

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5033868号  
(P5033868)

(45) 発行日 平成24年9月26日 (2012.9.26)

(24) 登録日 平成24年7月6日 (2012.7.6)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/18 Z N A
<b>C12N 15/02 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 C
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N
<b>A61P 25/28 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/28

請求項の数 21 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-501383 (P2009-501383)	(73) 特許権者	505164081
(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 ニューロサイエンス アーバー
(65) 公表番号	特表2009-530374 (P2009-530374A)		スウェーデン国 エス-18163 リディング, ラグマンズヴァゲン 13
(43) 公表日	平成21年8月27日 (2009.8.27)	(74) 代理人	100083806
(86) 国際出願番号	PCT/SE2007/000292		弁理士 三好 秀和
(87) 国際公開番号	W02007/108756	(74) 代理人	100095500
(87) 国際公開日	平成19年9月27日 (2007.9.27)		弁理士 伊藤 正和
審査請求日	平成21年4月23日 (2009.4.23)	(74) 代理人	100111235
(31) 優先権主張番号	0600662-1		弁理士 原 裕子
(32) 優先日	平成18年3月23日 (2006.3.23)	(72) 発明者	ゲラーフォース、 パール
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		スウェーデン国 エス-18163 リディング ラグマンズバーゲン 13
(31) 優先権主張番号	0602591-0		
(32) 優先日	平成18年11月30日 (2006.11.30)		
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		

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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト A プロトフィブリルに結合する抗体であって、前記抗体は重鎖及び軽鎖を含み、該重鎖は配列番号 1 5 8 のアミノ酸配列を含み、該軽鎖は配列番号 2 4 4 のアミノ酸配列を含む、抗体。

【請求項 2】

該抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

該モノクローナル抗体がヒト化抗体である、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

該ヒト化抗体がヒト定常領域を含む、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

該ヒト定常領域が I g G クラスである、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

該ヒト定常領域が I g G 1 又は I g G 4 サブクラスである、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 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、医薬組成物。

【請求項 8】

アルツハイマー病、ダウン症候群、レビー小体認知症、又は血管性認知症の処置用であ

る、請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 9】

アルツハイマー病の処置用である、請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 10】

以下のアミノ酸配列 ( a ) ~ ( f ) を含む、ヒト A プロトフィブリルに結合する抗体又はその断片：

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する V H - C D R 1

( b ) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する V H - C D R 2

( c ) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する V H - C D R 3

( d ) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する V L - C D R 1

( e ) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する V L - C D R 2

( f ) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する V L - C D R 3。

10

【請求項 11】

該抗体又はその断片がモノクローナル抗体又はその断片である、請求項 10 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 12】

該モノクローナル抗体又はその断片がヒト化抗体又はその断片である、請求項 11 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 13】

該ヒト化抗体又はその断片がヒト定常領域を含む、請求項 12 に記載の抗体又はその断片。

20

【請求項 14】

該ヒト定常領域が I g G クラスである、請求項 13 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 15】

該ヒト定常領域が I g G 1 又は I g G 4 サブクラスである、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 16】

請求項 10 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片、及び薬学的に許容可能な緩衝液を含む、医薬組成物。

【請求項 17】

アルツハイマー病、ダウン症候群、レビー小体認知症、又は血管性認知症の処置用である、請求項 16 記載の医薬組成物。

30

【請求項 18】

アルツハイマー病の処置用である、請求項 16 記載の医薬組成物。

【請求項 19】

A 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 ~ 6 及び 10 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体を、A 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 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。

40

【請求項 20】

前記検出方法が免疫測定法である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記検出方法が近接連結測定法である、請求項 19 に記載の方法。

【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タンパク質 ( A ) に対し選択性を有し、且つ I g G クラス及び I g G 1 若しくは I g G 4 サブク

50

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。

【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、65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タンパク質(A $\beta$ )からなる。この細胞外沈着物内のA $\beta$ は原線維状であることを特徴とし、ひだ状シート構造を伴う。この沈着物のA $\beta$ 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 $\beta$ 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のよじれた鎖で構成されるペアード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 $\beta$ ペプチドの2つの型、A $\beta$ 40及びA $\beta$ 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 $\beta$ 40が顕著な型である。酵素活性によりA $\beta$ 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。-及び-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 $\beta$ 生成が可能となる一方、-セクレターゼと呼ばれる第3の酵素がA $\beta$ 配列を内側で切断することによりA $\beta$ 生成を妨げる(セルコエ(Seelkoe)、1994年;エステル(Ester)、2001年;米国特許第5604102号明細書)。A $\beta$ 42は42アミノ酸長のペプチドであり、すなわちA $\beta$ 40と比較してC末端で2つのアミノ酸分だけ長い。A $\beta$ 42は疎水性がより高く、且つA $\beta$ 二量体、A $\beta$ 三量体、A $\beta$ 四量体、A $\beta$ オリゴマー、A $\beta$ プロトフィブリル又はA $\beta$ フィブリルなどのより大型の構造のA $\beta$ ペプチドへとより容易に凝集する(ジャレット(Jarrett)、1993年)。A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ ペプチド、特にA $\beta$ 42は、寿命の間に種々のより高度な分子構造のA $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 又はその集合体により引き起こされている。

【0004】

A $\beta$ 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 $\beta$ 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、

10

20

30

40

50

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<sub>1-42</sub>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プロトフィブリルなどの可溶性オリゴマーA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）、2002年）。さらに、オリゴマーの北極型（Arctic）Aペプチドが脳におけるLTPに対し野生型Aより一層深刻な阻害作用を呈し、これはそれらのA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<sub>1-40</sub>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（Nilsberth）ら、2001年）。この突然変異はA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ペプチドの変異体、例えば北極型A<sub>40</sub>及び北極型A<sub>42</sub>を生成することになる。北極型A<sub>40</sub>及び北極型A<sub>42</sub>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<sub>38-43</sub>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種がいくつか知られている。重要なことには、A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（ムラン（Mullan）ら、1992年）であり、これはAレベルの上昇を引き起こす。A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

10

20

30

40

50

A 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 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 2002/0162129 A 1 号明細書；ニルスバース（Nilsberth）ら、2001 年）。北極型 A P P 突然変異の同定及び A プロトフィブリルについての毒性作用の解明では、A D 発病における A 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、アルツハイマー病において所見されるフィブリル型の A であった。フィブリル化した A をワクチン（AN-1792）として使用した活性 A ワクチン接種の最近の第 I / II 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 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（Feifer）ら、2002 年；ラッケ（Racke）ら、2005 年）。そのうえ、参加患者のうち A 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 免疫化は A D 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。

#### 【0009】

ヒト A 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 2002/0162129 A 1 号明細書）。純度が高く、且つ安定なヒト A 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 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 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 プロトフィブリル及び A - Arc プロトフィブリルの双方と結合する（PCT/SE 2005/000993 号明細書）。

#### 【0010】

A フィブリル（オヌアライン（O'Nuallain）、2002 年）、ミセル A（カイエド（Kayed）、2003 年）、ADDL（ランベルト（Lambert）、2001 年）などの他の A 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 プロトフィブリル選択性ではない。

#### 【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 I g G 及びサブクラス I g G 1 又は I g G 4 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 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。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

本発明は、オリゴマー A 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 プロトフィブリルを選択的に結合する抗体由来の V L 鎖及び V H 鎖上の C D R 1 - 3 領域の共通アミノ酸配列を開示し、F c 領域の修飾と組み合わせることで補体因子 C 1 q 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 F c 受容体及び補体因子 C 1 q を結合する機能を有する。この C 1 q 結合機能が不活化されることで炎症反応が回避された。

#### 【発明の効果】

10

20

30

40

50

## 【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 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 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 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 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 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 又は 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<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>及びCH<sub>3</sub>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 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 抗体の非凝集特性及び末梢におけるA 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 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 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 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 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 プロトフィブリルのクリアラン

10

20

30

40

50

スは有意義な臨床的価値を有する。異なるA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プロトフィブリルの除去を介して、Aプロトフィブリルのクリアランスに加え、Aフィブリルを含む他のAオリゴマー型が間接的に低減されるであろう。A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疾患トランス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プロトフィブリルのクリアランスは他のA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IgG1の高親和性ヒトA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FcRI受容体に対し高親和性を有する。高親和性抗体はA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型を標的とするIgG1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CNS及び末梢の双方においてA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プロトフィブリルなどの毒性の可溶性A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APPSwearc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型が記載されている(ロード・A(Lord A.)ら、2006年)。

#### 【0020】

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

#### 【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フィブリルに対し選択的なAワクチン(AN-1792)を使用したエラン(Elan)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CAA(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。

#### 【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フィブリル結合性を有し(実施例2を参照)、CAA中に存在するA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プロトフィブリル選択的IgG抗体が改変されることによりIgG1のCH2ドメインと結合する補体因子C1q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

