

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-517057

(P2009-517057A)

(43) 公表日 平成21年4月30日(2009.4.30)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 0 6 4
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 B 0 6 5
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21	4 C 0 8 5
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00 A	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 115 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-542672 (P2008-542672)	(71) 出願人	391008788 アボット・ラボラトリーズ A B B O T T L A B O R A T O R I E S アメリカ合衆国、イリノイ州 60064 、アボット・パーク、アボット・パーク・ ロード 100、エーピー-6エー-1 377
(86) (22) 出願日	平成18年11月30日 (2006.11.30)	(71) 出願人	502104228 アボット ゲーエムベーハー ウント カ ンパニー カーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成20年7月29日 (2008.7.29)	(71) 出願人	ドイツ連邦共和国 65205 ヴィース バーデン、マックス-プランク-リング 2
(86) 國際出願番号	PCT/EP2006/011530	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(87) 國際公開番号	W02007/062852		
(87) 國際公開日	平成19年6月7日 (2007.6.7)		
(31) 優先権主張番号	60/740,866		
(32) 優先日	平成17年11月30日 (2005.11.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/779,171		
(32) 優先日	平成18年3月3日 (2006.3.3)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/787,361		
(32) 優先日	平成18年3月30日 (2006.3.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗A β グロブロマー抗体、その抗原結合部分、対応するハイブリドーマ、核酸、ベクター、宿主細胞、前記抗体を作製する方法、前記抗体を含む組成物、前記抗体の使用及び前記抗体を使用す

(57) 【要約】

抗A β グロブロマー抗体、その抗原結合部分、対応するハイブリドーマ、核酸、ベクター、宿主細胞、前記抗体の製造方法、前記抗体を含む組成物、前記抗体の使用及び前記抗体を使用する方法。本発明は、A₍₁₋₄₂₎グロブロマーに対する抗体の結合親和性より大きい、A₍₂₀₋₄₂₎グロブロマーへの結合親和性を有する抗A β グロブロマー抗体、その抗原結合部分、前記抗体を産生するハイブリドーマ、前記抗体をコードする核酸、前記核酸を含むベクター、前記ベクターを含む宿主細胞、前記抗体を作製する方法、前記抗体を含む組成物、前記抗体の治療的及び診断的使用並びにアルツハイマー病及び他のアミロイドーシスに関連する対応する方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

A (1-42) グロブロマーに対する結合親和性より大きい、A (20-42) グロブロマーに対する結合親和性を有する抗体。

【請求項 2】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも 10 倍大きい、請求項 1 の抗体。

【請求項 3】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも 100 倍大きい、請求項 1 又は 2 の抗体。 10

【請求項 4】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも 1000 倍大きい、請求項 1 から 3 のいずれか一項の抗体。

【請求項 5】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも 10000 倍大きい、請求項 1 から 4 のいずれか一項の抗体。

【請求項 6】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも 100000 倍大きい、請求項 1 から 5 のいずれか一項の抗体。 20

【請求項 7】

抗体が、 1×10^{-6} M から 1×10^{-12} M の範囲の K_d で、A (20-42) グロブロマーに結合する、請求項 1 から 6 のいずれか一項の抗体。

【請求項 8】

抗体が、 1×10^{-7} M 又はそれ以上の親和性の K_d で、A (20-42) グロブロマーに結合する、請求項 1 から 7 のいずれか一項の抗体。

【請求項 9】

抗体が、 1×10^{-8} M 又はそれ以上の親和性の K_d で、A (20-42) グロブロマーに結合する、請求項 1 から 8 のいずれか一項の抗体。 30

【請求項 10】

抗体が、 1×10^{-9} M 又はそれ以上の親和性の K_d で、A (20-42) グロブロマーに結合する、請求項 1 から 9 のいずれか一項の抗体。

【請求項 11】

抗体が、 1×10^{-10} M 又はそれ以上の親和性の K_d で、A (20-42) グロブロマーに結合する、請求項 1 から 10 のいずれか一項の抗体。

【請求項 12】

抗体が、 1×10^{-11} M 又はそれ以上の親和性の K_d で、A (20-42) グロブロマーに結合する、請求項 1 から 11 のいずれか一項の抗体。 40

【請求項 13】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (12-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性より大きい、請求項 1 から 12 のいずれか一項の抗体。

【請求項 14】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (12-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも 10 倍大きい、請求項 13 の抗体。

【請求項 15】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (12-42) グ 50

グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも100倍大きい、請求項13又は14の抗体。

【請求項16】

A(20-42)グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性が、A(12-42)グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも1000倍大きい、請求項13から15のいずれかの抗体。

【請求項17】

A(20-42)グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性が、A(12-42)グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも10000倍大きい、請求項13から16のいずれかの抗体。

10

【請求項18】

A(20-42)グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性が、A(12-42)グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも100000倍大きい、請求項13から17のいずれかの抗体。

【請求項19】

抗体が、 1×10^{-6} Mから 1×10^{-12} Mの範囲のK_dでA(20-42)グロブロマーマーに、 1×10^{-12} M又はそれより小さい親和性のK_dでA(1-42)グロブロマーマーに結合し、A(20-42)グロブロマーマーに対する結合親和性がA(1-42)グロブロマーマーに対する結合親和性より大きい、請求項1から18のいずれかの抗体。

20

【請求項20】

抗体が 10^{-12} M又はそれより小さい親和性のK_dでA(12-42)グロブロマーマーに結合し、A(20-42)グロブロマーマーへの結合親和性がA(12-42)グロブロマーマーへの結合親和性より大きい、請求項19の抗体。

【請求項21】

A(20-42)グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性が、A(1-42)モノマーマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも10倍大きい、請求項1から20のいずれか一項の抗体。

【請求項22】

A(20-42)グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性が、A(1-42)モノマーマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも100倍大きい、請求項1から21のいずれか一項の抗体。

30

【請求項23】

A(20-42)グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性が、A(1-42)モノマーマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも1000倍大きい、請求項1から22のいずれか一項の抗体。

【請求項24】

A(20-42)グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性が、A(1-42)モノマーマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも10000倍大きい、請求項1から23のいずれか一項の抗体。

40

【請求項25】

A(20-42)グロブロマーマーに対する抗体の結合親和性が、A(1-42)モノマーマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも100000倍大きい、請求項1から24のいずれか一項の抗体。

【請求項26】

抗体が、 1×10^{-8} M又はそれより小さい親和性のK_dで、A(1-42)モノマーマーに結合する、請求項1から25のいずれか一項の抗体。

【請求項27】

抗体が、 1×10^{-7} M又はそれより小さい親和性のK_dで、A(1-42)モノマーマーに結合する、請求項1から26のいずれか一項の抗体。

【請求項28】

50

抗体が、 1×10^{-6} M又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-42) モノマーに結合する、請求項1から27のいずれか一項の抗体。

【請求項29】

抗体が、 1×10^{-5} M又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-42) モノマーに結合する、請求項1から28のいずれか一項の抗体。

【請求項30】

A (20-42) グロブロマーリに対する抗体の結合親和性が、A (1-42) モノマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも10倍大きい、請求項1から29のいずれか一項の抗体。

【請求項31】

A (20-42) グロブロマーリに対する抗体の結合親和性が、A (1-40) モノマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも100倍大きい、請求項1から30のいずれか一項の抗体。

10

【請求項32】

A (20-42) グロブロマーリに対する抗体の結合親和性が、A (1-40) モノマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも1000倍大きい、請求項1から31のいずれか一項の抗体。

【請求項33】

A (20-42) グロブロマーリに対する抗体の結合親和性が、A (1-40) モノマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも10000倍大きい、請求項1から32のいずれか一項の抗体。

20

【請求項34】

A (20-42) グロブロマーリに対する抗体の結合親和性が、A (1-40) モノマーに対する抗体の結合親和性より少なくとも100000倍大きい、請求項1から33のいずれか一項の抗体。

【請求項35】

抗体が、 1×10^{-8} M又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-40) モノマーに結合する、請求項1から34のいずれか一項の抗体。

【請求項36】

抗体が、 1×10^{-7} M又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-40) モノマーに結合する、請求項1から35のいずれか一項の抗体。

30

【請求項37】

抗体が、 1×10^{-6} M又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-40) モノマーに結合する、請求項1から36のいずれか一項の抗体。

【請求項38】

抗体が、 1×10^{-5} M又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-40) モノマーに結合する、請求項1から37のいずれか一項の抗体。

【請求項39】

A (20-42) グロブロマーリに対する抗体の結合親和性が、A (1-42) フィブリルに対する抗体の結合親和性より少なくとも10倍大きい、請求項1から38のいずれか一項の抗体。

40

【請求項40】

A (20-42) グロブロマーリに対する抗体の結合親和性が、A (1-42) フィブリルに対する抗体の結合親和性より少なくとも100倍大きい、請求項1から39のいずれか一項の抗体。

【請求項41】

A (20-42) グロブロマーリに対する抗体の結合親和性が、A (1-42) フィブリルに対する抗体の結合親和性より少なくとも1000倍大きい、請求項1から40のいずれか一項の抗体。

【請求項42】

50

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-42) フィブリルに対する抗体の結合親和性より少なくとも 10000 倍大きい、請求項 1 から 41 のいずれか一項の抗体。

【請求項 43】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-42) フィブリルに対する抗体の結合親和性より少なくとも 100000 倍大きい、請求項 1 から 42 のいずれか一項の抗体。

【請求項 44】

抗体が、 1×10^{-8} M 又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-42) フィブリルに結合する、請求項 1 から 43 のいずれか一項の抗体。 10

【請求項 45】

抗体が、 1×10^{-7} M 又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-42) フィブリルに結合する、請求項 1 から 44 のいずれか一項の抗体。

【請求項 46】

抗体が、 1×10^{-6} M 又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-42) フィブリルに結合する、請求項 1 から 45 のいずれか一項の抗体。

【請求項 47】

抗体が、 1×10^{-5} M 又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-42) フィブリルに結合する、請求項 1 から 46 のいずれか一項の抗体。 20

【請求項 48】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-40) フィブリルに対する抗体の結合親和性より少なくとも 10 倍大きい、請求項 1 から 47 のいずれか一項の抗体。

【請求項 49】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-40) フィブリルに対する抗体の結合親和性より少なくとも 100 倍大きい、請求項 1 から 48 のいずれか一項の抗体。

【請求項 50】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-40) フィブリルに対する抗体の結合親和性より少なくとも 1000 倍大きい、請求項 1 から 49 のいずれか一項の抗体。 30

【請求項 51】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-40) フィブリルに対する抗体の結合親和性より少なくとも 10000 倍大きい、請求項 1 から 50 のいずれか一項の抗体。

【請求項 52】

A (20-42) グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-40) フィブリルに対する抗体の結合親和性より少なくとも 100000 倍大きい、請求項 1 から 51 のいずれか一項の抗体。 40

【請求項 53】

抗体が、 1×10^{-8} M 又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-40) フィブリルに結合する、請求項 1 から 52 のいずれか一項の抗体。

【請求項 54】

抗体が、 1×10^{-7} M 又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-40) フィブリルに結合する、請求項 1 から 53 のいずれか一項の抗体。

【請求項 55】

抗体が、 1×10^{-6} M 又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-40) フィブリルに結合する、請求項 1 から 54 のいずれか一項の抗体。

【請求項 56】

抗体が、 1×10^{-5} M 又はそれより小さい親和性の K_d で、A (1-40) フィブ 50

リルに結合する、請求項 1 から 5 5 のいずれか一項の抗体。

【請求項 5 7】

抗体が単離された抗体である、請求項 1 から 5 6 のいずれか 1 項の抗体。

【請求項 5 8】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 から 5 7 のいずれか 1 項の抗体。

【請求項 5 9】

抗体が組み換え抗体である、請求項 1 から 5 8 のいずれか 1 項の抗体。

【請求項 6 0】

抗体がヒト又はヒト化されている、請求項 1 から 5 9 のいずれか 1 項の抗体。

【請求項 6 1】

抗体が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 1 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 5 F 7、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 3 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 1 0 F 1 1、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 0 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 7 C 6、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 2 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 4 B 7、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 8 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 2 F 2、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 6 A 2、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 5 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 4 D 1 0、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 0 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 7 E 5、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 1 0 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 1 0 C 1 及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 5 1 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 3 B 1 0 からなる群から選択されるモノクローナル抗体と同一のエピトープに結合する、請求項 1 から 6 0 のいずれか一項の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 6 2】

抗体が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 1 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 5 F 7、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 3 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 1 0 F 1 1、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 0 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 7 C 6、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 2 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 4 B 7、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 8 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 2 F 2、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 6 A 2、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 5 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 4 D 1 0、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 0 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 7 E 5、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 1 0 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 1 0 C 1 及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 5 1 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 3 B 1 0 からなる群から選択されるモノクローナル抗体の重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列及び / 又は軽鎖 C D R 3 のアミノ酸

配列を含む、請求項 1 から 6 1 のいずれか一項の抗体。

【請求項 6 3】

抗体が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 1 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 5 F 7、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 3 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 1 0 F 1 1、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 0 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 7 C 6、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 2 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 4 B 7、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 8 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 2 F 2、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A 7 4 0 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 6 A 2、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 5 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 4 D 1 0、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 0 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 7 E 5、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 1 0 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 1 0 C 6 2 及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 5 1 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 3 B 1 0 からなる群から選択されるモノクローナル抗体の重鎖 C D R 2 のアミノ酸配列及び／又は軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 2 の抗体。 10

【請求項 6 4】

抗体が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 1 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 5 F 7、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 3 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 1 0 F 1 1、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 0 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 7 C 6、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 2 4 2 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 4 B 7、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 8 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 2 F 2、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A 7 4 0 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 6 A 2、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 4 0 5 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 4 D 1 0、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 0 9 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 7 E 5、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 1 0 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 1 0 C 6 2 及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 P T A - 7 8 5 1 によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体 3 B 1 0 からなる群から選択されるモノクローナル抗体の重鎖 C D R 1 のアミノ酸配列及び／又は軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 2 又は 6 3 の抗体。 20

【請求項 6 5】

配列番号 3 のアミノ酸残基 3 1 - 3 5、配列番号 3 のアミノ酸残基 5 0 - 6 6、配列番号 3 のアミノ酸残基 9 9 - 1 0 9、配列番号 4 のアミノ酸残基 2 4 - 3 9、配列番号 4 のアミノ酸残基 5 5 - 6 1、配列番号 4 のアミノ酸残基 9 4 - 1 0 2、配列番号 7 のアミノ酸残基 3 1 - 3 5、配列番号 7 のアミノ酸残基 5 0 - 6 6、配列番号 7 のアミノ酸残基 9 7 - 1 0 9、配列番号 8 のアミノ酸残基 2 4 - 3 9、配列番号 8 のアミノ酸残基 5 5 - 6 1、配列番号 8 のアミノ酸残基 9 4 - 1 0 2、配列番号 1 1 のアミノ酸残基 3 1 - 3 5、 30
40
50

配列番号 11 のアミノ酸残基 50 - 65、配列番号 11 のアミノ酸残基 98 - 107、配列番号 12 のアミノ酸残基 24 - 39、配列番号 12 のアミノ酸残基 55 - 61、配列番号 12 のアミノ酸残基 94 - 102、配列番号 15 のアミノ酸残基 31 - 35、配列番号 15 のアミノ酸残基 50 - 66、配列番号 15 のアミノ酸残基 99 - 107、配列番号 16 のアミノ酸残基 24 - 40、配列番号 16 のアミノ酸残基 56 - 62、配列番号 16 のアミノ酸残基 95 - 103、配列番号 19 のアミノ酸残基 31 - 35、配列番号 19 のアミノ酸残基 50 - 66、配列番号 19 のアミノ酸残基 99 - 109、配列番号 20 のアミノ酸残基 24 - 39、配列番号 20 のアミノ酸残基 55 - 61、配列番号 20 のアミノ酸残基 94 - 102、配列番号 23 のアミノ酸残基 31 - 35、配列番号 23 のアミノ酸残基 50 - 66、配列番号 23 のアミノ酸残基 99 - 109、配列番号 24 のアミノ酸残基 24 - 39、配列番号 24 のアミノ酸残基 55 - 61、配列番号 24 のアミノ酸残基 94 - 102、配列番号 27 のアミノ酸残基 31 - 35、配列番号 27 のアミノ酸残基 50 - 65、配列番号 27 のアミノ酸残基 98 - 101、配列番号 28 のアミノ酸残基 24 - 39、配列番号 28 のアミノ酸残基 55 - 61、配列番号 28 のアミノ酸残基 94 - 102、配列番号 31 のアミノ酸残基 31 - 35、配列番号 31 のアミノ酸残基 50 - 66、配列番号 31 のアミノ酸残基 99 - 107、配列番号 32 のアミノ酸残基 24 - 40、配列番号 32 のアミノ酸残基 56 - 62、配列番号 32 のアミノ酸残基 95 - 103、配列番号 35 のアミノ酸残基 31 - 35、配列番号 35 のアミノ酸残基 50 - 66、配列番号 35 のアミノ酸残基 99 - 107、配列番号 36 のアミノ酸残基 24 - 40、配列番号 36 のアミノ酸残基 56 - 62、配列番号 36 のアミノ酸残基 95 - 103、配列番号 38 のアミノ酸残基 31 - 35、配列番号 38 のアミノ酸残基 50 - 66 及び配列番号 38 のアミノ酸残基 98 - 109 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの CDR を含む、請求項 1 の抗体。
10
20

【請求項 6 6】

抗体が、少なくとも 3 つの CDR を含む、請求項 6 5 の抗体。

【請求項 6 7】

少なくとも 3 つの CDR が、

【表1】

VH 5F7 CDR セット		
VH 5F7 CDR-H1	TFYIH: 配列番号3の残基31-35	10
VH 5F7 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: 配列番号3の残基50-66	
VH 5F7 CDR-H3	AKSARAAWFAY: 配列番号3の残基99-109	
VL 5F7 CDR セット		
VL 5F7 CDR-L1	RSSQS VVQ SNGNTYLE: 配列番号4の残基24-39	
VL 5F7 CDR-L2	KVSNRFS: 配列番号4の残基55-61	
VL 5F7 CDR-L3	FQGSHVPPT: 配列番号4の残基94-102	
VH 10F11 CDR セット		
VH 10F11 CDR-H1	SYVMH: 配列番号7の残基31-35	
VH 10F11 CDR-H2	YIYPYNDGT KYNEKF KG: 配列番号7の残基50-66	
VH 10F11 CDR-H3	TVEGATWDGYFDV: 配列番号7の残基97-109	
VL 10F11 CDR セット		20
VL 10F11 CDR-L1	KSSQSLLYSKGKTYLN: 配列番号8の残基24-39	
VL 10F11 CDR-L2	LVS KLDS: 配列番号8の残基55-61	
VL 10F11 CDR-L3	VQGTHFPHT: 配列番号8の残基94-102	
VH 7C6 CDR セット		
VH 7C6 CDR-H1	SYAMS: 配列番号11の残基31-35	
VH 7C6 CDR-H2	SIHNR GTI FYL DSVK G: 配列番号11の残基50-65	
VH 7C6 CDR-H3	GRSN SYAM DY: 配列番号11の残基98-107	30
VL 7C6 CDR セット		
VL 7C6 CDR-L1	RST QTL VHR NGDTYLE: 配列番号12の残基24-39	
VL 7C6 CDR-L2	KVSNRFS: 配列番号12の残基55-61	
VL 7C6 CDR-L3	FQGSHVPYT: 配列番号12の残基94-102	
VH 4B7 CDR セット		
VH 4B7 CDR-H1	DYEMV: 配列番号15の残基31-35	
VH 4B7 CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG: 配列番号15の残基50-66	40

VH 4B7 CDR-H3	TLLRLHFDY: 配列番号15の残基99-107
VL 4B7 CDR セット	
VL 4B7 CDR-L1	RSSQSLFYRSNQKNFLA: 配列番号16の残基24-40
VL 4B7 CDR-L2	WASTRES: 配列番号16の残基56-62
VL 4B7 CDR-L3	QQYYSYWPWT: 配列番号16の残基95-103
VH 2F2 CDR セット	
VH 2F2 CDR-H1	TFYIH: 配列番号19の残基31-35
VH 2F2 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: 配列番号19の残基50-66
VH 2F2 CDR-H3	AKSARAABFAY: 配列番号19の残基99-109
VL 2F2 CDR セット	
VL 2F2 CDR-L1	RSSQSUVQSNQNTYLE: 配列番号20の残基24-39
VL 2F2 CDR-L2	KVSNRFS: 配列番号20の残基55-61
VL 2F2 CDR-L3	FQGSHVPPT: 配列番号20の残基94-102
VH 6A2 CDR セット	
VH 6A2 CDR-H1	TFYIH: 配列番号23の残基31-35
VH 6A2 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: 配列番号23の残基50-66
VH 6A2 CDR-H3	AKSHRAAWFAY: 配列番号23の残基99-109
VL 6A2 CDR セット	
VL 6A2 CDR-L1	RSSQSUVQSNQNTYLE: 配列番号24の残基24-39
VL 6A2 CDR-L2	KVSNRFF: 配列番号24の残基55-61
VL 6A2 CDR-L3	FQGSHVPPT: 配列番号24の残基94-102
VH 4D10 CDR セット	
VH 4D10 CDR-H1	SYGVH: 配列番号27の残基31-35
VH 4D10 CDR-H2	VIWRGGGRIDYNAAFMS: 配列番号27の残基50-65
VH 4D10 CDR-H3	NSDV: 配列番号27の残基98-101
VL 4D10 CDR セット	
VL 4D10 CDR-L1	KSSQSLLDIDGKTYLN: 配列番号28の残基24-39
VL 4D10 CDR-L2	LVSKLDS: 配列番号28の残基55-61
VL 4D10 CDR-L3	WQGTHFPYT: 配列番号28の残基94-102
VH 7E5 CDR セット	
VH 7E5 CDR-H1	DYEMV: 配列番号31の残基31-35
VH 7E5 CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG: 配列番号31の残基50-66
VH 7E5 CDR-H3	TLLRLHFDY: 配列番号31の残基99-107
VL 7E5 CDR セット	
VL 7E5 CDR-L1	RSSQSLFYRSNQKNFLA: 配列番号32の残基24-40

10

20

30

VL 7E5 CDR-L2	WASTRES: 配列番号32の残基56-62
VL 7E5 CDR-L3	QQYYSYPWT: 配列番号32の残基95-103
VH 10C1 CDR セット	
VH 10C1 CDR-H1	DYEMV: 配列番号35の残基31-35
VH 10C1 CDR-H2	YINSGSGTIHYADTVKG: 配列番号35の残基50-66
VH 10C1 CDR-H3	TLLRLHFDY: 配列番号35の残基99-107
VL 10C1 CDR セット	
VL 10C1 CDR-L1	KSSQSLFYSRNQKNFLA: 配列番号36の残基24-40
VL 10C1 CDR-L2	WASTGES: 配列番号36の残基56-62
VL 10C1 CDR-L3	QQYFSYPWT: 配列番号36の残基95-103
VH 3B10 CDR セット	
VH 3B10 CDR-H1	DYVIH: 配列番号38の残基31-35
VH 3B10 CDR-H2	YINPYNDGTQYNEKFKG: 配列番号38の残基50-66
VH 3B10 CDR-H3	VEGGTWDGYFDV: 配列番号38の残基98-109

10

20

30

40

50

からなる可変ドメイン C D R セットから選択される、請求項 6 6 の抗体。

【請求項 6 8】

抗体が、少なくとも 2 つの可変ドメイン C D R セットを含む、請求項 6 7 の抗体。

【請求項 6 9】

少なくとも 2 つの可変ドメイン C D R セットが、V H 5 F 7 C D R セット及び V L 5 F 7 C D R セット；V H 1 0 F 1 1 C D R セット及び V L 1 0 F 1 1 C D R セット；V H 7 C 6 C D R セット及び V L 7 C 6 C D R セット；V H 4 B 7 C D R セット及び V L 4 B 7 C D R セット；V H 2 F 2 C D R セット及び V L 2 F 2 C D R セット；V H 6 A 2 C D R セット及び V L 6 A 2 C D R セット；V H 4 D 1 0 C D R セット及び V L 4 D 1 0 C D R セット；V H 7 E 5 C D R セット及び V L 7 E 5 C D R セット；並びに V H 1 0 C 1 C D R セット及び V L 1 0 C 1 C D R セットからなる群から選択される、請求項 6 8 の抗体。

【請求項 7 0】

配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 7 、配列番号 8 、配列番号 1 1 、配列番号 1 2 、配列番号 1 5 、配列番号 1 6 、配列番号 1 9 、配列番号 2 0 、配列番号 2 3 、配列番号 2 4 、配列番号 2 7 、配列番号 2 8 、配列番号 3 1 、配列番号 3 2 、配列番号 3 5 、配列番号 3 6 及び配列番号 3 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つの可変ドメインを含む抗体。

【請求項 7 1】

2 つの可変ドメインを含み、前記 2 つの可変ドメインが、配列番号 3 及び配列番号 4 、配列番号 7 及び配列番号 8 及び配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 、配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 、配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 、配列番号 2 7 及び配列番号 2 8 、配列番号 3 1 及び配列番号 3 2 、並びに配列番号 3 5 及び配列番号 3 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 7 0 の抗体。

【請求項 7 2】

抗体が定常領域を含む、請求項 1 から 7 1 のいずれか一項の抗体。

【請求項 7 3】

抗体が、I g G 1 、I g G 2 、I g G 3 、I g G 4 、I g M 、I g A 、I g D 及び I g E 定常領域からなる群から選択される重鎖定常領域を含む、請求項 7 2 の抗体。

【請求項 7 4】

抗体が、IgG1重鎖定常領域を含む、請求項73の抗体。

【請求項 7 5】

定常領域がヒト定常領域である、請求項72から74のいずれか一項の抗体。

【請求項 7 6】

定常領域が、配列番号39から42からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項72の抗体。

【請求項 7 7】

抗体がヒトグリコシル化パターンを有する、請求項1から76のいずれか一項の抗体。

【請求項 7 8】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7241によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(5F7)。

【請求項 7 9】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7239によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(10F11)。

【請求項 8 0】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7240によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(7C6)。

【請求項 8 1】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7242によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(4B7)。

【請求項 8 2】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7408によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(2F2)。

【請求項 8 3】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7409によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(6A2)。

【請求項 8 4】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7405によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(4D10)。

【請求項 8 5】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7809によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(7E5)。

【請求項 8 6】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7810によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(10C1)。

【請求項 8 7】

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7851によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(3B10)。

【請求項 8 8】

請求項1から87のいずれか一項に定義されている抗体の抗原結合部分。

【請求項 8 9】

部分が、抗体のFab断片、F(ab')₂断片又は一本鎖Fv断片である、請求項88の抗原結合部分。

【請求項 9 0】

PTA-7241、PTA-7239、PTA-7240、PTA-7242、PTA-7408、PTA-7409、PTA-7405、PTA-7809、PTA-7810及びPTA-7851からなる群から選択されるアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号によって表記されるハイブリドーマ。

【請求項 9 1】

10

20

30

40

50

請求項 1 から 8 9 のいずれか 1 項の抗体アミノ酸配列をコードする単離された核酸。

【請求項 9 2】

請求項 9 1 の単離された核酸を含むベクター。

【請求項 9 3】

p c D N A、p T T、p T T 3、p E F B O S、p B V、p J V 及び p B J からなる群から選択される、請求項 9 2 のベクター。

【請求項 9 4】

請求項 9 2 又は 9 3 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 9 5】

原核細胞である、請求項 9 4 の宿主細胞。

10

【請求項 9 6】

前記原核細胞がイー・コリ (E. coli) である、請求項 9 5 の宿主細胞。

【請求項 9 7】

真核細胞である、請求項 9 4 の宿主細胞。

【請求項 9 8】

前記真核細胞が、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及び真菌細胞からなる群から選択される、請求項 9 7 の宿主細胞。

【請求項 9 9】

前記動物細胞が、哺乳動物細胞、鳥類細胞及び昆虫細胞からなる群から選択される、請求項 9 8 の宿主細胞。

20

【請求項 1 0 0】

前記真核細胞が、C H O 細胞、C O S 細胞又は酵母細胞である、請求項 9 7 の宿主細胞。

【請求項 1 0 1】

前記酵母細胞がサッカロミセス・セレビシアエ (S a c c a h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) である、請求項 1 0 0 の宿主細胞。

【請求項 1 0 2】

前記昆虫細胞が昆虫 S f 9 細胞である、請求項 9 9 の宿主細胞。

【請求項 1 0 3】

抗体を作製するのに適した条件下で、請求項 9 4 から 1 0 2 のいずれか 1 項の宿主細胞又は請求項 9 0 のハイブリドーマを培地中において培養することを含む、抗体を作製する方法。

30

【請求項 1 0 4】

請求項 1 0 3 の方法によって取得可能な抗体。

【請求項 1 0 5】

請求項 1 から 8 9 のいずれか一項に定義される抗体又は抗原結合部分を含む組成物。

【請求項 1 0 6】

組成物が医薬組成物であり、及び医薬として許容される担体をさらに含む、請求項 1 0 5 の組成物。

【請求項 1 0 7】

アミロイドーシスを治療又は予防するための医薬組成物を調製するための、請求項 1 から 8 9 のいずれか一項に定義される抗体又は抗原結合部分の使用。

40

【請求項 1 0 8】

医薬組成物が、受動免疫用である、請求項 1 0 7 の使用。

【請求項 1 0 9】

アミロイドーシスを診断するための組成物を調製するための、請求項 1 から 8 9 のいずれか一項に定義される抗体又は抗原結合部分の使用。

【請求項 1 1 0】

アミロイドーシスが、アルツハイマー病である、請求項 1 0 7 から 1 0 9 のいずれか一項の使用。

50

【請求項 111】

アミロイドーシスが、ダウン症候群のアミロイドーシスである、請求項107から109のいずれか一項の使用。

【請求項 112】

アミロイドーシスの治療又は予防を必要としている対象中のアミロイドーシスを治療又は予防する方法であり、請求項1から89のいずれか一項に定義される抗体又は抗原結合部分を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 113】

抗体又は抗原結合部分の投与が受動免疫のためである、請求項112の方法。

【請求項 114】

アミロイドーシスを診断する方法であり、アミロイドーシスを有すると疑われる対象から試料を準備すること、請求項1から89のいずれか一項に定義される抗体又は抗原結合部分と前記試料を接触すること、及び抗原とともに前記抗体又は抗原結合部分を含む複合体の形成を検出することを含み、前記複合体の前記存在が前記対象中のアミロイドーシスを示す、前記方法。

10

【請求項 115】

アミロイドーシスが、アルツハイマー病である、請求項112から114のいずれかの方法。

【請求項 116】

アミロイドーシスが、ダウン症候群のアミロイドーシスである、請求項112から114のいずれかの方法。

20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、抗A グロブロマーア抗体、その抗原結合部分、前記抗体を産生するハイブリドーマ、前記抗体をコードする核酸、前記核酸を含むベクター、前記ベクターを含む宿主細胞、前記抗体を作製する方法、前記抗体を含む組成物、前記抗体の治療的及び診断的使用並びにアルツハイマー病及び他のアミロイドーシスに関連する対応する方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

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

30

【0003】

分子的な観点から、アルツハイマー病 (AD) は、異常に凝集されたタンパク質の沈着によって特徴付けられる。細胞外アミロイドブラークの場合には、これらの沈着の多くは、アミロイド - - ベプチド纖維からなり、タンパク質の細胞内神経線維のもつれ (NFT) の場合には。アミロイド (A) ベプチドは、タンパク質分解切断によって、-アミロイド前駆体タンパク質から生じる。この切断は、-、及び -セクレターゼと名付けられた幾つかのプロテアーゼの協働的活性によって行われる。切断は、異なる長さの多数の特異的断片をもたらす。アミロイドブラークの多くは、40又は42アミノ酸の長さを有するペプチド (A 40、A 42) からなる。主要な切断産物はA 40であるが、A 42は、ずっと強い毒性効果を有する。

40

【0004】

アルツハイマー病で観察されるものと極めて類似する脳アミロイド沈着及び認知障害は、800の出生に約1件の頻度で発症するダウン症候群 (トリソミー21) の特徴もある。

50

【0005】

Hardy 及び Higgins のアミロイドカスケード仮説は、A₍₁₋₄₂₎の増加した産生が、A_β プラークの主成分である前フィブリル及びフィブリルの形成をもたらし、これらのフィブリルがアルツハイマー病の症候の原因であると仮定した。認知症の重度及び沈着した A_β プラークの負荷との間の相関が乏しいにも関わらず、この仮説は、最近まで支持されてきた。プラークの負荷より、AD の症候との相関が優れている、AD 脳内における可溶性 A_β 形態の発見は、修正されたアミロイドカスケード仮説をもたらした。

【0006】

A_β ペプチドでの能動免疫は、形成の減少及び既存のプラークの部分的な溶解を引き起こす。同時に、A_β ペプチドでの能動免疫は、APP トランスジェニックマウスマodelにおいて認知障害の緩和をもたらす。

【0007】

A_β ペプチドに対して誘導された抗体を用いた受動免疫の場合には、A_β プラークの負荷の減少も認められた。

【0008】

AN-1792 (凝集の纖維性状態の A₍₁₋₄₂₎ ペプチド) での能動免疫の第 I Ia 相試験の結果 (ELAN Corporation Plc, South San Francisco, CA, USA and Dublin, UK) は、A_β ペプチドに対して誘導された免疫療法が奏功することを示唆している。30人の患者の亜群において、疾病の進行は、MMSE 及び DAD 指標によって測定された陽性抗 A_β 抗体力値を有する患者で著しく減少していた。しかしながら、髄膜脳炎の形態の重い副作用のために、本研究は停止された (Bennett and Holtzman, 2005, Neurology, 64, 10-12)。

【0009】

髄膜脳炎は、神経炎症及び脳内への T 細胞の浸潤によって特徴付けられた。おそらく、これは、抗原として A₍₁₋₄₂₎ を注射することによって誘導された T 細胞免疫応答によるものであった。このような免疫応答は、受動免疫後には予想されない。今まで、これに関して入手できる臨床データは存在しない。しかしながら、5ヶ月にわたって週に1回、A₍₁₋₄₂₎ の N 末端エピトープに対して誘導された抗体を与えた極めて老齢の APP 23 マウスでの前臨床研究のために、免疫化のためのこのような受動的アプローチに関して、副作用特性についての懸念が表明された。これらのマウスは、生理的食塩水で処理された対照動物に比べて、微小出血の数及び重度の増大を示した (Pfeifer et al., 2002, Science, 298, 1379)。極めて老齢の (> 24 月齢) Tg2576 及び PDAPP マウスにおいても、同様の微小出血の増加が記載された (Racke et al., 2005, J. Neurosci., 25, 629-636; Wilcock et al. 2004, J. Neuroinflammation, 1(1):24; De Mattos et al., 2004, Neurobiology of Aging 25 (S2): 577)。マウスの両系統において、抗体注射は、微小出血の著しい増加をもたらした。これに対して、A₍₁₋₄₂₎ ペプチドの中央領域に対して誘導された抗体は、微小出血を誘導した (de Mattos et al., 上記)。CAA の形態の凝集した A_β ペプチドに結合しない抗体処理には、微小出血の誘導の欠如が伴った (Racke et al., J. Neurosci., 25, 629-636)。しかし、APP が遺伝子導入されたマウス中に微小出血をもたらす正確な機序は、理解されていない。おそらく、脳アミロイド血管症 (CAA) は、脳出血を誘導し、又は少なくとも悪化させる。CAA は、ほぼ全てのアルツハイマー病の脳内に存在し、症例の約 20% は、「重度 CAA」と認められる。従って、受動免疫は、A_β ペプチドの中央又はカルボキシ末端領域を認識する抗体を選択することによって微小出血を回避することを目指すべきである。

【0010】

10

20

30

40

50

WO 2004 / 067561は、安定なA (1 - 42)オリゴマー (A (1 - 42)グロブロマー)及び該グロブロマーに対して特異的に誘導された抗体を記載している。非特異的なプロテアーゼによる消化は、A グロブロマーは、球状のコア構造から突出する親水性N末端から開始して消化され得ることを示す (Barghout et al., 2005, J Neurochem, 95, 834 - 847)。このようなN末端切断されたA グロブロマー (A (12 - 42)及びA (20 - 42)グロブロマー)は、このオリゴマーA の基本構造単位に相当する。これらは、ウサギ及びマウスの能動免疫のための極めて強力な抗原であり、高い抗体力値をもたらす (WO 2004 / 067561)。N末端切断されたA 形態のインビボでの推定される病理的な役割が、AD脳内におけるそれらの存在についての幾つかの最近の報告によって示唆されている (Sergeant et al., 2003, J Neurochem, 85, 1581 - 1591; Thai et al., 1999, J Neuropathol. Exp. Neurol., 58, 210 - 216)。インビボ消化の間に、脳内に見出されるある種のプロテアーゼ、例えば、ネブリリシン (NEP 24.11)又はインシュリン分解酵素 (IDE) が関与し得る (Selkoe, 2001, Neuron, 32, 177 - 180)。

【発明の開示】

【0011】

免疫療法における患者の認知能力を向上させ、同時に、脳内のA ペプチドの全体量の僅かな一部のみと反応するA グロブロマーに対して誘導された抗体を提供することが本発明の目的であった。これは、脳のA バランスの大幅な妨害を抑制し、より少ない副作用をもたらすと予想される。(例えば、治療的に問題のある脳容積の低下が、凝集の纖維性状態におけるA ペプチドでの能動免疫の研究において観察されている (AN 1792 を用いたELAN試験)。さらに、この試験では、髄膜脳炎の形態の重い副作用が観察された。

【0012】

本発明は、A グロブロマーの末端切断された形態に対して高い親和性を有するグロブロマー特異的抗体を提供することによってこの問題を解決する。これらの抗体は、A ペプチド、特にモノマー及びフィブリルの他の形態のみならず、A グロブロマーの末端切断されていない形態も識別可能である。

【0013】

従って、本発明は、A (1 - 42)グロブロマーに対する本抗体の結合親和性より大きい、A (20 - 42)グロブロマーに対する結合親和性を有する抗体に関する。

【0014】

さらに、本発明は、A (12 - 42)グロブロマーに対する本抗体の結合親和性より大きい、A (20 - 42)グロブロマーに対する結合親和性を有する抗体に関する。

【0015】

特定の実施形態によれば、従って、本発明は、A (1 - 42)グロブロマー及びA (12 - 42)グロブロマーの両方に対するその結合親和性より大きい、A (20 - 42)グロブロマーに対する結合親和性を有する抗体に関する。

【0016】

本明細書において「A (X - Y)」という用語は、X およびY の両方を含むヒトアミロイド タンパク質のアミノ酸位置X からアミノ酸位置Yまでのアミノ酸配列、特にアミノ酸配列 D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A T (アミノ酸1 から43に相当) またはその天然変異体のアミノ酸位置X からアミノ酸位置Yのアミノ酸配列、特に位置X および位置Yの両方あるいはいずれもグロブロマー形成を妨害し得ない3個以下の別のアミノ酸置換を有し、好ましくはアミノ酸12 またはX (いずれか数値の高い方) からアミノ酸42 またはY (いずれか数値の低い方) の部分に別のアミノ酸置換がなく、より好ましくはアミノ酸20 またはX (いずれか数値の高い方) からアミノ酸42 またはY (いずれか数値の低い方) の部分に追加のアミノ酸置換がなく、最も好ましくはアミノ酸20 またはX (いずれか数値の高

10

20

30

40

50

い方)からアミノ酸40またはY(いずれか数値の低い方)の部分に追加のアミノ酸置換がない配列(ここで、「追加の」アミノ酸置換とは、自然には認められない、標準的な配列からの誘導である)を含むA2T、H6R、D7N、A21G(「フランドル」)、E22G(「北極」)、E22Q(「オランダ」)、E22K(「イタリア」)、D23N(「アイオア」)、A42TおよびA42V(数値は、Aペプチドの開始に関するものである)からなる群から選択される少なくとも1個の突然変異を有するものを指す。

