した。アフィニティマトリックスの量をFTの残留容量に調整したが、新鮮マトリックスの量は今回1800μLであった。再び、第二FTフラクション（FT2）を集めるための遠心前にマトリックスをFT1と1時間インキュベートした。これを4回繰り返し、4つのFTフラクション（FT1-FT4）を得た。連続FTとインキュベートされた全マトリックスサンプルを洗浄し、結合Igを高塩（1.14M NaCl, 10mM HEPES, 4.5mM CaCl₂, 0.005% Tween 20, pH 7.4）とインキュベートして1時間に2回溶出させ、4つの溶出フラクション（E1-E4）を得た。AおよびdOVAも上記と同様にNHSセファロースマトリックスへカップリングさせた。Dutch型突然変異E22QのA140を1mg/mLの濃度にPBSで溶解させ、ホイールで光から防御しながらローラー装置にて室温で2時間インキュベートした。A140E22Qを固定用溶液中0.66mg/mLの濃度でマトリックスとインキュベートさせた。dOVAセファロースアフィニティマトリックスの調製では、オボアルブミンをPBS中5mg/mLの濃度で100にて1時間かけて変性させ、固定用緩衝液中3.5mg/mLの濃度でNHSセファロースに固定させた。チオフラビンTおよびコンゴレッド測定から、100で加熱時のミスフォールドdOVAサンプルにおけるクロスペータ構造の形成を確認した。4FTフラクションおよび4溶出物の富化ファクターを前記（実施例4）のようにELISAで調べた。固定されたミスフォールドクロスペータタンパク質はdOVA、HbAGE、BSAAGEおよびA40であった。

20

30

40

【0196】

結果および考察

NHSセファロースマトリックスへの徹底グルコース6リン酸グリケート化ウシ血清アルブミン、ミスフォールドクロスペータBSAAGEの固定化で、OctagamからBSAAGE結合IgIVを捕捉するための効率的アフィニティマトリックスを得た（図16AおよびB）。Octagam IgIVのフラクションはBSAAGEセファロースと特異的に結合することが示されている。FT1はBSAAGEに親和性をもつIg分子について85%まで枯渇されている（富化ファクター0.15）。この数値は後のフラ

50

クションFT2 4で94.6% (富化ファクター0.054)から95% (富化ファクター0.050)および96.2% (富化ファクター0.038)に増加している。BSA AGEに親和性をもつ分子についてIgIVの効率的枯渇がIgIVとBSA AGEセファロースとの初回接触後に達成されていることを、データは示している。Ig分子がマトリックスでBSA AGEと特異的に結合したかどうかを更に試験するために、溶出物(E1 4)をBSA AGEとの結合性に関してELISAで試験し、富化ファクターを調べた。E1は予想通りにBSA AGEとの結合性に関して最高の親和性を示している。後のFTがBSA AGEマトリックスと再び接触された後の結合ステップにおいて、富化ファクターはE1の41.3からE2の13.7およびE3の11.8、E4の8.7へと減少している。これは、BSA AGEに親和性をもつFT中Ig分子の量が、アフィニティマトリックスとの初回接触後、既に劇的に減少していることを明らかに示している。これはFTフラクションが新たなアフィニティマトリックスへ6回適用された類似実験で更に一層明らかになった。この実験では、FTの富化ファクターが0.031もの低さになり、そのため基本的にBSA AGE結合性は残されていなかった(示さず)。溶出物E1 4中におけるIgIVの絶対および相対量は、各々89 μ g(0.16%)、36 μ g(0.23%)、18 μ g(0.28%)および17 μ g(0.53%)であった。

10

【0197】

A 40、dOVAおよびHb AGEへのBSA AGE富化IgIVおよび付随フロースルーの結合性も調べた。FTフラクションはA 40ともdOVAとも結合性に関して枯渇されておらず、即ち富化ファクターは1に留まった(図16C, E)。理論に拘束されることなく、この観察の可能な説明は、BSA AGEマトリックスとの富化で、BSA AGEとA 40およびdOVAに広範囲親和性を含んでなるアフィニティ領域のみが選択されていることである。外見上、A 40またはdOVAに比較的高い親和性だがBSA AGEに低親和性の多くのIg分子がFTフラクションに留まり、このことがほどほどな枯渇を説明している。図16CおよびDは、しかしながら、BSA AGEへの親和性に基づき選択されているにもかかわらず、IgIVとBSA AGEセファロースとの接触後の溶出物がA 40に親和性をもつIg分子でなおも富化されていることを示している。dOVAの場合、1.8の富化ファクターがE1で観察される(図16EおよびF)。富化ファクターは後の溶出物の場合に低い、連続溶出物でBSA AGEとの結合性に関する富化ファクターの減少とは平行でない。外見上、BSA AGEとdOVAへ二重親和性をもつOctagam IgIV中Ig分子のフラクションは比較的少なく、そのためBSA AGEマトリックスでの富化はdOVAとの結合性に関してほんのわずかな富化に留まる。Hb AGEへのFTフラクションおよび溶出フラクションの結合性はBSA AGEとの結合性で見られるものと類似のパターンをたどり、このことは双方のミスフォールドクロスベータタンパク質で重複するエピトープを示している(図16GおよびH)。連続FTフラクションでは、Hb AGEと結合するIg分子のフラクションが劇的に減少する。それと並行して、Hb AGEへのBSA AGEマトリックス富化IgIV溶出物の結合性に関する富化ファクターも、連続溶出物と比較したときに減少している。

20

30

40

【0198】

結論として、これらの実験は、BSA AGEアフィニティマトリックスで、Octagam IgIVがBSA AGEとの結合性のみならず、A 40、Hb AGEおよびdOVAのような他のミスフォールドクロスベータタンパク質との結合性に関する富化されることを示している。これは、ミスフォールド非フィブリルクロスベータBSA AGEが他の3種のミスフォールドクロスベータタンパク質でも露出されているエピトープを含んでいることを示している。A 40またはdOVAに親和性をもつIg分子のサブ集団と大きな重複を有しない、BSA AGEに親和性をもつアフィニティ領域のフラクションを、IgIVが含んでいるらしい。

【0199】

50

クロスベータタンパク質 セファロースの準最適用量を用いる1つの利点は、初回インキュベートで、比較的高親和性をもつアフィニティ領域のみが選択されることである。これは、高親和性をもつアフィニティ領域のみが用いられる目的のときに利点である。

【0200】

後の類似実験では、A 40 セファロースおよびdOVA セファロースをFTの6連続インキュベートに用いた(示さず)。A 40マトリックスでは、FTがBSA AGEとの結合性に関して枯渇され、例えば新鮮量のA 40マトリックスへの連続FTフラクションの6ラウンドの結合後、'富化'ファクターは0.45であった。dOVAへのA 40マトリックスとのインキュベート後FTの結合性はさほど影響されず、'富化'ファクターは6回の結合ステップ後に0.83である。A 40マトリックスの溶出物は、17、4、5、3、8および4の富化ファクターということで、BSA AGEとの結合性に関して富化されている。これらの溶出物はdOVAと全く結合しない。これは、A 40と結合するIgIV中アフィニティ領域のサブ集団が、dOVAと結合するIg分子のサブ集団とではなく、BSA AGEと結合するIg分子のサブ集団と重複していることを示している。

10

【0201】

dOVA セファロースでは、dOVAとの結合性に関するOctagam IgIV FTの枯渇がアフィニティマトリックスおよびIgIVのその適用比で既に準最適(83%)にあり、即ちFTとdOVAマトリックスとの連続インキュベートでdOVAとのFTの結合性に関して更なる減少が得られないのである。BSA AGEまたはA 40へのFTフラクションの結合性に関する、実際には'枯渇'ファクターと解される富化ファクターは影響を受けず、BSA AGEで約0.8およびA 40で1に留まる。溶出物は、しかしながら、BSA AGEおよびA 40との結合性に関して富化される(富化ファクターは各々5および14である)。富化ファクターは、連続FTを用いた連続結合ステップに際して得られる溶出物で、減少していない。

20

【0202】

再び、実験では、ミスフォールドクロスベータタンパク質'A'のアフィニティマトリックスを用いて富化されたIgIVがミスフォールドクロスベータタンパク質'B'との結合性に関して富化されていることを示している。これらの実験は、用いられた実験セッティングで、A セファロースと結合するOctagam IgIV中Ig分子のサブ集団がdOVAと結合するOctagam IgIV中アフィニティ領域のサブ集団と重複していないことも示している。BSA AGE セファロースの場合、溶出物E1 6中富化IgIVの絶対および相対量は各々31.5 μg(0.084%)、11.2(0.062)、9.5(0.098)、7.2(0.16)、4.1(0.145)および0.27 μg(0.032%)であった。A 40の場合、これらの数値は各々33.9(0.09)、29.4(0.17)、11.2(0.11)、9.45(0.21)、9.8(0.35)および3.8 μg(0.22%)であった。dOVAマトリックスの場合、これらの数値は27.6(0.07)、22.4(0.07)、21.8(0.12)、17.1(0.15)、11.5(0.13)および2.8 μg(0.06%)であった。

30

【0203】

結果は、ミスフォールドクロスベータタンパク質に親和性をもつアフィニティ領域が固定ミスフォールドクロスベータタンパク質のアフィニティマトリックスを用いて特異的に選択されることも示している。IgIVの量の枯渇は飽和であり、即ち、ミスフォールドタンパク質に特異性をもつサブ集団からIgIVの枯渇はミスフォールドタンパク質マトリックスを用いることにより達成される。

40

【0204】

BSA、Hb、A 40およびOVAは配列相同性を欠き、それらの天然状態では3D構造相同性を欠くが、BSA AGE、Hb AGE、A 40およびdOVAはクロスベータコンホメーションをもつアミノ酸のストレッチの存在を共有している。したがって、我々の結果は、天然形で3D構造相同性を欠くおよび/または配列相同性を欠く様々なタ

50

ンパク質でクロスベータコンホメーションまたはクロスベータ誘導コンホメーションに広域親和性をもつアフィニティ領域のサブ集団を I g I V が含んでなることを示している。更に、A セファロースとそれに続く d O V A E L I S A での結果は、I g I V の異なるサブ集団と、但し同様のクロスベータ色素、即ちコンゴレッド、T h T と結合する、構造的詳細の異なるクロスベータ構造が出現することを示している（‘実施例 6 ~ 20 の一般的物質および方法’参照）。

【0205】

実施例 8

フィブリン、A 凝集物およびミスフォールドオボアルブミンへの、Octagam I g I V および H b A G E アフィニティマトリックスを用いることで得られた富化 I g I V の結合性材料および方法

クロスベータ構造を含んでなるポリマーであるフィブリンに親和性の I g 分子を Octagam I g I V が含んでなるかどうかを試験するために（特許出願 US 2007003552、パラグラフ〔187, 188〕参照）、E L I S A プレートのウェルでフィブリノーゲンを トロンビン / 因子 II a とインキュベートすることによりフィブリンがその場で形成される E L I S A を行う。加えて、比較のために、クロスベータ構造のタンパク質の特性をもつ固定ミスフォールドオボアルブミン (d O V A) (物質セクション参照) およびアミロイド 凝集物との I g I V の結合性を評価する。

【0206】

オボアルブミン (Sigma , A 5 5 0 3 グレード V) を P B S に 1 m g / m L の濃度で穏やかに溶解させ、ローラー装置にて 3 7 ° で 2 0 分間、その後室温で 1 0 分間インキュベートし、- 8 0 ° で保存した n O V A と称される。n O V A を 3 0 ° から 8 5 ° へ 5 ° / m i n で加熱した。このステップを 4 回繰返し、変性 O V A をその後 - 8 0 ° で保存した d O V A s t d と称される。d O V A s t d との結合性研究のために、5 μ g / m L d O V A s t d を被覆した。固定 A への Octagam I g I V の親和性を解析するために、A 4 0 t = 0 および A 4 2 t = 0 ストックを結合研究に含めた。両 A 調製物を 5 μ g / m L で被覆する。H b A G E も 5 μ g / m L で被覆し、このクロスベータタンパク質との結合性の解析を陽性コントロールとして調べる。クロスベータコンホメーションの固定フィブリンへの I g I V および t P A の結合性を試験する際に、固定フィブリン含有の 9 6 ウェル E L I S A プレートのウェルを得るために下記プロトコルを適用した：

1 . 標準因子 II a / トロンビンストック (ヒト血漿 , 高活性 , Calbiochem, Germany , 製品番号 6 0 5 1 9 5) から H ₂ O 中 2 U / m L 因子 II a ストックを調製する。

2 . 使用前に 1 6 , 0 0 0 * g で 1 0 分間遠心されたストック溶液から P B S 中 5 0 μ g / m L フィブリノーゲン溶液 (2 0 m M クエン酸ナトリウム H C l p H 7 . 0 中 F i b 3 L 2 1 7 0 L , Kordia , オランダ) を調製する。

3 . 5 μ L の因子 II a 溶液をウェルへピペティングし、1 0 0 μ L のフィブリノーゲン溶液を加え、または 1 0 0 μ L P B S をコントロールウェルへ加える。最終濃度：〔因子 II a 〕 0 . 1 U / m L 、〔フィブリノーゲン〕 4 7 . 5 μ g / m L

4 . 穏やかに攪拌しながら室温で 2 時間インキュベートする。抗ヒトフィブリノーゲン抗体 (D A K O - Cytomation , P 0 4 5 5) を用いて被覆コントロールを行う。

5 . 空のウェルを T B S / 0 . 1 % T w e e n 2 0 T B S : 1 5 0 m M N a C l 、5 0 m M T r i s H C l 含有の T r i s 緩衝液 p H 7 . 3 で 2 回洗浄する。

【0207】

最初に、A 、 d O V A 、フィブリンまたはコントロール被覆用緩衝液で被覆されたウェルを、穏やかに攪拌しながら室温で 1 時間かけて、I g I V または t P A の濃度シリーズの 5 0 μ L / ウェルで三重に覆う。t P A シリーズでは、フィブリンの露出リシンおよびアルギニン残基へのクリングルドメインの結合を避けるため、および露出クロスベータ構造コンホメーションへの t P A フィンガードメインの結合を導くために、1 0 m M A C A を結合用緩衝液に含有させる。濃度シリーズ t P A または I g I V で覆われた無フィブリノーゲンの f i l a 被覆コントロールウェルで得られたシグナルを固定フィブリンの

対応ウェルから差し引く。クロスベータ構造の固定タンパク質で得られた全シグナルについて、被覆用緩衝液被覆ウェルで得られた対応シグナルをバックグラウンドとして差し引く。

【0208】

第二シリーズの実験では、フィブリンへの、Octagam Ig IVとのHb AGE アフィニティマトリックスのインキュベートで得られた富化Ig IVの結合性を評価した。

【0209】

結果 & 考察 / 結論

クロスベータ特異的色素コンゴレッドおよびチオフラビンTの結合性とtPAおよびプラスミノゲンの活性化のようなアミロイド様性質をもつタンパク質を連想させる特徴をフィブリンポリマーが示すことを、我々は以前に調べた。我々は、Octagam Ig IVがクロスベータ構造のタンパク質に親和性を示すIgのサブ集団を含んでなることも調べた。我々はしたがって、Ig IVがELISAでフィブリンと結合するかどうかを取り扱った。図17では、確かにIg IVが先に評価されたように陽性コントロールHb AGE (例えば図1参照)並びにdOVA、A 40およびA 42調製物と結合することが示されている。Hb AGEへの親和性は比較的高く、一方後の3種ミスフォールドタンパク質への親和性は類似してやや低い。フィブリンが考えられたとき、tPAおよびIg IVは双方とも飽和状態で結合する。フィブリンとのIg IVの半最大結合性は200 μg/mL (約1.3 μM)で達し、この値はdOVAおよびA 調製物で得られた値に匹敵する。これらの発見は、Octagam Ig IVがクロスベータ構造を含んでなる常用タンパク質、即ちHb AGE、dOVA、A とだけではなく、最近同定されたフィブリン中クロスベータ含有分子とも結合することを示している。

10

20

【0210】

これらの結果は、Octagam Ig IVがフィブリンに親和性のIgのサブ集団を含んでなることを示している。そのため、このサブ集団の使用は、フィブリン結合Ig IVとtPAとの競合によるフィブリンの寿命延長が症状または健康問題の減少に寄与する障害、またはフィブリンモノマーの重合を妨げるフィブリン結合Ig IVを導入することにより達成されるフィブリンの形成阻止が有益である障害に有益である。

【0211】

実施例 9

ミスフォールドヒト血漿アポリポタンパク質 A IへのIg IVアフィニティ領域の結合性

背景

膝関節の半月板におけるアミロイドは局在性アミロイドーシスで最も一般的な形の1つであり、特に老人で次第に増えてくる。アミロイド沈着は、最後には外科処置を要する関節問題になることがある。アポリポタンパク質 A I (Apo A I)は膝関節で検出され、アミロイドを形成し、関節問題を含めたいくつかの疾患および健康問題に関与している。Apo A Iは高密度リポタンパク質の主タンパク質成分である。アミロイドApo A Iはアテローム性動脈硬化症患者のアテローム硬化斑と動脈でもみられる。そのため体内の循環またはその他からミスフォールドApo A Iの除去は、アミロイドApo A I関連の疾患に罹患した患者にとり有益である。我々は、アフィニティ領域がミスフォールドApo A Iと結合しうるかどうか、および開示された手段および方法がApo A Iと結合するそれらのアフィニティ領域について富化されたアフィニティ領域を選択しうるかどうかを試験した。以下で示された結果は、確かにアフィニティ領域がApo A Iを認識し、開示された方法および手段がApo A Iと結合しうるアフィニティ領域の単離に適していることを示している。Apo A Iはここでは、アフィニティ領域が単離された疾患関連タンパク質の別な例として働いている。

40

【0212】

材料および方法

ヒト血漿Apo A Iに向けた、Octagam Ig IVとインキュベートされたHb AGE

50

セファロースを用いるアフィニティ領域の選択で得られた富化 I g I V の結合性の解析のために、直接 E L I S A を固定 A p o A I 調製物で行う。研究には天然 A p o A I と、37、75 または 100 で 30 分間加熱されて 5 M N a O H で生理的 p H に p H 調整された 100 m M N a O H 中 A p o A I を含める。図 14 でみられるように、選択クロスベータマーカ、即ちコンゴレッド蛍光の増強、T h T 蛍光の増強、t P A / プラスミノゲンの活性化、フィブロネクチンフィンガー 4 5 の結合性および t P A の結合性に関する相対的陽性度について、下記順序が観察される：

コンゴレッド： 100 < 天然 < 37 < 75
 T h T： 100 < 天然 < 75 < 37
 t P A / P l g 活性化： バックグラウンド = 天然 < 37 < 75 < < 100
 F n F 4 / 5 結合性： 天然 = 37 < 75 < 100
 t P A 結合性： バックグラウンド = 100 < 天然 37 75

【0213】

これらの比較から、既に天然 A p o A I がクロスベータ構造のミスフォールドタンパク質の特徴を有することは明らかであり、即ちそれはコンゴレッドおよび T h T の蛍光を高め、それは t P A と結合する。一般的に、塩基性条件下 37 または 75 で加熱することにより得られた A p o A I 調製物は比較的高いクロスベータ構造含有率の組成物として作用する。しかしながら、セリンプロテアーゼ (t P A / プラスミノゲン) を活性化しうる効力のみが考えられたとき、明らかに 100 に加熱された A p o A I が最高 ' 生物活性 ' クロスベータ含有率の組成物として示されている。

【0214】

結果および考察

図 18 では、天然 A p o A I および 3 種の熱 / 塩基ミスフォールド調製物への富化 I g I V の結合性に関する結合曲線が示されている。富化 I g I V が考えられたとき、k D は増加順に A p o A I 75、A p o A I 37、天然 A p o A I および A p o A I 100 で各々 1.3、1.6、2.0 および 2.8 μ g / m L である。結合部位の数は天然 A p o A I と A p o A I 75 で類似し、A p o A I 37 でやや多く、A p o A I 100 でかなり少ない。A 280 測定から、4 種調製物中のタンパク質含有率は類似していると結論づけられた。結合部位の最大数に関する差異は被覆効率の差異で反映される。しかしながら、F n F 4 / 5 に最大結合部位を曝しているのは A p o A I 100 である (図 14 E)。4 種 A p o A I 調製物への富化 I g I V の親和性が、富化 I g I V が選択された Octagam I g I V の親和性と比較されたとき、Octagam I g I V で得られた k D を富化 I g I V で得られた k D で割ることにより計算された富化ファクターは天然 A p o A I および A p o A I 75 の双方で 4.8 であり、一方 A p o A I 37 の場合は富化ファクターが 12.8 である。A p o A I 100 では富化ファクターが調べられず、Octagam I g I V の無結合性と富化 I g I V のわずかな結合性が検出された。しかしながら、A p o A I 100 との結合性に関する富化は、図 18 C で示されているような結合特性で反映されている。

【0215】

結論として、クロスベータマーカに関して ' 天然 ' A p o A I で得られるシグナルは (富化) I g I V の結合特性で反映され、それが製造業者から購入されていることから、そのことは天然 A p o A I がクロスベータ構造を含んでなるという結論を更に確認させる。更に、A p o A I 調製物との接触に際するコンゴレッドおよび T h T 蛍光双方の相対的増強が (富化) I g I V の予想結合特性に関する予知力を有していると結論付けられ、T h T 蛍光が最強の相関を示している。富化 I g I V と 37 に加熱された A p o A I との E L I S A データから、この A p o A I 調製物は、I g I V の富化に用いられた H b A G E のタンパク質コンホメーションと最相似性、および / または富化 I g I V に対して A p o A I で結合部位として働く露出クロスベータ構造エピトープの最匹敵数を有する、クロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導タンパク質コンホメーションを含んでなる、と結論づけられる。一般的に、適切なクロスベータフィニティマトリックス

を適用することにより、ミスフォールド A p o A I と結合するアフィニティ領域が選択されることを、データは示している。こうして、例えば膝関節アミロイドーシスで生じる痛みの治療、動脈におけるアミロイド沈着の溶解、およびブランクで A p o A I アミロイド蓄積を伴うアテローム性動脈硬化症の治療のような、ミスフォールド A p o A I の存在に関連する疾患または健康問題の治療法で使用上、最有力な治療向けアフィニティ領域組成物が得られる。

【0216】

実施例 10

ミスフォールド I g G 分子は、リウマチ様関節炎患者の 70 ~ 80 % に存在する自己抗体、リウマトイド因子の標的エピトープを含んでなる

10

材料 & 方法

I g G ミスフォールディングおよび構造解析

我々は、リウマチ様関節炎 (R A) 患者の 70 ~ 80 % に存在する自己抗体、ヒトリウマトイド因子 (R F) が、 I g G 自己抗原におけるクロスベータまたはクロスベータ誘導タンパク質コンホメーションと結合する、とする我々の仮説を試験した。65 で熱変性時に I g G の凝集が要件であることは、おそらく主にその標的自己抗原の F c ドメインへの、 (I g G および I g A R F も生じるが) 主に I g M サブクラスのものである R F による I g G 結合の検出にとり常識である、と我々は理解している。我々は実施例 6 ~ 20 の一般的物質および方法セクションに記載された操作に従い精製ヒト I g G (Octagam I g I V) を 65 に加温し、コンゴレッド蛍光、チオフラビン T 蛍光、 A N S 蛍光と t P A の結合性および活性化の解析により構造を解析した。コンゴレッドおよびチオフラビン T 蛍光の増強を 100 μ g / m L に希釈された I g I V 溶液で調べた。その後で、 (特許出願 W O 2006101387、パラグラフ [0195] で記載されているような) 標準化クロモゲンアッセイを用いて t P A / プラスミノゲン活性の増強を調べた。ミスフォールド I g I V への 10 m M アミノカプロン酸の存在下における t P A の結合性を、前記のような標準 E L I S A において、 t P A 結合性の陽性コントロールとして固定 A 40 t = 0 で評価した。

20

【0217】

結果

変性 I g G によるコンゴレッドおよびチオフラビン T 蛍光の増強

コンゴレッド蛍光およびチオフラビン T 蛍光の増強を熱変性ミスフォールド I g I V で測定した。コントロール I g I V と比較した相対シグナルに基づき、クロスベータコンホメーションをもつミスフォールドタンパク質の添付ホールマークで加熱 I g I V がミスフォールドされている (図 19 A , B) 。

30

【0218】

ミスフォールド I g G との t P A 結合性

我々は、クロスベータ経路の成分である t P A が d I g I V と結合することを観察した (図 19 E) 。この観察は、クロスベータ経路の成分が新たに導入された構造的特徴を認識するように、 d I g I V がミスフォールドされていることを更に証明している。

40

【0219】

ミスフォールド I g G による t P A / P 1 g 活性化

我々は d I g I V との t P A の結合性を観察したことから、 d I g I V が t P A / プラスミノゲンクロモゲンアッセイで t P A / プラスミノゲンを活性化するかどうかを我々は試験した。天然 I g I V は t P A 媒介プラスミノゲン活性化を誘導しない (図 19 D) 。しかしながら、熱変性ミスフォールド I g I V サンプル、即ち p H 2 の緩衝液中 65 で変性された I g I V (示さず) および N a P i 緩衝液中で熱変性された I g I V の双方は t P A / プラスミノゲンを活性化する。

【0220】

考察

I g G にクロスベータ構造でミスフォールディングの導入は R F の自己抗原でエピトープ

50

を露呈させる

65 に加熱されたヒトIgGは、クロスベータ構造のアミロイド様ミスフォールドタンパク質で通常見られる一連の構造的特性を示す。適用温度は、以前に他の研究者により記載された示差走査熱量測定によるとコンホメーション変化が誘導される、61の温度よりやや高い。ミスフォールドIgGはコンゴレッドおよびチオフラビンT蛍光を増強させ、tPAと結合し、tPA/プラスミノゲンを活性化する。我々の知る限りでは、RFに対するミスフォールドIgG自己抗原が、クロスベータコンホメーションのアミロイドを連想させる構造的性を含んでなるネオ エピトープを露出すると報告したのは、我々が最初である。我々の観察と一致するように、クロスベータ構造を含んでなるタンパク質と結合して活性化される2種のセリンプロテアーゼ、tPAおよび因子XIIのプロテアーゼ活性がRA患者で増すと報告された事実が、ここでやっと解明されている。

10

【0221】

我々の観察は、タンパク質でクロスベータ構造および/またはクロスベータ構造誘導コンホメーションに特異性を有するIgG、IgAおよびIgMクラスのヒト抗体の有用供給源として、RFを指し示している。IgIV中Ig分子のサブ集団がミスフォールドIgIV分子(表7参照)および/またはミスフォールドマウス グロブリン(実施例19参照)と結合するという我々の観察と合わせると、実際上ミスフォールドIgまたはミスフォールドタンパク質に親和性をもつIgIV中の単離サブ集団が一般的にRFを連想させる、と我々は結論づけた。ミスフォールドIgG自己抗原に親和性をもつアフィニティ領域の両供給源は、ミスフォールドIgGの出現に伴う疾患または健康問題の治療のためのアフィニティ領域ベース療法の開発に有益である。

