

(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2005-500389
(P2005-500389A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int.Cl.⁷**A 61 K 39/395****A 61 P 25/28**

F 1

A 61 K 39/395

A 61 K 39/395

A 61 P 25/28

テーマコード(参考)

4 C 0 8 5

D

K

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 125 頁)

(21) 出願番号	特願2003-521776 (P2003-521776)	(71) 出願人	590005922 イーライ・リリー・アンド・カンパニー E L I L I L L Y A N D C O M P A N Y アメリカ合衆国 46285 インディアナ州 インディアナポリス市、リリー・コーポ レイト・センター
(86) (22) 出願日	平成14年8月14日 (2002.8.14)	(74) 代理人	1000683526 弁理士 田村 恭生
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月17日 (2004.2.17)	(74) 代理人	100103230 弁理士 高山 裕貢
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/021324	(74) 代理人	100087114 弁理士 斎藤 みの里
(87) 國際公開番号	W02003/016467		
(87) 國際公開日	平成15年2月27日 (2003.2.27)		
(31) 優先権主張番号	60/313,576		
(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	60/383,851		
(32) 優先日	平成14年5月28日 (2002.5.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A β に関する病態および疾患を治療するための、可溶性 A β に高い親和性を有する抗体の使用

(57) 【要約】

本発明は、A ペプチドに関する病態または疾患を有する被検体の治療方法を提供し、この方法は被検体に A β を認識する抗体を投与することを含み、この抗体は可溶性 A β に 10^{-9} M よりも高い親和性を有する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被検体における A に関連した病態または疾患の認知症状の治療方法であって、可溶性 A に 10^{-9} Mよりも高い親和性を有する抗 A 抗体を有効量で被検体に投与することを含む方法。

【請求項 2】

A に関連した病態または疾患を有する被検体の疾患の進行を低下させる方法であって、可溶性 A に 10^{-9} Mよりも高い親和性を有する抗 A 抗体を有効量で被検体に投与することを含む方法。

【請求項 3】

被検体における A に関連した病態または疾患の認識症状の治療方法であって、可溶性 A 1-40またはA 1-42に 10^{-9} Mよりも高い親和性(KD)を有する抗 A 抗体を有効量で被検体に投与することを含む方法。

【請求項 4】

A に関連した病態または疾患を有する被検体の疾患の進行を低下させる方法であって、A 1-40またはA 1-42に 10^{-9} Mよりも高い親和性(KD)を有する抗 A 抗体を有効量で被検体に投与することを含む方法。

【請求項 5】

被検体における A に関連した病態または疾患の認知症状の治療方法であって、可溶性 A 抗体に対して 266が有する親和性よりも高い親和性を有する抗 A 抗体を有効量で投与することを含む方法。

【請求項 6】

A に関連した病態または疾患を有する被検体の疾患の進行を低下させる方法であって、可溶性 A に対して抗体 266が有する親和性よりも高い親和性を有する抗 A 抗体を有効量で投与することを含む方法。

【請求項 7】

抗 A 抗体が可溶性 A に対して 10^{-10} Mよりも高い親和性を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

抗 A 抗体が可溶性 A に対して 10^{-11} Mよりも高い親和性を有する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

抗 A 抗体が可溶性 A に対して 10^{-12} Mよりも高い親和性を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

抗 A 抗体の親和性が可溶性 A 1-40またはA 1-42について測定されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

被検体がヒトであり、抗 A 抗体がヒトまたはヒト型抗体である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

抗 A 抗体が、抗体 266が認識するエピトープと同じエピトープを認識するか、または可溶性 A への結合に関して抗体 266と競合する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

病態または疾患がアルツハイマー病である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

病態または疾患がダウン症である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

病態または疾患が、大脳アミロイド脈管障害である、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

病態または疾患が脈管性痴呆である、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

病態または疾患が軽度の認知障害である、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

Aに関連した病態または疾患の認知症状を治療するための医薬を製造するための、可溶性A 1-40またはA 1-42に対して 10^{-9} Mよりも高い親和性(KD)を有する抗A抗体の使用。

10

【請求項19】

Aに関連した病態または疾患を有する被検体の疾患の進行を低下させるための医薬を製造するための、可溶性A 1-40またはA 1-42に対して 10^{-9} Mよりも高い親和性(KD)を有する抗A抗体の使用。

【請求項20】

Aに関連した病態または疾患を有する被検体の認知症状を治療するための医薬を製造するための、可溶性Aに対して抗体266が有するよりも高い親和性を有する抗A抗体の使用。

【請求項21】

Aに関連した病態または症状を有する被検体の疾患の進行を低下するための医薬を製造するための、可溶性Aに対して抗体266が有するよりも高い親和性を有する抗A抗体の使用。

20

【請求項22】

請求項1～17のいずれか1項に記載の方法で用いる医薬を製造するための、抗A抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は米国仮出願出願番号60/313,576(2001年8月17日出願)および米国仮出願出願番号60/383,851(2002年5月28日出願)の優先権を主張する(これらは両方とも、特に本明細書中に参照して組み込む)。

30

【0002】

本発明は医薬の分野におけるものである。より具体的には、本発明はAペプチドに関連した病態および疾患(アルツハイマー病、ダウン症、大脳アミロイド脈管障害、軽度の認知欠陥等)の治療の分野にある。

【背景技術】

【0003】

A内の特定のN末端エピトープを認識する抗体(凝集型A 1-42に対して惹起されたポリクローナル抗体、およびモノクローナル抗体3D6および10D5等)の長期(数ヶ月)にわたる投与は、PDAPPマウスの脳におけるアミロイド斑を減少させた[Bardら、Nature Med. 6:916-919 (2000); Schenkら、W000/72880、2000年12月7日]。Schenkは、抗体がAに対して 10^6 M⁻¹, 10^7 M⁻¹, 10^8 M⁻¹, 10^9 M⁻¹または 10^{10} M⁻¹よりも高い親和性を有する選択性の記載にもかかわらず、斑の減少の効力は凝集型Aに対する抗体親和性に関連しないことを見出した。これらの親和性は、凝集型Aに対する親和性に関するものに違いない。なぜならば、1)凝集型Aに関する親和性が特異的抗体に関する開示に具体的に記載されている唯一の親和性であり、2)この開示はワクチン接種用の凝集型Aによる活性な免疫化を報告しており、3)この開示は、凝集型Aに対して惹起されたポリクローナル抗体、または他の抗A抗体での受動免疫の後のA斑の減少には、斑中の凝集型Aへの抗体の接着と、それに続く細胞媒介性の斑のクリアランスを必要とする、ということを報告しているからである。

40

50

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

種々の研究が、凝集型Aの投与が、アルツハイマー病の動物モデルへの長期投与(数週間～数ヶ月)後に記憶および認知に関する種々の試験における能力を改善することを示した[Weinerら、Ann. Neurol. 48:567-579 (2000)；Janusら、Nature 408:979-982 (2000)；Morganら、Nature 408:982-985 (2000)]。しかしながら、これらの研究者は、凝集型A、そしておそらく凝集型Aに対して得られたポリクローナル抗体を用いた。認知を改善するために明らかにいくらか有効であるこのような処置は、非常に長期的なものであり、効率の悪いものである。さらに、抗原としてのA型の使用は有害なものであるかもしれません、制御し難く、被検体間で非常に多様な免疫反応を生じる。

【0005】

DeMattosら[Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 98:8850-8855 (2001)]は、抗体266[Seubertら、Nature 359:325-327 (1992)]または4G8 [Shojoら、Science 258:126-129 (1992)](Aの13位から28位の間のアミノ酸のエピトープを認識する抗体)の投与後のA抗体複合体を同定した。Aの他の部分を認識する抗体を投与した場合は、可溶性Aに対して4G8と同様の親和性を有する場合でさえ、複合体は観察されなかった。Aの13～28の領域中のエピトープを認識する抗体は、複合体の形成を引き起こし、血漿中のAを隔離(隔絶)すると結論付けられた。Aに対する抗体の親和性は、血漿中のAの隔離に重要な因子ではないと考えられた。また、DeMattosは、266の投与が、投与後数時間以内にCNSから血漿への迅速で大量のAの流入を引き起こすことを示した。

【課題を解決するための手段】**【0006】**

今回、本発明者らは、抗体の投与後、最初の24時間以内でのAの流入速度が可溶性Aに対する抗体の親和性に関連していること、および可溶性Aに対してより高い親和性を有する抗体がより迅速な可溶性Aの流入を引き起こすことを見出した。最も驚くべきことに、認知能力の迅速な回復が特定の抗体の投与後24時間以内に観察された。相対的な回復の程度は、最初の24時間以内の可溶性Aの流入速度、および可溶性Aに対する抗体の親和性に相關していた。

【0007】

本発明は、以前は認識されておらず、先行技術からは推論されていなかった、抗A抗体の重要な特性に対する初めての認識に由来する(事実、有効な抗A抗体の重要な特性は、認識する特定のエピトープ(例えば、N-末端)または凝集型Aに対する抗体の親和性のいずれかであると教示されていた)。新しく認識された、抗A抗体の重要な特性は、可溶性型のAに対する親和性である。可溶性Aに対してより高い親和性を有する抗体は、Aペプチドに関連する病態または疾患の処置においてより有効である。

【発明の効果】**【0008】****発明の要旨**

したがって、本発明はAペプチドに関連した病態(状態)または疾患を有する被検体の治療方法を提供し、この方法はAを認識する抗体を被検体に投与することを含み、この抗体は可溶性Aに対して 10^{-9} Mよりも高い親和性を有する。より具体的には、本発明は、被検体におけるAに関連した病態または疾患の認知症状の治療方法であり、可溶性Aに対して抗体266が有するよりも高い親和性を有する抗A抗体を有効量で被検体に投与することを含む。より具体的には、親和性はA1-40またはA1-42に関するものである。

【0009】

本発明は、Aに関連した病態または疾患を有する被検体における疾患の進行を低下(減少)させる方法に関し、この方法は可溶性Aに対して 10^{-9} Mよりも高い親和性を有する抗A抗体を有効量で被検体に投与することを含む。より具体的には、本発明はAに関連

10

20

30

40

50

した病態または疾患を有する被検体における疾患の進行を低下させる方法であり、この方法は可溶性 A に対して抗体266が有する親和性よりも高い親和性を有する抗 A 抗体を有効量で被検体に投与することを含む。より具体的には、親和性は A 1-40またはA 1-42に関するものである。

【 0 0 1 0 】

また、本発明は、被検体における A と関連した病態または疾患の認知症状の治療方法を含み、この方法は、可溶性 A 1-40またはA 1-42に対して、 10^{-9} Mより高い、より具体的には抗体266の親和性よりも高い親和性を有する抗 A 抗体を有効量で被検体に投与することを含む。

【 0 0 1 1 】

A に関連した疾患の進行を低下させる、またはA に関連した病態または疾患の認知症状を治療するための医薬を製造するための、可溶性 A 1-40またはA 1-42に対して 10^{-9} Mよりも高い親和性(すなわち、抗体266よりも高い親和性)を有する抗 A 抗体の使用もまた、含まれる。さらに具体的には、本発明は、可溶性 A に対して抗体266が有するよりも高い親和性を有する抗 A 抗体の、A に関連した病態または疾患を有する被検体の、認知症状を治療するため、または疾患の進行を低下させるための医薬の製造における使用に関する。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 2 】

発明の詳細な説明

「認知(認識)(cognition)」は、短期記憶、長期記憶、精神集中(abstraction)、判断、言語、応用(練習)(praxis)、空間能力、行動または人格(personality)を意味する。認知は、広範な種々の試験のいずれか[Weinerら、Ann. Neurol. 48:567-579 (2000)；Janusら、Nature 408:979-982. (2000)；Morganら、Nature 408:982-985 (2000)；Dodartら、Neuro report. 8:1173-1178 (1997)]および本明細書中に記載の方法を用いて非ヒト被検体で評価することができる。ヒトにおける認知は、以下に記載の試験のいずれか、およびアルツハイマー病評価尺度認知下位尺度(ADAS-Cog)(Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive subscale)構成要素[Rosenら、Am J Psychiatry 141 : 13561364 (1984)]のような試験を用いて評価することができる。ADAS-Cogは、痴呆を有する患者の記憶、言語能力および他の認知機能を簡単に評価する70ポイント試験である。

【 0 0 1 3 】

「被検体」は、哺乳動物、好ましくはヒトを意味する。被検体が、被検体の脳における毒性型および/または集積した可溶性 A の存在により、引き起こされるか、またはこれらに関連した認知欠損または精神異常を有する場合に、被検体は本発明の恩恵を被る。被検体の脳における A の性質または濃度が確実に分っていないとしても、A 関連疾患に罹患していると推測されるか、または知られている被検体を周知の認知試験で処理することは、本発明の方法の恩恵を受ける多数の被検体を同定するのに十分である。他の被検体に関しては、臨床評価、被検体病歴およびおそらく実験室または他の診断評価の組み合わせが、本発明の利益を受け得る被検体の同定に必要かもしれない。

【 0 0 1 4 】

言語、記憶、視覚空間機能、実行機能(予め獲得した情報、複数処理(multitasking)、抽象概念、判断力、計算力などを操作する能力)、人格および機嫌のような認知領域の精神状態の試験は、おそらく本発明により利益を受ける被検体を同定する際に助けとなる。見込み(probable)ADの診断の判断基準を満たす被検体(すなわち、痴呆、40～90歳、2つ以上の認知領域の認知欠損、6ヶ月より長い欠損の進行、意識障害および他の妥当な診断の欠如)は、本発明により利益を受ける。同様に、ダウン症を有する被検体は本発明により利益を受ける。

【 0 0 1 5 】

ミニメンタル簡易痴呆検査(Mini-Mental State Examination)(MMSE)は、年齢および教育について調整された基準とともに、広く用いられている[Folsteinら、J. Psych. Res. 12

10

20

30

40

50

:196-198 (1975) ; Anthonyら、Psychological Med. 12: 397-408 (1982) ; Cockrellら、Psychopharmacology 24: 689-692 (1988) ; Crumら、J. Am. Med. Assoc'n 18:2386-2391 (1993)]。MMSEは成人における認知状態の、簡単な定量的測定である。認知欠損をスクリーニングするため、所定の時点での認知障害の重篤度を推定するため、時間経過にわたる個体の認知変化の経過を追跡するため、および治療に対する個体の反応を立証するために用いることができる。被検体の認知評価には、9ヶ月以上間を空けた追跡試験による正式な神経心理学試験が必要かもしれない(ヒトの場合)。本発明により処置される「認知症状」は、本明細書中に記載の通り、A に関連した病態および疾患と関連していることが公知である認知欠損である。

【0016】

10

検査室評価または構造的画像化研究により、可逆的な認知障害の原因を同定することができるかもしれません(おそらく本発明に反応しない)、そして局所性病変である脈管性痴呆に関係した重篤な白質疾患(重篤な一時的な萎縮)が同定されるかもしれません。ADでは、ポジトロン断層撮影法(PET)またはシングルフォトン断層撮影法(SPECT)等の機能研究は、通常、頭頂葉および側頭葉の両方で最も顕著な異常を示す。これらの研究は、通常の加齢に由来する初期のADまたは頭側頭葉型変性を区別する際に特に有用である。これらは、本発明により利益を受ける可能性のある被検体を同定するためには必要ではない。しかしながら、構造的画像化により決定される中央部の一時的な萎縮と、機能的画像化で測定される頭頂部欠損の組み合わせは、ADの有用なバイオマーカーである。MRIは、重篤な脳血管疾患を有する被検体を排除するために用いることができる。

20

【0017】

ApoE遺伝子型決定は独立して有用ではないが、患者がE4対立遺伝子を有さず診断が疑問視される場合に、診断の特異性を上げることができる。別の強力なバイオマーカーは、脳脊髄液(CSF) A 42およびtau濃度の複合評価である。低いA 42および高いtau濃度は、見込み(推定)ADという臨床診断に基づいて高い予測値(90%)およびネガティブ予測値(95%)を有する。

【0018】

30

「A に関連した病態または疾患」は、1)脳の中のアミロイド斑の発生、2)異常形態のA の合成、3)特に毒性形態のA の形成、または4)異常な速度のA の合成、分解またはクリアランス、に関連している病態および疾患を意味する。臨床的および発症前のアルツハイマー病、ダウン症候群、大脳アミロイド脈管障害、特定の血管性痴呆および軽度認知障害のような病態および疾患が、A との関連を有することが知れられているか推定されている。「疾患の進行」は、病態または疾患の兆候または症状が経時に悪化することを意味する。

