

(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2009-530374

(P2009-530374A)

(43) 公表日 平成21年8月27日(2009.8.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	4 B O 6 4
C07K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 7 6
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 4
A61K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
A61K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	4 H O 4 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-501383 (P2009-501383)	(71) 出願人	506318919
(86) (22) 出願日	平成19年3月23日 (2007. 3. 23)		バイオアークティック ニューロサイエン
(85) 翻訳文提出日	平成20年9月22日 (2008. 9. 22)		ス アーバー
(86) 国際出願番号	PCT/SE2007/000292		スウェーデン国 エス-104 25 ス
(87) 国際公開番号	W02007/108756		トックホルム ピー. オー. ボックス 3
(87) 国際公開日	平成19年9月27日 (2007. 9. 27)		0015
(31) 優先権主張番号	0600662-1	(74) 代理人	100083806
(32) 優先日	平成18年3月23日 (2006. 3. 23)		弁理士 三好 秀和
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)	(74) 代理人	100095500
(31) 優先権主張番号	0602591-0		弁理士 伊藤 正和
(32) 優先日	平成18年11月30日 (2006.11.30)	(74) 代理人	100111235
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		弁理士 原 裕子
		(72) 発明者	ゲラーフォース、 パール
			スウェーデン国 エス-181 63 リ
			ディンゴ ラグマンズバーゲン 13
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良型プロトフィブリル選択的抗体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病、及び他の類似の疾患の予防、処置及び診断に関する。より具体的には、プロトフィブリル高次構造においてアミロイドβタンパク質 (Aβ) に対し選択性を有し、且つ Ig G クラス及び Ig G 1 若しくは Ig G 4 サブクラス又はそれらの組み合わせ又はそれらの突然変異体であり、高 Fc 受容体結合性及び低 C1 (C1q) 結合性を保有し、Aβプロトフィブリルのクリアランスに有効で、且つ炎症のリスクが低減された高親和性抗体に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型ヒト A β プロトフィブリルに対し選択的および高親和性を有する抗体又はその断片であって、前記抗体又は断片がその 6 つの C D R 領域において以下の共通配列、

V H - C D R 1 S F G M H

V H - C D R 2 Y I S S G S S T I Y Y G D T V K G

V H - C D R 3 E G G Y Y Y G R S Y Y T M D Y

V L - C D R 1 R S S Q S I V H S N G N T Y L E

V L - C D R 2 K V S N R F S

V L - C D R 3 F Q G S H V P P T

を有し、前記抗体又は断片が前記 C D R 領域内でアミノ酸欠失、置換及び挿入を示し得る、抗体。

10

【請求項 2】

前記 C D R 領域内に 1 ～ 10 個のアミノ酸欠失、置換及び挿入を示す、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記 C D R 領域内に 1 ～ 5 個のアミノ酸欠失、置換及び挿入を示す、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記 C D R 領域内に 1 ～ 3 個のアミノ酸欠失を示す、請求項 1 に記載の抗体。

20

【請求項 5】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体が低減された補体活性化活性を有する、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

前記低減された補体活性化活性を、前記アミノ酸のプロリンを第 331 位でセリン又は他の極性アミノ酸に換えることにより獲得する、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 8】

前記低減された補体活性化活性を、グリコシル化を阻害するか、又は低下させるか、又は変化させることにより獲得する、請求項 6 に記載の抗体。

30

【請求項 9】

前記抗体が I g G クラスである、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 10】

前記抗体が I g G 1 又は I g G 4 サブクラスである、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

I g G 1 又は I g G 4 サブクラスのキメラである抗体であって、重鎖定常領域 C H 2 又は C H 2 の一部が I g G 4 に由来し、および領域 C H 1 及び C H 3 が I g G 1 に由来することにより補体活性化が低減される、請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 12】

表 3 1 の完全重鎖配列及び表 4 2 の完全軽鎖配列を含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 13】

表 4 3 の重鎖 (V H) に、A 60 G、D 1 E、P 74 A 及び T 82 S から選択される突然変異を含むか、及び／又は表 4 4 の軽鎖 (V K) に、L 3 V 及び G 100 P から選択される突然変異を含むか、又はこれらの V H 及び V K 突然変異の組み合わせを含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 14】

C D R 1 の前記重鎖配列の左側 8 番目のアミノ酸が S であることを除き、表 3 1 の完全重鎖配列及び表 4 2 の完全軽鎖配列を含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の抗体

50

。

【請求項 15】

ヒト又はヒト化又は変異型であることによりヒトにおける抗原性が低減される、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 16】

マウス抗体である、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 17】

A β 単量体とプロトフィブリルとの間の特異性の比が少なくとも 1：200 である、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 18】

6つのCDR領域に以下の共通配列：

VH-CDR1 AASGFTFSFGMHWVR
 VH-CDR2 WVAYISSGSTIYYGDTVKGRT
 VH-CDR3 CAREGGYYGRSYTMDYWGQ
 VL-CDR1 ISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYL
 VL-CDR2 LIYKVS N RFS GVP
 VL-CDR3 YYCFQGSHVPPTFGG

を有する抗体であって、前記抗体又は断片が前記CDR領域内にアミノ酸欠失、置換及び挿入を示し得る、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 19】

前記抗体がマウス抗体である、請求項 18 に記載の抗体。

【請求項 20】

前記抗体が表 11 の完全軽鎖配列 158 VK 及び表 15 の完全重鎖配列 158 VH を含む、請求項 18 又は 19 に記載の抗体。

【請求項 21】

ヒト及び獣医学用途の、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗体及び薬学的に許容可能な緩衝液を含む組成物。

【請求項 22】

抗菌剤をさらに含む、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記組成物が凍結乾燥されている、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記組成物が賦形剤と共に凍結乾燥されることにより凍結乾燥中及びその後の前記抗体の安定性が向上する、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記賦形剤がマンニトール又はトレハロースである、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 26】

アルツハイマー病を予防又は処置する方法であって、アルツハイマー病に罹っている、又は罹っていることが疑われる患者に対し、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 21～25 に記載の組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 27】

ダウン症候群、レビー小体認知症、血管性認知症及び他の神経変性障害を予防又は処置する方法であって、ダウン症候群、レビー小体認知症、血管性認知症及び他の神経変性障害に罹っている、又は罹っていることが疑われる患者に対し、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 21～25 に記載の組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 28】

A β プロトフィブリルを試験管内で検出する方法であって、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗体を、A β プロトフィブリルを含む、又は含むことが疑われる生体試料に付加する工程と、前記A β プロトフィブリルと前記抗体との間に形成される複合体の濃度を計測する工程と

10

20

30

40

50

、
を含む、方法。

【請求項 29】

前記検出方法が免疫測定法である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記検出方法が近接連結測定法である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

A β プロトフィブリルを生体内で検出する方法であって、
請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗体を、A β プロトフィブリルを含む、又は含む
ことが疑われる哺乳動物に付加する工程と、
前記 A β プロトフィブリルと前記抗体との間に形成される複合体の濃度を計測する工程と
、
を含んでなる、方法。

10

【請求項 32】

アルツハイマー病を診断する方法であって、
被験者から生体試料を採取する工程と、
請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗体を前記試料に付加する工程と、
前記試料中の前記抗体と任意の A β プロトフィブリルとの間に形成される複合体の濃度
を計測する工程と、
を含む、方法。

20

【請求項 33】

ダウン症候群、レビー小体認知症、血管性認知症及び他の神経変性障害を診断する方法
であって、
被験者から生体試料を採取する工程と、
請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗体を前記試料に付加する工程と、
前記試料中の前記抗体と任意の A β プロトフィブリルとの間に形成される複合体の濃度
を計測する工程と、
を含む、方法。

【請求項 34】

アルツハイマー病の処置用薬剤を調製するための、請求項 1～20 のいずれか一項に記
載の抗体又は請求項 21～25 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

30

【請求項 35】

ダウン症候群、レビー小体認知症、血管性認知症及び他の神経変性障害の処置用薬剤を
調製するための、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 21～25 のい
ずれか一項に記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病、及び他の類似疾患の予防、処置及び
診断に関する。より正確には、プロトフィブリル高次構造においてアミロイド β タンパク
質(A β)に対し選択性を有し、且つ IgG クラス及び IgG1 若しくは IgG4 サブク
ラス又はこれらの組み合わせ又はこれらの突然変異体であり、高 Fc 受容体結合性及び低
C1 (C1q) 結合性を保有し、A β プロトフィブリルのクリアランスに有効で、及び炎
症のリスクが低減された、高親和性の 10^{-7} M、好ましくは 10^{-8} M、さらには 10^{-9} M 未満又は 10^{-10} M 若しくは 10^{-11} M 未満の抗体に関する。

40

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病(AD)は、認知、記憶及び行動障害を引き起こす進行性で不可逆的
な神経変性障害である。AD は高齢者人口における認知症の最も一般的な原因であり、6
5 歳超の人口のおよそ 5% 及び 80 歳超の 20% が発症している。AD は複数の認知機能

50

における潜行性の発病及び進行性の悪化を特徴とする。神経病理としては、細胞外及び細胞内の双方の好銀性タンパク質沈着を伴う。細胞外の沈着物は老人斑と称され、主に異栄養性神経突起（腫脹し、変形した神経突起）に囲まれるアミロイド β タンパク質（A β ）からなる。この細胞外沈着物内のA β は原線維状であることを特徴とし、 β ひだ状シート構造を伴う。この沈着物のA β はある種の色素、例えばコンゴレッドで染色でき、原線維状の超微細構造を呈する。老人斑中の原線維状構造のA β が備えるこれらの特徴が、一般名称としてのアミロイドの定義である。古典的な細胞内のAD病変は神経原線維変化（NFT）であり、これは高リン酸化微小管結合タンパク質 τ のよじれた鎖で構成されるペアーヘリカルフィラメント（PHF）と呼ばれる繊維状構造からなる。脳において頻繁に見られる老人斑及び神経原線維変化の堆積が、死後に行われるAD診断の基準である。AD脳はまた、肉眼的な脳萎縮、神経細胞損失、局所炎症（ミクログリオシス及び星状細胞増加症）及びしばしば脳血管壁内に脳アミロイド血管症（CAA）も呈する。

【0003】

A β ペプチドの2つの型、A β 40及びA β 42がAD老人斑における主な型であるが、ADに関連する脳血管アミロイドにおいてはA β 40が顕著な型である。酵素活性によりA β は、健常及びAD罹患の双方の被験者における全ての体細胞中でアミロイド前駆体タンパク質（APP）と呼ばれる大型タンパク質から継続的に形成される。 β -及び γ -セクレターゼ活性を通じた2つの主要なAPP切断イベントによりA β 産生が可能となる一方、 α -セクレターゼと呼ばれる第3の酵素がA β 配列を内側で切断することによりA β 生成を妨げる（セルコエ（Selkoe）、1994年；エステル（Esther）、2001年；米国特許第5604102号明細書）。A β 42は42アミノ酸長のペプチドであり、すなわちA β 40と比較してC末端で2つのアミノ酸分だけ長い。A β 42は疎水性がより高く、且つA β 二量体、A β 三量体、A β 四量体、A β オリゴマー、A β プロトフィブリル又はA β フィブリルなどのより大型の構造のA β ペプチドへとより容易に凝集する（ジャレット（Jarrett）、1993年）。A β フィブリルは疎水性且つ不溶性だが、その他の構造は全て疎水性が低く可溶性である。これらのより高度な分子構造のA β ペプチドは全て、例えば電子顕微鏡法によるそれらの生物物理学的及び構造的な外観、及び例えばサイズ排除クロマトグラフィー／ウエスタンブロットでの分析によるそれらの生化学的特徴に基づき、個々に定義される。これらのA β ペプチド、特にA β 42は、寿命の間に種々のより高度な分子構造のA β へと徐々に集合することとなる。ADは年齢に大きく依存する障害であり、この集合プロセスが急速に生じるほど、生涯においてより早期に発症する。これが、ADの主原因はAPP切断、A β 42のレベル及びこれらのより高度な分子構造への集合であると主張するADの「アミロイドカスケード仮説」の中核をなす。他の全てのAD脳についての神経病理及び認知症などのADの症状が、何らかの形でA β 又はその集合体により引き起こされている。

【0004】

A β は、種々の長さで、すなわち1-39、1-40、1-42及び1-43が、並びに種々の断片サイズで、すなわち1-28及び25-35が存在し得る。ペプチドのN末端で切断が生じ得る。これらの全てのペプチドは凝集して可溶性中間体及び不溶性フィブリルを形成することができ、各分子型が特有の構造的な高次構造及び生物物理学的特性を有する。例えば単量体A β 1-42は42アミノ酸長の可溶性且つ非毒性ペプチドであり、正常なシナプス機能に関与していることが示唆される。一定の条件下で、A β 1-42は凝集して二量体、三量体、四量体、五量体、最大12量体及びそれ以上のオリゴマー型となることができ、それぞれの物理化学的特性、例えば分子の大きさ、EM構造及びAFM（原子間力顕微鏡法）分子形状などはどれも異なる。より高い分子量の可溶性オリゴマーA β 型の例がプロトフィブリル（ウォルシュ（Walsh）、1997年）であり、これは見かけの分子量が100kDaより大きく、且つ直径4~11nm及び長さ200nm未満の曲線線形構造を有する。近年、A β プロトフィブリルなどの可溶性オリゴマーA β ペプチドが、海馬における記憶形成を反映すると考えられているシナプス可塑性の尺度である長期増強（LTP）を損なうことが実証されている（ウォルシュ（Walsh）、2

002年)。さらに、オリゴマーの北極型 (Arctic) A β ペプチドが脳における LTP に対し野生型 A β より一層深刻な阻害作用を呈し、これはそれらの A β プロトフィブリルを形成する強力な性質に起因するものと思われる (クリュバン (Klyubin)、2003年)。

【0005】

文献には、プロトフィブリルとは明らかに異なる他の可溶性オリゴマー型も記載されている。かかるオリゴマー型の1つがADDL (アミロイド由来拡散性リガンド) である (ランベルト (Lambert)、1998年)。AFM分析によりADDLは、z軸に沿った4.7~6.2nmの主に小球状の型で、分子量が17~42kDaであることが明らかにとなった (スタイン (Stine)、1996年)。別の型はASPD (アミロイドスフェロイド) と呼ばれるものである (ホシ (Hoshi)、2003年)。ASPDはA β 1-40の球状オリゴマーである。毒性試験から、10nmより大きい球状ASPDは低分子型のものより毒性が高いことが示された (ホシ (Hoshi)、2003年)。この見解は、早期発症型ADを引き起こす北極型 (E693) APP突然変異の最近の発見により支持されている (米国特許出願公開第2002/0162129A1号明細書; ニルスバース (Nilsson) ら、2001年)。この突然変異はA β ペプチド配列の内側に位置する。このため突然変異保因者は、A β ペプチドの変異体、例えば北極型A β 40及び北極型A β 42を生成することになる。北極型A β 40及び北極型A β 42は双方とも、より高度な分子構造、すなわちプロトフィブリルへとより一層容易に凝集し得る。従って、北極型突然変異の発症機序から、可溶性でより高分子のプロトフィブリルがADを引き起こしているとともに、特異的な固有のエピトープ、すなわち「AD疾患エピトープ」を含むことが示唆される。

【0006】

アルツハイマー病 (AD) 脳においては一般的に、実質及び血管壁に細胞外アミロイドプラークが所見される。このプラークはアミロイド (A β 38-43アミノ酸長の疎水性で自己凝集性のペプチドを含み、徐々に重合してプラーク沈着となる。可溶性A β オリゴマー種はアミロイドプラークそれ自体より疾患相関性が高いことが提言されている (マクリーン (McLean) ら、1999年; ナスランド (Naeslund) ら、2000年)。これらの前フィブリル中間体A β 種のなかで、オリゴマー型は試験管内及び生体内の双方において有害な生物学的作用を誘発することが示されており (ウォルシュ (Walsh) ら、2002年)、従って疾患病因の中心的役割を果たすものであり得る。様々な分子サイズのオリゴマーA β 種がいくつか知られている。重要なことには、A β の単量体型、オリゴマー型及びフィブリル型の高次構造は異なり、高次構造選択的な抗体の標的となり得る。主要なA β 病原体の主体は不明であるものの、一部の証拠からは高分子量A β オリゴマーが特に神経毒性を有することを示唆する (ホシ (Hoshi) ら、2003年)。

【0007】

早期発症型ADを引き起こす、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 遺伝子における病原性突然変異についても記載されている。そのうちの1つがスウェーデン型APP突然変異 (ムーラン (Mullan) ら、1992年) であり、これはA β レベルの上昇を引き起こす。A β ドメイン内に位置する他の北極型APP突然変異 (E693G) は大型のA β オリゴマーであるプロトフィブリルの形成を亢進することが分かっており、これらのA β 中間体が特に病原性を有することが示唆される (米国特許出願公開第2002/0162129A1号明細書; ニルスバース (Nilsson) ら、2001年)。北極型APP突然変異の同定及びA β プロトフィブリルについての毒性作用の解明では、AD発病におけるA β オリゴマーに一層焦点が当てられている。

【0008】

アルツハイマー病に対する治療方針としての免疫活性化は、(シェンク (Schenk) ら、1999年) により最初に報告された。免疫化戦略の標的は、アルツハイマープラークにおいて所見されるフィブリル型のA β であった。フィブリル化したA β をワクチン

(AN-1792)として使用した活性A β ワクチン接種の最近の第I/I相臨床試験は、少数の患者における髄膜脳炎の発症により中止せざるを得なかった(バイヤー(Bayer)ら、2005年)。この研究において見られた副作用は、血管壁の原線維性アミロイドに対し反応する抗A β 抗体により引き起こされたものと見られた。CAAにおける原線維性アミロイドは血液脳関門(BBB)にごく近接しており、従って抗原抗体反応によりBBBに傷害が起こり、Tリンパ球のCNSへの浸潤に至った可能性がある(フェイファ(Pfeifer)ら、2002年; ラッケ(Racke)ら、2005年)。そのうえ、参加患者のうちA β ワクチンに対する免疫応答を呈したのは少数のみであった。当該研究は早々に終了されたが、活性A β 免疫化はAD患者の一部にしか有益でない可能性を含むように思われる。

10

【0009】

ヒトA β プロトフィブリルに対し選択的なモノクローナル抗体が記載されている(米国特許出願公開第2002/0162129A1号明細書)。純度が高く、且つ安定なヒトA β プロトフィブリルを生成するためのこの方法は、北極型突然変異(Glu22Gly)を有する合成A β 42ペプチドの使用を伴う。この突然変異により免疫化及びA β プロトフィブリル選択的抗体のハイブリドーマスクリーニングが促進される。重要なことは、この抗体は野生型A β プロトフィブリル及びA β -Arcプロトフィブリルの双方と結合する(PCT/SE2005/000993号明細書)。

【0010】

A β フィブリル(オヌアライン(O'Nuallain)、2002年)、ミセルA β (カイエド(Kayed)、2003年)、ADDL(ランベルト(Lambert)、2001年)などの他のA β 高次構造に関して選択的な抗体が記載されている。しかしながら、これらはどれもA β プロトフィブリル選択性ではない。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、改良型抗体、すなわちアルツハイマー病、ダウン症候群又は他の神経変性障害の予防、処置及び診断を改善するための、炎症のリスクが低減された、クラスIgG及びサブクラスIgG1又はIgG4若しくはそれらの組み合わせ又はそれらの突然変異体の高親和性(10^{-7} M未満)A β プロトフィブリル選択的抗体に関する。前記抗体は、古典的ハイブリドーマ技術及び抗体工学により開発されたものである。

30

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、オリゴマーA β 型、すなわち「アルツハイマー疾患エピトープ」を構成するA β プロトフィブリルを選択的に結合する抗体由来のVL鎖及びVH鎖上のCDR1-3領域の共通アミノ酸配列を開示し、Fc領域の修飾と組み合わせることで補体因子C1q結合を低減し、補体の活性化及び炎症のリスクを低減する。

【0013】

抗体の定常領域は多くの重要な機能を有し、特にFc受容体及び補体因子C1qを結合する機能を有する。このC1q結合機能が不活化されることで炎症反応が回避された。

40

【発明の効果】

【0014】

要約すれば、この種類の高親和性プロトフィブリル選択的抗体は、他の既知の免疫療法的な治療様式と比較した場合、以下の特徴的な利点を有する。

- 1) 高親和性により、疾患の原因であるA β プロトフィブリルを標的とする。
- 2) 補体因子C1qとの結合性が低いか、又は全くないことにより、炎症性副作用、すなわち髄膜脳炎のリスクが低減する。
- 3) 高親和性抗体により、有効な処置に必要な臨床用量が低減される。
- 4) 正確な投薬様式を提供する。
- 5) 血管壁におけるA β フィブリルへの結合、すなわちCAAが少なく、炎症性副作用の

