

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-527193

(P2011-527193A)

(43) 公表日 平成23年10月27日(2011.10.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-517268 (P2011-517268)
 (86) (22) 出願日 平成21年7月10日 (2009.7.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年3月4日 (2011.3.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2009/006596
 (87) 国際公開番号 W02010/004432
 (87) 国際公開日 平成22年1月14日 (2010.1.14)
 (31) 優先権主張番号 08290683.5
 (32) 優先日 平成20年7月10日 (2008.7.10)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 501474748
 インスティティ・パスツール
 INSTITUT PASTEUR
 フランス、エフ-75724 パリ セデ
 ックス 15、リュ デュ ドクトール
 ル 28
 28, rue du Docteur R
 oux, F-75724 Paris C
 edex 15 FRANCE

(71) 出願人 502205846
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
 ルシュ シアンティフィク
 フランス国 エフ-75016 パリ リ
 ュ ミシェル-アンジュ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリア線維酸性蛋白質に指向されたラクダ科動物の重鎖抗体の可変ドメイン

(57) 【要約】

本発明は、細胞内標的をターゲティングするための、またはペプチドベクターを製造するための、少なくとも8.5の等電点を有する、細胞内標的に指向されたラクダ科動物の重鎖抗体の可変ドメイン (VHHドメイン) の使用に関する。特に、本発明は、グリア線維酸性蛋白質に指向されたVHHドメイン、および治療剤または診断剤を製造するためのその使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

グリア線維酸性蛋白質（GFAP）に指向されたラクダ科動物の重鎖抗体の可変ドメイン（VHドメイン）。

【請求項 2】

前記GFAPが哺乳動物、好ましくはヒト由来であることを特徴とする請求項 1 に記載のVHHドメイン。

【請求項 3】

配列番号1のコンセンサスアミノ酸配列を含むか、または該配列からなることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のVHHドメイン。

10

【請求項 4】

配列番号3、配列番号6、配列番号9および配列番号12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該配列からなることを特徴とする請求項 3 に記載のVHHドメイン。

【請求項 5】

(a) 請求項 1 または 2 に定義されるGFAPでラクダ科動物を免疫にするステップと、
(b) 免疫にされたラクダ科動物の末梢リンパ球を単離し、トータルRNAを得、対応するcDNAを合成するステップと、

(c) VHHドメインをコードするcDNAフラグメントのライブラリを構築するステップと、
(d) PCRを用いて、ステップ(c)で得られたVHHドメインをコードするcDNAフラグメントをmRNAに転写し、mRNAをリボソームディスプレイ方式に変換し、リボソームディスプレイによってVHHドメインを選択するステップと、

20

(e) ベクター内のVHHドメインを発現するステップと

を含む方法によって得ることができることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のVHHドメイン。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のVHHドメインを含むことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 7】

C末端にアミノ酸配列LEHHHHHH（配列番号15）を含むことを特徴とする請求項 6 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のVHHドメインを含むことを特徴とする単離された抗体またはそのフラグメント。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のVHHドメイン、請求項 6 もしくは 7 に記載のポリペプチド、または請求項 8 に記載の抗体もしくはそのフラグメントをコードすることを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 10】

ヒンジがないか、または長いヒンジを有するVHHドメインDNAをコードする遺伝子由来のcDNAであることを特徴とする請求項 9 に記載のポリヌクレオチド。

40

【請求項 11】

請求項 9 または 10 に記載のポリヌクレオチドを、転写プロモーターの制御下に含むことを特徴とする組換え発現カセット。

【請求項 12】

請求項 9 もしくは 10 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 11 に記載の組換え発現カセットを含むことを特徴とする組換えベクター。

【請求項 13】

請求項 11 に記載の組換え発現カセットまたは請求項 12 に記載の組換えベクターを含むことを特徴とする宿主細胞。

【請求項 14】

50

28 rue du Dr Roux, 75734 Paris Cedex 15, FranceのCollection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) に、寄託番号I 3923で寄託された宿主細胞、

CNCMに寄託番号I 3924で寄託された宿主細胞、

CNCMに寄託番号I 3925で寄託された宿主細胞、および

CNCMに寄託番号I 3926で寄託された宿主細胞

からなる群より選択されることを特徴とする請求項13に記載の宿主細胞。

【請求項15】

請求項1～5のいずれか1項に記載のVHHドメイン、または請求項6もしくは7に記載のポリペプチド、または請求項8に記載の抗体を含み、興味対象の物質に直接的もしくは間接的に、共有結合もしくは非共有結合で結合していることを特徴とする治療剤または診断剤。

10

【請求項16】

前記の興味対象の物質がペプチド、酵素、核酸、ウイルス、蛍光体、重金属、化学物質および放射性同位体からなる群より選択される治療用または診断用化合物であることを特徴とする請求項15に記載の治療剤または診断剤。

【請求項17】

前記興味対象の物質が請求項16で定義された治療用または診断用化合物を含むリボソームまたはポリマー物質であることを特徴とする請求項15に記載の治療剤または診断剤。

【請求項18】

前記治療用化合物が抗癌化合物、鎮痛化合物、抗炎症化合物、抗うつ化合物、抗痙攣化合物、または抗神経変性化合物からなる群より選択されることを特徴とする請求項15～17のいずれか1項に記載の治療剤。

20

【請求項19】

脳のイメージングまたは脳障害の診断もしくはモニタリングにおける、請求項15～17のいずれか1項に記載の診断剤の使用。

【請求項20】

請求項1～5のいずれか1項に記載のVHHドメイン、請求項6もしくは7に記載のポリペプチド、請求項8に記載の抗体、請求項9もしくは10に記載のポリヌクレオチド、または請求項15～17のいずれか1項に記載の診断剤を少なくとも含むことを特徴とする脳のイメージング、または脳障害を診断もしくはモニタリングのためのキット。

30

【請求項21】

(a) 請求項1～5のいずれか1項に記載のVHHドメイン、請求項6もしくは7に記載のポリペプチド、または請求項16もしくは17に記載の診断剤と、適切な生体試料とをインビトロまたはエクスピボにおいて接触させるステップと、

(b) 生体試料中のGFAP量を測定するステップと、

(c) ステップ(b)で測定した量と、標準物質とを比較し、量の差が疾患の存在のマーカーを構成するステップと

を含む対象のグリア線維酸性蛋白質(GFAP)によって媒介される障害の診断方法。

【請求項22】

請求項15～18のいずれか1項に記載の治療剤または請求項9に記載のポリヌクレオチドおよび医薬的に許容される担体を含むことを特徴とする医薬組成物。

40

【請求項23】

グリア線維酸性蛋白質(GFAP)によって媒介される障害の治療に使用するための、または脳腫瘍、星状細胞腫、疼痛、精神障害もしくは神経変性障害の治療に使用するための請求項1～5のいずれか1項に記載のVHHドメイン、請求項6もしくは7に記載のポリペプチド、請求項8に記載の抗体、請求項9もしくは10に記載のポリヌクレオチド、請求項15～18のいずれか1項に記載の治療剤または請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項24】

GFAPによって媒介される前記障害がアレキサンダー病、グリオシスおよび星状細胞腫からなる群より選択される請求項23に記載のVHHドメイン。

50

【請求項 25】

治療剤または診断剤を製造するための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のVHHドメイン、請求項 8 に記載の抗体、または請求項 6 もしくは 7 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 26】

哺乳動物の血液脳関門もしくは細胞膜を横切って、好ましくは星状細胞膜を横切って興味対象の物質を送達するための、または興味対象の物質を哺乳動物の星状細胞内に送達するためのペプチドベクターを製造するための請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のVHHドメイン、請求項 6 もしくは 7 に記載のポリペプチドまたは請求項 8 に記載の抗体の使用。

【請求項 27】

細胞内標的をターゲティングするための、または前記細胞内標的を含む哺乳動物細胞内に興味対象の物質を送達するためのペプチドベクターを製造するための、少なくとも8.5の等電点を有する、細胞内標的に指向されたラクダ科動物の重鎖抗体の可変ドメイン（VHHドメイン）の使用。

10

【請求項 28】

前記VHHドメインが超安定性であることを特徴とする請求項 27 に記載の使用。

【請求項 29】

前記VHHドメインが請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のグリア線維酸性蛋白質（GFAP）を指向することを特徴とする請求項 27 または 28 に記載の使用。

【請求項 30】

前記哺乳動物細胞が星状細胞であることを特徴とする請求項 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グリア線維酸性蛋白質（GFAP）に指向されたラクダ科動物の重鎖抗体の可変ドメイン（VHHドメイン）および哺乳動物の血液脳関門および細胞膜を横切る治療用または診断用化合物を送達するためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

グリア線維酸性蛋白質（GFAP）は、中枢神経系（CNS）の星状細胞、腸グリアおよび末梢神経系のミエリン形成シュワン細胞において発現する蛋白質である。

30

【0003】

GFAPは、ビメンチンと共に、細胞骨格の重要な構成要素であるタイプIII中間径フィラメントの形成に参与する。GFAPは、細胞構造および細胞運動（GFAPは有糸分裂に役割を果たす）、細胞間情報伝達ならびに血液脳関門の機能にも関わる。hGFAPをコードするcDNAクローンは、REEVESらによって開示されている（Proc Natl Acad Sci USA., 1989, 86:5178-82）。

【0004】

GFAPは星状細胞の主要な免疫細胞化学的マーカーの1つとして、また中枢神経系の腫瘍および脳組織の変性または外傷状態におけるグリオーシス（すなわち、星状細胞の増殖）の重要なマーカーとしても考えられる。

40

【0005】

CNSの様々な部分、特に白質におけるGFAP陽性星状細胞の構造組織および分布の研究は、外傷状態に関しても関連し得る。

【0006】

いくつかの脳障害は、不適切なGFAP制御と関連する。例として、線維組織と相互作用する星状細胞によって癩痕が形成されるグリア性癩痕形成は、GFAPのアップレギュレーションによって引き起こされる。

【0007】

GFAPと直接的に関連するもう一つの状態はアレキサンダー病である。GFAP遺伝子のコー

50

ド領域における変異がこの病気の存在と関連することが示されている (BRENNERら, 2001, Nat Genet., 27:117-20)。

【0008】

したがって、グリア線維酸性蛋白質 (GFAP) によって媒介される障害の治療が可能な治療剤ばかりでなく、例えば脳腫瘍または変性病巣の検出に適切な診断剤の開発に大きな関心がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

抗体は、脳疾患の潜在的な神経診断用イメージング剤および潜在的な治療剤である。しかしながら、抗体は、いくつかの問題を抱えている。アルブミンのような他の大きな血漿蛋白質と同様に、それらは細胞膜を容易に横断することができず、通常、血液循環の血漿区画に閉じ込められている。細胞内抗原の場合、それらの安定性およびそれらの結合能は、細胞内環境の還元条件 (reducing conditions) による影響を受ける。

10

【0010】

過去10年間で、細胞内の標的に対して産生される抗体の製造および使用への関心が高まってきた。これは一般に細胞内での一本鎖可変ドメイン (scFv) 抗体の組換え発現により得られる。

【0011】

このタイプの抗体は、一般に「細胞内抗体 (intrabody)」とよばれる。この方法の欠点は、新規に合成された細胞内抗体の細胞内環境における安定性の乏しさである。

20

【0012】

細胞質の有害な還元条件は、ドメイン内におけるジスルフィド結合の形成を妨害し、次に蛋白質の高次構造の折りたたみに影響する。その結果、細胞内抗体は無機能となり得、乏しい発現レベル、低い溶解性および細胞内における半減期の減少を示す。

【0013】

HAMERS CASTERMAN (Nature, 1993, 363:446-8) は、ラクダ科 (camelidae) (ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマおよびアルパカ) において、約50%のイムノグロブリンが軽鎖の全くない抗体であることを示している。これらの重鎖抗体は、VHH、VHHドメインまたはVHH抗体とよばれる唯一の単一可変ドメインの力によって、抗原と相互作用する。

30

【0014】

軽鎖が存在しないにも拘らず、これらのホモ二量体抗体は、それらの超可変領域を拡張することによって、広い抗原結合レパートリーを示す。組換えVHHドメイン (VHH) は、元来熱安定性 (VHHの抗体結合は90°Cで実証される) であり、ラクダ科動物由来重鎖抗体の抗原結合能力を示す (NGUYENら, 2001, Adv. Immunol., 79, 261-96; MUYLDERMANSら, 2001, Trends in Biochemical Sciences, 26:230-235)。

【0015】

VHHsが結果として変性に付される場合、それらはしばしば定量的なリフォールディングができるという点で、VHHは極度に可塑性であることも示されている。

【0016】

低分子量 (14~17 Kda) および増強した可塑性は、VHHに独特の可能性を与えるようである：例えば、組織内へのそれらの拡散は、それらのサイズが小さいことによって促進され、いくつかのVHHは、アミラーゼ、炭酸脱水酵素およびニワトリ卵リゾチームのような酵素の活性部位の空隙との相互作用によって、酵素活性を阻害できる (DESMYTERら, 1996, Nature Structural Biology, 3:803-811; DESMYTERら, 2002, Journal of Biological Chemistry, 277:23645-23650; TRANSUEら, 1998, Proteins, 32:515-522; LAUWEREYSら, 1998, Embo J., 17:3512-20)。

40

【0017】

本発明を導いた研究の枠組みの中で、本発明者らは、GFAPに指向されたラクダ科動物の重鎖抗体を製造し、それらの結合特性をインビトロおよびインビボの両方で分析した。し

