

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5980207号  
(P5980207)

(45) 発行日 平成28年8月31日(2016.8.31)

(24) 登録日 平成28年8月5日(2016.8.5)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18 ZNA
<b>A61P 25/28 (2006.01)</b>	A61P 25/28
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395 N
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C12P 21/08

請求項の数 11 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2013-524156 (P2013-524156)  
 (86) (22) 出願日 平成23年8月9日(2011.8.9)  
 (65) 公表番号 特表2013-536191 (P2013-536191A)  
 (43) 公表日 平成25年9月19日(2013.9.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/046994  
 (87) 国際公開番号 W02012/021469  
 (87) 国際公開日 平成24年2月16日(2012.2.16)  
 審査請求日 平成26年6月27日(2014.6.27)  
 (31) 優先権主張番号 61/373,026  
 (32) 優先日 平成22年8月12日(2010.8.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 594197872  
 イーライ リリー アンド カンパニー  
 アメリカ合衆国 インディアナ州 462  
 85 インディアナポリス リリー コー  
 ポレイト センター (番地なし)  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗N3pGluアミロイドβペプチド抗体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗N3pGluA モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、軽鎖可変領域(LCVR)と重鎖可変領域(HCVR)とを含み、該LCVRはLCDR1、LCDR2、およびLCDR3ポリペプチドを含み、かつ該HCVRはHCDR1、HCDR2、およびHCDR3ポリペプチドを含み、該LCVRおよび該HCVRは、

a) LCDR1はKSSQSLLYSRGGKTYLN(配列番号3)であり、LCDR2はAVSKLDS(配列番号4)であり、LCDR3はVQGTHYPFT(配列番号5)であり、HCDR1はGYDFTRYYYIN(配列番号6)であり、HCDR2はWINPGSGNNTKYNEKFKG(配列番号8)であり、かつHCDR3はEGITVY(配列番号9)である、

b) LCDR1はKSSQSLLYSRGGKTYLN(配列番号3)であり、LCDR2はAVSKLDS(配列番号4)であり、LCDR3はVQGTHYPFT(配列番号5)であり、HCDR1はGYTFTRYYYIN(配列番号7)であり、HCDR2はWINPGSGNNTKYNEKFKG(配列番号8)であり、かつHCDR3はEGTTVY(配列番号10)である、

c) LCDR1はKSSQSLLYSRGGKTYLN(配列番号3)であり、LCDR2はAVSKLDS(配列番号4)であり、LCDR3はVQGTHYPFT(配列番号5)であり、HCDR1はGYTFTDYYIN(配列番号40)であり、HCDR2はWINPGSGNNTKYNEKFKG(配列番号8)であり、かつHCDR3はEGET

10

20

V Y (配列番号 41) である、および

d) L C D R 1 は K S T R S L L Y S R S K T Y L N (配列番号 45) であり、L C D R 2 は A V S K L D S (配列番号 4) であり、L C D R 3 は V Q G T H Y P F T (配列番号 5) であり、H C D R 1 は G Y T F T D Y Y I N (配列番号 40) であり、H C D R 2 は W I N P G S G N T K Y N E K F K G (配列番号 8) であり、かつ H C D R 3 は E G V T V Y (配列番号 46) である、

からなる群から選択される、

抗 N 3 p G l u A モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

軽鎖可変領域 (L C V R) と重鎖可変領域 (H C V R) とを含み、該 L C V R および H C V R は、

a) 配列番号 11 の L C V R かつ配列番号 12 の H C V R、

b) 配列番号 11 の L C V R かつ配列番号 13 の H C V R、

c) 配列番号 11 の L C V R かつ配列番号 42 の H C V R、および

d) 配列番号 47 の L C V R かつ配列番号 48 の H C V R

からなる群から選択されるポリペプチドである、

請求項 1 に記載の 抗 N 3 p G l u A モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

1 つの軽鎖 (L C) と 1 つの重鎖 (H C) とを含み、該 L C および H C ポリペプチドは、

a) 配列番号 14 の L C かつ配列番号 15 の H C、

b) 配列番号 14 の L C かつ配列番号 16 の H C、

c) 配列番号 14 の L C かつ配列番号 44 の H C、および

d) 配列番号 49 の L C かつ配列番号 50 の H C

からなる群から選択される、

請求項 1 または 2 に記載の 抗 N 3 p G l u A モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

2 つの軽鎖と 2 つの重鎖とを含み、各軽鎖および各重鎖は、

a) 配列番号 14 の L C かつ配列番号 15 の H C、

b) 配列番号 14 の L C かつ配列番号 16 の H C、

c) 配列番号 14 の L C かつ配列番号 44 の H C、および

d) 配列番号 49 の L C かつ配列番号 50 の H C

からなる群から選択されるポリペプチドである、

請求項 3 に記載の 抗 N 3 p G l u A モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の 抗体 またはその抗原結合断片と、薬学上許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 6】

療法における使用のための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の 抗体 またはその抗原結合断片と、薬学上許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 7】

臨床もしくは前臨床アルツハイマー病、前駆期アルツハイマー病、ダウン症候群、または臨床もしくは前臨床アミロイド血管症 (C A A) からなる群から選択される病態の処置における使用のための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の 抗体 またはその抗原結合断片と、薬学上許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 8】

アルツハイマー病の処置における使用のための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の 抗体 またはその抗原結合断片と、薬学上許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤とを含む、医薬組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 9】

療法における使用のための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 10】

臨床もしくは前臨床アルツハイマー病、前駆期アルツハイマー病、ダウン症候群、または臨床もしくは前臨床 C A A からなる群から選択される病態の処置における使用のための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 11】

アルツハイマー病の処置における使用のための、請求項 10 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、N3pGluアミロイドベータペプチドを選択的に結合する抗体及びアミロイドベータ(A<sub>β</sub>、Aベータとも呼ばれる)に関係する疾患を治療することにおけるその使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

循環形態でのA<sub>β</sub>ペプチドは前駆体タンパク質、アミロイド前駆体タンパク質(A<sub>β</sub>PP)の切断で生じる38~43(ほとんど38、40又は42のアミノ酸)のアミノ酸で構成される。A<sub>β</sub>の可溶性形態から、高いシート含量を有する不溶性形態への変換及び脳における老人斑及び脳血管プラークとしてのこれら不溶性形態の沈着は、アルツハイマー病(AD)、ダウン症候群及び脳アミロイド血管症(CAA)を含む多数の状態及び疾患に関連している。

20

## 【0003】

プラークに見られる沈着は、A<sub>β</sub>ペプチドの不均質な混合物で主として構成される。N3pE又はA<sub>β</sub>3-42とも呼ばれるN3pGluA<sub>β</sub>は、プラークにのみ見られるA<sub>β</sub>ペプチドの短縮形態である。N3pGluA<sub>β</sub>はA<sub>β</sub>のN末端で最初の2つのアミノ酸残基を欠き、第3番目のアミノ酸の位置にてグルタミン酸に由来したピログルタメートを有する。N3pGluA<sub>β</sub>は脳にて沈着したA<sub>β</sub>の軽微な成分ではあるが、研究によって

30

## 【0004】

N3pGluA<sub>β</sub>ペプチドを標的とするポリクローナル及びモノクローナルの抗体は以前記載されている(米国特許第7,122,374号及びWO2010/009987)が、生体内で標的に関与し(すなわち、プラークへの結合)、その後、プラークのレベルを下げる高親和性の抗N3pGluA<sub>β</sub>モノクローナル抗体へのニーズが依然として存在する。加えて、アミノ末端及びカルボキシ末端の抗A<sub>β</sub>抗体が脳アミロイド血管症(CAA)に関連する微細出血の増加を招くことを考えると、習慣的な治療が沈着したプラークの有意な減少を生じるとしても、微細出血の増加を生じない抗N3pGluA<sub>β</sub>抗体への

40

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明の範囲内の抗体は、多数の望ましい特性を持つ、治療上有用なN3pGluA<sub>β</sub>ペプチド拮抗剤である。本抗体は、高親和性でヒトN3pGluA<sub>β</sub>ペプチドを結合し、脳アミロイド血管症(CAA)に関連する微細出血の増加を起こすことなく、用量依存性で生体内のプラーク減少を示す。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

50

本発明は、ヒトの操作された抗N3pGluA抗体、又は25にてヒトN3pGluAペプチドに対して $1 \times 10^{-9}$ M未満のKdを有するその抗原結合断片を提供する。好まれる実施形態では、本発明は、ヒトの操作された抗N3pGluA抗体、又は25にてヒトN3pGluAペプチドに対して $9 \times 10^{-10}$ M未満のKdを有するその抗原結合断片を提供する。別の好まれる実施形態では、本発明は、ヒトの操作された抗N3pGluA抗体、又は25にてヒトN3pGluAペプチドに対して $7 \times 10^{-10}$ M未満のKdを有するその抗原結合断片を提供する。別の好まれる実施形態では、本発明は、ヒトの操作された抗N3pGluA抗体、又は25にてヒトN3pGluAペプチドに対して $9 \times 10^{-10}$ M~ $1 \times 10^{-10}$ Mの間のKdを有するその抗原結合断片を提供する。別の好まれる実施形態では、本発明は、抗N3pGluA抗体、又は25にてヒトN3pGluAペプチドに対して $9 \times 10^{-10}$ M~ $1 \times 10^{-10}$ Mの間のKdを有するその抗原結合断片を提供する。

