

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4511830号
(P4511830)

(45) 発行日 平成22年7月28日(2010.7.28)

(24) 登録日 平成22年5月14日(2010.5.14)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/53 (2006.01)

F 1

G O 1 N 33/53

D

請求項の数 8 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2003-520382 (P2003-520382)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月16日 (2002.8.16)
 (65) 公表番号 特表2004-538477 (P2004-538477A)
 (43) 公表日 平成16年12月24日 (2004.12.24)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2002/026321
 (87) 國際公開番号 WO2003/015617
 (87) 國際公開日 平成15年2月27日 (2003.2.27)
 審査請求日 平成17年7月26日 (2005.7.26)
 (31) 優先権主張番号 60/313,221
 (32) 優先日 平成13年8月17日 (2001.8.17)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/313,224
 (32) 優先日 平成13年8月17日 (2001.8.17)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 597025806
 ワシントン・ユニバーシティ
 Washington University School of Medicine
 アメリカ合衆国63130ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ
 (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 46285 インディアナポリス リリー・コーポレイテ センター (番地なし)
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恒生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アルツハイマー病のアッセイ方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者における臨床的および発症前アルツハイマー病の診断用キットであって、
 (i) A の第13-28位の間に含まれるエピトープに特異的に結合することができる
被験者への投与のための抗体、または、A ベプチドをその血中の結合、循環型から隔離し、中枢神経系および血漿中の可溶型および結合型 A のクリアランスを変更する被験者への投与のための抗体を含む容器；ならびに

(ii) (a) 少なくとも1つの測定値を得るために、被験者に当該容器中の抗体を投与した後の予め選択した時間間隔で得た被験者の血液サンプル中の1つ以上の下記成分を測定し、

- (1) 循環 A 40のレベル
- (2) 循環 A 42のレベル
- (3) 循環 A 42のレベルに対する循環 A 40のレベルの比率

(b) 少なくとも1つの測定値を予め選択したコントロール値と比較し、
 (c) コントロール値と比較して上昇した測定値という既定の基準に基づいて、該被験者をアルツハイマー病の発症前または臨床的段階であると同定するための一連の指示を包含する、当該容器中の抗体を投与するための指示書；
 を含むキット。

【請求項 2】

血液中の A 40および/または A 42のレベルを評価するための試薬をさらに含む請求

項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

正常な被験者の血液中の A 40 レベル、 A 42 レベルまたは A 40 / A 42 比率のコントロール値の説明書をさらに含む請求項 1 に記載のキット。

【請求項 4】

循環 A 40 、循環 A 42 の測定値の上昇、または循環 A 42 のレベルに対する循環 A 40 のレベルの比率の上昇を同定する方法であって、

(a) 測定のための 1 つ以上の下記成分を選択し、

(1) 循環 A 40 のレベル

(2) 循環 A 42 のレベル

(3) 循環 A 42 のレベルに対する循環 A 40 のレベルの比率

10

(b) 被験者の各選択された成分の測定値を得るために、 A の第 13 - 28 位の間に含まれるエピトープに特異的に結合することができる抗体、または、 A ペプチドをその血中の結合、循環型から隔離し、中枢神経系および血漿中の可溶型および結合型 A のクリアランスを変更する抗体を、アルツハイマー病の臨床的または発症前段階にある被験者の血液中の循環 A ペプチドのレベルを変更するのに有効な量で被験者に投与した後の予め選択された時間間隔で得た被験者の血液サンプル中の選択された 1 つ以上の成分のそれを測定し、

(c) 各測定値を予め選択したコントロール値と比較することを含む方法。

【請求項 5】

20

予め選択した時間間隔が、 24 時間以内である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

予め選択した時間間隔が、 3 時間以内である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

投与が、抗体の注射である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

被験者がヒトであり、抗体がヒト化抗体またはその断片である請求項 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連特許】

【0001】

30

本出願は、米国仮出願である 2001 年 10 月 23 日出願の 60/334,987 、 2001 年 8 月 17 日出願の米 60/313,221 および 2001 年 8 月 17 日出願の 60/313,224 (これらの開示内容は引用により本明細書中に包含される) の優先権を主張する。

【技術分野】

【0002】

本発明は、発症前および臨床的アルツハイマー病の診断を可能にするアッセイに関する。テストは、被験者にある抗 A 抗体を投与した後のアミロイドベータ (A) ペプチドのレベルを評価することに頼っている。

【背景技術】

40

【0003】

認識欠損、発作、脳出血および全般的精神衰弱を生じさせる多くの総合的症状は、アミロイドベータペプチド (A) を含有する脳内の神経突起および脳血管ブラークと関連すると思われる。これらの症状には、前臨床的および臨床的なアルツハイマー疾患、ダウン症候群、および前臨床的および臨床的な脳アミロイド血管障害 (CAA) がある。アミロイドブラークは、アミロイドベータペプチドから形成される。これらのペプチドは、血中および脳脊髄液 (CSF) 中を循環する。循環型の A ペプチドは、共通前駆体タンパク質、アミロイド前駆体タンパク質 (しばしば APP と称される) の分解により生じた 39 ~ 43 アミノ酸 (ほとんどが 40 または 42 アミノ酸) から構成される。

【0004】

50

A が脳および血液の間を行きつ戻りつして輸送され得ることを示唆する証拠がある (Ghersi-Egea, J-F. ら、J. Neurochem. (1996) 67: 880-883; Zlokovic, B. V. ら、Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67: 1034-1040; Shibata Mら、J. Clin. Invest. (2000) 106: 1489-1499)。さらに、plaques 中の A は、脳および血液内の可溶性 A と平衡状態にある (Kawarabayashi Tら、J. Neurosci. (2001) 21: 372-381)、DeMattosら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001) 98:8850-8855。

【 0 0 0 5 】

引用により本明細書中に包含される PCT 出願 U S 0 0 / 3 5 6 8 1 および米国第 0 9 / 1 5 3, 1 3 0 号に記載されるように、CSF 中の A ペプチドのトータル循環レベルは、正常な個体およびアルツハイマーの症状を示す傾向がある個体において同様である。しかし、A₄₂ レベルは、アルツハイマー疾患を有する個体において平均的に少ない (Nitsch, R. M. ら、Ann. Neurol. (1995) 37: 512-518)。A₄₂ が A₄₀ より凝集する傾向があることが既知であり、これが起こると、アミロイドplaques 中の A 蓄積、A の毒性可溶型への変換、神経細胞の損傷および痴呆のような行動上の障害のような有害な結果が生じる (Golde, T. E. ら、Biochem. Biophys. Acta. (2000) 1502: 172-187)。

【 0 0 0 6 】

2001年2月26日出願の「A ペプチドを隔離するヒト化抗体」と題する PCT 出願 PCT / U S 0 1 / 0 6 1 9 1 (この開示内容は引用により本明細書中に包含される) は、血液脳関門をかなりの程度で横切らず、体液中を循環する A ペプチドを隔離する抗体を記載する。これらの抗体は、脳内の A 含有拡散性、神経突起および脳血管plaques の形成に関連するコンディションの予防および治療的処置に有用であると記載される。本出願は、抗体を投与し、次いで、治療の進展を評価するために、血液中の A ペプチドの循環レベルを測定することを記載する。しかし、抗体を投与した後の A ペプチドのレベルがそのコンディションの診断に役立つという明確な示唆はない。本発明は、個体に抗体が投与されると、A₄₀ および A₄₂ の両方の増大されたレベルならびに A₄₀ / A₄₂ 比率が、脳内の A ペプチド蓄積のレベルに相關するという驚くべき結果に属するものである。したがって、抗体を投与した後の血液中のこれらの成分の測定は、臨床的および発症前のアルツハイマー病および関連する神経障害のための単純で簡単な診断テストを提供する。

