

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6058264号
(P6058264)

(45) 発行日 平成29年1月11日(2017.1.11)

(24) 登録日 平成28年12月16日(2016.12.16)

(51) Int.Cl.	F I					
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A		
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		D	
A 6 1 P 1/18	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		N	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		Y	
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/18			

請求項の数 15 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-517153 (P2011-517153)	(73) 特許権者	511009536
(86) (22) 出願日	平成21年7月8日(2009.7.8)		ジェウヌロ・エスエー
(65) 公表番号	特表2011-527887 (P2011-527887A)		GeNeuro SA
(43) 公表日	平成23年11月10日(2011.11.10)		スイス国、1228 プラン-レーウワッ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/058663		テ、シュマン・デ・オー 18
(87) 国際公開番号	W02010/003977		18 chemin des Aulx,
(87) 国際公開日	平成22年1月14日(2010.1.14)		1228 Plan-Les-Ouates,
審査請求日	平成24年5月28日(2012.5.28)	(74) 代理人	100108855
審判番号	不服2015-4824 (P2015-4824/J1)		弁理士 蔵田 昌俊
審判請求日	平成27年3月11日(2015.3.11)	(74) 代理人	100103034
(31) 優先権主張番号	61/129613		弁理士 野河 信久
(32) 優先日	平成20年7月8日(2008.7.8)	(74) 代理人	100075672
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 峰 隆司
(31) 優先権主張番号	61/202581		
(32) 優先日	平成21年3月13日(2009.3.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MSR V 関連疾患の特異的なリガンドの治療上の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1, 配列番号 2, 配列番号 3 配列番号 4, 配列番号 5 および 配列番号 6 で表される相補性決定領域 (CDRs) の各々を含み、MSRV-Envまたはその断片と結合する抗体。

【請求項 2】

アミノ酸配列 配列番号 1, 配列番号 2 および配列番号 3 の配列を含んでいる軽鎖可変領域 (VL), およびアミノ酸配列 配列番号 4, 配列番号 5 および配列番号 6 を含んでいる重鎖可変領域 (VH) を含み、MSRV-Envまたはその断片と結合する抗体。

【請求項 3】

配列番号 7 で表されるアミノ酸配列を有している軽鎖可変領域 (VL) および配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を有している重鎖可変領域 (VH) を含み、MSRV-Envまたはその断片と結合する抗体。

【請求項 4】

キメラ、操作された又はヒト化された抗体であることを特徴とする請求項 1~3 の何れか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5】

IgG である請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

IgG1 または IgG4 である請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

請求項1~3の何れか一項に記載の抗体を含んでいる薬学的組成物。

【請求項 8】

配列番号 13, 配列番号 14, 配列番号 15, 配列番号 16, 配列番号 17, および 配列番号 18で表される配列または前記配列と100% 相補的な配列の各々を含んでいる核酸分子。

【請求項 9】

少なくとも一つの配列番号 10または12で表される全長配列および少なくとも一つの配列番号9または11で表される全長配列を含んでいる核酸。

【請求項 10】

請求項8または9に記載の核酸を含んでいるベクター。

10

【請求項 11】

請求項10に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 12】

請求項1~3の何れか一項に記載の抗体を用いて生物学的サンプルにおける配列番号20または32で表されるアミノ酸配列からなるアンチリガンドを検出する方法であって、(a) 前記サンプルを請求項1~3の何れか一項に記載の抗体と接触させること、(b) 前記サンプルにおけるアンチリガンドの存在を検出すること、の工程を含んでいる方法。

【請求項 13】

請求項12に記載のアンチリガンドを検出する方法であって、さらに(c) 前記サンプルをGAG 抗原と特異的に結合する抗体と接触させることの工程を含んでいる方法。

20

【請求項 14】

生物学的サンプルにおける配列番号20または32で表されるアミノ酸配列からなるアンチリガンドを検出するための免疫学的アッセイのキットであって、請求項1~3の何れか一項に記載の抗体、および前記アンチリガンドと前記抗体との特異的な結合を検出するための試薬を含んでいるキット。

【請求項 15】

請求項14に記載のアンチリガンドを検出するための免疫学的アッセイのキットであって、さらにGAG 抗原と特異的に結合する抗体を含んでいるキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の説明】

30

【0001】

本発明の対象は、標的分子（アンチリガンド）と有意な結合を呈するリガンドである。

【0002】

本発明によると、「アンチリガンド (anti-ligand)」は、MSRV-ENV (エンペローブ) タンパク質 (MSRVは多発性硬化症関連レトロウイルス) である [Perron, et al. (1997). "Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis." Proc Natl Acad Sci USA 94(14): 7583-8.]。 「MSRV-ENV タンパク質」は、Komurian-Pradel, F等 [Komurian-Pradel, F, et al. (1999). Virology 260(1):1-9], および Rolland A等 [Rolland A, et al. (2006) J Immunol 176(12): 7636-44] で規定される MSRV env遺伝子によりコードされた完全な又は部分的なタンパク質産物またはMSRV-ENV (ミモトープ) の抗原性または結合特性を模倣している任意の分子と理解される。《ENV-T》は、例 2に詳細に記載される完全なタンパク質 (残基1~542) に対応する。また、《ENV-SU》は、例 2に詳細に記載されたとおりS30~K316 配列に対応するENV-1と命名された。また、Env-SUは、Rolland A等 [Rolland A, et al. (2006) J Immunol 176(12): 7636-44] で参照される。レトロウイルスに関して一般的であるように、MSRVは、エンペローブタンパク質-ENVに可変性を示す [Perron, H et al. (2000) J Neurovirol 6: S67-75; Voisset, C., O. Bouton, et al. (2000) AIDS Res Hum Retroviruses 16(8): 731-40]。MSRV ENVの部分的なタンパク質断片を模倣しているミモトープ (Mimotopes) が存在し、多発性硬化症の患者からの抗体により選択的に結合されることが示されている [Jolivet-Re 50

Ynaud, C., H. Perron, et al. (1999). "Specificities of multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum antibodies against mimotopes." *Clin Immunol* 93(3): 283-93)。

【0003】

より具体的には、本発明のリガンドは、アミノ酸配列 配列番号 1, 配列番号 2, 配列番号 3, 配列番号 4, 配列番号 5 および配列番号 6又は以下の何れかを有している任意の配列を有している相補性決定領域 (CDRs) の各々を含む：

CDR1 (配列番号1)の0 ~ 3, CDR2 (配列番号 2)の0 ~ 2, CDR3 (配列番号 3)の0 ~ 2, CDR4 (配列番号 4)の0 ~ 1, CDR5 (配列番号 5)の0 ~ 4, CDR6 (配列番号 6)の0 ~ 2 で示される前記配列内での幾つかの置換されたアミノ酸であって、機能的に均等なアミノ酸配列を得ることが可能であることが知られているアミノ酸 [Huang 1986; Zabin, Horvath et al. 1991; Edgar and Schwartz 1992; Sardana, Emini et al. 1992; Xu, Kapfer et al. 1992; Lamande and Bateman 1993; Verdoliva, Ruvo et al. 1995; Yu, Schurr et al. 1995; Wehrmann, Van Vliet et al. 1996; Ullmann, Hauswald et al. 1997; Minuth, Kramer et al. 1998; Ullmann, Hauswald et al. 2000; Janke, Martin et al. 2003], または

前記配列の配列番号1~配列番号 6内で、均等な化学的な機能および特性を有し、例として、類似するアミノ酸のリスト (一文字コード) G またはA, F またはY, D またはE, N またはQ, K またはR またはH, S またはT, C またはM, V またはL またはI, W またはP で示される当業者に周知 (「アミノ酸類似性 (aminoacid similarity)」とも称される) の他のアミノ酸で置換された, および/または従来技術 [Huang 1986; Zabin, Horvath et al. 1991; Edgar and Schwartz 1992; Sardana, Emini et al. 1992; Xu, Kapfer et al. 1992; Lamande and Bateman 1993; Verdoliva, Ruvo et al. 1995; Yu, Schurr et al. 1995; Wehrmann, Van Vliet et al. 1996; Ullmann, Hauswald et al. 1997; Minuth, Kramer et al. 1998; Ullmann, Hauswald et al. 2000; Janke, Martin et al. 2003] にしたがって置換されたアミノ酸。

【0004】

これらのバリエーションは、配列番号1 ~ 6のペプチドにおけるアミノ酸の欠失, 付加 または置換の結果である。これらのバリエーションも、本発明に包含され、部位特異的突然変異誘発による又は化学合成による方法などの当該技術分野において既知の方法により得ることができる。

【0005】

本発明のリガンドは、本発明のアンチリガンド (antiligand) に結合する能力を有する。

【0006】

本発明によると、「結合」または「結合すること」の表現によって、例 5に提供される判定基準にしたがってリガンドがアンチリガンドを有意に認識することが理解される。

【0007】

本発明の別の側面において、前記リガンドは、アミノ酸配列 配列番号 1, 配列番号 2 および配列番号 3または前記配列と少なくとも 80%同一性、より好ましくは 90%同一性を有している任意の配列を有している相補性決定領域 (CDRs) を含んでいる軽鎖可変領域 (VL), およびアミノ酸配列 配列番号 4, 配列番号 5 および配列番号 6または前記配列と少なくとも 80%同一性、より好ましくは 90%同一性を有している任意の配列を有しているCDRsを含んでいる重鎖可変領域 (VH) のドメインを含む。

【0008】

更なる側面において、本発明のリガンドは、配列番号 7で表されるアミノ酸配列または前記配列と少なくとも 75%の同一性、より好ましくは 80%、なおより好ましくは90%の同一性を有している任意の配列を有している軽鎖可変領域 (VL)および配列番号 8で表されるアミノ酸配列または前記配列と少なくとも 75%の同一性、より好ましくは 80%、なおより好ましくは90%の同一性を有している任意の配列を有している重鎖可変領域 (VH) を含む

。

【0009】

これらの本発明によるVHおよびVL配列のバリエーションは、アンチリガンドに有意に結合する。

【0010】

例えば、「配列同一性 (Sequence identity)」は、80%の配列同一性を有している配列において、80%同一アミノ酸が配列のアラインメントの際に同じポジションに存在することを意味する。このアラインメントは、文献〔Sequence -Evolution - Function Computational Approaches in Comparative genomics. Koonon E. et al., 2003: Kluwer Academic Publishers or according to default parameters of "Mac Vector" Software (UK) instruction book〕に記載される方法などの当該技術分野において既知の方法により行うことができる。

10

【0011】

また、本発明のリガンドは、組換え型の scFV タンパク質内に含まれると規定してもよい。

【0012】

本発明の更なる側面によると、前記リガンドは、抗体の Fab 断片に含まれる。該抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、オリゴクローナル、キメラ化、操作 (engineered) された又はヒト化された抗体であってもよい。本発明の特定の側面において、リガンドを含んでいる抗体は、ヒト IgG、より具体的には IgG1 または IgG4 である。

20

【0013】

ポリクローナル、オリゴクローナル (oligoclonal)、モノクローナル抗体は、例えば、Kohler および Milstein (1975) に記載された方法または Sambrook 等〔Sambrook et al, A Guide to Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition (1989)〕に記載される処理を用いる古典的な方法により上記のアンチリガンドを用いて作出できる。

【0014】

より具体的には、抗体を得るため使用される本発明のアンチリガンドは、配列番号 20 からなる又は配列番号 32 からなる又は配列番号 20 又は配列番号 32 で表される配列と少なくとも 75% の配列同一性を有している任意の配列又はその 100% 相補的な任意の配列からなるアンチリガンドである。

30

【0015】

特に、一般に血清アルブミンまたは KLH などの担体タンパク質と連結されたペプチドの形態で免疫化に使用される。

【0016】

また、本発明は、活性成分として本発明のリガンドを含んでいる薬学的組成物に関する。また、このリガンドは、ScFv、Fab 断片または抗体の形態で薬学的組成物に存在する。

。

【0017】

本発明の薬学的組成物は、MSRV 関連疾患を処置するため使用される。

【0018】

本発明の範囲内で、「処置 (treatment)」は、予防的な又は治療的な処置を包含する。

40

。

【0019】

本発明の薬学的組成物は、治療に有効であり、免疫原性である量で投与させる。当該技術分野において既知のように、投与される用量は、処置される個体に依存する。

【0020】

更なる側面において、本発明は、リガンド、ScFv、Fab 断片または抗体または上記の開示のとおり結合特性を維持している任意の分子または適切な治療上のベクターにおけるリガンドまたは上記の薬学的組成物を投与することを含んでいる処置に対処する。

【0021】

50

本発明の処置法は、MSRV関連疾患を処置することを目的とする。

【0022】

MSRVは、最初に多発性硬化症の患者から単離されたヒトレトロウイルスである〔Perron, H., B. Lalande, et al. (1991), Lancet 337(8745): 862-3; Perron, H., J. A. Carson, et al. (1997), Proc Natl Acad Sci USA 94(14): 7583-8〕。関連する疾患または症候群は、(i) 好ましくは体液(血液, 脳脊髄液, 尿...)で検出される特異的なMSRV RNAまたは抗原の何れか, (ii) 傷害または機能異常を有する器官からの細胞または組織におけるDNAまたはRNAのコピー数の上昇の何れか, (iii) 疾患または臨床の症候群のプロセスに参与する細胞または組織中の特異的なMSRVタンパク質または抗原の何れか, または(iv) 疾患を有する又は臨床的な症候群を発症している個体の体液中のMSRVタンパク質または抗原の何れかに対応する患者における存在により規定される(以下の例8の記載及び以下の他の記載を参照されたい)。MSRVはヒトの内因性レトロウイルスタイプW (HERV-W) ファミリーと遺伝的な相同性を有しているので(Blond et al., 1999; Dolei, 2005; Dolei and Perron, 2008)、MSRV-関連疾患の代替的または相補的な規定は同じ検出試験に使用されるHERV-W 核酸, 抗原またはタンパク質で得ることができる〔Antony et al., 2004; Arru et al., 2007; Karlsson et al., 2004; Mameli et al., 2007〕。そのうえ、MSRV 発現は、病原性の傷害で共に検出される特定のHERV-Wコピーのアップレギュレーションと関連しえる(Mameli et al., 2009)。従って、MSRV-関連疾患の規定は、暗示的(implicitly)にHERV-W因子との関連性を含む。

【0023】

上記のとおり、炎症または免疫の調節不全やMSRV 発現産物の存在と関連する場合、MSRV-関連疾患は多発性硬化症, 精神分裂病, 臨床的に分離した症候群(CIS, 神経学的な症状を伴う), 慢性炎症性の脱髄性多発性ニューロパチー, 癩癩, 乾癬, 癌, 炎症性の膵炎および糖尿病(例えば、1型または2型の糖尿病)を含んでいる群から選択される。

【0024】

特定の態様において、MSRV-関連疾患の処置の方法は、定期的に繰り返される注射での慢性的な処置としてのIgG4またはIgG1 抗体の投与を含む。

【0025】

別の側面において、本発明は、少なくとも一つの配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18で表される全長の核酸配列または前記配列と少なくとも70% および より好ましくは80% および なおより好ましくは90%の同一性を有している任意の配列またはその配列と100% 相補的な任意の配列を含んでいる核酸分子に対処する。

【0026】

例えば、「配列同一性(Sequence identity)」は、80%の配列同一性を有している配列において、80%同一ヌクレオチドが配列のアラインメントの際に同じポジションに存在することを意味する。このアラインメントは、当該技術分野において既知の方法により行うことができる(上記を参照されたい)。

【0027】

本発明の上記側面の好適な態様において、核酸分子は、配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17 および 配列番号18で表される配列または前記配列と少なくとも70% および より好ましくは80% および なおより好ましくは90%の同一性を有している任意の配列またはその配列と100% 相補的な任意の配列の各々を含む。

【0028】

本発明の更なる側面において、以前に記載されたオリジナルのリガンドまたはアンチリガンド分子の抗原性および結合特性を維持している置換(substitutions), 付加(insertions) および欠失(deletions)のパーセンテージに限定されることなく、前記核酸は、VH 鎖をコードする、より詳細には配列番号10または12または前記配列と少なくとも70% および より好ましくは80% および なおより好ましくは90%の同一性を有している任意の配列またはその配列と100% 相補的な任意の配列で表される〔Huang 1986; Zabin, Horv

10

20

30

40

50

ath et al. 1991; Edgar and Schwartz 1992; Sardana, Emini et al. 1992; Xu, Kapfer et al. 1992; Lamande and Bateman 1993; Verdoliva, Ruvo et al. 1995; Yu, Schurr et al. 1995; Wehrmann, Van Vliet et al. 1996; Ullmann, Hauswald et al. 1997; Minuth, Kramer et al. 1998; Ullmann, Hauswald et al. 2000; Janke, Martin et al. 2003]。

【 0 0 2 9 】

また、以前に記載されたオリジナルのリガンドまたはアンチリガンド分子の抗原性および結合特性を維持している置換、付加および欠失のパーセンテージに限定されることなく、前記核酸は、配列番号 9または11の配列または前記配列と少なくとも 70%およびより好ましくは 80%およびなおより好ましくは 90%の同一性を有している任意の配列またはその配列と100% 相補的な任意の配列で表されるVL 鎖をコードできる [Huang 1986; Zabin, Horvath et al. 1991; Edgar and Schwartz 1992; Sardana, Emini et al. 1992; Xu, Kapfer et al. 1992; Lamande and Bateman 1993; Verdoliva, Ruvo et al. 1995; Yu, Schurr et al. 1995; Wehrmann, Van Vliet et al. 1996; Ullmann, Hauswald et al. 1997; Minuth, Kramer et al. 1998; Ullmann, Hauswald et al. 2000; Janke, Martin et al. 2003]。

【 0 0 3 0 】

ストリンジェントな条件下での本発明の少なくとも一つのペプチドをコードしている核酸との任意の核酸ハイブリダイズも、本発明に包含される。本願の明細書等に使用される「ストリンジェントな条件 (stringent conditions)」の用語は、プローブ配列および検出されるヌクレオチド配列の間のハイブリダイゼーションを許す条件を参照する。適切なストリンジェントな条件は、例えば、プレハイブリダイゼーション および ハイブリダイゼーション溶液中の塩またはホルムアミドの濃度により、またはハイブリダイゼーション温度により規定でき、当該技術分野において周知である。特に、ストリンジェントな条件を、塩の濃度を減少させること、ホルムアミドの濃度を増加させること、またはハイブリダイゼーション温度を上昇させることにより増加できる。ストリンジェントな条件の特定のレベルに対応する温度範囲は、さらに所望の核酸のプリンとピリミジンの比を計算すること及び温度をそれに応じて調整することにより狭めることができる。上記の範囲および条件の変動は、当該技術において周知である。

【 0 0 3 1 】

また、本発明は、機能的に互いに関連する、少なくとも一つの宿主生物体において機能的であるプロモーター、本発明の核酸、および同じ宿主生物体において機能的であるターミネーター因子を含んでいるキメラ遺伝子に関する。キメラ遺伝子が含みえる様々な因子は、第一にタンパク質の転写、翻訳および成熟を制御する因子であり、例えば、プロモーター、シグナルペプチドまたは輸送ペプチドをコードしている配列、またはポリアデニル化シグナルを構成しているターミネーター因子および、第二にタンパク質をコードしているポリヌクレオチドである。「機能的に互いに関連する (functionally linked to one another)」の表現は、前記のキメラ遺伝子の因子が互いに関連して、これらの因子の一つの機能が別のものにより影響されることを意味する。例示として、プロモーターは、コード配列の発現に影響する能力がある場合にコード配列と機能的に関連する。本発明のキメラ遺伝子の構築および様々な因子の組立は、当業者に周知の技術を用いて実施することができる [特に Sambrook 等 (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) に記載される技術を用いて実施することができる]。キメラ遺伝子を構成している調節因子の選択は、基本的に機能すべきである宿主生物体に依存し、当業者は所与の宿主生物体で機能的な調節因子を選択する能力がある。「機能的 (functional)」の用語は、所与の宿主生物体で機能する能力があることを意味することが企図される。

【 0 0 3 2 】

本発明のキメラ遺伝子が含みえるプロモーターは、構成的または誘導性の何れであってもよい。例示として、哺乳類細胞での発現に使用される一般的な強力なプロモーターは、pC

10

20

30

40

50

MV (サイトメガロウイルス プロモーター)である。

【 0 0 3 3 】

本発明によると、キメラ遺伝子は、転写アクチベータ (エンハンサー)などのプロモーターおよびコード配列の間に配置される他の制御配列も含みえる。

【 0 0 3 4 】

また、本発明は、本発明のキメラ遺伝子を含んでいるクローニングおよび/または発現のベクターに関する。本発明のベクターは、宿主生物体を形質転換し、この生物体においてリガンドを発現させるため使用される。このベクターは、プラスミド、コスミド、バクテリオファージまたはウイルスであってもよい。好ましくは、本発明の形質転換ベクターは、プラスミドである。一般に、このベクターの主な資質は、自己を維持する、宿主生物体の細胞において自己複製する (特に、複製開始点の存在により)、ベクター中のリガンドを発現する能力であろう。宿主生物体の安定な形質転換を目的とするため、ベクターはゲノムに統合されてもよい。ベクターの組成は、リガンドを宿主中で合成するため必要とされる因子に限定されてもよい。係るベクターの選択 (同様に、本発明のキメラ遺伝子を本ベクターに挿入する技術) は、Sambrook等 [1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press] に詳細に記載される。本発明に使用されるベクターが、本発明のキメラ遺伝子に加えて選択可能なマーカーをコード化しているキメラ遺伝子も含むことは好都合である。この選択可能なマーカーによって、効率的に形質転換される宿主生物体 (即ち、ベクターが導入されたもの) を選択することが可能である。GUS 酵素、形質転換した細胞において色素 (pigments) または色素の産生を制御する酵素をコード化している遺伝子などの容易に同定可能な酵素をコード化している遺伝子であってもよい。係る選択可能なマーカー遺伝子は、特に特許出願WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 および WO 97/04103に記載される。

【 0 0 3 5 】

また、本発明は、ゲノムに統合された又は染色体外因子 (例えば、プラスミド) に保持される少なくとも一つの本発明のキメラ遺伝子を含んでいる形質転換した宿主生物体に関する。「宿主生物体 (host organism)」の用語は、本発明のリガンドを産生するため本発明のキメラ遺伝子を導入しえる任意のより下等な又は高等な単細胞または多細胞の生物体を意味することが企図される。好ましくは、宿主生物体は、CHO(チャイニーズハムスター卵巣)またはHEK (Human Epithelium Kidney)細胞である。

【 0 0 3 6 】

「形質転換した宿主生物体 (transformed host organism)」の表現は、ゲノムに又は染色体外因子 (例えば、プラスミド) に少なくとも一つの本発明のキメラ遺伝子が導入され、結果的に組織に又は培養培地にリガンドを産生する宿主生物体を意味することが企図される。本発明の宿主生物体を得るため、当業者は多くの既知の形質転換法のうちの一つを使用しえる。

【 0 0 3 7 】

これらの方法の一つは、形質転換される宿主生物体の細胞または組織をポリエチレングリコール(PEG)および本発明のベクターと接触させることからなる [Chang and Cohen, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 168(1), 111-115; Mercenier and Chassy, 1988, *Biochimie* 70(4), 503-517]。エレクトロポレーションは、形質転換される細胞または組織および本発明のベクターを電場に置くことからなる別の方法である [Andreason and Evans, 1988, *Biot techniques* 6(7), 650-660; Shigekawa and Dower, 1989, *Aust. J. Biotechnol.* 3(1), 56-62]。別の方法は、直接的にベクターを細胞または組織にマイクロインジェクションで注射することからなる [Gordon and Ruddle, 1985, *Gene* 33(2), 121-136]。「微粒子銃 (biolistic)」の方法を有利に使用しえる。この方法は、細胞または組織を本発明のベクターが吸着された粒子と衝突させることからなる [Bruce et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(24), 9692-9696; Klein et al., 1992, *Biotechnology* 10(3), 286-291; US. Pat. No. 4,945,050]。

【 0 0 3 8 】

また、本発明は、上記の宿主細胞をリガンド、F a b断片または抗体の合成を許容する条件下で培養する工程を含んでいる上記のリガンド、ScFv、F a b断片または抗体を産生するための方法を包含する。

【0039】

本発明のリガンドは、アンチリガンドへの結合特性により特徴付けられる。特定の形態において、本発明のアンチリガンドは、配列番号 20で規定されるアミノ酸配列からなることを特徴とする（好適な選択は配列番号 32で表される）。

【0040】

本発明のScFv、F a b断片または抗体の形態のリガンドを用いて生物学的サンプルのアンチリガンドを検出する方法も本発明の一部である。前記方法は、次の工程を含む：

(a) 前記サンプルを本発明のリガンド（上記のとおりScFv、F a b断片または抗体）と接触させること、

(b) サンプルにおけるアンチリガンドの存在を検出すること。

【0041】

前記の検出の方法は、サンプルをKomurian-Pradel等〔Komurian-Pradel et al. *Virology*, 1999 ; 260(1), pages 1-9〕に記載されるMSRV gag 遺伝子によりコードされたMSRV GAG 抗原と特異的に結合するリガンドと接触させる付加的な工程によって達成できる。

【0042】

別の側面によると、本発明は、生物学的サンプルにおけるアンチリガンドを検出するための免疫学的アッセイのキットにも対応し、該キットは本発明によるリガンド（上記のScFv、F a b断片または抗体）およびアンチリガンドと上記リガンドとの特異的な結合を検出するための試薬、F a b断片または抗原を含んでおり、また該キットは免疫学的な反応に必要な全ての試薬を含んでいる。

【0043】

前記キットは、前に規定したGAG 抗原と特異的に結合するリガンドを付加的に含むことができる。

【0044】

別の側面によると、本発明は、上記のような免疫学的アッセイのキットの多発性硬化症、精神分裂病、臨床的に分離した症候群（clinically isolated syndrome）、慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー（chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy）、癲癇、乾癬、癌、炎症性の膵炎および糖尿病（より詳細には、1型の糖尿病または2型の糖尿病）を含んでいる群から選択されるMSRV-関連疾患の検出における使用にも対処する。

【0045】

生物学的サンプルは、血清、尿、唾液、バイオプシーした物などであってもよい。

【0046】

免疫学的アッセイの設計は従来技術であり、固形の支持体または免疫沈降の使用などのプロトコールは周知技術である。抗体を、検出目的のために酵素性、蛍光性、化学発光性、放射性または色素性の標識を用いて標識することができる。ビオチン および アビジンまたはストレプトアビジンを用いるアッセイなどの免疫複合体からのシグナルを増幅するアッセイおよび酵素免疫アッセイ（例えば、ELISAまたはサンドイッチアッセイ）は、本発明の一部である。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】(A) VL アミノ酸配列、(B) VH アミノ酸配列、CDR 配列を下線で示した。

【図2】完全なENV タンパク質 (ENV-T) および 表面切断断片 (ENV 1またはENV-SU)の構造。

【図3】マウスの GNB AC1 抗体 リガンド (マウス IgG1 perox) および リガンドのみを伴う組換え型の ScFv 断片 (ScFv VH+VL biot) を比較するペルオキシダーゼ基質での比色分析により測定された光学密度。コーティング抗体および各検出リガンドの濃度は各々

10

20

30

40

50

5 $\mu\text{g/ml}$ であった； ストレプトアビジン ペルオキシダーゼ抱合体の希釈は 1 /2000であった。

【図4】マウスのGNb AC1 抗体リガンド および リガンドのみを有するFab 結合断片を比較するペルオキシダーゼ基質での比色分析により測定された光学密度。各検出リガンドまたはIgG1の濃度は、10 $\mu\text{g/ml}$ +Jackson ペルオキシダーゼ 抗-Fabまたは抗-IgG である (1/250に希釈)。異なる ENV-T 濃度を試験した。

【図5】ENV 抗原の段階希釈における本発明のGNbAC1 および キメラ抗体 IgG1 および IgG4の検査。抗体の濃度は1 mg/mlであり、二次のペルオキシダーゼ-標識 抗体 抗 IgGは1/250である。2G5E12抗体はENV 抗原と結合しない無関係の抗体であり、ここで負の対照として使用された。

10

【図6】(A) ロット 1, (B) ロット2の二つのロットのリガンドの定常的な抗原濃度(ENV-T)におけるGNbAC1 および キメラ構築物IgG1 および IgG4の検査。抗原の濃度は1 ~0.0078であり、オリジナルのマウス モノクローナル抗体 (GNb AC1)はmulgGと示され、ヒトIgG1またはIgG4 構築物(リガンドを伴う)はhulgG1 および hulgG4と示される ($\mu\text{g/ml}$)。Jackson 抗-マウスまたは抗-ヒト IgG 二次抗体の希釈は、1/250であった。

【図7】GNbAC1, ScFv, IgG1 および IgG4 キメラのヒト抗体構築物(リガンドを伴う) : IL-6の減少により示されるENV 抗原 (ENV SU)によるPBMCs炎症促進性の活性化の阻害。抗体またはScFv および ENV 抗原の間の比は、25/1であった。

【図8】ApoH-ELISAの結果。多発性硬化症の欧州での多施設治験からの血清を、独立した研究室で盲検試験した。

20

【図9】精神分裂病の患者および対照におけるMSRV-ENVおよびGAGのアンチゲネミア (antigenemia)。使用される抗体は、ENVに対して2A12A5および6A2B2、GAGに対して2G5E12である。

【図10】6A2B2 特異的モノクローナル抗体でのMSRV-ENV 抗原の検出のためのApoH-ELISAの光学密度 (OD)。

【図11】急性の神経炎症および脱髄(実験的なアレルギー性の脳脊髄炎, 多発性硬化症の動物モデル)を発症するヒト化SCIDマウスの臨床的な追跡: 非処理群と比較した異なる抗体で処理した群の臨床転帰の比較。オリジナルのマウス モノクローナル抗体 (GNb AC1)は、mulgGと示され、ヒト IgG1またはIgG4 構築物(リガンドを伴う)はhulgG1 および hulgG4と示される。

30

【図12】急性の神経炎症および脱髄(実験的なアレルギー性の脳脊髄炎, 多発性硬化症の動物モデル)を発症するヒト化SCIDマウスの生存曲線: 非処理群と比較した異なる抗体で処理した群の臨床転帰の比較。オリジナルのマウス モノクローナル抗体 (GNb AC1)は、mulgGと示され、ヒト IgG1またはIgG4 構築物(リガンドを伴う)はhulgG1 および hulgG4と示される。

【図13】本実験で試験した各NOD-SCID マウスの重量曲線。各マウスに注射されたENVタンパク質の用量は、括弧内に示される。IFA および PTX (P14)に乳化させたENV タンパク質の最後の注射は、矢印で示される。マウスは、受けたENVの用量によりM1~M6と命名され、図の説明の括弧の間の符号(0~20 マイクログラム)の隣に示される。曲線が中断していることは、対応するカテゴリーの動物が死亡した日に対応する。

40

【図14】対照(コントロール) および ENVを注射したNOD-SCIDマウス (ENV)における血中グルコース(血糖)濃度: 最初の注射の日(P0)と最後の注射の一週後(P30)との間の比較。P30で測定された血糖を、mock-注射およびENV-注射の群(X軸: -対照および「ENV」)に関してP0に測定された値のパーセンテージとして表す(Y-軸)。

【図15】GNb AC1 抗体重鎖 15AのCDRの規定: Chothiaの規定により同定されたアミノ酸は、小さなレターサイズで示される。Kabatの規定により同定されたアミノ酸は、下線で示した。15B: 両方の決定を組み合わせた好適な規定にしたがって、ヒト IgG4 抗体可変性重鎖への機能的なりガンド移植に関して考慮されるオリジナルのマウスのCDR領域が下線で示される。

【図16】GNb AC1 抗体軽鎖のCDR 規定。Kabatの規定により同定されたCDR は下線で示

50

され、Contact規定（標準ではない）により同定されたCDR は小さなレターサイズで示される。

【図17】キメラのGNb AC1抗体と固定化されたENVタンパク質の結合活性。条件は、対応する例の文中に記載される。Y軸は、比色分析により各ポイントを測定した光学密度(OD)を示し、標的のENVタンパク質に結合した抗体の量と相関する。X軸はマイクロプレートの対応するウェルのコーティングのため使用されたENV組換えタンパク質の濃度を示し、洗浄の後、対応するプレート（固定化されたタンパク質）の広く定量的なスペクトルが得られる。

【図18】ヒト化抗体H2/VK3と固定化されたENVの結合活性。条件は、対応する例の文中に記載される。Y軸は、比色分析により各ポイントを測定した光学密度(OD)を示し、標的のENVタンパク質に結合した抗体の量と相関する。X軸はマイクロプレートの対応するウェルのコーティングのため使用されるENV組換えタンパク質の濃度を示し、洗浄の後、対応するプレート（固定化されたタンパク質）の広く定量的なスペクトルが得られる。

【図19】ヒト化抗体H4/VK3と固定化されたENVの結合活性。条件は、対応する例の文中に記載される。Y軸は、比色分析により各ポイントで測定した光学密度(OD)を示し、標的のENVタンパク質に結合した抗体の量と相関する。X軸はマイクロプレートの対応するウェルのコーティングのため使用されるENV組換えタンパク質の濃度を示し、洗浄の後、対応するプレート（固定化されたタンパク質）の広く定量的なスペクトルが得られる。

【図20】ヒト化抗体H2/VK3 (H2vk3)およびキメラ抗体(GNbAC1 IgG4)の固定化されたENVへの結合活性の比較。条件は、対応する例の文中に記載される。Y軸は、比色分析により各ポイントを測定した光学密度(OD)を示し、標的のENVタンパク質に結合した抗体の量と相関する。X軸はマイクロプレートの対応するウェルのコーティングのため使用されるENV組換えタンパク質の濃度を示し、洗浄の後、対応するプレート（固定化されたタンパク質）の広く定量的なスペクトルが得られる。

【図21】非還元ゲルにおける精製されたH2VK3抗体 条件は対応する例の文中に記載される。左側でKD番号は写真の左レーンに示すとおり規定の分子量(KD)を有する標準タンパク質がゲルを移動する位置(バー)を示す。精製したH2/VK3抗体は、写真の中央レーンの単一バンドとして示され(矢印)、ウシ血清アルブミン(抗体緩衝剤の標準、対照として異なる分子量で矢印で示される)は写真の右レーンに示される；

【図22】精製H2/VK3 (hH2+hVK3 精製) および 精製キメラ抗体 (GNbAC1 IgG4)の固定化されたENV (0.5 microg/ml)への結合活性の比較。X軸は、IgG4キメラのまたは選択されたヒト化抗体のnanog/mlの濃度を示す。Y軸は比色分析により測定された光学密度を示し、アッセイにおいてENVタンパク質の固定化された定常濃度と結合した抗体の量と相関している。

【図23】ヒト化抗体H2重鎖およびVK3軽鎖のアミノ酸配列。上付きの太字のアミノ酸は、データベースで分析したヒト抗体配列でのコンセンサスポジションに基づくフレームワークに維持されたマウスのアミノ酸を表す。

【図24】炎症促進性のサイトカインは、アストロサイト細胞のHERV-W ENV関連タンパク質での刺激により強くアップレギュレートされる。結果は、トリプリケート値の平均として示される。ENV: MSRV-ENV; シンシチン(Syncytin): 染色体7q copyからのHERV-W ENV; X: 無関係の抗体(対照アイソタイプ); マウスの抗-ENV: GNb AC1 マウス抗体; キメラの抗-ENV: GNb AC1 キメラのヒト IgG4; Pg/ml: ピコグラム/ミリリットル。

【図25】末梢血単核球の培養。結果は、トリプリケート値の平均として示される。ENV: MSRV-ENV; シンシチン(Syncytin): 染色体7q copyからのHERV-W ENV; X: 無関係の抗体(対照アイソタイプ); マウスの抗-ENV: GNb AC1 マウス抗体; キメラの抗-ENV: GNb AC1 キメラのヒト IgG4; Pg/ml: ピコグラム/ミリリットル。

