

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7311113号
(P7311113)

(45)発行日 令和5年7月19日(2023.7.19)

(24)登録日 令和5年7月10日(2023.7.10)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
請求項の数 25 (全41頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2019-510567(P2019-510567)	(73)特許権者	500429103 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ ペンシルバニア アメリカ合衆国 1 9 1 0 4 ペンシルベ ニア州 フィラデルフィア シビック セ ンター プールパード 3 6 0 0 ナインス フロア
(86)(22)出願日	平成29年5月5日(2017.5.5)	(73)特許権者	516142001 ザ ウィスター インスティテュート オブ アナトミー アンド バイオロジー アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 フィ ラデルフィア スブルース ストリート 3 6 0 1
(65)公表番号	特表2019-518074(P2019-518074 A)	(74)代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(43)公表日	令和1年6月27日(2019.6.27)		
(86)国際出願番号	PCT/US2017/031193		
(87)国際公開番号	WO2017/192933		
(87)国際公開日	平成29年11月9日(2017.11.9)		
審査請求日	令和2年5月1日(2020.5.1)		
(31)優先権主張番号	62/332,377		
(32)優先日	平成28年5月5日(2016.5.5)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 I L - 6 及び C D 1 2 6 を標的とする D N A モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 つ以上の合成抗体をコードする 1 つ以上の核酸分子を含み、I L - 6 及び / 又は C D 1 2 6 を標的とするための組成物であって、1 つ以上の前記核酸分子が、

a) 抗 - I L - 6 合成抗体をコードするヌクレオチド配列、及び

b) 抗 - C D 1 2 6 抗体をコードするヌクレオチド配列、

からなる群から選択された少なくとも 1 つを含み、

抗 - I L - 6 合成抗体をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、及び配列番号 7 からなる群から選択されたヌクレオチド配列を含む、及び / 又は ;

抗 - C D 1 2 6 合成抗体をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 9 及び配列番号 1 1 からなる群から選択されたヌクレオチド配列を含む、及び / 又は ;

抗 - I L - 6 合成抗体が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、及び配列番号 8 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む、及び / 又は ;

抗 - C D 1 2 6 合成抗体が、配列番号 1 0 及び配列番号 1 2 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む、

前記組成物。

【請求項 2】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、及び配列番号 8 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む抗 - I L - 6 合成抗体をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に

記載の組成物。

【請求項 3】

抗 - I L - 6 合成抗体をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、及び配列番号 7 からなる群から選択されたヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

配列番号 10 及び配列番号 12 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む抗 - C D 1 2 6 合成抗体をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

抗 - C D 1 2 6 合成抗体をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 9 及び配列番号 11 からなる群から選択されたヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。 10

【請求項 6】

抗 - I L - 6 合成抗体をコードする第 1 のヌクレオチド配列、及び、抗 - C D 1 2 6 抗体をコードする第 2 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

開裂ドメインをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

抗 - I L - 6 の可変重鎖領域、及び、可変軽鎖領域をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

抗 - C D 1 2 6 の可変重鎖領域、及び、可変軽鎖領域をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。 20

【請求項 10】

ヒト I g G 1 の定常重鎖領域、及び、定常軽鎖領域をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

抗 - I L - 6 の可変重鎖領域、ヒト I g G 1 の定常重鎖領域、開裂ドメイン、抗 - I L - 6 の可変軽鎖領域、及び、I g G 1 の定常軽鎖領域を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

抗 - C D 1 2 6 の可変重鎖領域、ヒト I g G 1 の定常重鎖領域、開裂ドメイン、抗 - C D 1 2 6 の可変軽鎖領域、及び、I g G 1 の定常軽鎖領域を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。 30

【請求項 13】

前記ヌクレオチド配列が、リーダー配列をコードする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記核酸分子が、発現ベクターを含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の前記核酸分子を含む組成物。

【請求項 16】

医薬として許容可能な賦形剤をさらに含む、請求項 15 に記載の組成物。 40

【請求項 17】

対象における疾患の処置における使用のための、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記疾患が、がんである、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記疾患が、自己免疫疾患である、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記疾患が、敗血症である、請求項 17 に記載の組成物。 50

【請求項 2 1】

前記疾患が、ウイルス感染である、請求項 1 7 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記疾患が、多中心性キャスルマン病である、請求項 1 7 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記疾患が、高熱と関連している、請求項 1 7 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記疾患が、移植片対宿主病 (G V H) である、請求項 1 7 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記疾患が、細胞崩壊症候群である、請求項 1 7 に記載の組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する、2016年5月5日に出願された米国仮特許出願第62/332,377号の優先権及び利益を主張する。

【0 0 0 2】

本発明は、抗 - I L - 6 抗体、及び、抗 - C D 1 2 6 抗体、及び、それらの機能的断片を含む、1つ以上の合成抗体を、インピボで生成するための組換え核酸配列を含む組成物、及び、当該組成物を投与することによって、対象における疾患を、予防、及び/または、処置する方法に関する。

20

【背景技術】

【0 0 0 3】

前炎症性サイトカイン I L - 6 は、自己炎症、及び、敗血症において実質的な役割を果たす。数多くの研究が、I L - 6 シグナル伝達と腫瘍発生との間の関連性を実証している。現在のところ、I L - 6 と、その受容体である C D 1 2 6 とを標的とする治療用抗体が、多中心性キャスルマン病、及び、関節リウマチの処置に関して承認がされている。残念なことに、精製抗 - I L - 6 抗体、及び、抗 - C D 1 2 6 抗体の製造、及び、送達には法外な費用を要する。さらに、これらの抗体治療は、がんや自己免疫疾患などの慢性病態の処置において、厄介なことに、毎週乃至毎月、改めて投与をしなければならない。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 4】

したがって、当該技術分野にあっては、がん及び自己免疫疾患の治療のために、I L - 6、及び、C D 1 2 6 を標的とする改善された組成物、及び、方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 5】

本発明は、1つ以上の合成抗体をコードする1つ以上の核酸分子を含む組成物に関するものであって、1つ以上の当該核酸分子が、a) 抗 - I L - 6 合成抗体をコードするヌクレオチド配列、b) 抗 - I L - 6 合成抗体の断片をコードするヌクレオチド配列、c) 抗 - C D 1 2 6 抗体をコードするヌクレオチド配列、及び、d) 抗 - C D 1 2 6 抗体の断片をコードするヌクレオチド配列、からなる群から選択された少なくとも1つを含む。

40

【0 0 0 6】

ある実施形態において、当該組成物は、抗 - I L - 6 合成抗体をコードする第1のヌクレオチド配列、及び、抗 - C D 1 2 6 抗体をコードする第2のヌクレオチド配列を含む。

【0 0 0 7】

ある実施形態において、当該組成物は、開裂ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。

50

【 0 0 0 8 】

ある実施形態において、当該組成物は、抗 - I L - 6 の可変重鎖領域、及び、可変軽鎖領域をコードするヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 0 9 】

ある実施形態において、当該組成物は、抗 - C D 1 2 6 の可変重鎖領域、及び、可変軽鎖領域をコードするヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 1 0 】

ある実施形態において、当該組成物は、ヒト I g G 1 の定常重鎖領域、及び、定常軽鎖領域をコードするヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 1 1 】

ある実施形態において、当該組成物は、抗 - I L - 6 の可変重鎖領域、ヒト I g G 1 の定常重鎖領域、開裂ドメイン、抗 - I L - 6 の可変軽鎖領域、及び、I g G 1 の定常軽鎖領域を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 1 2 】

ある実施形態において、当該組成物は、抗 - C D 1 2 6 の可変重鎖領域、ヒト I g G 1 の定常重鎖領域、開裂ドメイン、抗 C D 1 2 6 の可変軽鎖領域、及び I g G 1 の定常軽鎖領域を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 1 3 】

ある実施形態において、当該組成物は、リーダー配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【 0 0 1 4 】

ある実施形態において、当該組成物は、発現ベクターを含む。

【 0 0 1 5 】

様々な実施形態において、本発明は、当該核酸分子を含む組成物を提供する。ある実施形態において、当該組成物は、医薬として許容可能な賦形剤をさらに含む。

【 0 0 1 6 】

ある実施形態において、本発明は、対象における疾患を予防または処置する方法であって、当該対象に対して、本明細書に記載の組成物を投与することを含む方法を提供する。ある実施形態において、当該疾患は、がんである。ある実施形態において、当該疾患は、自己免疫疾患である。ある実施形態において、当該疾患は、敗血症である。ある実施形態において、当該疾患は、ウイルス感染である。ある実施形態において、当該疾患は、多中心性キャスルマン病である。ある実施形態において、当該疾患は、高熱と関連している。ある実施形態において、当該疾患は、移植片対宿主病 (G V H) である。ある実施形態において、当該疾患は、細胞崩壊症候群である。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 7 】

【 図 1 】 図 1 は、抗 - I L - 6、及び、抗 - C D 1 2 6 をコードする D N A 構築物の概略図である。

【 図 2 】 図 2 A ~ 図 2 C を含む図 2 は、D M A b 構築物が、2 9 3 T 細胞において発現することを実証する実験の結果を示す。H E K 2 9 3 T 細胞を、抗 - I L - 6 (I L - 6 1 ~ 4)、または、抗 - C D 1 2 6 (C D 1 2 6 1 ~ 2) 構築物を保有するプラスミド D N A でトランスフェクトした。空のプラスミドを、陰性のコントロールとして用いた。(図 2 A 及び図 2 B) ヒト I g G 1 発現を、定量的 E L I S A (N = 3 トランスフェクション反復、± S E M 。) で決定した (図 2 C)。上清の重鎖及び軽鎖ペプチド開裂、及び、発現を示す代表的なウエスタンブロット。

40

【 図 3 】 図 3 A は、図 3 A 及び図 3 B を含んでおり、筋肉内電気穿孔をした後のマウス血清で、D M A b がインビボで発現することを実証する実験の結果を示す。B A L B / c マウスに対して、1 0 0 μ g のプラスミド D N A の筋肉内注射を行い、続いて、筋肉内電気穿孔をした。7 日後に、血清ヒト I g G 1 抗体レベルを、E L I S A で決定した。(図 3 A) 抗 - I L - 6 D M A b は、0 日目の採血前レベルのベースラインを超えて、1

50

. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 7 . 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (平均)まで発現した。(図3B)抗-CD126 DMA bは、0日目の採血前レベルのベースラインを超えて、1 . 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 . 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (平均)まで発現した。(N = 5、平均 \pm SEM。)

【図4】図4は、筋肉-電気穿孔をしたマウスから得た血清でのDMA bが、インビトロで標的抗原に結合する、ことを実証する実験の結果を示す。BALB/cマウスに対して、100 μg のプラスミドDNAの筋肉内注射を行い、続いて、筋肉内電気穿孔をした。1週間後に、組換えヒトIL-6(左)、及び、ヒトCD126(右)に結合する血清ヒト-IgG抗体をELISAで決定した。(N = 5、平均 \pm SEM。)

【図5】図5は、血清DMA bが、インビトロで、IL-6媒介細胞シグナル伝達を遮断する、ことを実証する実験の結果を示す。ヒトCD126及びSTAT3-誘導性分泌アルカリホスファターゼ(SEAP)で安定してトランスフェクトしたHEK-293細胞を得た。未処理マウス由来の希釈血清(1:40)は、マウス-IL-6駆動SEAP発現のベースラインレベルを誘導しており、細胞上清での100%SEAP活性(灰色棒)に対して標準化をした。DMA b電気穿孔処置して7日目のマウス由来の血清を希釈(1:40)し、及び、細胞の上清を、未処理コントロール(黒色棒)のパーセンテージとして、SEAP活性についてアッセイした。非特異的サイトカインTNFを、特異的サイトカイン活性化(白色棒)のコントロールとして作用させた。(N = 4、平均 \pm SEM。)

10

【図6】図6は、血清DMA bが、インビトロで、IL-6媒介細胞シグナル伝達を遮断する、ことを実証する実験の結果を示す。ヒトCD126及びSTAT3-誘導性分泌アルカリホスファターゼ(SEAP)で安定してトランスフェクトしたHEK-293細胞を得た。未処理マウス由来の希釈血清(1:40~1:40960)は、マウス-IL-6駆動SEAP発現のベースラインレベルを誘導しており、細胞上清での100%SEAP活性(黒色線)に対して標準化をした。DMA b電気穿孔処置して7日目のマウス由来の血清を希釈(1:40~1:40960)し、及び、細胞上清(青色線)を、SEAP活性について示した通りにアッセイした。非特異的サイトカインTNFを、特異的サイトカイン活性化(灰色線)のコントロールとして作用させた。(N = 4、平均 \pm SEM。)

20

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、抗体、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードする組換え核酸配列を含む組成物に関する。当該組成物を、それを必要とする対象に投与し、合成抗体のインビボでの発現および形成を容易にする。

30

【0019】

特に、当該組換え核酸配列から発現された当該重鎖ポリペプチド、及び、軽鎖ポリペプチドで、合成抗体を作ることができる。当該重鎖ポリペプチド、及び、軽鎖ポリペプチドは、所望の標的(例えば、IL-6、及び、CD126)に結合することができ、本明細書に記載したようにして作られた抗体と比較して免疫原性が大きく、かつ、所望の当該標的に対する免疫応答を惹起または誘発することができる合成抗体を得られるように互いに相互作用することができる。

【0020】

さらに、これらの合成抗体は、抗原誘発免疫応答にตอบสนองして産生される抗体よりも対象においてより迅速に生成される。当該合成抗体は、標的の範囲で効果的に結合し、かつ、中和をすることができる。また、当該合成抗体は、疾患から効果的に保護し、及び/または、疾患での延命を図ることができる。したがって、合成DNAプラスミドの形態の改変モノクローナル抗体(MAb)に関して、本発明は、抗体、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードする組換え核酸配列を含む組成物に関する。当該組成物は、それを必要とする対象に投与して、合成抗体のインビボでの発現及び形成を容易にする。ある実施形態において、当該ヌクレオチド配列を、本明細書に記載している。例えば、ある実施形態において、当該ヌクレオチド配列は、配列番号1、3、5、7、9、11、または、それらの変異体、または、それらの断片のヌクレオチド配列を含む。別の実施形態において、当該ヌクレオチド配列は、配列番号2、4、6、8、10、12、または

40

50

、それらの変異体、または、それらの断片のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を含む。ある実施形態において、当該ヌクレオチド配列は、本明細書に記載したDNA配列から転写したRNA配列を含む。例えば、ある実施形態において、当該ヌクレオチド配列は、配列番号1、3、5、7、9、11、または、それらの変異体、または、それらの断片のDNA配列によって転写されたRNA配列を含む。別の実施形態において、当該ヌクレオチド配列は、配列番号2、4、6、8、10、12、または、それらの変異体、または、それらの断片のポリペプチド配列をコードするDNA配列によって転写されたRNA配列を含む。

【0021】

ある実施形態において、当該ヌクレオチド配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、及び、配列番号12からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、当該アミノ酸配列の全長にわたって、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または、少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする。ある実施形態において、当該ヌクレオチド配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、及び、配列番号12からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、当該アミノ酸配列の全長にわたって、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または、少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列の断片をコードする。

10

【0022】

ある実施形態において、当該ヌクレオチド配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、及び、配列番号11からなる群より選択されるヌクレオチド配列に対して、当該ヌクレオチド配列の全長にわたって、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または、少なくとも約95%の同一性を有する。ある実施形態において、当該ヌクレオチド配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、及び、配列番号11からなる群より選択されるヌクレオチド配列に対して、当該ヌクレオチド配列の全長にわたって、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するヌクレオチド配列の断片である。

20

【0023】

1. 定義

特に定義していない限り、本明細書で使用する全ての技術的用語及び科学的用語は、当業者が一般的に理解するものと同じ意味を有する。矛盾が生じる場合には、定義を含めて本明細書が優先となる。本発明の実施または試験において、本明細書に記載したものと同様または同等の方法及び材料を用いることはできるが、好適な方法及び材料を以下に記載する。本明細書で言及する全ての刊行物、特許出願、特許、及び、他の引用文献は、本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する。なお、本明細書で開示した材料、方法、及び、実施例は、単なる例示であり、限定することを意図するものではない。

