

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-509503

(P2009-509503A)

(43) 公表日 平成21年3月12日(2009.3.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 14/00 (2006.01)	C07K 14/00	4B064
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4C076
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4C084
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-531493 (P2008-531493)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月15日 (2006. 9. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年5月23日 (2008. 5. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2006/001522
 (87) 国際公開番号 W02007/036021
 (87) 国際公開日 平成19年4月5日 (2007. 4. 5)
 (31) 優先権主張番号 60/720, 452
 (32) 優先日 平成17年9月27日 (2005. 9. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508090723
 ナショナル リサーチ カウンシル オブ
 カナダ
 カナダ国 ケー1エー Oアール6 オン
 タリオ, オタワ, モントリオールロード
 1200, インテレクチュアル プロパテ
 ィー サービスズ, ビルディング エム5
 8
 (74) 代理人 100080621
 弁理士 矢野 寿一郎
 (72) 発明者 アブルロブ, アペデルナッサー
 カナダ国 ケー4エー 3エックス8 オ
 ンタリオ, オタワ, ヘネシークレセント
 1880

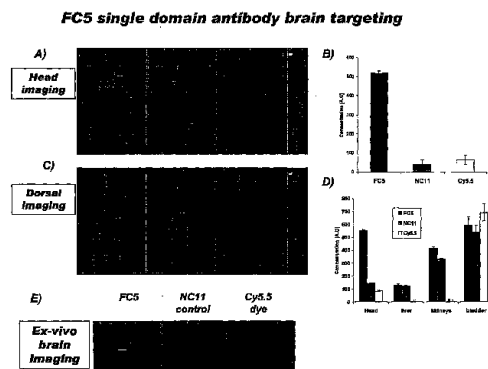
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液—脳隔壁エピトープとその利用

(57) 【要約】

本発明は、膜間領域タンパク質30A (TMEM30A) の新たな抗原のアイソフォームの使用による、血液脳隔壁を通過可能な試剤の同定および抗体の生成の方法を特徴とする。これは血液脳隔壁を経るの移行の機構の確立に有用である。これらの抗原は他の内皮細胞に比して脳内皮において豊富であり、トランスフェリンおよびインシュリン受容体に比して脳輸送のよりよい選択性および容量を持ちうる。抗原の1つがTMEM30Aである。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液 脳隔壁を経ての T M E M 3 0 A 媒介移行が可能な試剤の識別方法であって、
 S E Q I D N O . 3 のアミノ酸 6 7 ~ 3 2 3、S E Q I D N O . 4 のアミノ酸
 6 7 ~ 2 8 7 および S E Q I D N O . 5 のアミノ酸 1 ~ 2 0 4 からなる集団から選択
 された、少なくとも 7 5 % のアミノ酸配列が同定されたペプチドを有する試剤のインキュ
 ベート、および

該試剤と該ペプチドとの間の結合の検出からなることを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記試剤は抗体であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記試剤は単一領域抗体であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記試剤は単鎖抗体であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記試剤はペプチドであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記試剤は低分子であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ペプチドは少なくとも 7 5 % が S E Q I D N O . 3 のアミノ酸 6 7 ~ 3 2 3 と
 同定されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

少なくとも 7 5 % が S E Q I D N O . 3 のアミノ酸 6 7 ~ 3 2 3 と同定されること
 を特徴とする、精製または分離されたペプチド。

【請求項 9】

少なくとも 7 5 % が S E Q I D N O . 3 のアミノ酸 1 ~ 3 6 1 と同定されることを
 特徴とする、請求項 6 に記載のペプチド。

【請求項 10】

少なくとも 7 5 % が S E Q I D N O . 2 のアミノ酸 1 4 1 ~ 1 2 2 6 と同定される
 ことを特徴とする、精製または分離された核酸分子。

30

【請求項 11】

S E Q I D N O . 3 のアミノ酸 6 7 ~ 3 2 3、S E Q I D N O . 4 のアミノ酸
 6 7 ~ 2 8 7 および S E Q I D N O . 5 のアミノ酸 1 ~ 2 0 4 からなる集団から選択
 されたアミノ酸配列の連続した 6 以上のアミノ酸からなることを特徴とする、精製または
 分離されたペプチド。

【請求項 12】

前記アミノ酸は S E Q I D N O . 3 のアミノ酸 6 7 ~ 3 2 3 であることを特徴とす
 る、請求項 11 に記載のペプチド。

【請求項 13】

血液 脳隔壁を経ての T M E M 3 0 A 媒介移行が可能な抗体の生成方法であって、
 S E Q I D N O . 3 のアミノ酸 6 7 ~ 3 2 3、S E Q I D N O . 4 のアミノ酸
 6 7 ~ 2 8 7 および S E Q I D N O . 5 のアミノ酸 1 ~ 2 0 4 からなる集団から選択
 された、連続した 6 以上のアミノ酸からなる精製または分離されたペプチドと、目標物と
 のインキュベート、

40

該ペプチドに対する免疫反応を該目標物において生成する適当な賦形剤、および
 該目標物からの抗体の回収からなることを特徴とする方法。

【請求項 14】

前記目標物はヒトではない動物であることを特徴とする、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

T M E M 3 0 A との相互作用が可能な試剤の同定方法であって、

50

SEQ ID NO. 3のアミノ酸67~323、SEQ ID NO. 4のアミノ酸67~287およびSEQ ID NO. 5のアミノ酸1~204からなる集団から選択された、少なくとも75%のアミノ酸配列が同定されたペプチドと、関連する試剤とのインキュベート、および

該試剤と該ペプチドとの間の結合の検出からなることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、膜間領域タンパク質30A (TMEM30A) の新たな抗原のアイソフォームの使用による、血液 脳隔壁を通過可能な試剤の同定および抗体の生成の方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

新たなラマ単一領域抗体、FC5およびFC44が同定されている。これらの抗体は脳内皮細胞の表面において抗原に結合し、それから脳内へ移行する。これらの抗体およびエピトープへの親和性を持つ他の接着質は、他の分子(治療、診断の)を脳へと輸送するベクターとして有用である。

血液 脳隔壁を経てトランスサイトーシスを受ける受容体に対する抗体が、脳への薬剤または治療ペプチドを標的とするベクターとして用いられている。生体外でヒト大脳内皮細胞を、生体内で血液 脳隔壁を経て移行する新たな単一領域抗体、FC5が近來、同定

20

されている。ここで、FC5の血液 脳隔壁を経るヒト大脳内皮細胞上の、その推定上の受容体へのエンドサイトーシスおよびトランスサイトーシスの可能な機構を、FC5とその受容体への他の接着質とともに開示する。この受容体は脳標的薬剤配送ベクターを発達させる新たな標的となりうる。

脳毛細管内皮は、薬剤の中樞神経系への侵入に対する強固な隔壁を形成する。大脳内皮細胞(CEC)を封鎖する緊密な接合部は、治療薬剤を含む循環化合物が細胞間経路を経て脳に達することを防止する。CECの他の特異な特徴としては、開窓の欠如、ピノサイトーシス小胞の数が少ないこと、管腔表面の高い負電化を帯びた糖衣がある。流出ポンプの発現とCECの高酵素活性が、治療上の脳への配送に対するさらなる隔壁となる。

ペプチド、タンパク質およびオリゴヌクレオチドを含む生物学製品は、トランスサイトーシスとして知られるCECを経る小胞輸送による脳への配送を為しうる。これは、配位子とCECの管腔表面で発現する成分の特異的あるいは非特異的な相互作用を要する過程であり、配位子のエンドサイトーシス小胞への内在化、内皮細胞質を経る移動、およびCECの外側面でのエキソサイトーシスを開始させる。CECにおける異なるエンドサイトーシス経路が述べられている。a) マクロピノサイトーシス、大型タンパク質の内在化のランダム経路、b) 薬剤/生物学製品と内皮表面の非特異的で電荷に基づく相互作用を介して開始される吸着媒介エンドサイトーシス(AME)、c) CEC上で発現する受容体の特異的な相互作用によって開始される受容体媒介エンドサイトーシス(RME)、である。AMEおよびRMEは、血液 脳隔壁(BBB)を経ての配送のための薬剤輸送ベクターの設計に利用されている。例えば、SynBベクター族等の陽イオン細胞貫通ペ

30

40

プチドは、温度・エネルギー依存AME過程による親水性分子のBBBを経ての配送の能力を持つ(ドリン他、2003年)。BBBを経てのRMEおよびトランスサイトーシスを受ける脳内皮抗原に特異的な抗体、特にアンチトランスフェリン受容体抗体(OX26)が、抗体に化学的に連結された、または抗体機能化担体(例えばイムノリボソーム)に包まれた生物学製品の、BBBを経ての実験動物モデルでの輸送に用いられている。

目下、受容体媒介トランスサイトーシスを受ける、脳内皮細胞上で発現する受容体が少数知られている。インシュリン受容体、低濃度リポタンパク質依存タンパク質受容体(LRP)およびアンジオテンシンII受容体である。このうち、トランスフェリン受容体およびインシュリン受容体は、脳輸送ベクター(すなわち、これらの受容体を認識する抗体)の発達に利用されている。トランスフェリン受容体は他の器官に比して脳内皮において

50

豊富であることが知られているが、トランスフェリン受容体およびインシュリン受容体は他の器官に広く分布しており、したがってこれらの ' 標的 ' の使用に選択的に完成された脳は限定される。

以下の文献に含まれるものは、本発明の特許性に関係するものではない。

【非特許文献 1】Abulrob A., Zhang J., Tanha J., MacKenzie R. and Stanimirovic D. (2005). Single domain antibodies as blood brain barrier delivery vectors. *Intern. Cong. Ser.* 1277, 212-223.

【非特許文献 2】Dehouck B., Fenart L., Dehouck MP., Pierce A., Torpier G., and Cecchelli R. (1997) A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 138, 877-889.

【非特許文献 3】Demeule M., Poirier J., Jodoin J., et al. (2002) High transcytosis of melanotransferrin(P97) across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 83, 924-933.

【非特許文献 4】Drin G., Cottin S., Blanc E., Rees A.R. and Tamsamani J. (2003). Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.* 278, 31192-31201.

【非特許文献 5】Drin G., Rousselle C, Scherrmann J. M., Rees A.R. and Tamsamani J. (2002). Peptide delivery to the brain via adsorptive-mediated endocytosis: advances with SynB vectors. *AAPS PharmSci.* 4, E26.

【非特許文献 6】Fillebeen C, Descamps L., Dehouck M. P., Fenart L., Benaissa M., Spik G., Cecchelli R., and Pierce A. (1999) Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood- brain barrier. *J. Biol. Chem.* 274, 7011-7.

【非特許文献 7】Hayes G. R., Enns CA. and Lucas J.J. (1992). Identification of the O-linked glycosylation site of the human transferrin receptor. *Glycobiology.* 2, 355-359.

【非特許文献 8】Moos T. and Morgan E. H. (2001). Restricted transport on anti-transferrin receptor antibody (OX26) through the blood-brain barrier in the rat. *J. Neurochem.* 79, 119-129.

【非特許文献 9】Muruganandam A., Tanha J., Narang S. and Stanimirovic D. (2002). Selection of phage- displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J.* 16, 240-242.

【非特許文献 10】Qian Z. M., Li H., Sun H. and Ho K. (2002). Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.* 54, 561-587.

【非特許文献 11】Suzuki T., Futaki S., Niwa M., Tanaka S., Ueda K. and Sugiura Y. (2002). Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J. Biol. Chem.* 277, 2437-2443.

【非特許文献 12】Tanha J., Muruganadam A. and Stanimirovic D. (2003). Phage display technology for identifying specific antigens on brain endothelial cells. *Methods Mol. Med.* 89, 435- 449.

【非特許文献 13】Wessel D. and Flugge U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141-143.

【非特許文献 14】Zhang J., Tanha J., Hiramata T., Khieu N. H., To R., Tong-Sevinc H., Stone E., Brisson J. R. and MacKenzie CR. (2004). Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. *J. Mol. Biol.* 335, 49-56.

【非特許文献 15】Zhang J., Li Q., Nguyen T., Tremblay T., Stone E., Kelly J. and MacKenzie R. (2004). A pentavalent single domain antibody approach to tumor antibody discovery and the development of novel proteomics reagents. *J. Mol. Biol.*

10

20

30

40

50

341 , 161-9.

【発明の開示】

【0003】

本発明の第一の側面によって、少なくとも75%がSEQ ID NO. 2のヌクレオチドと同定される、精製または分離された核酸分子が提供される。

【0004】

本発明の第二の側面によって、

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 3の1から361のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

10

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 4の1から325のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 5の1から242のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 6の1から257のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 7の1から40のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

20

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 8の1から140のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 9の1から18のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 10の1から11のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

30

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 11の1から11のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 12の1から13のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 13の1から13のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

40

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 14の1から16のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、および

少なくとも75%の同定されたSEQ ID NO. 15の1から16のアミノ酸を含むペプチドと共に試剤をインキュベートすること、および該試剤と該ペプチドとの結合の検出、

のいずれかからなる、血液 脳隔壁を経てのTMEM30A媒介トランスサイトーシスが可能な試剤の同定方法が提供される。

【0005】

本発明の第三の側面によって、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、S

50

SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15のアミノ酸配列のいずれかの、少なくとも75%が同定され、精製または分離されたペプチドが提供される。

【0006】

本発明の第四の側面によって、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15のアミノ酸配列のいずれかの、6以上の連続したアミノ酸からなる、精製または分離されたペプチドが提供される。

10

【0007】

本発明の第五の側面によって、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 13、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 15のアミノ酸配列のいずれかの、6以上の連続したアミノ酸からなる、精製または分離されたペプチドおよび適当な賦形剤と共に目標物をインキュベートすることによって該ペプチドに対する免疫反応を生じる、血液脳隔壁を経てのT MEM 30 A 媒介トランスサイトーシスが可能な抗体の生成方法が提供される。好ましくは目標物はヒトではない動物である。当業者に理解されるように、様々な動物を目標物として用いる抗体に対する免疫反応を生じる手段は当該技術分野において既知である。特に、免疫化レジーム、補助剤、抗体回収方法、精製および分離は全て、様々な目標物について既知であり確立されている。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

細胞生物学、生物化学、免疫化学および分子生物学の手法の組み合わせを用い、血液脳隔壁に関連する新たな抗原が同定されている。これは血液脳隔壁を経ての移行の機構を確立するのに有用である。これらの抗原は他の内皮細胞に比して脳内皮細胞において豊富で、トランスフェリンおよびインシュリン受容体に比して選択性および脳への配送能力に優れているかもしれない。

30

この例において、血液脳隔壁抗原を認識し血液脳隔壁を経て移行される単一領域抗体FC5が検討される。

本発明は特定の機構または作用携帯に限定されず、仮定される機構は一般的関心の元に述べられる。

【0009】

BBBを経てのFC5移行の機構：

1. 脳内皮細胞上の推定上の受容体へ結合し、受容体媒介トランスサイトーシスとして知られる機構によってFC5は移行される。

40

2. FC5はクラスリン被覆穴において脳内皮に内在化され移行される。

3. FC5移行はエネルギー依存であり可飽和である。

4. FC5移行には非損傷細胞骨格ネットワークが必要である。

5. FC5移行はPI3キナーゼ活性に依存する。

【0010】

FC5抗原、T MEM 30 A (SEQ ID NO: 2) の分離と同定についても述べる。ここで述べるように、FC5抗原のT MEM 30 Aへの結合によって血液脳隔壁を経てFC5が移行される。

【0011】

FC5に認識される抗原：

50

1. (2、3) 結合シアル酸残余は F C 5 に認識される抗原エピトープの構成要素である。
2. F C 5 に認識される抗原はシアルタンパク質および非シアル脂質 (ガングリオシド) である。
3. F C 5 の推定上タンパク質抗体上の (2、3) 結合シアル酸残余の認識は F C 5 の脳内皮細胞を経てのエンドサイトーシスと移行に必要である。
4. (2、3) 結合シアル酸残余は完全な F C 5 に認識される抗原の単なる構成要素である。
5. トランスフェリン受容体は F C 5 に認識されない。
6. F C 5 に対するファージ表示ヒト脳 c D N A 発現ライブラリのパニングによって S E Q I D N O : 1 が引き出された。
7. T M E M 3 0 A と共に配列される S E Q I D N O . 2 を遺伝子が除去する。
8. T M E M 3 0 A m R N A の組織分布は図 1 1 に示される。脳組織において強い発現が示された。
9. T M E M 3 0 A m R N A の細胞分布は図 1 2 に示される。内皮細胞において強い発現が示される。
10. H E K 2 9 3 細胞において過剰発現した T M E M 3 0 A は F C 5 によって免疫沈降された (図 1 4) 。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