【図26】三形態のGNb AC1リガンド(マウス, キメラおよびヒト化抗体)でのヒトのグリコシル化HERV-W ENVタンパク質の検出。A) ヒトのグリコシル化HERV-W ENVタンパク質のGNb AC1マウス抗体での検出。B): ヒトのグリコシル化HERV-W ENVタンパク質のGNb AC1キメラ抗体での検出; C): ヒトのグリコシル化HERV-W ENVタンパク質のヒト化抗体

10

20

30

40

50

での検出。Y軸： 光学密度； X軸： 細菌性のMSRV-ENV タンパク質(ENV-T 7A バッチ)； 細菌性のMSRV-ENV表面断片(ENV-SU4A バッチ)； ヒトのグリコシル化シンシチン； ヒトのグリコシル化MSRV-ENVタンパク質(ENV-T P1 バッチ)。

【図27】MSRV ENVのMock溶液(sham)を脳内に注射されたラットの神経行動学的なスコアリング： sham(PBS 溶液)， ENV-icv (脳室内ENV 注射)およびENV-hipp ラットにおける脳内注射の後の幾つかのタイムポイント(P5, P6, P7, P11 および P12)で新規刺激 (novelty) に曝露された後の水平方向〔Y軸において「ラインを越える(crossed lines)」で示される〕(A)および垂直方向〔Y軸において「立ち上がり(rearings)」で示される〕(B)の自発運動活性 (locomotor activity)。

【図28】MSRV ENVのMock溶液(sham)で脳内に注射されたラットの神経行動学的なスコアリング： 水平方向はY軸においてラインを越えた数 (number of crossed lines) で示され(A)、垂直方向はY軸において立ち上がり (rearings) の数で示される(B) sham, ENV-icv および ENV-hipp ラットにおけるP11での塩類溶液注射の後の自発運動活性。

10

【図29】MSRV ENVのMock溶液(sham)を脳内に注射されたラットの神経行動学的なスコアリング： 水平方向はY軸においてラインを越えた数で示され(A)、垂直方向はY軸において立ち上がりの数で示される(B) sham, ENV-icv および ENV-hipp ラットにおけるP13での拘束ストレス (restraint stress) の後の自発運動活性。

【図30】IgG4 GNbAC1リガンドの治療効果を示しているMSRV ENVを脳内に注射されたラットの神経行動学的なスコアリング： (A) sham ラット, ENV (ENV+)で注射された無処置のラット, および IgG4-処理ENV+ ラット (レジェンドに示される) において、P12およびP32 (X軸に示される) で新規刺激に曝露された後にオープン・フィールドで測定された水平方向の自発運動活性。

20

【0048】

(B) 拘束ストレス後に水平方向の自発運動活性でP32に観察されたIgG4リガンドの治療効果の確認； X軸に示されるsham ラット, 無処置の ENV+ ラット および IgG4-処理ENV+ ラットにおけるENV タンパク質のリコール全身注射 (recall systemic injection) の後の拘束ストレスの後にオープン・フィールドで測定された (Y軸におけるラインを越えた数)。

【図31】IgG1 GNbAC1 リガンドの治療効果を示している「ENV-陽性」リンパ腫-移植ヌードマウスの研究。脾臓の指標(Y軸)はリンパ腫細胞の注射の19日後の対照 および IgG1-処理マウス (X-軸)で計算された。脾臓指標 (splenic index) は、[(脾臓重量/体重) x 100]と計算された。オーバーラップしないエラーバーは、統計学的な有意性を示す。

30

【図32】IgG1 GNbAC1 リガンドの治療効果を示している「ENV-陽性」リンパ腫-移植SCIDマウスの研究。脾臓/体重比 (Y-軸)はリンパ腫細胞の注射の7日後に計算された。脾臓/体重比 (Y-軸)はB-リンパ腫細胞の注射の7日後に非-処理およびIgG1-処理SCID マウスで計算された。脾臓/体重比 (spleen/body weight ratio) は、[(脾臓重量/体重) x 100]と計算された。

【図33】IgG1 GNbAC1 リガンドの治療効果を示している「ENV-陽性」リンパ腫-移植SCIDマウスの研究。リンパ腫細胞の注射の7日後、抗体注射の6日後、対照およびIgG1-処理マウスで集められた腹膜液中の生存可能な及び死亡した (X軸) リンパ芽球腫細胞の数(A), および他の白血球 (white blood cells) の数(B) (Y軸) 以下の例は、本発明の説明のために提供され、本発明を限定しない。

40

【0049】

[例]

例1: マウス特異的な抗体 (GNbAC1)の分析： MSRV ENV タンパク質及びその均等物に特異的な分子リガンドの配列 および 構造の同定

マウスのハイブリドーマを、Komurian等 [Komurian-Pradel, F., G. Paranhos-Baccala, et al. (1999), Virology 260(1):1-9] に記載のとおり、マウスのミエローマ と大腸菌 (E. coli) で産生させ、MSRV "ENV" クローンから精製した組換え型の MSRV タンパク質で免疫したBalb-C マウスからの脾臓細胞とを融合後に得た。

50

【 0 0 5 0 】

この IgG1/Kappa (GNbAC1) 産生ハイブリドーマからの VH および VL 領域の PCR 増幅を、次のプロトコールにしたがって行った。

【 0 0 5 1 】

ポリ(A+) RNAsを、製造者の指示にしたがってIgG1/Kappaを産生している 5×10^7 のハイブリドーマ細胞から、mRNA精製キット(Amersham Bioscience)を用いて抽出し、精製した。逆転写を、RT-PCR キット (Amersham Bioscience)を用いて製造者の指示にしたがって800 ng mRNAから行った。軽 (VL) および 重 (VH) 鎖の可変領域の遺伝子配列をコード化しているcDNAを、前の記載の方法(Ruberti et al., 1994, J. Immunol. Methods 173, 33-39)のとおりcDNA端の迅速増幅(RACE)を用いて取得した。

10

【 0 0 5 2 】

フォワードプライマーは以下の配列番号 21 (RACEforward)であった。リバースプライマー (backward primers) は以下の配列番号 22 (CL_Ala130_Fwd) VL増幅, および配列番号 23 (CH1_Pro119_Fwd) (VH 増幅に関して)であった(文字コード R = A/G, K = G/T, H = A/T/C)。Kabat等 [Kabat et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. National Institute of Health Bethesda, MD]により公開されたコンセンサス配列から推定されたリバースプライマー CL_Ala130_Backward および CH1_Pro119_Backwardは、それぞれマウス kappa/CL ドメイン および IgG/CH1 ドメインのN末の末端に特異的である。

【 0 0 5 3 】

PCR産物を、Taq DNAポリメラーゼを用いて取得し、直接的にpCR (登録商標) 2.1-TOPO (登録商標) ベクターにTA クローニング キット (Invitrogen)を用いて製造者の指示にしたがってライゲーションした。クローン化したDNAsの配列を、シーケンシングをABI310自動シーケンサーでDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystems)を用いて決定した。

20

【 0 0 5 4 】

これらのPCR増幅、続くクローニング および シーケンシング工程によって、それぞれオリジナルのヌクレオチド 配列から推定されたアミノ酸配列により配列番号 7 および 8で示されるVL および VH鎖の配列が提供された。加えて、これらのアミノ酸配列の分析によって、Kabat [Wu and Kabat 1970, An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J. Exp. Med. 132:211-250; Kabat et al. 1987, 1991, Sequences of proteins of immunological interest; 4th edn. US Govt. Printing Office. No.165-492]にしたがった又はChothia [Chothia and Lesk 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. 1989, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature 342: 877-883]にしたがった構造によるリガンド特異性に関する相補性決定領域(CDR)の同定が可能であった。

30

【 0 0 5 5 】

三つのCDR 配列は、VHのアミノ酸配列(図 1 B)において同定され、配列番号 4, 配列番号 5および配列番号 6に対応する。三つのCDR 配列は、VLのアミノ酸配列(図 1 A)において同定され、配列番号 1, 配列番号 2および配列番号 3に対応する。これらの六つのCDR 配列は、リガンドの結合特異性に必要とされるコアの「最小」配列を表すので、今回同定された特異的なリガンドの活性を保持している任意の組成物または分子構築物に含まれる。しかしながら、少数のアミノ酸を均等な特性のもので置換できることから、オリジナルのリガンド配列の特異性が保持され、均等なりガンドとされることが当業者に知られている。係るバリエーションは、10-12 %の最大範囲内で可能であろうことが知られている。

40

【 0 0 5 6 】

例 2: MSRV ENV 抗原の例, 特異的なハイブリドーマの生産のため抗-ENV反応性の脾細胞を得るマウス免疫化に関する生産および精製:

50

ソース: データベースのアクセッション番号(NCBI-Entrez/Genbank): AF331500.1に対応するタンパク質配列を含んでいるMSRV ピリオン (Perron, Jouvin-Marche et al.2001)からのプラスミド pV14。

【 0 0 5 7 】

図2は、完全なENV タンパク質 (ENV-T, 配列番号 19) および 表面切断断片(ENV 1またはENV-SU, 配列番号24)の構造を示す。図 2において、シグナルペプチドは、残基 #1 (メチオニン)で開始し、残基#29 (スレオニン)で終了する。

【 0 0 5 8 】

生産方法:

発現プラスミドにGeneart (USA)により規定されたENV-T コード配列をNovagen (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ, UNITED STATES)により提供された発現ベクター pET-15bに供給者の指示にしたがってライゲーションし、「DNA単離およびシーケンシング」(Essential Techniques Series) [Bruce A. Roe, Judy S. Crabtree and Akbar S. Khan Published by John Wiley & Sons, ISBN 0-471-97324-0 QP625.N89R64 1996 John Wiley & Sons and in "Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course (Paperback) by Katharine G. Field (Author), Walt Ream (Author)]に記載された古典的な CaCl₂透過により細菌BL21 大腸菌株を形質転換した後、形質転換された細菌をLB培地で30 µg/mL カナマイシンの存在下で37 °Cで前記光学密度まで成長させた。

10

【 0 0 5 9 】

タンパク質の発現は、1 mMのIPTGで誘導され、培養をさらに37 °Cで4 時間継続した。

20

【 0 0 6 0 】

抽出方法:

5000 g、20 分間、4 °Cでの遠心分離後に、細菌ペレットを、20 mL/L の培養物の溶解緩衝剤 (Tris 20mM pH7.5 ; NaCl 0.15M ; ロイペプチン1 µg/mL, ペプスタチン1 µg/mL, PMSF 1mM, MgCl₂ 2mM, リゾチーム 50 µg/mL)に再懸濁した。溶液は、30 min、4 °Cで攪拌してインキュベーションされ、氷/エタノールで超音波処理(80% 0.5で7 minを4 工程)された。デオキシリボヌクレアーゼ 1 mMが添加され、溶液は1時間、4 °Cで攪拌してインキュベーションされた。懸濁液は、40 000 g で30 min、4 °Cで遠心された。

【 0 0 6 1 】

ペレットは、7.5mL/L の培養物の可溶化緩衝剤 (Tris 20mM pH 7,5, NaCl 150mM, 尿素 2M, SDS 1,5% β-メルカプトエタノール 50mM)で再懸濁された。溶液は、2 時間、8 °Cで攪拌してインキュベーションされた。

30

【 0 0 6 2 】

懸濁液は、次に40,000g で30 min、10 °Cで遠心分離された。

【 0 0 6 3 】

精製方法

尿素上清は、緩衝剤 Tris 20mM pH7,5, NaCl 150mM, SDS 1,5%で5 倍に希釈された。

【 0 0 6 4 】

精製は、1 mL/L の培養物でNi Sepharose Fast Flow カラム (Amersham BioScience)でのアフィニティークロマトグラフィーにより行われた。上清は、緩衝剤 Tris 20mM pH7,5, NaCl 150mM, 尿素 500mM, SDS 1,5%, β-メルカプトエタノール 10mMで平衡化した後に2mL/minでレジンにロードされる。Env の溶出は、30 および 50mMのイミダゾールで段階的に行われた。

40

【 0 0 6 5 】

精製は、脱塩カラム (Amersham BioScience, 25mL のレジン)で行った。アフィニティークロマトグラフィーからのプールは、緩衝剤 Tris 20mM pH7.5, NaCl 150mM, SDS 1,5%, DTT 10mMで平衡化した後に2mL/minでレジンにロードされた。タンパク質は、同じ緩衝剤で溶出された。

【 0 0 6 6 】

その後、タンパク質は、緩衝剤 Tris 20mM pH7,5, NaCl 150mM, SDS 1,5%, DTT 10mMで

50

平衡化されたSuperdex 200 ゲル濾過(Amersham Bioscience)に1 mL/minでロードされた。タンパク質は、同じ緩衝剤で溶出された。

【 0 0 6 7 】

エンドトキシンの除去:

精製は、Acticleanカラム (Amersham Bioscience, 8mL のレジン)で行われた。プールは、緩衝剤 Tris 20mM pH7,5, NaCl 150mM, SDS 1,5%, DTT 10mMで平衡化した後に1 mL/minでレジンにロードされた。タンパク質は、同じ緩衝剤で溶出された。

【 0 0 6 8 】

バッチの品質管理

- 質量分析 MALDI-TOFF: SDSのため使用できない。

10

【 0 0 6 9 】

- N末端シークエンシング: ALPYXTFLFT
- エンドトキシンのアッセイ: < 5 UE/mL

バッチの特性:

見かけ上の溶解性: 100%

純度: > 90 %

濃度: 0,05 mg/m

貯蔵: -80

量: 1,5 mg

緩衝剤: Tris 20mM pH 7,5, NaCl 150mM, SDS 1,5%, DTT 10mM

20

例 3: MSRV ENV抗原に特異的なリガンド結合活性のインビトロの証拠:

I 課題

我々は、クローン化したVH+VL 配列のScFv 組換えタンパク質の形態下で又はオリジナルのマウスのGNbAC1から切断されたF a b断片(マウスの抗体の機能および構造を欠く切断されたVH+VL 鎖を含んでいる)の形態下で、組換え型のアンチリガンドに対するリガンドの親和性を免疫学的アッセイ技術(ELISA)で評価した。このリガンドを、オリジナルのマウスの GNbAC1と、および前記リガンドをヒトIgG1またはIgG4の定常鎖および薬理的なベクターとしての使用に関する適切な配列を挿入している分子の構築物と比較した。

【 0 0 7 0 】

II 材料および方法

30

a) VHおよびVLのクローニング:

軽 (VL) および 重 (VH) 鎖のGNb AC1の可変領域のクローニング および ヌクレオチドのシークエンシング

ポリ(A+) RNAsを、製造者の指示にしたがってGNb AC1抗体を産生している 5×10^7 のハイブリドーマ細胞から、mRNA精製キット(Amersham Bioscience)を用いて抽出し、精製した。逆転写を、RT-PCR キット (Amersham Bioscience)を用いて製造者の指示にしたがって800 ngのmRNAから行った。

【 0 0 7 1 】

軽 (VL) および 重 (VH) 鎖の可変領域の遺伝子配列をコードしているcDNAを、前の記載の方法(Ruberti et al.,1994, The use of the RACE method to clone hybridoma cDNA when V region primers fail. J. Immunol. Methods 173, 33-39)のとおりcDNA端の迅速増幅(RACE)を用いて取得した。フォワードプライマーは、次のRACE aller, (配列番号 21)であった。リバープライマーは、VL 増幅に関してCL Ala130_retour (配列番号 25)およびVH 増幅に関してCH1_Pro119_retour (配列番号 26)であった(文字コード R = A/G, K = G/T, H = A/T/C)。

40

【 0 0 7 2 】

Kabat等[1991, Sequences of proteins of immunological interest. National Institute of Health Bethesda, MD]により公開されたコンセンサス配列から推定されたリバープライマー CL Ala130_retour およびCH1_Pro119_retourは、それぞれマウス カップ/CL ドメイン および IgG/CH1 ドメインのN端の末端に特異的である。

50

【 0 0 7 3 】

PCR産物を、Taq DNAポリメラーゼを用いて取得し、直接的にpCR（登録商標）2.1-TOPO（登録商標）ベクターにTA クローニング キット（Invitrogen）を用いて製造者の指示にしたがってライゲーションした。クローン化したDNAsの配列を、シーケンシングをABI310自動シーケンサーでDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（Applied Biosystems）を用いて決定した。

【 0 0 7 4 】

b) ScFvの構築および発現：

ScFV を、Mallano A等〔Mallano A, et al. 2008, Generation and characterization of a human single-chain fragment variable (scFv) antibody against cytosine deaminase from Yeast. M. BMC Biotechnol. Sep 10;8:68〕に記載の技術にしたがって取得した。

10

【 0 0 7 5 】

c) GNb AC1 抗体からのFab

Fab を、Lefranc等（Lefranc G, Lefranc MP. Antibody engineering and perspectives in therapy. Biochimie. 1990 Sep;72(9):639-51）にしたがって取得した。

【 0 0 7 6 】

II-1 材料

II-1a モノクローナル抗体

リガンド（ヒト IgG 分子の 構築物またはGNbAC1）を、産生し、以下の濃度で精製した：

20

【 0 0 7 7 】

【表 1】

表 1：異なるリガンド、ScFV、Fab および 抗体の濃度

名称	濃度
GNbAC1	5.91/ml
ヒト IgG1におけるリガンド	1mg/ml
ヒト IgG4におけるリガンド	2mg/ml
マウスの Fab	1mg/ml
組換え型の ScFv	1mg/ml

30

【 0 0 7 8 】

II-1b 組換えタンパク質

MSRVの完全なENV タンパク質（ENV-T）および 表面 ドメイン 断片（ENV-SU）の組換えタンパク質の双方は、Protein Expertで大腸菌（E.coli）で産生され、さらに例 2に記載のとおり精製された。

【 0 0 7 9 】

【表 2】

40

タンパク質の名称	濃度	エンドトキシン
ENV-T	0.15mg/ml	<5UI/ml
ENV-SU	0.20mg/ml	<5UI/ml

表 2：組換えタンパク質の濃度

50

【 0 0 8 0 】

II-1c サンドイッチELISA

マイクロウェルを、100 μ l / ウェルの抗-ENV 捕獲抗体 (3C1 D5, bioMerieuxにより提供される)で被覆し、50mM 重炭酸ナトリウム, pH 9.6で希釈した。プレートをシールし、一晚4 に置いた。

【 0 0 8 1 】

マイクロウェルを、250 μ l / ウェルのPBST 0.05% (リン酸緩衝塩類溶液に0.05% のTween 20を含む; Sigma P7949)で3 回洗浄した。最終回後に、プレートを逆さにし、吸収紙にプロットし、残留する緩衝剤を除去した。

【 0 0 8 2 】

200 μ l / ウェル のPBST 0.05% + 5% ミルク を添加した。プレートをシールし、ATで軽い攪拌条件下で1 時間インキュベーションした。

【 0 0 8 3 】

マイクロウェルを、3 回250 μ l / ウェルのPBST 0.05%で洗浄した。最終回後に、プレートを逆さにし、吸収紙にプロットし、残留する緩衝剤を除去した。

【 0 0 8 4 】

マイクロウェルをPBST 0.05%で希釈した100 μ l / ウェル のENV 抗原 (ENV-TまたはENV-SU)でインキュベーションした。プレートを、シールし、室温で軽く攪拌して2 時間インキュベーションした。

【 0 0 8 5 】

マイクロウェルを、3 回250 μ l / ウェルのPBST 0.05%で洗浄した。最終回後に、プレートを逆さにし、吸収紙にプロットし、残留する緩衝剤を除去した。

【 0 0 8 6 】

PBST 0.05% + 5% ミルクで希釈した100 μ l / ウェル の検出抗体 (GNbAC1または組換え型の断片 ScFv)を添加した。プレートを、シールし、室温で軽く攪拌して1 時間インキュベーションした。GNbAC1 をペルオキシダーゼ標識し、Squarix, GermanyでScFvをビオチン標識した。

【 0 0 8 7 】

マイクロウェルを、4 回250 μ l / ウェルのPBST 0.05%で洗浄した。最終回後に、プレートを逆さにし、吸収紙にプロットし、残留する緩衝剤を除去した。

【 0 0 8 8 】

100 μ l / ウェルの基質溶液 [1 錠のo-フェニレンジアミン (OPD)を10ml の0.05M リン酸クエン酸緩衝剤 pH5で希釈した溶液 + 10 μ l のH₂O₂ 30%, 最終時に調製]を、添加した。プレートを、30 min、室温で暗所でインキュベーションした。

【 0 0 8 9 】

50 μ l / ウェルの停止液 2N H₂SO₄を添加した。

【 0 0 9 0 】

吸光度を、反応を停止する30 分間内に490nmで測定した。

【 0 0 9 1 】

II-1d ENV抗原(上記のENV-TまたはENV-SU)で被覆したマイクロプレートでの直接のELISA

マイクロウェルを、50mM 重炭酸ナトリウム, pH 9.6で希釈した100 μ l / ウェル のENV 抗原で被覆した。プレートをシールし、37 で軽く攪拌した条件下で2 時間インキュベーションした。

【 0 0 9 2 】

マイクロウェルを、4 回250 μ l / ウェルのPBS (リン酸緩衝塩類溶液)で洗浄した。最終回後に、プレートを逆さにし、吸収紙にプロットし、残留する緩衝剤を除去した。

【 0 0 9 3 】

PBS + BSA 1% (PBS に1% のウシ血清アルブミンを有する)で希釈した本発明の100 μ l / ウェル の検出抗体 (GNbAC1またはits Fab断片)を添加した。プレートを、シール

10

20

30

40

50

し、室温で軽く攪拌して1 時間インキュベーションした。

【0094】

マイクロウェルを、4 回250 μ l / ウェルのPBSで洗浄した。最終回後に、プレートを逆さにし、吸収紙にプロットし、残留する緩衝剤を除去した。

【0095】

PBS + BSA 1 % (抗 IgG Jackson -1/250希釈; 一次抗体に適切なIgG 抗 ヒト perox Jackson 115-035-146 または, IgG 抗 マウス perox Jackson 115-035-062)で希釈した100 μ l / ウェルの二次検出抗体を添加した。プレートを、シールし、室温で軽く攪拌して1 時間インキュベーションした。

【0096】

マイクロウェルを、6 回250 μ l / ウェルのPBSで洗浄した。最終回後に、プレートを逆さにし、吸収紙にプロットし、残留する緩衝剤を除去した。

【0097】

100 μ l / ウェルの基質溶液 [1 錠のo-フェニレンジアミン (OPD)を10ml の0.05M リン酸クエン酸緩衝剤 pH5で希釈した溶液 + 10 μ lのH₂O₂ 30%, 最終時に調製)を、添加した。プレートを、30 min、室温で暗所でインキュベーションした。

【0098】

50 μ l / ウェルの停止液 2N H₂SO₄を、添加した。

【0099】

吸光度を、反応を停止する30 分間内に490nmで測定した。

【0100】

III 結果

III-1 サンドイッチ ELISA: マウスの IgG1 (GNbAC1) および ScFv

【0101】

【表3】

	3C1D5 lot 060405CS02 IgG1GNbAC1ペルオキシダーゼ	3C1D5 lot 060405CS02 ScFvビオチン
	標識	標識
Env SU 0,5 μ g/ml	2.695	1.289
Env SU 0,1 μ g/ml	1.036	0.656
Env SU 0,02 μ g/ml	0.294	0.455
PBST 0,05%	0.101	0.411
Env T 0,5 μ g/ml	1.807	1.085
Env T 0,1 μ g/ml	0.862	0.594
Env T 0,02 μ g/ml	0.215	0.443
PBST 0,05%	0.143	0.420

表 3: 抗原の各濃度または対照緩衝剤に対するコーティング抗体 対 ペルオキシダーゼまたはビオチン検出リガンドの濃縮。結果は測定された光学密度に対応する。PBST: リン酸緩衝塩類溶液に 0.05% Tween 20 を有する溶液

【0102】

ScFv および オリジナルのGNbAC1で平行して行ったELISAの結果は、異なる条件で図 3 に示した。

【0103】

コーティング抗体および検出リガンドの濃度は各5 μ g/mlであった; ストレプトアビ

ジン ペルオキシダーゼ抱合体の希釈は 1 /2000であった。

【 0 1 0 4 】

我々は、GNbAc1 および 組換え型のScFvを、ENV-SU および ENV-T 組換えタンパク質に対するサンドイッチ ELISAにおける検出リガンドとして分析した。図 3で参照できるとおり、同じ 濃度でMAb および ScFvは、IgGが二価でScFvが一価である場合にENV タンパク質をScFvに対してIgGの半分以上を超えるODで検出できる。このようなことから結合部位 / 分子の数で比べて単離したリガンドは完全なマウスの IgGよりも良好な結果を示した。それ故、前記抗体機能は必要ではなく、単離したリガンドでの係る改善結果は予想外であった。

【 0 1 0 5 】

III-2 直接のELISA: GNb Ac1 および Fab

【 0 1 0 6 】

【表 4】

	Fab:100 µg/ml	GNb Ac1: 10 µg/ml
Env T 0.5 µg/ml	2.83	3.00
Env T 0.25 µg/ml	1.85	2.75
Env 0.125 µg/ml	1.19	8
Env T 0.0625 µg/ml	0.77	NA
Env T 0.013125 µg/ml	0.56	0.51
Env T 0.015625 µg/ml	0.56	0.37
Env T 0.0078125 µg/ml	0.48	0.26

表 4: 抗原の各濃度または対照緩衝剤に対するコーティング抗体 対ペルオキシダーゼ標識検出リガンド (直接の標識化) の濃縮。結果は測定された光学密度に対応する。NA: 適合可能な測定ではない(技術的なトラブルシューティング)

【 0 1 0 7 】

我々は、ENV-T 組換えタンパク質に対するサンドイッチ ELISAにおける検出リガンドとしてマウスの IgG1 及び その Fab断片を分析した。図 4で参照されるとおり、同じ 濃度で一価の Fabによって二価の IgGより優れた又は等しい光学密度でENVタンパク質が検出された。単離したリガンドによって、再び驚くことに完全なIgGよりも良好な結果が得られたことを参照されたい。

【 0 1 0 8 】

再び、前記抗体機能は必要ではないこと、リガンド自身は「天然」のマウスの IgGより効率的であることを結論できる。

【 0 1 0 9 】

例 4: ヒト IgG1 および IgG4 定常鎖およびリガンドの分子構築物の設計、構築およびインビトロ分析

天然 (Fab)または組換え型 (scFv)の VHおよびVL配列での一価の結合部位を含んでいる単離したリガンドの標的抗原の免疫学的アッセイ検出における予想外の改善された能力が確認された後に、リガンド 配列 (VH+VL)を含んでいるキメラの ヒト IgG1またはIgG4 分子の産生のための組換え型の配列を設計し、構築した。以上のように、我々は、リガンド

10

20

30

40

50

の分子のベクターとして完全な抗体を作出し、それらをオリジナルのマウスの IgGと比較して免疫学的アッセイで評価した。

【 0 1 1 0 】

これらの挿入されたりガンドを有する組換え型の抗体ベクターを生産するために、クローンをCHO細胞での発現に適合させた。そして、抗体を生産し、「Polymun」(Vienna, Austria)で精製した。これらの抗体の適切なベクターでの生産のための技術的な条件を、以下に要約する：

組換え型のCHO 細胞株 GNbAC1_IgG1 および GNbAC1_IgG4の樹立

このセクションでは、キメラの ヒト/マウス IgG1およびIgG4として組換え技術で発現された組換え型のモノクローナル抗体 GNb AC1の遺伝子の供給源を記載し、この抗体の定常領域はヒトであり、可変領域はオリジナルのVHおよびVL配列(それぞれ、配列番号8および配列番号7に記載される)である。

【 0 1 1 1 】

発現プラスミド

キメラGNb AC1 IgG1 軽鎖(LC)

基本的には、この発現プラスミドは商業的に利用可能なpCIneoであり、このプラスミドは最初の工程に使用されてコドンが至適化(GENEARTにより設計されたCHO 細胞における発現のためのコドン使用の至適化、またmRNA構造の至適化も含まれる)されたヒト カッパ軽鎖バックボーン(免疫グロブリンカッパシグナル配列およびヒト c-カッパ-定常領域を中間の制限酵素認識部位と共に含む)が挿入されて任意の可変性の軽鎖領域が挿入された。VL(配列番号7)の一次配列にしたがって、合成のヌクレオチド挿入物を GENEART AG (Regensburg, Germany)で合成し、シグナル配列の3'末端およびカッパ軽鎖領域の5'部位に制限酵素認識部位を含ませ、至適化された可変領域 -VL コドン- (配列番号27)を、CMV プロモーターの制御下にコドン至適化ヒト カッパ軽鎖バックボーン -IgG1 L コドン-を保持しているBsiW1 および AccIIIがオープンした真核生物性の発現ベクターに挿入した。付加的に、前記ベクターは、CHO 細胞をG418で選択するためのネオマイシン ホスホトランスフェラーゼを有する。配列番号28は、CHO細胞での発現に使用される至適化された「IgG1 L コドンおよびVL コドン」関連の構築物のヌクレオチド配列を示す。キメラのGNb AC1 IgG1 重鎖(HC)

GNb AC1 IgG1真核生物性発現ベクターの生産のためのクローニングベクターは、同一の調節領域を有する二つの真核生物の発現カセットからなる。このベクターは、既にコドンが至適化(GENEARTにより設計されたCHO 細胞における発現のためのコドン使用の至適化、またmRNA構造の至適化も含まれる)されたヒト IgG1 バックボーンを含み、これには免疫グロブリン 重鎖のシグナル領域 および ヒト IgG1 定常領域、任意の可変性の重鎖領域を挿入するための中間の制限酵素認識部位が共に含まれる。

【 0 1 1 2 】

マウスモノクローナル抗体 GNb AC1の可変領域(VH)のアミノ酸配列に関する情報は、配列番号 8に提供された。その一次配列にしたがって、合成のヌクレオチド挿入物を GENEARTで合成し、シグナル配列の3'末端およびガンマ鎖 CH1 領域の5'部位に制限酵素認識部位を含ませ、至適化された可変性の重鎖領域(配列番号29) -VH コドン-を、SV40 プロモーターの制御下にコドンが至適化されたヒト IgG1 バックボーンを保持しているAgeI および NheIがオープンした真核生物性発現ベクターに挿入した。付加的に、前記ベクターは、動物の細胞培養における選択/増幅マーカーとして使用するための第二の発現カセットとしてマウスのジヒドロ葉酸レダクターゼを含有する。配列番号30は、CHO細胞での発現に使用される至適化されたヒト IgG1 H-バックボーン コドン および 至適化されたVH コドンに関連している構築物のヌクレオチド配列を示す。キメラのGNb AC1 IgG4 重鎖(HC)

GNb AC1 IgG4 真核生物性発現ベクターの生産のためのクローニングベクターは、同一の調節領域を有する二つの真核生物の発現カセットからなり、IgG1 構築物と同じである。

。

10

20

30

40

50

【0113】

しかしながら、ヒト IgG4 定常領域はシグナル配列を含む全重鎖を利用可能ではないので、マウス GNB AC1 可変性の重(VH)領域およびヒトIgG4定常領域はGENEARTで合成された。

【0114】

配列番号 31は、キメラの GNB AC1 IgG4 至適化重鎖(IgG4H コドン)のコード領域のヌクレオチド配列を示す。その後、インサートをNotI および SacIIがオープンした真核生物性発現ベクターに導入して、配列番号32に示されるCHO 細胞での発現に使用される至適化されたIgG4Hコドンおよび至適化されたVH コドンに関連する構築物が生じた。

【0115】

全てのプラスミドをGENEARTでクローン化し、E.coli 株TOP10を形質転換した。組換え型の細菌を50 ml LB/Amp-培地で増殖させ、プラスミドをPromega PureYield™ Plasmid Midiprep Systemsで単離した。プラスミドの収量および純度は、光学的に制御され、260 nm および 280 nmでの光学密度の比率が少なくとも 1.5と決定された。

【0116】

組換え型の CHO 細胞株 GNB AC1 IGG1 および GNBAC1 IGG4の樹立
トランスフェクション手順

ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO dhfr-と称される、ATCC no. CRL 9096)を、最終的な発現システムの作出のための親細胞として選択した。これらの細胞〔American Type Culture Collection (ATCC)から由来〕を、4 mM L-グルタミン、0.1 mM ヒポキサンチン、0.016 mM チミジン (HT)、0.25 g/l 大豆ペプトン、0.1 % Pluronic F-68 および 無タンパク質のサプリメント(Polymun Scientific)が添加されたDMEM からなる「培養培地」で分離比 1:6で週二回で増殖させた。

【0117】

基礎培地で一度洗浄し、10 mlの完全培地に再懸濁された 5×10^6 細胞を、トランスフェクションに使用した。ポリプレックスは、900 μ l のポリエチレンイミン(1 mg/mlのPEI 直鎖状、MW: 25,000, Polysciences Inc.) を12 ugのHC および 12 ugのLC プラスミドを総容積2 mlで30 分間、RTでのインキュベーションによって形成された。ポリプレックスとCHO 細胞の12 mlでの相互作用を、四 時間持続し、遠心分離を170 gで行い、上清を廃棄し、細胞を培養培地に再懸濁した。24 時間後、完全培地を、4 mM L-グルタミン、0.25 g/l の大豆ペプトン、0.1 %のPluronic F-68, 無タンパク質サプリメント (Polymun Scientific) および 0.5 ug/mlのG418を添加したDMEMから構成される50 mlの選択培地で置換した。100 μ l の細胞 懸濁液を、ウェルごとに五つの96ウェルプレートに播種した。4 トランスフェクション実験〔キメラのGNbAC1-IgG1に関して「IgG1 L コドン + VL コドン」で共トランスフェクトされた「IgG1 H コドン + VH コドン」構築物; キメラの GNbAC1-IgG4に関して「IgG1 L コドン + VL コドン」で共トランスフェクトされた「IgG4H コドン + VH コドン」構築物〕によって、トータル20x96ウェルのプレート(1920ウェルに対応する)/IgG サブタイプを産生した。

【0118】

10~14 日後に、形成されたクローンを、選択培地中に0.048 uM MTXを含む100 μ l の「増幅培地(amplification medium)」を与えた。成長しているクローンを、0.048 uM MTXを含んでいる別の100 μ lの増幅培地で育て、二重のサンドイッチ ELISAで分析した。ELISAは、コーティングに抗ヒトガンマ特異的なポリクローナル血清および検出に抗ヒトカップ鎖HRPを共役したポリクローナル抗体を使用した。

【0119】

選択された高い生産クローンを、選択培地において0.19 uM MTXに順応させた。

【0120】

表 5は、GNb AC1 IgG1 および GNB AC1 IgG4の最高の生産者に関する0.096 および 0.19 uMのMTXでのT25 Rouxフラスコおよびスピナ管における選択を記載する。

【0121】

我々は、GNb AC1_IgG1の場合にクローン 6B6に決め、GNb AC1_IgG4の場合にクローン 7C1に決めた。GNb AC1_IgG1の場合に三つのクローン (GNb AC1_IgG1 6B6, GNb AC1_IgG1 8H2 および GNb AC1_IgG1_18A8) の凍結保存およびGNb AC1-IgG4の場合に二つのクローン (GNb AC1_IgG4_6C1 および GNb AC1_IgG4_7C1) の凍結保存を行った。最高のクローンが、文献 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition) Joseph Sambrook, Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Australia; David Russell, Cold Spring Harbour Laboratory Books] に記載された方法などの限界希釈法でサブクロニングされた。