【0019】

上記のアルツハイマー病は、A に関連する最も多い疾患である(痴呆の60~80%)。ADの明確な診断は、現在、検死を用いてのみ可能である。しかし、見込みADの診断はAD病理と非常に関連している。血管性痴呆(VaD)、レビー小体を伴う痴呆(DLB)および前頭側頭型痴呆(FTD)を合わせると痴呆の約15%~20%を占め、他の障害(たとえば、水頭症、ビタミンB12欠乏症)は約5%を占める。これらのうち、特定の血管性痴呆のみが顕著なA 成分を有すると疑われる。

40

【0020】

しばしばADへと進行する、認知問題に関する危険性の上昇または初期の徴候は、軽度認知障害(MCI)と称される。MCIは、記憶欠損により特徴付けられる臨床概念であり、他の認知領域における重篤な機能不全および日常生活動作(ADL)機能の障害は伴わない。MCIの初期の診断および治療(本発明の使用を含む)が重要である。MCIを有する被検体の30~50%が3~5年以内にADを発症しているので、病状発現前のADの現在最も良い予測物は、MCIの診断である。被検体がADを発症すると推測することができるMCIの形態上の相関物の1つは海馬の体積である。MCIを有する被検体は年齢が同等のコントロールよりも小さい海馬を有しており、より迅速な速度で構造体の萎縮を受けると思われる。

50

【0021】

「投与」は、製薬薬剤の被検体体内への導入行為を意味する。非経口経路は、本発明の方法における抗体の好ましい投与経路である。好ましい非経口経路としては、皮下、静脈内および腹腔内が挙げられる。

【0022】

「有効用量」は、被検体に投与した場合に認知の改善を引き起こす抗体の量を意味する。有効用量での抗体の量は、熟練した医師または臨床薬理学者により、被検体の体重、年齢、性別、A が関連する病態または疾患の重篤度、可溶性 A に対する抗体の親和性、投与経路、ならびに医師および薬理学者に周知の同様の因子、を考慮に入れて容易に決定することができる。有効用量は、例えば、抗体の総重量(グラム、ミリグラムまたはマイクログラム等)または抗体対体重の重量比(キログラムあたりのグラム(g/kg)、キログラムあたりのミリグラム(mg/kg)またはキログラムあたりのマイクログラム(μg/kg)等)で表すことができる。本発明の方法での抗体の有効用量は、1 μg/kg ~ 100mg/kgの範囲である。本発明における有効用量に関してより好ましい範囲は、1 μg/kg ~ 30 mg/kgの間である。さらにより好ましい範囲は、1 μg/kg ~ 10 mg/kg、1 μg/kg ~ 10 mg/kg、1 μg/kg ~ 1 mg/kg、1 μg/kg ~ 0.3 mg/kg、および1 μg/kg ~ 0.1 mg/kgである。

10

【0023】

「A ペプチド」および「A 」は、タンパク質分解切断によるアミロイド前駆体タンパク質(「APP」 - アルツハイマー病アミロイドA4タンパク質[前駆体])に由来するペプチドを意味する。全長 A ペプチドは、例えば、ヒトでは39 ~ 43アミノ酸長である。全長 A ペプチドはさらにインビボ切断をうけて、N末端、C末端または両方で1 ~ 数アミノ酸だけさらに短い A フラグメントを生じ得る。可溶性全長 A ペプチドまたはそのフラグメントを抗原として用いて、高い特異性および親和性で可溶性 A ペプチドに結合する抗体を惹起させることができる。例えば、この目的のために用いられる多数の A ペプチドフラグメントの中でも、A 13-28フラグメント(β-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを介して抗CD3抗体と結合している)を用いて抗体266を惹起させた[Seubertら、Nature 359:325-327 (1992)]。可溶性 A の選択的測定のための抗体266の使用は周知である[Schenkら、米国特許番号5,593,846、5,766,846、5,872,672および6,284,221 B1]。「可溶性 A 」への結合の評価は、本明細書中以下に記載するように非凝集形、主に単量形の A を用いて行う。

20

30

【0024】

「抗 A 抗体」との表現は、可溶性 A に結合する抗体を意味する。好ましくは、抗体は可溶性 A に高い親和性で結合する。抗体266の親和性よりも高い親和性が好ましい。 10^{-9} Mよりも高い親和性が好ましい。 10^{-10} Mよりも高い親和性がより好ましい。 10^{-11} Mよりも高い親和性がさらにより好ましい。 10^{-12} Mよりも高い親和性が非常に好ましい。文中の用語「A 」は、インビボでのタンパク質分解によるAPPタンパク質由来の39、40、41、42および43アミノ酸ペプチド、およびこれらのペプチドの任意のフラグメント[例えば、これらのペプチドに由来するN末端で短くしたペプチド(例えば、x-42(x = 1、2、3)で示されるもの等)、1-39、40、41および42ペプチドに由来するC末端で短くしたペプチド、両方の末端で短くしたペプチドのようなペプチド]を含む。表現「A 40」は、40位で終了する、A C末端でのみ結合する抗体に結合するペプチドを表すために用いられる。表現「A 42」は、42位で終了するA C末端でのみ結合する抗体に結合するペプチドを意味する。

40

【0025】

「親和性」は、1つの抗原結合部位の抗原性決定基との結合の強さを意味する。抗体と単独のハプテンまたは抗原決定基との間の結合の強さの基準である。親和性は抗体結合部位と抗原決定基との間の立体科学的な適合の親密さ、それらの接触領域のサイズ、および荷電基および疎水性基の分布に依存する。「アビディティ(親和力)」の概念を含み、これは可逆的な複合体形成の後の抗原抗体結合の強さを意味する。抗体親和性を測定するための最も直接的な方法は、周知の平衡透析法である。平衡透析よりも必要とする時間または材

50

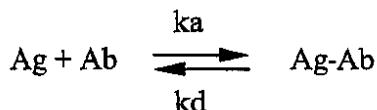
料が少ない方法が知られており、例えば、Griswoldらの方法(Immunology Letters 9:15-18 (1985))および本明細書中に記載の反応速度BIAcore法が挙げられる。BIAcore法は、表面プラズモン波が金属/液体界面で励起された時に生じる表面プラズモン共鳴(SPR)の現象を利用する。光はサンプルと接触していない側の表面に向けられ、そこから反射し、角度と波長が特定の組合せのとき、SPRは反射光強度の減少を生じる。2分子結合事象は表面層での屈折率に変化を起こし、SPRシグナルの変化として検出される。

【0026】

解離定数(KD)および結合定数(KA)は親和性の定量的基準である。平衡状態では、遊離抗原(Ag)および遊離抗体(Ab)は抗原抗体複合体(Ag-Ab)と平衡状態にあり、個々の反応の速度は速度定数(kaおよびkd)で示される。

10

【数1】



【0027】

平衡状態では、 $ka [Ab][Ag] = kd [Ag-Ab]$ である。解離定数KDは以下の式により与えられる： $KD = kd/ka = [Ag][Ab]/[Ag-Ab]$ 。KDは濃度の単位を有し、最も一般的には、M、mM、μM、nM、pM等である。KDで表される抗体親和性を比較した場合、Aに対する親和性が高ければ高いほど、より低い値で示される。結合定数KAは以下の式により得られる： $KA = ka/kd = [Ag-Ab]/[Ag][Ab]$ 。KAは濃度の逆数の単位を有し、最も一般的には M^{-1} 、 mM^{-1} 、 $μM^{-1}$ 、 nM^{-1} 、 pM^{-1} 等である。KAで表される抗体親和性を比較した場合、Aに対する親和性が高ければ高いほど、より高い値で示される。「可溶性Aに対する親和性」は、本明細書中に記載するように、A(通常、適度に凝集型を含まないAであるA1-40またはA1-42)のサンプルを用いて測定される。可溶性Aに対して高い親和性を有する抗体に関しては、本明細書中以下に記載するBIAcore法を用いる場合に特に注意しなければならない。

20

【0028】

本明細書中で用いる用語「治療(処置)」は、処置される病態がすでに存在することが知られている場合の治療的処置、および予防、すなわち、病態の将来の発生の可能性の予防または改善を含む。用語「治療する(処置する)」は、徴候、症状、病態、疾患または障害の予防(防止)、緩解(減少または逆転)または排除を含む。

30

【0029】

「抗体」は完全抗体を意味し、動物由来の抗体(マウス等)、キメラ、ヒト型、ヒト配列、組換え、トランスジェニック、グラフト型および単鎖抗体など、ならびにそれらの任意の融合タンパク質、結合体、フラグメントまたは誘導体を含むがこれらに限定しない。抗体は、タンパク質が抗原への結合部位を含み、この結合部位が3対の相補性決定基からなるという広い意味で、抗体に似ているタンパク質を含む。抗体は完全イムノグロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト型抗体、ヒト抗体またはこれらのうちのいずれかの免疫学的に有効なフラグメントを含む。抗体フラグメントまたは単にフラグメントは、Fv、ジスルフィド架橋型Fv、scFv、Fab、Fab'または $F(ab')_2$ フラグメントを意味し、この単語は当業者に周知である。本明細書中の文脈において、フラグメントは具体的に強調して記載されている。それ以外の場合にはフラグメントが特記されているかどうかにかかわらず、用語「抗体」がそのようなフラグメントならびに1本鎖形態を含むことが理解される。タンパク質が目的の標的に特異的に結合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」には単鎖形態も含まれる。好ましくは、しかし必ずしも必須ではないが、本発明に有用な抗体は組換え技術により産生される。体内での長期残留が望ましい場合、または中和抗体の発生危険性を最小にすることが望ましい場合のようないくつかの状況においてはグリコシル型抗体が好ましいが、抗体はグリコシル化されていても、グリコシル化されていなくとも良い。おそらく、ペプチドまたは他の化学的な

40

50

鎖により鎖間で架橋が達成される特定のタイプを除いて、抗体はジスルフィド結合で正確に架橋されている。

【0030】

基本的な抗体構造単位は、四量体であることが知られている。各四量体は2つの同一のポリペプチド鎖対からなり、各対は1本の「軽」鎖(約25kDa)および1本の「重」鎖(約50~70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主な抗原認識を担う約100~110以上のアミノ酸の可変域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は主にエフェクター機能を担う定常部を規定する。

【0031】

軽鎖は および に分類される。重鎖は 、 μ 、 、 または に分類され、それぞれ、 IgG、 IgM、 IgA、 IgDおよびIgEとして抗体イソタイプを規定する。 IgGイソタイプが好ましい。 IgGサブクラスの中でも、 IgG1およびIgG4が好ましい。

【0032】

各軽鎖 / 重鎖対の可変部は抗体結合部位を形成する。従って、インタクトな非フラグメント抗体および特定のフラグメント(例えば、 $F(ab') フラグメント)は2つの結合部位を有するが、ほとんどのフラグメントは1分子あたり1つの結合部位のみを有する。鎖は全て、3つの超可変部(相補性決定基またはCDRとも呼ぶ)により連結された比較的保存されているフレームワーク領域(FR)の同じ全体構造を示す。各対の2つの鎖に由来するCDRをフレームワーク領域により整列させ特異的エピトープに結合しうるようにする。N-末端からC-末端で、軽鎖および重鎖は両方とも、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。各ドメインに対するアミノ酸の配置は、周知の慣例に従って行う[Kabatら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991; Chothiaら、J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothiaら、Nature 342:878-883 (1989)]。$

【0033】

「ヒト型抗体」は、非ヒト相補性決定基(CDR)を有する抗体の配列を変更することによりヒト抗体生殖細胞系に由来するアミノ酸配列により部分的または完全に構成される抗体を意味する。また、ヒト型抗体はCDR-グラフト型または再成型(reshaped)抗体とも称される。ヒト型イムノグロブリンは、マウス可変部およびヒト定常部を有するキメラ抗体は含まない。しかしながら、抗体の可変部、およびCDRさえも、当該分野において現在周知である技術によりヒト型にされる。可変部のフレームワーク領域を、対応するヒトフレームワーク領域で置換し、非ヒトCDRは実質的にインタクトなままで残す。上記のように、本発明の方法での使用に関しては、抗体の免疫学的に特異的なフラグメント(単鎖形態を示すフラグメント)を用いれば十分である。

【0034】

分子生物学の技術を用いて遺伝子操作したヒト型mAbを製造する方法は比較的単純であるが、異種(通常、げっ歯類)相補性決定基(CDR)のヒトフレームワークへの単純なグラフト化により常に本来のmAbの結合親和性および特異性が再構築されることは限らない。遺伝子操作したmAbの設計は、本来の分子の機能の再生において重要な工程である。この設計は種々の選択を含む: CDRの範囲、用いるヒトフレームワーク、およびげっ歯類mAbからヒトフレームワーク領域への残基の置換(バック変異(backmutations))。これらのバック変異の位置は、主に、配列/構造分析または可変域の3D構造のホモジーモデルの分析により同定されている。近年、ファージライブラリーは選択した位置でアミノ酸を変更するために用いられている。同様に、多数のアプローチがげっ歯類CDRをグラフト化するための最も適切なヒトフレームワークを選択するために用いられてきた。げっ歯類可変部と高い配列同一性を有する可変部(ホモジーマッチングまたはベストフィット)、コンセンサス配列または生殖系細胞配列、または種々の異なるヒトmAb由来の各軽鎖または重鎖可変部内のフレームワーク配列のフラグメントを用いることができる。あるいは、表面げっ歯類残基を、ヒトmAbで最も一般的に見出される残基で置き換えても良い(「再舗装(resurfacing)」または「被覆(veneering)」)。

10

20

30

40

50

【0035】

本発明において重要なことが見出された特性を有する非ヒト抗体から開始するヒト型イムノグロブリンの設計は、以下のようにして行うことができる。ヒトフレームワーク領域に関しては、CDR提供(CDR-providing)非ヒトイムノグロブリンのフレームワークまたは可変部アミノ酸配列を、ヒトイムノグロブリン可変部配列コレクションの対応する配列と比較し、同一アミノ酸を高い割合で有する配列を選択する。アミノ酸が以下のカテゴリーに入る場合は、用いるヒトイムノグロブリン(アクセプターイムノグロブリン)のフレームワークアミノ酸を、CDR提供非ヒトイムノグロブリン(ドナーイムノグロブリン)由来のフレームワークアミノ酸により置き換える。

(a)アクセプターイムノグロブリンのヒトフレームワーク領域内のアミノ酸は、その位置のヒトイムノグロブリンにとっては異常であるが、ドナーイムノグロブリン内の対応するアミノ酸はその位置ではヒトイムノグロブリンにとっては典型的なものである。 10

(b)アミノ酸の位置はCDRの1つに直ちに隣接している。

(c)3次元イムノグロブリンモデルにおいて、フレームワークアミノ酸の任意の側鎖原子は、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~中心)内にある[Queenら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 86:10029-10033 (1989); Cööra、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 88:2869 (1991)]。アクセプターイムノグロブリンのヒトフレームワーク領域内のアミノ酸、およびドナーイムノグロブリン内の対応するアミノ酸はそれぞれ、その位置ではヒトイムノグロブリンにとっては異常である場合、このようなアミノ酸はその位置ではヒトイムノグロブリンにとっては典型的なアミノ酸により置き換えられる。 20

【0036】

ヒト抗体は、公知の方法(例えば、ヒト免疫ドナー、ファージライブラリーおよびマウスのようなトランスジェニック動物由来)を用いて簡単に入手することができる。B細胞のEBV形質転換またはPCRクローニングおよびファージディスプレイのいずれかを用いて免疫ヒトドナーから抗体を回収することができる。合成ヒト抗体V領域の無作為組み合わせを用いる合成ファージライブラリーを作製することができる。抗原上での選択により、いわゆる「十分なヒト抗体」を製造することができ、これは本質的にV領域が非常にヒト類似であると推定される。トランスジェニックマウスはヒトイムノグロブリン生殖細胞遺伝子セグメントのレパートリーを有するように作製することができる。これらのマウスは、可溶性Aを用いて免疫すると可溶性Aに対するヒト抗体を作製する。 30

