

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-176380

(P2014-176380A)

(43) 公開日 平成26年9月25日(2014.9.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
審査請求 有 請求項の数 28 O L (全 93 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-46116 (P2014-46116)	(71) 出願人	506027491
(22) 出願日	平成26年3月10日 (2014.3.10)		エーシー イミューン ソシエテ アノニ ム
(62) 分割の表示	特願2010-512182 (P2010-512182) の分割		スイス連邦共和国 ローザンヌ イーピー エフエル イノベーション パーク ビル ディング ビー
原出願日	平成20年6月12日 (2008.6.12)	(71) 出願人	509012625
(31) 優先権主張番号	60/943, 509		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(32) 優先日	平成19年6月12日 (2007.6.12)		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
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(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】 アミロイドβに対するヒト化抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】アルツハイマー病などのアミロイドタンパク質と関連する一群の障害および異常である、アミロイドーシスの診断および処置のための方法および組成物を提供する。

【解決手段】β-アミロイドタンパク質上の少なくとも1つのエピトープに対して特異的に結合するキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片であって、該キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片が変種Fc領域を含み、かつ該変種Fc領域が、この分子が野生型Fc領域より改変されたエフェクター機能を有するように、野生型Fc領域に対して少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

β-アミロイドタンパク質上の少なくとも1つのエピトープに対して特異的に結合するキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片であって、
該エピトープが、抗体に対する結合に主に関係する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、該少なくとも2つの連続するアミノ酸残基が、

(a) 以下のコア配列 (SEQ ID NO:10) 内に埋め込まれた-Lys-Leu-：

Xaa1 - Xaa2 - Lys - Leu - Xaa3

式中、

Xaa1はHis、Asn、Gln、Lys、およびArgからなる群より選択されるアミノ酸であり、

Xaa2はAsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸であり、かつ

Xaa3は、Ala、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸である；ならびに

(b) 以下のコア配列 (SEQ ID NO: 9) 内に埋め込まれた-Phe-Phe-：

Xaa3 - Phe - Phe - Xaa4 - Xaa5 - Xaa6

式中、

Xaa3はAla、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、

Xaa4はAla、Val、Leu、Ser、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり

、

Xaa5は、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、かつ

Xaa6は、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基である、

からなる群より選択され、

該キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片が変種Fc領域を含み、
かつ該変種Fc領域が、この分子が野生型Fc領域より改変されたエフェクター機能を有する
ように、野生型Fc領域に対して少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、
キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項2】

β-アミロイドタンパク質上の少なくとも2つのエピトープに特異的に結合するキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片であって、

該少なくとも2つのエピトープが、抗体の結合に主に関係する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基であるそれぞれ-Phe-Phe-および-Lys-Leu-を各々含み、かつ少なくとも2つの別個の結合部位がそれぞれ、SEQ ID NO:7において示されるアミノ酸配列Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp -およびSEQ ID NO:8において示されるアミノ酸配列His - Gln - Lys - Leu - Val -を示す、

請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項3】

可変領域において非ヒト起源の少なくとも1つのCDR、1つまたは複数のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域、および任意でヒトまたは霊長類起源の抗体に由来する定常領域を含む、ヒト化抗体またはその断片であって、

以下のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:11) を含むエピトープにおいて、β-アミロイドタンパク質、β-アミロイド単量体ペプチド、複数のβ-アミロイド単量体単位を含む多量体可溶性アミロイドペプチド、β-アミロイド線維、原線維、もしくは細線維、および単離されたまたはβ-アミロイド斑の一部としてのβ-アミロイド多量体ペプチドに特異的に結合することができる、

ヒト化抗体もしくはその断片：

Xaa1 - Xaa2 - Lys - Leu - Xaa3 - Phe - Phe- Xaa4 - Xaa5 - Xaa6；

式中、

Xaa1は、His、Asn、Glnからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にHisであり；

Xaa2は、AsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にGlnであり；

Xaa3は、Val、Leu、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にValであり；

Xaa4は、AlaおよびValからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にAlaであり；

Xaa5は、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にGluであり；ならびに

Xaa6は、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にAspである。

【請求項4】

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域と、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO:1、CDR2を表すSEQ ID NO:2、およびCDR3を表すSEQ ID NO:3、ならびに軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO:4、CDR2を表すSEQ ID NO:5、およびCDR3を表すSEQ ID NO:6からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのCDRとを有する可変領域を含む、請求項1記載のヒト化抗体またはその断片。 10

【請求項5】

SEQ ID NO:1～6において示される軽鎖および重鎖CDR領域のアミノ酸の少なくとも1つが、抗体がその完全な機能性を維持するように、保存的置換を通して変化している、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項6】

SEQ ID NO:5において示される軽鎖可変領域（LCVR）のCDR2のアミノ酸配列内で、Kabat 50位のLysがArg、Gln、またはGlu、特にArgに交換され、Kabat 53位のSerがAsnまたはThr、特にAsnに交換され、および／またはKabat 53位のAsnがAla、Val、Leu、Ser、およびIle、とりわけSerに交換されている、請求項5記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。 20

【請求項7】

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域のアミノ酸の少なくとも1つが、マウス抗体ACI-01-Ab7C2の対応する領域由来のアミノ酸への置換またはそれへの保存的置換を通して変化している、請求項1記載のヒト化抗体またはその断片。

【請求項8】

SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域におけるKabat 47位のTrpが、Leu、ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、およびPheからなる群より選択されるアミノ酸、特にLeuおよびIle、とりわけLeuに交換され、かつ／または 30

SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域におけるKabat 94位のArgが、SerおよびThrからなる群より選択されるアミノ酸、特にSerに交換され、かつ／または

SEQ ID NO:12において示される軽鎖可変領域のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域におけるKabat 87位のTyrがPhe、Leu、Val、Ile、およびAlaからなる群より選択されるアミノ酸、特にLeuおよびPhe、とりわけPheに交換されている、
請求項162記載のヒト化抗体またはその断片。

【請求項9】

重鎖可変領域（HCVR）が、SEQ ID NO:15および16においてそれぞれ記載される配列と90％、詳細には95％、より詳細には98％、さらにより詳細には100％同一であるアミノ酸配列を有する、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。 40

【請求項10】

軽鎖可変領域（LCVR）が、SEQ ID NO:12および13においてそれぞれ記載される配列と90％、詳細には95％、より詳細には98％、さらにより詳細には100％同一であるアミノ酸配列を有する、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項11】

重鎖可変領域（HCVR）のCDR領域の少なくとも2つ、特に3つが、SEQ ID NO:1～3におい 50

て記載される対応するCDR領域と90%、詳細には95%、より詳細には98%、さらにより詳細には100%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項1記載のヒト化抗体またはその断片。

【請求項12】

軽鎖可変領域（LCVR）のCDR領域の少なくとも2つ、特に3つが、SEQ ID NO:4～6において記載される対応するCDR領域と90%、詳細には95%、より詳細には98%、さらにより詳細には100%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項1記載のヒト化抗体またはその断片。

【請求項13】

Aβ単量体の凝集を阻害することができ、かつ多量体の原線維または細線維、特に高度の立体構造感受性と組み合わせさせて多量体の原線維または細線維を脱凝集することができる、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項14】

Aβ単量体ペプチド1-39；1-40、1-41、および1-42から選択されるβ-アミロイド単量体ペプチドと、および／または複数の前記Aβ単量体ペプチドを含む多量体の可溶性β-アミロイドペプチドと、ならびに特にAβ1-42単量体ペプチドおよび／または複数のAβ1-42単量体ペプチドを含むAβ多量体可溶性アミロイドペプチドとコインキュベーションすると、Aβ単量体が高分子多量体の原線維または細線維へ凝集することを阻害し、かつAβ単量体ペプチド1-39；1-40、1-41、および1-42から選択されるβ-アミロイド単量体ペプチドの凝集によって、および特にAβ1-42単量体ペプチドの凝集によって形成された、既に形成された高分子量多量体アミロイド原線維または細線維とコインキュベーションすると、既に形成された多量体の原線維または細線維を脱凝集することができる、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項15】

哺乳動物およびヒトから選択される対象の脳において凝集したAβに実質的に結合する、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項16】

哺乳動物またはヒトの脳におけるAβ斑の負荷を低減させる、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項17】

請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片をコードするヌクレオチド配列、または重鎖可変領域（HCVR）の相補性決定領域（CDR）2および3をそれぞれ表すSEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:3をコードする配列、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO:4、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20をコードする配列、SEQ ID NO:22の軽鎖可変領域をコードする配列、SEQ ID NO:22の軽鎖可変領域とSEQ ID NO:23の軽鎖定常領域とをコードする配列、SEQ ID NO:25の重鎖可変領域をコードする配列、およびSEQ ID NO:25の重鎖可変領域とSEQ ID NO:26の重鎖定常領域とをコードする配列から選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項18】

請求項17記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項19】

請求項18記載の発現ベクターを含む細胞。

【請求項20】

任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれる請求項1記載の抗体の治療的有効量を含み、かつ薬学的に許容される担体を任意でさらに含む、組成物。

【請求項21】

任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分を含み、かつ、さらなる生物学的に活性な物質を治療的有効量で、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／もしくは賦形剤を任意でさらに含む、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を含む組成物であって、該さらなる生物学的

10

20

30

40

50

に活性な物質が、アミロイドーシスの処置において用いられる化合物、酸化ストレスに対して有効な化合物、抗アポトーシス性化合物、金属キレート剤、ピレンゼピンおよび代謝物などのDNA修復の阻害剤、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸（3APS）、1,3-プロパンジスルホネート（1,3-PDS）、 α -セクレターゼ活性化剤、 β -および γ -セクレターゼ阻害剤、タウタンパク質、神経伝達物質、 β -シート破壊剤（breaker）、アミロイド β を除去する／枯渇させる細胞成分の誘引剤、ピログルタミン酸化したアミロイド β 3-42を含むN-末端切断型アミロイド β の阻害剤、抗炎症分子、ならびにタクリン、リバスチグミン、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剤（ChEI）、M1アゴニスト、および任意のアミロイドまたはタウ修飾薬物を含む他の薬物、および栄養補給剤、ならびに任意で薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤から選択される、組成物。

10

【請求項 2 2】

請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を、そのような障害に罹患した対象に治療的有效量で投与する段階を含む、それを必要とする対象における、アルツハイマー病（AD）、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-認知症複合などの神経学的障害であるアミロイドーシス；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）、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、および黄斑変性から選択される1つまたは複数のアミロイドーシス関連疾患の効果を予防、処置、または緩和するための方法。

20

【請求項 2 3】

認知記憶能の喪失を特徴とするアミロイド関連状態に罹患した対象、特に哺乳動物またはヒトの処置によって、認知記憶能の保持の向上またはその完全な回復が起こる、請求項22記載の方法。

【請求項 2 4】

以下を含む、対象におけるアミロイド関連疾患または状態を診断する方法：

- (a) アミロイドタンパク質を含有することが疑われる対象の組織試料、または特定の身体部分もしくは身体領域に、請求項1記載の抗体を接触させる段階；
- (b) 前記抗体をアミロイドタンパク質に結合させる段階；
- (c) 前記タンパク質に結合した抗体を検出する段階；および
- (d) 抗体結合の有無を、試料または特定の身体部分もしくは領域におけるアミロイドタンパク質の有無と関連させる段階。

30

【請求項 2 5】

以下の段階を含む、対象の組織および／または体液におけるアミロイド形成による斑負荷の程度を決定する方法：

- (a) 治験中の対象における組織および／または体液を表す試料を得る段階；
- (b) 請求項1記載の抗体によってアミロイドタンパク質の存在に関して試料を試験する段階；
- (c) タンパク質に結合した抗体の量を決定する段階；および
- (d) 対象の組織および／または体液における斑負荷を計算する段階。

40

【請求項 2 6】

請求項1記載の抗体を含み、かつ、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する目的で抗体を用いるための、および免疫学的複合体の有無がアミロイドタンパク質の有無と関連するような、免疫学的複合体の形成を検出するための説明書を任意でさらに含む、アミロイド関連疾患および状態を検出および診断するための試験キット。

【請求項 2 7】

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域と、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、およびSEQ ID NO:6から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのCDRとを含む、単離された軽鎖可変領域（LCVR）。

【請求項 2 8】

50

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域と、SEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:3からなる配列の群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのCDRとを含む、単離された重鎖可変領域（HCVR）。

【請求項 29】

SEQ ID NO:12の軽鎖可変領域（LCVR）。

【請求項 30】

Aβ単量体および／またはAβ線維、原線維、もしくは細線維、および／または可溶性の多量体アミロイドβに実質的に結合し、かつアミロイド前駆体タンパク質（APP）といかなる有意な交叉反応性も示さない、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト抗体もしくはその断片。

10

【請求項 31】

少なくとも約 1×10^{-7} M～少なくとも約 1×10^{-12} M、少なくとも約 1×10^{-8} M～少なくとも約 1×10^{-11} M、少なくとも約 1×10^{-8} M～少なくとも約 1×10^{-10} M、および少なくとも約 1×10^{-8} M～少なくとも約 5×10^{-8} Mからなる群より選択される範囲のKDによって表される結合親和性でAβ単量体に結合し、かつ少なくとも約 1×10^{-7} M～少なくとも約 1×10^{-12} M、少なくとも約 1×10^{-8} M～少なくとも約 1×10^{-11} M、少なくとも約 1×10^{-9} M～少なくとも約 1×10^{-10} M、および少なくとも約 2×10^{-9} M～少なくとも約 8×10^{-9} Mからなる群より選択される範囲のKDによって表される結合親和性でAβ線維、原線維、または細線維に結合する、請求項30記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

20

【請求項 32】

可溶性の多量体アミロイドβおよびAβ線維、原線維、または細線維に対して、Aβ単量体よりも高い親和性を有する、請求項30記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項 33】

Aβ線維、原線維、または細線維に対して、Aβ単量体に対する結合親和性よりも少なくとも10倍、詳細には少なくとも15倍、より詳細には少なくとも20倍、およびとりわけ少なくとも25倍高い結合親和性を示す、請求項32記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項 34】

哺乳動物の脳、特にヒトの脳における凝集したAβ、Aβ斑、および／または可溶性線維に対して実質的に結合するが、好ましくはアミロイド前駆体タンパク質（APP）に対していかなる有意な交叉反応性も示さない、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

30

【請求項 35】

立体構造のシフトを誘導することによって、線維を可溶性の多量体型および単量体型に脱凝集することによりAβの可溶性状態と凝集状態とのあいだの平衡をその可溶性型に向けてシフトさせることができ、かつ組織および／または体液、特に脳における脱凝集型および可溶性型Aβ型に結合してこれを安定化させることができる、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

40

【請求項 36】

α-ヘリックスおよび／またはランダムコイル立体構造に向けて、詳細にはランダムコイル立体構造に向けて、さらにより詳細には分子における所定の位置、特にAβタンパク質のTyr10およびVal12の環境におけるランダムコイル立体構造に向けてのβ-シート立体構造の転移を誘導することができ、これによってβ-シート立体構造を犠牲にしてランダムコイル立体構造を増加させて、既に形成された高分子多量体アミロイド原線維または細線維の可溶化を改善する、請求項35記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項 37】

β-シート立体構造の減少が、緩衝液中でインキュベートしたそれぞれの既に形成され

50

たアミロイド多量体の原線維または細線維（対照）と比較して少なくとも30%、詳細には少なくとも35%、ならびにより詳細には少なくとも40%およびそれより上に達する、請求項36記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項38】

多量体の可溶性A β タンパク質種、および／またはより凝集の少ない可溶性のA β タンパク質種、および／または可溶性A β タンパク質の単量体型に実質的に結合して、それにより、これらのA β タンパク質種の末梢での除去および異化を改変してその毒性効果を低減させる、請求項35記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項39】

ヒト化抗体またはその断片が、脳の外部で凝集したアミロイド β に結合する、請求項23記載の方法。

【請求項40】

線維を可溶性の多量体型および単量体型に脱凝集することにより、A β の可溶化状態と凝集状態とのあいだの平衡をその可溶性型に向けてシフトさせることができる、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項41】

ヒト組織および／または体液、特に脳においてA β に実質的に結合しないが、立体構造のシフトを誘導することによって、線維を可溶性の多量体型および単量体型に脱凝集することにより、A β の可溶性状態と凝集状態のあいだの平衡をその可溶性型に向けてシフトさせることができ、かつ組織および／または体液、特に脳における脱凝集型および可溶化型A β に結合して安定化させることができる、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項42】

マウス抗体の結合親和性より少なくとも5倍、10倍、詳細には少なくとも15倍、より詳細には少なくとも20倍、とりわけ少なくとも100倍高い結合親和性を示す、請求項1記載のヒト化抗体またはその断片。

【請求項43】

抗体またはその断片の親和性、特異性および安定性が、グリコシル化プロファイルの変化によって改変されている、請求項1記載のヒト化抗体またはその断片。

【請求項44】

アミノ酸改変によって、エフェクター機能の低減が起こる、請求項1記載の抗体。

【請求項45】

Fc領域アミノ酸改変が、アミノ酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438、または439位の1つまたは複数において変化を含む、請求項44記載の抗体またはその断片。

【請求項46】

Fc領域アミノ酸改変がD265Aアミノ酸変異を含む、請求項44記載の抗体またはその断片。

【請求項47】

SEQ ID NO:27もしくはSEQ ID NO:29と同様に少なくとも1つの可変領域を含む抗体、またはその変種。

【請求項48】

請求項47記載の抗体を発現する細胞株。

【請求項49】

既に形成された β -アミロイド線維とhC2抗体とを相互作用させる段階を含む、既に形成された β アミロイド線維を脱凝集するための方法。

【請求項50】

10

20

30

40

50

A β 誘導分解からニューロンを保護する、請求項1記載のヒト化抗体またはその断片。

【請求項51】

請求項1記載のヒト化抗体またはその断片の有効量によって、ニューロンを処置する段階を含む、A β 誘導ニューロン分解を防止する方法。

【請求項52】

変種Fc領域が変種IgG1 Fc領域である、請求項1記載の抗体またはその断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連特許出願の相互参照

10

本出願は、参照により本明細書に組み入れられる、2007年6月12日に提出された米国特許仮出願第60/943,509号に対する優先権を主張する。

【0002】

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と関連する一群の障害および異常である、アミロイドーシスの診断および処置のための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

アミロイドーシスは単一の疾患単位ではなく、1つまたは複数の臓器または身体系に蓄積するアミロイドと呼ばれる蠟状のデンプン様タンパク質の細胞外組織沈着を特徴とする多様な進行性疾患プロセスの一群である。アミロイド沈着が蓄積するにつれて、それらは臓器または身体系の正常な機能を妨げ始める。アミロイドーシスには少なくとも15の種類がある。主な型は、既知の既往症のない原発性アミロイドーシス、他の何らかの状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。

20

【0004】

続発性アミロイドーシスは、結核、細菌感染症、家族性地中海熱、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、およびハンセン病のような慢性感染症または炎症性疾患の間で起こる。

【0005】

アミロイド沈着物には、正常血清アミロイドP（SAP）に関連する糖タンパク質であるアミロイドP（五角形）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）が含まれる。アミロイドタンパク質原線維、これはアミロイド材料の約90%を占め、幾つかの種類のタンパク質のうち1つを含む。これらのタンパク質は、コンゴアレッドの結合部位を提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特有のタンパク質立体配置である、いわゆる「 β プリーツ」シート原線維へと折り畳むことができる。

30

【0006】

加齢性の多くの疾患はアミロイド様タンパク質に基づくかまたはそれと関連しており、これらは疾患の発生病理ならびに進行に寄与するアミロイドまたはアミロイド様材料の細胞外沈着の累加を特徴の1つとする。これらの疾患には、アルツハイマー病（AD）、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-認知症複合などの神経学的障害を含むが、これらに限定されない、疾患が含まれる。アミロイド様タンパク質に基づくかまたは関連する他の疾患には、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）、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他のものがある。

40

【0007】

これらの疾患の発生病理は多様であり得るが、それらの特徴的な沈着は、多くの共通の分子的構成要素を含むことが多い。かなりの程度で、これは、活性化された補体成分、急性期反応物質、免疫モジュレーターおよび他の炎症メディエーターの同時発生的沈着を結果として招く、炎症誘発性経路の局所的活性化に原因を求めることができる（McGeer et

50

al., 1994)。

【0008】

アルツハイマー病 (AD) は、脳内の異常なタンパク質沈着の蓄積物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疾患である。罹患個体の脳内に認められる最も頻度の高い種類のアミロイドは、主としてA β 原線維から構成される。科学的証拠により、斑状の β -アミロイドタンパク質の生成および蓄積が神経細胞死を招き、それがADの発症および進行に寄与することが実証されている。戦略的に重要な脳領域における神経細胞の喪失は、次には神経伝達物質の減少および記憶障害 (impairment) を引き起こす。斑の累加の主な原因になるタンパク質には、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。ほとんどの細胞において構成的に発現されて異化されるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の、 β および γ セクレターゼという酵素による逐次的切断により、39~43アミノ酸のA β ペプチドの放出がもたらされる。APPの分解は、それらが斑状に凝集する性向を高めると思われる。凝集物を構築する性向が強いのは特にA β (1-42) 断片であり、これはそのC末端に2つの極めて疎水性のアミノ酸残基があるためである。A β (1-42) 断片はこのため、ADにおける老人斑形成の開始に主として関与し、その原因となり、このため病原性が高いと考えられている。このため、アミロイド斑形成を防止し、ADにおける斑の存在を拡散させる薬剤は需要がある。

【0009】

ADの症状は緩徐に現れ、最初の症状は軽度の健忘に過ぎない。この段階では、個人は最近の出来事、活動、家族または物の名前を忘れることがあり、簡単な数学の問題を解けないことがある。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の人々または彼らの家族に医療の助けを求めようとさせるのに十分なほど深刻になる。ADの中期の症状には、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、不安になったり攻撃的になったりすることがあり、家から出て徘徊することもあり、最終的には全面看護を必要とする。

【0010】

現在、ADを診断するための唯一の確定的な手段は、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。このため、医師は、その人が生存している間は、ADが「疑われる」または「ほぼ確実である」という診断を下せるに過ぎない。現行の方法を用いると、医師は、「ほぼ確実な」ADの診断用の複数のツールを用いて、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、患者の全般的な健康状態、既往歴、および日常活動を行う上で覚え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学的検査によって認知障害に関する情報が得られ、血液、尿または脊髄液の検査、および脳スキャンなどの医学的検査によってさらに詳細な情報を得ることができる。

【0011】

ADの管理は、投薬を用いる治療と、投薬を用いない治療とからなる。この疾患の基礎をなす過程を変化させること (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。神経細胞の化学的メッセンジャー (神経伝達物質) の不足 (欠損) 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剤 (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的分解を妨げ、それによって脳内で神経シグナルの伝達に利用される化学的メッセンジャーの量を増加させる。

【0012】

この疾患の早期および中期の一部の患者の場合、タクリン (COGNEX (登録商標)、Morris Plains, NJ)、ドネベジル (ARICEPT (登録商標)、Tokyo, JP)、リバスチグミン (EXELON (登録商標)、East Hanover, NJ)、またはガランタミン (REMINYL (登録商標)、New Brunswick, NJ) といった薬剤は、ある限られた期間にわたって、幾つかの症状が悪化するのを防ぐのに役立つ可能性がある。別の薬物であるメマンチン (NAMENDA (登録商

標)、New York, NY) は、中等度ないし重度のADの治療に対して承認されている。ADの精神症状に対処するための薬物も利用可能である。また、幾つかの薬物は、不眠、興奮、徘徊、不安および抑うつといったADの行動上の症状を抑えるのに役立つ可能性がある。これらの症状を治療することで患者は落ち着き、介護者にとっては介護がより容易になる。しかし残念ながら、この一群の薬剤が一貫してプラセボよりも優れることを示している大きな治療上の進歩にもかかわらず、この疾患は進行を続け、精神機能に対する平均的な効果はわずかに過ぎない。たとえばChEIなどの、ADの薬物療法に用いられる多くの薬物にはまた、胃腸機能障害、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、またはそれらと関連のあるもう1つの疾患は、黄斑変性症である。

【0014】

黄斑変性症は、網膜（眼の後部にある紙のように薄い組織であり、そこにある光感受性細胞が視覚シグナルを脳に送る）の中心領域に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。鋭敏で明瞭な「正面からの（straight ahead）」視覚が黄斑によって処理される。黄斑に対する損傷は、盲斑および視野のかすみまたは乱れの発生をもたらす。加齢性黄斑変性症（AMD）は、米国における視覚障害（impairment）の主な原因の1つであり、65歳以上の人々にとっては白人における法的盲の主因である。40歳およびそれ以上の米国人のおよそ180万人が進行期AMDを有し、中間型AMDを有する別の730万人も視力低下のリスクがかなり高い。政府は、2020年までに進行型AMDの人々が290万人になると推定している。AMDの患者は多くの場合、この失明性疾患の原因および治療に関してほとんど解明されていないことを知ると驚いて失望する。

【0015】

黄斑変性症には2つの型、すなわち乾性黄斑変性症および湿性黄斑変性症がある。黄斑の細胞がゆっくりと崩壊し始める乾性型は、黄斑変性症の症例の85パーセントで診断される。乾性AMDによって通常は両眼が影響を受けるが、一方の眼で視力が低下し、もう一方の眼は冒されないこともある。網膜下の黄色沈着であるドルーゼンは、乾性AMDの一般的な早期徴候である。進行期の乾性AMDまたは湿性AMDを発症するリスクは、ドルーゼンの数またはサイズが増大するほど高くなる。乾性AMDは湿性型の疾患に転換することなしに進行して視力低下を引き起こすことがある。しかし、また、早期の乾性AMDが湿性型に突然変化することもある。

【0016】

湿性型は症例の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、進行期AMDと考えられている（早期または中間期の湿性AMDは存在しない）。湿性AMDは必ず乾性型の疾患が先に起こる。乾性型が悪化すると共に、一部の人々では異常血管が黄斑の背部に成長し始める。これらの血管は極めて脆弱であり、液体および血液を漏出して（それゆえに「湿性」黄斑変性症という）、黄斑に対して急激な損傷を引き起こす。

【0017】

乾性型のAMDは、最初は、視野のわずかなかすみを引き起こすことが多い。続いて視野の中心が特にかすむようになり、この領域は疾患が進行すると共に大きくなる。一方の眼のみが冒される場合には症状が気づかれないこともある。湿性AMDでは、直線が波打って見えたり、中心視野の喪失が急激に起こることがある。

【0018】

黄斑変性症の診断は、典型的には、散瞳させた眼の検査、視力検査、およびAMDを診断する一助になる眼底検査と呼ばれる手順を用いた眼の後部の観察を伴い、湿性AMDが疑われた場合には、蛍光眼底血管造影法が行われることもある。乾性AMDが進行期に達したならば、視力低下を防ぐための治療法は、現在存在しない。しかし、抗酸化剤および亜鉛の特別な高用量処方剤は、中間型AMDの進行期への進行を遅延または防止する可能性がある。Macugen（登録商標）（ペガプタニブナトリウム注射剤）、レーザー光凝固および光線力学療法は異常血管増殖および黄斑内の出血を抑えることができ、このことは湿性AMDを

有する一部の人々にとっては助けになる。しかし、すでに低下した視覚がこれらの手法によって回復することはない。視覚がすでに低下している場合には、生活の質を改善するのに役立ち得る低視力者用補助具が存在する。

【0019】

加齢性黄斑変性症（AMD）の最も早期の徴候の1つは、網膜色素上皮（RPE）の基底層とブルッフ膜（BM）との間の、ドルーゼンとして知られる細胞外沈着の蓄積である。Andersonらによって行われた最近の研究により、ドルーゼンはアミロイド β を含むことが確認されている（Experimental Eye Research 78（2004）243-256）。

【0020】

進行中の研究が、AMDの一因になり得る環境因子、遺伝因子、および食事因子を探索するための研究と共に続けられている。網膜細胞移植、疾患の進行を防止または遅らせると考えられる薬物、放射線療法、遺伝子治療、視覚を刺激する一助になる可能性のあるコンピュータチップの網膜への移植、および黄斑下の新たな血管の増殖を防止すると考えられる薬剤を含む、新たな治療戦略も探索されている。

【0021】

新たな薬物を開発する時に考慮すべき1つの重要な因子は、標的患者にとっての使い易さである。経口薬物送達、特に錠剤、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到達を好むことに同意する。まばらな投与間隔（すなわち、1日1回または持続放出）をもたらし製剤も好ましい。経口剤形で抗生物質を投与することが容易なことにより、治療中の患者のコンプライアンスの向上がもたらされる。

【0022】

必要とされているのは、アルツハイマー病（AD）、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-認知症複合などの神経学的障害を含むが、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に関係のあるアミロイドーシスを含む、アミロイド斑形成と関連する一群の疾患および障害であるアミロイドーシス；ならびに、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）、成人発症型糖尿病、老人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アミロイド様タンパク質と関連するその他の疾患、と関連する合併症を防止するかまたは該合併症に対処するための有効な方法および組成物である。特に必要とされているのは、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する斑の形成などの、疾患の生理学的出現に対抗することができる薬剤である。

【0023】

フロイント完全または不完全アジュバントと混合したA β_{1-42} の接種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けるアミロイド負荷量を減少させることが報告された（Schenk et al., 1999）。リボソーム中に再構成されたテトラパルミトイル化A β_{1-16} のNORBAトランスジェニックマウスに対する腹腔内接種は、有効な力価の抗アミロイド抗体を誘発し、このことは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させることが報告された（Nicolau et al., 2002）。

【0024】

想定される、アミロイド斑および線維の溶解を起こす機序は、Bardら（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、斑は続いてミクログリアのマクロファージによって破壊されることを結論付けた。De Mattosら（2001）は、 β -アミロイドの中心ドメインを標的とするmAbが、血漿アミロイドと結合してそれらを完全に隔絶させることを示した。彼らは、流血中のこれらのmAbの存在により、脳内への沈着の代わりに末梢での除去および異化を促すように、脳と血漿との間でのA β

の平衡が移動すると主張した。

【0025】

齧歯類抗体による長期にわたるヒトの治療は、投与後約8~12日で検出可能であり、かつ約20~30日でピークに達する抗グロブリン応答を結果的にもたらず場合がある。そのような抗グロブリン応答に直面した場合、長くても約10日後には処置を中断しなければならず、それが二次性の抗グロブリン応答の速やかな開始をもたらすので、後日の再処置は通常除外される。齧歯類抗体はヒト抗体の配列とかなりの程度の配列保存性を共有するが、齧歯類抗体とヒト抗体との間に、齧歯類抗体がヒトにおいて免疫原性であるのに十分な多くの配列相違がある。

【0026】

この問題は、直接ヒトで抗体を作製することによってかまたは（「再形成された(reshaped)抗体」としても公知の）「ヒト化」抗体の創出によって克服してもよい。ヒト化抗体は、ヒトまたはヒト様のフレームワーク配列中に散在する齧歯類由来のCDRを含む可変領域アミノ酸配列を有する。ヒト化抗体の特異性は齧歯類由来のCDRによってもたらされるので、それらの残基は本質的に変化させないで用いるべきであり、その標的抗原に対する抗体の親和性および特異性と著しくは干渉しない、わずかな修飾のみが許容される。フレームワーク残基は、任意の霊長類、もしくは特に任意のヒト可変領域に由来してもよく、またはその組み合わせであってもよく、結果として得られる設計された可変領域を再形成されているとみなすことができる。

【0027】

親和性が再形成された抗体で保持される可能性を最大化するために、フレームワーク領域の適切な選択をすることが重要である。フレームワーク配列が、CDRを抗原との相互作用のためにそれらの正しい空間的配向に保つように機能するということが公知である。その抗原に対する抗体の親和性を維持するために、齧歯類フレームワークの配列に最もよく似ているヒトフレームワーク配列を選択することが有利である。その後、ヒトフレームワーク配列中の1つまたは複数のアミノ酸を齧歯類フレームワーク中の対応する残基と置き換え、親和性の喪失を避ける必要が依然としてある場合がある。この置き換えは、コンピュータモデリングによって支援されてもよい。

【0028】

本発明は、単量体、ダイマー、トリマーなどの形態か、重合体の形態か、凝集体、線維、細線維の形態か、または凝縮した斑形態で抗体に提示され得る、様々なβ-アミロイド抗原由来の特異的エピトープを特異的に認識しかつ該エピトープに特異的に結合する能力を有する、極めて特異的でかつ極めて有効な抗体、詳細にはその断片を含むキメラ抗体、より詳細にはその断片を含む部分的にまたは完全にヒト化された抗体を含む、新規の方法および組成物を提供する。本発明の教示が可能にする抗体は、アルツハイマー病(AD)、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-認知症複合などの神経学的障害を含むが、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に関係のあるアミロイドーシスを含む、アミロイド斑形成と関連する一群の疾患および障害であるアミロイドーシス；ならびに進行性核上麻痺、多発性硬化症、クロイツフェルトヤコブ病、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)、成人発症型糖尿病、老人心アミロイドーシス、内分泌腫瘍、およびほんの一例として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アミロイド様タンパク質と関連するその他の疾患、の処置に特に有用である。

【発明の概要】

【0029】

ある態様において、本発明は、1つ、少なくとも2つ、および少なくとも3つの結合部位が各々、抗体の結合に主に関与する少なくとも1つまたは2つの連続するアミノ酸残基を含むβ-アミロイドタンパク質上の、少なくとも1つの別個の結合部位、詳細には少なくとも

10

20

30

40

50

2つの別個の結合部位、およびより詳細には少なくとも3つの別個の結合部位を認識しかつ該結合部位に結合する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片に関する。

【0030】

特に、本発明によるキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片は、3つの別個の結合部位のうちの少なくとも2つが、抗体の結合に主に関与する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、かつ3つの別個の結合部位のうちの少なくとも1つが、少なくとも1つのアミノ酸残基を含む、 β -アミロイドタンパク質上の少なくとも2つ、特に少なくとも3つの別個の結合部位に結合する。

【0031】

抗体の結合に主に関与する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含む少なくとも2つの別個の結合部位は、抗原上で互いにごく近接して位置し、抗体結合に関与しないかまたは前記少なくとも2つの連続するアミノ酸残基と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する少なくとも1つのアミノ酸残基によって隔てられかつ／または該少なくとも1つのアミノ酸残基と隣接し、それゆえ立体構造的な不連続エピトープを形成する。

【0032】

抗体の結合に主に関与する、それぞれ、少なくとも2つの連続するアミノ酸残基および少なくとも1つのアミノ酸残基を含む少なくとも3つの別個の結合部位は、エピトープ上で互いにごく近接して位置し、抗体結合に関与しないかまたは抗体の結合に主に関与する前記アミノ酸残基と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する少なくとも1つのアミノ酸残基によって隔てられかつ／または該アミノ酸残基と隣接し、それゆえ立体構造的な不連続エピトープを形成する。

【0033】

特に、 β -アミロイドタンパク質上の少なくとも1つの別個の結合部位、詳細には少なくとも2つの別個の結合部位、より詳細には少なくとも3つの別個の結合部位を認識しかつ該結合部位に結合する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。ここで、前記少なくとも1つまたは少なくとも2つの別個の結合部位は各々、抗体の結合に主に関与する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、第一の結合部位を表す該少なくとも2つの連続するアミノ酸残基は、以下のコア配列 (SEQ ID NO: 9) の中に埋め込まれた -Phe-Phe- である：

Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆

式中、

Xaa₃が、Ala、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₄が、Ala、Val、Leu、Ser、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₅が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、

Xaa₆が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、かつ

アミノ酸残基Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、およびXaa₆が、抗体結合に関与しないかまたは -Phe-Phe- 結合部位と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する。

【0034】

本発明の別の態様において、

Xaa₃がValまたはLeu、特にValであり；

Xaa₄がAlaまたはVal、特にAlaであり；

Xaa₅がGluまたはAsp、特にGluであり；

Xaa₆がGluまたはAsp、特にAspである、

キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

【0035】

特に、 β -アミロイドタンパク質上の少なくとも1つの別個の結合部位、詳細には少なくとも2つの別個の結合部位、より詳細には少なくとも3つの別個の結合部位を認識しかつ該