20

【0222】

実施例11アフィニティ領域の様々な調製物における免疫グロブリンサブクラスおよびIgGイソタイプの相対的出現率の測定方法

HbAGEアフィニティマトリックスからの溶出物として得られた富化IgIVに存在するIgGイソタイプIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4の相対含有率を調べるために、我々はNanosep 10k遠心装置(Pall life science)を用いて550μLのサンプルを濃縮した。濃縮富化IgIVの最終濃度は、PBS中Octagam IgIV希釈物で調べられた標準曲線と280nmの吸光度を比較することで調べてみると、890μg/mLであった。Igサブクラスのイソタイプ分類および相対的存在量をLaboratory for Medical Immunology(UMC Utrecht, オランダ)の標準方法を用いてImage Immunochemistry比濁計(Beckman, Coulter)で調べた。比較のために、富化IgIVが抽出されたOctagam IgIVもIgGイソタイプの相対的存在量について解析した。加えて、Igサブクラスの出現を調べた。濃縮富化IgIVサンプルとは別に、PBS中103μg/mLの非濃縮物質もイソタイプ分類およびサブクラス決定に付した。製造業者によると、3500例に及ぶヒトドナーのIgフラクションから調製されたOctagam IgIVは、IgG(95%)と、少量のIgAフラクション(0.4%)および微量の0.2% IgMからなる。4種IgGイソタイプの分布は: IgG1, 62.6%; IgG2, 30.1%; IgG3, 6.1%; IgG4, 1.2%である。製造業者によると、IgIVではIg分子の3%が凝集し、90%超の分子がモノマーおよびダイマーである。

30

40

【0223】

結果&考察

Octagam IgIVに関して、IgGのサブクラス決定およびイソタイプ分類で全7回の測定が表8に掲載されている。Octagam IgIVでは、確かにIgの大部分がIgGサブクラスのもので、即ち約99.5%であることが確認された。4種IgGイソタイプの分布は(方法セクションに記載されたような)Octagam IgIVデータシートで報告されているものにまさしく近い。非濃縮富化IgIVでは、サブクラス分布がImage Immunochemistry比濁計の検出下限のせいで調べられなかった。IgG2の相対的存在の測定も検出

50

限界のせいで阻まれた。I g G 1、I g G 3およびI g G 4の濃度は調べられた(表8)。富化I g I V中の全I g濃度は、B C Aタンパク質濃度測定技術を用いたところ、103 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることがわかった。比濁計では、全I g濃度が108 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であると計算された。濃縮富化I g I Vでは、全4種I g Gイソタイプの濃度と全I g G含有量が調べられた。I g AおよびI g Mレベルは検出限界より低かった。富化I g I Vフラクションでは、I g G 3の相対的存在量が、リファレンスとしてI g G 1と比較すると、富化I g I VがH b A G Eアフィニティマトリックスで選択されたOctagam I g I V出発物質と比べて約2倍に増えている。I g G 2およびI g G 4の相対的存在量は、I g G 1の量と比較したとき、富化でほとんど変化していない。そのため、結論として、I g G 3のサブ集団は他のイソタイプよりH b A G E セファロースに比較的高い親和性を有している。

10

【0224】

全4種I g Gイソタイプが富化I g I Vフラクションで調べられた結果に基づき、I gフラクションは少なくとも4種の異なるヒト抗体の混合物からなると結論づけられる。非還元条件下の等電点電気泳動ゲルでスミアとして富化I g I Vの出現も、2種以上のモノクローナル抗体が富化I g I Vセレクションに存在していることを示している(示さず)。富化アフィニティ領域集団中におけるI g AおよびI g M抗体の濃度は確認できなかったが、微量の1種以上I g AおよびI g Mクローンの存在は結果に基づけば排除できない。

20

【0225】

実施例12

ミスフォールド低密度リポタンパク質(o x L D L)により誘導される血小板凝集に及ぼすI g I Vアフィニティ領域の影響の解析、およびo x L D Lへの、H b A G Eアフィニティマトリックスを適用することでOctagam I g I Vから得られた富化I g I Vの結合性の解析

例えば酸化によるミスフォールドL D L(o x L D L)は、例えばアテローム性動脈硬化症のような破壊的な疾患および健康問題で重要な役割を果たす。酸化で、アミロイドクロスベータコンホメーションを連想させる構造的特徴が、L D Lのタンパク質部分、即ちA p o B 100に導入されることを、我々は最近証明した(特許出願W O 2003 N L 00501参照)。ヒトo x L D L、更に一層好ましくはA p o B 100のクロスベータコンホメーションまたはクロスベータ誘導コンホメーションに対するアフィニティ領域をI g I Vが含んでなる可能性を、我々は今回取り扱った。この研究では、固定ミスフォールドタンパク質と特異的に結合するOctagamヒトI g I Vからのアフィニティ領域をH b A G E セファロースで抽出することにより得られた富化I g I Vが用いられる(実施例6,7参照)。加えて、Octagam I g I Vが研究に含まれる。

30

【0226】

材料および方法

o x L D LまたはT R A P(トロンピンレセプター活性化ペプチド, アミノ酸: S F L L R N)によるヒト血小板の活性化に及ぼすOctagam I g I Vの影響を評価した。ヒト血液から精製されたL D LをF e S O₄含有の緩衝液とインキュベートすることによりo x L D Lを調製した(詳細に関しては実施例2の物質&方法セクション参照)。ジエン含有率を測定することで酸化度56%とわかった。以前に調べたように(特許出願W O 2003 N L 00501)、酸化でo x L D LはチオフラビンT蛍光を増強する(データ示さず, 例えば特許出願U S 2007003552参照)。血小板凝集を37 にて900 r p mで15分間にわたり凝集計(Chrono-Log Corporation, Havertown, P A, U S A)で経時的に追跡した。ある容量の270 μL 血小板懸濁物(200, 000/ μL)を指示濃度で解析のためにサンプル含有の30 μL 溶液とインキュベートした。I g I Vでの阻害実験のために、270 μL 血小板懸濁物を0.3 m g / m Lフィブリノーゲン(プラスミノゲン、フィブロネクチンおよびフォンビルブランド因子枯渇, Enzyme Research Laboratories, Lafayette, I N, U S A)、25 μL 酸化L D L、天然L D L(n L D L)ま

40

50

たはTRAP溶液およびIgIV含有の5 μ L溶液とインキュベートした。インヒビターとの実験では、oxLDL、nLDLまたはTRAPを22で10分間にわたり漸増濃度のIgIVとプレインキュベートした。最大凝集は、任意に100%に設定された、8 μ M TRAPにより誘導される応答のパーセンテージとして表示した。

【0227】

oxLDLへのOctagam IgIV、枯渴IgIV (IgIVをHbAGEセファロースと接触させた後のフロースルー) および富化IgIVの結合性をELISAで評価した。陽性コントロールとして、アフィニティ領域調製物の結合性を固定BSA AGEで試験した。

【0228】

結果および考察

図20Aでは、Octagam IgIVがoxLDL誘導血小板活性化および凝集を用量依存的に阻害することがわかる。IgIVは、TRAPでの活性化に際して、血小板の凝集に影響を与えない。天然LDLへの血小板の暴露時にみられる低レベルの凝集は、天然LDLが濃度シリーズのIgIVとプレインキュベートされたときに変化しない。

【0229】

直接ELISAセッティングでは、酸化LDLへのIgIVアフィニティ領域の結合性を評価し、ミスフォールドHbAGEアフィニティマトリックスを用いて富化されたIgIVのoxLDLへの相対的親和性を、アフィニティマトリックスのフロースルーとして回収された枯渴IgIV、およびミスフォールドクロスベータタンパク質に親和性をもつアフィニティ領域を選択するための供給源として用いられるOctagam IgIV出発物質の親和性と比較した。他のミスフォールドタンパク質、BSA AGEで得られたものと結合特性を比較してみる。図20で、結合性研究の結果が示されている。BSA AGEおよびoxLDLに対する富化IgIVおよび出発物質の結合性の比較では、HbAGEマトリックスを用いたアフィニティ領域の選択が両ミスフォールドタンパク質への富化IgIVの親和性増加をもたらすことを示している。出発IgIVサンプルの結合性に関して得られたKD値と富化IgIVで得られたKD値との比率として表示される、グリケート化アルブミンまたはoxLDLの結合性に関する富化ファクターを計算した。BSA AGEの場合、富化ファクターは45である。oxLDLの場合、富化ファクターは27である。フロースルーは両ミスフォールドタンパク質とほとんど結合せず、このことはHbAGEセファロースを用いたミスフォールドタンパク質に特異性のアフィニティ領域からのIgIVの枯渴がむしろ効率的に再び生じ、実施例7で記載されたものを連想させることを示している。

【0230】

受動的に投与されたまたは接種により誘導された抗体は、増えつつある疾患の治療に良い療法として一般的に考えられる。酸化LDLを含めた修飾LDLは、修飾LDLの形成および沈着増加を伴う疾患、特にアテローム性動脈硬化症の治療で候補標的である。これらの結果は、開示された方法が、クロスベータ構造的特性を含んでなる修飾タンパク質、例えば酸化LDLと優先的に結合するヒト抗体のようなアフィニティ領域を選択しうることを証明している。このような抗体は、好ましくは、酸化のような修飾の結果として、ミスフォールドタンパク質、好ましくはミスフォールドLDLの形成を伴う、アテローム性動脈硬化症のような疾患の検出および好ましくは治療に用いられる。加えて、それらの選択アフィニティ領域は、合成アフィニティ領域のデザインのために、ミスフォールドタンパク質に親和性をもつアフィニティ領域のアミノ酸配列および3D構造的特性を示すモデル分子として、好ましくは用いられる(実施例20参照)。

【0231】

図20Eでは、血小板の活性化に用いられたoxLDLとIgIVが飽和結合することが示されている。図20Gでは、ミスフォールドHbAGEへの親和性にに基づき選択されたアフィニティ領域も、富化IgIVが選択されたOctagam IgIVと比較したときに、oxLDLと高親和性で結合することが示されている。oxLDL誘導血小板凝集に及

10

20

30

40

50

ばす I g I V の観察阻害効果と一緒にすると、我々の結果は、I g I V がミスフォールド A p o B 1 0 0 に特異性のアフィニティ領域を含んでなり、アフィニティ領域がミスフォールドタンパク質への細胞の応答、即ちこの実施例 1 2 では例えばアテローム性動脈硬化症に係るミスフォールドタンパク質、o x L D L への暴露に際する血小板の凝集を妨げられることを示している。

【 0 2 3 2 】

実施例 1 3

マウス尾切除実験で出血時におけるクロスベータ構造結合化合物 静脈注射用免疫グロブリンおよび肝細胞成長因子アクチベーターフィンガードメインの役割

材料および方法

インビボ凝固および/または血小板凝集に及ぼすクロスベータ構造結合化合物の影響の解析のために、マウス尾切除アッセイを行って出血時間を調べた。このアプローチのために、11~13週齢雄性black six C 5 7 B L / 6 J O l a H s d マウス50匹を動物実験について地元の倫理委員会 (Utrecht University, オランダ) により承認されたプロトコールに従い用いた。マウスに100 μ L 緩衝液 (P B S, コントロール群, n = 1 4) または試験化合物もしくはヘパリン (陽性コントロール, 出血を延ばすことが知られている) 含有の緩衝液を尾静脈で静脈内 (i . v .) 注射した。5~20分間後、マウスをチャンパーで5% Isofluran (誘導) で麻酔し、次いで実験の過程でマスクを用いて2~2.5% Isofluran (維持) で麻酔した。尾をテーブルに垂れ下げさせてマウスを加温ブランケット (37) で保った。ハサミで尾から5mmの箇所を切り、血をカップに集めた。注射と尾切除との時間間隔と出血の開始と出血の停止との時間間隔を記録した。出血の終点を抑えて、出血時間を20分間以上に延ばし、創傷を焼灼により閉じることで能動的に止めたところ、速い出血のせいで200 μ L を超える出血容量に達した。20分間を超える長時間出血と比較的過剰な出血は、双方とも20分間の出血時間へ任意に設定した。予想される長時間出血の陽性コントロールとして、我々は100 μ L 0.9% N a C l (n = 8) 中10 I . E . / マウスヘパリン (Leo Pharmaceutical Products B.V., 5000 I E / m L) i . v . を用いた。肝細胞成長因子アクチベーター (H G F A) フィンガー/フィブロネクチン I 型ドメインを4.7 m g / m L で用いた。2 m L / マウスの推定血液容量に基づくとほぼ234 μ g / m L の最終濃度となる100 μ L を i . v . 注射した (n = 1 4)。製造業者により供給される50 m g / m L ストックからのヒト静脈注射用免疫グロブリン (I g I V, Octagam, OctaPharma) を20倍希釈で用いた (n = 1 4)。

【 0 2 3 3 】

研究のために、標準操作に従い化学的に合成された合成 H G F A フィンガードメインを用いた (Dr.T.Hackeng, Academic Hospital Maastricht, オランダ; Hackeng, T. et al. (2001) Protein Sci. 10, 864-870; Hackeng, T. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94, 7845-7850)。H G F A の場合、残基 2 0 0 2 4 0 (Swiss-Prot entry Q 0 4 7 5 6) を採用した。H G F A F ドメインはクロスベータ構造のミスフォールドタンパク質と結合しうる (例えば、特許出願 W O 2 0 0 3 N L 0 0 5 0 1 参照)。

【 0 2 3 4 】

結果

緩衝液処置、H G F A F 処置および I g I V 処置のマウス14匹の、尾の約0.5 cmの箇所を切った後における尾創傷からの出血の平均時間を調べた (図 2 1)。出血時間は5人の異なる人々によりランダムにスコアリングした。長い出血時間を誘導するための陽性コントロールは、用量10 I E / マウスのヘパリンであった (n = 8)。リファレンス群では P B S を注射した (n = 1 4)。平均出血時間は P B S 注射コントロールマウスで368秒間、ヘパリン注射コントロールマウスで1056秒間である。H G F A F および I g I V は出血時間を平均で706および765秒間に延ばした。両側 P 値の不对 t 検定によると、H G F A F 注射マウスおよび I g I V 注射マウスの出血時間は P B S 注射マウスで観察された出血時間と有意に異なる (図 2 1 参照)。P 値は、P B S 注射コ

10

20

30

40

50

ントロール群と比較したとき、各々HGF A Fで0.013およびIgIVで0.0045である。これらの観察は、血小板栓の凝固および形成をもたらす、カスケードにおけるクロスベータ構造のミスフォールドタンパク質の役割について実証している。以前に我々により示されたように（例えば、特許出願WO2003NL00501参照）、フィブリン重合にはクロスベータ構造形成を要し、tPAおよびプラスミノゲンによるフィブリン塊溶解がクロスベータ構造結合化合物により阻害されている。更に、血小板はクロスベータ構造のミスフォールドタンパク質により活性化され、活性化された血小板自体がクロスベータ構造を露出させる。実施例2および12において、我々はIgIVがクロスベータ誘導血小板凝集を妨げることを示している。実施例8において、IgIV富化に用いられた出発物質と比較して、HbAGEセファロースで富化されたIgIVがフィブリンとより強く特異的に結合することを、我々は証明している。尾切除出血アッセイにおいてHGF A FおよびIgIVで今回得られたデータは、これらのクロスベータ結合分子が、クロスベータ構造結合化合物に基づく、または凝固および血小板活性化に際してクロスベータ構造と結合することで凝固および/または血栓形成を促す分子と結合する化合物に基づく、抗凝固剤療法の開発に有益な出発点であることを示している。示唆された療法の一態様では、凝固および血小板凝集に關与するクロスベータ構造のタンパク質に特異性をもつアフィニティ領域が選択され、それにより凝固および/または血栓形成の基礎をなすクロスベータ構造のタンパク質へより特異的に治療作用を向けられるようになる。

【0235】

実施例14

ミスフォールドタンパク質へのアフィニティ領域をもつマトリックスを用いた、全身性アミロイドーシス患者の血漿とRA患者の血清および滑液からのタンパク質の単離および同定

クロスベータ構造およびクロスベータ構造を含んでなるタンパク質は本発明によるIgIV分子のコレクションおよび/または本発明による組成物へ効果的に結合されるため、それらはサンプルおよび/または動物またはヒトの体から効果的に分離および/または単離され、その後で同定される。クロスベータアフィニティマトリックスを用いた富化後のIgIVを、クロスベータ構造および/またはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質および/またはタンパク質中のクロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導コンホメーションと特異的に結合しうるタンパク質を単離するために用いた。タンパク質中のクロスベータ構造および/またはクロスベータ誘導コンホメーションと特異的に結合しうるタンパク質は、クロスベータ構造および/またはクロスベータ誘導コンホメーションのタンパク質と不飽和状態で結合されているときに、富化IgIVマトリックスがクロスベータおよび/またはクロスベータ誘導コンホメーションのタンパク質の遊離結合部位と結合し、それによりクロスベータ構造および/またはクロスベータ誘導コンホメーションへ結合されたクロスベータ構造またはクロスベータ誘導コンホメーションと結合するタンパク質と間接的に結合する、という事実により同定される。健康な個体のクロスベータ構造および/またはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質および/またはタンパク質中のクロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導コンホメーションと特異的に結合しうるタンパク質の存在および/または同一性を、クロスベータ構造および/またはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質および/またはタンパク質中のクロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導コンホメーションと特異的に結合しうるタンパク質の存在および/または同一性と比較した。アフィニティ領域のマトリックスで単離されたタンパク質の同一性を質量スペクトル分析により特定した。健康な個体からのサンプルと患者からのサンプルとの結果を比較した。更に、富化IgIVマトリックスと接触させた患者または健康な個体からのサンプルで得られた結果を、固定アフィニティ領域なしで同サンプルをコントロールマト

リックスと接触させた後に得られた結果と比較した。こうして、特定の病状時にミスフォールドするおよびクロスベータ構造コンホメーションを取る傾向があるタンパク質の同一性および/または感受性に関する、およびそれらのミスフォールドタンパク質と優先的に結合するタンパク質に関する情報を得た。これは、例えば病状をモニターする、療法の有効性をモニターする、疾患の発生をモニターするための、疾患特異的な診断ツールの開発のために重要な情報を提供し、好ましくは例示の障害に特異的なクロスベータ構造および/またはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質および/またはタンパク質中のクロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導コンホメーションと特異的に結合しうるタンパク質を標的とした療法の開発のために有益な手がかりを提供する。該療法は例えばその場でミスフォールドタンパク質を除去するか、または透析時に例えばアフィニティマトリックスを用いて体外にミスフォールドタンパク質を除去する。

【0236】

材料および方法

Octagam Ig IV (Octapharma, ロット 5024018434) を、この出願の他の箇所で記載されたように、A セファロース、Hb AGE セファロースおよび d Ig IV セファロースで富化させた。これらマトリックスの溶出物を PBS (2h, 1:2000, 4) に対して透析し、プールし、CNBr セファロース (GE-Healthcare, Amersham Biosciences) に被覆した。富化 Ig IV の固定化を本質的に NHS セファロースに関してこの出願の他の箇所で記載されたように行った。CNBr マトリックスを 1 mM HCl に 200 mg/mL で溶解し、NHS マトリックスと同様に処理したが、但しこの緩衝液で洗浄前にローラー装置にて 1 mM HCl 中で 5 分間の活性化ステップを加えた。プールされた富化フラクションを固定用緩衝液 (50 mM NaCl および 40 mM NaHCO₃) で 15 μg/mL の濃度に希釈した。コントロールマトリックスは固定用緩衝液のみに曝した。一夜後に固定マトリックスを Tris で遮蔽し、洗浄した。

【0237】

6 サンプルを Ig IV セファロースおよびコントロール セファロースとインキュベートした: 正常プール血漿、AL アミロイドーシスをもつ患者 I または患者 II の血漿、RA (リウマトイド因子, RF 力価 682) をもつ患者 III の血清、コントロール血清および RA (RF 力価 23) をもつ患者 IV の滑液。全サンプルを HBS で 20 × 希釈し、500 μL の 2 容量で 200 μL ビーズへ適用した。1 つの容量を RT で 4 時間インキュベートし、上澄を遠心 (1400 rpm で 2 分間) 後に捨てた。その後で、第二の容量を同マトリックスへ適用し、ローラー装置にて 4 で一夜インキュベートした。アフィニティマトリックスまたはコントロールマトリックスを HBS で 12 回洗浄し、結合タンパク質を PBS 中 8 M 尿素 50 μL で 2 回溶出させ、その後各 1 時間で 2 回のインキュベーションステップに付した。溶出物を集めるためにマトリックスを遠心し、2 溶出物を各サンプルについてプールした。

【0238】

サンプルコード:

- A 1 正常プール血漿
- C 1 正常プール血漿
- A 2 AL アミロイドーシス患者 I
- C 2 AL アミロイドーシス患者 I
- A 3 AL アミロイドーシス患者 II
- C 3 AL アミロイドーシス患者 II
- A 4 RA (RF 力価 682) をもつ患者 III の血清
- C 4 RA (RF 力価 682) をもつ患者 III の血清
- A 5 コントロール血清
- C 5 コントロール血清
- A 6 RA (RF 力価 23) をもつ患者 IV の滑液

C 6 R A (R F 力価 2 3) をもつ患者IVの滑液

A シリーズ：富化 I g I V セファロースのアフィニティマトリックス

C シリーズ：コントロールマトリックス（活性化/不活化セファロース）

【 0 2 3 9 】

溶出タンパク質をジチオスレイトール (D T T) (6 0 分間 , 最終濃度 6 . 5 m M) で還元し、次いでヨードアセトアミド (3 0 分間 , 最終濃度 5 4 m M) でアルキル化し、その後で一夜トリブシン消化 (1 0 n g / μ L) に付した。タンパク質消化物を記載されたように脱塩し (Rappsilber et al . , 2003 , Anal . Chem . 75 , 663 - 670) 、真空乾燥させ、 2 . 5 % ギ酸に溶解した。

【 0 2 4 0 】

ペプチド混合物の解析のために、Thermo Finnigan L T Q M S (Thermo Electron , Bremen , Germany) に接続されたAgilent 1 1 0 0 H P L S システム (Agilent Technologies) を用いた。タンパク質消化物をトラップカラム (Reprosil C 1 8 R P (Dr , Maisch , Germany) , 2 0 m m × 1 0 0 μ m I . D .) に 5 μ L / m i n で注入した。その後で、ペプチドを解析カラム (Reprosil C 1 8 R P , 2 0 c m × 5 0 μ m I . D .) へ 1 0 0 n L / m i n 溶媒 A (0 . 1 M 酢酸) の低スプリット流速で移した。ペプチドの溶出は 0 ~ 4 0 % B (8 0 % (v / v) アセトニトリル中 0 . 1 M 酢酸) の直線勾配により 4 0 分間で行った。カラム溶出物を突合せ接続ナノ E S I エミッター (New Objectives , Woburn , M A) からマススペクトロメーターの E S I 源へ直接導入した。マススペクトロメーターを陽イオンモードで操作し、親イオンをデータ依存モードでフラグメント化のために選択した。質量スペクトル測定後、BioWorksソフトウェア (Thermo Electron , Bremen , Germany) を用いてピークリストを作製した。タンパク質同定は、下記セッティング：完全トリブシン処理ペプチド、ペプチドトレランス 0 . 8 D a , M S / M S トレランス 0 . 9 D a , 許容ミス開裂 1 回 , 固定および可変修飾として各々カルバミドメチル (C y s) および酸化 (M e t) を用いて、I P I human データベース (バージョン 3 . 2 4 , ftp : // ftp . ebi . ac . uk / pub / databases / IPI / current からダウンロード) をサーチすることにより、Mascotソフトウェア (www . matrixscience . com) を用いて行った。データを解析し、9 5 % の信頼レベルでペプチドをフィルターにかけ、少なくとも 2 種のペプチドで同定されるタンパク質同定のみを行うために、Scaffoldソフトウェアパッケージ (www . proteomesoftware . com) を用いた。

【 0 2 4 1 】

結果および考察

表 9 では、異なるサンプルについて結果が示されている。アミロイドーシス患者では、ヒトプール血漿をコントロールとして用いた。R A 患者では、健康な対象者からの血清をコントロールとして用いた。コントロール血清および正常プール血漿に関する結果は、患者サンプルで得られたペプチド組成物で特有に存在するペプチドの同定に用いられる。示されるタンパク質は、コントロール血清または血漿と比較して、患者血清または血漿からの特異的に結合したタンパク質またはタンパク質フラグメントである。健康な対象者からの滑液が利用できなかったため、コントロールマトリックスのみが R A 患者からの滑液用の陰性コントロールとして用いられた。前記のように、タンパク質同定は I P I human データベースをサーチすることにより行った。I P I は ' International Protein Index ' の略であり、Swiss-Prot、T r E M B L および P I R のような異なるデータベース (これらのデータベースはすべてUniProtでつながれている) でタンパク質、タンパク質前駆体およびタンパク質フラグメントを同定するために用いられる。UniProtで掲載された (未だされていない) 予想タンパク質配列には多数あるが、ゲノム配列が完全に調べられた限定数の高等真核生物種については、I P I タンパク質セットが作られている。I P I は UniProtと予想を含んでなるソースからもデータをとっており、各種についてそれらを非リダントに包括的プロテオームセットに組み合わせている。この情報はすべて、www . ebi . au . uk からアクセスしうる European Bioinformatics Institute (E B I) のウェブサイトからアクセスした。

10

20

30

40

50

【0242】

滑液と接触させたコントロールマトリックスの溶出物で1つのペプチドが同定された1種のタンパク質 (I P I 0 0 8 0 7 4 2 8) が掲載されているが、その理由はこのタンパク質の7つのペプチドが富化 I g I V マトリックスの溶出物で同定されていたからである。みられるように、7種の‘仮想’タンパク質と検出タンパク質の分子量で示されるタンパク質がある。比較的短いアミノ酸配列は、免疫グロブリンの中で特にみられる特定のタンパク質へ常に唯一属するとはいえなため、多数の結果が同定されるタンパク質フラグメントのあるものにとり可能である。ある他のケースにおいて、仮想タンパク質の I P I 番号は既に同定されたタンパク質に関するものである。