【 0 0 0 7 】

A ペプチド抗体の性質に関するさらなる関連文献がある。たとえば、1999年6月10日公開の PCT 公開 WO 99 / 2 7 9 4 4 には、アミロイド蓄積を減少させるための免疫応答を誘導する方法が記載されている。1999年11月25日公開の WO 99 / 6 0 0 2 4 には、抗アミロイド抗体を用いるアミロイド除去のための方法が記載されている。WO 0 0 / 7 2 8 8 0、WO 0 0 / 7 2 8 7 6 および WO 0 0 / 7 7 1 7 8 などのさらに他の PCT 公開公報には、種々の抗 A ペプチド抗体が記載されている。このペプチドの N 末端に結合する抗体は、トランスジェニックマウスモデルにおいて plaques を減少させると言われている。アミロイド自体による免疫感作が、ペプチドの加水分解を触媒するように設計された抗体であると記載されている。

【 0 0 0 8 】

A 代謝に関する一経路は、CNS から血漿への輸送を介するものであることが示されている (Zlokovic, B. V. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1996) 93: 4229-4234; Ghersi-Egea, J-F. ら、J. Neurochem. (1996) 67: 880-883)。さらに、血漿中の A が血液脳関門を横切って脳にはいることができる事が示されている (Zlokovic, B. V. ら、Biochem. Biophys. Res. Comm. (1993) 67: 1034-1040)。また、アルツハイマー疾患の APP^{V 7 1 7 F} トランスジェニックマウスモデルにおいて、特定のポリクローナルおよびモノクローナル A 抗体を投与するとアミロイドplaques 中の A 蓄積が減少することが示されている (Bard, F. ら、Nature Med. (2000) 6:916-919)。しかしこれは、特定の抗 A 抗体が血液脳関門を横切り、アミロイドplaques のミクログリア細胞による貪食を刺激したせいであると言われた。Bard の実験では、脳スライスのエクスピボンセイにより、

10

20

30

40

50

外部から加えられたミクログリアとともに添加 A 抗体が存在することが A の貪食を誘導し、結果的に A 蓄積の除去を導くことが示された。

【0009】

C S F および血液中の可溶性 A₄₀ および A₄₂ 両者のレベルは、A 鎮に沿ったエピトープに対する抗体を用いる標準化されたアッセイにより容易に検出できる。このようなアッセイは、たとえば、米国特許 5,766,846; 5,837,672; および 5,593,846 中に報告されている。これらの特許は、A ペプチドの中央ドメインに対するマウスモノクローナル抗体の作成を記載しており、これらは、第 16 位および第 17 位まわりおよびこれらを含むエピトープを有することが報告された。N 末端領域に対する抗体も同様に記載された。いくつかのモノクローナル抗体が A ペプチドの第 13 - 28 位と免疫反応することが示され；これらは、第 17 - 28 位を表すペプチドと結合せず、したがって、引用特許によれば、これらの抗体の標的が第 16 - 17 位（ - セクレターゼ部位）を含むこの領域であることが確立された。A のアミノ酸 13 および 28 の間と結合することが既知である抗体には、マウス抗体 266、4G8、および 1C2 がある。

【発明の内容開示】

【0010】

A ペプチドに対するアッセイを行うのに有用であり、脳内のアミロイドplaques に関連するコンディションの治療に有用な抗体が、脳内の A ペプチドレベルの著しい増加を引き起こす応答を引き出すことができ、このレベルを臨床的および発症前アルツハイマー病のための診断マーカーとして用いることができる現在見出されている。これらの抗体（ヒト化されてもされなくてもよい）は、A ペプチドをその血中の結合、循環型から隔離し、中枢神経系および血漿中の可溶型および結合型 A のクリアランスを変更する。これらの抗体およびその断片は、A 分子のアミノ酸 13 および 28 の間のエピトープに特異的に結合する。これらの抗体の CDR は、マウスモノクローナル抗体 266（配列番号 1 ~ 配列番号 6）由来である。有用な抗体として、可変領域がマウス抗体 266 由来の CDR および特定のヒトフレームワーク配列を含む配列（配列番号 7 ~ 配列番号 10）を有するものであって、マウス抗体の結合性質をほぼ保持し、マウス抗体 266 と機能的に同等なインビトロおよびインビボ性質を有する抗体およびその断片が挙げられる。軽鎖が配列番号 11 であり、重鎖が配列番号 12 であるヒト化抗体およびその断片が、特に有用である。

【0011】

したがって、1つの態様において、本発明は、臨床的および発症前段階にある患者におけるアルツハイマー病の診断方法に関するものであり、該方法は、A ペプチドをその血中の結合、循環型から隔離し、中枢神経系および血漿中の可溶型および結合型 A のクリアランスを変更するかまたは A のアミノ酸 13 および 28 の間に含まれるエピトープに特異的に結合する抗体であって、好ましくは患者がアルツハイマー病の臨床的または発症前段階にある場合に、患者の血液中の循環 A ペプチドのレベルを変更するのに有効なマウス抗体 266 と同等な免疫活性を有する抗体を該患者に投与し、次いで、患者の血液中の A₄₀、A₄₂ のレベルまたは A₄₀ / A₄₂ 比率（ここで、患者における A₄₀、A₄₂ の増加したレベルおよび / または A₄₀ / A₄₂ 比率によって、該患者がアルツハイマー病または脳アミロイド血管障害の発症前または臨床的段階にあることが同定される）を測定することを含む。他の態様において、本発明は、該診断方法を行うための適当な機材を含むキットに関する。

【本発明の実施の様式】

【0012】

ヒト体液中を循環する A ペプチドは、染色体 21 上にコードされる前駆体タンパク質のカルボキシ末端領域である。インビトロ実験の結果から、A ペプチドは、細胞の脂質膜にその長い前駆体をアンカーする領域の一部分である一連の疎水性アミノ酸を含有するために、生理溶液中で低い溶解性しか有さないことが報告されている。したがって、循環 A ペプチドが通常、その凝集を防ぐ他の部分と複合体化していることは驚くべきことで

10

20

30

40

50

はない。これは、体液中の循環 A ペプチドの検出を困難にしてきた。

【0013】

上記特許文献（米国特許 5,766,846 ; 5,837,672 および 5,593,846）は、A ペプチドのアミノ酸 13 - 28 を含むペプチドに対して產生され、これに特異的に結合することが示されたクローン 266 (m 266) と称される抗体（モノクローナル抗体を含む）の製造を記載している。出願人は、アルツハイマー病のマウスモデルである APP^{V717F} マウスに m 266 を投与した後、脳内のアミロイドplaques のレベルの診断に役立つ循環中の A ペプチドのレベルを測定することができるを見出している。したがって、これらの抗体は、循環 A ペプチドについてのアッセイを行うのに有用であるのみならず、それ自体、脳内のアミロイドplaques の量の診断に役立つ循環血液レベルを顕在化させるアッセイを行うのにも有用であり、したがって、アルツハイマー病の臨床的および発症前段階にある個人を同定するのに有用である。

