

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-511386

(P2010-511386A)

(43) 公表日 平成22年4月15日(2010.4.15)

(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 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	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 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-539484 (P2009-539484)	(71) 出願人	391008788
(86) (22) 出願日	平成19年11月29日(2007.11.29)		アボット・ラボラトリーズ
(85) 翻訳文提出日	平成21年7月16日(2009.7.16)		ABBOTT LABORATORIES
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/085932		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(87) 国際公開番号	W02008/067464		パーク アボット パーク ロード 10
(87) 国際公開日	平成20年6月5日(2008.6.5)		0
(31) 優先権主張番号	60/872, 156	(71) 出願人	502104228
(32) 優先日	平成18年11月30日(2006.11.30)		アボット ゲーエムペーハー ウント カ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ンパニー カーゲー
			ドイツ連邦共和国 65205 ヴィース
			バーデン、マックス-プランク-リング
			2
		(74) 代理人	100062007
			弁理士 川口 義雄
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 新規Aβ配座異性体選択的抗Aβグロブロマーモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病の治療及び診断において使用され得るモノクローナル抗体に関する。特に、本発明は、10F4及び3C5と表記されるモノクローナル抗体並びにこれらと類似の特性を有する他のモノクローナル抗体(例えば、マウス、ヒト又はヒト化)に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脳脊髄液（CSF）中に存在する A（1-42）ペプチド及び b）CSF 中に存在する A（1-40）ペプチドからなる群から選択される少なくとも 1 つのアミロイドタンパク質より A（1-42）グロブリンに対してより高い親和性を有する単離された抗体。

【請求項 2】

a）A（1-42）単量体、b）A（1-40）単量体、c）A（1-42）原繊維及び d）可溶性アミロイド前駆体タンパク質（sAPP）からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミロイドタンパク質に対する結合親和性より大きい、A（1-42）グロブリンに対する結合親和性を有する単離された抗体。

10

【請求項 3】

前記抗体が、非 CSF 中に存在するアミロイドタンパク質に対し、CSF 中に存在するアミロイドタンパク質に対するよりも低い親和性で結合する、請求項 2 の単離された抗体。

【請求項 4】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 又は請求項 2 の単離された抗体。

【請求項 5】

抗体が組換え抗体である、請求項 4 の単離された抗体。

【請求項 6】

抗体がヒト又はヒト化である、請求項 1 又は 2 の単離された抗体。

20

【請求項 7】

前記抗体がアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 PTA-7808 によって指定されるハイブリドーマから取得可能なモノクローナル抗体 10F4 及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 PTA-7406 によって指定されるハイブリドーマから取得可能なモノクローナル抗体 3C5 からなる群から選択されるモノクローナル抗体として、少なくとも 1 つのエピトープに結合する、請求項 1 又は請求項 2 の単離された抗体。

【請求項 8】

配列番号 5 を含む単離された抗体。

30

【請求項 9】

配列番号 6 を含む単離された抗体。

【請求項 10】

配列番号 5 をさらに含む、請求項 9 の単離された抗体。

【請求項 11】

配列番号 7 を含む単離された抗体。

【請求項 12】

配列番号 8 を含む単離された抗体。

【請求項 13】

配列番号 7 をさらに含む、請求項 12 の単離された抗体。

40

【請求項 14】

a）アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 PTA-7808 によって指定されるハイブリドーマから取得可能なモノクローナル抗体（10F4）の重鎖 CDR3 のアミノ酸配列及び軽鎖 CDR3 のアミノ酸配列並びに b）アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 PTA-7406 によって指定されるハイブリドーマから取得可能なモノクローナル抗体（3C5）の重鎖 CDR3 のアミノ酸配列及び軽鎖 CDR3 のアミノ酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は請求項 2 の単離された抗体。

【請求項 15】

a）アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 PTA-7808 によ

50

て指定されるハイブリドーマから取得可能なモノクローナル抗体(10F4)の重鎖CDR2のアミノ酸配列及び軽鎖CDR2のアミノ酸配列並びにb)アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7406によって指定されるハイブリドーマから取得可能なモノクローナル抗体(3C5)の重鎖CDR2のアミノ酸配列及び軽鎖CDR2のアミノ酸配列からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、請求項1又は請求項2の単離された抗体。

【請求項16】

a)アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7808によって指定されるハイブリドーマから取得可能なモノクローナル抗体(10F4)の重鎖CDR1のアミノ酸配列及び軽鎖CDR1のアミノ酸配列並びにb)アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7406によって指定されるハイブリドーマから取得可能なモノクローナル抗体(3C5)の重鎖CDR1のアミノ酸配列及び軽鎖CDR1のアミノ酸配列からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、請求項1又は請求項2の単離された抗体。

10

【請求項17】

アミノ酸配列：a)SHYAWN；b)YIDYSGSTRYLPSLKS；c)GGYFYGM DY；d)HASQNI NVWLS；e)KASNLHT；f)QQGQSYPYT；g)NYLIE；h)VINPGSGDTNYNENFKG；i)GVITTFDY；j)RASGNIHNYLA；k)NAKT LAD及びl)QHFWSSPRTからなる群から選択される少なくとも1つのCDRを含む単離された抗体。

20

【請求項18】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7808によって指定されるハイブリドーマ。

【請求項19】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7808によって指定されるハイブリドーマから取得可能なモノクローナル抗体(10F4)。

【請求項20】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7406によって指定されるハイブリドーマ。

【請求項21】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7406によって指定されるハイブリドーマから取得可能なモノクローナル抗体(3C5)。

30

【請求項22】

請求項1又は請求項2の抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項23】

前記分子のヌクレオチド配列が配列番号1、配列番号2、配列番号3及び配列番号4からなる群から選択される少なくとも1つの配列を含む、請求項22の単離された核酸分子。

【請求項24】

請求項23の前記単離された核酸分子を含むベクター。

40

【請求項25】

請求項24の前記ベクターを含む宿主細胞。

【請求項26】

抗体を産生する方法であって、前記抗体の産生に適した時間及び条件下で、培地中において請求項25の前記宿主細胞を培養することを含む、方法。

【請求項27】

請求項26の前記方法によって産生された単離された抗体。

【請求項28】

請求項1の前記抗体、請求項2の前記抗体又はこれらの組み合わせを含む組成物。

【請求項29】

50

組成物が医薬組成物であり、及び医薬として許容される担体をさらに含む、請求項 2 8 の組成物。

【請求項 3 0】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 からなる群から選択される少なくとも 1 つのヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体。

【請求項 3 1】

前記抗体が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 6 によって指定されるハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 0 8 によって指定されるハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項 3 0 の単離された抗体。

10

【請求項 3 2】

配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 3 0 の単離された抗体。

【請求項 3 3】

アミロイドーシスの治療又は予防を必要としている患者において、アミロイドーシスを治療又は予防する方法であって、前記治療又は予防を実施するのに十分な量で、請求項 1 又は請求項 2 の前記抗体を前記患者に投与することを含む、方法。

【請求項 3 4】

前記アミロイドーシスがアルツハイマー病であり、又はダウン症候群のアミロイドーシスである、請求項 3 3 の方法。

20

【請求項 3 5】

アミロイドーシスを有する患者の脳内のアミロイド タンパク質の少なくとも 1 つのエピトープに結合する単離された抗体。

【請求項 3 6】

前記抗体が P T A - 7 4 0 6 及び P T A - 7 8 0 8 からなる群から選択される A T C C 寄託番号を有するハイブリドーマによって産生される、請求項 3 5 の単離された抗体。

【請求項 3 7】

アルツハイマー病を有すると疑われる患者においてアルツハイマー病を診断する方法であって、

30

- a . 前記患者から生物学的試料を単離する工程；
 - b . 抗原 / 抗体複合体の形成に十分な時間及び条件下で、請求項 1 又は請求項 2 の前記単離された抗体と、前記生物学的試料を接触させる工程；並びに
 - c . 前記試料中の前記抗原 / 抗体複合体の存在を検出する工程（前記複合体の存在は前記患者中のアルツハイマー病の診断を示す。）
- を含む、方法。

【請求項 3 8】

前記抗原がグロブリンである、請求項 3 7 の方法。

【請求項 3 9】

アルツハイマー病を有すると疑われる患者においてアルツハイマー病を診断する方法であって、

40

- a . 前記患者から生物学的試料を単離する工程；
- b . 抗体 / 抗原複合体の形成に十分な時間及び条件下で、前記生物学的試料を抗原と接触させる工程；
- c . 得られた抗体 / 抗原複合体に連結体を、結合された抗体へ前記連結体が結合するのに十分な時間及び条件下で添加する工程（前記連結体は、検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物に付着された請求項 1 又は請求項 2 の前記単離された抗体を含む。）；並びに

d . 前記シグナル生成化合物によって生成されたシグナルを検出することによって、前

50

記生物学的試料中に存在し得る抗体の存在を検出する工程（前記シグナルは前記患者中のアルツハイマー病の診断を示す。）

を含む、方法。

【請求項 40】

前記抗原がグロブリンである、請求項 28 の方法。

【請求項 41】

アルツハイマー病を有すると疑われる患者においてアルツハイマー病を診断する方法であって、

a . 前記患者から生物学的試料を単離する工程；

b . 抗抗体 / 抗体複合体（前記複合体は前記生物学的試料中に存在する抗体を含有する。）の形成を可能とするのに十分な時間及び条件下で、前記生物学的試料中を抗抗体（前記抗抗体は請求項 1 又は請求項 2 の前記抗体に対して特異的である。）と接触させる工程；

c . 得られた抗抗体 / 抗体複合体に連結体を、結合された抗体へ前記連結体が結合するのに十分な時間及び条件下で添加する工程（前記連結体は、検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物に結合する抗原を含む。）；並びに

d . 前記シグナル生成化合物によって生成されたシグナルを検出する工程（前記シグナルは前記患者中のアルツハイマー病の診断を示す。）

を含む、方法。

【請求項 42】

a) 請求項 1 の前記単離された抗体、請求項 2 の前記単離された抗体又はこれらの組み合わせと及び b) 医薬として許容されるアジュバントとを含むワクチン。

【請求項 43】

アルツハイマー病を発症すると予測された患者の能動免疫に適した化合物を同定する方法であって、

a) 目的とする 1 つ以上の化合物を、前記 1 つ又は以上の化合物が請求項 1 又は請求項 2 の前記単離された抗体に結合するのに十分な時間及び条件下で、請求項 1 又は請求項 2 の前記単離された抗体に曝露する工程；及び

b) 請求項 1 又は請求項 2 の前記単離された抗体に結合する化合物を同定する工程（前記同定された化合物がアルツハイマー病を発症すると予測された患者中での能動免疫において使用される。）

を含む、方法。

【請求項 44】

a) 請求項 1 又は請求項 2 の前記単離された抗体、及び b) シグナル生成化合物に付着された抗体を含む連結体を含み、前記連結体の前記抗体が前記単離された抗体とは異なる、キット。

【請求項 45】

a) 請求項 1 又は請求項 2 の前記単離された抗体に対する抗抗体及び b) シグナル生成化合物に付着された抗原を含む連結体を含むキット。

【請求項 46】

前記抗原がグロブリンである、請求項 46 のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2006年11月30日に出版された米国仮出願第60/872,156号の優先権を主張する。

【0002】

本発明は、アルツハイマー病の治療及び診断において使用され得るモノクローナル抗体に関する。特に、本発明は、10F4及び3C5と称されるモノクローナル抗体及び該抗体と類似の特性を有する他のモノクローナル抗体（例えば、マウス、ヒト又はヒト化）に

10

20

30

40

50

関する。

【背景技術】

【0003】

1907年に、医師Allois Alzheimerが、後にその名誉を称えてアルツハイマー病(AD)として彼の名が付けられた認知症の一形態の神経病理学的な特徴を最初に記載した(Alzheimer 1907)。特に、ADは、高齢者に最も頻繁に発生する認知症の原因であり、65歳を超える集団の約10%に発生する。年齢が上昇するとともに、疾病の確率も上昇する。全世界で、約1,500万人がこの疾病に罹患しており、平均寿命のさらなる増加が、今後10年にわたって、この病気の罹患者の数を約3倍まで増加させると予測されている。

10

【0004】

分子的な観点から、アルツハイマー病(AD)は、異常に凝集されたタンパク質の沈着によって特徴付けられる。細胞外アミロイド斑の場合には、これらの沈着の多くはアミロイド- β ペプチド繊維からなり、細胞内神経線維のもつれ(NFT)の場合には、これらの沈着の多くはタンパク質からなる。アミロイド(A β)ペプチドは、タンパク質分解切断によって、 β -アミロイド前駆体タンパク質から生じる。この切断は、 β -セクレターゼと名付けられた幾つかのプロテアーゼの協働的活性によって行われる。切断は、異なる長さの多数の特異的断片をもたらす。アミロイド斑の多くは、40又は42アミノ酸長を有するペプチド(A β 40、A β 42)からなる。主要な切断産物はA β 40であるが、A β 42は、ずっと強い毒性効果を有する。アルツハイマー病で観察されるものと極めて類似する脳アミロイド沈着及び認知障害は、800の出生に約1件の頻度で発症するダウン症候群(トリソミー21)の特徴でもある。

20

【0005】

Hardy及びHigginsのアミロイドカスケード仮説は、A β (1-42)の増加した産生が、前原繊維及び原繊維(すなわち、A β 斑の主成分)の形成をもたらし、これらの原繊維がアルツハイマー病の症候の原因であると仮定した。認知症の重度及び沈着したA β 斑の負荷との間に相関が乏しいにも関わらず、この仮説は、最近まで受け入れられてきた。斑の負荷より、ADの症候との相関が優れている、AD脳内における可溶性A β 形態の発見は、修正されたアミロイドカスケード仮説をもたらした。

30

【0006】

A β ペプチドでの能動免疫は、形成の減少及び既存の斑の部分的な溶解を引き起こす。同時に、A β ペプチドでの能動免疫は、APPトランスジェニックマウスモデルでの認知障害の緩和をもたらす。A β ペプチドに対して誘導された抗体を用いた受動免疫に関しては、A β 斑の負荷の減少も認められた。AN-1792(凝集の繊維性状態のA β (1-42)ペプチド)での能動免疫の第IIa相試験の結果(ELAN Corporation Pic, South San Francisco, CA, USA and Dublin, UK)は、A β ペプチドに対して誘導された免疫療法が成功を収めたことを示唆する。30人の患者の亜群において、疾病の進行は、MMSE及びDAD指標によって測定された陽性抗A β 抗体力価を有する患者で著しく減少していた。

40

【0007】

しかしながら、髄膜脳炎の形態の重い副作用のために、この研究は停止された(Bennett and Holtzman, 2005, Neurology, 64, 10-12)。特に、髄膜脳炎は、神経炎症及び脳内へのT細胞の浸潤によって特徴付けられた。おそらく、これは、抗原としてA β (1-42)を注射することによって誘導されたT細胞免疫応答によるものであった。このような免疫応答は、受動免疫後には予想されない。現在まで、これに関して入手できる臨床データは存在しない。しかしながら、5ヶ月にわたって週に1回、A β (1-42)のN末端エピトープに対して誘導された抗体を与えた極めて高齢のAPP23マウスでの前臨床研究のために、免疫化のためのこのような受動的アプローチに関して、副作用についての懸念が表明された。特に、これらのマウスは、生理的食塩水で処理された対照動物に比べて、微小出血の数及び重度の増大を示した(P

50

feifer et al., 2002, Science, 298, 1379)。極めて老齢の(>24月齢) Tg2576及びPDAPPマウスにおいても、同様の微小出血の増加が記載された(Racke et al., 2005, J Neurosci, 25, 629-636; Wilcock et al., 2004, J. Neuroinflammation, 1(1):24; De Mattos et al., 2004, Neurobiol. Aging 25(S2):577)。マウスの両系統において、抗体注射は、微小出血の著しい増加をもたらした。これに対して、A(1-42)ペプチドの中央領域に対して誘導された抗体は、微小出血を誘導しなかった(de Mattos et al., 上記)。CAAの形態の凝集したAペプチドに結合しない抗体処理には、微小出血の誘導の欠如が伴った(Racke et al., J Neurosci, 25, 629-636)。しかし、APPが遺伝子導入されたマウス中に微小出血をもたらす正確な機序は、理解されていない。おそらく、脳アミロイド血管症(CAA)は、脳出血を誘導し、又は少なくとも悪化させる。CAAは、ほぼ全てのアルツハイマー病の脳内に存在し、症例の約20%は、「重度CAA」と認められる。従って、受動免疫は、Aペプチドの中央又はカルボキシ末端領域を認識する抗体を選択することによって微小出血を回避することを目指すべきである。

【0008】

国際特許出願公開WO2004/067561は、安定なA(1-42)オリゴマー(A(1-42)グロブロマー)及び該グロブロマーに対して特異的に誘導された抗体を記載している。非特異的なプロテアーゼによる消化は、Aグロブロマーは、状のコア構造から突出する親水性N末端から開始して消化され得ることを示す(Barghom et al., 2005, J Neurochem, 95, 834-847)。このようなN末端切断されたAグロブロマー(A(12-42)及びA(20-42)グロブロマー)は、このオリゴマーAの基本構造単位に相当し、ウサギ及びマウスの能動免疫化のための極めて強力な抗原であり、高い抗体力価をもたらす(WO2004/067561)。N末端切断されたA形態のインビボでの推定される病理的な役割が、AD脳内におけるそれらの存在についての幾つかの最近の報告によって示唆されている(Sergeant et al., 2003, J Neurochem, 85, 1581-1591; Thal et al., 1999, J Neuropathol. Exp Neurol, 58, 210-216)。インビボ消化の間に、脳内に見出されるある種のプロテアーゼ、例えば、ネプリリシン(NEP24.11)又はインシュリン分解酵素(IDE)が関与し得る(Selkoe, 2001, Neuron, 32, 177-180)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際特許公開2004/067561号パンフレット

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Bennett and Holtzman、Neurology、64、2005年、pp.10-12

【非特許文献2】Pfeifer他、Science、298、1379、2002年、pp.1379

【非特許文献3】Racke他、J Neurosci、25、2005年、pp.629-636

【非特許文献4】Wilcock他、J. Neuroinflammation、1(1):24、2004年

【非特許文献5】De Mattos他、Neurobiol. Aging 25(S2):577、2004年

【非特許文献6】Racke他、J Neurosci、25、pp.629-636

10

20

30

40

50

【非特許文献7】Barghom他、J Neurochem、95、2005年、pp. 834 - 847

【非特許文献8】Sergeant他、J Neurochem、85、2003年、pp. 1581 - 1591

【非特許文献9】Thal他、J Neuropathol. Exp Neurol、58、1999年、pp. 210 - 216

【非特許文献10】Selkoe、Neuron、32、2001年、pp. 177 - 180

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0011】

上記に照らせば、仮に存在しても、ほとんど副作用（例えば、微小出血）を有さない、アルツハイマー病のための治療に対する極めて大きな、差し迫った要求が存在する。このような治療を用いれば、罹患患者は、このような治療なしに可能な状態を超えて、長年にわたって、機能的で、活動的なライフスタイルを維持することが可能であり得る。従って、患者のみならず、介護者にとっても、このような治療に対する経済的な意義が存在するとともに、「生活の質」の意義も存在する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、免疫療法における患者の認知能力を向上させ、同時に、脳内のA β の全体量の僅かな一部のみと反応するA β グロブリンに対して誘導された抗体を包含する。このような特性は脳内のA β バランスの大幅な妨害を抑制し、より少ない副作用をもたらすと予想される（例えば、治療的に問題のある脳容積の低下が、凝集の繊維性状態にあるA β ペプチドでの能動免疫の研究（ELAN Corporation Inc, South San Francisco, CA, USA and Dublin, UK）、AN-1792（凝集の繊維性状態にあるA β （1-42）ペプチド）での能動免疫の研究において観察されている。さらに、この試験では、髄膜脳炎の形態の重い副作用が観察された。）。

20

【0013】

特に、本発明は、A β グロブリンに対して高い親和性を有するA β グロブリン抗体を提供することによって上記副作用の問題を解決する。これらの抗体は、A β ペプチドの他の形態、特に単量体、原繊維及びsAPPを識別することができる。さらに、本発明の抗体は、非CSFアミロイド β のみに結合することによって、脳脊髄液（CSF）中のアミロイド β に対しても識別する。さらに、本発明の抗体（例えば、10F4及び3C5）は、公知の抗体（すなわち、6E10）に比べて、A β -斑及び血管A β への結合がより少ない。

30

【0014】

特に、本発明は、脳脊髄液（CSF）中に存在するA β （1-42）ペプチド及びb）CSF中に存在するA β （1-40）ペプチドからなる群から選択される少なくとも1つのアミロイドタンパク質に対する親和性に比べて、A β （1-42）グロブリンに対してより高い親和性を有する単離された抗体を包含する。

40

【0015】

本発明は、a）A β （1-42）単量体、b）A β （1-40）単量体、c）A β （1-42）原繊維及びd）可溶性アミロイド前駆体タンパク質（sAPP）からなる群から選択される少なくとも1つのアミロイドタンパク質への結合親和性より高い、A β （1-42）グロブリンへの結合親和性を有する単離された抗体も含む。

この抗体は、CSF中に存在するアミロイドタンパク質より、非CSF中に存在するアミロイドタンパク質へ、より大きな親和性で結合する。

【0016】

50

上記抗体は、例えば、マウス、モノクローナル、組換え、ヒト及びヒト化であり得る。さらに、本発明の抗体の1つ又はそれ以上の何れもが、モノクローナル抗体10F4（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7808によって指定されるハイブリドーマから取得可能）又はモノクローナル抗体3C5（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7406によって指定されるハイブリドーマから取得可能）が結合する同じ1つ又は複数のエピトープである少なくとも1つのエピトープに結合し得る。

【0017】

さらに、本発明は、配列番号5を含む単離された抗体、配列番号6を含む単離された抗体並びに配列番号5及び配列番号6の両方を含む単離された抗体を含む。

10

【0018】

さらに、本発明は、配列番号7を含む単離された抗体、配列番号8を含む単離された抗体並びに配列番号7及び配列番号8の両方を含む単離された抗体を含む。

【0019】

本発明の上記抗体は、a)モノクローナル抗体(10F4)(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7808によって指定されるハイブリドーマから取得可能)の重鎖CDR3のアミノ酸配列及び軽鎖CDR3のアミノ酸配列並びにb)モノクローナル抗体(3C5)(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7406によって指定されるハイブリドーマから取得可能)の重鎖CDR3のアミノ酸配列及び軽鎖CDR3のアミノ酸配列からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含み得る。

20

【0020】

さらに、本発明の上記抗体は、a)モノクローナル抗体(10F4)(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7808によって指定されるハイブリドーマから取得可能)の重鎖CDR2のアミノ酸配列及び軽鎖CDR2のアミノ酸配列並びにb)モノクローナル抗体(3C5)(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7406によって指定されるハイブリドーマから取得可能)の重鎖CDR2のアミノ酸配列及び軽鎖CDR2のアミノ酸配列からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含み得る。

【0021】

また、本発明の上記抗体は、a)モノクローナル抗体(10F4)(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7808によって指定されるハイブリドーマから取得可能)の重鎖CDR1のアミノ酸配列及び軽鎖CDR1のアミノ酸配列並びにb)モノクローナル抗体(3C5)(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7406によって指定されるハイブリドーマから取得可能)の重鎖CDR1のアミノ酸配列及び軽鎖CDR1のアミノ酸配列からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含み得る。

30

【0022】

さらに、本発明は、アミノ酸配列：a)SHYAWN；b)YIDYSGSTRYLP
SLKS；c)GSGYFYGM DY；d)HASQNI NVLS；e)KASNLHT；f)QQGQSYPYT；g)NYLIE；h)VINPGSGDTNYNENFK
G；i)GVITTFDY；j)RASGNIHNYLA；k)NAKT LAD及びl)
QHFWSSPRTからなる群から選択される少なくとも1つのCDRを含む単離された抗体も含む。

40

【0023】

さらに、本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7808によって指定されるハイブリドーマ及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7808によって指定されるハイブリドーマから取得可能な又は該ハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体(10F4)を包含する。

【0024】

50

本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 6 によって指定されるハイブリドーマ及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 6 によって指定されるハイブリドーマから取得可能な又は該ハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体 (3 C 5) も含む。

【 0 0 2 5 】

さらに、本発明は、上記抗体をコードする単離された核酸分子を含む。この分子のヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列を含み得る。また、本発明は、単離された核酸分子を含むベクター及び該ベクターを含む宿主細胞を含む。

【 0 0 2 6 】

さらに、本発明は、上記抗体の何れか 1 つの産生に適した時間及び条件下で、上記宿主細胞を培地中で培養することを含む、抗体を産生する方法を含む。この方法に従って産生された抗体も、本発明の範囲に含まれる。

【 0 0 2 7 】

また、本発明は、上記抗体の何れか 1 つ又はそれ以上を含む組成物を含む。さらに、この組成物は、医薬として許容される担体を含み得る。

【 0 0 2 8 】

さらに、本発明は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4 からなる群から選択される少なくとも 1 つのヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体を包含する。この抗体は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 6 によって指定されるハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 0 8 によって指定されるハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体からなる群から選択され得る。また、抗体は、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含み得る。

【 0 0 2 9 】

本発明は、アミロイドーシスの治療又は予防を必要としている患者中のアミロイドーシスを治療又は予防するための方法も含む。この方法は、治療又は予防を実施するのに十分な量で、患者に、(受動免疫化を介して) 上記抗体の 1 つ又はそれ以上を投与することを含む。アミロイドーシスは、例えば、アルツハイマー病であり得、又はダウン症候群のアミロイドーシスであり得る。

【 0 0 3 0 】

また、本発明は、アミロイドーシスを有する患者の脳内のアミロイド タンパク質の少なくとも 1 つのエピトープに結合する単離された抗体を包含する。この抗体は、例えば、P T A - 7 4 0 6 及び P T A - 7 8 0 8 からなる群から選択される A T C C 寄託番号を有するハイブリドーマによって産生され得る。

【 0 0 3 1 】

本発明は、アルツハイマー病を有すると疑われる患者中のアルツハイマー病を診断する方法も含む。この方法は、患者から生物学的試料 (例えば、C S F 試料又は脳組織試料) を単離する工程と、抗原 / 抗体複合体の形成に十分な時間及び条件下で、上記抗体の 1 つ又はそれ以上と生物学的試料を接触させる工程と、及び試料中の抗原 / 抗体複合体の存在を検出する工程とを含み、前記複合体の存在は、患者中のアルツハイマー病の診断を示唆する。複合体の抗原は、例えば、グロブロマーであり得る。

【 0 0 3 2 】

さらに、本発明は、アルツハイマー病を有することが疑われている患者において、アルツハイマー病を診断する別の方法を含む。この方法は、生物学的試料を患者から単離する工程 ; 抗体 / 抗原複合体の形成のために十分な時間及び条件下で、生物学的試料を抗原と接触させる工程 ; 結合された抗体に連結体を結合させるのに十分な時間及び条件下で、得られた抗体 / 抗原複合体に連結体を添加する工程 (前記連結体は、検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物に付着された本発明の単離された抗体を含む。

10

20

30

40

50

)、及びシグナル生成化合物によって生成されたシグナル(シグナルは、患者中のアルツハイマー病の診断を示唆する。)を検出することによって、生物学的試料中に存在し得る抗体の存在を検出する工程を含む。このアッセイにおいて使用される抗原は、例えば、グロブリンであり得る。

【0033】

さらに、本発明は、アルツハイマー病を有すると疑われる患者においてアルツハイマー病を診断するさらなる方法を含む。この方法は、生物学的試料を患者から単離する工程；抗抗体/抗体複合体(該複合体は、生物学的試料中に存在する抗体を含有する。)の形成のために十分な時間及び条件下で、生物学的試料を抗抗体(抗抗体は、本発明の抗体の1つ又はそれ以上に対して特異的である)と接触させる工程；結合された抗体に連結体を結合させるのに十分な時間及び条件下で、得られた抗抗体/抗原複合体に連結体を添加する工程(前記連結体は、検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物に結合する抗原を含む。)；並びにシグナル生成化合物によって生成されたシグナル(このシグナルは、前記患者中のアルツハイマー病の診断を示す。)を検出する工程を含む。

10

【0034】

さらに、本発明は、本発明の抗体の1つ又はそれ以上及び医薬として許容されるアジュバントを含むワクチンも含む。

【0035】

さらに、本発明は、アルツハイマー病を発症すると予測されている患者の能動免疫に適した化合物を同定する方法を包含する。この方法は、1つ又はそれ以上の化合物が1つ又はそれ以上の抗体に結合するのに十分な時間及び条件下で、本発明の抗体の1つ又はそれ以上に、目的の1つ又はそれ以上の化合物を曝露する工程、次いで、前記1つ又は複数の抗体に結合する化合物を同定する工程を含み、同定された化合物は、アルツハイマー病を発症すると予測されている患者での能動免疫において使用される。

20

【0036】

また、本発明には、本発明の抗体の1つ又はそれ以上、及びシグナル生成化合物に付着された抗体を含む連結体を含み、前記連結体の前記抗体がキット内の1つ又はそれ以上の抗体とは異なる、キットが含まれる。アッセイを実施する際に使用されるべき手順及びキットの成分を記載する同封物もキット中に含め得る。

【0037】

本発明の抗体の1つ又はそれ以上の抗体に対する抗抗体と及びシグナル生成化合物に結合された抗原を含む連結体とを含む別のキットも、本発明に含まれる。抗原は、例えば、グロブリンであり得る。同じく、アッセイを実施する際に使用されるべき工程及びキットの成分を記載する同封物を含め得る。

30

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1a】図1(a)は、異なる抗A抗体(-6E10, -3C5, 10F4)の特異性のドットプロット分析を示す。ここで調べたモノクローナル抗体は、A(12-42)グロブリン(実施例Iに記載されているように調製された。)でのマウスの能動免疫に続く、融合されたハイブリドーマ細胞の選択によって得られた(市販の6E10、Signet、カタログ番号9320を除く。)。各A形態を系列希釈に適用し、免疫反応のために、各モノクローナル抗体とともに温置した。1. A(1-42)単量体、0.1% NH₄OH 2. A(1-40)単量体、0.1% NH₄OH 3. A(1-42)単量体、0.1% NaOH 4. A(1-40)単量体、0.1% NaOH 5. A(1-42)グロブリン 6. A(12-42)グロブリン 7. A(20-42)グロブリン 8. A(1-42)原繊維調製物 9. sAPP(Sigma)(ファーストドット: 1 pmol)

40

【図1b】図1(b)は、強度の濃度測定分析を用いて行われた定量的評価を示している。A(1-42)グロブリンの光学的に明瞭に同定が為された最後のドットの相対密度の20%を超える相対密度を有すると仮定して、各A形態に対して、最小抗原濃度に