50

たがって、1体のアルパカをhGFAPに対して免疫にし、3つの抗GFAP VHHをリボソームディスプレイによって選択した。

【課題を解決するための手段】

【0018】

驚くべきことに、本発明者らは次のことを示した：

【0019】

抗GFAP VHHが、ヒトおよびマウスの両方の脳切片の星状細胞におけるGFAP蛋白質を強力かつ特異的に免疫標識したこと（これは、脳組織の固定および透過処理後の標準的な免疫細胞化学的分析によって示されている）。これに関連して、これらのVHHは、慣用の抗GFAP抗体の特性に適合した；

10

【0020】

抗GFAP VHHが、脳内に拡散し、脳細胞（特に星状細胞）の細胞質内に入り、インビボでGFAPに結合できること（VHHは、生きているマウスの吻背側線条体への定位注射後に、脳幹神経節およびその周辺に存在する星状細胞を強力かつ特異的に免疫標識した）；

【0021】

抗GFAP VHHが、（嗅球および大脳の前脳のグリア境界膜に存在する星状細胞の免疫染色によって明らかにされるように）インビボでの鼻腔内点滴注入による投与後に、拡散し、大脳内の標的に到達し、結合できること；したがって、いずれの方法の注射も必要とせず、これらのVHHは脳に容易に送達され、神経細胞およびグリア細胞（特に星状細胞）内に入ることができる。したがって、このようなVHHは、予期しないことに、如何なる人工的処置もなしに細胞内標的に到達できる。

20

【0022】

したがって、これらのVHHは、脳のイメージングおよび脳、特に星状細胞内に治療用化合物を送達するための興味深い物質である。

【0023】

したがって、本発明は、グリア線維酸性蛋白質（GFAP）に指向されたラクダ科動物の重鎖抗体の可変ドメイン（VHHドメイン）を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0024】

特に、GFAPは温血動物、より具体的には哺乳動物、とくにヒト由来である。例えば、ヒトGFAPは、GENBANKデータベースにおいて、次のアクセッション番号gi:164694994またはgi:24430142で利用可能である。

30

【0025】

VHHドメインは、一般に、ラクダ科動物（ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ、・・・）の重鎖抗体の可変ドメインを指す（上記引用のNGUYENら、2001；上記引用のMUYLDERMANSら、2001参照）。

【0026】

本発明によれば、VHHドメインは単離された、組換えまたは合成のVHHドメインを含む。

【0027】

本明細書中用いられるように、用語「単離された」は、VHHドメインが由来するラクダ科動物の重鎖抗体から分離されたVHHドメインを指す。

40

【0028】

本明細書中用いられるように、用語「組換え」は、前記のVHHドメインを生産するための遺伝子工学的な方法（クローニング、増幅）の使用を指す。

【0029】

本明細書中用いられるように、用語「合成の」はインビトロ化学または酵素合成による生産を指す。

【0030】

好ましくは、本発明のVHHドメインはアルパカ（ラマ・パコス（Lama pacos））重鎖抗体由来である。

50

【0031】

好ましくは、本発明のVHHドメインは100～130個のアミノ酸残基からなる。

【0032】

VHHドメインは、好ましくは245～265個のアミノ酸残基からなる二量体の形態にあり得る。

【0033】

好ましい実施形態では、本発明のVHHドメインは少なくとも8.5の等電点を有する。

【0034】

用語「等電点(pI)」は、VHHドメインが正味の電荷を帯びていないpHを指す。蛋白質、特にペプチドまたは蛋白質の等電点を測定する方法は、当業者によく知られている。

10

【0035】

例として、HGMP RC, Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SB, UKにおいて利用可能な、Alan Bleasbyによって書かれたEMBOSS iepソフトウェアのような、蛋白質のpIを計算するための多くの適切なコンピュータプログラムは、当該技術において公知である。

【0036】

もう一つの好ましい実施形態では、本発明のVHHドメインは、配列番号1のコンセンサスアミノ酸配列を含むか、または該配列からなる。

【0037】

より具体的な実施形態では、本発明のVHHドメインは、配列番号3、配列番号6、配列番号9および配列番号12からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該配列からなる。

20

【0038】

本発明のVHHドメインは、少なくとも2つの配列番号1のアミノ酸配列、好ましくは2つの配列番号6のアミノ酸配列も含み得る。例えば、配列番号12のVHHドメインは、配列番号6のVHHドメインのホモ二量体である。

【0039】

本発明のVHHドメインは、

(a) ラクダ科動物、好ましくはラマ・パコスを上記で定義されたGFAPで免疫にするステップと、

30

(b) 免疫にされたラクダ科動物の末梢リンパ球を単離し、トータルRNAを得、対応するcDNAを合成するステップ(方法は当該技術において周知である;例えば、LAFAYEら, 1995, Res Immune., 146:373-82; Res Immunol., 1996, 147:61の正誤表参照)と、

(c) VHHドメインをコードするcDNAフラグメントのライブラリを構築するステップと、

(d) PCRを用いて、ステップ(c)で得られたVHHドメインをコードするcDNAをmRNAに転写し、mRNAをリボソームディスプレイ方式に変換し、リボソームディスプレイによってVHHドメインを選択するステップと、

(e) ベクター内のVHHドメインを発現し(例えば、適切なベクターはpET22(Novagen, Cat. No. 69744-3)である)、任意に、発現したVHHドメインを精製するステップと

40

を含む方法によって得ることができる。

【0040】

前記方法の好ましい実施形態では、ステップ(a)において、ラクダ科動物を250 µgの前記GFAPで、0、21および35日目に免疫にする。結合したラクダ科動物の抗体は、ウサギ抗ラクダ科動物ポリクローナルIgG(例えば、MUYLDERMANS, Protein Eng., 1994, 7:1129-35参照)およびセイヨウワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ抗体を用いて検出することができる。

【0041】

前記方法のもう一つの好ましい実施形態では、ステップ(c)において、前記ライブラリは、VHHドメインをコードするDNAフラグメントをPCRによって増幅し、得られたPCR生成物をファージベクター(適切なファージベクターの例はpHEN; HOOGENBOOMら, J Mol Biol

50

., 1992, 227:381 8である)にライゲーションすることによって構築できる。

【0042】

ステップ(c)の具体的な実施形態では、VHHドメインをコードするDNAフラグメントは、配列番号16の配列(CH2FORTA4と称する)および配列番号17の配列(VHBACKA6と称する)のプライマーを用いるPCRによって増幅され、増幅された生成物は、配列番号18の配列(VHBACKA4と称する)および配列番号19の配列(VHFOR36と称する)のプライマーまたはVHBACKA4および配列番号20の配列(LHと称する)のプライマーのいずれかを用いる2回目のPCRに付される。このような方法は、国際PCT出願番号WO2004/044204に記述されている。

【0043】

前記方法の別の好ましい実施形態では、ステップ(d)において、前記PCRが配列番号21の配列(VHH SPEFと称する)および配列番号22の配列(VHH SPERと称する)のプライマーを用いて行われ、そしてPCR生成物は配列番号23の配列(SDA MRGSと称する)、配列番号24の配列(T7Cと称する)およびVHH SPERのプライマーの混合物を用いて増幅される。

【0044】

ペプチドリンカーも、リボソーム上にディスプレイされた蛋白質が潜在的なリガンドに近づけるようにするために加えられ得る。例として、大腸菌(E. coli)蛋白質ToIAの一部に相当するこのようなリンカーをコードするDNAは、配列番号25の配列(VHH linkと称する)および配列番号26の配列(ToIAkurzと称する)のプライマーを用いることによってPCR増幅され得る。

【0045】

VHHドメインをコードするcDNAのライブラリは、ToIAkurzおよび配列番号27の配列(T7Bと称する)のプライマーを用いるPCRアセンブリによって、ToIAリンカーと共に組み立てることができる。

【0046】

リボソームディスプレイ技術は、蛋白質と共にそれをコードするmRNAのインビトロでの選択を可能にする。特定の蛋白質、例えばVHHフラグメントをコードするDNAライブラリは、インビトロで転写される。mRNAは精製され、インビトロでの翻訳のために用いられる。

【0047】

mRNAは終止コドンを欠くため、リボソームは該mRNAの末端で立ち往生して、mRNA、リボソームおよび機能性蛋白質の三重複合体が形成される(HANESおよびPLUCKTUM, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-42)。

【0048】

これらの三重複合体のライブラリは、潜在的なリガンドに対して(抗体の場合、抗原に対して)試験される。三重複合体(リボソーム、mRNA、蛋白質)のリガンドへの結合は、該複合体に結合しており、かつ逆転写PCR(RT-PCR)によってcDNAに逆転写され得るコードmRNAの回収を可能にする。選択および回収のサイクルは、希少なリガンド結合分子を豊富にすること、および最良の親和性を有する分子を選択することの両方のために繰り返すことができる。

【0049】

リボソームディスプレイ選択の方法は、当該技術において周知である;例えば、MOURATOUら, 2007, Proc Natl Acad Sci USA., 104:17983-8参照。

【0050】

前記のステップ(d)の別の好ましい実施形態では、リボソームディスプレイ選択は3回のPCRで行われる。好ましくは、1回目のPCRは、プライマー-VHH SPEFおよびVHH SPERを用いて行われ、1回目のPCR後に得られたPCR生成物は、プライマー-T7C、SDA MRGSおよびVHH SPERを用いる2回目のPCRで再度増幅され、2回目のPCR後に得られたPCR生成物は、プライマー-T7BおよびToIAkurzを用いる3回目のPCRで再度増幅され、3回目のPCR生成物は、次回のリボソームディスプレイのためのテンプレートとして用いられる。

【0051】

10

20

30

40

50

本発明者らは、上記で定義された方法（実施例1も参照）を用いて、hGFAP蛋白質（GEN BANKデータベースにおけるアクセッション番号gi:164694994）に指向されたVHHドメインをコードするcDNAフラグメントのライブラリを作出した。

【0052】

本発明者らは、上記で定義されたVHHドメインを含むポリペプチドも提供する。

【0053】

本発明のポリペプチドが、少なくとも2つの上記で定義されたVHHドメインを含む場合、前記VHHドメインは同一であり得るかまたは異なり得、スペーサー、好ましくはアミノ酸スペーサーによって互いに離すことができる。

【0054】

本発明のポリペプチドの精製を可能にするために、ポリペプチドは、アミノ酸配列LEHHHHH（配列番号15）のようなHis tagをそのC末端に含み得る。

【0055】

したがって、前記のポリペプチドの実施形態では、ポリペプチドはアミノ酸配列LEHHHHHH（配列番号15）を、そのアミノ酸配列のC末端にさらに含む。例として、配列番号5（名称VHH A10）、配列番号8（名称VHH E3）、配列番号11（名称VHH E9）および配列番号14（名称VHH B8）のアミノ酸配列のポリペプチドは、アミノ酸配列LEHHHHHHHが融合しているそれぞれ配列番号3、6、9および12の配列のVHHドメインからなる。

【0056】

好ましい実施形態では、本発明のVHHドメインまたはポリペプチドは、少なくとも $<10^{-6}$ Mの結合親和性で、上記で定義されたGFAPに結合する。親和性（解離定数）測定は、FRIGUETら（J. Immunol. Methods, 1985, 77:305-319）に記載の方法を含む、当業者に周知の方法を用いて行われ得る。

【0057】

VHH A10、VHH E3、VHH E9およびVHH B8は、hGFAP（GENBANKデータベースにおけるgi:164694994）について、それぞれ 3.1×10^{-9} M、 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ M、 5.6×10^{-9} Mおよび 5.2×10^{-9} Mの親和性（FRIGUETら（上記引用）に記載の方法にしたがって測定した親和性）を有する。

【0058】

本発明は、本発明のVHHドメインを含む、単離された抗体、好ましくはラクダ科動物の重鎖抗体、またはそのフラグメントも提供し、前記単離された抗体またはそのフラグメントは、上記で定義されたGFAPに結合する。

【0059】

本明細書中用いられるように、用語「抗体フラグメント」は、完全長（全体の）抗体の一部、例えば、1つの重鎖のみまたはFab領域を意味する。

【0060】

本発明は、本発明のVHHドメイン、ポリペプチド、または抗体もしくはそのフラグメントをコードする単離されたポリヌクレオチドも提供する。本発明のポリヌクレオチドは公知の組換えDNA技術および/または化学的DNA合成の方法によって得られてもよい。

【0061】

前記ポリヌクレオチドの具体的な実施形態では、それは、ヒンジがないか、または長いヒンジを有するVHHドメインをコードする遺伝子由来のcDNAである。

【0062】

VHH A10、E3、E9およびB8をコードするヌクレオチド配列は、配列番号4、7、10および13として、本明細書に添付された配列表に書き添えられている。

【0063】

本発明は、宿主細胞において本発明のポリヌクレオチドの転写の調節を可能にする転写プロモーターの制御下に、前記ポリヌクレオチドを含む組換え発現カセットも提供する。前記ポリヌクレオチドは、宿主細胞においてその翻訳の調節を可能にする適当なコントロール配列に結合され得る。

10

20

30

40

50

【0064】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたは発現カセットを含む組換えベクターも提供する。

【0065】

本発明は、本発明の組換え発現カセットまたは組換えベクターを含む宿主細胞も提供する。該宿主細胞は、原核宿主細胞または真核宿主細胞のいずれかである。

【0066】

VHH A10を発現する原核宿主細胞は、28 rue du Dr Roux, 75734 Paris Cedex 15, FranceのCollection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) に、寄託番号I 3923で寄託されている。

VHH B3を発現する原核宿主細胞は、CNCMに寄託番号I 3924で寄託されている。

VHH E3を発現する原核宿主細胞は、CNCMに寄託番号I 3925で寄託されている。

VHH E9を発現する原核宿主細胞は、CNCMに寄託番号I 3926で寄託されている。

【0067】

本発明は、興味対象の物質に直接的または間接的に、共有結合的または非共有結合的に結合している、本発明のVHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体を含む治療剤または診断剤も提供する。

