

脳における持続的抗体濃度増強を目的
とした新規技術に関する研究

A Study of a new technology for increasing therapeutic antibody
levels in the brain over extended period

2019年9月

鹿児島大学大学院理工学研究科
博士後期課程総合理工学専攻

中野 了輔

【目次】

第 1 章 抗体、抗体医薬および脳・中枢標的化に関する背景

- 1-1 抗体とは
- 1-2 抗体医薬について
- 1-3 抗体医薬の高活性化技術
- 1-4 抗体医薬品の脳・中枢適応
- 1-5 中枢移行性技術
- 1-6 ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質：MOG

第 2 章 多様な種への交差性を示す新規抗 Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 抗体の取得

- 2-1 実験材料の調製
 - 2-1-1 可溶性 MOG 抗原、可溶性 HER2 抗原の作製
 - 2-1-2 膜型 MOG 抗原発現ベクターの作製
 - 2-1-3 各種抗体の調製
- 2-2 抗 MOG 抗体の取得
 - 2-2-1 ヒト抗体ファージライブラリでの抗体の取得
- 2-3 抗 MOG 抗体およびコントロール抗体発現ベクターの取得
 - 2-3-1 抗 MOG 抗体の発現ベクターの構築
 - 2-3-2 抗 Avermectin 抗体の発現ベクター-N5LG4PE_AVM
 - 2-3-3 抗ラットトランスフェリン受容体抗体 OX26 抗体の発現ベクター N5KG4PE(R409K)_OX26
- 2-4 取得抗体の in vitro 評価
 - 2-4-1 フローサイトメーターによる抗 MOG 抗体の MOG に対する結合性の評価
 - 2-4-2 表面プラズモン共鳴検出による抗 MOG 抗体の MOG に対する結合性の評価
- 2-5 抗 MOG 抗体の追加取得

- 2-5-1 FLAG-Fc が結合した可溶性ヒト MOG 抗原および可溶性マウス MOG 抗原の細胞外ドメインタンパク質の作製
- 2-5-2 GST が結合した MOG の細胞外ドメインタンパク質の作製
- 2-5-3 ヒト抗体産生マウスからの抗 MOG 抗体の取得
- 2-5-4 抗 MOG 抗体の作製
- 2-5-5 フローサイトメーターによる抗 MOG 抗体の MOG に対する結合性の評価
- 2-5-6 表面プラズモン共鳴検出による抗 MOG 抗体の MOG に対する結合性の評価

第 3 章 抗 MOG 抗体の脳内抗体濃度上昇効果と薬剤フォーマットへの応用

- 3-1 抗 MOG 抗体のラット脳移行性評価
- 3-2 抗 MOG 抗体のラット脳移行性の TfR 抗体との比較
- 3-3 抗 MOG 抗体 MOG01 のマウス脳移行性評価
- 3-4 抗 MOG 抗体 MOG01 の脳移行性イメージング解析
- 3-5 HER2 抗体と MOG 抗体とのバイスペシフィック抗体評価
 - 3-5-1 HER2 と MOG に結合するバイスペシフィック抗体の発現ベクターの作製
 - 3-5-2 AVM と MOG に結合するバイスペシフィック抗体の発現ベクターの作製
 - 3-5-3 抗 AVM 抗体の IgG の C 末端に抗 AVM 抗体の scFv が融合した抗体の発現ベクターの作製
 - 3-5-4 フローサイトメーターによる MOG のバイスペシフィック抗体の MOG または HER2 に対する結合性の評価
 - 3-5-5 表面プラズモン共鳴検出による MOG のバイスペシフィック抗体の MOG に対する結合性の評価
 - 3-5-6 表面プラズモン共鳴検出による MOG のバイスペシフィック抗体の HER2 に対する結合性の評価
 - 3-5-7 HER2 と MOG のバイスペシフィック抗体のラット脳移行性評価
- 3-6 各種フォーマットでの脳内抗体濃度上昇評価
 - 3-6-1 アシンメトリック型バイスペシフィック抗体発現ベクターの構築
 - 3-6-2 シンメトリック型バイスペシフィック抗体発現ベクターの構築
 - 3-6-3 各種バイスペシフィック抗体の調製

3-6-4 フローサイトメーターによる各種バイスペシフィック抗体の MOG に対する結合性の評価

3-6-5 表面プラズモン共鳴検出による各種バイスペシフィック抗体の MOG に対する結合性の評価

3-6-6 各種バイスペシフィック抗体のマウス脳移行性評価

3-7 酵素融合体での脳内抗体濃度上昇評価

3-7-1 酵素融合抗体発現ベクターの構築と融合体取得

3-7-2 酵素融合抗体の in vitro 活性評価

3-7-3 酵素融合抗体のマウス脳移行性評価

第 4 章 考察

4-1 抗体医薬の脳移行性

4-2 抗体医薬の脳移行性向上技術

4-3 酵素補充療法に対する脳移行性技術

4-4 Accumubrain 技術の構築

4-5 抗 MOG 抗体の脳内濃度向上メカニズムに関する考察

4-6 抗 TfR 抗体技術との比較

4-7 医薬品応用への期待と課題

第 5 章 総括

第 1 章 背景情報：抗体医薬と脳標的化

第 1 章は、本論文の研究背景であり、抗体医薬品の脳・中枢移行が極めて困難であることを説明する。現在、世界で行われている脳・中枢移行の研究や技術開発について整理するとともに、この問題を解決するためのいくつかのアプローチについて議論する。

【1-1 抗体とは】

抗体は生体内の感染防御機構である免疫の一部として機能しているタンパク質である [1]。抗体は IgG（イムノグロブリン G）、IgA、IgE などいくつかのクラスが存在しているが（表 1-1）、生体内に最も多いものが IgG であり、全抗体中 70-75% が IgG であり、血中に約 1.2g/L 存在している。IgG は重鎖（Heavy Chain）と軽鎖（Light Chain）のヘテロ 4 量体からなり、分子量 150kDa の高分子量タンパク質である（図 1-1）。抗体は大きく Fab（antigen-binding fragment）と Fc（fragment crystallizable region）に分けられ、2 価の Fab と 1 価の Fc からなる。Fab は軽鎖と重鎖から構成され、定常領域（constant region）と可変領域（variable region）からなり、可変領域はさらに配列が一定なフレームワーク領域（Framework region : FR）と多様な配列を持つ相補性決定領域（complementarity determining region : CDR）に分けられる。CDR は軽鎖に 3 か所、重鎖に 3 か所あり、この抗体の CDR の多様性が様々な標的（抗原）に対して結合することを可能とする。また、一般的にはある標的に強く結合する抗体は他の標的に結合することは無いと考えられ、高い結合特異性を持つとされる。一方で Fc は重鎖のみから構成され、各種 Fc 受容体（FcR）や補体などと結合することにより様々な機能を発揮する。IgG における Fc 受容体はヒトでは FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、FcγRIIIb、FcRn などが知られる。これらは発現細胞や機能が異なっており、例えば FcγRIIIa はナチュラルキラー（NK）細胞に発現し、抗体依存性細胞障害活性（Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity : ADCC）を示す一方で、FcγRIIb は ITIM（immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif）を持ち抑制性のシグナルを入れることが可能である。FcRn は血管内皮などに発現しておりリソソームへの抗体の移行から抗体を回収し血中に戻す効果を持ち、その結果抗体は長い血中半減期を示す。Fc はまた補体と結合することにより補体依存性細胞障害活性（Complement-Dependent Cytotoxicity : CDC）を発揮する。

IgG にもいくつかのサブクラスがあり、これは種によって異なっている。ヒトでは IgG1 から IgG4 まで 4 種あることが知られている。サブクラスの違いは重鎖の違いであり、主に Fc の違いとなる。そのため Fc が持つ各種機能がサブクラスによって影響を受ける。例えば ADCC 活性は IgG1 が高く、IgG4 は一般的には示さないとされる。また CDC 活性は IgG1、IgG2 が高い。また Hinge と呼ばれる Fab と Fc の間の領域も構造的に異なることが知られる。例えば IgG3 は Hinge が長く、IgG2 は短い。

以上示してきたように抗体は抗原に対する結合特異性、および各種エフェクター能により各種機能を発揮する。

以下抗体の特徴としてまとめる。

- ・約 150kDa の高分子量タンパク質である。
- ・多様な標的に結合可能である一方で、それぞれの抗体は抗原特異性が高い：Fab の CDR の多様性による。また一般的にはある抗原に結合する抗体は他の抗原には結合活性を示す可能性は低く、高い抗原特異性を持つとされる。
- ・血中動態が長い、体内安定性が高い：Fc の FcRn への結合活性による。また分子量が大きいことによる腎排泄がない点も血中半減期が長いことに寄与する。また長い血中半減期に呼応して、血中での安定性が高い。
- ・各種エフェクター能を持つ：Fc の FcR への結合、補体への結合による。

【1-2 抗体医薬について】

1986 年にマウス抗 CD3 抗体、muromonab-CD3 (OKT3) が最初の抗体医薬品としてアメリカ食品医薬品局 (FDA) から承認を受けて以来、数多くの抗体医薬品が開発されている[2]。1994 年には、マウス抗体のもつ抗原性を低減するために、マウス抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域を連結したキメラ抗体 abciximab が承認を受けている。

さらに抗原性を低減するために、マウス抗体の可変領域の抗原結合に重要な働きをもつ CDR をヒト抗体の FR 領域に移植するヒト化抗体技術が開発され、1998 年にヒト化抗 HER2 抗体 Trastuzumab が承認を受けている。

また、ヒトの抗体配列ライブラリを用いたファージディスプレイ技術が用いられるようになり、ファージディスプレイ技術で取得した最初の抗体として、完全ヒト抗 TNF α 抗体 adalimumab が 2002 年に承認されている。またヒトの抗体配列を含む部分の染色体をマウスに移植した

ヒト抗体産生動物も多く樹立されており、完全ヒト抗 EGFR 抗体 panitumumab が 2006 年に承認されている。

現在まで、CD20、TNF α 、HER2、EGFRなどを標的抗原とした抗体医薬品が、既に 70 品目以上が承認されている。

このように、抗体は幅広く認知された医薬品フォーマットとなっている。これまでに承認された抗体医薬品のうち大部分はがんや免疫疾患を対象とするものであり、全体の約 75%以上を占めている。

抗体はこれまで見てきたように医薬品としての特性に優れ、各種疾患に応用が広がってきている。しかし抗体医薬品でもいくつかの課題が知られている。主なものとしては生産コストの高さ、細胞内標的が狙えない、脳や中枢への送達量が低い、といった課題がある。1-1 で記載した抗体の特徴の医薬品としての特徴に則して以下に整理する。

- ・高分子量タンパク質である：タンパク質は胃や腸で分解されるため、抗体医薬の経口剤化は困難であり、注射剤が一般的である。また製造は合成では困難であり、主に動物細胞を用いて組み換えタンパク質として生産される。そのため生産コストは一般的に高いといわれており、これが抗体医薬品が高額となる一因と言われている[3]。なお、近年抗体医薬品の増加およびバイオシミラー等の発展により生産系の改善が進んでおり、生産コストは依然と比較すると低下の傾向にはある。

- ・抗原特異性が高い：そのため抗体医薬は分子標的薬に分類され、off-targetでの副作用を示すことは少ない。合成低分子薬においても分子標的薬は存在するが、その切り分けが抗体ほどではなく、またすべての合成低分子薬が分子標的薬ではない。このことは合成低分子薬との大きな違いとしてあげられる。なお当然だが On-targetでの毒性については回避されるものではなく、抗体医薬においても低分子薬と同様に問題となっている。

- ・血中動態が長い、体内安定性が高い：抗体は血中半減期が長く、一般的にはヒト IgG1 で半減期が 21 日程度[1]といわれる。治療用抗体においても標的抗原の性質、例えば可溶性抗原か膜型抗原か、抗原量、抗原のターンオーバーのスピードなどによって大きく変わるが、1-2 週間の血中半減期を示すものが多い。結果抗体医薬の暴露期間が維持されることになり、高い薬効につながる事が期待される。またそのため投与頻度が少なく、2 週に 1 回、1 か月に 1 回といった薬剤が多い。抗体医薬は注射剤であるが、この利点により注射剤ならではの課題、例えば痛み、侵襲性の高さ、投与のための通院の必要性などが最小限に抑えられていると考えられ、抗体医薬が広く利用されている理由の一つと考えられる。

・各種エフェクター能を持つ：抗体は ADCC、CDC を元来持つことから、がん細胞や免疫細胞など標的細胞の除去が期待される。また近年 ADCC 活性や CDC 活性をさらに増強させるような技術が開発されており、臨床応用もされている。

・薬剤にとって重要となる ADME（吸収（英：Absorption）、分布（英：Distribution）、代謝（英：Metabolism）、排泄（英：Excretion））の観点で述べると、吸収の観点では抗体医薬は注射剤であるため薬剤によって大きく変わることは無い。分布の観点では iv では抗体は速やかに血中に広がる。皮下注の場合は注射部位から血液に徐々に移行するが、血中に移行してからは iv と同様の挙動となる。抗体は血中に安定に存在しており、また抗原が発現している部位に抗原に結合することにより集積する。抗体は先に述べたように標的抗原以外への結合がほぼ無いと考えられ、一般的な抗体は抗原の発現部位への集積以外は同様の動態を示すと考えられる（抗原が発現していても送達されない部分はあるが、抗原が無い部分には基本的に集積しない）。代謝については抗原依存的なクリアランスがそれぞれの抗体で異なるが、それ以外の要素は抗体事に大きな違いはなく、一般的な抗体は同様に代謝されると考えられる。排泄については、抗体は分子量から腎排泄はされないと考えられる。基本的には肝臓や血管内皮により分解されていると思われる。以上、薬剤として重要な要素となる ADME について、抗体は抗原に依存した部分以外は基本的に一般的な抗体と同様であると期待される（厳密にはそれぞれの抗体で物性が微妙に異なり、それが分布や代謝に影響を与えることがあることが知られる）。

【1-3 抗体医薬の高活性化技術】

抗体医薬の活性をさらに向上させる技術開発が広く行われており、すでに実用化されているものも多い。以下いくつかについて簡単に分類する。

・エフェクター能向上技術

これまで述べてきたように抗体は元来エフェクター能を持つが、この活性をさらに向上させる技術が報告されている。例えば抗体には Fc に N 結合型糖鎖が付加されているが、この根本に存在するフコースを除去することで ADCC 活性は 100 倍以上に上昇することが知られている[4]。本技術が応用された抗 CCR4 ヒト化抗体 Mogamulizumab はヒトで高い薬効を示し、2012 年に上市され実用化されている。その他にも、Fc のアミノ酸配列を改変することにより高い ADCC 活性を示す報告がなされている[5]。

また、抗体がもともと活用できていなかったエフェクター細胞である T 細胞を活用可能とする技術も広く研究されている。がん抗原と CD3 抗原、両者に対するバイスペシフィック抗体（後述）により、がん細胞特異的に T 細胞による細胞障害活性を示すことが知られている [6]。本技術を活用した抗 CD19-抗 CD3 バイスペシフィック抗体 Blinatumomab は 2014 年 US にて承認されている。

・抗体薬剤融合体（Antibody-Drug Conjugate : ADC）

抗体の高い標的認識能を用いた薬剤コンジュゲート ADC に関しては古くから研究がなされている [7]。抗 CD33 抗体とカリケアマイシンの ADC である gemtuzumab ozogamicin についてはいったん US で承認されたが副作用の影響でその後承認が取り消され、2017 年に再承認されている。また 2013 年には次世代型 ADC として抗 HER2 抗体とメイタンシンの ADC が 2013 年に日米欧で承認されている。古くは RI 標識された ADC として抗 CD20 抗体にイットリウムがコンジュゲートされた ibritumomab tiuxetan も 2002 年に承認されている [8]。

・バイスペシフィック抗体

通常、抗体は 1 種の抗原に結合する特性を持つが、2 種の抗原に結合できる抗体医薬を総称してバイスペシフィック抗体と呼ばれる [9]。バイスペシフィック抗体は大きく 4 種に分類される（図 1-2）。以下に整理する。

1 点目は通常の IgG と形態は類似しているが、それぞれの Fab がそれぞれ別の抗原を認識するタイプであり、結合は 1 価 1 価の様式となる。このタイプのバイスペシフィック抗体は重鎖または/かつ軽鎖が異なるためアシンメトリック型とも呼ばれる。通常は重鎖が異なる配列を持ち、効率的にヘテロな組み合わせとなるよう（バイスペシフィック抗体となるよう）Fc に改変を加えられている。また軽鎖の掛け違いを抑えるため、軽鎖は同一のものを利用することもある。先に述べた T 細胞による細胞障害活性を目的として広く応用されている。

2 点目は通常の IgG の N 末または C 末にさらに抗原結合部位を持つタイプであり、結合は 2 価 2 価の様式となる。抗原結合部位としては Fab や単鎖可変領域フラグメント（single chain Fv : scFv）が一般的であるがドメイン抗体（domain of heavy chain of heavy chain antibody : VHH）を付加することも可能である。Fab を用いる場合、こちらも軽鎖の掛け違いを抑えるために共通の軽鎖を用いることもある。価数の多さを生かして、中和抗体の併用を目的として主に応用されている。

3 点目は scFv や VHH といった低分子量抗体をタンデムに結合したタイプである。通常 1 価 1 価であるが、さらにタンデムに続けることにより 2 価 2 価の様式にすることも可能であり、またトリスペシフィック抗体などの報告もある。先に述べた抗 CD19-抗 CD3 バイスペシフィック抗体 Blinatumomab はこのタイプとなる。

4 点目は通常の IgG とまったく同じ構造を持つが、1 つの Fab が 2 つの抗原に結合可能なタイプである。通常の IgG と同一の定常領域配列を持ち、バイスペシフィック化のための改変が無いことから抗原性は通常の IgG と同じと考えられる。取得については困難であるが、抗体の CDR ごとに変異ライブラリを作製し結合活性を向上させることにより狙ってこのようなバイスペシフィック抗体を取得したとする報告もある。

・半減期延長技術

抗体医薬はもともと血中半減期が長いことが知られているが、これをさらに延長させようとする試みも知られている。先に述べたように抗体は FcRn と相互作用することにより長い血中半減期を得ている。ここを最適化することによりさらに血中半減期が延長することが報告されている[10]。また、血管内皮は負電荷であることから、抗体も負電荷を導入することで血中動態を改善する報告もある[11]。

・多回抗原結合技術

1 つの抗体が複数個の抗原を除去する技術についても報告されている。通常抗体は 1 個の Fab が 1 個の抗原に対して結合するため、1 個は Fab が 1 個の抗原のみ中和する。抗体の抗原結合能を中性付近で結合し、酸性側では結合が弱くなる改変を加えることで、細胞のエンドソーム内で抗原から解離することで、抗体は FcRn によってリサイクリングされるが抗原はそのままリソソームに運ばれ、結果として 1 個の抗体が複数の抗原を除去する技術が開発されている[12]。

以上見てきたように抗体医薬は改良技術研究が活発に行われている。この理由として、抗体はアミノ酸置換に対して許容性が高いことが考えられる。多くの技術において抗体のアミノ酸置換が行われるが、抗体はこれを許容することが多い。抗体は元来可変領域が配列的な多様性を持つことから、アミノ酸置換に対して許容性が広いのかもしれない。

また、抗体は分子量が高く、薬剤などをコンジュゲーションしても抗体側の物性が出ることも利点として考えられる。これまで見てきたように、抗体は細かく見れば個々の抗体ごとに物性が異なるが、全体としては配列として共通の部分が多く、似た物性をもつ。また抗体は血中動態が良くまた安定性も高い。ADC を例にとれば、抗体側から見れば低分子薬剤付加の影

響は最小限に抑えられていると考えられる（薬剤側から見れば抗体コンジュゲートにより動態の向上は顕著である）。

【1-4 抗体医薬品の脳・中枢適応】

中枢神経疾患の治療においても、抗体などのバイオロジクスの重要性が高まっており、アミロイドβに対するモノクローナル抗体がアルツハイマー病に、αシヌクレインに対する抗体がパーキンソン病にそれぞれ検討されている。また、神経保護作用を有する各種神経栄養因子

（brain-derived neurotrophic factor ; BDNF、glial-derived neurotrophic factor; GDNF）が中枢神経疾患において神経保護作用を示すことが動物モデルで報告されている。

しかしながら、中枢神経系では、抗体を末梢に投与した場合に他の臓器と比べて送達量が低く（表 1-2）、抗体移行率（脳脊髄液（cerebrospinal fluid ; CSF）中濃度と血清濃度の比）は 0.1-0.3%と報告されている[13]-[15]。

脳及び脊髄を含む中枢神経系において薬剤送達量が低下する理由として、血液脳関門（Blood-Brain Barrier ; BBB）と呼ばれる血液と脳との組織液間での物質輸送を制限する機構が挙げられる（図 1-3）。血液脳関門は、血管内皮細胞の細胞間接合による物理的・非特異的な制御機構と、排出トランスポーターによる基質特異的な排出機構を有しており、異物若しくは薬物から中枢神経系を保護し、恒常性の維持に重要な役割を果たしている。

しかしながら、血液脳関門の存在により、中枢神経系では薬剤投与時の有効濃度が得られにくく、薬剤開発が困難になっている。例えば、ハラー症候群（ムコ多糖症 I 型）に対するα-L-イズロニダーゼや、ハンター症候群（ムコ多糖症 II 型）に対するイズロン酸 2-スルファターゼの静脈内投与による酵素補充療法が行われているが、酵素の分子量が大きく血液脳関門を通過しないため、中枢神経症状に対する有効性は認められていない[16]、[17]。

また、脳内濃度を高めるために、バイオロジクスを髄腔内または脳内に直接投与する試みも行われている。例えば、ハンター症候群（ムコ多糖症 II 型）の患者の脳障害の進行を防止するために、イズロン酸 2-スルファターゼを患者の脳内に投与する方法が報告されている。しかしながら、髄腔内または脳内への直接投与は侵襲性が高く課題がある[18]。

【1-5 中枢移行性技術】

そのため、バイオリジクスのような高分子物質の脳内濃度を高めるために、様々な送達技術が研究されている。例えば、脳血管内皮細胞に発現している膜タンパク質に結合し、高分子物質と膜タンパク質の複合体を形成させてエンドサイトーシスにより血液脳関門を通過させる方法が複数報告されている（表 1-3）。

報告されている技術のほとんどは、受容体介在性トランスサイトーシス（receptor-mediated transcytosis、以下 RMT）を利用したものであり、標的となる脳血管内皮発現受容体としては、例えばトランスフェリン受容体（Transferrin Receptor ; TfR）、インスリン受容体、インスリン様成長因子受容体、及び低比重リポタンパク質受容体ファミリー（LDLRf）がある。

抗 TfR 抗体と神経成長因子との融合タンパク質を作製することにより、TfR を介した血液脳関門通過技術が報告されている。抗 TfR 抗体を用いた技術としては、抗 TfR 抗体と抗ベーターセクレターゼ（BACE1）抗体とのバイスペシフィック抗体[19]、[20]や、抗アミロイドβ抗体のカルボキシル末端側に TfR に対する一価抗体を融合させた融合抗体が報告されている[21]。この報告の中で、抗 TfR 抗体と抗 BACE1 抗体とのバイスペシフィック抗体による脳送達は、マウスにおいて 20mg/kg 体重で抗体を投与した際に脳での抗体取り込み量がコントロールの約 4 倍に増加することが報告されている[20]。

また、抗 TfR 抗体を表面に有するリポソームに薬剤を内包させることで、薬剤を血液脳関門において通過させる技術が報告されている。抗ラットトランスフェリン受容体抗体とイムノミセル融合体により、ラット脳での取り込み量が約 2~5 倍に増加することが報告されている。

また、抗インスリン受容体抗体のカルボキシル末端側に神経栄養因子や酵素または抗アミロイド抗体を融合した融合タンパク質を作製することにより、インスリン受容体を介した血液脳関門通過技術が報告されている[22]-[25]。

アカゲザルにおいて、標識抗ヒトインスリン受容体抗体と GDNF との融合抗体を投与した 2 時間後の脳での取り込み量が、GDNF と比較して約 15 倍となることが報告されている[23]。

