

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5436414号

(P5436414)

(45) 発行日 平成26年3月5日(2014.3.5)

(24) 登録日 平成25年12月20日(2013.12.20)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/18 (2006.01)

C O 7 K 16/18

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

請求項の数 28 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-512181 (P2010-512181)  
 (86) (22) 出願日 平成20年6月12日 (2008.6.12)  
 (65) 公表番号 特表2010-530227 (P2010-530227A)  
 (43) 公表日 平成22年9月9日 (2010.9.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/007317  
 (87) 国際公開番号 W02008/156621  
 (87) 国際公開日 平成20年12月24日 (2008.12.24)  
 審査請求日 平成23年6月10日 (2011.6.10)  
 (31) 優先権主張番号 60/943,543  
 (32) 優先日 平成19年6月12日 (2007.6.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/943,541  
 (32) 優先日 平成19年6月12日 (2007.6.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 506027491  
 エーシー イミュン ソシエテ アノニ  
 ム  
 スイス連邦共和国 ローザンヌ イービー  
 エフエル イノベーション パーク ビル  
 ディング ビー  
 (73) 特許権者 509012625  
 ジェネンテック, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ  
 ス サンフランシスコ ディーエヌエー  
 ウェイ 1  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗 $\beta$ アミロイド抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体またはその活性断片であって、該抗体またはその活性断片は $\beta$ アミロイドに特異的に結合することができ、且つ、以下を含む：

a. (i) SEQ ID NO : 7記載の配列に90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、またはSEQ ID NO : 9~11のポリペプチド配列を有する3つの軽鎖CDRを含むその機能的部分；ならびに

(ii) SEQ ID NO : 8記載の配列と90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、またはSEQ ID NO : 12~14のポリペプチド配列を有する3つの重鎖CDRを含むその機能的部分；または

b. SEQ ID NO : 7~8のアミノ酸配列であって、抗体が、SEQ ID NO : 7~8の配列に1つ、2つ、または3つの保存的置換を導入することによって改変されており、抗体が、その抗体の全機能を本質的に維持し、かつ、位置52のアミノ酸が、システイン、チロシン、およびセリンからなる群のいずれかのアミノ酸、ならびにシステインのみから選択される、SEQ ID NO : 7~8のアミノ酸配列；または

c. (i) SEQ ID NO : 17およびSEQ ID NO : 19から選択される配列に90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または、SEQ ID NO : 21~23のポリペプチド配列を有する3つの軽鎖CDRを含む、その機能的部分；ならびに

(ii) SEQ ID NO : 18およびSEQ ID NO : 20から選択される配列に90%、91%、92%、93%、9

10

20

4%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、またはSEQ ID NO : 24 ~ 26のポリペプチド配列を有する3つの重鎖CDRを含むその機能的部分；または

d. SEQ ID NO : 17 ~ 18のアミノ酸配列であって、抗体が、SEQ ID NO : 17 ~ 18の配列に1つ、2つ、または3つの保存的置換を導入することによって改変されており、抗体が、その抗体の全機能を本質的に維持し、かつ、位置52のアミノ酸が、システイン、チロシン、およびセリンからなる群のいずれかのアミノ酸、ならびにシステインのみから選択される、SEQ ID NO : 17 ~ 18のアミノ酸配列；または

e. SEQ ID NO : 19 ~ 20のアミノ酸配列であって、抗体が、SEQ ID NO : 19 ~ 20の配列に1つ、2つ、または3つの保存的置換を導入することによって改変されており、抗体が、その抗体の全機能を本質的に維持し、かつ、位置52のアミノ酸が、システイン、チロシン、およびセリンからなる群のいずれかのアミノ酸、ならびにシステインのみから選択される、SEQ ID NO : 19 ~ 20のアミノ酸配列。

10

#### 【請求項 2】

抗体またはその活性断片であって、該抗体またはその活性断片はβアミロイドに特異的に結合することができ、且つ、

a. 抗体またはその活性断片のCDR領域が、

i. SEQ ID NO : 9のアミノ酸配列を有する抗体の軽鎖可変領域のCDR1；

ii. SEQ ID NO : 10のアミノ酸配列を有する抗体の軽鎖可変領域のCDR2；

iii. SEQ ID NO : 11のアミノ酸配列を有する抗体の軽鎖可変領域のCDR3；

20

iv. SEQ ID NO : 12のアミノ酸配列を有する抗体の重鎖可変領域のCDR1；

v. SEQ ID NO : 13のアミノ酸配列を有する抗体の重鎖可変領域のCDR2；および

vi. SEQ ID NO : 14のアミノ酸配列を有する抗体の重鎖可変領域のCDR3であるか、または、

b. 抗体またはその活性断片のCDR領域が、

i. SEQ ID NO : 21のアミノ酸配列を有する抗体の軽鎖可変領域のCDR1；

ii. SEQ ID NO : 22のアミノ酸配列を有する抗体の軽鎖可変領域のCDR2；

iii. SEQ ID NO : 23のアミノ酸配列を有する抗体の軽鎖可変領域のCDR3；

iv. SEQ ID NO : 24のアミノ酸配列を有する抗体の重鎖可変領域のCDR1；

v. SEQ ID NO : 25のアミノ酸配列を有する抗体の重鎖可変領域のCDR2；および

30

vi. SEQ ID NO : 26のアミノ酸配列を有する抗体の重鎖可変領域のCDR3である、

前記抗体またはその活性断片。

#### 【請求項 3】

寄託番号DSM ACC2844として寄託されたハイブリドーマ細胞株EJ1A9または寄託番号DSM ACC2845として寄託されたハイブリドーマ細胞株FG1F9E4または寄託番号DSM ACC2846として寄託されたハイブリドーマ細胞株FK2A6A6によって産生された、請求項1または2記載の抗体またはその活性断片。

#### 【請求項 4】

該抗体がモノクローナル抗体である、請求項1 ~ 3のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片。

40

#### 【請求項 5】

該抗体がキメラ抗体である、請求項1 ~ 4のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片。

#### 【請求項 6】

該抗体がヒト化抗体である、請求項1 ~ 4のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片。

#### 【請求項 7】

該抗体またはその活性断片が単離されている、請求項1 ~ 6のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片。

#### 【請求項 8】

50

請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 9】

SEQ ID NO : 15 ~ 16およびSEQ ID NO : 27 ~ 30記載のヌクレオチド配列のうちの少なくとも1つを含む、請求項8記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 10】

請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片を含む組成物。

【請求項 11】

該抗体またはその活性断片が治療的有効量で含まれる、請求項10記載の組成物。

【請求項 12】

薬学的に許容される担体、希釈剤、および/または賦形剤をさらに含む、請求項10または11記載の組成物。

【請求項 13】

アミロイドーシスを含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害の薬物療法において用いられる1つまたは複数の化合物、酸化ストレスを防ぐ化合物、抗アポトーシス化合物、金属キレート剤、DNA修復阻害剤、ピレンゼピン、代謝産物、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸(3APS)、1,3-プロパンジルスルホネート(1,3PDS)、セクレターゼアクチベーター、 $\beta$ -および $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤、tauタンパク質、神経伝達物質、 $\beta$ -シート破壊物質、抗炎症分子、コリンエステラーゼ阻害剤(ChEI)、タクリン、リバスチグミン、ドネペジル、ガラントミン、ならびに/または栄養補助剤より選択される生物学的に活性な物質をさらに含む、請求項10~12のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 14】

a. アミロイドーシスを含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害を治療すること；または

b. 対象における、アミロイドーシス、神経障害、アルツハイマー病(AD)、認知記憶能の消失を特徴とする疾患または状態、軽度認知機能障害(MCI)、レビー小体認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(オランダ型)、グアム・パーキンソン認知症複合、アミロイド様タンパク質に基づくまたはアミロイド様タンパク質と関連する疾患、進行性核上性麻痺、多発性硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS(筋萎縮性側索硬化症)、封入体筋炎(IBM)、成人発症型糖尿病、老人性心アミロイドーシス、内分泌腫瘍、ならびに黄斑変性を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害の影響を治療または軽減すること；または

c. 脳における増加した斑量と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における斑量を減らすこと；または

d. 脳における増加した斑量と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における斑の量を減らすこと；または

e. 脳における増加した濃度の可溶性A $\beta$ と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における可溶性A $\beta$ の総量を減らすこと；または

f. アミロイドに関連する疾患または状態を示す対象において認知記憶能を保持するか、または高めること、

において用いるための、請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片。

【請求項 15】

請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片を産生することを特徴とする、細胞株。

【請求項 16】

a. 2007年5月25日に寄託されて寄託番号DSM ACC2844が付与されたハイブリドーマEJ1A9、または

b. 2007年5月25日に寄託されて寄託番号DSM ACC2845が付与されたハイブリドーマFG1F9

10

20

30

40

50

E4、または

c. 2007年5月25日に寄託されて寄託番号DSM ACC2846が付与されたハイブリドーマFK2A6 A6

である、請求項15記載の細胞株。

【請求項 17】

患者から得た試料中でアミロイドタンパク質のエピトープとの抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を検出することを含む、患者におけるアミロイドに関連する疾患もしくは状態を検出する方法、または該疾患もしくは状態に対する素因を検出する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) アミロイドタンパク質を含有すると疑われる患者から得た試料を請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片と接触させる工程；

10

(b) 免疫複合体を形成させるために、抗体またはその活性断片をアミロイドタンパク質と結合させる工程；

(c) 免疫複合体の形成を検出する工程；および

(d) 免疫複合体の存在または非存在を試料におけるアミロイドタンパク質の存在または非存在と相関付ける工程。

【請求項 18】

対象の組織におけるアミロイド形成斑負荷量の程度を確かめる方法であって、以下の工程を含む方法：

a. アミロイドタンパク質の存在に関する研究下の対象から得た、対象の組織を代表する試料を、請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片を用いて試験する工程；

20

b. 抗原に結合した抗体またはその活性断片の量を求める工程；および

c. 対象の組織における斑負荷量を計算する工程。

【請求項 19】

対象における微小残存病変をモニタリングする方法であって、以下の工程を含む方法：

a. アミロイドタンパク質を含有すると疑われる対象から得た試料を請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片と接触させる工程；

b. 免疫複合体を形成させるために、抗体またはその活性断片をアミロイドタンパク質と結合させる工程；

30

c. 免疫複合体の形成を検出する工程；

d. 免疫複合体の存在または非存在を、試料中のアミロイドタンパク質の存在または非存在と相関付ける工程；ならびに

e. 該免疫複合体の量を正常対照値と比較する工程であって、正常対照値と比較した凝集物の量の増加が、該対象に依然として微小残存病変があることを示す、工程。

【請求項 20】

請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片を用いた治療に対する対象の応答性を予測する方法であって、以下の工程を含む方法：

a. アミロイドタンパク質を含有すると疑われる対象から得た試料を請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片と接触させる工程；

40

b. 免疫複合体を形成させるために、抗体またはその活性断片をアミロイドタンパク質に結合させる工程；

c. 免疫複合体の形成を検出する工程；

d. 免疫複合体の存在または非存在を、試料におけるアミロイドタンパク質の存在または非存在と相関付ける工程；ならびに

e. 治療の開始前および開始後の該免疫複合体の量を比較する工程であって、該凝集物の量の減少が、該対象が治療に応答する可能性が高いことを示す、工程。

【請求項 21】

請求項1~7のいずれか一項記載の抗体または活性断片を含む、検査キット。

【請求項 22】

50

免疫複合体を形成させるためにアミロイドタンパク質に結合させ、かつ免疫複合体の形成を検出する目的のために、抗体またはその活性断片を使用するための説明書をさらに含む、請求項21記載の検査キットであって、免疫複合体の存在または非存在がアミロイドタンパク質の存在または非存在と相関する、検査キット。

【請求項 2 3】

- a. アミロイドーシスを含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害を治療する；または
- b. 対象における、アミロイドーシス、神経障害、アルツハイマー病(AD)、認知記憶能の消失を特徴とする疾患または状態、軽度認知機能障害(MCI)、レビー小体認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(オランダ型)、グアム・パーキンソン認知症複合、アミロイド様タンパク質に基づく、またはアミロイド様タンパク質と関連する疾患、進行性核上性麻痺、多発性硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS(筋萎縮性側索硬化症)、封入体筋炎(IBM)、成人発症型糖尿病、老人性心アミロイドーシス、内分泌腫瘍、ならびに黄斑変性を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害の影響を治療または軽減する；または
- c. 脳における増加した斑量と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における斑量を減らす；または
- d. 脳における増加した斑量と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における斑の量を減らす；
- e. 脳における増加した濃度の可溶性Aβと関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における可溶性Aβの総量を減らす；または
- f. アミロイドに関連する疾患または状態を示す対象において認知記憶能を保持するか、または高める、  
ための薬剤の調製における請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片の使用。

【請求項 2 4】

以下において使用するための請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片を含む組成物：

- a. アミロイドーシスを含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害の治療；または
- b. 対象における、アミロイドーシス、神経障害、アルツハイマー病(AD)、認知記憶能の消失を特徴とする疾患または状態、軽度認知機能障害(MCI)、レビー小体認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(オランダ型)、グアム・パーキンソン認知症複合、アミロイド様タンパク質に基づく、またはアミロイド様タンパク質と関連する疾患、進行性核上性麻痺、多発性硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS(筋萎縮性側索硬化症)、封入体筋炎(IBM)、成人発症型糖尿病、老人性心アミロイドーシス、内分泌腫瘍、ならびに黄斑変性を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害の影響の治療または軽減；または
- c. 脳における増加した斑量と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における斑量の減少；または
- d. 脳における増加した斑量と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における斑の量の減少；
- e. 脳における増加した濃度の可溶性Aβと関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における可溶性Aβの総量の減少；または
- f. アミロイドに関連する疾患または状態を示す対象において認知記憶能の保持または増幅。

【請求項 2 5】

抗体またはその活性断片を作製する方法であって、請求項15または16記載の細胞株を培

10

20

30

40

50

養する工程を含み、該抗体またはその活性断片はβアミロイドに特異的に結合することができる方法。

【請求項26】

抗体またはその活性断片を作成する方法であって、請求項8または9記載のポリヌクレオチドを含む細胞を培養する工程を含み、該抗体またはその活性断片はβアミロイドに特異的に結合することができる方法。

【請求項27】

細胞株から抗体またはその活性断片を得る工程をさらに含む、請求項25または26記載の方法。

【請求項28】

(i) βアミロイド繊維形成を阻害することができ、かつβアミロイド繊維を脱凝集させることができる；かつ/または

(ii) βアミロイドオリゴマーおよびβアミロイドの高分子量プロトフィブリルに対して優先的結合を示す、

請求項1~7のいずれか一項記載の抗体またはその活性断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連特許出願の相互参照

本出願は、2007年6月12日に出願した米国特許仮出願第60/943,543号、2007年6月12日に出願した米国特許仮出願第60/943,541号、および2007年6月13日に出願した米国特許仮出願第60/943,790号の優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

本発明は、アルツハイマー病などの、アミロイドタンパク質に関連した障害および異常の一群であるアミロイドーシスを含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質に起因するかまたはこれと関連した疾患および障害の治療において、治療および診断用に使用するための方法および組成物に関する。

【0003】

アミロイドーシスとは単一の疾患実態ではなく、むしろ1つまたは複数の器官または体組織に蓄積する、アミロイドと称される蠟状の澱粉様タンパク質の細胞外組織沈着を特徴とする進行性疾患過程の多様な群である。アミロイド沈着物が形成されるにつれて、これは器官または体組織の正常な機能を妨げ始める。少なくとも15種類の異なるアミロイドーシスが存在する。主要な型は、公知の既往症のない原発性アミロイドーシス、他の何らかの病態に続いて起こる続発性アミロイドーシス、および遺伝性アミロイドーシスである。

【0004】

続発性アミロイドーシスは、結核、家族性地中海熱と称される細菌感染症、骨感染症(骨髄炎)、関節リウマチ、小腸の炎症(肉芽腫性回腸炎)、ホジキン病、およびハンセン病などの慢性感染症または炎症性疾患を有する人に起こる。

【0005】

アミロイド物質の約90%を占めるアミロイドタンパク質原線維は、いくつかの異なる種類のタンパク質のうちの1つを含む。これらのタンパク質の一部は、コンゴアレッドに対する結合部位を示してアミロイドタンパク質に特有の染色特性をもたらす独特なタンパク質立体配置である、いわゆる「βブリーツ」シート原線維に折りたたまれ得る。加えて、アミロイド沈着物は、正常な血清アミロイドP(SAP)に関連した糖タンパク質であるアミロイドP(5角形)成分(AP)、および結合組織の複合糖質である硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)と密接に会合している。

【0006】

多くの加齢疾患はアミロイド様タンパク質に基づくかまたはこれと関連しており、一部

10

20

30

40

50

に、病因および疾患の進行に寄与するアミロイドまたはアミロイド様物質の細胞外沈着物の形成を特徴とする。これらの疾患には、例えば軽度認知障害(MCI)、レビー小体型認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(オランダ型)；およびグアムパーキンソン認知症複合などの、認知記憶能の喪失を特徴とする疾患または病態を含む、アルツハイマー病(AD)などの神経障害が含まれるが、これらに限定されない。アミロイド様タンパク質に基づくかまたはこれと関連した他の疾患は、進行性核上性麻痺、多発性硬化症；クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS(筋萎縮性側索硬化症)、封入体筋炎(IBM)、成人発症型糖尿病；老人性心アミロイドーシス；内分泌腫瘍、および黄斑変性症を含むその他の疾患である。

【0007】

10

これらの疾患の病因は多様であると考えられるが、それらの特徴的な沈着物は多くの共通した分子成分を含む場合が多い。かなりの程度で、これは炎症誘発性経路の局所的活性化に起因し、そのため活性化補体成分、急性期反応物質、免疫調節因子、および他の炎症性メディエータの同時沈着を伴い得る(McGeer et al., 1994)。

【0008】

アルツハイマー病(AD)は、脳内のタンパク質の異常な沈着物の蓄積であるアミロイド斑によって引き起こされると主に考えられている神経障害である。罹患個体の脳内に認められる最も頻度の高いアミロイドの種類は、主にA $\beta$ 原線維から構成されている。科学的証拠から、斑における $\beta$ アミロイドタンパク質の生成および蓄積の増加によって神経細胞死が起こり、これがADの発症および進行に寄与することが実証されている。機能上重要な脳領域において神経細胞が喪失することで、次に神経伝達物質の減少および記憶障害が起こる。斑の形成に主に関与するタンパク質には、アミロイド前駆体タンパク質(APP)および2種類のプレセニリン(プレセニリンIおよびプレセニリンII)が含まれる。大部分の細胞において構成的に発現し異化されるアミロイド前駆体タンパク質(APP)の、酵素 $\beta$ および $\gamma$ セクレターゼによる連続的な切断により、39~43アミノ酸のA $\beta$ ペプチドが放出される。APPの分解により、斑において凝集する傾向が強くなる可能性が高い。特にA $\beta$ (1-42)断片は、そのC末端における非常に疎水性の高い2つのアミノ酸残基に起因して、凝集物を形成する傾向が高い。したがってA $\beta$ (1-42)断片は、ADにおける老人斑形成の開始に主に関与しその原因であって、そのため病的素質が高いと考えられている。したがって、アミロイド斑形成を標的化して拡散させ得る特異的抗体の必要性が存在する。

20

30

【0009】

ADの症状は緩やかに現れ、初発症状は軽度の健忘症に過ぎない。この段階では、個体は最近の出来事、行動、家族または物の名前を忘れる場合があり、また簡単な算数の問題を解けなくなる場合がある。疾患が進行するにつれて、症状はより容易に目に付くようになり、AD患者またはその家族が医学的な助けを求めるほど深刻になる。ADの中期症状には、身繕いなどの簡単な作業のやり方を忘れることが含まれ、話すこと、理解、読み書きに伴う問題が生じる。後期のAD患者は不安または攻撃的になる場合があり、家を出て徘徊する恐れもあり、最終的には全面看護が必要となる。

【0010】

現在、ADを診断する唯一の確定的な方法は、個体の死後の剖検において脳組織中の斑およびもつれを同定することである。したがって医師は、人が生存している間は、ADの「疑いがある」または「ほぼ確実に」ADであるという診断を下せるに過ぎない。現在の方法を用いると、医師は、「ほぼ確実な」ADを診断するためのいくつかの手段を用いて、最大90パーセントの確率でADを正しく診断することができる。医師は、人の全般的健康状態、既往歴、および日常活動を行う上で経験した問題の履歴に関する質問を行う。記憶、問題解決、注意、計算、および言語に関する行動試験によって認知障害に関する情報が得られ、また血液、尿、または髄液の検査、および脳スキャンなどの医学的検査によって、さらなる情報がいくらか得られ得る。

40

【0011】

ADの管理は、薬物療法に基づく治療および薬物療法を行わない治療からなる。疾患の根

50

本的過程の変化(進行の遅延または逆転)を目的とした治療は、これまでほとんど成功していない。神経細胞の化学的伝達物質(神経伝達物質)の欠損(欠陥)または機能不全を回復させる薬物、特にタクリンおよびリバスチグミンなどのコリンエステラーゼ阻害薬(ChEI)は、症状を改善することが示されている。ChEIは、神経伝達物質の酵素分解を妨げ、それによって脳内で神経シグナルの伝達に利用され得る化学的伝達物質の量を増加させる。

#### 【0012】

この疾患の初期および中期の一部の患者の場合、タクリン(COGNEX(登録商標)、ニュージャージー州、モリスプレーンズ)、ドネベジル(ARICEPT(登録商標)、日本、東京)、リバスチグミン(EXELON(登録商標)、ニュージャージー州、イーストハノーバー)、またはガラントミン(REMINYL(登録商標)、ニュージャージー州、ニューブランズウィック)といった薬物が、いくつかの症状が悪化するのをある限られた期間にわたって防ぐのに役立ち得る。別の薬物であるメマンチン(NAMENDA(登録商標)、ニューヨーク州、ニューヨーク)は、中程度～重度のADの治療に対して認可されている。ADの精神徴候に対処するための薬物療法も利用可能である。また、いくつかの薬物は、不眠、激越、徘徊、不安、および抑うつといった、ADの行動症状を抑えるのに役立ち得る。これらの症状を治療することで、多くの場合、患者は落ち着き、介護者にとっては患者の介護がより容易になる。しかし残念なことに、この種類の薬剤が一貫してプラセボより有効であることを示す治療上の進歩は大きいものの、疾患は進行し続け、精神機能に対する平均的な効果はわずかに過ぎない。例えばChEIのような、ADの薬物療法で用いられる薬物の多くには、胃腸障害、肝毒性、および体重減少を含む副作用もある。

#### 【0013】

アミロイド様タンパク質の蓄積および沈着に基づくかまたはこれと関連した他の疾患には、軽度認知障害、レビー小体型認知症(LBD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、封入体筋炎(IBM)、および黄斑変性症、特に加齢性黄斑変性症(AMD)がある。

#### 【0014】

軽度認知障害(MCI)とは、わずかであるが無視できない記憶障害として最も一般的に定義される総称である。MCI患者は、加齢に伴って通常予測されるよりも多くの記憶障害をきたすものの、判断または推論の障害のような認知症の他の症状を示すことはない。MCIは、ADの発症前段階を往々にして反映する状態である。

#### 【0015】

嗅内皮質(EC)におけるβアミロイドの沈着は、高齢者における軽度認知障害(MCI)の発症に重要な役割を果たすと考えられている。これは、ひとたびADが臨床的に明白になると、CSF-Aβ(1-42)レベルが有意に低下するという知見と一致する。CSF-Aβ(1-42)とは対照的に、CSF-τレベルはMCI段階で有意に上昇し、この値はその後にも上昇し続け、CSF-τレベルの上昇が、ADを発症すると予測されるMCI対象の検出に役立ち得ることが示される。

#### 【0016】

レビー小体型認知症(LBD)は、65歳超の人に起こり得る神経変性疾患であり、典型的に、認知(思考)障害および異常な行動変化という症状を引き起こす。症状には、認知障害、神経学的徴候、睡眠障害、および自律神経不全症が含まれ得る。認知障害は、大部分の症例においてLBDの主な特徴である。患者は再発性の錯乱発作を起こし、それは次第に悪化する。認知能力の変動は、注意力および覚醒の変わりやすさの程度と関連している場合が多い。認知障害および思考の変動は、数分、数時間、または数日で変わることがある。

#### 【0017】

レビー小体は、リン酸化および非リン酸化神経フィラメントタンパク質から形成される；レビー小体は、シナプスタンパク質α-シヌクレイン、および損傷または異常タンパク質の除去に関与するユビキチンを含む。レビー小体に加えて、神経細胞の細胞突起内の封入体であるレビー神経突起が存在する場合もある。LBD罹患患者の脳内にアミロイド斑が形成される場合もあるが、その数はアルツハイマー病患者に見られる数よりも少ない傾向がある。ADのもう1つの微小病理学的特徴である神経原線維のもつれは、LBDの主な特徴で

はないものの、アミロイド斑に加えて往々にして存在する。

【 0 0 1 8 】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、上位および下位運動ニューロンの変性を特徴とする。一部のALS患者には、認知症または失語症が存在する場合もある(ALS-D)。認知症は最も一般的には前頭側頭型認知症(FTD)であり、これらの症例の多くは、歯状回ならびに前頭葉および側頭葉の表層のニューロン中にユビキチン陽性で $\tau$ 陰性の封入体を有する。

【 0 0 1 9 】

封入体筋炎(IBM)は、通常50歳超の人に見られる肢体不自由を伴う疾患であり、筋線維が炎症を起こして萎縮し始めるが、脳は影響されず、患者の知性は完全に保たれる。高齢者に最もよく見られるこの進行性筋疾患を患う患者の筋細胞の内部では、アミロイド $\beta$ タンパク質の生成に関与する2種類の酵素が増加しており、アミロイド $\beta$ も同様に増加することが見出された。

【 0 0 2 0 】

アミロイド様タンパク質の蓄積および沈着に基づくかまたはこれと関連した別の疾患には、黄斑変性症がある。

【 0 0 2 1 】

黄斑変性症は、網膜(光感受性細胞が視覚信号を脳に送る、眼の後部にある紙のように薄い組織)の中央領域である黄斑の変質を引き起こす、よく見られる眼疾患である。鮮明で明瞭な「真っすぐな」視覚が、黄斑によって処理される。黄斑に損傷が起これば、盲点が生じ、視覚がぼやけるかまたは歪む。加齢性黄斑変性症(AMD)は米国における視力障害の主な原因であり、65歳超の人にとっては白人における法的盲の主な原因である。40歳以上の米国人のおよそ180万人が進行性AMDに罹患しており、中度AMDを有するさらなる約730万人に視力喪失の実質的リスクがある。2020年までに、進行性AMD患者は290万人に上ると政府は推定している。AMDの被害者は、この失明病態の原因および治療についてほとんどわかっていないことを知り、驚いて失望することが多い。

【 0 0 2 2 】

黄斑変性症には、非滲出型黄斑変性症および滲出型黄斑変性症の2つの型がある。黄斑変性症症例の85パーセントが非滲出型と診断され、非滲出型では黄斑の細胞がゆっくりと崩壊し始める。通常は両眼が非滲出型AMDに罹患するが、一方の眼が視力を失い、他方の眼が罹患しない場合もある。網膜下の黄色沈着物であるドルーゼンは、非滲出型AMDの一般的な初期徴候である。進行性の非滲出型AMDまたは滲出型AMDを発症するリスクは、ドルーゼンの数または大きさの増加に伴って高まる。非滲出型AMDが進行し、滲出型疾患に変化せずに視力喪失を引き起こすこともあり得る；しかしまた、初期の非滲出型AMDが滲出型に突然変化することもあり得る。

【 0 0 2 3 】

滲出型は症例の15パーセントを占めるに過ぎないが、90パーセントが失明を引き起こし、進行性AMDと見なされる(滲出型AMDに初期および中期は存在しない)。滲出型AMDには常に、非滲出型疾患が先行する。非滲出型が悪化するにつれて、一部の患者では黄斑の後方で異常な血管増殖が起こり始める。これらの血管は非常に脆弱であり、体液および血液を漏出させ(したがって「滲出型」黄斑性変性症という)、黄斑に対して急速な損傷を引き起こす。

【 0 0 2 4 】

非滲出型のAMDでは、最初は視覚がわずかにぼやける場合が多い。次いで特に視野の中心がぼやけ始め、疾患の進行に伴ってこの領域が大きくなっていく。一方の眼のみが罹患した場合には、症状に気付かない場合もある。滲出型AMDでは、直線が波打って見える場合があり、中心視力の喪失が急速に起こり得る。

【 0 0 2 5 】

黄斑変性症の診断は、典型的に、散大した眼の検査、視力検査、およびAMDの診断に役立つ眼底検査と称する手順を用いた眼の裏側の検査を含み、滲出型AMDが疑われた場合には、蛍光眼底血管造影が行われる場合もある。非滲出型AMDが進行期に達した場合、視力

10

20

30

40

50

喪失を防ぐ治療法は現在存在しない。しかし、抗酸化剤および亜鉛の特異的な高用量処方によって、中期AMDの進行期への進行を遅らせるまたは妨げることができる。Macugen(登録商標)(ペガブタニブナトリウム注射剤)、レーザー光凝固術、および光線力学療法は、黄斑における異常な血管増殖および出血を制御することができ、一部の滲出型AMD患者に有益である；しかし、既に失われた視力はこれらの技法により回復されることはない。既に視力が失われた場合には、生活の質の改善を助け得る低視力補助具が存在する。

【 0 0 2 6 】

加齢性黄斑変性症(AMD)の初発徴候の1つは、網膜色素上皮(RPE)の基底膜とブルッフ膜(BM)との間のドルーゼンの蓄積である。Andersonらによって行われた最近の研究から、ドルーゼンがアミロイドβを含むことが確認された(Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256)。

10

【 0 0 2 7 】

進行中の研究は、AMDの一因となり得る環境要因、遺伝的要因、および食事要因を探索する研究を継続している。新たな治療戦略もまた探索が続けられており、これには網膜細胞移植、疾患の進行を防ぐまたは遅延させる薬物、放射線療法、遺伝子療法、視力の促進を助け得る網膜に移植するコンピュータチップ、および黄斑下の新たな血管増殖を防ぐ薬剤が含まれる。

【 0 0 2 8 】

新規薬物を開発する際に考慮すべき重要な要素は、標的的患者にとって使いやすいことである。経口薬物送達、具体的には錠剤、カプセル剤、およびソフトゲルは、消費される全剤形の70%を占めているが、これは患者の利便性のためである。薬物の開発者は、患者が注射または他のより侵襲的な形態の薬物投与を受けるよりも経口送達を好むことに同意する。低間隔の投与間隔(すなわち、1日1回または持続放出)をもたらす製剤も好ましい。経口剤形にある抗生物質の投与が容易であることによって、治療中の患者の服薬遵守が向上する。

20

【 0 0 2 9 】

必要なのは、抗体を経口剤形で提供しようとする場合の前提条件となる、非常に特異的かつ非常に効果的な抗体を作製するための効果的な方法および組成物である。このような抗体は、アミロイドタンパク質などの種々の抗原上の特異的エピトープを認識することが好ましい。

30

【 0 0 3 0 】

したがって同様に必要であるのは、それを必要とする対象における、例えば軽度認知障害(MCI)、レビー小体型認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(オランダ型)；グアムパーキンソン認知症複合などの、認知記憶能の喪失を特徴とする疾患または病態を含む、アルツハイマー病(AD)などの神経障害を含むがこれらに限定されない、続発性アミロイドーシスおよび加齢性アミロイドーシスを含むアミロイド斑形成に関連した疾患および障害の一群であるアミロイドーシス；ならびに進行性核上性麻痺、多発性硬化症；クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS(筋萎縮性側索硬化症)、封入体筋炎(IBM)、成人発症型糖尿病；老人性心アミロイドーシス；内分泌腫瘍、および黄斑変性症を含むその他の疾患などの、アミロイド様タンパク質に基づくかまたはこれと関連した他の疾患を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質に起因するかまたはこれと関連した疾患および障害に伴う合併症に対処するための効果的な組成物および方法である。特に必要であるのは、アミロイドまたはアミロイド様ペプチドの線維の凝集と関連した斑の形成などの疾患の生理学的徴候を打ち消すことのできる、特殊化した非常に効果的な抗体である。

40

【 0 0 3 1 】

フロイント完全または不完全アジュバントと混合したAβ<sub>1-42</sub>を接種することによって誘発される抗アミロイド抗体は、ヒトアルツハイマー病のトランスジェニックマウスにおいてアミロイド負荷を減少させ得ることが立証されている(Schenk et al., 1999)。

【 0 0 3 2 】

50

リポソーム中に再構成されたテトラパルミトイル化 $A\beta_{1-16}$ をNORBAトランスジェニックマウスに腹腔内接種すると、有意な力価の抗アミロイド抗体が誘発され、これがインビトロおよびインビボでアミロイド線維および斑を可溶化し得ることも立証された(Nicolau et al., 2002)。

【0033】

アミロイド斑および線維の溶解が起こる予測される機構は、Bard et al., (2000)によって最初に提唱され、彼らは自らのデータに基づいて、抗体が斑をオプソニン化し、続いて斑がミクログリアのマクロファージによって破壊されるという結論を提起した。De Mattos et al., (2001)は、 $\beta$ アミロイドの中央ドメインに対するmAbが、血漿アミロイドに結合し、これを完全に隔離することを示した。彼らは、循環中にこれらのmAbが存在することによって、脳と血漿との間の $A\beta$ の平衡がシフトして、脳内に沈着する代わりに末梢での排除および異化が促されると主張した。

【0034】

本発明は、特定の $\beta$ アミロイドタンパク質を特異的に認識し、これに結合する能力を有する、非常に特異的かつ非常に効果的な抗体を含む新規な方法および組成物を提供する。本発明の教示によって可能となる抗体は、それを必要とする対象における、いくつか例を挙げると、例えば軽度認知障害(MCI)、レビー小体型認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(オランダ型)；グアムパーキンソン認知症複合などの、認知記憶能の喪失を特徴とする疾患または病態を含む、アルツハイマー病(AD)などの神経障害を含むがこれらに限定されない、続発性アミロイドーシスおよび加齢性アミロイドーシスを含むアミロイド斑形成に関連した疾患および障害の一群であるアミロイドーシス；ならびに進行性核上性麻痺、多発性硬化症；クロイツフェルト・ヤコブ病、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血オランダ型、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS(筋萎縮性側索硬化症)、封入体筋炎(IBM)、成人発症型糖尿病；老人性心アミロイドーシス；内分泌腫瘍、および黄斑変性症を含むその他の疾患などの、アミロイド様タンパク質に基づくかまたはこれに関連した他の疾患を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質に起因するかまたはこれに関連した疾患および障害の治療に特に有用である。

【0035】

さらに、本発明は、アミロイドに関連した疾患または病態を呈する哺乳動物における認知記憶能を保持または増加させる新規な方法および組成物であって、本発明によるモノクローナル抗体の治療有効量を、そのような治療を必要とする対象、詳細には哺乳動物、より詳細にはヒトに投与する段階を含む方法および組成物を提供する。

【発明の概要】

【0036】

本発明は、好ましい抗原コンホメーションの曝露および安定化の強化をもたらし、最終的に独特の特性を備えた抗体をもたらす抗原提示を利用する。

【0037】

本発明の1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含む抗体、またはより詳細にはその任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、例えばポリエチレングリコール(PEG)などの親水性部分、または別法として例えばパルミチン酸などの疎水性部分によって修飾され、該親水性部分または該疎水性部分が、例えばリジン、グルタミン酸、およびシステイン、またはペプチド断片に親水性部分もしくは疎水性部分を結合させるための連結手段として役立ち得る任意の他の適切なアミノ酸もしくはアミノ酸類似体などの少なくとも1つ、詳細には1つまたは2つのアミノ酸を介して抗原ペプチドの各末端に共有結合している、 $\beta$ アミロイドペプチドの、詳細には $\beta$ アミロイドペプチドの選択された断片のアミノ酸配列に対応する抗原ペプチドを含む超分子抗原構築物に対して産生された抗体を提供する。

【0038】

PEGなどの親水性部分を用いる場合、 $\beta$ アミロイドペプチドの選択される断片は、アミノ酸配列 $A\beta_{22-35}$ および $A\beta_{29-40}$ それぞれに対応する断片であってよく、遊離PEG末端は

、ホスファチジルエタノールアミン、または例えば抗原構築物をリボソームの二重層内に埋め込むための、係留エレメントとして機能するのに適している任意の他の化合物に共有結合させることができる。

【0039】

パルミチン酸などの疎水性部分を用いる場合、 $\beta$ アミロイドペプチドの選択される断片はアミノ酸配列 $A\beta_{1-15}$ に対応する断片であってよく、この疎水性部分は、例えば抗原構築物をリボソームの二重層内に埋め込むための、係留エレメントとして直接役立ち得る。

【0040】

本発明の1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、コンホメーションエピトープを認識してこれに結合し、ポリマー可溶性アミロイドおよびアミロイド原線維または線維それぞれに、詳細にはポリマー可溶性アミロイド $A\beta$ ペプチドおよびアミロイド $A\beta$ 原線維または線維それぞれに結合する抗体を提供する。

10

【0041】

本発明の1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、ポリマー可溶性アミロイドおよびオリゴマーアミロイドペプチドそれぞれの上に、詳細には複数の単量体 $A\beta_{1-42}$ ペプチドを含むポリマー可溶性アミロイド $A\beta$ ペプチドおよびオリゴマーアミロイド $A\beta$ ペプチドそれぞれの上に優先的に提示されるコンホメーションエピトープを認識してこれに結合する抗体を提供する。

20

【0042】

本発明の1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、ポリマー可溶性アミロイドおよびオリゴマーアミロイドペプチドそれぞれの上のみならず、アミロイド原線維または線維上に、詳細には複数の単量体 $A\beta_{1-42}$ ペプチドを含むポリマー可溶性アミロイド $A\beta$ ペプチドおよびオリゴマーアミロイド $A\beta$ ペプチドの上に、ならびに複数の該オリゴマーペプチドを組み込んだアミロイド原線維または線維それぞれの上に優先的に提示されるコンホメーションエピトープを認識してこれに結合する抗体を提供する。

【0043】

アポリタンパク質Eタンパク質の $\epsilon 4$ 対立遺伝子(apoE4)の遺伝は、ADの強力な遺伝的リスク因子である。このタンパク質はアミロイドに結合することができ、血液脳関門を介した $A\beta$ の排除および $A\beta$ 沈着の促進の両方に関与することが知られている。逆に、アミロイドの結合がApoEの疎水性リボタンパク質結合領域にマッピングされ、この会合によりApoEの全体的な脂質結合能が劇的に減少する。

30

【0044】

したがって、本発明のさらなる態様は、本明細書に記載の、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、脳内の $A\beta$ の濃度上昇に関連した疾患または病態に罹患している対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の、アミロイドとApoE4との相互作用を阻害またはさもなくば減少させ得る抗体を提供することである。したがって、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、ポリマー可溶性アミロイドおよびオリゴマーアミロイドペプチドそれぞれに、詳細には複数の $A\beta_{1-42}$ 単量体ペプチドを含む可溶性ポリマー $A\beta$ ペプチドおよびオリゴマー $A\beta$ ペプチドそれぞれに優先的に結合する。1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、少なくとも30、詳細には少なくとも35、より詳細には少なくとも38、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有する $A\beta$ 単量体ペプチドに結合するが、30未満の残基を有する $A\beta$ 単量体ペプチド、詳細には20未満の残基を有するペプチド、より詳細には10未満の残基を有するペプチド、特に8またはそれ未満の残基を有するペプチドに対する結合を本質的に示さない抗体に関する。