【0068】

本発明によれば、興味対象の物質は、哺乳動物もしくはヒトの血液脳関門または細胞（例えば、星状細胞）の膜を透過し得るか、または透過し得る。

【0069】

興味対象の物質が前記血液脳関門または細胞（例えば、星状細胞）の膜を透過する場合、本発明のVHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体の使用は、血液脳関門を横切つての、または細胞（特に、星状細胞）内への、該興味対象の物質の送達を増大させ得る。

【0070】

前記治療剤または診断剤の実施形態では、前記興味対象の物質は、ペプチド、酵素、核酸、ウイルス、蛍光体、重金属、化学物質および放射性同位体からなる群より選択される治療用または診断用化合物である。

【0071】

前記治療剤または診断剤の別の実施形態では、興味対象の物質は、上記で定義された治療用または診断用化合物を含むリポソームまたはポリマー物質である。

【0072】

前記診断剤の好ましい実施形態では、前記の診断用化合物は、

セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース 6 ホスファターゼまたはガラクトシダーゼのような酵素類；

電子検出器（CCDカメラ、光電子増倍管）で可視化される、緑色蛍光蛋白質（GFP）、スペクトルの紫外（UV）部分の波長にて励起される青色蛍光色素（例えば、AMCA（7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸）；Alexa Fluor 350）、青色光によって励起される緑色蛍光色素（例えば、FITC, Cy2, Alexa Fluor 488）、緑色光によって励起される赤色蛍光色素（例えば、ローダミン類, Texas Red, Cy3, Alexa Fluor色素546, 564および594）、または遠赤外線で励起される色素（例えば、Cy5）のような蛍光体；

ユーロピウム、ランタンまたはイットリウムのような重金属キレート類

[¹⁸F]フルオロデオキシグルコース、¹¹C、¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴C、³⁵Sまたは⁹⁹Tc 標識化合物のような放射性同位体からなる群より選択される。

【0073】

前記治療剤の別の好ましい実施形態では、治療用化合物は、抗癌化合物、鎮痛化合物、抗炎症化合物、抗うつ化合物、抗痙攣化合物または抗神経変性化合物からなる群より選択される。

【0074】

10

20

30

40

50

上記で定義された興味対象の物質は、本発明のVHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体に、VHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体の末端（NまたはC末端）のどちらかで、あるいは前記VHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体のアミノ酸の一つの側鎖に直接的に、かつ共有結合的または非共有結合的に結合され得る。

【0075】

興味対象の物質は、本発明のVHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体に、VHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体の末端のどちらかで、あるいはVHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体のアミノ酸の一つの側鎖に、連結手（例えば、架橋剤）によって、間接的に、かつ共有結合的または非共有結合的に結合し得る。

【0076】

ペプチド、特に抗体への興味対象の物質の結合方法は、当該技術において周知である（例えば、TERNYNCKおよびAVRAMEAS, 1987, "Techniques immunoenzymatiques" Ed. INSERM, Paris参照）。

【0077】

多くの化学的架橋方法も、当該技術において周知である。架橋試薬は、ホモ二官能性（すなわち、同一の反応を受ける2つの官能基を有する）またはヘテロ二官能性（すなわち、2つの異なった官能基を有する）であり得る。

【0078】

多数の架橋試薬は、市販されている。それらの使用についての詳細な取扱説明書は、市場供給者から容易に入手可能である。ポリペプチドの架橋およびコンジュゲーションの調製についての一般的な参考資料は：WONG, Chemistry of protein conjugation and cross linking, CRC Press (1991) である。

【0079】

あるいは、前記興味対象の物質が、本発明のペプチド、VHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体である場合、興味対象の物質は、本発明のVHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体および適切なペプチドを含む融合ポリペプチドとして遺伝子工学によって生産され得る。この融合ポリペプチドは、適切な既知の宿主細胞において、簡便に発現され得る。

【0080】

本発明のVHHドメイン、ポリペプチド、抗体、治療剤もしくは診断剤またはポリヌクレオチドは、静脈内、腹腔内、筋肉内もしくは皮下注射のような注射、または鼻腔内点滴注入によって対象（哺乳動物またはヒト）に投与され得る。

【0081】

有利には、本発明のVHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体が、鼻腔内点滴注入によって対象に投与される場合、それは星状細胞に到達し、中に入り得る。

【0082】

本発明の診断剤は、脳のイメージング、脳腫瘍、グリオーシス、星状細胞腫、アレキサンダー病、変性細胞巣、疼痛、精神障害（例えば、鬱病）または神経変性障害（例えば：アルツハイマー病）のような脳障害の診断またはモニタリングに用いられ得る。

【0083】

本発明は、脳のイメージングまたは上記で定義された脳障害の診断もしくはモニタリングのための、本発明のVHHドメイン、ポリペプチド、抗体、診断剤またはポリヌクレオチドを少なくとも含むキットも提供する。

【0084】

本発明は、

(a) 本発明のポリペプチドまたは診断剤と、適切な生体試料とをインビトロまたはエクスピボにおいて接触させるステップと、
 (b) 生体試料中のグリア線維酸性蛋白質（GFAP）量を測定するステップと、
 (c) ステップ（b）で測定した量と、標準物質とを比較し、量の差が疾患の存在のマーカーを構成するステップと
 を含む対象のGFAP、例えばアレキサンダー病、グリオーシス、星状細胞腫によって媒介さ

10

20

30

40

50

れる障害の診断方法も提供する。

【0085】

本発明は、上記で定義された治療剤および医薬的に許容される担体を含む医薬組成物も提供する。

【0086】

本明細書中用いられるように、「医薬的に許容される担体」は、医薬投与と両立可能な如何なるすべての溶媒、分散媒、被覆剤、抗菌および抗真菌剤、等張性吸収遅延剤などを含むことを意図する。

【0087】

適切な担体は、当該技術において標準的な参考テキストであるRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載されている。そのような担体または希釈剤の好ましい例は、水、生理食塩水、リンガー液、デキストロース溶液および5%ヒト血清アルブミンを含むが、これらに限定されない。リポソーム、カチオン脂質および不揮発性油類のような非水性賦形剤も用いてもよい。

【0088】

医薬的活性物質のための、このような媒体および物質の使用は、当該技術において公知である。如何なる慣用の媒体または物質も上記に定義された治療剤と併用不可能である場合を除いて、本発明の組成物について、それらの使用が考えられる。

【0089】

本発明は、アレキサンダー病、グリオースもしくは星状細胞腫のようなグリア線維酸性蛋白質(GFAP)によって媒介される障害の治療、または脳腫瘍、星状細胞腫、疼痛、精神障害もしくは神経変性障害のための、本発明のVHHドメイン、ポリペプチド、抗体、治療剤、医薬組成物またはポリヌクレオチドも提供する。

【0090】

本明細書中用いられるように、用語「治療」は、障害、障害の徴候または障害に対する素因を有する患者に対して、障害、障害の徴候または障害に対する素因を治癒する、癒す、緩和する、和らげる、変更する、軽減する、改善する、好転させる、または影響を与える目的で、上記に定義されたVHHドメイン、ポリペプチド、抗体、治療剤または医薬組成物を投与することを含む。

【0091】

別の観点では、本発明は、哺乳動物の血液脳関門または細胞膜、好ましくはヒトの血液脳関門または細胞膜を横切って、上記で定義された興味対象の物質を送達するためのペプチドベクターを製造するための、本発明のVHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体の使用に関する。

【0092】

特に、本発明のVHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体は、哺乳動物の星状細胞膜、好ましくはヒトの星状細胞膜を横切って、上記で定義された興味対象の物質を送達するための、または哺乳動物の星状細胞内、好ましくはヒトの星状細胞内に、上記で定義された興味対象の物質を送達するための、ペプチドベクターの製造に用いられ得る。

【0093】

本発明者らは、予期しないことに、9.15に等しい等電点を本来有する本発明のVHHドメインが、その抗原についての改変された親和性を有さず、インビボとインビトロにおいて細胞透過性抗体(transbody)および細胞内抗体として作用し得ることを見出している(実施例4参照)。

【0094】

したがって、別の観点では、本発明は、少なくとも8.5、好ましくは少なくとも9、より好ましくは9~10の等電点を有する、細胞内標的に指向されたラクダ科動物の重鎖抗体の可変ドメイン(VHHドメイン)、または、VHHドメインを含むポリペプチドもしくは抗体の、細胞内標的をターゲティングするための、もしくは細胞内標的を含む哺乳動物細胞に、好ましくはヒト細胞に、上記で定義されたように興味対象の物質を送達するためのペプチ

10

20

30

40

50

ドベクターを製造するための使用に関する。

【0095】

本明細書中用いられるように、用語「細胞内標的」は、細胞、好ましくはニューロンまたはグリア細胞のような脳細胞内に存在し、VHHドメインと結合もしくは相互作用するその能力によって、細胞内で前記VHHドメイン、またはVHHドメインを含むポリペプチドもしくは抗体を指向することができる如何なる抗原（または一部分）も指す。

【0096】

本明細書中用いられるように、用語「ターゲティング」は、細胞、好ましくはニューロンもしくはグリア細胞のような脳細胞に入り、前記細胞内標的（抗原）に結合するための、上記で定義されたVHHドメイン、ポリペプチドまたは抗体の能力を指す。

10

この観点の好ましい実施形態では、VHHドメインは超安定である。

【0097】

本明細書中用いられるように、用語「超安定」は、VHHドメインが、熱変性後（この場合、該VHHドメインは熱安定である）および/またはジスルフィド架橋還元後に、その活性作用（または機能）を回復できることを意味する。

【0098】

VHHドメインの熱安定性は、次のように測定できる：

- a) VHHドメイン（「未変性VHHドメイン」と称する）を300 mM PBS/NaClに懸濁し、
- b) 75 で15分間加熱し、
- c) 4 で20分間冷却し、
- d) ステップc) で得られたリフォールディングされたVHHドメインの結合親和性を測定し、リフォールディングされたVHHドメインの安定性が未変性VHHドメインと比べて最大でも2倍減少している場合、該VHHドメインは熱安定性である。

20

【0099】

VHHドメインのジスルフィド架橋の還元は、実施例4に記載されるようにして行われ得る。本発明によれば、ジスルフィドを形成しているシステイン残基がセリン残基で置換されたVHHドメインの結合親和性が、未変性VHHドメインと比べて最大でも2倍減少している場合、VHHドメインは超安定である。

【0100】

VHHドメイン（VHH抗体）の結合親和性は、当業者に周知の如何なる方法、例えば以下の実施例1に記載のELISAの手法によって、測定され得る。

30

【0101】

この観点の別の好ましい実施形態では、前記ヒト細胞は星状細胞であり、任意に前記細胞内標的はGFAPである。

【0102】

本発明は、

- (a) インピトロ、エクスピボまたはインピボにおいて、細胞を試験化合物と接触させるステップと、
 - b) 本発明の診断剤で前記細胞内のGFAP蛋白質量を検出および測定するステップと、
 - c) ステップb) で測定された量を、前記試験化合物の非存在下における細胞内のGFAP蛋白質量と比較するステップと
- を含み、量の差が、前記試験化合物が細胞内のGFAP蛋白質量を調節できることを示す、細胞内の、好ましくは星状細胞内のGFAP蛋白質量を調節できる化合物をスクリーニングする方法も提供する。

40

【0103】

本明細書中用いられるように、用語「GFAP蛋白質量を調節する」とは、GFAP蛋白質量を減少もしくは増加させること、またはGFAP蛋白質の産生を阻害することを意味する。

【0104】

前述の特徴に加えて、本発明は、本発明を説明する実施例および添付の図面を参照する以下の記述から明らかとなる他の特徴をさらに含む。

50

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】図1は、CLUSTAL W2プログラム(LARKINら, Bioinformatics, 2007, 23:2947-2948)で行われた抗GFAP VHHドメインVHH E3(配列番号8)、VHH B8(配列番号14)、VHH E9(配列番号11)およびVHH A10(配列番号5)の蛋白質アラインメントを示す。VHH B8は二重であり、対応するモノマーはVHH E3と同一である。(:)は類似の置換を示し、(.)は保存された置換を示す。

【図2】図2は、ELISAによって解析された、VHHドメインであるVHH A10、E3およびE9のGFAPへの結合を示す。マイクロタイタープレートはGFAPでコートされており、様々な濃度のVHHが加えられた。

【図3】図3は、抗GFAP特異性のウェスタンブロット解析を示す。マウス脳抽出物を電気泳動し、イムノブロットし、VHHドメインVHH A10、B8、E3およびE9と共にインキュベートした。

【図4】図4は、ネズミ脳切片の星状細胞内のGFAPの免疫標識を示す。VHH A10に曝露する前に、脳切片を固定し、透過処理した。

【図5】図5は、ヒト由来脳切片の星状細胞内のGFAP蛋白質の免疫標識を示す。対比染色：ハリス・ヘマトキシリン。海馬体の白質。aおよびb：免疫標識は細胞膜(矢印の頭)に近く、細胞体を満たしていない。cおよびdにおいて、星状細胞の足が毛細血管(矢印)に到達している。スケールバー：10 μm。

【図6】図6は、アルツハイマー病(AD)のヒト患者由来脳切片の星状細胞内のGFAP蛋白質の免疫標識を示す。海馬由来サンプル。免疫標識された星状細胞の突起は2つのアミロイドプラークを取り囲んでいる。スケールバー：10 μm。

【図7】図7は、星状細胞腫由来の脳切片の星状細胞内のGFAPの免疫標識を示す。aおよびb：腫瘍内の異常星状細胞。cおよびd：腫瘍周縁部の反応性星状細胞。スケールバー：10 μm。