10

20

30

40

50

れ得る。一つの方法は、I g G 1 定常領域の C H 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 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 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 1、C H 2 : I g G 4、C H 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 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る。

10

## 【 0 0 2 5 】

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 C 1 q 結合性及び補体活性化が低減されることとなる。ヒト I g G 1 では A s n - 2 9 7 における二分岐の複合型オリゴ糖の異なる構造が 3 0 種類記載されている。C H 2 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 C 1 q 結合の減退を低減すると考えられている。

## 【 0 0 2 6 】

任意の他のアミノ酸に対する A s n - 2 9 7 の部位特異的突然変異誘発による高親和性ヒト A プロトフィブリル選択的抗体の修飾は、C 1 q 結合性の低い F c 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 A s n - 2 9 7 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、M a n <sub>5</sub> G l c N A c <sub>2</sub> の構造が形成される。この炭水化物修飾は、補体因子 C 1 q 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 ( W r i g h t ) ら、1 9 9 8 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 F c 受容体機能も変化しているであろう ( レザーバロウ ( L e a t h e r b a r r o w ) ら、1 9 8 5 年 ) 。補体活性化が低く、且つ F c 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、A プロトフィブリルの高 F c 介在性クリアランス及び低 C 1 q 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。

20

30

## 【 0 0 2 7 】

本発明のさらに別の態様は、A D を処置又は予防するための、補体因子 C 1 q の結合を低減又は阻害するような方法で補体因子 C 1 q 結合部位が修飾されている、すなわち P r o 3 3 1 > S e r 3 3 1 ( スー ( X u ) ら、1 9 9 4 年 ) の、I g G 1 サブクラスの高親和性ヒト A プロトフィブリル選択的抗体である。ヒト I g G 1 の第 3 3 1 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 D N A 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。

40

## 【 0 0 2 8 】

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 A プロトフィブリル選択的 I g G 抗体の使用である。C S F 又は血液中のヒト A 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、C S F 又は血液中の A 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、C S F 又は血液中の A 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 A プロトフィブリル選択的抗体をサンドイッチ E L I S

50

A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A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A型、例えばAフィブリル、A単量体及びA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A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Aプロトフィブリルを、抗A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、ELISA、RIA、ウエ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。

10

#### 【0030】

CSF及び血液中のA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プロトフィブリルを計測可能とするために、ELISA法に基づく診断検査において高親和性A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(Gullberg)、2004年)若しくは類似の増幅系又はピアコア(Biacore)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RT-PCR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DNA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。

20

#### 【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プロトフィブリル特異抗体に使用することで、A単量体は検出せずに、低濃度の大型Aペプチド構造、すなわちA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PCR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DNA配列が、生成される(図4Aを参照)。

30

#### 【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。

40

#### 【0033】

本発明はさらに、ヒト及び動物組織中のA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、 $I^{131}$ 、 $C^{14}$ 、 $H^3$ 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。

50

## 【 0 0 3 5 】

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。

## 【 0 0 3 6 】

さらに別の態様は、例えば、限定はされないがPBS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。

## 【 0 0 3 7 】

抗体製品は、抗菌剤を含み得る。

## 【 0 0 3 8 】

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】

## 【 0 0 3 9 】

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。

## 【 0 0 4 0 】

## 実施例 1

ヒト野生型 A 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 ( V H ) 及び軽鎖可変領域 ( V L ) 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 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。

## 【 0 0 4 1 】

高親和性プロトフィブリル特異抗体 B A 9 / 1 5 8 についての V L 鎖及び V H 鎖の C D R 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 ( B A 2、B A 3、B A 4 及び B A 7 ) の配列決定データが C D R 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。V H 鎖及び V L 鎖の C D R 1 - 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 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 V H 鎖及び V L 鎖の双方に観察され、ヒト A 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。

## 【 0 0 4 2 】

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 C D R 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、V H 鎖及び V L 鎖の「マウスフレームワーク」領域、すなわち C D R 領域外、並びにヒト V L 及び V H フレームワーク領域のアミノ酸配列を主張する。

## 【 0 0 4 3 】

高親和性プロトフィブリル特異抗体 B A 9 / 1 5 8 に由来する V L 鎖及び V H 鎖の V L 及び V H 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。

## 【 0 0 4 4 】

表 1、2 及び 3 に示されるもの以外の C D R 領域における他のアミノ酸置換は、ヒト野生型 A 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 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

10

20

30

40

50

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<sub>β</sub> 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<sub>β</sub> 単量体との交差反応が200～1000倍低く、且つA<sub>β</sub> 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<sub>β</sub> 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<sub>β</sub> ペプチドのN末端部分及びA<sub>β</sub> 単量体に対しては非常に弱い親和性しか有しない。A<sub>β</sub> 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<sub>β</sub> 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<sub>β</sub> 型がウェルに添加された。結合したA<sub>β</sub> 型の計測が、ビオチン化mAb158及びHRP標識ストレプトアビジンを添加することにより行われた。製造者により推奨される手順に従い発色が計測された。

【0048】

図2Bには、競合ELISAが示される。ELISAプレートにヒトA<sub>β</sub> プロトフィブリルで被膜した。続いて抗体158が異なるA<sub>β</sub> 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抗体が標準的手順を使用して第2の抗体により計測された。

【0049】

実施例3

高親和性A<sub>β</sub> 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、抗体は脳実質のブ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<sub>β</sub> 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(Bacskaï)ら、2001年；ブレンザ(Brendza)ら、2005年)。高親和性A<sub>β</sub> 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ブラーク低減をもたらす(図3)。

【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1μg/μl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<sub>β</sub> 負荷のクリアランスが目目される。

【0051】

実施例4．A<sub>β</sub> 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

ヒト野生型A<sub>β</sub> 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<sub>β</sub> 単

10

20

30

40

50

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 $\beta$ 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 $\beta$ 単量体及びA $\beta$ 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。

10

#### 【0053】

実施例5. mA b 158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 $\beta$ 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 $\beta$ 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mA b 158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プ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、ドットプロットアッセイは、様々なA $\beta$ 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(protofibril)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 $\alpha$ -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。mA b 158は、A $\beta$ 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)。mA b 158のA $\beta$ フィブリルに対する結合性は、A $\beta$ プロトフィブリルエピトープの一部がA $\beta$ 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 $\beta$ )、pA b 179(メジン)、pA b A 110(IAPP)及びmA b 211( $\alpha$ -シヌクレイン)が使用された(図5B)。代表的プロットは反復実験(n=3)から示した。

20

30

#### 【0054】

mA b 158はA $\beta$ PPを結合しない

A $\beta$ PP及び可溶性A $\beta$ PP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 $\beta$ のレベルを上回り、従ってA $\beta$ -抗体のA $\beta$ PPに対する交差反応性はA $\beta$ PPと結合することにより処置を阻害し、結果としてA $\beta$ プロトフィブリル及び/又はA $\beta$ 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 $\beta$ のサンドイッチELISAアッセイによる生体試料中のA $\beta$ プロトフィブリルの計測を妨げ得る。mA b 158が未変性A $\beta$ PP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、A $\beta$ PP<sub>sw e</sub>及びA $\beta$ PP<sub>Arc-swe</sub>)及びマウス脳ホモジネート(非トランスジェニック、A $\beta$ PP<sub>sw e</sub>及びA $\beta$ PP<sub>Arc-swe</sub>)をmA b 158又は6E10で免疫沈降させた後、検出抗体として6E10を伴う変性ウエスタンプロットを行った(図5C)。図5Cに見られるとおり、mA b 158は細胞培養培地由来のA $\beta$ PP又はマウス脳ホモジネート由来の完全長A $\beta$ PP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 $\beta$ 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)。代表的なプロットは反復実験(n=3)から示した。

40

#### 【0055】

実施例6. A $\beta$ 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 $\beta$ プロトフィブリルの計測を可能にするため、mA b 158を捕捉抗体

50

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1 pMの検出限界及び最高250 pMの線形範囲でA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1 pMは1個のA単量体の分子量(4514 g/mol)に基づくが、プロトフィブリルの分子量は少なくとも100 kDaと推定されていることから、モルで計算されるAプロトフィブリルの検出限界は50 fMという低さであり得る。AArc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プロトフィブリルより少なく、これはおそらくA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(低分子量A)を滴定した。用語「低分子量A」は、分子量が約4~12 kDaのAの単量体、二量体及び三量体を意味する。Aプロトフィブリル及びA1-16を使用してELISAの高次構造特異性が検証され(図6B)、ここでは凝集しないことを予期して親水性A1-16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、A1-16はmAb158サンドイッチELISAではµM濃度でさえ検出されなかった(図6B)。LMW-A及びAプロトフィブリルを、凝集したA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の検出(図6B)はおそらく、凝集量の少ないペプチド調製物に起因する。