10

20

30

40

50

結合部位に結合する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。ここで、前記別個の結合部位がそれぞれ、抗体の結合に主に関与する少なくとも1つおよび少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、第一の結合部位を表す少なくとも2つの連続するアミノ酸残基は、以下のコア配列の中に埋め込まれた-Phe-Phe-でありかつ少なくとも1つのアミノ酸残基は該コア配列中に埋め込まれた-His-である：

-Xaa₁ - His - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Phe - Phe - Xaa₇ - Xaa₈ - Xaa₉-

式中、

Xaa₁が、His、Asn、Gln、Lys、およびArgからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₃が、AsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₄が、His、Asn、Gln、Lys、およびArgからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₅が、Ala、Val、Leu、Ser、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₆が、Ala、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₇が、Ala、Val、Leu、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₈が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₉が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、かつ

アミノ酸残基Xaa₁、Xaa₃、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、およびXaa₉がそれぞれ、抗体結合に関与しないか、または-His-および-Phe-Phe-結合部位と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する。

【0036】

本発明の別の態様において、

Xaa₃がGlnまたはAsn、特にGlnであり；

Xaa₄がLysであり；

Xaa₅がLeuであり；

Xaa₆がValまたはLeu、特にValであり；

Xaa₇がAlaまたはVal、特にAlaであり；

Xaa₈がGluまたはAsp、特にGluであり；かつ

Xaa₉がAspまたはGlu、特にAspである、

キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

【0037】

本発明の別の態様において、β-アミロイドタンパク質上の少なくとも1つの別個の結合部位、詳細には少なくとも2つの別個の結合部位、より詳細には少なくとも3つの別個の結合部位を認識しかつ該結合部位に結合する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。ここで、前記少なくとも1つまたは少なくとも2つの別個の結合部位は各々、抗体の結合に主に関与する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、第二の結合部位を表す少なくとも2つの連続するアミノ酸残基は、以下のコア配列 (SEQ ID NO: 10) の中に埋め込まれた-Lys-Leu-である：

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃

式中、

Xaa₁が、His、Asn、Gln、Lys、およびArgからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₂が、AsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₃が、Ala、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；かつアミノ酸残基Xaa₂、Xaa₃が、抗体結合に関与しないかまたは-Lys-Leu-結合部位と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する。

【0038】

本発明の別の態様において、β-アミロイドタンパク質上の少なくとも1つの別個の結合

部位、詳細には少なくとも2つの別個の結合部位、より詳細には少なくとも3つの別個の結合部位を認識しかつ該結合部位に結合する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。ここで、前記別個の結合部位はそれぞれ、抗体の結合に主に関与する少なくとも1つおよび少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、前記少なくとも1つおよび少なくとも2つの連続するアミノ酸は、抗体結合に関与しないかまたは抗体の結合に主に関与するアミノ酸残基と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する少なくとも1つのアミノ酸残基によって隔てられており、それぞれ以下のコア配列の中に埋め込まれた-His-および-Lys-Leu-である：

His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ - Xaa₈ -
式中、

Xaa₂が、AsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₃が、Ala、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₄が、Ala、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₅が、Ala、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₆が、Ala、Val、Leu、Ser、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₇が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、

Xaa₈が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、

かつアミノ酸残基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈がそれぞれ、抗体結合に関与しないか、または-His-および-Lys-Leu-結合部位と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する。

【0039】

本発明の別の態様において、

Xaa₂がGlnまたはAsn、特にGlnであり；

Xaa₃がValまたはLeu、特にValであり；

Xaa₄がPheであり；

Xaa₅がPheであり；

Xaa₆がAlaまたはVal、特にAlaであり；

Xaa₇がGluまたはAsp、特にGluであり；かつ

Xaa₈がAspまたはGlu、特にAspである、

キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

【0040】

本発明の別の態様において、少なくとも2つの別個の結合部位が各々、抗体の結合に主に関与する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含む、β-アミロイドタンパク質上の該少なくとも2つの別個の結合部位を認識しかつ該結合部位に結合する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。ここで、前記少なくとも2つの連続するアミノ酸は、抗体結合に関与しないかまたは連続するアミノ酸残基よりも著しくより少ない程度に関与する少なくとも1つのアミノ酸残基によって隔てられており、該連続するアミノ酸残基は、以下のコア配列の中に埋め込まれた第一および第二の結合部位をそれぞれ表す、-Phe-Phe-および-Lys-Leu-である：

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆
式中、

Xaa₁が、His、Asn、Gln、Lys、およびArgからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₂が、AsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₃が、Ala、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

10

20

30

40

50

Xaa₄が、Ala、Val、Leu、Ser、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₅が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、

Xaa₆が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、かつ

アミノ酸残基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、およびXaa₆がそれぞれ、抗体結合に関与しないかまたは、-Lys-Leu-および-Phe-Phe-結合部位と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する。

【0041】

本発明の別の態様において、β-アミロイドタンパク質上の少なくとも1つの別個の結合部位、詳細には少なくとも2つの別個の結合部位、より詳細には少なくとも3つの別個の結合部位を認識しかつ該結合部位に結合する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。ここで前記別個の結合部位はそれぞれ、抗体の結合に主に関与する少なくとも1つおよび少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、該少なくとも1つおよび少なくとも2つの連続するアミノ酸は、抗体結合に関与しないかまたは抗体の結合に主に関与するアミノ酸残基と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する少なくとも1つのアミノ酸残基によって隔てられ、かつ抗体の結合に主に関与するアミノ酸残基はそれぞれ、以下のコア配列の中に埋め込まれた-His-および-Phe-Phe-および-Lys-Leu-である：

His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆

式中、

Xaa₂が、AsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₃が、Ala、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₄が、Ala、Val、Leu、Ser、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₅が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、

Xaa₆が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、かつ

アミノ酸残基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆がそれぞれ、抗体結合に関与しないか、または-His-、-Lys-Leu-、および-Phe-Phe-結合部位と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する。

【0042】

本発明の別の態様において、

Xaa₂がGlnまたはAsn、特にGlnであり；

Xaa₃がValまたはLeu、特にValであり；

Xaa₄がAlaまたはVal、特にAlaであり；

Xaa₅がGluまたはAsp、特にGluであり；かつ

Xaa₆がAspまたはGlu、特にAspである、

キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

【0043】

本発明の別の態様において、β-アミロイドタンパク質上の少なくとも2つの別個の結合部位を認識しかつ該結合部位に結合する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。ここで前記少なくとも2つの別個の結合部位は各々、抗体の結合に主に関与する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、該少なくとも2つの連続するアミノ酸は、抗体結合に関与しないかまたは連続するアミノ酸残基よりも著しくより少ない程度に関与する少なくとも1つのアミノ酸残基によって隔てられている、以下のコア配列の中に埋め込まれた第一および第二の結合部位をそれぞれ表す、-Phe-Phe-および-Lys-Leu-である：

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆

式中、

Xaa₁が、His、Asn、Gln、Lys、およびArgからなる群より選択されるアミノ酸残基であ

り；

Xaa₂が、AsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₃が、Val、Ala、Leu、Met、Phe、ノルロイシン、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり

Xaa₄が、Ala、Val、Leu、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり；

Xaa₅が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、

Xaa₆が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、かつ

アミノ酸残基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆がそれぞれ、抗体結合に関与しないか、または-Lys-Leu-および-Phe-Phe結合部位と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する。

10

【0044】

本発明の別の態様において、

Xaa₁がHisまたはArg、特にHisであり；

Xaa₂がGlnまたはAsn、特にGlnであり；

Xaa₃がValまたはLeu、特にValであり；

Xaa₄がAlaまたはVal、特にAlaであり；

Xaa₅がGluまたはAsp、特にGluであり；かつ

Xaa₆がAspまたはGlu、特にAspである、

キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

【0045】

20

本発明のある態様において、β-アミロイドタンパク質上の少なくとも2つの別個の結合部位を認識しかつ該結合部位に結合する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。ここで前記少なくとも2つの別個の結合部位は各々、それぞれ、-Phe-Phe-Ala-Glu-、特に-Phe-Phe-Ala-、とりわけ-Phe-Phe-および-Lys-Leu-である、抗体の結合に主に関与する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、かつ少なくとも2つの別個の結合部位はそれぞれ、SEQ ID NO:7に示されるアミノ酸配列-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-およびSEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列His-Gln-Lys-Leu-Val-を示す。

【0046】

30

本発明のある態様において、β-アミロイドタンパク質上の少なくとも1つの別個の結合部位、詳細には少なくとも2つの別個の結合部位、より詳細には少なくとも3つの別個の結合部位を認識しかつ該結合部位に結合する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。ここで前記少なくとも1つまたは少なくとも2つの別個の結合部位が、それぞれ-Phe-Phe-および-Lys-Leu-、ならびに-His-である、抗体の結合に主に関与する少なくとも1つおよび少なくとも2つの連続するアミノ酸残基をそれぞれ含み、別個の結合部位がそれぞれ、アミノ酸配列-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-、およびアミノ酸配列-His-Gln-Lys-Leu-Val-に埋め込まれている。

【0047】

40

本発明の別の態様において、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片は、少なくとも2つの別個の結合部位が各々、それぞれSEQ ID NO:7および8に示したアミノ酸配列中に少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、連続するアミノ酸残基、特に-Phe-Phe-および-Lys-Leu-が、β-アミロイドタンパク質の結合に主に関与するβ-アミロイドタンパク質上の少なくとも2つの別個の結合部位を認識しかつ該結合部位に結合する、抗原認識部位および抗原結合部位を含む。

【0048】

本発明の具体的な態様において、本明細書で先に定義したような認識部位および結合部位は、アミノ酸残基12~24の間、詳細には残基14~23の間、より詳細にはアミノ酸残基14~20の間のβ-アミロイドタンパク質の領域に局在する立体構造的な不連続エピトープを形成している。ここで、各々が少なくとも2つのアミノ酸残基を含む少なくとも2つの別個の認識部位および結合部位がそれぞれ、位置16および17ならびに位置19および20に位置し

50

、かつ少なくとも1アミノ酸残基を含む少なくとも1つの別個の認識部位および結合部位は、その残基がβ-アミロイドタンパク質の結合に主に関与する位置14に位置し、かつ別個の認識部位および結合部位は、アミノ酸残基、特に残基21および22が隣接する少なくとも一方の側にあり、かつアミノ酸残基が抗原の結合に直接関与しないかまたは、少なくとも、実質的により少ない程度に関与する、位置15および18に位置する1つのアミノ酸残基によって隔てられている。

【0049】

本発明のまた別の態様において、少なくとも3つの別個の認識部位および結合部位は、アミノ酸残基、特に残基12および13、ならびに残基21および22が両側に隣接し、かつ抗原の結合に直接関与しないか、または少なくとも、実質的により少ない程度に関与する、位置15および18に位置する1つのアミノ酸残基によって隔てられている。

10

【0050】

具体的な態様において、β-アミロイドタンパク質の結合に主に関与する、連続するアミノ酸残基、特に位置16および17の-Lys-Leu-ならびに位置19および20の-Phe-Phe-が、以下のコア領域中に埋め込まれている。

Val- His- His- Gln- Lys- Leu- Val- Phe- Phe- Ala- Glu- Asp

12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

【0051】

別の具体的な態様において、β-アミロイドタンパク質の結合に主に関与する、アミノ酸残基、特に位置16および17の-Lys-Leu-ならびに位置19および20の-Phe-Phe-、ならびに位置14の-His-が、以下のコア領域中に埋め込まれている。

20

Val- His- His- Gln- Lys- Leu- Val- Phe- Phe- Ala- Glu- Asp- Val- Gly-

12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

【0052】

本発明の別の態様において、軽鎖および重鎖の可変領域に、それぞれ、1つまたは複数のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域に埋め込まれた、非ヒト起源の少なくとも1つのCDR、詳細には非ヒト起源の2つのCDR、より詳細には非ヒト起源の3つのCDR、および任意で、ヒトまたは霊長類が源の抗体に由来する定常領域を含む、ヒト化抗体またはその断片を提供する。ヒト化抗体またはその断片は、以下のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 11) を含むエピトープにて、孤立しているかまたはβ-アミロイド斑の一部としてのβ-アミロイドタンパク質、詳細にはβ-アミロイド単量体ペプチド、より詳細にはβ-アミロイド重合体ペプチド、さらにより詳細にはβ-アミロイドの線維、原線維、または細線維を特異的に認識および結合することができる：

30

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆

式中、

Xaa₁が、His、Asn、およびGlnからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にHisであり；

Xaa₂が、AsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にGlnであり；

Xaa₃が、Val、Leu、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にValであり

40

Xaa₄が、AlaおよびValからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にAlaであり；

Xaa₅が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にGluであり；

Xaa₆が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にAspである。

【0053】

本発明のまた別の態様において、軽鎖および重鎖の可変領域に、それぞれ、1つまたは複数のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域に埋め込まれた、非ヒト起源の少なくとも1つのCDR、詳細には非ヒト起源の2つのCDR、より詳細には非ヒト起源の3つのCDR、および任意で、ヒトまたは霊長類が源の抗体に由来する定常領域を含む、ヒト化抗体またはその断片を提供する。ヒト化抗体またはその断片は、以下のアミノ酸配列を含むエピトープにて、孤立しているかまたはβ-アミロイド斑の一部としてのβ-アミロイドタンパ

50

ク質、詳細にはβ-アミロイド単量体ペプチド、より詳細にはβ-アミロイド重合体ペプチド、さらにより詳細にはβ-アミロイドの線維、原線維、または細線維を特異的に認識および結合することができる：

His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆

式中、

Xaa₂が、AsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にGlnであり；かつ
Xaa₃が、Val、Leu、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にValであり；

Xaa₄が、AlaおよびValからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にAlaであり；

Xaa₅が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にGluであり；

Xaa₆が、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にGluであり；かつ
アミノ酸残基Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆が、抗体結合に関与しないかまたは-His-および-Lys-Leu-および-Phe-Phe-結合部位と比較した場合に著しくより少ない程度に関与する。

【0054】

本発明の具体的な態様において、非ヒト起源のCDRは、別個の結合部位を含まない抗原断片に対して作製されたドナー抗体から、特にマウスドナー抗体から得られる。このエピトープ領域の変換は、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たβ-アミロイドペプチドの、特にβ-アミロイドペプチドAβ₁₋₁₆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性構築物の使用によって少なくとも一部は生じている場合があり、親水性部分は、本明細書で以下の免疫化過程で記載するように、例えば、リジン、グルタミン酸、およびシステインまたは親水性部分をペプチド断片にカップリングするための接続装置として機能することができる任意の他の好適なアミノ酸もしくはアミノ酸類似体の少なくとも1つ、特に1つまたは2つのアミノ酸を通じて抗原性ペプチドの末端の各々に共有結合している。PEGを親水性部分として用いる場合、遊離のPEG末端を、ホスファチジルエタノールアミン、または例えば抗原性構築物を本明細書に記載のリボソームの二重層に埋め込むための、固定要素として機能するために好適な任意のその他の化合物に共有結合させる。

【0055】

特に、非ヒト起源のCDRは、2005年12月1日にBraunschweig, Mascheroder Weg 1B, 38124 BraunschweigのDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) に、ブダペスト条約の条項に基づいてアクセッション番号：DSM ACC2750の下で寄託された（本出願を通じて「mC2」とも名付けられている）ACI-01-Ab7C2の特徴的な特性を示すマウスドナー抗体から得られる。

【0056】

本発明のある態様において、非ヒト起源のCDRは、2005年12月1日にBraunschweig, Mascheroder Weg 1B, 38124 BraunschweigのDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) に、ブダペスト条約の条項に基づいてアクセッション番号：DSM ACC2750の下で寄託された（本出願を通じて「mC2」とも名付けられている）マウスドナー抗体ACI-01-Ab7C2から得られる。

【0057】

免疫化プロトコルの一部としてのリピドAの使用もまた、エピトープ領域の変換に寄与している可能性がある。

【0058】

具体的な態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR2を表すSEQ ID NO：2およびCDR3を表すSEQ ID NO：3ならびに軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を持つ少なくとも1つのペプチドを含む、ヒト化抗体またはその断片に関する。

【0059】

10

20

30

40

50

別の態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR2を表すSEQ ID NO：2およびCDR3を表すSEQ ID NO：3からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を持つ少なくとも1つのペプチドを含む、ヒト化抗体またはその断片に関する。

【0060】

また別の態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の軽鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4のアミノ酸配列を持つペプチドを含む、ヒト化抗体またはその断片に関する。

【0061】

特に、本発明は、ヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中に組み込まれた、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4のアミノ酸配列を持つ少なくとも1つのペプチドを含む軽鎖可変領域（LCVR）に関する。

【0062】

別の具体的な態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR2を表すSEQ ID NO：2およびCDR3を表すSEQ ID NO：3からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を持つ少なくとも1つのペプチドを含む重鎖可変領域（HCVR）に関する。

【0063】

本発明はさらに、ヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中に組み込まれた、少なくとも2つのペプチドを含む、ヒト化抗体またはその断片に関する。これらのペプチドは異なっており、かつ重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1、CDR2を表すSEQ ID NO：2、およびCDR3を表すSEQ ID NO：3ならびに軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4、CDR2を表すSEQ ID NO：5、およびCDR3を表すSEQ ID NO：6からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を示し、同じCDRは抗体中に二度は存在し得ない。特に、存在する少なくとも2つのCDRが両方とも軽鎖可変領域（LCVR）のCDRである場合、CDRのうちの少なくとも1つは、SEQ ID NO：4で表されるCDR1でなければならない。

【0064】

ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1、CDR2を表すSEQ ID NO：2、およびCDR3を表すSEQ ID NO：3からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を持つ少なくとも2つのペプチドを含むヒト化抗体またはその断片、特に同じCDRが抗体中に二度は存在し得ないヒト化抗体またはその断片もまた、本発明によって含まれる。

【0065】

特に、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1、CDR2を表すSEQ ID NO：2、およびCDR3を表すSEQ ID NO：3からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を持つ少なくとも2つのペプチドを含む、重鎖可変領域（HCVR）に関する。

【0066】

さらなる態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の軽鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4、CDR2を表すSEQ ID NO：5、およびCDR3を表すSEQ ID NO：6からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を持つ少なくとも2つのペプチドを含む、ヒト化抗体またはその断片に関する。

【0067】

特に、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の軽鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4、CDR2を表すSEQ ID NO：5、およびCDR3を表すSEQ ID NO：6からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を持つ少なくとも2つのペプチドを有し、同じCDRが抗体中に二度は存在し得ず、かつ特にCDRの少なくとも1つはSEQ ID NO：4で表されるCDR1でなければならない、軽鎖可変領域（LCVR）に関する。

【0068】

本発明はまた、ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域中に組み込まれた

、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1、CDR2を表すSEQ ID NO：2、およびCDR3を表すSEQ ID NO：3のアミノ酸配列を、特に上記で示した順序で持つペプチドを含む、ヒト化抗体またはその断片に関する。

【0069】

特に、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1、CDR2を表すSEQ ID NO：2、およびCDR3を表すSEQ ID NO：3のアミノ酸配列を、特に上記で示した順序で持つペプチドを含む、重鎖可変領域（HCVR）に関する。

【0070】

ヒト由来または霊長類由来の軽鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4、CDR2を表すSEQ ID NO：5、およびCDR3を表すSEQ ID NO：6のアミノ酸配列を、特に上記で示した順序で持つペプチドを含むヒト化抗体またはその断片もまた、本発明によって含まれる。 10

【0071】

特に、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の軽鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4、CDR2を表すSEQ ID NO：5、およびCDR3を表すSEQ ID NO：6のアミノ酸配列を、特に上記で示した順序で持つペプチドを含む軽鎖可変領域（LCVR）に関する。

【0072】

本発明はまた、ヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1、CDR2を表すSEQ ID NO：2、およびCDR3を表すSEQ ID NO：3、ならびに軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4、CDR2を表すSEQ ID NO：5、およびCDR3を表すSEQ ID NO：6からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を持つ少なくとも3つのペプチドを含む、ヒト化抗体またはその断片、特に同じCDRが抗体中に二度は存在し得ないヒト化抗体またはその断片に関する。 20

【0073】

別の態様において、本発明は、抗体が、ヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1、CDR2を表すSEQ ID NO：2、およびCDR3を表すSEQ ID NO：3、ならびに軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4、CDR2を表すSEQ ID NO：5、およびCDR3を表すSEQ ID NO：6からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を持つ少なくとも4つのペプチドを含む、ヒト化抗体またはその断片、特に同じCDRが抗体中に二度は存在し得ないヒト化抗体またはその断片に関する。 30

【0074】

また別の態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1、CDR2を表すSEQ ID NO：2、およびCDR3を表すSEQ ID NO：3、ならびに軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4、CDR2を表すSEQ ID NO：5、およびCDR3を表すSEQ ID NO：6からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を持つ少なくとも5つのペプチドを含む、ヒト化抗体またはその断片、特に同じCDRが抗体中に二度は存在し得ないヒト化抗体またはその断片に関する。 40

【0075】

また別の態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1、CDR2を表すSEQ ID NO：2、およびCDR3を表すSEQ ID NO：3、ならびに軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4、CDR2を表すSEQ ID NO：5、およびCDR3を表すSEQ ID NO：6のアミノ酸配列を持つペプチドを含む、ヒト化抗体またはその断片に関する。

【0076】

具体的な態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR2を表すSEQ ID NO：2のアミノ酸配列を 50

持つ少なくとも1つのペプチドを含む、ヒト化抗体、重鎖可変領域（HCVR）、またはその断片に関する。

【0077】

別の具体的な態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR3を表すSEQ ID NO：3のアミノ酸配列を持つ少なくとも1つのペプチドを含む、ヒト化抗体、重鎖可変領域（HCVR）、またはその断片に関する。

【0078】

別の具体的な態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1およびCDR2を表すSEQ ID NO：2のアミノ酸配列を持つ少なくとも2つのペプチドを含む、ヒト化抗体、重鎖可変領域（HCVR）、またはその断片に関する。

10

【0079】

別の具体的な態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1およびCDR3を表すSEQ ID NO：3のアミノ酸配列を持つ少なくとも2つのペプチドを含む、ヒト化抗体、重鎖可変領域（HCVR）、またはその断片に関する。

【0080】

別の具体的な態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、重鎖可変領域（HCVR）のCDR2を表すSEQ ID NO：2およびCDR3を表すSEQ ID NO：3のアミノ酸配列を持つ少なくとも2つのペプチドを含む、ヒト化抗体、重鎖可変領域（HCVR）、またはその断片に関する。

20

【0081】

別の具体的な態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域と、重鎖可変領域（HCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：1、重鎖可変領域（HCVR）のCDR2を表すSEQ ID NO：2、および軽鎖可変領域（LCVR）CDR1を表すSEQ ID NO：4からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのCDRとを有する可変領域を含む、ヒト化抗体またはその断片に関する。

【0082】

別の具体的な態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4およびCDR2を表すSEQ ID NO：5のアミノ酸配列を持つ少なくとも2つのペプチドを含む、ヒト化抗体、軽鎖可変領域（LCVR）、またはその断片に関する。

30

【0083】

別の具体的な態様において、本発明は、ヒト由来または霊長類由来の重鎖フレームワーク領域中に組み込まれた、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO：4およびCDR3を表すSEQ ID NO：6のアミノ酸配列を持つ少なくとも2つのペプチドを含む、ヒト化抗体、軽鎖可変領域（LCVR）、またはその断片に関する。

【0084】

マウスC2抗体の重鎖可変領域（HCVR）および軽鎖可変領域（LCVR）の両方が各々、そのCDR領域のうちの少なくとも1つをヒト化抗体の少なくとも2つのCDR領域に与える、ヒト化抗体またはその断片が、本発明によってさらに含まれる。したがって、結果として生じるヒト化抗体またはその断片は、以下を含んでもよい：

40

- 少なくともCDR1（LCVR）を表すSEQ ID NO：4のアミノ酸配列と組み合わせたCDR1（HCVR）を表すSEQ ID NO：1のアミノ酸配列；
- 少なくともCDR1（LCVR）を表すSEQ ID NO：4のアミノ酸配列と組み合わせたCDR2（HCVR）を表すSEQ ID NO：2のアミノ酸配列；
- 少なくともCDR1（LCVR）を表すSEQ ID NO：4のアミノ酸配列と組み合わせたCDR3（HCVR）を表すSEQ ID NO：3のアミノ酸配列；
- 少なくともCDR1（LCVR）を表すSEQ ID NO：5のアミノ酸配列と組み合わせたCDR2（HCVR）

50

R)を表すSEQ ID NO:1のアミノ酸配列;

-少なくともCDR2(LCVR)を表すSEQ ID NO:5のアミノ酸配列と組み合わせたCDR2(HCV R)を表すSEQ ID NO:2のアミノ酸配列;

-少なくともCDR3(LCVR)を表すSEQ ID NO:6のアミノ酸配列と組み合わせたCDR2(HCV R)を表すSEQ ID NO:2のアミノ酸配列;

-少なくともCDR1(LCVR)を表すSEQ ID NO:6のアミノ酸配列と組み合わせたCDR3(HCV R)を表すSEQ ID NO:1のアミノ酸配列;

-少なくともCDR2(LCVR)を表すSEQ ID NO:5のアミノ酸配列と組み合わせたCDR3(HCV R)を表すSEQ ID NO:3のアミノ酸配列;

-少なくともCDR3(LCVR)を表すSEQ ID NO:6のアミノ酸配列と組み合わせたCDR3(HCV R)を表すSEQ ID NO:3のアミノ酸配列。

10

【0085】

また別の態様において、本発明は、ヒト起源または霊長類起源の軽鎖および／または重鎖の定常領域を含む、本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片に関する。

【0086】

さらなる態様において、本発明は、SEQ ID NO:1~6に示される軽鎖および／または重鎖のCDR領域を代表するアミノ酸のうちの、少なくとも1つ、詳細には少なくとも1つだが多くても5つ、より詳細には少なくとも1つだが多くても4つ、さらにより詳細には少なくとも1つだが多くても3つ、とりわけ少なくとも1つだが多くても2つを、抗体がその完全な機能性を維持するように保存的置換を通じて変化させる、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片に関する。

20

【0087】

特に、本発明は、SEQ ID NO:5に示される軽鎖可変領域(LCVR)のCDR2で、Kabat位置50のLysが、Arg、Gln、およびGluからなる群より選択されるアミノ酸残基によって、特にArgによって置き換えられている、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片に関する。

【0088】

特に、本発明は、SEQ ID NO:5に示されるCDR2で、Kabat位置50のLysが、Arg、Gln、およびGluからなる群より選択されるアミノ酸残基によって、特にArgによって置き換えられている、軽鎖可変領域(LCVR)に関する。

30

【0089】

別の態様において、本発明は、SEQ ID NO:5に示される軽鎖可変領域(LCVR)のCDR2で、Kabat位置53のSerが、AsnおよびThrからなる群より選択されるアミノ酸残基によって、特にAsnによって置き換えられている、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片に関する。

【0090】

特に、本発明は、SEQ ID NO:5に示されるCDR2で、Kabat位置53のSerが、AsnおよびThrからなる群より選択されるアミノ酸残基によって、特にAsnによって置き換えられている、軽鎖可変領域(LCVR)に関する。

40

【0091】

本発明のある態様において、重鎖可変領域(HCVR)が、それぞれ、SEQ ID NO:15および16に示した配列と90%、詳細には95%、より詳細には98%同一であるアミノ酸配列を有する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

【0092】

本発明の別の態様において、軽鎖可変領域(LCVR)が、それぞれ、SEQ ID NO:12および13に示した配列と90%、詳細には95%、より詳細には98%同一であるアミノ酸配列を有する、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

【0093】

本発明のまた別の態様において、重鎖可変領域(HCVR)のCDR領域のうちの少なくとも2

50

つ、とりわけ3つが、SEQ ID NO:1~3に示される対応するCDR領域と90%、詳細には95%、より詳細には98%同一であるアミノ酸配列を有する、ヒト化抗体またはその断片を提供する。

【0094】

本発明のさらなる態様において、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR領域のうちの少なくとも2つ、とりわけ3つが、SEQ ID NO:4~6に示される対応するCDR領域と90%、詳細には95%、より詳細には98%同一であるアミノ酸配列を有する、ヒト化抗体またはその断片を提供する。

【0095】

また別の態様において、本発明は、重鎖可変領域（HCVR）が、それぞれ、SEQ ID NO:15および16に示した配列と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有する、本明細書で前述した通りの本発明によるキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片に関する。 10

【0096】

また別の態様において、本発明は、軽鎖可変領域（LCVR）が、それぞれ、SEQ ID NO:12および13に示した配列と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有する、本明細書で前述した通りの本発明によるキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片に関する。

【0097】

また別の態様において、本発明は、重鎖可変領域（HCVR）のCDR領域のうちの少なくとも1つ、特に少なくとも2つ、とりわけ3つが、SEQ ID NO:1~3に示される対応するCDR領域と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有する、本明細書で前述した通りの本発明によるキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片に関する。 20

【0098】

また別の態様において、本発明は、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR領域のうちの少なくとも1つ、特に少なくとも2つ、とりわけ3つが、SEQ ID NO:4~6に示される対応するCDR領域と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有する、本明細書で前述した通りの本発明によるキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片に関する。 30

【0099】

また別の態様において、本発明は、それぞれ、ヒト生殖系列 V_H および V_K 配列から得られるアクセプターフレームワーク配列を代表するアミノ酸の少なくとも1つが、マウス抗体ACI-01-Ab7C2の対応する領域由来のアミノ酸に対する置換またはそれに対する保存的置換を通じて変化している、本発明による、本明細書で前述した通りのヒト化抗体に関する。

【0100】

特に、本発明は、SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のKABATサブグループ V_{HI} IIのヒト生殖系列 V_H 配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 47位のTrpが、Leu、ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、およびPheからなる群より選択されるアミノ酸、特にLeuおよびIle、とりわけLeuに交換されている、ヒト化抗体に関する。 40

【0101】

本発明はさらに、SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のKABATサブグループ V_{HI} IIのヒト生殖系列 V_H 配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 94位のArgが、SerおよびThrからなる群より選択されるアミノ酸、とりわけSerに交換されている、ヒト化抗体に関する。

【0102】

なおもう1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のKABATサブグループ V_{HIII} のヒト生殖系列 V_H 配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 47位のTrpが、Leu、ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、およびPh 50

eからなる群より選択されるアミノ酸、特にLeuおよびIle、とりわけLeuに交換され、かつ Kabat 94位のArgがSerおよびThrからなる群より選択されるアミノ酸、とりわけSerに交換されているヒト化抗体に関する。

【0103】

本発明はさらに、SEQ ID NO:12において示される軽鎖可変領域のKABATサブグループV_KI Iのヒト生殖系列V_K配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 45位のGlnが、Lys、Arg、Gln、およびAsnからなる群より選択されるアミノ酸、特にLysおよびArg、とりわけLysに交換されているヒト化抗体に関する。

【0104】

本発明はさらに、SEQ ID NO:12において示される軽鎖可変領域のKABATサブグループV_KI Iのヒト生殖系列V_K配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 50位のLeuが、Lys、Arg、Gln、およびAsnからなる群より選択されるアミノ酸、特にLysおよびArg、とりわけLysに交換されているヒト化抗体に関する。

【0105】

本発明はさらに、SEQ ID NO:12において示される軽鎖可変領域のKABATサブグループV_KI Iのヒト生殖系列V_K配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 87位のTyrが、Phe、Leu、Val、Ile、およびAlaからなる群より選択されるアミノ酸、特にLeuおよびPhe、とりわけPheに交換されているヒト化抗体に関する。

【0106】

なおもう1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO:12において示される軽鎖可変領域のKABATサブグループV_KIIのヒト生殖系列V_K配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 53位のAsnが、Gln、His、Lys、およびArgからなる群より選択されるアミノ酸、とりわけHisおよびGlnに交換されてもよいヒト化抗体に関する。

【0107】

なおもう1つの態様において、SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のKABATサブグループV_HIIIのヒト生殖系列V_H配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 47位のTrpが、Leu、ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、およびPheからなる群より選択されるアミノ酸、特にLeuおよびIle、とりわけLeuに交換され、SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のKABATサブグループV_HIIIのヒト生殖系列V_H配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 94位のArgが、SerおよびThrからなる群より選択されるアミノ酸、とりわけSerに交換され、かつSEQ ID NO:12において示される軽鎖可変領域のKABATサブグループV_KIIのヒト生殖系列V_K配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 87位のTyrが、Phe、Leu、Val、Ile、およびAlaからなる群より選択されるアミノ酸、特にLeuおよびPhe、とりわけPheに交換されている、ヒト化抗体に関する。

【0108】

なおもう1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のKABATサブグループV_HIIIのヒト生殖系列V_H配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 47位のTrpが、Leu、ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、およびPheからなる群より選択されるアミノ酸、特にLeuおよびIle、とりわけLeuに交換されている、ヒト化抗体に関する。

【0109】

なおもう1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のKABATサブグループV_HIIIのヒト生殖系列V_H配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 94位のArgが、SerおよびThrからなる群より選択されるアミノ酸、とりわけSerに交換されている、ヒト化抗体に関する。

【0110】

なおもう1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のKABATサブグループV_HIIIのヒト生殖系列V_H配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 47位のTrpが、LeuおよびIle、とりわけLeuに交換され、かつSEQ ID

NO:15において示される重鎖可変領域のKABATサブグループV_HIIIのヒト生殖系列V_H配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 94位のArgが、Serに交換されている、ヒト化抗体に関する。

【0111】

なおもう1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO:12において示される軽鎖可変領域のKABATサブグループV_KIIのヒト生殖系列V_K配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 87位のTyrが、Pheに交換されているヒト化抗体に関する。

【0112】

なおもう1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のKABATサブグループV_HIIIのヒト生殖系列V_H配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 47位のTrpが、LeuおよびIle、とりわけLeuに交換され、SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のKABATサブグループV_HIIIのヒト生殖系列V_H配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 94位のArgが、Serに交換され、かつSEQ ID NO:12において示される軽鎖可変領域のKABATサブグループV_KIIのヒト生殖系列V_K配列から得られたアクセプターフレームワーク配列におけるKabat 87位のTyrがPheに交換されている、ヒト化抗体に関する。

【0113】

具体的な態様において、本発明は、SEQ ID NO:12の軽鎖可変領域に関する。

【0114】

本発明の別の具体的な態様において、SEQ ID NO:12の軽鎖可変領域を含む、ヒト化抗体を提供する。

【0115】

具体的な態様において、本発明は、SEQ ID NO:13に示すシグナル配列を含む軽鎖可変領域に関する。

【0116】

本発明の別の具体的な態様において、SEQ ID NO:13に示すシグナル配列を含む完全な軽鎖可変領域を含む、ヒト化抗体を提供する。

【0117】

本発明の別の具体的な態様において、SEQ ID NO:12の軽鎖可変領域およびSEQ ID NO:14の軽鎖定常領域を含む、ヒト化抗体を提供する。

【0118】

本発明の別の具体的な態様において、SEQ ID NO:13の完全な軽鎖可変領域およびSEQ ID NO:14の軽鎖定常領域を含む、ヒト化抗体を提供する。

【0119】

具体的な態様において、本発明は、SEQ ID NO:15の重鎖可変領域に関する。

【0120】

本発明の別の具体的な態様において、SEQ ID NO:15の重鎖可変領域を含む、ヒト化抗体を提供する。

【0121】

具体的な態様において、本発明は、SEQ ID NO:16に示すシグナル配列を含む重鎖可変領域に関する。

【0122】

本発明の別の具体的な態様において、SEQ ID NO:16に示すシグナル配列を含む完全な重鎖可変領域を含む、ヒト化抗体を提供する。

【0123】

本発明の別の具体的な態様において、SEQ ID NO:15の重鎖可変領域およびSEQ ID NO:17の重鎖定常領域を含む、ヒト化抗体を提供する。

【0124】

本発明の別の具体的な態様において、SEQ ID NO:16の重鎖可変領域およびSEQ ID NO:17の重鎖定常領域を含む、ヒト化抗体を提供する。

【0125】

ある態様において、本発明による、本明細書に記載のヒト化抗体は、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A β 単量体ペプチドおよび／または複数のA β 単量体単位を含むA β 重合体可溶性アミロイドペプチドと、とりわけA β_{1-42} 単量体ペプチドおよび／または複数のA β_{1-42} 単量体単位を含むA β 重合体可溶性アミロイドペプチドと、特に最大で1:1000の抗体対A β_{1-42} のモル濃度比で、とりわけ最大で1:10～1:100の抗体対A β_{1-42} のモル濃度比で、コインキュベーションすることによって、A β 単量体の高分子重合体の原線維への凝集を阻害する。

