

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2022-172166

(P2022-172166A)

(43)公開日 令和4年11月15日(2022.11.15)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 0 7 K 16/18

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 K 31/7088(2006.01)

A 6 1 K 31/7088

審査請求 有 請求項の数 22 O L (全59頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-130540(P2022-130540)

(22)出願日 令和4年8月18日(2022.8.18)

(62)分割の表示 特願2019-501965(P2019-501965

)の分割

原出願日 平成29年7月18日(2017.7.18)

(31)優先権主張番号 62/363,566

(32)優先日 平成28年7月18日(2016.7.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 PCT/CA2016/051303

(32)優先日 平成28年11月9日(2016.11.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

カナダ(CA)

(31)優先権主張番号 62/507,587

(32)優先日 平成29年5月17日(2017.5.17)

最終頁に続く

(71)出願人 300066874

ザ・ユニバーシティ・オブ・ブリティッ

シュ・コロンビア

カナダ国 V 6 T 1 Z 3 ブリティッシュ

コロンビア、バンクーバー、アグロノミ

ー ロード 1 0 3 - 6 1 9 0、ユニバー

シティ・インダストリー リエゾン オフ

イス

(71)出願人 514316411

プロミス、ニューロサイエンス、イン

コーポレイテッド

P R O M I S N E U R O S C I E N C

E S I N C .

カナダ国オンタリオ州、トロント、ヤン

グ、ストリート、1 9 2 0、スイート、

最終頁に続く

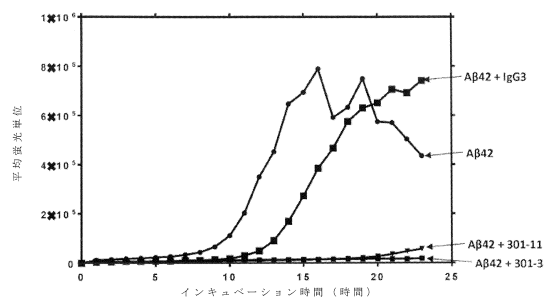
(54)【発明の名称】 アミロイドベータに対する抗体

(57)【要約】 (修正有)

【課題】アミロイドベータオリゴマーと結合する抗体、および該抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

【解決手段】相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含む重鎖可変領域と、相補性決定領域 C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域と、を含むヒト化抗体であって、該抗体が、同じ配列の直鎖状ペプチドと比較して、環状ペプチドに選択的または特異的に結合するか、あるいはオリゴマーアミロイドベータに、アミロイドベータモノマーおよび/またはアミロイドベータ線維と比較して、選択的または特異的に結合する、ヒト化抗体、および該ヒト化抗体と、検出可能な標識または細胞毒性物質と、を含む、イムノコンジュゲートである。

【選択図】図 1



10

20

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含む重鎖可変領域と、相補性決定領域 C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域と、を含むヒト化抗体であって、

前記重鎖可変領域が、配列番号 4 4、4 6、4 8、5 0、5 2 および 5 4 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含み、および / または前記軽鎖可変領域が、配列番号 5 8、6 0、6 2、6 4、6 6 および 6 8 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含み、

10

前記 C D R のアミノ酸配列が、

C D R - H 1	配列番号 7 4
C D R - H 2	配列番号 7 5
C D R - H 3	配列番号 7 6
C D R - L 1	配列番号 7 7
C D R - L 2	配列番号 7 8
C D R - L 3	配列番号 7 9

の配列を含み、

前記抗体が、配列番号 1 2 の配列を有する環状ペプチドに、同じ配列の直鎖状ペプチドと比較して、選択的または特異的に結合するか、あるいはオリゴマー A ベータに、A ベータモノマーおよび / または A ベータ線維と比較して、選択的または特異的に結合する、ヒト化抗体。

20

【請求項 2】

i) 配列番号 4 4、4 6、4 8、5 0、5 2 および 5 4 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列；または i i) 配列番号 4 4、4 6、4 8、5 0、5 2 および 5 4 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、前記 C D R 配列が配列番号 7 4 ~ 7 6 の配列である、アミノ酸配列；を含む重鎖可変領域、および

i) 配列番号 5 8、6 0、6 2、6 4、6 6 および 6 8 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列；または i i) 配列番号 5 8、6 0、6 2、6 4、6 6 および 6 8 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、前記 C D R 配列が配列番号 7 7 ~ 7 9 の配列である、アミノ酸配列；を含む軽鎖可変領域、を含む、請求項 1 に記載のヒト化抗体。

30

【請求項 3】

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号 4 3、4 5、4 7、4 9、5 1 および 5 3 のいずれか 1 つで示されるヌクレオチド配列；またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされ；かつ / あるいは前記抗体が、配列番号 5 7、5 9、6 1、6 3、6 5 および 6 7 のいずれか 1 つで示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載のヒト化抗体。

【請求項 4】

配列番号 4 4 と 5 8；配列番号 4 6 と 6 0；配列番号 4 8 と 6 2；配列番号 5 0 と 6 4；配列番号 5 2 と 6 6；もしくは配列番号 5 4 と 6 8 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体。

40

【請求項 5】

配列番号 4 4、4 6、4 8、5 0、5 2 および 5 4 のいずれか 1 つで示される重鎖可変配列と配列番号 5 8、6 0、6 2、6 4、6 6 および 6 8 のいずれか 1 つで示される軽鎖可変配列とを有する、請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 6】

配列番号 4 4 と 5 8 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体。

【請求項 7】

50

配列番号 4 6 と 6 0 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体。

【請求項 8】

配列番号 4 8 と 6 2 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体。

【請求項 9】

配列番号 5 0 と 6 4 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体。

【請求項 10】

配列番号 5 2 と 6 6 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体。

【請求項 11】

配列番号 5 4 と 6 8 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体。

【請求項 12】

任意選択で融合していてもよい軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含む、単離抗体であって、前記重鎖可変領域が、相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含み、前記軽鎖可変領域が、相補性決定領域 C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 を含み、前記 C D R のアミノ酸配列が、

C D R - H 1 配列番号 1

C D R - H 2 配列番号 2

C D R - H 3 配列番号 3

C D R - L 1 配列番号 4

C D R - L 2 配列番号 5

C D R - L 3 配列番号 6 ; または

C D R - H 1 配列番号 1

C D R - H 2 配列番号 2

C D R - H 3 配列番号 8 0

C D R - L 1 配列番号 4

C D R - L 2 配列番号 5

C D R - L 3 配列番号 6 ; または

C D R - H 1 配列番号 1

C D R - H 2 配列番号 2

C D R - H 3 配列番号 8 0

C D R - L 1 配列番号 8 1

C D R - L 2 配列番号 8 2

C D R - L 3 配列番号 8 3 ;

の配列を含むか、これよりなり、

前記抗体が、配列番号 1 2 の配列を有する環状ペプチドに、同じ配列の直鎖状ペプチドと比較して、選択的または特異的に結合するか、あるいはオリゴマー A ベータに、A ベータモノマーおよび / または A ベータ線維と比較して、選択的または特異的に結合する、単離抗体。

【請求項 13】

一本鎖抗体である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体と、検出可能な標識または細胞毒性物質とを含む、イムノコンジュゲートであって、好ましくは、前記検出可能な標識は、任意選択で P E T 撮像などの対象の撮像に使用するのものであってもよい、陽電子放出放射性核種を含む、イムノコンジュゲート。

【請求項 15】

任意選択で希釈剤とともに、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または請求項 8 に記載のイムノコンジュゲートを含む、組成物。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードする、核酸分子、または前記核酸分子を含むベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体を発現する、細胞。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 16 に記載の核酸分子もしくはベクターまたは請求項 17 に記載の細胞を含む、キット。

【請求項 19】

対象の A ベータのレベルを測定するための、請求項 14 に記載のイムノコンジュゲートであって、検出可能な標識に前記抗体がコンジュゲートされており、前記測定は、前記標識を検出すること、任意選択で前記標識を定量的に検出すること、を含み、任意選択で前記標識は陽電子放出放射性核種であってもよい、請求項 8 に記載のイムノコンジュゲート

10

【請求項 20】

A ベータオリゴマーの伝播を阻害するのに使用するための請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 21】

好ましくは脳または CNS の他の部分に直接投与される、AD および / またはその他の A ベータアミロイド関連疾患を治療するのに使用するための請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体、前記抗体を含む医薬組成物または請求項 16 に記載の核酸分子もしくはベクター。

【請求項 22】

20

治療対象由来の生体試料が、A ベータの有無またはレベルに関して評価される、請求項 21 に記載の抗体、医薬組成物、核酸分子もしくはベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(ファミリーの詳細)

本国際 PCT 出願は、2016 年 7 月 18 日に出願された米国特許仮出願第 62 / 363566 号、2016 年 11 月 9 日に出願された国際出願 PCT / CA2016 / 051303 号、2017 年 5 月 17 日に出願された米国特許仮出願第 62 / 507587 号および 2017 年 5 月 17 日に出願された米国特許仮出願第 62 / 507633 号に対する優先権の利益を主張するものであり、上記出願はそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0002】

(分野)

本開示は、アミロイドベータ (A ベータまたは A β) オリゴマーに対して選択的な抗体ならびにその組成物および使用に関する。

【背景技術】

【0003】

36 ~ 43 アミノ酸ペプチドとして存在するアミロイドベータ (A ベータ) は、酵素である β セクレターゼおよび γ セクレターゼによってアミロイド前駆体タンパク質 (APP) から解離する生産物である。AD 患者では、A ベータは可溶性モノマー、不溶性線維および可溶性オリゴマーの形で存在し得る。モノマー型の A ベータは、主として構造化されていないポリペプチド鎖として存在する。線維型の A ベータは、株と呼ばれることの多い異なる形態に凝集し得る。これらの構造のうち固体 NMR により明らかにされているものがいくつかある。

40

【0004】

例えば、原子分解三次元構造データに関する結晶データベースであるタンパク質データバンク (PDB) では、3 回対称性 A β 構造 (PDB エントリー、2M4J) ; A β - 40 モノマーの 2 回対称性構造 (PDB エントリー 2LMN) および A β - 42 モノマーの一本鎖平行 in-register 構造 (PDB エントリー 2MXU) を含めた、いくつ

50

かの線維株の構造が入手可能である。

【 0 0 0 5 】

2 M 4 J の構造は L u ら [8] に報告されており、2 M X U の構造は X i a o ら [9] に報告されている。2 L M N の構造は P e t k o v a ら [1 0] に報告されている。

【 0 0 0 6 】

A ベータオリゴマーは、培養した細胞系およびニューロンを死滅させ、スライス培養物および動物生体では記憶を促進し、長期増強 (L T P) と呼ばれる極めて重要なシナプス活性を遮断することが示されている。

【 0 0 0 7 】

これまでにオリゴマーの構造は決定されていない。さらに、N M R およびその他の証拠から、オリゴマーが単一の明確に定められた構造ではなく、規則性に乏しく立体配座的に可塑性で順応性のある構造アンサンブルの形で存在することがわかっている。さらに、毒性オリゴマー種の濃度はモノマーまたは線維の濃度よりはるかに低い (推定値には幅があるが、約 1 0 0 0 分の 1 またはそれ以下である) ため、この標的は捉えどころのないものとなっている。

【 0 0 0 8 】

A ベータと結合する抗体が記載されている。

【 0 0 0 9 】

「 U S E O F A N T I - A M Y L O I D A N T I B O D Y I N O C U L A R D I S E A S E S 」と題する国際公開第 2 0 0 9 0 4 8 5 3 8 (A 2) 号は、A ベータ上の 1 つまたは複数の結合部位を認識し、眼疾患の治療に有用なキメラ抗体を開示している。

【 0 0 1 0 】

「 C O M P O U N D S F O R T H E T R E A T M E N T O F D I S E A S E S A S S O C I A T E D W I T H A M Y L O I D O R A M Y L O I D - L I K E P R O T E I N S 」と題する米国特許第 9 2 2 1 8 1 2 (B 2) 号は、アミノ酸残基 1 2 ~ 2 4 の間のエピトープを含む A ベータと結合するアミロイド関連疾患治療のための医薬組成物および不連続な抗体について記載している。

【 0 0 1 1 】

「 A N T I - A M Y L O I D B E T A A N T I B O D I E S A N D T H E I R U S E 」と題する国際公開第 2 0 0 3 0 7 0 7 6 0 (A 2) 号は、A ベータの不連続エピトープを認識し、第一の領域がアミノ酸配列 A E F R H D S G Y またはそのフラグメントを含み、第二の領域がアミノ酸配列 V H H Q K L V F F A E D V G またはそのフラグメントを含む抗体を開示している。

【 0 0 1 2 】

「 C O M P O U N D S T R E A T I N G A M Y L O I D O S E S 」と題する米国特許第 2 0 1 1 0 1 7 1 2 4 3 (A 1) 号は、H Q K L V F および / または H Q K L V F F A E D と結合する抗体の i n v i v o での形成を誘導することが可能なペプチドモチーフおよびその使用を開示している。

【 0 0 1 3 】

国際公開第 2 0 0 8 0 8 8 9 8 3 (A 1) 号および国際公開第 2 0 0 1 0 6 2 8 0 1 (A 2) 号は、A ベータのアミノ酸 1 3 ~ 2 8 と結合するペグ化抗体フラグメントおよび A ベータ関連疾患治療へのその使用を開示している。ソラネズマブおよびクレネズマブは A ベータ上のアミノ酸 1 6 ~ 2 6 と結合する。クレネズマブはモノマー、オリゴマーおよび線維と相互作用する。ソラネズマブ (ピコモル濃度の親和性) およびクレネズマブ (ナノモル濃度の親和性) を含めた M i d r e g i o n 抗体は、単量体 A ベータと優先的に結合するものと思われる [1 3] 。

【 0 0 1 4 】

「 C O M P O U N D S F O R T R E A T I N G S Y M P T O M S A S S O C I A T E D W I T H P A R K I N S O N ' S D I S E A S E 」と題する国際公開第 2 0

10

20

30

40

50

09149487(A2)号は、EVHHQKL、HQKLVFおよびHQKLVFFAEDなどのAベータエピトープに特異的な抗体に対する結合能を有するペプチドを含む化合物について記載している。

【0015】

HHQK(配列番号7)ドメインは、Giulian Dら[11]およびWinklerら[12]に記載されているように、ヒトミクログリアでの斑による神経毒性の誘導に関与するとされている。HHQK(配列番号7)と結合するタンパク質フォールディング疾患の治療のための非抗体治療剤が開示されている(米国特許第20150105344(A1)号、国際公開第2006125324(A1)号)。

【0016】

米国特許第5,766,846号;同第5,837,672号;および同第5,593,846号(参照により本明細書に組み込まれる)は、Aβペプチドの中央ドメインに対するマウスモノクローナル抗体の作製について記載している。国際公開第01/62801号は、Aベータのアミノ酸13~28と結合する抗体について記載している。国際公開第2004071408号はヒト化抗体を開示している。

【0017】

「TREATMENT AND PROPHYLAXIS OF AMYLOIDOSIS」と題する国際公開第2009086539(A2)号は、アミロイドタンパク質A(AA)のC末端領域由来のAAフラグメントなどのネオエピトープを含むペプチドおよび凝集アミロイドタンパク質のネオエピトープに特異的な抗体、例えばAA線維のC末端領域に特異的な抗体を投与することによる、アミロイドーシスおよびアミロイド軽鎖アミロイドーシスに関するものである。

【0018】

「ANTI-AMYLOID BETA ANTIBODIES AND THEIR USE」と題する国際公開第2003070760号は、R-A4ペプチドの2つの領域であって、第一の領域がアミノ酸配列AEFRHDSGYまたはそのフラグメントを含み、第二の領域がアミノ酸配列VHHAEDVFFAEDVGまたはそのフラグメントを含む領域を特異的に認識することが可能な抗体分子に関するものである。

【0019】

「HUMANIZED AMYLOID BETA ANTIBODIES FOR USE IN IMPROVING COGNITION」と題する国際公開第2006066089号は、ベータアミロイドによる疾患の治療のための改善された薬剤および方法、特に、Aβペプチドと特異的に結合し、アミロイド原性障害(例えば、AD)による斑の量を減少させる効果のある、モノクローナル抗体12A11の同定および特徴付けに関するものである。

【0020】

「ANTIBODIES AGAINST AMYLOID BETA 4 WITH GLYCOSYLATED IN THE VARIABLE REGION」と題する国際公開第2007068429号は、少なくとも1つの抗原結合部位が重鎖(VH)の可変領域にグリコシル化アスパラギン(Asn)を含むことを特徴とする精製抗体分子調製物に関するものである。

【0021】

国際公開第03/016466号は、重鎖のCDR2内のNグリコシル化部位を欠くよう設計された266のバリエーション抗体、その医薬組成物ならびにそのバリエーション抗体を発現させるのに有用なポリヌクレオチド配列、ベクターおよび形質転換細胞に関するものである。このバリエーションは、ヒト体液由来の可溶性Aベータペプチドを捕捉し、アミロイドベータペプチドの13~28位内に含まれるエピトープと特異的に結合すると記載されている。

【0022】

Yuらは、PADREまたは毒素由来担体タンパク質と融合した六価の折畳み型Aβ1

10

20

30

40

50

- 15 (6Aβ15) について記載している。Wangら(2016)は、この抗体の末梢投与により老年性アルツハイマー病のトランスジェニック動物モデルのアルツハイマー病様病態および認知低下が軽減されることを報告している[14]、[15]。

【0023】

モノマーもしくは線維またはモノマーと線維の両方よりもAベータオリゴマーと優先的または選択的に結合する抗体が望ましい。

【発明の概要】

【0024】

一態様は、任意選択で融合している軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、重鎖可変領域が相補性決定領域CDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含み、軽鎖可変領域が相補性決定領域CDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含み、前記CDRのアミノ酸配列が、例えば表2に示すように、配列番号1～6；または配列番号1、2、80および4～6または配列番号1、2、80～83を含むか、これよりなるものである、単離抗体を含む。

10

【0025】

一実施形態では、単離抗体は立体配座特異的および/または立体配座選択的である。

【0026】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体、任意選択で、配列番号1～6または配列番号1、2、80および4～6または配列番号1、2、80～83を含むかこれよりなるCDRを有する抗体は、HHQK(配列番号7)を含む環状化合物と、対応する直鎖状ペプチドより選択的に結合し、任意選択で、この抗体は、環状化合物に対して対応する直鎖状化合物の少なくとも2倍、3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍選択的である。

20

【0027】

別の実施形態では、本明細書に記載される抗体、任意選択で、配列番号1～6または配列番号1、2、80および4～6または配列番号1、2、80～83を含むかこれよりなるCDRを有する抗体は、配列HHQK(配列番号7)を含む直鎖状ペプチドと特異的および/または選択的に結合することなく、任意選択で、直鎖状ペプチドの配列は、抗体を生じさせるのに使用する環状化合物の直鎖型である。

30

【0028】

別の実施形態では、表2に挙げるCDRのセットを有する抗体は、Aベータモノマーおよび/またはAベータ線維よりAベータオリゴマーと選択的に結合する。

【0029】

別の実施形態では、Aベータオリゴマーに対する選択性は、Aベータモノマーおよび/またはAベータ線維の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍選択的である。

【0030】

別の実施形態では、抗体は、*in situ*でAベータ線維斑と結合しない、またはほとんど結合しない。

40

【0031】

別の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。

【0032】

別の実施形態では、配列番号1～6または配列番号1、2、80および4～6または配列番号1、2、80～83を含むかこれよりなるCDRを有する抗体は、ヒト化抗体である。一実施形態では、ヒト化抗体は、表4Aの配列から選択される配列を有する重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を有する。

【0033】

別の態様では、表2に記載されるCDRを含む抗体を発現するハイブリドーマも提供さ

50

れる。

【 0 0 3 4 】

さらなる態様はヒト化抗体であり、ここでは、ヒト化抗体は、表 4 B の配列から選択される配列を有する重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を有する。

【 0 0 3 5 】

一実施形態では、ヒト化抗体は、配列番号 1 2 の直鎖状ペプチドより同じ配列を有する環状ペプチドと選択的または特異的に結合するか、あるいは A ベータモノマーおよび / または A ベータ線維よりオリゴマー A ベータと選択的または特異的に結合する。

【 0 0 3 6 】

別の実施形態では、抗体は、F a b、F a b'、F (a b') 2、s c F v、d s F v、
d s - s c F v、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディおよびその多量体から
選択される、本明細書に記載される抗体の抗体結合フラグメントである。 10

【 0 0 3 7 】

一態様は、本明細書に記載される抗体と、検出可能な標識または細胞毒性物質とを含む、イムノコンジュゲートを含む。

【 0 0 3 8 】

一実施形態では、検出可能な標識は、任意選択で P E T 撮像などの対象の撮像に使用する、陽電子放出放射性核種を含む。

【 0 0 3 9 】

一態様は、本明細書に記載される抗体または本明細書に記載されるイムノコンジュゲート
を任意選択で希釈剤とともに含む、組成物を含む。 20

【 0 0 4 0 】

一態様は、本明細書に記載される化合物もしくは免疫原のタンパク質性部分、本明細書
に記載される抗体または本明細書に記載されるタンパク質性イムノコンジュゲートをコー
ドする、核酸分子を含む。

【 0 0 4 1 】

一態様は、本明細書に記載される核酸を含む、ベクターを含む。

【 0 0 4 2 】

一態様は、本明細書に記載される抗体を発現する細胞を含み、任意選択で、細胞は、本
明細書に記載されるベクターを含む、ハイブリドーマである。 30

【 0 0 4 3 】

一態様は、本明細書に記載される抗体、本明細書に記載されるイムノコンジュゲート、
本明細書に記載される組成物、本明細書に記載される核酸分子、本明細書に記載されるベ
クターまたは本明細書に記載される細胞を含む、キットを含む。