【0017】

より具体的には、本明細書における「A(1-42)」という用語は、1および42の両方を含むヒトアミロイドタンパク質のアミノ酸位置1からアミノ酸位置42のアミノ酸配列、特にはアミノ酸配列DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFF AEDVG S N K G A I I G L M V G G V V IAまたはその天然変異体、特にはA2T、H6R、D7N、A21G(「フランドル」)、E22G(「北極」)、E22Q(「オランダ」)、E22K(「イタリア」)、D23N(「アイオア」)、A42TおよびA42V(数字は1および42の両方を含むAペプチドの開始に関するものである)からなる群から選択される少なくとも1個の突然変異を有するものまたはいずれもグロブロマー形成を妨害しない3個以下の別のアミノ酸置換を有し、好ましくはアミノ酸20からアミノ酸42の部分に別のアミノ酸置換を持たない配列を指す。同様に、本明細書における「A(1-40)」という用語は、1および40の両方を含むヒトアミロイドタンパク質のアミノ酸位置1からアミノ酸位置40のアミノ酸配列、特にはアミノ酸配列DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFF AEDVG S N K G A I I G L M V G G V V IAまたはその天然変異体、特にはA2T、H6R、D7N、A21G(「フランドル」)、E22G(「北極」)、E22Q(「オランダ」)、E22K(「イタリア」)およびD23N(「アイオア」)(数字は1および40の両方を含むAペプチドの開始に関するものである)からなる群から選択される少なくとも1個の突然変異を有するものまたはいずれもグロブロマー形成を妨害しない3個以下の別のアミノ酸置換を有し、好ましくはアミノ酸20からアミノ酸40の部分に別のアミノ酸置換を持たない配列を指す。

【0018】

より具体的には、本明細書における「A(12-42)」という用語は、12および42の両方を含むヒトアミロイドタンパク質のアミノ酸位置12からアミノ酸位置42のアミノ酸配列、特にはアミノ酸配列VHHQKLVFFF AEDVG S N K G A I I G L M V G G V V IAまたはその天然変異体、特にはA21G(「フランドル」)、E22G(「北極」)、E22Q(「オランダ」)、E22K(「イタリア」)、D23N(「アイオア」)、A42TおよびA42V(数値は、12および42の両方を含むAペプチドの開始に関するものである)からなる群から選択される少なくとも1個の突然変異を有するものまたはいずれもグロブロマー形成を妨害しない3個以下の別のアミノ酸置換を有し、好ましくはアミノ酸20からアミノ酸42までの部分に別のアミノ酸置換を持たない配列を指す。

【0019】

より具体的には、本明細書における「A(20-42)」という用語は、20および42の両方を含むヒトアミロイドタンパク質のアミノ酸位置20からアミノ酸位置42のアミノ酸配列、特にはアミノ酸配列F AEDVG S N K G A I I G L M V G G V V IAまたはその天然変異体、特にはA21G(「フランドル」)、E22G(「北極」)、E22Q(「オランダ」)、E22K(「イタリア」)、D23N(「アイオア」)、A42TおよびA42V(数値は20および42の両方を含むAペプチドの開始に関するものである)からなる群から選択される少なくとも1個の突然変異を有するものまたはいずれもグロブロマー形成を妨害しない3個以下の別のアミノ酸置換を有し、好ましくは別のアミノ酸置換を持たない配列を指す。

【0020】

本明細書における「A(X-Y)グロブロマー」(A(X-Y)球状オリゴマー)という用語は、均質性および明瞭な物理特性を有する上記で定義のA(X-Y)ペプチ

10

20

30

40

50

ド可溶性で球形の非共有結合的会合を指す。1態様によれば、A(X-Y)グロブロマーは、アニオン系界面活性剤とともに温置することで得ることができるA(X-Y)ペプチドの安定な非フィブリル性のオリゴマー集合体である。モノマーおよびフィブリルとは対照的に、これらのグロブロマーは、指定の集合体数のサブユニット（例えば、WO 2004/067561に記載の初期集合体型、n=4から6、「オリゴマーA」および後期集合体型、n=12から14、「オリゴマーB」）を特徴とする。グロブロマーは、3次元球状構造（「モルテン・グロビュール」、Barghomi et al., 2005, J Neurochem, 95, 834-84参照）を有する。それらは、下記の特徴のうちの1以上によってさらに特徴付けることができる。

【0021】

- 乱交雜プロテアーゼ（サーモリシンまたはエンドプロテアーゼGluCなど）によつてN末端アミノ酸X-23を開裂して、切断型のグロブロマーを生じることができる。

【0022】

- 乱交雜プロテアーゼおよび抗体ではC末端アミノ酸24-Yはアクセスできない。

【0023】

- 切断型のこれらグロブロマーは、グロブロマー配座において核エピトープA(20-Y)のアクセス性がより良好な前記グロブロマーの3次元核構造を維持している。

【0024】

本発明によれば、特には本発明の抗体の結合親和性の評価について、本明細書において「A(X-Y)グロブロマー」という用語は、WO 2004/067561（参照によって本明細書に組み込まれるものとする）の方法によって得ることができる製造物を指す。

【0025】

前記方法は、天然、組換えもしくは合成A(X-y)ペプチドまたはその誘導体を開く段階；少なくとも部分的に開かれたA(X-Y)ペプチドまたはその誘導体を界面活性剤に曝露する段階；製剤の作用を低減する段階；ならびに温置を続ける段階を有する。

【0026】

ペプチドの折り畳み解除に関しては、例えばヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）などの水素結合切断剤を、タンパク質に作用させることができる。作用温度が約20から50、特には約35から40である場合、数分間、例えば約10から60分間の作用時間で十分である。次に、蒸発乾固させた残留物、好ましくは濃縮された状態のものを、例えばジメチルスルホキシド（DMSO）などの水系緩衝液と混和性の好適な有機溶媒に溶解させることで、少なくとも部分的に折り畳み解除されたペプチドまたはその誘導体の懸濁液が得られ、それを次に用いることができる。必要に応じて、ストック懸濁液を、低温、例えば約-20で長期間にわたって保管することができる。

【0027】

あるいは、ペプチドまたはその誘導体を、若干酸性の、好ましくは水系の溶液、例えば約10mMのHCl水溶液に取ることができる。通常数分間の温置時間後、不溶成分を遠心によって除去する。10000gで数分間が都合が良い。これらの方法段階は好ましくは、室温、すなわち20から30の範囲の温度で行う。遠心後に得られる上清は、A(X-Y)ペプチドまたはその誘導体を含み、低温、例えば約-20でしばらくの間保存することができる。

【0028】

その後の界面活性剤への曝露は、ペプチドまたはその誘導体のオリゴマー化による中間体型オリゴマーの形成に関するものである（WO 2004/067561では、オリゴマーAと称されている）。これに関しては、界面活性剤は十分な中間体オリゴマーが製造されるまで、少なくとも部分的に折り畳み解除されたペプチドまたはその誘導体に作用させることができる。

【0029】

イオン系の界面活性剤、特にはアニオン系界面活性剤を用いることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0030】

特定の実施形態によれば、下記式(Ⅰ)の界面活性剤が用いられる。

【0031】

R-X

式中、基Rは、6から20個、好ましくは10から14個の炭素原子を有する未分岐もしくは分岐アルキルまたは6から20個、好ましくは10から14個の炭素原子を有する未分岐または分岐アルケニルであり、基Xは酸性基もしくはそれの塩であり、Xは好ましくは下記のもの：

-COO-M⁺、SO₃M⁺、特に

-OSO₃M⁺から選択され、M⁺は水素力チオンまたは好ましくはアルカリ金属およびアルカリ土類金属力チオンおよびアンモニウムカチオンから選択される無機もしくは有機カチオンである。10

【0032】

有利なものは、Rが未分岐アルキル(その中で、特に言及すべきものはアルク-1-イル基である)である式(Ⅰ)の界面活性剤である。特に好ましいものは、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)である。ラウリン酸およびオレイン酸も有利に使用可能である。界面活性剤であるラウロイルサルコシン(サルコシリ(sarkosyl)NL-30またはガルドール(Gardol;登録商標)とも称される)のナトリウム塩も特に有利である。20

【0033】

界面活性剤作用の時間は特に、オリゴマー化を受けるペプチドまたはその誘導体が折り畳み解除されたか否か、そしてそうであればどの程度折り畳み解除されたかによって決まる。折り畳み解除段階によれば、ペプチドまたはその誘導体が水素結合切断剤で、すなわち、特にはヘキサフルオロイソプロパノールで処理されている場合は、作用温度が約20から50、特には約35から40である場合には、数時間、有利には約1から20時間、特には約2から10時間の範囲の作用時間で十分である。折り畳み解除が少ないか実質的に折り畳み解除されていないペプチドまたはその誘導体が出発点である場合、それに相当して長い作用時間が良い。そのペプチドまたはその誘導体が、例えばHPIP処理に対する代替法として上記で示した手順に従って前処理されている場合、または前記ペプチドまたはその誘導体に対して直接オリゴマー化を行う場合、作用温度が約20から50、特には約35から40である場合には、約5から30時間、特には約10から20時間の範囲の作用時間で十分である。温置後、有利には遠心によって不溶成分を除去する。10000gで数分間が良い。30

【0034】

選択される界面活性剤濃度は、使用される界面活性剤によって決まる。SDSを用いる場合、0.01から1重量%、好ましくは0.05から0.5重量%の範囲の濃度、例えば、約0.2重量%が良いことがわかっている。ラウリン酸またはオレイン酸を用いる場合、例えば0.05から2重量%、好ましくは0.1から0.5重量%の範囲、例えば約0.5重量%という若干高い濃度が良い。

【0035】

界面活性剤作用は、ほぼ生理的範囲での塩濃度で起こるべきである。従って特には、50から500mM、好ましくは100から200mMの範囲、特には約140mMのNaCl濃度が良い。40

【0036】

界面活性剤のその後の低減および温置の継続は、さらなるオリゴマー化による本発明のA(X-Y)グロブロマーの取得に関連するものである(WO2004/067561では、オリゴマーBと称されている)。以前の段階から得られた組成物は常に界面活性剤および生理的範囲での塩濃度を含むことから、界面活性剤作用、好ましくはさらには塩濃度を低減することが良い。これは、界面活性剤および塩の濃度を低減することで、例えば好都合には水または相対的に低い塩濃度の緩衝液、例えばTris-HCl(pH7.3

50

20

30

40

50

)で希釈することで行うことができる。約2から10の範囲、有利には約3から8の範囲、特には約4の希釈係数が好適であることがわかっている。界面活性剤作用の低減は、前記界面活性剤作用を中和し得る物質を加えることによっても達成できる。これらの例には、精製および抽出手段の途中で細胞を安定化させることができる物質のような界面活性剤を錯化させることができる物質、例えば特定のEO/POブロックコポリマー、特にはピウロニック(Piuronnic;登録商標)F68という商品名でのブロックコポリマーなどがある。特定の臨界ミセル濃度付近もしくはそれより高い濃度範囲でのアルコキシリ化、特にはエトキシリ化アルキルフェノール類(例えば、トリトン(Triton;登録商標)Xシリーズのエトキシリ化t-Oクチルフェノール類、特にはトリトン(登録商標)X100、3-(3-クロラミドプロピルジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホネート(CHAPS(登録商標))またはアルコキシリ化、特にはエトキシリ化ソルビタン脂肪酸エステル類(例えば、Tween(登録商標)シリーズ、特にはTween(登録商標)20)を、同等地に用いることができる。

10

20

30

40

50

【0037】

次に、本発明の十分なA(X-Y)グロブロマーが産生されるまで、溶液を温置する。作用温度が約20から50、特には約35から40である場合は、数時間の範囲、好ましくは約10から30時間の範囲、特には約15から25時間の範囲の作用時間で十分である。次に、溶液を濃縮し、残留物があれば遠心によってそれを除去することができる。この場合もやはり、10000g数分間が良いことがわかっている。遠心後に得られた上清は、本発明のA(X-Y)グロブロマーを含む。

【0038】

本発明のA(X-Y)グロブロマーは、自体が公知の方法で、例えば限外濾過、透析、沈殿または遠心によって最終的に回収することができる。

【0039】

例えばSDS-PAGEによる、変性条件下でのA(X-Y)グロブロマーの電気泳動分離によって二重帯域が生じることがさらに好ましく(例えば、A(1-42)の場合には見かけの分子量が38/48kDa)、分離前のグロブロマーのグルタルジアルdehyド処理時に、これら2つの帯域が一つにまとまることが特に好ましい。グロブロマーのサイズ排除クロマトグラフィーによって単一ピーク(例えば、それぞれ、A(1-42)の場合には約60kDaの分子量に相当)となることも好ましい。

【0040】

A(1-42)ペプチド、A(12-42)ペプチドおよびA(20-42)ペプチドから出発すると、前記プロセスは、A(1-42)グロブロマー、A(12-42)グロブロマーおよびA(20-42)グロブロマーを得る上で特に好適である。

【0041】

本発明の特定の実施形態において、A(X-Y)(Xは、数字2..24からなる群から選択され、及びYは上記定義のとおりである。)は、A(1-Y)グロブロマー(Xは、数字2..24からなる群から選択され、Xは、好ましくは20又は12であり、及びYは上記定義のとおりである。)をより短い形態へ末端切断することによって取得されるものであり、これは、適切なプロテアーゼでの処理によって達成することが可能である。例えば、A(20-42)グロブロマーは、A(1-42)グロブロマーをサーモリシンタンパク質分解へ供することによって取得することが可能であり、A(12-42)グロブロマーは、A(1-42)グロブロマーをエンドプロテイナーゼG1uCタンパク質分解へ供することによって取得することが可能である。タンパク質分解の所望される程度に達した時点で、プロテアーゼは、一般的に知られている様式で不活化される。次いで、本明細書に既に記載されている操作に従って、得られたグロブロマーを単離し、必要であれば、さらなる作業及び精製工程によって、さらに加工し得る。前記プロセスの詳しい記述は、参照により、本明細書に組み込まれるWO2004/067561に開示されている。

【0042】

本発明の方法において、A₍₁₋₄₂₎グロプロマーは、特に、本明細書の実施例1aに記載されているA₍₁₋₄₂₎グロプロマーであり、A₍₂₀₋₄₂₎グロプロマーは、特に、本明細書の実施例1cに記載されているA₍₂₀₋₄₂₎グロプロマーであり、及びA₍₁₂₋₄₂₎グロプロマーは、特に、本明細書の実施例1dに記載されているA₍₁₂₋₄₂₎グロプロマーである。

【0043】

好ましくは、グロプロマーは、神経細胞に対して親和性を示す。好ましくは、グロプロマーは、神経調節効果も示す。

【0044】

本発明の別の態様によれば、グロプロマーは、11から16、最も好ましくは、12から14のA_(X-Y)ペプチドからなる。10

【0045】

本発明の別の態様によれば、本明細書において「A_(X-Y)グロプロマー」という用語は、A_(X-Y)サブユニットから実質的になるグロプロマーを表し、12のサブユニットのうち、平均、少なくとも11のサブユニットが、A_(X-Y)型であれば好ましく、グロプロマーの10%未満がいずれかの非A_(X-Y)ペプチドを含めば、より好ましく、最も好ましくは、非A_(X-Y)ペプチドの含量が検出閾値を下回っている。

【0046】

より具体的には、本明細書において「A₍₁₋₄₂₎グロプロマー」という用語は、上記定義のA₍₁₋₄₂₎単位から実質的になるグロプロマーを表し、本明細書において「A₍₁₂₋₄₂₎グロプロマー」という用語は、上記定義のA₍₁₂₋₄₂₎単位から実質的になるグロプロマーを表し、本明細書において「A₍₂₀₋₄₂₎グロプロマー」という用語は、上記定義のA₍₂₀₋₄₂₎単位から実質的になるグロプロマーを表す。20

【0047】

本明細書において、「架橋されたA_(X-Y)グロプロマー」という用語は、グロプロマーの構成単位の架橋によって、好ましくは化学的な架橋によって、より好ましくはアルデヒド架橋によって、最も好ましくは、グルタルジアルデヒド架橋によって、上述のようなA_(X-Y)グロプロマーから取得可能な分子を表す。本発明の別の態様において、架橋されたグロプロマーは、実質的に、前記単位が非共有的相互作用のみによって互いに固定されるのではなく、少なくとも部分的に共有結合によって連結されているグロプロマーである。本発明において、架橋されたA₍₁₋₄₂₎グロプロマーは、特に、本明細書の実施例1bに記載されている架橋されたA₍₁₋₄₂₎オリゴマーである。30

【0048】

本明細書において、「A_(X-Y)グロプロマー誘導体」という用語は、特に、検出を容易にする基、好ましくは、蛍光色素分子、例えば、フルオレセイン・イソチオシアート、フィコエリトリン、エコーレア・ビクトリア(Aequorea victoria)蛍光タンパク質、ディクチオソーマ(Dictyosoma)蛍光タンパク質又はこれらのあらゆる組み合わせ又は蛍光活性誘導体；発色団；化学発色団、例えば、ルシフェラーゼ、好ましくは、フォティヌス・ピラリス(Photinus pyralis)ルシフェラーゼ、ビブリオ・フィシェリ(Vibrio fischeri)ルシフェラーゼ又はこれらのあらゆる組み合わせ若しくは化学発光活性誘導体；酵素的に活性な基、例えば、ペルオキシダーゼ、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又は酵素的に活性なこれらのいずれかの誘導体；電子密度が高い基、例えば、重金属含有基、例えば、金含有基；ハプテン、例えば、フェノールに由来するハプテン；強く抗原性の構造、例えば、抗原性であると予測されるペプチド配列、例えば、Kolaskar及びTongaonkarのアルゴリズムによって、抗原性であると予測されるペプチド配列；別の分子に対するアプタマー；キレート基、例えば、ヘキサヒスチジニル；更なる特定のタンパク質-タンパク質相互作用を媒介する天然の又は天然由来のタンパク質構造、例えば、foss/jun4050

対の要素；磁性基、例えば、強磁性基；又は放射性基、例えば、 ^{1}H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 若しくは ^{125}I 若しくはこれらのあらゆる組み合わせを含む基；又は共有結合によって、若しくは非共有高親和性相互作用によってフラッグ標識されているグロプロマー、好ましくは、不活化、隔離、分解及び／又は沈殿を促進する基に共有結合されているグロプロマー、好ましくは、インビボ分解を促進する基、より好ましくはユビキチンでフラッグ標識されているグロプロマー（この場合、このフラッグ標識されたオリゴマーがインビボで組み立てられるのであれば、特に好ましい。）、又は上記のあらゆる組み合わせによって修飾されたグロプロマーを表す。このような標識及びフラッグ標識基並びにタンパク質にこれらを付着させるための方法は、本分野において公知である。標識及び／又はフラッグ標識は、グロプロマー化の前、間又は後に実施し得る。本発明の別の態様において、グロプロマー誘導体は、標識及び／又はフラッグ標識反応によって、グロプロマーから取得可能な分子である。

10

【0049】

対応して、本明細書において、「A (X-Y)モノマー誘導体」という用語は、特に、グロプロマーに対して記載されているように標識又はフラッグ標識されているAモノマーを表す。

【0050】

都合よく、本発明の抗体は、 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ から $1 \times 10^{-12}\text{M}$ の範囲の K_D で、A (20-42)グロプロマーに結合する。好ましくは、抗体は、高い親和性で、例えば、 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ の K_D 若しくはそれ以上の親和性で、例えば、 $3 \times 10^{-8}\text{M}$ の K_D 若しくはそれ以上の親和性で、 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ の K_D 若しくはそれ以上の親和性で、 $3 \times 10^{-9}\text{M}$ の K_D 若しくはそれ以上の親和性で、 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ の K_D 若しくはそれ以上の親和性で、 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ の K_D 若しくはそれ以上の親和性で、 $3 \times 10^{-10}\text{M}$ の K_D 若しくはそれ以上の親和性で、 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ の K_D 若しくはそれ以上の親和性で、又は $1 \times 10^{-11}\text{M}$ の K_D 若しくはそれ以上の親和性で、A (20-42)グロプロマーに結合する。

20

【0051】

本明細書において「より大きい親和性」という用語は、一方で結合していない抗体及び結合していないグロプロマーと他方で抗体-グロプロマー複合体との間の平衡が、さらに、抗体-グロプロマー複合体の方に傾く相互作用の程度を表す。同様に、本明細書において「より小さい親和性」という用語は、一方で結合していない抗体及び結合していないグロプロマーと他方で抗体-グロプロマー複合体との間の平衡が、さらに、結合していない抗体及び結合していないグロプロマーの方に傾く相互作用の程度を表す。「より大きい親和性」という用語は、「より高い親和性」という用語と同義であり、「より小さい親和性」という用語は「より低い親和性」という用語と同義である。

30

【0052】

特定の実施形態によれば、本発明は、 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ から $1 \times 10^{-12}\text{M}$ の範囲の K_D でA (20-42)グロプロマーに、 10^{-12}M 又はそれより小さい親和性の K_D でA (1-42)グロプロマーに結合し、A (20-42)グロプロマーに対する結合親和性がA (1-42)グロプロマーに対する結合親和性より大きい抗体に関する。

40

【0053】

A (20-42)グロプロマーへの本発明の抗体の結合親和性は、A (1-42)グロプロマーへの抗体の結合親和性より少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍又は少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍又は少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍又は少なくとも500倍、より好ましくは少なくとも1000倍、例えば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍又は少なくとも5000倍、より好ましくは少なくとも10000倍、例えば、少なくとも20000倍、少なくとも30000倍又は少なくとも50000倍、最も好ましくは少なくとも100000倍大きいことが好ましい。

50

【0054】

特定の実施形態によれば、本発明は、 $1 \times 10^{-1.2}$ M又はそれより小さい親和性の K_D で $A_{(12-42)}$ グロブロマーに結合し、 $A_{(20-42)}$ グロブロマーへの結合親和性が $A_{(12-42)}$ グロブロマーへの結合親和性より大きい抗体に関する。

【0055】

また、 $A_{(20-42)}$ グロブロマーへの本発明の抗体の結合親和性は、 $A_{(12-42)}$ グロブロマーへの抗体の結合親和性より少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍又は少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍又は少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍又は少なくとも500倍、より好ましくは少なくとも1000倍、例えば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍又は少なくとも5000倍、より好ましくは少なくとも10000倍、例えば、少なくとも20000倍、少なくとも30000倍又は少なくとも50000倍、最も好ましくは少なくとも100000倍大きいことが好ましい。

10

【0056】

好ましくは、本発明の抗体は、上記定義のように、少なくとも1つの $A_{(20-42)}$ グロブロマーに結合し、 $A_{(20-42)}$ の少なくとも1つの非グロブロマー形態に対して比較的より小さい親和性を有する。

【0057】

少なくとも1つの $A_{(20-42)}$ グロブロマーに対するより $A_{(1-42)}$ の少なくとも1つの非グロブロマー形態に対して比較的より小さい親和性を有する本発明の抗体には、 $A_{(1-42)}$ モノマーに対する結合親和性より大きい $A_{(20-42)}$ グロブロマーへの結合親和性を有する抗体が含まれる。さらに、これに代えて又はこれに加えて、 $A_{(20-42)}$ グロブロマーに対する抗体の結合親和性が、 $A_{(1-40)}$ モノマーに対する抗体の結合親和性より大きいことが好ましい。

20

【0058】

本発明の好ましい実施形態において、 $A_{(20-42)}$ グロブロマーに対する抗体の親和性は、 $A_{(1-40)}$ 及び $A_{(1-42)}$ モノマーの両方に対する抗体の親和性より大きい。

30

【0059】

本明細書において「 $A_{(X-Y)}$ モノマー」という用語は、単離型の $A_{(X-Y)}$ ペプチド、好ましくは本質的に非共有結合的相互作用で他の $A_{(X-Y)}$ ペプチドと関わっていない $A_{(X-Y)}$ ペプチドの一形態を指す。実際には、 $A_{(X-Y)}$ モノマーは通常、水溶液の形態で提供される。本発明の特に好ましい実施形態において、水系モノマー溶液は、0.05%から0.2%、より好ましくは約0.1%の NH_4OH を含む。本発明の別の特に好ましい実施形態において、水系モノマー溶液は、0.05%から0.2%、より好ましくは約0.1%の $NaOH$ を含む。使用される場合（例えば、本発明の抗体の結合親和性を測定するため）、前記溶液を適切な方法で希釈することが良い可能性がある。さらに通常は、前記溶液は、その調製から2時間以内、特には1時間以内、特別には30分以内に使用することが良い。

40

【0060】

より具体的には、本明細書において「 $A_{(1-40)}$ モノマー」という用語は、本明細書の実施例2に記載されている $A_{(1-40)}$ モノマー調製物を表し、本明細書において「 $A_{(1-42)}$ モノマー」という用語は、本明細書の実施例2に記載されている $A_{(1-42)}$ モノマー調製物を表す。

【0061】

都合よく、本発明の抗体は、低い親和性で、最も好ましくは 1×10^{-8} Mの K_D 若しくはそれより小さい親和性で、例えば、 3×10^{-8} Mの K_D 若しくはそれより小さい親和性で、 1×10^{-7} Mの K_D 若しくはそれより小さい親和性で、例えば、 3×10^{-7} Mの K_D 若しくはそれより小さい親和性で、又は 1×10^{-6} Mの K_D 若しくはそれより

50

小さい親和性で、例えば、 3×10^{-5} MのK_D若しくはそれより小さい親和性で、又は 1×10^{-5} MのK_D若しくはそれより小さい親和性で、一方の、又はより好ましくは両方のモノマーに結合する。

【0062】

A (20-42) グロプロマーへの本発明の抗体の結合親和性は、一方、又は、より好ましくは両方のモノマーへの抗体の結合親和性より少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍又は少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍又は少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍又は少なくとも500倍、より好ましくは少なくとも1000倍、例えば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍又は少なくとも5000倍、最も好ましくは少なくとも10000倍大きいことが特に好ましい。

10

【0063】

少なくとも1つのA グロプロマーに対する親和性よりA の少なくとも1つの非グロプロマー形態に対して比較的より小さい親和性を有する本発明の抗体には、A (1-42) フィブリルに対する結合親和性より大きいA (20-42) グロプロマーへの結合親和性を有する抗体がさらに含まれる。さらに、これに代えて又はこれに加えて、A (20-42) グロプロマーに対する抗体の結合親和性が、A (1-40) フィブリルに対する抗体の結合親和性より大きいことが好ましい。

20

【0064】

本明細書において、「フィブリル」という用語は、電子顕微鏡中で纖維性構造を示し、コンゴーレッドを結合し、次いで、偏光下で複屈折を示し、そのX線回折パターンがクロス-構造である非共有的に会合された各A (X-Y) ペプチドの集合物を含む分子構造を表す。

20

【0065】

本発明の別の態様において、フィブリルは、界面活性剤の不存在下で、例えば、0.1 M H C 1 中で、適切なA ペプチドの自己誘導された重合体凝集物を含む方法によって取得可能な分子構造であり、24超、好ましくは100単位超の凝集物の形成が得られる。この方法は、本分野において周知である。都合よく、A (X-Y) フィブリルは、水溶液の形態で使用される。本発明の特に好ましい実施形態において、水性フィブリル溶液は、0.1% NH₄ OH中にA ペプチドを溶解し、20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4で1:4にこれを希釈した後に、pHを7.4に再調整し、37度20時間溶液を温置した後、10000gでの10分間の遠心及び20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4中に再懸濁することによって作製される。

30

【0066】

「A (X-Y) フィブリル」という用語は、本明細書において、A (X-Y) サブユニットから実質的になるフィブリルを表し、サブユニットの少なくとも90%が、平均、A (X-Y) 型であれば好ましく、サブユニットの少なくとも98%が、A (X-Y) 型であればより好ましく、非A (X-Y) ペプチドの含量が検出閾値を下回っていれば、最も好ましい。

40

【0067】

より具体的には、「A (1-42) フィブリル」という用語は、本明細書において、本明細書中の実施例3に記載されているようにA (1-42) フィブリル調製物を表す。

【0068】

都合よく、本発明の抗体は、低い親和性で、最も好ましくは、 1×10^{-8} MのK_D若しくはそれより小さい親和性で、例えば、 3×10^{-8} MのK_D若しくはそれより小さい親和性で、 1×10^{-7} MのK_D若しくはそれより小さい親和性で、例えば、 3×10^{-7} MのK_D若しくはそれより小さい親和性で、又は 1×10^{-6} MのK_D若しくはそれよ

50

り小さい親和性で、例えば、 3×10^{-5} MのK_D若しくはそれより小さい親和性で、又は 1×10^{-5} MのK_D若しくはそれより小さい親和性で、一方の、又はより好ましくは両方のフィブリルに結合する。

【0069】

A (20-42) グロプロマーへの本発明の抗体の結合親和性は、一方、又は、より好ましくは両方のフィブリルへの抗体の結合親和性より少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍又は少なくとも5倍、好ましくは少なくも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍又は少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍又は少なくとも500倍、より好ましくは少なくとも1000倍、例えば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍又は少なくとも5000倍、より好ましくは少なくとも10000倍、例えば、少なくとも20000倍、少なくとも30000倍又は少なくとも50000倍、最も好ましくは少なくとも100000倍大きいことが特に好ましい。

10

【0070】

1つの特定の実施形態によれば、本発明は、A (1-40) 及びA (1-42) フィブリルの両方に対するその結合親和性より大きい、A (20-42) グロプロマーに対する結合親和性を有する抗体に関する。

【0071】

特定の好ましい実施形態によれば、本発明は、少なくとも1つのA グロプロマー、特にA (20-42) グロプロマーに対する親和性より、A のモノマー及び纖維性形態の両方に対して比較的より小さな親和性を有する抗体に関する。以下、これらの抗体は、グロプロマー特異的抗体と称される。

20

【0072】

本発明の抗体には、さ架橋されたA (1-42) グロプロマー、特に、本明細書の実施例1bに記載されているものなど、グルタルジアルデヒド架橋されたA (1-42) グロプロマーより、A (20-42) グロプロマーに対してより大きな結合親和性を有する抗体がさらに含まれる。

20

【0073】

本発明の特に好ましい実施形態において、A (20-42) グロプロマーへの抗体の結合親和性は、架橋されたA (1-42) グロプロマーへの抗体の結合親和性より少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍又は少なくとも5倍、好ましくは少なくも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍又は少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍又は少なくとも500倍、より好ましくは少なくとも1000倍、例えば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍又は少なくとも5000倍、より好ましくは少なくとも10000倍、例えば、少なくとも20000倍、少なくとも30000倍又は少なくとも50000倍、最も好ましくは少なくとも100000倍大きいことが好ましい。

30

【0074】

本発明の抗体は、好ましくは、単離されており、特に、モノクローナルであり、さらには具体的には、組み換えである。

40

【0075】

本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7241によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(5F7)にも関する。

【0076】

本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7239によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(10F11)にも関する。

【0077】

本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7240

50

によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(7C6)にも関する。

【0078】

本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7242によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(4B7)にも関する。

【0079】

本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7409によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(6A2)にも関する。

10

【0080】

本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7408によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(2F2)にも関する。

【0081】

本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7405によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(4D10)にも関する。

【0082】

本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7809によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(7E5)にも関する。

20

【0083】

本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7810によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(10C1)にも関する。

【0084】

本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号PTA-7851によって表記されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体(3B10)にも関する。

30

【0085】

本発明のこれらの抗体5F7、10F11、7C6、4B7、6A2、2F2、4D10、7E5、10C1及び3B10は、A(1-42)グロブロマーに対する抗体の結合親和性より高い、A(20-42)グロブロマーに対する結合親和性を有することによって特徴付けられる。

【0086】

本発明は、前記モノクローナル抗体5F7、10F11、7C6、4B7、6A2、2F2、4D10、7E5、10C1及び3B10のいずれか1つの結合特性と類似の結合特性を有する抗体にも関する。前記モノクローナル抗体のいずれか1つの結合特性と類似の結合特性を有する抗体は、A(1-42)グロブロマーに対する抗体の結合親和性より大きな、A(20-42)グロブロマーに対する結合親和性を有する抗体に限定されるものではないことを理解すべきである。

40

【0087】

前記モノクローナル抗体5F7、10F11、7C6、4B7、6A2、2F2、4D10、7E5、10C1及び3B10のいずれか1つの結合特性と類似の結合特性を有する抗体には、モノクローナル抗体5F7、10F11、7C6、4B7、6A2、2F2、4D10、7E5、10C1及び3B10と同一のエピトープに結合する抗体が含まれる。

【0088】

5F7、10F11、7C6、4B7、6A2、2F2、4D10、7E5、10C1

50

及び 3 B 1 0 からなる群から得られる全てのモノクローナル抗体は、 2 0 及び 4 2 A 配列範囲内に、特に、 2 0 から 3 0 A 配列範囲内に含有されるエピトープに結合する。理論に拘泥するものではないが、前記エピトープは、アミノ酸 2 0 と 4 2 の領域中のサブユニット間、特に、アミノ酸 2 0 と 3 0 の領域中のサブユニット間に存在する構造的な非直鎖エピトープであると考えられる。

【 0 0 8 9 】

本発明は、 5 F 7 、 1 0 F 1 1 、 7 C 6 、 4 B 7 、 6 A 2 、 2 F 2 、 4 D 1 0 、 7 E 5 、 1 0 C 1 及び 3 B 1 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つ、好ましくは全ての抗体と競合することができる抗体にも関する。

【 0 0 9 0 】

本明細書において、「競合する抗体」という用語は、同一の分子実体又は安定的に、但し、非共有結合的に連結された超分子実体、好ましくは同一分子を標的とする抗体のあらゆる数を表し、少なくとも 1 つは、好ましくは、その標的エピトープへの他の抗体のアクセスを立体的に妨害することによって、又は他の抗体に対する標的の親和性を低下させる標的実体中の立体構造を誘導及び／又は安定化させることによって、より好ましくは、標的実体のエピトープの十分近くに存在するエピトープに結合し、標的実体と重複し、又は標的実体と同一であり、最も好ましくは、重複又は同一であり、特に同一であることによって他の抗体の標的エピトープへの接近を直接的に遮断することによって、別の抗体の測定可能な結合を特異的に低下させることができ。本明細書において、2つのエピトープが、それらの化学構造、好ましくはそれらのアミノ酸配列の一部を共有すれば、2つのエピトープは、「重複する」と称され、それらの化学構造、好ましくはそれらのアミノ酸配列が同一であれば、「同一」であると称される。

10

20

30

30

40

50

【 0 0 9 1 】

従って、本発明は、その標的エピトープが、 5 F 7 、 1 0 F 1 1 、 7 C 6 、 4 B 7 、 6 A 2 、 2 F 2 、 4 D 1 0 、 7 E 5 、 1 0 C 1 及び 3 B 1 0 からなる群から選択される抗体の少なくとも 1 つの標的エピトープと重複し、好ましくは同一である抗体にも関する。

【 0 0 9 2 】

従って、前記モノクローナル抗体 5 F 7 、 1 0 F 1 1 、 7 C 6 、 4 B 7 、 6 A 2 、 2 F 2 、 4 D 1 0 、 7 E 5 、 1 0 C 1 及び 3 B 1 0 のいずれか 1 つの結合特性と類似の結合特性を有する抗体には、さらに、前記モノクローナル抗体 5 F 7 、 1 0 F 1 1 、 7 C 6 、 4 B 7 、 6 A 2 、 2 F 2 、 4 D 1 0 、 7 E 5 、 1 0 C 1 及び 3 B 1 0 のいずれか 1 つの抗原結合部分の少なくとも一部を含む抗体が含まれる。好ましくは、前記部分は、前記モノクローナル抗体 5 F 7 、 1 0 F 1 1 、 7 C 6 、 4 B 7 、 6 A 2 、 2 F 2 、 4 D 1 0 、 7 E 5 、 1 0 C 1 及び 3 B 1 0 のいずれか 1 つの少なくとも 1 つの相補性決定領域 (C D R) を含む。

【 0 0 9 3 】

従って、さらなる特定の実施形態によれば、本発明は、モノクローナル抗体 5 F 7 、 1 0 F 1 1 、 7 C 6 、 4 B 7 、 6 A 2 、 2 F 2 、 4 D 1 0 、 7 E 5 、 1 0 C 1 及び 3 B 1 0 の重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列及び／又は軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列を含む抗体に関する。このような抗体の具体例には、それぞれ、モノクローナル抗体 5 F 7 、 1 0 F 1 1 、 7 C 6 、 4 B 7 、 6 A 2 、 2 F 2 、 4 D 1 0 、 7 E 5 、 1 0 C 1 及び 3 B 1 0 の重鎖 C D R 2 のアミノ酸配列及び／又は軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列も含む抗体が含まれる。さらに具体的には、このような抗体には、それぞれモノクローナル抗体 5 F 7 、 1 0 F 1 1 、 7 C 6 、 4 B 7 、 6 A 2 、 2 F 2 、 4 D 1 0 、 7 E 5 、 1 0 C 1 又は 3 B 1 0 の重鎖 C D R 1 のアミノ酸配列及び／又は軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列も含む抗体が含まれる。

【 0 0 9 4 】

一態様において、従って、本発明は、 C D R 3 、 C D R 2 及び／又は C D R 1 ドメインが、モノクローナル抗体 5 F 7 、 1 0 F 1 1 、 7 C 6 、 4 B 7 、 6 A 2 、 2 F 2 、 4 D 1 0 、 7 E 5 、 1 0 C 1 又は 3 B 1 0 の重鎖 C D R 3 、 C D R 2 及び／又は C D R 1 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体に関する。

【0095】

さらなる態様において、従つて、本発明は、CDR3、CDR2及び/又はCDR1ドメインが、それぞれ、モノクローナル抗体5F7、10F11、7C6、4B7、6A2、2F2、4D10、7E5、10C1又は3B10の軽鎖CDR3、CDR2及び/又はCDR1のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体に関する。

【0096】

好ましくは、抗体は、配列番号3のアミノ酸残基31-35、配列番号3のアミノ酸残基50-66、配列番号3のアミノ酸残基99-109、配列番号4のアミノ酸残基24-39、配列番号4のアミノ酸残基55-61、配列番号4のアミノ酸残基94-102、配列番号7のアミノ酸残基31-35、配列番号7のアミノ酸残基50-66、配列番号7のアミノ酸残基97-109、配列番号8のアミノ酸残基24-39、配列番号8のアミノ酸残基55-61、配列番号8のアミノ酸残基94-102、配列番号11のアミノ酸残基31-35、配列番号11のアミノ酸残基50-65、配列番号11のアミノ酸残基98-107、配列番号12のアミノ酸残基24-39、配列番号12のアミノ酸残基55-61、配列番号12のアミノ酸残基94-102、配列番号15のアミノ酸残基31-35、配列番号15のアミノ酸残基50-66、配列番号15のアミノ酸残基99-107、配列番号16のアミノ酸残基24-40、配列番号16のアミノ酸残基56-62、配列番号16のアミノ酸残基95-103、配列番号19のアミノ酸残基31-35、配列番号19のアミノ酸残基50-66、配列番号19のアミノ酸残基99-109、配列番号20のアミノ酸残基24-39、配列番号20のアミノ酸残基55-61、配列番号20のアミノ酸残基94-102、配列番号23のアミノ酸残基31-35、配列番号23のアミノ酸残基50-66、配列番号23のアミノ酸残基99-109、配列番号24のアミノ酸残基24-39、配列番号24のアミノ酸残基55-61、配列番号24のアミノ酸残基94-102、配列番号27のアミノ酸残基31-35、配列番号27のアミノ酸残基50-65、配列番号24のアミノ酸残基98-101、配列番号28のアミノ酸残基24-39、配列番号28のアミノ酸残基55-61、配列番号28のアミノ酸残基94-102、配列番号31のアミノ酸残基31-35、配列番号31のアミノ酸残基50-66、配列番号31のアミノ酸残基99-107、配列番号32のアミノ酸残基24-40、配列番号32のアミノ酸残基56-62、配列番号32のアミノ酸残基95-103、配列番号35のアミノ酸残基31-35、配列番号35のアミノ酸残基50-66、配列番号35のアミノ酸残基99-107、配列番号36のアミノ酸残基24-40、配列番号36のアミノ酸残基56-62、配列番号36のアミノ酸残基95-103、配列番号38のアミノ酸残基31-35、配列番号38のアミノ酸残基50-66及び配列番号38のアミノ酸残基98-109からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのCDRを含む。
10
20
30
30

【0097】

好ましい実施形態において、抗体は、上に開示されている配列からなる群から選択される少なくとも3つのCDRを含む。より好ましくは、選択される3つのCDRは、以下からなる群から選択される可変ドメインCDRのセットから得られる。