【0014】

「A ペプチドの中間領域に結合するモノクローナル抗体」とは、A の第 13 位から第 28 位間に含有されるエピトープを表すアミノ酸配列と結合するモノクローナル抗体 (Mab または Mabs) を意味する。全領域が標的化される必要はない。抗体がこの領域内の少なくとも 1 エピトープ（特に、たとえば - セクレターゼ部位 16 - 17 または抗体 266 が結合する部位を含む）と結合する限り、このような抗体は本発明の方法において有効である。

【0015】

「抗体」とは、モノクローナル抗体それ自体または免疫学的に有効なその断片、たとえばその F_{ab}、F_{ab'} または F_(ab')2 断片を意味する。本明細書中、いくつかの関連では、強調のために断片が具体的に記載される；しかし、当然のことながら、断片が特定されるかどうかにかかわらず、用語「抗体」にはこのような断片ならびに单鎖型が含まれる。タンパク質が意図される標的に結合する特異的能力、そしてこの場合、血液中で A ペプチドをその担体タンパク質から隔離する能力を保持している限り、用語「抗体」に含まれる。また、定義「抗体」に含まれるものは、たとえば、この特異性を有する抗体の、单鎖型、一般には Fv 領域と称されるものである。ヒト化型に変換するために、適当な特異性を有する、典型的にはマウスまたは他の非ヒト抗体の操作が必要とされるため、必ずしもそうではないが、好ましくは、本発明において有用な抗体は、組換え的に作成されたものである。抗体はグリコシリ化されていてもよいが、グリコシリ化された抗体が好ましい。抗体は、周知のように、ジスルフィド結合を介して適正に架橋されている。

【0016】

基本的な抗体の構造単位は、テトラマーを含むことが既知である。各テトラマーは、2 つの同一対のポリペプチド鎖から構成され、各対は、1 つの「軽」鎖（約 25 kDa）および 1 つの「重」鎖（約 50 - 70 kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識を主に担う約 100 ~ 110 またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主に担う定常領域を規定する。

【0017】

軽鎖は、ガンマ、ミュー、アルファおよびラムダとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロンとして分類され、それぞれ抗体のイソ型、IgG、IgM、IgA、IgD および IgE を規定する。軽鎖および重鎖のうち、可変領域および定常領域は、約 12 またはそれ以上のアミノ酸の「J」領域によって連結され、重鎖はまた、約 10 またはそれ以上のアミノ酸の「D」領域を含んでいる。

【0018】

各軽 / 重鎖対の可変領域は、抗体の結合部位を形成する。したがって、無傷の抗体は、2 結合部位を有する。鎖はすべて、相補性決定領域または CDRs と称される 3 つの超可変領域と連結された比較的保存されたフレームワーク領域 (FR) の同一の全体構造を示す。各対の 2 つの鎖由来の CDRs は、フレームワーク領域によって向きを調節され、特

10

20

30

40

50

異的エピトープと結合することが可能にされている。N末端からC末端で、軽鎖および重鎖はともに、ドメインF R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3およびF R 4を含む。アミノ酸の各ドメインへの割り当ては周知の慣例にしたがうものである [Kabat 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」 National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 および 1991; Chothiaら、J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothiaら、Nature 342:878-883 (1989)] 。

【 0 0 1 9 】

当分野でよく理解されているように、哺乳類を免疫化し、該哺乳類の抗体産生細胞由來のハイブリドーマを形成させまたはそれを不死化し、ならびにハイブリドーマまたは不死化細胞を培養し、その適当な特異性に関して評価する標準的技術によって適当な特異性を有するモノクローナル抗体を容易に作成できる。この場合、このような抗体は、ヒト、ウサギ、ラットまたはマウスをたとえばAペプチドの13-28領域を含むエピトープを表すペプチドまたはその適当なサブ領域を用いて免疫化することにより作成できる。組換え操作に関する材料は、所望の抗体を產生するハイブリドーマまたは他の細胞から所望の抗体をコードするヌクレオチド配列を回収することによって得ることができる。次いで、要すれば、これらのヌクレオチド配列を処理して、ヒト化型の抗体を提供することができる。

10

【 0 0 2 0 】

ヒト患者においてペプチドの所望の循環レベルを引き出すために、ヒト化型のこれらの抗体を使用するのが望ましい。投与は短期間であり、診断目的のためだけなので、これは必須事項というものではないが、免疫応答のあらゆる可能性を回避するのが好ましいのは明らかであり、ゆえに、この目的にはヒト化型の使用が好ましい。もちろん、エクスピボでのAレベルのアッセイ(たとえば、ELISA)の実行には、それらのマウス型を用いることができる。

20

【 0 0 2 1 】

「ヒト化抗体」とは、非ヒト相補性決定領域(C D R)を有する抗体の配列を変更することによって、ヒト抗体生殖系列由來のアミノ酸配列から部分的に、あるいは全体的に構成される抗体を意味する。最もシンプルなこのような変更は単に、マウス定常領域をヒト抗体の定常領域で置換し、したがって、医薬的使用に関して許容されるほど十分に低い免疫原性を有し得るヒト/マウスキメラを作成することからなるものであり得る。しかし、好ましくは、抗体の可変領域およびC D Rさえもまた、現在までに当分野に周知である技術によってヒト化される。可変領域のフレームワーク領域は、対応するヒトフレームワーク領域によって置換され、非ヒトC D Rは実質的に無傷のままであるか、あるいはそのC D Rはヒトゲノム由來の配列で置換されることさえある。完全なヒト抗体は、免疫系がヒト免疫系に対応するように変更された遺伝的に修飾されたマウス内で生産される。上記のように、単鎖型である断片を含む、抗体の免疫学的に特異的な断片を用いれば、本発明の方法における使用に関しては十分である。

30

【 0 0 2 2 】

このように、ヒト化抗体とは、ヒトフレームワーク、少なくとも1つの非ヒト抗体由來C D Rを含み、存在する任意の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち少なくとも約85-90%、好ましくは少なくとも95%同一であるものを意味する。したがって、可能性としてはC D Rを除いて、ヒト化抗体のすべての部分は、1つまたはそれ以上の天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。たとえば、ヒト化免疫グロブリンは典型的にはキメラマウス可変領域/ヒト定常領域抗体を含まない。

40

【 0 0 2 3 】

ヒト化免疫グロブリンの設計は、以下のように行うことができる。アミノ酸が以下のカテゴリーに含まれる場合、用いられるヒト免疫グロブリン(アクセプター免疫グロブリン)のフレームワークアミノ酸は、C D R提供非ヒト免疫グロブリン(ドナー免疫グロブリン)由來のフレームワークアミノ酸で置換される：(a)アクセプター免疫グロブリンの

50

ヒトフレームワーク領域中のアミノ酸は、その部位のヒト免疫グロブリンに関して通常でないが、ドナー免疫グロブリン中の対応するアミノ酸は、その部位のヒト免疫グロブリンに関して典型的である；(b)このアミノ酸の位置がCDRの1つのすぐ隣であるか；あるいは(c)フレームワークの任意の側鎖原子が、三次元免疫グロブリンモデル中、CDRアミノ酸の任意の原子の約5-6オングストローム(中心から中心)内である[Queenら、前掲およびCoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2869 (1991)]。アクセプター免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の各アミノ酸およびドナー免疫グロブリン中の対応するアミノ酸がその位置のヒト免疫グロブリンに関して通常でない場合、このようなアミノ酸は、その位置のヒト免疫グロブリンに関して典型的なアミノ酸によって置換される。