【図8】図8は、共焦点顕微鏡によるアルツハイマー患者由来サンプルの二重免疫標識を示す。a：ウサギ抗Hisタグ抗体およびCY2と連結しているヤギ抗ウサギ抗体によって示されたアルパカ抗GFAP。b：CY3と連結しているヤギ抗マウス抗体によって示された抗GFAPマウスmAb。c：マージ画像。グリア線維内：核周辺の細胞体内、突起内および血管周囲の星状細胞の足において、共局在(黄色)が観察された。スケールバー：10 μm。

【図9】図9は、VHH A10およびmAbの拡散の比較を示す。a：両面にカバーガラスを貼付することによって、V_HHおよびマウスmAbの拡散を縁に限定するために用いられる様々なステップを示す図解。二次抗体をアプライし、検出は遊離浮遊切片上で行った。(1)前処理、(2)切片を2つのカバーガラス間に配置し、(3)2つのカバーガラス間の切片を、一次抗体を含む溶液と8時間接触させて放置し、(4)切片をカバーガラスから取り出し、(5)二次抗体をアプライし、遊離浮遊切片上で検出した。

【図10】図10は、マウス脳切片の星状細胞内のGFAP蛋白質の免疫標識を示す。VHH A10は、アルデヒドによる固定および免疫染色の手順の前に、生きている吻背側線条体に定位注射した。VHH注射の5(A)、7(B)または14(C)時間後に、脳を灌流した。

【図11】マウス脳切片の星状細胞内のGFAP蛋白質の免疫標識を示す。VHH A10を、アルデヒドによる固定および免疫染色の手順の前に、鼻腔内点滴注入により生きている脳に送達した。図は嗅球の2つの領域に対応する。

【図12】図12は、抗GFAP VHH-E9の特徴を示す。A：ウェスタンブロット。マウス脳抽出物を電気泳動し、イムノブロットし、VHH E9と共にインキュベートした。MW：分子量マーカー蛋白質。B：PhastGel IEF 3-9上の等電点電気泳動。Mpl：等電点マーカー。

【図13】図13は、マウス脳切片内の星状細胞の細胞質におけるGFAPのVHH E9の免疫標識を示す。A：線条体と脳梁近くの一次運動野との間の白質内の免疫標識された星状細胞。薄い線維質星状細胞(矢印の頭)およびいくつかの大きな原形質星状細胞(矢印)が主に同定された。B：背側第3脳室の面において軟膜表面のグリア境界膜(矢印)から発している、免疫標識された星状細胞の放射状に指向したグリア突起。C：前脳の基底に局

10

20

30

40

50

在する軟膜表面のグリア境界膜（矢印）から発している、免疫標識された星状細胞の放射状に指向したグリア突起。これらの突起は、前腹側室周囲および内側視索前核にわたって広がっている。D：前交連、前部（aca；矢印の頭）の円筒状白質に局在する免疫標識された星状細胞突起。acaに近接して、放射状に指向する免疫標識GFAP線維も局在する。これらのグリア突起は、側脳室（矢印）の底部に局在する軟膜表面の折りたたまれた部分から発している。

【図14】図14は、インビトロにおける血液脳関門（BBB）を横切るVHH-E9の移動を示す。A：輸送の研究は、先端区画（上部チャンバ）に10～20 μg/ml VHHを加えることによって開始し、VHH量を10分、30分および60分後に下部チャンバ内で測定した。B：インビトロBBBモデルを横切るVHHの移動に対する吸着媒介性エンドサイトーシス（AME）およびマクロピノサイトーシスの薬理的阻害剤の効果。hCMC/D3は、AME阻害剤である硫酸プロタミン（40 μg/ml）およびポリ-L-リシン（300 μM）、またはマイクロピノサイトーシス阻害剤であるアミロライド（500 μM）のいずれかと共に30分間前処理した。そしてVHH輸送を30分間にわたって測定した。

【図15】図15は、インビボで血液脳関門（BBB）を横切るVHH-E9の移動を示す。4 mgのVHHをC57/BL/6マウスの左頸動脈内に60分間灌流した。マウスを1時間後に安楽死させた。a：脳梁、b：海馬、c：嗅球、d：灰白質（スケールバー：10 μm）、e：吻側脳梁の冠状切片の免疫標識された星状細胞。右側（R）と比べて、注射された頸動脈と同側の左（L）脳梁膝節（矢印）において、より多くの星状細胞が標識されている（スケールバー：100 μm）。

【図16】図16は、30%マンニトール注射後のマウス脳切片におけるGFAPのVHH-E9免疫標識を示す。a：血管管と並列したグリア星状細胞の足の突起、b：白質における星状細胞のVHH免疫標識。

【図17】図17は、プラスモディウム・ベルゲイ（*Pl. Berghei*）寄生生物注射後のマウス脳切片の細胞質におけるGFAPのVHH-E9標識を示す。C57BL/6マウスに、マウスあたり 10^6 のプラスモディウム・ベルゲイ感染赤血球を腹腔内経路で接種した。5日目に、400 μgのVHHを左頸動脈内に60分間灌流した。マウスを1時間後に屠殺した。A：嗅球、B：白質、C：海馬、D：尾側領域、E：白質の冠状切片。星状細胞は脳梁内で標識された（Lは左脳半球であり、注射された頸動脈側に対応する；Rは右脳半球である）。

【実施例】

【0106】

次の実施例は、本発明を説明するが、決して本発明を限定するものではない。

【0107】

実施例1：抗GFAP VHHの製造

1) 材料および方法

材料

正常なヒト脳由来GFAP（GENBANKデータベースにおけるgi:164694994）は、United States Biological, Incから購入した。抗GFAPウサギポリクローナル抗体（GF5）は、Santa Cruz Biotechnology, Ca, USAから入手した。

【0108】

プライマー：

CH2FORA4（配列番号16）：

5' CGCCATCAAGGTACCAGTTGA 3'

VHBACKA6（配列番号17）：

5' GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG 3'

VHBACKA4（配列番号18）：

5' -CATGCCATGACTCGCGCCAGCCGCCATGGCCGAKGTSCAGCT 3'

VHFOR36（配列番号19）：

5' GGACTAGTTGCGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTG 3'

【0109】

10

20

30

40

50

LH (配列番号20) :

5' GGACTAGTTGCGGCCGCTGGTTGTGGTTTTTGGTGTCTTGGG 3'

VHH SPEF (配列番号21) :

5' GGAGATATATATCCATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGCCGAKGTSCAGCTG 3'

VHH SPER (配列番号22) :

5' CCATATAAAGCTTTGAGGAGACGGTGACCTG 3'

SDA MRGS (配列番号23) :

5' AGACCACAACGGTTTTCCCTCTAGAAAATAATTTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATATCCATGAGAGGATCG 3'

【 0 1 1 0 】

T7Cプライマー (配列番号24) :

5' ATACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTC 3'

VHH link (配列番号25) :

5' -CAGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTATATGGCCTCGGGGGCC 3'

ToIAkurz (配列番号26) :

5' -CCGCACACCAGTAAGGTGTGCGGTTTTCAAGTTGCCGCTTTCTTTCT 3'

T7B (配列番号27) :

5' -ATACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGG 3'

【 0 1 1 1 】

抗原の調製およびアルパカにおける体液性免疫応答の誘導

250 μ lのGFAP (1mg/ml) を、最初の免疫化のための250 μ lの完全フロイントアジュバントと、およびその後の免疫化のための250 μ lの不完全フロイントアジュバントと混合した。

【 0 1 1 2 】

1体の若年成体のオスのアルパカ(ラマ・パコス)を、0日目、21日目および35日目に、250 μ gの免疫原で免疫にした。アルパカを飼育し、0.5%ゼラチンを含む0.1%PBS Tweenに血清を希釈後、MaxiSorp(商標)プレート(Nunc, Denmark)上に固定したGFAP(PBS中1 μ g/ml)についてのELISAによる血清サンプルの抗体価測定によって、免疫応答をモニタリングした。結合したアルパカ抗体は、(プロテインAおよびプロテインGカラム(MU YLDERMANSら, 1994, 上記引用)で単離したアルパカイムノグロブリンでウサギを免疫にすることによって得られた)ポリクローナルウサギ抗アルパカIgGおよびセイヨウワサビ

【 0 1 1 3 】

ライブラリの構築

免疫化動物の血液を回収し、末梢血リンパ球をフィコール(Pharmacia)不連続勾配遠心分離によって単離し、さらに使用するまで80で保管した。トータルRNAおよびcDNAを、LAFAYEら, 1995(Res Immune., 146:373-82; Res Immunol., 1996, 147:61の正誤表)により以前に記載されたようにして得た。

【 0 1 1 4 】

VHHドメインをコードするDNAフラグメントを、VH遺伝子の3'および5'フランキング領域にそれぞれアニールするCH2FORTA4およびVHBACKA6プライマー(国際出願番号WO 2004/044204; LAFAYE、上記引用に記載)を用いたPCRによって増幅した。

【 0 1 1 5 】

約600 bpの増幅産物を、(国際出願番号WO 2004/044204に記載されるような)長いヒンジの抗体に特異的なプライマー-VHBACKA4およびVHFOR36、またはプライマー-VHBACKA4およびLHのいずれかを用いた2回目のPCRに付した。

【 0 1 1 6 】

プライマーは増幅産物の5'および3'末端に相補的であり、VHH遺伝子の末端にSfiIおよびNotI制限酵素サイトが組み込まれていた。PCR生成物を消化し、ファージベクター-pHEN1(HOOGENBOOMおよびWINTER, 1992, 上記引用)にライゲーションした。

【 0 1 1 7 】

10

20

30

40

50

得られたライブラリは、2つのサブライブラリからなり、一方はヒンジのないVHH DNAをコードする遺伝子に、他方は長いヒンジの抗体遺伝子に由来した。

【0118】

VHHドメイン群は、PCRを用いてリボソームディスプレイ方式に変換され、次のようにしてmRNAに転写された(MOURATOUら, 2007, Proc Natl Acad Sci USA., 104:17983-8)。

【0119】

VHHドメイン群からのクローンを、原核生物のシャイン ダルガーノ(Shine Dalgarno)配列を含む5'伸長を含むプライマー-VHH SPEFおよびプライマー-VHH SPERを用いて増幅した。

【0120】

その後400bpのPCR生成物を、SDA MRGSプライマー(5 μM)、VHH SPERプライマー(5 μM)およびT7Cプライマー(5 μM)の混合物を用いて増幅した。450bpの生成物をWizard(登録商標)SV精製キット(Promega)で精製した。

【0121】

ペプチドリンカーを、リボソームディスプレイされた蛋白質が潜在的なリガンドに接触できるようにするために加えた。大腸菌蛋白質ToIAの一部に相当する、このリンカーをコードするDNAを、プライマー-VHH linkおよびToIAkurzを用いることによってPCR増幅した。

【0122】

最終的に、ライブラリを、プライマー-ToIAkurzおよびT7Bを用いたPCRアセンブリ(assembly)によってToIAリンカーで組み立てた。

【0123】

最終的なアセンブリ生成物は、以前に記載されたようにして(MOURATOUら, 2007, 上記参照)、リボソームディスプレイ選択のための使用に必要なすべての5'および3'領域を有するVHHのライブラリに相当した。

【0124】

リボソームディスプレイ選択の繰り返し

GFAP(10 μg/ml)をMaxiSorp(商標)プレート(Nunc, Denmark)に結合させ、リボソームディスプレイ選択を4で行った。選択はMOURATOUら(2007, 上記参照)にしたがって行った。ウェルをTBS中の0.5%BSA 300 μlで、1時間室温でブロッキングした。

【0125】

1回のリボソームディスプレイの前に、ウェルを洗浄バッファWBT(50mM Tris酢酸, pH 7.5, 150mM NaCl, 50mM Mg(CH₃COO)₂, 0.05% Tween 20)で十分に洗浄した。

【0126】

1回のリボソームディスプレイは、PBSでコートされたウェルでの15分間のパンニングのステップおよび標的蛋白質との1時間の結合ステップからなった。洗浄後、RNAの精製および(プライマー-VHH SPERを用いた)逆転写の後に、プライマー-VHH SPEFおよびVHH SPERを用いる最初のPCRを行った。

【0127】

このRT PCR生成物をアガロースゲルで精製し、T7C、SDA MRGSおよびVHH SPERプライマーを用いる2回目のPCRで再度増幅した。このPCR生成物をアガロースゲルで精製し、T7BおよびToIAkurzプライマーを用いる3回目のPCRで再度増幅した。

【0128】

3回目のPCR生成物は、次回のリボソームディスプレイのための鋳型として使用した。高親和性結合物を単離するために、3つの同一の選択を繰り返した。

【0129】

抗タグまたは抗アルパカ抗体による認識を可能にするためのHisタグまたはCH₂ドメインのいずれかを有するVHHの発現

pETシステムにおけるHisタグを有するVHHの発現

VHHのコード配列は、製造業者の取扱説明書(Novagen, Darmstadt, Germany)にしたが

10

20

30

40

50

って、NcoIおよびNotI制限酵素サイトを用いてpET22ベクターにサブクローニングした。

【0130】

形質転換された大腸菌BL 21 (DE3) 細胞は、15℃で18時間の1mM IPTGによる誘導後、周辺細胞質 (periplasm) においてVHHを発現した。周辺細胞質抽出物を、20%スクロースおよび1mM EDTAを含む50mMのpH8リン酸ナトリウム緩衝液に懸濁して細胞をスフェロプラストにし、プロテアーゼ阻害剤 (Complete (商標), Boehringer Mannheim, Germany) の存在下に、20分間4℃において5 mg/mlリゾチームを用いてペプチドグリカンを加水分解することにより得た。

【0131】

その後、懸濁液を2分間、10,000rpmで遠心分離した。周辺細胞質に該当する上清を4℃で保持した。精製されたVHHは、製造業者の取扱説明書にしたがって、Ni²⁺で帯電したキレートアガロースカラム (Superflow Ni-NTA, Qiagen Ltd, UK) を用いるIMACによって得られた。