30

【0024】

本明細書で使用する用語「を含む (comprise(s))」、「を含む (include(s))」、「を有する (having)」、「を有する (has)」、「できる (can)」、「を含む (contain(s))」、及び、その変形は、付加的な行為または構造の可能性を妨げない、制限しない移行句、用語、または、単語であることを意図している。単数形である「a」、「and」、および「the」は、文脈上断りの無い限りは、複数形の意味を持つこともある。本開示は、明示的に記載されているかどうかに関わらず、本明細書に示される実施形態または要素「を含む (comprising)」、「からなる (consisting of)」、および「から実質的になる (consisting essentially of)」その他の実施形態も企図する。

40

【0025】

「抗体」は、クラスIgG、IgM、IgA、IgD、または、IgEの抗体、または、Fab、F(ab')₂、Fdを含む、その断片もしくは誘導体、ならびに、その一本鎖

50

抗体、及び、誘導体を意味し得る。当該抗体は、哺乳動物の血清試料から単離された抗体、ポリクローナル抗体、親和性精製抗体、または、これらの混合物のうち、所望のエピトープ、または、それに由来する配列に対する十分な結合特異性を示すものであり得る。

【 0 0 2 6 】

本明細書で互換的に使用する、「抗体断片」または「抗体の断片」は、抗原結合部位または可変領域を含む完全抗体の一部分のことを指す。この部分は、完全抗体のFc領域のある特定の重鎖領域（すなわち、抗体アイソタイプに応じてCH₂、CH₃またはCH₄）を含まない。抗体断片の例として、Fab断片、Fab'断片、Fab'-SH断片、F(ab')₂断片、Fd断片、Fv断片、ダイアボディ、一本鎖Fv(scFv)分子、1つの軽鎖可変領域のみを含有する一本鎖ポリペプチド、軽鎖可変領域の3つのCDRを含有する一本鎖ポリペプチド、1つの重鎖可変領域のみを含有する一本鎖ポリペプチド、及び、重鎖可変領域の3つのCDRを含有する一本鎖ポリペプチドなどがあるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 2 7 】

「抗原」は、宿主内で免疫応答を惹起することが可能なタンパク質のことを指す。抗原は、抗体により認識されて結合され得る。抗原は、体内または外部環境から生じ得る。

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用する「コード配列」または「コード核酸」とは、当該核酸（RNAまたはDNA分子）のことを意味しており、本明細書に記載した抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。また、当該コード配列は、RNA配列をコードするDNA配列を含み得る。当該コード配列は、調節エレメントに作動可能に連結した開始シグナル、及び、終止シグナルをさらに含むことができ、同エレメントは、当該核酸の投与を受ける個体または哺乳動物の当該細胞での発現を指示することができるプロモーター及びポリアデニル化シグナルを含む。当該コード配列は、シグナルペプチドをコードする配列をさらに含み得る。

20

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用する「相補体」または「相補的」とは、ある核酸が、ヌクレオチド間または核酸分子のヌクレオチド類似体間に、ワトソン・クリック（例えば、A-T/U及びC-G）、または、フーグスティーン塩基対を表わすことを意味し得る。

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用する「定電流」とは、組織、または、当該組織を規定する細胞が、同組織に送達される電気パルスの持続期間中に受容する、または、経験する電流を定義する。当該電気パルスは、本明細書に記載の電気穿孔装置から送達される。この電流は、電気パルスの寿命期間中、当該組織に定電流量で留まるが、それは、本明細書で提供される電気穿孔装置が、好ましくは、瞬間的フィードバックを有しているフィードバック素子を具備しているからである。当該フィードバック素子は、パルスの持続期間中の組織（または、細胞）の抵抗を測定し、及び、電気穿孔装置に自身の電気エネルギー出力を変化させる（例えば、電圧を上げる）ようにすることができるので、同組織での電流は、電気パルスの間ずっと（マイクロ秒のオーダーで）、及び、パルス間において、一定であり続ける。幾つかの実施形態において、フィードバック素子は、制御器を含む。

30

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用する「電流フィードバック」または「フィードバック」は、互換的に使用されており、及び、提供される電気穿孔装置の活発な応答を意味し得るが、これは、電極間の組織の電流を測定することと、電流を一定レベルで維持するために、EP装置が送達するエネルギー出力を適宜変化させることを含む。この一定レベルは、パルスシーケンスまたは電気処理を開始する前に、使用者が予め設定する。電気穿孔装置内の電気回路が、電極間の組織の電流を連続的にモニターし、そのモニターされた電流（または、組織内の電流）を予め設定された電流と比較し、連続的にエネルギー出力の調整を行なって、モニターされた電流を予め設定されたレベルで維持することができるように、フィードバックは、電気穿孔装置の電気穿孔コンポーネント、例えば、制御器によって達成され得る。当該フィードバックループは、瞬時のものであり得るものであり、それは、フィードバ

40

50

ックループが、アナログ閉ループフィードバックであるからである。

【0032】

本明細書で使用する「分散電流」とは、本明細書に記載の電気穿孔装置の様々な針電極アレイから送達される電流のパターンを意味し得るものであり、これらのパターンは、電気穿孔される組織のあらゆる領域に対する電気穿孔関連の熱ストレスの発生を最小限に抑えるか、または、好ましくは、消失させる。

【0033】

本明細書で互換的に使用する「電気穿孔」、「電気透過処理」、または「界面動電増強」(「EP」)は、生体膜に微細経路(細孔)を生じさせるための膜貫通電場パルスの使用を意味し得る。こうした微細経路の存在により、プラスミド、オリゴヌクレオチド、s iRNA、薬剤、イオン、及び、水などの生体分子が、細胞膜の片側から他方の側に通過することが可能になる。

10

【0034】

本明細書で使用する「内因性抗体」とは、体液性免疫応答を誘導するのに有効な量で存在する、抗原を投与されている対象内で生成される抗体のことを指し得る。

【0035】

本明細書で使用する「フィードバック機構」とは、ソフトウェアまたはハードウェア(または、ファームウェア)のいずれかによって実行されるプロセスであって、(エネルギーパルスの送達前、送達中、及び/または、送達後の)所望の組織のインピーダンスを受容し、それを現在値、好ましくは、電流と比較して、送達されるエネルギーパルスを調整して、予め設定された値を達成するプロセスのことを指し得る。フィードバック機構は、アナログ閉ループ回路により実施され得る。

20

【0036】

「断片」は、機能、すなわち、所望の標的に結合でき、かつ、全長抗体と同じ意図した効果を有する抗体のポリペプチド断片を意味し得る。抗体の断片は、シグナルペプチド、及び/または、第1位のメチオニンを含んでいても、欠いていても、いずれの場合にも、N末端、及び/または、C末端から少なくとも1つのアミノ酸が欠けている以外は、全長と100%同一であってもよい。断片は、付加されたあらゆる異種シグナルペプチドを除いて、特定の全長抗体の長さの20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上を含み得る。当該断片は、当該抗体に対して95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または、99%以上が同一であり、かつ、同一率を計算する際に含まれないN末端メチオニン、または、異種シグナルペプチドをさらに含むポリペプチドの断片を含む。さらに、断片は、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えば、IgEまたはIgGシグナルペプチドなどのN末端メチオニン、及び/または、シグナルペプチドをさらに含み得る。N末端メチオニン、及び/または、シグナルペプチドは、抗体の断片に結合し得る。

30

【0037】

抗体をコードする核酸配列の断片は、シグナルペプチド、及び/または、第1位のメチオニンをコードする配列を含んでいても、または、欠いていても、いずれの場合にも、5'末端、及び/または、3'末端から少なくとも1つのヌクレオチドが欠けている以外は、全長と100%同一とし得る。断片は、付加されたあらゆる異種シグナルペプチドを除いた特定の全長コード配列の長さの20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上を含み得る。当該断片は、抗体に対して95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または、99%以上が同一であり、かつ、同一率を計算する際に含まれないN末端メチオニン、または、異種シグナルペプチドをコードする配列をさらに任意に含むポリペプチドを

40

50

コードする断片を含み得る。さらに、断片は、免疫グロブリンシグナルペプチド、例えば、I g EまたはI g GシグナルペプチドなどのN末端メチオニン、及び/または、シグナルペプチドに対するコード配列をさらに含み得る。N末端メチオニン、及び/または、シグナルペプチドをコードするコード配列は、コード配列の断片に結合し得る。

【0038】

本明細書で使用する「遺伝子構築物」とは、DNAまたはRNA分子のことを指し、抗体などのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。また、当該遺伝子構築物は、RNAを転写するDNA分子のことも指し得る。当該コード配列は、調節エレメントに作動可能に連結した開始シグナル及び終止シグナルを含んでおり、同エレメントは、当該核酸分子の投与を受ける当該個体の当該細胞での発現を指示することができるプロモーター及びポリアデニル化シグナルを含む。本明細書で使用する場合、用語「発現可能な形態」とは、コード配列に作動可能に連結した必須の調節エレメントを含む遺伝子構築物のことを指し、同コード配列は、当該個体の細胞に存在する場合に、当該コード配列が発現されるように、タンパク質をコードする。

10

【0039】

本明細書において、2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の関係で使用する「同一」または「同一性」は、当該配列が、指定領域に渡って指定の割合の同一残基を有することを意味し得る。この割合を計算するには、2つの配列を好適に整列させ、指定領域に渡って2つの配列を比較し、双方の配列間で同一残基が発生する位置の数を確定して一致位置の数を得て、一致した位置の個数を指定領域の合計位置数で割り、計算結果に100を掛けることで、配列同一性のパーセント値を算出し得る。2つの配列の長さが異なるか、あるいは、アライメントにより1つ以上の付着末端が生じて、指定の比較領域に単一配列のみが含まれる場合には、単一配列の残基を、計算の分母には含めるが、分子には含めない。DNAとRNAを比較する場合には、チミン(T)とウラシル(U)を同等とみなし得る。同一性は、筆算で求めてもよく、あるいは、BLASTやBLAST 2.0等のコンピューター配列アルゴリズムを使用して計算することもできる。

20

【0040】

本明細書で使用する「インピーダンス」は、フィードバック機構を論ずる際に利用し得るものであり、かつ、オームの法則に従って電流値に変換することができるため、予め設定された電流と比較が可能である。

30

【0041】

本明細書で使用する「免疫応答」とは、1つ以上の核酸、及び/または、ペプチドの導入に応答して、宿主の免疫系、例えば、哺乳動物の免疫系が活性化することを意味し得る。この免疫応答は、細胞性応答または体液性応答、または、その両方であり得る。

【0042】

本明細書で使用する「核酸」または「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」は、互いに共有結合している少なくとも2つのヌクレオチドを意味し得る。一本鎖を表現することで、相補鎖の配列も定義される。したがって、核酸は、表現される一本鎖の相補鎖も包含する。ある核酸の多くの変異体を、所定の核酸として同一目的で使用し得る。したがって、核酸は、実質的に同一の核酸、及び、その相補体も含む。一本鎖は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で標的配列とハイブリダイズできるプローブを提供する。したがって、核酸は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするプローブも含む。

40

【0043】

核酸は、一本鎖または二本鎖とし得るものであり、あるいは、二本鎖と一本鎖の両方の配列の一部を含み得る。当該核酸は、DNA、双方のゲノム、及び、cDNA、RNA、または、ハイブリッドとし得るものであり、当該核酸は、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとの組み合わせを含み得るものであり、ウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン、及び、イソグアニンを含む塩基の組み合わせを含み得る。核酸は、化学合成法、または、組換え法

50

により取得し得る。

【0044】

本明細書で使用する「作動可能に連結した」は、遺伝子の発現が、遺伝子と空間的に接続しているプロモーターの制御下にあることを意味し得る。プロモーターは、その制御下にある遺伝子の5'（上流）または3'（下流）に位置し得る。当該プロモーターと遺伝子との間の距離は、プロモーターが由来する遺伝子において当該プロモーターを制御する遺伝子とプロモーターとの間の距離とほぼ同一とし得る。当該技術分野で周知の通り、プロモーター機能を喪失させずに、この距離の変化に適応し得る。

【0045】

本明細書で使用する「ペプチド」、「タンパク質」、または、「ポリペプチド」とは、アミノ酸の結合配列のことを意味することができ、天然、合成、または、天然及び合成の修飾、あるいは、それらの組み合わせとすることができる。

10

【0046】

本明細書で使用する「プロモーター」とは、核酸の細胞での発現を、実現し、活性化し、または、増強することのできる合成分子または天然由来分子のことを意味し得る。プロモーターは、発現をさらに増強し、及び/または、空間的発現、及び/または、その一時的発現を改変する目的で、1つ以上の特定の転写調節配列を含み得る。プロモーターは、遠位のエンハンサーエレメントまたは抑制エレメントを含むこともでき、このものは、転写開始部位から数千塩基対も離れた場所に位置することができる。プロモーターは、ウイルス、細菌、真菌、植物、昆虫、及び、動物を含む起源に由来し得る。プロモーターは、遺伝子成分の発現を調節し得るものであり、発現が起こる細胞、組織、もしくは、臓器、あるいは、発現が起こる発生段階については、恒常的もしくは差次的に、または、例えば、生理的ストレス、病原体、金属イオン、あるいは、誘発剤などの外部刺激に応答して同発現を調節し得る。プロモーターの代表例として、バクテリオファージT7プロモーター、バクテリオファージT3プロモーター、SP6プロモーター、lacオペレーター-プロモーター、tacプロモーター、SV40後期プロモーター、SV40初期プロモーター、RSV-LTRプロモーター、CMV IEプロモーター、SV40初期プロモーターまたはSV40後期プロモーター、及び、CMV IEプロモーターなどがある。

20

【0047】

「シグナルペプチド」及び「リーダー配列」は、本明細書で互換的に使用されており、本明細書に記載のタンパク質のアミノ末端に結合することができるアミノ酸配列のことを指す。一般的に、シグナルペプチド/リーダー配列は、タンパク質の局在化を指示する。本明細書で使用するシグナルペプチド/リーダー配列は、好ましくは、タンパク質を産生する細胞からタンパク質を分泌し易くする。シグナルペプチド/リーダー配列は、細胞からの分泌時に、タンパク質、別名、成熟タンパク質の残余から開裂されることが多い。シグナルペプチド/リーダー配列は、タンパク質のN末端に結合する。

30

【0048】

本明細書で使用する「ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件」とは、例えば、核酸の複合混合物において、第1の核酸配列（例えば、プローブ）が、第2の核酸配列（例えば、標的）とハイブリダイズする際の条件のことを意味し得る。ストリンジेंटな条件は配列に依存するため、状況に応じて変化する。ストリンジेंटな条件は、所定のイオン強度pHにおける特定の配列に対する融点（ T_m ）より約5～10低くなるように選択される。この T_m とは、（所定のイオン強度、pH、及び、核酸濃度下で）標的に対して相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度のことである（この標的配列は、過剰に存在するので、 T_m において、プローブの50%が平衡状態で占有される）。ストリンジेंटな条件は、塩濃度が、pH7.0～8.3において、約1.0M未満のナトリウムイオン、例えば、約0.01～1.0Mのナトリウムイオン濃度（または、その他の塩）であり、及び、温度が、短いプローブ（例えば、約10～50ヌクレオチド）では、低くとも約30、長いプローブ（例えば、約50ヌクレオチドを超えるもの）では、低くとも約60とし得る。ストリンジेंटな条件は、

40

50

ホルムアミドなどの不安定化剤を添加しても実現し得る。選択的または特異的ハイブリダイゼーションの場合、陽性シグナルは、バックグラウンドハイブリダイゼーションの少なくとも2～10倍であり得る。例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、以下の条件を含む。50%ホルムアミド、5×SSC、及び、1%SDSを用いて、42℃でのインキュベーション、あるいは、5×SSC、1%SDSを用いて、65℃でのインキュベーションと、0.2×SSC、及び、0.1%SDSを用いて、65℃での洗浄を含む。