【0126】

特に、本発明による抗体と、アミロイド単量体および／または重合体の可溶性アミロイドペプチドとのコインキュベーションを、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、とりわけ24時間、28℃～40℃の、詳細には32℃～38℃の温度で、より詳細には37℃で実行する。

【0127】

本発明の具体的な態様において、アミロイド単量体および／または重合体の可溶性アミロイドペプチドとのコインキュベーションを24時間、37℃の温度で遂行する。

【0128】

特に、抗体、特に任意の機能的に等価な抗体またはその機能性部分を含む本発明によるヒト化抗体は、A β_{1-42} 単量体ペプチドおよび／または複数のA β_{1-42} 単量体単位を含むA β 重合体可溶性アミロイドペプチドに結合し、かつA β_{1-42} 単量体ペプチドおよび／または複数のA β_{1-42} 単量体単位を含むA β 重合体可溶性アミロイドペプチドとのコインキュベーションによって、A β 単量体および／または重合体の高分子重合体の原線維への凝集を阻害する。

【0129】

ある態様において、抗体、特に任意の機能的に等価な抗体またはその機能性部分を含む本発明によるヒト化抗体は、最大で1:1000の抗体対A β_{1-42} のモル濃度比で、特に1:10～1:100のモル濃度比で、とりわけ1:10のモル濃度比で、緩衝剤中でインキュベートしたそれぞれのアミロイドペプチド単量体（対照）と比較した場合に、A β 単量体および／または複数のA β 単量体単位を含むA β 可溶性重合体の高分子重合体の原線維への凝集を、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%、とりわけ少なくとも85%～90%、またはそれを上回って阻害する。

【0130】

本発明の具体的な態様において、抗体、特に任意の機能的に等価な抗体またはその機能性部分を含む本発明によるヒト化抗体は、1:100の抗体対A β_{1-42} のモル濃度比で、A β 単量体および／または複数のA β 単量体単位を含むA β 可溶性重合体の高分子重合体の原線維への凝集を少なくとも30%阻害する。

【0131】

本発明の別の具体的な態様において、抗体、特に任意の機能的に等価な抗体またはその機能性部分を含む本発明によるヒト化抗体は、1:10の抗体対A β_{1-42} のモル濃度比で、A β 単量体および／または複数のA β 単量体単位を含むA β 可溶性重合体の高分子重合体の原線維への凝集を少なくとも80%阻害する。

【0132】

本発明による、本明細書に記載の抗体の、アミロイド生成性の単量体ペプチドおよび／または重合体ペプチド、特にアミロイド形態（1-42）との結合は、単量体アミロイド生成性ペプチドおよび／または重合体アミロイド生成性ペプチドの高分子原線維または細線維への凝集の阻害を招く。アミロイド生成性の単量体ペプチドおよび／または重合体ペプチドの凝集の阻害を通じて、本発明による抗体は、アミロイド斑、特に、二次立体構造の変化によって不溶性になること、および罹患した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）の形成を防止または遅らせることができる。

【0133】

本発明による抗体の凝集阻害能力は、当技術分野で公知の任意の適した方法によって、特に密度勾配超遠心法、それに続く予め形成された勾配でのSDS-PAGE沈降解析によって、および／またはチオフラビンT（Th-T）蛍光アッセイ法によって、決定することができる。

【0134】

ある態様において、本発明は、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A β 単量体ペプチド、とりわけA β ₁₋₄₂単量体ペプチドの凝集によって形成される既に形成された高分子重合体アミロイドの原線維または細線維と、1:10～1:1000の、より詳細には1:100の比で、コインキュベーションすることによって、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35%、さらにより詳細には少なくとも40%、とりわけ少なくとも50%、またはそれを上回って既に形成された重合体アミロイドの原線維または細線維を脱凝集する、任意の機能的に等価な抗体またはその機能性部分を含む本明細書に記載の抗体、特にヒト化抗体に関する。

10

【0135】

本発明の具体的な態様において、抗体の凝集阻害能力および脱凝集能力を、それぞれ、密度勾配超遠心分離法、それに続く予め形成された勾配でのSDS-PAGE沈降解析によって決定する。

20

【0136】

本発明の別の具体的な態様において、抗体の凝集阻害能力および脱凝集能力を、それぞれ、チオフラビンT（Th-T）蛍光アッセイ法によって決定する。

【0137】

別の具体的な態様において、本発明による抗体は、アミロイドが既に形成された高分子重合体アミロイドの原線維または細線維と、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、28℃～40℃、詳細には32℃～38℃、より詳細には37℃の温度で、コインキュベーションされる。

【0138】

特に、既に形成された高分子重合体アミロイドの原線維または細線維とのコインキュベーションを24時間、37℃の温度で行う。

30

【0139】

本発明の具体的な態様において、抗体、特に任意の機能的に等価な抗体またはその機能性部分を含む本発明によるヒト化抗体は、1:100の抗体 対 A β 1-42のモル濃度比で、既に形成された重合体の原線維または細線維を少なくとも24%脱凝集させることができる。

【0140】

本発明の別の具体的な態様において、抗体、特に任意の機能的に等価な抗体またはその機能性部分を含む本発明によるヒト化抗体は、1:10の抗体 対 A β 1-42のモル濃度比で、既に形成された重合体アミロイドの原線維または細線維を少なくとも32%脱凝集させることができる。

40

【0141】

アミロイド生成性重合体の原線維または細線維の脱凝集を通じて、本発明による抗体は、アミロイド斑の形成を防止または遅らせることができ、それは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をもたらす。

【0142】

したがって、本明細書に記載の任意の機能的に等価な抗体またはその機能性部分を含む抗体、特にヒト化抗体であって、脳内でのA β の濃度の上昇を招く疾患または状態に罹患した動物、特に哺乳動物、とりわけヒトの脳内でのA β の総量を減少させることができる抗体を提供することは、本発明の1つのさらなる態様である。

50

【0143】

別の態様において、本発明は、それが高度の立体構造成受性(conformational sensitivity)と特に組み合わせさせた、凝集阻害特性と脱凝集特性の両方を示すという点で二重に効果的(bi-effective)である、本発明による、本明細書で前述した通りのヒト化抗体に関する。

【0144】

特に、本発明は、アミロイド単量体および／または重合体の可溶性アミロイドペプチドとの、特に例えば、A β 単量体ペプチド1-39；1-40、1-41、もしくは1-42などの β -アミロイド単量体ペプチド、および／または複数のA β 単量体単位を含む重合体可溶性 β -アミロイドペプチドとの、とりわけA β_{1-42} 単量体および／または複数のA β_{1-42} 単量体単位を含むA β 重合体の可溶性アミロイドペプチドとのコインキュベーションによって、A β 単量体の高分子重合体の原線維または細線維への凝集を阻害し、さらにアミロイド単量体ペプチド、特に例えば、A β 単量体ペプチド1-39；1-40、1-41、もしくは1-42などの β -アミロイド単量体ペプチド、とりわけA β_{1-42} 単量体ペプチドの凝集によって形成される既に形成された高分子重合体アミロイドの原線維または細線維とのコインキュベーションによって、既に形成された重合体の原線維または細線維を脱凝集させることができる、本発明による、本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片に関する。

【0145】

別の局面において、本発明は、 β -シート立体構造を代償にしたランダムコイル立体構造の増加および既に形成された高分子重合体アミロイドの原線維または細線維の向上した可溶化をもたらす、 α -ヘリックスおよび／またはランダムコイル立体構造、詳細にはランダムコイル立体構造、さらにより詳細には分子中の所与の場所での、とりわけA β タンパク質のTyr 10およびVal 12の環境におけるランダムコイル立体構造への β -シート立体構造の転換を誘導することができる、本発明による、本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片、またはヒト化抗体もしくはその断片に関する。特に、 β -シート立体構造の減少は、緩衝剤中でインキュベートした各々の既に形成されたアミロイド重合体の原線維または細線維（対照）と比較して、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40%およびそれ以上に達する。

【0146】

二次構造における転移を誘導する抗体の能力は、固体¹³C NMR分光法によって、特にA β_{1-42} ペプチドにおけるTyr 10およびVal 12 C β の立体構造の積分強度を測定することによって決定される。

【0147】

本発明のさらなる態様において、少なくとも約 1×10^{-7} ～少なくとも約 1×10^{-12} の、詳細には少なくとも約 1×10^{-8} ～少なくとも約 1×10^{-11} の、より詳細には少なくとも約 1×10^{-9} ～少なくとも約 1×10^{-10} の、さらにより詳細には少なくとも約 1×10^{-8} ～少なくとも約 2×10^{-8} の結合親和性でA β 単量体に結合するが、好ましくは、アミロイド前駆体タンパク質（APP）との顕著な交差反応性を少しも示さない、少なくとも1つの軽鎖もしくはその断片または少なくとも1つの重鎖もしくはその断片を含む、本発明による、本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

【0148】

本発明の別の態様において、少なくとも約 1×10^{-7} ～少なくとも約 1×10^{-12} の、詳細には少なくとも約 1×10^{-8} ～少なくとも約 1×10^{-11} の、より詳細には少なくとも約 1×10^{-9} ～少なくとも約 1×10^{-10} の、さらにより詳細には少なくとも約 2×10^{-9} ～少なくとも約 5×10^{-9} の結合親和性でA β の線維、原線維、または細線維に結合するが、好ましくは、アミロイド前駆体タンパク質（APP）との顕著な交差反応性を少しも示さない、少なくとも1つの軽鎖もしくはその断片または少なくとも1つの重鎖もしくはその断片を含む、本発明による、本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

【0149】

別の態様において、本発明による、本明細書で前述した通りの抗体またはその断片は、 $A\beta$ 単量体に対する結合親和性よりも少なくとも10倍、詳細には少なくとも15倍、より詳細には少なくとも20倍、とりわけ少なくとも25倍高い $A\beta$ の線維、原線維、または細線維に対する結合親和性を示す。

【0150】

また別の態様において、哺乳動物の、特にヒトの脳内の $A\beta$ 斑を含む凝集した $A\beta$ に実質的に結合するが、好ましくはアミロイド前駆体タンパク質（APP）との顕著な交差反応性を少しも示さない、本明細書で前述した通りの、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

10

【0151】

本発明の別の局面において、哺乳動物の、特にヒトの脳内の $A\beta$ 単量体を含む、可溶性重合体アミロイド、特にアミロイド β （ $A\beta$ ）に実質的に結合するが、好ましくはアミロイド前駆体タンパク質（APP）との顕著な交差反応性を少しも示さない、本明細書で前述した通りの、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

【0152】

哺乳動物の、特にヒトの脳内の $A\beta$ 斑負荷を顕著に低下させる、本明細書で前述した通りの、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片をさらに提供する。このことは、抗体の斑への結合によるか、または立体構造の転換を誘導することで線維を可溶性の重合体形態および単量体形態まで脱凝集させ、哺乳動物およびヒトを含む対象の組織および／または体液中、特に対象の脳内の脱凝集および可溶化したアミロイド形態、特にアミロイド β （ $A\beta$ ）形態に結合しかつ該 $A\beta$ 形態を安定化することによって、アミロイド、特にアミロイド β （ $A\beta$ ）の不溶性の状態と凝集した状態との間の平衡をその可溶性の形態へと移動させることによるかのいずれかで、達成することが可能である。したがって、本発明による抗体の活性を通じて、対象の組織および／または体液中、特に脳内での堆積よりもむしろ、末梢での除去および異化に有利に働く。したがって、本発明による抗体の有利な効果を、抗体の斑への結合を伴わずに得ることができる。

20

【0153】

この安定化活性を通じて、本発明による抗体は、対象、詳細には哺乳動物、さらにより詳細にはヒトの組織および／または体液中の、重合体でかつあまり凝集していない可溶性アミロイドタンパク質、特にアミロイド β （ $A\beta$ ）タンパク質の毒性作用を中和することができる。したがって、本発明の具体的な態様において、本発明による抗体は、対象の脳内の凝集したアミロイド β に必ずしも結合することなくその有利な効果を達成する可能性がある。

30

【0154】

本発明のさらなる局面において、マウスドナー抗体の親和性よりも少なくとも5倍、詳細には少なくとも8倍、より詳細には少なくとも10倍、とりわけ少なくとも15倍の $A\beta$ に対する親和性を有するマウスドナー抗体から、特に2005年12月1日にBraunschweig, Mascher oder Weg 1B, 38124 BraunschweigのDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) に、アクセッション番号：DSM ACC2750の下で寄託された（本出願の全体を通じて、「mC2」と名付けられかつヒト化C2抗体についてはhC2と名付けられている）マウス抗体ACI-01-Ab7C2から得られる少なくとも1つ、詳細には2つ、より詳細には3つのCDR領域を組み入れた少なくとも1つの軽鎖もしくはその断片または少なくとも1つの重鎖もしくはその断片を含む、本発明による、本明細書で前述した通りのヒト化抗体またはその断片を提供する。

40

【0155】

本発明の抗体は、ある態様において、任意のアイソタイプおよびサブタイプ（例えば、IgM、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgA1、およびIgA2）の（例えば、2つの全長軽鎖および2つの全長重鎖を持つ）完全な抗体；とりわけIgG4アイソタイプの抗体であり得

50

；あるいは、別の態様において、それは完全な抗体の抗原結合断片（例えば、Fab、F(ab')₂、およびFv）であり得る。

【0156】

したがって、本発明はまた、本明細書で記載した抗体の抗原結合断片に関する。本発明のある態様において、断片は、Fab免疫グロブリン発現ライブラリーの産物ならびに上記で言及した抗体および断片のいずれかのエピトープ結合断片を含む、Fab断片、Fab'断片、F(ab)₂断片、およびFv断片からなる群より選択される。

【0157】

別の態様において、本発明の抗体または抗原結合断片をポリエチレングリコールに結合する。さらに別の態様において、本発明の抗体の定常領域を修飾し、未修飾の抗体と比べて少なくとも1つの定常領域を介する生物学的エフェクター機能を低下させる。また別の態様において、本発明の抗体または抗原結合断片は、改変されたエフェクター機能を有するFc領域を含む。

【0158】

本発明はさらに、本発明による、本明細書で先に開示したような、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片をコードするヌクレオチド配列を含む、ヌクレオチド分子に関する。

【0159】

特に、本発明は、それぞれ重鎖可変領域（HCVR）の相補性決定領域（CDR）2および3を示す、SEQ ID NO：2および3に示される一続きの連続的なアミノ酸分子をコードするヌクレオチド配列または相補配列を含む、ヌクレオチド分子に関する。

【0160】

より詳細には、本発明は、軽鎖可変領域（LCVR）の相補性決定領域（CDR）1を示す、SEQ ID NO：4に示される一続きの連続的なアミノ酸分子をコードするヌクレオチド配列または相補配列を含む、ヌクレオチド分子に関する。

【0161】

本発明の別の態様において、重鎖可変領域（HCVR）の、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列をそれぞれコードする、SEQ ID NO：18およびSEQ ID NO：19に示されるヌクレオチド配列または相補配列を含む、ヌクレオチド分子を提供する。

【0162】

本発明の別の態様において、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1のヌクレオチド配列をコードする、SEQ ID NO：20に示されるヌクレオチド配列または相補配列を含む、ヌクレオチド分子を提供する。

【0163】

本発明の別の態様において、軽鎖可変領域をコードするSEQ ID NO：21のヌクレオチド配列または相補配列を含む、ヌクレオチド分子を提供する。

【0164】

本発明の別の態様において、シグナル配列を含む完全な軽鎖可変領域をコードする、SEQ ID NO：22のヌクレオチド配列または相補配列を含む、ヌクレオチド分子を提供する。

【0165】

本発明の別の態様において、SEQ ID NO：22の軽鎖可変領域およびSEQ ID NO：23の軽鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を提供する。本発明はまた、本ヌクレオチド分子の相補鎖を含む。

【0166】

本発明の別の態様において、重鎖可変領域をコードするSEQ ID NO：24のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を提供する。本発明はまた、本ヌクレオチド分子の相補鎖を含む。

【0167】

本発明の別の態様において、シグナル配列を含む完全な重鎖可変領域をコードするSEQ ID NO：25のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を提供する。本発明はまた、本ヌ

10

20

30

40

50

クレオチド分子の相補鎖を含む。

【0168】

本発明の別の態様において、SEQ ID NO：25の重鎖可変領域およびSEQ ID NO：26の重鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を提供する。本発明はまた、本ヌクレオチド分子の相補鎖を含む。

【0169】

上記の抗体をコードする本発明のヌクレオチド配列のうちの1つに、特にその相補鎖に、孤立してかまたはより長いヌクレオチド分子の一部としてかのいずれかでハイブリダイズするヌクレオチド配列もまた、本発明によって含まれる。

【0170】

特に、本発明は、従来のハイブリダイゼーション条件下で、特にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、SEQ ID NO：18～26および29～32に示したヌクレオチド配列のいずれかに、特にその相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列に関する。

【0171】

本発明の別の態様において、本発明による、本明細書で先に言及したような核酸分子を含む発現ベクターを提供する。

【0172】

本発明の別の態様において、本発明による、本明細書で先に言及したような核酸を含む発現ベクターを含む、細胞を提供する。

【0173】

また別の態様において、本発明は、本発明による抗体、特に治療的有効量の、機能的に等価な抗体またはその任意の誘導体もしくは機能性部分を含む、本発明による本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を含む組成物、特に薬学的に許容される担体を任意でさらに含む薬学的または治療的な組成物である組成物に関する。

【0174】

本発明の別の態様において、組成物は治療的有効量の抗体を含む。

【0175】

抗体、特に本発明によるモノクローナル抗体、特に治療的有効量の、任意の機能的に等価な抗体またはその誘導体もしくは機能性部分を含む、本発明による本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片、ならびに任意で、さらなる生物活性物質および／または薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤を含む組成物が、本発明によってさらに含まれる。

【0176】

特に、本発明は、さらなる生物活性物質が、アルツハイマー病に關与するA β タンパク質などのアミロイドまたはアミロイド様タンパク質と関連する一群の疾患および障害であるアミロイドーシスの薬物治療で用いられる化合物である、組成物または混合物に関する。

【0177】

本発明の別の態様において、その他の生物活性物質または化合物はまた、アミロイド β によって引き起こされるアミロイドーシスの処置で使用し得るかまたはその他の神経学的障害の薬物治療で使用し得る治療的薬剤であってもよい。

【0178】

他の生物活性物質または化合物は、その生物学的効果を、本発明による抗体と同じもしくは類似の機序によって発揮してもよく、または関係のない作用機序によって、または複数の関係のあるおよび／もしくは関係のない作用機序によって発揮してもよい。

【0179】

一般に、他の生物活性化合物には、ニューロン伝達賦活薬、精神治療薬、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、カルシウムチャネル拮抗薬、生体アミン、ベンゾジアゼピン系精神安定剤、アセチルコリンの合成、貯蔵または放出の賦活薬、アセチルコリンシナプス後

10

20

30

40

50

受容体アゴニスト、モノアミノオキシダーゼ-Aまたは-Bの阻害剤、N-メチル-D-アスパラギン酸グルタミン酸受容体アンタゴニスト、非ステロイド性抗炎症薬、抗酸化剤、およびセロトニン作動性受容体アンタゴニストが含まれ得る。

【0180】

より詳細には、本発明は、本発明による抗体ならびに、任意で、薬学的に許容される担体および／もしくは希釈剤および／もしくは賦形剤と共に、酸化ストレスに対して有効な化合物、抗アポトーシス性化合物、金属キレート剤、ピレンゼピンおよび代謝物などのDNA修復の阻害剤、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸(3APS)、1,3-プロパンジスルホネート(1,3PDS)、 α -セクレターゼ活性化剤、 β -および γ -セクレターゼ阻害剤、タウタンパク質、神経伝達物質、 β -シート破壊剤(breaker)、アミロイド β を除去する／枯渇させる細胞成分の誘引剤、ピログルタミン酸化したアミロイド β 3-42を含むN末端切断型アミロイド β の阻害剤、抗炎症分子、またはタクリン、リバスチグミン、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剤(ChEI)、M1アゴニスト、ならびに任意のアミロイドもしくはタウの修飾薬物を含むその他の薬物、ならびに栄養補給剤からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を含む組成物または混合物に関する。

10

【0181】

本発明はさらに、化合物がコリンエステラーゼ阻害剤(ChEI)である混合物、特に化合物がタクリン、リバスチグミン、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化合物である、組成物または混合物に関する。

【0182】

さらなる態様において、本発明による組成物は、本発明による抗体と共にナイアシンまたはメマンチンを、ならびに任意で、薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤を含んでもよい。

20

【0183】

本発明のまた別の態様において、抗体、特に本発明によるモノクローナル抗体、特に本発明による本明細書に記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片、ならびに任意で、さらなる薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤と共に、幻覚、妄想、(際立った思考散乱、脱線、脱線思考が現れる)思考障害、および突飛な行動または混乱した行動だけでなく、処置を必要とする対象の無快感症、抑揚のない感情、無気力症、および社会的引きこもりも含む陽性および陰性の精神症状の処置用の、例えば、クロザピン、ジプラシドン、リスペリドン、アリプラゾール、またはオランザピンなどの「非定型抗精神病薬」を含む組成物を提供する。

30

【0184】

本発明の1つの特定の態様において、本発明による、および本明細書に前述した通りの組成物および混合物は、抗体および生物活性物質をそれぞれ治療的有效量で含む。

【0185】

本発明による抗体と組み合わせた混合物中で好適に用いることができるその他の化合物は、WO 2004/058258(とりわけ16~17ページを参照)に記載されており、これには治療薬標的(36~39ページ)、アルカンスルホン酸およびアルカノール硫酸(39~51ページ)、コリンエステラーゼ阻害剤(51~56ページ)、NMDA受容体アンタゴニスト(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)、抗酸化剤(61~62ページ)、ペルオキシソーム増殖活性化受容体(PPAR)アゴニスト(63~67ページ)、コレステロール低下剤(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鬱薬(80~82ページ)、栄養補給物質(83~89ページ)ならびに脳内での生物活性物質の生物学的利用能を高める化合物(89~93ページ参照)およびプロドラッグ(93および94ページ)が含まれ、この文書は参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0186】

別の態様において、本発明は、抗体、特に本発明によるモノクローナル抗体、特に本発明による本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくは

50

はその断片、ならびに／あるいは生物活性物質を治療的有効量で含む組成物に関する。

【0187】

本発明はさらに、処置を必要とする対象におけるアルツハイマー病（AD）、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-認知症複合などの神経学的障害を含むが、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に関係のあるアミロイドーシスを含むアミロイド斑形成と関連する一群の疾患および障害であるアミロイドーシス；ならびに進行性核上麻痺、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）、成人発症型糖尿病、老人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アミロイド様タンパク質と関連するその他の疾患、の影響を処置または緩和するための医薬の調製のための、抗体、特に本発明によるモノクローナル抗体、特に本発明による本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片、および／もしくはその機能性部分、ならびに／または本抗体を含む薬学的組成物もしくは混合物、の使用に関する。

10

【0188】

処置を必要とする対象における、アルツハイマー病（AD）、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-認知症複合などの神経学的障害も含むが、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に関係のあるアミロイドーシスを含むアミロイド斑形成と関連する一群の疾患および障害である、アミロイドーシス；ならびに進行性核上麻痺、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）、成人発症型糖尿病、老人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アミロイド様タンパク質と関連するその他の疾患、の影響を防止するか、処置するか、または緩和する方法で使用するための、抗体、特に本発明によるモノクローナル抗体、特に本発明による本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片、および／もしくはその機能性部分、ならびに／または特に治療的有効量の、抗体および／もしくはその機能性部分を含む薬学的組成物もしくは混合物の調製のための方法であって、抗体、特に本発明によるモノクローナル抗体、特に薬学的に許容される形態の本発明によるキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を製剤化する工程を含む方法もまた、本発明によって含まれる。

20

30

【0189】

抗体および／もしくはその機能性部分、特にヒト化抗体および／もしくはその機能性部分、またはそのような抗体および／もしくはその機能性部分を含む組成物もしくは混合物を、治療的有効量で、以下のような障害によって冒された哺乳動物またはヒトを含む対象に投与することによって、それを必要とする対象におけるアルツハイマー病（AD）、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-認知症複合などの神経学的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に関係のあるアミロイドーシスを含む、アミロイド斑形成と関連する一群の疾患および障害であるアミロイドーシス；ならびに、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）、成人発症型糖尿病、老人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アミロイド様タンパク質と関連するその他の疾患、の影響を防止するか、処置するか、または緩和するための方法がさらに、本発明によって含まれる。

40

【0190】

以下のような障害によって冒された対象、特に哺乳動物またはヒトに、抗体、特に本発明による、本明細書に記載の薬学的組成物を投与することによって、それを必要とする対象におけるアルツハイマー病（AD）などの神経学的障害、特に認知的記憶能力の喪失を特

50

徴とする疾患または状態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に関係のあるアミロイドーシスを含む、アミロイド斑形成と関連する一群の疾患および障害であるアミロイドーシスの処置のための方法を提供することも、本発明の目的である。

【0191】

具体的な態様において、本発明は、それを必要とする対象、特に哺乳動物またはヒトに、抗体、特に本発明による本明細書で前述した通りの薬学的または治療的な組成物を投与することによって、認知的記憶能力を保持するかまたは増加させるための、特に、記憶障害(impairment)に罹患している、対象、特に哺乳動物またはヒトの認知的記憶能力を回復させるための方法を提供する。

10

【0192】

治療的組成物およびそのような組成物を生産する方法だけでなく、本発明による、本明細書で前述した通りの抗体を用いた、処置を必要とする対象におけるアルツハイマー病(AD)などの神経学的障害、特に認知的記憶能力の喪失を特徴とする疾患または状態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に関係のあるアミロイドーシスを含む、アミロイド斑形成と関連する一群の疾患および障害であるアミロイドーシスの処置のための方法を提供することも、本発明のさらなる目的である。

【0193】

特に、本発明は、認知的記憶能力の保持をもたらす、認知的記憶能力の喪失を特徴とするアミロイド関連の状態に罹患している、対象、特に哺乳動物またはヒトの処置に関する。

20

【0194】

本発明はさらに、アミロイドタンパク質のエピトープに対する抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を試料中でまたはインサイチューで検出する工程を含む、対象におけるアミロイド関連疾患または状態の診断の方法であって、

(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対象の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エピトープに結合する、抗体、特に本発明によるモノクローナル抗体、特に本発明による、本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片、および／またはその機能性部分と接触させる工程；

30

(b) 該抗体および／またはその機能性部分をアミロイドタンパク質と結合させて免疫学的複合体を形成させる工程；

(c) 該免疫学的複合体の形成を検出する工程；ならびに

(d) 免疫学的複合体の有無と、試料または対象の特定の身体部分もしくは部位におけるアミロイドタンパク質の有無とを相関付ける工程を含む方法に関する。

【0195】

決定を必要とする対象の組織および／または体液中のアミロイド形成的な斑負荷(burden)の程度を決定する方法であって、

(a) 調査中の対象の組織および／または体液を代表する試料を得る工程；

40

(b) 抗体、特に本発明によるモノクローナル抗体、特に本発明による、本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片、もしくはヒト化抗体もしくはその断片、ならびに／またはその機能性部分を用いて、アミロイドタンパク質の存在に関して該試料を検査する工程；

(c) 該タンパク質に結合した抗体の量を決定する工程；ならびに

(d) 対象の該組織および／または体液中の斑負荷を計算する工程を含む方法も含まれる。

【0196】

特に、本発明は、免疫学的複合体の有無が、アミロイドタンパク質の有無と相関するように工程(c)において免疫学的複合体の形成を決定する、決定を必要とする対象の組織お

50

よび／または体液中のアミロイド形成的な斑負荷の程度を決定する方法に関する。

【0197】

本発明の別の態様において、抗体、特に本発明によるモノクローナル抗体、特に本発明による、本明細書で前述した通りのキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片、および／またはその機能性部分を含む、対象におけるアミロイド関連の疾患または状態の検出および診断のための検査キットを提供する。

【0198】

特に、本発明は、本発明による1つもしくは複数の抗体、および／またはその機能性部分を入れた容器、ならびに免疫学的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、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かつ該免疫学的複合体の形成を検出する目的のために抗体を用いるための取扱説明書を含む、検出および診断を必要とする対象におけるアミロイド関連の疾患または状態の検出および診断のための検査キットに関する。

【0199】

もう1つの局面において、本発明は、野生型Fc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸改変を含む変種Fc領域をさらに含む、本明細書において記述される免疫グロブリンを用いて、それを必要とする対象におけるアミロイドーシスに関連する疾患を予防、処置、または検出するための方法および組成物を提供する。Fc領域は、抗体またはその断片のエフェクター機能を媒介する。抗体のFc部分またはその断片がその受容体に結合または活性化する能力を調整することによって、抗体またはその断片のエフェクター機能を排除または増強することが可能である。

【0200】

このように、もう1つの局面において、本発明は、エフェクター機能を減少させる少なくとも1つのアミノ酸変異を含む変種Fc領域をさらに含む本発明の抗体またはその断片を提供する。1つのそのような局面において、少なくとも1つのアミノ酸変異は、抗体またはその断片のグリコシル化を減少させる。もう1つのそのような局面において、少なくとも1つのアミノ酸変異は同族のFc受容体に対する結合を減少させる。もう1つのそのような局面において、少なくとも1つのアミノ酸変異は、抗体またはその断片の結合時に同族のFc受容体の活性化を減少させる。1つのそのような局面において、変種Fc領域は変種IgG1 Fc領域である。1つのそのような局面において、抗体またはその断片は、Fc領域においてD26 5A変異を含む。

【0201】

もう1つの局面において、本発明は、エフェクター機能を増加させる少なくとも1つのアミノ酸変異を含む変種Fc領域をさらに含む本発明の抗体またはその断片を提供する。1つのそのような局面において、少なくとも1つのアミノ酸変異は、抗体またはその断片のグルコシル化を増強する。もう1つのそのような局面において、少なくとも1つのアミノ酸変異は同族のFc受容体に対する結合を増加させる。もう1つのそのような局面において、少なくとも1つのアミノ酸変異は、抗体またはその断片の結合時に同族のFc受容体の活性化を増加させる。本発明の上記および他の目的、特徴および利点は、以下に開示する態様および添付する特許請求の範囲の詳細な記述を吟味することによって明らかになると考えられる。

[本発明1001]

β -アミロイドタンパク質上の少なくとも1つのエピトープに対して特異的に結合するキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片であって、該エピトープが、抗体に対する結合に主に関係する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、該少なくとも2つの連続するアミノ酸残基が、

(a) 以下のコア配列 (SEQ ID NO:10) 内に埋め込まれた-Lys-Leu-:

Xaa1 - Xaa2 - Lys - Leu - Xaa3

式中、

Xaa1はHis、Asn、Gln、Lys、およびArgからなる群より選択されるアミノ酸であり、

10

20

30

40

50

Xaa2はAsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸であり、かつ

Xaa3は、Ala、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸である；ならびに

(b) 以下のコア配列 (SEQ ID NO: 9) 内に埋め込まれた -Phe-Phe- :

Xaa3 - Phe - Phe - Xaa4 - Xaa5 - Xaa6

式中、

Xaa3はAla、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、

Xaa4はAla、Val、Leu、Ser、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり

、

Xaa5は、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、かつ

Xaa6は、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基である、

からなる群より選択され、

該キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片が変種Fc領域を含み、かつ該変種Fc領域が、この分子が野生型Fc領域より改変されたエフェクター機能を有するように、野生型Fc領域に対して少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1002]

β-アミロイドタンパク質上の少なくとも2つのエピトープに特異的に結合するキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片であって、

該少なくとも2つのエピトープが、抗体の結合に主に関係する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基であるそれぞれ-Phe-Phe-および-Lys-Leu-を各々含み、かつ少なくとも2つの別個の結合部位がそれぞれ、SEQ ID NO:7において示されるアミノ酸配列Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - およびSEQ ID NO:8において示されるアミノ酸配列His - Gln - Lys - Leu - Val - を示す、

本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1003]

可変領域において非ヒト起源の少なくとも1つのCDR、1つまたは複数のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域、および任意でヒトまたは霊長類起源の抗体に由来する定常領域を含む、ヒト化抗体またはその断片であって、

以下のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:11) を含むエピトープにおいて、β-アミロイドタンパク質、β-アミロイド単量体ペプチド、複数のβ-アミロイド単量体単位を含む多量体可溶性アミロイドペプチド、β-アミロイド線維、原線維、もしくは細線維、および単離されたまたはβ-アミロイド斑の一部としてのβ-アミロイド多量体ペプチドに特異的に結合することができる、

ヒト化抗体もしくはその断片：

Xaa1 - Xaa2 - Lys - Leu - Xaa3 - Phe - Phe- Xaa4 - Xaa5 - Xaa6；

式中、

Xaa1は、His、Asn、Glnからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にHisであり；

Xaa2は、AsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にGlnであり；

Xaa3は、Val、Leu、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にValであり

；

Xaa4は、AlaおよびValからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にAlaであり；

Xaa5は、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にGluであり；ならびに

Xaa6は、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基、特にAspである。

[本発明1004]

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域と、重鎖可変領域 (HCVR) のCDR1を表すSEQ ID NO:1、CDR2を表すSEQ ID NO:2、およびCDR3を表すSEQ ID NO:3、ならびに軽鎖可変領域 (LCVR) のCDR1を表すSEQ ID NO:4、CDR2を表すSEQ ID NO:5、およびCDR3を表すSEQ

10

20

30

40

50

ID NO:6からなる配列の群より選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのCDRとを有する可変領域を含む、本発明1001のヒト化抗体またはその断片。

[本発明1005]

SEQ ID NO:1～6において示される軽鎖および重鎖CDR領域のアミノ酸の少なくとも1つが、抗体がその完全な機能性を維持するように、保存的置換を通して変化している、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1006]

SEQ ID NO:5において示される軽鎖可変領域（LCVR）のCDR2のアミノ酸配列内で、Kabat 50位のLysがArg、Gln、またはGlu、特にArgに交換され、Kabat 53位のSerがAsnまたはThr、特にAsnに交換され、および／またはKabat 53位のAsnがAla、Val、Leu、Ser、およびIle、とりわけSerに交換されている、本発明1005のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。 10

[本発明1007]

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域のアミノ酸の少なくとも1つが、マウス抗体ACI-01-Ab7C2の対応する領域由来のアミノ酸への置換またはそれへの保存的置換を通して変化している、本発明1001のヒト化抗体またはその断片。

[本発明1008]

SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域におけるKabat 47位のTrpが、Leu、ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、およびPheからなる群より選択されるアミノ酸、特にLeuおよびIle、とりわけLeuに交換され、かつ／または 20

SEQ ID NO:15において示される重鎖可変領域のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域におけるKabat 94位のArgが、SerおよびThrからなる群より選択されるアミノ酸、特にSerに交換され、かつ／または

SEQ ID NO:12において示される軽鎖可変領域のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域におけるKabat 87位のTyrがPhe、Leu、Val、Ile、およびAlaからなる群より選択されるアミノ酸、特にLeuおよびPhe、とりわけPheに交換されている、本発明1162のヒト化抗体またはその断片。

[本発明1009]

重鎖可変領域（HCVR）が、SEQ ID NO:15および16においてそれぞれ記載される配列と90％、詳細には95％、より詳細には98％、さらにより詳細には100％同一であるアミノ酸配列を有する、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。 30

[本発明1010]

軽鎖可変領域（LCVR）が、SEQ ID NO:12および13においてそれぞれ記載される配列と90％、詳細には95％、より詳細には98％、さらにより詳細には100％同一であるアミノ酸配列を有する、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1011]