50

対応するドットのみを評価した（閾値）。この閾値は、全てのドットプロットに対して独立に測定した。値は、ある抗体に対する A (1 - 42) グロブリンとそれぞれの A 形態の認識との間の関係を示す。

【図 2 a】図 2 は、アルツハイマー病の脳組織から免疫沈降された A ペプチドの結果を示している。図 2 (a) は、分析のために使用された患者の材料の詳細な記述を表している。

【図 2 b】図 2 (b) は、抗体 6 E 10、3 C 5、10 F 4 及び対照抗体 I g G 2 b での、異なる患者及び対照の脳試料に対する S E L D I - M S 分析によって定量された A (1 - 40) ペプチド及び A (1 - 42) ペプチドの免疫沈降された量を示している。

【図 2 c】図 2 (c) は、抗体 3 C 5、10 F 4 及び対照抗体 I g G 2 b を用いて、異なる患者及び対照の脳試料に対する S E L D I - M S 分析によって定量された A (1 - 40) ペプチド及び A (1 - 42) ペプチドの、汎 A 抗体 6 E 10 と比較したパーセントで表した免疫沈降された相対量を示している。抗体 6 E 10 によって免疫沈降された A ペプチドの総量を 100% に設定した。

【図 2 d】図 2 (d) は、抗体 6 E 10、3 C 5、10 F 4 及び対照抗体 I g G 2 b での、様々な患者及び対照脳試料に対するウェスタンブロット分析によって定量された A ペプチドの免疫沈降された量を示している。

【図 2 e】図 2 (e) は、抗体 3 C 5、10 F 4 及び対照抗体 I g G 2 b を用いて、異なる患者及び対照の脳試料に対するウェスタンブロット分析によって定量された A ペプチドの、汎 A 抗体 6 E 10 と比較したパーセントで表した免疫沈降された相対量を示している。抗体 6 E 10 によって免疫沈降された A ペプチドの総量を 100% に設定した。

【図 3 a】図 3 (a) は、1) 標準タンパク質 (分子マーカータンパク質) 2) A (1 - 42) 原繊維調製物; 対照 3) A (1 - 42) 原繊維調製物 + m A b 6 E 10、20 時間、37、上清 4) A (1 - 42) 原繊維調製物 + m A b 6 E 10、20 時間、37、沈降物 5) A (1 - 42) 原繊維調製物 + m A b 3 C 5、20 時間、37、上清 6) A (1 - 42) 原繊維調製物 + m A b 3 C 5、20 時間、37、沈降物 7) A (1 - 42) 原繊維調製物 + m A b 10 F 4、20 時間、37、上清 8) A (1 - 42) 原繊維調製物 + m A b 10 F 4、20 時間、37、沈降物の C o o m a s s i e 染色された S D S - P A G E を示している。

【図 3 b】図 3 (b) は、A 原繊維へのインビトロでの抗体結合の濃度測定定量分析を示している。

【図 4 a】図 4 は、アルツハイマー病 (A D) 患者又は老齢の A P P トランスジェニックマウスの新皮質の横断切片への、異なる濃度の抗体の結合を示している。図 4 (a) は、A P P トランスジェニックマウス系統 T g 2576 及び A D 患者 (R Z 55) において、脳組織中の斑として及び脳血管中の大脳アミロイド血管症 (C A A) として、C o n g o R e d 染色によって確認されたアミロイド沈着を表している。

【図 4 b】図 4 (b) は、A D 患者 (R Z 16) 中での A の実質性沈着 (アミロイド斑) の強い染色は 6 G 1 及び市販抗体 6 E 10 を用いた場合にのみ起こり、これに対して、10 F 4 及び 3 C 5 はかなり弱い染色を示すことを示している。全ての抗体は、0.7 μ g / m L の濃度で調べた。

【図 4 c】図 4 (c) は、T G 2576 マウス中での A の実質性沈着 (アミロイド斑) の強い染色が 6 G 1 及び市販抗体 6 E 10 を用いた場合にのみ起こり、これに対して、10 F 4 及び 3 C 5 はより弱い染色を示すことを示している。全ての抗体は、0.7 μ g / m L の濃度で調べた。

【図 4 d】図 4 (d) から 4 (g) は、画像分析を用いた、組織学的画像中の A 斑染色の分析の定量を示している。光学密度の値 (0% = 染色なし) は、バックグラウンド組織のグレイスケール値を差し引いた斑のグレイスケール値から計算した。図 4 (d) は、T g 2576 マウス中での 0.7 μ g / m L 抗体の結合を示している。

【図 4 e】図 4 (d) から 4 (g) は、画像分析を用いた、組織学的画像中の A 斑染色の分析の定量を示している。光学密度の値 (0% = 染色なし) は、バックグラウンド組織

10

20

30

40

50

のグレイスケール値を差し引いた斑のグレイスケール値から計算した。図4(e)は、APP/Lマウス中での0.07から0.7 μg/mL抗体の結合を示している。

【図4f】図4(d)から4(g)は、画像分析を用いた、組織学的画像中のA斑染色の分析の定量を示している。光学密度の値(0% = 染色なし)は、バックグラウンド組織のグレイスケール値を差し引いた斑のグレイスケール値から計算した。図4(f)は、AD患者中での0.7 μg/mL抗体(RZ55)の結合を示している。

【図4g】図4(d)から4(g)は、画像分析を用いた、組織学的画像中のA斑染色の分析の定量を示している。光学密度の値(0% = 染色なし)は、バックグラウンド組織のグレイスケール値を差し引いた斑のグレイスケール値から計算した。図4(g)はAD患者(RZ16)中での0.07から0.7 μg/mL抗体の結合を示している。市販の抗体6E10(星)及び4G8(丸)と抗体6G1、10F4及び3C5の染色の間の差を統計学的に評価した(1つのアスタリスク/丸: 対照に対して $p < 0.05$ 、2つのアスタリスク/丸: $p < 0.01$ 及び3つのアスタリスク/丸: $p < 0.001$; $p < 0.001$ を有するANOVA後の後知恵Bonferroniのt検定。)(図4(d)及び(e))。図4(e)及び4(g)において、抗体10F4及び3C5は、市販抗体6E10及び4G8より有意に弱い染色を常に示した(ANOVAで $p < 0.001$ の後、後知恵t検定で $p < 0.05$)。

【図4h】図4(h)は、Aの血管沈着(矢印)の強い染色が6G1及び市販抗体6E10を用いた場合にのみ起こり、これに対して、8F5及び8C5での染色はずっと弱かったことを示している。全ての抗体は、0.7 μg/mLの濃度で調べた。Tg2576マウスにおいて、定性的に類似の状況が認められた(ここには図示せず)。

【図5a】図5(a)、(c)、(e)及び(g)は、モノクローナル抗体6E10、10F4、3C5及び8F5によって、アルツハイマー病患者の脳脊髄液から免疫沈降されたA(1-40)及びA(1-42)ペプチドの量を示している。4つの各アルツハイマー病脳脊髄液試料に対する結果が示されている((a) = アルツハイマー病患者#0504009; (c) = アルツハイマー病患者#30027; (e) = アルツハイマー病患者#30026; (g) = アルツハイマー病患者#26748015)。

【図5b】図5(b)は、抗体6E10によって免疫沈降されたAペプチドの量と比較した、抗体10F4、3C5及び8F5によってアルツハイマー病患者の脳脊髄液から免疫沈降されたA(1-40)及びA(1-42)ペプチドのパーセントで表した相対量を示している。mAb6E10抗体によって免疫沈降されたAペプチドの総量を100%に設定した。4つの各アルツハイマー病脳脊髄液試料に対する結果が示されている((b) = アルツハイマー病患者#0504009; (d) = アルツハイマー病患者#30027; (f) = アルツハイマー病患者#30026; (h) = アルツハイマー病患者#26748015)。

【図5c】図5(a)、(c)、(e)及び(g)は、モノクローナル抗体6E10、10F4、3C5及び8F5によって、アルツハイマー病患者の脳脊髄液から免疫沈降されたA(1-40)及びA(1-42)ペプチドの量を示している。4つの各アルツハイマー病脳脊髄液試料に対する結果が示されている((a) = アルツハイマー病患者#0504009; (c) = アルツハイマー病患者#30027; (e) = アルツハイマー病患者#30026; (g) = アルツハイマー病患者#26748015)。

【図5d】図5(b)は、抗体6E10によって免疫沈降されたAペプチドの量と比較した、抗体10F4、3C5及び8F5によってアルツハイマー病患者の脳脊髄液から免疫沈降されたA(1-40)及びA(1-42)ペプチドのパーセントで表した相対量を示している。mAb6E10抗体によって免疫沈降されたAペプチドの総量を100%に設定した。4つの各アルツハイマー病脳脊髄液試料に対する結果が示されている((b) = アルツハイマー病患者#0504009; (d) = アルツハイマー病患者#30027; (f) = アルツハイマー病患者#30026; (h) = アルツハイマー病患者#26748015)。

【図5e】図5(a)、(c)、(e)及び(g)は、モノクローナル抗体6E10、10F4、

10

20

30

40

50

3C5及び8F5によって、アルツハイマー病患者の脳脊髄液から免疫沈降されたA (1-40)及びA (1-42)ペプチドの量を示している。4つの各アルツハイマー病脳脊髄液試料に対する結果が示されている((a) = アルツハイマー病患者#0504009; (c) = アルツハイマー病患者#30027; (e) = アルツハイマー病患者#30026; (g) = アルツハイマー病患者#26748015)。

【図5f】図5(b)は、抗体6E10によって免疫沈降されたA ペプチドの量と比較した、抗体10F4、3C5及び8F5によってアルツハイマー病患者の脳脊髄液から免疫沈降されたA (1-40)及びA (1-42)ペプチドのパーセントで表した相対量を示している。mAb6E10抗体によって免疫沈降されたA ペプチドの総量を100%に設定した。4つの各アルツハイマー病脳脊髄液試料に対する結果が示されている((b) = アルツハイマー病患者#0504009; (d) = アルツハイマー病患者#30027; (f) = アルツハイマー病患者#30026; (h) = アルツハイマー病患者#26748015)。

【図5g】図5(a)、(c)、(e)及び(g)は、モノクローナル抗体6E10、10F4、3C5及び8F5によって、アルツハイマー病患者の脳脊髄液から免疫沈降されたA (1-40)及びA (1-42)ペプチドの量を示している。4つの各アルツハイマー病脳脊髄液試料に対する結果が示されている((a) = アルツハイマー病患者#0504009; (c) = アルツハイマー病患者#30027; (e) = アルツハイマー病患者#30026; (g) = アルツハイマー病患者#26748015)。

【図5h】図5(b)は、抗体6E10によって免疫沈降されたA ペプチドの量と比較した、抗体10F4、3C5及び8F5によってアルツハイマー病患者の脳脊髄液から免疫沈降されたA (1-40)及びA (1-42)ペプチドのパーセントで表した相対量を示している。mAb6E10抗体によって免疫沈降されたA ペプチドの総量を100%に設定した。4つの各アルツハイマー病脳脊髄液試料に対する結果が示されている((b) = アルツハイマー病患者#0504009; (d) = アルツハイマー病患者#30027; (f) = アルツハイマー病患者#30026; (h) = アルツハイマー病患者#26748015)。

【図5i】図5(i)は、図5(a)から5(i)での分析のために使用されたアルツハイマー病患者の脳脊髄液物質の詳細な記述を表している。

【図6a】図6(a)は、本明細書において「3C5」と称されるモノクローナル抗体をコードする可変重鎖のDNA配列(配列番号1)を示している。

【図6b】図6(b)は、本明細書において「3C5」と称されるモノクローナル抗体をコードする可変軽鎖のDNA配列(配列番号2)を示している。

【図6c】図6(c)は、本明細書において「10F4」と称されるモノクローナル抗体をコードする可変重鎖のDNA配列(配列番号3)を示している。

【図6d】図6(d)は、本明細書において「10F4」と称されるモノクローナル抗体をコードする可変軽鎖のDNA配列(配列番号4)を示している。

【図7a】図7(a)は、本明細書において「3C5」と称されるモノクローナル抗体をコードする可変重鎖のアミノ酸配列(配列番号5)を示している。

【図7b】図7(b)は、本明細書において「3C5」と称されるモノクローナル抗体をコードする可変軽鎖のアミノ酸配列(配列番号6)を示している。

【図7c】図7(c)は、本明細書において「10F4」と称されるモノクローナル抗体をコードする可変重鎖のアミノ酸配列(配列番号7)を示している。

【図7d】図7(d)は、本明細書において「10F4」と称されるモノクローナル抗体をコードする可変軽鎖のアミノ酸配列(配列番号8)を示している。(記載されている各配列中の相補性決定領域(CDR)には、下線が付されている。)

【発明を実施するための形態】

【0039】

本発明の抗体は、実施例1に記載されているように、末端切断されたグロブロマーA (12-42)を用いた免疫化から設計された。特に、モノクローナル抗体3C5及び1

10

20

30

40

50

0 F 4 は、(A (1 - 4 2) グロブロマーに対して作製されたモノクローナル抗体 8 F 5 及び 8 C 5 とは異なり)、末端切断された(1 2 - 4 2) グロブロマーに対して作製された。この(1 2 - 4 2) グロブロマーは、限定的タンパク分解によって既存の 1 - 4 2 グロブロマーから(1 2 - 4 2) グロブロマーが作製される B a r g h o r n 他(J . N e u r o c h e m , 9 5 , 8 3 4 - 8 4 7) 及び実施例 3、第 6 節に記載されている手順とは異なり、A 1 2 - 4 2 ペプチドから直接作製された。これら 2 つの A (1 2 - 4 2) グロブロマー変形物の最終凝集パターンは異なる。A (1 2 - 4 2) ペプチドから作製されたものは、中間グロブロマー形態(W O 2 0 0 4 / 0 6 7 5 6 1 に記載されているような「オリゴマー A」)のみを示し、既存の A (1 - 4 2) グロブロマーから作製されたものは、成熟したグロブロマーである(W O 2 0 0 4 / 0 6 7 5 6 1 に記載されているような「オリゴマー B」)。

10

【 0 0 4 0 】

免疫療法における患者の認知能力を向上させ、同時に、脳内の A ペプチドの全量の僅かな一部のみと反応する A グロブロマーに対して誘導された抗体を提供することが本発明の目的である。これは、脳の A バランスの大幅な妨害を抑制し、より少ない副作用をもたらすと予想される(例えば、上述のように、治療的に問題のある脳容積の低下が、凝集の繊維性状態における A ペプチドでの能動免疫の研究において観察されている(A N 1 7 9 2 を用いた E L A N 試験)。さらに、この試験では、髄膜脳炎の形態の重い副作用が観察された。本発明は、A グロブロマーに対して高い親和性を有するグロブロマー特異的抗体を提供することによってこの問題を解決する。これらの抗体は、A ペプチドの他の形態、特に単量体及び原繊維を識別することができる。さらに、これらの抗体は、脳脊髄液中のアミロイド に結合しない(又は 6 E 1 0 (S i g n e t カタログ番号 9 3 2 0) などの)市販の抗体と比べて、より低い親和性で結合する。その結果、本発明は、A グロブロマーに対して結合親和性を有する抗体に関する。

20

【 0 0 4 1 】

本明細書において「A (X - Y)」という用語は、ヒトアミロイド タンパク質のアミノ酸位置 X からアミノ酸位置 Y (X 及び Y の両方を含む。)のアミノ酸配列を指し、特に、アミノ酸配列 D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A T (アミノ酸位置 1 から 4 3 に対応する。)又はその天然に存在する変形物の何れかの、アミノ酸位置 X からアミノ酸位置 Y のアミノ酸配列を指し、特に、A 2 T、H 6 R、D 7 N、A 2 1 G (「フランドル」)、E 2 2 G (「北極」)、E 2 2 Q (「オランダ」)、E 2 2 K (「イタリア」)、D 2 3 N (「アイオワ」)、A 4 2 T 及び A 4 2 V からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異を有するもの(ここで、数字は、A ペプチドの開始位置に対するものであり、位置 X 及び位置 Y の両方を含む。)又は最大 3 個のさらなるアミノ酸置換(これらの何れもがグロブロマー形成を妨害し得ない。)を有し、好ましくはアミノ酸 1 2 又は X (大きい方の数)からアミノ酸 4 2 又は Y (小さい方の数)までの部分にさらなるアミノ酸置換を有さない、より好ましくはアミノ酸 2 0 又は X (大きい方の数)からアミノ酸 4 2 又は Y (小さい方の数)までの部分にさらなるアミノ酸置換を有さない、最も好ましくはアミノ酸 2 0 又は X (大きい方の数)からアミノ酸 4 0 又は Y (小さい方の数)までの部分にさらなるアミノ酸置換を有さない配列を指し、本明細書において「さらなる」アミノ酸置換とは、自然には見られない標準的な配列からの何らかの逸脱である。

30

40

【 0 0 4 2 】

本明細書において「A (1 - 4 2)」という用語は、ヒトアミロイド タンパク質の、アミノ酸位置 1 からアミノ酸位置 4 2 (1 及び 4 2 の両方を含む。)のアミノ酸配列を指し、特に、アミノ酸配列 D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A 又は天然に存在するその変形物の何れかを指し、特に、A 2 T、H 6 R、D 7 N、A 2 1 G (「フランドル」)、E 2 2 G (「北極」)、E 2 2 Q (「オランダ」)、E 2 2 K (「イタリア」)、D 2 3 N (「アイオワ」)、A 4 2 T 及び A 4 2 V からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異を有する変形物

50

(ここで、数字は、A ペプチドの開始位置に対するものであり、1及び42の両方を含む。)又は最大3個のさらなるアミノ酸置換(これらの何れもがグロブロマー形成を妨害し得ない。)を有し、好ましくはアミノ酸20からアミノ酸42までの部分にさらなるアミノ酸置換を有さない配列を指す。同様に、本明細書における「A (1-40)」という用語は、ヒトアミロイド タンパク質の、アミノ酸位置1からアミノ酸位置40(1及び40の両方を含む。)までのアミノ酸配列を指し、特に、アミノ酸配列 D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V又は天然に存在するその変形物の何れかを指し、特に、A 2 T、H 6 R、D 7 N、A 2 1 G(「フランドル」)、E 2 2 G(「北極」)、E 2 2 Q(「オランダ」)、E 2 2 K(「イタリア」)及びD 2 3 N(「アイオワ」)からなる群から選択される少なくとも1つの突然変異を有する変形物(ここで、数字は、A ペプチドの開始位置に対するものであり、1及び40の両方を含む。)又は最大3個のさらなるアミノ酸置換(これらの何れもがグロブロマー形成を妨害し得ない。)を有し、好ましくはアミノ酸20からアミノ酸40までの部分にさらなるアミノ酸置換を有さない配列を指す。

10

【0043】

本明細書において「A (12-42)」という用語は、ヒトアミロイド タンパク質の、アミノ酸位置12からアミノ酸位置42(12及び42の両方を含む。)のアミノ酸配列を指し、特に、アミノ酸配列 V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A又は天然に存在するその変形物の何れかを指し、特に、A 2 1 G(「フランドル」)、E 2 2 G(「北極」)、E 2 2 Q(「オランダ」)、E 2 2 K(「イタリア」)、D 2 3 N(「アイオワ」)、A 4 2 T及びA 4 2 Vからなる群から選択される少なくとも1つの突然変異を有する変形物(ここで、数字は、A ペプチドの開始位置に対するものであり、12及び42の両方を含む。)又は最大3個のさらなるアミノ酸置換(これらの何れもがグロブロマー形成を妨害し得ない。)を有し、好ましくはアミノ酸20からアミノ酸42までの部分にさらなるアミノ酸置換を有さない配列を指す。

20

【0044】

本明細書において「A (20-42)」という用語は、ヒトアミロイド タンパク質の、アミノ酸位置20からアミノ酸位置42(20及び42の両方を含む。)のアミノ酸配列を指し、特に、アミノ酸配列 F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A又は天然に存在するその変形物の何れかを指し、特に、A 2 1 G(「フランドル」)、E 2 2 G(「北極」)、E 2 2 Q(「オランダ」)、E 2 2 K(「イタリア」)、D 2 3 N(「アイオワ」)、A 4 2 T及びA 4 2 Vからなる群から選択される少なくとも1つの突然変異を有する変形物(ここで、数字は、A ペプチドの開始位置に対するものであり、20及び42の両方を含む。)又は最大3個のさらなるアミノ酸置換(これらの何れもがグロブロマー形成を妨害し得ない。)を有し、好ましくはさらなるアミノ酸置換を一切有さない配列を指す。

30

【0045】

本明細書において「A (X-Y)グロブロマー」(「A (X-Y)球状オリゴマー」という用語は、上で定義されるように、均一性及び独特の物理的特性を有する、A (X-Y)ペプチドの可溶性の球状の非共有結合を指す。一態様によれば、A (X-Y)グロブロマーは、陰イオン性界面活性剤とともに温置することによって取得可能なA (X-Y)ペプチドの安定な非原線維性のオリゴマー集合体である。単量体及び原線維とは異なり、これらのグロブロマーは、サブユニットの定められた集合体数によって特徴付けられる(例えば、P C T国際出願公開W O 0 4 / 0 6 7 5 6 1に記載のように、初期集合形態、n = 4 - 6、「オリゴマーA」及び後期集合形態、n = 1 2 - 1 4、「オリゴマーB」)。)。グロブロマーは、3次元球状型構造を有する(「モルテングロビュール」、B a r g h o r nら、2 0 0 5、J N e u r o c h e m、9 5、8 3 4 - 8 4 7参照)。これらは、以下の特性の1つ又はそれ以上によってさらに特徴付けられる。

40

【0046】

- グロブロマーの末端切断された形態を与える広域プロテアーゼ(サーモリシン又はエ

50

ンドプロテイナーゼ Gluc など) で N 末端アミノ酸 X - 23 を切断できること ;

- 広域プロテアーゼ及び抗体が C 末端アミノ酸 24 - Y に接近できないこと ; 並びに

- これらのグロブロマーの末端切断された形態が、前記グロブロマーの 3 次元コア構造を維持しており、そのグロブロマー立体構造中のコアエピトープ A (20 - Y) の接近性がより優れている。

【 0047 】

本発明によると、及び、特に本発明の抗体の結合親和性を評価する目的のために、本明細書において「 A (X - Y) グロブロマー」という用語は、特に、例えば以下に提示されている実施例 I に記載されているような方法によって得ることができる産物を指す。(WO 04 / 067561 も参照)。このような方法は、 A (1 - 42) グロブロマー、 A (12 - 42) グロブロマー及び A (20 - 42) グロブロマーを得るために使用され得る。好ましくは、グロブロマーは、神経細胞に対して親和性を示す。好ましくは、グロブロマーは、神経調節効果も示す。本発明の別の態様によれば、グロブロマーは 11 ないし 16、より好ましくは 12 ないし 14 の A (X - Y) ペプチドからなる。

10

【 0048 】

本発明の別の態様によれば、本明細書において「 A (X - Y) グロブロマー」という用語は、 A (X - Y) サブユニットから実質的になるグロブロマーを表し、 12 のサブユニットのうち、平均、少なくとも 11 のサブユニットが A (X - Y) 型であれば好ましく、グロブロマーの 10 % 未満が何れかの非 A (X - Y) ペプチドを含めば、より好ましく、非 A (X - Y) ペプチドの含量が検出閾値を下回っていれば、最も好ましい。より具体的には、本明細書において「 A (1 - 42) グロブロマー」という用語は、上記定義の A (1 - 42) 単位から実質的になるグロブロマーを表し、本明細書において「 A (12 - 42) グロブロマー」という用語は、上記定義の A (12 - 42) 単位から実質的になるグロブロマーを表し、本明細書において「 A (20 - 42) グロブロマー」という用語は、上記定義の A (20 - 42) 単位から実質的になるグロブロマーを表す。

20

【 0049 】

本明細書において使用される「架橋された A (X - Y) グロブロマー」という用語は、グロブロマーの構成単位の架橋によって、好ましくは化学的な架橋によって、より好ましくはアルデヒド架橋によって、最も好ましくは、グルタルジアルデヒド架橋によって、上述のような A (X - Y) グロブロマーから取得可能な分子を表す。本発明の別の態様において、架橋されたグロブロマーは、実質的に、前記単位が非共有の相互作用のみによって互いに固定されるのではなく、少なくとも部分的に共有結合によって連結されているグロブロマーである。本発明において、架橋された A (1 - 42) グロブロマーは、特に、架橋された A (1 - 42) オリゴマーである。

30

【 0050 】

本明細書において使用される「 A (X - Y) グロブロマー誘導体」という用語は、特に、検出を容易にする基、好ましくは、蛍光色素分子、例えば、フルオレセイン・イソチオシアナート、フィコエリトリン、エコーレア・ピクトリア (*Aequorea victoria*) 蛍光タンパク質、ディクチオソーマ (*Dictyosoma*) 蛍光タンパク質又はこれらのあらゆる組み合わせ若しくは蛍光活性誘導体 ; 発色団 ; 化学発色団、例えば、ルシフェラーゼ、好ましくは、フォティヌス・ピラリス (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼ、ピブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) ルシフェラーゼ又はこれらのあらゆる組み合わせ若しくは化学発光活性誘導体 ; 酵素的に活性な基、例えば、ペルオキシダーゼ、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又は酵素的に活性なこれらの何れかの誘導体 ; 電子密度が高い基、例えば、重金属含有基、例えば、金含有基 ; ハプテン、例えば、フェノールに由来するハプテン ; 強く抗原性の構造、例えば、抗原性であると予測されるペプチド配列、例えば、Kolaskar 及び Tongaonkar のアルゴリズムによって、抗原性であると予測されるペプチド配列 ; 別の分子に対するアプタマー ; キレート基、例えば、ヘキサヒスチジン ; 更なる特定のタンパク

40

50

質 - タンパク質相互作用を媒介する天然の又は天然由来のタンパク質構造、例えば、f o s / j u n 対の要素；磁性基、例えば、強磁性基；又は放射性基、例えば、 ^1H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 若しくは ^{125}I 又はこれらのあらゆる組み合わせを含む基；又は共有結合によって若しくは非共有結合高親和性相互作用によってフラッグ標識されているグロブロマー、好ましくは、不活化、隔離、分解及び/又は沈殿を促進する基に共有結合されているグロブロマー、好ましくはインビボでの分解を促進する基、より好ましくはユビキチンでフラッグ標識されているグロブロマー（この場合、このフラッグ標識されたオリゴマーがインビボで組み立てられるのであれば、特に好ましい。）、又は上記のあらゆる組み合わせによって修飾されたグロブロマーを表す。このような標識及びフラッグ基並びにタンパク質へこれらを付着させるための方法は本分野において公知である。標識化及び/又はフラッグ標識化は、グロブロマー化の前、間又は後に実施され得る。本発明の別の態様において、グロブロマー誘導体は、標識化及び/又はフラッグ化反応によって、グロブロマーから取得できる分子である。対応して、本明細書における「A (X - Y) 単量体誘導体」という用語は、特に、グロブロマーに対して記載されているように、標識化又はフラッグ化されたA 単量体を表す。

10

【0051】

本明細書における「より大きな親和性」という用語は、一方で、結合していない及び結合していないグロブロマーと他方で抗体 - グロブロマー複合体との間の平衡が抗体 - グロブロマー複合体をさらに好む相互作用の程度を表す。同様に、本明細書中の「より小さな親和性」という用語は、一方で、結合していない及び結合していないグロブロマーと他方で抗体 - グロブロマー複合体との間の平衡が、結合していない抗体と結合していないグロブロマーをさらに好む相互作用の程度を表す。「より大きな親和性」という用語は「より高い親和性」という用語と同義であり、「より小さな親和性」という用語は「より低い親和性」という用語と同義である。

20

【0052】

本明細書において「A (X - Y) 単量体」という用語は、A (X - Y) ペプチドの単離された形態、好ましくは、他のA ペプチドとの非共有結合的相互作用に実質的に関わっていないA (X - Y) ペプチドの一形態を指す。実際には、A (X - Y) 単量体は通常、水溶液の形態で提供される。本発明の特に好ましい実施形態では、水系単量体溶液は、0.05%から0.2%、より好ましくは約0.1%の NH_4OH を含有する。本発明の別の特に好ましい実施形態では、水系単量体溶液は、0.05%から0.2%、より好ましくは約0.1%の NaOH を含有する。（例えば、本発明の抗体の結合親和性を測定するために）使用される場合、前記溶液を適切な方法で希釈することが都合よい場合があり得る。さらに、通常、前記溶液は、その調製から2時間以内、特に1時間以内、特別には30分以内に使用するのが都合よい。

30

【0053】

本明細書において「原繊維」という用語は、電子顕微鏡中で原繊維性構造を示し、コンゴレッドを結合し、次いで、偏光下で複屈折を示し、そのX線回折パターンがクロス - 構造である非共有的に会合された各A (X - Y) ペプチドの集合物を含む分子構造を表す。本発明の別の態様において、原繊維は、界面活性剤の不存在下で、例えば、0.1M HCl 中で、適切なA ペプチドの自己誘導された重合体凝集を含む方法によって取得可能な分子構造であり、24超、好ましくは100単位超の凝集物が形成される。この方法は、本分野において周知である。都合よく、A (X - Y) 原繊維は、水溶液の形態で使用される。本発明の特に好ましい実施形態において、水性原繊維溶液は、0.1% NH_4OH 中にA ペプチドを溶解し、20mM NaH_2PO_4 、140mM NaCl 、pH 7.4で1:4にこれを希釈した後に、pHを7.4に再調整し、37°Cで20時間溶液を温置した後、10000gでの10分間の遠心及び20mM NaH_2PO_4 、140mM NaCl 、pH 7.4注に再懸濁することによって作製される。

40

【0054】

「A (X - Y) 原繊維」という用語は、本明細書において、A (X - Y) サブユニ

50

ットから実質的になる原繊維を表し、サブユニットの少なくとも90%が、平均、A (X - Y)型であれば好ましく、サブユニットの少なくとも98%がA (X - Y)型であればより好ましく、非A (X - Y)ペプチドの含量が検出閾値を下回っていれば、最も好ましい。

【0055】

本発明は、前記モノクローナル抗体10F4及び3C5の何れか1つの結合特性と類似の結合特性を有する抗体にも関する。前記モノクローナル抗体の何れか1つの結合特性と類似の結合特性を有する抗体には、モノクローナル抗体10F4及び3C5と同じエピトープに結合する抗体が含まれる。