【0037】

本発明に用いるための高親和性ヒト型またはヒト抗体の製造は当該分野において周知の方法(周知の技術を用いるモノクローナル抗体の製造および高親和性抗体に関するスクリーニング、または最初に適度な高親和性を有するモノクローナル抗体を同定し、次いで例えば、米国特許番号5,976,562、5,824514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、W097/29131、Thomasら、J. Biol. Chem. 277:2059-2064 (2002)；Shreder, Methods 20:372-379 (2000)；Boderら、Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 97:10701-10705 (2000)；Chenら、J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)；Wuら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 95:6037-6042 (1998)；Hoogenbloom, Trends Biotechnol. 15:62-70 (1997)；Raderら、Curr. Opin. Biotechnol., 8:503-508 (1997)；Cramerら、Nature Medicine 2:100-102 (1996)；Cramerら、Nature Medicine 2:100-103 (1996)；Schierら、J. Mol. Biol. 255:28-43 (1996)；Yangら、J. Mol. Biol. 254:392-403 (1995)；Yangら、J. Mol. Biol. 254:392-403 (1995)；Yeltonら、J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)；Stemmer, Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 91:10747-10751 (1994)；Stemmer, Nature 370:389-391 (1994)；Huseら、Internat'l Rev. Immunol. 10:129-137 (1993)(これらのうちの各々の高親和性抗体の製造を有する部分を本明細書中に参照して組み込む)に記載されるような周知の方法を用いて親和性を改善することを含む)により行うことができる。 40

【0038】

本発明で用いる抗体は組換え宿主中で最も都合よく発現されるか、周知の技術を用いて精製される[Pageら、Bio/Technol. 9, 64-68 (1991)；Carrollら、Mol. Immunol. 29, 821-50

827 (1992) ; Colomaら、J. Immunol. Meth. 152, 89-104 (1992) ; Bebbingtonら、Bio/Technol. 10, 169-175 (1992) ; Deyevら、FEBS Lett. 330, 111-113 (1993) ; Benderら、Hum. Antibodies Hybridomas 4, 74-79 (1993) ; Norderhaugら、J. Immunol. Meth. 204, 77-87 (1997) ; Poulsenら、Eur. J. Immunol. 25, 2005-2009 (1995)、これらを各々本明細書中に参照して組み込む]。

【0039】

本発明での使用に好ましい抗体は、266が結合するA上上のエピトープと同一のエピトープに結合する抗体、または266とヒトまたはマウスAとの結合を競合的に阻害する任意の抗体である。当業者であれば、任意の特定の抗体が266とヒトAとの結合を競合的に阻害するかどうかを周知の方法を用いてどのように決定するかを知っている。例えば、競合的ELISA方法を用いることができる。96ウェルELISAプレート(例えば、Nunc-Immunoプレート、カタログ番号439454, NalgeNunc)のウェルをAペプチド(1-40が特に好都合であるが、他の長さもまた使用することができる)でコーティングし、場合によりアルブミンのようなより長いタンパク質に結合させる。ウェルを洗浄した後、必要に応じてプロックし、次いでリンスして適当に乾燥させる。ビオチン化266抗体(例えば、ビオチン化ヒト型266、軽鎖として配列番号11に記載のアミノ酸配列および重鎖として配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する)(最終濃度0.3μg/ml)等、および競合抗体(最終濃度750μg/mlから開始する3倍の系列希釈物)の混合物を1ウェルあたり最終容量100μlで加える。競合物質なし、およびバックグラウンドコントロールを用いて実行する。ELISAプレートを適当な温度で適当な時間の間インキュベートし、次いでウェルを洗浄する。ウェルの洗浄後、HRP結合型ストレプトアビシン(カタログ番号21124, Pierce)または等価物を各ウェルに加える(例えば、1μg/mlを100μl)。プレートを室温で適当な時間の間(例えば、30分)インキュベートし、次いで完全に洗浄する。呈色させるために、ABTSペルオキシダーゼ基質(Kirkegaard & Perry Laboratories)(100μl/ウェル)または等価物を加える。呈色を停止し、吸光度を読み取る(例えば、415nm)。吸光度を競合物の濃度のlog値に対してプロットし、曲線をデータ点に当てはめ(例えば、Prismまたは等価物を用いる)、当該分野で周知の方法を用いてIC50を決定する。266のIC50の100分の1よりも高いIC50を有する抗体は、266のAへの結合を競合的に阻害するとみなす。可溶性Aに対する抗体の親和性を、当該分野において周知の方法または本明細書中に記載の方法を用いて決定することができる。

10

20

30

【0040】

抗体266はCDRとして以下のアミノ酸配列を有する。

【化1】

軽鎖 CDR1:

1 5 10 15
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
 (配列番号 1)

軽鎖 CDR2:

1 5
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser (配列番号 2)

10

軽鎖 CDR3:

1 5
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr (配列番号 3)

重鎖 CDR1:

1 5
 Arg Tyr Ser Met Ser (配列番号 4)

20

重鎖 CDR2:

1 5 10 15
 Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly
 (配列番号 5)

および 重鎖 CDR3:

1
 Gly Asp Tyr (配列番号 6).

30

【0 0 4 1】
 266のヒト型バージョンでは、ヒトフレームワーク領域は、場合により、ヒト型抗体266の結合の強さ又は特異性を維持するために、マウス266由来の残基の1~数個の残基の置換を有する[W001/62801]。ヒト型266抗体の好ましい軽鎖可変部は以下のアミノ酸配列を有する。

【化2】

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

Arg

(配列番号 7)

[配列中、
 2位のXaaはValまたはIleであり、
 7位のXaaはSerまたはThrであり、
 14位のXaaはThrまたはSerであり、
 15位のXaaはLeuまたはProであり、
 30位のXaaはIleまたはValであり、
 50位のXaaはArg、GlnまたはLysであり、
 88位のXaaはValまたはLeuであり、
 105位のXaaはGlnまたはGlyであり、
 108位のXaaはLysまたはArgであり、
 109位のXaaはValまたはLeuである]。
 【0042】

ヒト型266抗体の好ましい重鎖可変部は以下のアミノ酸配列を有する。

【化3】

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

(配列番号 8)

[配列中、
 1位のXaaはGluまたはGlnであり、
 7位のXaaはSerまたはLeuであり、
 46位のXaaはGlu、Val、AspまたはSerであり、
 63位のXaaはThrまたはSerであり、
 75位のXaaはAla、Ser、ValまたはThrであり、
 76位のXaaはLysまたはArgであり、
 89位のXaaはGluまたはAspであり、
 107位のXaaはLeuまたはThrである]。
 【0 0 4 3】
 ヒト型266抗体の特に好ましい軽鎖可変部は以下のアミノ酸配列を有する。
 【化4】

1 5 10 15
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

20 25 30
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser

35 40 45
Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

50 55 60 10
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

65 70 75 80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

85 90 95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser

100 105 110 20
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

Arg (配列番号 9) .

【0044】

ヒト型266抗体の特に好ましい重鎖可変部は以下のアミノ酸配列を有する。

【化5】

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

(配列番号 10).

【0 0 4 5】

ヒト型266抗体の好ましい軽鎖は以下のアミノ酸配列を有する。

【化6-1】

1 5 10 15
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu
 20 25 30 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
 Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 40
 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

【化6-2】

95	100	105	
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln			
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	10
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			
170	175	180	
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu			
185	190	195	20
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
200	205	210	
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			(配列番号 11).

【0046】

ヒト型266抗体の好ましい軽鎖は以下のアミノ酸配列を有する。

【化7-1】

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				

【化7-2】

10

20

30

40

50	55	60	
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	10
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			
125	130	135	
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
140	145	150	20
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			
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			
230	235	240	
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
245	250	255	40
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	10
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	20
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			
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			(配列番号 12).

【0047】

本発明での使用に好ましい抗体は266のアナログであり、これは重鎖(配列番号5)のCDR2内でのN-グリコシル化部位がグリコシル化されないように遺伝子操作されている。このようなアナログは、A₁に対して266より高い親和性を有し、軽鎖は、マウスモノクローナル抗体266(配列番号1～3)由来の3個の軽鎖相補性決定基(CDR)を含み、重鎖はマウスモノクローナル抗体266由来の重鎖CDR1およびCDR3(それぞれ、配列番号4および6)および配列番号13により示される配列を有する重鎖CDR2を含む。

【化8】

1

5

10

15

Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly

(配列番号 13)

[配列中、

7 位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし、8 位のXaaがAspでもProでもなく、9 位のXaaがSerまたはThrである場合、7 位のXaaはAsnではなく、

8 位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし、7 位のXaaがAsnであり、9 位のXaaがSerまたはThrである場合、8 位のXaaはAspまたはProであり、10

9 位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし、7 位のXaaがAsnであり、8 位のXaaがAspでもProでもない場合、9 位のXaaはSerでもThrでもない]。

【0048】

「任意のアミノ酸」は、天然に存在する任意のアミノ酸を意味する。好ましい天然に存在するアミノ酸は、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。

【0049】

好ましい抗体群は、軽鎖CDR1～CDR3としてそれぞれ配列番号1～3の配列、重鎖CDR1およびCDR3としてそれぞれ配列番号4および6の配列を有するものであり、配列中、重鎖CDR2の配列は配列番号13であり、20

配列番号13の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からなる群から選択されるが、ただし、8 位のXaaがAspでもProでもなく、9 位のXaaがSerまたはThrである場合、7 位のXaaはAsnではなく、

配列番号13の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からなる群から選択されるが、ただし、7 位のXaaがAsnであり、9 位のXaaがSerまたはThrである場合、8 位のXaaはAspまたはProであり、

配列番号13の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からなる群から選択されるが、ただし、7 位のXaaがAsnであり、8 位のXaaがAspでもProでもない場合、9 位のXaaはSerでもThrでもない。30

【0050】

好ましい群の別の説明は、軽鎖CDR1-CDR3としてそれぞれ配列番号1～3の配列、重鎖CDR1およびCDR3としてそれぞれ配列番号4および6の配列を有し、重鎖CDR2の配列が以下からなる群から選択されている、抗体またはそのフラグメントである：

1) 配列番号14

【化9】

1

5

10

15

40

Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

Gly (配列番号14)

[配列中、

配列番号14の7 位のXaaはAla、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpおよびTyrからなる群から選択され、

配列番号14の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からなる群から選択され、50

配列番号14の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からなる群から選択される]、

2) 配列番号15

【化10】

1	5	10	15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys			

Gly (配列番号15)

10

[配列中、

配列番号15の7位のXaaはAsnであり、

配列番号15の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からなる群から選択され、

配列番号15の9位のXaaはAla、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Val、TrpおよびTyrからなる群から選択される]、

3) 配列番号16

【化11】

1	5	10	15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys			

20

Gly (配列番号16)

[配列中、

配列番号16の7位のXaaはAsnであり、

配列番号16の8位のXaaはAspおよびProからなる群から選択され、

配列番号16の9位のXaaはSerおよびThrからなる群から選択される]。

重鎖のCDR2に好ましい配列としては、ただ1つのアミノ酸が変化している、アミノ酸2つのみが変化している、または3つ全てが変化している配列が挙げられる。7位のAsnを置換すること、または9位のThrを置換すること、または両方を置換することが好ましい。

1、2または3個全ての位置での保存的置換が好ましい。最も好ましい種は、7位のAsnがSerまたはThrで置換されているものである。

【0051】

本発明での使用に好ましい脱グリコシル型266抗体は、重鎖のCDR2内(すなわち、上記の配列番号13内)において、以下のとおりである；

7位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択されるが、ただし9位のXaaがSerまたはThrである場合、7位のXaaはAsnではなく、

8位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され、

9位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択されるが、ただし7位のXaaがAsnである場合、9位のXaaはSerでもThrでもない。

【0052】

好ましい脱グリコシル型266抗体の別の説明は、軽鎖CDR1-CDR3としてそれぞれ配列番号1～3の配列、重鎖CDR1およびCDR3としてそれぞれ配列番号4および6の配列を有し、重鎖CDR2の配列が以下からなる群から選択されている、抗体またはそのフラグメントである：

1) 配列番号17

【化12】

30

40

1

5

10

15

Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

Gly (配列番号17)

[配列中、

配列番号17の7位のXaaはAla、Gly、His、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され、
配列番号17の8位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され、

10

配列番号17の9位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択される]、

2) 配列番号18

【化13】

1

5

10

15

Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

Gly (配列番号18)

[配列中、

20

配列番号18の7位のXaaはAsnであり、

配列番号18の8位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され、

配列番号18の9位のXaaはAla、Gly、His、AsnおよびGlnからなる群から選択される]。

【0053】

本発明での使用に好ましいヒト型抗体は、配列番号7の軽鎖可変部、および以下の配列番号19:

【化14】

1 5 10 15
 Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa 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
 Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr
 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 (配列番号 19)

[配列中、
 1位のXaaはGluまたはGlnであり、
 7位のXaaはSerまたはLeuであり、
 46位のXaaはGlu、Val、AspまたはSerであり、
 56位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし57位のXaaはAspでもProでもなく、59位のXaaがSerまたはThrである場合、56位のXaaはAsnではなく、
 57位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし56位のXaaがAsnであり、58位のXaaがSerまたはThrである場合、57位のXaaはAspまたはProであり、
 58位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし56位のXaaがAsnであり、57位のXaaがAspでもProでもない場合、58位のXaaはSerでもThrでもなく、
 63位のXaaはThrまたはSerであり、
 75位のXaaはAla、Ser、ValまたはThrであり、
 76位のXaaはLysまたはArgであり、
 89位のXaaはGluまたはAspであり、
 107位のXaaはLeuまたはThrである]
 40
 で示される重鎖可変部を有する。]

【0054】

本発明での使用に好ましいヒト型抗体は、配列番号9の軽鎖可変部、および以下の配列番号20:

【化15】

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				10
	50	55	60	
Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa 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	20
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly				
	110			
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			(配列番号 20) .	

[配列中、

56位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし57位のXaaがAspでもProでもなく、59位のXaaがSerまたはThrである場合、56位のXaaはAsnではなく、

57位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし56位のXaaがAsnであり、58位のXaaがSerまたはThrである場合、57位のXaaはAspまたはProであり、

58位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし56位のXaaがAsnであり、57位のXaaがAspでもProでもない場合、58位のXaaはSerでもThrでもない】

で示される重鎖可変部を有する。

【0055】

本発明での使用に好ましいヒト型抗体は、配列番号11の軽鎖可変部、および以下の配列番号21：

【化16-1】

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 10

50 55 60
Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa 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 20

110 115 120
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

【化16-2】

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	10
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val			
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	20
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
230	235	240	
Ala Pro Glu Leu Leu 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	40
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			

【化16-3】

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	10
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr 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			
425	430	435	20
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
440			
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		(配列番号 21)	

[配列中、

56位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし57位のXaaがAspでもProでもなく、59位のXaaがSerまたはThrである場合、56位のXaaはAsnではなく、

57位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし56位のXaaがAsnであり、58位のXaaがSerまたはThrである場合、57位のXaaはAspまたはProであり、

58位のXaaは任意のアミノ酸であるが、ただし56位のXaaがAsnであり、57位のXaaがAspでもProでもない場合、58位のXaaはSerでもThrでもない】

で示される重鎖可変部を有する。

【0056】

配列番号19、配列番号20および配列番号21の重鎖可変部を有する好ましい脱グルコシル型266抗体は、以下に従う：

56位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択されるが、ただし、58位のXaaがSerまたはThrである場合、56位のXaaはAsnではなく、

57位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され、

58位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択されるが、ただし、56位のXaaがAsnである場合、58位のXaaはSerでもThrでもない。

【0057】

重鎖配列番号19、配列番号20および配列番号21のCDR2(56位、57位および58位)に好ましい配列としては、1個のアミノ酸のみが変化している、2個のアミノ酸のみが変化している、または3個全てのアミノ酸が変化している配列が挙げられる。56位のAsnを置換することが好ましい。58位のThrをSer以外のアミノ酸で置換することが好ましい。57位のSerをProまたはAspで置換することにより、266重鎖のCDR2中のN-グリコシル化部位を破壊しないことが好ましい。1、2または3個全ての位置での保存的置換が好ましい。最も好ましい種は、56位のAsnがSerまたはThrで置換されているものである。特に好ましい抗体は、配列番号19、配列番号20または配列番号21の56位がSerまたはThr、57位がSer、そして58位

10

20

30

40

50

がThrであるものである。

【0058】

最も好ましい種は、配列番号11の軽鎖および配列番号21の重鎖を含む抗体であって、配列番号21中、56位のXaaがSer、57位のXaaがSer、そして58位のXaaがThrである(「N56S」)か、または配列番号21中、56位のXaaがThr、57位のXaaがSer、そして58位のXaaがThr(「N56T」)である。