しかしながら、TfR やインスリン受容体は脳血管内皮細胞だけでなく、肝臓など全身で発現しているため、これらの技術では中枢神経系への薬剤送達量の増大とともに肝臓などにも薬剤送達が起こる[26]。さらに、全身で抗原が発現しているため、抗体の血中半減期が短い[19]。

また、脳血管内皮膜発現抗原である TMEM30A に対する抗体 (Fc5) が、RMT 様の活性を示すことが報告されている[27][28]。Fc5 はラマ由来のシングルドメインの重鎖抗体の重鎖可変領域 (variable domain of heavy chain of heavy chain antibody、以下 VHH) 抗体であり、Fc5 とヒト Fc 融合体がコントロール IgG と比較して脳送達が増加することが、in vitro BBB モデルおよびラット in vivo モデルにおいて示されている。

Fc5 由来の単鎖抗体 (single chain antibody ; scFv) と代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (metabotropic glutamate receptor type I、以下 mGluRI) 抗体との融合体が、コントロール単鎖抗体と mGluRI 抗体との融合体と比較して、ラットモデルでの CSF 曝露が高まることが報告されているが、増加量としては 5 倍程度である[29]。

また、IgG 抗体は胎児性 Fc5 受容体 (neonatal Fc receptor ; FcRn) によって脳内から循環血液方向へ速やかに排出されることが報告されており[30][31]、例えばラットにおける IgG の脳内投与後の脳内半減期は 48 分間と短い。

【1-6 ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 : MOG】

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (myelin oligodendrocyte glycoprotein ; MOG) は免疫グロブリンスーパーファミリーに属するタンパク質であり、ミエリンを構成している。ヒト MOG の全長は 218 アミノ酸からなり、中枢神経系においてミエリンの最外層で発現しており、細胞接着及び細胞表面相互作用において役割を果たしている[32]-[34]。

多発性硬化症 (multiple sclerosis ; MS) のような中枢神経のグリア細胞が自己免疫により攻撃される炎症性疾患において、MOG は自己抗原候補であると考えられている[35][36]。MS 患者において、血清中の抗 MOG 抗体の濃度は低いが、中枢神経内でも抗 MOG 抗体が検出されることが報告されている[35]。

この理由として、MS のような病態時には液性因子の漏出と炎症性細胞の侵入により血液脳関門の破綻が起こり、抗体が中枢神経系に移行しやすくなっていることが報告されている[36][37]。さらに、中枢神経系に浸潤した B 細胞や形質細胞により自己抗体が中枢神経系内局所で産生されていることが報告されている[36][38][39]。

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis ; EAE) は、MS と多くの病態を共有することから、MS の病態研究

において使用されているモデルである。MOG タンパク質またはペプチドを動物に免疫することにより、EAE が誘導できることが報告されている[40]。

また、EAE を誘導した動物に抗 MOG 抗体を投与することで EAE スコアが増悪するという報告があるが[35][41]、抗体投与後 1-2 日後または 4 日後が EAE スコアのピークを示しており、一過的である。一方で、正常な動物に抗 MOG 抗体のみを投与しても EAE は発症しないことが報告されている[42][43]。

クラス	サブクラス	重鎖	軽鎖	分子量 (kDa)		主な役割
IgG	1、2、3、4	γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4	Kまたは λ	150	単量体	血中に多く存在、ADCC、CDCなど
IgA	1、2	A1、 α 2	Kまたは λ	150-600	単量体または4量体	粘膜免疫
IgE		ϵ	Kまたは λ	190	単量体	寄生虫防御
IgM		μ	Kまたは λ	600	5量体	高い補体結合能
IgD		δ	Kまたは λ	150	単量体	不明

表 1-1 各クラスの抗体分類

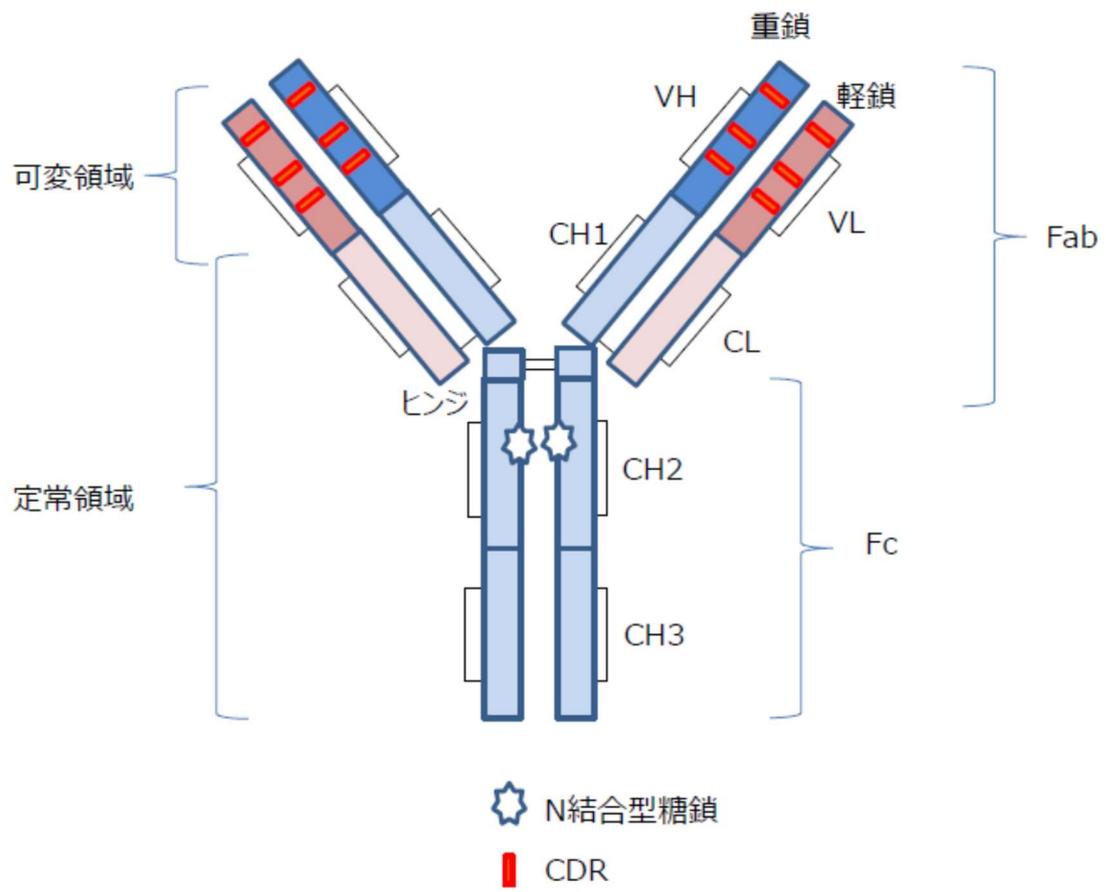


図 1-1 IgG1 抗体の構造
IgG1 の構造について記す。

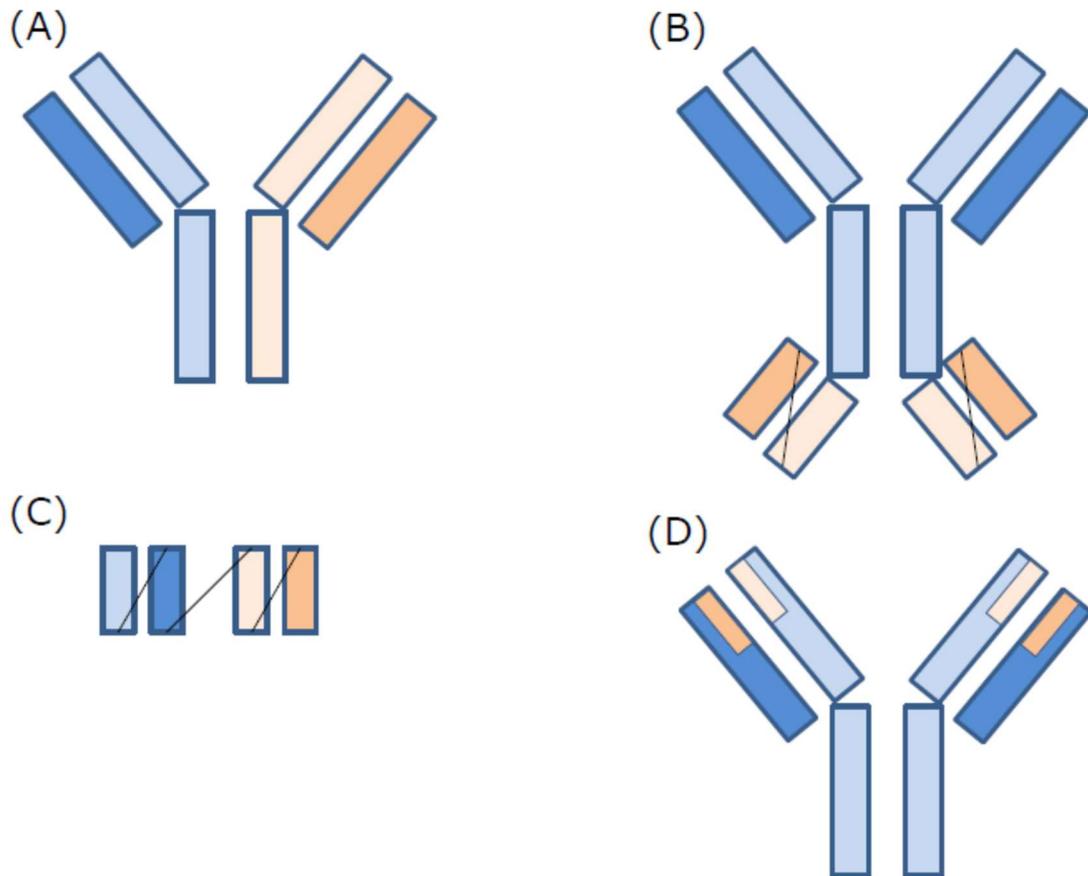


図 1-2 代表的なバイスペシフィック抗体構造

(A) : アシメトリック型 : IgG 様でそれぞれの Fab が異なる抗原を認識する。1 価-1 価の結合様式を持つ。

(B) : シンメトリック型 : IgG の C 末または N 末に別の結合ドメインを持つ。2 価-2 価の結合様式を持つ。

(C) : 低分子型 : 低分子抗体がタンデムに結合した形を持つ。主に 1 価-1 価の結合様式を持つ。

(D) : 2 抗原結合型 : 同一の Fab が 2 種の抗原に結合能を持つ。

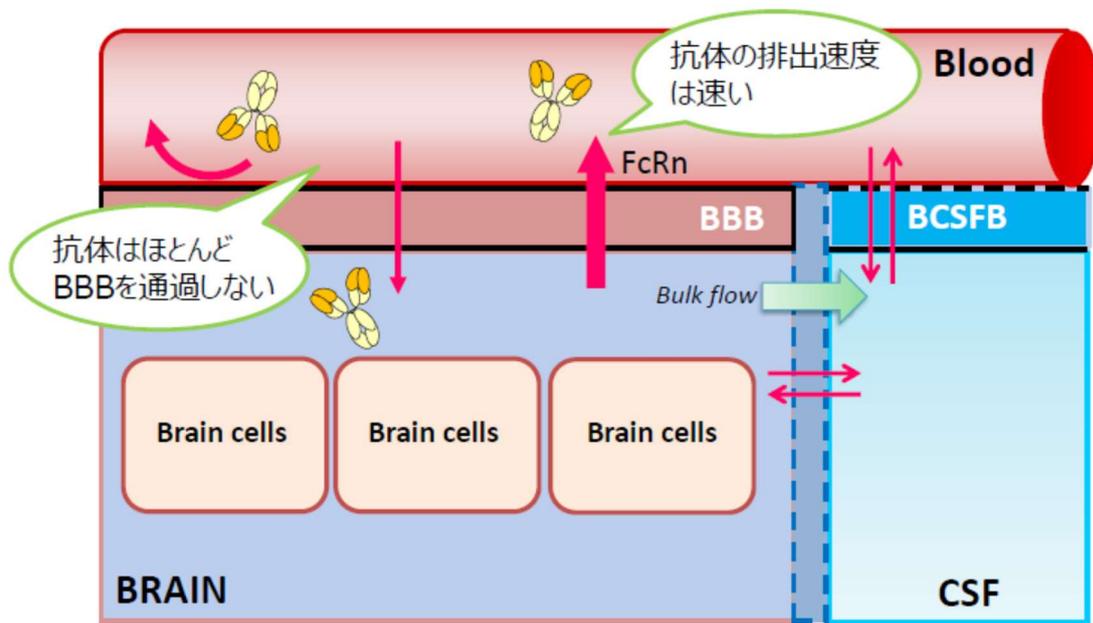
	ABC (%)	CV%
Lung	14.9	4.95
Heart	10.2	3.57
Kidney	13.7	3.1
Muscle	3.97	5.76
Skin	15.7	5.67
Small int.	5.22	3.89
Large Int.	5.03	4.74
spleen	12.8	4.85
liver	12.1	3.75
Bone	7.27	11.8
Stomach	4.98	8.06
Lymph nodes	8.46	11.4
Fat	4.78	9.59
Brain	0.351	10.7
Pancreas	6.4	14.6
Testes	5.88	10.8
Thyroid	67.5	38.4
Thymus	6.62	27.1

表 1-2 抗体の各臓器への送達割合。

mAbs 5:2, 297-305; March/April 2013 (参考文献[44]) より改変。

モダリティ	会社	標的抗原 / 技術	送達薬剤	中枢移行性	コメント	引用元
Nano particle	2-BBB Medicines	Glutathione-liposome <i>G-Technology</i>	Small molecule	~5-fold	低分子用	J Drug Target, 2014; 22(5): 460-467
Peptide	Angiochem	LRP1	Enzyme, Small molecule	5~10-fold	低分子用	J. Med. Chem. 2010, 53, 2814-2824
Antibody	ArmaGen Technologies	InsulinR	Enzyme	5~10-fold	酵素で先行	Drug Metab Dispos. 2009 Dec; 37(12): 2299-2304.
	JCR pharma	TfR <i>/J-Brain cargo</i>	Enzyme, small molecule, Antibody	20~50 fold	酵素で先行	WO 2015/098989 A1
	Genentech	TfR	Antibody	≈25-fold	TfRにより血中半減期短い	Jessica A. Couch <i>et al. Sci Transl Med</i> 5, 183ra57 (2013)
		CD98	Antibody	<10-fold	-	Zuchero <i>et al., Neuron</i> 89, 1-13 January 6, 2016
	Roche	TfR <i>/Brain shuttle</i>	Antibody	≈55-fold	TfRにより血中半減期短い	Niewoehner <i>et al., Neuron</i> 81, 49-60, January 8, 2014
	Denali	anti-TfR Fc built-in	Antibody	~10-fold	TfRにより血中半減期短い	https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1714899/000119312517340997/d445892ds1.htm

表 1-3 脳・中枢移行性技術に関する報告



Advances in Pharmacology,
Volume 71, 2014 より一部改変

図 1-3 抗体の脳移行性模式図

Adv Pharmacol. 2014;71:301-35. (参考文献[45]) より改変。

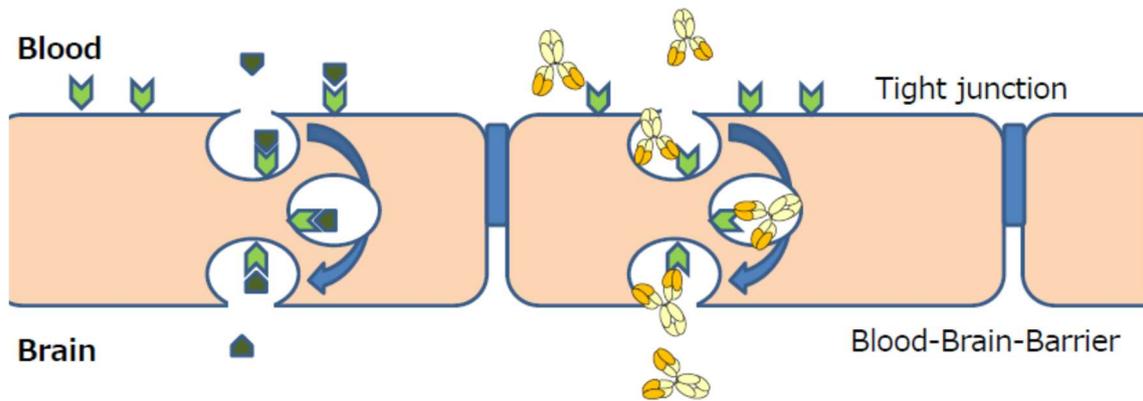


図 1-4 Receptor-Mediated Transcytosis (RMT) のモデル図

Front. Syst. Neurosci., 20 June 2014 (参考文献[46]) より一部改変

Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)

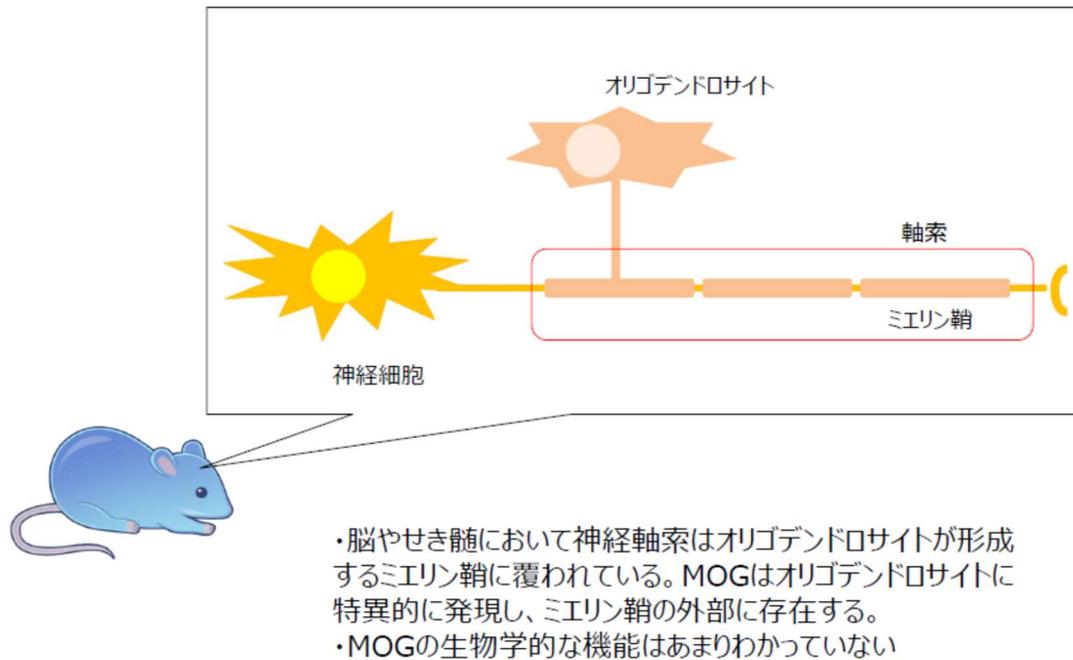


図 1-5 Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)

第 2 章 多様な種への交差性を示す新規抗 Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 抗体の取得

第 2 章は、脳・中枢移行性の向上をもたらす脳内抗原として、MOG (Myelin oligodendrocyte glycoprotein) に着目し、本抗原に対する新規の抗体取得について検討を行った。その結果、マウス、ラット、サル、ヒトに交差性を有しいずれの抗原に対しても同程度に結合する新規 MOG 抗体を取得に成功した。

【2-1 実験材料の調製】

2-1-1 可溶性 MOG 抗原、可溶性 HER2 抗原の作製

(1) FLAG-Fc が結合したラット MOG の細胞外ドメインタンパク質の作製

ラット MOG の可溶性抗原として、C 末端に FLAG-Fc が付加された MOG の細胞外ドメインタンパク質を以下に記載する方法で作製した。

MOG の細胞外ドメインの遺伝子配列を合成し、FLAG-Fc が挿入された INPEP4 (IDEC 社製) ベクターの BglII-XbaI サイトに挿入することにより、C 末側に FLAG-Fc が付加された MOG の細胞外ドメインを発現するプラスミドベクター INPEP4_rMOG-FLAG-Fc を作製した。これを Expi293 Expression System (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて浮遊性 293 細胞に導入して培養し、一過性発現系でタンパク質を発現させた。ベクター導入 4 日後に培養上清を回収し、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルター (MILLIPORE 社製) で濾過した。この培養上清中の MOG-FLAG-Fc タンパク質を ProteinA 樹脂 (MabSelect SuRe, GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いてアフィニティー精製した。洗浄液としてリン酸緩衝液を用いた。プロテイン A に吸着させたタンパク質を、20mM クエン酸ナトリウム、50mM NaCl 緩衝液 (pH3.4) により溶出し、1M Tris-HCl Buffer Solution (pH8.0) を含むチューブに回収した。次に、VIVASPIN (Sartrius stealin 社製) を用いた限外ろ過と NAP カラム (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) により溶出液の溶媒を PBS に置換後、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルター (Millex-GV, MILLIPORE 社製) でろ過滅菌を行った。溶液中の精製した各 MOG-FLAG-Fc タンパク質の濃度は 280nm の吸光度により測定した。

(2) GST が結合した MOG および HER2 の細胞外ドメインタンパク質の作製

ラット MOG の可溶性抗原として、C 末端に GST が付加された MOG の細胞外ドメインタンパク質を以下に記載する方法で作製した。MOG の細胞外ドメインの遺伝子配列を合成し、GST が挿入された N5 ベクター (IDEC 社製) の BglII-KpnI サイトに挿入することにより、C 末側に GST が付加された MOG の細胞外ドメインを発現するプラスミドベクター N5_rMOG-GST を作製した。

ヒト HER2 の可溶性抗原として、C 末端に GST が付加された HER2 の細胞外ドメインタンパク質を以下に記載する方法で作製した。HER2 の細胞外ドメインの遺伝子配列を合成し、GST が挿入された N5 ベクター (IDEC 社製) の BglII-KpnI サイトに挿入することにより、C 末側に GST が付加された HER2 の細胞外ドメインを発現するプラスミドベクター N5_hHER2-GST を作製した。

N5_rMOG-GST、N5_hHER2-GST を Expi293 Expression System (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて浮遊性 293 細胞に導入して培養し、一過性発現系でタンパク質を発現させた。ベクター導入 4 日後に培養上清を回収し、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルター (MILLIPORE 社製) で濾過した。この培養上清中のタンパク質を Glutathione Sepharose 4B (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いてアフィニティー精製した。洗浄液としてリン酸緩衝液を用いた。Glutathione Sepharose 4B に吸着させたタンパク質を、50mM Tris-HCl、10mM reduced glutathione (pH8.0) により溶出した。次に、VIVASPIN (Sartrius stealin 社製) を用いた限外ろ過と NAP カラム (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製) により溶液中の溶媒を PBS に置換後、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルター (Millex-GV、MILLIPORE 社製) でろ過滅菌を行った。溶液中の精製した rMOG-GST タンパク質、hHER2-GST タンパク質の濃度は 280nm の吸光度により測定した。

2-1-2 膜型 MOG 抗原発現ベクターの作製

ラット MOG (rMOG)、マウス MOG (mMOG)、サル MOG (cMOG) およびヒト MOG (hMOG) の全長遺伝子配列を合成し、それぞれの遺伝子配列を pEF6/V5-His (Thermo Fisher Scientific 社製) ベクターの BamHI-NotI サイトに挿入することにより、各種 MOG の膜発現用プラスミドベクター pEF6_rMOG、pEF6_mMOG、pEF6_cMOG および pEF6_hMOG を作製した。マウス、ラット、サルおよびヒト MOG のアミノ酸配列の比較の図 2-1 に示す。

2-1-3 各種抗体の調製

上記で作製した抗体発現プラスミドベクターを Expi293TM Expression System(Thermo Fisher Scientific 社製)を用いて浮遊性 293 細胞に導入して培養し、一過性発現系で抗体を発現させた。ベクター導入 4 日後に培養上清を回収し、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルター(MILLIPORE 社製)で濾過した。この培養上清中のタンパク質を ProteinA 樹脂(MabSelect SuRe、GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)を用いてアフィニティー精製した。洗浄液としてリン酸緩衝液を用いた。プロテイン A に吸着させた抗体を、20mM クエン酸ナトリウム、50mM NaCl 緩衝液(pH3.4)により溶出し、1M Tris-HCl Buffer Solution(pH8.0)を含むチューブに回収した。