【0049】

本明細書で互換的に使用する「対象」及び「患者」とは、あらゆる脊椎動物を指すものであって、哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、及び、マウス）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル、もしくは、アカゲザル、チンパンジーなどのサル）、及び、ヒトなどがあるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、当該対象は、ヒトあるいは非ヒトとし得る。当該対象あるいは患者は、その他の形態の処置を受け得る。

10

【0050】

本明細書で使用する「実質的に相補的」は、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、または、それ以上の個数のヌクレオチドまたはアミノ酸の領域に渡って、第1の配列が、第2の配列の相補体と、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または、99%が同一であること、あるいは、2つの配列が、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることを意味し得る。

20

【0051】

本明細書で使用する「実質的に同一」は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個、1000個、1100個、または、それ以上の個数のヌクレオチドまたはアミノ酸の領域に渡って、第1の配列と第2の配列が、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または、99%が同一であること、あるいは、核酸に関して、当該第1の配列が、当該第2の配列の相補体と実質的に相補的であることを意味し得る。

30

【0052】

本明細書で使用する「合成抗体」とは、本明細書に記載の組み換え核酸配列によってコードされ、そして、対象において生成される抗体のことを指す。

40

【0053】

本明細書で使用する「処置」または「処置する」は、疾患の予防、抑制、抑圧、または、完全排除の手段を介して、対象を疾患から防御するものと意味することができる。疾患を予防することは、その疾患の発症前に、当該対象に対して、本発明のワクチンを投与することを含む。疾患を抑制することは、その疾患の誘導後であって、その疾患の臨床的出現の前に、当該対象に対して、本発明のワクチンを投与することを含む。疾患を抑圧することは、その疾患の臨床的出現後に、当該対象に対して、本発明のワクチンを投与することを含む。

【0054】

核酸に関して本明細書で使用する「変異体」は、(i)基準ヌクレオチド配列の一部ま

50

たは断片、(i i) 基準ヌクレオチド配列またはその一部の相補体、(i i i) 基準核酸またはその相補体と実質的に同一の核酸、または、(i v) ストリンジエントな条件下で、基準核酸、その相補体、または、それらと実質的に同一の配列とハイブリダイズする核酸のことを意味し得る。

【 0 0 5 5 】

ペプチドまたはポリペプチドに関して使用する「変異体」は、アミノ酸の挿入、欠失、または、保存的置換によってアミノ酸配列が異なっているが、少なくとも1つの生物活性を保持しているものを意味し得る。また、変異体は、少なくとも1つの生物活性を保持するアミノ酸配列を有する基準タンパク質と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質も意味し得る。アミノ酸の保存的置換、すなわち、あるアミノ酸を、類似する特性（例えば、荷電領域の親水性、程度、及び、分布）の別のアミノ酸に置換することは、当該技術分野では、通常は軽微な変化を伴うものと認識されている。こうした軽微な変化は、当該技術分野で理解されているように、アミノ酸の疎水親水度指数を検討することで、部分的に同定できる。K y t e e t a l . , J . M o l . B i o l . 1 5 7 : 1 0 5 - 1 3 2 (1 9 8 2) 。アミノ酸の疎水親水度指数は、その疎水性と電荷の考察に基づく。類似の疎水親水度指数を有するアミノ酸は置換可能であり、その後もタンパク質機能を維持する、ことが当該技術分野において公知である。ある態様において、 ± 2 の疎水親水度指数を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性を用いて、生物機能を保持したタンパク質となる置換を明らかにすることもできる。ペプチドに関連してアミノ酸の親水性を検討することで、そのペプチドの局所的な最大平均親水性を計算でき、抗原性と免疫原性に対して良好に相関すると報告された有用な尺度となる。本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する米国特許第4,554,101号。当該技術分野で理解されているように、類似の親水性値を有するアミノ酸を置換すると、例えば、免疫原性などの生物活性を保持したペプチドが得られる。親水性値が互いに ± 2 以内のアミノ酸を用いて、置換を実施できる。アミノ酸の疎水性指標と親水性値の両方とも、そのアミノ酸の特定の側鎖の影響を受ける。こうした知見と一致して、生物機能に適合するアミノ酸の置換とは、当該アミノ酸の相対的類似性、特に、当該アミノ酸の側鎖の相対的類似性に依存するものと理解されており、このことは、疎水性、親水性、電荷、大きさ、及び、その他の特性から明らかになる。

【 0 0 5 6 】

変異体を、核酸配列とすることができ、同核酸配列は、当該完全遺伝子配列、または、その断片と、その全長にわたって、実質的に同一である。当該核酸配列は、当該遺伝子配列、または、その断片と、その全長にわたって、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または、100%同一とし得る。変異体を、アミノ酸配列とすることができ、同アミノ酸配列は、当該アミノ酸配列、または、その断片と、その全長にわたって、実質的に同一である。当該アミノ酸配列は、当該アミノ酸配列、または、その断片と、その全長にわたって、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または、100%が同一とし得る。

【 0 0 5 7 】

本明細書で使用する「ベクター」は、複製開始点を含む核酸配列を意味し得る。ベクターは、プラスミド、バクテリオファージ、細菌人工染色体、または、酵母人工染色体とし得る。ベクターは、DNAベクター、または、RNAベクターとし得る。ベクターは、自己複製過剰染色体ベクター、または、宿主ゲノムに組み込むベクターのいずれかとし得る。

【 0 0 5 8 】

本明細書における数値範囲の記載については、同程度の精度で、その間に入る各数を、明示的に企図している。例えば、6~9という範囲の場合、6及び9に加えて、7及び8という数を企図しており、6.0~7.0という範囲の場合、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、及び、7.0という数を明

10

20

30

40

50

示的に企図している。

【 0 0 5 9 】

2. 組成物

本発明は、抗体、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードする組換え核酸配列を含む組成物に関する。また、本発明は、哺乳動物細胞における抗体の産生、または、細菌、酵母、ならびに、ウイルスベクターを含むDNAまたはRNAベクターにおける送達のための使用に供する新規の配列を含む。当該核酸配列は、DNA配列、RNA配列、または、それらの組み合わせ、及び/または、それらの誘導體とし得る。当該組成物を、それを必要とする対象に投与した場合に、当該対象において合成抗体を生成できる。当該合成抗体は、当該対象に存在する標的分子（すなわち、IL-6、及び、CD126）に結合することができる。そのような結合は、標的を中和し、その他の分子、例えば、タンパク質、または、核酸によって標的の認識をブロックし、及び、当該標的に対する免疫応答を惹起または誘発することができる。

10

【 0 0 6 0 】

ある実施形態において、当該組成物は、合成抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。ある実施形態において、当該組成物は、第1の合成抗体をコードする第1のヌクレオチド配列、及び、第2の合成抗体をコードする第2のヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む。ある実施形態において、当該核酸分子は、開裂ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【 0 0 6 1 】

ある実施形態において、第1の合成抗体をコードする第1の当該ヌクレオチド配列は、重鎖領域をコードする第1のドメイン、及び、第1の当該合成抗体の当該軽鎖領域をコードする第2のドメインを含む。ある実施形態において、第2の合成抗体をコードする第2の当該ヌクレオチド配列は、当該重鎖領域をコードする第1のドメイン、及び、第2の当該合成抗体の当該軽鎖領域をコードする第2のドメインを含む。

【 0 0 6 2 】

ある実施形態において、当該核酸分子は、抗-IL-6抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。ある実施形態において、抗-IL-6抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、抗-IL-6の可変VH領域、及び、VL領域をコードするコドン最適化核酸配列を含む。ある実施形態において、抗-IL-6抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、ヒトIgG1のCH領域、及び、CL領域をコードするコドン最適化核酸配列を含む。

30

【 0 0 6 3 】

ある実施形態において、当該核酸分子は、抗-CD126抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。ある実施形態において、抗-CD126抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、抗-CD126の可変VH領域、及び、VL領域をコードするコドン最適化核酸配列を含む。ある実施形態において、抗-CD126抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、ヒトIgG1のCH領域、及び、CL領域をコードするコドン最適化核酸配列を含む。

【 0 0 6 4 】

ある実施形態において、当該核酸分子は、ヌクレオチド配列を含み、同ヌクレオチド配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、それらの断片、または、それらの相同配列から選択されるアミノ酸配列を含む抗-IL-6合成抗体をコードする。

40

【 0 0 6 5 】

ある実施形態において、当該抗-IL-6合成抗体は、配列番号2のアミノ酸配列を含み、同アミノ酸配列は、配列番号1のヌクレオチド配列によってコードされる。幾つかの実施形態において、当該抗-IL-6合成抗体は、配列番号2に記載のアミノ酸配列の全長にわたって、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または、100%が同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

50

【 0 0 6 6 】

配列番号 2 の断片を、提供することができる。断片は、配列番号 2 の少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または、少なくとも 9 9 % を含むことができる。幾つかの実施形態において、断片は、例えば、免疫グロブリンリーダーや、I g E リーダーなどのリーダー配列を含む。幾つかの実施形態において、断片は、リーダー配列を含まない。

【 0 0 6 7 】

ある実施形態において、当該抗 - I L - 6 合成抗体は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、同アミノ酸配列は、配列番号 3 のヌクレオチド配列によってコードされる。幾つかの実施形態において、当該抗 - I L - 6 合成抗体は、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列の全長にわたって、少なくとも約 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または、1 0 0 % が同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

10

【 0 0 6 8 】

配列番号 4 の断片を、提供することができる。断片は、配列番号 4 の少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または、少なくとも 9 9 % を含むことができる。幾つかの実施形態において、断片は、例えば、免疫グロブリンリーダーや、I g E リーダーなどのリーダー配列を含む。幾つかの実施形態において、断片は、リーダー配列を含まない。

20

【 0 0 6 9 】

ある実施形態において、当該抗 - I L - 6 合成抗体は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、同アミノ酸配列は、配列番号 5 のヌクレオチド配列によってコードされる。幾つかの実施形態において、当該抗 - I L - 6 合成抗体は、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列の全長にわたって、少なくとも約 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または、1 0 0 % が同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

30

【 0 0 7 0 】

配列番号 6 の断片を、提供することができる。断片は、配列番号 6 の少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または、少なくとも 9 9 % を含むことができる。幾つかの実施形態において、断片は、例えば、免疫グロブリンリーダーや、I g E リーダーなどのリーダー配列を含む。幾つかの実施形態において、断片は、リーダー配列を含まない。

【 0 0 7 1 】

ある実施形態において、当該抗 - I L - 6 合成抗体は、配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、同アミノ酸配列は、配列番号 7 のヌクレオチド配列によってコードされる。幾つかの実施形態において、当該抗 - I L - 6 合成抗体は、配列番号 8 に記載のアミノ酸配列の全長にわたって、少なくとも約 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または、1 0 0 % が同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

40

【 0 0 7 2 】

配列番号 8 の断片を、提供することができる。断片は、配列番号 8 の少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または、少なくとも 9 9 % を含むことができる。幾つかの実施形

50

態において、断片は、例えば、免疫グロブリンリーダーや、IgEリーダーなどのリーダー配列を含む。幾つかの実施形態において、断片は、リーダー配列を含まない。

【0073】

特定の実施形態において、当該核酸分子は、当該抗-IL-6合成抗体をコードするヌクレオチド配列を含み、当該ヌクレオチド配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号6、それらの断片、または、それらの相同配列を含む。

【0074】

ある実施形態において、当該抗-IL-6合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号1の当該ヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、当該抗-IL-6合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号1に記載した当該核酸配列の全長にわたって、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または、100%が同一である。

10

【0075】

幾つかの実施形態は、配列番号1の断片に関する。断片は、配列番号1の少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、97%、少なくとも98%、または、少なくとも99%とすることができる。

【0076】

ある実施形態において、当該抗-IL-6合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号3の当該ヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、当該抗-IL-6合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号3に記載した当該核酸配列の全長にわたって、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または、100%が同一である。

20

【0077】

幾つかの実施形態は、配列番号3の断片に関する。断片は、配列番号3の少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、97%、少なくとも98%、または、少なくとも99%とすることができる。

30

【0078】

ある実施形態において、当該抗-IL-6合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号5の当該ヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、当該抗-IL-6合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号5に記載した当該核酸配列の全長にわたって、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または、100%が同一である。

【0079】

幾つかの実施形態は、配列番号5の断片に関する。断片は、配列番号5の少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、97%、少なくとも98%、または、少なくとも99%とすることができる。

40

【0080】

ある実施形態において、当該抗-IL-6合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号7の当該ヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、当該抗-IL-6合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号1に記載した当該核酸配列の全長にわたって、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または、100%が同一である。

【0081】

50

幾つかの実施形態は、配列番号7の断片に関する。断片は、配列番号7の少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、97%、少なくとも98%、または、少なくとも99%とすることができる。

【0082】

ある実施形態において、当該核酸分子は、ヌクレオチド配列を含み、同ヌクレオチド配列は、配列番号10、配列番号12、それらの断片、または、それらの相同配列から選択されるアミノ酸配列を含む抗-CD126合成抗体をコードする。

【0083】

ある実施形態において、当該抗-CD126合成抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を含み、同アミノ酸配列は、配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされる。幾つかの実施形態において、抗-CD126合成抗体は、配列番号10に記載した当該アミノ酸配列の全長にわたって、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または、100%が同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

10

【0084】

配列番号10の断片を、提供することができる。断片は、配列番号10の少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または、少なくとも99%を含むことができる。幾つかの実施形態において、断片は、例えば、免疫グロブリンリーダーや、IgEリーダーなどのリーダー配列を含む。幾つかの実施形態において、断片は、リーダー配列を含まない。

20

【0085】

ある実施形態において、当該抗-CD126合成抗体は、配列番号12のアミノ酸配列を含み、同アミノ酸配列は、配列番号11のヌクレオチド配列によってコードされる。幾つかの実施形態において、抗-CD126合成抗体は、配列番号12に記載した当該アミノ酸配列の全長にわたって、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または、100%が同一であるアミノ酸配列を含むことができる。

30

【0086】

配列番号12の断片を、提供することができる。断片は、配列番号12の少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または、少なくとも99%を含むことができる。幾つかの実施形態において、断片は、例えば、免疫グロブリンリーダーや、IgEリーダーなどのリーダー配列を含む。幾つかの実施形態において、断片は、リーダー配列を含まない。

【0087】

特定の実施形態において、当該核酸分子は、抗-CD126合成抗体をコードするヌクレオチド配列を含み、当該ヌクレオチド配列は、配列番号9、配列番号11、それらの断片、または、それらの相同配列のヌクレオチド配列を含む。

40

【0088】

ある実施形態において、当該抗-CD126合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号9のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、当該抗-CD126合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号9に記載した当該核酸配列の全長にわたって、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または、100%を含む。

【0089】

50

幾つかの実施形態は、配列番号 9 の断片に関する。断片は、配列番号 9 の少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または、少なくとも 99 % とすることができる。

【0090】

ある実施形態において、当該抗 - CD 126 合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号 11 のヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態において、当該抗 - CD 126 合成抗体をコードする当該ヌクレオチド配列は、配列番号 11 に記載した当該核酸配列の全長にわたって、少なくとも約 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または、100 % を含む。

10

【0091】

幾つかの実施形態は、配列番号 11 の断片に関する。断片は、配列番号 11 の少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または、少なくとも 99 % とすることができる。

【0092】

本発明の組成物は、IL - 6、及び/または、CD 126 活性に関連するあらゆる疾患、障害、または、病態に対して、処置、予防、及び/または、保護をすることができる。特定の実施形態において、当該組成物は、炎症に対して、処置、予防、及び/または、保護をすることができる。特定の実施形態において、当該組成物は、自己免疫疾患、または、障害に対して、処置、予防、及び/または、保護をすることができる。特定の実施形態において、当該組成物は、がんに対して、処置、予防、及び/または、保護をすることができる。

20

【0093】

当該合成抗体は、当該組成物の投与を受けた当該対象での疾患に対して、処置、予防、及び/または、保護をすることができる。当該合成抗体は、当該標的に結合することで、当該組成物の投与を受けた当該対象での疾患に対して、処置、予防、及び/または、保護をすることができる。当該合成抗体は、当該組成物の投与を受けた当該対象における当該疾患での延命を図ることができる。当該合成抗体は、当該組成物の投与を受けた当該対象での当該疾患で、少なくとも約 50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または、100 % の延命を果たすことができる。他の実施形態において、当該合成抗体は、当該組成物の投与を受けた当該対象での当該疾患で、少なくとも約 65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、または、80 % が生存を果たすことができる。