【 0 1 2 2 】

最高の産生性のトランスフェクタント GNb AC1_IgG1 6B6 および GNb AC1_IgG4 7C1のサブクロニング

10

サブクロニングを96ウェルプレートで90, 30 および 10 細胞/ウェルで増幅培地で行い、GNb AC1_IgG1_6B6の場合: 0.2 μ mで濾過した0.19 μ M メトトレキサート (Sigma, MTX) および50%のGNb AC1_IgG1_6B6 培養上清, GNb AC1_IgG4_7C1の場合: 0.2 μ mで濾過した0.19 μ M MTXおよび50%のGNb AC1_IgG4_7C1培養上清で行った。成長しているウェルを、96ウェルプレート中で0.38 μ M MTXに順応させ、ELISAで分析し、更なるスクリーニングおよび0.77 μ M MTXへの順応のためT25 フラスコで増殖させた。

【 0 1 2 3 】

表6は、GNb AC1_IgG1 6B6 - および GNb AC1_IgG4 7C1 - サブクロンの最高の産生細胞に関する0.77 μ MのMTXでT25 Rouxフラスコおよびスピナ管での選択を記載する。

20

【 0 1 2 4 】

最高の産生細胞は、GNb AC1_IgG1 6B6の場合にはクローン GNb AC1_IgG1_6B6_10E4であり、GNb AC1_IgG4_7C1の場合にはクローン GNb AC1_IgG4_7C1_15B7であった。これらの二つのクローンを、更なる細胞株の開発のため選択した。

【 0 1 2 5 】

二つのGNb AC1-IgG1 クローン: GNb AC1-IgG1 6B6_1 D1, GNb AC1_IgG1 6B6_10E4 および二つのGNb AC1-IgG4 クローン: GNb AC1-IgG4_7C1_3E11, GNb AC1-IgG4_7C1_15B7の凍結保存を行った。

【 0 1 2 6 】

最高の生産性のサブクロン GNb AC1-IgG1_6B6_10E4 および GNb AC1-IgG4_7C1_15B7のサブクロニング

30

最終的なサブクロニング手順を再び96ウェルプレートで90, 30 および 10 細胞/ウェルで増幅培地で行い、GNb AC1_IgG1_6B6_10E4の場合: 0.2 μ mで濾過した0.77 μ M MTX および 50% GNb AC1_IgG1_6B6_10E4 培養上清, GNb AC1_IgG4_7C1_15B7の場合: 0.2 μ mで濾過した0.77 μ M MTX および 50% GNb AC1_IgG4_7C1_15B7培養上清で行った。成長しているウェルをELISAで分析し、最高の生産者を更なるスクリーニングのためT25 フラスコ および スピナ フラスコ (Sp125)で増殖させた。

【 0 1 2 7 】

表 7は、GNb AC1_IgG1_6B6_10E4 - および GNb AC1_IgG4_7C1_15B7 - サブクロンの最高の生産者に関する0.77 μ MのMTXでT25 Rouxフラスコおよびスピナフラスコでの選択を記載する。

40

【 0 1 2 8 】

GNb AC1_IgG1の場合に二クローン GNb AC1_IgG1 6B6_10E4_18C7 および GNb AC1_IgG1_6B6_10E4_18D12を、GNb AC1_IgG4の場合に二クローン GNb AC1_IgG4_7C1_15B7_3E4 および GNb AC1_IgG4_7C1_15B7_5G10 を、スピナ培養後に低温保存した。

【 0 1 2 9 】

【表 5 - 1】

表 5: トランスフェクションおよび異なるレベルの MTX への馴化後に
選択されたウェル

	細胞計数 E+05c/ml	力価 $\mu\text{g/ml}$	日	spec. $\text{pg/c}^*\text{d}^\text{E}$	titre
T25 :					
6B6	6.9	14.2	4	5.2	
8H2	5.6	4.0	3	2.3	
18A8	3.8	3.3	3	2.9	
Sp125					
6B6	2.6	11.5	4	11.3	
8H2	5.0	3.5	3	3.1	
18A8	4.2	4.0	3	2.4	

E: ピコグラム/細胞・日

0.19 μM MTX への馴化後:

	細胞計数 E+05c/ml	力価 $\mu\text{g/ml}$	日	spec. titre $\text{pg/c}^*\text{d}^\text{E}$
In T25 :				
6B6	5.3	7.4	3	4.7
8H2	4.2	4.0	3	3.2
18A8	5.5	3.4	3	2.0

*: ピコグラム/細胞

GNb AC1-IgG4: 0.096 μM MTX:

【 0 1 3 0 】

【表 5 - 2】

	細胞計数 E+05c/ml	力価 $\mu\text{g/ml}$	日	Spec. titre [pg/c*d]
T25 :				
61C	4.1	9.6	3	7.9
7C1	2.3	3.7	3	5.4
Sp125 :				
6C1	5.5	14.3	3	8.6
7C1	4.5	10.9	3	8.2

10

0.19 μM MTXへの馴化後:

	細胞計数 E+05c/ml	力価 $\mu\text{g/ml}$	日	Spec. titre [pg/c*d]
T25 :				
6C1	3.6	11.8	3	10.8
7C1	4.7	12.5	3	8.8

20

【 0 1 3 1 】

【表 6】

表 6: 0.77 μ M MTX での第一のサブクローニング後に選択されたサブクローン:

	細胞計数 E+05c/ml	力価 μ g/ml	日	Spec. titre [pg/c*d]
T25 :				
GNb AC1- IgG1_6B6_1D1	4.8	23.4	4	12.1
GNb AC1- IgG1_6B6-10E4	3.4	11.9	3	11.8
Sp125:				
GNb AC1- IgG1_6B6_1D1	4.0	12.9	3	10.8
GNb AC1- IgG1_6B6-10E4	3.5	10.9	3	10.4

10

GNb AC1-IgG4:

	細胞計数 E+05c/ml	力価 μ g/ml	日	Spec. titre [pg/c*d]
T25 :				
GNb AC1- IgG1_7C1_3E11	3.8	7.8	3	7.0
GNb AC1- IgG4_7C1_15B7	3.1	11.5	4	9.3
Sp125:				
GNb AC1- IgG1_7C1_3E11	5.1	16.7	3	10.9
GNb AC1- IgG4_7C1_15B7	4.5	14.7	3	11.0

20

30

【 0 1 3 2 】

【表 7】

表 7: 0.77 μ M MTX での第二（最終）のサブクローニング後に選択されたサブクローン:

GNb AC1-IgG1_6B6_10 ^{E4} _...:	細胞計数 E+05c/ml	力価 μ g/ml	日	Spec. titre [pg/c*d]
T25 :				
18C7	7.2	18.5	4	6.4
18D12	9.6	18.4	4	4.8
Sp125:				
18C7 (160608)	4.1	21.6	4	13.3
18D12 (160608)	4.0	15.0	4	9.5
18C7 (190608)	6.2	20.9	3	11.3
18D12 (190608)	6.5	15.7	3	8.1
18C7 (230608)	4.7	20.9	4	11.1
18D12 (230608)	5.3	18.6	4	8.7
18C7 (260608)	2.7	11.2	3	13.8
18D12 (260608)	3.5	10.6	3	10.1

10

20

GNb AC1-IgG4:

GNb AC1-IgG4_7C1_15B7_...:	細胞計数 E+05c/ml	力価 μ g/ml	日	Spec. titre [pg/c*d]
T25 :				
3E4	4.1	25.6	4	15.6
5G10	5.2	30.5	4	14.8
Sp125 :				
3E4 (160608)	3.0	20.0	4	16.6
5G10 (160608)	3.4	20.2	4	14.7
3E4 (190608)	4.3	20.9	3	16.2
5G10 (190608)	4.2	23.2	3	18.5
3E4 (230608)	3.3	20.8	4	15.9
5G10 (230608)	3.0	21.4	4	18.1
3E4 (260608)	2.5	16.7	3	22.1
5G10 (260608)	2.6	16.4	3	21.3

30

40

【 0 1 3 3 】

従って、組換え型の IgG1 および IgG4 抗体 ベクターを、例 1 に記載のとおり六つの CDR 配列を含んでいる挿入されたりガンドで産生した。これらの六つの CDRs を含んでいるベクターは、ベクターの陽性および陰性の影響を決定し、それらの各々に関して選択および/または適切な使用を提唱するため、次の例で分析された。

【 0 1 3 4 】

例 5: リガンド及びそのヒト IgG1 および IgG4 キメラ構築物に対するオリジナルのマウス IgG1 の研究: インビトロ親和性。

50

【 0 1 3 5 】

材料および方法は、例3 および 4の記載と同じであった。

【 0 1 3 6 】

5.a. 異なる濃度のMSRV-ENV 完全タンパク質(ENV-T)でのELISA

【 0 1 3 7 】

【表 8】

[ENV-T 7A]	GNbAC1 キメラ IgG1 ロット2	GNbAC1 キメラ IgC4 ロット2	GNbAC1 マウス 060413CS01	2G5E12 マウス 010227FP01
	3	3	2.998	0.082
0.5	3	2.889	2.899	0.12
0.25	2.891	2.524	2.837	0.093
0.125	2.393	1.985	2.285	0.111
0.0625	1.804	1.522	1.565	0.092
0.03125	1.562	1.367	1.341	0.066
0.0156	1.257	1.021	1.299	0.125
0.0078	0.815	0.692	0.625	0.114

10

20

表 8 : マイクロタイタープレートのウェルへの異なる濃度(左欄, マイクログラム)の抗-リガンド (ENV-T)のコーティングにおける異なるリガンド(1 マイクログラム)または無関係の対照(2G5E12)で ELISA により測定された光学密度 (OD) 結合は、ペルオキシダーゼ標識 抗-Ig 抗体 (1/250; Jackson-USA) および ペルオキシダーゼの基質反応で明らかとされた。無関係の対照からの全ての OD の平均値は 0.1004 であり、標準偏差 (SD) は 0.0205 である。従って、カットオフ 値を決定でき、その値未満で全ての値が 99% 信頼区間で非特異的である (平均+ 3*SD = 0.1618) それゆえ、GNb AC1 構築物の全ての提示された値は、標的タンパク質への特異的な結合に関して有意である

30

【 0 1 3 8 】

我々は、ENV 組換えタンパク質に対するサンドイッチ ELISAにおける検出抗体として抗体 GNbAC1 および キメラバージョンのIgG1 および IgG4を分析した。図 5および表 8で参照できるとおり、同じ 濃度でマウスのおよびキメラの MAbsは、類似するカイネティクスでENV タンパク質の現在の濃度を検出できる。新しい構築物(ヒトのベクターにおけるリガンド)の特異性および相対的な親和性は維持され、リガンドを有するヒト IgG1および IgG4 構築物の両方が提供されて、ピコグラムの組換え型のENV タンパク質を検出できる。この特性は驚くほど優れており、それらの全体のデザイン、構築および発現条件の全体にわたって最適化が達成されたことが確認された。例 1に記載されたとおり、安定で頑強なリガンド構造を選択することも有効である。

40

【 0 1 3 9 】

そのうえ、この経験から、リガンド(GNb AC1)と無関係の「非結合」リガンド(2G5E12)とからも明らかのように、それらの結合間の有意性およびオリジナルのアンチリガンド (ENV)の有意性に基づいてリガンドと均等な分子を同定するための手段が提供される。

【 0 1 4 0 】

Env-T抗原は、マイクロタイターの ELISA プレートウェルに1 $\mu\text{g/ml}$ ~ 約 0.01 $\mu\text{g/ml}$

50

の範囲で連続的に希釈して被覆された。

【 0 1 4 1 】

参照リガンド(GNbAC1) および無関係のリガンド(2G5E12)は、1 μ g/mlで試験され、二次抗体(ここで、抗-IgG ペルオキシダーゼ-標識 二次抗体はJackson Ltd, USAからの抗体であり、1/250に希釈された、以下、抗 マウス IgG (H+L) Jacksonまたは抗 ヒト IgG; Jackson, USAと参照する)で染色された。

【 0 1 4 2 】

参照リガンドの曲線は、最高の ENV 濃度でシグナルの飽和(3を超える又は等しい光学密度)を示し、進行に伴って約 1.0-0.5の光学密度に減少したので、特異的な結合活性(0.1618の計算された統計学的なカットオフ値を超える; 表 8を参照されたい)の典型的な用量反応曲線が明らかとされた。平行して、無関係の分子(2G5E12)は、用量反応曲線(平らな平均曲線)を示さず、任意のENV 濃度で0.1 および 0.05の光学密度の間で振動する(0.1618の計算された統計学的なカットオフ値以下(表 8))。

10

【 0 1 4 3 】

従って、リガンドと均等な任意の分子は、以下の何れかで確認できる、

1) この検査において、段落 5aに示すとおり本例の条件で用量反応曲線が存在すること、および

2) 0.01 マイクログラムのENV 濃度に対する参照の GNbAC1で得られたカットオフを超える値と比較して、無関係の抗体(Cf. 表 8の2G5E12)で得られる光学密度値から計算された統計学的なカットオフ(平均 + 三回の標準偏差)未満で振動している、平らな曲線が存在しないこと(表 8を参照されたい);

20

又は、

3) 段落 5bにおける、リガンド連続希釈および固定されたアンチリガンド濃度での以下に記載の検査での用量反応曲線の存在(表 9)、および

4) 段落 5bの記載と同じ条件で、0.01 マイクログラム/mlの濃度で対応する参照の GNbAC1で得られたカットオフを超える値と比較して、無関係の抗体(Cf. 表 9の2G5E12)で得られる光学密度値から計算された統計学的なカットオフ(平均 + 三回の標準偏差)未満で振動(oscillating)している、平らな曲線が存在しないこと(表 9を参照されたい)。

【 0 1 4 4 】

5.b 異なる MAb 濃度のELISA

30

【 0 1 4 5 】

【表 9】

濃度	抗-マウス IgG (H+L) Jackson 1/250					抗 ヒト IgG Jackson 1/250		
	GNbAC1 マウス	2G5E1 2	GNbAC 1-IgG1	GNbAC 1-IgC4	緩衝剤の 対照	2G5E12	GNbAC1- IgG1	GNbAC 1-IgC4
1	2.065	0.077	0.738	0.753	0.05	0.046	1.78	1.696
0.5	1.926	0.085	0.586	0.43	0.047	0.056	1.724	1.741
0.25	2.149	0.069	0.365	0.374	0.046	0.049	1.535	1.499
0.125	2.029	0.071	0.221	0.238	0.048	0.046	1.544	1.248
0.0625	1.965	0.074	0.221	0.189	0.047	0.045	1.205	1.154
0.03125	1.728	0.074	0.171	0.156	0.047	0.047	0.906	0.929
0.0156	1.681	0.066	0.093	0.105	0.051	0.048	0.55	0.511
0.0078	0.964	0.072	0.073	0.087	0.061	0.073	0.276	0.372

表 9 リガンドを連続希釈して抗-リガンド濃度を固定した ELISA により測定された光学密度 (ENV-T; 0.01 マイクログラム) マイクロタイタープレートのウェルへのコート。結合は、ペルオキシダーゼ標識 抗-IgG 抗体 (1/250; Jackson-USA) および ペルオキシダーゼの基質反応で明らかとされた

【 0 1 4 6 】

抗-マウス二次抗体での検出で、無関係の対照からの全てのODの平均値は0.0735であり、標準偏差 (SD)は0.0057であるので、カットオフ 値を決定でき、その値未満で全ての値が99% 信頼区間で非特異的である (平均+ 3*SD = 0.0907)。それゆえ、対応するマウスのGNb AC1の全ての示された値は、標的タンパク質への特異的な結合に関して有意である。

【 0 1 4 7 】

抗-ヒト二次抗体での検出で、無関係の対照からの全てのODの平均値は0.0513であり、標準偏差 (SD)は0.0094であるので、カットオフ 値を決定でき、その値未満で全ての値が99% 信頼区間で非特異的である (平均+ 3*SD = 0.0796)。それゆえ、GNb AC1キメラ構築物の全ての示された値は、標的タンパク質への特異的な結合に関して有意である。

【 0 1 4 8 】

図 6において、マウスの IgG 抗体 GNbAC1 および キメラのバージョンのIgG1 および IgG4の両方が、数ナノグラム未満のENV タンパク質を検出するため数ナノグラム程度低い量の精製 IgGでENV-T 組換えタンパク質に対しサンドイッチ ELISAにおいて検出抗体として効率的であることを参照できる。

【 0 1 4 9 】

加えて、抗-ヒトまたはマウス IgGは、これらの条件において、オリジナルのマウスの抗体またはキメラの構築物にヒト IgG1またはIgG4 バックボーンを有するものの何れとも交差反応しなかったため、挿入されたリガンド (VH+VL)は何らかの望まれない修飾が作られず、ヒト 構築物において検出されなかった。

【 0 1 5 0 】

5c: GNbAC1とENV-Tの親和性

【 0 1 5 1 】

【表 10】

	ENV-Tを mAb det.の 半分[mg/l]	Env-濃度 [M]	親和性 [M]	MM His-ENV- T [g/mole]
IgG1	0.25	1.07E-09	2.46E+08	61.440
IgG4	0.35	5.70E-09	1.76E+08	

表 10 : IgG4 および IgG 1 抗体 ベクターに挿入されたりガンドの結合親和性の決定(単位は表に示した)

10

【 0 1 5 2 】

5.d: GnbAC1等電点

GnbAC1の等電点は、文献〔Fractionation of complex protein mixtures by liquid-phase isoelectric focusing. Hey J, Posch A, Cohen A, Liu N, Harbers A. Methods Mol Biol. 2008;424:225-39〕に記載の技術にしたがって決定された。

【 0 1 5 3 】

構築物IgG1 (pI 8.3) および IgG4 (pI 7.53)の等電点は、非常に有用であり、治療上の使用に関する安定性および貯蔵の条件を決定する。従って、中性の pI のIgG4は、定期的に反復される注射で慢性的な処置として治療上の Mabの製剤に優れている。従って、IgG4は、この点から優れた構築物である。

20

【 0 1 5 4 】

例 6: リガンド及びそのヒト IgG1 および IgG4 構築物とGnbAC1の研究: ヒト末梢血単核球(PBMC)培養における炎症亢進性サイトカインの阻害活性。

【 0 1 5 5 】

材料および方法:

培養培地

PBMCs を、RPMI Glutamax (Gibco) + 10%FBS (Biowest S1810 South America) + 1% 非必須アミノ酸 + 1% ピルビン酸 + 1 % ペニシリン - ストレプトマイシン中で37 °Cで6.5% CO₂中で培養した。

30

【 0 1 5 6 】

パフィーコートからのPBMCsの調製

パフィーコートは、HUGにより提供された。

【 0 1 5 7 】

血液〔PBS-FBS 2% (4ml + 31ml)で希釈された〕は、15mlのフィコールに静かに配置され、2850rpm (1650g) /20min / 室温 / 中断なく遠心分離された。

【 0 1 5 8 】

次にPBMCsを慎重に集め、PBS-SVF 2%で3回洗浄し、1500rpm /10minで遠心分離した。

40

【 0 1 5 9 】

次に細胞は、計数され、SVF 90% + DMSO 10%で凍結された。

【 0 1 6 0 】

凍結した細胞からのPBMCsの調製

-80 °Cで維持したPBMCsは、37 °Cで解凍され、前記培地で3回洗浄され、1500 rpm /10minで遠心分離された。

【 0 1 6 1 】

次に細胞を、計数し、通常 1X10⁶ 細胞/mlの濃度に希釈した。

【 0 1 6 2 】

50

阻害試験

ENV + MAbsの混合物は、PBMCsが解凍される前に調製された。MAbs (ENVで選択された比) + ENV (選択された濃度)は、48ウェルプレートの各ウェルにおいて100 μ l の培地中で混合され、1 時間、+4 でインキュベーションされた。MAbs (ENVで選択された比) + ENV (選択された濃度)は、48ウェルプレートの各ウェルにおいて100 μ l の培地中で混合され、1 時間、+4 でインキュベーションされた。

【 0 1 6 3 】

次にPBMCsは、各ウェルに1 X 10⁶細胞/ml (0.5mlまたは1 ml 最終ノウェル)の終濃度で添加された。

【 0 1 6 4 】

細胞は、24, 48または72 時間, 37 , 5% CO₂でインキュベーションされた。

【 0 1 6 5 】

上清を1400rpm/10min/RTで遠心分離して収集し、-20 で維持した。

【 0 1 6 6 】

IL-2d サイトカイン量

サイトカインは、BD Pharmingen ELISAセットでIL-6; IL-12p40, TNF- およびIFN- を提供された。供給者のプロトコールにしたがった。

【 0 1 6 7 】

【表 1 1】

Lot ENV	MAbs	MAbs/ ENV-T比 T	IL-6			IFN- γ		
			pg/ml	反応(%)	阻害(%)	pg/ml	反応(%)	阻害(%)
			72h					
ENV-SU 4A 0.5ug/ml	Mabsなし	-	88742	100	-	558	100	-
	GNb AC1 マウスの IgG1	25/1	42250	48	52	270	48	52
	GNb AC1 ScFv	25/1	56675	64	36	661	118	-18
	ヒトの キメラ							
	GNb AC1 IgG1 2008	25/1	32871	37	63	606	109	-9
	GNb AC1 IgG4 2008	25/1	52954	60	40	318	57	43

表 11: 異なるリガンドの存在下または非存在下における異なる PBMC (末梢血 単核球) 培養上清におけるサイトカイン量

【0168】

我々は、PBMCsでの細胞試験で我々の抗体またはScFvがENV タンパク質および細胞(TLR4レセプターを介して)の間の相互作用を阻害し、炎症亢進性サイトカイン〔例えば、IL-6(先天性免疫)およびIFN- γ (T-リンパ球媒介性免疫)〕の産生を阻害する潜在能力を試験した。異なる分子を、前記タンパク質と同じ比(モル/モル)で試験したので(25/1)、それらの性能を比較できる。

【0169】

図 7 および 表 11に認められるとおり、全てのリガンド分子〔マウスのまたは組換え型の起源の何れかである(scFvまたはIgG1 および IgG4 構築物にリガンドを伴う)〕は、PBMCsにより産生される炎症促進性(pro-inflammatory)のサイトカイン(IL-6)の減少により示されるような阻害特性を有し、保持する。

【0170】

それにもかかわらず、挿入されたGNb AC1 および 組換え型の ヒト IgG4(リガンドを有する)がリンパ球活性化(双方はインターフェロン-ガンマ産生を減少させる)に効率的であること、他方で scFV(おそらく一価であることが理由)およびIgG1 ヒト 構築物はイ

インターフェロン ガンマの阻害において阻害効率が非常に低いことが認められる。ここで、ヒト IgG1 Fc 領域がヒトの免疫細胞に率先 (proactive) して影響するとの事実によって、この特性がENVによるこのタイプのリンパ球活性化におけるリガンドの阻害効果と均衡 (counterbalance) しえることが明らかに示される。ヒト IgG4 ベクターにおける同じリガンド (免疫学的に率先することはない) によって、オリジナルのマウスの IgGのような二価のリガンドの阻害効果が示された。

【 0 1 7 1 】

この理由のため (5.dの例に表した事項に関して)、IgG4は、抗体の免疫機能を避けるべき場合に好適な構築物であろう。本発明で明らかとされたとおり、抗体の機能は、阻害効果に必要ではなく (二価のリガンドが産生される場合、一価のscFvは効率が低いため)、リガンドの阻害効果に明らかに有害である。

10

【 0 1 7 2 】

IL-6 産生 (単球/マクロファージからの、おそらく、B-リンパ球からも) における効果に関して、IgG1 および IgG4はむしろ均等であり、良好に阻害することが明らかである (インターフェロン-ガンマで認められたものと異なる)。興味深いことに、一価のscFvは、低いが有意な前記先天性免疫サイトカインの阻害を呈する。このように、特定の免疫活性は、IgG1 および IgG4ヒトベクター (リガンドを有する) の双方により良好に阻害された。しかし、IgG4は、ヒト PBMCの先天免疫 (IL-6の結果) および獲得免疫 (IFN-ガンマの結果) 細胞のユニークな阻害を提示する。

【 0 1 7 3 】

20

それに対して、興味深いことに、IgG1 ベクターは、先天免疫の炎症促進性のサイトカイン (IL-6の例で代表される) の強い阻害を提供し、幾つかのT-細胞 クローンを刺激 (インターフェロンガンマの量により反映される) し、特定の抗-ウイルス性の防御機構における有用性を示すだろう。

【 0 1 7 4 】

従って、我々は、共通の結合の親和性および特異性を有するヒト抗体ベクターからなる薬学的送達形態 (pharmaceutical delivery form) におけるリガンドの高親和性 および生物活性を確認したが、それらのアイソタイプに依存する多岐にわたる免疫効果は確認されていない。

【 0 1 7 5 】

30

例 7: 標的ENVタンパク質 (アンチリガンド結合配列) におけるリガンド結合サイトの分子的同定
オリジナルのマウスの IgG1/カッパ (Gnb AC1) のエピトープ マッピングは、Pepscan (Pepscan BV The Netherlands) により達成された。

【 0 1 7 6 】

これらの結果から、リガンドの結合サイトのアミノ酸配列は、配列番号 2で表される配列内に含まれることが同定された。

【 0 1 7 7 】

上記配列に含まれる、最良の標的 エピトープは、完全ENV タンパク質 (ENV-T) 中の切断されたSU (ENV1) ドメインのC末端部分からなり、特に次の配列番号 32で表される配列のアミノ酸の選択配列に対応する。

40

【 0 1 7 8 】

このアンチリガンド 配列 (及びその選択配列) は、限られることなく、例 2に記載されたMSRV エンベロープ タンパク質 (ENV) の一次アミノ酸配列内にも含まれる。

【 0 1 7 9 】

それでもなお、アミノ酸は機能的な均等物により置換されえること、異なる配列の類似する結合サイトを提供しえることは当業者に知られている。そのうえ、「MSRV ENV」ミトープが記載されており、特異的な 抗体に効率的に結合できる [Jolivet-Reynaud, C., H. Perron, et al. 1999. "Specificities of multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum antibodies against mimotopes." Clin Immunol 93;3: 283-93.]。

50

【 0 1 8 0 】

例 8: MSRV-関連疾患の患者におけるMSRV-ENV 標的抗原の存在の証拠: 多発性硬化症, 臨床的に分離した症候群 (CIS), 慢性炎症性の脱髄性多発性ニューロパチー (CIPD), 精神分裂病, および癲癇における関連疾患または病理学的な症候群の例。

【 0 1 8 1 】

8a. 多発性硬化症, 臨床的に分離した症候群および 多発性ニューロパチー:

材料および方法

ENV 抗原血症の免疫量 (Immunodosage)

予備的な血清採集:

試験は、大学病院 (University Hospitals of Creteil and Grenoble, France) の倫理委員会により承認された。神経疾患の患者は、双方のセンターから含められた。全ての患者は、参加の前にインフォームドコンセントを書面で与えられた。健常な血液ドナーは、グルノーブルおよびモンペリエの輸血センターから集められた。神経疾患ではない対照は、グルノーブルから得られた。患者の臨床データを結果に示す。MS 患者 および 健常対照からの血清サンプルのアリコート、暗号化し、比色計の出力条件 (colorimetric read-out conditions) を用いたApoH ELISAでの盲検試験のために独立の研究室に送付した。

10

【 0 1 8 2 】

欧州での多施設での血清採集:

試験は、倫理委員会 [the ethical committees of the faculty of medicine, University of Wurzburg in Germany, of the University of Sassari, of the Don Gnocchi's Hospital of Milan in Italy, of Marseille University Hospital in France and of the University of Pamplona in Spain] により承認された。McDonaldの判定基準 (McDonald, Compston et al. 2001) にしたがう明白なMSの74 患者および臨床的に分離した症候群 (CIS: clinically isolated syndromes) の14 患者が含められた。対応する臨床および処置のデータは、以下の表 12に示される。(McDonald, Compston et al. 2001)。MS再発の場合、血液サンプルを、ステロイド処置の開始前に抜いた。MS 患者 および 健常対照からの血清サンプルのアリコート、暗号化し、照度計の出力条件を用いたApoH ELISAでの盲検試験のために独立の研究室に送付した。

20

【 0 1 8 3 】

サンプル採集:

一つのチューブ (7ml B&D dry tube) に血液を採取した。サンプルを採集後2 時間以内に処理した。血液凝固後、それらを10 min、2800g、14 で遠心分離した。次に血清を集めてエプンドルフチューブに250uLに等分した。アリコートを、-20 で凍結した。

30

【 0 1 8 4 】

ApoH-ELISA免疫学的アッセイ

比色法: ApoH 被覆したマイクロタイタープレート (APOH Technologies, Montpellier, France) にTris-HCl 50mM pH 7.6で希釈された血清 サンプルをロードした; プレートを1.5 h、37 でインキュベーションした; プレートをそれからPBSで四回洗浄した; 精製したマウス抗-ENV mAbを5% BSAを含んでいるPBSで10 μg/mlの濃度に希釈し、添加した。プレートを、1 h、37 でインキュベーションし、PBSで四回洗浄した。5% BSAを含んでいるPBSに1:5000で希釈したペルオキシダーゼ-標識 ヤギ 抗-マウス IgG (H+L; Sigma) を添加し、プレートを、1 h、37 でインキュベーションし、PBSで六回洗浄した。OPD 基質溶液を添加し、プレートを30 min、暗所でインキュベーションした。呈色反応を2N H2SO4で停止した。490nmの吸光度をTecan readerで読んだ。この検査の統計学的なカットオフ値 (C.O.) を、50個体の健常血液 ドナー (BD) からの陰性血清の系列の個体の血清からの光学密度 (OD) の結果のトリプリケートの平均で決定した。従って、C.O. は、統計学的に陰性の対照の有効な系列からの平均値 プラス 三つの値の標準偏差 (A+3SD; 陽性の有意性 $p < 0.01$) として計算され、参照する陽性および陰性サンプルのパネル (panel) で実験的に確認された。検査で陽性の決定に関する信頼区間は、99.9%を示す。

40

【 0 1 8 5 】

50

照度の方法

Tris-HCl 50mM pH7.6に希釈したサンプルを、ApoH-被覆マイクロプレート (APOH Technologies, Montpellier, France)にロードした。マイクロプレートを、1 h 30 min、37 °C でインキュベーションし、PBSで四回洗浄した。精製したマウス抗-ENV mAb (PBS-BSA 5%中に1 µg/ml) を、添加し、マイクロプレートを1 h、37 °C でインキュベーションし、PBSで四回洗浄した。ペルオキシダーゼ-標識 ヤギ 抗-マウス 抗体 (Jackson, PBS-BSA 5%中に1/2000に希釈した)を添加し、マイクロプレートを1 h、37 °C でインキュベーションし、PBSで六回洗浄した。SuperSignal フェムト (ピラス) 基質溶液を添加し、TECAN リーダーで測定した。

【0186】

10

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体 (Mab) は、bioMerieux (Marry l'Etoile, France)により開発されたものであり、精製された細胞外のMSRVビリオンから増幅されたクローン化したRT-PCR 領域から発現された組換え型の MSRV エンベロープ (ENV) タンパク質でマウスを免疫後にえられた。マウス 血清をENVでELISA試験した後、脾臓細胞 をハイブリドーマを得るために非-分泌性の骨髓腫細胞系統 Sp2/0-Ag14と融合した。特異的なクローンを、同じ ELISA アッセイにおいて抗体産生スクリーニングで選択した。以上のように、約 40の MSRV/ENV タンパク質-特異的な Mabを単離し、約 28の Mab をさらに選択し、それらの結合特異性を確認した。ApoH-ELISA 技術をヒト 血清に用いた際、最高の 結合 Mab は2A12A5であった。

20

【0187】

結果

血清中のMSRV ENV タンパク質の免疫量 (immunodosage)

我々は、オリジナルのマイクロプレートの免疫アッセイを開発し、このアッセイにおいて捕獲相はエンベロープの構造および/または脂質と相互作用した際に微生物の タンパク質に結合するアポリタンパク質-H (ApoH)の特に 効率的な特性に依存する (Stefas et al., 1997; Stefas et al., 2001)。ApoHは、タンパク質自身のアミノ酸領域との第一の低親和性相互作用を許し、これにより二次的にアロステリック反応を活性化し、ApoH C-末端 ドメインと脂質-または膜-結合ドメインとの共有結合様の結合を生じる。それ故、ウイルス性の エンベロープ タンパク質またはビリオン粒子を不可逆的に捕獲でき、オリジナルのサンプルを排除する洗浄工程の後、「ApoH」捕獲工程の後になおも暴露したエピトープを標的とするモノクローナル抗体を加えることにより特異的な抗原を検出できる。

30

【0188】

検査の技術的な確認のために、両方の MSRV ウイルス粒子を以前に記載 [Perron et al., 1997a; Perron et al., 1997b] の条件にしたがって沈降させ、MS B-細胞 培養上清から精製し、精製された組換え型の MSRV エンベロープ タンパク質 (ENV)を、連続的に希釈し、異なる 抗-MSRV ENV Mabで試験した。比較を周知のウイルス [例えば、C型肝炎ウイルス (HCV) および B型肝炎 ウイルス (HBV)]で行い、対応する特異的な Mabで検出した。実際の血清サンプルでの付加的な試行後に、Mab 2A12A5がApoH 捕獲工程後の診断上の免疫検出に最も効率的であることが示され、次の試験のため保持された。

40

【0189】

第一の予備的な盲検試験： 多発性硬化症 (MS: Multiple Sclerosis) および慢性炎症性の脱髄性多発性ニューロパチー (CIDP: Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy)

様々な 疾患の異なる群の患者でのこの免疫学的アッセイの予備的な評価のために、我々は最初にMSからの29の患者、他の神経疾患からの28 の患者、非神経疾患からの60 の患者および50の健常血液ドナーからの血清を分析した (トータルで167の血清サンプル)。結果をMS および 他の 神経疾患に関して表 12に示す。

【0190】

【表 1 2 - 1】

(a) 多発性硬化症の患者(N=29)			
患者	臨床的な状態	年齢(年)	OD/GO比
1	RP	6	1.84
2	RP	1	1.64
3	RR	3	1.62
4	RR	4	1.54
5	<i>nr</i>	2	1.54
6	<i>nr</i>	<i>nr</i>	1.35
7	<i>nr</i>	<i>nr</i>	1.31
8	<i>nr</i>	<i>nr</i>	1.37
9	8	8	1.11
10	19	19	1.19
11	2	2	1.12
12	<i>nr</i>	<i>nr</i>	1.19
13	<i>nr</i>	<i>nr</i>	1.12
14	<i>nr</i>	<i>nr</i>	1.11
15	<i>nr</i>	<i>nr</i>	1.06
16	1	1	1.21
17	5	5	1.18
18	7	7	1.18
19	1	1	1.06
20	4	4	1.09
21	3	3	1.18
22	4	4	1.28
23	2	2	1.03
24	26	26	0.95
25	22	22	0.99
26	4	4	0.90
27	22	22	0.70
28	14	14	0.96
29	18	18	0.92

10

20

30

【表 1 2 - 2】

(b) ONDの患者(N=20)		
患者	疾患のタイプ	OD/CO比
1	てんかん	0.910
2	慢性の多発性筋炎	0.940
3	原発性の脳腫瘍	0.640
4	坐骨神経症	0.940
5	ギラン・バレー症候群	1.000
6	発作	0.840
7	原発性の脳腫瘍	0.880
8	多系統萎縮症 (Multisystem atrophy)	0.88
9	顔面神経麻痺	0.940
10	ギラン・バレー症候群	1.000
11	てんかん	0.930
12	ALS	0.680
13	ギラン・バレー症候群	0.830
14	大脳転移(肺癌)	0.910
15	ゴーシェ病	1.000
16	てんかん	0.800
17	外傷性脳幹疾患 (Traumatic medular)	0.810
18	脳膿瘍[リステリア (Listeria)]	0.930
19	てんかん	0.800
20	発作	0.960