重鎖可変領域（HCVR）のCDR領域の少なくとも2つ、特に3つが、SEQ ID NO:1～3において記載される対応するCDR領域と90％、詳細には95％、より詳細には98％、さらにより詳細には100％同一であるアミノ酸配列を有する、本発明1001のヒト化抗体またはその断片。 40

[本発明1012]

軽鎖可変領域（LCVR）のCDR領域の少なくとも2つ、特に3つが、SEQ ID NO:4～6において記載される対応するCDR領域と90％、詳細には95％、より詳細には98％、さらにより詳細には100％同一であるアミノ酸配列を有する、本発明1001のヒト化抗体またはその断片。

[本発明1013]

Aβ単量体の凝集を阻害することができ、かつ多量体の原線維または細線維、特に高度 50

の立体構造感受性と組み合わせさせて多量体の原線維または細線維を脱凝集することができる、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1014]

A β 単量体ペプチド1-39；1-40、1-41、および1-42から選択される β -アミロイド単量体ペプチドと、および／または複数の前記A β 単量体ペプチドを含む多量体の可溶性 β -アミロイドペプチドと、ならびに特にA β 1-42単量体ペプチドおよび／または複数のA β 1-42単量体ペプチドを含むA β 多量体可溶性アミロイドペプチドとコインキュベーションすると、A β 単量体が高分子多量体の原線維または細線維へ凝集することを阻害し、かつA β 単量体ペプチド1-39；1-40、1-41、および1-42から選択される β -アミロイド単量体ペプチドの凝集によって、および特にA β 1-42単量体ペプチドの凝集によって形成された、既に形成された高分子量多量体アミロイド原線維または細線維とコインキュベーションすると、既に形成された多量体の原線維または細線維を脱凝集することができる、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1015]

哺乳動物およびヒトから選択される対象の脳において凝集したA β に実質的に結合する、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1016]

哺乳動物またはヒトの脳におけるA β 斑の負荷を低減させる、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1017]

本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片をコードするヌクレオチド配列、または重鎖可変領域（HCVR）の相補性決定領域（CDR）2および3をそれぞれ表すSEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:3をコードする配列、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO:4、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20をコードする配列、SEQ ID NO:22の軽鎖可変領域をコードする配列、SEQ ID NO:22の軽鎖可変領域とSEQ ID NO:23の軽鎖定常領域とをコードする配列、SEQ ID NO:25の重鎖可変領域をコードする配列、およびSEQ ID NO:25の重鎖可変領域とSEQ ID NO:26の重鎖定常領域とをコードする配列から選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

[本発明1018]

本発明1017の核酸分子を含む発現ベクター。

[本発明1019]

本発明1018の発現ベクターを含む細胞。

[本発明1020]

任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれる本発明1001の抗体の治療的有効量を含み、かつ薬学的に許容される担体を任意でさらに含む、組成物。

[本発明1021]

任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分を含み、かつ、さらなる生物学的に活性な物質を治療的有効量で、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／もしくは賦形剤を任意でさらに含む、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を含む組成物であって、該さらなる生物学的に活性な物質が、アミロイドーシスの処置において用いられる化合物、酸化的ストレスに対して有効な化合物、抗アポトーシス性化合物、金属キレート剤、ピレンゼピンおよび代謝物などのDNA修復の阻害剤、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸（3APS）、1,3-プロパンスルホネート（1,3-PDS）、 α -セクレターゼ活性化剤、 β -および γ -セクレターゼ阻害剤、タウタンパク質、神経伝達物質、 β -シート破壊剤（breaker）、アミロイド β を除去する／枯渇させる細胞成分の誘引剤、ピログルタミン酸化したアミロイド β 3-42を含むN-末端切断型アミロイド β の阻害剤、抗炎症分子、ならびにタクリン、リバスチグミン、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剤（ChEI）、M1アゴニスト、および任意のアミロイドまたはタウ修飾薬物を含む他の薬物、および栄養補給剤、ならびに任意で薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤から

選択される、組成物。

[本発明1022]

本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を、そのような障害に罹患した対象に治療的有効量で投与する段階を含む、それを必要とする対象における、アルツハイマー病（AD）、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-認知症複合などの神経学的障害であるアミロイドーシス；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）、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、および黄斑変性から選択される1つまたは複数のアミロイドーシス関連疾患の効果を予防、処置、または緩和するための方法。

10

[本発明1023]

認知記憶能の喪失を特徴とするアミロイド関連状態に罹患した対象、特に哺乳動物またはヒトの処置によって、認知記憶能の保持の向上またはその完全な回復が起こる、本発明1022の方法。

[本発明1024]

以下を含む、対象におけるアミロイド関連疾患または状態を診断する方法：

- (a) アミロイドタンパク質を含有することが疑われる対象の組織試料、または特定の身体部分もしくは身体領域に、本発明1001の抗体を接触させる段階；
- (b) 前記抗体をアミロイドタンパク質に結合させる段階；
- (c) 前記タンパク質に結合した抗体を検出する段階；および
- (d) 抗体結合の有無を、試料または特定の身体部分もしくは領域におけるアミロイドタンパク質の有無と関連させる段階。

20

[本発明1025]

以下の段階を含む、対象の組織および／または体液におけるアミロイド形成による斑負荷の程度を決定する方法：

- (a) 治験中の対象における組織および／または体液を表す試料を得る段階；
- (b) 本発明1001の抗体によってアミロイドタンパク質の存在に関して試料を試験する段階；
- (c) タンパク質に結合した抗体の量を決定する段階；および
- (d) 対象の組織および／または体液における斑負荷を計算する段階。

30

[本発明1026]

本発明1001の抗体を含み、かつ、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する目的で抗体を用いるための、および免疫学的複合体の有無がアミロイドタンパク質の有無と関連するような、免疫学的複合体の形成を検出するための説明書を任意でさらに含む、アミロイド関連疾患および状態を検出および診断するための試験キット。

[本発明1027]

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域と、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、およびSEQ ID NO:6から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのCDRとを含む、単離された軽鎖可変領域（LCVR）。

[本発明1028]

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域と、SEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:3からなる配列の群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのCDRとを含む、単離された重鎖可変領域（HCVR）。

40

[本発明1029]

SEQ ID NO:12の軽鎖可変領域（LCVR）。

[本発明1030]

Aβ単量体および／またはAβ線維、原線維、もしくは細線維、および／または可溶性の多量体アミロイドβに実質的に結合し、かつアミロイド前駆体タンパク質（APP）といかなる有意な交叉反応性も示さない、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト抗体もしくはその断片。

50

[本発明1031]

少なくとも約 1×10^{-7} M～少なくとも約 1×10^{-12} M、少なくとも約 1×10^{-8} M～少なくとも約 1×10^{-11} M、少なくとも約 1×10^{-8} M～少なくとも約 1×10^{-10} M、および少なくとも約 1×10^{-8} M～少なくとも約 5×10^{-8} Mからなる群より選択される範囲のKDによって表される結合親和性でA β 単量体に結合し、かつ少なくとも約 1×10^{-7} M～少なくとも約 1×10^{-12} M、少なくとも約 1×10^{-8} M～少なくとも約 1×10^{-11} M、少なくとも約 1×10^{-9} M～少なくとも約 1×10^{-10} M、および少なくとも約 2×10^{-9} M～少なくとも約 8×10^{-9} Mからなる群より選択される範囲のKDによって表される結合親和性でA β 線維、原線維、または細線維に結合する、本発明1030のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

10

[本発明1032]

可溶性の多量体アミロイド β およびA β 線維、原線維、または細線維に対して、A β 単量体よりも高い親和性を有する、本発明1030のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1033]

A β 線維、原線維、または細線維に対して、A β 単量体に対する結合親和性よりも少なくとも10倍、詳細には少なくとも15倍、より詳細には少なくとも20倍、およびとりわけ少なくとも25倍高い結合親和性を示す、本発明1032のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1034]

哺乳動物の脳、特にヒトの脳における凝集したA β 、A β 斑、および／または可溶性線維に対して実質的に結合するが、好ましくはアミロイド前駆体タンパク質（APP）に対していかなる有意な交叉反応性も示さない、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

20

[本発明1035]

立体構造のシフトを誘導することによって、線維を可溶性の多量体型および単量体型に脱凝集することによりA β の可溶性状態と凝集状態とのあいだの平衡をその可溶性型に向けてシフトさせることができ、かつ組織および／または体液、特に脳における脱凝集型および可溶性型A β 型に結合してこれを安定化させることができる、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

30

[本発明1036]

α -ヘリックスおよび／またはランダムコイル立体構造に向けて、詳細にはランダムコイル立体構造に向けて、さらにより詳細には分子における所定の位置、特にA β タンパク質のTyr10およびVal12の環境におけるランダムコイル立体構造に向けての β -シート立体構造の転移を誘導することができ、これによって β -シート立体構造を犠牲にしてランダムコイル立体構造を増加させて、既に形成された高分子多量体アミロイド原線維または細線維の可溶化を改善する、本発明1035のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1037]

β -シート立体構造の減少が、緩衝液中でインキュベートしたそれぞれの既に形成されたアミロイド多量体の原線維または細線維（対照）と比較して少なくとも30%、詳細には少なくとも35%、ならびにより詳細には少なくとも40%およびそれより上に達する、本発明1036のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

40

[本発明1038]

多量体の可溶性A β タンパク質種、および／またはより凝集の少ない可溶性のA β タンパク質種、および／または可溶性A β タンパク質の単量体型に実質的に結合して、それにより、これらのA β タンパク質種の末梢での除去および異化を改変してその毒性効果を低減させる、本発明1035のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1039]

ヒト化抗体またはその断片が、脳の外部で凝集したアミロイド β に結合する、本発明10

50

23の方法。

[本発明1040]

線維を可溶性の多量体型および単量体型に脱凝集することにより、 $A\beta$ の可溶化状態と凝集状態とのあいだの平衡をその可溶性型に向けてシフトさせることができる、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1041]

ヒト組織および／または体液、特に脳において $A\beta$ に実質的に結合しないが、立体構造のシフトを誘導することによって、線維を可溶性の多量体型および単量体型に脱凝集することにより、 $A\beta$ の可溶性状態と凝集状態のあいだの平衡をその可溶性型に向けてシフトさせることができ、かつ組織および／または体液、特に脳における脱凝集型および可溶化型 $A\beta$ に結合して安定化させることができる、本発明1001のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

[本発明1042]

マウス抗体の結合親和性より少なくとも5倍、10倍、詳細には少なくとも15倍、より詳細には少なくとも20倍、とりわけ少なくとも100倍高い結合親和性を示す、本発明1001のヒト化抗体またはその断片。

[本発明1043]

抗体またはその断片の親和性、特異性および安定性が、グリコシル化プロファイルの変化によって改変されている、本発明1001のヒト化抗体またはその断片。

[本発明1044]

アミノ酸改変によって、エフェクター機能の低減が起こる、本発明1001の抗体。

[本発明1045]

Fc領域アミノ酸改変が、アミノ酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438、または439位の1つまたは複数において変化を含む、本発明1044の抗体またはその断片。

[本発明1046]

Fc領域アミノ酸改変がD265Aアミノ酸変異を含む、本発明1044の抗体またはその断片。

[本発明1047]

SEQ ID NO:27もしくはSEQ ID NO:29と同様に少なくとも1つの可変領域を含む抗体、またはその変種。

[本発明1048]

本発明1047の抗体を発現する細胞株。

[本発明1049]

既に形成された β -アミロイド線維とhC2抗体とを相互作用させる段階を含む、既に形成された β -アミロイド線維を脱凝集するための方法。

[本発明1050]

$A\beta$ 誘導分解からニューロンを保護する、本発明1001のヒト化抗体またはその断片。

[本発明1051]

本発明1001のヒト化抗体またはその断片の有効量によって、ニューロンを処置する段階を含む、 $A\beta$ 誘導ニューロン分解を防止する方法。

[本発明1052]

変種Fc領域が変種IgG1 Fc領域である、本発明1001の抗体またはその断片。

【図面の簡単な説明】

【0202】

【図1】（実施例2）キメラ抗体重鎖発現ベクター。

【図2】（実施例2）キメラ抗体軽鎖発現ベクター。

【図3】（実施例2）キメラ抗体のマウス軽鎖可変領域の発現カセット。

【図4】（実施例2）キメラ抗体のマウス重鎖可変領域の発現カセット。

【図5】（実施例5.2）マウス重鎖可変領域の最も近いマウス生殖系列配列との比較。

【図 6】（実施例 8）精製ヒト化 C2 抗体の活性。

【図 7】（実施例 9）一過性トランスフェクションによって産生された、キメラ抗体 C2ChV HAF/ChVK および精製抗体と比較した、C2 キメラ重鎖と連結した C2 修飾型 CDRL2 構築物の一過性発現によって産生された抗体の結合活性。

【図 8】（実施例 11）キメラ抗体 AF (IgG4) およびヒト化抗体 H4K1 (IgG4) を用いた免疫組織化学的結合アッセイの結果。

【図 9】（実施例 12）アミロイド線維に対する mC2 の機能性。A) PBS（左側、対照として役立つ）または ACI-7-C2（右側）と共に 24 時間インキュベートした後凍結乾燥した U-¹³C Tyr10 および Val12 標識アミロイド β 1-42 線維の ¹³C CPMAS スペクトルの比較および適合。c 33 ppm でのピークは、線維の β シート立体構造に対応するが、30 ppm でのピークはランダムコイル立体構造の結果である。B) Val12 Cβ の 2 つの立体構造の適合させたパラメータの比較。2 つの立体構造に関して適合させたケミカルシフトは全く類似であるが、積分強度は非常に異なっており、当初の β シート立体構造がおよそ 35% 低減（1 - (53.5/81.7)）したことを反映しており、このことは、蛍光測定から得られた値と一致する。

【図 10】（実施例 12）ELISA におけるヒト化 C2 の結合親和性。

【図 11】（実施例 14）異なるクラスのアミロイドタンパク質に対する mC2 の立体構造特異的結合。この図に対する説明文中のペレット調製物は Aβ₁₋₄₂ 線維を指し、上清調製物はアミロイド単量体を指す。

【図 12】マウス配列およびヒトアクセプター配列 DPK15 および J_K1 と比較したヒト化 C2 V K 配列。

【図 13】マウス配列およびヒトアクセプター配列 DP54 および J_H6 と比較したヒト化 C2 V H 配列。

【図 14】C2 ヒト化抗体、C2HuVK1 の軽鎖可変領域の完全な DNA およびタンパク質配列。

【図 15-1】ヒト化 C2 抗体の軽鎖定常領域（ヒト C カッパ）の完全な DNA およびタンパク質配列。

【図 15-2】図 15-2 は、図 15-1 の続きを示す図である。

【図 15-3】図 15-3 は、図 15-2 の続きを示す図である。

【図 15-4】図 15-4 は、図 15-3 の続きを示す図である。

【図 15-5】図 15-5 は、図 15-4 の続きを示す図である。

【図 16-1】ヒト化 C2 抗体の重鎖定常領域（ヒト IgG4 ser228-pro）の完全な DNA およびタンパク質配列。

【図 16-2】図 16-2 は、図 16-1 の続きを示す図である。

【図 17】（実施例 15）図 17 1~3：エピトープマッピング実験の結果である。

【図 18】（実施例 13）凝集アッセイ実験の結果。

【図 19】（実施例 13）脱凝集アッセイ実験の結果。

【図 20】（実施例 16）ヒト化抗体 C2 を用いた神経保護実験の結果。

【発明を実施するための形態】

【0203】

配列の簡単な説明

SEQ ID NO: 1 C2 HuVH AF 4 ヒト化重鎖可変領域 (CDR1) のアミノ酸配列。

SEQ ID NO: 2 C2 HuVH AF 4 ヒト化重鎖可変領域 (CDR2) のアミノ酸配列。

SEQ ID NO: 3 C2 HuVH AF 4 ヒト化重鎖可変領域 (CDR3) のアミノ酸配列。

SEQ ID NO: 4 C2 HuVK 1 ヒト化軽鎖可変領域 (CDR1) のアミノ酸配列。

SEQ ID NO: 5 C2 HuVK 1 ヒト化軽鎖可変領域 (CDR2) のアミノ酸配列。

SEQ ID NO: 6 C2 HuVK 1 ヒト化軽鎖可変領域 (CDR3) のアミノ酸配列。

SEQ ID NO: 7 Aβ エピトープ領域 2 のアミノ酸配列。

SEQ ID NO: 8 Aβ エピトープ領域 1 のアミノ酸配列。

SEQ ID NO: 9 修飾された Aβ エピトープ領域 2 のアミノ酸配列。

SEQ ID NO: 10 修飾された Aβ エピトープ領域 1 のアミノ酸配列。

SEQ ID NO: 11 完全な修飾されたエピトープ領域のアミノ酸配列。

SEQ ID NO:12 C2 HuVK 1ヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列。
 SEQ ID NO:13 C2ヒト化軽鎖のアミノ酸配列。
 SEQ ID NO:14 ヒト化C2軽鎖定常領域のアミノ酸配列。
 SEQ ID NO:15 C2 HuVH AF 4ヒト化重鎖可変領域のアミノ酸配列。
 SEQ ID NO:16 C2ヒト化重鎖のアミノ酸配列。
 SEQ ID NO:17 修飾されたIGガンマ-4鎖C領域のアミノ酸配列。
 SEQ ID NO:18 C2 HuVH AF 4ヒト化重鎖可変領域のCDR2のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:19 C2 HuVH AF 4ヒト化重鎖可変領域のCDR3のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:20 C2 HuVK 1ヒト化軽鎖可変領域のCDR1のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:21 C2 HuVK 1ヒト化軽鎖可変領域のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:22 C2ヒト化軽鎖のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:23 C2ヒト化軽鎖定常領域のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:24 C2 HuVH AF 4ヒト化重鎖可変領域のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:25 C2ヒト化重鎖のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:26 C2ヒト化重鎖定常領域のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:27 マウスC2軽鎖可変領域のアミノ酸配列。
 SEQ ID NO:28 マウスC2重鎖可変領域のアミノ酸配列。
 SEQ ID NO:29 マウスC2軽鎖可変領域のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:30 マウスC2軽鎖のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:31 マウスC2重鎖可変領域のヌクレオチド配列。
 SEQ ID NO:32 マウスC2重鎖のヌクレオチド配列。

10

20

【0204】

定義

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書で用いる場合、互換的であり、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸で構成される生体分子を意味するものと定義される。

【0205】

本明細書で用いる「1つ(a)」、「1つ(an)」、および「その(the)」という用語は、「1つまたは複数の」を意味し、文脈が不適切である場合を除き、複数を含むものと定義される。

30

【0206】

「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アミロイドまたはアミロイド様タンパク質に関連する疾患および障害」という言葉には、単量体、原線維、もしくは重合体の状態か、または3つの任意の組み合わせのアミロイド様タンパク質の存在または活性によって引き起こされる疾患および障害が含まれるが、これらに限定されない。そのような疾患および障害には、アミロイドーシス、内分泌腫瘍、および黄斑変性症が含まれるが、これらに限定されない。

【0207】

「アミロイドーシス」という用語は、例えば、軽度の認知的障害(impairment)(MCI)などの認知的記憶能力の喪失を特徴とする疾患または状態を含む、アルツハイマー病(AD)、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-認知症複合などの神経学的障害を含むが、これら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に関係のあるアミロイドーシス；ならびに進行性核上麻痺、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、老人心アミロイドーシス、ならびに黄斑変性症、ドルーゼン関連視神経症、およびβ-アミロイド堆積による白内障を含む、眼疾患などの、アミロイド様タンパク質に基づくかまたはアミロイド様タンパク質に関連するその他の疾患、を含むが、これらに限定されない、アミロイド斑形成と関連する一群の疾患および障害を指す。

40

【0208】

50

本明細書で用いる「検出すること」または「検出された」という用語は、免疫化学的方法または組織学的方法といった生体分子の検出のための公知の方法を用いることを意味し、調査中の生体分子の存在または濃度を質的または量的に決定することを指す。

【0209】

「重合体可溶性アミロイド」は、哺乳動物もしくはヒトの身体で、より詳細には脳で可溶性であるアミロイドペプチドの、またはアミロイド様ペプチドの、または修飾もしくは切断されたアミロイドペプチドの、またはオリゴマー構造もしくは重合体構造を形成するアミロイドペプチドのその他の誘導体の複数の凝集した単量体を指し、詳細には哺乳動物もしくはヒトの身体で、より詳細には脳で可溶性である、アミロイド β ($A\beta$) のまたは修飾もしくは切断されたアミロイド β ($A\beta$) ペプチドの、もしくはその誘導体の、複数の凝集した単量体を指す。

10

【0210】

「アミロイド β 、 $A\beta$ または β -アミロイド」とは、当技術分野で認知されている用語であり、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、断片および任意の機能的等価物のことを指す。特に、本明細書で用いるアミロイド β は、APPのタンパク質分解性切断によって生成される任意の断片、とりわけ、 $A\beta_{1-38}$ 、 $A\beta_{1-39}$ 、 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-41}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 、および $A\beta_{1-43}$ を含むがこれらに限定されない、アミロイド病態に関与するか、またはそれと関連のある断片のことを意味する。

【0211】

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周知であり、前記ペプチドを生産する方法またはそれらを脳および他の組織から抽出する方法は、例えば、Glenner and Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984)に記載されている。さらに、アミロイド β ペプチドは様々な形態で市販されてもいる。

20

【0212】

「単離された」とは、天然の状態で存在する構成要素の少なくとも一部を含まない生体分子のことを意味する。

【0213】

本明細書で用いる「抗体」または「抗体」という用語は、当技術分野で認知されている用語であり、公知の抗原と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免疫学的活性部分、すなわち、抗原と特異的に結合する結合部位を含む分子を指すものと解釈される。免疫グロブリンは、免疫グロブリンのカップおよびラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、およびミュー定常領域遺伝子だけでなく、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子によっても実質的にコードされる1つまたは複数のポリペプチドを含むタンパク質である。軽鎖はカップまたはラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、それぞれ、順に免疫グロブリンクラス、IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEを規定する、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類される。重鎖のサブクラスも公知である。例えば、ヒトにおけるIgG重鎖は、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4サブクラスのいずれかであり得る。本発明による免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子の任意のクラス (IgG、IgM、IgD、IgE、IgA、およびIgY) またはサブクラス (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2) であり得る。

30

40

【0214】

本明細書で用いる場合、抗体に関して「特異的に結合する」とは、それが構造的に異なる抗原に結合するよりも大きい親和性で、抗体がその標的抗原に結合するということの意味する。

【0215】

典型的な免疫グロブリン構造単位は、テトラマーを含むことが公知である。各々のテトラマーは、2つの同一のポリペプチド鎖の対から構成され、各々の対は1つの「軽」鎖 (約25 kD) および1つの「重」鎖 (約50~70 kD) を有する。各々の鎖のN末端は、抗原認識に主として関与する約100~110またはそれより多くのアミノ酸の可変領域を規定する。可変

50

軽鎖 (V_L) および可変重鎖 (V_H) という用語は、それぞれこれらの軽鎖および重鎖を指す。

【0216】

抗体は、全長の未変化の抗体として、または様々なペプチダーゼもしくは化学物質による消化によって産生される多くの十分に特徴付けられた断片として存在する。したがって、例えば、ペプシンは、抗体をヒンジ領域中のジスルフィド連結より下で消化し、それ自体ジスルフィド結合によって V_H -CH₁ に接続された軽鎖である Fab のダイマーである、 $F(ab')_2$ を産生する。 $F(ab')_2$ を穏和な条件下で還元してヒンジ領域中のジスルフィド連結を破壊し、それによって $F(ab')_2$ ダイマーを Fab' 単量体に変換してもよい。Fab' 単量体は、本質的にヒンジ領域の一部を持つ Fab 断片である（その他の抗体断片のより詳細な説明については、Fundamental Immunology, W. E. Paul 編, Raven Press, N.Y. (1993) 参照）。様々な抗体断片が、未変化の抗体の消化の観点から規定されているが、当業者は、種々の抗体断片のいずれかを、化学的にかまたは組換え DNA 方法論を利用することによるかのいずれかでデノボ合成し得るということを正しく理解すると考えられる。したがって、本明細書で用いる場合の、抗体という用語には、抗体全体の修飾によって産生されるかもしくはデノボ合成されるかのいずれかの抗体断片、または組換え DNA 方法論を用いることによって得られる抗体および断片も含まれる。

10

【0217】

「抗体」は、本発明の範囲において、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、サル化抗体、ヒト抗体およびヒト化抗体、ならびにそれらの活性断片を含むものとする。公知の抗原と結合する分子の活性断片の例には、Fab 免疫グロブリン発現ライブラリーの産物、ならびに上述した抗体および断片の任意のものエピトープ結合性断片を含む、分離された軽鎖および重鎖、Fab、Fab/c、Fv、Fab'、および $F(ab')_2$ 断片が含まれる。

20

【0218】

これらの活性断片は、数多くの手法によって本発明の抗体から導き出すことができる。例えば、モノクローナル抗体をペプシンなどの酵素で切断して、HPLC ゲル濾過に供することができる。続いて、Fab 断片を含む適切な画分を収集して、膜濾過によって濃縮することなどができる。抗体の活性断片の単離のための一般的な手法に関するさらなる記述については、例えば、Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986 を参照のこと。

30

【0219】

組換えによって作製された抗体は、従来の全長抗体、タンパク質分解による消化由来の公知の活性抗体断片、Fv または単鎖 Fv (scFv) などの独特の活性抗体断片、ドメイン欠失抗体などであってもよい。Fv 抗体は、サイズが約 50 Kd でありかつ軽鎖および重鎖の可変領域を含む。単鎖 Fv (「scFv」) ポリペプチドは、直接的に接続されているかまたはペプチドをコードするリンカーによって接続されているかのいずれかの VH および VL コード配列を含む核酸から発現し得る、共有結合的に連結された VH:VL ヘテロダイマーである。Huston, et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 を参照されたい。抗体 V 領域由来の、自然に凝集されているが化学的に分離されている軽および重ポリペプチド鎖を、抗原結合部位と実質的に同様の 3次元構造に折り畳まれると考えられる scFv 分子に変換するための多くの構造。例えば、米国特許第 5,091,513 号、同第 5,132,405 号、および同第 4,956,778 号を参照されたい。

40

【0220】

結合部位とは、抗原結合に関与する抗体分子の部分を指す。抗原結合部位は、重 (「H」) 鎖および軽 (「L」) 鎖の N 末端可変 (「V」) 領域のアミノ酸残基によって形成される。抗体可変領域は、「フレームワーク領域」(FR) として知られるより保存された隣接するストレッチの間に介在している「超可変領域」または「相補性決定領域」(CDR) と称される 3 つの極めて相違するストレッチを含む。抗体分子中で、軽鎖の 3 つの超可変領域 (LCDR1、LCDR2、および LCDR3) ならびに重鎖の 3 つの超可変領域 (HCDR1、HCDR2、および

50

HCDR3) は、互いに対して3次元空間で抗原結合表面またはポケットを形成するように配置されている。それゆえに、抗体結合部位は、抗体のCDRを構成するアミノ酸および結合部位ポケットを構成する任意のフレームワーク残基に相当する。

【0221】

結合部位を構成する特定の抗体中のアミノ酸残基の正体を、当技術分野において周知の方法を用いて決定することができる。例えば、抗体CDRを、Kabatらによって最初に定義された超可変領域として同定してもよい(「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services; Johnson, G and Wu, TT (2001) Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Research, 29: 205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu>参照)。また、CDRの位置を、Chothiaおよびその他によって最初に記載された構造的ループ構造として同定してもよい(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chothia et al., Nature 342, 877 (1989)、およびTramontano et al., J. Mol. Biol. 215, 175 (1990)参照)。その他の方法として、KabatとChothiaの折衷でかつOxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェア(現在はAccelrys)を用いて得られる「AbM定義」またはMacallumら(「Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography」, J Mol Biol. 1996 Oct 11;262(5):732-45)によるCDRの「接触定義」が含まれる。以下の節は、様々な公知の定義に基づいてCDRを同定する。

ループ	Kabat	AbM	Chothia	コンタクト
----	-----	-----	-----	-----
L1	L24 -- L34	L24 -- L34	L24 -- L34	L30 -- L36
L2	L50 -- L56	L50 -- L56	L50 -- L56	L46 -- L55
L3	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L96
H1	H31 -- H35B	H26 -- H35B	H26 -- H32..34	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	H52 -- H56	H47 -- H58
H3	H95 -- H102	H95 -- H102	H95 -- H102	H93 -- H101

【0222】

配列のみから抗体中のCDRを同定し得る一般的な指針は以下の通りである。

【0223】

LCDR1:

開始 - 残基24前後。

前の残基は常にCysである。

後ろの残基は常にTrpである。典型的には、TRPに続いてTYR-GLNであるが、LEU-GLN、PHE-GLN、またはTYR-LEUも続き得る。

長さは10～17残基である。

【0224】

LCDR2:

開始 - L1の末端の16残基後ろ。

前の配列は通常、ILE-TYRであるが、VAL-TYR、ILE-LYS、またはILE-PHEである場合もある。

長さは通常7残基である。

【0225】

LCDR3:

10

20

30

40

50

開始 - 通常L2の末端の33残基後ろ。
前の残基はCysである。
後ろの残基はPHE-GLY-X-GLYである。
長さは7～11残基である。

【0226】

HCDR1:

開始 - 残基26 (CYSの4残基後ろ) 前後 [Chothia / AbM定義] に。Kabat定義は5残基後ろで始まる。

前の配列はCYS-X-X-Xである。

後ろの残基はTRPで、典型的にはVALがその後に続くが、ILE、またはALAも続く。

長さはAbM定義によると10～12残基であるが、Chothia 定義は最後の4残基を除外する。

【0227】

HCDR2:

開始 - Kabat/AbM定義のCDR-H1の末端の15残基後ろ。

前の配列は典型的には、LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID NO:1) であるが、多くの変形があり得る。

後ろの残基はLYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALAである。

長さは、Kabat定義によると16～19残基である (AbM定義は7残基より早く終わる)。

【0228】

HCDR3:

開始 - CDR-H2の末端の33残基後ろ (CYSの2残基後ろ)。

前の配列はCYS-X-X (典型的にはCYS-ALA-ARG) である。

後ろの配列は、TRP-GLY-X-GLYである。

長さは、3～25残基である。

【0229】

CDRの外側にあるが、それでもやはり結合部位の裏打ちの一部である側鎖を有する (すなわち、それが結合部位を通じた連結に利用可能である) ことによって結合部位の一部を構成する特定の抗体中のアミノ酸残基の正体を、分子モデリングおよびX線結晶学などの当技術分野において周知の方法を用いて決定することができる。例えば、Riechmann et al., (1988) Nature, 332:323-327を参照されたい。

【0230】

キメラ抗体は、抗体の1つまたは複数の領域がある種の動物由来であり、かつ抗体の1つまたは複数の領域が異なる種の動物由来である抗体である。好ましいキメラ抗体は、霊長類免疫グロブリン由来の領域を含む抗体である。ヒトの臨床使用のためのキメラ抗体は典型的には、ヒト由来の定常領域と共に、非ヒト動物、例えば、齧歯類由来の変換領域を有すると理解されている。対称的に、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン由来の変換フレームワーク領域の大部分または全ておよびヒト免疫グロブリン由来の定常領域全てと共に、非ヒト抗体由来のCDRを用いている。ヒトキメラ抗体は典型的には、齧歯類由来の変換領域を有すると理解されている。典型的なヒトキメラ抗体は、齧歯類抗体に由来する重鎖および軽鎖両方の変換領域と共に、ヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域を有する。キメラ抗体は、ヒト定常領域のネイティブなアミノ酸配列およびネイティブな齧歯類変換領域配列に対する若干の変化を含んでもよい。キメラ抗体およびヒト化抗体を、CDR接合アプローチ (例えば、米国特許第5,843,708号; 同第6,180,370号; 同第5,693,762号; 同第5,585,089号; 同第5,530,101号参照)、鎖シャッフリング戦略 (例えば、米国特許第5,565,332号; Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:8910-8915参照)、分子モデリング戦略 (米国特許第5,639,641号参照) などを含む当技術分野において周知の方法で調製してもよい。

【0231】

2つの鎖の抗体の場合に本明細書で用いるような「ヒト化抗体」は、少なくとも1つの鎖がヒト化されている抗体である。ヒト化抗体鎖は、フレームワーク領域の1つまたは複数

10

20

30

40

50

がヒトである可変領域を有する。単鎖であるヒト化抗体は、フレームワーク領域の1つまたは複数がヒトである可変領域を、鎖が有する抗体である。ヒト化抗体鎖またはその断片の可変領域の非ヒト部分は、非ヒト源、特に典型的には齧歯類起源の、非ヒト抗体に由来する。ヒト化抗体に対する非ヒトの寄与は、典型的には、1つ（または複数）のヒト免疫グロブリンに由来するフレームワーク領域中に散在する少なくとも1つのCDR領域の形態でもたらされる。さらに、フレームワーク支持残基を改変し、結合親和性を保存してもよい。

【0232】

ヒト化抗体はさらに、定常領域（例えば、軽鎖の場合には、少なくとも1つの定常領域またはその部分、および重鎖の場合には、好ましくは3つの定常領域）を含んでもよい。ヒト化抗体の定常領域は、存在する場合には、通常ヒトである。

10

【0233】

「ヒト化抗体」を入手するための方法は当業者に周知である（例えば、Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)を参照）。

【0234】

「ヒト化抗体」を、例えばウサギおよびマウスなどの大型動物における親和性が成熟したヒト様ポリクローナル抗体の生産を可能にする、新規な遺伝子操作アプローチによって入手することもできる。例えば、米国特許第6,632,976号を参照されたい。

[ここにおける、*部分は、上記の定義に置き換えられる]

20

【0235】

本明細書で用いる場合の定常領域（CR）という用語は、免疫グロブリンの定常領域遺伝子を指す。定常領域遺伝子は、エフェクター機能を付与する抗体分子の部分をコードする。キメラヒト抗体およびヒト化抗体について、典型的には非ヒト（例えば、マウス）の定常領域を、ヒト定常領域によって置換する。本キメラ抗体またはヒト化抗体の定常領域は典型的には、ヒト免疫グロブリンに由来する。重鎖定常領域を5つのアイソタイプ：アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、またはミューのいずれかより選択することができる。さらに、（重鎖のIgGサブクラスなどの）様々なサブクラスの重鎖は、異なるエフェクター機能に関与し、したがって所望の重鎖定常領域を選ぶことによって、所望のエフェクター機能を持つ抗体を産生することができる。本発明の範囲内で使用し得る定常領域は、ガンマ1（IgG1）、特にガンマ1（IgG1）アイソタイプ、ガンマ3（IgG3）、およびとりわけガンマ4（IgG4）のFc領域である。軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ型、特にカッパ型であり得る。ある態様において、軽鎖定常領域は、ヒトカッパ定常鎖であり（Heiter et al. (1980) Cell 22:197-207) かつ重定常鎖は、ヒトIgG4定常鎖である。

30

【0236】

「Fc領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のC-末端領域を定義するために用いられる。「Fc領域」は、ネイティブな配列のFc領域または変種Fc領域であってもよい。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は多様であってもよいが、ヒトIgG重鎖Fc領域は通常、Cys226位のアミノ酸残基からまたはPro230位からそのカルボキシル末端まで及ぶとして定義される。免疫グロブリンのFc領域は一般的に2つの定常ドメイン、CH2およびCH3を含む。

40

【0237】

「機能的Fc領域」は、ネイティブな配列のFc領域の「エフェクター機能」を保有する。例示的な「エフェクター機能」には、C1q結合；補体依存的細胞障害性；Fc受容体結合；抗体依存的細胞媒介性細胞障害性（ADCC）；貪食；細胞表面受容体（たとえば、B細胞受容体、BCR）のダウンレギュレーション等が含まれる。そのようなエフェクター機能は一般的に、Fc領域が結合ドメイン（たとえば、抗体可変ドメイン）と結合することを必要とし、たとえば本明細書において開示される様々なアッセイを用いて査定することができる。機能的Fc領域には一般的に、会合している2つの重鎖CH2およびCH3含有ポリペプチドが含まれる。

【0238】

50

「ネイティブな配列のFc領域」は、天然において見いだされるFc領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸付加配列およびその天然に存在する変種を含む。