【0059】

抗体(免疫学的に反応性のフラグメントを含む)を、上記のとおり確認した被検体に、標準的な非経口的な末梢投与方法を用いて、静脈内、腹腔内、皮下、経肺、経皮、筋肉内、鼻内、経頬粘膜、舌下または坐剤での投与により被検体に投与する。好ましい投与経路は、
10 静脈内、皮下および腹腔内である。

【0060】

本発明に用いる抗体の許容可能な医薬製剤の製造(強度、賦形剤、pH、等張性、提示方法(presentation)、投与形態等)は、当業者に周知である。本発明で用いるための医薬組成物は選択した投与態様に適切であるべきであり、製薬上許容可能な賦形剤(緩衝化剤、界面活性剤、保存剤、可溶化剤、等張化剤、安定化剤等)が必要に応じて用いられる。Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, 最新版(本明細書中に参照して組み込む)は、通常、当業者に公知の製薬技術の概説を提供する。本発明で用いるための医薬製剤は、滅菌されているか、または少なくともほぼ滅菌されており、必要であれば保存化(preserved)されるか、または静菌的にされる。
20

【0061】

以下の実施例は、本発明の限定ではなく例示を意図する。実施例はマウスの系で行った実験を記載しており、それゆえマウスモノクローナル抗体の使用は満足のいくものである。しかし、本発明の治療方法ではヒトでの使用を意図しており、ヒト型または十分なヒト抗体が好ましい。

【実施例】

【0062】

実施例1

抗A 抗体266の投与後の認知における迅速な改善

APPV717Fトランスジェニックマウス(PDAPPマウス、11ヶ月齢)を用いた[Gamesら、Nature 30 373:523-527 (1995)]。行動試験の前5日間、マウスを毎日、処理した。動物は全て、食餌および水を自由に摂取させた。室温(23±1°C)で、午前6時に明かりをつけて12:12時間の明暗サイクルで飼育した。明期間である午前8時~午後2時の間に行動実験を行った。
。

【0063】

物体認識課題は、げっ歯類が見慣れた物体よりも新しい物体を探索する無意識の傾向を有することに基づく[Ennaceur et Delacour, Behavioral Brain Research. 31:47-59 (1988); Dodartら、Neuroreport. 8:1173-1178 (1997)]。この課題は、ブラックPlexiglasTMオープンフィールド(50×50×40cm)で行った。識別する物体はビー玉(1.5 cm直径)およびプラスチックのさいころ(1辺1.8 cm)であった。各試行の後、物体は使い捨て手袋で扱ってアルコールに浸して匂いの印(olfactory cues)を取り除いた。実験の前に、試験環境に馴化させるために雄性マウスを数匹オープンフィールドにおいていた。試験の最初の日に、マウスを空のオープンフィールドに30分間配置してマウスに習熟セッションを行い、コンピューター援用ビデオトラッキングシステム(San Diego Instrument, CA)を用いて移動距離(cm)を5分間隔で記録した。翌日、試行の間に3時間の間を空けて、マウスに10分の試行を行った。第1試行では、マウスに物体A(ビー玉またはさいころ)を置いたオープンフィールドを探索させた。移動距離(cm)および物体の探索に費やした時間(物体から1cm以下の距離に鼻を向ける)を、それぞれ、ビデオトラッキングシステムおよび手で記録した。第2試行では、マウスに2つの物体:慣れた物体(「物体A」)および新しい物体(「物体B」)(例えば、ビー玉およびさいころ)を置いたオープンフィールドを探索させた。
40 50

【0064】

各動物に関して計算した認識指標は比で表した： $(t_B \times 100) / (t_A + t_B)$ [式中、 t_A および t_B は、それぞれ、物体 A および物体 B で費やした時間である]。動物の処理状態を知らない観察者が物体探索時間を記録した。

【0065】

マウス抗 A 抗体 266 [「m266」, Seubertら、Nature 359:325-327 (1992)] および精製マウス IgG1 イソタイプコントロール (Pharmingen) は、投与前にストック溶液から PBS で希釈した。動物に m266 (n=8, 1 mg/mL)、コントロール IgG 溶液 (n=8, 1 mg/mL) または PBS (n=7) を習熟セッションの 3 時間前 (第 1 試行の 24 時間前に対応する) に注射した (500 μL, i.p.)。野生型マウス (WT) 動物のさらなるコントロールグループを平行して物体認識課題 (n=6) で試験した。 10

【0066】

第 2 試行の完了後、血液および CSF 液をサンプリングし、脳を 3 工程抽出方法を用いて処理した。第 1 工程は、サンプルを冷却 PBS およびプロテイナーゼインヒビター混合物 (CompleteTM, Boehringer-Mannheim, IN) 中でホモジナイズする工程、続いて 10,000 rpm で 10 分間、4 で遠心分離する工程 (この上清を PBS 「可溶性」 プールとみなす) から構成される。第 2 工程は、ペレットを RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% DOC, 1% NP40, 0.1% SDS および CompleteTM, pH 8.0) に再懸濁する工程、続いて 10,000 rpm で 10 分間、4 で遠心分離する工程 (この上清を 「界面活性剤可溶性」 プールと表す) から構成される。最後に、第 3 工程は、ペレットを 5M グアニジン-HCl に再懸濁する工程、チューブを室温で 2 時間振盪させ、続いて 10,000 rpm で 10 分間、4 で遠心分離する工程から構成される。この工程は 「不溶性」 プールを生じる。A 40 および A 42 を、ELISA [Balesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:15233-15238 (1999)] を用いて各プールで定量する。 20

【0067】

ELISA について簡単に説明すると、モノクローナル抗体 2G3 および 21F12 を用いて、それぞれ 40 および 42 残基で終わる A ペプチドを補足した [Johnson-Woodら、1997]。ビオチン型 3D6 は A 1-5 領域を認識し、これをレポーター抗体として用いた。

【0068】

血漿および CSF サンプルのタンパク質を、4-20% TBE ゲル (Criterion gel, Bio Rad, CA) を用いて非変性条件下での電気泳動により分離し、CAPS 緩衝液 (CAPS 10 mM, 0.01% SDS、1% メタノール、pH 11) 中で PVDF メンブレンに移した。SuperBlock ブロック緩衝液 (Pierce, IL) 中で 1 時間ブロックした後、メンブレンをビオチン型 3D6 (0.045 mg/ml) でプローブし、その後 StreptAvidin (1:200000) と反応させ、SuperSignal West Femto (Pierce, IL) を用いて可視化した。 30

【0069】

グループ間の行動データおよび A レベルを比較するために、Statview5 software (SAS Institute Inc., NC) を用いて一元配置または二元配置の分散分析 (ANOVA) および相関分析を行った。

【0070】

図 1 に示すように、物体認識指標は処置グループ間で有意に異なった (グループ効果 : $F_{3,25} = 25.085$, $p < 0.0001$)。m266 処置 tg マウスの能力は、生理食塩水処置 tg マウスおよびコントロール IgG 処置 tg マウスの能力よりも有意に高く ($p < 0.0001$)、WT マウスに匹敵した。物体認識指標は、生理食塩水-およびコントロール IgG 処置 tg マウスの間では異ならなかった。さらに、グループ内 t 検定分析により、m266 (t 値 = 9.526, $p < 0.0001$) 処置 tg マウス および WT マウス (t 値 = 9.581, $p < 0.0002$) が偶然レベル (50%) を超えて実行することを確認したが、他方、生理食塩水およびコントロール IgG 処置 tg マウスは超えなかつた (それぞれ、 t 値 = 0.081 および 1.157, NS)。グループ効果分析もまた、第 1 試行 ($F_{3,25} = 0.555$, NS) または第 2 試行 ($F_{3,25} = 0.679$, NS) の間の全体的な物体探索時間にグループ間で差異は無いことを確認した。移動距離もまた、第 1 試行 (グループ効果 : $F_{3,25} = 1.326$, NS) または第 2 試行 (グループ効果 : $F_{3,23} = 1.334$, NS) の習熟セッションの間はグループ間で 40

50

50

異なることを確認した(グループ×ブロック相互作用： $F_{15,125} = 1.455$ 、NS；グループ効果： $F_{3,25} = 1.200$ 、NS)。

【0071】

$m266$ の投与の後、ELISAにより検出されるように(図2a)、血漿サンプル中でA 40およびA 42ペプチドのレベルの両方が、生理食塩水およびIgG処置マウスと比較して有意に上昇した($p < 0.0001$)。A 40の上昇は、生理食塩水処置マウスと比較すると、約150倍であり、A 42の上昇は約70倍であった。A 40またはA 42のレベルはいずれも生理食塩水およびコントロールIgG処置マウスの間では異ならなかった。注目すべきことに、 $m266$ 処置の後、両方のA ペプチドの血漿レベルは、物体認識記憶能力と非常に相関していた(A 40に関しては $r = 0.774$ 、 $p < 0.0001$ ；A 42に関しては $r = 0.781$ 、 $p < 0.0001$) (図2b 10)。

【0072】

CSFサンプルでは、A 40のレベルはグループ間で有意に異なっており($F_{2,19} = 4.798$ 、 $p < 0.05$)、 $m266$ 処置動物は、生理食塩水またはコントロールIgG処置動物と比較して、ペプチドレベルの上昇を示した($p < 0.05$ 、タンパク質1ml中のA 40レベル(ng)：生理食塩水 7.79 ± 1.73 ；コントロールIgG、 8.72 ± 2.9 ； $m266$ 、 16.57 ± 3.25)。A 42のCSFレベルの差異は、グループ間で観察されなかった($F_{2,19} = 3.006$ 、NS)。

【0073】

大脳皮質では、PBS可溶性プールのA 40に関してのみ、グループ間で顕著な差異が観察された($F_{2,20} = 7.785$ 、 $p < 0.01$)。 $m266$ 処置マウスは可溶性A ペプチドの上昇を示した。海馬抽出物にはグループ間でA のレベルに顕著な差異は観察されなかった(データは示さず)。興味深いことに、物体認識能力もまた、CSFおよび皮質PBS可溶性プール中のA 40のレベルと有意に相関した($r = 0.491$ 、 $p < 0.05$ および $r = 0.605$ 、 $p < 0.01$)。

【0074】

11～12ヶ月齢APPV^{717F} tgマウスでの馴化(habituation)セッションの24時間前に、3D6を1匹あたり $360 \mu g$ 投与すると、試験した8匹のマウスのうち2匹のみがOR能力が改善した(図8)($p < 0.05$)。この改善は、可溶性A に対して3D6よりも有意に高い親和性を有し、脳からのA の流入を3D6よりも有意に高く引き起こし得る抗体266を用いて得られた改善よりも、かなり有意性が低いものであった。

【0075】

これらの結果は、可溶性A に対して非常に高い親和性を有する(しかし、不溶性A に対しては親和性が非常に低い)抗体の投与が、APPV717Fトランスジェニックマウスにおいて迅速かつ有效地に物体認識記憶障害を逆転させることを実証した。この認知機能の迅速な改善は、血漿、CSFおよび皮質可溶性レベルのA に有意かつ著しい上昇を伴うが、脳不溶性プール中のA に重要な変化は伴わなかった。

【0076】

実施例2

可溶性A に対する親和性と相関する、抗A 抗体投与の認知に対する迅速な効果抗A マウス抗体 21F12 (A 42を認識するが、A 40は認識しない)、2G3 (A 40を認識するが、A 42は認識しない)、4G8 (13と28の間でA に結合する)、10D5 (1-16を認識する)および3D6 (1-5に結合する)をトランスジェニックPDAPPマウスに、上記のように投与する。

【0077】

次いで、これらの抗体を投与したマウスの能力を上記の物体認識試験で測定する。能力は、可溶性A の抗体の親和性と正に相関する。すなわち、可溶性A に対する抗体の親和性が高くなればなるほど、通常、抗体の投与後、短時間の間の認識試験の能力は高くなる。

【0078】

抗体 $m266$ はより顕著な血漿中へのA の流入を引き起こし、 $m266$ の約1000分の1の可溶性A に対する親和性を有する3D6のような抗体よりも早く、より完全な物体認識の回復を

10

20

30

40

50

引き起こした。可溶性 A₄₀ に対してより高い結合親和性を有する抗体は、より顕著な流入、および認識機能の有意により早く、そしてより良好な改善を引き起こす。

【 0 0 7 9 】

実施例 3

単独の抗 A₄₀ 抗体処置の後の APPV717F マウスにおける空間学習

被検体は雌性 APPV717F であり、野生型マウスは約 11 ヶ月齢であった。各マウスに、試験開始 24 時間前にマウス 266 抗体またはビヒクル (PBS) を 355 μg 投与した (ip)。連続 4 日間、マウスをホールボード空間学習アッセイで試験した (図 3)。4 つの穴に 1 粒の食餌を入手可能に入れておき、残りの穴は入手可能ではないようにスクリーンの下に餌をおいた。試験前の晩と翌朝はそれぞれマウスを絶食させた。マウスは、1 日あたり 180 秒の試行を 4 回試験した。試験は 4 日間連続で行った。

【 0 0 8 0 】

A₄₀ 抗体 (266) の単回投与は、ビヒクル処置トランスジェニックマウスと比較して 11 ヶ月齢の APPV717F マウスの認知機能を有意に上昇させた (図 4)。

【 0 0 8 1 】

4 日目にはビヒクル処置 WT マウスは全エラーが有意に減少したが、他方、抗体処置野生型マウスに関しては 3 日目と 4 日目にわたってエラー数は同等であった (図 5)。

【 0 0 8 2 】

実施例 4

24 時間後の血漿および皮質可溶性 A₄₂ 濃度に対する種々の抗体投与の効果

20

トランスジェニック (+/-) マウス (4 ヶ月齢) に各抗体を 355 μg 投与した (腹腔内)。サンプルは 24 時間後に得た。

【 0 0 8 3 】

表 1. 種々の抗 A₄₀ 抗体投与 24 時間後の皮質中の可溶性 A₄₂ の濃度 (μg/g)

【 表 1 】

	平均値	S.E.M.
コントロール (5)	0.058	0.007
266 (4)	0.169	0.047
3D6 (5)	0.091	0.007
10D5 (5)	0.065	0.004

30

【 0 0 8 4 】

表 2. 種々の抗 A₄₀ 抗体投与 24 時間後の血漿中の A₄₀ の濃度 (ng/mL)

【 表 2 】

	A _β 40		A _β 42	
	平均値	S.E.M.	平均値	S.E.M.
コントロール (4)	0.054	0.0045	0.064	0.004
266 (4)	5.0	0.13	9.2	0.055
10D5 (5)	0.19	0.022	0.20	0.002
コントロール (4)	0.50	0.02	0.13	0.005
3D6 (5)	3.0	0.35	1.18	0.15

40

【 0 0 8 5 】

抗体 3D6 の投与により、血漿 A₄₀ および A₄₂ の上昇が生じた (それぞれ、6 倍および 8 倍)。血漿 A₄₀ および A₄₂ レベルは、同様に 10D5 の投与により上昇した (約 3 ~ 4 倍)。

抗体 266 の投与により、A₄₀ および A₄₂ の両方で非常に顕著な上昇が生じた (それぞれ、93 倍および 144 倍)。

【 0 0 8 6 】

皮質組織由来の可溶性 A₄₀ は 266 のみで顕著に上昇した。3D6 または 10D5 の投与は脳内の

50

可溶性 A 40のレベルに対する影響は有さなかった。

【 0 0 8 7 】

抗体投与の迅速な効果の別の試験では、266、3D6および4G8の各々を355 μg、ipで半接合型PDAPPトランスジェニックマウス(3ヶ月齢)に投与した。サンプルは24時間後に得た。

【 0 0 8 8 】

表3 . 種々の抗 A 抗体投与24時間後の血漿サンプル中の A 42濃度(ng/mL)

【表3】

A _β 42		
	平均値	S.E.M.
コントロール(7)	0.048	0.0018
266(5)	3.8	0.30
4G8(5)	0.23	0.035
コントロール(7)	0.088	0.0035
3D6(5)	0.72	0.15

【 0 0 8 9 】

抗体の投与の迅速な効果に対する別の試験では、抗 A 抗体2G3(A 40のC末端を認識するが、A 42は認識しない)、10D5(A のN末端を認識する)および21F12(A 42のC末端を認識するが、A 40は認識しない)を各々355 μg、腹腔内で投与した。24時間後にサンプルを得た。血漿 A 42レベルの唯一の有意な差は10D5グループにあった。