40

50

## 【 0 0 4 5 】

1つの特定の態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、少なくとも30、詳細には少なくとも35、より詳細には少なくとも38、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有するA $\beta$ 単量体ペプチドに、詳細にはA $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、ならびに複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対する結合を本質的に示さない抗体に関する。

## 【 0 0 4 6 】

本発明の別の特定の態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、詳細にはA $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、ならびに複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対する結合を本質的に示さない抗体を提供する。

10

## 【 0 0 4 7 】

本発明の別の特定の態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、詳細にはA $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、ならびに複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合を示す抗体を提供する。

20

## 【 0 0 4 8 】

本発明の別の特定の態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、詳細にはA $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、ならびに複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-42に対しては中等度の結合を示す抗体を提供する。

## 【 0 0 4 9 】

本発明の別の特定の態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、詳細にはA $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、ならびに複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合、および単量体ペプチド1-42に対しては中等度の結合を示す抗体を提供する。

30

## 【 0 0 5 0 】

本発明の別の特定の態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、詳細にはA $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、ならびに複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合を示し、かつA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さない抗体を提供する。

40

## 【 0 0 5 1 】

本発明の別の特定の態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、詳細にはA $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、ならびに複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-42に対しては中等度の結合を示し、かつA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さない抗体を提供する。

## 【 0 0 5 2 】

本発明の別の特定の態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 単量体ペプチド1

50

-40に、詳細にはA $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、ならびに複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合、および単量体ペプチド1-42に対しては中等度の結合を示し、かつA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さない抗体を提供する。

【0053】

1つの態様において、本明細書に記載の本発明による抗体は、単量体および/またはオリゴマー形態の、少なくとも30、詳細には少なくとも35、より詳細には少なくとも38、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有する単量体および/またはオリゴマー形態のA $\beta$ 単量体ペプチドとの、特にA $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体ペプチドおよび/または複数の該A $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含むオリゴマーペプチドとの、詳細には抗体とA $\beta$ 1-42の最大1:1000のモル濃度比での、特に1:10~1:100のモル濃度比での同時インキュベーションに際して、A $\beta$ 単量体および/またはオリゴマーの高分子量ポリマー原線維への凝集を阻害する。

10

【0054】

特に、本発明による抗体とアミロイド単量体および/またはオリゴマーペプチドとの同時インキュベーションは、28 ~ 40、詳細には32 ~ 38、より詳細には37 という温度で、24時間~60時間、詳細には30時間~50時間、より詳細には48時間行う。

【0055】

本発明の特定の態様において、アミロイド単量体および/またはオリゴマーペプチドとの同時インキュベーションは、37 という温度で48時間行う。

20

【0056】

特に、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、A $\beta$ <sub>1-40</sub>単量体ペプチドに優先的に結合し、A $\beta$ <sub>1-40</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドとの同時インキュベーションに際して、A $\beta$ 単量体の高分子量ポリマー原線維への凝集を阻害する。

【0057】

1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ <sub>1-40</sub>単量体ペプチドに、詳細にはA $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、ならびに複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに優先的に結合し、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合、および単量体ペプチド1-42に対しては中等度の結合を示し、かつA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドとの同時インキュベーションに際して、A $\beta$ 単量体の高分子量ポリマー原線維への凝集を阻害する抗体を提供する。

30

【0058】

1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ <sub>1-40</sub>単量体ペプチドならびにまたA $\beta$ <sub>1-42</sub>オリゴマーおよび/またはポリマーペプチドに優先的に結合し、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合、および/または単量体ペプチド1-42に対しては中等度の結合を示し、かつ/またはA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドとの同時インキュベーションに際して、A $\beta$ 単量体および/またはオリゴマーの高分子量ポリマー原線維への凝集を阻害する抗体を提供する。

40

【0059】

1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、A $\beta$ 単量体の高分子量ポリマー原線維への凝集を、緩衝液中でインキュベートした各アミロイドペプチド単量体(対照)と比較して少なくとも40%、少なくとも50%、詳細には少なくとも60%、詳細には少なくとも65%、より詳細には少なくとも75%、さらにより詳細には少なくとも80%、特に少なくとも85%~90%またはそれ以上阻害する。

50

## 【0060】

1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、 $A\beta_{1-40}$ 単量体ペプチドならびにまた $A\beta_{1-42}$ オリゴマーおよび/またはポリマーペプチドに優先的に結合し、 $A\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合、および/または単量体ペプチド1-42に対しては中等度の結合を示し、かつ/または $A\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、 $A\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドとの37℃という温度での24時間の同時インキュベーションに際して、 $A\beta$ 単量体および/またはオリゴマーの高分子量ポリマー原線維への凝集を、チオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイ、詳細には以下の実施例1.4および2.4に記載するチオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイにより決定して、抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:10のモル濃度比で少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、詳細には少なくとも60%、詳細には少なくとも65%、より詳細には少なくとも75%、さらにより詳細には少なくとも80%、特に少なくとも85%~90%、および抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:10のモル濃度比で少なくとも40%、少なくとも50%、詳細には少なくとも60%、詳細には少なくとも65%、より詳細には少なくとも75%、さらにより詳細には少なくとも80%、特に少なくとも85%~90%阻害する抗体を提供する。

10

## 【0061】

アミロイド形成性単量体および/またはオリゴマーペプチド、詳細にはアミロイド形態(1-42)に、本明細書に記載の本発明による抗体が結合することで、単量体および/またはオリゴマーアミロイド形成性ペプチドの高分子量原線維またはフィラメントへの凝集の阻害が起こる。アミロイド形成性単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集の阻害により、本発明による抗体は、アミロイド斑、詳細には二次コンホメーションの変化によって不溶性となること、および罹患動物またはヒトの脳内でのアミロイド斑の主要部分であることが知られているアミロイド形態(1-42)の形成を妨げるまたは遅延させることができる。

20

## 【0062】

本発明による抗体の凝集阻害能は、例えば、予め形成された勾配での密度勾配超遠心続くSDS-PAGE沈降分析、および/またはチオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイによるなど、当技術分野で公知の任意の適切な方法によって決定することができる。

## 【0063】

1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、単量体形態および/または複数の該単量体ペプチドを含むオリゴマー形態の、少なくとも30、詳細には少なくとも35、より詳細には少なくとも38、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有する $A\beta$ 単量体および/またはオリゴマーペプチド、特に $A\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された、前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの、詳細には1:10~1:1000のモル濃度比、より詳細には1:100の比での同時インキュベーションに際して、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントを少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも35%、詳細には少なくとも40%、より詳細には少なくとも50%、さらにより詳細には少なくとも60%、特に少なくとも70%またはそれ以上脱凝集させることができる抗体に関する。

30

40

## 【0064】

本発明の特定の態様において、抗体の凝集阻害および脱凝集能はそれぞれ、予め形成された勾配での密度勾配超遠心続くSDS-PAGE沈降分析により決定する。

## 【0065】

本発明の別の特定の態様において、抗体の凝集阻害および脱凝集能はそれぞれ、チオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイにより決定する。

## 【0066】

別の特定の態様において、本発明による抗体は、前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントと、28~40、詳細には32~38、より詳細に

50

は37 という温度で、12時間～36時間、詳細には18時間～30時間、より詳細には24時間同時インキュベートする。

【0067】

特に、前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの同時インキュベーションは、37 という温度で24時間行う。

【0068】

1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、 $A\beta_{1-40}$ 単量体ペプチドに、詳細には $A\beta$ 単量体ペプチド1-40に、ならびに複数の $A\beta_{1-42}$ 単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに優先的に結合し、 $A\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合、および単量体ペプチド1-42に対しては中等度の結合を示し、かつ $A\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、 $A\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された、前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの同時インキュベーションに際して、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントを、詳細には少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、詳細には少なくとも30%、より詳細には少なくとも40%、さらにより詳細には少なくとも50%、特に少なくとも60%、さらにより詳細には70%またはそれ以上脱凝集させることができる抗体に関する。

【0069】

特に、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、 $A\beta_{1-40}$ 単量体ペプチドならびにまた $A\beta_{1-42}$ オリゴマーおよび/またはポリマーペプチドに優先的に結合し、 $A\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合、および/または単量体ペプチド1-42に対しては中等度の結合を示し、かつ/または $A\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、 $A\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された、前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの同時インキュベーションに際して、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントを、詳細には少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、詳細には少なくとも30%、より詳細には少なくとも40%、さらにより詳細には少なくとも50%、特に少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%またはそれ以上脱凝集させることができる抗体に関する。

【0070】

本発明の1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、 $A\beta_{1-40}$ 単量体ペプチドならびにまた $A\beta_{1-42}$ オリゴマーおよび/またはポリマーペプチドに優先的に結合し、 $A\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合、および/または単量体ペプチド1-42に対しては中等度の結合を示し、かつ/または $A\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、 $A\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された、前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの37 という温度での24時間の同時インキュベーションに際して、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントの脱凝集を、チオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイ、詳細には以下の実施例1.4および2.4に記載するチオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイにより決定して、抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:100のモル濃度比で少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、詳細には少なくとも55%、詳細には少なくとも60%、より詳細には少なくとも70%およびそれ以上、ならびに抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:10のモル濃度比で少なくとも40%、少なくとも50%、詳細には少なくとも60%、詳細には少なくとも65%、より詳細には少なくとも75%、さらにより詳細には少なくとも80%、特に少なくとも85%～90%もたらす抗体を提供する。

【0071】

アミロイドタンパク質の凝集の阻害およびアミロイド形成性ポリマー原線維またはフィラメントの脱凝集の両方を通じて、本発明による抗体は、アミロイド斑の形成を妨げるま

10

20

30

40

50

たは遅延させることができ、それによって疾患に伴う症状の緩和およびその進行の遅延または逆転がもたらされる。

【0072】

したがって、本発明のさらなる態様は、本明細書に記載の、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、脳内のA $\beta$ の濃度上昇に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内のA $\beta$ の総量を減少させることができる抗体を提供することである。

【0073】

本発明の別の態様において、本明細書に記載の、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、脳内の斑負荷量の増加に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の斑を破壊し、ひいては斑負荷量を減少させることができる抗体を提供する。その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体は、脳内の斑負荷量を少なくとも10%、少なくとも20%、詳細には少なくとも25%、より詳細には少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、詳細には少なくとも60%、詳細には少なくとも65%、より詳細には少なくとも75%、さらにより詳細には少なくとも80%、特に少なくとも85%~90%減少させる。

10

【0074】

本発明のさらに別の態様において、本明細書に記載の、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、脳内の斑負荷量の増加に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の斑の量の減少を伴って斑を可溶化することができる抗体を提供する。その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体は、脳内の斑の量を少なくとも10%、詳細には少なくとも15%、より詳細には少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、詳細には少なくとも60%、詳細には少なくとも65%、より詳細には少なくとも75%、さらにより詳細には少なくとも80%、特に少なくとも85%~90%減少させる。

20

【0075】

本発明による抗体は、本明細書に記載する特異的な特性の1つ、2つ、またはそれ以上を様々な組み合わせで示し得ることが理解されるべきである。

【0076】

例えば、1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、特にモノクローナル抗体であって、それらが、詳細には高度のコンホメーション感受性と組み合わせて、本明細書において定義するように凝集阻害特性および凝集特性の両方を示すという点で二重特異性または二重有効性である抗体を提供する。

30

【0077】

1つの態様において、本明細書に記載の本発明による抗体は二重特異性または二重有効性であり、単量体形態および/または複数の該単量体ペプチドを含むオリゴマー形態の、少なくとも30、詳細には少なくとも35、より詳細には少なくとも38、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有するA $\beta$ 単量体および/またはオリゴマーペプチド、特にA $\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドとの同時インキュベーションに際して、A $\beta$ 単量体の高分子量ポリマー原線維への凝集を阻害し、加えて、単量体形態および/または複数の該単量体ペプチドを含むオリゴマー形態の、少なくとも30、詳細には少なくとも35、より詳細には少なくとも38、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有するA $\beta$ 単量体および/またはオリゴマーペプチド、特にA $\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された、前もって形成された高分子ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの同時インキュベーションに際して、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントを脱凝集させることができる。

40

【0078】

特に、アミロイド単量体および/またはオリゴマーペプチド、ならびに前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントそれぞれとの同時インキュベーションは、最大で1:1000のモル濃度比、特に1:10~1:100のモル濃度比、詳細には1:100

50

のモル濃度比で行う。

【0079】

本発明による抗体とアミロイド単量体および/またはオリゴマーペプチドとの同時インキュベーションは、28 ~ 40、詳細には32 ~ 38、より詳細には37 という温度で、24時間 ~ 60時間、詳細には30時間 ~ 50時間、より詳細には48時間行い、アミロイドの前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの同時インキュベーションは、28 ~ 40、詳細には32 ~ 38、より詳細には37 という温度で、12時間 ~ 36時間、詳細には18時間 ~ 30時間、より詳細には24時間行う。

【0080】

1つの態様において、本明細書に記載の本発明による二重特異性または二重有効性抗体は、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントを少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、詳細には少なくとも55%、詳細には少なくとも65%、より詳細には少なくとも70%、さらにより詳細には少なくとも70%、特に少なくとも75% ~ 80%脱凝集させることができる。

【0081】

1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の二重特異性または二重有効性抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、単量体形態および/または複数の該単量体ペプチドを含むオリゴマー形態の、少なくとも30、詳細には少なくとも35、より詳細には少なくとも38、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有するA $\beta$ 単量体および/またはオリゴマーペプチド、特にA $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集を、緩衝液中でインキュベートした各アミロイドペプチド単量体(対照)と比較して少なくとも40%、少なくとも50%、詳細には少なくとも65%、より詳細には少なくとも75%、さらにより詳細には少なくとも80%、特に少なくとも85% ~ 90%またはそれ以上阻害する抗体を提供する。

【0082】

1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の二重特異性または二重有効性抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ <sub>1-40</sub>単量体ペプチドに、詳細にはA $\beta$ 単量体ペプチド1-40に、ならびに複数のA $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに対して高い特異性を示すが、A $\beta$ <sub>1-28</sub>、A $\beta$ <sub>17-40</sub>、A $\beta$ <sub>1-38</sub>、A $\beta$ <sub>1-39</sub>、A $\beta$ <sub>1-41</sub>、および/またはA $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体ペプチドからなる群より選択されるアミロイドペプチド単量体に対しては交差反応性を本質的に示さないか、またはわずかな ~ 中程度の交差反応性しか示さない抗体を提供する。

【0083】

特定の態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ <sub>1-28</sub>、A $\beta$ <sub>17-40</sub>、A $\beta$ <sub>1-38</sub>、A $\beta$ <sub>1-39</sub>、A $\beta$ <sub>1-41</sub>、A $\beta$ <sub>1-42</sub>と比較して、アミロイドペプチドA $\beta$ <sub>1-40</sub>に対して最大で1000倍、詳細には50 ~ 100倍、より詳細には80 ~ 100倍、特に100倍感受性が高く、かつアミロイド形成性単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集をインビトロおよびインビボで阻害することができる抗体に関する。

【0084】

1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の二重特異性または二重有効性抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ <sub>1-40</sub>単量体ペプチドならびにまたA $\beta$ <sub>1-42</sub>オリゴマーおよび/またはポリマーペプチドに優先的に結合し、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的に弱い結合、および/または単量体ペプチド1-42に対しては中等度の結合を示し、かつ/またはA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、チオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイ、詳細には以下の実施例1.4および2.4に記載するチオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイにより決定して、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドとの37 という温度での24時間の同時インキュベーションに際して、A $\beta$ 単量体および/またはオリゴマーの高分子量ポリマー原線維へ

10

20

30

40

50

の凝集を、抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:100のモル濃度比で少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、詳細には少なくとも55%、詳細には少なくとも65%、より詳細には少なくとも70%、および抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:10のモル濃度比で少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、詳細には少なくとも60%、詳細には少なくとも65%、より詳細には少なくとも75%、さらにより詳細には少なくとも80%、特に少なくとも85%~90%阻害し、かつ $A\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された、前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの37℃という温度での24時間の同時インキュベーションに際して、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントの脱凝集を、抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:100のモル濃度比で少なくとも10%、および抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:10のモル濃度比で少なくとも20%もたらす抗体を提供する。

10

**【0085】**

別の特定の態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、アミロイドペプチド $A\beta_{1-40}$ に対して高い結合感受性を有し、かつ最低0.01  $\mu\text{g}$ までの濃度、詳細には0.5  $\mu\text{g}$ ~0.01  $\mu\text{g}$ 、より詳細には0.1  $\mu\text{g}$ ~0.01  $\mu\text{g}$ の濃度、特に0.01  $\mu\text{g}$ の濃度の $A\beta_{1-42}$ 可溶性オリゴマーおよび/またはポリマーアミロイドペプチドを検出することができる抗体に関する。

**【0086】**

1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、疎水性パルミチン酸部分で修飾され、該疎水性部分が、例えばリジン、またはリンカー分子として役立ち得る任意の他の適切なアミノ酸もしくはアミノ酸類似体などのアミノ酸を介して各末端に共有結合している、 $\beta$ アミロイドペプチド $A\beta_{1-15}$ のアミノ酸配列に対応する抗原ペプチドを含む超分子抗原構築物に対して産生された抗体を提供する。

20

**【0087】**

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、コンホメーションエピトープを認識し、これに結合する。

**【0088】**

1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 7に示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖可変領域、またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 9~11を有する軽鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含む、その機能的部分に関する。

30

**【0089】**

1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 8に示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す重鎖可変領域、またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 12~14を有する重鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含む、その機能的部分に関する。

40

**【0090】**

さらに、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、SEQ ID NO: 7に示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖可変ドメイン、またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 9~11を有する軽鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分を含む抗体に関する。

**【0091】**

50

さらに、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、SEQ ID NO: 8に示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す重鎖可変ドメイン、またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 12~14を有する重鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分を含む抗体に関する。

【0092】

1つの態様において、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、SEQ ID NO: 7およびSEQ ID NO: 8に示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖および重鎖可変ドメイン、またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 9~14を有する重鎖および軽鎖CDRの一部もしくはすべてを含むその機能的部分を含む抗体に関する。

【0093】

本発明はさらに、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、SEQ ID NO: 7および/またはSEQ ID NO: 8に示されるポリペプチド配列を含む抗体に関する。本発明はさらに、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 7~8を有するモノクローナル抗体ACI-24-Ab-3に関する。

【0094】

抗体がその完全な機能性を本質的に維持するように、SEQ ID NO: 7~8の配列に少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つまたはそれ以上の保存的置換を導入することによって、その配列が変更された抗体もまた、本発明によって含まれる。

【0095】

1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 9に示される軽鎖CDR1、および/またはSEQ ID NO: 10に示される軽鎖CDR2、および/またはSEQ ID NO: 11に示される軽鎖CDR3を含むペプチド断片に関する。

【0096】

1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 12に示される重鎖CDR1、および/またはSEQ ID NO: 13に示される重鎖CDR2、および/またはSEQ ID NO: 14に示される重鎖CDR3を含むペプチド断片に関する。

【0097】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 9に示される軽鎖CDR1に関する。

【0098】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 10に示される軽鎖CDR2に関する。

【0099】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 11に示される軽鎖CDR3に関する。

【0100】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 12に示される重鎖CDR1に関する。

【0101】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 13に示される重鎖CDR2に関する。

【0102】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 14に示される重鎖CDR3に関する。

【0103】

1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 7に示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖可変領域、またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 9~11を有する軽鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分をコードする又

クレオチド配列を含むポリヌクレオチドに関する。1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 8に示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す重鎖可変領域、またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 12~14を有する重鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに関する。

【0104】

1つの態様において、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに関し、該抗体は、SEQ ID NO: 7に示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖可変ドメイン、またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 9~11を有する軽鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分を含む。

10

【0105】

1つの態様において、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに関し、該抗体は、SEQ ID NO: 8に示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す重鎖可変ドメイン、またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 12~14を有する重鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分を含む。

20

【0106】

1つの態様において、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに関し、該抗体は、SEQ ID NO: 7およびSEQ ID NO: 8に示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖および重鎖可変ドメイン、またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 9~14を有する軽鎖および重鎖CDRを含むその機能的部分を含む。

30

【0107】

本発明の別の態様において、本明細書に記載の本発明による抗体をコードするヌクレオチド配列、詳細にはポリペプチド配列SEQ ID NO: 7~8を有するモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。特に、これらのポリヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 15~16である。

【0108】

別の態様において、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 7~8を有するモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。特に、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 15~16にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

40

【0109】

特に、SEQ ID NO: 8の52位は任意のアミノ酸であってよい。さらなる態様において、52位はチロシン、セリン、またはシステイン残基であってよい。より詳細には、52位はシステイン残基である。

【0110】

特定の態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2844が付与

50

されたハイブリドーマ細胞株EJ1A9によって産生される抗体の特徴的特性を有する抗体に関する。

【0111】

特に、本発明は、2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2844が付与されたハイブリドーマ細胞株EJ1A9によって産生される、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体に関する。

【0112】

特に、本発明はまた、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体に結合するA $\beta$ エピトープに関し、該抗体は、疎水性パルミチン酸部分で修飾され、該疎水性部分が、例えばリジン、またはリンカー分子として役立ち得る任意の他の適切なアミノ酸もしくはアミノ酸類似体などのアミノ酸を介して各末端に共有結合している、 $\beta$ アミロイドペプチドA $\beta_{1-15}$ のアミノ酸配列に対応する抗原ペプチドを含む超分子抗原構造に対して産生されたものである。本発明はさらに、モノクローナル抗体ACI-24-Ab-3に結合するA $\beta$ エピトープに関する。

【0113】

1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、少なくとも10、詳細には少なくとも20、より詳細には少なくとも30、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有するA $\beta$ 単量体ペプチド、および/または複数の該アミロイド単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーアミロイドペプチド、および/または複数の該ポリマーペプチドを組み込んだアミロイド線維もしくは原線維に、特に、A $\beta_{1-42}$ 単量体ペプチド、および複数のA $\beta_{1-42}$ 単量体ペプチドを含むポリマー可溶性A $\beta$ ペプチド、および複数の該ポリマーペプチドを組み込んだA $\beta$ 原線維もしくは線維に結合し、8またはそれよりも少ないアミノ酸残基を有するA $\beta$ 単量体ペプチドに対する結合を本質的に示さない抗体に関する。

【0114】

1つの特定の態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、少なくとも30、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有するA $\beta$ 単量体ペプチド、および/または複数の該アミロイド単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーアミロイドペプチド、および/または複数の該ポリマーペプチドを組み込んだアミロイド線維もしくは原線維に、特に、A $\beta_{1-42}$ 単量体ペプチド、および複数の $\beta_{1-42}$ 単量体ペプチドを含むポリマー可溶性A $\beta$ ペプチド、および複数の該ポリマーペプチドを組み込んだA $\beta$ 原線維もしくは線維に結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対する結合を本質的に示さない抗体に関する。

【0115】

本発明の別の特定の態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 単量体ペプチド1-42、および複数のA $\beta_{1-42}$ 単量体ペプチドを含むポリマー可溶性A $\beta$ ペプチド、および複数の該ポリマーペプチドを組み込んだA $\beta$ 原線維または線維に結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合を示す抗体を提供する。

【0116】

本発明の別の特定の態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 単量体ペプチド1-42、および複数のA $\beta_{1-42}$ 単量体ペプチドを含むポリマー可溶性A $\beta$ ペプチド、および複数の該ポリマーペプチドを組み込んだA $\beta$ 原線維または線維に結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合を示し、かつA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さない抗体を提供する。

【0117】

特に、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、A $\beta$ 1-42単量体ペプチド、および複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含むポリマー可溶性A $\beta$ ペプチド、および複数の該ポリマーペプチドを組み込んだA $\beta$

原線維または線維に結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合を示し、かつ/またはA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドとの同時インキュベーションに際して、A $\beta$ 単量体の高分子量ポリマー原線維への凝集を阻害する。

【0118】

1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、A $\beta$ 単量体および/またはオリゴマーの高分子量ポリマー原線維への凝集を、緩衝液中でインキュベートした各アミロイドペプチド単量体(対照)と比較して少なくとも20%、少なくとも30%、詳細には少なくとも40%、詳細には少なくとも50%、より詳細には少なくとも60%、さらにより詳細には少なくとも70%、特に

10

【0119】

本発明の1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 1-42単量体ペプチド、および複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含むポリマー可溶性A $\beta$ ペプチド、および複数の該ポリマーペプチドを組み込んだA $\beta$ 原線維または線維に結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合を示し、かつ/またはA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドとの37℃という温度での24時間の同時インキュベーションに際して、A $\beta$ 単量体の高分子量ポリマー原線維への凝集を、チオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイ、詳細には以下の実施例1.4および2.4に記載するチオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイにより決定して、抗体とA $\beta$ <sub>1-42</sub>の1:100のモル濃度比で少なくとも20%、少なくとも30%、詳細には少なくとも40%、詳細には少なくとも50%、より詳細には少なくとも60%、さらにより詳細には少なくとも70%、および抗体とA $\beta$ <sub>1-42</sub>の1:10のモル濃度比で少なくとも50%、より詳細には少なくとも60%、より詳細には少なくとも65%、さらにより詳細には少なくとも70%阻害する抗体を提供する。

20

【0120】

特に、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 1-42単量体ペプチド、および複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含むポリマー可溶性A $\beta$ ペプチド、および複数の該ポリマーペプチドを組み込んだA $\beta$ 原線維または線維に結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合を示し、かつ/またはA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された、前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの同時インキュベーションに際して、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントを、詳細には少なくとも10%、少なくとも20%、詳細には少なくとも30%、より詳細には少なくとも40%、さらにより詳細には少なくとも50%、特に少なくとも60%またはそれ以上脱凝集させることができる抗体に関する。

30

【0121】

本発明の1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、A $\beta$ 1-42単量体ペプチド、および複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含むポリマー可溶性A $\beta$ ペプチド、および複数の該ポリマーペプチドを組み込んだA $\beta$ 原線維または線維に結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合を示し、かつ/またはA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された、前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの37℃という温度での24時間の同時インキュベーションに際して、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントの脱凝集を、チオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイ、詳細には以下の実施例1.4および2.4に記載するチオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイにより決定して、抗体とA $\beta$ <sub>1-42</sub>の1:100のモル濃度比で少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、詳細には少なくとも40%、詳細には少なくとも50%、より詳細には少なくとも60%

40

50

、さらにより詳細には少なくとも70%、および抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:10のモル濃度比で少なくとも40%、詳細には少なくとも50%、より詳細には少なくとも60%、さらにより詳細には少なくとも70%もたらす抗体を提供する。

【0122】

アミロイドタンパク質の凝集の阻害を通じて、および/またはアミロイド形成性ポリマー原線維またはフィラメントの脱凝集を通じて、本発明による抗体は、アミロイド斑の形成を妨げるまたは遅延させることができ、それによって疾患に伴う症状を妨げるまたは遅延させることができ、それによって疾患に伴う症状の緩和およびその進行の遅延または逆転がもたらされる。

【0123】

したがって、本発明のさらなる態様は、本明細書に記載の、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、脳内の $A\beta$ の濃度上昇に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の $A\beta$ の総量を減少させることができる抗体を提供することである。

【0124】

本発明の別の態様において、本明細書に記載の、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、脳内の斑負荷量の増加に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の斑を破壊し、ひいては斑負荷量を減少させることができる抗体を提供する。その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体は、脳内の斑負荷量を少なくとも20%、詳細には少なくとも25%、より詳細には少なくとも30%、さらにより詳細には30%超減少させる。

【0125】

本発明のさらに別の態様において、本明細書に記載の、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、脳内の斑負荷量の増加に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の斑の量の減少を伴って斑を可溶化することができる抗体を提供する。その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体は、脳内の斑の量を少なくとも10%、詳細には少なくとも15%、より詳細には少なくとも20%減少させる。

【0126】

本発明による抗体は、本明細書に記載する特異的な特性の1つ、2つ、またはそれ以上を様々な組み合わせで示し得ることが理解されるべきである。

【0127】

例えば、1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、それらが、詳細には高度のコンホメーション感受性と組み合わせ、本明細書において定義するように凝集阻害特性および脱凝集特性の両方を示すという点で二重特異性または二重有効性である抗体を提供する。

【0128】

1つの態様において、本明細書に記載の本発明による抗体は二重特異性または二重有効性であり、少なくとも30、詳細には少なくとも35、より詳細には少なくとも38、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有する $A\beta$ 単量体および/またはオリゴマーペプチド、特に $A\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドとの同時インキュベーションに際して、 $A\beta$ 単量体の高分子量ポリマー原線維への凝集を阻害し、加えて、少なくとも30、詳細には少なくとも35、より詳細には少なくとも38、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有する $A\beta$ 単量体および/またはオリゴマーペプチド、特に $A\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された、前もって形成された高分子ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの同時インキュベーションに際して、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントを脱凝集させることができる。

【0129】

特に、アミロイド単量体および/またはオリゴマーペプチド、ならびに前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントそれぞれの同時インキュベーションは、最大で1:1000のモル濃度比、特に1:10～1:1000のモル濃度比、詳細には1:100のモル濃度比で行う。

#### 【0130】

本発明による抗体とアミロイド単量体および/またはオリゴマーペプチドとの同時インキュベーションは、28℃～40℃、詳細には32℃～38℃、より詳細には37℃という温度で、24時間～60時間、詳細には30時間～50時間、より詳細には48時間行い、アミロイドの前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの同時インキュベーションは、28℃～40℃、詳細には32℃～38℃、より詳細には37℃という温度で、12時間～36時間、詳細には18時間～30時間、より詳細には24時間行う。

10

#### 【0131】

1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による二重特異性または二重有効性抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントを少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、詳細には少なくとも40%、詳細には少なくとも50%、より詳細には少なくとも60%、さらにより詳細には少なくとも70%脱凝集させることができる。

#### 【0132】

1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による二重特異性または二重有効性抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、少なくとも30、詳細には少なくとも35、より詳細には少なくとも38、さらにより詳細には少なくとも40アミノ酸残基を有するAβ単量体および/またはオリゴマーペプチド、特にAβ<sub>1-42</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集を、緩衝液中でインキュベートした各アミロイドペプチド単量体(対照)と比較して少なくとも30%、詳細には少なくとも40%、詳細には少なくとも50%、より詳細には少なくとも60%、さらにより詳細には少なくとも70%、特に少なくとも80%～90%またはそれ以上阻害することができる。

20

#### 【0133】

1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の二重特異性または二重有効性抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、Aβ<sub>1-42</sub>単量体ペプチドに対して高い特異性を示すが、Aβ<sub>1-28</sub>およびAβ<sub>17-40</sub>単量体ペプチドからなる群より選択されるアミロイドペプチド単量体に対しては交差反応性を本質的に示さないか、またはわずかな交差反応性しか示さない抗体を提供する。

30

#### 【0134】

特定の態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、Aβ<sub>1-28</sub>および/またはAβ<sub>17-40</sub>と比較して、アミロイドペプチドAβ<sub>1-42</sub>に対して最大で1000倍、詳細には50～1000倍、より詳細には80～100倍、特に100倍感受性が高く、かつアミロイド形成性単量体および/もしくはオリゴマーペプチドの凝集をインビトロおよびインビボで阻害すること、ならびに/または前もって形成されたポリマー原線維もしくはフィラメントを脱凝集させることができる抗体に関する。

40

#### 【0135】

1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の二重特異性または二重有効性抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、Aβ<sub>1-42</sub>単量体ペプチド、および複数のAβ<sub>1-42</sub>単量体ペプチドを含むポリマー可溶性Aβペプチド、および複数の該ポリマーペプチドを組み込んだAβ原線維または線維に結合するが、Aβ単量体ペプチド1-28に対しては実質的により弱い結合を示し、かつ/またはAβ単量体ペプチド17-40に対しては結合を本質的に示さず、チオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイ、詳細には以下の実施例1.4および2.4に記載するチオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイにより決定して、Aβ<sub>1-42</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドとの37℃という温度での24時間の同時インキュベーションに際して、Aβ単量体の高分子量ポリマー原線維へ

50

の凝集を、抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:100のモル濃度比で少なくとも30%、および抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:10のモル濃度比で少なくとも65%阻害し、かつ $A\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された、前もって形成された高分子量ポリマーアミロイド原線維またはフィラメントとの37℃という温度での24時間の同時インキュベーションに際して、前もって形成されたポリマー原線維またはフィラメントの脱凝集を、抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:100のモル濃度比で少なくとも20%、および抗体と $A\beta_{1-42}$ の1:10のモル濃度比で少なくとも50%もたらず抗体を提供する。

【0136】

別の特定の態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、アミロイドペプチド $A\beta_{1-42}$ に対する高い結合感受性を有し、かつ最低0.01  $\mu\text{g}$ までの濃度、詳細には0.5  $\mu\text{g}$  ~ 0.01  $\mu\text{g}$ 、より詳細には0.1  $\mu\text{g}$  ~ 0.01  $\mu\text{g}$ の濃度、特に0.01  $\mu\text{g}$ の濃度の $A\beta_{1-42}$ 線維を検出することができる抗体に関する。

10

【0137】

1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、例えばポリエチレングリコール(PEG)などの親水性部分で修飾され、該親水性部分が、例えばリジン、またはリンカー分子として役立ち得る任意の他の適切なアミノ酸もしくはアミノ酸類似体などのアミノ酸を介して各末端に共有結合している、 $\beta$ アミロイドペプチド $A\beta_{22-35}$ および $A\beta_{29-40}$ それぞれのアミノ酸配列に対応する抗原ペプチドを含む超分子抗原構築物に対して産生された抗体を提供する。

20

【0138】

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、コンホメーションエピトープを認識し、これに結合する。

【0139】

1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 17およびSEQ ID NO: 19それぞれに示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖可変領域、または軽鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分に関する。

30

【0140】

1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 18およびSEQ ID NO: 20それぞれに示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す重鎖可変領域、または重鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分に関する。

【0141】

さらに、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、SEQ ID NO: 17およびSEQ ID NO: 19それぞれに示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖可変ドメイン、または軽鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分を含む抗体に関する。

40

【0142】

さらに、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、SEQ ID NO: 18およびSEQ ID NO: 20それぞれに示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す重鎖可変ドメ

50

イン、または重鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分を含む抗体に関する。

【0143】

1つの態様において、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体であって、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 18、およびSEQ ID NO: 20に示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖および重鎖可変ドメイン、または重鎖および軽鎖CDRの一部もしくはすべてを含むその機能的部分を含む抗体に関する。

10

【0144】

本発明はさらに、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、SEQ ID NO: 17およびSEQ ID NO: 19ならびに/またはSEQ ID NO: 18およびSEQ ID NO: 20に示されたポリペプチド配列を含む抗体に関する。本発明はさらに、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 17~18を有するモノクローナル抗体ACI-11-Ab-9、およびポリペプチド配列SEQ ID NO: 19~20を有するモノクローナル抗体ACI-12-Ab-11に関する。

【0145】

抗体がその完全な機能性を本質的に維持するように、SEQ ID NO: 17~18およびSEQ ID NO: 19~20それぞれの配列に少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つまたはそれ以上の保存的置換を導入することによって、その配列が変更された抗体もまた、本発明によって含まれる。

20

【0146】

1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 21に示される軽鎖CDR1、および/またはSEQ ID NO: 22に示される軽鎖CDR2、および/またはSEQ ID NO: 23に示される軽鎖CDR3を含むペプチド断片に関する。

【0147】

1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 24に示される重鎖CDR1、および/またはSEQ ID NO: 25に示される重鎖CDR2、および/またはSEQ ID NO: 26に示される重鎖CDR3を含むペプチド断片に関する。

【0148】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 21に示される軽鎖CDR1に関する。

30

【0149】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 22に示される軽鎖CDR2に関する。

【0150】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 23に示される軽鎖CDR3に関する。

【0151】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 24に示される重鎖CDR1に関する。

【0152】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 25に示される重鎖CDR2に関する。

【0153】

1つの態様において、本発明はSEQ ID NO: 26に示される重鎖CDR3に関する。

40

【0154】

1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 17およびSEQ ID NO: 19それぞれに示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖可変領域、またはSEQ ID NO: 21~23に示される軽鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに関する。

【0155】

1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 18およびSEQ ID NO: 20それぞれに示され

50

た配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す重鎖可変領域、またはSEQ ID NO: 24~26に示される重鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに関する。

【0156】

1つの態様において、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに関し、該抗体は、SEQ ID NO: 17およびSEQ ID NO: 19それぞれに示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖可変ドメイン、またはSEQ ID NO: 21~23に示される軽鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分を含む。

10

【0157】

1つの態様において、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに関し、該抗体は、SEQ ID NO: 18およびSEQ ID NO: 20それぞれに示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す重鎖可変ドメイン、またはSEQ ID NO: 24~26に示される重鎖CDRの少なくとも1つ、詳細には少なくとも2つ、より詳細には少なくとも3つ、特にそれらの天然フレームワーク領域内に埋め込まれたすべてのCDRを含むその機能的部分を含む。

20

【0158】

1つの態様において、本発明は、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに関し、該抗体は、SEQ ID NO: 17およびSEQ ID NO: 19ならびにSEQ ID NO: 18およびSEQ ID NO: 20それぞれに示された配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を示す軽鎖および重鎖可変ドメイン、またはSEQ ID NO: 21~26に示される軽鎖および重鎖CDRを含むその機能的部分を含む。

30

【0159】

本発明の別の態様において、本明細書に記載の本発明による抗体をコードするヌクレオチド配列、詳細にはポリペプチド配列SEQ ID NO: 17~18を有するモノクローナル抗体またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 19~20を有するモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。特に、SEQ ID NO: 17~18およびSEQ ID NO: 19~20をコードするポリヌクレオチドは、それぞれSEQ ID NO: 27~28およびSEQ ID NO: 29~30である。

【0160】

別の態様において、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 17~18を有するモノクローナル抗体またはポリペプチド配列SEQ ID NO: 19~20を有するモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。特に、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 27~28またはSEQ ID NO: 29~30にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。特定の態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、2007年5月25日にDSM ACC2845として寄託されたハイブリドーマ細胞株FJ1F9E4によって産生される抗体の特徴的特性を有する抗体に関する。

40

【0161】

特に、本発明は、2007年5月25日にDSM ACC2845として寄託されたハイブリドーマ細胞株FJ1F9E4によって産生される、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノ

50

ノクローナル抗体に関する。

【0162】

特定の態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、2007年5月25日にDSM ACC2846として寄託されたハイブリドーマ細胞株FK2A6A6によって産生される抗体の特徴的特性を有する抗体に関する。

【0163】

特に、本発明は、2007年5月25日にDSM ACC2846として寄託されたハイブリドーマ細胞株FK2A6A6によって産生される、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体に関する。

【0164】

特に、本発明はまた、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体に結合するA $\beta$  エピトープに関し、該抗体は、例えばポリエチレングリコール(PEG)などの親水性部分で修飾され、該親水性部分が、例えばリジン、またはリンカー分子として役立ち得る任意の他の適切なアミノ酸もしくはアミノ酸類似体などのアミノ酸を介して各末端に共有結合している、 $\beta$  アミロイドペプチド、A $\beta$ <sub>22-35</sub> およびA $\beta$ <sub>29-40</sub> それぞれのアミノ酸配列に対応する抗原ペプチドを含む超分子抗原構築物に対して産生されたものである。本発明はさらに、モノクローナル抗体ACI-11-Ab-9に結合するA $\beta$  エピトープに関する。本発明はさらに、モノクローナル抗体ACI-12-Ab-11に結合するA $\beta$  エピトープに関する。1つの局面において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、脳内の可溶性A $\beta$  の濃度上昇に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の可溶性A $\beta$  の総量を減少させることができる。