【0098】

【表2】

VH 5F7 CDR セット	
VH 5F7 CDR-H1	TFYIH: 配列番号3の残基31-35
VH 5F7 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: 配列番号3の残基50-66
VH 5F7 CDR-H3	AKSARAATFAY: 配列番号3の残基99-109

VL 5F7 CDR セット	
VL 5F7 CDR-L1	RSSQS VVQ SNGNTYLE: 配列番号4の残基24-39
VL 5F7 CDR-L2	KVSNRFS: 配列番号4の残基55-61
VL 5F7 CDR-L3	FQGSHVPPT: 配列番号4の残基94-102
VH 10F11 CDR セット	
VH 10F11 CDR-H1	SYVMH: 配列番号7の残基31-35
VH 10F11 CDR-H2	YIYPYNDGTKYNEKFKG: 配列番号7の残基50-66
VH 10F11 CDR-H3	TVEGATWDGYFDV: 配列番号7の残基97-109
VL 10F11 CDR セット	
VL 10F11 CDR-L1	KSSQS LLYSKGKTYLN: 配列番号8の残基24-39
VL 10F11 CDR-L2	LVS KLDS: 配列番号8の残基55-61
VL 10F11 CDR-L3	VQGTHFPHT: 配列番号8の残基94-102
VH 7C6 CDR セット	
VH 7C6 CDR-H1	SYAMS: 配列番号11の残基31-35
VH 7C6 CDR-H2	SIHNR GTI FYLDS VKG: 配列番号11の残基50-65
VH 7C6 CDR-H3	GRSN SYAMD Y: 配列番号11の残基98-107
VL 7C6 CDR セット	
VL 7C6 CDR-L1	RST QTL VHR NGDTYLE: 配列番号12の残基24-39
VL 7C6 CDR-L2	KVSNRFS: 配列番号12の残基55-61
VL 7C6 CDR-L3	FQGSH VPYT: 配列番号12の残基94-102
VH 4B7 CDR セット	
VH 4B7 CDR-H1	DYEMV: 配列番号15の残基31-35
VH 4B7 CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG: 配列番号15の残基50-66
VH 4B7 CDR-H3	TLLRLHFDY: 配列番号15の残基99-107
VL 4B7 CDR セット	
VL 4B7 CDR-L1	RSSQS LFYRSNQKNFLA: 配列番号16の残基24-40
VL 4B7 CDR-L2	WASTRES: 配列番号16の残基56-62
VL 4B7 CDR-L3	QQYY SYPWT: 配列番号16の残基95-103
VH 2F2 CDR セット	
VH 2F2 CDR-H1	TFYIH: 配列番号19の残基31-35
VH 2F2 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: 配列番号19の残基50-66
VH 2F2 CDR-H3	AKSARA AWFAY: 配列番号19の残基99-109
VL 2F2 CDR セット	
VL 2F2 CDR-L1	RSSQS VVQ SNGNTYLE: 配列番号20の残基24-39
VL 2F2 CDR-L2	KVSNRFS: 配列番号20の残基55-61

10

20

30

VL 2F2 CDR-L3	FQGSHVPPT: 配列番号20の残基94-102
<u>VH 6A2 CDR セット</u>	
VH 6A2 CDR-H1	TFYIH: 配列番号23の残基31-35
VH 6A2 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: 配列番号23の残基50-66
VH 6A2 CDR-H3	AKSHRAAWFAY: 配列番号23の残基99-109
<u>VL 6A2 CDR セット</u>	
VL 6A2 CDR-L1	RSSQSVVQSNGNTYLE: 配列番号24の残基24-39
VL 6A2 CDR-L2	KVSNRFF: 配列番号24の残基55-61
VL 6A2 CDR-L3	FQGSHVPPT: 配列番号24の残基94-102
<u>VH 4D10 CDR セット</u>	
VH 4D10 CDR-H1	SYGVH: 配列番号27の残基31-35
VH 4D10 CDR-H2	VIWRGGGRIDYNAAFMS: 配列番号27の残基50-65
VH 4D10 CDR-H3	NSDV: 配列番号27の残基98-101
<u>VL 4D10 CDR セット</u>	
VL 4D10 CDR-L1	KSSQSLLDIDGKTYLN: 配列番号28の残基24-39
VL 4D10 CDR-L2	LVSKLDS: 配列番号28の残基55-61
VL 4D10 CDR-L3	WQGTHFPYT: 配列番号28の残基94-102
<u>VH 7E5 CDR セット</u>	
VH 7E5 CDR-H1	DYEMV: 配列番号31の残基31-35
VH 7E5 CDR-H2	YISSLGRTIHYADTVKG: 配列番号31の残基50-66
VH 7E5 CDR-H3	TLLRLHFDY: 配列番号31の残基99-107
<u>VL 7E5 CDR セット</u>	
VL 7E5 CDR-L1	RSSQSLFYRSNQKNFLA: 配列番号32の残基24-40
VL 7E5 CDR-L2	WASTRES: 配列番号32の残基56-62
VL 7E5 CDR-L3	QQYYSYPWT: 配列番号32の残基95-103
<u>VH 10C1 CDR セット</u>	
VH 10C1 CDR-H1	DYEMV: 配列番号35の残基31-35
VH 10C1 CDR-H2	YINSGSGTIHYADTVKG: 配列番号35の残基50-66
VH 10C1 CDR-H3	TLLRLHFDY: 配列番号35の残基99-107
<u>VL 10C1 CDR セット</u>	
VL 10C1 CDR-L1	KSSQSLFYRSNQKNFLA: 配列番号36の残基24-40
VL 10C1 CDR-L2	WASTGES: 配列番号36の残基56-62
VL 10C1 CDR-L3	QQYFSYPWT: 配列番号36の残基95-103
<u>VH 3B10 CDR セット</u>	
VH 3B10 CDR-H1	DYVIH: 配列番号38の残基31-35

VH 3B10 CDR-H2	YINPYNDGTQYNEKFKG: 配列番号38の残基50-66
VH 3B10 CDR-H3	VEGGTWDGYFDV: 配列番号38の残基98-109

【 0 0 9 9 】

—実施形態において、本発明の抗体は、少なくとも2つの可変ドメインCDRセットを含む。より好ましくは、2つの可変ドメインCDRセットは、VH5F7CDRセット及びVL5F7CDRセット；VH10F11CDRセット及びVL10F11CDRセット；VH7C6CDRセット及びVL7C6CDRセット；VH4B7CDRセット及びVL4B7CDRセット；VH2F2CDRセット及びVL2F2CDRセット；VH6A2CDRセット及びVL6A2CDRセット；VH4D10CDRセット及びVL4D10CDRセット；VH7E5CDRセット及びVL7E5CDRセット；並びにVH1

10

20

30

40

50

0 C 1 C D R セット及び V L 1 0 C 1 C D R セットからなる群から選択される。

【 0 1 0 0 】

別の実施形態において、上に開示されている抗体は、ヒトアクセプターフレームワークをさらに含む。

【 0 1 0 1 】

好ましい実施形態において、抗体は C D R 移植された抗体である。好ましくは、 C D R 移植された抗体は、上に開示されている C D R の 1 つ又はそれ以上を含む。

【 0 1 0 2 】

好ましくは、 C D R 移植された抗体は、ヒトアクセプターフレームワークを含む。

【 0 1 0 3 】

好ましい実施形態において、抗体はヒト化された抗体である。好ましくは、ヒト化された抗体は、上に開示されている C D R の 1 つ又はそれ以上を含む。より好ましくは、ヒト化された抗体は、上に開示されている C D R の 3 つ又はそれ以上を含む。最も好ましくは、ヒト化された抗体は、上に開示されている 6 つの C D R を含む。特定の実施形態において、 C D R は、ヒトアクセプターフレームワークのヒト抗体可変ドメイン中に取り込まれる。好ましくは、ヒト抗体可変ドメインは、コンセンサスヒト可変ドメインである。より好ましくは、ヒトアクセプターフレームワークは、中心的残基に、少なくとも 1 つのフレームワーク領域アミノ酸置換を含み、中心的残基は、 C D R に隣接する残基；グリコシル化部位残基；稀な残基； A (2 0 - 4 2) グロプロマーと相互作用することが可能な残基； C D R と相互作用することが可能な残基；標準的 (c a n o n i c a l) 残基；重鎖可変領域と軽鎖可変領域の間の接触残基；ベルニエ (V e r n i e r) ゾーン内の残基；並びに C h o t h i a 定義された可変重鎖 C D R 1 と K a b a t 定義された第一の重鎖フレームワーク間の重複する領域内の残基からなる群から選択される。好ましくは、ヒトアクセプターフレームワークヒトアクセプターフレームワークは、少なくとも 1 つのフレームワーク領域アミノ酸置換を含み、フレームワークのアミノ酸配列は、前記ヒトアクセプターフレームワークの配列と少なくとも 6 5 % 同一であり、及び前記ヒトアクセプターフレームワークと同一の少なくとも 7 0 のアミノ酸残基を含む。

【 0 1 0 4 】

さらなる態様において、本発明は、上記重鎖及び軽鎖の両方を含む抗体に関する。

【 0 1 0 5 】

好ましくは、抗体は、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 7 、配列番号 8 、配列番号 1 1 、配列番号 1 2 、配列番号 1 5 、配列番号 1 6 、配列番号 1 9 、配列番号 2 0 、配列番号 2 3 、配列番号 2 4 、配列番号 2 7 、配列番号 2 8 、配列番号 3 1 、配列番号 3 2 、配列番号 3 5 、配列番号 3 6 及び配列番号 3 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つの可変ドメインを含む。より好ましくは、抗体は、2 つの可変ドメインを含み、前記 2 つの可変ドメインは、配列番号 3 及び配列番号 4 、配列番号 7 及び配列番号 8 及び配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 、配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 、配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 、配列番号 2 7 及び配列番号 2 8 、配列番号 3 1 及び配列番号 3 2 、並びに配列番号 3 5 及び配列番号 3 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【 0 1 0 6 】

別の態様において、本発明の抗体は、 I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4 、 I g M 、 I g A 、 I g D 、 I g E 及びヒト I g G 1 A 1 a 2 3 4 、 A 1 a 2 3 5 変異定常領域からなる群から選択される重鎖定常領域を含む。特に、抗体は、ヒト定常領域を含む。より好ましくは、抗体は、配列番号 3 9 から 4 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。 I g G 1 重鎖定常領域を含む抗体が好ましい。

【 0 1 0 7 】

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

10

20

30

40

50

【0108】

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

【0109】

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

10

【0110】

別の態様において、宿主細胞は、本明細書に開示されたベクターで形質転換されている。好ましくは、宿主細胞は原核細胞である。より好ましくは、宿主細胞はイー・コリである。関連する実施形態において、宿主細胞は真核細胞である。好ましくは、真核細胞は、原生生物細胞、動物細胞(例えば、哺乳動物細胞、鳥類細胞及び昆虫細胞)、植物細胞及び真菌細胞からなる群から選択される。より好ましくは、宿主細胞は、CHO及びCOSを含む(但し、これらに限定されない。)哺乳動物細胞；又は真菌細胞、例えば、サッカロミセス・セレビシアエなどの酵母細胞；又はSf9などの昆虫細胞である。

20

【0111】

本発明の別の態様は、本発明の抗体を生産するのに十分な条件下で、本明細書に開示されている宿主細胞又はハイブリドーマのいずれか1つを培地中において培養することを含む、本発明の抗体を生産する方法を提供する。別の実施形態は、本明細書に開示されている方法によって取得可能である抗体を提供する。

30

【0112】

本発明の抗体は、それ自体公知の様式で取得することが可能である。

【0113】

全体として、異なる抗体特異性の数千億から構成される抗体レパートリーを含有するBリンパ球は、哺乳動物の免疫系の一部である。特定の抗原に対する正常な免疫応答とは、前記抗原に対して特異的に結合する前記レパートリーの1つ又はそれ以上の抗体を選択することを意味し、免疫応答の成功は、少なくとも部分的には、前記抗体が刺激抗原を特異的に認識し(最終的には、除去する)、前記抗体の環境中の他の分子を無視する能力に基づいている。

30

【0114】

1つの特定の標的抗原を特異的に認識する抗体の有用性は、モノクローナル抗体技術の開発をもたらした。現在では、標準化されたハイブリドーマ技術によって、目的の抗原に対して単一の特異性を有する抗体を作製することが可能である。より最近では、抗体ライブラリーのインビトロスクリーニングなどの組み換え抗体技術が開発されている。これらの技術は、同様に目的の抗原に対して単一の特異性を有する抗体の產生を可能とする。

40

【0115】

本発明の方法において、インビボ又はインビトロのいずれかで、抗体レパートリーに対して、目的の抗原を作用させ得る。

【0116】

一実施形態によれば、インビボにおいて動物を抗原で免疫化することによって、抗原をレパートリーに作用させる。このインビボアプローチは、さらに、動物のリンパ球から多数のハイブリドーマを確立すること、及び前記抗原へ特異的に結合する抗体を分泌する特定のハイブリドーマを選択することを含み得る。免疫化すべき動物は、例えば、マウス、

50

ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ科の動物若しくはヒツジであり得、又は、抗原刺激後にヒト抗体を産生する、上に挙げられている動物のいずれかのトランスジェニック様式、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスであり得る。免疫化され得る動物の他の種類には、ヒト末梢血単核球で（キメラ h u - P B M C S C I D マウス）又はリンパ球系細胞若しくはその前駆体で再構成されている重症複合免疫不全症（S C I D）を有するマウス、及び致死的な全身照射を施された後に、重症複合免疫不全症（S C I D）を有するマウスから得られた骨髄細胞によって照射に対して保護され、続いて、機能的ヒトリンパ球が移植されたマウス（「トリメラ」系）が含まれる。免疫化すべき動物の別の種類は、抗原での免疫化後に、前記動物が前記抗原を外来として認識するように、そのゲノム内において、目的の抗原をコードする内在性遺伝子のスイッチが、例えば、相同意的組み換えによって停止されている（ノックアウトされている）動物（例えば、マウス）である。本方法によって作製されたポリクローナル又はモノクローナル抗体は、E L I S A 及びドットプロット技術を含む（但し、これらに限定されない。）公知のスクリーニング方法を用いることによって性質決定及び選択されることが当業者に自明である。

10

【0117】

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

20

【0118】

本発明の抗体を作製する別のアプローチは、インビボ及びインビトロアプローチの組み合わせを含む。例えば、インビボにおいて、動物を抗原で免疫化した後、前記動物のリンパ球系細胞から調製された組み換え抗体ライブラリー又は（例えば、重鎖及び／又は軽鎖を含有する）單一ドメイン抗体ライブラリーを、前記抗原を用いてインビトロでスクリーニングすることによって、抗体レパートリーに対して抗原を作用させ得る。別のアプローチによれば、インビボにおいて、動物を抗原で免疫化した後、前記動物のリンパ球系細胞から作製された組み換え抗体ライブラリー又は单ードメインライブラリーをアフィニティ－成熟に供することによって、抗体レパートリーに対して抗原を作用させる。別のアプローチによれば、インビボで動物を抗原で免疫化した後、目的の抗体を分泌する各抗体産生細胞を選択し、（例えば、P C R を用いて）重鎖及び軽鎖の可変領域に対するc D N A を、前記選択された細胞から取得し、インビトロにおいて、哺乳動物宿主細胞中で重鎖及び軽鎖の前記可変領域を発現させることにより（これは、選択されたリンパ球抗体法又はS L A M と称される。）、選択された抗体遺伝子配列をさらに選択及び操作できるようにすることによって、抗原を抗体レパートリーに作用させる。さらに、モノクローナル抗体は、重鎖及び軽鎖に対する抗体遺伝子を哺乳動物細胞中で発現させ、所望の結合親和性を有する抗体を分泌する哺乳動物細胞を選択することによる発現クローニングによって選択され得る。

30

【0119】

本発明は、スクリーニング及びカウンタースクリーニングのための所定の抗原を提供する。従って、本発明によれば、上に定義されている結合親和性で、A (20-42) グロブロマーに結合するポリクローナル及びモノクローナル抗体を選択することが可能である。

40

【0120】

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

50

【0121】

本発明は、さらに、本発明のモノクローナル抗体を產生（分泌）することができるハイブリドーマに関する。本発明のハイブリドーマには、PTA-7241、PTA-7239、PTA-7240、PTA-7242、PTA-7408、PTA-7409、PTA7405、PTA-7809、PTA-7810及びPTA-7851からなる群から選択されるアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号によって表記されるハイブリドーマが含まれる。

【0122】

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

10

【0123】

本発明は、上に定義されているように、本発明の抗体又はその抗原結合部分を含む組成物にも関する。

20

【0124】

特定の実施形態によれば、前記組成物は、本発明の抗体又は抗原結合部分及び医薬として許容される担体を含む医薬組成物である。

【0125】

上に定義されている本発明の抗体又は抗原結合部分は、インビトロ及びインビボの両方において、本発明の抗体又は抗原結合部分が結合するA グロプロマー又はその誘導体の活性を好ましくは中和することができる。従って、前記抗体又は抗原結合部分は、例えば、前記グロプロマー若しくはその誘導体を含有する調製物中で、又は前記グロプロマー若しくはその誘導体がその中に存在するヒト個体若しくは他の哺乳動物中で、前記グロプロマー又はその誘導体の活性を阻害するために使用され得る。

30

【0126】

一実施形態によれば、本発明は、前記グロプロマー又はその誘導体の活性を阻害する方法であり、前記グロプロマー又はその誘導体の活性を阻害するために、本発明の抗体又はその抗原結合部分をグロプロマー又はその誘導体に対して作用させることを含む、前記方法に関する。前記活性は、例えば、インビトロで阻害され得る。例えば、本発明の抗体又は抗原結合部分は、試料中で、グロプロマー又はその誘導体の活性を阻害するために、前記グロプロマー又はその誘導体を含有し、又は含有すると疑われている対象又は細胞培養から得られた試料などの調製物に添加され得る。あるいは、グロプロマー又はその誘導体の活性は、インビボで、個体中において阻害され得る。

40

【0127】

従って、本発明は、さらに、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病及びダウン症候群のアミロイドーシスからなる群から選択されるアミロイドーシスを治療又は予防するための医薬組成物を調製するための、上記抗体又は抗原結合部分の使用に関する。従って、本発明の前記使用の一態様は、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスの治療又は予防を必要としている対象において、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスを治療又は予防する方法であり、前記対象に上記抗体又は抗原結合部分を投与することを含む、前記方法である。アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン症候群のアミロイドーシスを治療し、及び特に予防するために、前記抗体又は抗原結合部分を使用することは、特に、受動免疫のためである。従って、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウン

50

症候群のアミロイドーシスを治療又は予防することを必要とする対象において、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウント症候群のアミロイドーシスを治療又は予防する方法では、前記対象へ抗体又は抗原結合部分を投与する1つの目的は、アミロイドーシス、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウント症候群のアミロイドーシスに対して前記対象を受動的に免疫することである。

【0128】

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

10

【0129】

一実施形態によれば、本発明は、前記グロプロマー又はその誘導体を検出する方法であり、前記グロプロマー又はその誘導体に結合させるために、本発明の抗体又はその抗原結合部分をグロプロマー又はその誘導体に対して作用させること(これにより、好ましくは、抗体又はその抗原結合部分及びグロプロマー又はその誘導体を含む複合体を形成する。)を含む、前記方法に関する。前記グロプロマーは、例えば、インビトロで検出され得る。例えば、本発明の抗体又は抗原結合部分は、調製物中のグロプロマー又はその誘導体を検出するために、調製物、例えば、前記グロプロマー又はその誘導体を含有し、又は含有すると疑われている対象又は細胞培養から得られた試料に添加され得る。あるいは、グロプロマー又はその誘導体の活性は、インビボで、個体中において検出され得る。

20

【0130】

従って、本発明は、さらに、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウント症候群のアミロイドーシスを診断するための組成物を調製するための、上記抗体又は抗原結合部分の使用に関する。本発明の前記使用の一態様は、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウント症候群のアミロイドーシスを有することが疑われている対象において、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウント症候群のアミロイドーシスを診断する方法であり、上記抗体又は抗原結合部分を前記対象に投与すること、及び前記抗体又は抗原結合部分を前記抗原とともに含む複合体の形成を検出することを含み、前記複合体の存在が、前記対象におけるアミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウント症候群のアミロイドーシスの存在を示唆する、前記方法である。本発明の前記使用の第二の態様は、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウント症候群のアミロイドーシスを有することが疑われている対象において、アミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウント症候群のアミロイドーシスを診断する方法であり、前記対象から試料を準備すること、前記試料を上記抗体又は抗原結合部分と接触させること、及び前記抗体又は抗原結合部分を前記抗原とともに含む複合体の形成を検出することを含み、前記複合体の存在が、前記対象におけるアミロイドーシス、特に、アルツハイマー病又はダウント症候群のアミロイドーシスを示唆する、前記方法である。

30

【0131】

(発明の詳細)

本発明の抗体の結合親和性は、ELISA、ドットプロット又はBIACore分析(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)などの標準化されたインビトロイムノアッセイを使用することによって評価され得る。さらなる記載については、Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; 及び Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277を参照され

40

50

たい。

【0132】

特定の実施形態によれば、本明細書において定義されている親和性は、実施例8に記載されているドットプロットを実施し、これを濃度測定によって評価することによって得られる値を表す。本発明の特定の実施形態によれば、ドットプロットによって結合親和性を測定することは、以下のことを含む。抗原(例えば、上に定義されているような、A(X-Y)グロブロマー、A(X-Y)モノマー又はA(X-Y)フィブリル)又は、好適には、例えば、100pmol/μL、10pmol/μl、1pmol/μl、0.1pmol/μl及び0.01pmol/μlの抗原濃度になるように、例えば、20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH 7.4、0.2mg/mL BSA中へ抗原の適切な希釈物の一定量を、ニトロセルロース膜上にドット状に滴加し、次いで、非特異的な結合を防止するために、膜をミルクでブロックし、洗浄し、次いで、目的の抗体と接触させた後、酵素連結された二次抗体及び呈色反応を用いて酵素を検出し、所定の酵素濃度で、結合した抗体の量が親和性の測定を可能とする。従って、1つの標的への2つの異なる抗体の相対親和性又は2つの異なる標的への1つの抗体の相対親和性は、本明細書において、その他は同一のドットプロット条件下で、2つの抗体-標的組み合わせを用いて観察された標的結合された抗体のそれぞれの量の関係として定義される。ウェスタンブロッティングに基づく類似のアプローチとは異なり、ドットプロットアプローチは、天然の立体構造を探る所定の標的への抗体の親和性を測定する。ELISAアプローチとは異なり、ドットプロットアプローチは、異なる標的とマトリックス間の親和性の差という問題がなく、これにより、異なる標的間でのより正確な比較が可能となる。10

【0133】

本明細書において使用される「K_d」という用語は、本分野において公知であるよう、特定の抗体抗原相互作用の解離定数を表すものとする。20

【0134】

本発明の抗体は、好ましくは、単離された抗体である。「単離された抗体」とは、上述の結合親和性を有し、及び異なる結合親和性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を意味する。本明細書において、「実質的に含まない」という用語は、抗体の少なくとも95%、好ましくは抗体の少なくとも98%、より好ましくは抗体の少なくとも99%が所望の結合親和性を有する抗体調製物を表す。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質及び/又は化学物質を実質的に含まないことができる。30

【0135】

本発明の単離された抗体には、モノクローナル抗体が含まれる。本明細書において使用される「モノクローナル抗体」は、異なるアミノ酸配列の抗体の混合物を含有する「ポリクローナル」抗体調製物とは異なり、共通の重鎖及び共通の軽鎖アミノ酸配列を共有する抗体分子、抗体の調製物を表すものとする。モノクローナル抗体は、ファージ、細菌、酵母又はリボソームディスプレイのような幾つかの新しい技術及びハイブリドーマから得られた抗体(例えば、標準的な Kohler 及び Milstein のハイブリドーマ法((1975) Nature 256: 495-497などのハイブリドーマ技術によって調製されたハイブリドーマによって分泌された抗体)が例である古典的な方法によって作製することが可能である。従って、ハイブリドーマに由来しない均一な配列を有する抗体は、本明細書において、なお、モノクローナル抗体と称されるが、これは、非古典的な方法によって取得され得、「モノクローナル」という用語は、ハイブリドーマに由来する抗体に限定されず、1つの核酸クローンに由来する全ての抗体を表すために使用される。40

【0136】

従って、本発明のモノクローナル抗体には、組み換え抗体が含まれる。本明細書において「組み換え」という用語は、例えば、化学合成によって、又は遺伝子工学技術による核酸の単離されたセグメントの操作によって、本来隔てられている配列の2つのセグメントを人工的に組み合わせることを表す。特に、「組み換え抗体」という用語は、宿主細胞中に形質移入された組み換え発現ベクターを用いて発現された抗体;組み換えコンビナトリ50

アル抗体ライブラリーから単離された抗体；ヒト免疫グロブリン遺伝子のためにトランスデュニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295を参照されたい。）など、組み換え手段によって產生され、発現され、作製され若しくは単離された抗体又は、特定の免疫グロブリン遺伝子配列（ヒト免疫グロブリン遺伝子配列など）が他のDNA配列と組み合わされている、他のいずれかの方法で產生され、発現され、作製され若しくは単離された抗体を表す。組み換え抗体には、例えば、キメラ、CDR移植及びヒト化抗体が含まれる。当業者は、異種の系内での、ハイブリドーマに由来する慣用のモノクローナル抗体の発現は、得られた抗体タンパク質のアミノ酸配列が変化されておらず、又は変化されることが意図される場合でさえ、組み換え抗体の作製を必要とすることに気づく。

10

【0137】

本発明の特定の実施形態において、抗体は、ヒト化された抗体である。

【0138】

複数の実施形態によれば、抗体は、ヒト抗体又はマウス抗体など、専ら单一の種に由来するアミノ酸配列を含み得る。他の実施形態によれば、抗体は、キメラ抗体又はCDR移植抗体又はヒト化された抗体の別の形態であり得る。

【0139】

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

20

【0140】

抗体の「抗原結合部分」（又は単に「抗体部分」）という用語は、本発明の抗体の断片の1つ又はそれ以上の断片を表し、前記断片は、上記結合親和性をなす有する。完全な抗体の断片は、抗体の抗原結合機能を実施可能であることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に従えば、結合断片の例には、（i）Fab断片（すなわち、VL、VH、CL及びCH1ドメインから構成される一価断片）、（ii）F(ab')₂断片（すなわち、ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋を介して互いに連結された2つのFab断片を含む二価断片）、（iii）VH及びCH1ドメインから構成されるFd断片、（iv）抗体の單一アームのFL及びVHドメインから構成されるFv断片、（v）VHドメイン又はVH、CH1、CH2、DH3若しくはVH、CH2、CH3からなるdAb断片（Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546）及び（vi）単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。Fv断片の2つのドメイン、すなわちVL及びVHは、別個の遺伝子によってコードされているが、これらは、VL及びVH領域が対合して一価分子（一本鎖Fv(scFv）として知られている。例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-426；及びHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883を参照。）を形成している単一のタンパク質鎖として、これらの調製を可能とする合成リンク（例えば、ポリ-G₄Sアミノ酸配列）、及び組み換え法を用いてさらに互いに連結され得る。抗体の「抗原結合部分」という用語は、このような一本鎖抗体も含むものとする。「ダイアボディ」などの一本鎖抗体の他の形態も、同様にここに包含される。ダイアボディは、VH及びVLドメインが一本鎖

30

40

50

ポリペプチド鎖上に発現されているが、2つのドメインが同じ鎖上で対合するには短すぎるリンクアを使用することにより、前記ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対形成するよう強制し、2つの抗原結合部位を形成する二価の二重特異性抗体である（例えば、H o l l i g e r , P . , et al . (1 9 9 3) Proc . Natl . Acad . S d . U S A 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 ; Poljak et al (1 9 9 4) Structure 2 : 1 1 2 1 - 1 1 2 3 を参照）。免疫グロブリン定常ドメインは、重鎖又は軽鎖定常ドメインを表す。ヒト Ig G 重鎖及び軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は、本分野において公知であり、表1に示されている。

【 0 1 4 1 】

【 表 3 】

たんぱく質	配列番号	配列	
Ig γ -1 定常領域	配列番号: 39	12345678901234567890123456789012 ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	10
Ig γ -1 定常領域 mutant	配列番号: 40	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	20
Ig κ 定常領域	配列番号: 41	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFV PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSLTL SKADYEHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFRN GEC	30
Ig λ 定常領域	配列番号: 42	QPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS	

【 0 1 4 2 】

さらに、本発明の抗体又はその抗原結合部分は、前記抗体又は抗体部分の、1つ又はそれ以上のさらなるタンパク質又はペプチドとの共有又は非共有的会合によって形成されたより大きな免疫接着分子の一部であり得る。このような免疫接着分子に対して適しているのは、四量体 s c F v 分子を調製するためにストレプトアビジンコア領域を使用すること（ K i p r i y a n o v , S . M . , et al . (1 9 9 5) Human Antibodies and Hybridomas 6 : 9 3 - 1 0 1 ）、並びに二価及びビオチン化された s c F v 分子を作製するために、システイン残基、マーカーペプチド及び C 末端ポリヒスチジニル、例えば、ヘキサヒスチジニルタグを使用する（ K i p r i y a n o v , S . M . , et al . (1 9 9 4) Mol . Immunol . 3 1 : 1 0 4 7 - 1 0 5 8 ）ことである。

【 0 1 4 3 】

「ヒト抗体」という用語は、その可変及び定常領域が、例えば、Kabat ら (Kabat , et al . (1 9 9 1) Sequences of Proteins of

40

50

Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 参照。) によって記載されているように、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に対応し、又はヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に由来する抗体を表す。しかしながら、本発明のヒト抗体は、例えば、CDR中、特にCDE3中に、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでのランダムな突然変異導入若しくは部位特異的突然変異導入によって、又はインビオでの体細胞変異によって導入された変異)を含有し得る。本発明の組み換えヒト抗体は可変領域を有し、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に由来する定常領域も含有し得る(Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 参照。)。しかしながら、特定の実施形態によれば、組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列が、ヒト生殖系列のVH及びVL配列に関連し、又はこれらの配列に由来するにも関わらず、インビオで、ヒト抗体生殖系列レパートリー内には、天然に存在しない配列であるように、インビトロ突然変異導入(又は、ヒトIg配列のためにトランスジェニックである動物が使用される場合には、インビオ体細胞突然変異導入)に供される。特定の実施形態によれば、この種の組み換え抗体は、選択的な突然変異導入又は逆突然変異又は両者の結果である。好ましくは、突然変異導入は、親抗体の親和性より大きい、標的にに対する親和性をもたらし、及び/又は親抗体の親和性より小さい、非標的構造に対する親和性をもたらす。

10

20

30

【0144】

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

【0145】

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

【0146】

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

【0147】

「Kabat番号」、「Kabat定義」及び「Kabat標識」という用語は、本明細書において、互換的に使用される。本分野において認められているこれらの用語は、抗体又はその抗原結合部分の重鎖及び軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基に比べて、より可変的な(すなわち、超可変的な)アミノ酸残基に付番するシステムを表す(Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391及びKabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication NO. 91-3242)。重鎖可変領域の場合、超過片領域は、CDR1に対するアミノ酸位置31から35、CDR2に対するアミノ酸位置50から65及びCDR3に対するアミノ酸位置9

40

50

5から102にわたる。軽鎖可変領域の場合、超過片領域は、CDR1に対するアミノ酸位置24から34、CDR2に対するアミノ酸位置50から56及びCDR3に対するアミノ酸位置89から97にわたる。

【0148】

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

【0149】

本明細書で使用される「CDR」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を表す。重鎖及び軽鎖の各可変領域中には3つのCDRが存在し、これらは、各可変領域に対して、CDR1、CDR2及びCDR3と表記される。本明細書において使用される「CDRセット」という用語は、抗原を結合することが可能な单一の可変領域中に存在する3つのCDRの群を表す。これらのCDRの正確な境界は、異なる系に従って、異なって定義されてきた。Kabatによって記載された系(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991))は、抗体の何れの可変領域に対しても適用可能な明瞭な残基付番系を提供するのみならず、3つのCDRを画する正確な残基境界も提供する。これらのCDRは、Kabat CDRと称され得る。Chothia及び共同研究者(Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) and Chothia et al., Nature 342: 877-883 (1989))は、Kabat CDR内のある種の亜部分が、アミノ酸配列のレベルで大きな多様性を有するにも関わらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造を探ることを見出した。これらの亜部分は、L1、L2及びL3又はH1、H2及びH3（「L」及び「H」は、それぞれ、軽鎖及び重鎖領域を表記する。）と表記された。これらの領域は、Chothia CDRと称される場合があり、これは、Kabat CDRと重複する境界を有する。Kabat CDRと重複するCDRを画する他の境界は、Padlanによって記載されている(FASEB J. 9: 133-139 (1995))及びMaccallum(J. Mol. Biol. 262 (5): 732-45 (1996))。さらに別のCDR境界定義は、上記系の1つに厳格に従わない場合があり得るが、それにも関わらず、Kabat CDRと重複するが、それらは、特定の残基又は残基の群又はCDR全体さえ、抗原結合に著しい影響を与えないという予測又は実験的な発見に照らして、短縮又は延長され得る。本明細書に使用されている方法は、これらの系のいずれかに従って定義されたCDRを使用し得るが、好ましい実施形態は、Kabat又はChothia定義されたCDRを使用する。203040

【0150】

本明細書において使用される「標準的な(canonical)」残基という用語は、

Chothiaら (J. Mol. Biol. 196: 901 - 907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799 (1992)、何れも、参照により、本明細書中に組み込まれる。) によって定義される所定の標準的な CDR 構造を規定する CDR 又はフレームワーク中の残基を表す。Chothia らによれば、多くの抗体の CDR の重大な一部は、アミノ酸配列のレベルでの大きな多様性に関わらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造を有する。各標準的な構造は、ループを形成するアミノ酸残基の連続するセグメントに対して、ペプチド骨格ねじれ角の群を主に指定する。

【0151】

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

10

【0152】

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

20

【0153】

ヒト重鎖及び軽鎖アクセプター配列は、本分野において公知である。

【0154】

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

30

【0155】

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

40

【0156】

本明細書において使用される「ヒト化抗体」という用語は、特に、目的の抗原に免疫特

50

異的に結合し、並びにヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク（F R）領域及び非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補的決定領域（C D R）を含む抗体又はそのバリエント、誘導体、類縁体若しくは断片を表す。C D Rに関して、本明細書において使用される「実質的に」という用語は、非ヒト抗体C D Rのアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有するC D Rを表す。ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメイン（F a b、F a b'、F (a b') 2、F a b C、F v）の全てを実質的に含み、C D R領域の全て又は実質的に全ては非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）のものに対応し、及びフレームワーク領域の全て又は実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。好ましくは、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部（F c）、典型的には、ヒト免疫グロブリンの一部も含む。幾つかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖と、重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。抗体は、重鎖のC H 1、ヒンジ、C H 2、C H 3及びC H 4領域も含み得る。幾つかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖のみを含有する。幾つかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖のみを含有する。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメイン及び/又はヒト化重鎖のみを含有する。

10

【0157】

ヒト化抗体は、I g M、I g G、I g D、I g A及びI g Eなどの免疫グロブリンのあらゆるクラス、並びにI g 1、I g G 2、I g G 3及びI g G 4など（但し、これらに限定されない。）の免疫グロブリンのあらゆる亜クラスから選択することが可能である。

20

【0158】

ヒト化抗体のフレームワーク及びC D R領域は、親配列に正確に対応する必要はない。例えば、ドナー抗体C D R又はコンセンサスフレームワークは、当該部位のC D R又はフレームワーク残基が、ドナー抗体又はコンセンサスフレームワークのいずれかに正確に対応しないように、少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、挿入及び/又は欠失によって変異され得る。好ましい実施形態において、このような変異は、しかしながら、大規模なものではない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%及び最も好ましくは少なくとも95%は、親F R及びC D R配列のものに対応する。本明細書で使用される「コンセンサスフレームワーク」という用語は、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク領域を表す。本明細書において使用される「コンセンサス免疫グロブリン配列」という用語は、関連する免疫グロブリン配列のファミリー中の最も頻繁に存在するアミノ酸（又はヌクレオチド）から形成される配列を表す（例えば、Winnacker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987を参照されたい。）。免疫グロブリンのファミリーにおいて、コンセンサス配列中の各位置は、ファミリー内で当該位置において最も頻繁に存在するアミノ酸によって占有される。2つのアミノ酸が等しい頻度で存在する場合には、何れも、コンセンサス配列中に含まれ得る。

30

【0159】

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

40

【0160】

「エピトープ」という用語には、免疫グロブリンに特異的な結合をすることができるあらゆるポリペプチド決定基が含まれる。ある種の実施形態において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル又はスルホリルなどの分子の化学的に活性な表面基を含

50

み、ある種の実施形態において、特異的な三次元構造的特徴及び／又は特異的な電荷特徴を有し得る。エピトープとは、抗体によって結合される抗原の領域である。ある種の実施形態において、抗体が、タンパク質及び／又は高分子の複雑な混合物中で、その標的抗原を優先的に認識する場合に、抗体は抗原を特異的に結合すると称される。

【0161】

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

【0162】

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

【0163】

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

【0164】

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

10

20

30

40

50

シングに不可欠である成分を含むものとし、その存在が有利である追加の成分、例えば、リーダー配列及び融合対配列も含むことが可能である。

【0165】

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

10

【0166】

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

20

【0167】

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

30

【0168】

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

40

【0169】

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

【0170】

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

【0171】

インビボアプローチ

50

所望される抗体の種類に応じて、インビボ免疫化のために様々な宿主動物を使用し得る。それ自体、目的の抗原の内在性様式を発現している宿主が使用され得る。あるいは、目的の抗原の内在性様式が欠乏された宿主を使用することが可能である。例えば、対応する内在遺伝子における相同的組み換えを介して、特定の内在性タンパク質が欠乏されたマウス（すなわち、ノックアウトマウス）は、マウスを免疫化した当該タンパク質に対して液性応答を生成し、従って、該タンパク質に対する高親和性モノクローナル抗体の作製のために使用できることが示されている（例えば、Roess, J. et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 183: 231-237; Lunn, M.P. et al. (2000) *J. Neurochem.* 75: 404-412を参照されたい）。 10

【0172】

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

【0173】

一実施形態によれば、ヒト以外の哺乳動物が抗原刺激時にヒト抗体を作製するように、A (20-42) グロプロマー又はその誘導体で免疫化された動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子のためにトランスジェニックとなっているヒト以外の哺乳動物、好ましくはマウスである。典型的には、ヒト生殖系列配置を有する重鎖及び軽鎖のための免疫グロブリン導入遺伝子は、それらの内在性重鎖及び軽鎖遺伝子座が不活性であるように改変されたこのような動物中に導入される。このような動物が抗原で（例えば、ヒト抗原で）刺激されると、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体（ヒト抗体）が產生される。標準化されたハイブリドーマ技術を用いて、このような動物ヒトモノクローナル抗体のリンパ球から作製することが可能である。ヒト免疫グロブリンを有するトランスジェニックマウス及びヒト抗体の作製におけるそれらの使用のさらなる記載については、例えば、USS 939, 598, WO 96/33735, WO 96/34096, WO 98/24893 及び WO 99/53049 (Abgenix Inc.)、及び USS 5, 545, 806, USS 5, 569, 825, USS 5, 625, 126, USS 5, 633, 425, USS 5, 661, 016, USS 5, 770, 429, USS 5, 814, 318, USS 5, 877, 397 及び WO 99/45962 (Genpharm Inc.) を参照されたい。「MacQuitty, J. J. and Kay, R. M. (1992) *Science* 257: 1188; Taylor, L. D. et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20: 6287-6295; Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368: 856-859; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding, F. A. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764: 536-546; Fishwild, D. M. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; Mendez, M. J. et al. (1997) *Nature Genetics* 15: 146-156; Green, L. L. and Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188: 483-495; Green, L. L. (1999) *J. Immunol. Methods* 231: 11-23; Yang, X. D. et al. (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66: 401-410; Gallo, M. L. et al. (2000) *Eur. J. Immunol.* 30: 534-540 も参照されたい。 20 30 40 50