#### 【0056】

過剰量の単量体A、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、A1-16の過剰量を一定濃度のA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mAb158ELISA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6C)。A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A1-16はmAb158サンドイッチELISAでの計測を妨害しなかったが、これはA1-16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A1-16は6E10-6E10ELISA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A1-16は高親和性で捕捉抗体と結合した(図6C)。そのうえ、合成A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)。

#### 【0057】

##### 実施例7．生体試料中のAプロトフィブリルの計測

北極型突然変異を保有する細胞及びマウスモデルにおいてA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プロトフィブリルを直接測定する方法はない。従ってmAb158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有する細胞及びマウス由来の試料が野生型A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を発現する細胞及びマウス由来の試料がAArcプロトフィブリル標準曲線(図6A)と比較された。この測定において計測される全てのAを確実に溶解状態にするとともに、A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×gで遠心された。一時的に導入されたAPP<sub>sw e</sub>及びAPP<sub>Arc-sw e</sub>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6A)からA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<sub>Arc-sw e</sub>HEK細胞培養培地中のAプロトフィブリル濃度は28 pM(±2)であり、APP<sub>sw e</sub>に見られた8.2 pM(±

10

20

30

40

50

0.3)より有意に高かった ( $p < 0.0001$ ) (図7A)。偽処理の培地中ではAプロトフィブリルは検出できなかった。A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病理の双方を伴う10月齢のAPP<sub>Arc-Swe</sub>及びAPP<sub>Swe</sub>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(Lord)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プロトフィブリルレベルはAPP<sub>Arc-Swe</sub>トランスジェニックマウス脳において397 pM ( $\pm 59$ )及びAPP<sub>Swe</sub>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7B)。

#### 【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<sub>Swe</sub> ( $n = 8$ )を一時的に導入したもの及びAPP<sub>Arc-Swe</sub>を一時的に導入したもの ( $n = 11$ )であった。APP<sub>Arc-Swe</sub>培地中のAプロトフィブリルのレベルはAPP<sub>Swe</sub>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<sub>Swe</sub>,  $n = 3$ 、及びAPP<sub>Arc-Swe</sub>,  $n = 6$ )と比較された(B)。細胞培養培地と同様、APP<sub>Arc-Swe</sub>マウスのAプロトフィブリルレベルはAPP<sub>Swe</sub>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。

#### 【0059】

実施例8. mAb158は腹腔内投与後のAPP<sub>Swe</sub> arcトランスジェニックマウス中のAプロトフィブリル及び総Aを有意に低下させる

mAb158 (12 mg / kg)が9~10月齢のAPP<sub>Swe</sub> 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<sub>Swe</sub> arcトランスジェニックマウス脳TBS抽出物中のAプロトフィブリルレベルを示す。

#### 【0060】

ギ酸画分中の総AがELISAにより測定された(ギ酸を使用して全てのA型が可溶化されたことにより、全てのA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<sub>Swe</sub> arcトランスジェニックマウス脳ギ酸抽出物中の総Aレベルを示す。

#### 【0061】

実施例9~11

#### 【0062】

## 【表 A】

略称		
A	アデニン	
Ab	抗体	
Ab	プロトコル	
BHK	ベビーハムスター腎臓	
bp	塩基対	
C	センチグレード (Centrigrad)	
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	
COS 7	アフリカミドリザル腎線維芽細胞系	10
dhfr	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	
hr	時間	
HRP	西洋ワサビペルオキシダーゼ	
IgG	免疫グロブリン	
K	G又はT (IUPAC協定)	20
LSAP	大型可溶性アミロイド産物	
mAb	モノクローナル抗体	
sec	秒	
min	分	
M	A又はC (IUPAC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	
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応	
R	A又はG (IUPAC協定)	30
RT	室温	
S	C又はG (IUPAC協定)	
T	チミン	
UV	紫外線	
V	可変	
V	A又はC又はG (IUPAC協定)	
VH	免疫グロブリン重鎖可変領域	
VK	免疫グロブリン $\kappa$ 軽鎖可変領域	
W	A又はT (IUPAC協定)	
Y	C又はT (IUPAC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: GeneAmp 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
CO2ガス37° インキュベーター	ロスラボPLC (Ros s Lab plc) 社	HSO-501TVBB
微生物インキュベーター	ケンドロ/ヘラウス (K endro/Hera eus) 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 <sup>2</sup> 組織培養フラスコ	サーステッド社	83.1812. 002
25cm <sup>2</sup> 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 <sup>2</sup> 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・パイ オサイエンス社	27-926 1-01	3375313
Advantage (登録商 標) -HF 2 PCRキット	クロンテック社	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 (Themop rime) +DNAポリメラー ゼ	アプジェン社	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	109-00 5-098	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	スカイピオ社	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)	スカイピオ社	301475	60104
	キアゲン社	74106	10916587
エビアルカリホスファターゼ	USB社	70092Y	107635
Subcloning Eff iciency (商標) DH5 α (商標) 化学的にコンピテン	インビトロジェン社	44 009 8	1164658
T4 DNAリガーゼ	プロメガ社	M1801	167080
HRP用TMBワンステップ基	スカイピオ社	KB176	
TOPO-TA Clonin g (登録商標) キット	インビトロジェン社	45-064 1	1350772
X-Gal	シグマ社	B-9146	20965701

10

20

30

40

【0067】

## 【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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 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、4500mg/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	41966 -047	9206	07/07
DMSO(ジメチルスルホキ シド)	シグマ社	D2650	125K2 409	12/07
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	15070 -063	12984 01	
血清：胎仔クローンI	ペルビオ・サイエ ンス社	SH300 80	AMM17 779	12/07
SOC	インビトロジェ ン社	15544 -034	13060 51	
トリパンプルー	シグマ社	T8154	19H23 88	
トリプシン-EDTA溶液、 細胞培養試験済み、0.25 %	シグマ社	T4049	48K23 42	04/08

10

20

30

## 【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  $5 \times 10^6$ 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158RNA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158cDNA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。

40

## 【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158cDNAがPCRにより別個の23反応において増幅された。免疫グロブリン鎖可変領域(VK)cDNAが、11個のVKプライマー(MKV1~11)を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

50

、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 (MHV 1 ~ 12) を 4 個の IgG 定常領域プライマーの混合物 (MHC G 1 / 2 a / 2 b / 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、MHV 5 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 MHV 5 + (MHC G 1 / 2 a / 2 b / 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 pCR 2.1 (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 MKV 1 及び MKV 2 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 MKV 1 又は MKV 2 + 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 pCR 2.1 (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) TOP 10 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び取る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 500 bp) を産生するクローンが同定された。各クローンの一晩培養物 (5 ml) 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 v 3.0 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、GeneAmp 9600 PCR 機上でサイクルに付され、及び ABI 310 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 MKV 2 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 クローンの配列は、MOPC - 21、SP 2 及び Ag 8 などの骨髓腫融合パートナーに由来する無菌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 MKV 1 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 クローンの共通配列 (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 FW 1 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 MHV 5 及び MHC G 1 / 2 a / 2 b / 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 クローンの共通配列 (158VH) が、表 15 に示される。158VK と同様、表 1、4 及び 5 に示される FW 1 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 - 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、Kabata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、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1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。スプライドナー配列は、VKの定常領域へのインフレーム付着が必要なV: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、不要なスプライドナー部位、スプライス受容部位、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 - 発現ベクター

発現ベクターpKN100、及びpG1D200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 - 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、スプライドナー部位及びBamHI制限部位を導入する。

#### 【0080】

##### 10.3 - 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、pG1D200発現ベクターへのクロ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、1C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 - キメラ158VH構築物、pG1D200158VH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pG1D200発現ベクターにサブクロニングされ、的確な

10

20

30

40

50

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ーニングされた。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。

10

#### 【 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  $\mu$  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。

20

#### 【 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 x 1 5 8 V K 抗体を 0 . 3  $\mu$  g / m l で、続いて 3 . 7  $\mu$  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  $\mu$  g / m l のキメラ抗体馴化培地を使用して、A 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 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 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。

30

#### 【 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。

40

#### 【 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 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 】

50

## 実施例 12 - ヒト化抗体設計及び考察

【 0 0 8 9 】

【表 G】

## 略称及び定義

158	マウスモノクローナル抗LSAP（商標）抗体158	
158VH	マウス158抗体のVH	
158VK	マウス158抗体のVK	
158RKA <sub>ss</sub>	潜在性プライス部位を保有する158VKのヒト化バージョン	10
158RKA	潜在性プライス部位が除去された158VKのヒト化バージョン	
158RHA <sub>ss</sub>	潜在性プライス部位を保有する158VHのヒト化バージョン	
158RHA	潜在性プライス部位が除去された158VHのヒト化バージョン	
A	アデニン	
b <sub>p</sub>	塩基対	
C	シトシン	
CDR	免疫グロブリン可変領域内の相補性決定領域、Kabat番号体系を使用して定義される	
D遺伝子	多様性遺伝子	20
DNA	デオキシリボ核酸	
FW	フレームワーク領域：CDR領域を除く免疫グロブリン可変領域	
G	グアニン	
IgG	免疫グロブリンG	
J遺伝子	連結遺伝子	
Kabat	エルビン・A・カバット（Elvin A Kabat）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	
mAb	モノクローナル抗体	30
MRCT	医学研究会議技術部門（Medical Research Council Technology）	
T	チミン	
VCI	バーニヤ又はカノニカル又はVH-VL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VHについてはD遺伝子）と共に再構成され完全VH又はVKを生成する遺伝子セグメント	
V領域	異なる抗体間の配列において可変のIgG鎖のセグメント。軽鎖においてはKabat残基109まで、及び重鎖においてはKabat残基113まで伸長している。	40
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	