【0243】

サンプル2/3、A L アミロイドーシス患者 I および II の血清において、1つの同定タンパク質は‘ダイニン重鎖ドメイン3’であった。ダイニンは、細胞内カーゴを細胞膜から細胞へ動かす‘モータータンパク質’である。これは例えば自食作用および軸索輸送に関する場合である。ダイニンはタンパク質凝集物の輸送に関与している。そのためそれが血漿中のタンパク質凝集物とある理由で結合されると、それは最終的に富化 I V I g マトリックスと結合することになる。したがって、ダイニンはクロスベータ結合タンパク質として同定される。加えてサンプル2/3では、1種の仮想タンパク質、2種の25 k D a タンパク質および1種の免疫グロブリンラムダ定常1領域を同定した。I P I 番号 I P I 0 0 7 4 7 7 5 2 の25 k D a タンパク質はデータベースのいずれにもリファレンスを有しなかった。しかしながら、それは免疫グロブリンのすべての構造的特性を有していた。他の25 k D a タンパク質は免疫グロブリンラムダ座に遺伝子リファレンスを有していた。仮想タンパク質は免疫グロブリンラムダ可変4 3 の遺伝子およびタンパク質リファレンスを有していた。免疫グロブリンは、各々が定常領域と抗原結合可変領域を有する2本の重鎖と、各々が定常領域と抗原結合可変領域を有する2本の軽鎖からなる。

患者は原発性 A L アミロイドーシスに罹患しているため、同定された軽鎖はおそらく疾患の病理に関与するミスフォールド免疫グロブリン軽鎖である。

【0244】

サンプル4、R A 患者 III からの血清では、いくつか特有のタンパク質を同定した。この患者は600超の R F 力価を有し、これはこの患者が重度 R A に罹患していることを示す。同定されたタンパク質の4種は仮想タンパク質であり、その1つ (I P I 0 0 7 6 0 6 7 8) は免疫グロブリンラムダ座に遺伝子リファレンスおよび免疫グロブリンラムダ定常領域にタンパク質リファレンスを有していた。他の3種は免疫グロブリンのすべての構造的特性を有していた。25 k D a タンパク質として同定された2種のタンパク質は双方とも、免疫グロブリンラムダ座に遺伝子リファレンスを有していた。1種は、リウマトイド因子に外見上特異的なラムダ可変3領域、リウマトイド因子 G 9 軽鎖に特異的タンパク質リファレンスを有していた。したがって、このフラグメントはクロスベータ結合免疫グロブリンの一部である、と結論づけられる。免疫グロブリンラムダ定常1として同定された2種のタンパク質 (I P I 0 0 6 5 8 1 3 0 、 I P I 0 0 7 1 9 3 7 3) と免疫グロブリンラムダ定常2として同定された2種のタンパク質 (I P I 0 0 5 5 5 9 4 5 、 I P I 0 0 4 5 0 3 0 9) があつた。免疫グロブリン領域として同定された1種の他のタンパク質、即ち免疫グロブリンラムダ可変3 2 5 があつた。このフラグメントは、ミスフォールドタンパク質に親和性を示すアミノ酸配列を含んでなる、と結論づけられる。

【0245】

異なる研究では、リウマトイド因子は多くの場合に特異的ラムダ領域を含むことが示され、その1つがこの実験で外見上同定された。同定された他のラムダ領域もリウマトイド因子の一部だったのであろう。これらの領域もミスフォールド免疫グロブリン分子の一部であったのか、またはそれらは、クロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質の特性を示す、免疫グロブリンの F c 領域である R F 自己抗原の一部であった (実施例 1 0 参照) 。

【0246】

10

20

30

40

50

3種の他のタンパク質を同定した。1種は中心体タンパク質Cep290のイソ型Iとして同定された(IPI00784201)。中心体および繊毛関連タンパク質は、有糸分裂後細胞で極性を確立して細胞内輸送を調節する上で重要な役割を果たす。その細胞内局在性のために、その存在は溶解細胞の内容物が患者サンプルに存在することを示している。第二の種がフィブリノーゲンガンマ鎖前駆体のイソ型ガンマBとして同定された(IPI00021891)。異なる形のフィブリノーゲンが、リウマチ様関節炎では自己抗体に対する抗原である。脱イミノ化形のフィブリノーゲンがこれら抗原の1種であり、それはリウマチ様関節炎患者の滑膜で豊富にみられる。

【0247】

同定された最終タンパク質(IPI00004233)はモノクローナル抗体Ki67に対する抗原であった。この抗原は増殖マーカーとして用いられる。一部の場合に、それは腫瘍成長のマーカーとして用いられる。最も興味深いことに、滑膜で炎症細胞タイプの増殖を評価するために、それはリウマチ様関節炎でも増殖マーカーとして記載されていた。

【0248】

サンプル6、リウマチ様関節炎患者IVの滑液には、特有に同定された数種のタンパク質もあった。これらタンパク質のうち3種は仮想タンパク質であった。1種(IPI00807428)は遺伝子またはタンパク質リファレンスを有しなかったが、免疫グロブリンの全特性を有していた。1種(IPI00760678)は免疫グロブリンラムダ座(定常2)に遺伝子データベースリファレンスおよび免疫グロブリンラムダ座定常領域にタンパク質データベースリファレンスと、可変2-14領域および仮想タンパク質にもタンパク質リファレンスを有していた。最後の1種(IPI00003362)は実際に熱ショックタンパク質BiP(GRP78)であった。BiPはクロスベータ経路の成分の1つであり、ミスフォールドタンパク質と結合する(表4および5参照)。BiPがおそらく患者サンプルで同定されるが、その理由はそれがミスフォールドタンパク質に結合されていたからである。BiPはRA患者でそれ自体が標的自己抗原としても同定された。

【0249】

仮想タンパク質以外に、3種の他の無名タンパク質が同定された；25kDaタンパク質2種および26kDaタンパク質1種。両25kDaタンパク質は免疫グロブリンラムダ座に遺伝子リファレンスを有していた(IPI00747752, IPI00154742)。これらのうち1種(IPI00154742)も、前記された、リウマトイド因子に特異的なラムダ可変3領域、リウマトイド因子G9軽鎖にタンパク質リファレンスを有していた。26kDaタンパク質は免疫グロブリンカッパ可変1-5に遺伝子リファレンスを有していた。

【0250】

同定された他の免疫グロブリン領域も数種あった。1種は免疫グロブリンカッパ定常(IPI00807413)、1種(IPI00166866)は免疫グロブリン重定常アルファ1、1種(IPI00748998)は免疫グロブリン一本鎖Fvフラグメント(重鎖可変領域)であり、最後の1種(IPI00658130)は免疫グロブリン軽鎖定常1として同定された。

【0251】

滑液は補体系の一部成分、即ち補体C1q副成分サブユニットC(IPI00022394)、補体C1r副成分(IPI00296165)および補体因子H関連タンパク質1(IPI00011264)も含有していた。リウマチ様関節炎患者の滑液では、C1q、C4および/またはC3結合のミクロ粒子が、リウマチ様関節炎患者および健康なコントロール双方の血清と比較して、豊富にみられることが示された。C1qがアミロイドベータプラークに蓄積することもわかった。最後に、C1qはサーファクタントプロテインA(SPA)と構造的に類似し、双方とも球状ヘッド領域とコラーゲン様テールを有している。SPAは滑膜にある層板小体と会合されて、SPAに対する抗体がリウマチ様関節炎患者の滑液に存在している。これらの自己抗体はC1qと一部交差反応性を有

10

20

30

40

50

している。C1qはクロスベータ経路で作用している(表4および5参照)。SPAとC1qに対する自己抗体との交差反応性から判断して、それも自己抗原であると考えられる。特に、コラーゲンはリウマチ様関節炎における共通自己抗原だからである。

【0252】

補体C1rは、C1qと会合しうるセリンプロテアーゼである。C1rは他の補体因子を活性化しうる。リウマチ様関節炎またはタンパク質ミスフォールディングとの明確な関連性はこれまでのところみられなかった。補体因子H関連タンパク質1(FHR1)は5つのショートコンセンサスリピート(因子Hでもみられる)からなり、その機能はこれまでのところ未知である。FHR1はあるリポタンパク質粒子の一部としてヒト血漿で見られる。FHR1は血漿中でリン脂質および他のタンパク質のリポタンパク質複合体と会合され、この複合体はリポ多糖(LPS)への細胞の応答を媒介することが示された。我々は、LPSがタンパク質でクロスベータコンホメーションを誘導することを証明した。我々は、ApoA-Iがクロスベータコンホメーションをとりうることも確かめた。加えて、ApoA-Iはクロスベータコンホメーションを含んでなる他のタンパク質と結合しうる。該複合体のリポタンパク質は、リン脂質、アポリポタンパク質(apoAI)、リポ多糖結合タンパク質(LBP)および因子H関連タンパク質(FHR)からなる。FHR1はLBPの機能を伝達および/または調節する上で役割を果たす、と結論づけられる。FHR1がこれら粒子の優位タンパク質成分であるため、FHR1はApoA-IまたはLBPより数倍豊富に出現する。以前に、ベータ2糖タンパク質I(アポリポタンパク質Hとも称される)として知られる6つのショートコンセンサスリピートから構成される関連タンパク質がHDL粒子およびリン脂質の双方と会合することが示されていた。

10

20

【0253】

ベータ2糖タンパク質I(IP100298828)も滑液サンプルで同定された。ベータ2糖タンパク質Iはアテローム性動脈硬化症および抗リン脂質症候群、血栓のリスクが大きい状態で公知の自己抗原である。ベータ2糖タンパク質Iの機能は不明のままである。しかしながら、それがリン脂質依存性凝固反応、例えばプロトロンビナーゼテナーゼ複合体の活性および因子XII活性化を阻害することが示されていた。それは因子XIとも結合し、その活性化を阻害する。対照的に、それは活性化プロテイン質Cの抗凝固活性を阻害し、それはインビボでトロンビン生成に寄与している。ベータ2糖タンパク質Iがプラスミンにより開裂されると、それはプラスミノゲンと結合して、プラスミン生成を抑制する。我々は、カルジオリピンと接触させたときまたはアルキル化させたときに2gpIがクロスベータコンホメーションを含んでなり、こうしてそれを免疫原性ポテンシャルにさせることを示した。

30

【0254】

滑液サンプルでは3種の他のタンパク質、即ちカルモジュリン様タンパク質5(IP100021536)(カルモジュリン様皮膚タンパク質とも称される)、デスモブラキンのイソ型I(DPI)(IP100013933)およびゲルゾリンのイソ型I(IP100026314)が同定された。カルモジュリン様タンパク質5は皮膚特異的カルシウム結合タンパク質であり、その発現は顆粒層と角質層の下層に限定される。それは細胞分化に際して発現される。このタンパク質はおそらく汚染物(皮膚細胞)として滑液に存在している。デスモブラキンは表皮における微小管組織のレギュレーターであり、それは表皮のケラチンと会合している。このタンパク質もおそらく汚染物である。ゲルゾリンはアクチンフィラメントにキャップし、ゲルゾリンの分泌形は血漿に存在し、そこではそれがおそらくアクチンスカベンジャーとして作用している。ゲルゾリンはアミロイド沈着物も形成でき、脳アミロイド血管障害を引き起こすタンパク質の1種である。ゲルゾリン遺伝子の突然変異はゲルゾリン関連家族性アミロイドーシスのFinnish型を招く。ゲルゾリンが凝集するかまたはミスフォールドゲルゾリンが滑液サンプルに存在していたとき、それが富化IVIgマトリックスと結合したことは意外ではない。

40

【0255】

50

本実施例で記載されているように、富化 I g I V アフィニティマトリックスの使用により、我々はアミロイドーシス患者に特有のタンパク質数種を同定し、一連のタンパク質がリウマチ様関節炎の患者から得られたサンプルで特有に同定された。これらのタンパク質はクロスベータ構造を含有するか、またはクロスベータ結合タンパク質そのものである。これらのタンパク質は疾患特異的診断ツールの開発のための基礎を形成し、および/またはインビボ（例えば、薬物を投与することによる）および/または半ビボ（例えば、体外装置）で疾患関連ミスフォールドタンパク質を患者から枯渇させることを目指す療法の開発のために新たに特定された標的である。更に、研究では外見上疾患と関連した数種の同定クロスベータ結合分子への洞察もみせた。I g の同定された可変領域は、合成アフィニティ領域の開発にとり良い出発点として役立つ（下記実施例 20 参照）。

10

【0256】

実施例 15アフィニティ領域によるミスフォールドタンパク質と細胞との相互作用の調節

クロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質は細胞と結合して、炎症応答および細胞成長またはアポトーシスの変化に限定されないが、それらを含めた細胞応答を誘起しうる。我々は、アフィニティ領域がこのようなミスフォールドタンパク質と細胞との相互作用を調節しうるかどうかについて取り扱った。我々は臍静脈から単離されたヒト一次内皮細胞（H U V E C）を用いた。

【0257】

材料および方法

20

ヒト臍静脈内皮細胞（H U V E C）の単離、培養および解析単離および培養

H U V E C は、当業者に公知の汎用標準操作に従い、0.1% コラゲナーゼ（Sigma, C 0 1 3 0, 1 0 0 m g, 1 0 % F C S (Gibco 1 0 1 0 6 1 6 9) およびペニシリン ストレプトマイシン（P / S, Gibco, 1 5 1 4 0 1 2 2）で補充された 1 0 0 m L M 1 9 9 培地に溶解）を用いて臍帯から単離された一次内皮細胞（E C）である。H U V E C は E C の典型的特徴、例えば丸石形態および Weibel-Palade 体中フォンビルブランド因子貯蔵を有している。H U V E C は継代 5 まで規則的に培養できる；継代 5 を超えると H U V E C は典型的 E C マーカーを放出する。単離法はここでは簡単に記載されている。臍帯をエタノールに続き P B S で 3 分以内に洗浄する。血管をカニューレへつなぎ、1 0 m L P B S でフラッシングし、次いで 0.1% コラゲナーゼ溶液で負荷する。37 °C で 1 5 分間インキュベート後、後でコラゲナーゼ溶液に加えらるる 1 0 m L 培地で血管をフラッシングすることにより、離れた内皮細胞懸濁物を回収する。E C 懸濁物を室温にて低 g 力で 5 分間遠心する。上澄を捨て、細胞ペレットを 5 m L ‘富培地’（E G M 2；内皮基礎培地（E B M 2, Cambrex, C C 3 1 5 6）および内皮細胞用サプリメント含有の S i n g l e q u o t (Cambrex, C C 4 1 7 6)）に再懸濁する。細胞（継代 0, P 0）を 0.5% ゼラチン（Sigma, G 1 3 9 3）で被覆された培養フラスコに接種する。内皮細胞の接着を促すため、ヒトフィブロネクチンを 2 μ g / m L の最終濃度で細胞培養物へ加える。E C を 5 % C O 2 下 37 °C で培養する。細胞培地を密集的になるまで 2 ~ 3 日毎に入れ替える。次いで、トリプシン E D T A の添加で、細胞をフラスコから離し、低 g 力で遠心し、富培地に再懸濁し、大きな 0.5% ゼラチン前被覆細胞培養フラスコに接種する。

30

40

【0258】

R A G E の発現および精製

組換えヒト s R A G E クローニング、発現および精製の記載に関しては、特許出願 W O 2 0 0 6 1 0 1 3 8 7 (パラグラフ [0303]) 参照。精製 s R A G E F L A G H i s ストックは P B S 中 2 8 4 μ g / m L であり、- 8 0 °C で保存した。

【0259】

ミスフォールドタンパク質への細胞の接着

9 6 ウェルプレート（Immulon 1 B Thermo Labsystems 3 3 5 5）に、タンパク質、即ち B S A A G E (5 μ g / m L)、1 0 μ g / m L 天然 I V I g (Octagamチャージ

50

5 0 2 4 0 1 8 4 3 4)、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 富化 I V I g (Octagam I g I V を H b A G E セファロースと接触させることで富化〔記載に関しては本出願の他の箇所参照〕) またはゼラチン (Sigma, G 1 3 9 3, H_2O または P B S 中 2 % 溶液, E C への接着に関する陽性コントロール) を $100 \mu\text{L}$ 溶液で被覆させた。37 で 2 時間インキュベート後、溶液を捨て、ウェルをフィルター ($0.22 \mu\text{m}$) 滅菌された P B S 中 0.5 % ポリビニルピロリドン (P V P, Sigma P 5 2 8 8) の $100 \mu\text{L}$ / ウェルで 37 にて 1 時間かけて遮蔽した。P V P は細胞接着をサポートしない不活性ポリマーである。その後で、P V P 含有溶液を捨てた。次いで、プレートを $40 \mu\text{L}$ R P M I 1 6 4 0 培地 (Gibco 5 2 4 0 0) および $10 \mu\text{L}$ のポテンシャルインヒビター、例えばアフィニティ領域とインキュベートした。H U V E C をトリプシン処理により得た。遠心後、細胞を P / S 含有の R P M I 1 6 4 0 培地に再懸濁し、 $80,000 \sim 100,000$ 細胞 / mL に希釈した。各ウェルを $100 \mu\text{L}$ の細胞懸濁物で接種した。細胞を 37 で 1 時間かけて接着させた。プレートを P / S 含有の R P M I 1 6 4 0 培地で穏やかに洗浄した。ウェルの壁に沿うピベッティングにより培地を除去した。ブランクウェルがほとんど細胞を含有しなくなるまで、即ち 1 ~ 3 回プレートを洗浄した。その後で、 $50 \mu\text{L}$ R P M I 培地を各ウェルへ加え、次いで $5 \mu\text{L}$ / ウェルの P B S 中 10 % Triton X 100 を加え、37 で 10 分間インキュベートした。次いで、 $50 \mu\text{L}$ のラクトデヒドロゲナーゼ (L D H, Roche Applied Science, 1 1 6 4 4 7 9 3 0 0 1) 溶液を製造業者の指示に従い加えた。プレートを暗所中室温で 0.5 ~ 3 時間インキュベートした。 490nm の吸光度を Versamax マイクロプレートリーダーにより様々な時点で測定した。

10

20

30

40

50

【 0 2 6 0 】

蛍光活性化細胞分取 (F A C S) 解析により評価された細胞へのミスフォールドタンパク質の結合性

これらの実験のために、H U V E C をトリプシン処理により単離した。トリプシン処理後、細胞を P / S および 10 % F C S 含有の R P M I 1 6 4 0 で集め、遠心した。遠心後、細胞を $250,000$ 細胞 / $250 \mu\text{L}$ の濃度で無 F C S の R P M I 1 6 4 0 に再懸濁した。 $250 \mu\text{L}$ 細胞懸濁物を含有する個別 4mL チューブ (ポリプロピレン, Greiner) を作製した。各チューブに、緩衝液 (P B S) のみ含有のサンプル $75 \mu\text{L}$ 、 $25 \mu\text{L}$ o x L D L ($1 \text{mg}/\text{mg}$) 含有の $50 \mu\text{L}$ 緩衝液または $1 \mu\text{L}$ B S A A G E ($25 \text{mg}/\text{mg}$) 含有の $74 \mu\text{L}$ 緩衝液を加えた。その後で、細胞を 4 で約 3.5 時間にわたりサンプルとインキュベートした。次いで細胞を遠心によりペレット化し、上澄を捨てた。細胞をその後 4 にて F A C S 緩衝液 (P B S / 0.5 % B S A / 0.05 % m / v NaN_3) で洗浄し、後の解析のために約 1×10^5 細胞 / $100 \mu\text{L}$ で F A C S 緩衝液に再懸濁した。 $3 \mu\text{L}$ 7 アミノアクチノマイシン D (7 A A D) 溶液 (標準操作に従い調製) を加えることにより細胞死を調べた。サンプル B S A A G E (調製の詳細に関しては本出願の他の箇所参照) の結合性を抗 A G E モノクローナル抗体 4 B 5 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)、洗浄後にヤギ抗マウス P E 二次抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, U S A) で調べた。B S A A G E の結合性は P E チャンネルで B S A A G E の固有蛍光を用いることでも評価した。酸化 L D L (o x L D L, FeSO_4 でインキュベート後に 56 % 酸化; チオフラビン T 蛍光の特異的増強) の結合性を、 $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、抗 A p o B 1 0 0 ポリクローナル抗体 (Data Behring, Newark, D E, U S A, ロット 1 5 3 6 7 0) 含有の、細胞を洗浄した後、F I T C 標識ヤギ抗ウサギ抗体 (1 : 200, Jackson) 含有のウサギ血清により調べた。

【 0 2 6 1 】

結果および結論

ミスフォールドタンパク質への細胞の接着

H U V E C がミスフォールドタンパク質と、即ちここで示されているように、ゼラチンよりもやや大きい程度、約 125 % で B S A A G E と接着することがわかった (図 2 2 A, パー 1 vs. 3)。漸増濃度のアフィニティ領域、即ち I g I V が B S A A G E への E C の接着を阻害した (パー 7 ~ 9 vs. パー 3)。これらのデータは、アフィニティ領域

がミスフォールドタンパク質と細胞との相互作用を妨げることを示している。

【0262】

図22Bは、細胞がアフィニティ領域(IgG, Octagam)、最も効率的には富化アフィニティ領域(富化IgG, OctagamをHb A GE セファロースと接触させることによる富化後、記載に関しては本出願の他の箇所参照)とも結合することを示している。Fcドメインを含んでなる固定アフィニティ領域へのECの結合は古典的Fcレセプターにより媒介されず、このようなレセプター、即ちCD16、CD32aおよびbとCD64がFACS解析を用いて調べられるように細胞に存在しないからであった(示さず)。アフィニティ領域はミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうるため、アフィニティ領域と細胞とのこの相互作用はアフィニティ領域への細胞上ミスフォールドタンパク質の特異的な結合により説明される。確かに、細胞の約1~2%はFACS解析で調べられるように生存力が低い(示さず)。

10

【0263】

フローサイトメトリーにより調べられた細胞へのミスフォールドタンパク質の結合性

2方法を用いて、BSA A GEは13.9の平均蛍光強度(MFI)でECの96%と効率的に結合することがわかった。oxLDLはインキュベートされたECの18%と結合し、1.6のMFIを示した。BSA A GEと懸濁状態でインキュベートされたECで得られた結合特性は、BSA A GEで被覆された細胞培養プレートのウェルとECが効率的に結合するという観察と一致する(図22参照)。

20

【0264】

一緒にすると、これらの結果は、細胞がクロスベータ構造のミスフォールドタンパク質と特異的に結合でき、アフィニティ領域、好ましくは富化アフィニティ領域がこのようなミスフォールドタンパク質と細胞との相互作用を調節することを証明している。この実施例で、我々はOctagam IgIVに存在するIgIVアフィニティ領域が固定ミスフォールドBSA A GEへのECの接着を効率的に遮蔽することを観察した。固定ミスフォールドタンパク質に対するアフィニティ領域はミスフォールドタンパク質と結合して、EC表面レセプターとの相互作用からそれを遮断している、と結論づけられる。

30

【0265】

実施例16

富化IgIVを用いたミスフォールドタンパク質から溶液の枯渇

我々は、クロスベータ構造を含んでなる固定ミスフォールドタンパク質のマトリックスと結合するアフィニティ領域の選択後に得られた富化IgIVが、クロスベータ構造から溶液を枯渇させるための適しているかどうかを解析した。簡単に言えば、ELISAアプローチにおいて、実施例6で記載されたようにA フィブリル セファロース、dIgIV セファロース、dHSA セファロースおよびBSA A GE セファロースを用いて富化されたIgIVの混合物を固定し、ミスフォールドHb A GEおよびdOVAのスパイク溶液へ曝し、その後で富化IgIVへのミスフォールドタンパク質の結合性を評価した。

40

【0266】

材料および方法

実施例6で記載されたように、A フィブリル セファロース、dIgIV セファロース、dHSA セファロースおよびBSA A GE セファロースを用いることによりOctagam IgIV(ロット5024018434)を富化させた。Ig濃度は約30µg/mLであった。本実験では、アフィニティマトリックスからの4溶出物を容量ベースで1:1:1:1混合し、運動下室温で1時間かけてGreiner MicroLon高結合性プレートに5µg/mLの濃度で被覆した。陰性コントロールとして、コントロール緩衝液のみまたは天然HSA(CEALB, Sanquin, オランダ)を被覆した。ELISAを本質的に前記のように行った。富化IgIVまたはHSAまたは被覆用緩衝液で被覆された遮蔽(Roché遮蔽試薬)ウェルを0、1、10または100µg/mLのdOVAまたはHb A GEで二重に覆った。dOVAの結合性はモノクローナル抗ニワトリ卵アルブミン(Sigma,

50

A 6 0 7 5 , 1 : 1 0 , 0 0 0) および R A M P O (Dako Cytomation, P 0 2 6 0 , 1 : 3 0 0 0) を用いて評価した。H b A G E はグルコース 6 リン酸グリケート化ヒトフィブロネクチンに対する A G E 特異的マウスハイブリドーマ I g G 4 B 5 および R A M P O を用いて検出した。後にタンパク質溶液で覆われる緩衝液被覆ウェルで得られたバックグラウンドシグナル(下記参照)を、被覆富化 I g I V または H S A のウェルで得られたシグナルから差し引いた。加えて、d O V A または H b A G E が加えられなかったウェルとの一次および二次抗体インキュベートで得られたバックグラウンドシグナル(結合の緩衝液コントロール)を 1、10 および 100 μ g / mL ミスフォールドタンパク質で得られたシグナルから差し引いた。

【0267】

結果および考察

図 2 3 は、d O V A が固定富化 I g I V により溶液から抽出され、一方 H S A への付着がほとんど生じなかったことを示す。同様に、H b A G E も富化 I g I V により特異的に抽出された。これらの結果は、適切な固体支持体に固定されたクロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質に増加した親和性をもつ富化 I g I V が、クロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質、例えば d O V A および H b A G E から溶液の枯渇に適用される上で適していることを示す。

【0268】

ミスフォールドタンパク質からタンパク質溶液を枯渇させるために開示されたこの方法の適用例は、例えば、i) タンパク質ミスフォールディング疾患、例えば腎不全、全身性アミロイドーシス、例えば A L、A A または A T T R アミロイドーシス、または R A の診断、ii) 例えば生物薬剤およびワクチンのようなタンパク質溶液の品質コントロール、iii) タンパク質ミスフォールディング疾患、例えば腎不全、全身性アミロイドーシス、例えば A L、A A または A T T R アミロイドーシス、または R A に罹患した患者の、例えば体外装置を用いた透析、および iv) (免疫原性) 副作用の誘導リスクをもつミスフォールドタンパク質から生物薬剤のクリアランスの分野であるが、それらに限定されない。上記適用例のすべてにおいて、ミスフォールドタンパク質への優先的および特異的結合に関する適用アフィニティ領域の詳細はニーズに合わせて調整される。1つの好ましい態様において、実施例 6 および 7 と以下の“実施例 1 ~ 20 に基づく要旨”で記載された方法および手段により、それらの特異的アフィニティ領域は、例えば前記のようなある目的に要されるアフィニティ領域の組成物から選択される。