10

【0132】

精製したVHHをPBSに対して透析し、Bradford試薬を用いて蛋白質含量を測定した。最終調製物の純度は、SDS-PAGEとクマジー染色およびウェスタンブロットによって評価した。

【0133】

CH2ドメインを有するVHHの発現

抗Hisタグ抗体は、免疫組織化学的な実験における使用が困難であることが立証され得る。これが、CH2ドメインと連結しているVHHも調製した理由である。

20

【0134】

CH2ドメインに指向された特異的かつ高感度ウサギ抗アルパカ抗体が利用可能である (LAFAYEら, 2009, Mol Immunol., 46:695-704)。セイヨウワサビペルオキシダーゼがコンジュゲートした抗ウサギ二次抗体は、神経病理学の実験室で日常的に使用される。

【0135】

アルパカイムノグロブリンのCH2ドメインは、プライマー-CH2-Fwd-NotIおよびCH2-Rev-XhoI (LAFAYEら, 2009, 上記引用) を用いるRT-PCRによって増幅された。

【0136】

これらのプライマーは、それぞれNotIおよびXhoIサイトを含み、CH2ドメインをpETベクターにVHH遺伝子とインフレームでクローニングすることを可能にする。VHHの発現および精製は、LAFAYEら, 2009 (上記引用) に記載されるようにして行った。

30

【0137】

ヌクレオチドシーケンシング

核酸の配列は、二本鎖DNAおよび適当なプライマー (LAFAYEら, 1995, Res Immune., 14:373-382; Res Immunol., 1996, 147:61の正誤表およびEHSANIら, Plant Mol. Biol., 2003, 52:17-29) を用いて決定した。

【0138】

酵素免疫吸着測定法 (ELISA)

標準的なELISAの改変版を用いて、培養上清中のVHHの存在を試験した。PBSに希釈した抗原 5 µg/mlで、4℃で一晩インキュベートすることによって、マイクロタイタープレート (Nunc, Denmark) をコーティングした。

40

【0139】

プレートをバッファA (PBS中0.1% Tween 20) で4回洗浄し、VHHをバッファB (バッファA中0.5%ゼラチン) で希釈した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗c-myc (A14) (Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA) またはウサギ抗Hisタグ抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA) を加える前に、プレートを2時間37℃でインキュベートし、再び洗浄した。

【0140】

その後、プレートをバッファAで洗浄し、新しく調製した0.2%オルトフェニレンジアミ

50

ン (Dakopatts A/S, Glostrup, Denmark)、0.1 MのpH 5.2クエン酸バッファ中0.03% H_2O_2 を、各ウェルに加えた。3 M HClを加えることによってペルオキシダーゼ反応を停止し、490 nmにおける光学密度を測定した。

【0141】

ELISAによる解離定数の決定

VHHの結合親和性は、FRIGUETら (1985, J Immunol Methods, 77:305-319) によって記載されるようにして測定した。簡単には、様々な濃度のGFAPを、既知の量のVHHと共に、平衡に到達するまで、4 において一晩、溶液中でインキュベートした。

【0142】

VHH濃度を予備的なELISAキャリブレーションによって測定した。予めGFAPでコートしたマイクロタイタープレートのウェルに100 μ lの溶液を移し、20分間4 においてインキュベートした。プレートを0.1%PBS Tweenで洗浄した。

10

【0143】

ウサギ抗Hisタグ抗体 (eBiosciences, San Diego, CA) と、その後にはガラクトシダーゼがコンジュゲートしたヤギ抗ウサギIgs (Biosys, Compiègne, France) および4-メチルウンベリフェリル Dガラクトシダーゼ (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) を加えて、VHHを検出した。

【0144】

355nmで励起後、460nmで蛍光を読み取った。抗原のモル濃度の逆数に対して結合抗体フラクションの逆数をプロットすることによって得られた回帰曲線の傾きから、 K_D を推定した。

20

【0145】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロット

ネズミ脳蛋白質 (300mg) を600 μ lのNuPage LDSサンプルバッファ (Invitrogen) でポッターに抽出し、70 において10分間保持した。一定量を同じサンプルバッファで1:10 (v/v) に希釈し、その後70 において10分間処理した。

【0146】

NuPAGE Novex 4-12% Bis tris gel (Invitrogen) を用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) による分離に続き、Xcell II blot module (Invitrogen) を用いてHybond C (Amersham) へのセミ・ドライトランスファーとウェスタンブロットを行った。

30

【0147】

免疫化学反応に先立って、4%スキムミルク溶液でメンブレンをブロッキングした。メンブレンのイムノプロットリングは、種々のVHHを用いて行い、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗Hisタグ (Santa Cruz, Ca, USA) と、それに続くペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギイムノグロブリンによって明らかにした。最終的に、化学蛍光キット (Amersham) を用いてペルオキシダーゼ活性を可視化した。

【0148】

2) 結果

PCRによってVHHを増幅し、3回の連続的な選択を行った。3回目の選択後、DNAを精製し、可溶性VHHの周辺細胞質における発現のために、pET22ベクターにクローニングした。

40

【0149】

ELISAによるスクリーニングのために、20のクローンを選択したが、これらのクローンはすべてGFAPに特異的に結合する。これらのクローンをシークエンシングし、3つの配列 (VHH E3, E9および A10) を得た (図1)。これらの配列はわずかな差を示しており、GFAPへの特異的免疫応答がオリゴクローナルであることを示す。

【0150】

VHH E3, E9および A10をコードするヌクレオチド配列は、本明細書に添付された配列表に、配列番号7、10および4として列挙されている。

【0151】

菌体培養物1Lあたり1~2 mgのVHHの収量が、周辺細胞質抽出物の固定化金属アフィニ

50

ディクロマトグラフィ後に得られた。SDS PAGEによって、単一ドメイン生成物は高度に純粋で均質であることが示された。

【0152】

種々のVHHの特異性は、ELISAおよびウェスタンブロットによって試験された。すべてのVHHはELISAによりGFAPに特異的であり(図2)、少なくとも40ngの蛋白質を検出できた。GFAPのサイズに該当する46kDaのバンドは、マウス脳抽出物のイムノブロットで明らかになった(図3)。

【0153】

VHH A10およびVHH E9は、それぞれ 3.1×10^{-9} Mおよび 5.6×10^{-9} Mの親和性を有する一方、VHH E3の親和性はマイクロモルの範囲である。

10

【0154】

実施例2：VHH A10(配列番号5)は、ネズミおよびヒトの脳切片上のGFAPを認識する

1) 材料および方法

対象

ヒト脳皮質組織はHopital Pitie-La Salpetriere, Paris, Franceから入手した。

6~8週齢のメスのBalb/Cマウスは、ペントバルビタールナトリウム(Ceva)で安楽死させ、PBS中の4%パラホルムアルデヒド200mlで大動脈内を灌流することによって固定した。

【0155】

免疫細胞化学

20

ペントバルビタールナトリウム(Ceva)でマウスを屠殺した。PBS中4%パラホルムアルデヒド200mlで大動脈内を灌流することによって、脳を固定した。免疫標識のために遊離浮遊切片方法を用いた。組織内に残った遊離アルデヒドの中和、内因性ペルオキシダーゼの中和、非特異的結合部位の飽和および洗浄剤としてのTritonを用いる神経組織内の細胞の透過処理のために、固定化された脳から得られたビブラトーム切片を連続的に処理した。

【0156】

ヒト脳組織の免疫染色は、5 μ mの厚さのパラフィン切片上で行った。切片をキシレン中で脱パラフィン化し、エタノール(100%、96%および90%)により再水和し、最後に水に入れた。

30

【0157】

内因性ペルオキシダーゼを停止するために、それらを3%過酸化水素および20%メタノールとインキュベートし、水で洗浄した。非特異的結合は、0.5%Tweenを補ったTBS中の2%ウシ血清アルブミン中で、切片を10分間インキュベートすることによってブロックした。

【0158】

一次抗体の適切な希釈物は、室温で湿潤チャンパ内で一晚アプライした(典型的には、VHHについて1 μ g/mlおよびウサギ抗GFAPポリクローナル抗体について1:200)。TBS Tweenでスライドを洗浄し、TBS Tween中の二次抗体(ウサギ抗Hisタグまたはウサギ抗アルパカイムノグロブリン)と共に、2時間室温でインキュベートした。

40

【0159】

その後スライドをペルオキシダーゼヤギ抗ウサギイムノグロブリンと共にインキュベートし、ジアミノベンジジン(DAB)で2分間発色させた。TBS Tweenで洗浄後、スライドをヘマトキシリンで対比染色した。

【0160】

二重標識

ヒトサンプルのパラフィン切片を上記のようにして前処理した。抗GFAP VHHおよびマウス抗GFAPモノクローナル抗体を適切な希釈で含む溶液(抗GFAP VHHについて1 μ g/mlおよびマウス抗GFAPモノクローナル抗体M0756, Dakoについて1:500)中で、それらを室温で湿潤チャンパ内に一晚放置した。

50

【 0 1 6 1 】

TBS Tweenでスライドを洗浄し、ウサギ抗Hisタグ（1：300）を含むTBS Tween溶液中で2時間室温においてインキュベートした。スライドを、その後CY2およびCY3（Cy2 AffiniPure F(ab')₂ フラグメント ヤギ抗ウサギ IgG, Cy3 AffiniPure F(ab')₂ フラグメント ヤギ抗マウス IgG, すべてJackson ImmunoResearchから）にそれぞれ連結しているヤギ抗ウサギおよびヤギ抗マウスイムノグロブリン溶液中でインキュベートし、TBS Tweenで洗浄し、脱水し、Mowiol中でマウントした。

【 0 1 6 2 】

VHHおよびmAbの拡散解析

前頭皮質のブロックは、ピプラトームを用いて70 μmの厚さで薄切した。室温において3%過酸化水素で切片を30分間前処理した。それらを透過処理し、0.1% Triton X 100 (PBST)、2%ウシ血清アルブミンおよび5%正常ヤギ血清を含むPBS溶液中で、室温において30分間ブロッキングした。

10

【 0 1 6 3 】

（約4 cm²の面積を覆う）切片を2つのカバーガラスの間にマウントし、一次抗体溶液（VHH His, PBS中1 μg/mlまたはモノクローナルネズミ抗GFAP抗体、1：500）中で一晩放置した。カバーガラスを用いて、一次抗体と切片の両面との接触を妨げることによって、拡散を切片の端へ限定した（GABBOTおよびSOMOGYI（1984, J Neurosci Methods, 11:221-230）によって、手法が開示されている）。

【 0 1 6 4 】

過剰な溶液および気泡の除去によってカバーガラス同士を接着させた。一晩のインキュベート後に、カバーガラスを分離する、空隙の間に入れたカッターの刃をゆっくり回転させることによって、カバーガラスの一方を穏やかに取り外した。

20

【 0 1 6 5 】

以下のステップは遊離浮遊切片上で行った。VHHを明らかにするために、希釈率1：10000のウサギ抗His抗体を用いた。Dako REAL（商標）System Kit（ペルオキシダーゼ/DAB）によって、ウサギ抗His抗体またはマウス抗GFAP抗体を明らかにした。段階的なエタノール（70%、90%および100%）およびキシレンにより、切片を脱水した。

【 0 1 6 6 】

統計学的解析

軟膜と最深の免疫染色された星状細胞との距離（「拡散距離」）は、4切片において18回測定した。平均拡散距離は、マウスmAbおよびラマVHHについて算出した。鏡面切片と同じ位置のVHH/mAb免疫組織化学の対として、スチューデントt検定によって拡散距離を比較した（N=18）。

30

【 0 1 6 7 】

2) 結果

マウスおよびヒトの脳切片におけるVHH特異的免疫反応性の分布は、免疫染色の標準的な手順を用いて、アルデヒド固定および膜透過処理の後に評価した。

【 0 1 6 8 】

免疫組織化学的実験は、Ig CH2ドメインとインフレイムで融合したVHH A10（配列番号5）または配列番号3のVHHドメインを用いて行い、Hisタグ（配列番号29）をともに用いた。この構築物を用いて、二次抗体としてウサギ抗アルパカIgポリクローナル抗体を用い、次いでヤギ抗ウサギポリクローナル抗体によって標識することにより、シグナルを増幅できた。

40

【 0 1 6 9 】

以前報告されたように（LAFAYEら, 1995, 上記引用）、得られた結果は、Hisタグの付いた抗体と似通っている。VHH A10は、星状細胞における強力な免疫反応性を明らかにした。GFAP陽性星状細胞は、マウスの脳において、主としてグリア境界膜および白質において観られた。灰白質において、星状細胞はほとんど観察されなかった（図4）。

【 0 1 7 0 】

50

ヒトの脳における免疫標識

CH2ドメインに融合したVHH A10は、対照およびアルツハイマー患者からのヒト脳切片（それぞれ図5および6）と、グリア細胞腫からの切片（図7）とからの星状細胞を免疫染色した。

【0171】

正常皮質サンプル

線維質GFAP陽性星状細胞は、白質および軟膜下領域において観られた。突起および細胞膜に近い細胞体において強く標識された一方、核周辺領域は標識されなかった（図5）。GFAP陽性星状細胞は、軟膜質から離れた皮質内に散在し、それらの突起はわずかに標識されただけであった。

10

【0172】

CA4領域および歯状回を除く海馬錐体領域において、それらは等しく希少であった。血管（毛細血管、静脈および動脈）をGFAP陽性星状細胞の足によって覆われた（図5cおよびd）。いくつかのニューロンは、陽性線維によって取り囲まれているように見える。