【 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)
Lasergene6.0	DNAスター社
Modeler9.0	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 (Foot, 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に示されるとおり、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

#### 【 0 0 9 3 】

##### 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), 1997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」、Protein Eng 10 : 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 DNA 配列からの DNA 配列 1 5 8 R H A s s の生成を示す。1 5 8 R H A s s DNA 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 DNA 配列 (表 3 1) が生成された。

20

#### 【 0 0 9 4 】

##### 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。

30

40

#### 【 0 0 9 5 】

##### 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 DNA 配列からの 1 5 8 R K A s s の DNA 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ドナー部位の存在が予測されたが、そのスコアが表 4 0 に示される。非コード突然変異 ( 4 1 ) の導入によりこれらの部位が不活化され、最終 1 5 8 R K A DNA 構築物が生成された ( 表 4 2 )。

【 0 0 9 6 】

1 2 . 6 ヒト化抗体 ( B A N 2 4 0 1 ) 結合活性

1 5 8 R K A 及び 1 5 8 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 1 5 8 抗体を生成した。ヒト化 1 5 8 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 1 5 8 及び 1 5 8 キメラ抗体と同一の結合特性を示した ( 図 1 4 を参照 )。

【 0 0 9 7 】

1 2 . 7 1 5 8 R H A 鎖及び 1 5 8 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 1 5 8 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 1 5 8 の分子モデルは、 1 5 8 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 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 4 3 )。同様に、 1 5 8 R K A に保存されていない C D R 残基の 5 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 4 4 )。ヒト化バージョン 1 5 8 R H B、 1 5 8 R H C、 1 5 8 R H D、 1 5 8 R K B 及び 1 5 8 R K C における、 1 5 8 R H A 及び 1 5 8 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 4 3 及び 4 4 に示される。

【 0 0 9 8 】

10

20

## 【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	EVKLVEGCGGLVQPGSSRKLSCASLSEFTSESYEMHWVQAPKQGLERWAVYISGSSSTIYADTVKGRFTISRDNPATFLQVTSLSRSEDTAMVYCAKVCYKAM...-----DYNGCGSTVTVSS
VH-BA2: X736	EVRLVESGGGLVQPGGSLKLSCLDSEFTSSYAMHWKQTEKLELVATIISGSSSYIYVDSVKERFTISRDNAKNTENLQYSSLSRSEDTAMVYCAHYGSERFV...-----DYNGAGSTVTVSS
VH-BA3: X745	QVHLQSSPELVKPKGASVWNSCKGSGYFTFSYVHWVWQKXGQLENIGYIDPNDGTXNHEKPKGKAVLISEKSSSTAPKLESLSEDSNAYYCAHRYVSLTSTAM...--DYNGCGSTVTVSS
VH-BA7: X746	QVQLKESGGGLVQVQPSLSITCTYSFELTSYGVHWVROPEKQLENLVWIRGCSSTYHWLSLKS-RLSIKHNKSKSYFLKKECSLQTDIDTAMVYCAHRYVDEKTRPA...--YKSGSTLTVSS
VH-BA4: X748	EVKLVEGCGGLVQPGGSLKLSCLDSEFTSSYEMHWVQAPKQGLERWAVYISGSSSTIYADTVKGRFTISRDNPATFLQVTSLSRSEDTAMVYCAHRYVDEKTRPA...-----DYNGCGSTLTVSS
VH-BA9: X758	EVQVWESGGGLVQPGGSKLSCNDEGFTSESYEMHWVQAPKQGLERWAVYISGSSSTIYKQDVTVGRFTISKDNPATFLQVTSLSRSEDTAMVYCAHESYVYGRSYTNDYKSGSTVTVSS
VK-BA1: X731	DYVWVQVPLSLPNSLGGDQASISCRSSQSIYHSENGTILS- <u>FWLQKPGQSPKLLIYVSNHESGVPDRFESGSSGTDFELKISDVEARDLQYVYCFQESNIVPZFFGGTKLEIK</u>
VK-BA2: X736	DIWVWQPKFLVAVAGDAVTITCKRQSIVSNBVA- <u>-----HYQKPGQSPKLLIYASNAITVEVDFRTGSGYGTDFETFTSTVQAEADLAVYFCQDYSSTFFGSGTKLHIK</u>
VK-BA3: X745	DIWVWQVSSLVAVSAGEKVTNCKSSQSLMSRTRVYLVAVYQKFGGSPKLLIYVASTRESCVDRDRTGSGSSTDFTHIISVQAEHLAVYVYKQSYHL- <u>HYFGGSKLEIK</u>
VK-BA7: X746	EVVLACSEALMSASFGKVTNCRASSVSSSYLH- <u>-----HYQKSGAGPKLIYVSNLSVSEVARESSGSSSTVSYSTISSVEARDNAVYVQKQSGYFLERFAGTKLEIK</u>
VK-BA4: X748	DIWVWQVPLSLPNSLGGDQASISCRSSQSIHSENGTILH-WYLQKPGQSPKLLIYVSNHESGVPDRFESGSSGTDFELKISKVAEADLQYVYFCQSTPFWLTFGSGTKLEIK
VK-BA9: X758	DIWVWQVPLSLPNSLGGDQASISCRSSQSIHSENGTIVL- <u>SHYLQKPGQSPKLLIYVSNHESGVPDRFESGSSGTDFELKISKVAEADLQYVYFCQSHIVSFFFGGSKLEIK</u>

\* 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 $\beta$ 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 -----YA-S---	抗体158 置換*	10
VH鎖CDR-2領域 WVAYISSGSSTIYYGDTVKGRFT -----A----- ---T---G-YT--P-S-----	抗体158 置換* 置換*	
VH鎖CDR-3領域 CAREG-GYYYGRSYY-TMDYWGQ CARYGxxxxxNYxxxxAMDYWGQ CARNYxxxxGSRRxxyFDVWGA	抗体158 置換及び欠失* 置換及び欠失*	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。

## 【0101】

## 【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 $\beta$ 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 ITCKASQSVxxSNDxxxVAWYQ	抗体158 置換及び欠失*	30
VL鎖CDR-2領域 LIYKVSNRFSGVP ---YA---YT---	抗体158 置換*	40
VL鎖CDR-3領域 YYCFQGSHVPPTFGG -F-Q-DYSS-F---S	抗体158 置換*	

\*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
Di.vmtqaplsipvs1gdqasiscwylqkpgqspklliygvpdrfsgsgtdftlkisrveaedlgiyyyc		BA9_VL_fr123
.v.....t.....		BA1_VL_fr123
.....kf.l.l.a.rvt.t.q.....	t.y.....ft..t.q.....av.f.	BA2_VL_fr123
ヒトフレームワーク*VL領域		
.....t.....tp.ep.....		VKII-3-1-(1)-O11
.....s.....tp.ep.....		VKII-4-1-(1)-A19
.....t.....s.tp.qp.....		VKII-4-1-(1)-A18
.....t.....s.tp.qp.....		VKII-4-1-(1)-A2
.v.....s.....t.qp.....	fg.r.....rr.....	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。

10

20

30

40



【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	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG
MKV4	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG
MKV5	ATGGATTTWAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
MKV6	ATGAGGTKCKKTGKTSAGSTSCTGRGG
MKV7	ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
MKV8	ATGTGGGGAYCTKTTYCMMTTTTTCAATTG
MKV9	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
MKV10	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT
MKV11	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTCC
MKC	ACTGGATGGTGGGAAGATGG

10

20

【0105】

【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	ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTCTGC
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTG TG
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCTG
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
MHV12	ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG
MHCG2a	CAGTGGATAGACCGATGGGGC
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC

30

40

注: ゆらぎ塩基は略称で定義される(第2節)。

50

【 0 1 0 6 】

【 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	<b>G C C G C C R C C<sup>-1</sup> A<sup>+1</sup> U G G</b>
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 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)。

【 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> <b>GCCGCCACCATGGACTCCAGGCTC</b>
158vhrev	<u>GGGCCCTT</u> <b>GGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACTGAGG</b>
158vl	<u>AAGCTT</u> <b>GCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGG</b>
158vlrev	<u>GGATCC</u> <b>ACTCACGTTTGATTTCCAGCTTGG</b>