10

【0024】

好みしいヒト化抗体は、マウス抗体266のヒト化型である。ヒト化266のCDRsは、以下のアミノ酸配列を有する：

軽鎖CDR1：

【数1】

1	5	10	15
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His			
(SEQ ID NO:1)			

20

軽鎖CDR2：

【数2】

1	5
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser (SEQ ID NO:2)	

軽鎖CDR3：

【数3】

1	5
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr (SEQ ID NO:3)	

30

重鎖CDR1：

【数4】

1	5
Arg Tyr Ser Met Ser (SEQ ID NO:4)	

重鎖CDR2：

【数5】

1	5	10	15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly			
(SEQ ID NO:5)			

40

および重鎖CDR3：

【数6】

1	
Gly Asp Tyr (SEQ ID NO:6)	

50

【0025】

本発明のヒト化抗体の好ましい軽鎖可変領域は、以下のアミノ酸配列を有し、そのフレームワークは、ヒト生殖系列V κセグメントD P K 18およびJセグメントJ κ 1起源であり、同一ヒトVサブグループ内のコンセンサスアミノ酸へのいくつかのアミノ酸置換を有し、潜在的免疫原性が減少している：

【数7】

1	5	10	15	
Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Leu Pro Val Xaa Xaa				
20	25	30		10
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa				
35	40	45		
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro				
50	55	60		
Gly Gln Ser Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe				
65	70	75		
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp				
80	85	90		20
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val				
95	100	105		
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa				
110				
Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:7)				

ここで：

第2位のXaaはValまたはIleである；

第7位のXaaはSerまたはThrである；

第14位のXaaはThrまたはSerである；

第15位のXaaはLeuまたはProである；

第30位のXaaはIleまたはValである；

第50位のXaaはArg、GlnまたはLysである；

第88位のXaaはValまたはLeuである；

第105位のXaaはGlnまたはGlyである；

第108位のXaaはLysまたはArgである；および

第109位のXaaはValまたはLeuである。

【0026】

本発明のヒト化抗体の好ましい重鎖可変領域は、以下のアミノ酸配列を有し、そのフレームワークは、ヒト生殖系列V HセグメントD P 5 3およびJセグメントJ H 4を起源とし、同一ヒトサブグループ内のコンセンサスアミノ酸へのいくつかのアミノ酸置換を有し、潜在的免疫原性が減少している：

30

40

【数8】

1 5 10 15
 Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 20 25 30
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 35 40 45
 Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr 10
 65 70 75
 Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa
 80 85 90
 Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp
 95 100 105
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 110
 Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:8) 20

ここで：

第1位のXaaはGluまたはGlnである；
 第7位のXaaはSerまたはLeuである；
 第46位のXaaはGlu、Val、AspまたはSerである；
 第63位のXaaはThrまたはSerである；
 第75位のXaaはAla、Ser、ValまたはThrである；
 第76位のXaaはLysまたはArgである；
 第89位のXaaはGluまたはAspである；および
 第107位のXaaはLeuまたはThrである。 30

【0027】

本発明のヒト化抗体の特に好ましい軽鎖可変領域は、以下のアミノ酸配列を有し、そのフレームワークは、ヒト生殖系列V_kセグメントD_PK₁₈およびJ_kセグメントJ_k1起源であり、同一ヒトVサブグループ内のコンセンサスアミノ酸へのいくつかのアミノ酸置換を有し、潜在的免疫原性が減少している：

【数9】

1 5 10 15
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu
 20 25 30
 Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro
 50 55 60 10
 Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 80 85 90
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
 95 100 105
 Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
 110
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg (SEQ ID NO:9) 20

。

【0028】

本発明のヒト化抗体の特に好ましい重鎖可変領域は、以下のアミノ酸配列を有し、そのフレームワークは、ヒト生殖系列VHセグメントD P 5 3およびJセグメントJH 4起源である：

【数10】

1 5 10 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 20 25 30 30
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 35 40 45
 Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75

【数11】

Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 80 85 90
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 95 100 105
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:10) 40

。

【0029】

本発明のヒト化抗体にとって好ましい軽鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

【数12】

1	5	10	15												
Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	
	20		25		30										
Gly	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Ile	
	35		40		45										10
Tyr	Ser	Asp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	His	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	
	50		55		60										
Gly	Gln	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	
	65		70		75										
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp			
	80		85		90										
Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	
	95		100		105										
Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	20
	110		115		120										
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	
	125		130		135										
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	
	140		145		150										
Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	
	155		160		165										
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	30
	170		175		180										
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
	185		190		195										
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	
	200		205		210										

【数13】

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 215
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEQ ID NO:11)

発明13

40

【0030】

本発明のヒト化抗体の好ましい重鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

【数14】

1	5	10	15	
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly				Gly Leu Val Gln Pro Gly
20	25	30		
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser				Gly Phe Thr Phe Ser
35	40	45		
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys				Gly Leu
50	55	60		10
Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr				Tyr
65	70	75		
Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn				Ala
80	85	90		
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp				
95	100	105		
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln				Gly
110	115	120		20
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val				
125	130	135		
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala				
140	145	150		
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr				
155	160	165		
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe				
170	175	180		
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val				30
185	190	195		
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys				
200	205	210		
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val				
215	220	225		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro				

【数15】

230 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	235 240	
245 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr	250 255	
260 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	265 270	
275 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys	280 285	10
290 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	295 300	
305 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	310 315	
320 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	325 330	
335 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr	340 345	20
350 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	355 360	
365 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	370 375	
380 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro	385 390	
395 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu	400 405	
410 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys	415 420	30
425 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	430 435	
440 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO:12)		

。

【0031】

他の配列は、本発明のヒト化抗体およびヒト化266の軽鎖および重鎖にとって可能である。免疫グロブリンは、二対の軽鎖／重鎖複合体を有し、少なくとも1つの鎖は、1つまたはそれ以上のヒトフレームワーク領域セグメントに機能的に結合した相補性決定領域を含む。

重鎖可変領域の56位から開始して、m266およびヒト化266の両方が、Asn-Ser-Thrを含む。この配列は、N-結合グリコシル化に対するAsn-X-Ser/Thrシグナルの一例であり、Asnが、N-結合グリコシル鎖の付着の部位である。m266およびヒト化266の両方が、この部位で頻繁にグリコシル化される。まったく予測がつかず、そして有利なことには、重鎖CDR2において脱グリコシルされるヒト化266のAペプチドに対する親和性は、ヒト化266の親和性よりも著しく高い。脱グリコシルされたヒト化266の重鎖CDR2は、以下のアミノ酸配列を有する：

40

50

【数16】

1	5	10	15												
Gln	Ile	Asn	Ser	Val	Gly	Xaa	Xaa	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly
(SEQ ID NO:13)															

ここで：

第7位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第8位のXaaがAspでもProでもなく、第9位のXaaがSerまたはThrである場合、第7位のXaaはAsnではない；

第8位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第7位のXaaがAsnであり、第9位のXaaがSerまたはThrである場合、第8位のXaaはAspまたはProである；および

第9位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第7位のXaaがAsnであり、第8位のXaaがAspでもProでもない場合、第9位のXaaはSerでもThrでもない。