【0173】

アルツハイマー病サンプル

アルツハイマー患者からのサンプルにおいて、陽性星状細胞数はより多かった。これは同皮質および海馬の灰白質において特に多かった。突起は非常に多く、強く標識された。これらの突起は老人斑を取り込んでいた（図6）。これらは細胞外（ゴースト）の神経線維質のもつれの全面に広がっていた。非常に多くのニューロンがGFAP陽性線維によって取り囲まれていた。

20

【0174】

星状細胞腫サンプル

反応性で腫瘍性の二核星状細胞の細胞体および突起を標識した（図7aおよびb）。原形質星状細胞は、ネクローシスに接する領域において見られた（図7cおよびd）。

【0175】

マウス抗GFAP mAbおよびVHH A10での二重標識

ほとんどすべての免疫標識星状細胞において、共局在が見られた（図8）。いくつかは、VHH A10によってのみ標識された；マウスmAbのみによって標識されたものはなかった。

30

【0176】

突起において、いくつかの短い分節は、2つの抗体のうちの1つのみ、すなわち突起に隣接する部分ではおおかたマウスmAb、その遠位および薄い部分ではおおかたVHH-A10だけによって標識されているようであった。共局在は星状細胞の足において見られた。

【0177】

VHH A10は、組織において、抗GFAP mAbよりも効率的に拡散する

星状細胞は、2つの連続切片において、2つの抗体のうちのそれぞれ1つで標識された。（8時間にわたる）拡散距離は、mAbについて $196 \pm 17 \mu\text{m}$ （平均 \pm SEM）であり、VHH A10について $422 \pm 42 \mu\text{m}$ （すなわち、それぞれ $24.5 \mu\text{m}/\text{時間}$ および $52.75 \mu\text{m}/\text{時間}$ ）であった。平均の差は $226 \mu\text{m}$ （ $= 28.25 \mu\text{m}/\text{時間}$ 、 $N=18$ 、 $t=9.3$ および $p < 0.0001$ ）であった（図9）。言い換えれば、拡散距離はVHH A10について、mAbについてよりも約2倍長かった。

40

【0178】

実施例3：VHH A10（配列番号5）の定位、鼻腔内または静脈内投与

1) 材料および方法

VHHの定位および鼻腔内または静脈内投与

6～8週齢のメスのBalb/Cマウスを後の実験に用いた。定位および鼻腔内投与の前に、ケタミン塩酸塩（Imalgen）およびキシラジン（Rompun）の混合物の腹腔内への単回投与で、マウスに麻酔をかけた。

【0179】

50

定位注射について、定位フレーム (Kopf) 上にマウスを置いた。頭蓋骨に空けた穴を通して、金属製カニューレを吻背側線条体内に入れた ($x=1.3(\pm 0.2)\text{mm}$; $y=\text{ブレグマ} + 1.54$; $z= 3$; PAXINOSおよびFRANKLIN, The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact 2nd edition, Elsevier Academic Press, San Diego, 2004)。

【0180】

ハーバードポンプを用いて、 $3\ \mu\text{l}$ のVHH (1mg/ml) を $0.2\ \mu\text{l/分}$ の速度で線条体内に注射した。その後、免疫組織化学の方法において上記に記載したようにして安楽死および灌流する前に、4、7.5または14時間VHHを浸透させた。

【0181】

鼻腔内点滴注入について、ゲルローディングチップを用いて、VHH (1mg/ml) を鼻腔内に入れた。各マウスに、2～3分毎に、交互に鼻腔に $10\ \mu\text{l}$ の滴で、合計 $40\ \mu\text{g}$ を与えた。その後、安楽死および灌流の前に、1～24時間、VHHを浸透させた。

【0182】

2) 結果

VHHの頭蓋内定位投与により星状細胞は標識される

この実験において、まずVHH A10を生きている吻背側線条体に定位注射した。これは、大脳組織内に拡散させ、その後、アルデヒドによる灌流工程と、さらに免疫組織化学の標準的な手順のために処理された。注射されたVHHは、定位注射後5時間で線条体を通して拡散分布することが示された (図10)。

【0183】

7時間後、VHHの拡散パターンは広域に残っており、免疫標識された星状細胞は白質において見られた。14時間後、白質の免疫標識はより強く、グリア境界膜も染色された。

【0184】

VHHの鼻腔内投与により星状細胞は標識される

この実験において、組織学的処理の前に、VHH A10を生きている脳組織に投与した。 $40\ \mu\text{g}$ のVHHを鼻腔内に点滴注入することで、CNSの隅々まで星状細胞が強力に染色される結果となった (図11)。

【0185】

鼻腔内点滴注入の1時間後に、グリア境界膜および白質における顕著な免疫反応性で、嗅球が著しく染色された (図11)。大脳皮質表面に位置するグリア境界膜も標識された。点滴注入の3時間後に、グリア境界膜の免疫染色は微弱であった。鼻腔内点滴注入後6時間、12時間および24時間において、染色は見られなかった。

【0186】

実施例4: VHH E9は血液脳関門を横断し、GFAPを特異的に標識する

1) 材料および方法

VHH E9の入手、精製および特徴付け

抗GFAP VHH E9の発現および精製は、上記の実施例1に従って行った。SDS PAGEは、製造業者の取扱説明書 (Invitrogen) にしたがって、NuPAGE Novax 4 12% Bis tris gelを用いて行った。ウェスタンブロッティングは上記の実施例1にしたがって行った。

【0187】

等電点電気泳動は、PhastGel IEF 3 9を用いるPhastSystemを用いて行った。標準物質としてpI Calibration Kit (Biorad) を用いた。VHHのpIの算出は、EMBOSS iep software (<http://emboss.sourceforge.net/>) を用いて行った。

【0188】

VHH E9の熱変性には、OLICHONら (2007, BMC Biotechnol., 7:7) に記載の方法を採用した。VHHをPBS/NaCl 300mMに再懸濁し、 75°C で15分間加熱し、その後 4°C で20分間冷却する。VHHの結合親和性は、上記の実施例1に記載されるように、ELISAによって測定した。

【0189】

部位特異的突然変異誘発

10

20

30

40

50

Quick change site directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いた。突然変異誘発は、以下のプライマーを用いて、製造業者の取扱説明書にしたがって行った：

【 0 1 9 0 】

22番システインの変異

E9C22Ssens (配列番号30) :

5' GGGTCTCTGAGACTCTCCTCTGCAGCCTCTGG 3'

E9C22Srev (配列番号31) :

5' CCAGAGGCTGCAGAGGAGAGTCTCAG 3'

【 0 1 9 1 】

96番システインの変異

E9C96Ssens (配列番号32) :

5' CTACCTTGTTCGCGTATCGCAGAGTAATACACGGCCGT 3'

E9C96Srev (配列番号33) :

5' ACGGCCGTGTATTACTCTGCGATCACGCAACAAGGTAGC 3'

【 0 1 9 2 】

VHHを含むプラスミドは、T7プロモーターおよびT7ターミネータープライマーを用いるA TGCによってシーケンシングした。

【 0 1 9 3 】

血液脳関門インビトロモデルを横切る輸送

不死化ヒト脳内皮細胞hCMEC/D3は、WEKSLERら (2005, The FASEB Journal, 19:1872 1874) によって、すでに詳細に記載されている。VHH存在下における細胞生存率は、MTTアッセイを用いて評価した。

【 0 1 9 4 】

VHHへのhCMEC/D3細胞単層の透過性は、トランスウェルポリカーボネートインサートフィルター (孔サイズ 3 μm , Corning, Brumath, France) 上で測定した。EGM 2培地中に 2×10^5 細胞 / cm^2 の集密密度でフィルタ上にhCMEC/D3細胞を播種した。

【 0 1 9 5 】

輸送の研究は、播種後3日目に行った。コラーゲン、細胞なしのコートされた挿入物、hCMEC/D3細胞または30分間様々な薬理モジュレータに予めさらされたhCMEC/D3細胞のいずれかを含む上部チャンパに、VHHを加えることによって、実験を開始した。

【 0 1 9 6 】

輸送研究は37 で行った。下部チャンパを様々な時間間隔 (10、30および60分) でサンプリングし、VHHの存在をELISAおよびウェスタンブロットで測定した。

【 0 1 9 7 】

組織切片の免疫組織化学

成体のメスC57B16マウスを、腹腔内にペントバルビタールナトリウム (Ceva) で安楽死させた。0.1MのpH7.4 PBS中の150mlの4%パラホルムアルデヒドでの動脈内灌流によって脳を固定し、その後同じ固定剤中で、一晚4 で固定した。

【 0 1 9 8 】

厚さ70 μm のビブラトーム切片を0.1MのpH7.4 PBS中に回収した。免疫染色の前に、遊離アルデヒド、内因性ペルオキシダーゼおよび非特異的結合サイトを中和するために、遊離浮遊脳切片を処理した。1%BSA、1%正常ヤギ血清および0.1%Triton X100を含むPBSに1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で希釈した一次抗体VHHを、一晚4 でインキュベートした。

【 0 1 9 9 】

切片において、一晚4 でウサギ抗Hisタグ抗体 (eBiosciences, USA)、その後2時間室温でヤギビオチン化抗ウサギIgG (H+L) (Vector BA 1000) および30分間ABC複合体 (Vector) を、連続的にVHHに付加した。色原体としてDABを用いた。スーパーフrostスライドガラス上に切片を回収し、段階的なエタノール溶液中で脱水し、DPXニュートラルマウンティングミディアム (Aldrich) にマウントした。

【 0 2 0 0 】

10

20

30

40

50

インビボにおけるVHHの頸動脈注射

頸動脈内注射の前に、ケタミン塩酸塩 (Imalgen) およびキシラジン (Rompun) 混合物の腹腔内への単回投与で、マウスに麻酔をかけた。

【0201】

顕微鏡の補助により、総頸動脈をあらわにし、微細シリコン配管 (PP25x100FT, Portex, UK) でカニューレを挿入した。VHHを含む灌流流体を、蠕動ポンプ (Model PHD 2000, Harvard apparatus, Harvard, MA) によって、一定の速度で頸動脈に注入した。

【0202】

VHH注射の前に、30% マンニトール (2時間300 μ l) で、数匹の動物を一時的に灌流し、BBBを崩壊させた (RAPOPORTら, 1980, American Journal of Physiology, 238:R421-R431)。多様な時間にわたり組織内に拡散させ、その後マウスを灌流した。大脳組織における細胞内抗体と推定されるVHH His₆の存在を、上記に記載した標準的な免疫組織化学の手順によって検出した。

【0203】

寄生体感染: プラスモディウム・ベルゲイANKA株での感染後の大脳マラリア病理学の主要な特徴は、BBBの変化および開通である (BEGHDADIら, 2008, Journal of Experimental Medicine, 205:395-408)。C57/B16マウスに、マウスあたり 10^6 の感染赤血球Pb ANKAを腹腔内経路で接種した。感染後5日目に、頸動脈経由でマウスにVHHを注射した。

【0204】

2) 結果

VHH E9の特徴付け

GFAPのサイズに対応する単一の46kDaバンドは、マウス脳抽出物のイムノプロットで明らかになった (図12参照)。

【0205】

VHH E9のpIを等電点電気泳動 (IEF) (図12参照) によって測定し、IEPソフトウェアを用いて算出した。Hisタグを有するか、または有さないVHH E9について、pIはそれぞれ8.72および9.15であることが見出された。

【0206】

遊離浮遊脳切片について、標準的な免疫組織化学の方法を用いて、マウス星状細胞におけるGFAP標識を分析した。GFAP陽性星状細胞は、白質、海馬、グリア境界膜においてほとんど見られ、いくつかは大脳皮質の灰白質において見られた (図13)。

【0207】

75°Cで15分間加熱されたVHH E9の親和性は、 $3.8 \cdot 10^{-9}$ Mで測定され、VHH E9が熱安定性であることを示唆する。

【0208】

VHH E9のインビトロにおけるBBB横断能力

VHH E9のBBB横断能力は、WEKSLERら (2005, The FASEB Journal, 19:1872-1874) によって開発されたインビトロBBBモデルにおいて、単層のhCMEC/D3細胞を用いて試験した。

【0209】

VHH E9は、非常に高い濃度 (1 mg/ml) ですら、これらの細胞に対して毒性でなかった。上部チャンバに10~20 μ g/mlのVHH E9を入れ、単層の管腔から管腔外側へのVHH E9の通過率を測定した。

【0210】

図14Aは、機能的なVHH E9のトランスサイトーシスを示す。この時間依存的通過は30分で最大に達し、60分後に約1~5%のVHHが下部チャンバに存在する。

【0211】

カチオン性蛋白質と細胞膜上に存在する負電荷とのイオンの相互作用が吸着媒介性エンドサイトーシス (AME) を引き起こすことが現在認識されている (VORBRODT, 1989, Journal of Neurocytology, 18:359-368)。VHH E9トランスサイトーシスへのAMEの寄与をそ

10

20

30

40

50

の後評価した。

【0212】

VHH E9の取り込みおよび輸送を評価する前に、共にAMEを阻害することが以前に示されている、高度にカチオン性の硫酸プロタミン(40 µg/ml)またはポリリシン(300 µM)のいずれかと共に、HCMEC/D3を30分間プレインキュベートした。両方のカチオン性ペプチドは、VHH E9の内皮横断移動を阻害し、移動が電荷依存的であることを示している(図14B)。

【0213】

VHH E9が取り込まれ、マクロピノサイトーシスによって輸送されるかどうか調べるために、マクロピノソームの形成を阻害するアミロライド500 µMの存在下に、VHH移動を試験した。VHH E9の内皮横断移動に対して、アミロライドは阻害効果を有していた(図14B)。

10

【0214】

これらの観察結果は、VHH E9が、細胞間経路を経由するよりも、むしろ細胞内の内細胞機構によって、内皮細胞単層を介して輸送されることを強く示唆する。

【0215】

VHH E9のインビボにおけるBBB通過能力

その後、正常および病的状態の両方において、BBB通過能力について、VHH E9をインビボで試験した。未処理のマウスの左頸動脈を経由して、60分間、種々の量のVHH E9を注射した。