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 】

10

20

30

【表10】

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)	GTTTTCCCAGTCACGAC
1233 (24mer)	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA
Hu-K2 (17mer)	CTCATCAGATGGCGGGA
BDSH61R	CGCTGCTGAGGGAGTAGAGTC

10

【0109】

表11. 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	ATGAAGTTGCCCTGTAGGCTGTGGTGTGATGTTCTGGATTCCTGCTCCAGCAGTGATGTTTGGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTG	158	VK
1	.....VV.....		MKV1
1	-----A..G.....GG.....		*** VK
91	CCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAAATGGTAC	158	VK
34	.....		*** VK
181	CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAAGCTCCCTGATCTACAAAAGTTTCCAACCCGATTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGA	158	VK
124	.....		*** VK
271	TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAAGGTTTCACATGTTCCCTCCG	158	VK
214	.....		*** VK
361	ACGTTCCGTTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAACGGGCTG	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

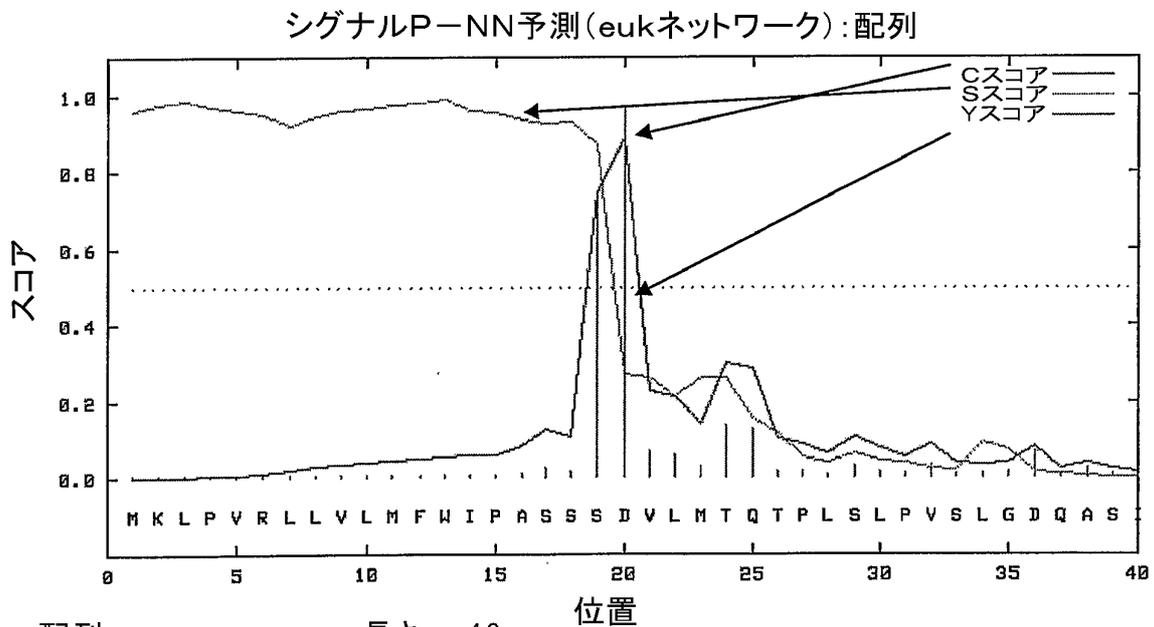
158 VK	MKLPVRLLVLMFWIPASSS
K5. 1#タンパク質	MKLPVRLLVLMFWIPASSS
K5.1#DNA	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCT GCTTCCAGCAGT

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			
#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-DV)が最も高い

注:シグナルPアルゴリズム<sup>6</sup>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 1 2】

表 14. キメラ158VK構築物のタンパク質及びbDNA配列

HindIII	81
AGCTTGCCGCCACCATGAAGTTGCCCTGTTAGGCTGTTGGTGGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCCAGCAGTGATGTTTG	
↓コザック	
KLAAATMKLLPVRLLVLLMLMFWIPASSDVL	158 VK
ATGACCCAACTCCACICTCCCTGCCCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTA	162
MTQTPLSLPSLVSLGDAQASISCSQSIV	158 VK
CATAGTAATGGAAACACCTATTAGAAJGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTCC	243
HSNGNTYLEWYLYLQKPGQSPKLLIYKVS	158 VK
AACCGATTTCTGGGGTCCGACACAGGTTCCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG	324
NRFSGVPRDFSSGSGTGTDFTLKLISRVE	158 VK
GCTGAGGATCGGGAAITTTACTGCTTTCAAGTTACATGTTCTCCGACGTTCCGAGTGGAGGCCAACCAAGCTGGAAATC	405
AEDLGLIYYCYCFQGSHPVPTFFGGTKLEI	
BamHI	
AAACGTGAGTGGATCC	
↓	421
15>ヒトイントロン	
KREWI	

表15. 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	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTTCCCTTTCCCTTATTTTAAAGGTGTCACAGTGTGATGTGCAGTGTCCAGTGTGATGTTGAAAGGTTGAAATGCACCTTTCAGTAGCTTTGAAATGCACCTGGGTTTCGTCAGGCTCCA	158	VH
1	-----G...A.....A.....A.....	***	VH
1	.....		MHV5
91	GTGCAGCCTGGAGGGTCCCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTTTGAAATGCACCTGGGTTTCGTCAGGCTCCA	158	VH
34	.....	***	VH
181	GAGAAGGGCTGGAGTGGTCCGATACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTATGGAGACACACAGTGAAGGGCCGATTCAACCATCTCC	158	VH
124	.....	***	VH
271	AGAGACAAATCCCAAGAACACCCCTGTTCCCTGCAAAATGACCAGTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAGAGGGGGGA	158	VH
214	.....	***	VH
361	TATTACTACGGTAGGAGTTACTATATACTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCCGTTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCA	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。

10

20

30

40

【表 16】

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	MDSRLNIVFLVLIILKGVQC
NL-1 タンパク質	MDSRLNIVFLVLIILKGVQC
NL-1 DNA	ATGGACTCCAGGCTCAATTAGTTTTCCTTGTCCTTAATTTTAAAGGTGCCAGTGT

10

20

30

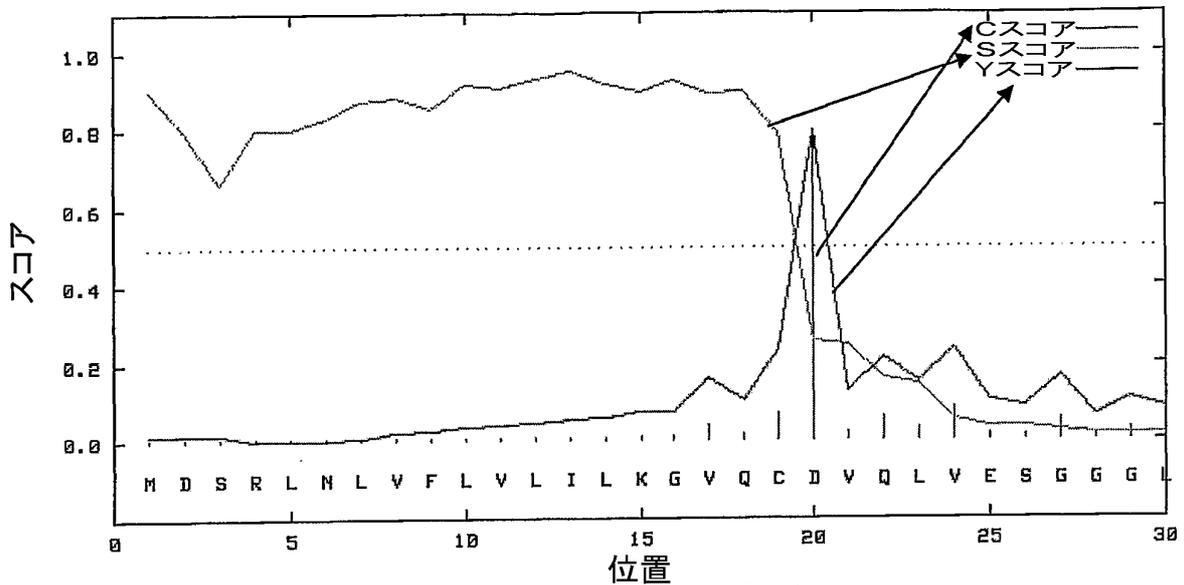
40

【 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

シグナルP-NN予測(eukネットワーク):配列



# 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<sup>6</sup>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 1 6 】



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 $\mu$ 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 2 0】

表20. 158VH及び158VKのアミノ酸配列

VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAAAGFTFSSFCMHWVRQAPKGLWVAIISGSSIIYGDIVKGRFTISRDNPKNTFLQMTSLRSEDTAMYYCAPREGGYYGRSYITMDYWGQGTSTVTVSS
VK	DVIMTQTPLSLPVSILGDAQISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSEPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSTDFLKI SRVEAEDLGIYCFQGSHPVPPFEGGGTKLEIK