【0239】

「変種Fc領域」は、本明細書において定義される少なくとも1つの「アミノ酸改変」によってネイティブな配列のFc領域の配列とは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、変種Fc領域は、ネイティブな配列のFc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換、たとえばネイティブな配列のFc領域または親ポリペプチドのFc領域において約1個～約10個のアミノ酸置換、好ましくは約1個～約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書における変種Fc領域は、好ましくはネイティブな配列のFc領域と、および／または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の同一性、最も好ましくは少なくとも約90%の同一性、より好ましくは少なくとも約95%の同一性を保有すると考えられる。

10

【0240】

「アミノ酸改変」は、既定のアミノ酸配列のアミノ酸配列における変化を指す。例示的な改変には、アミノ酸置換、挿入、および／または欠失が含まれる。本明細書における好ましいアミノ酸改変は置換である。

【0241】

たとえばFc領域における、明記された位置「でのアミノ酸改変」は、明記された残基の置換もしくは欠失、または明記された残基に隣接する少なくとも1つのアミノ酸残基の挿入を指す。明記された残基に「隣接する」挿入とはその残基1～2個以内での挿入を意味する。挿入は、明記された残基に対してN-末端であってもよく、またはC-末端であってもよい。

20

【0242】

「アミノ酸置換」は、既定のアミノ酸配列における少なくとも1つの既存のアミノ酸残基の、もう1つの異なる「交換」アミノ酸残基への交換を指す。交換残基または複数の交換残基は、「天然に存在するアミノ酸残基」（すなわち、遺伝子コードによってコードされた）であってもよく、アラニン（Ala）；アルギニン（Arg）；アスパラギン（Asn）；アスパラギン酸（Asp）；システイン（Cys）；グルタミン（Gln）；グルタミン酸（Glu）；グリシン（Gly）；ヒスチジン（His）；イソロイシン（Ile）；ロイシン（Leu）；リジン（Lys）；メチオニン（Met）；フェニルアラニン（Phe）；プロリン（Pro）；セリン（Ser）；トレオニン（Thr）；トリプトファン（Trp）；チロシン（Tyr）；およびバリン（Val）からなる群より選択されてもよい。好ましくは交換残基はシステインではない。1つまたは複数の天然に存在しないアミノ酸残基の置換も同様に、本明細書におけるアミノ酸置換の定義に包含される。

30

【0243】

「天然に存在しないアミノ酸残基」は、ポリペプチド鎖において隣接するアミノ酸残基に共有結合することができる、先に記載した天然に存在するアミノ酸残基以外の残基を指す。天然に存在しないアミノ酸残基の例には、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン、およびEllman et al. Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)において記述される類似体などの他のアミノ酸残基類似体が含まれる。そのような天然に存在しないアミノ酸残基を生成するために、Noren et al. Science 244:182 (1989)およびEllmanら、前記の技法を用いることができる。簡単に説明すると、これらの技法は、天然に存在しないアミノ酸残基によるサプレッサー-tRNAの化学的活性化の後にRNAのインビトロ転写および翻訳を伴う。

40

【0244】

「アミノ酸挿入」は、既定のアミノ酸配列への少なくとも1つのアミノ酸の組み入れを指す。挿入は通常、1つまたは2つのアミノ酸残基の挿入からなるが、本発明は、より大きい「ペプチド挿入」、たとえばアミノ酸残基約3個から約5個、または約10個までの挿入を企図する。挿入された残基は、先に開示されたように天然に存在してもよく、または天然に存在しなくてもよい。

50

【0245】

「アミノ酸欠失」は、既定のアミノ酸配列からの少なくとも1つのアミノ酸残基の除去を指す。

【0246】

「抗体依存的細胞媒介細胞障害性」または「ADCC」は、標的細胞によって発現された標的抗原に結合した分泌された抗体が、特定の細胞障害性細胞（たとえば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcR）によって認識されて、これらの細胞障害性エフェクター細胞が、抗体でコーティングされた標的細胞に特異的に結合して認識し、その後サイトトキシンによって標的細胞を殺すことができる細胞障害性の型を指す。ADCCを媒介する主な細胞であるNK細胞は、FcγRIIIのみを発現するが、単球はFcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIを発現する。造血細胞におけるFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464ページの表3において要約されている。関心対象分子のADCC活性を査定するために、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号において記述されるようなインビトロADCCアッセイを行ってもよい。そのようなアッセイに関する有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。またはもしくは加えて、関心対象分子のADCC活性はインビボで、たとえば、Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)において開示されるモデルなどの動物モデルにおいて査定されてもよい。

10

【0247】

「免疫エフェクター細胞」は、1つまたは複数のFcRを発現して、エフェクター機能を行う白血球である。好ましくは、この細胞は少なくともFcγIIIを発現して、ADCCエフェクター機能を行う。ADCCを媒介するヒト白血球の例には、末梢血単核球（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞障害性T細胞および好中球が含まれ、PBMCおよびNK細胞が好ましい。エフェクター細胞は、そのネイティブな起源から、たとえば本明細書において記述される血液またはPBMCから単離されてもよい。

20

【0248】

「補体依存的細胞障害性」または「CDC」は、標的細胞によって発現された抗原と反応性の抗体によって結合されている標的細胞の補体依存的溶解を指す。古典的補体経路の活性化は、同族の抗原に結合した抗体（適当なサブクラスの）に対する補体系の第一成分（C1q）の結合によって開始される。補体活性化を査定するために、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)において記述されるようなCDCアッセイを行ってもよい。

30

【0249】

「変更された」FcR結合親和性またはADCC活性を有する変種IgG Fcを有するポリペプチドは、親ポリペプチドまたはネイティブな配列のFc領域を含むポリペプチドと比較して、FcR結合活性（FcγRまたはFcRn）および／またはADCC活性を増強または低減させるポリペプチドである。FcRに対して「増加した結合を示す」変種Fcは、親ポリペプチドより良好な親和性で少なくとも1つのFcRに結合する。親ポリペプチドと比較した結合の改善は、約3倍、好ましくは約5、10、25、50、60、100、150、200倍、500倍まで、または結合の約25%～1000%の改善であってもよい。FcRに対して「減少した結合を示す」ポリペプチド変種は、親ポリペプチドより不良な親和性で少なくとも1つのFcRに結合する。親ポリペプチドと比較した結合の減少は、約40%またはそれより多い結合の減少であってもよい。FcRに対する結合の減少を示すそのようなFc変種は、たとえば本明細書の実施例において決定されるように、ネイティブな配列のIgG Fc領域と比較してFcRに対して認識可能な結合をほとんどまたは全く保有しなくてもよく、たとえば0～20%の結合を保有してもよい。

40

【0250】

ヒトエフェクター細胞の存在下で野生型IgG Fcを有するポリペプチドより有効に「増加したADCCを示す」または抗体依存的細胞媒介性細胞障害性（ADCC）を媒介する変種Fc領域を含むポリペプチドは、アッセイにおいて用いられる変種Fc領域を有するポリペプチドの量と野生型Fc領域を有するポリペプチドの量が本質的に同じである場合（他の全ての要因

50

は等しい)に、インビトロまたはインビボでADCCの媒介において実質的により有効であるポリペプチドである。一般的に、そのような変種は、インビトロADCCアッセイを用いて同定されるが、ADCC活性を決定するための他のアッセイまたは方法、たとえば動物モデルにおけるアッセイまたは方法等も同様に企図される。好ましい変種は、ADCCの媒介において野生型Fcより約5倍～約100倍、たとえば約25倍～約50倍有効である。

【0251】

「モノクローナル抗体」という用語も、当技術分野でよく認知されており、単一のクローン化された抗体産生細胞の産物である抗体のことを指す。モノクローナル抗体は典型的には、通常の短寿命の抗体産生性B細胞を、癌細胞(時には「不死」細胞と呼ばれる)などの急速増殖性細胞と融合させることによって作製される。その結果得られるハイブリッド細胞またはハイブリドーマは、急速に増加して、抗体を産生するクローンを作り出す。

【0252】

本発明の目的において、「モノクローナル抗体」は、完全な単クローン性にはまだ達していない母クローン(mother clone)によって産生される抗体も含むものと解釈されるべきである。

【0253】

「機能的に等価な抗体」は、 β -アミロイドタンパク質に対する、詳細には $A\beta_{1-42}$ タンパク質に対する、より詳細には $A\beta_{1-42}$ タンパク質の16-21エピトープ領域に対する結合特異性、インビトロでの免疫反応性、 $A\beta_{1-42}$ 単量体の高分子重合体の原線維への凝集の阻害および／または既に形成された $A\beta_{1-42}$ 重合体の原線維の脱凝集、および／または β -シート破壊特性、ならびに予防的または治療的に投与された場合に、アルツハイマー病(AD)、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-認知症複合などの神経学的障害を含むが、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に関係のあるアミロイドーシスを含む、アミロイド斑形成と関連する一群の疾患および障害であるアミロイドーシス；ならびに進行性核上麻痺、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)、成人発症型糖尿病、老人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アミロイド様タンパク質と関連するその他の疾患、の影響を緩和することを含む、上で言及しかつ本明細書で記載した抗体と少なくとも1つの主な機能的特性を実質的に共有する抗体を指すことが本発明の範囲内で理解される。抗体は、IgG、IgMもしくはIgAなどの任意のクラス、またはIgG1、IgG2aなどの任意のサブクラス、および本明細書に上述したかまたは当技術分野で公知である他のサブクラスのもの、特にIgG4クラスのものであってよい。さらに、抗体をファージディスプレイなどの任意の方法によって生産すること、または細菌、昆虫、哺乳動物、もしくはヒト化抗体のように所望の特性を備える抗体を生産する他の種類の細胞もしくは細胞株を含む、任意の生物もしくは細胞株において産生させることもできる。抗体をまた、異なる種からのFab部分およびFc領域を組み合わせてることによって形成させることもできる。

【0254】

使用する場合の「ハイブリダイズする」という用語は、従来のハイブリダイゼーション条件、好ましくは $5\times$ SSPE、1% SDS、 $1\times$ デンハルト溶液を溶液として用い、かつ／またはハイブリダイゼーション温度が $35^{\circ}\text{C}\sim 70^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは 65°C であるハイブリダイゼーション条件を指す。ハイブリダイゼーション後、洗浄を好ましくは最初 $2\times$ SSC、1% SDSで、その後 $0.2\times$ SSCで $35^{\circ}\text{C}\sim 70^{\circ}\text{C}$ の温度で、好ましくは 65°C で実行する(SSPE、SSC、およびデンハルト溶液の定義に関しては、Sambrook et al、前に引用された場所、参照)。例えば、Sambrook et al、前記で記載された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、例えば、ハイブリダイゼーションおよび洗浄が、上記で示したような 65°C で生じる場合に存在する。例えば、ハイブリダイゼーションおよび洗浄が 45°C で実行される、ストリンジェントでないハイブリダイゼーション条件は、あまり好ましくなく、かつ 35°C で実行

されるストリンジェントでないハイブリダイゼーション条件は、さらにあまり好ましくない。

【0255】

2つの配列間の「相同性」は、配列同一性によって決定される。互いに比較しようとする2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パーセンテージに関係する。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) などのコンピュータプログラムの使用によって慣例的に決定することができる。Bestfitは、2つの配列間で最も高い配列同一性を有するセグメントを見つけ出すために、Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489の局所相同性アルゴリズムを利用する。ある特定の配列が本発明の参照配列に対して例えば95%の同一性を有するか否かを判定するために、Bestfitまたは別の配列アラインメントプログラムを用いる場合には、パラメータは好ましくは、一致度 (percentage of identity) が参照配列の全長にわたって計算され、参照配列中のヌクレオチドの総数の最大で5%の相同性ギャップが許容されるように調整される。Bestfitを用いる場合には、いわゆる随意的パラメータは好ましくはそのプリセット (「デフォルト」) 値のままにする。所定の配列と本発明の上記の配列との間の比較において認められる偏差は、例えば、付加、欠失、置換、挿入または組換えに起因し得る。そのような配列比較を、好ましくは、プログラム「fasta20u66」 (バージョン2.0u66, September 1998, William R. PearsonおよびUniversity of Virginiaによる; W.R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, 添付の例および<http://workbench.sdsc.edu/>も参照のこと) を用いて行うこともできる。この目的のために、「デフォルト」パラメータセッティングが用いられてもよい。

【0256】

本発明による抗体は、(多価の場合に) 同一なその結合部位の各々を有すると理解される、免疫グロブリンもしくは抗体であってもよく、または代わりになるものとして、「二重特異性抗体」もしくは「二重機能性抗体」であってもよい。

【0257】

「二重特異性抗体」または「二重機能性抗体」は、2つの異なる重/軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工的なハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結を含む種々の方法で産生することができる。例えば、Songcivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992) を参照されたい。

【0258】

「断片」という用語は、未変化のまたは完全な抗体または抗体鎖よりも少ないアミノ酸残基を含む、抗体または抗体鎖の一部または部分を指す。断片は、未変化のまたは完全な抗体または抗体鎖の、化学的または酵素的な処置によって得ることができる。断片は、組換え手段によって得ることもできる。例示的な断片には、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab_c、および/またはFv断片が含まれる。「抗原結合断片」という用語は、抗原に結合するか、または未変化の抗体と(すなわち、それらが由来した未変化の抗体と) 抗原結合(すなわち、特異的結合) を競合する、免疫グロブリンまたは抗体のポリペプチド断片を指す。

【0259】

結合断片を、組換えDNA技術によるか、または未変化の免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的な切断によって産生する。結合断片には、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab_c、Fv、単鎖、および単鎖抗体が含まれる。

【0260】

「断片」は、別のポリペプチドの、アミノ酸配列の少なくとも5つの連続的なアミノ酸残基、少なくとも10の連続的なアミノ酸残基、少なくとも15の連続的なアミノ酸残基、少なくとも20の連続的なアミノ酸残基、少なくとも25の連続的なアミノ酸残基、少なくとも40の連続的なアミノ酸残基、少なくとも50の連続的なアミノ酸残基、少なくとも60の連続

的なアミノ酸残基、少なくとも70の連続的なアミノ酸残基、少なくとも80の連続的なアミノ酸残基、少なくとも90の連続的なアミノ酸残基、少なくとも100の連続的なアミノ酸残基、少なくとも125の連続的なアミノ酸残基、少なくとも150の連続的なアミノ酸残基、少なくとも175の連続的なアミノ酸残基、少なくとも200の連続的なアミノ酸残基、または少なくとも250の連続的なアミノ酸残基のアミノ酸配列を含む、ペプチドまたはポリペプチドも指す。具体的な態様において、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持する。

【0261】

「抗原」という用語は、抗体に結合することができる実体またはその断片を指す。免疫原は、生物、詳細には動物、より詳細にはヒトを含む哺乳動物で免疫応答を誘発することができる抗原を指す。抗原という用語には、（接触しているかまたは抗原中にあり抗原性または抗原決定基に関与する接触を支持するのに重要な役割を果たしている）抗原の一部を指す、抗原決定基またはエピトープとして知られる領域が含まれる。

10

【0262】

本明細書で用いる場合、「可溶性」という用語は、水性溶液中に部分的または完全に溶解することを意味する。

【0263】

同じく本明細書で用いる場合、「免疫原の」という用語は、免疫原の抗原に対して向けられる、抗体、T細胞および他の反応性免疫細胞の産生を誘発する物質のことを意味する。

20

【0264】

免疫応答が起こるのは、個体が、投与された本発明の免疫原性組成物に対して十分な抗体、T細胞および他の反応性免疫細胞を産生して、処置しようとする障害が和らいだり緩和されたりする場合である。

【0265】

本明細書で用いる場合の免疫原性という用語は、レシピエントに投与された場合に免疫応答（液性または細胞性）を誘発する抗原の能力の大きさを指す。本発明は、本ヒトキメラ抗体またはヒト化抗体の免疫原性を低下させるアプローチに関係する。

【0266】

低下した免疫原性のヒト化抗体とは、もとの抗体、例えば、マウス抗体と比べて低下した免疫原性を示すヒト化抗体を指す。

30

【0267】

もとの抗体の結合特性を実質的に保持するヒト化抗体とは、そのようなヒト化抗体を産生するのに用いたもとの抗体によって認識される抗原に特異的に結合する能力を保持するヒト化抗体を指す。好ましくは、ヒト化抗体は、もとの抗体と同じかまたは実質的に同じ抗原結合親和性および結合活性（avidity）を示すと考えられる。理想的には、抗体の親和性は、もとの抗体の親和性の10%未満ではなく、より好ましくは約30%未満ではないと考えられ、最も好ましくは、親和性は、もとの抗体の50%未満ではないと考えられる。抗原結合親和性をアッセイするための方法は、当技術分野において周知であり、かつ最大半減結合アッセイ法、競合アッセイ法、およびスキャッチャード解析を含む。好適な抗原結合アッセイ法を本出願で記載する。

40

【0268】

「復帰突然変異」とは、ヒト化抗体をコードするヌクレオチド配列に導入された突然変異であり、本突然変異は、もとの抗体（例えば、ドナー抗体、例えば、マウス抗体）中のアミノ酸に対応するアミノ酸を結果的に生じる。結果として得られる抗体の潜在的免疫原性を同時に最小化しつつ、もとの抗体の結合特性を実質的に保持するために、もとの抗体に由来する、あるフレームワーク残基を本発明の抗体のヒト化の間ずっと保持してもよい。本発明のある態様において、もとの抗体はマウス起源である。例えば、復帰突然変異によって、ヒトのフレームワーク残基がもとのマウス残基に変化する。復帰突然変異し得るフレームワーク残基の例として、カノニカル（canonical）残基、界面充填残基、結合部

50

位に近い稀なもとの残基、(CDRが基礎を置くプラットフォームを形成する)「バーニアゾーン (Vernier Zone)」中の残基 (Foote & Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224, 487-499)、およびCDR3 H3に近い残基が含まれるが、これらに限定されない。

【0269】

本明細書で用いる場合、「保存的变化」は、ネイティブなタンパク質と比較した場合に、実質的に立体構造または抗原性が中立であり、それぞれ、突然変異体ポリペプチドの三次構造の最小限の変化をもたらすか、または突然変異体ポリペプチドの抗原決定基の最小限の変化をもたらす改変を指す。本発明の抗体および抗体断片に言及する場合、保存的变化は、抗体を本受容体に結合することができないようにしないアミノ酸置換を意味する。当業者は、立体構造および抗原性が中立である高い可能性を維持しつつ、どのアミノ酸置換を行うことができるかを予測することができると考えられる。そのような指針は、例えば、Berzofsky, (1985) Science 229:932-940およびBowie et al. (1990) Science 247:1306-1310で提供されている。考慮されるべき、立体構造および抗原性の中立性を維持する可能性に影響を及ぼす要因として、(a) 疎水性残基はタンパク質の内部に位置する可能性がより高いので、疎水性アミノ酸の置換が抗原性に影響を及ぼす可能性はあまり高くないということ；(b) 置換されたアミノ酸はネイティブなアミノ酸を構造的に模倣するので、物理化学的に類似したアミノ酸の置換が立体構造に影響を及ぼす可能性はあまり高くないということ；および(c) そのような保存によって、アミノ酸配列が機能的な重要性を有し得るということが示唆されるので、進化的に保存された配列の改変は立体構造に悪影響を及ぼす可能性が高いということが含まれるが、これらに限定されない。当業者は、

微小補体固定法 (microcomplement fixation methods) (Wasserman et al. (1961) J. Immunol. 87:290-295; Levine et al. (1967) Meth. Enzymol. 11:928-936) などの、しかしこれらに限定されない、周知のアッセイ法を用いて、および立体構造依存的なモノクローナル抗体を用いる結合検討 (Lewis et al. (1983) Biochem. 22:948-954) を通じて、タンパク質立体構造の改変を評価することができると考えられる。

【0270】

さらに、「治療的有効量」という用語は、ヒトまたは動物に投与された場合に、ヒトまたは動物で治療的効果を結果的にもたらすのに十分である、抗体の量を指す。有効量は、日常的な手順に従って当業者により容易に決定される。

【0271】

本明細書で用いる場合、「処置する」、「防止する(prevent)」、「防止する(preventing)」、および「防止(prevention)」という用語は、予防的または治療的薬剤の投与が結果としてもたらす、対象における障害の1つまたは複数の症状の再発または発症の防止を意味する。

【0272】

ヒト化抗体の構築

本発明は、本明細書に含まれる特定の態様に関する以下の詳細な説明を参照することによってより容易に理解されると思われる。本発明をその特定の態様の具体的な詳細を参照しながら説明しているが、このような詳細は本発明の範囲を制限するものとみなされるべきではない。

【0273】

本発明は、様々なβ-アミロイド抗原由来の特異的エピトープを特異的に認識しかつ該エピトープに特異的に結合する能力を有する、極めて特異的でかつ極めて効果的な抗体を含む新規の方法および組成物を提供する。本発明の教示により可能になる抗体は、アルツハイマー病 (AD)、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-認知症複合などの神経学的障害を含むが、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に関係のあるアミロイドーシスを含む、アミロイド斑形成と関連する一群の疾患および障害であるアミロイドーシス；ならびに進行性核上麻痺、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)、成人発症型糖尿病、老人心アミロイドー

シス、内分泌腫瘍、およびほんの一例として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アミロイド様タンパク質と関連するその他の疾患、の処置に特に有用である。

【0274】

本発明による完全にヒト化されているかまたは再形成されている可変領域を、非ヒト、特に齧歯類由来のCDR、とりわけヒト由来のフレームワーク配列中に埋め込まれた（本出願の全体を通じて「mC2」と名付けられかつ2005年12月1日にBraunschweig, Mascheroder Weg 1B, 38124 BraunschweigのDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) に、ブダペスト条約の条項および所与のアクセッション番号：DSM ACC2750の下で寄託されている）マウス抗体ACI-01-Ab7C2に由来するCDRを含む可変領域アミノ酸配列をまず設計することによって、本発明の範囲内で創出してもよい。本発明による抗体から得てもよい、非ヒト、特に齧歯類由来のCDRは、所望の特異性を提供する。したがって、これらの残基は、本質的に不変の再形成された可変領域の設計に含まれるべきである。したがって、任意の修飾を最小限に制限し、かつ抗体の特異性および親和性の変化を念入りに注意すべきである。他方、フレームワーク残基は、理論的には、任意のヒト可変領域から得ることができる。

10

【0275】

許容される親和性または向上すらした親和性を示す再形成された抗体を創出するために、再形成された可変領域を創出しかつ抗体親和性を保持するのに等しく好適である、ヒトフレームワーク配列を選ぶべきである。

20

【0276】

この目的を達成するために、最適戦略が開発された。フレームワーク配列はCDRを抗原との相互作用のためにその正しい空間的配向を保つよう機能するということが知られているので、この戦略は、抗体再形成に用いられるヒトフレームワーク配列を、非ヒト、特に齧歯類由来の可変領域と最も相同であるかまたは類似しているヒト可変領域から得ることによって、3次元構造に負の影響をもたらす変化を最小化することを目指す。これは、親和性が再形成された抗体中で保持される可能性を最大化するとも考えられる。

【0277】

その最も単純なレベルで、「最適」戦略は、ドナー齧歯類V領域を全ての公知のヒトV領域アミノ酸配列と比較し、かつその後ヒト化実行用のアクセプターフレームワーク領域を提供するために最も相同なものを選択する工程を伴う。実際には、考慮すべき、かつアクセプターフレームワーク領域の最終的な選択に影響し得る幾つかのその他の因子がある。この点に関して、結果として得られる再形成された抗体の親和性を最大化しようとする任意の実験研究の前に、分子モデリング予測を用いてもよい。本質的に、モデリングの目的は、再形成された抗体で最高の親和性を得るために、最も相同なヒトフレームワークの（もしあるとすれば）どの鍵残基を齧歯類と同じように残すべきかということを実験することである。

30

【0278】

本発明のある態様において、CDRは、マウスモノクローナル抗体から、特にその開示が参照により本明細書に組み入れられる、2005年12月12日に出版された同時係属中の出願であるEP 05 02 7092.5に記載された（本出願の全体を通じて「mC2」と名付けられている）マウスモノクローナル抗体ACI-01-Ab7C2から得られる。

40

【0279】

マウスモノクローナル抗体ACI-01-Ab7C2（本出願の全体を通じて、「mC2」と名付けられかつヒト化C2抗体についてはhC2と名付けられている）を産生する、ハイブリドーマ細胞FP-12H3-C2は、2005年12月1日に、同時係属中の出願であるEP05027092.5において、Braunschweig, Mascheroder Weg 1B, 38124 BraunschweigのDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) に、ブダペスト条約の条項および所与のアクセッション番号：DSM ACC2750の下で寄託された。

50

【0280】

マウス抗体を、例えばパルミチン酸などの疎水性部分、もしくは例えばポリエチレングリコール（PEG）などの親水性部分、または両方の組み合わせにより修飾された、 β -アミロイドペプチド、特に β -アミロイドペプチド $A\beta_{1-15}$ 、 $A\beta_{1-16}$ 、および $A\beta_{1-16}(\Delta 14)$ 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作製してもよく、疎水性部分および親水性部分はそれぞれ、例えば、リジン、グルタミン酸、およびシステイン、または疎水性部分および親水性部分をペプチド断片に共役するための接続装置として機能することができる任意のその他の好適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、特に1つまたは2つのアミノ酸を通じて、抗原ペプチドの末端の各々に共有結合している。PEGを親水性部分として用いる場合には、遊離のPEG末端を、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ポソームの二重層中に埋め込むための固定要素として機能するのに好適な任意のその他の化合物に、共有結合させる。

10

【0281】

特に、マウス抗体を、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た β -アミロイドペプチド $A\beta_{1-16}$ 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作製してもよく、親水性部分は、例えばリジン、グルタミン酸、およびシステイン、または疎水性部分および親水性部分をペプチド断片に共役するための接続装置として機能することができる任意のその他の好適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、特に1つまたは2つのアミノ酸を通じて、抗原ペプチドの末端の各々に共有結合している。PEGを親水性部分として用いる場合には、遊離のPEG末端を、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ポソームの二重層中に埋め込むための、固定要素として機能するのに好適な任意のその他の化合物に、共有結合させる。

20

【0282】

本発明の態様において、可変領域中に、1つまたは複数のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中に埋め込まれかつヒトまたは霊長類源抗体に由来する定常領域と組み合わされた非ヒト起源のCDRの少なくとも1つを含み、 β -アミロイド単量体ペプチドを特異的に認識しかつ β -アミロイド単量体ペプチドに特異的に結合することができる、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を提供する。

【0283】

CDRは、抗原に結合する可能性が最も高い残基を含みかつ再形成された抗体中で保持されなければならない。CDRは、Kabat et al, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 第5版, The United States Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991による配列によって定義される。CDRは、カノニカルな部類（Chothia et al, 1989 Nature, 342, 877-883）に分類されており、その場合、鍵残基がかなりの程度までCDRループの構造的な立体構造を決定する。これらの残基はほとんど必ず再形成された抗体中で保持される。

30

【0284】

本発明によるヒト化抗体を調製するための過程で、C2重鎖および軽鎖可変領域（ V_H および V_K ）のアミノ酸配列を、NCBIおよびKabatデータベース中の齧歯類抗体の V_H および V_K 配列と比較する。

40

【0285】

C2 V_K に対して最も近似して一致するマウス生殖系列遺伝子は、bbl、Locus MMU231201である（Schable et al, 1999）。比較により、2つのアミノ酸がこの生殖系列配列とは異なっており、両方ともCDRL1内に位置することが明らかになった。類似しているが、同一ではない配列を持つ成熟マウス抗体を見出すことが可能である。幾つかは、同一のCDRL2および同一のCDRL3を有するが、C2のCDRL1は独特であるように思われる。ヒト生殖系列 V_K 配列との比較により、サブグループ V_{KII} 由来の遺伝子がC2 V_K に対して最高に一致するものであるということが示されている（Cox et al, 1994）。したがって、C2 V_K をKabatサブグループ MuV_{KII} 配列に割り当てることができる。

50

【0286】

DPK15をヒトJ領域HuJ_K1と共に選択し、ヒト化V_K用のアクセプターフレームワーク配列を提供してもよい。

【0287】

可変軽鎖と可変重鎖との間の境界面の残基が規定されている (Chothia et al, 1985 J. Mol. Biol., 186, 651-663)。これらは通常、再形成された抗体中で保持されている。マウスC2 V_Kの位置87のPheは境界面では稀であり、境界面ではTyrがV_KIIサブグループでより一般的である。このことは、このフレームワーク残基が抗体活性に重要であり得ることを示している。Tyr 87は、ヒト生殖系列およびヒト化C2VK中に存在する。

【0288】

したがって、C2HuVK1が、DPK 15およびヒトJ_K1由来のフレームワークを持つマウスC2 V_K CDRからなるように、ヒト化V_K配列を設計してもよい。本発明の具体的な態様において、マウス残基を、ヒトフレームワーク領域中、位置45および／もしくは87で、ならびに／または50および／もしくは53で置換してもよい。残基45は、CDRの立体構造を支持するのに関与する可能性がある。残基 87は、V_HおよびV_Kドメインの境界面に位置する。それゆえに、これらの残基は、抗体結合の維持に決定的に重要な意味を持つ可能性がある。

【0289】

C2 V_H AFに対して最も近似して一致するマウス生殖系列遺伝子は、VH7183、Locus AF12 0466である (Langdon et al, 2000)。ヒト生殖系列V_H配列との比較により、サブグループV_HIII由来の遺伝子がC2 V_Hに対して最高に一致するものであるということが示されている。C2 V_H AFをKabatサブグループMuV_HIIIDに割り当てることができる。配列DP54をヒトJ領域HuJ_H6と共に選択し、ヒト化V_H用のアクセプターフレームワーク配列を提供することができる。

【0290】

比較により、C2 V_H配列とヒトアクセプター生殖系列配列DP54およびJ_H6,の間に9つのアミノ酸の違いがあり、大部分がCDRH2の中に位置することが示されている。同一もしくは類似の(1残基異なる)CDRH1を持つかまたは類似のCDRH2(1残基異なる)を持つ成熟マウス抗体が見出されるが、3つ全てのCDRがC2 V_H AFと同一である抗体はない。C2抗体のCDRH3は異常に短く、わずか3残基からなる。しかしながら、この長さのCDRH3を持つその他の抗体がデータベース中に見出される。C2 V_Hの残基47は、より一般的なTrpではなく、Leuであり、残基94は通常のArgではなくSerであり、これらのフレームワーク残基が抗体活性に有用であり得ることを示している。

【0291】

様々なヒト化V_H配列を設計してもよい。C2HuVH1は、DP54およびHuJ_H6由来のフレームワークを持つC2 V_H AF CDRからなる。本発明の具体的な態様において、マウス残基を、ヒトフレームワーク領域中、位置47もしくは94または両方で置換してもよい。フレームワーク2における残基47は、CDRおよびV_Kドメインの両方と接触する。残基 94は、CDRの立体構造を支持するのに関与する可能性がある。それゆえに、これらの残基は、抗体結合の維持に決定的に重要な意味を持つ可能性がある。

【0292】

ネイティブかまたは修飾されたヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中に埋め込まれた、ドナー抗体、例えばマウス抗体から得られる非ヒトCDRを含む、異なるHCVRおよびLCVR領域を設計してもよい。修飾は特に、それぞれのサブグループ中のこの位置でより一般的に見出される非ヒト残基、特にマウス残基によるかまたはそれぞれのサブグループ中のこの位置でより一般的に見出される残基と類似の特性を有する残基による、フレームワーク領域内の1つまたは複数のアミノ酸残基の交換に関してもよい。

【0293】

フレームワーク領域の修飾において、フレームワーク配列はCDRを抗原との相互作用のためにそれらの正しい空間的配向に保つよう機能し、かつそのフレームワーク残基は時に、抗原結合に関与することさえできる。本発明のある態様において、親和性が再形成され

10

20

30

40

50

た抗体中で保持される可能性を最大にするために、それらが齧歯類フレームワークの配列に最も類似するよう選択されたヒトフレームワーク配列をさらに適応させるための措置を講じる。

【0294】

したがって、ヒトフレームワーク領域中のマウス残基を置換してもよい。特に、マウス残基を、重鎖可変（HCVR）領域のヒトフレームワーク領域中、位置47もしくは94または両方で、および軽鎖可変（LCVR）領域のヒトフレームワーク領域中、位置45および／もしくは87で、ならびに／または50および／もしくは53でそれぞれ置換してもよい。

【0295】

ヒトフレームワーク領域中の上で示した位置で見出される残基を、それぞれのサブグループ中のこの位置でより一般的に見出されるマウス残基と交換してもよい。特に、SEQ ID NO: 15に示す重鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置47のTrpを、Leuによって、または類似の特性を有しかつその置換によって実質的に立体構造もしくは抗原性が中立であり、突然変異体ポリペプチドの三次構造に最小限の変化をもたらすか、もしくは抗原決定基に最小限の変化をもたらす改変が生じるアミノ酸残基によって、置き換えてもよい。特に、SEQ ID NO: 15に示す重鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置47のTrpを、ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、およびPheからなる群より選択されるアミノ酸によって、特にIleによってさらに置き換えてもよい。立体構造および抗原性が中立である別の保存的置換を企図してもよい。

【0296】

SEQ ID NO: 15に示す重鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置94のArgを、Serによって、または類似の特性を有しかつその置換によって実質的に立体構造もしくは抗原性が中立であり、突然変異体ポリペプチドの三次構造に最小限の変化をもたらすか、もしくは抗原決定基に最小限の変化をもたらす改変が生じるアミノ酸残基によって、置き換えてもよい。特に、SEQ ID NO: 15に示す重鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置94のArgを、Thrによって代わりに置き換えてもよい。

【0297】

本発明の別の態様において、両方の残基をヒト化抗体中で置き換えてもよい。

【0298】

SEQ ID NO: 12に示す軽鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置45のGlnを、Lysによって、または類似の特性を有しかつその置換によって実質的に立体構造もしくは抗原性が中立であり、突然変異体ポリペプチドの三次構造に最小限の変化をもたらすか、もしくは抗原決定基に最小限の変化をもたらす改変が生じるアミノ酸残基によって、置き換えてもよい。特に、SEQ ID NO: 12に示す軽鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置45のGlnを、Arg、Gln、およびAsnからなる群より選択されるアミノ酸によって、特にArgによって置き換えてもよい。

【0299】

SEQ ID NO: 12に示す軽鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置50のLeuを、Lysによって、または類似の特性を有しかつその置換によって実質的に立体構造もしくは抗原性が中立であり、突然変異体ポリペプチドの三次構造に最小限の変化をもたらすか、もしくは抗原決定基に最小限の変化をもたらす改変が生じるアミノ酸残基によって、置き換えてもよい。特に、SEQ ID NO: 12に示す軽鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置50のLeuを、Arg、Gln、およびAsnからなる群より選択されるアミノ酸によって、特にArgによって置き換えてもよい。

【0300】

SEQ ID NO: 12に示す軽鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置53のAsnを、HisおよびGlnによって、または類似の特性を有しかつその置換によって実質的に立体構造もしくは抗原性が中立であり、突然変異体ポリペプチドの三次

構造に最小限の変化をもたらすか、もしくは抗原決定基に最小限の変化をもたらす改変が生じるアミノ酸残基によって、置き換えてもよい。特に、SEQ ID NO: 12に示す軽鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置53のAsnを、Gln、His、Lys、およびArgからなる群より選択されるアミノ酸によって置き換えてもよい。

【0301】

SEQ ID NO: 12に示す軽鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置87のThrを、Pheによって、または類似の特性を有しかつその置換によって実質的に立体構造もしくは抗原性の中立であり、突然変異体ポリペプチドの三次構造に最小限の変化をもたらすか、もしくは抗原決定基に最小限の変化をもたらす改変が生じるアミノ酸残基によって、置き換えてもよい。特に、SEQ ID NO: 12に示す軽鎖可変領域のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中のKabat位置87のTyrを、Leu、Val、Ile、およびAlaからなる群より選択されるアミノ酸によって、特にLeuによって置き換えてもよい。