【0165】

別の局面において、本明細書に記載の本発明による抗体は、脳内の斑負荷量の増加に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の斑を破壊し、ひいては斑負荷量を減少させることができる。

【0166】

別の局面において、本明細書に記載の本発明による抗体は、脳内の斑負荷量の増加に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の斑の量の減少を伴って斑を可溶化することができる。

【0167】

本発明の別の目的は、例えば、本明細書に先に記載した本発明による抗体を、哺乳動物またはヒトを含む対象に受動免疫することにより、それを必要とする対象において、アルツハイマー病(AD)などの神経障害、例えば軽度認知障害(MCI)、レビー小体型認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(オランダ型)；グアムパーキンソン認知症複合などの、認知記憶能の喪失を特徴とする疾患または病態を含むがこれに限定されない疾患などの、続発性アミロイドーシスおよび加齢性アミロイドーシスを含むアミロイド斑形成に関連した疾患および障害の一群であるアミロイドーシス；ならびに進行性核上性麻痺、多発性硬化症；クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS(筋萎縮性側索硬化症)、封入体筋炎(IBM)、成人発症型糖尿病；および老人性心アミロイドーシス)；内分泌腫瘍、および黄斑変性症などの、アミロイド様タンパク質に基づくかまたはこれと関連した他の疾患および病態を含むがこれに限定されない、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質に起因するかまたはこれと関連した疾患および障害の影響を予防的および/もしくは治療的に処置するためならびに/または緩和するための、本明細書に記載の本発明による抗体を含む方法および組成物を提供することである。

【0168】

本発明の特定の局面において、これらの方法のモノクローナル抗体は、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 7~8を有するACI-24-Ab-3、または本明細書に記載のその機能的部分である。

【0169】

10

20

30

40

50

本発明の別の特定の局面において、これらの方法のモノクローナル抗体は、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 17~18を有するACI-11-Ab-9、もしくはポリペプチド配列SEQ ID NO: 9~10を有するACI-12-Ab-11それぞれ、または本明細書に記載のその機能的部分である。

【0170】

本発明はさらに、治療有効量の、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体を含む治療組成物に関する。

【0171】

1つの態様において、薬学的組成物は、詳細には治療有効量の、薬学的に許容される担体をさらに含む。

【0172】

1つの態様において、本発明は、これらに限定されないがアミロイドーシス、腫瘍、および黄斑変性症を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質に起因するかまたはこれに関連した疾患および障害の治療において用いるための、本明細書に記載の組成物を提供する。

【0173】

そのような態様の特定の局面において、用いるモノクローナル抗体は、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 7~8を有するACI-24-Ab-3、または本明細書に記載のその機能的部分である。

【0174】

そのような態様の別の特定の局面において、用いるモノクローナル抗体は、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 17~18を有するモノクローナル抗体ACI-11-Ab-9、およびポリペプチド配列SEQ ID NO: 19~20を有するモノクローナル抗体ACI-12-Ab-11、または本明細書に記載のその機能的部分より選択される。

【0175】

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、疾患の治療のための他の生物活性物質または他の治療手順と組み合わせて投与することができる。他の生物活性物質は、抗体および他の生物活性物質が薬学的に許容される同じ溶媒および/もしくは担体の中でもしくはそれらと共に混合されている混合物の形態の、本発明による抗体を既に含む同じ組成物の一部であってもよいし、または、抗体および他の生物活性物質は、別々に提供され得るか、もしくは複数の部分からなる1つのキットの形態で共に提供され得る、別々の組成物の一部として別々に提供されてもよい。

【0176】

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体は、1つまたは複数の他の生物活性物質と同時に、間欠的に、または連続して、それを必要とする対象に投与することができる。例えば、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明によるモノクローナル抗体は、第1の付加的な生物活性物質と同時に、または抗体の投与の後もしくは前に連続して投与することができる。1つを上回る付加的な生物活性物質を本発明による少なくとも1つの抗体と共に投与する適用計画を選択する場合には、化合物または物質を、様々な組み合わせで部分的に同時に、部分的に連続して投与することができる。

【0177】

1つの態様において、本発明は、治療有効量の、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体、およびさらなる生物活性物質または化合物、詳細には、これらに限定されないがアミロイドーシス、内分泌腫瘍、および黄斑変性症を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質に起因するかまたはこれに関連した疾患または障害の薬物治療において用いられる化合物、ならびに/または薬学的に許容される担体および/もしくは希釈剤および/もしくは賦形剤を含む組成物に関する。

【0178】

10

20

30

40

50

1つの態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体を含み、かつ、酸化ストレスに対する化合物、抗アポトーシス化合物、金属キレート剤、ピレンゼピンおよび代謝産物などのDNA修復阻害剤、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸(3APS)、1,3-プロパンジスルホン酸(1,3PDS)、セクレターゼ活性化薬、 $\beta$ セクレターゼおよび $\gamma$ セクレターゼ阻害薬、 $\tau$ タンパク質、神経伝達物質、 $\beta$ シート破壊剤、抗炎症分子、またはタクリン、リバステグミン、ドネペジル、および/もしくはガラントミンなどのコリンエステラーゼ阻害薬(ChEI)、ならびに他の薬物および栄養補助剤からなる群より選択される少なくとも1つの化合物、ならびに任意に薬学的に許容される担体および/または希釈剤および/または賦形剤をさらに含む、本明細書に記載の本発明による組成物を提供する。

10

**【0179】**

特定の態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体を含み、コリンエステラーゼ阻害薬(ChIE)である少なくとも1つの化合物をさらに含む組成物を提供する。

**【0180】**

別の特定の態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体を含み、タクリン、リバステグミン、ドネペジル、ガラントミン、ナイアシン、およびメマンチンからなる群より選択される少なくとも1つの付加的な化合物をさらに含む組成物を提供する。

**【0181】**

20

本発明のさらに別の態様において、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体を含み、幻覚、妄想、思考障害(顕著な思考錯乱、脱線、脱線思考によって顕在化する)、および奇異なまたは混乱した行動、ならびに快感消失症、感情鈍麻、無感情、および引きこもりを含む陽性および陰性の精神病症状を治療するための、例えばクロザピン、ジプラシドン、リスペリドン、アリピプラゾール、またはオランザピンなどの少なくとも1つの「非定形抗精神病薬」をさらに含む、ならびに任意に薬学的に許容される担体および/または希釈剤および/または賦形剤をさらに含む組成物を提供する。

**【0182】**

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明による抗体と組み合わせて組成物中で適切に用いられ得る他の化合物は、例えば、治療薬標的(36~39ページ)、アルカンスルホン酸およびアルカノールスルホン酸(39~51ページ)、コリンエステラーゼ阻害薬(51~56ページ)、NMDA受容体拮抗薬(56~58ページ)、エストロゲン(58~59ページ)、非ステロイド性抗炎症薬(60~61ページ)、抗酸化薬(61~62ページ)、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)作動薬(63~67ページ)、コレステロール低下薬(68~75ページ); アミロイド阻害剤(75~77ページ)、アミロイド形成阻害剤(77~78ページ)、金属キレート剤(78~79ページ)、抗精神病薬および抗うつ薬(80~82ページ)、栄養補助剤(83~89ページ)、ならびに脳中の生物活性物質の利用能を増加させる化合物(89~93ページ)、およびプロドラッグ(93および94ページ)を含むWO 2004/058258(特に16および17ページを参照されたい)に記載されており、この文献は参照により本明細書に組み入れられる。

30

40

**【0183】**

特に、本発明による組成物は、治療有効量の、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体、および/または生物活性物質を含む。

**【0184】**

1つの態様において、本発明は、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体を産生させる方法であって、疎水性部分または親水性部分が、例えばリジン、グルタミン酸、およびシステイン、またはリンカー分子として役立ち得る任意の他の適切なアミノ酸もしくはアミノ酸類似体などの少なくとも1つ、詳細には1つまたは2つのアミノ酸を介して各末端に共有結合している、 $\beta$ アミロイドペプチドまたはその断片、詳細には、疎水性部分、詳細にはパルミチン酸部分

50

で修飾された $\beta$ アミロイドペプチド $A\beta_{1-15}$ 、または別法として、詳細には、親水性部分、詳細にはポリエチレングリコール(PEG)部分で修飾された、 $\beta$ アミロイドペプチド $A\beta_{22-35}$ および $A\beta_{29-40}$ それぞれのアミノ酸配列に対応する抗原ペプチドを含む超分子抗原構築物に対する抗体を、適切な宿主生物において産生させる段階；ならびにその抗体を単離する段階を含む方法に関する。

【0185】

PEGなどの親水性部分を用いる場合、 $\beta$ アミロイドペプチドの選択される断片は、アミノ酸配列 $A\beta_{22-35}$ および $A\beta_{29-40}$ それぞれに対応する断片であってよく、遊離PEG末端は、ホスファチジルエタノールアミン、または例えば抗原構築物をリボソームの二重層内に埋め込むための、係留エレメントとして機能するのに適している任意の他の化合物に共有結合させることができる。

10

【0186】

1つの態様において、本発明は、それを必要とする対象において、これらに限定されないがアミロイドーシス、内分泌腫瘍、および黄斑変性症を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質に起因するかまたはこれと関連した疾患および障害の影響を治療または軽減するための薬剤を調製するための、その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体、および/または本明細書に記載の本発明による薬学的組成物、もしくは本明細書に記載の本発明による混合物の使用に関する。

【0187】

20

1つの態様において、本発明は、それを必要とする対象において、これらに限定されないがアミロイドーシス、内分泌腫瘍、および黄斑変性症を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質に起因するかまたはこれと関連した疾患および障害の影響を治療または軽減する上で用いるための、本明細書に記載の本発明による薬学的組成物または混合物を、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体を用いて調製する方法に関する。

【0188】

1つの態様において、本発明は、それを必要とする対象において、これらに限定されないがアミロイドーシス、内分泌腫瘍、および黄斑変性症を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質に起因するかまたはこれと関連した疾患および障害の影響を予防、治療、または軽減するための薬剤を、本明細書に記載の本発明による、その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体、薬学的組成物または混合物を用いて調製する方法に関する。

30

【0189】

特定の態様において、本発明は、詳細には、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体を用いて薬学的組成物を調製する方法であって、詳細には該抗体が治療有効量で組成物中に含まれるように、該抗体を薬学的に許容される形態で製剤化する段階を含む方法に関する。

【0190】

本発明の1つの局面において、脳内の斑負荷量の増加に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の斑負荷量を減少させる方法であって、その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体の治療有効量、または本明細書に先に記載した本発明による組成物もしくは混合物を、そのような治療を必要とする対象、詳細には哺乳動物、より詳細にはヒトに投与する段階を含む方法を提供する。

40

【0191】

本発明の特定の局面において、これらの方法において用いる抗体は、ポリペプチド配列 SEQ ID NO: 7~8を有するACI-24-Ab-3、または本明細書に記載のその機能的部分である。特に、このモノクローナル抗体は、2007年5月25日にDSM ACC2844として寄託されたハイブリドーマEJ1A9によって産生される。

50

## 【 0 1 9 2 】

本発明のさらなる特定に局面において、これらの方法において用いるモノクローナル抗体は、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 17~18を有するACI-11-Ab-9、およびポリペプチド配列SEQ ID NO: 19~20を有するACI-12-Ab-11、または本明細書に記載のその機能的部分を含む抗体の群より選択されるモノクローナル抗体である。特に、モノクローナル抗体は、2007年5月25日にDSM ACC2845として寄託されたハイブリドーマFG1F9E4、または2007年5月25日にDSM ACC2846として寄託されたハイブリドーマFK2A6A6によって産生される。

## 【 0 1 9 3 】

特に、斑負荷量は、少なくとも20%、詳細には少なくとも25%、より詳細には少なくとも30%、さらにより詳細には30%超減少する。

10

## 【 0 1 9 4 】

本発明の別の局面において、脳内の斑負荷量の増加に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の斑の量を減少させる方法であって、その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体の治療有効量、または本明細書に先に記載した本発明による組成物もしくは混合物を、そのような治療を必要とする対象、詳細には哺乳動物、特にヒトに投与する段階を含む方法を提供する。

## 【 0 1 9 5 】

本発明の特定の局面において、このような方法において用いる抗体は、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 7~8を有するACI-24-Ab-3、または本明細書に記載のその機能的部分である。特に、このモノクローナル抗体は、2007年5月25日にDSM ACC2844として寄託されたハイブリドーマEJ1A9によって産生される。

20

## 【 0 1 9 6 】

本発明のさらなる特定に局面において、これらの方法において用いるモノクローナル抗体は、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 17~18を有するACI-11-Ab-9、およびポリペプチド配列SEQ ID NO: 19~20を有するACI-12-Ab-11、または本明細書に記載のその機能的部分を含む抗体の群より選択されるモノクローナル抗体である。特に、モノクローナル抗体は、2007年5月25日にDSM ACC2845として寄託されたハイブリドーマFG1F9E4、または2007年5月25日にDSM ACC2846として寄託されたハイブリドーマFK2A6A6によって産生される。

## 【 0 1 9 7 】

特に、脳内の斑の量は、少なくとも10%、詳細には少なくとも15%、より詳細には15%超減少する。

30

## 【 0 1 9 8 】

本発明のさらに別の局面において、脳内の可溶性A $\beta$ の濃度上昇に関連した疾患または病態に罹患した対象、詳細には哺乳動物、特にヒトの脳内の可溶性A $\beta$ の総量を減少させる方法であって、その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体の治療有効量、または本明細書に先に記載した本発明による組成物もしくは混合物を、そのような治療を必要とする対象、詳細には哺乳動物、特にヒトに投与する段階を含む方法を提供する。

## 【 0 1 9 9 】

本発明の特定の局面において、これらの方法のモノクローナル抗体は、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 7~8を有するACI-24-Ab-3、または本明細書に記載のその機能的部分である。特に、モノクローナル抗体は、2007年5月25日にDSM ACC2844として寄託されたハイブリドーマEJ1A9によって産生される。

40

## 【 0 2 0 0 】

本発明のさらなる特定の局面において、これらの方法において用いるモノクローナル抗体は、ポリペプチド配列SEQ ID NO: 17~18を有するACI-11-Ab-9、およびポリペプチド配列SEQ ID NO: 19~20を有するACI-12-Ab-11、または本明細書に記載のその機能的部分を含む抗体の群より選択されるモノクローナル抗体である。特に、モノクローナル抗体は、2007年5月25日にDSM ACC2845として寄託されたハイブリドーマFG1F9E4、または2007年5月

50

25日にDSM ACC2846として寄託されたハイブリドーマFK2A6A6によって産生される。

【0201】

本発明のさらに別の局面において、その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体の治療有効量、または本明細書に先に記載した本発明による組成物もしくは混合物を、そのような治療を必要とする対象、詳細には哺乳動物、特にヒトに投与することにより、それを必要とする対象において、これらに限定されないがアミロイドーシス、内分泌腫瘍、および黄斑変性症を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質に起因するかまたはこれに関連した疾患および障害の影響を、そのような障害に罹患した動物、哺乳動物、またはヒトにおいて予防、治療、または軽減する方法を提供する。

10

【0202】

本発明のさらに別の局面において、アミロイドに関連した疾患または病態を呈する哺乳動物における認知記憶能を保持または増加させる方法であって、その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含む抗体、詳細にはモノクローナル抗体の治療有効量、または本明細書に先に記載した本発明による組成物もしくは混合物を、そのような治療を必要とする対象、詳細には哺乳動物、特にヒトに投与する段階を含む方法を提供する。

【0203】

1つの態様において、本発明は、本明細書に先に記載した本発明によるモノクローナル抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ細胞株に関する。

【0204】

20

特に、本発明は、2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2844を付与されたハイブリドーマEJ1A9によって産生される抗体の特徴的特性を有するモノクローナル抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ細胞株に関する。

【0205】

本発明の特定の態様において、2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2844を付与されたハイブリドーマ細胞株EJ1A9を提供する。

【0206】

特に、本発明は、2007年5月25日にDSM ACC2845として寄託されたハイブリドーマFG1F9E4、または2007年5月25日にDSM ACC2846として寄託されたハイブリドーマFK2A6A6によって産生される抗体の特徴的特性を有するモノクローナル抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ細胞株に関する。

30

【0207】

本発明の特定の態様において、2007年5月25日にDSM ACC2845として寄託されたハイブリドーマFG1F9E4を提供する。

【0208】

本発明の別の特定の態様において、2007年5月25日にDSM ACC2846として寄託されたハイブリドーマFK2A6A6を提供する。

【0209】

1つの態様において、本発明は、試料中またはインサイチューのアミロイドタンパク質のエピトープに対する、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体の免疫特異的結合を検出する段階を含む、対象におけるアミロイドに関連した疾患または病態を診断する方法であって、以下の段階を含む方法に関する：

40

(a) アミロイドタンパク質を含むことが疑われる対象の試料または特定の身体部分もしくは身体部位を、アミロイドタンパク質のコンホメーションエピトープと結合する本発明による抗体と接触させる段階；

(b) 抗体をアミロイドタンパク質に結合させて、免疫複合体を形成させる段階；

(c) 詳細には免疫複合体の有無がアミロイドタンパク質の有無と相関するように、免疫複合体の形成を検出する段階；および

(d) 対象の試料または特定の身体部分もしくは部位における、免疫複合体の有無とアミ

50

ロイドタンパク質の有無とを相関づける段階。

【0210】

特定の態様において、段階(a)の組成物は、対象を治療するための抗体の組み合わせを含む。

【0211】

1つの態様において、それを必要とする対象の組織中のアミロイド形成斑の負荷の程度を決定する方法であって、以下の段階を含む方法を提供する：

(a) 調査中の対象の組織を代表する試料を入手する段階；

(b) 該試料を、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体を用いて、アミロイド斑の存在に関して検査する段階；

(c) 詳細には免疫複合体の有無がアミロイド斑の有無と相関するように、試料に結合した抗体の量を決定する段階；および

(d) 対象の組織中の斑負荷を計算する段階。

【0212】

1つの態様において、試料中またはインサイチューのアミロイドタンパク質のエピトープに対する、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の抗体、詳細にはモノクローナル抗体の特異的結合を検出する段階を含む、対象におけるアミロイドに関連した疾患または状態に対する素因を診断する方法であって、

(a) アミロイドタンパク質を含むことが疑われる対象の試料または特定の身体部分もしくは身体部位を、アミロイドタンパク質のコンホメーションエピトープと結合する抗体と接触させる段階；

(b) 抗体を試料中の任意のアミロイドタンパク質に結合させて、免疫複合体を形成させる段階；

(c) 免疫複合体の形成を検出する段階；

(d) 対象の試料または特定の身体部分もしくは部位における、免疫複合体の有無とアミロイドタンパク質の有無とを相関づける段階；および

(e) 該免疫複合体の量を正常対照値と比較する段階、  
を含み、該複合体の量が正常対照値と比較して多いことにより、該患者がアミロイドに関連した疾患または病態に罹患しているか、またはそれを発症するリスクがあることが示される方法を提供する。

【0213】

1つの態様において、本発明による抗体または組成物による治療後の対象における微小残存病変をモニターする方法であって、

(a) アミロイドタンパク質を含むことが疑われる対象の試料または特定の身体部分もしくは身体部位を、アミロイドタンパク質のコンホメーションエピトープと結合する、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体と接触させる段階；

(b) 抗体をアミロイドタンパク質に結合させて、免疫複合体を形成させる段階；

(c) 免疫複合体の形成を検出する段階；

(d) 対象の試料または特定の身体部分もしくは部位における、免疫複合体の有無とアミロイドタンパク質の有無とを相関づける段階；および

(e) 該免疫複合体の量を正常対照値と比較する段階、  
を含み、該複合体の量が正常対照値と比較して多いことにより、該患者がなお微小残存病変に冒されていることが示される方法を提供する。

【0214】

特定の態様において、段階(a)の組成物は、対象を治療するための抗体の組み合わせを含む。

【0215】

1つの態様において、本発明による抗体または組成物による治療を受けた対象の反応性

を予測する方法であって、

(a) アミロイドタンパク質を含むことが疑われる試料または特定の身体部分もしくは身体部位を、アミロイドタンパク質のコンホメーションエピトープと結合する、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体と接触させる段階；

(b) 抗体をアミロイド抗原に結合させて、免疫複合体を形成させる段階；

(c) 免疫複合体の形成を検出する段階；

(d) 対象の試料または特定の身体部分もしくは部位における、免疫複合体の有無とアミロイドタンパク質の有無とを相関づける段階；および

(e) 治療の開始の前および後の該免疫複合体の量を比較する段階、  
を含み、該免疫複合体の量が減少することにより、該対象が治療に反応する高い可能性を有することが示される方法を提供する。

10

#### 【0216】

特定の態様において、段階(a)の組成物は、対象を治療するための抗体の組み合わせを含む。

#### 【0217】

1つの態様において、本発明は、それを必要とする対象におけるアミロイドに関連した疾患および病態を検出および診断するための検査キットであって、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本明細書に記載の本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体と、アミロイドタンパク質に結合させて免疫複合体を形成させ、免疫複合体の有無がアミロイドタンパク質の有無と相関するように、免疫複合体の形成を検出する目的で該抗体を用いるための説明書とを含むキットに関する。

20

#### 【0218】

本発明のこれらおよびその他の目的、特徴、および利点は、開示する態様の以下の詳細な説明および添付の特許請求の範囲を検討することで明らかになるであろう。

#### [本発明1001]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、コンホメーションエピトープを認識し、かつそれぞれが複数の単量体Aβ1-42ペプチドを含む、多量体可溶性アミロイドペプチド、オリゴマーアミロイドペプチド、多量体可溶性アミロイドAβペプチド、および/またはオリゴマーアミロイドAβペプチドに結合する、モノクローナル抗体。

30

#### [本発明1002]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、Aβ単量体ペプチド1-40に結合し、複数のAβ1-42単量体ペプチドを含む可溶性多量体アミロイドペプチドおよび/もしくはオリゴマーアミロイドペプチドに結合し、Aβ単量体ペプチド17-40に本質的に結合せず、Aβ単量体ペプチド1-28に対して実質的に弱い結合を有し、ならびに/または単量体ペプチド1-42に対して中間レベルの結合を有する、本発明1001のモノクローナル抗体。

#### [本発明1003]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、単量体および/またはオリゴマーの形態の、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも38、少なくとも40のアミノ酸残基、および42アミノ酸の残基より選択される複数のアミノ酸残基を含むAβペプチドとコインキュベーションした際に、Aβ単量体および/またはオリゴマーが高分子量多量体原繊維に凝集するのを阻害する、本発明1001のモノクローナル抗体。

40

#### [本発明1004]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、Aβ<sub>1-40</sub>単量体ペプチドに優先的に結合し、Aβ<sub>1-42</sub>オリゴマーおよび/または多量体ペプチドにも結合するが、Aβ単量体ペプチド1-28に対して実質的に弱い結合および/もしくは単量体ペプチド1-42に対して中間の結合を示し、ならびに/またはAβ単

50

量体ペプチド17-40に本質的に結合せず、 $A\beta_{1-42}$ 単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された、予め形成された高分子量多量体アミロイド原繊維またはフィラメントとコインキュベーションした際に、予め形成された多量体原繊維またはフィラメントを、詳細には少なくとも10%、少なくとも20%、詳細には少なくとも30%、さらに詳細には少なくとも40%、なおさらに詳細には少なくとも50%、とりわけ少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%またはそれ以上、脱凝集させることができる、本発明1001のモノクローナル抗体。

[本発明1005]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、 $A\beta_{1-40}$ 単量体ペプチドに対して、ならびに複数の $A\beta_{1-42}$ 単量体ペプチドを含む可溶性多量体アミロイドペプチドおよび/または可溶性オリゴマーアミロイドペプチドに対して高い特異性を示すが、 $A\beta_{1-28}$ 、 $A\beta_{17-40}$ 、 $A\beta_{1-38}$ 、 $A\beta_{1-39}$ 、 $A\beta_{1-41}$ 、および/または $A\beta_{1-42}$ 単量体ペプチドに対して本質的に交差反応性を示さないか、または中程度の交差反応性を示す、本発明1001のモノクローナル抗体。

10

[本発明1006]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、脳における増加した濃度の可溶性 $A\beta$ と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における可溶性 $A\beta$ の総量を減少させることができる、本発明1001のモノクローナル抗体。

[本発明1007]

20

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、斑を可溶化および/または破壊することができ、従って、脳における増加した斑量と関連する疾患または状態に罹患している、動物、特に、哺乳動物、とりわけ、ヒトの脳における斑量を減少させることができる、本発明1001のモノクローナル抗体。

[本発明1008]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2844が付けられたハイブリドーマ細胞株EJ1A9により産生された抗体の特性を有する、モノクローナル抗体。

[本発明1009]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2844が付けられたハイブリドーマ細胞株EJ1A9により産生された、モノクローナル抗体。

30

[本発明1010]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、疎水性パルミチン酸部分で修飾された $\beta$ -アミロイドペプチド $A\beta_{1-15}$ のアミノ酸配列に対応する抗原性ペプチドを含む超分子抗原性構築物に対して作製されており、該疎水性部分が、リジン、またはリンカー分子として役立ち得る他の任意の適切なアミノ酸もしくはアミノ酸類似体より選択されるアミノ酸を介して各末端に共有結合している、モノクローナル抗体。

[本発明1011]

40

SEQ ID NO:7に示した配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、またはSEQ ID NO:9~11の1つまたは複数より選択されるポリペプチド配列を有する軽鎖CDRの少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つを含む、その機能的部分。

[本発明1012]

SEQ ID NO:8に示した配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、またはSEQ ID NO:12~14の1つまたは複数より選択されるポリペプチド配列を有する重鎖CDRの少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つを含む、その機能的

50

部分。

[本発明1013]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、SEQ ID NO:7に示した配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、またはSEQ ID NO:9~11の1つまたは複数より選択されるポリペプチド配列を有する軽鎖CDRの少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つを含むその機能的部分を含む、モノクローナル抗体。

[本発明1014]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、SEQ ID NO:8に示した配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、またはSEQ ID NO:12~14の1つまたは複数より選択されるポリペプチド配列を有する重鎖CDRの少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つを含むその機能的部分を含む、モノクローナル抗体。

10

[本発明1015]

SEQ ID NO:7~8のアミノ酸配列を含む、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、SEQ ID NO:7~8の配列に少なくとも1つの、少なくとも2つの、もしくは少なくとも3つの、またはそれ以上の保存的置換を導入することによって改変されており、その抗体の全機能を本質的に維持し、位置52のアミノ酸が、システイン、チロシン、およびセリンからなる群からの任意のアミノ酸ならびにシステインのみより選択される、モノクローナル抗体。

20

[本発明1016]

SEQ ID NO:9~14より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたCDR。

[本発明1017]

本発明1011の軽鎖可変領域をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1018]

本発明1012の重鎖可変領域をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1019]

本発明1013の抗体またはその機能的部分をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

30

[本発明1020]

本発明1014の抗体またはその機能的部分をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1021]

本発明1001の抗体またはその機能的部分をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1022]

SEQ ID NO:15~16に示したヌクレオチド配列の少なくとも1つを含む、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1023]

治療的有効量の本発明1001の抗体またはその機能的部分を含み、任意で、薬学的に許容される担体、希釈剤、および/または賦形剤をさらに含む、治療用組成物。

40

[本発明1024]

本発明1001の抗体またはその機能的部分を投与する工程を含む、アミロイドーシスを含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害を治療する方法。

[本発明1025]

アミロイドーシスを含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害の薬物療法において用いられる1つまたは複数の化合物、酸化ストレスを防ぐ化合物、抗アポトーシス化合物、金属キレート剤、DNA修復阻害剤、例えば、ピレンゼピンおよび代謝産物、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸(3APS)、1,3-プロパンジスルホネート(1,3PDS)、セクレターゼアクチベーター、 $\beta$ -お

50

よび  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤、tauタンパク質、神経伝達物質、 $\beta$ -シート破壊物質、炎症分子、もしくはコリンエステラーゼ阻害剤(ChEI)、例えば、タクリン、リバスチグミン、ドネペジル、ガランタミン、ならびに/または栄養補助剤より選択される、さらに生物学的に活性な物質をさらに含む、本発明1023の組成物。

[本発明1026]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む本発明1001の抗体を作製する方法であって、以下の工程を含む方法:

$\beta$ -アミロイドペプチドA $\beta_{1-15}$ 、1つまたは複数の疎水性部分で修飾された $\beta$ -アミロイドペプチドA $\beta_{1-15}$ 、パルミチン酸部分で修飾された $\beta$ -アミロイドペプチドA $\beta_{1-15}$ より選択される $\beta$ -アミロイドペプチドのアミノ酸配列に対応する抗原性ペプチドを含む超分子抗原性構築物に対して抗体を、適切な宿主生物において作製する工程であって、該疎水性部分が、リジン、またはリンカー分子として役立ち得る他の任意の適切なアミノ酸もしくはアミノ酸類似体より選択されるアミノ酸を介して各末端に共有結合している、工程;

10

ならびに  
該抗体を単離する工程。

[本発明1027]

対象における、アミロイドーシス、神経障害、例えば、アルツハイマー病(AD)、および認知記憶能の消失を特徴とする疾患または状態、例えば、軽度認知機能障害(MCI)、レビー小体認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(オランダ型);グアム・パーキンソン認知症複合;ならびにアミロイド様タンパク質に基づく、またはアミロイド様タンパク質と関連する他の疾患、例えば、進行性核上性麻痺、多発性硬化症;クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS(筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)), 封入体筋炎(IBM)、成人発症型糖尿病;老人性心アミロイドーシス;内分泌腫瘍、ならびに黄斑変性を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害の影響を治療または軽減する方法であって、該疾患または障害の影響が治療および/または軽減されるように、本発明1001のモノクローナル抗体またはその機能的部分を対象に投与する工程を含む、方法。

20

[本発明1028]

続発性アミロイドーシスおよび加齢性アミロイドーシスを含むアミロイド斑形成に関連する疾患および障害のグループであるアミロイドーシスを含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する、例えば以下を含むがこれらに限定されない疾患および障害の影響を治療または軽減する方法であって、本発明1023の組成物を投与する工程を含む、方法:

30

神経障害、例えば、アルツハイマー病(AD)、および認知記憶能の消失を特徴とする疾患または状態、例えば、軽度認知機能障害(MCI)、レビー小体認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(オランダ型);グアム・パーキンソン認知症複合;ならびにアミロイド様タンパク質に基づく、またはアミロイド様タンパク質と関連する他の疾患、例えば、進行性核上性麻痺、多発性硬化症;クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS(筋萎縮性側索硬化症)、成人発症型糖尿病;老人性心アミロイドーシス;内分泌腫瘍、ならびに黄斑変性を含むその他の疾患。

40

[本発明1029]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む、治療的有効量の本発明1010のモノクローナル抗体を含み、任意で、薬学的に許容される担体、希釈剤、および/または賦形剤をさらに含む、治療用組成物。

[本発明1030]

脳における増加した斑量と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における斑量を減らす方法であって、治療的有効量の本発明1001のモノクローナル抗体を対象に投与する工程を含む、方法。

[本発明1031]

50

脳における増加した斑量と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における斑の量を減らす方法であって、治療的有効量の本発明1001のモノクローナル抗体を対象に投与する工程を含む、方法。

[本発明1032]

脳における増加した濃度の可溶性A $\beta$ と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における可溶性A $\beta$ の総量を減らす方法であって、治療的有効量の本発明1001のモノクローナル抗体を対象に投与する工程を含む、方法。

[本発明1033]

アミロイドに関連する疾患または状態を示す対象において認知記憶能を保持するか、または高める方法であって、治療的有効量の本発明1001のモノクローナル抗体を対象に投与する工程を含む、方法。

10

[本発明1034]

本発明1001のモノクローナル抗体を産生することを特徴とする、細胞株。

[本発明1035]

2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2844が付けられたハイブリドーマEJ1A9により産生された抗体の特性を有する、その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含むモノクローナル抗体を産生することを特徴とするか、または

2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2844が付けられたハイブリドーマEJ1A9である、細胞株。

20

[本発明1036]

試料中またはインサイチューでモノクローナル抗体またはその活性断片とアミロイドタンパク質のエピトープとの免疫特異的結合を検出することを含む、患者におけるアミロイドに関連する疾患もしくは状態を診断する方法、または該疾患もしくは状態に対する素因を診断する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a)アミロイドタンパク質を含有すると疑われる試料または特定の身体部位もしくは身体領域と、本発明1001のモノクローナル抗体を接触させる工程であって、該抗体がアミロイドタンパク質のコンホメーションエピトープに結合する、工程；

(b)抗体とアミロイドタンパク質を結合させて、免疫複合体を形成する工程；

(c)免疫複合体の形成を検出する工程；および

(d)免疫複合体の存在または非存在と、対象の試料または特定の身体部位もしくは身体領域におけるアミロイドタンパク質の存在または非存在を相関付ける工程。

30

[本発明1037]

対象の組織におけるアミロイド形成斑負荷量の程度を確かめる方法であって、以下の工程を含む方法：

(a)研究中の対象の組織を代表する試料を得る工程；

(b)本発明1001のモノクローナル抗体を用いて、アミロイドタンパク質の存在について該試料を試験する工程；

(c)抗原に結合した抗体の量を求める工程；および

(d)対象の組織における斑負荷量を計算する工程。

40

[本発明1038]

本発明1001の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその機能的部分を用いた治療後に、対象における微小残存病変をモニタリングする方法であって、以下の工程を含む方法：

(a)アミロイドタンパク質を含有すると疑われる対象の試料または特定の身体部位もしくは身体領域と、アミロイドタンパク質のコンホメーションエピトープに結合する本発明1001のモノクローナル抗体を接触させる工程；

(b)抗体とアミロイドタンパク質を結合させて、免疫複合体を形成する工程；

(c)免疫複合体の形成を検出する工程；

(d)免疫複合体の存在または非存在と、試料または特定の身体部位もしくは身体領域に

50

おけるアミロイドタンパク質の存在または非存在を相関付ける工程;ならびに

(e)該免疫複合体の量と正常対照値を比較する工程であって、正常対照値と比較した凝集物の量の増加が、該対象に依然として微小残存病変があることを示す、工程。

[本発明1039]

本発明1001の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその機能的部分を用いて治療されている対象の応答性を予測する方法であって、以下の工程を含む方法:

(a)アミロイドタンパク質を含有すると疑われる対象の試料または特定の身体部位もしくは身体領域と、アミロイドタンパク質のコンホメーションエピトープに結合する本発明1001のモノクローナル抗体を接触させる工程;

(b)抗体とアミロイドタンパク質を結合させて、免疫複合体を形成する工程;

(c)免疫複合体の形成を検出する工程;

(d)免疫複合体の存在または非存在と、対象の試料または特定の身体部位もしくは身体領域におけるアミロイドタンパク質の存在または非存在を相関付ける工程;ならびに

(e)治療の開始前および開始後の該免疫複合体の量を比較する工程であって、該凝集物の量の減少が、該対象が治療に応答する可能性が高いことを示す、工程。

[本発明1040]

本発明1001の少なくとも1つの抗体またはその機能的部分を含み、任意で、アミロイドタンパク質に結合させて免疫複合体を形成し、免疫複合体の存在または非存在がアミロイドタンパク質の存在または非存在と相関するような免疫複合体の形成を検出する目的で抗体を使用するための説明書をさらに含む、検査キット。

[本発明1041]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体によって特異的に認識される、A $\beta$  エピトープであって、該抗体が、疎水性パルミチン酸部分で修飾された $\beta$ -アミロイドペプチドA $\beta_{1-15}$ のアミノ酸配列に対応する抗原性ペプチドを含む超分子抗原性構築物に対して作製されており、該疎水性部分が、リジンなどのアミノ酸、またはリンカー分子として役立ち得る他の任意の適切なアミノ酸もしくはアミノ酸類似体を介して各末端に共有結合している、A $\beta$  エピトープ。

[本発明1042]

本発明1015のモノクローナル抗体またはその機能的部分によって特異的に認識される、A $\beta$  エピトープ。

[本発明1043]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、少なくとも30、詳細には少なくとも35、さらに詳細には少なくとも38、なおさらに詳細には少なくとも40のアミノ酸残基を有するA $\beta$  単量体ペプチドに結合するが、A $\beta$  単量体ペプチド17-40に本質的に結合しない、本発明1001のモノクローナル抗体。

[本発明1044]

ストリンジェントな条件下で本発明1021のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズする、ポリヌクレオチド。

[本発明1045]

ストリンジェントな条件下で本発明1022のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズする、ポリヌクレオチド。

[本発明1046]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、コンホメーションエピトープを認識し、かつコンホメーションエピトープに結合し、複数の単量体A $\beta_{1-42}$ ペプチドを含む、多量体可溶性アミロイド、アミロイド原繊維、アミロイド繊維、多量体可溶性A $\beta$  ペプチド、および/またはそれぞれが複数の該多量体ペプチドを組み込んでいるA $\beta$  原繊維もしくは繊維に結合する、モノクローナル抗体。

[本発明1047]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、A $\beta$  単量体ペプチド1-42に結合し、A $\beta$  単量体ペプチド17-40に本質的に結合せ

10

20

30

40

50

ず、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対して実質的により弱い結合を有する、本発明1046のモノクローナル抗体。

[本発明1048]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、単量体および/またはオリゴマーの形態の、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも38、少なくとも40のアミノ酸残基、および42のアミノ酸残基より選択される複数のアミノ酸残基を含むA $\beta$ ペプチドとコインキュベーションした際に、A $\beta$ 単量体および/またはオリゴマーが高分子量多量体原繊維に凝集するのを阻害する、本発明1046のモノクローナル抗体。

[本発明1049]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、A $\beta$ 1-42単量体ペプチドに結合し、複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む多量体可溶性A $\beta$ ペプチドおよび複数の該多量体ペプチドを組み込んでいるA $\beta$ 原繊維または繊維にも結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28に対して実質的により弱い結合を示し、および/またはA $\beta$ 単量体ペプチド17-40に本質的に結合せず、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体および/またはオリゴマーペプチドの凝集によって形成された予め形成された高分子量多量体アミロイド原繊維またはフィラメントとコインキュベーションした際に、予め形成された多量体原繊維またはフィラメントを、少なくとも10%、少なくとも20%、詳細には少なくとも30%、さらに詳細には少なくとも40%、なおさらに詳細には少なくとも50%、とりわけ少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%またはそれ以上、脱凝集させることができる、本発明1046のモノクローナル抗体。

[本発明1050]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体ペプチド、ならびに複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む多量体可溶性A $\beta$ ペプチド、ならびに複数の該多量体ペプチドを組み込んでいるA $\beta$ 原繊維または繊維に対して高い特異性を示すが、A $\beta$ <sub>1-28</sub>および/またはA $\beta$ <sub>17-40</sub>単量体ペプチドに対して本質的に交差反応性を示さないか、中程度の交差反応性を示す、本発明1046のモノクローナル抗体。

[本発明1051]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、脳における増加した濃度の可溶性A $\beta$ と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における可溶性A $\beta$ の総量を減少させることができる、本発明1046のモノクローナル抗体。

[本発明1052]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、斑を可溶化および/または破壊することができ、従って、脳における増加した斑量と関連する疾患または状態に罹患している、動物、特に、哺乳動物、とりわけ、ヒトの脳における斑量を減少させることができる、本発明1046のモノクローナル抗体。

[本発明1053]

その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2845が付けられたハイブリドーマ細胞株FG1F9E4により産生された抗体の特性を有する、モノクローナル抗体。

[本発明1054]

その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2845が付けられたハイブリドーマ細胞株FG1F9E4により産生される、モノクローナル抗体。

[本発明1055]

その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2846が付けられたハイブリドーマ細胞株FK2A6A6により産生された抗体の特性を有する、モノクローナル抗体。