10

20

30

40

【 0 1 1 9】

【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 <sup>6</sup>			2	24	26	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 <sup>8</sup>			-111-1-----2----1-																							
バーニヤ残基 <sup>7</sup>			*---*****--*****--**-																							
界面残基 <sup>9</sup>			-----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のものと同じの残基は点で表示される。

【 0 1 2 0 】

10

20

30

40





【表 2 4】

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

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAAASGFTFSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYIS	158 VH
E.....LR...S.....TYW.T.....G.....N.K AF062243	
E.....LR.....YW.S.....G.....N.K M99649	
SGSSTIYGDIVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMFYCAR	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。

10

20

30

40

【表 2 5】

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	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCCCTTGTTCCTATTTTAGAAGGTGCCAGTGT
タンパク質	MELGLSWFLVAILEGVQC

10

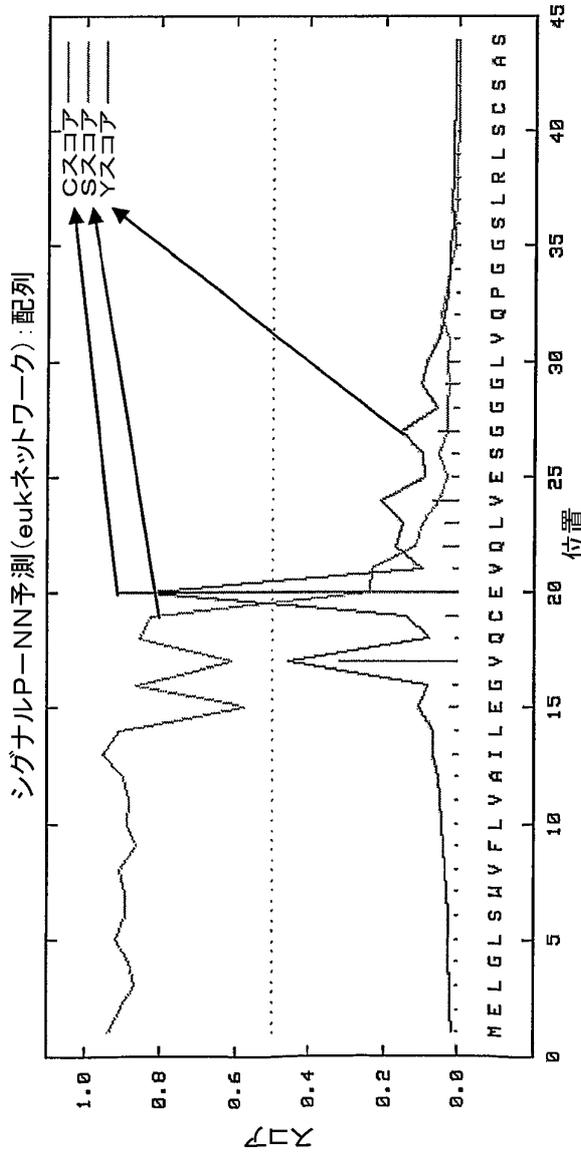
20

【 0 1 2 4】

30

【表 2 6】

表26. M99649シグナルペプチド切断予測



# 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<sup>10</sup>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 2 5】

表27. 158RHAタンパク質配列の生成

Kabat番号 <sup>6</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CDR	01234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123										
H3 VH	F-DVQINSGGGIVDFGSRKLSCAIASGFTFSFGMH--WVROAPEKGLERVAISS--GSSTLYGDMKGRDRESRNPKNITFFLOMTSRSSEFTAMVYCARGGGYYVGRSYYT--MDYWGCGGTIVTSS										
H3 CDR	-----H1-----										
158RHA	-EVQLVESGGGLVDFGSLRLSCSASGFTFSFGMH--WVROAPEKGLERVAISS--GSSTLYGDMKGRDRESRNPKNITFFLOMTSRSSEFTAMVYCARGGGYYVGRSYYT--MDYWGCGGTIVTSS										
AF062243 FW	-EVOLVESGGGLVDFGSLRLSCSASGFTFS										
AF062243	CEVQLVESGGGLVDFGSLRLSCSASGFTFSYVMT--WVROAPEKGLERVAIKP--HGSEAYVDSVKGRFTISRDNKNSLFLQMSLRAEDTAVYYCARANS-----LDVWGCGGTIVTSS										

10

20

30

40

表28. 158RHA DNA配列の生成 - 158RHAs DNA配列の生成

領域	DNA	タンパク質
VH3-07 J-ダ-	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTCCTTGTCTATTATTAGAAAGGTGCCAGTGT	MELGLSWFLVAILEGVQC
AF062243 FW1	GAGGTGACGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTTCAGCCTCTGGATTACACCTTTAGT	EVQLVRSGGGLVQPGGSLRLS CSASGFTFS
AF062243 FW2	TGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCC	WYRQAPGKLEWVA
AF062243 FW3	CGATTCACCAFTCCAGAGACACCCCAAGAACTCACTGTTCTGCAAAATGACGACGCTGAGAGCCGAGACACGGCCCGT	RFTISRDNAKNSLFLQMSLLR AEDTAVVYCAR
AF062243 FW4	TGGGCCAAGGACACCGTCCCGTCTCC	WGQGTIVTVS