【 0 0 9 0 】

表4 . 種々の抗 A 抗体の投与24時間後の血漿サンプル中の A 42の濃度(ng/ml)

【表4】

A _β 42		
	平均値	S.E.M.
コントロール(5)	0.065	0.0055
2G3(5)	2.34	0.091
10D5(5)	0.087	0.0044
コントロール(5)	0.058	0.0029
21F12(5)	1.80	0.036

【 0 0 9 1 】

表5 . 種々の抗 A 抗体の投与24時間後の皮質中の可溶性 A 40およびA 42の濃度(μg/g)

【表5】

	A _β 40		A _β 42	
	平均値	S.E.M.	平均値	S.E.M.
コントロール(5)	27	3	7.0	0.61
2G3(5)	48	5	4.0	0.23
10D5(5)	62	9	5.2	0.49
21F12(5)	91	14	5.4	0.16

【 0 0 9 2 】

いずれのグループにおいても不溶性 A に顕著な差は存在しなかった。21F12および10D5の投与により、脳中の可溶性 A 40レベルの統計上有意な上昇が生じた。A 42の可溶性レベルは、3種の抗体全てでの処置の後、顕著に減少した。

【 0 0 9 3 】

さらに別の試験において、266、3D6または10D5抗体の動物1匹あたり360 μgの投与(1グループあたり動物5匹、生理食塩水コントロール)は、平均血漿 A 1-40を、それぞれ、約334、92および14倍上昇させ、平均血漿 A 1-42をそれぞれ約168、32および19倍上昇さ

10

20

30

40

50

せた。これらの反応の相対値は、明らかに抗体の可溶性 A に対する相対的な親和性と直接関連している。

【0094】

まとめると、24時間後の抗 A 抗体の投与の効果のこれらの研究は、血漿 A のレベルと可溶性 A 40および A 42に対する抗体の親和性との間の強い相関関係を示す。また、24時間後の有意に高い A の流入(すなわち、266を3D6と比較して)を引き起こす。抗体は、同じ期間に認知の有意に高い回復を引き起こす。したがって、本発明者らは、認知における改善は可溶性 A に対してより高い親和性を有する抗体を投与した場合の程度で早く、および / または大きくなると考える。

【0095】

実施例 5

可溶性 A に対して種々の親和性を有する抗体の投与後の認知

可溶性 A に対して約 1 nM ~ 約 1 pM の間の親和性を有する抗体を入手するか、本明細書中に記載するように製造する。抗体を実施例 1 に記載のようにトランスジェニックマウスに投与する。可溶性 A に対してより高い親和性を有する抗体は、通常、投与後に短期間でより強い A の流入を生じ、また、認知の迅速な改善により強く影響を及ぼす。

【0096】

実施例 6

可溶性 A の結合親和性

可溶性 A に対する抗体親和性を、BIAcoreバイオセンサー2000を用いて測定し、データをBIAevaluation (v. 3.1)ソフトウェアで分析する。補足抗体 (ウサギ抗マウス Ig または抗ヒト Ig)を、バイオセンサーチップのフローセル 2 (CM5)上で N-エチル-N-ジメチルアミノプロピルカルボジイミドおよび N-ヒドロキシスルシンイミド (EDC/NHS)を用いて、遊離アミン基を介してカルボキシル基にカップリングする。非特異的ウサギ IgG をバックグラウンドコントロールとしてフローセル 1 にカップリングする。試験抗体を補足して 300 共鳴単位 (RU)を得る。次いで、可溶性 A 1-40 または 1-42 (Biosource International, Inc.)を減少濃度でチップ上に流す (1000 ~ 0.1 × KD)。チップを再生させるために、結合型抗 A 抗体をグリシン-HCl (pH 2)を含む洗浄液を用いてチップから溶離させる。アミロイドを含まないコントロール注入は、ベースラインの除去のためのコントロールとして役立つ。結合相および解離相を示すセンサーグラムを分析して kd および ka を決定する。この方法を用いて、1 ~ 42、および / または 1 ~ 40 に対する以下の抗体の親和性を決定し、表 1 に示す。抗体 10D5 に関しては 2 種類の親和性が見出された。

【0097】

表 6 . 可溶性 A 1-40 および / または可溶性 A 1-42 に対する種々の抗体の親和性 (nM)

【表 6】

10

20

30

	可溶性 A β 1-40	可溶性 A β 1-42
3D6	2.4	2.4
10D5	390	0.57/4,950
266	0.004	0.004
266	-	0.0025
N56S*		
266	-	0.0019
N56T†		
4G8	23	24
21F12	-	4.4
2G3	0.9	-

10

* 脱グリコシル型266アナログ、重鎖可変部の56位のAsnがSerで置き換えられている

† 脱グリコシル型266アナログ、重鎖可変部の56位のAsnがThrで置き換えられている

【 0 0 9 8 】

図6では、流入対可溶性A β に対するlog親和性をプロットする。流入は、上記の実施例4に記載したように、抗体の投与24時間後の血漿A β (40または42)の上昇倍率と規定する。親和性は上記の表2に示す。10D5は可溶性A β 42に対して明らかに極度に変動する2種類の親和性を有するので、10D5に関してはA β 40に対するデータのみを用いた。可溶性A β に対する親和性と流入との間の明確な相関関係は明らかである。

【 0 0 9 9 】

図7に、Bardら、Nat. Med. 6:916-919 (2000)から得たデータを用いて流入データを凝集型A β に対する親和性に対してプロットする。抗体266は凝集型A β に結合しないことが報告されているので、データはプロットしていない。明らかに、凝集型A β に対する親和性と流入との間に相関関係は存在しない。

【 0 1 0 0 】

本明細書中に記載するように、抗A β 抗体の可溶性(凝集型ではない)A β に対する親和性は、抗体投与後24時間以内の、脳由来のA β の血漿内への流入と正に相関している。さらにまた、A β の流入速度は実施例1および図2に記載の認知能力の急速な改善と関係している。可溶性A β に対してより高い親和性を有する抗体はより顕著な流入を引き起こし、A β に関連した病態および疾患での認知機能の改善に、より迅速でより顕著に影響を与える。さらに、A β の可溶性形態に対して高い親和性を有する抗体の長期的な投与は、より効率的に、脳由来のA β の流入を生じさせ、そして脳組織からA β を引き離し、これはA β に関連する病態および疾患を妨げる。最終的に、本発明者らは可溶性(不溶性または凝集型ではない)形態のA β に対する高い親和性が、A β 関連病態および疾患における認知障害を治療するための抗A β 抗体の重要な特徴であることを本発明において実証する。本発明者らはまた、可溶性(不溶性または凝集型ではない)形態のA β に対する高い親和性は、A β 関連病態および疾患における認知障害を治療するための抗A β 抗体の重要な特徴であると考える。

【 0 1 0 1 】

実施例7

可溶性A β に対する高い親和性を有する抗体の結合親和性の、別の決定方法

この方法は、上記実施例6で用いた方法と非常に類似するが、以下に記載するいくつかの改変を伴う。プロテインAまたはプロテインA/GをアミンカップリングによりB1またはCM5センサー(チップ(BIAcore)のフローセル1および2に固定化する。ついで、試験抗体を所望のレベル(通常、10~60秒の抗体注入)でフローセル2に補足させ、5分間、抗体を安定化させる。凍結A β 1-40溶液にアリコートを融解し、ついで希釈して最高濃度(例えば

40

50

、200 nM)をつくり、ついでこれを最低濃度(例えば、6.25nM)まで系列希釈する(1:2の希釈)。各濃度を流速50 μ L/分の流速で5分間、表面に注入する。高親和性抗体に関してオフ速度(off-rate)の正確な測定を得るために、A 1-40の解離を5時間追跡する。ついで、A 1-40および抗体を、40秒間のグリシン(pH1.5)の注入で両方のフローセルから溶離させる。次のサイクルの前に、シグナルを2分間安定させる。フローセル1のデータをフローセル2のデータから差し引き、緩衝液の差異またはセンサーチップまたはプロテインAに対する非特異的結合による任意のバルクシフト(bulk shifts)を明らかにする。種々の濃度を無作為に注入し、各濃度は2連で行う。2回の0nMでの実行を、プロテインAまたはA/G補足表面からの抗体の解離を制御するために用いる。Biaevalutionソフトウェアを用いてデータを分析する。物質移動(mass transfer)および極所的R_{max}を有する1:1モデルを、データにもっとも適したものとして用いる。

【0102】

この代替方法を用いて、可溶性A 1-40に対するヒト型266抗体の親和性は0.4 M⁻⁹ (\pm 0.2 M⁻⁹)であることを見出した。この親和性の値を、他の抗体に関するデータ(上記)とともに用いて、log(流入)対log(可溶性A 1-40に対する親和性)をプロットした(図8)。可溶性A に対する親和性と流入との間の非常に明確な相関関係は以前明らかなままである。

【0103】

可溶性A 1-40ストックおよび希釈サンプルは以下のように製造する。固体A 1-40 (Biosource International, Camarillo California USA 93012)を水に1 mg/mL(約230 μ M)で溶解し、この溶液をすぐに20-50 μ Lにアリコートし、ついで凍結させる(-70)。Fezouいら、Amyloid: Int'l J. Exp. Clin. Invest. 7:166-178 (2000)に記載のように、アルカリ条件を用いてA を溶解する。凝集型を含まない可溶性ストックA 溶液の別の製造方法はZagorskiら[Meth. Enzymol. 309:189-204 (1999)]の方法である。この方法は、順番に、ペプチドをトリフルオロ酢酸(TFA)に溶解すること、TFAを除去すること、ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)に再懸濁すること、HFIPを除去すること、および水に溶解することを含む。アリコート、および凍結は、HFIPの除去前または後のいずれかで行うことができる。ストックA 溶液は、当該分野で周知の方法、例えば、光散乱 [Tomskiら、Arch. Biochem. Biophys. 294:630-638 (1992)]、チオフラビンT結合 [LaVine, Meth. Enzymol. 309:274-285 (1999)]またはコンゴレッド結合 [Klunkら、Anal. Biochem. 266:66 (1999)]により凝集に関してチェックすることができる。使用直前に、ストックアリコートを融解し、用いる最高濃度まで希釈する(通常、約200nMまで約1000倍希釈)。この1000倍希釈したサンプルは主に1量体である可溶性A を含むと予測される。A は自己会合する傾向が強いので、記載したように注意深く製造した場合でさえ、A のサンプルは少しの割合のA 2量体(特に)、そしておそらくやはり高次の会合状態を含有するかもしれない。ストックアリコートは融解した後は凍結しない。ストックアリコートは融解した日の後は使用せず、また希釈したサンプルも調製した日の後は使用しない。

【0104】

実施例8

雄性カニクイザルでの種々のヒト型抗体の投与24時間後の血漿A 濃度に対する影響

動物(2~4 kg、成体初期~成体、1グループ動物2匹)に抗体(1 mg/kg; ヒト型266 - 配列番号N0:11および配列番号12を発現するように形質転換した宿主細胞中で発現; N56S-配列番号11および配列番号21を発現するように形質転換した宿主細胞中で発現; またはヒト型3D6 - 米国特許出願60/287,539、2001年4月30日出願)を静脈内ボーラス投与した。動物を、ステンレス鋼のケージで個別に飼育した。環境コントロールは、18~29摂氏度、相対湿度30%~70%、明12時間/暗12時間サイクルを維持するように設定した。認可されている靈長類食餌を1日1回または2回与えた。水は自由に摂取させた。動物は、体重、臨床上の観察、臨床上の病理データおよび必要な場合には他のデータに基づき、試験のために選択した。血漿サンプル(投薬前および投薬24時間後)をEDTA中に回収し、分析まで凍結した。

【0105】

免疫反応性の A_{1-40} または A_{1-42} の血漿濃度を、ELISAアッセイを用いて決定した。免疫反応性 A_{1-40} をマウスモノクローナル抗体2G3を用いてELISAプレートで補足するか、または A_{1-42} をマウスモノクローナル抗体21F12を用いて補足した。結合した複合体をビオチニル型3D6抗体を用いて、続いてストレプトアビシン-HRPを添加して検出した。呈色は、TMBを基質として用いて行った。光学密度値を450/630nmで読み取り、生データをSTATLIAソフトウェア (Brendan Scientific)を用いて5パラメーターロジスティックアルゴリズムで分析した。免疫反応性 A_{1-40} の血清濃度を、熱処置した活性炭処理(charcoal stripped)ヒト血清中で調製した16~1000 pg/mlの範囲の校正を用いて推定した。コントロールサンプルの回収率および校正のバックフィット(back-fit)に基づき、このアッセイでの定量の下限および上限を、それぞれ、50および1000pg/mlと推定する。 A_{1-40} に対する結果は以下の表7に示す。投与前濃度が検出限界未満だったので、 A_{1-42} に対する流入は計算できなかった。

【0106】

表7. カニクイザルでの免疫反応性抗体および A_{1-40} の平均濃度 (1グループあたり動物2匹)

【表7】

	ヒト型 266	N56S	ヒト型 3D6
[$A_{\beta}1-40$] 授与前 (ng/mL)	0.6	1.4	0.6
[$A_{\beta}1-40$] 24時間目 (ng/mL)	109	124	12.2
差 (ng/mL)	108	123	11.6
流入(-上昇倍率)	181	87.6	19.3

ヒト型266およびN56Sの投与24時間後の血漿 A_{1-40} の増加は、ほぼ同じであり、ヒト型3D6の投与後の上昇よりもかなり高い。通常のサル(すなわち、A代謝に影響を与える任意の既知の欠損または任意の既知のA関連病態または疾患を有さない)で得られたこれらのデータは、本明細書中に記載のマウス試験、すなわち、抗体投与24時間以内の可溶性(凝集型ではない)Aに対する抗A抗体の親和性が脳から血漿へのAの流入と正に相關していることと一致した。N56Sは、ヒト型266または3D6よりも速いターンオーバーを有している(投与量は同じであるが、血漿中、N56Sの5.5倍の266、および8.6倍の3D6)。従って、存在する抗体の濃度に対して正規化した場合、N56Sに関して24時間目の A_{1-40} レベルは、本発明に基づき予測されるように、ヒト型266に対するものより高く、これはN56Sが可溶性Aに対してヒト型266よりも高い親和性を有するためである。266および3D6により引き起こされる流入の差異は、本明細書中に記載の他の実験で用いたサルまたはマウスのいずれかにおける2種の抗体の薬物動態での差異に起因するかもしれない。

【図面の簡単な説明】

【0107】

【図1】m266抗A抗体の投与24時間後の、物体認識記憶能力。認識の指標は、試行2(テスト試行)の間に新規な目的物を調査するために費やした時間の割合である。生理食塩水およびコントロールのIgGで処理したtgマウスは両方とも偶然レベル(認識指標 = 50%)で実行したが、他方、m266で処理したtgマウスおよびWTマウスは偶然よりも有意に高く実行した(t検定分析)。値は平均 \pm SEM; **は $p < 0.0001$ (生理食塩水およびIgG処理したtg群に対して)を表す; # #は $p < 0.0001$ (野生型(WT)マウスに対して)である。

【図2】m266の投与24時間後の血漿 A_{40} および A_{42} レベル。血漿レベルは物体認識記憶能力に相關した。(A)両方のペプチドの血漿レベルは、生理食塩水またはコントロールIgGで処理したtgマウスと比較して、m266を急速に投与したAPP^{V717F}tgマウス中で顕著に上昇する。値は平均値 \pm SEMである;(B)二変量散布図は、Aの血漿レベルおよび物体

10

20

30

40

50

認識記憶能力の間に非常に有意な相関を示す。

【図3】ホールボード空間学習アッセイ用に用いた装置。

【図4】急速なA_β抗体治療は、APPV717Fマウスにおける参照記憶を改善した。

【図5】急速なA_β抗体治療は、APPV717Fマウスにおける全エラーを減少させた。

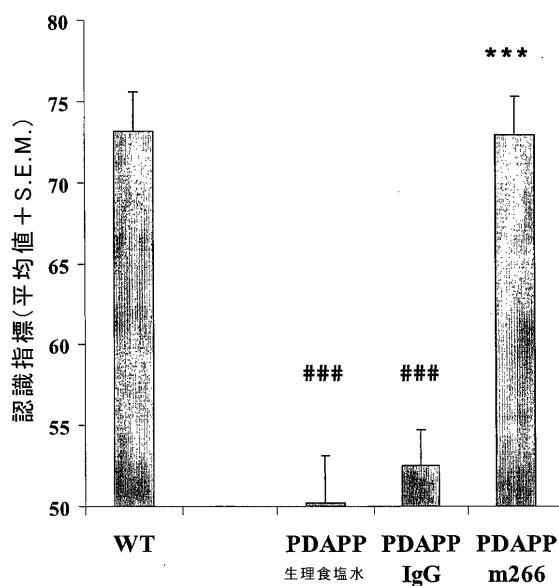
【図6】Log(A_β流入)とLog(可溶性A_βに対する種々の抗A_β抗体の親和性)の間の相関関係。