[本発明1056]

その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2846が付けられたハイブリドーマ細胞株FK 2A6A6により産生される、モノクローナル抗体。

[本発明1057]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、それぞれ親水性ポリエチレングリコール(PEG)部分で修飾されている $\beta$ -アミロイドペプチドである $A\beta_{22-35}$ および $A\beta_{29-40}$ のアミノ酸配列に対応する抗原性ペプチドを含む超分子抗原性構築物に対して作製されており、該疎水性部分が、リジン、グルタミン酸、システインより選択されるアミノ酸、およびリンカー分子として役立ち得る他の任意の適切なアミノ酸またはアミノ酸類似体を介して各末端に共有結合している、モノクローナル抗体。

10

[本発明1058]

SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:19より選択される配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、またはSEQ ID NO:21~23の1つまたは複数より選択されるポリペプチド配列を有する軽鎖CDRの少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つを含む、その機能的部分。

[本発明1059]

SEQ ID NO:18およびSEQ ID NO:20より選択される配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、またはSEQ ID NO:24~26の1つまたは複数より選択されるポリペプチド配列を有する重鎖CDRの少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つを含む、その機能的部分。

20

[本発明1060]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:19より選択される配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、またはSEQ ID NO:21~23の1つまたは複数より選択されるポリペプチド配列を有する軽鎖CDRの少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つを含むその機能的部分を含む、モノクローナル抗体。

30

[本発明1061]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、SEQ ID NO:18およびSEQ ID NO:20より選択される配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、またはSEQ ID NO:24~26の1つまたは複数より選択されるポリペプチド配列を有する重鎖CDRの少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つを含むその機能的部分を含む、モノクローナル抗体。

[本発明1062]

SEQ ID NO:17~18のアミノ酸配列を含む、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、SEQ ID NO:17~18の配列に少なくとも1つの、少なくとも2つの、もしくは少なくとも3つの、またはそれ以上の保存的置換を導入することによって改変されており、その抗体の全機能を本質的に維持しており、位置52のアミノ酸が、システイン、チロシン、およびセリンからなる群からの任意のアミノ酸、ならびにシステインのみより選択される、モノクローナル抗体。

40

[本発明1063]

SEQ ID NO:19~20のアミノ酸配列を含む、その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、SEQ ID NO:19~20の配列に少なくとも1つの、少なくとも2つの、もしくは少なくとも3つの、またはそれ以上の保存的置換を導入することによって改変されており、その抗体の全機能を本質的に維持しており、位置

50

52のアミノ酸が、システイン、チロシン、およびセリンからなる群からの任意のアミノ酸、ならびにシステインのみより選択される、モノクローナル抗体。

[本発明1064]

SEQ ID NO:21 ~ 23より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたCDR。

[本発明1065]

本発明1058の軽鎖可変領域をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1066]

本発明1059の重鎖可変領域をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1067]

本発明1060の抗体またはその機能的部分をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1068]

本発明1061の抗体またはその機能的部分をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1069]

本発明1046の抗体またはその機能的部分をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1070]

SEQ ID NO:27 ~ 28に示したヌクレオチド配列の少なくとも1つを含む、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1071]

SEQ ID NO:29 ~ 30に示したヌクレオチド配列の少なくとも1つを含む、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1072]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む、治療的有效量の本発明1046のモノクローナル抗体を含み、任意で、薬学的に許容される担体、希釈剤、および/または賦形剤をさらに含む、治療用組成物。

[本発明1073]

アミロイドーシスを含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害を治療する方法であって、本発明1046の抗体またはその機能的部分を投与する工程を含む、方法。

[本発明1074]

アミロイドーシスを含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害の薬物療法において用いられる1つまたは複数の化合物、酸化ストレスを防ぐ化合物、抗アポトーシス化合物、金属キレート剤、DNA修復阻害剤、例えば、ビレンゼピンおよび代謝産物、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸(3APS)、1,3-プロパンジスルホネート(1,3PDS)、セクレターゼアクチベーター、 $\beta$ -および $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤、tauタンパク質、神経伝達物質、 $\beta$ -シート破壊物質、抗炎症分子、もしくはコリンエステラーゼ阻害剤(ChEI)、例えば、タクリン、リバスチグミン、ドネペジル、ガラントミン、ならびに/または栄養補助剤より選択される、さらに生物学的に活性な物質をさらに含む、本発明1072の組成物。

[本発明1075]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む、本発明1046の抗体を作製する方法であって、以下の工程を含む方法:

適切な宿主生物において、それぞれ1つもしくは複数の親水性部分または親水性ポリエチレングリコール(PEG)部分で修飾されている、 $A\beta_{22-35}$ および $A\beta_{29-40}$ より選択される $\beta$ -アミロイドペプチドのアミノ酸配列に対応する抗原性ペプチドを含む超分子抗原性構築物に対して抗体を作製する工程であって、該親水性部分が、リジン、グルタミン酸、システインより選択されるアミノ酸、およびリンカー分子として役立ち得る他の任意の適切なアミノ酸またはアミノ酸類似体を介して各末端に共有結合している、工程;ならびに

該抗体を単離する工程。

[本発明1076]

対象における、アミロイドーシス、神経障害、例えば、アルツハイマー病(AD)、および

10

20

30

40

50

認知記憶能の消失を特徴とする疾患または状態、例えば、軽度認知機能障害(MCI)、レビー小体認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(オランダ型);グアム・パーキンソン認知症複合;ならびにアミロイド様タンパク質に基づく、またはアミロイド様タンパク質と関連する他の疾患、例えば、進行性核上性麻痺、多発性硬化症;クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS(筋萎縮性側索硬化症)、封入体筋炎(IBM)、成人発症型糖尿病;老人性心アミロイドーシス;内分泌腫瘍、ならびに黄斑変性を含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する疾患および障害の影響を治療または軽減する方法であって、該疾患または障害の影響が治療および/または軽減されるように、本発明1046のモノクローナル抗体またはその機能的部分を対象に投与する工程を含む、方法。

10

[本発明1077]

続発性アミロイドーシスおよび加齢性アミロイドーシスを含むアミロイド斑形成に関連する疾患および障害のグループであるアミロイドーシスを含む、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって引き起こされるか、またはこれらに関連する、例えば以下を含むがこれらに限定されない疾患などの疾患および障害の影響を、それを必要とする対象において治療または軽減する方法であって、本発明1072の組成物を投与する工程を含む、方法：

それを必要とする対象における、神経障害、例えば、アルツハイマー病(AD)、および認知記憶能の消失を特徴とする疾患または状態、例えば、軽度認知機能障害(MCI)、レビー小体認知症、ダウン症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(オランダ型);グアム・パーキンソン認知症複合;ならびにアミロイド様タンパク質に基づく、またはアミロイド様タンパク質と関連する他の疾患、例えば、進行性核上性麻痺、多発性硬化症;クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS(筋萎縮性側索硬化症)、成人発症型糖尿病;老人性心アミロイドーシス;内分泌腫瘍、ならびに黄斑変性を含むその他の疾患。

20

[本発明1078]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含む、治療的有効量の本発明1057のモノクローナル抗体を含み、任意で、薬学的に許容される担体、希釈剤、および/または賦形剤をさらに含む、治療用組成物。

[本発明1079]

脳における高い斑量と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における斑量を減らす方法であって、治療的有効量の本発明1046のモノクローナル抗体を対象に投与する工程を含む、方法。

30

[本発明1080]

脳における高い斑量と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における斑の量を減らす方法であって、治療的有効量の本発明1046のモノクローナル抗体を対象に投与する工程を含む、方法。

[本発明1081]

脳における増加した濃度の可溶性A $\beta$ と関連する疾患または状態に罹患している対象の脳における可溶性A $\beta$ の総量を減らす方法であって、治療的有効量の本発明1046のモノクローナル抗体を対象に投与する工程を含む、方法。

40

[本発明1082]

アミロイドに関連する疾患または状態を示す対象において認知記憶能を保持するか、または高める方法であって、治療的有効量の本発明1046のモノクローナル抗体を対象に投与する工程を含む、方法。

[本発明1083]

本発明1046のモノクローナル抗体を産生することを特徴とする、細胞株。

[本発明1084]

2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2845が付けられたハイブリドーマFG1F9E4により産生された抗体の特性を有する、その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部

50

分を含むモノクローナル抗体を産生することを特徴とするか、または

2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2845が付けられたハイブリドーマFG1F9E4である、細胞株。

[本発明1085]

2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2846が付けられたハイブリドーマFK2A6A6により産生された抗体の特性を有する、その任意の機能的に等価な抗体もしくは機能的部分を含有モノクローナル抗体を産生することを特徴とするか、または

2007年5月25日に寄託され、寄託番号DSM ACC2846が付けられたハイブリドーマFK2A6A6である、細胞株。

[本発明1086]

試料中またはインサイチューでモノクローナル抗体またはその活性断片とアミロイドタンパク質のエピトープとの免疫特異的結合を検出することを含む、対象におけるアミロイドに関連する疾患もしくは状態の診断方法、または該疾患もしくは状態に対する素因を診断する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a)アミロイドタンパク質を含有すると疑われる対象の試料または特定の身体部位もしくは身体領域と、本発明1046のモノクローナル抗体を接触させる工程であって、該抗体がアミロイドタンパク質のコンホメーションエピトープに結合する、工程；

(b)抗体とアミロイドタンパク質を結合させて、免疫複合体を形成する工程；

(c)免疫複合体の形成を検出する工程；および

(d)免疫複合体の存在または非存在と、対象の試料または特定の身体部位もしくは身体領域におけるアミロイドタンパク質の存在または非存在を相関付ける工程。

[本発明1087]

それを必要とする対象の組織において、アミロイド形成斑負荷量の程度を確かめる方法であって、以下の工程を含む方法：

(e)研究中の対象の組織を代表する試料を得る工程；

(f)本発明1046のモノクローナル抗体を用いて、アミロイドタンパク質の存在について該試料を試験する工程；

(g)抗原に結合した抗体の量を求める工程；および

(h)対象の組織における斑負荷量を計算する工程。

[本発明1088]

本発明1046の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその機能的部分を用いた治療後に、対象における微小残存病変をモニタリングする方法であって、以下の工程を含む方法：

(a)アミロイドタンパク質を含有すると疑われる対象の試料または特定の身体部位もしくは身体領域と、本発明1046のモノクローナル抗体を接触させる工程であって、該抗体がアミロイドタンパク質のコンホメーションエピトープに結合する、工程；

(b)抗体とアミロイドタンパク質を結合させて、免疫複合体を形成する工程；

(c)免疫複合体の形成を検出する工程；

(d)免疫複合体の存在または非存在と、対象の試料または特定の身体部位もしくは身体領域におけるアミロイドタンパク質の存在または非存在を相関付ける工程；および

(e)該免疫複合体の量と正常対照値を比較する工程であって、正常対照値と比較した凝集物の量の増加が、該対象に依然として微小残存病変があることを示す、工程。

[本発明1089]

本発明1046の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその機能的部分を用いて治療されている対象の応答性を予測する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a)アミロイドタンパク質を含有すると疑われる対象の試料または特定の身体部位もしくは身体領域と、本発明1046のモノクローナル抗体を接触させる工程であって、該抗体がアミロイドタンパク質のコンホメーションエピトープに結合する、工程；

- (b)抗体とアミロイドタンパク質を結合させて、免疫複合体を形成する工程；  
 (c)免疫複合体の形成を検出する工程；  
 (d)免疫複合体の存在または非存在と、対象の試料または特定の身体部位もしくは身体領域におけるアミロイドタンパク質の存在または非存在を相関付ける工程；および  
 (e)治療の開始前および開始後の該免疫複合体の量を比較する工程であって、該凝集物の量の減少が、該対象が治療に応答する可能性が高いことを示す、工程。

[本発明1090]

本発明1046の少なくとも1つの抗体またはその機能的部分を含み、任意で、アミロイドタンパク質に結合させて免疫複合体を形成し、免疫複合体の存在または非存在がアミロイドタンパク質の存在または非存在と相関するような免疫複合体の形成を検出する目的で抗体を使用するための説明書をさらに含む、検査キット。

10

[本発明1091]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体によって特異的に認識される、A $\beta$  エピトープであって、該抗体が、それぞれ親水性ポリエチレングリコール(PEG)部分で修飾されている、 $\beta$ -アミロイドペプチドA $\beta_{22-35}$ およびA $\beta_{29-40}$ のアミノ酸配列に対応する抗原性ペプチドを含む超分子抗原性構築物に対して作製されており、該親水性部分が、リジンなどのアミノ酸、またはリンカー分子として役立ち得る他の任意の適切なアミノ酸もしくはアミノ酸類似体を介して各末端に共有結合している、A $\beta$  エピトープ。

20

[本発明1092]

本発明1062のモノクローナル抗体またはその機能的部分によって特異的に認識される、A $\beta$  エピトープ。

[本発明1093]

本発明1063のモノクローナル抗体またはその機能的部分によって特異的に認識される、A $\beta$  エピトープ。

[本発明1094]

その任意の機能的に等価な抗体または機能的部分を含むモノクローナル抗体であって、該抗体が、少なくとも30、詳細には少なくとも35、さらに詳細には少なくとも38、なおさらに詳細には少なくとも40のアミノ酸残基を有するA $\beta$  単量体ペプチドに結合するが、A $\beta$  単量体ペプチド17-40に本質的に結合しない、本発明1046のモノクローナル抗体。

30

[本発明1095]

ストリンジェントな条件下で本発明1069のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズする、ポリヌクレオチド。

[本発明1096]

ストリンジェントな条件下で本発明1070のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズする、ポリヌクレオチド。

[本発明1097]

ストリンジェントな条件下で本発明1071のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズする、ポリヌクレオチド。

【図面の簡単な説明】

40

【0219】

【図1】A $\beta$  1-42の完全なアミノ酸配列をカバーする重複ペプチドのペプチドライブラリを使用するELISAによって実施されたネズミモノクローナル抗体ACI-24-Ab-3のエピトープマッピング実験の結果を示す。完全なA $\beta$  1-42への結合を正の対照として使用した。他すべてのペプチドは長さ8~10aaであった。ペプチド番号は、ペプチドが開始するA $\beta$  1-42配列中のaaに対応する。結果をO.D.として表す。

【図2】A $\beta$  1-28、17-40、1-40、1-42A (Anaspec) または1-42B (Bachem) をカバーする長めのペプチドを使用するELISAによって実施されたネズミモノクローナル抗体ACI-24-Ab-3のエピトープマッピング実験の結果を示す。バックグラウンドを差し引いた後の結果をO.D.として表す。結果は、二つの独立した実験の平均 $\pm$ 1標準誤差を示す。

50

【図3】1:100および1:10の抗体:A $\beta$ 1-42モル比におけるA $\beta$ 1-42凝集のACI-24-Ab-3媒介障害を示す。結果は、二つの独立した実験の平均 $\pm$ 1標準誤差を示す。

【図4】1:100および1:10の抗体:A $\beta$ 1-42モル比における事前に凝集したA $\beta$ 1-42のACI-24-Ab-3媒介脱凝集を示す。結果は、二つの独立した実験の平均 $\pm$ 1標準誤差を示す。

【図5】A $\beta$ 1-42ペプチドの高分子量(HMW)プロトフィブリル(PF)オリゴマー濃縮および低分子量(LMW)単量体標本に対するACI-24-Ab-3抗体の結合を示す。

【図6】A $\beta$ 1-42ペプチドの高分子量(HMW)プロトフィブリル(PF)オリゴマー濃縮プロトフィブリルおよび低分子量(LMW)単量体標本に対する6E10対照抗体の結合を示す。

【図7】A $\beta$ 1-42ペプチドの単量体およびオリゴマーに対するACI-24-Ab-3抗体(A)および対照抗体6E10(B)の結合を示す。結果を、三つの独立した実験の平均( $\pm$ SEM)光学密度(O.D.)値として報告する。

10

【図8】A $\beta$ 1-42の完全なアミノ酸配列をカバーする重複ペプチドのペプチドライブラリを使用するELISAによって実施されたネズミモノクローナル抗体ACI-11-Ab-9のエピトープマッピング実験の結果を示す。完全なA $\beta$ 1-42への結合を正の対照として使用した。他すべてのペプチドは長さ8~10aaであった。ペプチド番号は、ペプチドが開始するA $\beta$ 1-42配列中のaaに対応する。結果をO.D.として表す。

【図9】A $\beta$ 1-28、17-40、1-40、1-42A(Anaspec)または1-42B(Bachem)をカバーする長めのペプチドを使用するELISAによって実施されたネズミモノクローナル抗体ACI-11-Ab-9のエピトープマッピング実験の結果を示す。バックグラウンドを差し引いた後の結果をO.D.として表す。結果は、二つの独立した実験の平均 $\pm$ 1標準誤差を示す。

20

【図10】A $\beta$ 1-42の完全なアミノ酸配列をカバーする重複ペプチドのペプチドライブラリを使用するELISAによって実施されたネズミモノクローナル抗体ACI-12-Ab-11のエピトープマッピング実験の結果を示す。完全なA $\beta$ 1-42への結合を正の対照として使用した。他すべてのペプチドは長さ8~10aaであった。ペプチド番号は、ペプチドが出発するA $\beta$ 1-42配列中のaaに対応する。結果をO.D.として表す。

【図11】A $\beta$ 1-28、17-40、1-40、1-42A(Anaspec)または1-42B(Bachem)をカバーする長めのペプチドを使用するELISAによって実施されたネズミモノクローナル抗体ACI-11-Ab-9のエピトープマッピング実験の結果を示す。バックグラウンドを差し引いた後の結果をO.D.として表す。結果は、二つの独立した実験の平均 $\pm$ 1標準誤差を示す。

【図12】1:100および1:10の抗体:A $\beta$ 1-42モル比におけるA $\beta$ 1-42凝集のACI-11-Ab-9媒介障害を示す。結果は、二つの独立した実験の平均 $\pm$ 1標準誤差を示す。

30

【図13】1:100および1:10の抗体:A $\beta$ 1-42モル比における事前に凝集したA $\beta$ 1-42のACI-11-Ab-9媒介脱凝集を示す。結果は、三つの独立した実験の平均 $\pm$ 1標準誤差を示す。

【図14】1:100および1:10の抗体:A $\beta$ 1-42モル比におけるA $\beta$ 1-42凝集のACI-12-Ab-11媒介障害を示す。結果は、二つの独立した実験の平均 $\pm$ 1標準誤差を示す。

【図15】1:100および1:10の抗体:A $\beta$ 1-42モル比における事前に凝集したA $\beta$ 1-42のACI-12-Ab-11媒介脱凝集を示す。結果は、二つの独立した実験の平均 $\pm$ 1標準誤差を示す。

【図16】A $\beta$ 1-42ペプチドの単量体およびオリゴマーに対するACI-12-Ab-11抗体(A)および対照抗体6E10(B)の結合を示す。結果を、三つの独立した実験の平均( $\pm$ SEM)光学密度(O.D.)値として報告する。

40

【図17】A $\beta_{42}$ ピオチンへのrhApoE4の結合を分析するために使用することができるELISAアッセイにおけるステップを概略的に示す。

【図18】A $\beta_{42}$ ピオチンへのrhApoE4結合に関するELISAアッセイの展開から得られた結果を表す。rhApoE4およびA $\beta_{42}$ ピオチンの濃度を最適化するために、rhApoE4の希釈物を一定濃度のA $\beta_{42}$ ピオチンで試験した。

【図19】前記ELISAアッセイにおけるrhApoE4に複合化したA $\beta_{42}$ ピオチンの結合に対する過剰量のA $\beta_{42}$ ピオチンの効果を示す。

【図20】前記ELISAアッセイに関するA $\beta_{42}$ ピオチンの最適濃度のサンプル測定を示す。

【発明を実施するための形態】

【0220】

50

## 表の簡単な説明

(表 1 . 1 ) 本明細書に記載される特定の抗体を産生するために使用される抗体および抗原性コンストラクトを示す。

(表 1 . 2 ) ACI-24-Ab-3へのA $\beta$  ペプチドの結合。バックグラウンドを差し引いた後の結果をO.D.として表す。

(表 1 . 3 ) ELISAによって分析されたA $\beta$  1-42の33の重複ペプチドへのACI-24-Ab-3の結合。完全なA $\beta$  1-42への結合を正の対照として使用した。他すべてのペプチドは長さ8~10aaであった。ペプチド番号は、ペプチドが出発するA $\beta$  1-42配列中のaaに対応する。結果をO.D.として表す。

(表 1 . 4 ) A $\beta$  1-42ペプチドの高分子量 (HMW) プロトフィブリル (PF) オリゴマー濃縮および低分子量 (LMW) 単量体標本に対するACI-24-Ab-3 (マウスEJ1A9) 抗体の結合。

10

(表 1 . 5 ) A $\beta$  1-42ペプチドのプロトフィブリルおよびLMW高分子量 (HMW) プロトフィブリル (PF) 濃縮オリゴマーおよび低分子量 (LMW) 単量体標本に対する6E10対照抗体の結合。

(表 1 . 6 ) A $\beta$  1-42ペプチドの単量体およびオリゴマーへのACI-24-Ab-3 (マウスEJ1A9) 抗体の結合。結果をO.D.値として示す。

(表 1 . 7 ) A $\beta$  1-42ペプチドの単量体およびオリゴマーへの6E10対照抗体の結合。結果をO.D.値として示す。

(表 2 . 1 ) 本明細書に記載される特定の抗体を産生するために使用される抗体および抗原性コンストラクトを示す。

20

(表 2 . 2 ) ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11へのA $\beta$  ペプチドの結合。バックグラウンドを差し引いた後の結果をO.D.として表す。

(表 2 . 3 ) ELISAによって分析されたA $\beta$  1-42の33の重複ペプチドへのACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11の結合。完全なA $\beta$  1-42への結合を正の対照として使用した。他すべてのペプチドは長さ8~10aaであった。ペプチド番号は、ペプチドが出発するA $\beta$  1-42配列中のaaに対応する。結果をO.D.として表す。

(表 2 . 4 ) A $\beta$  1-42ペプチドの単量体およびオリゴマーへのACI-12-Ab-11 (クローンFK2A6A6) 抗体の結合。結果をO.D.値として示す。

(表 2 . 5 ) A $\beta$  1-42ペプチドの単量体およびオリゴマーへの6E10対照抗体の結合。結果をO.D.値として示す。

30

## 【 0 2 2 1 】

## 配列の簡単な説明

(配列番号: 1) 抗原性ペプチドA $\beta$  <sub>22-35</sub>

(配列番号: 2) 抗原性ペプチドA $\beta$  <sub>29-40</sub>

(配列番号: 3) A $\beta$  ペプチド断片A $\beta$  <sub>1-28</sub>

(配列番号: 4) A $\beta$  ペプチド断片A $\beta$  <sub>17-40</sub>

(配列番号: 5) A $\beta$  ペプチド断片A $\beta$  <sub>1-40</sub>

(配列番号: 6) A $\beta$  ペプチド断片A $\beta$  <sub>1-42</sub>

(配列番号: 7) ACI-24-Ab-3の軽鎖可変ドメイン配列のアミノ酸配列。

40

(配列番号: 8) ACI-24-Ab-3の重鎖可変ドメイン配列のアミノ酸配列。

(配列番号: 9) 軽鎖CDR1のアミノ酸配列

(配列番号: 10) 軽鎖CDR2のアミノ酸配列

(配列番号: 11) 軽鎖CDR3のアミノ酸配列

(配列番号: 12) 重鎖CDR1のアミノ酸配列

(配列番号: 13) 重鎖CDR2のアミノ酸配列

(配列番号: 14) 重鎖CDR3のアミノ酸配列

(配列番号: 15) 軽鎖可変ドメイン配列ACI-24-Ab-3をコードするポリヌクレオチド配列。

(配列番号: 16) ACI-24-Ab-3の重鎖可変ドメイン配列をコードするポリヌクレオ

50

チド配列。

(配列番号：17) ACI-11-Ab-9の軽鎖可変ドメイン配列のアミノ酸配列。

(配列番号：18) ACI-11-Ab-9の重鎖可変ドメイン配列のアミノ酸配列。

(配列番号：19) ACI-12-Ab-11の軽鎖可変ドメイン配列のアミノ酸配列。

(配列番号：20) ACI-12-Ab-11の重鎖可変ドメイン配列のアミノ酸配列。

(配列番号：21) 軽鎖CDR1のアミノ酸配列

(配列番号：22) 軽鎖CDR2のアミノ酸配列

(配列番号：23) 軽鎖CDR3のアミノ酸配列

(配列番号：24) 重鎖CDR1のアミノ酸配列

(配列番号：25) 重鎖CDR2のアミノ酸配列

(配列番号：26) 重鎖CDR3のアミノ酸配列

(配列番号：27) ACI-11-Ab-9の軽鎖可変ドメイン配列をコードするポリヌクレオチド配列。

(配列番号：28) ACI-11-Ab-9の重鎖可変ドメイン配列をコードするポリヌクレオチド配列。

(配列番号：29) ACI-12-Ab-11の軽鎖可変ドメイン配列をコードするポリヌクレオチド配列。

(配列番号：30) ACI-12-Ab-11の重鎖可変ドメイン配列をコードするポリヌクレオチド配列。

【0222】

発明の詳細な説明

定義

本明細書で使用される「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は交換可能であり、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸で構成された生体分子を意味するものと定義される。

【0223】

本明細書で使用される単数形は、「一つまたは複数」を意味し、文脈的に不適切ではない限り、複数形を含むものと定義される。

【0224】

本明細書で使用される「検出」という用語は、生物学的分子の検出のための公知の技術、たとえば免疫化学的または組織学的方法を使用することを意味し、研究対象の生体分子の存在または濃度を定性的または定量的に決定することをいう。

【0225】

「アミロイドβ、Aβまたはβアミロイド」は、当技術分野で認められた語であり、アミロイドβタンパク質およびペプチド、アミロイドβ前駆体タンパク質（APP）ならびにそれらの修飾物、断片および機能的均等物をいう。本明細書で使用されるアミロイドβは、APPのタンパク質分解開裂によって生成される断片、特に、アミロイド病理に関与または関連する断片、たとえばAβ<sub>1-38</sub>、Aβ<sub>1-39</sub>、Aβ<sub>1-40</sub>、Aβ<sub>1-41</sub>、Aβ<sub>1-42</sub>およびAβ<sub>1-43</sub>をいう。

【0226】

上述したアミロイドβペプチドの構造および配列は当業者には周知であり、前記ペプチドを製造する、または前記ペプチドを脳および他の組織から抽出する方法が、たとえばGlenner and Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984)に記載されている。そのうえ、アミロイドβペプチドは様々な形態で市販されている。

【0227】

「Aβ原線維」または「Aβフィラメント」または「アミロイド原線維」または「プロトフィブリル」は、水性媒体に不溶性であり、多量の交差β構造をそのコアに含有し、たいていは原線維軸に対して垂直なβストランドを有する、一定の線維直径を有する個別線維または束状線維を形成する単量体タンパク質のポリマー形態である。

【0228】

10

20

30

40

50

「単量体A $\beta$ 」または「A $\beta$ 単量体」は、水性媒体中で凝集した複合体を有しない完全に可溶化されたアミロイド $\beta$ タンパク質である。

【0229】

本明細書で使用される「プロトフィブリル」または「プロトフィブリル試料」とは、可溶性アミロイドA $\beta$ オリゴマーを多く含むポリマーA $\beta$ アミロイドペプチドの高分子量分画をいう。

【0230】

「ポリマー可溶性アミロイド」および「オリゴマーアミロイドペプチドA $\beta$ 」および「A $\beta$ オリゴマー」は、本明細書では交換可能に使用され、インピトロでは水性媒体に可溶性であり、かつインピボでは哺乳動物またはヒトの体、特に脳に可溶性である、オリゴマーまたはポリマー構造を形成するアミロイドペプチドまたはアミロイド様ペプチドまたは修飾もしくはトランケート型アミロイドペプチドまたはアミロイドペプチドの他の誘導体の多数の凝集した単量体をいい、特に、哺乳動物またはヒトの体、特に脳に可溶性である、アミロイドペプチドまたは修飾もしくはトランケート型アミロイドペプチドまたはそれらの誘導体の多数の凝集した単量体をいう。

10

【0231】

「ポリマー可溶性アミロイドA $\beta$ ペプチド」および「オリゴマーアミロイドA $\beta$ ペプチド」および「A $\beta$ オリゴマー」は、本明細書では交換可能に使用され、インピトロでは水性媒体に可溶性であり、かつインピボでは哺乳動物またはヒトの体、特に脳に可溶性である、オリゴマーまたはポリマー構造を形成するアミロイドA $\beta$ ペプチドまたは修飾もしくはトランケート型アミロイドA $\beta$ ペプチドまたはアミロイドA $\beta$ ペプチドの他の誘導体の多数の凝集した単量体をいい、特に、哺乳動物またはヒトの体、特に脳に可溶性である、アミロイド $\beta$  (A $\beta$ ) または修飾もしくはトランケート型アミロイド $\beta$  (A $\beta$ ) ペプチドまたはそれらの誘導体の多数の凝集した単量体をいう。

20

【0232】

A $\beta$ 単量体ペプチド1-40、特にA $\beta$ 単量体ペプチド1-40ならびに複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28には実質的に弱い結合を示し、単量体ペプチド1-42には中間的結合を示し、A $\beta$ 単量体ペプチド17-40には本質的に結合を示さないモノクローナル抗体(機能的に均等な抗体またはその機能性部分を含む)に関して、「実質的に弱い結合」は、A $\beta$ 単量体ペプチド1-40への結合よりも少なくとも約80%、詳細には少なくとも約85%、より詳細には少なくとも約90%、特に少なくとも約95%少ない結合を意味する。

30

【0233】

A $\beta$ 単量体ペプチド1-42および複数のA $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体ペプチドを含むポリマー可溶性A $\beta$ ペプチドおよび複数の前記ポリマーペプチドを含むA $\beta$ 原線維または線維に結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28には実質的に弱い結合を示し、A $\beta$ 単量体ペプチド17-40には本質的に結合を示さないモノクローナル抗体(機能的に均等な抗体またはその機能性部分を含む)に関して、「実質的に弱い結合」は、A $\beta$ 単量体ペプチド1-42への結合よりも少なくとも約60%、詳細には少なくとも約65%、より詳細には少なくとも約70%、さらに詳細には少なくとも約80%、特に少なくとも約90%および100%まで少ない結合を意味する。

40

【0234】

A $\beta$ 単量体ペプチド1-40、特にA $\beta$ 単量体ペプチド1-40および複数のA $\beta$ 1-42単量体ペプチドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに結合するが、A $\beta$ 単量体ペプチド1-28には実質的に弱い結合を示し、単量体ペプチド1-42には中間的結合を示し、A $\beta$ 単量体ペプチド17-40には本質的に結合を示さないモノクローナル抗体(機能的に均等な抗体またはその機能性部分を含む)に関して、「中間的結合」は、A $\beta$ 単量体ペプチド1-40への結合よりも少なくとも約60%、詳細には少なくとも約65%、より詳細には少なくとも約70%、さらに詳細には少なくとも約80%少ない結合を意味する。

【0235】

A $\beta$ 単量体ペプチド1-40、特にA $\beta$ 単量体ペプチド1-40および複数のA $\beta$ 1-42単量体ペ

50

チドを含む可溶性ポリマーおよび/またはオリゴマーアミロイドペプチドに結合するが、Aβ単量体ペプチド1-28には実質的に弱い結合を示し、単量体ペプチド1-42には中間的結合を示し、Aβ単量体ペプチド17-40には本質的に結合を示さないモノクローナル抗体（機能的に均等な抗体またはその機能性部分を含む）に関して、「本質的に結合を示さない」は、Aβ単量体ペプチド1-40への結合よりも少なくとも約95%、詳細には少なくとも約98%、特に少なくとも約99%および100%まで少ない結合を意味する。

【0236】

Aβ単量体ペプチド1-42および複数のAβ<sub>1-42</sub>単量体ペプチドを含むポリマー可溶性Aβペプチドおよび複数の前記ポリマーペプチドを含むAβ原線維または線維に結合するが、Aβ単量体ペプチド1-28には実質的に弱い結合を示し、Aβ単量体ペプチド17-40には本質的に結合を示さないモノクローナル抗体（機能的に均等な抗体またはその機能性部分を含む）に関して、「本質的に結合を示さない」は、Aβ単量体ペプチド1-42への結合よりも少なくとも約85%、詳細には少なくとも約90%、より詳細には少なくとも約95%、さらに詳細は少なくとも約98%、特に少なくとも約99%および100%まで少ない結合を意味する。

【0237】

本明細書に記載される発明の抗体、特にモノクローナル抗体（機能的に均等な抗体またはその機能性部分を含む）の、Aβ単量体ペプチドへの結合は、ELISAタイプアッセイ、特にビオチン化Aβ単量体ペプチドを使用するELISAアッセイ、特に以下の実施例1.16および2.16に記載されるようなELISAアッセイによって決定される。

【0238】

「単離された」とは、生物学的分子が、本来いっしょに存在する成分の少なくともいくつかから離れていることをいう。

【0239】

「アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって生じる、またはそれと関連する疾病および障害」という語句は、非限定的に、単量体、原線維もしくはポリマー状態またはそれら三つの組み合わせにあるアミロイド様タンパク質の存在または活性によって生じる疾病および障害を含む。そのような疾病および障害は、非限定的に、アミロイドーシス、内分泌腫瘍および黄斑変性症を含む。

【0240】

「アミロイドーシス」という用語は、アミロイド斑形成を伴う疾病および障害の群、たとえば、続発性アミロイドーシスおよび加齢性アミロイドーシス、たとえばアルツハイマー病（AD）のような神経学的障害、認識記憶能力の損失を特徴とする疾病または症状、たとえば軽度認知障害（MCI）、レビー小体認知症、ダウン症、アミロイドーシスを伴う遺伝性大脳出血（オランダ型）、グアム・パーキンソン認知症症候群ならびにアミロイド様タンパク質に基づくまたはそれと関連する他の疾病、たとえば進行性核上麻痺、多発性硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS（筋萎縮性側索硬化症）、封入体筋炎（IBM）、成人発症型糖尿病および老人性心アミロイドーシスならびに黄斑変性症、晶洞関連視覚性神経病およびβアミロイド沈着による白内障を含む各種眼疾患をはじめとする疾病および障害の群をいう。

【0241】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、当技術分野で認められた語であり、公知の抗原に結合する分子または分子の活性断片、特に免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の活性部分、すなわち免疫特異的に抗原に結合する結合部位を含有する分子をいうものと理解される。本発明の免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子のいかなるタイプ（IgG、IgM、IgD、IgE、IgAおよびIgY）またはクラス（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）もしくはサブクラスであることもできる。

【0242】

「抗体」は、本発明の範囲において、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、単鎖、二重特異性もしくは二重有効性、サル化、ヒトおよびヒト化抗体ならびにそれらの活性断片を含むと解釈される。公知の抗原に結合する分子の活性断片の例は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>

2、scFvおよびFv断片（Fab免疫グロブリン発現ライブラリの産物ならびに上述の抗体および断片のいずれかのエピトープ結合性断片を含む）を含む。

【0243】

このような活性断片は、本発明の抗体から当技術分野で公知の複数の技術によって誘導することができる。たとえば、精製モノクローナル抗体は、ペプシンのような酵素によって開裂させ、HPLCゲルろ過に付すことができる。そして、Fab断片を含有する適切な分画を捕集し、膜ろ過などによって濃縮することができる。抗体の活性断片の単離のための一般的技術のさらなる説明に関しては、たとえば、Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23: 1011-1019 (1982)、Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986を参照。

10

【0244】

「ヒト化抗体」とは、非ヒトドナー免疫グロブリンに由来するCDRを有し、分子の残りの免疫グロブリン由来部分が一つ（または複数）のヒト免疫グロブリンに由来する、ある種の遺伝子操作された抗体をいう。加えて、結合アフィニティーを保存するためにフレームワーク支持残基が変更されていることもできる。「ヒト化抗体」を得る方法は当業者に周知である（たとえば、Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989)、Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)を参照）。

【0245】

「ヒト化抗体」はまた、たとえばウサギのような大型動物におけるアフィニティー成熟ヒト様ポリクローナル抗体の産生を可能にする新規な遺伝子操作手法によって得ることもできる（たとえば米国特許第7,129,084号を参照）。

20

【0246】

「モノクローナル抗体」という用語もまた、当技術分野で十分に認められており、単一クローンから実験室で量産され、一つの抗原のみを認識する抗体をいう。モノクローナル抗体は通常、正常に短命な抗体産生性B細胞を成長の速い細胞、たとえばガン細胞（「不死」細胞と呼ばれることもある）に融合することによって作られる。得られるハイブリッド細胞、すなわちハイブリドーマは速やかに増殖して、多量の抗体を産生するクローンを創造する。本発明に関して、「モノクローナル抗体」はまた、完全なモノクローン性に達していない母クローンによって産生される抗体を含むものと理解される。

【0247】

「CDR」という用語は、抗体の高頻度可変領域をいう。「高頻度可変領域」、「HVR」または「HV」という用語は、本明細書で使用される場合、配列において高頻度可変性である、および/または構造的に画定されたループを形成する抗体可変ドメインの領域をいう。一般に、抗体は、六つの高頻度可変領域、すなわちVH中の三つ（H1、H2、H3）およびVL中の三つ（L1、L2、L3）を含む。本明細書では、いくつかの高頻度可変領域描写が使用され、包含される。Kabat相補性決定領域は、配列可変性に基づくものであり、もっとも一般的に使用されている（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）。

30

【0248】

「CDR」という用語の前に付く文字「HC」および「LC」は、それぞれ、重鎖および軽鎖のCDRをいう。Chotiaは、代わりに、構造ループの場所を参照している（Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。AbM高頻度可変領域は、Kabat CDRとChothia構造ループとの間の妥協を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用されている。「コンタクト」高頻度可変領域は、利用可能な複雑な結晶構造の分析に基づく。これらの高頻度可変領域それぞれからの残基を以下に記す。

40

【0249】

| ループ  | Kabat            | AbM      | Chothia  | コンタクト    |
|------|------------------|----------|----------|----------|
| ---- | ----             | -----    | -----    |          |
| L1   | L24-L34          | L24-L34  | L26-L32  | L30-L36  |
| L2   | L50-L56          | L50-L56  | L50-L52  | L46-L55  |
| L3   | L89-L97          | L89-L97  | L91-L96  | L89-L96  |
| H1   | H31-H35B         | H26-H35B | H26-H32  | H30-H35B |
|      | (Kabat ナンバリング)   |          |          |          |
| H1   | H31-H35          | H26-H35  | H26-H32  | H30-H35  |
|      | (Chothia ナンバリング) |          |          |          |
| H2   | H50-H65          | H50-H58  | H53-H55  | H47-H58  |
| H3   | H95-H102         | H95-H102 | H96-H101 | H93-H101 |

## 【 0 2 5 0 】

10

高頻度可変領域は、以下のような「拡張高頻度可変領域」、すなわちVL中24～36または24～34 (L1)、46～56または50～56 (L2) および89～97または89～96 (L3) ならびにVH中26～35 (H1)、50～65または49～65 (H2) および93～102、94～102または95～102 (H3) を含むことができる。可変ドメイン残基は、これらの定義それぞれに関して上記Kabatらにしたがってナンバリングされる。

## 【 0 2 5 1 】

「Kabatにおけるような可変ドメイン残基ナンバリング」または「Kabatにおけるようなアミノ酸位置ナンバリング」という用語ならびにその変形は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)における抗体の編集の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに使用されるナンバリングシステムをいう。