10

【0302】

1つまたは複数のヒト由来または霊長類由来のフレームワーク領域中に埋め込まれた非ヒト起源の少なくとも1つのCDRを含むように得られた可変領域を、次にヒトまたは霊長類が源の抗体に由来する定常領域と、特にヒトIgG4またはκの定常領域とそれぞれ組み合わせてもよい。IgG4定常領域を、例えばヒンジ領域中の位置228のセリンをプロリンに変化させることによって、修飾してもよい(HuIgG4 Ser-Pro)。この突然変異は、鎖間ジスルフィド結合を安定化し、かつネイティブなヒトIgG4調製物で起こり得る半分子の形成を防止する。IgG4定常領域を、SEQ ID NO: 16に示す位置439の末端Lysの欠失によってさらに修飾してもよい。

20

【0303】

修飾された可変領域を、例えば、重複するPCR組換えなどの当技術分野において公知の方法で構築してもよい。キメラ抗体、C2 ChV_H AFおよびC2 ChV_K用の発現カセットを、フレームワーク領域の必要とされる配列への突然変異導入のための鋳型として用いてもよい。改変されるべき領域を包含する突然変異導入プライマー対の組を合成する。産生されるヒト化V_HおよびV_K発現カセットを、例えば、pUC19などの当技術分野において公知の適当なクローニングベクターにクローニングしてもよい。DNA配列全体が各々のV_HおよびV_Kについて正しいことを確認した後、修飾された重鎖および軽鎖のV領域遺伝子を、クローニングベクターから発現カセットとして切り出し、適切な発現ベクターに移すことができる。

30

【0304】

Fc領域の変異

本発明は、ポリペプチド変種、特に変種領域を含む抗体を作出するための方法を提供する。たとえば変種Fc領域を含むそのような抗体は、アミロイドーシスなどの疾患または障害を処置するために用いられてもよい。

【0305】

「親」、「開始」、または「非変種」ポリペプチドは、たとえばFc領域を含むポリペプチドを生成するために当技術分野において利用可能な技術を用いて調製される。本発明の好ましい態様において、親ポリペプチドは抗体であり、抗体を生成するための例示的な方法は以下の節においてより詳細に記述される。しかし、親ポリペプチドは、Fc領域を含む他の任意のポリペプチド、たとえばイムノアドヘシンであってもよい。イムノアドヘシンを作出するための方法を以下でより詳細に述べる。

40

【0306】

別の態様において、変種Fc領域は、本明細書において開示される方法に従って生成されてもよく、この「変種Fc領域」を、抗体可変ドメインまたは受容体もしくはリガンドの結合ドメインなどの、選ばれた異種ポリペプチドに融合させることができる。

【0307】

親ポリペプチドは、Fc領域を含む。一般的に、親ポリペプチドのFc領域は、ネイティブ

50

な配列のFc領域、好ましくはヒトのネイティブな配列のFc領域を含むと考えられる。しかし、親ポリペプチドのFc領域は、ネイティブな配列のFc領域からの1つまたは複数の既存のアミノ酸配列の変更または改変を有してもよい。たとえば、Fc領域のC1q結合活性は既に変更されていてもよい（他のタイプのFc領域改変を以下でより詳細に記述する）。さらなる態様において、親ポリペプチドのFc領域は、「概念的」であり、これは物理的に存在しないが、抗体の技術者は、望ましい変種Fc領域アミノ酸配列を決定して、その配列を含むポリペプチドまたはその望ましい変種Fc領域アミノ酸配列をコードするDNAを生成してもよい。

【0308】

しかし、本発明の好ましい態様において、親ポリペプチドのFc領域をコードする核酸が利用可能であり、この核酸配列は、Fc領域変種D265Aをコードする変種核酸配列を生成するように変更される。

【0309】

開始ポリペプチドのアミノ酸配列変種をコードするDNAは、当技術分野において公知の多様な方法によって調製される。これらの方法には、ポリペプチドをコードする先に調製されたDNAの部位特異的（またはオリゴヌクレオチド媒介）変異誘発、PCR変異誘発、およびカセット変異誘発による調製が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0310】

部位特異的変異誘発は、置換変種を調製するために好ましい方法である。この技術は当技術分野において周知である（たとえば、Carter et al. *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443 (1985)およびKunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488 (1987)を参照されたい）。簡単に説明すると、DNAの部位特異的変異誘発を行う場合、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドを開始DNAの一本鎖に最初にハイブリダイズすることによって、開始DNAが変更される。ハイブリダイゼーション後、DNAポリメラーゼによって、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、開始DNAの一本鎖を鋳型として用いて第二の鎖全体を合成する。このように、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドが、得られた二本鎖DNAにおいて組み入れられる。

【0311】

PCR変異誘発はまた、開始ポリペプチドのアミノ酸配列変種を作出するためにも適している。Higuchi, in *PCR Protocols*, pp.177-183 (Academic Press, 1990); およびVallette et al., *Nuc. Acids Res.* 17:723-733 (1989)を参照されたい。簡単に説明すると、少量の鋳型DNAをPCRにおける開始材料として用いる場合、鋳型DNAにおける対応する領域と配列がわずかに異なるプライマーを用いて、プライマーが鋳型と異なる位置のみが鋳型配列と異なる特異的DNA断片を比較的大量に生成することができる。

【0312】

変種を調製するためのもう1つの方法であるカセット変異誘発は、Wells et al., *Gene* 34:315-323 (1985)によって記述される技術に基づいている。開始材料は、変異される開始ポリペプチドDNAを含むプラスミド（または他のベクター）である。変異される開始DNAにおけるコドン进行を同定する。同定された制限部位の各々の側に独自の制限エンドヌクレアーゼ部位が存在しなければならない。そのような制限部位が存在しない場合、開始ポリペプチドDNAにおける適切な位置でそれらを導入するために、上記のオリゴヌクレオチド媒介変異誘発法を用いてそれらを生成してもよい。プラスミドDNAをこれらの部位で切断して直線状にする。制限部位のあいだのDNAの配列をコードするが所望の変異を含有する二本鎖オリゴヌクレオチドを、標準的な技法を用いて合成する。ここで、オリゴヌクレオチドの2つの鎖は個々に合成された後、標準的な技術を用いて共にハイブリダイズされる。この二本鎖オリゴヌクレオチドはカセットと呼ばれる。このカセットは、プラスミドに直接ライゲーションされるように、直線状のプラスミドの末端と適合性である5'および3'末端を有するように設計される。このプラスミドは今や、変異したDNA配列を含有する。

【0313】

またはもしくは加えて、ポリペプチド変種をコードする所望のアミノ酸配列を決定する

ことができ、そのようなアミノ酸配列変種をコードする核酸配列は合成によって生成される。

【0314】

親ポリペプチドのアミノ酸配列は、インビトロおよび／もしくはインビボで変更されたFc受容体結合親和性または活性を有する、インビトロおよび／もしくはインビボで変更された抗体依存的細胞媒介性細胞障害性(ADCC)を有する、ならびに／またはインビトロおよび／もしくはインビボで変更された細胞媒介性細胞障害(CDC)活性を有する変種Fc領域を生成するために改変される。

【0315】

一般的に改変は、1つまたは複数のアミノ酸置換を必要とする。置換はたとえば、「保守的置換」であってもよい。Fc領域の生物学的特性における実質的な改変は、(a)たとえばシートまたはヘリックス立体構造としての、置換領域におけるポリペプチド骨格の構造、(b)標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖の大きさ、の維持においてその効果が有意に異なる置換を選択することによって達成されてもよい。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて群に分類される：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性親水性：cys、ser、thr；
- (3) 酸性：asp、glu；
- (4) 塩基性：asn、gln、his、lys、arg；
- (5) 側鎖の方向性に影響を及ぼす残基：gly、pro；および
- (6) 芳香族：trp、tyr、phe。

【0316】

アミノ酸残基のほかに、本発明は、たとえば変更されたエフェクター機能を有するFc領域変種を生成するために親領域アミノ酸配列の他の改変を企図する。

【0317】

たとえば、FcRに対する結合を低減するために、Fc領域の1つまたは複数のアミノ酸残基を欠失させてもよい。一般的に、そのようなFc領域変種を生成するために、本明細書においてFcR結合をもたらすとして同定されたFc領域残基の1つまたは複数に欠失させる。一般的に、本発明のこの態様に従ってわずか1個〜約10個のFc領域残基が欠失される。1つまたは複数のアミノ酸欠失を含む本明細書におけるFc領域は、好ましくは、親Fc領域またはネイティブな配列のヒトFc領域の少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、および最も好ましくは少なくとも約95%を保持する。

【0318】

親Fc領域に適切なアミノ酸配列改変を導入することによって、たとえば、(a)ヒトエフェクター細胞の存在下でより有効に、またはより無効に抗体依存的細胞媒介性細胞障害性(ADCC)を媒介する、および／または(b)親ポリペプチドより高いまたは低い親和性でFc γ 受容体(Fc γ R)に結合する、変種Fc領域を生成することができる。そのようなFc領域変種は一般的に、Fc領域において少なくとも1つのアミノ酸改変を含む。アミノ酸改変を組み合わせることは特に望ましいと考えられる。たとえば、変種Fc領域には、たとえば本明細書において同定された特異的Fc領域位置の2個、3個、4個、5個等の置換が含まれてもよい。

【0319】

たとえば、IgG1と関連して、Fc領域のアミノ酸位置 238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438、または439位の任意の1つまたは複数でアミノ酸改変を導入することによって、Fc γ Rに対して低減された結合を有するFc領域変種を生成することができる。たとえばPrestaの米国特許第6,737,056号を参照されたい。

【0320】

Fc γ RIに対して低減された結合を示すIgG1変種には、アミノ酸位置238、265、269、270

、327、または329位の任意の1つまたは複数でFc領域アミノ酸改変を含む変種が含まれる。たとえば、Prestaの米国特許第6,737,056号を参照されたい。

【0321】

Fc γ RIIに対して低減された結合を示すIgG1変種には、アミノ酸位置238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438、または439位の任意の1つまたは複数でFc領域アミノ酸改変を含む変種が含まれる。たとえば、Prestaの米国特許第6,737,056号を参照されたい。

【0322】

Fc γ RIIIに対して低減された結合を示すIgG1 Fc領域変種には、アミノ酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435、または437位の任意の1つまたは複数でFc領域アミノ酸改変を含む変種が含まれる。たとえば、Prestaの米国特許第6,737,056号を参照されたい。

【0323】

残基の番号は異なるが、他のIg Fc領域における特異的残基を変えることによって類似の効果を得ることができることは、当業者によって理解されるであろう。たとえば、Prestaの米国特許第6,737,056号を参照されたい。

【0324】

たとえばClq結合および／またはFcR結合を改変することによって、およびそれによってCDC活性および／またはADCC活性を変化させることによって、変更されたエフェクター機能を有するFc領域を設計することができる。たとえば改善されたClq結合と改善されたFc γ RIII結合とを有する変種Fc領域；たとえば改善されたADCC活性と改善されたCDC活性の双方を有する変種Fc領域を生成することができる。または、エフェクター機能を低減させるまたは除去させることを望む場合、低減されたCDC活性および／または低減されたADCC活性を有する変種Fc領域を操作してもよい。他の態様において、これらの活性の1つのみを増加させてもよく、任意で他の活性を低減させてもよく、たとえば改善されたADCC活性を有するが、CDC活性が低減されたFc領域変種、およびその逆であるFc領域変種を生成してもよい。たとえば、Prestaの米国特許第6,737,056号を参照されたい。

【0325】

さらなるアミノ酸配列の変更に関して、ポリペプチド変種の適当な立体構造の維持に関係しない任意のシステイン残基もまた、分子の酸化的安定性を改善して、異常なクロスリンクを防止するために、一般的にはセリンに置換されてもよい。たとえば、Prestaの米国特許第6,737,056号を参照されたい。

【0326】

もう1つのタイプのアミノ酸置換は、ポリペプチドのグリコシル化パターンを変更するために役立つ。これは、ポリペプチドにおいて見いだされる1つまたは複数の糖質部分を欠失させることによって、および／またはポリペプチドに存在しない1つまたは複数のグリコシル化部位を付加することによって、達成されてもよい。ポリペプチドのグリコシル化は典型的に、N結合型またはO結合型のいずれかである。N結合型は、アスパラギン残基の側鎖への糖質部分の付着を指す。Xがプロリンを除く任意のアミノ酸であるトリペプチド配列、アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニンは、アスパラギン側鎖に糖質部分を酵素的に付着させるための認識配列である。このように、ポリペプチドにこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位を作製する。O結合型グリコシル化は、糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうちの1つの、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にセリンまたはトレオニンへの付着を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンも同様に用いられてもよい。ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、それが1つまたは複数の上記のトリペプチド配列（N結合型グリコシル化部位に関して）を含有するように、アミノ酸配列を変更させることによって簡便に達成される。変更はまた、当初のポリペプチドの配列に1つまたは複数のセリンまたはトレオニン残基を付加または置換することによって作出されても

よい（0結合型グリコシル化部位に関して）。例示的なグリコシル化変種は重鎖の残基Asn 297でアミノ酸置換を有する。たとえば、Prestaの米国特許第6,737,056号を参照されたい。

【0327】

さらに、Fc領域のクラス、サブクラス、またはアロタイプを、1つまたは複数のさらなるアミノ酸置換によって変更して、異なるクラス、サブクラス、またはアロタイプに対してより相同なアミノ酸配列を有するFc領域を必要に応じて生成してもよい。たとえば、マウスFc領域を変更して、ヒトFc領域に対してより相同なアミノ酸配列を生成してもよく；ヒトの非AアロタイプIgG1 Fc領域を改変して、ヒトAアロタイプIgG1 Fc領域を達成してもよい等である。1つの態様において、本明細書におけるFcR結合および／またはADCC活性を変更するアミノ酸改変は、Fc領域のCH2ドメインにおいて作出され、CH3ドメインは欠失されるか、またはもう1つの二量体化ドメインに交換される。しかし、好ましくはCH3ドメインは保持される（本明細書において開示されるエフェクター機能を変更するその中のアミノ酸改変を別として）。たとえば、Prestaの米国特許第6,737,056号を参照されたい。

【0328】

結合アッセイ

ポリペプチド変種がFcRに結合する能力を評価してもよい。FcRが、FcγRI、FcRn、またはFcγRIIIA-V158などの高親和性Fc受容体である場合、標準的なELISAフォーマットにおいてポリペプチド変種に特異的に結合する抗体を用いて、単量体ポリペプチド変種を力価測定して、結合したポリペプチド変種を測定することによって、結合を測定することができる。たとえば、Prestaの米国特許第6,737,056号を参照されたい。低親和性FcRに関するFcR結合アッセイは当技術分野において周知であり、中でもPrestaの米国特許第6,737,056号において記述される。

【0329】

ポリペプチド変種のADCC活性を査定するために、多様なエフェクター：標的比を用いてインビトロADCCアッセイを行ってもよい。そのようなアッセイに関して有用な「エフェクター細胞」には、末梢血単核球（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。またはもしくは加えて、ポリペプチド変種のADCC活性はインビボで、たとえばClynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)において開示されるモデルなどの動物モデルにおいて査定されてもよい。

【0330】

発現ベクター

本発明を実践するために、任意の適した発現ベクターを用いてもよい。たとえば、当業者は例としてpSVgptにおいてIgG1を発現させることができるであろう。

発現ベクター-pSVgptは、pSV₂gpt (Mulligan and Berg, 1980)に基づいており、かつ細菌細胞での選択用のアンピシリン耐性遺伝子、哺乳動物細胞での選択用のgpt遺伝子、マウス重鎖免疫グロブリンエンハンサー領域、定常領域遺伝子をコードするゲノム配列、およびSV40ポリA配列を含む。発現用の重鎖可変領域をHindIII～BamHI断片として挿入する。

【0331】

発現ベクター-pSVhygは、細菌細胞での選択用のアンピシリン耐性遺伝子、哺乳動物細胞での選択用のhyg遺伝子、マウス重鎖免疫グロブリンエンハンサー領域、カップ定常領域遺伝子をコードしかつカップエンハンサーを含むゲノム配列、およびSV40ポリA配列を含む。発現用の軽鎖可変領域をHindIII～BamHI断片として挿入する。

【0332】

DNA配列はその後、発現ベクター中のヒト化V_HおよびV_Kについて正しいことが確認されるべきである。

【0333】

抗体産生のために、ヒト化重鎖および軽鎖の発現ベクターを、例えば、NS0細胞などの当技術分野において公知の適当な産生細胞株に導入してもよい。発現ベクターの導入を、エレクトロポレーションを介するコトランスフェクション、または当技術分野において利

用可能な任意のその他の好適な形質転換技術によって遂行してもよい。その後、抗体産生細胞株を選択しかつ増殖させ、かつヒト化抗体を精製することができる。その後、精製された抗体をSDS-PAGEなどの標準的技術によって解析することができる。

【0334】

向上した親和性、特異性、安定性を持つ抗体

マウスC2抗体のCDRL2配列（「KVSNRFS」）を、抗体活性に悪影響を及ぼすことなく少し修飾してもよい。保存的置換を、位置50におけるKとRの交換および位置53におけるNとSの交換によって行ってもよい。それゆえに、2つの代わりとなるCDRL2配列は、それぞれ「RVSNRFS」および「KVSSRFS」である。これらを、その他の変化を伴うことなく、それぞれC2 VK-RおよびC2 VK-SとしてマウスV_K配列に組み入れる。

10

【0335】

本明細書で前述した通りの本発明による抗体またはその断片の親和性、特異性、および安定性を、そのグリコシル化のプロファイルまたはパターンの変化によって修飾し、向上した治療的価値を結果的にもたらすことができる。

【0336】

このグリコシル化パターンの変化を達成するために、宿主細胞が、バイセクティング（bisecting）GlcNAcを持つ複合型のN結合型オリゴ糖を増加させる糖タンパク質を修飾する好ましい範囲の糖転移酵素活性を発現するように、宿主細胞を人工的に改変することができる。さらに、例えば完全な抗体分子、抗体断片、または免疫グロブリンのFc領域と等価な領域を含み、増強されたFc介在性の細胞性細胞毒性を有する融合タンパク質を含む、抗体などの糖タンパク質の修飾されたグリコフォームを得てもよい。

20

【0337】

修飾されたグリコシル化パターンを持つ抗体を得る方法は、当業者にとって公知であり、かつ例えば、EP1071700、US2005272128、Ferrara et al (2006) J Biol Chem 281(8), 5032-5036 ; Ferrara et al (2006) Biotechnology and Bioengineering 93(5), 851-861 に記載されている。

【0338】

薬学的調製および投与

本発明による抗体、特に本発明によるモノクローナル抗体は、生理的に許容される製剤として調製することができ、かつ薬学的に許容される、担体、希釈剤、および／または賦形剤を公知の手法を用いて含んでもよい。例えば、任意の機能的に等価な抗体またはその機能性部分を含む、本発明によるおよび本明細書に前述した通りの抗体、特に任意の機能的に等価な抗体またはその機能性部分を含むモノクローナル抗体を、薬学的に許容される、担体、希釈剤および／または賦形剤と混ぜ合わせて、治療用組成物を形成させる。適した薬学的担体、希釈剤および／または賦形剤は当技術分野で周知であり、これには例えば、リン酸緩衝食塩水、水、水中油型エマルジョンなどのエマルジョン、様々な種類の湿潤剤、滅菌溶液などが含まれる。

30

【0339】

本発明による薬学的組成物の製剤化は、当技術分野で公知の標準的な方法に従って達成することができる。

40

【0340】

本発明の組成物を、適した薬学的有効量で固体、液体、またはエアロゾルの形態で対象に投与することができる。固体組成物の例には、丸剤、クリーム、および埋め込み型の投薬単位が含まれる。丸剤は経口的に投与することができる。治療用のクリームは局所的に投与することができる。埋め込み型の投薬単位は、局所的に、例えば腫瘍部位に投与することもでき、または治療用組成物の全身的な放出を目的として、例えば皮下に埋め込むことができる。液体組成物の例には、筋肉内、皮下、静脈内、動脈内への注射に適した製剤、ならびに局所投与用および眼内投与用の製剤が含まれる。エアロゾル製剤の例には、肺への投与を目的とした吸入用製剤が含まれる。

【0341】

50

組成物を、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、局所経路、経口経路、直腸内経路、鼻内経路、皮内経路、腹腔内経路、または非経口的な（例えば、静脈内、皮下もしくは筋肉内）経路で投与することができる。加えて、組成物を、送達が望まれる部位、例えば腫瘍部位の近傍に埋め込まれる重合体である生分解性重合体などの徐放性マトリックス中に組み入れることもできる。本方法は、単回投与、所定の間隔での反復投与、および所定の期間にわたる持続的投与を含む。

【0342】

本明細書で用いる場合、徐放性マトリックスは、酵素もしくは酸／塩基による加水分解によってまたは溶解によって分解する材料、通常は重合体でできたマトリックスである。このようなマトリックスは、身体内に挿入されると、酵素および体液の働きによる作用を受ける。徐放性マトリックスは望ましくは、リポソーム、ポリラクチド（ポリ乳酸）、ポリグリコリド（グリコール酸の重合体）、ポリラクチドコ-グリコリド（乳酸とグリコール酸の共重合体）、ポリ無水物、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、硫酸コンドロイチン、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、多糖、核酸、ポリアミノ酸、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシンなどのアミノ酸、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、およびシリコンなどの、生体適合性を有する材料から選択される。好ましい生分解性マトリックスは、ポリラクチド、ポリグリコリド、またはポリラクチドコ-グリコリド（乳酸とグリコール酸の共重合体）のうちいずれか1つのマトリックスである。

【0343】

組成物の用量が、例えば、処置される状態、用いる特定の組成物といった様々な要因、ならびに、患者の体重、サイズ、性別および全般的健康状態、体表面積、投与しようとする特定の化合物または組成物、同時に投与する他の薬剤および投与の経路といった他の臨床的因子に依存すると考えられることは、当業者には周知である。

【0344】

本組成物を、生物活性物質または化合物、特に酸化ストレスに対する化合物、抗アポトーシス性化合物、金属キレート剤、ピレンゼピンおよび代謝物などのDNA修復の阻害剤、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸（3APS）、1,3-プロパンジスルホネート（1,3PDS）、 α -セクレターゼ活性化剤、 β -および γ -セクレターゼ阻害剤、タウタンパク質、神経伝達物質、 β -シート破壊剤、アミロイド β を除去する／枯渇させる細胞成分の誘引剤、ピログルタミン酸化したアミロイド β 3-42を含むN末端切断型アミロイド β の阻害剤、抗炎症分子、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、もしくはオランザピンなどの「非定型抗精神病薬」、またはタクリン、リバスチグミン、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剤（ChEI）、M1アゴニスト、ならびに任意のアミロイドもしくはタウの修飾薬物を含むその他の薬物、ならびに例えば、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、ギンコピローバ（Ginkgo biloba）、アセチル-L-カルニチン、イデベノン、プロベントフィリン、もしくはキサンチン誘導体などの栄養補給剤からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を含むその他の組成物と組み合わせて、本発明による抗体、ならびに、任意で、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、ならびに疾患の処置用の手順と共に、投与してもよい。

【0345】

タンパク質性の薬学的活性物質は、1回の用量当たり1ng~10mgの量で存在してよい。一般に、投与レジメンは、本発明による抗体が、0.1 μ g~10mgの範囲、詳細には1.0 μ g~1.0mgの範囲、より詳細には1.0 μ g~100 μ gの範囲にあるべきであり、これらの範囲内にある全ての個々の数も同じく本発明の一部である。投与が連続注入によって行われる場合には、より適切な用量は、体重1kgおよび1時間当たり0.01 μ g~10mgの範囲にあってよく、これらの範囲内にある全ての個々の数も同じく本発明の一部である。

【0346】

投与は一般に非経口的、例えば静脈内であると考えられる。非経口的投与のための調製

物には、滅菌された水性または非水性溶液、懸濁液およびエマルジョンが含まれる。非水性溶媒には、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機酸エステルが含まれるが、それらに限定されない。水性溶媒を、食塩液および緩衝媒質を含む、水、アルコール性／水性溶液、エマルジョンまたは懸濁液からなる群から選んでもよい。非経口用媒体には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース液、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、または固定油が含まれる。静脈内用媒体には、液体および栄養分の補充液、電解質補充液（リンゲルデキストロース液を基にしたものなど）などが含まれる。また、例えば、抗菌薬、抗酸化物質、キレート剤および不活性ガスなどの、保存料が存在してもよい。

10

【0347】

薬学的組成物はさらに、例えば、血清アルブミンまたは免疫グロブリン、特にヒト起源のものなどのタンパク質性担体を含んでもよい。本発明の薬学的組成物中に、さらなる生物活性物質が、その意図した用途に応じて存在してもよい。

【0348】

結合標的が脳に位置する場合、本発明のある種の態様は、血液脳関門を横断する抗体またはその活性断片を提供する。ある種の神経変性疾患は、血液脳関門の透過性の増加と関連しており、そのために抗体またはその活性断片を脳に容易に導入させることができる。血液脳関門が無傷のままである場合、物理的方法、脂質に基づく方法、ならびに受容体およびチャネルに基づく方法を含むが、これらに限定されない、血液脳関門を横断して分子を輸送するための幾つかの当技術分野において公知のアプローチが存在する。

20

【0349】

血液脳関門を横断して抗体またはその活性断片を輸送する物理的方法として、血液脳関門を完全に回避するもの、または血液脳関門に開口部を創出することによるものが含まれるが、これらに限定されない。回避法として、脳内への直接注射（例えば、Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002) 参照）ならびに脳に送達装置を埋め込むこと（例えば、Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003)；およびGliadel Wafers（商標）、Guildford Pharmaceuticalを参照）などが含まれるが、これらに限定されない。関門に開口部を創出する方法として、超音波（例えば、米国特許出願公開第2002/0038086号参照）、浸透圧（例えば、高張マンニトールの投与によるもの（Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y (1989)））、例えば、ブラジキニンまたは透過剤A-7による透過処理（例えば、米国特許第5,112,596号、同第5,268,164号、同第5,506,206号、および同第5,686,416号参照）、ならびに抗体または抗原結合断片をコードする遺伝子を含むベクターによる血液脳関門にまたがるニューロンのトランスフェクション（例えば、米国特許出願公開第2003/0083299号参照）が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0350】

血液脳関門を横断して抗体またはその活性断片を輸送する脂質に基づく方法として、血液脳関門の血管内皮上の受容体に結合する抗体結合断片と共役しているリボソームの中に抗体またはその活性断片をカプセル化すること（例えば、米国特許出願公開第20020025313号参照）、および低密度リポタンパク質粒子（例えば、米国特許出願公開第20040204354号参照）またはアポリポタンパク質E（例えば、米国特許出願公開第20040131692号参照）の中に抗体またはその活性断片をコーティングすることが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0351】

血液脳関門を横断して抗体またはその活性断片を輸送する受容体およびチャネルに基づく方法として、グルココルチコイド遮断薬を用いて血液脳関門の透過性を増加させること（例えば、米国特許出願公開第2002/0065259号、同第2003/0162695号、および同第2005/0124533号参照）；カリウムチャネルを活性化すること（例えば、米国特許出願公開第2005/0089473号参照）、ABC薬物トランスポーターを阻害すること（例えば、米国特許出願公

50

開第2003/0073713号参照)；抗体をトランスフェリンでコーティングしかつ1つまたは複数のトランスフェリン受容体の活性を調節すること(例えば、米国特許出願公開第2003/0129186号参照)、ならびに抗体を陽イオン化すること(例えば、米国特許第5,004,697号)が含まれるが、これらに限定されない。

【0352】

検出／診断

さらなる態様において、本発明は、アミロイド関連の疾患または状態の検出および診断のための方法およびキットを提供する。これらの方法には、生物学的試料中かまたはインサイチュー状態で物質を検出または定量化するのに一般に用いられる、公知の免疫学的方法が含まれる。

10

【0353】

患者におけるアミロイド関連の疾患または状態の診断を、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試料中またはインサイチューで検出することによって達成してもよい。それには、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エピトープに結合する抗体と接触させる工程、抗体をアミロイドタンパク質と結合させ、免疫学的複合体を形成させる工程、免疫学的複合体の形成を検出する工程、および免疫学的複合体の有無を、試料または特定の身体部分もしくは部位におけるアミロイドタンパク質の有無と相関付ける工程が含まれる。

【0354】

アミロイド関連の疾患または状態の診断で使用し得る生物学的試料は、例えば、血清、血漿、唾液、胃の分泌物、粘液、脳脊髄液、リンパ液などの体液、または神経、脳、心臓、もしくは血管の組織などの、生物から得られる組織もしくは細胞試料である。試料中のアミロイドタンパク質の有無を決定するためには、当業者に公知の任意のイムノアッセイ法(Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612)を参照)、例えば、検出用の二次試薬を用いる間接的検出法を利用するアッセイ法、ELISAおよび免疫沈降および凝集アッセイ法を用いることができる。これらのアッセイ法の詳細な記述は、例えば、MaertensおよびStuyverに対するW096/13590、Zreinら(1998)およびW096/29605に与えられている。

20

【0355】

インサイチュー診断のために、本発明による抗体とアミロイドタンパク質上のエピトープ領域との間の特異的結合が起こるように、当技術分野で公知の方法、例えば、静脈内、鼻腔内、腹腔内、大脳内、動脈内注射によって、抗体またはその任意の活性のある機能性部分を、診断しようとする生物に対して投与することができる。抗体／抗原複合体は、抗体またはその機能性断片に結合させた標識によって検出することができる。

30

【0356】

診断用途に用いられるイムノアッセイは、典型的には、標識された抗原、抗体または検出用の二次試薬に依拠する。これらのタンパク質または試薬は、酵素、放射性同位体、ならびにコロイド金およびラテックスビーズなどの着色粒子を含む蛍光性、発光性および発色性物質を含む、当業者に一般に知られた化合物で標識することができる。これらのうち、放射性同位体標識は、ほぼ全ての種類のアッセイ法に用いることができ、バリエーションも非常に多い。酵素結合による標識は、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に特に有用である。蛍光色素は、用いるために高価な装置を必要とするが、極めて感度の高い検出方法を提供する。これらのアッセイ法において有用な抗体には、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されたポリクローナル抗体が含まれる。

40

【0357】

あるいは、プロテインAもしくはGまたは第2の抗体などの、免疫グロブリンに対する親和性のある標識物質との反応によって、抗体を間接的に標識してもよい。抗体を第2の物質と結合させ、抗体と結合した第2の物質に対する親和性のある標識した第3の物質を用い

50

て検出してもよい。例えば、抗体をビオチンと結合させ、標識したアビジンまたはストレプトアビジンを用いて抗体-ビオチン結合物を検出してもよい。同様に、抗体をハプテンと結合させ、標識した抗ハプテン抗体を用いて抗体-ハプテン結合物を検出してもよい。

【0358】

当業者は、本発明に従って用い得る上記および他の適した標識を把握していると考えられる。抗体またはその断片に対するこれらの標識の結合は、当業者に公知の標準的な手法を用いて行うことができる。典型的な手法は、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) に記載されている。後者に言及されているカップリング法には、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、ジマレイミド法、および他のものがあり、これらは全て参照により本明細書に組み入れられる。

【0359】

現行のイムノアッセイ法は、方法において分析物の存在を検出するために、二重抗体法を利用している。抗体は、検出可能な標識で標識された第2の抗体との反応によって間接的に標識される。第2の抗体は、好ましくは、モノクローナル抗体の由来となった動物の抗体と結合するものである。言い換えると、モノクローナル抗体がマウス抗体である場合には、標識された第2の抗体は抗マウス抗体である。以下に述べるアッセイにモノクローナル抗体を用いる場合には、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。本明細書に記載のイムノアッセイにポリクローナル抗体を用いる場合、標識は好ましくは、放射性、蛍光性または電気化学発光性の物質などの検出可能な分子である。

【0360】

分析物の存在の迅速判定用に適合化されているために迅速フォーマットシステムと呼ばれることが多い、代替的な二重抗体システムを、本発明の範囲において用いることもできる。本システムは、抗体と分析物との間の高い親和性を必要とする。本発明の1つの態様によれば、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用いて決定される。前記抗体対の一方は本明細書で「検出用抗体」と呼ばれ、前記抗体対のもう一方は本明細書で「捕捉用抗体」と呼ばれる。本発明のモノクローナル抗体は、捕捉用抗体または検出用抗体のいずれとしても用いることができる。また、本発明のモノクローナル抗体を、単一のアッセイで捕捉用抗体および検出用抗体の両方として用いることもできる。このため、本発明の1つの態様は、生体液の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用いる。この方法では、分析物（アミロイドタンパク質）を検出用抗体と捕捉用抗体との間にサンドイッチ状に挟み、捕捉用抗体は固体支持体に不可逆的に固定化しておく。検出用抗体は、抗体-分析物サンドイッチの存在を同定するため、およびしたがって分析物の存在を同定するために、検出可能な標識を含む。

【0361】

例示的な固相物質には、ラジオリイムノアッセイ法および酵素イムノアッセイ法の分野で周知であるマイクロタイタープレート、ポリスチレン製試験管、磁性ビーズ、プラスチックビーズ、またはガラス製ビーズおよびスライドが非限定的に含まれる。抗体を固相に対してカップリングさせるための方法も当業者に周知である。さらに最近では、ナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、グラスファイバーおよび他の多孔性重合体などの様々な多孔性材料が固体支持体として用いられている。

【0362】

本発明はまた、上記に定義した組成物を含む、生物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も関する。さらに、本発明は、上記に定義した組成物に加えて、上記に定義した検出試薬も含む、後者の診断キットにも関する。「診断キット」という用語は一般に、当技術分野で公知の任意の診断キットのことを指す。より具体的には、後者の用語は、Zreinら（1998）に記載された診断キットのことを指す。

【0363】

10

20

30

40

50

本発明による抗体を含む、アミロイドに関連した疾患および状態の検出および診断のための新規な免疫プローブおよび検査キットを提供することは、本発明のさらにもう1つの目的である。免疫プローブに関しては、抗体を、適したレポーター分子、例えば酵素または放射性核種に対して直接的または間接的に結合させる。検査キットは、本発明による1つまたは複数の抗体と、抗体をアミロイドタンパク質と結合させて免疫学的複合体を形成させ、かつ免疫学的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学的複合体の形成を検出する目的に用いるための説明書とを収容する容器を含む。

【実施例】

【0364】

材料

マウスモノクローナル抗体ACI-01-Ab7C2（本出願の全体を通じて、「mC2」と名付けられかつヒト化C2抗体についてはhC2と名付けられている）の開発および調製は、その開示が参照により本明細書に組み入れられる、2005年12月12日に出願された同時係属中の出願であるEP05 02 7092.5に記載されている。

【0365】

マウスモノクローナル抗体ACI-01-Ab7C2（本出願の全体を通じて、「mC2」と名付けられかつヒト化C2抗体についてはhC2と名付けられている）を産生する、ハイブリドーマ細胞FP-12H3-C2は、2005年12月1日に、同時係属中に出願であるEP05027092.5において、Braunschweig, Mascheroder Weg 1B, 38124 BraunschweigのDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) に、ブダペスト条約の条項および所与のアクセッション番号：DSM ACC2750の下で寄託された。

【0366】

ハイブリドーマ細胞を、10% 胎仔ウシ血清および抗生物質（ペニシリン／ストレプトマイシン）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中で培養した。産生された抗体のアイソタイプを調べ、予期した通り、マウスIgG2b/カッパであることが分かった。

【0367】

アッセイ

アミロイドβに対する結合についてのELISAにより、C2抗体の効力の信頼できる測定がもたらされた。陽性対照抗体、マウスFP-12H3-C2抗体（Genovacロット番号：AK379/01）、および標準的なChemiconの抗体1560（ロット番号：0508008791）。

【0368】

ヒト定常領域の選択

免疫系動員は臨床抗体候補に望ましくないもので、重鎖用を選択されたヒト定常領域は、ヒンジ領域中の位置228のセリンをプロリンに変化させるよう修飾された、ヒトIgG4（HuIgG4 Ser-Pro）であった。この突然変異は、鎖間ジスルフィド結合を安定化し、かつネイティブなヒトIgG4調製物で起こり得る半分子の形成を防止する。産生細胞株から発現された抗体はまた、末端リジンが取り除かれていると考えられる。ヒト定常領域HuIgG4 Ser-Proおよびヒトカッパの配列をそれぞれ、SEQ ID NO：17および14に示す。