10

20

30

【表 1 2 - 3】

(c) CIDPの患者(N=8)	
患者	OD/CO比
1	1.13
2	1.27
3	1.06
4	1.08
5	1.06
6	0.90
7	0.86
8	0.93

表 12. MSRV 関連疾患または MSRV 関連亜群の患者の同定のための ENV-免疫検出検査。第一の血清系列における APO-H ELISA の結果 — 多発性硬化症 (MS) の患者、他の神経疾患 (OND) の患者、慢性炎症性の脱髄性多発性ニューロパチー (CIDP) の患者および健常血液ドナー (BD)。APO-H 捕獲工程 (Stefas et al., 1997) での ELISA 試験を、モノクローナル IgG (MSRV ENV に関して 2A 12A5) で行った (bioMerieux, Marcy L'Etoile, France により作出され、特異性が選択された) N= 患者の数, nr= 記録せず, OD= 光学密度, P= 進行性, RP= 軽減 進行性 (Remitting Progressive), RR= 軽減 再発性 (Remitting Relapsing)。CO= 検査結果が陰性となる限界値 (当該値未満で陰性) を決定するカットオフ値。健常血液ドナーの系列からの平均値 プラス その三回の標準偏差 (99 % 信頼区間) として決定され、図の底部に示される。OD/CO 比= OD を実験の CO で除し、陽性 (>1) および陰性 (<1) の結果を分けた

【 0 1 9 1】

1に等しい結果は「未決定 (undetermined)」と考えられる。同じ個体からの対応するサンプルまたは新しいサンプルは、決定のため別の実験で再び試験しなければならない。全ての光学密度の平均値 (平均) および標準偏差 (s.d.) は、以下に示されるとおり、被験者の各群および亜群で決定された:

BD (N=50): 平均値 0.53, s.d. 0.16。

【 0 1 9 2】

MS (N=29): 陽性のMS (N=23)の平均値 1.27 s.d. 0.22, 陰性のMS (N=6)の平均0.90 s.d. 0.25, 全てのMSの平均値 1.20 s.d 0.25。

【 0 1 9 3】

OND (N=20): 陰性のONDの平均値 0.88 s.d. 0.10。

【 0 1 9 4】

CIDP (N=8): 陽性のCIDP (N=5)の平均値 1.12 s.d. 0.09, 陰性のCIDP (N=3)の平均 0.9 s.d. 0.03, 全てのCIDPの平均 1.04 s.d. 0.13。

【 0 1 9 5】

我々は、フランスの29名のMS患者(クレテーユから19, グルノーブルから10)からの血清を、様々な疾患の異なる群の患者における、この免疫学的アッセイの予備的な評価として分析した。MS 患者の結果を表 12aに示す。十名の健常血液ドナーを、陽性の限界(カットオフまたはCO, その値未満で特異的なシグナルが検出されない閾値)を決定するため陰

性の標準として使用した。これらの系列の統計学的なカットオフ値によると、23名のMS患者は有意に陽性のMSRV-ENV 抗原血症(平均OD = 0.88)を有し、他方で6名は陰性と考えられ、むしろ閾値(陰性のMSのODの平均 0.62)の近くであると考えられる。興味深いことに、陰性のMSケースは、どちらかと言えば良性の形態の長い継続時間を有する(#24, 25, 28)またはシクロホスファミド治療のプロトコールを経験していた。

【0196】

平行して、我々は、他の神経疾患(OND)の28名の患者(クレテューユから12, グルノーブルから16)からの血清を分析した。5名の患者は結果が陽性である。従って、ここで試験した患者の約 18%のOND 患者を代表している。全ての 陽性の OND のケースは類似の診断〔慢性の炎症性の脱髄性多発性ニューロパチー(CIDP)〕をうけていたが、他方で他の診断をされた OND 患者は、全て陰性〔または、一つのケースの急性のギラン - バレー症候群に関してカットオフ限界で「未決定」〕であった。従って、OND 患者からの結果は表 12bにCIDP 患者(表 12c)とは別にOND (CIDP なし)として 示される。約半分のCIDPのケースは陽性であったが、現在の低い数で「炎症性」 対 「非-炎症性」の神経疾患を分析したことを意味しない。

【0197】

さらにまた、我々は平行して、慢性肝炎 B ウイルス感染の15 患者、同様に、慢性肝炎 C ウイルス感染の15 患者などの他の非神経疾患(ONND: other non-neurological diseases)からの血清を試験した。これらの 30 サンプルは、陽性であると認められなかった。30名の患者からの抗-DNA, 抗-核および抗-リウマチ因子(通常、多数の血清学的な試験に干渉する)との多反応性の血清(Polyreactive sera)は、如何なる陽性の結果も生じなかった。健常血液ドナーからの五十検体の血清も平行して試験した。陽性の検体は、認められなかった。

【0198】

MS 群と任意の他の群とを比較した結果は、有意差を示した(但し、CIDP亜群を除く)。非-パラメトリック検定法(正規性の検定は失敗)で比較した場合、完全なMS および OND 群(MS陰性、CIDP陰性を含む)からの光学密度値は、非常に有意に異なっていた($p = < 0,001$; Mann-Whitneyの順位和検定 $T = 517,000$)。完全なMS 群(complete MS group)と全てのCIDPケースとを比較した場合、統計学的な差は、もはや認められなかった($p = 0,053$; Mann-Whitneyの順位和検定 $T = 99,000$)。有意差は、陽性のMSおよび陽性のCIDPのOD値の間の各々で証明された($P = 0,072$; Mann-Whitneyの順位和検定 $T = 42,000$)。

【0199】

欧州の多施設の血清系列での盲検試験: 多発性硬化症(MS)および臨床的に分離した症候群(CIS)

異なる地理的な地域からのMS 患者の大きなパネルで最初の結果を確認するため、我々は異なる欧州の国の神経科の多施設共同体から血清を集めた。これらのサンプルにおいて、我々は、シグナル検出およびバックグラウンドノイズの区別を改善するための照度計の出力を使用した。

【0200】

血清を比色法で内部評価した後に、照度計の出力での比較によって、シグナルの検出および動力学(dynamics)の増強が確認された。従って、クワドリプリケートアッセイのための血清の標本抽出を、疾患の全ての形態および期間で(大抵は進行中の特定の治療を行っている)ランダムに選択されたMS 患者において行ったところ、本臨床ネットワークの各々の地理的な由来が示された。それらを暗号化し、中心的な研究室(APO-H technologies, Montpellier, France)へ盲検試験のために送った。非コードの血清(10の陰性対照および10の陽性のMS)を、カットオフ値の決定のための技術的な確認のために送付した。加えて、臨床的に分離した症候群(CIS, 単一の 神経学的なエピソード および 付加的な イメージング および/または 生物学的な異常)からの14個体の血清を、コード化し、このシリーズ内で盲検試験した。これはCISの最初の評価であり、大多数のMSの最初のエピソードを含むことが予想された。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 1 】

結果を、図 8に示す(独立した施設で盲検試験した欧州での多施設治験からの血清のApoH-ELISAの結果)。それらは同じ実験で決定されたカットオフ値で照度単位(RLU: ratio of luminometry units)を除した比として表され、そのため前の系列の比に匹敵する(Cf. 表 9)。実際、照度計で「陽性の MS」血清において得られた比の範囲(1~6)によって、比色分析(1~2)と比較したシグナルの動力学の技術的な至適化が確認された。

【 0 2 0 2 】

独立の施設で盲検試験した欧州での多施設治験からの血清のApoH-ELISAの結果。

【 0 2 0 3 】

使用した出力は照度 (luminometry) であり、結果は同じ実験で参照の陰性の血清の系列で決定されたカットオフ値で除した個々の照度単位の比としてY軸に示される。従って、>1の値は、陽性である。

【 0 2 0 4 】

群間のAPO-H ELISAの照度計の結果の統計的な分析によって、次の(i)から(ii)の比較の結果が得られた (Fisher の検定 p 値): (i) BD vs. 全ての MS, BD vs. 全ての MS + CIS, BD vs. RRMS, BD vs. PPMS, BD vs. SPMS, BD vs. CIS: $p < 0.001$; (ii) CIS vs. RRMS: $p = 0.759$, CIS vs. PPMS: $p = 0.704$, CIS vs. SPMS: $p = 0.749$, RRMS vs. PPMS, SPMS: $p = 1$, PPMS vs. SPMS: $p = 1$ 。

【 0 2 0 5 】

74の非選択のMS ケースの54ケース(73%)は、異なる国および研究の領域から由来し、MSRV ENV タンパク質に関して陽性の抗原血症 (antigenaemia) を有していたが、26のBD (実験の参照サンプルとして使用される10の非-コード化のBDに関して) とコードされたものはいなかった。MS および BDの間に存在する差は有意性が高いが(カイ二乗: $p < 0,0001$)、別の多数(百以上)の「非盲検の系列」はわずかな陽性の健常または無症候性の血液ドナー (4/103; 示さず) を検出した。興味深いことに、14 CIS のうち9(約 64%)は、陽性であったが、低い値であった。

【 0 2 0 6 】

異なるMSの形態〔一次の進行性(PPMS)、二次の進行性(SPMS) および軽減 再発性(RRMS)〕を示している異なる群 (MS, BD, CIS)からの、同様に、異なる亜群からの値を、Fischerの検定で比較した。健常な血液ドナーの結果は、全ての MS および CIS の組み合わせと有意に異なっていたが(常に $p < 0,001$)、他方で潜在的な(CIS)または明確なMS、または異なる MS 疾患の進展形態(71%がRRMSで陽性、78%がPPMSで陽性、70%がSPMSで陽性)の何れかを示している任意の亜群の間で MSRV ENV 抗原血症の検出に有意差は認められなかった。しかしながら、CIS 対 MS 亜群において不均一の傾向が若干が低い p 値 ($p = 0.7 \sim 0.75$) で表され(これに対して、MS形態の間で $p = 1$)、後者の値は統計学的に 同一の結果の分布を明らかとしている。

【 0 2 0 7 】

8b. 精神疾患の系列: 精神分裂病 (SCZ)。

【 0 2 0 8 】

患者および方法

患者および健常な対照

精神分裂病のDSM-IV (American Psychiatric Association: Diagnostic and statistical Manual of Mental Disorders, DSM-IV;1994) 判定基準を満たす患者を、フランスの大学関連の精神医学部門における急性エピソードの入院の終了時にランダムに選択した。ヒト免疫不全症ウイルス (HIV1+2)、B型およびC型肝炎ウイルス に関する神経学的障害、急性または慢性の感染、および血清学的に陽性の対象は、除外の基準である。これらの正常な対照における年齢および性別の分布は、本件の患者群と統計学的に異なっていなかった。精神病症状を、精神病疾病 スケール -SSPI-(Houenou et al,2007)の徴候および症状のフランスのバージョンで評価した。気分 (Mood) の症状を、Bech および Rafaelsenの躁病の評定尺度およびMontgomery および Asbergのうつ病の評定尺度 -MADRS-(Bech et al,19

10

20

30

40

50

78; Montgomery and Asberg, 1979)で評価した。プロトコールは地域の倫理委員会によって承認された。患者の臨床評価を担う精神医学者の検査の記載を完成させた後、インフォームドコンセントの署名を全ての対象者から取得した。

【 0 2 0 9 】

血清の採集

一つのチューブ(7ml B&D dry tube)の血液を、採集後2 時間以内に処理した： 凝固後に10 分間、2800gで14 で遠心分離した。血清を採取し、低結合チューブ (low binding tubes) に等分し、-80 ° で貯蔵した。

【 0 2 1 0 】

免疫学的アッセイ

APO-H 捕獲工程(Stefas et al., 1997)でのELISA試験を、モノクローナル IgGs (MSRV ENVに関して2A12A5, 6A2B2およびMSRV GAGに関して2G5E12)で行った (bioMerieux, Marcy L'Etoile, Franceにより作出され、特異性が選択された)。

【 0 2 1 1 】

Tris-HCl 50mM pH7.6で1/10に希釈した100 μ l / ウェルのサンプルを、ApoH-被覆マイクロプレート (APOH Technologies, Montpellier, France)にロードした。マイクロプレートを、37 で2 時間インキュベーションし、四回250 μ lのPBS / ウェルで洗浄した。100 μ l / ウェルの一次抗体 (PBS-BSA 2%中に10 μ g/ml) を、添加し、マイクロプレートを1時間37 でインキュベーションし、PBST 0.05%で四回、PBSで二回洗浄した。100 μ l / ウェルのペルオキシダーゼ-標識抗体 (抗-マウス Jackson, PBS-BSA 2%中で1/250) を、添加し、マイクロプレートを1 時間、37 でインキュベーションし、前のおり洗浄した。100 μ lの基質溶液 (OPD) / ウェルを添加し、マイクロプレートを30 分間、暗所でインキュベーションし、反応をH₂SO₄ 2N (50 μ l / ウェル)で停止させた。490nmの吸光度をBiotek readerで読んだ。

【 0 2 1 2 】

統計学的分析

統計学的分析を、SigmaStat ソフトウェアで行った。非パラメトリック検定法 Mann-Whitney 順位和検定を、データ系列の比較に選択した。というのも、それらは正規分布に適合しないからである(正規性検査に失敗)。カイ二乗検定を使用して、使用した各抗原 および / または各抗体について各集団における陽性 対 陰性の抗原血症の有病率を比較した。各条件 (当該条件下の結果) に関するカットオフ値を、陰性対照の統計学的な系列から平均値 プラス 三つの標準偏差 (M+3SD; 陽性の有意性: p<0.01)として計算し、参照の陽性および陰性のサンプルを確認した。

【 0 2 1 3 】

結果

年齢(33 +/-6.5 年) および 性別 (73% 男性, 27% 女性)に適合した49の精神分裂病の患者 および 49の対照を含めた。八名の患者は精神分裂病の最初の発症時に含まれたが、大多数(N = 41)は重篤な慢性の精神分裂病を有していた。彼等は、抑鬱性スコア(平均MADRS = 5.6 + 6.6) および躁病スコア (平均Bech スコア = 4.8 + 4.5)の双方で気分正常 (euthymic) である。全ての患者 (しかし、一名の未処理者を除く) は、抗精神病薬薬(27 %が古典的な、71 %が非定型の抗精神病薬)を摂取した。患者の三分の一 (N =13) は、Kane 判定基準 (Kane 1996)による薬剤抵抗性であった。

【 0 2 1 4 】

MSRV GAG 抗原に関して、49の対照および49の精神分裂病の患者を試験した。MSRV ENVに関して、30の対照(技術的な制限が原因)および49の精神分裂病の患者を試験した。標準化した値で全ての系列を比較可能とするため(図 22 および 表 10)、免疫学的アッセイ結果をカットオフ値で除してえた血清のデュプリケート (duplicates) の平均光学密度として免疫学的アッセイの結果を表した。

【 0 2 1 5 】

47 % (N = 23) および 43 % (N=21) の精神分裂病の被験者は、それぞれ2A12A5 および

10

20

30

40

50

6A2B2 抗体で陽性の MSR V ENV 抗原血症を有していた。49% (N= 24) の精神分裂病の患者は、陽性の MSR V GAG 抗原血症を有しており、GAG のみに関して一人は陽性であり、一人は「境界性 (borderline)」とされた。健常な対照との比較によって、陽性の普及率の有意差が明らかとされた (カイニ乗検定: 両方の ENV 検出に関して $p < 0.001$; GAG に関して $p < 0.0001$)。また、ELISA 値を患者と対照とで Mann-Whitney 順位和検定で比較することによって、高い有意差が確認された ($p < 0.001$; 表2)。対照の中の、一被験者は、有意に陽性の抗原血症を有していた。興味深いことに、ENV タンパク質の結果および GAG タンパク質で得られた結果の間に正の相関関係が存在した。抗-ENV6A2B2 で得られた ELISA 値と抗-GAG 2G5E12 で得られた ELISA 値とを比較している Mann-Whitney 順位和検定によって、抗-ENV-2A12A5 と抗-GAG-2G5E12 との比較 ($p = 0.290$)、および抗-ENV-6A2B2 と抗-ENV-2A12A5 との比較 ($p = 0.159$) に関して有意差 ($p = 0.744$) は認められないことが明らかとされた。従って、これらの抗体によって、MSRV 抗原の均等 および / または平行な発現 (parallel expression) が検出された:

"ENV" 抗原血症の ELISA 値は、陽性の間で変動し、表 10 に示すとおり、陰性の対照 (それぞれ 0.09 および 0.08) と比較して標準偏差 (2A12A5 抗体に関して 0.28, 6A2BA に関して 0.48) が増加した。これによって、特定の精神分裂病の患者における MSR V 抗原の動的な産生の検出が確認された。

【 0 2 1 6 】

【表 1 3】

表 13: 精神分裂病 (SCZ) の患者 および 対照の血清における MSR V キャプシド (GAG) および エンベロープ (ENV) の量

	MSRV ENV				MSRV GAG	
	2A12A5 抗体		6A2B2 抗体		2G5E12 抗体	
	SCZ	対照	SCZ	対照	SCZ	対照
陽性の数/ 試験した 集団の血清	23/49	1/30	21/49	0/30	24/49	2/49
	46,94%	3,33%	42,86%	0,00%	48,98%	4,08%
SCZ対BDに おける陽性数: カイニ乗検定	CHI2=16,73 (P<0,001)		CHI2= 17,51 (P<0,001)		CHI2= 25,34 (P<0,0001)	
標準偏差:陽性の SCZ血清/陰性の 対照血清	陽性 SCZ 0,28	Neg. 対照 0,09	陽性 SCZ 0,48	Neg. 対照 0,08	陽性 SCZ 0,47	Neg. 対照 0,15
SCZ対BD における陽性の数 Mann-Whitney 順位和検定	T=603,000 (P=<0,001)		T=638,000 (P=<0,001)		T=1451,500 (P=<0,001)	

SCZ: 精神分裂病患者 ; BD: 血液

【 0 2 1 7 】

免疫学的アッセイ (ELISA) 検査の比 (Y軸) を、同じ血清から得られたデュプリケートのウ

エルで測定された平均の光学密度を対応する系列(Cf. 材料および方法)のカットオフ値で除した。ENV抗原は2A12A5 モノクローナル抗体または6A2B2 モノクローナル抗体の何れかを投与 (dosed) され、GAGは2G5E12 モノクローナル抗体を投与された (それぞれのグラフの円柱にプロットした値を記した)。

【0218】

図9において、平均値および信頼度インターバル (0,01および0,001)をバーおよびボックスで示し、各抗原および抗体 (各欄の上に示す)の最大および最小値の分布をポイントで示した。精神分裂病の患者からの値の系列を、対応するプロットの底部に「SCZ」と示し、健常血液ドナーからのものを「対照」(底部/X軸)と示した。

【0219】

8c. 他の神経疾患:

てんかん。

【0220】

ELISA試験を、上記(8b)のとおり行った。てんかんの患者および正常の対照を、平行して、血清におけるMSRV-ENVタンパク質の存在に関して試験した。結果を図10に示す。

【0221】

各々の垂直方向のバーは、単独の癩癩の患者 (左から38)または対照 (右から24)の血清からのデュプリケートの結果の平均ODを示す。

【0222】

水平な黒色のバーは、検査のカットオフ値を示し、この値以上で検出されたシグナルは血清中の抗原の存在に特異的である。これは健常血液ドナー (対照) プラス その三回の標準偏差の結果の平均により決定される。

【0223】

本発明において、MSRV-ENV 関連癩癩の8患者の亜群を検出し、異なる病原学的な原因を伴う他のケースの中でこの特定の病因を伴う亜群に単純に対応しえる。MSRV 陽性の癩癩のみが、抗-ENVリガンド (例えば、抗体ベクター) の処置と関連する。

【0224】

8d: 乾癬患者。

【0225】

乾癬の患者は、類似するレトロウイルスを発現することが長く知られている [Iversen, O. J. (1990), "The expression of retrovirus-like particles in psoriasis." *J Invest Dermatol* 95(5 Suppl): 41S-43S./ Bjerke, J. R., G. Haukenes, et al. (1983), "Activated T lymphocytes, interferon, and retrovirus-like particles in psoriatic lesions." *Arch Dermatol* 119(12): 955-6]。従って、リガンドを含んでいる本発明の治療ベクターの妥当性は、当業者には自明である。

【0226】

例9: リガンドを含み、GNbAC1との活性特性を有するリガンド親和性を保持している薬学的ベクターのインビボでの効率。

【0227】

適切な薬理的なベクター化合物を有するベクター化したリガンドの形態で送達されるリガンドの抗炎症性、免疫保護および神経保護効果のインビボでの証拠: 神経炎症、脱髄および/またはニューロン変性の動物モデルにおける治療効果の例

材料および方法:

ヒト化 SCID (huSCID) マウスモデルにおけるMSRV/ENV-誘発性EAE。

【0228】

病原体フリーの6~8週齢のSCIDマウスを、Charles River (Charles River, France) から購入した。マウスのヒト化を、健常血液ドナーからのPBMCsを用いて以前に記載されたプロトコール (Firouzi et al., 2003)にしたがって達成した (Etablissement Francais du Sang, Lyon, France)。特にマウスは、ガンマ線照射され、抗-NK抗体を与えられ、 50×10^6 ヒト PBMCsを腹腔内 (i.p.) に注射してヒト化された。ヒト化の質を、マウス

10

20

30

40

50

血清中のヒト 免疫グロブリンの特異的な検出により制御した。一を超えるドナー / 系列が必要とされる場合、全ての huSCID 亜群は各献血でヒト化されたマウスと同じ比率で比較可能とされる。

【 0 2 2 9 】

EAE プロトコールに含ませる前(ミエリン抗原の最初の注射前)の2週の遅延が必要であった。次にマウス群を、mock-対照群に対してミエリン塩基性タンパク質 (MBP) および不完全フロイントアジュバント (希釈剤のみを含んでいる IFA)での注射,または「ENV-誘導性」のEAEに関してMBPおよびIFA 希釈剤でホモジナイズした精製したエンドトキシンプリーのMSRV ENV タンパク質の何れかで注射した。疾患の活性を臨床的にMRI でモニターし、傷害を生じ、臨床上の欠陥が進行している際に、オリジナルのマウスモノクローナル抗体 (GNb_AC1)と比較した選択した抗-ENV リガンドの効果を疾患マウス (huSCIDマウス)におけるENVでのMBP-EAE誘発)への注射で試験した。

【 0 2 3 0 】

EAE 動物の誘発または「mock-誘発」を、最初に50 µgのヒト MBP + 150 µgのMBP ペプチド(MBP ペプチド87-99) + 20 µgの組換え型の ENV タンパク質 + IFA (ENV 群)または50 µgのヒト MBP + 150 µgのMBP ペプチド(MBP ペプチド87-99) + IFA のみ(対照群)で0日に頸部にs.c.で注射した。また、200ngの百日咳毒素 (PTX) / 動物を、2 日後全ての群でi.p.で注射した。各群に対し前の記載に対応する腹腔内 (i.p.) 経路で同じ成分で同じ用量 (MBP ペプチド および ヒト MBP 完全タンパク質を含む)による第二の注射を、示した日(表 11)に行った。これに伴い類似する200 ng / 動物のPTX注射を行った。三回目および最後の注射と同じ免疫原を、頸部の後側に示した日 (表 14)に類似のPTX注射とともにs.c.で注射した。

【 0 2 3 1 】

【表 1 4】

群	説明	注射	成分		MAh (日に100ug)	臨床評価	
			FA	NV (20µg)		臨床スコア	MRI (日)
1	対照マウス	X	X	-		毎日	17;24;31;43; 50
2	対照マウス	X	X	-	19;35	毎日	17;24;31;43; 50
3	EAE マウス	X	X	X	-	毎日	17;24;31;43; 50
4	EAE マウス	X	X	X	35	毎日	17;24;31;43; 50
5	EAE マウス	X	X	X	19;35	毎日	17;24;31;43; 50

表 14. 前臨床系列の抗体治療評価: Hu-SCID マウスにおける ENV 誘発性および対照「MBP-EAE」に関する異なる群およびプロトコールの説明

【 0 2 3 2 】

追跡に関して、動物を5日/週計量し、臨床的にスコアをつけた。臨床スコアを、0 = 徴候なし; 1 = 尾の麻痺または後肢の反射の亢進または一側性の後肢の虚弱; 2 = 両側性の後肢または前肢の虚弱; 3 = プラス 一側性の麻痺または大きな欠陥; 4 = 完全な後肢または前肢の麻痺; 5 = プラス 逆側の肢の部分的な麻痺または大きな欠陥; 6 = 瀕死状態または死亡の判定基準にしたがって作成した。

【 0 2 3 3 】

Hu-SCID 実験のトータル時間は、mAb 処理および 対照 マウス (四 月)が関与している生存試験の例外を除いて、二 月を超えなかった。

【 0 2 3 4 】

MRI および 免疫組織化学の分析(本例で写真は示さない):

動物を、MRI T2-強調分析および死後の組織でモニターした〔これによって、中枢神経系の炎症 および脱髄の両方のタイプの傷害、同様に、臨床が改善された処理マウスでの炎症パターンの著しい 改善のイメージング (MRI)が確認される〕。

【 0 2 3 5 】

結果

ヒトのリンパ系を有するSCID マウス(上記のとおり移植された)によって、機能的な ヒト 免疫系を有するハイブリッド動物が提供される。これらの動物は、MBPとともに油性の希釈剤 (IFA)で乳化したMSRV ENV タンパク質の三回の注射を青色の矢印で示した日にうけた。動物がMRI (EAE)で視覚化された進行中の 神経炎症を伴う臨床の スコアの上昇を有していた際に、彼等は単一用量 (10 μ g 腹腔内)のオリジナルのマウスモノクローナル抗体 (GNb AC1, muIgGと図 10に示す)または一つのヒト IgG1またはIgG4 構築物にリガンドを伴うもの (huIgG1 および huIgG4 と図 11に示す)で注射された。無処理のままの群は、処理動物および「mock-対照」群と比較するため、ENV なしでIFA 中のMBPで注射し、オリジナルのマウスの 抗体 (GNbAC1)の注射を処理疾患動物と同日に受けた。

【 0 2 3 6 】

図 11 および 12に説明される結果から認められるとおり、全ての非処理マウスは、30 日後死亡し、MSRV ENV タンパク質の三回の注射の最終回後に重篤な臨床進行を示した。重篤な傷害が組織学 および 免疫組織学により認められ、脱髄、リンパ球系細胞の浸潤、ニューロンの死、血液脳関門の崩壊 およびアストログリオーシスが確認された。興味深いことに、多発性硬化症において、血液脳関門の崩壊は、活動的なCNS 傷害の特徴である。

【 0 2 3 7 】

以上より、ENVを標的とするリガンドを含んでいるマウスの 抗体またはキメラの ヒト IgG 1または4は、腹腔内注射から全身(特に、病気の動物における活性なCNS傷害に)拡散できるだろう。

【 0 2 3 8 】

著しいことに、生存曲線は、IgG1またはIgG4 キメラの 抗体の何れかで処理した動物で100%の生存を示したのに対して非処理のもので35 日に0%の生存を示した。驚くことに、オリジナルのマウスの IgG1/kappa (GNbAC1)は、同じ用量を注射された場合に効率が低い(一動物は28日に死亡した)。そのうえ、図 11の臨床曲線は、非常に良好で持続する改善をヒト IgG1または4 構築物で処理された動物で示したが、オリジナルのマウスの 抗体で処理された動物においては安定化(stabilization)または穏やかな改善のみ認められた。

【 0 2 3 9 】

ヒト IgG1またはIgG4 ベクターにおけるリガンドで処理した動物の係る著しい改善は、無処置の対照と比較したMRIモニタリングによっても明らかとされた。

【 0 2 4 0 】

従って、ヒト キメラの IgG 1または4の臨床上の有効性は、神経炎症、脱髄、ニューロン死、血液脳関門の崩壊 および アストログリオーシスを中枢神経系において示している動物モデルで確認された(CNS; Cf. MSRV ENV タンパク質で注射されたHu-SCID および C57/bl6モデル)。驚くことに、同じリガンドを含んでいるオリジナルのマウスの IgG(VH+VL 鎖)と比較して有効性が改善された。

【 0 2 4 1 】

従って、神経炎症の本件の動物モデルの治療の有効性によって、本発明の文章中で規定されたとおりMSRV-関連疾患または症候群における他の適用が明らかとされた。

【 0 2 4 2 】

10

20

30

40

50

さらに、例 1に規定された6つのCDRsを含んでいる最小の組成物または構築物の予想外の「リガンド効果」によって、抗体機能から完全に独立にリガンドを使用することが可能であるのみならず、各々の可能な治療上の適用のための異なるベクター（排他的にIgG アイソタイプに関連するわけではない）の付与された価値および相対的な興味を変化させ、選択することも可能である。

【0243】

例10: MSRV- ENV タンパク質は、固形腫瘍を有する患者のバイオプシーまたはリンパ球増殖性障害またはリンパ性癌を有する患者のバイオプシーからの特定の細胞で高い強度で検出された。

【0244】

材料および方法:

試験抗体

GNb AC1, 1.0 ml, 濃度: 5.918 mg/ml

負の対照の抗体

マウスのミエローマ タンパク質 IgG1 カッパ(MOPC-21, Sigma), 1.0 ml, 濃度: 1.0 mg/ml

この抗体は、試験抗体と共に使用された。

【0245】

阻害タンパク質

ENV-T(MSRV ENV, GeNeuro SA), 10 ml (10 x 1ml バイアル); 濃度: 0.05 mg/ml

このアンチリガンドは、試験抗体と共に使用された。

【0246】

ヒト組織のサンプル

患者の同意をえて倫理的に集めたヒト 組織を、外部の提供先から取得した。

【0247】

全ての組織を、抗原性試験に供試した。各組織と関連する一般的に発現させたタンパク質; S100, CD45, デスミン, サイトケラチンまたはビメンチンのIHC染色した切片を、組織が本研究の使用を許されると判断される前に評価した。

【0248】

アッセイの確認

調査したパラメータは、以下を含む:

1. 中性に緩衝したホルマリン, パラホルムアルデヒドおよびアセトン固定を用いた陽性対照の組織の染色の比較。

【0249】

2. 適切な免疫染色検出法の使用。

【0250】

3. 試験抗体の最適な力価の決定、0~5.0 $\mu\text{g/ml}$ を調査した(アイソタイプの対照抗体を同じ濃度で行った)。

【0251】

4. 染色の特異性を試験抗体を省略し、緩衝剤で置換して確認。加えて、MSRVの抗原結合部位を、組織のインキュベーションの前にENV-T タンパク質を用いてブロックした。

【0252】

5. 標的抗原シグナルに干渉できる内因性物質の任意の必要なブロッキングを行った。

【0253】

免疫組織化学的な(IHC)染色法

確認フェーズの所見の結果として、組織サンプルの各々を同時に次の様式でスクリーニングした:

- ・ 染色手順からGNbAC1を省略
- ・ MOPC-21 抗体を1.0 $\mu\text{g/ml}$
- ・ GNbAC1を0.25, 1.0 および 3.0 $\mu\text{g/ml}$

10

20

30

40

50

各組織サンプルを、光学顕微鏡を用いて評価した。スコアシステムは、組織および細胞タイプを同定し、本質的に染色の強度が反映される。

【0254】

負の対照の抗体または抗体なしの何れかで処理された組織における全ての染色（個々の細胞を特異的に描写しない）は、非特異的であると推定される。これらの組織の免疫組織化学的な染色が試験抗体で処理されなかった組織に対する染色と強度および分布において類似し、個々の細胞が特異的に描写されなかった場合には、試験抗体で処理された組織に関して特異的な染色を記録しなかった。

【0255】

陽性の染色を、組織構造または細胞のタイプに名前をつけ記録し、強度を以下の通り示した：

- 0 陰性
- + 軽度
- ++ 中等度
- +++ 顕著

各々の細胞タイプにおいて同定された染色の頻度を以下の通り示した：

- <10% 極少数 (Few)
- 11-40% 少数 (Several)
- 41-75% 多数 (Many)
- >76% 最多数 (Most)

切片が評価に適切と考えられない場合、データを結果の表に含めないで、可能になるまで染色を繰り返した。

【0256】

試験した他の希釈と比較して0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で膜染色は低かった。

【0257】

既知の陽性の対照および最初に陽性であると同定されなかった組織の間の比較として肝臓の組織を含めた。

【0258】

陰性の緩衝剤の対照またはアイソタイプに有意な染色は認められなかった。ENV-Tが抗-MSRV/ ENV GNbAC1抗体と反応した場合、陽染性の組織と比べた陽性染色は実質的に除外された。

【0259】

将来のスクリーニング試験のために、検査 Mab (GNb AC1) を、 1.00 ug.ml^{-1} の最適濃度、 3.00 ug.ml^{-1} の一段階上の濃度および 0.25 ug.ml^{-1} の低濃度で使用した。

【0260】

確認の所見の結果、以下のIHC染色手順を凍結した正常なヒト組織のスクリーニングに適合させた。

【0261】

手順	時間	
組織切片の風乾	N/A	
アセトン固定および風乾	約10 分間	
水道水を流した洗浄	N/A	
0.3%過酸化水素 (メタノール中)	約10 mins	
水道水中での洗浄	約5 mins	50

P B S での洗淨	約5 mins	
GNb AC1 モノクローナル抗体で0.25, 1.0および 3.0 $\mu\text{g/ml}$ および アイソタイプ対照で 1.0 $\mu\text{g/ml}$ でのインキュベーション。また、染色手順から一次を省略し、ENV-Tを10 $\mu\text{g}/$ mlでGNb AC1を1.0 $\mu\text{g/ml}$ で阻害した。		
P B S での洗淨	約5 mins	
Envision/HRPでのインキュベート	約 30 mins	10
P B S での洗淨 X 2	各約5 mins	
DAB 酵素基質での処理	約5 mins	
水道水を流した洗淨	約5 mins	
Mayersヘマトキシリンでの対比染色	約15 secs	
水道水を流した洗淨	必要に応じて	20
脱水する, 透明化およびマウント 【 0 2 6 2 】	必要に応じて	
結果: 乳癌。		

【表 15】

	顕微鏡所見	ENV-T		アイソ タイプ	Gnb AC1 抗体濃度 (ug/ml)				
		10.00	1.00		0.00	0.25	1.00		3.00
						極少数	少数		極少数
胸部 (乳房)	管性/腺性の上皮	0	0	0	極少数	少数	極少数	10	
	細胞質/膜				+	++	+		
(上皮 内癌)	管腔の内容物	0	0	0	0	少数	極少数	20	
						+	+		
	管腔表面	0	0	0	0	少数	多数		
						++	++		
(腺癌 乳房)	管-内皮 細胞質/膜	0	0	0	0	多数	極少数	30	
						++	+		
	管性/腺性の上皮	0	0	0	0	極少数	多数		
						+	+++		
(腺癌 乳房)	管腔の内容物	0	少数	少数	少数	少数	少数	40	
			+	+	+	++	+++		
	管腔表面	0	0	0	0	極少数	多数		
						+	+++		
(腺癌 乳房)	管-内皮 細胞質/膜	0	0	0	0	少数	多数	50	
						++	++		
	管性/腺性の上皮	0	0	0	0	極少数	少数		
						+	++		
(腺癌 乳房)	管腔の内容物	0	0	0	0	0	0	40	
	管腔表面	0	0	0	0	少数	最多数		
						+	++		
	管-内皮 細胞質/膜	0	0	0	0	少数	少数		
					+	++			

表 15: 異なる個体からの乳癌組織で得られた結果。

強度 陰性 0 軽度 + 中等度 ++ 顕著 +++ 頻度 極少数 少数 多数 最多数

【0263】

MSRV ENVが、特異的な GnbAC1で試験した乳房の腫瘍の3/3において管性/腺性の上皮細胞および周囲の血管の内皮細胞に高度に発現されたことを確認できる。

【0264】

従って、MSRV関連疾患の見解によると、乳癌の癌腫がこれらのヒト疾患の一つであることを確認できる。

【 0 2 6 5 】

リンパ性癌 (Lymphoid Cancer) およびリンパ増殖性の障害:

【表 1 6】

顕微鏡 所見	ENV-T	アイソ タイプ	抗体濃度 (ug/ml)				
			GNb AC1	0.00	0.25	1.00	3.00
扁桃腺 リンパ性 細胞質膜 (cytoplasm membrane)	0	0	0	少数	多数	極少数	
				+++	+++	+++	
	管内皮の細胞質 膜	0	0	0	極少数	多数	多数
					++	++	+++
(濾胞性の 過形成) リンパ性 細胞質膜 (cytoplasm membrane)	0	0	0	多数	最多数	最多数	
				+++	+++	+++	
	管内皮の細胞質 膜	0	0	0	極少数	多数	多数
					++	++	+++
(濾胞性の 過形成) 管内の白色細胞 細胞質膜 (cytoplasm membrane)	多数	0	0	NI	NI	NI	
						++	

表 16: 異なる個体の過形成性のリンパ様組織で得られた結果。

強度 陰性 0 軽度 + 中等度 ++ 顕著 +++; 頻度 極少数 少数 多数 最多数; NP: 実行不可能

【 0 2 6 6 】

GNbAC1で試験した場合、MSRV ENVがリンパ細胞 (lymphoid cells) に及びリンパ増殖性障害の患者の2/2からの顕著な過形成の扁桃腺バイオプシーにおける周囲の血管の内皮細胞に高度に発現されたことを確認できる。

【 0 2 6 7 】

従って、MSRV関連疾患の見解によると、リンパ球増殖性の障害 (リンパ球系細胞の癌を含む) がこれらのヒト疾患であることが今回確認できる。

【 0 2 6 8 】

腎臓癌

【 0 2 6 9 】

【表 17】

顕微鏡 所見	抗体濃度 (ug/ml)							
	ENV-T	アイソ タイプ	GNb AC1		1.00	3.00		
	10.00	1.00	0.00	0.25				
(癌 腎臓)	管腔表面	0	0	0	極少数	極少数	多数	10
	細胞質/膜				+	+	+++	
	糸球体メサンギウム 膜/細胞質	0	0	0	0	0	0	
(腎細 胞癌)	糸球体管のループ 内皮/細胞質	0	0	0	極少数 +++	極少数 +++	NI NI	20
	管円柱 (Tubule Casts)					0 多数 +++	最多数 +	
	管腔表面 細胞質/膜				極少数 +	少数 ++	少数 ++	
(腎細 胞癌)	糸球体メサンギウム 膜/細胞質				極少数 +++	極少数 +++	極少数 +++	30
	ボーマン嚢					0 少数 +++	少数 +++	
	糸球体管のループ 内皮/細胞質					0 多数 +++	最多数 +++	
	管円柱 (Tubule Casts)				極少数 +	極少数 +	極少数 +	

表 17: 異なる個体からの腎癌組織で得られた結果。

強度 陰性 0 軽度 + 中等度 ++ 顕著 +++; 頻度 極少数 少数 多数 最多数; NP: 実行不可能

40

【0270】

一つの細胞タイプにおける光背景染色 (light background staining) であっても (各ケースで異なる)、分析は実行可能であり、特異的な抗-MSRV ENV 抗体 (GNbAC1) で試験した場合にMSRV ENVが腎癌の患者の2/2からの腎臓バイオプシーにおける腎臓細胞に及び周囲の血管の内皮細胞に高度に発現されたことを確認できる。

【0271】

従って、MSRV関連疾患の見解によると、腎臓癌がこれらのヒト疾患の一つであることを確認できる。

【0272】

50

特異的な抗-ENV 抗体 (GNb AC1) または無関係の対照抗体 (MOPC-21) の何れかで染色された組織切片の光学顕微鏡で可視化した際の対応する写真によって、腎臓癌、リンパ性癌またはリンパ球増殖性の障害および乳癌に関する表15-17に示される所見が確認された。

【 0 2 7 3 】

例 11: MSRV ENV および GAG タンパク質は、糖尿病を発症する特定の急性ケースの血清において有意に一致 (concordant) するレベルで検出された:

急性のインスリン-依存性の糖尿病からの血清を、診断および追跡の目的のルーチンの試験の後に残った量から自動的に集めた。健康血液ドナーからの血清を、資格がある血液銀行組織からえた。

【 0 2 7 4 】

血清を、APO-H 捕獲プレート および 特異的なリガンド検出を用いた免疫検出技術により、本発明の例の前の記載にしたがって試験した。

【 0 2 7 5 】

以下の表は、トリプリケート試験での平均光学密度を提供し、この結果は急性の糖尿病 (Diab.) の患者の血清から及び代表的な血液ドナー (BD) から測定された。抗-MSRVマウスモノクローナル抗体リガンドを使用した:つまり、

一つの抗-エンベロープ (ENV) GNbAC1 (Geneuro, Switzerland)。

【 0 2 7 6 】

一つの抗-マトリックスおよびキャプシドポリタンパク質 (GAG): 2G5E12 (bioMerieux France)。

【 0 2 7 7 】

これらの抗体の特異的な結合は、二次の抗-マウス抗体 (Jackson, USA, ref. 115-035-146) で明らかとされた。使用された希釈または濃度は、以下の表に記載される。

【 0 2 7 8 】

カットオフ値 [対応する系列の健全な対照の平均値 プラス 二の標準偏差 (SD) から決定された] で除した平均光学密度の比 (P/N) が 1 より大きい場合、結果は有意である。係る値は、太字で大きな文字で P/N 2 の列にある。

【 0 2 7 9 】

従って、十八患者のうち十患者が少なくともリガンド マウスモノクローナル抗体で検出される ENV タンパク質の有意な抗原血症を有することが確認できる。全ての「MSRV-陽性」患者は、二つの抗体により検出され、GAG および ENV タンパク質の両方に有意な結果を有する。

【 0 2 8 0 】

二つの異なる MSRV タンパク質 (ENV および GAG) を提示している二つの異なるエピトープを標的とする二つの異なるモノクローナル抗体の検出での結果は明らかに有意であり、本発明において他で記載されたとおり、MSRV-関連疾患の決定のためMSRVとの関連性 (association) の点で意義がある。

【 0 2 8 1 】

以上、I型または他の炎症-関連性糖尿病は、疾患の病因がMSRV ENV タンパク質の炎症亢進性で免疫病原性 (immunopathogenic) の影響により生じえる患者の亜群を含む。

【 0 2 8 2 】

10

20

30

40

【表 18】

表 18: APOH-ELISA アンチゲネミアは、健常ドナー (BD) と比較して糖尿病 (Diab.) の患者に生じた。例の文中の詳細なコメントを参照されたい。
P/N 2=カットオフ値で除されたサンプル結果として計算された光学密度の比。
後者は健常ドナーを健常群の平均 + 二回の標準偏差として決定された

		GNb AC1 1ug/ml + Jackson 115-035-146 1/1000	2G5E12 080604CP01 1ug/ml + Jackson 115-035146 1/1000
DIAB.	MORF	0,061	0,066
	GIRD	0,014	0,020
	THEP	0,085	0,140
	LOND	0,045	0,096
	LEGM	0,030	0,034
	ELAM	0,089	0,085
	NFDK	0,118	0,122
	GEOV	0,088	0,120
	FIOP	0,021	0,052
	VERV	0,026	0,041
	CHOM	0,023	0,047
	HAMH	0,220	0,464
	DJES	0,035	0,040
	PCTP	0,047	0,066
	MEST	0,065	0,062
	HMAA	0,092	0,120
	GIUM	0,046	0,072
TRAF	0,049	0,049	
BD	GE3	0,025	0,049
	GE4	0,035	0,070
	GE5	0,017	0,037
	GE6	0,027	0,058
	GE7	0,036	0,039
	GE8	0,047	0,054
P/N 2	MORF	1,172	0,870
	GIRD	0269	0,264
	THEP	1,633	1,845
	LOND	0,865	1,265
	LEGM	0,576	0,448
	ELAM	1,710	1,120
	NFDK	2,267	1,608
	GEOV	1,691	1,582
	FIOP	0,404	0,685
	VERV	0,500	0,540
	CHOM	0,442	0,619
	HAMH	4,227	6,116
	DJES	0,673	0,527
	PCTP	0,903	0,870
	MEST	1,249	0,817
	HMAA	1,768	1,582
	GIUM	0,884	0,949
TRAF	0,942	0,646	
Mean BD	0,031	0,051	
SD BD	0,010	0,012	
Mean MS	0,064	0,094	
SD MS	0,049	0,099	
Cut off 2SD	0,052	0,078	

【 0 2 8 3 】

例 12: ENV-誘発性糖尿病の適切な動物モデルの予想外の発見。

【 0 2 8 4 】

10

20

30

40

50

1. イントロダクション

非肥満の糖尿病性 SCID (NOD-SCID) 自然発生変異マウスモデルは、糖尿病感受性のNODバックグラウンドへと移したSCID 変異を有する。驚くことに、ヒト化 NOD-SCID マウスをENV タンパク質 (25 μg) および マウスの MBP (タンパク質 および ペプチド)で一次免疫化することによって試験した全ての動物の急速な死を組織的に導いたが、ENV タンパク質なしの同じ免疫原を受けた全てのヒト化SCIDマウス (Mock対照) は生存することを出願人による予備的な実験は明らかとした。最初の段階において、我々は、組織学的なアプローチと組み合わせた臨床モニタリングを用いた様式の用量反応でNOD-SCID マウスにおけるENV タンパク質の有害な影響を評価した。第二の段階において、我々は、ENV タンパク質で誘導されたダメージを予防する我々のキメラIgG4リガンドの有益な効果を評価した。

10

【0285】

2. NOD-SCID マウスにおけるENV タンパク質の有害な影響の評価

a. 材料および方法

a.1. 動物

六病原体フリーの SCID マウス (6 ~ 8 週齢) を、Charles River (Charles River, France) から購入した。動物を、3/ケージで標準光源で暗期サイクルを維持し、食物および水を自由に摂取させ、8-日の順化期間で平静にさせた。非常にきれいな飼育条件を保証するため特別な注意を払った。特に、動物をフィルターリッド (filter lid) を備えた特殊なケージで飼育した。

【0286】

20

a.2. NOD-SCID マウスのヒト化

NOD-SCID マウスを得るため、リンパ性の免疫系を欠き、ヒトの免疫系を移植されたマウスを、末梢単核球でヒト化して、免疫病原性の動物モデルにおけるヒトの免疫系の機能的な役割を研究する潜在能力を提供した。これによって、ヒトの病原性タンパク質 (例えば、MSRV- ENV) の免疫の病理および応答の点で現実のヒトの状況に非常に近い結果が提供される。マウスのヒト化は、Firouzi (Firouzi et al., 2003) により以前に記載されたプロトコールにしたがって達成された。但し、該動物はガンマ線照射されず、抗-NK リガンドで処理されない (というのも、NOD-SLID マウスは、自然発生的にNK 細胞が枯渇しているからである)。2健常対照からの血液 [ロイコ-血小板層 (leuko-platelet layer), 45-50 ml] を、Lyonの輸血センター (EFS) から得た。血液の質 および 安全性は、免疫学的及び血液学的な分析により保証された。全ての実験処理は、層流 (laminar air flow) 下で無菌グローブを用いて行われた。ヒト 末梢血単核球 (PBMCs) は、フィコール 勾配密度分離法により得られ、NOD-SCIDに i.p. 注射で投与された ($50 \cdot 10^6$ 細胞)。二の異なるドナーの血液を使用して全ての動物がヒト化されたとの理由から、同じ比率のマウスを各々の供血者でヒト化した。以下に記載するとおり、何れかのドナーで移植された動物の間で全ての将来の実験において差が認められないことが既に確認された。

30

【0287】

3. NOD-SCID マウスにおけるENV タンパク質の有害な影響の評価

ENV タンパク質の注射

0日 (P0) に、マウスは、単回の腹膜内 (i.p.) 注射 (0.5 ml) でENV タンパク質 (PX' Therapeutics, France) を 0.1, 1, 5, 10, および 20 μg の用量で受けた。ENV タンパク質を、無菌のリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) (Lonza, France) で希釈した。単一のマウスは、PBS単独の注射を受けた。

40

【0288】

ENV タンパク質の濃度および生理活性における低下を回避するため、0.5 mlの不完全フロイントアジュバント (Sigma, France) に乳化させたENV タンパク質の第二の注射をP7で行った。各マウスは、単回の皮下注射を頸部に受けた。各マウスに使用されるENV タンパク質の用量は、P0における最初の注射と同じであった。

【0289】

ミネラル油希釈剤 (IFA) (0.5 ml) に乳化させたENV タンパク質の三回の s.c. 注射を、P

50

14に頸部に行った。同日、マウスは、200 ng (0.5 ml)の百日咳毒素 (PTX) (Wako, Germany) / 動物を受けて、CNS外免疫細胞 (extra-CNS immune cells) の通過のため血液脳関門が一過性に開かれた。

【0290】

臨床評価

一般的な健康状態 (外皮, ケージにおける歩行, 姿勢の状況) および動物の重量を、P14 ~ P37の間にモニターした。

【0291】

組織学的な検査

全ての死亡した動物の脳および内部の器官を除去し、引き続く組織学的な検査のためホルモール(10%)に保存した。

【0292】

b. 結果

1. 臨床のモニタリング

IFA および PTXに乳化させたENV タンパク質の注射に続く最初の数日の間、ENV タンパク質の最高の用量を受けた全てのマウスは、ケージおよび疲憊行動 (prostration behavior) における低活性により示された一般的な健康状態の悪化がひどく、また関連性の体重減少を呈した (図 13を参照されたい)。最終的に、全てのこれらのマウスは、最後の注射後の四日以内に死亡した。興味深いことに、低用量のENV タンパク質を注射されたマウスは、良好な一般健康状態と関連した軽微な体重増加を示した (低用量のENV タンパク質を注射された二匹の残りのマウスに徐々に穏やかな逆立った外皮が出現した)。

【0293】

最後の注射後の週の間、生存しているマウスの体重は、安定するか又は僅かに減少したが (図 13を参照されたい)、一般的な健康状態は不変であった。

【0294】

最後の注射後の第二週の間、生存しているマウスは連続的に重量が増加し (図 13を参照されたい)、一般的な健康状態は安定した。

【0295】

2. 組織学的な検査

研究目的

NOD マウス M4, M5 および M6からの膵臓の組織病理学的な研究

材料および方法

膵臓の組織のサンプル (ホルマリンに固定) を受領した。組織サンプルを、パラフィンに包埋し、5um-厚で切片を切った。

【0296】

組織切片を、ヘマトキシリン-エオシン-サフランで染色し、光学顕微鏡で検査した。代表的な数量化した写真をとった。

【0297】

結果

M4 膵臓:

膵臓の全体の構築を保存した。限局的な炎症性の傷害が存在した: それらは、多形性の小さい浸潤を形成し、血管周囲に優先的に存在し、管の周囲に分布していた。外分泌性の膵臓の有意な変化は存在しなかった。内分泌島 (endocrine islets) の傷害が観察された: 炎症細胞は末梢に沿って存在し、アポトーシス性の内分泌細胞が視認される。

【0298】

M5 膵臓:

膵炎が存在する。大きい炎症性の浸潤が外分泌性の膵臓内に存在し、これは限局的な腺房細胞 (acinar cell) のネクローシスと関連する。フィブリノイドネクローシス (Fibri noid necrosis) が時々存在する。

【0299】

10

20

30

40

50

M6 膵臓:

重篤な傷害が存在する。大きく、集密的なネクロシスの領域が、膵臓に存在し、多数の腺房細胞の完全なネクロシスを生じる。加えて、炎症性の傷害が膵周囲組織に認められ、サイトステートネクロシス (cytosteatonecrosis) の病巣をともなう。組織学的な側面に関しては、急性、壊死性の膵炎の典型である。

【 0 3 0 0 】

概要:

M4からの膵臓における限局的な軽度の炎症性の傷害。

【 0 3 0 1 】

M5からの膵臓における中等度の急性膵炎。

【 0 3 0 2 】

M6からの膵臓における重度な急性の壊死性膵炎。

【 0 3 0 3 】

C. 考察

全体的に、我々の結果は、ENV タンパク質注射が5 pgよりも高い用量でのみNOD-SCID マウスに致死的であることを示唆している。高用量のENV タンパク質が注射された動物は、PTXの注射前の一般的な健康状態の衰退を呈したので、主要なCNSダメージがNOD-SCID マウスで観察されたENV タンパク質の有害な効果を説明できる可能性は低い。ENV タンパク質が一または幾つかの他の器官における主要な機能不全を惹起し、動物の死を導く可能性がある。NOD-SCID マウスは糖尿病感受性のバックグラウンドを有するので、死亡した動物の膵臓の組織学的な状態 (上記) は、ENVにより誘導された膵炎によることが高度に示唆される。興味深いことに、最低の致死量によって、ベータ島 (beta-islets) および内分泌膵臓のみにおいて傷害が誘導され、この所見は明らかに糖尿病傷害に対応し、この用量でのENV-誘発性炎症により排除されたインシュリン-分泌細胞の非存在下でのマウスの死亡を十分説明するものである。

【 0 3 0 4 】

我々の試験は、高用量でおそらくヒトの糖尿病で直面するだろう相対的な 用量/重量をこえていると思われる、急性の壊死性の膵炎において係る高レベルのENVが膵臓全体 (分泌性の部分を含む) の大規模な炎症を誘発すると思われる。これらの観察は、高用量のMSRV-ENV タンパク質が注射された場合に発生することが示された膵炎と関連性がある。

【 0 3 0 5 】

4: NOD-SCID マウスにおけるENV タンパク質の反復注射後の血糖のモニタリング

A. イントロダクション

前の実験において、我々は、ヒト化 NOD-SCID マウスにおける5 µgのENV タンパク質の反復皮下注射が急性の膵島 細胞の破壊と関連するだろう対応する動物群の死を導きえることを示した。本研究において動物の突然死を生じる条件における血糖のキネティクスの進展が多義的に解釈されること防ぐため、我々は、ヒト化 NOD-SCID マウスの血糖を研究するため致死量以下の 用量のENV タンパク質の反復注射を使用した。

【 0 3 0 6 】

B. 材料および方法

1. 動物

上記の2.a.1を参照されたい。

【 0 3 0 7 】

2. NOD-SCID マウスのヒト化

上記の2.a.2を参照されたい。

【 0 3 0 8 】

3. ENV タンパク質の注射

この研究において、マウスを、一度/週 (P0, P9, P16 および P23)で4週注射した。各タイムポイントで二匹のマウスは、0.5 mlの不完全フロイントアジュバント (Sigma, France)で乳化させた2.5 µgのENV タンパク質 (PX' Therapeutics, France)の頸部皮下注射

10

20

30

40

50

を受けた。二匹の残りのマウス(対照マウス)は、0.5 mlの不完全フロイントアジュバントの頸部皮下注射を受けた。

【0309】

4. 血糖の測定

P0 および P30で血液サンプルを、意識のある動物の尾静脈から集めた。血中グルコース濃度を、血糖リーダー(Optium Xceed, Abbott, France)を用いて評価した。

【0310】

C. 結果

亜致死量で予想されたとおり、ENV タンパク質の四注射を受けたマウスは、四回目の注射後になおも生存しているが、前に記載されたように徐々に穏やかな逆立った外皮が出現した。

10

【0311】

P0 (対照におけるENVまたはmock-溶液の最初の注射の日)で、対照 および ENV-注射マウスの間で明白な差は検出できなかった。興味深いことに、P30でENV-注射マウスの血中グルコース濃度(血糖)は、対照マウスと比較して増加したことが見出され、他方で対照マウスの血中グルコース濃度(血糖)はP0の前の値と異なっていなかった(図 14)。

【0312】

このENV-処理動物における血糖の変動によって、ヒト糖尿病の特徴であるENV-注射動物の高血糖に向けた進展の有意性を明らかとし、前の組織病理学的な所見が強まった。

【0313】

20

以上、これらの結果によって、さらに糖尿病のENV-ターゲティング治療薬を研究するための関連性のある前臨床モデルとしての我々の実験条件が確認された。

【0314】

例 13: 適切な動物モデルにおける糖尿病関連疾患の出現の予防におけるキメラIgG4リガンド形態下でのGNb AC1 リガンドの治療効果の証拠

1. 材料および方法

a, 1. 動物

この研究は、前の実験に使用された低用量のENV タンパク質(0.1 および 1 μ g)を注射された二匹の生存しているマウスで行われた。

【0315】

30

2. 実験手順

5 μ gのENV タンパク質の反復注射がマウスの急速な死を導くことが示されているので、我々は、我々のリガンドの有益な効果の評価のためこの挑戦的な用量を使用した。前の実験に記載したとおり、マウスは、IFA (0.5 ml)で乳化させたENV タンパク質の三回のs.c.注射をP50, P57 および P64で頸部に受けた。各時点に対し、マウスは同じ日に単回の i.p. 注射(0.5 ml)で100 μ gのGNb AC1 IgG4 キメラリガンドを受けた。各マウスの臨床状態および重量を、P50~P81で5日/週でモニターした。

【0316】

3. 結果

120日の追跡までの処理動物の観察によって、これらの動物が長期に生存したことが明らかに示された。このようにGNbAC1注射は、彼等を保護し、致死用量のMSRV-ENV注射の三回連続に対して彼らを生存させた。

40

【0317】

この追跡期間の間、彼等の一般的な健康状態は良好なままであり、生理的な範囲で重量は連続的に増加した(肥満は観察されなかった)。

【0318】

糖尿病傷害を裏付け、さらに膵炎を誘発できる本動物モデルにおいて、GNb AC1 IgG4リガンドが致死用量のMSRV ENVに対し有効であり、炎症およびMSRV ENV発現または抗原血症と関連する糖尿病または膵炎などの疾患に所望の治療効果を有すると結論づけることができる。

50

【 0 3 1 9 】

例 14: (i) ヒト化IgG4 可変鎖に挿入するための一段階の最適化, (ii) IgG4 ベクターの至適な標的(ENV-タンパク質) 結合活性のためのCDR配列の最高の組み合わせの選択, および (iii) CHO 細胞におけるIgG4の安定な発現のための選択の最適化での、リガンドからの6つのCDRアミノ酸配列を含んでいるIgG4 アイソタイプ鎖を有するGNb AC1 ヒト化抗体のデザイン, 構築およびインビトロ分析。

【 0 3 2 0 】

A. リガンドを有するヒト化および安定化したIgG4 抗体ベクターを得るための分子構築物のデザイン, 前記構築物の産生および選択。

【 0 3 2 1 】

1. GNb AC1マウスの抗-ENV 抗体のFv 領域の分析

GNb AC1 マウス抗体のヒト化に適切なヒトフレームワークを見つけるために、GNb AC1 重鎖および軽鎖のFv 領域のアミノ酸配列をPanorama 研究所 (1230 Bordeaux Drive, Sunnyvale, California 94089, USA)からのヒト抗体生殖系列遺伝子データベースと整列させた。ヒト 生殖系列 V 遺伝子でヒットしたトップは、ヒト V 遺伝子候補と同定された。

【 0 3 2 2 】

データベース探索から、ヒト VH1-46 および VH1-69 遺伝子は、マウスのGNb AC1 重鎖に最も近い配列を有すると同定した。それゆえ、我々は、VH1-69をヒト化のヒト フレームワークとして選択した。同じ データベースを用いて、我々は、ヒト化重鎖におけるフレームワーク 4のため使用されるヒト JH4 配列を同定した。

【 0 3 2 3 】

抗体軽鎖に関して、VK1-5, VK3-11, VK1-33, VK1-39は、マウスの抗体軽鎖と高い相同性を示した。それゆえ、我々は、VK1-39を軽鎖のヒト化のため選択した。同法を用いて、我々はヒト 抗体軽鎖のフレームワーク 4の構築のためJK4 を同定した。

【 0 3 2 4 】

ヒト化抗体のヒト VH 鎖への移植に適切な CDR 領域を規定するため、我々は、オリジナルのマウス抗体の可変重鎖内のこれらの CDR 領域の適合され、至適化された輪郭を再評価した。我々は、我々の好適な規定としてKabatの規定 および Chothiaの規定 [Johnson G, Wu TT. Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Res 2001; 29: 205-6. and Chothia C, Gelfand I, Kister A. Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. J Mol Biol 1998; 278: 457-79] の組み合わせを使用した。要約すると、Chothiaの規定はコンホメーションの可変性に特権 (privileges) をあたえ、他方でKabatの規定は配列の可変性に特権をあたえる。GNb AC1 マウスの抗体重鎖のCDR 領域は、前に記載された好適な規定にしたがって、ヒト IgG4 可変重鎖 (VH)への機能的な挿入のための好適な領域の選択とともに図 15 (配列番号 33, 34 および 35)に示される。

【 0 3 2 5 】

ヒト化抗体のヒト VL 鎖への移植に適切な CDR 領域を規定するため、我々は、オリジナルのマウス抗体の可変軽鎖内のこれらの CDR 領域の適合された至適化された輪郭を再評価した。我々は、Kabatの規定 (Johnson G, Wu TT. Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Res 2001; 29: 205-6) およびContactの規定 (Panorama Research Institute, CA, USA)の組み合わせを使用した。マウスの 抗体軽鎖の評価の後、我々は、CDR 領域を規定する我々の好適な規定としてKabatの規定を使用した。抗体軽鎖に関して選択されたCDR 領域は、図 16 (配列番号36, および 配列番号38)に示される。

【 0 3 2 6 】

2. ヒト化重鎖の可変領域

マウス抗体のCDRs および ヒト生殖系列 VH1-69 遺伝子に基づいて、七つのVH 配列 を、GNb AC1 重鎖のヒト化に関してデザインした。それらはH1, H2, H3, H4, H4A, H4B, および H4Cと表される。これらの V 領のDNA断片を、合成し、ヒト IgG4 定常領域 cDNAの

10

20

30

40

50

5'に融合して、7の完全長のIgG4重鎖を作出した。完全長のIgG4重鎖を、CMVプロモーターの下流のpCMVプラスミドバックボーンに挿入した(Cf.例4)。正確な重鎖のインサートを含むクローンを制限酵素消化により同定し、それらのDNA配列をシーケンシング分析で確認した(それぞれ配列番号39~配列番号45に対応する)。

【0327】

3. ヒト化軽鎖の可変領域

マウスの抗体軽鎖のCDRsおよびヒト生殖系列VK1-39遺伝子に基づいて、三つのヒト化VL配列をデザインし、合成した。これらの配列はVK1, VK2, およびVK3と表される。三つのVKのDNA断片を、ヒトカッパ鎖配列を含んでいるpTT5プラスミドバックボーン中のカッパ定常領域と融合した。各軽鎖のオープンリーディングフレームは、CMVプロモーターにより駆動される。遺伝子発現を増加させる、カッパ軽鎖配列は、VLおよび軽鎖定常領域の接合部にイントロンも含む。正確な重鎖のインサートを含むプラスミドクローンを制限酵素消化により同定し、それらのDNA配列をシーケンシング分析で確認した(それぞれ、配列番号46~配列番号48に対応する)。

【0328】

4. ヒト化抗体バリエーションの発現

抗体を発現するため、七の重鎖および三の軽鎖のプラスミドを、プラスミドDNA精製Maxiキット(Qiagen)を用いて精製した。加えて、キメラのGNb AC1 IgG4重鎖およびキメラのGNb AC1カッパ軽鎖(Provided by GeNeuro)のプラスミドを、同じキットを用いて精製した。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を、6-ウェルプレート中で無血清培地(Invitrogen)で培養し、様々な組み合わせの重鎖および軽鎖プラスミドを1:1のDNA比で共トランスフェクトした。トランスフェクションを、Invitrogen freestyle Maxトランスフェクション試薬を用いて行った。トータル32のトランスフェクションを行い、これには8重鎖(7のヒト化重鎖プラス一つのキメラ重鎖)および四の軽鎖(3のヒト化軽鎖プラス一つのキメラ軽鎖)の組み合わせが含まれていた。トランスフェクション後の3日目、細胞の培養上清を収穫した。上清における抗体濃度を、標準曲線を作成するため精製したキメラGNb AC1 IgG4抗体(GeNeuroにより提供された)が使用されたヒトIgG4 ELISAアッセイにより決定した。

【0329】

5. ヒト化抗体バリエーションの予備的なスクリーン

ヒト化抗体バリエーションを評価するため、我々は、ENVタンパク質への結合活性のためのベンチマーク/陽性の対照としてCHO細胞中のキメラの重鎖およびキメラの軽鎖の共トランスフェクションから作出したキメラ抗体を使用した。キメラのGNb AC1抗体および全てのヒト化抗体バリエーションはIgG4型式であるので、固定化されたMSRV ENVタンパク質でのELISAに基づく結合実験をうまく利用して相対的な抗体結合活性を評価できる。この結合実験において、ELISAプレートを、精製した組換え型のENVタンパク質(GeNeuroにより提供)で1μg/mlでコートした。プレートを、1%BSAでブロックし、様々な希釈の抗-ENV抗体をウェルに適用した。結合抗体を、二次抗-ヒトIgG Fc抗体のHRP結合体により検出し、HRP基質(KPL)で色を発色させた。このアッセイを用いて、我々は、キメラの抗-ENV IgG4抗体が固定化されたENVに非常に良好な結合活性を有することを示した(図17)。

【0330】

同じ結合実験を用いて、我々は、様々な組み合わせのヒト化の重および軽配列でトランスフェクトされたCHO培養から収穫された上清を評価した。二つの判定基準を、最高の抗体を決定するため設定した、即ち:

ヒト化抗体は、キメラのGNb AC1抗体に近い結合活性を有するべきである;

ヒト化抗体は、重鎖および軽鎖プラスミドの共トランスフェクション後の上清に妥当な発現レベル(即ち、>100 ng/ml)を有するべきである。

【0331】

これらの選択の判定基準に基づいて、H2/VK3は、その良好な結合活性(図18)および

10

20

30

40

50

発現 (6-ウェルプレートにおいて、 $>1 \mu\text{g/ml}$)のため最高の抗体として選択された。H4/VK3は、ENV タンパク質への結合活性は、H2/VK3よりも低いので二番目に最高の抗体である (図 19)。第三の抗体 (H1/VK3) は、結合活性は良好だが、抗体発現は乏しい(6-ウェルプレートにおいて、 $<10\text{ng/ml}$) (データ示さず)。この予備的なスクリーンに基づいて、我々は、更なる評価においてH2/VK3に焦点を合わせることを決定した。

【 0 3 3 2 】

6. H2/VK3の更なる評価

予備的なスクリーンの後、我々は、さらに標準化した抗体濃度を用いた結合実験でH2/VK3をキメラ 抗-ENV IgG4 抗体と比較した。上清中の抗体 H2/VK3の濃度を、精製 キメラ Gnb AC1 抗体を標準として用いて我々のIgG4 ELISAで慎重に測定した。上清におけるH2/VK3 抗体および精製したキメラの Gnb AC1 IgG4 抗体を、同じ濃度に希釈し、ENV-結合 ELISA アッセイで比較した。アッセイは、ヒト化H2/VK3 抗体がキメラの IgG4 抗-ENV タンパク質と殆ど 同一のENV-結合活性を有することを示す(図 20)。

【 0 3 3 3 】

次に、我々は、H2/VK3 抗体の十分な 量が精製できるようにH2/VK3の発現をスケールアップした。pCMV H2 および pTT5 VK3 プラスミドを、プラスミド 精製 maxi キット (Qiagen)を用いて調製した。CHO細胞を、無血清の CHO 培地中で培養し、Invitrogen Freestyle Maxトランスフェクション試薬を用いて二のプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションの五日後、細胞培養上清を収穫し、3400 rpm、15 分間で遠心分離した。上清を次にプロテイン A カラム (GE)にとおし、PBS で洗浄し、pH 3.5 溶出緩衝剤で溶出した。タンパク質含有フラクションを、プールし、適切な容量まで10 kDの分子量カットオフのAmicon スピンカラムで濃縮した。抗体濃度をヒト IgG4 ELISAで決定し、Bradford タンパク質アッセイ (Bio-Rad)で確認した。精製 H2/VK3 抗体を、非還元性のSDS-PAGE ゲル中でチェックし、単一の バンドが分子量 約 150 kDで観察された(図 21)。

【 0 3 3 4 】

最終的に、精製したH2/VK3を、ENV-結合実験において精製したキメラ Gnb AC1 抗体と比較した。結果は、精製したH2/VK3が精製したキメラ抗体とほとんど 同一の結合活性を有することを示した(図 22)。これらのデータに基づいて、我々は、H2/VK3が我々の 判定基準に合致し、ヒト化 Gnb AC1 抗体として選択されたと結論付けた。前の結合活性データ(図 3 -6 および 8)を考慮に入れると、ヒト化抗体内でリガンド活性を維持することが必要な6つのCDR 配列は、選択されたヒト化 IgG4 抗体ベクターのH2 および VK3 鎖のアミノ酸配列に挿入され(図 22)、配列番号 49~配列番号 54で表される。

【 0 3 3 5 】

それらは選択で至適化され、CDR 配列の変異がマウスの VH および VL 鎖において分析された、これらは最初に主にヒト VH および ヒト VL 構築物 (配列番号33-38)内の適切な挿入に関して選択されたものである。選択されたヒト化 H2 重鎖 および VK3 軽鎖 (選択されたヒト化 IgG4 構築物に関する)に関するアミノ酸配列、それらの残りのマウス残基は図 23に示される。

【 0 3 3 6 】

我々は、1 mgのH2/VK3 完全ヒト化抗体構築物をCHO 細胞から無血清の CHO培地においてpCMV H2 および pTT5 VK3 プラスミドをトランスフェクションすることで産生し、この H2/VK3 抗体をプロテイン A カラムで精製した。

【 0 3 3 7 】

7. ヒト化 抗-ENV mAbのS241P 変異での作出

IgG4 抗体は、時々インビボで機能上一価であることが認められる。最近の研究によって、これがIgG4 分子の間での IgG 半分子(一つのH- プラス 一つのL鎖)のインビボ 交換が原因であることが解明された。このプロセスによって、大抵の状況で機能上一価の抗体として振る舞う二重特異性抗体が生じる (Aalberse and Schuurman 2002, IgG4 breaking the rules, Immunology. 2002,105:9-19)。これは大部分はポジション 241 (ヒンジ 領域)の残基で PからSの変化が原因の鎖間のジスルフィド橋の不安定性により生じ、抗体の

特異性および作用強度が減少する可能性がある。この問題を回避するため、我々は、可能なアミノ酸置換の3Dでのタンパク質の評価（www.NCBI-ENTREZで利用可能なものなどのソフトウェア、例えば、Protein Cn3D viewer、または、例えば、M CLC Main Workbench, CLC Bio company, Aarhus, Denmark、または、Panorama Research institute, CA, USAで開発されたものを用いて）を行った。以上より、我々は、ヌクレオチド構築物内で残基をコード化している至適化されたヌクレオチド配列から、ポジション 241における現存のセリン (S) 残基をプロリン (P) 残基で置換することからなる一次ヌクレオチド配列のオリジナルの修飾が、リガンドを有するIgG4 抗体ベクターの結果として起る不安定性の解決策であることを想到した。それゆえ、部位特異的突然変異誘発を行い、PCR産物をH2 S241 Pと表されるpCMV プラスミドにクローン化した。変異したH2 重鎖のDNA 配列を、シーケンシング分析で確認した。