よって、T M E M 3 0 A に結合する化合物、分子または試剤は血液 脳隔壁を経ての T M E M 3 0 A 媒介転移が可能であることが示されている。続いて、以下に述べるように、実施例の 1 つにおいて、関連する試剤の提供と該試剤が T M E M 3 0 A に結合する場合の定量とを含む、血液 脳隔壁を通過することができる試剤の同定方法が提供される。

【 0 0 1 3 】

他の実施例において、以下で述べる関連する試剤の T M E M 3 0 A ペプチドへの結合の適した条件での T M E M 3 0 A ペプチドの試剤への暴露と、結合が起こった場合の定量とを含む、血液 脳隔壁を経ての T M E M 3 0 A の転移が可能な試剤の同定方法が提供される。ここで述べるように、結合または相互作用は様々な方法、例えば以下に述べるように T M E M 3 0 A をその上に載せたカラムまたは他の類似の支持上への試剤の保持、またはここで述べる生体外細胞検定または生体内検定を用いる転移の実証によって定量される。これらの検定は例証となる目的のためであることが留意され、関連する試剤と T M E M 3 0 A との相互作用の様々な幅広い検出方法があることは当業者に理解できる。

【 0 0 1 4 】

他の実施例において、以下で述べる試剤の T M E M 3 0 A ペプチドへの結合の適した条件での T M E M 3 0 A ペプチドの関連する試剤への暴露と、その後結合が起こった場合の定量とを含む、T M E M 3 0 A との相互作用が可能な薬剤を同定する方法が提供される。当業者に評価されるように、このような試剤はここで述べるように様々な目的、例えば膜輸送や画像化等に用いることができる。

【 0 0 1 5 】

当業者に評価されるように、T M E M 3 0 A の結合の定量は複数の方法で行うことができる。例えば、高スループット初期スクリーニングを行うことができ、例えばカラムに T M E M 3 0 A を入れ、関連する試剤を該カラムを通過させる。残留した化合物を溶出しさらに調査し、例えば以下で述べる生体外または生体内での検定を行うことができる。

このような試剤は関連する化合物へ結合、接合、架橋または他の取り付けが可能であり、血液 脳隔壁を経て転移可能な結合を形成することが留意される。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施例において、関連する化合物は検出可能な化合物でありえ、例えば放射性同位元素、同位体、可視または近赤外線蛍光ラベル、レポーター分子、ビオチン等であるがこれらに限定されない。当業者に評価されるように、このような結合を、試剤の転移の確認、画像化または他の類似の目的に用いることができる。

【 0 0 1 7 】

他の実施例において、関連する化合物は小分子、例えば抗がん剤であり、これは例えばパクリタクセル、ビンブラスチン、ピンクリスチン、エトポシド、ドキシソルビシン、シクロフォスファミド、クロラムブチル等であるがこれらに限定されない。

【 0 0 1 8 】

他の実施例において、小分子は神経病、例えば脳腫瘍、脳転移、精神分裂病、癲癇、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、脳卒中、肥満症、多発性硬化症等を治療するための治療または薬事の化合物でありうる。

【 0 0 1 9 】

ここで述べるように、FC5抗体はT MEM 3 0 Aに結合する。SEQ ID NO. 3の6以上、7以上、8以上、9以上、または10以上の連続したアミノ酸を含むペプチドを、FC5を認識するモノクローナル抗体の生成に用いることができる。いくつかの実施例において、ペプチドはT MEM 3 0 Aの細胞外領域、すなわちSEQ ID NO. 2の67~323アミノ酸に対し選択的である。同様に、アイソフォーム2 (SEQ ID NO. 4)の細胞外領域はSEQ ID NO. 4の67~287アミノ酸に対応し、アイソフォーム3 (SEQ ID NO. 5)はSEQ ID NO. 5の1~204アミノ酸からの細胞外領域を有する。したがって、他の好ましい実施例において、ペプチドはアイソフォーム2および3からのこれらの細胞外領域の範囲に対応する。よって、いくつかの実施例において、関連する試剤はここで述べるT MEM 3 0 Aの免疫抗原性断片に対して配列されるモノクローナル抗体でありうる。当業者には他の適した断片も容易に明白であることが留意される。例えば、グリコシル化サイトを含むT MEM 3 0 Aの範囲からの6以上、7以上、8以上、9以上、または10以上の連続したアミノ酸を含むペプチド、例えばSEQ ID NO. 7またはSEQ ID NO. 8に含まれるものをいくつかの実施例において用いることができる。あるいは前記のように、例えばSEQ ID NO. 9~15に含まれる、T MEM 3 0 Aと他の進化的に類似のペプチドとの間で高度に保護された範囲を選択的に用いることもできる。

10

20

【 0 0 2 0 】

他の実施例において、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、あるいは少なくとも99%がSEQ ID NO: 1に含まれるヌクレオチドと同定された、精製または分離されたヌクレオチド配列が提供される。

30

【 0 0 2 1 】

他の実施例において、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、あるいは少なくとも99%がSEQ ID NO: 2に含まれるヌクレオチド141~1226と同定された、精製または分離されたヌクレオチド配列が提供される。当業者には明らかであるように、このようなヌクレオチド配列はここで述べるT MEM 3 0 Aペプチドの調製のための発現系で用いることができ、あるいはここで述べる標識、プライマー等として用いることができる。

40

【 0 0 2 2 】

他の実施例において、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少

50

91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、あるいは少なくとも99%がSEQ ID NO: 14に含まれるヌクレオチド1~16と同定された、精製または分離されたヌクレオチド配列が提供される。

【0034】

他の実施例において、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、あるいは少なくとも99%がSEQ ID NO: 15に含まれるヌクレオチド1~16と同定された、精製または分離されたヌクレオチド配列が提供される。

10

【0035】

ここで述べるように、TMEM30Aアイソフォーム1、SEQ ID NO. 3は、内部C末端(アミノ酸1~42)、膜間領域(アミノ酸43~66)および外部領域(アミノ酸67~323)を有する。当業者には明らかなように、膜間領域内での変異が膜連結機能によって保護されなければ、このペプチドは欠損を有するであろう。同様に、C末端内での追加、削除および置換は細胞外N末端でよりも許容されうる。個々に述べるように、例えば挿入や削除等の大きい変化が許容されうることを強く示すTMEM30Aの少なくとも2つの接合変異が存在することが留意される。

20

【0036】

TMEM30Aアイソフォーム2、SEQ ID NO. 4は2つの膜間領域、アミノ酸44~66とアミノ酸288~310を有し、アミノ酸67~287は外部である。

TMEM30Aアイソフォーム3、SEQ ID NO. 5は1つの膜間領域をSEQ ID NO. 5のアミノ酸205~227に有し、SEQ ID NO. 5のアミノ酸1~204の外部領域を有する。

【0037】

他の実施例において、上記のペプチドまたはアミノ酸配列のいずれかから導き出されるヌクレオチド配列を含む核酸分子が提供される。これらの核酸分子は前記のように、例えば発現のため、標識やプライマー等として用いることができる。

30

【0038】

ここで述べる全長配列TMEM30Aポリペプチドに加えて、TMEM30A変異体を調製することができると考えられる。適当なヌクレオチド変化のTMEM30AのDNAへの導入、および/または所望のTMEM30Aポリペプチドの合成によって、TMEM30A変異体を調製することができる。当業者には明らかなように、アミノ酸変化を、TMEM30Aの翻訳後処理、例えばグリコシル化サイトの数または位置の変化や膜定着性の変化へと変更することができる。

【0039】

加えて、TMEM30A変異体に1つ以上の他の変位、例えばアミノ酸置換、1つ以上のアミノ酸の挿入、1つ以上のアミノ酸の削除、または化学的変位を行うことが可能である。例えば、本発明によって断片であるTMEM30A変異体が提供される。この実施例の変更において、該断片はSEQ ID NO. 3の残余67から残余323へ延伸するヒトTMEM30Aの一部に対応する残余を含有する。

40

【0040】

全長配列TMEM30Aポリペプチドまたはここで述べるTMEM30Aの様々な領域における変化は、例えば保存的および非保存的突然変異の手法および指針のいずれかを用いて作成することができる。変化はTMEM30Aをエンコードする1つ以上のコドンの置換、削除または挿入でありえ、これは未変性配列TMEM30Aに対するTMEM30Aのアミノ酸配列の変化になる。変化は任意に少なくとも1つ以上のアミノ酸のTMEM

50

30Aの1つ以上の領域の他のアミノ酸との置換によるものことができる。アミノ酸置換は、1つのアミノ酸の類似した構造および/または化学的性質を持つ別のアミノ酸との置き換え、例えばロイシンとセリンとの入れ替えによって行うことができる。挿入または削除は任意に約1から5のアミノ酸の範囲でありうる。

【0041】

[T M E M 3 0 A アンチセンスオリゴヌクレオチド]

本出願で開示される T M E M 3 0 A 配列は標識としても用いることができる。 T M E M 3 0 A 核酸の断片は、標的 T M E M 3 0 A の mRNA (センス) または T M E M 3 0 A の DNA (アンチセンス) 配列への結合が可能な単鎖核酸配列 (RNA または DNA) を含むアンチセンスまたはセンスのオリゴヌクレオチドの設計に有用でありうる。アンチセンスまたはセンスのオリゴヌクレオチドは、前記のように T M E M 3 0 A の DNA のコード領域の断片を含む。このような断片は一般的に少なくとも約14のヌクレオチドを、好ましくは約14~30のヌクレオチドを含む。所定のタンパク質をエンコードする cDNA 配列に基づいてアンチセンスまたはセンスのオリゴヌクレオチドを誘導する能力は、例えば (コーエン J S、オリゴヌクレオチド治療法、トレンドス・イン・バイオテクノロジー誌 1992年3月号、10(3):87~91) において述べられている。アンチセンスまたはセンスのオリゴヌクレオチドの標的 T M E M 3 0 A 核酸配列への結合によって、二本鎖の増強された分解、翻訳または転写の早発の終了あるいは他の手段を包含するいくつかの手段の1つにより T M E M 3 0 A 配列の翻訳または転写を妨げる二本鎖の形成がなされる。よってアンチセンスのオリゴヌクレオチドは、脳薬剤配送を調節するであろう T M E M 3 0 A タンパク質の発現の妨害に用いることができる。アンチセンスまたはセンスのオリゴヌクレオチドはさらに、変異糖ホスホジエステル主鎖を有するオリゴヌクレオチドを含み、このような糖結合は内生ヌクレアーゼに耐性があり生体内での適用により適している。

10

20

【0042】

[抗 T M E M 3 0 A 抗体への使用]

以下の例は説明のためにのみ提示され、本発明の視野の限定を意図するものではない。

本発明の抗 T M E M 3 0 A 抗体は様々な効用を持つ。例えば、抗 T M E M 3 0 A 抗体は T M E M 3 0 A の診断検定、例えば特定の細胞、組織または血清におけるその発現 (およびいくつかの場合においては差次的発現) の検出に用いることができる。当該分野で既知の様々な診断検定手法、例えば競合結合検定、直接または関節サンドイッチ検定、免疫沈降検定等を用いることができる。診断検定に用いられる抗体を検出可能成分によってラベルすることができる。検出可能成分は放射性同位体 ^{32}P 、ローダミンヤルシフェリン等の蛍光または化学ルミネセンス化合物、またはアルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ等の酵素でありうる。抗体の検出可能ラベルへの結合の方法は当該分野において既知である。

30

【0043】

抗 T M E M 3 0 A 抗体は組換細胞培養物または天然精製源からの T M E M 3 0 A の親和精製にも有用である。この処理において、T M E M 3 0 A に対する抗体は適当な支持体、例えばセファデックス (登録商標) 樹脂等に、当該分野で既知の方法を用いて固定される。それから固定された T M E M 3 0 A 抗体を、精製する T M E M 3 0 A を含有する試料と接触させ、その後、固定された抗体に結合された T M E M 3 0 A 以外の試料内の実質的に全ての物質を除去する適当な溶媒で支持体を洗浄する。最後に、精製された T M E M 3 0 A を溶出する別の適当な溶媒で支持体を洗浄する。

40

【0044】

[二機能抗体]

二重特異性抗体 (モノクローナル、単鎖、単一領域あるいは他の断片)、好ましくはヒトまたはヒト化抗体は、少なくとも2つの異なる抗原への結合特異性を持つ。この場合は該結合特異性の一方は T M E M 3 0 A であり、もう一方は他の脳抗体であり、好ましくはニューロン細胞表面タンパク質、ニューロン受容体またはニューロン受容体サブユニット

50

である。

【 0 0 4 5 】

[T M E M 3 0 A の薬剤スクリーニングへの使用]

本発明は特に、様々な薬剤スクリーニング手法のいずれかによる、T M E M 3 0 A ポリペプチドまたはその断片を用いての化合物のスクリーニングに有用である。このような試験に用いられるT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片は、溶液中で自由とするか、固体支持体に付加するか、あるいは細胞表面に配置してもよい。薬剤スクリーニングの1つの方法は、T M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片を発現する組み替え核酸によって安定して変換される真核または原核の宿主細胞を利用する。競合結合検定においてこのような変換細胞に対し薬剤がスクリーニングされる。生存可能または固定形態のこのような細胞を標準結合検定に用いることができる。例えばT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片と試験される試剤との複合体の形成を測定するか、あるいはT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片への結合に従って試験される試剤の内在化の増強を実験することができる。あるいは、試験される試剤によるT M E M 3 0 A ポリペプチドのその標的細胞内での内在化の減少を実験することができる。

10

【 0 0 4 6 】

よって、本発明により、試験される薬剤の細胞内での内在化の増強によるT M E M 3 0 A ポリペプチドまたはその断片に作用できる薬剤または他の試剤のスクリーニングの方法が提供される。これらの方法は、当該分野で既知の方法による、試剤のT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片への接触、および試剤とT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片との複合体の存在または細胞内での試剤とT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片との複合体の存在の検定を含む。このような競合結合検定において、試剤またはT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片は典型的にはラベルされる。適当なインキュベーションの後で、自由なT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片が結合形態で存在するものから分離され、自由または複合されていないラベルの数によってT M E M 3 0 A ポリペプチドに結合した特定の試剤を測定する。

20

【 0 0 4 7 】

また本発明により、T M E M 3 0 A ポリペプチドの発現に作用する、または脳血管性疾患に機能することができる薬剤または他の試剤のスクリーニングの方法が提供される。これらの方法は、当該分野で既知の方法による、試剤のT M E M 3 0 A ポリペプチドまたはその断片への接触、および試剤とT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片との複合体の存在または細胞内での試剤とT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片との複合体の存在の検定を含む。このような競合結合検定において、試剤またはT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片は典型的にはラベルされる。適当なインキュベーションの後で、自由なT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片が結合形態で存在するものから分離され、自由または複合されていないラベルの数によってT M E M 3 0 A ポリペプチドに結合した特定の試剤を測定する。

30

【 0 0 4 8 】

他の薬剤スクリーニング手法により、T M E M 3 0 A ポリペプチドへの適当な結合親和性を持つ化合物の高スループットスクリーニングが提供される。例えば、異なる小さいペプチド試験化合物が固体基質上で合成される。T M E M 3 0 A ポリペプチドへの添加により、ペプチド試験化合物はT M E M 3 0 A ポリペプチドと反応し、洗浄される。結合したT M E M 3 0 A ポリペプチドは当該分野で既知の方法によって検出される。精製されたT M E M 3 0 A ポリペプチドは薬剤スクリーニング手法において用いるプレート上に直接被覆することができる。加えて、F C 5 等のT M E M 3 0 A 非中和抗体をT M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片の捕捉と固体支持体への固定に用いることができる。

40

【 0 0 4 9 】

本発明はまた、T M E M 3 0 A ポリペプチドへ特異的に結合可能な中和抗体（例えばF C 5）を試験化合物とT M E M 3 0 A ポリペプチドまたはその断片への結合において競合させる競合薬剤スクリーニング検定の使用を企図する。この方式において、1つ以上の抗

50

原決定基を T M E M 3 0 A ポリペプチドと共有するペプチドの存在の検出に抗体を用いることができる。

【 0 0 5 0 】

[合理的な薬剤設計]

合理的な薬剤設計の目標は、生物学的に活性の T M E M 3 0 A または T M E M 3 0 A と相互作用する小分子の構造類似体、例えばアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤の製造である。これらの例は、T M E M 3 0 A ポリペプチドのより活性または安定な形態であるかまたは生体内脳薬剤配送を増強する薬剤の形成に用いることができる。

【 0 0 5 1 】

取り組み方の 1 つにおいて、T M E M 3 0 A ポリペプチドまたは T M E M 3 0 A ポリペプチド - 試剤複合体の三次元構造を、X 線結晶学またはコンピューターモデリングによって定量する。より多くの場合、T M E M 3 0 A ポリペプチドの構造に関する有用な情報は T M E M 3 0 B (遺伝子銀行番号 0 0 1 0 1 7 9 7 0) 等の相同タンパク質に基づくモデリングから得ることができる。いずれの場合も、関連構造情報を、類似性 T M E M 3 0 A ポリペプチド的分子の設計、または安定性または薬剤配送を向上する活性を向上された有効なモジュレーターの同定に用いる。