【0032】

「いずれかのアミノ酸」は、天然に発生するアミノ酸のいずれかを意味する。好ましい天然アミノ酸は、Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpおよびTyrである。

【0033】

好ましい脱グリコシルされたヒト化抗体は、m266のヒト化型であり、ここで、脱グリコシルされた重鎖CDR2は、配列番号13である：

ここで：

配列番号13の第7位のXaaは、Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpおよびTyrから選ばれる、ただし、第8位のXaaがAspでもProでもなく。第9位のXaaがSerまたはThrである場合、第7位のXaaはAsnではない；

配列番号13の第8位のXaaは、Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpおよびTyrから選ばれる、ただし、第7位のXaaがAsnであり、第9位のXaaがSerまたはThrである場合、第8位のXaaはAspまたはProである；および

配列番号13の第9位のXaaは、Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpおよびTyrから選ばれる、ただし、第7位のXaaがAsnであり、第8位のXaaがAspでもProでもない場合、第9位のXaaはSerでもThrでもない。

【0034】

本発明の脱グリコシルされたヒト化抗体の好ましい重鎖可変領域は、以下のアミノ酸配列を有し、そのフレームワークは、ヒト生殖系列VHセグメントDP53およびJセグメントJH4を起源とし、同一ヒトサブグループ内のコンセンサスアミノ酸へのいくつかのアミノ酸置換を有し、潜在的免疫原性が減少しており、重鎖CDR2におけるN-グリコシル化部位は、N-グリコシル化されないように修飾される：

20

30

40

【数17】

1	5	10	15				
Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly							
				20	25	30	
				Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
				35	40	45	
				Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
				50	55	60	
				Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr			10
				65	70	75	
				Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa			
				80	85	90	
				Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp			
				95	100	105	
				Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
				110			(SEQ ID NO:14)
							20

ここで：

第1位のXaaはGluまたはGlnである；

第7位のXaaはSerまたはLeuである；

第46位のXaaはGlu、Val、AspまたはSerである；

第56位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第57位のXaaがAspでもProでもなく、第59位のXaaがSerまたはThrである場合、第56位のXaaはAsnではない；

第57位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第56位のXaaがAsnであり、第58位のXaaがSerまたはThrである場合、第57位のXaaはAspまたはProである；および

第58位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第56位のXaaがAsnであり、第57位のXaaがAspでもProでもない場合、第9位のXaaはSerでもThrでもない；

第63位のXaaはThrまたはSerである；

第75位のXaaはAla、Ser、ValまたはThrである；

第76位のXaaはLysまたはArgである；

第89位のXaaはGluまたはAspである；および

第107位のXaaはLeuまたはThrである。

【0035】

本発明の脱グリコシルされたヒト化抗体の特に好ましい重鎖可変領域は、以下のアミノ酸配列を有し、そのフレームワークは、ヒト生殖系列VHセグメントDP53およびJセグメントJH4を起源とし、同一ヒトサブグループ内のコンセンサスアミノ酸へのいくつかのアミノ酸置換を有し、潜在的免疫原性が減少しており、重鎖CDR2におけるN-グリコシル化部位は、N-グリコシル化されないように修飾される：

30

40

【数18】

1	5	10	15	
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly				
	20	25	30	
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser				
	35	40	45	
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu				
	50	55	60	
Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr				10
	65	70	75	
Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala				
	80	85	90	

【数19】

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
95	100	105	
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			20
110			
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			(SEQ ID NO:15)

ここで：

第56位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第57位のXaaがAspでもProでもなく、第59位のXaaがSerまたはThrである場合、第56位のXaaはAsnではない；

第57位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第56位のXaaがAsnであり、第58位のXaaがSerまたはThrである場合、第57位のXaaはAspまたはProである；および

第58位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第56位のXaaがAsnであり、第57位のXaaがAspでもProでもない場合、第9位のXaaはSerでもThrでもない。

【0036】

本発明の脱グリコシルされたヒト化抗体の好ましい重鎖領域は、以下のアミノ酸配列を有し、重鎖CDR2におけるN-グリコシル化部位は、N-グリコシル化されないように修飾される：

10

20

30

【数20】

1	5	10	15	
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly				
20	25	30		
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser				
35	40	45		
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu				
50	55	60		
Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr				10
65	70	75		
Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala				
80	85	90		
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp				
95	100	105		
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly				
110	115	120		
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val				20
125	130	135		

【数21】

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 140 145 150
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 155 160 165
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 170 175 180
 Pro Ala Val Leu Gin Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 185 190 195
 Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 200 205 210
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 215 220 225
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 230 235 240
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 275 280 285
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 290 295 300
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 305 310 315
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 320 325 330
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 335 340 345
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 350 355 360
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 365 370 375
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 380 385 390
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 395 400 405
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 410 415 420
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

【数22】

425	430	435
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
440		
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		(SEQ ID NO:16)

ここで：

第56位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第57位のXaaがAspでもProでもなく、第59位のXaaがSerまたはThrである場合、第56位のXaaはAsnではない；

第57位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第56位のXaaがAsnであり、第58位のXaaがSerまたはThrである場合、第57位のXaaはAspまたはProである；および

第58位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第56位のXaaがAsnであり、第57位のXaaがAspでもProでもない場合、第9位のXaaはSerでもThrでもない。

【0037】

配列番号14、配列番号15および配列番号16で示される重鎖可変領域を有する脱グリコシルされた266抗体が好ましい：

ここで：

第56位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第57位のXaaがAspでもProでもなく、第59位のXaaがSerまたはThrである場合、第56位のXaaはAsnではない；

第57位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第56位のXaaがAsnであり、第58位のXaaがSerまたはThrである場合、第57位のXaaはAspまたはProである；および

第58位のXaaはいずれかのアミノ酸である、ただし、第56位のXaaがAsnであり、第57位のXaaがAspでもProでもない場合、第9位のXaaはSerでもThrでもない。

【0038】

配列番号14、配列番号15および配列番号16で示される重鎖のCDR2（第56、57および58位）にとって好ましい配列には、単一のアミノ酸のみが変更される配列、2つのアミノ酸のみが変更される配列または3つのアミノ酸すべてが変更される配列が含まれる。第56位のAsnを置き換えるのが好ましい。第58位のThrをSer以外のアミノ酸で置き換えるのが好ましい。第57位のSerをProまたはAspで置き換えることによって266重鎖のCDR2中のN-グリコシル化部位を破壊しないのが好ましい。1箇所、2箇所または全3箇所の部位での同類置換が好ましい。第56位のAsnがSerまたはThrで置き換えられるのが最も好ましい。第56位がSerまたはThrであり、第57位がSerであり、第58位が配列番号14、配列番号15または配列番号16である抗体が特に好ましい。

特に好ましい脱グリコシルされた種類は、配列番号11の軽鎖および配列番号16の重鎖を含む抗体であり、ここで、配列番号16において、第56位のXaaはSerであり、第57位のXaaはSerであり、第58位のXaaはThrである（N56S）か、または配列番号16において、第56位のXaaはThrであり、第57位のXaaはSerであり、第58位のXaaはThrである（N56T）。