【 0 3 3 8 】

この最適化が既に上記のVL および 軽鎖定常領域のジャンクション中のイントロンの封入でのカップ軽鎖配列の修飾と組み合わせられて遺伝子発現が増加する。

【 0 3 3 9 】

一次アミノ酸構造に又は最終的な産物の産生割合に影響するヌクレオチド変異または付加により以前に選択されたクローンから至適化された配列のオリジナルの組み合わせは図 24に示され、この配列はIgG4 抗体産物に対応し、前記のアミノ酸の組成及びその固有の構造を有し、標的ENV タンパク質抗原に対する機能的な結合特性を保存している本発明のリガンドのため至適化され、安定で高度に発現されるベクターを提供する。これは抗-ENV ヒト化 抗体重鎖 H2 S241Pの最終的な配列を示す〔それをコードするヌクレオチド配列 (配列番号55) 及びそのアミノ酸配列 (配列番号56)〕。また、これは抗-ENV ヒト化 抗体軽鎖 VK3の最終的な配列を示し、VK3はヌクレオチド配列 (配列番号57)〔イントロンは下線で示される (配列番号58)〕でコードされる。イントロンなしの軽鎖 VK3のサプライされたヌクレオチド配列が続く (配列番号59)。最後に示されるものは、最終的に至適化された軽鎖 VK3 に対応するコード化アミノ酸配列である (配列番号60)。

【 0 3 4 0 】

最終的に、我々は、CHO 細胞から S241 P 変異を有するヒト化抗体の2 mgの最終的なバージョンを産生した。pCMV H2 S241PおよびpTT5 VK3プラスミドを、Qiagen plasmid DNA Maxi kitにより精製した。CHO細胞を、無血清のCHO培地中で培養し、pCMV H2 S241P および pTT5 VK3 プラスミドでFreestyle トランスフェクション Max 試薬 (インビトロゲン) を用いてトランスフェクトした。

【 0 3 4 1 】

五日後、細胞培養上清を収穫し、3400 rpm、15 分間で遠心分離した。抗体タンパク質を、プロテイン A カラム (GE)を用いて精製した。

【 0 3 4 2 】

B. リガンドを有するキメラおよびヒト化IgG4 抗体ベクターのCHO細胞発現に至適化されたアミノ酸およびヌクレオチド配列

B1. 抗体 mAb GNbAC1のキメラおよびヒト化バージョンのタンパク質およびコドン至適化 (CHO 細胞発現に関して)ヌクレオチドの配列

B1.1 キメラGNbAC1

chGNb AC1 IgG4 成熟タンパク質に対応する配列は、配列番号61に表される。

【 0 3 4 3 】

chGNb AC1 LC 成熟タンパク質に対応する配列は、配列番号62に表される。

【 0 3 4 4 】

B1.2 ヒト化GNb AC1

huGNb AC1 IgG4 成熟タンパク質に対応する配列は、配列番号63に表される。

【 0 3 4 5 】

huGNb AC1 LC 成熟タンパク質に対応する配列は、配列番号64に表される。

【 0 3 4 6 】

10

20

30

40

50

B2. Gnb AC1のヒト化の軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列(プラスミド配列を含む) hu Gnb AC1 LCのヌクレオチド配列は、配列番号65に表される。huGnb AC1 IgG4HCのヌクレオチド配列は、配列番号67に表される。

【0347】

C. 選択されたヒト化 IgG4 リガンド(安定化およびコドン最適化ヒト化 IgG4 抗体ベクター)の結合活性のインビトロ相補分析

C1. 生化学的な抗体結合の分析。

【0348】

プロトコール:

バイカルボネート 50mM pH9.6 緩衝剤におけるENVの2h、37 °Cでのインキュベーション

PBS BSA 1%に希釈した抗体での1 h、室温での検出

二次抗マウス および 抗ヒト抗体ペルオキシダーゼ標識(ref 115-035-146 および ref 109-035-088, Jackson, USA)をPBS BSA 1%で1/1000希釈し、1h、室温でインキュベーションして検出。呈色は、OPD基質を添加することによりなされ、30min後 分光光度計で光学密度を読んだ(PBSでの洗浄工程を各工程の間に行った)。

【0349】

【表 19】

		ENV-T 7A 1ug/ml					
		抗 ヒト 109-035-088 Jackson 1/1 または抗 マウス 115-035-146 Jackson 1/1000					
		HuMAb GNbAC 1 Exp # 1	HuMAb GNbAC1 Exp # 2	GNbAC1 マウス SQ08AK111	GNbAC1 IgG1 キメラ Polymun パッチ3	GNbAC1 IgG4 キメラ Polymun パッチ3	2G5E12 マウス 080604CP01
MAbs 濃度	[ug/ml]	2,583	2,454	2,001	2,539	2,375	0,114
	0,5	2,458	2,694	1,854	2,54	2,493	0,041
	0,25	2,141	2,248	1,211	2,638	2,166	0,04
	0,125	1,848	1,897	0,945	2,442	1,806	0,043
	0,0625	1,316	1,578	0,585	2,508	1,66	0,041
	0,03125	0,729	0,894	0,406	1,979	1,259	0,073
	0,0156	0,501	0,52	0,166	1,274	0,777	0,042
	0,0078	0,286	0,324	0,13	0,85	0,474	0,043

10

20

		MAbs 1ug/ml					
		抗 ヒト 109-035-088 Jackson 1/1000 または抗 マウス 115-035-146 Jackson 1/1000					
		HuMAb GNbAC 1 Exp # 1	HuMAb GNbAC1 Exp# 2	GNbAC1 マウス SQ08AK111	GNbAC1 IgG1 キメラ Polymun パッチ3	GNbAC1 IgG4 キメラ Polymun パッチ3	2G5E12 マウス 080604CP01
ENV 濃度	[ug/ml]	2,576	2,602	2,221	2,519	2,67	0,053
	0,5	2,501	2,346	1,867	2,533	2,26	0,084
	0,25	2,183	1,719	1,418	2,273	2,296	0,087
	0,125	1,728	1,48	0,975	1,822	1,558	0,093
	0,0625	1,27	1,4	0,837	1,855	1,548	0,081
	0,03125	0,907	0,703	0,367	1,6	1,095	0,091
	0,0156	0,547	0,403	0,186	0,888	0,71	0,09
	0,0078	0,36	0,211	0,111	0,642	0,313	0,082

30

40

【 0 3 5 0 】

表19: GNb AC1 ヒト化抗体と標的タンパク質 MSR-ENVの用量反応の結合キネティクス

【 0 3 5 1 】

これらの結果は、二つの実験においてヒト化 IgG4 抗体が固定されたENV-タンパク質標的 および 抗体の連続希釈 (表の上部)または固定された抗体濃度 および 標的タンパク質希釈(表の下部)での再現性のある用量反応キネティクスを有することを明らかに示す。それらは同じ キメラ抗体 アイソタイプのもと同等(しかし、オリジナルのGNb AC1 抗

50

体よりも良い)であり、他方で無関係の対照抗体 (2G5E12) に関して有意な結合キネティクス (binding kinetics) は認められなかった。

【0352】

C2. PBMC反応検査

材料および方法: 例 6を参照されたい。

【0353】

【表20】

タンパク質	MAbs (10/1の比)	IL-6	IFN-g
		24h	72h
ENV (EN-T 10A 0.1ug/ml)	抗体なし	4363	-
	Hu-GNb AC1 # 1	2910	-
	GNb AC1 chim IgG4 バッチ 3	2274	-
ENV (ENV-SU 4A 0.5ug/ml)	抗体なし	-	336
	Hu-GNb AC1 # 1	-	46
	GNb AC1 chim IgG4 バッチ 3	-	384
ENVなし	-	695	13
LPS	-	26039	212

10

20

表 20 ヒト化およびキメラ IgG4 抗体ベクターの双方に挿入された GNb AC1 リガンドによる PBMC 培養における IL-6 および IFN- γ 炎症亢進性サイトカインの阻害。NB. ENV なしのバックグラウンドシグナルを示す (ENV なし)、細菌性の LPS により誘導された陽性対照を底部に示す

30

【0354】

これらの結果は、以下の事項の有意な阻害を証明する:

(i) 末梢血単核球培養 (完全 ENV タンパク質, ENV-T, 0.1 microg/lm で使用) における 24h でピークに達する MSR/V ENV タンパク質によるインターロイキン 6 (IL-6) 誘導は、ヒト化およびキメラ抗体の存在下で有意に阻害された。

【0355】

(ii) 末梢血単核球培養 (ENV タンパク質の表面断片, ENV-SU, 0.5 microg/lm で使用) における 72h でピークに達する MSR/V ENV タンパク質によるインターフェロン ガンマ (IFN- γ) 誘導は、ヒト化抗体の存在下で強く阻害されたが、キメラ抗体の存在下で阻害されなかった。従って、T-細胞活性化におけるヒト化抗体のキメラ化抗体と比較した改善効果が証明される。後者のキメラベクターにおいて、残りのマウスの VH および VL 鎖は、異種抗原 (フレームワークに移植されたマウスのタンパク質鎖) のヒト T-細胞認識をとおした有害な免疫活性化を誘発しえる。これは、ENV タンパク質と結合するリガンドの選択されたヒト化 IgG4 ベクターでは起こらない。この差は、IL-6 で 24h に認められない。というのも、ここでは特異的な抗原認識 (T-リンパ球での獲得免疫) を意味せず、先天免疫活性化のみを意味しているからであり、これは標的の免疫病原性の ENV タンパク質に結合した場合にリガンドによりブロックされる。

40

【0356】

例 15: 染色体 7q からの HERV-W エンベロープタンパク質 (シンシチン) および MSR/V 粒

50

子は、免疫およびアストロサイトの細胞に炎症促進性応答を誘発し、これは抗-MSRV-ENV 抗体 Gnb AC1及びそのキメラIgG4 構築物（リガンドを有する）により阻害される。

【0357】

ヒトにおける免疫病原性の特性と、これらの ENV タンパク質の生物学的効果との間の関連性が提起された。MSRV-ENV および シンシチンの配列は81%以上の配列同一性を共有するので(Mallet, Bouton et al. 2004; Mameli, Astone et al. 2007)、我々は、これらの二つの姉妹タンパク質が類似する炎症促進性効果を提示できるかどうかを調査した。末梢血単核球 (PBMCs) および 脳のアストロサイトにおける以前の研究は、それぞれMSRV-ENV またはシンシチンとの影響を示すので、我々は両方の細胞タイプで平行的な分析を行った。

10

【0358】

方法

タンパク質の調製 および 単離

例2を参照されたい。

【0359】

細胞の単離 および 調製

ヒト PBMCsを、健常ドナーのパフィーコート(Transfusion Center - HUG - Geneva)から Ficoll-Paqueに対する密度勾配遠心で単離した。

【0360】

ヒトのアストロサイトを、InVivogenに注文した。

20

【0361】

細胞刺激

PBMCs を、1 % 非必須アミノ酸、1 % ペニシリン/ストレプトマイシン、1% ナトリウム-ピルビン酸 および 10%の熱失活した FCS (BioWest)を添加したRPMI Glutamax 1640 (Invitrogen)からなる1 mlの培地中に1 X10⁶/ウェルの濃度で24または48-ウェルのプレートに播種した。細胞を、37 °C、5% CO₂で加湿した雰囲気中で24、48または72hインキュベーションした。

【0362】

細胞培養実験に関して、シンシチン、MSRV-ENV および LPS を、ENVに対する抗体(Gnb AC1 モノクローナル マウス IgG, GeNeuro)を有する100 µlの培地で1 h、4 °でプレインキュベートし、細胞に添加した。

30

【0363】

サイトカイン産生アッセイ

培養上清を24、48または72hで収穫し、-20 °Cで貯蔵し、ELISAでサイトカイン産生を評価した。ヒト サイトカインの検出のためBD BioscienceのOptEIA ELISA キットを製造者の指示にしたがって行った。

【0364】

結果

MSRV-ENV および シンシチンは、二つのHERV-W 関連タンパク質である。

【0365】

HERV-W シンシチン エンベロープ タンパク質 (アクセッション番号 NCBI AF072056.2)に 関連する生物学的特性とMSRV-ENV (アクセッション番号 NCBI AF331500.1)のものとを比較するため、我々は、本研究の類似する条件（例 2に記載される条件）下で二つのタンパク質を発現および産生させた。

40

【0366】

二つのHERV-W 関連タンパク質の生物学的効果を調査し比較するため、我々は、炎症促進性のサイトカインの誘導における効果を研究した。我々は、HERV-W ENV 関連タンパク質での刺激が炎症促進性のインターロイキン 6 (IL-6) アストロサイト応答を強くアップレギュレートすることを見出した。最も重要なことに、この刺激は、無関係の抗体（何れのENVにも結合しない）により影響されないが、Gnb AC1 マウスの 抗体により及びGnb AC1

50

ヒト キメラの IgG4により強く阻害された。この事項によって、抗体ベクターの何れかの形態における我々のリガンドがHERV-W ENV 関連バリエーションの炎症促進性効果 (MSRV-ENVのみではない) を阻害することが明瞭に実証された。

【 0 3 6 7 】

図 24において、この類似する生物学的効果の例は、各HERV-W ENV 関連タンパク質の存在下で培養上清に放出されるIL-6の量により明らかとされた。これは特異的な効果である。というのも、マウスまたはIgG4 キメラの抗体の形態でのGNb AC 1 リガンドによっても阻害されたからである。その結果、異なるHERV-W ENV 関連タンパク質におけるリガンドの類似する阻害効率が確認された。

【 0 3 6 8 】

アストロサイト細胞 (この細胞は局所性の脳傷害 および 炎症に關与する) に加えて、我々は、MSRV-ENV および シンシチンの両方の全身性の免疫効果を示す [これによりヒト末梢血単核球(PBMC、即ち、リンパ球および単球)培養において炎症誘発性サイトカインの産生が刺激される]。

【 0 3 6 9 】

図 25において、このPBMCにおける類似する生物学的効果の例が、両方のHERV-W ENV 関連タンパク質の培養上清における、IL12 P40の検出 (生得的な免疫応答の特性) により確認され、また同じ量のIL-6 放出により確認された。そのうえ、アストロサイトでの実験に関して、このIL-6 放出は、マウスまたはIgG4 キメラ抗体の形態でのGNb AC1 リガンドによっても特異的に阻害された。

【 0 3 7 0 】

例 16: MSRV-ENV および HERV-W ENV 7q/シンシチン タンパク質 (ヒト細胞のグリコシル化を有する) の双方に結合するGNb AC1 リガンド および組換え型の ヒト-キメラ IgG4 GNb AC1 抗体 および 前記リガンドを含んでいる ヒト化 IgG4 抗体。

【 0 3 7 1 】

1. 材料および方法:

a. ENVの細菌性の組換えタンパク質を、例 2に記載のとおり取得した。

【 0 3 7 2 】

b. ヒト グリコシル化 MSRV ENV タンパク質は、Geneuroに次の手順にしたがってP'X therapeutics (Grenoble, France) により生産された: HERV-W-ENV 類似タンパク質 (シンシチンと称される) を同じプロトコールで生産した。

【 0 3 7 3 】

ヒト細胞発現物からのENV グリコシル化精製タンパク質の生産プロセス。

【 0 3 7 4 】

トランスフェクション:

HEK-Freestyle 細胞を、 10^6 細胞/mLで播種し、293Fectin トランスフェクション 試薬を用いてEnv-MSRV_pMCMVHE/1でトランスフェクトした。

【 0 3 7 5 】

収穫 および 溶解:

トランスフェクションの三日後、細胞を収穫し、遠心分離した。細胞 ペレットを、溶解 緩衝剤 (抗-プロテアーゼを補充したPBS) に再懸濁し、細胞破壊を超音波処理で行った。

【 0 3 7 6 】

可溶化:

遠心分離後に、ペレットを可溶化 緩衝剤 (50mM Tris pH8, 100mM NaCl, 2M 尿素, 2% FOS-Choline10) に再懸濁し、一晚、+4 で攪拌下で可溶化した。

【 0 3 7 7 】

精製前の希釈: 次の日に可溶化したタンパク質を、希釈 緩衝剤 (50mM Tris pH8, 100mM NaCl) に4 倍に希釈し、精製前にホモジナイズした。

【 0 3 7 8 】

10

20

30

40

50

プール 1 EnvMSRV His tag 精製法: Ni セファロース アフィニティークロマトグラフィー

Ni セファロース アフィニティークロマトグラフィー (GE Healthcare, 4ml)を行ってHis タグを付けたEnv-MSRVを精製した。

【0379】

平衡緩衝剤: 50mM Tris pH8, 100mM NaCl, 0.5% FOS-Choline10, 0.5M 尿素。

【0380】

溶出緩衝剤: 50mM Tris pH8, 100mM NaCl, 0.5% FOS-Choline10, 0.5M 尿素, 1M イミダゾール。

【0381】

溶出工程: 0%から100%の溶出緩衝剤で30CVの勾配。

【0382】

プール濃度: Amicon カットオフ 30kDaを用いて7 倍

プール 2 EnvMSRV His tag 精製法: Ni セファロース アフィニティークロマトグラフィー

この第二のアフィニティークロマトグラフィーを、最初のものフロースルーを50mM Tris pH8, 100mM NaCl, 0.2% FOS-Choline10, 0.5M 尿素で希釈したものを出発原料 (= ロード)として用いて行った。

【0383】

平衡緩衝剤: 50mM Tris pH8, 100mM NaCl, 0.2% FOS-Choline10, 0.5M 尿素。

【0384】

溶出緩衝剤: 50mM Tris pH8, 100mM NaCl, 0.2% FOS-Choline10, 0.5M 尿素, 1M イミダゾール。

【0385】

溶出工程: 0%から100%の溶出緩衝剤で30CVの勾配。

【0386】

品質管理: SDS-PAGEで品質管理分析し、クーマシーブルー 染色し、GNb AC1 マウスの抗体を用いてウエスタン-プロット 分析した。N末のシークエンシングによって、精製タンパク質の同一性が確認された。

【0387】

バッチの透析 および 凍結

Env-MSRVの二つのバッチを、50mM Tris pH8, 100mM NaCl, 0.5%または0.2% FOS-Choline10に対して透析し、10%のグリセロールを付加し、液体窒素で凍結させた。

【0388】

C. ELISA検査での特異的な結合検出

ELSA マイクロプレートにおけるタンパク質のコートイングのため、全ての ENV 調製をCaCO2 緩衝剤 50mM pH9.6で希釈し、Elisa マイクロプレートウェル中で2h、37 °Cでインキュベーションした。生産量が低いため、被覆したシンシチンの濃度は、MSRV-ENVの濃度よりも低かった。

【0389】

検出抗体を、PBS BSA 1 %で希釈し、1 h、室温でトリプレートのマイクロプレートウェルでインキュベーションした。マウスのモノクローナルに関してペルオキシダーゼ-標識 抗-マウス 二次抗体(ref 115-035-14)並びにヒト化 および ヒト-キメラのリコンビナントに関して抗-ヒト二次抗体(ref 115-035-088)を、PBS BSA 1 % 緩衝剤で1/1000希釈し、1 h、室温でインキュベーションした。ペルオキシダーゼに関するOPD呈色を30minで行い、光学密度を490 nmで読んだ。各インキュベーション工程の間の洗浄は、それぞれ4, 4 および 6の洗浄サイクルで行った。

【0390】

2. 結果:

図 26に認められるとおり、MSRV-ENVの細菌性およびヒト-グリコシル化精製タンパク質調

10

20

30

40

50

製物の双方は、リガンドを有する全ての抗体タイプ（マウス、キメラおよびヒト化）により容易に検出され、照度計の光学密度測定において良好なシグナルを生じた。興味深いことに、本ELISA条件において、ヒト化抗体 GNB AC1 リガンドのみがヒトグリコシル化シンシチンの良好な認識を生じ、他方で本コーティング濃度でマウスおよびキメラの抗体はシンシチンで低いシグナルを生じた。

【0391】

これらの結果は、標的エピトープへの結合に使用される分子ベクター（マウス、キメラ IgG4またはヒト化 IgG4 抗体）がなにも本発明のリガンドが、エピトープを含んでいる全ての形態の標的タンパク質に効率的に結合することが認められることを明らかに示している（即ち、両方の細菌性およびヒトのグリコシル化 ENV タンパク質および、特にヒト化抗体で、両方のHERV-W 関連タンパク質、MSRV-ENV および HERV-W 7q ENV タンパク質、シンシチンとも称される）。

10

【0392】

従って、治療上のリガンドは、標的 ENV タンパク質のヒトグリコシル化形態に結合する。

【0393】

例 17: MSRV ENVにより誘発された精神分裂病の行動異常の動物モデルにおいて治療効果を有するIgG4 アイソタイプのGNB AC1 キメラ抗体のインビボ分析

1. イントロダクション

例 8において、我々は、精神分裂病の患者の血清におけるMSRV-ENV タンパク質の存在を実証した。この結果は、適切な動物モデルにおけるENV タンパク質の存在および脳の変化および行動性の欠陥の出現の間の関連性を探索する必要性を強調する。精神分裂病の神経発達の理論は、この疾患が臨床的に現れるずっと以前の一次的な原因の行動性転帰（behavioral outcome）であることを仮定する（Weinberger and Lipska, 1995; Lewis and Levitt, 2002）。

20

【0394】

従って、この生理病理学の特性は、精神分裂病-関連障害を模倣する適切な動物モデルのデザインを考慮しなければならない。

【0395】

II. 実験 1: 初期成人期（early adulthood）にENV-誘発性の免疫プライミングを受けたラットにおけるENV タンパク質の一側性の脳室内の反復注射後の行動学的および解剖学的な変化におけるIgG4 キメラ抗体の効果

30

A. 材料および方法

1. 動物

雄のSprague-Dawleyラット（6 ~ 8 週齢）（n=8）を、Charles River（Charles River, France）から購入した。動物を、3/ケージで標準光源で暗期サイクルを維持し、食物および水に自由に摂取させ、8-日の順化期間で平静にさせた。全ての処置は、1986年11月24日のEuropean Communities Council Directive（86/609/EEC）および1987年10月のNational Council Directive（87848, "Ministere del'Agriculture et de la Foret", France）を満たす。使用される動物の数および彼等の苦痛を最小化するためできうる限り努力した。

40

【0396】

2. ENV-誘発性の免疫プライミング

第一日〔「ポイント0」(P0)と称される〕、ラットを、無作為にリン酸緩衝塩類溶液(PBS)（Lonza, France）の注射のsham-注射群(n=2)およびPBSに溶解された250 ngの組換え型のENV タンパク質（His-ENV-081206-1, PX' Therapeutics, France）の注射のENV-注射群（n=6）に割り当てた。

【0397】

各ラットを、キシラジン 10 mg/kg（Rompun（登録商標）, Alcyon, France）およびケタミン 80mg/kg（Imalgene（登録商標）, Alcyon, France）の混液のi.p. 投与で麻酔した。

50

耳の間から目の直前にわたる領域を剃毛した。耳栓を挿入し、動物を定位脳手術装置に耳内線 (intra-aural line) の上方5 mmで上顎切歯で固定した。剃毛した頭皮領域を、クロルヘキシジン-ベースの消毒液 (Alcyon, France) で拭き、耳の間から目の間のポイントで切開した。皮膚を鉗子で後退させ、基礎 (骨膜を含む) の組織を除去して明らかなドライ・スカル (dry skull) の領域 (約15 x 18 mm) を暴露させた。

【0398】

プラスチック カニューレ (o.d. = 0.457 mm および i.d. = 0.267 mm) (Plastic One, USA) は、右側脳室にインプラントすることを意図された。カニューレを定位固定装置にマウントし、チップをブレグマ (bregma) でゼロにあわせた。頭蓋から側脳室にドリルして孔を開けた [ブレグマに対して、前後 (antero-posterior), 0.92 mm; 中外 (medio-lateral), ± 1.7 mm]。カニューレの先端を中央の孔をこえて配置し、チップが頭蓋の表面に存在するようにした。カニューレを、大脳皮質をとおして3.5 mm側脳室に下げた。

10

【0399】

ラットに対し、PBS 単独のまたはENV タンパク質をともなう注射を、カニューレのチップに配置され、0.5 mm下部に突出しているステンレス・スチール注射器を介して達成した。注射器をポリテチウブでハミルトン シリンジ (VWR, France) に連結して手動で溶液を3-minの期間分配した。注射器を放出の完了の3 min後に戻して、注射経路に沿ってPBSまたはENV タンパク質が流れることを予防した。

【0400】

創傷を、持針器と縫合糸を用いて閉塞した。動物を個々のケージにおいて2日間回復させた。次に、動物を、無作為に三匹/ケージで飼育し、さらなる実験まで平静にさせて維持した。

20

【0401】

3. 潜時期間後のENV タンパク質の一側性の脳室内の反復注射
八月後に、反復性の脳室内 (icv) 注射を可能にする頭蓋カニューレを、全てのラットにインプラントした。

【0402】

手術の日 (P0)、各ラットを、キシラジン 10 mg/kg (Rompun (登録商標), Alcyon, France) および ケタミン 80mg/kg (Imalgene (登録商標), Alcyon, France) の混液のi.p.投与で麻酔した。耳の間から目の直前にわたる領域を剃毛した。耳栓を挿入し、動物を定位脳手術装置に耳内線 (intra-aural line) の上方5 mmで上顎切歯で固定した。剃毛した頭皮領域を、クロルヘキシジン-ベースの消毒液 (Alcyon, France) で拭き、耳の間から目の間のポイントで切開した。

30

【0403】

皮膚を鉗子で後退させ、基礎 (骨膜を含む) の組織を除去して明らかなドライ・スカル (dry skull) の領域 (約15 x 18 mm) を暴露させた。三つの孔をドリルした (二つは頭蓋の右および左側の双方でブレグマの約7 mm 前側、第三の孔はブレグマの7 mm後側)。ナイロンのネジ (直径 = 0.50 mm) (Plastic One, USA) を、孔にしっかり合わせ、デンタルセメント (dental cement) のアンカーとして機能させた。これらの処置中に硬膜が保護されるよう注意した。プラスチック カニューレ (o.d. = 0.457 mm および i.d. = 0.267 mm) (Plastic One, USA) は、右側脳室にインプラントすることを意図された。カニューレを定位固定装置にマウントし、チップをブレグマでゼロにあわせ、ゼロのマークの0.92 mm 後側、1.7 mm外側にポイントをマークした。このマークの部位をドリルして孔をあけた。カニューレの先端を中央の孔に配置し、チップが頭蓋の表面に存在するようにした。カニューレを、大脳皮質を介して3.5 mm右側脳室に下げた。定位脳手術装置のチャック (chuck) に保持されたカニューレで少量のデンタルコーク [Paladur (登録商標), Heraeus Kulzer, France] をカニューレおよびアンカーネジの周囲に配置した。創傷を、持針器と縫合糸を用いて縫合した。デンタル材 (dental material) をセットした際にマウンティング針を抜き、動物を定位固定装置から解放した。

40

【0404】

50

PBSまたはENV タンパク質の注射を、頭蓋カニューレの移植の同日 (P0)および25 日後 (P25)に行った。

【 0 4 0 5 】

各時点で、PBS 単独のまたは250 ngの組換え型の ENV タンパク質 (His-ENVT-081206-1, PX'Therapeutics, France)を、カニューレのチップに配置し、0.5 mm下部に突出しているステンレス・スチール注射器を介して投与した。注射器をポリテフロン製でハミルトン シリンジ (VWR, France)に連結して手動で溶液 (3 μ l) を3-minの期間分配した。注射器を放出の完了の3 min後に戻して、注射経路に沿ってPBSまたはENV タンパク質が流れることを予防した。

【 0 4 0 6 】

4. IgG4 キメラ抗体の全身投与

ENV タンパク質の第二のリコールの翌日 (P26)、ENV-注射ラットを無作為に選択してPBS (n=3)または100 μ gのIgG4 キメラ抗体 (PBSに希釈) (n=3)の単回の腹腔内 (i.p.) 注射を投与した。

【 0 4 0 7 】

5. インビボ磁気共鳴映像法 (MRI)

ラットの脳の形態を、インビボ MRIでP12 および P37に検査した。ラットを、最初に承認されたシステム (TEM Sega, France)でイソフルラン 3% 吸入を0.6 l/min 空気、30% 酸素の流量を用いて麻酔した。導入後、麻酔をイソフルラン ガスを1.5 ~ 2% および 0.6 l/min の流量で維持した。体温を、循環水加熱パッド (circulating water heating pad) を用いて制御し、 37 ± 1 に維持した。呼吸数を、実験をとおしてモニターした。ラットを、定位固定器 [トウスポー (tooth bar) およびイヤープイン (ear pins)] を備えたプラスチック ベッド (Bruker Biospec Animal Handling Systems, Germany)に腹臥位に配置した。22-ゲージの静脈内カテーテルを、続く注射のためにラットの尾静脈に配置した。

【 0 4 0 8 】

スキニングを、400mT/m グラディエントセットを備えたBruker 7T Biospec システム (Bruker, Germany)で送信コイル (transmitting body coil) (o.d. =112 mm および i.d. = 72 mm)を用いて行った。そして、25 mm直径の表面コイルを、シグナル受信に使用した。最初に三つの直交方向の急速なグラジエントエコーローカライザーおよび5 cm視野で脳領域を識別し、次のスキニングのための固定空間座標の計算を可能とした。軸平面における緩和促進 (RARE) シークエンスで二の迅速な獲得を行った。最初のT2強調イメージを、スピン-エコー パルス シークエンシングで4200 msの繰り返し時間 (TR), 36 msのエコー時間 (TE)の単一エコー, 35714 Hz レシーババンドを用いて4 minのスキニング時間で取得した。第二のT2強調イメージを、スピン-エコー パルス シークエンシングで3000 msのTR, 17 ms および 51 msのTEの二のエコー, 55555 Hz レシーババンドを用いて5 minのスキニング時間で取得した。双方のシークエンスに関して、トータルで30 スライス(800 μ m 厚)を、2.56 cmの視野で256 x 256のアクイジション マトリックス サイズ (acquisition matrix size) で取得し、面内の分解能は100 x 100 μ mとなった。

【 0 4 0 9 】

ENV タンパク質を注射したラットにおける脳髄膜 (cerebroveningeal) および脳室関門 (cerebroventricular barriers) の動力学を評価するため、ガドリニウム-増強MRI法 (gadolinium-enhanced MRI method) を使用した。冠状の造影前T1-強調イメージ (Coronal precontrast T1-weighted images) を、高速低角度ショット (FLASH: fast low angle shot) シークエンスおよび繰り返し時間/エコー時間 = 2.2/1.4 msで取得した。トータルで30 スライス(800 μ m 厚)を、2.56 cmの視野で256 x 192のアクイジション マトリックス サイズで取得し、面内の分解能は100 x 133 μ mとなった。その後、動物は、ガドリニウム 0.5 M (Dotarem (登録商標), Guerbet, France) (1 mL/kg 体重)のボラス注射を接種された。造影後T1スキニング (Postcontrast T1 scanning) を、上記と同じ条件でガドリニウム投与後の10 minに行った。

10

20

30

40

50

【0410】

6. 行動性の分析

P15 および P40でPC コンピュータに連結した自動化デジスキャン装置 (Imetronic, Pessac, France) を用いてラットの自発運動活性を試験した。自発運動活性を床の上0.7 cmに配置した四つの平行な水平方向の赤外ビームのアレイ(二つは前部、二つは背部)を備えた光電セル試験ケージ (photocell testing cage) でモニターして水平方向の活動を測定した。ビーム遮断 (beam breaks) の数を自動的に記録した。水平方向の活動を、ケージ越え (即ち、ケージの何れかの側での連続的な遮断) の用語で表した。ケージ越えの数を、10-minのインターバルで連続的に記録し、蓄積した。

【0411】

全てのラットに関して、自発運動活性を穏やかなストレス条件(即ち、新規の環境への曝露後またはi.p. 塩類溶液注射後)において及びアンフェタミンチャレンジにおいて評価した。これらの全ての試験を、不活性期(明期)の間に行った。新規性の検査に関して、ラットをホームケージから出して、個々の光電セル試験ケージに配置し、自発運動活性を1h測定した。次にラットは、塩類溶液注射 (1 mL/kg, i.p.)を投与され、彼等の自発運動活性を付加的な一時間でモニターした。最終的に、動物は、D-アンフェタミン (硫酸塩 1.5 mg/kg, i.p., Sigma Aldrich, A-5880, バッチ 90K3354)を注射され、彼等の活性を付加的な二時間で記録した。

【0412】

B. 結果

1. インビボ磁気共鳴映像法

a) ENV タンパク質の最初のリコール注射後

P12の殆どの動物のT2強調イメージの定性分析によって、側脳室に対応する大きいハイパーシグナル (hypersignals) が明らかとされた。未処置ラットの脳の古典的なMRIイメージと比較して、これらの本研究に認められるハイパーシグナルの拡大は、対応する動物における側脳室の腫脹を示唆した。そのうえ、右側脳室(即ち、注射した部位)の強い拡大が、shamおよびENV-注射動物の双方において観察された。ENV タンパク質を注射された動物で観察された側脳室に対応するハイパーシグナルの程度はPBSを注射された動物のものと異なり、ENV タンパク質が神経炎症プロセスを惹起することを示唆している。

【0413】

ガドリニウム注射の前後で取得されたT1-強調イメージの比較によって、PBSまたはENV タンパク質の何れかで注射された動物における差が明らかとされた。これらの結果は、脳髄膜および脳室関門がENV タンパク質の脳室内 (icv)注射後12 日に変更できることを示唆する。

【0414】

b) ENV タンパク質の二番目のリコール注射後

ENV タンパク質のリコール注射後の記載のように、二番目のリコール注射 (P37) の後に取得されたT2強調イメージの定性分析によって、多くの動物の側脳室に対応する大きいハイパーシグナルが明らかとされた。shamラットにおいて、二つのタイムポイントの間の側脳室に対応する有意なハイパーシグナル (脳の側脳室内のMRIにより通常視覚化される脳脊髄液の正常なバックグラウンドシグナルをこえるシグナルの増加を考慮した) を我々は検出しなかった。ENV-注射ラットは、これらの二番目の注射の後に著しいハイパーシグナルの強い拡大を呈した。さらに有意な事象として、ハイパーシグナルは、周囲の構造 (特に、海馬) に広がった。IgG4 キメラ抗体で処理されたENV-注射ラットで得られたMRIイメージによって、側脳室に対応するハイパーシグナルの強い拡大が明らかとされた。

【0415】

興味深いことに、海馬のような周囲の構造における、これらのT2強調ハイパーシグナルの伸展は、IgG4 キメラ抗体で処理されたENV-注射ラットに限定された。抗体は中枢神経系 (CNS) の末梢に注射されたので(腹腔内)、この後者のポイントは次の事実を強調している：つまり

10

20

30

40

50

1- 本件の動物モデルに使用される特定のプロトコール (MSRV ENV タンパク質の直接の icv 注射を意味する) に排他的に関連する脳室の即時型の炎症促進性効果は、ENV icv 注射後 (従って、局所性の脳室の炎症の開始後) の24h以上で注射されたIgG4 キメラ抗体リガンドにより即時に阻害されない。局所性の脳室の炎症は精神病の病因の主要な特性ではなく、おそらく本モデルにおいて神経行動学の問題が関与していないことは明らかであるに違いない。以上より、この即時型のicv後の局所炎症は、本モデルの副次的な作用 (side-effect) と考えられる。

【0416】

2- 精神病の発現と関連することが知られている関連性のある特性 (例えば、海馬の病因の関与) は、CNS と距離をおいたCNSの末梢におけるENV icv 注射後に注射されたヒト-キメラ IgG4 抗体の形態での本発明の治療リガンドで注射されたラットにおいて阻害された。この事項は、脳室から海馬の重要な脳領域のMRIにより観察されたハイパーシグナルの伸展の阻害により確認された。

10

【0417】

ガドリニウム注射の前後で取得されたT1-強調イメージの比較によって、全ての群における任意の見かけ上の差は明らかとされなかった。これらの結果は、脳髄膜および脳室関門がENV タンパク質の二番目のリコール注射後にさらに変更されたとはおもわれなことを示唆する。