【0056】

本発明は、10F4及び3C5からなる群から選択される少なくとも1つ、好ましくは全ての抗体と競合することができる抗体にも関する。本明細書において、「競合する抗体」という用語は、同一の分子の実体又は安定的に、但し、非共有結合的に連結された超分子実体、好ましくは同一の分子を標的とする抗体のあらゆる数を表し、少なくとも1つは、好ましくは、その標的エピトープへの他の抗体のアクセスを立体的に妨害することによって、又は他の抗体に対する標的の親和性を低下させる標的実体中の立体構造を誘導及び/又は安定化させることによって、より好ましくは、標的実体の十分近くに近接するエピトープに結合し、標的実体と重複し、又は標的実体と一致し、最も好ましくは、重複又は一致し、特に一致することによって他の抗体の標的エピトープへの接近を直接的に遮断することによって、別の抗体の測定可能な結合を特異的に低下させることが可能である。2つのエピトープが、それらの化学構造、好ましくはそれらのアミノ酸配列の一部を共有すれば、2つのエピトープは、「重複する」と称され、それらの化学構造、好ましくはそれらのアミノ酸配列が同一であれば、「同一」と称される。従って、本発明は、その標的エピトープが、10F4及び3C5からなる群から選択される抗体の少なくとも1つの標的エピトープと重複し、好ましくは同一である抗体にも関する。従って、前記モノクローナル抗体10F4及び3C5の何れか1つの結合特性と類似の結合特性を有する抗体には、さらに、前記抗体の何れか1つの抗原結合部分の少なくとも一部を含む抗体が含まれる。好ましくは、前記部分は、前記モノクローナル抗体の何れか1つの少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含む。従って、さらなる特定の実施形態によれば、本発明は、それぞれ、モノクローナル抗体10F4又は3C5の重鎖CDR3のアミノ酸配列及び/又は軽鎖CDR3のアミノ酸配列を含む抗体に関する。このような抗体の具体例には、それぞれ、モノクローナル抗体10F4又は3C5の重鎖CDR2のアミノ酸配列及び/又は軽鎖CDR2のアミノ酸配列も含む抗体ものが含まれる。さらにより具体的には、このような抗体には、それぞれ、モノクローナル抗体10F4又は3C5の重鎖CDR1のアミノ酸配列及び/又は軽鎖CDR1のアミノ酸配列も含む抗体が含まれる。一態様において、従って、本発明は、CDR3、CDR2及び/又はCDR1ドメインがモノクローナル抗体10F4又は3C5の重鎖CDR3、CDR2及び/又はCDR1のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体に関する。従って、さらなる態様において、本発明は、CDR3、CDR2及び/又はCDR1ドメインが、それぞれモノクローナル抗体10F4又は3C5の軽鎖CDR3、CDR2及び/又はCDR1のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体に関する。

【0057】

一実施形態において、本発明の抗体は、少なくとも2つの可変ドメインCDRの組を含む。より好ましくは、2つの可変ドメインCDRの組は、VH10F4CDRセット及びVL10F4CDRセット；VH3C5CDRセット及びVL3C5CDRセットからなる群から選択される(図7aから7d参照)。

【0058】

別の実施形態において、上に開示されている抗体は、ヒトアクセプターフレームワークをさらに含む。好ましい実施形態において、抗体はCDR移植された抗体である。好ましくは、CDR移植された抗体は上に開示されているCDRの1つ又はそれ以上を含む。好

10

20

30

40

50

ましくは、CDR移植された抗体はヒトアクセプターフレームワークを含む。

【0059】

好ましい実施形態において、抗体はヒト化抗体である。好ましくは、ヒト化抗体は上に開示されているCDRの1つ又はそれ以上を含む。より好ましくは、ヒト化抗体は、上に開示されているCDRの3つ又はそれ以上を含む。最も好ましくは、ヒト化抗体は、上に開示されている6つのCDRを含む。特定の実施形態において、CDRは、ヒトアクセプターフレームワークのヒト抗体可変ドメイン中に取り込まれる。好ましくは、ヒト抗体可変ドメインはコンセンサスヒト可変ドメインである。より好ましくは、ヒトアクセプターフレームワークは、CDRに隣接する残基、グリコシル化部位残基、まれな残基、CDRと相互作用することができる残基、標準的残基、重鎖可変領域と軽鎖可変領域の間の接触領域、Vernierゾーン内の残基及びChothia定義された可変重鎖CDR1及びKabata定義された第一の重鎖フレームワークの間で重複する領域中の残基からなる群から選択される中心的残基に少なくとも1つのフレームワーク領域アミノ酸置換を含む。好ましくは、ヒトアクセプターフレームワークは、少なくとも1つのフレームワーク領域アミノ酸置換を含み、フレームワークのアミノ酸配列は前記ヒトアクセプターフレームワークの配列と少なくとも65%同一であり、及び前記ヒトアクセプターフレームワークと同一である少なくとも70のアミノ酸を含む。さらなる態様において、本発明は、上に定義されている重鎖及び軽鎖の両方を含む抗体に関する。好ましくは、抗体は上に記載されている少なくとも1つの可変ドメインを含む。より好ましくは、抗体は上記2つの可変ドメインを含み、前記2つの可変ドメインは、図7に注記されているようにアミノ酸配列を有する。

10

20

【0060】

別の態様において、本発明の抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD、IgE及びヒトIgG1Ala234Ala235変異体定常領域からなる群から選択される重鎖定常領域を含む。特に、抗体はヒト定常領域を含む。IgG1重鎖定常領域を含む抗体が好ましい。

【0061】

別の実施形態において、抗体はグリコシル化されている。好ましくは、グリコシル化パターンは、ヒトグリコシル化パターンであり、又は本明細書に開示されている真核細胞の何れか1つ、特にCHO細胞によって産生されるグリコシル化パターンである。

30

【0062】

本発明は、本発明の抗体の抗原結合部分にも関する。このような抗原結合部分には、抗体のFab断片、F(ab')₂断片及び一本鎖Fv断片が含まれるが、これらに限定されるものではない。さらなる抗原結合部分は、Fab'断片、Fv断片及びジスルフィド結合されたFv断片である。

【0063】

本発明は、本明細書に開示されている抗体のあらゆる1つをコードする単離された核酸も提供する。さらなる実施形態は、本明細書に開示されている単離された核酸を含むベクターを提供する。ベクターは、特に、pcDNA；pTT(Durocher et al., Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No. 2)；pTT3(追加の多重クローニング部位を有するpTT)；pEFBOS(Mizushima, Sand Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17)；pBV；pJV；及びpBJからなる群から選択され得る。

40

【0064】

別の態様において、宿主細胞は、本明細書に開示されているベクターで形質転換される。好ましくは、宿主細胞は原核細胞である。より好ましくは、宿主細胞はイー・コリ(E. coli)である。関連する実施形態において、宿主細胞は真核細胞である。好ましくは、真核細胞は、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及び真菌細胞からなる群から選択される。より好ましくは、宿主細胞は、CHO及びCOSを含む(但し、これらに限定され

50

ない。) 哺乳動物細胞又はサッカロミセス・セレビスシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの真菌細胞又は Sf9 などの昆虫細胞である。

【0065】

本発明の別の態様は、抗体を生産するのに適した条件下で、本明細書に開示されている宿主細胞又はハイブリドーマの何れか1つを培地中において培養することを含む、本発明の抗体を生産する方法を提供する。別の実施形態は、本明細書に開示されている方法によって取得可能である抗体を提供する。本発明の抗体は、それ自体公知の様式で取得することが可能である。全体として、異なる抗体特異性の数千億から構成される抗体レパートリーを含有するBリンパ球は、哺乳動物の免疫系の一部である。特定の抗原に対する正常な免疫応答とは、前記抗原に特異的に結合する前記レパートリーの1つ又はそれ以上の抗体を選択することを意味し、免疫応答の成功は、少なくとも部分的には、前記抗体が刺激抗原を特異的に認識し(最終的には、除去する)、前記抗体の環境中の他の分子を無視する能力に基づいている。1つの特定の標的抗原を特異的に認識する抗体の有用性は、モノクローナル抗体技術の開発をもたらした。現在では、標準化されたハイブリドーマ技術によって、目的の抗原に対して単一の特異性を有する抗体を産生することが可能である。より最近では、抗体ライブラリーのインビトロスクリーニングなどの組換え抗体技術が開発されている。これらの技術は、同様に、目的の抗原に対して単一の特異性を有する抗体の産生を可能とする。

10

【0066】

本発明の方法において、インビボ又はインビトロの何れかで、抗体レパートリーに対して、目的の抗原を作用させ得る。一実施形態によれば、インビボにおいて動物を抗原で免疫化することによって、抗原をレパートリーに作用させる。このインビボアプローチは、さらに、動物のリンパ球から多数のハイブリドーマを確立すること、及び前記抗原へ特異的に結合する抗体を分泌する特定のハイブリドーマを選択することを含む。免疫化すべき動物は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ科の動物若しくはヒツジであり得、又は、抗原刺激後にヒト抗体を産生する、上に挙げられている動物の何れかのトランスジェニック様式、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスであり得る。免疫され得る動物の他の種類には、ヒト末梢血単核球で(キメラhu-PBMCSCIDマウス)又はリンパ球系細胞若しくはその前駆体で再構成されている重症複合免疫不全症(SCID)を有するマウス、及び致死的な全身照射を施された後に、重症複合免疫不全症(SCID)を有するマウスから得られた骨髄細胞で照射に対して保護され、続いて、機能的ヒトリンパ球が移植されたマウス(「トリメラ」系)が含まれる。免疫化すべき動物の別の種類は、抗原での免疫化後に、前記動物が前記抗原を外來として認識するように、そのゲノム内において、目的の抗原をコードする内在性遺伝子のスイッチが、例えば、相同的組換えによって停止されている(ノックアウトされている)動物(例えば、マウス)である。この方法によって生産されたポリクローナル又はモノクローナル抗体は、ELISA及びドットプロット技術を含む(但し、これらに限定されない。)公知のスクリーニング方法を用いることによって性質決定及び選択される。

20

30

【0067】

別の実施形態によれば、インビトロにおいて、抗原を用いて組換え抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって、抗原を抗体レパートリーに作用させる。組換え抗体ライブラリーは、例えば、バクテリオファージの表面上又は酵母細胞の表面上又は細菌細胞の表面上に発現され得る。様々な実施形態において、組換え抗体ライブラリーは、例えば、scFvライブラリー又はFabライブラリーである。別の実施形態によれば、抗体ライブラリーは、RNA-タンパク質融合物として発現される。

40

【0068】

本発明の抗体を生産する別のアプローチは、インビボ及びインビトロアプローチの組み合わせを含む。例えば、インビボにおいて、動物を抗原で免疫化した後、前記動物のリンパ球系細胞から調製された組換え抗体ライブラリー又は(例えば、重鎖及び/又は軽鎖を含有する)単ドメイン抗体ライブラリーを、前記抗原を用いてインビトロでスクリーニ

50

ングすることによって、抗体レパートリーに対して抗原を作用させ得る。別のアプローチによれば、インビボにおいて、動物を抗原で免疫化した後、前記動物のリンパ球系細胞から作製された組換え抗体ライブラリー又は単ドメインライブラリーをアフィニティー成熟に供することによって、抗体レパートリーに対して抗原を作用させる。別のアプローチによれば、インビボにおいて動物を抗原で免疫化した後、目的の抗体を分泌する各抗体産生細胞を選択し、(例えば、PCRを用いて)重鎖及び軽鎖の可変領域に対するcDNAを、前記選択された細胞から取得し、インビトロにおいて、哺乳動物宿主細胞中で重鎖及び軽鎖の前記可変領域を発現させることにより(これは、選択されたリンパ球抗体法又はSLAMと称される。)、選択された抗体遺伝子配列をさらに選択及び操作できるようにすることによって、抗原を抗体レパートリーに作用させる。さらに、モノクローナル抗体は、重鎖及び軽鎖に対する抗体遺伝子を哺乳動物細胞中で発現させ、所望の結合親和性を有する抗体を分泌する哺乳動物細胞を選択することによる発現クローニングによって選択され得る。

10

【0069】

抗体を生産するための本発明の方法は、抗体の様々な種類を生産するために使用することが可能である。これらには、モノクローナル、特に組換え抗体、特に実質的にヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体及びCDR移植抗体並びにこれらの抗原結合部分が含まれる。

【0070】

本発明は、さらに、本発明のモノクローナル抗体を産生(分泌)することができるハイブリドーマに関する。

20

本発明のハイブリドーマには、PTA-7808及びPTA-7406からなる群から選択されるアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号によって指定されるハイブリドーマ並びにモノクローナル抗体10F4及び3C5を生産するモノクローナル抗体が含まれる。

【0071】

本発明の抗体は、本明細書に記載されているA グロブロマー以外のA 形態とも反応し得、すなわち結合し得ることが注目される。これらの抗原は、オリゴマー若しくはグロブロマーであってもよく、又はオリゴマー若しくはグロブロマーでなくてもよい。従って、本発明の抗体が結合する抗原には、本発明の抗体が反応性を有するグロブロマーエピトープを含むあらゆるA 形態が含まれる。このようなA 形態には、A (20-42)、A (20-40)、A (12-42)、A (12-40)、A (1-42)及びA (1-40)形態などの末端切断された及び末端切断されていないA (X-Y)形態(X及びYは、上に定義されている。)が含まれるが、但し、前記形態はグロブロマーエピトープを含む。

30

【0072】

本発明は、上に定義されているように、本発明の抗体又はその抗原結合部分を含む組成物にも関する。特定の実施形態によれば、前記組成物は、本発明の抗体又は抗原結合部分及び医薬として許容される担体を含む医薬組成物である。上に定義されている本発明の抗体又は抗原結合部分は、インビトロ及びインビボの両方において、本発明の抗体又は抗原結合部分が結合するA グロブロマー又はその誘導体の活性を好ましくは中和することができる。従って、前記抗体又は抗原結合部分は、例えば、前記グロブロマー若しくはその誘導体を含む調製物中で、又は前記グロブロマー若しくはその誘導体がある中に存在するヒト個体又は他の哺乳動物中で、前記グロブロマー又はその誘導体の活性を阻害するために使用され得る。

40

【0073】

一実施形態によれば、本発明は、前記グロブロマー又はその誘導体の活性を阻害するために、本発明の抗体又はその抗原結合部分をグロブロマー又はその誘導体に対して作用させることを含む、前記グロブロマー又はその誘導体の活性を阻害する方法に関する。前記活性は、例えば、インビトロで阻害され得る。例えば、本発明の抗体又は抗原結合部分は、試料中で、グロブロマー又はその誘導体の活性を阻害するために、前記グロブロマー又

50

はその誘導体を含有し、又は含有すると疑われている対象又は細胞培養から得られた試料などの調製物に添加され得る。あるいは、グロブリン又はその誘導体の活性は、インビボで、個体中において阻害され得る。従って、本発明は、さらに、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病及びダウン症候群のアミロイドーシスからなる群から選択されるアミロイドーシスを治療又は予防するための医薬組成物を調製するための、上記抗体又は抗原結合部分の使用に関する。従って、本発明の前記使用の一態様は、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスの治療又は予防を必要としている対象において、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスの治療又は予防する方法であり、前記対象に上記抗体又は抗原結合部分を投与することを含む、前記方法である。アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスを治療し、及び特に予防するために、前記抗体又は抗原結合部分を使用することは、特に、受動免疫のためである。従って、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスを治療又は予防することを必要とする対象において、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスを治療又は予防する方法において、前記対象へ抗体又は抗原結合部分を投与する1つの目的は、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスに対して前記対象を受動的に免疫することである。

10

20

30

40

50

【0074】

好ましくは、上に定義されている本発明の抗体又は抗原結合部分は、インビトロ及びインビボの両方において、本発明の抗体又は抗原結合部分が結合するA グロブリン又はその誘導体を検出することができる。従って、前記抗体又は抗原結合部分は、例えば、前記グロブリン若しくはその誘導体を含有する調製物中で、又は前記グロブリン若しくはその誘導体がある中に存在するヒト個体又は他の哺乳動物中で、前記グロブリン又はその誘導体を検出するために使用され得る。

【0075】

一実施形態によれば、グロブリン又はその誘導体を結合するために、本発明の抗体又はその抗原結合部分をグロブリン又はその誘導体に対して作用させること（これにより、好ましくは、抗体又はその抗原結合部分及びグロブリン又はその誘導体を含む複合体を形成する。）を含む、前記グロブリン又はその誘導体を検出する方法に関する。グロブリンは、例えば、インビトロで検出され得る。例えば、本発明の抗体又は抗原結合部分は、調製物中でグロブリン又はその誘導体を検出するために、調製物に、例えば、前記グロブリン又はその誘導体を含有し、又は含有すると疑われている対象又は細胞培養から得られた試料に添加され得る。あるいは、グロブリン又はその誘導体は、インビボで、個体中において検出され得る。従って、本発明は、さらに、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスを診断するための組成物を調製するための、上記抗体又は抗原結合部分の使用に関する。本発明の前記使用の一態様は、抗体又は抗原結合部分を対象に投与すること、及び前記抗体又は抗原結合部分を抗原とともに含む複合体の形成を検出することを含み、前記複合体の存在が、前記対象におけるアミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスの存在を示唆する、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスを有することが疑われている対象において、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスを診断する方法である。本発明の前記使用の第二の態様は、対象から試料を準備すること、前記試料を上記定義の抗体又は抗原結合部分と接触させること、及び前記抗体又は抗原結合部分を抗原とともに含む複合体の形成を検出することを含み、前記複合体の存在が前記対象におけるアミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスを示唆する、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスを有することが疑われている対象において、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスを診断する方法である。

【0076】

本発明の抗体の結合親和性は、ELISA、ドットプロット又はBIACore分析 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ) などの標準化されたインビトロイムノアッセイを使用することによって評価され得る。さらなる記載については、Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19 - 26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11: 620 - 627; Johnson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125 - 131; 及び Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268 - 277を参照されたい。特定の実施形態によれば、本明細書において定義されている親和性は、ドットプロットを実施し、これを濃度測定によって評価することによって得られる値を表す。本発明の特定の実施形態によれば、ドットプロットによって結合親和性を測定することは、以下のことを含む。抗原 (例えば、上に定義されているような、A (X - Y) グロブリン、A (X - Y) 単量体又はA (X - Y) 原繊維) 又は、都合よく、例えば、100 pmol / μ L、10 pmol / μ L、1 pmol / μ L、0.1 pmol / μ L及び0.01 pmol / μ Lの抗原濃度になるように、例えば、20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4、0.2 mg BSA中に希釈された抗原の適切な希釈物の一定量を、ニトロセルロース膜上にドット状に付与し、次いで、非特異的な結合を防止するために、膜をミルクでブロックし、洗浄し、次いで、目的の抗体と接触させた後、酵素連結された二次抗体及び呈色反応を用いて目的の抗体を検出し、所定の酵素濃度で、結合された抗体の量が親和性の測定を可能とする。従って、1つの標的への2つの異なる抗体の相対的親和性又は2つの異なる標的への1つの抗体の相対的親和性は、本明細書において、その他は同一のドットプロット条件下で、2つの抗体 - 標的組み合わせを用いて観察された標的結合された抗体のそれぞれの量の関係として定義される。ウェスタンブロッティングに基づく類似のアプローチとは異なり、ドットプロットアプローチは、天然の立体構造を採る所定の標的への抗体の親和性を測定する。ELISAアプローチとは異なり、ドットプロットアプローチには、異なる標的とマトリックス間の親和性の差という問題がなく、これにより、異なる標的間でのより正確な比較が可能となる。

【0077】

本明細書において使用される「K_d」という用語は、本分野において公知であるように、特定の抗体抗原相互作用の解離定数を表すものとする。

【0078】

本発明の抗体は、好ましくは、単離された抗体である。「単離された抗体」とは、上述の結合親和性を有し、異なる結合親和性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を意味する。本明細書において、「実質的に含まない」という用語は、抗体の少なくとも95%、好ましくは抗体の少なくとも98%、より好ましくは抗体の少なくとも99%が所望の結合親和性を有する抗体調製物を表す。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質及び/又は化学物質を実質的に含まないことができる。

【0079】

本発明の単離された抗体には、モノクローナル抗体が含まれる。本明細書において使用される「モノクローナル抗体」は、異なるアミノ酸配列の抗体の混合物を含有する「ポリクローナル」抗体調製物とは異なり、共通の重鎖及び共通の軽鎖アミノ酸配列を共有する抗体分子、抗体の調製物を表すものとする。モノクローナル抗体は、ファージ、細菌、酵母又はリボソームディスプレイのような幾つかの新しい技術及びハイブリドーマから得られた抗体 (例えば、標準的なKohler及びMilsteinハイブリドーマ法 ((1975) Nature 256: 495 - 497) などのハイブリドーマ技術によって調製されたハイブリドーマによって分泌された抗体) が例である古典的な方法によって作製することが可能である。従って、ハイブリドーマに由来しない均一な配列を有する抗体は、なお、本明細書においてモノクローナル抗体と称されるが、これは、非古典的な方法によって取得され得、「モノクローナル」という用語は、ハイブリドーマ

に由来する抗体に限定されず、1つの核酸クローンに由来する全ての抗体を表すために使用される。従って、本発明のモノクローナル抗体には、組換え抗体が含まれる。本明細書において使用される「組換え」という用語は、例えば、化学合成によって、又は遺伝子工学技術による核酸の単離されたセグメントの操作によって、組換えがなければ分離されていた配列の2つのセグメントが人工的に組み合わせられていることを表す。特に、「組換え抗体」という用語は、宿主細胞中に形質移入された組換え発現ベクターを用いて発現された抗体；組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体；ヒト免疫グロブリン遺伝子のためにトランスジュニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acid Res.* 20: 6287-6295を参照されたい。）など、組換え手段によって産生され、発現され、作製され若しくは単離された抗体又は特定の免疫グロブリン遺伝子配列（ヒト免疫グロブリン遺伝子配列など）が他のDNA配列と組み合わせられている、他の何れかの方法で産生され、発現され、作製され若しくは単離された抗体を表す。組換え抗体には、例えば、キメラ、CDR移植及びヒト化抗体が含まれる。当業者は、異種の系内での、ハイブリドーマに由来する慣用のモノクローナル抗体の発現には、得られた抗体タンパク質のアミノ酸配列が変化されていない場合又は変化されることが意図される場合でさえ、組換え抗体の作製が必要であることを理解する。

10

【0080】

本発明の特定の実施形態において、抗体は、ヒト化された抗体である。実施形態の複数によれば、抗体は、ヒト抗体又はマウス抗体など、専ら単一の種に由来するアミノ酸配列を含み得る。他の実施形態によれば、抗体は、キメラ抗体又はCDR移植抗体又はヒト化された抗体の別の形態であり得る。

20

【0081】

「抗体」という用語は、4つのポリペプチド鎖（2つの重（H）鎖及び2つの軽（L）鎖）からなる免疫グロブリン分子を表すものとする。鎖は、通常、ジスルフィド結合を介して、互いに連結されている。各重鎖は、前記重鎖の可変領域（本明細書において、HCVR又はVHと略称される。）及び前記重鎖の定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメインCH1、CH2及びCH3からなる。各軽鎖は、前記軽鎖の可変領域（本明細書において、LCVR又はVLと略称される。）及び前記軽鎖の定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、CLドメインからなる。VH及びVL領域は、相補性決定領域（CDR）と称され、フレームワーク領域（FR）と称される保存された領域が散在された超可変領域へさらに分割され得る。従って、各VH及びVL領域は、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で、N末端からC末端に配置された3つのCDR及び4つのFRからなる。この構造は、当業者に周知である。

30

【0082】

抗体の「抗原結合部分」（又は単に「抗体部分」）という用語は、本発明の抗体の断片の1つ又はそれ以上の断片を表し、前記断片は上記結合親和性をなお有する。完全な抗体の断片は、抗体の抗原結合機能を実施可能であることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に従えば、結合断片の例には、(i) Fab断片（すなわち、VL、VH、CL及びCH1ドメインから構成される一価断片）、(ii) F(ab')₂断片（すなわち、蝶番領域において、ジスルフィド架橋を介して互いに連結された2つのFab断片を含む二価断片）、(iii) VH及びCH1ドメインから構成されるFd断片、(iv) 抗体の単一アームのFL及びVHドメインから構成されるFv断片、(v) VHドメイン又はVH、CH1、CH2、DH3若しくはVH、CH2、CH3からなるdAb断片（Ward et al. (1989) *Nature* 341: 544-546）及び(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。Fv断片の2つのドメイン、すなわちVL及びVHは、別個の遺伝子によってコードされているが、これらは、VL及びVH領域が組み合わせられて一価分子（一本鎖Fv(scFv)）として知られている。例えば、Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426；及びHouston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U*

40

50

S A 8 5 : 5 8 7 9 - 5 8 8 3) を形成している単一のタンパク質鎖として、これらの調製を可能とする合成リンカー（例えば、ポリ - G₄ S アミノ酸配列）、及び組換え法を用いて互いにさらに連結され得る。抗体の「抗原結合部分」という用語は、このような一本鎖抗体も含むものとする。「ダイアボディ」などの一本鎖抗体の他の形態も、同様にここに包含される。ダイアボディは、VH及びVLドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現されているが、2つのドメインが同じ鎖上で組み合わされるには短すぎるリンカーを使用することにより、前記ドメインを異なる鎖の相補的ドメインと対合するように強制し、2つの抗原結合部位を形成する二価の二重特異的抗体である（例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448; Poljak R. J. et al (1994) Structure 2: 1121 - 1123を参照）。免疫グロブリン定常ドメインは、重鎖又は軽鎖定常ドメインを表す。ヒトIgG重鎖及び軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は、本分野において公知である。

10

【0083】

さらに、本発明の抗体又はその抗原結合部分は、前記抗体又は抗体部分の、1つ又はそれ以上のさらなるタンパク質又はペプチドとの共有又は非共有会的会合によって形成されたより大きな免疫接着分子の一部であり得る。このような免疫接着分子に対して適しているのは、四量体scFv分子を調製するためにストレプトアビジンコア領域を使用すること（Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93 - 101）、並びに二価及びピオチン化されたscFv分子を作製するために、システイン残基、マーカーペプチド及びC末端ポリヒスチジニル、例えば、ヘキサヒスチジニルタグを使用する（Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047 - 1058）ことである。

20

【0084】

「ヒト抗体」という用語は、その可変及び定常領域が、例えば、Kabata (Kabata, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91 - 3242参照。)によって記載されたように、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に対応し、又はヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に由来する抗体を表す。しかしながら、本発明のヒト抗体は、例えば、CDR中、特にCDR3中に、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インピトロでのランダムな突然変異導入若しくは部位特異的突然変異導入によって、又はインピボでの体細胞変異によって導入された変異）を含有し得る。本発明の組換えヒト抗体は可変領域を有し、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に由来する定常領域も含有し得る（Kabata, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91 - 3242参照。）。しかしながら、特定の実施形態によれば、組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列が、ヒト生殖系列のVH及びVL配列に関連し、又はこれらの配列に由来するにも関わらず、インピボで、ヒト抗体生殖系列レパートリー内には、天然に存在しないように、組換えヒト抗体はインピトロ突然変異導入（又は、ヒトIg配列のためにトランスジェニックである動物が使用される場合には、インピボ体細胞突然変異導入）に供される。特定の実施形態によれば、この種の組換え抗体は、選択的な突然変異導入又は逆突然変異又は両者の結果である。好ましくは、突然変異導入は、親抗体の親和性より大きい、標的に対する親和性をもたらし、及び/又は親抗体の親和性より小さい、非標的構造に対する親和性をもたらす。

30

40

【0085】

50

「キメラ抗体」という用語は、ヒト定常領域に連結されたマウス重鎖及び軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種に由来する重鎖及び軽鎖の可変領域に対する配列並びに別の種に由来する定常領域配列を含有する抗体を表す。

【0086】

「CDR移植された抗体」という用語は、マウスCDRの1つ又はそれ以上（例えば、CDR3）がヒトCDR配列で置換されているマウス重鎖及び軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種に由来する重鎖及び軽鎖可変領域配列を含むが、VH及び/又はVLのCDR領域の1つ又はそれ以上の配列が、別の種のCDR配列と置換されている抗体を表す。

【0087】

「ヒト化された抗体」という用語は、ヒト以外の種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ科の動物、ヒツジ又はヤギ）由来の重鎖及び軽鎖の可変領域の配列を含有するが、VH及び/又はVL配列の少なくとも一部が、より「ヒト類似に」、すなわち、ヒト生殖系列の可変配列により類似するように改変された抗体を表す。ヒト化抗体の1つの種類は、対応する非ヒトCDR配列を置換するために、ヒトCDR配列がヒト以外のVH及びVL配列中に挿入されているCDR移植抗体である。

10

【0088】

「Kabata番号」、「Kabata定義」及び「Kabata標識」という用語は、本明細書において互換的に使用される。本分野において認知されているこれらの用語は、抗体又はその抗原結合部分の重鎖及び軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基に比べて、より可変的な（すなわち、超可変的な）アミノ酸残基に付番するシステムを表す（Kabata et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 及び Kabata, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication NO. 91-3242）。

20

【0089】

本明細書において使用される「アクセプター」及び「アクセプター抗体」という用語は、フレームワーク領域の1つ又はそれ以上のアミノ酸配列の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は100%を提供又はコードする抗体又は核酸配列を表す。幾つかの実施形態において、「アクセプター」という用語は、定常領域を提供し、又はコードする抗体アミノ酸又は核酸配列を表す。さらに別の実施形態において、「アクセプター」という用語は、フレームワーク領域及び定常領域の1つ又はそれ以上を提供し、又はコードする抗体アミノ酸又は核酸配列を表す。具体的な実施形態において、「アクセプター」という用語は、フレームワーク領域の1つ又はそれ以上のアミノ酸配列の少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は100%を提供又はコードするヒト抗体アミノ酸又は核酸配列を表す。本実施形態によれば、アクセプターは、ヒト抗体の1つ又はそれ以上の特定の位置に存在しない少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ又は少なくとも10のアミノ酸残基を含有し得る。アクセプターフレームワーク領域及び/又はアクセプター定常領域は、例えば、生殖系列抗体遺伝子、成熟抗体遺伝子、機能的抗体（例えば、本分野で周知の抗体、開発中の抗体又は市販の抗体）に由来し、又はこれらから取得され得る。

30

40

【0090】

本明細書で使用される「CDR」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を表す。重鎖及び軽鎖の各可変領域中には3つのCDRが存在し、これらは、可変領域の各々に対して、CDR1、CDR2及びCDR3と表記される。本明細書において使用される「CDRセット」という用語は、抗原を結合することが可能な単一の可変領域中に存在する3つのCDRの群を表す。これらのCDRの正確な境界は、異なるシステムに従って、異なって定義されてきた。Kabataによって記載されたシステム（Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunologic

50

al Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)) は、抗体の何れの可変領域に対しても適用可能な明瞭な残基付番系を提供するのみならず、3つのCDRを画する正確な残基境界も提供する。これらのCDRは、Kabata CDRと称され得る。Chothia及び共同研究者(Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) and Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)) は、Kabata CDR内のある種の亜部分が、アミノ酸配列のレベルで大きな多様性を有するにも関わらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造を採ることを見出した。これらの亜部分は、L1、L2及びL3又はH1、H2及びH3(「L」及び「H」は、それぞれ、軽鎖及び重鎖領域を表記する。)と表記される。これらの領域は、Chothia CDRと称される場合があり、これは、Kabata CDRと重複する境界を有する。Kabata CDRと重複するCDRを画する他の境界は、Padlanによって記載されている(FASEB J. 9:133-139 (1995))及びMacCallum (J. Mol. Biol. 262(5):732-45 (1996))。さらに別のCDR境界定義は、上記系の1つに厳格に従わない場合があり得るが、それにも関わらず、Kabata CDRと重複するが、それらは、残基又は場合によってはCDR全体の特定の残基又は基が、抗原結合に著しい影響を与えないという予測又は実験的な発見に照らして、短縮又は延長され得る。本明細書に使用されている方法は、これらのシステムの何れかに従って定義されたCDRを使用し得るが、好ましい実施形態は、Kabata又はChothiaによって定義されたCDRを使用する。

10

20

【0091】

本明細書において使用される「標準的な(canonical)」残基という用語は、Chothiaら(J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992))によって定義される所定の標準的なCDR構造を規定するCDR又はフレームワーク中の残基を表す。Chothiaらによれば、多くの抗体のCDRの重大な一部は、アミノ酸配列のレベルでの大きな多様性に関わらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造を有する。各標準的な構造は、ループを形成するアミノ酸残基の連続するセグメントに対して、ペプチド骨格ねじれ角度の群を主に指定する。

30

【0092】

本明細書で使用される「ドナー」及び「ドナー抗体」という用語は、1つ又はそれ以上のCDEを提供する抗体を表す。好ましい実施形態において、ドナー抗体は、フレームワーク領域が得られた又は由来する抗体とは異なる種に由来する抗体である。ヒト化抗体という文脈において、「ドナー抗体」という用語は、1つ又はそれ以上のCDRを提供する非ヒト抗体を表す。

40

【0093】

本明細書で使用される「フレームワーク」又は「フレームワーク配列」という用語は、CDRを差し引いた可変領域の残りの配列を表す。CDR配列の正確な定義は、異なるシステムを用いて決定され得るので、フレームワーク配列の意義は、これに対応して、異なる解釈に供せられる。また、6つのCDR(軽鎖のCDR-L1、-L2及び-L3並びに重鎖のCDR-H1、-H2及び-H3)は、軽鎖及び重鎖上のフレームワーク領域を各鎖上の4つの亜領域(FR1、FR2、FR3及びFR4)に分割し、CDR1はFR1とFR2の間に位置し、CDR2はFR2とFR3の間に、CDR3はFR3とFR4の間に位置する。他者によって表記されるように、FR1、FR2、FR3又はFR4として特定の亜領域を特定せずに、フレームワーク領域は、天然に存在する単一の免疫グロブリン鎖の可変領域内の組み合わせられたFRを表す。本明細書において使用される、1つのFRは、4つの亜領域の1つを表し、複数のFRは、フレームワーク領域を構成する4つの亜領域の2つ又はそれ以上を表す。ヒト重鎖及び軽鎖アクセプター配列は、本分野において公知である。

50

【0094】

本明細書において使用される「生殖系列抗体遺伝子」又は「遺伝子断片」という用語は、特定の免疫グロブリンの発現のための遺伝的再編成又は突然変異をもたらす変異プロセスを経ていない非リンパ系細胞によってコードされる免疫グロブリン配列を表す。(例えば、Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200(2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484: 13-30(2001)参照)。本発明の様々な実施形態によって提供される利点の1つは、生殖系列抗体遺伝子は、成熟した抗体遺伝子より、種内の個体に特徴的な必須のアミノ酸配列構造を保存する傾向がより大きく、このため、その種において使用された場合に、非自己と認識される可能性がより低いという知見から生じる。

10

【0095】

本明細書において使用される「中心的な」残基という用語は、抗体、特に、ヒト化抗体の結合特異性及び/又は親和性に対してより大きな影響を有する可変領域内のある種の残基を表す。中心的な残基には、以下の1つ又はそれ以上、すなわちCDRに隣接する残基、グリコシル化候補部位(N又はOグリコシル化部位の何れかであり得る。)、稀な残基、抗原と相互作用することができる残基、CDRと相互作用することができる残基、標準的な残基、重鎖可変領域と軽鎖可変領域の間の接触残基、Vernierゾーン内の残基並びに可変重鎖CDR1のChothia定義及び第一の重鎖フレームワークのKabata定義の間で重複する領域中の残基が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0096】

本明細書において使用される「ヒト化抗体」という用語は、目的の抗原に免疫特異的に結合し、並びにヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク(FR)領域及び非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補的決定領域(CDR)を含む抗体又はその変形物、誘導体、類縁体若しくは断片を具体的に表す。CDRに関して、本明細書において使用される「実質的に」という用語は、非ヒト抗体CDRのアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有するCDRを表す。ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)の全てを実質的に含み、CDR領域の全て又は実質的に全ては非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)のものに対応し、及びフレームワーク領域の全て又は実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。好ましくは、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部(Fc)、典型的には、ヒト免疫グロブリンの一部も含む。幾つかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖と、重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。抗体は、重鎖のCH1、蝶番、CH2、CH3及びCH4領域も含み得る。幾つかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖のみを含有する。幾つかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖のみを含有する。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメイン及び/又はヒト化重鎖のみを含有する。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEなどの免疫グロブリンのあらゆるクラス、並びにIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4など(但し、これらに限定されない)のあらゆるサブクラスから選択することが可能である。ヒト化抗体のフレームワーク及びCDR領域は、親配列に正確に対応する必要はない。例えば、ドナー抗体CDR又はコンセンサスフレームワークは、当該部位のCDR又はフレームワーク残基が、ドナー抗体又はコンセンサスフレームワークの何れかに正確に対応しないように、少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、挿入及び/又は欠失によって変異され得る。好ましい実施形態において、このような変異は、しかしながら、大規模なものではない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%及び最も好ましくは少なくとも95%は、親FR及びCDR配列のものに対応する。本明細書で使用される「コンセンサスフレームワーク」という用語は、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク領域を表す。本明細書において使用される「コンセンサス免疫グロブリン配列」という用語は、関連

30

40

50

する免疫グロブリン配列のファミリー中の最も頻繁に存在するアミノ酸（又はヌクレオチド）から形成される配列を表す（例えば、Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987を参照されたい。)。免疫グロブリンのファミリーにおいて、コンセンサス配列中の各位置は、ファミリー内で当該位置において最も頻繁に存在するアミノ酸によって占有される。2つのアミノ酸が等しい頻度で存在する場合には、何れも、コンセンサス配列中に含まれ得る。

【0097】

本明細書において使用される「Vernier」ゾーンとは、Foote及びWinter (1992, J. Mol. Biol. 224: 487-499)によって記載されているように、CDR構造を調整し、抗原への適合性を微調整し得るフレームワーク残基のサブセットを表す。Vernierゾーン残基は、CDRの下に存在する層を形成し、CDRの構造及び抗体の親和性に対して影響を及ぼし得る。

10

【0098】

「エピトープ」という用語には、免疫グロブリンに特異的な結合をすることができるあらゆるポリペプチド決定基が含まれる。ある種の実施形態において、エピトープ決定基は、アミノ酸又は糖側鎖、ホスホリル又はスルホリルなどの分子の化学的に活性な表面基を含み、ある種の実施形態において、特異的な三次元構造的特徴及び/又は特異的な電荷特徴を有し得る。エピトープとは、抗体によって結合される抗原の領域である。ある種の実施形態において、抗体が、タンパク質及び/又は高分子の複雑な混合物中で、その標的抗原を優先的に認識する場合に、抗体は抗原を特異的に結合すると称される。

20

【0099】

本明細書において「ポリヌクレオチド」と称される用語は、2つ又はそれ以上のヌクレオチド（リボヌクレオチド若しくはデオキシヌクレオチドの何れか又はヌクレオチドの何れかのタイプの修飾された形態）のポリマー形態を意味する。本用語は、DNAの一本鎖及び二本鎖形態を含むが、好ましくは、二本鎖DNAである。

【0100】

本明細書において使用される「単離されたポリペプチド」という用語は、（例えば、ゲノム、cDNA若しくは合成起源又はこれらの何れかの組み合わせの）ポリヌクレオチドを意味するものとし、その起源のために、「単離されたポリヌクレオチド」は、「単離されたポリヌクレオチド」が本来一緒に見出されるポリヌクレオチドの全部又は一部と会合しておらず、本来連結されていないポリヌクレオチドに作用可能に連結されており、又はより大きな配列の一部として本来存在しない。

30

【0101】

本明細書において使用される「ベクター」という用語は、核酸分子に連結されている別の核酸を輸送することができる該核酸分子を表すものとする。ベクターの1つの種類は「プラスミド」であり、これは、その中にさらなるDNAセグメントを連結し得る環状二本鎖DNAを表す。ベクターの別の種類はウイルスベクターであり、ここにおいて、追加のDNAセグメントはウイルスゲノム中に連結され得る。ある種のベクターは、当該ベクターがその中に導入された宿主細胞中で自律的複製を行うことができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中への導入時に、宿主細胞のゲノム中に組み込まれることが可能であり、これにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが作用可能に連結されている遺伝子の発現を誘導することが可能である。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」（又は単に、「発現ベクター」）と称される。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。プラスミドは、最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、本明細書において、「プラスミド」及び「ベクター」は互換的に使用され得る。しかしながら、本発明は、均等な機能を果たす、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）などの発現

40

50

ベクターのこのような他の形態を含むものとする。

【0102】

「作用可能に連結された」という用語は、記載された成分がそれらを所期の様式で機能させることができる関係にある併置を表す。例えば、コード配列に対して「作用可能に連結された」調節配列は、調節配列と適合的な条件下で、コード配列の発現が達成されるように接続されている。「作用可能に連結された」配列は、目的の遺伝子と連続する発現調節配列及び目的の遺伝子を調節するように、トランスで又は離れて作用する発現調節配列の両方を含む。本明細書において使用される「発現調節配列」という用語は、それらが連結されているコード配列の発現及びプロセッシングに影響を与えるために必要なポリヌクレオチド配列を表す。発現調節配列には、適切な転写開始、終結、プロモーター及びエンハンサー配列；スプライシング及びポリアデニル化シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化させる配列；翻訳効率を増強する配列（すなわち、Kozakコンセンサス配列）；タンパク質の安定性を増強する配列；及び所望であれば、タンパク質分泌を増強させる配列が含まれる。このような調節配列の性質は、宿主生物に応じて異なる。原核生物では、このような調節配列は、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結配列を含む。真核生物では、このような調節配列は、一般に、プロモーター及び転写終結配列を含む。「調節配列」という用語は、その存在が発現及びプロセッシングに不可欠である成分を含むものとし、その存在が有利である追加の成分、例えば、リーダー配列及び融合対配列も含むことが可能である。

10

【0103】

本明細書で定義される「形質転換」とは、外来DNAが宿主細胞に入る全てのプロセスを表す。形質転換は、本分野で周知の様々な方法を用いて、自然の条件又は人工の条件下で起こり得る。形質転換は、原核又は真核宿主細胞中へ外来核酸配列を挿入するための何れかの公知の方法に依拠し得る。本方法は、形質転換されている宿主細胞に基づいて選択され、ウイルス感染、電気穿孔、リポフェクション及び粒子照射を含み得るが、これらに限定されない。このような「形質転換された」細胞には、挿入されたDNAが、自律的に複製するプラスミドとして、又は宿主染色体の一部として、その中で複製することできる安定に形質転換された細胞が含まれる。それらには、挿入されたDNA又はRNAを、限られた時間にわたって一過性に発現する細胞も含まれる。

20

【0104】

本明細書において使用される「組換え宿主細胞」（又は単に、「宿主細胞」という用語は、外来DNAがその中に導入されている細胞を表すものとする。このような用語は、当該細胞を表すのみならず、このような細胞の子孫も表すことを理解すべきである。突然変異又は環境的な影響のために、後続の世代中にある種の修飾が生じ得るので、このような子孫は、実際には、親細胞と同一でないことがあり得るが、本明細書において使用される「宿主細胞」という用語の範囲になお含まれる。好ましくは、宿主細胞には、生物の何れかの界から選択される原核及び真核細胞が含まれる。好ましい真核細胞には、原生動物、真菌、植物及び動物細胞が含まれる。最も好ましくは、宿主細胞には、原核細胞株E. コリ；哺乳動物細胞株CHO、HEK293及びCOS；昆虫細胞株Sf9及び真菌細胞サッカロミセス・セレピシアエが含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

40

【0105】

組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成及び組織培養及び形質転換（例えば、電気穿孔、リポフェクション）に対しては標準的な技術が使用され得る。酵素反応及び精製技術は、製造業者の仕様書に従って、又は本分野で一般的に遂行されているように、又は本明細書に記載されているように実施され得る。一般に、先述の技術及び手順は、本分野で周知の慣用的な方法に従い、並びに本明細書を通じて引用及び論述されている様々な一般的参考文献及びより具体的な参考文献中に記載されているように実施され得る。例えば、「Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ded., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))」を

50

参照されたい。

【0106】

本分野において公知であり、本明細書において使用されている「トランスジェニック生物」は、導入遺伝子を含有する細胞を有する生物を表し、生物（又は生物の先祖）中に導入された導入遺伝子は、当該生物中で天然には発現されていないポリペプチドを発現する。「導入遺伝子」とは、トランスジェニック生物がそこから発達する細胞のゲノム中に安定に及び作用可能に組み込まれており、トランスジェニック生物の1つ又はそれ以上の細胞種又は組織中で、コードされた遺伝子産物の発現を誘導するDNA構築物である。

【0107】

本発明の抗体を作製する方法は、以下に記載されている。本明細書では、インビボアプローチ、インビトロアプローチ又は両方の組み合わせの間で、区別が為される。

【0108】

インビボアプローチ：

所望される抗体の種類に応じて、インビボ免疫化のために様々な宿主動物を使用し得る。目的の抗原の内在性様式そのものを発現している宿主が使用され得る。あるいは、目的の抗原の内在性様式を欠乏させた宿主を使用することが可能である。例えば、対応する内在遺伝子における相対的組換えを介して、特定の内在性タンパク質を欠乏させたマウス（すなわち、ノックアウトマウス）は、マウスを免疫化した当該タンパク質に対して液性応答を生成し、従って、該タンパク質に対する高親和性モノクローナル抗体の作製のために使用できることが示されている（例えば、Roes, J. et al. (1995) J. Immunol. Methods 183: 231 - 237; Lunn, M. P. et al. (2000) J. Neurochem. 75: 404 - 412 参照）。

【0109】

本発明の非ヒト抗体を作製するために、ヒト以外の哺乳動物の複数が、抗体産生のための適切な宿主である。これらには、例えば、マウス、ラット、ニワトリ、ラクダ科の動物、ウサギ、ヒツジ及びヤギ（及びこれらのノックアウト様式）が含まれるが、ハイブリドーマの作製のためには、マウスが好ましい。さらに、ヒト抗体レパトリーを発現している非ヒト宿主動物は、二重特異性を有するヒト抗原に対する実質的にヒト抗体を作製するために使用され得る。この種の非ヒト動物には、ヒト免疫グロブリン導入遺伝子を有するトランスジェニック動物（例えば、マウス）（キメラ hu - PBMCS CID マウス）及び、以下でより詳しく記載されているヒト/マウス照射キメラが含まれる。

【0110】

一実施形態によれば、免疫化された動物は、ヒト以外の哺乳動物が抗原刺激時にヒト抗体を作製するように、ヒト免疫グロブリン遺伝子のためにトランスジェニックとなっているヒト以外の哺乳動物、好ましくはマウスである。典型的には、それらの内在性重鎖及び軽鎖遺伝子座が不活性であるように改変されたこのような動物中に、ヒト生殖系列配置を有する重鎖及び軽鎖のための免疫グロブリン導入遺伝子が導入される。このような動物が抗原で（例えば、ヒト抗原で）刺激されると、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体（ヒト抗体）が産生される。標準化されたハイブリドーマ技術を用いて、このような動物のリンパ球からヒトモノクローナル抗体を作製することが可能である。ヒト免疫グロブリンを有するトランスジェニックマウス及びヒト抗体の作製におけるそれらの使用のさらなる記載については、例えば、米国特許第 5,939,598号、WO96/33735、WO96/34096、WO98/24893及びWO99/53049 (Abgenix Inc.) 及び米国特許第 5,545,806号、米国特許第 5,569,825号、米国特許第 5,625,126号、米国特許第 5,633,425号、米国特許第 5,661,016号、米国特許第 5,770,429号、米国特許第 5,814,318号、米国特許第 5,877,397号及びWO99/45962 (Genpharm Inc.) を参照されたい。「MacQuitty, J. J. and Kay, R. M. (1992) Science 257: 1188; Taylor, L. D. et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20: 6287 - 6295; Lonberg, N.

10

20

30

40

50

et al. (1994) *Nature* 368: 856 - 859; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13: 65 - 93; Harding, F. A. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764: 536 - 546; Fishwild, D. M. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845 - 851; Mendez, M. J. et al. (1997) *Nature Genetics* 15: 146 - 156; Green, L. L. and Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188: 483 - 495; Green, L. L. (1999) *J. Immunol. Methods* 231: 11 - 23; Yang, X. D. et al. (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66: 401 - 410; Gallo, M. L. et al. (2000) *Eur. J. Immunol.* 30: 534 - 540

【0111】

別の実施形態によれば、免疫されている動物は、ヒト末梢血単核球若しくはリンパ球系細胞又はこれらの前駆体で再構築された重症複合免疫不全 (SCID) を有するマウスであり得る。キメラ hu - PBMC SCID マウスと称されるこのようなマウスは、証明されているように、抗原刺激をすると、ヒト免疫グロブリン応答を産生する。これらのマウス及び抗体を作製するためのそれらの使用のさらなる記述については、例えば、Leader, K. A. et al. (1992) *Immunology* 76: 229 - 234; Bombil, F. et al. (1996) *Immunobiol.* 195: 360 - 375; Murphy, W. J. et al. (1996) *Semin. Immunol.* 8: 233 - 241; Herz, U. et al. (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113: 150 - 152; Albert, S. E. et al. (1997) *J. Immunol.* 159: 1393 - 1403; Nguyen, H. et al. (1997) *Microbiol. Immunol.* 41: 901 - 907; Arai, K. et al. (1998) *J. Immunol. Methods* 217: 79 - 85; Yoshinari, K. and Arai, K. (1998) *Hybridoma* 17: 41 - 45; Hutchins, W. A. et al. (1999) *Hybridoma* 18: 121 - 129; Murphy, W. J. et al. (1999) *Clin. Immunol.* 90: 22 - 27; Smithson, S. L. et al. (1999) *Mol. Immunol.* 36: 113 - 124; Chamat, S. et al. (1999) *J. Infect. Diseases* 180: 268 - 277; 及び Heard, C. et al. (1999) *Molec. Med.* 5: 35 - 45 を参照されたい。

【0112】

別の実施形態によれば、免疫されている動物は、全身照射の致死線量で処理された後、重症複合免疫不全 (SCID) を有するマウスから得られた骨髄細胞で照射から保護され、続いて、機能的ヒトリンパ球で移植されたマウスである。目的の抗原で前記マウスを免疫化し、次いで、標準化されたハイブリドーマ技術を使用することによってモノクローナル抗体を作製することによって、ヒトモノクローナル抗体を作製するために、Trimer a 系と称されるキメラのこの種類が使用される。これらのマウス及び抗体を作製するためのそれらの使用のさらなる記述については、例えば、Eren, R. et al. (1998) *Immunology* 93: 154 - 161; Reisner, Y. and Dagan, S. (1998) *Trends Biotechnol.* 16: 242 - 246; Ilan, E. et al. (1999) *Hepatology* 29: 553 - 562; 及び Bocher, W. O. et al. (1999) *Immunology* 96: 634 - 641 を参照されたい。

【0113】

インビボ生成された抗体産生細胞から開始して、Kohler と Milstein によって最初に記載されたハイブリドーマ技術などの標準化された技術を用いて、モノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体を作製し得る(1975, Nature 256:495-497)(Brown et al.(1981) J. Immunol 127:539-46; Brown et al.(1980) J Biol Chem 255:4980-83; Yeh et al.(1976) PNAS 76:2927-31; 及び Yeh et al.(1982) Int. J. Cancer 29:269-75も参照されたい。)。モノクローナル抗体ハイブリドーマを作製する技術は、十分に公知である(一般的には、R. H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54:387-402; M. L. Gefter et al., (1977) Somatic Cell Genet., 3:231-36を参照されたい。)。要約すれば、不死化された細胞株(典型的には、骨髄腫)は、本発明のA グロブリン又はその誘導体で免疫された哺乳動物のリンパ球(典型的には、脾細胞又はリンパ節細胞又は末梢血リンパ球)と融合され、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定するために、得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングする。この目的のために、リンパ球及び不死化された細胞株を融合するための多くの周知のプロトコールのうち何れをも使用することが可能である(G. Galfre et al., (1977) Nature 266:550-52; Gefter et al., Somatic Cell Genet (上で引用); Lerner, Yale J. Biol. Med. (上で引用); Kenneth, Monoclonal Antibodies (上で引用)も参照されたい。)。さらに、当業者は、同様に有用であるこのような方法の多様な変形が存在することを理解する。典型的には、不死化された細胞株(例えば、骨髄腫細胞株)は、リンパ球と同じ哺乳動物種から得られる。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫されたマウスから得られたリンパ球を、不死化されたマウス細胞株と融合することによって確立され得る。好ましい不死化された細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン(HAT培地)を含有する培地に対して感受性であるマウス骨髄腫細胞株である。骨髄腫細胞株の多数の何れも、例えば、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653又はSp2/O-Ag14骨髄腫細胞株を、融合対として、当初からby default使用し得る。これらの骨髄腫細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)、Manassas, Virginiaから入手することができる。典型的には、HAT感受性マウス骨髄腫細胞は、ポリエチレングリコール(PEG)を用いて、マウス脾細胞に融合される。次いで、HAT培地を使用し、これにより、融合されていない骨髄腫細胞及び非生産的に融合された骨髄腫細胞を死滅させることによって(融合されていない脾細胞は形質転換されていないので、数日後に死亡する。)、融合から得られたハイブリドーマ細胞株を選択する。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば、上に定義されているように結合親和性を有する抗体を選択するために、ドットプロットアッセイを用いることによって、このような抗体に対してハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって同定される。モノクローナル抗体10F4及び3C5の全ては、上記インビボアプローチを用いて作製され、本明細書に定義されているハイブリドーマから取得することができる。

【0114】

同様に、前記ハイブリドーマは、以下でさらに詳しく記載されているように、本発明の抗体を組換え的に産生するために、軽鎖及び/又は重鎖をコードする核酸の源として使用することができる。

【0115】

インビトロアプローチ:

免疫化及び選択によって本発明の抗体を生産する別の方法として、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングし、これにより、必要とされる結合親和性を有する免疫グロブリンライブラリーの要素を単離することによって、本発明の抗体

を同定及び単離し得る。ディスプレイライブラリーを作製し、スクリーニングするためのキットは、市販されている（例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01；及び Stratagene SurfZAP^(R) Phage Display Kit、カタログ番号240612）。多くの実施形態において、ディスプレイライブラリーはscFvライブラリー又はFabライブラリーである。組換え抗体ライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ技術は、十分に記載されている。抗体ディスプレイライブラリーを作製し、スクリーニングするために特に有利に使用することができる方法及び化合物の例は、例えば、McCaffertyらWO92/01047、米国特許第5,969,108号及び欧州特許第589877号（特に、scFv displayを記載する。）、Ladnerら米国特許第5,223,409号、米国特許第5,403,484号、米国特許第5,571,698号、米国特許第5,837,500号及び欧州特許第436597号（例えば、pIII融合を記載する。）；DowerらWO91/17271、米国特許第5,427,908号、米国特許第5,580,717号及び欧州特許第527839号（特に、Fabディスプレイを記載する。）；WinterらInternational PublicationWO92/20791号及び欧州特許368,684号（特に、可変免疫グロブリンドメインに対する配列のクローニングを記載する。）；Griffithsらの米国特許第5,885,793号及び欧州特許第589877号（特に、組換えライブラリーを使用することによる、ヒト抗原に対するヒト抗体の単離を記載する。）；GarrardらWO92/09690（特に、ファージ発現技術を記載する。）；KnappikらWO97/08320（ヒト組換え抗体ライブラリーHuCalを記載する。）；SalfeldらWO97/29131（ヒト抗原（ヒト腫瘍壊死因子）に対する組換えヒト抗体の作製及び組換え抗体のインビトロ親和性成熟も記載する。）及びSalfeldらの米国仮特許出願第60/126,603号及びこれらに基づく特許出願（同様に、ヒト抗原（ヒトインターロイキン-12に対する組換えヒト抗体の作製及び組換え抗体のインビトロ親和性成熟も記載する。）に見出すことができる。

【0116】

組換え抗体ライブラリーのスクリーニングのさらなる記述は、Fuchs et al., (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al., (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al., (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths et al., (1993) EMBOJ 12:725-734; Hawkins et al., (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clarkson et al., (1991) Nature 352:624-628; Gram et al., (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard et al., (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al., (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; Barbas et al., (1991) PNAS 88:7978-7982; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; 及びKnappik et al., (2000) J. Mol. Biol. 296:57-86などの科学的な刊行物中に見出すことができる。

【0117】

バクテリオファージディスプレイ系の使用に代えて、組換え抗体ライブラリーは、酵母細胞又は細菌細胞の表面上に発現され得る。WO99/36569は、酵母細胞の表面上に発現されたライブラリーを調製し、スクリーニングする方法について記載する。WO98/49286は、細菌細胞の表面上に発現されたライブラリーを調製し、スクリーニングする方法についてさらに詳しく記載する。全てのインビトロアプローチにおいて、所望の特性を有する組換え抗体を濃縮するための選択方法は、該方法の不可欠な部分を形成し、これは、一般的に、「パニング」と呼ばれ、しばしば、そのマトリックスに標的構造が

付着されたカラム上のアフィニティークロマトグラフィーの形態を採る。次いで、好ましくは標準化されたドットプロットアッセイを用いて、有望な候補分子を、それらの絶対的及び/又は相対的親和性の個別的測定に供する。

【0118】

コンビナトリアルライブラリーの目的の抗体が一旦同定され、十分に性質決定されたら、前記抗体の軽鎖及び重鎖をコードするDNA配列は、標準化された分子生物学的技術を用いて、例えば、ライブラリースクリーニングの間に単離されたディスプレイパッケージ（例えば、ファージ）からのDNAのPCR増幅を用いて単離される。PCRプライマーを調製するために使用し得る軽及び重抗体鎖に対する遺伝子のヌクレオチド配列は、当業者に公知である。このような配列の複数が、例えば、「Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242」及びヒト生殖系列VBASEの配列のデータベースに記載されている。

10

【0119】

本発明の抗体又は抗体部分は、宿主細胞中で、軽及び重免疫グロブリン鎖に対する遺伝子を組換え的に発現することによって作製され得る。抗体を組換え的に発現させるために、前記抗体の軽及び重免疫グロブリン鎖をコードすることにより、宿主細胞中の軽鎖及び重鎖を発現し、好ましくは前記宿主細胞がその中で培養されている培地中にそれらを分泌するDNA断片を担持する1つ又はそれ以上の組換え発現ベクターで、宿主細胞が形質移入される。抗体は、この培地から単離することが可能である。重及び軽抗体鎖に対する遺伝子を取得し、前記遺伝子を組換え発現ベクター中に挿入し、前記ベクターを宿主細胞中に導入するために、標準化された組換えDNA法が使用される。この種の方法は、例えば、「Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds.), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) 及びBossらの米国特許第4,816,397号に記載されている。

20

30

【0120】

目的の抗体のVH及びVLセグメントをコードするDNA断片が取得されたら、該DNA断片は、例えば、可変領域に対する遺伝子を完全長抗体鎖に対する遺伝子に、Fab断片に対する遺伝子に、又はscFv遺伝子に変換するために、標準化された組換えDNA技術を用いてさらに操作され得る。これらの操作は、VL又はVHをコードするDNA断片を、別のタンパク質、例えば、定常抗体領域又は柔軟なリンカーをコードする別のDNA断片に作用可能に連結することを含む。本明細書において「作用可能に連結された」という用語は、2つのDNA断片によってコードされたアミノ酸配列が翻訳領域内部に保たれるように、2つのDNA断片が連結されることを意味することと理解すべきである。VH領域をコードする単離されたDNAは、VHをコードするDNAを重鎖定常領域をコードする別のDNA分子(CH1、CH2及びCH3)と作用可能に連結することによって、完全長重鎖に対する遺伝子へと変換し得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、周知であり（例えば、Kabat, E. A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照）、前記領域を包含するDNA断片は、標準化されたPCR増幅を用いて取得し得る。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgE又はIgDから得られる定常領域であり得、IgG、特に、IgG1又はIgG4

40

50

由来の定常領域が好ましい。重鎖 F a b 断片に対する遺伝子を得るために、V H をコードする D N A は、重鎖定常領域 C H 1 のみをコードする別の D N A 分子へ作用可能に連結され得る。V L 領域をコードする単離された D N A は、V L をコードする D N A を、軽鎖定常領域 C L をコードする別の D N A 分子に作用可能に連結することによって、完全長軽鎖に対する遺伝子（及び F a b 軽鎖に対する遺伝子）へと変換され得る。ヒト軽鎖の定常領域の遺伝子の配列は、周知であり（K a b a t , E . A . , e t a l . , (1 9 9 1) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U . S . Department of Health and Human Services, N I H Publication No . 9 1 - 3 2 4 2 を参照）、前記領域を包含する D N A 断片は、標準化された P C R 増幅を用いて取得し得る。軽鎖定常領域は、又は定常領域であり得るが、定常領域が好ましい。

10

【 0 1 2 1 】

s c F v 遺伝子を作製するために、V H 及び V L 配列が連続する一本鎖タンパク質として発現され、V L 及び V H 領域が柔軟なリンカーによって互いに連結されるように、V H 及び V L をコードする D N A 断片は、柔軟なリンカーをコードする別の断片（例えば、アミノ酸配列（G l y ₄ - S e r ₃）へ、作用可能に連結され得る（B i r d e t a l . (1 9 8 8) Science 2 4 2 : 4 2 3 - 4 2 6 ; H u s t o n e t a l . (1 9 8 8) Proc . Natl . Acad . S d . U S A 8 5 : 5 8 7 9 - 5 8 8 3 ; M c C a f f e r t y e t a l , Nature (1 9 9 0) 3 4 8 : 5 5 2 - 5 5 4 参照）。