【 0 0 4 4 】

一態様は、生体試料が A ベータを含むかどうかを判定する方法であって、

a . 生体試料と、本明細書に記載される抗体または本明細書に記載されるイムノコンジ
ュゲートとを接触させること ; および

b . 何らかの抗体複合体の存在を検出すること

を含む、方法を含む。 40

【 0 0 4 5 】

一実施形態では、生体試料は A ベータオリゴマーを含有し、方法は、

a . 抗体 : A ベータオリゴマー複合体の形成が可能な条件下で、試料と、 A ベータオリ
ゴマーに特異的かつ / または選択的な本明細書に記載される抗体または本明細書に記載さ
れるイムノコンジュゲートとを接触させること ; および

b . 何らかの複合体の存在を検出すること

を含み、

検出可能な複合体の存在により、試料が A ベータオリゴマーを含有し得ることが示され
る。

【 0 0 4 6 】

別の実施形態では、複合体の量を測定する。

【0047】

別の実施形態では、試料は、脳組織もしくはその抽出物、全血、血漿、血清および/またはCSFを含む。

【0048】

別の実施形態では、試料はヒト試料である。

【0049】

別の実施形態では、試料を対照、任意選択で以前の試料と比較する。

【0050】

別の実施形態では、特に限定されないが、SPR、Kinexa、Mesoscale、ELISA、Singulex、LuminexおよびSimoaを含めた分析アッセイによりAベータのレベルを検出する。 10

【0051】

一態様は、対象のAベータのレベルを測定する方法であって、ADを有するリスクもしくは疑いがある、またはADを有する対象に、本明細書に記載される抗体を含み、抗体が検出可能な標識とコンジュゲートされているイムノコンジュゲートを投与すること；および標識を検出すること、任意選択で標識を定量的に検出することを含む、方法を含む。

【0052】

一実施形態では、標識は陽電子放出放射性核種である。

【0053】

一態様は、Aベータオリゴマー伝播を阻害する方法であって、有効量の本明細書に記載されるAベータオリゴマーに特異的または選択的な抗体またはイムノコンジュゲートを、Aベータを発現する細胞もしくは組織と接触させて、または必要とする対象に投与して、Aベータの凝集および/またはオリゴマー伝播を阻害することを含む、方法を含む。 20

【0054】

一態様は、ADおよび/またはその他のAベータアミロイド関連疾患を治療する方法であって、必要とする対象に1)有効量の本明細書に記載される抗体もしくはイムノコンジュゲートまたは前記抗体を含む医薬組成物を投与すること；2)必要とする対象に1の抗体をコードする核酸または1の抗体をコードする核酸を含むベクターを投与することを含む、方法を含む。 30

【0055】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体を用いて、治療する対象由来の生体試料をAベータの有無またはレベルに関して評価する。

【0056】

別の実施形態では、抗体、イムノコンジュゲート、組成物または核酸もしくはベクターを脳またはCNSの他の部分に直接投与する。

【0057】

以下の詳細な説明から本開示のその他の特徴と利点が明らかになるであろう。ただし、この詳細な説明から本開示の趣旨および範囲内に含まれる様々な変更および改変が当業者 40
に明らかになることから、詳細な説明および具体例は、本開示の好ましい実施形態を示すと同時に、単に説明を目的として記載されるものであることが理解されるべきである。

【0058】

これより本開示の実施形態を図面と関連させて説明する。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】in vitroでのAベータオリゴマー伝播に対する抗体の効果を報告するグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0060】

(本開示の詳細な説明)

本明細書には、表 2 に示す配列を有する C D R を含み、かつ / あるいは表 3、4 A および 4 B のいずれかに記載される可変領域配列および / または表 8 の配列を有する抗体、その免疫療法組成物ならびにその使用方法が提供される。前記抗体は、アルツハイマー病 (A D) に関連するオリゴマー種を含めた、A ベータの毒性オリゴマー種内で優先的に接触可能なエピトープを標的とし得る。

【0061】

実施例で示すように、H H Q K (配列番号 7) を含む環状ペプチドを用いて生じさせた抗体は、オリゴマー A ベータと優先的に結合し、かつ / または同じ配列 (例えば、対応する直鎖状配列) の直鎖状ペプチドと比較して環状ペプチドと選択的に結合する。実験結果が記載されており、合成モノマーと比較して合成オリゴマーと選択的に結合し、対照 C S F よりも A D 患者の C S F と優先的に結合し、かつ / または対照の可溶性脳抽出物よりも A D 患者の可溶性脳抽出物と優先的に結合する、エピトープ特異的かつ立体配座選択的な抗体が特定される。さらに、A D 脳組織の染色では、斑との結合を全くまたはほとんど示さない抗体が特定され、i n v i t r o 試験では、抗体が A β オリゴマーの伝播および凝集を阻害することがわかった。

10

【0062】

I. 定義

本明細書で使用される「A ベータ」という用語は、代替的に「アミロイドベータ」、「アミロイド β 」、「A ベータ、A ベータまたは「A β 」と呼ばれ得る。アミロイドベータは、36 ~ 43 個のアミノ酸よりなるペプチドであり、あらゆる種のあらゆる野生型および変異型、特にヒト A ベータを包含する。A ベータ 40 は 40 アミノ酸型を指し、A ベータ 42 は 42 アミノ酸型を指すなど。ヒト野生型 A ベータ 42 のアミノ酸配列は配列番号 7 で示されるものである。

20

【0063】

本明細書で使用される「A ベータモノマー」という用語は、A ベータ (例えば、1 ~ 40、1 ~ 42、1 ~ 43) ペプチドの個々のサブユニット型のいずれかを指す。

【0064】

本明細書で使用される「A ベータオリゴマー」という用語は、本明細書では、複数 (例えば、少なくとも 2 つ) の A ベータモノマーが非共有結合によって、約 100 個未満またはより通常には約 50 個未満のモノマーからなり、立体配座に柔軟性があり、部分的に規則的である三次元の小球に凝集した A ベータサブユニットのいずれか複数のものを指す。例えば、オリゴマーは、3 個、4 個、5 個またはそれ以上のモノマーを含み得る。本明細書で使用される「A ベータオリゴマー」という用語は、合成 A ベータオリゴマーおよび / または天然 A ベータオリゴマーの両方を包含する。「天然 A ベータオリゴマー」は、i n v i v o で、例えば A D を有する対象の脳および C S F 内で形成される A ベータオリゴマーを指す。

30

【0065】

本明細書で使用される「A ベータ線維」という用語は、電子顕微鏡下で線維構造を示す個々の A ベータペプチドが非共有結合により会合した集合体を含む分子構造を指す。線維構造は通常、「クロスベータ」構造であり、理論上、多量体の大きさに上限はなく、線維は数千個または何千個ものモノマーを含み得る。線維は数千個単位で凝集し、A D に特徴的な主な病理学的形態の 1 つである老人斑を形成し得る。

40

【0066】

「H H Q K」という用語は、配列番号 7 で示されるヒスチジン、ヒスチジン、グルタミン、リジンというアミノ酸配列を意味する。アミノ酸配列に言及する場合、それは文脈に応じて、A ベータまたは単離ペプチドの配列、例えば環状化合物のアミノ酸配列などを指し得る。

【0067】

「アミノ酸」という用語は、天然のアミノ酸および修飾された L - アミノ酸をすべて包含する。アミノ酸の原子は様々な同位体を含み得る。例えば、アミノ酸は、水素に代わる

50

ジュウテリウム、窒素 14 に代わる窒素 15 および炭素 12 に代わる炭素 13 ならびにその他の同様の变化を含み得る。

【0068】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ベニヤ化 (veneer ed) 抗体、ヒト化抗体およびその他のキメラ抗体ならびに例えば一本鎖 Fab フラグメント、Fab' 2 フラグメントまたは一本鎖 Fv フラグメントを含めた上記の結合フラグメントを包含するものとする。抗体は、組換え供給源由来のものおよび/またはウサギ、ラマ、サメなどの動物で産生されたものであり得る。また、トランスジェニック動物で産生され得る、もしくは生化学技術を用いて作製され得る、またはファージライブラリーなどのライブラリーから単離され得るヒト抗体も包含される。ヒト化抗体またはその他のキメラ抗体は、1 種類または 2 種類以上のアイソタイプもしくはクラスまたは種由来の配列を含み得る。

10

【0069】

「単離抗体」という語句は、in vivo または in vitro で産生され、抗体を産生した供給源、例えば、動物、ハイブリドーマまたはその他の細胞系 (抗体を産生する組換え昆虫、酵母または細菌細胞など) から取り出された抗体を指す。単離抗体は任意選択で「精製」されており、これは少なくとも 80%、85%、90%、95%、98% または 99% の純度であることを意味する。

【0070】

本明細書で使用される「結合フラグメント」という用語は、抗体または抗体鎖の一部または一部分であって、インタクトの抗体もしくは抗体鎖または完全な抗体もしくは抗体鎖より少ないアミノ酸残基を含み、抗原と結合する、またはインタクトの抗体と競合するものを指す。例示的結合フラグメントとしては、特に限定されないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディおよびその多量体が挙げられる。フラグメントは、インタクトの抗体もしくは抗体鎖または完全な抗体もしくは抗体鎖の化学処理または酵素処理によって得ることができる。フラグメントは、組換え手段によっても得ることができる。例えば、抗体をペプシンで処理することにより F(ab')₂ フラグメントを作製することができる。得られた F(ab')₂ フラグメントにジスルフィド架橋を還元する処理を実施して、Fab' フラグメントを作製することができる。パパイン消化により Fab フラグメントの形成を引き起こすことができる。また、組換え発現技術により Fab、Fab' および F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体フラグメントならびにその他のフラグメントを構築することもできる。

20

30

【0071】

当該技術分野で認められている「IMGT 番号付け」または「ImMun oGeneT i c s データベース番号付け」という用語は、抗体またはその抗原結合部分の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の他のアミノ酸残基より可変性のある (すなわち、超可変性の) アミノ酸残基を番号付けするシステムを指す。

【0072】

本明細書で使用される「立体配座エピトープ」という用語は、エピトープアミノ酸配列が特定の三次元構造を有し、その三次元構造の少なくとも一面が別の形態、例えば対応する直鎖状ペプチドまたは A ベータモノマー中に存在しないか、または存在する可能性が低く、コグネイト抗体によって特異的かつ/または選択的に認識されるエピトープを指す。立体配座特異的エピトープと特異的に結合する抗体は、その立体配座特異的エピトープの 1 つまたは複数のアミノ酸の空間的配置を認識する。例えば、HHQK (配列番号 7) 立体配座エピトープは、抗体によって選択的に、例えば直鎖状 HHQK (配列番号 7) を用いて生じさせた抗体の少なくとも 2 倍、3 倍、5 倍、10 倍、50 倍、100 倍、250 倍、500 倍もしくは 1000 倍またはそれ以上選択的に認識される、HHQK (配列番号 7) のエピトープを指す。ある抗体がエピトープ、例えば HHQK (配列番号 7) などの立体配座エピトープなどと選択的に結合する場合、それは、抗体が、特定の残基

40

50

またはその一部を含む1つまたは複数の特定の立体配座と、別の立体配座の前記残基と結合する場合より高い親和性で優先的に結合することを意味する。例えば、ある抗体が、HHQKまたは関連エピトープを含むシクロペプチドと、対応する直鎖状ペプチドより選択的に結合するという場合、その抗体は、直鎖状ペプチドと結合する場合の少なくとも2倍の親和性でシクロペプチドと結合する。同様に、ある抗体がオリゴマーAベータと選択的に結合するという場合、その抗体は、Aベータモノマーおよび/または斑線維と結合する場合の少なくとも2倍の親和性でオリゴマー種と結合する。

【0073】

本明細書で抗体に関して使用される「斑との結合が全くまたはほとんどみられない」または「斑と結合しない、またはほとんど結合しない」という用語は、抗体が（例えば、任意選択でAベータ抗体6E10でみられる斑染色と比較した、*in situ*の）免疫組織化学法で典型的な斑の染色形態を示さず、染色のレベルが、IgG陰性の（例えば、無関係な）アイソタイプ対照でみられるレベルと同等である、またはその2倍以下であることを意味する。

10

【0074】

「単離ペプチド」という用語は、例えば組換え技術または合成技術によって作製され、ペプチドを作製した組換え細胞または残存ペプチド合成反応物などの供給源から取り出されたペプチドを指す。単離ペプチドは、任意選択で「精製」されており、これは少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%の純度および任意選択で医薬品等級の純度であることを意味する。

20

【0075】

本明細書で使用される「検出可能な標識」という用語は、本明細書に記載されるペプチドまたは化合物内に付加または導入することができるペプチド配列（mycタグ、HAタグ、V5タグまたはNEタグなど）、蛍光タンパク質などの部分であって、直接的または間接的に検出可能なシグナルを発生することが可能な部分を指す。例えば、標識は、（例えば、PET撮像に使用する）放射線不透過性の陽電子放出放射性核種もしくは放射性同位元素、例えば ^3H 、 ^{13}N 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I など；蛍光化合物（フルオロフォア）もしくは化学発光化合物（発色団）、例えばフルオレセインイソチオシアナート、ローダミンもしくはルシフェリンなど；酵素、例えばアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼもしくは西洋ワサビペルオキシダーゼなど；造影剤；または金属イオンであり得る。検出可能な標識はまた、例えば二次抗体を用いて間接的に検出可能なものであり得る。

30

【0076】

通常使用される「エピトープ」という用語は、抗体によって特異的に認識される抗原の抗体結合部位、通常、ポリペプチドセグメントを意味する。本明細書で使用される「エピトープ」はまた、記載される集団座標法を用いてAベータ上で特定され得るアミノ酸配列またはその一部を指すこともある。例えば、特定された標的領域HHQK（配列番号7）を含む環状化合物に対応する単離ペプチドに対して作製した抗体は、前記エピトープ配列の一部または全部を認識する。エピトープが抗体による結合に接触可能な場合、それは本明細書において「接触可能な」ものである。

40

【0077】

本明細書で使用される「より高い親和性」という用語は、抗体Xが標的Zより強く（ K_{on} ）かつ/または小さい解離定数（ K_{off} ）で標的Yと結合する場合の相対的抗体結合度を指し、この文脈では、抗体Xは標的Yに対して標的Zより高い親和性を有する。これと同様に、本明細書の「より低い親和性」は、抗体Xが標的Zより弱くかつ/または大きい解離定数で標的Yと結合する場合の抗体結合度を指し、この文脈では、抗体Xは標的Yに対して標的Zより低い親和性を有する。抗体とその標的抗原との間の結合の親和性は $K_A = 1 / K_D$ で表すことができ、式中、 $K_D = k_{on} / k_{off}$ である。 k_{on} および k_{off} の値は、表面プラズモン共鳴技術を用いて、例えばMolecular Affinity Screening System (MASS-1) (Sierra Sen

50

s o r s 社、ハンブルク、ドイツ)を用いて測定することができる。環状化合物、例えば任意選択の環状ペプチド中に提示される立体配座に選択的な抗体は、環状化合物(例えば、環状ペプチド)に対する親和性が直鎖状形態の対応する配列(例えば、非環化配列)より大きい。

【0078】

環状化合物に関する「対応する直鎖状化合物」という用語は、環状化合物と同じ配列もしくは化学的部分を含む、またはこれよりなるが、直鎖状(すなわち、非環状)形態であり、例えば直鎖状ペプチドの溶液中でみられ得る特性を有する、化合物、任意選択でペプチドを指す。例えば、対応する直鎖状化合物は、環化されていない合成ペプチドであり得る。

10

【0079】

ある抗体に関して本明細書で使用される「特異的に結合する」は、その抗体がエピトープ配列を認識し、最小限の親和性でその標的抗原と結合することを意味する。例えば、多価抗体は、その標的と少なくとも 1×10^{-6} 、少なくとも 1×10^{-7} 、少なくとも 1×10^{-8} 、少なくとも 1×10^{-9} または少なくとも 1×10^{-10} の K_D で結合する。少なくとも 1×10^{-8} より高い親和性が好ましいものであり得る。例えば、 K_D はナノモルの範囲またはピコモルの範囲内であり得る。可変ドメインを1つ含むFabフラグメントなどの抗原結合フラグメントは、非フラグメント化抗体との多価相互作用の10倍または100倍低い親和性でその標的と結合する。

【0080】

20

ある形態のAベータ(例えば、線維、モノマーまたはオリゴマー)または環状化合物と選択的に結合する抗体に関して本明細書で使用される「選択的に結合する」という用語は、その抗体が上記の形態と少なくとも2倍、少なくとも3倍または少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍もしくは少なくとも1000倍またはそれ以上の親和性で結合することを意味する。したがって、特定の立体配座(例えば、オリゴマー)に対してより選択的な抗体は、別の形態のペプチドおよび/または直鎖状ペプチドの少なくとも2倍などの親和性で特定の形態のAベータと優先的に結合する。

【0081】

本明細書で使用される「動物」または「対象」という用語は、任意選択でヒトを含ままたは除外した哺乳動物を含めた動物界のあらゆるメンバーを包含する。

30

【0082】

本明細書で使用される「保存的アミノ酸置換」とは、タンパク質の所望の特性を打ち消すことなく、あるアミノ酸残基が別のアミノ酸残基に置き換わるアミノ酸置換のことである。適切な保存的アミノ酸置換は、疎水性、極性およびR鎖長が互いに類似したアミノ酸同士を置き換えることにより実施することができる。保存的アミノ酸置換の例としては以下のものが挙げられる：

【表1】

40

保存的置換	
アミノ酸のタイプ	置換可能なアミノ酸
親水性	Ala、Pro、Gly、Glu、Asp、Gln、Asn、Ser、Thr
スルフィドリル	Cys
脂肪族	Val、Ile、Leu、Met
塩基性	Lys、Arg、His
芳香族	Phe、Tyr、Trp

【0083】

本明細書で使用される「配列同一性」という用語は、2つのポリペプチド配列または2つの核酸配列の間の配列同一性のパーセンテージを指す。2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するには、配列を最適な比較目的で整列させる(例

50

えば、第二のアミノ酸配列または核酸配列との最適アライメントのために第一のアミノ酸配列または核酸配列の配列内にギャップを導入することができる)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第一の配列内のある位置が第二の配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合、その分子は上記の位置において同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、その配列が共有する同一位置の数の関数である(すなわち、%同一性 = 同一の重複位置の数 / 位置の総数 × 100%)。一実施形態では、2つの配列は同じ長さである。2つの配列間のパーセント同一性の決定はまた、数学的アルゴリズムを用いて実施することができる。2つの配列の比較に用いられる数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例には、KarlinおよびAltschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 5873-5877で改変されたKarlinおよびAltschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 2264-2268のアルゴリズムがある。Altschulら, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラムにはそのようなアルゴリズムが組み込まれている。NBLASTヌクレオチドプログラムパラメータを例えばスコア = 100、ワード長 = 12に設定してBLASTヌクレオチド検索を実施し、本願の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。XBLASTプログラムパラメータを例えばスコア = 50、ワード長 = 3に設定してBLASTタンパク質検索を実施し、本明細書に記載されるタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップ付きアライメントを得るには、Altschulら, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載されているGapped BLASTを用いることができる。あるいは、PSI-BLASTを用いて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施することができる(同文献)。BLASTプログラム、Gapped BLASTプログラムおよびPSI-BLASTプログラムを用いる場合、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)の初期パラメータを用いることができる(例えば、NCBIのウェブサイトを参照されたい)。配列の比較に用いられる数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例には、MyersおよびMiller, 1988, CABIOS 4: 11-17のアルゴリズムがある。GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)には、そのようなアルゴリズムが組み込まれている。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを用いる場合、PAM120加重残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を用いることができる。ギャップを許容するかしないかを問わず、上記のものと類似した技術を用いて2つの配列間のパーセント同一性を決定することができる。パーセント同一性を算出する際には通常、完全一致のみをカウントする。

【0084】

抗体に関しては、抗体配列をIMGTまたはその他のもの(例えば、Kabatt番号付けの慣例)により最大限に整列させたとき、パーセンテージ配列同一性を決定することができる。アライメント後、対象抗体領域(例えば、重鎖または軽鎖の全成熟可変領域)を参照抗体の同じ領域と比較している場合、対象抗体領域と参照抗体領域の間のパーセンテージ配列同一性は、ギャップをカウントせず、対象抗体領域および参照抗体領域の両方で同じアミノ酸によって占められている位置の数を、整列させた2つの領域の位置の総数で除したものに100を乗じてパーセンテージに変換したものである。

【0085】

本明細書で使用される「核酸配列」という用語は、天然の塩基、糖および糖間(主鎖)結合よりなるヌクレオシドモノマーまたはヌクレオチドモノマーの配列を指す。この用語はまた、非天然のモノマーまたはその一部分を含む修飾または置換された配列を包含する。本願の核酸配列は、デオキシリボ核酸配列(DNA)またはリボ核酸配列(RNA)であり得、アデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシルを含めた天然の塩基を含み得る。配列はまた、修飾塩基を含み得る。このような修飾塩基の例としては、アザお

よびデアザアデニン、グアニン、シトシン、ミジンおよびウラシル；ならびにキサンチンおよびヒポキサンチンが挙げられる。核酸は二本鎖または一本鎖であり得、センス鎖またはアンチセンス鎖を表す。さらに、「核酸」という用語は、相補的核酸配列およびコドン最適化等価物または同義コドン等価物を包含する。本明細書で使用される「単離核酸配列」という用語は、組換えDNA技術により作製した場合は実質的に細胞物質も培地も含まない核酸、あるいは化学的に合成した場合は実質的に化学的前駆体もその他の化学物質も含まない核酸を指す。単離核酸はまた、その核酸が由来する核酸に天然の状態で隣接する配列（すなわち、核酸の5'側および3'側に位置する配列）を実質的に含まない。