【0369】

実施例1 抗体可変領域のクローニングおよびシーケンシング

トータルRNAを、 3×10^6 個のハイブリドーマ細胞（T175フラスコ1つ）からQiagen RNeasyミニキット（カタログ番号：74104）を用いて調製した。RNAを50 μ L 水に溶出し、1.2% アガロースゲルで調べた。細胞由来の馴化培地を保持し、試料を抗体活性アッセイ法で検査するために用いた。

【0370】

V_HおよびV_K cDNAを、マウスIgGおよびκの定常鎖プライマーで逆転写酵素を用いて調製した。第一鎖cDNAを、多くの組のシグナル配列プライマーを用いるPCRで増幅させた。増幅されたDNAをゲル精製し、ベクターpGem（登録商標）T Easy（Promega）にクローニングした。得られたV_HおよびV_Kクローンを期待される大きさの挿入についてPCRでスクリーニングし、選択されたクローンのDNA配列を自動化DNAシーケンシングで決定した。配列中

の相補性決定領域（CDR）の場所を、その他の抗体配列（Kabat EA et al., 1991）を参照して決定した。抗体可変領域についてのKabatの付番規則を、本出願の全体を通じて用いており；それゆえに、残基番号は厳密な直鎖状の番号とは異なる場合がある。

【0371】

mC2 V_KについてのDNA配列および推定されるアミノ酸配列をそれぞれ、SEQ ID NO：29および27に示す。4つのクローンがこの同一の生産的配列を生じた。ハイブリドーマ融合パートナーから生じる非生産的で異常なV_K配列も、多くのクローンで見出された。

【0372】

mC2 V_Hについて、2つの異なる生産的配列を単離した。mC2 V_H AF配列（SEQ ID NO：30参照）は、合計29クローンで見出され、個々のクローンで14個の1塩基対変化があった。mC2 V_H B配列は、合計8クローンで見出された。これらのうちの5つが主要配列を示し、その他の3クローンはこれに対する変異であった。これらの類似のV_H B配列はPCR増幅の人工産物として生じたという可能性がある。非生産的で異常なV_HもC2ハイブリドーマから得られており、欠陥のあるV-D-J接続に起因する。

【0373】

どちらが正しい活性mC2 V_Hであるかを決定するために、2つのキメラ抗体を2つの異なるV_H配列、AFおよびB、を用いて調製し、mC2 V_Kと組み合わせ、正しい抗体活性について検査した。

【0374】

実施例2 キメラ抗体遺伝子の構築

その最も一般的形態のヒトキメラ抗体は、マウス（またはその他の非ヒト）可変領域に連結されたヒト定常領域からなる。キメラ抗体は、第一に正しい可変領域が同定されているかどうかという確認のために、第二にヒト化された抗体または人工的に作製された抗体と同じエフェクター機能を持ちかつ同じ二次検出試薬を利用する、抗原結合アッセイ法における対照抗体としての使用のために、非常に有用なツールを提供し、また抗体の特定の標的に関するヒト定常領域の薬物動態およびその他の特性を検討するのに用いてもよい。

【0375】

発現ベクターpSVgpt中でHuIgG4（Ser-Pro）定常領域に連結されたmC2 V_H AFまたはmC2 V_H B可変領域からなる、2つのキメラ重鎖発現ベクターを構築した（図1）。これは、pSV₂gpt（Mulligan and Berg, 1980）に基づいており、かつ細菌細胞での選択用のアンピシリン耐性遺伝子、哺乳動物細胞での選択用のgpt遺伝子、マウス重鎖免疫グロブリンエンハンサー領域、定常領域遺伝子をコードするゲノム配列、およびSV40ポリA配列を含む。発現用の重鎖可変領域をHindIII～BamHI断片として挿入する。

【0376】

発現ベクターpSVhyg中でヒトC_κ定常領域に連結されたC2 V_Kからなるキメラ軽鎖ベクターを構築した（図2）。pSVhygには、細菌細胞での選択用のアンピシリン耐性遺伝子、哺乳動物細胞での選択用のhyg遺伝子、マウス重鎖免疫グロブリンエンハンサー領域、C_κ定常領域遺伝子をコードしかつC_κエンハンサーを含むゲノム配列、およびSV40ポリA配列を含む。発現用の軽鎖可変領域をHindIII～BamHI断片として挿入する。

【0377】

マウスC2 V_HおよびV_K配列用の発現カセットを、ベクターVH-PCR1およびVK-PCR1を鋳型として用いて（Riechmann et al., 1988）、リーダーシグナルペプチド、リーダーイントロン、およびマウス免疫グロブリンプロモーターを含む5'隣接配列、ならびにスプライス部位およびイントロン配列を含む3'隣接配列の付加によって構築した。キメラ発現ベクター中のVHおよびVKについて、DNA配列が正しいことを確認した。発現カセット中のVHおよびVK 遺伝子のDNAおよびアミノ酸配列を、図3および4に示す。

【0378】

実施例3 キメラ抗体の発現

3.1 安定細胞株における発現

抗体発現用の宿主細胞株は、European Collection of Animal Cell Cultures, Porton

10

20

30

40

50

UK (ECACC番号85110503) から入手した、免疫グロブリンを産生しないマウスミエローマであるNS0であった。重鎖および軽鎖の発現ベクターを、エレクトロポレーションでNS0細胞にコトランスフェクトした。gpt遺伝子を発現するコロニーを、10%胎仔ウシ血清 (FBS)、0.8 $\mu\text{g/ml}$ ミコフェノール酸、および250 $\mu\text{g/ml}$ キサンチンを補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で選択した。トランスフェクトされた細胞クローンを、ヒト抗体の産生についてヒトIgG用のELISAでスクリーニングした。抗体を分泌する細胞株を増殖させ、最も多く産生するものを選択しかつ液体窒素中に沈めて凍結した。各々の抗体についての最高の産生細胞株を、上記と同じだが、FBSを5%しか含まない培地中で増殖させた。キメラ抗体をProsep (登録商標) -A (Bioprocessing Ltd) を用いて精製した。濃度をヒトIgG κ 抗体用のELISAで決定した。抗体をSDS-PAGEでも解析した。

10

【0379】

3.2 キメラ抗体の一過性発現

異なるキメラ抗体の検査を捗らせるために、一過性発現を用いて、検査用の組換え抗体を含む少量の細胞上清を速やかに産生した。mC2 V_HおよびV_K発現カセットを、一過性発現用のpcDNA3.1 (Invitrogen) に基づくベクターに移した。重鎖ベクターには、ヒトIgG定常領域が含まれた。軽鎖ベクターには、ヒトカッパ定常領域が含まれた。mC2 V_H AFおよびmC2 V_H Bの両方を、mC2 V_Kと共に、Lipofectamine 2000試薬 (Invitrogenカタログ番号: 11668) を用いて製造業者によって供給されたプロトコルに従って、ヒト胎児腎臓 (HEK 298) 細胞にトランスフェクトした。馴化培地を細胞からトランスフェクション3日後に採取した。産生された抗体の量をヒトIgG κ 抗体用のELISAで決定した。

20

【0380】

実施例4 キメラC2抗体の活性

4.1 一過性トランスフェクションによって産生されたキメラC2抗体の活性

2つの異なるキメラ抗体についての一過性トランスフェクション由来の馴化培地の試料を、アミロイド β に対する結合についてELISAで検査した。結果は、C2 V_H AF/C2 V_Kキメラ抗体は本アッセイでよく結合するが、C2 V_H B/C2 V_Kは結合を全く示さない。Chemicon 1560マウス対照抗体は良好な結合を示したが、供給された精製マウスC2抗体による結合はわずかであった。ヒト定常領域を持つキメラ抗体と比較して、異なる二次抗体を、マウス定常領域を持つマウス抗体に利用したので、結果は直接的には比較可能ではないということに留意すべきである。C2ハイブリドーマ由来の馴化培地は本アッセイで良好な結果をもたらすことが後に分かった。

30

【0381】

4.2 精製キメラC2抗体の活性

2つの異なるC2キメラ抗体を、記載したような安定なNS0細胞株から精製し、アミロイド β ELISAを用いて検査した。得られた結果は、一過性発現された抗体で得られた結果と一致している。C2 ChVH AF/ChVK抗体はELISAでよく結合し、C2 ChVH B/ChVK抗体は全く結合しない。

【0382】

実施例5 ヒト化C2抗体遺伝子の設計

mC2 V_HおよびV_Kアミノ酸配列を、NCBIおよびKabatデータベース中の齧歯類抗体V_HおよびV_K配列と比較した。

【0383】

5.1 軽鎖可変領域

mC2 V_Kに対して最も近似して一致するマウス生殖系列遺伝子は、bb1、Locus MMU231201である (Schable et al, 1999)。わずか2つのアミノ酸がこの生殖系列配列とは異なっており、両方ともCDRL1内に位置する。類似しているが、同一ではない配列を持つ成熟マウス抗体が見出される。幾つかは、同一のCDRL2および同一のCDRL3を有するが、mC2のCDRL1は独特であるように思われる。mC2 V_KをKabatサブグループMuV_KIIに割り当てることができる。mC2 V_Kの位置87は、サブグループ中でより一般的であるYではなくFであり、このこ

40

とは、このフレームワーク残基が抗体活性に重要であり得るということを示している。ヒト生殖系列 V_K 配列との比較により、サブグループ V_{KI} 由来の遺伝子がmC2 V_K に対して最高に一致するものであるということが示されている (Cox et al, 1994)。配列DPK15をヒトJ領域HuJ K_1 と共に選択し、ヒト化 V_K 用のアクセプターフレームワーク配列を提供した。

【0384】

4つのヒト化 V_K 配列を設計した。C2HuVK1は、DPK 15およびヒトJ K_1 由来のフレームワークを持つmC2 V_K CDRからなる。バージョン2、3、および4では、マウス残基が、フレームワーク中の位置45もしくは87または両方で置換されている。残基45は、CDRの立体構造の支持に参与する可能性がある。残基87は、 V_H および V_K ドメインの境界面に位置する。したがって、これらの残基は、抗体結合の維持に決定的に重要な意味を持つ可能性がある。

10

【0385】

軽鎖フレームワーク領域での位置および起こった変化を表1：ヒト化配列とmC2 V_K 配列との、ならびにDPK15とヒトJ K_1 との比較に示す。

【0386】

5.2 重鎖可変領域

mC2 V_H AFに対して最も近似して一致するマウス生殖系列遺伝子は、VH7183、Locus AF120466である (Langdon et al, 2000)。比較を図5に示す。9つのアミノ酸がこの生殖系列配列とは異なり、大部分がCDR2の中に位置している。同一または類似の(1残基異なる)CDR1を持つまたは類似のCDR2(1残基異なる)を持つ成熟マウス抗体が見出されるが、3つ全てのCDRがmC2 V_H AFと同一である抗体はない。mC2抗体のCDR3は異常に短く、わずか3残基からなる。しかしながら、この長さのCDR3を持つその他の抗体がデータベース中で見出される。mC2 V_H AFをKabatサブグループMu V_{HI} IIDに割り当てることができる。mC2 V_H の残基47は、より一般的なWではなくLであり、残基94は通常はRではなくSであり、このことはこれらのフレームワーク残基が抗体活性に有用であり得るということを示している。ヒト生殖系列 V_H 配列との比較により、サブグループ V_{HII} 由来の遺伝子がmC2 V_H に対して最高に一致するものであるということが示されている。配列DP54をヒトJ領域HuJ H_6 と共に選択し、ヒト化 V_H 用のアクセプターフレームワーク配列を提供した。

20

【0387】

4つのヒト化 V_H 配列を設計した。C2HuVH1は、DP 54およびHuJ H_6 由来のフレームワークを持つmC2 V_H AF CDRからなる。バージョン2、3、および4では、マウス残基が、フレームワーク中の位置47もしくは94または両方で置換されている。フレームワーク2における残基47は、CDRおよび V_K ドメインの両方と接触する。残基94は、CDRの立体構造を支持するのに参与する可能性がある。したがって、これらの残基は、抗体結合の維持に決定的に重要な意味を持つ可能性がある。

30

【0388】

重鎖フレームワーク領域での位置および起こった変化を表2に示す。

【0389】

実施例6 ヒト化抗体遺伝子の構築

修飾された可変領域を、重複するPCR組換えという方法で構築した。キメラ抗体、C2 Ch V_H AF and C2 Ch V_K 用の発現カセットを、フレームワーク領域の必要とされる配列への突然変異導入のための鋳型として用いた。改変されるべき領域を包含する突然変異導入プライマー対の組を合成した。産生されたヒト化 V_H および V_K 発現カセットをpUC19にクローニングし、DNA配列全体が各々の V_H および V_K について正しいことを確認した。修飾された重鎖および軽鎖のV領域遺伝子を、pUC19からHindIII~BamHI発現カセットとして切り出した。これらを、キメラ抗体ベクターについてと同様に、ヒトIgG4 Ser-Proまたは κ の定常領域をそれぞれ含む発現ベクターpSVgptおよびpSVhygに移した。DNA配列が、発現ベクター中のヒト化 V_H および V_K について正しいことを確認した。

40

【0390】

実施例7 ヒト化抗体の発現

7.1 安定細胞株における発現

50

ヒト化重鎖および軽鎖の発現ベクターを、キメラ抗体の発現についてと同様に、NS0細胞にエレクトロポレーションでコトランスフェクトした。抗体産生細胞株を選択および増殖させ、キメラ抗体についてと全く同様に、ヒト化抗体を精製した。精製された抗体をSDS-PAGEで解析した。

【0391】

7.2 ヒト化抗体の一過性発現

異なるヒト化 V_H および V_K 構築物の検査を捗らせるために、C2ヒト化 V_H および V_K 発現カセットもまた、第7.2節で記載した一過性発現用のベクターに移した。4つのヒト化C2 V_K 構築物を、キメラC2 V_H 構築物と共に、HEK293細胞にコトランスフェクトした。同様に、4つのヒト化C2 V_H 構築物を、キメラC2 V_K 構築物と共に、HEK293細胞にコトランスフェクトした。トランスフェクション3日後に馴化培地を細胞から採取した。産生された抗体の量を、ヒトIgG κ 抗体用のELISAで決定した。

【0392】

実施例8 ヒト化C2抗体の活性

8.1 一過性トランスフェクションによって産生されたヒト化C2抗体の活性

一過性トランスフェクション由来の馴化培地の試料を、アミロイド β ELISAで検査した。得られた結果は、ヒト化 V_H 構築物C2 Hu V_H AFのバージョン2および4が、キメラC2カップ鎖と組み合わせた場合に機能的であり、かつ本アッセイでキメラC2抗体と同程度であるということを示している。対照的に、キメラC2カップ鎖と組み合わせたC2 Hu V_H AFのバージョン1および3を含む抗体は、本アッセイで結合を全く示さない。これは、位置94でのマウス残基の置換が抗体活性に必須であるということを示している。4つのヒト化C2カップ鎖と組み合わせたキメラC2重鎖を含む抗体は全て、キメラ抗体と同程度の、良好な結合をELISAで示した。

【0393】

8.2 精製ヒト化C2抗体の活性

2つのヒト化重鎖および4つのヒト化軽鎖の全ての組み合わせを含む8つの異なるヒト化C2抗体を、記載したような安定なNS0細胞株から精製し、アミロイド β ELISAを用いて検査した（図6）。

【0394】

得られた結果は、C2 Hu V_H 4抗体がC2 Hu V_H 2抗体よりも良好に本アッセイで機能するということを示している。C2 Hu V_H 2抗体のうち、C2 Hu V_H 2/Hu V_K 3が最高の結合活性を示すが、これはキメラ対照抗体C2 Ch V_H AF/Ch V_K と比較しておよそ2倍減である。C2 Hu V_H 2/Hu V_K 2活性は、対照と比較して4~5倍減である。C2Hu V_H 4を含む4つの異なるヒト化軽鎖を持つ抗体の活性はよく似ている。最高の活性は、C2Hu V_H 4/Hu V_K 1について観察され、4つの抗体は全て、本アッセイで対照キメラ抗体と近似している。

【0395】

実施例9 CDRL2の修飾

9.1 修飾されたCDRL2を持つ軽鎖の設計

上で触れたように、多くの抗体は、C2抗体と同じCDRL2配列（「KVSNRFS」）を共有する。抗体活性に悪影響を及ぼすことなくCDRL2を少し修飾することができるか否かを検査することにした。2つの保存的置換、すなわち、位置50におけるKとRの置換および位置53におけるNとSの置換を選択した。それゆえに、2つの代わりとなるCDRL2配列は、「RVSNRFS」および「KVSSRFS」である。これらを、その他の変化を伴うことなく、それぞれmC2 V_K -R and mC2 V_K -Sとして、マウス V_K 配列に組み入れた。

【0396】

9.2 修飾されたCDRL2抗体の一過性発現

第11.2.1節で記載した修飾されたCDRL2を持つ2つのC2軽鎖構築物を、一過性発現用の軽鎖ベクターにクローニングした。各々を、キメラC2 V_H ベクターと共に、HEK293細胞にコトランスフェクトした。トランスフェクション3日後に馴化培地を細胞から採取した。産生された抗体の量を、ヒトIgG κ 抗体用のELISAで決定した。

【0397】

9.3 修飾されたCDRL2を持つC2抗体の活性

mC2 V_H と組み合わせた修飾されたCDRL2を持つmC2 V_K の一過性トランスフェクション由来の馴化培地の試料を、アミロイド β ELISAで検査した（図7）。VK-R抗体およびVK-S抗体の両方がキメラC2抗体と同程度であり、CDRL2に対する選ばれた個々の修飾が、本アッセイで抗体の活性に際立った影響を及ぼさないことを示している。

【0398】

実施例10 親和性決定

マウス（ACI-01-Ab-7-C2）抗体、キメラ（AF）抗体、およびヒト化抗体（H4K1；H4K4）の結合特異性および親和性を評価するために、アミロイド β 1-42の単量体および線維をCM 5チップ上に固定化した抗原として用いて、BIACORE（登録商標）解析を行った。BIACORE（登録商標）技術は、層上に固定化した抗原への抗体の結合による、表面層での屈折率の変化を利用する。結合は、表面から屈折するレーザー光の表面プラズモン共鳴（SPR）によって検出される。結合速度および解離速度に関するシグナル動力学の解析により、非特異的相互作用と特異的相互作用の区別が可能となる。使用した抗体の濃度は、0.05 μM ～1.0 μM の範囲であった。

	単量体			線維		
	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	KD (M)	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	KD (M)
マウス ACI-01-Ab-7-C2	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,1E-08
キメラ AF	4,7E+04	9,5E-04	2E-08	5,1E+04	3,3E-04	6,5E-09
ヒト化 H4K1	5,0E+04	9,5E-04	1,9E-08	4,9E+04	2,3E-04	4,7E-09
ヒト化 H4K4	2,5E+04	4,4E-04	1,8E-08	1,3E+05	3,0E-04	2,3E-09

【0399】

実施例11 免疫組織化学的結合アッセイ

11.1 ヒト脳切片

健康な患者、非認知症の前AD患者、およびAD患者由来の脳を、BonnのUniversitätsklinikから倫理的承認後に入手した。脳をホルムアルデヒド中で固定し、海馬領域を脱水し、パラフィン中に包埋し、5 μm 切片をミクロトームで切った。パラフィン切片を使用するまでRTで保存した。新鮮材料用に、5 μm 凍結切片をクライオスタットで切り、切片を使用するまで-80℃で保存した。

【0400】

11.2 免疫組織化学

パラフィン切片を脱パラフィン処理し、スライドをキシレン、次いで100% エタノール、90% エタノール、および70% エタノールに浸すことによって再水和した。バックグラウンドを、10% H_2O_2 、10% メタノールを含む水の中での30分間のインキュベーションによって減少させた。スライドを100% ギ酸中で3分間インキュベートすることによって、抗原回復を得た。Tris緩衝化食塩水（TBS、pH 7.5）中での3回の洗浄の後、10% BSA、0.25% Triton X-100を含むTBS中でのスライドの2時間のインキュベーションによって、非特異的標識をブロッキングした。洗浄した後（TBS中で3回）、非標識抗ヒトIgG（Biomed）を添加し、スライドを湿潤チャンバーの中で終夜RTでインキュベートすることによって、内在性抗体のブロッキングを行った。さらに3回の洗浄後、一次ヒト抗アミロイド抗体をスライドに添加し、さらに24時間RTでインキュベートした。洗浄後、アルカリホスファターゼ標識された二次抗ヒトIgG（Sigma）をスライドに添加し、2時間RTでインキュベートした。洗浄後、スライドをLiquid permanent Red（Dakocytomation）で染色し、水で洗浄し、退色しないマウント剤（corbitbalsam）を用いて標本にする前に風乾した。

【0401】

凍結切片をメタノール中で30分間-80℃で固定し、冷メタノールに H_2O_2 を10%の最終濃

度まで添加し、30分間RTでインキュベートすることによってバックグラウンドを減少させた。Tris緩衝化食塩水（TBS、pH 7.5）中での3回の洗浄の後、上記のような10% BSA、0.25% Triton X 100を含むTBS中でスライドを2時間インキュベーションすることによって非特異的標識をブロッキングし、上記と同じ染色手順を実行した。

【0402】

切片をLeica DMLB顕微鏡で調べ、Leica DC500カメラおよびLeica FireCam 1.2.0ソフトウェアを用いて写真を撮影した。

【0403】

ヒト抗体AおよびCの両方が、AD疾患患者由来の脳の斑を標識した（図8）。拡散した斑および中空の芯を持つ斑の両方が標識された。さらに、非認知症の前AD患者における拡散した斑もまた、AおよびC抗体で検出することができた。脳アミロイド血管症（CAA）におけるアミロイドが両方の抗体で標識され、細胞内アミロイドに対応する可能性があるニューロンの多少の染色も検出された。健康な患者由来の対照脳では標識が見られなかった。斑は、ギ酸で前処置したパラフィン切片で検出することができたが、ギ酸前処置なしのパラフィン切片およびメタノール中で固定した凍結切片では斑は標識されなかった。ヒト抗体Bはパラフィン切片上の斑を検出せず、マウス抗体はヒト脳のパラフィン切片も凍結切片も染色しなかった。

【0404】

略語：

A = 結合するキメラ抗体AF（IgG4）

B = 結合しないキメラ抗体B（IgG4）

C = 結合するヒト化抗体H4K1（IgG4）

マウス = ACI-01-Ab-C2マウス抗体（IgG2b）

【0405】

実施例12 アミロイド線維に対するmC2の機能性

12.1 mC2抗体の結合後のA β 1-42線維の立体構造の改変および脱凝集の開始

既に形成された β -アミロイド（A β ₁₋₄₂）線維を抗体が脱凝集させる機序について評価するために、脱凝集を測定するチオフラビン-T（Th-T）蛍光アッセイと、二次立体構造を分析するU-¹³Cチロシン10およびバリニン12で標識したA β 1-42ペプチドの固体核磁気共鳴（NMR）との直接比較を行った（図9A）。mC2抗体は、既に形成されたA β 1-42線維の35.4%を可溶化し、同時に β -シートからランダムコイル状への二次立体構造の変換を誘導した。ランダムコイル立体構造に対する β -シート立体構造の集団の減少は35%という程度であり、このため蛍光Th-Tアッセイを用いて測定したものとよく一致する（図9B）。これらのデータは、mC2抗体の結合によって二次構造の転移が惹起され、それが β -シートの平行的分子間配置の不安定化を引き起こして、伸長した線維のより小型の断片への分解に影響を及ぼす可能性を示している。

【0406】

12.2 mC2抗体の立体構造依存的な結合親和性

抗体抗原結合エネルギーのある割合を抗原の立体構造のエネルギー依存的な改変のために利用し得ることが科学文献で周知であることから(Blond and Goldberg, 1987)、A β ₁₋₄₂タンパク質全体、および抗体エピトープを含むより小型の9アミノ酸長のペプチドに対するC2抗体の結合親和性に関する比較実験を行った（図10）。この比較のために、ヒト化抗体C2の親和性を、C2のエピトープの完全アミノ酸配列をカバーするジオチン化ペプチド（Mimotopes社により製造、ANAWA Trading SA社より購入）およびジオチン化完全A β 1-42ペプチド（Bachem）を用いるELISAによって分析した。分析は製造元（Mimotopes）の指示に従って行った。図10で示すように、この抗体は、全A β 1-42タンパク質に対するよりも、その特定のエピトープ（A β ₁₋₄₂配列のアミノ酸13-21）を含むペプチドに対して36.0%高い親和性で結合した。このため、結合親和性エネルギーの違いが、抗体相互作用のためにより許容される位置で抗原を提示するような、アミロイドタンパク質の二次立体構造のエネルギー消費性転移に用いられたことが示唆された。これは、抗体の親和性が、単離され

たサブユニットに対するよりも自然な状態（全アミロイドタンパク質）に対して低い理由を説明する。

【0407】

実施例13 アミロイドβ1-42ペプチドの凝集に対する抗アミロイドhC2の効果

ヒト化抗ヒトアミロイドβモノクローナル抗体hC2がアミロイドβ（Aβ）に対する抗凝集および脱凝集効果を仲介する能力を評価するために、チオフラビンT分光蛍光アッセイを遂行した。

【0408】

13.1 凝集の阻害アッセイ

Aβ1-42凍結乾燥粉末をヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）で再構成し、1 mMにした。ペプチド溶液を15分間室温で超音波処理し、終夜攪拌し、アリコートを作製してシリコン処理していない微小遠心分離チューブに入れた。その後、HFIPをアルゴンの流れの下で蒸発させた。結果として生じるペプチド膜を10分間真空乾燥させ、使用するまで-80℃で保存した。

【0409】

Aβ1-42凝集の抗体介在性の阻害についてアッセイするために、hC2抗体をPBS中で前希釈し、以下の成分を含むアッセイ溶液を、シリコン処理していないインキュベーションチューブ中で作製した：3.3または0.33 mM 前希釈抗体、10 mM チオフラビンT、33 mM Aβ1-42、および8.2% DMSO。それゆえに、抗体対Aβ1-42の最終的なモル比は、1：10および1：100であった。適当な対照溶液も調製した。その後、溶液を24時間37℃でインキュベートし、分光蛍光（相対蛍光単位；RFU）を、黒い384ウェルプレート（Perkin-Elmer）中でPerkin-Elmer FluoroCount分光蛍光計で6回繰り返して読み取った。その後、分光蛍光を測定し、脱凝集パーセントを以下で記載するように計算した。

【0410】

13.2 脱凝集アッセイ

既に凝集したAβ1-42の抗体介在性の脱凝集についてアッセイするために、上記のように調製した低分子量Aβ1-42を、27% DMSOおよび1×PBS中の110 mM溶液として作製した。その後、この溶液を37℃で24時間凝集させ、その後以下を添加した：3.3または0.33 mM 前希釈抗体、および10 mM チオフラビンT。これにより、1：10および1：100の抗体対Aβ1-42のモル比が結果的にもたらされた。その後、この溶液をさらに24時間37℃でインキュベートした。その後、分光蛍光を測定し、脱凝集パーセントを以下で記載するように計算した。

【0411】

13.3 計算

凝集の阻害または脱凝集を、以下の方程式に従って、それぞれ平均阻害パーセントまたは脱凝集±平均の標準偏差（SEM）として表す。

$$\% \text{ 阻害} = \frac{(\text{陽性対照のRFU} - \text{陰性対照のRFU}) - (\text{A}\beta 1\text{-42を伴うRFU} - \text{A}\beta 1\text{-42を伴わないRFU})}{(\text{陽性対照のRFU} - \text{陰性対照のRFU})} \times 100\%$$

【0412】

13.4 結果

13.4.1 Aβ1-42凝集の阻害

hC2抗体を用いたAβ1-42凝集の阻害を表1および図18に示す。1：100の抗体対Aβ1-42モル比では、阻害が平均して30%であったのに対し（2回の独立の実験）、1：10のモル比では、阻害は平均して80%であった（2回の独立の実験；表1参照）。

【0413】

（表1）1：100および1：10の抗体対Aβ1-42モル比でのAβ1-42凝集のhC2介在性の阻害

10

20

30

40

抗体	モル比 (抗体 対 A β 1-42)	
	1:100	1:10
hC2	30.0 $\pm$ 4.1%	80.4 $\pm$ 6.9%

【0414】

13.4.2 既に凝集したA β 1-42の脱凝集

hC2抗体を用いた、既に凝集したA β 1-42の脱凝集を表2および図19に示す。1:100の抗体 対 A β 1-42モル比では、脱凝集が平均して24%であったのに対し、1:10のモル比では、阻害は平均して32%であった（3回の独立の実験；表2参照）。

【0415】

（表2）1:100および1:10の抗体 対 A β 1-42モル比での既に凝集したA β 1-42凝集のhC2介在性の脱凝集

抗体	モル比 (抗体 対 A β 1-42)	
	1:100	1:10
hC2	23.9 $\pm$ 4.4%	31.9 $\pm$ 3.5%

【0416】

チオフラビンTアッセイを用いて、抗A β ヒト化抗体hC2の二重機能特性、すなわち、A β 1-42の病原性プロトフィブリル立体構造への凝集を阻害すること、およびさらに既に形成されたA β 1-42プロトフィブリルを脱凝集することを示すことができる。hC2は、1:10の抗体 対 A β 1-42モル比で、A β 1-42凝集を80%阻害した。hC2が、1:10のモル比でA β 1-42の既に凝集したプロトフィブリルを脱凝集する能力は、32%であることが示された。

【0417】

実施例14：異なるクラスのアミロイドタンパク質に対するmC2の立体構造特異的結合

単量体アミロイド、重合体可溶性アミロイド、および原線維アミロイドという、異なる段階の重合体化されたアミロイドタンパク質に対するmC2の特異性を評価するために、これらの異なる段階の重合体 β -アミロイドでコーティングしたELISAを行った（図11）。単量体は（Klein, 2002）によって公表された修正法によって調製し、可溶性重合体アミロイド β は（Barghorn et al., 2005）によって調製する一方で、線維は、1 μ g/ μ lの最終濃度のアミロイド（Bachem, Switzerland）のTris/HCl pH 7.4中で37°Cで5日間のインキュベーション、それに続く遠心分離工程（10,000 rpm、5分間）によってあらかじめ形成した。その後、アミロイド重合体をELISAプレート上に55 μ g/mlの最終濃度でコーティングし、アルカリホスファターゼで標識された抗マウスIgGモノクローナル抗体（Jackson）を用いることによる結合親和性ELISAを行った。図11に示したように、mC2抗体は、線維に対してよりも高い親和性で可溶性重合体アミロイド β に結合し、単量体に対しては最も低い親和性で結合した。これらのデータは、抗体の結合がアミロイドエピトープによって、および異なるアミロイド凝集体の立体構造によって影響を受けるということを示している。

【0418】

実施例15：AC免疫のモノクローナル抗体hC2のエピトープマッピング

ヒト化モノクローナル抗体hC2のエピトープマッピングを、3種の異なるペプチドライブラリーを用いるELISAによって行った。1つのライブラリーは、A β 1-42の完全アミノ酸（aa）配列をカバーする合計33種のビオチン化ペプチドを含んだ（Mimotopes社により製造、ANAWA Trading SA社から購入）。第2のライブラリーは、第1のペプチドライブラリーからのペプチド12（A β のaa12-20）を用い、配列中の各aaがアラニンによって置換されたビオチン化ペプチドを含み（以下の表3を参照）、第3のライブラリーは、ビオチン化ペプチド

13、14または15 (A β のaa 13-21、14-22、または15-23) を含み、それぞれの場合に最後のアミノ酸はアラニンに、またはすでにそれがアラニンであるaa 21についてはグリシンに置換されている (以下の表4を参照)。ビオチン化完全A β 1-42ペプチドを陽性対照として用いた (Bachem)。エピトープマッピングは製造元 (Mimotopes) の指示に従って行った。手短に述べると、ストレプトアビジンでコーティングしたプレート (NUNC) を、PBS中の0.1% BSAにより4℃で一晩かけてブロッキングした。PBS-0.05% Tween 20で洗浄した後に、PBS中の0.1% BSA、0.1% アジ化ナトリウム中に最終濃度10 μ Mに希釈したライブラリーからの種々のペプチドにより、プレートを室温で1時間かけてコーティングした。洗浄後に、プレートを、PBS中の2% BSA、0.1% アジ化ナトリウム中に200ng/mlに希釈したhC2抗体または非A β 結合キメラIgG4抗体と共に、室温で1時間インキュベートした。プレートを再び洗浄し、アルカリホスファターゼが結合したヤギ抗ヒトIgGと共に室温で1時間インキュベートした。最終洗浄の後に、プレートをホスファターゼ基質 (pNPP) と共にインキュベートし、ELISAプレートリーダーを用いて405nmで読み取りを行った。

10

【0419】

ヒト化モノクローナル抗体hC2は、第1のペプチドライブラリーのペプチド12、13、14、15および16と特異的に結合することが示された。これらのペプチドは、A β 1-42のaa 12-20、13-21、14-22、15-23、および16-24をそれぞれ含み、このことはエピトープがA β の領域12-24に存在することを示唆する。アラニン置換を有する第2のライブラリーは、A β 12-20 (VHHQKLTVFF) に対する結合のために決定的なaaを決定するために用いた。アミノ酸16、17、19または20をアラニンで置換するとhC2抗体の結合は完全に失われ、このことはこれらのaaがA β に対する抗体の結合に極めて決定的であることを示している。aa 15および18を置換した場合には、hC2抗体の結合は一部が失われた。

20

【0420】

aa 14をアラニンに置換した場合も結合はやはりほぼ完全に失われ、このことはaa 14も結合のために非常に重要であることを示している。

【0421】

最後に、第3のライブラリーを、aa 21、22または23がエピトープに対する結合のために決定的であるか否かを判定するために用いた。aa 23をアラニンに置換するとaa 15-23に対する抗体の結合は低下し、このことはaa 23も結合のために重要なことを示している。aa 21をグリシンに置換した場合には結合は一部が失われ、aa 22をアラニンに置換した場合にはわずかに失われた。

30

【0422】

実施例16: hC2抗体による神経保護

抗体hC2がA β オリゴマー誘導性の変性からニューロンを保護する能力をインビトロアッセイで評価した。胎生期16.5~17.5日目のマウス皮質ニューロンを単離し、解離させ、インビトロでN3-F12培地中で培養した。細胞を合計9日間成長させ、3日目と、およびA β オリゴマーまたはA β オリゴマーおよび抗A β 抗体hC2を添加する日に栄養を与えた。5日目 (「4日間のA β 」) または6日目 (「3日間のA β 」) に、あるウェルの細胞を、2 μ M A β オリゴマーのみか、または2 μ M A β オリゴマーおよび50 μ g/mL 抗A β 抗体hC2のいずれかで処置した。

40

【0423】

A β オリゴマーは、A β 1-42 (rペプチド) をHFIPに溶かすことによって調製し、そこからA β ペプチドを10 μ lアリコートに1 mg/mlで分注し、その後ドラフト内で30分間蒸発させ、ペプチド膜を使用するまで-80℃で保存した。使用時に、ペプチド膜を10 μ lのDMSO、その後78.6 μ lのHAMS F12に溶かし、A β ペプチド溶液を4℃で24~48時間インキュベートした (25 μ Mの最終濃度のA β)。

【0424】

対照細胞については、DMSO-F12のみをA β -DMSOと同じ容量で5日目に添加し、細胞をさらに4日間何らの追加の処置もなく培養した。9日目に、全ての培養条件由来のニューロンを固定し、Tuj1 (抗 β -チューブリン抗体) で染色し、それに続いてFITCで標識された二

50

次抗体で染色して、微小管、ひいてはニューロンの突起一般を可視化した。結果を図20に示す。未処置のマウス胎児皮質ニューロンは、培養の9日後に正常な形態を示した（図20、左端のパネル）。細胞のA β オリゴマーによる3日間の処置は、軸索変性を誘導しかつ軸索の総数の減少をもたらした（図20、中央下のパネル）、この効果は処置の4日目ですらにより顕著であった（図20、中央上のパネル）。対称的に、A β オリゴマーおよび抗A β 抗体hC2の組み合わせで処置した細胞は、対照細胞と同様に見えた（図20、右上および右下のパネル）。これらの結果は、抗A β 抗体hC2が、A β オリゴマー誘導性の変性から胎児マウス皮質ニューロンを保護することができたということを示している。

【0425】

（表1）ヒト化C2軽鎖フレームワーク領域での位置および起こった変化

軽鎖の位置	45	87	50	53
マウス C2V _K	K	F	K	N
ヒト化 C2HuV _K 1	Q	Y	K	N
ヒト化 C2HuV _K 2	Q	F	K	N
ヒト化 C2HuV _K 3	K	Y	K	N
ヒト化 C2HuV _K 4	K	F	K	N
ヒト生殖系 dpk15	Q	Y	L	N
マウス C2V _K -R			R	
マウス C2V _K -S				S

【0426】

（表2）ヒト化C2重鎖フレームワーク領域での位置および起こった変化

重鎖の位置	47	94
マウス C2VHAF	L	S
ヒト化 C2HuVHAF1	W	R
ヒト化 C2HuVHAF2	W	S
ヒト化 C2HuVHAF3	L	R
ヒト化 C2HuVHAF4	L	S
ヒト生殖系 DP-54	W	R

【0427】

合計8つの異なる抗体を、軽鎖ヒト化C2HuV_K1、C2HuV_K2、C2HuV_K3、C2HuV_K4、ならびに重鎖C2HuVHAF4およびC2HuVHAF2を用いて構築した。

【0428】

（表3）第2のライブラリーで用いたペプチドのまとめ

結合に重要であるaaをイタリック体および下線で示し、かつ結合に決定的なaaをイタリック体および太字で示した。

p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	A	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	A	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	A	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	A	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	A	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	A	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	A	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	A	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	A
aa no.	12	13	14	<u>15</u>	16	17	<u>18</u>	19	20

10

【 0 4 2 9 】

(表2) 第3のライブラリーで用いたペプチドのまとめ

結合に重要であるaaをイタリック体および下線で示し、かつ結合に決定的なaaをイタリック体および太字で示した。

p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A		
p13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	G		
p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E	
p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A	A	
p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	D
p15-23	A23			Q	K	L	V	F	F	A	E	A
aa no.		13	14	<u>15</u>	16	17	<u>18</u>	19	20	21	22	<u>23</u>

20

【 0 4 3 0 】

参考文献リスト

30

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.