20

【 0 1 2 2 】

上記結合親和性を有する単一のドメイン V H 及び V L は、上記方法によって、単一ドメインライブラリーから単離され得る。所望の結合親和性を有する 2 つの V H 単一ドメイン鎖（C H 1 あり又はなし）又は 2 つの V L 鎖又は 1 つの V H 鎖及び 1 つの V L 鎖の対は、本発明の抗体に対して本明細書に記載されているように有用であり得る。

【 0 1 2 3 】

本発明の組換え抗体又は抗体部分を発現させるために、遺伝子を適切な転写調節配列及び翻訳調節配列へ作用可能に連結するように、部分又は完全長軽鎖及び重鎖をコードする D N A は発現ベクター中に挿入され得る。この文脈において、「作用可能に連結された」という用語は、ベクター内の転写調節配列及び翻訳調節配列が、抗体遺伝子の転写及び翻訳を制御するという所期の機能を充足するように、抗体遺伝子がベクター中に連結されていることを意味するものと理解すべきである。都合よく、発現ベクター及び発現調節配列は、使用される発現宿主細胞と適合的であるように選択される。抗体軽鎖に対する遺伝子及び抗体重鎖に対する遺伝子は、別個のベクター中に挿入され得、又は両遺伝子は同一の発現ベクター中に挿入され、これが通常の事例である。抗体遺伝子は、標準化された方法を（例えば、抗体遺伝子断片及びベクター上の相補的制限切断部位の連結によって、又は制限切断部位が存在しなければ、平滑末端連結によって）用いて発現ベクター中に挿入される。発現ベクターは、軽鎖及び重鎖に対する配列の挿入の前に、抗体定常領域に対する配列を既に担持し得る。例えば、1 つのアプローチは、V H 及び V L 配列を、それぞれ、重鎖及び軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクター中に挿入し、これにより、ベクター内において、V H セグメントを C H セグメントに作用可能に連結し、また、ベクター内において、V L セグメントを C L セグメントへ作用可能に連結することによって、V H 及び V L 配列を完全長抗体遺伝子へ変換することである。

30

40

【 0 1 2 4 】

これに加えて又はこれに代えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードし得る。前記抗体鎖に対する遺伝子をベクター中にクローニングし、これにより、抗体鎖に対する遺伝子の N 末端へ、翻訳領域内にシグナルペプチドを連結し得る。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチド又は異種のシグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）

50

であり得る。抗体鎖に対する遺伝子に加えて、本発明の発現ベクターは、宿主細胞中の抗体鎖に対する遺伝子の発現を調節する制御配列を有し得る。

【0125】

「制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー及び抗体鎖に対する遺伝子の転写又は翻訳を調節するさらなる発現調節要素（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むものとする。この種の制御配列は、例えば、「Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)」に記載されている。当業者は、制御配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現強度などの要因に依存し得ることを理解する。哺乳動物宿主細胞中での発現のための好ましい制御配列には、サイトメガロウイルス（CMV）（CMVプロモーター/エンハンサーなど）、サルウイルス40（SV40）（SV40プロモーター/エンハンサーなど）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP））及びポリオーマに由来するプロモーター及び/又はエンハンサーなど、哺乳動物細胞中に強い恒常的タンパク質発現をもたらすウイルス要素が含まれる。ウイルス制御要素及びその配列のさらなる記述については、例えば、Stinskiに対する米国特許第5,168,062号、Bellらに対する米国特許4,510,245号及びSchaffnerらに対する米国特許第4,968,615号を参照されたい。

10

【0126】

抗体鎖に対する遺伝子及び制御配列以外に、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中でのベクターの複製を制御する配列（例えば、複製起点）及び選択可能なマーカー遺伝子など、さらなる配列を有し得る。選択可能なマーカー遺伝子は、その中にベクターが導入される宿主細胞の選択を容易にする（例えば、全てAxelに対する米国特許第4,399,216号、米国特許第4,634,665号及び米国特許第5,179,017を参照されたい。）。例えば、選択可能なマーカー遺伝子は、その中にベクターが挿入される宿主細胞に対して、G418、ハイグロマイシン又はメトトレキサートなどの細胞毒性薬に対する耐性を付与するのが一般的である。好ましい選択可能なマーカー遺伝子には、（メトトレキサート選択/増幅とともに、dhfr^r宿主細胞中で使用するための）ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）に対する遺伝子及びneo遺伝子（G418選択用）が含まれる。

20

30

【0127】

軽鎖及び重鎖を発現させるために、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターは、標準化された技術を用いて、宿主細胞中に形質移入される。「形質移入」という用語の様々な形態は、原核又は真核宿主細胞中に外来DNAを導入するために一般に使用される技術の複数、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン形質移入などを包含するものとする。原核又は真核宿主細胞の何れの中でも、本発明の抗体を発現することは理論的に可能であるが、真核細胞、特に、哺乳動物細胞中では、原核細胞中に比べて、適切に折りたたまれ、免疫学的に活性な抗体を組み立て、及び分泌する確率がより高いので、真核細胞、特に哺乳動物宿主細胞中で抗体を発現させることが好ましい。抗体遺伝子の原核発現は、活性な抗体の高い収率の産生には有効でないことが報告されている（Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6: 12 - 13）。

40

【0128】

本発明の組換え抗体を発現するための好ましい哺乳動物宿主細胞には、CHO細胞（Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 - 4220に記載されており、例えば、R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601 - 621に記載されているようにDHFR-選択可能マーカーとともに使用されるdhfr^r-CHO細胞を含む。）、NSO骨髓腫細胞、COS細胞及びSP2細胞が含まれる。抗体

50

遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞中に導入すると、抗体が前記宿主細胞中で発現されるまで、又は、好ましくは、宿主細胞がその中で増殖している培地中に抗体が分泌されるまで、宿主細胞を培養することによって抗体が産生される。次いで、抗体は、標準化されたタンパク質精製方法を用いることによって、培地から単離され得る。同様に、F a b断片又はs c F v分子など、完全な状態の抗体の部分を作製するために、宿主細胞を使用することが可能である。上記操作の変形は、もちろん、本発明に含まれる。例えば、本発明の抗体の軽鎖又は重鎖の何れか（但し、両鎖ではない。）をコードするDNAで宿主細胞を形質移入することが望ましい場合があり得る。目的の抗原の結合のために必要とされない軽鎖又は重鎖が存在する場合には、このような軽鎖又はこのような重鎖又は両鎖をコードするDNAは、組換えDNA技術を用いて、部分的に又は完全に除去され得る。このような末端切断されたDNA分子によって発現された分子は、同様に、本発明の抗体に含まれる。さらに、標準化された化学的方法を用いて本発明の抗体を第二の抗体に架橋することによって、1つの重鎖及び1つの軽鎖が本発明の抗体であり、他の重鎖及び他の軽鎖が、目的の抗原とは異なる抗原に対して特異性を有する二機能性抗体を作製することが可能である。

10

【0129】

本発明の抗体又はその抗原結合部分の組換え発現用の好ましい系では、リン酸カルシウムによって媒介された形質移入を用いて、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、d h f r⁻ CHO細胞中に導入される。組換え発現ベクター内で、抗体重鎖及び軽鎖に対する遺伝子は、各事例において、前記遺伝子の強い転写を実施するために、制御CMVエンハンサー/A d M P Lプロモーター要素へ作用可能に連結されている。組換え発現ベクターは、メトレキサート選択/増幅を使用することによって、ベクターで形質移入されたd h f r⁻ CHO細胞を選択するために使用可能なD H F R遺伝子も担持する。選択された被形質転換宿主細胞は、重及び軽抗体鎖が発現され、完全な状態の抗体が培地から単離されるように培養される。組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞を形質移入し、形質転換体を選択し、前記宿主細胞を培養し、培地から抗体を回収するために、標準化された分子生物学的技術が使用される。従って、本発明は、本発明の組換え抗体が合成されるまで、適切な培地中で、本発明の宿主細胞を培養することによって、本発明の組換え抗体を合成する方法に関する。この方法は、前記培地から前記組換え抗体を単離することをさらに含み得る。

20

30

【0130】

ファージディスプレイによって、組換え抗体ライブラリーをスクリーニングする代わりに、巨大なコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングして本発明の抗体を同定するために、当業者に公知の他の方法を使用し得る。基本的には、核酸と該核酸によってコードされる抗体との間の密接な物理的連結が確立され、及び核酸配列がコードする抗体の特性によって適切な核酸配列を選択するために使用され得る全ての発現系を使用し得る。別の発現系の1つの種類において、組換え抗体ライブラリーは、S z o s t a k及びR o b e r t sに対するW O 9 8 / 3 1 7 0 0並びに「R o b e r t s , R . W . a n d S z o s t a k , J . W . (1 9 9 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 4 : 1 2 2 9 7 - 1 2 3 0 2」に記載されているように、RNA-タンパク質融合物の形態で発現される。この系では、3'末端上にピューロマイシン（ペプチジルアクセプター抗生物質）を担持する合成mRNAのインビトロ翻訳は、mRNA及びこれによってコードされるペプチド又はタンパク質の共有的融合をもたらす。従って、mRNAの複雑な混合物（例えば、コンビナトリアルライブラリー）の特定のmRNAは、A（12-42）グロブマー又はその誘導体への前記抗体又は前記抗体の前記部分の結合など、コードされるペプチド又はタンパク質の（例えば、抗体又はその部分の）特性に基づいて濃縮され得る。抗体又はその部分をコードし、このようなライブラリーのスクリーニングによって得られる核酸配列は、上述のように（例えば、哺乳動物宿主細胞中で）組換え手段によって発現され得、さらに、mRNA-ペプチド融合物をさらなるラウンドにおいてスクリーニングし、最初に選択された配列中に変異を導入することによって、又は上述のように組

40

50

換え抗体のインビトロアフィニティー成熟の他の方法を用いることによって、さらなる親和性成熟に供され得る。

【0131】

インビボとインビトロアプローチの組み合わせ

同様に、A (12-42) グロブリン又はその誘導体を、まず、インビボで、宿主動物中の抗体レパートリーに対して作用させて、A (12-42) グロブリン又は誘導体結合抗体の産生を刺激した後、1つ又はそれ以上のインビトロ技術の補助を得て、さらなる抗体選択及び/又は抗体成熟(すなわち、最適化)が達成される方法など、インビボとインビトロアプローチの組み合わせを使用することによって、本発明の抗体を作製し得る。一実施形態によれば、この種の組み合わせられた方法は、まず、抗原に対する抗体応答を刺激するために、前記A (12-42) グロブリン又はその誘導体でヒト以外の動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ科の動物、ヒツジ若しくはヤギ又はこれらのトランスジェニック様式又はキメラマウス)を免疫化し、次いで、前記A (12-42) グロブリン又は誘導体の作用によってインビボで刺激されたリンパ球の免疫グロブリン配列を使用することによって、ファージディスプレイ抗体ライブラリーを調製及びスクリーニングすることを含み得る。この組み合わせ操作の第一の工程は、インビボアプローチと組み合わせる上記の様式で実施され得るが、この操作の第二の工程は、インビトロアプローチと組み合わせる上記の様式で実施され得る。前記刺激されたリンパ球から調製されたファージディスプレイライブラリーのその後のインビトロスクリーニングによって非ヒト動物を過免疫化する好ましい方法には、BioSite Inc.によって記載される方法に含まれ、例えば、WO 98/47343、WO 91/17271、米国特許第5,427,908号及び米国特許第5,580,717号を参照されたい。

10

20

【0132】

別の実施形態によれば、組み合わせられた方法は、まず、A (12-42) グロブリン又はその誘導体に対する抗体応答を刺激するために、本発明のA (12-42) グロブリン又はその誘導体でヒト以外の動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ科の動物、ヒツジ若しくはヤギ又はこれらのノックアウト及び/又はトランスジェニック様式又はキメラマウス)を免疫化し、(例えば、免疫化された動物から調製された)ハイブリドーマをスクリーニングすることによって、所望の特異性を有する抗体を作製するリンパ球を選択することを含む。抗体又は単ドメイン抗体に対する遺伝子は、(逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応などの標準化されたクローニング方法を用いて)選択されたクローンから単離され、選択された1つ又は複数の抗体の結合特性を改善するために、インビトロアフィニティー成熟に供される。この操作の第一の工程は、インビボアプローチに関連する上記様式で実施され得るのに対して、この操作の第二の工程は、特に、WO 97/29131及びWO 00/56772に記載されているものなど、インビトロアフィニティー成熟の方法を用いることによって、インビトロアプローチに関連して上述されている様式で実施され得る。

30

【0133】

さらなる組み合わせられた方法において、組換え抗体は、選択リンパ球抗体法(SLAM; selected lymphocyte antibody method)として当業者に公知であり、米国特許第5,627,052号、WO 92/02551及びBabcock, J. S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848に記載されている操作を使用することによって、個別の単離されたリンパ球から作製される。この方法では、まず、オリゴマー又は誘導体への免疫応答を刺激するために、A (12-42) グロブリン又はその誘導体で、ヒト以外の動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ科の動物、ヒツジ、ヤギ若しくはこれらのトランスジェニック様式、又はキメラマウス)をインビボで免疫化し、次いで、抗原特異的溶血斑アッセイを用いることによって、目的の抗体を分泌する個別の細胞を選択する。この目的のために、グロブリン又はその誘導体又は構造的に関連する目的の分子は、ピオチンなどのリンカーを用いて、ヒツジ赤血球に結合し、これに

40

50

より、溶血斑アッセイを使用することによって、適切な特異性を有する抗体を分泌する個別の細胞を同定することを可能とし得る。目的の抗体を分泌する細胞の同定に続き、逆転写酵素PCRによって、軽鎖及び重鎖の可変領域に対するcDNAを細胞から取得し、次いで、COS又はCHO細胞などの哺乳動物宿主細胞中で、適切な免疫グロブリン定常領域（例えば、ヒト定常領域）に付随して、前記可変領域を発現し得る。インビトロで選択されたリンパ球に由来する増幅された免疫グロブリン配列で形質移入された宿主細胞は、次いで、例えば、結合親和性を有する抗体を発現する細胞を単離するために、形質移入された細胞を伝播させることによって、さらなるインビトロ分析及びインビボ選択に供され得る。増幅された免疫グロブリン配列は、さらに、インビトロで操作され得る。

【0134】

本明細書に定義されている必要とされる親和性を有する抗体は、実質的に上述されているドットプロットを実施することによって選択することができる。簡潔に述べると、系列希釈して、抗原を固体マトリックスに付着させ、好ましくはニトロセルロース膜上に点状に付着させる。次いで、固定化された抗原を目的の抗体と接触させた後、酵素連結された二次抗体及び比色反応を用いた抗体の検出を行う。所定の抗体及び抗原濃度で、結合された抗体の量が、アフィニティー測定を可能とする。従って、1つの標的への2つの異なる抗体の相対的親和性又は2つの異なる標的への1つの抗体の相対的親和性は、本明細書において、その他は同一のドットプロット条件下で、2つの抗体-標的組み合わせを用いて観察された標的結合された抗体のそれぞれの量の関係として定義される。モノクローナル抗体10F4又は3C5と同一のエピトープに結合する抗体は、それ自体公知の様式で取得することが可能である。

【0135】

上記抗体が競合され得るのと同様に、これらの構造の少なくとも1つは、好ましくは重複するエピトープ又は同一のエピトープ、より好ましくは同一のエピトープを提供することによって、別の構造の測定可能な結合を特異的に低下させることができれば、本明細書において、異なる標的構造は、特定の抗体に対して「競合する」と称される。標的実体との競合は、このような標的構造に対するそれらの相対的親和性によって抗体を直接的に選択するのに有用である。従って、競合実体、例えば、異なって標識された競合構造の区別可能な形態を目的の抗体と接触させ、抗体によって結合されるこれらの実体の相対量から、これらの実体の各々に対する抗体の相対的親和性を推定する競合アッセイを使用することによって、相対的親和性を直接測定し得る。より大きな親和性が望まれる実体を固体マトリックス支持体に付着させ、培地に対してより小さな親和性が望まれる競合実体の適切な量、好ましくは、モル過剰を添加することによって、標的実体に対する所望の相対的親和性を有する抗体を直接濃縮するために、このような競合を使用し得る。従って、所望の相対的親和性を示す抗体は、他の抗体より強くマトリックスに結合する傾向があり、例えば、低い塩濃度で洗浄した後、高い塩濃度を使用することにより、結合した抗体をその標的から可逆的に剥離させることによって結合した抗体を採集することによって、より望ましくない形態を洗浄除去した後に取得され得る。所望であれば、濃縮を数回繰り返して実施し得る。例えば、ハイブリドーマ又は抗原をディスプレイするファージ又は酵母細胞のプール中で、抗体の基礎を成す遺伝子型がこの抗体に物理的に関連付けられている本発明の特定の実施形態では、対応する表現型が救出され得る。

【0136】

本発明の別の実施形態において、抗体の相対的親和性が固定化された抗原に結合されたパーセントから推測できるように、抗体結合に関して、固定化された抗原が溶解された実体と競合する修飾されたドットプロットが使用される。パバイン又はペプシンでの消化など慣用技術を使用することによって、完全な抗体から、Fab及びF(ab')₂断片などの抗体部分を作製し得る。さらに、抗体、抗体部分及び免疫接着分子は、標準化された組換えDNA技術を使用することによって取得し得る。

【0137】

本発明は、本発明の抗体を含み、医薬として適切な担体の場合によって含む薬剤（組成

10

20

30

40

50

物)にも関する。

本発明の医薬組成物は、少なくとも1つの追加の治療剤、例えば、その緩和のために本発明の抗体が有用である疾病の治療のための1つ又はそれ以上のさらなる治療剤をさらに含有し得る。例えば、本発明の抗体が本発明のグロブリンに結合すれば、医薬組成物は、さらに、前記グロブリンの活性が重要である疾患の治療に有用である1つ又はそれ以上の追加の治療剤を含有し得る。医薬として適切な担体には、生理的に適合性がある限り、全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などが含まれる。医薬として許容される担体には、例えば、水、生理的食塩水、リン酸緩衝化された生理的食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどの及びこれらの組み合わせが含まれる。多くの事例で、等張剤、例えば、糖、マニトール若しくはソルビトールなどの多価アルコール又は塩化ナトリウムをさらに使用することが好ましい。医薬として適切な担体は、抗体の半減期又は効力を増強する、湿潤剤又は乳化剤、防腐剤又は緩衝剤などの補助物質の比較的少量をさらに含有し得る。医薬組成物は、例えば、非経口投与に適切であり得る。ここで、抗体は、好ましくは、0.1から250 mg/mLの抗体含量を有する注射可能溶液として調製される。注射可能溶液は、液体又は凍結乾燥された形態で調製され得、剤形は、フリントガラス又はバイアル、アンプル又は予め充填された注射器である。緩衝液は、L-ヒスチジン(1から50 mM、好ましくは、5から10 mM)を含有し得、5.0から7.0、好ましくは6.0のpHを有する。さらに、適切な緩衝液には、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム又はリン酸カリウム緩衝液が含まれるが、これらに限定されない。0から300 mMの濃度に(好ましくは、液体剤形に対して150 mM)の溶液の浸透圧を調整するために、塩化ナトリウムを使用し得る。凍結乾燥された剤形に対して、凍結保護剤、例えば、スクロース(例えば、0から10%、好ましくは、0.5から1.0%)も含め得る。他の適切な凍結保護剤は、トレハロース及びラクトースである。凍結乾燥された剤形に対して、充填剤、例えば、マニトール(例えば、10%、好ましくは、2から4%)も含め得る。液体及び凍結乾燥された剤形の両方に、安定化剤、例えば、L-メチオニン(例えば、51から50 mM、好ましくは5から10 mM)を使用し得る。さらなる適切な充填剤は、グリシン及びアルギニンである。界面活性剤、例えば、ポリソルベート80(例えば、0.05%、好ましくは、0.005から0.01%)も使用し得る。さらなる界面活性剤は、ポリソルベート20及びBRIJ界面活性剤である。

【0138】

本発明の組成物は、多様な形態を有し得る。これらには、液体溶液(例えば、注射可能及び注入可能な溶液)、分散液又は懸濁液、錠剤、丸薬、粉末、リポソーム及び坐剤などの液体、半固体及び固体剤形が含まれる。好ましい形態は、予定される投与の種類及び治療用途に依存する。典型的には、注射可能溶液又は注入可能溶液の形態の組成物、例えば、ヒトの受動免疫のための他の抗体と類似する組成物が好ましい。投与の好ましい経路は、非経口(例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内)である。好ましい実施形態によれば、抗体は、静脈内注入又は注射によって投与される。別の好ましい実施形態によれば、抗体は、筋肉内又は皮下注射によって投与される。治療組成物は、典型的には、調製及び保存条件下で、無菌及び安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム又は活性物質の高濃度に適したその他の秩序化された構造として製剤化され得る。無菌注射可能溶液は、適宜、必要であれば、上記成分の1つ又は組み合わせとともに、必要な量で活性化合物(すなわち、抗体)を適切な溶媒中に導入し、次いで、前記溶液を滅菌ろ過することによって調製され得る。通常、分散液は、塩基性分散媒、及び、適宜、その他の必要とされる成分を含有する無菌ビヒクル中に活性化合物を導入することによって調製される。無菌注射可能溶液を調製するための凍結乾燥された無菌粉末の場合には、予め滅菌ろ過された溶液から、活性成分の粉末、及び、適宜、さらなる所望の成分の粉末を産生する真空乾燥及び粉末乾燥が好ましい調製方法である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合には、必要な粒径を維持することによって、又は界面活性剤を使用することによって維持し

10

20

30

40

50

得る。注射可能組成物の延長された吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチンを組成物中にさらに導入することによって実現され得る。

【0139】

本発明の抗体は、当業者に公知の方法の複数によって投与され得るが、多くの治療用途に対して好ましい投与の種類は、皮下注射、静脈内注射又は注入である。当業者は、投与の経路及び/又は種類が所望される結果に依存することを理解する。特定の実施形態によれば、活性化合物は、例えば、インプラント、経皮膏薬及び微小封入された放出系を含む持続的な放出又は調節された放出を有する製剤など、急速な放出に対して化合物を保護する担体とともに調製され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸などの生物分解可能な生体適合性ポリマーを使用し得る。このような製剤を調製する方法は、当業者に周知であり、例えば、「Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978」を参照されたい。

10

【0140】

特定の実施形態によれば、本発明の抗体は、例えば、不活性希釈剤又は代謝可能な食用担体中に入れて、経口投与され得る。また、抗体（及び、所望であれば、さらなる成分）を硬若しくは軟ゼラチンカプセル中に封入し、錠剤へと圧縮し、又は食物に直接添加し得る。経口治療的投与の場合、抗体は、賦形剤と混合され、経口錠剤、口腔錠、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップなどの形態で使用され得る。非経口経路以外の経路を介して本発明の抗体を投与することが予定される場合には、その不活化を妨げる材料からコーティングを選択することが必要であり得る。

20

【0141】

本発明は、アミロイドタンパク質が関与しており、及び、特に、本発明の前記グロブロマーの活性が重要である疾患に罹患している個体中の本発明のグロブロマーの活性を阻害する方法にも関する。抗体が結合するグロブロマーの活性を阻害する目的で、前記方法は、本発明の少なくとも1つの抗体を個体に投与することを含む。前記個体は、好ましくは、ヒトである。本発明の抗体は、治療目的のために、ヒト個体に投与され得る。さらに、本発明の抗体は、獣医目的のためにヒト以外の哺乳動物に投与され得、又は、特定の疾患に対する動物モデルの枠組み内に投与され得る。このような動物モデルは、（例えば、投与の用量及び時間を検査するために）本発明の抗体の治療的効力を評価するのに有用であり得る。

30

【0142】

本発明のグロブロマーが役割を果たしている疾患には、特に、その発達及び進行に、本発明のグロブロマーが関与している疾患が含まれる。これらは、特に、本発明のグロブロマーが、明らかに又はおそらく、疾患の病態生理の原因であり、又は前記疾患の発達及び/又は進行に寄与している因子である疾患である。従って、本発明のグロブロマーの活性の阻害が疾患の症候及び/又は進行を緩和させることができるこれらの疾患が本明細書に含まれる。このような疾患は、例えば、特定の疾患に罹患している個体の生物学的液体中の本発明のグロブロマーの増加された濃度（例えば、血清、血漿、CSF、尿中などの増加された濃度）によって確認することができる。これは、例えば、本発明の抗体を使用することによって検出され得る。本発明のグロブロマーは、神経変性要素、認知不全、神経毒性要素及び炎症性要素が関与する疾患の複数と関連する病理において重要な役割を果たしている。

40

【0143】

本発明の別の態様において、治療又は予防可能な疾患には、アミロイドーシスを伴う疾患が含まれる。本明細書において「アミロイドーシス」という用語は、身体の様々な組織中の特定のタンパク質（アミロイド、繊維性タンパク質及びこれらの前駆体）の異常な折り畳み、凝集塊形成、凝集及び/又は蓄積を特徴とする多数の疾患を表す。アルツハイマー病及びダウン症候群では神経組織が冒され、脳アミロイド血管症では血管が冒される。

50

本発明の医薬組成物は、本発明の抗体又は抗体部分の「治療的有効量」又は「予防的有効量」を含み得る。「治療的有効量」は、所望の治療的結果を達成するために必要な投薬量で、及び所望の治療的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。抗体又は抗体部分の治療的有効量は、当業者によって決定され得、病状、年齢、性別及び個体の体重並びに抗体又は抗体部分が個体内で所望の応答を惹起する能力などの因子に従って変動し得る。治療的有効量は、抗体又は抗体部分のあらゆる毒性効果又は有害な効果が、治療的に有益な効果によって凌駕される量でもある。「予防的有効量」は、所望の予防的結果を達成するために必要な投薬量で、及び所望の予防的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。疾病のより初期段階の前に又は疾病のより初期段階において、予防的投薬が対象中で使用されるので、通例、予防的有効量は、治療的有効量を下回る。

10

【0144】

さらに、本発明は、アルツハイマー病の予防又は治療を必要としている患者において、アルツハイマー病を予防又は治療するさらなる方法をさらに含む。この方法は、予防又は治療を実施するのに十分な量で、上記ワクチンを患者に投与する工程を含む。

【0145】

さらに、本発明は、アミロイドーシス、例えば、アルツハイマー病を発症すると予測されている患者の能動免疫に適した化合物を同定する方法を包含する。この方法は、1) 1つ又はそれ以上の化合物が1つ又は複数の抗体に結合するのに十分な時間及び条件下で、上記抗体の1つ又はそれ以上に目的の1つ又はそれ以上の化合物を曝露すること、2) 前記1つ又は複数の抗体に結合する化合物を同定することを含み、同定された化合物は、アミロイドーシス、例えば、アルツハイマー病を発症すると予測されている患者での能動免疫において使用される。

20

【0146】

抗体の診断的使用の枠内において、定性又は定量特異的グロブリン測定は、特に、疾病に関連するアミロイド形態を診断する役割を果たす。この文脈において、特異性とは、あるグロブリン又はその誘導体又はこれらの混合物を十分な感度で検出できる可能性を意味する。本発明の抗体は、試料の10 ng/mL未満、好ましくは試料の1 ng/mL未満、及び特に好ましくは試料の100 pg/mL未満の検出閾値濃度を有利に有し、少なくとも各事例に示されているmL試料当りのグロブリンの濃度、有利には、より低い濃度が、本発明の抗体によって検出可能であることを意味する。検出は、免疫学的に実施される。これは、原則として、凝集及び沈殿技術、イムノアッセイ、免疫組織学的方法並びにイムノプロット技術、例えば、ウェスタンブロットティング又は、好ましくは、ドットプロット法など、抗体が使用されるあらゆる分析又は診断アッセイ方法によって実施され得る。インビボ法では、例えば、画像化法も本発明に含まれる。

30

【0147】

イムノアッセイにおける使用が有利である。競合的イムノアッセイ(すなわち、抗原及び標識された抗原(追跡物質)が抗体結合を競合するアッセイ)及びサンドイッチアッセイ(すなわち、抗原への特異的抗体の結合が、第二の、通常は標識された抗体によって検出されるアッセイ)が、ともに適切である。これらのアッセイは、均一(すなわち、固相及び液相への分離がない。)又は不均一(すなわち、結合された標識が、例えば、固相に結合された抗体を介して、結合されていない抗体から分離されている。)の何れかであり得る。標識化及び測定の方法に応じて、様々な不均一及び均一イムノアッセイフォーマットは、特定のクラスに、例えば、RIA(ラジオイムノアッセイ)、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、FIA(蛍光イムノアッセイ)、LIA(発光イムノアッセイ)、TRFIA(時間分解FIA)、IMAC(免疫活性化(immunactivation))、EMIT(酵素増倍免疫検査)、TIA(免疫比濁法)、I-PCR(イムノPCR)に分類することができる。

40

【0148】

発明のグロブリン定量の場合、追跡物質としての役割を果たす標識されたグロブリン

50

ー誘導体の所定量が、使用されている抗体への結合について定量されるべき試料（標識されていないグロブロマーの未知の量を含む。）のグロブロマーと競合する競合的イムノアッセイが好ましい。試料中の抗原の量、すなわち、グロブロマーの量は、標準曲線の補助を得て、置換された追跡物質の量から測定することが可能である。

【0149】

これらの目的のために利用可能な標識のうち、酵素が有利であることが判明している。ペルオキシダーゼ、特に西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及び -Dガラクトシダーゼに基づく系が、例えば使用され得る。例えば、その転化を分光学的にモニターすることができる特異的な基質をこれらの酵素に対して利用することが可能である。適切な基質系は、アルカリホスファターゼに対しては、p-ニトロフェニルホスファート（p-NPP）、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスファート/ニトロブルーテトラゾリウム（BCIP/NPT）、ファーストレッド/ナフトール-AS-TSホスファート；ペルオキシダーゼに対しては、2,2-アジノビス（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS）、o-フェニレンジアミン（OPT）、3,3',5,5'-テトラメチルベンジン（TMB）、o-ジアニシジン、5-アミノサリチル酸、3-ジメチルアミノ安息香酸（DMAB）及び3-メチル-2-ベンゾチアゾリンヒドラゾン（MBTH）；-ガラクトシダーゼに対しては、o-ニトロフェニル-D-ガラクトシド（o-NPG）、p-ニトロフェニル-D-ガラクトシド及び4-メチルウンベリフェニル-D-ガラクトシド（MUG）に基づく。多くの事例で、これらの基質系は、即時使用形態で、例えば、適切な緩衝液などのさらなる試薬も含有し得る錠剤の形態で市販されている。使用される追跡物質は、標識されたグロブロマーであり得る。この意味で、特定のグロブロマーは、測定されるべきグロブロマーを標識し、これを追跡物質として使用することによって測定することが可能である。追跡物質を調製するための、グロブロマーへの標識の結合は、それ自体公知の様式で実施され得る。本発明のグロブロマーの誘導体化に関する上記コメントは、類推によって表記されている。さらに、タンパク質への連結のために適切に修飾された多数の標識、例えば、ビオチン、アビジン、エクストラビジン又はストレプトアビジン連結された酵素、マレイミドで活性化された酵素などが利用可能である。これらの標識は、オリゴマーと直接、又は、必要であれば、追跡物質を与えるために適切に誘導体化されたグロブロマーと反応され得る。例えば、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ連結体を使用される場合には、次いで、これは、まず、グロブロマーのビオチン化を必要とする。これは、逆の順序に対しても準用される。この目的のための適切な方法は、当業者にも公知である。