【0039】

本発明に有用な抗体の產生は、典型的には、先に引用され、全体を参考文献として本発明に援用されるPCT/US01/06191に記載の組み換え技術を含む。

臨床的または発症前アルツハイマー疾患あるいは臨床的または発症前アミロイド血管障

10

20

30

40

50

害などの A 蓄積に関連するコンディションを評価するために、標準的投与技術を用いて、静脈内、腹腔内、皮下、肺性、経皮、筋肉内、鼻腔内、頬側、舌下または坐剤投与により、好ましくは末梢的に（すなわち中枢神経系への投与によってではなく）、被験者に抗体（免疫学的反応性断片を含む）を投与する。

【0040】

投与用医薬組成物は選択される投与様式に適当であるように設計され、分散剤、緩衝液、界面活性剤、保存剤、可溶化剤、等張剤、安定化剤などの医薬に許容しうる賦形剤が適当に用いられる。全体を参考文献として本発明に援用される Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, latest edition は、概して当業者に既知の製剤化技術の概論を提供する。たとえばリポソーム内にカプセル化するか、あるいは極性基をブロックすることによって本発明の抗体の可溶性特徴を変更し、それらをより親油性にすることは特に有用である。 10

【0041】

静脈内または腹腔内または皮下注射による末梢全身性デリバリーが好ましい。このような注射に関する適当なビヒクルは簡単なものである。しかし、さらに鼻腔エアロゾルまたは坐剤を用いて、粘膜を介して投与することもできる。このような投与様式に適当な製剤は周知であり、典型的には膜を横切る移動を促進する界面活性剤を含む。このような界面活性剤はしばしばステロイド由来であり、あるいはカチオン性脂質、たとえば N-[1-(2,3-ジオレオイル)プロピル-N,N,N-トリエチルアンモニウムクロライド (DOTMA) または種々の化合物、たとえばコレステロール ヘミスクシネート、ホスファチジル グリセロールなどである。 20

【0042】

選択される特定の投与様式にしたがって、製剤中のヒト化抗体の濃度は、少なくて約 0.1 重量 % ~ 多くて 1.5 または 2.0 重量 % であり、主に液体容量、粘度などに基づいて選択される。したがって、典型的な注射用医薬組成物は、リン酸緩衝化塩類溶液の 1 mL 減菌緩衝水および本発明のヒト化抗体 1 ~ 1000 mg、好ましくは 10 ~ 100 mg を含有して構成され得る。この製剤は、製剤の作成後に滅菌ろ過するか、あるいは微生物学的に許容されるものにすることができる。典型的な静脈内注入用組成物は、1 ~ 250 mL 量の液体、たとえば滅菌リンガー溶液、および 1 ~ 100 mg / mL またはそれ以上の抗体濃度を有し得る。本発明の治療剤は保存用に凍結あるいは凍結乾燥することができ、使用前に適当な滅菌担体中に再組成することができる。凍結乾燥および再組成は、抗体活性喪失の程度を変化させ得る（たとえば慣用的免疫グロブリンでは、IgM 抗体は IgG 抗体より大きな活性喪失を示す傾向がある）。用量を調節して補正する必要がある場合もある。製剤の pH は、抗体の安定性（化学的および物理的）および投与時の患者に対する苦痛のなさのバランスをとって択される。一般に、4 ~ 8 の範囲の pH が寛容される。 30

【0043】

タンパク質、たとえばヒト化抗体の投与には、前記方法が最も都合がよく、最も適当であると思われるが、適当な適合化により、適正な製剤されれば、他の投与技術、たとえば経皮投与および経口投与を用いることができる。

【0044】

さらに、生物分解性フィルムおよびマトリクス、または浸透性ミニポンプ、またはデキストランビーズ、アルギナート、またはコラーゲンに基づくデリバリー系を利用する制御放出製剤を用いるのが望ましいこともある。

まとめると、製剤は、本発明の抗体の投与に利用可能であり、当分野に周知であり、種々のオプションから選択することができる。

典型的な投与量は、標準的臨床技術を用いて最適化することができ、これは投与の様式および患者の症状に応じる。

【0045】

被検者に抗体を投与した後、分、時間、日にわたって定期的に血液サンプルを採取する。適当な期間は、2,3 分、10 分、30 分または 1 時間であり、あるいは数時間もしく 50

は数日が経過した後に血液サンプルを採取してもよい。3時間以内に測定するのが好ましい。必要に応じて、分析を簡略化するために、血漿フラクションを得ることができる。A₄₀、A₄₂およびそれらの比率のための標準的分析技術を用いる。これらの技術は、たとえば、米国特許第5,766,846号に記載されている。しかし、クロマトグラフィー分離、ウエスタンプロッティング、ELISAアッセイ、ホモジニアスアッセイなどの分析のためのいずれかの適当な技術を用いることができる。

【0046】

次いで、A₄₀、A₄₂の濃度またはその比率を、コントロールの値と比較する。典型的なコントロールは、10代の若者または非常に若い成人などのアミロイドplaquesに関連するコンディションに該当しないことがわかっている個体であり、さらには、一般集団からの平均値による年齢に適合して認知的に正常なコントロールが得られる。初老の年齢に適合して認知的に正常なコントロールは、発症前ADであることもあるが、大部分はそうではない。したがって、このような集団からの平均値を得ることは、有用であり、重要である。標準コントロールの設計は、当業者には周知のプロセスである。次いで、コントロール値と比較して、当該ペプチドのレベルまたはA₄₂に対するA₄₀の比率が上昇している個体を、アミロイドplaquesの形成に関連する臨床的または発症前コンディションの確率が高いものとして同定する

【0047】

本発明のアッセイを実行するための構成要素をパッケージングして便利なキットにするのが望ましい。このようなキットは、採取された血液サンプルにおいてアッセイを行うための、投与される抗体のサンプルならびに適当な試薬を含むボトルまたはバイアルなどの容器を含む。キットは、さらに、アッセイを行うための指示書および、必要に応じて、コントロール値のチャートを含む。

【0048】

以下の実施例は本発明を制限するためのものではなく、例示するためのものである。

本明細書中以下の実施例は、特に、元々、ヒトAペプチドの残基13-28から構成されるペプチドを用いる免疫化によって製造された「266」と称されるマウスモノクローナル抗体を用いる。この抗体はこのペプチドと免疫反応することが確認されているが、ヒトAペプチドの残基17-28のみを含有するペプチド、またはAペプチド内の任意の他のエピトープにおいては反応しないことが以前に報告されている。この抗体の製造は、引用により本明細書中に包含される米国特許5,766,846に記載されている。本明細書中の実施例はマウス系において行われた実験を記載しているので、マウスモノクローナル抗体の使用で十分である。しかし、ヒトにおける使用を意図される本発明の処置方法では、抗体266の免疫特異性に対応する免疫特異性を有するヒト化型の抗体が好ましい。

【実施例】

【0049】

実施例1

循環ペプチドレベルとplaquesの相関関係

これらのアッセイには、アルツハイマー病のマウスモデルであるAPP V717Fトランスジェニックマウスを用いる。これらのマウスは、Games、D.ら、Nature (1995) 373:523-527; Bales、K.R.ら、Nature Genet. (1997) 17:263-264; およびHoltzman、D.M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2000) 97:2892-2897に記載されている。このモデルにおいては、突然変異型のヒトAPP遺伝子が発現され、結果として早期発症型の家族性アルツハイマー病になる。これらのマウスの脳は、最初は正常と思われるが、6~15ヶ月で広汎な老人斑の形状でA₄₂蓄積が生じる。トランス遺伝子に対してホモ接合型のマウスは、9~14ヶ月齢において変異性を示すが、他のマウスが発症していないのにA₄₂蓄積を発症させるマウスもある。