【0269】

実施例 17

富化アフィニティ領域によるミスフォールドタンパク質への細胞応答の免疫調節

ミスフォールドタンパク質から体を浄化するために、免疫細胞が様々な手法でミスフォールドタンパク質に応答する。応答には、ミスフォールドタンパク質のオプソニン化、免疫系の他の細胞を活性化および誘起するためのサイトカインおよびケモカインの産生、および他の細胞を活性化するための細胞表面マーカーの発現がある。特に、ミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうるアフィニティ領域のような抗体は、このような免疫細胞を活性化するために、免疫細胞と相互作用する。我々は、グリケート化 B S A のようなミスフォールドタンパク質を認識する抗体で富化されたアフィニティ領域が、ミスフォールドタンパク質への応答を高められたかどうかについて試験した。我々は健康なボランティアの末梢血から単離された一次ヒト樹状細胞(DC)を用いた。我々はサイトカインインターロイキン 6 (I L 6) およびケモカイン I L 8 の産生、細胞表面マーカー(C D 8 0、C D 8 3、C D 8 6 および C D 4 0) の発現と、細胞生存率および残存率(7 A A D の結合)を調べた。

【0270】

材料 & 方法

末梢血単球由来樹状細胞のインビトロ作製および活性化の解析

本質的に公表された方法(Sallustro and Lanzavecchia[1994], J.Exp.Med.179, 1109-

10

20

30

40

50

1118) により、末梢血単核細胞 (P B M C) から選択された非増殖前駆体からヒト D C を作製する。C D 1 a、C D 3 2、C D 3 6、C D 4 0、C D 5 4、C D 8 6、H L A D R および C D 2 0 6 の相対的に豊富な存在量と C D 1 4 陽性、C D 1 6 陽性、C D 6 4 陽性、C D 8 0 陽性、C D 8 3 陽性および C D 1 6 3 陽性細胞の比較的低い含有量が、未成熟 D C の品質尺度として働く。G M C S F および I L 4 の刺激で未成熟 D C を得た後、1 m L の細胞懸濁物を、5 0 μ L の下記化合物 (最終濃度)、i) P B S、ii) 5 0 μ g / m L ポリ I C と 1 0 0 n g / m L T N F、iii) 5 0 μ g / m L B S A A G E、iv) B S A A G E + 4 . 4 μ g / m L 富化 I g I V、v) iv) と同様だが、細胞が飽和濃度の遮蔽抗 C D 3 2 a 抗体とプレインキュベートされたもの、vi) B S A A G E + 6 6 0 μ g / m L Octagam I g I V、vii) vi) と同様だが、細胞が飽和濃度の遮蔽抗 C D 3 2 a 抗体とプレインキュベートされたものと、2 2 時間インキュベートする。Octagam I g I V を H b A G E セファロースと接触させ、その後でミスフォールドタンパク質マトリックスと結合したアフィニティ領域を単離することにより、富化 I g I V を得る。

10

【0271】

下記パラメーター：F A C S を用いて測定される C D 8 3、C D 8 6、C D 8 0 および C D 4 0 の表面密度 (平均蛍光強度, M F I または % 陽性細胞) と、アポトーシスマーカー 7 アミノアクチノマイシン D (7 A A D) 結合性で調べられるような細胞死 / 細胞生存率に関して、D C を解析した。加えて、I L 6 では Pelipair E L I S A (M 9 3 1 6, Sanquin Reagents, Amsterdam, オランダ) および I L 8 では Cytosets C H C 1 3 0 4 キット (Biosource) を用いて、I L 6 分泌および I L 8 分泌の程度を細胞培養上澄で調べる。

20

【0272】

結果および考察

表 1 0 は解析からの結果を示している。D C はコントロール刺激 (T N F アルファの存在下ポリ I C) に強く応答していることがわかる。データは、富化 I g I V が B S A A G E の存在下で D C を刺激しうることを証明している。対照的に、非富化 I g I V は 1 5 0 倍高濃度のときでも D C をほとんど増強できない。例えば、I L 6 (4 4 3 3 p g / m L) および I L 8 (1 9 3 1 6 p g / m L) の発現は富化 I g I V により強く刺激されるが、非富化 I g I V では限定的にすぎない (各々 1 9 1 p g / m L および 4 6 8 2 p g / m L)。加えて、富化 I g I V は C D 8 0、C D 8 3、C D 8 6 および C D 4 0 のような補助刺激分子の発現も刺激する。応答は F c R I I a に対する抗体 (抗 C D 3 2 a) により阻害され、このことは効果がこの F c レセプターにより媒介されていることを示す。

30

【0273】

一緒にすると、これらの結果は、アフィニティ領域、好ましくは富化アフィニティ領域が、特に F c R を介して、ミスフォールドタンパク質を除去するために免疫系を増強する役割を果たしていることを示す。このように、開示された方法により、当業者であれば、ミスフォールドタンパク質を除去するため、疾患の病理におけるミスフォールドタンパク質の関与を減らすために、好ましくは疾患の治療で用いられるアフィニティ領域を選択することができる。

40

【0274】

実施例 1 8

富化 I g I V アフィニティ領域と、H b A G E セファロースミスフォールドタンパク質アフィニティマトリックスを用いて富化 I g I V が選択された I g I V における、抗環式シトルリン化ペプチド抗体の存在に関する解析

実施例 1 および 3 ~ 9 において、アフィニティ領域、即ちヒト I g I V の様々な調製物がクロスベータ構造のミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうることを我々は証明した。実施例 1 0 では、I g G 分子の F c ドメインに対する自己抗体、リウマトイド因子 (R F) 力価の解析に関するアッセイで使用のヒト I g G の調製のために 6 5 で加熱す

50

ることにより凝集させる広く許容された方法が、I g G分子でクロスベータ構造を誘導することを我々は証明した。RF力価は全リウマチ様関節炎患者の70～80%でみられる。加えて、外見上健康な集団の約5%もRFに陽性である。我々は、クロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導タンパク質コンホメーションと特異的に結合しうるI g I V中のI g サブ集団が、環式シトルリン化ペプチド(C C P)に親和性を有する可能性について、今回は取り扱った。

【0275】

リウマチ様関節炎患者の80%超でみられる自己抗体の集団が、フィブリノーゲン、フィラグリンおよびピメンチンのようなあるタンパク質の脱イミノ化形を標的とすることが、広く記載されていた。最近、抗合成シトルリン化フィラグリン配列抗体は実際に患者でシトルリン化フィブリンと結合することが記載されていた。我々は以前に、フィブリンがクロスベータ構造コンホメーションを有することを示した。脱イミノ化で、アミノ酸アルギニンがアミノ酸シトルリンに変換される。したがって、このプロセスはシトルリン化と称され、シトルリン化タンパク質を生じる。シトルリン化タンパク質へのこれら抗シトルリン化タンパク質自己抗体の結合に基づくリウマチ様関節炎の診断試験、例えば抗環式シトルリン化ペプチド(C C P) E L I S A試験(抗C C P E L I S A)が、ルーチンで用いられている。タンパク質のシトルリン化がどのようにRA患者で自己免疫応答を誘起するかが大いに未知であったのは、本発明までのことであった。我々は、タンパク質のシトルリン化の引証結果がタンパク質のアンフォールディング/リフォールディングであることに気付いた。本発明によると、酵素ペプチジルアルギニンデイミナーゼによるアルギニン残基のシトルリン化は、アルギニン残基を含んでなるタンパク質のミスフォールディングを誘導する。アルギニンシトルリン化の結果は、タンパク質における正電荷の正味喪失である。正電荷のこの正味喪失は、タンパク質三次元構造の安定性および完全性に関与する、イオン相互作用および水素結合の調節によるミスフォールディングに寄与する。我々は以前に、クロスベータコンホメーションの出現によるタンパク質のミスフォールディングが、タンパク質を免疫原性体へ変えることを証明した(特許出願“クロスベータアジュベーション”, WO 2007008070参照)。我々はしたがって、タンパク質のシトルリン化およびこのタンパク質で生じるミスフォールディングがクロスベータ構造の形成を伴い、そのことがこれらシトルリン化タンパク質の(自己)免疫原性特徴を説明している、とここでは結論づけている。この結論を確認するために、我々はNH₂セファロースに固定されたミスフォールドグリケート化ヘモグロビンとOctagam I g I Vを接触させることにより回収された我々の富化I g I Vアフィニティ領域集団中における抗C C P抗体の存在について試験した。

【0276】

材料および方法

下記アフィニティ領域調製物を抗C C P抗体力価の出現について解析した：

1. Octagam I g I V (Octapharma, チャージ番号：5024018434, 50 mg/mL)
2. 10 mg/mL ヒト グロブリン (Sigma G4386, ロット21k7600)。PBSに溶解し、ローラー装置にて室温で10分間、その後37℃で10分間、および再びローラー装置にて室温で10分間インキュベートする。
3. Gammagard I g I V (Baxter Hyland Immuno Gammagard S/D5 g, ロットLE08E044AL, 52 mg/mL, 供給溶液に溶解し、等分し、-20℃で保存する)
4. PBS中103 μg/mL 富化I g I V。実施例6、7で記載されているように、Hb A G E セファロースを用いてOctagam I g I V (チャージ番号：5024018434)から富化する。

【0277】

ルーチン力価測定は、抗C C P抗体力価測定のためにE l i Aシステム(Phadia GmbH)を用いて、Laboratory for Medical Immunology (U M C Utrecht, オランダ)で行った。サンプル1～4を、患者の血清に関してルーチンに行われる100×希釈の代わりに、

解析のために 10 × 希釈した。

【0278】

結果 & 考察

様々なアフィニティ領域調製物における抗CCP抗体力価を、EliAシステムを用いて地元のLaboratory for Medical Immunology (UMC Utrecht, オランダ) で測定した。測定された力価に関しては表11参照。IgIVおよび グロブリン調製物で得られた値は、疾患を診断する目的に照らし陰性として血清中抗CCP力価を判断する限界範囲、即ち < 7 U/mL に属する。実際に、測定された力価は外見上健康な個体の血清で規則的にみられる。富化IgIVでは、得られた力価 2.7 U/mL が、富化IgIVが単離されたOctagam IgIVで測定されたものに匹敵する。富化IgIVの濃度はしかしながら 485 倍低く、このことは抗CCP抗体に関して富化IgIVアフィニティ領域調製物の 437 倍富化を示唆している。このことから、ミスフォールドHbへのそれらの親和性に基き選択されたアフィニティ領域もシトルリン化ペプチドに親和性を示す、と我々は結論づけている。

【0279】

ペプチジルアルギニンデイミナーゼは様々な組織および細胞にタンパク質レベルおよび mRNA レベルで局在していたが、赤血球にはない。更に、赤血球プロテオームにおけるペプチジルアルギニンデイミナーゼの存在はプロテオミクスアプローチで検出されなかった。したがって、これらの発見に基づき、リシンおよびアルギニン残基の徹底グリケーションに用いられたヒトヘモグロビン (Hb) はシトルリン化されていない、と我々は結論づけている。加えて、抗CCP力価解析で用いられた環式シトルリン化ペプチドはヒトフィラグリンに基づく修飾配列であり、したがってHbアミノ酸配列を含まない。ヒトフィラグリンアミノ酸配列とヒトHb 鎖または 鎖アミノ酸配列との配列アライメントでは、約19アミノ酸残基、即ち解析に用いられた第二世代のCCPの長さのペプチド鎖間で、低～無配列相同性 (即ち、約20～35%) を呈する。前記のように、シトルリン化はタンパク質リフォールディングの誘導について周知である。したがって、我々の結果は、クロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質、即ちHbAGEの使用で、我々がヒトHbと無関係なアミノ酸配列を有するCCPに特異的な一連のアフィニティ領域をIgIVアフィニティ領域のコレクションから選択しえたことを証明している。この発見で、グリケーションで誘導された、シトルリン化で誘導された、またはタンパク質ミスフォールディングのためのいずれか他の手段もしくは方法により誘導されたミスフォールディングが、アミノ酸配列と無関係な、タンパク質に共通の構造的特徴、即ちクロスベータ構造および/またはクロスベータ構造誘導コンホメーションの獲得を招く、という我々の結論を我々は確証した。これは抗CCP力価データの解釈にとり重要な示唆を有している。シトルリン化タンパク質と特異的に結合しうるアフィニティ領域が、タンパク質のシトルリン化で誘導されるアミノ酸配列非依存性構造的特徴に特異性をもつアフィニティ領域の集団を実際に含んでなることが開示されていたため、特定抗CCP力価の患者が罹患している疾患の病理におけるタンパク質ミスフォールディングの示唆は明らかに無視しえないのである。シトルリン化で形成されたミスフォールドタンパク質は、したがって、例えばRA特異的療法の開発で行われるリサーチに向けて新たに特定された標的である。我々の結果は、ミスフォールドタンパク質 マトリックスを用いて得られた富化IgIVアフィニティ領域が、RA関連ミスフォールドタンパク質に対する薬物開発のためにこのように新たに特定されたリード化合物であることを証明している。

【0280】

実施例 19

ミスフォールドマウス グロブリンに特異性をもつヒト富化IgIVアフィニティ領域背景

リウマトイド因子 (RF) は、熱への暴露によるIgGのミスフォールディングで露出される自己IgG分子のFcドメインにおけるエピトープに対するIgA、IgG、IgM自己抗体の組成物である。RFはリウマチ様関節炎 (RA) 患者の70～80%で生じ

10

20

30

40

50

、比較的高いRF力価が重度の疾患進行と相関している。実施例10において、我々は、クロスベータ構造が形成されるように、RFエピトープを暴露させる方法が実際にIgGをミスフォールドさせ、こうしてRFがIgGでクロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導コンホメーションに親和性をもつアフィニティ領域であるという結論に至ることを証明している。我々は、クロスベータ構造をもつ4種の異なるタンパク質、即ち合成ヒトA140、ニワトリ血清アミロイドA、グリケート化ヒトヘモグロビンおよびヒトフィブリン鎖の合成フラグメントでのマウスの免疫化が免疫応答を誘起し、クロスベータ構造を含んでなるミスフォールドヒトIgGに特異性をもつハイブリドーマIgMクローンをもたらすことをみつけた。無関係のアミノ酸配列をもつが、クロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導コンホメーションの存在が共通する、4種のタンパク質抗原のうち1種以上は、ミスフォールドヒトIgGのクロスベータ特徴を偶然にも近密に連想させるクロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導構造的特徴を含んでなる。別な説明は、4種抗原のうち1種以上における構造的クロスベータ特徴が、マウス自己Ig分子におけるクロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導コンホメーションと似ていることである。交差反応性は、B細胞によるIgの過剰産生を伴う、免疫系の高活性時に生じたのかもしれない。マウス免疫系の異常反応性は、多数の浸潤線維芽細胞を伴う、極めて大きな脾臓(細胞数7倍増加)から結論づけられる。更に、マウスは免疫化試験時にしばらく重症であった。これらの観察は、ミスフォールドヒトIgGへのハイブリドーマIgMの親和性観察で反映される、自己IgGに対する自己免疫応答の帰結かもしれない。第三のもっともな説明は、マウスがレパートリーでRFと共通した性質の一般的クロスベータ結合IgMクローンをまさに有し、それがクロスベータアフィニティマトリックスを適用することでヒトIgIVから選択されるIgGと似ていることである。我々は、HbAGEマトリックスで選択時にミスフォールドタンパク質に親和性をもつアフィニティ領域について富化されたヒトIgIVが、ミスフォールドマウスIgGに親和性をもつアフィニティ領域を含んでなるかどうかについて今回は評価した。これは、一般的にミスフォールドタンパク質に親和性をもつ自己免疫グロブリンの集団の存在に関する我々の知識を更に確証させることになる。

【0281】

材料および方法

クロスベータ構造と結合するアフィニティ領域の選択のためのプールとして用いられるOctagam IgIV出発物質と富化ヒトIgIVが、クロスベータ構造のミスフォールドマウスIgGに親和性をもつアフィニティ領域の集団を含んでなるかどうかについて試験するために、我々はマウスIgGの様々なミスフォールド形へのOctagam IgIVおよび富化IgIVの結合性を解析し、天然マウスIgGとの結合性の結果と比較した。天然マウスIgG、高pHに曝されたマウスIgG(dmIgG塩基)、低pHに曝されたマウスIgG(dmIgG酸)およびPBS中85に加熱されたマウスIgG(dmIgG85)でThT蛍光およびコンゴレッド蛍光を測定すると、クロスベータ構造が様々なミスフォールディング方法で誘導されることを明らかにした。ELISAを2つの異なる手法で行った。1アプローチでは、マウスIgGをウェルに直接被覆し、富化IgIVの濃度シリーズで覆った。それとは別に、第一のウサギ抗マウス免疫グロブリン(RAMPO, Dako Cytomation, Denmark)をウェルに被覆した。ウェルを(Roche遮蔽試薬)遮蔽し、その後でマウスIgG調製物を固定抗体へ結合させてから、OctagamヒトIgIVの濃度シリーズを三重にウェルへ適用した。

【0282】

結果&考察

図24では、2つの別なELISAアプローチの結果がまとめられている。両実験アプローチにおいて、ヒトアフィニティ領域はマウスIgGの様々なミスフォールド形と優先的に結合する。天然マウスIgGへの富化IgIVの結合はほとんど検出されず、Octagam IgIVは天然マウスIgGと全く結合しなかった。Octagam IgIVおよび富化IgIVは双方とも、各々約200µg/mLおよび4.4µg/mL IgIVの半最大結

合性を示す濃度で、dmIgG塩基と最高親和性で結合した。富化IgIVで天然マウスIgGへの一部結合性がみられ、一方結合性がOctagam IgIVで検出されなかったという事実は、富化IgIVが高親和性を有するマウスIgG組成物中におけるミスフォールドIgG分子のあるフラクションの存在を示している。これらの数値から、富化IgIVはミスフォールドマウスIgGとの結合性に関して約50倍富化されている、と導かれる。

【0283】

結論として、3つの異なる形のミスフォールドマウスIgGは、富化ヒトIgIVおよび富化IgIVが選択されるOctagam IgIVとの結合部位を含んでなる。dmIgG塩基は、Octagam IgIVおよび富化IgIVの双方が最高親和性を呈するミスフォールドタンパク質コンホメーションを曝している。これらのデータは、ミスフォールドグリケート化ヘモグロビンから構成されるアフィニティマトリックスを用いることにより、ミスフォールドマウスIgGに親和性を示すIgG分子の組成物、即ちOctagam IgIVからアフィニティ領域の集団が選択されることを示している。これは、選択された富化IgIVフラクション、ひいてはOctagam IgIV中におけるRF様アフィニティ領域、即ちクロスベータ構造のミスフォールドアフィニティ領域と優先的に結合するアフィニティ領域の出現を示している。

【0284】

実施例20

リウマトイド因子を連想させる結合性のハイブリドーマIgM

背景

実施例1～5の物質および方法セクションで前記されたように、マウスハイブリドーマIgM 7H2H2はヒト免疫グロブリンの一部ミスフォールド形と特異的に結合する。我々はしたがって7H2H2をリウマトイド因子様抗体と命名した。マウスを合成ヒトA140、ニワトリ血清アミロイドA、グリケート化ヒトヘモグロビンおよびヒトフィブリン鎖の合成ペプチドで連続免疫してから、脾臓をハイブリドーマの調製用に摘出した。注目すべきことに、脾臓が摘出されたとき、それは例外的に多数の細胞、 7×10^8 を含んでいた（正常数は 1×10^8 細胞である）。加えて、脾臓は例外的に多数の浸潤線維芽細胞を含んでいた。これらの観察は、マウス免疫系の高活性に起因する、高活性脾臓を示している。注目すべきことに、Aで初回免疫化後約40週目に、第二、第三または第四ミスフォールド抗原で免疫化前に、マウスは病気になったが、数週間以内で、第二抗原、即ちニワトリSAAで免疫化前に回復した。7H2H2が免疫グロブリンおよびミスフォールドIgIVを認識し、一方無関係のアミノ酸配列を含んでなる4種の抗原が免疫化に用いられ、（外来）免疫グロブリンが抗原として用いられていないという事実は、免疫化操作に際するある時点の高活性化免疫系とマウスの病気の観察と合わせると、マウスが自己抗体に対する自己免疫応答を起こしたと我々に結論づけさせた。7H2H2へエピトープを曝すためのヒトIgGの構造的要件を更に解析する上で、我々は異なる方法で得られたミスフォールド抗体を含んでなる一連のヒトIgG調製物で結合実験を行った。

【0285】

材料および方法

ヒトIgGの様々な構造外形へのハイブリドーマクローン7H2H2 IgMの結合性の解析のために、希釈シリーズの精製7H2H2（PBS中2.5mg/mL；P.van Kooten, ABC-Hybridoma facility, University of Utrecht/UMC Utrecht, オランダ）または固定濃度の12.5μg/mL IgMを固定ヒトIgGでELISAに用いた。陰性コントロールとして、ハイブリドーマIgM 2G10を用いた。解析に用いられたヒトIgGのミスフォールド形および天然コントロールが図25で示されており、1) IgIV65で5分間（‘RF’法）、2) IgIV65、3) IgIV69、4) IgIV76、5) IgIV80、6) IgIV83、7) IgIV86、8) IgIV酸/塩基コントロール、9) IgIV酸、10) IgIV塩基、11) 天然Gammagard IgI

10

20

30

40

50

V、12) IgIV HFIP/TFA、13) IgIV NaPi 5mg/mL、14) IgIV NaPi 20mg/mL、および15) IgG塩基変性、37 である。構造詳細に関しては、クロスベータ標準の調製および構造決定で‘実施例6~20の一般的物質および方法’セクション参照。図8および9では、15形のヒトIgGの構造的特徴が示されている。NaOHを加えた後37 で30分間加温されたヒト グロブリン(hIgG 塩基 37)は、懸濁状態で大きな微粒子として現れ(図9L)、天然IgIVと比較したときTrp蛍光の増加を示し(図8F)、調製物はThTおよびCR蛍光を増強させる(図8A, B)。

【0286】

第二実験では、マウス グロブリンの様々な調製物への精製マウスハイブリドーマIgM 7H2H2の濃度シリーズの結合性をhIgG 塩基 37 およびコントロール天然IgIV Gammagardとの結合性と比較し、同シリーズのIgG調製物へのコントロールマウスハイブリドーマIgM 2G10との結合性と比較した。実施例19の場合と同様のマウスIgG調製物、即ち天然mIgG、dmIgG酸、dmIgG塩基、dmIgG85 を研究に含めた。5μg/mLのマウスおよびヒトIgG調製物またはコントロール緩衝液をMicrolon高結合性ELISAプレート(Greiner)に被覆させ、被覆後それを遮蔽試薬(Roche)で遮蔽した。IgM 7H2H2およびIgM 2G10(陰性コントロール)をPBS/0.1%Tween20中0/1/10/100μg/mLで三重にウェルへ適用した。洗浄後、PBS/0.1%Tween20で1:5000希釈された二次ヤギ抗マウスIgM PO抗体(Jackson)を用いてIgMの結合性を検出した。吸光度を450nmで読んだ。濃度シリーズのIgMで非被覆ウェルについて測定されたバックグラウンドシグナル、および0μg/mL IgM、但し二次抗体でIgG被覆ウェルについて得られたバックグラウンドシグナルを、IgMで覆われたIgG被覆ウェルの対応シグナルから差し引いた。

【0287】

結果&考察

図25Aにおいて、12.5μg/mLのマウスハイブリドーマIgM 7H2H2はヒトIgG調製物1、2、3、9、10、11、13および14と全くまたはほとんど結合せず、調製物4および5と少ない程度で結合し、6、7、8および12と中程度に結合し、ヒトIgG調製物15(グロブリン、塩基性条件、37 で30分間処理、次いでHClで生理的pHへ逆にpH調整)と最も良く結合することが示されている。精製7H2H2の結合性が調製物1、6、11、14および15で解析されたとき、天然Octagam IgIV、1) IgIV 65 で5分間(‘RF’法)、11)天然Gammagard IgIVまたは14) IgIV NaPi 20mg/mLとの結合性は検出されない(図25B)。同様に、高親和性結合がヒトIgG調製物6) 20mMリン酸ナトリウムpH5.0中5mg/mLで83 に加熱されたGammagard IgIV、および15) 37 で5mg/mLのIgG塩基変性、37 でみられる。結合部位の数(B_{max} は各々0.65および0.59a.u.である)と、結合部位の半分が占有される濃度7H2H2、即ち3.3μg/mL 7H2H2は双方とも、両固定ミスフォールドIgG調製物について匹敵している。調製物15)は、IgIV塩基(サンプル10)およびIgIV HFIP/TFA(サンプル12)と類似した凝集物構造として、TEM像で現れた。固定ヒトIgGとのIgM結合性に関する陰性コントロール、ハイブリドーマIgM 2G10は、ヒトIgG調製物といかなる親和性も示さなかった(データ示さず)。調製物6)の場合、すべての蛍光プローブが、他の全調製物と比較して、比較的高程度に、コンゴレッドおよびチオフラビンSの場合は最高程度に結合することが、図9からわかる。しかしながら、サンプル6)はtPA/プラスミノーゲン活性化を中度に高め、一方9)および12)はプロテアーゼ活性を強く増強する(図9M)。TEM像の解析では、色素の蛍光増加がマルチマーサイズの増加とある程度正相関することを示した。6つの蛍光データポイント(CR、ThT、ThS、Trp、ピスANSおよびANS)は一緒にすると7H2H2の予想結合性に関する予測力を強化する、と結論づけられる。各IgG調製物に関する

シグナルを掛け合わせてみると、サンプル 6) がハイブリドーマクローンに最適のリガンドとして顕在化することを確かに予測している。t P A / プラスミノゲン活性化も考慮すると、サンプル 9) および 12) への 7 H 2 H 2 のやや高い結合性が予想される。結論として、クロスベータ構造に親和性をもつ一連の蛍光色素、即ち C R、T h T および T h S の結合性の大きさ増加、またはタンパク質構造、即ちビス A N S および A N S 中における疎水性パッチのプロープ溶媒暴露、および蛍光強度の増加として示される T r p 残基の局所環境下における変化は、ハイブリドーマ I g M クローン 7 H 2 H 2 が高親和性で結合するかどうかを予測しうるらしい。これらの結果は明らかに、マウスがある時点で、先天性免疫応答としてまたは免疫化に用いられる 4 種外来クロスベータ抗原の 1 種以上への暴露時における適応応答として、天然フォールド I g G に隠されたまたは存在しないエピトープ、即ち露出クロスベータ構造またはクロスベータ構造誘導コンホメーションに対して免疫応答を起こしたことを証明している。要約すると、我々の結果は、あるミスフォールドタンパク質または一連のミスフォールドタンパク質を選択することにより、特定のミスフォールドタンパク質に明白な特異性をもつアフィニティ領域をもたらし、クロスベータ構造またはクロスベータ媒介暴露コンホメーションのある外形と優先的に結合するように、免疫応答がマウスで誘導されることを示している。