注: 158RHAs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)。

10

20

30

40

表29. 158RHAssのDNA及びタンパク質配列

```

ATGGAATTGGGECTGAGCTGGGTTTCCCTTGTCTAATTTAGAGGGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGCTGGAGTCTGGG      81
└──スプライス4.3──┬──スプライス6.9──┬──
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
GGAGCTTGGTCCAGCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTTTCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTTTGGAATGCAC      162
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
TGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTGGCTACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTATGGAGAC      243
└──スプライス5.9──┬──
W V R Q A P G K G L E W V A Y I S S G S S T I Y Y G D
ACAGTGAAGCGGATTCACCATCTCCAGAGACAAGCCCAAGAACTCAGTCTTCTGCAAAATGAGCAGCTGAGAGCCGGAG      324
└──スプライス0──┬──
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
GACAGCGCGTGTATTGTCCGAGAGAGGGGGATATTACTACGGTAGGAGTTACTATACTATGGACTACTGGGGCCAA      405
└──スプライス4.7──┬──
D T A V Y Y C A R E G G Y Y G R S Y Y T M D Y W G Q
GGGACCAAGGTCACCGTCTCC
└──426──┬──
G T 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	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTTGCTATTTTAGAGGGAGT	158RHA
1	.....A..T..	
	158RHAss	
51	CCAGTGCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG	158RHA
51	.....T..G.....	
	158RHAss	
101	GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTGAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGC	158RHA
101	.....	
	158RHAss	
151	TTTGAATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGT	158RHA
151	.....G.....	
	158RHAss	
201	GGCCTACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTATGGAGACACCGTGA	158RHA
201	.....A.....	
	158RHAss	
251	AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTTTCTG	158RHA
251	.....	
	158RHAss	
301	CAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGAG	158RHA
301	.....	
	158RHAss	
351	AGAGGGGGATATTACTACGGAAGGAGTTACTATACTATGGACTACTGGG	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】

表31. 158RHAのDNA及びタンパク質配列

ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTCATTTTAGAGGGAGTCCAGTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGCTCGGG 81  
 ──────────── VH3-07J-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  
 GGAGCTTGGTCCAGCCTGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTGAGCCCTGGAITTCACCTTTAGTAGCTTTGGAAATGCAC 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  
 TGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAATGGGTGGCCCTACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTATGGAGAC 243  
 ──────────── 158RHA FW2 ──────────── CDR2 ────────────  
 W V R Q A P G K G L E W V A Y I S S G S S T I Y Y G D  
 ACCGTGAAGGGCCGATTCCACCACTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCAGTCTGCAAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAG 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  
 GACACGGCCGTATTATTGTCGAGAGAGGGGGGATATTACTACGGAAGGAGTTACTATACTACTATGGACTTGGGGCCAA 405  
 ──────────── 158RHA FW3 ──────────── CDR3 ──────────── 158RHA F ────────────  
 D T A V Y Y C A R E G G Y Y G R S Y Y T M D Y W G Q  
 GGGACCACGGTCACCGTCTCC 426  
 ──────────── 158RHA FW4 ────────────  
 G T T V T V S

10  
20  
30  
40

【表 3 2】

表32. 158VKと比較して、ヒトVKの最良のVCIスコア

Kabat番号 <sup>6</sup>			2	4	35	36	38	44	46	47	48	49	64	66	68	69	71	87	98		
カノニカル残基 <sup>8</sup>			1				2	2			1										
バーニヤ残基 <sup>7</sup>			***** ***** *																		
界面残基 <sup>9</sup>			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33. 158VKと比較して、最良のVCISコアのヒトVK配列

Kabat番号 <sup>6</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
カニカル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
VCIS	1	*	1	1	1F	F	F	F	F	F
Kabat CDR	*****									
158 VK	DVLMTQTPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSI VHS - NGNTYLEWY LQKPGQSPKLLIYKVSNRFPVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDLGIYFCQGSHPV -----PTFGGQTKLEIK									
AB064054	DVVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHT - NGVNFLDWY LQKPGQSPKLLIYLASHRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQGLQTP -----FTFGGQTKLEIK									
AB063934	DVVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----LTFGGGQTKVEIK									
AB064105 scFv	DVVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----YTFGGGQTKLEIK									
AY941999 scFv	DVVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----YTFGGGQTKLEIK									
AX805665 特許	DVVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGWYIYQWY LQKPGQSPQLLIYKVSNRLYGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYFCQGSHPV -----WTFGGGQTKVEIK									
AB064104	DVVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----HTFGGQTKLEIK									
AY942057 scFv	DVVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQSP -----PTFGGQTKVEIK									
AB064055	DVVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYSDWY LQKPGQSPQLLIYLGSSRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----FTFGGQTKVDIK									
AX742874	DVVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - DGMTEYEWY LQKPGQSPQLLIYEVSNRFPVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQNIQLP -----WTFGGGQTKVEIK									
AY685343	DVVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSV VFT - NGKNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMHVAQAP -----WTFGGGQTKVEIK									
AY685353	DVVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSV VFT - NGKNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMHVAQAP -----WTFGGGQTKVEIK									
DQ187506	DIVMTQTPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - HGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRPSGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQNIQLP -----YSFGGQTKLEIR									
DQ187679	DIVMTQTPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----HSFGGQTKLEIK									
AY043107	DIVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----LTFGGGQTKVEIK									
AJ388639	DIVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYFAWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQVLIQTP -----YTFGGQTKLEIS									
AJ388646	DIVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----LTFGGGQTKVEIK									
AJ388642	DIVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----PTFGGQTKVEIK									
M74470	DIVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGFNYLHWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQSP -----YTFGGGQTKLEIK									
X72466	DIVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHN - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQVLIQIP -----LTFGGGQTKVEIK									
U95244	DIVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LYS - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQSP -----LTFGGGQTKVEIK									
AAA51016	DIVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGFNYLHWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQSP -----YTFGGGQTKLEIK									
X89054	DIVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - NGYNYFDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----LTFGGGQTKVEIK									
DQ187505	DIVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHS - HGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRPSGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQNIQLP -----YSFGGQTKLEIR									