50

リスクが低減する。

6) 末梢において結合する抗体が少なく、ひいてはより多くの抗体が血液脳関門を通過し得るとともに脳内でのA β オリゴマー型の結合及び除去に利用可能となり得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明の一態様は、ヒト野生型A β プロトフィブリルを結合するCDR領域の抗体共通アミノ酸配列の発見である(実施例1)。この発見は、治療用又は診断用として野生型ヒトA β プロトフィブリルに対し高親和性及び高選択性を供する結合部位(CDR領域)を定義するものである。免疫グロブリン(IgG)分子の基本構造は、ジスルフィド架橋により共に結合する2つの同一の軽鎖及び2つの同一の重鎖を含む(図1)。軽鎖は λ 又は κ のいずれかであり、それぞれ約110アミノ酸残基の可変領域(VL)及び定常領域(CL)を有する。重鎖の有する可変領域(VH)は約110アミノ酸残基だが、定常領域(CH)は300~400アミノ酸残基とはるかに大きく、CH γ 1、CH γ 2及びCH γ 3領域又はドメインを含む。

【0016】

定常領域(Fc)は補体系を活性化するとともに、感染性微生物又は外来/非自己抗原を貪食及び破壊するマクロファージ、ミクログリア及び好中球上でFc受容体と結合する。これは抗体の治療原理の一部、すなわちFc受容体介在性ミクログリア食作用及びA β プロトフィブリルのクリアランスであることから、この機能は特に重要である。沈降仮説に従えば、他の抗体介在性クリアランス機序、すなわちA β 抗体の非凝集特性及び末梢におけるA β プロトフィブリルのクリアランスもまた作動している。重鎖及び軽鎖の可変領域は相補性決定領域又はCDRと呼ばれる3つの超可変領域を含む。CDR領域は約13~23アミノ酸長の短い伸長部であり、VL及びVH領域に位置する。抗体の1本の「腕」上の6つのCDR領域が、抗原を結合する「ポケット」を形成する。図1は、IgG免疫グロブリン及びそのサブドメインの基本構造を示す。

【0017】

本発明の別の態様は、高親和性のプロトフィブリル選択的抗体に関する。プロトフィブリルに対する 10^{-7} M、好ましくは 10^{-8} M、さらには 10^{-9} M未満、 10^{-10} M未満、又は 10^{-11} M未満の範囲の親和性が記載される(実施例2)。これらの抗体は、親和性が 10^{-6} Mの範囲の抗体と比較してより低用量で投与され得る点で有利である。これは、効果を実現するうえで少量の抗体しか必要ないため、注射により投与されるこれらの高親和性抗体が皮下に投与され得る点で有意義な臨床上的利点を有する。投与様式は皮下注射に限定されない。さらには、有効とするために必要な用量が少なくなることから、抗体の製造原価が低減されるであろう。

【0018】

本発明の別の態様においては、抗体がIgGクラスのものであり、血液脳関門を通過し得るため、治療用途に好適である。脳実質内でのA β プロトフィブリルのクリアランスは、ミクログリア細胞によるFc受容体介在性食作用により実現される。他の抗A β クリアランス機序も同様に作動するものと見られる。可溶性A β プロトフィブリルのこのクリアランスが、処置の中心的な機序である。A β プロトフィブリルは神経毒性が高く、疾患プロセスを惹起及び駆動すると考えられる。脳におけるA β プロトフィブリルのクリアランスは有意義な臨床的価値を有する。異なるA β 凝集型、すなわち二量体、三量体、四量体及びプロトフィブリル及びフィブリルを含むより高分子のオリゴマー型は平衡状態にあるため、A β プロトフィブリルの除去を介して、A β プロトフィブリルのクリアランスに加え、A β フィブリルを含む他のA β オリゴマー型が間接的に低減されるであろう。A β フィブリルを含むプラークの低減の例が、高親和性プロトフィブリル選択的抗体(mAb158)による処置後72時間のアルツハイマーランズジェニックマウスモデル(APPSwe)において示されている(実施例3)。従って、前記抗体によるA β プロトフィブリルのクリアランスは他のA β 凝集型又はオリゴマー型を間接的に低減するという利点もまた有するであろう。

【0019】

本発明のさらに別の態様は、サブクラス I g G 1 の高親和性ヒト A β プロトフィブリル選択的抗体であり、これは脳内のミクログリア細胞上に存在するヒト F c γ R I 受容体に対し高親和性を有する。高親和性抗体は A β プロトフィブリルの効率的なクリアランスをもたらすこととなり、有意義な治療的価値を有するものである。従って、他の免疫療法方針、例えば活性ワクチン接種又は他の A β 型を標的とする I g G 1 サブクラスの他のモノクローナル抗体によるモノクローナル抗体処置などと比較した場合、この抗体は C N S 及び末梢の双方において A β プロトフィブリルのクリアランスを示す。重要なことは、この処置は A β プロトフィブリルなどの毒性の可溶性 A β 種が高いレベルで存在する疾患過程の初期だけでなく、疾患過程の後期においても効果的であり得る。スウェーデン型及び北極型突然変異 A P P s w e a r c を示すトランスジェニックマウスモデルにおいては、高いレベルのオリゴマー A β 型が記載されている（ロード・A (L o r d A .) ら、2006年）。

10

【0020】

本発明のさらに別の態様においては、高親和性 A β プロトフィブリル選択的抗体が A β 凝集を低減又は阻害し、それにより脳内の可溶性オリゴマー A β 型のレベルが低下し得る。

【0021】

さらに、本発明の別の態様においては、高親和性 A β プロトフィブリル選択的抗体が A β のオリゴマー型、すなわち C N S 外の A β プロトフィブリルも同様に結合し、それにより前記 A β 型の血液脳関門にわたる平衡は、前記 A β 型の C N S レベルがより低くなるようにシフトし得る（ドレナージ）。

20

【0022】

上記で考察されるとおり、アルツハイマー患者を処置するため A β フィブリルに対し選択的な A β ワクチン（A N - 1 7 9 2）を使用したエラン（E l a n）臨床研究は、結果として症例の 6 % に副作用、すなわち髄膜脳炎を生じた。脳実質内、また重要なことには血管壁内にも存在するアミロイドプラークの中核となる A β フィブリルを標的とする方針は、結果として重篤な副作用を生じた。この副作用は、脳の血管壁において抗体が C A A（脳アミロイド血管症）と結び付き、炎症性のプロセスを開始したことにより引き起こされた可能性が最も高いと見られた。この重大な臨床的課題は、補体活性化活性の低下した改良型高親和性プロトフィブリル選択的抗体により回避される。この抗体は、副作用、すなわち髄膜脳炎のリスクが低減した、高い A β プロトフィブリルクリアランス効果を保有するであろう。

30

【0023】

本発明の別の態様においては、高親和性プロトフィブリル選択的抗体が低 A β フィブリル結合性を有し（実施例 2 を参照）、C A A 中に存在する A β フィブリルへの結合性が低いため、副作用のリスクが低減する。

【0024】

本発明のさらに別の態様においては、高親和性 A β プロトフィブリル選択的 I g G 抗体が改変されることにより I g G 1 の C H 2 ドメインと結合する補体因子 C 1 q が低減するとともに補体活性化及び炎症リスクが低減する。この修飾はいくつかの異なる方法で行われ得る。一つの方法は、I g G 1 定常領域の C H γ 2 ドメインを欠失させて、I g G 4 由来の対応するドメイン又は C 1 q 結合を供するドメインの一部に交換したキメラ抗体の作成である。I g G 4 は C 1 q を結合せず、従って補体カスケードを活性化しないことが十分に立証されている。これを実現するため、I g G 1 上の高親和性 F c 受容体ドメイン（C H γ 3）を、補体因子 C 1 q に対する結合性を有しない I g G 4 ドメイン（C H γ 2）と組み合わせるような方法で、重鎖（C H）の定常領域が改変される。キメラ定常重鎖（I g G 1 : C H γ 1、C H γ 2 : I g G 4、C H γ 3 : I g G 1）を含むこの新規抗体は、F c 受容体介在性食作用を通じた A β プロトフィブリルの効率的なクリアランス、及び副作用、すなわち髄膜脳炎などの炎症リスク低減の、双方の重要な特性を有することとな

40

50

る。

【0025】

炎症リスクを低減するさらに別の方法は、抗体のオリゴ糖構造を変化させることであり、これにより補体因子C1q結合性及び補体活性化が低減されることとなる。ヒトIgG1ではAsn-297における二分岐の複合型オリゴ糖の異なる構造が30種類記載されている。CH2関連炭水化物の不在が、抗体の「ヒンジ」領域に高次構造上の変化を引き起こし、エフェクター分子との相互作用効果並びに補体活性化機能及びC1q結合の減退を低減すると考えられている。

【0026】

任意の他のアミノ酸に対するAsn-297の部位特異的突然変異誘発による高親和性ヒトAβプロトフィブリル選択的抗体の修飾は、C1q結合性の低いFc受容体を保有する抗体を生成し、従って特に血液脳関門における炎症リスクが低減するであろう。抗体上でグリコシル化を修飾する代替例としては、酵素N-アセチルグルコサミニル転移酵素Iが不活化された細胞型における抗体の発現がある。これによりAsn-297の炭水化物構造が変化した抗体が得られることとなる。限定はされないが、Man₅GlcNAc₂の構造が形成される。この炭水化物修飾は、補体因子C1q結合性を低減するとともに炎症を阻害するものである（ライト（Wright）ら、1998年）。あるいは、グリコシル化されたプロトフィブリル選択的抗体は、グリコシル化を阻害するツニカマイシンの存在下で抗体を発現する細胞を培養することにより実現し得る。この抗体は、補体活性化活性が変化していると同時にFc受容体機能も変化しているであろう（レザーバロウ（Leatherbarrow）ら、1985年）。補体活性化が低く、且つFc受容体結合性が高い抗体を発現するクローンのスクリーニングにより、Aβプロトフィブリルの高Fc介在性クリアランス及び低C1q結合性を示すプロトフィブリル選択的抗体が生成されることとなる。

【0027】

本発明のさらに別の態様は、ADを処置又は予防するための、補体因子C1qの結合を低減又は阻害するような方法で補体因子C1q結合部位が修飾されている、すなわちPro331>Ser331（スー（Xu）ら、1994年）の、IgG1サブクラスの高親和性ヒトAβプロトフィブリル選択的抗体である。ヒトIgG1の第331位におけるプロリン残基はまた、スレオニン若しくはグリシン又は任意の他の極性アミノ酸に換えてもよい。この修飾は、部位特異的突然変異誘発又はDNA欠失などの標準的な分子生物学的技術により実現され得る。

【0028】

本発明のさらに別の態様は、ヒト組織、特に脳脊髄液、血液、尿又は唾液においてプロトフィブリルレベルを特異的に測定するための、アルツハイマー病の診断ツール又はバイオマーカーとしての高親和性ヒトAβプロトフィブリル選択的IgG抗体の使用である。CSF又は血液中のヒトAβプロトフィブリルのレベルは、アルツハイマー病に罹っていない対応する高齢者対照群と比較した場合、異なると見られる。アルツハイマー病の発症者は、CSF又は血液中のAβプロトフィブリルレベルが上昇していると思われる。従って、CSF又は血液中のAβプロトフィブリルレベルの測定により疾患の早期診断が行われ得る。これは、新規高親和性Aβプロトフィブリル選択的抗体をサンドイッチELISA法と組み合わせることにより実現可能であり（実施例2A）、ここではAβプロトフィブリルが10pMレベルに至るまで測定されている。測定における他のAβ型、例えばAβフィブリル、Aβ単量体及びAβ断片（1-16；17-40）などの干渉は、10%以下である。

【0029】

本発明はさらに、ヒト及び動物組織、例えば限定はされないが、脳脊髄液、血液、血清、尿及び脳組織といった組織中のAβプロトフィブリルを測定するための高親和性プロトフィブリル特異抗体の使用に関し、アルツハイマー病についての可能な診断方法を提供する。これらの組織中並びに細胞培養物中のAβプロトフィブリルを、抗Aβプロトフィブ

リル抗体を使用して測定するための好適な方法は、E L I S A、R I A、ウェスタンブロッティング又はドットブロッティングなどの免疫測定法である。本方法は、臨床治験における処置効果（プロトフィブリル低減）の追跡に好適であり得るとともにアルツハイマー病又はダウン症候群の診断検査として好適であり得る。

【0030】

C S F及び血液中のA β プロトフィブリルレベルは非常に低いため、低レベルのA β プロトフィブリルを計測可能とするために、E L I S A法に基づく診断検査において高親和性A β プロトフィブリル選択的抗体を必要とする。近接連結（実施例4）（グルベルグ（G u l l b e r g）、2004年）若しくは類似の増幅系又はピアコア（B i a c o r e）若しくは類似の技術など、他の高感度方法を使用して感度を高めてもよい。近接連結技術は、分析物（この場合タンパク質）上の異なるエピトープに対して産生した抗体が、前記分析物上で互いに近づいて結合し得るという発見に基づく。前記異なる抗体がオリゴヌクレオチドと接合する場合、前記オリゴヌクレオチド間の距離は、連結オリゴヌクレオチドが連結成分を用いてオリゴヌクレオチド間に架橋を形成するうえで十分に短いものであろう。増幅成分もまた付加され、その上でR T - P C Rが実施され得る。この原理により、主体性及び標的タンパク質量を反映する増幅可能なD N A配列が生成される。この技術により亢進されたシグナル応答が得られ、ひいてはより低濃度の分析物を検出することが可能となる。

【0031】

本発明者らは意外にも、修正版近接連結技術を同様にこのA β プロトフィブリル特異抗体に使用することで、A β 単量体は検出せずに、低濃度の大型A β ペプチド構造、すなわちA β プロトフィブリルを検出し得ることを発見した。本発明者らは、プロトフィブリル高次構造のA β ペプチドが、本発明により、2個の抗体がプロトフィブリル上で互いに十分に近づいて結合可能となる構造（反復単位）を示すことを発見した。前記抗体がオリゴヌクレオチドと接合される場合、前記オリゴヌクレオチドは連結オリゴヌクレオチドを使用して架橋され得る。増幅成分を使用してP C Rが実施される。この原理により、主体性及び標的プロトフィブリル量を反映する増幅可能なD N A配列が、生成される（図4Aを参照）。

【0032】

近接連結又はその「ローリングサークル」と呼ばれる種類の技術は、高感度技術であるとともに特に、アルツハイマー病及び他の神経変性障害の診断に使用されるA β プロトフィブリルなどの反復配列を伴う重合体構造の検出に非常に適している。

【0033】

本発明はさらに、ヒト及び動物組織中のA β プロトフィブリルの検出、局在決定及び定量の画像化における高親和性プロトフィブリル特異抗体の使用に関する。抗体は、限定はされないが、I¹³¹、C¹⁴、H³又はガリウム⁶⁸といった放射性同位元素などの検出用放射性リガンドで標識され得るであろう。本方法は、アルツハイマー病又はダウン症候群の診断ツールとして好適であろう。

【0034】

本発明のさらに別の態様は、獣医学における使用に特化した抗体種の作製である。概説される診断方法もまた、獣医学上の使用に好適である。

【0035】

本発明の別の態様は、副作用を回避するため、すなわち治療薬又は診断薬として使用する際のヒトにおける前記抗体に対する免疫応答を回避するための、前記抗体のヒト化である。

【0036】

さらに別の態様は、例えば、限定はされないがP B Sなどの、ヒト及び動物への投与に好適な生理緩衝液中の抗体の製剤である。抗体製品は安定性を高めるため凍結乾燥され得る。凍結乾燥製剤は、限定はされないが、マンニトール（m a n i t o l）などの賦形剤を含んで、凍結乾燥後の製品を安定化させ得る。

10

20

30

40

50

【0037】

抗体製品は、抗菌剤を含み得る。

【0038】

本発明に係る抗体又は断片は、前記CDR領域及び／又はそのフレームワーク内にアミノ酸欠失、置換及び挿入を示し得る。挿入又は置換されるアミノ酸はまた、抗体の親和性及び特異性がなお損なわれていないことを条件に、アミノ酸誘導体であってもよい。

【実施例】

【0039】

以下の実施例は例示のために提供されるが、本発明をこれらの具体例に限定することを意図したものではない。

【0040】

実施例1

ヒト野生型A β プロトフィブリル選択的モノクローナル抗体がクローニング及び配列決定された。重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）のアミノ酸配列が表1に示される。CDR領域1～3の位置には下線が引かれているとともに、これらは表2及び3にも同様に示される。CDR領域のアミノ酸配列は、「アルツハイマー疾患エピトープ」を構成するヒト野生型A β プロトフィブリルを結合するための構造基盤を形成する。

【0041】

高親和性プロトフィブリル特異抗体BA9／158についてのVL鎖及びVH鎖のCDR領域1～3のアミノ酸配列が、表1、2及び3に示される。他のプロトフィブリル選択的抗体（BA2、BA3、BA4及びBA7）の配列決定データがCDR領域の代替的アミノ酸配列を提供するが、これらに限定されない。VH鎖及びVL鎖のCDR1～3領域のアミノ酸配列が組み合わされて分子「ポケット」を作り、これが高い親和性及び特異性でヒトA β 野生型プロトフィブリルを結合する。この「ポケット」が「アルツハイマー病エピトープ」の構造基盤を形成する。CDRアミノ酸配列長の変動がVH鎖及びVL鎖の双方に観察され、ヒトA β プロトフィブリルとの結合に適合する（表2及び3）。CDR領域が短いほど、提供される抗体の結合ポケットの3次元構造はより限定的となり、長いほど適応性が高くなる。

【0042】

本願出願人は、限定はされないが、表1、2及び3に示されるとおりのCDR配列、並びに表4及び5に示されるとおりのプロトフィブリル特異抗体についての、VH鎖及びVL鎖の「マウスフレームワーク」領域、すなわちCDR領域外、並びにヒトVL及びVHフレームワーク領域のアミノ酸配列を主張する。

【0043】

高親和性プロトフィブリル特異抗体BA9／158に由来するVL鎖及びVH鎖のVL及びVH領域1～3のフレームワーク領域のアミノ酸配列が、表4及び5に示される。

【0044】

表1、2及び3に示されるもの以外のCDR領域における他のアミノ酸置換は、ヒト野生型A β プロトフィブリルとの高親和性及び高特異性結合を伴うことで適合性を有する。CDR領域の特定の位置に極性アミノ酸が存在する場合、当該の特定アミノ酸は、A β プロトフィブリルとの高い親和性及び特異性結合が保有又は改良されながら、別の極性アミノ酸に置換され得る。同様に、ある位置に非極性又は負若しくは正に帯電したアミノ酸が存在する場合、当該アミノ酸は同一群由来の類似のアミノ酸に置換され得る。

【0045】

また、特定の1個又は複数のアミノ酸は、CDR領域における任意の位置で、抗体と類似の機能及び構造を供する機能的等価物に交換され得る。

【0046】

実施例2．ELISAによる高親和性ヒトA β 野生型プロトフィブリル（profibril）選択的モノクローナル抗体の特性決定

実施例2は、サンドイッチELISAにより計測した場合、A β 単量体との交差反応が

10

20

30

40

50

200～1000倍低く、且つA β フィブリルとの交差反応が40倍未満の高親和性プロトフィブリル選択的抗体を示す(図2A)。競合ELISA実験から、抗体はヒトA β 42野生型プロトフィブリルに対し強力な親和性を有するが、A β ペプチドのN末端部分及びA β 単量体に対しては非常に弱い親和性しか有しない。A β のC末端断片との結合は観察されなかった(図2B)。さらにこの抗体は、メジン又はトランスサイレチンのような他の種類のアミロイドとは交差反応しない。さらにこの抗体は、A β の豊富な前駆体であるヒトAPPを認識しない。

【0047】

図2AにサンドイッチELISAが示される。抗体158がウェル内に被膜され、続いて濃度を上昇させながら異なるA β 型がウェルに添加された。結合したA β 型の計測が、

10

【0048】

図2Bには、競合ELISAが示される。ELISAプレートをヒトA β プロトフィブリルで被膜した。続いて抗体158が異なるA β 型を増量させながらインキュベートされた(競合法)。インキュベーション混合物をマイクロタイタープレートウェルに添加して、遊離抗体をウェル中の固定プロトフィブリルと結合させた。結合した158抗体が標準

【0049】

実施例3

20

高親和性A β プロトフィブリル選択的抗体の有効性が、アルツハイマー病トランスジェニックマウスモデル(APPSwe)において急性脳内注射により測定された。有効性評価に使用されるトランスジェニックマウスは、スウェーデン型突然変異(APPSwe)に伴うヒトAPPを発現する。このパラダイムにおいて、抗体は脳実質のプラークリッチ領域に直接注射され、神経病理に対する影響が72時間後に評価される(ウィルコック(Wilcock)ら、2003年)。他の研究では、抗A β 抗体の直接施用により結果として生体内でアミロイド沈着物の急速なクリアランスが生じることが示されている(バクスカイ(Bacskai)ら、2001年；ブレンザ(Brendza)ら、2005年)。高親和性A β プロトフィブリル選択的抗体の注射は、APPSweマウスモデルにおいて有意なプラーク低減をもたらす(図3)。