30

【0094】

当該組成物は、当該対象に当該組成物を投与した後、少なくとも約 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、8 時間、9 時間、10 時間、11 時間、12 時間、13 時間、14 時間、15 時間、20 時間、25 時間、30 時間、35 時間、40 時間、45 時間、50 時間、または、60 時間以内に、その対象にて当該合成抗体を生成することができる。当該組成物は、当該対象に当該組成物を投与した後、少なくとも約 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、または、10 日以内に、その対象にて当該合成抗体を生成することができる。当該組成物は、当該対象に当該組成物を投与した後、約 1 時間 ~ 約 6 日、約 1 時間 ~ 約 5 日、約 1 時間 ~ 約 4 日、約 1 時間 ~ 約 3 日、約 1 時間 ~ 約 2 日、約 1 時間 ~ 約 1 日、約 1 時間 ~ 約 72 時間、約 1 時間 ~ 約 60 時間、約 1 時間 ~ 約 48 時間、約 1 時間 ~ 約 36 時間、約 1 時間 ~ 約 24 時間、約 1 時間 ~ 約 12 時間、または、約 1 時間 ~ 約 6 時間以内に、その対象にて当該合成抗体を生成することができる。

40

【0095】

50

当該組成物は、それを必要とする対象に投与した場合に、抗原の投与を受けて体液性免疫応答を誘発する対象において内因性抗体を生成する場合よりも迅速に、当該対象において当該合成抗体を生成することができる。当該組成物は、抗原の投与を受けて体液性免疫応答を誘発する対象において内因性抗体を生成する少なくとも約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または、10日前に、当該合成抗体を生成することができる。

【0096】

本発明の組成物は、安全であるなど、有効な組成物に必要とされる特徴を有しているため、当該組成物は、疾病や死亡に至らしめるものではなく、疾病を防御し、そして、投与が容易で、副作用もほぼ皆無であり、生物学的に安定で、また、用量当たりのコストも削減する。

10

【0097】

3. 組換え核酸配列

上記したように、当該組成物は、組換え核酸配列を含むことができる。当該組換え核酸配列は、当該抗体、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードすることができる。当該抗体の詳細については、後述する。

【0098】

当該組換え核酸配列を、異種核酸配列とすることができる。当該組換え核酸配列は、少なくとも1つの異種核酸配列、または、1つ以上の異種核酸配列を含むことができる。

【0099】

当該組換え核酸配列を、最適化核酸配列とし得る。そのような最適化は、当該抗体の免疫原性を増加、または、改変し得る。また、最適化は、転写、及び/または、翻訳を改善することもできる。最適化は、以下の1つ以上を含むことができる。低GC含量リーダー配列によって、転写を増大させること。mRNA安定性及びコドン最適化。コザック配列（例えば、GCC ACC）を追加して、翻訳を増進させること。そして、シグナルペプチドをコードする免疫グロブリン（Ig）リーダー配列を追加すること。そして、シス作用配列モチーフ（すなわち、内部TATAボックス）を可能な限り取り除くこと。

20

【0100】

a. 組換え核酸配列構築物

当該組換え核酸配列は、1つ以上の組換え核酸配列構築物を含むことができる。当該組換え核酸配列構築物は、1つ以上の構成要素を含むことができ、その詳細については、後述する。

30

【0101】

当該組換え核酸配列構築物は、重鎖ポリペプチド、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードする異種核酸配列を含むことができる。当該組換え核酸配列構築物は、軽鎖ポリペプチド、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードする異種核酸配列を含むことができる。当該組換え核酸配列構築物は、プロテアーゼ、または、ペプチダーゼ開裂部位をコードする異種核酸配列も含むことができる。当該組換え核酸配列構築物は、1つ以上のリーダー配列を含むことができ、各リーダー配列は、シグナルペプチドをコードする。当該組換え核酸配列構築物は、1つ以上のプロモーター、1つ以上のイントロン、1つ以上の転写終止領域、1つ以上の開始コドン、1つ以上の終止コドンまたは停止コドン、及び/または、1つ以上のポリアデニル化シグナルを含むことができる。当該組換え核酸配列構築物はまた、1つ以上のリンカーまたはタグ配列も含むことができる。当該タグ配列は、赤血球凝集素（HA）タグをコードすることができる。

40

【0102】

(1) 重鎖ポリペプチド

当該組換え核酸配列構築物は、当該重鎖ポリペプチド、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードする異種核酸配列を含むことができる。当該重鎖ポリペプチドは、可変重鎖（VH）領域、及び/または、少なくとも1つの定常重鎖（CH）領域を含むことができる。少なくとも1つの当該定常重鎖領域は、定常重鎖領域1（CH1）、定

50

常重鎖領域 2 (C H 2)、定常重鎖領域 3 (C H 3)、及び/または、ヒンジ領域を含むことができる。

【 0 1 0 3 】

幾つかの実施形態において、当該重鎖ポリペプチドは、V H 領域、及び、C H 1 領域を含むことができる。他の実施形態において、当該重鎖ポリペプチドは、V H 領域、C H 1 領域、ヒンジ領域、C H 2 領域、及び、C H 3 領域を含むことができる。

【 0 1 0 4 】

当該重鎖ポリペプチドは、相補性決定領域 (「 C D R 」) セットを含むことができる。この C D R セットは、V H 領域の 3 つの超可変領域を含むことができる。当該重鎖ポリペプチドの N - 末端から開始して、これらの C D R を、それぞれ、「 C D R 1 」、
10 「 C D R 2 」、及び「 C D R 3 」と命名する。当該重鎖ポリペプチドの C D R 1、C D R 2、及び、C D R 3 は、当該抗原に対する結合、または、抗原の認識に寄与することができる。

【 0 1 0 5 】

(2) 軽鎖ポリペプチド

当該組換え核酸配列構築物は、当該軽鎖ポリペプチド、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードする異種核酸配列を含むことができる。当該軽鎖ポリペプチドは、可変軽鎖 (V L) 領域、及び/または、定常軽鎖 (C L) 領域を含むことができる。

【 0 1 0 6 】

当該軽鎖ポリペプチドは、相補性決定領域 (「 C D R 」) セットを含むことができる。
20 この C D R セットは、V L 領域の 3 つの超可変領域を含むことができる。当該軽鎖ポリペプチドの N - 末端から開始して、これらの C D R を、それぞれ、「 C D R 1 」、
「 C D R 2 」、及び「 C D R 3 」と命名する。当該軽鎖ポリペプチドの C D R 1、C D R 2、及び、C D R 3 は、当該抗原に対する結合、または、抗原の認識に寄与することができる。

【 0 1 0 7 】

(3) プロテアーゼ開裂部位

当該組換え核酸配列構築物は、当該プロテアーゼ開裂部位をコードする異種核酸配列を含むことができる。当該プロテアーゼ開裂部位は、プロテアーゼまたはペプチダーゼによって認識することができる。このプロテアーゼは、エンドペプチダーゼまたはエンドプロ
30 テアーゼとすることができ、例えば、フォーリン、エラスターゼ、H t r A、カルパイン、
トリプシン、キモトリプシン、トリプシン、及び、ペプシンなどがあるが、これらに限定されない。このプロテアーゼを、フォーリンとすることができる。他の実施形態において、このプロテアーゼを、セリンプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、または、内部ペプチド結合を開裂する (すなわち、N - 末端または C - 末端ペプチド結合を開裂しない) あらゆるプロテアーゼとすることができる。

【 0 1 0 8 】

当該プロテアーゼ開裂部位は、開裂の効率を改善または増大する 1 つ以上のアミノ酸配列を含むことができる。1 つ以上の当該アミノ酸配列は、個別のポリペプチドの形成または生成の効率を改善または増大することができる。1 つ以上の当該アミノ酸配列は、2 A
40 ペプチド配列を含むことができる。

【 0 1 0 9 】

(4) リンカー配列

組換え核酸配列構築物は、1 つ以上のリンカー配列を含むことができる。当該リンカー配列は、本明細書に記載の 1 つ以上の構成要素を、空間的に分離、または、連結することができる。他の実施形態において、当該リンカー配列は、2 つ以上のポリペプチドを空間的に分離、または、連結するアミノ酸配列をコードすることができる。

【 0 1 1 0 】

(5) プロモーター

当該組換え核酸配列構築物は、1 つ以上のプロモーターを含むことができる。1 つ以上
50

の当該プロモーターは、遺伝子発現を駆動し、かつ、調節することが可能なあらゆるプロモーターとし得る。かようなプロモーターは、DNA依存RNAポリメラーゼを経由する転写に必要とされるシス作用配列要素である。遺伝子発現の指示に用いられるプロモーターは、特定の用途によって選択される。当該プロモーターは、その自然環境における転写開始部位から由来しているため、当該組換え核酸配列構築物の当該転写開始からほぼ同じ距離で位置し得る。しかしながら、この距離の変動は、プロモーター機能を喪失せずに、適合し得る。

【0111】

当該プロモーターは、当該重鎖ポリペプチド、及び/または、当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列に作動可能に連結され得る。当該プロモーターは、真核細胞での発現に有効であることが示されたプロモーターとし得る。当該コード配列に作動可能に連結されたプロモーターは、CMVプロモーター、サルウイルス40(SV40)由来のプロモーター、例えば、SV40初期プロモーター、及び、SV40後期プロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)プロモーター、例えば、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)長い末端反復(LTR)プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、トリ白血病ウイルス(ALV)プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、例えば、CMV前初期プロモーターなど、エプスタインバーウイルス(EBV)プロモーター、または、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターなどとし得る。また、当該プロモーターは、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン、ヒトポリヘドリン、または、ヒトメタロチオネインなどのヒト遺伝子由来のプロモーターとし得る。

【0112】

当該プロモーターは、宿主細胞が何らかの特定の外的刺激に曝された場合にのみ転写を開始する、構成的プロモーター、または、誘導性プロモーターとすることができる。多細胞生物の場合、当該プロモーターを、特定の組織、または、器官、または、発生段階に特異的にすることもできる。また、当該プロモーターは、組織特異的プロモーター、例えば、筋肉または皮膚特異的プロモーター、天然または合成のものとし得る。かようなプロモーターの例は、本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する米国特許出願公開公報第US20040175727号に記載されている。

【0113】

当該プロモーターは、エンハンサーと関連することができる。当該エンハンサーは、当該コード配列の上流に位置することができる。当該エンハンサーは、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン、または、CMV、FMDV、RSV、または、EBVに由来するウイルスエンハンサーとし得る。ポリヌクレオチド機能増強は、本明細書の一部を構成するものとしてそれぞれの全内容を援用する米国特許第5,593,972号、第5,962,428号、及び、第WO94/016737号に記載されている。

【0114】

(6) イントロン

当該組換え核酸配列構築物は、1つ以上のイントロンを含むことができる。各イントロンは、機能的スプライドナー部位、及び、機能的スプライスアクセプター部位を含むことができる。当該イントロンは、スプライシングのエンハンサーを含むことができる。当該イントロンは、効率のよいスプライシングに必要な1つ以上のシグナルを含むことができる。

【0115】

(7) 転写終止領域

当該組換え核酸配列構築物は、1つ以上の転写終止領域を含むことができる。当該転写終止領域は、効率的な終止を提供するためにコード配列の下流とすることができる。当該転写終止領域は、上記したプロモーターと同じ遺伝子から取得することができ、あるいは、1つ以上の異なる遺伝子から取得することもできる。

10

20

30

40

50

【0116】

(8) 開始コドン

当該組換え核酸配列構築物は、1つ以上の開始コドンを含むことができる。当該開始コドンは、当該コード配列の上流に位置させることができる。当該開始コドンは、当該コード配列と共にインフレームにすることができる。当該開始コドンは、効率的な翻訳開始のために必要な1つ以上のシグナルと関連することができるが、例えば、リボソーム結合部位と関連することができるが、これに限定されることはない。

【0117】

(9) 終止コドン

当該組換え核酸配列構築物は、1つ以上の終止または停止コドンを含むことができる。当該終止コドンは、当該コード配列の下流とすることができる。当該終止コドンは、当該コード配列と共にインフレームにすることができる。当該終止コドンは、効率的な翻訳終止のために必要な1つ以上のシグナルと関連することができる。

10

【0118】

(10) ポリアデニル化シグナル

当該組換え核酸配列構築物は、1つ以上のポリアデニル化シグナルを含むことができる。当該ポリアデニル化シグナルは、当該転写の効率的なポリアデニル化のために必要な1つ以上のシグナルを含むことができる。当該ポリアデニル化シグナルは、当該コード配列の下流に位置させることができる。当該ポリアデニル化シグナルは、SV40ポリアデニル化シグナル、LTRポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン(bGH)ポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン(hGH)ポリアデニル化シグナル、または、ヒト - グロビンポリアデニル化シグナルとし得る。当該SV40ポリアデニル化シグナルは、pCEP4プラスミド(Invitrogen, San Diego, CA)由来のポリアデニル化シグナルとし得る。

20

【0119】

(11) リーダー配列

当該組換え核酸配列構築物は、1つ以上のリーダー配列を含むことができる。当該リーダー配列は、シグナルペプチドをコードすることができる。当該シグナルペプチドを、免疫グロブリン(Ig)シグナルペプチドとすることができ、例えば、IgGシグナルペプチド、及び、IgEシグナルペプチドなどがあるが、これらに限定されない。

30

【0120】

b. 組換え核酸配列構築物の配置

上記したように、当該組換え核酸配列は、1つ以上の組換え核酸配列構築物を含むことができ、当該組換え核酸配列構築物の各々は、1つ以上の構成要素を含むことができる。1つ以上の当該構成要素とは、先に詳述した通りである。1つ以上の当該構成要素が当該組換え核酸配列構築物に含まれる場合、互いにあらゆる順序で配置し得る。幾つかの実施形態において、1つ以上の当該構成要素は、後述するようにして、当該組換え核酸配列構築物に配置することができる。

【0121】

(1) 配置1

ある配置において、第1の組換え核酸配列構築物は、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列を含むことができ、かつ、第2の組換え核酸配列構築物は、当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列を含むことができる。

40

【0122】

当該第1の組換え核酸配列構築物は、ベクターに配置することができる。当該第2の組換え核酸配列構築物は、第2のベクター、または、他のベクターに配置することができる。当該組換え核酸配列構築物のベクターへの配置の詳細を、後述する。

【0123】

当該第1の組換え核酸配列構築物は、プロモーター、イントロン、転写終止領域、開始コドン、終止コドン、及び/または、ポリアデニル化シグナルも含むことができる。当該

50

第1の組換え核酸配列構築物は、当該リーダー配列が、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列の上流（または、5'）に位置する当該リーダー配列をさらに含むことができる。したがって、当該リーダー配列によってコードされる当該シグナルペプチドは、ペプチド結合によって当該重鎖ポリペプチドに連結することができる。

【0124】

当該第2の組換え核酸配列構築物は、プロモーター、開始コドン、終止コドン、及び、ポリアデニル化シグナルも含むことができる。当該第2の組換え核酸配列構築物は、当該リーダー配列が、当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列の上流（または、5'）に位置する当該リーダー配列をさらに含むことができる。したがって、当該リーダー配列によってコードされる当該シグナルペプチドは、ペプチド結合によって当該軽鎖ポリペプチドに連結することができる。

10

【0125】

したがって、配置1の一例は、VH及びCH1を含む当該重鎖ポリペプチドをコードする当該第1のベクター（したがって、第1の組換え核酸配列構築物）、及び、VL及びCLを含む当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該第2のベクター（したがって、第2の組換え核酸配列構築物）を含むことができる。配置1の第2の例は、VH、CH1、ヒンジ領域、CH2、及び、CH3を含む当該重鎖ポリペプチドをコードする当該第1のベクター（したがって、第1の組換え核酸配列構築物）、及び、VL及びCLを含む当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該第2のベクター（したがって、第2の組換え核酸配列構築物）を含むことができる。