【0086】

「作動可能に連結されている」は、核酸の発現が可能のようにその核酸が制御配列と連結されていることを意味するものとする。適切な制御配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物または昆虫の遺伝子を含めた様々な供給源に由来するものであり得る。適切な制御配列の選択は、選択する宿主細胞によって決まり、当業者により容易に達成され得る。このような制御配列の例としては、転写プロモーターおよび転写エンハンサーまたはRNAポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含めたりボソーム結合配列が挙げられる。さらに、選択する宿主細胞および用いるベクターに応じてその他の配列、例えば複製起点、追加のDNA制限部位、エンハンサーおよび転写の誘導性を付与する配列などを発現ベクター内に組み込み得る。

【0087】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、核酸分子を例えば、原核細胞および/または真核細胞内に導入し、かつ/あるいはゲノム内に組み込むことを可能にする前記核酸分子の任意の中間運搬体を含み、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージまたはウイルスベクター、例えばレトロウイルス系ベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどがこれに包含される。本明細書で使用される「プラスミド」という用語は一般に、通常は環状DNA二本鎖であり、染色体DNAとは独立して複製することができる、染色体外遺伝物質の構築物を指す。

【0088】

「少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、溶液中の2つの相補的核酸分子の間の選択的ハイブリダイゼーションを促進する条件を選択することを意味する。ハイブリダイゼーションは核酸配列分子の全部または一部に起こり得る。ハイブリダイズする部分は通常、少なくとも15（例えば、20、25、30、40または50）ヌクレオチドの長さである。当業者には、核酸の二本鎖またはハイブリッドの安定性が、ナトリウム含有緩衝液中でのナトリウムイオン濃度と温度の関数である T_m （ $T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% (G + C) - 600 / 1)$ ）またはこれと類似した方程式）によって決まることが認識されよう。したがって、ハイブリッドの安定性を決定する洗浄条件のパラメータはナトリウムイオン濃度および温度である。既知の核酸分子に類似しているが同一ではない分子を特定するには、1%のミスマッチにより T_m が約1 低下するものと考えられ、例えば、同一性が95%を上回る核酸分子を探索するのであれば、最終洗浄温度は約5 低下することになる。当業者は、これらの考慮事項に基づき、適切なハイブリダイゼーション条件を容易に選択することが可能であろう。好ましい実施形態では、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を選択する。例として、以下の条件を用いてストリンジェントなハイブリダイゼーションを実施し得る：上の方程式に基づき、 T_m を-5 とし、5×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）/5×デンハルト溶液/1.0% SDSで、ハイブリダイゼーションを実施し、次いで、60 にて0.2×SSC/0.1% SDSで洗浄する。中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、42 、3×SSCでの洗浄段階が含まれる。ただし、上のものに代わる緩衝液、塩および温度を用いても同等のストリンジェンシーが達成されることが理解される。ハイブリダイゼーション条件に関するさらなる指針については、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2002およびSa

10

20

30

40

50

mbrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001にみることができる。

【0089】

本明細書で使用され、当該技術分野で十分に理解されている「治療すること」または「治療」という用語は、臨床結果を含めた有益な結果または所望の結果を得る方法を意味する。有益な臨床結果または所望の臨床結果としては、特に限定されないが、検出可能なものであるか検出不可能なものであるかを問わず、1つまたは複数の症状または病態の軽減または改善、疾患の程度の減少、疾患の状態の安定化（すなわち、悪化しないこと）、疾患の拡散の予防、疾患進行の遅延または緩徐化、病状の改善または緩和、疾患再発の減少および寛解（部分寛解または完全寛解を問わない）が挙げられる。「治療すること」および「治療」はまた、治療を受けない場合に予想される生存期間と比較して生存期間が長くなることを意味し得る。本明細書で使用する「治療すること」および「治療」はまた、予防的治療を包含する。例えば、初期段階のADを有する対象を本明細書に記載される化合物、抗体、免疫原、核酸または組成物で治療して進行を予防することができる。

【0090】

本明細書で使用する「投与される」という用語は、細胞または対象への治療有効量の開示の化合物または組成物の投与を意味する。

【0091】

本明細書で使用する「有効量」という語句は、所望の結果を得るのに必要な投与回数および期間で効果が得られる量を意味する。対象に投与する場合、有効量は対象の病状、年齢、性別、体重などの因子によって異なり得る。最適な治療反応を得るために投与レジメンを調整し得る。

【0092】

「薬学的に許容される」という用語は、担体、希釈剤または補形剤が、製剤の他の成分と適合性があり、その被投与者に対して実質的に有害でないことを意味する。

【0093】

1つまたは複数の記載される要素を「含む（comprisingまたはincluding）」組成物または方法は、具体的に記載されていない他の要素を含み得る。例えば、抗体を「含む（compriseまたはinclude）」組成物は、抗体を単独で、または他の成分とともに含有し得る。

【0094】

本開示の範囲を理解するにあたって、本明細書で使用する「～よりなる」という用語およびその派生語は、記載される特徴、要素、成分、グループ、整数および/または段階の存在を明記し、また他の記載されていない特徴、要素、成分、グループ、整数および/または段階の存在を排除する、制限的用語であるものとする。

【0095】

本明細書で端点により数値範囲が記載されている場合、その範囲内に含まれる数および端数がいずれも含まれる（例えば、1～5には、1、1.5、2、2.75、3、3.90、4および5が含まれる）。また、数およびその端数はすべて「約」という用語によって修飾されることが考えられることを理解するべきである。さらに、「a」、「an」および「the」は、内容からそうでないことが明らかでない限り、複数形の指示対象を包含することを理解するべきである。「約」という用語は、言及されている数のプラスまたはマイナス0.1～50%、5～50%または10～40%、好ましくは10～20%、より好ましくは10%または15%を意味する。

【0096】

さらに、当業者であれば理解するように、特定のセクションに記載される定義および実施形態は、本明細書に記載される他の実施形態のうちそれらが適しているものに適用可能であるものとする。例えば、以下の節では、本発明の様々な態様がさらに詳細に定義される。そのように定義された各態様は、そうでないことが明記されない限り、1つまたは複

数の他の任意の態様と組み合わせ得る。特に、好ましいまたは有利であると示されている任意の特徴と、好ましいまたは有利であると示されている１つまたは複数の他の任意の特徴とを組み合わせ得る。

【 0 0 9 7 】

冠詞の単数形である「 a 」、「 a n 」および「 t h e 」は、文脈上そうでないことが明らかでない限り、複数の指示物を包含する。例えば、「化合物 (a c o m p o u n d) 」または「少なくとも１つの化合物」という用語は、複数の化合物をその混合物も含め包含し得る。

【 0 0 9 8 】

II . 抗体および核酸

10

本明細書に特定の抗体およびその使用を開示する。

【 0 0 9 9 】

実施例で示すように、シクロ (C G H H Q K G) (配列番号 1 2) を用いて生じさせた抗体は配列が決定され、対応する直鎖状ペプチドより環状化合物と選択的に結合し、モノマーより A ベータオリゴマーと選択的に結合し、かつ / または A D 組織で認識できる斑染色はみられなかった。さらに、前記抗体は A ベータ凝集の伝播を *i n v i t r o* で阻害することができた。

【 0 1 0 0 】

したがって、一態様は、任意選択で融合している軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、重鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含み、軽鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 を含み、前記 C D R のアミノ酸配列が配列：

20

C D R - H 1 G F T F S D Y Y (配列番号 1)

C D R - H 2 I S D G G S Y T (配列番号 2)

C D R - H 3 A R D Y Y G S S S Y T S G F A Y (配列番号 3)

C D R - L 1 Q S L L N S R T R K N Y (配列番号 4)

C D R - L 2 W A S (配列番号 5)

C D R - L 3 K Q S Y N L Y T (配列番号 6)

を含む、抗体を含む。

【 0 1 0 1 】

30

一実施形態では、抗体は、i) 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列；i i) 配列番号 9 と少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % もしくは少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、C D R 配列が配列番号 1、2 および 3 で示される、アミノ酸配列、または i i i) C D R 配列が配列番号 1、2 および 3 で示される保存的に置換されたアミノ酸配列 i) を含む、重鎖可変領域を含む。

【 0 1 0 2 】

別の実施形態では、抗体は、i) 配列番号 1 1 で示されるアミノ酸配列、i i) 配列番号 1 1 と少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % もしくは少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、C D R 配列が配列番号 4、5 および 6 で示される、アミノ酸配列、または i i i) C D R 配列が配列番号 4、5 および 6 で示される、保存的に置換された i) のアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域を含む。

40

【 0 1 0 3 】

別の実施形態では、重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号 8 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされ；かつ / あるいは抗体が、配列番号 1 0 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 0 4 】

別の実施形態では、重鎖可変領域が、配列番号 9 で示されるアミノ酸配列を含むか、これよりなり、かつ / または軽鎖可変領域が、配列番号 1 1 で示されるアミノ酸配列を含むか、これよりなる。

50

【 0 1 0 5 】

別の実施形態では、抗体は、配列番号 1 2 の配列を有する環状ペプチドおよび / またはヒト A ベータオリゴマーとの結合に関して、本明細書に配列番号 1 ~ 6 で記載される C D R 配列を含む抗体と競合する、抗体である。

【 0 1 0 6 】

別の実施形態では、抗体は、配列番号 1 2 の配列を有する環状ペプチドならびに / あるいは配列番号 9 の重鎖可変鎖配列および / または配列番号 1 1 の軽鎖可変領域配列を含む抗体を有するヒト A ベータオリゴマー。

【 0 1 0 7 】

別の態様は、任意選択で融合している軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、重鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含み、軽鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 を含み、前記 C D R のアミノ酸配列が配列：

C D R - H 1 G F T F S D Y Y (配列番号 1)

C D R - H 2 I S D G G S Y T (配列番号 2)

C D R - H 3 A R D Y Y G S N S Y T S G F A Y (配列番号 8 0)

C D R - L 1 Q S L L N S R T R K N Y (配列番号 4)

C D R - L 2 W A S (配列番号 5)

C D R - L 3 K Q S Y N L Y T (配列番号 6)

を含む、立体配座に特異的かつ / または選択的な単離抗体を含む。

【 0 1 0 8 】

一実施形態では、抗体は、i) 配列番号 8 5 で示されるアミノ酸配列 ; i i) 配列番号 8 5 と少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % もしくは少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、C D R 配列が配列番号 1、2 および 8 0 で示される、アミノ酸配列、または i i i) C D R 配列が配列番号 1、2 および 8 0 で示される、保存的に置換されたアミノ酸配列 i) を含む、重鎖可変領域を含む。

【 0 1 0 9 】

別の実施形態では、抗体は、i) 配列番号 8 7 で示されるアミノ酸配列、i i) 配列番号 8 9 と少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % もしくは少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、C D R 配列が配列番号 4、5 および 6 で示される、アミノ酸配列、または i i i) C D R 配列が配列番号 4、5 および 6 で示される、保存的に置換された i) のアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域を含む。

【 0 1 1 0 】

別の実施形態では、重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号 8 4 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされ ; かつ / あるいは抗体が、配列番号 8 6 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 1 1 】

別の実施形態では、重鎖可変領域が、配列番号 8 5 で示されるアミノ酸配列を含むか、これよりなり、かつ / または軽鎖可変領域が、配列番号 8 7 で示されるアミノ酸配列を含むか、これよりなる。

【 0 1 1 2 】

別の実施形態では、抗体は、配列番号 1 2 の配列を有する環状ペプチドおよび / またはヒト A ベータオリゴマーとの結合に関して、本明細書に配列番号 1、2、8 0、4 ~ 6 で記載される C D R 配列を含む抗体と競合する、抗体である。

【 0 1 1 3 】

別の実施形態では、抗体は、配列番号 8 5 の重鎖可変鎖配列および / または配列番号 8 7 の軽鎖可変領域配列を含む抗体とともに、配列番号 1 2 の配列を有する環状ペプチドおよび / またはヒト A ベータオリゴマーと結合する、抗体である。

【 0 1 1 4 】

別の態様は、任意選択で融合している軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、重鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含み、軽鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 を含み、前記 C D R のアミノ酸配列が配列：

C D R - H 1 G F T F S D Y Y (配列番号 1)

C D R - H 2 I S D G G S Y T (配列番号 2)

C D R - H 3 A R D Y Y G S N S Y T S G F A Y (配列番号 8 0)

C D R - L 1 Q S I V H S N G N T Y (配列番号 8 1)

C D R - L 2 K V S (配列番号 8 2)

C D R - L 3 F Q G S H V P L T (配列番号 8 3)

10

を含む、立体配座に特異的かつ／または選択的な単離抗体を含む。

【0115】

一実施形態では、抗体は、i) 配列番号 8 5 で示されるアミノ酸配列；ii) 配列番号 8 5 と少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % もしくは少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、C D R 配列が配列番号 1、2 および 8 0 で示される、アミノ酸配列、または iii) C D R 配列が配列番号 1、2 および 8 0 で示される保存的に置換されたアミノ酸配列 i) を含む、重鎖可変領域を含む。

【0116】

別の実施形態では、抗体は、i) 配列番号 8 9 で示されるアミノ酸配列、ii) 配列番号 8 9 と少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % もしくは少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、C D R 配列が配列番号 8 1、8 2 および 8 3 で示される、アミノ酸配列、または iii) C D R 配列が配列番号 8 1、8 2 および 8 3 で示される保存的に置換された i) のアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域を含む。

20

【0117】

別の実施形態では、重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号 8 4 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされ；かつ／あるいは抗体が、配列番号 8 8 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。

【0118】

別の実施形態では、重鎖可変領域が、配列番号 8 5 で示されるアミノ酸配列を含むか、これよりなり、かつ／または軽鎖可変領域が、配列番号 8 9 で示されるアミノ酸配列を含むか、これよりなる。

30

【0119】

別の実施形態では、抗体は、配列番号 1 2 の配列を有する環状ペプチドおよび／またはヒト A ベータオリゴマーとの結合に関して、本明細書に配列番号 1、2、8 0 ~ 3 で記載される C D R 配列を含む抗体と競合する、抗体である。

【0120】

別の実施形態では、抗体は、配列番号 8 5 の重鎖可変鎖配列および／または配列番号 8 9 の軽鎖可変領域配列を含む抗体とともに、配列番号 1 2 の配列を有する環状ペプチドおよび／またはヒト A ベータオリゴマーと結合する、抗体である。

40

【0121】

一実施形態では、抗体は、任意選択で実施例に記載する条件下で、配列 H H Q K (配列番号 7) を含む直鎖状ペプチドと結合することではなく、任意選択で、直鎖状ペプチドの配列は、抗体を生じさせるのに使用する環状配列の直鎖型である。

【0122】

一実施形態では、抗体は、i n v i v o で存在する A ベータ上のエピトープと特異的に結合し、エピトープは、H H Q K (配列番号 7) またはその一部を含むか、これよりなる。

【0123】

一実施形態では、抗体は、H H Q K (配列番号 7) からなる直鎖状ペプチドと特異的に

50

結合することではなく、かつ／またはこれに対して選択的ではない。本明細書に記載されるように、選択的結合はE L I S Aまたは表面プラズモン共鳴測定を用いて測定することができる。

【0124】

一実施形態では、抗体は、任意選択でシクロ(C G H H Q K G)(配列番号12)とH H Q K(配列番号7)を含む直鎖状ペプチドとを、任意選択で直鎖状C G H H Q K G(配列番号12)との関連で比較して、H H Q K(配列番号7)またはその一部を含む環状化合物と選択的に結合する。例えば、一実施形態では、抗体は、環状立体配座のH H Q K(配列番号7)と選択的に結合し、例えば任意選択で本明細書に記載される方法を用いるE L I S Aまたは表面プラズモン共鳴による測定で、環状立体配座のH H Q K(配列番号7)に対し、対応する直鎖状化合物などの直鎖状化合物のH H Q K(配列番号7)の少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍の選択性を示す。

10

【0125】

一実施形態では、抗体は、エピトープ配列を含む環状化合物と直鎖状ペプチドより選択的に、またはAベータオリゴマーなどのAベータ種とモノマーより選択的に結合する。一実施形態では、環状化合物および／またはAベータオリゴマーに対する選択性は、Aベータモノマーおよび／またはAベータ線維から選択されるAベータ種ならびに／あるいは直鎖状H H Q K(配列番号7)、任意選択で直鎖状C G H H Q K G(配列番号12)の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍選択的である。

20

【0126】

一実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナルの作製については実施例に記載する。

【0127】

モノクローナル抗体を作製するには、本明細書に記載される免疫原で免疫感作した対象から抗体産生細胞(リンパ球)を回収し、標準的な体細胞融合法によりミエローマ細胞と融合し、それにより上記の細胞を不死化してハイブリドーマ細胞を得ることができる。このような技術は当該技術分野で周知である(例えば、K o h l e r およびM i l s t e i nにより最初に開発されたハイブリドーマ技術(N a t u r e 256:495-497(1975))ならびにその他の技術、例えばヒトB細胞ハイブリドーマ技術(K o z b o r ら, I m m u n o l . T o d a y 4:72(1983))、ヒトモノクローナル抗体を作製するE B Vハイブリドーマ技術(C o l e ら, M e t h o d s E n z y m o l , 121:140-67(1986))およびコンビナトリアル抗体ライブラリーのスクリーニング(H u s e ら, S c i e n c e 246:1275(1989)など)。所望のエピトープと特異的に反応する抗体の産生に関してハイブリドーマ細胞を免疫学的にスクリーニングし、モノクローナル抗体を単離することができる。

30

【0128】

特定の抗原または分子に対して反応性の特異的抗体または抗体フラグメントはまた、細胞表面成分とともに細菌内で発現する免疫グロブリン遺伝子またはその一部をコードする発現ライブラリーをスクリーニングすることにより作製し得る。例えば、ファージ発現ライブラリーを用いて、完全F a bフラグメント、V H領域およびF V領域を細菌内で発現させることができる(例えば、W a r d e t a l . , N a t u r e 41:544-546(1989); H u s e e t a l . , S c i e n c e 246:1275-1281(1989); およびM c C a f f e r t y e t a l . , N a t u r e 348:552-554(1990)を参照されたい)。

40

【0129】

一実施形態では、抗体はヒト化抗体である。実施例で示すように、特異的ヒト化抗体が

50

記載されている。

【0130】

非ヒト種からの抗体のヒト化については文献に十分に記載されている。例えば、欧州特許第0239400号(B1)ならびにCarterおよびMerchant 1997(全体が参照により本明細書に組み込まれるCurr Opin Biotechnol 8, 449-454, 1997)を参照されたい。ヒト化抗体はまた、商業的に容易に入手できる(例えば、イギリス、ミドルセックス、トゥイッケナム、ホーリーロード2番のScotgen Limited社)。

【0131】

ヒト化型のげっ歯類抗体は、CDR移植(Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988)によって容易に作製される。この方法では、げっ歯類モノクローナル抗体の抗原結合部位を含む6つのCDRループと、対応するヒトフレームワーク領域とを結合させる。CDR移植では、フレームワーク領域のアミノ酸が抗原認識に影響を及ぼし得ることから、親和性が低下した抗体が得られることが多い(FooteおよびWinter, J Mol Biol, 224:487-499, 1992)。抗体の親和性を維持するには多くの場合、部位特異的変異誘発またはその他の組換え技術により特定のフレームワーク残基を置き換える必要があり、コンピュータによる抗原結合部位のモデル化を援用することもある(Coet al., J Immunol, 152:2968-2976, 1994)。

【0132】

ヒト化型の抗体は任意選択で、リサーフィング(resurfacing)(Pedersen et al., J Mol Biol, 235:959-973, 1994)によって得られる。この方法では、げっ歯類抗体の表面残基のみをヒト化する。

【0133】

一実施形態では、ヒト化抗体は、表2に示されるCDRを含む。

【0134】

具体的なヒト化配列を表4Aおよび4Bに記載する。

【0135】

一態様は、表4Aもしくは4Bに記載される配列を含むか、または表4Aもしくは4Bに示される配列と少なくとも50%の配列同一性を有し、CDRアミノ酸配列がそこに示される通りのものである配列を有する、ヒト化抗体を含む。

【0136】

一実施形態では、ヒト化抗体は、i)配列番号16、18、20、22、24および26のいずれか1つで示されるアミノ酸配列；ii)配列番号16、18、20、22、24および26のいずれか1つと少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%もしくは少なくとも90%の配列同一性を有し、CDR配列が配列番号1、2および3で示される、アミノ酸配列、またはiii)CDR配列が配列番号1、2および3で示される保存的に置換されたアミノ酸配列i)を含む、重鎖可変領域を含む。

【0137】

別の実施形態では、抗体は、i)配列番号30、32、34、36、38および40のいずれか1つで示されるアミノ酸配列、ii)配列番号30、32、34、36、38および40のいずれか1つと少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%もしくは少なくとも90%の配列同一性を有し、CDR配列が配列番号4、5および6で示される、アミノ酸配列、またはiii)CDR配列が配列番号4、5および6で示される、保存的に置換されたi)のアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域を含む。

【0138】

別の実施形態では、重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号15、17、19、21、23および25のいずれか1つで示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型も

10

20

30

40

50

しくはコドン最適化型によってコードされ；かつ／あるいは抗体が、配列番号 29、31、33、35、37 および 39 のいずれか 1 つで示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。

【0139】

別の実施形態では、重鎖可変領域が、配列番号 16、18、20、22、24 および 26 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列を含むか、これよりなり、かつ／または軽鎖可変領域が、配列番号 30、32、34、36、38 および 40 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列を含むか、これよりなる。