次に、VIVASPIN(Sartorius stealin 社製)を用いた限外ろ過と NAP カラム(GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)により溶出液の溶媒を PBS に置換後、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルター(Millex-GV、MILLIPORE 社製)でろ過滅菌を行った。抗体溶液の 280nm の吸光度を測定し、濃度 1mg/mL を 1.40Optimal density と換算することで、精製抗体の濃度を算出した。

【2-2 抗 MOG 抗体の取得】

2-2-1 ヒト抗体ファージライブラリでの抗体の取得

ヒト PBMC 由来の cDNA から、PCR にて VH 遺伝子断片、VL 遺伝子断片を増幅させた。VH 遺伝子断片と VL 遺伝子断片をファージミドベクター-pCANTAB 5E

(Amersham Pharmacia 社製) にそれぞれ挿入し、大腸菌 TG 1 (Lucigen 社

製) を形質転換してプラスミドを得た。得られたプラスミドを M13KO7 Helper Phage

(Invitrogen 社製) に感染させることで、VH 遺伝子、VL 遺伝子がライブラリ化されたヒト抗体 M13 ファージライブラリを得た。

このヒト抗体 M13 ファージライブラリを用いて、下記のファージディスプレイ法を用いて、抗ラット MOG (rMOG) モノクローナル抗体を取得した。MAXISORP STARTUBE (NUNC 社製) に、rMOG-FLAG Fc を固相化し、SuperBlock Blockig Buffer (Thermo 社製) を用いて rMOG-FLAG-Fc が結合していない部位をブロックした。このチューブにヒト抗体 M13 ファージライブラリを室温下で 1 時間反応させ、PBS または 0.1% Tween20 含有 PBS(以下 PBS-T と記載する)で洗浄後に 0.1M の Gly-HCl(pH2.2)でファージを

溶出した。溶出液は Tris-HCl(pH8.5)を加えて中和した。溶出したファージは、TG1 コンピ
テントセルに感染させ、ファージを増幅した。

その後、再度 MAXISORP STARTUBE に固相化した rMOG-FLAG_Fc と反応させて、
洗浄および溶出を実施した。この操作を繰り返し、rMOG-FLAG_Fc に特異的に結合する
scFv を提示したファージを濃縮した。濃縮されたファージを単クローン化し、ELISA にて
rMOG-FLAG_Fc への結合性を有する 3 つのクローンを選択した。

ELISA には、MAXISORP(NUNC 社製)に rMOG-FLAG_Fc を固相化し、
SuperBlock Blockig Buffer(Thermo 社製)を用いて rMOG-FLAG_Fc が結合して
いない部位をブロックした。ネガティブコントロールとして、FLAG_Fc を固相化したプレートも用
意した。

各ウェルに各々のファージクローンを加え、室温下で 30 分間反応させた後、各ウェルを
PBS-T で洗浄した。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された抗 M13 抗体(GE ヘ
ルスケア社製)を 10%ブロックエース(大日本製薬株式会社製)含有 PBS-T で希釈した溶
液を、各ウェルに加え、室温下 30 分間インキュベートした。

マイクロプレートを、PBS-T で 3 回洗浄後、TMB 発色基質液(DAKO 社製)を加え、室温
下でインキュベートした。各ウェルに 0.5M 硫酸を加えて発色反応を止め、波長 450nm(参
照波長 570nm)での吸光度をマイクロプレートリーダー(モレキュラーデバイス社製)で測定し
た。得られた結果を図 2-2 に示す。

図 2-2 に示されているように、3 種のファージクローンは、いずれも rMOG-FLAG Fc に結合
することが確認できた。一方、いずれのファージクローンも FLAG Fc には結合しなかった(データ
示さず)。

rMOG-FLAG_Fc に結合したクローンについて配列解析を行い、抗 MOG 抗体ファージミド
ベクター-pCANTAB_MOG01、pCANTAB_MOG09 および pCANTAB_MOG14 を取得
した。

以降の文章において、pCANTAB_MOG01、pCANTAB_MOG09 および
pCANTAB_MOG14 を用いて発現させたファージが提示する抗 MOG scFv 抗体の名称
を、それぞれ MOG01 抗体、MOG09 抗体および MOG14 抗体と記載する。各種抗 MOG
scFv 抗体の VH または VL をコードする塩基配列および塩基配列から推定されるアミノ酸
配列を配列表 2-1 から配列表 2-6 に示す。MOG01 抗体、MOG09 抗体は軽鎖がλ鎖
であった。一方で MOG14 は軽鎖がκ鎖であった。

```

Mouse      1:MACLWSFSWPSCFLSLLLLLLQLSCSYAGQFRVIGPGYPIRALVGDEAELPCRISPGKN 60
Rat        1:MAGVWSLSLPSCLLSLLLLL--QLSCSYAGQFRVIGPGHPIRALVGDEAELPCRISPGKN 58
Monkey     1:MASLSRPSLPSCLCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRQPIRALVGDEVELPCRISPGKN 60
Human      1:MASLSRPSLPSCLCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHPIRALVGDEVELPCRISPGKN 60
          ** . * .***. * ****. * * ***** ***** *****
          *

Mouse      61:ATGMEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTELLKETISEGKVTLRIQNVRF 120
Rat        59:ATGMEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTELLKESIGEGKVALRIQNVRF 118
Monkey     61:ATGMEVGWYRPPFSRVVHLYRNGRDQDGEQAPEYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIRNVRF 120
Human      61:ATGMEVGWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPEYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIRNVRF 120
          ***** ***** .*** .***** * .***.*** *****
          *

Mouse      121:DEGGYTCFFRDHSYQEEAAMELKVEDPFYWVNPVGLTIALVPTILLQVSVGLVFLFLQH 180
Rat        119:DEGGYTCFFRDHSYQEEAAVELKVEDPFYWINPGVLALIALVPMLLLQVSVGLVFLFLQH 178
Monkey     121:DEGGFTCFFRDHSYQEEAAIELKVEDPFYWVSPAVLVLLAVLPVLLQITVGLVFLCLQY 180
Human      121:DEGGFTCFFRDHSYQEEAAMELKVEDPFYWVSPGVLVLLAVLPVLLQITVGLIFLCLQY 180
          **** ***** ***** .*** * * * .*** ** .*** **
          *

Mouse      181:RLRGKLRAEVENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALIICYNWLHRRLAGQFL 240
Rat        179:RLRGKLRAEVENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALIICYNWLHRRLAGQFL 238
Monkey     181:RLRGKLRAEIENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALIICYNWLHRRLAGQFL 240
Human      181:RLRGKLRAEIENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALIICYNWLHRRLAGQFL 240
          ***** *****
          *

Mouse      241:EELRNPF 247
Rat        239:EELRNPF 245
Monkey     241:EELRNPF 247
Human      241:EELRNPF 247
          *****
          *

```

図 2-1 MOG のマウス、ラット、サル、ヒトアミノ酸配列相同性

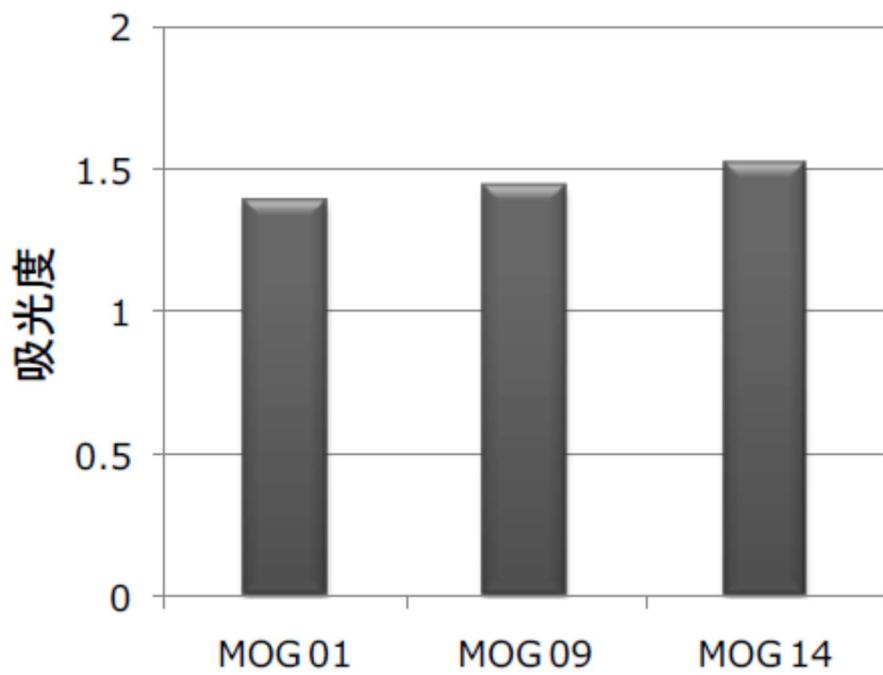


図 2-2 取得ファージクローンのラット MOG への反応性

取得したファージクローン MOG01、MOG09、MOG14 のラット MOG への反応性を ELISA で評価した。

MOG01 VH 塩基配列

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGCGCAGGATTATTGAAGCCTTCGGAGACCCT
TTCCCTCACCTGCGCTGTGTCTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGACCTG
GATCCGCCAGCGCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGAAATCAATCATC
GTGGAAGCACCGATTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAATAG
ACACGTCCAAGAGCCAGTTCTCCCTGAATTTGAAATCTGTGACCGCCGCGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCCGCCTGGGGGTCTTGTTATGATGGGAC
CTGCTACCCCGCTGAATACTTCCAATACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG
TCTCCTCA

MOG01 VL 塩基配列

CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATC
ACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCCGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCC
TGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTTATGATGTCAAT
AATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGGTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACAC
GGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCT
GCAGCTCATATAACAAGCAGTAGCACCCCTGTGGTATTCGGCGGTGGGACCAAG
CTGACCGTCCTA

配列表 2-1 MOG01 可変領域の塩基配列

MOG09 VH 塩基配列

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGTCTTCGGAGACCCT
GTCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTCACTCCATCAGCAGTGCTTACTACTGGGG
CTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTGGGAGTATTTATC
ATAGTGGGAACACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAG
TAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAGGCTGACCTCTGTGACCGCCGCA
GACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGCGTGGATATAGTGGCTACGATAG
CGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

MOG09 VL 塩基配列

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGT
CACCATCTCTTGTTCTGGAACCAGCTCCAACATCGGAATCAATAGTGTAAGTGG
GTATCAACAGCTCCCAGGAATGGCCCCAAACTCGTCATCTACAGTAGGGATCA
GCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCCAGTCTGGCACCTCAG
CCTCCCTGGCCATCAATGGCCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTGGTGTT
CAACATGGGATGACAGCCTGAATGGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTG
ACCGTCCTA

配列表 2-2 MOG09 可変領域の塩基配列

MOG14 VH 塩基配列

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGGTCTCCTGCCAGGCTTCTGGATACACGTTACCCGGCGACTATATTCCTG
GGTGGCAGAGGCCCTGGACAAGGGCTGGAATACTTGGGATGGATCAACCCTG
ACAGGGGTTTACATACTATACACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACC
CGGGACACGTCCAGCAACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
CGACACGGCCATGTATTACTGTACGAGAGAGAACCCTCGCGCGTACTTCTTTGA
CCTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

MOG14 VL 塩基配列

GAAATAGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCGGCAGCTACGTGACCT
GGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTACATCCA
ATAGGGCCATTGGCATCCCAGACAAGTTCAGTGGCGGTGGGTCTGGGAGAGAC
TTCCTCTCACCATCAACAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT
CAGCAGAGTGTTAGTTCTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAAT
CAA

配列表 2-3 MOG14 可変領域の塩基配列

MOG01 VH アミノ酸配列

QVQLQQSGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWTWIRQRPKGKLEWIGEINHR
GSTDYNPSLKSRVTMSIDTSKSFSLNLKSVTAADTAVYYCARAAWGSCYDGTC
YPAEYFQYWGQGTLVTVSS

MOG01 VL アミノ酸配列

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSRDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDYN
NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSSTPVVFGGGTKLT
VL

配列表 2-4 MOG01 可変領域のアミノ酸配列

MOG09 VH アミノ酸配列

QVQLQESGPGGLVKSSSETLSLTCAVSGHSSISSAYYWGWI
RQPPGKGLEWLGSIYHS
GNTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLRLTSVTAADTAVYYC
ARGRGYSGYDSGM
DVWGQGTTVTVSS

MOG09 VL アミノ酸配列

SYVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGTSSNIGINSVNWYQQL
PGMAPKLVIIYSRDQR
PSGVPDRFSGSQSGTSASLAINGLQSEDEADYWCSTWDD
SLNGWVFGGGTKLT
VL

配列表 2-5 MOG09 可変領域のアミノ酸配列

MOG14 VH アミノ酸配列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYTFTGDYIHWVRQAPGQGLEYLGWINP
DRGFTYYTQKFQGRVTMTRDTSSNTAYMELSSLRSDDTAMYYCTRENPRAYFFD
LWGQGTLVTVSS

MOG14 VL アミノ酸配列

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSIGSYVTWYQQKPGQAPRLLIYATSNRA
IGIPDKFSGGGSGRDFTLTINRLEPEDFAVYYCQQSVSSPYTFGQGTKVEIK

配列表 2-6 MOG14 可変領域のアミノ酸配列

【2-3 抗 MOG 抗体およびコントロール抗体発現ベクターの取得】

2-3-1 抗 MOG 抗体の発現ベクターの構築

ヒト IgG 型の抗 MOG 抗体を作製するために、取得したヒト抗体ファージライブラリ由来抗 MOG scFv 抗体の各可変領域のアミノ酸配列をコードする DNA 配列をヒト IgG 抗体定常領域のアミノ酸配列をコードするアミノ酸配列に組みこんだ各種抗 MOG 抗体の発現ベクターを以下に記載する方法で作製した。

ヒト IgG のラムダ鎖定常領域をコードする塩基配列を合成し、N5KG4PE ベクター(国際公開第 2002/088186 号公報に記載)の BglII-EcoRI サイトに挿入し、N5LG4PE ベクターを作製した。MOG01 抗体および MOG09 抗体の各 VH、VL のアミノ酸配列をコードする塩基配列を N5LG4PE に挿入した発現ベクターを、それぞれ N5LG4PE_MOG01、N5LG4PE_MOG09 と命名した。また、MOG14 抗体の VH、VL のアミノ酸配列をコードする塩基配列を N5KG4PE ベクターに挿入した発現ベクターを N5KG4PE_MOG14 と命名した。

2-3-2 抗 Avermectin 抗体の発現ベクター-N5LG4PE_AVM

ネガティブコントロール抗体として、すでに取得されていたキメラ抗 Avermectin(AVM)抗体を用いた。抗 AVM 抗体の VH および VH のアミノ酸配列、塩基配列を配列表 2-7、2-8 に示す。発現ベクターは上記と同様の方法で作製した。AVM 抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする塩基配列を N5LG4PE に挿入した発現ベクターを、N5LG4PE__AVM と命名した。

2-3-3 抗ラットトランスフェリン受容体抗体 OX26 抗体の発現ベクター

N5KG4PE(R409K)_OX26

抗ラットトランスフェリン受容体抗体のポジティブコントロール抗体として参考文献[47]に記載された抗ラットトランスフェリン受容体抗体 OX26 抗体を作製した。OX26 抗体の VH、VL のアミノ酸配列をコードする塩基配列を N5KG4PE(R409K)(国際公開第 2002/088186 号公報に記載)に挿入した発現ベクターを、上記同様の方法で作製し、N5KG4PE(R409K)_OX26 と命名した。OX-26 抗体の VH および VH のアミノ酸配列、塩基配列を配列表 2-9、2-10 に示す。

AVM VH 塩基配列

GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGATCCCT
GAAACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCACTTTCAGTAACTATGCCATGGCTTG
GGTCCGCCGGGCTCCAACGAAGGGTCTGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAATG
GTGGTGGTAACACTTACTATCGCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCA
GAGATGATGCAAAAACACCCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAG
GACACGGCCACTTATTACTGTGCAAGACACGGGAATTATATATATTATGGGTCC
TTCTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA

AVM VL 塩基配列

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGG
GCCACCATCTCATAACAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTAT
ATGCACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTT
GTATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
GACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT
ATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGG
AAATAA

配列表 2-7 抗 AVM 抗体可変領域の塩基配列

AVM VH アミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSNYAMAWVRRAPTKGLEWVASISNG
GGNTYYRDSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMDSLRS EDTATYYCARHGNYIYYGSFF
DYWGQGVMVTVSS

AVM 抗体 VL アミノ酸配列

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQKPGQPPRLLIYLV
SNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPSWK

配列表 2-8 抗 AVM 抗体可変領域のアミノ酸配列

OX-26 VH 塩基配列

CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGGGCTGCGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAAT
GAGGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACTCCTTCACCACCTACTGGATGAACTG
GGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTTGATTGGCATGATTCATCCTT
CCGATAGTGAAGTTAGGTTAAATCAGAAATTCAAGGACAAGGCCACATTGACTG
TTGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCCGACATCTGAGG
ACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTCGGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGC
ACCACTCTCACAGTCTCCTCC

OX-26 VL 塩基配列

GATATCGTGATCACCCAATCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGCGACACA
ATTCTCATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAATGTTTGGTTAAGTTGGTTC
CAGCAGAAACCAGGAAATGCTCCTAAACTGTTGATCTATAAGGCTTCCAACCTG
CACACAGGCGTCCCATCAAGATTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGGTTTCAC
ATTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGACATTGCCACTTACTACTGTCAACA
GGGTCAAAGTTATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

配列表 2-9 抗 TfR 抗体 OX-26 可変領域の塩基配列

OX-26 VH アミノ酸配列

EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTTYDINWVRQATGQGLEWMGWMN
PNSGYTG YAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCARTNWESWYF
DLWGRGTLVTVSS

OX-26 VL アミノ酸配列

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQR SNWPLTFGPGTKVDIK

配列表 2-10 抗 TfR 抗体 OX-26 可変領域のアミノ酸配列

【2-4 取得抗体の in vitro 評価】

2-4-1 フローサイトメーターによる抗 MOG 抗体の MOG に対する結合性の評価

抗 MOG 抗体 MOG01 抗体、MOG09 抗体、MOG14 抗体の MOG への結合を以下の手順に従い fluorescence activated cell sorting (FACS)法により評価した。

各種膜型 MOG 抗原発現ベクターを FreeStyle 293 Expression System(Thermo Fisher Scientific 社製)を用いて浮遊性 293 細胞に導入して培養し、一過性発現系で膜型抗原を発現させた。上記の細胞を用いて、以下に記載する方法で抗 MOG 抗体の反応性を解析した。rMOG/HEK293F、mMOG/HEK293F、cMOG/HEK293 および hMOG/HEK293 細胞をそれぞれ、 5×10^5 cells/mL の濃度で 0.1% Na₃N₃、1% FBS 含有 PBS の Staining Buffer(SB)に懸濁し、96 穴丸底プレート(ベクトンディッキンソン社製)に分注した。遠心分離(2000rpm、4℃、2 分間)の後、上清を除去し、ペレットへ 10 μ g/mL の各抗体を加えて懸濁した後、氷温下で 30 分間静置した。さらに遠心分離(2000rpm、4℃、2 分間)して上清を除去し、ペレットを SB で洗浄後に、1 μ g/mL の RPE 蛍光標識ヤギ抗ヒト抗体(Southern Bioblot 社製)を加え、氷温下 30 分間インキュベートした。SB で洗浄後、SB に懸濁し、フローサイトメーター FACS CANTO II、(ベクトンディッキンソン社製)で各細胞の蛍光強度を測定した。得られた結果を図 2-3 に示す。なお、ネガティブコントロールとして、抗 AVM 抗体を用いた。

図 2-3 に示すように、rMOG/HEK293F 細胞及び mMOG/HEK293F 細胞に対して、抗 MOG 抗体である MOG01 抗体、MOG09 抗体、MOG14 抗体はいずれも結合活性を示した。また、MOG01 抗体および MOG14 抗体は、いずれも cMOG/HEK293 細胞及び hMOG/HEK293 細胞にも結合活性を示した。

よって、抗 MOG ヒト IgG 抗体 MOG01 および MOG14 は、ラット、マウス MOG だけでなく、カニクイザルおよびヒト MOG の全てを認識して、結合することが明らかになった。

2-4-2 表面プラズモン共鳴検出による抗 MOG 抗体の MOG に対する結合性の評価

抗 MOG 抗体 MOG01 抗体、MOG09 抗体、MOG14 抗体のラット MOG へのアフィニティーを Biacore T-100(GE Healthcare)を用いて測定した。CM5 センサーチップ上に Human antibody Capture キットを用いて各抗体を固定化し、rMOG-GST をアナライトとして結合能を評価した。得られたセンサグラムについて BIAevaluation software により解析を行うことで解離定数(KD 値)を算出した。得られた結果を表 2-1 に示す。

各抗 MOG 抗体の解離定数(KD 値)は $2.1 \times 10^{-11}(\text{M}) \sim 4.0 \times 10^{-8}(\text{M})$ であり、いずれの抗体も良好なアフィニティーを示すことが明らかになった。MOG09 抗体では、解離速度定数 k_d が機器測定範囲外となり、KD 値が一意に決定できていない。

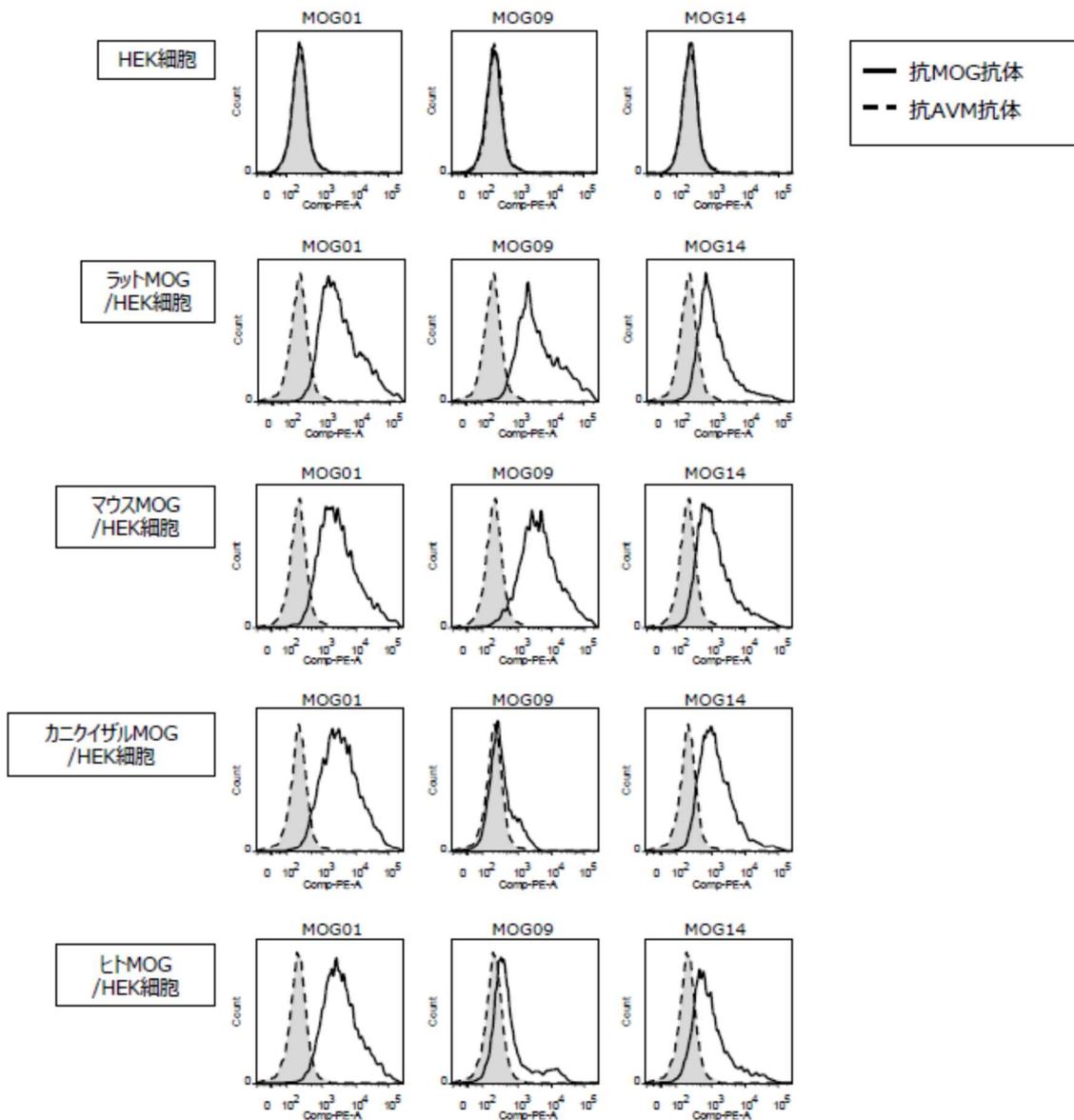


図 2-3 取得した抗 MOG 抗体の種交差性

MOG01 抗体、MOG09 抗体、MOG14 抗体のラット、マウス、サルおよびヒト MOG 発現細胞への反応性を FCM にて評価した。

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
MOG01	1.4E+05	9.5E-04	6.6E-09
MOG09	9.0E+03	1.9E-07	2.1E-11
MOG14	4.7E+03	1.9E-04	4.0E-08