20

【0126】

(2) 配置2

第2の配置において、当該組換え核酸配列構築物は、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列、及び、当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列を含むことができる。当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列は、当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列の上流（または5'）に配置することができる。あるいは、当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列を、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列の上流（または5'）に配置することができる。

【0127】

当該組換え核酸配列構築物のベクターへの配置の詳細を、後述する。

30

【0128】

当該組換え核酸配列構築物は、プロテアーゼ開裂部位、及び/または、リンカー配列をコードする当該異種核酸配列を含むことができる。当該組換え核酸配列構築物に含まれる場合、当該プロテアーゼ開裂部位をコードする当該異種核酸配列は、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列と当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列との間に配置することができる。したがって、当該プロテアーゼ開裂部位は、発現時に、当該重鎖ポリペプチド、及び、当該軽鎖ポリペプチドを、異なるポリペプチドに分離させる。他の実施形態において、当該リンカー配列が当該組換え核酸配列構築物に含まれる場合、当該リンカー配列は、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列と当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列との間に配置することができる。

40

【0129】

当該組換え核酸配列構築物は、プロモーター、イントロン、転写終止領域、開始コドン、終止コドン、及び/または、ポリアデニル化シグナルも含むことができる。当該組換え核酸配列構築物は、1つ以上のプロモーターを含むことができる。当該組換え核酸配列構築物は、第1のプロモーターが、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列と会合することができ、かつ、当該第2のプロモーターが、当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列と会合できるような、2つのプロモーターを含むことができる。さらに他の実施形態において、当該組換え核酸配列構築物は、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列、及び、当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列に関連する1つのプロモーターを含むことができる。

50

【 0 1 3 0 】

当該組換え核酸配列構築物は、第1のリーダー配列を、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列の上流（または、5'）に配置し、かつ、第2のリーダー配列を、当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列の上流（または、5'）に配置している、2つのリーダー配列をさらに含むことができる。したがって、当該第1のリーダー配列によってコードされる第1のシグナルペプチドは、ペプチド結合によって当該重鎖ポリペプチドに連結することができ、かつ、当該第2のリーダー配列によってコードされる第2のシグナルペプチドは、ペプチド結合によって当該軽鎖ポリペプチドに連結することができる。

【 0 1 3 1 】

したがって、配置2の一例は、VH及びCH1を含む当該重鎖ポリペプチド、及び、VL及びCLを含む当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該ベクター（したがって、組換え核酸配列構築物）を含むことができ、当該リンカー配列は、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列、及び、当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列を含む。

10

【 0 1 3 2 】

配置2の第2の例は、VH及びCH1を含む当該重鎖ポリペプチド、及び、VL及びCLを含む当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該ベクター（したがって、組換え核酸配列構築物）を含むことができ、当該プロテアーゼ開裂部位をコードする当該異種核酸配列は、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列と当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列との間に配置する。

20

【 0 1 3 3 】

配置2の第3の例は、VH、CH1、ヒンジ領域、CH2、及び、CH3を含む当該重鎖ポリペプチド、及び、VL及びCLを含む当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該ベクター（したがって、組換え核酸配列構築物）を含むことができ、当該リンカー配列は、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列と当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列との間に配置する。

【 0 1 3 4 】

配置2の第4の例は、VH、CH1、ヒンジ領域、CH2、及び、CH3を含む当該重鎖ポリペプチド、及び、VL及びCLを含む当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該ベクター（したがって、組換え核酸配列構築物）を含むことができ、当該プロテアーゼ開裂部位をコードする当該異種核酸配列は、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列と当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列との間に配置する。

30

【 0 1 3 5 】

c. 組換え核酸配列構築物からの発現

上記したように、当該組換え核酸配列構築物は、1つ以上の構成要素に、当該重鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列、及び/または、当該軽鎖ポリペプチドをコードする当該異種核酸配列を含むことができる。したがって、当該組換え核酸配列構築物は、当該重鎖ポリペプチド、及び/または、当該軽鎖ポリペプチドの発現を促す。

【 0 1 3 6 】

上記した配置1を用いる場合、当該第1の組換え核酸配列構築物は、当該重鎖ポリペプチドの発現を促すことができ、かつ、当該第2の組換え核酸配列構築物は、当該軽鎖ポリペプチドの発現を促すことができる。上記した配置2を用いる場合、当該組換え核酸配列構築物は、当該重鎖ポリペプチド、及び、当該軽鎖ポリペプチドの発現を促す。

40

【 0 1 3 7 】

発現時に、例えば、細胞、生物、または、哺乳動物に限らず、それらにおいて、当該重鎖ポリペプチド及び当該軽鎖ポリペプチドから、合成抗体を組み立てることができる。特に、当該重鎖ポリペプチド、及び、当該軽鎖ポリペプチドは、組み立てることで、当該抗原に結合することが可能な当該合成抗体をもたらすように、互いに相互作用することができる。他の実施形態において、当該重鎖ポリペプチド、及び、当該軽鎖ポリペプチドは、本

50

明細書に記載したようにして組み立てていない抗体と比較して、免疫原性が強い合成抗体を組み立てられるように、互いに相互作用することができる。さらに別の実施形態において、当該重鎖ポリペプチド、及び、当該軽鎖ポリペプチドは、当該抗原に対して免疫応答を惹起または誘導することができる合成抗体を組み立てられるように、互いに相互作用することができる。

【0138】

d. ベクター

ベクターとして、プラスミド、発現ベクター、組換えウイルス、組換え「裸のDNA」、ベクターなど、あらゆる形態などあるが、これらに限定されない。「ベクター」は、細胞を、感染、トランスフェクション、一時的または永久的に形質導入することができる核酸を含む。ベクターを、裸の核酸、または、タンパク質または脂質と複合体を形成した核酸とする、ことが認識されるであろう。当該ベクターは、ウイルスまたは細菌の核酸、及び/または、タンパク質、及び/または、膜（例えば、細胞膜、ウイルス性脂質エンベロープなど）を任意に含む。ベクターとして、DNAの断片が付着して複製され得るレプリコン（例えば、RNAレプリコン、バクテリオファージ）などがあるが、これらに限定されない。したがって、ベクターとして、RNA、自律的自己複製環状または線状DNAまたはRNA（例えば、プラスミド、ウイルスなど、米国特許第5,217,879号を参照されたい）などあり、また、発現プラスミドと非発現プラスミドの双方もあるが、これらに限定されない。組換え微生物または細胞培養物が、「発現ベクター」を宿しているとの記載がある場合、それは、染色体外の環状及び線状DNA、及び、宿主染色体に取り込まれたDNAの双方を含む。ベクターが宿主細胞によって維持される場合、当該ベクターは、有糸分裂中に自律的構造として安定に複製されるか、あるいは、宿主のゲノム内に組み込まれ得る。上記した組換え核酸配列構築物は、1つ以上のベクターに配置することができる。1つ以上の当該ベクターは、複製起点を含むことができる。1つ以上の当該ベクターは、プラスミド、バクテリオファージ、細菌人工染色体、または、酵母人工染色体とすることができる。1つ以上の当該ベクターを、自己複製染色体外ベクター、あるいは、宿主ゲノムに組み込まれるベクターとすることができる。

【0139】

1つ以上の当該ベクターは、異種発現構築物とすることができる、それは、一般的には、標的細胞に特定の遺伝子を導入するために使用されるプラスミドである。当該発現ベクターが細胞内に一旦入ると、当該組換え核酸配列構築物によってコードされる当該重鎖ポリペプチド、及び/または、当該軽鎖ポリペプチドは、当該細胞転写、及び、翻訳機構リボソーム複合体によって産生される。1つ以上の当該ベクターは、大量の安定したメッセンジャーRNA、及び、故に、タンパク質を発現することができる。

【0140】

(1) 発現ベクター

1つ以上の当該ベクターは、環状プラスミド、または、線状核酸とすることができる。当該環状プラスミド、及び、線状核酸は、適切な対象細胞において特定のヌクレオチド配列の発現を指示することができる。当該組換え核酸配列構築物を含む1つ以上の当該ベクターは、キメラとすることができる、このことは、その構成要素の少なくとも1つが、その他の構成要素の少なくとも1つに関して異種であることを意味している。

【0141】

(2) プラスミド

1つ以上の当該ベクターを、プラスミドとすることができる。当該プラスミドは、当該組換え核酸配列構築物で細胞をトランスフェクトするために有用であり得る。当該プラスミドは、当該組換え核酸配列構築物を当該対象に導入するために有用であり得る。また、当該プラスミドは、当該プラスミドが投与される細胞における遺伝子発現に十分に適合し得る調節配列を含み得る。

【0142】

当該プラスミドは、当該プラスミドを染色体外で維持し、かつ、細胞内で当該プラスミ

10

20

30

40

50

ドの複数のコピーを産生するために、哺乳動物の複製起点をも含み得る。当該プラスミドを、Invitrogen (San Diego, CA) の pVAX、pCEP4、または、pREP4 とすることができ、それらは、エプスタインバーウイルス起点複製、及び、核抗原 EBNA-1 コード領域を含み得るものであり、組み込みをしなくとも、高コピーエピソーム複製を生じ得る。当該プラスミドの主鎖を、pAV0242 とすることができる。このプラスミドを、複製欠損型アデノウイルス5型 (Ad5) プラスミドとし得る。

【0143】

当該プラスミドを、E. coli におけるタンパク質産生のために使用され得る、pSE420 (Invitrogen, San Diego, CA) とし得る。また、当該プラスミドは、酵母の *Saccharomyces cerevisiae* 株におけるタンパク質産生のために使用され得る、pYES2 (Invitrogen, San Diego, CA) とし得る。また、当該プラスミドは、昆虫細胞におけるタンパク質産生のために使用され得る、MAXBAC (商標) 完全バキュロウイルス発現系 (Invitrogen, San Diego, CA) のものとし得る。また、当該プラスミドは、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞などの哺乳動物細胞におけるタンパク質産生のために使用され得る、pcDNA1 または pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) とし得る。

【0144】

(3) RNA ベクター

ある実施形態において、当該核酸は、RNA 分子である。ある実施形態において、当該 RNA 分子は、本明細書に記載した DNA 配列から転写される。例えば、幾つかの実施形態において、当該 RNA 分子は、配列番号 1、3、5、7、9、11 のいずれか 1 つ、または、その変異体、または、その断片によってコードされる。別の実施形態において、当該ヌクレオチド配列は、配列番号 2、4、6、8、10、12 のポリペプチド配列、または、その変異体、または、その断片をコードする DNA 配列によって転写される RNA 配列を含む。したがって、ある実施形態において、本発明は、本明細書に記載した 1 つ以上の抗体または他の分子をコードする RNA 分子を提供する。当該 RNA は、プラス鎖とし得る。したがって、幾つかの実施形態において、当該 RNA 分子は、逆転写などの介在性複製ステップを必要とせずに、細胞によって翻訳することができる。本発明に有用な RNA 分子は、5' キャップ (例えば、7-メチルグアノシン) を有し得る。このキャップは、当該 RNA のインピボでの翻訳を改善することができる。本発明に有用な RNA 分子の当該 5' ヌクレオチドは、5' 三リン酸基を有し得る。キャップした RNA において、このものは、5' から 5' への架橋を介して 7-メチルグアノシンに連結し得る。RNA 分子は、3' ポリ-A テイルを有し得る。それは、ポリA ポリメラーゼ認識配列 (例えば、AAUAAA) も、3' 末端の近傍に有する。本発明に有用な RNA 分子は、一本鎖とし得る。

【0145】

(4) 環状及び線状ベクター

1 つ以上の当該ベクターを、1 つ以上の環状プラスミドとすることができ、同ベクターは、当該細胞ゲノムへの組み込みによって、標的細胞を形質転換し得るか、あるいは、染色体外に存在し得る (例えば、複製起点を有する自律複製プラスミド)。当該ベクターを、pVAX、pcDNA3.0、または、provax、または、当該組換え核酸配列構築物によってコードされる当該重鎖ポリペプチド、及び/または、当該軽鎖ポリペプチドを発現することができるあらゆる他の発現ベクターとし得る。

【0146】

電気穿孔によって対象に対して効率的に送達され、及び、当該組換え核酸配列によってコードされる当該重鎖ポリペプチド、及び/または、当該軽鎖ポリペプチドを発現することができる、線状核酸、または、線状発現カセット (「LEC」) も提供する。この LEC は、あらゆるリン酸主鎖を欠いた、あらゆる線状 DNA とし得る。当該 DNA は、1 つ以上の抗体をコードし得る。当該 LEC は、プロモーター、イントロン、終止コドン、ポリアデニル化シグナルを含むことができる。当該 LEC は、抗生物質耐性遺伝子、及び/

10

20

30

40

50

または、リン酸主鎖を含まなくともよい。当該LECは、所望の抗体発現とは無関係の他の核酸配列を含まなくともよい。当該LECは、電気穿孔を介して対象に効率的に送達され、かつ、1つ以上の所望の抗体を発現することができる。

【0147】

当該LECは、線状化することができるあらゆるプラスミドに由来し得る。これらは、細菌を増殖せずとも、かつ、線状化した配列からでなくとも、合成することができる。当該プラスミドは、当該組換え核酸配列構築物によってコードされた当該重鎖ポリペプチド、及び/または、軽鎖ポリペプチドを発現し得る。当該プラスミドは、pNP (Puerto Rico / 34)、または、pM2 (New Caledonia / 99) とし得る。当該プラスミドは、WLV009、pVAX、pcDNA3.0、または、prova
x、または、当該組換え核酸配列構築物によってコードされる当該重鎖ポリペプチド、及び/または、当該軽鎖ポリペプチドを発現することができるあらゆる他の発現ベクターとし得る。

10

【0148】

当該LECを、pcrM2とすることができる。当該LECを、pcrNPとすることができる。pcrNP、及び、pcrMRは、それぞれ、pNP (Puerto Rico / 34)、及び、pM2 (New Caledonia / 99) から誘導することができる。

【0149】

(5) ウイルスベクター

ある実施形態において、本明細書において、本発明の核酸を細胞に送達することができるウイルスベクターを提供する。当該発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供され得る。ウイルスベクター技術は、当該技術分野で周知であり、例えば、Sambrook et al. (2001)、及び、Ausubel et al. (1997)、及び、その他のウイルス学、及び、分子生物学のマニュアルに記載がされている。ベクターとして有用なウイルスとして、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、及び、レンチウイルスなどがあるが、これらに限定されない。一般的に、適切なベクターは、少なくとも1つの生物において機能する複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、及び、1つ以上の選択マーカを含む。(例えば、WO01/96584、WO01/29058、及び、米国特許第6,326,193号を参照されたい。ウイルスベクター、特に、レトロウイルスベクターは、遺伝子を哺乳類、例えば、ヒト細胞に挿入するための最も広く使用されている方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルス、及び、アデノ随伴ウイルスなどから誘導することができる。例えば、米国特許第5,350,674号、及び、第5,585,362号を参照されたい。

20

30

【0150】

(6) ベクターの調製方法

本明細書では、当該組換え核酸配列構築物が配置された1つ以上のベクターを調製する方法を提供する。最後のサブクロニング工程の後に、当該ベクターを用いて、当該技術分野で周知の方法を用いて、大規模発酵タンクに細胞培養物を接種することができる。

40

【0151】

他の実施形態において、最後のサブクロニング工程の後に、当該ベクターは、1つ以上の電気穿孔(EP)装置と共に使用することができる。このEP装置の詳細は、後述する。

【0152】

1つ以上のベクターは、公知の装置、及び、技術の組み合わせを利用して製剤または製造することができるが、好ましくは、それらを、2007年5月23日に出願された許諾対象である同時係属中の米国特許仮出願第60/939,792号に記載されたプラスミド製造技術を用いて製造する。幾つかの例において、本明細書に記載のDNAプラスミドは、10mg/mL以上の濃度で製剤することができる。その製造技術は、米国特許出願