10

## 【0007】

本発明はさらに、ヒトの操作された抗N3pGluA抗体、又は25にてヒトN3pGluAペプチドに対して $1 \times 10^{-9}$ M未満、又は $9 \times 10^{-10}$ M未満、又は $7 \times 10^{-10}$ M未満、又は $9 \times 10^{-10}$ M~ $1 \times 10^{-10}$ Mの間のKdを有し、生体内でプラークを減少させるその抗原結合断片を提供する。さらなる好まれる実施形態では、本発明は、ヒトの操作された抗N3pGluA抗体、又は25にてヒトN3pGluAペプチドに対して $1 \times 10^{-9}$ M未満、又は $9 \times 10^{-10}$ M未満、又は $7 \times 10^{-10}$ M未満、又は $9 \times 10^{-10}$ M~ $1 \times 10^{-10}$ Mの間のKdを有し、CAA関連の微細出血を増加させることなく生体内でプラークを減少させるその抗原結合断片を提供する。

20

## 【0008】

本発明はまた、ヒトの操作された抗N3pGluA抗体、又はLCVR及びHCVRを含むその抗原結合断片を提供するが、その際、LCDR1はK<sub>1</sub>SX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SLLYSRX<sub>3</sub>KTYLN(配列番号51)であり、LCDR2はAVSKLX<sub>4</sub>S(配列番号52)であり、LCDR3はVQGTHYPFT(配列番号5)であり、HCDR1はGYX<sub>5</sub>FTX<sub>6</sub>YYIN(配列番号53)であり、HCDR2はWINPGSGNTKYNEKFKG(配列番号8)であり、HCDR3はEGX<sub>7</sub>TVY(配列番号54)であり、X<sub>1</sub>はS又はTであり；X<sub>2</sub>はQ又はRであり、X<sub>3</sub>はG又はSであり、X<sub>4</sub>はD又はGであり、X<sub>5</sub>はD又はTであり、X<sub>6</sub>はR又はDであり、X<sub>7</sub>はI、T、E又はVである。

30

## 【0009】

本発明は、ヒトの操作された抗N3pGluA抗体、又は軽鎖可変領域(LCVR)及び重鎖可変領域(HCVR)を含むその抗原結合断片を提供するが、該LCVRはLCDR1、LCDR2、LCDR3のポリペプチドを含み、HCVRはHCDR1、HCDR2、HCDR3のポリペプチドを含み、それらは以下から成る群から選択される：

(a) LCDR1はKSSQSLLYSRGGKTYLN(配列番号3)であり、LCDR2はAVSKLDS(配列番号4)であり、LCDR3はVQGTHYPFT(配列番号5)であり、HCDR1はGYDFTRYYYIN(配列番号6)であり、HCDR2はWINPGSGNTKYNEKFKG(配列番号8)であり、HCDR3はEGITVY(配列番号9)である；

40

(b) LCDR1はKSSQSLLYSRGGKTYLN(配列番号3)であり、LCDR2はAVSKLDS(配列番号4)であり、LCDR3はVQGTHYPFT(配列番号5)であり、HCDR1はGYTFTRYYYIN(配列番号7)であり、HCDR2はWINPGSGNTKYNEKFKG(配列番号8)であり、HCDR3はEGTTVY(配列番号10)である；

(c) LCDR1はKSSQSLLYSRGGKTYLN(配列番号3)であり、LCDR2はAVSKLDS(配列番号4)であり、LCDR3はVQGTHYPFT(配列番号5)であり、HCDR1はGYTFTDYYIN(配列番号40)であり、HCDR2は

50

WINPGSGNTKYNEKFKG (配列番号8) であり、HCDR3はEGETVY (配列番号41) である；

(d) LCDR1はKSSQSLLYSRGKTYLN (配列番号3) であり、LCDR2はAVSKLGS (配列番号35) であり、LCDR3はVQGTHYPFT (配列番号5) であり、HCDR1はGYTFTRYYYIN (配列番号7) であり、HCDR2はWINPGSGNTKYNEKFKG (配列番号8) であり、HCDR3はEGTTVY (配列番号10) である；及び

(e) LCDR1はKSTRSLLYSRSKTYLN (配列番号45) であり、LCDR2はAVSKLDS (配列番号4) であり、LCDR3はVQGTHYPFT (配列番号5) であり、HCDR1はGYTFTDYYIN (配列番号40) であり、HCDR2はWINPGSGNTKYNEKFKG (配列番号8) であり、HCDR3はEGVTVY (配列番号46) である。

【0010】

実施形態では、本発明は、ヒトの操作された抗N3pGl u A 抗体、又はLCVR及びHCVRを含むその抗原結合断片を提供し、その際、LCDR1は配列番号3であり、LCDR2は配列番号4であり、LCDR3は配列番号5であり、HCDR1は配列番号6であり、HCDR2は配列番号8であり、HCDR3は配列番号9である。実施形態では、本発明は、ヒトの操作された抗N3pGl u A 抗体、又はLCVR及びHCVRを含むその抗原結合断片を提供し、その際、LCDR1は配列番号3であり、LCDR2は配列番号4であり、LCDR3は配列番号5であり、HCDR1は配列番号7であり、HCDR2は配列番号8であり、HCDR3は配列番号10である。好まれる実施形態では、本発明は、ヒトの操作された抗N3pGl u A 抗体、又はLCVR及びHCVRを含むその抗原結合断片を提供し、その際、LCDR1は配列番号3であり、LCDR2は配列番号4であり、LCDR3は配列番号5であり、HCDR1は配列番号40であり、HCDR2は配列番号8であり、HCDR3は配列番号：41である。好まれる実施形態では、本発明は、ヒトの操作された抗N3pGl u A 抗体、又はLCVR及びHCVRを含むその抗原結合断片を提供し、その際、LCDR1は配列番号3であり、LCDR2は配列番号35であり、LCDR3は配列番号5であり、HCDR1は配列番号7であり、HCDR2は配列番号8であり、HCDR3は配列番号10である。好まれる実施形態では、本発明は、ヒトの操作された抗N3pGl u A 抗体、又はLCVR及びHCVRを含むその抗原結合断片を提供し、その際、LCDR1は配列番号45であり、LCDR2は配列番号4であり、LCDR3は配列番号5であり、HCDR1は配列番号40であり、HCDR2は配列番号8であり、HCDR3は配列番号46である。

【0011】

別の実施形態では、本発明は、ヒトの操作された抗N3pGl u A 抗体、又は軽鎖可変領域(LCVR)及び重鎖可変領域(HCVR)を含むその抗原結合断片を提供し、その際、該LCVR及びHCVRは

(a) 配列番号11のLCVR及び配列番号12のHCVR；

(b) 配列番号11のLCVR及び配列番号13のHCVR；

(c) 配列番号11のLCVR及び配列番号42のHCVR；

(d) 配列番号36のLCVR及び配列番号37のHCVR；並びに

(e) 配列番号47のLCVR及び配列番号48のHCVRから成る群から選択されるポリペプチドである。

【0012】

実施形態では、本発明は、配列番号11のLCVR及び配列番号12のHCVRを含む抗N3pGl u A モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。実施形態では、本発明は、配列番号11のLCVR及び配列番号13のHCVRを含む抗N3pGl u A モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。実施形態では、本発明は、配列番号11のLCVR及び配列番号42のHCVRを含む抗N3pGl u A モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。好まれる実施形態では、本発明は、配列番号

10

20

30

40

50

36のLCVR及び配列番号37のHCVRを含む抗N3pGluAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。好まれる実施形態では、本発明は、配列番号47のLCVR及び配列番号48のHCVRを含む抗N3pGluAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0013】

本発明は、軽鎖(LC)及び重鎖(HC)を含む抗N3pGluAモノクローナル抗体を提供するが、その際、LC及びHCのポリペプチドは、

- (a) 配列番号14のLC及び配列番号15のHC；
- (b) 配列番号14のLC及び配列番号16のHC；
- (c) 配列番号14のLC及び配列番号44のHC；
- (d) 配列番号38のLC及び配列番号39のHC；並びに
- (e) 配列番号49のLC及び配列番号50のHC；から成る群から選択される。

10

【0014】

実施形態では、本発明は、配列番号14のLC及び配列番号15のHCを含む抗N3pGluAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。実施形態では、本発明は、配列番号14のLC及び配列番号16のHCを含む抗N3pGluAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。実施形態では、本発明は、配列番号14のLC及び配列番号44のHCを含む抗N3pGluAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。好まれる実施形態では、本発明は、配列番号38のLC及び配列番号39のHCを含む抗N3pGluAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。好まれる実施形態では、本発明は、配列番号49のLC及び配列番号50のHCを含む抗N3pGluAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0015】