表 2-1 取得した抗 MOG 抗体の MOG 抗原への反応性

【2-5 抗 MOG 抗体の追加取得】

2-5-1 FLAG-Fc が結合した可溶性ヒト MOG 抗原および可溶性マウス MOG 抗原の細胞外ドメインタンパク質の作製

ヒト MOG とマウス MOG の可溶性抗原として、C 末端に FLAG-Fc が付加された MOG の細胞外ドメインタンパク質を発現するプラスミドベクター-INPEP4_hMOG-FLAG-Fc と INPEP4_mMOG-FLAG-Fc を作製した。FLAG-Fc が結合した MOG の細胞外ドメインタンパク質は、HEK293 で一過性発現させ、PeoteinA カラムで精製して取得した。

2-5-2 GST が結合した MOG の細胞外ドメインタンパク質の作製

ヒト MOG とマウス MOG の可溶性抗原として、C 末端に GST が付加された MOG の細胞外ドメインタンパク質を発現するプラスミドベクター-N5_hMOG-GST と N5_mMOG-GST を作製した。GST が結合した MOG の細胞外ドメインタンパク質は、HEK293 一過性発現させ、アフィニティカラムにて精製して取得した。

2-5-3 ヒト抗体産生マウスからの抗 MOG 抗体の取得

ヒト抗体産生マウス(参考文献[48]および[49])に、hMOG-GST と mMOG-GST を百日咳ワクチンとアラムゲルと混合して、腹腔内または皮内に投与した。

初回免疫以降、hMOG-GST と mMOG-GST を 3 回免疫した。最終免疫から 4 日後に、腹腔内投与を行った個体から解剖して脾臓を採材し、赤血球除去試薬(SIGMA 社製)にて赤血球を除去後、CELLBANKER 1(日本全薬工業株式会社製)にて凍結した。皮内投与を行った個体からは、解剖により腋下リンパ節を採材し、赤血球除去試薬にて赤血球を除去後、CELLBANKER 1 にて凍結した。得られた脾臓細胞と腋下リンパ節の細胞から、RNeasy Plus Mini kit(QIAGEN 社製)を用いて RNA を抽出し、SMARTer RACE cDNA 増幅キット(Clontech 社製)にて cDNA を合成した。合成した cDNA を用いてヒト抗体産生マウス由来ファージライブラリを作製した。このヒト抗体産生マウス由来ファージライブラリを用いて、ファージディスプレイ法により抗ヒト MOG モノクローナル抗体を取得した。ファージディスプレイ法及びクローニング ELISA は、hMOG-FLAG_Fc と mMOG-FLAG_Fc を用いて行った。

hMOG-FLAG_Fc、mMOG-FLAG_Fc および hMOG/Expi293F 細胞に結合したクローンについて配列解析を行い、MOG301 抗体、MOG303 抗体、MOG307 抗体、

MOG310 抗体、MOG312 抗体、MOG326 抗体、MOG329 抗体、MOG446 抗体、MOG456 抗体および MOG473 抗体を取得した。各種抗 MOG 抗体の VH または VL をコードする塩基配列を配列表 2-11 から 2-20 に示す。

また、MOG301 抗体には相同性 91~93%の類似配列クローン(MOG426、MOG428)、MOG03 抗体には相同性 85~95%の類似配列クローン(MOG313、MOG314、MOG315、MOG331、MOG357、MOG476)、MOG307 抗体には相同性 97~99%の類似配列クローン(MOG323、MOG341、MOG354、MOG355)、MOG310 抗体には相同性 85~98%の類似配列クローン(MOG308、MOG316、MOG319、MOG320、MOG338、MOG352、MOG359、MOG478)、MOG329 抗体には相同性 85%の類似配列クローン(MOG470)、MOG456 抗体には相同性 84%の類似配列クローン(MOG418)がファージディスプレイ法により得られている。これらの類似クローンは hMOG-FLAG_Fc、mMOG-FLAG_Fc および hMOG/Expi293F 細胞に結合することが確認できている。類似クローンのアミノ酸配列の比較を図 2-4 から図 2-9 に示す。

2-5-4 抗 MOG 抗体の作製

ファージミドベクター-pCANTAB_MOG01 を鋳型として、PCR により scFv 領域の遺伝子断片を増幅した。重鎖定常領域の合成遺伝子を鋳型として、PCR により Hinge-CH2-CH3 領域の遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片を N5KG4PE ベクター(WO 国際公開第 2002/088186 号に記載)に挿入し、N5-MOG01 scFv-hG4PE ベクターを作製した。各 MOG 抗体ファージミドベクターを鋳型として、PCR により scFv 領域の遺伝子断片を増幅した。重鎖定常領域の合成遺伝子を鋳型として、PCR により Hinge-CH2-CH3 領域の遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片を pCI ベクター(Promega 社製)に挿入し各 MOG 抗体発現ベクターを作製した。

作製した抗 MOG 抗体の発現ベクターを HEK293 にて発現させ、PeoteinA カラムにて精製しモノクローナル抗体を取得した。

2-5-5 フローサイトメーターによる抗 MOG 抗体の MOG に対する結合性の評価

上記で得た抗 MOG 抗体の MOG 発現細胞への結合を評価した。結果を図 2-10 に示す。図 2-10 に示されるように、各抗体はいずれも hMOG/Expi293F 細胞および mMOG/Expi293F 細胞に結合活性を示した。

2-5-6 表面プラズモン共鳴検出による抗 MOG 抗体の MOG に対する結合性の評価

上記で得た各 MOG 抗体のヒト MOG およびマウス MOG への結合を Biacore で評価した。アナライトには、hMOG-GST と mMOG-GST を用いた。ヒト MOG への結合性評価の結果を表 2-2 に、マウス MOG への結合性評価の結果を表 2-3 に示す。表 2-2、表 2-3 に示されよう取得された抗体は良好な抗原結合能を示し、またほとんどのクローンはヒトとマウスと同程度の結合活性を示した。

MOG301 VH 塩基配列

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACAGCTTTACCAGCTATGGTATCAACTG
GGTGCAGACAGGCCCCAGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTT
ACAATGGTTACACAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACC
AGAGACACATCCACGCGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGA
CGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTACGATATTTTGACTGGTTATTC
CGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

MOG301 VL 塩基配列

GAAATAGTGATGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCT
GGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA
GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
TTCCTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT
CAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAAT
CAA

配列表 2-11 MOG301 可変領域の塩基配列

MOG303 VH 塩基配列

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGGGCT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTCTCAGCTGTTAGTGGT
AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC
CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGAGGATACGATATTTTGACTGGTT
ACTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCACGGTCACTGTCTCCTCA

MOG303 VL 塩基配列

GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA
GTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTG
GAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC
TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACA
GTTTAATAGTTACCCATTCACCTTCGGCCCTGGGACACGACTGGAGATTA

配列表 2-12 MOG303 可変領域の塩基配列

MOG307 VH 塩基配列

CGGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCT
CACGCTGACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAGTGGGTG
TGGGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACTCATT
TTTTGGGATGATGATAGTCACTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATC
ACCAAGGACACCTCCAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCC
TGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGGTATTACTTTGGTTCGGGGAGTTA
TTTCCCTAGCTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGT
CTCCTCA

MOG307 VL 塩基配列

GAAATAGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGT
ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACA
GGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC
ACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG
CAGCGTAGCAACTGGCCTCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAA
A

配列表 2-13 MOG307 可変領域の塩基配列

MOG310 VH 塩基配列

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGATATGCTATCAGCT
GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCT
ATGTTTAGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACC
GCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTGGGCAGTGGCTGGTATGGGCT
TTAACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

MOG310 VL 塩基配列

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCT
GGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA
GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
TTCCTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT
CAGCAGTATGGTAGCTCACCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAAGTGGATAT
CAA

配列表 2-14 MOG310 可変領域の塩基配列

MOG312 VH 塩基配列

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCT
GTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTAAGTGGTTACTACTGGAGCTG
GATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGATATCACTCATA
GTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTT
GACACGTCCAAAACCAGTTCTCCCTGAACCTGAACTCTGTGACCGCCGCGGA
CACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAGGGGGATAGGAGCTGCTGTCTTTGACC
TCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

MOG312 VL 塩基配列

GAAATAGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCT
GGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA
GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
TTCCTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT
CAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT
CAA

配列表 2-15 MOG312 可変領域の塩基配列

MOG326 VH 塩基配列

GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCACTG
GGTGCAGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCTA
GTGGTGGTAGCACAAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACC
AGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATTACGATATTTTGACTGGTTC
CTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

MOG326 VL 塩基配列

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA
GTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGTCTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTG
GAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC
TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACA
GTTTAATAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAAGTGGATATCAAA

配列表 2-16 MOG326 可変領域の塩基配列

MOG329 VH 塩基配列

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCCTTTCGCAACTATGCCATGAACT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGT
AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC
CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACTACGGTGGTATCTCCCCCTTTG
ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

MOG329 VL 塩基配列

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA
GTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTG
GAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC
TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACA
GTTTAATAGTTACCCTCACACTTTTGGCCAGGGGACCAAAGTGGATATCAAA

配列表 2-17 MOG329 可変領域の塩基配列

MOG446 VH 塩基配列

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGGCATGAGCT
GGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTAATATTAATTGG
AATGGTGATAGCACAGGTTATGTAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCC
AGAGACAACGCCAAGAAGCTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGA
GGACACGGCCTTGTATTACTGTGCGAGAGCGAGGACCTATTACTATGTTTCGGG
GAGGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

MOG446 VL 塩基配列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA
GTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTG
GAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC
TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACA
GTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

配列表 2-18 MOG446 可変領域の塩基配列

MOG456 VH 塩基配列

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGCACT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTGGTAGT
AGGAGTCGTTACATATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCC
AGAGACAACGCCAAGAAGCTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGTATTACGATATTTTACTGGTTC
TCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

MOG456 VL 塩基配列

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA
GTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTG
GAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTAC
TCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACA
GTTTAATAGTTACCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

配列表 2-19 MOG456 可変領域の塩基配列

MOG473 VH 塩基配列

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGCACT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCGGACATTAGTACT
AATAGTAGAACCAGAACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCC
AGAGACAATGCCAAGAACTCAGTGTATCTGCAAATGCACAGCCTGAGGGACGA
GGACACGGCTGTGTACTACTGTGCGAGAGACTACGGTGGTATCTATTACTTTGA
CTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

MOG473 VL 塩基配列

GAAATAGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGT
ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACA
GGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC
ACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAG
CAGCGTAGCAACTGGCCTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT
CAAA

配列表 2-20 MOG473 可変領域の塩基配列

MOG#426 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFNSYGINWVRQAPGQGLEWMGWI SA YTGKTSY
 MOG#428 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFNSYGINWVRQAPGQGLEWMGWI SA YTGKTSY
 MOG#301 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFNSYGINWVRQAPGQGLEWMGWI SA YNGYTNV

MOG#426 AQKVQGRVTMTTDRSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCAREYDILTGYSDAFDTWGQGTMTVT
 MOG#428 AQKVQGRVTMTTDRSTSTAYMELRSLRSDDTAMYYCAREYDILTGYSDAFDTWGQGTMTVT
 MOG#301 AQKLVGRVTMTTRDTSRTAYMELRSLRSDDTAMYYCAREYDILTGYSDAFDTWGQGTLVV

MOG#426 VSSGGGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSS-YLAWYQQKPG
 MOG#428 VSSGGGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSS-YLAWYQQKPG
 MOG#301 VSSGGGGSGGRASGGGGSEIVMTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSS-YLAWYQQKPG

MOG#426 QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGDFTLTISSLLEPEDFAVYYCQQRGNWPLTFGGG
 MOG#428 QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPRTFGQG
 MOG#301 QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPRTFGGG

MOG#426 TKLEIK
 MOG#428 TKLEIK
 MOG#301 TKVEIK

図 2-4 抗 MOG301 とその類似クローン

MOG#303 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMGWVVRQAPGKGL EWVSAI S G SGGSTYY
 MOG#476 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVVRQAPGKGL EWVSAI S Y SGRSTYY
 MOG#314 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGL EWVSAI S GRGSSTYY
 MOG#315 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMS WVRQAPGKGL EWVSAI S GSGVSTYY
 MOG#313 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGL EWVSAI S G SGGSTYY
 MOG#357 EVQLVEIGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGL EWVSDI NH SGGSTYY
 MOG#331 EVQLVESGGGLVYPPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGL EWVSAI S G SGGSTYY

MOG#303 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGYDILTG YFFDYWGQGTITVTV
 MOG#476 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLYDILTG GFDYW GQGTITVTV
 MOG#314 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGYDILTGSFFDYWGQGTITVTV
 MOG#315 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAYYDILTG NFDYWGQGTITVTV
 MOG#313 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAYYDILTGS LFDYWGQGTITVTV
 MOG#357 ADSVKGRFTISRDN SKHTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDYDILTGSFFDYWGQGTITVTV
 MOG#331 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAYYDILTGSFFDYWGQGTITVTV

MOG#303 SSGGGSGGRASGGGSAIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIS SALAWYQQKPGKA
 MOG#476 SSGGGSGGRASGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIS SALAWYQQKPGKA
 MOG#314 SSGGGSGGRASGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIS SALAWYQQKPGKA
 MOG#315 SSGGGSGGRASGGGSAIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIS SALAWYQQKPGKA
 MOG#313 SSGGGSGGRASGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIS SALAWYQQKPGKA
 MOG#357 SSGGGSGGRASGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIS SALAWYQQKPGKA
 MOG#331 SSGGGSGGRASGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQA

MOG#303 PKLLIYDASLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYFNSYPFTFGGTR
 MOG#476 PKLLIYDASLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYFNSYPSTFGGTR
 MOG#314 PKLLIYDASLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYFNSYPYTFGGTK
 MOG#315 PKLLIYDASLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYFNSYPLTFGGTK
 MOG#313 PKLLIYDASLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYFNSYPLTFGGTK
 MOG#357 PKLLIYDASLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYFNSYPLTFGGTK
 MOG#331 PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYFGSSPLTFGGTK

MOG#303 LEIK
 MOG#476 LEIK
 MOG#314 LEIK
 MOG#315 VEIK
 MOG#313 VEIK
 MOG#357 VEIK
 MOG#331 LEIK

図 2-5 抗 MOG303 とその類似クローン

MOG#307 R V T L R E S G P T L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G V G V G W I R Q P P G K A L E W L A L I F W D D D S H
 MOG#323 R I T L R E S G P T L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G V G V G W I R Q P P G K A L E W L A L I F W D D D S H
 MOG#341 R I T L K E S G P T L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G V G V G W I R Q P P G K A L E W L A L I F W D D D K H
 MOG#354 R I T L R E S G P T L V K P T Q T L T L T C T S S G L S L S T S G V G V G W I R Q P P G K A L E W L A L I F W D D D T H
 MOG#355 R I T L R E S G P T L V K P T Q T L T L T C T S S G L S L S T S G V G V G W I R Q P P G K A L E W L A L I F W D D D T H

MOG#307 Y S P S L K S R L T I T K D T S K N Q V V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R Y Y F G S G S Y F P S Y W Y F D L W G R G
 MOG#323 Y S P S L K S R L T I T K D T S K N Q V V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R Y Y F G S G S Y F P S Y W Y F D L W G R G
 MOG#341 Y S P S L K S R L T I T K D T S K N Q V V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R Y Y F G S G S Y S P S Y W Y F D L W G R G
 MOG#354 Y S P S L K S R L T I T K D T S K N Q V V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R Y Y F G S G S Y F P S Y W Y F D L W G R G
 MOG#355 Y S P S L K S R L T I T K D T S K N Q V V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R Y Y F G S G S Y F P S Y W Y F D L W G R G

MOG#307 T L V T V S S G G G G S G G R A S G G G G S E I V M T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q
 MOG#323 T L V T V S S G G G G S G G R A S G G G G S E I V M T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q
 MOG#341 T L V T V S S G G G G S G G R A S G G G G S E I V T I T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q
 MOG#354 T M V T V S S G G G G S G G R A S G G G G S E I V M T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q
 MOG#355 T L V T V S S G G G G S G G R A S G G G G S E I V T I T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q

MOG#307 K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W P P T F
 MOG#323 K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W P P T F
 MOG#341 K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W P P T F
 MOG#354 K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W P L T F
 MOG#355 K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W P L T F

MOG#307 G Q G T K V E I K
 MOG#323 G G G T K L E I K
 MOG#341 G G G T K V E I K
 MOG#354 G G G T K V E I K
 MOG#355 G G G T K L E I K

図 2-6 抗 MOG307 とその類似クローン

MOG#308 EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSRYAI SWVRQAPGQGL EWMGG I I PMFSTINY
 MOG#338 QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSRYAI SWVRQAPGQGL EWMGG I I PMFNTANY
 MOG#319 QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSRYAI SWVRQAPGQGL EWMGG I I PMFSTANY
 MOG#320 QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSRYAI NWVRQAPGQGL EWMGG I I PMFSTINY
 MOG#310 QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSRYAI SWVRQAPGQGL EWMGG I I PMFSTANY
 MOG#359 EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSRYAI SWVRQAPGQGL EWMGG I I PMFNTANY
 MOG#478 EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSRYAI SWVRQAPGQGL EWMGG I I PMFATANY
 MOG#316 EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSRYAI SWVRQAPGQGL EWMGG I I PMFNTANY
 MOG#352 EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSRYAI NWVRQAPGQGL EWMGG I I PMFSTINY

MOG#308 AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDWAVAGMGF AYWGQGT LVTVSS
 MOG#338 AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDWAVAGMGF DPWGQGT LVTVSS
 MOG#319 AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSDYAVYYCARDWAVAGMGF NYWGQGT LVTVSS
 MOG#320 AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDWAVAGMGF DYWGQGT LVTVSS
 MOG#310 AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDWAVAGMGF NYWGQGT LVTVSS
 MOG#359 AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDWAVAGMGF NYWGQGT LVTVSS
 MOG#478 AQKFQGRVTITADETSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDWAVAGMGF AHWGQGT LVTVSS
 MOG#316 AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDWAVAGMGF NYWGQGT LVTVSS
 MOG#352 AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDWAVAGMGF DYWGQGT LVTVSS

MOG#308 GGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRA SQSVSS - YLAWYQQKPGQAP
 MOG#338 GGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRA SQSVSS - YLAWYQQKPGQAP
 MOG#319 GGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRA SQSVSS YLAWYQQKPGQAP
 MOG#320 GGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRA SQSVSS YLAWYQQKPGQAP
 MOG#310 GGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRA SQSVSS YLAWYQQKPGQAP
 MOG#359 GGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRA SQSVSS YLAWYQQKPGQAP
 MOG#478 GGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRA SQSVSS YLAWYQQKPGQAP
 MOG#316 GGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRA SQSVSS YLAWYQQKPGQAP
 MOG#352 GGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRA SQSVSS YLAWYQQKPGQAP

MOG#308 RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQR SNWP LTFGGGTKV
 MOG#338 RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQR NNWP LTFGGGTKL
 MOG#319 RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSP LTFGGGTKV
 MOG#320 RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSP LTFGGGTKV
 MOG#310 RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSP LTFGGGTKV
 MOG#359 RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSP LTFGGGTKL
 MOG#478 RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSP LTFGGGTRL
 MOG#316 RLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQY NSYP LTFGGGTRL
 MOG#352 KSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQY NSYP LTFGGGTKV

MOG#308 DIK
 MOG#338 EIK
 MOG#319 EIK
 MOG#320 DIK
 MOG#310 DIK
 MOG#359 EIK
 MOG#478 EIK
 MOG#316 EIK
 MOG#352 DIK

図 2-7 抗 MOG310 とその類似クローン

MOG#329 QVQLVE SGGGLVQPGGS LRLSCAASGFAFRNYAMNWRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY
 MOG#470 QVQLVE SGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFS SYAMNWRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY

 MOG#329 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYGGISPFDYWGQGLVTVSSG
 MOG#470 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYGGISPFDYWGQGLVTVSSG

 MOG#329 GGGSGGRASGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDVTTITCRASQGISALAWYQKPKKAPKL
 MOG#470 GGGSGGRASGGGSEIVMTQSPA TLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPKQAPRL

 MOG#329 LIYDASSLESGLPSSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSTPHTFGGTRKVDI
 MOG#470 LIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYCCQQYGSSTPYTFGGTRLEI

 MOG#329 K
 MOG#470 K

図 2-8 抗 MOG329 とその類似クローン

MOG#418 QVYLVSQGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMHWVRQAPGKGLEWVSSISSHSSYISY
 MOG#456 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMHWVRQAPGKGLEWVSSISGRSRYIYY

MOG#418 ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGYDILTGSLFDYWGGTLVTV
 MOG#456 ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGYDILTGSLFDYWGGTLVTV

MOG#418 SSGGGGSGGRASGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA
 MOG#456 SSGGGGSGGRASGGGSDIVMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISALAWYQQKPGKA

MOG#418 PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAMYYCQQYGSDFTFGPGTK
 MOG#456 PKLLIYDASLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFATYYCQQENSYPWTFGQGTK

MOG#418 VDIK
 MOG#456 VEIK

図 2-9 抗 MOG456 とその類似クローン



図 2-10 抗 MOG 抗体のヒトおよびマウス MOG 発現細胞への結合活性評価

MOG301 抗体、MOG303 抗体、MOG307 抗体、MOG310 抗体、MOG312 抗体、MOG326 抗体、MOG329 抗体、MOG446 抗体、MOG456 抗体および MOG473 抗体のヒトおよびマウス MOG 発現細胞への結合を FCM で評価した。

ヒトMOGへの反応性

抗体名	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
MOG01 scFv-hG4PE	4.1E+06	1.5E-02	3.6E-09
MOG301 scFv-hG4PE(R409K)	1.1E+06	1.8E-04	1.8E-10
MOG303 scFv-hG4PE(R409K)	9.1E+05	1.6E-04	1.7E-10
MOG307 scFv-hG4PE(R409K)	1.6E+05	1.4E-04	8.9E-10
MOG329 scFv-hG4PE(R409K)	1.6E+06	2.1E-04	1.3E-10
MOG446 scFv-hG4PE(R409K)	1.9E+05	1.7E-04	8.7E-10
MOG456 scFv-hG4PE(R409K)	1.0E+06	2.6E-04	2.5E-10
MOG473 scFv-hG4PE(R409K)	1.5E+06	1.5E-04	1.0E-10