【 0 2 8 8 】

図 2 5 C では、図 2 5 A および B で証明されてきたことと一致して、7 H 2 H 2 が全試験濃度で h I g G 塩基 37 と結合することが示されている。100 μ g / m L では、天然 I g I V Gammagard との一部結合性もみられる。これは Gammagard 中である割合の I g I V 凝集物の存在を反映しているか、またはこれは使用 E L I S A プレートの変性状態を示しているのかもしれない。陰性コントロール I g M 2 G 1 0 は全く結合しなかった。図 2 5 D では、既に 1 μ g / m L で 7 H 2 H 2 が酸変性マウス グロブリン (d m I g G 酸) と結合することがわかる。10 および 100 μ g / m L でハイブリドーマ I g M が全 3 形のミスフォールド自己 I g G と結合し、最大シグナルが d m I g G 酸および d m I g G 塩基の場合 100 μ g / m L で得られる。100 μ g / m L では天然 m I g G との一部結合性も生じる。陰性コントロール I g M 2 G 1 0 はマウス I g G 調製物のいずれとも全く結合しなかった (示さず) 。これらの結果から、ハイブリドーママウス I g M 7 H 2 H 2 がミスフォールド形のヒト I g G のみでなく、ミスフォールド形のマウス自己 I g G とも特異的に結合することが、明らかに証明されている。これは、ハイブリドーマクローン 7 H 2 H 2 が選択されたマウスが、自己 I g G に対する自己免疫応答を起こしたことを示している。これは、4 種の異なる非 I g G、非自己ミスフォールドタンパク質、即ちヒト合成 A、ニワトリ S A A、ヒト H b A G E および合成ヒトフィブリンフラグメントでの免疫化試験に際して生じていたのかもしれない。7 H 2 H 2 がクロスベータ構造のミスフォールドマウス自己 I g G と結合するという観察から、このハイブリドーマ I g M はリウマトイド因子抗体と命名されている。免疫化実験に際するマウスの病気および異常に多量の浸潤線維芽細胞をもつ異常肥大脾臓は、クロスベータ構造を含んで異なるミスフォールドタンパク質で免疫された際に誘発された自己免疫応答と関連している。

【 0 2 8 9 】

組換え / 合成アフィニティ領域

富化 I g I V から得られる組換え / 合成アフィニティ領域の作製

本発明は、タンパク質ミスフォールディングおよびタンパク質ミスフォールディング疾患の診断および治療向けにミスフォールドタンパク質に特異的なアフィニティ領域の選択のための方法および手段について開示している。アフィニティ領域は、例えば天然ヒト免疫グロブリン (即ちヒト I V I g または I g I V) のような、アフィニティ領域のコンビナトリアルライブラリーから選択される。こうして得られたものに相似するアフィニティ領域は、例えば、タンパク質配列解析、D N A クローニングおよび発現技術を含めた、当業者に知られている標準技術を適用することにより、組換えまたは合成で作製される。この実施例は一態様を記載している。続くステップでは、(1) 少なくとも重および軽両鎖の可変領域からまたは少なくとも相補性決定領域 1 - 3 (C D R) からまたは少なくとも

10

20

30

40

50

個別単離アフィニティ領域の重鎖（HC）のCDR3からのアミノ酸配列を、タンパク質配列解析により得る。（2）特定アミノ酸配列をコードするDNA配列を合成で作製する。タンパク質解析により決定された正確な配列の代わりとして、変化した親和性、好ましくは増加したおよび/またはより特異的な親和性をもつアフィニティ領域を作製するために、好ましくはCDR3、更に好ましくは重鎖（HC）のCDR3に1以上の突然変異が導入された配列も用いる。（3）DNAを適切な発現ベクターへクローニングする。このようなベクターは、例えばIgG1、IgG2a、IgG2b、IgM、IgA、IgEなどを得るために、好ましくは所望型の免疫グロブリンの定常領域をコードする配列を既に含有している。（4）ベクターを選択の発現系、好ましくは哺乳動物細胞へ何らかの手法で導入する。（5）アフィニティ領域を発現する細胞を選択する。（6）組換え産生アフィニティ領域を細胞または細胞由来培養上澄から精製する。親和性を最適化するために突然変異が原アフィニティ領域配列へ導入されると、新たに作製されたアフィニティ領域が開示された方法および手段を用いて再選択される。好ましくは相補性決定領域、好ましくはCDR3、更に一層好ましくはHCのCDR3における、アフィニティ領域のレパートリーが更に増加した、半合成アフィニティ領域のこのような作製が、好ましくは半合成ライブラリー、例えばファージディスプレイライブラリーの作製により行われる（下記参照）。

【0290】

組換え/合成アフィニティ領域の作製

血液から得られるIVIgのようなヒト免疫グロブリンのコレクションのほかに、コンビナトリアルライブラリーもいずれか他の一連のアフィニティ領域、好ましくは一連の組換えアフィニティ領域、例えばファージディスプレイライブラリーに存在するものから得られる（Winter et al.1994 ; Hoogenboom,1992,1997,2000,2002,2005）。好ましくは、このようなライブラリーは哺乳動物アフィニティ領域、好ましくはヒトアフィニティ領域、例えば免疫グロブリンに関連した配列から構成されている。好ましくは、アフィニティ領域のコレクションを含んでなるこのようなファージディスプレイライブラリーは次のように作製される（Winter et al.1994,de Kruif et al,1995a,1995b）。最初に、B細胞またはB細胞を含んでなる組織からRNAを抽出する。その後で、cDNAを作製する。次いで、可変領域をコードするcDNAを増幅させ、適切なプラスミドベクターへクローニングし、例えばEscherichia coliの株のような適切な宿主へトランスフォームする。こうしてアフィニティ領域が発現され、即ち繊維状バクテリオファージの表面で融合タンパク質としてファージにより呈示される。ファージディスプレイライブラリーは、例えば、健康な哺乳動物、好ましくはヒト、マウス、ラットまたはラマから、または代わりにミスフォールドタンパク質で免疫された哺乳動物から得られるB細胞から作製する。一態様において、ファージディスプレイライブラリーは、特定の疾患、好ましくはミスフォールディング疾患、例えばRAに罹患した哺乳動物、好ましくはヒトのB細胞から作製する。こうして、アフィニティ領域のコレクションが、ミスフォールドタンパク質に特異的なアフィニティ領域を含むように、特別な目的で作製される。例えば、マウスを（この実施例20の場合のように）ミスフォールドタンパク質の1種またはセレクションで1回または数回免疫し、B細胞を脾臓から単離して、ファージディスプレイライブラリーを作製するために用いる。他の例では、B細胞を特定の疾患、例えば（リウマチ様）関節炎のヒトから単離する。これらのB細胞から作製されたcDNAを次いで、ファージディスプレイライブラリーを作製するために用いる。こうして、ファージディスプレイライブラリーが選択ミスフォールディング疾患に関与するミスフォールドタンパク質に特異的なアフィニティ領域を含むように作製される。例えば、IgのFcドメインに関するアフィニティ領域、即ちリウマトイド因子（RF）のようなアフィニティ領域を含むライブラリーが作製される（van Esch et al.2003,Clin Exp.Immunol）。上記手法で、当業者であれば、特定の疾患または適用例に力点を置いたアフィニティ領域のコレクションを含むファージディスプレイライブラリーをデザインおよび作製することができる。

【0291】

レパートリーが増加したアフィニティ領域のこのようなコレクションを含むファージディスプレイライブラリーは合成でも作製される (Hoogenboom, 1992, 1997, 2000, 2002, 2005 ; de Kruif et al, 1995a, 1995b)。このように、当業者であれば、顕著な追加多様性のアフィニティ領域を含んでなるライブラリーをデザインすることができる。最も顕著には、抗原と相互作用するCDR、超可変領域に追加配列を入れることにより、可変ドメインを作り直して追加のアフィニティ領域が作られる。ヒト配列から得られるアフィニティ領域のほかに、当業者であれば、ラマ、ラクダ、アルパカまたはカメリドのようないずれか他の種からアフィニティ領域のコレクションを作製して、これらの種に関連した性質を有する、ナノボディとも称される、ラマ抗体のようなアフィニティ領域を得ることができる。こうして、ファージディスプレイライブラリーおよび/またはアフィニティ領域のコレクションが多くの手法で、好ましくは1種または一連のミスフォールドタンパク質で免疫された哺乳動物から作製される。特に好ましい態様において、ファージディスプレイライブラリーおよび/またはアフィニティ領域のコレクションが、疾患、好ましくはミスフォールディング疾患の哺乳動物から作製される。ミスフォールドタンパク質に特異的なアフィニティ領域は、ファージを単離するための標準操作と組み合わせて、開示された手段および方法を用いてファージディスプレイライブラリーから選択される。最も率直には、好ましい態様において、好ましくはこの出願で開示された操作のいずれか1つに従い、ミスフォールドタンパク質を作製および固定し、その後でファージと結合させる。徹底洗浄後、結合ファージを回収し、宿主の再感染により増幅させる。特異的ファージのみの回収を行うために、選択操作を好ましくは数回繰り返す。最後に、ミスフォールド標的と特異的に結合しうるファージを単離する。一方、ミスフォールドタンパク質を疾患の個体または個体の組合せから得られた組織サンプルから単離する。例えば、ミスフォールドタンパク質は、クロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質と特異的に結合しうるタンパク質、例えば(リウマチ様)関節炎の患者の滑液からのtPA、RAGEまたはその機能相当物(表4参照)を用いて単離する。同様に、いずれか他のサンプルもとりうる。

【0292】

上記のようなアプローチを用いて、ミスフォールドタンパク質に関して組換え産生されたアフィニティ領域が得られる。

【0293】

適切なファージの選択後、単離アフィニティ領域の可変領域をコードするDNAを、好ましくは完全抗体を作製するためにファージミドDNAから単離する。これは標準操作に従い当業者により容易に行われる。好ましくは重および軽鎖の定常領域をコードするDNAへベクターをクローニングする。いかなるベクターおよびいかなる望ましいタイプの定常領域も用いられる。ベクターを選択の発現系、好ましくは哺乳動物細胞へいずれか公知の手法で導入する。アフィニティ領域を発現する細胞を選択する。組換え産生されたアフィニティ領域を、好ましくは細胞または細胞由来培養上澄から精製する。こうして、ミスフォールドタンパク質に関するいかなる免疫グロブリンアフィニティ領域も作製される (Bloemendal et al 2004 ; Huls et al 1999a, 1999b ; Boel et al 2000)。

【0294】

“キメラ”または“ヒト化”組換えアフィニティ領域の作製

ヒトで使用の場合は、非ヒト配列が可能であればどこでもヒト配列と置き換えられ、アフィニティ領域の結合性が好ましくは過度に影響されないように、他の種から得られたアフィニティ領域を好ましくは修飾する。好ましくはマウスまたはラットを用いる、更に一層好ましくはヒト免疫グロブリンをコードするトランスジェニックマウスを用いる、古典的免疫化戦略に際してもアフィニティ領域が作製される。免疫化後、モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞系が、標準操作により、または上記のファージディスプレイ技術を適用することにより作製される。ミスフォールドタンパク質と特異的に相互作用しうるモノクローナル抗体が選択される。このようなアフィニティ領域の“キメラ”または“ヒト化”バージョンは、正常マウスまたはラットを用いて作製されるとき、例えば非ヒト定常領域および関連非ヒト可変領域を関連ヒト相同性領域で置き換えることにより作

製される (Morrison et al 1984 ; Jones et al.1986)。更に、所望であれば異なる定常領域が導入される。

【0295】

実施例 1 ~ 20 に基づく要旨

好ましくはミスフォールドタンパク質または一連のミスフォールドタンパク質と関連する特定の疾患または健康問題に特異的な、1種または一連のミスフォールドタンパク質に関して富化されたアフィニティ領域を選択するための操作

実施例 1 ~ 9 において、我々は、ミスフォールドタンパク質および/またはクロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質を含有したアフィニティマトリックスの使用で、ミスフォールドタンパク質および/またはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質と優先的、選択的にかつ高親和性で結合しうる、選択に用いられる一連のアフィニティ領域に必ずしも含まれていなかったアフィニティ領域が、アフィニティ領域のいずれかの組成物から選択されることを証明した。クロスベータ構造を含んでなる選択ミスフォールドタンパク質が固定された固体支持体の使用で、我々が事実上いかなるミスフォールドタンパク質とも親和性を有するアフィニティ領域をアフィニティ領域のコレクションから単離しうることを、実施例は証明した。Hb A G E、d H S A、A フィブリル および d I g I V マトリックスで、我々は d H S A、A フィブリル、A 非フィブリル凝集物、d O V A、B S A A G E、H b A G E、ミスフォールドマウス I g G、シトルリン化ペプチド/タンパク質、A p o A I および o x L D L と結合するアフィニティ領域を選択した。富化 I g I V 組成物に関するリガンドのこのリストの多数メンバーが、例えば A (アルツハイマー病)、o x L D L および A p o A I (アテローム性動脈硬化症、アミロイドーシス)、グリケート化タンパク質 (アミロイドーシス、最終段階腎臓疾患、糖尿病、R A)、ミスフォールド I g G、シトルリン化タンパク質 (A L アミロイドーシス、R A) のようなタンパク質ミスフォールディング疾患の病理に関与している。

【0296】

加えて、フィブリル外形のミスフォールドタンパク質およびフィブリル特徴を欠くミスフォールドタンパク質凝集物の双方で、クロスベータ構造を含んでなるミスフォールドタンパク質に広範囲特異性を示すアフィニティ領域が選択されることを、我々は示した。A フィブリル アフィニティマトリックスで、例えばミスフォールド B S A A G E の非フィブリルマルチマー、A および d O V A の凝集物に特異性を示すアフィニティ領域が選択された。他方、非フィブリル H b A G E マトリックスまたは非フィブリルミスフォールド I g I V マトリックスの使用で、A フィブリルと効率的に結合するアフィニティ領域が選択された。

【0297】

ウシ血清アルブミン A G E マトリックスの使用で、ヒト A、ヒトアルブミンおよびニワトリオボアルブミンと親和性をもつアフィニティ領域が証明された。ヒト A マトリックスの使用で、グリケート化 ウシ血清アルブミン および ニワトリオボアルブミン と結合するアフィニティ領域が選択された。グリケート化 ヒト H b マトリックスで、ミスフォールド マウス I g G と結合するアフィニティ領域が選択された。これらのデータは、1種に由来するミスフォールドタンパク質で、他種に由来するミスフォールドタンパク質に親和性を有するヒトアフィニティ領域が選択されることを示している。

【0298】

結論として、我々は、ヒト I g I V アフィニティ領域のコレクションから、様々な種に由来する広範囲のタンパク質に結合性を示す、I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 イソタイプを産生する少なくとも 4 種の異なる B 細胞クローンに由来するアフィニティ領域の選択が行われたことを証明したが、ここで該タンパク質は実質的アミノ酸配列相同性も、類似のアミノ酸配列長さも、それらの天然フォールドで重複または類似 3 D 構造も有しないが、それらはミスフォールドタンパク質と共通した構造的特徴を有する。この構造的特徴は、リシンおよびアルギニン残基のグリケーション、アルギニンのシトルリン化、アミノ酸側鎖の酸化と、すべて様々なタンパク質濃度における低 p H、高 p H、熱、

炭水化物への暴露の組合せに決して限定されないが、例えばそれらのような様々な手段により、タンパク質構造へ導入される。ミスフォールドタンパク質および/またはクロスベータ構造を含んでなるタンパク質に特異性を有する選択されたアフィニティ領域は、様々な適用例に有用である。以下では、タンパク質ミスフォールディング疾患に対する療法に用いられる富化アフィニティ領域が更に詳細に記載されている。

【0299】

開示された手段および方法によれば、タンパク質ミスフォールディングに関連する疾患の療法および/または診断で適用しうるアフィニティ領域の選択を可能にする。好ましい操作の一般的特徴の概略が図26で示されている。選択のいかなるミスフォールドタンパク質(ミスフォールドドームを表わす図26のミックスXおよびY)もアフィニティ領域を選択するために用いられる上で適するが、好ましくは疾患に関連したミスフォールドタンパク質(図26のミックスA)が用いられる。ミスフォールドタンパク質は一般的に共通特性を有しているため、2種以上の特定ミスフォールドタンパク質と結合するアフィニティ領域が選択されることになる。しかしながら、この出願で開示されているように、ミスフォールドタンパク質のサブセットまたはまさに単一タイプと優先的に結合するアフィニティ領域も選択しうる。一連のカラムを組み合わせることにより、当業者であれば、一般的にミスフォールディングの療法および/または診断に適用しうる、または選択のミスフォールドタンパク質が関与する特定の疾患または一連の疾患へ優先的に適用しうる、アフィニティ領域を選択することができる。図26で示されているように、カラムI(疾患と必ずしも関連しないミスフォールドタンパク質のミックス)の適用は、一般的なミスフォールドタンパク質、即ちミスフォールドドームに親和性をもつアフィニティ領域(調製物1)をもたらす。このようなアフィニティ領域は診断と療法でも使用に適する。しかしながら、疾患関連ミスフォールドタンパク質(望ましい治療効果)のみならず存在する他のミスフォールドタンパク質(療法の予測不能な副作用)とも結合するアフィニティ領域が患者に導入されるという事実のせいで、療法目的にこのようなアフィニティ領域の使用は副作用の潜在的リスクを伴う。カラムIおよびIII、更に好ましくはカラムIIおよびIVを組み合わせることにより、疾患または一連の疾患に特異的なミスフォールドタンパク質と優先的に相互作用するアフィニティ領域を当業者は選択する。カラムIVは、選択の標的疾患と関連しないミスフォールドタンパク質と相互作用しうるアフィニティ領域を除去するために用いられる。このように、調製物3および4は特定療法目的に優先的に選択される。

【0300】

10

20

30

【表 1】

表 1: 患者へのIgIV投与に関連して報告された副作用 ⁺			
静脈血栓症	動脈血栓症	頭痛	悪寒
悪心	発熱	痙攣	頻脈
無菌性髄膜炎	(急性)腎不全	アナフィラキシー	血栓塞栓事象
偽低ナトリウム血症	背部痛	passagere 頭痛	発作
低血圧	溶血性貧血	溶血性出血	腎毒性
不耐症(IgA欠乏時の抗IgA抗体)	新生児の偽低ナトリウム血症	一部生存ウイルスワクチン(おたふくかぜ、はしか、水痘/風疹ワクチン)に対する低免疫応答	ループス様抗凝固剤に伴う後天性フォンビルブラント症候群
発疹	湿疹	赤血球癆	疲労
脳血管偶発症	新生児の高粘性症	急性心筋虚血	一過性虚血発作
一過性好中球減少	急性腎臓移植片損傷	急性心筋梗塞	溶血尿毒症候群
注射部位の痛み			
⁺ データは Pubmed データマイニングにより得られた文献レファレンスと Octagam および Gammagard データシートから検索されている			

10

20

【 0 3 0 1 】

【表 2】

表 2: 合成ペプチドの配列同一性		
ペプチド	配列同一性	アミノ酸配列
FP13K157G	配列番号 1	KRLEVDIDIGIRS
A β (1-40)	配列番号 2	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
A β (1-40)E22Q	配列番号 3	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAQDVGSNKGAIIGLMVGGVV
FP10	配列番号 4	KRLEVDIDIK
酵母プリオンペプチド	配列番号 5	GNNQQNY
FP6	配列番号 6	IDIKIR
TRAP	配列番号 7	SFLLRN
PPACK	配列番号 8	FPR-クロロメチルケトン
A β ペプタ 1-42	配列番号 9	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

30

【 0 3 0 2 】

【表 3】

表 3: クロス β 構造コンホメーション結合化合物		
コンゴレッド	クリサミンG	チオフラビンT
2-[4'-(メチルアミノ)フェニル]-6-メチルベンゾチアジオール	他のアミロイド結合色素/化合物	グリコサミノグリカン
チオフラビンS	ステリル色素	BTA-1
ポリ(チオフェン酢酸)	複合化高分子電解質PTAA-Li	

40

【 0 3 0 3 】

【表 4】

表4:ミスフォールドタンパク質と結合および/または相互作用することによりクロスベータ経路で作用するタンパク質		
組織型プラスミノーゲンアクチベーター	tPA、因子 XII、フィブロネクチン、HGFAのフィンガードメイン	アポリポタンパク質E
フィンガードメイン	フィンガードメインを含んでなるタンパク質、例えばtPA、HGFA、因子 XII、フィブロネクチン	アフニティ領域
因子 XII	プラスミン(ogen)	マトリックスメタロプロテアーゼ-1
フィブロネクチン	75kD-ノイロトロフィンレセプター(p75NTR)	マトリックスメタロプロテアーゼ-2
肝細胞成長因子アクチベーター	α 2-マクログロブリン	マトリックスメタロプロテアーゼ-3
血清アミロイドP成分	高分子量キニノーゲン	モノクローナル抗体2C11(F8A6) ⁺
C1q	カテプシンK	モノクローナル抗体4A6(A7) ⁺
CD36	マトリックスメタロプロテアーゼ9	モノクローナル抗体2E2(B3) ⁺
前進性グリケーション終末産物のレセプター	ヘムオキシゲナーゼ-1	モノクローナル抗体7H1(C6) ⁺
スカベンジャーレセプター-A	低密度リポタンパク質レセプター関連タンパク質(LRP, CD91)	モノクローナル抗体7H2(H2) ⁺
スカベンジャーレセプター-B	DnaK	モノクローナル抗体7H9(B9) ⁺
ERシャペロンErp57	GroEL	モノクローナル抗体8F2(G7) ⁺
カルレチクリン	VEGF165	モノクローナル抗体4F4 ⁺
モノクローナルコンホメーション抗体W O1(ref. O' Nuallain and Wetzel,2002)	モノクローナルコンホメーション抗体W O2(ref. O' Nuallain and Wetzel,2002)	アミロイドオリゴマー特異的抗体(ref. (Kayed et al.,2003))
ホルミルペプチドレセプター様1	α (6) β (1)-インテグリン	CD47
ウサギ抗アルブミン-AGE抗体, A β 精製 ^{a)}	CD40	小さな高密度リポタンパク質に属する apoA-I
apoJ/クラスタリン	10倍モル過剰PPACK, 10mM ϵ AC A. (100pM~500nM)tPA ²⁾	CD40-リガンド
マクロファージスカベンジャーレセプター CD163	マウスd- γ -グロブリンに親和性をもつアフニティ領域	BiP/grp78
Erdj3	ハプトグロビン	α 2-マクログロブリン-トリプシン複合体
α 2-マクログロブリン- α -キモトリプシン複合体	α 2-マクログロブリン-プロメライン	リウマトイド因子
リウマトイド因子IgAイソタイプ	リウマトイド因子IgGイソタイプ	リウマトイド因子IgMイソタイプ
α , γ または μ 鎖をもつB細胞レセプター	抗環式シトルリン化ペプチド(自己)抗体	抗シトルリン化タンパク質(自己)抗体
HSP60	HSP90	DNAK
HSP104	ClpA	ClpB

10

20

30

40

ミスフォールドタンパク質に親和性をもつアフィニティ領域	抗シトルリン化タンパク質／ペプチド抗体	クロスベータアフィニティマトリックスを用いてアフィニティ領域の組成物から集められたアフィニティ領域	
クロスベータHbAGEアフィニティマトリックスを用いてアフィニティ領域の組成物から集められたアフィニティ領域	クロスベータdIgIVアフィニティマトリックスを用いてアフィニティ領域の組成物から集められたアフィニティ領域	クロスベータBSAAGEアフィニティマトリックスを用いてアフィニティ領域の組成物から集められたアフィニティ領域	
クロスベータA β アフィニティマトリックスを用いてアフィニティ領域の組成物から集められたアフィニティ領域	クロスベータA β フィブリルアフィニティマトリックスを用いてアフィニティ領域の組成物から集められたアフィニティ領域	クロスベータdHSAアフィニティマトリックスを用いてアフィニティ領域の組成物から集められたアフィニティ領域	10
広域(ヒト)免疫グロブリンG(IgG)抗体(IgIV, IVIg)	例えばアフィニティ領域の組成物から集められた、クロスベータ構造またはクロスベータ誘導コンホメーションに親和性をもつアフィニティ領域	クロスベータ構造および／またはクロスベータ誘導コンホメーションに親和性をもつアフィニティ領域マトリックスを用いて患者血清／血漿／滑液から集められたアフィニティ領域	
oxLDL/ApoB-100に親和性をもつアフィニティ領域	ミスフォールドApoA-Iに親和性をもつアフィニティ領域	A β に親和性をもつアフィニティ領域	
A β フィブリルに親和性をもつアフィニティ領域	非フィブリルA β 凝集物に親和性をもつアフィニティ領域	フィブリンに親和性をもつアフィニティ領域	20
HbAGEに親和性をもつアフィニティ領域	BSAAGEに親和性をもつアフィニティ領域	グリケート化タンパク質に親和性をもつアフィニティ領域	
シトルリン化タンパク質に親和性をもつアフィニティ領域	dOVAに親和性をもつアフィニティ領域	dHSAに親和性をもつアフィニティ領域	
ヒトdIgIVに親和性をもつアフィニティ領域	マクロファージスカベンジャーレセプター-1(MSR-1)	抗環式シトルリン化ペプチド抗体	
<p>* ABC-Hybridoma facility, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands と共同で開発されたモノクローナル抗体</p> <p>^{a)} 抗原アルブミン-AGEおよびリガンドAβ は Davids Biotechnologie (Regensburg, Germany) へ送った; ウサギはアルブミン-AGE で免疫し、構造エピトープに対する抗体は固定Aβのカラムを用いてアフィニティ精製した。</p> <p>²⁾ PPACKはPhe-Pro-Arg-クロロメチルケトン(配列番号8)、ϵACAはϵ-アミノカプロン酸、tPAは組織型プラスミノゲンアクチベーターである</p>			