30

【0050】

図3において、トランスジェニックマウスモデル(APPSwe)における高親和性プロトフィブリル選択的抗体の治療有効性が試験された。A：14月齢のAPPSweトランスジェニックマウスが頭蓋内にPBSを、及びB：高親和性プロトフィブリル選択的抗体(158)を1 μ g/ μ l注射され、及び注射後72時間で検査された。対照側(A；矢印)と比較した場合、注射部位(B；矢印)の近傍の鉤状回における著しいA β 負荷のクリアランスが注目される。

【0051】

実施例4．A β プロトフィブリルを計測するための高親和性プロトフィブリル選択的抗体と組み合わせた近接連結

40

ヒト野生型A β プロトフィブリルが10pMの範囲に至るまで検出された一方、A β 単量体調製物は全く検出されなかった。超高感度近接連結法及び高親和性抗体の組み合わせが特に有利であるのは、アルツハイマー病及び他のタンパク質「凝集」疾患、例えばプリオン病、クロイツフェルトヤコブ病、アミロイドーシス及びパーキンソン病などを診断する際に特に好適なオリゴマー型の分析物のみを測定する系を提供するためである。

【0052】

図4において、ヒトA β プロトフィブリルが近接連結技術によりpMレベルで計測される。近接連結測定法(proximity ligation assay)の方法説明を以下に示す(グルベルグ(Gullberg)ら、2004年より)：ステップ1、近接プローブ対との試料のインキュベーション(約1時間)；ステップ2、連結に必要な全

50

成分の添加及び定量的PCRによる検出（約5分間の連結時間）。測定においては高親和性プロトフィブリル選択的モノクローナル抗体が使用された；ステップ3、定量的PCR（約2時間）。合成A β 単量体及びA β プロトフィブリル調製物が希釈され、それらの反応性について上記の近接連結測定法で試験された。

【0053】

実施例5．mAb158は一般的なアミロイドエピトープを認識しない。

既に報告されているA β 高次構造依存性抗体は他のアミロイド形成性タンパク質のオリゴマー及びフィブリルを結合することが示されており、全てのアミロイド凝集について共通のエピトープの存在が示唆される。A β 以外のアミロイド形成性タンパク質からプロトフィブリルを生成する技術的困難から、代わりにmAb158が異なるアミロイドフィブリルに対し試験された。これらの実験にはドットブロットアッセイが使用されたが、これは抗体抗原反応が溶液中で生じる場合、阻害ELISAはフィブリルなどの不溶性抗原に好適でないためである。しかしながら、ドットブロットアッセイは、様々なA β 型についての抗体特異性を評価する、すなわちプロトフィブリル（profibril）及びフィブリルに対する選択性の差異を計測するうえでは好適でない。メジンのフィブリルである膵島アミロイドポリペプチド（IAPP）及び α -シヌクレインがニトロセルロース膜上に固定され、天然の高次構造が維持された。mAb158は、A β フィブリル以外のどのアミロイドとも反応性を示さなかった（図5A）。mAb158のA β フィブリルに対する結合性は、A β プロトフィブリルエピトープの一部がA β フィブリル構造中にも存在することを示唆する。陽性対照としては、抗体6E10（A β ）、pAb179（メジン）、pAbA110（IAPP）及びmAb211（ α -シヌクレイン）が使用された（図5B）。代表的ブロットは反復実験（n=3）から示した。

【0054】

mAb158はAPPを結合しない

A β 及び可溶性APP断片のレベルは一般に、CSF及び脳ホモジネートなどの生体試料中でA β のレベルを上回り、従ってA β -抗体のAPPに対する交差反応性はAPPと結合することにより処置を阻害し、結果としてA β プロトフィブリル及び／又はA β オリゴマーを結合及び除去するための遊離抗体が少なくなる可能性がある。また、これはA β のサンドイッチELISAアッセイによる生体試料中のA β プロトフィブリルの計測を妨げ得る。mAb158が未変性APPと結合するかどうかを解明するため、免疫沈降実験が実施された。HEK細胞培養培地（偽処理、APP_{sw e}及びAPP_{Arc-sw e}）及びマウス脳ホモジネート（非トランスジェニック、APP_{sw e}及びAPP_{Arc-sw e}）をmAb158又は6E10で免疫沈降させた後、検出抗体として6E10を伴う変性ウェスタンブロットを行った（図5C）。図5Cに見られるとおり、mAb158は細胞培養培地由来の α APP又はマウス脳ホモジネート由来の完全長APPを免疫沈降させなかったが、予期されたとおり、6E10は免疫沈降させた。対照として使用された合成A β プロトフィブリルは双方の抗体により同様に十分に免疫沈降した（図5C）。代表的なブロットは反復実験（n=3）から示した。

【0055】

実施例6．A β プロトフィブリル特異的サンドイッチELISAの確立。

生体試料中のA β プロトフィブリルの計測を可能にするため、mAb158を捕捉抗体及び検出抗体の双方として伴うサンドイッチELISAが確立された。このアッセイは1pMの検出限界及び最高250pMの線形範囲でA β プロトフィブリルを計測する（図6A、線は標準曲線の線形回帰を示す）。標準曲線において使用されるA β プロトフィブリルのサイズに関しては不確実であるため、濃度1pMは1個のA β 単量体の分子量（4514g/mol）に基づくが、プロトフィブリルの分子量は少なくとも100kDaと推定されていることから、モルで計算されるA β プロトフィブリルの検出限界は50fMという低さであり得る。A β Arcプロトフィブリルの標準曲線から得られるシグナルは野生型A β プロトフィブリルより少なく、これはおそらくA β プロトフィブリルのサイズの差に起因する（図6A、6B）。合成LMW-A β （低分子量A β ）を滴定した。用語「

低分子量 A β 」は、分子量が約 4～12 kDa の A β の単量体、二量体及び三量体を意味する。A β プロトフィブリル及び A β 1-16 を使用して ELISA の高次構造特異性が検証され（図 6 B）、ここでは凝集しないことを予期して親水性 A β 1-16 ペプチドが使用された。2 つの同一の抗体からなる ELISA では、シグナルを生成するために少なくとも二量体のタンパク質が必要とされるが、予想通り、A β 1-16 は mAb 158 サンドイッチ ELISA では μ M 濃度でさえ検出されなかった（図 6 B）。LMW-A β 及び A β プロトフィブリルを、凝集した A β を単量体に解離させることが知られる 70 % のギ酸（FA）で前処置すると、サンドイッチ ELISA のシグナルは消失した（データは示さず）。従って、高 nM 濃度での LMW-A β の検出（図 6 B）はおそらく、凝集量の少ないペプチド調製物に起因する。

10

【0056】

過剰量の単量体 A β 、ホロ APP 及び APP 断片は、生体試料中に天然に存在するが、捕捉抗体被膜の結合部位を占有し、ひいてはプロトフィブリルの結合を阻害することにより A β プロトフィブリル分析を妨げる可能性がある。この問題が、A β 1-16 の過剰量を一定濃度の A β プロトフィブリル（50 pM、単量体単位としての表現）まで増加させながら添加し、それを mAb 158 ELISA 及び 6E10-6E10 サンドイッチ ELISA の双方で分析することにより調査された（図 6 C）。A β プロトフィブリルと比較したとき、モルで 500, 000 倍の過剰量の A β 1-16 は mAb 158 サンドイッチ ELISA での計測を妨害しなかったが、これは A β 1-16 が捕捉抗体と結合しにくいことから予期されたとおりであった。対照的に、500 倍の過剰量の A β 1-16 は 6E10-6E10 ELISA におけるシグナルを減少させるのに十分であったが、ここで A β 1-16 は高親和性で捕捉抗体と結合した（図 6 C）。そのうえ、合成 A β プロトフィブリルが偽処理の HEK 細胞培養培地又は非トランスジェニックマウス脳ホモジネートに添加されると、90 % のシグナルが回復した（データは示さず）。

20

【0057】

実施例 7. 生体試料中の A β プロトフィブリルの計測

北極型突然変異を保因する細胞及びマウスモデルにおいて A β プロトフィブリルの存在が示唆されているが、現在のところ生体試料中の A β プロトフィブリルを直接測定する方法はない。従って mAb 158 サンドイッチ ELISA はまず初めに、かかる細胞及びマウスモデルにおいて A β プロトフィブリルレベルを計測するとともにそれらをこの A β 内突然変異を有しないモデルと比較する機会を提供する。スウェーデン型突然変異のみを保因する細胞及びマウス由来の試料が野生型 A β プロトフィブリル標準曲線と比較された一方、北極型突然変異を伴う A β を発現する細胞及びマウス由来の試料が A β Arc プロトフィブリル標準曲線（図 6 A）と比較された。この測定において計測される全ての A β を確実に溶解状態にするとともに、A β フィブリルからの干渉の可能性を一切排除するため、全試料が分析前に 5 分間、17, 900 $\times$ g で遠心された。一時的に導入された APP_{Swedish} 及び APP_{Arc-Swedish} HEK 細胞からの細胞培地群が分析され、偽処理の HEK 細胞培養培地と比較された。標準曲線（図 6 A）から A β プロトフィブリルレベルが 3 回の平均値として計算された後 APP レベルに対し正規化され、導入レベルの差が補正された（ステン（Stenh）ら）。APP_{Arc-Swedish} HEK 細胞培養培地中の A β プロトフィブリル濃度は 28 pM（ $\pm$ 2）であり、APP_{Swedish} に見られた 8.2 pM（ $\pm$ 0.3）より有意に高かった（ $p < 0.0001$ ）（図 7 A）。偽処理の培地中では A β プロトフィブリルは検出できなかった。A β プロトフィブリルのレベルもまた、ブランク及び神経細胞内の A β 病理の双方を伴う 10 月齢の APP_{Arc-Swedish} 及び APP_{Swedish} トランスジェニックマウス由来の脳において計測された（ロード（Load）ら）。脳は TBS 中でホモジナイズされたうえで、分析に先立ち可溶性 A β 画分を回収するため遠心された。細胞培養培地を使用した分析と同様、A β プロトフィブリルレベルは APP_{Arc-Swedish} トランスジェニックマウス脳において 397 pM（ $\pm$ 59）及び APP_{Swedish} トランスジェニックマウス脳において 108 pM（ $\pm$ 14）と、群間で有意に異なった（ $p = 0.005$ ）（図 7 B）。

30

40

50

【0058】

上述の図（図6及び7）における試料数は、偽処理の細胞（ $n=3$ ）及びAPP_{sw e}（ $n=8$ ）を一時的に導入したもの及びAPP_{Arc-sw e}を一時的に導入したもの（ $n=11$ ）であった。APP_{Arc-sw e}培地中のA β プロトフィブリルのレベルはAPP_{sw e}培地中より約9倍高かった一方、偽処理の培地からはシグナルは得られなかった（A）。非トランスジェニックマウス脳ホモジネート（ $n=6$ ）のTBS可溶性画分中のA β プロトフィブリルレベルの計測値が、トランスジェニックマウス（APP_{sw e}、 $n=3$ 、及びAPP_{Arc-sw e}、 $n=6$ ）と比較された（B）。細胞培養培地と同様、APP_{Arc-sw e}マウスのA β プロトフィブリルレベルはAPP_{sw e}マウスのものより7倍高かった。エラーバーは $\pm$ SEMを示す。

10

【0059】

実施例8. mAb158は腹腔内投与後のAPP_{sw e arc}トランスジェニックマウス中のA β プロトフィブリル及び総A β を有意に低下させる

mAb158（12mg/kg）が9～10月齢のAPP_{sw e arc}マウスに対し18週間にわたり1週間に1回、腹腔内注射された。研究後、脳が単離され、TBS中でホモジナイズした後遠心にかけて不溶性物質を沈降させた。不溶性物質はギ酸中で可溶化された。従って、マウス脳からは2つの画分、すなわちTBS画分及びギ酸画分が得られた。TBS画分中のA β プロトフィブリルレベルがELISAにより測定された。プラセボ群と比較してmAb158処置群にはA β プロトフィブリルの有意な低減が見られた（図8）。図8は、mAb158又はプラセボのいずれかによる処置後4ヶ月のAPP_{sw e arc}トランスジェニックマウス脳TBS抽出物中のA β プロトフィブリルレベルを示す。

20

【0060】

ギ酸画分中の総A β がELISAにより測定された（ギ酸を使用して全てのA β 型が可溶化されたことにより、全てのA β 型が検出可能となった）。プラセボ群と比較して処置群には総A β の有意な低減が観察された（図9）。図9は、mAb158又はプラセボのいずれかによる処置後4ヶ月のAPP_{sw e arc}トランスジェニックマウス脳ギ酸抽出物中の総A β レベルを示す。

【0061】

実施例9～11

30

【0062】

【表 A】

略称		
A	アデニン	
Ab プロトコル	A E R E S 生物医学プロトコル	
BHK	ベビーハムスター腎臓	
b p	塩基対	
C	センチグレード (C e n t r i g r a d	
C	シトシン	
CHO	チャイニーズハムスター卵巣	
CMF	カルシウム・マグネシウム無し	10
COS 7	アフリカミドリザル腎線維芽細胞系	
d h f r	ジヒドロ葉酸還元酵素	
DMEM	ダルベッコ変法イーグル培地	
DMSO	ジメチルスルホキシド	
DNA	デオキシリボ核酸	
ELISA	酵素結合免疫吸着検定法	
FCS	ウシ胎仔血清	
g	グラム	
G	グアニン	
h r	時間	
HRP	西洋ワサビペルオキシダーゼ	
I g G	免疫グロブリン	20
K	G 又は T (I U P A C 協定)	
LSAP	大型可溶性アミロイド産物	
mAb	モノクローナル抗体	
s e c	秒	
m i n	分	
M	A 又は C (I U P A C 協定)	
MTX	メトトレキサート	
NIMR	国立医学研究所 (英国)	
nm	ナノメートル	
OD	光学濃度	
PBS	リン酸緩衝生理食塩水	30
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応	
R	A 又は G (I U P A C 協定)	
RT	室温	
S	C 又は G (I U P A C 協定)	
T	チミン	
UV	紫外線	
V	可変	
V	A 又は C 又は G (I U P A C 協定)	
VH	免疫グロブリン重鎖可変領域	
VK	免疫グロブリン κ 軽鎖可変領域	
W	A 又は T (I U P A C 協定)	
Y	C 又は T (I U P A C 協定)	40

【0063】

物質

【0064】

【表 B】

器具

器具	英国供給業者	カタログ番号
DNAサーマルサイクラー: Gene Amp 9600	パーキン・エルマー社	N801-0177
殺菌灯を装備したクラスII微生物学的安全キャビネットを有する指定組織培養実験室	ウォーカー・セーフティ・キャビネット社	非該当
Innova (登録商標) 卓上インキュベーターシェーカー	ニュー・ブランズウィック・サイエンティフィック社	4000
卓上遠心機	フィッシャー・サイエンティフィック社	CEK-126-010N
CO ₂ ガス37° インキュベーター	ロスラボPLC (Ross Lab plc) 社	HSO-501TVBB
微生物インキュベーター	ケンドロ/ヘラウス (Kendro/Heraeus) 社	B6060
エレクトロポレーター モデル: Gene Pulser II	バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社	341BR-3092
ELISAリーダー: Microplate Reader 3550	バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社	3550
Microplate Manager (登録商標) 2.2 マッキントッシュコンピュータ用データ解析ソフトウェアパッケージ	バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社	非該当
96ウェルGeneAmp PCRシステム9700	ABI	N8050200
ABI PRISM310 遺伝子解析機	アプライド・バイオシステムズ社	310-00-100/120
T100 表面プラズモン共鳴検出器	ビアコア社	

10

20

30

40

【0065】

【表 C】

プラスチック製消耗品

品目	英国供給業者	カタログ番号
175cm ² 組織培養フラスコ	サーステッド社	83. 1812. 002
25cm ² 組織培養フラスコ	コーニング・コスター社	3056
30ml 万能容器	ステリリン社	128C
75cm ² 組織培養フラスコ	サーステッド社	83. 1813. 002
エレクトロポレーションキュベット	バイオ・ラッド・ラボラ トリーズ社	165-208 8
ELISAプレート：Nunc Maxi Sorp	インビトロジェン・ライ フ・テクノロジーズ社	43945A
GeneAmp（商標）PCR反応管	パーキン・エルマー社	N801-01 80
Glasstic（登録商標）使い捨て細 胞計数スライド	バイオスタット・ダイア グノスティック社	887144
Nunc 接種針	ライフ・テクノロジーズ 社	254399
組織培養ペトリ100×20mm、多孔	ヘレナ・バイオサイエン シーズ社	93100
組織培養プレート：6ウェル+蓋	コーニング社	C3516
組織培養プレート：24ウェル+蓋	コーニング社	C3526

10

20

30

【0066】

【表 D】

免疫学及び分子生物学試薬

品目	英国供給業者	カタログ番号	ロット番号
第一鎖合成キット	アマーシャム・バイオサイエンス社	27-9261-01	3375313
Advantage (登録商標) -HF 2 PCRキット	クローンテック社	639123	6040151
アガロース (UltraPure (商標))	インビトロジェン社	15510-027	3019491
ウシアルブミン (BSA)	カルバイオケム社	126575	B65755
アンピシリン	シグマ社	A-9518	63H0992
Apa I	プロメガ社	R636	16007003
サーモプライム (ThemoPrime) +DNAポリメラーゼ	アブジェン社	AB0301	014/0103/ 11019/060 7/13020/1 808/13
Bam HI	プロメガ社	R602	15851606
BigDye (登録商標) ターミネーター v3. 0 サイクル・	ABI社	4390242	605143 608154
臭化エチジウム (10mg/m	シグマ社	E-1510	43H9414
ヤギ抗ヒトIgG (Fc断片特異的) 抗体	ストラテック・サイエンティフィック社	109-005-098	68215
ヤギ抗ヒトκ鎖西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体	シグマ社	A7164	032K9157
Hind III	プロメガ社	R604	16834803
ヒトIgG1/κ抗体	ザ・バインディング・サイト社	BP078	223729
KブルーHRP基質	スカイバイオ社	308176	60823
オリゴヌクレオチド	シグマ社	非該当	
PBS錠剤	シグマ社	P4417	11K8204
QIAGENプラスミドマキシキット (25)	キアゲン社	12162	124114870
QIAprepスピンミニプレップキット	キアゲン社	27106	124117906
QIAquickゲル精製キット	キアゲン社	28704	11549740
QIAquick PCR精製キット	キアゲン社	28106	G10. 1. 12
レッド停止液 (Kブルー用)	スカイバイオ社	301475	60104
	キアゲン社	74106	10916587
エピアルカリホスファターゼ	USB社	70092Y	107635
Subcloning Efficiency (商標) DH5α (商標) 化学的にコンピテン	インビトロジェン社	440098	1164658
T4 DNAリガーゼ	プロメガ社	M1801	167080
HRP用TMBワンステップ基	スカイバイオ社	KB176	
TOPO-TA Cloning (登録商標) キット	インビトロジェン社	45-0641	1350772
X-Gal	シグマ社	B-9146	20965701

10

20

30

40

【表 E】

国立医学研究所 (National Institute of Medical Research) からの溶液

溶液名	成分	量
PBS「A」ダルベッコ (Ca 及び Mg 無し)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ 水	8 g 0.2 g 1.15 g 0.2 g 1 L
LB	バクトトリプトン 酵母抽出物 NaCl 水	10 g 5 g 10 g 1 L
LB寒天	LB 寒天 (ディフコ (Difco))	1 L 15 g

10

20

【0068】

【表 F】

培養試薬

品目	英国供給業者	カタログ番号	ロット番号	有効期限
DMEM (1×) ダルベッコ 変法イーグル培地 (高グルコース)、G l u t a M A X (商標) I、4 5 0 0 m g / L の D - グルコース、ピルビン酸ナトリウム (S o d i u m P u r u v a t e) 含有	インビトロジェン社	4 1 9 6 6 - 0 4 7	9 2 0 6	0 7 / 0 7
DMSO (ジメチルスルホキシド)	シグマ社	D 2 6 5 0	1 2 5 K 2 4 0 9	1 2 / 0 7
ペニシリン及びストレプトマイシン	インビトロジェン社	1 5 0 7 0 - 0 6 3	1 2 9 8 4 0 1	
血清：胎仔クローン I	ペルビオ・サイエンス社	S H 3 0 0 8 0	A M M 1 7 7 7 9	1 2 / 0 7
S O C	インビトロジェン社	1 5 5 4 4 - 0 3 4	1 3 0 6 0 5 1	
トリパンブルー	シグマ社	T 8 1 5 4	1 9 H 2 3 8 8	
トリプシン-EDTA 溶液、細胞培養試験済み、0. 2 5 %	シグマ社	T 4 0 4 9	4 8 K 2 3 4 2	0 4 / 0 8

【0069】

実施例 9-158 抗体の DNA 配列

9. 1-RNA 調製

マウスハイブリドーマ 158 のスナップ凍結細胞ペレット (ラベル付きバイアル 060824#158 5×10⁶ 細胞) が、2006 年 10 月 3 日に TAG に入れられた。これらの細胞は切断まで凍結貯蔵され、キアゲン (Q i a g e n) R N e a s y ミディキットを使用して製造者の実験手順に従い RNA が単離された。