【0140】

別の実施形態では、抗体は、配列番号 12 の配列を有する環状ペプチドおよび／またはヒト A ベータ、任意選択でヒト A ベータオリゴマーとの結合に関して、表 4 A に示される重鎖配列を含み、任意選択で表 4 A に示される軽鎖配列を含む抗体と競合する、抗体である。

【0141】

別の実施形態では、抗体は、配列番号 12 の配列を有する環状ペプチドおよび／またはヒト A ベータ、任意選択でヒト A ベータオリゴマーとの結合に関して、配列番号 16、18、20、22、24 および 26 のいずれか 1 つの重鎖可変鎖配列および／または配列番号 30、32、34、36、38 および 40 のいずれか 1 つで示される軽鎖可変領域配列を含む抗体と競合する、抗体である。

【0142】

一実施形態では、抗体は、配列番号 16 と 30；配列番号 18 と 32；配列番号 20 と 34；配列番号 22 と 36；配列番号 24 と 38；もしくは配列番号 36 と 40 またはそれと少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80% もしくは少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を有し、CDR が表 2 に示される通りに維持されている配列を含む。

【0143】

別の実施形態では、ヒト化抗体は、表 4 B に示される配列を含む。

【0144】

一実施形態では、ヒト化抗体は、i) 配列番号 44、46、48、50、52 および 54 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列；ii) 配列番号 44、46、48、50、52 および 54 のいずれか 1 つと少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80% もしくは少なくとも 90% の配列同一性を有し、CDR 配列がその下線部分で（配列番号 74～76 でも）示される配列である、アミノ酸配列、または iii) CDR 配列がその下線部分（例えば、配列番号 74～76）で示される配列である、保存的に置換された i) のアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域を含む。

【0145】

別の実施形態では、抗体は、i) 配列番号 58、60、62、64、66 および 68 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列、ii) 配列番号 58、60、62、64、66 および 68 のいずれか 1 つと少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80% もしくは少なくとも 90% の配列同一性を有し、CDR 配列がその下線部分で（配列番号 77～79 でも）示される配列である、アミノ酸配列、または iii) CDR 配列がその下線部分で（配列番号 77～79 でも）示される配列である、保存的に置換された i) のアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域を含む。

【0146】

別の実施形態では、重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号 43、45、47、49、51 および 53 のいずれか 1 つで示されるヌクレオチド配列；またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされ；かつ／あるいは抗体が、配列番号 57、59、61、63、65 および 67 のいずれか 1 つで示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖可変領域のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を含む。

【 0 1 4 7 】

別の実施形態では、重鎖可変領域が、配列番号 4 4、4 6、4 8、5 0、5 2 および 5 4 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列を含むか、これよりなり、かつ / あるいは軽鎖可変領域が、配列番号 5 8、6 0、6 2、6 4、6 6 および 6 8 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列を含むか、これよりなる。

【 0 1 4 8 】

別の実施形態では、抗体は、配列番号 1 2 の配列を有する環状ペプチドおよび / またはヒト A ベータオリゴマーとの結合に関して、表 4 B に示される重鎖配列を含み、任意選択で表 4 B に示される軽鎖配列をさらに含む抗体と競合する、抗体である。

10

【 0 1 4 9 】

別の実施形態では、抗体は、配列番号 1 2 の配列を有する環状ペプチドおよび / またはヒト A ベータオリゴマーとの結合に関して、配列番号 4 4、4 6、4 8、5 0、5 2 および 5 4 のいずれか 1 つの重鎖可変鎖配列ならびに / あるいは配列番号 5 8、6 0、6 2、6 4、6 6 および 6 8 のいずれか 1 つの軽鎖可変領域配列を含む抗体と競合する、抗体である。

【 0 1 5 0 】

一実施形態では、抗体は、配列番号 4 4 と 5 8 ; 配列番号 4 6 と 6 0 ; 配列番号 4 8 と 6 2 ; 配列番号 5 0 と 6 4 ; 配列番号 5 2 と 6 6 ; もしくは配列番号 5 4 と 6 8 またはそれと少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % もしくは少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を有し、C D R がその下線部分で (配列番号 7 4 ~ 7 9 でも) 示される通りに維持されている配列を含む。

20

【 0 1 5 1 】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体は、i) 配列番号 7 0 および / または 7 2 で示されるアミノ酸配列 ; i i) 配列番号 7 0 および / または 7 2 のいずれか 1 つと少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % または少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列 ; あるいは i i i) 保存的に置換されたアミノ酸配列 i) を有する、定常領域を含む。

【 0 1 5 2 】

別の実施形態では、重鎖定常領域のアミノ酸配列が、配列番号 6 9 で示されるヌクレオチド配列 ; またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされ ; かつ / あるいは抗体が、配列番号 7 1 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖定常領域のアミノ酸配列を含む。

30

【 0 1 5 3 】

特定の抗原に特異的なヒト抗体は、ファージディスプレイ戦略 (J e s p e r s e t a l . , B i o / T e c h n o l o g y , 1 2 : 8 9 9 - 9 0 3 , 1 9 9 4) によって特定され得る。1つの方法では、特異的抗原に対するげっ歯類抗体の重鎖をクローン化し、ヒト軽鎖のレパートリーと対にして、繊維状ファージ上に F a b フラグメントとして提示させる。抗原との結合によりファージを選択する。次いで、選択されたヒト軽鎖をヒト重鎖のレパートリーと対にしてファージ上に提示させ、再び抗原との結合によりファージを選択する。その結果は、特定の抗原に特異的なヒト抗体 F a b フラグメントとなる。別の方法では、メンバーがその外表面に様々なヒト抗体フラグメント (F a b または F v) を提示するファージのライブラリーを作製する (D o w e r e t a l . , 国際公開第 9 1 / 1 7 2 7 1 号および M c C a f f e r t y e t a l . , 国際公開第 9 2 / 0 1 0 4 7 号) 。特異的抗原に対するアフィニティー濃縮により、所望の特異性を有する抗体を提示するファージを選択する。いずれかの方法で特定されたヒト F a b フラグメントまたはヒト F v フラグメントを再クローン化して、哺乳動物細胞でヒト抗体として発現させ得る。

40

【 0 1 5 4 】

任意選択で、ヒト抗体をトランスジェニック動物から得る (米国特許第 6 , 1 5 0 , 5

50

84号；同第6，114，598号；および同第5，770，429号）。この方法では、キメラマウスまたは生殖系列変異体マウスの重鎖連結領域（JH）遺伝子を欠失させる。次いで、そのような変異体マウスにヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを導入する。次いで、得られたトランスジェニックマウスは抗原曝露時にヒト抗体の全レパートリーを作製することが可能になる。

【0155】

ヒト化抗体は通常、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fvおよび単ドメイン抗体フラグメントなどの抗原結合フラグメントまたは重鎖と軽鎖がスパーサーにより連結された一本鎖抗体として作製される。また、ヒト抗体またはヒト化抗体はモノマー型またはポリマー型で存在し得る。ヒト化抗体は任意選択で、1本の非ヒト鎖と1本のヒト化鎖（すなわち、1本のヒト化重鎖または軽鎖）とを含む。

10

【0156】

ヒト化抗体またはヒト抗体を含めた抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAまたはIgEを含めた任意のクラスの免疫グロブリン；ならびにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含めた任意のアイソタイプから選択される。ヒト化抗体またはヒト抗体は、1つまたは2つ以上のアイソタイプまたはクラスに由来する配列を含み得る。

【0157】

配列番号74～79で示されるCDRを有する抗体をコドン最適化し、IgG1またはIgG2aアイソタイプにした。配列を表8に示す。

【0158】

一実施形態では、抗体は、表8に記載される配列またはその一部分を有し、その一部分は少なくともCDR、任意選択で重鎖CDRおよび/または軽鎖CDRを含む。一実施形態では、一部分は、表8の配列から選択される配列の可変鎖部分である。

20

【0159】

表8に示される定常領域（例えば、本明細書に記載される配列番号42および56などの他の配列と比較することにより決定可能である）を、配列番号1～6または1、2、80、4～6または1、2、80～83を有するCDRを有する抗体の可変配列と組み合わせることもできる。

【0160】

さらに、本明細書に記載されるエピトープに特異的な抗体は、抗体ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることにより容易に単離される。例えば、任意選択で、本発明の疾患特異的なエピトープを用いることにより抗体ファージライブラリーをスクリーニングして、その疾患特異的なエピトープに特異的な抗体フラグメントを特定する。任意選択で、特定した抗体フラグメントを用いて、本発明の様々な実施形態に有用な様々な組換え抗体を作製する。抗体ファージディスプレイライブラリーは、例えばXoma社（バークレー、カリフォルニア州）から市販されている。抗体ファージライブラリーをスクリーニングする方法は当該技術分野で周知である。

30

【0161】

一実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。一実施形態では、抗体はキメラ抗体、例えば表2に記載されるCDR配列を含むヒト化抗体などである。

40

【0162】

別の実施形態では、表2に挙げるCDR、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を、任意選択で一本鎖抗体の形で含む、抗体が提供される。

【0163】

本明細書の抗体は一本鎖抗体であり得る。記載されるヒト化抗体はまた、一実施形態では一本鎖抗体である。

【0164】

記載したように、配列番号12の配列を有する環状ペプチドおよび/またはヒトAベータオリゴマーとの結合に関して、表2に記載されるCDR配列を含むか、または表3、4A、4Bおよび8のいずれか1つに記載される配列を含む抗体と競合する、抗体も含まれ

50

る。

【0165】

抗体間の競合は、例えば、被験抗体が参照抗体と共通の抗原との特異的結合を阻害する能力を評価するアッセイを用いて判定することができる。競合結合アッセイによる測定で、過剰の被験抗体（例えば、少なくとも2倍、5倍、10倍または20倍）が参照抗体の結合を少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%阻害する場合、被験抗体は参照抗体と競合することになる。

【0166】

一実施形態では、抗体は単離されている。一実施形態では、抗体は外来抗体である。

【0167】

一実施形態では、抗体は、例えば実施例に記載する条件下で、単量体Aペータと結合することはない。一実施形態では、抗体は、例えば実施例に記載する条件下で、例えばAD脳組織において*in situ*で、老人斑のAペータと結合することはない。

【0168】

別の実施形態では、抗体は、天然または合成のオリゴマーAペータと比較して単量体Aペータと選択的に結合することはない。

【0169】

一実施形態では、Aペータオリゴマーは、Aペータの1~42サブユニットを含む。

【0170】

一実施形態では、抗体は、例えば免疫組織化学による測定で、Aペータ線維斑（老人斑とも呼ばれる）染色を示さない。斑染色がみられないことは、Aペータ特異的抗体である6E10および4G8（Biolegend社、サンディエゴ、カリフォルニア州）または2C8（Enzo Life Sciences社、ファーマーシングデール、ニューヨーク州）などの陽性対照ならびにアイソタイプ対照と比較することにより評価することができる。本明細書に記載される抗体は、その抗体が典型的な斑形態染色を示さず、染色のレベルがIgG陰性アイソタイプ対照でみられるレベルの2倍と同等またはそれ以下である場合、Aペータ線維斑染色を示さない、またはほとんど示さないことになる。尺度は、例えば、アイソタイプ対照での染色レベルを1に設定し、6E10での染色レベルを10に設定することができる。抗体は、そのような尺度で染色レベルが2以下である場合、Aペータ線維斑染色を示さないことになる。実施形態では、抗体は、例えば上記の尺度で、最小限のAペータ線維斑染色を示し、そのレベルのスコアは少なくとも3程度または3未満である。

【0171】

さらなる態様は、治療剤、検出可能な標識または細胞毒性物質とコンジュゲートした抗体である。一実施形態では、検出可能な標識は陽電子放出放射性核種である。陽電子放出放射性核種は、例えばPET撮像で使用され得る。

【0172】

さらなる態様は、本明細書に記載される抗体および/またはその結合フラグメントとオリゴマーAペータとを含む、抗体複合体に関する。

【0173】

さらなる態様は、本明細書に記載される抗体またはその一部をコードする、単離核酸である。

【0174】

重鎖もしくは軽鎖またはその一部をコードする核酸、例えば、本明細書に記載されるCDR-H1、CDR-H2および/またはCDR-H3領域を含む重鎖をコードする、または本明細書に記載されるCDR-L1、CDR-L2および/またはCDR-L3領域を含む軽鎖、本明細書に記載される可変鎖をコードする核酸ならびにそのコドン最適化型およびコドン縮重型も提供される。

【0175】

本開示はまた、本明細書に開示される抗体および/またはその結合フラグメントをコー

10

20

30

40

50

ドする核酸配列のバリエーションを提供する。例えば、バリエーションとしては、本明細書に開示される抗体および/またはその結合フラグメントをコードする核酸配列と少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列またはコドン縮重配列もしくはコドン最適化配列が挙げられる。別の実施形態では、バリエーション核酸配列は、表 2、3、4 A、4 B および 8 に示されるいずれかのアミノ酸配列をコードする核酸配列と少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、最も好ましくは少なくとも 80 %、さらにより好ましくは少なくとも 90 %、さらに最も好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性を有する。

【0176】

さらなる態様は、本明細書に記載される抗体をコードする単離核酸、例えば、表 2、3、4 A、4 B および 8 のいずれかに示される核酸である。 10

【0177】

別の態様は、本明細書に開示される核酸を含む発現カセットまたはベクターである。一実施形態では、ベクターは単離ベクターである。

【0178】

ベクターは、抗体および/またはその結合フラグメントの作製あるいは本明細書に記載されるペプチド配列の発現に適したベクターを含めた任意のベクターであり得る。

【0179】

核酸分子を既知の方法で、タンパク質を確実に発現させる適切な発現ベクター内に組み込み得る。考え得る発現ベクターとしては、特に限定されないが、コスミド、プラスミドまたは改変ウイルス（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）が挙げられる。ベクターは使用する宿主細胞と適合性のあるものであるべきである。発現ベクターは「宿主細胞の形質転換に適した」ものであり、これは、その発現ベクターが、本明細書に記載されるエピトープまたは抗体に対応するペプチドをコードする核酸分子を含んでいることを意味する。 20

【0180】

一実施形態では、ベクターは、遺伝子治療により例えば一本鎖抗体を発現させるのに適したものである。ベクターは、例えば神経特異的プロモーターなどを用いて、神経組織での特異的発現に適合させることができる。一実施形態では、ベクターは、IRES を含み、軽鎖可変領域および重鎖可変領域の発現を可能にする。このようなベクターは、in vivo で抗体を送達するのに用いることができる。 30

【0181】

適切な制御配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物または昆虫の遺伝子を含めた様々な供給源に由来するものであり得る。

【0182】

このような制御配列の例としては、転写プロモーターおよび転写エンハンサーまたは RNA ポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含めたりボソーム結合配列が挙げられる。さらに、選択する宿主細胞および用いるベクターに応じてその他の配列、例えば複製起点、追加の DNA 制限部位、エンハンサーおよび転写の誘導性を付与する配列などを発現ベクター内に組み込み得る。 40

【0183】

一実施形態では、制御配列は、神経組織および/または細胞での発現を指令する、または増大させる。

【0184】

一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。

【0185】

組換え発現ベクターはまた、本明細書に記載される抗体またはエピトープペプチドを発現させるためにベクターにより形質転換、感染または形質移入した宿主細胞の選択を容易にするマーカー遺伝子を含み得る。

【0186】

組換え発現ベクターはまた、組換えペプチドの発現または安定性を増大させる；組換えペプチドの溶解度を増大させる；ならびに例えば本明細書に記載されるタグおよび標識を含めたアフィニティー精製のリガンドとして作用することにより標的組換えペプチドの精製を補助する融合部分（すなわち、「融合タンパク質」）をコードする、発現カセットを含み得る。さらに、標的組換えタンパク質にタンパク質分解切断部位を付加して、融合タンパク質精製後に融合部分から組換えタンパク質を分離させ得る。典型的な融合発現ベクターとしては、pGEX（Amrad社、メルボルン、オーストラリア）、pMAL（New England Biolabs社、ビバリー、マサチューセッツ州）およびpRIT5（Pharmacia社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）が挙げられ、これらは組換えタンパク質にそれぞれグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質またはプロテインAを融合させるものである。

10

【0187】

例えばニューロンおよび神経組織内に*in vitro*および*in vivo*の両方で遺伝子を導入するシステムとしては、ウイルス、中でもとりわけ単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）およびレンチウイルスを含めたレトロウイルスに基づくベクターが挙げられる。これに代わる遺伝子送達の方法としては、裸のプラスミドDNAおよびリボソーム-DNA複合体の使用が挙げられる。また別の方法として、DNAをポリカチオン濃縮して脂質に封入し、脳内遺伝子送達により脳内に導入する、AAVプラスミドの使用（Leonera, 米国特許出願公開第2002076394号）がある。

20

【0188】

したがって、別の態様では、本明細書に記載される化合物、免疫原、核酸、ベクターおよび抗体をリボソーム、ナノ粒子およびウイルスタンパク質粒子などの小胞に製剤化し、例えば、本明細書に記載される抗体、化合物、免疫原および核酸を送達し得る。特に、ポリマーソームを含めた合成ポリマー小胞を用いて抗体を投与することができる。

【0189】

別の態様では、本明細書に記載される抗体を発現する、または本明細書に開示されるベクターを含む細胞、任意選択で単離細胞および/または組換え細胞も提供される。

【0190】

組換え細胞は、ポリペプチドの産生に適した、例えば抗体および/またはその結合フラグメントの産生に適した任意の細胞を用いて作製することができる。例えば、核酸（例えば、ベクター）を細胞内に導入するには、用いるベクターに応じて、細胞に形質移入し得る、細胞を形質転換し得る、または細胞に感染させ得る。

30

【0191】

適切な宿主細胞としては、多種多様な原核宿主細胞および真核宿主細胞が挙げられる。例えば、本明細書に記載されるタンパク質を大腸菌（*E. coli*）などの細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルスを用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞で発現させ得る。

【0192】

一実施形態では、細胞は、酵母細胞、植物細胞、蠕虫細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、魚類細胞、爬虫類細胞および哺乳動物細胞から選択される真核細胞である。

40

【0193】

別の実施形態では、哺乳動物細胞は、ミエローマ細胞、脾臓細胞またはハイブリドーマ細胞である。

【0194】

一実施形態では、細胞は神経細胞である。

【0195】

抗体またはペプチドを発現させるのに適した酵母宿主細胞および真菌宿主細胞としては、特に限定されないが、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）、ピキア（*Pichia*）属またはクリベロミセス（*Kluyveromyces*）属およびアスペルギ

50

ルス (*Aspergillus*) 属の様々な種が挙げられる。酵母 (*S. cerevisiae*) で発現させるためのベクターの例としては、pYepSec1、pMFA、pJRY88およびpYES2 (Invitrogen 社、サンディエゴ、カリフォルニア州) が挙げられる。酵母および真菌を形質転換させるプロトコルは当業者に周知である。

【 0 1 9 6 】

適切であり得る哺乳動物細胞としては、特にCOS (例えば、ATCC 番号 CRL 1650 または 1651)、BHK (例えば、ATCC 番号 CRL 6281)、CHO (ATCC 番号 CCL 61)、HeLa (例えば、ATCC 番号 CCL 2)、293 (ATCC 番号 1573) および NS - 1 細胞が挙げられる。哺乳動物細胞での発現を指令するのに適した発現ベクターは一般に、プロモーター (例えば、ポリオーマ、アデノウイルス 2、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス 40 などのウイルス材料由来のもの) ならびにその他の転写制御配列および翻訳制御配列を含む。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8 および pMT2PC が挙げられる。

10

【 0 1 9 7 】

一実施形態では、細胞はハイブリドーマ細胞などの融合細胞であり、ハイブリドーマ細胞は、例えば A ベータモノマーより A ベータオリゴマーと選択的に結合する、直鎖状化合物より環状化合物中に存在するエピトープ配列と選択的に結合する、または斑と結合しない、もしくはほとんど結合しない抗体を含めた、本明細書に記載されるエピトープまたはエピトープ配列に特異的かつおよび / または選択的な抗体を産生する。

【 0 1 9 8 】

20

さらなる態様は、本明細書に記載される CDR のセットを含む抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞系である。

【 0 1 9 9 】

III . 組成物

さらなる態様は、本明細書に記載される核酸、ベクターまたは抗体を含む組成物である。

【 0 2 0 0 】

一実施形態では、組成物は希釈剤を含む。

【 0 2 0 1 】

核酸に適した希釈剤としては、特に限定されないが、水、生理食塩水およびエタノールが挙げられる。

30

【 0 2 0 2 】

抗体もしくはそのフラグメントを含めたポリペプチドおよび / または細胞に適した希釈剤としては、特に限定されないが、生理食塩水、pH 緩衝溶液およびグリセロール溶液あるいはポリペプチドおよび / または細胞を凍結させるのに適した他の溶液が挙げられる。

【 0 2 0 3 】

一実施形態では、組成物は、本明細書に開示される抗体、核酸またはベクターのいずれかを含み、任意選択で薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物である。

【 0 2 0 4 】

本明細書に記載される組成物は、対象に投与することができる薬学的に許容される組成物を調製する既知の方法それ自体により、任意選択でワクチンとして、有効量の活性物質が薬学的に許容される溶媒との混合物の形で組み合わせるように調製することができる。

40

【 0 2 0 5 】

医薬組成物としては、特に限定されないが、凍結乾燥粉末剤または水性もしくは非水性の無菌注射用液剤もしくは無菌注射用懸濁剤が挙げられ、これらは、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および組成物を目的とする被投与者の組織または血液に実質的に適合させる溶質をさらに含有し得る。このような組成物中に存在し得るその他の成分としては、例えば水、界面活性剤 (Tween など)、アルコール、ポリオール、グリセリンおよび植物油が挙げられる。無菌粉末剤、顆粒剤、錠剤または濃縮した液剤もしくは懸濁剤から即時注射液剤および即時注射懸濁剤を調製し得る。組成物は、例えば、特に限定されないが、患者に