好まれる実施形態では、抗N3pGluAモノクローナル抗体は、2つの軽鎖及び2つの重鎖を含み、各LCは配列番号14のポリペプチドであり、各HCは配列番号15のポリペプチドである。好まれる実施形態では、抗N3pGluAモノクローナル抗体は、2つの軽鎖及び2つの重鎖を含み、各LCは配列番号14のポリペプチドであり、各HCは配列番号16のポリペプチドである。好まれる実施形態では、抗N3pGluAモノクローナル抗体は、2つの軽鎖及び2つの重鎖を含み、各LCは配列番号14のポリペプチドであり、各HCは配列番号44のポリペプチドである。好まれる実施形態では、抗N3pGluAモノクローナル抗体は、2つの軽鎖及び2つの重鎖を含み、各LCは配列番号38のポリペプチドであり、各HCは配列番号39のポリペプチドである。好まれる実施形態では、抗N3pGluAモノクローナル抗体は、2つの軽鎖及び2つの重鎖を含み、各LCは配列番号49のポリペプチドであり、各HCは配列番号50のポリペプチドである。

30

【0016】

本発明は、本発明の抗N3pGluAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物も提供する。好まれる実施形態では、医薬組成物は、本発明の抗N3pGluAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片及び薬学上許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤を含む。別の好まれる実施形態では、医薬組成物は1以上の治療成分をさらに含む。

40

【0017】

さらなる態様では、本発明は、それを必要とするヒト患者に本発明の抗N3pGluAモノクローナル抗体又は抗原結合断片を投与することを含むAペプチド活性に関連する状態を治療する方法を提供する。

【0018】

さらなる態様では、本発明は、それを必要とするヒトに本発明の抗N3pGluAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を投与することを含む、臨床の又は前臨床のアルツハイマー病、前駆アルツハイマー病、ダウン症候群、及び臨床の又は前臨床のCAAから成る群から選択される状態を治療する方法を提供する。好まれる実施形態では、本

50

発明はアルツハイマー病を治療する方法を提供する。

【0019】

さらなる態様では、本発明は、治療で使用するための抗N3pG1uAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。好まれる実施形態では、臨床上の又は前臨床のアルツハイマー病、前駆アルツハイマー病、ダウン症候群、及び臨床上の又は前臨床のCAAから成る群から選択される状態の治療において使用するための抗N3pG1uAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。さらに好まれる実施形態では、本発明はアルツハイマー病の治療で使用するための抗N3pG1uAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。別の好まれる実施形態では、本発明は、臨床上の又は前臨床のアルツハイマー病、前駆アルツハイマー病、ダウン症候群、及び臨床上の又は前臨床のCAAから成る群から選択される状態の予防において使用するための抗N3pG1uAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。さらに好まれる実施形態では、本発明はアルツハイマー病の予防で使用するための抗N3pG1uAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0020】

さらなる態様では、本発明は、臨床上の又は前臨床のアルツハイマー病、前駆アルツハイマー病、ダウン症候群、及び臨床上の又は前臨床のCAAから成る群から選択される状態の治療のために薬物を製造することにおける抗N3pG1uAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片の使用を提供する。好まれる実施形態では、本発明はアルツハイマー病の治療のために薬物を製造することにおける抗N3pG1uAモノクローナル抗体又はその抗原結合断片の使用を提供する。

20

【発明を実施するための形態】

【0021】

完全長の抗体は、ジスルフィド結合によって相互結合した2本の重鎖(H)及び2本の軽鎖(L)を含む免疫グロブリン分子である。各鎖のアミノ末端部分には、その中に含まれる相補性決定領域(CDR)を介して主として抗原認識に関与する約100~110アミノ酸の変領域が含まれる。各鎖のカルボキシ末端部分は主としてエフェクター機能に関与する定常領域を規定する。

【0022】

CDRはフレームワーク領域(FR)と呼ばれる保存されている領域に散在する。各軽鎖可変領域(LCVR)及び重鎖可変領域(HCVR)は、以下の順:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端に配置される3つのCDRと4つのFRで構成される。軽鎖の3つのCDRは「LCDR1、LCDR2及びLCDR3」と呼ばれ、重鎖の3つのCDRは「HCDR1、HCDR2及びHCDR3」と呼ばれる。CDRは抗原と特異的な相互作用を形成する残基のほとんどを含有する。LCVR及びHCVR領域内におけるCDRアミノ酸残基の番号付け及び位置決めは周知のKabat番号方式に準じる。

30

【0023】

軽鎖はカップ及びラムダとして分類され、当該技術で既知の特定の定常領域を特徴とする。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ又はイプシロンとして分類され、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgD又はIgEとしての抗体のアイソタイプを定義する。IgG抗体はさらに、たとえば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のようなサブクラスに分類される。各重鎖の型は、当該技術で周知の配列を持つ特定に定常領域を特徴とする。

40

【0024】

本明細書で使用されるとき、用語「モノクローナル抗体」(Mab)は、たとえば、真核、原核又はファージのクローンを含む単一のコピー又はクローンに由来する又はそれから単離される抗体を指すのであって、それが作出される方法ではない。本発明のMabは好ましくは均質な又は実質的に均質な集団で存在する。完全なMabは2本の重鎖と2本の軽鎖を含有する。語句「抗原結合断片」には、たとえば、Fab断片、Fab'断片、

50

F(ab')<sub>2</sub>断片、及び単鎖Fv断片が含まれる。本発明のモノクローナル抗体及びその抗原結合断片は、たとえば、組換え技法、ファージディスプレイ法、合成法、たとえば、CDRグラフト又はそのような技法の組み合わせ、又は当該技術で既知のその他の技法によって作出することができる。たとえば、ヒト抗N3pGlUA又はその断片によってマウスを免疫することができ、得られた抗体を回収し、精製することができ、それらが本明細書で開示する抗体化合物に類似する又はそれと同一である結合特性及び機能特性を持つかどうかの判定を、特に以下の実施例で記載されるような開示される方法によって評価することができる。従来の方法によって抗原結合断片も調製することができる。抗体及び抗原結合断片を産生させ、精製する方法は、当該技術で周知であり、たとえば、Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, chapters 5-8 and 15, ISBN: 0-87969-314-2に見つけ出すことができる。

10

#### 【0025】

語句「ヒトの操作された抗体」は、本発明に係る結合特性及び機能特性を有し、非ヒト抗体に由来するCDRを取り囲む実質的にヒトの又は完全にヒトのものであるフレームワーク領域を有するモノクローナル抗体を指す。そのようなヒトの操作された抗体の「抗原結合断片」には、たとえば、Fab断片、Fab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、及び単鎖Fv断片が挙げられる。「フレームワーク領域」又は「フレームワーク配列」はフレームワーク領域1~4のいずれか1つを指す。本発明に包含されるヒトの操作された抗体及びその抗原結合断片は、フレームワーク領域1~4のいずれか1以上が実質的に又は完全にヒトのものである、すなわち、個々の実質的に又は完全にヒトのフレームワーク領域1~4の考えられる組み合わせのいずれかが存在する分子を含む。たとえば、これには、フレームワーク領域1及びフレームワーク領域2、フレームワーク領域1及びフレームワーク領域3

20

フレームワーク領域1、2及び3等が実質的に又は完全にヒトのものである分子が含まれる。実質的に、ヒトのフレームワークは既知のヒトの生殖系列フレームワーク配列に対して少なくとも約80%の配列同一性を有するものである。好ましくは、実質的にヒトのフレームワークは既知のヒトの生殖系列フレームワーク配列に対して少なくとも約85%、約90%、約95%又は約99%の配列同一性を有する。

30

#### 【0026】

完全にヒトのフレームワークは既知のヒトの生殖系列フレームワーク配列に一致するものである。ヒトのフレームワーク生殖系列配列は、そのウェブサイト<http://imgt.cines.fr>を介してImmunoGenetics (IMGT)から、又はThe Immunoglobulin Facts Book by Marie-Paule Lefranc and Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN: 012441351から入手することができる。たとえば、生殖系列の軽鎖フレームワークは、A11、A17、A18、A19、A20、A27、A30、L1、L1I、L12、L2、L5、L15、L6、L8、O12、O2及びO8から成る群から選択することができ、生殖系列の重鎖フレームワーク領域は、VH2-5、VH2-26、VH2-70、VH3-20、VH3-72、VHI-46、VH3-9、VH3-66、VH3-74、VH4-31、VHI-18、VHI-69、VI-13-7、VH3-11、VH3-15、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-48、VH4-39、VH4-59及びVH5-5Iから成る群から選択することができる。

40

#### 【0027】

本明細書で開示されるものに加えて、本発明に係る同様の機能特性を示すヒトの操作された抗体は幾つかの異なった方法を用いて生成することができる。本明細書で開示される特定の抗体化合物を鋳型又は親抗体化合物として使用して追加の抗体化合物を調製するこ

50

とができる。アプローチの1つでは、親抗体化合物のCDRを、親抗体化合物のフレームワークと高い配列同一性を有するヒトのフレームワークに接合する。新しいフレームワークの配列同一性は一般に、親抗体化合物における相当するフレームワークの配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%同一である。この接合は、親抗体に比べて結合親和性に低下を生じ得る。その場合、フレームワークは、Queenら(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 2869によって開示された特定の基準に基づいた特定の位置にて親フレームワークに復帰変異し得る。マウスの抗体をヒト化するのに有用な方法を記載している追加の参考文献には、米国特許第4,816,397号;同第5,225,539号及び同第5,693,761号;Levitt(1983)、J. Mol. Biol. 168: 595-620に記載されたようなコンピュータプログラムABMOD及びENCAD;並びにWinter及び共同研究者らの方法(Jonesら(1986)、Nature, 321: 522-525;Riechmannら(1988)、Nature, 332: 323-327;及びVerhoeyenら(1988)、Science, 239: 1534-1536)が挙げられる。