【0070】

9. 2-第一鎖合成

約 5 マイクログラムの 158 RNA が逆転写に供され、アマシャム・バイオサイエンス (A m e r s h a m B i o s c i e n c e s) 第一鎖合成キットを使用して製造者の実験手順に従い 158 cDNA が産生された—これが反復されることにより 3 つの個別の cDNA 産物 (ラウンド 1、2 及び 3) が生成され、RT 反応による DNA 突然変異を防いだ。

【0071】

9. 3 158 免疫グロブリン cDNA のクローニング

ハイブリドーマ 158 cDNA が PCR により別個の 23 反応において増幅された。免疫グロブリン κ 鎖可変領域 (VK) cDNA が、11 個の VK プライマー (MKV1~1

10

20

30

40

50

1) を κ 定常領域プライマーMKC (表6) と組み合わせて使用して増幅された。同様に、免疫グロブリン重鎖可変領域 (VH) cDNAがPCRにより、12個の異なるVHプライマー (MHV1~12) を4個のIgG定常領域プライマーの混合物 (MHCG1/2a/2b/3: 表7) と組み合わせて使用して増幅された。

【0072】

初回分のIgH-PCR反応の結果は、MHV5プライマーを使用した単一増幅産物であった。他の11個のプライマー対はどれもPCR産物をもたらさなかった。オリゴヌクレオチドプライマーMHV5+ (MHCG1/2a/2b/3混合物) によりプライミングされたPCR反応の産物が、TOPO-TAクローニング (登録商標) キットを使用してpCR2.1 (登録商標) -TOPO (登録商標) ベクターに連結された。初回分のIgK-PCR反応の結果は、プライマーMKV1及びMKV2をMKCと共に使用した2個の単一増幅産物であった。他の9個のプライマー対は産物を生成しなかった。オリゴヌクレオチドプライマーMKV1又はMKV2+MKCによりプライミングされたPCR反応の産物が、TOPO-TAクローニング (登録商標) キットを使用してpCR2.1 (登録商標) -TOPO (登録商標) ベクターに連結された。

【0073】

連結されたベクターで形質転換された大腸菌 (E. coli) TOP10細菌が、LB/アンピシリン/X-gal寒天プレート上で、寒天グリッド上のPCRスクリーニング混合物中へと選り取りることによりクローニングされた。クローニングされたプラスミドインサートがPCR増幅によりスクリーニングされた。PCR産物はゲル電気泳動され、及びサイズ補正されたPCR増幅産物 (約500bp) を産生するクローンが同定された。各クローンの一晚培養物 (5ml) が、QIAprepスピンミニプレップキット実験手順を使用して切断され、DNAプラスミドミニプレップが産生された。

【0074】

9. 4-cDNA配列決定

RT-PCR、クローニング、及びDNA配列解析の完全サイクルが反復され、各免疫グロブリン鎖についての3つの完全に独立した配列情報を得た。各々独立したセットのRT-PCR反応からのプラスミドクローンが、1212及び1233プライマー (表10) を使用して双方向で配列決定された。プラスミドがBigDye (登録商標) ターミネーターv3.0サイクル・シーケンシング・レディ・反応キット (ABI) を使用して配列決定され、GeneAmp9600PCR機上でサイクルに付され、及びABI310キャピラリーシーケンサー上で解析された。

【0075】

9. 5-158VK DNA配列

PCRプライマーMKV2及びMKCを使用して第一鎖cDNAラウンド1及び2で生成されたVKクロンの配列は、MOPC-21、SP2及びAg8などの骨髓腫融合パートナーに由来する無菌 κ 転写産物と同一であった。これは無菌転写産物である。PCRプライマーMKV1及びMKCを使用して第一鎖cDNAラウンド1~3上で生成されたVKクロンの共通配列 (158VK) が表11に示される。これは機能上の再構成である。表11は、表1、4及び5に示される配列といくらかの相違を示す。これらの相違は、PCRプライマーが位置したFW1領域にある。本願出願人のプライマーによりコードされなかった、158VKにおけるリーダーの断片と最も同一性の高いマウスVKリーダー配列は、K5.1#であった (表12)。#K5.1シグナル配列を正確に切断するシグナルペプチドの予測が、予測プログラムにより行われた。最も可能性が高いと予測された切断部位は、正確にアミノ酸残基19と20との間であった (表13)。キメラ158VKタンパク質及びDNA配列が表14に示される。

【0076】

9. 6-158VH DNA配列

PCRプライマーMHV5及びMHCG1/2a/2b/3混合物を使用して第一鎖cDNAラウンド1~3で生成されたVHクロンの共通配列 (158VH) が、表15に

示される。158VKと同様、表1、4及び5に示されるFW1配列とはいくらか異なる。本願出願人のプライマーによってはコードされなかった、リーダーの断片と最も同一性の高いマウスVHリーダー配列は、NL-1であった(表16)。

【0077】

実施例10ーキメラ発現ベクターの構築

キメラ発現ベクターの構築には、HindIII制限部位及びコザック配列の前方での、好適なリーダー配列のVH及びVKへの付加が伴う。コザック配列(表8)により可変領域配列の効率的な翻訳が確実となる。これはリボソームが翻訳を開始し得る正確なAUGコドンとを定義するとともに、最も重要な塩基は第3位、AUG開始上流のアデニンである。リーダー配列は、Kabatデータベース内で最も類似したマウスリーダー配列として選択される。これらの付加は、順方向プライマー(表9)内でコードされる。さらには、キメラ発現ベクターの構築には、天然ApaI制限部位に至り、158のJ領域の3'末端と隣接する、ヒトγ1定常領域の5'断片の導入が伴う。CHは挿入されたVH配列の下流の発現ベクター内でコードされるが、V-Cイントロンが欠如している。軽鎖について、天然スプライズドナー部位(表8)及びBamHI部位が、V領域の下流に付加される。スプライズドナー配列は、VKの定常領域へのインフレーム付着に必要なκV-Cイントロンのスプライシングを円滑にする。マウスVH及びVK遺伝子が解析され、不要なスプライズドナー部位、スプライズ受容部位、コザック配列がいずれも、及び機能性の全抗体のサブクロニング及び/又は発現を後に干渉し得る任意の追加的なサブクロニング制限部位の存在について同定された。この場合、何も見つからなかった。

【0078】

10.1ー発現ベクター

発現ベクターpKN100、及びpGD200のプラスミドDNA調製物が、キアゲン(Qiagen)マキシキットを使用して製造者の実験手順に従い精製された。TOP10細菌の培養物500ml由来の、キアゲン(QIAGEN)プラスミドミディ及びマキシキットを使用したプラスミドDNA精製物にいずれかのベクターが導入された。ベクターマップが図10及び11に示される。

【0079】

10.2ー軽鎖キメラ化プライマー

マウスリーダー配列K5.1#がキメラ158VKの設計に組み込まれた。プライマーは、この完全リーダーと、pKN100発現ベクター(表9)へのクローニング用の末端制限部位HindIII及びBamHIを備える158VKとを含有するPCR産物を生成するように設計された。順方向プライマー158vlは、HindIII制限部位;コザック部位及びK5.1#リーダー配列を導入する。逆方向プライマー158vlrevは、スプライズドナー部位及びBamHI制限部位を導入する。

【0080】

10.3ー重鎖キメラ化プライマー

リーダー配列NL-1がキメラ158VHの設計に組み込まれた。プライマーは、このリーダーと、pGD200発現ベクターへのクローニング用の末端制限部位HindIII及びApaIを備える158VH領域とを含むPCR産物を生成するように設計された。これらは表9に示される。順方向プライマー158vhは、HindIII制限部位;コザック翻訳開始部位及びNL-1リーダー配列を導入する。逆方向プライマー158vhrevは、γ1C領域の5'末端及び天然ApaI制限部位を導入する。VKのK5.1リーダー配列についてのシグナルペプチド切断部位の予測が表17に示される。

【0081】

10.4ーキメラ158VH構築物、pGD200158VHの生成

158VH DNA断片がプライマーの158vh及び158vhrev(表9)で増幅された。450bp(約)のPCR産物がベクターpCR2.1にT-A連結され、これを使用して化学的にコンピテントTOP10細菌が形質転換された。クローンが然るべき挿入サイズにより選択され、1212プライマー(表10)を使用して配列決定された

。的確な発現インサートが p G 1 D 2 0 0 発現ベクターにサブクロニングされ、的確なサブクローンが、プライマー B D S H 6 1 R (表 1 0) を使用した D N A 配列決定により選択された。このクローンを 2 0 0 m l の培養液中で成長させ、キアゲン・マキシキットを使用して製造者の実験手順を用いてプラスミド D N A を産生した。キメラ 1 5 8 V H タンパク質及び D N A 配列が表 1 8 に示される。

【 0 0 8 2 】

1 0 . 5 - キメラ 1 5 8 V K 構築物、 p K N 1 0 0 1 5 8 V K の生成

1 5 8 V K D N A 断片がプライマー 1 5 8 v l 及び 1 5 8 v l r e v (表 9) で増幅された。4 5 0 b p (約) の P C R 産物がベクター p C R 2 . 1 に T - A 連結され、これを使用して化学的にコンピテントな T O P 1 0 細菌が形質転換された。クローンが然るべき挿入サイズにより選択され、1 2 1 2 プライマー (表 1 0) を使用して配列決定された。的確なクローンが p K N 1 0 0 発現ベクターにサブクロニングされた。正しいサブクローンが、挿入サイズについてのスクリーニング及びプライマー H u - K 2 (表 1 0) を使用した D N A 配列決定により選択された。このクローンを 2 0 0 m l の培養液中で成長させ、キアゲン・マキシキットを使用して製造者の実験手順を用いてプラスミド D N A を産生した。

【 0 0 8 3 】

実施例 1 1 - キメラ 1 5 8 抗体の産生及び結合特性

1 1 . 1 - C O S 7 細胞の形質転換及び細胞培養

1 つのバイアルの C O S 7 細胞を解凍して、1 0 % の胎仔クローン I 血清及び抗生物質を補給した D M E M 中で成長させた。1 週間後、細胞 (1 0 ⁷ / m l で 0 . 8 m l) が、p G 1 D 2 0 0 1 5 8 V H に加え p K N 1 0 0 1 5 8 V K (各 1 0 μ g の D N A) によって電気穿孔処理された。細胞をペトリ皿の 8 m l の成長培地中で 3 日間成長させた。

【 0 0 8 4 】

1 1 . 2 - キメラ抗体産生

サンドイッチ E L I S A を使用して C O S 7 上清中の抗体濃度が計測された。キメラ 1 5 8 V H × 1 5 8 V K 抗体を 0 . 3 μ g / m l で、続いて 3 . 7 μ g / m l (表 1 9) で、一時的に同時導入された C O S 細胞馴化培地において発現させた。

【 0 0 8 5 】

1 1 . 3 - キメラ抗体活性

2 つの E L I S A を使用してキメラ 1 5 8 の抗原結合を分析した。3 . 7 μ g / m l のキメラ抗体馴化培地を使用して、A β 単量体の結合が直接 E L I S A 実験手順 (図 1 2) により計測され、マウス 1 5 8 I g G と比較された。次に、抗体と液相中で混合したうえ続いて A β 単量体と固相で結合させた単量体又はプロトフィブリルを使用して、競合 E L I S A が行われた (図 1 3) 。これらから、キメラ 1 5 8 抗体が元の 1 5 8 マウス抗体と同様にアミロイド A β 単量体及びプロトフィブリルと結合することが示された。

【 0 0 8 6 】

注釈

その後の配列決定により、表 1 及び 4 に示されるとおりのマウス抗体配列データが、5' 末端で V H 鎖及び V K 鎖の双方にエラーを含むことが示された。本願出願人はこれが、V 領域内に位置するプライマーの使用に起因することを提言したい。その後の配列決定において、V 領域内に突然変異を導入できない、リーダー配列内に位置するプライマーが使用された。この配列決定は、配列の差異を示した (表 1 5 及び 1 1 を参照) 。しかしながら、前記差異は C D R 領域内には位置しない。

【 0 0 8 7 】

直接結合 E L I S A 及び競合 E L I S A によりそれぞれ示されるとおり、キメラ抗体はアミロイド A β 単量体及びプロトフィブリルを結合する。この証拠から、1 5 8 V H 鎖及び 1 5 8 V K 鎖の組み合わせが抗 L S A P 抗体 1 5 8 をコードすることが確認され、これらの配列がヒト化 1 5 8 抗体を生成するためのヒト化手順に好適であることが示唆される。

。

【 0 0 8 8 】

実施例 1 2－ヒト化抗体設計及び考察

【 0 0 8 9 】

【表 G】

略称及び定義

1 5 8	マウスモノクローナル抗L S A P（商標）抗体1 5 8	
1 5 8 V H	マウス1 5 8抗体のV H	
1 5 8 V K	マウス1 5 8抗体のV K	10
1 5 8 R K A s s	潜在性スプライス部位を保有する1 5 8 V Kのヒト化バージョン	
1 5 8 R K A	潜在性スプライス部位が除去された1 5 8 V Kのヒト化バージョン	
1 5 8 R H A s s	潜在性スプライス部位を保有する1 5 8 V Hのヒト化バージョン	
1 5 8 R H A	潜在性スプライス部位が除去された1 5 8 V Hのヒト化バージョン	
A	アデニン	
b p	塩基対	
C	シトシン	
C D R	免疫グロブリン可変領域内の相補性決定領域、K a b a t 番号体系 を使用して定義される	20
D遺伝子	多様性遺伝子	
D N A	デオキシリボ核酸	
F W	フレームワーク領域：C D R 領域を除く免疫グロブリン可変領域	
G	グアニン	
I g G	免疫グロブリンG	
J 遺伝子	連結遺伝子	
K a b a t	エルビン・A・カバット（E l v i n A K a b a t）により開 発された免疫グロブリンアラインメント及び番号体系	30
m A b	モノクローナル抗体	
M R C T	医学研究会議技術部門（M e d i c a l R e s e a r c h C o u n c i l T e c h n o l o g y）	
T	チミン	
V C I	バーニヤ又はカノニカル又はV H－V L 界面として分類されるフレ ームワーク残基	
V 遺伝子	J 遺伝子（及びV H についてはD 遺伝子）と共に再構成され完全V H又はV K を生成する遺伝子セグメント	40
V 領域	異なる抗体間の配列において可変のI g G 鎖のセグメント。軽鎖に おいてはK a b a t 残基1 0 9 まで、及び重鎖においてはK a b a t 残基1 1 3 まで伸長している。	
V H	免疫グロブリン重鎖可変領域	
V K	免疫グロブリンκ 軽鎖可変領域	

【 0 0 9 0 】

【表 H】

器具

ハードウェア及びソフトウェア	出所
SGW02コンピュータ	シリコン・グラフィックス社
PCコンピュータ	ヒューレット・パカード社
SR7.6	スティーブ・サール (Steve Searle)、ウェルカム・トラスト・サンガー・インスティテュート (Wellcome Trust Sanger Institute)、ケンブリッジ (Cambridge)
Laser gene 6.0	DNAスター社
Modeler 9.0	アクセルリス社
SignalP	www.cbs.dtu.dk
BlastP	www.ncbi.nlm.nih.gov

10

【0091】

20

12.1-ヒトV遺伝子データベース

国際免疫遺伝学データベース (International Immunogenetics Database) 2006 及び「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の Kabat データベース第5版 (最終更新日1999年11月17日) からのヒト及びマウス免疫グロブリンのタンパク質配列を使用して Kabat アラインメントにおける免疫グロブリンタンパク質配列のデータベースを編纂した。本願出願人のデータベースは、9322本のヒトVH配列及び2689本のヒトVK配列を含む。配列分析プログラムSR7.6が使用され、158VH及び158VKタンパク質配列 (表20) についてヒトVH及びVKデータベースに問い合わせた。

30

【0092】

12.2-158RHAのためのヒトフレームワークの選択

12.2.1-158VHのヒトVH配列との比較

バーニヤ (フート・J (Foote, J.) 及びG・ウィンター (G. Winter)、1992年、「Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops」、J Mol. Biol. 224:487-499頁)、カノニカル (モレア・V (Morea, V.)、A・M・レスク (A. M. Lesk)、及びA・トラモンタノ (A. Tramontano)、2000年、「Antibody modeling: implications for engineering and design」、Methods 20:267-279頁) 及びVH-VL界面 (コチア・C (Chothia, C.)、J・ノボトニー (J. Novotny)、R・ブルコレリ (R. Brucoleri)、及びM・カープラス (M. Karplus)、1985年、「Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains」、J Mol. Biol. 186:651-663頁) (VCI) 残基において、158VHとの同一性が最も高いヒトVH配列で、V領域フレームワーク (FW) 内に位置するものが、表21に示される。158と同一のVCI残基の数 (VCIスコア) 及びFW残基の数 (FWスコア) もまた示される。これらのVH配列の全てが、表22に示れるとおり、同一のVCI残基、及びCDR長を共有する。AJ556669は、このデ

40

50

ータセットの他のヒト配列中には見られない異常な P r o 7 4 を有することから、本願出願人は当初の分析においてこれを無視することとする。しかしながら、P r o 7 4 は 1 5 8 V H 配列中に存在するため、A F 0 6 2 2 4 3 に基づく V H 構築物が抗原を結合しない場合には、A J 5 5 6 6 6 9 がヒト化の代替 F W として考慮され得るであろう。これらの配列のアラインメント（表 2 3）は、それらの相違を強調表示している。このデータセット内で A F 0 6 2 2 4 3 は唯一、保存された変化 T（8 2 a）S 及び F 7 9 の保存を有する。A F 0 6 2 2 4 3 の他の特徴は、保存された変化 D 1 E、K 1 9 R、A 2 3 S、T 7 7 S、S 1 1 8 T である。他の全ての F W 変化は、表 2 3 のフレームワーク全てに共通していた。A F 0 6 2 2 4 3 が 1 5 8 R H A の基盤となるフレームワークとして選択された。

10

【0093】

1 2 . 3 - 1 5 8 R H A の生成

1 5 8 R H A の設計は単に、1 5 8 V H から A F 0 6 2 2 4 3 のアクセプター F W への C D R 1、2 及び 3 の移植である。A F 0 6 2 2 4 3 と最も同一性の高いヒト生殖細胞系列 V 遺伝子は、V H M 9 9 6 4 9（V H 3 - 0 7）であり（表 2 4）、これからリーダーペプチドが抽出された（表 2 5）。シグナル P アルゴリズム（ニールセン・H（N i e l s e n, H.）、J・エンゲルブレヒト（J. E n g e l b r e c h t）、S・ブルナク（S. B r u n a k）、及び G・フォン・ヘイネ（G. v o n H e i j n e）、1 9 9 7 年、「I d e n t i f i c a t i o n o f p r o k a r y o t i c a n d e u k a r y o t i c s i g n a l p e p t i d e s a n d p r e d i c t i o n o f t h e i r c l e a v a g e s i t e s」、P r o t e i n E n g 1 0 : 1 - 6 頁）から、これがシグナルペプチダーゼにより適切に切断されるものと予測された（表 2 6）。表 2 7 は、1 5 8 V H C D R 1、2 及び 3 を A F 0 6 2 2 4 3 F W に移植して 1 5 8 R H A タンパク質配列を生成するスキームを示す。表 2 8 は、1 5 8 V H 及び A F 0 6 2 2 4 3 の天然 D N A 配列からの D N A 配列 1 5 8 R H A s s の生成を示す。1 5 8 R H A s s D N A 配列の分析からスプライスドナー部位の存在が予測されたが、その予測スコアが表 2 9 に示される。非コード突然変異の導入により、表 3 0 に示されるとおりのこれらの予測されたスプライス部位が不活化され、最終 1 5 8 R H A D N A 配列（表 3 1）が生成された。

20

【0094】

1 2 . 4 - 1 5 8 R K A のためのヒトフレームワークの選択

1 2 . 4 . 1 - 1 5 8 V K のヒト V K 配列との比較

V C I 残基で 1 5 8 V K との同一性が最も高いヒト V K 配列が、1 5 8 V K と同一の V C I 残基の数（V C I スコア）及び F W 残基の数（F W スコア）と共に表 3 2 に示される。1 1 本の配列が 1 5 8 V K と同一の V C I 残基を全て有する。表 3 3 は、これらの配列の全てが 1 5 8 V K と同一の C D R 長を有することを示す。表 3 4 は、これらの相違を強調表示しており、同様に I 8 5 を保有する A B 0 6 4 0 5 4 のみが K 4 5 を保有することを示す。G 1 0 0 P 変化は、P 1 0 0 が本願出願人のヒト V K データベース内で 1 5 % の出現率を有して一般的なため、特別注目に値しない。2 つの置換、T 7 7 S 及び K 7 4 R が保存されているとともに、他の全ての置換は表 3 4 の全ての配列に共通である。以上の理由から、1 5 8 R K A を生成するために A B 0 6 4 0 5 4 が選択された。