10

【 0 0 5 2 】

[T M E M 3 0 A / リガンド相互作用の同定]

受容体 / リガンド相互作用の同定のために、T M E M 3 0 A ポリペプチドまたは断片への結合能力について試剤を試験することができる。T M E M 3 0 A のリガンドの同定は様々な表示、例えば脳薬剤配送のために受容体を発現することが既知である脳内皮細胞等の細胞への生体活性分子 (リガンドまたは T M E M 3 0 A に結合) のターゲティング、および同じものを含有すると推測される配合物内でのリガンドまたは T M E M 3 0 A の存在の検出のための試薬としての T M E M 3 0 A またはリガンドの使用に有用であろう。配合物は、リガンドまたは T M E M 3 0 A を発現する、T M E M 3 0 A またはリガンドを発現または応答すると知られている細胞の生体活性を調節する、T M E M 3 0 A を発現する細胞の薬剤への透過性を調節する、または T M E M 3 0 A またはリガンドに対するアゴニスト、アンタゴニストおよび / または抗体を許容する、と推測される細胞を含みうる。これは T M E M 3 0 A を発現する細胞の透過性または他の生体活性を調節するであろう。様々な他の表示も当業者には明らかである。例えばポリヒスチジン標識等のエピトープ標的潜在リガンドは T M E M 3 0 A との相互作用が可能である。エピトープ標識ペプチド試剤との 1 時間のインキュベーションの後で、T M E M 3 0 A はタンパク質 A ビーズによって免疫沈降され、該ビーズは洗浄される。潜在リガンド相互作用は、エピトープ標識への抗体との複合体のウエスタンプロットによって定量される。

20

30

【 0 0 5 3 】

よって、本発明の実施例において、荷役物質の血液 脳隔壁を経ての移動を発生または増強する方法が提供される。該方法は以下を含む：

- a) 血液 脳隔壁抗原への親和性を持つ接着質の取得；
- b) 荷役物質の接着質への機能的連結 (例えば表面に接着質を持つリポソームまたは他の適当な包での荷役物質の結合または被包) ；
- c) 接着質と脳内皮細胞との接触の許容。

40

【 0 0 5 4 】

荷役物質は、医薬品、像形成剤、毒素あるいは他の適当な化合物を含む関連する化合物でありうることは十分に理解されるであろう。

いくつかの例において、血液 脳隔壁の移行の後で接触可能な標的への親和性を持つ 1 つ以上の分子を含み、荷役物質の特異的ターゲティングを促進することが望ましい。

受容体を密集させるとともにその移行を刺激する様々なリガンドを顕出させることで、血液 脳隔壁を経ての受容体媒介トランスサイトーシスを受ける受容体 (F C 5 に認識される抗原等) を薬剤 / 治療薬の脳への配送に利用することができる。これらは典型的には抗体であるが、ペプチド、オリゴサッカライド等でもありうる。

50

【実施例】

【0055】

経血管的脳配送を開発できる新たな抗原-リガンド系を発見するために、ラマ単一領域抗体 (sdAb) フェージ像形成ライブラリ (タンハ-他、2002年) をヒト肺と脳微小血管内皮細胞との間の異なる抗原選択に用いた。sdAbは自然に生じ軽鎖を欠く重鎖IgGのV_HH断片であり、単鎖抗体 (scFv) の半分の大きさ (13kDa) である。HCECを選択的に認識するとともに生体外および生体内でBBBを経て移行する2つの新たなsdAb、FC5 (遺伝子銀行番号AF441486) およびFC44 (遺伝子銀行番号AF441487) がこれらの研究で分離された。これらのsdAbは生物工学製品および担体との結合が可能ないように作成された (アブルロブ (Abulrob) 他、2005年)。sdAbは有望な経血管的脳配送ベクターとして、従来 of 抗体に対し、その小さいサイズ、高水準でFc受容体を発現する組織 (例えば肝臓や脾臓) に対する低い非特異的相互作用、それによる低い免疫原性、および高温、pH、塩に対する著しい安定性を含むいくつかの利点を持つ。

10

【0056】

[例1. FC5は生体内での静脈内注射の後で脳を標的とする]

FC5の生体内分布を調査するために、FC5をNHSエステル結合を介して近赤外線プローブ、Cy5.5に結合させ、マウスに尾静脈から注射した。マウスを小動物時間領域エクスプローラーオプティクス (explore Optix) 前臨床画像化システムによって画像化した。近赤外線蛍光プローブ、Cy5.5単独、またはFC5 (50μg) または陰性対照抗体NC11 (50μg) と結合したものを27ゲージ固定針の0.5mlインシュリン注射器を用いて動物に静脈から注射した。薬剤注射から6時間後に動物をエクスプローラーオプティクスによって画像化した。全ての画像化試験において、繰返し数80MHzおよび時間分解能250ps光パルスの670nmパルスレーザーダイオードを刺激のために用いた。700nmの蛍光エミッションを高感受性時間分解能単一光子計数システムによって収集し、3mmオフセットされた高速光電子増倍管を介して拡散光学微細構成再構成のために検出した。それぞれの動物を板の上につぶせにし、該板を画像化システム内の加熱台 (36℃) に乗せた。頭部を包囲する二次元中央体走査領域を上面視リアルタイムデジタルカメラで選択した。動物の最適な高さは側面視デジタルカメラで検証された。それから動物が自動的にレーザー走査のために画像化室へ移動される。それからガルバノミラーによって制御されるレーザー刺激ビームを選択されたROI上に移動した。レーザーの力とピクセル毎計数時間をそれぞれ30μWと0.5sに最適化した。これらの値は試験全体において維持された。ラスト走査間隔は1.5mmとし、それぞれのフレームの獲得の間維持された。1024の点を関連する領域 (ROI) のために走査した。データを一時的点像分布関数 (TPSF) として記録し、画像を蛍光分布図として再構成した。

20

30

【0057】

注射から6時間後のエクスプローラーオプティクス小動物画像化システム (670nm刺激レーザー) を用いた光学画像化において、異なる標的に対し同一のライブラリからの陰性対照抗体、NC11に比して頭領域でより高いFC5蓄積を示した (図1)。頭部 (図1、BおよびD) を含む様々な領域でのオプティビュー (OptiView、登録商標) ソフトウェアを用いた蛍光濃度の定量化によって頭部でのFC5の選択的蓄積が示された。殺および灌流後の動物から取り出した脳の生体外画像化 (図1E) によって、FC11を注射した動物に比してFC5を注射した動物の脳の蛍光濃度はより高いことが実証される。

40

[例2. FC5は荷役分子を血液 脳隔壁内皮細胞を経て輸送することができる]

【0058】

sdAbは治療成分との結合に利用できる-SH基を持たないので、FC5は追加の自由システインを発現するように作成された。よって図2Aに示すように、cysFC5はマレイミド活性反応を用いてマウスHRP-IgG (~190kDa) と結合した。HR

50

P - I g G または H R P - I g G - c y s F C 5 はヒト C E C 培養物に取り込まれ、30分間いずれかの構造に細胞を暴露した後で定量された。I g G - H R P の有効細胞取り込みは分子が c y s F C 5 と連結された場合にのみ見られる (図 2 B および C)。同様に、c y s F C 5 と連結された H R P - I g G は生体外 B B B モデルの外側面室への有効細胞間移行を表し (図 2 D)、I g G - H R P 単独のヒト C E C 単層を経ての輸送は無視できるものだった。

【0059】

F C 5 にベクター化された H R P - I g G のみがヒト C E C に入り生体外 B B B を経て移行されることが表され s d A b は成功裏に 10 倍大きい分子を標的組織内へ、またはこれを経て輸送できることが示唆された。類似の化学結合原理を用い、有望な治療の性質により選択された大分子を c y s F C 5 に取り付けることができる。ビオチン - アビジンリンカーを含む、全体または単鎖抗体に用いられている他の化学的リンカーの取り組み方もまた s d A b と用いることができ、適応したスパーサーを抗原結合サイトの立体障害を避けるために用いる。s d A b を遺伝子学的に作成可能とすることで、キメラ (融合) タンパク質を含む治療分子への化学的連結の択一的な取り組み方も可能である。

10

【0060】

例えば c y s F C 5 によって達成される自由連結成分を提供する B B B 透過性 s d A b F C 5 の作成によって、薬剤担体の文脈における多重結合表示のための択一的な取り組み方が可能になる。例えば、I g G s または s c F v s について報告されている結合と同様にして、c y s F C 5 をナノ粒子配送系の高分子成分またはリポソーム基剤粒子と結合させることができる。これらの s d A b にベクター化された 'コンテナ' を脳への薬剤配送、トランスフェリン受容体を含む既知の B B B 抗原に対する古典的抗体を用いる既に開発されている構想に用いることができる。

20

【0061】

[例 3 . F C 5 の内在化および脳内皮細胞を経ての移行の機構]

[H C E C を経ての F C 5 移行は有極であり電荷に対し独立である]

F C 5 は非常に高い濃度であっても (1 mg / ml) H C E C に対し毒性ではない。[¹⁴C] - スクロースの生体外 B B B モデルを経ての透過性には、10 μg / ml F C 5 の不在と存在で有意な差はなく [それぞれ $P_e = (0.897 \pm 0.11) \times 10^{-3}$ および $(0.862 \pm 0.18) \times 10^{-3}$ cm / min]、F C 5 は H C E C の細胞間透過性には影響しないことが示唆される。生体外 B B B モデルを経ての F C 5 のトランスサイトーシスは有極である。F C 5 の頂端部から側底部への輸送は側底部から頂端部より 1.2 倍高いことが 30 分間のみで観測された (図 3 A)。これに対し、[¹⁴C] - スクロース、細胞間拡散のマーカは、細胞単層膜の頂端部から側底部、側底部から頂端部で等しい (すなわち有極でない) 分布を示した。

30

【0062】

マクロピノサイトーシスによって F C 5 が内在化および輸送されるかを調査するために、500 μM アミロライド存在下で F C 5 移行を試験した。アミロライドは被覆穴媒介エンドサイトーシスに影響することなくマクロピノソームの形成を阻害する (ウエスト他、1989年)。アミロライドは F C 5 の内皮透過移動に影響しなかった (図 3 B)。

40

【0063】

A M E の F C 5 トランスサイトーシスへの寄与は、s d A b が正に帯電していることによって査定される (F C 5 の算出された等電点は ~ 9.23)。F C 5 の取り込みおよび輸送の査定に先行して H C E C を高カチオン硫酸プロタミン (40 μg / ml) またはポリ-L-リジン (300 μM) と共に 30 分間インキュベートした。これらはいずれも A M E を阻害することが示されている (サイ他、1998年)。いずれの化合物も F C 5 の H C E C への取り込み (データは図示しない) および生体外 B B B モデルを経ての輸送 (図 3 B) に影響せず、F C 5 の H C E C を経ての結合および移行は電荷に対し独立であることが示唆される。

【0064】

50

驚いたことに、BBB内のAMEを刺激する能力についてこれらの研究で試験された小麦胚細胞凝集素(WGA)は有意にFC5移行を阻害し、これによって内皮糖衣が電荷媒介相互作用ではない機構を介してこの過程に関係することが示される。この可能性は以下で述べる研究においてさらに探求された。

【0065】

[FC5のHCECを経ての輸送はエネルギー依存である]

FC5トランスサイトーシスのエネルギー依存の調査のために、FC5の取り込みおよび輸送を37°Cおよび4°Cで測定した。c-mycに続くFITCラベル二次抗体により、細胞内FC5は免疫化学によって検出された。FC5は早くも15分間でHCEC内に内在化し、37°Cでの添加の30分後に大半の細胞で検出された(図4A)。37°Cに比して、4°CではFC5の細胞内蓄積(図4A・B)および内皮間移行(図2C)の両方において顕著な減少が観測された。[¹⁴C]-スクロースのBBBモデルを経ての輸送は温度の影響を受けなかった。無グルコース培地でのHCECの5mMアジ化ナトリウム(NaN₃)および5mM2-デオキシグルコースへの30分間の暴露による呼吸および解糖作用経路の同時阻害によって、FC5移行はほぼ完全に阻害された(図4C)。この処理によって他の細胞種の細胞ATPの完全な涸渇が示されている(ロナー他、1999年)。Na⁺, K⁺-ATPアーゼポンプ阻害剤、ウアバイン(1μM)との30分間の前処理でもFC5のHCECを経ての輸送は40%減少した(図4D)。

10

【0066】

[FC5トランスサイトーシスはクラスリン被覆小胞を経て起こる]

FC5移行のための2つの主要なエネルギー依存受容体媒介エンドサイトーシス/トランスサイトーシス経路、クラスリン被覆小胞およびカベオラが、コロカリゼーション研究およびエンドサイトーシス阻害剤を用いて調査された。

20

【0067】

5μg/mlFC5へ30分間暴露されたHCEC内でのカベオリン-1およびFC5の二重免疫細胞化学法は、FC5免疫蛍光Aとによってカベオリン-1免疫蛍光Bを示さなかった(図5D~F)。これに対し、クラスリン免疫蛍光EはほとんどFC5免疫蛍光Dとによってコロカリゼーションされた(図5A~C)。さらに、密度勾配遠心分離法によるHCEC分画の後で、ウエスタンブロット上でのFC5免疫反応によって同じ分画(#7、8および9)クラスリン免疫反応として見られたが、高カベオリン-1分画(#2および3)からは見られなかった(図5G)。

30

【0068】

FC5の取り込みと移行が、クロルプロマジン(50μg/ml)および低張性K⁺枯渇緩衝剤(0.14MNaCl、2mMCaCl₂、1mg/mlグルコース、20mMH₂PO₄、pH7.4、水で1:1に希釈)を含むクラスリン媒介エンドサイトーシスの薬理的阻害剤、またはフィリピン(5μg/ml)、ナスタチン(5μg/ml)およびメチル-β-シクロデキストリン(5mM)を含むカベオラ媒介エンドサイトーシス阻害剤で30分間前処理した細胞において実験された。クロルプロマジンはエンドソームからのAP-2の再循環を破壊するとともに、原形質膜上の被覆穴の組み立てを防止するが、K⁺枯渇はクラスリン被覆小胞形成を阻止する。フィリピンおよびナスタチンはコレステロールに結合し、メチル-β-シクロデキストリンは原形質膜からコレステロールを排出し、結果、高コレステロールカベオラ小胞が破壊される。試験されたカベオラ媒介エンドサイトーシス阻害剤は全て、生体外BBBモデルを経てのFC5移行に影響しなかった(図5H)。これに対し、クロルプロマジンおよびK⁺枯渇はそれぞれ52%、46%のFC5移行を阻害した(図5H)。

40

【0069】

エンドサイトーシス後のFC5の細胞間移行を調査するため、初期および後期エンドソーム/リソソームのマーカーでコロカリゼーション研究を行った。初期エンドソームのマーカー、テキサスレッド(登録商標)結合トランスフェリン(図6A~C)でコロカリゼーションされたFC5はカテプシンB(図6D~F)、後期エンドソームのマーカー

50

ではコロ-カリゼ-ションされなかった。BBBモデルの側底部室から収集されたトランスサイト-シスされたFC5は、頂端部区画に添加されたFC5とウエスタンブロット上で区別できず(図6G)、これによってHCECを経てのトランスサイト-シスの間、FC5はリソソームを迂回し非損傷のままであることが示される。同じライブラリからの非選択sdAbはモデルの側底部室から検出できず(ムルガナダム(Muruganadam)他、1997年)これによってFC5は細胞間輸送で側底部室に入らないことが示される。

【0070】

FC5の輸送はまた、カチオンイオノフォアモネンシンによる細胞内区画の中和に感受性である。モネンシンはエンドソームおよびリソソームの区画内の Na^+ および H^+ 勾配を破壊し、エンドサイト-シス小胞のpHは5.5から7以上に上がり、これによって受容体の再循環が阻害される。モネンシン(25 μM)はFC5のHCECを経てのトランスサイト-シスを34%阻害し(図6H)、これによって酸性化された細胞内区画およびFC5の推定上受容体の再循環が効率的な内皮透過輸送の維持に重要でありうることを示される。

10

【0071】

[通信経路がHCEC内のFC5エンドサイト-シス/トランスサイト-シスに含まれる]