10

**【0028】**

復帰突然変異について考慮するための残基の特定は以下のように実施することができる:

アミノ酸が以下のカテゴリーに入る場合、使用されているヒト生殖系列配列のフレームワーク(「受容体フレームワーク」)のアミノ酸は、本抗体化合物のフレームワークから

20

のフレームワーク(「ドナーフレームワーク」)のアミノ酸によって置き換えられる。(a)受容体フレームワークのヒトフレームワーク領域におけるアミノ酸がその位置ではヒトのフレームワークに普通ではないが、ドナーの免疫グロブリンにおける相当するアミノ酸はその位置でヒトのフレームワークに典型的である;

(b)アミノ酸の位置がCDRの1つに直接隣接する;又は

(c)フレームワークのアミノ酸の側鎖原子が免疫グロブリン三次元モデルにてCDRのアミノ酸のいずれかの原子の約5~6オングストローム以内(中心間)である。

**【0029】**

受容体フレームワークのヒトフレームワーク領域におけるアミノ酸及びドナーフレームワークにおける相当するアミノ酸のそれぞれが、その位置でヒトフレームワークにとって一般に普通ではない場合、そのようなアミノ酸はその位置でヒトフレームワークに典型的なアミノ酸によって置き換えられ得る。この復帰突然変異の基準によって親抗体化合物の活性を回復するのが可能になる。

30

**【0030】**

本明細書で開示される抗体化合物に類似する機能特性を示すヒトの操作された抗体を生成することへの別のアプローチには、フレームワークを変えずに接合されたCDRの範囲内でアミノ酸を無作為に変異させることと、親抗体化合物と同じくらい又はそれよりも良好な結合親和性及び他の機能特性について得られた分子をスクリーニングすることが関与する。各CDRの範囲内で各アミノ酸位置にて単一の変異を導入し、その後、結合親和性及び他の機能特性に対するそのような変異の効果を評価する。改善された特性を作り出す単一の変異を組み合わせる互いの組み合わせにおけるその効果を評価することができる。

40

**【0031】**

さらに、前述のアプローチ双方の組み合わせも可能である。CDRを接合した後、CDRにてアミノ酸の変更を導入することに加えて、特定のフレームワーク領域を復帰変異させることができる。この方法論はWuら、(1999)、J. Mol. Biol. 294: 151-162に記載されている。

**【0032】**

本発明の教示を適用して、当業者は、たとえば、部位特異的変異誘発のような一般的技法を用いて、現在開示されているCDR及びフレームワークの配列の範囲内でアミノ酸を

50

置換し、それによって本配列に由来するさらなる可変領域のアミノ酸配列を生成する。代替の天然に存在するアミノ酸はすべて、特定の置換部位にて導入することができる。次いで本明細書で開示される方法を用いてこれら追加の可変領域のアミノ酸配列をスクリーニングして示された生体内での機能を有する配列を特定することができる。このようにして、本発明に係るヒトの操作された抗体及びその抗原結合断片を調製するのに好適なさらなる配列を特定することができる。好ましくは、フレームワーク内でのアミノ酸の置換は、本明細書で開示される4つの軽鎖及び/又は重鎖のフレームワーク領域の1以上の範囲内で1、2又は3の位置に限定される。好ましくは、CDR内でのアミノ酸置換は、3つの軽鎖及び/又は重鎖のCDRの1以上の範囲内で1、2又は3の位置に限定される。上述されたこれらのフレームワーク領域及びCDRの中での種々の変更の組み合わせも可能である。

10

#### 【0033】

用語「治療すること」（又は「治療する」又は「治療」）は、存在する症状、障害、状態又は疾患の進行又は重症度を遅らせる、中断する、停止させる、制御する、止める、軽減する又は防ぐことが関与する過程を指すが、抗N3pGluA抗体に関係する疾患関連の症状、状態又は障害すべての完全な排除は必ずしも関与しない。

#### 【0034】

本発明の抗体を種々の経路で投与されるヒトの薬物の中間体として使用することができる。最も好ましくは、そのような組成物は非経口投与用である。そのような医薬組成物は、当該技術で周知の方法（たとえば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> ed. (1995), A. Gennaroら、Mack Publishing Co.を参照のこと）によって調製することができ、本明細書で開示されるような抗体又はその抗原結合断片及び薬学上許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤を含む。

20

#### 【0035】

以下のアッセイの結果は、本発明のモノクローナル抗体及びその抗原結合断片が、たとえば、アルツハイマー病、ダウン症候群及びCAAのようなAβペプチドの活性に関連する状態を治療するのに有用であることを明らかにしている。

#### 【実施例】

#### 【0036】

実施例1：抗体の作出

最初の抗体の生成：

37で一晚予備処理して凝集させたN末端を切除し、ピログルタミン酸で修飾したヒトのアミロイドペプチド3~42(N3pGlu)でFVBトランスジェニックマウスを免疫する。マウスの脾臓細胞を回収し、MACSによってA<sub>1</sub>~40に反応性のB細胞を除く。凝集したN3pGluAペプチドへの結合について残りの細胞を選別する。選択したB細胞からRNAを単離し、オリゴdTを用いてcDNAに変換する。抗体のシグナル配列プライマーを用いたPCRによって抗体の重鎖と軽鎖の可変領域を得、Kunkelの変異誘発によってファージベクターにクローニングし、Fabライブラリを作る。シングルポイントELISA(SPE)によって凝集N3pGluペプチドへの結合についてFabライブラリをスクリーニングし、A<sub>1</sub>~40に対して対比スクリーニングする。陽性のクローンは、DNA配列決定、fabの発現、及びN3pGluAペプチドへの結合、及び可溶性A<sub>1</sub>~40又はA<sub>1</sub>~42のペプチドへの結合の欠如によって特徴付けられる。

40

#### 【0037】

単一アミノ酸変異体ライブラリを構築し、凝集N3pGluAペプチドに結合するが、A<sub>1</sub>~42には結合しないことについてスクリーニングする。有益な変異を組み合わせライブラリに組み合わせる。親和性を最適化した組み合わせ変異体を選択し、BIACORE(登録商標)による親和性測定及び免疫組織化学によるAβプラーク結合のためのマウスIgG1に変換する。特定されたクローンから、生体内の有効性試験のためにマウ

50

スIgG1(mE8)及びIgG2a(mE8c)のアイソタイプ双方にてmAbタンパク質を作製する。mE8はマウスN3pGluAの配列(mE3~16)又はヒトA1~42に結合しない。

【0038】

最初のヒト化には、ヒトの生殖系列フレームワークVH1-69/JH6及びVk-A18/JK2を使用する。mE8抗体(4つの親和性変異を伴う)のCDRをヒトのフレームワークに接合して抗体hE8-C6を生じる。hE8-C6の主鎖でさらなる親和性の最適化を行い、有益な変異を組み合わせることで高親和性のヒト化変異体R5、R17、R24及び2420を作製する。

【0039】

薬剤開発性を改善するための2回目の最適化：

細胞への非特異的結合を減らすことによって抗体の血清での半減期を改善し、可溶性N3pGluAペプチドへの抗体親和性を高めるための2回目の最適化のために主鎖として2つのヒト化変異体、hE8-C6及びR17を選択する。N3pGluAのN末端14アミノ酸(pE3~13B)から成るビオチン化可溶性ペプチドを合成し、抗体mE8の結合についてN3pGluAペプチドと同等であることを評価する。pE3~16Bを用いた高処理能力フィルター寿命アッセイを開発し、その後のライブラリのスクリーニングすべてに適用する。凝集N3pGluAへの結合によってフィルター寿命選抜からの的中すべてが裏付けられる。

【0040】

フィルター寿命アッセイを用いてhE8-C6変異体のライブラリを再びスクリーニングして一連の有益な変異を特定する。それらのサブセットを用いて組み合わせライブラリを作製する。このアプローチから4つの組み合わせ変異体(CoII-E10、CoII-G2、CoII-G8及びCoII-E2)を選択する。

【0041】

コンピュータのモデル化を用いて、hE8-C6、R17、R24及びその他の変異体のV領域構造モデルを創る。構造モデルの解析によって、細胞への抗体の非特異的結合の考えられる原因である、結合部位でクラスター形成する親和性最適化のために導入された陽性電荷が特定される。モデル化に基づいて、表面の静電電位の均衡を保つ変更を導入するために幾つかの位置を選択する。ライブラリのスクリーニングからの幾つかの有益な変異と構造モデル化によって定義された変更を組み合わせることによって組み合わせライブラリを合成する。この取り組みからさらなる試験のために3つの変異体(R17m-B4、R17m-A12及びR17m-B12)を選択する。