50

第60/939792号に記載されたものに加えて、2007年7月3日に発行された許諾対象特許である米国特許第7,238,522号に記載されたものをはじめとする、当業者に概ね公知の様々な装置、及び、プロトコルをも含み、かつ、取り入れている。上記した参照出願及び特許である米国特許出願第60/939,792号、及び、米国特許第7,238,522号は、それぞれ、本明細書の一部を構成するものとしてそれらの全内容を援用する。

【0153】

4. 抗体

上記したように、当該組換え核酸配列は、抗体、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードすることができる。当該抗体は、抗原に結合できるか、あるいは、抗原と反応することができ、その詳細は、後述する。

10

【0154】

当該抗体は、本発明の組成物の投与を受けた当該対象での疾患に対して、処置、予防、及び/または、保護をすることができる。当該抗体は、当該抗原に結合することによって、当該組成物の投与を受けた当該対象での当該疾患に対して、処置、予防、及び/または、保護をすることができる。当該抗体は、当該組成物の投与を受けた当該対象において、当該疾患に対して延命を図ることができる。ある実施形態において、当該抗体は、当該抗体の投与を受けていない疾患を有する当該対象において予想された生存期間について、当該対象での当該疾患に対する延命を図ることができる。様々な実施形態において、当該抗体は、当該組成物の投与を受けた当該対象での当該疾患に対して、当該組成物の非存在下で予想された生存期間よりも、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または、100%の延命を可能にする。ある実施形態において、当該抗体は、当該抗体の投与を受けていない当該対象において予想された保護を超えて、当該対象での当該疾患からの保護を改善することができる。様々な実施形態において、当該抗体は、当該組成物の非存在下で予想した保護を超えて、当該組成物の投与を受けた当該対象の少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または、100%で、当該疾患からの保護を可能にする。

20

30

【0155】

当該抗体は、重鎖及び軽鎖相補性決定領域(「CDR」)セットを含んでいてもよく、それぞれは、CDRに対する支持体をもたらし、互いにCDRの空間関係を規定する、重鎖及び軽鎖フレームワーク(「FR」)セットの間に介在する。当該CDRセットは、重鎖または軽鎖V領域の3つの超可変領域を含み得る。重鎖または軽鎖のN-末端から開始して、これらの領域は、それぞれ、「CDR1」、「CDR2」、及び、「CDR3」と命名する。したがって、抗原結合部位は、各々が重鎖及び軽鎖V領域からなるCDRセットを含む6つのCDRを含み得る。

【0156】

タンパク質分解酵素パパインは、IgG分子を優先的に開裂して、幾つかの断片を生じさせ、その内の2つの(Fab)断片は、それぞれ、無傷抗原結合部位を含む共有結合ヘテロ二量体を含む。当該酵素ペプシンは、IgG分子を開裂して、双方の抗原結合部位を含むFab₂断片を含めた幾つかの断片を供することができる。したがって、当該抗体は、FabまたはFab₂とすることができる。当該Fabは、当該重鎖ポリペプチド、及び、当該軽鎖ポリペプチドを含むことができる。当該Fabの当該重鎖ポリペプチドは、当該VH領域、及び、当該CH1領域を含むことができる。当該Fabの軽鎖は、当該VL領域、及び、当該CL領域を含むことができる。

40

【0157】

当該抗体を、免疫グロブリン(Ig)とすることができる。当該Igを、例えば、Ig

50

A、IgM、IgD、IgE、及び、IgGとすることができる。当該免疫グロブリンは、当該重鎖ポリペプチド、及び、当該軽鎖ポリペプチドを含むことができる。当該免疫グロブリンの当該重鎖ポリペプチドは、VH領域、CH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、及び、CH3領域を含むことができる。当該免疫グロブリンの当該軽鎖ポリペプチドは、VL領域及びCL領域を含むことができる。

【0158】

当該抗体を、ポリクローナル抗体、または、モノクローナル抗体とすることができる。当該抗体は、キメラ抗体、一本鎖抗体、親和性成熟抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、または、完全ヒト抗体とすることができる。当該ヒト化抗体を、非ヒト種由来の相補性決定領域(CDR)の1つ以上と、ヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを含む、

10

所望の抗原に結合する非ヒト種由来の抗体とすることができる。

【0159】

当該抗体を、以下に詳述するような二重特異性抗体とすることができる。当該抗体は、以下にさらに詳述するような二機能性抗体とすることができる。

【0160】

上記したように、当該対象に当該組成物を投与すると、当該対象において、当該抗体を生成することができる。当該抗体は、当該対象内で半減期を有し得る。幾つかの実施形態において、当該抗体は、当該対象内でその半減期を延長または短縮するように改変され得る。そのような改変の詳細は、後述する。

【0161】

当該抗体は、その詳細を後述するように、脱フコシル化することができる。

20

【0162】

当該抗体は、その詳細を後述するように、当該抗原に関連する疾患の抗体依存性増強(ADE)を、緩和または防止するように修飾し得る。

【0163】

a. 二重特異性抗体

当該組換え核酸配列は、二重特異性抗体、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードすることができる。当該二重特異性抗体は、2つの抗原、例えば、詳細を後述した抗原の2つに結合、または、反応することができる。当該二重特異性抗体を、本明細書に記載した抗体の2つの断片から構成することができ、これにより、当該二重特異性抗体は、2つの所望の標的分子に結合、または、反応することができ、同標的分子は、詳細を後述した当該抗原、リガンド、受容体に対するリガンドなど、受容体、当該受容体でのリガンド結合部位など、リガンド-受容体複合体、及び、マーカー、がんマーカーなどを含み得る。

30

【0164】

b. 二機能性抗体

当該組換え核酸配列は、二機能性抗体、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードすることができる。当該二機能性抗体は、後述する抗原と結合するか、または、反応することができる。当該二官能性抗体は、当該抗原の認識及び抗原への結合を超えて、当該抗体に対して付加的な機能性を付与するように改変することもできる。そのような改変として、因子H、または、その断片へのカップリングを含むことができるが、これらに限定されない。因子Hは、補体活性化の可溶性調節因子であり、また、補体媒介性溶解(CML)を介した免疫応答に寄与し得る。

40

【0165】

c. 抗体半減期の延長

上記したように、当該抗体を、当該対象における当該抗体の半減期を延長または短縮するように改変し得る。当該改変は、当該対象での当該血清に含まれる当該抗体の当該半減期を延長または短縮し得る。

【0166】

当該改変は、当該抗体の定常領域に存在し得る。当該改変を、当該抗体の定常領域にお

50

ける1つ以上のアミノ酸の置換としてもよく、1つ以上の当該アミノ酸の置換を含有しない抗体の半減期と比較して、当該抗体の当該半減期を延長する。当該改変を、当該抗体のC H 2ドメインにおける1つ以上のアミノ酸の置換としてもよく、1つ以上の当該アミノ酸の置換を含有しない抗体の半減期と比較して、当該抗体の当該半減期を延長する。

【0167】

幾つかの実施形態において、当該定常領域における1つ以上の当該アミノ酸の置換として、当該定常領域のメチオニン残基をチロシン残基で置換すること、当該定常領域のセリン残基をスレオニン残基で置換すること、当該定常領域のスレオニン残基をグルタミン酸残基で置換すること、または、それらのあらゆる組み合わせを含み得るものであって、それにより、当該抗体の当該半減期を延長する。

10

【0168】

他の実施形態において、当該定常領域における1つ以上の当該アミノ酸の置換として、当該C H 2ドメインのメチオニン残基をチロシン残基で置換すること、当該C H 2ドメインのセリン残基をスレオニン残基で置換すること、当該C H 2ドメインのスレオニン残基をグルタミン酸残基で置換すること、または、それらのあらゆる組み合わせを含み得るものであって、それにより、当該抗体の当該半減期を延長する。

【0169】

d. 脱フコシル化

当該組換え核酸配列は、フコシル化されていない抗体（すなわち、脱フコシル化抗体、または、非フコシル化抗体）、その断片、その変異体、または、それらの組み合わせをコードすることができる。フコシル化は、当該糖フコースの分子への付加、例えば、N-グリカン、O-グリカン、及び、糖脂質へのフコースの結合を含む。したがって、脱フコシル化抗体では、フコースは、当該定常領域の当該炭水化物鎖に結合していない。次に、このフコシル化が欠如すると、当該フコシル化抗体と比較して、当該抗体によるFcRIIa結合、及び、抗体依存性細胞毒性(ADCC)活性を改善し得る。したがって、幾つかの実施形態において、当該非フコシル化抗体は、フコシル化抗体と比較して、ADCC活性の増加を示し得る。

20

【0170】

当該抗体を改変して、当該抗体のフコシル化を予防または阻害し得る。幾つかの実施形態において、そのような改変抗体は、未改変の当該抗体と比較して、ADCC活性の増加を示し得る。当該改変は、重鎖、軽鎖、または、それらの組み合わせとし得る。当該改変は、当該重鎖における1つ以上のアミノ酸の置換、当該軽鎖における1つ以上のアミノ酸の置換、または、それらの組み合わせとし得る。

30

【0171】

e. ADE応答の低下

当該抗体を改変して、当該抗原に関連する疾患の抗体依存性感染増強(ADE)は抑制または防止するが、当該抗原は依然として中和し得る。

【0172】

幾つかの実施形態において、当該抗体を改変して、FcγR1aに対する当該抗体の結合を抑制または予防する1つ以上のアミノ酸の置換を含むようにし得る。1つ以上の当該アミノ酸の置換は、当該抗体の当該定常領域に存在し得る。1つ以上の当該アミノ酸の置換は、当該抗体の当該定常領域でのロイシン残基をアラニン残基で置換すること、すなわち、本明細書でLA、LA変異、または、LA置換として示した置換を含み得る。1つ以上の当該アミノ酸の置換は、当該抗体の当該定常領域での2つのロイシン残基を、それぞれ、アラニン残基で置換すること、すなわち、本明細書でLALA、LALA変異、または、LALA置換として示した置換を含み得る。当該LALA置換の存在は、FcγR1aに対する抗体の結合を予防またはブロックし得るものであって、したがって、当該改変抗体は、当該抗原に関連する疾患のADEを増強または惹起せずに、当該抗原は依然として中和し得る。

40

【0173】

50

5. 標的

当該合成抗体は、その標的、または、その断片、または、その変異体に向かう。当該標的は、核酸配列、アミノ酸配列、または、それらの組み合わせとすることができる。当該核酸配列は、DNA、RNA、cDNA、それらの変異体、それらの断片、または、それらの組み合わせとすることができる。当該アミノ酸配列は、タンパク質、ペプチド、それらの変異体、それらの断片、または、それらの組み合わせとすることができる。

【0174】

ある実施形態において、当該標的は、IL-6である。ある実施形態において、当該標的は、CD126である。IL-6、及び、その受容体のCD126は、数多くの疾患における炎症、及び、自己免疫プロセスを刺激し、同疾患として、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、鬱病、アルツハイマー病、全身性エリテマトーデス、多発性骨髄腫、がん、ベーチェット病、及び、関節リウマチなどがあるが、これらに限定されない。

10

【0175】

6. 組成物の賦形剤及び他の成分

当該組成物は、医薬として許容される賦形剤をさらに含み得る。医薬として許容される当該賦形剤を、ビヒクル、担体、または、希釈剤としての機能的分子とすることができる。医薬として許容される当該賦形剤を、界面活性剤を含むことができる、トランスフェクション促進剤、例えば、免疫刺激複合体 (ISCOMS)、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリル脂質AなどのLPS類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体、スクアレン及びスクアレンなどの小胞、ヒアルロン酸、脂質、リポソーム、カルシウムイオン、ウイルスタンパク質、ポリアニオン、ポリカチオン、または、ナノ粒子、または、その他の公知のトランスフェクション促進剤とすることができる。

20

【0176】

当該トランスフェクション促進剤は、ポリアニオン、ポリカチオン、ポリ-L-グルタミン酸塩 (LGS) など、または、脂質である。当該トランスフェクション促進剤は、ポリ-L-グルタミン酸塩であり、かつ、当該ポリ-L-グルタミン酸塩は、6 mg/ml未満の濃度で当該組成物に存在し得る。当該トランスフェクション促進剤は、界面活性剤、例えば、免疫刺激複合体 (ISCOMS)、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリル脂質AなどのLPS類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体、及び、スクアレン及びスクアレンなどの小胞を含んでもよく、そして、ヒアルロン酸を用いて、当該組成物と共に投与もし得る。当該組成物は、トランスフェクション促進剤、例えば、脂質、レシチンリポソームまたはDNAリポソーム混合物 (例えば、W09324640を参照されたい) などの当該技術分野で周知のその他のリポソームなどのリポソーム、カルシウムイオン、ウイルスタンパク質、ポリアニオン、ポリカチオン、または、ナノ粒子、または、その他の公知のトランスフェクション促進剤も含み得る。当該トランスフェクション促進剤は、ポリアニオン、ポリカチオン、ポリ-L-グルタミン酸塩 (LGS) など、または、脂質である。当該ワクチンでの当該トランスフェクション剤の濃度は、4 mg/ml未満、2 mg/ml未満、1 mg/ml未満、0.750 mg/ml未満、0.500 mg/ml未満、0.250 mg/ml未満、0.100 mg/ml未満、0.050 mg/ml未満、または、0.010 mg/ml未満である。

30

40

【0177】

当該組成物は、本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する、1994年4月1日に出願された米国特許出願第021,579号に記載の遺伝的助長因子をさらに含み得る。

【0178】

当該組成物は、約1 ng ~ 100 mg、約1 µg ~ 約10 mg、または、好ましくは、約0.1 µg ~ 約10 mg、または、より好ましくは、約1 mg ~ 約2 mgの量のDNAを含む。幾つかの好ましい実施形態において、本発明の組成物は、約5 ng ~ 約1000 µgのDNAを含む。幾つかの好ましい実施形態において、組成物は、約10 ng ~ 約800 µgのDNAを含むことができる。幾つかの好ましい実施形態において、当該組成物

50

は、約 0.1 ~ 約 500 μg の DNA を含むことができる。幾つかの好ましい実施形態において、当該組成物は、約 1 ~ 約 350 μg の DNA を含むことができる。幾つかの好ましい実施形態において、当該組成物は、約 25 ~ 約 250 μg 、約 100 ~ 約 200 μg 、約 1 ng ~ 100 mg、約 1 μg ~ 約 10 mg、約 0.1 μg ~ 約 10 mg、約 1 mg ~ 約 2 mg、約 5 ng ~ 約 1000 μg 、約 10 ng ~ 約 800 μg 、約 0.1 ~ 約 500 μg 、約 1 ~ 約 350 μg 、約 25 ~ 約 250 μg 、約 100 ~ 約 200 μg の DNA を含むことができる。

【0179】

当該組成物は、用いられる投与様式にしたがって製剤することができる。注射可能な医薬組成物は、滅菌された発熱物質不含のもの、及び、微粒子不含のものとすることができる。等張性製剤または溶液を用いることができる。等張性のための添加剤として、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、及び、ラクトースがある。当該組成物は、血管収縮剤を含むことができる。当該等張性溶液は、リン酸緩衝生理食塩水を含むことができる。当該組成物は、ゼラチンやアルブミンなどの安定化剤をさらに含むことができる。当該安定剤、LGS、または、ポリカチオン、または、ポリアニオンなどは、製剤を、室温または周囲温度で、長時間安定にすることができる。

10

【0180】

7. 合成抗体の生成方法

また、本発明は、合成抗体の生成方法に関する。当該方法は、その詳細を後述する送達方法を用いて、それを必要とする当該対象に対して当該組成物を投与することを含むことができる。したがって、当該組成物を当該対象に投与した際に、当該合成抗体は、対象内またはインピボで生成される。

20

【0181】

また、当該方法は、当該組成物を、1つ以上の細胞に導入することを含むことができ、したがって、当該合成抗体を、1つ以上の細胞において生成または製造することができる。さらに、当該方法は、当該組成物を、例えば、皮膚、及び、筋肉に限らず、それら組織の1つ以上に対して導入することを含むことができ、したがって、当該合成抗体は、1つ以上の組織において生成または製造することができる。