この実験には、12ヶ月齢の53匹のホモ接合型マウスを用いた。

【0050】

10

20

30

40

50

500 μ g の m 266 の投与前およびこの抗体の投与後の 24 時間以内の種々時間間隔において、ELISA によって、これらのマウス血漿における A₄₀、A₄₂ の血漿レベルおよび A₄₀ / A₄₂ の比率を測定した。DeMattos ら Proc. Nat'l. Acad. Sci USA (2001) 98:8850-8855 に記載されているように、24 時間後にマウスを屠殺し、脳内の A 蓄積量を海馬および皮質において評価し、A 蓄積によって被覆された脳のパーセンテージとして評定した。

【0051】

図 1 の A、B および C に示すように、抗体投与前に、y 軸の血漿中の各ペプチドのレベルおよびそれらの比率に対して、海馬における蓄積による A 被覆パーセンテージを x 軸にプロットする場合には、相関関係は見出されない。A 蓄積 % が本質的にゼロであるかまたは 75 % 以上であるかどうかに問わらず、A₄₀ の平均レベルはおよそ 250 (pg / ml) であり、A₄₂ の平均レベルはおよそ 400 (pg / ml) である。したがって、A₄₂ に対する A₄₀ の比率は、およそ 0.5 ~ 0.6 であった。

しかし、図 2 の A、B および C に示すように、A₄₀ の血漿レベルは、m 266 注射後 1 時間での海馬における A 蓄積のパーセンテージと強く相関し、A₄₂ に対する A₄₀ の比率に関しても同様であった。

【0052】

図 3 の A、B および C は、注射後 24 時間で得られた同様の結果を示す。得られた A₄₀ のレベルおよび A₄₀ / A₄₂ 比率は、海馬における A 蓄積 % と相関した。A₄₀ レベルのみならず、A₄₂ レベルも A 蓄積 % と相関した。

図 4 の A、B および C は、血漿への 2 つの A ペプチドの侵入速度に関する同様な結果およびこれらのペプチドの比率の関数として侵入速度について計算された値を示す。A 蓄積と最も相関するのは、A₄₀ の侵入速度および A₄₀ / A₄₂ の比率である。

図 5 の A および B は、注射後 24 時間および 1 時間の血漿 A₄₀ レベルのデータについての別の表現を示す。海馬における A 被覆の度合いを低、中または高のグループに分けた場合、A 蓄積が低い動物は、血漿 A₄₀ レベルの関数として、高蓄積の動物から完全に区別することができた。

【0053】

実施例 2

実施例 1 で示した実験と同様の実験において、同世代の 49 匹のホモ接合型 APP V717F マウスを用いた。500 μ g の m 266 の静脈内注射の前後に、5 分、1 時間、3 時間、6 時間および 24 時間の時点で血漿サンプルを採取し、実施例 1 に記載したように、A₄₀ および A₄₂ のレベルを評価した。24 時間後にマウスを屠殺し、A ペプチドによって占められた海馬または帯状皮質の領域（定量的 A 免疫蛍光染色を用いる）およびアミロイドによって占められた領域（チオフラビン - S (アミロイド) 染色）のパーセンテージについて一方の半球を評価した。

【0054】

他方の半球からの領域を、ELISA によって A ペプチドについて評価した。

GraphPad Prism software (version 3.00 for Windows, San Diego, USA) を用いて、血漿 A 値 (m 266 の注射の前後) と海馬 A またはアミロイド負荷の間で Pearson 相関係数 (Pearson r) および有意性 (P 値) を決定した。A 負荷は、A 免疫反応性蓄積によって被覆された海馬の領域パーセンテージとして定義される。アミロイド負荷は、チオフラビン - 陽性蓄積によって被覆された海馬の領域パーセンテージとして定義される。24 時間にわたっての血漿 A 蓄積 (曲線下領域、AUC) と海馬 A 負荷またはアミロイド負荷との間の相関関係も決定した。

【0055】

図 6 は、得られた結果を示す。簡単に述べると、ベースラインレベル (注射前) の A₄₀、A₄₂ および m 266 注射前の計算された A₄₀ / A₄₂ 比率が、A またはアミロイド蓄積のパーセンテージと相関しないことが見出された。しかし、m 266 の投与後、海馬および帯状皮質において、血漿 A₄₀、A₄₂ および A₄₀ / A₄₂ 比率と A およびアミロイド蓄積のパーセンテージと相関する。

イド負荷の両方との間に有意な相関関係があった。

結果の統計分析から、m 2 6 6 注射後 2 4 時間での血漿 A_{40} レベルに基づいて、これらのマウスにおける海馬 A β 負荷の正確な予測ができることがわかる。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図 1】図 1 の A、B および C は、抗体 m 2 6 6 の投与前のトランスジェニックマウスの血漿中の A_{40} (図 1 A)、 A_{42} (図 1 B) のレベルおよび A_{40} / A_{42} 比率 (図 1 C) ならびに脳 A_{β} 蓄積との相関関係の欠如を示すグラフである。

【図 2】図 2 の A および B は、抗体 m 2 6 6 の注射後 1 時間のトランスジェニックマウスの血漿 A_{40} (図 2 A) および血漿 A_{40} / A_{42} 比率 (図 2 B) ならびに脳 A_{β} 蓄積との有意な相関関係を示すグラフである。

【図 3】図 3 の A、B および C は、モノクローナル抗体 m 2 6 6 の注射後 2 4 時間の 2 つの A β ペプチド (図 3 A および 3 B) およびその比率 (図 3 C) と脳内 A_{β} 蓄積との有意な相関関係を示すグラフである。

【図 4】図 4 の A、B および C は、2 つの A β ペプチドの循環への侵入速度 (図 4 A および 4 B) およびその比率 (図 4 C) とトランスジェニックマウスにおける A β ペプチド蓄積との有意な相関関係を示すグラフである。

【図 5】図 5 の A および B は、 A_{β} 蓄積によって被覆された海馬のパーセンテージと相関させた m 2 6 6 の注射後 2 4 時間 (図 5 A) および 1 時間 (図 5 B) の血漿中の A_{40} レベルの別の図示的表現を示すグラフである。

【図 6】図 6 は、血漿 A_{β} 値 (m 2 6 6 注射前および後) と海馬 A_{β} またはアミロイド負荷との間で決定された Pearson 相関係数 (Pearson r) および有意性 (P 値) を示す表である。