【図7】Log(A_β流入)およびLog(不溶性A_βに対する種々の抗A_β抗体の親和性)の間の相関関係の欠落。

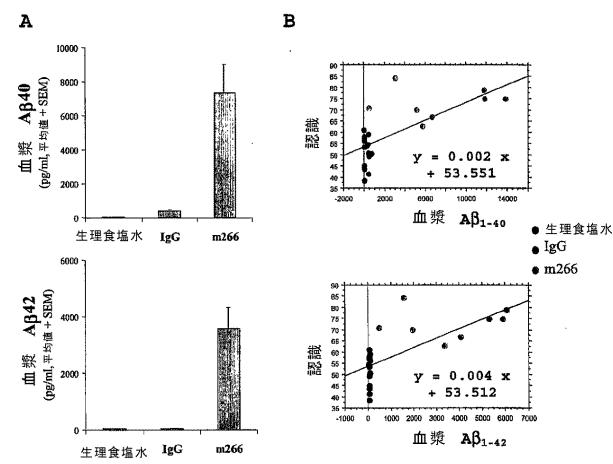
【図8】266または3D6抗A_β抗体の投与24時間後の物体認識記憶能力(*はp<0.05(生理食塩水またはIgGに対する)を意味し、***はp<0.001(生理食塩水またはIgGに対する)を意味する) 10

【図9】Log(A_β流入)およびLog(改変BIAcore法を用いた可溶性A_βに対する種々の抗A_β抗体の親和性)の間の相関関係。

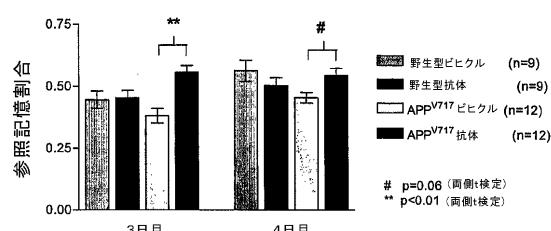
【図1】



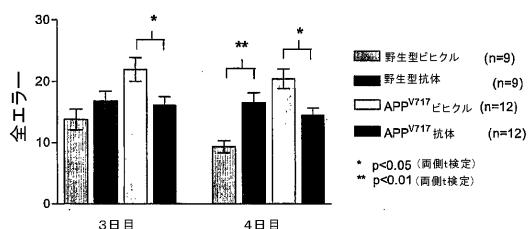
【図2】



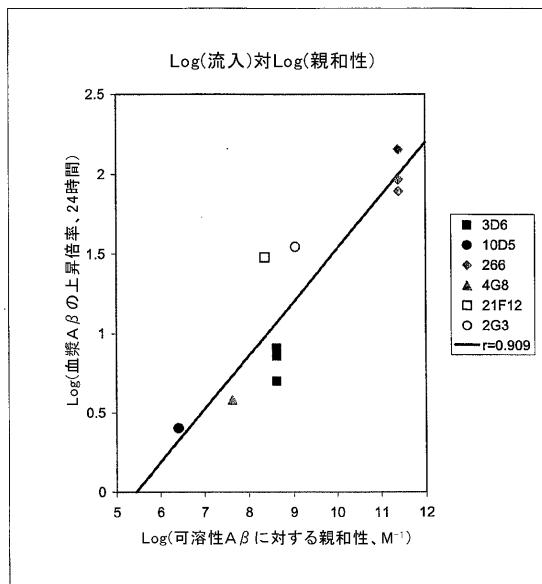
【図4】



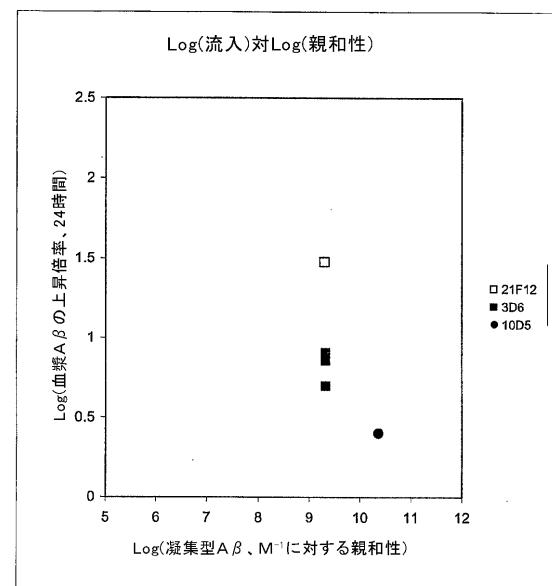
【図5】



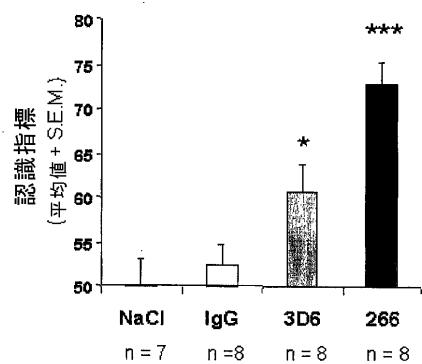
【図6】



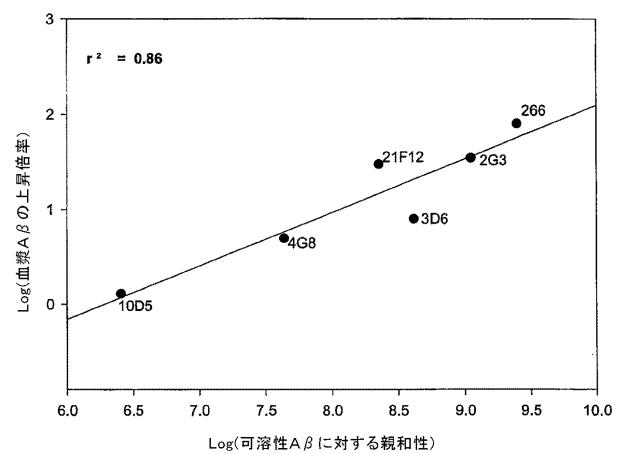
【図7】



【図8】



【図9】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/016467 A2(51) International Patent Classification⁵: C12N 46268 (US). PAUL, Steven, Marc [US/US]; 1145 Laurelwood, Carmel, IN 46032 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/21324

(22) International Filing Date: 14 August 2002 (14.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/313,576 17 August 2001 (17.08.2001) US
60/383,851 28 May 2002 (28.05.2002) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ELI LILLY AND COMPANY [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BALES, Kelly, Renee [US/US]; 8833 Running Creek Court, Indianapolis, IN

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, GE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, IR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, ME, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

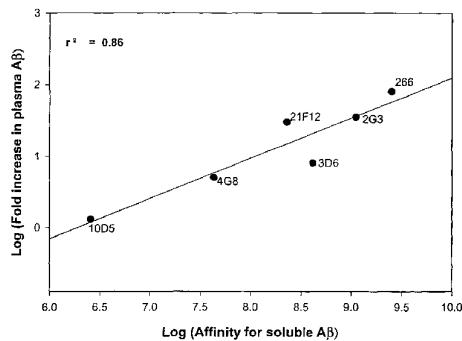
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AL, BE, BG, CL, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK).

[Continued on next page]

(54) Title: USE OF ANTIBODIES HAVING HIGH AFFINITY FOR SOLUBLE ASS TO TREAT CONDITIONS AND DISEASES RELATED TO ASS



WO 03/016467 A2

WO (57) Abstract: This invention provides a method for treating a subject having a condition or disease related to the Aβ peptide comprising administering to the subject an antibody that recognizes Aβ, wherein the antibody has an affinity for soluble Aβ higher than 10⁻⁹ M.

WO 03/016467 A2



TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NH, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(iii)) for the following designations: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

-1-

**USE OF ANTIBODIES HAVING HIGH AFFINITY FOR SOLUBLE A β TO
TREAT CONDITIONS AND DISEASES RELATED TO A β**

This application claims the priority of U.S. Provisional Application 60/313,576, filed August 17, 2001, and U.S. Provisional Application 60/383,851, filed May 28, 2002, 5 both of which are expressly incorporated by reference.

This invention is in the field of medicine. More particularly, this invention is in the field of treatment of conditions and diseases related to the A β peptide, such as Alzheimer's disease, Down's syndrome, cerebral amyloid angiopathy, mild cognitive impairment, and the like.

10 Chronic administration (several months) of antibodies that recognize certain N-terminal epitopes within A β (e.g., polyclonal antibodies raised against aggregated A β 1-42 and monoclonal antibodies 3D6 and 10D5) reduced amyloid plaque in the brains of PDAPP mice [Bard, *et al.* *Nature Med.* 6:916-919 (2000); Schenk, *et al.* WO00/72880, December 7, 2000]. Schenk found that efficacy in reducing plaque was not related to 15 antibody affinity for aggregated A β , despite stating a preference for antibodies with affinity for A β greater than 10^6 M $^{-1}$, 10^7 M $^{-1}$, 10^8 M $^{-1}$, 10^9 M $^{-1}$, or 10^{10} M $^{-1}$. These affinities must be in terms of affinity for aggregated A β because: 1) the affinities for aggregated A β are the only affinities specifically mentioned in the disclosure for specific antibodies; 2) the disclosure reported active immunization that relied on aggregated A β 20 for vaccinations; 3) the disclosure reported that A β plaque reduction following passive immunization with polyclonal antibodies raised against aggregated A β or with other anti-A β antibodies requires adherence of the antibodies to aggregated A β in plaques followed by cell mediated plaque clearance.

Several studies have shown that administration of aggregated A β improves 25 performance in various tests of memory and cognition in animal models of Alzheimer's disease after chronic administration (several weeks to several months) [Weiner, *et al.*, *Ann. Neurol.* 48:567-579 (2000); Janus, *et al.*, *Nature* 408:979-982 (2000); Morgan, *et al.*, *Nature* 408:982-985 (2000)]. However, these investigators used aggregated A β , and so presumably obtained polyclonal antibodies against aggregated A β . Such treatment,

-2-

apparently somewhat effective to improve cognition, is very prolonged and inefficient. Furthermore, the use of forms of A β as antigens may be hazardous and produce immunological responses that are difficult to control and quite variable between subjects.

- DeMattos, *et al.* [Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 98:8850-8855 (2001)] identified an A β -antibody complex after administration of antibodies 266 [Seubert, *et al.*, *Nature* 359:325 – 327 (1992)] or 4G8 [Shoji, *et al.*, *Science* 258:126-129 (1992)], antibodies that recognize epitopes between amino acids 13 and 28 of A β . No complexes were observed when antibodies that recognize other portions of A β were administered, even though some had affinities for soluble A β similar to that of 4G8. It was concluded that antibodies recognizing epitopes in the 13-28 region of A β would cause formation of the complex and sequester A β in the plasma. The affinity of the antibody for A β was not considered an important factor in sequestration of A β in plasma. DeMattos also showed that administration of 266 causes a rapid, massive efflux of A β from the CNS to the plasma within hours after administration.
- 15 We have now found that the rate of A β flux in the first 24 hours after administration of antibodies is related to the affinity of the antibody for soluble A β , and that antibodies with higher affinity for soluble A β cause a more rapid efflux of soluble A β . Most surprisingly, rapid recovery of cognitive performance was seen within 24 hours of administering certain antibodies. The relative magnitude of recovery was related to the 20 rate of efflux of soluble A β within the first 24 hours, and to the affinity of the antibody for soluble A β .

The invention proceeds from the first recognition of an important feature of anti-A β antibodies that was previously unrecognized and could not have been deduced from the prior art, which in fact taught that the important features of effective anti-A β antibodies were either the particular epitope recognized (e.g., N-terminal) or the affinity of the antibody for aggregated forms of A β . The newly recognized, important feature of anti-A β antibodies is their affinity for soluble forms of A β . An antibody having a higher affinity for soluble A β will be more effective in treating conditions or diseases related to the A β peptide.

-3-

SUMMARY OF THE INVENTION

Therefore, this invention provides a method for treating a subject having a condition or disease related to the A β peptide comprising administering to the subject an antibody that recognizes A β , wherein the antibody has greater affinity for soluble A β than 5 10⁻⁹ M. More particularly, the invention is a method for treating cognitive symptoms of a condition or disease associated with A β in a subject, comprising administering to the subject an effective amount of an anti-A β antibody that has greater affinity for soluble A β than antibody 266 has. More particularly, the affinity is with respect to A β 1-40 or A β 1-42.

10 The invention includes a method for reducing disease progression in a subject having a condition or disease associated with A β , comprising administering to the subject an effective amount of an anti-A β antibody that has greater affinity for soluble A β than 10⁻⁹ M. More particularly, the invention is a method for reducing disease progression in a subject having a condition or disease associated with A β , comprising administering to the 15 subject an effective amount of an anti-A β antibody that has greater affinity for soluble A β than antibody 266 has. More particularly, the affinity is with respect to A β 1-40 or A β 1-42.

16 The invention also includes a method for treating cognitive symptoms of a condition or disease associated with A β in a subject, comprising administering to the 20 subject an effective amount of an anti-A β antibody that has affinity for soluble A β 1-40 or A β 1-42 higher than 10⁻⁹ M, more particularly, higher than the affinity of antibody 266.

Also included is the use of an anti-A β antibody that has affinity for soluble A β 1-40 or A β 1-42 higher than 10⁻⁹ M (i.e., higher than the affinity of antibody 266) for 25 preparing medicaments for reducing disease progression or treating cognitive symptoms of a condition or disease associated with A β . More particularly, the invention is the use of an anti-A β antibody having higher affinity for soluble A β than antibody 266 has to prepare a medicament for treating cognitive symptoms or reducing disease progression in a subject having a condition or disease associated with A β .

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Object recognition memory performance 24 hours after administration of m266 anti- $\text{A}\beta$ antibody. The recognition index is the percentage of time spent exploring a novel object during trial 2 (test trial). Both saline- and control IgG-treated tg mice performed at chance levels (recognition index = 50%), whereas m266-treated tg mice and WT mice significantly performed above chance (t-test analysis). Values are means \pm SEM; ** means $p < 0.0001$ vs. saline- and IgG-treated tg groups; ## means $p < 0.0001$ vs. wild type (WT) mice.

Figure 2. Plasma $\text{A}\beta$ 40 and $\text{A}\beta$ 42 levels 24 hours after administration of m266. Plasma levels correlated with object recognition memory performance. (A) Plasma levels of both peptides are markedly increased in APP^{V717F} tg mice acutely administered m266, compared to saline or control IgG-treated tg mice. Values are means \pm SEM; (B) Bivariate scattergrams showing highly significant correlation between plasma levels of $\text{A}\beta$ and the object recognition memory performance.

Figure 3. Apparatus used for holeboard spatial learning assay.

Figure 4. Acute $\text{A}\beta$ antibody treatment improved reference memory in APPV717F mice.

Figure 5. Acute $\text{A}\beta$ antibody treatment decreased total errors in APPV717F mice.

Figure 6. Correlation between Log ($\text{A}\beta$ flux) and Log (affinity of various anti- $\text{A}\beta$ antibodies for soluble $\text{A}\beta$).

Figure 7. Lack of correlation between Log ($\text{A}\beta$ flux) and Log (affinity of various anti- $\text{A}\beta$ antibodies for insoluble $\text{A}\beta$).

Figure 8. Object recognition memory performance 24 hours after administration of 266 or 3D6 anti- $\text{A}\beta$ antibody. (*) means $p < 0.05$ vs. saline or IgG, *** means $p < 0.001$ vs. saline or IgG.

Figure 9. Correlation between Log ($\text{A}\beta$ flux) and Log (affinity of various anti- $\text{A}\beta$ antibodies for soluble $\text{A}\beta$ using altered BIACore method).