50

投与する前に滅菌水または生理食塩水で再構築する凍結乾燥粉末として供給され得る。

【0206】

医薬組成物は薬学的に許容される担体を含み得る。適切な薬学的に許容される担体は、実質的に化学的に不活性かつ無毒性であり医薬組成物の生物活性の効果に干渉しない組成物を含む。適切な医薬担体の例としては、特に限定されないが、水、生理食塩水、グリセロール溶液、エタノール、N - (1 (2 , 3 - ジオレイルオキシ) プロピル) N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、ジオレシルホスファチジル - エタノールアミン (diole syl phospho tidyl - ethanol amine) (D O P E) およびリポソームが挙げられる。このような組成物は、患者に直接投与する形態になるように、治療有効量の化合物を適量の担体とともに含有するべきである。

10

【0207】

組成物は薬学的に許容される塩の形態であり得、このような塩としては、特に限定されないが、遊離アミノ基を用いて形成される塩、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来する塩などおよび遊離カルボキシル基とともに形成される塩、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2 - エチルアルニノエタノール (2 - ethyl arnino ethanol) に由来する塩などが挙げられる。

【0208】

一実施形態では、組成物は、本明細書に記載される抗体を含む。別の実施形態では、組成物は、本明細書に記載される抗体と希釈剤とを含む。一実施形態では、組成物は無菌組成物である。

20

【0209】

さらなる態様は、本明細書に記載される抗体とAベータ、任意選択でAベータオリゴマーとを含む、抗体複合体を含む。複合体は、任意選択でin vitroで、溶液中のもの、または組織中に含まれるものであり得る。

【0210】

IV . キット

さらなる態様は、無菌バイアルなどのバイアルあるいはその他の筐体に入ったi) 抗体および/またはその結合フラグメント、ii) 前記抗体またはその一部の核酸、iii) 本明細書に記載される抗体、核酸または細胞を含む組成物あるいはiv) 本明細書に記載される組換え細胞と、任意選択で参照物質および/またはキットの使用のための説明書とを含む、キットに関する。

30

【0211】

一実施形態では、キットは、収集バイアル、標準緩衝液および検出試薬のうちの1つまたは複数のものをさらに含む。

【0212】

別の実施形態では、キットは、アルツハイマー病またはオリゴマーAベータが関与する病態の診断またはモニタリングのためのものである。

【0213】

V . 方法

本明細書に記載される抗体を作製する方法が含まれる。

40

【0214】

具体的には、本明細書に記載される抗体を用いてHHQK (配列番号7) の立体配座エピトープに選択的な本明細書に記載される抗体を作製する方法であって、対象、任意選択で非ヒト対象に本明細書に記載されるエピトープ配列を含む環状化合物を投与することと、抗体産生細胞または本明細書に記載されるCDRを含む抗体を単離することとを含む、方法が提供される。

【0215】

一実施形態では、この方法は、例えば本明細書に記載される方法を用いて、モノクローナル抗体を作製するためのものである。

50

【 0 2 1 6 】

別の実施形態では、キメラ抗体またはその結合フラグメントを作製する方法が提供され、この方法は、組換え技術を用いて、本明細書に記載される抗体（重鎖および／または軽鎖）の可変領域をコードする核酸を任意選択でFc部分を有するか有さないヒト抗体定常ドメイン（例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4）をコードする核酸を含むベクターにサブクローニングし、キメラ抗体ベクターを作製することと；キメラ抗体ベクターを細胞内で発現させることと；抗体を単離することとを含む。一実施形態では、キメラはマウスヒトキメラである。

【 0 2 1 7 】

一実施形態では、この方法は、例えば本明細書に記載される方法を用いて、ヒト化抗体を作製するためのものである。一実施形態では、この方法は、キメラ中間体を作製することを含む。キメラ中間体の可変領域に例えば変異を誘発して、CDR領域外部の1つまたは複数のアミノ酸変化を導入する。別の実施形態では、本明細書に記載される1つまたは複数のCDRコード配列をヒト抗体スキャフォールドに挿入する。

【 0 2 1 8 】

環状化合物を用いて作製した抗体を本明細書および実施例に記載される通りに選択する。一実施形態では、この方法は、任意選択で本明細書に記載される方法を用いて、直鎖状ペプチドより環状ペプチドと特異的または選択的に結合し、エピトープ配列に特異的であり、オリゴマーと特異的に結合し、かつ／あるいはin situの斑および／または対応する直鎖状ペプチドと結合しない、またはほとんど結合しない抗体を単離することを含む。

【 0 2 1 9 】

さらなる態様では、生体試料がAベータを含むかどうかを検出する方法であって、生体試料と本明細書に記載される抗体とを接触させること、および／または何らかの抗体複合体の存在を検出することを含む、方法が提供される。一実施形態では、この方法は、生体試料がオリゴマーAベータを含むかどうかを検出するためのものである。

【 0 2 2 0 】

一実施形態では、この方法は、

a．抗体：Aベータオリゴマー複合体の生成が可能な条件下で、生体試料と、本明細書のAベータオリゴマーに特異的かつ／または選択的な本明細書に記載される抗体とを接触させること；および

b．何らかの複合体の存在を検出すること

を含み、

検出可能な複合体の存在により、試料がAベータオリゴマーを含有し得ることが示される。

【 0 2 2 1 】

一実施形態では、形成された複合体のレベルを、適切なIg対照または無関係な抗体などの被験抗体と比較する。

【 0 2 2 2 】

一実施形態では、検出を定量化し、生成した複合体の量を測定する。測定は、例えば標準物質に対して相対的なものであり得る。

【 0 2 2 3 】

一実施形態では、測定された量を対照と比較する。

【 0 2 2 4 】

別の実施形態では、この方法は、

(a) 抗体 - 抗原複合体の生成が可能な条件下で、前記対象の被験試料と本明細書に記載される抗体とを接触させることと；

(b) 被験試料中の抗体 - 抗原複合体の量を測定することと；

(c) 被験試料中の抗体 - 抗原複合体の量を対照と比較することと

を含み、

10

20

30

40

50

対照と比較して被験試料中に抗体 - 抗原複合体が検出されることにより、試料が A ベータを含むことが示される。

【 0 2 2 5 】

対照は、試料対照（例えば、A D を有さない対象または軽度、中等度もしくは進行型といった特定の型の A D を有する対象に由来するもの）または対象の A ベータオリゴマーレベルの変化をモニターするための同じ対象由来の以前の試料であり得る。あるいは、対照は、A D の有無を問わない複数の患者から得た値であり得る。

【 0 2 2 6 】

一実施形態では、抗体は、本明細書に記載される C D R 配列を有する抗体である。一実施形態では、抗体はヒト化抗体である。一実施形態では、抗体はキメラ抗体である。

10

【 0 2 2 7 】

一実施形態では、試料は生体試料である。一実施形態では、試料は、脳組織もしくはその抽出物および / または C S F を含む。一実施形態では、試料は、全血、血漿または血清を含む。一実施形態では、試料はヒト対象から採取されるものである。一実施形態では、対象は、A D が疑われる、A D のリスクがある、または A D を有する。

【 0 2 2 8 】

本明細書に記載される抗体を用いて A ベータ：抗体複合体を検出し、それにより試料中に A ベータオリゴマーが存在するかどうかを判定するには、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、E L I S A、S P R および免疫沈降とそれに続く S D S - P A G E 免疫細胞化学などの免疫測定法を含めたいくつかの方法を用いることができる。

20

【 0 2 2 9 】

実施例に記載するように、表面プラズモン共鳴技術を用いて立体配座特異的結合を評価することができる。抗体を標識する、または複合体の抗体に特異的で検出可能に標識した二次抗体を用いる場合、その標識を検出することができる。一般に用いられる試薬としては、蛍光発光抗体および H R P 標識抗体が挙げられる。定量的方法では、発生したシグナルの量を標準物質または対照との比較により測定することができる。測定はまた、相対的なものであり得る。

【 0 2 3 0 】

さらなる態様は、対象または組織中の A ベータのレベルを測定する、またはそのような A ベータを撮像する方法であって、任意選択で、測定または撮像する A ベータがオリゴマー A ベータである、方法を含む。一実施形態では、この方法は、A D を有するリスクがある、A D を有することが疑われる、または A D を有する対象に検出可能な標識とコンジュゲートした本明細書に記載の抗体を投与することと；標識を検出すること、任意選択で標識を定量的に検出することとを含む。標識は、一実施形態では、例えば P E T 撮像に使用することができる陽電子放出放射性核種である。

30

【 0 2 3 1 】

この方法を他の A D または認知障害の検査法と組み合わせてもよい。例えば、C S F 中の S N A P - 2 5 またはシナプス小胞糖タンパク質 2 a (S V G 2 a) などのシナプスタンパク質 (S c i T r a n s l M e d . 2 0 1 6 J u l 2 0 ; 8 (3 4 8) : 3 4 8 r a 9 6 . d o i : 1 0 . 1 1 2 6 / s c i t r a n s l m e d . a a f 6 6 6 7) のレベルを測定することができる。例えば、フロロデオキシグルコース (f l o u r o d e o x y g l u c o s e) P E T (F D G - P E T) をシナプス代謝の間接的測定に用いる。

40

【 0 2 3 2 】

本明細書に記載される抗体を使用する A ベータレベル検出を単独で、または治療に対する反応をモニターする他の方法と組み合わせて用いることができる。

【 0 2 3 3 】

本明細書では、シクロ (C G H H Q K G) (配列番号 1 2) に対して生じさせた、本明細書に記載される C D R のセットを含む抗体が、A ベータオリゴマーと特異的かつ / または選択的に結合することが可能であることを示す。オリゴマー A ベータ種は、A D におい

50

て毒性のある伝播性の種であると考えられる。さらに、図 1 に示し実施例に記載するように、これらの抗体は、オリゴマーに特異的であり、A ベータの凝集および A ベータオリゴマーの伝播を阻害した。したがって、A ベータオリゴマーの伝播を阻害する方法であって、有効量の本明細書に記載の A ベータオリゴマーに特異的または選択的な抗体を、A ベータを発現する細胞もしくは組織と接触させて、または必要とする対象に投与して、A ベータの凝集および / またはオリゴマーの伝播を阻害することを含む、方法も提供される。実施例に記載するように、*in vitro* でアッセイをモニターすることができる。

【0234】

抗体はまた、AD および / またはその他の A ベータアミロイド関連疾患の治療に有用であり得る。例えば、レビー小体型認知症のバリエーションおよび封入体筋炎（筋肉疾患の 1 つ）では、AD と類似した斑がみられ、A ベータが脳アミロイド血管症に關与する凝集体を形成することもある。記載されるように、CDR のセットを含み、本明細書に記載されるヒト化抗体の配列中にある抗体は、*in vitro* で AD の毒素原性の A ベータ種であると考えられるオリゴマー A ベータと結合し、毒素原性 A ベータオリゴマーの形成を阻害する。

10

【0235】

したがって、さらなる態様は、AD および / またはその他の A ベータアミロイド関連疾患を治療する方法であって、必要とする対象に有効量の本明細書に記載の CDR のセットを含む本明細書に記載の抗体、任意選択で表 4 A もしくは 4 B に記載される、または選択的なヒト化抗体を、あるいは必要とする対象に前記抗体を含む医薬組成物を投与することを含む、方法である。他の実施形態では、任意選択で対象に核酸を送達するのに適したベクターを用いて、本明細書に記載される抗体をコードする核酸を対象に投与することもできる。

20

【0236】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体を用いて、治療する対象由来の生体試料の A ベータの存在またはレベルを評価する。一実施形態では、検出可能な A ベータレベル（例えば、*in vitro* で測定される、または撮像により測定される A ベータ抗体複合体）を有する対象を抗体で治療する。

【0237】

抗体、ペプチドおよび核酸を例えば、本明細書に記載される医薬組成物に含ませ、例えば小胞に製剤化して送達を改善することができる。

30

【0238】

HHQK（配列番号 7）を標的とする 1 つまたは複数の抗体を組み合わせて投与することができる。さらに、本明細書に開示される抗体をベータセクレターゼ阻害剤またはコリンエステラーゼ阻害剤などの 1 つまたは複数の他の治療剤とともに投与することができる。

【0239】

また、AD または A ベータアミロイド関連疾患の治療への組成物、抗体、単離ペプチドおよび核酸の使用が提供される。

【0240】

本明細書に記載される組成物、抗体、単離ペプチドおよび核酸、ベクターなどを、例えば、非経口投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、頭蓋内投与、脳室内投与、髄腔内投与、眼窩内投与、点眼、脊髄内投与、槽内投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、エアロゾル投与または経口投与により投与することができる。

40

【0241】

ある特定の実施形態では、医薬組成物を全身投与する。

【0242】

他の実施形態では、医薬組成物を脳または CNS の他の部分に直接投与する。例えば、このような方法は、埋込み型カテーテルおよびポンプの使用を含み、これらはカテーテルを通して注入部位に所定用量を放出するものである。当業者にはさらに、カテーテルは、

50

それを可視化して脳内の所望の投与部位または注入部位に隣接する位置に配置することが可能な外科技術により埋め込まれ得ることが理解されよう。このような技術は、参照により本明細書に組み込まれる、Elsberryらの米国特許第5,814,014号「Techniques of Treating Neurodegenerative Disorders by Brain Infusion」に記載されている。また、米国特許出願公開第20060129126号(KaplitteおよびDuring,「Infusion device and method for infusing material into the brain of a patient」)に記載されているものなどの方法が企図される。脳およびCNSの他の部分に薬物を送達する装置が市販されている(例えば、SynchroMed(登録商標)EL Infusion System; Medtronic社、ミネアポリス、ミネソタ州)。

【0243】

別の実施形態では、血液脳関門を通過する受容体介在型輸送が可能になるよう投与する化合物を修飾するなどの方法を用いて、医薬組成物を脳に投与する。

【0244】

他の実施形態では、本明細書に記載される組成物、抗体、単離ペプチドおよび核酸と、血液脳関門を通過する輸送を促進することが知られている生物学的に活性な分子との共投与が企図される。

【0245】

また、ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物、抗体、単離ペプチドおよび核酸を、血液脳関門を通過させて投与する方法、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7012061号「Method for increasing the permeability of the blood brain barrier」に記載されている、血液脳関門の透過性を一時的に増大させることを目的とする方法などが企図される。

【0246】

上の開示は本願を全体的に説明するものである。以下の具体例を参照することにより、さらに十全に理解することができる。これらの例は単に説明を目的として記載されるものであって、本願の範囲を限定することを意図するものではない。状況によって好都合であることが示唆される、または好都合である場合、形態の変更および均等物による置換が企図される。本明細書では特定の用語が使用されているが、このような用語は説明的な意味で意図されるものであって、限定を目的とするものではない。

【0247】

以下の非限定的な例は本開示を例示するものである。

【0248】

(実施例)

実施例1

抗体作製

方法および材料

免疫原

シクロ(CGHHQKG)(配列番号12)ペプチド(環状および直鎖状の両方)をPC Scientific社(サニーバール、カリフォルニア州、米国)で作製し、トリフルオロ酢酸塩対イオンプロトコルを用いてKLH(免疫感作用)およびBSA(スクリーニング用)とコンジュゲートした。同じ配列CGHHQKG(配列番号12)の直鎖状ペプチドも作製した。ペプチドを脱塩し、MSおよびHPLCにより検査し、純度95%であると判断した。マウスでモノクローナル抗体を作製するため、シクロペプチドをIPAに送った。

【0249】

抗体

キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)と結合したシクロ(CGHHQKG)(

配列番号 12) に対するハイブリドーマおよびモノクローナル抗体を作製した。

【0250】

50日齢雌BALB/cマウス(Charles River Laboratories、ケベック州)を免疫感作した。抗原を含有するアジュバントを含有しない一連の皮下の水溶液注入を19日間にわたって実施した。環状ペプチド-KLHの0.5mg/mL無菌生理食塩水溶液をマウスに1匹当たり100μg注入して免疫感作した。第19日にマウス全4匹を安楽死させ、リンパ球を回収してハイブリドーマ細胞系の作製に供した。

【0251】

融合/ハイブリドーマの発育

10

リンパ球を単離し、ポリエチレングリコール(PEG1500)の存在下でマウスSP2/0ミエローマ細胞と融合させた。HAT選択を用いて融合細胞を培養した。この方法では、半固形メチルセルロース系HAT選択培地を用いてハイブリドーマ選択とクローン化とを1つの段階に組み合わせる。半固形培地上で単一細胞由来のハイブリドーマが増殖してモノクローナルコロニーを形成した。融合事象から10日後、得られたハイブリドーマクローンを96ウェル組織培養プレートに移し、中期対数増殖期に達するまで(5日)HT含有培地で増殖させた。

【0252】

ハイブリドーマの解析

ハイブリドーマの組織培養上清を間接ELISAによりスクリーニング抗原(環状ペプチド-BSA)(一次スクリーニング)で試験し、ヤギ抗IgG/IgM(H&L)-HRP二次抗体を用いてIgG抗体およびIgM抗体の両方について探索し、TMB基質で発色させた。このアッセイで0.2OD超であったクローンを試験の次のラウンドに進めた。陽性培養物をスクリーニング抗原で再試験して分泌を確認し、無関係の抗原(ヒトトランスフェリン)で再試験して非特異的mAbを除去し、偽陽性を除外した。選択されたクローンについて抗体捕捉ELISAによりアイソタイピングを実施して、それらがIgGアイソタイプであるのか、またはIgMアイソタイプであるのかを判定した。また、選択されたクローンを間接ELISAにより他の環状ペプチド-BSAコンジュゲートおよび直鎖状ペプチド-BSAコンジュゲートで試験して、交差反応性およびリンカー反応性を評価した。抗体をSPR解析でもスクリーニングした。

20

30

【0253】

ELISA抗体スクリーニング

ELISAプレートを1)4の炭酸塩コーティング緩衝液(pH9.6)O/N中0.1μg/ウェルのシクロペプチドコンジュゲートBSA100uL/ウェル;2)4の炭酸塩コーティング緩衝液(pH9.6)O/N中0.1μg/ウェルの直鎖状ペプチドコンジュゲートBSA100uL/ウェル;または3)4の炭酸塩コーティング緩衝液(pH9.6)O/N中0.1μg/ウェルの陰性ペプチド100uL/ウェルでコートした。37で振盪しながら1時間インキュベートした100uL/ウェルの一次抗体:ハイブリドーマ上清。二次抗体:37で1時間振盪したPBS-Tween中1:10,000の100uL/ウェルのヤギ抗マウスIgG/IgM(H+L)-HRP。全洗浄段階をPBS-Tweenで30分間実施した。基質TMBを50uL/ウェルで加え、暗所で発色させ、等体積の1M HClで停止させた。

40

【0254】

SPR結合アッセイ

抗体と環状ペプチド、Aベータモノマーおよびオリゴマーとの結合に関するSPR解析
Aベータモノマーおよびオリゴマーの調製:氷冷ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)にAベータ40およびAベータ42ペプチド(California Peptide社、ソルトレイクシティ、ユタ州、米国)を溶かした。一晚蒸発させることによりHFIPを除去し、SpeedVac遠心機で乾燥させた。モノマーの調製には、ペプチド薄膜をDMSOで戻して5mMとし、dH2Oでさらに100μMに希釈し、直ちに使

50

用した。5 mMのDMSOペプチド溶液を無フェノールレッドF12培地 (Life Technologies社、パーリントン、オンタリオ州、カナダ) で希釈して最終濃度100 μ Mにすることによりオリゴマーを調製し、4 で24時間~7日間インキュベートした。

【0255】

環状ペプチド、Aベータモノマーおよびオリゴマー結合のSPR解析：高強度レーザー光および高速光学式走査を用いて結合相互作用をリアルタイムでモニターする分析用バイオセンサーであるMolecular Affinity Screening System (MASS-1) (Sierra Sensors社、ハンブルク、ドイツ) を用いて、全SPR測定を実施した。SPR直接結合アッセイを用いて組織培養上清の一次スクリーニングを実施し、このアッセイでは、High Amine Capacity (HAC) センサーチップ (Sierra Sensors社、ハンブルク、ドイツ) の個々のフローセル上にBSAコンジュゲートペプチド、Aベータ42モノマーおよびAベータ42オリゴマーを共有結合で固定化し、表面に抗体を流した。各試料を希釈し、固定化したペプチドおよびBSA参照の表面に二重反復で注入し、次いで、解離相にのみランニング緩衝液を注入した。解析サイクル毎に、センサーチップ表面を再生した。BSA参照表面およびブランクランニング緩衝液注入から結合を減算することによりセンサグラムを二重参照し、解離相の結合応答報告点を収集した。

10

【0256】

プロテインGで精製したmAbを、SPR間接(捕捉)結合アッセイを用いて二次スクリーニングで解析し、このアッセイでは、プロテインA誘導体化センサーチップ (Xantec Bioanalytics社、デュッセルドルフ、ドイツ) 上に抗体を固定化し、表面にAベータ40モノマー、Aベータ42オリゴマー、プールした可溶性脳抽出物を流した。SPR直接結合アッセイで、HACセンサーチップの個々のフローセル上にAベータ42モノマーおよびAベータ42オリゴマーを共有結合で固定化し、表面に精製mAbを流すことにより抗体の特異性を検証した。

20

【0257】

抗体のシーケンシング

重鎖および軽鎖のCDRおよび可変領域のシーケンシングを実施した。標準的なRT-PCRを用いて、ハイブリドーマが発現した免疫グロブリン遺伝子転写物をハイブリドーマ細胞から得たcDNAから増幅し、標準的なダイターミネーターキャピラリーシーケンシング法を用いてシーケンシングを実施した。