【0150】

異種のイムノアッセイフォーマットが選択されるのであれば、例えば、支持体に結合された抗イディオタイプ抗体、例えば、ウサギIgGに対して誘導された抗体を介して、抗原抗体複合体を支持体に結合することによって抗原抗体複合体を分離し得る。適切な支持体、特に、適切な抗体で被覆されたマイクロタイタープレートが公知であり、一部は市販されている。

【0151】

さらに、本発明は、少なくとも1つの上記抗体及びさらなる成分を有するイムノアッセイセットに関する。前記セットは、通常、本発明のグロブロマー測定を実施するための手段の組み合わせであるパッケージング単位の形態である。取り扱いを可能な限り容易にするために、前記手段は、好ましくは、実質的に即時使用形態で提供される。有利な配置は、キットの形態のイムノアッセイを与える。キットは、通常、成分を分離して配置するための複数の容器を含む。全ての成分は、即時使用希釈液中に、希釈するための濃縮物として、又は溶解若しくは懸濁するための乾燥物質若しくは凍結乾燥物として与えることができ、個々の又は全ての成分は、凍結され、又は使用まで室温で保存され得る。これらの事例において、イムノアッセイは、好ましくは、使用前に凍結温度以下の温度に保たなければならないので、血清は、好ましくは、例えば-20で、瞬間凍結される。イムノアッセイとともに供給されるさらなる成分は、前記イムノアッセイの種類に依存する。通常、

10

20

30

40

50

標準的なタンパク質、必要とされ得る又は必要とされ得ない追跡物質及び対照血清が、抗血清とともに供給される。さらに、マイクロタイプレート（好ましくは、抗体で被覆されている。）、例えば、検査用、洗浄用又は基質の転化用緩衝液及び酵素基質自体も含まれ得る。

【0152】

イムノアッセイの一般的な原理並びに研究室及び病院での補助具としての抗体の作製及び使用は、例えば、「Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow, E., and Lane, D., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988) 中に見出すことができる。

10

【0153】

本発明は、アミロイドーシスを有することが疑われている患者において、アミロイドーシス、例えば、アルツハイマー病を診断する方法も含む。この方法は、1) 患者から生物学的試料を単離する工程；2) 抗原/抗体複合体の形成のために十分な時間及び条件下で、上記抗体の少なくとも1つと生物学的試料を接触させる工程；及び3) 前記試料中の抗原/抗体複合体の存在を検出する工程を含み、複合体の存在が、患者中のアミロイドーシス、例えば、アルツハイマー病の診断を示唆する。抗原は、グロブロマーであり得、又は、例えば完全なグロブロマーと同じ機能的特性（例えば、結合活性）を有するその一部若しくは断片であり得る。

20

【0154】

さらに、本発明は、アミロイドーシスを有することが疑われている患者において、アミロイドーシス、例えば、アルツハイマー病を診断する別の方法を含む。この方法は、1) 生物学的試料を患者から単離する工程；2) 抗体/抗原複合体の形成のために十分な時間及び条件下で、生物学的試料を抗原と接触させる工程；3) 結合された抗体に連結体を結合させるのに十分な時間及び条件下で、得られた抗体/抗原複合体に連結体を添加する工程（前記連結体は、検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物に付着された、上記抗体の1つを含む。）、及び4) 前記シグナル生成化合物によって生成されたシグナルを検出することによって、前記生物学的試料中に存在し得る抗体の存在を検出する工程（前記シグナルは前記患者中のアミロイドーシス、例えばアルツハイマー病の診断を示す。）を含む。抗原はグロブロマーであり得、又は完全なグロブロマーと同じ機能的特性（例えば、結合活性）を有するその一部若しくは断片であり得る。

30

【0155】

本発明は、アミロイドーシス、例えば、アルツハイマー病を有することが疑われている患者において、アミロイドーシス、例えば、アルツハイマー病を診断するさらなる方法を含む。この方法は、1) 生物学的試料を前記患者から単離する工程；2) 抗体/抗体複合体（該複合体は、生物学的試料中に存在する抗体を含有する。）の形成を可能とする十分な時間及び条件下で、生物学的試料を抗体（抗体は、上記抗体の1つに対して特異的である）と接触させる工程；2) 結合された抗体に連結体を結合させるのに十分な時間及び条件下で、得られた抗体/抗体複合体に連結体を添加する工程（前記連結体は、検出可能なシグナルを生成することができるシグナル生成化合物に結合する抗原を含む。）；並びに3) シグナル生成化合物によって生成されたシグナルを検出する工程を含み、シグナルは、前記患者中のアミロイドーシス、例えば、アルツハイマー病の診断を示す。

40

【0156】

また、本発明には、a) 上記抗体の少なくとも1つ、及びb) シグナル生成化合物に付着された抗体を含む連結体を含み、前記連結体の前記抗体が単離された抗体とは異なる、キットが含まれる。

【0157】

本発明は、a) 上記抗体の1つに対する抗体及びb) シグナル生成化合物に付着された抗原を含む連結体を含むキットも包含する。抗原はグロブロマーであり得、又はグロブロマーと同じ機能的な特徴（例えば、結合活性）を有するその断片若しくは一部であり得

50

る。

【0158】

本発明の1つの診断的实施形態において、本発明の抗体又はその一部は、固相上にコートされている(又は液相中に存在する。)。次いで、検査又は生物試料(例えば、全血、脳脊髄液、血清など)を固相と接触させる。抗原(例えば、グロブリン)が試料中に存在する場合には、このような抗原は、固相上の抗体に結合し、次いで、直接法又は間接法の何れかによって検出される。直接法は、単に、複合体そのものの存在を検出し、従って抗原の存在を検出することを含む。間接法では、連結体が、結合された抗原に添加される。連結体は、シグナル生成化合物又は標識に付着された第二の抗体を含み、第二の抗体は、結合された抗原を結合する。第二の抗体が結合された抗原に結合すると、シグナル生成化合物は、測定可能なシグナルを生成する。次いで、このようなシグナルは、検査試料中の抗原の存在を示す。診断用イムノアッセイにおいて使用される固相の例は、多孔性及び非多孔性材料、ラテックス粒子、磁気粒子、微粒子(米国特許第5,705,330号を参照。)、ビーズ、膜、マイクロタイターウェル及びプラスチックチューブである。固相材料の選択及び連結体中に存在する抗原又は抗体を標識する方法は、所望であれば、所望のアッセイフォーマット性能特性に基づいて決定される。

10

【0159】

上述のように、連結体(又は指標試薬)は、シグナル生成化合物又は標識に付着された抗体(又は、おそらく、アッセイによっては、抗抗体)を含む。このシグナル生成化合物又は「標識」は、それ自体検出可能であり、又は検出可能な生成物を生成させるための1つ又はそれ以上の追加の化合物と反応させ得る。シグナル生成化合物の例には、色素原、放射性同位体(例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 及び ^{14}C)、化学発光化合物(例えば、アクリジニウム)、粒子(可視又は蛍光)、核酸、錯化剤又は酵素(例えば、アルカリホスファターゼ、酸ホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ及びリボヌクレアーゼ)などの触媒が含まれる。酵素(例えば、アルカリホスファターゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼ)を使用する場合には、色素産生性、蛍光性又は発光性基質の添加が、検出可能なシグナルの生成をもたらす。時間分解蛍光、内部反射蛍光、増幅(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応)及びラマン分光法などの他の検出系も有用である。上記イムノアッセイによって検査され得る生物学的液体の例には、血漿、全血、乾燥された全血、血清、脳脊髄液又は組織及び細胞の水性又は有機水性抽出物が含まれる。

20

30

【0160】

本発明は、検査試料中の抗体の存在を検出するための方法も包含する。この方法は、(a)抗抗体/抗体複合体の形成を可能とするのに十分な時間及び条件下で、患者試料中の抗体に対して特異的な抗抗体(抗抗体は、患者試料中の抗体に結合する本発明の抗体である。)と、抗体を含有することが疑われる検査試料を接触させる工程、(b)得られた抗抗体/抗体複合体に連結体を添加する工程(前記連結体は、検出可能なシグナルを検出することができるシグナル生成化合物に付着された抗原(抗抗体に結合する。))を含む。)、及び(d)シグナル生成化合物によって生成されたシグナルを検出することによって、検査試料中に存在し得る抗体の存在を検出する工程を含む。抗抗体に対する抗体を含む対照又は標準物質を使用し得る。

40

【0161】

キットも、本発明の範囲に含まれる。より具体的には、本発明は、アルツハイマー病又は認知障害を特徴とする別の症状を有すると疑われる患者中の抗原(例えば、グロブリン)の存在を測定するためのキットを含む。特に、検査試料中の抗原の存在を測定するためのキットは、a)本明細書に記載されている抗体又はその部分、及びb)検出可能なシグナルを検出することができるシグナル生成化合物に付着された第二の抗体(抗原に対する特異性を有する。))を含む連結体を含む。キットは、抗原に結合する試薬を含む対照又は標準物質及びアッセイを実施する際に使用されるべき操作を記載する同封物も含有し得る。

50

【0162】

本発明は、検査試料中の抗体を検出するためのキットも含む。キットは、a) 目的の抗体に対して特異的な抗抗体（例えば、本発明の1つ）、及びb) 上記抗原又はその一部を含み得る。抗原に結合する試薬を含む対照又は標準物質も含まれ得る。より具体的には、前記キットは、a) 抗体に対して特異的な抗抗体（本発明の1つなど）及びb) 検出可能なシグナルを生成することが可能なシグナル生成化合物に付着された抗原（例えば、グロブロマー）を含む連結体を含み得る。この場合にも、キットは、抗原に結合する試薬を含む対照又は標準物質並びにキットの成分及びその使用法を記載する同封物も含み得る。キットは、バイアル、瓶又は細片などの1つの容器も含み得、各容器は予め設置された固相を有し、他の容器はそれぞれの連結体を含有する。これらのキットは、洗浄、加工及び指示試薬など、アッセイを実施するために必要とされる他の試薬のバイアル又は容器も含有し得る。

10

【0163】

本発明は、上記完全長抗体を含むのみならず、その部分又は断片、例えば、そのFab部分も含むことに留意すべきである。さらに、本発明は、例えば、結合特異性、構造などの点で、本発明の抗体と同一の特性を有するあらゆる抗体を包含する。

【0164】

発明の利点

（実施例Iに記載されているように）A₁（12-42）グロブロマーでの免疫化によって、上述されている比較ドットプロットングによって測定されるように、異なるA₁（1-42）オリゴマー及びA₁（X-42）オリゴマーの寛容性又は認識が異なる、異なったモノクローナル抗体が取得され得る。これによって、認知増強効果の間の最適な関係、他のA₁形態に比べて望ましい特異性及び最小の副作用特性を有するA₁オリゴマーに対して誘導された抗体の開発が可能となる。同じことが、受動免疫において使用するためのモノクローナル抗体に対しても当てはまる。（能動及び受動）免疫化のためのこのような特定の戦略の利点は、A₁単量体に対する免疫応答、凝集の繊維性状態にあるA₁ペプチド又はsAPPを誘導しないことである。これは、幾つかの点で有利である。

20

【0165】

1) 不溶性A₁斑の形態において、凝集の繊維性状態中のA₁ペプチドは、AD脳内の全体のA₁ペプチドプールの主要な部分を占める。これらの斑との抗A₁抗体の反応によって誘導されたA₁斑の溶解によるA₁の大規模な放出は、有害であると認められる。A₁のこの大規模な放出は、次いで、血液脳関門を横切り、血流に入り、微小出血のリスクを増大させ得る。さらに、上記ELAN試験において、繊維性A₁ペプチド形態を用いた免疫化のこの戦略は、髄膜脳炎を発症する症例の6%のために、試験を止める必要があった。

30

【0166】

2) 単量体A₁ペプチド形態は認知増強効果を発揮し得ることが示され得るので、単量体A₁ペプチド形態に対して誘導された免疫応答は望ましくない。

【0167】

3) 反応に対して誘導された免疫応答。
さらに、sAPPも認知増強効果を発揮することが示された。

40

【0168】

4) 微小出血の望ましくない副作用を回避するために、CAAの形態の血管A₁ペプチドに対して誘導された応答は避けるべきである（すなわち、A₁の中央部分に対する抗体、及び、さらに、CAAの形態で凝集されたA₁ペプチドに結合しない抗体は、N末端に対するこのような抗体と比べて、より少ない微小結果を誘導する。上記参照。）。

【0169】

5) A₁オリゴマーと特異的に反応する抗体は、例えば、繊維性A₁又は単量体A₁に結合されず、従って、治療的效果のために利用不能なので、病態生理学的に関連するA₁種に関してより高い生物学的利用性を有する。

50

【0170】

この場合にも、本発明の抗体、特に10F4及び3C5は、6E10のような市販の抗体(Signetカタログ番号9320)と比べて、脳脊髄液中のアミロイドを検出しない(又はより低い結合親和性で検出する。)ことに注目すべきである。従って、CSF中のアミロイドの高い代謝回転速度のために、CSF中のアミロイドに抗体が結合しないことにより、抗体の浪費が抑制されるとともに、体内(例えば、脳及びCSF)に見出される全てのアミロイドに結合する抗体と比べて、より効果的で選択的な系を作出される。さらに、本発明の抗体のこの特性のために、(受動免疫に関連して)投与されるべき抗体の量が低減され、投薬量がより少なくなることによって、抗体が標的へ限局されるので副作用のリスクが低減され、効力が増大し、治療指数も増大する。さらに、微小出血のリスクも低減される。さらに、抗体はアミロイドの原繊維形態を検出しないので、このような複合体系性に伴うリスクも低減される。

10

【0171】

寄託情報:

モノクローナル抗体3C5を産生するハイブリドーマ(ML45-3C5.5C10)は、ブダペスト条約の規定に基づいて、2006年2月28日に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801UniversityBoulevard、Manassas、Virginia20110に寄託され、ATCC番号PTA-7406が割り当てられた。モノクローナル抗体10F4を産生するハイブリドーマ(ML43-10F4.3H8)は、ブダペスト条約の規定に基づいて、2006年8月16日に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801UniversityBoulevard、Manassas、Virginia20110に寄託され、ATCC番号PTA-7808が割り当てられた。

20

【0172】

本発明は、以下の非限定的な実施例の使用によって例示され得る。

【実施例】

【0173】

(実施例I)

免疫化のためのA(12-42)グロブロマーの調製

100%(v/v)1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール(HFIP)中に、40mg/mL(HFIP125μL中5mg)で、A(12-42)合成ペプチド(AnaSpecInc.;Lot#40443)を懸濁し、完全に可溶化するために、37で1時間、振盪下で温置した。HFIPは水素結合切断物質として作用し、Aペプチド中の既存の構造的な不均一性を除去するために使用される。10,000gで10分間遠心した後、HFIP溶解されたA(12-42)の上清を、リン酸緩衝化された生理的食塩水(PBS)(20mMNaH₂PO₄,140mMNaCl,pH7.4)6.1mLで希釈し、(H₂O中の)2%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)625μLを添加し(0.2%(w/v)SDSの最終濃度)、37で3時間温置した。もう一度、(H₂O中の)2%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)625μLを添加し(0.4%(w/v)SDSの最終濃度)を添加し、37で3時間、さらに温置した。H₂O7mLで溶液を希釈し、37で16時間温置した。3000gで10分間遠心した後、PBS(20mMNaH₂PO₄,140mMNaCl,pH7.4)15mLで上清をさらに希釈し、0.65mLまで限外ろ過(5kDaカットオフ)によって濃縮し、室温で16時間、20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、0.05%(w/v)SDS、pH7.4に対して透析し、10000gで10分間遠心し、A(12-42)グロブロマーを含む上清を採取した。試料を分取し、さらなる使用まで、-80で保存した。

30

40

【0174】

(実施例II)

モノクローナル抗体3C5及び10F4の作製

50

CFA (Sigma) 中の、実施例 I に記載されている A (12-42) グロブロマー 50 μg で、Balb/c マウスを皮下に免疫化し、1ヶ月の間隔を置いて、2回強化免疫を行った。脾臓を集め、PEG 操作によって、5:1 の比で、脾臓細胞をマウス骨髄腫 SP2/0 細胞と融合した。2 \times 10⁵ 細胞/mL、200 mL/ウェルで、アザセリン/ヒポキサンチン選択培地中、96 ウェルの皿の中に融合細胞を播種した。目に見えるコロニーを形成させるために、細胞を増殖させ、直接的 ELISA アッセイにより、A オリゴマー反応性に関して上清をアッセイした。抗体発現が安定であるように見受けられるまで、限界希釈によって、A オリゴマーに対する抗体を分泌するハイブリドーマをサブクローニングした。

【0175】

10

(実施例 III)

抗 A グロブロマー抗体の選択性のドットプロット特性

モノクローナル抗 A グロブロマー抗体の選択性を性質決定するために、異なる A 形態での認識に関して、モノクローナル抗 A グロブロマー抗体を探索した。この目的のために、0.2 mg/mL BSA が補充された PBS 中の、100 pmol/ μL から 0.01 pmol/ μL の範囲の各 A 形態の系列希釈を作製した。各試料 1 μL をニトロセルロース膜上に吸収転移させた。検出のために、対応する抗体を使用した (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。ペルオキシダーゼ連結された抗マウス IgG 及び染色試薬 BMB1ue PODS substrate (Roche) を用いて、免疫染色を行った。

【0176】

20

ドットプロットのための A 標準:

1. A (1-42) 単量体、0.1% NH₄OH

(調製直後の) H₂O 中の 0.1% NH₄OH 0.5 mL 中に A (1-42) 1 mg (Bachem Inc., カタログ番号 H-1368) を溶解し (= 2 mg/mL)、室温で 30 秒間、直ちに振盪して透明な溶液を得た。さらなる使用のために、試料を -20 で保存した。

【0177】

2. A (1-40) 単量体、0.1% NH₄OH

(調製直後の) H₂O 中の 0.1% NH₄OH 0.5 mL 中に A (1-40) 1 mg (Bachem Inc., カタログ番号 H-1368) を溶解し (= 2 mg/mL)、室温で 30 秒間、直ちに振盪して透明な溶液を得た。さらなる使用のために、試料を -20 で保存した。

30

【0178】

3. A (1-42) 単量体、0.1% NaOH

(調製直後の) H₂O 中の 0.1% NaOH 0.5 mL 中に A (1-42) 2.5 mg (Bachem Inc., カタログ番号 H-1368) を溶解し (= 5 mg/mL)、室温で 30 秒間、直ちに振盪して透明な溶液を得た。さらなる使用のために、試料を -20 で保存した。

【0179】

4. A (1-40) 単量体、0.1% NaOH

(調製直後の) H₂O 中の 0.1% NaOH 0.5 mL 中に A (1-40) 2.5 mg (Bachem Inc., カタログ番号 H-1368) を溶解し (= 5 mg/mL)、室温で 30 秒間、直ちに振盪して透明な溶液を得た。さらなる使用のために、試料を -20 で保存した。

40

【0180】

5. A (1-42) グロブロマー

6 mg/mL で 100% 1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) 中に、A (1-42) 合成ペプチド (H-1368, Bachem, Bubenendorf, Switzerland) を懸濁し、完全に可溶化するために、振盪しながら、37 で 1.5 時間温置した。HFIP は水素結合切断物質として作用し、A

50

ペプチド中の既存の構造的な不均一性を除去するために使用される。Speed Vac 中の蒸発によって HFIP を除去し、ジメチルスルホキシド中、5 mM の濃度で A (1 - 42) を再懸濁し、20 秒間音波処理した。リン酸緩衝化された生理的食塩水 (PBS) (20 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7.4) 中に、予め HFIP 処理された A (1 - 42) を 400 μM になるように希釈し、(H₂O 中の) 2% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 1/10 容量を添加した (0.2% SDS の最終濃度)。37 で 6 時間の温置によって、16/20 kDa A (1 - 42) グロブロマー (球状オリゴマーに対する短縮形態) 中間体 が得られた。H₂O の 3 倍容量でさらに希釈し、37 で 18 時間温置することによって、38/48 kDa A (1 - 42) グロブロマーを 10 作製した。3000 g で 20 分間の遠心後、限外ろ過 (30 kDa カットオフ) によって 10 試料を濃縮し、5 mM NaH₂PO₄、35 mM NaCl、pH 7.4 に対して透析し、10000 g で 10 分間遠心し、38/48 kDa A (1 - 42) グロブロマーを含む 10 上清を採取した。透析に対する代替法として、4 で 1 時間、氷冷されたメタノール/酢酸溶液 (33% メタノール、4% 酢酸) の 9 倍過剰 (v/v) によって、38/48 kDa A (1 - 42) グロブロマーを沈殿させることもできる。次いで、38/48 kDa A (1 - 42) グロブロマーを沈降させ (16200 g で 10 分)、5 mM NaH₂PO₄、35 mM NaCl、pH 7.4 中に再懸濁し、pH を 7.4 になるように調整した。

10

【0181】

6. A (12 - 42) グロブロマー

20

実施例 3.5 (上記参照) に従って調製された A (1 - 42) グロブロマー調製物 2 mL を、緩衝液 (5 mM リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム 35 mM、pH 7.4) 38 mL 及び H₂O 中の Gluc エンドプロテイナーゼ (Roche) 1 mg/mL の 150 μL と混合した。反応混合物を室温で 6 時間攪拌し、H₂O 中の Gluc エンドプロテイナーゼ (Roche) 1 mg/mL のさらなる 150 μL を続いて添加する。反応混合物を室温でさらに 16 時間攪拌した後、5 MDIFP (ジイソプロピルフルオロリン酸) 溶液 8 μL を添加する。15 mL の 30 kDa Centriprep チューブを介して、反応混合物を約 1 mL まで濃縮する。濃縮物を緩衝液 (5 mM リン酸ナトリウム、35 mM 塩化ナトリウム、pH 7.4) 9 mL と混合し、再び、1 mL まで濃縮する。透析チューブ中で 16 時間、緩衝液 (5 mM リン酸ナトリウム、35 mM 塩化ナトリウム) 1 L に対して、濃縮物を 6 で透析する。H₂O 中の 1% 強度 SDS 溶液を用いて、0.1% の SDS 含量になるように、透析液を調整する。10000 g で 10 分間の遠心によって試料を除去し、上清を除去する。

30

【0182】

7. A (20 - 42) グロブロマー

実施例 2.5 (上記参照) に従って調製された A (1 - 42) グロブロマー調製物 1.59 mL を、緩衝液 (50 mM MES NaOH、pH 7.4) 38 mL 及び H₂O 中のサーモリシン溶液 (Roche) 1 mg/mL の 200 μL と混合する。反応混合物を室温で 20 時間攪拌する。次いで、H₂O 中の 100 mM EDTA 溶液、pH 7.4 の 80 μL を添加し、1% 強度の SDS 溶液 400 μL を用いて、0.01% の SDS 含量になるように、混合物をさらに調整する。15 mL の 30 kDa Centriprep チューブを介して、反応混合物を約 1 mL まで濃縮する。濃縮物を緩衝液 (50 mM MES / NaOH、0.02% SDS、pH 7.4) 9 mL と混合し、再び、1 mL まで濃縮する。透析チューブ中で 16 時間、緩衝液 (5 mM リン酸ナトリウム、35 mM 塩化ナトリウム) 1 L に対して、濃縮物を 6 で透析する。H₂O 中の 2% 強度 SDS 溶液で、0.1% の SDS 含量になるように透析液を調整する。10000 g での 10 分間の遠心によって試料を除去し、上清を除去する。

40

【0183】

8. A (1 - 42) 原繊維

0.1% NH₄OH 水溶液 500 μL (Eppendorf チューブ) 中に、A (

50

1 - 42) (Bachem Inc . カタログ番号 : H - 1368) 1 mg を溶解し、室温で1分間、試料を攪拌した。調製された直後のこのA (1 - 42) 溶液 100 μ L を、20 mM NaH₂PO₄ ; 140 mM NaCl , pH 7 . 4 の 300 μ L で中和した。1% HCl で、pH 7 . 4 になるように pH を調整した。37 で 24 時間、試料を温置し、遠心した (10000 g で 10 分) 。上清を廃棄し、1分間渦巻き攪拌することによって、原繊維沈降物を 20 mM NaH₂PO₄ ; 140 mM NaCl 、 pH 7 . 4 の 400 μ L で再懸濁した。

【 0184 】

9 . s A P P

Sigma によって供給された (カタログ番号 S 9564 ; 20 mM NaH₂PO₄ ; 140 mM NaCl ; pH 7 . 4 中 25 μ g) 。 20 mM NaH₂PO₄ 、 140 mM NaCl 、 pH 7 . 4 、 0 . 2 mg / mL BSA を用いて、0 . 1 mg / mL (= 1 pmol / μ L) になるように s A P P を希釈した。

10

【 0185 】

ドットプロットのための材料 :

A 標準 :

20 mM NaH₂PO₄ 、 140 mM NaCl 、 pH 7 . 4 + 0 . 2 mg / mL BSA
中の A 抗原の系列希釈

1) 100 pmol / μ L

2) 10 pmol / μ L

3) 1 pmol / μ L

4) 0 . 1 pmol / μ L

5) 0 . 01 pmol / μ L

20

ニトロセルロース :

Trans - Blot Transfer 溶媒、Pure Nitrocellulose Membrane (0 . 45 μ m) ; BIO - RAD

抗マウス POD : カタログ番号 : 715 - 035 - 150 (Jackson Immuno Research)

検出試薬 :

BMBLue POD 基質、沈殿 (Roche)

ウシ血清アルブミン (BSA) :

カタログ番号 : A - 7888 (SIGMA)

ブロッキング試薬 :

TBS 中の 5% 低脂肪乳

緩衝液溶液 :

TBS

25 mM Tris / HCl 緩衝液 pH 7 . 5 + 150 mM NaCl

TTBS 25 mM Tris / HCl - 緩衝液 pH 7 . 5 + 150 mM NaCl + 0 . 05% Tween 20

PBS + 0 . 2 mg / mL BSA

40

20 mM NaH₂PO₄ 緩衝液 pH 7 . 4 + 140 mM NaCl + 0 . 2 mg / mL BSA

抗体溶液 I :

TBS 中の 1% 低脂肪乳 20 mL 中に希釈された 0 . 2 μ g / mL 抗体

抗体溶液 II :

1 : 5000 希釈

TBS 中の 1% 低脂肪乳中の抗マウス POD

【 0186 】

ドットプロット操作 :

1) 互いに約 1 cm の距離で、(5 つの系列希釈中の) 異なる A 標準の各 1 μ L を二

50

トロセルロース膜上へドット状に付与した。

2) 室温 (RT) で、少なくとも 10 分間、A 標準ドットをニトロセルロース膜上において風乾させた (= ドットプロット)。

3) ブロッキング:

TBS 中の 5% 低脂肪乳 30 mL とともに、室温で 1.5 時間、ドットプロットを温置した。

4) 洗浄:

ブロッキング溶液を廃棄し、室温で、10 分間、TTBS 20 mL とともに、振盪しながらドットプロットを温置した。

5) 抗体溶液 I:

洗浄緩衝液を廃棄し、室温で 2 時間、抗体溶液とともにドットプロットを温置した。

6) 洗浄:

抗体溶液 I を廃棄し、室温で 10 分間、TTBS 20 mL とともに、振盪しながらドットプロットを温置した。洗浄溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TTBS 20 mL とともに、振盪しながらドットプロットを温置した。洗浄溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TBS 20 mL とともに、振盪しながらドットプロットを温置した。

7) 抗体溶液 II:

洗浄緩衝液を廃棄し、室温で一晩、抗体溶液 II とともにドットプロットを温置した。

8) 洗浄:

抗体溶液 II を廃棄し、室温で 10 分間、TTBS 20 mL とともに、振盪しながらドットプロットを温置した。洗浄溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TTBS 20 mL とともに、振盪しながらドットプロットを温置した。洗浄溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TBS 20 mL とともに、振盪しながらドットプロットを温置した。

9) 展開:

洗浄溶液を廃棄した。BMB1uePOD 基質 10 mL を用いて 10 分間、ドットプロットを展開した。H₂O でドットプロットを激しく洗浄することによって、展開を停止させた。ドット強度の濃度測定分析 (GS800 濃度計 (BioRad) 及びソフトウェアパッケージ Quantity one、バージョン 4.5.0 (BioRad)) を用いて、定量的評価を行った。A (20-42) グロブロマーの光学的に明確に同定された最後のドットの相対密度の 20% を超える相対密度を有するドットのみを評価した。この閾値は、全てのドットプロットに対して独立に決定した。計算された値は、A (1-42) グロブロマーの認識と所定の抗体に対するそれぞれの A 形態の間の関係を示す。

【0187】

(実施例 I に記載されているように調製された) A (12-42) グロブロマーでのマウスの能動免疫化の後、融合されたハイブリドーマ細胞を選択することによって、検査したモノクローナル抗体 (6E10 を除く。) を得た。各 A 形態を系列希釈に適用し、免疫反応のために各抗体とともに温置した。

【0188】

1. A (1-42) 単量体、0.1% NH₄OH

2. A (1-40) 単量体、0.1% NH₄OH

3. A (1-42) 単量体、0.1% NaOH

4. A (1-40) 単量体、0.1% NaOH

5. A (1-42) グロブロマー

6. A (12-42) グロブロマー

7. A (20-42) グロブロマー

8. A (1-42) 原繊維調製物

9. sAPP (Sigma); (第一のドット: 1 pmol)