FC5のトランスサイト-シスにおける細胞骨格機構部分の要求を定量するために、HCECをアクチン解重合剤であるサイトカラシンD(0.5 μM)またはラトランキュリンA(0.1 μM)、あるいは微小管阻害剤であるノコダゾール(20 μM)またはコルヒチン(20 μM)とともにHCECは30分間インキュベートした。サイトカラシンDおよびラトランキュリンAは実質的に(70~80%)FC5のHCECを経ての頂端から側底への輸送を減少させた(図7A)。これに対し、微小管阻害剤はFC5トランスサイト-シスに影響しなかった(図7A)。

20

【0072】

通信経路によるFC5トランスサイト-シスの調節を定量するために、HCECを以下のモジュレーターの一つと共により30分間インキュベートした。チロシンキナーゼ阻害剤であるゲニステイン(50 μM)；タンパク質キナーゼC(PKC)阻害剤であるビスインドールマレイミド-1(BIM-1；5 μM)；PI3-キナーゼ阻害剤であるウォルトマニン(0.5 μM)；およびタンパク質キナーゼA(PKA)阻害剤であるジブチリル-cAMP(db-cAMP；500 μM)である。HCECを経てのFC5トランスサイト-シスはゲニステイン(図7B)およびdb-cAMP(図7B)の影響を受けず、PKC阻害剤存在下で25%減少し(図7B)、PI3-キナーゼ阻害剤存在下ではほぼ完全に妨げられた(図7B)。用いられた薬理学試剤はいずれも細胞に対し毒性ではなかった。

30

【0073】

[FC5トランスサイト-シスにおける炭水化物エpite-ブの役割]

FC5トランスサイト-シスにおける内皮糖衣の役割は、BBBでのAMEを刺激すると知られているレクチンであるWGA(パンクス他、1998年)がHCECへのFC5取り込み(図8Aおよび8B)を阻害することの観察によって示される。

40

【0074】

硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)鎖の二糖ユニットの20~200の繰り返しからなる大型の非分岐ポリマーでありCEC内で豊富に発現するプロテオグリカンが、HCECを経てのFC5トランスサイト-シスを媒介するかどうかを試験するために、膜上で発見されるいくつかの既知の可溶性GAGによる競合実験を行った。ヘパリン硫酸(50U/ml)、コンドロイチン硫酸A(10 $\mu\text{g/ml}$)およびコンドロイチン硫酸C(10 $\mu\text{g/ml}$)によってHCECを前処理することは、生体外でのBBBを経てのFC5トランスサイト-シスに影響しなかった。同様に、マンナン(1mg/ml)およびマンノース(50 μM)はFC5移行に影響せず、これによって脳の発達においてBBB輸送に含まれる多機能膜間糖タンパク質であるマンノース6-リン酸/インシュリン類似生育要

50

素 2 受容体が F C 5 内在化には含まれないことが示唆される。

【 0 0 7 5 】

W G A は幅広い範囲のシアロ結合体と相互作用することが知られているため、F C 5 の膜内および膜間でのシアル酸残基の重要性を次に試験した。200 μ M シアル酸、または 0.1 ~ 0.2 U の、様々な細胞膜糖タンパク質からの全てのシアル酸を放出するコレラ菌由来ノイラミニダーゼ、あるいは (2 , 3) 結合シアル酸に選択的な腸チフス菌由来 (2 , 3) ノイラミニダーゼによって H C E C を前処理した。F C 5 取り込み (図 8 C および 8 D) および F C 5 の H C E C を経てのトランスサイトーシス (図 8 E) はいずれもシアル酸およびノイラミニダーゼ (シアリダーゼ) に阻害された。ノイラミニダーゼは特に F C 5 トランスサイトーシスを 91% 減少させた (図 8 E) 。これらの研究によっ

10

【 0 0 7 6 】

F C 5 トランスサイトーシスに含まれるシアロ糖結合体の性質を、細胞をそれぞれ 3 つのシアル酸結合レクチン、幅広い範囲のシアロ結合体と相互作用する小麦麦芽凝集素 (W G A ; 100 μ g / m l) 、セイヨウニワトコ凝集素 (S N A ; 100 μ g / m l) および (2 , 6) および (2 , 3) シアリルガラクトシル残基を認識するイヌエンジュ凝集素 (M A A ; 100 μ g / m l) によって前処理することでさらに試験した。

【 0 0 7 7 】

F C 5 認識シアル酸残基が糖脂質に取り付けられるかどうかを調査するために、H C E C 細胞を述べられたように (ヴェッセルおよびフリュゲ、1983年) タンパク質および脂質に分画した。ノイラミニダーゼの不在または存在下でのこれらの分画への F C 5 結合を酵素結合免疫吸着検定法によって試験した。F C 5 の H C E C 脂質分画への結合は無視できた (図 6 G) 。F C 5 はまた分離された脳ガングリオシドを認識できなかった。これに対し、ノイラミニダーゼに暴露された細胞溶解産物のタンパク質分画において F C 5 の H C E C タンパク質分画への結合は 50% 減少した。F C 5 は H E K 293 細胞のタンパク質および脂質分画のいずれとも結合しなかった。正の対照として用いたガラクトシルセラミドが脂質分画に O 1 抗ガラクトシルセラミド抗体に検出される強い信号を生じた。

20

【 0 0 7 8 】

[トランスフェリン受容体の排除]

トランスフェリン受容体は C E C において豊富であり (ジェフリーズ他、1984年) 、B B B を経てのトランスサイトーシスに含まれるとともに (キアン他、2002年) 、高度にグリコシル化されていることから (ヘイズ他、1992年) 、F C 5 の推定上の受容体が実際にヒトトランスフェリン受容体であるかどうかを調査した。抗トランスフェリン受容体抗体 C D 7 1 (図 9 A ・ B) に対し、F C 5 およびその高結合力五量体構成 P 5 (アブルロブ (A b u l r o b) 他、2005年) は酵素結合免疫吸着検定法検定において固定されたヒトトランスフェリン受容体に結合せず (図 9 A) 、ウエスタンブロットにおいて該タンパク質を認識しなかった (図 9 B) 。加えて、F C 5 取り込み (データは図示しない) および内皮透過輸送 (図 9 C) はホロトランスフェリンの 100 倍過剰存在下

30

40

【 0 0 7 9 】

[考察]

この研究にある集合的存在によって、F C 5 の取り込みおよびトランスサイトーシスはクラスリン被覆穴を経て起こるとともにノイラミニダーゼ感受性、(2 , 3) - シアロ糖結合体の認識に依存する。これらの結論は F C 5 移行の有極化、温度およびエネルギー依存を示す一連の実験によって補強されるとともに、細胞間拡散、穴形成およびマクロピノサイトーシス経路を排除した。しかし、一般的な仮定に対し、電荷媒介 B B B 選択性を示す膜貫通ペプチドの新たな網の近來の研究によって、R M E と同様に A M E も温度およびエネルギー依存でありうることが示された (ドリン他、2003年) 。C E C 上の負電

50

荷を中和することで正に帯電した F C 5 の内皮透過輸送を減少させる A M E 阻害剤の欠損により、R M E の機構がさらに示唆された。R M E の 2 つの主要な小胞経路、クラスリン被覆穴およびカベオラが次に試験された。F C 5 内在化のクラスリン被覆穴経路は F C 5 のクラスリンによる強いコロカリゼーションによって示されたが非損傷および分画された H C E C の両方におけるカベオラ免疫反応によっては示されず、クラスリン被覆穴形成の阻害を示す前処理による F C 5 トランスサイトーシスの阻害によって示された。内在化において、F C 5 は初期エンドソームおよび分岐後期エンドソーム/リソソームの標的にされるとともに、エキソサイトーシスによって有効な細胞内劣化なしに外側面区画へと排出された。

【 0 0 8 0 】

F C 5 の小胞細胞間輸送は非損傷アクチン重合に強く依存していた。近年の研究によって、A b p 1 p、P a n 1 p およびコアクチンを含むいくつかのタンパク質が同定されており、これらはアクチンフィラメント集合をクラスリン被覆穴内在化と機能的に連結する。

【 0 0 8 1 】

クラスリン被覆穴の往来を制御する信号事象の複雑さは判読が困難なままである。F C 5 トランスサイトーシスは本質的に P 1 3 - キナーゼ阻害剤、ウォルトマニンに妨げられ、これは P K C、P K A およびトリプトシンキナーゼ阻害剤を含む他の信号経路にほとんど影響されなかった。P 1 3 - キナーゼによるイノシトール脂質のリン酸化はクラスリン被覆穴経路を含む別種の膜輸送事象に関係している。P 1 3 K - C 2 アルファはクラスリン被覆小胞の個体数と共精製されるが、A P - 2 およびダイナミンを含むこれらの小胞の機能を包含するタンパク質は P 1 3 キナーゼと相互作用する。P K C および P K A は様々な受容体の内在化に関係しているが、いずれもクラスリン媒介エキソサイトーシスに要求されることは見られない。従来から R M E 媒介脳輸送に利用されているインシュリン生育因子 (I G F) 受容体 (チャン他、2 0 0 2 年) を含むいくつかの膜受容体のチロシンキナーゼ活性の阻害によってその内在化が防止される。F C 5 トランスサイトーシスにおけるゲニステイン効果の欠損によって、F C 5 に認識される受容体はチロシンキナーゼではないらしいことが示唆された。

【 0 0 8 2 】

脳内皮細胞の表面は、細胞 - 細胞伝達、病原体認識 / 付着および細胞外マトリクスとの相互作用に関係する複合炭水化物の密層で覆われている (ブリース他、2 0 0 0 年) 。表面糖結合の様々なモジュレーターまたは競合阻害剤を用いた研究によって、ノイラミンダーゼ感受性 (2、3) - シアル酸残基が F C 5 抗原認識、F C 5 内在化およびトランスサイトーシスにおいて重要であることが実証された。糖タンパク質およびガングリオシドの双方に取り付け可能なシアル酸残基はクラスリン被覆穴において豊富である。H C E C において発現する主要なガングリオシドは G M 3 およびシアリルパラグリオシド (L M 1) である。F C 5 は H C E C から抽出された脂質に結合できなかつた、または抗原の糖タンパク質性質を含む主要な脳ガングリオシドのいずれをも認識できなかつた。シアル酸残基は多くの組織で発現されるため、F C 5 の脳内皮細胞への選択性は抗原エピトープのタンパク質成分によるものであろう。

【 0 0 8 3 】

トランスフェリン受容体は脳内皮に豊富な、クラスリン被覆小胞媒介エンドサイトーシスを受ける多重シアル酸残基を持つ N - および O - グリコシル化経膜タンパク質である。トランスフェリン受容体に対する抗体、O X 2 6 は、生物学上の脳標的ベクターおよびリポソームとして用いられている。F C 5 は分離されたヒトトランスフェリン受容体の認識に失敗し、ホロトランスフェリンは F C 5 トランスサイトーシスと競合しなかつた。これに従って、脱シアル化および N - 脱グリコシル化されたトランスフェリン受容体変異体は、未変性トランスフェリン受容体と同様のトランスフェリン結合と内在化特性を示している。トランスフェリン受容体に加えて、メラノトランスフェリン (p 9 7) を含む他の鉄輸送分子、他の受容体と同様にインシュリン受容体を含むラクトフェリン (チャン他、2

10

20

30

40

50

002年)および低濃度リポタンパク質受容体(デホーク(Dehouck)他、1997年)が可能性のある脳配送のためのRME経路として同定されている。他の研究によつて、TNF受容体(オスブルグ他、2002年)等の病理学的条件において特に上方制御される受容体が脳内皮細胞においてRMEを受けることが示唆された。これらのタンパク質はFC5によつて認識される推定上の抗原として選択的に排除されていない。

【0084】

要約すると、FC5は脳内皮細胞の管腔表面において発現する(2,3)-シアロ糖結合体を認識するとともにクラスリン被覆小胞を経てのアクチン及びPI3キナーゼ依存トランスサイトーシスを受ける新たな単一領域抗体である。リンカー成分を提供するために作成されたFC5およびその誘導體(アブルロブ(Abulrob)他、2005年)は、薬剤、生物化学製品およびナノ担体の脳標的ベクターへと発達しうる。生体内での生体内分布研究(ムルガナンダム(Muruganandam)他、2001年)によつて、同様の大きさの他の生物化学製品に典型的な、脳内での有意なFC5蓄積およびその腎臓および肝臓による高速排除が実証された。よつて、PEG化等の戦略によるFC5薬物動態学の向上は、効率的な生体内脳ターゲティングの達成に必要であろう。にもかかわらず、OX26抗体等の'古典的'抗体ベクターと同様に、内皮透過輸送を受ける細胞特異抗体の認識により、BBB標的sdAbは(細胞貫通Syn-Bペプチドと同様に)ペプチド様サイズであり脳内皮へ高電荷媒介結合する(ドリン他、2003年)。sdAbはペプチドとは異なりプロテアーゼへの著しい耐性を持ち、完全なIgGとは異なり脳からBBBにおけるFc受容体媒介流出系によつて搬出されることがない。これらの利点によりsdAbは、小胞内皮透過輸送の開発によつて脳への標的薬剤および生物化学製品と多角的に代替される。

10

20

【0085】

[例4.FC5に対するファージ表示ヒトcDNAライブラリのパニングによる抗原同定]

FC5に認識されるタンパク質抗原の同定のために、ゲノミクスおよびプロテオミクスの方法の組み合わせが用いられた。戦略は概略的に図10に示される。ゲノミクスの取り組み方は固定されたFC5に対するヒト脳cDNAのファージ表示ライブラリ(コーテック)のパニングからなる。4周のパニングの後で、FC5に認識される最も頻度の高い配列、SEQ ID No. 1が同定された。破壊解析によつてSEQ ID No. 1を、膜間タンパク質30A(別名:C6orf67、CDC50A、細胞サイクル制御タンパク質50A)のヌクレオチド配列1598~1979に沿つて配列した。膜間領域タンパク質30A(TMEM30A)のコード領域はSEQ ID No. 2として示される。コードされたタンパク質のスプライシング変異体はSEQ ID No. 3、SEQ ID No. 4およびSEQ ID No. 5として示される。TMEM30Aの細胞外領域はSEQ ID No. 6として示される。N-グリコシル化サイトを含むTMEM30Aのアミノ酸配列はSEQ ID No. 7およびSEQ ID No. 8として示される。TMEM30Bでのいくつかの小変異でも見られるTMEM30Aの保護CDC50領域の配列はSEQ ID No. 9~15として示される。これらの配列は本出願の全体において詳細に検討されることが留意される。

30

40

【0086】

[SEQ ID No. 1]

G	A	A	T	T	T	T	A	T	G	G	A	G	A	A	A	G	G	G	A	T	T	A	C	A	A	G	A	T	G							
T	A	T	G	A	G	T	A	T	A	A	T	G	A	C	T	T	G	C	T	A	A	C	C	T	T	T	T	T	T	T						
C	A	G	G	A	T	T	C	A	G	A	G	A	A	A	G	A	T	G	A	A	G	A	A	G	A	A	G	A	C	C	A					
T	A	T	C	T	A	A	A	T	A	A	T	A	A	C	A	C	T	T	C	A	T	C	A	T	C	A	T	T	T	T	C	A	T			
G	T	G	T	A	T	A	A	A	T	G	C	T	T	A	A	A	G	T	A	C	C	A	T	C	A	T	C	T	T	T	G	T	T			
T	G	A	G	G	T	G	G	T	T	C	A	T	G	T	A	T	C	C	A	G	T	T	T	A	T	C	C	A	G	C	A	G	C	A	G	
T	A	C	A	G	T	T	A	T	T	T	G	T	C	A	A	G	C	T	T	A	G	C	T	T	T	G	A	T	T	T	G	A	T	T	T	
T	C	A	A	A	G	G	A	C	A	C	G	C	T	T	A	C	C	T	T	G	T	C	T	G	G	C	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A

50

A G A A T T A A T G C T C A T G T C T G C A G T G G T T G G
 G T A G G T C C T G C T T A G G A G A A T T A A A A A A T T
 C C T C T T T C C G T T T G G T T G A A T G T T G C A G T C
 A G G A A C C C C A A C T C A C T T G G A A T G T T T T C A
 T A T G T A A T C A T T T C C C T T G A A G C T T A T

この配列はFC5に対するファージ表示ヒトcDNAライブラリのパニングから得られた。この配列はMEM30Aヌクレオチド配列(遺伝子銀行番号018247)のヌクレオチド配列1598~1979に沿って配列され、コーディングされていない。

【0087】

[SEQ ID No. 2]

MEM30Aのヌクレオチドコーディング領域(141~1226)