30

【0258】

ヒト化抗体

ヒト化Fab抗体を調製し (Abzena社) シーケンシングを実施した。

【0259】

結果

ELISA試験では、ハイブリドーマクローンが直鎖状ペプチドよりシクロペプチドと優先的に結合することがわかった。シクロ (CGHHQKG) に対して生じさせたクローン301-3、301-11および301-17をさらなる解析に選択した。

40

【0260】

アイソタイピングでは、301-3、301-11および301-17がIgG3サブタイプであることがわかった。

【0261】

抗体が上記の通りに調製した環状ペプチド、直鎖状ペプチド、Aベータ1~42モノマーおよびAベータ1~42オリゴマーと結合する能力を1つまたは複数のアッセイで試験した。

【0262】

ELISAおよびSPRアッセイにより、上記のクローンが直鎖状ペプチドよりシクロペプチドと優先的に結合し (かつ無関係な環状ペプチドとの交差反応を示さず) かつ/ま

50

たはモノマーよりA β オリゴマーと優先的に結合することが確認された。ハイブリドーマ培養上清にSPRを用いた結合解析の結果を表1Aに示す。

【0263】

ハイブリドーマ上清から精製した抗体を固定化し、そのA β オリゴマーとの結合能をSPRによりアッセイした。その結果を表1Bに示す。

【0264】

【表2】

表1A

	環状ペプチド (RU)	直鎖状ペプチド (RU)	Ab42モノマー (RU)	Ab42オリゴマー (RU)
301-11	488	210.5	21.6	75.3
301-3	468.9	60.6	-1.8	56.8

10

【0265】

【表3】

表1B

	Ab42モノマー(RU)	Ab42オリゴマー(RU)
301-3	-23.8	15.5
301-11	-14.1	-2.8
301-17	-27.1	147.8

20

【0266】

抗体の配列

クローン301-3、301-11および301-17抗体のシーケンシングを実施した。301-3および301-11のCDR配列を表2に記載する。301-17のCDRを配列番号74～79に記載する。抗体の重鎖および軽鎖の可変部分のコンセンサスDNA配列およびポリペプチド配列を表3に記載する。

【0267】

表2に示されるように、301-3と301-11の重鎖CDRはCDR1およびCDR2が一致しており、CDR3が1つの位置で異なっていた。

30

【0268】

2つの軽鎖のシーケンシングを実施した。1つの軽鎖は301-11の軽鎖とほぼ一致していた。

【0269】

301-17のヒト化抗体を調製しシーケンシングを実施した(Abzena社、ケンブリッジ、イギリス)。ヒト化抗体の配列を表4A(301-11)および4B(301-17)に記載する。各抗体の配列のCDR配列を太字および下線で示す。

【0270】

40

50

【表 4】

表 2

抗体	鎖	CDR	配列	配列番号
301-11	重鎖	CDR-H1	GFTFSDYY	1
301-11		CDR-H2	ISDGGSYT	2
301-11		CDR-H3	ARDYYGSSSYTSGFAY	3
301-11	軽鎖	CDR-L1	QSLNLSRTRKNY	4
301-11		CDR-L2	WAS	5
301-11		CDR-L3	KQSYNLYT	6
301-03-1	重鎖	CDR-H1	GFTFSDYY	1
301-03-1		CDR-H2	ISDGGSYT	2
301-03-1		CDR-H3	ARDYYGSNSYTSFGAY	80
301-03-1	軽鎖	CDR-L1	QSLNLSRTRKNY	4
301-03-1		CDR-L2	WAS	5
301-03-1		CDR-L3	KQSYNLYT	6
301-03-2	重鎖	CDR-H1	GFTFSDYY	1
301-03-2		CDR-H2	ISDGGSYT	2
301-03-2		CDR-H3	ARDYYGSNSYTSFGAY	80
301-03-2	軽鎖	CDR-L1	QSIVHSNGNTY	81
301-03-2		CDR-L2	KVS	82
301-03-2		CDR-L3	FQGSHVPLT	83

10

20

【 0 2 7 1 】

30

40

50

【表 5】

表 3

可変領域のコンセンサス DNA 配列および翻訳タンパク質配列。相補性決定領域 (CDR) には IMTG/LIGM-DB に従って下線が施されている。

抗体および アイソタイプ	コンセンサス cDNA 配列	ポリペプチド配列
301-11 IgG3 配列番号 8, 9	ATGAACTTTGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTG TTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGA GTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTG AAACTCTCCTGTGCAGCCTCT <u>GGATTCACTTTTCAGT</u> <u>GACTATTAC</u> ATGTATTGGGTTCCGACAGCTCCGGAAA AGAGGCTGGAGTGGGTGCGCAACC <u>ATTAGTGATGGTG</u> <u>GTAGTTACACC</u> TCCTATCCAGACAGTGTGAAGGGAC GATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCT GTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACA GCCATGTATTACTGT <u>GCAAGAGATTACTACGGTAGT</u> <u>AGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTAC</u> TGGGGCCA AGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	MNFGLSLIFLVLV LKGVCQEVQLVES GGGLVKPGGSLKL SCAAS <u>GFTFSDYY</u> MYWVRQTPEKRLE WVAT <u>ISDGGSYTS</u> YPDSVKGRFTISR DNAKNNLYLQMSS LRSEDTAMYIC <u>AR</u> <u>DYYGSSSYTSGF</u> <u>AY</u> WGQGLVTVSA
301-11 カップ 配列番号 10, 11	ATGGATTACAGGCCAGGTTCTTATATTGCTGCTGC TATGGGTATCTGGTACCTGTGGGGACATTGTGATGTC ACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAACAGGAGAG AAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGT <u>CAGAGTCTG</u> <u>CTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTAC</u> TTGGCTTG GTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTG ATCTAC <u>TGGGCATCC</u> ACTAGGGAATCTGGGGTCCCTG ATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC TCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCA GTTTATTACTGC <u>AAGCAATCTTATAATCTGTACAC</u> <u>GTT</u> CGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	MDSQAQVLILLLL WVSGTCGDIVMSQ SPSSLAVSTGEKV TMSCKSS <u>QSLINS</u> <u>RTRKNY</u> LAWYQQK PGQSPKLLIY <u>WAS</u> TRESGVPDRFTGS GSGTDFTLTISSV QAEDLAVYYC <u>KQS</u> <u>YNLYT</u> FGGGTKLE IK
301-03 IgG3 配列番号 84, 85	ATGAACTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTG TTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGA GTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTG AAACTCTCCTGTGCAGCCTCT <u>GGATTCACTTTTCAGT</u> <u>GACTATTAC</u> ATGTATTGGGTTCCGACAGCTCCGGAAA AGAGGCTGGAGTGGGTGCGCAACC <u>ATTAGTGATGGTG</u> <u>GTAGTTACACC</u> TCCTATCCAGACAGTGTGAAGGGGC GATTCACCATCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACAACCT GTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACA GCCATGTATTACTGT <u>GCAAGAGATTACTACGGTAGT</u> <u>AATAGTTACACCTCGGGCTTTGCTTAC</u> TGGGGCCA AGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	MNFGLSLIFLVLV LKGVCQEVQLVES GGGLVKPGGSLKL SCAAS <u>GFTFSDYY</u> MYWVRQTPEKRLE WVAT <u>ISDGGSYTS</u> YPDSVKGRFTISR DSAKNNLYLQMSS LKSEDTAMYIC <u>AR</u> <u>DYYGNSYTSGF</u> <u>AY</u> WGQGLVTVSA
301-03 カップ 1 配列番号	ATGGATTACAGGCCAGGTTCTTATATTGCTGCTGC TATGGGTATCTGGTACCTGTGGGGACATTGTGATGTC ACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAACAGGAGAG AAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGT <u>CAGAGTCTG</u>	MDSQAQVLILLLL WVSGTCGDIVMSQ SPSSLAVSAGEKV TMSCKSS <u>QSLINS</u>

10

20

30

40

50

86, 87	<u>CTCAATAGTAGAACCCGAAAGAACTAC</u> TTGGCTTG GTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTG ATCTAC <u>TGGGCATCC</u> ACTAGGGAATCTGGGGTCCCTG ATCGCTTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCAC TCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCA GTTTATTACTGC <u>AAGCAATCTTATAATCTGTACAC</u> <u>G</u> TTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	<u>RTRKNY</u> LAWYQQK PGQSPKLLIY <u>WAS</u> TRESGVPDRFTGS GSGTDFTLTISSV QAEDLAVYYC <u>KQS</u> <u>YNLYT</u> FGGGTKLE IK
301-03 カップ 2 配列番号 88, 89	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCT GGATTCTGCTTCCAGCAGTGATGTTTTGATGACCCA AACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAA GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT <u>CAGAGCATTGTA</u> <u>CATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTACCTG CAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACA <u>A</u> <u>AAGTTTCC</u> AACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATT TCTGC <u>TTTCAAGGTTACATGTTCTCTCACG</u> TTC GGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	MKLPVRLLVLMFW IPASSSDVLMQT PLSLPVSLGDQAS ISCRSS <u>QSI VHSN</u> <u>GNTY</u> LEWYLQKPG QSPKLLIY <u>KVSNR</u> FSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEA EDLGVYFC <u>FQGS</u> H <u>VPLT</u> FGAGTKLEL K

10

20

【 0 2 7 2 】

【 表 6 】

表 4 A

ヒト化抗 体 301-11	cDNA 配列	ポリペプチド配 列
VH0 配列番号 13, 14	CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTC <u>TGGATTCACTTTTCAGTGACTATTAC</u> ATAAACTGGGTG AAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAG AT <u>ATTAGTGATGGTGGTAGTTACACC</u> TACAATGCTAA GTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTCTGGACACATCC TCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACAT CTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT <u>GCAAGAGATTA</u> <u>CTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTAC</u> TGGGGCGCAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLQQPGAELVK PGASVKMSCKAS <u>G</u> <u>FTFSDYY</u> INWVKQ RPGQGLEWIGD <u>IS</u> <u>DGGSYT</u> YNAKFKS KATLTLDTSSTA YMQLSLSTSEDSA VYYC <u>CARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u> WGAGTT VTVSS
VH1 配列番号 15, 16	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGCTTAAGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTC <u>TGGATTCACTTTTCAGTGACTATTAC</u> ATAAACTGGGTG AAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAG AT <u>ATTAGTGATGGTGGTAGTTACACC</u> TACAATGCTAA GTTCAAGAGCAGAGCCACACTGACTCTGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACAT CTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT <u>GCAAGAGATTA</u> <u>CTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTAC</u> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAELKK PGASVKMSCKAS <u>G</u> <u>FTFSDYY</u> INWVKQ RPGQGLEWIGD <u>IS</u> <u>DGGSYT</u> YNAKFKS RATLTLDTSISTA YMQLSLSTSEDSA VYYC <u>CARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u> WGQGT VTVSS
VH2 配列番号	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTC <u>TGGATTCACTTTTCAGTGACTATTAC</u> ATAAACTGGGTG	QVQLVQSGAEVKK PGASVKMSCKAS <u>G</u> <u>FTFSDYY</u> INWVKQ

30

40

50

17, 18	AAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAG AT <u>ATTAGTGATGGTGGTAGTTACACCT</u> TACAATGCTAA GTTCAAGAGCAGAGCCACACTGACTCTGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGAT CTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>GCAAGAGATTA</u> <u>CTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTAC</u> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	RPGQGLEWIGD <u>IS</u> <u>DGGSYTY</u> NAKFKS RATLTLDTSISTA YMESSLRSED VYYC <u>ARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u> WGQGT VTVSS
VH3 配列番号 19, 20	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTC <u>TGGATTCACTTTT</u> CAGTGACTATTACATAAACTGGGTG CGACAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAG AT <u>ATTAGTGATGGTGGTAGTTACACCT</u> TACAATGCTAA GTTCAAGAGCAGAGCCACACTGACTCTGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGAT CTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>GCAAGAGATTA</u> <u>CTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTAC</u> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKAS <u>G</u> <u>FTFSDYY</u> INWVRQ RPGQGLEWIGD <u>IS</u> <u>DGGSYTY</u> NAKFKS RATLTLDTSISTA YMESSLRSED VYYC <u>ARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u> WGQGT VTVSS
VH4 配列番号 21, 22	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTC <u>TGGATTCACTTTT</u> CAGTGACTATTACATAAACTGGGTG CGACAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAG AT <u>ATTAGTGATGGTGGTAGTTACACCT</u> TACAATGCTAA GTTCAAGAGCAGAGTCACACTGACTCTGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGAT CTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>GCAAGAGATTA</u> <u>CTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTAC</u> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKAS <u>G</u> <u>FTFSDYY</u> INWVRQ RPGQGLEWIGD <u>IS</u> <u>DGGSYTY</u> NAKFKS RATLTLDTSISTA YMESSLRSED VYYC <u>ARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u> WGQGT VTVSS
VH5 配列番号 23, 24	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTC <u>TGGATTCACTTTT</u> CAGTGACTATTACATAAACTGGGTG CGACAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAG AT <u>ATTAGTGATGGTGGTAGTTACACCT</u> TACAATGCTAA GTTCAAGAGCAGAGTCACACTGACTAGGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGAT CTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>GCAAGAGATTA</u> <u>CTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTAC</u> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKAS <u>G</u> <u>FTFSDYY</u> INWVRQ RPGQGLEWMD <u>IS</u> <u>DGGSYTY</u> NAKFKS RATLTLDTSISTA YMESSLRSED VYYC <u>ARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u> WGQGT VTVSS
VH6 配列番号 25, 26	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTC <u>TGGATTCACTTTT</u> CAGTGACTATTACATAAACTGGGTG CGACAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAG AT <u>ATTAGTGATGGTGGTAGTTACACCT</u> TACAATGCTAA GTTCCAGGGCAGAGTCACAATGACTAGGGACACATCC ATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGAT CTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>GCAAGAGATTA</u> <u>CTACGGTAGTAGTAGCTACACCTCGGGCTTTGCTTAC</u> TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKAS <u>G</u> <u>FTFSDYY</u> INWVRQ RPGQGLEWMD <u>IS</u> <u>DGGSYTY</u> NAKFQ RATLTLDTSISTA YMESSLRSED VYYC <u>ARDYYGSSS</u> <u>YTSGFAY</u> WGQGT VTVSS

10

20

30

40

50

VK0 配列番号 27, 28	GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTG TCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAAC</u> <u>TACT</u> TTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTC CAAAGCTCCTGATCTAC <u>TGGGCATCCA</u> ACCGATTTTC TGGGGTCCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGG ACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG AGGATCTGGGAGTTTATTACTGC <u>AAGCAATCTTATAA</u> <u>TCTGTACACG</u> TTTGGCAGCGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVLMQTPLSLPV SLGDQASISCRSS <u>QSLNSRTRKNYL</u> EWYLQKPGQSPKL LIY <u>WAS</u> NRFSGVP DRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDLGV YYC <u>KQSYNLYT</u> FG SGTKLEIK
VK1 配列番号 29, 30	GATGTTTTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAAC</u> <u>TACT</u> TTAGAATGGTTTCAGCAGAAACCAGGCCAGTCTC CAAGGCGCCTGATCTAC <u>TGGGCATCCA</u> ACCGATTTTC TGGGGTCCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGG ACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG AGGATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>AAGCAATCTTATAA</u> <u>TCTGTACACG</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVLMQSPSLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSLNSRTRKNYL</u> EWFQKPGQSPRR LIY <u>WAS</u> NRFSGVP DRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGV YYC <u>KQSYNLYT</u> FG QGTKLEIK
VK2 配列番号 31, 32	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAAC</u> <u>TACT</u> TTAGAATGGTTTCAGCAGAAACCAGGCCAGTCTC CAAGGCGCCTGATCTAC <u>TGGGCATCCA</u> ACCGATTTTC TGGGGTCCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGG ACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG AGGATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>AAGCAATCTTATAA</u> <u>TCTGTACACG</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVVMQSPSLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSLNSRTRKNYL</u> EWFQKPGQSPRR LIY <u>WAS</u> NRFSGVP DRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGV YYC <u>KQSYNLYT</u> FG QGTKLEIK
VK3 配列番号 33, 34	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAAC</u> <u>TACT</u> TTAGAATGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCTC CAAGGCGCCTGATCTAC <u>TGGGCATCCA</u> ACCGATTTTC TGGGGTCCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGG ACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG AGGATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>AAGCAATCTTATAA</u> <u>TCTGTACACG</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVVMQSPSLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSLNSRTRKNYL</u> EWFQKPGQSPRR LIY <u>WAS</u> NRFSGVP DRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGV YYC <u>KQSYNLYT</u> FG QGTKLEIK
VK4 配列番号 35, 36	GATGTTCTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAAC</u> <u>TACT</u> TTAGAATGGTACCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTC CAAAGCTGCTGATCTAC <u>TGGGCATCCA</u> ACCGATTTTC TGGGGTCCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGG ACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG AGGATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>AAGCAATCTTATAA</u>	DVLMQSPSLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSLNSRTRKNYL</u> EWYLQKPGQSPKL LIY <u>WAS</u> NRFSGVP DRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGV YYC <u>KQSYNLYT</u> FG

10

20

30

40

	<u>TCTGTACACG</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	QGTKLEIK
VK5 配列番号 37, 38	GATGTTCTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATC TAGT <u>CAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAAC</u> <u>TACT</u> TTAGAATGGTACCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCTC CAAGGCTGCTGATCTAC <u>TGGGCATCCA</u> ACCGATTTC TGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGG ACAGATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG AGGATGTTGGAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAA <u>TCTGTACACG</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVLMTQSPLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSLNSRTRK</u> NYL EWYQQRPGQSPRL LIY <u>WASN</u> RFGVP DRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGV YYC <u>KQSYN</u> LYTFG QGTKLEIK
VK6 配列番号 39, 40	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGCAGATC TAGT <u>CAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAAC</u> <u>TACT</u> TTAGAATGGTACCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCTC CAAGGCTGCTGATCTAC <u>TGGGCATCCA</u> ACCGATTTC TGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGG ACAGATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG AGGATGTTGGAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAA <u>TCTGTACACG</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVVMTQSPLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSLNSRTRK</u> NYL EWYQQRPGQSPRL LIY <u>WASN</u> RFGVP DRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGV YYC <u>KQSYN</u> LYTFG QGTKLEIK

10

20

【0273】

【表7】

表4B

ヒト化抗体	cDNA 配列	ポリペプチド配列
301-17 VH0 配列番号 41, 42 (マウス)	CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCT TGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCT GCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGCTTCACCAGCTAC</u> <u>TGG</u> ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACA AGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>GTGCATCCTG</u> <u>G</u> TAGAGGCGTGTCACAATACAATGCTAAGTTC AAGAGCAAGGCCACACTGACTCTGGACACATC CTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCC TGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTT</u> <u>TGACGTC</u> TGGGGCGCAGGCACCACGGTCACCG TCTCCTCA	QVQLQQPGAELVK PGASVKMSCKAS <u>G</u> <u>YSFTSYW</u> INWVKQ RPGQGLEWIGDVH <u>PGRGVST</u> YNAKFK SKATLTLDTSST AYMQLSSLTSEDS AVYYC <u>SRSHGNTY</u> <u>WFEDV</u> WGAGTTVT VSS
VH1 配列番号 43, 44	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGCT TAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCT GCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGCTTCACCAGCTAC</u> <u>TGG</u> ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACA AGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>GTGCATCCTG</u> <u>G</u> TAGAGGCGTGTCACAATACAATGCTAAGTTC	QVQLVQSGAELKK PGASVKMSCKAS <u>G</u> <u>YSFTSYW</u> INWVKQ RPGQGLEWIGDVH <u>PGRGVST</u> YNAKFK SRATLTLDTSIST

30

40

50

	AAGAGCAGAGCCACACTGACTCTGGACACATC CATAAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCC TGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTT</u> <u>TGACGTC</u> TGGGGCCAAAGGCACCACGGTCACCG TCTCCTCA	AYMQLSSLTSEDS AVYYC <u>SRSHGNTY</u> <u>WFFDV</u> WGQGTTVT VSS
VH2 配列番号 45, 46	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGT GAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCT GCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGCTTCACCAGCTAC</u> <u>TGG</u> ATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACA AGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>GTGCATCCTG</u> <u>GTAGAGGCGTGTCACACA</u> TACAATGCTAAGTTC AAGAGCAGAGCCACACTGACTCTGGACACATC CATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCC TGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTT</u> <u>TGACGTC</u> TGGGGCCAAAGGCACCACGGTCACCG TCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKK PGASVKMSCKAS <u>G</u> <u>YSFTSYW</u> INWVKQ RPGQGLEWIGD <u>VH</u> <u>PGRGVST</u> YNAKFK SRATLTLDTSIST AYMELSSLRSEDT AVYYC <u>SRSHGNTY</u> <u>WFFDV</u> WGQGTTVT VSS
VH3 配列番号 47, 48	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGT GAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGCTTCACCAGCTAC</u> <u>TGG</u> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGGACA AGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>GTGCATCCTG</u> <u>GTAGAGGCGTGTCACACA</u> TACAATGCTAAGTTC AAGAGCAGAGCCACACTGACTCTGGACACATC CATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCC TGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTT</u> <u>TGACGTC</u> TGGGGCCAAAGGCACCACGGTCACCG TCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCCKAS <u>G</u> <u>YSFTSYW</u> INWVRQ RPGQGLEWIGD <u>VH</u> <u>PGRGVST</u> YNAKFK SRATLTLDTSIST AYMELSSLRSEDT AVYYC <u>SRSHGNTY</u> <u>WFFDV</u> WGQGTTVT VSS
VH4 配列番号 49, 50	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGT GAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGCTTCACCAGCTAC</u> <u>TGG</u> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGGACA AGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>GTGCATCCTG</u> <u>GTAGAGGCGTGTCACACA</u> TACAATGCTAAGTTC AAGAGCAGAGTCACACTGACTCTGGACACATC CATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCC TGAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAGATCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTT</u> <u>TGACGTC</u> TGGGGCCAAAGGCACCACGGTCACCG TCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCCKAS <u>G</u> <u>YSFTSYW</u> INWVRQ RPGQGLEWIGD <u>VH</u> <u>PGRGVST</u> YNAKFK SRVTLTLDTSIST AYMELSSLRSEDT AVYYC <u>SRSHGNTY</u> <u>WFFDV</u> WGQGTTVT VSS
VH5 配列番号 51, 52	CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGT GAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCTTCT <u>GGCTACAGCTTCACCAGCTAC</u> <u>TGG</u> ATAAACTGGGTGCGACAGAGGCCTGGACA AGGCCTTGAGTGGATTGGAGAT <u>GTGCATCCTG</u> <u>GTAGAGGCGTGTCACACA</u> TACAATGCTAAGTTC	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCCKAS <u>G</u> <u>YSFTSYW</u> INWVRQ RPGQGLEWMD <u>VH</u> <u>PGRGVST</u> YNAKFK SRVTLTRDTSIST