結果は、図 1 に示されている。

【0189】

ドットプロット結果の分析に基づいて、抗 A グロブロマー mAb 10F4 及び 3C5

10

20

30

40

50

は、A (1-42) グロブロマー、A (12-42) グロブロマー及びA (20-42) グロブロマーなどのA グロブロマー形態に対して高い親和性を有する。抗A グロブロマーmAb10F4及び3C5は、A 単量体などの他のA 形態をある程度識別し、A (1-42) フィブリル又はsAPP を有意に認識しない。従って、抗体10F4及び3C5は、創出された「抗A グロブロマー抗体」であり得る。

【0190】

(実施例IV)

10F4及び3C5によるアルツハイマー病脳中のA グロブロマーエピトープの検出
A：抽出操作

試薬リスト：

3% SDS 緩衝液：

- 50 mM Tris / HCl、150 mM NaCl、0.5% Triton X100、1 mM EGTA、3% SDS、1% デオキシコール酸ナトリウム、pH 7.4

完全プロテアーゼ阻害剤カクテル：

- H₂O 1 mL 中に1錠の完全阻害剤カクテル (Roche Diagnostics GmbH; カタログ番号1697498) を溶解；新たに調製

PMSF 溶液：

- メタノール中500 mM PMSF

3% SDS 抽出緩衝液：

- 3% SDS 緩衝液に1/100の完全阻害剤カクテル溶液を添加

- 3% SDS 緩衝液に1/500 PMSF 溶液を添加

- 使用直前に、室温で、抽出緩衝液を調製

抗体：

- mAb10F4

- mAb3C5

- mAb6E10 (Signet; カタログ番号：9320)

- mAbIgG2b (対照抗体、合成ハプテンに対して作製、Dianova、クローンNCG2B.01、カタログ番号：DLN-05812)

操作：

新たに調製された室温の3% SDS 抽出緩衝液1.8 mLに、-80 で凍結された死後のヒトAD脳組織試料及び年齢を合致させた対照脳組織試料0.2 gを添加した。ガラスポッターによって、氷上で、試料を直ちに均質化した。均質化された試料を反応容器に移し、10,000 gで5分間遠心した。上清 (= 3% SDS 脳抽出物) を慎重に集め、さらなる使用のために、-80 で、反応容器中に保存した。

【0191】

B：モノクローナルマウス抗体でのDynabeadsの活性化

- 発泡を防ぐために、dynabeads (Dynabeads M-280 ヒツジ抗マウスIgG、Invitrogen; カタログ番号112.02) の原懸濁物を慎重に振盪した。

- 1 mL を無菌的に取り出し、1.5 mL の反応容器に移した。

- 免疫沈降 (IP) 洗浄緩衝液1 mL (IP-洗浄緩衝液：PBS (20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4)、0.1% BSA) で3回5分間、dynabeads を洗浄した。磁気分離装置スタンド (MSS) を用いて、反応容器の側面にdynabeads を固定化しながら、洗浄操作の間に、上清を慎重に除去した。

- PBS 1 mL、0.1% BSA 中のA 抗体40 µg とともに、洗浄されたdynabeads を温置した。

- 4 で攪拌しながら、一晚温置することによって、活性化を行った。

- (再びMSSを用いて) IP 洗浄緩衝液 (PBS (20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4)、0.1% BSA) 1 mL で、活性化されたdynabeads を4回、30分間洗浄した。

10

20

30

40

50

- P B S、0.1% B S A、0.02% アジ化ナトリウム 1 m L を用いて、活性化された d y n a b e a d s を再懸濁し、渦巻き攪拌し、短時間遠心した。

- 抗体活性化された d y n a b e a d s は、さらなる使用まで、4 で保存した。

【0192】

C : 免疫沈降 (I P)

- 3% S D S 脳抽出物 25 μ L を、20 m M N a H₂ P O₄、140 m M N a C l ; 0.05% T w e e n 20、p H 7.5 の 975 μ L で希釈した (= 1 : 40 希釈)。

- 以下のリストの抗体活性化された各 d y n a b e a d s 25 μ L を、1 : 40 希釈された 3% S D S 脳抽出物 1 m L とともに温置した。

・ 6 E 1 0 - D y n a b e a d s

・ 3 C 5 - D y n a b e a d s

・ 1 0 F 4 - D y n a b e a d s

・ I g G 2 b - D y n a b e a d s

- 免疫沈降は、6 で、振盪しながら一晩温置 (約 20 時間) することによって実施した。

- M P S を用いて、d y n a b e a d s を固定化した。

- 上清を慎重に取り除き、廃棄した。

- 以下のようにして、d y n a b e a d s を洗浄した。

・ 20 m M N a H₂ P O₄、140 m M N a C l、p H 7.5 + 0.1% B S A 500 μ L で、2回、5分

・ 2 m M N a H₂ P O₄、14 m M N a C l、p H 7.5 の 500 μ L で、1回、3分

・ 重要 : 洗浄緩衝液を最後に除去した後、反応容器を遠心し、M S S 中に戻し、液体の残りの滴を慎重に除去した。

・ H₂ O 中の 50% C H₃ C N、0.5% T F A 10 μ L を反応容器に添加し、渦巻き攪拌した

・ 振盪しながら、室温で 10 分間、反応容器を温置した

・ M S S を用いて、d y n a b e a d s を固定化した。

・ 免疫沈降され、溶出された A 種を含む上清を慎重に採取した (= I P 溶出液)

【0193】

D : 表面増強レーザー脱離イオン化質量分析法 (S E L D I - M S) :

- H 4 P r o t e i n C h i p A r r a y (C i p h e r g e n ; カタログ番号 C 5 7 3 - 0 0 2 8) 上へ、I P 溶出液 1 μ L をスポット状に付与した。

- 暖かい温置装置プレート上でスポットを乾燥させた

- C H C A 溶液 :

・ アセトニトリル 150 μ L + 1% T F A 150 μ L 中に C H C A 5 m g を溶解した = 原溶液 ; - 20 で保存した

・ 原溶液のうち 10 μ L を、アセトニトリル 20 μ L 及び 1% T F A 20 μ L で希釈した = 作業 C H C A 溶液

・ 作業 C H C A 溶液 2 μ L をスポット上に適用した。

- 暖かい温置装置プレート上でスポットを乾燥させ、S E L D I - M S (表面増強レーザー脱離イオン化質量分析法) によって分析した

・ 条件 : レーザー強度 200 ; 感度 6 ; 質量範囲 800 D a から 10000 D a ; 位置 20 から 80 ; コレクト 5

・ 分析 : 各 A 質量ピークの M Z 面積を定量した

【0194】

E . 免疫沈降された A D 脳抽出物のウェスタンブロット分析 :

S D S - P A G E :

S D S - 試料緩衝液 :

- S D S 0.3 g

- 1 M T r i s / H C l p H 6.8 4 m L、

10

20

30

40

50

- グリセロール 8 mL
- エタノール中の 1% プロモフェノールブルー 70 μ L
- 50 mL になるように H₂O を添加

- 走行緩衝液:

- Tris 7.5 g
- グリシン 36 g
- SDS 2.5 g
- 2.5 L になるように H₂O を添加

SDS - PAGE ゲルシステム:

18% Tris / グリシングル: (Invitrogen Inc., カタログ番号 EC 65055 BOX) 10

試料緩衝液 (SDS 試料緩衝液 300 μ L + H₂O 中の 1M Tris 溶液 10 μ L + 8.5% グリセロール 20 μ L) 13 μ L に、IP 溶出液 5 μ L を添加した。得られた 18 μ L の試料を 18% Tris / グリシングル (Invitrogen, Inc. カタログ番号: EC 65055 BOX) 上に搭載する。20 mA の定常電流で、SDS - PAGE を実施する。

ウェスタンブロット操作:

電気泳動に続いて、半乾燥プロットチャンバー (BioRad) を用いて、ニトロセルロース膜 (7.5 cm x 9 cm, 0.2 μ m, BioRad) 上に、75 mA で 45 分間、ゲルを吸収転移させた。 20

ブロット緩衝液:

- Tris 6 g
- グリシン 28.1 g
- メタノール 500 mL
- 2.5 L になるように H₂O を添加する

ウェスタンブロット免疫染色:

材料:

- 抗 A 抗体 6E10 (Signet; カタログ番号 9320)
- 抗マウス POD (Jackson ImmunoResearch, カタログ番号: 715-035-150) 30

- 検出試薬:

- SuperSignal West Pico Substrate (Pierce, カタログ番号 34077)

- ウシ血清アルブミン (BSA, Serva, カタログ番号: 11926)

- 低脂肪乳粉末 (Lasana)

- ブロッキング試薬:

- PBST 中の 2% BSA

- TBST:

- 25 mM Tris / HCl

- 150 mM NaCl 緩衝液、pH 7.5 40

- TTBS:

- 25 mM Tris / HCl

- 150 mM NaCl 緩衝液

- 0.05% Tween 20、pH 7.5

- PBS:

- 20 mM NaH₂PO₄ 緩衝液

- 140 mM NaCl 緩衝液、pH 7.5

- PBST:

- 20 mM NaH₂PO₄ 緩衝液

- 140 mM NaCl 緩衝液 50

・ 0.05% Tween 20、pH 7.5

- 抗体溶液 I :

・ 1 μ g / mL 6E10 = TBS 中の 3% 低脂肪乳 20 mL 中 1 : 1000

- 抗体溶液 II :

・ TBS 中の 3% 低脂肪乳 20 mL 中の 1 : 10000 希釈された抗マウス POD

操作 :

1) PBS 中で 10 分間、ウェスタンブロットを沸騰させた。

2) ブロッキング :

ブロッキング試薬 50 mL とともに、6 で 16 時間、ウェスタンブロットを温置した。

3) 洗浄 :

- ブロッキング溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TTBS 50 mL でウェスタンブロットを洗浄した。

- ブロッキング溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TBS 50 mL でウェスタンブロットを洗浄した。

4) 抗体溶液 I :

- 洗浄溶液を廃棄し、室温で 4 時間、抗体溶液 I とともにウェスタンブロットを温置した。

5) 洗浄 :

- ブロッキング溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TTBS 50 mL でウェスタンブロットを洗浄した。

- ブロッキング溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TTBS 50 mL でウェスタンブロットを洗浄した。

- ブロッキング溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TBS 50 mL でウェスタンブロットを洗浄した。

6) 抗体溶液 II : 洗浄溶液を廃棄し、室温で 1 時間、抗体溶液 II とともにウェスタンブロットを温置した。

7) 洗浄 :

- ブロッキング溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TTBS 50 mL でウェスタンブロットを洗浄した。

- ブロッキング溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TTBS 50 mL でウェスタンブロットを洗浄した。

- ブロッキング溶液を廃棄し、室温で 10 分間、TBS 50 mL でウェスタンブロットを洗浄した。

8) 展開及び定量分析 :

- 洗浄溶液を廃棄した。

SuperSignalWestPicoSubstrateEnhancer 2 mL 及び Peroxide Solution 2 mL を混合した。

- 得られた 4 mL の溶液をウェスタンブロットに添加し、ブロットを暗所で 5 分間温置した。

- 化学発光画像化システム (VersaDoc, BioRad) を用いて、ブロットを分析した。30、97.5、165、232.5 及び 300 秒の獲得時間に、5 つの写真撮影した。

- ソフトウェアパッケージ Quantity one、Version 4.5.0 (BioRad) を用いて、A タンパク質バンドの痕跡 (強度 \times mM) の飽和が起こらなかった写真を定量的に分析した。

【0195】

結果は、図 2 に示されている。緩衝液組成は凝集された原繊維形態中の A ペプチドを可溶化するのに十分でないので、本実施例で使用した 3% (w/v) を用いた抽出操作は脳内の全 A ペプチドプールの可溶性形態を抽出すると考えられる。従って、モノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体 3C5 及び 10F4 によってアルツハイマー病脳抽出物中で結合される A ペプチドは、可溶性 A ペプチドである。これらの可溶性 A 種は、AD 脳中に見出される A 斑の形態の原繊維 A より、疾病の重症度とよく相関しているので (Kuo et al. 1996, J. Biol. Chem. 271, 4077-4081; Lue et al., 1999, Am. J. Pathol. 155, 853-862)、アルツハイマー病関連種であると考えられる。従って、抗体 10F4 及び 3C5 は疾病関連 A 種を標的とする。さらに、汎 A 抗体 6E10 と比べて、モノクローナル抗体 3C5 及び 10F4 はアルツハイマー病脳抽出物中の全可溶性 A プールの垂画分のみに結合する。残りの A 形態は、3C5 及び 10F4 によって認識される A グロブリンエピトープを明らかに有しない。これらの A 形態は神経病原性であると考えられないという事実により、副作用を低減するために、及び中枢神経系中の循環する抗体の有効濃度を低下させないために、これらの A 形態を治療抗体によって攻撃しないことが有利である。従って、治療抗体の投薬を低下させることができ、よりよい治療指数がもたらされる。

10

【0196】

(実施例 V)

A (1-42) 原繊維に対する抗 A グロブリン抗体の識別の SDS-PAGE によって可視化された半定量的分析

A (1-42) 原繊維の調製:

H₂O 中の 0.1% NH₄OH 500 μL 中に、A (1-42) (Bachem, カタログ番号: H-1368) 1mg を溶解し、室温で 1 分間攪拌した。10000g で 5 分間、試料を遠心した。上清を集めた。上清中の A (1-42) 濃度は、Bradford の方法 (BIO-RAD Inc. アッセイ操作) に従って測定した。

20

【0197】

0.1% NH₄OH 中の A (1-42) 100 μL を、20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH 7.4 の 300 μL と混合し、pH 7.4 になるように 2% HCl で調整した。次いで、37 °C で 20 時間、試料を温置した。この後、10,000g で 10 分間、試料を遠心した。上清を廃棄し、残留物を 20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH 7.4 の 400 μL と混合し、1 分間激しく攪拌 (「渦巻き攪拌」) することによって再懸濁し、10000g で 10 分間遠心した。さらにもう一度、上清を廃棄し、残留物を 20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH 7.4 の 400 μL と混合し、1 分間激しく攪拌 (「渦巻き攪拌」) することによって再懸濁し、10000g で 10 分間遠心した。上清を廃棄した。20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH 7.4 の 380 μL 中に残留物を再懸濁し、激しい攪拌 (「渦巻き攪拌」) によって促進した。

30

【0198】

A (1-42) 原繊維への抗 A 抗体の結合:

20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.4 の 160 μL で、A (1-42) 原繊維調製物 40 μL を希釈し、室温で 5 分間攪拌し、次いで、10000g で 10 分間試料を遠心した。上清を廃棄し、20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.4 の 95 μL 中に残留物を再懸濁した。激しい攪拌 (「渦巻き攪拌」) によって、再懸濁を促進した。原繊維調製物 10 μL の分取試料を、それぞれ、以下のものと混合した。

40

【0199】

- a) 20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH 7.4 の 10 μL
- b) 20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH 7.4 中の 3C5 の 0.5 μg / μL の 10 μL
- c) 20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH 7.4 中の 10F4 の 0.5 μg / μL の 10 μL
- d) 20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH 7.4 中の 6E10 (Signet カタログ番号 9320) の 0.5 μg / μL の 10 μL

50

【0200】

37 で20時間、試料を温置し、次いで、10000gで10分間遠心した。上清を集め、SDS-PAGE試料緩衝液20 μ Lと混合した。20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、0.025%Tween20、pH7.4の50 μ Lと残留物を混合し、「渦巻き攪拌」によって再懸濁した。次いで、10,000gで10分間、試料を遠心した。上清を廃棄し、20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、0.025%Tween20、pH7.4の20 μ Lと残留物を混合し、次いで、SDS-PAGE試料緩衝液20 μ Lと混合した。電気泳動のために、試料を4から20%Tris/グリシゲルにかけた。

【0201】

SDS-PAGEに対するパラメータ：

SDS試料緩衝液：0.3gSDS

1MTris-HCl、pH6.8の4mL

グリセリン8mL

エタノール中の1%プロモフェノールブルー1mL

50mLになるようにH₂Oで満たす

4から20%Tris/グリシゲル：(Invitrogenカタログ番号EC6025BOX)

電気泳動緩衝液：Tris7.5g

グリシン36g

SDS2.5g

2.5LになるようにH₂Oで満たす

20mAの定常電流でゲルを走行させる。

ゲルの染色：CoomassieBlueR250

結果は、図3に示されている。

【0202】

異なる抗A抗体及びそれらのA(1-42)原繊維の識別の半定量的分析：

抗体、A(1-42)原繊維抗体重鎖、抗体軽鎖及びA(1-42)単量体の位置が、ゲルの端にマークされている。そのサイズのために、A(1-42)原繊維はSDS-PAGEの中に入ることができず、ゲルスロット中に見ることができる。

【0203】

1. マーカー

2. A(1-42)原繊維調製物：対照

3. A(1-42)原繊維調製物；+mAb6E10；20時間37；上清

4. A(1-42)原繊維調製物；+mAb6E10；20時間37；沈降物

5. A(1-42)原繊維調製物；+mAb63C5；20時間37；上清

6. A(1-42)原繊維調製物；+mAb3C5；20時間37；沈降物

7. A(1-42)原繊維調製物；+mAb10F4；20時間37；上清

8. A(1-42)原繊維調製物；+mAb10F4；20時間37；沈降物

【0204】

遠心後の結合した原繊維(沈降粒画分)及び上清画分中の抗体の重鎖から光学密度(OD)値を測定することによって、原繊維型Aへの相対的結合をSDS-PAGE分析から評価した。A原繊維に結合した抗体はA原繊維と一緒に沈降するはずであり、従って、沈降物画分中に見出されるのに対して、非A原繊維結合(遊離)抗体は上清中に見出される。A原繊維に結合された抗体のパーセントは、以下の式に従って計算した。

【0205】

A原繊維に結合された%抗体 = $OD_{原繊維画分} \times 100\% / (OD_{原繊維画分} + OD_{上清画分})$

【0206】

結果は、図3に示されている。AA1から17の間の直鎖Aエピトープを認識及び結

10

20

30

40

50

合する市販の抗体 6 E 1 0 (S i g n e t カタログ番号 9 3 2 0) とは異なり、共沈降実験において、A グロブリン抗体 3 C 5 及び 1 0 F 4 は A (1 - 4 2) 原繊維に、より低い親和性で結合する。これは、A (1 - 4 2) 原繊維とともに温置した後、A (1 - 4 2) 原繊維に結合されているために、3 C 5 及び 1 0 F 4 抗体が沈降工程後に主として上清中に残存し、共沈降しないという事実によって証明される。

【 0 2 0 7 】

アルツハイマー病の脳では、A 原繊維は全 A ペプチドプールの主成分である。抗 A 抗体によってこれらの原繊維を攻撃することによって、その後微小出血のリスクを増大させ得る A の大量の解離のために、負の副作用のリスクが増大する。微小出血に対する増大したリスクは、A ペプチドの原繊維凝集物を用いた能動免疫アプローチにおいて観察された (B e n n e t t a n d H o l t z m a n , 2 0 0 5 , N e u r o l o g y , 6 4 , 1 0 - 1 2 ; O r g o g o z o J , N e u r o l o g y , 2 0 0 3 , 6 1 , 4 6 - 5 4 ; S c h e n k e t a l . , 2 0 0 4 , C u r r O p i n I m m u n o l , 1 6 , 5 9 9 - 6 0 6) 。

10

【 0 2 0 8 】

(実施例 V I)

アミロイド斑の形態の原繊維 A ペプチド並びに老齢 A P P トランスジェニックマウス及びアルツハイマー病患者中の髄膜血管中のアミロイドへの抗体 1 0 F 4 及び 3 C 5 の特異的反応の原位置分析

抗体 1 0 F 4 及び 3 C 5 は原繊維 A ペプチド沈着への低下した染色を示し、これらの治療効果が A ペプチドの原繊維性の沈着された形態ではなく、可溶性グロブリン形態への結合によって媒介されることを示唆する。原繊維性 A ペプチドへの抗体結合は凝集物の迅速な溶解及び可溶性 A 濃度のその後の増加 (可溶性 A 濃度のその後の増加は神経毒性であると考えられており、微小出血をもたらす得る。) をもたらすことができるので、単量体ではなく可溶性グロブリンに影響を与える抗体治療が好ましい。

20

【 0 2 0 9 】

方法 :

これらの実験のために、2人のAD患者 (R Z 1 6 及び R Z 5 5) から得た皮質組織及び19月齢の T g 2 5 7 6 マウス (A P P S W E # 0 0 1 3 4 9 , T a c o n i c , H u d s o n , N Y , U S A) 又は12月齢の A P P / L マウス (R e M Y N D , L e u v e n , B e l g i u m) から得た皮質組織という幾つかの脳材料試料を使用した。マウスは、家族性アルツハイマー病突然変異を有するヒト A P P を過剰発現し、約11月齢で脳実質中にアミロイド沈着を形成し、約18月齢でより大きな脳血管中にアミロイド沈着を形成する。動物に深く麻酔をかけ、0.1Mリン酸緩衝化生理的食塩水 (P B S) で経心的に灌流して、血液を洗い流した。次いで、頭蓋から脳を取り出し、縦方向に分割した。脳の一方の半球を瞬間凍結し、4%パラホルムアルデヒド中に浸漬することによって他方の半球を固定した。P B S 中の30%スクロース中に浸すことによって、浸漬固定された半球を凍結保護し、凍結マイクローム上に戴置した。前脳全体を40µmの横断切片へ切断し、これをP B S 中に集めて、その後の染色操作のために使用した。アルツハイマー病患者由来の新皮質試料は、B r a i n - N e t、ミュンヘン、ドイツから、凍結された組織として取得し、融解の間に4%パラホルムアルデヒド中に浸漬固定し、続いて、マウス組織と同様に処理した。

30

40

【 0 2 1 0 】

以下のプロトコルを用いて、各切片を C o n g o R e d で染色した。

【 0 2 1 1 】

材料 :

- アルコール性 N a C l 溶液、N a O H 溶液及び C o n g o R e d 溶液からなるアミロイド染料 C o n g o R e d キット (S i g m a - A l d r i c h ; H T - 6 0)
- 染色キュベット
- 顕微鏡スライド S u p e r f r o s t P l u s 及びカバーガラス

50

- エタノール、キシロール、包埋溶媒

【0212】

試薬：

- NaCl 溶液で 1 : 100 希釈された NaOH は、アルカリ生理的食塩水を与える
- Congo Red 溶液で 1 : 100 希釈されたアルカリ生理的食塩水はアルカリ Congo Red 溶液を与える（使用の 15 分以内に調製し、ろ過する）
- 切片をスライド上に戴置し、切片を乾燥させる
- まず、アルカリ生理的食塩水中で 30 から 40 分間、次いで、アルカリ Congo Red 溶液中で 30 から 40 分間、スライドを染色キュベット中で温置する
- 新鮮なエタノールで 3 回濯ぎ、キシロールの上に包埋する

10

まず、Zeiss Axio Plan 顕微鏡 (Zeiss, Jena, Germany) を用いて染色の写真を撮影し、定性的に評価した。赤い色は、アミロイドが斑の形態で及びより大きな髄膜血管中に沈着することを示唆した。その後、抗体染色の評価は、これらの構造に集中した。

【0213】

以下のプロトコールに従って、各抗体の 0.07 から 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含有する溶液とともに切片を温置することによって染色を行った。

【0214】

材料：

- TBST 洗浄溶液 (Tween 20 を加えた Tris 緩衝化生理的食塩水 ; 10x 濃縮物 ; Dako Cytomation S3306, DAKO, Hamburg, Germany) Aquabidest. 中に 1 : 10)
- メタノール中の 0.3% H_2O_2
- ロバ血清 (Serotec, Dusseldorf, Germany)、TBST 中 5%、ブロッキング血清として
- TBST 中に所定の濃度で希釈されたモノクローナルマウス抗グロブリン抗体
- 二次抗体 : ピオチン化されたロバ抗マウス抗体 (Jackson Immuno/Dianova, Hamburg, Germany ; 715-065-150 ; TBST 中に 1 : 500 希釈)
- Strept ABC complex (Dako Cytomation K0377, DAKO, Hamburg, Germany)
- ペルオキシダーゼ基質キットジアミノベンジジン (= DAB ; SK-4100 ; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- SuperFrost Plus 顕微鏡スライド及びカバーガラス
- 無キシロール包埋溶媒 (Mediate, Burgdorf, Germany ; X-tra Kit)

20

30

【0215】

操作：

- 浮遊している切片を氷冷された 0.3% H_2O_2 中に移し、30 分間温置する
- TBST 緩衝液中で 5 分間洗浄する
- ロバ血清 / TBST とともに 20 分間温置する
- 室温で 24 時間、一次抗体とともに温置する
- TBST 緩衝液中で 5 分間洗浄する
- ブロッキング血清とともに 20 分間温置する
- TBST 緩衝液中で 5 分間洗浄する
- 室温で 60 分間、二次抗体とともに温置する
- TBST 緩衝液中で 5 分間洗浄する
- 室温で 60 分間、Strept ABC complex とともに温置する
- TBST 緩衝液中で 5 分間洗浄する
- DAB とともに 20 分間温置する

40

50

- 切片をスライド上に戴置し、スライドを風乾し、アルコールでスライドを脱水し、スライドを包埋する

【0216】

顕微鏡下で切片を視覚的に検査するとともに、Image Pro 5.0 画像分析システムを用いて組織学的画像から無作為に選択された10個の斑を光学的に切除し、それらの平均グレイスケール値を求めることによって、アミロイド染色をさらに定量した。アミロイド斑の密度から染色された物質の平均バックグラウンド密度を差し引くことによって、グレイスケール値から、光学密度の値を計算した(0% - 周囲のバックグラウンドを上回る斑の染色なし、100%透過なし/最大染色)。ANOVAを用いて、統計学的有意性に関して、それぞれ、抗体6E10/4G8と6G1の間、10F4と3C5の間の差を検定した。

10

【0217】

結果：

以下に記載されている全ての抗体染色された物質は、congo親和性アミロイド沈着であることが判明した(図4(a))。グロブリンを好む抗体10F4及び3C5は、0.7 µg/mLの同じ濃度で、Aβペプチドの実質及び硬膜のcongo親和性沈着を、抗体6G1及び6E10より有意に弱く染色した(図4(b, c, h))。実質アミロイド斑染色の定量分析によって、全ての抗体が斑に結合するが(対照を上回る統計的に有意な密度)、抗体10F4及び3C5の結合は(AβのN末端配列に対して産生された)参照抗体6E10の結合より有意に低く、(AβのN末端配列に対して産生された)参照抗体4G8と等しく、又は低いことが明らかとなった(図4(d-g))。抗体10F4及び3C5はAβ単量体又はAβ配列の一部を認識する抗体より、アミロイド沈着により少なく結合する。原繊維Aβペプチドに結合する抗体での処理によって、脳組織中のアミロイド斑の素早い溶解及びその後の可溶性Aβ濃度の増大(可溶性Aβ濃度の増大は、次いで、神経毒性であると考えられ、微小出血を引き起こし得る。)、及び/又は血管アミロイドの素早い溶解(これも、微小出血を引き起こし得る。)をもたらす得る。従って、単量体ではなく可溶性グロブリンに対して影響を与える抗体治療が好ましい。

20

【0218】

(実施例VII)

抗Aβグロブリン抗体10F4及び3C5での免疫沈降後のAD患者の脳脊髄液中の内蔵性Aβ(1-42)及びAβ(1-40)レベル

30

Dynabeads M-280 ヒツジ抗マウスIgGでの、AD脳の脳脊髄液由来のAβ種の免疫沈降(IP)

以下のmAbをDynabeads M-280 ヒツジ抗マウスIgGに固定した。

- mAb 6E10 (Signet Inc.; カタログ番号9320)
- mAb 3C5
- mAb 10F4
- mAb 8F5

Dynabeads m-280 ヒツジ抗マウスIgG :

ヒツジ抗マウスIgG (Invitrogen Inc., カタログ番号112.02) を磁気ビーズ(Dynabeads)に共有結合させる。

40

モノクローナルマウス抗体でのDynabeadsの活性化

- 発泡を防ぐために、dynabeads (Dynabeads M-280 ヒツジ抗マウスIgG、Invitrogen; 製品番号112.02) の原懸濁物を慎重に振盪した。

- 1 mL を無菌的に取り出し、1.5 mL の反応容器に移した。

- 免疫沈降(IP)洗浄緩衝液1 mL (IP洗浄緩衝液: PBS (20 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7.4)、0.1% (w/v) BSA) で、dynabeads を3回、5分間洗浄した。磁気分離装置スタンド(MSS)を用いて、反応容器の側面にdynabeadsを固定化しながら、洗浄操作の間に、上清を慎重に除去した

50

。

- P B S 1 m L、0 . 1 % (w / v) B S A 中の A 抗体 4 0 μ g とともに、洗浄された d y n a b e a d s を温置した。

- 4 で振盪しながら、一晚温置することによって、活性化を行った。

- (再び M S S を用いて) I P 洗浄緩衝液 1 m L (P B S (2 0 m M N a H ₂ P O ₄、1 4 0 m M N a C l、p H 7 . 4)、0 . 1 % B S A) で、活性化された d y n a b e a d s を 4 回、3 0 分間洗浄した。

- P B S、0 . 1 % (w / v) B S A、0 . 0 2 % アジ化ナトリウム 1 m L を用いて、活性化された d y n a b e a d s を再懸濁し、渦巻き攪拌し、短時間遠心した。

- 抗体活性化された d y n a b e a d s は、さらなる使用まで、4 で保存した。

10

【 0 2 1 9 】

C S F 試料の調製

アルツハイマー病患者から得た C S F 4 0 0 μ L を完全プロテアーゼ阻害剤カクテル (R o c h e I n c . カタログ番号 1 6 9 7 4 9 8、水 1 m L 中に 1 錠溶解) 4 μ L に添加し、5 0 0 m M P M S B 0 . 8 μ L をメタノール中に溶解した。1 0 分後、2 0 m M N a H ₂ P O ₄、1 4 0 m M N a C l、0 . 0 5 % T w e e n 2 0、p H 7 . 4 (P B S T) 1 . 6 m L を添加した。

【 0 2 2 0 】

ヒト A D - C S F からの A 種の免疫沈降 :

調製された C S F 試料の分取試料 2 5 0 μ L を抗 A - D y n a b e a d s 懸濁物 2 5 μ L に添加した。

20

- 攪拌しながら、6 で 1 6 時間、免疫沈降を行った。続いて、P B S / 0 . 1 % (w / v) B S A で 5 分間 3 回、最後に、1 0 m M T r i s H C l p H 7 . 5 の 1 m L で 3 分間 1 回、ビーズの洗浄を行った。磁気分離装置スタンド (M S S) を用いて、反応容器の側面に d y n a b e a d s を固定化しながら、洗浄操作の間に、上清を慎重に除去した。