【0042】

構造モデルの解析によって、軽鎖フレームワーク残基Y36と重鎖CDR3における残基との間の立体的対立も発見される。変異Y36LをhE8-C6の軽鎖に導入して変異体hE8Lを作出する。このフレームワークの変更単独が、抗体の親和性を高めること及び非特異的な細胞への結合を減らすこと双方に対して有意な影響を有することが見出される。

【0043】

その他の取り組みはヒト化のために別のヒトのフレームワークを調べることであった。mE8抗体のCDRをフレームワークVH5-51/VKO2及びVH3-23/VKA2に接合する。VH5-51/VKO2(hE8-51O2)によるヒト化Fabは、それ以上ではないが、N3pGluAへの結合においてhE8-C6と同等であると判定される。追加の有益な変異のhE8-51O2への導入によって、組み合わせ変異体、CI-A1、CI-B6、CI-C7及びCI-B8が生成される。

【0044】

抗原特異性及び親和性のためのELISA及びBIACORE(登録商標)、非特異的細胞結合並びにIHC染色を含む試験管内のアッセイにおけるすべてを通過した後、5つの変異体mAb、B12L、CI-C7、hE8L、R17L及びR17を選択する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

抗体を以下のように作製し、本質的に精製することができる。最適な所定のHC : LCベクター比を用いて抗体をスクリーニングするための発現系によって、又は配列番号56及び配列番号43のようなHCと配列番号55のようなLCの双方をコードする単一ベクター系によって、たとえば、HEK293EBNA又はCHOのような適当な宿主細胞に一過性に又は安定的に形質移入を行う。多数の一般に使用される技法のいずれかを用いて、抗体が分泌されている澄んだ培地を精製する。たとえば、リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)のような相溶性の緩衝液によって平衡化されているプロテインA又はGセファロースFFカラムに培地を従来のように適用してもよい。カラムを洗浄して非特異的な結合成分を取り除く。結合した抗体を、たとえば、pH勾配(たとえば、0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8から0.1Mのクエン酸ナトリウム緩衝液pH2.5)によって溶出する。たとえば、SDS-PAGEによって抗体分画を検出し、次いでプールする。さらなる精製は用途に応じて任意である。一般の技法によって抗体を濃縮してもよく、及び/又は無菌のフィルターを通してよい。サイズ排除、疎水性相互作用、イオン交換、又はハイドロキシアパタイトのクロマトグラフィを含む一般の技法によって可溶性の凝集物及び多量体を効果的に除き得る。これらのクロマトグラフィ工程の後、抗体の純度は99%を超える。生成物を直ちに-70で凍結してもよく、又は凍結乾燥してもよい。本発明のこれらの抗体のアミノ酸配列を以下に提供する。

10

【表1】

表1. 抗体の配列番号

20

抗体	軽鎖	重鎖	LCVR	HCVR
I (B12L)	14	15	11	12
II (R17L)	14	16	11	13
III (hE8L)	14	44	11	42
IV (R17)	38	39	36	37
V (CI-C7)	49	50	47	48
VI (mE8)	22	23	20	21
VII (mE8c)	22	24		

30

【 0 0 4 6 】

実施例2：可溶性N3pG1uへの結合親和性

BIACORE(登録商標)2000機器によって測定される表面プラズモン共鳴を用いて抗N3pG1u抗体へのN3pG1uAの結合を測定する。言及される場合を除いて、試薬及び材料はすべてBIACORE(登録商標)AB(スウェーデン、ウプサラ)からのものである。測定はすべて25で行う。試料をHBS-EP緩衝液(150mMの塩化ナトリウム、3mMのEDTA、0.005%(w/v)界面活性剤P-20及び10mMのHEPES、pH7.4)に溶解する。

40

【 0 0 4 7 】

位置変更(グリシン変異体)を伴った一連のAペプチドを合成し、抗体結合に対する所与の残基の影響を評価し、それによって抗体認識に必要なとされる特徴及び配列を特定する：

ペプチド名            A    3 ~ 16の配列

50

p E 3 - 1 6 E F R H D S G Y E V H H Q K - ビオチン 配列番号 2 5  
 E 3 - 1 6 E F R H D S G Y E V H H Q K - ビオチン 配列番号 2 6  
 p E G 4 P y r - E G R H D S G Y E V H H Q K - ビオチン 配列番号 2 7  
 m p E 3 - 1 6 P y r - E F G H D S G F E V H H Q K - ビオチン ( 齧歯類 ) 配列番号 2 8  
 p E G 6 P y r - E F R G D S G Y E V H H Q K - ビオチン 配列番号 2 9  
 p E G 7 P y r - E F R H G S G Y E V H H Q K - ビオチン 配列番号 3 0  
 p E G 8 P y r - E F R H D G G Y E V H H Q K - ビオチン 配列番号 3 7  
 p E F 1 0 P y r - E F R H D S G F E V H H Q K - ビオチン 配列番号 3 9

A<sub>1</sub> ~ A<sub>42</sub> への結合対 A<sub>3</sub> ~ A<sub>16</sub> への結合対 p E 3 ~ 1 6 への結合 ( それぞれ配列番号 1 対配列番号 2 6 対配列番号 2 5 ) を比較することによってグルタミン酸の切除 ( d e s 1 , 2 ) 形態及び修飾形態 ( 3 - p y r - E 又は 3 - p y r - G l u ) の重要性を評価する。結合実験の希釈前にペプチドは 5 m g / m l にて P B S に溶解する。

#### 【 0 0 4 8 】

抗体捕捉の多重解析サイクル、ペプチドの注入/会合、解離のための延長緩衝液流、及び表面再生を用いて結合を評価する。抗体の捕捉工程については、捕捉される抗体の種類に応じて、プロテイン A 又はヤギ抗マウス F c のいずれかで C M 5 チップを固相化する。マウスの抗体を除いて、各サイクルは、5  $\mu$  L / 分での 1 0  $\mu$  g / m L の抗 N 3 p G l u 抗体約 5 ~ 7  $\mu$  L の注入 ( 捕捉 : 約 3 , 0 0 0 R U ) 、5 0  $\mu$  L / 分での 1 0 0  $\mu$  L のペプチドの注入 ( 各サイクルについて 2 倍連続希釈で 1 0 0 0 n M ~ 6 2 . 5 n M ) 、その後の解離のための 1 0 分間から成る。マウスの抗体については、流速は 5 0  $\mu$  L / 分であり、5 0  $\mu$  g / m L のマウス抗体 2 0  $\mu$  L を注入する。双方の場合にて、1 0 m M の塩酸グリシン p H 1 . 5 を 2 0  $\mu$  L 用いてチップの表面を再生する。次いで、B I A 評価解析ソフトウェアにおける 1 : 1 結合モデルを用いて各サイクルについての会合と解離の速度から結合親和性 ( K<sub>D</sub> ) を得る。抗 N 3 p G l u 抗体、B 1 2 L と R 1 7 L 、及び親マウス抗体 ( m E 8 C ) は 1 n M 未満の K<sub>D</sub> にて N 3 p G l u A を特異的に認識する。抗 N 3 p G l u 抗体、B 1 2 L と R 1 7 L 、及び親マウス抗体 ( m E 8 C ) が同様の親和性にて p E 3 ~ 1 6 にも結合するという事は、エピトープがペプチドのこの領域内に位置することを示している。グリシン変異体ペプチドへの抗体の結合解析は、結合に決定的な残基が、3 ~ 7 : 3 位のピロ E 、4 位の F 、5 位の R 、6 位の H 及び 7 位の D であったことを示す。A<sub>1</sub> ~ A<sub>40</sub> への検出可能な結合は本発明の抗体については検出されない。

#### 【 0 0 4 9 】

実施例 3 : 凝集した N 3 p G l u に対する結合親和性

凝集した N 3 p G l u A に対する抗 N 3 p G l u 抗体の結合を監視するために、B I A C O R E ( 登録商標 ) 実験も実施した。本実験において、N 3 p G l u A ペプチドは、アミンカップリング化学反応を通じて C M - 5 チップ上のフローセル 2 ( 低密度、LD ) 、フローセル 3 ( 中程度の密度、MD ) 、およびフローセル 4 ( 高密度、HD ) へと異なる密度で固定化されている。異なるレベルの N 3 p G l u A ペプチドを固定化して、抗 N 3 p G l u 抗体の結合に及ぼす表面密度の影響を検討する。固定化の際に、N 3 p G l u A の大部分は、単量体ペプチドしか認識しない対照モノクローナル抗体の結合がないことによって示されるように、表面上に凝集する。この凝集型のペプチドは、原繊維型またはアミロイド型で凝集した  $\alpha$  ベータペプチドの特性を模倣しており、該型において、該ペプチドの N 末端領域は露出しており、抗体の標的にされることができる。

#### 【 0 0 5 0 】

2 5 での複数の分析周期を使用して、結合を評価する。各周期は 5 0  $\mu$  L / 分の流速で実施され、以下の工程からなる。すなわち、2 5 0  $\mu$  L の N 3 p G l u 抗体溶液の注入 ( 5 0 0 n M で出発し、各周期について 2 倍連続希釈物を使用 ) に続いて解離と、約 3 0  $\mu$  L の 1 0 m M グリシン塩酸塩 ( p H 1 . 5 ) を使用した再生とについて 2 0 分間であった。各周期についての結合速度および解離速度を、B I A 評価ソフトウェアにおける異種性リガンドモデルを使用して評価する。1 : 1 結合モデルはこのデータに適合しないので