40

【0095】

1 2 . 5 - 1 5 8 R K A の生成

1 5 8 R K A の設計は単に、C D R 1、2 及び 3 を 1 5 8 V K からヒト A B 0 6 4 0 5 4 のアクセプター F W へと移植することである。A B 0 6 4 0 5 4 に最も近い生殖細胞系列 V 遺伝子は A 1 9 であり（表 3 5）、これからリーダーペプチドが抽出された（表 3 6）。シグナル P アルゴリズムから、このリーダーペプチドの適切な切断（表 3 7）が予測された。表 3 8 は、1 5 8 V K C D R を A B 0 6 4 0 5 4 の F W に挿入することによる 1 5 8 R K A のタンパク質配列の生成を示す。表 3 9 は、1 5 8 V K 及び A B 0 6 4 0 5 4 の天然 D N A 配列からの 1 5 8 R K A s s の D N A 配列の生成を示す。1 5 8 R K A s

50

s の分析からスプライスドナー部位の存在が予測されたが、そのスコアが表 40 に示される。非コード突然変異 (41) の導入によりこれらの部位が不活化され、最終 158 R K A DNA 構築物が生成された (表 42)。

【0096】

12. 6 ヒト化抗体 (BAN2401) 結合活性

158 R K A 及び 158 R H A 遺伝子を、I g G 1 定常領域を含む発現ベクターに挿入した。この構築物を C O S 細胞で発現させてヒト化 158 抗体を生成した。ヒト化 158 抗体が結合活性及び特異性について競合 E L I S A で試験した。ヒト化抗体は、m A b 158 及び 158 キメラ抗体と同一の結合特性を示した (図 14 を参照)。

【0097】

10

12. 7 158 R H A 鎖及び 158 R K A 鎖における追加的な突然変異

マウス生殖細胞系列 V 遺伝子 V H A A K 7 1 6 1 2 を 158 V H と比較することにより、単一の体細胞突然変異 A 6 0 G が C D R 2 において同定された。さらには、抗体 158 の分子モデルは、158 R H A には保存されていない 3 個の V H F W 残基を C D R 残基の 5 Å 内に含む。これらの置換は、D 1 E、P 7 4 A 及び T 8 2 S である (表 43)。同様に、158 R K A に保存されていない C D R 残基の 5 Å 内に 2 個の V K F W 残基がある。この置換は、L 3 V 及び G 1 0 0 P である (表 44)。ヒト化バージョン 158 R H B、158 R H C、158 R H D、158 R K B 及び 158 R K C における、158 R H A 及び 158 R K A への位置 V H - 1、V H - 7 4、V H - 8 2、V K - 3 及び V K - 1 0 0 での逆突然変異の導入が、表 43 及び 44 に示される。

20

【0098】

【表 I】

参考文献

- Bacskai et al., Nat.Med. 7:369-372, 2001.
- Bard et al., Nat. Med. 6:916-919, 2000.
- Bayer et al., Neurology 64:94-101, 2005.
- Brendza et al., J. Clin. Invest. 115:428-33, 2005.
- Chen et al., Nature, 408:975-9, 2000. 10
- Chothia,C. et al, *J Mol.Biol.*, 186:651-663, 1985.
- Ester W.P. Science 293, 1449-1459, 2001.
- Gullberg et al., Proc. Natl Acad Sci, 101:8420-4, 2004.
- Foote,J. et al., *J Mol.Biol.*, 224:487-499, 1992.
- Hoshi et al. Proc. Natl Acad. Sci, 100:6370-6375, 2003.
- Jarret J.T. , Biochemistry, 32, 4693-4697,1993.
- Leatherbarrow R.J. et al., Mol. Immunol. 22, 407, 1985. 20
- Lord et al., Neurobiol. Aging, 27:67-77, 2006.
- McLean et al., Ann. Neurol. 46:860-866, 1999.
- Morea,V. et al., *Methods* 20:267-279, 2000.
- Mullan et al., Nat Genet. 1:345-347, 1992.
- Nielsen,H. et al. *Protein Eng* 10:1-6, 1997.
- Nilsberth et al., Nat Neurosci. 4:887-893, 2001.
- Näslund et al., JAMA, 283:1571-1577, 2000.
- Pfeifer et al., Science 298:1379, 2002. 30
- Racke et al., J.Neurosci 25 :629-36, 2005.
- Schenk D. et al. Nature, 400, 173-177, 1999.
- Stenh et al., Ann. Neurol. 58:147-50, 2005.
- Walsh D. M. et al., 272, 22364-22372,1997
- Walsh D. M.et al., Nature, 416, 535-9, 2002.
- Wilcock et al., J. Neurosci., 23:3745-51, 2003.
- Wright A. et al., J. of Immunology, 3393-3402, 1998. 40
- Xu Y. et al. J.Biol. Chem. 269, 3469-3474,1994.

【 0 0 9 9 】

表1.
ヒト野生型Aβプロトフィブリルに特異的な6個の異なるモノクローナル抗体由来の
重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL/VK)のアミノ酸配列。

VH-BA1: X731	ZVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCLMSGFTFNSHGHHWVROAPEKGLHWAVYISSGSSSTIYVADVVKGRFTISRDKPKNTFLQWISLASEDTAMYYCARGYVYM-----DYKSGGTSVTVSS
VH-BA2: X736	EVRLVESGGGLVQPGGSRKLSCLMSGFTFSSYAMHWKOTEEKLELWVATISSGSSYTYVDSVKGRFTISRDNKMTNLYLQWSSLSHEDTAMYYCERNYGSRRYP-----DVMKGGTSVTVSS
VH-BA3: X745	QVHLCSSGPELVKPGASVNSCKLSGYTFTSYVHHVYKQKFGQGLEHIGVINDGTYNKPKGKNTLTSDKSSSTANXELSLTSDSDAMYYCRRVSPSLTSYM---DYKSGGTSVTVSS
VH-BA7: X746	QVQLKESGPELVAPQSLSITCTYISAPFELTSTGVHWPQPEKQLENLGVHWRGASTYVNSALNS-RLSLCKENSKSQVELKCSLQITDDTAMYYCARGYDZKTRPA----YKSGGTLATTVSS
VH-BA4: X748	EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCLMSGFTFSSFGHHWVROAPEKGLHWAVYISSGSSSTIYVADVVKGRFTISRDKPKNTFLQWISLASEDTAMYYCARGDPSF-----DYKSGGTLATTVSS
VH-BA9: X758	EVQRVESGGGLVQPGGSRKLSCLMSGFTFSSFGHHWVROAPEKGLHWAVYISSGSSSTIYKQDTVKGRFTISRDKPKNTFLQWISLASEDTAMYYCARGSYVYGRSYTNDVNSGGSVTVSS
VK-BA1: X731	DYKNTQTFPLSLPVSIGDDQASISCRSSQSLVHNSNTYLH-WILOKPGQSPKLLIYKVSRRFESVHPDRFSSGSSSTDFTLKISRVEADHLGVYTCFQGSNHPZFFTFGGGTKLHLK
VK-BA2: X736	DIYNTQAPKELLVAGDRTVITCKLSQSVENDWA-----HYQKPGQSPKLLIYVASHRYTGVDFDFTISGVTDFDTFTITVQADHLAVYFCQDYSSTFFGASSTKLHLK
VK-BA3: X745	DIYNTQAPSSLVASGKGVNTNSCKSSQSLINSTRKLYLWYKQKPGQSPKLLIYMASTRSGVDPDRFTSGGSGSTDFTHFISWQADHLAVYCKQSYNL-WYFGGGLKLHLK
VK-BA7: X746	ENVLTQSPAIMSAPFGERVYNTCRASSSVSSSYLH-----HYQKPGQSPKLLIYKVSRRFESVHPDRFSSGSSSTSYGSTITISVEADHLAVYCOQVSGYPLTFGAGSTKLHLK
VK-BA4: X748	DIYNTQAPLSLFLVSLZDQASISCRSSQSLVHNSNTYLH-WILOKPGQSPKLLIYKVSRRFESVHPDRFSSGSSSTDFTLKISRVEADHLGVYTCFQGSNHPZFFTFGGGTKLHLK
VK-BA9: X758	DIYNTQAPLSLFLVSLZDQASISCRSSQSLVHNSNTYLH-ENVLQKPGQSPKLLIYKVSRRFESVHPDRFSSGSSSTDFTLKISRVEADHLGIYTCFQGSNHPZFFTFGGGTKLHLK

* VL及びVHにおける様々なCDR領域(1~3)の位置には下線が引かれている。CDR領域(1~3)の境界は表3及び表4に示されている。本特許出願においては158とも命名される抗体BA9が、本発明に係る高親和性プロトフィブリル特異抗体の例である。

【表 2】

表2.

プロトフィブリル選択的抗体のVH鎖由来のCDR1-2領域のアミノ酸配列及びヒト野生型A β プロトフィブリルに対する高親和性結合に適合性を有するアミノ酸置換。

VH鎖CDR-1領域		
AASGFTFSSFGMHWVR	抗体158	
-----YA-S---	置換*	10
VH鎖CDR-2領域		
WVAYISSGSSTIYYGDTVKGRT	抗体158	
-----A-----	置換*	
---T---G-YT--P-S-----	置換*	
VH鎖CDR-3領域		
CAREG-GYYYGRSYY-TMDYWGQ	抗体158	20
CARYGxxxxxNYxxxxAMDYWGQ	置換及び欠失*	
CARNYxxxxGSRRxxxYFDVWGA	置換及び欠失*	

*アミノ酸置換(抗体158内のもの以外のアミノ酸)はアミノ酸1文字コードで示される。
欠失は(x)で示される。

【表 3】

表3.

プロトフィブリル選択的抗体のVL鎖由来のCDR1-3領域のアミノ酸配列及び
ヒト野生型A β プロトフィブリルに対する高親和性結合に適合性を有するアミノ酸置換

VL鎖CDR-1領域		
ISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYL	抗体158	10
ITCKASQSV _{xx} SND _{xxx} VAWYQ	置換及び欠失*	
VL鎖CDR-2領域		
LIYKVSNRFSGVP	抗体158	
---YA---YT---	置換*	
VL鎖CDR-3領域		
YYCFQGSHVPPTFGG	抗体158	
-F-Q-DYSS-F---S	置換*	20

*アミノ酸置換(抗体158内のもの以外のアミノ酸)はアミノ酸1文字コードで示される。
欠失は(x)で示される。

【0102】

表4.
プロトフィブリル特異抗体由来のマウス及びヒトの軽鎖可変(VL)領域のマウスフレームワーク領域のアミノ酸配列

マウスフレームワーク*VL領域		抗体158
DivmtgapIslpvsIgdqasiscwylqkpgqspklliygvpdrrfsgsgsgtdftlkisrveaedlgiyy		BA9_VL_fr123
.....		BA1_VL_fr123
.v....t.....		BA2_VL_fr123
.....kf.l..a..rvt.t...q.....t...y.....ft..t.q....av.f.		
ヒトフレームワーク*VL領域		
.....t.....tp.ep.....q.....v.v...		VKII-3-1-(1)-O11
.....s.....tp.ep.....q.....v.v...		VKII-4-1-(1)-A19
.....t.....s.tp.qp.....q.....v.v...		VKII-4-1-(1)-A18
.....t.....s.tp.qp.....p.q.....v.v...		VKII-4-1-(1)-A2
.v....s.....t...qp.....fq.r.....rr.....v.v...		VKII-4-1-(1)-A17

* フレームワーク領域はCDR領域外の領域である。明確にするためCDR領域は削除されている。

表5.
プロトフィブリル特異抗体由来のマウス及びヒト重鎖可変(VH)領域のマウス及びヒトフレームワーク領域のアミノ酸配列

マウスフレームワーク*VH領域										抗体158
Evklmesggglvqp	gsgsrkl	scaaswvr	qapekglew	varftisr	dnpknt	lflqmtsl	rse	dtam	yycar	BA9_VH_fr123
.....										BA1_VH_fr123
.....v.....										BA2_VH_fr123
.....v.....	k.....	l.....	t.....	r.....	a.....	y.....	s.....			
ヒトフレームワーク*VH領域										
..q.v.....	..lr.....	..g.....	..g.....	..a.....	..s.y.....	..n.....	..a.....	..v.....	..	VH3-7_fr123
..q.v.....	..i.....	..lr.....	..g.....	..s.....	..g.....	..y.....	..n.....	..a.....	..v.....	VH3-53_fr123
..q.l.....	..lr.....	..g.....	..g.....	..s.....	..s.....	..y.....	..n.....	..a.....	..v.....	VH3-23_fr123
..q.v.....	..lr.....	..g.....	..g.....	..s.....	..s.....	..a.....	..s.y.....	..n.....	..d.....	VH3-48_fr123
..q.v.....	..lr.....	..g.....	..g.....	..v.....	..s.....	..a.....	..y.....	..n.....	..a.....	VH3-74_fr123

* フレームワーク領域はCDR領域外の領域である。明確にするためCDR領域は削除されている。

【表 6】

表6. マウスVKのクローニング用PCRプライマー

名称	配列 (5'→3')
MKV1	ATGAAGTTGVVVTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
MKV2	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG
MKV3	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGS GTG
MKV4	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG
MKV5	ATGGATTTWAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
MKV6	ATGAGGTKCKKTGKTSAGSTSCTGRGG
MKV7	ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
MKV8	ATGTGGGGAYCTKTTYCMMTTTTTCAATTG
MKV9	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
MKV10	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT
MKV11	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
MKC	ACTGGATGGTGGGAAGATGG

10

20

【 0 1 0 5 】

【表 7】

表7. マウス重鎖VHのクローニング用PCRプライマー

名称	配列 (5'→3')
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT
MHV4	ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRTTT
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT
MHV6	ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTGC
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCTG
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
MHV12	ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG
MHCG2a	CAGTGGATAGACCGATGGGGC
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC

注: ゆらぎ塩基は略称で定義される(第2節)。

【0106】

【表 8】

表8.

哺乳動物細胞における免疫グロブリンの効率的な発現に重要な配列

名称	コンセンサスDNA配列 (5'→3')
コザック翻訳 開始部位	G C C G C C R C C ¹ A ⁴¹ U G G
κ 軽鎖スプライス ドナー部位	A C :: G T R A G T
重鎖スプライス ドナー部位	M A G :: G T R A G T
免疫グロブリン スプライス受容部位	Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y N C A G :: G

注: 太字で示される塩基は各コンセンサス配列内で不変と考えられる。
スプライス部位は記号「::」により定義される。ゆらぎ塩基は略称で定義される
(実施例9～11を参照)。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 7 】

【 表 9 】

表9. キメラ158の生成に使用されるオリゴヌクレオチドプライマー

オリゴヌクレオチド名	配列 (5'→3')
158vh	<u>AAGCTT</u> GCCGCCACCATGGACTCCAGGCTC
158vhrev	GGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACTGAGG
158vl	<u>AAGCTT</u> GCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGG
158vlrev	<u>GGATCC</u> ACTCACGTTTGATTTCAGCTTGG

10

注:制限部位には下線が引かれている。コザック配列は太字体である。

【 0 1 0 8 】

【 表 1 0 】

20

表10. 配列決定に使用されるオリゴヌクレオチドプライマー

オリゴヌクレオチド名	配列 (5'→3')
1212 (17mer)	GTTTTCCCGAGTCACGAC
1233 (24mer)	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
Hu-K2 (17mer)	CTCATCAGATGGCGGGA
BDSH61R	CGCTGCTGAGGGAGTAGAGTC

30

【 0 1 0 9 】

表11.
158VK、プライマーMKV1及びV領域内に位置するプライマーの使用に由来するVK配列のDNA配列

1	ATGAAGTTGCCTGTAGGCTGTTGGTGTGCTGATGTTCTGGATTCTGTCTCCAGCAGTGATGTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTG	158	VK
1	VV.....		MKV1
1	-----A..G.....GG.....		*** VK
91	CCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAACACCTATTAGAAATGGTAC	158	VK
34			*** VK
181	CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTCCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGA	158	VK
124			*** VK
271	TCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTATTACTGCTTCAAGGTTTCACATGTTCCCTCCG	158	VK
214			*** VK
361	ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAAACGGGCTG	158	VK
304			*** VK

注: 158VKと同一の残基は点で表示される。***V領域内に位置するプライマーを使用した配列決定

【表 1 2】

表12. キメラVKリーダー配列選択ーキメラVK用K5. 1#リーダー選択

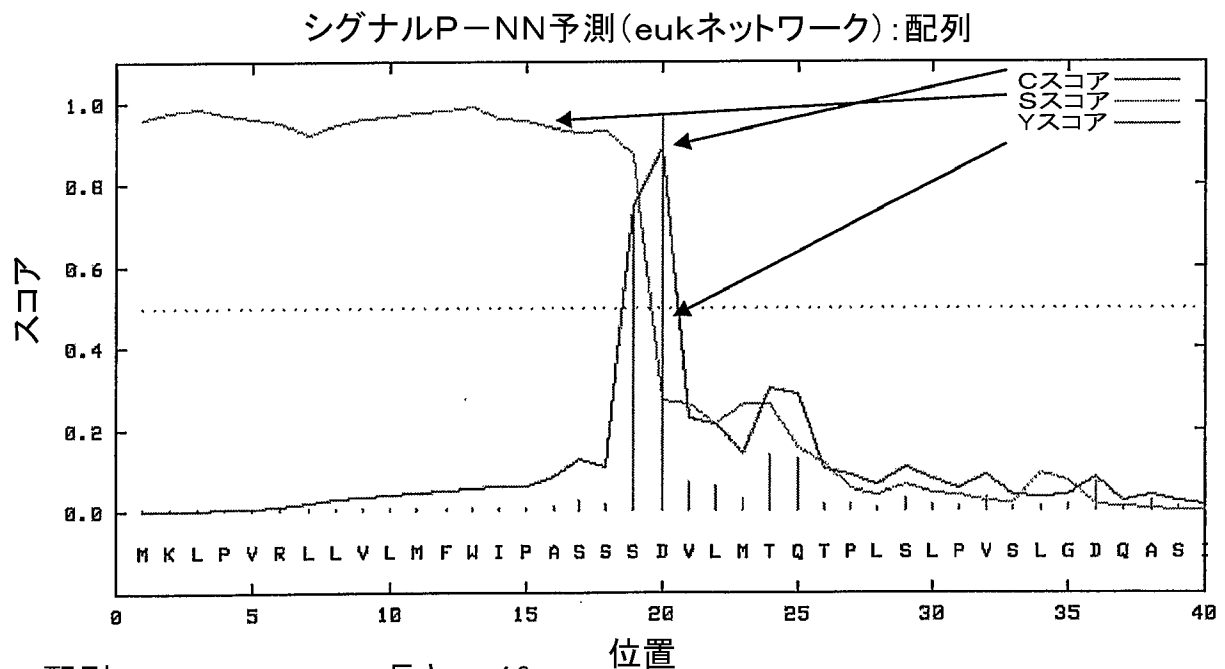
158 VK	MKLPVRLLVLMFWIPASSS
K5. 1#タンパク質	MKLPVRLLVLMFWIPASSS
K5.1#DNA	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCT GCTTCCAGCAGT

10

【0 1 1 1】

【表 1 3】

表13. K5. 1#リーダーについてのシグナルP結果6



20

30

> 配列		長さ = 40		位置	
#計測	位置	値	カットオフ	シグナルペプチド?	
最大	C 20	0.970	0.32	はい	
最大	Y 20	0.890	0.33	はい	
最大	S 13	0.989	0.87	はい	
平均	S 1-19	0.954	0.48	はい	
	D 1-19	0.922	0.43	はい	

40

切断の可能性は、アミノ酸残基19と20との間(SSSーDV)が最も高い

注:シグナルPアルゴリズム⁶は、切断部位スコアC、及びシグナルペプチドスコアSから結合スコアYを生成する。

50

表14. キメラ158VK構築物のタンパク質及びDNA配列

HindIII	
AAAGCTTGCCGCCACCATGAAGTTGCCCTGTTAGGCTGTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTCTGCTTCCAGCAGTGTGTTTTG	81
K5.1#1-ダー	
KLATMKLLPVRLLLVLLMLFWIPASSDVL	158VK
ATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTA	162
158VK	
MTQTPLSLPVSLGLGDQAASISCRSSQSI	243
CATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCC	
158VK	
HSNGNTYLEWYLLQKPGQSPKLLIYKVS	324
AACCGATTTCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG	
158VK	
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE	405
GCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCTCCGACGTTCCGTTGGAGGCCACCAAGCTGGAATC	
158VK	
AEDLGIIYYCYCFQGSHPVPTTFGGGTLKEI	
BamHI	
AAACGTCAGTGGATCC	421
15ヒトイントロン	
KREWI	