-5-

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

By "cognition" is meant short-term memory, long-term memory, abstraction, judgment, language, praxis, visuospatial skills, behavior or personality. Cognition may be assessed in non-human subjects using any of a wide array of tests [Weiner, *et al.*, *Ann. Neurol.* 48:567-579 (2000); Janus, *et al.*, *Nature* 408:979-982. (2000); Morgan, *et al.*, *Nature* 408:982-985 (2000); Dodart, *et al.*, *Neuroreport*, 8:1173-1178 (1997)], and the methods described herein. Cognition in humans may be assessed using any of the tests mentioned below, plus tests such as the Alzheimer's Disease Assessment Scale - Cognitive subscale (ADAS-Cog) component [Rosen, *et al.*, *Am J Psychiatry* 141: 1356-1364 (1984)]. The ADAS-Cog is a 70-point test that briefly assesses memory, language capabilities, and other cognitive functions in patients with dementia.

By "subject" is meant a mammal, preferably a human. A subject will benefit from the present invention if the subject has a cognitive deficiency or aberration caused by or related to the presence of toxic forms and/or concentrations of soluble A β in the subject's brain. Even though the nature or concentration of A β in a subject's brain may not be known with certainty, the administration of well-known tests of cognition in subjects who are suspected or known to suffer from an A β -related disease will suffice to identify many subjects who will benefit from the present methods. For other subjects, a combination of clinical assessment, subject history, and perhaps laboratory or other diagnostic assessments may be needed to identify subjects likely to benefit from the present invention.

A mental status examination of cognitive domains such as language, memory, visuospatial function, executive function (ability to manipulate previously acquired information, multitasking, abstraction, judgment, calculation, etc.), personality, and mood will aid in identifying subjects most likely to benefit from the present invention. Subjects meeting the criteria for a diagnosis of probable AD (i.e., dementia, 40-90 years old, cognitive deficits in two or more cognitive domains, progression of deficits for more than six months, consciousness undisturbed, and absence of other reasonable diagnoses) will benefit from the present invention. Likewise, subjects with Down's syndrome will benefit from the present invention.

The Mini-Mental State Examination (MMSE) is widely used, with norms adjusted for age and education [Folstein *et al.*, *J. Psych. Res.* 12:196-198 (1975); Anthony, *et al.*,

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-6-

Psychological Med. 12: 397-408 (1982); Cockrell, *et al.*, *Psychopharmacology* 24: 689-692 (1988); Crum, *et al.*, *J. Am. Med. Assoc.* 269:2386-2391 (1993)]. The MMSE is a brief, quantitative measure of cognitive status in adults. It can be used to screen for cognitive impairment, to estimate the severity of cognitive impairment at a given point in time, to follow the course of cognitive changes in an individual over time, and to document an individual's response to treatment. Cognitive assessment of subjects may require formal neuropsychologic testing, with follow-up testing separated by nine months or more (in humans). The "cognitive symptoms" treated by the present invention are cognitive deficits known to be associated with conditions and diseases related to A β as discussed herein.

10 Laboratory assessment or structural imaging studies may identify reversible causes of cognitive impairment, which are not likely to respond to the present invention, and to identify focal lesions, significant white matter disease implicating vascular dementia, significant temporal atrophy. In AD, functional studies such as positron emission tomography (PET) or single-photon emission computed tomography (SPECT) typically show abnormalities most marked in the parietal and temporal lobes bilaterally. These studies are particularly useful in differentiating early AD from normal aging or frontotemporal degeneration. They are not required to identify subjects who are likely to benefit from the present invention. The combination of medial temporal atrophy 15 determined by structural imaging and parietal impairment determined with functional imaging is, however, a useful biomarker of AD. MRI can be used to exclude subjects with significant cerebrovascular disease.

20 ApoE genotyping is not useful in isolation, but may increase the specificity of the diagnosis when patients do not have the E4 allele if the diagnosis is in question. Another potential biomarker is the combined assessment of cerebral spinal fluid (CSF) A β 42 and tau concentrations. A low A β 42 and high tau concentration have a high predictive value (90%) and negative predictive value (95%) based on a clinical diagnosis of probable AD.

25 By "condition or disease related to A β " is meant conditions and diseases that are associated with: 1) the development of β -amyloid plaques in the brain, 2) the synthesis of 30 abnormal forms of A β , 3) the formation of particularly toxic forms of A β , or 4) abnormal rates of synthesis, degradation, or clearance of A β . Conditions and diseases such as clinical and pre-clinical Alzheimer's disease, Down's syndrome, cerebral amyloid

-7-

angiopathy, certain vascular dementias, and mild cognitive impairment are known or suspected of having relationship to A β . "Disease progression" refers to worsening of signs or symptoms of the condition or disease with time.

Alzheimer's disease, discussed above, is the most prevalent disease related to A β
5 (60-80% of dementias). Definite diagnosis of AD is only possible presently with a post-mortem examination. But, a diagnosis of probable AD correlates highly with AD pathology. Vascular dementia (VaD), dementia with Lewy bodies (DLB), and frontotemporal dementia (FTD) together probably account for 15% to 20% of dementias, with other disorders (e.g., hydrocephalus; vitamin B12 deficiency) accounting for about
10 5%. Of these, only certain vascular dementias are suspected of having a significant A β component.

A state of increased risk or early manifestation of cognitive problems that often progresses to AD is termed mild cognitive impairment (MCI). MCI is a clinical entity characterized by memory loss, without significant dysfunction in other cognitive domains
15 and without impairment in activities of daily living (ADL) function. Early diagnosis and treatment of MCI, including with the use of the present invention, is important. Currently the best predictor of preclinical AD is a diagnosis of MCI, because 30-50% of subjects with MCI develop AD within 3-5 years. One structural correlate of MCI that may be predictive for which subjects will develop AD is the volume of the hippocampus.

20 Subjects with MCI have smaller hippocampi than age-equivalent controls and appear to experience atrophy of the structure at a more rapid pace.

By "administering" is meant the act of introducing a pharmaceutical agent into the subject's body. The parenteral route is the preferred route of administering the antibodies in the methods of the present invention. Preferred parenteral routes include subcutaneous, intravenous, and intraperitoneal.

25 By "effective dose" is meant an amount of antibody, which when administered to the subject, will cause improvement in cognition. The amount of antibody in an effective dose can be readily determined by a skilled physician or clinical pharmacologist, taking into account the subject's body mass, age, gender, severity of the A β -related condition or
30 disease, affinity of the antibody for soluble A β , route of administration, and similar factors well known to physicians and pharmacologists. Effective doses may be expressed, for example, as the total mass of antibody (e.g., in grams, milligrams or micrograms) or as

-8-

a ratio of mass of antibody to body mass (e.g., as grams per kilogram (g/kg), milligrams per kilogram (mg/kg), or micrograms per kilogram (μg/kg)). An effective dose of antibody in the present methods will range between 1 μg/kg and 100 mg/kg. A more preferred range for effective dose in the present invention is between 1 μg/kg and 30 mg/kg. Yet 5 more preferred ranges are between 1 μg/kg and 10 mg/kg, 1 μg/kg and 10 mg/kg, between 1 μg/kg and 1 mg/kg, between 1 μg/kg and 0.3 mg/kg, and between 1 μg/kg and 0.1 mg/kg.

“A β peptide” and “A β ” refer to a peptide that is derived from amyloid precursor protein (“APP” – Alzheimer’s disease amyloid A4 protein [Precursor]) by proteolytic cleavage. Full-length A β peptides are from 39 to 43 amino acids long in humans, for example. Full length A β peptide may undergo further cleavage *in vivo* to produce A β fragments that are shorter at the N-terminus, at the C-terminus, or both, by one to several amino acids. Soluble full-length A β peptide or fragments thereof may be used as antigens to raise antibodies that bind soluble A β peptide with high specificity and affinity. For 10 example, among the many A β peptide fragments used for this purpose, the A β 13 – 28 fragment (conjugated via m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester to an anti-CD3 antibody) was used to raise antibody 266 [Seubert, *et al.*, *Nature* 359:325 – 327 (1992)]. The use of antibody 266 for selective measurement of soluble A β is well known [Schenk, *et al.*, U.S. Patents 5,593,846, 5,766,846, 5,872,672, and 6,284,221 B1]. 15 Assessment of binding to “soluble A β ” is carried out with A β in an unaggregated form, predominantly monomeric form, as described hereinbelow.

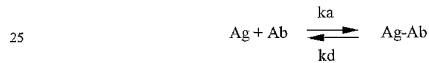
The expression “anti-A β antibody” means an antibody that binds to soluble A β . The antibody preferably binds with high affinity to soluble A β . Affinity higher than that of antibody 266 is preferred. Affinity higher than 10^{-9} M is preferred. Affinity higher 20 than 10^{-10} M is more preferred. Affinity higher than 10^{-11} M is yet more preferred. Affinity higher than 10^{-12} M is highly preferred. The term “A β ” in this context includes the 39, 40, 41, 42, and 43 amino acid peptides derived from the APP protein *in vivo* by proteolysis, and any fragments of those peptides, such as N-terminally shortened peptides derived from those peptides (e.g., denoted by, for example, x-42, where x = 1, 2, 3, etc.), 25 C-terminally shortened peptides derived from 1-39, 40, 41, and 42 peptides, and peptides shortened at both termini. The expression “A β 40” is used to denote peptides that bind to antibodies that bind only at an A β C-terminus that ends at position 40. The expression 30

-9-

"A β 42" denotes peptides that bind to antibodies that bind only at an A β C-terminus that ends at position 42.

By "affinity" is meant the strength of the binding of a single antigen-combining site with an antigenic determinant. It is a measure of the binding strength between 5 antibody and a simple hapten or antigen determinant. It depends on the closeness of stereochemical fit between antibody combining sites and antigen determinants, on the size of the area of contact between them, and on the distribution of charged and hydrophobic groups. It includes the concept of "avidity," which refers to the strength of the antigen-antibody bond after formation of reversible complexes. The most direct way of 10 measuring antibody affinity is by the well known method of equilibrium dialysis. Methods requiring less time or materials than equilibrium dialysis are known, for example, the method of Griswold, *et al. Immunology Letters* 9:15-18 (1985) and the 15 kinetic BIAcore method described herein. The BIAcore method relies on the phenomenon of surface plasmon resonance (SPR), which occurs when surface plasmon waves are excited at a metal/liquid interface. Light is directed at, and reflected from, the side of the surface not in contact with sample, and SPR causes a reduction in the reflected 20 light intensity at a specific combination of angle and wavelength. Bimolecular binding events cause changes in the refractive index at the surface layer, which are detected as changes in the SPR signal.

20 The dissociation constant, KD, and the association constant, KA, are quantitative measures of affinity. At equilibrium, free antigen (Ag) and free antibody (Ab) are in equilibrium with antigen-antibody complex (Ag-Ab), and the rate constants, ka and kd, quantitate the rates of the individual reactions:



At equilibrium, $\text{ka} [\text{Ab}][\text{Ag}] = \text{kd} [\text{Ag-Ab}]$. The dissociation constant, KD, is given by: $\text{KD} = \text{kd/ka} = [\text{Ag}][\text{Ab}] / [\text{Ag-Ab}]$. KD has units of concentration, most typically M, mM, nM, pM, etc. When comparing antibody affinities expressed as 30 KD, having greater affinity for A β is indicated by a lower value. The association constant, KA, is given by: $\text{KA} = \text{ka/kd} = [\text{Ag-Ab}] / [\text{Ag}][\text{Ab}]$. KA has units of inverse concentration, most typically M^{-1} , mM^{-1} , μM^{-1} , nM^{-1} , pM^{-1} , or the like. When comparing

-10-

antibody affinities expressed as KA, having greater affinity for A β is indicated by a higher value. "Affinity for soluble" A β is measured as described herein using samples of A β , typically A β 1-40 or A β 1-42, that are reasonably free of aggregated forms of A β . For antibodies having high affinity for soluble A β , particular care must be taken when using

5 the BIAcore technology, as described hereinbelow.

As used herein, the word "treat" includes therapeutic treatment, where a condition to be treated is already known to be present, and prophylaxis - *i.e.*, prevention of, or amelioration of, the possible future onset of a condition. The term "treating" includes prophylaxis (preventing), amelioration (reducing or reversing), or elimination of a sign,

10 symptom, condition, disease, or disorder.

By "antibody" is meant a whole antibody, including without limitation an animal-derived antibody (e.g., murine), chimeric, humanized, human sequence, recombinant, transgenic, grafted and single chain antibody, and the like, and any fusion proteins, conjugates, fragments, or derivatives thereof. An antibody comprises protein resembling

15 an antibody in the broadest sense in that the protein comprises a binding site for an antigen, which binding site is comprised of three pairs of complementarity determining regions. Antibody includes a whole immunoglobulin molecule, a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody, or an immunologically effective fragment of any of these. An antibody fragment, or simply fragment, means an

20 Fv, a disulfide linked Fv, scFv, Fab, Fab', or F(ab')₂ fragment, which terms are well known in the art. In some contexts herein, fragments will be mentioned specifically for emphasis. Nevertheless, it will be understood that regardless of whether fragments are specified, the term "antibody" includes such fragments as well as single-chain forms. As long as a protein retains the ability specifically to bind its intended target, it is included

25 within the term "antibody." Also included within the definition "antibody" are single chain forms. Preferably, but not necessarily, the antibodies useful in the invention are produced recombinantly. Antibodies may or may not be glycosylated, though glycosylated antibodies are preferred under some circumstances, such as when prolonged residence in the body is desirable, or when minimum risk of developing neutralizing

30 antibodies. Antibodies, except perhaps for certain types in which cross-linking between chains is accomplished by peptide or other chemical chains, are properly cross-linked via disulfide bonds.

-11-

The basic antibody structural unit is known to comprise a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kDa) and one "heavy" chain (about 50-70 kDa). The amino-terminal portion of each chain includes a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily 5 responsible for antigen recognition. The carboxy-terminal portion of each chain defines a constant region primarily responsible for effector function.

Light chains are classified as kappa and lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, and define the antibody's isotype as IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively. IgG isotypes are preferred. Of the IgG subclasses, IgG1 and 10 IgG4 are preferred.

The variable regions of each light/heavy chain pair form the antibody binding site. Thus, an intact non-fragment antibody and certain fragments (e.g., an F(ab')₂ fragment) has two binding sites, whereas, most fragments have only one binding site per molecule. The chains all exhibit the same general structure of relatively conserved framework 15 regions (FR) joined by three hypervariable regions, also called complementarity determining regions or CDRs. The CDRs from the two chains of each pair are aligned by the framework regions, enabling binding to a specific epitope. From N-terminal to C-terminal, both light and heavy chains comprise the domains FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 and FR4. The assignment of amino acids to each domain is in accordance 20 with well known conventions [Kabat, *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991; Chothia, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia, *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989)].

By "humanized antibody" is meant an antibody that is composed partially or fully of amino acid sequences derived from a human antibody germline by altering the 25 sequence of an antibody having non-human complementarity determining regions (CDR). Humanized antibodies are also referred to as CDR-grafted or reshaped antibodies. A humanized immunoglobulin does not encompass a chimeric antibody having a mouse variable region and a human constant region. However, the variable region of the antibody and even the CDR are humanized by techniques that are by now well known in 30 the art. The framework regions of the variable regions are substituted by the corresponding human framework regions leaving the non-human CDR substantially intact. As mentioned above, it is sufficient for use in the methods of the invention, to

-12-

employ an immunologically specific fragment of the antibody, including fragments representing single chain forms.

Although the mechanics of producing an engineered, humanized mAb using the techniques of molecular biology are relatively straightforward, simple grafting of 5 xenogenic (usually rodent) complementarity-determining regions (CDRs) into human frameworks does not always reconstitute the binding affinity and specificity of the original mAb. The design of the engineered mAb is the critical step in reproducing the function of the original molecule. This design includes various choices: the extents of the CDRs, the human frameworks to use and the substitution of residues from the rodent 10 mAb into the human framework regions (backmutations). The positions of these backmutations have been identified principally by sequence/structural analysis or by analysis of homology models of the variable regions' 3D structure. Recently, phage libraries have been used to vary the amino acids at chosen positions. Similarly, many approaches have been used to choose the most appropriate human frameworks in which to 15 graft the rodent CDRs. Variable regions with high amino acid sequence identity to the rodent variable regions (homology matching or best-fit), consensus or germline sequences, or fragments of the framework sequences within each light or heavy chain variable region from several different human mAbs may be used. Alternatively the surface rodent residues may be replaced with the most common residues found in human 20 mAbs ("resurfacing" or "veneering").