10

20

30

【 0 3 0 4 】

【表5】

表5: クロスベータ経路の一部であるタンパク質		
モノクローナル抗体4B5	熱ショックタンパク質27	熱ショックタンパク質40
モノクローナル抗体3H7 ⁺	Nod2(=CARD15)	熱ショックタンパク質70
FEEL-1	ペントラキシン-3	HDT1
LOX-1	血清アミロイドAタンパク質	GroES
MD2	スタビリン-1	熱ショックタンパク質90
FEEL-2	スタビリン-2	CD36およびLIMPII analogous-1 (CLA-1)
低密度リポタンパク質	LPS結合タンパク質	CD14
C反応性タンパク質	CD45	オロソムコイド
インテグリン	アルファ-1抗トリプシン	apoA-IV-TTランスチレイン複合体
アルブミン	アルファ-1酸糖タンパク質	β 2-糖タンパク質I
リゾチーム	ラクトフェリン	メガリン
Tamm-Horsfall タンパク質	アポリポタンパク質E3	アポリポタンパク質E4
Toll-like レセプター	(プレ)カリクレイン	CD11d/CD18 (サブユニットaD)
CD11b2	CD11a/CD18 (LFA-1, サブユニットaL)	CD11c/CD18 (CR4, サブユニットaX)
フォンビルブランド因子	ミオシン	アグリン
パールカン	シャペロン60	b2インテグリンサブユニット
原核および真核細胞の小胞体 (ER) のアンフォールドタンパク質応答 (UPR) 経路で作用するタンパク質	原核および真核細胞の小胞体ストレス応答 (ESR) 経路で作用するタンパク質	コラーゲン構造をもつマクロファージレセプター (MARCO)
20S	シャペロン16ファミリーメンバー	HSC73
HSC70	プラスミン (ogen)	26Sプロテアソーム
プロテアソームの19Sキャップ (PA700)	肝細胞成長因子/分散因子	シャペロン70相互作用タンパク質 (CHIP) のカルボキシ末端
パターン認識レセプター	Derlin-1	カルネキシン
トロンボスポンジ	GRP94	小胞体p72
(広域) (ヒト) 免疫グロブリンM (IgM) 抗体	小胞体関連分解系 (ERAD) で作用するタンパク質	(超)低密度リポタンパク質レセプターファミリー
Fcレセプター (例えば、ヒトCD16, CD32A, CD32B, CD64)	Bcl-2関連アタノジェン (Bag-1)	UDP-グルコース: 糖タンパク質グルコシルトランスフェラーゼ (UGGT)
多剤トランスポーター, 様々に称される多剤耐性1タンパク質 (MDR1), P-糖タンパク質 (多面性-糖タンパク質), PgpまたはP-170	トランスロケーションチャンネルタンパク質 Sec61p	補体レセプターCD11b/CD18 (Mac-1, CR3)
カゼイン, α s-カゼイン, β -カゼイン	NF κ B	ピトロネクチン
Chromozym p450	c3	CD79
GrpE	TLR2	TLR4
TLR9	(プロ)トロンピン	Fc ϵ -レセプター
MAC-2		

⁺ABC-Hybridoma facility, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands と共同で開発されたモノクローナル抗体

【表 6】

表6～11(実施例6～20)

表6 LALアッセイを用いた、様々なタンパク質溶液中内毒素レベルの測定		
サンプル ⁺	内毒素レベル(EU)	概算LPS含有量 (ng/mL)
dOVA std(1mg/mL)	115.6	250
Octagam(ロット 5024018434,50mg/mL)	0.033, 0.147	<0.25
富化IgIV(HbAGE-セファロース)(PBS中 52 μg/mL)ロット1	19.2	25
富化IgIV(HbAGE-セファロース)(PBS中 103 μg/mL)ロット2, 濃縮	35	
HbAGE-セファロース接触後の枯濁IgIV	0.772, 1.112	1
HbAGE(1.6mg/mL)	0.122	<0.25
CEALB(Sanquin,ロット 05C29H120A,200 mg/mL)	0	0
マウス7H2 IgM(ハイブリドーマ培地中)	0	0
マウス7H2H2 IgM(精製,PBS中)	>3	
フィブロネクチンフィンガー4-5-FLAG-Hi s(10%グリセロール含有PBS中290 μ g/mL)	1.7	
tPA(Actilyse,50 μM;3.65mg/mL)	2.7	
CEALBから得られたdHSA(20mg/mL)	0.043	
⁺ dOVAは、前記のように、オボアルブミンをPBSで1mg/mLに溶解し、PCRサーモサイクラーにて30°Cから85°Cへ5°C/minで5サイクル加熱し、30°Cへ急速に戻すことにより得た。HbAGEは38週間にわたりグリケート化し、その後で水に対して透析した。dHSAは、CEALBを20mg/mL、pH2、65°Cで6時間かけて変性させ、次いでNaOH溶液で生理的pHへ中和することにより得た。		

10

20

30

【0306】

【表 7】

表7 様々なミスフォールドクロスベータタンパク質への、 数種ミスフォールドクロスベータタンパク質-アフィニティマトリックスで 富化後のIgIVの結合性に関する富化ファクター ⁺				
	ミスフォールドクロスベータタンパク質のマトリックスからの溶出IgIVで得られた富化ファクター			
→アフィニティマトリックス	BSA-AGE	Aβ42/Aβ40 フィブリル	dHSA	dIgIV
結合研究の固定リガンド				
BSA-AGE	30, 15, 44	5, 5, 5	1, 9, 0, 7, 5	2, 1, 8, 2
Aβ42/Aβ40 フィブリル	53, 25, 6	35, 23, 3	18, 11, 3	34, 21, 2
Aβ42/Aβ40 非フィブリル凝集物	25, 13	6, 12	7, 0, 6	5, 9
nOVA	1	0, 6	0, 8	0, 5
dOVA	1, 9, 1, 3, 2, 9	0, 5, 6, 1, 7	0, 5, 0, 25, 1, 3	1, 6, 4, 1, 4
dHSA*	116	145	186	1170
HSA	0	0	0	0
dmγ-グロブリン	>1**	0	0	0
マウスγ-グロブリン	0	0	0	0
⁺ 富化ファクターは各個別実験で示されている。N. d. 測定せず; 0, 結合せず; 1, 富化せず [*] HSAおよびdHSAへの Octagam IgIVの結合は非常に低いシグナルをもたらす。 ミスフォールドタンパク質マトリックスでの富化はdHSAとの結合性を明らかに増すが、 正確な富化ファクターの測定は妨げられる。 ^{**} 同様のことがマウスγ-グロブリンへの Octagam IgIVの結合性に関してみられる。 mγ-グロブリンへのBSA-AGE富化IgIVの結合性は出発物質と比較して増加している。 この効果は変性γ-グロブリン(Mdγ-グロブリン)の場合により強い。				

10

20

30

【 0 3 0 7 】

【表 8】

表8 (富化)アフィニティ領域の調製物のサブクラス決定およびIgGイソタイプ分類							
Octagam IgIV				富化IgIV		濃縮富化IgIV	
Ig	mg/mL	%	%(データシート)	mg/mL	%	mg/mL	%
IgG	47.2	99.45	≥95	n.d.	-	0.434	-
IgA	0.185	0.39	≤0.4	n.d.	-	n.d.	-
IgM	0.0756	0.16	≤0.2	n.d.	-	n.d.	-
IgG1	28.6	56.1	62.6	0.0823	76.3	0.242	51.3
IgG2	18.6	36.5	30.1	n.d.	-	0.169	35.8
IgG3	3.20	6.3	6.1	0.0236	21.9	0.0538	11.4
IgG4	0.548	1.1	1.2	0.0019 1	1.8	0.00675	1.4
n.d.検出せず。IgG2では検出限界が<0.093mg/mLである。IgAでは検出限界が0.0667mg/mL、IgMでは0.0417mg/mLであり、一方予想概算値は大きさが1ケタ低い。							

10

20

【0308】

【表 9】

表9: RAまたはALアミロイドーシス患者サンプルと接触させた、ミスフォールドタンパク質に親和性をもつアフィニティ領域のマトリックスの溶出物で特異的に同定されたタンパク質			
タンパク質名 ⁺	IPIアクセス番号 [†]	サンプルA# 中ペプチドの# ¹⁾	サンプルC# 中ペプチドの#
サンプルA2およびA3[ALアミロイドーシス患者血漿]			
ダイニン重鎖ドメイン3(遺伝子名: KIAA1503)	IPI00783464	1	0
IGLC1タンパク質/免疫グロブリンラムダ鎖	IPI00658130 (A4及びA6でも)	1	0
25kDaタンパク質/免疫グロブリンラムダ座(遺伝子)	IPI00747752 (A4及びA6でも)	1	0
仮想タンパク質/免疫グロブリンラムダ可変4-3	IPI00382938	1	0
25kDaタンパク質/免疫グロブリンラムダ鎖/リウマトイド因子G9軽鎖(ラムダV3)/IGLC1タンパク質	IPI00154742 (A4及びA6でも)	1	0
サンプルA4[RA患者血清]			
IGLV3-25タンパク質(免疫グロブリンラムダ可変3-25: 別名: V2-17)	IPI00550162	1	0
仮想タンパク質/免疫グロブリンラムダ座/免疫グロブリンラムダ鎖C領域(1/2/3)/免疫グロブリンラムダ可変V2-14/IgラムダC3タンパク質(C2セグメントタンパク質/C3セグメントタンパク質)/仮想タンパク質DKFZp667J0810(フラグメント)	IPI00760678 (A6でも)	1	0
仮想タンパク質	IPI00784519	1	0
仮想タンパク質	IPI00784711	1	0
仮想タンパク質	IPI00784983	1	0
IGLC2タンパク質(免疫グロブリンラムダC2)	IPI00555945	1	0
IGLC2タンパク質(免疫グロブリンラムダC2)	IPI00450309	1	0
中心体タンパク質Cep290のイソ型I/中心体タンパク質Cep290: 別名: (ネフロシスチン-6)(腫瘍抗原se2-2)	IPI00784201	1	0
フィブリノーゲンガンマ鎖前駆体のイソ型ガンマ-B	IPI00021891	1	0
IGLC1タンパク質(免疫グロブリンラムダC1)/免疫グロブリンラムダ鎖	IPI00658130(A2, A3及びA6でも)	1	0
25kDaタンパク質/免疫グロブリンラムダ鎖	IPI00747752(A2, A3及びA6でも)	1	0
25kDaタンパク質/免疫グロブリンラムダ鎖/リウマトイド因子G9軽鎖(ラムダV3)/IGLC1タンパク質	IPI00154742(A2, A3及びA6でも)	1	0
IGLC1タンパク質(免疫グロブリンラムダC1)/免疫グロブリンラムダ鎖/免疫グロブリンC1セグメントタンパク質(フラグメント)	IPI00719373	1	0
抗原KI-67のイソ型 Long/抗原KI-67	IPI00004233	1	0

10

20

30

40

サンプルA6[RA患者滑液]			
IGKCタンパク質(免疫グロブリンカッパ定常)	IPI00807413	10	0
仮想タンパク質/免疫グロブリンラムダ定常2/IGLV2-14(免疫グロブリン可変2-14)/IgラムダC3タンパク質(C2セグメントタンパク質/C3セグメントタンパク質)/IGLC1(免疫グロブリンラムダ定常1)/仮想タンパク質DKFZp667J0810	IPI00760678 (A4でも)	1	0
仮想タンパク質	IPI00807428	7	1
IGHA1タンパク質(免疫グロブリン重定常アルファ1)	IPI00166866	10	0
一本鎖Fv(フラグメント)/免疫グロブリン重鎖可変領域(フラグメント)	IPI00748998	2	0
ベータ-2糖タンパク質1前駆体/ベータ-2糖タンパク質(アポリポタンパク質H)	IPI00298828	7	0
補体C1q副成分サブユニットC前駆体/補体成分1, q副成分, C鎖	IPI00022394	1	0
補体C1r副成分前駆体/補体成分1, r副成分/仮想タンパク質DKFZp686O02154	IPI00296165	1	0
カルモジュリン様タンパク質5(カルモジュリン様皮膚タンパク質)	IPI00021536	2	0
補体因子H関連タンパク質1前駆体/補体因子H関連1	IPI00011264	2	0
デスモプラキンのイソ型DPI(250/210kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原)/デスモプラキン	IPI00013933	1	0
ゲルゾリン前駆体のイソ型1/ゲルゾリン	IPI00026314	3	0
仮想タンパク質/熱ショック70kDaタンパク質5(グルコース調節タンパク質=78kDa=GRP78=BiP=HSPA5)	IPI00003362	2	0
IGLC1タンパク質(免疫グロブリンラムダC1)/免疫グロブリンラムダ鎖	IPI00658130(A2, A3及びA4でも)	1	0
25kDaタンパク質/免疫グロブリンラムダ座(遺伝子)	IPI00747752(A2, A3及びA4でも)	1	0
25kDaタンパク質/免疫グロブリンラムダ鎖/リウマトイド因子G9軽鎖(ラムダV3)/免疫グロブリンラムダC1	IPI00154742(A2, A3及びA4でも)	1	0
25kDaタンパク質/免疫グロブリンカッパ可変1-5	IPI00738024	1	0
<p>+特定ペプチド質量に基づき同定されたタンパク質が掲載されている。単一タンパク質に特有でないペプチド質量の場合、同定配列をもつすべてのタンパク質が掲載されている。</p> <p>' A#シリーズ: 指定患者サンプルと接触後における富化IgIV-マトリックスからの解析溶出物; 示されたコントロールシリーズC#は、同患者サンプルと接触させた、アフィニティ領域をもつコントロールマトリックスからの溶出物の解析である; バックグラウンド測定</p> <p>¹⁾IPIアクセスコードは様々なタンパク質/ペプチドデータベースのタンパク質エントリーコードに関する。アフィニティ領域-マトリックスを患者サンプルと接触させた後で、同一タンパク質が他の解析溶出物の1以上でも同定されたとき、これらの患者サンプルコードが示されている。</p>			

10

20

30

40

【表 10】

DC ステイムレーター →	PBS コントロール	BSA-AGE	BSA-AGE +enr.IgIV	BSA-AGE +enr.IgIV+ 抗 CD32a	BSA-AGE +IgIV	BSA-AGE +IgIV+ 抗 CD32a	ホリ I-C+ TNF α
↓マーカー							
IL-6 (pg/mL)	104	118	4433	1417	191	25	15119
IL-8 (pg/mL)	2452	1842	19316	20260	4682	638	26225
細胞死(%)	17	11	8	6	14	16	15
CD80 (MFI比)	8.9	4.2	11.9	11.7	5.2	3.5	25.7
CD83 (%陽性細胞)	5	5	25	23	8	3	66
CD86 (MFI比)	7.3	3.8	9.5	8.6	4.3	2.9	14.4
CD40 (MFI比)	16.1	9.5	13.4	10.6	9.6	5.8	20.7

10

20

【0310】

【表 11】

Ig調製物	[抗CCP力価](U/mL)	富化ファクター ⁺
1. Octagam IgIV,50mg/mL	3	1
2. γ -グロブリン,10mg/mL	2.6	-
3. Gammagard IgIV,52mg/mL	3.1	-
4. 富化IgIV,0.1mg/mL	2.7	437

個体の血清中抗CCP力価が $>10\text{U/mL}$ であるとき、血清は抗CCP抗体陽性である。
 2.6~3.1U/mLの測定力価はEliAシステムの検出限界内であり、この力価範囲は健康な個体の血清で定期的に測定される。
⁺富化IgIVがHbAGE-セファロースアフィニティマトリックスを用いて選択された Octagam IgIVと比較して、抗CCP抗体の濃度に関する富化が富化IgIVで見られる。

30

【0311】

40

参考文献

【表 1 2】

References

- Bouma, B. *et al.* Glycation induces formation of amyloid cross- β structure in albumin. *J. Biol. Chem.* 278, 41810-41819 (2003)
- Citterio, S. *et al.* Dendritic cells as natural adjuvants. *Methods* 19, 142-147 (1999) 10
- Gebbink, M.F., Claessen, D., Bouma, B., Dijkhuizen, L. & Wosten, H.A. 2005. Amyloids--a functional coat for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 333-341
- Horbach, D.A., van Oort, E., Donders, R.C., Derksen, R.H. & de Groot, P.G. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison between different assays for the detection of antiphospholipid antibodies. *Thromb. Haemost.* 76, 916-924 (1996) 20
- Kaye, R., E. Head, J.L. Thompson, T.M. McIntire, S.C. Milton, C.W. Cotman, and C.G. Glabe. 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300:486-489 Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300: 486-489 30
- Kranenburg, O., B. Bouma, L.M. Kroon-Batenburg, A. Reijerkerk, Y.P. Wu, E.E. Voest, and M.F. Gebbink. 2002. Tissue-type plasminogen activator is a multiligand cross-beta structure receptor. *Curr. Biol.* 12:1833-1839
- O'Nuallain, B. & Wetzel, R. Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 1485-1490 (2002)
- Hackeng, T. M., Rosing, J., Spronk, H. M., and Vermeer, C. (2001) *Protein Sci.* 10, 864-870 40
- Hackeng, T. M., Mounier, C. M., Bon, C., Dawson, P. E., Griffin, J. H., and Kent, S. B. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 7845-7850
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., and Mann, M. (2003) *Anal. Chem.* 75, 663-670
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994) *J. Exp. Med.* 179, 1109-1118

- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., and Hoogenboom, H. R. (1994) *Annu.Rev.Immunol.* 12:433-55., 433-455
- Hoogenboom, H. R. and Winter, G. (1992) *J.Mol.Biol.* %20;227, 381-388
- Hoogenboom, H. R. (2002) *Methods Mol.Biol.* 178:1-37., 1-37
- Hoogenboom, H. R. and Chames, P. (2000) *Immunol.Today.* 21, 371-378
- Hoogenboom, H. R. (1997) *Trends Biotechnol.* 15, 62-70 10
- Hoogenboom, H. R. (2005) *Nat.Biotechnol.* 23, 1105-1116
- de Kruif, J., Terstappen, L., Boel, E., and Logtenberg, T. (1995) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 3938-3942
- de Kruif, J., Boel, E., and Logtenberg, T. (1995) *J.Mol.Biol.* 248, 97-105
- Bloemendal, H. J., de Boer, H. C., Koop, E. A., van Dongen, A. J., Goldschmeding, R., Landman, W. J., Logtenberg, T., Gebbink, M. F., and Voest, E. E. (2004) *Cancer Immunol.Immunother.* 53, 799-808 20
- Huls, G., Heijnen, I. A., Cuomo, E., van der, L. J., Boel, E., Van De Winkel, J. G., and Logtenberg, T. (1999) *Cancer Res.* 59, 5778-5784
- Huls, G. A., Heijnen, I. A., Cuomo, M. E., Koningsberger, J. C., Wiegman, L., Boel, E., van der Vuurst de Vries AR, Loyson, S. A., Helfrich, W., Berge Henegouwen, G. P., van Meijer, M., de Kruif, J., and Logtenberg, T. (1999) *Nat.Biotechnol.* 17, 276-281
- Boel, E., Verlaan, S., Poppelier, M. J., Westerdaal, N. A., van Strijp, J. A., and Logtenberg, T. (2000) *J.Immunol.Methods.* 239, 153-166 30
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., and Oi, V. T. (1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81, 6851-6855

【図面の簡単な説明】

【 0 3 1 2 】

【図1】ヒトIgIVはミスフォールドグリケート化タンパク質と特異的に結合する ELLISAセッアップにおいて、2製造業者IおよびIIから得られた治療向けヒトIgIVの結合性が、固定グリケート化タンパク質で評価された。A. 被覆グリケート化ヒトヘモグロビン(Hb AGE)、新鮮溶解Hbおよび凝集アミロイドペプチド(A)への製造業者IからのIgIV(IgIV(I))の結合性が試験された。B. 被覆Hb AGE、新鮮溶解Hbおよび凝集Aへの製造業者IIからのIgIV(IgIV(II))の結合性が試験された。C. 被覆グリケート化アルブミン(BSA AGE)、新鮮溶解コントロールアルブミンおよびFP13K157GアミロイドへのIgIV(I)の結合性が解析された。D. 被覆Hb AGEへの15μg/mL IgIV(I)の結合性に及ぼすtPAおよびK2P tPAの影響が、濃度シリーズのtPAまたはK2P tPAをIgIV(I)インキュベート混合物へ加えることにより取り扱われた。露出リシンまたはアルギニン側鎖へのtPAの結合を避けるために、結合10mMのACAが混合物へ 40

加えられた。

【図2】アミロイド様コンホメーションのミスフォールドグリケート化タンパク質により誘導される血小板凝集はI g I Vおよびモノクローナル抗体の混合物により阻害されるコラーゲンまたはT R A P（陽性コントロール）、緩衝液（陰性コントロール）またはミスフォールドアミロイド様グリケート化アルブミンまたはヘモグロビンの導入後における血小板凝集が、H E P E S Tyrode緩衝液中の新鮮採取加クエン酸血漿からの単離血小板を用いて、凝集計で追跡された。血小板凝集に及ぼす、ヒトI g I Vおよび4種の異なるアミロイド構造に対するネズミモノクローナル抗体の提示阻害性が評価された。A．製業者Iから購入されたI g I Vは、ヒトドナー‘A’の血小板のグリケート化ヘモグロビン誘導凝集を効果的に阻害する。I g I V（I）自体は血小板に影響を有しない、即ちI g I V（I）を血小板へ加えても凝集が誘導されない。用いられたI g I V（I）濃度は4.7 mg / mLであり、H b A G E濃度は18 μ g / mLであり、コラーゲンは10 μ g / mLの濃度で用いられた。B．ドナーAの血小板の凝集に及ぼす、10 μ g / mLコラーゲン、18 μ g / mL H b A G E、4.7 mg / mL I g I V（I）および4.7 mg / mL I g I V（I）とプレインキュベートされた18 μ g / mL H b A G Eの影響が調べられた。C．ドナーAの血小板で行われた実験（A．）と同様に、ドナー‘B’の血小板による血小板凝集が経時的に追跡された。今回は、10 μ g / mLコラーゲン、90 μ g / mL H b A G E、4.7 mg / mL I g I V（I）および4.7 mg / mL I g I V（I）とプレインキュベートされた90 μ g / mL H b A G Eが用いられた。D．ドナー‘C’の血小板でのコントロール実験では、5 μ M T R A Pを陽性コントロールとして用いた。クロスベータ構造コンホメーションのミスフォールドタンパク質に親和性をもつ5種モノクローナル抗体の混合物100 μ g / mLの影響が、凝集のアクチベーターとしてT R A PまたはH E P E S Tyrode緩衝液コントロールで調べられた。E．、F．血小板凝集（ドナーC）が25 μ g / mLグリケート化ウシ血清アルブミン（B S A A G E , E．）またはグリケート化ヒトヘモグロビン（H b A G E , F．）により誘導された。クロスベータ構造コンホメーションのミスフォールドタンパク質に親和性をもつ5種モノクローナル抗体の25または100 μ g / mL混合物によるこの凝集の影響が調べられた。

【図3】血小板凝集はアミロイドにより誘導され、I g I Vまたはモノクローナル抗体により阻害される A．、B．50 μ g / mLアミロイドによる血小板凝集の誘導は、2.5 mg / mL I g I V（I）がアミロイドとプレインキュベートされたとき（A．）、またはミスフォールドタンパク質と結合する5種モノクローナル抗体の160 μ g / mL混合物がアミロイドとプレインキュベートされたとき（B．）に阻害される。ドナーDおよびE 2例の血小板が別々に解析されている。

【図4】アミロイド特異的小化合物は固定ミスフォールドタンパク質へのI g I Vまたはt P Aの結合性に異なる影響を及ぼす E L I S Aセッアップにおいて、クロスベータ構造三次/四次フォールドを含んでなるミスフォールドタンパク質に親和性をもつマルチリガンド結合タンパク質、I g I Vまたはt P Aの結合性が、アミロイド特異的色素コンゴレドおよびチオフラビンTの濃度シリーズの影響下で解析された。A C．固定H b A G Eへの15 μ g / mL I g I V（I）の結合性に及ぼすアミロイド特異的色素コンゴレド（A．）、チオフラビンT（B．）およびチオフラビンS（C．）の影響が、溶液をE L I S Aプレートへ加える前に3種色素の濃度シリーズとI g I V（I）をプレインキュベートすることにより取り扱われた。D．、F．被覆B S A A G E（D．）またはA（F．）への準最適濃度のt P Aの結合性に及ぼすコンゴレドの影響。E．、G．被覆B S A A G E（E．）またはA（G．）への準最適濃度のt P Aの結合性に及ぼすチオフラビンTの影響。

【図5】クロスベータ構造コンホメーションのミスフォールドタンパク質と結合するタンパク質と結合しうる能力をもつアフィニティマトリックス グリケート化およびミスフォールドヒトヘモグロビンがC N B r セファロースへ結合され、クロスベータ構造フォールドを含んでなるミスフォールドタンパク質に親和性をもつタンパク質と結合しうる能力

10

20

30

40

50

が t P A 結合性を解析することにより調べられた。次いで、クロス構造および/またはクロス構造を含んでなるタンパク質へのアフィニティ領域を含んでなる I g I V I からの免疫グロブリン分子のサブセットを単離するために、アフィニティマトリックスが適用された。A . H b A G E セファロースおよび空のコントロールビーズが 6 μ M t P A 溶液とインキュベートされ、その後で t P A クロモゲン基質 S 2 7 6 5 を加えることにより t P A 活性の存在について上澄が解析された。B . t P A とのインキュベート後、H b A G E セファロースおよびコントロールビーズが洗浄緩衝液で数回洗浄された。第一洗浄溶出物中 t P A の存在が再び 3 7 で経時的に t P A 基質 S 2 7 6 5 変換を追跡することにより解析された。C . 徹底洗浄後、結合 t P A が空のコントロールセファロースビーズおよび H b A G E セファロースから高塩で溶出された。S 2 7 6 5 を加えることにより t P A の存在について 1 0 倍希釈溶出物が解析された。D . A D V 0 1 で染色された希釈 I g I V ストック (Octagam) の 5 9 0 n m における吸光度の標準曲線。E . E L I S A で調べられるような、H b A G E への I g I V ストック (Octagam) の希釈シリーズの結合性の標準曲線。F . E L I S A で評価されるような、1 0 0 0 倍希釈 I g I V ストック、H b A G E セファロースと接触後の I g I V およびコントロールマトリックスと接触後の I g I V の固定 H b A G E との結合性。G . E L I S A で評価されるような、H b A G E セファロースから溶出された I g I V およびコントロールマトリックスから溶出された I g I V の固定 H b A G E との結合性。I g I V ストック結合曲線から計算されるような、相対数としてシグナルが示されている (図 E 参照) 。H . E L I S A で調べられるような、熱変性 B S A への希釈シリーズの I g I V ストック (Octagam) の結合性の標準曲線。I . E L I S A で評価されるような、1 0 0 0 倍希釈 I g I V ストック、H b A G E セファロースと接触後の I g I V およびコントロールマトリックスと接触後の I g I V の固定熱変性 B S A との結合性。J . E L I S A で評価されるような、H b A G E セファロースから溶出された I g I V およびコントロールマトリックスから溶出された I g I V の固定熱変性 B S A との結合性。I g I V ストック結合曲線から計算されるような、相対数としてシグナルが示されている (図 H 参照) 。

【図 6】グリケーションによるミスフォールドアルブミン (B S A A G E) およびヘモグロビン (H b A G E) の T E M 解析 像は、B S A A G E (A .) および H b A G E (B .) が非フィブリル無定形凝集物を形成することを示している。

【図 7】Octagam I g I V のミスフォールディングはクロスベータ構造を誘導する A E . 1 0 m M N a P i 緩衝液 p H 8 . 1 中 1 m g / m L (A) 、 2 . 5 m g / m L (B) 、 5 m g / m L (C) 、 1 0 m g / m L (D) および 2 0 m g / m L (E) におけるミスフォールド I g I V Octagam の T E M 解析。F . ミスフォールド Octagam I g I V のチオフラビン T 解析。変性の異なる条件が異なる T E M およびチオフラビン T 特性のミスフォールドタンパク質をもたらすことがわかる。