【0174】

別の実施形態によれば、A(20-42)グロブロマー又はその誘導体で免疫されている動物は、ヒト末梢血単核球若しくはリンパ球系細胞又はこれらの前駆体で再構築された重症複合免疫不全(SCID)を有するマウスであり得る。証明されているように、キメラhu-PBMCSCIDマウスと称されるこのようなマウスは、抗原刺激をすると、ヒト免疫グロブリン応答を產生する。これらのマウス及び抗体を作製するためのそれらの使用のさらなる記述については、例えば、Leader, K.A. et al. (1992) Immunology 76: 229-234; Bombail, F. et al. (1996) Immunobiol. 195: 360-375; Murphy, W.J. et al. (1996) Semin. Immunol. 8: 233-241; Herz, U. et al. (1997) Int. Arch. Allergy Immunol. 113: 150-152; Albert, S.E. et al. (1997) J. Immunol. 159: 1393-1403; Nguyen, H. et al. (1997) Microbiol. Immunol. 41: 901-907; Arai, K. et al. (1998) J. Immunol. Methods 217: 79-85; Yoshinari, K. and Arai, K. (1998) Hybridoma 17: 41-45; Hutchins, W.A. et al. (1999) Hybridoma 18: 121-129; Murphy, W.J. et al. (1999) Clin. Immunol. 90: 22-27; Smithson, S.L. et al. (1999) Mol. Immunol. 36: 113-124; Chamat, S. et al. (1999) J. Infect. Diseases 180: 268-277; and Heard, C. et al. (1999) Molec. Med. 5: 35-45を参照されたい。
10
20

【0175】

別の実施形態によれば、A(20-42)グロブロマー又はその誘導体で免疫されている動物は、全身照射の致死線量で処理された後、重症複合免疫不全(SCID)を有するマウスから得られた骨髄細胞で照射から保護され、続いて、機能的ヒトリンパ球で移植されたマウスである。目的の抗原で前記マウスを免疫化し、次いで、標準化されたハイブリドーマ技術を使用することによってモノクローナル抗体を作製することによって、ヒトモノクローナル抗体を作製するために、Trimeria系と称されるキメラのこの種類が使用される。これらのマウス及び抗体を作製するためのそれらの使用のさらなる記載については、例えば、Eren, R. et al. (1998) Immunology 93: 154-161; Reisner, Y. and Dagan, S. (1998) Trends Biotechnol. 16: 242-246; Nan, E. et al. (1999) Hepatology 29: 553-562; and Bocher, W.O. et al. (1999) Immunology 96: 634-641を参照されたい。
30

【0176】

インビオ生成された抗体産生細胞から開始して、KohlerとMilsteinによって最初に記載されたハイブリドーマ技術などの標準化された技術を用いて、モノクローナル抗体を作製し得る(1975, Nature 256: 495-497)(Brown et al. (1981) J. Immunol. 127: 539-46; Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255: 4980-83; Yeh et al. (1976) PNAS 76: 2927-31; 及びYeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29: 269-75も参照されたい。)。モノクローナル抗体ハイブリドーマを作製するための技術は、十分に公知である(R.H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E.A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med.,
40
50

54 : 387 - 402 ; M. L. Gefter et al., (1977) *Somatic Cell Genet.*, 3 : 231 - 36). 要約すれば、不死化された細胞株（典型的には、骨髄腫）は、本発明のA グロブロマー又はその誘導体で免疫された哺乳動物のリンパ球（典型的には、脾細胞又はリンパ節細胞又は末梢血リンパ球）と融合され、本発明のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを同定するために、得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングする。この目的のために、リンパ球及び不死化された細胞株を融合するための多くの周知のプロトコールのうち何れをも使用することが可能である (G. Galfre et al., (1977) *Nature* 266 : 550 - 52; Gefter et al., *Somatic Cell Genet.*, 上で引用; Lerner, Yale J. Biol. Med., 上で引用; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, 上で引用)。さらに、当業者は、同様に有用であるこのような方法の多様な変形が存在することを理解する。典型的には、不死化された細胞株（例えば、骨髄腫細胞株）は、リンパ球と同じ哺乳動物種から得られる。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫されたマウスから得られたリンパ球を、不死化されたマウス細胞株と融合することによって確立され得る。好ましい不死化された細胞株は、ヒポキサンチン、アミノブテリン及びチミジン (HAT 培地) を含有する培地に対して感受性であるマウス骨髄腫細胞株である。骨髄腫細胞株の多数のいずれか、例えば、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653 又は Sp2/O-Ag14 骨髄腫細胞株を、融合対として、当初から使用し得る。これらの骨髄腫細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC)、Rockville、MD から入手することができる。典型的には、HAT 感受性マウス骨髄腫細胞は、ポリエチレンギリコール (PEG) を用いて、マウス脾細胞に融合される。次いで、HAT 培地を使用し、これにより、融合されていない骨髄腫細胞及び非生産的に融合された骨髄腫細胞を死滅させることによって（融合されていない脾細胞は形質転換されていないので、数日後に死亡する。）、融合から得られたハイブリドーマ細胞株を選択する。本発明のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞は、例えば、上に定義されているように結合親和性を有する抗体を選択するために、上に及び実施例 8 に記載されているドットプロットアッセイを用いることによって、このような抗体に対してハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって同定される。

【0177】

モノクローナル抗体 5F7、10F11、7C6、4B7、6A2、2F2、4D10、7E5、10C1 及び 3B10 の全ては、上記インビボアプローチを用いて作製され、本明細書に記載されているハイブリドーマから取得することができる。

【0178】

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

【0179】

インビトロアプローチ

免疫化及び選択によって本発明の抗体を作製する別の方法として、A (20 - 42) グロブロマー又はその誘導体で、組み換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングし、これにより、必要とされる結合親和性を有する免疫グロブリンライブラリーの要素を単離することによって、本発明の抗体を同定及び単離し得る。ディスプレイライブラリーを作製し、スクリーニングするためのキットは、市販されている（例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号 27-9400-01；及び Stratagene SurfZAP^(R) Phage Display Kit、カタログ番号 240612）。多くの実施形態において、ディスプレイライブラリーは、scFv ライブラリー又は Fab ライブラリーである。組み換え抗体ライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ技術は、十分に記載されている。抗体ディスプレイライブラリーを作製し、ス

10

20

30

40

50

リーニングするために特に有利に使用することができる方法及び化合物の例は、例えば、McCaffertyらWO92/01047、USS, 969, 108及びEP 589 877(特に、scFvディスプレイを記載する。)、LadnerらUSS, 223, 409、USS, 403, 484、USS, 571, 698、USS, 837, 500及びEP 436597(例えば、pIII融合を記載する。); DowerらWO91/17271、USS, 427, 908、USS, 580, 717及びEP 527839(特に、Fabディスプレイを記載する。); WinterらInternational Publication WO92/20791及びEP 368, 684(特に、可変免疫グロブリンドメインに対する配列のクローニングを記載する。); GriffithsらのUSS, 885, 793及びEP 589877(特に、組み換えライブラリーを使用することによる、ヒト抗原に対するヒト抗体の単離を記載する。); GarrardらWO92/09690(特に、ファージ発現技術を記載する。); KnappikらWO97/08320(ヒト組み換え抗体ライブラリーHuCaiを記載する。); SalefeldらWO97/29131(ヒト抗原(ヒト腫瘍壞死因子)に対する組み換えヒト抗体の产生及び組み換え抗体のインビトロ親和性成熟を記載する。)及びSalefeldらのU.S. Provisional Application No. 60/126, 603及びこれらを基礎とする特許出願(同様に、ヒト抗原(ヒトイントロイキン-12)に対する組み換えヒト抗体の作製及び組み換え抗体のインビトロ親和性成熟を記載する。)に見出すことができる。

10

20

30

【0180】組み換え抗体ライブラリーのスクリーニングのさらなる記述は、Fuchs et al., (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay et al., (1992) Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85; Huse et al., (1989) Science 246: 1275-1281; Griffiths et al., (1993) EMBO J 12: 725-734; Hawkins et al., (1992) J Mol Biol 226: 889-896; Clarkson et al., (1991) Nature 352: 624-628; Gram et al., (1992) PNAS 89: 3576-3580; Garrad et al., (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom et al., (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137; Barbas et al., (1991) PNAS 88: 7978-7982; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552-554; 及びKnappik et al., (2000) J. Mol. Biol. 296: 57-86などの科学的な刊行物中に見出される。

40

40

【0181】バクテリオファージディスプレイ系の使用に代えて、組み換え抗体ライブラリーは、酵母細胞又は細菌細胞の表面上に発現され得る。WO99/36569は、酵母細胞の表面上に発現されたライブラリーを調製し、スクリーニングする方法について記載する。WO98/49286は、細菌細胞の表面上に発現されたライブラリーを調製し、スクリーニングする方法についてさらに詳しく記載する。

40

【0182】

全てのインビトロアプローチにおいて、所望の特性を有する組み換え抗体を濃縮するための選択方法は、該方法の不可欠な部分を形成し、これは、一般的に、「パニング」と呼ばれ、しばしば、そのマトリックスに標的構造が付着されたカラム上のアフィニティーコロマトグラフィーの形態を探る。次いで、好ましくは、上に及び実施例8に記載されているように、標準化されたドットプロットアッセイを用いて、有望な候補分子を、それらの絶対的及び/又は相対的親和性の個別的測定に供する。

50

【0183】

コンビナトリアルライブラリーの目的の抗体が一旦同定され、十分に性質決定されたら

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

10

【0184】

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

20

【0185】

目的の抗体のVH及びVLセグメントをコードするDNA断片が取得されたら、該DNA断片は、例えば、可変領域に対する遺伝子を完全長抗体鎖に対する遺伝子に、Fab断片に対する遺伝子に、又はscFv遺伝子に変換するために、標準化された組み換えDNA技術を用いてさらに操作され得る。これらの操作は、VL又はVHをコードするDNA断片を、別のタンパク質、例えば、定常抗体領域又は柔軟なリンカーをコードする別のDNA断片に作用可能に連結することを含む。本明細書において、「作用可能に連結された」という用語は、2つのDNA断片によってコードされたアミノ酸配列が翻訳領域内部に保たれるように、2つのDNA断片が連結されることを意味することを理解すべきである。

30

【0186】

VH領域をコードする単離されたDNAは、VH領域をコードするDNAを、重鎖定常領域をコードする別のDNA分子(CH1、CH2及びCH3)に作用可能に連結することによって、完全長重鎖に対する遺伝子へと変換し得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、周知であり（例えば、Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照）、及び前記領域を包含するDNA断片は、標準化されたPCR増幅を用いて取得し得る。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgE又はIgDから得られる定常領域であり得、IgG、特に、IgG1又はIgG4由来の定常領域が好ましい。重鎖Fab断片に対する遺伝子を得るために、VHをコードするDNAは、重鎖定常領域CH1のみをコードする別のDNA分子へ作用可能に連結され得る。

40

50

【0187】

V L 領域をコードする単離されたDNAは、V LをコードするDNAを、軽鎖定常領域C Lをコードする別のDNA分子に作用可能に連結することによって、完全長軽鎖に対する遺伝子（及びF ab 軽鎖に対する遺伝子）へと変換され得る。ヒト軽鎖の定常領域の遺伝子の配列は、周知であり（Kabat, E. A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照）、前記領域を包含するDNA断片は、標準化されたPCR增幅を用いて取得し得る。軽鎖定常領域は、又は定常領域であり得るが、定常領域が好ましい。

10

【0188】

s c F v 遺伝子を作製するために、V H 及びV L 配列が連続する一本鎖タンパク質として発現され、V L 及びV H 領域が柔軟なリンカーを介して互いに連結されるように、V H 及びV L をコードするDNA断片は、柔軟なリンカー（例えば、アミノ酸（Gly₄-Ser）₃）をコードする別の断片へ、作用可能に連結され得る（Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552-554参照）。

20

【0189】

上記結合親和性を有する单一のドメインV H 及びV L は、上記方法によって、單一ドメインライブラーから単離され得る。所望の結合活性を有する2つのV H 単一ドメイン鎖（C H 1あり又はなし）又は2つのV L 鎖又は1つのV H 鎖及び1つのV L 鎖の対は、本発明の抗体に対して本明細書に記載されているように有用であり得る。

【0190】

本発明の組換え抗体又は抗体部分を発現させるために、遺伝子が適切な転写調節配列及び翻訳調節配列へ作用可能に連結されるように、部分又は完全長軽鎖及び重鎖をコードするDNAは発現ベクター中に挿入され得る。この文脈において、「作用可能に連結された」という用語は、ベクター内の転写調節配列及び翻訳調節配列が、抗体遺伝子の転写及び翻訳を制御するという所期の機能を充足するように、抗体遺伝子がベクター中に連結されていることを意味するものと理解すべきである。

30

【0191】

都合よく、発現ベクター及び発現調節配列は、使用される発現宿主細胞と適合的であるように選択される。抗体軽鎖に対する遺伝子及び抗体重鎖に対する遺伝子は、別個のベクター中に挿入され得、又は両遺伝子は同一の発現ベクター中に挿入され、これが通常の事例である。抗体遺伝子は、標準化された方法（例えば、抗体遺伝子断片及びベクター上の相補的制限切断部位の連結によって、又は制限切断部位が存在しなければ、平滑末端連結の連結によって）を用いて発現ベクター中に挿入される。発現ベクターは、軽鎖及び重鎖に対する配列の挿入の前に、抗体定常領域に対する配列を既に担持し得る。例えば、1つのアプローチは、V H 及びV L 配列を、それぞれ、重鎖及び軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクター中に挿入し、これにより、ベクター内において、V H セグメントをC H セグメントに作用可能に連結し、また、ベクター内において、V L セグメントをC L セグメントへ作用可能に連結することによって、V H 及びV L 配列を完全長抗体遺伝子に変換することである。

40

【0192】

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

50

シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であり得る。抗体鎖に対する遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中の抗体鎖に対する遺伝子の発現を調節する制御配列を有し得る。

【0193】

「制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー及び抗体鎖に対する遺伝子の転写又は翻訳を調節するさらなる発現調節要素（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むものとする。この種の制御配列は、例えば、「Goeddele, ; Gene Expression Technology : Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)」に記載されている。当業者は、制御配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現強度などの要因に依存し得ることを理解する。哺乳動物宿主細胞中での発現のための好ましい制御配列には、サイトメガロウイルス(CMV)(CMVプロモーター/エンハンサーなど)、サルウイルス40(SV40)(SV40プロモーター/エンハンサーなど)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))及びポリオーマに由来するプロモーター及びエンハンサーなど、哺乳動物細胞中で強く、恒常的タンパク質発現をもたらすウイルス要素が含まれる。ウイルス制御要素及びその配列のさらなる記述については、例えば、Stinskiに対するUS5,168,062、Bellらに対するUS4,510,245及びSchaffnerらに対するUS4,968,615を参照されたい。

【0194】

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

【0195】

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

【0196】

本発明の組換え抗体を発現するための好ましい哺乳動物宿主細胞には、CHO細胞(Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されており、例えば、R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621に記載されているようにDHFR-選択可能マーカーとともに使用されるdhfr⁻CHO細胞を含む。)、NS0骨髄腫細胞、COS細胞及びSP2細胞が含まれる。抗体

10

20

30

40

50

遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞中に導入すると、抗体が前記宿主細胞中で発現されるまで、又は、好ましくは、宿主細胞がその中で増殖している培地中に抗体が分泌されるまで、宿主細胞を培養することによって抗体が産生される。次いで、抗体は、標準化されたタンパク質精製方法を用いることによって、培地から単離され得る。

【0197】

同様に、F a b 断片又は s c F v 分子など、完全な状態の抗体の部分を作製するために、宿主細胞を使用することが可能である。上記操作の変形は、もちろん、本発明に含まれる。例えば、本発明の抗体の軽鎖又は重鎖のいずれか（両鎖ではない。）をコードするDNAで宿主細胞を形質移入することが望ましい場合があり得る。目的の抗原の結合のために必要とされない軽鎖又は重鎖が存在する場合には、このような軽鎖又はこの重鎖又は両鎖をコードするDNAは、組み換えDNA技術を用いて、部分的に又は完全に除去され得る。このような末端切断されたDNA分子によって発現された分子は、同様に、本発明の抗体に含まれる。さらに、標準化された化学法を用いて本発明の抗体を第二の抗体に架橋することによって、1つの重鎖及び1つの軽鎖が本発明の抗体であり、並びに他の重鎖及び他の軽鎖が、目的の抗原とは異なる抗原に対して特異性を有する二機能性抗体を作製することが可能である。

【0198】

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

【0199】

ファージディスプレイによって、組み換え抗体ライブラリーをスクリーニングする代わりに、巨大なコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングして本発明の抗体を同定するために、当業者に公知の他の方法を使用し得る。基本的には、核酸と該核酸によってコードされる抗体との間の密接な物理的連結が確立され、及び核酸配列がコードする抗体の特性によって適切な核酸配列を選択するために使用され得る全ての発現系を使用し得る。

【0200】

別の発現系の1つの種類において、組み換え抗体ライブラリーは、S z o s t a k 及びR o b e r t s に対するW O 9 8 / 3 1 7 0 0 並びに「R o b e r t s , R . W . a n d S z o s t a k , J . W . (1 9 9 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 4 : 1 2 2 9 7 - 1 2 3 0 2 」に記載されているように、R N A - タンパク質融合物の形態で発現される。この系では、3' 末端上にピューロマイシン（ペプチジルアクセプター抗生物質）を担持する合成m R N A のインビトロ翻訳は、m R N A 及びこれによってコードされるペプチド又はタンパク質の共有的融合をもたらす。従って、m R N A の複雑な混合物（例えば、コンビナトリアルライブラリー）の特定のm R N A は、A (2 0 - 4 2) グロブロマーやその誘導体への前記抗体又は前記その部分の結合など、コードされるペプチド又はタンパク質の（例えば、抗体又はその部分の）特性に基づいて濃縮され得る。抗体又はその部分をコードし、このようなライブラリーのスクリーニング

10

20

30

40

50

によって得られる核酸配列は、上述のように（例えば、哺乳動物宿主細胞中で）組み換え手段によって発現され得、さらに、さらなるラウンドにおいてmRNA - ペプチド融合をスクリーニングし、最初に選択された配列中に変異を導入することによって、又は上述のように組み換え抗体のインビトロ親和性成熟の他の方法を用いることによって、さらなる親和性成熟に供され得る。

【0201】

インビボとインビトロアプローチの組み合わせ

同様に、A (20-42) グロブロマーやその誘導体を、まず、インビボで、宿主動物中の抗体レパートリーに対して作用させて、A (20-42) グロブロマーや誘導体結合抗体の產生を刺激した後、1つ又はそれ以上のインビトロ技術の補助を得て、さらなる抗体選択及び／又は抗体成熟（すなわち、最適化）が達成される方法など、インビボとインビトロアプローチの組み合わせを使用することによって、本発明の抗体を作製し得る。一実施形態によれば、この種の組み合わされた方法は、まず、抗原に対する抗体応答を刺激するために、前記A (20-42) グロブロマーやその誘導体でヒト以外の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ科の動物、ヒツジ若しくはヤギ又はそのトランスジェニック様式又はキメラマウス）を免疫化し、次いで、前記A (20-42) グロブロマーや誘導体の作用によってインビボで刺激されたリンパ球の免疫グロブリン配列を使用することによって、ファージディスプレイ抗体ライブラリーを調製及びスクリーニングすることを含み得る。この組み合わされた操作の第一の工程は、インビボアプローチと組み合わせて上記の様式で実施し得るのに対して、この操作の第二の工程は、インビトロアプローチと組み合わせて上記の様式で実施し得る。前記刺激されたリンパ球から調製されたファージディスプレイライブラリーのその後のインビトロスクリーニングによって非ヒト動物を過免疫化する好ましい方法には、Biosite Inc. によって記載される方法が含まれ、例えば、Biosite Inc., WO 98/47343, WO 91/17271, US 5,427,908 及び US 5,580,717 を参照されたい。

10

20

30

30

40

【0202】

別の実施形態によれば、組み合わされた方法は、まず、本発明のA (20-42) グロブロマーやその誘導体に対する抗体応答を刺激するために、本発明のA (20-42) グロブロマーやその誘導体でヒト以外の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ科の動物、ヒツジ、ヤギ又はそのノックアウト及び／又はトランスジェニック様式又はキメラマウス）を免疫化し、（例えば、免疫化された動物から調製された）ハイブリドーマをスクリーニングすることによって、所望の特異性を有する抗体を作製するリンパ球を選択することを含む。抗体又は単一ドメイン抗体に対する遺伝子は、（逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応などの標準化されたクローニング方法を用いて）選択されたクローニングから単離され、選択された1つ又は複数の抗体の結合特性を改善するために、インビトロアフィニティー成熟に供される。この操作の第一の工程は、インビボアプローチに関連する上記様式で実施され得るのに対して、この操作の第二の工程は、特に、WO 97/29131 及び WO 00/56772 に記載されているものなど、インビトロアフィニティー成熟の方法を用いることによって、インビトロアプローチに関連して上述されている様式で実施され得る。

40

【0203】

さらなる組み合わされた方法において、組み換え抗体は、選択リンパ球抗体法（SLA M ; selected lymphocyte antibody method）として当業者に公知であり、U.S. 5,627,052, WO 92/02551 及び Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 7843 - 7848 に記載されている操作を使用することによって、個別の単離されたリンパ球から作製される。この方法において、まず、オリゴマー又は誘導体への免疫応答を刺激するために、A (20-42) グロブロマーやその誘導体で、ヒト以外の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ科の動物、ヒツ

50

ジ、ヤギ又はそのトランスジェニック様式、又はキメラマウス)をインビボで免疫化し、次いで、抗原特異的溶血プラーカッセイを用いることによって、目的の抗体を分泌する個別の細胞を選択する。この目的のために、グロプロマー又はその誘導体又は構造的に関連する目的の分子は、ビオチンなどのリンカーを用いて、ヒツジ赤血球に結合され、これにより、溶血プラーカッセイを使用することによって、適切な特異性を有する抗体を分泌する個別の細胞を同定することを可能とし得る。目的の抗体を分泌する細胞の同定に続き、逆転写酵素 P C R によって、軽鎖及び重鎖の可変領域に対する c D N A を細胞から取得し、次いで、C O S 又はC H O 細胞などの哺乳動物宿主細胞中で、適切な免疫グロブリン定常領域(例えば、ヒト定常領域)に付随して、前記可変領域を発現し得る。インビボで選択されたリンパ球に由来する増幅された免疫グロブリン配列で形質移入された宿主細胞は、次いで、例えば、結合親和性を有する抗体を発現する細胞を単離するために、形質移入された細胞を伝播されることによって、さらなるインビトロ分析及びインビボ選択に供され得る。増幅された免疫グロブリン配列は、さらに、インビトロで操作され得る。

10

【0204】

本明細書に定義されている必要とされる親和性を有する抗体は、実質的に上述されているドットプロットを実施することによって選択することができる。簡潔に述べると、系列希釈して、抗原を固体マトリックスに付着させ、好ましくは二トロセルロース膜上にドット状に添加する。次いで、固定化された抗原を目的の抗体と接触させた後、酵素連結された二次抗体を用いて抗体の検出及び比色反応を行う。所定の抗体及び抗原濃度で、結合された抗体の量が、アフィニティー測定を可能とする。従って、1つの標的への2つの異なる抗体の相対親和性又は2つの異なる標的への1つの抗体の相対親和性は、本明細書において、その他は同一のドットプロット条件下で、2つの抗体 - 標的組み合わせを用いて観察された標的結合された抗体のそれぞれの量の関係として定義される。

20

【0205】

モノクローナル抗体5F7、10F11、7C6、4B7、6A2、2F2、4D10、7E5、10C1又は3B10と同一のエピトープに結合する抗体は、それ自体公知の様式で取得することが可能である。

30

【0206】

上記抗体が競合され得るのと同様に、本明細書において、これらの構造の少なくとも1つが、好ましくは、重複するエピトープ又は同一のエピトープ、より好ましくは、同一のエピトープを提供することによって、別の構造の測定可能な結合を特異的に低下させることができれば、本明細書において、異なる標的構造は、特定の抗体に対して「競合する」と称される。

【0207】

標的実体との競合は、このような標的構造に対するそれらの相対親和性によって抗体を直接的に選択するのに有用である。従って、競合実体、例えば、異なって標識された競合構造の区別可能な形態を目的の抗体と接触させ、抗体によって結合されるこれらの実体の相対的量から、これらの実体の各々に対する抗体の相対親和性を推定する競合アッセイを使用することによって、相対的親和性を直接測定し得る。

40

【0208】

より大きな親和性が望まれる実体を固体マトリックス支持体に付着させ、培地に対してより小さな親和性が望まれる競合実体の適切な量、好ましくは、モル過剉を添加することによって、標的実体に対する所望の相対親和性を有する抗体を直接濃縮するために、このような競合を使用し得る。従って、所望の相対親和性を示す抗体は、他の抗体より強くマトリックスに結合する傾向があり、例えば、低い塩濃度で洗浄した後、高い塩濃度を使用することにより、結合した抗体をその標的から可逆的に剥離させることによって、結合した抗体を採集することによって、より望ましくない形態を洗浄した後に取得され得る。所望であれば、濃縮を数回繰り返して実施し得る。例えば、ハイブリドーマ又は抗原を提示するファージ又は酵母細胞のプール中で、抗体の基礎を成す遺伝子型がこの抗体に物理的に関連付けられている本発明の特定の実施形態では、対応する表現型が救出され得る。

50

【0209】

本発明の別の実施形態において、抗体の相対的親和性が固定化された抗原に結合されたパーセントから推測できるように、抗体結合に関して、固定化された抗原が溶解された実体と競合する修飾されたドットプロットが使用される。

【0210】

パパイン又はペプシンでの消化など慣用技術を使用することによって、完全な抗体から、 Fab 及び $F(ab')断片などの抗体部分を作製し得る。さらに、抗体、抗体部分及び免疫接着分子は、標準化された組み換えDNA技術を使用することによって取得し得る。$

【0211】

本発明は、本発明の抗体を含み、医薬として適切な担体を場合によって含む薬剤（組成物）にも関する。本発明の医薬組成物は、さらに、少なくとも1つの追加の治療剤、例えば、その緩和のために本発明の抗体が有用である疾患の治療のための1つ又はそれ以上のさらなる治療剤を含有し得る。例えば、本発明の抗体が本発明のグロブロマーマーに結合する場合には、医薬組成物は、さらに、前記グロブロマーマーの活性が重要である疾患の治療に有用である1つ又はそれ以上の追加の治療剤を含有し得る。

10

【0212】

医薬として適切な担体には、生理的に適合性がある限り、全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などが含まれる。医薬として許容される担体には、例えば、水、生理的食塩水、リン酸緩衝化された生理的食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどの及びこれらの組み合わせが含まれる。多くの場合、さらに、等張剤、例えば、糖、マニトール若しくはソルビトールなどの多価アルコール又は塩化ナトリウムを使用することが好ましい。医薬として適切な担体は、抗体の半減期又は効力を増強する、湿潤剤又は乳化剤、防腐剤又は緩衝剤などの補助物質の比較的小量をさらに含有し得る。

20

【0213】

医薬組成物は、例えば、非経口投与に適切であり得る。ここで、抗体は、好ましくは、 $0.1 - 250 \text{ mg/mL}$ の抗体含量を有する注射可能溶液として調製される。注射可能溶液は、液体又は凍結乾燥された形態で調製され得、剤形は、フリントガラス又はバイアル、アンプル又は予め充填されたシリンジである。緩衝液は、 $L - \text{HISCHIN}$ （1から50 mM、好ましくは、5から10 mM）を含有し得、5.0から7.0、好ましくは6.0のpHを有し得る。さらに、適切な緩衝液には、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム又はリン酸カリウム緩衝液が含まれるが、これらに限定されない。0から300 mMの濃度に（好ましくは、液体剤形に対して150 mM）の溶液の毒性（toxicity）を修飾するために、塩化ナトリウムを使用し得る。凍結乾燥された剤形に対して、凍結保護剤、例えば、スクロース（例えば、好ましくは、0から10%、好ましくは0.5から1.0%）も含め得る。他の適切な凍結保護剤は、トレハロース及びラクトースである。凍結乾燥された剤形に対して、充填剤、例えば、マニトール（例えば、1から10%、好ましくは、2から4%）も含め得る。液体及び凍結乾燥された剤形の両方に、安定化剤、例えば、L-メチオニン（例えば、51から50 mM、好ましくは5から10 mM）を使用し得る。さらなる適切な充填剤は、グリシン及びアルギニンである。界面活性剤、例えば、ポリソルベート80（例えば、0から0.05%、好ましくは、0.005から0.01%）も使用し得る。さらなる界面活性剤は、ポリソルベート20及びBRIDGE界面活性剤である。

30

40

【0214】

本発明の組成物は、多様な形態を有し得る。これらには、液体溶液（例えば、注射可能及び注入可能な溶液）、分散液又は懸濁液、錠剤、丸薬、粉末、リポソーム及び坐剤などの液体、半固体及び固体剤形が含まれる。好ましい形態は、予定される投与の種類及び治療用途に依存する。典型的には、注射可能溶液又は注入可能溶液の形態の組成物、例えば、ヒトの受動免疫のための他の抗体と類似する組成物が好ましい。投与の好ましい経路は

50

、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内又は筋肉内）である。好ましい実施形態によれば、抗体は、静脈内注入又は注射によって投与される。別の好ましい実施形態によれば、抗体は、筋肉内又は皮下注射によって投与される。

【0215】

治療組成物は、典型的には、調製及び保存条件下で、無菌及び安定でなければならない。組成物は、溶液、ミクロエマルジョン、分散液、リポソーム又は活性物質の高濃度に適したその他の秩序化された構造として製剤化され得る。無菌注射可能溶液は、適宜、必要であれば、上記成分の1つ又は組み合わせとともに、必要な量で、適切な溶媒中に活性化合物（すなわち、抗体）を導入し、次いで、前記溶液を滅菌ろ過することによって調製され得る。通常、分散液は、塩基性分散媒、及び、適宜、その他の必要とされる成分を含有する無菌ビヒクル中に活性化合物を導入することによって調製される。無菌注射可能溶液を調製するための凍結乾燥された無菌粉末の場合には、予め滅菌ろ過された溶液から、活性成分の粉末、及び、適宜、さらなる所望の成分の粉末を產生する真空乾燥及び粉末乾燥が好ましい調製方法である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合には、必要な粒径を維持することによって、又は界面活性剤を使用することによって維持し得る。注射可能組成物の延長された吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチンを組成物中にさらに導入することによって実現され得る。

10

【0216】

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

20

【0217】

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

30

【0218】

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

40

【0219】

本発明のグロプロマーが役割を果たしている疾患には、特に、その発達及び／又は進行

50

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

10

【0220】

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

【0221】

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

20

【0222】

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

30

【0223】

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

40

【0224】

抗体の診断的使用的枠内において、定性又は定量特異的グロプロマー測定は、特に、疾患に関連するアミロイド形態を診断する役割を果たす。この文脈において、特異性は、十分な感受性で、特定のグロプロマー若しくはその誘導体又はその混合物を検出できる可能性を意味する。本発明の抗体は、有利には、10 ng / mL 試料未満、好ましくは、1 ng / mL 試料未満、及び特に好ましくは100 pg / mL 試料未満の検出閾値濃度を有し、少なくとも各事例に示されている mL 試料当たりのグロプロマーの濃度、有利には、より低い濃度が、本発明の抗体によって検出可能であることを意味する。

【0225】

50

検出は、免疫学的に実施される。これは、原則として、凝集及び沈殿技術、イムノアッセイ、免疫組織学的方法並びにイムノプロット技術、例えば、ウェスタンプローティング又は、好ましくは、ドットプロット法など、抗体が使用されるあらゆる分析又は診断アッセイ方法を使用することによって実施され得る。インビオ法では、例えば、画像化法も本発明に含まれる。

【0226】

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

10

【0227】

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

20

【0228】

これらの目的のために利用可能な標識のうち、酵素は、有利であることが判明している。例えば、ペルオキシダーゼ、特に、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及び-Dガラクトシダーゼに基づく系が使用され得る。例えば、その転化が分光学的にモニターできる特異的な基質をこれらの酵素に対して利用することが可能である。適切な基質系は、アルカリホスファターゼについては、p-ニトロフェニルホスファート（p-NPP）、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスファート/ニトロブルーテトラゾリウム（BCIP/NPT）、ファーストレッド/ナフトール-AS-TSホスファート；ペルオキシダーゼについては、2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS）、o-フェニレンジアミン（OPT）、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）、o-ジアニシジン、5-アミノサリチル酸、3-ジメチルアミノ安息香酸（DMAB）及び3-メチル-2-ベンゾチアゾリンヒドラゾン（MBTH）；-ガラクトシダーゼについては、o-ニトロフェニル-D-ガラクトシド（o-NPG）、p-ニトロフェニル-D-ガラクトシド及び4-メチルウンベリフェニル-D-ガラクトシド（MUG）に基づく。多くの事例で、これらの基質系は、即時使用形態で、例えば、適切な緩衝液などのさらなる試薬も含有し得る錠剤の形態で市販されている。

30

【0229】

使用される追跡物質は、標識されたグロプロマーであり得る。この意味で、特定のグロプロマーは、測定されるべきグロプロマーを標識し、これを追跡物質として使用することによって測定することが可能である。

40

【0230】

追跡物質を調製するための、グロプロマーへの標識の結合は、それ自体公知の様式で実施され得る。本発明のグロプロマーの誘導体化に関する上記コメントは、類推によって表記されている。さらに、タンパク質への連結のために適切に修飾された多数の標識、例えば、ビオチン、アビジン、エクストラビジン又はストレプトアビジン連結された酵素、マ

50

レイミドで活性化された酵素などが利用可能である。これらの標識は、オリゴマーと直接、又は、必要であれば、追跡物質を与えるために適切に誘導体化されたグロブロマーと反応され得る。例えば、ストレプトアビシン・ペルオキシダーゼ抱合体が使用される場合には、これは、まず、グロブロマーのビオチン化を必要とする。これは、逆の順序に対しても準用される。この目的のための適切な方法は、当業者にも公知である。

【0231】

異種のイムノアッセイフォーマットが選択されるのであれば、例えば、支持体に結合された抗イディオタイプ抗体、例えば、ウサギ IgG に対して誘導された抗体を介して、抗原抗体複合体を支持体に結合することによって抗原抗体複合体を分離し得る。適切な支持体、特に、適切な抗体で被覆されたマイクロタイタープレートが公知であり、一部は市販されている。10

【0232】

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

【0233】

イムノアッセイとともに供給されるさらなる成分は、前記イムノアッセイの種類に依存する。通常、標準的なタンパク質、必要とされ得る又は必要とされ得ない追跡物質及び対照血清が、抗血清とともに供給される。さらに、マイクロタイタープレート（好ましくは、抗体で被覆されている。）、例えば、検査用、洗浄用又は基質の転化用緩衝液及び酵素基質自体も含まれ得る。

【0234】

イムノアッセイの一般的な原理並びに研究室及び病院での補助具としての抗体の作製及び使用は、例えば、「Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow, E., and Lane, D., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988) 中に見出すことができる。30

【0235】

従って、本発明は、アミロイドーシスを有することが疑われている患者において、アミロイドーシス、例えば、アルツハイマー病を診断する方法も含む。本方法は、1) 患者から生物学的試料を単離する工程；2) 抗原 / 抗体複合体の形成のために十分な時間及び条件下で、上記抗体の少なくとも 1 つと生物学的試料を接触させる工程；及び 3) 前記試料中の抗原 / 抗体複合体の存在を検出する工程を含み、複合体の存在が、患者中のアミロイドーシス、例えば、アルツハイマー病の診断を示唆する。抗原は、例えば、グロブロマー又は完全なグロブロマーと同じ機能的特性（例えば、結合活性）を有するその一部若しくは断片であり得る。40

【0236】

さらに、本発明は、アミロイドーシスを有することが疑われている患者において、アミロイドーシス、例えば、アルツハイマー病を診断する別の方法を含む。本方法は、1) 生物学的試料を患者から単離する工程；2) 抗体 / 抗原複合体の形成のために十分な時間及び条件下で、生物学的試料を抗原と接触させる工程；3) 結合された抗体に抱合体を結合させるのに十分な時間及び条件下で、得られた抗体 / 抗原複合体に抱合体を添加する工程；4) シグナル発生化合物によって発生されたシグナルを検出することによって、生物学

的試料中に存在し得る抗体の存在を検出する工程を含み、前記シグナルは、患者中のアミロイドーシス、例えばアルツハイマー病の診断を示す。抗原は、グロブロマー又は完全なグロブロマーと同じ機能的特性（例えば、結合活性）を有するその一部若しくは断片であり得る。

【0237】

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

10

【0238】

また、本発明には、キットであって、a)上記抗体の少なくとも1つ、及びb)シグナル発生化合物に付着された抗体を含む抱合体を含み、前記抱合体の前記抗体が単離された抗体とは異なる、前記キットが含まれる。

20

【0239】

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

30

【0240】

本発明の1つの診断的実施形態において、本発明の抗体又はその一部は、固相上にコートされている（又は液相中に存在する。）。次いで、検査又は生物試料（例えば、全血、脳脊髄液、血清など）を固相と接触させる。抗原（例えば、グロブロマー）が試料中に存在する場合には、このような抗原は、固相上の抗体に結合し、次いで、直接法又は間接法のいずれかによって検出される。直接法は、単に、複合体そのものの存在を検出し、これにより抗原の存在を検出することを含む。間接法では、抱合体が、結合された抗原に添加される。抱合体は、シグナル発生化合物又は標識に付着された第二の抗体を含み、第二の抗体は、結合された抗原に結合する。第二の抗体が結合された抗原に結合すると、シグナル発生化合物は、測定可能なシグナルを発生する。次いで、このようなシグナルは、検査試料中の抗原の存在を示す。

【0241】

診断用イムノアッセイにおいて使用される固相の例は、多孔性及び非多孔性材料、ラテックス粒子、磁気粒子、微粒子（U.S.Patent No.5,705,330を参照。）、ビーズ、膜、マイクロタイターウェル及びプラスチックチューブである。固相材料の選択及び抱合体中に存在する抗原又は抗体を標識する方法は、所望であれば、所望のアッセイフォーマット性能特性に基づいて決定される。

40

【0242】

上述のように、抱合体（又は指標試薬）は、シグナル発生化合物又は標識に付着された抗体（又は、おそらく、アッセイによっては、抗抗体）を含む。このシグナル発生化合物又は「標識」は、それ自体検出可能であり、又は検出可能な生成物を生成させるための1つ又はそれ以上の追加の化合物と反応させ得る。シグナル発生化合物の例には、色素原、放射性同位体（例えば、¹²⁵I、¹³¹I、³²P、³H、³⁵S及び¹⁴C）、化学発光化合物（例えば、アクリジニウム）、粒子（可視又は蛍光）、核酸、錯化剤又は酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、酸ホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ及びリボヌクレアーゼ）などの触媒が含まれる。酵素（例えば、アルカリホスファターゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼ）を使用する場合には、色素産生

50

性、蛍光性又は発光性 (lumogenic) 基質の添加が、検出可能なシグナルの生成をもたらす。時間分解蛍光、内部反射蛍光、増幅 (例えば、ポリメラーゼ連鎖反応) 及びラマン分光法などの他の検出系も有用である。

【0243】

上記イムノアッセイによって検査され得る生物学的液体の例には、血漿、全血、乾燥された全血、血清、脳脊髄液又は組織及び細胞の水性又は有機水性抽出物が含まれる。

【0244】

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

10

【0245】

キットも、本発明の範囲に含まれる。より具体的には、本発明は、アルツハイマー病又は認知障害を特徴とする別の症状を有すると疑われる患者中の抗原 (例えば、グロブロマーチ) の存在を測定するためのキットを含む。特に、検査試料中の抗原の存在を測定するためのキットは、a) 本明細書に記載されている抗体又はその部分、及び b) 検出可能なシグナルを発声することができるシグナル発生化合物に付着された第二の抗体 (抗原に対する特異性を有する。) を含む抱合体を含む。キットは、抗原に結合する試薬を含む対照又は標準物質も含有し得る。

20

【0246】

本発明は、検査試料中の抗体を検出するためのキットも含む。キットは、a) 目的の抗体に対して特異的な抗抗体 (例えば、本発明の 1 つ) 、及び b) 上記抗原又はその一部を含み得る。抗原に結合する試薬を含む対照又は標準物質も含まれ得る。より具体的には、前記キットは、a) 抗体に対して特異的な抗抗体 (本発明の 1 つなど) 及び b) 検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に付着された抗原 (例えば、グロブロマーチ) を含む抱合体を含み得る。同じく、キットは、抗原に結合する試薬を含む標準物質の対照も含み得る。