10

20

20

【図 1】

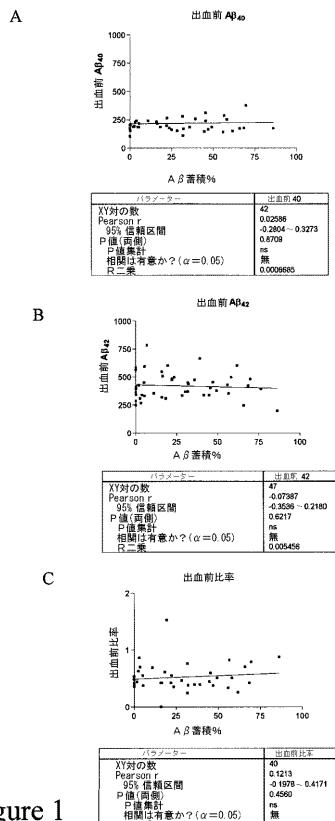


Figure 1

【図 2】

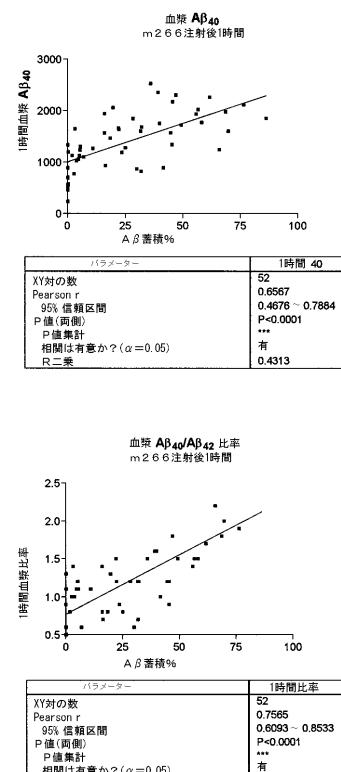


Figure 2

【図3】

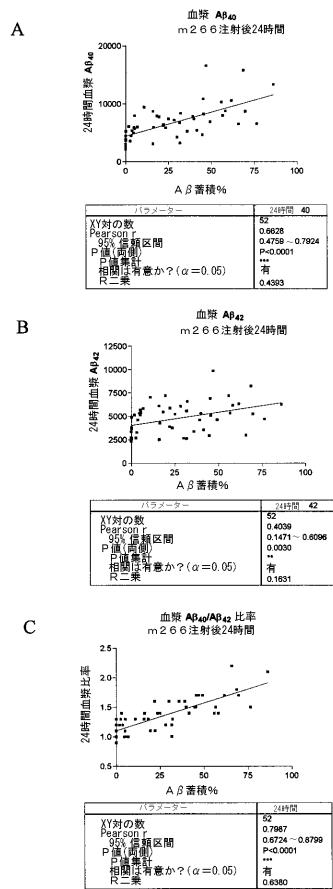


Figure 3

【図5】

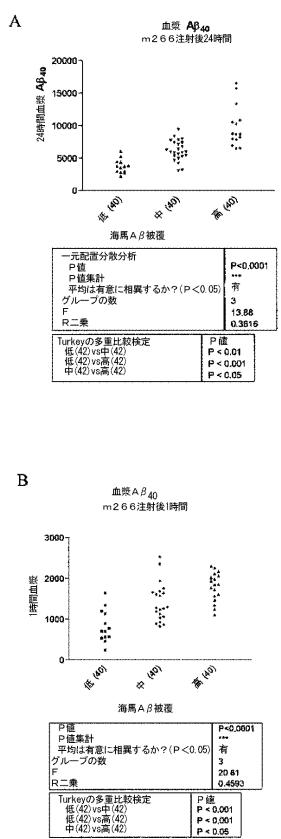


Figure 5

【図4】

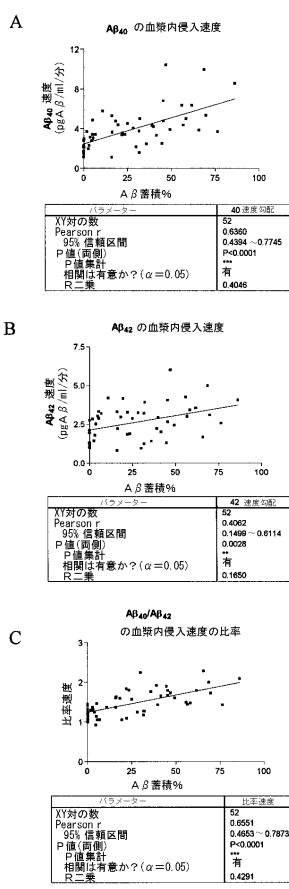
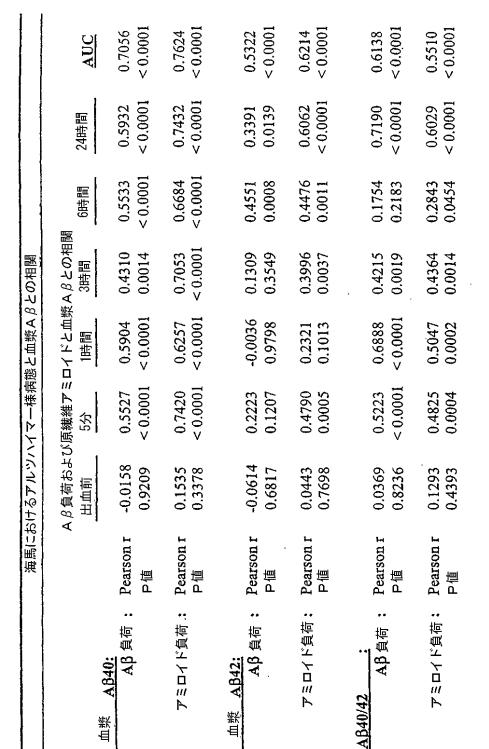


Figure 4

【図6】



6/6

Figure 6

【配列表】

0004511830000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/334,987

(32)優先日 平成13年10月23日(2001.10.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100087114

弁理士 斎藤 みの里

(74)代理人 100100158

弁理士 鮫島 瞳

(74)代理人 100138900

弁理士 新田 昌宏

(74)代理人 100162684

弁理士 吳 英燐

(72)発明者 デイビッド・エム・ホルツマン

アメリカ合衆国6 3 1 4 1 ミズーリ州セント・ルイス、サンウェイ・レイン3 6 8番

(72)発明者 ロナルド・デマットス

アメリカ合衆国6 3 1 0 8 ミズーリ州セント・ルイス、ウエスト・パイン・ブルバード4 9 4 9

番、アパートメント・ナンバー1 2 エス

(72)発明者 ケリー・アール・ペイルズ

アメリカ合衆国4 6 1 2 0 インディアナ州クローバーデイル、サウス・1 0 0 0 ・イースト6 3 7
6 番

(72)発明者 デイビッド・ジェイ・カミンズ

アメリカ合衆国4 6 2 5 6 インディアナ州インディアナポリス、キャッスルブルック・ドライブ8
3 5 0 番

(72)発明者 スティーブン・エム・ポール

アメリカ合衆国4 6 0 3 2 インディアナ州カーメル、ローレルウッド1 1 4 5 番

審査官 廣田 健介

(56)参考文献 国際公開第0 0 / 0 7 2 8 8 0 (WO , A 2)

特表平0 8 - 5 0 2 5 8 7 (JP , A)

国際公開第0 0 / 0 7 5 3 2 8 (WO , A 1)

Pankaj D et al. , Plasma and Cerebrospinal Fluid Levels of Amyloid Proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer Disease , Arch Neurol. , 2 0 0 0 年 , vol. 57 , 94-99

FREDERIQUE BARD et al. , Peripherally administered antibodies against amyloid -peptid e enter the central nervous system and reducepathology in a mouse model of Alzheimer disease , NATURE MEDICINE , 2 0 0 0 年 8 月 , VOL. 6, NUMBER 8 , 916-919

Peter Seubert et al. , Isolation and quantification of soluble Alzheimer's-peptide from biological fluids , Nature , 1 9 9 2 年 9 月 2 4 日 , vol. 359 , 325-327

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/48-33/98

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)