【0418】

この第一のセットの実験において、ENV タンパク質の二回のicvのリコール注射によって、初期成人期にENV-誘発性の免疫プライミングを受けたラットの脳室および海馬の領域において神経炎症プロセスを導くことができることを我々は初めて示した。著しい事象として、海馬の解剖的および機能的な損傷は、ニューロンの欠損および脳室の拡大と関連する長期の認知の減退を有する精神分裂病の患者で報告されたMRI研究と一致している (Bornstein et al., 1992)。興味深いことに、ENV タンパク質の反復したりコール注射により誘導された海馬のダメージは、ENV-誘発性の病因の誘導後にヒト キメラ IgG4 抗体の投与で阻害された (これは精神分裂病の前臨床モデルにおける本キメラ抗体の製剤で投与された際のリガンドの治療効果と一致する)。

20

【0419】

III. 実験 2: ラットの海馬または側脳室におけるENV タンパク質の単回の両側性注射に続く神経行動学的な損傷の評価

30

A. 材料および方法

1. 動物

雄のSprague-Dawleyラット (6 ~ 8 週齢) (n=6)を、Charles River (Charles River, France) から購入した。動物を、3/ケージで標準光源で暗期サイクルを維持し、食物および水を自由に摂取させ、8-日の順化期間で平静にさせた。全ての処置は、1986年11月24日のEuropean Communities Council Directive (86/609/EEC) および1987年10月19日のNational Council Directive (87848, "Ministere de l'Agriculture et de la Foret", France) を満たす。使用される動物の数および彼等の苦痛を最小化するためできる限り努力した。

40

【0420】

2. 海馬または側脳室におけるENV タンパク質の両側性注射

手術の日 (P0)、ラットを、無作為にPBS (Lonza, France)の注射のsham-注射群 (n=2) およびPBSに溶解された250 ngの組換え型のENV タンパク質 (ENVT, バッチ081206-1, PX'Therapeutics, Grenoble, France)のicv (ENV-icv ラット, n=2)または海馬内 (ENV-hipp ラット, n=2) 注射の二試験群に割り当てた。

【0421】

各ラットを、キシラジン 10 mg/kg (Rompun (登録商標), Alcyon, France) および ケタミン 80mg/kg (Imalgene (登録商標), Alcyon, France)の混液のi.p. 投与で麻酔した。

50

【0422】

耳の間から目の直前にわたる領域を剃毛した。耳栓を挿入し、動物を定位脳手術装置に耳内線 (intra-aural line) の上方5 mmで上顎切歯で固定した。剃毛した頭皮領域を、クロルヘキシジン-ベースの消毒液(Alcyon, France)で拭き、耳の間から目の間のポイントで切開した。皮膚を鉗子で後退させ、基礎(骨膜を含む)の組織を除去して明らかなドライ・スカル(dry skull)の領域(約15 x 18 mm)を暴露させた。

【0423】

プラスチック カニューレ (o.d. = 0.457 mm および i.d. = 0.267 mm) (Plastic One, USA)は、側脳室または海馬に両側性にインプラントすることを意図された。カニューレを定位固定装置にマウントし、チップをブレグマ(bregma)でゼロにあわせた。頭蓋から側脳室〔ブレグマに対して、前後, 0.92 mm; 中外, ± 1.7 mm〕または海馬〔ブレグマに対して、前後, 4.8 mm; 中外, ± 5.0 mm〕に両側性にドリルして孔を開けた。カニューレの先端を中央の孔に配置し、チップが頭蓋の表面に存在するようにした。カニューレを、大脳皮質を介して3.5 mm側脳室に又は7.5 mm海馬に下げた。

10

【0424】

ラットに対し、PBS 単独のまたはENV タンパク質をともなう注射を、カニューレのチップに配置され、0.5 mm下部に突出しているステンレス・スチール注射器を介して達成した。注射器をポリテフロンでハミルトン シリンジ (VWR, France)に連結して手動で溶液を3-minの期間分配した。注射器を放出の完了の3 min後に戻して、注射経路に沿ってPBSまたはENV タンパク質が流れることを予防した。

20

【0425】

創傷を、持針器と縫合糸を用いて縫合した。動物を個々のケージにおいて2日間回復させた。次に、動物を、無作為に三匹ノケージで飼育し、さらなる実験まで平静にさせて維持した。

【0426】

3. 行動の分析

ラットの自発運動反応を、新規刺激、塩類溶液注射および拘束ストレスの三つのパラダイムを用いたオープン・フィールドの穏やかなストレス条件で試験した。新規刺激への自発運動反応をP5, P6, P7, P11 および P12で試験し、塩類溶液注射 および 拘束ストレスの後の自発運動活性をそれぞれ一度P11 および P13で試験した。

30

【0427】

オープン・フィールド装置は木製の正方形の箱(80x75cmx40 cm)からなり、薄暗い照明をつけた。オープン・フィールドの床を、同一サイズの九つの平方ゾーンに分けた。新規刺激の検査に関して、ラットを個々にオープン・フィールドの中央に配置し、フィールドを5min探索させた。次に、ラットを彼等のホームケージに戻させた。動物の間の活動領域(arena)を塩類溶液で洗浄した。P11での塩類溶液注射の検査に関して、ラットは塩類溶液注射{1 mL/kg, i.p.}を接種され、直ちにオープン・フィールドのセンターに配置されて、フィールドを5min探索させた。拘束ストレス検査に関して、動物を、プレクシグラスチュウブ(5.5 cmx21 cm)での15 minの固定で拘束し、直ちにオープン・フィールドのセンターに配置されて、フィールドを5min探索させた。

40

【0428】

全ての検査に関して、実験者は、各動物の行動を観察した。全体の水平方向の運動活動を、5min-間のラインを越えた数として定量した。さらに、立ち上がりの数(空気中で又は壁に対して後肢で前肢を上にあげること)を、0 = 非存在, 1 = 極少数, 2 = 中等度, 3 = 高度, 4 = 超高度でスコアをつけた。

【0429】

B. 結果

1. 新規刺激への自発運動反応

全てのタイムポイントに関して、新規刺激への曝露後に、全てのラットは、5-minの間オープン・フィールドにおいて高い程度で水平および垂直方向の自発運動活性を呈

50

した。

【0430】

異なる実験のタイムポイントでの新規性検査の全体の結果は、図 27に示される。全ての ENV-注射動物において、水平方向の自発運動活性の増加は、注射 (P5)後の早期に存在しないが、特に海馬に注射されたラット(ENV-hipp ラット) (図 27A)で次第に時間ともない出現する。興味深いことに、ENV-hipp ラットのみが、P12で持続性の水平方向の運動の悪化を呈する。さらにまた、垂直方向の自発運動活性の増加は、ENV-hipp ラットにおいてP5 および P6で検出されたが、sham動物との差はENV-icv ラットで同じタイムポイントで報告されなかった。

【0431】

2. 塩類溶液注射後の自発運動活性

塩類溶液注射への曝露後、全てのラットは、5-minの期間の間にオープン・フィールドにおいて高い程度で水平および垂直方向の自発運動活性を呈した。

【0432】

ENV-hipp ラットのみが、sham動物と比較して水平方向の自発運動活性の明らかな増加を示したが(図 28A)、全ての群の垂直方向の自発運動活性は類似していた(図 28B)。

【0433】

3. 拘束ストレス後の自発運動活性

拘束ストレスへの曝露後、全てのラットは、5-minの期間の間にオープン・フィールドにおいて高い程度で水平および垂直方向の自発運動活性を呈した。水平および垂直方向の活性の双方に関して、ENV-hipp ラットは、sham動物と比較して高い自発運動活性を示したが、sham およびENV-icvラットの間に明らかな差は検出されなかった(図 29)。

【0434】

この第二の系列の実験において、我々は、側脳室または海馬におけるENV タンパク質の単回の両側性注射が穏やかなストレス条件への感受性の悪化を導きえることを示した。そのうえ、行動の変化は、ENV-Hipp ラットにおいて有意に重篤で持続性であることが示された。加えて、拘束ストレスチャレンジへの異常な自発運動反応は、ENV-Hipp ラットでのみ観察された。ラットのENV タンパク質の両側性の海馬注射によって、前臨床モデルで精神分裂病の治療を研究するためのicv-注射モデルよりも関連性のあるモデルが提供される。

【0435】

それゆえ、さらに我々は、この至適化モデルにおけるヒト-キメラの IgG4 リガンドの治療効果を評価した。

【0436】

IV. ラットの海馬におけるENV タンパク質の単回の両側性注射に続く神経行動学的な精神病性の症状におけるキメラ IgG4 リガンドの治療効果の評価。

【0437】

A. 材料および方法

1. 動物

本例のパートIIIと同じ。

【0438】

2. 海馬または側脳室におけるENV タンパク質の両側性注射

本例のパートIIIと同じである(以下の記載のとおり特定の動物における抗体の付加的な注射)。

【0439】

ラットに対し、各溶液(PBS, ENVおよびIgG4)をとまなう注射を、カニューレのチップに配置され、0.5 mm下部に突出しているステンレス・スチール注射器を介して達成した。注射器をポリテンチュウブでハミルトン シリンジ (VWR, France)に連結して手動で溶液を3-minの期間分配した。注射器を放出の完了の3 min後に戻して、注射経路に沿ってPBSまたはENV タンパク質が流れることを予防した。IgG4-処理ENV ラットに関して、2 ugの抗体

10

20

30

40

50

をENV タンパク質の注射後10 分間で両方の半球に同じ座標で輸液した。創傷を、持針器と縫合糸を用いて縫合した。動物を個々のケージにおいて2 日間回復させた。次に、動物を、無作為に 三匹/ケージで飼育し、さらなる実験まで平静にさせて維持した。

【 0 4 4 0 】

3. 結果

これらの結果によって、図 31AにおいてP12に関して説明される例のとおり、穏やかなストレス条件への感受性の悪化をともなうENV タンパク質の海馬における定位固定注射の以前の実験の再現が最初に提供された。

【 0 4 4 1 】

驚くことに、12 日 (P12)の後に動物の追跡をやめた以前の実験では認められなかった、(無処置の) ENV+ ラットの行動の変化が示され、穏やかなストレスに対する高反応性 (P12でなおも観察された) から本群でP32で観察された低反応性〔硬直 (freezing)〕 (図 30Aのヒストグラムにおいて中央のバーで表される) への有意な進展を有することが示された。32日でのIgG4 リガンドの治療効果における更なる結果とは別に、この観察は非常に興味深い。というのも、血液中で上昇したENV 抗原血症 および CRP(例 8で確認された)の存在と相関することが同定されたヒトの精神分裂病のサブタイプの自然な臨床経過の鍵となる特性を再現するからであり: つまり、陽性の症状(本動物モデルに対するストレスへの高反応性)により特徴づけられる早期フェーズの後の認知の減退およびニューロンの欠損と関連する「陰性の症候性フェーズ」 (本動物モデルに対するストレスへの低反応性)の出現である。

【 0 4 4 2 】

実際、この事項は、典型的に一次の ENV icv 注射後9 月でとられたラットの脳の本研究の間に行われたMRI観察のように脳室の拡大で確認できるニューロン欠損と関連する後の影響である。興味深いことに、この事項は本実験でのような適切な行動試験により客観的に定量されていないが、これらのラットは長い遅延の間に顕著な低応答性を進行性に進展した(これは主観的であるが、常に観察された)。

【 0 4 4 3 】

定量的な適切な試験で、この「陽性の症状 (positive symptoms)」から「陰性の症状 (negative symptoms)」へのシフトは、SHAM対照に対して海馬にENV タンパク質を注射された動物のP32での拘束ストレスでの第二の検査により確認された(図 30B)。このように平行したMSRV ENV タンパク質の注射後、IgG4 リガンドで処理された類似する動物において今回報告される治療効果の有意性および重要性が強調される。

【 0 4 4 4 】

図 31Aで認められるとおり、IgG4で処理された"ENV+" 動物は、この認知の減退をP32でのこの行動の低反応性 ("硬直")の出現とともに発生せず、このタイムポイントでSHAM対照と区別することはできなかったが(ヒストグラムにおいてオーバーラップするエラーバーにより説明される)、他方でこの差は非処理動物で有意であった(ヒストグラムにおけるエラーバーの重複なし)。再び、拘束ストレス後の第二の行動検査は、IgG4 リガンドで処理した"ENV+" ラットおよび無処置動物の間の差(二群間の結果の差は大きい)を再現し、無処置の"ENV+" 動物が有意に処理動物と比較してほとんど半分まで減少した活性を有し、後者はSHAM対照と区別不可能な結果を有していた(図 31 B)。

【 0 4 4 5 】

従って、上昇したCRP 血清レベルを有する精神分裂病のサブタイプは、例 8においてMSRVと関連することが同定され、また後期フェーズの認知の減退およびニューロンの欠損と関連する「陰性の総体症状 (negative symptomatology)」により特徴付けられ、IgG4 リガンドでの処置の前臨床モデルにおける有益な治療効果の証拠は予想外に係る劇的な総体症状で確認された。MSRV ENV 注射がこのモデルにおいて関連性のある病原プロセスを開始させた後、これにより精神分裂病の係る形態における本発明のリガンドの僅かな治療効果が確認される (Dickerson, F., C. Stallings, et al. 2007)。

【 0 4 4 6 】

10

20

30

40

50

例 18: ヒトリンパ腫細胞を移植された癌の動物モデルにおいて治療効果を有するIgG1 アイソタイプのGNb AC1 キメラ抗体のインビボ分析

I. 実験 I: ヌードマウスの皮下に注射したヒト B-リンパ腫細胞の遊走におけるIgG1 キメラの GNb AC1 抗体の効果

A. 材料および方法

1. 動物

病原体フリーの雌のヌードマウス(6 ~ 8 週齢)(n=4)を、Charles River (Charles River, France) から購入した。動物を、同じケージで標準光源で暗期サイクルを維持し、食物および水を自由に摂取させ、8-日の順化期間で平静にさせた。全ての処置は、1986年11月24日のEuropean Communities Council Directive (86/609/EEC) および1987年10月19日

10

【0447】

2) 細胞培養

Akata 細胞株は、パーキットリンパ腫を罹患した患者から由来するエプスタインバーウイルス陽性の細胞株である。前記細胞株を、10% ウシ胎児血清 (Gibco (登録商標), Invitrogen, France), 40 Uのペニシリン/ml および 50 ugのストレプトマイシン/mlを添加したRPMI 1640 培地(Sigma, France)で、37 °C、5% CO₂の加湿した雰囲気

【0448】

20

3. 細胞注射および抗体投与

P0 (一日)で、 15×10^7 リンパ腫細胞を、ヌードマウスの皮下に注射した。6h-遅延後に、二匹の対照マウスはi.p.注射でリン酸緩衝塩類溶液(PBS) (Lonza, France)、一匹のマウスはIgG1 キメラ抗体 (100 μg/動物)のi.p.注射を接種された。最後のマウスは、同じ抗体で同様にリンパ腫細胞の注射後72hで処理された。

【0449】

4. 組織学的な検査

P19で全てのマウスを、過量のペントバルビタールで屠殺し、解剖して解剖病理学的な異常の存在を評価した。写真を、デジタルカメラ [モデル Coolpix S500 (即ち、7 百万ピクセル), Nikon, France]でとり、カメラからPCコンピュータに転送した。

30

【0450】

B. 結果

予想外に、可視の皮下組織の塊(腫瘍)は無処置マウスにおいて検出できなかったが、双方のIgG1-処理マウスは局所的に注射の部位で塊を示した。

【0451】

剖検で、我々は、双方の対照マウスで強い脾腫大 (splenomegaly) を観察したが、双方のIgG1-処理マウスは脾臓の巨視的な変化を示さなかった。脾臓の拡大を良好に見積るため、脾臓指標 (splenic index) を[(脾臓重量/体重) x 100]と計算した。興味深いことに、無処置のヌードマウスは、IgG1-処理ヌードマウスの増加と比較して、脾臓/体重比の2倍の増加を提示した(図 32に示す)。そのうえ、軽微な肝臓の拡大が、IgG1-処理マウスと比べて対照マウスにおいても視認することができた。他の器官(心臓, 肺, 腎臓, 脳, 腸 および 胃)の巨視的な検査によって、主要な異常は明らかとされなかった。

40

【0452】

C. 考察

この第一の実験において、我々は、ヌードマウスにおけるリンパ芽球腫細胞の皮下注射がリンパ器官においてリンパ腫細胞の播種 (dissemination) を導くことができ(強い脾腫大で確認された)、他方でインサイチューで注射された細胞はほとんど全て移動したと思われることを示した。キメラ IgG1-処理マウスにおいて、インサイチューで限局された局所的に注射されたリンパ腫細胞塊の残留と関連した脾臓拡大が非存在であることを我々は報告した。

50

【0453】

本データによると、IgG1 キメラ GNB AC1 抗体は、そのリガンドの効果でリンパ腫細胞の遊走を阻止したにちがいない。以上、これらの結果は、本発明のリガンドを含んでいるIgG1 キメラ抗体がENV-陽性ヒト腫瘍の処置において有用な治療上の道具であり得ることの説得力のある証拠である。

【0454】

II. 実験2: SCIDマウスモデルにおけるIgG1 キメラ 抗体の形態でのMSRV-ENV 結合リガンドの注射後のインビボでのヒト B-細胞リンパ腫に対する細胞毒性の証拠

A. 材料および方法

1. 動物

病原体フリーの雌のSCID (重症複合免疫不全症; 機能的な T および Bリンパ球を欠き、NK集団が低下) マウス (6~8 週齢; n=5) を、Charles River, Franceから購入した。動物を、同じケージで標準光源で暗期サイクルを維持し、食物および水を自由に摂取させ、8-日の順化期間で平静にさせた。全ての処置は、1986年11月24日のEuropean Communities Council Directive (86/609/EEC) および1987年10月19日のNational Council Directive (87848, "Ministere del'Agriculture et de la Foret", France) を満たす。使用される動物の数および彼等の苦痛を最小化するためできる限り努力した。

【0455】

2) 細胞培養

リンパ腫の細胞株は、パーキットリンパ腫を罹患した患者から由来するエプスタインバーウイルス陽性の細胞株である。Akata細胞株を、10% ウシ胎児血清 (Gibco (登録商標), Invitrogen, France), 40 Uのペニシリン/ml および 50 ugのストレプトマイシン/mlを添加したRPMI 1640 培地 (Sigma, France) で、37 °C、5% CO₂の加湿した雰囲気で維持した。

【0456】

3. 細胞注射および抗体投与

最初の日のP0に、 15×10^7 Akata リンパ芽球腫細胞(LC)を、全ての SCID マウスの腹腔内に注射した。24h-遅延後に、三匹の対照マウスはi.p.注射でリン酸緩衝塩類溶液(PBS) (Lonza, France)、二匹のマウスは100 ugのIgG1 キメラ抗体のi.p. 注射を接種された。

【0457】

4. 組織学的な検査および細胞の計数

P7で、全てのマウスを、過量のペントバルビタールで屠殺した。その後、腹膜の洗浄細胞を5 mlのPBSに集めた。LCの生存度決定は、腹膜の流体のトリパンブルー色素染色に基づいて行った。LC および 他の白血球を、低出力の顕微鏡観察で観察し、計数した。ヒトのパーキットリンパ腫細胞は形態で容易に同定できた。そして、特異性の確認は、抗-エプスタインバーウイルスモノクローナル (潜在の発現タンパク質に特異的)、同様に、ヒトB-細胞マーカーに特異的なモノクローナルで行った免疫細胞化学により得られた (示さず)。

【0458】

また、マウスを解剖して解剖病理学的な異常の存在を評価した。特に、脾臓変化の可能性は、[(脾臓重量/体重) x 100]の通り計算された脾臓/体重比 (spleen/body weight ratio) により見積った。

【0459】

B. 結果

全てのマウスの巨視的な検査によって、腫瘍の明白な存在は明らかとされなかった。これは研究の持続時間が非常に短いことと矛盾せず、リンパ腫の細胞注射後、その後の抗体またはmock-注射の短い遅延時間で抗体依存的な細胞毒性と取り組むことが必要であることから正当化される。しかしながら、双方の対照マウスで脾腫大を容易に観察でき、これに対し、双方のIgG1-処理マウスでは脾臓の巨視的な修飾が示されなかった。ヌードマウスにおける同じ細胞の皮下注射での前の実験のとおり、無処置のSCID マウスは、IgG1-処理

10

20

30

40

50

SCID マウスの増加と比較して、脾臓/体重比の2倍の増加を提示した(図 32)。他の器官(心臓, 肺, 腎臓, 脳, 腸 および 胃)の巨視的な検査によって、主要な異常は明らかとされなかった。

【 0 4 6 0 】

IgG1-処理マウスの腹膜の流体の分析によって、対照マウスの数と比較して、生存した及び死亡したリンパ腫細胞の双方の数の減少が明らかとされた(図 33A)。最も興味深いことに、キメラ GNb AC1 IgG1-処理マウスの腹腔から集められた約 50%のリンパ腫細胞は、抗体注射後六日で死亡した。平行して、他の単核白血球細胞(SCIDマウスにおいて、主に単球起源のマクロファージ細胞および僅かなNK細胞)の数の増加は、対照マウスと比較してIgG1-処理マウスで観察された(図 33B)。

10

【 0 4 6 1 】

C. 考察

この第二の研究において、我々は、SCID マウスにおけるパーキットリンパ腫細胞の腹腔内注射が7 日後に脾腫大を誘導できることを観察し、19 日後に同じことを示しているヌードマウスにおける我々の前の研究と一致している。興味深いことに、IgG1-処理マウスは、係る脾臓の拡大を示さなかった。

【 0 4 6 2 】

さらに、(i) 無処置動物と比較した場合に腹腔から集めた生きているリンパ腫細胞の数の減少、(ii) 死亡した悪性細胞の重大な比率(important proportion)、および(iii) 他の単核白血球細胞の数の増加の組み合わせは、腫瘍細胞における抗体依存性の直接的および/または細胞媒介性の細胞傷害効果の高度な指標である。以上、この効果は、(i) 例 8で確認されたヒト腫瘍細胞に暴露されたMSRV-ENV タンパク質における標的エピトープを発現している腫瘍細胞と結合するリガンドの特異性および(ii) 腫瘍細胞の破壊に関与している付加されたIgG1 アイソタイプ-媒介性の体液性の免疫効果を反映している。後者の効果は、IgG1 活性部位による補体活性化および腫瘍MSRV-ENV抗原と結合したGNb AC1 IgG1とFC レセプターの相互作用で誘導されたマクロファージ殺腫瘍活性などで媒介できる。

20

【 0 4 6 3 】

このキメラ IgG1 抗体の効果に関与している機構がどのようなものであるかと、我々の結果は前臨床動物モデルにおいてヒト腫瘍細胞でのリンパ腫の細胞増殖の阻害を実証しており、係るENV-陽性の癌の治療における抗-ENV リガンド抗体の治療上の潜在能力を証明している。

30

以下に本願の出願当初の請求項を実施の態様として付記する。

(1)

配列番号 1, 配列番号 2, 配列番号 3 配列番号 4, 配列番号 5 および 配列番号 6又は以下の何れかで表される相補性決定領域(CDRs)の各々を含むリガンド: CDR1(配列番号1)の0 ~ 3, CDR2 (配列番号 2)の0 ~ 2, CDR3 (配列番号 3)の0 ~ 2, CDR4 (配列番号 4)の0 ~ 1, CDR5 (配列番号 5)の0 ~ 4, CDR6 (配列番号 6)の0 ~ 2で示される前記配列内に何れかの数の置換されたアミノ酸を有している任意の配列, 又は前記配列の配列番号 1~配列番号 6内で均等な化学的な機能および特性を有している他のアミノ酸で置換されたアミノ酸。

40

(2)

アミノ酸配列 配列番号 1, 配列番号 2および配列番号 3または前記配列と少なくとも 80%の同一性およびより好ましくは 90%の同一性を有している任意の配列を含んでいる軽鎖可変領域(VL), およびアミノ酸配列 配列番号 4, 配列番号 5 および配列番号 6または前記配列と少なくとも 80%の同一性およびより好ましくは 90%の同一性を有している任意の配列を含んでいる重鎖可変領域(VH)を含むリガンド。

(3)

配列番号 7で表されるアミノ酸配列または前記配列と少なくとも 75%の同一性、より好ましくは 80%、なおより好ましくは90%の同一性を有している任意の配列を有している軽鎖

50

可変領域 (VL)および配列番号 8で表されるアミノ酸配列または前記配列と少なくとも 75%の同一性、より好ましくは 80%、なおより好ましくは90%の同一性を有している任意の配列を有している重鎖可変領域(VH)を含むリガンド。

(4)

(1) ~ (3) のリガンドを含むScFV 断片。

(5)

(1) ~ (3) のリガンドを含むFab 断片。

(6)

(1) ~ (3) のリガンドを含む抗体。

(7)

キメラ、操作された又はヒト化された抗体であることを特徴とする(6)に記載の抗体。

(8)

IgGである(6)または(7)に記載の抗体。

(9)

ヒト IgG1またはIgG4である(8)に記載の抗体。

(1 0)

(1) ~ (3) に記載のリガンド、(4) のscFV 断片、(5) の F a b 断片または(6) ~ (9) の抗体を活性成分として含んでいる薬学的組成物。

(1 1)

少なくとも一つの配列番号 13b, 配列番号 14, 配列番号 15, 配列番号 16, 配列番号 17, 配列番号 18で表される全長配列または前記配列と少なくとも 70% および より好ましくは 80% および なおより好ましくは 90%の同一性を有している任意の配列または前記配列と100% 相補的な任意の配列を含んでいる核酸。

(1 2)

配列番号 13, 配列番号 14, 配列番号 15, 配列番号 16, 配列番号 17, および 配列番号 18で表される配列または前記配列と少なくとも 70% および より好ましくは 80% および なおより好ましくは 90%の同一性を有している任意の配列または前記配列と100% 相補的な任意の配列の各々を含んでいる(11)の核酸分子。

(1 3)

少なくとも一つの配列番号 10または12で表される全長配列または前記配列と少なくとも 70% および より好ましくは 80% および なおより好ましくは 90%の同一性を有している任意の配列 前記配列と100% 相補的な任意の配列を含んでいる核酸。

(1 4)

少なくとも一つの配列番号 9または11で表される全長配列または前記配列と少なくとも 70% および より好ましくは 80% および なおより好ましくは 90%の同一性を有している任意の配列または前記配列と100% 相補的な任意の配列を含んでいる核酸。

(1 5)

(11) ~ (14) の何れか一項に記載の核酸を含んでいるベクター。

(1 6)

(15) に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

(1 7)

(1) ~ (3) に記載のリガンド、(4) のscFV 断片、(5) の F a b 断片または(6) ~ (9) に記載の抗体を産生するための方法であって、(16) の宿主細胞をリガンド、scFV抗体、F a b断片または抗体の合成を許容する条件下で培養する工程を含む方法。

(1 8)

(1) ~ (3) に記載のリガンド、(4) のscFV 断片、(5) の F a b 断片または(6) ~ (9) に記載の抗体または(1) ~ (3) に記載のリガンド、(4) のscFV 断片、(5) の F a b断片または(6) ~ (9) に記載の抗体または(10) に記載の薬学的組成物の薬学的に許容される形態を投与することを含む処置の方法。

(1 9)

10

20

30

40

50

多発性硬化症，精神分裂病，臨床的に分離した症候群，慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー，癲癇，乾癬，癌，炎症性の膵炎および糖尿病、より詳細には1型の糖尿病を含んでいる群から選択されるMSRV-関連疾患を処置するための(18)に記載の処置の方法。

(20)

(18)または(19)の何れか一項に記載のMSRV-関連疾患の処置の方法であって、定期的に繰り返される注射での慢性的な処置として(9)記載のIgG4またはIgG1抗体を投与することを含む方法。

(21)

配列番号20または配列番号32で表されるアミノ酸配列または配列番号20または配列番号32で表される配列と少なくとも75%の配列同一性を有している配列または前記配列と100%相補的な任意の配列からなることを特徴とするアンチリガンド。

10

(22)

(1)～(3)に記載のリガンド，(4)のscFV断片，(5)のFab断片または(6)～(9)に記載の抗体を用いて生物学的サンプルにおけるアンチリガンドを検出する方法であって、(a)前記サンプルを(1)～(3)に記載のリガンド，(4)のscFV断片，(5)のFab断片または(6)～(9)に記載の抗体と接触させること、(b)前記サンプルにおけるアンチリガンドの存在を検出することの工程を含んでいる方法。

(23)

(22)に記載のアンチリガンドを検出する方法であって、さらに(c)前記サンプルをGAG抗原と特異的に結合するリガンドと接触させることの工程を含んでいる方法。

20

(24)

生物学的サンプルにおけるアンチリガンドを検出するための免疫学的アッセイのキットであって、(1)～(3)に記載のリガンド，(4)のscFV断片，(5)のFab断片または(6)～(9)に記載の抗体、および前記アンチリガンドと上記のリガンド，scFV，Fab断片または抗原との特異的な結合を検出するための試薬を含んでいるキット。

(25)

(24)に記載のアンチリガンドを検出するための免疫学的アッセイのキットであって、さらにGAG抗原と特異的に結合するリガンドを含んでいるキット。

(26)

多発性硬化症，精神分裂病，臨床的に分離した症候群，慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチー，癲癇，乾癬，癌，炎症性の膵炎および糖尿病、より詳細には1型の糖尿病を含んでいる群から選択されるMSRV-関連疾患の検出における、(24)または(25)に記載の免疫学的なアッセイキットの使用。

30

【参考文献】

【0464】

Johnson G, Wu TT. Kabat Database and its applications: future directions. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 205-6.

Chothia C, Gelfand I, Kister A. Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *J Mol Biol* 1998; 278: 457-79.

40

Bech P, Rafaelsen OJ, Kramp P, Bolwig TG (1978) The mania rating scale: scale construction and inter-observer agreement. *Neuropharmacology* 17:430-431.

Edgar PP, Schwartz RD (1992) Functionally relevant gamma-aminobutyric acid receptors: equivalence between receptor affinity (Kd) and potency (EC50)? *Mol Pharmacol* 41:1124-1129.

Firouzi R, A. R, Michel M, E. J-M, Hauw JJ, Malcus-vocanson C, Lazarini F, Gebhauer L, Seigneurin JM, Touraine J, Sanhadji K, Marche P, Perron H (2003) Multiple

50

Sclerosis Associated Retrovirus Particles Cause T-Lymphocyte Dependent Death with Brain Hemorrhage, in Humanized SCID Mice Model. *Journal of Neurovirology* 9:79-93.

Houenou J, Szoke A, Meary A, Loze J-Y, Mathieu M, Leboyer M, Schurhoff F (2007) Psychometric properties of the French version of the signs and symptoms of psychotic illness (SSPI) scale. *Encephale* 33:744-750.

Huang WM (1986) The 52-protein subunit of DNA topoisomerase is homologous to the gyrA-protein of gyrase. *Nucleic Acids Res* 14:7379-7390. 10

Janke C, Martin D, Giraud-Panis MJ, Decoville M, Locker D (2003) *Drosophila* DSP1 and rat HMGB1 have equivalent DNA binding properties and share a similar secondary fold. *J Biochem* 133:533-539.

Kane JM (1996) Treatment-resistant schizophrenic patients. *J Clin Psychiatry* 57 Suppl 9:35-40.

Lamande SR, Bateman JF (1993) A type I collagen reporter gene construct for protein engineering studies. Functional equivalence of transfected reporter COL1A1 and endogenous gene products during biosynthesis and in vitro extracellular matrix accumulation. *Biochem J* 293 (Pt 2):387-394. 20

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121-127.

Minuth T, Kramer B, Lehle K, Jaenicke R, Kohnert U (1998) The spectroscopic analysis, inhibition and binding studies demonstrate the equivalence of *Erythrina caffra* trypsin inhibitor and the recombinant substitution variant recSerETI. *J Biotechnol* 62:231-239. 30

Montgomery SA, Asberg M (1979) A new depression scale designed to be sensitive to change. *Br J Psychiatry* 134:382-389.

Perron H, Firouzi R, Tuke P, Garson JA, Michel M, Beseme F, Bedin F, Mallet F, Marcel E, Seigneurin JM, Mandrand B (1997a) Cell cultures and associated retroviruses in multiple sclerosis. Collaborative Research Group on MS. *Acta Neurol Scand Suppl* 169:22-31. 40

Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Mallet F, Tuke PW, Voisset C, Blond JL, Lalande B, Seigneurin JM, Mandrand B (1997b) Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7583-7588.

Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, Jolivet-Reynaud C, Marcel F, Souillet Y, Borel E, Gebuhrer L, Santoro L, Marcel S, Sei 50

gneurin JM, Marche PN, Lafon M (2001) Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology* 287:321-332.

Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN (2006) The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD141TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol* 176:7636-7644.**

Sardana VV, Emini EA, Gotlib L, Graham DJ, Lineberger DW, Long WJ, Schlabach AJ, Wolfgang JA, Condra JH (1992) Functional analysis of HIV-1 reverse transcriptase amino acids involved in resistance to multiple nonnucleoside inhibitors. *J Biol Chem* 267:17526-17530. 10

Stefas E, Rucheton M, Graafland H, Moynier M, Sompeyrac C, Bahraoui EM, Veas F (1997) Human plasmatic apolipoprotein H binds human immunodeficiency virus type 1 and type 2 proteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13:97-104.

Stefas I, Rucheton M, D'Angeac AD, Morel-Baccard C, Seigneurin JM, Zarski JP, Martin M, Cerutti M, Bossy JP, Misse D, Graafland H, Veas F (2001) Hepatitis B virus Dane particles bind to human plasma apolipoprotein H. *Hepatology* 33:207-217. 20

Ullmann GM, Hauswald M, Jensen A, Knapp EW (2000) Structural alignment of ferredoxin and flavodoxin based on electrostatic potentials: implications for their interactions with photosystem I and ferredoxin-NADP reductase. *Proteins* 38:301-309.

Ullmann GM, Hauswald M, Jensen A, Kostic NM, Knapp EW (1997) Comparison of the physiologically equivalent proteins cytochrome c6 and plastocyanin on the basis of their electrostatic potentials. Tryptophan 63 in cytochrome c6 may be isofunctional with tyrosine 83 in plastocyanin. *Biochemistry* 36:16187-16196. 30

Verdoliva A, Ruvo M, Cassani G, Fassina G (1995) Topological mimicry of cross-reacting enantiomeric peptide antigens. *J Biol Chem* 270:30422-30427.

Wehrmann A, Van Vliet A, Opsomer C, Botterman J, Schulz A (1996) The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat Biotechnol* 14:1274-1278.

Xu GL, Kapfer W, Walter J, Trautner TA (1992) BsuBI--an isospecific restriction and modification system of PstI: characterization of the BsuBI genes and enzymes. *Nucleic Acids Res* 20:6517-6523. 40

Yu H, Schurr MJ, Deretic V (1995) Functional equivalence of *Escherichia coli* sigma E and *Pseudomonas aeruginosa* AlgU: *E. coli* rpoE restores mucoidy and reduces sensitivity to reactive oxygen intermediates in algU mutants of *P. aeruginosa*. *J Bacteriol* 177:3259-3268.

Zabin HB, Horvath MP, Terwilliger TC (1991) Approaches to predicting effects of single amino acid substitutions on the function of a protein. *Biochemistry* 30:6230-6240. 50

Antony JM, Ellestad KK, Hammond R, Imaizumi K, Mallet F, Warren KG, Power C (2007). The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes. *J Immunol* 179:1210-24.

Antony JM, van Marie G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong Vw, Wallace JL, Deacon RM, Warren K, Power C (2004). Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* 7:1088-95.

10

Blond JL, Beseme F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H, Mandrand B, Mallet F (1999). Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol* 73: 1175-85.