表15.
158VH、プライマー-MHV5及びV領域内に位置するプライマーの使用に由来する配列のDNA配列

1	ATGGACTCCAGGCTCAATTAGTTTTCCTTGTCCTTATTTTAAAGGTGTCCAGTGTGATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTA	158	VH
1	-----G...A...A.....	***	VH
1		MHV5	
91	GTGCAGCCTGGAGGGTCCCGGAAACTCTCCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTTCGTCAGGCTCCA	158	VH
34		***	VH
181	GAGAGGGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTATGGAGACACAGTGAAAGGGCCGATTCACCATCTCC	158	VH
124		***	VH
271	AGAGACAATCCCAAGAACACCCCTGTTCCCTGCAAAATGACCAGTCTAAGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAGAGGGGGGA	158	VH
214		***	VH
361	TATTACTACGGTAGGAGTTACTATATACTATGGACTACTGGGCTCAAGGAACTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCA	158	VH
304		***	VH

注:158VHと同一の残基は点で表示される。***V領域内に位置するプライマーを使用した配列決定。

【表 1 6】

表16. キメラVHリーダー選択－NL－1VHリーダー配列

158 VH リーダー	MDSRLNLVFLVLLILKGVQC
NL－1 タンパク質	MDSRLNLVFLVLLILKGVQC
NL-1 DNA	ATGGACTCCAGGCTCAATTAGTTTTTCCTTGTCCCTTATTTTAAAGGTGTCCAGTGT

10

20

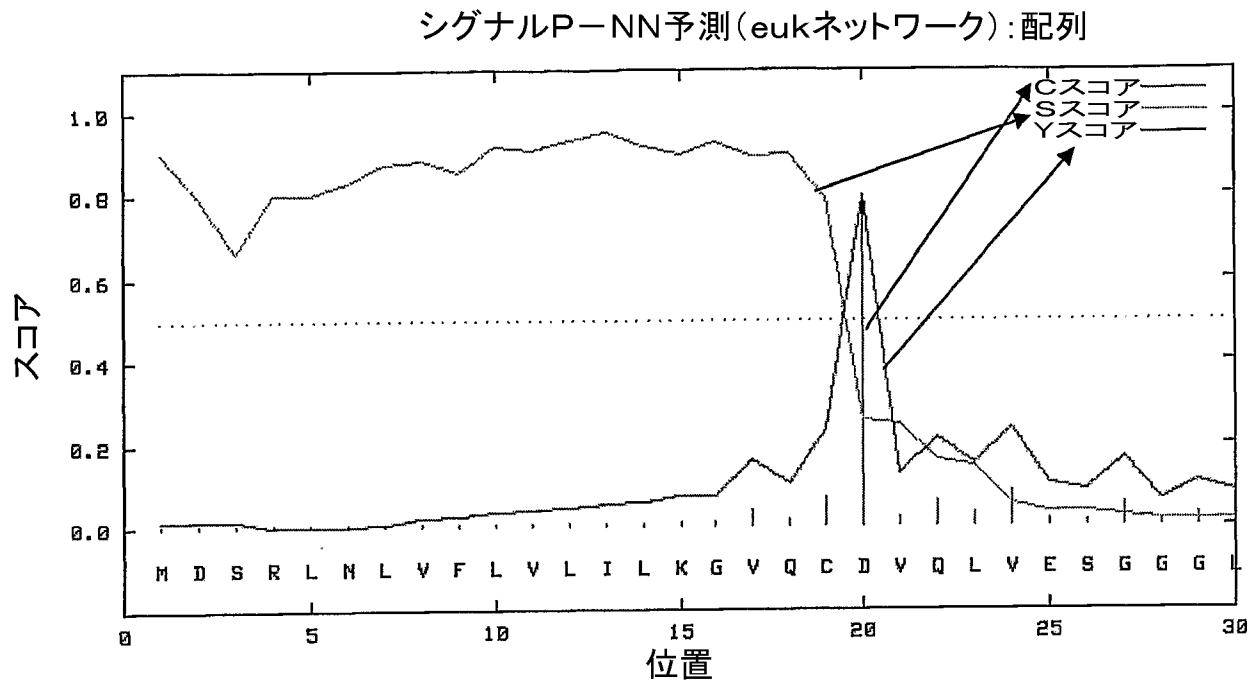
30

40

【 0 1 1 5】

【表 17】

表17. NL-1VHリーダー配列についてのシグナルP結果6



# 計測	位置	値	カットオフ	シグナルペプチド?
最大	C 20	0.775	0.32	はい
最大	Y 20	0.795	0.33	はい
最大	S 13	0.953	0.87	はい
平均	S 1-19	0.866	0.48	はい
	D 1-19	0.830	0.43	はい

切断の可能性は、アミノ酸残基19と20との間(VQC-DV)が最も高い
19及び20:VQC-DV

注:シグナルPアルゴリズム⁶は、切断部位スコアC、及びシグナルペプチドスコアS
から結合スコアYを生成する。

【0116】

表18. キメラ158VHのタンパク質及びDNA配列

HindIII	
AAGCTTGCCGCCACCATGGACTCCAGGCTCAATTAGTTTCTTGCTCTTATTTTAAAGGTGCCAGTGTGTCAG	81
コザック	
NL-1 IJ-Δ	
158 VH	
K L A A T M D S R L N L V F L V L I L K G V Q C D V Q	
CTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGCTCCGGAACCTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTACATTTCAGT	162
158 VH	
L V E S G G G L V Q P G G S R K L S C A A S G F T F S	
AGCTTTGCAATGCACCTGGGTTTCGTACGGCTCCAGAGAGGGGCTGGAGTGGTCCCATACATTAGTAGTGGCAGTAGTACC	243
158 VH	
S F G M H W V R Q A P E K G L E W V A Y I S S G S S T	
ATCTACTATGGAGACACAGTGAAGGGCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCCTGTTCCTGCAAATGACC	324
158 VH	
I Y Y G D T V K G R F T I S R D N P K N T L F L Q M T	
AGTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAGAGGGGGATATTACTACGGTAGGAGTTACTATCTATG	405
158 VH	
S L R S E D T A M Y Y C A R E G G Y Y Y G R S Y Y T M	
Apal	
GACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC	481
158 VH	
ヒトHC領域	
D Y W G Q G T S V T V S S A S T K G P	

表19. COS細胞におけるキメラ158抗体の発現

同時導入数	同時導入された発現ベクター構築物	抗体濃度 (ng/ml)
2 プール済み	pG1D200158及びpKN100158	300
2 プール済み	pG1D200158及びpKN100158	3700

注:抗体濃度はELIZAにより、導入されたCOS7細胞の3日間培養物中で計測された。
COS細胞は、各10 μ gの重鎖及び軽鎖キメラ発現ベクター-pG1D200158及び
pKN100158で同時形質転換された。

表20. 158VH及び158VKのアミノ酸配列

VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSFSGMHVVRQAPAEKGLEWVAYISSGSSTIYYGDTYKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAREGGYYGRSYTMDYWGQGSTVTYSS
VK	DVLTMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDIGIYYCFQGSHPPTFGGGTKLEIK

10

20

30

40

【表 2 1】

表21. 158VHと比較して最良のヒトVHフレームワークVCIスコア

Kabat番号 ⁶			2	24	25	27	28	29	30	37	39	45	47	48	49	67	69	71	73	78	91	93	94	103		
カノニカル残基 ⁸			-111-1-----2----1-																							
バーニヤ残基 ⁷			*---*****---*****--*-																							
界面残基 ⁹			-----IIII-----II-I																							
配列名	FW スコア	VCI スコア	VCI残基																							
158 VH	87	22	VAGFTFSVQLWVAFIRNLYARW																							
38687	79	22																								
AB021520	77	22																								
AJ556669	77	22																								
38672	77	22																								
38673	77	22																								
DQ322738	77	22																								
AB067108	76	22																								
AB021531	76	22																								
AB021532	76	22																								
AB063892	76	22																								
AB067237	76	22																								
AB021507	76	22																								
AF471177	76	22																								
AF471184	76	22																								
AF062243	76	22																								
AF174030	76	22																								
AF466141	76	22																								
AF466142	76	22																								
AJ245279	76	22																								
AJ579216	76	22																								

注：本表においてカノニカル残基は、どのCDRと関連するかに従い番号付けされる。FWスコア及びVCIスコアは、それぞれFW又はVCIの定義における残基数であり、158においてそれらに対応するものと同じである。158VHのものと同一の残基は点で表示される。

表22. 158VHと比較した、最良のVCISコアのヒトVH配列

Kabat番号 ⁶	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
-123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123											
カノニカル	1	1	1	1	2	22	2		1		
バーニヤ	****				***		*****	*	**		*
界面	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Kabat CDR	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
158 VH	-DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSYGMH--WVROAPEKGLWVAVIYSS--GSSTLYGDIIVKGRFTISRDNPKNTLFQMTSLRSRDTAAVYCARREGVYVGRSYVT-----MDYWGQGTFTVTVSS										
AB021520	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSS--WVROAPEKGLWVAVANIKQ--DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQNNSLRAEDTAVYCARDDSSGYYSABY-----FOHWGQGTFTVTVSS										
AJ556669	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSS--WVROAPEKGLWVAVANIKQ--DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQNNSLRAEDTAVYCARERGHDFWLSIYYTH-----FDYWGQGTFTVTVSS										
DQ322738	PLVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSS--WVROAPEKGLWVAVIWIY--DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQNNSLRAEDTAVYCARDDGSI-----FDYWGQGTFTVTVSS										
AB067108	-EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMH--WVROAPEKGLWVAVIYSS--DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQNNSLRAEDTAVYCARARDIYYYP-----MDVWGQGTFTVTVSS										
AB021531	-QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSYAMH--WVROAPEKGLWVAVIYSS--DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQNNSLRAEDTAVYCARQDSRSRIAAGTTPPSL-----FDPWGQGTFTVTVSS										
AB021532	-QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSYAMH--WVROAPEKGLWVAVIYSS--DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQNNSLRAEDTAVYCARARNYYDSSGYS-----FDYWGQGTFTVTVSS										
AR063892	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSS--WVROAPEKGLWVAVANIKQ--DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQNNSLRAEDTAVYCARVRRGS-----GDSWGQGTFTVTVSS										
AB067237	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSS--WVROAPEKGLWVAVANIKQ--DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQNNSLRAEDTAVYCARQQLGPHNW-----FDPWGQGTFTVTVSS										
AB021507	-QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSYAMH--WVROAPEKGLWVAVIYSS--DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQNNSLRAEDTAVYCARQDGTGTFDYIYYG-----MDVWGQGTFTVTVSS										
AF471177	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSS--WVROAPEKGLWVAVANIKQ--DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQNNSLRAEDTAVYCARDPMTTVVKPSLAT-----ADYWGQGTFTVTVSS										
AF471184	-EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSS--WVROAPEKGLWVAVANIKQ--DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQNNSLRAEDTAVYCARDCVGAIGA-----FDYWGQGTFTVTVSS										
AF062243	CEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYMT--WVROAPEKGLWVAVANIKP--HGSEAYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQNNSLRAEDTAVYCARANS-----LDVWGQGTFTVTVSS										
AF174030	CEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSS--WVROAPEKGLWVAVANIKQ--DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQNNSLRAEDTAVYCARQDGIQDW-----FDPWGQGTFTVTVSS										
AF466141	-QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSYGMH--WVROAPEKGLWVAVIWIY--DGSNKYYADSAKGRFTISRDNKNTLYLQNNSLRAEDTAVYCARDKGYDYVWGSYRSNPKNDA-----FDYWGQGTFTVTVSS										
AF466142	-QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSYGMH--WVROAPEKGLWVAVIWIY--DGSNKYYADSAKGRFTISRDNKNTLYLQNNSLRAEDTAVYCARDKGYDYVWGSYRSNPKNDA-----FDYWGQGTFTVTVSS										
AJ245279	-QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMH--WVROAPEKGLWVAVIWIY--DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQNNSLRAEDTAVYCARDRFF-----FDNWGQGTFTVTVSS										

表23. 最良のVCIスコアのヒトVHとの158VHのアライメント

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
12345678901234567890123456789012345678901234567890123											158 VH
DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSFGHWRQAPFKGLEWVA											AB021520
E.....L.....											DQ322738
L.....LR.....											AB067108
E.....V.....LR.....											AB021531
Q.....V.....R.L.....											AB021532
Q.....V.....R.L.....											AB063892
E.....L.....LR.....											AB067237
E.....L.....LR.....											AB021507
Q.....V.....R.L.....											AF471177
E.....L.....LR.....											AF471184
E.....L.....LR.....											AF062243

注: 158VHと同一の残基は点で表記される。CDRは灰色で網掛けされている。

表24. VHシグナルペプチド選択－5. 5. 1 158VH、ヒトAF062243
及びヒト生殖細胞系列M99649 (VH3－07)のV遺伝子アラインメント

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSFGMHVVRQAPKGLWVAIS	158 VH
E.....LR...S.....TYW.T.....G.....N.K AF062243	
E.....LR.....YW.S.....G.....N.K M99649	
SGSSTIYYGDTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAR	158 VH
PHG.EA..V.S.....A..S.....S...A....V.....AF062243	
QDG.EK..V.S.....A..S.Y..N...A....V.....M99649	

注：158VHと同一のV遺伝子残基は点で表記されている。

表25. M99649ヒト生殖細胞系列VH遺伝子のシグナルペプチド

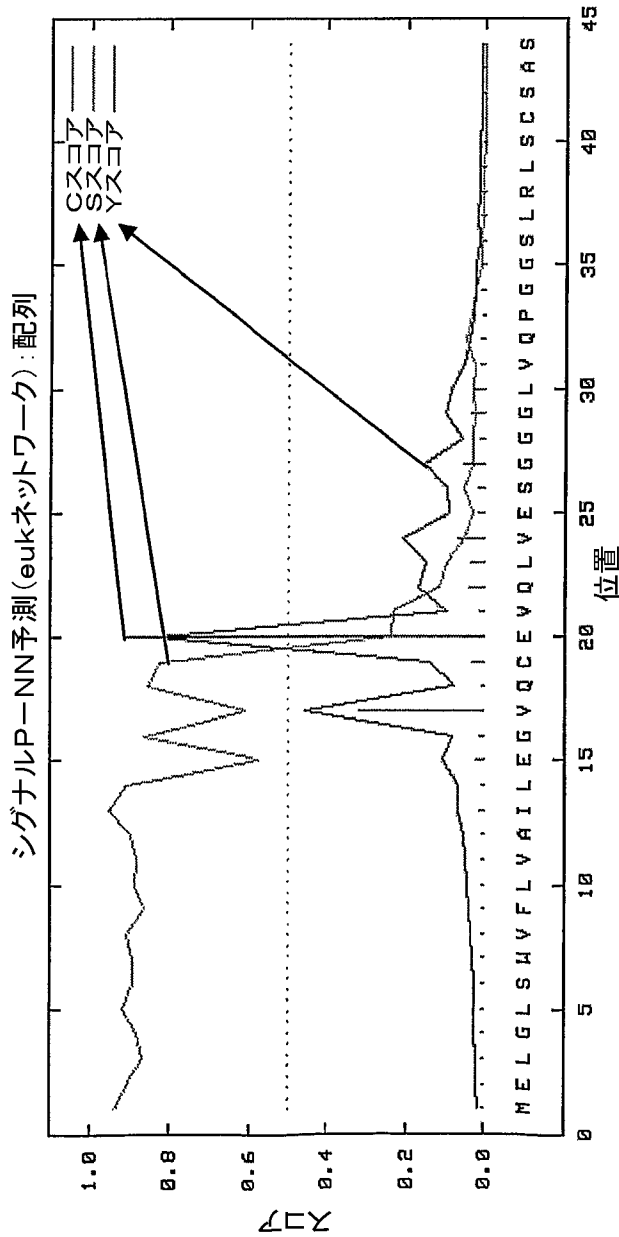
DNA	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTTGCTATTTAGAAAGGTGCCAGTGT
タンパク質	MELGLSWFLVAILEGVQC

10

20

30

表26. M99649シグナルペプチド切断予測



#	計測	位置	値	カットオフ	シグナルペプチド?
最大	C	20	0.909	0.32	はい
最大	Y	20	0.836	0.33	はい
最大	S	13	0.953	0.87	はい
平均	S	1-19	0.859	0.48	はい
	D	1-19	0.848	0.43	はい

切断の可能性は、アミノ酸残基19～20間、VQC-DVが最も高い。

注:シグナルPアルゴリズム¹⁰ は、切断部位スコアC、及びシグナルペプチドスコアSから結合スコアYを生成する。

表27. 158RHAタンパク質配列の生成

Kabat番号 ⁶	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CDR	01234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123	====H1====									
158VH	F	D	V	I	V	E	S	G	G	L	V
158ODR	F	D	V	I	V	E	S	G	G	L	V
158RHA	-	E	V	O	L	V	E	S	G	G	L
AF062243 FW	-	E	V	O	L	V	E	S	G	G	L
AF062243	C	E	V	O	L	V	E	S	G	G	L

10

20

30

40

表28. 158RHA DNA配列の生成－158RHAssDNA配列の生成

領域	DNA	タンパク質
VH3－07 リーダー	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTTCCTTGTTCCTATTTAGAGGTGTCCAGTGT	MELGLSWVFLVALLEGVQC
AF062243 FW1	GAGGTGCAGCTGTGTGAGTCTGGGGGAGGCTTGCTCCAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTCAGCCCTCTGGATTACACCTTTAGT	EVQLVESGGGLVQPGGGSLRLS CSASGFTFS
H38-CDR1	AGGHHGGGMAHSCAG	SEGMH
AF062243 FW2	TGGGTCCGCAGGCTCCAGGGAAGGGGTGGAGTGGGTGGCC	WVRQAPGKGLEWVA
H38-CDR2	DAQHTTACTAGTGGGAGTACTACCATCTATCTGACAGACACAGAGAGGGG	MTSSGSSNTIYAGTVYKG
AF062243 FW3	CGAATTCACCATCTCCAGAGACACGCCAAGAACTCACTGTCTGCATAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACACGGCCGT	RFTISRDNAKNSLFLQMSSLR AEDTAVYYCAR
H38-CDR3	KACGGGSCATATTTCTGCTACGACAGTAACTATATTTGCGTAAAC	EGCMYVGHSMATMDN
AF062243 FW4	TGGGGCCAGGGACACACGGTCAACCCGTCTCC	WGQGTITVTVS

注: 158RHAssを生成するために158VH CDR(灰色網掛け)が挿入された
AF062243VH FW及びヒトVH3－07リーダー(表27及び28に関連)。

表29. 158RHAssのDNA及びタンパク質配列

ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCCCTTGGTTGCTAATTTAGAGGTGTCAGGTGTCAGCTGGTGGAGTCTGGG	81
スプライス4. 3スプライス6. 9	
MELEGLSWVFLVAILLEGVQCQLEVESG	
GGAGCTTGGTCCAGCTGGGGGTCCTCGAGACTCTCCTGTTCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTTTGGAATGCAC	162
GGLVQPGGSLRLSLCSASGFTFSFGMH	
TGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCTACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCACTACTAIGGAGAC	243
スプライス5. 9	
WVRQAPGKGL EWVA Y I S S G S S T I Y G D	
ACAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCAGTGTCTTGCAAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAG	324
スプライス5. 0	
TVKGRFTISRDNAKNSLFLQMS SLRAE	
GACACGGCCGTGATTATTGTCCGAGAGAGGGGGGATATTACTACGGTAGGAGTTACTATACTAATGACTACTGGGGCCAA	405
スプライス4. 7	
DTAVVYCYCAREGGY Y Y G R S Y Y T M D Y W G Q	
GGGACCGACGGTCACCGTCTCC	426
GT T V T V S	

注: スプライスドナー部位が、それらのスコアと共にLasergene6. 0 GeneQuest分析により、
閾値が4. 2のヒト_ds_2マトリクスを使用して予測された。

【表 3 0】

表30. 158RHAssにおけるスプライス部位を除去する158RHA中の突然変異

1	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGCTATTTAGAGGGAGT	158RHA
1	A..T..	
158RHAss		
51	CCAGTGCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG	158RHA
51	T..G.....	
158RHAss		
101	GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTTCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGC	158RHA
101		
158RHAss		
151	TTTGGAATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGT	158RHA
151	G.....	
158RHAss		
201	GGCCTACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTATGGAGACACCGTGA	158RHA
201	A....	
158RHAss		
251	AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTTTCTG	158RHA
251		
158RHAss		
301	CAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGAG	158RHA
301		
158RHAss		
351	AGAGGGGGGATATTACTACGGAAGGAGTTACTATACTATGGACTACTGGG	158RHA
351	T.....	
158RHAss		
401	GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC	158RHA
401		
158RHAss		

10

20

30

注 158RHA DNA配列を、予測されたスプライス部位を含む
158RHAss(表5. 7. 2)と比較した。158RHAと同一の位置は
点で表示される。

【0 1 2 9】

40

表31. 158RHAのDNA及びタンパク質配列

ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTGCTATTTAGAGGGAGTCCAGTGCAGTCGGAGTGCAGTCIGGAGTCTIGGG	81
VH3-07J-データ	
158RHA FW1	
M E L G L S W V F L V A I L E G V Q C E V Q L V E S G	
GGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTTGAGCCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTTTGGAAATGCAC	162
158RHA FW1	
CDR1	
G G L V Q P G G S L R L S C S A S G F T F S S F G M H	
TGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAATGGGTGGCTACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTATGGAGAC	243
158RHA FW2	
CDR2	
W V R Q A P G K G L E W V A Y I S S G S T I Y Y G D	
ACCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACACGCCAAGCAACTGTTTCTGCAAAATGAGCAGCCIGAGAGCCGAG	324
CDR2	
158RHA FW3	
T V K G R F T I S R D N A K N S L F L Q M S S L R A E	
GACACGGCCGTGTTATTGTCCAGAGAGGGGGGATATTACTACGGAAGGAGTTACTATATACTATGACTACTGGGGCCAA	405
158RHA FW3	
CDR3	
158RHA F	
D T A V Y Y C A R E G G Y Y Y G R S Y Y T M D Y W G Q	
GGGACCAAGGTCACCGTCTCC	426
158RHA FW4	
G T T V T V S	

表32. 158VKと比較して、ヒトVKの最良のVCIスコア

Kabat番号 ⁶			2	4	35	36	38	44	46	47	48	49	64	66	68	69	71	87	98
カノニカル残基 ⁸			1				2	2			1								
バーニヤ残基 ⁷			*****																
界面残基 ⁹			IIII										II						
配列	Fw スコア	VCI スコア	VCI残基																
158 VK	80	17	VMWYQPLLIYGGGTFYF																
AB064054	71	17	V.....																
AB063934	70	17	V.....																
AB064105	70	17	V.....																
AY941999	70	17	V.....																
AX805665	69	17	V.....																
AB064104	69	17	V.....																
AY942057	69	17	V.....																
AB064055	68	17	V.....																
AX742874	68	17	V.....																
AY685343	67	17	V.....																
AY685353	67	17	V.....																
DQ187506	70	16	I.....																
DQ187679	70	16	I.....																
AY043107	69	16	I.....																
AJ388639	69	16	V.....																
AJ388646	69	16	I.....																
AJ388642	69	16	I.....																
M74470	69	16	I.....																
X72466	69	16	I.....																
U95244	69	16	I.....																
AAA51016	69	16	I.....																
X89054	69	16	I.....																
DQ187505	69	16	I.....																
DQ187683	69	16	I.....																
DQ187691	69	16	I.....																
AX805669	68	16	I.....																
AF455562	68	16	I.....																