、異種性適合は、2つの結合親和性（低親和性および高親和性）を生じる。R 1 7 L 抗体およびB 1 2 L 抗体ならびに親ネズミ抗体m E 8 cは、凝集したN 3 p G 1 u A に、高親和性 $K_D, 1 < 100 \text{ pM}$ およびより低い親和性 $K_D, 2 < 10 \text{ nM}$ で結合する。最大結合シグナル（R m a x）を低親和性結合および高親和性結合からのR m a xの合計として算出した。R m a xは、より多くの結合部位がより高密度の表面において利用可能である場合に期待されるように、表面上のペプチド密度が増加するにつれて高まることが示されている。これらの結合研究は、本発明の抗体が凝集したN 3 p G 1 u A に結合することを示している。

#### 【 0 0 5 1 】

##### 実施例 4：生体外での標的会合研究

固定したP D A P P 脳（24か月齢）からの脳切片上での生体外での標的会合を決定するために、外来的に添加したA 抗体を用いて免疫組織化学的分析を実施する。該P D A P P トランスジェニックマウスは、アルツハイマー病と関連した病状の多くを発症することが示されている。ネズミ抗体について、本実験をネズミ組織に関して実施したので、ビオチンタグを標識として使用したのであって、したがって、ビオチン化していない非ネズミ抗N 3 p G 1 u 抗体間での直接的な比較は適切ではない。ビオチン化した3 D 6 のN 末端（1～5）抗体は、P D A P P 海馬に沈着した有意な量のA を頑強に標識するのに対し、ビオチン化したm E 8 は、沈着物の部分集合しか標識しない。ヒトアルツハイマー病脳とは異なり、P D A P P 脳に沈着したA のほとんどは全長である。（m E 8 と比較して）B 1 2 L およびR 1 7 L などのビオチン化していない抗N 3 p G 1 u 抗体について、類似のブランク標識が観察される。非特異的ブランク標識は、マウス対照I g G およびヒト対照I g G のいずれにおいても観察されない。沈着したA の組成および起こりそうな構造が、アルツハイマー病脳とは劇的に異なっているので、ビオチン化していない抗N 3 p G 1 u（ $3 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）抗体が新鮮凍結アルツハイマー病脳からの脳切片上での沈着したA を結合するかどうかを判定するために、該抗体を研究する。陽性対照抗体（ビオチン化した3 D 6）は、アルツハイマー病脳における多くのA ブランクを強く標識するのに対し、陰性対照抗体（ネズミおよびヒトのI g G）は、いずれの適切な結合も欠失している。B 1 2 L およびR 1 7 L などのビオチン化していない抗N 3 p G 1 u 抗体のうちのいくつかは、沈着したA に同様に結合する。これらの組織学的研究は、本発明の抗N 3 p G 1 u 抗体が、沈着したA 標的と生体外で会合することができることを示している。

#### 【 0 0 5 2 】

##### 実施例 5：生体内での標的会合研究

沈着した標的に生体内で会合する抗N 3 p G 1 u 抗体の能力を測定する。亜慢性の4週間の研究を、ビオチン化したネズミ抗体3 D 6 およびm E 8 cを $40 \text{ mg} / \text{kg}$ で毎週腹腔内（I P）投与して実施する。本実験の終結時に脳を収集し、標的会合のレベルを脳の組織学的検討によって決定する。ビオチン化した3 D 6 を注射した動物では、海馬裂に沿ってのみブランク標識を有しているのに対し、ビオチン化したm E 8 cを注射したマウスでは、海馬および皮質領において頑強なブランク標識を示す。非常に類似した標的会合パターンは、より急性の3日間アッセイにおいて観察される（3 D 6 の海馬裂染色ならびにm E 8 の海馬領および皮質領の両方の標識）。これらの結果は、可溶性および不溶性の両A を結合する3 D 6 抗体が、可溶性A で飽和となり、したがって所望の沈着した標的に会合することができないことを強く示唆している。純然たる対照において、ネズミ抗N 3 p G 1 u 抗体であるm E 8 cは、決定的な脳領域のいずれにおいても、意図された標的と一貫して会合する。高用量および低用量のR 1 7 L およびB 1 2 L 抗N 3 p G 1 u 抗体を、同様の3日間の生体内での研究において評価する。該抗体を $10 \text{ mg} / \text{kg}$ （低用量）または $40 \text{ mg} / \text{kg}$ （高用量）のいずれかでI P 注射する。本研究の終結時に、血漿および脳を収集し、血漿P Kを決定する。脳を切片にし、免疫組織化学的分析を同種の切片に関して、（結合型抗N 3 p G 1 u 抗体を検出するための）抗ヒト抗体および（該切片における沈着した標的の総量を検出するための）3 D 6 を使用して実施する。生体内での標的会合のレベルをより良好に定量化するために、抗N 3 p G 1 u 抗体によって結合した

10

20

30

40

50

%面積を、起こり得る標的の総%面積（外来性3D6の免疫組織化学的分析によって可視化される沈着型A 全体）に対して標準化する。加えて、有意な曝露を本研究の終結時に検出するので、%標的会合全体を各個々のマウスについての血漿薬物動態（PK）値に対して標準化する。R17LおよびB12Lの両抗N3pG1u抗体は、ネズミ抗N3pG1u抗体（mE8）を使用して観察されるのと類似の分布を有する沈着したプラークと会合することが発見されている。これらの結果は、R17LおよびB12L抗N3pG1u抗体が末梢性投与されると、血液脳関門を通過することができ、かつ沈着したA の意図された標的と会合できるのに対し、可溶性および不溶性の両A を結合する抗体は、可溶性A で飽和となり、かつ意図された沈着型標的と会合できないことを示している。

【0053】

10

実施例6：治療的プラーク減少研究

23か月齢のPDAPPマウスにおける治療的プラーク減少研究を以下の抗体、すなわち陰性対照抗体（IgG2a）、3D6、mE8（IgG1）、およびmE8c（IgG2a）を使用して実施する。老齢PDAPPマウスに12.5mg/kgの各抗体を毎週3か月間皮下注射する。23か月齢での初期的なプラーク負荷量を決定するために、マウスの1群を、研究開始時（時間0）に剖検する。本研究の終結時に、血漿を得、脳を生化学的結果および組織学的結果のために加工する（各1半球）。海馬および皮質領を5Mグアニジンにおいて均質化し、A 含有量を酸尿素ゲルに続くウェスタンブロット法によって測定する。23か月齢の時間0および陰性抗体対照（26か月齢）の同齡集団からの海馬グアニジン溶解物の分析は、沈着したA<sub>1-42</sub>の有意ではない増加を示し、それによりPDAPPマウスの脳がプラークの平衡状態にあることを確認している。老齢PDAPPマウスにおける先行研究と同様に、比較因子である抗体3D6による処置は、プラーク減少に何ら効果がない。mE8またはmE8cのいずれかのN3pG1u抗体による処置は、IgG2a陰性対照抗体と比較して、有意なプラーク減少を結果的に生じる（それぞれ、 $p < 0.01$ および $p < 0.001$ ）（表2）。mE8およびmE8cは、海馬のA<sub>1-42</sub>をそれぞれ約38%および約53%減少させる。最大のエフェクター機能を有するN3pG1u抗体mE8cは、（対照と比較して）最小のエフェクター機能の抗体mE8よりも有効である傾向にあるが、この差は統計的有意性に到達していない。また、mE8c抗体は、時間0マウスと比較して、海馬のA<sub>1-42</sub>を約30%有意に減少させ（t検定、 $p < 0.0066$ ）、したがって、すでに沈着したプラークのクリアランスを示している。皮質グアニジン溶解物の分析は、非常に類似した結果を生じているが、例外は、最大のエフェクター機能を有するmE8cしかA<sub>1-42</sub>沈着を有意に減少させないことである。これらの結果は、本実施例のN3pG1u抗体による慢性的な処置が、老齢PDAPPマウスにおけるプラーク沈着をエフェクター機能依存的様式で有意に減少させることを示している。加えて、これらの結果は、（老化とは反対に）可溶性および不溶性の両A を結合するA 抗体の標的会合の乏しいことが、治療パラダイムにおいて使用される場合に有効性に欠ける原因となる因子であったという仮説を支持している。

20

30

【0054】

【表 2】

表 2ー海馬および皮質のプラークの減少 (ngAβ<sub>1-42</sub>/湿重量mg)

23~26 か月齢 PDAPP マウスの海馬プラーク					
	時間0 対照	陰性対照ー IgG2a	m3D6	mE8 - IgG1	mE8c - IgG2a
値の数	15	27	30	27	23
平均	48.13	71.96	66.73	44.25	33.62
標準偏差	17.12	39.4	29.48	19.64	13.8
標準誤差	4.42	7.583	5.383	3.78	2.877