(別名:膜間タンパク質30A、MEM30A、C6orf67、CDC50A、細胞サイクル制御タンパク質50A)

a t g g c g a t g a a c t a t a a c g c g a a g g a t g a a g t g g a c
 g g t g g g c c c c g t g t g c t c c g g g g g g c a c c g c g a a g
 a c t c g g a g a c c g g a t a a c a c g g c c t t c a a a c a g c a a c
 g g c t g c c a g c t t g g c a g c c c a t c c t t a c g g c t g g c a
 c g g t g c t a c c t a t t t t c t t c a t c a t c g g t c t c a t c t
 t c a t t c c c a t c g g c a t t g g c a t t t t t g t c a c c t c c a a
 c a a c a t c c g c g a g a t c g a g a t t g a t t a t a c c g g a a c
 a g a g c c t t c c a g t c c c t g t a a t a a a t g t t t a t c t c c
 g g a t g t g a c a c c t t g c t t t t g t a c c a t t a a c t t c a c a
 c t g g a a a a g t c a t t t g a g g g g c a a c g t g t t t a t g t a t
 t a t g g a c t g t c t a a t t t c t a t c a a a a c c a t c g t c g t t
 a c g t g a a a t c t c g a g a t g a t a g t c a a c t a a a t g g a g
 a t t c t a g t g c t t t g c t t a a t c c c a g t a a g g a a t g t g
 a a c c t t a t c g a a g a a a t g a a g a c a a a c c a a t t g c t c c
 t t g t g g a g c t a t t g c c a a c a g c a t g t t t a a t g a t a c
 a t t a g a a t t g t t t c t c a t t g g c a a t g a t t c t t a t c c
 t a t a c c t a t c g c t t t g a a a a a g a a a g g t a t t g c t t g g
 t g g a c a g a t a a a a a t g t g a a a t t c a g a a a t c c c c c t
 g g a g g a g a c a a c c t g g a a g a a c g a t t t a a a g g t a c a
 a c a a a g c c t g t g a a c t g g c t t a a a c c a g t t t a c a t g c
 t g g a t t c t g a c c c a g a t a a t a a t g g a t t c a t a a a t g
 a g g a t t t t a t t g t t t g g a t g c g t a c t g c a g c a t t a c c
 t a c t t t t c g c a a g t t g t a t c g t c t t a t a g a a a g g a a
 a a g t g a t t t a c a t c c a a c a t t a c c a g c t g g c c g a t a
 c t c t t t g a a t g t c a c a t a c a a t t a c c c t g t a c a t t a t
 t t t g a t g g a c g a a a a c g g a t g a t c t t g a g c a c t a t t
 t c a t g g a t g g g a g g a a a a a a t c c a t t t t t g g g g a t t
 g c t t a c a t c g c t g t t g g a t c c a t c t c c t t c c t t c t g g
 g a g t t g t a c t g c t a g t a a t t a a t c a t a a a t a t a g a a
 a c a g t a g t a a t a c a g c t g a c a t t a c c a t t t a a t t t t

【0088】

[SEQ ID No. 3]

[1.アイソフォーム1]

>gi|8922720|ref|NP_060717.1|膜間タンパク質30A[ヒト]

M A M N Y N A K D E V D G G P P C A P G G T A K T R R P D N T A F K Q Q R L P
 A W Q P I L T A G T V L P I F F I I G L I F I P I G I G I F V T S N N I R E I

E I D Y T G T E P S S P C N K C L S P D V T P C F C T I N F T L E K S F E G N
V F M Y Y G L S N F Y Q N H R R Y V K S R D D S Q L N G D S S A L L N P S K E C
E P Y R R N E D K P I A P C G A I A N S M F N D T L E L F L I G N D S Y P I P
I A L K K K G I A W W T D K N V K F R N P P G G D N L E E R F K G T T K P V N
W L K P V Y M L D S D P D N N G F I N E D F I V W M R T A A L P T F R K L Y R L
I E R K S D L H P T L P A G R Y S L N V T Y N Y P V H Y F D G R K R M I L S T
I S W M G G K N P F L G I A Y I A V G S I S F L L G W L L V I N H K Y R N S S
N T A D I T I

【0089】

[SEQ ID No. 4]

10

[2. アイソフォーム2]

> sp_vs | Q9NV96 - 2 | Q9NV96 Q9NV96のアイソフォーム2
M A M N Y N A K D E V D G G P P C A P G G T A K T R R P D N T A F K Q Q R L P
A W Q P I L T A G T V L P I F F I I G L I F I P I G I G I F V T S N N I R E I
E G N V F M Y Y G L S N F Y Q N H R R Y V K S R D D S Q L N G D S S A L L N P
S K E C E P Y R R N E D K P I A P C G A I A N S M F N D T L E L F L I G N D S Y
P I P I A L K K K G I A W W T D K N V K F R N P P G G D N L E E R F K G T T K
P V N W L K P V Y M L D S D P D N N G F I N E D F I V W M R T A A L P T F R K
L Y R L I E R K S D L H P T L P A G R Y S L N V T Y N Y P V H Y F D G R K R M I
L S T I S W M G G K N P F L G I A Y I A V G S I S F L L G W L L V I N H K Y R
N S S N T A D I T I

20

アイソフォーム2は消失アミノ酸79~114である。

【0090】

[SEQ ID No. 5]

[3. アイソフォーム3]

> sp_vs | Q9NV96 - 3 | Q9NV96 Q9NV96のアイソフォーム3
M Y Y G L S N F Y Q N H R R Y V K S R D D S Q L N G D S S A L L N P S K E C E
P Y R R N E D K P I A P C G A I A N S M F N D T L E L F L I G N D S Y P I P I
A L K K K G I A W W T D K N V K F R N P P G G D N L E E R F K G T T K P V N W
L K P V Y M L D S D P D N N G F I N E D F I V W M R T A A L P T F R K L Y R L I
E R K S D L H P T L P A G R Y S L N V T Y N Y P V H Y F D G R K R M I L S T I
S W M G G K N P F L G I A Y I A V G S I S F L L G W L L V I N H K Y R N S S N
T A D I T I

30

アイソフォーム2は消失アミノ酸1~119である。

TMEM30Aの細胞外領域はアミノ酸67~323を含む。

【0091】

[SEQ ID No. 6]

G I F V T S N N I R E I E I D Y T G T E P S S P C N K C L S P D V T P C F C T
I N F T L E K S F E G N V F M Y Y G L S N F Y Q N H R R Y V K S R D D S Q L N
G D S S A L L N P S K E C E P Y R R N E D K P I A P C G A I A N S M F N D T L
E L F L I G N D S Y P I P I A L K K K G I A W W T D K N V K F R N P P G G D N L
E E R F K G T T K P V N W L K P V Y M L D S D P D N N G F I N E D F I V W M R
T A A L P T F R K L Y R L I E R K S D L H P T L P A G R Y S L N V T Y N Y P V
H Y F D G R K R M I L S T I S W M G G K N P

40

【0092】

[N-グリコシル化サイトを含むTMEM30Aのアミノ酸配列]

[SEQ ID No. 7]

R R N E D K P I A P C G A I A N S M F N D T L E L F L I G N D S Y P I P A L
K

(TMEM30A残基160~200に見られる)

50

【0093】

[SEQ ID No. 8]

RRNEDKPIAP CGA IANSMFNDTLELFLIGN DSYPIPI
 ALK KKGIAWWDK NVKFRNPPGG DNLEERFKGT TKP
 VNWLKPVYMLDSDPDNN GFINEDFIVW MRTAALPTFR
 KLYRLIERKS DLHPTLPAGR YSLNVTYNYP

(TMEM30A 残基 160 ~ 300 に見られる)

N - グリコシル化感受性残基 : 180、190、294

TMEM30B でのいくつかの小変異でも見られる TMEM30A の保護 CDC50 領域の配列。

10

【0094】

[SEQ ID No. 9]

NFYQNHRRYVKSRDDSQL

(TMEM30A 残基 126 ~ 144 および TMEM30B 残基 115 ~ 133 に見られる)

【0095】

[SEQ ID No. 10]

APCGAIANSMF

(TMEM30A 残基 169 ~ 179 に見られる)

【0096】

[SEQ ID No. 11]

APCGAIANSLF

(TMEM30B 残基 160 ~ 170 に見られる)

20

【0097】

[SEQ ID No. 12]

DFIVWMRTAALPT

(TMEM30A 残基 256 ~ 269 に見られる)

【0098】

[SEQ ID No. 13]

DFVWMRTAALPT

(TMEM30B 残基 249 ~ 262 に見られる)

30

【0099】

[SEQ ID No. 14]

MGGKNPFLGIA YIAVG

(TMEM30A 残基 256 ~ 269 に見られる)

【0100】

[SEQ ID No. 15]

MGGKNPFLGIA YLVVG

(TMEM30B 残基 249 ~ 262 に見られる)

40

【0101】

[FC5 抗原の組織分布]

推定上の FC5 抗原の組織分布を解析するために、組織を表示するコーテック組織マイクロアレイによって様々な器官、様々な脳領域および様々な細胞系から抽出する。組織マイクロアレイを TMEM30A プライマーによってプローブし、TMEM30A 結合をサウザンブロットによって検出した。図 11 に様々な脳領域および肺癌腫における FC5 の高反応性 (抗原の豊富さ) が示される。

【0102】

[脳での TMEM30A 遺伝子の発現]

異なる細胞系での TMEM30A 遺伝子発現は RT - PCR および正 5' GAAGAC
 TCGGAGACCGGATAACAC' 3 (SEQ ID No. 16) と逆 5' CA

50

G T A C A A C T C C A G A A G G A A G G A G ' 3 (S E Q I D N o . 1 7) を用いて試験された。図 1 2 にヒト脳内皮細胞 (H B E C) での T M E M 3 0 A の高発現およびヒト胎児星状細胞での低発現が示される。ヒト臍帯血管内皮細胞 (H U V E C) およびヒト肺微小血管内皮細胞 (H M L C E) もまた T M E M 3 0 A 遺伝子発現を示した。

【 0 1 0 3 】

[例 5 . プロテオミクスによる抗原同定]

プロテオミクスによる抗原同定は、 a) 脳内皮細胞 (抗原を含む) の原形質膜の抽出 ; b) 該抽出物の、ニッケルマイクロスピカラムに結合した F C 5 または負の対照の抗原、 N C 1 1 の通過 ; c) 溶出液のカラムからの回収、 0 . 2 U ノイラミニダーゼ酵素 (シグマ社のコレラ菌より) との処理または不処理、および質量分光測定によるこれらの解析、によってなされる。この取り組み方について以下で述べる。

10

【 0 1 0 4 】

[原形質膜タンパク質の抽出]

固定されたラット脳内皮細胞 (S V - A R B E C) を 160 cm^2 ペトリ皿で約 1 週間培養した。細胞が完全培地変更によって 4 日後に供給された。細胞が融合状態に達した際に、原形質膜タンパク質を抽出した。8 枚の 160 cm^2 ペトリ皿を用いた。細胞を氷上に置き、 30 ml の P B S で 1 回および 10 ml の緩衝剤 A (0.25 M スクロース、 1 mM E D T A , 20 mM トリシン、 $\text{pH}7.8$) で 2 回洗浄した。 5 ml の緩衝剤 A + (緩衝剤 A に 1 : 1000 のシグマ社の阻害剤カクテルを加える) を加え、細胞を掻取った。それから細胞を 2 つの 50 ml ファルコン (登録商標) チューブに収集し (4 皿 / チューブ)、 4°C 、 $1400\times\text{g}$ で 5 分間回転させた。細胞ペレットを 1 ml の緩衝剤 A + に再懸濁した。再懸濁したペレット双方を一緒にし、ガラスチューブとテフロン (登録商標) 乳棒 (20 ストローク) を用いて均質化した。該ホモジェネートを 2 つの 2 ml 遠心チューブに移し、 4°C 、 $1000\times\text{g}$ で 10 分間回転させた。上澄みを収集した。ペレットを 2 ml の緩衝剤 A + に再懸濁し、それから均質化した。原形質膜を 20 ml の 30 % パーコールに加え、 4°C 、 $83000\times\text{g}$ で 30 分間回転させた。原形質膜試料を収集し 5 ml の P B S + に再懸濁し、 4°C 、 $118000\times\text{g}$ で 1 時間回転させた。タンパク質濃度を B C A キット (ピアス社) を用いて測定した。試料を等分し - 80°C で凍結した。

20

【 0 1 0 5 】

[抗原同定のための抗体装填カラム]

アマシャム マイクロスピカラム H i s 精製モジュールのカラムを抗体の結合に用いた。簡単には、カラムを $200\text{ }\mu\text{g}$ の F C 5、N C 1 1 または単に P B S と共に倒置して室温で 1 時間インキュベートした。カラムを $735\times\text{g}$ で 1 分間回転し、それから $500\text{ }\mu\text{l}$ の P N I ₂₀ で 1 回、 $500\text{ }\mu\text{l}$ の P B S で 2 回洗浄した。 $300\text{ }\mu\text{g}$ の原形質膜タンパク質を各カラムで倒置して 4°C で 3 . 5 時間インキュベートし、それから倒置して室温で 30 分間インキュベートした。それからカラムを $735\times\text{g}$ で 1 分間回転し、その後 $500\text{ }\mu\text{l}$ の P N I ₂₀ で 4 回洗浄し、各洗浄の間に $735\times\text{g}$ で 1 分間回転した。カラムを $200\text{ }\mu\text{l}$ の P N I ₄₀₀ と共に倒置して室温で 15 分間インキュベートし、 $735\times\text{g}$ で 1 分間回転することによって、タンパク質を溶出した。各タンパク質試料から溶出したタンパク質を 0 . 2 U ノイラミニダーゼで 1 時間処理し、あるいは処理しなかった。

30

40

【 0 1 0 6 】

[トリプシン消化]

下ろした試料それぞれ (F C 5、N C 1 1、P B S) を、10 倍の冷アセトンを加え - 20°C で 12 時間以上インキュベートすることで沈殿させた。 $5000\times\text{g}$ 、5 分間の遠心分離によりタンパク質をペレットとし、 $50\text{ }\mu\text{l}$ 変性緩衝剤 (50 mM T r i s - H C l、 $\text{pH}8.5$ 、 0.1% S D S、 4 mM D D T) に溶解させた。タンパク質を 15 分間煮沸し変性させ、2 分間冷却した。試料それぞれに $5\text{ }\mu\text{g}$ のトリプシン (プロメガ社、カタログ番号 V 5 2 8 0) を加え、試料を 37°C で 12 時間以上インキュベートした。

50

【0107】

[カチオン変換(CE)カラムでの精製]

試料それぞれをCE移動相緩衝剤(10mM KH_2PO_4 、pH3.0、25%アセトニトリル)で2mlに希釈し、pHが3.3以下であることを確認した。試料をカチオン変換カラム(POROS(登録商標)50HS、50 μm 粒子サイズ、4.0mm x 15mm, アプライドバイオシステム社、カタログ番号4326695)で精製した。

【0108】

[質量分光測定およびデータベース探索]

複合四重極飛行時間型質量分析測定(Q-TOF(登録商標)ウルティマ、ウォーターズ社、アメリカ合衆国マサチューセッツ州ミルフォード)およびエレクトロスプレーイオン化(ESI)およびオンライン逆相ナノフロー液体クロマトグラフィーカラム(ナノLC、0.3mm x 15cm ペプマップ(PepMap、登録商標)C18毛管カラム、ダイオネクス社/LCパッキング社, アメリカ合衆国カリフォルニア州サンフランシスコ)を全ての解析に用いた。用いたナノLCカラムの勾配はCapLC HPLC(高速液体クロマトグラフィー)ポンプ(ウォーターズ社)によって提供される50min、0.35 $\mu\text{l}/\text{min}$ での5~95%アセトニトリル、0.2%蟻酸である。試料それぞれの解析を2つの手順で行った。第一の手順において、試料の5%をナノLC MSにより測定(MS専用)モードで行い、試料それぞれに存在するタンパク質全ての強度を定量化した。関連するペプチドは「定量化データ解析」に述べるように決定され、「目標リスト」に含まれた。第二の手順において、試料それぞれを質量分析装置に再注入し(5%)、目標リストに含まれるペプチドのみをナノLC MS/MSモードで配列決定した。MS/MSスペクトルは2+、3+および4+イオンのみで得られた。それからこれらをPEAKSサーチエンジン(バイオインフォメティクスソリューションズ社、カナダ オンタリオ州)にかけ、NCBI非冗長トリプシン消化(2つの開裂を許容)ヒトデータベースに対して探索した。

10

20

【0109】

[MatchRxソフトウェアを用いた量的データ解析]

試料それぞれのナノLC MS生データから、個々のペプチドの存在度に対応するピーク強度を、初期に述べられたように(ハッカーニ他、FASEBジャーナル、2005年11月;19:1809~21)抽出した。MatchRxソフトウェアを用いて全ての試料の間でペプチド強度を量的に比較した。FC5引落しに存在しNC11およびPBS引落しに存在しないペプチドは関連した。FC5から抽出されたプロテオミクスによって同定されたがNC11抗体カラムからはされなかったペプチドは以下である:

30

SSPCNK(SEQ ID No. 18)

LIER(SEQ ID No. 19)