MOG01はkaが測定範囲外

表 2-2 抗 MOG 抗体のヒト MOG への結合活性評価

マウスMOGへの反応性

抗体名	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
MOG01 scFv-hG4PE	5.9E+06	4.0E-02	6.9E-09
MOG301 scFv-hG4PE(R409K)	4.9E+05	2.1E-04	4.3E-10
MOG303 scFv-hG4PE(R409K)	1.1E+06	2.1E-04	1.9E-10
MOG307 scFv-hG4PE(R409K)	1.6E+05	1.5E-04	9.6E-10
MOG329 scFv-hG4PE(R409K)	1.1E+06	2.3E-04	2.2E-10
MOG446 scFv-hG4PE(R409K)	1.2E+05	3.7E-04	3.2E-09
MOG456 scFv-hG4PE(R409K)	7.6E+05	3.9E-04	5.2E-10
MOG473 scFv-hG4PE(R409K)	7.6E+05	3.7E-04	4.9E-10

表 2-3 抗 MOG 抗体のマウス MOG への結合活性評価

第 3 章 抗 MOG 抗体の脳内抗体濃度上昇効果と薬剤フォーマットへの応用

第 3 章は、取得した抗 MOG 抗体の脳内貯留機能について、マウスおよびラットを用いて検討を行った。その結果、血中投与された抗 MOG 抗体は、血中濃度の急速な低下を伴わずに、脳内での高い抗体濃度を長期にわたって維持できることが明らかとなった。さらに、取得した MOG 抗体と抗体医薬品や酵素との融合抗体を作製し、これらの薬剤フォーマットにおいても脳内濃度を高められることを明らかにした。前半で抗 MOG 抗体の *in vivo* 評価を、後半で薬剤フォーマットでの脳内抗体濃度上昇効果評価をまとめる。

【3-1 抗 MOG 抗体のラット脳移行性評価】

ラットに抗体を尾静脈(i.v.)投与後、尾静脈採血を行った。採血と同じ日に、ペントバルビタール麻酔下にて全身灌流後、脳組織を回収し、その重さを測定した。また、回収した脳組織にバッファー溶液を加えホモジナイズし、遠心分離後、上清に溶出された抗体溶液を回収した。その容量を測定するとともに抗体濃度を AlphaLISA (PerkinElmer 社製) により測定し、単位脳重量あたりの抗体量を算出した。

抗 MOG 抗体 MOG01 抗体、MOG14 抗体、ならびにネガティブコントロールの抗 AVM 抗体について、1mg/kg 体重で抗体を投与して 4 日後の血清中の抗体濃度および脳組織中の単位脳重量あたりの抗体量を図 3-1(A)および(B)に示す。

図 3-1 (A)および(B)に示すように、抗 MOG 抗体のいずれの抗体についても、ネガティブコントロール(AVM)と比較して、血清中の抗体濃度は変化しなかったが、脳内の抗体量が 5-10 倍に増加することが確認された。

【3-2 抗 MOG 抗体のラット脳移行性の TfR 抗体との比較】

抗 MOG 抗体 MOG01 抗体、抗トランスフェリン受容体抗体 OX26 抗体、およびネガティブコントロールの抗 AVM 抗体について、5mg/kg 体重の量で抗体を投与して 4 日後及び 10 日後の血清中の抗体濃度および脳組織中の単位脳重量あたりの抗体量を図 3-2(A)および(B)に示す。

図 3-2(A)に示されるように、OX26 抗体では、4 日後の血清中の抗体濃度が評価した抗体の中で最も低く、10 日後には検出感度以下となり、抗体の血中動態が悪かった。抗 MOG 抗体である MOG01 抗体では、投与 4 日後、10 日後の血清中の抗体濃度に大き

な変化はなく、ネガティブコントロールと同程度の抗体濃度であった。この結果から、抗 TfR 抗体はこれまでの報告の通り短い血中半減期を示したのに対して、MOG01 抗体の血中半減期はネガティブコントロールと同程度であり、良好な血中動態を示した。

また、図 3-2(B)に示されるように、脳内の抗体量については、ネガティブコントロールは投与から 4 日後の時点で評価した抗体の中で最も抗体量が低く、10 日後もわずかではあるがさらに抗体量が減少した。

OX26 抗体は、投与 4 日後においては高い脳内抗体濃度を示したが、10 日後は急速に抗体量が減少し、投与 10 日後の抗体量はネガティブコントロール以下の値を示した。一方で MOG01 抗体では、投与 4 日後から 10 日後の間に抗体量が増加し、投与 4 日後の抗体量はネガティブコントロールの約 2.5 倍、投与 10 日後の抗体量はネガティブコントロールの約 10 倍となった。

以上により、抗 MOG 抗体 MOG01 抗体は、血清中ではネガティブコントロールと同程度の良好な抗体動態を示しながらも、脳内の抗体量を投与 4 日後には、ネガティブコントロールの約 2.5 倍に、投与 10 日後には約 10 倍に高められることが示された。一方で抗 TfR 抗体 OX-26 は血中動態が悪く、その影響と思われるが 4 日後では高い脳内抗体濃度を示す一方で速やかに抗体濃度が低下し、10 日後ではネガティブコントロール以下の濃度まで低減することが示された。

【3-3 抗 MOG 抗体 MOG01 のマウス脳移行性評価】

評価動物をマウスに変更し、抗体を 5 mg/kg で尾静脈(i.v.)投与して数日後、尾静脈採血を行った。採血と同じ日に、ペントバルビタール麻酔下にて全身灌流後、脳組織を回収し、その重さを測定した。また、回収した脳組織にバッファー溶液を加えホモジナイズし、遠心分離後、上清に溶出された抗体溶液を回収した。その容量を測定するとともに抗体濃度を AlphaLISA (PerkinElmer 社製) により測定し、単位脳重量あたりの抗体量を算出した。

抗 MOG01 抗体ならびにネガティブコントロールの抗 AVM 抗体について、抗体を投与して 3、6、10、14、21、28 日後の血清中の抗体濃度および脳組織中の単位脳重量あたりの抗体量をそれぞれ図 3-3(A)および(B)に示した。

図 3-3 (A)に示されるように、抗 MOG01 抗体は、ネガティブコントロールと比較して、14 日目までは血清中の抗体濃度に差は観察されなかった。一方で 14 日目以降、28 日目で比較すると抗 MOG 抗体はコントロールと比較して低下傾向を示した。

図 3-3(B)に示すように、抗 MOG 抗体は 3 日目から脳内抗体濃度が上昇し、6 日後から 10 日後にピークに達し、その後 28 日間にわたり高い脳内抗体量を維持した。コントロール抗体と比較して数十倍に高められた。

以上から、ラットのみならずマウスにおいても、MOG01 抗体は脳内抗体濃度を向上させることが示された。また血中動態の悪化は最小限であり、その結果脳内抗体濃度上昇効果は 4 週にわたって維持された。

【3-4 抗 MOG 抗体 MOG01 の脳移行性イメージング解析】

抗 MOG01 抗体ならびにネガティブコントロールの抗 AVM 抗体について、Alexa FluorR 488 Protein Labeling Kit (Molecular Probes 社製) にて標識を行った。標識後の抗体を、AF488-MOG01 IgG4PE 抗体、AF488-AVM IgG4PE 抗体とする。標識後の抗体を 10mg/kg でマウスに尾静脈(i.v.)投与数日後、トマトレクチン投与を行い、頬採血を行った。採血後、ペントバルビタール麻酔下にて全身灌流後、脳組織を回収し、IVIS Spectrum(パーキンエルマー社製)にて蛍光強度を測定した。6 日後の脳イメージング像を図 3-4(A)、14 日後の脳イメージング像を図 3-4(B)に示した。投与抗体の蛍光強度で補正後の脳中蛍光量を図 3-4(C)に示す。

図 9(A)に示されるように、抗 MOG 抗体はコントロール抗体と比較して脳内で高い蛍光強度を示した。IVIS で確認できる限り、その効果は特に部位特性は観察されず、脳内全域にわたって抗体濃度を高めていると考えられた。また、その効果は少なくとも 14 日後まで維持された。

また図 9(B)に見られるように、血清中の蛍光強度はむしろ抗 MOG 抗体が低値となっていた。抗体の修飾レベルの違いは可能性として考えられるものの、血中と脳内の比で考えればより脳内濃度を高められていると考えられる。

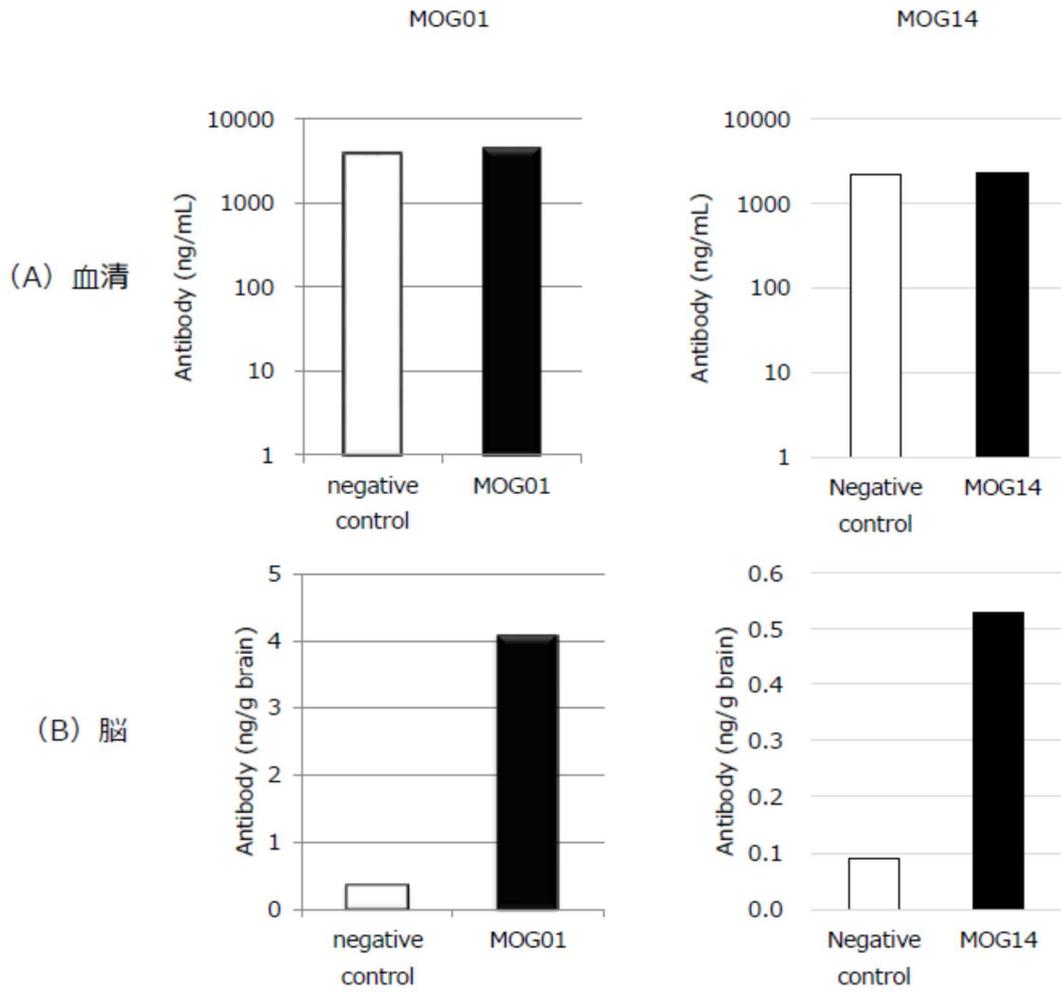
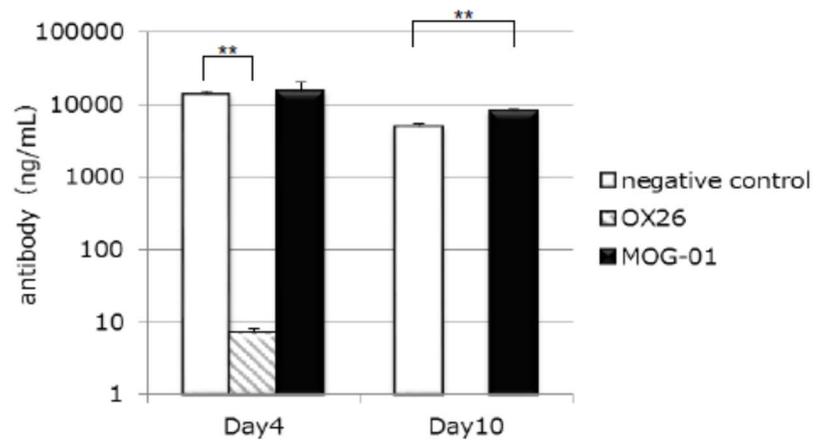


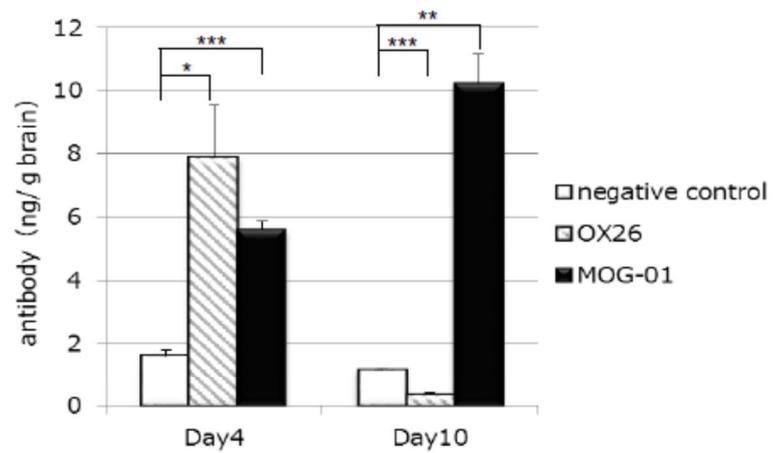
図 3-1 抗 MOG 抗体のラット脳内抗体濃度上昇

抗 MOG 抗体 MOG01、MOG14 を iv し、脳内抗体濃度を測定した。コントロール抗体として AVM 抗体を用いた。

(A) 血清



(B) 脳



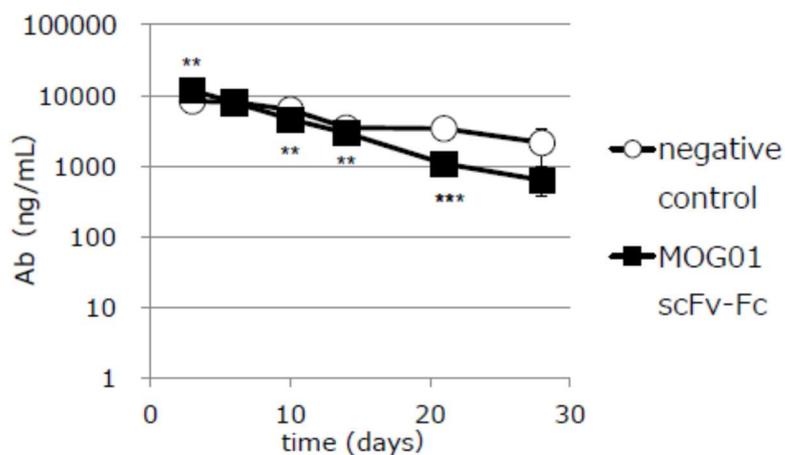
brain/plasma ratio

	Day4	Day10
negative control	0.00011	0.00023
OX26	1.12310	-
MOG-01	0.00037	0.00125

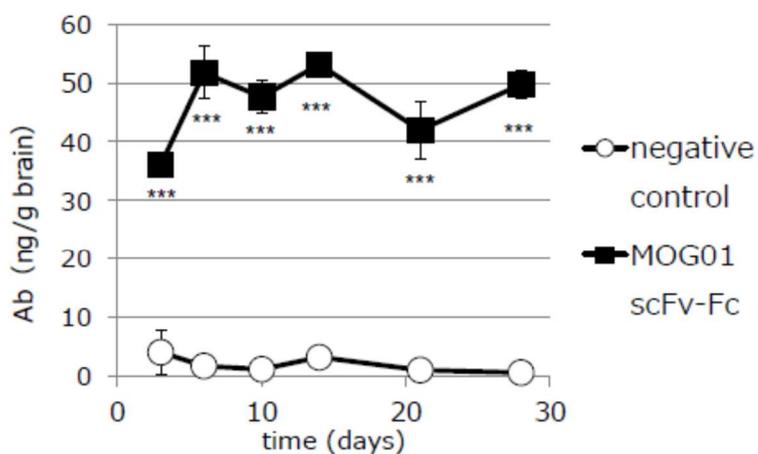
図 3-2 抗 MOG 抗体 MOG01 と抗 Tfr 抗体 OX-26 のラット in vivo 比較

抗 MOG 抗体 MOG01 と抗 Tfr 抗体 OX-26 のラットにおける脳内抗体濃度上昇効果と比較した。

(A) 血清



(B) 脳



brain/plasma ratio

	Day3	Day6	Day10	Day14	Day21	Day28
negative control	0.00049	0.00022	0.00020	0.00094	0.00032	0.00032
MOG-01	0.00307	0.00653	0.01039	0.01802	0.03884	0.07892

図 3-3 抗 MOG 抗体 MOG01 のマウス脳移行性評価

抗 MOG 抗体 MOG01 のマウスにおける脳内抗体濃度上昇効果を 4 週と長期にわたり評価した。

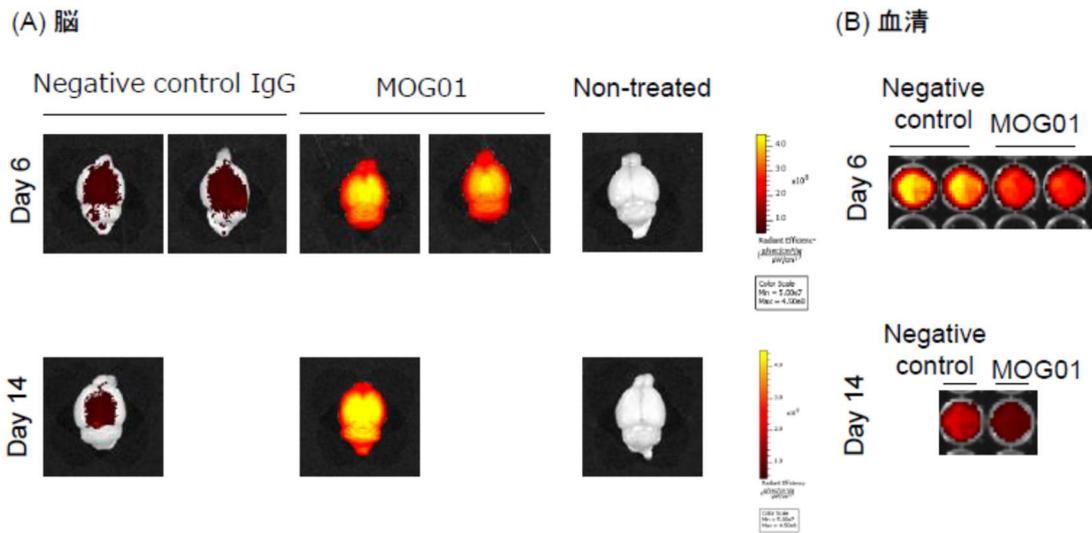


図 3-4 抗 MOG 抗体 MOG01 の脳移行性イメージング解析
 抗 MOG 抗体 MOG01 をラベル化し、脳内送達を評価した。

【3-5 HER2 抗体と MOG 抗体とのバイスペシフィック抗体評価】

3-5-1 HER2 と MOG に結合するバイスペシフィック抗体の発現ベクターの作製

HER2 と MOG に結合するバイスペシフィック抗体の発現ベクター pCI-Trastuzumab-hKG4PE(R409K)_MOG01scFv を以下の方法で作製した。このバイスペシフィック抗体は、抗 HER2 抗体の IgG の 2 本の H 鎖の C 末端に抗 MOG 抗体の scFv が融合したものである。

重鎖定常領域の合成遺伝子を鋳型として、PCR により CH1-Hinge-CH2-CH3-linker 領域の遺伝子断片を増幅した。続いて、ファージミドベクター pCANTAB_MOG01 を鋳型として PCR により scFv 領域(以下 MOG01scFv と記載)の遺伝子断片を増幅した。これら CH1-Hinge-CH2-CH3 領域および MOG01scFv 領域を鋳型とし、CH1-Hinge-CH2-CH3-MOG01scFv を増幅した。得られた遺伝子断片を pCI ベクター(Promega 社製)に挿入し、pCI-hG4PE(R409K)_MOG01scFv ベクターを作製した。

抗 HER2 抗体(Trastuzumab)(国際公開第 1999/57134 号公報に記載)の VL のアミノ酸配列をコードする遺伝子を合成して鋳型とし、プライマー 21(配列番号 63)およびプライマー 22(配列番号 64)、ならびに KOD plus DNA Polymerase(東洋紡社製)を用いて、PCR により VL 領域の遺伝子断片を増幅した。続いて N5KG4PE ベクター(国際公開第 2002/088186 号公報に記載)を鋳型とし、CL 領域の遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片 VL 及び CL を鋳型とし遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片を pCI-hG4PE(R409K)_MOG01scFv に挿入し、pCI-TrastuzumabVL-hKG4PE(R409K)_MOG01scFv を得た。次に Trastuzumab の VH のアミノ酸配列をコードする遺伝子を合成して鋳型とし、PCR により VH 領域の遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片を pCI-TrastuzumabVL-hKG4PE(R409K)_MOG01scFv に挿入し、pCI-Trastuzumab-hKG4PE(R409K)_MOG01scFv を得た。

3-5-2 AVM と MOG に結合するバイスペシフィック抗体の発現ベクターの作製

また、AVM と MOG に結合するバイスペシフィック抗体の発現ベクターを pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_MOG01scFv を以下に記載する方法で作製した。このバイスペシフィック抗体は、抗 AVM 抗体の IgG の C 末端に抗 MOG 抗体の scFv が融合したものである。N5LG4PE_AVM を鋳型として、PCR により AVM 軽鎖領域および重鎖領域の遺伝子断片を増幅した。

N5LG4PE_AVM を鋳型として、AVM VH 領域の遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片を上記で作製した pCI-hG4PE(R409K)_MOG01scFv に挿入し、pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_MOG01scFv を得た。

3-5-3 抗 AVM 抗体の IgG の C 末端に抗 AVM 抗体の scFv が融合した抗体の発現ベクターの作製

ネガティブコントロール抗体として、抗 AVM 抗体の IgG の C 末端に抗 AVM 抗体の scFv が融合した抗体の発現ベクターを pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_AVM scFv と命名した。

重鎖定常領域の合成遺伝子を鋳型として、PCR により CH1-Hinge-CH2-CH3-linker 領域の遺伝子断片を増幅した。続いて AVM scFv の合成遺伝子を鋳型として、PCR により scFv 領域の遺伝子断片を増幅した。これら CH1-Hinge-CH2-CH3 領域および AVM scFv 領域を鋳型とし、CH1-Hinge-CH2-CH3-AVM scFv を増幅した。得られた遺伝子断片を上記 pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_MOG01scFv の NheI-BamHI サイトに挿入し、pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_AVM scFv を得た。

上記作製した各種バイスペシフィック抗体発現ベクター pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_AVM scFv、pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_MOG01scFv、および pCI-Trastuzumab-hKG4PE(R409K)_MOG01scFv を発現させて得た抗体をそれぞれ AVM IgG4PE(R409K)_AVM dscFv 抗体、AVM IgG4PE(R409K)_MOG01dscFv 抗体、および Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01scFv 抗体と命名した。

3-5-4 フローサイトメーターによる MOG のバイスペシフィック抗体の MOG または HER2 に対する結合性の評価

作成した MOG と HER2 に結合するバイスペシフィック抗体 Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体、MOG と AVM に結合するバイスペシフィック抗体 AVM IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体、および AVM に結合する抗体 AVM IgG4PE(R409K)_AVM dscFv 抗体の MOG または HER2 への結合を以下の手順に従い fluorescence activated cell sorting (FACS) 法により評価した。

作成した膜型 MOG 抗原発現ベクターを FreeStyle(商標)293Expression System(Thermo Fisher Scientific 社製)を用いて浮遊性 293 細胞に導入して培養