【 0 2 2 1 】

最終洗浄工程後、残存する上清を完全に除去した。 - メルカプトエタノールなしの試料緩衝液 (0 . 3 6 M B i s t r i s、0 . 1 6 M ビシン、1 % S D S (w / v)、1 5 % (w / v) スクロース、0 . 0 0 4 % (w / v) ブロムフェノールブルー) 2 5 μ L を E p p e n d o r f f チューブに添加し、加熱ブロック中において、9 5 で 5 分間加熱することによって、A ペプチド及び対応する抗体を D y n a b e a d s から除去した。室温まで冷却した後、磁気分離装置スタンド (M S S) を用いて、反応容器の側面に d y n a b e a d s を固定化し、上清を別の E p p e n d o r f f チューブ (I P 溶出液) に移した。

30

【 0 2 2 2 】

尿素 - P A G E に続くウェスタンブロット操作による A 免疫沈降物の分析 :

「 H . W . K l a f k i e t a l . , A n a l y t i c a l B i o c h e m i s t r y 2 3 7 . , 2 4 - 2 9 (1 9 9 6) 」によって最初に記載され、「 J . W i l t f a n g e t a l . , J . o f N e u r o c h e m i s t r y 8 1 , 4 8 1 - 4 9 6 , 2 0 0 2 」によっても後に使用された操作に従い、8 M 尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動系及びその後のウェスタンブロット分析によって、A 1 - 4 0 及び A 1 - 4 2 種の定量を行った。実験操作に施された 2 つの僅かな変更のみが存在した。

40

【 0 2 2 3 】

1) スタッキングゲル中の S D S 濃度は、0 . 1 % (w / v) の代わりに 0 . 2 5 % (w / v) に調整した。

2) ウェスタンブロットのために、抗体 1 E 8 (S e n e t e k D r u g D e l i v e r y T e c h n o l o g i e s I n c . S t . L o u i s , M O , U S A) は抗ヒトアミロイド (N) (8 2 E 1) マウス I g G m A b (I B L カタログ番号 1 0 3 2 3) に置き換えられた。

【 0 2 2 4 】

50

免疫沈降された試料のIP溶出液分取試料15 μ Lを8M尿素PAGEにかけた。電気泳動は100V(15分)で行い、60Vで継続した。青い試料搭載色素の走行する先頭がゲルの末端からなお0.5cm離れている時点で、電気泳動を停止した。

【0225】

ウェスタンブロットの操作：

ウェスタンブロット分析は、7.5cm \times 9cmニトロセルロース0.45 μ m(BioRad Inc.)上への、SemiDry Blottingチャンバー(BioRad Inc., 75mAで45分)中で行った。

ブロッティング緩衝液：Tris 6g；グリシン 28.1g；メタノール 500mL；2.5Lになるように水で調整。

10

【0226】

PBS中において、100 で10分間、ニトロセルロースブロットを沸騰させた。室温で1時間、PBST中の5%(w/v)BSA 50mLでの処理によって、ブロットを飽和させた。液体相を除去した後、室温で10分間、TTBS(25mM Tris/HCl；150mM NaCl 緩衝液；0.05% Tween 20；pH 7.5) 50mLで2回、室温で10分間、続いてTBS(25mM Tris/HCl；150mM NaCl 緩衝液；pH 7.5) 50mLで以下の洗浄工程を実施した。

【0227】

さらなる展開のために、ブロットから最終洗浄緩衝液を廃棄し、抗体I溶液15mL(3%(w/v)スキムミルク粉末(Lasana Inc.)中の(0.2 μ g/mL 82 E1 = 1:500、TBS 15mL中)を6 で20時間添加した。緩衝液の除去後、上述されているように3つの洗浄工程を行った。抗体溶液II(TBS 15mL中の3%(w/v)スキムミルク粉末15mL中の抗マウスPODの1:10000希釈)とともに、室温で1時間、ブロットを温置した。緩衝液の除去後、上述されているように3つの洗浄工程を行った。

20

【0228】

最後の洗浄緩衝液を除去した後、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Enhancer 2mL及びPeroxide Solution 2mLを混合した。調製した直後の溶液を、暗所で5分間、事前温置されたブロット上に注いだ。VersaDoc Imagingシステム(BioRad)を用いて、化学発光を記録した。

30

【0229】

画像化パラメータ：

露出時間 180秒。

30秒、60秒、120秒及び180秒後に、写真を記録。

180秒の露出時間での写真から、結果を得た。

【0230】

本発明の抗グロブロマー抗体10F4及び3C5は、(文献において、A の立体構造に関わらず、全てのA 形態を認識すると認められている)市販の抗体6E10と比べて、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中のA (1-42)及びA (1-40)ペプチドに対して、より低い親和性を有する。CSFA ペプチド形態は高い代謝回転速度に供せられ(Bateman et al., Nature Medicine, 2006, 12(7): 856-61)、従って、疾病の関連種である可能性は低い。従って、CSFA 形態は、望ましくない副作用のリスクを低減するために、アルツハイマー病の受動免疫治療戦略における標的とすべきではない。より初期の研究において(Barghorn et al., J Neurochem, 2005; 95(3): 834-847)、抗A グロブロマー抗体8F5はアルツハイマー病患者のCSF中のA ペプチドを認識及び結合しないことが注目される。この初期の研究は、サンドイッチELISA法を用いて行われた。これに対して、上記免疫沈降及び尿素PAGE法を使用する場合、同じ抗体8F5はアルツハイマー病患者の脳脊髄液中のA ペプチドを認識する(図5参照)。

40

50

従って、サンドイッチELISA法は偽陰性結果を与えた。従って、CSF中のAβペプチドの検出のために、本明細書に記載されている免疫沈降及び尿素PAGE法を使用すべきである。

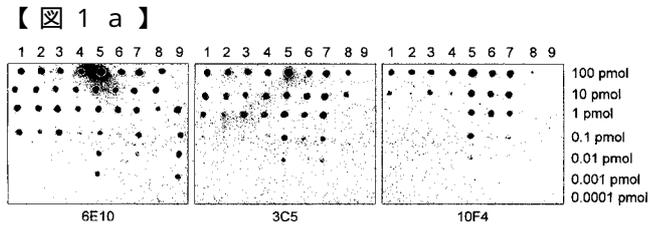


FIG.1a

【図1b】

	Aβ(1-42) 単量体 0.1%NH ₄ OH 中	Aβ(1-40) 単量体 0.1%NH ₄ OH 中	Aβ(1-42) 単量体 0.1%NaOH 中	Aβ(1-42) 単量体 0.1%NaOH 中	Aβ(1-42) グロブロマー	Aβ(12-42) グロブロマー	Aβ(20-42) グロブロマー	Aβ(1-42) 原繊維	sAPPα
6E10	41	132	41	196	1	225	16	1216	0.8
10F4	645	1429	455	769	1	11	9	12500	> 100
3C5	341	577	288	306	1	47	6	3488	> 1000

FIG.1b

【図2a】

患者番号	診断	性別	死亡時の年齢	死後の時間	Braak&Braak 指数	CERAD 指数	脳試料の領域
RZ55	AD	男	80	12	V	C	前頭皮質
RZ119	AD	男	76	24	VI	C	前頭皮質
RZ122	AD	女	83	14	V-VI	C	前頭皮質
RZ296	AD	男	88	4	V	C	前頭皮質
RZ307	AD	女	78	21	VI	C	前頭皮質
ABS 0504009	AD	男	88	3	測定せず	測定せず	前頭皮質
RZ145	痴呆症状なし	女	86	20	I	0	前頭皮質
RZ342	痴呆症状なし	女	84	22	II	0	前頭皮質

FIG.2a

【図2b】

SEI/O-MS 分析	アルツハイマー病の脳												年齢を合わせた対照脳			
	RZ55	RZ119	RZ122	RZ296	RZ307	ABS 0504009	RZ145	RZ342	RZ55	RZ119	RZ122	RZ296	RZ307	RZ145	RZ342	
Aβ(1-40) IP の% Aβ	6074	686	370	626	284	1101	161	1030	6736	1688	66	933	38	272	76	491
Aβ(1-42) IP の% Aβ	1667	110	13	21	58	652	32	507	2046	233	17	110	2	4	15	54
Aβ(1-40) IP の% Aβ	2655	303	17	47	69	684	39	618	4012	856	46	395	2	34	47	286
lgG2b	10	1	2	3	2	10	2	4	9	4	3	9	1	4	1	1

FIG.2b

【図2c】

SEI/O-MS 分析	アルツハイマー病の脳												年齢を合わせた対照脳			
	RZ55	RZ119	RZ122	RZ296	RZ307	ABS 0504009	RZ145	RZ342	RZ55	RZ119	RZ122	RZ296	RZ307	RZ145	RZ342	
Aβ(1-40) IP の% Aβ	27	16	4	3	20	59	20	49	30	14	26	12	5	1	20	11
Aβ(1-42) IP の% Aβ	44	44	5	8	24	62	24	60	60	51	70	42	5	13	62	58
lgG2b	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	5	1	3	1	1	0

FIG.2c

【図2d】

ウェスタンプロット分析	アルツハイマー病の脳												年齢を合わせた対照脳			
	RZ55 Aβ [a.u.]	RZ119 Aβ [a.u.]	RZ122 Aβ [a.u.]	RZ296 Aβ [a.u.]	RZ307 Aβ [a.u.]	ABS 0504009 Aβ [a.u.]	RZ145 Aβ [a.u.]	RZ342 Aβ [a.u.]	RZ55 Aβ [a.u.]	RZ119 Aβ [a.u.]	RZ122 Aβ [a.u.]	RZ296 Aβ [a.u.]	RZ307 Aβ [a.u.]	ABS 0504009 Aβ [a.u.]	RZ145 Aβ [a.u.]	RZ342 Aβ [a.u.]
6E10	229402	146045	151948	172822	242537	123837	42788	61855								
3C5	44195	5624	35957	49785	47228	10662	169	3933								
10F4	97036	44398	88681	103512	120196	44366	963	29300								
lgG2b	754	109	601	1594	233	111	45	91								

FIG.2d

【図2e】

ウェスタンプロット分析	アルツハイマー病の脳												年齢を合わせた対照脳			
	RZ55 6E10 IP の% Aβ	RZ119 6E10 IP の% Aβ	RZ122 6E10 IP の% Aβ	RZ296 6E10 IP の% Aβ	RZ307 6E10 IP の% Aβ	ABS 0504009 6E10 IP の% Aβ	RZ145 6E10 IP の% Aβ	RZ342 6E10 IP の% Aβ	RZ55 6E10 IP の% Aβ	RZ119 6E10 IP の% Aβ	RZ122 6E10 IP の% Aβ	RZ296 6E10 IP の% Aβ	RZ307 6E10 IP の% Aβ	ABS 0504009 6E10 IP の% Aβ	RZ145 6E10 IP の% Aβ	RZ342 6E10 IP の% Aβ
3C5	19	4	24	29	19	9	0	6								
10F4	42	30	58	60	50	36	2	47								
lgG2b	0	0	0	1	0	0	0	0								

FIG.2e

【 図 3 a 】

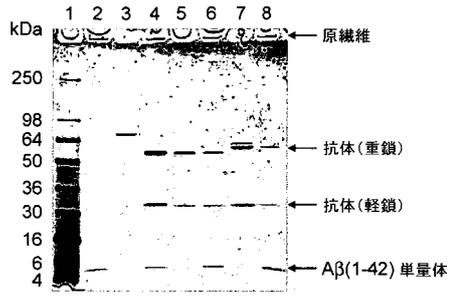


FIG.3a

【 図 3 b 】

		痕跡 OD x mm [a.u.]	原繊維に結合された抗体[%]
6E10	上清	0.007	97
	沈降物	0.233	
3C5	上清	0.111	34
	沈降物	0.057	
10F4	上清	0.160	23
	沈降物	0.047	

FIG.3b

【 図 4 a 】

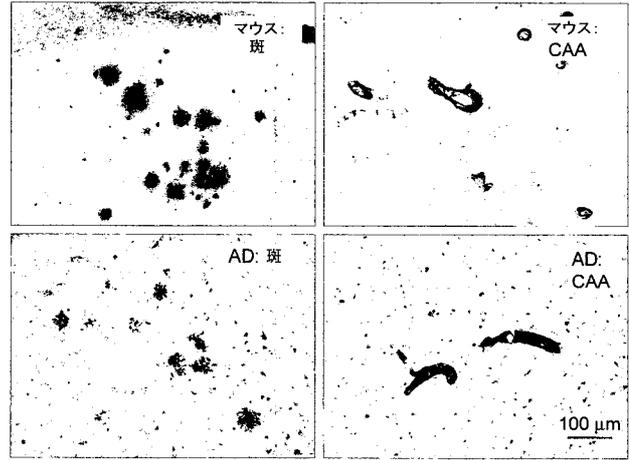


FIG.4a

【 図 4 b 】

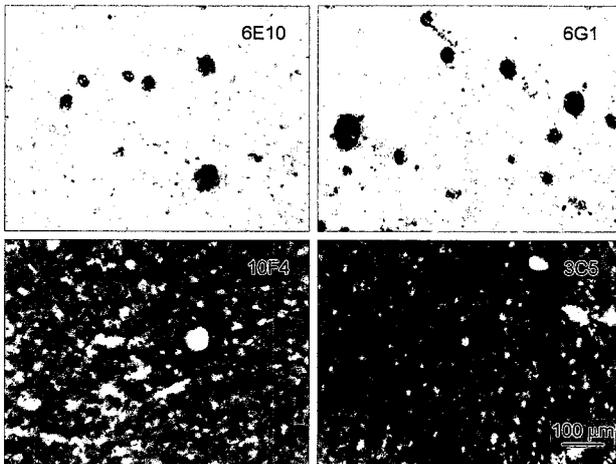


FIG.4b

【 図 4 c 】

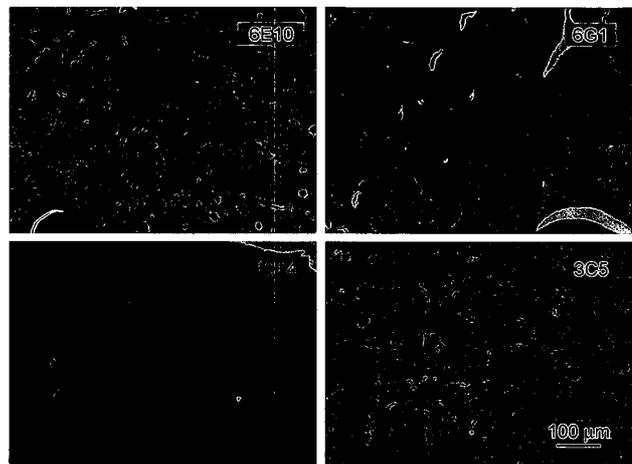
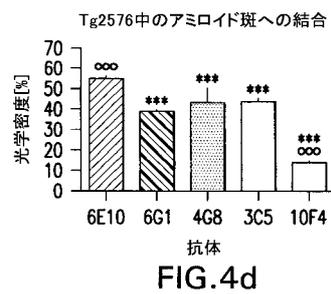


FIG.4c

【 図 4 d 】



【 図 4 e 】

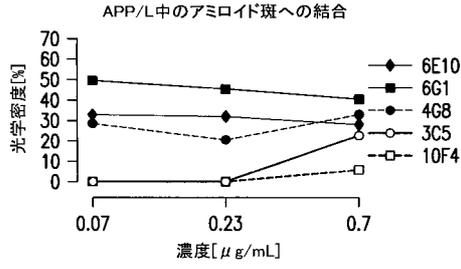


FIG.4e

【 図 4 g 】

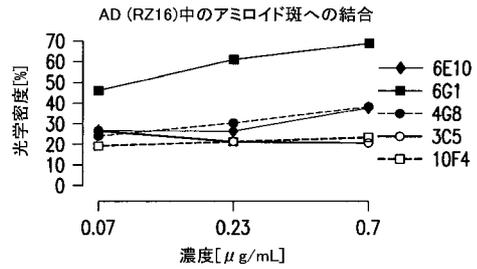


FIG.4g

【 図 4 f 】

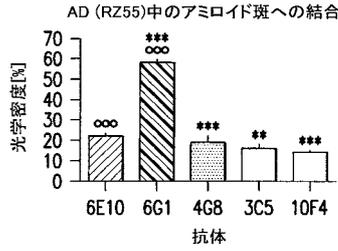


FIG.4f

【 図 4 h 】

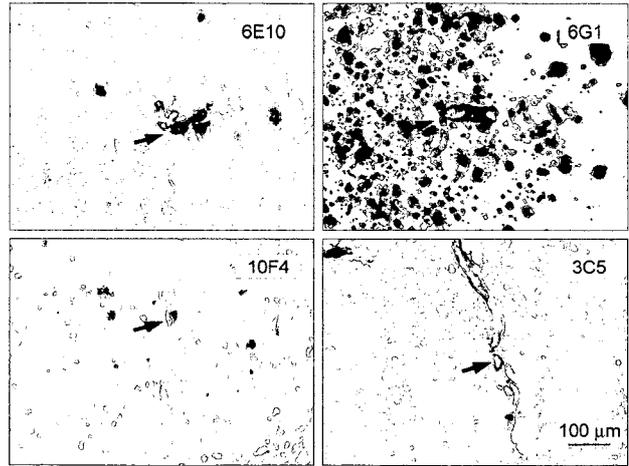


FIG.4h

【 図 5 a 】

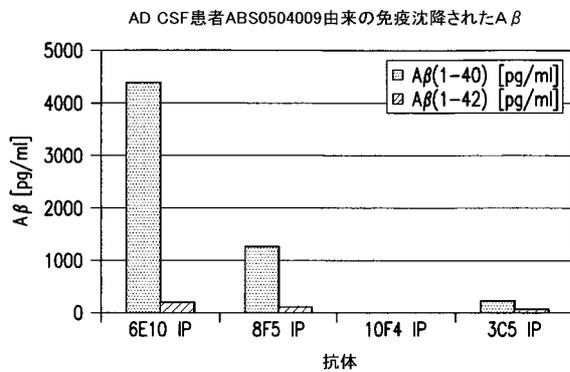


FIG.5a

【 図 5 c 】

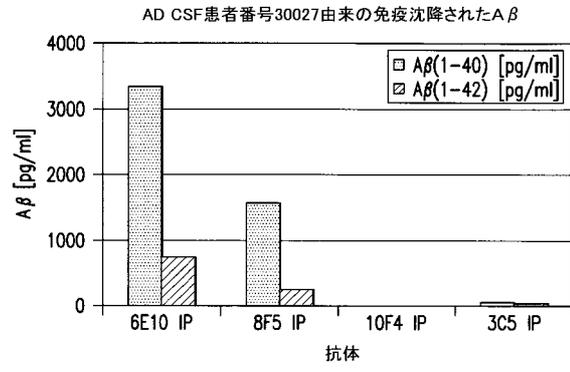


FIG.5c

【 図 5 b 】

患者番号	抗体	6E10 IPの % Aβ(1-40)	6E10 IPの % Aβ(1-42)
ABS 0504009	8F5	29	55
	10F4	0	0
	3C5	5	38

FIG.5b

【 図 5 d 】

患者番号	抗体	6E10 IPの % Aβ(1-40)	6E10 IPの % Aβ(1-42)
30027	8F5	47	34
	10F4	0	0
	3C5	2	5

FIG.5d

【 図 5 e 】

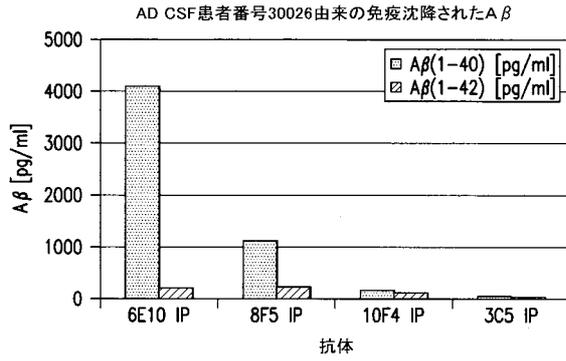


FIG.5e

【 図 5 g 】

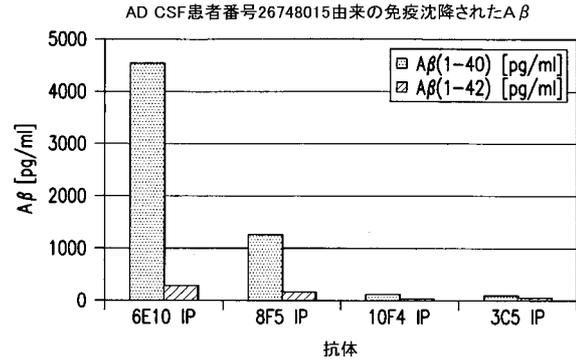


FIG.5g

【 図 5 f 】

患者番号	抗体	6E10 IPの % Aβ(1-40)	6E10 IPの % Aβ(1-42)
30026	8F5	27	112
	10F4	4	56
	3C5	1	9

FIG.5f

【 図 5 h 】

患者番号	抗体	6E10 IPの % Aβ(1-40)	6E10 IPの % Aβ(1-42)
26748015	8F5	28	58
	10F4	3	13
	3C5	2	17

FIG.5h

【 図 5 i 】

患者番号	診断	性別	死後のCSF試料		死亡前のCSF試料	
			死亡時の年齢	死後の時間(h)	試料を採取したときの患者の年齢	小精神状態検査(MMSE)スコア
ABS 0504009	AD	男	88	3	不明	測定せず
30027	AD	男	不明	不明	72	14
30026	AD	男	不明	不明	70	22
26748015	AD	女	不明	不明	48	11

FIG.5i

【 図 6 c 】

配列番号:3 (VH ML43-10F4)

```

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGA
GGGTGCTCCTGCAAGCCTTCGGATACGCCCTTCACTAATTACTTGATAGAGTGGGT
AAAGCAGAGGCCCTGGACAGGCCCTTGAGTGGATTGGAGTAAATCCTGGAAG
TGGTGATACTAACTACAATGAGAATTTCAAGGCCAAGGCAACTGACTGCAGA
CAAACTCCTCCAGCAGTGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCT
GGGTCTATTCTGTACAAGAGCGGTGATTACGACGGGTTTGACTACTGGGGCC
AAGGCACCACTCTCACAATCTCTCA

```

FIG.6c

【 図 6 a 】

配列番号:1 (VH ML45-3C5)

```

GATGTGCAGCTTCAGGAGTGGGACCTGGCCCTGGTAAACCTTCTCAGTCTCTGT
CCCTCACCTGCAGCTGTCGCTGGCTCCTCAATCACCAGTCAATTATGCCTGGAACCTGG
ATCCCGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAGACTATAGT
GGTAGCACTGCTACCTCCCTCCTCAAAGTGAATCTCTATCACTCGAGACA
CATCCAAGAACCAGTTCTCCTGTCAGTTGAATTTCTGTGACTACTGAGGACACAGC
CACATATTACTGTGAAGGGGTAGTGGTTATTTCTATGGTATGACTACTGGGGT
CAAGGAACCTCAGTCAACCCTCCTCA

```

FIG.6a

【 図 6 d 】

配列番号:4 (VL ML43-10F4)

```

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGAGAACTG
TCACCATCACATGTGGAGCAAGTGGGAATTCACAATTTATAGCATGGTATCA
GCAGAAACAGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTAATGCAAAAACCTTAGCA
GATGGTGGCCATCAAGTTTCAAGTGGATCAGGAACAATTTCTCTCA
AGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTTG
GAGTAGTCTCGGAGCTTCGGTGGAGCACCAAGCTGGAATCAAACGG

```

FIG.6d

【 図 6 b 】

配列番号:2 (VL ML45-3C5)

```

GACATCCAGATGAACCACTCTCCATCCAGTCTGTCCATCCCTTGGAGACACAA
TTACCATCACTTGCCATGCCAGTCAAGAACATTAATGTCTGGTTAAGCTGGTACCA
GCAGAAACCAGGAAATATTCCTAAACTATTGATCTATAAGGCTTCCAACCTGGCAC
ACAGGCGTCCCATCAAGGTTTATGGCAGTGGATCGGAATAGGTTTTACATTA
CCATCCGAGCCTGCAGCCTGAAGACATTGCCACTTACTTCTGTCAACAGGGTCA
AAGTTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGACTAAGCTGGAATAAAACGG

```

FIG.6b

【 図 7 a 】

配列番号:5 (VH ML45-3C5)

```

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVAGSSITSHYANNWIRQFPGNKLEMMGYIDYSGS
TRYLP SLKRSIRISITRDTSKNFFLQLNSVTTEDTATYTCARGSGYFGMDYWGQGT
VTYSS

```

FIG.7a

【 図 7 b 】

配列番号:6 (VL ML45-3C5)

DIQMNQSPSSLSPLGDTITITCHASQNIINWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVP
SRFSGSGSIGFTLTIRSLQPEDIATYFCQQGQSYPTFGGGTKLEIKR

FIG.7b

【 図 7 c 】

配列番号:7 (VH ML43-10F4)

QVQLQQSGAELVRPGTSVRVSKASGYAFNYLIEWVKQRPGGLEWIGVINPGSGD
TNYNENFKGKATLTADKSSSTAYMHLSSLTSDSAVYFCTRGVITIGFDYWGQGTTL
TISS

FIG.7c

【 図 7 d 】

配列番号:8 (VL ML43-10F4)

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADG
VPSRFSGSGGTQYSLKINSLQPEDFGSYQCQHFWSSPRTFGGGTKLEIKR

FIG.7d

【 配列表 】

201051138600001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/85932
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 39/395(2006.01),31/711(2006.01);C12N 15/09(2006.01) USPC: 424/139.1;514/44;435/252.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/139.1; 514/44; 435/252.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, Pubmed, Dialog		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 613 007 Becker	1-6,28-29,33-35,42
X	WO 2004/090544 (Hu et al), esp. Figure 1B	17
X	US 2003/0108551 (Nicolau et al)	1-6,22,35,37-42,44-46 ----- 43
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 28 August 2008 (28.08.2008)		Date of mailing of the international search report 22 SEP 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer: DANIEL KOMER Telephone No. (571) 272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/85932

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/85932**BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1 - 21, 27 - 32, 35 - 36, 42, and 44 - 46, drawn to isolated antibodies and kits, vaccines, and compositions comprising same.

Group 2, claim(s) 22 - 26, drawn to isolated nucleic acids, vectors, host cells, and methods of making protein.

Group 3, claim(s) 33 - 34, drawn to methods of administering antibodies to patients.

Group 4, claim(s) 37 - 41, drawn to methods of diagnosing disease.

Group 5, claim(s) 43, drawn to a method of identifying compounds for immunization of patients.

The inventions listed as Groups 1 - 5 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the first claimed technical feature is not a contribution over the prior art and therefore is not a special technical feature as defined in PCT Rule 13. The first claimed technical feature is an antibody that binds with a higher affinity to globulomer (i.e. aggregated) forms of A β than to other forms of A β peptide. However this is not a contribution over the prior art. Becker European Patent Application 0 613 007, published 31 August 1994, teaches antibodies that specifically bind to the aggregated form of A β peptide; see column 7 lines 25 - 40. As the first claimed technical feature is not a special technical feature, there cannot be a special technical feature which links all inventions. Note that PCT Rule 13 does not allow for multiple products or methods in the same application.

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 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
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 K 39/395 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	B
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
	A 6 1 K 39/39	
	G 0 1 N 33/53	D

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100140523

弁理士 渡邊 千尋

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 バルクホルン, シユテファン

ドイツ国、6 8 1 6 1・マンハイム、ベルリナー・シユトラーセ・3 0

(72)発明者 ヒレン, ハイנטツ

ドイツ国、6 7 4 5 4・ハスロツホ、マツクス - ブランク - シユトラーセ・1 7

(72)発明者 シユトリーピンガー, アンドレーアス・エール

ドイツ国、6 7 3 4 6・シユバイヤー、ツイーゲローフエンベーク・4 6・アー

(72)発明者 ラブコフスキー, ボリス

アメリカ合衆国、マサチューセツツ・0 1 0 8 1、ウエールズ、ユニオン・ロード・1 1 5、ピー・オー・ボツクス・7

(72)発明者 エーベルト, ウルリヒ

ドイツ国、6 8 1 6 3・マンハイム、ケーニツヒシユトウールシユトラーセ・6

(72)発明者 ケラー, パトリック

ドイツ国、6 4 2 9 1・ダルムシユタツト、ベルンハルトシユトラーセ・3 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 CA02 CA07 CA20 GA03 GA11 GA18

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA92X AB01 AB05 AC14 AC15 BA08 CA25 CA44 CA46

4C085 AA03 AA13 AA14 AA38 CC22 CC23 EE03 EE06 FF24

4H045 AA11 BA09 BA41 DA76 EA21 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	新型A β 构象异构体选择性抗A β 球聚体单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2010511386A	公开(公告)日	2010-04-15
申请号	JP2009539484	申请日	2007-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司 基于EM的雅培门硬UND公司汽车游戏		
申请(专利权)人(译)	雅培制药 雅培GMBH UND有限公司卡格		
[标]发明人	バルクホルンシュテファン ヒレンハインツ シュトリービンガーアンドレーアスエール ラブコフスキーボリス エーベルトウルリヒ ケラーパトリック		
发明人	バルクホルン,シュテファン ヒレン,ハインツ シュトリービンガー,アンドレーアス・エール ラブコフスキー,ボリス エーベルト,ウルリヒ ケラー,パトリック		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12P21/08 C07K16/46 C12N15/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P25/28 A61P25/00 A61K39/39 G01N33/53		
CPC分类号	A61P25/00 A61P25/28 C07K16/18 C07K2317/10 C07K2317/565 C07K2317/14 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/92 G01N33/6896 G01N2800/2821		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C12P21/08 C07K16/46 C12N15/00.C C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N15/00.B A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/28 A61P25/00 A61K39/39 G01N33 /53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/CA20 4B024/GA03 4B024 /GA11 4B024/GA18 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/AC15 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065 /CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA38 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF24 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045 /EA21 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	60/872156 2006-11-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及可用于治疗 and 诊断阿尔茨海默病的单克隆抗体。特别地，本发明涉及称为10F4和3C5的单克隆抗体以及具有与其相似性质的其他单克隆抗体（例如鼠，人或人源化）。

ウェスタン ブロット 分析	アルツハイマー病の脳					年齢を合わせた対照脳		
	R255 A β [a.u.]	R2119 A β [a.u.]	R2122 A β [a.u.]	R2266 A β [a.u.]	R2307 A β [a.u.]	AGS 0504009 A β [a.u.]	R2145 A β [a.u.]	R2342 A β [a.u.]
6E10	229402	146045	151948	172802	242537	123837	42788	61855
3F5	44195	5624	35957	49785	47228	10662	169	3993
10F4	97036	44388	88681	103612	120196	44366	963	29380
6f2b	754	109	601	1594	233	111	45	91

FIG.2d