注: 本表においてカノニカル残基は、どのCDRに関連するかに従い番号付けされる。FWスコア及びVCIスコアは、それぞれFW又はVCIの定義における残基数であり、これらは158において対応するものと同一である。158VKと同一の残基は点で表示される。

【表 3 3】

表33. 158VKと比較して、最良のVCISコアのヒトVK配列

Kabat番号 6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
カノニカル 8	1	1	1	1	2	2	1	3	3	3
バーニヤ 7	*	*	*	*	***	*	*	*	*	*
界面 9				F F F	F F	F F F	F F F	F F F	F F F	F F
VCi	1 *	1	1	1	1F*F F	F	***	*	F3F	33 * F3F
Kabat CDR	*****									
158 VK	DVLTQTPLSLPVSIGDQASISCRSSQSIVHS-NGNTYLEWYLOKPGQSPKLLIYKVSNRSGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGLIYCFQGSHPV-----PTFGGQTKLEIK									
AB064054	DVMTQSPSLPVTGAPASISCRSSQSILHT-NGVNFLDWYLOKPGQSPKLLIYLASHRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGLIYCMQGLQTP-----FTFGGQTKLEIK									
AB063934	DVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----LTFGGGQTKVEIK									
AB064105 scFv	DVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----YTFGQGTKEIK									
AY941999 scFv	DVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----YTFGQGTKEIK									
AX805665 特許	DVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNTYLQWYLOKPGQSPKLLIYKVSNRUYGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCFQGSHPV-----WTFGQGTKEIK									
AB064104	DVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----HTFGQGTKEIK									
AY942057 scFv	DVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----PTFGRGTKEIK									
AB064055	DVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSSRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----FTFGPQTKVDIK									
AX742874	DVMTQTPSLSVTPGQASISCRSSQSILHS-DCMTYFHWYLOKPGQSPKLLIYKVSNRSGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----WTFGQGTKEIK									
AY685343	DVMTQSPSLAVTPGEPASISCRSSQSVVFT-NGKNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMHVAQAP-----WTFGQGTKEIK									
AY685353	DVMTQSPSLAVTPGEPASISCRSSQSVVFT-NGKNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMHVAQAP-----WTFGQGTKEIK									
DQ187506	DIVMTQTPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----YSFGQGTKEIK									
DQ187679	DIVMTQTPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----HSFGQGTKEIK									
AY043107	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----LTFGGGQTKLEIK									
AJ388639	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----YTFGQGTKEIS									
AJ388646	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----LTFGGGQTKVEIK									
AJ388642	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----PTFGSGGTKEIK									
M74470	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----PTFGSGGTKEIK									
X72466	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHN-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQSP-----YTFGQGTKEIK									
U95244	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILYS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQIP-----LTFGGGQTKVEIK									
AAA51016	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQSP-----LTFGGGQTKVEIK									
X89054	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----YTFGQGTKEIK									
DQ187505	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSILHS-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----LTFGGGQTKLEIK									
DQ187683	DIVMTQTPSLPVTGEPASISCRSSQSILHG-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----RTFGQGTKEIK									
DQ187691	DIVMTQTPSLPVTGEPASISCRSSQSILHG-NGNYLDWYLOKPGQSPKLLIYLGSNRASGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCMQALQTP-----RTFGQGTKEIK									
AX805669	DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSIVHS-NGNTYLQWYLOKPGQSPKLLIYKVSNRUYGVPPDRFSGSGGTDTLTKISRVEAEDGVYVYCFQGSHPV-----WTFGQGTKEIK									

表34. 158VKの、最良のVCISコアのヒトVKとのアライメント

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Kabat番号
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567	DVLTQTPLSLPVSIGDQASISQSSSSSHVHSNGNTVHEWYIQKPGQSPKLLIYVSNRFSGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLIYYCFQGSHPVPRFGGGTKLEIK	158K								
.V...	.S...	.TP.AP...	.EL.T...VNF.D...	.EG...A...	.V...	.R...	.V...	.M...LOT.F...	.P...	AB064054
.V...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.L...	.V...	AB063334
.V...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.Y...	.Q...	AB064105
.V...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.Y...	.Q...	AY941999
.V...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.W...	.Q...	AX805665
.V...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.H...	.Q...	AB064104
.V...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.S...	.R...	AY942057
.V...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.F...	.P...	AB064055
.V...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.W...	.Q...	AX742874
.V...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.W...	.Q...	AY685343
.V...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.W...	.Q...	AY685353
.IV...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.YS...	.Q...	DQ187506
.IV...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.HS...	.Q...	DQ187679
.IV...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.L...	.V...	AY043107
.V...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.Y...	.Q...	AJ388639
.IV...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.L...	.V...	AJ388646
.IV...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.L...	.V...	AJ388642
.IV...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.Y...	.Q...	AAA51016
.IV...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.L...	.V...	X89054
.IV...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.YS...	.Q...	DQ187505
.IV...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.R...	.Q...	DQ187683
.IV...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.M...LOT.R...	.Q...	DQ187691
.IV...	.S...	.TP.AP...	.LL...YN.D...	.EG...A...	.V...	.V...	.V...	.W...	.Q...	AX805669

注: CDR1、2及び3は灰色で網掛けされている。

【表 3 5】

表35. VKシグナルペプチド選択－158VKのヒトAB064054及びヒト生殖細胞系列A19とのアラインメント

DVLMTQTPLSLPVSIGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLOKPGQSPKLLIYKVS	N	158	VK
..V...S.....TP.AP.....LL.T..VNF.D.....LA.H			AB064054
.IV...S.....TP.EP.....LL...YN..D.....Q....LG..			A19
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPPTFGGGTKLEIK		158	VK
.A.....R.....V.....M..LQT.F...P.....N			AB064054
.A.....V.V...M.ALQT.			A19

10

【0 1 3 4】

【表 3 6】

表36. ヒトA19(VK2－28;X63397)生殖細胞系列VKのシグナルペプチド

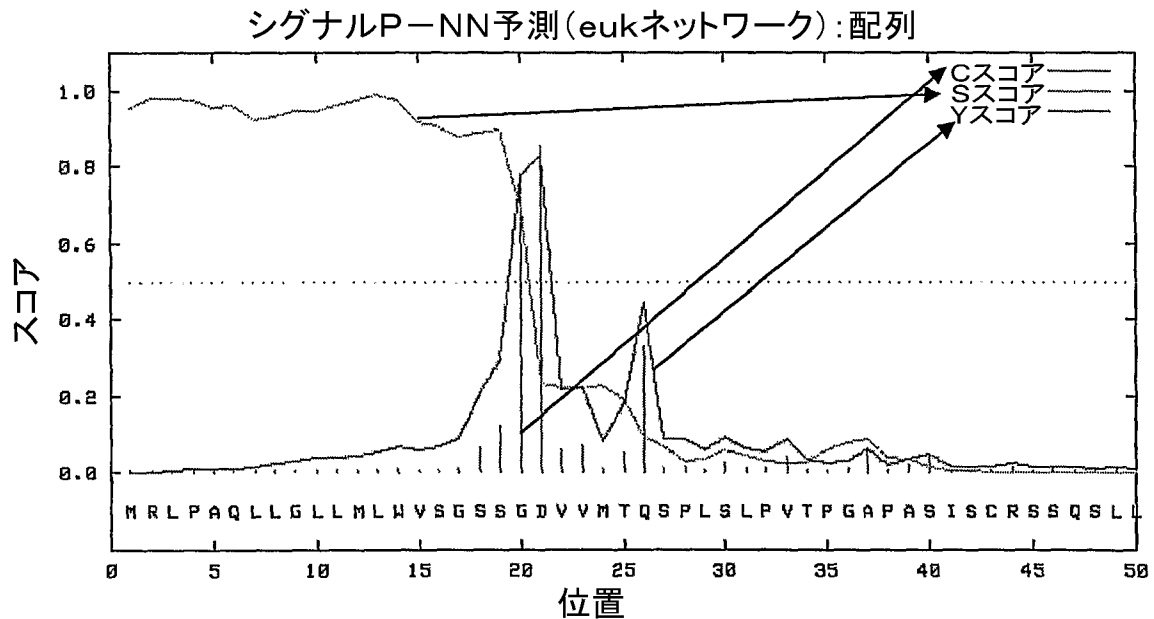
	VK A19 リーダー配列
DNA	ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGG
タンパク質	MRLPAQLLGLLMLWVSGSSG

20

【0 1 3 5】

【表 3 7】

表37. A19シグナルペプチド切断予測



> 配列

長さ = 50

#	計測	位置	値	カットオフ	シグナルペプチド?
	最大 C	21	0.853	0.32	はい
	最大 Y	21	0.831	0.33	はい
	最大 S	13	0.990	0.87	はい
	平均 S	1-20	0.932	0.48	はい
	D	1-20	0.881	0.43	はい

最も可能性の高い切断部位は、第20位と第21位との間、SSG-DVである。

注:シグナルPアルゴリズム¹⁰ は、切断部位スコアC、及びシグナルペプチドスコアSから結合スコアYを生成する。

【0 1 3 6】

注: 158VK(灰色網掛け)CDRはヒトAB064054FWに挿入されて158RKAを生成した。

[illegible]

10

表39. 158RKAss DNA配列の生成 - 158VKのAB064054FWへの挿入

領域	DNA	タンパク質
A191-ター	ATCAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGG	MRLPQQLGLLMLMWSSSG
AB064054 FW1	GATGCTGTGATGACTCACTCTCACTCTCCCTGCCCGCACCCCTGAGCGCGGCTCCATCTCCTGC	DVYMTQSLSLPYTPGAPASIS
AB064054 FW2	TGCTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCAGAGCTCCTGATCTAT	RSQSTVHSHNNNTLE
AB064054 FW3	CGAGTCCCTGCAGAGTTCAGTGGCAGCTGGGTGAGGCACAGATTTACACTGAGATCAGCAGAGTGGAGGC	WYLOKPGQSPKLLIY
AB064054 FW4	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW5	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW6	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW7	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW8	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW9	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW10	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW11	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW12	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW13	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW14	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW15	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW16	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW17	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW18	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW19	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW20	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW21	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW22	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW23	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW24	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW25	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW26	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW27	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW28	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW29	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW30	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW31	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW32	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW33	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW34	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW35	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW36	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW37	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW38	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW39	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW40	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW41	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW42	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW43	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW44	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW45	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW46	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW47	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW48	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW49	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW50	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW51	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW52	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW53	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW54	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW55	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW56	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW57	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW58	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW59	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW60	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW61	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW62	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW63	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW64	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW65	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW66	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW67	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW68	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW69	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW70	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW71	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW72	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW73	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW74	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW75	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW76	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW77	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW78	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW79	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW80	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW81	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW82	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW83	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW84	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW85	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW86	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW87	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW88	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW89	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW90	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW91	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW92	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW93	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW94	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW95	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW96	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW97	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW98	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW99	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS
AB064054 FW100	TTCGGCCCTGGGACCAATTTGAAATCAA	SSNRFS

注: 158RKAssを生成するために158VK(灰色網掛け)CDRが挿入されたAB064054FW及びA19リダー

表40. 158RKAssDNA配列

ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGCTCTGGATCCAGTGGGATGTTGTGATGACTCAGTCT	81
スプライス4. 0	
M R L P A Q L L G L L M L W V S G S S G D V V M T Q S	
CCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGCGCCGCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAGCAITGTACATAGTAATGGA	162
P L S L P V T P G A P A S I S C R S S Q S I V H S N G	
AACACCTATTAGAAATGGTATCTGCAGAAAGCCAGGCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTATAAGTTTCCAACCGATTTTCT	243
スプライス5. 5	
N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S	
GGAGTCCCTGACACAGETTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACAGATTTTACACTGAGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTT	324
スプライス5. 0	
スプライス4. 4	
G V P D R F S G S G S G T D F T L R I S R V E A E D V	
GGAAITTTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCTCCGACGTTCCGGCCCTGGGACCAAAATTGGAAATCAAA	396
G I Y Y C F Q G S H V P P T F G P G T K L E I K	

注: スプライスドナー部位がそれらのスコアと共に、閾値が4. 2 のヒト_ds_2マトリクスを使用して、Lasergene6. 0GeneQuest分析により予測された。

【表 4 1】

表41. 158RKAのスプライス部位を除去する158RKAにおける突然変異

1	ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGAAGCAGTGGG	158RKA
1	TC.....	158RKAss
61	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGCGCCGGCCTCC	158RKA
61		158RKAss
121	ATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAGTGG	158RKA
121	A...	158RKAss
181	TATCTTCAAAAGCCAGGGCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTATAAAGTTTCCAACCGATTT	158RKA
181	G..G.....	158RKAss
241	TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAGAATC	158RKA
241	C.....G.....	158RKAss
301	AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCCT	158RKA
301		158RKAss
361	CCGACGTTTCGGCCCTGGGACCAAATTGAAATCAAA	158RKA
361		158RKAss

10

20

注: 158RKA DNA配列を、予測されたスプライス部位を含む158RKAss
(表5. 13. 2)と比較した。158RKAと同一の残基は点で表示される。

【0 1 4 0】

【表 4 2】

表42. 158RKAのDNA及びタンパク質配列

ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAAATGCTCTGGTCTCTGGAAGCAGTGGGATGTTGTGATGACTCAGTCT	81
A19リーダー配列	
M R L P A Q L L G L L M L W V S G S G D V V M T Q S	
158RKA FW1	
CCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGCGCCGCCCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA	162
158RKA FW1	
P L S L P V T P G A P A S I S C R S S Q S I V H S N G	
AACACCTATTAGAGTGGTATCTTCAAAGCCAGGGCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTATAAGTTTCCAAACCGATTCTTCT	243
158RKA FW2	
N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S	
158RKA FW3	
GGAGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGAGTGGAATCAGGCACAGATTITACACTGAGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTT	324
158RKA FW3	
G V P D R F S G S G S G T D F T L R I S R V E A E D V	
GGAATTTATTACIGCTTTCAAGGTTTCACATGTTCTCCGACGTTTCGGCCCTGGGACCAAAATTGGAAATCAAA	396
158RKA FW4	
G I Y Y C F Q G S H V P P T F G P G T K L E I K	

【表 4 3】

表43. ヒトヒ158VHAの別のバージョン(158RHB、158RHC、158RHD)

[illegible]

表44. ヒト化158VKAの別のバージョン(158RKB、158RKC)

Kabat 番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
158RKA	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567									
158RKB	DVVMTQSPLSLPVTPGAPASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGIYYCFQGS									
158RKC	DVVMTQSPLSLPVTPGAPASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGIYYCFQGS									

【 0 1 4 3 】

【 図 1 】

【 図 2 】

【 図 3 】

【 図 4 】

【 図 5 】

【 図 6 】

【 図 7 】

【 図 8 】

【 図 9 】

【 図 1 0 】

【 図 1 1 】

【 図 1 2 】

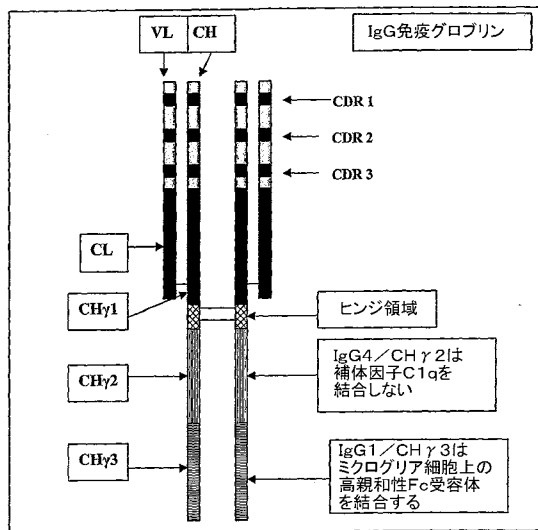
【 図 1 3 】

【 図 1 4 】

10

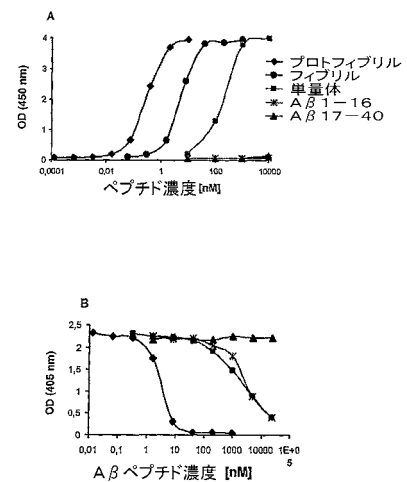
【 図 1 】

Figure 1

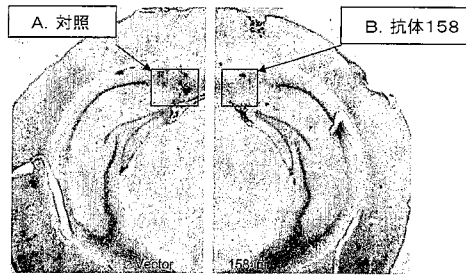


【 図 2 】

図2:高親和性プロトフィブリル選択的モノクローナル抗体の特性決定



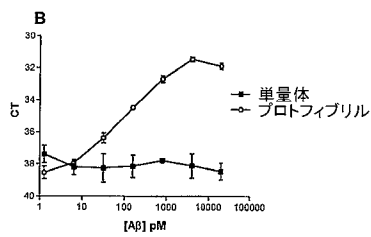
【図 3】

図3. トランスジェニックマウスモデル (APP^{Swe})における高親和性プロトフィブリル選択的抗体の治療効果

【図 4】

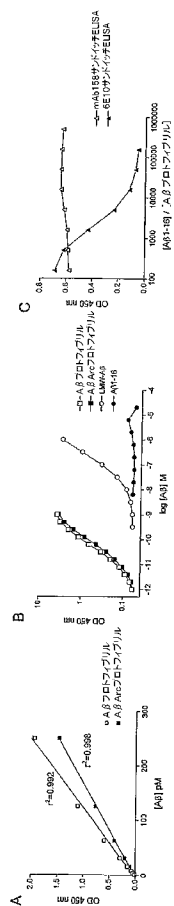
Figure 4

ヒトAβプロトフィブリルが近接接合技術によりpMレベルで計測される。



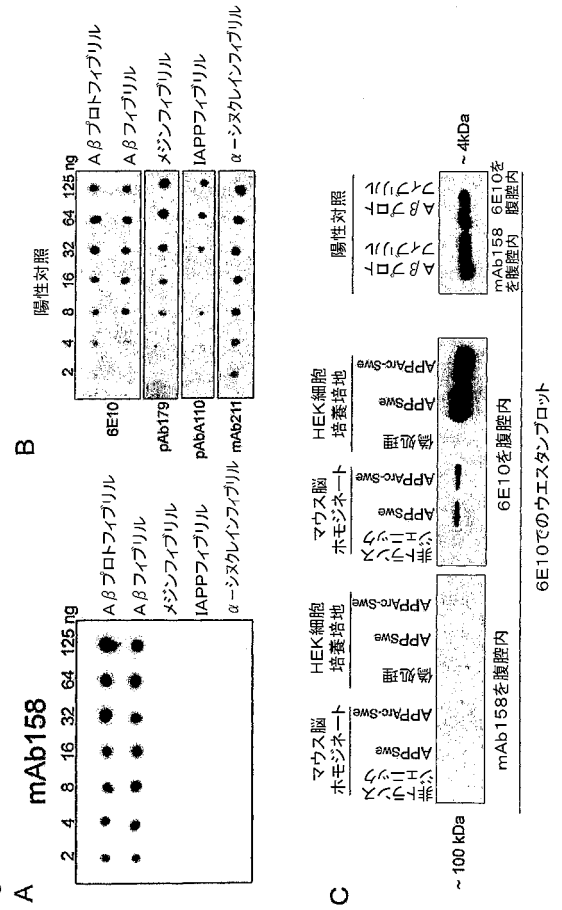
【図 6】

Figure 6



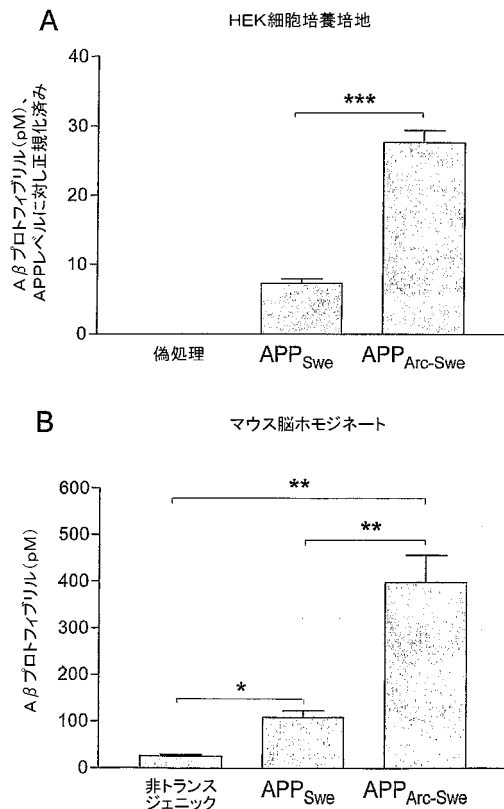
【図 5】

Figure 5



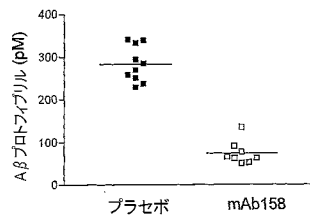
【図 7】

Figure 7



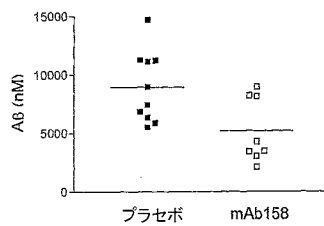
【图 8】

図8. mAb158又はプラセボのいずれかによる処置後4ヶ月の APP^{swearct}トランスジェニックマウス脳TBS抽出物中の A β プロトフィブリルレベル