20

## 【 0 2 5 2 】

このナンバリングシステムを使用して、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFRまたはHVRの短縮またはそれへの挿入に対応して、より少数または追加のアミノ酸を含有することができる。たとえば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後の単一アミノ酸インサート (Kabatにしたがって残基52a) および重鎖FR残基82の後に挿入された残基 (たとえば、Kabatにしたがって残基82a、82bおよび82cなど) を含むことができる。残基のKabatナンバリングは、「標準」Kabatナンバリングされた配列との抗体配列の相同性の領域における整合によって所与の抗体に関して決定することができる。

## 【 0 2 5 3 】

30

「機能的に均等な抗体」とは、本発明の範囲内で、少なくとも一つの主要な機能性、たとえば、 $\beta$  アミロイドタンパク質、詳細には $A\beta_{1-42}$  タンパク質、より詳細には $A\beta_{1-42}$  タンパク質の4～16エピトープ領域への結合特異性、インビトロでの免疫反応性、高分子量ポリマー原線維への $A\beta_{1-42}$  単量体の凝集および/または予備形成された $A\beta_{1-42}$  ポリマー原線維の脱凝集の阻害および/または $\beta$  シート破断性ならびに、予防的または治療的に投与された場合の、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって生じる、またはそれと関連する疾病および障害、たとえばアミロイドーシス、内分泌腫瘍および黄斑変性症の効果の軽減をはじめとする、本明細書に記載される機能性を抗体とで共有する抗体をいうものと理解される。抗体は、IgG、IgMまたはIgAなどのような任意のクラスまたはIgG1、IgG2aなどのような任意のサブクラスおよび本明細書に記載され、当技術分野で公知である他のサブクラスであることができるが、特にIgG4クラスである。さらに、抗体は、ファージディスプレイのような任意の方法によって産生することができ、細菌、昆虫、哺乳動物または所望の特性を有する抗体、たとえばヒト化抗体を産生する他のタイプの細胞もしくは細胞系をはじめとする生物体または細胞系中で産生することができる。抗体はまた、異なる種からのFab部分とFc領域とを組み合わせることによって形成することもできる。

40

## 【 0 2 5 4 】

「二重特異性」または「二機能性」および「二重有効性」という用語は、本出願の範囲内で、アミロイドまたはアミロイド様線維形成に対する阻害性およびアミロイドまたはアミロイド様線維の脱凝集性の両方を示す抗体を特徴づけるために同義的に使用される。

## 【 0 2 5 5 】

50

「抗原」という用語は、生物体、詳細には動物、より詳細にはヒトを含む哺乳動物中に免疫応答を誘発することができる実体またはその断片をいう。この語は、抗原性または抗原決定基の原因である免疫原およびその領域を含む。

【0256】

本明細書で使用される「可溶性」という用語は、水溶液に部分的または完全に溶解されることをいう。

【0257】

同じく本明細書で使用される「免疫原性」という用語は、免疫原性作用因子に対して向けられた抗体、T細胞または他の反応性免疫細胞の産生を誘発または増強し、ヒトまたは動物における免疫応答に寄与する物質をいう。

【0258】

治療される障害を緩和または軽減するために投与された本発明の免疫原性組成物に対して個体が十分な抗体、T細胞および他の反応性免疫細胞を産生したとき、免疫応答が起こる。

【0259】

「ポリマー可溶性アミロイド」とは、哺乳動物またはヒトの体、特に脳に可溶性である、オリゴマーまたはポリマー構造を形成するアミロイドペプチドまたはアミロイド様ペプチドまたは修飾もしくはランケート型アミロイドペプチドまたはアミロイドペプチドの他の誘導体の多数の凝集した単量体をいい、特に、哺乳動物またはヒトの体、特に脳に可溶性である、アミロイド $\beta$  ( $A\beta$ ) または修飾もしくはランケート型アミロイド $\beta$  ( $A\beta$ ) ペプチドまたはそれらの誘導体の多数の凝集した単量体をいう。

【0260】

「ハイブリドーマ」という用語は、当技術分野で十分に認められており、当業者により、抗体産生性細胞と不死細胞、たとえば多発性骨髄腫細胞との融合によって産生される細胞をいうものと理解される。そのようなハイブリッド細胞は、抗体の連続的供給を産生することができる。当技術分野で公知の一つの融合方法のより詳細な説明に関しては、上記「モノクローナル抗体」の定義および以下の実施例を参照すること。

【0261】

本明細書で使用される「担体」という用語は、抗原性ペプチドまたは超分子コンストラクトを組み込んで、または会合させて、それにより、抗原性ペプチドまたはペプチドの一部をヒトまたは動物の免疫系に提示または暴露することができる構造をいう。動物またはヒト治療に適当に使用することができる粒子、たとえば小胞、粒子または粒状体を、本発明に関して担体として使用することができる。この語はさらに、抗原性ペプチドを含む超分子抗原性コンストラクト組成物を送達機構によって所望の部位に輸送することができる送達方法を含む。そのような送達システムの一例は、コロイド金のようなコロイド金属を使用する。「担体」という用語はさらに、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA) および他のアジュバントをはじめとする、当業者には公知である送達機構を含む。

【0262】

本発明の超分子抗原性コンストラクト組成物においては、リポソームは、本明細書に記載される超分子コンストラクトを含む担体として使用することができ、同時に、本発明の治療用ワクチンで治療される標的動物またはヒト内の免疫応答を増大または刺激するためのアジュバントとしても機能することができるという二重の機能を有することができる。また、本発明の超分子抗原性コンストラクト組成物は、さらなるアジュバント、たとえば脂質A、ミョウバン、リン酸カルシウム、インターロイキン1および/または多糖およびタンパク質のマイクロカプセル、特に解毒された脂質A、たとえばモノホスホリルもしくはジホスホリル脂質Aまたはミョウバン、さらなる保存剤、希釈剤、乳化剤、安定剤ならびに当技術分野で公知であり、ワクチンに使用される他の成分をさらに含むこともできるということが理解されなければならない。そのうえ、当技術分野で公知の任意のアジュバント系を本発明の組成物に使用することができる。そのようなアジュバントは、非限定的に

10

20

30

40

50

、フロイント不完全アジュバント、フロイント完全アジュバント、多分散 $\beta$  - (1,4) 結合アセチル化マンナン(「エースマンナン(Acemannan)」)、TITERMAX(登録商標)(Cyt Rx社のポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーアジュバント)、Chiron社の修飾脂質アジュバント、Cambridge Biotechのサポニン誘導体アジュバント、死菌ボルデテラ・パータシス(*Bordetella pertussis*)、グラム陰性バクテリアのリポ多糖(LPS)、巨大ポリマーアニオン、たとえば硫酸デキストランおよび無機ゲル、たとえばミョウバン、水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムを含む。

【0263】

本発明の超分子抗原性コンストラクト組成物に使用することができる担体タンパク質は、非限定的に、マルトース結合タンパク質「MBP」、ウシ血清アルブミン「BSA」、キーホールリンペットヘモシアニン「KLH」、オボアルブミン、フラゲリン、チログロブリン、任意の種の血清アルブミン、任意の種の $\gamma$ グロブリン、同系細胞、Ia抗原を有する同系細胞ならびにDおよび/またはL型アミノ酸のポリマーを含む。

【0264】

さらには、「治療有効量」という用語は、ヒトまたは動物に投与された場合、当該ヒトまたは動物において治療効果を生じさせるのに十分である免疫応答を誘発する抗体の量をいう。有効量は、当業者により、通常の手順にしたがって容易に決定される。

【0265】

二つの配列の間の「相同性」は配列同一性によって決定される。互いに比較される二つの配列の長さが異なるならば、配列同一性は、好ましくは、長い方の配列のヌクレオチド残基と同一である、短い方の配列のヌクレオチド残基の割合に関する。配列同一性は、Bestfitプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711)のようなコンピュータプログラムの使用によって普通に決定することができる。Bestfitは、二つの配列の間で最高の配列同一性を有するセグメントを見いだすために、SmithおよびWatermanの局所相同性アルゴリズム(Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489)を使用する。Bestfitまたは別の配列整合プログラムを使用して特定の配列が本発明の参照配列とで95%同一性を有するかどうかを決定する場合、パラメータは、好ましくは、参照配列の全長にわたって同一性の割合が計算され、参照配列中のヌクレオチドの総数の5%までの相同性ギャップが許容されるように調節される。Bestfitを使用する場合、いわゆる任意パラメータは、好ましくは、そのプリセット(「デフォルト」)値に放置される。たとえば、追加、欠失、置換、挿入または組み合わせによって所与の配列と本発明の上記配列との間の比較に現れる偏差が生じるかもしれない。そのような配列比較もまた、好ましくは、プログラム「fasta20u66」(version 2.0u66, September 1998 by William R. Pearson and the University of Virginia. 同じく、W.R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98, appended examplesおよび<http://workbench.sdsc.edu/>を参照)を用いて実施することができる。この目的のために、「デフォルト」パラメータ設定を使用することもできる。

【0266】

本明細書で使用される「保存的变化」とは、天然タンパク質と比較して、突然変異ポリペプチドの三次構造における最小限の変化を生じさせる、または突然変異ポリペプチドの抗原決定基における最小限の変化を生じさせる、実質的にコンホメーション的または抗原的に中立である変更をいう。本発明の抗体および抗体断片を参照する場合、保存的变化とは、対象レセプターに結合する抗体の能力を奪わないアミノ酸置換をいう。当業者は、コンホメーション的および抗原的に中立である高い確率を維持しながらもどのアミノ酸置換を実施することができるのかを予測することができるであろう。そのような手引きは、たとえば、Berzofsky, (1985) Science 229:932-940およびBowie et al. (1990) Science 247:1306-1310に提供されている。コンホメーション的および抗原的中立性を維持する確率に影響する、考慮されるべき要因は非限定的に以下を含む。(a)疎水性残基はタンパク質の内部に位置する可能性が高いため、疎水性アミノ酸の置換は抗原性に影響しにくい、

10

20

30

40

50

(b)置換されたアミノ酸は天然アミノ酸を構造的に模倣するため、物理化学的に類似したアミノ酸の置換はコンホメーションに影響しにくい、および(c)進化的に保存された配列の変更は、そのような保存がアミノ酸配列が機能的な重要性を有するかもしれないことを示唆するため、コンホメーションに悪影響を及ぼしやすい。当業者は、周知のアッセイ、たとえば顕微鏡補体固定法(たとえばWasserman et al. (1961) J. Immunol. 87:290-295、Levine et al. (1967) Meth. Enzymol. 11:928-936を参照)を使用して、また、コンホメーション依存性モノクローナル抗体を使用する結合実験(たとえばLewis et al. (1983) Biochem. 22:948-954を参照)を通じて、タンパク質コンホメーションにおける変更を評価することができるであろう。

【0267】

10

本明細書で使用される「ハイブリダイズ」という用語は、通常のハイブリダイゼーション条件、好ましくは、 $5\times$ SSPE、1% SDS、 $1\times$ デンハート液を溶液として使用する、および/またはハイブリダイゼーション温度が $35\sim70^\circ\text{C}$ 、好ましくは $65^\circ\text{C}$ であるハイブリダイゼーション条件をいう。ハイブリダイゼーションののち、好ましくは、まず $2\times$ SSPE、1%SDSを用い、次いで $0.2\times$ SSCを用いて、 $35\sim70^\circ\text{C}$ 、好ましくは $65^\circ\text{C}$ の温度で洗浄を実施する(SSPE、SSCおよびデンハート液の定義に関しては、Sambrook et al. Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989を参照)。たとえば上記Sambrookらに記載されているようなストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が特に好ましい。特に好ましいストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、たとえば、上記のようにハイブリダイゼーションおよび洗浄が $65^\circ\text{C}$ で実施される場合に存在する。たとえば $45^\circ\text{C}$ でハイブリダイゼーションおよび洗浄が実施される非ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は好ましくなく、 $35^\circ\text{C}$ でハイブリダイゼーションおよび洗浄が実施される非ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件はより好ましくない。

20

【0268】

本発明は、本明細書に含まれる特定の態様の以下の詳細な説明を参照することにより、より容易に理解することができる。本発明を、その特定の態様の詳細を参照して説明したが、そのような詳細が本発明の範囲に対する制限と見なされると解釈されてはならない。

【0269】

本発明は、コンホメーション的に感受性を有する抗体である抗体およびその機能性部分を提供する。これらの抗体は、多種多様なアミロイドタンパク質系抗原上の特定のエピトープを認識する。抗体は、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって生じる、またはそれと関連する疾病および障害、特にアルツハイマー病の診断および治療処置に有用である。

30

【0270】

抗体は、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって生じる、またはそれと関連する多様な疾病および障害、特にアルツハイマー病に対して個体を受動的に免疫感作するために個体に投与することができる。

【0271】

本明細書で提供される抗体は、アミロイドまたはアミロイド様タンパク質によって生じる、またはそれと関連する様々な疾病および障害、たとえばアルツハイマー病の初発、進行および/または悪化に關与する抗原性ペプチドに対して結合特異性を有するモノクローナルまたはポリクローナル抗体である。

40

【0272】

本発明の抗体は、動物、たとえばマウス、ラット、ウサギまたは天然もしくはヒト抗体を産生することができる他の動物種を超分子抗原性コンストラクト組成物で免疫感作することによって調製される。

【0273】

本明細書で開示される超分子抗原性コンストラクトは、一般に、抗原効果を増強するように修飾されたペプチドを含み、そのようなペプチドは、PEG化(ポリエチレングリコー

50

ルまたは修飾ポリエチレングリコールを使用)または他の方法、たとえばパルミチン酸、ポリアミノ酸(たとえばポリグリシン、ポリヒスチジン)、多糖類(たとえばポリガラクトロン酸、ポリ乳酸、ポリグリコリド、キチン、キトサン)、合成ポリマー(ポリアミン、ポリウレタン、ポリエステル)もしくはコポリマー(たとえばポリ(メタクリル酸)およびN-(2-ヒドロキシ)プロピルメタクリルアミド)などによって修飾されている。

【0274】

パルミチン酸による修飾(パルミトイル化)は、リポソーム二重層中のペプチドのためのアンカーを提供しながら、 $C_{16:0}$ 脂肪酸部分の相対長の減少のせいで、ペプチドをリポソーム表面に実際に横たわらせる。したがって、抗原を処理する細胞は、ペプチドとともにリポソーム全体を吸収しなければならず、それが、大多数の場合、相対的により遅い免疫応答を生じさせる。

10

【0275】

本発明の一つの態様において、修飾アミロイド $A\beta_{22-35}$ ペプチドおよび $A\beta_{29-40}$ ペプチドが、本発明の抗体、特にモノクローナル抗体の調製に使用される。

【0276】

本発明の一つの態様において、修飾アミロイド $A\beta_{1-15}$ ペプチドが、本発明の抗体、特にモノクローナル抗体の調製に使用される。

【0277】

修飾アミロイド $A\beta_{1-15}$ ペプチドは、Nicolau et. al. 2002で報告されている方法にしたがって合成することができる。Nicolauらで報告されている手法は、予備形成されたペプチドの末端アミノ酸残基に親油性または疎水性部分を樹脂上グラフティングすることによって抗原性ペプチドを修飾して、かなり高純度の産物を生じさせることを含む。特に、公知のカップリング化学を使用して、保護されたアミノ酸、特にFmoc保護されたアミノ酸を樹脂に付ける。保護基を除去し、第二の保護されたアミノ酸残基を結合させる。そして、公知の保護化学、特にFmoc/tBu化学を使用する標準的な自動化ペプチド合成および標準的な側鎖保護基を使用して、アミロイドタンパク質 $A\beta_{1-42}$ のアミノ酸22~25、29~40および1~15に結合させてペプチド断片を製造することにより、 $A\beta$ 抗原性ペプチドを合成する。最終ステップで、成長するペプチド断片に二つのさらなる保護されたアミノ酸を結合させる。そして、Mtt基を選択的に開裂させ、パルミチン酸に結合させる。樹脂を洗浄したのち、保護基を除去し、同時に樹脂を開裂させたのち、標準的方法を使用して側鎖脱保護を実施する。すると、最終産物を高純度で得ることができ、その同一性を、当技術分野で公知の方法、たとえばエレクトロスプレー質量分析法によって確認することができる。

20

30

【0278】

本発明の親油性または疎水性部分は、脂肪酸炭素バックボーンが少なくとも10個の炭素原子を有する脂肪酸、トリグリセリドまたはリン脂質であることができる。特に、親油性または疎水性部分は、少なくとも約14個の炭素原子および約24個までの炭素原子の炭素バックボーンを有する脂肪酸であり、この範囲に入る個々の炭素原子数それぞれもまた本発明の一部である。特に、親油性または疎水性部分は、少なくとも14個の炭素原子の炭素バックボーンを有する。疎水性部分の例は、非限定的に、パルミチン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸、ラウリル酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸およびコレステロールまたはDSPEを含む。本発明の特定の態様において、親油性または疎水性部分はパルミチン酸である。

40

【0279】

免疫応答を増強するために、好適には、もう一つのアンカー/スペーサを適用して、リポソーム、たとえばポリエチレングリコール(PEG)中でペプチドを再構成することができる。

【0280】

PEGは、ペプチドの両末端に結合したアミノ酸残基、特にGlu、CysもしくはLysアミノ酸残基またはPEGをペプチドに共有結合させるために適当に使用することができる他のアミノ酸残基に共有結合させる。鎖の他端では、疎水性部分を共有結合させて、リポソーム二

50

重層、たとえばホスファチジルエタノールアミン (PEA) 中でアンカ要素として機能させることができる。このように、リポソームはアジュバントとしても機能し、二重層から十分に離れたペプチドだけが処理されることができ、それにより、パルミトイル化抗原と比較してその免疫原性を増す。

#### 【0281】

特定の態様において、本発明の範囲内で使用される超分子抗原性コンストラクトは、各末端で一つずつPEG化樹脂に共有結合したペプチド配列を含む。PEG (ポリエチレングリコール) 鎖の長さは、 $n = 8 \sim n = 150.000$  またはそれ以上、詳細には  $n = 10 \sim n = 80.000$ 、より詳細には  $n = 20 \sim n = 10.000$  で異なることができる。本発明の特定の態様において、PEGの長さは、 $n = 45$  を超えず、詳細には  $n = 5 \sim n = 40$ 、より詳細には  $n = 10 \sim n = 30$ 、さらに詳細には  $n = 10$  である。

10

#### 【0282】

本明細書に記載される超分子コンストラクトは、自動化ペプチド合成および公知の保護化学、特に Fmoc/tBu 化学および標準的な側鎖保護基を使用して合成することができる。通常、ペプチドのPEG化が位置異性体の混合物を生じさせる。

#### 【0283】

A $\beta$  のCおよびN末端へのPEG - 脂質抱合体の部位特異的結合を達成するためには、部分的に保護されたペプチドを使用することができる。内部LysまたはHis残基を含有するペプチド配列の場合、直交方向に保護されたLys (ivDde) を各末端に付加する。さらなるGlyをC末端に付加して合成を容易にすることもできる。保護基を除去し、酸無水物を使用してN

20

#### 【0284】

酸感受性であり、したがって、保護されたペプチドの単離を可能にする樹脂、特に2-クロロトリチル樹脂が好ましい。

#### 【0285】

本発明の特定の態様において、カップリング反応は溶液相で実施される。そして、穏やかな条件下、樹脂からの選択的開裂が、内部的に保護されたペプチドを解放する。

#### 【0286】

脂肪酸ホスファチジルコリン、たとえばDSPEによって修飾されたPEG分子への溶液相カップリングは、 $\beta$  アミロイドタンパク質配列に由来するペプチド、たとえばA $\beta_{22-35}$  およびA $\beta_{29-40}$  またはA $\beta_{1-15}$  を用いてうまく達成された。最終的な側鎖脱保護の前のモノおよびジカップリングされた産物の分離は、カチオン交換クロマトグラフィーを使用して達成することができる。その後、ペプチド側鎖脱保護が許容可能な純度の目的抱合体の単離を生じさせる。精製は、当技術分野で周知の方法、たとえばHPLCなどによって達成することができる。

30

#### 【0287】

保護されたペプチドを使用するNおよびC末端脂質PEG  $\beta$  アミロイド抗原の合成のためのこの手法は多種多様なペプチド配列に適用可能である。

#### 【0288】

そして、Nicolau et al., 2002に記載されているようにして本発明のリポソーム抗原を調製することができる。修飾アミロイドA $\beta$  抗原性ペプチド、特に修飾PEG化A $\beta_{22-35}$  およびA $\beta_{29-40}$  抗原性ペプチドまたはパルミトイル化A $\beta_{1-15}$  抗原性ペプチドは、リポソーム、特に、ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC)、ジミリスチルホスファチジルエタノールアミン (DMPEA)、ジミリスチルホスファチジルグリセロール (DMPG) およびコレステロールでできた、場合によってはモノホスホリル脂質Aを含有するリポソームからなるコンストラクト中で再構成することができる。

40

#### 【0289】

本発明の特定の態様において、脂質Aを含むリポソームを抗アミロイドワクチンを調製するためのアジュバントとして使用する。ジミリスチルホスファチジルコリン、ジミリスチルホスファチジルグリセロールおよびコレステロールを特に0.9 : 1.0 : 0.7のモル

50

比で混合する。そして、強力な免疫調節物質、たとえばモノホスホリル脂質Aを、適当な濃度、詳細にはリン脂質1mmolあたり30～50mg、より詳細にはリン脂質1mmolあたり40mgの濃度で添加する。そして、修飾抗原性A $\beta$ ペプチドを、1:30～1:200のペプチド:リン脂質のモル比、詳細には1:1000、1:50～1:120のモル比、より詳細には1:100のモル比で加える。溶媒をたとえば蒸発によって除去し、得られるフィルムを無菌緩衝液、たとえばPBSで水和させる。

#### 【0290】

リポソームはまた、Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259-270に記載されているクロスフロー注入技術によって調製することもできる。リポソーム溶液を水性緩衝系に注入する間、脂質は「沈降物」を形成する傾向を示し、その後、小胞中に自己配列する。得られる小胞サイズは、脂質濃度、攪拌速度、注入速度および脂質の選択のような要因に依存する。調製系は、クロスフロー注入モジュール、極相（たとえばPBS緩衝液）のための容器、エタノール/脂質溶液容器および圧力装置、特に窒素圧力装置からなることができる。水溶液または極性溶液がクロスフロー注入モジュールにポンピングされるとき、エタノール/脂質溶液は、異なる圧力を加えられながら極相に注入される。

#### 【0291】

リポソームはアジュバントとしても機能し、二重層から十分に離れたペプチドだけが処理されることができ、したがって、パルミトイル化抗原と比較してその免疫原性を増す。

#### 【0292】

自由PEG末端はホスファチジルエタノールアミン（脂肪酸は、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸などまたはそれらの組み合わせであることができる）の分子に共有結合して、アンカ要素として機能する。この超分子構造は、リン脂質およびコレステロール（異なるモル比のホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、コレステロールからなるリポソーム中での再構成によってアンカリングすることができる。他のリン脂質を使用することができる。脂質Aは、リン脂質1 $\mu$ モルあたり約40 $\mu$ gの濃度で使用される。

#### 【0293】

特定の態様において、パルミトイル化またはPEG化超分子抗原性コンストラクトは、 $\beta$ アミロイドのアミノ酸配列を有するペプチドを含む。ペプチドはまた、アミロイド $\beta$ ペプチド全体およびその活性断片を含む、またはそれらに対応することができる。さらには、本発明に有用なペプチドは、特に、A $\beta_{22-35}$ およびA $\beta_{29-40}$ またはA $\beta_{1-15}$ ならびにそれら活性断片を含む。

#### 【0294】

抗体を誘発および調製し、修飾A $\beta$ 抗原性コンストラクトの免疫原性を決定するためには、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、トリなどからなる群より選択される適当な動物、特にマウス、とりわけC57BL/6マウスを抗原性ペプチドで免疫感作する。抗原性コンストラクトの免疫原性は、免疫感作ののち適当な時間間隔で、イムノアッセイ、たとえばELISAアッセイを使用して、血清試料をブローピングすることによって決定される。

#### 【0295】

本発明のモノクローナル抗体は、当技術分野で周知の標準的なクローニングおよび細胞融合技術を使用して調製することができる。通常、対象の免疫原（抗原）を、野生型または同系交配マウス（たとえばBALB/cまたは特にC57BL/6マウス）、ラット、ウサギまたは天然もしくはヒト抗体を産生することができる他の動物種もしくはトランスジェニックマウスに投与（例えば腹腔内注射）する。免疫原は、免疫応答を誘発させるために、単独で、またはアジュバントと混合した状態で、またはベクター（VEEレプリコンベクター、ワクチニア）から発現した状態で、またはDNAとして、または融合タンパク質として投与することができる。融合タンパク質は、担体タンパク質、たとえば $\beta$ ガラクトシダーゼ、グルタチオンSトランスフェラーゼ、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびウシ血清アルブミンに結合された、それに対する免疫応答が望まれるペプチドを含む。これら

の場合、ペプチドは、担体タンパク質を有するハプテンとして働く。動物をたとえば2回またはそれ以上ブーストしたのち、免疫感作動物から脾臓細胞を収穫し、KohlerおよびMilstein (Nature 256:495-497 (1975)) ならびにHarlowおよびLane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988)) の周知の方法を使用して、感作脾臓細胞を骨髓腫細胞系、たとえばネズミSP2/0骨髓腫細胞 (ATCC, Manassas, VA) と融合させることによってハイブリドーマを生成する。

【0296】

本発明の特定の態様において、本発明の抗原性コンストラクト、特に前記抗原性コンストラクトを薬学的に許容可能な形態で含むワクチン組成物は、1~10週の時間間隔で、詳細には1~6週の時間間隔、より詳細には1~4週の時間間隔、さらに詳細には2~3週の時間間隔で、繰り返し用量、詳細には1~15用量、より詳細には2~10用量、さらに詳細には3~7用量、特に4~6用量で投与される。免疫応答は、ブースト後の適当な時期、詳細にはブースト後3~10日、より詳細にはブースト後4~8日、より詳細にはブースト後5~6日で血清試料を採取し、公知の方法、特に一般に使用されるイムノアッセイの一つ、たとえばELISAアッセイを使用して抗原性コンストラクトの免疫原性を決定することによってモニタリングされる。

10

【0297】

本発明の抗原性コンストラクト、特に本発明の抗原性コンストラクトを薬学的に許容可能な形態で含むワクチン組成物による免疫感作は、処置される動物における有意な免疫応答を生じさせる。治療的な力価(therapeutic titer)を有する動物、特にマウスを、抗体産生性細胞、特にBリンパ球と、絶えず成長する、または不死の細胞系、たとえば骨髓腫細胞系との融合のために選択する。細胞は、ポリエチレングリコールの添加によって融合に導入する。治療的な力価は、1:4000~1:6000、詳細には1:4500~1:5500、より詳細には1:5000の希釈度で、ELISAアッセイでプラスの結果を与える力価である。

20

【0298】

そして、得られたハイブリッド細胞を、従来のやり方で、たとえば限界希釈法を使用してクローン化し、得られたクローンを培養すると、このクローンが目的のモノクローナル抗体を産生する。

【0299】

こうして得られたハイブリドーマを、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(HAT)を含有する選択培地にプレーティングすることによって化学的に選択する。

30

【0300】

その後、特定のアミロイド関連疾病または障害に対するモノクローナル抗体を産生する能力に関してハイブリドーマをスクリーニングする。対象の抗体を産生するハイブリドーマをクローン化し、増量し、将来の産生のために凍結保存する。好ましいハイブリドーマは、IgGイソタイプを有するモノクローナル抗体を産生する。

【0301】

ポリクローナル抗体は、動物、たとえばマウスもしくはウサギまたは他の適当な動物を本明細書に記載される本発明の超分子抗原性コンストラクト組成物で免疫感作することによって調製される。その後、その動物から血清を捕集し、血清中の抗体をアミロイドタンパク質に対する結合反応性に関してスクリーニングする。

40

【0302】

本発明の抗体は、生理学的に許容可能な製剤に調製することができ、公知の技術を使用して、薬学的に許容可能な担体、希釈剤および/または添加剤を含むことができる。たとえば、本明細書に記載される本発明の抗体(機能的に均等な抗体またはその機能性部分を含む)、特にモノクローナル抗体(機能的に均等な抗体またはその機能性部分を含む)は、薬学的に許容可能な担体、希釈剤および/または添加剤と組み合わされて治療組成物を形成する。適当な薬学的担体、希釈剤および/または添加剤は当技術分野で公知であり、たとえば、リン酸緩衝食塩水、水、エマルション、たとえば油/水エマルション、各種湿潤剤、無菌溶液などを含む。

50

## 【0303】

本発明の薬学的組成物の製剤化は、当業者に公知の標準的方法にしたがって達成することができる。

## 【0304】

本発明の組成物は、固体、液体またはエアロゾルの形態で、適当な薬学的に有効な用量を対象に投与することができる。固体組成物の例は、丸剤、クリームおよび埋め込み可能な用量単位を含む。丸剤は経口投与することができる。治療用クリームは局所的に投与することができる。埋め込み可能な用量単位は、たとえば腫瘍部位で局所的に投与することもできるし、治療組成物の全身的放出のためにたとえば皮下的に埋め込むこともできる。液体組成物の例は、筋肉内注射、皮下注射、静脈内注射、動脈内注射に適合された製剤ならびに局所投与および眼内投与に適合された製剤を含む。エアロゾル製剤の例は、肺への投与のための吸入製剤を含む。

10

## 【0305】

組成物は、標準的な投与経路によって投与することができる。一般に、組成物は、局所、経口、経直腸、経鼻、皮内、腹腔内または非経口（たとえば静脈内、皮下または筋肉内）経路によって投与することができる。加えて、組成物は、徐放性マトリックス、たとえば生分解性ポリマーに組み込むこともでき、その場合、ポリマーは、送達が望まれるところ、たとえば腫瘍の部位の近くに埋め込まれる。方法は、単一用量の投与、所定の時間間隔での繰り返し用量の投与および所定の期間における徐放的投与を含む。

## 【0306】

20

本明細書で使用される徐放性マトリックスは、酵素的もしくは酸/塩基加水分解または溶解によって分解可能である材料、通常はポリマーでできているマトリックスである。ひとたび体内に挿入されると、マトリックスは、酵素および体液による作用を受ける。徐放性マトリックスは、望ましくは、生適合性材料、たとえばリポソーム、ポリラクチド（ポリ乳酸）、ポリグリコリド（グリコール酸のポリマー）、ポリラクチド-コ-グリコリド（乳酸とグリコール酸とのコポリマー）、ポリ酸無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、コンドロイチン硫酸、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、多糖類、核酸、ポリアミノ酸、アミノ酸、たとえばフェニルアラニン、チロシン、イソロイシン、ポリヌクレオチド、ポリビニルプロピレン、ポリビニルピロリドンおよびシリコーンによって選択される。好ましい生分解性マトリックスは、ポリラクチド、ポリグリコールまたはポリラクチド-コ-グリコリド（乳酸とグリコール酸とのコポリマー）のいずれかのマトリックスである。

30

## 【0307】

当業者には、組成物の用量が様々な要因、たとえば治療される病状、使用される具体的な組成物ならびに他の臨床要因、たとえば患者の体重、体格、性別および健康状態全体、体表面積、投与される具体的な化合物または組成物、同時に投与される他の薬物ならびに投与経路に依存するということが周知である。

## 【0308】

組成物は、生物学的に活性な物質または化合物、特に抗酸化ストレス性化合物、抗アポトーシス性化合物、金属キレート剤、DNA修復の阻害剤、たとえばピレンゼピンおよび代謝産物、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸（3APS）、1,3-プロパンジルスルホネート（1,3PDS）、セクレターゼアクチベータ、 $\beta$ および $\gamma$ セクレターゼ阻害剤、 $\tau$ タンパク質、神経伝達物質、 $\beta$ シートブレーカ、抗炎症性分子、「非定型抗精神病薬」、たとえばクロザピン、ジブラシドン、リスペリドン、アリピプラゾールもしくはオランザピンまたはコリンエステラーゼ阻害剤（ChEI）、たとえばタクリン、リバスチグミン、ドネベジルおよび/またはガラントミンならびに他の薬物およびサプリメント、たとえばビタミンB12、システイン、アセチルコリンの前駆体、レシチン、コリン、イチョウ、アセチル-Lカルニチン、イデベノン、プロペントフィリンもしくはキサンチン誘導体からなる群より選択される少なくとも一つの化合物を、本発明の抗体ならびに場合によっては薬学的に許容可能な担体および/または希釈剤および/または添加剤ならびに疾病治療の指示とともに含む他

40

50

の組成物と組み合わせて投与することができる。

【0309】

タンパク質系薬学活性物質は、1用量あたり1ng～10mgの量で存在することができる。一般に、投与法は、本発明の抗体0.1μg～10mgの範囲、詳細には1.0μg～1.0mgの範囲、より詳細には1.0μg～100μgの範囲にあるべきであり、これらの範囲に該当する個々の数字すべてもまた本発明の一部である。投与が連続輸液によって実施されるならば、より正しい用量は、毎時体重1kgあたり0.01μg～10mgの範囲にあることができ、これらの範囲に該当する個々の数字すべてもまた本発明の一部である。

【0310】

投与は一般に非経口投与、たとえば静脈内投与である。非経口投与のための製剤は、無菌水性または非水性溶液、懸濁液およびエマルションを含む。非水性溶媒は、非限定的に、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、たとえばオリーブ油および注射可能な有機エステル、たとえばオレイン酸エチルを含む。水性溶媒は、水、アルコール/水溶液、食塩水および緩衝媒体を含むエマルションまたは懸濁液からなる群より選択することができる。非経口溶媒は、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液または固定油を含む。静脈内媒体は、流体および栄養補液、電解質補液（たとえばリンゲルデキストロースに基づくもの）およびその他を含む。保存剤、たとえば抗微生物剤、酸化防止剤、キレート化剤、不活性ガスなどが存在してもよい。

【0311】

医薬組成物はさらに、特にヒト起源のタンパク質系担体、たとえば血清アルブミンまたは免疫グロブリンを含むことができる。所期の用途に依存して、さらなる生物学的に活性な薬剤が本発明の医薬組成物中に存在してもよい。

【0312】

結合標的が脳の中に位置する場合、本発明の特定の態様は、抗体またはその活性断片が血液脳関門を通過することを考慮する。特定の神経変性疾患は、抗体またはその活性断片を容易に脳に導入することができるような血液脳関門の透過性の増大を伴う。血液脳関門が無傷のままである場合、物理的方法、脂質ベースの方法ならびにレセプターおよびチャネルベース方法をはじめとする、分子をそこに通して輸送するための当技術分野で公知のいくつかの方法が存在する。

【0313】

抗体またはその活性断片を血液脳関門に通して輸送する物理的方法は、非限定的に、血液脳関門を完全に迂回する方法または血液脳関門に穴を開けることによる方法を含む。迂回方法は、非限定的に、脳への直接注入（たとえばPapanastassiou et al., Gene Therapy 9:398-406 (2002)を参照）および送達装置を脳に埋め込むこと（たとえばGill et al., Nature Med. 9:589-595 (2003)およびGliadel Wafers（商標）Guildford Pharmaceuticalsを参照）を含む。関門に穴を開ける方法は、非限定的に、超音波（たとえば米国特許出願公開公報第2002/0038086号を参照）、浸透圧（たとえば高張性マンニトールの投与による（Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)）、たとえばブラジキニンまたは透過性促進剤A-7による透過性化（たとえば米国特許第5,112,596号、第5,268,164号、第5,506,206号および第5,686,416号を参照）および抗体または抗原結合性断片をコードする遺伝子を含むベクタによる血液脳関門をまたがるニューロンのトランスフェクション（たとえば米国特許出願公開公報第2003/0083299号を参照）を含む。

【0314】

抗体またはその活性断片を血液脳関門に通して輸送する脂質ベースの方法は、非限定的に、抗体またはその活性断片をリポソーム中に封入し、そのリポソームを、血液脳関門の血管内皮上のレセプターに結合するその活性断片に結合すること（たとえば米国特許出願公開公報第20020025313号を参照）および抗体またはその活性断片を低密度リポタンパク質粒子（たとえば米国特許出願公開公報第20040204354号を参照）またはアポリポタンバ

ク質E（たとえば米国特許出願公開公報第20040131692号を参照）でコーティングすることを含む。

【0315】

抗体またはその活性断片を血液脳関門に通して輸送するレセプターおよびチャネルベースの方法は、非限定的に、糖質コルチコイド遮断薬を使用して血液脳関門の透過性を高めること（たとえば米国特許出願公開公報第2002/0065259号、第2003/0162695号および第2005/0124533号を参照）、カルシウムチャネルをアクティブ化すること（たとえば米国特許出願公開公報第2005/0089473号を参照）、ABCドラッグトランスポータを阻害すること（たとえば米国特許出願公開公報第2003/0073713号を参照）、抗体をトランスフェリンでコーティングし、一つまたは複数のトランスフェリンレセプターの活性を変調させること（たとえば米国特許出願公開公報第2003/0129186号を参照）および抗体をカチオン化すること（たとえば米国特許第5,004,697号を参照）を含む。

10

【0316】

さらなる態様において、本発明は、アミロイド関連の疾患もしくは状態を検出および診断する、アミロイド関連の疾患もしくは状態の素因を診断する、または患者における最小残留疾患をモニタリングする、または本明細書に記載される本発明の抗体もしくはワクチン組成物による治療に対する患者の応答性を予測するための方法およびキットを提供する。これらの方法は、生物学的試料中またはインサイチュー条件下で物質を検出または定量するために一般に使用されている公知の免疫学的方法を含む。

【0317】

20

患者におけるアミロイド関連疾患もしくは病状またはアミロイド関連疾患もしくは病状の素因の診断は、試料中またはインサイチューでのアミロイドタンパク質のエピトープに対する本発明の抗体、特にモノクローナル抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を検出することであって、アミロイドタンパク質を含有することが疑われる試料または特定の体の部位もしくは区域を、アミロイドタンパク質のエピトープと結合する抗体と接触させ、抗体をアミロイドタンパク質に結合させて免疫学的複合体を形成させ、免疫学的複合体の形成を検出し、免疫学的複合体の存在または非存在を試料または特定の体の部位もしくは区域中のアミロイドタンパク質の存在または非存在と関連させ、場合によっては前記免疫学的複合体の量を正常な対照値と比較することを含むことによって達成することができ、正常な対照値と比較した前記免疫学的複合体の量の増大が、前記患者がアミロイド関連疾患または病状を病んでいる、またはそれを発症する危険にあることを示す。アミロイドタンパク質は、単量体、原線維および/またはポリマー形態にあることができる。抗体またはその活性部分は、アミロイドタンパク質の単量体、原線維および/またはポリマー形態に特異的であることができる。

30

【0318】

本発明の抗体またはワクチン組成物による治療ののちの患者における最小残留疾患のモニタリングは、試料中またはインサイチューでのアミロイドタンパク質のエピトープに対する本発明の抗体、特にモノクローナル抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を検出することであって、アミロイドタンパク質を含有することが疑われる試料または特定の体の部位もしくは区域を、アミロイドタンパク質のエピトープと結合する抗体と接触させ、抗体をアミロイドタンパク質に結合させて免疫学的複合体を形成させ、免疫学的複合体の形成を検出し、免疫学的複合体の存在または非存在を試料または特定の体の部位もしくは区域中のアミロイドタンパク質の存在または非存在と関連させ、場合によっては前記免疫学的複合体の量を正常な対照値と比較することを含むことによって達成することができ、正常な対照値と比較した前記免疫学的複合体の量の増大が、前記患者がなおも最小残留疾患を病んでいることを示す。アミロイドタンパク質は、単量体、原線維および/またはポリマー形態にあることができる。抗体またはその活性部分は、アミロイドタンパク質の単量体、原線維および/またはポリマー形態に特異的であることができる。