し、一過性発現系で膜型抗原を発現させた。HEK293F 細胞、rMOG/HEK293F 細胞、hMOG/HEK293F 細胞およびヒト乳癌細胞株 SK-BR-3 細胞を、それぞれ 5×10^5 細胞/mL の濃度で 0.1%NaN₃、1% FBS 含有 PBS の Staining Buffer(SB)に懸濁し、96 穴丸底プレート(ベクトンディッキンソン社製)に分注した。遠心分離(2000rpm、4℃、2 分間)の後、上清を除去し、ペレットへ実施例 6 で得た 10 μ g/mL の各抗体を加えて懸濁した後、氷温下で 30 分間静置した。さらに遠心分離(2000rpm、4℃、2 分間)して上清を除去し、ペレットを SB で洗浄後に、1 μ g/mL の RPE 蛍光標識ヤギ抗ヒト抗体(Southern Bioblot 社製)を加え、氷温下 30 分間インキュベートした。

SB で洗浄後、SB に懸濁し、フローサイトメーターFACS CANTO II(ベクトンディッキンソン社製)で各細胞の蛍光強度を測定した。なお、ネガティブコントロールとして、10 μ g/mL の抗 AVM 抗体を用いた。HEK293F 細胞、rMOG/HEK293F 細胞、および hMOG/HEK293F 細胞に対する結合性解析の結果を図 3-5 に示す。図 3-5 より、AVM IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体、Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体では、rMOG/HEK293F 細胞、hMOG/HEK293F 細胞への結合がみられることから、バイスペシフィック抗体の形状であっても、ラット MOG およびヒト MOG への結合性を保持していることが示された。ヒト乳癌細胞株 SK-BR-3 細胞に対する結合性解析の結果を図 3-6 に示す。当該細胞には、HER2 が発現していることが知られている。3-6 より、Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体はバイスペシフィック抗体の形状であっても、HER2 への結合性を保持していることが示された。

3-5-5 表面プラズモン共鳴検出による MOG のバイスペシフィック抗体の MOG に対する結合性の評価

MOG のバイスペシフィック抗体の MOG へのアフィニティーを測定し、結果を表 3-1 に示す。表 3-1 に示すように、各バイスペシフィック抗体の解離定数(KD 値)は、AVM

IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体で 2.0×10^{-7} (M)、Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体で 1.0×10^{-7} (M)であり、いずれの MOG のバイスペシフィック抗体についても良好なアフィニティーを示すことが明らかになった。Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体では、結合速度定数 k_a 、および解離速度定数 k_d が機器測定範囲外となり、KD 値が一意に決定できていない。

3-5-6 表面プラズモン共鳴検出による MOG のバイスペシフィック抗体の HER2 に対する結合性の評価

MOG と HER2 に結合するバイスペシフィック抗体 Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体の HER2 へのアフィニティーを Biacore T-100(GE Healthcare)を用いて測定した。CM5 センサーチップ上に Human antibody Capture キットを用いて各抗体を固定化し、実施例 4 で作製した HER2-GST をアナライトとして結合能を評価した。得られたセンサグラムについて BIAevaluation software により解析を行うことで解離定数(KD 値)を算出した。結果を表 3-2 に示す。

表 3-2 に示すように、Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体の HER2 に対する解離定数(KD 値)は、 3.7×10^{-9} (M)であり、良好なアフィニティーを示す抗体であることが明らかになった。

3-5-7 HER2 と MOG のバイスペシフィック抗体のラット脳移行性評価

各バイスペシフィック抗体 AVM IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体、Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体、および AVM IgG4PE(R409K)_AVM dscFv 抗体のラットでの脳移行性評価を定した。5mg/kg 体重の量で抗体を投与して 10 日後の血清中の抗体濃度および脳組織中の単位脳重量あたりの抗体量を図 3-7(A)および(B)に示す。図 3-7(A)に示すように、バイスペシフィック抗体のネガティブコントロールである AVM IgG4PE(R409K)_AVM dscFv 抗体と比較して、AVM IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体、Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体では、血清中の抗体濃度に差はなかった。一方、図 3-7(B)に示すように、バイスペシフィック抗体のネガティブコントロールである AVM IgG4PE(R409K)_AVM dscFv 抗体と比較して、AVM IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体、Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv 抗体では、脳内の抗体量が約 10 倍に高まることが示された。

以上より、MOG に結合するバイスペシフィック抗体は、MOG に結合しないバイスペシフィック抗体よりも、脳内の抗体量を約 10 倍高めることができる一方で、血中半減期には変化がないことが示された。

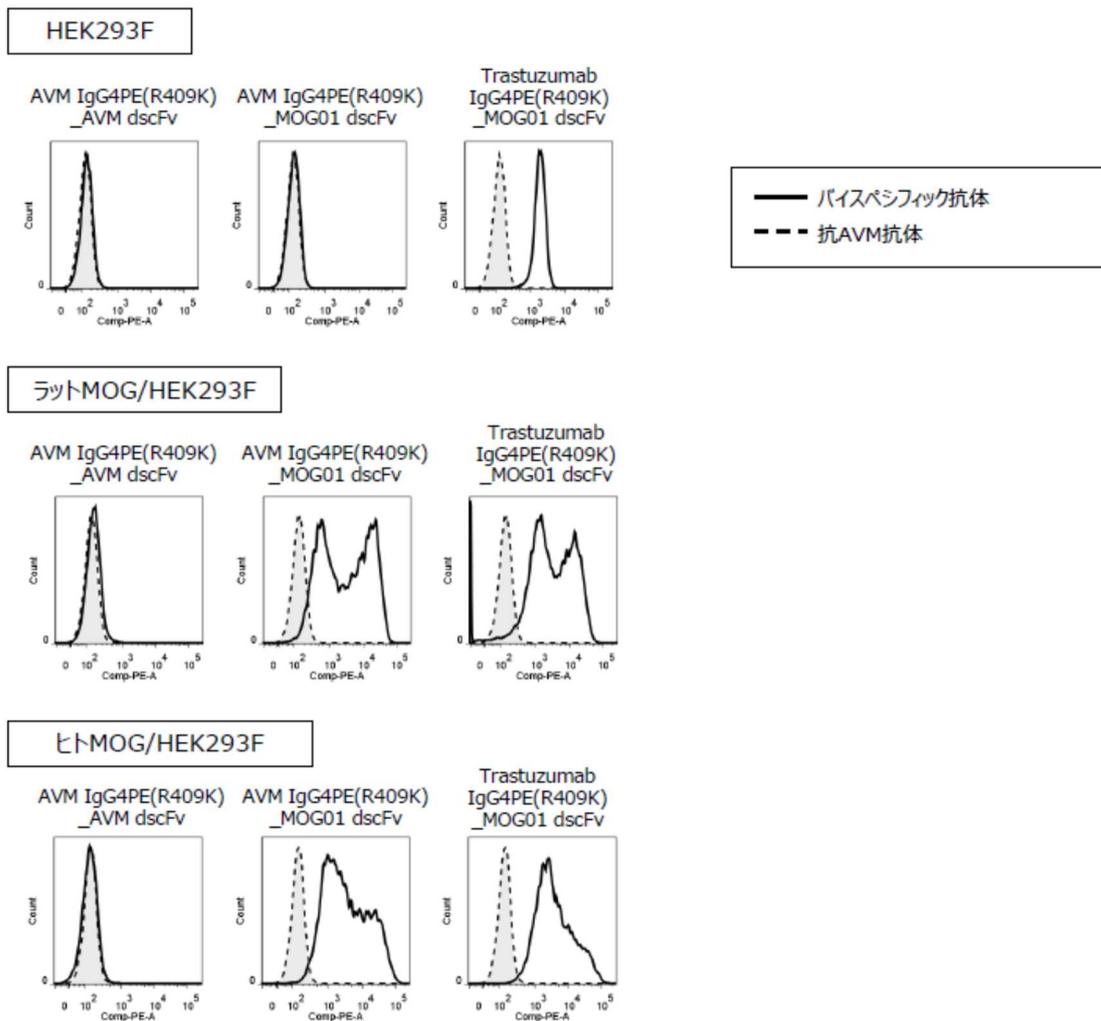


図 3-5 抗 MOG-抗 HER2 バイスペシフィック抗体の MOG への結合評価

作製された AVM IgG4PE(R409K)_AVM dscFv 抗体、AVM IgG4PE(R409K)_MOG01dscFv 抗体、Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01scFv 抗体のラットおよびヒト MOG 発現細胞への反応性を示した。宿主細胞である HEK293 への Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01scFv 抗体の反応性が確認されるが HER2 が発現しているためと考えられる。

SK-BR-3

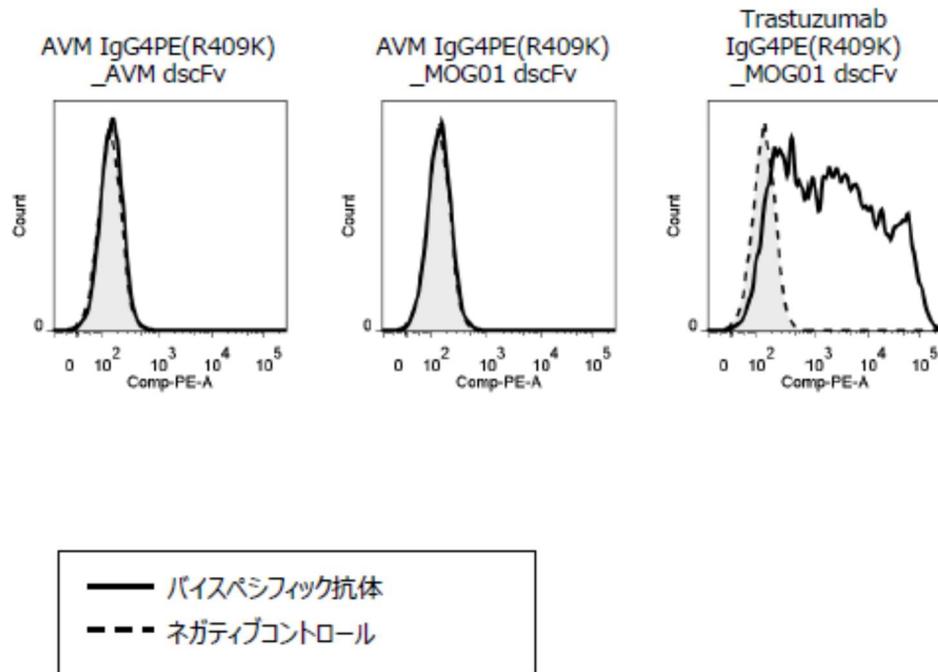


図 3-6 抗 MOG 抗 HER2 バイスペシフィック抗体の HER2 への結合評価

作製された AVM IgG4PE(R409K)_AVM dscFv 抗体、AVM IgG4PE(R409K)_MOG01dscFv 抗体、Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01scFv 抗体の HER 陽性細胞 SK-BR-3 細胞への反応性を示した。

抗体名	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
AVM IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv	2.3E+04	4.6E-03	2.0E-07
Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv	2.4E+08	2.5E+01	1.0E-07

表 3-1 各抗体の MOG に対する結合活性評価

抗体名	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Trastuzumab IgG4PE(R409K)_MOG01 dscFv	4.7E+04	1.8E-04	3.7E-09

表 3-2 抗 HER2 抗体の HER 2 に対する結合活性評価

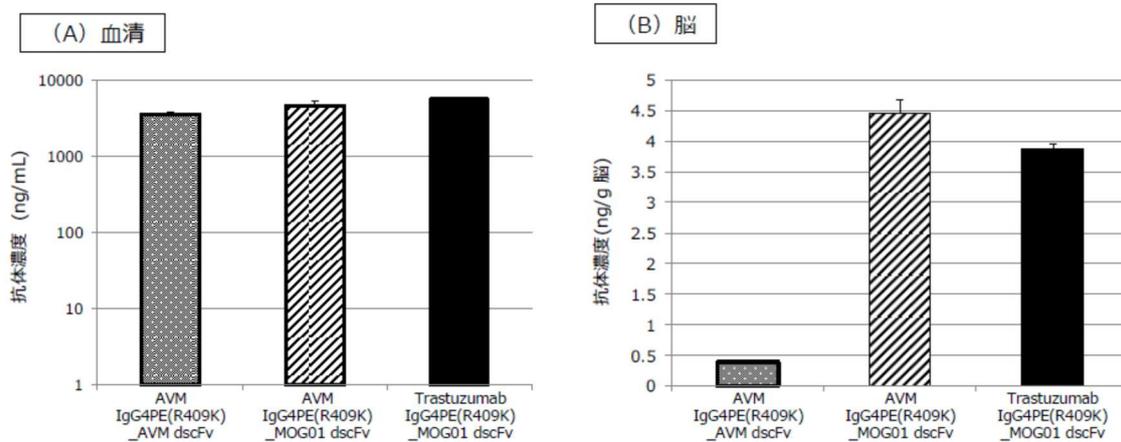


図 3-7 抗 MOG 抗 HER2 バイスペシフィック抗体のラット in vivo 評価

【3-6 各種フォーマットでの脳内抗体濃度上昇評価】

3-6-1 アシンメトリック型バイスペシフィック抗体発現ベクターの構築

(1)抗 AVM 抗体側ベクター-pCI-AVM-hLG4PE(R409K/S354C/T366W)-FLAG tag の構築

合成遺伝子を鋳型として、PCR により CH1-Hinge-CH2-CH3(R409K/S354C/T366W)領域の遺伝子断片を増幅し、pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_AVMscFv の NheI-BamHI サイトに挿入し、pCI-AVM-hLG4PE(R409K/S354C/T366W)-FLAG tag ベクターを作製した。

(2)抗 MOG 抗体側ベクター-pCI-MOG01-

hLG4PE(R409K/Y349C/T366S/L368A/Y407V)-His tag の構築

合成遺伝子を鋳型として、PCR により CH1-Hinge-CH2-CH3(R409K/Y349C/T366S/L368A/Y407V)-His tag 領域の遺伝子断片を増幅した。また、N5LG4PE_MOG01 を鋳型として、MOG01 軽鎖領域の遺伝子断片と MOG01 VH 領域の遺伝子断片を PCR により増幅した。得られた遺伝子断片を pCI ベクター(Promega 社製)に挿入し、pCI-MOG01-hLG4PE(R409K/Y349C/T366S/L368A/Y407V)-His tag ベクターを作製した。

3-6-2 シンメトリック型バイスペシフィック抗体発現ベクターの構築

(1)pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_MOG01scFv ベクターの構築

合成遺伝子を鋳型として、PCR により CH1-Hinge-CH2-CH3-linker 領域の遺伝子断片を増幅した。また、MOG01scFv を鋳型として、PCR により MOG01 の VH 領域、VL 領域の遺伝子断片を増幅した。CH1-Hinge-CH2-CH3-linker 領域の遺伝子断片と MOG01 の VH 領域、VL 領域の遺伝子断片を pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_AVMscFv の NheI-BamHI サイトに挿入し、pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_MOG01scFv5 ベクターを作製した。

(2)pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_AVMscFv ベクターの構築

合成遺伝子を鋳型として、PCR により CH1-Hinge-CH2-CH3-linker 領域の遺伝子断片を増幅した。また、N5LG4PE_AVM を鋳型として、PCR により AVM の VH 領域、VL 領域の遺伝子断片を増幅した。CH1-Hinge-CH2-CH3-linker 領域の遺伝子断片と AVM の VH 領域、VL 領域の遺伝子断片を pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_AVMscFv

の NheI-BamHI サイトに挿入し、pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_AVMscFv5 ベクターを作製した。

3-6-3 各種バイスペシフィック抗体の調製

シンメトリック型バイスペシフィック抗体は 2-1-3 に示した方法で調製し、AVM IgG4PE(R409K)_MOG01dscFv5 抗体、および AVM IgG4PE(R409K)_AVMdscFv5 抗体を得た。

アシンメトリック型バイスペシフィック抗体は以下に示す方法で調製し、AVM-MOG01 IgG4PE(R409K)抗体を得た。

抗体発現プラスミドベクターを Expi293™(商標) Expression System(Thermo Fisher Scientific 社製)を用いて浮遊性 293 細胞に導入して培養し、一過性発現系で抗体を発現させた。ベクター導入 4 日後に培養上清を回収し、孔径 0.22µm のメンブランフィルター(MILLIPORE 社製)で濾過した。この培養上清中のタンパク質を Ni Sepharose 樹脂(GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)を用いて His tag によるアフィニティー精製した。洗浄液として 20mM Imidazole-リン酸緩衝液を用いた。Ni Sepharose 樹脂に吸着させた抗体を、500mM Imidazole-リン酸緩衝液により溶出した。次に、VIVASPIN(Sartrius stealin 社製)を用いた限外ろ過と NAP カラム(GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)により溶出液の溶媒を PBS に置換した。この His tag 精製後のタンパク質を FLAG 抗体 アフィニティゲル(Sigma-Aldrich 社製)を用いてアフィニティー精製した。洗浄液としてリン酸緩衝液を用いた。FLAG 抗体 アフィニティゲルに吸着させた抗体を、20 mM クエン酸ナトリウム、50mM NaCl 緩衝液(pH 3.4)により溶出し、1M Tris--HCl Buffer Solution(pH 8.0)を含むチューブに回収した。次に、VIVASPIN(Sartrius stealin 社製)を用いた限外ろ過と NAP カラム(GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)により溶出液の溶媒を PBS に置換後、孔径 0.22 µm のメンブランフィルター(Millex-GV、MILLIPORE 社製)でろ過滅菌を行った。抗体溶液の 280 nm の吸光度を測定し、精製抗体の濃度を算出した。

3-6-4 フローサイトメーターによる各種バイスペシフィック抗体の MOG に対する結合性の評価

上記で得た各種バイスペシフィック抗体およびネガティブコントロール抗体の MOG に対する結合を以下の手順に従い fluorescence activated cell sorting (FACS)法により評価した。

作製した pEF6_ hMOG を、HilyMax(同仁化学社製)を用いてマウス結合組織由来線維芽細胞 L929[American Type Culture Collection(ATCC)番号:CCL-1]に導入した。遺伝子導入後の細胞を抗生物質 Blasticidin(Invitrogen 社製)により選抜した後、限界希釈法によるクローニングを行い、hMOG を細胞表面に発現した L929 細胞(以下、hMOG/L929 と略記する)を用いて、以下に記載する方法で各種バイスペシフィック抗体の反応性を解析した。hMOG/L929 を 0.1% NaN₃、1% FBS 含有 PBS の Staining Buffer(SB)に懸濁し、96 穴丸底プレート(ベクトンディッキンソン社製)に分注した。遠心分離(2000rpm、4℃、2 分間)の後、上清を除去し、ペレットへ実施例 6 および各種 MOG01 改変抗体を加えて懸濁した後、氷温下で 30 分間静置した。さらに遠心分離(2000rpm、4℃、2 分間)して上清を除去し、ペレットを SB で洗浄後に、1μg/mL の RPE 蛍光標識ヤギ抗ヒト抗体(Southern Biotech 社製)を加え、氷温下 30 分間インキュベートした。SB で洗浄後、SB に懸濁し、フローサイトメーター-FACS CANTO II、(ベクトンディッキンソン社製)で各細胞の蛍光強度を測定した。結果を図 3-9 に示す。図 3-9 に示した結果のように、各種バイスペシフィック抗体はいずれも MOG への結合性を有していることを確認した。

3-6-5 表面プラズモン共鳴検出による各種バイスペシフィック抗体の MOG に対する結合性の評価

各種バイスペシフィック抗体の MOG への結合を 2-4-2 に示した方法で評価した。得られた結果を表 3-3 に示す。表 3-3 に示すように、各 MOG のバイスペシフィック抗体の解離定数(KD 値)は 1.2×10^{-8} (M)~ 2.0×10^{-7} (M)であり、いずれの抗体も良好なアフィニティを示すことが明らかになった。

3-6-6 各種バイスペシフィック抗体のマウス脳移行性評価

(1)抗体量測定

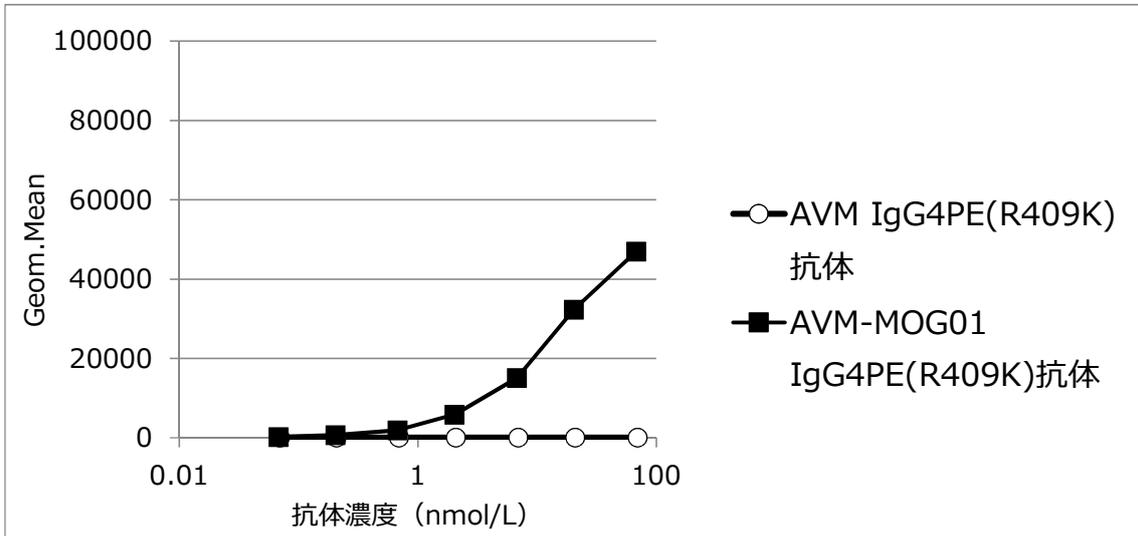
作製した各種バイスペシフィック抗体およびネガティブコントロール抗体のマウス脳移行性を評価した。

AVM-MOG01 IgG4PE(R409K)抗体、AVM IgG4PE(R409K)_MOG01sscFv 抗体および AVM IgG4PE(R409K)_MOG01 Fab 抗体について、抗体を 5mg/kg で投与し、10 日後での血清中抗体濃度および脳組織中の単位脳重量あたりの抗体量を図 3-10 に示す。

図 3-10 (A)、(C) に示すように、いずれの MOG01 改変抗体でも、ネガティブコントロールと比較して血清中の抗体濃度に差はなかった。一方、図 3-10 (B)、(D) に示されるように、ネガティブコントロールと比較して、アシンメトリック型バイスペシフィック抗体 AVM-MOG01 IgG4PE(R409K)抗体では、シンメトリック型バイスペシフィック抗体 AVM IgG4PE(R409K)_MOG01dscFv5 抗体ともに約 10 倍に脳内の抗体量が高まること示された。

以上より、MOG に結合する各種バイスペシフィック抗体は、MOG に結合しないネガティブコントロール抗体よりも、脳内の抗体量を高めることができる一方で、血中半減期には変化がないことが示された

(A)



(B)

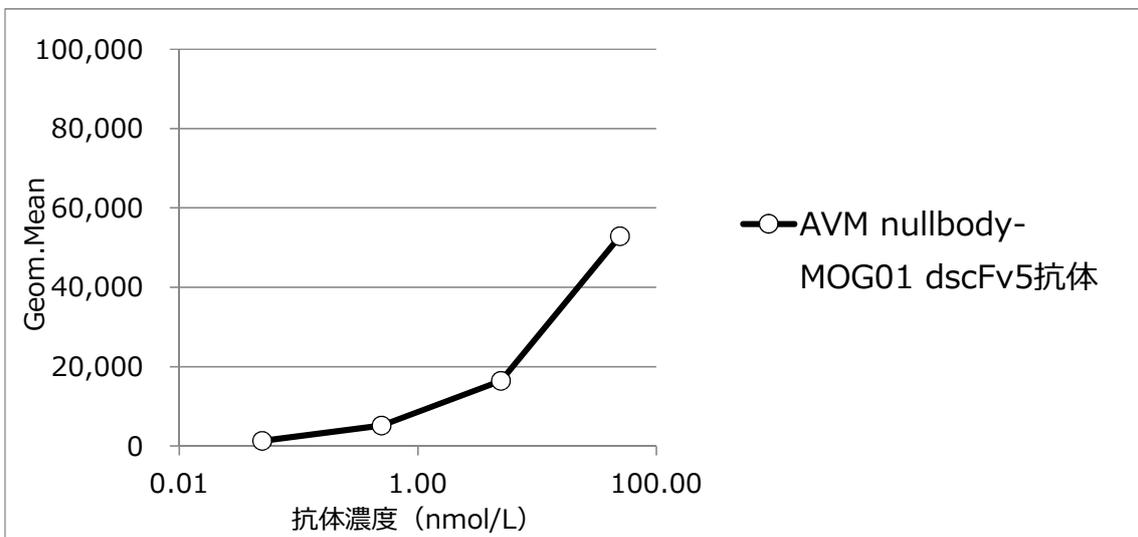


図 3-9 各種バイスペシフィック抗体の MOG 発現細胞への反応性

(A) アシンメトリック型バイスペシフィック抗体

(B) シンメトリック型バイスペシフィック抗体

抗体名	ka/(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
AVM-MOG01 IgG4PE(R409K)抗体	1.3E+05	1.6E-03	1.2E-08
AVM IgG4PE(R409K)_MOG01dscFv5 抗体	2.0E+05	4.8E-03	2.4E-08