【0182】

8. 抗体の同定方法またはスクリーニング方法

さらに、本発明は、上記した抗原に反応または結合する上記した抗体の同定またはスクリーニングの方法に関する。当該抗体を同定またはスクリーニングする当該方法を、当業者に周知の方法論における抗原に用いて、抗体を同定またはスクリーニングすることができる。そのような手法として、ライブラリ（例えば、ファージディスプレイ）由来の当該抗体の選択、及び、動物の免疫処置、続いて、当該抗体の単離、及び/または、精製があるが、これらに限定されない。

30

【0183】

9. 組成物の送達の方法

また、本発明は、当該組成物を、それを必要とする当該対象に対して送達する方法に関する。当該送達方法は、当該組成物を、当該対象に対して投与することを含む、ことができる。投与としては、インピボ電気穿孔を利用する、及び、同電気穿孔を利用しない核酸（すなわち、DNA 及び/または RNA、または、それらの改変型）注入、リポソーム介在送達、及び、ナノ粒子促進送達などがあるが、これらに限定されない。

40

【0184】

当該組成物の送達を受ける当該哺乳動物を、ヒト、霊長類、非ヒト霊長類、ウシ、畜牛、ヒツジ、ヤギ、レイヨウ、バイソン、水牛、バイソン、ウシ、シカ、ハリネズミ、ゾウ、ラマ、アルパカ、マウス、ラット、及び、ニワトリとし得る。

【0185】

当該組成物を、経口、非経口、舌下、経皮、経直腸、経粘膜、局所、吸入、頬側投与、胸腔内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻内、髄腔内、及び、関節内、または

50

、それらの組み合わせなどの異なる経路で投与し得る。獣医学的使用については、通常の獣医学的実施に従って、当該組成物を、適切に許容しうる製剤として投与し得る。獣医師は、特定の動物に対して最も適切な投与計画、及び、投与経路を、容易に決定することができる。当該組成物を、伝統的なシリンジ、無針注射装置、「微粒子衝撃遺伝子銃」、または、その他の物理的方法、例えば、電気穿孔法（E P）、「流体力学的方法」、または、超音波によって投与し得る。

【0186】

a. 電気穿孔

電気穿孔による当該組成物の投与は、細胞膜に可逆的な孔を形成させるのに効果的なエネルギーパルスを哺乳動物の所望の組織に送達するように構成することができる電気穿孔装置を用いて達成され得るものであり、及び、好ましくは、当該エネルギーパルスは、使用者が入力したプリセット電流に近い定電流である。当該電気穿孔装置は、電気穿孔コンポーネント、及び、電極アセンブリ、または、ハンドルアセンブリを含み得る。電気穿孔コンポーネントは、制御器、電流波形発生器、インピーダンススタ、波形口ガー、入力要素、ステータス報告要素、コミュニケーションポート、メモリーコンポーネント、電源、及び、電源スイッチなどの当該電気穿孔装置の1つ以上の様々な要素を含み、及び、組み込み得る。当該電気穿孔は、インピボ電気穿孔装置、例えば、CELECTRA EP システム（Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA）、または、Elgenエレクトロポレーター（Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA）を使用して、プラスミドによる細胞のトランスフェクションを容易にし得る。

【0187】

当該電気穿孔コンポーネントは、当該電気穿孔装置の1つの要素として機能し得るものであり、及び、その他の要素は、当該電気穿孔コンポーネントと連絡する別々の要素（または、コンポーネント）である。当該電気穿孔コンポーネントは、当該電気穿孔装置の1つを超える個数の要素として機能し得るものであり、当該電気穿孔コンポーネントとはなお別の当該電気穿孔装置のその他の要素とも連絡し得る。1つの電気機械的、または、機械的装置の一部として存在する当該電気穿孔装置の要素は、それらの要素が、1つの装置として、または、互いに連絡する別の要素として機能することができるものに限定しなくともよい。当該電気穿孔コンポーネントは、所望の組織内で定電流を生成するエネルギーパルスを送達し得るものであり、及び、フィードバック機構を含む。当該電極アセンブリは、空間的配置内に複数の電極を有する電極アレイを含み得るものであり、当該電極アセンブリは、当該電気穿孔コンポーネントからエネルギーパルスを受け、そして、電極を介して所望の組織に向けて同パルスを送達する。複数の当該電極の少なくとも1つは、エネルギーパルスの送達期間ではニュートラルであり、及び、所望の組織でのインピーダンスを測定して、そのインピーダンスを、当該電気穿孔コンポーネントに連絡する。当該フィードバック機構は、測定された当該インピーダンスを受けてもよく、また、当該電気穿孔コンポーネントによって送達されたエネルギーパルスを調整して、当該定電流を維持することができる。

【0188】

複数の電極は、分散パターンでエネルギーパルスを送達し得る。複数の当該電極は、プログラムされたシーケンス下の当該電極の制御を介して、当該分散パターンでエネルギーパルスを送達してもよく、そして、プログラムされたシーケンスは、使用者によって、電気穿孔コンポーネントに入力される。プログラムされた当該シーケンスは、順に送達された複数のパルスを含んでいてもよく、複数の当該パルスの各々のパルスが、インピーダンスを測定する1つのニュートラル電極を備えた少なくとも2つの活性電極によって送達されており、複数の当該パルスの次のパルスが、インピーダンスを測定する1つのニュートラル電極を備えた少なくとも2つの活性電極の異なる1つによって送達される。

【0189】

当該フィードバック機構は、ハードウェア、または、ソフトウェアのいずれかで実施し

得る。当該フィードバック機構は、アナログ閉回路によって実施し得る。当該フィードバックは、 $50\ \mu\text{s}$ 、 $20\ \mu\text{s}$ 、 $10\ \mu\text{s}$ 、または、 $1\ \mu\text{s}$ ごとに起こるが、好ましくは、実時間フィードバック、または、瞬時（すなわち、応答時間を決定するための入手可能な技術によって決定した実質的な瞬時）である。当該ニュートラル電極で、所望の組織でのインピーダンスを測定してもよく、そして、そのインピーダンスをフィードバック機構に連絡し、次いで、当該フィードバック機構が同インピーダンスに反応してエネルギーパルス調整し、及び、プリセット電流と同様の値の定電流を維持する。当該フィードバック機構は、エネルギーのパルスの送達期間内に定電流を連続的かつ瞬時的に維持し得る。

【0190】

本発明の組成物の送達を促進しうる電気穿孔装置及び電気穿孔法の例として、本明細書の一部を構成するものとしてそれらの全内容を援用する、*Draghia - Akli, et al.*、の米国特許第7,245,963号、*Smith, et al.*、が出願した米国特許公開第2005/0052630号に記載されたものがある。当該組成物の送達を促進するために用い得るその他の電気穿孔装置及び電気穿孔法として、本明細書の一部を構成するものとしてそれらの全内容を援用する、2006年10月17日に出願した米国特許仮出願第60/852,149号、及び、2007年10月10日に出願した同第60/978,982号に対して35 USC 119(e)による利益を主張する、2007年10月17日に出願した、同時係属中で、かつ、共有にかかる米国特許出願第11/874072号で提供されたものがある。

【0191】

Draghia - Akli, et al.、の米国特許第7,245,963号は、体内または植物内の選択された組織の細胞への生体分子の導入を促進するためのモジュラー電極システム、及び、その使用が記載している。このモジュラー電極システムは、複数の針電極、皮下注射針、プログラム可能な定電流パルス制御器から複数の針電極への導電的連結を提供する電気コネクタ、及び、電源を含み得る。使用者は、支持構造上に搭載された複数の針電極を掴み、そして、体内または植物内の選択された組織に同電極をしっかりと挿入することができる。その後、皮下注射針を介して、生体分子を選択された組織へ送達する。プログラム可能な当該定電流パルス制御器を活性化して、定電流の電気パルスを、複数の針電極に印加する。印加された当該定電流電気パルスは、複数の電極間での細胞内への生体分子の導入を促進する。本明細書の一部を構成するものとして米国特許第7,245,963号の全内容を援用する。

【0192】

Smith, et al.、が出願した米国特許公開第2005/0052630号には、体内または植物内の選択された組織の細胞への生体分子の導入を効果的に促進するために用い得る電気穿孔装置が記載されている。当該電気穿孔装置は、その操作が、ソフトウェアまたはファームウェアで指定される電気運動装置（「EKD装置」）を含む。このEKD装置は、ユーザ制御に基づく一列の電極とパルスパラメータ入力との間で一連のプログラム可能な定電流パルスパターンを生成し、そして、電流波形データの保存と取得を可能にする。当該電気穿孔装置は、針電極、注射針用の中央注入チャンネル、及び、取り外し可能なガイドディスクのアレイを有する交換可能な電極ディスクも含む。本明細書の一部を構成するものとして米国特許公開第2005/0052630号の全内容を援用する。

【0193】

米国特許第7,245,963号、及び、米国特許公開第2005/0052630号に記載された電極アレイ及び方法は、筋肉などの組織だけでなく、その他の組織または臓器にも深く浸透させるように適合し得る。電極アレイの形態によって、注射針（選択された生体分子を送達する）が、標的臓器にも完全に挿入され、そして、電極によって、あらかじめ描かれた領域の標的組織に対して垂直に注射投与される。米国特許第7,245,963号、及び、米国特許公開第2005/0052630号に記載された電極は、好ましくは、長さが20mmで、21ゲージのものである。

【 0 1 9 4 】

加えて、電気穿孔装置、及び、その使用を組み込んだ幾つかの実施形態で予期されるように、以下の特許、1993年12月28日発行の米国特許第5,273,525号、2000年8月29日発行の米国特許第6,110,161号、2001年7月17日発行の同第6,261,281号、2005年10月25日発行の同第6,958,060号、及び、2005年9月6日発行の米国特許第6,939,862号に記載された電気穿孔装置が存在する。さらに、様々な装置のいずれかをを用いてDNAを送達することに関係している2004年2月24日発行の米国特許第6,697,669号、及び、DNA注入の方法に関する2008年2月5日発行の米国特許第7,328,064号に開示された発明を含む特許は、本明細書において企図している。本明細書の一部を構成するものとして上記した全特許の内容を援用する。

10

【 0 1 9 5 】

10. 処置の方法

本明細書でさらに提供されるものは、それを必要とする対象において、疾患の処置、疾患に対する防御、及び/または、予防をする方法であり、合成抗体を当該対象内で生成する。当該方法は、当該組成物を当該対象に投与することを含むことができる。当該対象への当該組成物の投与は、上記した送達の方法を用いて行うことができる。

【 0 1 9 6 】

特定の実施形態において、本発明は、IL-6、及び/または、CD126が関連した疾患に対して、処置、保護を行い、及び/または、予防をする方法を提供する。例えば、ある実施形態において、当該方法は、自己免疫障害に対して処置、保護を行い、及び/または、予防をする。ある実施形態において、当該方法は、がんに対して処置、保護を行い、及び/または、予防をする。本発明の組成物の投与によって、処置または予防される疾患または障害の例として、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、鬱病、アルツハイマー病、全身性エリテマトーデス、多発性骨髄腫、がん、ベーチェット病、関節リウマチ、敗血症、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染、多中心性キャスルマン病、高熱を伴うあらゆる疾患、移植片対宿主病(GVH)、細胞崩壊症候群などがあるが、これらに限定されない。

20

【 0 1 9 7 】

当該対象内で合成抗体が生成されると、当該合成抗体は、当該抗原と、結合または反応することができる。かかる結合により、当該抗原を中和し、別の分子、例えば、タンパク質または核酸による抗原の認識をブロックし、そして、当該抗原に対する免疫応答を惹起または誘発し、それにより、当該対象での抗原と関連する疾患を処理、防御、及び/または、予防することができる。

30

【 0 1 9 8 】

当該組成物の用量は、1 μ g~100活性成分mg/体重kg/時間とすることができる、及び、20 μ g~100成分mg/体重kg/時間とすることができる。当該組成物は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、または、31日おきに、投与することができる。効果的な処置のための組成物の投与回数を、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または、10回とすることができる。

40

【実施例】

【 0 1 9 9 】

本発明は、複数の態様を有しており、その具体例を以下に示すが、これらに限定されることはない。

【 0 2 0 0 】

11. 実施例

以下の例において、本発明をさらに例示する。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すものであって、例示目的のみで記載しているものと理解すべきである。上記した説明、及び、これらの実施例から、当業者であれば、本発明に必須の特徴を確認する

50

ことができ、また、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本発明に対して様々な変更や改変を加えて、様々な用途や条件に適合させることができる。したがって、本明細書で説明した発明に加えて、本発明に対して様々な改変を加えることが当業者に自明であることは、上記した説明からも明らかである。そのような改変も、特許請求の範囲に属していることも意図をしている。

【0201】

例1

本明細書で提示した研究は、プラスミドDNAの筋肉内電気穿孔を介した機能性抗-IL-6、及び、抗-CD126「DNAモノクローナル抗体」(DMAb)の生成を実証する。

10

【0202】

これらの研究は、IL-6、及び、CD126を標的とする機能性DNAモノクローナル抗体(DMAb)が、インビボで発現されることを実証している。当該ヒトIgG1定常ドメインに関する4つの抗-IL-6モノクローナル抗体、及び、2つの抗-CD126モノクローナル抗体に由来するコドン最適化可変領域DNA配列を構築した。各抗体をコードするプラスミドDNAを、ヌードマウス、及び、免疫コンピテントマウスに対して電気穿孔で筋肉内に送達した。DMAb送達の複数の態様を、最適化して、インビボでの発現を増強し、同態様として、抗体配列、プラスミド重鎖及び軽鎖配列、及び、製剤がある。

【0203】

抗-IL-6、及び、抗-CD126 DMAbを、BALB/cマウスにおいて、1.5 µg/ml ~ 7.1 µg/mlの範囲のレベルで、血清で発現した。当該ヌードマウスにおける長期間のDMAb発現も観察した。血清DMAbは、精製IL-6、及び、CD126に対する機能的結合を保持していた。また、血清DMAbは、インビトロで、下流のIL-6細胞シグナル伝達を遮断した。抗-IL-6、及び、抗-CD126 DMAbについて、敗血症のコントロール、急性ウイルス感染中の炎症の抑制、及び、腫瘍進行の遅延における、それらの役割を研究した。これらの研究は、免疫病理におけるインビボでのIL-6シグナル伝達の役割をさらに定義する新規な方法を提供するのみならず、タンパク質抗体療法の代替としてDMAbを定義している。

20

【0204】

この研究は、DMAbが、既存の生物学的療法の代替であることを支持しており、かつ、新規な方法を提供して、免疫病理におけるインビボでのIL-6シグナル伝達の役割をさらに定義する。

30

【0205】

当該材料と方法についての説明をする。

【0206】

抗体DNA配列及びクローニング

抗-IL-6抗体(クラザキツマブ[Alder Biopharmaceuticals]、オロキズマブ[R-Pharm]、シルツキシマブ[Sylvant(登録商標)]、Janssen Biotech]、シルクマブ[Centocor/GSK])、及び、抗-CD126抗体(サリルマブ[Regeneron Pharmaceuticals]、トシリツマブ[Actemra(登録商標)]、Genentech)の可変VH及びVLアミノ酸配列を、コドン最適化した。コドン最適化した定常ヒトIgG1でDNA配列を合成し、そして、改変pVax-1(Invitrogen)哺乳動物発現プラスミドに、クローニングした。フォーリン/2Aペプチド開裂部位を、重鎖及び軽鎖ペプチドの分離のために残した(図1)。

40

【0207】

トランスフェクション

1 × 10⁶個の293T細胞を、GeneJammer(Agilent Technologies)を用いて、0.5 µgのプラスミドDNAでトランスフェクトした。細

50

胞上清、及び、全溶解物を、トランスフェクションの48時間後に回収した。

【0208】

DMAb電気穿孔

BALB/cマウスに対して、大腿四頭筋への筋肉内送達で、100µgの製剤したプラスミドDNAを与え、次いで、先述したようにして、CELLLECTRA(登録商標)3Pデバイス(Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA)で電気穿孔した(Flingai et al., 2015, Sci Rep, 5:12616; Muthumani et al., 2013, Hum Vaccin Immunother, 9(10):2253-63)。