Cheyne V, Oriol G, Mallet F (2006). Identification of the hASCT2-binding domain of the Env ERVWE1/syncytin-1 fusogenic glycoprotein. *Retrovirology* 3: 41.

Christensen T, Dissing Sorensen P, Riemann H, Hansen HJ, Moller-Larsen A (1998). Expression of sequence variants of endogenous retrovirus RGH in particle form in multiple sclerosis. *Lancet* 352:1033.

20

Deb-Rinker P, Klempner TA, O'Reilly RL, Torrey EF, Singh SM (1999). Molecular characterization of a MSR-like sequence identified by RDA from monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia. *Genomics* 61:133-44.

Dolei A, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Sechi G, Cirotto MC, Rosati G, Sotgiu S (2002). Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology* 58: 471-3.

30

Firouzi R, Rolland A, Michel M, Jouvin-Marche E, Hauw JJ, Malcus-Vocanson C, Lazarini F, Gebuhrer L, Seigneurin JM, Touraine JL, Sanhadji K, Marche PN, Perron H (2003). Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. *J Neurovirol* 9: 79-93.

Flockerzi A, Ruggieri A, Frank O, Sauter M, Maldener E, Kopper B, Wullich B, Seifarth W, Muller-Lantzsch N, Leib-Mosch C, Meese E, Mayer J (2008). Expression patterns of transcribed human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) loci in human tissues and the need for a HERV Transcriptome Project. *BMC Genomics* 9: 354.

40

Garson JA, Tuke PW, Giraud P, Paranhos-Baccala G, Perron H (1998). Detection of virion-associated MSR-like RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 351: 33.

Karlsson H, Bachmann S, Schroder J, McArthur J, Torrey EF, Yolken RH (2001). Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4634-9.

Karlsson H, Schroder J, Bachmann S, Bottmer C, Yolken RH (2004). HERV-W-related

50

RNA detected in plasma from individuals with recent-onset schizophrenia or schizoaffective disorder. *Mol Psychiatry* 9:12-3.

Kim HS (2001). Sequence and phylogeny of HERV-W pol fragments. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:1665-71.

Knerr I, Huppertz B, Weigel C, Dotsch J, Wich C, Schild RL, Beckmann MW, Rascher W (2004). Endogenous retroviral syncytin: compilation of experimental research on syncytin and its possible role in normal and disturbed human placentogenesis. *Mol Hum Reprod* 10: 581-8. 10

Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Bedin F, Ounanian-Paraz A, Sodoyer M, Ott C, Rajoharison A, Garcia E, Mallet F, Mandrand B, Perron H (1999). Molecular cloning and characterization of MSRV-related sequences associated with retrovirus-like particles. *Virology* 260:1-9.

Langbein M, Strick R, Strissel PL, Vogt N, Parsch H, Beckmann MW, Schild RL (2008). Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. *Mol Reprod Dev* 75:175-83. 20

Laufer G, Mayer J, Mueller BF, Mueller-Lantzsch N, Ruprecht K (2009). Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences. *Retrovirology* 6: 37.

Lavillette D, Marin M, Ruggieri A, Mallet F, Cosset FL, Kabat D (2002). The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *J Virol* 76: 6442-52.

Linial ML, Miller AD (1990). Retroviral RNA packaging: sequence requirements and implications. In: *Retroviruses- strategies of replication.* " Swanstrom R, Vogt PK, (eds). Springer-Verlag: Berlin, pp 125-152. 30

Malassine A, Handschuh K, Tsatsaris V, Gerbaud P, Cheynet V, Oriol G, Mallet F, Evain-Brion D (2005). Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta. *Placenta* 26: 556-62.

Mallet F, Bouton G, Prudhomme S, Cheynet V, Oriol G, Bonnaud B, Lucotte G, Duret L, Mandrand B (2004). The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a bona fide gene involved in hominoid placental physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1731-6 40

Mameli G, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, Serra C, Sotgiu S, Bonetti B, Dolei A (2007). Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-w endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. *J Gen Virol* 88: 264-74.

Noorali S, Rotar IC, Lewis C, Pestaner JP, Pace DG, Sison A, Bagasra A (2009). Role of HERV-W Syncytin-1 in Placentation and Maintenance of Human Pregnancy. *A* 50

ppl Immunohistochem Mol Morphol.

Perron H, Bernard C, Bertrand JB, Lang AB, Popa I, Sanhadji K, Portoukalian J (2009). Endogenous retroviral genes, Herpesviruses and gender in Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci.*

Perron H, Firouzi R, Tuke P, Garson JA, Michel M, Beseme F, Bedin F, Mallet F, Marcel E, Seigneurin JM, Mandrand B (1997a). Cell cultures and associated retroviruses in multiple sclerosis. Collaborative Research Group on MS. *Acta Neurol Scand Suppl 169: 22-31.*

10

Perron H, Carson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala C, Komurian-Pradel F, Mallet F, Tuke PW, Voisset C, Blond JL, Lalande B, Seigneurin JM, Mandrand B (1997b). Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A 94: 7583-8*

Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelos, Dumon A, Jolivet-Reynaud C, Marcel F, Souillet Y, Borel E, Gebuhrer L, Santoro L, Marcel S, Seigneurin JM, Marche PN, Lafon M (2001). Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology 287: 321-32.*

20

Perron H, Lalande B, Gratacap B, Laurent A, Genoulaz O, Geny C, Mallaret M, Schuller E, Stoebner P, Seigneurin JM (1991). Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet 337: 862-3.*

Perron H, Lazarini F, Ruprecht K, Pechoux-Longin C, Seilhean D, Sazdovitch V, Creange A, Battail-Poirot N, Sibai G, Santoro L, Jolivet M, Darlix JL, Rieckmann P, Arzberger T, Hauw JJ, Lassmann H (2005). Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol 11: 23-33.*

30

Perron H, Mekaoui L, Bernard C, Veas F, Stefanis I, Leboyer M (2008). Endogenous retrovirus type W GAG and envelope protein antigenemia in serum of schizophrenic patients. *Biol Psychiatry 64:1019-23.*

Perron H, Penn JP, Rieger F, Alliel PM (2000). Particle-associated retroviral RNA and tandem RGHHERV-W copies on human chromosome 7q: possible components of a 'chain-reaction' triggered by infectious agents in multiple sclerosis? *J Neurovirol 6 Suppl 2: S67-75.*

40

Rasmussen HB, Perron H, Clausen J (1993). Do endogenous retroviruses have etiological implications in inflammatory and degenerative nervous system diseases? *Acta Neurol Scand 88:190-8.*

Rolland A, Jouvin-Marche E, Saresella M, Ferrante P, Cavaretta R, Creange A, Marche P, Perron H (2005). Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSR (multiple sclerosis associated retroviral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol 160:195-2*

50

03.

Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN (2006). The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol* 176: 7636-44.

Saresella M, Rolland A, Marventano I, Cavarretta R, Caputo D, Marche P, Perron H, Clerici M (2009). Multiple sclerosis-associated retroviral agent (MSRV)-stimulated cytokine production in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 15: 443-7.

10

Serra C, Sotgiu S, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Dolei A (2001). Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurol Sci* 22:171-3.

Sotgiu S, Arru G, Mameli G, Serra C, Pugliatti M, Rosati G, Dolei A (2006). Multiple sclerosis-associated retrovirus in early multiple sclerosis: a six-year follow-up of a Sardinian cohort. *Mult Scler* 12: 698-703.

Sotgiu S, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Arru G, Dolei A (2002). Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis: an observational study. *Neurology* 59:1071-3.

20

Voisset C, Blancher A, Perron H, Mandrand B, Mallet F, Paranhos-Baccala G (1999). Phylogeny of a novel family of human endogenous retrovirus sequences, HERV-W, in humans and other primates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:1529-33.

Voisset C, Bouton O, Bedin F, Duret L, Mandrand B, Mallet F, Paranhos-Baccala G (2000). Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 731-40.

30

Weis S, Llenos IC, Dulay JR, Verma N, Sabunciyan S, Yolken RH (2007). Changes in region- and cell type-specific expression patterns of neutral amino acid transporter 1 (ASCT-1) in the anterior cingulate cortex and hippocampus in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *J Neural Transm* 114: 261-71.

Yolken RH, Karlsson H, Yee F, Johnston-Wilson NL, Torrey EF (2000). Endogenous retroviruses and schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31:193-9.

Bornstein, R. A., S. B. Schwarzkopf, et al. (1992). "Third-ventricle enlargement and neuropsychological deficit in schizophrenia." *Biol Psychiatry* 31(9): 954-61

40

Dickerson, F., C. Stallings, et al. (2007). "C-reactive protein is associated with the severity of cognitive impairment but not of psychiatric symptoms in individuals with schizophrenia." *Schizophr Res* 93(1-3): 261-5.

Aalberse and Schuurman 2002, IgG4 breaking the rules, *Immunology*. 2002,105:9-19

【 図 1 】

図 1

(A)

QIVLTQSPAIMSASPGKVTISCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPKANIYRT
SNLASGVPRFSGSGSSTSYSLTISSEAEADAATYYCQQYQSLPLTFGSG
TKLEIK

(B)

QVQLQQSGAELVPRGAPVTLSCSKASGYTFDYEMHWVKQTPVHGLEWIGA
VAPETGGTAYNOKFKGKATLTAAKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTSTV
VPFAYWQGTLITVSA

FIGURE 1

【 図 3 】

図 3

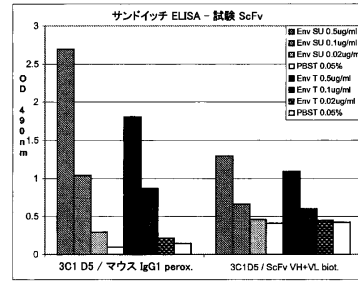


FIGURE 3

【 図 2 】

図 2

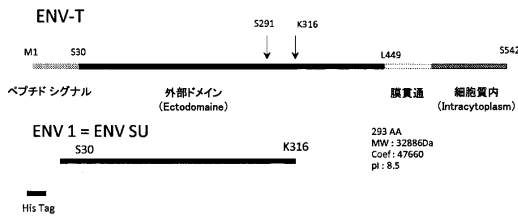


FIGURE 2

【 図 4 】

図 4

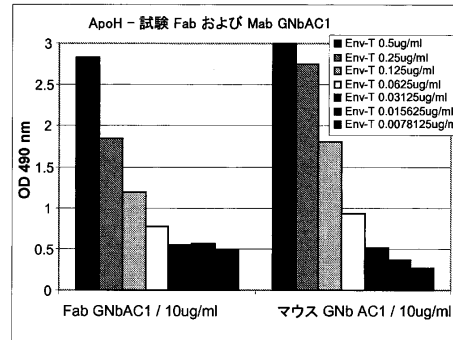


FIGURE 4

【 図 5 】

図 5

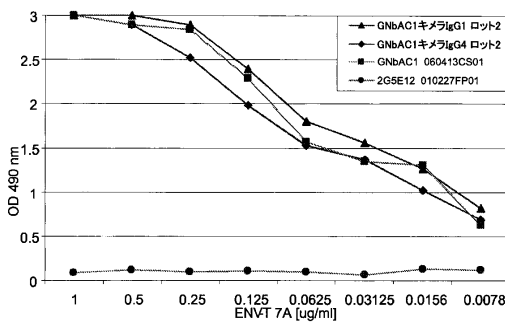


FIGURE 5

【 図 6 】

図 6

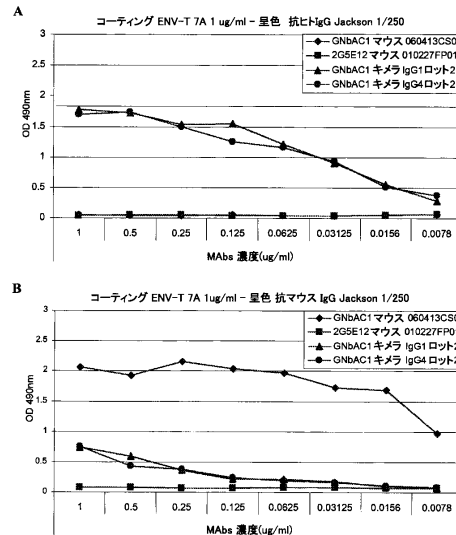


FIGURE 6

【 図 7 】

図 7

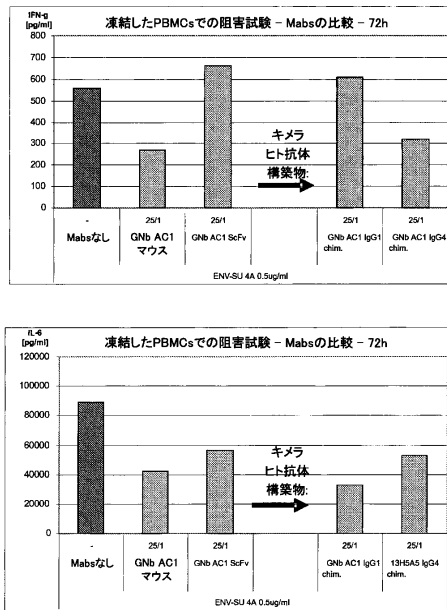


FIGURE 7

【 図 8 】

図 8

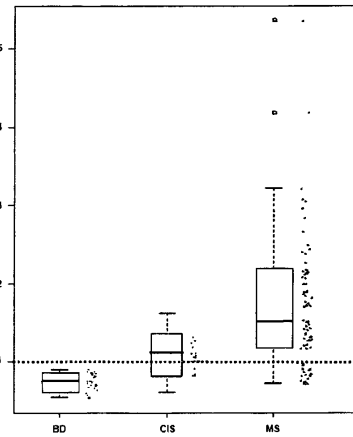


FIGURE 8

【 図 9 】

図 9

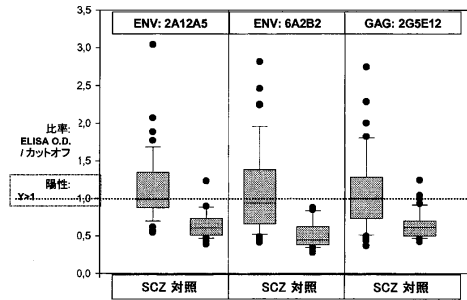


FIGURE 9

【 図 1 1 】

図 11

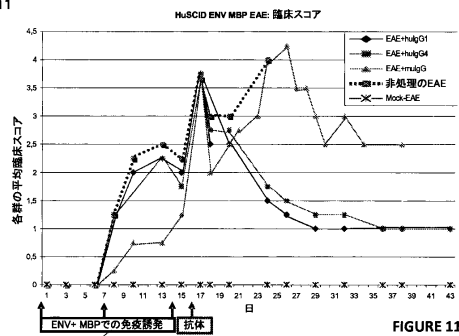


FIGURE 11

【 図 1 0 】

図 10

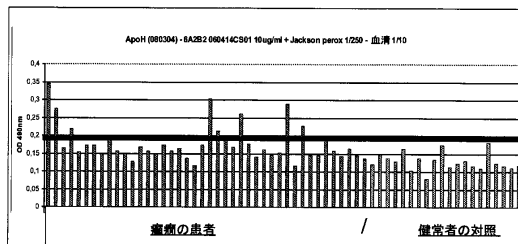


FIGURE 10

【 図 1 2 】

図 12

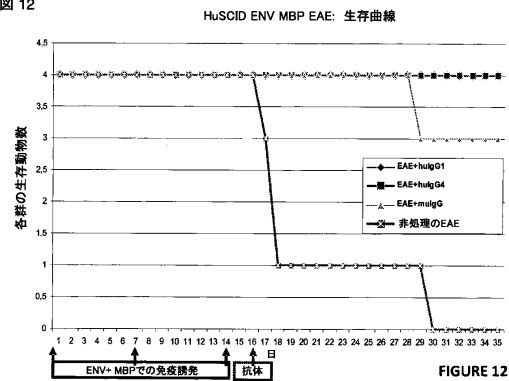


FIGURE 12

【 図 1 3 】

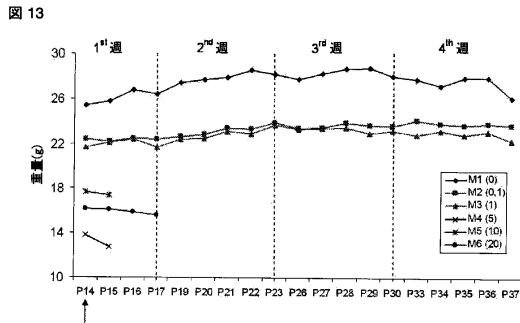


FIGURE 13

【 図 1 4 】

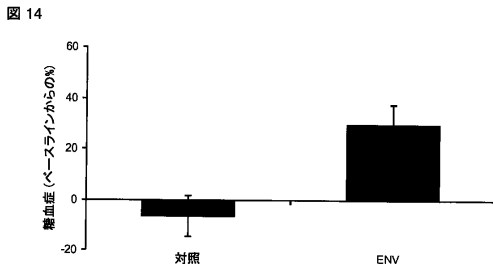


FIGURE 14

【 図 1 8 】

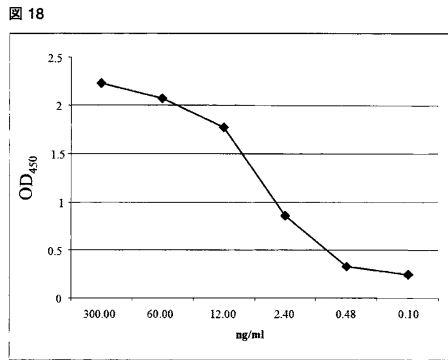


FIGURE 18

【 図 1 9 】

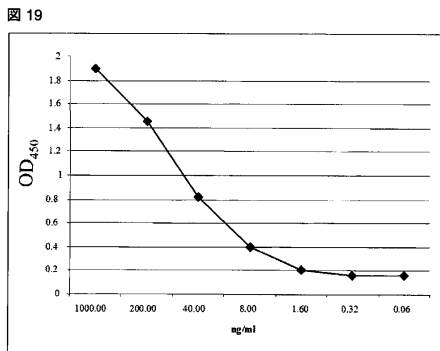


FIGURE 19

【 図 1 5 】

図 15
 15A: KabatおよびOchothiaの規定:
 QVQLQQSGAELVRRPGASVTLSCASGYTPT DYEMH WVKQTPVHGLEWIG
 AVAPETGGTAYWQKFKGKATLTAAKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTS
 TVVPFAY WGGGTLTVSA
 15B: 好適(組み合わせ)な規定:
 QVQLQQSGAELVRRPGASVTLSCAS GYPTPDYEMH WVKQTPVHGLEWIG
 AVAPETGGTAYWQKFKGKATLTAAKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTS
 TVVPFAY WGGGTLTVSA

FIGURE 15

【 図 1 6 】

図 16
 QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPKAWIYRTSNL
 ASGVPRGRFSGSGSGTSYSLTISSEMEADAATYCCQQYQSLPLT
 FSGGTKLEIKR

FIGURE 16

【 図 1 7 】

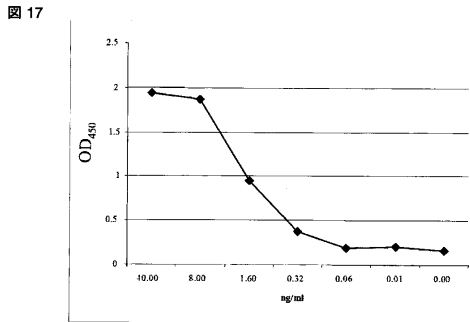


FIGURE 17

【 図 2 0 】

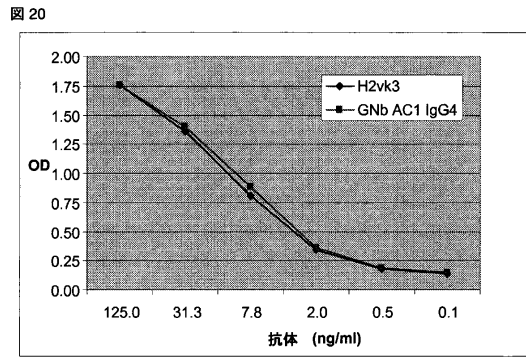


FIGURE 20

【 図 2 1 】

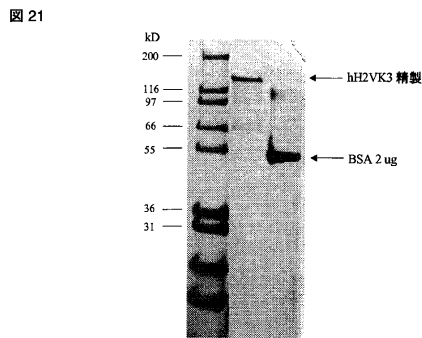


FIGURE 21

【 図 2 2 】

図 22

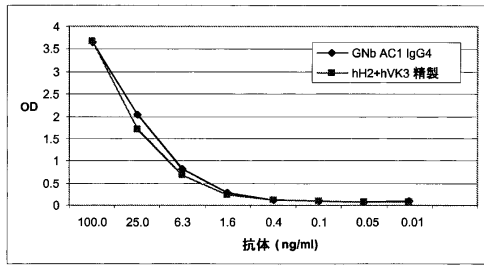


FIGURE 22

【 図 2 3 】

図 23

H2 重鎖:
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGYTETD**YEM**HWVRQAPGQGLEW**G**AVAPE
 TGGTAY**NQKFKGR**^ATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**TS**₁**LV**PFAYWGQGT
 LVTVSS

VK3 軽鎖:
 C**Q**IQ**T**QSPSSLASVSGDRVITITCSASSSVSYMYWQKPKGKAPK**AW**IV**R**TSNLSAGV
 PSRFSGSGSGTD^VLTISSLQPEDFATYYC**QQYQSLPL**TFGGGTKVEIK

FIGURE 23

【 図 2 4 】

図 24

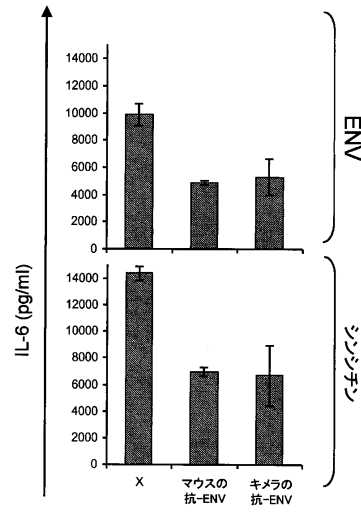


FIGURE 24

【 図 2 5 】

図 25

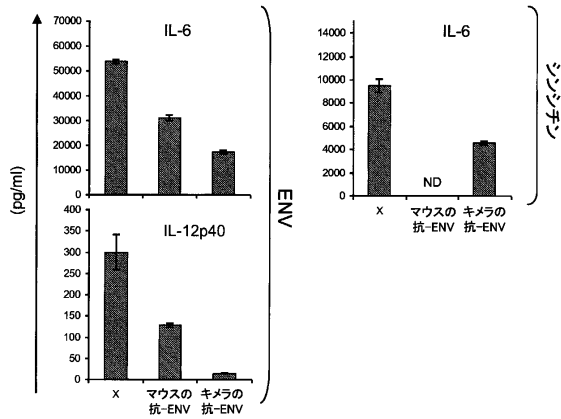


FIGURE 25

【 図 2 6 】

図 26

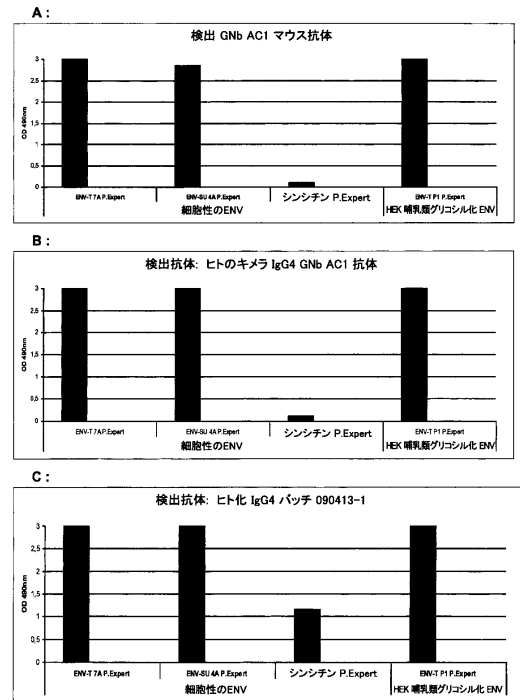


FIGURE 26

【 図 27 】

図 27

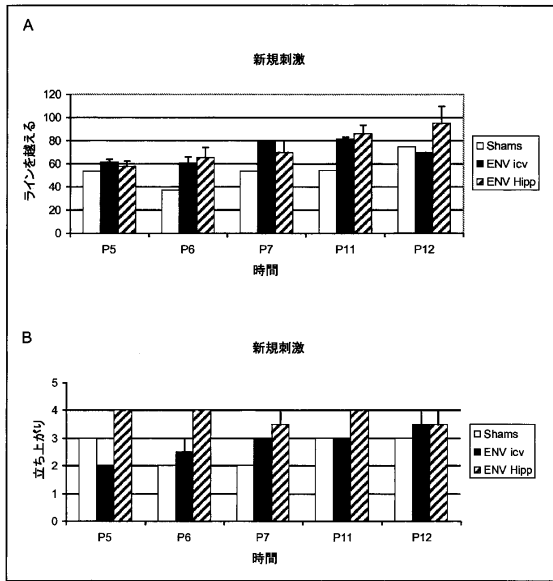


FIGURE 27

【 図 28 】

図 28

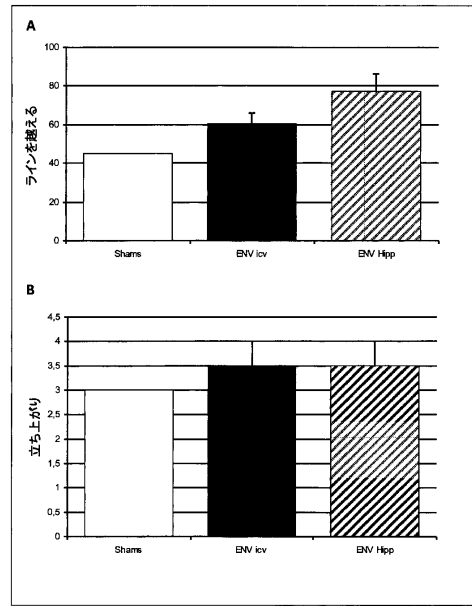


FIGURE 28

【 図 29 】

図 29

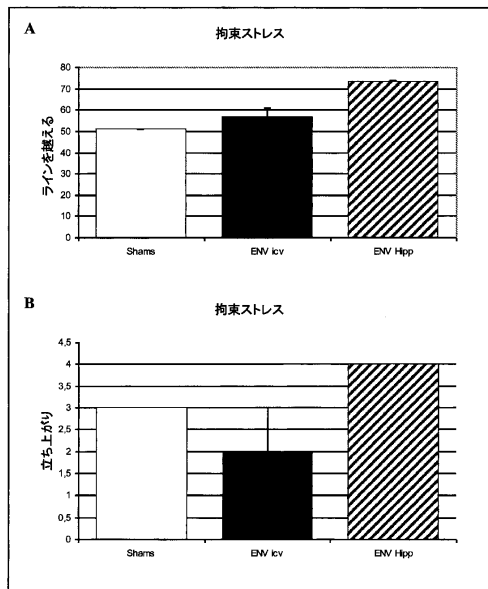


FIGURE 29

【 図 30 】

図 30

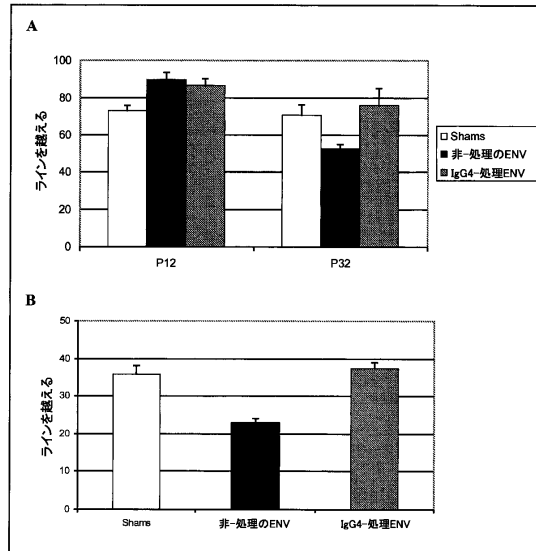


FIGURE 30

【 図 3 1 】

図 31

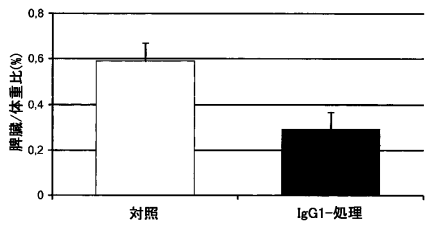


FIGURE 31

【 図 3 2 】

図 32

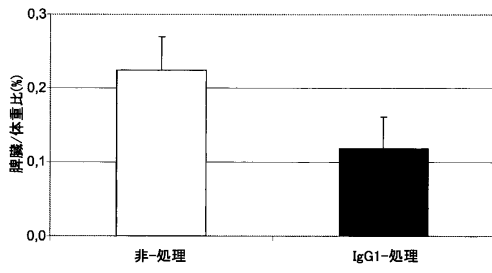


FIGURE 32

【 図 3 3 】

図 33

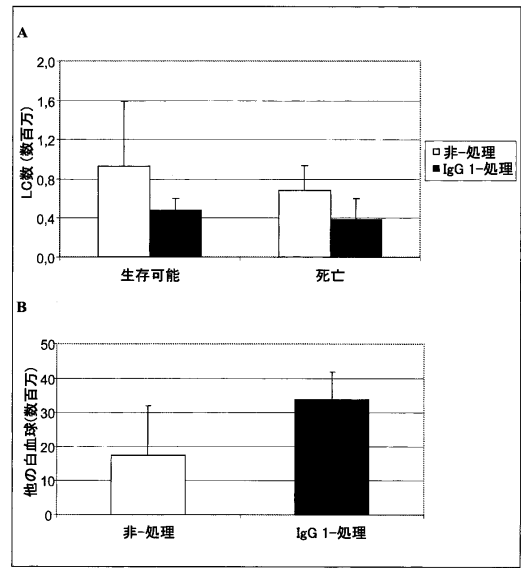


FIGURE 33

【 配列表 】

0006058264000001.xml

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P 25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/08	
C 0 7 K 14/15	(2006.01)	A 6 1 P	25/18	
C 0 7 K 16/10	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K 16/46	(2006.01)	C 0 7 K	14/15	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 0 7 K	16/10	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
G 0 1 N 33/569	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
G 0 1 N 33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/569	H
		G 0 1 N	33/574	Z

(31)優先権主張番号 61/213189

(32)優先日 平成21年5月15日(2009.5.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100153051

弁理士 河野 直樹

(74)代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(74)代理人 100124394

弁理士 佐藤 立志

(74)代理人 100112807

弁理士 岡田 貴志

(74)代理人 100111073

弁理士 堀内 美保子

(72)発明者 ベルナル、コランヌ

フランス国、7 4 1 6 0 サン・ジュリアン・アン・ジュヌボワ、リュ・モンブラン 1 8

(72)発明者 ランク、アロイス・ベルンハルト

スイス国、3 0 0 8 ベルン・スイツァーランド、ハルデガーシュトラッセ 3 3

(72)発明者 ペロン、エルベ

フランス国、6 9 2 9 0 サン・ジェニ・レ・オリエール、アレ・ドゥ・ラ・ギゴニエール 4

(72)発明者 ベルトラン、ジャン・パプティスト

フランス国、6 9 0 0 8 リヨン、リュ・ドゥ・ラ・ロジエール 1 1 ビス

合議体

審判長 田村 明照

審判官 三原 健治

審判官 長井 啓子

(56)参考文献 特表2008-505847(JP,A)

国際公開第2006/138627(WO, A2)

国際公開第2006/137354(WO, A1)

国際公開第2006/006693(WO, A1)

国際公開第2006/028197(WO, A1)

J. Neurovirol., 2007, Vol. 13, Suppl. 1, p. 112 - 113

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

PubMed

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	治疗使用MSRV相关疾病的特定配体		
公开(公告)号	JP6058264B2	公开(公告)日	2017-01-11
申请号	JP2011517153	申请日	2009-07-08
申请(专利权)人(译)	Jeunuro SA		
当前申请(专利权)人(译)	Jeunuro SA		
[标]发明人	ベルナールコランヌ ランクアロイスベルンハルト ペロンエルベ ベルトランジャンバプティスト		
发明人	ベルナール、コランヌ ランク、アロイス・ベルンハルト ペロン、エルベ ベルトラン、ジャン-バプティスト		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P1/18 A61P3/10 A61P17/06 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/18 A61P35/00 C07K14/15 C07K16/10 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/574		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/18 A61P3/10 A61P17/06 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/18 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 C07K16/1036 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/92 C07K16/10		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.Y A61P1/18 A61P3/10 A61P17/06 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/18 A61P35/00 C07K14/15 C07K16/10 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/569.H G01N33/574.Z		
代理人(译)	河野直树 冈田隆		
优先权	61/129613 2008-07-08 US 61/202581 2009-03-13 US 61/213189 2009-05-15 US		
其他公开文献	JP2011527887A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
配体包括SEQ ID No.1, SEQ ID No.2, SEQ ID No.3 SEQ ID No.4, SEQ ID No.5和SEQ ID No.6中列出的每个互补决定区(CDR)。或如下所示在所述序列中具有任意数目的取代氨基酸的任何序列, CDR1 (SEQ ID No.1) 中的0至3, CDR2 (SEQ ID No.2) 中的0至2, 0至2在CDR3 (SEQ ID No.3) 中, 在CDR4 (SEQ ID No.4) 中从0到1, 在CDR5 (SEQ ID No.5) 中从0到4, 在CDR6中从0到2 (SEQ ID No.6) 在所述序列SEQ ID No.1至SEQ ID No.6中, 或具有等同化学功能和性质的其他氨基酸取代的氨基酸。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6058264号 (P6058264)
(45) 発行日 平成29年1月11日(2017.1.11)	(24) 登録日 平成28年12月16日(2016.12.16)	
(51) Int. Cl.	F I	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	Z N A A
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	D
A61P 1/18 (2006.01)	A61K 39/395	N
A61P 3/10 (2006.01)	A61K 39/395	Y
A61P 17/06 (2006.01)	A61P 1/18	
請求項の数 15 (全 93 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2011-517153(P2011-517153)	(73) 特許権者 511009536	
(62) 出願日 平成21年7月8日(2009.7.8)	ジェウヌロ・エヌエー	
(65) 公表番号 特表2011-527887(P2011-527887A)	GeNeuro SA	
(43) 公表日 平成23年11月10日(2011.11.10)	スイス国、1228 プラン-レーウワツ	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2009/058663	チ、シュマン・デ・オー 18	
(87) 国際公開番号 W02010/003977	18 chemin des Aulx,	
(87) 国際公開日 平成22年1月14日(2010.1.14)	1228 Plan-Les-Ouat	
審査請求日 平成24年5月28日(2012.5.28)	es, SWITZERLAND	
審判番号 不服2015-4824(P2015-4824/J1)	(74) 代理人 100108855	
審判請求日 平成27年3月11日(2015.3.11)	弁理士 藏田 昌俊	
(31) 優先権主張番号 61/129613	(74) 代理人 100103034	
(32) 優先日 平成20年7月8日(2008.7.8)	弁理士 野河 信久	
(33) 優先権主張国 米国(US)	(74) 代理人 100075672	
(31) 優先権主張番号 61/202581	弁理士 峰 隆司	
(32) 優先日 平成21年3月13日(2009.3.13)		
(33) 優先権主張国 米国(US)		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 MSRV関連疾患の特異的なリガンドの治療上の使用		