30

【0247】

キットは、バイアル、瓶又は細片などの 1 つの容器も含み得、各容器は予め設置された固相を有し、他の容器はそれぞれの抱合体を含有する。これらのキットは、洗浄、加工及び指示試薬など、アッセイを実施するために必要とされる他の試薬のバイアル又は容器も含有し得る。

【0248】

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

40

【0249】

本発明の利点

A (20-42) グロブロマーチでの免疫化によって、上述されている比較ドットプロットティングによって測定されるように、異なる A (1-42) オリゴマー及び A (X-42) オリゴマーとは寛容性又は認識が異なる、別のモノクローナル抗体が取得され得る。これによって、認識増強効果の間の最適な関係、他の A 形態に比べて所望される特異性及び最小の副作用特性を有する N 末端切断された A オリゴマーに対して誘導された抗体の開発が可能となる。驚くべきことに、A (1-42) 及び A (12-42) グロブロマーチは、構造的要素を含有するにも関わらず、末端切断されたさらなる A (20

50

- 42) グロブロマーを抗原として使用することによって得られる抗体によって、部分的に認識されるに過ぎない。

【 0 2 5 0 】

特異的なオリゴマー性 A 形態を基本的な構造原理（すなわち、N末端切断された A グロブロマーの使用）に限定することによって、オリゴマー A 形態に対して高度に特異的である能動免疫において、抗体特性が生成される。同じことが、受動免疫において使用するためのモノクローナル抗体に対しても当てはまる。（能動及び受動）免疫化のためのこのような特定の戦略の利点は、A モノマーに対する免疫応答、凝集の纖維性状態にある A ペプチド又は sAPP を誘導しないことである。これは、幾つかの点で有利である。

10

【 0 2 5 1 】

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

【 0 2 5 2 】

2) モノマー A ペプチド形態は認知増強効果を発揮し得ることを示すことが可能であったので、モノマー A ペプチド形態に対して誘導される免疫応答は望ましくない。

20

【 0 2 5 3 】

3) sAPP に対して誘導された免疫応答は、生理的に存在する前駆体タンパク質 APP との反応をもたらし、従って、自己免疫反応をもたらし得るので、sAPP に対して誘導された免疫応答は、同様に望ましくない。さらに、sAPP は、認知増強効果を発揮することも示された。

【 0 2 5 4 】

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

30

【 0 2 5 5 】

5) A オリゴマーと特異的に反応する抗体は、例えば、纖維性 A に結合されず、従って、治療的効果のために利用可能でないので、病態生理学的な関連する A 種に関してより高い生物学的利用性を有する。

【 0 2 5 6 】

寄託情報：モノクローナル抗体 5F7 を產生するハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に基づいて、2005年12月1日に、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 に寄託され、受託番号 PTA-7241 が与えられた。さらに、モノクローナル抗体 10F11 を產生するハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に基づいて、2005年12月1日に、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801 に寄託され、受託番号 PTA-7239 が与えられた。さらに、モノクローナル抗体 4B7 を產生するハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に基づいて、2005年12月1日に、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801 に寄託され、受託番号 PTA-7242 が与えられ、モノクローナル抗体 7C6 を產生するハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に基づいて、2005年12月

40

50

1日に、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801に寄託され、受託番号PTA-7240が与えられた。さらに、モノクローナル抗体6A2を產生するハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に基づいて、2006年2月28日に、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801に寄託され、受託番号PTA-7409が与えられ、モノクローナル抗体2F2を產生するハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に基づいて、2006年2月28日に、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801に寄託され、受託番号PTA-7408が与えられた。10
 モノクローナル抗体4D10を產生するハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に基づいて、2006年2月28日に、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801に寄託され、受託番号PTA-7405が与えられた。モノクローナル抗体7E5を產生するハイブリドーマは、20
 ブダペスト条約の規定に基づいて、2006年8月16日に、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801に寄託され、受託番号PTA-7809が与えられた。モノクローナル抗体10C1を產生するハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に基づいて、2006年8月16日に、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801に寄託され、受託番号PTA-7810が与えられた。30
 モノクローナル抗体3B10を產生するハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に基づいて、2006年9月1日に、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801に寄託され、受託番号PTA-7851が与えられた。全ての寄託は、Abbott Laboratories, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois 60064(US)を代理して行われた。30

【0257】

実施例

以下の実施例は、本発明を例示することを意図するものであり、その範囲を限定するものではない。

【実施例1】

【0258】

グロプロマーの調製

a) A (1-42) グロプロマー

A (1-42) 合成ペプチド (H-1368、Bachem、Bubendorf、40
 Switzerland) を 6 mg / mL で 100 % の 1, 1, 1, 3, 3, 3 - ヘキサ
 フルオロ - 2 - プロパノール (HFIP) 中に懸濁し、完全な可溶化のために、37 度
 1.5 時間、振盪下で温置した。HFIP は、水素結合破壊剤として作用し、A ペプチ
 ド中にあらかじめ存在する構造的な不均質性を排除するために使用する。Speed Vac 中での蒸発により HFIP を除去し、ジメチルスルホキシド中で 5 mM 浓度で再懸濁し、20 秒間超音波処理した。HFIP で前処理された A (1-42) をリン酸緩衝塩類
 溶液 (PBS) (20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4) 中で 40
 0 μM に希釈し、(H₂O 中の) 1 / 10 容積の 2 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)
 を添加した (0.2 % SDS の終濃度)。37 度 6 時間温置すると、16 / 20 kDa
 の A (1-42) グロプロマー (球状オリゴマーのための短い形態) の中間体が得られ50

た。H₂Oの3容積でさらに希釈し、37で18時間温置することによって、38/48kDaのA(1-42)グロブロマーを生じた。3000gで20分間遠心分離した後、試料を限外濾過(30kDaカットオフ)により濃縮し、5mMNaH₂PO₄、35mMNaCl、pH7.4に対して透析し、10000gで10分間遠心分離し、38/48kDaのA(1-42)グロブロマーを含む上清を回収した。透析に対する代替例として、冰冷メタノール/酢酸溶液(33%メタノール、4%酢酸)の9倍過剰量(v/v)によって、38/48kDaのA(1-42)グロブロマーを4で1時間沈殿させることも可能である。次に、38/48kDaのA(1-42)グロブロマーをペレットにし(16200gで10分間)、5mMNaH₂PO₄、35mMNaCl、pH7.4中で再懸濁し、pHを7.4に調整した。

10

【0259】

b) 架橋されたA(1-42)グロブロマー

A(1-42)合成ペプチド(H-1368、Bachem、Bubendorf、Switzerland)を6mg/mLで100%の1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール(HFIP)中に懸濁し、完全な可溶化のために、37で1.5時間、振盪下で温置した。HFIPは、水素結合破壊剤として作用し、Aペプチド中にあらかじめ存在する構造的な不均質性を排除するために使用した。SpeedVac中の蒸発によりHFIPを除去し、ジメチルスルホキシド中で5mM濃度で再懸濁し、20秒間超音波処理した。HFIPで前処理されたA(1-42)をリン酸緩衝塩類溶液(PBS)(20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、pH7.4)中で400μMに希釈し、(H₂O中の)1/10容積の2%Dデシル硫酸ナトリウム(SDS)を添加した(0.2%SDSの終濃度)。37で6時間温置すると、16/20kDaのA(1-42)グロブロマー(球状オリゴマーのための短い形態)の中間体が得られた。H₂Oの3容積でさらに希釈し、37で18時間温置することによって、38/48kDaのA(1-42)グロブロマーを生じた。1mMグルタルアルデヒドとともに21の室温(RT)で2時間温置した後、RTで30分間エタノールアミン(5mM)処理することによって、38/48kDaのA(1-42)グロブロマーの架橋をここで実施した。

20

【0260】

c) A(20-42)グロブロマー

30

実施例1aに従って調製されたA(1-42)グロブロマー調製物1.59mLを、緩衝液(50mM MES/NaCl、pH7.4)38mL及び水中の1mg/mLサモリシン溶液(Rochelle)200μLと混合した。反応混合物をRTで20時間攪拌した。次に、水中の100mM EDTA溶液(pH7.4)80μLを添加し、1%強度のSDS溶液400μLで0.1%のSDS含有量へと混合物をさらに調整した。15mLの30kDa遠心沈殿チューブを介して、反応混合物を約1mLに濃縮した。濃縮物を緩衝液(50mM MES/NaOH、0.02%SDS、pH7.4)9mLと混合し、1mLに再度濃縮した。透析チューブ中で緩衝液(5mMリン酸ナトリウム、35mMNaCl)1Lに対して、濃縮物を6で16時間透析した。水中の2%強度のSDS溶液で、透析物を0.1%のSDS含有量に調整した。試料を10000gで10分間遠心分離し、A(20-42)グロブロマー上清を回収した。

40

【0261】

d) A(12-42)グロブロマー

50

実施例1aに従って調製されたA(1-42)グロブロマー調製物2mLを、38mLの緩衝液(5mMリン酸ナトリウム、35mM塩化ナトリウム、pH7.4)及び水中の1mg/mL G1uCエンドプロテアーゼ(Rochelle)150μLと混合した。反応混合物をRTで6時間攪拌し、その後、水中の1mg/mL G1uCエンドプロテアーゼ(Rochelle)150μLをさらに添加した。反応混合物をRTでさらに16時間攪拌した後、5M DIFP溶液8μLを添加した。15mLの30kDa遠心沈殿チューブを介して、反応混合物を約1mLに濃縮した。濃縮物を緩衝液(5mMリン酸ナトリウ

ム、35 mM 塩化ナトリウム、pH 7.4) 9 mL と混合し、1 mL に再度濃縮した。透析チューブ中で緩衝液(5 mM リン酸ナトリウム、35 mM NaCl)1 L に対して、濃縮物を 6 度で 16 時間透析した。水中の 1% 強度の SDS 溶液で、透析物を 0.1% の SDS 含有量に調整した。試料を 10000 g で 10 分間遠心分離し、A (12-42) グロブロマー上清を回収した。

【実施例 2】

【0262】

異なる A (1-42) モノマー及び A (1-40) モノマー調製物の分子ふるいクロマトグラフィー

A (1-42)、0.1% NH₄OH :

A (1-42)(Bachem、カタログ番号 H-1368) 1 mL を H₂O 中の 0.1% NH₄OH 500 μL 中に溶解し、大気温で 1 分間攪拌した。試料を 10000 g で 5 分間遠心分離した。上清を回収した。上清中の A (1-42) 濃度を、Bradford 法(BIORAD) に従って決定した。

【0263】

5 分間試料：

上清を含有する 0.1% NH₄OH 中の A (1-42) 20 μL を 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4 で、0.2 mg/mL の A (1-42) 濃度に希釈した。試料を大気温で 5 分間温置した。次に、分子ふるいクロマトグラフィー(SEC) によって、100 μL を分析した。

【0264】

1 時間試料：

上清を含有する 0.1% NH₄OH 中の A (1-42) 20 μL を 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4 で、0.2 mg/mL の A (1-42) 濃度に希釈した。試料を大気温で 1 時間温置した。次に、分子ふるいクロマトグラフィー(SEC) によって、100 μL を分析した。

【0265】

A (1-42)、70% HCOOH :

A (1-42) 1 mg を H₂O 中の 50 μL の 70% HCOOH 中に溶解し、大気温で 1 分間攪拌した。試料を 10000 g で 5 分間遠心分離した。上清を回収した。上清中の A (1-42) 濃度を、Bradford 法(BIORAD) に従って決定した。

【0266】

5 分間試料：

70% HCOOH 中の A (1-42) 2 μL を 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4 で 0.2 mg/mL の A (1-42) の濃度に希釈し、1 M NaOH で pH 7.4 に調整した。試料を大気温で 5 分間温置した。次に、分子ふるいクロマトグラフィーによって、100 μL を分析した。

【0267】

1 時間試料：

70% HCOOH 中の A (1-42) 2 μL を 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4 で 0.2 mg/mL の A (1-42) の濃度に希釈し、1 M NaOH で pH 7.4 に調整した。試料を大気温で 1 時間温置した。次に、分子ふるいクロマトグラフィーによって、100 μL を分析した。

【0268】

A (1-42)、0.1% NaOH :

A (1-42)(Bachem、カタログ番号 H-1368) 1 mL を H₂O 中の 0.1% NaOH の 500 μL 中に溶解し、大気温で 1 分間攪拌した。試料を 10000 g で 5 分間遠心分離した。上清を回収した。上清中の A (1-42) 濃度を、Bradford 法(BIORAD) に従って決定した。

【0269】

10

20

30

40

50

5分間試料：

0.1%NaOH中のA(1-42)20μLを20mMNaH₂PO₄、140mMNACl、pH7.4で0.2mg/mLのA(1-42)の濃度に希釈した。試料を大気温で5分間温置した。次に、分子ふるいクロマトグラフィーによって、100μLを分析した。

【0270】

1時間試料：

0.1%NaOH中のA(1-42)20μLを20mMNaH₂PO₄、140mMNACl、pH7.4で0.2mg/mLのA(1-42)の濃度に希釈した。試料を大気温で1時間温置した。次に、分子ふるいクロマトグラフィーによって、100μLを分析した。10

【0271】

A(1-42)、0.1%NaOH：

A(1-40)(Bachem、カタログ番号H-1194)1mgをH₂O中の0.1%NaOHの500μL中に溶解し、大気温で1分間攪拌した。試料を10000gで5分間遠心分離した。上清を回収した。上清中のA(1-42)濃度を、Bradford法(BIORAD)に従って決定した。

【0272】

5分間試料：

0.1%NaOH中のA(1-40)20μLを20mMNaH₂PO₄、140mMNACl、pH7.4で0.2mg/mLのA(1-40)の濃度に希釈した。試料を大気温で5分間温置した。次に、分子ふるいクロマトグラフィーによって、100μLを分析した。20

【0273】

1時間試料：

0.1%NaOH中のA(1-40)20μLを20mMNaH₂PO₄、140mMNACl、pH7.4で0.2mg/mLのA(1-40)の濃度に希釈した。試料を大気温で1時間温置した。次に、分子ふるいクロマトグラフィーによって、100μLを分析した。

【0274】

分子ふるいクロマトグラフィー(SEC)のための条件：

SECカラム：Superose 12 HR 10/300 GL (Amersham、カタログ番号17-5173-01)

流速：0.5mL/分

紙送り：0.2cm/分

214nmでの吸光度：0ないし0.2吸収単位

移動相：20mMNaH₂PO₄、140mMNACl、pH7.4

【0275】

結果を図1に示す。

Aペプチド、特にA(1-42)モノマーがフィブリルへ凝集する傾向が強いので、純粋にモノマーのA溶液の調製は、困難な課題である。それにもかかわらず、A(1-42)モノマー及びA(1-40)モノマーを識別する抗A(20-42)グロブロマーやスクリーニング及び性質決定のために、最もよく技術的に達成可能なAモノマー調製物が使用されるべきである。本発明において、20mMNaH₂PO₄、140mMNACl、pH7.4中へさらに希釈した後の凝集効果に及ぼすAペプチドの初期溶媒の効果を検査した。Aペプチド供給元(Bachem)は、その技術情報において、A(1-42)が0.1%NH₄OH中で可溶化されるべきであると述べている。NH₄OH中にA(1-42)を可溶化してすぐに20mMNaH₂PO₄、140mMNACl、pH7.4中に1:10にさらに希釈した後に、室温(RT)で5分間、分子ふるいクロマトグラフィーを行うと、74kDに小さなピークを有する纖維状前駆体に対40

10

30

40

50

する A (1-42) 凝集の最初の兆候を示す。モノマー A (1-42) は、11 kD で主要ピーク及び 6 kD での肩部で流れる。室温 (RT) で 1 時間の温置の後、NH₄OH 中の A (1-42) ペプチドは、既に、A (1-42) フィブリルへとかなりの程度まで凝集し、分子ふるいクロマトグラフィーカラムに入らなかつた検出可能な材料を喪失するに至る。A (1-42) ペプチドのための初期溶媒として 70 % ギ酸を使用する場合、RT で 1 時間後の凝集のかなりの程度が生じるとともに、わずかな画分の A (1-42) モノマーが残る (ギ酸自体は、タンパク質検出波長において背景吸収が高くなることに留意されたい。)。凝集を防止するための A (1-42) のための最良の初期溶媒は、0.1% NaOH であり、これは、可溶化の 1 時間の温置及びさらなる希釈後でさえ、凝集した A (1-42) のわずかな画分のみを示し、A (1-42) の大部分はなおモノマーである。0.1% NaOH 中に最初に可溶化される A (1-40) は、RT 温置の 1 時間後でさえ、凝集の全てにおいて兆候を示さない。

10

【実施例 3】

【0276】

A (1-42) フィブリルのための A (20-42) グロプロマー選択的抗体の識別の SDS-PAGE によって可視化された半定量的分析

A (1-42) フィブリル調製物：

A (1-42) (Bachem、カタログ番号 H-1368) 1 mg を H₂O 中の 500 μL の 0.1% NH₄OH 中に溶解し、大気温で 1 分間攪拌した。試料を 10000 g で 5 分間遠心分離した。上清を回収した。上清中の A (1-42) 濃度を、Bradford 法 (BIO-RAD) に従って決定した。

20

【0277】

0.1% NH₄OH 中の A (1-42) 100 μL を 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4 の 300 μL と混合し、2% HCl で pH 7.4 に調整した。次に、試料を 37 度 20 時間温置した。その後、試料を 10000 g で 10 分間遠心分離した。上清を廃棄し、残留物を 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4 の 400 μL と混合し、1 分間激しく攪拌する (「渦巻き攪拌する」) ことによって再懸濁し、10000 g で 10 分間遠心分離した。上清を廃棄し、残留物を 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4 の 400 μL と混合し、1 分間激しく攪拌する (「渦巻き攪拌する」) ことによって再懸濁し、10000 g で 10 分間さらにもう 1 回遠心分離した。上清を廃棄した。残留物を 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4 の 380 μL 中で再懸濁し、激しい攪拌 (「渦巻き攪拌」) によって促進した。

30

【0278】

A (1-42) フィブリルに対する抗 A 抗体の結合：

A (1-42) フィブリル調製物 40 μL を 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.4 の 160 μL で希釈した後、試料を 10000 g で 10 分間遠心分離した。上清を廃棄し、残留物を 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.4 の 95 μL 中に再懸濁した。再懸濁は、激しい攪拌 (「渦巻き攪拌」) によって促進された。

40

【0279】

フィブリル調製物 10 μL の一定分量を

- a) 10 μL の 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4
- b) 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4 中の 5F7 の 0.5 μg / μL の 10 μL
- c) 20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4 中の 6E10 (Sington 9320 番) の 0.5 μg / μL の 10 μL

と各々混合した。

【0280】

試料を 37 度 20 時間温置した後、10000 g で 10 分間遠心分離した。上清を回

50

収し、SDS-PAGE試料緩衝液20μLと混合した。残留物を20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、0.025%Tween20、pH7.4の50μLと混合し、「渦巻き攪拌」によって再懸濁した後、試料を10000gで10分間遠心分離した。上清を廃棄し、残留物を20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、0.025%Tween20、pH7.4の20μLと混合した後、SDS-PAGE試料緩衝液20μLと混合した。電気泳動用4ないし20%トリス/グリシングルへ試料を適用した。

【0281】

SDS-PAGEのためのパラメータ：

SDS試料緩衝液：0.3g SDS

4mLの1Mトリス/HCl(pH6.8)

8mLグリセリン

エタノール中の1%プロモフェノールブルー1mL

H₂Oで適宜50mLに充填

4ないし20%トリス/グリシングル：(Invitrogenカタログ番号EC6025BOX)

電気泳動緩衝液：7.5gトリス

36gグリシン

2.5g SDS

H₂Oで適宜2.5Lに充填

20mAの定常電流でゲルを泳動する。

10

20

30

40

50

【0282】

ゲルの染色：クーマシープルーR250

結果を図2に示す。

【0283】

異なる抗A抗体の半定量的分析及び前記抗体によるA(1-42)フィブリルの識別A(1-42)フィブリル及びA(1-42)モノマーの抗体の位置をゲルの縁に標識する。それらの大きさにより、A(1-42)フィブリルは、SDS-PAGEゲルへ進入することが不可能であり、ゲルの水中に観察されることが可能である。

【0284】

1.マーカー

2.A(1-42)フィブリル調製物；対照

3.A(1-42)フィブリル調製物；+mAb5F7；37、20時間；上清

4.A(1-42)フィブリル調製物；+mAb5F7；37、20時間；ペレット

5.A(1-42)フィブリル調製物；+mAb6E10；37、20時間；上清

6.A(1-42)フィブリル調製物；+mAb6E10；37、20時間；ペレット

遠心分離後の纖維に結合した画分(ペレット画分)及び上清画分中の抗体の重鎖から光学密度(OD)値を測定することによって、A型纖維に対する相対的な結合をSDS-PAGEから評価した。Aフィブリルへ結合した抗体は、Aフィブリルとともにペレットになり、従って、ペレット画分中に見出されるべきであるのに対し、Aフィブリルへ結合していない(遊離の)抗体は、上清中に見出される。Aフィブリルへ結合した抗体の割合を次式に従って算出した：

$$\text{A フィブリルに結合した抗体の割合} = \frac{\text{OD}_{\text{フィブリル画分}}}{\text{OD}_{\text{フィブリル画分}} + \text{OD}_{\text{上清画分}}} \times 100\%$$

【0285】

mAb6E10(Signet、カタログ番号9320)、5F7、2F2、6A2、4D10、10F11、3B10、7C6、7E5及び10C1に関して、この手法を実施した。

【0286】

アルツハイマー病患者の脳において、A フィブリルは、A ペプチドプール全体の主要成分である。抗 A 抗体によってこれらのフィブリルを攻撃することによって、負の副作用の危険性は、A の多量の遊離により上昇し、これがその後、微小出血の危険性を増大し得る。微小出血に関する危険性の増大は、A ペプチドの纖維状凝集体による能動免疫のアプローチにおいて観察された (Bennett and Holtzman, 2005, Neurology, 64, 10-12; Orgogozo J, Neurology, 2003, 61, 46-54; Schenk et al., 2004, Current Opin Immunol, 16, 599-606)。

【0287】

A A 1 - 1 7 間で線形 A エピトープを認識する市販の抗体 6 E 1 0 (Signet 109320) とは対照的に、(A (20 - 42) に対して最小限の選択性を実際に有する) A (20 - 42) グロブロマーセレクト抗体 5 F 7 は、同時ペレット化実験において A (1 - 42) フィブリルに結合しない。これは、A (1 - 42) フィブリルとの温置後の 5 F 7 抗体が、ペレット化工程後に上清中に残留し、A (1 - 42) フィブリルに結合しているために同時ペレット化しないという事実によって示される。

【実施例 4】

【0288】

野生型と比較した A (1 - 42) モノマー (0.1% NH₄OH)、A (1 - 42) グロブロマーゼ又は A (20 - 42) グロブロマーゼによる能動免疫後の対象認識検査によるマウスにおける認知成績の分析

これらの実験において、点変異を有するヒト APP を過剰発現するマウスを使用した。点変異とは、アミノ酸 717 (イソロイシンのバリンとの置換) を指し、寿命が 60 歳になる前に AD の開始に至るロンドンのある一家で発見されている (Mullan et al., Nature Genetics 2 (1992) 340 - 342)。本明細書で APP/L と呼ばれる遺伝子導入マウスは、ルーベン (Leuven) (Moerchaerts et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 6483 - 6492) によって作出され、ルーベンにおいて最初に記載された。6 週齢で、雌 APP/L マウスを能動免疫へ供した。

【0289】

マウスは、フロイント完全アジュvant の等しい量と混合されたリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) 中の A (1 - 42) モノマー (0.1% NH₄OH)、A (1 - 42) グロブロマーゼ又は A (20 - 42) グロブロマーゼのいずれかの 100 μg を腹腔内に受容した後、フロイント不完全アジュvant 中のアンチジーンの同一量による追加免疫注射を 3 週間ごとに 3 ヶ月間受容した。実験の時間経過を通じて、逆転した昼 / 夜周期 (午後 7 時に開始する明期 14 時間 / 暗期 10 時間) 中の標準的な条件下で動物を維持した。実験を通じて経時的に体重が増加したことは、予想通りであり、PBS / アジュvant 単独を受容した対照群と差はなく、抗原処理が十分許容されることを示唆した。

【0290】

4.5 ヶ月齢で、マウスの認知能を先行技術 (Dewachter et al. Journal of Neuroscience 22 (2002) 3445 - 3453) に記載されている対象認識検査によって検査した。この目的のため、マウスを活動領域へ慣れさせた後、2 つの同一要素 (同様の大きさ約 4 cm の青色の錐体、緑色の立方体、黄色の円柱) を含有する活動領域中に個々に配置される獲得相へ 10 分間曝露した。マウスが対象を探索する時間及び頻度を記録した。2.5 時間後の保持相の間、既知の対象に加え、他の対象から無作為に選択された未知の対象を含有している活動領域へマウスを戻した。時間全体 (旧い及び新しい対象の探索) に対するマウスが古い対象を探索している時間として、新たな対象の認識を記録した。「認識指数」は、この関係を表す (新たな対象のための時間 / 時間全体)。既知の対象を思い出さないマウスは、既知の対象を新たな対象と等しく興味があるものと考え、既知の対象を探索する時間の等しい量を過ごし、言い換えれば、50% の認識指数を示す。既知の対象を思い出すマウスは、既知の対象を興味

10

20

30

40

50

のないものと考え、それゆえ、有意により高い認識指數を示す。APP/Lマウスは、4.5ヶ月齢で認知の欠乏が生じることが公知であり、無作為なレベル、すなわち50%の次元における認識指數を呈する。

【0291】

結果を図3に示す。

【0292】

マウスにおける対象認識検査。前記検査は、10分間の検査相の間の探索行動に関して測定された、未知の対象と比較した既知の対象の認識を報告する。認識指數は、マウスが、両対象を探索するのにかかる時間に対する未知の対象を探索するのにかかる時間の割合として定義される。検査相の3時間前の10分間の獲得相の間、マウスが、既知の対象を探索した。マウスの5群（数nが、列の下に付与される。）を比較した。正常なC57BL/6マウス（野生型）は、無作為なレベル（50%、すなわち既知及び未知の両対象にかかる探索の等しい時間）とは有意に異なる高いRIを示す（*** = p < 0.001；Studentのt検定）。3ヶ月前に、APP遺伝子導入マウスの他の4群を能動免疫へ供した。使用される免疫原は、A（1-42）モノマー、A（1-42）グロブロマー及びA（20-42）グロブロマーであった。リン酸緩衝塩類溶液（PBS）を対照として使用した。PBSと他の群との間の有意差を円で示す： = p < 0.05； = p < 0.01（ANOVAにおけるp < 0.05後のpost-hoc t検定）。

10

【0293】

APP/Lマウスは、非遺伝子導入マウスとは対照的に、4.5ヶ月齢で認知欠乏を示すことが公知であり、スコア化の結果は無作為レベル（すなわち、50%認識指數）に近い。実際、PBS処理したマウスは、非遺伝子導入マウス（野生型）とは対照的に無作為な行動を示した。天然A（1-42）グロブロマー及びA（20-42）グロブロマーによる免疫化の結果、APP/Lマウスにおける対象認識が有意に改良された。

20

【0294】

両グロブロマー調製物（天然型及び切断型）によってAPP遺伝子導入動物における記憶の改良及びA（20-42）で処理した動物におけるさらに優れた認識が得られたため、切断型A（20-42）グロブロマーに対する抗体の誘導が、最良の結果を生じ、この種と特異的に反応する抗体による受動免疫が処理の最適な戦略に該当することを想定することは妥当である。

30

【実施例5】

【0295】

A（20-42）グロブロマーによるAPP/L Tgマウスの能動免疫後の異なるA形態に関する抗体特性のドットプロット分析

Aの異なる形態によるAPP/Lマウス（Mo e c h a r s et al., 1999, J. Biol. Chem. 274, 6483-6492）のマウスの免疫化（実施例4と比較）の後、抗A抗体に関して血漿試料を評価した。この目的のため、0.2mg/mL BSAを補充されたPBS中の100pmol/μLから0.01pmol/μLまでの範囲の個々のA（1-42）形態を連続的に希釈した。各試料1μLをニトロセルロースメンブレン上へプロットした。検出のため、（1:400に希釈された）対応するマウス血漿試料を使用した。アルカリホスファターゼ抱合型抗マウスIgG及び染色試薬NBT/BCIPを使用して、免疫染色を実施した。

40

【0296】

ドットプロットのためのA標準物質：

1. A（1-42）グロブロマー

A（1-42）グロブロマーの調製を実施例1aに記載している。

【0297】

2. HFIPIで前処理されたPluronic F68中のA（1-42）モノマーA（1-42）（Bachem Inc.；カタログ番号H-1368）3mgを1.7mLのエッペンドルフチューブ中の0.5mL HFIPI（6mg/mL懸濁液）中

50

に溶解し、透明な溶液が得られるまで、37で1.5時間振盪した(Eppendorff Thermoミキサー、1400rpm)、試料をSpeed Vac濃縮器中で乾燥させ(1.5時間)、13.2μLのDMSO中に再懸濁し、10秒間振盪した後、超音波処理し(20秒間)、(例えば、Eppendorff Thermoミキサー中で、1400rpm)10分間振盪した。20mM NaH₂PO₄; 140mM NaCl; 0.1% Pluronic F68; pH 7.4の6mLを添加し、室温で1時間攪拌した。試料を3000gで20分間遠心分離した。上清を廃棄し、沈殿物を0.6mLの20mM NaH₂PO₄; 140mM NaCl; 1% Pluronic F68、pH 7.4中に溶解した。H₂O 3.4mLを添加し、室温で1時間攪拌した後、3000gで20分間遠心分離した。さらなる使用のため、上清各0.5mLの8個の一定分量を-20で保存した。

10

【0298】

3.A (20-42) グロプロマー

A (20-42) グロプロマーの調製を実施例1cに記載している。

【0299】

4.A (12-42) グロプロマー

A (12-42) グロプロマーの調製を実施例1dに記載している。

【0300】

5.HFIPで前処理された、DMSO中の5mMのA (1-40)モノマー
1mgのA (1-40)(Bachem Inc.、カタログ番号H-1194)をエッペンドルフチューブ中の0.25mLのHFIP(4mg/mL懸濁液)中に懸濁した。(例えば、Eppendorff Thermoミキサー中で、1400rpm)チューブを37で1.5時間振盪して透明な溶液を得た後、speed vac濃縮器中で乾燥させた(1.5時間)。試料を46μLのDMSO中で再度溶解し(21.7mg/mL溶液=5mM)、10秒間振盪した後、20秒間超音波処理した。(例えば、Eppendorff Thermoミキサー中で、1400rpm)10分間の振盪後、さらなる使用のために試料を-20で保存する。

20

【0301】

6.A (1-42) モノマー、0.1% NH₄OH

1mgのA (1-42)(Bachem Inc.、カタログ番号H-1368)を(新鮮に調製された)H₂O中の0.1% NH₄OH(=2mg/mL)0.5mL中に溶解し、室温で即時30秒間振盪し、透明な溶液を得た。さらなる使用のため、試料を-20で保存した。

30

【0302】

7.A (1-42) フィブリル

1mgのA (1-42)(Bachem Inc.、カタログ番号H-1368)を500μLの0.1% NH₄OH水溶液(エッペンドルフチューブ)中に溶解し、試料を室温で1分間攪拌した。この新鮮に調製されたA (1-42)溶液100μLを300μLの20mM NaH₂PO₄; 140mM NaCl、pH 7.4で中和した。pHを1% HClでpH 7.4に調整した。試料を37で24時間温置し、(10000gで10分間)遠心分離した。上清を廃棄し、フィブリルのペレットを20mM NaH₂PO₄; 140mM NaCl、pH 7.4の400μLで、1分間の渦巻き攪拌により再懸濁した。

40

【0303】

8.sAPP

Sigmaから供給された(カタログ番号S9564; 20mM NaH₂PO₄; 140mM NaCl; pH 7.4中の25μg)。20mM NaH₂PO₄; 140mM NaCl; pH 7.4、0.2mg/mL BSAでsAPPを0.1mg/mL(=1pmol/μL)に希釈した。

【0304】

50

ドットプロットの材料

A 標準物質：

20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7.4 + 0.2 mg/mL BSA

A中のA 抗原の連続希釈物

1) 100 pmol/μL

2) 10 pmol/μL

3) 1 pmol/μL

4) 0.1 pmol/μL

5) 0.01 pmol/μL

ニトロセルロース：

10

トランスプロットトランスファー媒体、ピュアニトロセルロースメンブレン(0.4

5 μm); BIORAD

抗マウスAP：

AQ330A (Chemicon)

検出試薬：

NBT/BCIP錠剤(Roche)

ウシ血清アルブミン(BSA)：

A-7888(SIGMA)

プロッキング試薬：

TBS中の5%低脂肪乳

20

緩衝溶液：

TBS

25 mMトリス/HCl緩衝液(pH 7.5)

+ 150 mM NaCl

TTBS

25 mMトリス/HCl緩衝液(pH 7.5)

+ 150 mM NaCl

+ 0.05% Tween 20

PBS + 0.2 mg/mL BSA

20 mM NaH₂PO₄緩衝液(pH 7.4)

30

+ 140 mM NaCl

+ 0.2 mg/mL BSA

抗体溶液I：

A(20-42)グロプロマーによる能動免疫研究由来のマウス血漿試料(TBS中の1%低脂肪乳20 mL中で1:400に希釈)

抗体溶液II：

1:5000希釈

TBS中の1%低脂肪乳中の抗マウスAP

【0305】

ドットプロット手法：

40

1) (5個の連続希釈物中の)異なるA標準物質各1 μLを、互いに約1 cmの距離で、ニトロセルロースメンブレン上へ滴下した。

2) A標準物質のドットをニトロセルロースメンブレン上で、室温(RT)で少なくとも10分間空気乾燥させた(=ドットプロット)。

3) プロッキング：

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

4) 洗浄：

プロッキング溶液を廃棄し、20 mLのTTBSとともにドットプロットをRTで10分間振盪しながら温置した。

50

5) 抗体溶液 I :

洗浄緩衝液を廃棄し、抗体溶液 I とともに R T で一晩温置した。

6) 洗浄 :

抗体溶液 I を廃棄し、20 mL の T T B S とともにドットプロットを R T で 10 分間振盪しながら温置した。洗浄溶液を廃棄し、20 mL の T T B S とともにドットプロットを R T で 10 分間振盪しながら温置した。洗浄溶液を廃棄し、20 mL の T B S とともにドットプロットを R T で 10 分間振盪しながら温置した。

7) 抗体溶液 II :

洗浄緩衝液を廃棄し、抗体溶液 II とともにドットプロットを R T で 1 時間温置した。

10

8) 洗浄 :

抗体溶液 II を廃棄し、20 mL の T T B S とともにドットプロットを R T で 10 分間振盪しながら温置した。洗浄溶液を廃棄し、20 mL の T T B S とともにドットプロットを R T で 10 分間振盪しながら温置した。洗浄溶液を廃棄し、20 mL の T B S とともにドットプロットを R T で 10 分間振盪しながら温置した。

9) 発色 :

洗浄溶液を廃棄した。1個の N B T / B C I P 錠剤を 20 mL の H₂O 中に溶解し、この溶液とともにドットプロットを 5 分間温置した。H₂O による集中洗浄により、発色を停止させた。

20

【0306】

結果を図 4 に示す。

【0307】

抗 A 抗体のドットプロット分析は、A (20 - 42) グロブロマーやによるマウスの能動免疫後に、A の異なる形態に対する前記抗体の特異性を評価するために実施された。A の個々の形態を連続希釈物中でプロットし、免疫反応中に產生された抗 A 抗体を含有する対応するマウス血漿とともに温置した。個々のドットプロットは、免疫化されたマウスの異なる個体に対応する。

【0308】

- 1 . A (1 - 42) グロブロマー
- 2 . H F I P で前処理された 0 . 1 % P l u r o n i c F 6 8 中の A (1 - 42) モノマー
- 3 . A (20 - 42) グロブロマー
- 4 . A (12 - 42) グロブロマー
- 5 . H F I P で前処理された D M S O 中の 5 m M A (1 - 40) モノマー
- 6 . A (1 - 42) モノマー、0 . 1 % N H₄ O H
- 7 . A (1 - 42) フィブリル調製物
- 8 . s A P P (S i g m a) ; (第一ドット : 1 p m o l)

【0309】

A P P / L T g マウスの能動免疫研究において、A (20 - 42) グロブロマーによる免疫化は、P B S 処理と比較して、これらのマウスにおいて認知機能障害を緩和する最良の結果に至ることが示された。A (20 - 42) グロブロマーで能動免疫された後の A P P / L T g マウス由来の血漿試料は、本明細書で主張される A (20 - 42) グロブロマー m A b のものと類似する抗体特性 (A (20 - 42) グロブロマー及び A (12 - 42) グロブロマーの顕著な認識) を呈する。

40

【実施例 6】

【0310】

A (1 - 42) モノマー、A (1 - 42) グロブロマー、A (20 - 42) グロブロマー又は対照としての媒体のいずれかで能動免疫された A P P / P S 1 T g マウスの脳抽出物中の可溶性及び不溶性 A (1 - 42) 及び A (1 - 40) ペプチドの濃度 4 ヶ月齢で F V B × C 5 7 B I / 6 J の背景にあるアルツハイマー病の二重遺伝子導入

50

マウスモデル (APP / PS1 Tg マウス) の 40 匹の雌マウスを本研究に使用した。APP / PS1 Tg マウスは、V717I 変異 (最長の APP 分子種と呼ぶ位置) を有するヒト APP の 695 個アミノ酸形態、及び、加えて、A264E 変異を有するヒトプレセニリン 1 遺伝子を含有する。両遺伝子は、Thy1 プロモーターの調節下にある。r e M Y N D , the E x p e r i m e n t a l G e n e t i c s G r o u p , C a m p u s G a s t h u i s b e r g , C a t h o l i c U n i v e r s i t y L e u v e n の創立研究室のうちの 1 つにおいて、F r e d V a n L e u v e n 教授によって、マウスを作出し、特徴付けた。

【0311】

全てのマウスを 3 週齢でポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって遺伝子型で分類し、
P C R 結果が一度わかると、固有の識別番号を受容した。 10

【0312】

マウスは、あらかじめ充填し滅菌した水 (紫外線光) 及び標準的なマウス餌へ自由にアクセスした。十分に換気された貯蔵室中で、乾燥及び冷却条件下で食餌を保存した。水及び食餌の量は、毎日チェックされ、必要な場合に供給され、初期設定によって 1 週間に 2 回補給した。

【0313】

標準的な金属ケージ R V S T 2 型 (540 cm^2 の面積) 中で、午後 7 時に開始する 14 時間の明期 / 10 時間の暗期の逆転した昼夜リズムのもとでマウスを飼育した。ケージに固体の床及び木屑床敷き層を装備した。ケージ当たりのマウスの数を、動物保護法に従って制限した。行動検査開始 5 日前に、マウスをマクロロン 2 型ケージ中で再度収容し、行動検査に備えて研究室環境に適応させるために、研究室へ移送した。 20

【0314】

マウスは、フロイント完全アジュバントの等しい量と混合されたリン酸緩衝塩類溶液 (P B S) 中の A (1 - 42) モノマー (0.1% NH₄ OH)、A (1 - 42) グロブロマー又は A (20 - 42) グロブロマーのいずれかの 100 μg を腹腔内に受容した後、フロイント不完全アジュバント中のアンチジーンの同一量による追加免疫注射を 3 週間ごとに 4 ヶ月間受容した。

【0315】

生化学

一半球の可溶性画分中の A (1 - 40) 及び A (1 - 42) を E L I S A によって測定した。さらに、一半球の不溶性膜画分中の A (1 - 40) 及び A (1 - 42) を E L I S A によって測定した。 30

【0316】

ケタラール (ケタミン)、ロンパン (2% キシラジン) 及びアトロピンの 2 : 1 : 1 の混合物でマウスを麻酔し、生理学的血清を使用して 4 で経心的に流した。これを実施して脳血管から血液を除去し、これは、臓器の完全性に何ら影響を及ぼさない手法である。