10

23~26 か月齢 PDAPP マウスの皮質プラーク					
	時間0 対照	陰性対照ーIgG2a	m3D6	mE8 - IgG1	mE8c - IgG2a
値の数	15	27	30	27	24
平均	34.43	41.93	40.46	33.66	27.52
標準偏差	16.14	19.98	18.14	14.91	16.95
標準誤差	4.168	3.845	3.313	2.869	3.459

【 0 0 5 5 】

実施例 7：老齢 PDAPP マウスにおける微量出血の分析

20

老齢 PDAPP マウスにおける低下したプラーク減少をもたらす N3pG1u 抗体の作用機序が、脳アミロイド血管症と関連した微量出血の増悪を結果として生じるであろうかを研究するために、組織学的研究を実施する。先行研究は、ある抗 Aβ<sub>1-42</sub> アミノ末端抗体およびカルボキシル末端抗体による老齢 APP トランスジェニックマウスの処置が、脳アミロイド血管症と関連した微量出血の増加をもたらすことを示している (Pfeifer et al. 2002; Wilcock et al. 2004; Racke et al. 2005)。この潜在的な有害事象に潜む機序は未明だが、独立して排他的な 2 つの仮説、すなわち、脳血管への Aβ<sub>1-42</sub> の再分布 (Wilcock et al. 2004)、または存在する脳アミロイド血管症に対する抗体の直接的な結合 (Racke et al. 2005) が提供されている。生化学的および組織学的分析は、Aβ<sub>1-42</sub> がアルツハイマー病患者および老齢 PDAPP マウスの両方において脳アミロイド血管症の構成因子であることを示している。N3pG1u 抗体および対照抗体で治療的に処置された老齢 PDAPP マウス (23 から 26 か月齢) における微量出血についての詳細な組織学的分析を、12.5 mg/kg の毎週の皮下注射を 3 か月間実施する。微量出血についての陽性対照は、この抗 Aβ<sub>1-42</sub> アミノ末端抗体が微量出血を有意に増悪させることをすでに示している、3D6 で慢性的に処置した動物である (Racke et al. 2005)。本研究の終結時に、各動物からの 1 つの半球を 4%ホルムアルデヒドにおいて浸漬固定 (drop-fix) し、パラフィン中に包埋する。2mm の組織を包囲する冠状断を 50 枚のスライドへと切片作製した (スライド 1 枚につき 4 つの 10 μm 切片)。ヘモシデリン (微量出血による細胞の鉄蓄積) を可視化するために、2mm の組織を等間隔で横断する 11 枚のスライドをパールズブルー (Perls Blue) で染色する。スライド 1 枚につき 2 つの切片を盲検様式で手動で計数する。老齢 PDAPP マウスの 3D6 (陽性対照) による慢性的な処置は、微量出血を劇的に増加させる (p < 0.001)。重要なことに、mE8 (IgG1) または mE8c (IgG2a) のいずれによる処置も微量出血を増悪させないが、これらの N3pG1u 抗体はこれらの動物における沈着した Aβ<sub>1-42</sub> を有意に減少させることが示されている。これらの結果は、本実施例の N3pG1u 抗体が老齢 PDAPP マウスにおける脳アミロイド血管症と関連した微量出血を増悪させないことを示している。

30

40

【 0 0 5 6 】

配列表

<配列番号1; PRT1; 人工>

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

(A 1-42)

50

- <配列番号2; PRT1; 人工>  
 [pE]FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVIA (N3pE A )
- <配列番号3; PRT1; 人工>  
 KSSQSLLYSRGKTYLN (LCDR1-B12L/R17L/hE8L/R17)
- <配列番号4; PRT1; 人工>  
 AVSKLDS (LCDR2-B12L/R17L/hE8L/CI-C7) 10
- <配列番号5; PRT1; 人工>  
 VQGTHYPFT (LCDR3-B12L/R17L/hE8L/R17/CI-C7)
- <配列番号6; PRT1; 人工>  
 GYDFTRYIN (HCDR1-B12L)
- <配列番号7; PRT1; 人工>  
 GYTFTRYIN (HCDR1-R17L/R17)
- <配列番号8; PRT1; 人工> 20  
 WINPGSGNTKYNEKFKG (HCDR2-B12L/R17L/R17/CI-C7)
- <配列番号9; PRT1; 人工>  
 EGITVY (HCDR3 - B12L)
- <配列番号10; PRT1; 人工>  
 EGTTVY (HCDR3-R17L/R17)
- <配列番号11; PRT1; 人工> 30  
 DIVMTQTPLSLSVTPGQPAS I SCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLL I YAVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLK I  
 SRVEAEDGVVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLE I K
- <配列番号12; PRT1; 人工> (HCVR - B12L)  
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYDFTRYI NWVRQAPQGQLEWMGWI NPGSGNTKYNEKFKGRVT I TADESTSTAY  
 MELSSLRSEDVAVYYCAREG I TVYWGQGTTVTVSS
- <配列番号13; PRT1; 人工> (HCVR-R17L)  
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTRYI NWVRQAPQGQLEWMGWI NPGSGNTKYNEKFKGRVT I TADESTSTAY  
 MELSSLRSEDVAVYYCAREG TTVYWGQGTTVTVSS 40
- <配列番号14; PRT1; 人工> (LC - B12L/R17L)  
 DIVMTQTPLSLSVTPGQPAS I SCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLL I YAVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLK I  
 SRVEAEDGVVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLE I KRTVAAPSVF I FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQ  
 SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- <配列番号15; PRT1; 人工> (HC - B12L)  
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYDFTRYI NWVRQAPQGQLEWMGWI NPGSGNTKYNEKFKGRVT I TADESTSTAY  
 MELSSLRSEDVAVYYCAREG I TVYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY I CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
 FPPKPKDTLM I SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK 50

VSNKALPAP I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD I AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

<配列番号16; PRT1; 人工> (HC - R17L)  
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYTFTRYI I NWVRQAPGGLEWMGI I NPGSGNTKYNEKFKGRVT I TADESTSTAY  
MELSSLRSEDTAVYYCAREGTTVYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY I CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLM I SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAP I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD I AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

<配列番号17; DNA; 人工> (LCVR DNA- B12L/R17L)  
GATATTGTGATGACTCAGACTCCACTCTCCCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGTCAAGTCA  
GAGCCTCTTATATAGTCGCGGAAAAACCTATTTGAATTGGCTCCTGCAGAAGCCAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATTT  
ATGCGGTGTCTAAACTGGACTCTGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTGAGGCACAGATTTACACTGAAAATC  
AGCAGGGTGGAGCCGAAGATGTTGGGGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTACCCATTACGTTTGGCCAAGGGAC  
CAAGCTGGAGATCAAA

<配列番号18; DNA; 人工> (HCVR DNA- B12L)  
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGTTA  
CGACTTCACTAGATACTATATAAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTAATCCTG  
GAAGCGTAATACTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTAC  
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGGCATCACGGTCTACTGGGGCCA  
AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

20

<配列番号19; DNA; 人工> (HCVR DNA- R17L)  
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGTTA  
CACCTTCACTAGATACTATATAAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTAATCCTG  
GAAGCGTAATACTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTAC  
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGGCACAACGGTCTACTGGGGCCA  
AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

30

<配列番号20; PRT1; 人工> (LCVR - mE8)  
N I V L T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L Y S R G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K R L I Y A V S K L D S G V P D R F I G S G S G T D F T L K I  
S R V E A E D L G V Y Y C V Q G T H Y P F T F G S G T K L E I K

<配列番号21; PRT1; 人工> (HCVR - mE8)  
E V Q L L E S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y T F T D Y Y I N W V K Q R P G Q G L E W I G W I N P G S G N T K Y N E K F K G K A T L T V D T S S S T A Y  
M Q L S S L T S E D S A V Y F C T R E G E T V Y W G Q G T T L T V S S

40

<配列番号22; PRT1; 人工> (LC - mE8およびmE8c)  
N I V L T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L Y S R G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K R L I Y A V S K L D S G V P D R F I G S G S G T D F T L K I  
S R V E A E D L G V Y Y C V Q G T H Y P F T F G S G T K L E I K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V K W K I D G S E R  
Q N G V L N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S F N R N E C

<配列番号23; PRT1; 人工> (HC - mE8)  
E V Q L L E S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y T F T D Y Y I N W V K Q R P G Q G L E W I G W I N P G S G N T K Y N E K F K G K A T L T V D T S S S T A Y  
M Q L S S L T S E D S A V Y F C T R E G E T V Y W G Q G T T L T V S S A K T T P P S V Y L A P G S A A Q T N S M V T L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S G S  
L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N V A H P A S S T K V D K K I V P R D C G C K P C I C T V P E V S S V F I F P P K P K  
D V L T I T L T P K V T C V V V D I S K D D P E V Q F S W F V D D V E V H T A Q T Q P R E E Q F N S T F R S V S E L P I M H Q D W L N G K E F K C R V N S A A F

50

PAP I EKT I SKTKGRPKAPQVYT I PPPKEQMAKDKVSLTCM I TDFFPED I TVEWQWNGQPAENYKNTQP I MDTDGSYFVYS  
KLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