HSFDGRKR(SEQ ID No. 20)

NYPVHSFDGR(SEQ ID NO. 21)

これら全てのペプチドはTMEM30Aタンパク質に属する。

【0110】

[例6.TMEM30Aの発現およびFC5による認識]

次にTMEM30Aタンパク質をクローニングし、発現させた。TMEM30A発現細胞の細胞溶解物内のTMEM30AのFC5による認識を用い、TMEM30AのFC5による特異的認識を確認した。

40

【0111】

[ヒトTMEM30A遺伝子のpTT5SH8Q2ベクターへのクローニングによる哺乳類細胞内のその目標タンパク質の精製]

C末端His6タグに寄宿するpTT5SH8Q2ベクターを、TMEM30A遺伝子のクローニングに用いた。クローニングのためのPCRに用いたプライマーは以下である:

【0112】

50

[T M E M 3 0 A 正]

【化1】

5' T CTC GAA TTC ATG GCG ATG AAC TAT AAC GCG 3' (SEQ ID No. 22)
EcoRI

【0113】

[T M E M 3 0 A 逆]

【化2】

5' T CTC ACC GGT AAT GGT* AAT GTC AGC TGT ATT 3' (SEQ ID No. 23)
AgeI

10

【0114】

アンピシリン (100 μg/ml) を追加したサークルグロウ (Circle Grow) 液体培地中で生育した大腸菌 DH5 株を用いてプラスミドを増幅し、マキシ/ギガ (Maxi/Giga) プラスミド精製キット (キアゲン社) を用いて精製した。

【0115】

以下のプライマーを用いて配列を確認した：

T M E M 3 0 A - S P 1

5' TCT CGA TCT CGC GGA TGC 3' (SEQ ID No. 24)

20

T M E M 3 0 A - S P 2

5' CAT CCA ACA TTA CCA GCT 3' (SEQ ID No. 25)

T M E M 3 0 A - S P 3

5' CGG ATG ATC TTG AGC ACT 3' (SEQ ID No. 26)

50 mM トリス (Tris) 内での 260 nm の紫外線吸収により、DNA 濃度を測定した。

30

【0116】

[T M E M 3 0 A タンパク質の生産]

0.1% プルロニック (登録商標) F-68、1% 子ウシ血清 (BCS)、50 μg/ml ジェネティシン (登録商標) G418、および 10 mM HEPES を追加した低カルシウム SFM (LC-SFM、インビトロジェン社、ニューヨーク州グランドアイランド) 内において、エプスタイン-バーウイルス核抗原を安定して発現するヒト胚腎臓 293 細胞系 (293E) を、浮遊培養として生育した。無血清細胞系 HEK293 SFE (293 SFE) もまた T M E M 3 0 A 生産に用いた。これらの細胞を先に述べられたように (ファム他、2003年) 0.5% GPN3 を追加した LC-SFM 内において生育した。全ての細胞経路を 20 ml の培地を含む 125 ml エルレンマイヤーフラスコ内で慣例的に行った。LC-SFMLB、10 μg/ml のジェネティシンおよび 10 mM HEPES を含む培養フラスコ内で浮遊する 293 SFE 細胞は対数期に維持された。培養フラスコを、37 °C、加湿された 5% CO₂ 大気中で 110 rpm で振動させた。

40

【0117】

[T M E M 3 0 A の細胞溶解物内での発現]

図 13 に示すように、1% セシト (Thesit、登録商標) およびデオキシコールエステルを用いて T M E M 3 0 A を細胞から抽出した。抗ヒスチジン抗体を検出に用いた。T M E M 3 0 A の予想 Mwt は 40 kDa で、約 50 kDa の高タンパク質分子重量サイズはグリコシル化されるはずである。

【0118】

50

[T M E M 3 0 A の F C 5 との相互作用の免疫沈降による調査]

T M E M 3 0 A と F C 5 の相互作用の研究のため、T M E M 3 0 A を発現するように転換された H E K 2 9 3 から 1 0 0 μ g の上澄み細胞溶解物を最初に 4 でゆるやかな揺動と共に 5 0 μ l タンパク質 A セファロース (5 0 % スラリー) を 2 時間インキュベートし、5 0 0 g で 4 分間回転することで透明にした。改良結合力を有した F C 5 の多重結合形態 (改変五量体 F C 5) (2 5 μ g) を透明にした上澄みに加え、4 で一晚インキュベートした。タンパク質 A セファロース (5 0 μ l 、 5 0 % スラリー) を免疫結合溶解物に加え、4 で 2 時間インキュベートした。それから免疫複合体を氷冷 P B S で 5 回洗浄した。その後スラリーをレムリ緩衝剤中で 5 分間煮沸することで結合タンパク質を分離し、1 4 0 0 0 g で 1 分間遠心分離して免疫沈降したタンパク質を収集した。沈降したタンパク質を 1 2 % S D S アクリルアミドゲル上で分離し、それから銀染色することでバンドを視覚化した。

10

図 1 4 に示すように、五量体 F C 5 は分子量約 5 0 のバンドでのみ免疫沈降し、図 1 3 のタンパク質サイズが同定された。F C 5 五量体と共にインキュベートされなかった細胞は T M E M 3 0 A を免疫沈降しなかった。

【 0 1 1 9 】

[7 . F C 5 による T M E M 3 0 A 媒介輸送の機能的競合]

ラット脳内皮細胞をカバーリップで 3 日間培養し、それから F C 5 、五量体 F C 5 または負対照抗体 (N C 1 1) の存在下または非存在下で、アバンティ リピッド社から購入した 1 - パルミトイル - 2 - [6 - [(7 - ニトロ - 2 - 1 , 3 - ベンゾオキサジアゾール - 4 基) アミノ] ヘキサノイル] - S A 7 - グリセロ - 3 - ホスホコリン (1 6 : 0 - 0 6 : 0 N B D P C) (D S M O に溶解) によって 3 7 で 3 0 分間処理した。それから細胞を広範囲に洗浄し 4 % ホルムアルデヒドで固定し、その後 D A P I を加えたダコ蛍光封入剤 (1 : 2 0 0 0 、 2 m g / m l ストックから) で処理した。全ての画像はアクシオバート (A x i o v e r t) 2 0 0 及び以下の設定を用いて得られた : 2 0 X 対物レンズ、DNA - D A P I (青) 8 5 m s e c 、 N B D - F I T C (緑) 2 5 0 m s e c である。

20

図 1 5 に示す結果から、F C 5 およびその五量体 P 5 が、N B D ホスファチジルコリン (N B D - P C) の内在化の減少より測定される T M E M 3 0 A 生理機能と競合することが実証される。これに対し、負対照抗体 N C 1 1 は N B D - P C の内在化を阻害しなかった。

30

【 0 1 2 0 】

[材料および方法]

[材料]

細胞培養プラスチックはベクトン ディキンソン社 (オンタリオ州ミシソーガ) から得た。ダルベッコ変法イーグル培地をインビトロジェン社 (カリフォルニア州カールズバッド) 、 F B S をハイクローン社 (ユタ州ローガン) 、 ヒト血清をウイゼント社 (ケベック州モントリオール) 、 内皮細胞生育補給剤をコラボレーティブバイオメディカルプロダクツ社 (マサチューセッツ州ベッドフォード) から購入した。抗体は以下の供給元から得た : 抗 c - M y c ペルオキシダーゼ抗体をロッシュ社 (アメリカ合衆国インディアナ州インディアナポリス) 、 抗カベオリンおよび抗クラスリン抗体をサンタクルス バイオテクノロジー社 (カリフォルニア州サンタクルス) 、 F I T C 結合抗マウスおよびアレクサ 5 6 8 結合抗ウサギ二次抗体をモレキュラーブローブ社 (アメリカ合衆国オレゴン州ユージーン) 、 テキサスレッド結合トランスフェリンおよびカルセイン - A M をモレキュラーブローブ社 (アメリカ合衆国オレゴン州ユージーン) から購入した。モネンシンおよびビスインドリルマレイミド - 1 (B I M) はカルピオケム (C a l b i o c h e m 、 アメリカ合衆国カリフォルニア州サンディエゴ) から得た。オプティプレップはアキュレイト ケミカル アンド サイエнтиフィック社 (アメリカ合衆国ニューヨーク州ウェストベリー) から購入した。精製ヒトトランスフェリン受容体およびモノクローナル抗 C D 7 1 (抗トランスフェリン受容体) 抗体はリサーチ ディアゴノスティクス社 (アメリカ合衆国ニ

40

50

ユージージョージ州フランダーズ)から購入した。[¹⁴C]-スクロースはパーキン エルマー社(アメリカ合衆国マサチューセッツ州ボストン)から購入した。テトラメチルベンジジン(TMB)/過酸化水素基質システムはR&Dシステムズ(ミネソタ州ミネアポリス)から得た。EZリンク硫酸-NHS-LC-LC-ビオチンおよびピシンコニン酸検定(BCA)はピアス バイオテクノロジー社(アメリカ合衆国イリノイ州ロックフォード)から購入した。他の全ての化学物質はシグマ社(アメリカ合衆国ミズーリ州セントルイス)から得た。

【0121】

[FC5sdAbのクローニング、発現および精製]

FC5はラマ重鎖抗体の可変領域(V_HH)であり、遺伝子銀行のmRNAおよびアミノ酸配列(それぞれNo. AF441486およびNo. AAL58846)をエンコードする。DNAエンコードFC5をプラスミドpSJF2のBbsI/BamHIサイトへクローニングし、FC5の発現ベクターを生成した。DNA構造は373A DNAシーケンサーストレッチ(PEアプライド バイオシステムズ社)での、プライマーfdTGII、5'-GTGAAAAAATTAATTAATTAATTCGCAATTCCT-3'(SEQ ID No. 27)および96GII、5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'(SEQ ID NO. 28)を用いたヌクレオチド配列決定によって確認された。FC5はHis₅およびc-mycタグとの融合で発現し、ハイトラップ キレーティング(HiTrap Chelating、登録商標)カラムを用いた固定金属親和クロマトグラフィーによる精製、および免疫化学による検出を可能とした。組換え抗体発現バクテリア大腸菌株TG1の単クローンをを用いて100μg/mlのアンピシリンを含む100mlのM9培地に接種し、培地を37℃、200rpmで一晩振動させた。5μg/mlのビタミンB₁、0.4% カザミノ酸および100μg/mlのアンピシリンを加えたM9培地(0.2% グルコース、0.6% Na₂HPO₄、0.3% KH₂PO₄、0.1% NH₄Cl、0.05% NaCl、1 mM MgCl₂、0.1 mM CaCl₂)1Lへ、生育した細胞(25ml)を移した。細胞培地を室温、200rpmで24時間振動させ、それから12% トリプトン、24% 酵母抽出物および4% グリセロールを含む10X誘導培地テリフィックブロス 100mlを加えた。イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG、1mM)を加えることでタンパク質発現を誘導した。誘導の後で、培地をさらに25℃で72時間振動させ、ペリプラズム分画を浸透圧ショック法(アナンド他、1991年)によって抽出した。ハイトラップ キレーティング(HiTrap Chelating、登録商標)カラム(アマシャム ファーマシア バイオテック社、ニュージャージー州ピスカタウェイ)を用いた固定金属親和クロマトグラフィーによってFC5断片を分離した。生産されたFC5を10mM HEPES緩衝剤、500mM NaCl、pH7.0中、10~500mM イミダゾール勾配において溶出し、ピーク分画を10mM HEPES緩衝剤、150mM NaCl、3.4mM EDTA、pH7.4に対し広範囲で透析した。FC5の分子量は13.2kDaで、FC5とc-mycおよびHis₅との融合タンパク質の分子量は15.2kDaである。

【0122】

[cysFC5のクローニングおよび精製]

FC5は、薬剤および担体との結合が可能ないように、追加の自由システインを加えるために作成された。sdAb FC5をエンコードするDNAをプラスミドpSJF2のBbsI/BamHIサイトへクローニングし、単量体FC5の発現ベクターを生成した。cysFC5遺伝子をFC5テンプレートから、His₅'精製'タグコドンの直後にシステインを追加した正プライマーを用いて標準的PCRによって生成した。続いてcysFC5遺伝子を、標準的なクローニング技法を用いてpSJF2へクローニングした。クローンされた構造物の完全性は373A DNAシーケンサーストレッチ(PEアプライド バイオシステムズ社、オンタリオ州スツリーツビル)でのヌクレオチドシーケンスによって確認された。cysFC5は細菌の大腸菌株TG1で発現し、固定金属親和クロマ

10

20

30

40

50

トグラフィー (IMAC) によって精製された。cysFC5 と相同であると SDS-PAGE で判定された分離された分画は蓄積され、10 mM HEPES 緩衝剤 (150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、pH 7.4) に対し広範囲で透析された。タンパク質濃度はピシンコニン酸検定 (BCA) によって決定された。保存された Cys22-Cys92 内部ジスルフィド結合を損傷することなしに改変されていないシステインの完全な減少を確認するために、cysFC5 を結合に優先して G-25 セファデックスカラムでの高速分離の後で 4 で一晚 PBS 中で 5 mM の EDTA を含む 50 mM の Tris (2-カルボキシエチル) 塩酸ホスフィンに暴露した。これらの条件は非損傷の細胞の上澄みおよび CEC 単層を経ての移行によって決定される cysFC5 の抗原結合活性を損傷しなかった。

10

【0123】

[HRP-IgG の cysFC5 への結合]

ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) タグマウス IgG と cysFC5 との架橋結合が、架橋結合試剤としてのスルフォスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルフォ-SMCC) によって達成された。スルフォ-SMCC は HRP-IgG 上のアミン (-NH₂) 機能グループと cysFC5 の s d A b 上のスルフォヒドリル (-SH) グループとの間に橋を構築する。まず、HRP-IgG を PBS 中の 10 モル以上のスルフォ-SMCC 溶液と共に室温で 30 分間インキュベートすることでマレイミド活性化した。マレイミド試薬を G-25 セファデックスカラム (ロッシュ社、インディアナ州インディアナポリス) によって除去した。マレイミド活性化 HRP-IgG は減少された cysFC5 と 5:1 モル濃度比で室温において 1 時間混合することで架橋結合された。

20

【0124】

[細胞培養物]

一次性のヒト大脳微少血管細胞 (HCEC) 培養物は、真性てんかんの影響を受けた脳の病巣周囲の領域から外科的に除去されたヒト側頭皮質から分離された。細胞を既に述べられたようにして分離、培養し特性を決定した (スタニミロビッチ (Stanimirovic) 他、1996 年; ムルガナンダム (Muruganadam) 他、1997 年)。これらの HCEC 培養物の形態学、表現型、生化学および機能的特性は既に述べられている (スタニミロビッチ (Stanimirovic) 他、1996 年; ムルガナンダム他、1997 年)。HCEC の経路 2~6 をこの研究の実験に用いている。

30

【0125】

FC5 および様々な薬理学試剤の存在下での生存力を、生体染色カルセイン AM 放出検定によって先に述べられたように査定した (ワン他、1998 年)。

FC5 の HCEC への取り込みは、5 μg/ml の FC5 を加えた後でエンドサイトーシスの様々な薬理的モジュレーターの不存または存在下において 15~90 分間試験された。FC5 の細胞分布を視覚化するために、FITC ラベル抗マウス IgG とのインキュベート (1:250、1 時間) の後で細胞を固定、透過性化し、抗 c-myc 抗体でプローブした (1:100、1 時間)。

40

【0126】

[生体外血液-脳隔壁モデルを経ての輸送]

HCEC (80000 細胞/膜) を 1 ml の増殖培地中において 0.5%ゼラチン被覆ファルコン組織培養インサート (孔径 1 μm; 表面積 0.83 cm²) に接種した。インサートアセンブリの底室は、胎児ヒト星状細胞条件基剤を体積比 1:1 で供給した 2 ml の増殖培地を含んでいた (ムルガナンダム他、1997 年)。モデルは分子量 1 kDa 以上の親水性化合物に対し実質的に不浸透性であった (ムルガナンダム他、1997 年)。

【0127】

輸送研究は既に述べられたようにして接種後に 7 日間行われた (ムルガナンダム他、1997 年; ムルガナンダム他、2002 年)。フィルターインサートを輸送緩衝剤 [5 mM グルコース、5 mM MgCl₂、10 mM HEPES、0.05% ウシ血清ア