【図 8】Gammagard I g I V のミスフォールディングはクロスベータ構造を誘導する 様々なミスフォールド I g I V Gammagard 調製物のチオフラビン T (A) 、コンゴレッド (B) 、A N S (C) 、B i s A N S (D) およびチオフラビン S (E) 蛍光。F . 3 7 5 n m の蛍光強度が 2 8 3 n m で励起時に測定されたときの、様々なミスフォールド I g I V Gammagard 調製物のトリプトファン蛍光。

【図 9 A】Gammagard I g I V のミスフォールディングは、t P A / プラスミノージェンを活性化しうる能力に伴い、凝集を誘導する A . 天然 I g I V Gammagard と、様々な形のミスフォールド I g I V Gammagard、即ち B . I g I V R F、C . I g I V 6 5、D . I g I V 6 9、E . I g I V 7 6、F . I g I V 8 0、G . I g I V 8 3 Gammagard、H . I g I V 8 6、I . I g I V 酸および J . I g I V 塩基、K . I g I V H F I P / T F A、L . h I g G 塩基 3 7 の T E M 解析、M . 1 0 0 μ g / m L の最終濃度で様々な変性 I g I V Gammagard 調製物への暴露時における t P A 媒介プラスミン生成。4 0 μ g / m L における d O V A の補因子刺激が任意に 1 0 0 % に設定された。

【図 9 B】Gammagard I g I V のミスフォールディングは、t P A / プラスミノージェンを活性化しうる能力に伴い、凝集を誘導する A . 天然 I g I V Gammagard と、様々な形の

ミスフォールド Ig I V Gammagard、即ち B . I g I V R F、C . I g I V 6 5、D . I g I V 6 9、E . I g I V 7 6、F . I g I V 8 0、G . I g I V 8 3 Gammagard、H . I g I V 8 6、I . I g I V 酸および J . I g I V 塩基、K . I g I V H F I P / T F A、L . h I g G 塩基 3 7 の TEM 解析、M . 1 0 0 μ g / m L の最終濃度で様々な変性 Ig I V Gammagard 調製物への暴露時における t P A 媒介プラスミン生成。4 0 μ g / m L における d O V A の補因子刺激が任意に 1 0 0 % に設定された。

【図 1 0】A 調製物の Th T、コンゴレッドおよび A N S 解析

【図 1 1】A の TEM 解析 A . A 4 0 t = 0、B . A 4 0 H C l、C . f A 4 0 (即ち、1 6 8 時間保存)、D . A 4 2 t = 0、E . A 4 2 H B S および F . f A 4 2 (即ち、3 7 で 2 4 時間 H C l 処理)

【図 1 2】H S A 構造の解析 天然および変性 H S A のチオフラビン T 蛍光 (A) と、天然 H S A (B) および 1 m g / m L (C)、2 . 5 m g / m L (D)、5 m g / m L (E)、1 0 m g / m L (F) または 2 0 m g / m L (G) で変性された H S A の TEM 解析

【図 1 3】ミスフォールドマウス Ig G による Th T および C R の蛍光増強 熱変性マウス Ig G (d m I g G 8 5)、酸変性マウス Ig G (d m I g G 酸)、塩基変性マウス Ig G (d m I g G 塩基) および天然マウス Ig G (n m I g G) のチオフラビン T (A) およびコンゴレッド (B) 蛍光。用いられたマウス Ig G 調製物はマウス グロブリンの組成物である。

【図 1 4】ヒト A p o A I の構造解析 (A) Th T 蛍光、(B) コンゴレッド蛍光、(C) A 2 8 0 n m タンパク質測定、(D) t P A / プラスミノゲン (P l g) 活性化アッセイおよび (E) 固定 A p o A I および H b A G E へのフィブロネクチン F 4 5 F L A G H i s の結合性 (陽性コントロール)。コントロール緩衝液被覆ウェルで得られたバックグラウンドシグナルが、固定タンパク質において対応 F n F 4 5 希釈シリーズで得られたシグナルから差し引かれる。ミスフォールド A p o A I a ~ c : a = 天然 A p o A I ストックへ 1 0 0 m M の最終濃度まで N a O H を加えた後 3 7 で 3 0 分間インキュベート；加温後 1 0 0 m M の最終濃度まで H C l の添加；b = a と同様だが、7 5 に加熱；c = a、b と同様だが、今回は 1 0 0 に加熱。(F)。A と同様に、A p o A I 調製物および H b A G E への t P A 結合性。明確化のために、2 セグメント y 軸が示されているが、t P A および A p o A I 調製物で得られた絶対シグナルが H b A G E で得られたシグナルより実質的に低いからである。

【図 1 5】マトリックスへカップリングされた指定のミスフォールドクロスベータタンパク質を用いて富化されたアフィニティ領域のミスフォールド B S A A G E との増強結合性 図中、マトリックスに固定されたミスフォールドタンパク質が示されている。‘ F T ’, アフィニティマトリックスフロースルー；‘ E L ’, アフィニティマトリックス溶出物、または指定のミスフォールドタンパク質に結合されたアフィニティ領域の溶出後における回収フラクション。1 の富化ファクター箇所における実線は、例えばこの事例では、B S A A G E へのアフィニティ領域の結合性に関する枯渇または富化間の境界を示している。

【図 1 6】Ig I V をミスフォールドクロスベータ B S A A G E アフィニティマトリックスと接触させた後におけるミスフォールドクロスベータタンパク質への富化および枯渇 Ig I V の結合性 Octagam Ig I V が B S A A G E セファロスとインキュベートされた。フロースルー (F T) フラクションの一部が B S A A G E との結合性について E L I S A で試験され、残留 F T が新鮮量の B S A A G E マトリックスへ再び適用された (A)。溶出物フラクション E が集められ、B S A A G E との結合性について E L I S A で同様に試験された (B)。富化ファクターが、Octagam Ig I V 出発物質と比較した、ミスフォールドタンパク質への結合性 / 質量単位として示されている。連続結合ステップに際して B S A A G E 結合 I g 分子が Octagam プールから更に単離され、連続 F T フラクションで富化ファクターの減少をもたらす。B S A A G E マトリックスへ特異的に結合された I g 分子がアフィニティマトリックスから溶出される (溶出物, E)。F T および溶出物フラクションの富化ファクターが A (C および D)、d O V A (E および F

10

20

30

40

50

) および H b A G E (G および H) でも調べられた。

【図 17】 E L I S A で解析された、フィブリンを含めたクロスベータコンホメーションの様々なタンパク質への Octagam I g I V の結合性 A . D . 固定 H b A G E (A . , 陽性コントロール)、 d O V A (B .)、フィブリン (C .) と A 1 4 0 および A 1 4 2 (D .) への Octagam I g I V の結合性を示す E L I S A 。 E . フィブリンへの t P A の結合性 (C . の陽性コントロール)

【図 18】 様々なミスフォールドヒト血漿アポリポタンパク質 A I 調製物への様々な I g I V 調製物の結合性 A . E L I S A において、固定天然 A p o A I と、 Na O H を 1 0 0 m M の最終濃度まで加えてから 3 7 ° C 、 7 5 ° C または 1 0 0 ° C で 3 0 分間のインキュベートによりミスフォールドされた A p o A I への Octagam I g I V の結合性が評価された。 1 0 0 ° C で加熱された A p o A I では結合性がみられない。 B . A と同様の E L I S A , マトリックスを Octagam I g I V と接触させた後に H b A G E アフィニティマトリックスから回収された枯渴 I g I V フロースルー。再び、 1 0 0 ° C で加熱された A p o A I では結合性がみられない。 C . A . および B . と同様の E L I S A , H b A G E アフィニティマトリックスを Octagam I g I V と接触させた後における富化 I g I V 溶出物

【図 19】 ミスフォールド I g I V によるコンゴレッドおよびチオフラビン T 蛍光増強、 t P A 結合性および t P A / プラスミノゲン活性化 Na P i 緩衝液 p H 8 . 1 中 6 5 ° C または H C l p H 2 中 6 5 ° C で 6 時間にわたり、 I g I V が漸増濃度で熱変性された。コンゴレッド (A) およびチオフラビン T 蛍光増強 (B) が測定された。コンゴレッド蛍光は 1 m g / m L で変性された I g I V で試験されなかった。天然 I g I V と、 1 m g / m L または 5 m g / m L で加熱された熱変性ミスフォールド I g I V による t P A / プラスミノゲンの活性化が、プラスミンのクロモゲン基質を用いて調べられる、 C . 最大プラスミン活性が、指示濃度でミスフォールドされた加熱 I g I V で調べられた。 D . Na P i 緩衝液中 1 m g / m L および 5 m g / m L でミスフォールドされた I g I V により誘導されたプラスミン活性を示す代表的グラフ。 E . A 4 0 t = 0 およびミスフォールド I g I V への t P A の結合性

【図 20】 o x L D L によるヒト血小板の凝集が I g I V により阻害される；非富化出発物質およびミスフォールド H b A G E アフィニティマトリックスへの I g I V の暴露後にフロースルーとして集められた枯渴 I g I V と比較された、 o x L D L への富化 I g I V の親和性 A . o x L D L 誘導血小板凝集に及ぼす I g I V の影響。 T R A P により誘導される凝集が最大であり、任意に 1 0 0 % に設定される。濃度シリーズの I g I V の影響が、血小板懸濁物への添加および凝集実験の開始前に、天然 L D L コントロールまたは o x L D L を I g I V とプレインキュベートすることにより評価される。 B . ~ D . E L I S A : Octagam I g I V (B .)、 H b A G E マトリックスへ固定されたアフィニティ領域から枯渴された I g I V (C .)、および H b A G E アフィニティマトリックスを適用することにより富化された I g I V (D .) の固定 B S A A G E への結合性。 E . ~ G . は同様の 3 種指定アフィニティ領域ストックの o x L D L との結合性を示す。 E . 出発物質、 Octagam I g I V、 F . クロスベータタンパク質および / またはタンパク質中クロスベータ誘導コンホメーションに親和性をもつアフィニティ領域から枯渴された I g I V、 および G . o x L D L への富化 I g I V の結合性。可能であれば、実験で比較可能な品質尺度を得るために k D 値が計算される。ミスフォールド H b A G E マトリックスを用いて、 o x L D L への I g I V の結合性および富化 I g I V の結合性に関して得られた k D 間の比率は 2 7 であり、これは指定の操作で得られた富化ファクターがミスフォールド A p o B 1 0 0 へのアフィニティ領域の結合性に関して 2 7 であることを示している。

【図 21】 インビボマウス出血時間アッセイにおいて出血時間に及ぼすクロスベータ構造結合化合物 I g I V および H G F A F の影響 A . マウス尾切除アッセイにおいて、 H G F A F (約 2 3 4 μ g / m L 最終濃度) および I g I V (約 2 . 5 m g / m L 最終濃度) は双方とも出血時間を有意に延ばす。緩衝液 (P B S) が出血時間のリファレンスと

10

20

30

40

50

して用いられた。10 IEヘパリン/マウスが長時間出血時間の陽性コントロール群に用いられた。計算平均出血時間およびエラーバーが示されている。B・A・で示されているような平均データが、測定出血時間の分布に関する洞察を与えるために、今回は分散プロットで示されている。注記：20分間を超える出血時間は20分間に設定され、出血が能動的に止められ、加えて、200 μ L超の失血をもたらす過剰出血も20分間の出血時間に設定され、出血が能動的に止められた（両操作は地元の倫理委員会により承認されたプロトコールに従っている）。

【図22】ミスフォールドタンパク質への細胞の接着および富化アフィニティ領域での調節 A・ECはゼラチン（任意に100%に設定）またはBSA A GEで前被覆された培養プレートのウェルと結合する。Octagam Ig IVが細胞懸濁物で滴定されたとき、グリケート化アルブミンへの接着が用量依存的に阻害される。接着の同様な阻害がヒトRAGEの組換え可溶性フラグメントで見られる。B・ECは同濃度で被覆された天然Ig IVよりも優先的に富化Ig IVと結合する。接着の陽性コントロールはゼラチン（100%に結合性設定）またはBSA A GEである。陰性コントロールはタンパク質で全く被覆されなかった細胞培養プレートへの細胞の接着である（0%接着）。

【図23】富化Ig IVを用いたミスフォールドタンパク質から溶液の枯渇 A~B・固体支持体、即ちELISAプレートのウェルに固定された富化Ig IVアフィニティ領域を用いることによる、タンパク質溶液からミスフォールドdOVA（A・）およびHbA GE（B・）の抽出。陰性コントロール：固体支持体に固定されたHSA

【図24】様々な形のミスフォールドマウスIg Gへの富化ヒトIg IVおよびOctagam Ig IVの結合性 A・ミスフォールドマウスIg Gへの富化ヒトIg IVの結合性が固定マウスIg G調製物での直接ELISAで評価された。B・第二アプローチでは、第一の抗マウスIg G抗体が96ウェルプレートのウェルに被覆され、次いで様々なマウスIg G調製物と結合され、濃度シリーズのOctagamヒトIg IVで覆われた。

【図25】様々な形のミスフォールドヒト 免疫グロブリンおよびマウス自己 グロブリンへのマウスハイブリドーマIg M 7H2H2の結合性 様々な形のミスフォールドヒトIg G調製物へのマウスハイブリドーマIg M 7H2H2の結合性がELISAで評価された。A・PBS/0.1% Tween 20中12.5 μ g/mLの7H2H2

Ig Mが、‘実施例6~20の一般的物質および方法’セクションで示されているように、15種の異なるヒトIg G調製物との結合性について試験された。B・第二の実験では、精製ハイブリドーマクローン7H2H2 Ig Mが指示濃度で5種ヒトIg G調製物との結合性について再び解析された。コントロール天然Ig GはGammagard Ig IVおよびOctagam Ig IVである。Ig IV調製物の番号はAで用いられたIg IV調製物に関する（テキストも参照）。C・hIg G 塩基 37 および天然Ig IV GammagardへのマウスハイブリドーマIg M 7H2H2の結合性。D・ミスフォールドマウスIg G および天然マウス グロブリンの様々な調製物への7H2H2の結合性。

【図26】タンパク質ミスフォールディング疾患特異的診断および療法のためのアフィニティ領域を選択するために好ましい操作の要旨 一連のミスフォールドタンパク質に対するアフィニティ領域は、アフィニティ領域を含んでなる組成物をミスフォールドタンパク質のアフィニティマトリックスへ適用することにより選択しうる。このようなマトリックスが1種または一連のミスフォールドタンパク質（ミックスX, カラムI）を含有しているとき、一般的なミスフォールドタンパク質に対するアフィニティ領域（調製物1）が得られる。このようなアフィニティ領域はすべてのミスフォールディング疾患に適用しうるが、それらは全く疾患特異的ではないため副作用を生じるかもしれない。疾患特異的アフィニティ領域は、1種または一連の疾患特異的ミスフォールドタンパク質含有のカラム（ミックスA, カラムII）へアフィニティ領域の組成物を適用することにより単離しうる。こうして得られたアフィニティ領域（調製物2）は疾患特異的アフィニティ領域を含有しているが、一般的なミスフォールドタンパク質と相互作用するアフィニティ領域も含有している。後者は、カラムIから得られるアフィニティ領域と類似しているため、場合により存在するミスフォールドタンパク質と結合しうるアフィニティ領域の存在のせいで、特

10

20

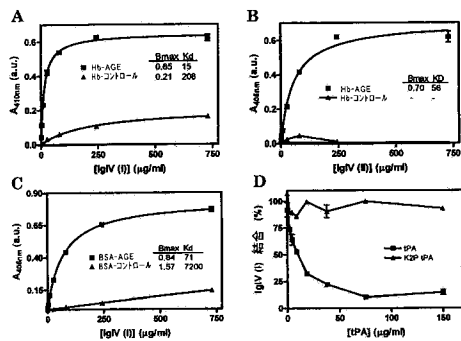
30

40

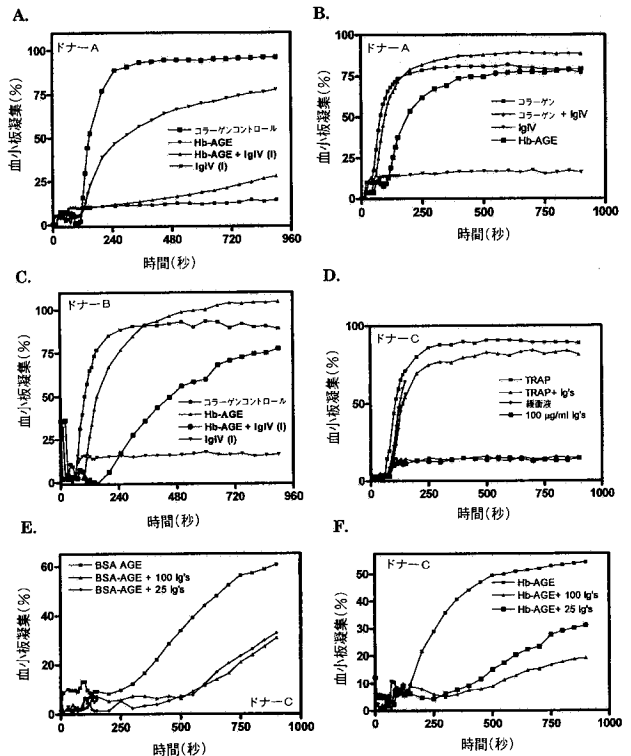
50

定の疾患へ適用されたときに副作用をなお生じるかもしれない。このように、更に好ましくは、アフィニティ領域（調製物3）は、アフィニティ領域を含んでなる組成物をミスフォールドタンパク質のカラム（カラムI）、その後で1種または一連の疾患特異的ミスフォールドタンパク質含有のカラム（カラムIII、カラムIIと類似または同一）へ適用することにより製造される。更に一層好ましくは、疾患の病理に關与するミスフォールドタンパク質と高度に特異的なアフィニティ領域（調製物4）は、アフィニティ領域を含んでなる組成物が1種または一連の疾患特異的ミスフォールドタンパク質のカラム（カラムII）含有のカラム、次いで通常ミスフォールドタンパク質と相互作用するものからカラムIIで集められたアフィニティ領域の混合物を枯渇させるために用いられる、カラムIIに固定された標的疾患の病理に關与するミスフォールドタンパク質を除く一連のミスフォールドタンパク質を含んでなるカラム（カラムIV）へ適用されたときに得られる。

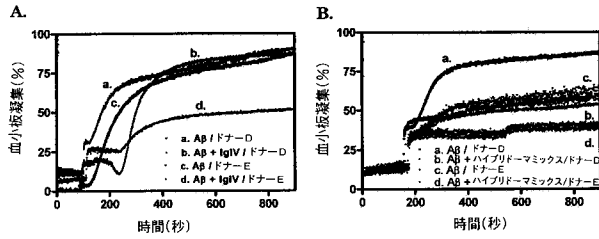
【 図 1 】



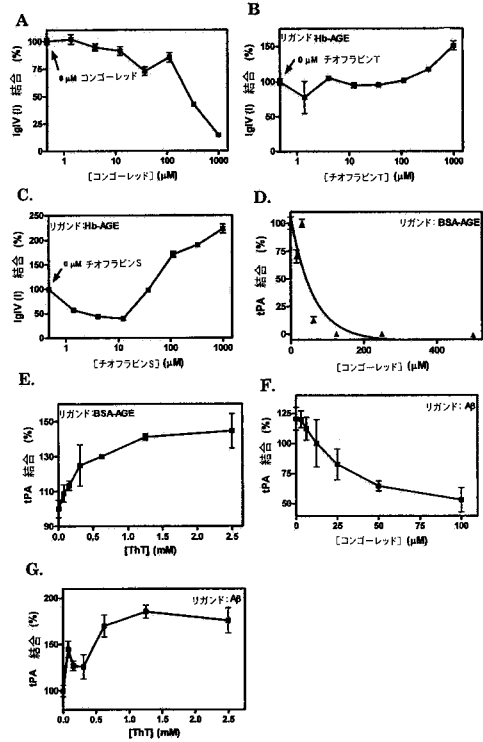
【 図 2 】



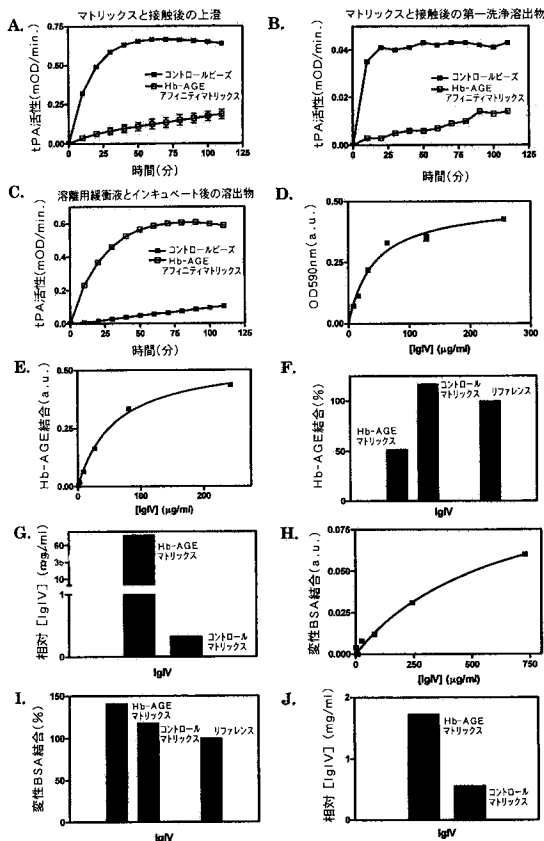
【 図 3 】



【 図 4 】

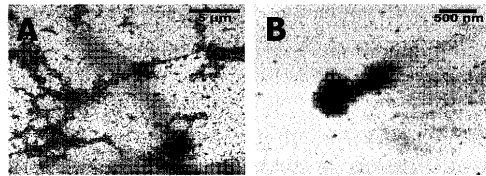


【 図 5 】

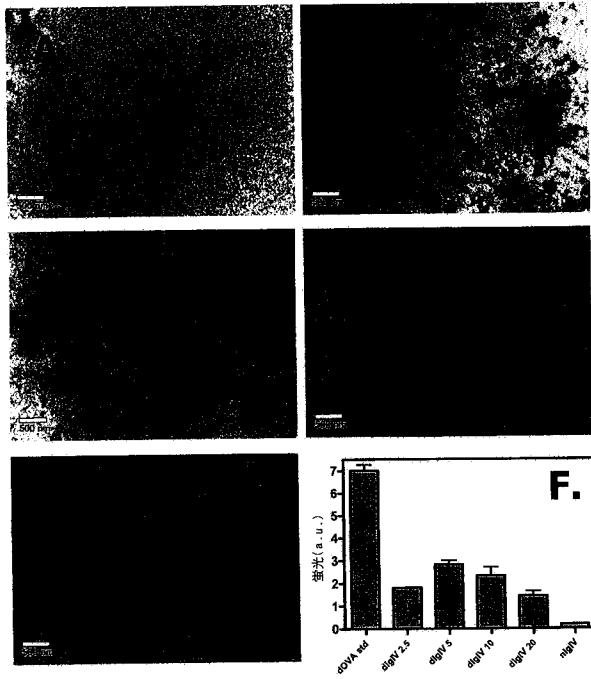


【 図 6 】

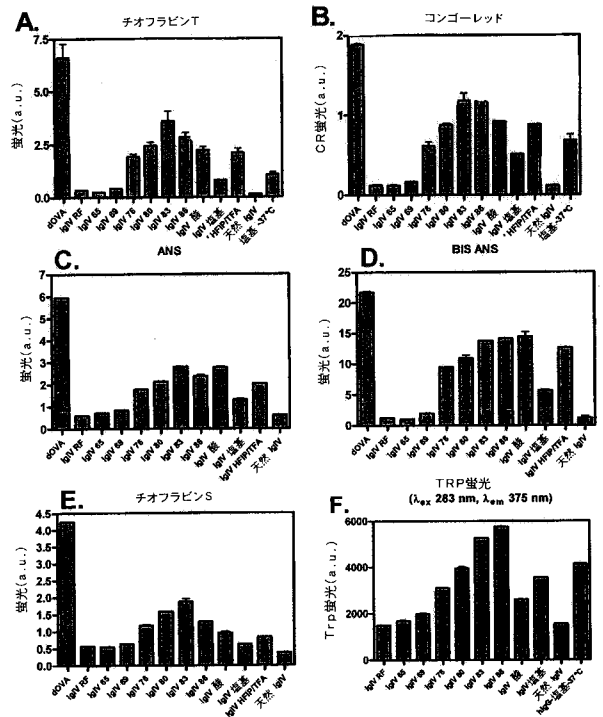
Figure 6



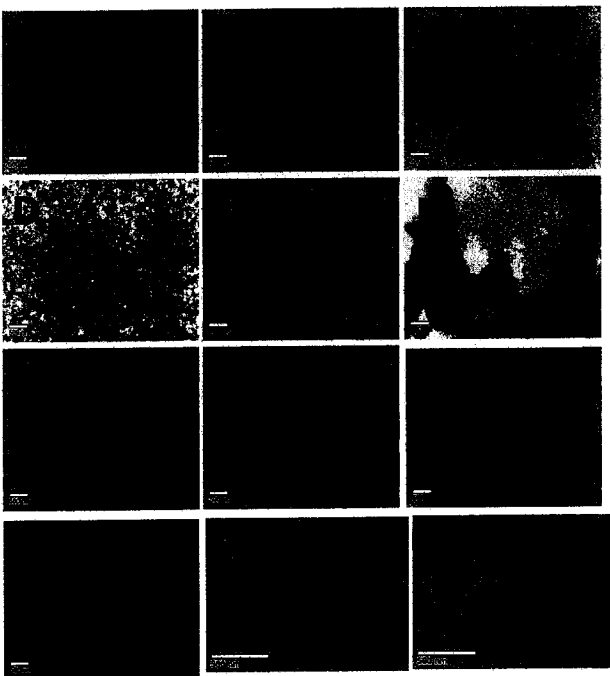
【 図 7 】



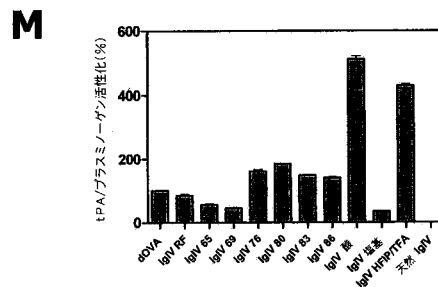
【 図 8 】



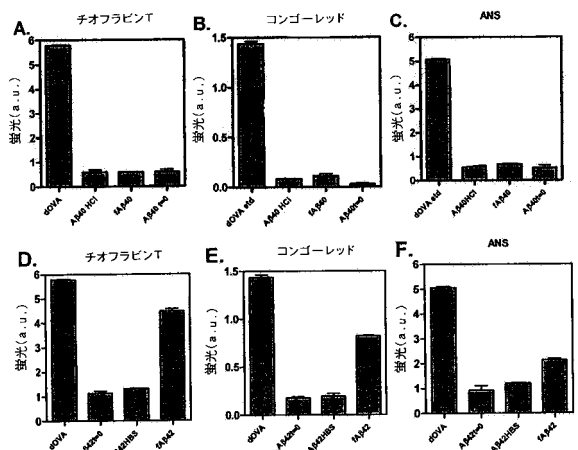
【 図 9 A 】



【 図 9 B 】

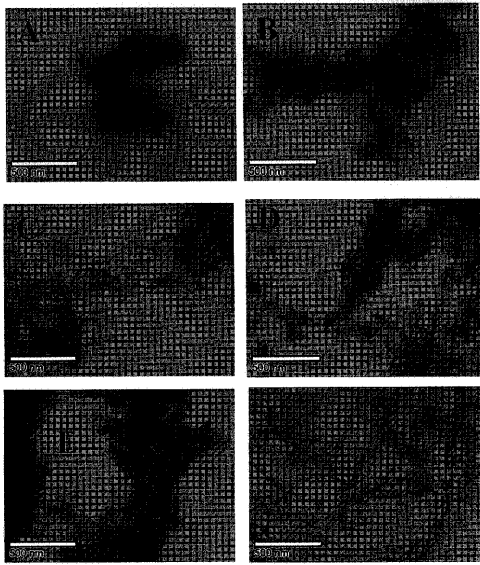


【 図 10 】

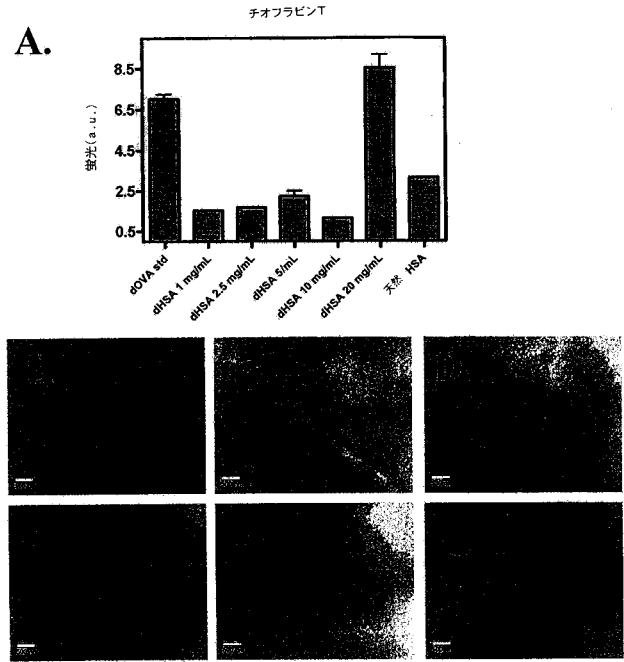


【 図 1 1 】

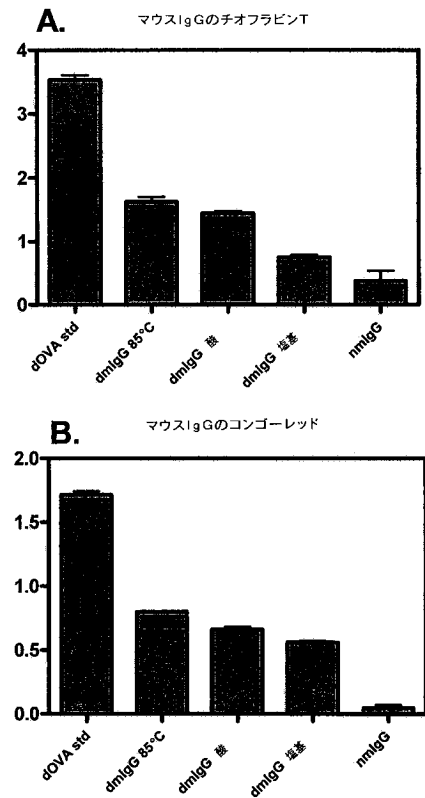
Figure 11.