10

20

30

40

50

	AAGAGCAGAGTCACACTGACTAGGGACACATC CATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCT GAGATCTGAGGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAGA</u> <u>TCCCATGGTAACACCTACTGGTTTTTTGACGTC</u> TGGG GCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	AYMELSSSLRSED AVYYC <u>SRSHGNTY</u> <u>WFFDV</u> WGQGT VSS
VH6 配列番号 53, 54	CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTC T <u>GGCTACAGCTTCACCAGCTACTGG</u> ATAAACTGGGTG CGACAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATGGGAG AT <u>GTGCATCCTGGTAGAGGCGTGCCACA</u> TACAATGC TAAGTTCCAGGGCAGAGTCACAATGACTAGGGACACA TCCATAAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGA GATCTGGAGACACGGCGGTCTATTACTGT <u>AGCAGATC</u> <u>CCATGGTAACACCTACTGGTTTTTTGACGTC</u> TGGGGC CAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKKAS <u>G</u> <u>YSFTSYW</u> INWVRQ RPGQGLEWMGD <u>VH</u> <u>PGRGVST</u> YNAKFQ GRVTMTRDTSIST AYMELSSSLRSED AVYYC <u>SRSHGNTY</u> <u>WFFDV</u> WGQGT VSS
VK0 配列番号 55, 56 (マウス)	GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTG TCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAA AGCTCCTGATCTAC <u>AAAGTTTCC</u> AACCGATTTTCTGG GGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACA GATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATCTGGGAGTTTATTACTGC <u>TTTCAAGGTTACATGT</u> <u>TCCTTTCACT</u> TTTGGCAGCGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVLMQTPLSLPV SLGDQASISCRSS <u>QSIVHSNGNTYLE</u> WYLQKPGQSPKLL IY <u>KVSN</u> RFSGVDP RFSGSGSGTDFTL KISRVEADLGVI YC <u>FOGSHVPFT</u> FG SGTKLEIK
VK1 配列番号 57, 58	GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCTTGAGACAGCGGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTTTTAGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAA GGCGCCTGATCTAC <u>AAAGTTTCC</u> AACCGATTTTCTGG GGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACA GATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>TTTCAAGGTTACATGT</u> <u>TCCTTTCACT</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVLMQSPSLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSIVHSNGNTYLE</u> WFQKPGQSPRRL IY <u>KVSN</u> RFSGVDP RFSGSGSGTDFTL KISRVEADVGVY YC <u>FOGSHVPFT</u> FG QGTKLEIK
VK2 配列番号 59, 60	GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCTTGAGACAGCGGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTTTTAGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAA GGCGCCTGATCTAC <u>AAAGTTTCC</u> AACCGATTTTCTGG GGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACA GATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>TTTCAAGGTTACATGT</u> <u>TCCTTTCACT</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVVMQSPSLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSIVHSNGNTYLE</u> WFQKPGQSPRRL IY <u>KVSN</u> RFSGVDP RFSGSGSGTDFTL KISRVEADVGVY YC <u>FOGSHVPFT</u> FG QGTKLEIK
VK3 配列番号	GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCTTGAGACAGCGGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u>	DVVMQSPSLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSIVHSNGNTYLE</u>

10

20

30

40

61, 62	TTAGAATGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAA GGCGCCTGATCTAC <u>AAAGTTTCC</u> AACCGATTTTCTGG GGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACA GATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>TTTCAAGGTTACATGT</u> <u>TCCTTTCACT</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	WFQQRPGQSPRRL IY <u>KVS</u> NRFSGVDP RFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVY YC <u>FQGSHPFT</u> FG QGTKLEIK
VK4 配列番号 63, 64	GATGTTCTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTACCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAA AGCTGCTGATCTAC <u>AAAGTTTCC</u> AACCGATTTTCTGG GGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACA GATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>TTTCAAGGTTACATGT</u> <u>TCCTTTCACT</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVLMTQSPLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSIVHSNGNTYLE</u> WYLQRPQGSPKLL IY <u>KVS</u> NRFSGVDP RFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVY YC <u>FQGSHPFT</u> FG QGTKLEIK
VK5 配列番号 65, 66	GATGTTCTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTACCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAA GGCTGCTGATCTAC <u>AAAGTTTCC</u> AACCGATTTTCTGG GGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACA GATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>TTTCAAGGTTACATGT</u> <u>TCCTTTCACT</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVLMTQSPLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSIVHSNGNTYLE</u> WYQQRPGQSPRLL IY <u>KVS</u> NRFSGVDP RFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVY YC <u>FQGSHPFT</u> FG QGTKLEIK
VK6 配列番号 67, 68	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCTTGAGATC TAGT <u>CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTAT</u> TTAGAATGGTACCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAA GGCTGCTGATCTAC <u>AAAGTTTCC</u> AACCGATTTTCTGG GGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACA GATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATGTTGGAGTTTATTACTGC <u>TTTCAAGGTTACATGT</u> <u>TCCTTTCACT</u> TTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATC AAA	DVVMTQSPLSLPV TLGQPASISCRSS <u>QSIVHSNGNTYLE</u> WYQQRPGQSPRLL IY <u>KVS</u> NRFSGVDP RFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVY YC <u>FQGSHPFT</u> FG QGTKLEIK

10

20

30

* V H 0 および V K 0 は比較のために記載したマウス配列である。

【 0 2 7 4 】

40

【 表 8 】

表 5

定常領域	cDNA 配列	ポリペプチド配列
IgG4 重鎖 配列番号 69, 70	GCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGC CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACT	ASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSL

50

	CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAATGTAGATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGA GTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCA CCTGAGTTCTTG GGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTC CCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAG GAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATG GCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTC CTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC AGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT CTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA	SSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPKPSN TKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGG PSVFLFPKPKDT LMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRV VSVLTLVHQDWLN GKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFL YSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSL GK
カップ 配列番号 71, 72	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG	RTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKST YSLSSLTLSKAD YEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNR GEC

10

20

30

【 0 2 7 5 】

実施例 2

免疫組織化学

固定も抗原回復も実施していない凍結ヒト脳切片に免疫組織化学を実施した。加湿チャンバ内で無血清タンパク質ブロッキング試薬（Dako Canada社、ミシサガ、オンタリオ州、カナダ）と1時間インキュベートすることにより非特異的染色をブロックした。免疫染色には以下の一次抗体を使用した：マウスモノクローナルアイソタイプ対照IgG1、IgG2aおよびIgG2bならびに抗アミロイドβ6E10（以上、Biologicals社から購入）ならびに精製抗体301-11および301-17。いずれの抗体も1μg/mLで使用した。切片を室温で1時間インキュベートし、TBS-Tで3×5分間洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした抗マウスIgG（1：1000）を切片に添加し、45分間インキュベートし、次いでTBS-Tで3×5分間洗浄した。DAB発色試薬（Vector Laboratories社、バーリントン、オンタリオ州、カナダ）を加え、バックグラウンド染色に対して所望の標的レベルに達したとき、切片を蒸留水でリンスした。切片をマイヤーのヘマトキシリンで対比染色し、脱水し、カバーガラスをかけた。スライドを光学顕微鏡（Zeiss Axiovert 200M、Carl Zeiss Canada社、トロント、オンタリオ州、カナダ）下で検査し、Leica社のDC300デジタルカメラおよびソフトウェア（Leica

40

50

Microsystems Canada社、リッチモンドヒル、オンタリオ州)を用いて代表的な画像を20倍および40倍の倍率でキャプチャーした。Adobe PhotoshopでLevels Auto Correctionを用いて画像を最適化した。
【0276】

脳抽出物:UBCのClinical Research Ethics Board (C04-0595)から承認を受け、メリーランド大学のBrain and Tissue Bankからヒト脳組織を入手した。ADの可能性があるという臨床診断はNINCDS-ADRDA基準[5]に基づくものとした。
【0277】

ホモジナイゼーション:ヒト脳組織試料の重量を測定し、次いで、脳組織の最終濃度が20%(w/v)になるよう一定量の新鮮な氷冷TBSおよび無EDTAプロテアーゼインヒビターカクテル(Roche Diagnostics社、ラヴァル、ケベック州、カナダ)に浸漬した。この緩衝液中で機械的プローブホモジナイザーを用いて組織をホモジナイズ(間に30秒の停止を挟んで3×30秒のパルス、いずれも氷上で実施)した。次いで、TBS中でホモジナイズした試料を超遠心分離にかた(70,000×gで90分)。上清を収集し、等分し、-80℃で保管した。BCAタンパク質アッセイ(Pierce Biotechnology社、ロックフォード、イリノイ州、米国)を用いてTBSホモジネートのタンパク質濃度を求めた。

【0278】

抗体6E10を用いて脳抽出物での陽性結合を確認した。

SPR解析:AD患者の脳抽出物4例および同年齢対照の脳抽出物4例をプールし解析した。TBS中でホモジナイズした脳試料には前頭皮質のブロードマン第9野が含まれていた。いずれの実験も、実施例6に記載するように、高強度レーザー光および高速光学式走査を用いて結合相互作用をリアルタイムでモニターする分析用バイオセンサーであるMolecular Affinity Screening System(MASS-1)(Sierra Sensors社、ハンブルク、ドイツ)を用いて実施した。本明細書に記載されるシクロペプチドに対して作製した精製抗体をプロテインA誘導体化センサーチップの別個のフローセル上に捕捉し、表面に希釈試料を180秒間注入し、次いで、緩衝液で120秒間解離を実施し、表面を再生した。マウス対照IgG参照の表面結合およびアッセイ緩衝液の減算により結合応答を二重参照し、異なる試料のグループを比較した。

【0279】

結果

脳抽出物、CSFおよび免疫組織化学

死体健常対照およびADの脳の可溶性脳抽出物、CSFおよび組織試料中での抗体のAβとの結合能を試験し、結果を表6に示す。表6の陽性強度は正符号の数で示されている。

【0280】

抗体301-11および301-17はそれぞれ、対照患者と比較してAD患者の脳ホモジネートおよびCSFで陽性の結合を示した。

【0281】

表6に示されるように、精製抗体は、可溶性脳抽出物およびCSF中で非ADよりADとの優先的な結合を示し、IHCによる斑線維とはあまり結合しなかった。

【0282】

10

20

30

40

【表 9】

表 6：結合特性のまとめ

抗体	オリゴマー／モノマー	脳抽出物AD/非AD	IHC-斑染色（凍結切片脳1630）	CSF
301-3	++	++	-	+
301-11	++	+++	-	++
301-17	++	++	-	+

*採点は、表には示されていない同じ試料カテゴリーの他のクローンに対して相対的なものである。

10

【0283】

実施例 3

A ベータ合成オリゴマーとの結合

A ベータ 42 オリゴマー結合をさらに検証および確認するため、精製抗体をセンサーチップに共有結合で固定化し、次いで、市販の調製済みの安定な A ベータ 42 オリゴマー（1 microM）（SynAging 社、ヴァンドゥーヴル＝レ＝ナンシー、フランス）の表面に注入した。

【0284】

抗体 301 - 3、301 - 11 および 307 - 17 は安定な A ベータ 42 オリゴマー（1 microM）と結合し、結合応答単位（BRU）の平均値はそれぞれ 14.5（301 - 3）、19.3（301 - 11）および 30（301 - 17）であった。比較すると、陰性対照 IgG 1 はオリゴマーと有意に結合することはない（結合の平均値は BRU 2.5）、汎 A β 陽性対照抗体 6E10 は平均 BRU 90 で結合した。

20

【0285】

実施例 4

ホルマリン固定組織での免疫組織化学

抗体 301 - 11、301 - 17 を用いてヒト AD 脳組織切片を評価した。患者はそれまでに、(i) 老人斑および神経原線維濃縮体を示すビルショウスキー銀法、(ii) アミロイドを示すコンゴレッドならびに (iii) 濃縮体を示し老人斑が「神経突起性」であることを確認するタウ免疫組織化学法の 3 部よりなる方法でアルツハイマー病であることが特徴付けられ診断されていた。この組織を用いて、選択したモノクローナル抗体クローンの斑反応性を試験した。脳組織を 10% 緩衝ホルマリンで数日間固定し、Sakura VIP 組織処理装置でパラフィン処理した。組織切片にマイクロ波による抗原回復（AR）を実施するか、または実施せずに、1 μg/ml の抗体で探索した。陽性対照として汎アミロイドベータ反応性抗体 6E10 を選択した抗体クローンとともに含めた。抗体を抗体希釈剤（Ventana 社）で希釈し、OptiView DAB（Ventana 社）で発色させた。Ventana Benchmark XT IHC 染色装置で染色を実施した。Olympus BX45 顕微鏡で画像を取得した。神経病理学の専門知識を有する専門の病理学者が画像を盲検的に解析した。

30

【0286】

下の表 7 に示されるように、固定組織を用いると、被験抗体は老人斑アミロイドの特異的染色が陰性であった。陽性対照として用いた 6E10 抗体は強い斑染色を示した。

40

【0287】

50

【表 10】

表 7

	抗体	老人斑アミロイドの染色
	301-11	陰性
	301-17	陰性
陽性対照	6E10	強い陽性

【0288】

10

実施例 5

組換え IgG1 抗体および IgG2a 抗体

ハイブリドーマ由来 301-17 の CDR をマウス IgG1 または IgG2a の主鎖に移植することにより組換え IgG1 および IgG2a 301-17 構築物を作製した (WuXi Biologics 社)。その配列を表 8 に記載する。

【0289】

【表 11】

表 8-301-17 アイソタイプの重鎖および軽鎖の配列

抗体およびアイソタイプ	cDNA 配列	ポリペプチド配列
301-17 IgG1 配列番号 90, 91	CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAGCTGGTGA AGCCTGGAGCCTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCTC CGGCTACTCCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGGTG AAGCAGAGGCCCGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAG ACGTGCACCCTGGCCGGGGAGTGTCCACCTACAACGC CAAGTTCAAGTCCAAGGCCACCCTGACCCTGGACACC TCCAGCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCTCCCTGA CCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCAGCAGGTC CCACGGCAACACCTACTGGTTTTTTCGACGTGTGGGGC GCCGGAACCACAGTGACCGTGTCTCCGCCAAAACGA CACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGC TGCCCAAACCTAATCCATGGTGACCCTGGGATGCCTG GTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCT GGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTT CCCAGCTGTCTCTGGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGC AGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCG AGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAG CACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGT GGTTGTAAGCCTTGCAATATGTACAGTCCCAGAAGTAT CATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGT GCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTT GTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGT TCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGC TCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACT TTCCGCTCAGTCAGTGAACCTTCCCATCATGCACCAGG ACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAA	QVQLQQPGAELVK PGASVKMSCKASG YSFTSYWINWVKQ RPGQGLEWIGDVH PGRGVSTYNKFK SKATLTLDTSST AYMQLSSLTSEDS AVYYCSRSHGNTY WFFDVWGAGTTVT VSSAKTTPPSVYP LAPGSAAQTNSMV TLGCLVKGYFPEP VTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLESDLY TLSSSVTVPSSPR PSETVTCNVHPA SSTKVDKIVPRD CGCKPCICTVPEV SSVFIFPPKPKDV LTITLTPKVTQV VDISKDDPEVQFS WFDVDEVHTAQT QPREEQFNSTFRS VSELPIMHQDWLN GKEFKCRVNSAAF PAPIEKTISKTKG

20

30

40

50

	CAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGT ACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGA TAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTC CCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGGAATGGGC AGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCAT GAACACGAATGGCTCTTACTTCTGTCTACAGCAAGCTC AATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTT TCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCA CCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAA TGATGA	RPKAPQVYTIPFP KEQMAKDKVSLTC MITDFFPEDITVE WQWNGQPAENYKN TQPIMNNTNGSYFV YSKLNQKSNWEA GNTFTCSVLHEGL HNHHTKSLSHSP GK
301-17 IgG2a 配列番号 92, 93	CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAGCTGGTGA AGCCTGGAGCCTCCGTGAAGATGTCTTGCAAGGCCTC CGGCTACTCCTTACCAGCTACTGGATCAACTGGGTG AAGCAGAGGCCCGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAG ACGTGCACCCTGGCCGGGGAGTGTCCACCTACAACGC CAAGTTCAGTCCAAGGCCACCCTGACCTGGACACC TCCAGCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCTCCCTGA CCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCAGCAGGTC CCACGGCAACACCTACTGGTTTTTCGACGTGTGGGGC GCCGGAACCACAGTGACCGTGTCTCCGCCAAAACAA CAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCCTGTGTGTGG AGATACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTG GTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCT GGAAGTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTT CCCAGCTGTCTGTCAGTCTGACCTCTACACCTCAGC AGCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCC AGTCCATCACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAAGCAG CACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCCC ACAATCAAGCCCTGTCTTCCATGCAAATGCCAGCAC CTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCC TCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGC CCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGG ATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAA CGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGA GAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAAGTCCC TCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGA GTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCG CCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAG TAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCTCCACCAGA AGAAGAGATGACTAAGAAGAACAGGTCACTCTGACCTGC ATGGTACACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGG AGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAA GAACACTGAACAGTCTGACTCTGATGGTTCTTAC TTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACT GGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAAGTGGTCCA CGAGGGTCTGCACAATCACCACAGCTAAGAGCTTC TCCCGGACTCCGGGTAAATGATGA	QVQLQPPGAELVK PGASVKMSCKASG YSFTSYWINWVKQ RPGQGLEWIGDVH PGRGVSTYNAKFK SKATLTLDTSST AYMQLSSLTSEDS AVYYCSRSHGNTY WFFDVWGAGTTVT VSSAKTTAPSVYP LAPVCGDITGSSV TLGLVLKGYFPEP VLTWNSSGLSSG VHTFPAVLQSDLY TLSSSVTVTSSTW PSQSITCNVAHPA SSTKVDKKIEPRG PTIKPCPPCKCPA PNLLGGPSVFIFP PKIKDVLMLSLSP IVTCVVVDVSEDD PDVQISWVFNNE VHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCK VNNKDLPAPIERT ISKPKGSVRAPQV YVLPPEEEMTKK QVTLTCMVTDMP EDIYVEWTNNGKT ELNYKNTEPVLD DGSYFMYSKLRVE KKNWVERNSYSCS VVHEGLHNHHTTK SFSRTPGK

10

20

30

40

301-17 カップ 配列番号 94, 95	GATGTGCTGATGACCCAGACCCCTCTGTCCCTGCCTG TGTCCCTGGGCGATCAGGCCAGCATCTCCTGCAGGTC CTCCCAGTCCATCGTGCACCTCCAACGGCAACACCTAC CTGGAGTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCA AGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGGTTCTCCGG CGTGCCCGATAGGTTCTCCGGATCCGGCTCCGGCACC GACTTTACCCTGAAGATCTCCAGGGTGGAGGCCGAGG ACCTGGGCGTGTACTACTGCTTTTCAGGGCTCCCACGT GCCCTTCACCTTCGGCTCCGGCACCAAGCTGGAGATC AAGCGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCC CACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTC AGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGAC ATCAATGTCAAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGAC AAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAG CAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACG TTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATA CCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTACCCAT TGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTGATGA	DVLMQTPLSLPV SLGDQASISCRSS QSI VHSNGNTYLE WYLQKPGQSPKLL IYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDLG VY YCFQGSHPVFTFG SGTKLEIKRADAA PTVSIFPPSSEQL TSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKID GSERQNGVLNSWT DQDSKDSTYSMSS TLTLTKDEYERHN SYTCEATHKTSTS PIVKSFNRNEC
---------------------------------	--	--

10

20

【0290】

以下に記載するように、301-17 IgG1抗体およびIgG2a抗体の結合特性を試験し、親ハイブリドーマ精製IgG3抗体と比較した。

【0291】

301-17 IgG2aのAbOとのProteOn Biosensor (BioRad社) 結合：組換え301-17 IgG2aおよびハイブリドーマ精製301-17 IgG3を抗マウスIgGまたはアミンカップリングによりProteon GLM Sensorチップ上で捕捉し、AbO結合 (SynAging AbO) を試験した。AbO 3倍希釈物：1 μ M、0.33 μ M、0.11 μ M、37 nM、12.3 nMを使用した。アッセイ緩衝液はPBS-E+Tween 20+2 mg/ml BSAとした。