20

【0216】

1体目のマウスは濃度2 mg/ml(0.4mg)のVHH E9を200 µl受けた；2体目のマウスは濃度20mg/ml(4mg)のVHH E9を200 µl受けた；3体目のマウスは濃度50mg/ml(25mg)のVHH E9を500 µl受けた。注射後、大脳組織内のVHH E9を1時間拡散させ、マウスを安楽死させ、固定剤で灌流した。

【0217】

星状細胞の免疫染色は、4 mgおよび25mgのVHH E9を受けたマウスだけで見られた(図15)。染色パターンは、2匹のマウスで類似しており、25 mgのVHHを受けているマウスの方がわずかに強かった。この染色は、血脈管を囲んでいる星状細胞の足、白質内に存在する星状細胞(図15A,B)、海馬(図15C)、軟膜表面(図15D)、灰白質(図15E)および嗅球(図15F)に局在していた。この染色は、右半球と比較して、注射された頸動脈と同側である左半球においてより強かった(図15G)。

30

【0218】

4 mgのVHHも60分間注射され、90分または4時間後のいずれかにマウスを灌流した。60分および90分のマウスにおいて、染色は似通っており、4時間後に減退した。

【0219】

神経疾患(炎症性、感染性、腫瘍性)および神経変性疾患に見られるBBBの病理的開放は、有害な効果を伴って、大脳組織へ血漿、電解質、薬物、蛋白質、血球を循環させる。変化したBBBをVHH E9が通過する能力を、浸透圧ストレスまたは脳性マラリアのいずれかを用いて調査した。

40

【0220】

脳血管内皮の密着結合は、浸透圧ストレス下に、インビボにおいて可逆的に開くことができる。濃度2 mg/mlの200 µlのVHH E9を60分間注射する前に、マンニトール30%の高張性溶液250 µlを頸動脈に30秒間注射した。星状細胞の有意な染色は、CNSの至るところで見られた(図16)。

【0221】

昏睡および脳症の臨床的複合症候群である脳性マラリアは、BBBの完全性(integrity)の破壊と相関がある。実験モデルでは、C57BL/6マウスは、プラスモディウム・ベルゲイA NKA感染赤血球の静脈内注射後5日目に、似通った神経病の徴候を生じた(BEGHDADIら, 2008, Journal of Experimental Medicine, 205:395-408)。

50

【0222】

2体の感染マウスにおいて、200 μ lのVHH E9 (2 mg/ml) (400 μ g)を60分間頸動脈内注射することで、星状細胞 (図17)、嗅球 (図17A)、白質 (図17B)、海馬 (図17C) および脳の「尾側」領域 (図17) が著しく染色された。再び、免疫染色は、右半分と比較して、VHH E9が注射された頸動脈と同側である左半分においてより強かった (図17E)。

【0223】

浸透圧ストレスおよび脳性マラリアの両方の条件下において、BBBが無傷である場合に4 mgを要したのに対して、400 μ gのVHH E9が星状細胞の標識に十分であった。よって、病的条件下の脳組織において、VHH E9が拡散し、活性のままであることが示された。

10

【0224】

VHH E9 SS freeの特徴付け

ジスルフィドを形成しているシステイン残基 (Cys 22およびCys 96) を、アミノ酸の組合せセリン セリンで置換することによって、十分に機能的なVHH E9のシステイン非含有誘導体を作成した。VHH E9 SS freeは、未変性VHH E9の親和性と比較して、2倍だけ減少した 12.10^{-9} Mの親和性を有し、抗原結合特性がジスルフィド結合の除去による影響を受けなかったことを示唆した。

【0225】

結論

インビボとインビトロにおいて、細胞透過性抗体および細胞内抗体として作用する、GFAP特異的VHHの能力が示されている。これらの細胞透過性抗体は、慣用の抗体および対応するフラグメントで観察されない一連の要件を満たす必要がある；すなわち：

20

- 1) それらはBBBを通過し、
- 2) 脳組織に拡散し、
- 3) 細胞内に浸透し、
- 4) 細胞内で安定であり、そして
- 5) 細胞内抗原に特異的に結合する。

GFAP特異的VHHが細胞内に一旦浸透すれば、それはGFAPを特異的に標識し、このことは、細胞質の還元的特性にも拘らず、活性のままであることを示唆する。

【0226】

抗体ドメインは、サンドイッチ構造の両方のシートを連結している内部ジスルフィド結合を有し、進化の過程で厳密に保存されおり、それらの安定性に対するその重要な寄与を証明している (ALZARIら, 1998, Annual Review of Immunology, 6:555-580; PROBAら, 1997, Journal of Molecular Biology, 265:161-172)。

30

【0227】

抗体フラグメント (Fab、Fv、またはscFv) の可変ドメイン内のジスルフィド結合の遺伝学的除去は機能的な蛋白質を産生せず、安定性の深刻な喪失を示唆する。正常な抗体フラグメントは、細胞質においてジスルフィド結合を形成せず、通常、ジスルフィド結合の非存在下に安定な天然の折りたたみを獲得することができない (BIOCCAら, 1995, Bio/Technology, 13:1110-1115)。

40

【0228】

GFAPに指向されたVHHは、アミロイド蛋白質のような脳内の抗原を標的にするため、脳内の腫瘍細胞に到達するため、またはウイルス、細菌もしくは寄生体によって引き起こされる感染症を治療するための、脳のイメージングおよび新規な治療戦略のための興味深い物質である。

【 図 1 】

```

VHH-E3      DVQLVSGGGSVQPGGSLRLSCAAGFTFSNYAMYWLRAQPGKIEWVSRIGPGGSHTFY
VHH-B8      DVQLVSGGGSVQPGGSLRLSCAAGFTFSNYAMYWLRAQPGKIEWVSRIGPGGSHTFY
VHH-B9      DVQLVSGGGSVQPGGSLRLSCAAGFTFSNYAMYWLRAQPGKIEWVSRIGPGGSHTFY
VHH-A10     *****

VHH-E3      ADSVKGRFAISRDNANTLSLQMSNLKPEDTAVYCAITQQSGRGRGTQVTVSSAAA--
VHH-B8      ADSVKGRFAISRDNANTLSLQMSNLKPEDTAVYCAITQQSGRGRGTQVTVSSAAA--
VHH-B9      ADSVKGRFTISRDNANTLSLQMSNLKPEDTAVYCAITQQSGRGRGTQVTVSSAAA--
VHH-A10     *****

VHH-E3      -----
VHH-B8      STELEPGSELPIISMADVQLVSGGGSVQPGGSLRLSCAAGFTFSNYAMYWLRAQPGK
VHH-B9      -----
VHH-A10     -----

VHH-E3      -----
VHH-B8      IEWVSRIGPGGSHTFYADSVKGRFTISRDNANTLSLQMSNLKPEDTAVYCAITQQSG
VHH-B9      -----
VHH-A10     -----

VHH-E3      -----LEHHHHH (SEQ ID NO: 8)
VHH-B8      RGRGTQVTVSSAAAASLEHHHHH (SEQ ID NO: 14)
VHH-B9      -----LEHHHHH (SEQ ID NO: 13)
VHH-A10     -----LEHHHHH (SEQ ID NO: 5)
*****

```

FIGURE 1

【 図 2 】

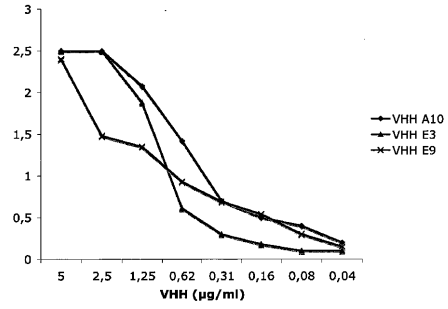


FIGURE 2

【 図 3 】

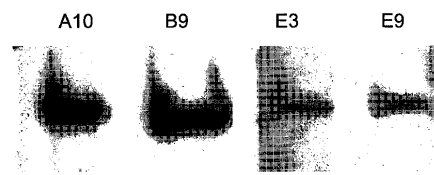


FIGURE 3

【 図 4 】

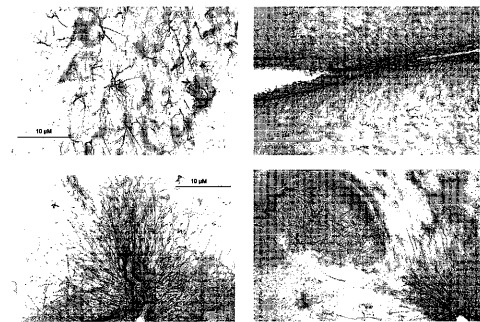
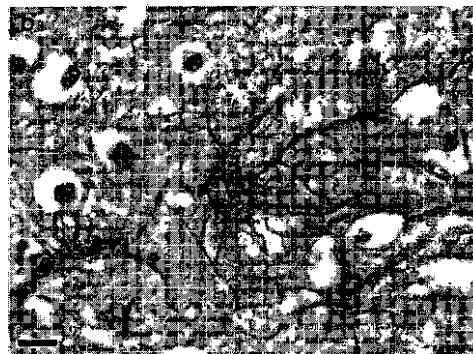


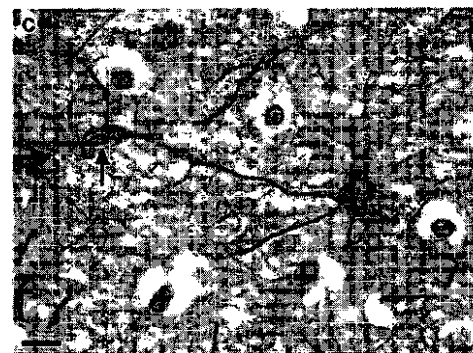
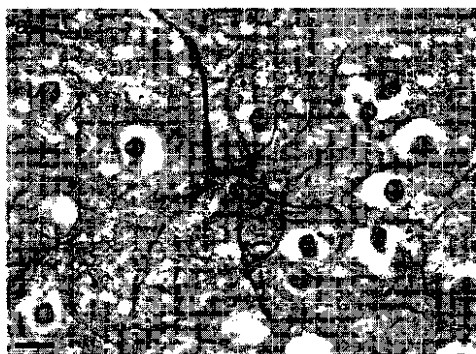
FIGURE 4