Blond and Goldberg, 1987, PNAS March 1, 1987 Vol. 84 | no. 5 | 1147-1151

Cox JPL, Tomlinson IM and Winter G. *Eur. J. Immunol.* 1994; **24**: 827-836. A directory of human germ-line V κ segments reveals a strong bias in their usage.

10

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991.

Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular soluble polymeric amyloid beta (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352.

20

Langdon SD, Inaioki M, Kelsoe G. and Tedder TF. *Immunogenetics* 2000; **51**: 241-245. Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution

Mulligan RC and Berg P. *Science* 1980; 209: 1422-1427. Expression of a bacterial gene in mammalian cells.

30

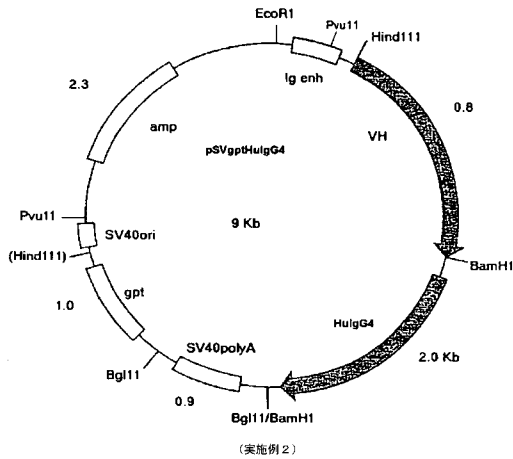
Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G, *Nature* 1988; **332**: 323-327. Reshaping human antibodies for therapy.

Schable KF, Thiebe R, Bensch A, Brensing-Kueppers J, Heim V, Kirschbaum T, Lamm R, Ohnrich M, Pourrajabi S, Roschenthaler F, Schwendinger J, Wichelhaus D, Zocher I and Zachau HG. *Eur. J. Immunol.* 1999; **29**: 2082-2086. Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans in the mouse genome.

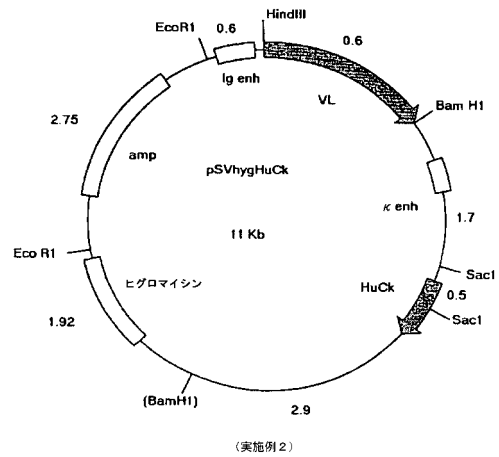
40

Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB and Winter G. *J. Mol. Biol.* 1992; **227**: 776-798. The repertoire of human germline V_H sequences reveals about 50 groups of V_H segments with different hypervariable loops

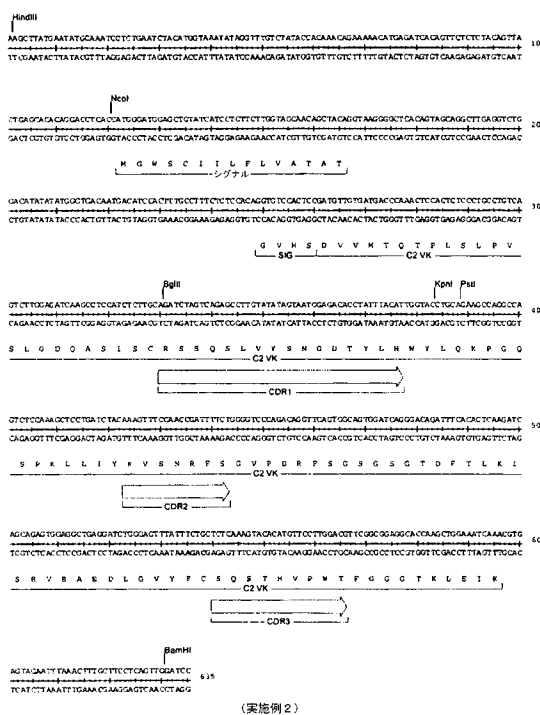
【図 1】



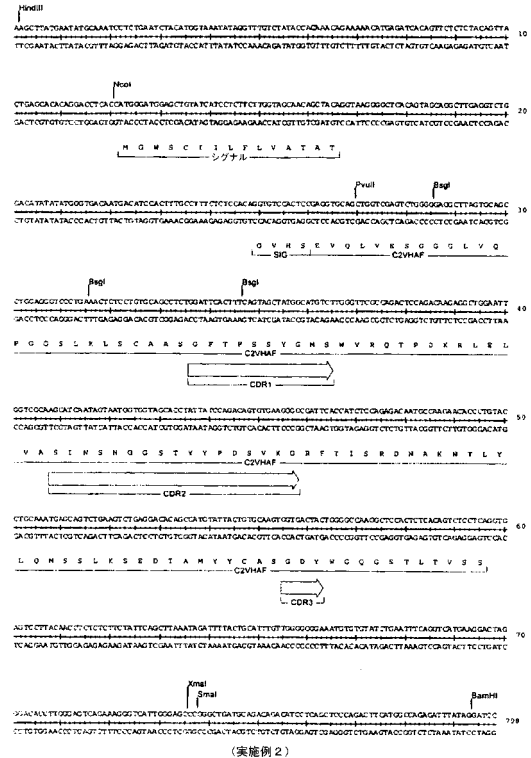
【図 2】



【図 3】



【図 4】

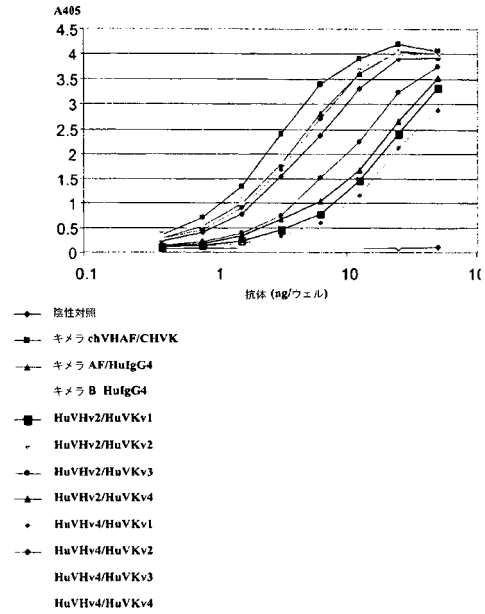


【図 5】

		10		20		30																								
C2VHAF	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	
AF120466	E	V	X	L	V	E	S	G	G	L	V	X	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	
		40		50		60																								
C2VHAF	S	Y	Q	M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	L	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
AF120466	S	Y	Q	M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	X	V	A	T	I	S	I	S	G	S	Y	T	Y	Y
		70		80		90																								
C2VHAF	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
AF120466	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
		100		110																										
C2VHAF	T	A	N	Y	Y	C	A	S	G	D	Y	W	G	G	S	T	L	T	V	S	S									
AF120466	T	A	N	Y	Y	C	A	R	R																					

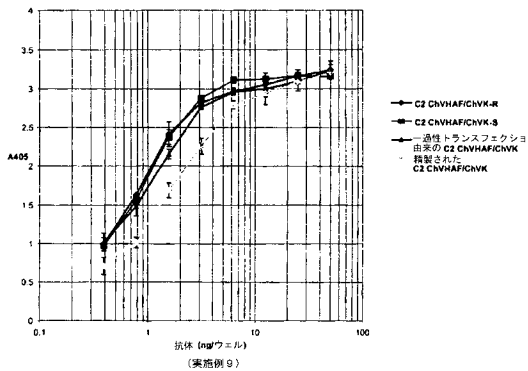
(実施例 5. 2)

【図 6】



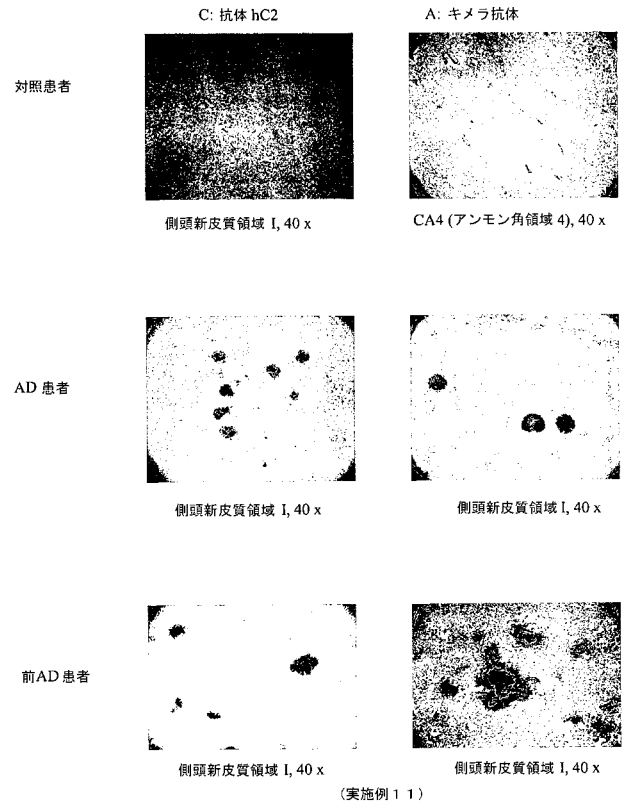
(実施例 8)

【図 7】



(実施例 9)

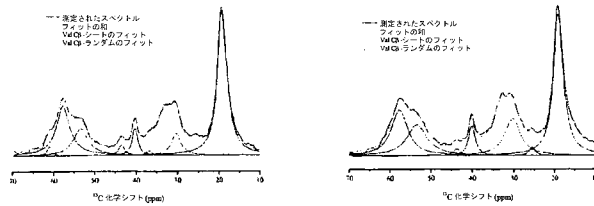
【図 8】



(実施例 11)

【図 9】

A)



B)

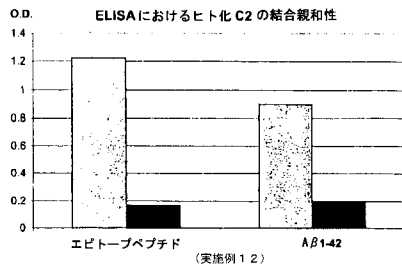
共振	PBS			マウス C2		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	積分強度 (%)	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	積分強度 (%)
Val C β -シート	32.60	479	81.7	33.09	366	53.5
Val C β -ランダム	30.27	200	18.3	30.27	140	46.5

A) PBS (左: 対照としての役割を果たす) または ADI-7-C2 (右) で 24 時間インキュベートし、その後凍結乾燥した U-¹³C Tyr10 および Val112 標識アミロイド β 1-42 標識についての ¹³C CP-MAS スペクトルおよびフィットの比較。Val112 C β の 2 つの立体構造についてのフィットを緑 (シート) および青 (ランダムコイル) で示す。633 ppm でのピークは線維のベータシート立体構造に対応するが、一方 30 ppm でのピークはランダムコイル立体構造の結果である。

B) Val112 C β の 2 つの立体構造についてのフィットしたパラメータの比較。2 つの立体構造についてのフィットした化学シフトは非常に似ているが、積分強度は大きく異なっており、元のベータシート立体構造のおよそ 35% (1-(53.5/81.7)) の低下を反映している。これは、本発明者が蛍光測定から得た値と極めてよく一致している。

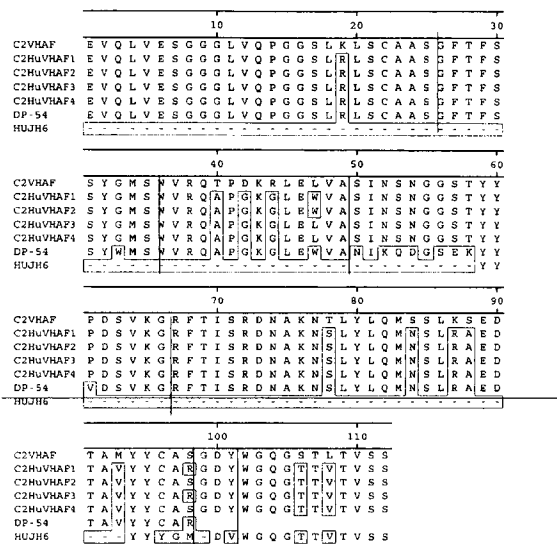
(実施例 12)

【図 10】

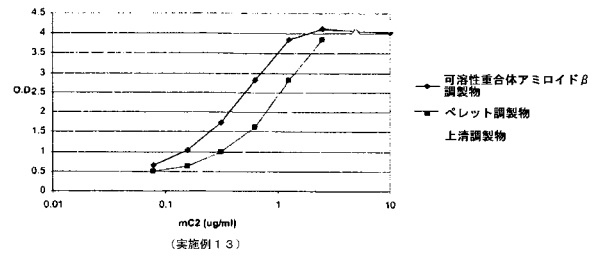


(実施例 12)

【図 13】

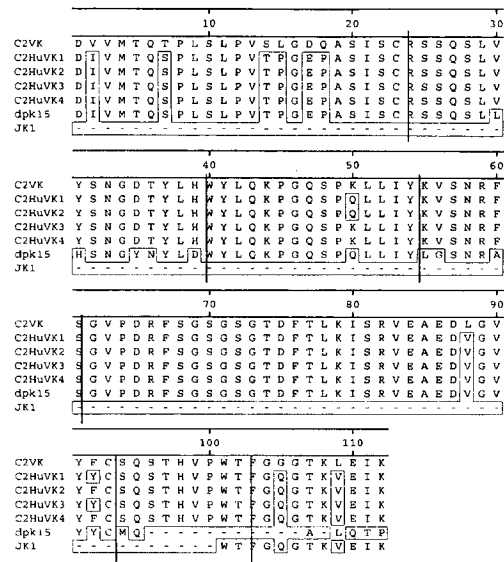


【図 11】

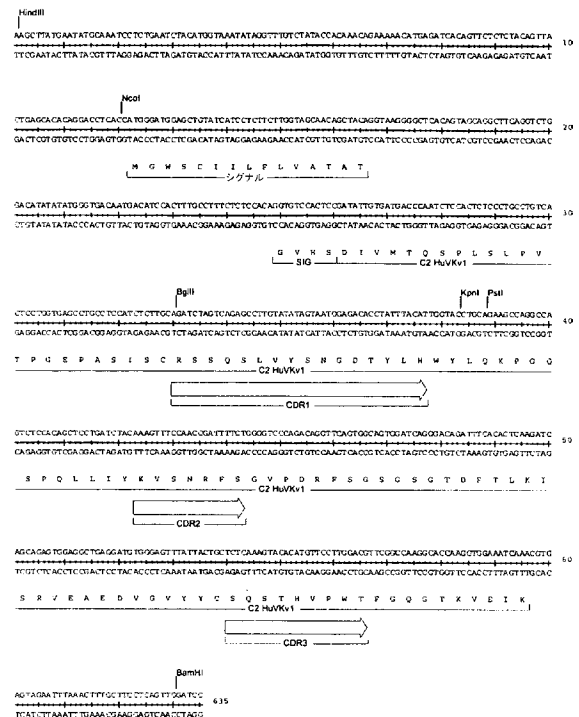


(実施例 13)

【図 12】



【図 14】



[illegible]

【図 1 6 - 1】

AA TTAATGAGTAGAGAGAGCAATCTTCTGTTCTCCAGGGGTTAGGCTGTGGTGGAGAAAGAGTAGGCTAAATCTATAGGCGAGATCTTCTGATCTGTGGCA
 TTAATATGCTCTATCTCTTCTAGAGCAAGAGGCTCCCAATCCGACCCAGCTCTCTCTCATCCGCTTGATATTTCTGCTCTAGAAACACTAGTACCTCT
 510
 TAAATCTGTATCTTCAATTCGATGGTAGTGTACGAGCACTGTAGACATGTGTAATTAATGACATGAGAACTGTACACATCTTATTTAATGCTGCAAAATCTCTG
 ATTGATGACATCAACTAAAGCTCCAGCATCTGCTGCTGCTGATCTGTACATCTTTTCTCTGTATCTGACATCTGTGCTCAATTAATATCTTACAGCTTTAAGAC
 540
 GTTTTATATATGCTACTGATTAATCTATGCAAGTAATCAAGACAGAGAACTGGGTGGGAGACATCTGAGACTCTGTGCTCTTATATCTCTGTTTGTACTACT
 CAAATTTATAGTACATCAATATATGCTACTCTTCACTGTGCTCTCTTTCAGCAAGCTCTGTATGCTGAGACAGAAATATAGGACAGAAAGCATGA
 550
 TCTGCTTGAATTAATTAATTTCTCAATTAATTTTAAATCTTTCTGCTCTGCTGAT
 AGACACTGGAATTTATTAATGAAGCTTTATTAATAAAAATTTGAAAAAAAATATAGCACTAGC
 5561

Figure 1. Schematic representation of the genome organization of the *Yersinia enterocolitica* strain 48/O/94. The genome is shown as a linear map with the following features:

- Genome Organization:** The genome is represented as a linear map with the following features:
 - Genes:** Genes are indicated by arrows pointing to the right, representing the direction of transcription. The genes are labeled with their names in italics, such as *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, etc.
 - Genomic Islands:** Genomic islands are indicated by boxes with the following labels: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, etc.
 - Genomic Islands:** Genomic islands are indicated by boxes with the following labels: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, etc.
- Genomic Islands:** Genomic islands are indicated by boxes with the following labels: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, etc.
- Genomic Islands:** Genomic islands are indicated by boxes with the following labels: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*, etc.

【図 17】

[illegible]

UT CT CCG TCT TTT CT GGG TAAA TGA GTC CAG GGC GGG GA AGC GC CTT CTT CCG CCG GGC TCT TGG GTT CCG CCG AGT GAT CTT GGC AGG TAC CTT CTT TCT ACA
GAG AGG GAC AGA GA CCG CTT TTA CTT CAG GGT TCC CCG GCT TTT TCG GCG GCG GA GGG GCG CCG AGG CTT CAG CCG CTT CTT AAG GAA CTT TGC AT GGG GCG AGA TGT

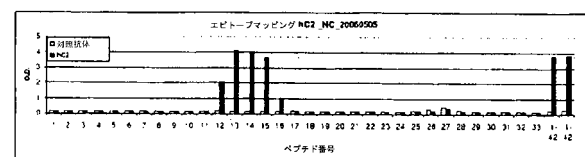
[illegible]

図1. hC2は、A β 1-42ペプチドライブラリーのペプチド12、13、14、15、および16に結合する。A β 1-42の重複するペプチドに対するhC2の結合をELISAで解析した。完全なA β 1-42に対する結合および結合しないキメラ抗体（对照抗体）の結合をそれぞれ陽性対照および陰性対照として用いた。ペプチド番号は、ペプチドが始まるA β 1-42配列中のアミノ酸に対応する。結果を00として表示。

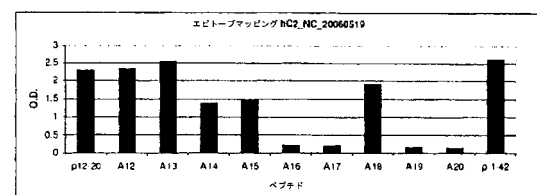


図2 Aβ 12-20に対するhG2結合は、アミノ酸16、17、19、および20に完全に依存し、アミノ酸14、15、および18に部分的に依存する。
Aβ 12-20およびアラニン置換したAβ 12-20に対するhG2の結合をELISAで解析した。完全なAβ 1-42に対する結合を陽性対照として用いた。番号は、アラニンで置換したアミノ酸に対応する。結果を0として表す。

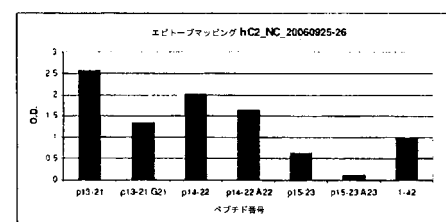
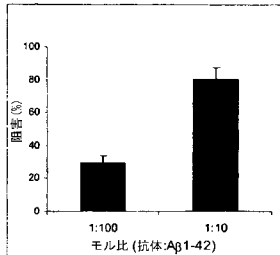
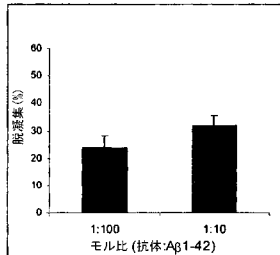


図3. A β 15-23に対するhC2結合は、アミノ酸23に依存し、アミノ酸21に部分的に依存し、アミノ酸22にわずかに依存する。
A β 13-21、14-22、または15-23に対する、および13-21G21、14-22A22、または15-23A23に対するhC2の結合をELISAで解析した。完全なA β 1-42に対する結合を陽性対照として用いた。結果をODとして表す。

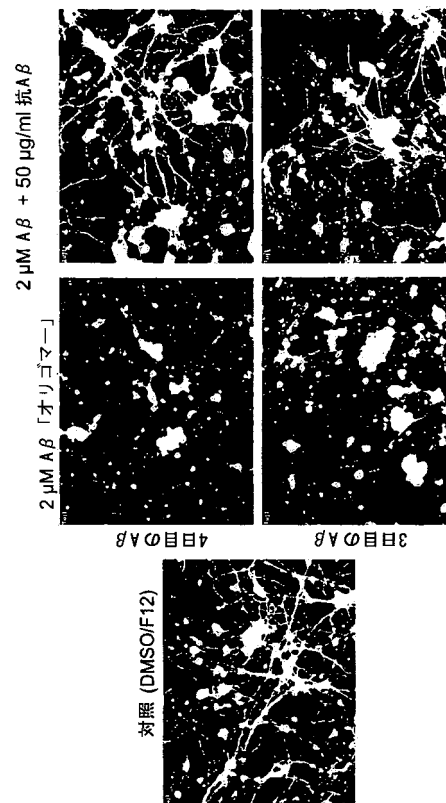
【図 18】



【図 19】



【図 20】



【配列表】

2014176380000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成26年4月9日(2014.4.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

β-アミロイドタンパク質上の少なくとも1つのエピトープに対して特異的に結合するキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片であって、
 該エピトープが、抗体に対する結合に主に関係する少なくとも2つの連続するアミノ酸残基を含み、該少なくとも2つの連続するアミノ酸残基が、

(a) 以下のコア配列 (SEQ ID NO:10) 内に埋め込まれた-Lys-Leu-:

Xaa1 - Xaa2 - Lys - Leu - Xaa3

式中、

Xaa1はHis、Asn、Gln、Lys、およびArgからなる群より選択されるアミノ酸であり、

Xaa2はAsnおよびGlnからなる群より選択されるアミノ酸であり、かつ

Xaa3は、Ala、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸である；ならびに

(b) 以下のコア配列 (SEQ ID NO: 9) 内に埋め込まれた-Phe-Phe-:

Xaa3 - Phe - Phe - Xaa4 - Xaa5 - Xaa6

式中、

Xaa3はAla、Val、Leu、ノルロイシン、Met、Phe、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、

Xaa4はAla、Val、Leu、Ser、およびIleからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、

、

Xaa5は、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基であり、かつ

Xaa6は、GluおよびAspからなる群より選択されるアミノ酸残基である、

からなる群より選択され、

該キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片が変種Fc領域を含み、かつ該変種Fc領域が、この分子が野生型Fc領域より改変されたエフェクター機能を有するように、野生型Fc領域に対して少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、

キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【手続補正書】

【提出日】平成26年4月24日(2014.4.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

重鎖可変領域(HCVR)のCDR1を表すSEQ ID NO:1のアミノ酸配列、CDR2を表すSEQ ID NO:2のアミノ酸配列、およびCDR3を表すSEQ ID NO:3のアミノ酸配列を含み、かつ

Fc領域のアミノ酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438、または439位の1つまたは複数においてアミノ酸改変を含む、

β-アミロイドに特異的に結合することができるキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項2】

軽鎖可変領域(LCVR)のCDR1を表すSEQ ID NO:4のアミノ酸配列、CDR2を表すSEQ ID NO:5のアミノ酸配列、およびCDR3を表すSEQ ID NO:6のアミノ酸配列を含み、かつ

Fc領域のアミノ酸位置238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438、または439位の1つまたは複数においてアミノ酸改変を含む、

β-アミロイドに特異的に結合することができるキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項3】

軽鎖可変領域(LCVR)のCDR1を表すSEQ ID NO:4のアミノ酸配列、CDR2を表すSEQ ID NO:5のアミノ酸配列、およびCDR3を表すSEQ ID NO:6のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項4】

SEQ ID NO:5において示される軽鎖可変領域(LCVR)のCDR2のアミノ酸配列内で、Kabat 50位のLysがArgに交換され、および／またはKabat 53位のAsnがSerに交換されている、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項5】

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域を有する可変領域を含み、ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域のアミノ酸の少なくとも1つが、2005年12月1日にBraunschweig, Mascheroder Weg 1B, 38124 BraunschweigのDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) に、ブダペスト条約の条項に基づいてアクセッション

番号：DSM ACC2750の下で寄託されたマウス抗体ACI-01-Ab7C2の対応する領域由来のアミノ酸への置換またはそれへの保存的置換を通して変化している、請求項1、2、または3記載のヒト化抗体またはその断片。

【請求項6】

(a) 軽鎖可変領域のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域におけるKabat 87位のアミノ酸が、Phe またはTyrである、および／または

(b) 軽鎖可変領域のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域におけるKabat 45位のアミノ酸が、LysまたはGlnである、および／または

(c) 重鎖可変領域のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域におけるKabat 47位のアミノ酸が、Leuである、および／または

(d) 重鎖可変領域のヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域におけるKabat 94位のアミノ酸が、Serである、

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域を有する可変領域を含む、請求項5記載のヒト化抗体またはその断片。

【請求項7】

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域を有する可変領域を含み、重鎖可変領域（HCVR）が、SEQ ID NO:15に記載される配列と90%、詳細には95%、より詳細には98%、さらにより詳細には100%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項1、2、または3記載のヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項8】

ヒトまたは霊長類由来のフレームワーク領域を有する可変領域を含み、軽鎖可変領域（LCVR）が、SEQ ID NO:12に記載される配列と90%、詳細には95%、より詳細には98%、さらにより詳細には100%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項1、2、または3記載のヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項9】

アミノ酸改変によって、エフェクター機能の低減が起こる、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項10】

Fc領域がIgG1 Fc領域である、請求項1、2、または3記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項11】

Fc領域変種D265Aを含む、請求項1、2、または3記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項12】

Fc領域がIgG1 Fc領域である、請求項11記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項13】

請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片をコードするヌクレオチド配列、または重鎖可変領域（HCVR）の相補性決定領域（CDR）2および3をそれぞれ表すSEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:3をコードする配列、軽鎖可変領域（LCVR）のCDR1を表すSEQ ID NO:4、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20をコードする配列、SEQ ID NO:21の軽鎖可変領域をコードする配列、SEQ ID NO:21の軽鎖可変領域とSEQ ID NO:23の軽鎖定常領域とをコードする配列、SEQ ID NO:24の重鎖可変領域をコードする配列、およびSEQ ID NO:24の重鎖可変領域とSEQ ID NO:26の重鎖定常領域とをコードする配列から選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項14】

請求項12のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項15】

請求項13または14の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 16】

請求項15記載の発現ベクターを含む細胞。

【請求項 17】

任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれる請求項1、2、または3記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片の治療的有効量を含み、かつ薬学的に許容される担体を任意でさらに含む、組成物。

【請求項 18】

任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分が含まれる請求項11記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片の治療的有効量を含み、かつ薬学的に許容される担体を任意でさらに含む、組成物。

【請求項 19】

任意の機能的に同等な抗体またはその機能的部分を含み、かつ、さらなる生物学的に活性な物質を治療的有効量で、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／もしくは賦形剤を任意でさらに含む、請求項1、2、または3記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を含む組成物であって、

該さらなる生物学的に活性な物質が、アミロイドーシスの処置において用いられる化合物、酸化的ストレスに対する化合物、抗アポトーシス性化合物、金属キレート剤、ピレンゼピンおよび代謝物などのDNA修復の阻害剤、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸（3APS）、1,3-プロパンジスルホネート（1,3-PDS）、 α -セクレターゼ活性化剤、 β -および γ -セクレターゼ阻害剤、タウタンパク質、神経伝達物質、 β -シート破壊剤（breaker）、アミロイド β を除去する／枯渇させる細胞成分の誘引剤、ピログルタミン酸化したアミロイド β 3-42を含むN-末端切断型アミロイド β の阻害剤、抗炎症分子、ならびにタクリン、リバスチグミン、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剤（ChEI）、M1アゴニスト、および任意のアミロイドまたはタウ修飾薬物を含む他の薬物、および栄養補給剤、ならびに任意で薬学的に許容される担体および／または希釈剤および／または賦形剤から選択される、前記組成物。

【請求項 20】

それを必要とする対象における、アミロイドーシス、アルツハイマー病（AD）などの神経学的障害、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；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）、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、 $A\beta$ 誘導ニューロン分解、および黄斑変性から選択される1つまたは複数のアミロイドーシス関連疾患の効果を予防、処置、または緩和する際に使用するための、治療的有効量の、請求項1、2、または3記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項 21】

認知記憶能の喪失を特徴とするアミロイド関連状態に罹患した対象、特に哺乳動物またはヒトの処置によって、認知記憶能の保持の向上またはその完全な回復が起こる、請求項20記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

【請求項 22】

以下を含む、アミロイド関連疾患または状態を診断する方法：

- (a) アミロイドタンパク質を含有することが疑われる対象の組織試料、または特定の身体部分に、請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を接触させる段階；
- (b) 前記抗体をアミロイドタンパク質に結合させる段階；
- (c) 前記タンパク質に結合した抗体を検出する段階；および
- (d) 抗体結合の有無を、試料または特定の身体部分におけるアミロイドタンパク質の有無と相関させる段階。

【請求項 23】

以下の段階を含む、対象の組織および／または体液の試料におけるアミロイド形成による斑負荷の程度を決定する方法：

- (a) 請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片によってアミロイドタンパク質の存在に関して試料を試験する段階；
- (b) タンパク質に結合した抗体の量を決定する段階；および
- (c) 対象の組織および／または体液における斑負荷を計算する段階。

【請求項 2 4】

請求項1記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を含み、かつ、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する目的で抗体を用いるための、および免疫学的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な、免疫学的複合体の形成を検出するための説明書を任意でさらに含む、アミロイド関連疾患および状態を検出および診断するための試験キット。

【請求項 2 5】

請求項16の細胞を培養する段階、または請求項13もしくは請求項14の核酸分子を発現する段階を含む、キメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片を調製する方法。

【請求項 2 6】

アミロイドーシス、アルツハイマー病（AD）などの神経学的障害、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、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）、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、A β 誘導ニューロン分解、および黄斑変性から選択される1つまたは複数のアミロイドーシス関連疾患の効果を予防、処置、または緩和するため医薬の調製のための、治療的有効量の、請求項1、2、または3記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片の使用。

【請求項 2 7】

アミロイドーシス、アルツハイマー病（AD）などの神経学的障害、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、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）、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、A β 誘導ニューロン分解、および黄斑変性から選択される1つまたは複数のアミロイドーシス関連疾患の効果を予防、処置、または緩和するため医薬の調製のための、治療的有効量の、請求項11記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片の使用。

【請求項 2 8】

(a)既に形成された β アミロイド線維を脱凝集する、または (b) A β 誘導ニューロン分解を防止する際に使用するための、請求項1、2、または3記載のキメラ抗体もしくはその断片またはヒト化抗体もしくはその断片。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
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 5/00 (2006.01)	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D

(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 サンーレジエール ルート デ フェニル 1 6 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 4 2 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 3 9 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 5 2 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA04 CA20 DA02 EA04 GA14
4B065 AA90Y AA91X AA93Y AB01 AC14 BA03 CA25 CA44
4C085 AA14 AA16 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	针对淀粉样蛋白 β 的人源化抗体		
公开(公告)号	JP2014176380A	公开(公告)日	2014-09-25
申请号	JP2014046116	申请日	2014-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	AC免疫有限公司 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 Genentech公司		
[标]发明人	フェイスファーアンドレア ピールグレンマリア ムースアンドレアス ワッツライアン		
发明人	フェイスファー アンドレア ピールグレン マリア ムース アンドレアス ワッツ ライアン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/00 A61P5/00 A61P35/00 A61P21/00 A61P3/10 A61P27/02 A61K39/395 G01N33/53		
CPC分类号	A61P3/10 A61P3/12 A61P5/00 A61P9/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/00 A61P27/02 A61P27/12 A61P35/00 A61P37/00 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/52 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/71 C07K2317/92 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800 /2821		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/00 A61P5/00 A61P35/00 A61P21/00 A61P3/10 A61P27/02 A61K39/395.N G01N33 /53.D A61P27/12 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/13 C12N15/63.Z C12N5/10 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA14 4B065 /AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA03 4B065/CA25 4B065 /CA44 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064 /CC15 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关		
优先权	60/943509 2007-06-12 US		
其他公开文献	JP5898715B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于诊断和治疗淀粉样变性的方法和组合物，淀粉样变性是与淀粉样蛋白相关的一组疾病和异常，例如阿尔茨海默氏病。与 β -淀粉样蛋白，嵌合抗体或其片段或人源化抗体或其特异性结合的至少一个表位的嵌合抗体或其片段或人源化抗体或其片段。包含变体Fc区的片段，并且其中所述变体Fc区包含对野生型Fc区的至少一个氨基酸修饰，使得该分子比野生型Fc区具有

嵌合抗体的修饰的效应子功能。 或其片段或人源化抗体或其片段。 [选择图]无

抗体	モル比 (抗体 対 Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	23.9±4.4%	31.9±3.5%