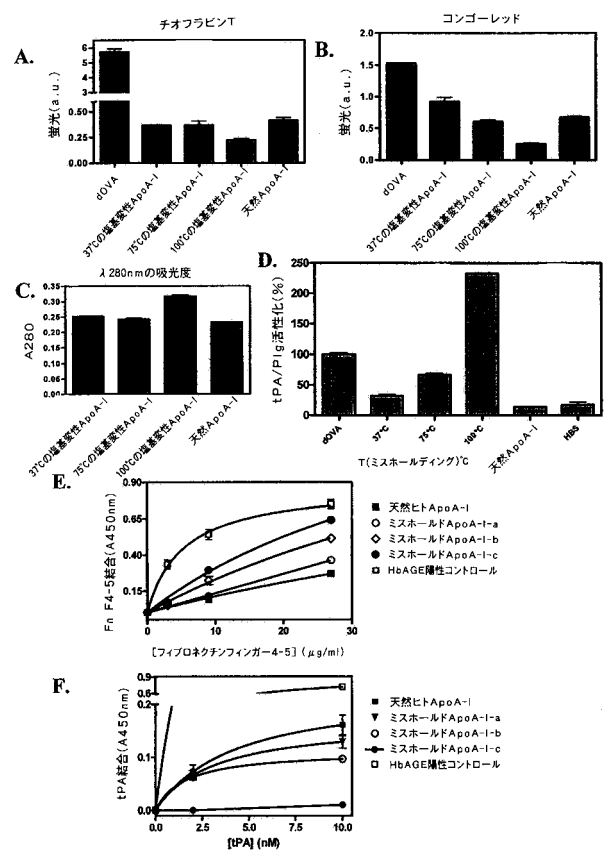
【 図 1 2 】



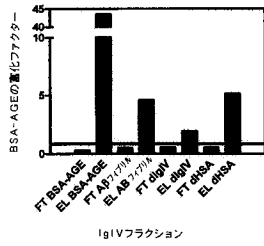
【 図 1 3 】



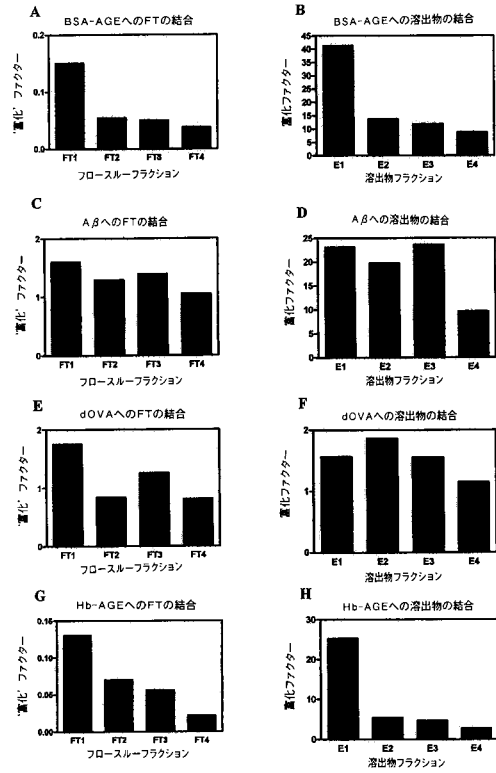
【 図 1 4 】



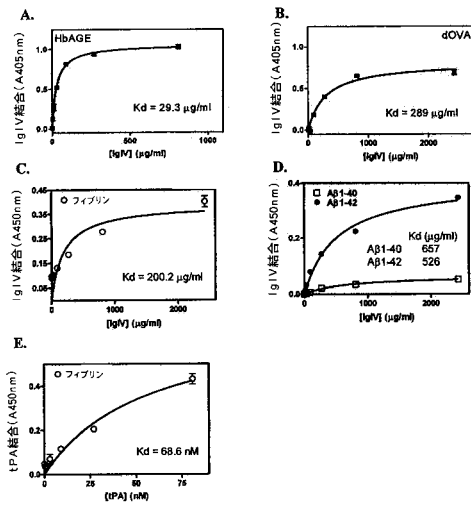
【 図 15 】



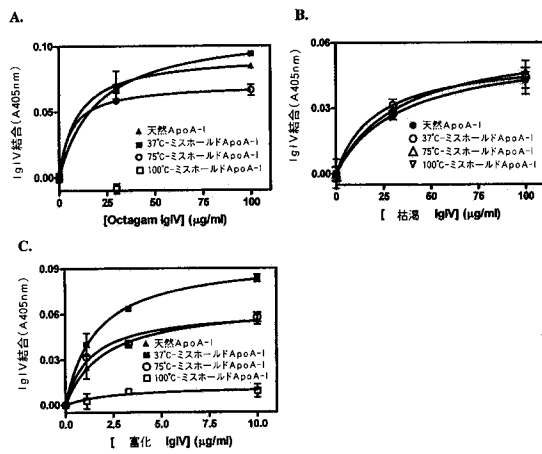
【 図 16 】



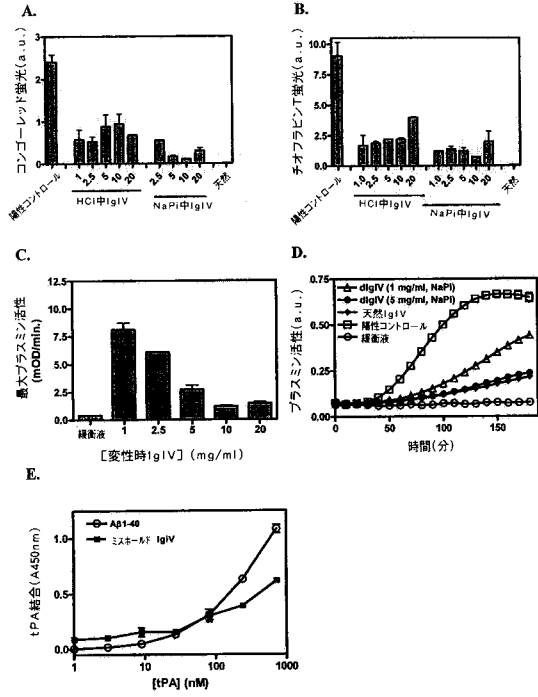
【 図 17 】



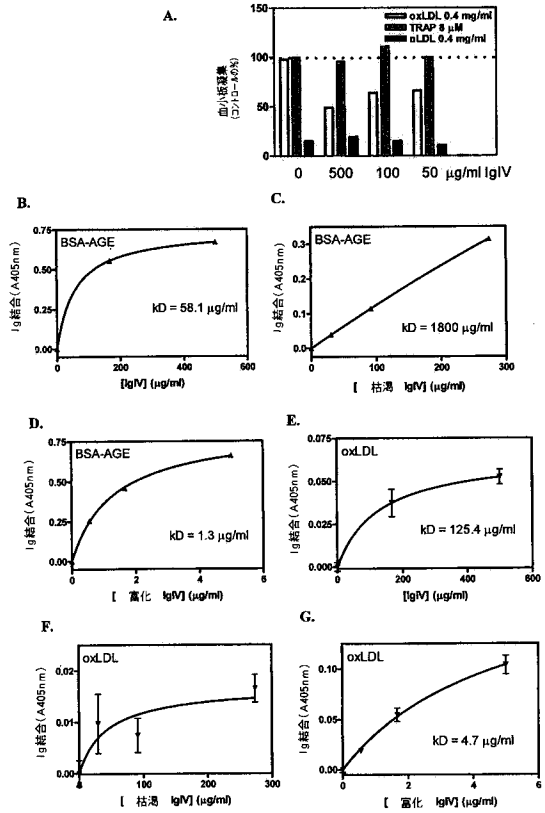
【 図 18 】



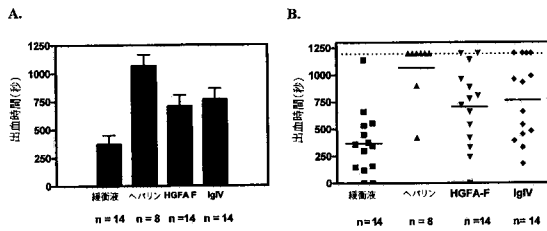
【 図 1 9 】



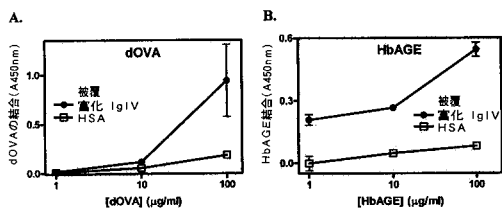
【 図 2 0 】



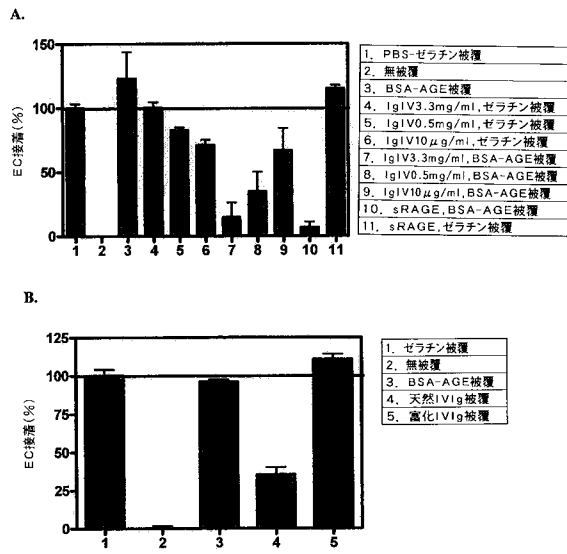
【 図 2 1 】



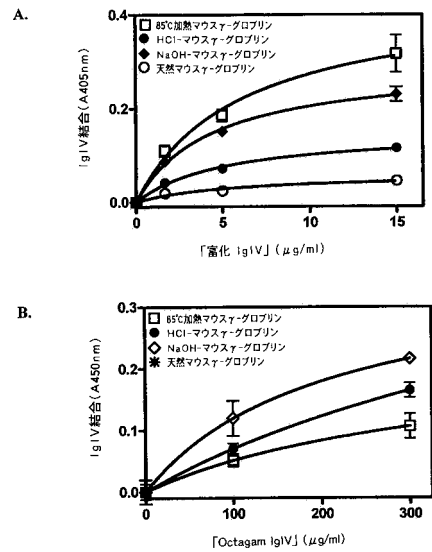
【 図 2 3 】



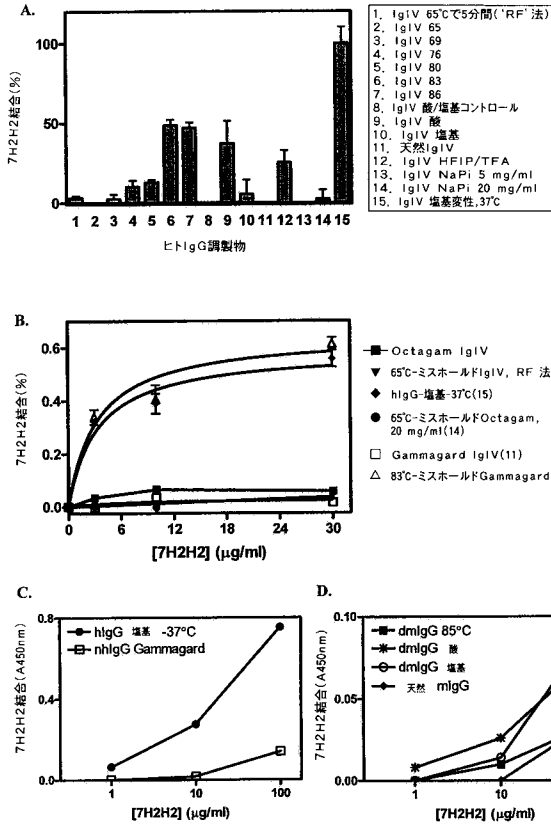
【 図 2 2 】



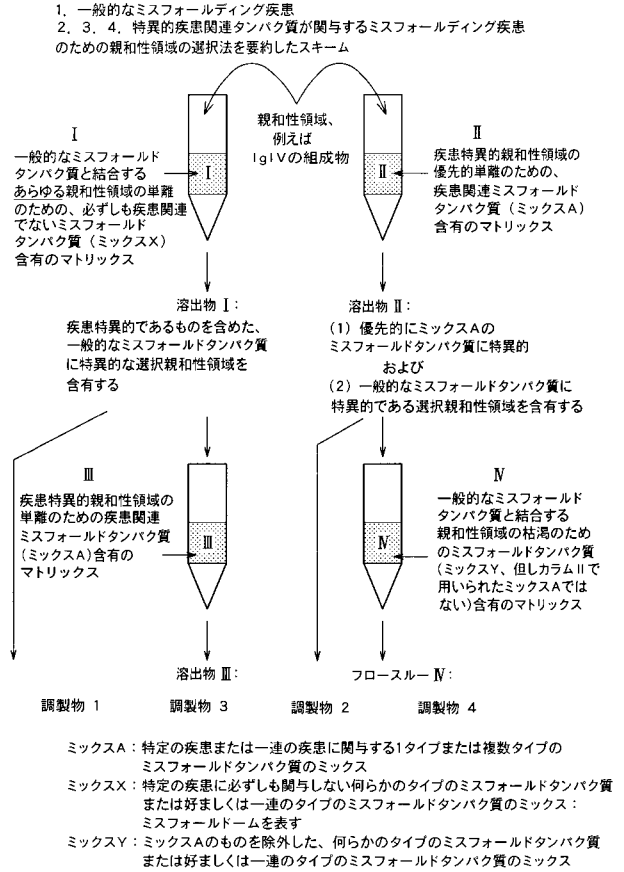
【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



【 図 2 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/NL2007/050063
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18 A61K39/395 C07K1/22 G01N33/68 A61P25/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 172 378 A (DODEL, RICHARD, DR; DU, YANSHENG, DR) 16 January 2002 (2002-01-16) abstract paragraph [0012] paragraph [0022] paragraph [0014] paragraph [0023] paragraph [0015] paragraph [0025] ----- -/--	1-61
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 April 2007		Date of mailing of the international search report 08/05/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/NL2007/050063

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DODEL R ET AL: "HUMAN ANTIBODIES AGAINST AMYLOID BETA PEPTIDE: A POTENTIAL TREATMENT FOR ALZHEIMER'S DISEASE" ANNALS OF NEUROLOGY, BOSTON, US, vol. 52, no. 2, August 2002 (2002-08), pages 253-256, XP009026281 ISSN: 0364-5134 abstract page 253, right-hand column, paragraph 3 - paragraph 4 page 254, left-hand column, paragraph 2 page 254, left-hand column, paragraph 5 - paragraph 6 page 255, right-hand column, paragraph 1 - paragraph 2	1-61
X	DU Y ET AL: "Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity" BRAIN, OXFORD UNIVERSITY PRESS, OXFORD, GB, vol. 126, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 1935-1939, XP002360367 ISSN: 0006-8950 abstract page 1936, left-hand column, paragraph 1 page 1936, line R, last paragraph - page 1937, last line, paragraph 2 page 1938, left-hand column - page 1939, left-hand column, paragraph 1	1-61
X	WEKSLER MARC E ET AL: "The immune system, amyloid-beta peptide, and Alzheimer's disease" IMMUNOLOGICAL REVIEWS, vol. 205, June 2005 (2005-06), pages 244-256, XP002399375 ISSN: 0105-2896 page 253, right-hand column, paragraph 3 - page 254, right-hand column page 252, right-hand column, paragraph 2 - page 253, right-hand column, paragraph 2	1-61
X	WEKSLER M E ET AL: "The immunotherapy of Alzheimer's disease" IMMUNITY & AGEING, vol. 1, no. 1, 12 November 2004 (2004-11-12), pages 1-7, XP002988926 page 6, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 4	1-61
	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2007/050063

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>O'NUALLAIN BRIAN ET AL: "Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 99, no. 3, 5 February 2002 (2002-02-05), pages 1485-1490, XP002211263 ISSN: 0027-8424 abstract page 1489, right-hand column, paragraph 5</p>	1-61
X	<p>WO 99/60024 A (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION) 25 November 1999 (1999-11-25) page 3, line 12 - line 26 page 8, line 19 - page 9, line 2 claims 1,9 page 11, line 19 - line 27</p>	1-61
X	<p>WO 2004/004698 A (UNIVERSITAIR MEDISCH CENTRUM UTRECHT; UNIVERSITEIT UTRECHT HOLDING B.V) 15 January 2004 (2004-01-15) page 13, paragraph 3 page 14, paragraph 2 page 15, paragraph 2 page 18, paragraph 3 page 16, paragraph 1 - paragraph 2 page 20, paragraph 3 page 20, paragraph 5</p>	61-66
X	<p>KRANENBURG D ET AL: "TISSUE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR IS A MULTILIGAND CROSS-BETA STRUCTURE RECEPTOR" CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE,, GB, vol. 12, no. 21, 29 October 2002 (2002-10-29), pages 1833-1839, XP001172448 ISSN: 0960-9822 abstract</p>	61-66

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/NL2007/050063

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOUMA BAREND ET AL: "Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 278, no. 43, 24 October 2003 (2003-10-24), pages 41810-41819, XP002343361 ISSN: 0021-9258 abstract page 41818, right-hand column, paragraph 2 - page 41819, left-hand column, paragraph 1	61-66
X	CARDOSO I ET AL: "APROTININ BINDING TO AMYLOID FIBRILS" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 267, no. 8, April 2000 (2000-04), pages 2307-2311, XP001128718 ISSN: 0014-2956 abstract page 2309, right-hand column, paragraph 3 - page 2310, left-hand column, paragraph 4	61-66
P,X	WO 2007/008072 A (CROSSBETA BIOSCIENCES B V [NL]; GEBBINK MARTIJN FRANS BEN GERA [NL]; B) 18 January 2007 (2007-01-18) the whole document page 23, lines 10-13 tables 1-3 page 56, line 9 - page 57, line 23 page 60, line 6 - page 62, line 2 page 76, lines 2-20	1-66
P,X	WO 2007/008069 A (CROSSBETA BIOSCIENCES B V [NL]; GEBBINK MARTIJN FRANS BEN GERA [NL]; B) 18 January 2007 (2007-01-18) the whole document	61-66
P,X	WO 2007/008071 A (CROSSBETA BIOSCIENCES B V [NL]; GEBBINK MARTIJN FRANS BEN GERA [NL]; B) 18 January 2007 (2007-01-18) the whole document	61-66
P,X	WO 2007/008073 A (CROSSBETA BIOSCIENCES B V [NL]; GEBBINK MARTIJN FRANS BEN GERA [NL]; B) 18 January 2007 (2007-01-18) the whole document	61-66
	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2007/050063

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MAAS COEN ET AL: "A role for protein misfolding in immunogenicity of biopharmaceuticals" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 282, no. 4, January 2007 (2007-01), pages 2229-2236, XP002430064 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-66

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NL2007/050063

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 24-27, 33, 34, 48-51, 54, 64-66 are directed to a method of treatment of the human/animal body (Article 52(4) EPC), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/NL2007/050063

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1172378	A	16-01-2002	NONE	
WO 9960024	A	25-11-1999	AU 4007599 A CA 2325600 A1 CN 1344275 A CN 1589903 A EP 1078005 A1 JP 2002515235 T MX PA00011348 A NZ 507727 A ZA 200007811 A	06-12-1999 25-11-1999 10-04-2002 09-03-2005 28-02-2001 28-05-2002 22-04-2003 28-11-2003 21-06-2002
WO 2004004698	A	15-01-2004	AU 2003251233 A1 CA 2492010 A1 EP 1380290 A1 JP 2005537254 T US 2006045853 A1 ZA 200500062 A	23-01-2004 15-01-2004 14-01-2004 08-12-2005 02-03-2006 01-11-2005
WO 2007008072	A	18-01-2007	NONE	
WO 2007008069	A	18-01-2007	US 2007015206 A1	18-01-2007
WO 2007008071	A	18-01-2007	US 2007015133 A1	18-01-2007
WO 2007008073	A	18-01-2007	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01) G 0 1 N 33/50 Z

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

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(72)発明者 マルティン、フランス、ベン、ヘラルド、ヘビंक

オランダ国3755、ハーエル、エームネス、ザードコレル、34

(72)発明者 バレンド、パウマ

オランダ国3994、セーエー、ハウテン、タッペルスギルデ、3

Fターム(参考) 2G045 AA40 CA25 CA26 DA36 DA37 FB03

4C085 AA33 CC13 CC14 DD33 GG02

專利名稱(譯)	亲和区		
公開(公告)号	JP2009529657A	公開(公告)日	2009-08-20
申請号	JP2008555179	申請日	2007-02-16
申請(專利權)人(譯)	十字测试, 生物科学赛斯, Besuroten, 奋笔记本闭嘴		
[標]發明人	マルティンフランスベンヘラルドヘピンク バレンドバウマ		
發明人	マルティン、フランス、ベン、ヘラルド、ヘピンク バレンド、バウマ		
IPC分類号	G01N33/53 A61K39/395 A61P31/00 A61P7/02 G01N33/15 G01N33/50		
CPC分類号	A61K2039/505 A61P7/02 A61P25/28 A61P31/00 C07K16/065 C07K16/18 C07K2317/21		
FI分類号	G01N33/53.D A61K39/395.X A61P31/00 A61P7/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分類号	2G045/AA40 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB03 4C085/AA33 4C085/CC13 4C085/CC14 4C085/DD33 4C085/GG02		
代理人(譯)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
優先权	2006075355 2006-02-16 EP		
其他公开文献	JP2009529657A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(譯)

本发明提供了一种从IgIV分子的集合中选择至少一种IgIV分子的方法, 该IgIV分子包含能够与十字形结构的表位和/或与包含十字形的蛋白的表位相互作用的亲和区。-结构, 所述方法包括使具有交叉2结构的IgIV分子和/或包含具有交叉2结构的蛋白质接触, 并收集至少一个包含与上述表位相互作用的亲和区的IgIV分子。

静脈血栓症	動脈血栓症	頭痛	悪寒
悪心	発熱	痙攣	頻脈
無菌性髄膜炎	(急性)腎不全	アナフィラキシー	血栓塞栓事象
偽低ナトリウム血症	背部痛	passagere 頭痛	発作
低血圧	溶血性貧血	溶血性出血	腎毒性
不耐症 (IgA欠乏時の抗IgA抗体)	新生児の偽低ナトリウム血症	一部生存ウイルスワクチン(おたふくかぜ、はしか、水痘/風疹ワクチン)に対する低免疫応答	ループス様抗凝固剤に伴う後天性フォンビルブラント症候群
発疹	湿疹	赤血球癆	疲労
脳血管偶発症	新生児の高粘性症	急性心筋虚血	一過性虚血発作
一過性好中球減少	急性腎臓移植片損傷	急性心筋梗塞	溶血尿毒症候群
注射部位の痛み			
*データは Pubmed データマイニングにより得られた文献レファレンスと Octagam および Gammagard データシートから検索されている			