DQ187683	DIVMTQTPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHG - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----RTFGGQTKVEIK									
DQ187691	DIVMTQTPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSL LHG - NGYNYLDWY LQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYCMQALQTP -----RTFGGQTKVEIK									
AX805669	DIVMTQSPLSLPLVTPGEPASISCRSSQSI VHS - NGWYIYQWY LQKPGQSPQLLIYKVSNRLYGVDRFSGSGS GDTFLKISRVEAEDVGIYFCQGSHPV -----WTFGGGQTKVEIK									



【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

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS	N	158	VK
..V...S.....TP.AP.....LL.T..VNF.D.....LA.H			AB064054
.IV...S.....TP.EP.....LL...YN..D.....Q....LG..			A19
RFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK		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

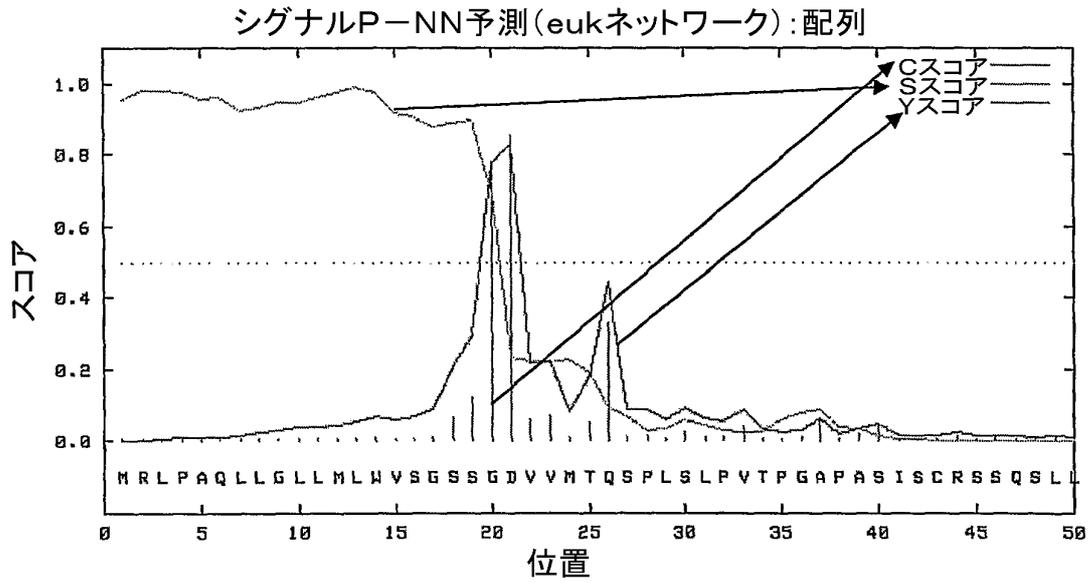
	VK A19 リーダー配列
DNA	ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGG
タンパク質	MRLPAQLLGLLMLWVSGSSG

20

【 0 1 3 5】

【表 3 7】

表37. A19シグナルペプチド切断予測



10

> 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

20

# 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<sup>10</sup> 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。

30

【 0 1 3 6】







【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.....	158RKA <sub>ss</sub>
61	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGCGCCGGCCTCC	158RKA
61	.....	158RKA <sub>ss</sub>
121	ATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAGTGG	158RKA
121	.....A...	158RKA <sub>ss</sub>
181	TATCTTCAAAGCCAGGGCAGTCTCAAAGCTCCTGATCTATAAAGTTTCCAACCGATTT	158RKA
181	.....G..G.....	158RKA <sub>ss</sub>
241	TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGAAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAGAATC	158RKA
241	.....C.....G.....	158RKA <sub>ss</sub>
301	AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAATTTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCT	158RKA
301	.....	158RKA <sub>ss</sub>
361	CCGACGTTCCGGCCCTGGGACCAAATTGGAAATCAA	158RKA
361	.....	158RKA <sub>ss</sub>

10

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

20

【 0 1 4 0】

表42. 158RKAのDNA及びタンパク質配列

ATGAGGCTCCCTGCCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAAAGCTCTGGGTCTCTGGAAAGCAGTGGGATGTTGIGATGACTCAGTCT 81  
 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  
 A19リーダー配列 → 158RKA FW1  
 CCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGCGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA 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  
 AACACCTATTAGAGTGGTATCTTCAAAGCCAGGCGAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCT 243  
 CDR1 → 158RKA FW2 → CDR2  
 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  
 GGAGTCCCTGACAGGTTGAGTGGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTT 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  
 GGAATTTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCTCCGACGTTCCGGCCCTGGACCAAATGGAAATCAA 396  
 158RKA FW3 → CDR3 → 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

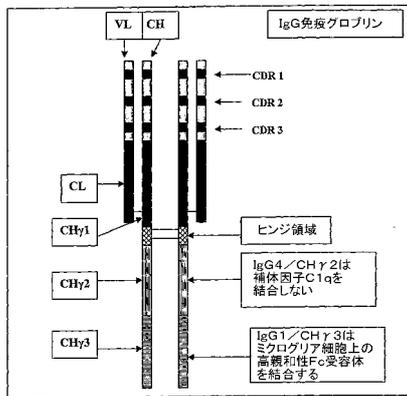




- 【 3 】
- 【 4 】
- 【 5 】
- 【 6 】
- 【 7 】
- 【 8 】
- 【 9 】
- 【 10 】
- 【 11 】
- 【 12 】
- 【 13 】
- 【 14 】

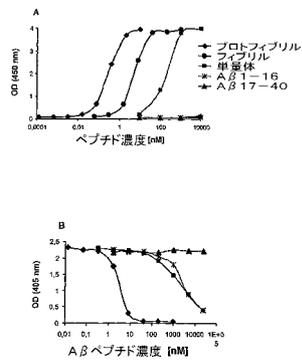
【 1 】

Figure 1



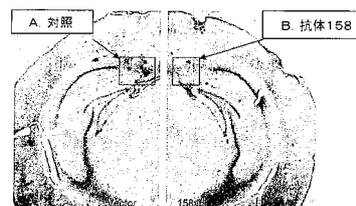
【 2 】

図2: 高親和性プロトフィリル選択的モノクローナル抗体の特性決定



【 3 】

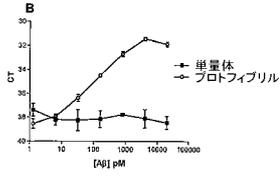
図3. トランスジェニックマウスモデル (APP<sup>swe</sup>) における高親和性プロトフィリル選択的抗体の治療効果



【 図 4 】

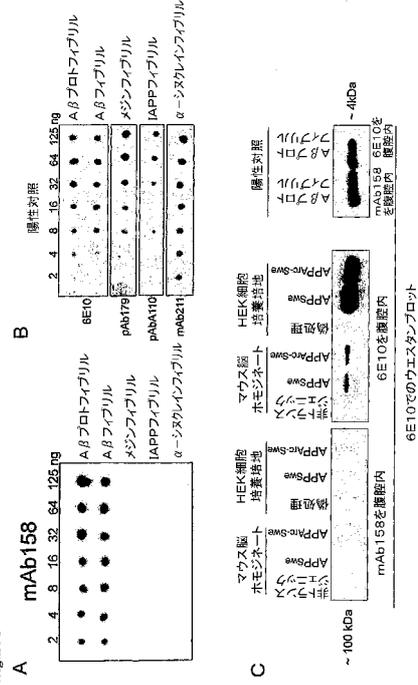
Figure 4

ヒトAβプロトフィリルが近接接合技術によりpMレベルで計測される。



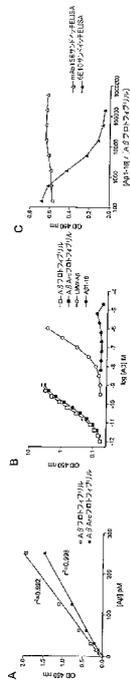
【 図 5 】

Figure 5



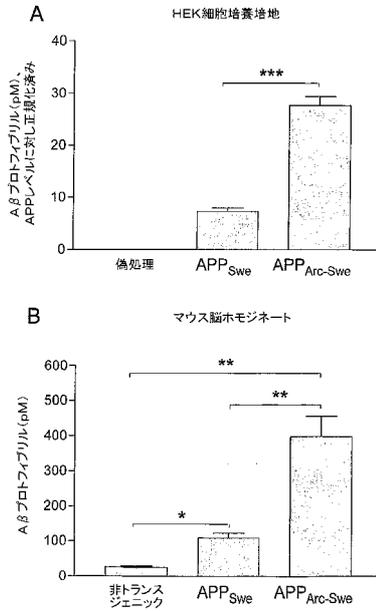
【 図 6 】

Figure 6



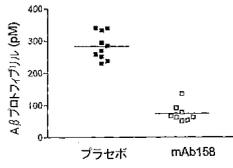
【 図 7 】

Figure 7



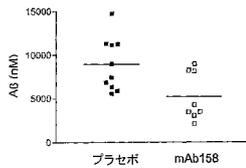
【 図 8 】

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<sup>swearc</sup>トランスジェニックマウス脳TBS抽出物中の Aβプロトフィリルレベル



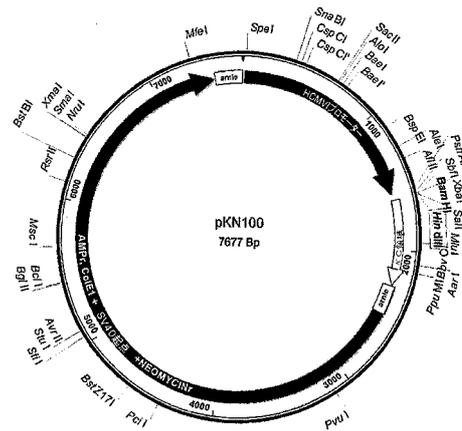
【 図 9 】

図9. 4ヶ月後のAPP<sup>swearc</sup>トランスジェニックマウス脳抽出物中の総Aβレベル



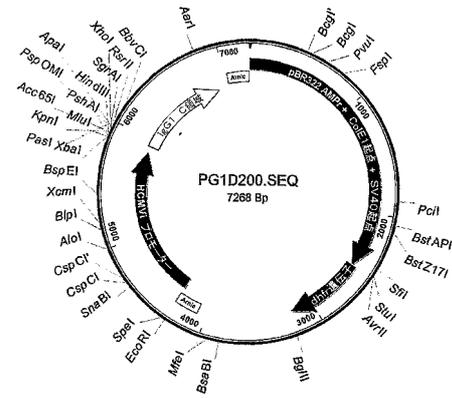
【 図 10 】

図10. pKN100ベクター



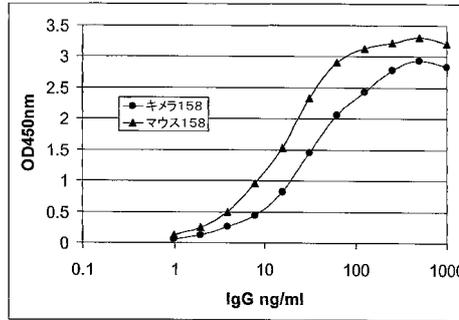
【 図 11 】

図11. pG1D200ベクター



【 図 12 】

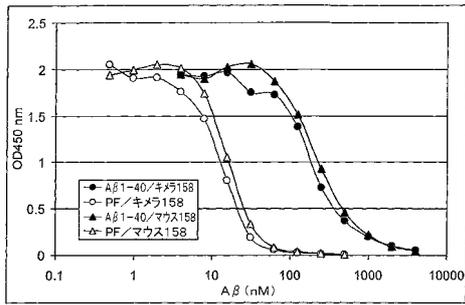
図12. キメラ及びマウス158抗体によるAβ単量体の結合



注: Aβ 1-40 (217 ng/ウェル) で被覆され、且つmAbの連続希釈を使用した直接ELISA。最高濃度 (1 μg/ml) でのFCG量は2.7%である。抗マウス又は抗ヒトk軽鎖抗体での検出。

【 図 1 3 】

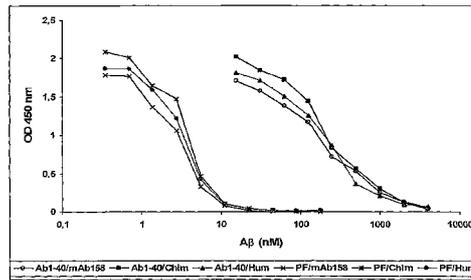
図13. 単量体又はプロトフィブリルAβのキメラ158又はマウス158抗体に対する結合についての競合法



注: 単量体Aβ1-40(●▲)又はプロトフィブリル(PF)(○△)がキメラ158(○●)又はマウス158(△▲)を併有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Aβ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Aβのキメラ158、マウス158抗体及びヒト158抗体(BAN2401)に対する結合についての競合法



注: 単量体Aβ1-40、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Aβ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。

【 配 列 表 】

0005033868000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>A 6 1 P 25/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 25/00	
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 ランフェルト、 ラルス  
スウェーデン国 エス - 1 1 6 4 3 ストックホルム ピ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 - 7 5 3 2 6 ウブサラ 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 - 7 5 2 6 0 ウブサラ アルバーツパーゲン 1 0

(72)発明者 イングランド、 ヒレビ  
スウェーデン国 エス - 7 5 3 3 0 ウブサラ ホーガナスガータン 1 1 ビー

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 特開 2 0 0 3 - 3 3 4 0 7 5 ( J P , A )  
特表 2 0 0 6 - 5 0 6 9 4 3 ( J P , A )  
国際公開第 2 0 0 5 / 1 2 3 7 7 5 ( W O , A 1 )  
国際公開第 2 0 0 4 / 0 2 4 0 9 0 ( W O , A 2 )  
PNAS , 2 0 0 5 年 , Vol.102, No.24, p.8466-8471  
J. Mol. Biol. , 2 0 0 2 年 , Vol.321, p.851-862

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C12N 15/00-15/90  
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/REGISTRY(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed  
Science Direct

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	<a href="#">JP5033868B2</a>	公开(公告)日	2012-09-26
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		
当前申请(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 エークホルムペ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 ペテルション、フリーダ イングランド、ヒレビ		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/02 C07K16/46 A61K39/395 A61P25/28 A61P25/00 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 C12N15/00.C C07K16/46 A61K39/395.N A61P25/28 A61P25/00 G01N33/53.D C12P21/08		
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	JP2009530374A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 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，它对原纤维构象中的淀粉样β蛋白 (Aβ) 具有选择性，并且是IgG类和IgG 1或IgG 4亚类或其组合或其突变体，并且具有高Fc接受性与具有体结合和低C1 (C1q) 结合的高亲和力抗体相关，对于Aβ原纤维的清除是有效的并且具有降低的炎症风险。

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	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・フランスウィック・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 (Ros s Lab pic) 社	HSO-501TVBB
微生物インキュベーター	ケンドロ/ヘラウス (K endro/Herae us) 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 マックイ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	310-00100/120
T100表面プラズモン共鳴検出器	ピアコア社	