40

【0319】

本発明のワクチン組成物による治療に対する患者の応答性の予測は、試料中またはイン

50

サイチューでのアミロイドタンパク質のエピトープに対するモノクローナル抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を検出することであって、アミロイドタンパク質を含有することが疑われる試料または特定の体の部位もしくは区域を、アミロイドタンパク質のエピトープと結合する抗体と接触させ、抗体をアミロイドタンパク質に結合させて免疫学的複合体を形成させ、免疫学的複合体の形成を検出し、免疫学的複合体の存在または非存在を試料または特定の体の部位もしくは区域中のアミロイドタンパク質の存在または非存在と相関させ、場合によっては前記免疫学的複合体の量を治療開始の前と後とで比較することを含むことによって達成することができ、前記免疫学的複合体の量の減少が、前記患者が治療に対して応答性である高い可能性を有することを示す。アミロイドタンパク質は、単量体、原線維および/またはポリマー形態にあることができる。抗体またはその活性部分

10

#### 【0320】

アミロイド関連の疾病もしくは病状の診断、アミロイド関連の疾病もしくは病状の素因の診断または患者における最小残留疾病のモニタリングまたは本明細書に記載される本発明の抗体もしくはワクチン組成物による治療に対する患者の応答性の予測に使用することができる生物学的試料は、たとえば、流体、たとえば血清、血漿、唾液、胃分泌液、粘液、脳脊髄液、リンパ液などまたは生物体から得られる組織もしくは細胞試料、たとえば神経、脳、心臓または血管組織である。試料中のアミロイドタンパク質の存在または非存在を決定するためには、当業者に公知のイムノアッセイ、たとえば、検出のために二次試薬

20

を使用する間接的検出法を使用するアッセイ、ELISAならび免疫沈降および凝集アッセイを使用することができる。これらのアッセイの詳細な説明は、たとえば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612、MaertensおよびStuyverへのWO96/13590、Zrein et al. (1998)およびWO96/29605に記載されている。

#### 【0321】

インサイチュー診断の場合、本発明の抗体とアミロイドタンパク質上のエピトープ領域との特異的結合が起こるよう、抗体またはその任意の活性および機能性部分を、当技術分野で公知の方法、たとえば静脈内、鼻内、腹腔内、脳内、動脈内注射によって、診断される生物体に投与することができる。抗体/抗原複合体は、抗体もしくはその機能性断片に

30

取り付けられた標識または当技術分野で公知の他の検出方法によって簡便に検出することができる。

#### 【0322】

診断用途またはアミロイド関連の疾病もしくは病状の素因の診断または患者における最小残留疾病のモニタリングまたは本明細書に記載される本発明の抗体もしくはワクチン組成物による治療に対する患者の応答性の予測の用途に使用されるイムノアッセイは、通常、検出のために標識された抗原、抗体または二次試薬に依存する。これらのタンパク質または試薬は、一般に当業者に公知の化合物、たとえば酵素、放射性同位体ならびに蛍光、発光および色素産生性物質、たとえば着色粒子、たとえばコロイド金およびラテックスビーズで標識することができる。これらのうち、ほぼすべてのアッセイおよび大部分の変形のために放射性標識を使用することができる。放射能を避けなければならない場合または迅速な結果が求められる場合、酵素抱合標識が特に有用である。蛍光色素は、その使用のために高価な装備を要するが、非常に高感度の検出方法を提供する。これらのアッセイに有用な抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびアフィニティー精製ポリクローナル抗体を含む。

40

#### 【0323】

または、抗体は、免疫グロブリンに対してアフィニティーを有する標識物質、たとえばプロテインAもしくはGまたは二次抗体との反応によって間接的に標識することもできる。抗体は、第二の物質と抱合させ、抗体と抱合した第二の物質に対してアフィニティーを有する標識された第三の物質で検出することもできる。たとえば、抗体をビオチンと抱合さ

50

せ、標識されたアビジンまたはストレプトアビジンを使用して抗体 - ビオチン抱合体を検出することができる。同様に、抗体をハプテンと抱合させ、標識された抗ハプテン抗体を使用して抗体 - ハプテン抱合体を検出することもできる。

#### 【0324】

当業者は、これらの適当な標識および本発明にしたがって使用することができる他の適当な標識を周知しているであろう。抗体またはその断片へのこれらの標識の結合は、当業者には一般に公知である標準的技術を使用して達成することができる。一般的な技術は、Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31)およびSchurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40)によって記載されている。後者で述べられている結合技術は、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸塩法、ジマレイミド法およびその他である。これらすべてが参照により本明細書に組み入れられる。

10

#### 【0325】

現在のイムノアッセイは、分析対象物の存在を検出するために二重抗体法を使用し、この方法では、抗体は、検出可能な標識で標識されている二次抗体との反応性によって間接的に標識される。第二の抗体は、好ましくは、モノクローナル抗体が由来する動物の抗体に結合する抗体である。換言するならば、モノクローナル抗体がマウス抗体であるならば、標識された第二の抗体は抗マウス抗体である。抗体が本明細書に記載されるアッセイで使用されるためには、この標識は、好ましくは、抗体でコーティングされたビーズ、特に磁性ビーズである。抗体が本明細書に記載されるイムノアッセイで使用されるためには、標識は、好ましくは、検出可能な分子、たとえば放射性、蛍光性または電気化学的発光性物質である。

20

#### 【0326】

分析対象物の存在の速やかな決定に適合されているために高速フォーマットシステムと呼ばれることが多い代替の二重抗体システムを本発明の範囲内で使用することもできる。このシステムは、抗体と分析対象物との間の高いアフィニティーを要する。本発明の一つの態様にしたがって、アミロイドタンパク質の存在は、それぞれがアミロイドタンパク質に対して特異的である一対の抗体を使用して決定される。本明細書では、前記対の抗体の一方を「検出抗体」と呼び、他方を「捕獲抗体」と呼ぶ。本発明のモノクローナル抗体は、捕獲抗体または検出抗体のいずれかとして使用することができる。本発明のモノクローナル抗体はまた、捕獲抗体および検出抗体の両方として単一のアッセイでいっしょに使用することもできる。このように、本発明の一つの態様は、生物学的流体試料中のアミロイドタンパク質を検出するために二重抗体サンドイッチ法を使用する。この方法において、分析対象物（アミロイドタンパク質）は、検出抗体と捕獲抗体との間にサンドイッチされ、捕獲抗体が固体支持体上に不可逆的に固定化される。検出抗体は、抗体 - 分析対象物サンドイッチの存在、ひいては分析対象物の存在を識別するために、検出可能な標識を含有するであろう。

30

#### 【0327】

例示的な固相物質は、非限定的に、ラジオイムノアッセイおよび酵素イムノアッセイの分野で周知であるマイクロタイタープレート、ポリスチレンの試験管、磁性、プラスチックまたはガラスビーズおよびスライドを含む。抗体を固相に結合する方法もまた、当業者には周知である。より最近には、いくつかの多孔質材料、たとえばナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ガラスファイバおよび他の多孔質ポリマーが固体支持体として使用されている。

40

#### 【0328】

本発明はまた、先に定義した組成物を含む、生物学的試料中のアミロイドタンパク質を検出するための診断キットに関する。そのうえ、本発明は、先に定義した組成物に加えて、先に定義した検出試薬をさらに含む、後者の診断キットに関する。「診断キット」という用語は、一般に、当技術分野で公知の診断キットをいう。より具体的には、後者の語は、Zrein et al. (1998)に記載されているような診断キットをいう。

#### 【0329】

50

本発明のさらに別の目的は、本発明の抗体を含む、アミロイド関連疾患または病状の検出および診断のための新規な免疫プローブおよび試験キットを提供することである。免疫プローブの場合、抗体は、適当なレポータ分子、たとえば酵素または放射性核種に直接的または間接的に付けられる。試験キットは、本発明の一つまたは複数の抗体を保持する容器およびアミロイド抗原に結合して免疫学的複合体を形成し、免疫学的複合体の存在または非存在がアミロイドタンパク質の存在または非存在と関連するような免疫複合体の形成を検出するために抗体を使用するための指示を含む。

#### 【 0 3 3 0 】

##### 実施例

実施例1: パルミトイル化 $A\beta_{1-15}$ 超分子抗原性構築物を用いた免疫化によって生じた抗体

10

実施例1.1: パルミトイル化 $A\beta_{1-15}$ 超分子抗原性構築物を作る方法

1.1.1 テトラ(パルミトイルリジン)- $A\beta_{1-15}$ ペプチド抗原の合成

以前に報告され、改善された方法(Nicolau et. al. 2002)に従って、パルミトイル化アミロイド1-15ペプチドを合成した。この新たなアプローチは、修飾アミノ酸9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)-Lys(Pal)-OHを組み込む段階的固相合成ではなく、予め形成されたペプチドの末端Lys残基へのパルミチン酸の樹脂上でのグラフティングを伴った。この新たなアプローチはカップリング効率を改善し、純度がかなり高い生成物を生じる。従って、[2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート](HBTU)カップリング化学を用いて、オルソゴナルに保護された(orthogonally protected)アミノ酸Fmoc-Lys(Mtt)-OHをWang樹脂に取り付けた。DMFに溶解した20%ピペリジンを用いてFmoc基を除去し、Fmoc-Lys(Mtt)-OHの第2の残基をカップリングした。次いで、Fmoc/tBu化学および標準的な側鎖保護基を用いた標準的な自動ペプチド合成を用いて、次の15アミノ酸をカップリングして、ペプチド配列を得た。最後に、カップリングされた最後の2つのアミノ酸はFmoc-Lys(Mtt)-OHであった。次いで、ペプチド断片を放出するために、ジクロロメタンに溶解した1%トリフルオロ酢酸(TFA)を用いて、Mtt基を選択的に切断し、次いで、HBTUを用いてパルミチン酸にカップリングした。樹脂洗浄後、ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解した20%ピペリジンを用いて、Fmoc基を除去した。最後に、標準的な条件下でTFAを用いて、樹脂切断および側鎖脱保護を同時に行った。冷ジエチルエーテルからの粉碎によって、生成物を白色固体として得た。エレクトロスプレー質量分析によって、生成物の同一性を確認し( $m/z$ 推定値:1097.9([M] $^{3+}$ );実測値:1096.8([M-3H] $^{3+}$ )、他のトリパルミトイル化、ジパルミトイル化、またはモノパルミトイル化ペプチドは観察されなかった。

20

30

#### 【 0 3 3 1 】

実施例1.2: 超分子抗原性構築物によって誘発された抗体

パルミトイル化 $A\beta_{1-15}$ 超分子抗原性構築物に対するmAbの製造

C57BL/6マウスにおける免疫化のために、パルミトイル化抗原(ACI-24,  $A\beta_{1-15}$ )を2週間隔で使用した。10~12匹の動物を、それぞれの抗原(注射体積:200  $\mu$ l、8nmoleのペプチドを含む)で免疫化した。動物を屠殺する4日前に最後の注射を行った。5回の追加免疫の後に、治療的な力価(1:5,000に希釈した血清がELISAにおいて陽性であった場合)を有するマウスを融合のために選択した。脾細胞を免疫化動物から採取し、感作脾細胞と骨髓腫細胞株を融合することによってハイブリドーマを作製した。マウスの脾臓由来Bリンパ球と骨髓腫細胞株SP2-0(ATCC, Manassas, VA)の細胞の融合は、Kohler and Milstein (Nature 256: 495-497 (1975))およびHarlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))の周知のプロセスを用いて行った。

40

#### 【 0 3 3 2 】

ポリエチレングリコールを添加することによって、細胞融合を誘導した。次いで、クローン増殖を可能にする従来のやり方で、結果として生じたハイブリッド細胞を $10 \pm 14$ 日間培養した。限界希釈を用いて、最初のクローン選択を行った。IgG産生ハイブリドーマクローンを、ELISAによって、 $A\beta_{1-42}$ ペプチドに特異的に結合するかどうか選択および試験し、結果として生じた、望ましいモノクローナル抗体を産生するクローンを培養した。

50

## 【0333】

このように得られたハイブリドーマを、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン(HAT)を含有する選択培地に細胞をプレートすることによって化学選択した。

## 【0334】

その後、アミロイドに関連する特定の疾患または障害に対するモノクローナル抗体を産生する能力について、ハイブリドーマをスクリーニングした。母クローンが特定されたら、単クローン性を保証し、ハイブリッドを安定させるために、サブクローニングを4回行った。関心対象の抗体を産生するハイブリドーマをクローニングし、増殖させ、将来の産生のために凍結保存した。

## 【0335】

市販のマウスモノクローナルアイソタイプキットによって、抗体をアイソタイプングし、安定クローンを無血清培地に順応させ、抗体産生のためにバイオリアクターに入れた。

## 【0336】

好ましいハイブリドーマは、IgG1イソタイプを有するモノクローナル抗体を産生した。

## 【0337】

## 実施例1.3: 抗体mACI-24-Ab3の特異性の決定

抗体mACI-24-Ab3の特異性を分析するために、異なる濃度の予め形成されたアミロイド1-42、1-40および17-40、1-28の原繊維をHybond ECLニトロセルロース膜(Amersham Biosciences)にプロットする。10%ドライミルクおよび0.7%Tween20でブロッキングした後、膜を20 µg/mlの一次抗体と室温で2時間インキュベートする。洗浄後、膜を、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗マウスIgG抗体(Amersham Biosciences)と室温で1時間インキュベートし、洗浄し、化学発光溶液とインキュベートした後に、X線フィルムに膜を曝露する。

## 【0338】

mAb mACI-24-Ab3と、アミロイドβ 1-42、1-40および17-40、1-28繊維との結合を測定するために、アミロイドβ 1-42、1-40および17-40、1-28繊維を37 °Cで7日間予め形成し、膜にプロットする。20 µg/ml抗体を用いて結合能を測定し、結合した抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗マウスIgG抗体によって20分間の曝露の間に検出する。

## 【0339】

## 実施例1.4: チオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイ

mAbの凝集阻害ならびに脱凝集性を測定するために、原繊維Aβ 1-42分子に特異的に結合するチオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイを使用した。その後、蛍光発光強度は、溶液中に存在するAβ<sub>1-42</sub>フィラメントの量と相関する。

## 【0340】

Aβ 1-42凍結乾燥粉末を、ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)に溶解して1mMに再構成した。ペプチド溶液を室温で15分間超音波処理し、一晚攪拌し、シリコン処理していない微量遠心管に分注した。次いで、HFIPをアルゴン流の下で蒸発させた。結果として生じたペプチド薄膜を10分間真空乾燥し、使用まで-80 °Cで保存した。

## 【0341】

## 1.4.1 Aβ 1-42凝集アッセイ

抗体を介したAβ 1-42凝集阻害をアッセイするために、抗体をPBSで予め希釈し、以下の成分: 3.3 µMまたは0.33 µMの予め希釈した抗体、10 µMチオフラビンT、33 µM Aβ 1-42、および8.2% DMSOを含有するアッセイ溶液を、シリコン処理していないインキュベーションチューブに入れて作った。従って、抗体:Aβ 1-42の最終モル比は、1:10および1:100であった。適切な対照溶液も調製した。次いで、溶液を37 °Cで24時間インキュベートし、スペクトル蛍光(相対蛍光単位; RFU)を、黒色の348ウェルプレート(Perkin-Elmer)においてPerkin-Elmer FluoroCount分光蛍光光度計により6回繰り返して測定した。凝集阻害または脱凝集は、それぞれ、以下の式に従って、阻害または脱凝集の平均%として表した。

10

20

30

40

$$\text{阻害 (\%)} = \frac{(\text{正の対照のRFU} - \text{負の対照のRFU}) - (\text{A}\beta 1-42\text{を含む試料のRFU} - \text{A}\beta 1-42\text{を含まない試料のRFU})}{(\text{正の対照のRFU} - \text{負の対照のRFU})} \times 100\%$$

平均26%であったが(2回の独立した実験)、1:10のモル比では阻害は51%であった(2回の独立した実験)。

【0342】

#### 1.4.2 A $\beta$ 1-42脱凝集アッセイ

mAbの脱凝集性を測定するために、原繊維A $\beta$  1-42分子に特異的に結合するチオフラビンT(ThT)蛍光アッセイを使用した。その後に、蛍光発光強度は、溶液中に存在するA $\beta$  1-42フィラメントの量と相関する。

10

【0343】

抗体を介した、予め凝集させたA $\beta$  1-42の脱凝集をアッセイするために、前記のように調製した低分子量A $\beta$  1-42を、27%DMSOおよび1xPBSに溶解して110  $\mu$ M溶液として作った。次いで、この溶液を37℃で24時間凝集させた後に、以下:3.3  $\mu$ Mまたは0.33  $\mu$ Mの予め希釈した抗体、および10  $\mu$ MチオフラビンTを添加した。これにより、8.2%DMSOを含有する、1:10および1:100のモル比の抗体:A $\beta$  1-42が得られた。次いで、この溶液をさらに24時間37℃でインキュベートした。次いで、スペクトル蛍光を測定し、%脱凝集を前記のように計算した。

【0344】

抗体ACI-24-Ab-3は、脱凝集アッセイにおいて、予め凝集させたA $\beta$  1-42の有意な脱凝集を示した。1:100のモル比の抗体:A $\beta$  1-42では、脱凝集の平均は12%であったが(2回の独立した実験)、1:10モル比では、脱凝集は20%であった(2回の独立した実験)。

20

【0345】

前記の結果から、ACI-24-Ab-3は、A $\beta$  1-42の凝集を阻害し、予め形成されたA $\beta$  1-42繊維を脱凝集できたという点で、A $\beta$  1-42フィラメントとの相互作用において二機能性を示すことは明らかである。

【0346】

#### 実施例1.5:mACIと01Ab7 C2-A $\beta$ 1-42の相互作用

抗体ACI-24-Ab-3とアミロイドペプチドA $\beta$  1-42の相互作用を、表面プラズモン共鳴を用いて試験する。マウス抗体と、A $\beta$  1-42の単量体または繊維との結合を確かめる。

30

【0347】

全てのSPR実験はBiacore X機器(Biacore AB)により行う。固定化用試薬(EDC、NHS、およびエタノールアミン)、センサーチップCM5およびSA、ならびにランニング緩衝液および試料緩衝液HBS-EPはBiacore ABから購入した。カップリング収率を高めるために、カップリング緩衝液として酢酸ナトリウム(10mM、pH5.0)を使用する。PBS緩衝液をA $\beta$  1-42に最終濃度3mg/mlまで添加し、バイアルを37℃で7日間放置することによって、原繊維A $\beta$  1-42(BAchem)を調製する。原繊維A $\beta$  1-42を、表面結合カルボキシメチルデキストランマトリックスを含有するCM5センサーチップにカップリングする。ピオチン化単量体A $\beta$  1-42(BAchem)を、ストレプトアビジンと共有結合したカルボキシメチルデキストランマトリックスからなるセンサーチップSAにカップリングする。典型的には、ランニング緩衝液を用いた段階希釈によって、4または5種類の濃度のmAbをアッセイする。最低濃度から開始して注入を行い、流速30  $\mu$ L/minで3分間、fc1および2に通過させる。フローセル2は誘導体化されておらず、機器のノイズおよびバルク屈折変化(bulk refractive change)を補正するために、反応をfc1から差し引く。注入が終わった後に、表面をすぐにランニング緩衝液を用いて5分間洗浄する。残存している結合抗体をA $\beta$  1-42原繊維から除去するために、10mM NaOHのパルスを入力することによって表面再生を行う。キネティック分析は、BIAevaluation 3.0を用いた数値積分および網羅的解析のアルゴリズムを用いて行う。異なる濃度の分析物の注入について得られた曲線を重ね合わせ、ベースラインを0に調節する。曲線フィッティングのために、全てのデータを1:1の均質複合体に同時にフィットさせる。

40

【0348】

50

マウスACI-24-Ab-3抗体とアミロイドとの結合を確かめる。

【0349】

実施例1.6:ACI-24-Ab-3モノクローナル抗体とアミロイド繊維との結合

予め形成された繊維上での抗体ACI-24-Ab-3の分子結合側を分析するために、ネガティブコントラスト透過型電子顕微鏡法(TEM)を行う。

【0350】

抗体ACI-24-Ab-3を、Slot JW, Geuze HJ(1985)に従って8nmコロイド金とカップリングさせる。アミロイド1-42(A $\beta$ 1-42)繊維のコインキュベーションのために、6.65 $\mu$ M繊維を金標識抗体と1:100のモル比で室温で24時間インキュベーションする。その後、5 $\mu$ lの試料を、パルロジウム(parlodium)/Cフィルムで覆った新しいグロー放電Cuグリッド(メッシュ200)上で45秒間インキュベートし、水で3回洗浄し、希釈および濾過した新しい2%酢酸ウラニルで1回洗浄する。試料を2%酢酸ウラニルで15~20秒間染色する。グリッド上の過剰な染色液を吸引し、結果的に風乾させる。各試料の3つのグリッドを調製する。グリッドを透過型電子顕微鏡Hitachi 7000において分析する。

10

【0351】

実施例1.7:密度勾配超遠心による分画

A $\beta$ <sub>1-42</sub>繊維の重合阻害およびA $\beta$ <sub>1-42</sub>繊維の脱凝集におけるモノクローナル抗体ACI-24-Ab-3の特性を、密度勾配超遠心(Rzepecki et al., 2004)によって研究する。これは、抗体とのインキュベーションおよび抗体無しでのインキュベーションを行い、続いて、予め形成された勾配(OptiPrep(商標))上でSDS-PAGE沈降分析を行った後に、結果として生じた、サイズの異なるペプチド繊維間に分布するという原理に基づいている。予め形成されたA $\beta$ 繊維の集団、コインキュベーションされた抗体の脱凝集および凝集阻害の特性、ならびに抗体と繊維の結合を同時に分析できることは、この方法の明らかな利点である。

20

【0352】

A $\beta$ <sub>1-42</sub>凝集阻害のために、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体を、2種類のモル比のmAb ACI-24-Ab-3(単量体A $\beta$ <sub>1-42</sub>のモル比はmAbより30倍または100倍大きい)とインキュベーションする。A $\beta$ 最終濃度は50 $\mu$ Mである。37℃で24時間のインキュベーション後、試料をOptiPrep(商標)の不連続勾配上に被せ、チューブを259000g、4℃で3時間間スピンする。15の画分を採取する(各140 $\mu$ L)。画分1は、勾配上部から得た最低密度の画分であり、画分15は、勾配底部から得た最高密度の画分である。ペレットも採取する。集めた画分をSDS-PAGEと銀染色によって分析する。阻害アッセイ用のA $\beta$ <sub>1-42</sub>の濃度は、アミロイド凝集キネティックを減らし、線形位相内での測定を確実にする、脱凝集アッセイの1/5である。

30

【0353】

mAb ACI-24-Ab-3とのコインキュベーションによる(2種類のモル比1:30および1:100のmAb+単量体A $\beta$ <sub>1-42</sub>、A $\beta$ 最終濃度246 $\mu$ M)、予め形成されたA $\beta$ <sub>1-42</sub>原繊維の脱凝集のために、試料を37℃で24時間インキュベーションする。前記のように、および以前に述べられたように(Rzepecki et al., 2004)、24時間後に、試料を超遠心により分画し、SDS-PAGEにより分離する。

【0354】

実施例1.8:mAb ACI-24-Ab-3とのコインキュベーションによる、A $\beta$ <sub>1-42</sub>フィラメントの凝集阻害および予め形成されたA $\beta$ <sub>1-42</sub>フィラメントの脱凝集を評価するための蛍光アッセイ

40

BIS-ANS蛍光アッセイ

mAbの阻害特性を評価するために、A $\beta$ <sub>1-42</sub>フィラメントの単量体または非原繊維集団を特異的に検出する、BIS-ANS(LeVine, 2002)蛍光アッセイを使用する。蛍光測定の前に、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体を、対照として役立つ緩衝液、またはmAb ACI-24-Ab-3(モル比1:100のmAb対A $\beta$ <sub>1-42</sub>ペプチド)と37℃で14時間ブレインキュベーションする。相対蛍光単位を自動記録し、結果を、対照に対する変化としてパーセントで表す。

【0355】

実施例1.9:ACI-24-Ab-3モノクローナル抗体と<sup>13</sup>C標識 $\beta$ -アミロイド1-42ペプチドの相互

50

作用のNMRおよび蛍光による特徴付け

mAbが、予め形成された繊維を可溶化する、または繊維形成を阻害する、可能性のある機構を評価するために、U- $^{13}\text{C}$  Tyr10およびVal12で標識された $\beta$ -アミロイド1-42ペプチドのTh-T蛍光アッセイと固体NMRとの間で一対一で実験を行う。従って、この研究の目的は、固体NMR分光法により、モノクローナル抗体存在下での $\beta$ -アミロイドペプチドの $\beta$ -シート移行を追跡し、これと、Th-T蛍光アッセイにより測定された脱凝集能を直接比較することである。

【0356】

固体NMR分光法は二次構造の移行を検出するだけでなく、構造移行を支配する、 $\text{A}\beta_{1-42}$ ペプチドのドメインを局在化することもできる。固体NMRは、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 繊維の構造決定に寄与してきたので、この問題に適用できることが分かっている(Petkova et al., 2004, Petkova et al., 2002)。特に、 $^{13}\text{C}_\alpha$ および $^{13}\text{C}_\beta$ 化学シフトと二次構造が相関することは(Cornilescu et al., 1999, Luca et al., 2001, Iwadate et al., 1999)、ペプチド内の二次構造の変化を試験する有用なツールである。

【0357】

位置12にある $^{13}\text{C}$ で予め標識されたバリン( $^{12}\text{Val}$ )および位置10にある $^{13}\text{C}$ で予め標識されたチロシン( $^{10}\text{Tyr}$ )を含む標識ペプチドの合成を、Fmoc合成プロトコールによって行う。ペプチドの同一性および純度はMALDI質量分析によって確認する。標識 $\beta$ -アミロイドペプチド(1-42)を用いて、PBS緩衝液に溶解したペプチド溶液を37℃で1週間インキュベートすることによって繊維を作製する。アミロイド $\beta$ -ペプチドがPBS緩衝液に十分に溶解しないという大きな問題は、以下のやり方で解決することができる。PBS緩衝液のpH値を少量のアンモニアによって一時的に高めて、アミロイド $\beta$ -ペプチドを溶解する。アンモニアの揮発性を用いて、さらに多量のPBS浴の存在下で試料をインキュベートすることによって、PBS緩衝液の元のpH値に戻す。

【0358】

$\beta$ -シート破壊抗体の効果を測定するために、NMRおよびTh-Tアッセイ用に、繊維溶液を抗体と37℃で24時間インキュベートする。リアルタイム比較のために、同じ溶液のアリコートでTh-T蛍光アッセイに使用し、残りの溶液をNMR測定のために凍結乾燥する。

【0359】

ACI-24-Ab-3の脱凝集能は、Th-T蛍光アッセイを用いて、予め形成された $^{13}\text{C}$ 標識アミロイド $\beta$ 繊維とコインキュベーションすることによって分析する。

【0360】

PBS(対照)とmAbインキュベーションの差を調べるために、PeakFit([www.systat.com/-products/PeakFit](http://www.systat.com/-products/PeakFit))を用いて、各スペクトルをデコンボリューションする。Lorentzian/Gaussianの混合フィッティング法を用いることによって、ラインをうまく一致させる。

【0361】

実施例1.10: アミロイド繊維に対するACI-24-Ab-3の機能性

12.1 ACI-24-Ab-3抗体結合後の $\text{A}\beta_{1-42}$ 繊維コンホメーションの改変および脱凝集の開始

抗体が、予め形成された $\beta$ アミロイド( $\text{A}\beta_{1-42}$ )繊維を脱凝集できる機構を評価するために、U- $^{13}\text{C}$ チロシン10およびバリン12で標識された $\text{A}\beta_{1-42}$ ペプチドの脱凝集を測定するチオフラビン-T(Th-T)蛍光アッセイと、二次コンホメーションを分析する固体核磁気共鳴(NMR)を一対一で比較する。

【0362】

実施例1.11: モノクローナル抗体ACI-24-Ab-3のエピトープマッピング

モノクローナル抗体ACI-24-Ab-3のエピトープマッピングは、 $\text{A}\beta_{1-42}$ の完全アミノ酸(aa)配列をカバーする合計33個のピオチン化ペプチドを含むペプチドライブラリー(Mimotopes, Clayton Victoria, Australiaが製造し、ANAWA Trading SA, Wangen Switzerlandから購入した)を用いてELISAによって行った。ペプチドライブラリーの中のペプチドは、8マー、9マー、または10マーのアミノ酸ペプチドからなった。ピオチン化完全 $\text{A}\beta_{1-42}$ ペプチド(ヒト配列)は正の対照(Bachem, Bubendorf, Switzerland)として使用した。さらに、

これらの抗体が結合し得るさらに広い領域を規定するために、A $\beta$  1-28、A $\beta$  17-40、A $\beta$  1-40およびA $\beta$  1-42をカバーする長いペプチドを使用した。これらの4種類のペプチドもビオチン化した(Anaspecが製造し、ANAWA Trading SA, Switzerlandから購入した)。エピトープマッピングは、製造業者(Mimotopes)の説明書に従って行った。簡単に述べると、ストレプトアビジンでコーティングされたプレート(NUNC, Roskilde, Denmark)を、0.1%BSAを含むPBSで4 で一晩ブロックした。PBS-0.05%Tween20で洗浄した後、プレートを、0.1%BSA、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSで最終濃度10  $\mu$ Mまで希釈した、異なるライブラリーペプチドで室温で1時間コーティングした。洗浄後、10  $\mu$ g/mlまで希釈した異なる抗体とプレートを室温で1時間インキュベートした。ACI-24-Ab-3の場合、2%BSA、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSで希釈した。プレートを再洗浄し、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウスIgG(Jackson Immunresearch West Grove, PA, USA)と室温で1時間インキュベートした。最後の洗浄の後、プレートをホスファターゼ基質(pNPP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)とインキュベートし、3時間インキュベートした後に、ELISAプレートリーダーを用いて405nmで測定した。

10

#### 【0363】

驚いたことに、ACI-24-Ab-3はA $\beta$  1-42の凝集を阻害する能力があるのにもかかわらず、A $\beta$  1-42に有意に結合しないことが見出され、ライブラリーの他のペプチドのいずれとも結合しなかった。

#### 【0364】

ACI-24-Ab-3が他のA $\beta$  ペプチドを認識する可能性があるかどうか確かめるために、A $\beta$  1-28、A $\beta$  17-40、およびA $\beta$  1-40およびA $\beta$  1-42との結合を評価した。ACI-24-Ab-3はA $\beta$  17-40に結合せず、A $\beta$  1-28およびA $\beta$  1-42に対して結合を示さないか、低い結合を示したが、A $\beta$  1-40に有意に結合した。この結果は、ACI-24-Ab-3がA $\beta$  1-40に特異的である可能性があることを示唆している。

20

#### 【0365】

実施例1.12: シングルトランスジェニックhAPPマウスにおける脳アミロイド量に及ぼすACI-24-Ab-3受動的ワクチン接種の影響

インビボでACI-24-Ab-3モノクローナル抗体が可溶性アミロイドに結合し、脳から可溶性アミロイドを除去する能力を評価するために、性別および年齢が同じ6ヶ月齢シングルhAPPマウスを、異なる用量を用いた受動免疫試験に使用する。この試験の終わりに、動物の脳を採取し、A $\beta$  1-40およびA $\beta$  1-42に特異的なELISA(TGC, Germany)を行うことによって、可溶性アミロイド量を分析する。

30

#### 【0366】

1群あたり8~13匹の動物に、100  $\mu$ g、300  $\mu$ g、および1000  $\mu$ gのモノクローナル抗体を溶解したPBS 200  $\mu$ lを1週間間隔で2回注射する。これに対して、対照としてPBSのみを注射する。可溶性アミロイド画分の生化学的分析のために、2回目の注射をした1日後に動物を屠殺する。脳ホモジネートの可溶性画分および/または脳脊髄液(CSF)中のヒトA $\beta$  1-40およびヒトA $\beta$  1-42の量を定量するために、市販の酵素結合免疫測定法(ELISA)キットを使用する(アミロイド $\beta$  40または $\beta$  42 ELISA高感度, TGC, Switzerland)。ELISAは製造業者のプロトコールに従って行う。簡単に述べると、標準(合成A $\beta$  1-40またはA $\beta$  1-42の希釈液)および試料を、タンパク質結合能のない96ウェルポリプロピレンプレート(Greiner, Germany)の中で調製する。最終濃度が1000pg/ml、500pg/ml、250pg/ml、125pg/ml、62.5pg/ml、31.3pg/ml、および15.6pg/mlの標準希釈液、ならびに試料を、ELISAキットに付いている試料希釈剤で調製して、最終体積60  $\mu$ lにする。アミロイドレベルはマウスの年齢と共に増加し、実際の評価には検量線の直線部分の中で試料が読み取られることが必要であるので、A $\beta$  40分析用の試料は2:3に希釈し、A $\beta$  42分析用の試料は希釈しない。

40

#### 【0367】

試料、標準、およびブランク(50  $\mu$ l)を抗A $\beta$ でコーティングされたポリスチロールプレートに添加し(捕捉抗体は抗原のC末端を選択的に認識する)、さらに、選択的抗A $\beta$ 抗体結合体(ビオチン化検出抗体)を添加し、抗体-アミロイド-抗体-複合体を形成するために4

50

で一晩インキュベートする。翌日、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ-結合体を添加し、その30分後にTMB/ペルオキシド混合物を添加して、基質を色の付いた生成物に変換させ、色の強度を、450nmフィルターの付いたELISAリーダーを用いて測光法によって測定する。試料のA $\beta$  内容物は、吸光度と、合成A $\beta$  1-40またはA $\beta$  1-42を用いて作られた検量線を比較することによって定量する。データは、対照平均値に対する個々の変化(対照に対するパーセント)として表す。

#### 【0368】

実施例1.13:二重トランスジェニックhAPPxPS1マウスにおける斑量に及ぼすACI-24-Ab-3の長期受動的投与の影響

インビボでACI-24-Ab-3モノクローナル抗体が脳のアミロイド斑に結合し、アミロイド斑を減らす能力を評価するために、性別および年齢が同じ3.5ヶ月齢二重トランスジェニックhAPPxPS1マウスを、4ヶ月の長期受動免疫試験に使用する。この試験の終わりに、チオフラビンS結合による動物の脳の組織化学的検査によって、アミロイド斑を分析する。

#### 【0369】

15匹のトランスジェニック動物に、500  $\mu$ gのモノクローナル抗体をPBSに溶解した注射液を16回毎週与える。対照として、15匹の動物にPBSのみを注射する。注射は全て腹腔内に行う。屠殺時に、マウスを麻酔し、脳血管から血液を取り除くために4で経心的に生理学的血清を流す。その後、脳を頭蓋から取り出し、後脳および前脳を冠状面/前頭面で切断して分離する。前脳は、正中矢状切断を用いて左半球から右半球に均一に分ける。一方の半球を組織学的検査のために4%パラホルムアルデヒドで一晩、後固定する。フリーフローティング(free floating)インキュベーションのために矢状ビブラトーム切片(40  $\mu$ m)を作り、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSで染色するまで4で保管する。異なるレベルにある5枚の切片を、チオフラビンSを含む濃い斑があるかどうか染色する。染色および盲検法による定量のために、使用した全ての動物の切片を無作為化する。Sony DXC-910 OPカメラを備えたLeica DMR顕微鏡を用いて画像を取得し、コンピュータとLeica Q-Winソフトウェアを用いて分析する。顕微鏡の光強度およびコンデンサーの設定は、画像取得プロセス全体を通して一定に保つ。研究者の偏見を最小限にするために、取得した全ての画像は同じコンピュータサブルーチンに供する。分析全体を通じて、密度スライス閾値を一樣に適用する。チオフラビンS染色においてアミロイド量を自動定量するために、鉤状回の領域を選択する。

#### 【0370】

実施例1.14:シングルトランスジェニックhAPPマウスにおける記憶能に及ぼすACI-24-Ab-3受動的ワクチン接種の影響

インビボでACI-24-Ab-3抗体が認知機能を改善する、または高める能力を評価するために、性別および年齢が同じ9ヶ月齢シングルhAPPマウスを受動免疫試験に使用する。この免疫期間の終わりに、新たな物体認識タスク(Object Recognition Task)(ORT)によって非空間認知を測定する。

#### 【0371】

1群あたり12匹の動物に、400  $\mu$ gのモノクローナル抗体を溶解したPBS 200  $\mu$ lを2回、腹腔内注射する。これに対して、対照としてPBSのみを注射する。2回目の注射の1日後に、新たな物体認識タスク(ORT)<sup>12,13</sup>において認知能力を試験する。ORTのために、登録したマウスを行動アリーナ(behavioral arena)に10分間入れ、新しい未知の物体と対面させる。探索時間を記録する。3時間後に、2回目のセッションのために同じ動物を同じアリーナに戻すが、以前に探索した前の物体、およびさらに新しい物体と対面させる。再度、両物体の探索時間を記録し、結果として生じた認知指数を、総探索時間に対する新たな物体の探索時間の比として計算し、対照に対する比例変化として表した。

#### 【0372】

実施例1.15-マウスモノクローナル抗体は、A $\beta$  1-42ペプチドの低分子量(LMW)単量体より高分子量(HMW)プロトフィブリル(PF)オリゴマー濃縮調製物に優先的に結合する

マウス抗アミロイド $\beta$ モノクローナル抗体と、低分子量(LMW)単量体A $\beta$  1-42ペプチドお

10

20

30

40

50

よびA $\beta$  1-42ペプチドの高分子量プロトフィブリル(PF)オリゴマー濃縮調製物との結合は、ELISAを用いて行うことができる。

【 0 3 7 3 】

2種類のSECカラム, Superdex 75 HR 10/30(範囲3~70kDa)およびSuperose 6 HR 10/30(範囲5~5,000kDa)を用いるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を使用して、A $\beta$  1-42ペプチドの高分子量(HMW)プロトフィブリル(PF)オリゴマー濃縮調製物および低分子量(LMW)単量体調製物からなるA $\beta$  1-42ペプチド画分を調製した。次いで、結果として生じた溶出液を酢酸ウラニルで染色し、溶出したA $\beta$  1-42画分の構造形態を確認するために高分解能透過型電子顕微鏡(TEM)によって100kVで調べた。

【 0 3 7 4 】

次いで、2 $\mu$ MのA $\beta$  1-42画分を高結合アッセイプレートに一晩コーティングすることによって、ELISAを行った。次いで、コーティングされたプレートを1.0%BSAでブロックし、20 $\mu$ g/mlから段階希釈したACI-24-Ab-3(マウスEJ1A9)抗体を添加する。標準抗体(6E10, Chemicon)の段階希釈液も使用した。結合の検出には、アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgG抗体および4-ニトロフェニルホスフェートを使用した。プレートを405nmで測定した。全ての条件を2回繰り返してアッセイし、変動係数(CV)は<0.2であった。

【 0 3 7 5 】

マウス抗A $\beta$  抗体ACI-24-Ab-3(マウスEJ1A9)および対照抗体6E10の結合をELISAによって測定した。表1.4および図5は、ACI-24-Ab-3(マウスEJ1A9)抗体がヒトA $\beta$  1-42ペプチドのプロトフィブリル(PF)オリゴマー濃縮調製物およびLMW単量体調製物に結合した時の光学密度(O.D.)値を示している。表1.5および図6は、6E10抗A $\beta$  1-42対照抗体がヒトA $\beta$  1-42ペプチドのプロトフィブリル(PF)オリゴマー濃縮調製物およびLMW単量体調製物に結合した時の光学密度(O.D.)値を示している。