表 3-3 各種バイスペシフィック抗体の Biacore による抗原反応性

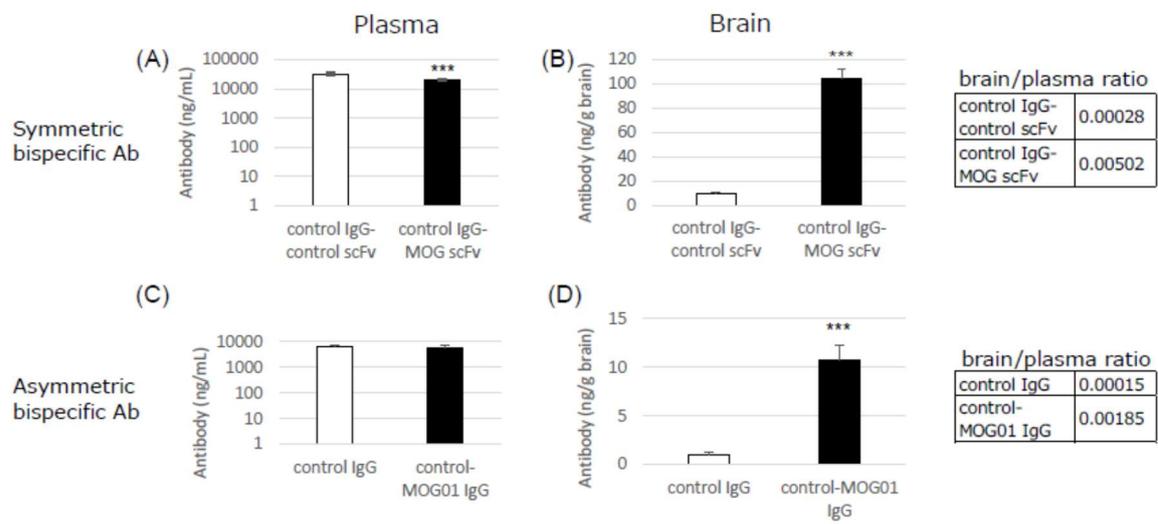


図 3-10 各種バイスペシフィック抗体のマウス動態評価

【3-7 酵素融合体での脳内抗体濃度上昇評価】

3-7-1 酵素融合抗体発現ベクターの構築と融合体取得

抗 MOG01 抗体および抗 AVM 抗体の C 末端に酸性スフィンゴミエリナーゼ(Acid Sphingomyelinase; ASM.)が融合した酵素融合抗体を以下に記載する方法で作製した。抗 MOG01 抗体の C 末端に ASM が融合した抗体の発現ベクターを pCI-MOG01-hLG4PE(R409K)_ASM、抗 AVM 抗体の C 末端に ASM が融合した抗体の発現ベクターを pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_ASM とした。

図 3-11 に示す ASM の合成遺伝子を鋳型として、PCR により linker-ASM 領域の遺伝子断片を増幅した。また、合成遺伝子を鋳型として、PCR により CH1-Hinge-CH2-CH3(R409K)領域の遺伝子断片を合成した。N5LG4PE_MOG01 を鋳型として、MOG01 軽鎖領域の遺伝子断片と MOG01 VH 領域の遺伝子断片を PCR により増幅した。得られた遺伝子断片を pCI ベクター(Promega 社製)に挿入し、pCI-MOG01-hLG4PE(R409K)_ASM ベクターを作製した。合成遺伝子を鋳型として、PCR により CH2-CH3 領域の遺伝子断片を増幅した。CH2-CH3 領域と linker-ASM 領域の遺伝子断片を pCI-AVM-hLG4PE(R409K)ベクターの PmlI-BamHI サイトに挿入し、pCI-AVM-hLG4PE(R409K)_ASM を作製した。

得られたベクターを用いて発現、精製し、MOG 抗体酵素融合体 MOG01 IgG4PE(R409K)-ASM を、AVM 抗体酵素融合体 AVM IgG4PE(R409K)-ASM を得た。

3-7-2 酵素融合抗体の in vitro 活性評価

MOG01 IgG4PE(R409K)-ASM の MOG 発現細胞への結合性を確認した。結果を図 3-12 に示す。また、MOG 可溶性抗原への結合性を Biacore を用いて確認した。その結果 MOG01 IgG4PE(R409K)-ASM の解離定数(KD 値)は 2.9×10^{-9} (M)であり、良好なアフィニティーを示した。

作製した MOG01 IgG4PE(R409K)-ASM および AVM IgG4PE(R409K)-ASM へ、抗 ASM 抗体(LSBio 社製)が結合することを以下に示す ELISA 法で確認した。ELISA では、MAXISORP(NUNC 社製)に MOG01 IgG4PE(R409K)-ASM および AVM IgG4PE(R409K)-ASM を固相化(100ng/50 μ L)し、SuperBlock Blockig

Buffer(Thermo 社製)を用いて MOG01 IgG4PE(R409K)-ASM および AVM IgG4PE(R409K)-ASM が結合していない部位をブロックした。ネガティブコントロールとして、抗 MOG01 抗体および抗 AVM 抗体を固相化(50ng/50 μ L)したプレートも用意した。各ウェルに 0.2、1、5 μ g/mL の濃度に PBS-T で希釈した抗 ASM 抗体を加え、室温下で 1 時間反応させた後、各ウェルを PBS-T で洗浄した。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された抗 Mouse Immunoglobulins 抗体(Dako 社製)を PBS-T で希釈した溶液を各ウェルに加え、室温下 1 時間反応させた。TMB 発色基質液(DAKO 社製)を加え、室温下でインキュベートした。各ウェルに 2M 塩酸を加えて発色反応を止め、波長 450nm(参照波長 570nm)での吸光度を測定した。得られた結果を図 3-13 に示す。作製した ASM 融合抗体は、抗 ASM 抗体に結合し、認識されることが示された。作製した MOG01 IgG4PE(R409K)-ASM および AVM IgG4PE(R409K)-ASM のスフィンゴミエリナーゼ活性をスフィンゴミエリナーゼ活性測定キット(Echelon Biosciences 社製)を用いて測定した結果、作製した ASM 融合抗体が酵素活性を有していることが確認された。

3-7-3 酵素融合抗体のマウス脳移行性評価

ASM 融合抗体のマウス脳移行性を評価した。ASM 融合抗体を 5mg/kg で投与し、10 日後での血清中抗体濃度および脳組織中の単位脳重量あたりの抗体量を図 3-14 に示す。図 3-14 に示すように、MOG01 IgG4PE(R409K)-ASM は、AVM IgG4PE(R409K)-ASM と比較して血清中の抗体濃度に差はなかった。一方で、MOG01 IgG4PE(R409K)-ASM では AVM IgG4PE(R409K)-ASM と比較して約 58 倍に脳内の抗体量が高まることが示された。

Acid Sphingomyelinase (ASM) の塩基配列

ATGCCCCGCTACGGAGCGTCACTCCGCCAGAGCTGCCCCAGGTCCGGCCGGGAGCAGG
GACAAGACGGGACCGCCGGAGCCCCGGACTCCTTTGGATGGGCCTGGTGTGGCGCT
GGCGCTGGCGCTGGCGCTGGCTCTGTCTGACTCTCGGGTTCTCTGGGCTCCGGCAGAG
GCTCACCTCTTTCTCCCAAGGCCATCCTGCCAGGTTACATCGCATAGTGCCCCGGCTC
CGAGATGTCTTTGGGTGGGGGAACCTCACCTGCCAATCTGCAAAGGTCTATTCACCGCC
ATCAACCTCGGGCTGAAGAAGGAACCCAATGTGGCTCGCGTGGGCTCCGTGGCCATCAA
GCTGTGCAATCTGCTGAAGATAGCACCACTGCCGTGTGCCAATCCATTGTCCACCTCTT
TGAGGATGACATGGTGGAGGTGTGGAGACGCTCAGTGCTGAGCCCATCTGAGGCCTGTG
GCCTGCTCCTGGGCTCCACCTGTGGGCACTGGGACATTTTCTCATCTTGAACATCTCTT
TGCCTACTGTGCCGAAGCCGCCCCCAACCCCCCTAGCCCCCAGCCCCAGGTGCCCT
GTCAGCCGCATCCTCTTCTCACTGACCTGCACTGGGATCATGACTACCTGGAGGGCAC
GGACCCTGACTGTGCAGACCCACTGTGCTGCCGCCGGGGTTCTGGCCTGCCGCCCGCA
TCCCGGCCAGGTGCCGATACTGGGGCGAATACAGCAAGTGTGACCTGCCCTGAGGA
CCCTGGAGAGCCTGTTGAGTGGGCTGGGCCAGCCGGCCCTTTTGATATGGTGTACTGG
ACAGGAGACATCCCCGCACATGATGTCTGGCACCAGACTCGTCAGGACCAACTGCGGGC
CCTGACCACCGTCACAGCACTTGTGAGGAAGTTCCTGGGGCCAGTGCCAGTGTACCCTG
CTGTGGGTAACCATGAAAGCATACCTGTCAATAGCTTCCCTCCCCCTTTCATTGAGGGCAA
CCTCCTCCCGCTGGCTCTATGAAGCGATGGCCAAGGCTTGGGAGCCCTGGCTGCCTG
CCGAAGCCCTGCGCACCCCTCAGAATTGGGGGGTTCTATGCTCTTCCCCATAACCCGGTC
TCCGCCTCATCTCTCAATATGAATTTTGTTCCTGAGAACTTCTGGCTCTTGATCAAC
TCCACGGATCCCGCAGGACAGCTCCAGTGGCTGGTGGGGGAGCTTCAGGCTGTGAGG
ATCGAGGAGACAAAGTGCATATAATTGCCACATTCCCCAGGGCACTGTCTGAAGAGCT
GGAGCTGGAATTATTACCGAATTGTAGCCAGGTATGAGAACACCCTGGCTGCTCAGTTCTT
TGCCCACTCATGTGGATGAATTTGAGGTCTTCTATGATGAAGAGACTCTGAGCCGGCC
GCTGGCTGTAGCCTTCTGGCACCCAGTGCAACTACCTACATCGGCCTTAATCCTGGTTA
CCGTGTGTACCAAATAGATGGAACTACTCCAGGAGCTCTCACGTGGTCTTGGACCATGA
GACCTACATCCTGAATCTGACCCAGGCAAACATACCGGGAGCCATACCGCACTGGCAGCT
TCTCTACAGGGCTCGAGAAACCTATGGGCTGCCAACACACTGCCTACCGCCTGGCACA
ACCTGGTATATCGCATGCGGGGCGACATGCAACTTTTCCAGACCTTCTGGTTTCTCTACCA
TAAGGGCCACCCACCCTCGGAGCCCTGTGGCACGCCCTGCCGTCTGGCTACTCTTTGTG
CCCAGCTCTTGCCCGTGTGACAGCCCTGCTCTGTGCCGCCACCTGATGCCAGATGGG
AGCCTCCCAGAGGCCAGAGCCTGTGGCCAAGGCCACTGTTTTGC

図 3-11 ASM の塩基配列

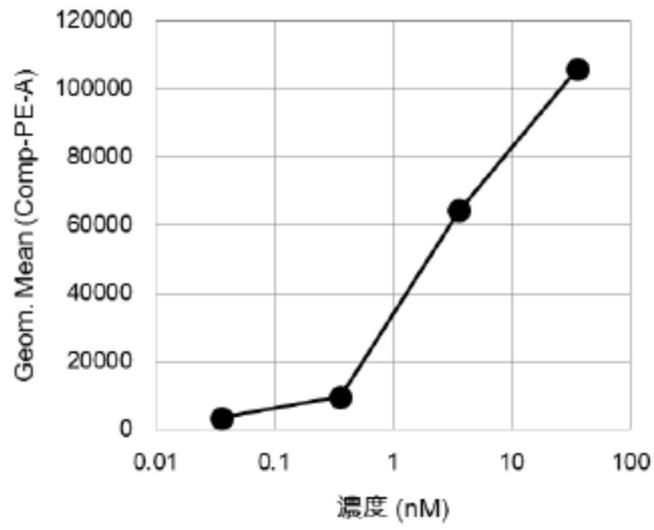


図 3-12 抗毒素融合 MOG 抗体の MOG 発現細胞への反応性評価

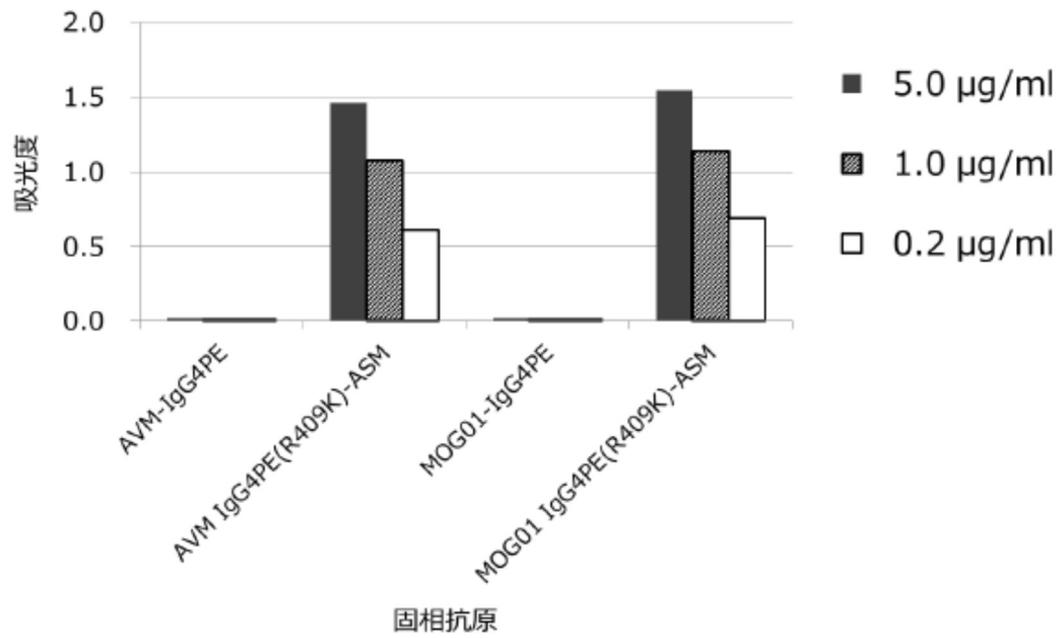


図 3-13 ASM 酵素融合抗体への抗 ASM 抗体の反応性評価

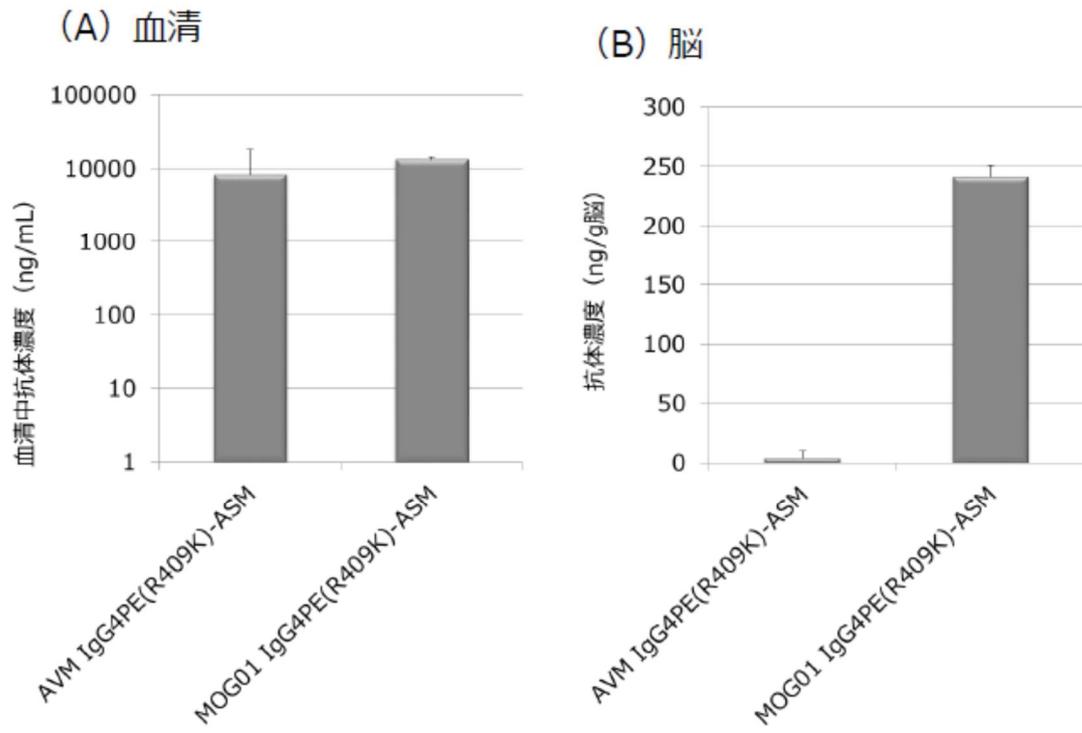


図 3-14 ASM 酵素融合抗体への in vivo 評価

第4章 考察

第4章では、見出された抗 MOG 抗体による脳内抗体濃度上昇と、既存技術である抗トランスフェリン受容体 (TfR) 抗体を使った脳移行性技術とのメカニズムの違いについて考察を行うとともに、本技術を医療に適用する際に予想される課題の解決に向け、本技術の利点と弱点を明らかにした。

【4-1 抗体医薬の脳移行性】

多くの抗体医薬ががんや自己免疫疾患を中心としてすでに上市され、また現在臨床試験で開発されている。同様に、脳や中枢神経疾患に対する抗体医薬も多く臨床試験に入っているが、ほとんどの抗体医薬は承認まで至っていない。

抗体はタンパク質であり、経口剤は困難であるために注射剤で利用されている。一般的に iv (intravenous) もしくは sc (subcutaneous) された場合、抗体医薬も含むたんぱく質は脳内濃度が非常に低いことが知られる。そのため、いくつかの脳・中枢神経疾患を対象とした抗体医薬は非常に多量に、例えば 60mg/kg や 100mg/kg といった、一般的な抗体医薬の投与量の 1 桁高い量で投与された例もある。

この理由として脳血管にある血液脳関門 (Blood-Brain Barrier : BBB) の存在があげられる。BBB は脳血管の構造体で、Tight Junction を形成し高分子量分子の血液から脳への抗体の移行を阻害する。また、胎児性 Fc 受容体 (neonatal Fc receptor : FcRn) により脳内から抗体が速やかに排出される機構についても報告されている。脳内への直接投与、あるいは髄腔内投与なども行われることもあるが、侵襲性が非常に高く一般的な投与方法ではない。

【4-2 抗体医薬の脳移行性向上技術】

これまで抗体の脳移行性を高める試みがなされている。受容体介在的トランスサイトーシス (Receptor-mediated transcytosis : RMT) は抗体を脳に運ぶ最も一般的なメカニズムとして知られる。TfR やインスリン受容体は血液側から脳側にリガンド輸送のためトランスサイトーシスするが、これらの受容体に結合する分子は RMT を介して脳内に運ばれることが可能である。

しかしこれらの受容体は脳血管に限らず、生体内全体で発現しており、投与された抗体はそれらに結合するため結果として血中半減期が低下することが報告されている。今回の検

討により、抗 TfR 抗体 OX-26 は 4 日後において高い脳内抗体濃度を示した。これはこれまでの報告[47]を再現したものであるが、その際の血中抗体濃度はコントロールと比べて速やかに低下している。10 日後では血中抗体濃度は検出限界以下となっており、脳内濃度もコントロールを下回っている。すなわち、TfR を用いた脳移行性技術は、投与直後は脳内濃度を高めることが可能であるが持続性に課題があると考えられる。

ここに示されたような抗 TfR 抗体の血中動態の課題に対応する報告がなされている。例えば抗 TfR 抗体の結合を下げることで血中半減期を延長させ、それにより脳内抗体濃度上昇期間を延長させていることが報告されている[19]。また抗 TfR 抗体の価数を 2 価から 1 価にすることでリソソームへの送達を減少させ、血中動態を改善させた報告例もある[21]。それでも脳内抗体濃度上昇効果は 1 週間程度となっている。[19]。参考文献[19]では、結合活性を高めると脳内抗体濃度は投与直後では抗 TfR 抗体の脳内濃度は高値を示すが、血中動態が悪く血中から速やかに低下する。一方で結合活性を下げすぎると動態はコントロール抗体近くまで改善するが脳内濃度上昇効果も消失する。すなわち抗 TfR 抗体の結合活性により、脳内濃度上昇と血中動態はトレードオフの関係性を示すと考えられる。

抗体医薬は一般的には血中半減期が長く、投与頻度は 2 週に 1 回、もしくは 1 か月に 1 回であることが多い。抗体は高分子量のタンパク質であることから、経口投与は困難であり、注射剤での投与が求められる。この血中動態の良さに起因する投与頻度が少ないことが、注射剤であることが求められる抗体医薬が広く利用されている一つの理由であると予想される。抗 TfR 抗体を用いた脳移行性技術を抗体医薬にアドオンした場合、抗体医薬が持つこの利点が低減すると予想される。すなわち、血中動態が悪化するためにより頻繁な注射が求められると考えられる。侵襲性が高く痛みを伴う注射剤での投与頻度が増えることは患者 QOL の低下につながる。また注射剤は一般的には病院で投与されることから、患者の通院も求められ、また医療現場の負担も増加する。また投与頻度が増えることは当然ながら使用する抗体医薬量も増加するため、コストは必然的に増加する。

上記への対応として、1 回に大量に抗体を投与することで投与頻度間隔を広げる対応が考えられる。しかし一般的に大量に抗体を投与する場合、製剤化の部分での困難がある。一般的には投与が短時間で終了する sc 製剤が iv 製剤よりも医療現場で求められているが、sc 製剤では 1 回に投与可能な薬剤量（体積的な）に限界があり、その中で必要となる抗体医薬を含有させる必要がある。対応として薬剤の高濃度化があるが、その抗体が持

つ特性により困難な場合もある。また投与抗体が多すぎる場合は高濃度化では対応できない。より大量に投与する場合、一般的には iv 製剤となるが、量が増えれば病院での拘束時間が長くなり病院側の負担が大きくなる。また当然ながら使用する抗体量が多く、コストの増加は避けられない。

以上から、抗体医薬への応用を考えた場合 TfR による中枢移行性向上は期待感が高いが課題もある技術と考えられる。

【4-3 酵素補充療法に対する脳移行性技術】

ライソゾーム病はライソゾームの酵素が遺伝的に欠失する疾患で、希少疾患であり難病指定されている。ライソゾーム病においては酵素自体を血中に補充する治療法が行われる。また酵素も高分子量タンパク質であり、脳や中枢神経系への移行性は低いことが知られており、上記酵素製剤は中枢症状を改善しないと報告されている。従ってライソゾーム病における酵素補充療法においても脳・中枢移行性技術が求められている。