【0209】

ELISA及びウエスタンブロット

ヒトIgG1を、抗-ヒト-Fc断片を用いて捕捉し、そして、ヒトIgG1コントロール(Bethyl)に対する定量を使って、二次抗-軽鎖-HRP結合抗体で検出した。組換えヒトIL-6、及び、CD126(Sino Biological)に対する結合を、HRP-結合抗-ヒト-IgG二次抗体(Sigma)で検出した。ウエスタンブロットを、結合抗-ヒトIgG 800nm抗体(Licor)を用いて行った。

【0210】

STAT3シグナル伝達アッセイ

ヒトCD126、及び、STAT3で誘導分泌したアルカリホスファターゼで安定してトランスフェクトしたHEK-Blue(商標)293細胞を、InVivoGenから購入した。マウス血清を、培地で、1:40に希釈し、そして、1ng/mlの組換えヒトIL-6で処理をした細胞に添加した。上清SEAPを、24時間後に、比色定量Quantiblu(商標)アッセイ(InVivoGen)でアッセイした。吸光度の値を、処置を受けていない(DMAbなし)マウス由来の血清を与える細胞におけるSEAP発現に対して正規化した。10µg/mlのTNFを、コントロールとして用いた。

【0211】

実験の結果を説明する。

【0212】

抗-IL-6、及び、抗-CD126抗体配列を含むプラスミドDNAの筋肉内電気穿孔は、インビボで、筋肉組織からモノクローナル抗体を生成する

抗-IL-6、及び、抗CD126モノクローナル抗体に由来するコドン最適化した可変領域のDNA配列を、ヒトIgG1定常ドメインで合成した。抗体をコードするプラスミドDNAを、BALB/cマウスに送達した(図1)。モノクローナル抗体可変VH及びVLアミノ酸配列を、DNAコドンで最適化した。当該コドン最適化DNAを、ヒトIgG1抗体の定常CH及びCL領域のDNA配列を用いて合成した。改変したDNA配列を、改変したpVax-1発現ベクターにクローニングした。当該プラスミド構築物を、筋肉内に注射し、続いて、CELLLECTRA(登録商標)デバイス(Inovio Pharmaceuticals)で電気穿孔を行った。インビボで産生されたヒトIgG1の発現及び機能を測定した。

【0213】

DMAb構築物は、トランスフェクトされた293T細胞から発現及び分泌される

実験を行って、当該DMAb構築物によってコードされる抗-IL-6、及び、抗-CD126の発現及び分泌を評価した。HEK293T細胞を、抗-IL-6、または、抗-CD126構築物を保有するプラスミドDNAでトランスフェクトした。空のプラスミドを、陰性コントロールとして用いた。ヒトIgG1発現を、定量的ELISAで決定し、及び、ウエスタンブロットを行って、上清の重鎖及び軽鎖ペプチドの開裂及び発現を検出した(図2A~図2C)。図2A及び図2Bに示したように、抗-IL-6、及び、抗-CD126は、HEK293T上清及びHEK293T溶解物において観察されており、このことは、抗-IL-6、及び、抗-IL-6抗体の発現及び分泌を誘導する、と

10

20

30

40

50

いうDMAb構築物の能力を示している。

【0214】

マウスにDNA電気穿孔した後の安定した血清レベルの抗-IL-6、及び、抗-CD126 DNAモノクローナル抗体

実験を行って、DMAbが、インビボで、抗-IL-6、及び、抗-CD126の発現を誘導するか否かを評価した。BALB/cマウスに、100 µgのプラスミドDNAを筋肉内に注射し、続いて、電気穿孔を行った。7日後に、血清ヒトIgG1抗体レベルを、ELISAで決定した。図3A及び図3Bに示したように、高レベルの抗-IL-6及び抗-CD126抗体が、筋肉のDNA電気穿孔をした後に、マウス血清で産生している。

10

【0215】

血清DNAモノクローナル抗体は、標的抗原IL-6、及び、CD126に結合する

実験を行って、発現した抗-IL-6及び抗-CD126の機能性を調べた。BALB/cマウスに100 µgのプラスミドDNAを注射し、続いて、筋肉内の電気穿孔を行った。1週間後に、組換えヒトIL-6及びヒトCD126に結合する血清ヒト-IgG抗体を、ELISAで決定した。図4に示したように、発現した当該抗体は、標的IL-6及びCD126抗原に結合する。

【0216】

血清DNAモノクローナル抗体は、インビトロで、IL-6媒介細胞シグナル伝達をブロックする

実験を行って、発現した抗体が、IL-6媒介性シグナル伝達を阻害することが可能であるか否かを調べた。ヒトCD126、及び、STAT3誘導性分泌アルカリホスファターゼ(SEAP)で安定にトランスフェクトしたHEK-293細胞を得た。未処理のマウスに由来する希釈(1:40)血清は、マウス-IL-6-駆動SEAP発現のベースラインレベルを誘導し、同レベルを、細胞上清での100%SEAP活性に対して標準化した。DMAbを電気穿孔したマウスの-7日目の血清を、希釈(1:40)し、そして、細胞上清を、未処理コントロールのパーセンテージとして、SEAP活性についてアッセイをした。当該HEK-293細胞は、IL-6シグナル伝達にตอบสนองしてSEAPを分泌する。図5に示したように、抗-IL-6をコードするDMAb構築物で処置をしたマウスに由来する血清は、SEAP活性を遮断しており、このことは、コードされた当該抗体が、IL-6媒介シグナル伝達をブロックできることを示している。

20

30

【0217】

本明細書に記載した実験は、コドン最適化した抗体可変配列を発現するプラスミドDNA構築物の筋肉内電気穿孔の後に、抗-IL-6、及び、抗-CD126 DNAモノクローナル抗体(DMAb)を、マウス血清において、インビボで、高レベルで発現していることを実証している。インビボで筋肉細胞から産生された抗体は、インビトロで、機能的に結合、及び、シグナル伝達する。DMAbは、IL-6、及び、CD126を標的とする精製タンパク質モノクローナル抗体療法に対して、安全で、経済的で、実用的な代替物を提供する。敗血症のコントロール、急性ウイルス感染中の炎症の抑制、及び、腫瘍進行の遅延におけるIL-6の当該役割が実行されている。

40

【0218】

DMAbは、精製タンパク質モノクローナル抗体、及び、ウイルスベクターよりも有利な点が幾つかある。タンパク質モノクローナル抗体については、DMAbは、比較的到低コストで製造することができ、熱安定性があり、流通が容易であり、改変可能であり、そして、頻回投与を必要とせずに持続的発現を誘導する。ウイルスベクターに関しては、DMAbは、安全かつ非組み込み型であり、非免疫原性であり、繰り返し流通することができ、既存の血清学には存在しておらず、及び、迅速な投与のための急性発現を誘導する。潜在的かつ持続的なDMAbの発現は、がんや自己免疫疾患など、潜在的に再投与の必要がある慢性疾患の治療で実質的な利益をもたらす。低価格のDNAベクターの生産と流通は、特に、開発途上国で、また、恒常的に需要がある場合に、入手しやすい価格を提供す

50

る。

【 0 2 1 9 】

上記した詳細な説明、及び、関連する実施例は、単なる例示でしかなく、そして、添付した特許請求の範囲、及び、それらの等価範囲のみをもってして定義される本発明の範囲が、それらによって、限定的に解釈されることはない、ことが理解されよう。

【 0 2 2 0 】

開示した実施形態に対する様々な変更や修正は、当業者にとって明白のことであろう。そのような変更や修正は、本発明の趣旨及び範囲から逸脱せずに実施し得るものであり、本発明の化学構造、置換基、誘導体、中間体、合成物、組成物、製剤、または、使用方法に関するものなどがあるが、これらに限定されない。

10

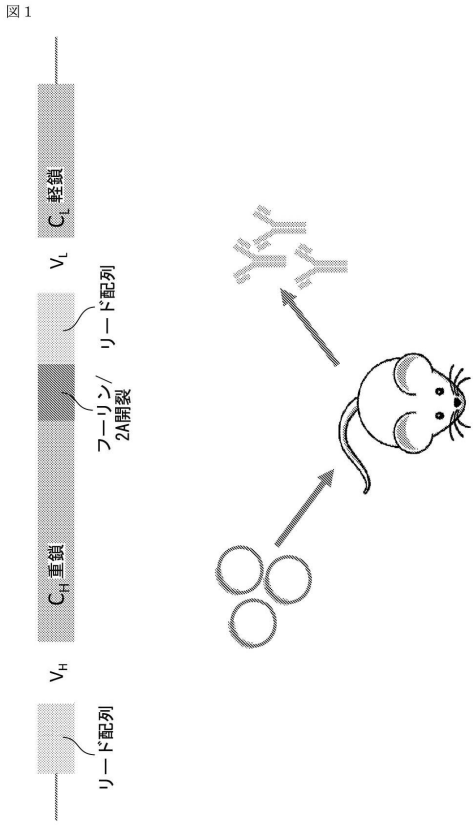
20

30

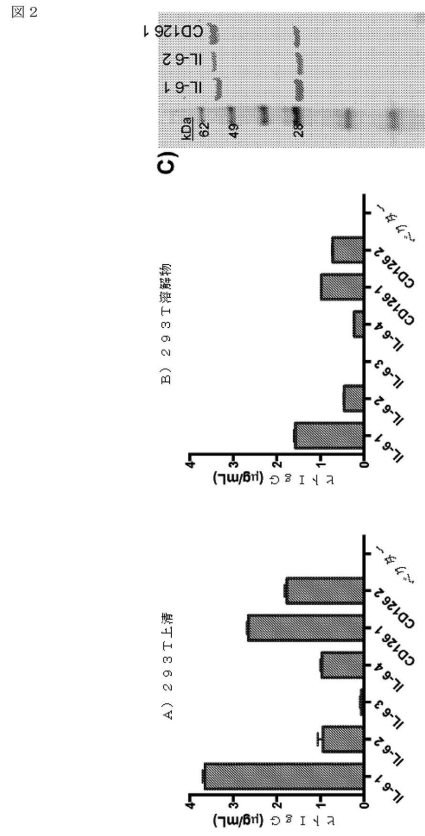
40

50

【図面】
【図 1】



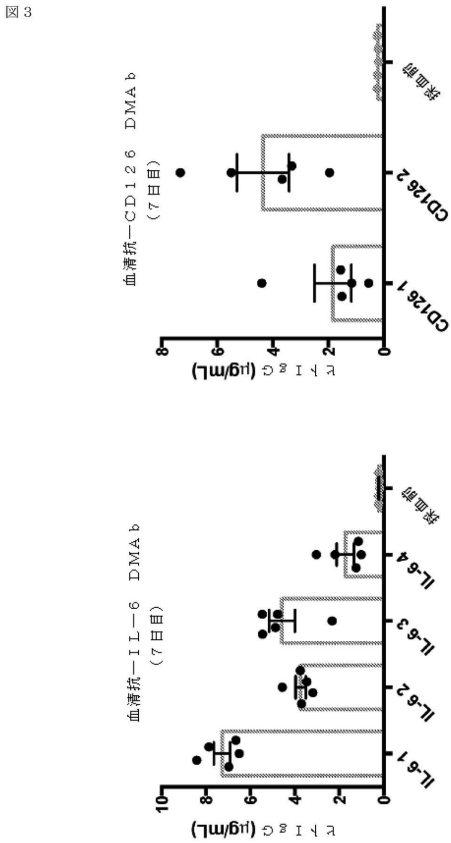
【図 2】



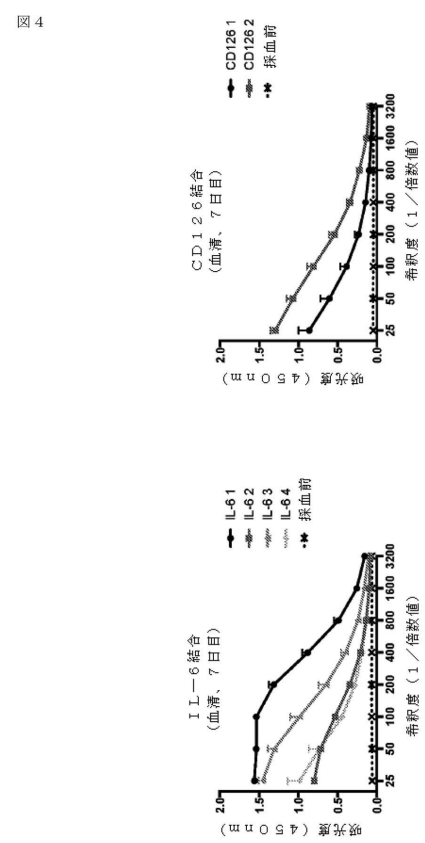
10

20

【図 3】



【図 4】



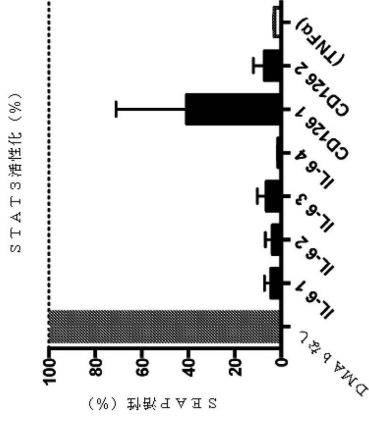
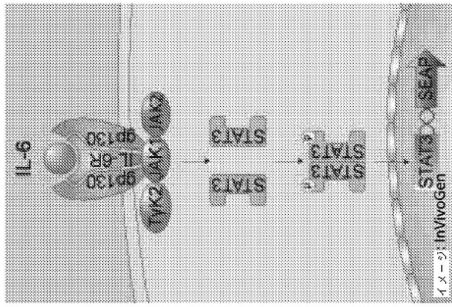
30

40

50

【図 5】

図 5

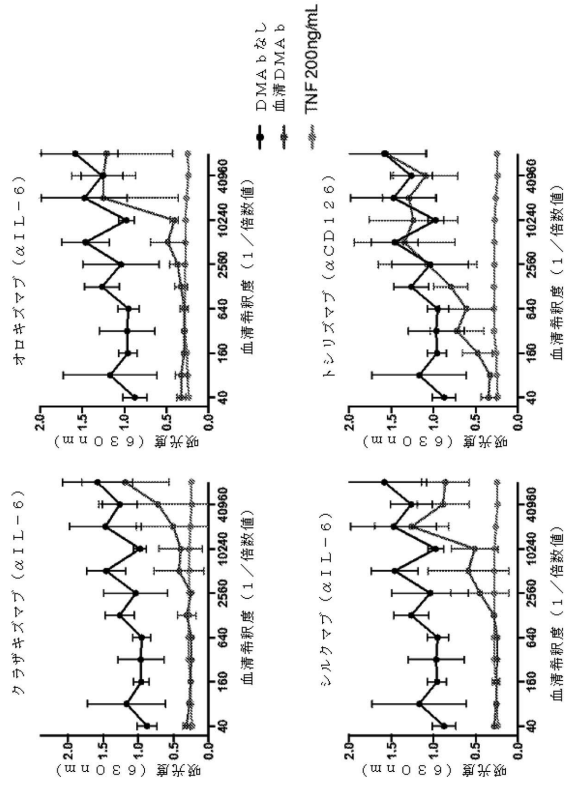


【配列表】

0007311113000001.app

【図 6】

図 6



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I			
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12		
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		Z N A
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63		Z
C 0 7 K	16/24 (2006.01)	C 0 7 K	16/24		
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100092624

弁理士 鶴田 準一

(74)代理人 100114018

弁理士 南山 知広

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(72)発明者 デイビッド ビー・ウェイナー

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19066, メリオン, ビーコン レーン 717

(72)発明者 サラ エリオット

アメリカ合衆国, ワシントン 99163, プルマン, ポスト オフィス ボックス 301

審査官 大久保 元浩

(56)参考文献 特表2016-501535(JP,A)

特表2011-520898(JP,A)

特表2016-530318(JP,A)

特表2009-518023(JP,A)

国際公開第2011/084714(WO,A2)

米国特許出願公開第2012/0128626(US,A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 0 0 - 15 / 9 0

A 6 1 K

C 0 7 K

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q