<配列番号24; PRT1; 人工> (HC - mE8c)  
EVQLLESPELVKPGASVK I SCKASGYTFTDYY I NWVKQRPGGLEW I G W I NPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSSTAY  
MQLSSLTSEDSAVYFCTREGETVYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGS  
LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS I TCNVAHPASSTKVDKK I EPRGPT I KPCPPCKCPAPNLLGGPSVF I  
FPPK I KDVLM I SLSP I VTCVVVDVSEDDPDVQ I SWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALP I QHQDWMMSGKEFKCK  
VNNKDL P A P I ERT I SKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTDMPED I YVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSGD  
SYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNNHHTTKSFSRTPGK

10

<配列番号25; PRT1; 人工> (pE3-16)  
Pyr -EFRHDSGYEVHHQK- ビオチン

<配列番号26; PRT1; 人工> (E3-16)  
EFRHDSGYEVHHQK- ビオチン

<配列番号27; PRT1; 人工> (pEG4)  
Pyr -EGRHDSGYEVHHQK- ビオチン

20

<配列番号28; PRT1; 人工> (mpE3-16)  
Pyr -EFGHDSGFVHHQK- ビオチン

<配列番号29; PRT1; 人工> (pEG6)  
Pyr -EFRGDSGYEVHHQK- ビオチン

<配列番号30; PRT1; 人工> (pEG7)  
Pyr -EFRHDSGYEVHHQK- ビオチン

<配列番号31; PRT1; 人工> (LCVR - hE8-C6) 30  
DI VMTQTPLSLSVTPGQPAS I SCKSSQSLLYSRGKTYLNWYLQKPGQSPQLL I YAVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLK I  
SRVEAEDVGYYCVQGTHYPFTFGQGTKLE I K

<配列番号32; PRT1; 人工> (HCVR - hE8-C6)  
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDYY I NWVRQAPGGLEWMGW I NPGSGNTKYNEKFKGRVT I TADESTSTAY  
MELSSLRSEDTAVYYCAREGETVYWGQGTTVTVSS

<配列番号33; PRT1; 人工> (LC - hE8-C6) 40  
DI VMTQTPLSLSVTPGQPAS I SCKSSQSLLYSRGKTYLNWYLQKPGQSPQLL I YAVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLK I  
SRVEAEDVGYYCVQGTHYPFTFGQGTKLE I KRTVAAPSVF I FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

<配列番号34; PRT1; 人工> (HC - hE8-C6)  
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDYY I NWVRQAPGGLEWMGW I NPGSGNTKYNEKFKGRVT I TADESTSTAY  
MELSSLRSEDTAVYYCAREGETVYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY I CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLM I SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKAL P A P I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD I AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

50

<配列番号35; PRT1; 人工> (LCDR2 - R17)  
AVSKLGS

<配列番号36; PRT1; 人工> (LCVR - R17)  
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYAVSKLGS~~GV~~PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQ~~GH~~THYPFTFGGQTKLEIK

<配列番号37; PRT1; 人工> (pEG8)  
Pyr-EFRHDGGYEVHHQK- ビオチン

10

<配列番号38; PRT1; 人工> (LC - R17)  
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYAVSKLGS~~GV~~PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQ~~GH~~THYPFTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

<配列番号39; PRT1; 人工> (pEF10)  
Pyr-EFRHDSGFVHHQK- ビオチン

<配列番号40; PRT1; 人工> (HCDR1 - hE8L/C1-C7)  
GYTFTDYYIN

20

<配列番号41; PRT1; 人工> (HCDR3 - hE8L)  
EGETVY

<配列番号42; PRT1; 人工> (HCVR - hE8L)  
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYYINWVRQAPGGLEWMGWINPGSGNTKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGETVYWGQGT~~TV~~TVSS

<配列番号43; DNA; 人工> (HC DNA-R17L)  
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAGTTTCTGCAAGGCATCTGGTTA  
CACCTTCACTAGATATTATATAAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTAATCCTG  
GAAGCGTAATACTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAGAGTCAACCATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTAC  
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGGCACAACGGTCTACTGGGGCCA  
AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCTCCTCAAGAGCACCT  
CTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCC  
CTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC  
CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG  
AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTC  
TTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA  
AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT  
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTACAGTCTCACCCTGACACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAG  
GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA  
CACCTGCCCCATCCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCG  
ACATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCAGCCCCCGTGTGGACTCCGACGGC  
TCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  
TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGT

30

40

<配列番号44; PRT1; 人工> (HC - hE8L)  
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYYINWVRQAPGGLEWMGWINPGSGNTKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGETVYWGQGT~~TV~~TVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA

50

LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ<配列番号45; PRT1; 人工> (LCDR1 - CI-C7)  
KSTRSLLYSRSKTYLN

<配列番号46; PRT1; 人工> (HCDR3 - CI-C7)  
EGVTVY

10

<配列番号47; PRT1; 人工> (LCVR - CI-C7)  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSTRSLLYSRSKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAVSKLDSGVP SRFSGSGSGTDFLT I  
SSLQPEDFATYYCVQGHYPFTFGGGTKVEIK

<配列番号48; PRT1; 人工> (HCVR - CI-C7)  
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFDYIINWVRQMPGKGLEWMGWINPGSGNTKYNEKFKGQVTISADKSI STAY  
LQWSSLKASDTAMYYCAREGVTVYWGQGLVTVSS

<配列番号49; PRT1; 人工> (LC - CI-C7)  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSTRSLLYSRSKTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAVSKLDSGVP SRFSGSGSGTDFLT I  
SSLQPEDFATYYCVQGHYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

<配列番号50; PRT1; 人工> (HC - CI-C7)  
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFDYIINWVRQMPGKGLEWMGWINPGSGNTKYNEKFKGQVTISADKSI STAY  
LQWSSLKASDTAMYYCAREGVTVYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

30

<配列番号51; PRT1; 人工配列> (LCDR1 共通)  
KS<sub>x<sub>1</sub></sub><sub>x<sub>2</sub></sub> SLLYSR<sub>x<sub>3</sub></sub> KTYLN (配列中<sub>x<sub>1</sub></sub>はSまたはTであり、<sub>x<sub>2</sub></sub>はQまたはRであり、<sub>x<sub>3</sub></sub>はGまたはS  
である。)

<配列番号52; PRT1; 人工配列> (LCDR2 共通)  
AVSKL<sub>x<sub>4</sub></sub> S (配列中<sub>x<sub>4</sub></sub>はDまたはGである。)

<配列番号53; PRT1; 人工配列> (HCDR1 共通)  
GY<sub>x<sub>5</sub></sub> FT<sub>x<sub>6</sub></sub> YYIN (配列中<sub>x<sub>5</sub></sub>はDまたはTであり、<sub>x<sub>6</sub></sub>はRまたはDである。)

40

<配列番号54; PRT1; 人工配列> (HCDR3 共通)  
EG<sub>x<sub>7</sub></sub> TVY (配列中<sub>x<sub>7</sub></sub>はI、T、E、またはVである。)

<配列番号55; PRT1; 人工配列> (LC DNA- B12L/R17L)  
GATATTGTGATGACTCAGACTCCACTCTCCCTGTCCGTACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGTCAAGTCA  
GAGCCTTATATAGTCGCGGAAAAACCTATTTGAATTGGCTCCTGCAGAAGCCAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATTT  
ATGCGGTGTCTAAACTGGACTCTGGGGTCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTGAGGCACAGATTTACACTGAAAATC  
AGCAGGGTGGAGGCCGAAGATGTTGGGGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTACCCATTCACGTTTGGCCAAGGGAC

50

CAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA  
 CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA  
 TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG  
 CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT  
 TCAACAGGGGAGAGTGC

<配列番号56; PRT1; 人工配列>

(HC DNA- B12L)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGTTA  
 CGACTTCACTAGATACTATATAAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTAATCCTG  
 GAAGCGTAATACTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAGAGTACCATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTAC  
 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGGCATCACGGTCTACTGGGGCCA  
 AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCCCTCCTCAAGAGCACCT  
 CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAATCAGGCGCC  
 CTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC  
 CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG  
 AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC  
 TTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA  
 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT  
 ACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAG  
 GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA  
 CACCCTGCCCCCATCCCGGACGAGCTGACCAAGAACCAGTCTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG  
 ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCCCGTGTGGACTCCGACGGC  
 TCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGT

10

20

【配列表】

0005980207000001 . app

## フロントページの続き

(72)発明者 ジロン・ル

アメリカ合衆国46206-6288インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス6288、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

(72)発明者 タン・イン

アメリカ合衆国46206-6288インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス6288、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

(72)発明者 ロナルド・ブラッドリー・ディマツス

アメリカ合衆国46206-6288インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス6288、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 米国特許第07122374(US, B1)

国際公開第2008/131298(WO, A1)

国際公開第2005/018424(WO, A1)

J Neural Transm., 2010年 1月, Vol.117, No.1, pp.85-96

Proc Natl Acad Sci U S A., 2003年, Vol.100, No.4, pp.2023-2028

J Neurosci., 2005年, Vol.25, No.3, pp.629-636

医学のあゆみ, 2009年, Vol.229, No.5, pp.395-398

Biochemistry, 2009年, Vol.48, pp.5210-5217

臨床神経学, 2009年11月, Vol.49, No.11, pp.848-850

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00-16/46

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)