現在、ムコ多糖症 II 型（ハンター病）およびムコ多糖症 I 型（ハーラー病）において、インスリン受容体および TfR に対する抗体技術を用いた中枢移行性技術がアドオンされた薬剤が抗体医薬に先んじて臨床試験が行われている。それぞれモノクローナル抗体の C 末に酵素を融合させるフォーマットを用いている。最も先行している TfR 抗体を用いた技術において、ムコ多糖症 II 型に対する薬剤（JR-141）が PIII に入っており、本薬剤は CSF 中の基質量を投与量の約半分程度にまで減少させることが報告されており[50]、中枢移行性技術の有用性が示唆される。一方で CSF 中の基質量はそれでもコントロールの 10 倍程度残されており、現状では十分な活性とはいえない。

酵素補充療法において、治療用酵素は週に 1 回、もしくは 2 週に 1 回の頻度で投与されている。この酵素補充療法は生涯にわたって行われるため、投与頻度の低減は患者 QOL の向上に直結する。

以上より、酵素補充療法においてもより脳内濃度を高める技術、脳内濃度を長期に高める技術が望まれている。

【4-4 Accumubrain 技術の構築】

本検討において、脳内濃度を 1 か月にわたり 10 倍かそれ以上に維持することが可能な技術を構築し、AccumuBrain と命名した。AccumuBrain において、抗体はミエリンに特異

的に発現する MOG に結合する。MOG の発現は中枢神経特異的であり、このことにより抗体は脳・中枢神経系のみで増加し、逆に血中動態の悪化は最小限に抑えられる。この血中動態の悪化が最小限に抑えられることで、血中半減期が長くなり、結果として脳内抗体濃度上昇期間も長く維持される。

【4-5 抗 MOG 抗体の脳内濃度向上メカニズムに関する考察】

多発性硬化症（multiple sclerosis : MS）患者や視神経脊髄炎（neuromyelitis optica : NMO）患者の脳において抗 MOG 自己抗体が発見されることが報告されている。この理由の 1 つとして、抗 MOG 自己産生 B 細胞が脳内に浸潤していることがあげられる[38][39]。他の理由として、これら自己免疫疾患患者では炎症下のため BBB のタイトジャンクションが緩んでおり、その結果自己抗体の浸潤能が向上していることもあげられる[36][37]。また、CNS 特異的な T 細胞と抗 MOG 抗体を投与することで、CNS の神経細胞の脱ミエリン化が誘導される[51]。この報告において、活性化 T 細胞は CNS において BBB を緩めることで抗体が BBB を通過するとされる。逆に言えば、免疫非活性化状態では BBB は緩んでおらず抗体の脳送達向上は起こらないと考えられる。また抗 MOG 抗体自体は免疫の活性化を誘導しないことも報告されている[42][43]。加えて、今回の試験では我々はもともとエフェクター活性が低い IgG4 に、さらにその活性を消失させる改変体を使用している。以上から、抗 MOG 抗体が免疫を活性化し、BBB を緩めることで脳内抗体濃度を上昇させる、といった可能性は極めて低いのではと予想される。

現時点では、抗 MOG 抗体は通常のコントロール抗体と同様に BBB を通過するが、脳からの排出が脳内の MOG 分子に結合することで遅くなることから、結果脳内抗体濃度が高められる、というメカニズムが想定される。しかしながらこれはあくまで仮説であり、今後詳細な検討が必要と思われる。

【4-6 抗 TfR 抗体技術との比較】

TfR は脳血管に発現しており、抗 TfR 抗体はこの TfR に結合し、その後 TfR がトランスサイトーシスすることにより、いわゆる受容体介在性トランスサイトーシス（Receptor-Mediated Transcytosis : RMT）により脳内に移行される。実験的には、還流後脳を回収し、そこからの抗体量を測定しているが、その方法では抗 TfR 抗体が脳側に抜けているか、血液側に存在し、単に脳血管に結合しているだけか、の区別が困難である。TfR 抗体

技術の論文の中でも一定量の抗 TfR 抗体が脳血管に結合しており、どちら側に存在するか判断は難しい [21]。従って脳回収後抗体を溶出する方法では、抗 TfR 抗体は過剰に見積もっている可能性が高い。一方で MOG は中枢神経系のミエリン特異的に発現しており（より正確にはオリゴデンドロサイト特異的に発現しており、オリゴデンドロサイトにより形成される）ミエリンは脳内特異的であり、血管内皮には発現していないことから、脳からの溶出で得られる抗 MOG 抗体は血管側ではなく脳側に抜けている抗体量を測定していると考えられる。

また、IVIS のデータからは極端に部位特異的に抗体が集積している像は得られておらず、脳に広く分散していると考えられる。

1 か月の長期投与の結果から、抗 MOG 抗体の血中濃度はコントロールと比較して 14 日目以降では低下傾向にある。これはおそらく抗原依存的なクリアランスと考えられ、一定の割合の抗 MOG 抗体は MOG に結合し、その後オリゴデンドロサイト内に内在化していると予想される。

【4-7 医薬品応用への期待と課題】

医薬品応用を考えた場合、サルを用いての安全性試験およびげっ歯類を用いた薬効薬理試験が求められる。今回取得された抗 MOG 抗体はヒト、サル、マウス、およびラット抗原に同程度に結合する。このことはすなわち同じ抗体を用いて薬効薬理試験、安全性試験、ヒトでの臨床試験が行えることを示しており、より正確なデータが得られることが期待される。

抗 MOG 抗体を用いる場合、安全性は非常に重要な課題となる。MOG ペプチドや MOG タンパク自体は実験的自己免疫性脳脊髄炎（Experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE）をマウスモデルにおいて誘導することが知られている。[40]。一方で MOG 抗体そのものは pathogenic ではないとする報告があり[42][43]、全ての MOG 抗体が pathogenic ではないことを示唆する。また抗 MOG 抗体の pathogenicity は CDC 活性によるものとする報告があるが、ヒトでは IgG1 や IgG3 がその活性を示す。MS や NMO 患者では IgG1 サブクラスの抗 MOG 抗体が検出され[52][53]、抗体のサブクラスの pathogenicity への影響が大きいと予想される。さらにヒト IgG4 は CDC 活性を示さないことが知られており[54]、また今回 Fc 受容体への結合能を欠失させる 235 位のグルタミン酸をセリンに置換する改変も加えている[55]。これらの報告から、Fc

受容体への結合能を欠失させた IgG4 サブクラスは安全性に関する懸念を低減させることが期待される。

以上から、抗 MOG 抗体の副作用は十分に低減が期待できると考えられるが、安全性に関しては実用化に向けて引き続き重要な課題として今後の試験の進捗に期待される。

第 5 章 総括

第 5 章では、本論文を総括するとともに、今回、新たに構築された脳・中枢移行技術 (AccumuBrain) の脳疾患治療へ向けた医薬品開発への展望について議論した。

本論文において、抗体医薬の脳・中枢神経疾患への応用を考えた際の課題について第 1 章で述べた。また、その課題に対してどのような技術が構築されているか、またその技術の課題について述べた。具体的には抗 TfR 抗体に代表される RMT を介した脳・中枢移行性技術があげられる。本技術はその標的抗原である TfR が生体内に広く分布して発現していることから、血中動態が悪く、その結果投与直後は高い脳内抗体濃度を示すがその効果が短時間で消失するといった課題があることを示した。

第 2 章では、抗 TfR 抗体の課題を克服するため、脳内に特異的に発現する MOG 分子に着目し、この抗体取得を行った。抗体は実用化の観点を見据えて、ヒト、サル、げっ歯類に同程度に結合する交差反応性を持った抗体を SCR した。その結果、MOG01 を始めとする複数の交差性を持つ抗体を取得した。

第 3 章では、取得した MOG 抗体の脳内抗体濃度上昇活性について評価した。抗 TfR 抗体は既報と同様短期では脳内濃度を高めるが、持続性に課題があることが示された一方で、MOG01 は高い脳内濃度を長期に持続した。また、MOG01 は十倍から数十倍の高い脳内抗体濃度を 1 か月にわたり維持するデータを得た。また、MOG01 は薬剤抗体とのバイスペシフィック抗体フォーマット、あるいは薬剤酵素の融合抗体でも動態を評価した。その結果バイスペシフィック抗体や酵素融合抗体のフォーマットにおいても高い脳内濃度上昇を示した。以上から本技術が医療応用への可能性が示唆された。

第 4 章では構築された技術を AccumuBrain と命名し、本技術の期待と課題について考察した。TfR を用いた技術とは特性が異なり、長期持続性にその利点があると考察した。一方で自己抗体として抗 MOG 抗体が観察される疾患があることから、抗 MOG 抗体の安全性に関して議論した。現時点で抗 MOG 抗体そのものには pathogenicity は報告されていないこと、適切なサブクラス選択や改変で免疫を介した副作用を最小限にすることなどについて考察したうえで今後の課題について整理した。

中枢神経疾患としてはアルツハイマー病（Alzheimer's disease : AD）を代表とする痴呆や、運動神経が障害されるパーキンソン病（parkinson's disease : PD）や筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis : ALS）、ライソゾーム病で難病のニーマンピック病など様々な疾患が知られている。抗体医薬やタンパク医薬は低分子医薬に続く薬剤プラットフォームであるが、中枢神経疾患における臨床試験も順調とはいえない。

例えば AD ではアミロイドβに対する抗体医薬が多数臨床試験されていたが、そのほとんどが失敗に終わっている。もちろんコンセプトの妥当性、すなわち標的であるアミロイドβを中和することが本当に薬効を示すか、が大きな理由としてはあげられるが、その送達量の妥当性については議論の余地がある可能性がある。例えば唯一薬効を示した例として BAN2401 があげられるが、これも最高用量でのみ効果が見られており、さらなる投与量増量による効果向上が期待される。

また、PD においてはαシヌクレインに対する中和抗体が臨床試験に入っているが、最大投与量が 60mg/kg と非常に高いところまで臨床試験で試みられている。一般的な抗体医薬は 10mg/kg 程度であることから、脳・中枢移行性の低さを投与量でカバーしようとする試みであると予想される。

酵素補充療法においては中枢移行性技術がすでに臨床応用されており、ハンター病に対する酵素送達にアドオンされ CSF の基質を半分程度に低減する効果が観察されているが、それでもコントロールと比較してまだ 10 倍程度の基質があることから、さらなる活性向上が期待される。

以上から脳・中枢神経疾患に対するアンメットメディカルニーズとそれにこたえる技術構築の必要性は高いと考えられる。本技術が将来、これらの疾患に対する薬剤にアドオンされ、その効果を最大化させることにより患者さんの QOL 向上につながることを期待する。

参考文献

- [1] 免疫学イラストレイテッド Ivan Roitt, David Male, Jonathan Brostoff, 多田 富雄 (翻訳)
- [2] Singh S, Kumar NK, Dwiwedi P, Charan J, Kaur R, Sidhu P, Chugh VK . Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr Clin Pharmacol*. 2018;13(2):85-99.
- [3] 金子 佳寛 (2013) 生物工程学 第91巻 9号 511-513
- [4] Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2003 Jan 31;278(5):3466-73
- [5] Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiya BI. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 14;103(11):4005-10.
- [6] Huehls AM, Coupet TA, Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2015 Mar;93(3):290-6. doi: 10.1038/icb.2014.93.
- [7] Walter RB. Investigational CD33-targeted therapeutics for acute myeloid leukemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018 Apr;27(4):339-348. doi: 10.1080/13543784.2018.1452911.
- [8] Rizzieri D. Zevalin(®) (ibritumomab tiuxetan): After more than a decade of treatment experience, what have we learned? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Sep;105:5-17. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.07.008.
- [9] Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *MAbs*. 2017 Feb/Mar;9(2):182-212. doi: 10.1080/19420862.2016.1268307.

- [10] Wang Y, Tian Z, Thirumalai D, Zhang X. Neonatal Fc receptor (FcRn): a novel target for therapeutic antibodies and antibody engineering. *J Drug Target.* 2014 May;22(4):269-78. doi: 10.3109/1061186X.2013.875030.
- [11] Bas M, Terrier A, Jacque E, Dehenne A, Pochet-Béghin V, Béghin C, Dezetter AS1, Dupont G, Engrand A, Beaufils B, Mondon P, Fournier N1, de Romeuf C, Jorieux S, Fontayne A, Mars LT, Monnet C. Fc Sialylation Prolongs Serum Half-Life of Therapeutic Antibodies. *J Immunol.* 2019 Mar 1;202(5):1582-1594. doi: 10.4049/jimmunol.1800896.
- [12] Igawa T, Ishii S, Tachibana T, Maeda A, Higuchi Y, Shimaoka S, Moriyama C, Watanabe T, Takubo R, Doi Y, Wakabayashi T, Hayasaka A, Kadono S, Miyazaki T, Haraya K, Sekimori Y, Kojima T, Nabuchi Y, Aso Y, Kawabe Y, Hattori K. Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat Biotechnol.* 2010 Nov;28(11):1203-7. doi: 10.1038/nbt.1691.
- [13] Wang W, Wang EQ, Balthasar JP. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Nov;84(5):548-58. doi: 10.1038/clpt.2008.170.(特許 3)
- [14] Garg A, Balthasar JP. Investigation of the influence of FcRn on the distribution of IgG to the brain. *AAPS J.* 2009 Sep;11(3):553-7. doi: 10.1208/s12248-009-9129-9. (特許 4、FcRn)
- [15] Blennow K, Zetterberg H, Rinne JO, Salloway S, Wei J, Black R, Grundman M, Liu E; AAB-001 201/202 Investigators. Effect of immunotherapy with bapineuzumab on cerebrospinal fluid biomarker levels in patients with mild to moderate Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2012 Aug;69(8):1002-10.(特許 5)
- [16] Wraith JE, Clarke LA, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Swiedler SJ, Kakkis ED, Braakman T, Chadbourne E, Walton-Bowen K, Cox GF. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-

controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *J Pediatr*. 2004 May;144(5):581-8.(特許 6)

[17] Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, Vellodi A, Martin R, Ramaswami U, Guzsavas-Calikoglu M, Vijayaraghavan S, Wendt S, Puga AC, Ulbrich B, Shinawi M, Cleary M, Piper D, Conway AM, Kimura A. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med*. 2006 Aug;8(8):465-73.(特許 7)

[18] Sorrentino NC, Fraldi A. Brain Targeting in MPS-IIIA. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2016 Jun;13 Suppl 1:630-8. (特許 11)

[19] Couch JA, Yu YJ, Zhang Y, Tarrant JM, Fuji RN, Meilandt WJ, Solanoy H, Tong RK, Hoyte K, Luk W, Lu Y, Gadkar K, Prabhu S, Ordonia BA, Nguyen Q, Lin Y, Lin Z, Balazs M, Searce-Levie K, Ernst JA, Dennis MS, Watts RJ. Addressing safety liabilities of TfR bispecific antibodies that cross the blood-brain barrier. *Sci Transl Med*. 2013 May 1;5(183):183ra57, 1-12. doi: 10.1126/scitranslmed.3005338.(特許 12)

[20] Yu YJ, Atwal JK, Zhang Y, Tong RK, Wildsmith KR, Tan C, Bien-Ly N, Hersom M, Maloney JA, Meilandt WJ, Bumbaca D, Gadkar K, Hoyte K, Luk W, Lu Y, Ernst JA, Searce-Levie K, Couch JA, Dennis MS, Watts RJ. Therapeutic bispecific antibodies cross the blood-brain barrier in nonhuman primates. *Sci Transl Med*. 2014 Nov 5;6(261):261ra154. doi: 10.1126/scitranslmed.3009835. (特許 13)

[21] Niewoehner J, Bohrmann B, Collin L, Urich E, Sade H, Maier P, Rueger P, Stracke JO, Lau W, Tissot AC, Loetscher H, Ghosh A, Freskgård PO. Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron*. 2014 Jan 8;81(1):49-60. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.061. 特許 14)

[22] Pardridge WM, Boado RJ. Reengineering biopharmaceuticals for targeted delivery across the blood-brain barrier. *Methods Enzymol*. 2012;503:269-92. doi: 10.1016/B978-0-12-396962-0.00011-2. (特許

16)

[23] Boado RJ, Pardridge WM. Comparison of blood-brain barrier transport of glial-derived neurotrophic factor (GDNF) and an IgG-GDNF fusion protein in the rhesus monkey. *Drug Metab Dispos.* 2009 Dec;37(12):2299-304. doi: 10.1124/dmd.109.028787. (特許 17)

[24] Boado RJ, Hui EK, Lu JZ, Pardridge WM. Drug targeting of erythropoietin across the primate blood-brain barrier with an IgG molecular Trojan horse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Jun;333(3):961-9. doi: 10.1124/jpet.109.165092. (特許 18)

[25] Boado RJ, Hui EK, Lu JZ, Pardridge WM. IgG-enzyme fusion protein: pharmacokinetics and anti-drug antibody response in rhesus monkeys. *Bioconjug Chem.* 2013 Jan 16;24(1):97-104. doi: 10.1021/bc3005123. (特許 19)

[26] Zhang Y, Pardridge WM. Delivery of beta-galactosidase to mouse brain via the blood-brain barrier transferrin receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Jun;313(3):1075-81. (特許 20)

[27] Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D. The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem.* 2005 Nov;95(4):1201-14. (特許 21)

[28] Farrington GK, Caram-Salas N, Haqqani AS, Brunette E, Eldredge J, Pepinsky B, Antognetti G, Baumann E, Ding W, Garber E, Jiang S, Delaney C, Boileau E, Sisk WP, Stanimirovic DB. A novel platform for engineering blood-brain barrier-crossing bispecific biologics. *FASEB J.* 2014 Nov;28(11):4764-78. doi: 10.1096/fj.14-253369. (特許 22)

[29] Webster CI, Caram-Salas N, Haqqani AS, Thom G, Brown L, Rennie K, Yogi A, Costain W, Brunette E, Stanimirovic DB. Brain penetration, target engagement, and disposition of the blood-brain barrier-crossing bispecific antibody antagonist of metabotropic glutamate receptor type 1. *FASEB J.* 2016 May;30(5):1927-40. doi: 10.1096/fj.201500078. (特

許 23)

[30] Zhang Y, Pardridge WM. Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol.* 2001 Mar 1;114(1-2):168-72. (特許 24)

[31] Cooper PR, Ciambrone GJ, Kliwinski CM, Maze E, Johnson L, Li Q, Feng Y, Hornby PJ. Efflux of monoclonal antibodies from rat brain by neonatal Fc receptor, FcRn. *Brain Res.* 2013 Oct 9;1534:13-21. doi: 10.1016/j.brainres.2013.08.035. (特許 25)

[32] Brunner C, Lassmann H, Waehneltd TV, Matthieu JM, Linington C. Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem.* 1989 Jan;52(1):296-304.(特許 26)

[33] Pham-Dinh D, Mattei MG, Nussbaum JL, Roussel G, Pontarotti P, Roeckel N, Mather IH, Artzt K, Lindahl KF, Dautigny A. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 1;90(17):7990-4. (特許 27)

[34] Gardinier MV, Amiguet P, Linington C, Matthieu JM. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J Neurosci Res.* 1992 Sep;33(1):177-87. (特許 28)

[35] Urich E, Gutcher I, Prinz M, Becher B. Autoantibody-mediated demyelination depends on complement activation but not activatory Fc-receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 5;103(49):18697-702. (特許 29)

[36] Reindl M, Linington C, Brehm U, Egg R, Dilitz E, Deisenhammer F, Poewe W, Berger T. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other

neurological diseases: a comparative study. *Brain*. 1999 Nov;122 (Pt 11):2047-56.(特許 30)

[37] Shimizu F, Kanda T. Disruption of blood-brain barrier in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Nihon Rinsho*. 2014 Nov;72(11):1949-54.(特許 31)

[38] Sinmaz N, Amatoury M, Merheb V, Ramanathan S, Dale RC, Brilot F. Autoantibodies in movement and psychiatric disorders: updated concepts in detection methods, pathogenicity, and CNS entry. *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Sep;1351:22-38. doi: 10.1111/nyas.12764. (特許 32)

[39] Quintana FJ, Farez MF, Izquierdo G, Lucas M, Cohen IR, Weiner HL. Antigen microarrays identify CNS-produced autoantibodies in RRMS. *Neurology*. 2012 Feb 21;78(8):532-9. doi: 10.1212/WNL.0b013e318247f9f3. (特許 33)

[40] Gold R, Lington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006 Aug;129(Pt 8):1953-71. (特許 34)

[41] Morris-Downes MM, Smith PA, Rundle JL, Piddlesden SJ, Baker D, Pham-Dinh D, Heijmans N, Amor S. Pathological and regulatory effects of anti-myelin antibodies in experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J Neuroimmunol*. 2002 Apr;125(1-2):114-24. (特許 35)

[42] Locatelli G, Wörtge S, Buch T, Ingold B, Frommer F, Sobottka B, Krüger M, Karram K, Bühlmann C, Bechmann I, Heppner FL, Waisman A, Becher B. Primary oligodendrocyte death does not elicit anti-CNS immunity. *Nat Neurosci*. 2012 Feb 26;15(4):543-50. doi: 10.1038/nn.3062.(特許 36)

[43] Schliesener HJ, Sobel RA, Lington C, Weiner HL. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol*. 1987 Dec 15;139(12):4016-21. (特許 37)

- [44] Shah DK, Betts AM. Antibody biodistribution coefficients: inferring tissue concentrations of monoclonal antibodies based on the plasma concentrations in several preclinical species and human. *MAbs*. 2013 Mar-Apr;5(2):297-305. doi: 10.4161/mabs.23684.
- [45] Stanimirovic D, Kemmerich K, Haqqani AS, Farrington GK. Engineering and pharmacology of blood-brain barrier-permeable bispecific antibodies. *Adv Pharmacol*. 2014;71:301-35. doi: 10.1016/bs.apha.2014.06.005.
- [46] Vidu R, Rahman M, Mahmoudi M, Enachescu M, Poteca TD, Opris I. Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation. *Front Syst Neurosci*. 2014 Jun 20;8:91. doi: 10.3389/fnsys.2014.00091.
- [47] Li JY, Sugimura K, Boado RJ, Lee HJ, Zhang C, Duebel S, Pardridge WM. Genetically engineered brain drug delivery vectors: cloning, expression and in vivo application of an anti-transferrin receptor single chain antibody-streptavidin fusion gene and protein. *Protein Eng*. 1999 Sep;12(9):787-96.
- [48] Ishida I, Tomizuka K, Yoshida H, Tahara T, Takahashi N, Ohguma A, Tanaka S, Umehashi M, Maeda H, Nozaki C, Halk E, Lonberg N. Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo animals. *Cloning Stem Cells*. 2002;4(1):91-102.
- [49] 石田功 ヒト抗体作製の最新技術 実験医学 20(6): 846 -851 2002
- [50] Okuyama T, Eto Y, Sakai N, Minami K, Yamamoto T, Sonoda H, Yamaoka M, Tachibana K, Hirato T, Sato Y. Iduronate-2-Sulfatase with Anti-human Transferrin Receptor Antibody for Neuropathic Mucopolysaccharidosis II: A Phase 1/2 Trial. *Mol Ther*. 2019 Feb 6;27(2):456-464. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.12.005.
- [51] Iwasaki A. Immune regulation of antibody access to neuronal tissues. *Trends Mol Med*. 2017;23: 227-245.
- [52] McLaughlin KA, Chitnis T, Newcombe J, Franz B, Kennedy J, McArdel S, et al. Age-dependent B cell autoimmunity to a myelin surface antigen

in pediatric multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009;183: 4067–4076.

[53] Mader S, Gredler V, Schanda K, Rostasy K, Dujmovic I, Pfaller K, et al. Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. *J Neuroinflammation.* 2011;8: 184.

[54] Stein R, Qu Z, Chen S, Solis D, Hansen HJ, Goldenberg DM. Characterization of a humanized IgG4 anti-HLA-DR monoclonal antibody that lacks effector cell functions but retains direct antilymphoma activity and increases the potency of rituximab. *Blood.* 2006;108: 2736–1744.

[55] Newman R, Hariharan K, Reff M, Anderson DR, Braslawsky G, Santoro D, et al. Modification of the Fc region of a primatized IgG antibody to human CD4 retains its ability to modulate CD4 receptors but does not deplete CD4(+) T cells in chimpanzees. *Clin Immunol.* 2001;98: 164–174.