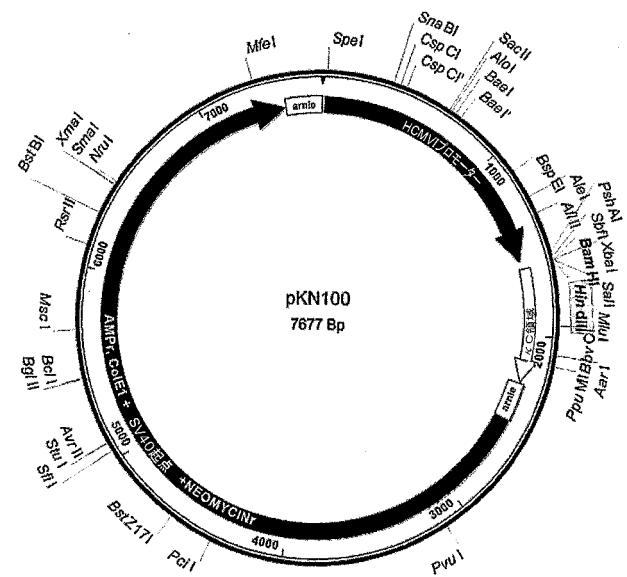
【图 9】

図9.
4ヶ月後のAPP^{swearc}トランスジェニックマウス脳ギ酸抽出物中の総A β レベル



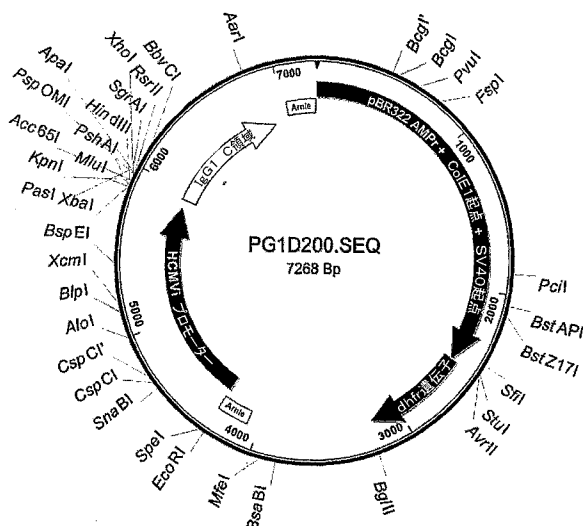
【 図 1 0 】

図10. pKN100ベクター



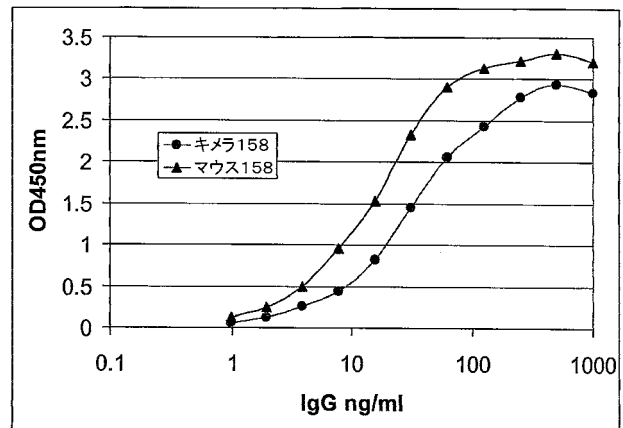
【図 1 1】

図11. pG1D200ベクター



【 図 1 2 】

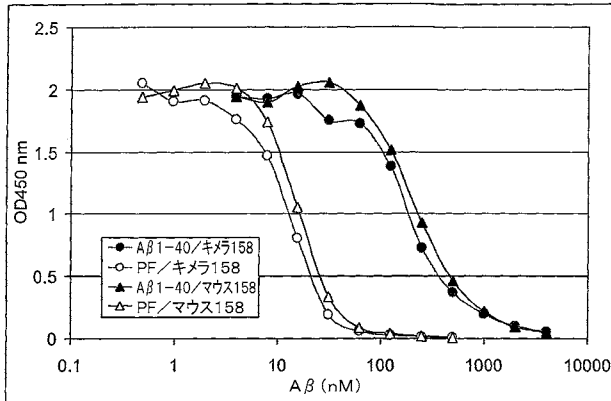
図12. キメラ及びマウス158抗体によるA β 単量体の結合



注: A β 1-40 (217 ng/ウェル) で被膜され、且つ mAb の連続希釈を使用した直接 ELISA。最高濃度 (1 μ g/ml) での FCS 量は 2.7% である。抗マウス k 又は抗ヒト k 軽鎖接合体での検出。

【図 1 3】

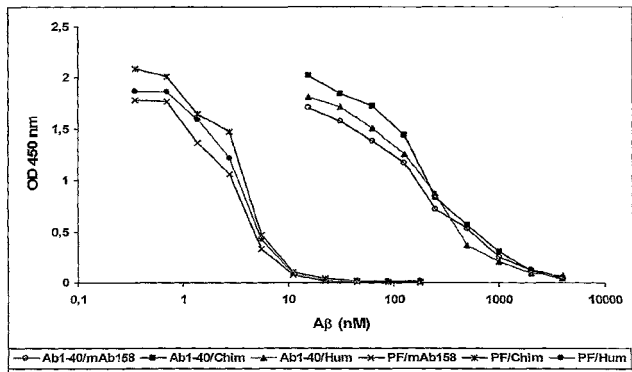
図13. 単量体又はプロトフィブリルA β のキメラ158又はマウス158抗体に対する結合についての競合法



注: 単量体A β 1-40(●▲)又はプロトフィブリル(PF)(○△)がキメラ158(○●)又はマウス158(△▲)を伴う溶液中でインキュベートされた。FCSの最終濃度は0.3%であった。1時間のインキュベーション後、混合物がA β 単量体で被覆されたプレートに添加された。抗体のプレートに対する結合が抗マウス κ 又は抗ヒト κ 軽鎖抗体により検出された。

【図 1 4】

図14. 単量体又はプロトフィブリルA β のキメラ158、マウス158抗体及びヒト化158抗体(BAN2401)に対する結合についての競合法



注: 単量体A β 1-40、又はプロトフィブリル(PF)が、キメラ158抗体(chim)、マウス158抗体(mAb158)又はヒト化158抗体BAN2401(Hum)を含む溶液中でインキュベートされた。FCSの最終濃度は0.3%であった。1時間のインキュベーション後、混合物がA β 単量体で被覆されたプレートに添加された。抗体のプレートに対する結合が、抗マウス κ 又は抗ヒト κ 軽鎖抗体により検出された。

【手続補正書】

【提出日】平成21年4月23日(2009.4.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

野生型ヒトA β プロトフィブリルに対し、選択的および高親和性を有する抗体又はその断片であって、前記抗体又は断片がその6つのCDR領域において以下の共通配列、

```
VH-CDR1  SFGMH
VH-CDR2  YISSGSSTIYYGDTVKG
VH-CDR3  EGGYYYGRSYTMDY
VL-CDR1  RSSQSIVHSNGNTYLE
VL-CDR2  KVS NRFS
VL-CDR3  FQGSHVPPPT
```

を有し、前記抗体又は断片が前記CDR領域内でアミノ酸欠失、置換及び挿入を示し得る、抗体。

【請求項2】

前記CDR領域内に1～10個のアミノ酸欠失、置換及び挿入を示す、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

前記CDR領域内に1～5個のアミノ酸欠失、置換及び挿入を示す、請求項1に記載の抗体。

【請求項 4】

前記 C D R 領域内に 1 ～ 3 個のアミノ酸欠失を示す、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

ヒト A β プロトフィブリルに特異的であることを特徴とするヒト化モノクローナル抗体であって、表 3 1 のヌクレオチド配列 5 8 - 4 2 6 でコードされるポリペプチド、及び表 4 2 のヌクレオチド配列 6 1 - 3 9 6 でコードされるポリペプチドを含む、抗体。

【請求項 7】

前記抗体が低減された補体活性化活性を有する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

前記低減された補体活性化活性を、前記アミノ酸のプロリンを第 3 3 1 位でセリン又は他の極性アミノ酸に換えることにより獲得する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

前記低減された補体活性化活性を、グリコシル化を阻害するか、又は低下させるか、又は変化させることにより獲得する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 1 0】

前記抗体が I g G クラスである、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 1】

前記抗体が I g G 1 又は I g G 4 サブクラスである、請求項 1 0 に記載の抗体。

【請求項 1 2】

I g G 1 又は I g G 4 サブクラスのキメラである抗体であって、重鎖定常領域 C H 2 又は C H 2 の一部が I g G 4 に由来し、および領域 C H 1 及び C H 3 が I g G 1 に由来することにより補体活性化が低減される、請求項 1 1 に記載の抗体。

【請求項 1 3】

表 3 1 の完全重鎖配列及び表 4 2 の完全軽鎖配列を含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 4】

表 4 3 の重鎖 (V H) に、A 6 0 G、D 1 E、P 7 4 A 及び T 8 2 S から選択される突然変異を含むか、及び／又は表 4 4 の軽鎖 (V K) に、L 3 V 及び G 1 0 0 P から選択される突然変異を含むか、又はこれらの V H 及び V K 突然変異の組み合わせを含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 5】

前記重鎖配列の C D R 1 の左側 8 番目のアミノ酸が S であることを除き、表 3 1 の完全重鎖配列及び表 4 2 の完全軽鎖配列を含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 6】

ヒト又はヒト化又は変異型であることによりヒトにおける抗原性が低減される、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 7】

マウス抗体である、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 8】

A β 単量体とプロトフィブリルとの間の特異性の比が少なくとも 1 : 2 0 0 である、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 9】

6 つの C D R 領域に以下の共通配列：

V H - C D R 1 A A S G F T F S S F G M H W V R
V H - C D R 2 W V A Y I S S G S S T I Y Y G D T V K G R F T
V H - C D R 3 C A R E G G Y Y Y G R S Y Y T M D Y W G Q

V L - C D R 1 I S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W Y L
V L - C D R 2 L I Y K V S N R F S G V P
V L - C D R 3 Y Y C F Q G S H V P P T F G G

を有する抗体であって、前記抗体又は断片が前記 C D R 領域内にアミノ酸欠失、置換及び挿入を示し得る、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

前記抗体がマウス抗体である、請求項 1 9 に記載の抗体。

【請求項 2 1】

前記抗体が、表 1 1 の完全軽鎖配列 1 5 8 V K 及び表 1 5 の完全重鎖配列 1 5 8 V H を含む、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の抗体。

【請求項 2 2】

ヒト及び動物への使用のための、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の抗体及び薬学的に許容可能な緩衝液を含む、組成物。

【請求項 2 3】

抗菌剤をさらに含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記組成物が凍結乾燥されている、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記組成物が賦形剤と共に凍結乾燥されることにより、凍結乾燥中及びその後の前記抗体の安定性が向上する、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記賦形剤がマンニトール又はトレハロースである、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

A β プロトフィブリルを試験管内で検出する方法であって、
請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の抗体を、A β プロトフィブリルを含む、又は含むことが疑われる生体試料に付加する工程と、
前記 A β プロトフィブリルと前記抗体との間に形成される複合体の濃度を計測する工程と、
を含む、方法。

【請求項 2 8】

前記検出方法が免疫測定法である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記検出方法が近接連結測定法である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

A β プロトフィブリルを生体内で検出する方法であって、
請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の抗体を、A β プロトフィブリルを含む、又は含むことが疑われる哺乳動物に付加する工程と、
前記 A β プロトフィブリルと前記抗体との間に形成される複合体の濃度を計測する工程と、
を含む、方法。

【請求項 3 1】

アルツハイマー病の処置用薬剤を調製するための、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項 2 2 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 3 2】

ダウン症候群、レビー小体認知症、血管性認知症及び他の神経変性障害の処置用薬剤を調製するための、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項 2 2 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2007/000292

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: see extra sheet

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)

IPC: C07K, A61K, A61P, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS DATA,
SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	US 20060079447 A1 (WETZEL, RONALD B.), 13 April 2006 (13.04.2006), column 5, paragraph (0066); column 6, paragraphs (0074) - (0077); column 13, paragraph (0128), abstract ---	1-35
P,X	WO 2006066233 A1 (NEURALAB LIMITED), 22 June 2006 (22.06.2006), page 15, line 29 - page 16, line 9 --	1-35
A	WO 2005123775 A1 (BIOARCTIC NEUROSCIENCE AB), 29 December 2005 (29.12.2005) --	1-35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 2007

Date of mailing of the international search report

20 -07- 2007

Name and mailing address of the ISA/
Swedish Patent Office
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Yvonne Siösteen/EÖ
Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2007/000292

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LANNFELT L., "Genetics, patophysiology and a beta protofibril formation in Alzheimer's disease", Neurobiology of aging, 2004, Vol. 25, Supplement 2, page S308 --	1-35
A	KAYED, RAKEZ et al, "Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis", Science, 18 april 2003, page 486 - page 489 --	1-35
A	CHROMY, BRETT A. et al, "Self-Assembly of A Beta 1-42 into Globular Neurotoxins", Biochemistry, 2003, Vol. 42, page 12749 - page 12760 -- -----	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2007/000292
--

International patent classification (IPC)

C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

Download your patent documents at www.prv.se

The cited patent documents can be downloaded at www.prv.se by following the links:

- In English/Searches and advisory services/Cited documents (service in English) or
- e-tjänster/anförda dokument (service in Swedish).

Use the application number as username.

The password is **XAC0ZTYUVF**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2007/000292

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.: 26-27, 31-33
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 26-27 and 31-33 relate to a method of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy, as well as
.../...
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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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/SE2007/000292

Box II.1

Diagnostic methods /Rule 39.1(iv). Nevertheless, a search has been executed for this these claims. The search has been based on the alleged effects of the compound.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

30/06/2007

International application No.
PCT/SE2007/000292

US	20060079447	A1	13/04/2006	US	D534464	S	02/01/2007
				US	7154070	B	26/12/2006
				US	20060076342	A	13/04/2006
WO	2006066233	A1	22/06/2006	US	20060240486	A	26/10/2006
WO	2005123775	A1	29/12/2005	AU	2005254928	A	29/12/2005
				CA	2570130	A	29/12/2005
				EP	1781703	A	09/05/2007
				SE	0401601	D	00/00/0000

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 D
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08

(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,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,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

(72)発明者 ランフェルト、 ラルス
スウェーデン国 エスー 1 1 6 4 3 ストックホルム ビンターツルストーゲット 2 8
(72)発明者 セーリン、 ダグ
スウェーデン国 エスー 7 5 3 2 6 ウプサラ サラガータン 4 3 エイ
(72)発明者 エークホルム ペテルション、 フリーダ
スウェーデン国 エスー 7 5 2 6 0 ウプサラ アルバーツバーゲン 1 0
(72)発明者 イングランド、 ヒレビ
スウェーデン国 エスー 7 5 3 3 0 ウプサラ ホーガナスガータン 1 1 ビー

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 DA03 DA04 DA13
4C076 AA29 BB11 CC01 DD38A FF04 GG06
4C084 AA19 MA02 MA44 MA66 NA14 ZA012 ZA162 ZB352
4C085 AA14 BB11 DD23
4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 CA40 DA76 EA21 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	改进的原纤维选择性抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2009530374A	公开(公告)日	2009-08-27
申请号	JP2009501383	申请日	2007-03-23
[标]申请(专利权)人(译)	生命北极神经科学公司		
申请(专利权)人(译)	北极生物神经安倍晋三		
[标]发明人	ゲラーフォースパール ランフェルトラルス セーリンダグ エークホルムベテルションフリーダ イングランドヒレビ		
发明人	ゲラーフォース、パール ランフェルト、ラルス セーリン、ダグ エークホルム ベテルション、フリーダ イングランド、ヒレビ		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/46 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/10 A61P25/28 A61P25/00 A61P31/04 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/28 C07K16/18 C07K16/465 C07K2317/24 C07K2317/565 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2814 G01N2800/387		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C07K16/46 A61K39/395.N A61K45/00 A61K47/10 A61P25/28 A61P25/00 A61P31/04 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA03 4B064/DA04 4B064/DA13 4C076/AA29 4C076/BB11 4C076/CC01 4C076/DD38A 4C076/FF04 4C076/GG06 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/MA44 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA162 4C084/ZB352 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD23 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	三好秀 伊藤雅一 原 裕子		
优先权	0600662 2006-03-23 SE 0602591 2006-11-30 SE		
其他公开文献	JP5033868B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及神经变性疾病，特别是阿尔茨海默病和其他类似疾病的预防，治疗和诊断。更具体地说，对于原纤维构象中的淀粉样蛋白β蛋白（A2）和IgG类和IgG1或IgG4亚类或其组合或其突变具有选择性的高亲和力抗体，保留高Fc受体结合和低C1（C1q）结合，有效清除A^β原纤维，减少炎症风险。

器具

器具	英国供給業者	カタログ番号
DNAサーマルサイクラー：GeneAmp 9600	バーキン・エルマー社	N801-0177
殺菌灯を装備したクラスII微生物学的安全キャビネットを有する指定組織培養実験室	ウォーカー・セーフティ・キャビネット社	非該当
Innova（登録商標）卓上インキュベーターシェーカー	ニュー・ブランズウィック・サイエンティフィック社	4000
卓上遠心機	フィッシャー・サイエンティフィック社	CEK-126-010N
CO2ガス37°インキュベーター	ロスラボPLC（Rosslab plc）社	H50-501TVBB
微生物インキュベーター	ケンドロ／ヘラウス（Kendro／Heraeus）社	B6060
エレクトロポレーター モデル：GenePulser II	バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社	341BR-3092
ELISAリーダー：Microplate Reader 3550	バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社	3550
Microplate Manager（登録商標）2.2マッキントッシュコンピュータ用データ解析ソフトウェアパッケージ	バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社	非該当
96ウェルGeneAmp PCRシステム9700	ABI	N8050200
ABI PRISM310遺伝子解析機	アプライド・バイオシステムズ社	310-00-100/120
T100表面プラズモン共鳴検出器	ピアコア社	