【0317】

頭蓋骨と第一頸椎との間の頸筋中の切開部を介して、脳脊髄液 (C S F) を回収した。大槽中への穿刺を 26 ゲージ針で付与し、C S F 10 ないし 20 μL を細いガラスピペットで回収した。 40

【0318】

心臓穿刺及びヘパリンコーティングされたエッペンドルフチューブ中への 1 mL シリンジを介して血液を回収した。4 、 14000 rpm で 5 分間、血液を遠心分離した。血清を -70 に保存した。

【0319】

マウスを 4 の生理学的血清で経心的に流した。

【0320】

脳を頭蓋から摘出し、冠状 / 前額平面における切断により、後脳及び前脳を分離した。小脳を除去した。正中線矢状切断を使用することによって、前脳を左右の半球へと均等に

10

20

30

40

50

分割した。

【0321】

一半球を液体窒素中に即時浸漬し、生化学的分析まで -70 で保存した。

【0322】

一脳半球の均質化及び分画

ポッター、ガラスチューブ（界面活性剤非含有、 2 cm^3 ）及び機械的ホモジナイザーを使用して脳を均質化した（650 rpm）。プロテアーゼ阻害剤（50 mL トリス / HCl 緩衝液当たり 1 錠剤、Complete（商標）、Roche、Mannheim、Germany）を有する新鮮に調製された 20 mM トリス / HCl 緩衝液（pH 8.5）の $6.5 \times 1/2$ 脳重量の容積を、均質化緩衝液として使用した。 10

【0323】

-70 から液体窒素を有する試料ホルダー中へ、試料を転移させ、ベンチ上での温置により各個々の試料を数秒間あらかじめ加温した後、均質化した。均質化液をベックマン遠心チューブ TL X 中に回収し、氷上で回収した後、遠心分離した。2つの試料間で、界面活性剤を有しない蒸留水（AD）でポッター及びガラスチューブを注意深くすすぎ、吸水紙で乾燥させた。

【0324】

あらかじめ冷却しておいた超遠心機（Beckman、Mannheim、Germany）中で試料を 4 、 48000 rpm (135000 $\times g$) で 1 時間 20 分遠心分離した。遠心分離ホルダー（N = 8）の数が限定されていることにより、（遠心分離を平衡化するために）試料を脳重量により分別し、異なる遠心分離セッションにわたって異なる処理群を分けるために無作為化した。 20

【0325】

上清（分泌された APP 及びアミロイドペプチドを含有する可溶性画分）をペレット（膜に結合した APP 断片を含有する膜画分及び、老齢マウスの場合、ブラーク結合型アミロイドペプチド）から分離した。上清を 2 本のチューブに分け、そのうちの 1 つをバックアップとして -20 で保存し、その他をカラムクロマトグラフィーでさらに処理して、アミロイドペプチドを濃縮した。 30

【0326】

脳重量、使用されるトリス / HCl 緩衝液の容積、（色により標識される）遠心分離セッション及びカラムクロマトグラフィーのために使用される可溶性画分の容積は、次の表中に典型的に付与されている。

【0327】

【表 4】

試料番号	処理	マウス番号	脳重量 (W) (mg)	V トリス (=W $\times 6.5$) (μL)	50% V トリス (μL)
19	X	TAB. TPF1305	157.8	1026	513
21	X	TAB. TPF1335	160.2	1041	521

【0328】

小さな逆相カラム（C18 - Sep - Pack Vac 3cc カートリッジ、Walter、Massachusetts, MA）を真空システムへ装着し、0.1% トリフルオロ酢酸（A-TFA）中の 80% アセトニトリルで洗浄した後、0.1% TFA で 2 回洗浄した。次に、試料を適用し、カラムを 5% 及び 25% A-TFA で連続洗浄した。アミロイドペプチドを 75% A-TFA で溶出し、溶出物を氷上で 2 mL チューブ中に回収した。溶出物を Speed / Vac 濃縮機（Savant, Farmingdale, NY）中で一晩凍結乾燥させ、ELISA キットに備えられた試料希釈剤 330 μL 中 40

に溶解した。

【0329】

ペレットを異なる膜画分、すなわち膜画分A(MFA)、全長のAPPを含有する膜画分B(MFB)及びブラーク結合型アミロイドを含有する膜画分C(MFC)へとさらに分画した。それゆえ、プロテアーゼ阻害剤(50mLTBS緩衝液当たり1錠剤、Complate(商標)、Roche、Mannheim、Germany)を有するTBS緩衝液中にペレットを溶解し、MFAを2つのチューブに分け、そのうちの1つをバックアップとして-20で保存した。プロテアーゼ阻害剤を有するTBS中にNP40(最終容積の2%)及びトリトンX-100(最終容積の2%)を添加して、MFAの60%をさらに処理し、4でスウィングアウトローター(SW60)を使用するベックマン遠心分離装置において、27000rpm(98000×g)で1時間遠心分離した。上清(MFB)をペレット(MFC)から分離し、両者を-20で保存した。

10

【0330】

脳重量、脳重量の60%、使用されるTBS+PI+NP40+トリトンX-100緩衝液の容積及び(色により標識される)遠心分離セッションを、次の表中に典型的に付与する。

【0331】

【表5】

試料番号	処理	マウス番号	脳重量(W) (mg)	3/5×脳重量 (mg)	緩衝液容積=3/5W×15 (μL)
19	X	TAB.TPF1305	157.8	95	1420
21	X	TAB.TPF1335	160.2	96	1442

20

【0332】

一半球の可溶性画分中のヒトAのELISA

脳均質液の可溶性画分及び/又は脳脊髄液(CSF)中のヒトA(1-40)及びヒトA(1-42)の量を定量化するために、市販の酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)キットを使用した(ヒトアミロイド40又は42ELISA高感度、The Genetics Company, Zurich, Switzerland)。製造元のプロトコールに従って、ELISAを実施した。簡潔には、標準物質(合成A(1-40)又はA(1-42)の希釈物)及び試料を、タンパク質結合能を有さない96ウェルポリプロピレンプレート(Greiner bio-one, Fritzenhausen, Germany)中に調製した。1000、500、250、125、62.5、31.3及び15.6pg/mLの終濃度を有する標準物質希釈物及び試料を、ELISAキットとともに備えられた試料希釈剤中で60μLの最終容積に調製した。アミロイドレベルがマウスの加齢とともに増大するので、及び実際の評価では、試料の読み取りが標準物質の曲線の直線部分内にあることが必要であるので、A(1-40)分析のための試料を1:3に希釈し、A(1-42)分析のための試料を1:6に希釈した。

30

【0333】

選択的抗A抗体抱合体(ビオチン化検出抗体)とともに、試料、標準物質及びブランク(50μL)を、抗Aコーティングされたポリスチロールプレート(捕捉抗体が、抗原のC末端を選択的に認識する。)へ添加し、4で一晩温置して、抗体-アミロイド-抗体-複合体を形成させた。翌日、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ抱合体を添加した30分後に、TMB/過酸化物混合物を添加し、それにより基質が、着色された生成物へと変換された。硫酸(1M)の添加により、この反応を停止し、450nmフィルターを有するELISAリーダーを備えた測光法によって、色の強度を測定した。吸光度を合成A(1-40)又はA(1-42)で作成された標準物質曲線と比較することに

40

50

よって、試料のA含有量の定量化を得た。

【0334】

一半球の不溶性画分中のヒトAのELISA

脳均質液の不溶性膜画分中のヒトA(1-40)及びヒトA(1-42)の量を定量化するため、MFC試料をさらに処理し、80 mMトリス/HCl中の8Mグアニジン中に溶解した。その後、25℃でサーモミキサー中で試料を3時間温置し、毎時間100μLピペットで上下にピペッティングし、グアニジン緩衝液中へMFCペレットを溶解した。最後に、試料を4000 rpmで1分間だけ遠心分離し、細片を除去した。

【0335】

脳重量、MFCペレットの重量及び8Mグアニジン緩衝液の容積を、次の表に典型的に付与する。

【0336】

【表6】

試料番号	処理	マウス番号	脳重量(W) (mg)	MFCのペレットの重量 (WMFC) (40%脳)	8Mグアニジンの容積 (WMFC × 1.6) (μL)
19	X	TAB.TPF1305	157.8	63	101
21	X	TAB.TPF1335	160.2	64	103

【0337】

最終的な試料中のヒトA(1-40)及びヒトA(1-42)の量を定量化するため、市販の酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)キットを使用した(ヒトアミロイド40又は42ELISA高感度、The Genetics Company, Zurich, Switzerland)。製造元のプロトコールに従ってELISAを実施したが、例外は標準物質(合成A(1-40)又はA(1-42)の希釈物)の調製であった。ELISAキットとともに備えられた試料希釈剤中で、60μLの最終容積へ試料を調製した。グアニジンは、標準物質曲線のOD値に影響するため、1000、500、250、125、62.5、31.3及び15.6 pg/mLの終濃度を有する標準物質希釈物を、試料に関するものと同一濃度のグアニジンを有する試料希釈剤中で調製した。タンパク質結合能を有さない96ウェルポリプロピレンプレート(Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany)中でこれを実施した。

【0338】

アミロイドレベルがマウスの加齢とともに亢進するため、及び試料の読み取りが標準物質の曲線の直線部分内にあることを実際の評価が必要とするため、不溶性A(1-40)及び不溶性A(1-42)分析のための試料を1:500に希釈した。

【0339】

選択的抗A抗体抱合体(ビオチン化検出抗体)とともに、試料、標準物質及びブランク(50μL)を、抗Aコーティングされたポリスチロールプレート(捕捉抗体が、抗原のC末端を選択的に認識する。)へ添加し、4℃で一晩温置して、抗体-アミロイド-抗体-複合体を形成させた。翌日、ストレプトアビシン-ペルオキシダーゼ抱合体を添加した30分後に、TMB/過酸化物混合物を添加し、それにより基質が、着色された生成物へと変換された。硫酸(1M)の添加により、この反応を停止し、450 nmフィルターを有するELISAリーダーを備えた測定光法によって、色の強度を測定した。吸光度を合成A(1-40)又はA(1-42)で作成された標準物質曲線と比較することによって、試料のA含有量の定量化を得た。

【0340】

結果を図5に示す。

10

20

30

40

50

【0341】

A (1-42)モノマー(0.1%NH₄OH)、A (1-42)グロブロマー、A (20-42)グロブロマー又は対照としての媒体のいずれかで能動免疫されたAPP/PS1 Tgマウスの脳抽出物中の可溶性及び不溶性A (1-42)及びA (1-40)ペプチドの濃度

A (20-42)グロブロマーで能動免疫されたAPP/PS1 Tgマウスの脳抽出物の可溶性及び不溶性画分中で、A (1-40)ペプチド及びA (1-42)ペプチドのレベルは、媒体対照に対して有意に異なる。対照的に、A (1-42)グロブロマー及びA (1-42)モノマーによる免疫化によって、脳のA (1-40)レベル及びA (1-42)レベルが低下する。これは、A (20-42)グロブロマー配向型免疫化アプローチが、A 脳中レベル全体を有意には変化させないが、それにもかかわらず、A ペプチドと関連した認知障害を緩和する上で効果的であることを示す(実施例4参照)。

【実施例7】

【0342】

抗A (20-42)グロブロマー抗体による受動免疫後のAPP/L遺伝子導入マウスにおける対象認識検査による認知成績の分析

これらの実験において、点変異を有するヒトAPPを過剰発現するマウスを使用した。点変異とは、アミノ酸717(イソロイシンのバリンとの置換)を指し、寿命が60歳になる前にADの開始に至るロンドンのある一家で発見されている(Mulligan et al., Nature Genetics 2 (1992) 340-342)。本明細書でAPP/Lと呼ばれる遺伝子導入マウスは、ルーベン(Leuven)(Moech et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 6483-6492)によって作出され、ルーベンにおいて最初に記載された。3ヶ月齢で、雌APP/Lマウスを受動免疫へ供した。マウスは、リン酸塩類緩衝液(PBS)100μL中のマウスマノクローナル抗体5F7、10F11又は7C6のいずれか250μgを受容した。実験の時間経過を通じて、逆転した昼/夜周期(午後7時に開始する明期14時間/暗期10時間)中の標準的な条件下で動物を維持した。前記マウスは、受動免疫に十分耐容し、副作用の何れの徴候も有さなかった。

【0343】

3回目の注射の後(実験15日目)、先行技術(Dewachter et al. Journal of Neuroscience 22 (2002) 3445-3453)に記載されている対象認識検査によって、マウスの認知能を検査した。この目的のため、マウスを活動領域へ慣れさせた後、2つの同一要素(同様の大きさ約4cmの緑色の立方体又はオレンジ色の円柱)を含有する活動領域中に個々に配置される獲得相へ10分間曝露した。マウスが対象を探索する時間及び頻度を記録した。2.5時間後の保持相の間、既知の対象に加え、その他の対象を含有している活動領域へマウスを戻した。時間全体(旧い及び新しい対象の探索)に対するマウスが旧い対象を探索している時間として、新たな対象の認識を記録した。「認識指数」は、この関係を表す(新たな対象のための時間/時間全体)。既知の対象を思い出さないマウスは、既知の対象を新たな対象と等しく興味があるものと考え、既知の対象を探索する時間の等しい量を過ごし、言い換えれば、50%の認識指数を示す。既知の対象を思い出すマウスは、既知の対象を興味のないものと考え、それゆえ、有意により高い認識指数を示す。APP/Lマウスは、4.5ヶ月齢で認知の欠乏が生じることが公知であり、無作為なレベル、すなわち50%の次元における認識指数を呈する。

【0344】

結果を図6に示す。

【0345】

マウスにおける対象認識検査。前記検査は、10分間の検査相の間の探索行動に関して測定された、未知の対象と比較した既知の対象の認識を報告する。認識指数は、マウスが

10

20

30

40

50

、両対象を探索するのにかかる時間に対する未知の対象を探索するのにかかる時間の割合として定義される。検査相の2.5時間前の10分間の獲得相の間、マウスが、既知の対象を探索した。

【0346】

a) 5F7抗体($n = 9$)、10F11抗体($n = 11$)又は7C6抗体($n = 11$) $250 \mu\text{g}$ の腹腔内注射によって、APP遺伝子導入マウスを週1回、3週間免疫化し；対照動物はPBSを受容した($n = 6$)。

無作為レベル(50%、すなわち既知の対象及び未知の対象に関してかかる等しい探索時間)との有意差を星印で示す。 $^* = p < 0.05$ (t検定)

b) 抗体(5F7、10F11及び7C6)で処理したマウス全部($n = 31$)及びリン酸塩類緩衝溶液(PBS)で処理したマウス($n = 6$)。無作為レベルとは有意に異なる抗体処理群のRI($^{**} = P < 0.01$; t検定)

10

【0347】

APP/Lマウスは、4.5ヶ月齢で認知の欠乏が生じることが公知であり、無作為なレベル、すなわち50%の次元における認識指数を呈する。

【0348】

実際、PBS処理したマウスは、無作為な行動を示した。3つの抗体全て(5F7、10F11及び7C6)による受動免疫は、認識指数が顕著に増大する結果となった。ブルルされた群を対照群に対して比較すると、認識指数は有意に増大する。3つの抗体全ての投与後のAPP/Lマウスの記憶成績に及ぼすこの利益のある効果は、切断型A(20-42)グロブロマーに対する抗体が、認知の改良を達成するのに十分であることを示唆する。

20

【実施例8】

【0349】

抗A(20-42)グロブロマー抗体の選択性に関するドットプロット特性

モノクローナル抗A(20-42)グロブロマー抗体の選択性を特徴付けるために、異なるA形態で認識するためのプローブを前記抗体につけた。この目的のため、0.2mg/mL BSAを補充されたPBS中の100pmol/ μL から0.01pmol/ μL までの範囲の個々のA(1-42)形態の連続希釈を使用した。各試料 $1 \mu\text{L}$ をニトロセルロースメンブレン上へプロットした。検出のため、対応する抗体を使用した(0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。ペルオキシダーゼ抱合型抗マウスIgG及び染色試薬BM Bl ue POD基質(Roche)を使用して、免疫染色を実施した。

30

【0350】

ドットプロットのためのA標準物質：

1.A(1-42)モノマー、0.1%NH₄OH

1mgのA(1-42)(Bachem Inc.、カタログ番号H-1368)を(新鮮に調製された)H₂O中の0.1%NH₄OH(=2mg/mL)0.5mL中に溶解し、室温で即時30秒間振盪し、透明な溶液を得た。さらなる使用のため、試料を-20で保存した。

40

【0351】

2.A(1-40)モノマー、0.1%NH₄OH

1mgのA(1-40)(Bachem Inc.、カタログ番号H-1368)を(新鮮に調製された)H₂O中の0.1%NH₄OH(=2mg/mL)0.5mL中に溶解し、室温で即時30秒間振盪し、透明な溶液を得た。さらなる使用のため、試料を-20で保存した。

【0352】

3.A(1-42)モノマー、0.1%NaOH

2.5mgのA(1-42)(Bachem Inc.、カタログ番号H-1368)を(新鮮に調製された)H₂O中の0.1%NH₄OH(=5mg/mL)0.5mL中に溶解し、室温で30秒間振盪し、透明な溶液を得た。さらなる使用のため、試料を-

50

20で保存した。

【0353】

4. A (1-40)モノマー、0.1%NaOH

2.5mgのA (1-40)(Bachem Inc.、カタログ番号H-1368)を(新鮮に調製された)H₂O中の0.1%NH₄OH(=5mg/mL)0.5mL中に溶解し、室温で即時30秒間振盪し、透明な溶液を得た。さらなる使用のため、試料を-20で保存した。

【0354】

5. A (1-42)グロブロマー

A (1-42)グロブロマーの調製を実施例1aに記載している。

10

【0355】

6. A (12-42)グロブロマー

A (12-42)グロブロマーの調製を実施例1dに記載している。

【0356】

7. A (20-42)グロブロマー A (20-42)グロブロマーの調製を実施例1cに記載している。

【0357】

8. A (1-42)フィブリル

1mgのA (1-42)(Bachem Inc. カタログ番号H-1368)を500μLの0.1%NH₄OH水溶液(エッペンドルフチューブ)中に溶解し、試料を室温で1分間攪拌した。この新鮮に調製されたA (1-42)溶液100μLを300μLの20mMNaH₂PO₄; 140mMNaCl、pH7.4で中和した。pHを1%HClでpH7.4に調整した。試料を37で24時間温置し、(10000gで10分間)遠心分離した。上清を廃棄し、フィブリルのペレットを20mMNaH₂PO₄; 140mMNaCl、pH7.4の400μLで、1分間の渦巻き攪拌により再懸濁した。

20

【0358】

9. sAPP

Sigmaによって供給された(カタログ番号S9564; 20mMNaH₂PO₄; 140mMNaCl; pH7.4中の25μg)。20mMNaH₂PO₄; 140mMNaCl; pH7.4、0.2mg/mL BSAでsAPPを0.1mg/mL(=1pmol/μL)に希釈した。

30

【0359】

ドットプロットのための材料:

A 標準物質:

20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、pH7.4+0.2mg/mL BSA中のA 抗原の連続希釈物

1) 100pmol/μL

2) 10pmol/μL

3) 1pmol/μL

4) 0.1pmol/μL

5) 0.01pmol/μL

40

ニトロセルロース:

Trans-Blot Transfer媒体、Pure Nitrocellulose Membrane(0.45μm); BIO-RAD

抗マウスPOD:

カタログ番号715-035-150(Jackson Immuno Research)

検出試薬:

B M B l u e P O D 基質、沈殿物(Roché)

50

ウシ血清アルブミン (B S A) :

カタログ番号 A - 7888 (SIGMA)

プロッキング試薬 :

T B S 中の 5 % 低脂肪乳

緩衝溶液 :

T B S

25 mM トリス / H C l 緩衝液 (pH 7 . 5)

+ 150 mM N a C l

T T B S

25 mM トリス / H C l 緩衝液 (pH 7 . 5)

10

+ 150 mM N a C l

+ 0 . 05 % T w e e n 2 0

P B S + 0 . 2 m g / m L B S A

20 mM N a H₂ P O₄ 緩衝液 (pH 7 . 4)

+ 140 mM N a C l

+ 0 . 2 m g / m L B S A

抗体溶液 I :

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

抗体溶液 I I :

1 : 5000 希釈

20

T B S 中の 1 % 低脂肪乳中の抗マウス P O D

【 0 3 6 0 】

ドットプロット手法 :

1) (5 個の連続希釈物中の) 異なる A 標準物質各 1 μ L を、互いに約 1 cm の距離で、ニトロセルロースメンブレン上へ滴下した。

【 0 3 6 1 】

2) A 標準物質のドットをニトロセルロースメンブレン上で、室温 (R T) で少なくとも 10 分間空気乾燥させた (= ドットプロット) 。

【 0 3 6 2 】

3) プロッキング :

30

ドットプロットを T B S 中の 5 % 低脂肪乳 30 mL とともに、 R T で 1 . 5 時間温置した。

【 0 3 6 3 】

4) 洗浄 :

プロッキング溶液を廃棄し、 20 mL の T T B S とともにドットプロットを R T で 10 分間振盪しながら温置した。

【 0 3 6 4 】

5) 抗体溶液 I :

洗浄緩衝液を廃棄し、 抗体溶液 I とともにドットプロットを R T で 2 時間温置した。

【 0 3 6 5 】

6) 洗浄 :

40

抗体溶液 I を廃棄し、 20 mL の T T B S とともにドットプロットを R T で 10 分間振盪しながら温置した。洗浄溶液を廃棄し、 20 mL の T T B S とともにドットプロットを R T で 10 分間振盪しながら温置した。洗浄溶液を廃棄し、 20 mL の T B S とともにドットプロットを R T で 10 分間振盪しながら温置した。

【 0 3 6 6 】

7) 抗体溶液 I I :

洗浄緩衝液を廃棄し、 ドットプロットを抗体溶液 I I とともに R T で一晩温置した。

【 0 3 6 7 】

8) 洗浄 :

50

抗体溶液Ⅱを廃棄し、20mLのTTBSとともにドットプロットをRTで10分間振盪しながら温置した。洗浄溶液を廃棄し、20mLのTTBSとともにドットプロットをRTで10分間振盪しながら温置した。洗浄溶液を廃棄し、20mLのTBSとともにドットプロットをRTで10分間振盪しながら温置した。

【0368】

9) 発色：

洗浄溶液を廃棄した。ドットプロットを10mLのBM Blue P O D基質で10分間発色させた。H₂Oによるドットプロットの集中洗浄によって発色を停止させた。ドットの強度に関する濃度計分析(GS800濃度計(BioRad)及びソフトウェアパッケージであるQuantity one、第4.5.0版(BioRad))を使用して、定量的評価を実施した。A(20-42)グロプロマーの最後の光学的に明確に同定されたドットの相対密度の20%を超える相対密度を有するドットのみを評価した。ドットプロットごとに独立して、この閾値を決定した。算出された値は、A(20-42)グロプロマーの認識と付与された抗体に関する個々のA形態との間の関係を示す。

10

【0369】

結果を図7に示す。

【0370】

Aの異なる形態に対する異なる抗A抗体(6E10、5F7、4B7、10F11、6A2、4D10、2F2；3B10、7C6、7E5、10C1)の特異性に関するドットプロット分析A(20-42)グロプロマーによるマウスの能動免疫後の融合されたハイブリドーマ細胞の選択によって、検査されたモノクローナル抗体を得た(6E10以外)。個々のA形態を連続希釈物中に適用し、免疫反応のため、個々の抗体とともに温置した。

20

【0371】

- 1. A(1-42)モノマー、0.1%NH₄OH
- 2. A(1-40)モノマー、0.1%NH₄OH
- 3. A(1-42)モノマー、0.1%NaOH
- 4. A(1-40)モノマー、0.1%NaOH
- 5. A(1-42)グロプロマー
- 6. A(12-42)グロプロマー
- 7. A(20-42)グロプロマー
- 8. A(1-42)フィブリル調製物
- 9. sAPP(Sigma)；(第一ドット：1pmol)

30

【0372】

A(1-42)グロプロマー及びA(12-42)グロプロマーの識別について、抗A(20-42)グロプロマー選択的mAbを、3つのクラスに分割することが可能である。抗体6A2、5F7及び2F2を含む第一のクラスは、A(20-42)グロプロマーを優先的に認識し、ある程度A(1-42)グロプロマーを(及びA(12-42)グロプロマーも)認識する。抗体10F11、4D10及び3B10を含む第二のクラスは、A(20-42)グロプロマーを優先的に認識し、A(12-42)グロプロマーも認識するが、その程度はより低く、A(1-42)グロプロマーを有意には認識しない。抗体7C6、4B7、7E5及び10C1を含む第三のクラスは、A(20-42)グロプロマーを認識するが、その他の有意な認識を示さない。3つのクラスは全て、モノマーA(1-42)、モノマーA(1-40)、A(1-42)フィブリル又はsAPPを有意には認識しない。

40

【0373】

抗A(20-42)グロプロマー抗体の選択性特性は、(図6中の)受動免疫において有意に上昇した認識指數が、切断型A(20-42)グロプロマー及びA(12-42)グロプロマーの選択的認識に主としてよるものでなければならず、それより非常に低い程度でA(1-42)グロプロマーが認識され、モノマーA(1-42)、モノ

50

マーA (1-40)、A (1-42) フィブリル又はSAPPは認識されないことを示す。

【実施例9】

【0374】

老齢TG2576マウスにおけるA プラークの形態の纖維状A ベプチド及び髄膜血管中のA アミロイドに対するA (20-42) 選択的抗体の特異的反応に関する生体内原位置での分析

これらの実験のため、19ヶ月齢のTG2576マウス(Hsiao et al., 1996, Science; 274(5284), 99-102)若しくは9ヶ月齢のAPP/LxPS1マウス(上述の記載; REMYND, Leuven, Belgium)の脳材料又は2名のアルツハイマー病患者の剖検材料(RZ16及びRZ55; BrainNet, Münichから入手)を使用した。マウスは、A264E変異を有するヒト1型プレセニリン遺伝子(APP/LxPS1)に加えて、いわゆるスウェーデン変異(K670N/M671L; Tg2576)又はいわゆるロンドン変異(V717I)を有するヒトAPPを過剰発現し、形成されるアミロイドは、約7ないし11ヶ月齢で脳実質中に沈着し、アミロイドは、約18ヶ月齢でより大きな脳血管中に沈着する(Tg2576)。動物を深麻酔し、0.1Mリン酸緩衝塩類溶液(PBS)で経心的に灌流して血液を流した。次に、脳を頭蓋から摘出し、長軸方向に分割した。脳の一半球をショック凍結させ、もう半分を4%パラホルムアルデヒド中への浸漬により固定した。浸漬により固定された半球を、PBS中の30%ショ糖中に浸漬することによって凍結保護し、凍結しているミクロトーム上に載せた。前脳全体を40μm切片に切り、PBS中に回収して、その後の染色手法のために使用した。ヒト脳材料は、新皮質の深さ約1cm³の凍結ブロックであった。ブロックのわずかな部分を4%パラホルムアルデヒド中に浸漬固定し、マウスマウス脳材料と同様さらに処理した。

10

20

20

【0375】

次のプロトコールを使用して、個々の切片をコンゴーレッドで染色した。

【0376】

材料:

NaClアルコール溶液、NaOH溶液及びコンゴーレッド溶液からなるアミロイド色素コンゴーレッドキット(Sigma-Aldrich; HT-60)

30

染色キュベット

Superfrost Plus顕微鏡スライド及びカバーガラス

エタノール、キシロール、包埋媒体

【0377】

試薬:

NaCl溶液で1:100に希釈されたNaOHは、アルカリ塩類溶液を生じる。

コンゴーレッド溶液で1:100に希釈されたアルカリ塩類溶液は、アルカリ性コンゴーレッド溶液を生じる。(使用前15分以内に調製、濾過)

スライド上に切片を載せ、乾燥させる。

40

【0378】

染色キュベット中でスライドを、最初の30ないし40分間はアルカリ塩類溶液中で、次の30ないし40分間はアルカリ性コンゴーレッド溶液中で温置する。

【0379】

新鮮なエタノールで3回すすぎ、キシロール上で包埋する。

【0380】

Zeiss Axioplan顕微鏡を使用して染色物をまず写真撮影し、定性的に評価した。赤色は、plaquesの形態及びより大きな髄膜血管の両者中のアミロイド沈着物を示した。これらの結果を図8Aに示す。後に、これらの構造に焦点を絞って抗体染色を評価した。

【0381】

50

次のプロトコールに従って、個々の抗体 0.07ないし 7.0 μg / mL を含有する溶液と切片を温置することによって、抗体染色を実施した。

【0382】

材料：

T B S T 洗浄溶液 (T w e e n 2 0 含有トリス緩衝塩類溶液；10倍濃縮物；D a k o C y t o m a t i o n ; S 3 3 0 6 A q u a b i d e s t 中の 1 : 1 0)
メタノール中の 0.3% H₂O₂
T B S T 中の 5% 口バ血清 (S e r o t e c)
T B S T 中に希釈されたモノクローナルマウス抗グロブロマー抗体
二次抗体：ビオチン化口バ抗マウス抗体 (J a c k s o n I m m u n o ; 7 1 5 - 10 0 6 5 - 1 5 0 ; T B S T 中に 1 : 5 0 0 で希釈)
S t r e p t A B C o m p l e x (D a k o C y t o m a t i o n ; K 0 3 7 7)
ペルオキシダーゼ基質キットジアミノベンジジン (= D A B ; V e c t o r L a b o r a t o r i e s ; S K - 4 1 0 0)
S u p e r F r o s t P l u s 顕微鏡スライド及びカバーガラス
キシリール非含有包埋媒体 (M e d i t e ; X - t r a K i t t)

【0383】

手法：

氷冷 0.3% H₂O₂ 中へ浮遊切片を転移させ、30分間温置する。
T B S T 緩衝液中で 5 分間洗浄する。
口バ血清 / T B S T とともに 20 分間温置する。
一次抗体とともに室温で 24 時間温置する。
T B S T 緩衝液中で 5 分間洗浄する。
V e c t a s t a i n E l i t e A B C ペルオキシダーゼキットからのプロッキング血清とともに 20 分間温置する。
T B S T 緩衝液中で 5 分間洗浄する。
二次抗体とともに大気温で 60 分間温置する。
T B S T 緩衝液中で 5 分間洗浄する。
S t r e p t A B C o m p l e x とともに大気温で 60 分間温置する。
T B S T 緩衝液中で 5 分間洗浄する。
V e c t a s t a i n E l i t e A B C ペルオキシダーゼキットからの D A B とともに 20 分間温置する。
スライド上に切片を載せ、空気乾燥させ、アルコールで脱水し、包埋した。

【0384】

染色の視覚的検査のほかに、I m a g e P r o 5 . 0 画像分析システムを使用して組織学的画像から 10 個の無作為に選択されたブラークをグラフで切り取り、それらの平均グレースケール値を測定することによって、ブラーク染色をさらに定量化した。アミロイドブラークの密度から染色された材料の平均背景密度を差し引くことによって、グレースケール値から光学密度値を算出し (0% - 取り囲んでいる背景上にブラーク染色なし、100% - 透過なし / 最大染色)、対照と抗体との間の差異及び 6 G 1 と A (20 - 42) 選択的抗体との間の差異を、A N O V A による統計的有意性に関して検査した。

【0385】

T g 2 5 7 6 及び A P P / L x P S 1 マウスにおける染色の結果を図 8 B ないし D 及び H に示す。

【0386】

19ヶ月齢の遺伝子導入 T G 2 5 7 6 マウスの新皮質の横断切片中の 0.7 μg / mL の濃度での異なる抗体の結合：

C) 実質性 A 沈着物 (アミロイドブラーク) は、6 G 1 及び 6 E 1 0 によってのみ染色されたが、グロブロマー選択的抗体 (すなわち、5 F 7、2 F 2、6 A 2、4 D 1 0、1 0 F 1 1、3 B 1 0、7 C 6、7 E 5 及び 1 0 C 1) によっては染色されなかった。

【0387】

D) 全てのグロプロマー選択的抗体（すなわち、5F7、2F2、6A2、4D10、10F11、3B10、7C6、7E5及び10C1）は、市販の抗体6E10及び4G8と比較して有意に弱い実質性plaques染色を示した。

11ヶ月齢の遺伝子導入TG2576マウスの新皮質の横断切片中の0.7μg/mlの濃度での異なる抗体の結合：

【0388】

E) 実質性A沈着物（アミロイドplaques）は、グロプロマー選択的抗体（すなわち、5F7、2F2、6A2、4D10、10F11、3B10、7C6、7E5及び10C1）よりも低い濃度で6G1、6E10及び4G8により有意により強く染色した。 10

【0389】

全てのアミロイド沈着物は、以前、コンゴーレッド親和性染色によって確認されている（コンゴーレッド；図8A参照）。バー=100μm

【0390】

褐色のDAB沈着物の評価は、A非選択的6G1及び6E10抗体がplaques及び髄膜血管を染色するのに対し、A（20-42）グロプロマー選択的抗体5F7、2F2、6A2、4D10、10F11、3B10、7C6、7E5及び10C1は染色しないことを示した。この発見は、インビボではアミロイド構造中に存在するAフィブリル又は他のA種に対するこれらの抗体の結合が全くないか又は著しく低いことを示している。この結合の低下は、plaquesのあまりにも迅速な溶解及びその後の可溶性A中の増大、又はミクログリアとのplaques結合抗体の相互作用による神経炎症によって誘導される副作用の危険性を低下させると推定される。 20

【0391】

ヒトアルツハイマー病患者の脳における染色結果を図8B、FないしHに示す。

【0392】

患者RZ55の新皮質の横断切片中の0.7μg/mlの濃度での異なる抗体の結合：

B) 実質性A沈着物（アミロイドplaques）は、6G1及び6E10によってのみ染色されたが、グロプロマー選択的抗体（すなわち、5F7、2F2、6A2、4D10、10F11、3B10、7C6、7E5及び10C1）によっては染色されなかった。 30

【0393】

F) 全てのグロプロマー選択的抗体（すなわち、5F7、2F2、6A2、4D10、10F11、3B10、7C6、7E5及び10C1）は、市販の抗体6E10及び4G8と比較して有意に弱い実質性plaques染色を示した。

【0394】

H) 血管A沈着物（矢印）は、6G1及び6E10によってのみ染色されたが、グロプロマー選択的抗体（すなわち、5F7、2F2、6A2、4D10、10F11、3B10、7C6、7E5及び10C1）によっては染色されなかった。

【0395】

11ヶ月齢の遺伝子導入APP/LxPS1マウスの新皮質の横断切片中の0.07ないし7.0μg/mlの濃度での異なる抗体の結合：

G) 実質性A沈着物（アミロイドplaques）は、グロプロマー選択的抗体（すなわち、5F7、2F2、6A2、4D10、10F11、3B10、7C6、7E5及び10C1）よりも低い濃度で6G1、6E10及び4G8により有意により強く染色した。 40

【0396】

全てのアミロイド沈着物は、以前、コンゴーレッド親和性染色によって確認されている（コンゴーレッド；図8A参照）。

【0397】

褐色のDAB沈着物の評価は、A非選択的6G1及び6E10抗体がplaques及び髄膜血管を染色するのに対し、A（20-42）グロプロマー選択的抗体5F7、2F2、6A2、4D10、10F11、3B10、7C6、7E5及び10C1は染色しない

10

20

30

40

50

ことを示した。市販の抗体 6 E 10 及び 4 G 8 は、グロプロマー選択的抗体と比較してより強い染色を示したが、6 G 1 に比べて弱い染色を示した。この発見は、インビボではアミロイド構造中に存在する A フィブリル又は他の A 種に対するグロプロマー選択的抗体の結合が全くないか又は著しく低い APP 遺伝子導入マウスにおける染色パターンを確認している。この結合の低下は、plaques のあまりにも迅速な溶解及びその後の可溶性 A 中の増大、又はミクログリアとのplaques 結合抗体の相互作用による神経炎症によって誘導される副作用の危険性を低下させると推定される。

【実施例 10】

【0398】

能動免疫の約 1 年後の TG 2576 マウスの血漿における抗 A 抗体力価及びドットプロット選択性特性

(実施例 9 からの) TG 2576 マウスの (A (20 - 42) グロプロマー、A (12 - 42) グロプロマー、A (1 - 42) モノマー及び媒体による) 最後の免疫化の約 1 年後、產生され、なおも存在する抗 A 抗体に関して血漿試料を評価した。この目的のため、PBS + 0.2 mg / mL BSA 中の 100 pmol / μL から 0.01 pmol / μL までの範囲の濃度における A (1 - 42) の異なる形態を連続的に希釈した。各試料の 1 μL をニトロセルロースメンブレンへ適用した。(1 : 400 に希釈された) 適切なマウス血漿試料で検出を実施した。抗マウス IgG 抱合型アルカリホスファターゼ及び染色試薬 NBT / BCIP の添加によって、染色を実施した。

【0399】

ドットプロットのための A 標準物質 :

1. A (1 - 42) グロプロマー

A (1 - 42) グロプロマーの調製を実施例 1a に記載している。

【0400】

2. HFIPI 前処理した Pluronic F68 中の A (1 - 42) モノマー
3 mg の A (1 - 42) (Bachem Inc.; カタログ番号 H-1368) を 1.7 mL のエッペンドルフチューブ中の 0.5 mL HFIPI (6 mg / mL 懸濁液) 中に溶解し、透明な溶液が得られるまで、37 度 1.5 時間振盪した (Eppendorff Thermo ミキサー、1400 rpm)、試料を Speed Vac 濃縮器中で乾燥させ (1.5 時間)、13.2 μL の DMSO 中に再懸濁し、10 秒間振盪した後、超音波処理し (20 秒間)、(例えば、Eppendorff Thermo ミキサー中で、1400 rpm) 10 分間振盪した。6 mL の 20 mM NaH₂PO₄; 140 mM NaCl; 0.1% Pluronic F68; pH 7.4 を添加し、室温で 1 時間攪拌した。試料を 3000 g で 20 分間遠心分離した。上清を廃棄し、沈殿物を 0.6 mL の 20 mM NaH₂PO₄; 140 mM NaCl; 1% Pluronic F68、pH 7.4 中に溶解した。3.4 mL の H₂O を添加し、室温で 1 時間攪拌した後、3000 g で 20 分間遠心分離した。さらなる使用のため、上清各 0.5 mL の 8 個の一定分量を -20 度で保存した。

【0401】

3. A (20 - 42) グロプロマー

A (20 - 42) グロプロマーの調製を実施例 1d に記載している。

【0402】

4. A (12 - 42) グロプロマー

A (1 - 42) グロプロマーの調製を実施例 1d に記載している。

【0403】

5. HFIPI 前処理された、DMSO 中の 5 mM の A (1 - 40) モノマー
1 mg の A (1 - 40) (Bachem Inc.、カタログ番号 H-1194) をエッペンドルフチューブ中の 0.25 mL の HFIPI (4 mg / mL 懸濁液) 中に懸濁した。(例えば、Eppendorff Thermo ミキサー中で、1400 rpm) チューブを 37 度 1.5 時間振盪して透明な溶液を得た後、Speed Vac 濃縮器中で (

10

20

30

40

50

1.5時間)乾燥させた。試料を46μLのDMSO中に再度溶解し(21.7mg/mL溶液=5mM)、10秒間振盪した後、20秒間超音波処理した。(例えば、Eppendorff Thermoミキサー中で、1400rpm)10分間振盪した後、さらなる使用のために、試料を-20で保存する。

【0404】

6.A (1-42)モノマー、0.1%NH₄OH
1mgのA (1-42)(Bachem Inc.、カタログ番号H-1368)を(新鮮に調製された)H₂O中の0.1%NH₄OH 0.5mL中に溶解し(=2mg/mL)、即時、室温で30秒間振盪し、透明な溶液を得た。さらなる使用のため、試料を-20で保存した。10

【0405】

7.A (1-42)フィブリル
1mgのA (1-42)(Bachem Inc.カタログ番号H-1368)を500μLの0.1%NH₄OH水溶液(エッペンドルフチューブ)中に溶解し、試料を室温で1分間攪拌した。この新鮮に調製されたA (1-42)溶液100μLを300μLの20mMNaH₂PO₄; 140mMNaCl、pH 7.4で中和した。pHを1%HClでpH 7.4に調整した。試料を37で24時間温置し、(10000gで10分間)遠心分離した。上清を廃棄し、フィブリルのペレットを400μLの20mMNaH₂PO₄; 140mMNaCl、pH 7.4で、1分間の渦巻き攪拌により再懸濁した。20