30

【0292】

結果：

およその動態値は次の通りであった：

ハイブリドーマ：KD = 26.9 nM

IgG2a-301-17抗体：KD = 16.2 ~ 19.5 nM

対照マウスIgGでは結合は検出されなかった。

【0293】

301-17 IgG2aの環状ペプチドエピトープとのProteOn Biosensor (BioRad社) 結合：組換え301-17 IgG2aをProteon GLHバイオセンサーチップにアミンカップリングさせ、BSAとカップリングした配列番号2のシクロペプチドとの結合を試験した。シクロ-BSAの9 nM ~ 111 pMの3倍希釈物を使用した。アッセイ緩衝液をPBS-E+0.05% Tween+10 mg/ml BSAとした。抗体301-17 IgG2aはBSAとコンジュゲートした環状ペプチド (配列番号12) と結合し、KDは約17 pM (3回の試験の平均値) であることがわかった。試験した他の市販のAベータ抗体 (汎Aベータ6E10、Biolegend社) およびウサギ抗Aベータ抗体 (D54D2、Cell Signaling社；ab201060、(abcam社；NBP1-78007、Novus社) では結合が全くまたはほとんど検出されなかった。

40

【0294】

301-17 IgG1のAbOとのMAAS-2結合：組換え301-17 IgG

50

1 およびハイブリドーマ精製 301-17 IgG3 を M A A S - 2 センサーチップ上に固定化し、1 μ M の A b O (S y n A g i n g 社) との結合を試験した。試験条件下では、2 回の試験で組換え IgG1 301-17 抗体の方がハイブリドーマ精製抗体より大きいシグナルが発生した (それぞれ 40 ~ 55 B R U 対 15 ~ 25 B R U)。対照マウス IgG では結合がほとんどまたは全く検出されなかった。

【0295】

301-17 IgG1 の環状ペプチドエピトープとの M A A S - 2 結合 : 組換え 301-17 IgG1 を M A A S - 2 センサーチップ上に固定化し、B S A とカップリングした配列番号 2 のシクロペプチドとの結合を pH 6.5、7.5 または 8.0 で試験した。301-17 IgG1 では、3 種類のいずれの pH 条件下でも等しく高いレベルの結合がみられた (約 400 B R U)。対照マウス IgG、汎 A ベータ 6 E 10 抗体 (B i o l e g e n d 社) とともに、いずれの pH 条件下でも結合がほとんどまたは全く検出されなかった。

10

【0296】

実施例 6

オリゴマー伝播の阻害

チオフラビン T (T h T) 結合アッセイを用いてアミロイドベータ (A β) 凝集に対する抗体の効果を検討することにより、その生物学的機能を *in vitro* で試験した。A β 凝集は、予め形成された小さい A β オリゴマーの核によって誘導され、この核を介して伝播し、単量体 A β から可溶性オリゴマー、次いで不溶性線維への全過程には、同時に増大するベータシート形成が伴う。このことはベンゾチアゾール塩の T h T によってモニターすることができ、T h T がベータシートに富む構造に結合すると、その励起および発光の最大値がそれぞれ 385 nm から 450 nm および 445 nm から 482 nm に遷移し、それにより蛍光が増大する。簡潔に述べれば、A β 1 ~ 42 (B a c h e m A m e r i c a s 社、トーランス、カリフォルニア州) を可溶化し、超音波処理し、トリス - E D T A 緩衝液 (pH 7.4) で希釈し、黒色の 96 ウェルマイクロタイタープレート (G r e i n e r B i o - O n e 社、モンロー、ノースカロライナ州) のウェルに加え、これに等体積のシクロペプチドに対する抗体または無関係のマウス IgG 抗体アイソタイプ対照を加え、A β 1 ~ 42 ペプチドと抗体のモル比を 1 : 5 とした。T h T を加え、プレートを室温で 24 時間インキュベートし、1 時間毎に W a l l a c V i c t o r 3 v 1420 M u l t i l a b e l C o u n t e r (P e r k i n E l m e r 社、ウォルサム、マサチューセッツ州) を用いて T h T 蛍光の測定値 (440 nm で励起、486 nm で発光) を記録した。全ウェルからバックグラウンド緩衝液の蛍光読取り値を減算し、さらに、対応するウェルから抗体単独のウェルの読取り値を減算した。

20

30

【0297】

T h T 蛍光によりモニターした A β 42 凝集は、蛍光が最小である最初の遅滞期、蛍光が急激に増大する対数期および最後に A β 分子種が平衡状態にあり蛍光の増大がみられないプラトー期を特徴とする S 字形を示した。A β 42 と無関係のマウス抗体との共インキュベーションでは、凝集過程に対する有意な効果が全くみられなかった。これとは対照的に、A β 42 と被験抗体との共インキュベーションでは、凝集過程のいずれの期も完全に阻害された。抗体 301-11 で得られた結果を図 1 に示す。

40

【0298】

301-17 および 301-3 でもほぼ同じ結果が得られた。

【0299】

T h T 凝集アッセイは、A D の病理発生に極めて重要な A β 伝播ならびにモノマー、オリゴマー、前原線維および線維からの A β 凝集の *in vivo* の生物物理学的 / 生化学的段階を模倣するものであることから、これらの抗体はこの過程を完全に打ち消す可能性を秘めている。マウス IgG 対照抗体を用いて実施したアイソタイプ対照では阻害がみられなかった。

【0300】

50

実施例 7

毒性阻害アッセイ

抗体による A ベータ 4 2 オリゴマーの毒性阻害をラット一次皮質ニューロンアッセイで試験することができる。

【 0 3 0 1 】

抗体および対照 I g G をそれぞれ 2 m g / m L などの濃度に調節する。様々なモル比の A ベータオリゴマーと抗体を溶媒対照、A ベータオリゴマー単独および神経保護ペプチドのヒューマニン H N G などの陽性対照とともに試験する。

【 0 3 0 2 】

例示的設定を表 9 に示す。

10

【 0 3 0 3 】

室温で 1 0 分間ブレインキュベートした後、培地で体積を 8 4 0 マイクロリットルに調節する。この溶液を 3 7 で 5 分間インキュベートする。次いで、溶液を一次皮質ニューロンに直接添加し、細胞を 2 4 時間インキュベートする。M T T アッセイを用いて細胞生存率を求めることができる。

【 0 3 0 4 】

【表 1 2 】

表 9

AβO / MAB モル比	AβO (μL)	AβO (μM)	AB (μM)	AB (μL)	培地 (μL)	最終体積 (μL)
5/1	1.68	4.2	0.84	12.73	185.6	200
1/1	1.68	4.2	4.20	63.64	134.7	200
1/2	1.68	4.2	8.4	127.27	71.1	200

20

AβO 希釈標準溶液: 2,2 mg/mL - 500 μM

対照溶媒:オリゴマー緩衝液1.68μL+PBS 127.3μL+培地711μL
対照AβO:AβO 1.68μL+PBS 127.3μL+培地711μL
対照HNG:AβO 1.68μL+HNG 8.4μL(最終100nM)+PBS 127.3μL+培地702.6μLCTRL

30

【 0 3 0 5 】

A ベータオリゴマーの不在下では、3 0 1 - 1 7 抗体は単独で神経細胞の生存率に何ら影響を及ぼすことはなかった。A ベータオリゴマーの存在下でインキュベートしたところ、抗体は、試験したいずれのモル濃度比でも A ベータオリゴマー誘導性神経細胞死を阻害した。

【 0 3 0 6 】

40

実施例 8

i n v i v o 毒性阻害アッセイ

抗体による A ベータ 4 2 オリゴマーの毒性阻害をマウス行動試験で i n v i v o で試験することができる。

【 0 3 0 7 】

新奇物体認識 (N O R)

新奇物体認識 (N O R) モデルでは、新奇な物体を既知の物体より有意に長い時間をかけて調べるといってげっ歯類の正常な行動を利用する。この試験は、諸項目について認識記憶を評価するものであり、そのヒトに相当するものが視覚的対比較 (V P C) である。げっ歯類、霊長類およびヒトでは、物体の認識は嗅周皮質を介するものである。A D 病態は

50

最初、海馬より先に嗅周皮質および嗅内皮質に発現する。VPCの作業課題は軽度認知障害(MCI)の記憶欠損を検出するものであり、この作業課題によってMCIからADへの転換が予測される(16)。

【0308】

結果：

試験はSynAging社(ヴァンドゥーヴル=レ=ナンシー、フランス)で実施した。第0日、1グループ当たり12匹のC57BL6Jマウス(11~12週齢)に溶媒(Aβオリゴマー化に使用した緩衝液)またはAβO(50ピコモル)を溶媒(PBS)または抗体301-17の存在下でICV注射した。第+7日および第+8日に実施した新奇物体認識(NOR)試験により全マウスの認知能力を求めた。

10

【0309】

操作者に対して盲検で実施したこの試験には、1実験グループ当たりマウス12匹の4つの実験グループに分けたマウス計48匹を含めた。全個体に抗体の不在下または存在下で総体積5μLの溶媒またはAβOを単回(かつ片側に)ICV注射した。実験グループは以下のように定めた：

- ・グループA(溶媒対照)：溶媒のICV注射(n=12)
- ・グループB(AβO対照)：AβOのICV注射(n=12)
- ・グループC(抗体対照)：AβO+抗体のICV注射(n=12)
- ・グループD(治療)：AβO+抗体のICV注射(n=12)

【0310】

ICV注射の前、4μL(すなわち、112ピコモル)の抗体1を1μLの溶媒(すなわち、Aβオリゴマー化のための緩衝液)または抗体/AβOモル比2.24に相当する1μLのAβO(50ピコモル)と室温で30分間インキュベートした。

20

【0311】

第0日、マウスに溶媒または抗体の存在下で溶媒またはAβOの5μL単回ICV注射を実施した。

【0312】

第+7日および第+8日、マウス計48匹を用いてNOR試験を1回の試行で実施した。認知試験の1日前(すなわち、第+7日)、マウスを何も無いオープンフィールドに置いて10分間の試行に慣れさせる。認知試験当日(すなわち、第+8日)、同じオープンフィールドに置き、5分間の試行(獲得試行)で2つの同じ物体を自由に探索させる。次いで、マウスを5分間の試行間時間の間、ホームケージに戻す。保持試行では、マウスに異なる2つの物体、すなわち、なじみのある同じ物体と1つの新奇物体を探索させる。この間、治療に対して盲検の実験者が、マウスが能動的に各物体を探索する時間を記録する。いずれの試行もビデオで記録する(Smart v3.0ソフトウェア、Bioseb社)。次いで、弁別指数(DI)を： $DI = (\text{新奇物体の探索時間} - \text{なじみのある物体の探索時間}) / \text{総探索時間}$ で求める。総探索時間が5秒以下であれば、マウスを弁別指数の算出および統計解析から除外する。

30

【0313】

溶媒対照群(グループA)のマウスは正常な行動を示し、平均弁別指数が 0.443 ± 0.053 であった。この結果は、これまでのSynAging社の同様の対照群の観察結果と一致している。予想された通り、AβOの単回ICV注射(グループB)では、溶媒対照マウスに比して認知能力の有意な低下が認められ($p < 0.0001$)、平均弁別指数は -0.062 ± 0.048 であった。AβOを注射したマウスは新奇物体となじみのある物体を弁別することができなかった。

40

【0314】

溶媒の存在下で抗体を投与したマウス(グループC)は正常な認知能力を示し、平均弁別指数が 0.439 ± 0.049 であることがわかった。これらのマウスには、溶媒対照マウスとは有意差が認められず($p = 0.9163$)、AβOを注射したマウスとは有意差が認められた($p < 0.0001$)。

50

【 0 3 1 5 】

抗体を A β O とともに注射した場合、N O R 試験で A β O 誘導性認知障害が完全に予防された。実際、グループ D のマウスは平均弁別指数が 0.481 ± 0.055 であり、対照マウスとの差はみられなかった ($p = 0.6126$) が、A β O を注射したマウスとの差がみられた ($p = 0.0002$)。以上のデータを考え合わせると、抗体 3 0 1 - 1 7 が A β O 誘導性認知障害からの保護作用を示したことが示唆される。

【 0 3 1 6 】

シナプスマーカー

行動試験に加え、脳組織を収集し、シナプスマーカー (P S D 9 5、S N A P 2 5、シナプトフィジン) および炎症マーカー (I L - 1 ベータおよび T N F アルファ) のレベルを解析することができる。オリゴマーの I C V 注射から約 1 4 日後にマウスを殺し、生理食塩水を灌流する。海馬を収集し、急速凍結し、解析まで - 8 0 で保管する。ホモジナイズした試料のタンパク質濃度を B C A により求める。E L I S A キット (C l o u d - C l o n e 社、米国) を用いてシナプスマーカーの濃度を求める。通常、A ベータオリゴマーを注射したマウスではシナプスマーカーが 2 5 ~ 3 0 % 減少し、ヒューマニン陽性対照により 9 0 ~ 1 0 0 % に回復する。A ベータオリゴマーを注射したマウスでは I L - 1 ベータ炎症性マーカーの濃度が約 3 倍になり、この増大はヒューマニンによって大幅に抑えられる。

【 0 3 1 7 】

行動試験を実施したマウスから脳を収集する。

【 0 3 1 8 】

海馬 (記憶形成に重要な構造) を切り出し、抗プロテアーゼカクテルを含有する R I P A 緩衝液中でホモジナイズする。液体窒素および 3 7 の水浴中で凍結融解を 3 サイクル実施することにより組織を溶解させ、遠心分離後に上清を回収する。

【 0 3 1 9 】

ライセートの T N F アルファのレベル (炎症があると上昇する) およびシナプスマーカー P S D - 9 5 および S N A P - 2 5 のレベル (シナプス損傷があると低下する) を解析することができる。

【 0 3 2 0 】

抗体は行動試験で完全な保護作用を示した。脳でも S N A P 2 5 および P S D - 9 5 両方のレベルの改善ならびに脳内の T N F アルファレベルの低下がみられることが予想される。

【 0 3 2 1 】

実施例 9

i n v i v o 伝播阻害アッセイ

A ベータ毒性オリゴマーの i n v i v o の伝播およびそれに関連する病態を様々なアルツハイマー病 (A D) げっ歯類モデルで研究することができる。例えば、ヒト A P P のトランスジェニックマウス (例えば、A P P 2 3 マウス) またはヒト A P P と P S E N 1 のトランスジェニックマウス (A P P P S 1 マウス) は高レベルの A ベータを発現し、加齢とともに炎症および神経損傷を伴うアミロイド沈着が徐々にみられるようになる。オリゴマー含有脳抽出物の脳内接種によりこの過程を大幅に加速させることができる (1 3、1 4)。これらのモデルは、脳内または全身に投与した被験抗体による A ベータオリゴマー伝播の阻害を研究するためのシステムとなる。

【 0 3 2 2 】

表 1 0 . A ベータの配列および化合物

1)

H H Q K (配列番号 7)

C G H H Q K G、シクロ (C G H H Q K G) (配列番号 1 2)

【 0 3 2 3 】

表 1 1

ヒトAベータ1～42

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGV
VIA (配列番号73)

【0324】

ここまで、現時点で好ましい例であると考えるものに関して本願を記載してきたが、本願は本開示の例に限定されないことを理解するべきである。これとは逆に、本願は、添付の請求項の趣旨および範囲に含まれる様々な改変および同等の構成を包含するものとする。

【0325】

刊行物、特許および特許出願はいずれも、個々の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個別にその全体が参照により組み込まれることが明記された場合と同じように、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。特に、例えば表またはその他の箇所に記載されるアクセッション番号および/またはバイオマーカー配列(例えば、タンパク質および/または核酸)を含めた本明細書に記載される各アクセッション番号に関連する配列は、その全体が参照により組み込まれる。

【0326】

請求項の範囲は、好ましい実施形態および実施例によって限定されるべきではなく、記載全体と一致する最も広い解釈がなされるべきである。

【0327】

(本明細書で参照される参考文献の列記)

[1] Gabriela A. N. Crespi, Stefan J. Hermans, Michael W. Parker, and Luke A. Miles. Molecular basis for mid-region amyloid- β capture by leading Alzheimer's disease immunotherapies. SCIENTIFIC REPORTS | 5:9649, 2015 | DOI:10.1038/srep09649

[2] Vincent J. Hilser and Ernesto Freire. Structure-based calculation of the equilibrium folding pathway of proteins. correlation with hydrogen exchange protection factors. J. Mol. Biol., 262:756-772, 1996. The COREX approach.

[3] Samuel I. A. Cohen, et. al. Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110(24):9758-9763, 2013.

[4] Pietro Sormanni, Francesco A. Aprile, and Michele Vendruscolo. The camsol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility. J. Mol. Biol., 427(2):478-490, 2015.

[5] Deborah Blacker, MD, ScD; Marilyn S. Albert, PhD; Susan S. Bassett, PhD; Rodney C. P. Go, PhD; Lindy E. Harrell, MD, PhD; Marshai F. Folstein, MD. Reliability and Validity of NINCDS-ADRDA Criteria for Alzheimer's Disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. Arch Neurol. 1994; 51(12):1198-1204. doi:10.1001/archneur.1994.00540240042014.

10

20

30

40

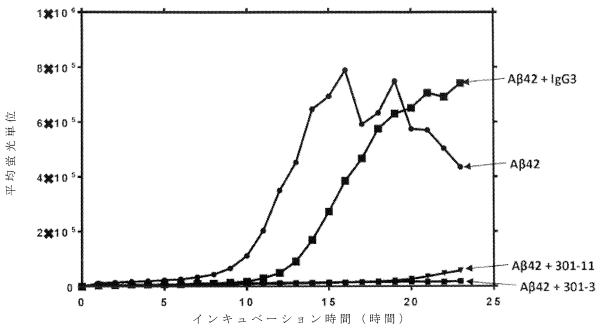
50

- [6] Hamley, I. W. PEG - Peptide Conjugates 2014; 15, 1543 - 1559; dx.doi.org/10.1021/bm500246w
- [7] Roberts, MJ et al Chemistry for peptide and protein PEGylation 64:116 - 127.
- [8] J. X. Lu, W. Qiang, W. M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, R. Tycko, MOLECULAR STRUCTURE OF BETA - AMYLOID FIBRILS IN AD BRAIN TISSUE. CELL Vol. 154 p. 1257 (2013)
- [9] Y. Xiao, B. MA, D. McElheny, S. Parthasarathy, F. Long, M. Hoshi, R. Nussinov, Y. Ishii, A BETA(1 - 42) FIBRIL STRUCTURE ILLUMINATES SELF - RECOGNITION AND REPLICATION OF AMYLOID IN ALZHEIMER'S DISEASE. NAT. STRUCT. MOL. BIOL. Vol. 22 p. 499 (2015). 10
- [10] A. Petkova, W. Yau, R. Tycko EXPERIMENTAL CONSTRAINTS ON QUATERNARY STRUCTURE IN ALZHEIMER'S BETA - AMYLOID FIBRILS BIOCHEMISTRY V. 45 498 2006
- [11] Giulian D, Haverkamp LJ, Yu J, Karshin W, Tom D, Li J, Kazanskaia A, Kirkpatrick J, Roher AE. The HHQK domain of β - amyloid provides a structural basis for the immunopathology of Alzheimer's disease, J. Biol Chem. 1998, 273(45), 29719 - 26. 20
- [12] Winkler K, Scharnagl H, Tisljar U, Hoshvitzky H, Friedrich I, Hoffmann MM, Hutter M, Wieland H, Marz W. Competition of A β amyloid peptide and apolipoprotein E for receptor - mediated endocytosis. J. Lipid Res 30
- [13] SCIENTIFIC REPORTS | 5:9649 | DOI:10.1038/srep09649].
- [14] Yu YZ, Wang WB, Chao A, Chang Q, Liu S, Zhao M, et al. Strikingly reduced amyloid burden and improved behavioral performance in Alzheimer's disease mice immunized with recombinant chimeric vaccines by hexavalent foldable Ab 1 - 15 fused to toxin - derived carrier proteins. J Alzheimer's Dis 40
- [15] Wang, HC; Yu, YZ; Liu, S; Zhao, M and Q Xu, Peripherally administered sera antibodies recognizing amyloid - oligomers mitigate Alzheimer's disease - like pathology and cognitive decline in aged 3 $\times$ Tg - AD mice, Vaccine 2016.
- [16] Zola SM, Manzanares CM, Clopton P, Lah JJ, Levey AI. A behavioral task predicts conversion to mild cognitive impairment a 50

nd Alzheimer's disease. Am J Alzheimer's Dis & other dementia. 2013, 28(2), 179-184

【図面】

【図 1】



【配列表】

202217216600001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	39/395	Y
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	47/68	
G 0 1 N	33/536	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
			G 0 1 N	33/536	B

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/507,633

(32)優先日 平成29年5月17日(2017.5.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/443,766

(32)優先日 平成29年1月8日(2017.1.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

2 0 0

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 キャッシュマン, ニール アール .

カナダ国, プリティッシュ コロンビア州, ブイ 6 エス 1 エム 8 , バンクーバー , 3 7 9 3 ウェ
スト キング エドワード アベニュー

(72)発明者 プロトキン, スティーブン エス .

カナダ国, プリティッシュ コロンビア州, ブイ 5 ゼット 1 シー 3 , バンクーバー , # 4 0 8 - 9
0 8 ダブリュー . 7 番 アベニュー

(72)発明者 カプラン, ヨハンネ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 7 7 0 , シャーボーン , 1 2 3 ミル ストリート

(72)発明者 シルバーマン, ジュディス マックスウェル

カナダ国, プリティッシュ コロンビア州, ブイ 0 エヌ 1 ビー 4 , ウィスラー , ピーオー ボック
ス 1 7 1 3

(72)発明者 ギブス, エブリマ

カナダ国, プリティッシュ コロンビア州, ブイ 3 エイチ 5 ジェー 5 , ポート ムーディー , 1 3
1 - 2 0 0 0 パノラマ ドライブ