【 0 3 7 6 】

これらの結果から、ACI-24-Ab-3モノクローナル抗体は、LMW単量体ペプチドより、高次PF/オリゴ形態を有するA $\beta$  1-42ペプチドに強く結合することが分かる。さらに、これらの結果は、ACI-24-Ab-3が、A $\beta$  1-42のプロトフィブリル(PF)オリゴマー濃縮画分に優先的に示されるエピトープに結合することを示唆している。

【 0 3 7 7 】

実施例1.16: モノクローナル抗体ACI-24-Ab-3と、アミロイド $\beta$  1-42ペプチドの単量体およびオリゴマーとの結合

抗アミロイド $\beta$  抗体ACI-24-Ab-3(クローン:EJ1A9)と、A $\beta$  1-42ペプチドの単量体およびオリゴマーの結合を評価した。この研究に使用する前に、抗体は-80℃で保管した。A $\beta$  1-42ペプチド(W.M. Keck Facility, Yale University)は使用日まで凍結乾燥粉末として保管した。他の全ての材料は、特にことわらない限り、Sigma-Aldrich(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)からのものであった。

【 0 3 7 8 】

A $\beta$  1-42ペプチドの単量体、およびオリゴマー濃縮が改善された高分子画分を調製するために、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いる改良法を使用した。LMW単量体およびそれより高い質量のオリゴマー画分が濃縮されたA $\beta$  1-42ペプチド画分を調製するために、2種類のSECカラム, Supelco TSK G4000PW-XL(範囲:10~1500kDa; Sigma)およびSuperose 6 HR 10/30(範囲5~5,000kDa; GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Sweden)を使用した。次いで、結果として生じたSEC溶出液を酢酸ウラニルで染色し、A $\beta$  1-42画分の構造形態を確認するために高分解能透過型電子顕微鏡(TEM)によって100kVで調べた(示さず)。抗体とA $\beta$  1-42画分の結合を調べるために、ELISAを行った。PBSに溶解した2.2 $\mu$ MのA $\beta$  1-42画分を高結合アッセイプレートに2時間コーティングした。次いで、コーティングされたプレートを、0.05%Tween-20を含むPBSで5回洗浄し、1.0%BSAでブロックした。指示した濃度から段階希釈した抗A $\beta$  抗体を、対照抗体(6E10)を含めて添加した。結合の検出には、アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgG抗体(Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England)および4-ニトロフェニルホスフェートを使用した。室温で14時間インキュベ

10

20

30

40

50

ートした後、プレートを405nmで測定した。アッセイを3回繰り返した。図7は、3回別々のELISAアッセイから得た平均(±SEM)光学密度(O.D.)値を示している。抗体ACI-24-Ab-3とAβ1-42のオリゴマー濃縮調製物の結合は、オリゴマーが濃縮されておらず、主にAβ1-42単量体からなる画分と比較して優れていた(図7A)。それに対して、対照抗体6E10は両Aβ1-42画分に等しく結合した。表1.6および1.7は、それぞれ、抗体ACI-24-Ab-3および6E10のELISAアッセイ1、2、および3において得られたO.D.値を示している。

#### 【0379】

これらの結果は、抗体ACI-24-Ab-3(クローン:EJ1A9)のAβ1-42オリゴマー濃縮調製物に対する結合親和性がAβ1-42単量体調製物に対する結合親和性より優れていることを示している。

10

#### 【0380】

実施例2: ペグ化超分子抗原性構築物を用いた免疫化によって生じた抗体

実施例2.1: 超分子抗原性構築物を作る方法

##### 2.1.1 ペグ化β-アミロイドペプチド抗原の合成

免疫応答を高める目的で、リポソームの中でペプチドを再構成するためにアンカー/スパーサー、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)が適用されてきた。PEGを、ペプチドの両端に結合しているリジン残基に共有結合させた。この鎖(PEG n=70)のもう一方の端に、ホスファチジルエタノールアミン(PEA)を、リポソーム二重層内での固定要素として機能するように共有結合させた。従って、リポソームはアジュバントとしてなお機能し、二重層から十分に離れているペプチドは単独で処理することができ、従って、パルミトイル化抗原と比較して免疫原性を高める。

20

#### 【0381】

本明細書に記載の超分子構築物は、標準的なFmoc/tBuアミノ酸側鎖保護を用いて特別に合成した。典型的には、ペプチドをペグ化すると位置異性体の混合物が得られる。本明細書において、AβのC末端およびN末端にPEG-脂質結合体を部位特異的に取り付ける便利な方法が、部分的に保護されたペプチドを用いて証明される。

#### 【0382】

LysまたはHisの内部残基を含有するペプチド配列(22-35)については、各末端に、オルソゴナルに保護されたLys(ivDde)を付加した。合成を容易にするために、C末端には、さらなるGlyを付加した。20%ピペリジンを含むDMFを用いてFmoc基を除去し、無水酢酸を用いてN-アセチル化した。3%ヒドラジン水和物を含むDMFを用いて、1時間、ivDde基を選択的に切断した。2-クロロトリチル樹脂は耐ヒドラジン分解が非常に高いことが分かったので、より広範に用いられているWang樹脂より優れていた。さらに、2-クロロトリチル樹脂は酸感受性が極めて高く、従って、Wang樹脂とは異なり、保護ペプチドを単離することができる。実際には、樹脂結合ペプチドと、予め活性化させたペグ化脂質試薬DSPE-PEG-SPAをカップリングさせても、カップリング生成物は生じないので、溶相中でカップリング反応を行うことが必要であった。従って、穏やかな条件下(酢酸/トリフルオロエタノール/ジクロロメタン、1:1:8、1時間、室温)で樹脂から選択的に切断することによって、内部保護ペプチドを得た。

30

#### 【0383】

配列Aβ<sub>22-35</sub>およびAβ<sub>29-40</sub>に由来するペプチドはそれぞれ、DSPE-PEG-SPAに、DMSOおよび過剰塩基中で首尾よく液相カップリングされた。次いで、過剰なエタノールアミンを2時間添加することによって反応を止め、溶液を凍結乾燥した。

40

#### 【0384】

配列29-40については、特別な保護戦略は必要とされなかった。

#### 【0385】

HPLC(セミ分取逆相C<sub>4</sub>カラム)による精製によって、50~70%純度のN末端およびC末端PEG-脂質結合体を得た。これらの同一性は、MALDI(マトリックス支援レーザー脱離イオン化)によって確認した。各配列は、カップリング反応のし易さに相当のばらつきがあることを示し、それに応じて条件(温度、DSPE-PEG-SPAのモル当量数、時間)を調整した。過剰な

50

DSPE-PEG-SPAを望ましい生成物から分離するために、HPLC精製を適用する。最後の側鎖脱保護の前に、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて、モノカップリング生成物およびジカップリング生成物を分離することができる。その後、ペプチド側鎖を脱保護し、クエンチングされた過剰なDSPE-PEG-SPAを分離することによって、許容可能な純度を有する望ましい結合体を単離する。

#### 【0386】

保護ペプチドを用いて、N末端およびC末端脂質-PEG- $\beta$ -アミロイド抗原を合成するこのアプローチは、多種多様なペプチド配列に適用することができる。

#### 【0387】

実施例2.2: 超分子抗原性構築物によって誘発された抗体

10

ペグ化A $\beta_{22-35}$ 超分子抗原性構築物およびペグ化A $\beta_{29-40}$ 超分子抗原性構築物に対するmAbの製造

記載のように(Nicolau et al., 2002, PNAS, 99, 2332-37)、リボソーム抗原を調製した。モノホスホリルリピドA(40mg/mMリン脂質)を含有する、ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)、ジミリスチルホスファチジルエタノールアミン(DMPEA)、ジミリスチルホスファチジルグリセロール(DMPG)、およびコレステロール(0.9:0.1:0.1:0.7モル比)で作られたリボソームからなる構築物中で、配列PEG-A $\beta_{22-35}$ およびPEG-A $\beta_{29-40}$ を再構成した。C57BL/6マウスにおける免疫化のために、これらの抗原を2週間隔で使用した。10~12匹の動物を、それぞれの抗原を用いて免疫化した。3~6回の追加免疫の後に、融合のために、治療的な力価(1:5,000に希釈した血清がELISAにおいて陽性であった場合)を有するマウスを選択した。脾細胞を免疫化動物から採取し、感作脾細胞と骨髓腫細胞株を融合することによってハイブリドーマを作製した。マウスの脾臓由来Bリンパ球と骨髓腫細胞株SP2-0(ATCC, Manassas, VA)の細胞の融合は、Kohler and Milstein (Nature 256:495-497 (1975))およびHarlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))の周知のプロセスを用いて行った。

20

#### 【0388】

ポリエチレングリコールを添加することによって、細胞融合を誘導した。次いで、従来のやり方で、例えば、限界希釈を用いて、結果として生じたハイブリッド細胞をクローニングした。IgG産生ハイブリドーマクローンを、ELISAによって、A $\beta_{1-42}$ ペプチドに特異的に結合するかどうか選択および試験し、望ましいモノクローナル抗体を産生する、結果として生じたクローンを培養した。

30

#### 【0389】

このように得られたハイブリドーマを、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン(HAT)を含有する選択培地に細胞をプレートすることによって化学選択した。

#### 【0390】

その後、アミロイドに関連する特定の疾患または障害に対するモノクローナル抗体を産生する能力について、ハイブリドーマをスクリーニングした。関心対象の抗体を産生するハイブリドーマをクローニングし、増殖させ、将来の産生のために凍結保存した。好ましいハイブリドーマは、IgGアイソタイプを有するモノクローナル抗体を産生する。

#### 【0391】

実施例2.3: 抗体ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11の特異性の決定

40

抗体ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11の特異性を分析するために、異なる濃度の予め形成されたアミロイド1-42、1-40および17-40、1-28原繊維を、Hybond ECLニトロセルロース膜(Amersham Biosciences)にプロットする。10%ドライミルクおよび0.7%Tween20でブロッキングした後、膜を20 $\mu$ g/mlの一次抗体と室温で2時間インキュベートする。洗浄後、膜を、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗マウスIgG抗体(Amersham Biosciences)と室温で1時間インキュベートし、洗浄し、化学発光溶液とインキュベートした後に、X線フィルムに膜を曝露する。

#### 【0392】

mAb ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11と、アミロイド $\beta$ 1-42、1-40および17-40、1-28繊

50

維の結合を測定するために、アミロイドβ 1-42、1-40および17-40、1-28繊維を37℃で7日間予め形成し、膜にプロットする。20 μg/ml抗体を用いて結合能を測定し、結合した抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗マウスIgG抗体によって20分間の曝露の間に検出する。

【0393】

実施例2.4:チオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイ

mAbの凝集阻害ならびに脱凝集性を測定するために、原繊維Aβ<sub>1-42</sub>分子に特異的に結合するチオフラビンT(Th-T)蛍光アッセイを使用した。その後、蛍光発光強度は、溶液中に存在するAβ<sub>1-42</sub>フィラメントの量と相関する。

【0394】

10

Aβ 1-42凍結乾燥粉末を、ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)に溶解して1mMに再構成した。ペプチド溶液を室温で15分間超音波処理し、一晚攪拌し、シリコン処理していない微量遠心管に分注した。次いで、HFIPをアルゴン流の下で蒸発させた。結果として生じたペプチド薄膜を10分間真空乾燥し、使用まで-80℃で保存した。

【0395】

2.4.1 Aβ 1-42凝集アッセイ

抗体を介したAβ 1-42凝集阻害をアッセイするために、抗体をPBSで予め希釈し、以下の成分:3.3 μMまたは0.33 μMの予め希釈した抗体、10 μMチオフラビンT、33 μM Aβ 1-42、および8.2% DMSOを含有するアッセイ溶液を、シリコン処理していないインキュベーションチューブに入れて作った。従って、抗体:Aβ 1-42の最終モル比は1:10および1:100であった。適切な対照溶液も調製した。次いで、溶液を37℃で24時間インキュベートし、スペクトル蛍光(相対蛍光単位;RFU)を、黒色の348ウェルプレート(Perkin-Elmer)においてPerkin-Elmer FluoroCount分光蛍光光度計により6回繰り返して測定した。凝集阻害または脱凝集は、それぞれ、以下の式に従って、阻害または脱凝集の平均%として表した。

20

$$\text{阻害 (\%)} = \frac{(\text{正の対照のRFU} - \text{負の対照のRFU}) - (\text{A}\beta 1-42\text{を含む試料のRFU} - \text{A}\beta 1-42\text{を含まない試料のRFU})}{(\text{正の対照のRFU} - \text{負の対照のRFU})} \times 100\%$$

【0396】

抗体ACI-11-Ab-9は、対照と比較して、Aβ 1-42凝集の有意な阻害を示した。1:100のモル比の抗体:Aβ 1-42では、阻害の平均は34%であったが(3回の独立した実験)、1:10モル比では、阻害は69%であった(2回の独立した実験)。

30

【0397】

抗体ACI-12-Ab-11もまた、対照と比較して、Aβ 1-42凝集の有意な阻害を示した。1:100のモル比の抗体:Aβ 1-42では、阻害の平均は30%であったが(2回の独立した実験)、1:10モル比では、阻害は66%であった(2回の独立した実験)。

【0398】

2.4.2 Aβ 1-42脱凝集アッセイ

mAbの脱凝集性を測定するために、原繊維Aβ<sub>1-42</sub>分子に特異的に結合するチオフラビンT(ThT)蛍光アッセイを使用した。その後、蛍光発光強度は、溶液中に存在するAβ<sub>1-42</sub>フィラメントの量と相関する。

40

【0399】

抗体を介した、予め凝集させたAβ 1-42の脱凝集をアッセイするために、前記のように調製した低分子量Aβ 1-42を、27% DMSOおよび1xPBSに溶解して110 μM溶液として作った。次いで、この溶液を37℃で24時間凝集させた後に、以下:3.3 μMまたは0.33 μMの予め希釈した抗体、および10 μMチオフラビンTを添加した。これにより、8.2% DMSOを含有する、1:10および1:100のモル比の抗体:Aβ 1-42が得られた。次いで、この溶液をさらに24時間37℃でインキュベートした。次いで、スペクトル蛍光を測定し、%脱凝集を前記のように計算した。

【0400】

抗体ACI-11-Ab-9は、脱凝集アッセイにおいて、予め凝集させたAβ 1-42の有意な脱凝集

50

を示した。1:100のモル比の抗体:A $\beta$  1-42では、脱凝集の平均は22%であったが(3回の独立した実験)、1:10モル比では、脱凝集は52%であった(3回の独立した実験)。

【0401】

抗体ACI-12-Ab-11もまた、脱凝集アッセイにおいて、予め凝集させたA $\beta$  1-42の有意な脱凝集を示した。1:100のモル比の抗体:A $\beta$  1-42では、脱凝集の平均は18%であったが(2回の独立した実験)、1:10モル比では、脱凝集は54%であった(2回の独立した実験)。

【0402】

前記の結果から、抗体ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11は、A $\beta$  1-42の凝集を阻害し、予め形成されたA $\beta$  1-42繊維を脱凝集できたという点で、A $\beta$  1-42フィラメントとの相互作用において二機能性を示すことは明らかである。

【0403】

実施例2.5:ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11の相互作用

抗体ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11とアミロイドペプチドA $\beta$  1-42の相互作用を、表面プラズモン共鳴を用いて試験する。マウス抗体と、A $\beta$  1-42の単量体または繊維との結合を確かめる。

【0404】

全てのSPR実験はBiacore X機器(Biacore AB)により行う。固定化用試薬(EDC、NHS、およびエタノールアミン)、センサーチップCM5およびSA、ならびにランニング緩衝液および試料緩衝液HBS-EPはBiacore ABから購入した。カップリング収率を高めるために、カップリング緩衝液として酢酸ナトリウム(10mM、pH5.0)を使用する。PBS緩衝液をA $\beta$  1-42に最終濃度3mg/mlまで添加し、バイアルを37℃で7日間放置することによって、原繊維A $\beta$  1-42(BAchem)を調製する。原繊維A $\beta$  1-42を、表面結合カルボキシメチルデキストランマトリックスを含有するCM5センサーチップにカップリングする。ビオチン化単量体A $\beta$  1-42(BAchem)を、ストレプトアビジンと共有結合したカルボキシメチルデキストランマトリックスからなるセンサーチップSAにカップリングする。典型的には、ランニング緩衝液を用いた段階希釈によって、4または5種類の濃度のmAbをアッセイする。最低濃度から開始して注入を行い、流速30  $\mu$ L/minで3分間、fc1および2に通過させる。フローセル2は誘導体化されておらず、機器のノイズおよびバルク屈折変化を補正するために、反応をfc1から差し引く。注入が終わった後に、表面をすぐにランニング緩衝液を用いて5分間洗浄する。残存している結合抗体をA $\beta$  1-42原繊維から除去するために、10mM NaOHのパルスを注入することによって表面再生を行う。キネティック分析は、BIAevaluation 3.0を用いた数値積分および網羅的解析のアルゴリズムを用いて行う。異なる濃度の分析物の注入について得られた曲線を重ね合わせ、ベースラインを0に調節した。曲線フィッティングのために、全てのデータを1:1の均質複合体に同時にフィットさせる。

【0405】

マウスACI-11-Ab-9抗体およびACI-12-Ab-11抗体とアミロイドとの結合を確かめる。

【0406】

実施例2.6:ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11モノクローナル抗体とアミロイド繊維との結合

予め形成された繊維上での抗体ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11の分子結合側を分析するために、ネガティブコントラスト透過型電子顕微鏡法(TEM)を行う。

【0407】

抗体ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11を、Slot JW, Geuze HJ(1985)に従って8nmコロイド金とカップリングさせる。アミロイド1-42(A $\beta$  1-42)繊維のコインキュベーションのために、6.65  $\mu$ M繊維を金標識抗体と1:100のモル比で室温で24時間インキュベーションする。その後、5  $\mu$ lの試料を、パルロジウム(parlodium)/Cフィルムで覆った新しいグロー放電Cuグリッド(メッシュ200)上で45秒間インキュベートし、水で3回洗浄し、希釈および濾過した新しい2%酢酸ウラニルで1回洗浄する。試料を2%酢酸ウラニルで15~20秒間染色する。グリッド上の過剰な染色液を吸引し、結果的に風乾させる。各試料の3つのグリッドを調製する。グリッドを透過型電子顕微鏡Hitachi 7000において分析する。

## 【0408】

## 実施例2.7:密度勾配超遠心による分画

A $\beta$ <sub>1-42</sub>繊維の重合阻害およびA $\beta$ <sub>1-42</sub>繊維の脱凝集におけるモノクローナル抗体ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11の特性を、密度勾配超遠心(Rzepecki et al., 2004)によって研究する。これは、抗体とのインキュベーションおよび抗体無しでのインキュベーションを行い、続いて、予め形成された勾配(OptiPrep(商標))上でSDS-PAGE沈降分析を行った後に、結果として生じた、サイズの異なるペプチド繊維間に分布するという原理に基づいている。予め形成されたA $\beta$ 繊維の集団、コインキュベーションされた抗体の脱凝集および凝集阻害の特性、ならびに抗体と繊維の結合を同時に分析できることは、この方法の明らかな利点である。

10

## 【0409】

A $\beta$ <sub>1-42</sub>凝集阻害のために、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体を、2種類のモル比のmAb ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11(単量体A $\beta$ <sub>1-42</sub>のモル比はmAbより30倍または100倍大きい)とそれぞれインキュベーションする。A $\beta$ 最終濃度は50  $\mu$ Mである。37℃で24時間のインキュベーション後、試料をOptiPrep(商標)の不連続勾配上に被せ、チューブを259000g、4℃で3時間間スピンする。15の画分を採取する(各140  $\mu$ L)。画分1は、勾配上部から得た最低密度の画分であり、画分15は、勾配底部から得た最高密度の画分である。ペレットも採取する。集めた画分をSDS-PAGEと銀染色によって分析する。阻害アッセイ用のA $\beta$ <sub>1-42</sub>の濃度は、アミロイド凝集キネティックを減らし、線形位相内での測定を確実にする、脱凝集アッセイの1/5である。

20

## 【0410】

mAb ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11とのコインキュベーションによる(2種類のモル比1:30および1:100のmAb+単量体A $\beta$ <sub>1-42</sub>、A $\beta$ 最終濃度246  $\mu$ M)、予め形成されたA $\beta$ <sub>1-42</sub>原繊維の脱凝集のために、試料を37℃で24時間インキュベーションする。前記のように、および以前に述べられたように(Rzepecki et al., 2004)、24時間後に、試料を超遠心により分画し、SDS-PAGEにより分離する。

## 【0411】

実施例2.8:mAb ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11とそれぞれコインキュベーションすることによる、A $\beta$ <sub>1-42</sub>フィラメント凝集阻害および予め形成されたA $\beta$ <sub>1-42</sub>フィラメントの脱凝集を評価する蛍光アッセイ

30

## BIS-ANS蛍光アッセイ

mAbの阻害特性を評価するために、A $\beta$ <sub>1-42</sub>フィラメントの単量体または非原繊維集団を特異的に検出する、BIS-ANS(LeVine, 2002)蛍光アッセイを使用する。蛍光測定の前に、A $\beta$ <sub>1-42</sub>単量体を、対照として役立つ緩衝液、またはmAb ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11(モル比1:100のmAb対A $\beta$ <sub>1-42</sub>ペプチド)と37℃で14時間プレインキュベーションする。相対蛍光単位を自動記録し、結果を、対照に対する変化としてパーセントで表す。

## 【0412】

実施例2.9:ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11モノクローナル抗体と<sup>13</sup>C標識 $\beta$ -アミロイド1-42ペプチドの相互作用のNMRおよび蛍光による特徴付け

mAbが、予め形成された繊維を可溶化する、または繊維形成を阻害する、可能性のある機構を評価するために、U-<sup>13</sup>C Tyr10およびVal12で標識された $\beta$ -アミロイド1-42ペプチドのTh-T蛍光アッセイと固体NMRとの間で一対一で実験を行う。従って、この研究の目的は、固体NMR分光法により、モノクローナル抗体存在下での $\beta$ -アミロイドペプチドの $\beta$ -シート移行を追跡し、これと、Th-T蛍光アッセイにより測定された脱凝集能を直接比較することである。

40

## 【0413】

固体NMR分光法は二次構造の移行を検出するだけでなく、構造移行を支配する、A $\beta$ <sub>1-42</sub>ペプチドのドメインを局在化することもできる。固体NMRは、A $\beta$ <sub>1-42</sub>繊維の構造決定に寄与してきたので、この問題に適用できることが分かっている(Petkova et al., 2004, Petkova et al., 2002)。特に、<sup>13</sup>C $_{\alpha}$ および<sup>13</sup>C $_{\beta}$ 化学シフトと二次構造が相関することは(C

50

ornilescu et al., 1999, Luca et al., 2001, Iwadate et al., 1999)、ペプチド内の二次構造の変化を試験する有用なツールである。

【0414】

位置12にある $^{13}\text{C}$ で予め標識されたバリン( $^{12}\text{Val}$ )および位置10にある $^{13}\text{C}$ で予め標識されたチロシン( $^{10}\text{Tyr}$ )を含む標識ペプチドの合成を、Fmoc合成プロトコールによって行う。ペプチドの同一性および純度はMALDI質量分析によって確認する。標識 $\beta$ -アミロイドペプチド(1-42)を用いて、PBS緩衝液に溶解したペプチド溶液を37℃で1週間インキュベートすることによって繊維を作製する。アミロイド $\beta$ -ペプチドがPBS緩衝液に十分に溶解しないという大きな問題は、以下のやり方で解決することができる。PBS緩衝液のpH値を少量のアンモニアによって一時的に高めて、アミロイド $\beta$ -ペプチドを溶解する。アンモニアの揮発性を用いて、さらに多量のPBS浴の存在下で試料をインキュベートすることによって、PBS緩衝液の元のpH値に戻す。

10

【0415】

$\beta$ -シート破壊抗体の効果を測定するために、NMRおよびTh-Tアッセイ用に、繊維溶液を抗体と37℃で24時間インキュベートする。リアルタイム比較のために、同じ溶液のアリコートでTh-T蛍光アッセイに使用し、残りの溶液をNMR測定のために凍結乾燥する。

【0416】

ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11の脱凝集能は、Th-T蛍光アッセイを用いて、予め形成された $^{13}\text{C}$ 標識アミロイド $\beta$ 繊維とコインキュベーションすることによって分析する。

【0417】

20

PBS(対照)とmAbインキュベーションの差を調べるために、PeakFit(<http://www.systat.com/-products/PeakFit>)を用いて、各スペクトルをデコンボリューションする。Lorentzian/Gaussianの混合フィッティング法を用いることによって、ラインをうまく一致させる。

【0418】

実施例2.10: アミロイド繊維に対するACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11の機能性

12.1 ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11抗体が結合した後のA $\beta$ 1-42繊維コンホメーションの改変および脱凝集の開始

抗体が、予め形成された $\beta$ アミロイド(A $\beta_{1-42}$ )繊維を脱凝集できる機構を評価するために、U- $^{13}\text{C}$ チロシン10およびバリン12で標識されたA $\beta$ 1-42ペプチドの脱凝集を測定する。チオフラビン-T(Th-T)蛍光アッセイと、二次コンホメーションを分析する固体核磁気共鳴(NMR)を一对で比較する。

30

【0419】

実施例2.11: モノクローナル抗体ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11のエピトープマッピング

モノクローナル抗体ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11のエピトープマッピングは、A $\beta$ 1-42の完全アミノ酸(aa)配列をカバーする合計33個のビオチン化ペプチドを含むペプチドライブラリー(Mimotopes, Clayton Victoria, Australiaが製造し、ANAWA Trading SA, Wangen Switzerlandから購入した)を用いてELISAによって行った。ペプチドライブラリーの中のペプチドは、8マー、9マー、または10マーのアミノ酸ペプチドからなった。ビオチン化完全A $\beta$ 1-42ペプチド(ヒト配列)は正の対照(Bachem, Bubendorf, Switzerland)として使用した。さらに、これらの抗体が結合し得るさらに広い領域を規定するために、A $\beta$ 1-28、A $\beta$ 17-40、A $\beta$ 1-40およびA $\beta$ 1-42をカバーする長いペプチドを使用した。これらの4種類のペプチドもビオチン化した(Anaspecが製造し、ANAWA Trading SA, Switzerlandから購入した)。エピトープマッピングは、製造業者(Mimotopes)の説明書に従って行った。簡単に述べると、ストレプトアビジンでコーティングされたプレート(NUNC, Roskilde, Denmark)を、0.1%BSAを含むPBSで4℃で一晩ブロックした。PBS-0.05%Tween20で洗浄した後、プレートを、0.1%BSA、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSで最終濃度10 $\mu\text{M}$ まで希釈した異なるライブラリーペプチドで室温で1時間コーティングした。洗浄後、10 $\mu\text{g/ml}$ まで希釈した異なる抗体とプレートを室温で1時間インキュベートした。抗体ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11の場合、2%BSA、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSで希釈した。プレート

40

50

を再洗浄し、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウスIgG(Jackson Immunresearch West Grove, PA, USA)と室温で1時間インキュベートした。最後の洗浄の後、プレートホスファターゼ基質(pNPP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)とインキュベートし、3時間インキュベートした後に、ELISAプレートリーダーを用いて405nmで測定した。

【0420】

驚いたことに、ACI-11-Ab-9はA $\beta$  1-42に対して有意に結合することが示されたが、ペプチドライブラリーの短いペプチドのいずれにも結合することができなかった。従って、この抗体は、エピトープに結合するために8個より大きなアミノ酸を必要とする、および/またはACI-11-Ab-9は、完全長A $\beta$  1-42にのみ存在するコンホメーションエピトープを認識する可能性がある結論付けた。

10

【0421】

ACI-12-Ab-11もまたAb1-42に有意に結合したが、ACI-11-Ab-9と同様に、ACI-12-Ab-11はペプチドライブラリーの短いペプチドのいずれにも結合しなかった。

【0422】

抗体ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11が他のA $\beta$  ペプチドを認識する可能性があるかどうか確かめるために、A $\beta$  1-28、A $\beta$  17-40、ならびにA $\beta$  1-40およびA $\beta$  1-42に対する結合も評価した。

【0423】

ACI-11-Ab-9はA $\beta$  1-28、A $\beta$  1-40、およびA $\beta$  1-42にかなり結合したが、A $\beta$  17-40には全く結合しなかった。

20

【0424】

まとめると、これらの結果は、ACI-11-Ab-9のエピトープがA $\beta$  の領域1-28にあり、かつ8アミノ酸より長く、および/またはA $\beta$  との結合がA $\beta$  のコンホメーションに依存することを示唆している。

【0425】

ACI-12-Ab-11はAb1-40およびAb1-42に有意に結合したが、A $\beta$  1-28にもA $\beta$  17-40にも全く結合しなかった。従って、ACI-12-Ab-11は完全長A $\beta$  1-40およびA $\beta$  1-42にのみ結合することができ、これより短いA $\beta$  ペプチドには結合できなかった。これらの結果は、A $\beta$  の24マーでも28マーでも抗体結合に不十分であるので、ACI-12-Ab-11によって認識されるエピトープはA $\beta$  のコンホメーションに依存することを示唆している。

30

【0426】

実施例2.12: シングルトランスジェニックhAPPマウスにおける脳アミロイド量に及ぼす、ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11を用いた受動的ワクチン接種の影響

インビボでACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11モノクローナル抗体が可溶性アミロイドに結合し、脳から可溶性アミロイドを除去する能力を評価するために、性別および年齢が同じ6ヶ月齢シングルhAPPマウスを、異なる用量を用いた受動免疫試験に使用する。この試験の終わりに、動物の脳を採取し、A $\beta$  1-40およびA $\beta$  1-42に特異的なELISA(TGC, Germany)を行うことによって、可溶性アミロイド量を分析する。

【0427】

1群あたり8~13匹の動物に、100  $\mu$ g、300  $\mu$ g、および1000  $\mu$ gのモノクローナル抗体を溶解したPBS 200  $\mu$ lを1週間間隔で2回注射する。これに対して、対照としてPBSのみを注射する。可溶性アミロイド画分の生化学的分析のために、2回目の注射をした1日後に動物を屠殺する。脳ホモジネートの可溶性画分および/または脳脊髄液(CSF)中のヒトA $\beta$  1-40およびヒトA $\beta$  1-42の量を定量するために、市販の酵素結合免疫測定法(ELISA)キットを使用する(アミロイド $\beta$  40または $\beta$  42 ELISA高感度, TGC, Switzerland)。ELISAは製造業者のプロトコールに従って行う。簡単に述べると、標準(合成A $\beta$  1-40またはA $\beta$  1-42の希釈液)および試料を、タンパク質結合能のない96ウェルポリプロピレンプレート(Greiner, Germany)の中で調製する。最終濃度が1000pg/ml、500pg/ml、250pg/ml、125pg/ml、62.5pg/ml、31.3pg/ml、および15.6pg/mlの標準希釈液、ならびに試料を、ELISAキットに付いている試料希釈剤で調製して、最終体積60  $\mu$ lにする。アミロイドレベルはマウスの年齢と

40

50

共に増加し、実際の評価には検量線の直線部分の中で試料が読み取られることが必要であるので、A $\beta$  40分析用の試料は2:3に希釈し、A $\beta$  42分析用の試料は希釈しない。

【0428】

試料、標準、およびブランク(50  $\mu$ l)を抗A $\beta$ でコーティングされたポリスチロールプレートに添加し(捕捉抗体は抗原のC末端を選択的に認識する)、さらに、選択的抗A $\beta$ 抗体結合体(ビオチン化検出抗体)を添加し、抗体-アミロイド-抗体-複合体を形成するために4で一晩インキュベートする。翌日、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ-結合体を添加し、その30分後にTMB/ペルオキシド混合物を添加して、基質を色の付いた生成物に変換させ、色の強度を、450nmフィルターの付いたELISAリーダーを用いて測光法によって測定する。試料のA $\beta$ 内容物は、吸光度と、合成A $\beta$  1-40またはA $\beta$  1-42を用いて作られた検量線を比較することによって定量する。データは、対照平均値に対する個々の変化(対照に対するパーセント)として表す。

10

【0429】

実施例2.13:二重トランスジェニックhAPPxPS1マウスにおける斑量に及ぼすACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11の長期受動的投与の影響

インビボでACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11モノクローナル抗体が脳のアミロイド斑に結合し、アミロイド斑を減らす能力を評価するために、性別および年齢が同じ3.5ヶ月齢の二重トランスジェニックhAPPxPS1マウスを、4ヶ月の長期受動免疫試験に使用する。この試験の終わりに、チオフラビンS結合による動物の脳の組織化学的検査によって、アミロイド斑を分析する。

20

【0430】

15匹のトランスジェニック動物に、500  $\mu$ gのモノクローナル抗体をPBSに溶解した注射液を16回毎週与える。対照として、15匹の動物にPBSのみを注射する。注射は全て腹腔内に行う。屠殺時に、マウスを麻酔し、脳血管から血液を取り除くために4で経心的に生理学的血清を流す。その後、脳を頭蓋から取り出し、後脳および前脳を冠状面/前頭面で切断して分離する。前脳は、正中矢状切断を用いて左半球から右半球に均一に分ける。一方の半球を組織学的検査のために4%パラホルムアルデヒドで一晩、後固定する。フリーフローティングインキュベーションのために矢状ピラトーム切片(40  $\mu$ m)を作り、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSで染色するまで4で保管する。異なるレベルにある5枚の切片を、チオフラビンSを含む濃い斑があるかどうか染色する。染色および盲検法による定量のために、使用した全ての動物の切片を無作為化する。Sony DXC-9100Pカメラを備えたLeica DMR顕微鏡を用いて画像を取得し、コンピュータとLeica Q-Winソフトウェアを用いて分析する。顕微鏡の光強度およびコンデンサーの設定は、画像取得プロセス全体を通して一定に保つ。研究者の偏見を最小限にするために、取得した全ての画像は同じコンピュータサブルーチンに供する。分析全体を通じて、密度スライス閾値を一律に適用する。チオフラビンS染色においてアミロイド量を自動定量するために、鉤状回の領域を選択する。

30

【0431】

実施例2.14:シングルトランスジェニックhAPPマウスにおける記憶能に及ぼすACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11を用いた受動的ワクチン接種の影響

40

インビボでACI-11-Ab-9抗体およびACI-12-Ab-11抗体が認知機能を改善する、または高める能力を評価するために、性別および年齢が同じ9ヶ月齢シングルhAPPマウスを受動免疫試験に使用する。この免疫期間の終わりに、新たな物体認識タスク(ORT)によって非空間認知を測定する。

【0432】

1群あたり12匹の動物に、400  $\mu$ gのモノクローナル抗体を溶解したPBS 200  $\mu$ lを2回、腹腔内注射する。これに対して、対照としてPBSのみを注射する。2回目の注射の1日後に、新たな物体認識タスク(ORT)<sup>12,13</sup>において認知能力を試験する。ORTのために、登録したマウスを行動アリーナに10分間入れ、新しい未知の物体と対面させる。探索時間を記録する。3時間後に、2回目のセッションのために同じ動物を同じアリーナに戻すが、以前に探

50

索した前の物体と、さらに新しい物体と対面させる。再度、両物体の探索時間を記録し、結果として生じた認知指数を、総探索時間に対する新たな物体の探索時間の比として計算し、対照に対する比例変化として表した。

#### 【0433】

実施例2.15-マウスモノクローナル抗体は、 $A\beta$  1-42ペプチドの低分子量(LMW)単量体より高分子量(HMW)プロトフィブリル(PF)オリゴマー濃縮画分に優先的に結合する

マウス抗アミロイド $\beta$ モノクローナル抗体と、低分子量(LMW)単量体 $A\beta$  1-42ペプチドおよび $A\beta$  1-42ペプチド高分子量プロトフィブリル(PF)オリゴマー濃縮調製物との結合は、ELISAを用いて行うことができる。

#### 【0434】

2種類のSECカラム, Superdex 75 HR 10/30(範囲3~70kDa)およびSuperose 6 HR 10/30(範囲5~5,000kDa)を用いるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を使用して、 $A\beta$  1-42ペプチドの高分子量(HMW)プロトフィブリル(PF)オリゴマー濃縮調製物および低分子量(LMW)単量体調製物からなる $A\beta$  1-42ペプチド画分を調製する。次いで、結果として生じた溶出液を酢酸ウラニルで染色し、溶出した $A\beta$  1-42画分の構造形態を確認するために高分解能透過型電子顕微鏡(TEM)によって100kVで調べる。

#### 【0435】

次いで、2 $\mu$ Mの $A\beta$  1-42画分を高結合アッセイプレートに一晩コーティングすることによって、ELISAを行う。次いで、コーティングされたプレートを1.0%BSAでブロックし、20 $\mu$ g/mlから段階希釈したACI-24-Ab-3(マウスEJ1A9)抗体を添加する。標準抗体(6E10, Chemicon)の段階希釈液も使用する。結合の検出には、アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgG抗体および4-ニトロフェニルホスフェートを使用する。プレートを405nmで測定する。全ての条件を2回繰り返してアッセイし、変動係数(CV)は<0.2である。

#### 【0436】

実施例2.16-ACI-12-Ab-11モノクローナル抗体(クローンFK2A6A6)と、 $A\beta$  1-42ペプチドの単量体濃縮画分およびオリゴマー濃縮画分との結合

後続の抗 $A\beta$ 抗体ACI-12-Ab-11(クローン:FK2A6A6)と、 $A\beta$  1-42ペプチドの単量体およびオリゴマーの結合を評価した。この研究に使用する前に、抗体は-80℃で保管した。 $A\beta$  1-42ペプチド(W.M. Keck Facility, Yale University)は、使用日まで凍結乾燥粉末として保管した。他の全ての材料は、特にことわらない限り、Sigma-Aldrich(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)からのものであった。

#### 【0437】

$A\beta$  1-42ペプチドの単量体およびオリゴマー濃縮が改善された高分子画分を調製するために、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いる改良法を使用した。LMW単量体およびより高い質量のオリゴマー画分が濃縮された $A\beta$  1-42ペプチド画分を調製するために、2種類のSECカラム, Supelco TSK G4000PW-XL(範囲:10~1500kDa; Sigma)およびSuperose 6 HR 10/30(範囲5~5,000kDa; GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Sweden)を使用した。次いで、結果として生じたSEC溶出液を酢酸ウラニルで染色し、 $A\beta$  1-42画分の構造形態を確認するために高分解能透過型電子顕微鏡(TEM)によって100kVで調べた(示さず)。抗体と $A\beta$  1-42画分の結合を調べるために、ELISAを行った。PBSに溶解した2.2 $\mu$ Mの $A\beta$  1-42画分を高結合アッセイプレートに2時間コーティングした。次いで、コーティングされたプレートを、0.05%Tween-20を含むPBSで5回洗浄し、1.0%BSAでブロックした。指示した濃度から段階希釈した抗 $A\beta$ 抗体を、対照抗体(6E10)を含めて添加した。結合の検出には、アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgG抗体(Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England)および4-ニトロフェニルホスフェートを使用した。室温で14時間インキュベートした後、プレートを405nmで測定した。アッセイを3回繰り返した。

#### 【0438】

図16は、3回別々のELISAアッセイから得た平均( $\pm$ SEM)光学密度(O.D.)値を示している。抗体ACI-12-Ab-11と $A\beta$  1-42オリゴマー濃縮調製物の結合は、オリゴマーが濃縮されておらず、主に $A\beta$  1-42単量体からなる画分と比較して優れていた(図16A)。それに対して、

10

20

30

40

50

対照抗体6E10は両A $\beta$  1-42画分に等しく結合した(図16B)。表2.4および2.5は、それぞれ、抗体ACI-12-Ab-11および6E10のELISAアッセイ1、2、および3において得られたO.D.値を示している。