【0406】

8.sAPP
Sigmaから供給された(カタログ番号S9564; 20mMNaH₂PO₄; 140mMNaCl; pH 7.4中の25μg)。sAPPを20mMNaH₂PO₄; 140mMNaCl; pH 7.4、0.2mg/mL BSAで0.1mg/mL(=1pmol/μL)に希釈した。30

【0407】

ドットプロットのための材料:

A 標準物質:
20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、pH 7.4+0.2mg/mL BSA中のA 抗原の連続希釈物30

- 1) 100pmol/μL
- 2) 10pmol/μL
- 3) 1pmol/μL
- 4) 0.1pmol/μL
- 5) 0.01pmol/μL

ニトロセルロース:

Trans-Blot Transfer媒体、Pure Nitrocellulose Membrane(0.45μm); BIO-RAD40

抗マウスAP:

AQ330A (Chemicon)

検出試薬:

NBT/BCIP錠剤(Roche)

ウシ血清アルブミン(BSA):

A-7888(Fa. SIGMA)

プロッキング試薬:

TBS中の5%低脂肪乳

緩衝溶液:

TBS

25mMトリス/HCl緩衝液(pH 7.5)50

+ 1 5 0 m M N a C 1
 T T B S
 2 5 m M トリス / H C 1 緩衝液 (pH 7 . 5)
 + 1 5 0 m M N a C 1
 + 0 . 0 5 % T w e e n 2 0
 P B S + 0 . 2 m g / m L B S A
 2 0 m M N a H ₂ P O ₄ 緩衝液 (pH 7 . 4)
 + 1 4 0 m M N a C 1
 + 0 . 2 m g / m L B S A

抗体溶液 I :

10

T B S 中の 2 0 m L の 1 % 低脂肪乳中に 1 : 4 0 0 で 希釀された、能動免疫された T G 2 5 7 6 マウスの 血漿

抗体溶液 I I :

1 : 5 0 0 0 希釀

T B S 中の 1 % 低脂肪乳中の 抗マウス A P

【 0 4 0 8 】

ドットプロット手法 :

1) (5 個の連続希釀物中の) 異なる A 標準物質各 1 μ L を、互いに約 1 c m の距離で、ニトロセルロースメンブレン上へ滴下した。

【 0 4 0 9 】

20

2) A 標準物質のドットをニトロセルロースメンブレン上で、室温 (R T) で少なくとも 1 0 分間空気乾燥させた (= ドットプロット) 。

【 0 4 1 0 】

3) ブロッキング :

ドットプロットを T B S 中の 5 % 低脂肪乳 3 0 m L とともに、R T で 1 . 5 時間温置する。

【 0 4 1 1 】

4) 洗浄 :

ブロッキング溶液を廃棄し、2 0 m L の T T B S とともにドットプロットを R T で 1 0 分間振盪しながら温置する。

30

【 0 4 1 2 】

5) 抗体溶液 I :

洗浄緩衝液を廃棄し、ドットプロットを抗体溶液 I とともに R T で一晩温置する。

【 0 4 1 3 】

6) 洗浄 :

抗体溶液 I を廃棄し、2 0 m L の T T B S とともにドットプロットを R T で 1 0 分間振盪しながら温置する。洗浄溶液を廃棄し、2 0 m L の T T B S とともにドットプロットを R T で 1 0 分間振盪しながら温置する。洗浄溶液を廃棄し、2 0 m L の T B S とともにドットプロットを R T で 1 0 分間振盪しながら温置する。

【 0 4 1 4 】

40

7) 抗体溶液 I I :

洗浄緩衝液を廃棄し、ドットプロットを抗体溶液 I I とともに R T で 1 時間温置する。

【 0 4 1 5 】

8) 洗浄 :

抗体溶液 I I を廃棄し、2 0 m L の T T B S とともにドットプロットを R T で 1 0 分間振盪しながら温置する。洗浄溶液を廃棄し、2 0 m L の T T B S とともにドットプロットを R T で 1 0 分間振盪しながら温置する。洗浄溶液を廃棄し、2 0 m L の T B S とともにドットプロットを R T で 1 0 分間振盪しながら温置する。

【 0 4 1 6 】

50

9) 発色 :

洗浄溶液を廃棄する。1個のNBT/BCIP錠剤を20mLのH₂O中に溶解し、この溶液とともにドットプロットを5分間温置する。H₂Oによる集中洗浄により、発色を停止させる。

【0417】

結果を図9に示す。

【0418】

異なる免疫化群の血漿：a) A (20-42) グロブロマー；b) A (12-42) グロブロマー；c) A (1-42) モノマー、0.1% NH₄OH；d) 媒体対照を、異なる抗体特性に関してドットプロット中の異なるA形態に対して検査した。

【0419】

10

1. A (1-42) グロブロマー

2. HPIPで前処理された0.1% Pluronic F68中のA (1-42) モノマー

3. A (20-42) グロブロマー

4. A (12-42) グロブロマー

5. HPIPで前処理されたDMSO中の5mMのA (1-40) モノマー

6. 0.1% NH₄OH中に溶解されたA (1-42) モノマー

7. A (1-42) フィブリル調製物

8. sAPP (Sigma)；(第一ドット：1pmol)

【0420】

20

対照としての媒体又はA (1-42) モノマーのいずれかによる能動免疫とは対照的に、A (20-42) グロブロマー又はA (12-42) グロブロマーによる免疫化は、最後の免疫化の約1年後でさえ、抗体の高い力価を呈する。これらの抗体は、A (20-42) グロブロマー免疫化の場合、A (20-42) グロブロマー選択的であり、A (12-42) グロブロマー免疫化の場合、A (20-42) グロブロマー及びA (12-42) グロブロマー選択的である。これは、切断型A (20-42) グロブロマー及びA (12-42) グロブロマーが、非常に良好な抗原を表し、前記グロブロマーに対する抗体がインビボで非常に長く持続することを示す。

【0421】

30

(幾つかのドットプロットに関して、おそらく、A ペプチドの連続希釈において使用されるBSAに対するネズミ抗体の交差反応である、非特異的染色シグナルが観察されることに留意されたい。)

【実施例11】

【0422】

アルツハイマー病患者におけるA (20-42) グロブロマーエピトープの脳レベル SDS-DTT脳抽出物：

アルツハイマー病患者の脳試料：RZ16；RZ52及びRZ55(Brain Net, Munichから入手した。)

対照試料：RZ92(Brain Net, Munichから入手した。)

Complete Protease Inhibitor (Roche、カタログ番号1697498) 1錠剤を1mLのH₂O中に溶解する(=プロテアーゼ阻害剤溶液)。アルツハイマー病患者の脳試料100mgを2.5mLの(25μLのプロテアーゼ阻害剤溶液で補充された)NaH₂PO₄、140mM NaCl、0.05% Tween 20、0.5% BSA中で、ガラスポッター中で20ストロークで均質化する。懸濁液を氷上で30秒間超音波処理した後、37℃で16時間温置する。懸濁液を100000g、8℃で1時間遠心分離した後、上清を回収する。残留物を5mM NaH₂PO₄、35mM NaCl、pH 7.4中に溶解し、ガラスポッター中で10ストロークで均質化する。10% SDS 75μL及び0.16mg/mL DTT 125μLを添加し、大気温で20分間攪拌する。試料を10000gで10分間遠心分離した後、上清を-20℃で一晩保存する。使用前に、上清を解凍し、10000gでさらに10分間遠心分離する。上清

40

50

(= SDS / DTT 脳抽出物) を E L I S A に使用する。

【 0 4 2 3 】

- a) A (2 0 - 4 2) グロプロマーエピトープのためのサンドイッチ E L I S A 試薬リスト :
- 1 . F 9 6 C e r t . M a x i s o r p N U N C - I m m u n o P l a t e (カタログ番号 4 3 9 4 5 4)
 - 2 . 結合抗体 : 5 F 7 、 7 C 6 、 1 0 F 1 1
 - 3 . 共役緩衝液 :
1 0 0 mM 炭酸水素ナトリウム、 pH 9 . 6
 - 4 . E L I S A のためのブロッキング試薬 (R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H カタログ番号 1 1 1 2 5 8 9)
 - 5 . P B S T 緩衝液 :
2 0 mM NaH₂PO₄ 、 1 4 0 mM NaCl 、 0 . 0 5 % Tween 20 、 pH 7 . 4
 - 6 . A (2 0 - 4 2) 較正標準物質
 - 7 . 一次抗体 :
抗 A p R A b B A 1 9 9 ; (A (1 - 4 2) グロプロマー - セファロースにより) アフィニティ精製された P B S 中の IgG 溶液 ; K o n z . : 0 . 2 2 mg / mL
 - 8 . 二次抗体 :
抗ウサギ P O D 抱合体 ; (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 、 カタログ番号 1 1 1 - 0 3 6 - 0 4 5)
 - 9 . 発色 :
T M B ; (R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H カタログ番号 9 2 8 1 7 0 6 0) D M S O 中の 4 2 mM
H₂O 中の 3 % H₂O₂
1 0 0 mM 酢酸ナトリウム、 pH 4 . 9
停止溶液 : 2 M 硫酸

【 0 4 2 4 】

- 試薬の調製 :
- 1 . 結合抗体 :
個々の結合抗体 5 F 7 、 7 C 6 及び 1 0 F 1 1 を共役緩衝液中で 0 . 7 μg / mL の終濃度に希釈する。

【 0 4 2 5 】

- 2 . ブロッキング試薬 :
ブロッキングストック溶液の調製に関し、ブロッキング試薬を 1 0 0 mL の H₂O 中に溶解し、各 1 0 mL の一定分量で - 2 0 で保存する。

【 0 4 2 6 】

- 1 枚の E L I S A プレートをブロッキングするために、ブロッキングストック溶液 3 mL を 2 7 mL の H₂O で希釈する。

【 0 4 2 7 】

- 3 . A (2 0 - 4 2) 較正標準物質 (C S 1)

【 0 4 2 8 】

- A (1 - 4 2) グロプロマーの調製を実施例 1 a に記載している。A (2 0 - 4 2) グロプロマータンパク質濃度を Bradford (Bi o R a d) 後に測定した (6 . 8 1 mg / mL) 。 1 0 mL の 2 0 mM NaH₂PO₄ 、 1 4 0 mM NaCl 、 0 . 0 5 % Tween 20 、 pH 7 . 4 、 0 . 5 % B S A 中に 1 4 . 6 8 μL の A (2 0 - 4 2) グロプロマー (6 . 8 1 mg / mL) を希釈する (= 1 0 μg / mL) 。 1 0 mL の 2 0 mM NaH₂PO₄ 、 1 4 0 mM NaCl 、 0 . 0 5 % Tween 20 、 pH 7 . 4 、 0 . 5 % B S A 中に 1 0 μg / mL 溶液 1 0 μL をさらに希釈する (= 1 0 ng / mL = C S 1) 。

30

40

50

【0429】

A (20-42) のための較正標準物質：

【0430】

【表7】

較正標準物質	較正標準物質の容積	P B S T + 0. 5% B S A	終濃度 A β (20-42) (p g / mL)
C S 1. 1	C S 1 の 1 mL	0 mL	1 0 0 0 0
C S 1. 2	C S 1. 1 の 0. 316 mL	0. 684 mL	3 1 6 0
C S 1. 3	C S 1. 2 の 0. 316 mL	0. 684 mL	1 0 0 0
C S 1. 4	C S 1. 3 の 0. 316 mL	0. 684 mL	3 1 6
C S 1. 5	C S 1. 4 の 0. 316 mL	0. 684 mL	1 0 0
C S 1. 6	C S 1. 5 の 0. 316 mL	0. 684 mL	3 1. 6
C S 1. 7	C S 1. 6 の 0. 316 mL	0. 684 mL	1 0
C S 1. 8	0. 0	1. 0 mL	0. 0

10

20

【0431】

S D S - D T T 脳抽出物：

S D S - D T T 脳抽出物 = E #

(#は、4つのヒト脳試料(1)R Z 1 6 ; (2)R Z 5 2 ; (3)R Z 5 5 ; (4)R Z 9 2 を表す。)

【0432】

【表8】

抽出試料	抽出試料の容積	P B S T + 0. 5% B S A	希釈係数
E #. 1	E # 1 mL	0. 0 mL	直接
E #. 2	E #. 1 の 0. 316 mL	0. 684 mL	1 : 3. 16
E #. 3	E #. 1 の 0. 316 mL	0. 684 mL	1 : 10
E #. 4	E #. 1 の 0. 316 mL	0. 684 mL	1 : 31. 6

30

【0433】

4. 一次抗体：

抗 A p R A b ストック溶液を P B S T + 0. 5% B S A 中で 0. 05 μ g / mL に希釈する。抗体溶液を即時使用する。

【0434】

5. 二次抗体：

凍結乾燥した抗ウサギ P O D 抱合体を 0. 5 mL の H₂O 中に溶解し、500 μ L のグリセロールと混合する。次に、抗体濃縮物を 100 μ L の一定分量で - 20° で保存する。濃縮物を P B S T 緩衝液中で 1 : 10000 に希釈する。抗体溶液を即時使用する。

【0435】

6. T M B 溶液：

100 mM 酢酸ナトリウム、pH 4. 9 の 20 mL を 200 μ L の T M B 溶液及び 3% 過酸化水素 29. 5 μ L と混合する。この溶液を即時使用する。

【0436】

A (20-42) のための E L I S A プレート：

40

50

較正標準物質（CS1.1ないしCS1.8）及び4つのヒト脳試料のSDS/DTT脳抽出物（1）RZ16；（2）RZ52；（3）RZ55；（4）RZ92（4つの連続希釈物E#.1ないしE#.4中のE1ないしE4）を二重に測定する。

【0437】

【表9】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CS1.1	CS1.1	E1.1	E1.1	E3.1	E3.1						
B	CS1.2	CS1.2	E1.2	E1.2	E3.2	E3.2						
C	CS1.3	CS1.3	E1.3	E1.3	E3.3	E3.3						
D	CS1.4	CS1.4	E1.4	E1.4	E3.4	E3.4						
E	CS1.5	CS1.5	E2.1	E2.1	E4.1	E4.1						
F	CS1.6	CS1.6	E2.2	E2.2	E4.2	E4.2						
G	CS1.7	CS1.7	E2.3	E2.3	E4.3	E4.3						
H	CS1.8	CS1.8	E2.4	E2.4	E4.4	E4.4						

【0438】

結合モノクローナル抗体5F7、7C6、10F11の各々を使用して、このELISA Aを実施した。

【0439】

手法：

1. ウェルあたり100μLのモノクローナル抗体溶液を添加する。+6（冷蔵庫）で一晩ELISAプレートを温置する。

【0440】

2. 抗体溶液を廃棄し、各250μLのPBS緩衝液でウェルを3回洗浄する。

【0441】

3. ブロッキング溶液250μL/ウェルを添加する。大気温で2時間温置する。

【0442】

4. ブロッキング溶液を廃棄し、各250μLのPBS緩衝液でウェルを3回洗浄する。

【0443】

5. 較正標準物質及びSDS/DTT脳抽出物各100μL/ウェルを添加する。プレートを大気温で2時間温置した後、6で一晩温置する。

【0444】

6. 較正標準物質及びSDS/DTT脳抽出物溶液を廃棄し、各250μLのPBS緩衝液でウェルを3回洗浄する。

【0445】

7. 一次抗体溶液200μL/ウェルを添加し、大気温で1時間温置する。

【0446】

8. 一次抗体溶液を廃棄し、各250μLのPBS緩衝液でウェルを3回洗浄する。

【0447】

9. 二次抗体溶液200μL/ウェルを添加し、大気温で1時間温置する。

【0448】

10. 二次抗体溶液を廃棄し、各250μLのPBS緩衝液でウェルを3回洗浄する。

【0449】

11. TMB溶液100μL/ウェルを添加する。

【0450】

12. 発色中のプレートの色をモニターし（大気温で5ないし15分間）、適切な色が

10

20

30

40

50

発色したとき、停止溶液 50 μL / ウェルを添加することによって反応を終結させる。

【0451】

13.450 nmでの励起を測定する。

【0452】

14.較正物質を使用して結果を算出する。

【0453】

15.評価：試料の励起が、較正物質の直線的な範囲を超過する場合、試料を再度希釈し、反復する。

【0454】

結果を図10に示す。

10

【0455】

アルツハイマー病患者及び対照対象者由来の脳抽出物中の A (20-42) グロブロマーエピトープの脳レベル

サンドイッチELISAを使用して、脳抽出物を、切断型 A (20-42) グロブロマーエピトープ含有量に関して評価した。A (20-42) グロブロマーエピトープに対する個々の抗体を使用するELISAを較正のために使用した。

【0456】

アルツハイマー病患者の脳組織の抽出物は、A (20-42) グロブロマーエピトープ含有量が、対照患者と比較して有意に上昇することを示す。これは、A (20-42) グロブロマーエピトープが実際に、ヒトアルツハイマー病患者の脳中の関連する A 種であり、アルツハイマー病動物モデルに関連しているだけではないことを示す。それゆえ、A (20-42) グロブロマーエピトープに対する抗体は、アルツハイマー病の治療のために非常に望ましい。

20

【実施例12】

【0457】

抗 A (20-42) グロブロマーアイブリドーマ細胞系の発達

ハイブリドーマ、組換え及びファージディスプレイ技術、又はそれらの組み合わせの使用を含む本分野で周知の広範な技術を使用して、モノクローナル抗体を調製することが可能である。例えば、モノクローナル抗体は、本分野で周知であり、例えば Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (該参考文献は、その全ての内容が全体として参照により本明細書に組み入れられる。)において教示されるものを含むハイブリドーマ技術を使用して產生されることが可能である。本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という語は、ハイブリドーマ技術を通じて產生された抗体に限定されるものではない。「モノクローナル抗体」という語は、真核クローン、原核クローン又はファージクローンのいずれかを含む單一のクローンに由来する抗体を指し、產生される方法を指すものではない。

30

【0458】

本明細書に記載される抗体を產生するために使用される具体的なプロトコールは、次のとおりである。

【0459】

マウスの免疫化：Balb/c 及び A/J マウス (6ないし 8 週齢) を CFA 中の抗原 50 μg で皮下的に免疫化した。Immuneasy (商標) (Qiagen) 中の抗原 50 μg で 3 週ごとに動物を追加免疫し、合計 3 回の追加免疫を実施した。融合の 4 日前に、抗原 10 μg でマウスを静脈内で追加免疫した。

40

【0460】

細胞融合及びハイブリドーマスクリーニング：標準的な技術を使用して、免疫化された

50

動物由来の脾臓細胞を5：1の割合でS P 2 / 0 - A g 1 4 ミエローマ細胞と融合した。融合の7ないし10日後、肉眼でコロニーを観察すると、A (20-42) グロブロマーマーに対する抗体に関して、ELISAによりSNを検査した。ELISA陽性ウェル由來の細胞を増大させ、希釈を制限することによってクローニングした。

【0461】

抗体のアイソタイプの決定：Z y m e d E I A アイソタイプ分類キットを使用して、抗A (20-42) グロブロマーモノクローナル抗体のアイソタイプを決定した。

【0462】

モノクローナル抗体の規模拡大及び精製：5%低IgGウシ胎児血清(H y c l o n e)を含有する培地中へハイブリドーマを拡大した。上清を回収し濃縮した。タンパク質Aクロマトグラフィーを使用してモノクローナル抗体を精製し、P B S中へ透析した。
10

【0463】

血清力価：10匹のマウスをA (20-42) グロブロマーマーで免疫化した。全てのマウスは、1：5000ないし10,000のELISA力価(1/2最大OD450nm)で血清転換した。

【0464】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの設計

委託のために使用されるAbbott Laboratoriesの内部設計

寄託された細胞系：

1) (本明細書では、「7C6」とも呼ばれる)ML13-7C6.1D4.4A9.
5G8
20

2) (本明細書では、「5F7」とも呼ばれる)ML15-5F7.5B10

3) (本明細書では、「10F11」とも呼ばれる)ML15-10F11.3D9

4) (本明細書では、「4B7」とも呼ばれる)ML15-4B7.3A6

5) (本明細書では、「2F2」とも呼ばれる)ML15-2F2.3E12

6) (本明細書では、「6A2」とも呼ばれる)ML15-6A2.4B10

7) (本明細書では、「4D10」とも呼ばれる)ML13-4D10.3F3

8) (本明細書では、「7E5」とも呼ばれる)ML15-7E5.5E12

9) (本明細書では、「10C1」とも呼ばれる)ML15-10C1.5C6.3H
4
30

10) (本明細書で「3B10」とも呼ばれる)ML15-3B10.2D5.3F1

【図面の簡単な説明】

【0465】

【図1A】図1は、A (1-42) 及びA (1-40) の分子ふるいクロマトグラムを示す。A) 0.1%NH₄OH、B) 70%ギ酸、C) 0.1%NaOH中にA (1-42) モノマーを溶解し、D)においてA (1-40) を0.1%NaOH中に溶解した。その後、20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、pH7.4中で試料を1：10にさらに希釈した。これらの試料を大気温で溶解した後、5分間(左の列)又は1時間(右の列)温置した後、分子ふるいカラムへ適用した。

【図1B】図1は、A (1-42) 及びA (1-40) の分子ふるいクロマトグラムを示す。A) 0.1%NH₄OH、B) 70%ギ酸、C) 0.1%NaOH中にA (1-42) モノマーを溶解し、D)においてA (1-40) を0.1%NaOH中に溶解した。その後、20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、pH7.4中で試料を1：10にさらに希釈した。これらの試料を大気温で溶解した後、5分間(左の列)又は1時間(右の列)温置した後、分子ふるいカラムへ適用した。
40

【図1C】図1は、A (1-42) 及びA (1-40) の分子ふるいクロマトグラムを示す。A) 0.1%NH₄OH、B) 70%ギ酸、C) 0.1%NaOH中にA (1-42) モノマーを溶解し、D)においてA (1-40) を0.1%NaOH中に溶解した。その後、20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、pH7.4中で試料を1：10にさらに希釈した。これらの試料を大気温で溶解した後、5分間(左の列)又は1
50

時間(右の列)温置した後、分子ふるいカラムへ適用した。

【図1D】図1は、A (1-42)及びA (1-40)の分子ふるいクロマトグラムを示す。A) 0.1%NH₄OH、B) 70%ギ酸、C) 0.1%NaOH中にA (1-42)モノマーを溶解し、D)においてA (1-40)を0.1%NaOH中に溶解した。その後、20mMNaH₂PO₄、140mMNaCl、pH7.4中で試料を1:10にさらに希釈した。これらの試料を大気温で溶解した後、5分間(左の列)又は1時間(右の列)温置した後、分子ふるいカラムへ適用した。

【図2A】図2のA)は、標準タンパク質(分子マーカータンパク質、レーン1)；A (1-42)フィブリル調製物；対照(レーン2)；A (1-42)フィブリル調製物+モノクローナル抗体5F7、37、20時間、上清(レーン3)；A (1-42)フィブリル調製物+モノクローナル5F7、37、20時間、ペレット(レーン4)；A (1-42)フィブリル調製物+モノクローナル6E10、37、20時間、上清(レーン5)；A (1-42)フィブリル調製物+モノクローナル6E10、37、20時間、ペレット(レーン6)のSDS-PAGEを示す；

【図2B】B)は、抗体全体の割合におけるA フィブリルへ結合したモノクローナル抗体の定量分析の結果を示す。

【図3】図3は、野生型マウス(ポジティブ対照)及びPBS処理したAPP/Lマウス(ネガティブ対照)と比較した、0.1%NH₄OH中のA (1-42)モノマー、A (1-42)グロブロマー(globulomer)及びA (20-42)グロブロマーによる能動免疫後のAPP/L遺伝子導入マウスを使用する、対象認識検査の結果を示す棒グラフであり、円は、PBS処理したAPP/Lマウスに対する有意差を示し、星印は、群間の差異に関するANOVAにおけるP<0.05後のpost-hoc t検定に従った見込みレベル(50%)に対する高度に有意な差を示す。

【図4】図4は、A (20-42)グロブロマーによるAPP/L Tgマウスの能動免疫後に得られた多様な抗血清による、A (1-42)グロブロマー(1列)；HFI Pで前処理されたPluronic F68中のA (1-42)モノマー(2列)；A (20-42)グロブロマー(3列)；A (12-42)グロブロマー(4列)；HFI Pで前処理されたDMSO中のA (1-40)(5列)；A (1-42)モノマー、NH₄OH(6列)；A (1-42)フィブリル調製物(7列)；Sigma製sAPP (8列)の100pmol/μL(A行)；10pmol/μL(B行)；1pmol/μL(C行)；0.1pmol/μL(D行)及び0.01pmol/μL(E行)の反応性のドットプロットを示す。

【図5】図5は、A (1-42)モノマー(0.1%NH₄OH)、A (1-42)グロブロマー、A (20-42)グロブロマー又は対照としての媒体のいずれかで能動免疫されたAPP/PS1 Tgマウスの脳抽出物中の可溶性及び不溶性A (1-42)及びA (1-40)ペプチドの濃度を示す棒グラフである。

【図6A】図6は、A)別個に各抗体に関する、及びB)全ての抗体を総合したものに関する対照マウスと比較した抗A (20-42)グロブロマー抗体5F7、10F11及び7C6による受動免疫後のAPP/L遺伝子導入マウスによる、対象認識検査の結果を示す棒グラフである。

【図6B】図6は、A)別個に各抗体に関する、及びB)全ての抗体を総合したものに関する対照マウスと比較した抗A (20-42)グロブロマー抗体5F7、10F11及び7C6による受動免疫後のAPP/L遺伝子導入マウスによる、対象認識検査の結果を示す棒グラフである。

【図7A】図7のA)は、異なる抗A 抗体(6E10、5F7、4B7、10F11、6A2、4D10、3B10、2F2、7C6、7E5、10C1)の特異性のドットプロット分析を示す。A (20-42)グロブロマーによるマウスの能動免疫後に融合されたハイブリドーマ細胞(市販の6E10、Sigma 9320番以外)の選択によって、本発明で検査されるモノクローナル抗体を得た。個々のA 形態を連続希釈物中に適用し、免疫反応のため、個々のモノクローナル抗体とともに温置した。 1. A (1-

10

20

30

40

50

42) モノマー、0.1% NH₄OH 2.A (1-40) モノマー、0.1% NH₄OH 3.A (1-42) モノマー、0.1% NaOH 4.A (1-40) モノマー、0.1% NaOH 5.A (1-42) グロブロマー 6.A (12-42) グロブロマー 7.A (20-42) グロブロマー 8.A (1-42) フィブリル調製物 9.sAPP (Sigma) (第一ドット: 1 pmol)

【図7B】B) の定量的評価は、強度の濃度測定分析を使用して実施した。各A 形態に
関し、最低の抗原濃度に相当するドットのみを評価し、ただし、前記濃度は、A (20
- 42) グロブロマーの光学的に明確に同定された最後のドットの相対密度(閾値)の2
0%を超える相対密度を有した。ドットプロットごとに独立して、この閾値を決定した。
前記値は、A (20-42) グロブロマーの認識と付与された抗体に関する個々のA
形態との間の関係を示す。

10

【図8A】図8は、アルツハイマー病(AD)患者又は老齢APP遺伝子導入マウスの新
皮質の横断切片に対する異なる濃度での抗体の結合を示す。A) APP遺伝子導入マウ
スTg2576系及びAD患者(RZ55)における脳組織中のplaquesとしての、及び
脳血管中の脳アミロイド血管症(CAA)としてのコンゴーレッド染色によるアミロイド
沈着物の立証。

【図8B】B) AD患者(RZ16)におけるA (アミロイドplaques)の実質性沈着
物の強い染色は、6G1及び市販の抗体6E10でのみ生じる(左の列)のに対し、抗体
5F7、2F2及び6A2(第二列)、4D10、10F11及び3B10(第三列)並
びに7C6、7E5及び10C1(右の列)は、無染色を示す。0.7 μg / mL の濃度
で全ての抗体を使用した。

20

【図8C】C) 19ヶ月齢のTg2976におけるA (アミロイドplaques)の実質性
沈着物の強い染色は、6G1及び市販の抗体6E10でのみ生じる(左の列)のに対し、抗体
5F7、2F2及び6A2(第二列)、4D10、10F11及び3B10(第三列)
並びに7C6、7E5及び10C1(右の列)は、無染色を示す。0.7 μg / mL の濃度で全ての抗体を使用した。

【図8D】D)ないしG)画像分析を使用した組織学的画像におけるA plaques染色の
分析の定量化。背景組織のグレースケール値によって差し引かれるplaquesのグレースケ
ール値から、光学密度値(0% = 無染色)を算出した。D)老齢Tg2576マウスにお
ける0.7 μg / mL 抗体での染色、E)APP / Lマウスにおける抗体の3つの異なる
濃度での染色、F)AD患者(RZ55)における0.7 μg / mL 抗体での染色、及び
G)AD患者(RZ16)における抗体の3つの異なる濃度での染色。市販の抗体6E1
0(星印)及び4G8(円)及びその他の全ての抗体の染色間の差(3つの星印 / 円 : 対
照に対するp < 0.001; p < 0.001でのANOVA後のpost-hoc Bonferroniのt検定)を統計的に評価した(D、F)。E)及びG)において、6
G1以外の全ての抗体は、市販の抗体6E10及び4G8よりも有意に弱い染色を常に示
した(ANOVAにおけるp < 0.001後のpost-hoc t検定におけるp < 0
.001)。

30

【図8E】D)ないしG)画像分析を使用した組織学的画像におけるA plaques染色の
分析の定量化。背景組織のグレースケール値によって差し引かれるplaquesのグレースケ
ール値から、光学密度値(0% = 無染色)を算出した。D)老齢Tg2576マウスにお
ける0.7 μg / mL 抗体での染色、E)APP / Lマウスにおける抗体の3つの異なる
濃度での染色、F)AD患者(RZ55)における0.7 μg / mL 抗体での染色、及び
G)AD患者(RZ16)における抗体の3つの異なる濃度での染色。市販の抗体6E1
0(星印)及び4G8(円)及びその他の全ての抗体の染色間の差(3つの星印 / 円 : 対
照に対するp < 0.001; p < 0.001でのANOVA後のpost-hoc Bonferroniのt検定)を統計的に評価した(D、F)。E)及びG)において、6
G1以外の全ての抗体は、市販の抗体6E10及び4G8よりも有意に弱い染色を常に示
した(ANOVAにおけるp < 0.001後のpost-hoc t検定におけるp < 0
.001)。

40

50

【図 8 F】D)ないしG)画像分析を使用した組織学的画像におけるA プラーク染色の分析の定量化。背景組織のグレースケール値によって差し引かれるプラークのグレースケール値から、光学密度値(0% = 無染色)を算出した。D)老齢Tg2576マウスにおける0.7 μg / mL抗体での染色、E)APP/Lマウスにおける抗体の3つの異なる濃度での染色、F)AD患者(RZ55)における0.7 μg / mL抗体での染色、及びG)AD患者(RZ16)における抗体の3つの異なる濃度での染色。市販の抗体6E10(星印)及び4G8(円)及びその他の全ての抗体の染色間の差(3つの星印/円:対照に対する $p < 0.001$; $p < 0.001$ でのANOVA後のpost-hoc Bonferroniのt検定)を統計的に評価した(D、F)。E)及びG)において、6G1以外の全ての抗体は、市販の抗体6E10及び4G8よりも有意に弱い染色を常に示した(ANOVAにおける $p < 0.001$ 後のpost-hoc t検定における $p < 0.001$)。

【図 8 G】D)ないしG)画像分析を使用した組織学的画像におけるA プラーク染色の分析の定量化。背景組織のグレースケール値によって差し引かれるプラークのグレースケール値から、光学密度値(0% = 無染色)を算出した。D)老齢Tg2576マウスにおける0.7 μg / mL抗体での染色、E)APP/Lマウスにおける抗体の3つの異なる濃度での染色、F)AD患者(RZ55)における0.7 μg / mL抗体での染色、及びG)AD患者(RZ16)における抗体の3つの異なる濃度での染色。市販の抗体6E10(星印)及び4G8(円)及びその他の全ての抗体の染色間の差(3つの星印/円:対照に対する $p < 0.001$; $p < 0.001$ でのANOVA後のpost-hoc Bonferroniのt検定)を統計的に評価した(D、F)。E)及びG)において、6G1以外の全ての抗体は、市販の抗体6E10及び4G8よりも有意に弱い染色を常に示した(ANOVAにおける $p < 0.001$ 後のpost-hoc t検定における $p < 0.001$)。

【図 8 H】H)A の血管沈着物の強い染色(矢印)は、6G1及び市販の抗体6E10(左の列)でのみ生じるのに対し、抗体5F7、2F2及び6A2(第二列)、4D10、10F11及び3B10(第三列)並びに7C6、7E5及び10C1(右の列)は、無染色を示す。0.7 μg / mLの濃度で全ての抗体を使用した。定量的に同様の状況は、Tg2576マウスにおいて見出された(ここでは示されていない。)。

【図 9 A】図9は、能動免疫の約1年後のTg2576マウスの血漿における抗A 抗体力値及びドットプロット選択性特性を示す。A (20-42)グロブロマー、B)A (12-42)グロブロマー、C)A (1-42)モノマー及びD)媒体による最後の免疫化の約1年後のTg2576マウスの血漿試料を、產生された抗A 抗体に関して評価し、ドットプロットによってなおも存在した。1.A (1-42)グロブロマー 2.HFIPで前処理された0.1% Pluronnic F68中のA (1-42)モノマー 3.A (20-42)グロブロマー 4.A (12-42)グロブロマー 5.HFIPで前処理されたDMSO中の5mMのA (1-40)モノマー 6.A (1-42)モノマー、0.1% NH₄OH 7.A (1-42)フィブリル調製物 8.sAPP (Sigma); (第一ドット: 1 pmol)

【図 9 B】図9は、能動免疫の約1年後のTg2576マウスの血漿における抗A 抗体力値及びドットプロット選択性特性を示す。A (20-42)グロブロマー、B)A (12-42)グロブロマー、C)A (1-42)モノマー及びD)媒体による最後の免疫化の約1年後のTg2576マウスの血漿試料を、產生された抗A 抗体に関して評価し、ドットプロットによってなおも存在した。1.A (1-42)グロブロマー 2.HFIPで前処理された0.1% Pluronnic F68中のA (1-42)モノマー 3.A (20-42)グロブロマー 4.A (12-42)グロブロマー 5.HFIPで前処理されたDMSO中の5mMのA (1-40)モノマー 6.A (1-42)モノマー、0.1% NH₄OH 7.A (1-42)フィブリル調製物 8.sAPP (Sigma); (第一ドット: 1 pmol)

【図 9 C】図9は、能動免疫の約1年後のTg2576マウスの血漿における抗A 抗体

10

20

30

40

50

力価及びドットプロット選択性特性を示す。A (20 - 42) グロブロマー、B) A (12 - 42) グロブロマー、C) A (1 - 42) モノマー及びD) 媒体による最後の免疫化の約1年後のTg2576マウスの血漿試料を、產生された抗A抗体に関して評価し、ドットプロットによってなおも存在した。1. A (1 - 42) グロブロマー
2. H F I Pで前処理された0.1% Pluronic F68中のA (1 - 42) モノマー
3. A (20 - 42) グロブロマー 4. A (12 - 42) グロブロマー
5. H F I Pで前処理されたDMSO中の5mMのA (1 - 40) モノマー 6. A (1 - 42) モノマー、0.1% NH₄OH 7. A (1 - 42) フィブリル調製物
8. sAPP (Sigma); (第一ドット: 1 pmol)

【図9D】図9は、能動免疫の約1年後のTg2576マウスの血漿における抗A抗体力価及びドットプロット選択性特性を示す。A (20 - 42) グロブロマー、B) A (12 - 42) グロブロマー、C) A (1 - 42) モノマー及びD) 媒体による最後の免疫化の約1年後のTg2576マウスの血漿試料を、產生された抗A抗体に関して評価し、ドットプロットによってなおも存在した。1. A (1 - 42) グロブロマー
2. H F I Pで前処理された0.1% Pluronic F68中のA (1 - 42) モノマー
3. A (20 - 42) グロブロマー 4. A (12 - 42) グロブロマー
5. H F I Pで前処理されたDMSO中の5mMのA (1 - 40) モノマー 6. A (1 - 42) モノマー、0.1% NH₄OH 7. A (1 - 42) フィブリル調製物
8. sAPP (Sigma); (第一ドット: 1 pmol)

【図10】図10は、アルツハイマー病を有するヒト及び痴呆になっていない対照の脳組織中のA (20 - 42) グロブロマーのレベルを要約する表を示す。

【図11A】図11は、次表のとおりのモノクローナル抗体(mAb)の可変重鎖及び軽鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す(各アミノ酸配列において相補性決定領域(CDR)に下線を付す。)。

【図11B】図11は、次表のとおりのモノクローナル抗体(mAb)の可変重鎖及び軽鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す(各アミノ酸配列において相補性決定領域(CDR)に下線を付す。)。

【図11C】図11は、次表のとおりのモノクローナル抗体(mAb)の可変重鎖及び軽鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す(各アミノ酸配列において相補性決定領域(CDR)に下線を付す。)。

【図11D】図11は、次表のとおりのモノクローナル抗体(mAb)の可変重鎖及び軽鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す(各アミノ酸配列において相補性決定領域(CDR)に下線を付す。)。

【図11E】図11は、次表のとおりのモノクローナル抗体(mAb)の可変重鎖及び軽鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す(各アミノ酸配列において相補性決定領域(CDR)に下線を付す。)。

【図11F】図11は、次表のとおりのモノクローナル抗体(mAb)の可変重鎖及び軽鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す(各アミノ酸配列において相補性決定領域(CDR)に下線を付す。)。

【図11G】図11は、次表のとおりのモノクローナル抗体(mAb)の可変重鎖及び軽鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す(各アミノ酸配列において相補性決定領域(CDR)に下線を付す。)。

【図11H】図11は、次表のとおりのモノクローナル抗体(mAb)の可変重鎖及び軽鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す(各アミノ酸配列において相補性決定領域(CDR)に下線を付す。)。

【図11I】図11は、次表のとおりのモノクローナル抗体(mAb)の可変重鎖及び軽鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す(各アミノ酸配列において相補性決定領域(CDR)に下線を付す。)。

【図11J】図11は、次表のとおりのモノクローナル抗体(mAb)の可変重鎖及び軽鎖のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す(各アミノ酸配列において相補性決定領域

10

20

30

40

50

(C D R) に下線を付す。)。

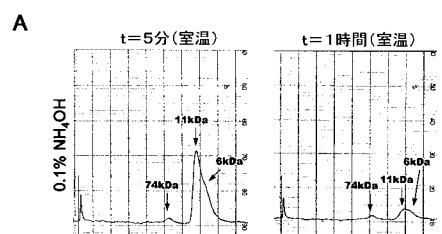
【 0 4 6 6 】

【 表 1 0 】

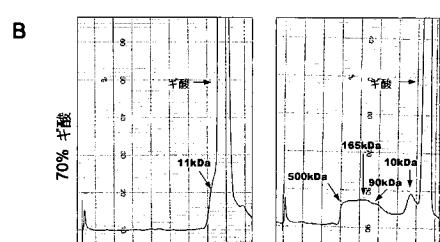
図 1 1	配列番号	配列の種類	鎖	m A b
A 1	1	ヌクレオチド	可変重鎖 (V H)	5 F 7
A 2	2	ヌクレオチド	可変軽鎖 (V L)	5 F 7
A 1	3	アミノ酸	可変重鎖 (V H)	5 F 7
A 2	4	アミノ酸	可変軽鎖 (V L)	5 F 7
B 1	5	ヌクレオチド	可変重鎖 (V H)	1 0 F 1 1
B 2	6	ヌクレオチド	可変軽鎖 (V L)	1 0 F 1 1
B 1	7	アミノ酸	可変重鎖 (V H)	1 0 F 1 1
B 2	8	アミノ酸	可変軽鎖 (V L)	1 0 F 1 1
C 1	9	ヌクレオチド	可変重鎖 (V H)	7 C 6
C 2	1 0	ヌクレオチド	可変軽鎖 (V L)	7 C 6
C 1	1 1	アミノ酸	可変重鎖 (V H)	7 C 6
C 2	1 2	アミノ酸	可変軽鎖 (V L)	7 C 6
D 1	1 3	ヌクレオチド	可変重鎖 (V H)	4 B 7
D 2	1 4	ヌクレオチド	可変軽鎖 (V L)	4 B 7
D 1	1 5	アミノ酸	可変重鎖 (V H)	4 B 7
D 2	1 6	アミノ酸	可変軽鎖 (V L)	4 B 7
E 1	1 7	ヌクレオチド	可変重鎖 (V H)	2 F 2
E 2	1 8	ヌクレオチド	可変軽鎖 (V L)	2 F 2
E 1	1 9	アミノ酸	可変重鎖 (V H)	2 F 2
E 2	2 0	アミノ酸	可変軽鎖 (V L)	2 F 2
F 1	2 1	ヌクレオチド	可変重鎖 (V H)	6 A 2
F 2	2 2	ヌクレオチド	可変軽鎖 (V L)	6 A 2
F 1	2 3	アミノ酸	可変重鎖 (V H)	6 A 2
F 2	2 4	アミノ酸	可変軽鎖 (V L)	6 A 2
G 1	2 5	ヌクレオチド	可変重鎖 (V H)	4 D 1 0
G 2	2 6	ヌクレオチド	可変軽鎖 (V L)	4 D 1 0
G 1	2 7	アミノ酸	可変重鎖 (V H)	4 D 1 0
G 2	2 8	アミノ酸	可変軽鎖 (V L)	4 D 1 0
H 1	2 9	ヌクレオチド	可変重鎖 (V H)	7 E 5
H 2	3 0	ヌクレオチド	可変軽鎖 (V L)	7 E 5
H 1	3 1	アミノ酸	可変重鎖 (V H)	7 E 5
H 2	3 2	アミノ酸	可変軽鎖 (V L)	7 E 5