【 図 5 b 】

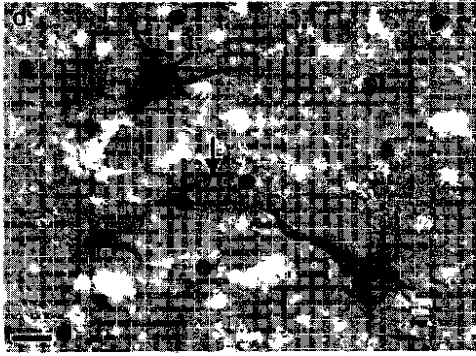


【 図 5 c 】

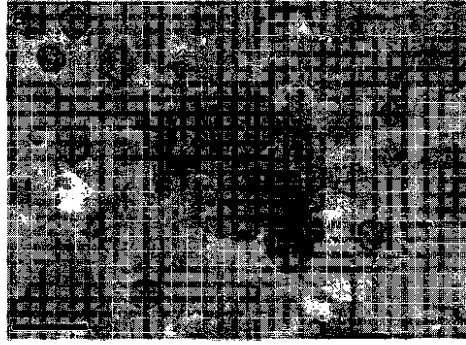
【 図 5 a 】



【 図 5 d 】



【 図 7 a 】



【 図 6 】

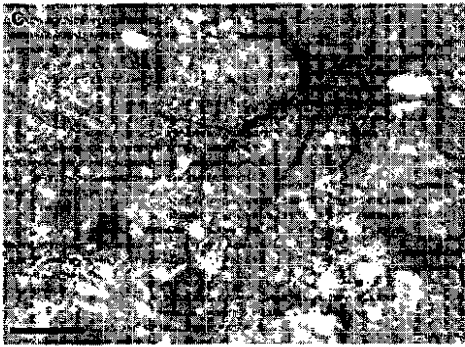


【 図 7 b 】

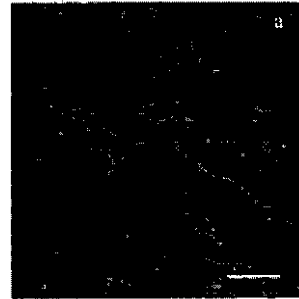


FIGURE 6

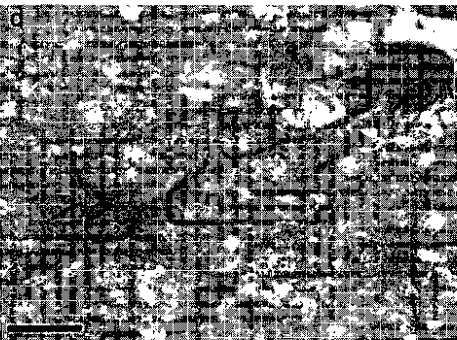
【 図 7 c 】



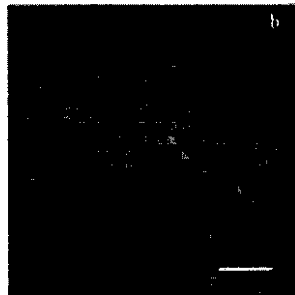
【 図 8 a 】



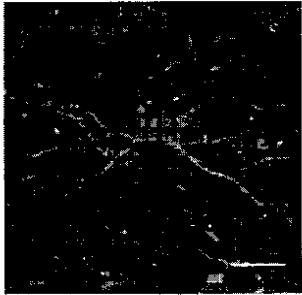
【 図 7 d 】



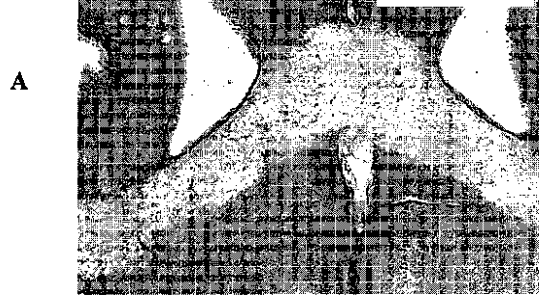
【 図 8 b 】



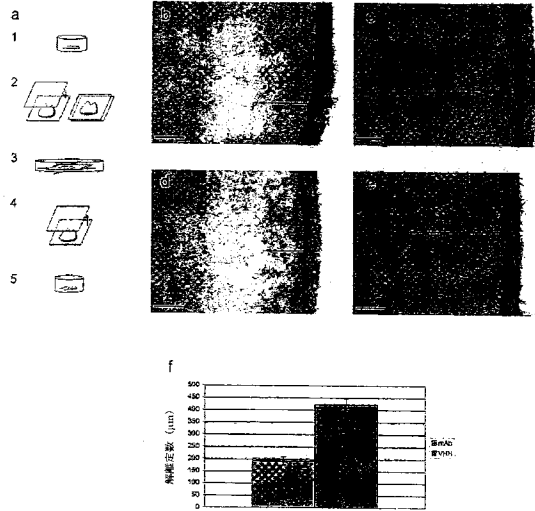
【 図 8 c 】



【 図 1 0 A 】



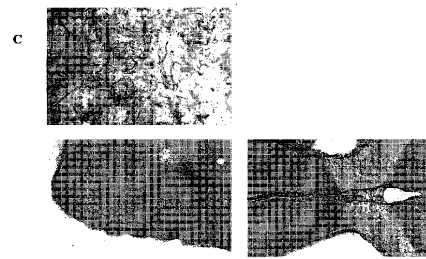
【 図 9 】



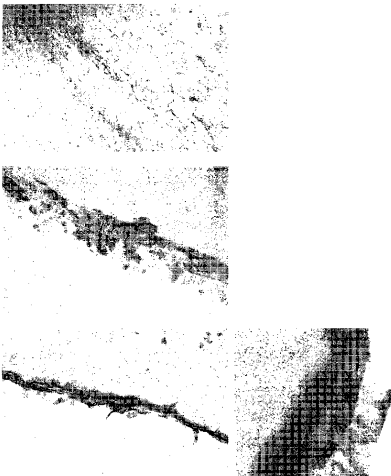
【 図 1 0 B 】



【 図 1 0 C 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 A 】

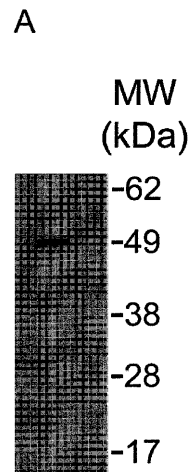
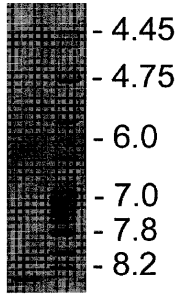


FIGURE 11

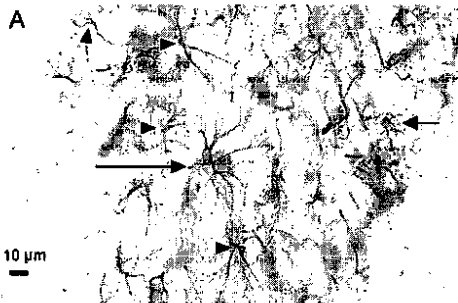
【図 1 2 B】

B

Mpl



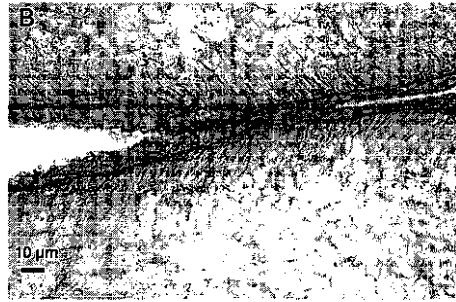
【図 1 3 A】



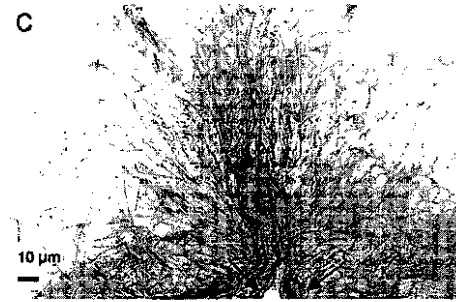
【図 1 3 D】



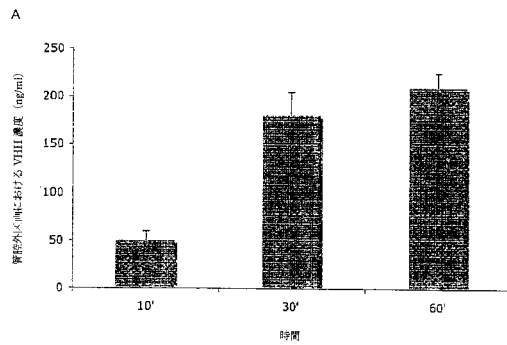
【図 1 3 B】



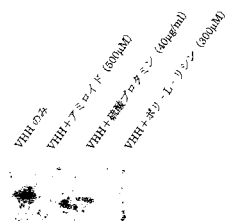
【図 1 3 C】



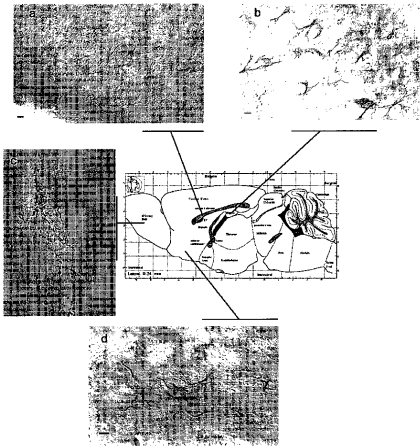
【図 1 4】



B



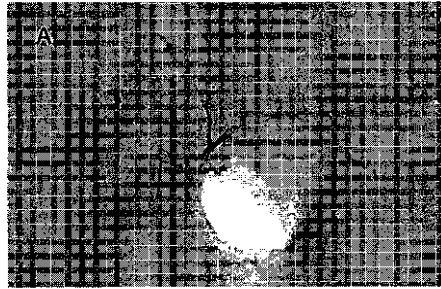
【 図 15 a - 15 d 】



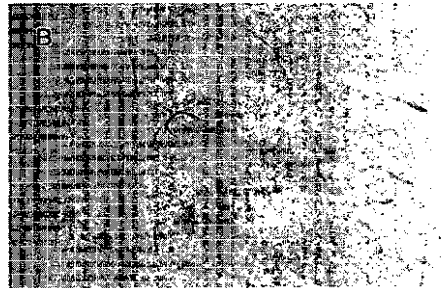
【 図 15 e 】



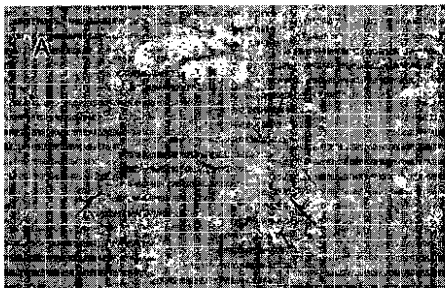
【 図 16 A 】



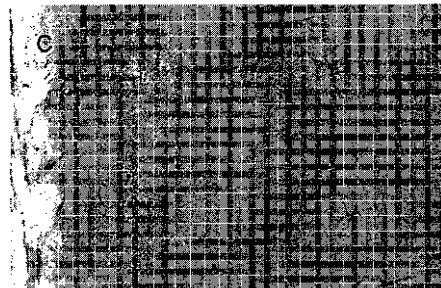
【 図 16 B 】



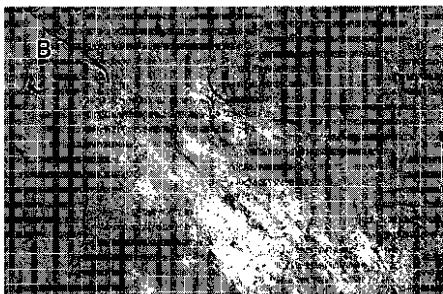
【 図 17 A 】



【 図 17 C 】



【 図 17 B 】



【 図 17 D 】



【 図 1 7 E 】



【 配 列 表 】

2011527193000001.xml

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 23 年 5 月 20 日 (2011.5.20)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 配 列 表

【 補 正 方 法 】 追 加

【 補 正 の 内 容 】

【 配 列 表 】

2011527193000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/006596

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/30 A61K39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/036021 A (NAT RES COUNCIL [CA]; ABULROB ABDELNASSER [CA]; STANIMIROVIC DANICA []) 5 April 2007 (2007-04-05) the whole document	27, 28
A	REEVES S A ET AL: "Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA JUL 1989, vol. 86, no. 13, July 1989 (1989-07), pages 5178-5182, XP002506142 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 October 2009		Date of mailing of the international search report 30/10/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hermann, Patrice

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/006596

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/057445 A (NAT RES COUNCIL [CA]; MURUGANANDAM ARUMUGAM [CA]; TANHA JASMID [CA]; N) 25 July 2002 (2002-07-25) the whole document	1-30
A	WO 2008/049897 A (ABLYNX N V [BE]; MERCHERS PASCAL GERARD [BE]; REVETS HILDE ADI PIERRE) 2 May 2008 (2008-05-02) the whole document	1-30
A	ABULROB A ET AL: "The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, NEW YORK, NY, US, vol. 95, no. 4, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 1201-1214, XP003010699 ISSN: 0022-3042 the whole document	1-30
A	MURUGANANDAM ARUMUGAM ET AL: "Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY FEB 2002, vol. 16, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 240-242, XP002506143 ISSN: 1530-6860 the whole document	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2009/006596

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007036021 A	05-04-2007	CA 2623659 A1	05-04-2007
		CA 2623841 A1	05-04-2007
		WO 2007036022 A1	05-04-2007
		EP 1943341 A1	16-07-2008
		JP 2009509503 T	12-03-2009
		US 2009047300 A1	19-02-2009
		US 2009233357 A1	17-09-2009
WO 02057445 A	25-07-2002	CA 2441903 A1	25-07-2002
		EP 1328626 A1	23-07-2003
		US 2004161738 A1	19-08-2004
		US 2009162422 A1	25-06-2009
WO 2008049897 A	02-05-2008	AU 2007310838 A1	02-05-2008
		CA 2667466 A1	02-05-2008
		EP 2081960 A1	29-07-2009

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 H 0 4 5
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 C	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P	25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P	25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P	25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K	9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K	47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 A	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	

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

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(74)代理人 100145229

弁理士 秋山 雅則

(74)代理人 100159385

弁理士 甲斐 伸二

(74)代理人 100163407

弁理士 金子 裕輔

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(72)発明者 ラファイエ, ピエール

フランス、エフ - 9 2 2 4 0 マラコフ、ブルバール カメリナ 3 1

(72)発明者 ブルジョワ, ジャン - ピエール

フランス、エフ - 9 4 1 6 0 サン マンド、アヴェニュー フォシュ 9

(72)発明者 ルージョン, フランソワ

フランス、エフ - 9 2 3 1 0 セーブル、リュ デ フォンテーヌ 3 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA54 CA02 DA06 EA03 FA02 HA01 HA17

4B065 AA26X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C076 AA19 CC01 CC04 CC27 EE59 FF68

4C084 AA17 AA27 MA24 NA10 ZA022 ZA062 ZA082 ZA122 ZB112 ZB262

4C085 AA19 AA21 CC05 JJ05 KA03 LL13

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 EA22 EA50 EA51 FA72

FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2011527193A5	公开(公告)日	2012-08-23
申请号	JP2011517268	申请日	2009-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所 法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	仪器蒂蒂巴斯德 中心法国国家Shiantifiku		
[标]发明人	ラファイエピエール ブルジョワジャンピエール ルージュオンフランソワ		
发明人	ラファイエ,ピエール ブルジョワ,ジャン-ピエール ルージュオン,フランソワ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P35/00 A61P25/04 A61P29/00 A61P25/24 A61P25/08 A61P25/00 A61K9/127 A61K47/48 A61K45/00 A61K49/00 G01N33 /53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/54 A61K2039/543 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/24 A61P29 /00 C07K16/18 C07K16/3053 C07K2317/22 C07K2317/569 A61K51/1018 A61K2039/545 C07K2317 /92 C12N5/0622		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395.C A61P35 /00 A61P25/04 A61P29/00 A61P25/24 A61P25/08 A61P25/00 A61K9/127 A61K47/48 A61K45/00 A61K49/00.A G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA54 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/FA02 4B024 /HA01 4B024/HA17 4B065/AA26X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C076/AA19 4C076/CC01 4C076/CC04 4C076/CC27 4C076/EE59 4C076/FF68 4C084 /AA17 4C084/AA27 4C084/MA24 4C084/NA10 4C084/ZA022 4C084/ZA062 4C084/ZA082 4C084 /ZA122 4C084/ZB112 4C084/ZB262 4C085/AA19 4C085/AA21 4C085/CC05 4C085/JJ05 4C085/KA03 4C085/LL13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045 /EA22 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	正徳秋山 清稻本潤一		
优先权	2008290683 2008-07-10 EP		
其他公开文献	JP5813504B2 JP2011527193A		

摘要(译)

本发明涉及针对胶原蛋白纤维酸性蛋白质的骆驼科动物重链抗体的可变结构域及其用于制备治疗剂或诊断剂的用途。