#### 【0439】

これらの結果は、抗体ACI-12-Ab-11(クローン:FK2A6A6)のA $\beta$  1-42オリゴマー濃縮画分に対する結合親和性が単量体A $\beta$  1-42に対する結合親和性より優れていることを示している。

#### 【0440】

#### 実施例3:A $\beta$ <sub>42</sub>-ApoE4結合の阻害

ApoE4とアミロイドの結合、および本発明によるモノクローナル抗体がApoE4とA $\beta$ <sub>42</sub>ペプチドの相互作用を阻害する能力を評価する。

#### 【0441】

ヒト組換えApoE4をPBSを用いて200nMまで希釈し、0.5mlアリコートにして-80℃で保管する。A $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチンペプチド1mgをDMSO 20 $\mu$ lに再懸濁し、次いで、PBS/0.1%BSA/0.1%アジ化ナトリウム1980 $\mu$ lに再懸濁して、0.5mg/mlの最終溶液を得る。ELISAアッセイを用いて、rhApoE4とA $\beta$ <sub>42</sub>の結合を確かめる。rhApoE4(100nM)とA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチン(1 $\mu$ M)を、このタンパク質とペプチド結合させるために37℃で3時間インキュベートする。混合物を、PBST(PBS+0.05%Tween20)で3回予め洗浄したストレプトアビジンコーティングプレートに適用する。室温(RT)で1時間インキュベーションした後に、プレートをPBSTで3回洗浄し、0.1%BSAを含有するPBSを用いて4℃で一晩ブロックする。IgG1マウス抗ヒトApoE抗体をPBSで1:3000に希釈して使用し、室温で2.5時間プレートに適用して、結合ApoE4を検出する。プレートをPBSTで4回洗浄し、次いで、PBSで1:5000に希釈した、検出抗体であるアルカリホスファターゼ(AP)結合抗マウスIgGと室温で1時間インキュベーションする。4xPBSTで最後に洗浄した後に、プレートをAP基質pNPP(ホスファターゼ基質,4-ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム塩六水和物)と5.5時間インキュベーションし、ELISAプレートリーダーを用いて405nmで測定する。図17に実験の概要を示す。

#### 【0442】

rhApoE4(150nM)およびA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチン(1.5 $\mu$ M)の混合物の2倍希釈液を8回作ることによって、ELISAアッセイを開発した。以下の負の対照:(1)rhApoE4のみ;(2)A $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチン;および(3)rhApoE4-A $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチン(マウス抗ApoE4を含まないプロトコール)を添加する。図18は、rhApoE4およびA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチンが存在し、完璧なELISAプロトコールに従った場合にのみ、正のシグナルが得られたことを示している。

#### 【0443】

アッセイにおけるrhApoE4およびA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチンの濃度を最適化するために、rhApoE4希釈液(例えば、150nM)を、一定濃度のA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチン(例えば、正常:1.5 $\mu$ Mまたは過剰:15 $\mu$ M)を用いて試験する。図19は、rhApoE4と複合体化した低濃度のA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチンがプレートに結合するので、過剰なA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチンがELISAアッセイのシグナルを弱めることを示している。この試験に基づいて、rhApoE4の最適濃度を選択した。

#### 【0444】

アッセイにおけるA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチンの濃度を、100nMという一定濃度のrhApoE4を用いて最適化する。A $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチン希釈液(例えば、出発濃度1.5 $\mu$ M(例えば、1500nMというさらに低い濃度に希釈する))をELISA装置において試験する。図20に示した結果に基づいて、rhApoE4とA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチンの結合に及ぼすモノクローナル抗体の影響を確かめるために、1 $\mu$ Mという最適濃度のA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチンを選択する。

#### 【0445】

プレートの前に結合混合物に本発明の抗体をさらに含めた以外は前記のELISAアッセイを用いて、rhApoE4とA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチンの結合に及ぼす本発明の抗体の1つまたは複数の影響を評価する。例えば、抗体の2倍希釈液を、50 $\mu$ g/mLの濃度から初めて使用してもよい。抗体を含めるのは、ApoE4およびA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチンが最初に組み合わされた時でもよく、ApoE4およびA $\beta$ <sub>42</sub>-ビオチンが最初に組み合わされた後(例えば、数時間後)でもよい。

。前者の場合は、本発明の抗体がApoE4とA $\beta_{42}$ -ビオチンの相互作用を阻止または阻害する能力を評価するのに対して、後者の場合では、本発明の抗体がApoE4とA $\beta_{42}$ -ビオチンの既存の複合体を破壊する能力を評価する。

#### 【 0 4 4 6 】

(表1.1) 抗体、および抗体の作製に使用した抗原性構築物

| マウス mAb     | クローン  | イソタイプ | 抗原／配列            | リンカー | アンカー | アジュバント |
|-------------|-------|-------|------------------|------|------|--------|
| mACI-24-Ab3 | EJ1A9 | IgG1  | A $\beta_{1-15}$ | -    | Palm | リピドA   |

#### 【 0 4 4 7 】

(表1.2) A $\beta$  ペプチドとACI-24-Ab-3との結合

10

結果は、バックグラウンドを差し引いた後のO.D.で表した。

| ペプチド               | 抗体          |       |
|--------------------|-------------|-------|
|                    | ACI-24-Ab-3 |       |
| 1-28 <sup>1</sup>  | 平均          | 0.13  |
|                    | SD          | 0.08  |
|                    | SEM         | 0.06  |
| 17-40 <sup>1</sup> | 平均          | -0.23 |
|                    | SD          | 0.07  |
|                    | SEM         | 0.05  |
| 1-40 <sup>1</sup>  | 平均          | 0.90  |
|                    | SD          | 0.22  |
|                    | SEM         | 0.16  |
| 1-42A <sup>1</sup> | 平均          | 0.31  |
|                    | SD          | 0.35  |
|                    | SEM         | 0.24  |
| 1-42B <sup>2</sup> | 平均          | 0.27  |
|                    | SD          | 0.07  |
|                    | SEM         | 0.05  |

20

<sup>1</sup>Anaspecからのペプチド

<sup>2</sup>Bachemからのペプチド

#### 【 0 4 4 8 】

(表1.3) ACI-24-Ab-3とA $\beta$  1-42の33個の重複ペプチドとの結合

ELISAで分析した。

30

| ペプチド   | 抗体          |    |
|--------|-------------|----|
|        | ACI-24-Ab-3 |    |
| 1      | 0.32        |    |
| 2      | 0.26        |    |
| 3      | 0.37        |    |
| 4      | 0.36        |    |
| 5      | 0.32        |    |
| 6      | 0.34        |    |
| 7      | 0.30        |    |
| 8      | 0.21        | 10 |
| 9      | 0.19        |    |
| 10     | 0.20        |    |
| 11     | 0.23        |    |
| 12     | 0.34        |    |
| 13     | 0.23        |    |
| 14     | 0.30        |    |
| 15     | 0.32        |    |
| 16     | 0.34        |    |
| 17     | 0.31        |    |
| 18     | 0.30        |    |
| 19     | 0.30        |    |
| 20     | 0.22        | 20 |
| 21     | 0.21        |    |
| 22     | 0.21        |    |
| 23     | 0.20        |    |
| 24     | 0.18        |    |
| 25     | 0.23        |    |
| 26     | 0.25        |    |
| 27     | 0.26        |    |
| 28     | 0.26        |    |
| 29     | 0.27        |    |
| 30     | 0.29        |    |
| 31     | 0.31        |    |
| 32     | 0.31        | 30 |
| 33     | 0.26        |    |
| Aβ1-42 | 0.36        |    |
| Aβ1-42 | 0.36        |    |
| Aβ1-42 | 0.35        |    |

【 0 4 4 9 】

(表1.4)ACI-24-Ab-3(マウスEJ1A9)抗体とAβ1-42ペプチドの高分子量(HMW)プロトフィブリル調製物およびLMW単量体調製物との結合

| ACI-24-Ab-3<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | A $\beta$ 1-42 調製物 |                   | O. D. 差 |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------|---------|
|                                     | プロトフィブリル<br>(O.D.) | 低分子量単量体<br>(O.D.) |         |
| 20                                  | 3.765              | 1.946             | 1.82    |
| 10                                  | 2.546              | 0.836             | 1.71    |
| 5                                   | 1.629              | 0.619             | 1.01    |
| 2.5                                 | 1.101              | 0.331             | 0.77    |
| 1.25                                | 0.642              | 0.295             | 0.35    |
| 0.6250                              | 0.457              | 0.177             | 0.28    |
| 0.3125                              | 0.253              | 0.143             | 0.11    |
| 0.1563                              | 0.167              | 0.115             | 0.05    |

## 【 0 4 5 0 】

(表1.5)6E10対照抗体とA $\beta$  1-42ペプチドの高分子量(HMW)プロトフィブリル調製物およびLMW単量体調製物との結合

| 6E10<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | A $\beta$ 1-42 調製物 |                   | O. D. 差 |
|------------------------------|--------------------|-------------------|---------|
|                              | プロトフィブリル<br>(O.D.) | 低分子量単量体<br>(O.D.) |         |
| 1                            | 2.550              | 2.677             | 0.13    |
| 0.5                          | 1.998              | 2.126             | 0.13    |
| 0.25                         | 1.442              | 1.563             | 0.12    |
| 0.125                        | 0.863              | 0.999             | 0.14    |
| 0.0625                       | 0.544              | 0.574             | 0.03    |
| 0.0313                       | 0.286              | 0.329             | 0.04    |
| 0.0156                       | 0.201              | 0.207             | 0.01    |
| 0.0078                       | 0.116              | 0.133             | 0.02    |

## 【 0 4 5 1 】

(表1.6)ACI-24-Ab-3(マウスEJ1A9)抗体とA $\beta$  1-42ペプチドのオリゴマー濃縮調製物および単量体濃縮調製物との結合

| 抗体<br>希釈 <sup>b</sup> | 単量体 (O.D.) |       |       |      |      | オリゴマー(O.D.) |       |       |      |      |
|-----------------------|------------|-------|-------|------|------|-------------|-------|-------|------|------|
|                       | アッセイ1      | アッセイ2 | アッセイ3 | 平均   | SEM  | アッセイ1       | アッセイ2 | アッセイ3 | 平均   | SEM  |
| 1:1                   | 2.03       | 0.95  | 1.82  | 1.60 | 0.33 | 2.74        | 3.65  | 3.13  | 3.17 | 0.26 |
| 1:2                   | 1.17       | 0.57  | 1.16  | 0.97 | 0.20 | 1.84        | 3.26  | 2.25  | 2.45 | 0.42 |
| 1:4                   | 0.83       | 0.37  | 0.86  | 0.69 | 0.16 | 1.16        | 2.62  | 1.57  | 1.79 | 0.43 |
| 1:8                   | 0.55       | 0.24  | 0.56  | 0.45 | 0.10 | 0.84        | 1.87  | 1.10  | 1.27 | 0.31 |
| 1:16                  | 0.39       | 0.15  | 0.34  | 0.29 | 0.07 | 0.59        | 1.22  | 0.69  | 0.83 | 0.20 |
| 1:32                  | 0.28       | 0.10  | 0.23  | 0.20 | 0.05 | 0.31        | 0.73  | 0.42  | 0.49 | 0.13 |
| 1:64                  | 0.22       | 0.10  | 0.18  | 0.17 | 0.04 | 0.27        | 0.41  | 0.32  | 0.33 | 0.04 |
| 1:128                 | 0.18       | 0.10  | 0.18  | 0.15 | 0.03 | 0.21        | 0.24  | 0.28  | 0.24 | 0.02 |

<sup>a</sup>O.D.: 405nmでの光学密度

<sup>b</sup>ACI-24-Ab-3(クローン:EJ1A9)の出発希釈は30  $\mu\text{g/ml}$ であった

## 【 0 4 5 2 】

(表1.7)6E10対照抗体とA $\beta$  1-42ペプチドのオリゴマー濃縮調製物および単量体濃縮調製物との結合

| 抗体<br>希釈 <sup>b</sup> | 単量体 (O.D.) |       |       |      |      | オリゴマー (O.D.) |       |       |      |      |
|-----------------------|------------|-------|-------|------|------|--------------|-------|-------|------|------|
|                       | アッセイ1      | アッセイ2 | アッセイ3 | 平均   | SEM  | アッセイ1        | アッセイ2 | アッセイ3 | 平均   | SEM  |
| 1:1                   | 3.67       | 3.77  | 4.04  | 3.83 | 0.11 | 3.36         | 3.67  | 3.89  | 3.64 | 0.15 |
| 1:2                   | 3.30       | 3.48  | 4.00  | 3.59 | 0.21 | 3.39         | 3.55  | 3.83  | 3.59 | 0.13 |
| 1:4                   | 3.00       | 3.29  | 3.52  | 3.27 | 0.15 | 3.10         | 3.37  | 3.64  | 3.37 | 0.16 |
| 1:8                   | 2.67       | 3.00  | 2.80  | 2.82 | 0.10 | 2.73         | 2.99  | 3.23  | 2.98 | 0.15 |
| 1:16                  | 1.78       | 1.94  | 2.23  | 1.98 | 0.13 | 1.78         | 1.92  | 2.07  | 1.92 | 0.08 |
| 1:32                  | 1.18       | 1.34  | 1.54  | 1.36 | 0.10 | 1.27         | 1.30  | 1.40  | 1.32 | 0.04 |
| 1:64                  | 0.81       | 0.94  | 1.08  | 0.94 | 0.08 | 0.93         | 0.88  | 0.95  | 0.92 | 0.02 |
| 1:128                 | 0.64       | 0.75  | 0.86  | 0.75 | 0.06 | 0.62         | 0.61  | 0.66  | 0.63 | 0.02 |

<sup>a</sup>O.D.: 405nmでの光学密度

<sup>b</sup>6E10の出発希釈は0.5  $\mu$ g/mlであった

【 0 4 5 3 】

(表2.1)抗体および抗体の作製に使用した抗原性構築物

| マウス mAb      | クローン    | 抗原/<br>配列                  | リンカー | アンカー | アジュバント |
|--------------|---------|----------------------------|------|------|--------|
| ACI-11-Ab-9  | FG1F9E4 | A $\beta$ <sub>22-35</sub> | PEG  | DSPE | リポドA   |
| ACI-12-Ab-11 | FK2A6A6 | A $\beta$ <sub>29-40</sub> | PEG  | DSPE | リポドA   |

【 0 4 5 4 】

(表2.2)A $\beta$  ペプチドとACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11との結合

結果は、バックグラウンドを差し引いた後のO.D.で表した。

| ペプチド               | 抗体          |              |
|--------------------|-------------|--------------|
|                    | ACI-11-Ab-9 | ACI-12-Ab-11 |
| 1-28 <sup>1</sup>  | 平均          | 0.53         |
|                    | SD          | 0.06         |
|                    | SEM         | 0.04         |
| 17-40 <sup>1</sup> | 平均          | 0.02         |
|                    | SD          | 0.04         |
|                    | SEM         | 0.03         |
| 1-40 <sup>1</sup>  | 平均          | 1.02         |
|                    | SD          | 0.39         |
|                    | SEM         | 0.27         |
| 1-42A <sup>1</sup> | 平均          | 0.78         |
|                    | SD          | 0.12         |
|                    | SEM         | 0.08         |
| 1-42B <sup>2</sup> | 平均          | 1.54         |
|                    | SD          | 0.38         |
|                    | SEM         | 0.27         |

<sup>1</sup>Anaspecからのペプチド

<sup>2</sup>Bachemからのペプチド

【 0 4 5 5 】

(表2.3)ACI-11-Ab-9およびACI-12-Ab-11とA $\beta$  1-42の33個の重複ペプチドとの結合

ELISAで分析した。

| ペプチド           | 抗体          | 抗体           |    |
|----------------|-------------|--------------|----|
|                | ACI-11-Ab-9 | ACI-12-Ab-11 |    |
| 1              | 0.10        | 0.10         | 10 |
| 2              | 0.10        | 0.10         |    |
| 3              | 0.12        | 0.11         |    |
| 4              | 0.11        | 0.10         |    |
| 5              | 0.11        | 0.10         |    |
| 6              | 0.11        | 0.10         |    |
| 7              | 0.11        | 0.10         |    |
| 8              | 0.11        | 0.10         |    |
| 9              | 0.11        | 0.10         |    |
| 10             | 0.13        | 0.10         |    |
| 11             | 0.11        | 0.11         | 20 |
| 12             | 0.24        | 0.21         |    |
| 13             | 0.17        | 0.15         |    |
| 14             | 0.16        | 0.12         |    |
| 15             | 0.14        | 0.10         |    |
| 16             | 0.14        | 0.14         |    |
| 17             | 0.13        | 0.12         |    |
| 18             | 0.11        | 0.10         |    |
| 19             | 0.10        | 0.10         |    |
| 20             | 0.10        | 0.10         |    |
| 21             | 0.10        | 0.09         | 30 |
| 22             | 0.10        | 0.10         |    |
| 23             | 0.11        | 0.10         |    |
| 24             | 0.10        | 0.10         |    |
| 25             | 0.11        | 0.11         |    |
| 26             | 0.12        | 0.12         |    |
| 27             | 0.13        | 0.12         |    |
| 28             | 0.12        | 0.11         |    |
| 29             | 0.20        | 0.11         |    |
| 30             | 0.11        | 0.11         |    |
| 31             | 0.12        | 0.11         |    |
| 32             | 0.12        | 0.11         |    |
| 33             | 0.11        | 0.11         |    |
| A $\beta$ 1-42 | 0.80        | 0.69         |    |
| A $\beta$ 1-42 | 0.81        | 0.69         |    |
| A $\beta$ 1-42 | 0.80        | 0.69         |    |

【 0 4 5 6 】

(表2.4)ACI-12-Ab-11(クローン:FK2A6A6)とA $\beta$ 1-42ペプチドの単量体濃縮調製物およびオリゴマー濃縮調製物との結合

| 抗体希釈 <sup>b</sup> | 単量体 (O.D.) |       |       |      |      | オリゴマー (O.D.) |       |       |      |      |
|-------------------|------------|-------|-------|------|------|--------------|-------|-------|------|------|
|                   | アッセイ1      | アッセイ2 | アッセイ3 | 平均   | SEM  | アッセイ1        | アッセイ2 | アッセイ3 | 平均   | SEM  |
| 1:1               | 1.60       | 1.04  | 1.37  | 1.34 | 0.16 | 2.24         | 1.85  | 2.27  | 2.12 | 0.14 |
| 1:2               | 0.85       | 0.51  | 0.75  | 0.70 | 0.10 | 1.33         | 1.04  | 1.32  | 1.23 | 0.10 |
| 1:4               | 0.53       | 0.30  | 0.45  | 0.43 | 0.07 | 0.70         | 0.64  | 0.80  | 0.71 | 0.05 |
| 1:8               | 0.29       | 0.18  | 0.25  | 0.24 | 0.03 | 0.44         | 0.42  | 0.47  | 0.44 | 0.02 |
| 1:16              | 0.25       | 0.12  | 0.18  | 0.18 | 0.04 | 0.30         | 0.25  | 0.28  | 0.28 | 0.01 |
| 1:32              | 0.19       | 0.10  | 0.14  | 0.14 | 0.03 | 0.20         | 0.16  | 0.20  | 0.18 | 0.01 |
| 1:64              | 0.15       | 0.09  | 0.13  | 0.12 | 0.02 | 0.19         | 0.14  | 0.16  | 0.16 | 0.01 |
| 1:128             | 0.14       | 0.09  | 0.12  | 0.12 | 0.02 | 0.16         | 0.14  | 0.15  | 0.15 | 0.01 |

<sup>a</sup>O.D.: 405nmでの光学密度

<sup>b</sup>ACI-12-Ab-12(クローン:FK2A6A6)の出発希釈は40 µg/mlであった。

【 0 4 5 7 】

(表2.5)6E10対照抗体とAβ1-42ペプチドの単量体濃縮調製物およびオリゴマー濃縮調製物との結合

| 抗体希釈 <sup>b</sup> | 単量体 (O.D.) |       |       |      |      | オリゴマー (O.D.) |       |       |      |      |
|-------------------|------------|-------|-------|------|------|--------------|-------|-------|------|------|
|                   | アッセイ1      | アッセイ2 | アッセイ3 | 平均   | SEM  | アッセイ1        | アッセイ2 | アッセイ3 | 平均   | SEM  |
| 1:1               | 3.67       | 3.77  | 4.04  | 3.83 | 0.11 | 3.36         | 3.67  | 3.89  | 3.64 | 0.15 |
| 1:2               | 3.30       | 3.48  | 4.00  | 3.59 | 0.21 | 3.39         | 3.55  | 3.83  | 3.59 | 0.13 |
| 1:4               | 3.00       | 3.29  | 3.52  | 3.27 | 0.15 | 3.10         | 3.37  | 3.64  | 3.37 | 0.16 |
| 1:8               | 2.67       | 3.00  | 2.80  | 2.82 | 0.10 | 2.73         | 2.99  | 3.23  | 2.98 | 0.15 |
| 1:16              | 1.78       | 1.94  | 2.23  | 1.98 | 0.13 | 1.78         | 1.92  | 2.07  | 1.92 | 0.08 |
| 1:32              | 1.18       | 1.34  | 1.54  | 1.36 | 0.10 | 1.27         | 1.30  | 1.40  | 1.32 | 0.04 |
| 1:64              | 0.81       | 0.94  | 1.08  | 0.94 | 0.08 | 0.93         | 0.88  | 0.95  | 0.92 | 0.02 |
| 1:128             | 0.64       | 0.75  | 0.86  | 0.75 | 0.06 | 0.62         | 0.61  | 0.66  | 0.63 | 0.02 |

<sup>a</sup>O.D.: 405nmでの光学密度

<sup>b</sup>6E10の出発希釈は0.5 µg/mlであった。

【 0 4 5 8 】

寄託:

以下のハイブリドーマ細胞株を、ブタベスト条約の条項により、Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 BraunschweigにあるDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ)に寄託した。

| ハイブリドーマ系呼称 | 抗体呼称         | 寄託日付       | アクセッション番号   |
|------------|--------------|------------|-------------|
| EJ1A9      | ACI-24-Ab-3  | 2007年5月25日 | DSM ACC2844 |
| FG1F9E4    | ACI-11-Ab-9  | 2007年5月25日 | DSM ACC2845 |
| FK2A6A6    | ACI-12-Ab-11 | 2007年5月25日 | DSM ACC2846 |

【 0 4 5 9 】

参考文献

10

20

30

40

Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. (2000). *Nature Med.* 6, 916-919.

Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95:834-847. 10

Baschong W, Wrigley NG (1990) Small colloidal gold conjugated to Fab fragments or to immunoglobulin G as high-resolution labels for electron microscopy: a technical overview. *J Electron Microsc Tech* 14:313-323.

Blond and Goldberg, 1987, PNAS March 1, 1987 Vol. 84 | no. 5 | 1147-1151

Cornilescu G, Delaglio F, Bax A. (1999) *J.Biomol.NMR*; 13: 289-302.

Burdick,D. *et al.* Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* 267, 546-554 (1992). 20

DeMattos, Bales, KR, Cummins, DJ, Dodart, JC, Paul, SM, Holtzman, D.M (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8850-8855.

Dewachter I, Van DJ, Smeijers L, Gilis M, Kuiperi C, Laenen I, Caluwaerts N, Moechars D, Checler F, Vanderstichele H, Van LF (2000) Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1. *J Neurosci* 20:6452-6458.

Dewachter I, Reverse D, Caluwaerts N, Ris L, Kuiperi C, Van den HC, Spittaels K, Umans L, Semeels L, Thiry E, Moechars D, Mercken M, Godaux E, Van Leuven F (2002) Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. *J Neurosci* 22:3445-3453. 30

Glenner and Wong, *Biochem Biophys Res Comm* 129, 885-890 (1984)

Harlow and Lane (Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988))

Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van LF (2005) Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2:22. 40

- Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)
- Iwadata M, Asakura T, Williamson MP. (1999) *J.Biomol.NMR*; 13: 199-211.
- Kirschner,D.A., Abraham,C., & Selkoe,D.J. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 503-507 (1986).
- Khaw, B. A. et al. *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982)
- Kennedy, J. H., et al.,1976 (*Clin. Chim. Acta* 70:1-31)
- Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352. 10
- Kohler and Milstein (*Nature* 256: 495-497 (1975))
- LeVine, H. III, (2002). *Arch Biochem Biophys* 404, 106-115.
- Luca et al., 2001
- McGeer et al., 1994
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van LF (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274:6483-6492. 20
- Nelson,R. & Eisenberg,D. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.*(2006).
- Nicolau, C., Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E., and Hopkins, R. J. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2332-2337.
- Queen et al., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989)
- Pearson W.R. (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98 30
- Petkova AT, Buntkowsky G, Dyda F, Leapman RD, Yau WM, Tycko R. *J.Mol.Biol.* 2004; 335: 247-260.
- Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R. (2002) *Proc.Nat..Acad.Sci.U.S.A*; 99: 16742-16747.
- Rousseaux et al. *Methods Enzymology*, 121:663-69, Academic Press, 1986
- Rzepecki, P., Nagel-Steger, L., Feuerstein, S., Linne, U., Molt, O., Zadmard, R., Aschermann, K., Wehner, M., Schrader,T. and Riesner, D. (2004). *J Biol Chem* 279, 47497-47505. 40
- Sambrook et al. *Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Smith, S. O., and Bormann, B. J. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 488-491.

Schenk et al., 1999

Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40

Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2000, 924:17-25.

Slot JW, Geuze HJ (1985) A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. Eur J Cell Biol 38:87-93.

Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489

Van dA, I, Wera S, Van LF, Henderson ST (2005) A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease. Nutr Metab (Lond) 2:28.

Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259 – 270

Ye, J., Dave, U. P., Grishin, N. V., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2000). Proc Natl Acad Sci U S A 97, 5123-5128.

Zrein et al. (1998), Cinincal and Diagnostic Laboratory Immunology, 5(1): 45-49.

Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256

WO 2004/058258

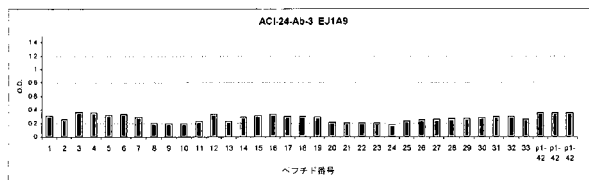
WO96/1359

WO96/29605

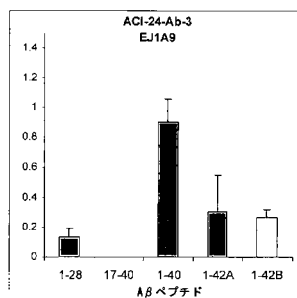
10

20

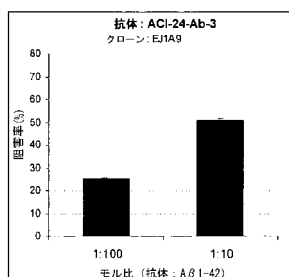
【図 1】



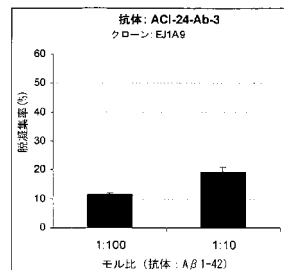
【図 2】



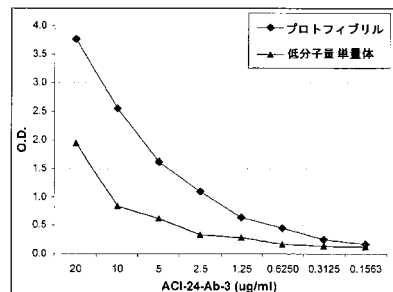
【図 3】



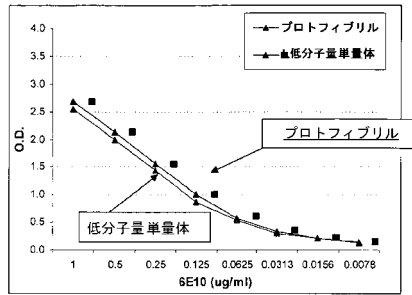
【図 4】



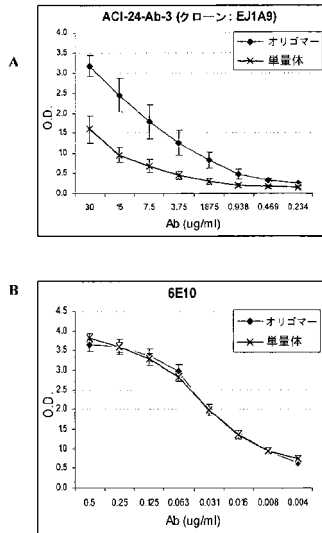
【図 5】



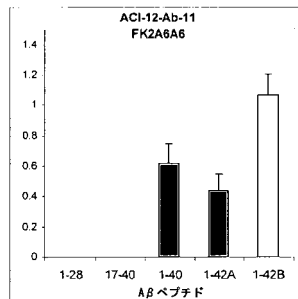
【図 6】



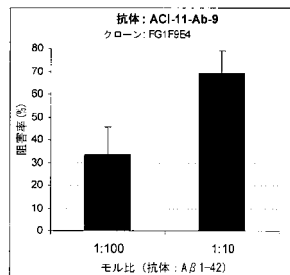
【図 7】



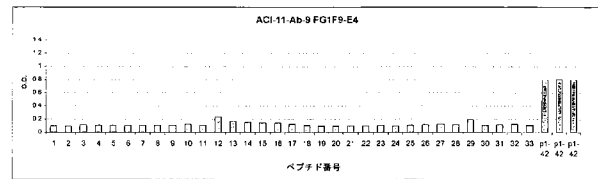
【図 11】



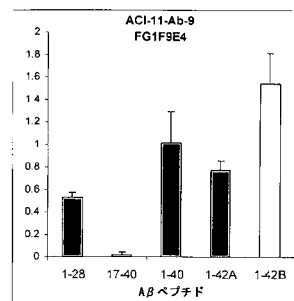
【図 12】



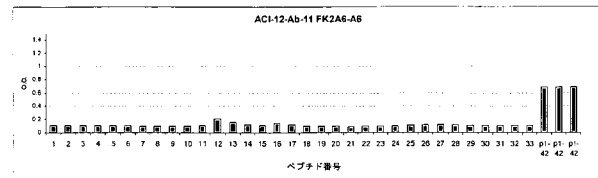
【図 8】



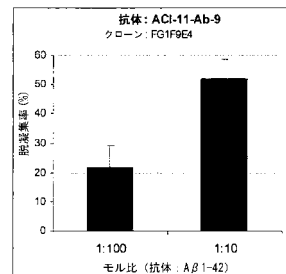
【図 9】



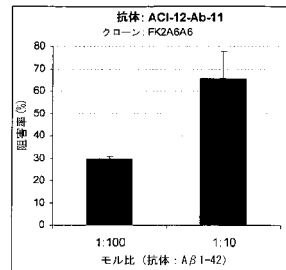
【図 10】



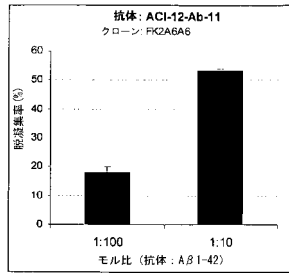
【図 13】



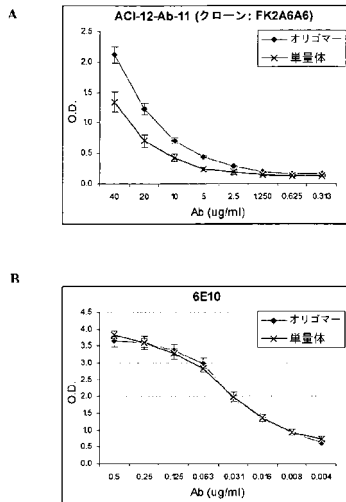
【図 14】



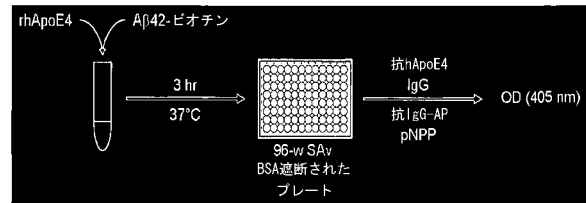
【図 15】



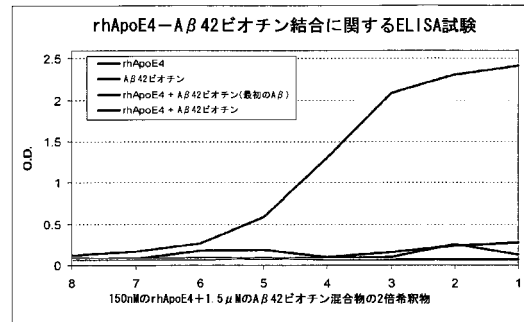
【図 16】



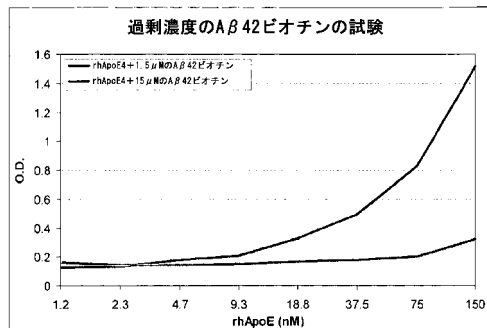
【図 17】



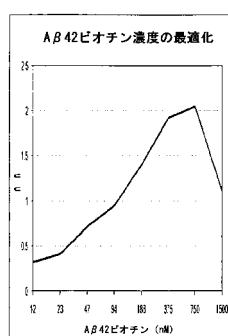
【図 18】



【図 19】



【図 20】



【配列表】

0005436414000001.app

0005436414000002.xml

## フロントページの続き

|               |           |               |   |
|---------------|-----------|---------------|---|
| (51)Int.Cl.   |           | F I           |   |
| A 6 1 P 25/28 | (2006.01) | A 6 1 P 25/28 |   |
| A 6 1 P 25/16 | (2006.01) | A 6 1 P 25/16 |   |
| A 6 1 P 25/00 | (2006.01) | A 6 1 P 25/00 |   |
| A 6 1 P 31/18 | (2006.01) | A 6 1 P 31/18 |   |
| A 6 1 P 21/04 | (2006.01) | A 6 1 P 21/04 |   |
| A 6 1 P 3/10  | (2006.01) | A 6 1 P 3/10  |   |
| A 6 1 P 21/00 | (2006.01) | A 6 1 P 21/00 |   |
| A 6 1 P 35/00 | (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |   |
| A 6 1 P 27/02 | (2006.01) | A 6 1 P 27/02 |   |
| G 0 1 N 33/53 | (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | D |

(31)優先権主張番号 60/943,790

(32)優先日 平成19年6月13日(2007.6.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2844

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2845

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2846

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 フェイファー アンドレア

スイス連邦共和国 サン - レジエール ルート デ フェニル 16エー

(72)発明者 ピールグレン マリア

スイス連邦共和国 サン シュルピス ルー デュ セントレ 42エー

(72)発明者 ムース アンドレアス

スイス連邦共和国 ピュリー アベニュー デ スリジエ 39ビー

(72)発明者 ワッツ ライアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン マテオ エール ドライブ 524

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第2005/081872(WO,A1)

PNAS,Vol.104,No.23(Jun.5 2007)p.9810-9815

BBRC,Vol.344(2006)p.79-86

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 16/00 - 16/46

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

|                |                                                                                                                                                                                |         |            |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 单克隆抗 $\beta$ 淀粉样蛋白抗体                                                                                                                                                           |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP5436414B2</a>                                                                                                                                                    | 公开(公告)日 | 2014-03-05 |
| 申请号            | JP2010512181                                                                                                                                                                   | 申请日     | 2008-06-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | AC免疫有限公司<br>健泰科生物技术公司                                                                                                                                                          |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 应用细胞免疫兴业ANONYME<br>Genentech公司                                                                                                                                                 |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 应用细胞免疫兴业ANONYME<br>Genentech公司                                                                                                                                                 |         |            |
| [标]发明人         | フェイスファーアンドレア<br>ピールグレンマリア<br>ムースアンドレアス<br>ワッツライアン                                                                                                                              |         |            |
| 发明人            | フェイスファー アンドレア<br>ピールグレン マリア<br>ムース アンドレアス<br>ワッツ ライアン                                                                                                                          |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 C07K16/18 C12P21/08 C12N5/10 A61K39/395 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/00 A61P31/18 A61P21/04 A61P3/10 A61P21/00 A61P35/00 A61P27/02 G01N33/53                           |         |            |
| CPC分类号         | A61K2039/505 A61K2039/6018 A61K2039/6093 A61P3/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/28 A61P27/02 A61P31/18 A61P35/00 C07K16/18 C07K2317/56 C07K2317/565 |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNAA C07K16/18 C12P21/08 C12N5/00.102 A61K39/395.N A61P25/28 A61P25/16 A61P25/00 A61P31/18 A61P21/04 A61P3/10 A61P21/00 A61P35/00 A61P27/02 G01N33/53.D              |         |            |
| 代理人(译)         | 清水初衷<br>井上隆一<br>佐藤俊光<br>小林智彦<br>渡边真一<br>正人大关                                                                                                                                   |         |            |
| 审查员(译)         | 三原贤治                                                                                                                                                                           |         |            |
| 优先权            | 60/943543 2007-06-12 US<br>60/943541 2007-06-12 US<br>60/943790 2007-06-13 US                                                                                                  |         |            |
| 其他公开文献         | JP2010530227A<br>JP2010530227A5                                                                                                                                                |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                      |         |            |

#### 摘要(译)

本申请涉及用于治疗 and 诊断用于治疗由淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白引起的或与之相关的疾病和病症的方法和组合物，包括淀粉样变性，一组与淀粉样蛋白相关的病症和异常，例如阿尔茨海默氏病。本申请提供了包含高度特异性和高效抗体的新方法和组合物，所述抗体具有特异性识别和结合来自一系列 $\beta$ -淀粉样蛋白的特定表位的能力。通过本申请的教导实现的抗体特别可用于治疗由淀粉样蛋白或类淀粉样蛋白引起的或与之相关的疾病和病症，包括淀粉样变性，一组与淀粉样蛋白斑形成相关的疾病和病症，包括

继发性淀粉样变性。和年龄相关的淀粉样变性病包括但不限于阿尔茨海默氏病 ( AD ) 等神经系统疾病。

【 0 4 4 7 】  
( 表 1. 2 ) Aβ ペプチドと ACI - 24- Ab- 3 .  
結果は、バックグラウンドを差し

| ペプチド               | 抗体          |       |
|--------------------|-------------|-------|
|                    | ACI-24-Ab-3 |       |
| 1-28 <sup>1</sup>  | 平均          | 0.13  |
|                    | SD          | 0.08  |
|                    | SEM         | 0.06  |
| 17-40 <sup>1</sup> | 平均          | -0.23 |
|                    | SD          | 0.07  |
|                    | SEM         | 0.05  |
| 1-40 <sup>1</sup>  | 平均          | 0.90  |
|                    | SD          | 0.22  |
|                    | SEM         | 0.16  |
| 1-42A <sup>1</sup> | 平均          | 0.31  |
|                    | SD          | 0.35  |
|                    | SEM         | 0.24  |
| 1-42B <sup>2</sup> | 平均          | 0.27  |
|                    | SD          | 0.07  |
|                    | SEM         | 0.05  |

<sup>1</sup> Anaspecからのペプチド  
<sup>2</sup> Bachemからのペプチド  
【 0 4 4 8 】  
( 表 1. 3 ) ACI - 24- Ab- 3 と Aβ 1 - 42 の 331  
ELISAで分析した。