I 1	3 3	スクレオチド	可変重鎖 (VH)	1 0 C 1
I 2	3 4	スクレオチド	可変軽鎖 (VL)	1 0 C 1
I 1	3 5	アミノ酸	可変重鎖 (VH)	1 0 C 1
I 2	3 6	アミノ酸	可変軽鎖 (VL)	1 0 C 1
J 1	3 7	スクレオチド	可変重鎖 (VH)	3 B 1 0
J 1	3 8	アミノ酸	可変重鎖 (VH)	3 B 1 0

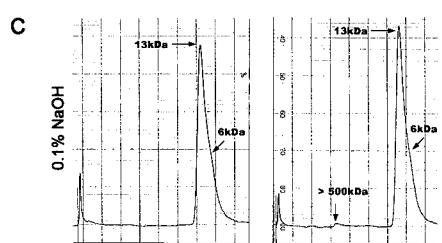
【図 1 A】



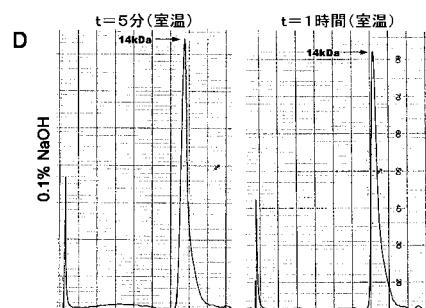
【図 1 B】



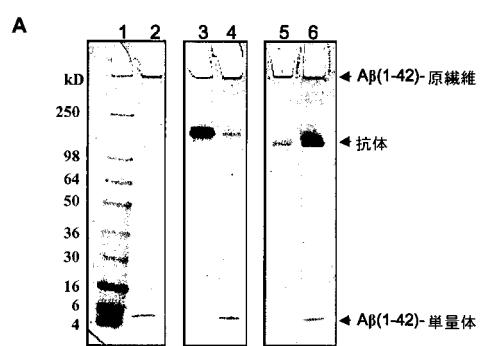
【図 1 C】



【図 1 D】



【図 2 A】



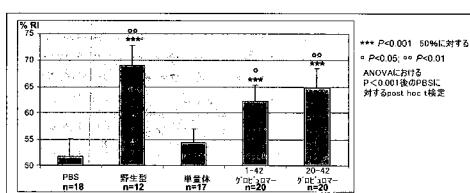
【図2B】

B

	原繊維へ結合した抗体 [%]
6E10	98
5F7	7
2F2	15
6A2	22
4D10	6
10F11	7
3B10	5
7C6	2
7E5	3
10C1	5

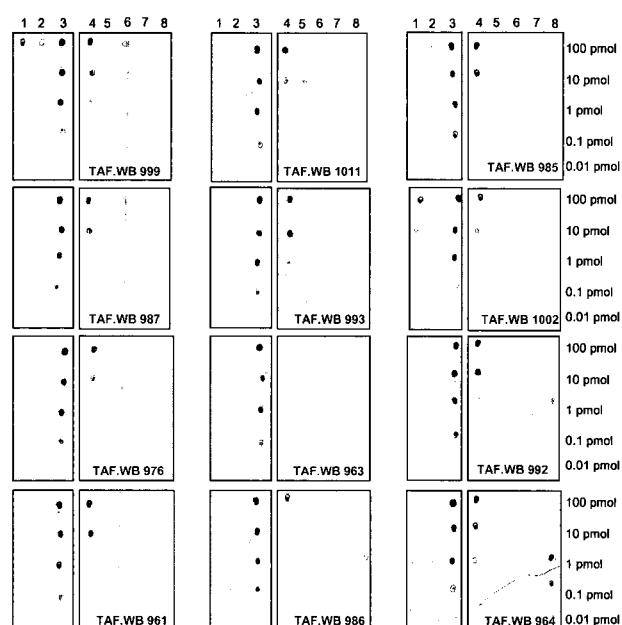
【図3】

FIG. 3



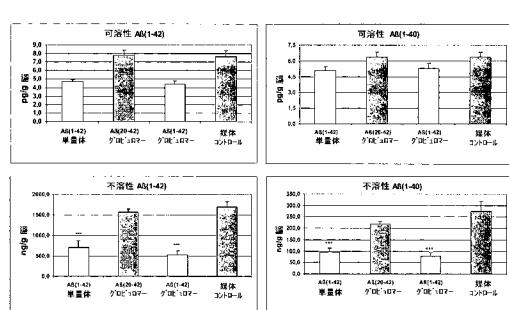
【図4】

FIG. 4



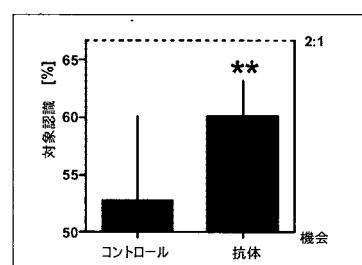
【図5】

FIG. 5

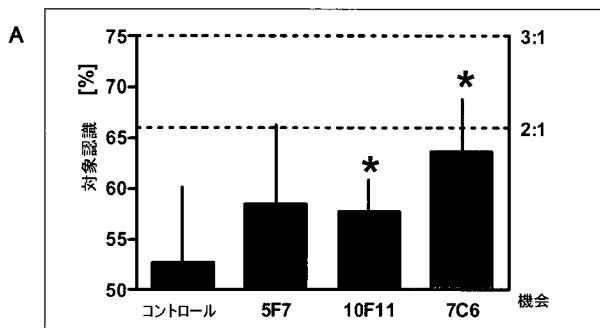


【図6B】

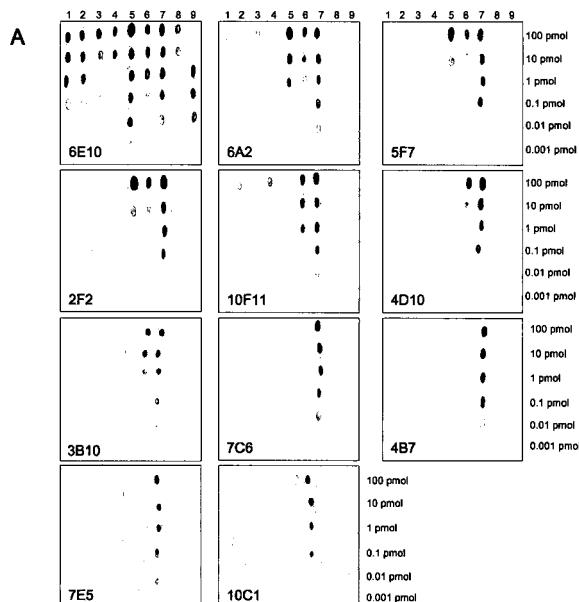
B



【図6A】



【図7A】

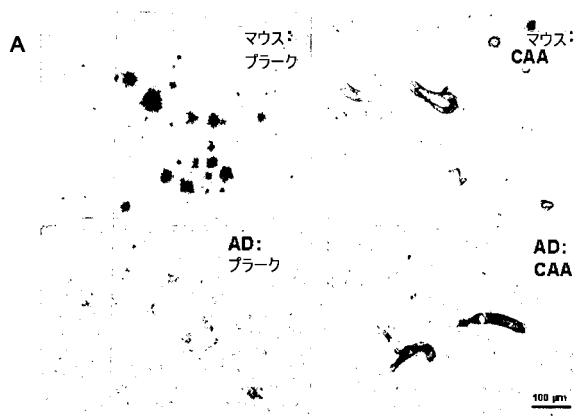


【図7B】

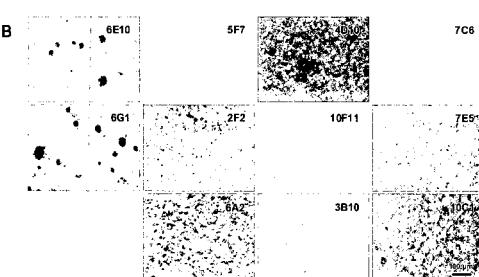
B

	Ab(1-42) 0.1% SDS-PAGE 0.1% Triton X-100	Ab(1-40) 0.1% SDS-PAGE 0.1% Triton X-100	Ab(1-42) SDS-PAGE 0.1% SDS-PAGE	Ab(1-40) SDS-PAGE 0.1% SDS-PAGE	Ab(1-42) グリコロマー グリコユロマー	Ab(12-42) グリコロマー グリコユロマー	Ab(20-42) グリコロマー グリコユロマー	Ab(1-42) 原縮縫	%APPs
6E10	7.840	5.078	509	322	0.2	9	1	510	6.3
6A2	>10.000	>10.000	7.717	38.583	47	138	1	337/531	>1.000
5F7	26.958	23.463	164.182	226	262	1	>10.000	>100	
2F2	39.517	31.000	30.460	19.500	195	274	1	37.000	
10F11	83.267	37.19	17.417	2.233	77.985	12	1	234.366	>1.000
4D10	>10.000	43.535	35.059	>10.000	29	1	>10.000	>100	
3B10	>100.000	>100.000	>100.000	>100.000	20	1	>100.000	>100	
7C6	>100.000	>100.000	>100.000	>100.000	94.052	>100.000	1	>100.000	>100
4B7	>100.000	>100.000	>100.000	>100.000	>100.000	>100.000	1	>100.000	>100
7E5	>100.000	>100.000	>100.000	>100.000	>100.000	>100.000	1	>100.000	>100
10C1	>100.000	>100.000	>100.000	>100.000	49.000	>100.000	1	>100.000	>100

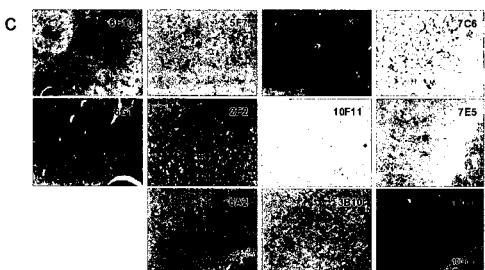
【図8A】



【図8B】

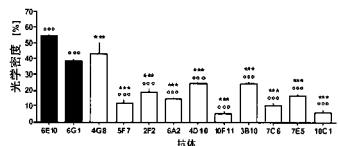


【図8C】

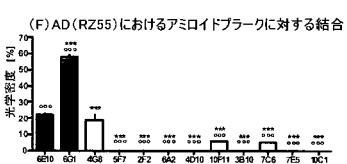


【図8D】

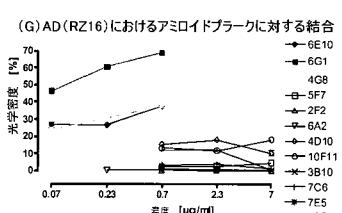
(D) Tg2576におけるアミロイドプラーカに対する結合



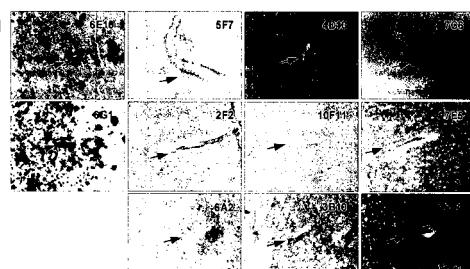
【図8F】



【図8G】

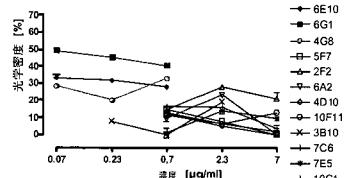


【図8H】



【図8E】

(E) APP/LIにおけるアミロイドプラーカに対する結合



【図9A】

	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	100 pmol
A				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
13161		13105	13117	0.01 pmol
				100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
13330		13191	10910	0.01 pmol
				100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
10885		10822	10912	0.01 pmol
				100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
10886		11101	11086	0.01 pmol
				100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
11100		11099	11099	0.01 pmol

【図9B】

	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	100 pmol
B				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
				0.01 pmol
				100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
13174			13115	0.01 pmol
				100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
10903			10903	0.01 pmol
				100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
11098			11098	0.01 pmol
				100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
11091			11087	0.01 pmol

【図9C】

	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	100 pmol
C				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
				0.01 pmol
10879		10892	10915	100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
				0.01 pmol
10902		13108	10906	100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
				0.01 pmol
13179		13186	10909	100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
				0.01 pmol
11097		11096	11096	0.01 pmol

【図9D】

	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	100 pmol
D				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
				0.01 pmol
				100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
13135			13332	0.01 pmol
				100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
13147			13114	0.01 pmol
				100 pmol
				10 pmol
				1 pmol
				0.1 pmol
11093			11092	0.01 pmol

【図10】

	7C6 ->BA199 Aβ(20-42) グロビュロマー [pmol/g] 脳組織	10F11 ->BA199 Aβ(20-42) グロビュロマー [pmol/g] 脳組織	5F7 ->BA199 Aβ(20-42) グロビュロマー [pmol/g] 脳組織
RZ16 (AD)	50,1	10,6	10,2
RZ 52 (AD)	43,9	14,3	13,9
RZ 55 (AD)	13,9	2,9	3,6
RZ 92 (コントロール)	< 0,2	< 0,06	< 0,06

【図 1 1 A】

A1) VH ML15-5F7

配列番号 1

CAGGTCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAAGCCCTGGGACTTC
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCGCTACACCTTCACTACCTCTATAT
ACACTGGTGAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGCTTGAGTGATTGAAATG
ATTTGGTCTGGAAAGTGGTAAATCTACTACATGAGATGTCAAGGACAA
GGCACATGACTGAGACACATCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA
GCAGCCTCACATCTGGAGACTCTGGGTCTATTTCTGTCAAGGACAAAG
TCAGCTGGCGCCGCTGGTACTCTGGGCAAGGGACTCTGGTAC
TGCTCTGCA

配列番号 3

QVQLQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTF~~T~~FYIHWVKQRPGQGLEWIGMI
GPGSNTYYNEMFKD~~K~~ATLTVTDSSSTAYMQLSSLSED~~S~~AVYFCARAKSAR
AAWFAYWGQGTLVTVSA

A2) VL ML15-5F7

配列番号 2

GATGTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCGTGAGCTTGGAGAT
CAAGCCTCATCTCTGAGATCTAGTCAGAGCTTGACAGATAATGG
AAACACCTATTAGAATGTAACCTGAGAAACCCAGGCCAGTCTCAAAGC
CTCTGATCTACAAAGTTCCACCGATTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA
GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCAACACTCAAGATCAGCAGAGTGG
GGCTGAGGATCTGGAGTTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTCCTCC
CACCTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGAAATAAACGG

配列番号 4

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSOSVVSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI
YKVSNRESGV~~PDRFS~~GS~~G~~TDFTLKR~~V~~EAEDLGVYYCFQGSHV~~P~~TFGG
TKLEIKR

【図 1 1 B】

B1) VH ML15-10F11

配列番号 5

CAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGCTTC
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCGATACACCTACTAGCTATGTTAT
GCACTGGTGAAGCAGAGGCCCTGGCAGGGCTTGAGTGATTGGAATATA
TTTATCTTCAATGAGTGGTACTAAGTCAAATGAGAAAGTCAAAGGCAAG
GCCACACTGACTTCAGAACATCTCCAGCACAGTATATGAGCTCAG
CAGCCTGACCTGAGGACTCTACAGTCTATTACTGACAGTAGAGGTTG
CTACCTGGACGGTACTTCGATGTCGGGACAGGGACCACGGTCAACC
GTCTCCTCA

配列番号 7

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT~~S~~YVMH~~W~~VKQRPGQGLEWIGYI
Y~~P~~YNDG~~T~~KYNEKF~~K~~GKATLTSKSSSTVY~~M~~ELSSLT~~E~~D~~S~~TVYYCT~~V~~EGATW
DGYFDVWGTTTVTVSS

B2) VL ML15-10F11

配列番号 6

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCAGTTCGTTACCAATTGGACAA
TCAGCCTATCTCTGCAACTCAAGTCAGGCTCTTATATAGTAAAGGA
AAAACCTATTGAATTGGTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCAAAGCG
CTTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCA
TGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTCAC~~T~~GAAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGATTGGAGTTATTACTGCTGCAAGGTAACACATTTCCTCAC
ACGTCGGAGGGGGGACCAAGCTGAAATAAACCG

配列番号 8

DVVMTQPLTLSVTIQQSASISCKSSQ~~S~~LLYSKGKTYLNWLQRPGQSPKRLI
YLVSKLD~~S~~GPDRFTGSGSGTDFTLKISR~~V~~EAEDLGVYYC~~V~~QGTHFPHTFGG
GTKLEIKR

【図 1 1 C】

C1) VH ML13-7C6

配列番号 9

GAAGTGAAGCTGGAGCTGGGGAGGCTAGTGAAGCCTGGAGGGT
CCCTGAAACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCACTAGTAGCTATGCCA
TGTCTGGTTCGCGCAGACTCAGCGAAGAGGCTAGAGTGGGTCGGCTC
ATTCTAAATAGAGTACTATCTCTATCTAGACACTGTAAGGCCCCGATT
ACCATCTCCAGAGATAATGTCAGGAACACCCCTGACCTGCAAATGAGCAG
TCTGAGGCTGAGGACACGGCCATATTACTGTCACAAGAGGGCCGAGTA
ACTCTATGCTATGGACTACTGGGTCAGGAACCTCAGTCACCGCTCTCCT
CG

配列番号 1 1

EVKLVESGGGLVKPGS~~L~~LSLSCAASGFTFSSYAMS~~W~~RQTPAKRL~~E~~W~~V~~ASHI
NRGTFYLD~~S~~VKG~~R~~F~~T~~ISRD~~N~~VRN~~T~~LYLQM~~S~~SLR~~S~~EDTAIYYCT~~R~~GR~~S~~NSYAM
DWYGQGTSVTVSS

C2) VL ML13-7C6

配列番号 1 0

GATGTTGGTACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCGTGAGGCTGGAGAT
CAAGCCTCATCTCTGCGATCTACTAGACCCCTGACATGTAATGG
GACACCTATTAGAATGTAACCTGAGAAACCCAGGCCAGTCTCAAAGTC
CCTGATCTACAAAGTTCCACCGATTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA
CGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCAACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGATCTGGAGTTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTCCTGAC
ACGTCGGAGGGGGGACCAAGCTGAAATAAACCG

配列番号 1 2

DVLVTQSPLSLPVRLGDQASISCRSTQ~~T~~LVHRNGDTYLEWYLQKPGQSPKSLI
YKVSNRESGV~~PDRFS~~GS~~G~~TDFTLKR~~V~~EAEDLGVYYCFQGSHV~~P~~TFGG
TKLEIKR

【図 1 1 D】

D1) VH ML15-4B7

配列番号 1 3

GAGGTGAAGCTGGAGCTGGGGAGGCTAGTGCAGCCTGGAGGCTC
CCGGAACACTCTCTGTGAGCCTCTGGATTCACTTCACTGACTACGAAT
GGTGTGGGTTCGACAGGCTCCAGGGGGGGGGCTGGAGTGGGTTGCATACA
TTAGTACTGGCAGTCGATCCACTATCAGACACAGTGAAGGCCGA
TTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAAGAACCCCTGTTCTGCAAATGAG
CAGTCTGAGGCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTCAGAACATTAC
TACGGCTACACTTGACTACTGGGCAAGGCACATTCTCACAGTCTCCT
CA

配列番号 1 5

EVKLVESGGGLVQPG~~S~~R~~L~~SCAASGFTFSD~~Y~~EMVWVRQAPGEGLEWVAYI
SSGRTIHYADTVKG~~R~~F~~T~~ISRD~~N~~PK~~N~~TLFLQM~~S~~LR~~S~~EDTAIYYCAR~~T~~LLRH
FDYWQGQT~~I~~TVSS

D2) VL ML15-4B7

配列番号 1 4

GACATTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCAGTGTGAGCTGGAGAG
AAGGTTACTATGAGCTGAGGCTCAGTCAGAGCCTTTCTATAGGAGCAG
TCAAAAGAACATCTGGCCTGTCAGGAGCAGAACAGGGCAGTCTCTA
AACTGCTGATTACTGGCAGTCCACTAGGGAAATCTGGGGTCCCTGATCCT
TCACAGGAGTGGATCTGGAGCAGATTCACTCAGCAGTGTG
AAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGTCAGCAATATTAGTATC
GTGACGCTCGGGAGGACCAAGCTGAAATCAAACCG

配列番号 1 6

DIVMSQPSSLAVS~~V~~GEKVTMS~~C~~RSS~~S~~LYRSNQKNFLA~~W~~YQQKPGQSPK~~L~~
LIYWA~~S~~TR~~E~~SGV~~P~~DRFTGSGSGTDF~~L~~TISSVKAEDLAVYYC~~Q~~YY~~S~~YP~~W~~TF~~G~~
GGTKLEIKR

【図11E】

E1) VH ML15-2F2

配列番号1 7

CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCCTGGGACTTC
AGTAAGATGTCTCGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACTACCTTCTATAT
ACACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGGACAGGCCCTGAGTGATTTGAATG
ATTGGTCTGGAAAGTGGTAACTTACTAACATGAGATGTTCAAGGACAA
GGCACATTTGACTTAGACACATCCTCAGCACAGCCTACATGCAAGCTCA
GCAGCCTCACATGAGGACTCTGGGTCTATTCTGTCAAGAGCAAAG
TCACATGGCGGCCCTGGTCTACTGGGCAAGGGACTCTGGTCA
TGTCTCTGCA

配列番号1 9

QVQLKQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTF~~T~~FYIHVVVKQRPGQGLEWIGMI
GPGSNTYYNEMFKD~~K~~ATLTVTSSSTAYMQLSSLTSEDAVYFCARAKSAR
AAWFAYWGQGTLVTVSA

E2) VL ML15-2F2

配列番号1 8

GATTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCGTGTCAGTCTGGAGAT
CAAGCCTCCATCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACAGAGATAATGG
AAACACCTATTAGAATGTTACCTGAGAAACCCAGGCCAGTCTCAAAAGC
TCCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATTCTGGGTCCCAGACAGGTICA
GTGCGACTGAGTCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGOA
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTAACTGCTTCAAGGTTACATGTCCTCC
CACCTTCGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAAACCG

配列番号2 0

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQS~~V~~QSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI
YKVSNRFSGV~~P~~DRFSGSGSTDFTL~~K~~ISRVEADLGVYYCFQGSHVPPTFGGG
TKLEIKR

【図11F】

F1) VH ML15-6A2

配列番号2 1

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCCTGGGACTTC
AGTAAGATGTCTCGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACTACCTTCTATAT
ACACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGGACAGGCCCTGAGTGATTTGAATG
ATTGGTCTGGAAAGTGGTAACTTACTAACATGAGATGTTCAAGGACAA
GGCACATTTGACTTAGACACATCCTCAGCACAGCCTACATGCAAGCTCA
GCAGCCTCACATGAGGACTCTGGGTCTATTCTGTCAAGAGCAAAG
TCACATGGCGGCCCTGGTCTACTGGGCAAGGGACTCTGGTCA
TGTCTCTGCA

配列番号2 3

QVQLQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTF~~T~~FYIHVVVRQRPGQGLEWIGMI
GPGSNTYYNEMFKD~~K~~ATLTVTSSSTAYMQLSSLTSEDAVYFCARAKSHR
AAWFAYWGQGTLVTVSA

F2) VL ML15-6A2

配列番号2 2

GATTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCGTGTCAGTCTGGAGAT
CAAGCCTCCATCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGGTACAGAGATAATGG
AAACACCTATTAGAATGTTACCTGAGAAACCCAGGCCAGTCTCCAAGC
TCCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATTCTGGGTCCCAGACAGGTICA
GTGCGACTGAGTCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGA
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTAACTGCTTCAAGGTTACATGTCCTCC
CACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAAACCG

配列番号2 4

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQS~~V~~QSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI
YKVSNRFSGV~~P~~DRFSGSGSTDFTL~~K~~ISRVEADLGVYYCFQGSHVPPTFGGG
TKLEIKR

【図11G】

G1) VH ML13-4D10

配列番号2 5

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGCCACTAGCCTAACTACAGGCCAACAGAG
CCTGCCATAACCTGCACAGTCTCTGGTTCTCATTAACATGCTATGGTGT
ACACTGGGTTCTGGCAGTCTCCAGGAAAGGGCTGGAGTGCTGGAGTGA
TATGGAGAGTGGAGGATAGACTATAATGCACTTCTCATGTCAGACTG
AGCATCACCAAGACAACCTCAAGAGCCAAGTTCTTAAATGAAACAG
TCTGCAAGCTGATGACACTGCCATATACTGTCAGGCCAGAACACTCCGATG
TCTGGGCACAGGGACCACGGTACCCGTCACCTCA

配列番号2 7

QVQLKQSGPSLIQPSQLSITCTVSGFLSTS~~Y~~GVHVVVRQSPKGLEWLGVIWR
GGRIDYNA~~A~~FM~~S~~RSL~~I~~KDN~~S~~KSQVF~~K~~M~~N~~LQADDTAIYYC~~A~~RNS~~D~~V~~W~~~~G~~
GTTVTVSS

G2) VL ML13-4D10

配列番号2 6

GATTTTGATGACCCAGACTCCACTCTTGCGGTTACCTGGACAA
CCAGCCTCCATCTTGCAGTCAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGG
AAGACATATTGAA~~T~~GGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCAAAAGCG
CCTAACTCATCTGGTCTAAACTGACTCTGGAGTCCCTGACAGG~~T~~CAC
TGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGATTGGGAGTTTATTGCTGCCAGG~~T~~ACACATTCCG~~T~~AC
ACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGAAATAAACCG

配列番号2 8

DVVMQTPLTLSVTIQPASISCKSS~~O~~LL~~I~~D~~G~~KTYLNWL~~L~~Q~~R~~PQ~~S~~PKRLIY
LVSKLD~~S~~GV~~P~~DRFTGSGSTDFTL~~K~~ISRVEADLGVYYCFQGSHVPPTFGGG
TKLEIKR

【図11H】

H1) VH ML15-7E5

配列番号2 9

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGCTC
CCGGAACACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGTGA~~T~~ACGAAAT
GGTGTGGITCGAGGCCAGGAGGGGGCTGGAGTGGGTTG~~C~~ATACA
TTAGTAGTGGCAGTGTACCATCACTATGCA~~G~~ACACAGTGAAGGCCCG
TTCACCATCTCCAGAGACAACTCCAAGAACACCC~~T~~GTCTGC~~A~~ATGAG
CAGCTGAGG~~T~~CTGAGGACACGCC~~T~~GTATTACTGTGCAAGGACATTAC
TACGGCTACACTTGACTACTGGGCAAGGCCACATTCTCACAGTCTCT
CA

配列番号3 1

EVKLVESGGGLVQP~~G~~SR~~K~~LS~~C~~AAS~~G~~FTSDYEMVVVRQAPGE~~L~~EWVAYI
SSGSRTHYAD~~T~~VKG~~R~~FTISRDNP~~K~~N~~L~~FLQM~~S~~LR~~S~~EDTAMYYC~~A~~RT~~L~~~~R~~~~H~~
FDYWQG~~T~~ILT~~V~~SS

H2) VL ML15-7E5

配列番号3 0

GACATTGTGATGTCACAGTCCATCTCCCTAGCTGTCAGTGGAGAG
AAGGTACTATGAGCTGAGGCCAGTCAAGGCC~~T~~TTCTATAGGAGCAA
TC~~A~~AAAGAAC~~T~~CTTGGCCTGGTACCA~~G~~AGCAGAAACCAAGGCCAGTCTC~~T~~
AACTGCTGTTTACTGGC~~A~~TCCACTAGGGA~~A~~CTGGGGTCCCTGATCGCT
TCACGGCAGTGGAT~~T~~GGACAGATTTCAC~~T~~CCACCATCAGCAGTGTG
AAGGTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGCA~~G~~CA~~A~~TTATAGCTATCC
GTGGACGTTGGTGGAGGCCACCAAGCTGAA~~T~~CAAACCG

配列番号3 2

DIVMSQSPSSLAVSVGEKV~~T~~M~~S~~CRSSQS~~L~~FYRSNQKNFLAWYQQKPGQSPK~~L~~
LIY~~W~~ASTRE~~S~~GV~~P~~DRFTGSGSTDFTL~~T~~ISSVKAEDLA~~V~~YYC~~Q~~Q~~Y~~S~~P~~WT~~F~~
GGTKLEIKR

【図 1 1 I】

I1) VH ML15-10C1

配列番号 3 3

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTAGTCAGCCTGGAGGCTC
CGGAAACTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGTGACTACGAAAT
GGTGTGGTICGACAGGCTCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTTGCATA
TTAATAGTGGCAGTGTTACCATCCACTATGCAGACACAGTGAAGGCCGA
TTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAGAACACCCCTGTTCTGCAAATGAG
CAGTCTAAGGCTGAGGGACACGGCCATGTATTACTGTCAAGGACATTAC
TACGGCTACATTGACTACTGGGCCAAGGCACCATTCTCACTGTCTCCT
CA

配列番号 3 5

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTSDYEMWVRQAPGKLEWVAYI
NSGSIHYADTVKGRFTISRDNPNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCARTLLRH
EDYWGGTILTVSS

I2) VL ML15-10C1

配列番号 3 4

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAG
AAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTCTATAGTCGCAAT
CAAAAGAACCTCTGGCCTGGTACCAAGCAGAACCCAGGGCAGTCTCTAA
ACTGCTGATTTACTGGCATCCACTGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTT
CACAGGCAGTGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCCATCAGCAGTGTA
AGGCTGAAGACCTGGCAGTTTAACTGTCAAGCAATATTTAGCTATCCGT
GGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

配列番号 3 6

DIVMSQPSSLAVSVEKVTMSCKSSQLFYSRNOKNFLAWYQQKPGQSPKL
LIWASTGESGVPDFRTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLA~~VYYCQQYFSYPWTFG~~
GGTKLEIKR

【図 1 1 J】

J1) VH ML15-3B10

配列番号 3 7

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCCTGGGCTTC
AGTGAAGATGCTCTGCAAGGCTCTGGATACACATTCACTGACTATGTTAT
ACACTGGGTGAAGCAGAACGCTGGCAGGGCTTGAGTGGATTGGATATA
TTAATCCTTACAATGATGGTACTCAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG
GCCACACTGACTTCAGACAAATCTCCAGCACAGTCTACATGGAGCTCAG
CAGTCTGACCTCTGAGGACTCTACAGTCTACTACTGTACAGTAGAGGGTG
GTACCTGGGACGGGTATTGATGTCTGGGCACAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA

配列番号 3 8

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVIHWVKQKPGQGLEWIGI
NPYNDGTQYNEKFKGKATLTSKSSSTVYME~~LSSLT~~SEDSTVYYCTVEGGTW
DGYFDVWGTGTTVSS

【配列表】

2009517057000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/011530

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18 C07K14/47 A61K38/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/067561 A (ABBOTT GMBH & CO.) 12 August 2004 (2004-08-12) cited in the application the whole document	1-69, 88, 89, 91-116
X	N SERGEANT ET AL.: "Truncated beta-amyloid peptide species in pre-Alzheimer diseases as new targets for the vaccination approach" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY., vol. 85, June 2003 (2003-06), pages 1581-1591, XP002257887 US NEW YORK, NY cited in the application the whole document	1-69, 88, 89, 91-116
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 27 February 2007	Date of mailing of the international search report 06/06/2007	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Masturzo, Pietro	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/011530

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	S BARGHORN ET AL.: "Globular amyloid beta-peptide 1-42 oligomer - a homogeneous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY., vol. 95, 2005, pages 834-847, XP002386548 US NEW YORK, NY cited in the application the whole document _____	1-69,88, 89, 91-116
P,X	WO 2006/094724 A (ABBOTT GMBH & CO.) 14 September 2006 (2006-09-14) the whole document _____	1-69,88, 89, 91-116

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP2006/011530**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-69, 88-89 (partially), 91-116 (partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-69, 88-89 (partially), 91-116 (partially)

Antibodies having a binding affinity to an A-beta (20-42) globulomer that is greater than the binding affinity of the antibody to an A-beta (1-42) globulomer, antigen-binding moieties of these antibodies, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

2. claims: 70-77, 88-89 (partially), 91-116 (partially)

Antibodies comprising at least a variable domain having an amino acid sequence selected from the groups of Seqq. Idd. nos. 3-4, 7-8, 11-12, 15-16, 19-20, 23-24, 27-28, 31-32, 35-36 and 38, antigen-binding moieties of these antibodies, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

3. claims: 78, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7241, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

4. claims: 79, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7239, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

5. claims: 80, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7240, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210**6. claims: 81, 88-116 (partially)**

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7242, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

7. claims: 82, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7408, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

8. claims: 83, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7409, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

9. claims: 84, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7405, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

10. claims: 85, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7809, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

11. claims: 86, 88-116 (partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7810, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

12. claims: 87, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7851, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2006/011530

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2004067561	A 12-08-2004	AU 2004207075	A1 12-08-2004	
		BR PI0407084	A 24-01-2006	
		CA 2514582	A1 12-08-2004	
		CN 1768076	A 03-05-2006	
		DE 10303974	A1 05-08-2004	
		EP 1594891	A1 16-11-2005	
		KR 20050103483	A 31-10-2005	
		MX PA05007964	A 20-09-2005	
		US 2007098721	A1 03-05-2007	
WO 2006094724	A 14-09-2006	NONE		

フロントページの続き

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

(31) 優先権主張番号 60/842,400

(32) 優先日 平成18年9月5日(2006.9.5)

(33) 優先権主張国 米国(US)

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

(74) 代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74) 代理人 100140523

弁理士 渡邊 千尋

(74) 代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74) 代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74) 代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72) 発明者 バルクホルン, シュテファン

ドイツ国、6 8 1 6 1 ・マンハイム、ベルリーナー・シュトゥーレセ・3 0

(72) 発明者 エーベルト, ウルリヒ

ドイツ国、6 8 1 6 3 ・マンハイム、ケーニヒシュトワールシュトゥーレセ・6

(72) 発明者 ヒレン, ハインツ

ドイツ国、6 7 4 5 4 ・ハスロホ、マツクス - プランク - シュトゥーレセ・1 7

(72) 発明者 ケラー, パトリツク

ドイツ国、6 4 2 9 1 ・ダルムシュタット、ベルンハルトシュトゥーレセ・3 0

(72) 発明者 シュトリービンガー, アンドレーアス

ドイツ国、6 7 3 4 6 ・シュパイヤー、ツイーゲローフエンペーク・4 6 ・ア-

(72) 発明者 ラブコフスキー, ボリス

アメリカ合衆国、マサチューーセッツ・0 1 8 0 1 、ウェールズ、ユニオン・ロード・1 1 5 、ピ-
・オー・ボツクス・7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 DA01 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12

EA04 FA01 GA11 HA01

4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA11 CA19 CA20 CC24 DA01

4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA88X AA90X AB01 AB02 BA01 BA08

CA25 CA44 CA46

4C085 AA14 AA16 BB11 CC02 CC23 DD62 EE01 GG01

4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 FA20 FA72 FA74

(54)【発明の名称】抗A グロプロマー抗体、その抗原結合部分、対応するハイブリドーマ、核酸、ベクター、宿主細胞、前記抗体を作製する方法、前記抗体を含む組成物、前記抗体の使用及び前記抗体を使用する方法。

专利名称(译)	抗Aβ球聚体抗体，其抗原结合部分，相应的杂交瘤，核酸，载体，宿主细胞，抗体的制备方法，含有该抗体的组合物，抗体的用途，以及使用该抗体的方法。		
公开(公告)号	JP2009517057A	公开(公告)日	2009-04-30
申请号	JP2008542672	申请日	2006-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司 基于EM的雅培门硬UND公司汽车游戏		
申请(专利权)人(译)	雅培制药 雅培GMBH UND有限公司卡格		
[标]发明人	バルクホルンシユテフアン エーベルトウルリヒ ヒレンハインツ ケラー・パトリック シユトリービンガー・アンドレーアス ラブコフスキーボリス		
发明人	バルクホルン,シユテフアン エーベルト,ウルリヒ ヒレン,ハインツ ケラー,パトリック シユトリービンガー,アンドレーアス ラブコフスキー,ボリス		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 A61K39/395 A61P25/28 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/00 A61P25/28 C07K14/4711 C07K16/18 A61K2039/505 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/41 C07K2317/565 C07K2317/92 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821 G01N2800/387		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C07K16/18 A61K39/395.N A61P25/28 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024 /DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064 /CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA88X 4B065 /AA90X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085 /GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA20 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	60/740866 2005-11-30 US 60/779171 2006-03-03 US 60/787361 2006-03-30 US 60/842400 2006-09-05 US		
其他公开文献	JP2009517057A5 JP5475994B2		

摘要(译)

抗A 2球蛋白抗体，其抗原结合部分，相应的杂交瘤，核酸，载体，宿主细胞，产生所述抗体的方法，包含所述抗体的组合物，所述抗体的用途和使用所述抗体的方法。本发明涉及对A 2 (20-42) 球聚体具有结合亲和力的抗A 2球蛋白抗体，其大于抗体与A 2 (1-42) 球聚体的结合亲和力，其抗原结合部分，产生所述抗体的杂交瘤。抗体，编码所述抗体的核酸，包含所述核酸的载体，包含所述载体的宿主细胞，产生所述抗体的方法，包含所述抗体的组合物，所述抗体的治疗和诊断用途以及与阿尔茨海默病和其他淀粉样变性有关的相应方法。

特表2009-517

(P2009-5170

(43) 公表日 平成21年4月30日(2009.4

(51) Int.Cl.	F I	テマコード (参考)
C 12 N 15/00 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 0 6 4
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 B 0 6 5
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21	4 C 0 8 5
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00	A 4 H 0 4 5
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 115 頁) 最終頁に
(21) 出願番号 特願2008-542672 (P2008-542672)	(71) 出願人 391008788	アボット・ラボラトリーズ
(36) (22) 出願日 平成18年11月30日 (2006.11.30)		ABBOTT LABORATORIES
(35) 翻訳文提出日 平成20年7月29日 (2008.7.29)		アメリカ合衆国、イリノイ州 6006
(36) 國際出願番号 PCT/EP2006/011530		、アボット・パーク、アボット・パー
(37) 國際公開番号 WO2007/062852		ロード 100、エーピー6エー-1
(37) 國際公開日 平成19年6月7日 (2007.6.7)		377
(31) 優先権主張番号 60/740,866		(71) 出願人 502104228
(32) 優先日 平成17年11月30日 (2005.11.30)		アボット ゲームベーハー ウント
(33) 優先権主張国 米国 (US)		ンパニー カーゲー
(31) 優先権主張番号 60/779,171		ドイツ連邦共和国 65205 ヴィ-
(32) 優先日 平成18年3月3日 (2006.3.3)		バーデン、マックス-プランク-リン
(33) 優先権主張国 米国 (US)		2
(31) 優先権主張番号 60/787,361		(74) 代理人 100062007
(32) 優先日 平成18年3月30日 (2006.3.30)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国 米国 (US)		最終頁に続く