50

ルブミン (B S A) を含む p H 7 . 4 のリン酸緩衝塩類溶液 (P B S)] でリンスし、37 で30分間平衡させた。実験は、細胞、対照 H C E C または薬理的モジュレーターに30分間暴露された H C E C を除いた 0 . 5 % ゼラチン被覆インサートを含むインサートの頂端および側底に 1 0 g / m l の F C 5 を加えることで開始された。輸送研究は 37 で、30 ~ 4 0 r p m で攪拌する回転台上のプレートにおいて行われた。部分標本 (1 0 0 μ l) を逆の室から様々な時間間隔において (5、15、30、60、90分) 収集し、新しい緩衝剤に移した。空のインサートまたは H C E C 単層を経て輸送された F C 5 の量は酵素結合免疫吸着検定 (E L I S A) によって決定された (下を参照)。H C E C 膜の完全性の対照および細胞間拡散の評価のために、[¹⁴C] - スクロースの F C 5 輸送実験で用いられたものと同じ単層を経ての頂端から側底および側底から頂端のクリアランス率を事実上先に述べられたようにして決定し算出した (ムルガナンダム他、2002年 ; ガーバーグ他、2005年)。50 μ l の部分標本における試料関連放射能をマイクロベータ (登録商標) トリラックス液体シンチレーション計数器 (ウォレス社、フィンランド) を用いて測定した。

【 0 1 2 8 】

クリアランスは $C_l (ml) = C_A / C_I \times V_A$ として算出され、ここで C_I は供与体室の初期トレーサーまたは s d A b 濃度、 C_A は受容体室のトレーサーまたは s d A b 濃度、 V_A は受容体室の体積である。F C 5 のクリアランスは 15 分から 60 分の間において線形であり、60 分から 90 分の間において飽和に達した (ムルガナンダム他、2002年)。F C 5 移行での薬理的モジュレーターの効果は続いて 30 分において査定された。H C E C 単層は、同一のライブラリまたは同様の分子量の蛍光デキストランから分離された非選択 s d A b に対し実質的に不浸透性である (ムルガナンダム他、2002年)。

【 0 1 2 9 】

[レーザー走査共焦鏡検]

クラスリンまたはカベオリン - 1 による F C 5 のコロカリゼーションは二重免疫蛍光ラベルによって研究された。H C E C をまず 5 μ g / m l F C 5 と共に 30 分間インキュベートし、洗浄し、4 % ホルムアルデヒドによって固定し、0 . 1 % トライトン X - 1 0 0 により 10 分間で透過性化した。それから細胞を 4 % ヤギ血清により 1 時間で閉塞した。閉塞の後で、細胞をまず抗 c - M y c 単層抗体 (1 : 1 0 0) と共に 1 時間インキュベートし、広範囲に洗浄し、それから F I T C 抗マウス I g G 二次抗体 (1 : 2 5 0) と共に 1 時間インキュベートした。4 % ヤギ血清での 2 回目の一晩の閉塞の後で、H C E C を抗クラスリン (1 : 1 0 0) または抗カベオリン - 1 (1 : 3 0 0) ポリクローナル抗体と共に 1 時間インキュベートし、それからアレクサ 5 6 8 結合抗ウサギ I g G 二次抗体 (1 : 3 0 0) 共に 1 時間インキュベートした。テキサスレッド結合トランスフェリン (1 μ M) およびカテプシン - B モノクローナル抗体 (1 : 2 0 0) をそれぞれ初期および後期エンドソームのマーカーとして用いた。染色細胞のカバーガラスを H B S S で 5 回洗浄し、蛍光封入剤 (ダコ社、オンタリオ州ミシソーガ) に封入した。

【 0 1 3 0 】

二重の免疫化学で処理された細胞の画像化を、アルゴン/クリプトンイオンレーザーおよびプランネオフルオラ 6 3 X 1 . 3 N A 油浸対物レンズを装備したツァイス L S M 4 1 0 (カールツァイス社、ニューヨーク州ソーンウッド) 反転レーザー走査顕微鏡 (L S M) を用いて行った。2 つのフッ素プローブの共焦画像が 4 8 8 および 5 6 8 n m 励起レーザー線を用いた連続捕捉と同時に得られ、それぞれ F I T C (B P 5 0 5 ~ 5 5 0 エミッション) およびテキサスレッド / アレクサ 5 6 8 蛍光 (L P 5 9 0 エミッション) を検出した。全ての画像をそれぞれのチャンネルについて同一のレーザー力およびピンホールサイズを用いて収集し、同じ方式で処理した。

一次抗体の省略では染色がなされなかった。一次および非対応二次抗体の間では交差反応は観測されなかった。

【 0 1 3 1 】

[細胞分画]

タンパク質および脂質分画を分離するために、HCECをPBSで洗浄し、掻取り凍結乾燥した。細胞残物をpH7.2、50mMのトリスに溶解した。ヴェッセルおよびフリュゲのプロトコルの改良版（ヴェッセル、1984年）を用いてクロロホルム-メタノール混合物によりタンパク質を脂質から分離した。窒素ガス流での脂質分画の乾燥の前に、ガラクトシルセラミドを正の対照として加えた。タンパク質および脂質を6Mの尿素およびエタノールにそれぞれ溶解した。

【0132】

界面活性剤を用いない方法を用いて既に述べられたようにして低濃度膜分画を分離した（アブルロブ（Abulrob）他、2004年）。全ての行程は4において行い、全ての緩衝剤はプロテアーゼ阻害剤のカクテル（シグマ社）を追加した。5 μ g/ml FC5存在下で30分間インキュベートした融合HCECの5つの75cm²組織培養フラスコから、原形質膜分画を調製した。個々のフラスコを10ml 緩衝剤A（0.25Mスクロース、1mM EDTA、20mMトリシン、pH7.8）で2回洗浄し、それから5ml 緩衝剤A中で細胞を掻取って収集し、1400 \times g、5分間の遠心分離（ベックマンJ-68）でペレット化し、1mlの緩衝剤Aに再懸濁し、テフロンガラスホモジナイザーによる20回の上下動により均質化した。均質化した細胞を1000 \times g、10分間で2回遠心分離し（エッペンドルフ遠心機5415C）、2つの核後上澄み分画を収集し、貯蔵し、緩衝剤A中で23mlの30%パーコール溶液に上乗せし、ベックマン（登録商標）60Tiにおいて83000 \times g、30分間で超遠心分離した。原形質膜分画を示すペレットを収集し每秒50J/Wで6回超音波処理した（フィッシャー ソニック ディスメンブレーター300）。超音波処理した原形質膜分画を緩衝剤B（0.25Mスクロース、6mM EDTA、120mMトリシン、pH7.8）中で50% オプティプレップと混合した（オプティプレップの最終濃度23%）。溶液全体をベックマンSW41Tiチューブの底に移し、線形20~10%オプティプレップ勾配を上乗せし、SW41Ti（ベックマン インストゥルメンツ社）を用いて52000 \times g、90分間で遠心分離した。勾配の上の5mlを採取し緩衝剤B中で50% オプティプレップと混合し、SW41Tiチューブの底に移し、緩衝剤A中で2mlの5% オプティプレップを上乗せし、52000 \times g、90分間で遠心分離した。5%界面の直上の不透明帯が"カベオラ分画"を示した。勾配を1.25ml分画に分画した。

【0133】

[SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）およびウエスタン免疫ブロット解析]

FC5、カベオリン-1およびクラスリン重鎖タンパク質の免疫ブロット検出のために、最終オプティプレップ勾配のそれぞれの分画を減少条件においてSDS-ポリアクリルアミドゲル上に溶解した。分離されたタンパク質を電気泳動によりPVDF膜（イモビロンP（登録商標）；ミリポア社、オンタリオ州ネピアン）へと移した。5%スキムミルクでの1時間の閉塞の後で、該膜を5%スキムミルクを含むTBS-トウェイン中でHRP結合抗c-Mycモノクローナル抗体（希釈1:1000）、ポリクローナル抗カベオリン抗体（希釈1:500）または抗クラスリン抗体（希釈1:500）でプローブした。ECLプラスウエスタンブロッティング検出システムを信号検出に用いた。

【0134】

[酵素結合免疫吸着検定（ELISA）]

生体外BBBモデルを経て移行されたFC5の量を測定するために、適当な区画から採取した50 μ lの部分標本をHisGrabニッケル被覆96穴プレート（ピアス社）において室温で一晩で固定した。該プレートを2% BSAで室温、2時間で閉塞した後、HRP結合抗c-Mycモノクローナル抗体を希釈1:5000で1時間加えた。洗浄後、結合したFC5をテトラメチルベンジジン（TMB）/過酸化水素基質システムにより検出した。マイクロタイター プレートリーダーにおいて450nmで信号を測定した。採取された部分標本のFC5濃度を、既知のFC5濃度を用いて構成された標準曲線から決定した。

【 0 1 3 5 】

HCECのタンパク質および脂質分画へのFC5結合を測定するために、分離された分画を37℃、一晚の乾燥によりフレキシブル96穴ELISAプレート上に被覆した。該ELISAプレートをPBS中で0.5% BSAで2時間閉塞した。それからプレートをFC5抗体またはガラクトシルセラミドに対するO1抗体(ドイツハイデルベルク大学のJ.トッター博士より贈与)と共にインキュベートした。FC5抗体をマウス抗myc抗体9E10で検出した。述べたようにこの検定をさらに実行した。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 3 6 】

【図1】光学画像化によって同定されたマウスへのi.v.インジェクション後の脳内のFC5抗体の蓄積。(A)FC5またはNC11は赤外線プローブに近いCy5.5へと結合し、それから6時間に渡って動物へと尾静脈によって注入された。頭の画像化によって、NC11またはフルオロフォア単独に対しFC5がより高く蓄積されていることが示された。(B)FC5、NC11またはCy5.5単独の注入後の、平均蛍光濃度の頭範囲の定量化。(C)FC5、NC11またはCy5.5単独の注入後の、全ての動物の背脳体の画像化。(D)FC5、NC11またはCy5.5単独の注入後の、平均蛍光濃度の器官範囲の定量化。(E)殺および灌流により脳内でのFC5蓄積がより高いことを実証した後のFC5、NC11またはCy5.5を注入した動物の生体外での脳の画像化。

10

【図2】血液脳隔壁浸透性sdAb FC5と、ホースラディッシュペルオキシダーゼによってタグされたマウスIgG(IgG-HRP)との結合、および構造の生体外での機能評価の説明。[材料および方法]で述べるようにして遺伝子工学によって追加のシステイン成分をFC5に加えた。A)示される反応においてcysFC5がマレイミド活性化IgG-HRPと結合した。B・C)培地内のヒト脳内皮細胞内での、IgG-HRP(B)あるいはFC5-IgG-HRP結合(C)の取り込み。一方が結合した5μg/mlの添加の後で細胞を30分間固定した。[材料および方法]のFITCラベル抗マウス二次抗体を用いて固定された細胞において取り込みが定量される。D)生体外血液脳隔壁モデルを経てのIgG-HRP()またはFC5-IgG-HRP結合()の移行。[材料および方法]で述べるようにして輸送実験が行われた。

20

【図3】A)生体外血液脳隔壁(BBB)モデルを経てのFC5の極性移行。[材料および方法]で述べるようにして輸送実験は10μg/ml FC5の頂端部(A)または側底部(B)区画への添加で開始され、反対側の区画でのFC5の量は30分後に定量された。同じHCEC単分子層を経ての¹⁴Cスクロースの配送を細胞間輸送の内部制御として用いた。B)生体外BBBモデルを経てのFC5移行における吸着媒介エンドサイトーシス(AME)および微小貪食作用の薬理的阻害剤の効果。[材料および方法]で述べるようにしてHCECは、AME阻害剤、硫化プロタミン(40μg/ml)およびポリリジン(300μM)、または微小貪食作用阻害剤、アミロライド(500μM)によって30分間前処理され、FC5輸送は30分間に渡って測定された。それぞれの棒は6つの複製膜からの±s.d.を示す。

30

【図4】HCECへのFC5取り込みおよび生体外BBBモデルを経ての移行のエネルギー依存。37℃(A)および4℃(B)でのFC5のHCECへの取り込みの共焦鏡検画像。[材料および方法]で述べるようにして細胞を5μg/ml FC5に30分間暴露し、FC5のc-myc標識の二重免疫化学で処理した。C)37℃および4℃でのHCECを経ての、あるいは無グルコース培地内でのHCECの5mMのNaN₃および5mMのデオキシグルコース(2DG)への30分間の暴露後の、10μg/ml FC5の細胞間移行。[材料および方法]で述べるようにしてFC5移行はHCEC添加の30分後に定量された。D)HCECを経てのFC5の細胞間移行におけるNa⁺, K⁺-ATPアーゼ阻害剤、ウアバインの効果。[材料および方法]で述べるようにして細胞は1μMのウアバインで30分間前処理された。それぞれの棒は6つの複製膜からの±s.d.を示す。アスタリスクは37℃または未処理細胞からの有意差を示す(P<0.05;ス

40

50

チューデント t - 検定)。

【図5】HCEC内のFC5のエンドサイトーシスおよびトランスサイトーシスにおける、クラスリン被覆穴およびカベオラの役割。FC5(緑蛍光)(A)およびクラスリン(赤蛍光)(B)のHCEC細胞内でのコロケーション。オーバーレイ画像が(C)に示される。FC5(緑蛍光)(D)およびカベオリン1(赤蛍光)(E)のコロケーション。オーバーレイ画像が(F)に示される。[材料および方法]で述べるようにして二重の免疫細胞化学のために細胞をFC5に30分間暴露し、洗浄し処理した。画像は3~5の別途の実験を示す。G)FC5に30分間暴露したHCECから得られた亜細胞分画内の、カベオリン-1、FC5およびクラスリン重鎖の免疫反応の分布を示すウエスタンブロット。[材料および方法]で述べるようにしてHCEC細胞を分画した。ウエスタンブロットは3つの別途の実験を示す。H)生体外BBBモデルを経てのFC5の移行における、カベオラ媒介エンドサイトーシスの薬理的阻害剤、メチル-シクロデキストリン(5mM)、ナイスタチン(5 μ g/ml)およびフィリピン(5 μ g/ml)、またはクラスリン被覆穴媒介エンドサイトーシスの阻害剤、クロルプロマジン(50 μ g/ml)または無カリウム緩衝剤の効果。[材料および方法]で述べるようにしてヒトCECは前記阻害剤とともに30分間前処理され、FC5輸送は30分間にわたって測定された。それぞれの棒は6つの複製膜からの \pm s.d.を示す。アスタリスクは有意差を示す(P<0.05;一要因分散分析、手段間のダネットの多重比較による)。

10

【図6】エンドソーム内でのFC5処理。FC5(緑蛍光)(A)およびテキサスレッド(登録商標)結合トランスフェリン(赤蛍光)(B)のHCEC細胞内でのコロケーション。オーバーレイ画像が(C)に示される。内在化FC5(緑蛍光)(D)およびカテプシン-B(赤蛍光)(E)のHCEC細胞内でのコロケーション。オーバーレイ画像が(F)に示される。[材料および方法]で述べるようにしてCECは免疫化学および共焦鏡検のために処理される。G)HCEC生体外BBBモデルを経てのトランスサイトーシスの前(上)と後(下)のFC5のウエスタンブロット。H)25 μ Mモネンシンによって30分間前処理されたHCECを経ての、10 μ g/mlFC5の細胞間移行。[材料および方法]で述べるようにして輸送実験が行われた。

20

【図7】A)HCECを経てのFC5トランスサイトーシスにおける細胞骨格ネットワークの役割。[材料および方法]で述べるようにして、アクチン微細繊維阻害剤、サイトカラシンD(0.5 μ M)またはラトランキュリンA(0.1 μ M)、あるいは微小管阻害剤、ノコダゾール(20 μ M)またはコルヒチン(20 μ M)とともにHCECを30分間前処理し、生体外BBBモデルを経てのFC5移行は30分間にわたって測定された。B)10 μ g/mlのFC5を加える30分前に、HCECに通信経路モジュレーター、ウォルトマニン(0.5 μ M)、BIM-1(5 μ M)、ゲニステイン(50 μ M)またはdbcAMP(500 μ M)を加え、生体外BBBモデルを経てのトランスサイトーシスは30分間にわたって測定された。それぞれの棒は6つの複製膜からの \pm s.d.を示す。アスタリスクは対照からの有意差を示す(P<0.05;一要因分散分析、手段間のダネットの多重比較による)。

30

【図8】HCECに取り込まれHCECを経てトランスサイトーシスされるFC5内のオリゴ糖抗原性エピトープの役割。A~D)不在(A)または100 μ g/mlWGA(B)、200 μ Mシアル酸(C)あるいは0.1Uノイラミニダーゼ存在下での、HCECに取り込まれたFC5の蛍光顕微鏡写真。取り込みは30分間にわたって測定された。E)30分間にわたって200 μ Mのシアル酸によって前処理された、あるいはノイラミニダーゼ濃度を示されたHCECを経ての、10 μ g/mlFC5のトランスサイトーシス。F)100 μ g/mlWGA、100 μ g/mlセイヨウニワトコ凝集素(SNA)または100 μ g/mlイヌエンジュ凝集素(MAA)によって前処理されたHCECを経ての、10 μ g/mlFC5のトランスサイトーシス。[材料および方法]で述べるようにして輸送実験が行われた。G)酵素結合免疫吸着検定法によって定量されたHCECの分離されたタンパク質(黒い棒)および脂質(灰色の棒)の分画とのFC5の結合。分画の前に、溶解した細胞を不在または1U/mlノイラミニダーゼ存在

40

50

下において37℃、1時間インキュベートした。[材料および方法]で述べるようにして、分離されたタンパク質および脂質での酵素結合免疫吸着検定法が行われた。それぞれの棒は6つの複製膜からの±s.d.を示す。アスタリスクは対照からの有意差を示す(P<0.05;一要因分散分析、手段間のダネットの多重比較による)。

【図9】生体外BBBを経てのFC5トランスサイトーシスに伴うトランスフェリン受容体の欠乏。A)アンチトランスフェリン受容体モノクローナル抗体、CD71、FC5、FC5五量体構成(P5)または炭水化物抗原、CEAを認識する同じライブラリからの無関連抗体の、酵素結合免疫吸着検定法プレートに固定されたヒトトランスフェリン受容体への結合。プレートは自動マイクロプレートリーダーによって450nmにおいて読み取られた。B)P5ではなく抗CD71によって免疫的に検出されたヒトトランスフェリン受容体のウエスタンブロット。C)10μg/ml FC5単独または100倍(1mg/ml)のホロトランスフェリン存在下でのHCEC単層を経てのトランスサイトーシス。[材料および方法]で述べるようにして輸送は30分間にわたって測定された。それぞれの棒は6つの複製膜からの±s.d.を示す。

【図10】FC5抗原同定に用いるゲノムおよびプロテオーム戦略の組み合わせ。

【図11】推定のFC5抗原の組織分布。

【図12】様々な細胞種でのTMEM30A遺伝子発現。

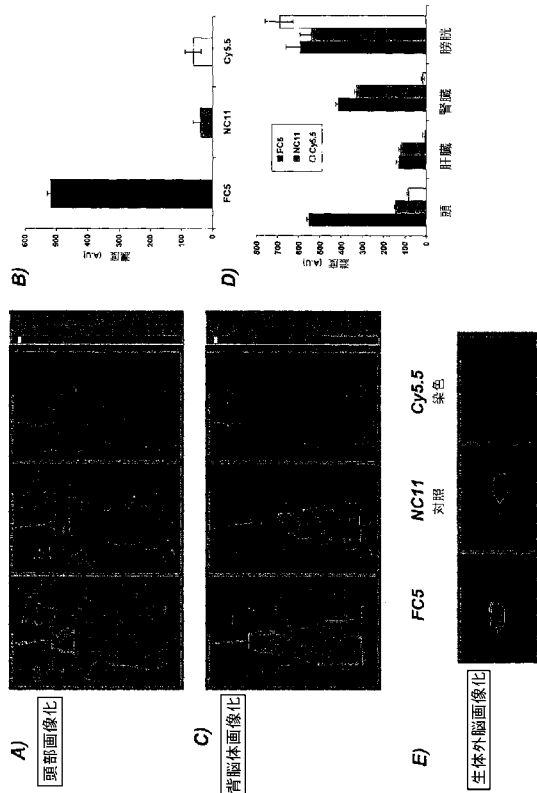
【図13】HEK293細胞でのTMEM30A遺伝子発現。

【図14】TMEM30A過剰発現細胞の細胞溶解物における、FC5によるTMEM30Aの認識。

【図15】FC5によるヒト大脳内皮細胞でのホスファチジルコリンのTMEM30A媒介膜間輸送の競合。

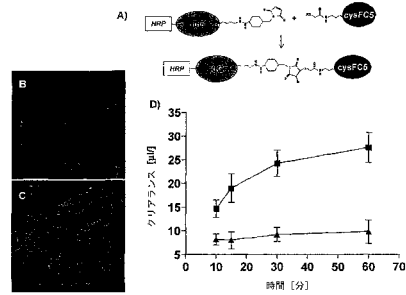
【図1】

FC5単一領域抗体の脳ターゲティング

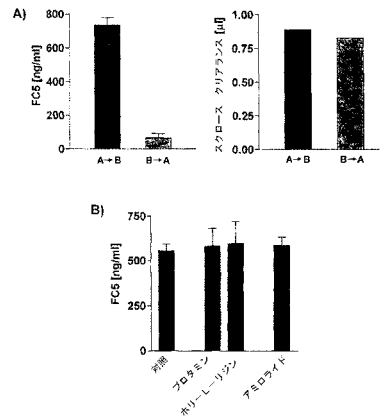


【図2】

FC5-HRP-IgG構造の脳内皮細胞を経ての移行



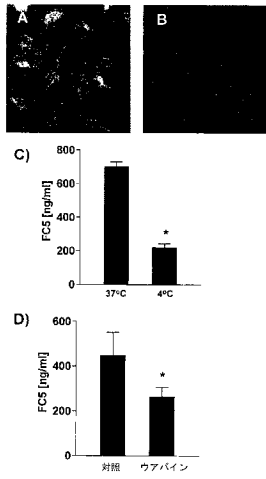
【図3】



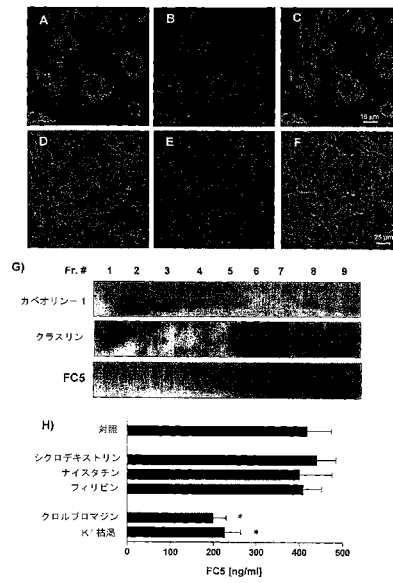
10

20

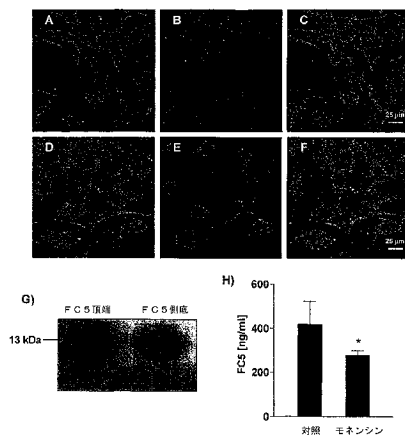
【 図 4 】



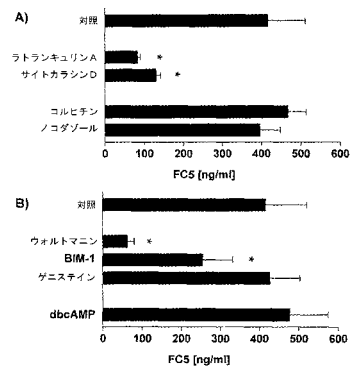
【 図 5 】



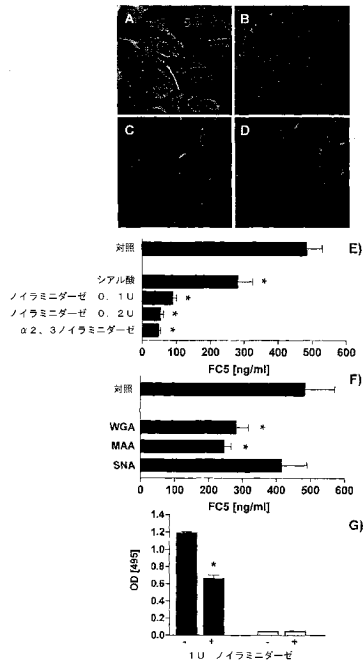
【 図 6 】



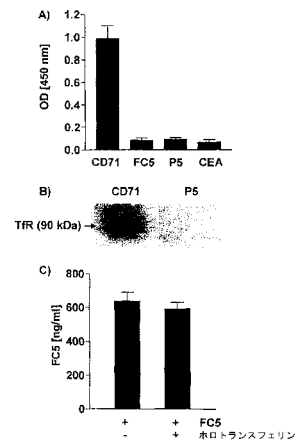
【 図 7 】



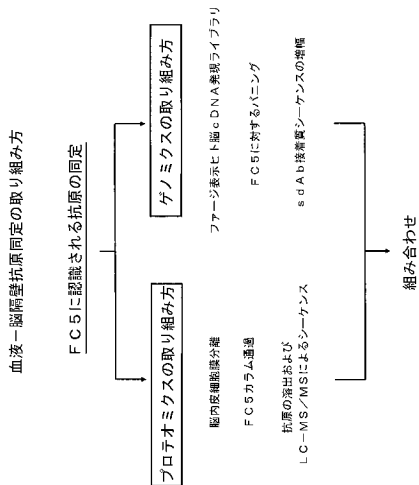
【 図 8 】



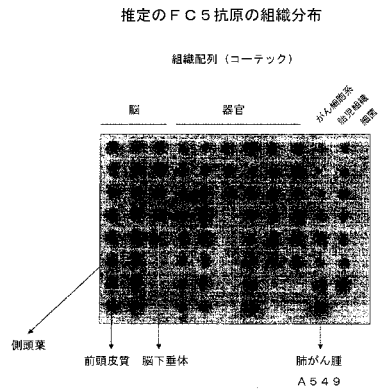
【 図 9 】



【 図 10 】

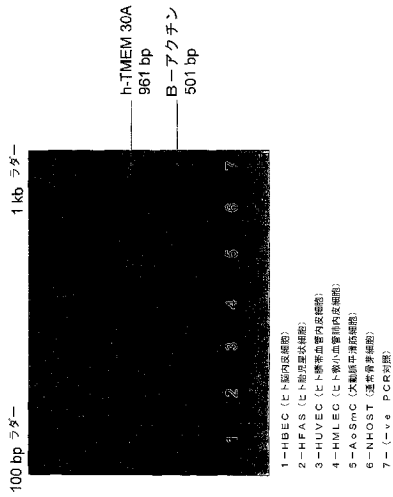


【 図 11 】



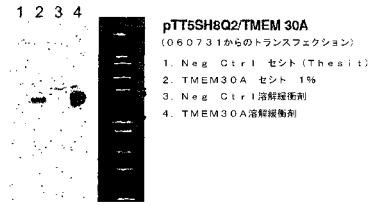
【 図 1 2 】

異なる細胞種でのTMEM30A遺伝子発現



【 図 1 3 】

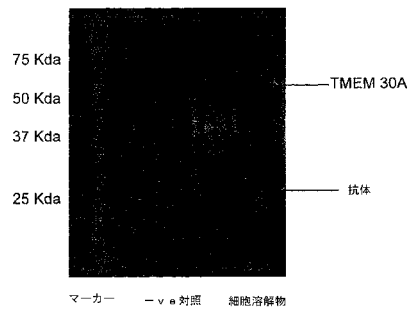
細胞溶解物でのTMEM30A発現



グリコシル化TMEM30Aの分子量は52Kda前後である

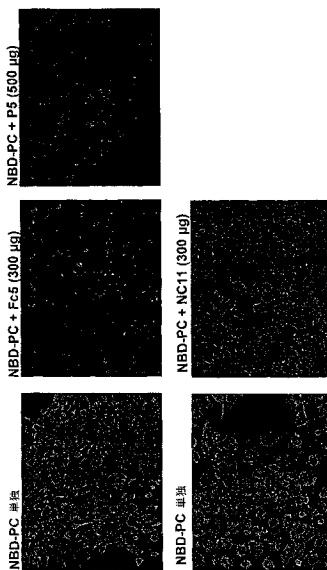
【 図 1 4 】

TMEM30A過剰発現細胞の細胞溶解物における、FC5によるTMEM30Aの認識



【 図 1 5 】

FC5によるTMEM30A媒介輸送の機能的阻害



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2006/001522
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12N 15/12</i> (2006.01), <i>C07K 16/28</i> (2006.01), <i>C07K 14/705</i> (2006.01), <i>G01N 33/53</i> (2006.01), <i>G01N 33/566</i> (2006.01) 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) IPC: <i>C12N 15/12</i> (2006.01), <i>C07K 16/28</i> (2006.01), <i>C07K 14/705</i> (2006.01), <i>G01N 33/53</i> (2006.01), <i>G01N 33/566</i> (2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Canadian Patent Database, PubMed, Delphion, GenomeQuest and Scopus. Keywords: Blood Brain Barrier, BBB, Transmembrane protein 30A, TMEM30A, C6orf67, CDC50A, cell cycle control protein 50A, Target drug delivery system, receptor-mediated endocytosis/transcytosis, RME, transmigration, methods to identify agents, phage panning, binding assays, and immunoprecipitation and IP.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US20050181375 A1 (AZIZ N. and ZLOTNIK A.) 18-August-2005 (18-08-2005) see pages 1, 10, 13, 14, 28, tables 1 - 12 and SEQ ID Nos 1566 and 1139.	1 - 6, 8 - 11 and 13 - 15
X	KATO H. Y. and KATO H. M. Identification and characterization of CDC50A, CDC50B and CDC50C genes in silico. ONCOLOGY REPORTS October 2004 12(4): 939 - 943 see abstract and GenBank Accession Nos NM_018247 and NP_060717.	8 - 11
<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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3-December-2006 (03-12-2006)		Date of mailing of the international search report 5 January 2007 (05-01-2007)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001(819)953-2476		Authorized officer Ken Steinberg 819- 934-7929

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2006/001522

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHAO W. et al. Brain insulin receptors and spatial memory. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY December-1999 274(49): 34893 - 34902.	
A	PENICHERET M. et al. An antibody-avidin fusion protein specific for the transferrin receptor serves as a delivery vehicle for effective brain targeting: Initial applications in anti-HIV antisense drug delivery to the brain. THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS The American Association of Immunologists October-1999 163(8): 4421 - 4426.	
P, 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 November-2005 95(4): 1201 - 1214.	
A	MURUGANANDAM A. et al. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY February-2002 16(2): 240 - 242.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2006/001522**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. Claim Nos. : 13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Claim 13 is directed to a method for generating an antibody that can be construed to encompass human therapy which the International Search Authority is not required to search under PCT Rule 39.1(iv). However, the search has been carried out based on the use of non-human mammals as the subject of inoculation.
2. Claim Nos. :
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3. Claim Nos. :
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2006/001522

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2005181375	18-08-2005	WO2004063355 A2	29-07-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	47/48 (2006.01)	A 6 1 K	47/48	
A 6 1 K	47/42 (2006.01)	A 6 1 K	47/42	
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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 スタニミロヴィック, ダニカ
カナダ国 ケー4ピー 1アール7 オンタリオ, グリーリー, スパークリングレイクウェイ 6
8 9 2

(72)発明者 ムルガナンダム, アルムガム
カナダ国 ケー2ピー 8ジー2 オンタリオ, ネベアン, ウッドブリッジクレセント 7 0 3 -
2 3 0

Fターム(参考) 4B024 AA15 BA53 CA02 HA01 HA15
4B064 AG26 CA19 CC24 DA13
4C076 EE41A EE59A
4C084 AA07 MA05 NA13
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 DA86 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2009509503A5	公开(公告)日	2009-07-16
申请号	JP2008531493	申请日	2006-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	加拿大国家研究委员会		
申请(专利权)人(译)	加拿大国家研究理事会		
[标]发明人	アブルロブアベデルナッサー スタニミロヴィックダニカ ムルガナンダムアルムガム		
发明人	アブルロブ,アベデルナッサー スタニミロヴィック,ダニカ ムルガナンダム,アルムガム		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/00 C07K16/18 C12P21/08 A61K45/00 A61K47/48 A61K47/42 G01N33/53		
CPC分类号	A61K49/0058 A61K47/6849 A61K49/0032 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C07K2317/22 C07K2317/569 C07K2317/77 G01N33/5064 G01N33/6854 G01N2500/04 G01N2500/10		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/00 C07K16/18 C12P21/08 A61K45/00 A61K47/48 A61K47/42 G01N33/53. D		
F-TERM分类号	4B024/AA15 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/CA19 4B064 /CC24 4B064/DA13 4C076/EE41A 4C076/EE59A 4C084/AA07 4C084/MA05 4C084/NA13 4H045 /AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/720452 2005-09-27 US		
其他公开文献	JP2009509503A JP5269597B2		

摘要(译)

本发明的特征在于一种通过使用跨膜区蛋白30A的新型抗原同工型 (TMEM30A) 来鉴定能够穿过血脑隔膜并产生抗体的试剂的方法。这对于建立血脑易位机制很有用。这些抗原在脑内皮细胞中比其他内皮细胞丰富,并且可能在转铁蛋白和胰岛素受体上具有更好的选择性和脑转运能力。抗原之一是TMEM30A。[选型图]图1