The design of humanized immunoglobulins starting from a non-human antibody that has properties found to be critical in the present invention may be carried out as follows. As to the human framework region, a framework or variable region amino acid sequence of a CDR-providing non-human immunoglobulin is compared with 25 corresponding sequences in a human immunoglobulin variable region sequence collection, and a sequence having a high percentage of identical amino acids is selected. When an amino acid falls under the following category, the framework amino acid of a human immunoglobulin to be used (acceptor immunoglobulin) is replaced by a framework amino acid from a CDR-providing non-human immunoglobulin (donor 30 immunoglobulin):

- (a) the amino acid in the human framework region of the acceptor immunoglobulin is unusual for human immunoglobulin at that position, whereas the

-13-

- corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is typical for human immunoglobulin at that position;
- (b) the position of the amino acid is immediately adjacent to one of the CDRs; or
- (c) any side chain atom of a framework amino acid is within about 5-6 angstroms 5 (center-to-center) of any atom of a CDR amino acid in a three dimensional immunoglobulin model [Queen, *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 86:10029-10033 (1989); Co, *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 88:2869 (1991)]. When each of the 10 amino acid in the human framework region of the acceptor immunoglobulin and a corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is unusual for human immunoglobulin at that position, such an amino acid is replaced by an amino acid typical for human immunoglobulin at that position.

Human antibodies may be readily obtained using known methods, such as, from human immune donors, from phage libraries, and from transgenic animals such as mice. Antibodies may be rescued from immune human donors using either EBV transformation 15 of B-cells or by PCR cloning and phage display. Synthetic phage libraries may be created that use randomized combinations of synthetic human antibody V-regions. By selection on antigen, so called 'fully human antibodies' can be made, in which it is assumed that the V-regions are very human-like in nature. Transgenic mice can be created that have a repertoire of human immunoglobulin germline gene segments. These mice, when 20 immunized with soluble A β , make human antibodies directed against soluble A β .

Preparation of high affinity humanized or human antibodies for use in the present invention may be carried out by methods well known in the art, including preparing monoclonal antibodies using well known techniques and screening for high affinity 25 antibodies, or by first identifying a monoclonal antibody having reasonably high affinity and then improving the affinity using well known methods such as those described, for example, in: US Patent Nos. 5,976,562, 5,824514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323; WO97/29131; Thomas, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:2059-2064 (2002); Shreder, *Methods* 20:372-379 (2000); Boder, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 97:10701-10705 (2000); Chen, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999); Wu, *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 95:6037-6042 (1998); Hoogenbloom, *Trends Biotechnol.* 15:62-70 (1997); Rader, *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:503-508 (1997); Crameri, *et al.*, *Nature Medicine* 2:100-30 102 (1996); Crameri, *et al.*, *Nature Medicine* 2:100-103 (1996); Schier, *et al.*, *J. Mol.*

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-14-

Biol. 255:28-43 (1996); *Yang, et al., J. Mol. Biol.* 254:392-403 (1995); *Yang, et al., J. Mol. Biol.* 254:392-403 (1995); *Yelton, et al., J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); *Stemmer, Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 91:10747-10751 (1994); *Stemmer, Nature* 370:389-391 (1994); *Huse, et al., Internat'l Rev. Immunol.* 10:129-137 (1993); the 5 portion of each of which having to do with preparation of high affinity antibodies is incorporated herein by reference.

The antibodies used in the present invention will most advantageously be expressed in recombinant hosts and purified using well known techniques [Page, *et al.*, *Bio/Technol.* 9, 64-68 (1991); Carroll, *et al., Mol. Immunol.* 29, 821-827 (1992); Coloma, 10 *et al., J. Immunol. Meth.* 152, 89-104 (1992); Bebbington, *et al., Bio/Technol.* 10, 169-175 (1992); Deyev, *et al., FEBS Lett.* 330, 111-113 (1993); Bender, *et al., Hum. Antibodies Hybridomas* 4, 74-79 (1993); Norderhaug, *et al., J. Immunol. Meth.* 204, 77-87 (1997); Poul, *et al., Eur. J. Immunol.* 25, 2005-2009 (1995), each of which is incorporated herein by reference].

15 A preferred antibody for use in the present invention is an antibody that binds to the same epitope on A β that 266 binds or any antibody that competitively inhibits the binding of 266 and human or mouse A β . The skilled reader will know how to determine, using well known methods, whether any particular antibody competitively inhibits the binding of 266 and human A β . For example, a competitive ELISA method could be used. 20 Wells of a 96-well ELISA plate (e.g., Nunc-Immuno plate, Cat # 439454, NalgeNunc) are coated with A β peptide (1-40 is particularly convenient, but other lengths could be used also), optionally conjugated to a larger protein such as albumin. After washing the wells, they are blocked as appropriate, and then rinsed and dried appropriately. A mixture of biotinylated 266 antibody (e.g., biotinylated humanized 266, having as light chain the 25 amino acid sequence of SEQ ID NO:11 and as heavy chain the amino acid sequence of SEQ ID NO:12) at 0.3 μ g/ml final concentration, for example, and a competitor antibody (starting at 750 μ g/ml final concentration and serial 3-fold dilutions) are added in a final volume of 100 μ l per well. No-competitor and background controls are run. The ELISA plate is incubated at an appropriate temperature for an appropriate length of time, and then 30 the wells are washed. After washing the wells, HRP-conjugated streptavidin (Cat # 21124, Pierce), or equivalent, is added to each well (e.g., 100 μ l of 1 μ g/ml). The plate is incubated at room temperature for an appropriate length of time, e.g., 30 min, and then is

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-15-

thoroughly washed. For color development, 100 μ l/well of ABTS Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories), or equivalent, is added. Color development is stopped and absorbance is read (e.g., at 415 nm). The absorbances are plotted against the log of the competitor concentration, curves are fitted to the data points (e.g., using Prism or equivalent) and the IC50 determined using methods well known in the art. An antibody having an IC50 greater than 100-fold less than of that of 266 is considered to competitively inhibit the binding of 266 to A β . The affinity of an antibody for soluble A β can be determined using methods well known in the art or described herein.

5 Antibody 266 has the following amino acid sequences as CDRs:

10 light chain CDR1:

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

15

light chain CDR2:

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

20 light chain CDR3:

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

heavy chain CDR1:

25 1 5
Arg Tyr Ser Met Ser (SEQ ID NO:4)

heavy chain CDR2:

30 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)

and, heavy chain CDR3:

35 1
Gly Asp Tyr (SEQ ID NO:6).

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-16-

In humanized versions of 266, human framework regions may optionally have substitutions of one to several residues from mouse 266 for the purpose of maintaining the strength or specificity of the binding of humanized antibody 266 [WO01/62801]. A preferred light chain variable region of a humanized 266 antibody has the following

5 amino acid sequence:

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

Arg (SEQ ID NO:7)

30

wherein:

Xaa at position 2 is Val or Ile;
Xaa at position 7 is Ser or Thr;
Xaa at position 14 is Thr or Ser;
Xaa at position 15 is Leu or Pro;
Xaa at position 30 is Ile or Val;
Xaa at position 50 is Arg, Gln, or Lys;
Xaa at position 88 is Val or Leu;

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-17-

Xaa at position 105 is Gln or Gly;

Xaa at position 108 is Lys or Arg; and

Xaa at position 109 is Val or Leu.

5 A preferred heavy chain variable region of a humanized 266 antibody has the following amino acid sequence:

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

(SEQ ID NO:8)

30

wherein:

Xaa at position 1 is Glu or Gln;

Xaa at position 7 is Ser or Leu;

Xaa at position 46 is Glu, Val, Asp, or Ser;

35 Xaa at position 63 is Thr or Ser;

Xaa at position 75 is Ala, Ser, Val, or Thr;

Xaa at position 76 is Lys or Arg;

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-18-

Xaa at position 89 is Glu or Asp; and

Xaa at position 107 is Leu or Thr.

A particularly preferred light chain variable region of a humanized 266 antibody
 5 has the following amino acid sequence:

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

A particularly preferred heavy chain variable region of a humanized 266 antibody
 has the following amino acid sequence:

35	1	5	10	15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly				
20	25	30		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr				

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-19-

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

(SEQ ID NO:10).

20 A preferred light chain for a humanized 266 antibody has the amino acid sequence:

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

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-20-

95	100	105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln		
110	115	120
5	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		
170	175	180
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
185	190	195
20	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys	
200	205	210
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
215		
25	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	

(SEQ ID NO:11).

A preferred heavy chain for a humanized 266 antibody has the amino acid
 30 sequence:

1	5	10	15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
35	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			
40			

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-21-

	50	55	60
	Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr		
	65	70	75
5	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		
10	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		
15	125	130	135
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
	140	145	150
20	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		
25	170	175	180
	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
	185	190	195
	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
30	200	205	210
	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
	215	220	225
35	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
	230	235	240
	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
40	245	250	255
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-22-

	260	265	270
	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
	275	280	285
5	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		
10	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		
15	335	340	345
	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
	350	355	360
20	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		
25	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		
30	410	415	420
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
	425	430	435
35	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:12).		

40 A preferred antibody for use in the present invention is an analog of 266, in which an N-glycosylation site within CDR2 of the heavy chain (SEQ ID NO:5) is engineered so

-23-

as not to be glycosylated. Such an analog has higher affinity for A β than 266 does, and comprises a light chain and a heavy chain, wherein the light chain comprises the three light chain complementarity determining regions (CDRs) from mouse monoclonal antibody 266 (SEQ ID NO:1-3), and wherein the heavy chain comprises heavy chain 5 CDR1 and CDR3 from mouse monoclonal antibody 266 (SEQ ID NO: 4 and 6, respectively), and a heavy chain CDR2 having the sequence given by SEQ ID NO:13:

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

wherein,

- Xaa at position 7 is any amino acid, provided that if Xaa at position 8 is neither 15 Asp nor Pro and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 7 is not Asn;
Xaa at position 8 is any amino acid, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 8 is Asp or Pro; and
Xaa at position 9 is any amino acid, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 9 is neither Ser nor Thr.
20 By "any amino acid" is meant any naturally occurring amino acid. Preferred naturally-occurring amino acids are Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr.
A preferred group of antibodies are those having as light chain CDR1-CDR3 the sequences SEQ ID NO:1-3, respectively, as heavy chain CDR1 and CDR3 the sequences 25 SEQ ID NO:4 and 6, respectively, and wherein the sequence of heavy chain CDR2 is SEQ ID NO:13, wherein:
Xaa at position 7 of SEQ ID NO:13 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr, provided that if Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 9 is 30 Ser or Thr, then Xaa at position 7 is not Asn;
Xaa at position 8 of SEQ ID NO:13 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp,

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-24-

and Tyr, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 8 is Asp or Pro; and

Xaa at position 9 of SEQ ID NO:13 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, 5 and Tyr, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 9 is neither Ser nor Thr.

Another description of the preferred group is: antibodies or fragments thereof having as light chain CDR1-CDR3 the sequences SEQ ID NO:1-3, respectively, as heavy chain CDR1 and CDR3 the sequences SEQ ID NO:4 and 6, respectively, and wherein the sequence of heavy chain CDR2 is selected from the group consisting of:

1) SEQ ID NO:14
1 5 10 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
15
Gly (SEQ ID NO:14)

wherein:

Xaa at position 7 of SEQ ID NO:14 is selected from the group consisting of Ala,
20 Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and
Tyr;

Xaa at position 8 of SEQ ID NO:14 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr; and

25 Xaa at position 9 of SEQ ID NO:14 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr;

2) SEQ ID NO:15
 30 1 5 10 15
 Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 Gly (SEQ ID NO:15)

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-25-

wherein:

Xaa at position 7 of SEQ ID NO:15 is Asn;

Xaa at position 8 of SEQ ID NO:15 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, 5 and Tyr; and

Xaa at position 9 of SEQ ID NO:15 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Val, Trp, and Tyr; and

10 3) SEQ ID NO:16

1 5 10 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

Gly (SEQ ID NO:16)

15

wherein:

Xaa at position 7 of SEQ ID NO:16 is Asn;

Xaa at position 8 of SEQ ID NO:16 is selected from the group consisting of Asp and Pro; and

20 Xaa at position 9 of SEQ ID NO:16 is selected from the group consisting of Ser and Thr.

Preferred sequences for CDR2 of the heavy chain include those in which only a single amino acid is changed, those in which only two amino acids are changed, or all 25 three are changed. It is preferred to replace Asn at position 7, or to replace Thr at position 9, or to replace both. Conservative substitutions at one, two, or all three positions are preferred. The most preferred species are those in which Asn at position 7 is replaced with Ser or Thr.

Preferred deglycosylated 266 antibodies for use in the present invention are those 30 in which in CDR2 of the heavy chain (i.e., within SEQ ID NO:13, as described above):

Xaa at position 7 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr, provided that if Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 7 is not Asn;

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-26-

Xaa at position 8 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr; and

Xaa at position 9 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr, provided that if Xaa at position 7 is Asn, then Xaa at position 9 is neither

5 Ser nor Thr.

An alternate description of preferred declycogylated 266 antibodies is: antibodies or fragments thereof having as light chain CDR1-CDR3 the sequences SEQ ID NO:1-3, respectively, as heavy chain CDR1 and CDR3 the sequences SEQ ID NO:4 and 6, respectively, and wherein the sequence of heavy chain CDR2 is selected from the group consisting of:

19 consisting of:

1) SEQ ID NO:17
1 5 10 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
Gly (SEQ ID NO:17)

wherein:

20 Xaa at position 7 of SEQ ID NO:17 is selected from the group consisting of Ala,
Gly, His, Gln, Ser, and Thr;

Xaa at position 8 of SEQ ID NO:17 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr; and

Xaa at position 9 of SEQ ID NO:17 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr; and

25

2) SEO ID NO:18

1 5 10 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

30 G

Xaa at position 7 of SEQ ID NO:18 is Asn:

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-27-

Xaa at position 8 of SEQ ID NO:18 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr; and

Xaa at position 9 of SEQ ID NO:18 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, and Gln.

5

A preferred humanized antibody for use in the present invention has the light chain variable region of SEQ ID NO:7 and a heavy chain variable region of SEQ ID NO:19:

10	1	5	10	15
Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa 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				
15		35	40	45
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu				
		50	55	60
20	Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr			
		65	70	75
Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa				
25		80	85	90
Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp				
		95	100	105
30	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:19)				

wherein:

35 Xaa at position 1 is Glu or Gln;

Xaa at position 7 is Ser or Leu;

Xaa at position 46 is Glu, Val, Asp, or Ser;

-28-

Xaa at position 56 is any amino acid, provided that if Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 59 is Ser or Thr, then Xaa at position 56 is not Asn;

Xaa at position 57 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 58 is Ser or Thr, then Xaa at position 57 is Asp or Pro; and

5 Xaa at position 58 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 58 is neither Ser nor Thr

Xaa at position 63 is Thr or Ser;

Xaa at position 75 is Ala, Ser, Val, or Thr;

10 Xaa at position 76 is Lys or Arg;

Xaa at position 89 is Glu or Asp; and

Xaa at position 107 is Leu or Thr.

A preferred humanized antibody for use in the present invention has the light
15 chain variable region of SEQ ID NO:9 and a heavy chain variable region of SEQ ID
NO:20:

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			
25	35	40	45
Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
30	50	55	60
Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr			
35	65	70	75
Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala			
40	80	85	90
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
45	95	100	105
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-29-

110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:20).

5 wherein:

Xaa at position 56 is any amino acid, provided that if Xaa at position 57 is neither

Asp nor Pro and Xaa at position 59 is Ser or Thr, then Xaa at position 56 is not Asn;

Xaa at position 57 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 58 is Ser or Thr, then Xaa at position 57 is Asp or Pro; and

10 Xaa at position 58 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 58 is neither Ser nor Thr.

A preferred humanized antibody for use in the present invention has the light chain variable region of SEQ ID NO:11 and a heavy chain given by SEQ ID NO:21:

15
 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
 25 50 55 60
 Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr
 30 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
 35 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

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-30-

	125	130	135
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
5	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		
10	170	175	180
	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
	185	190	195
15	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		
20	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		
25	245	250	255
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
	260	265	270
30	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		
35	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		
40	320	325	330
	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-31-

	335	340	345
	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
5	350	355	360
	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
10	365	370	375
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
15	380	385	390
	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
20	395	400	405
	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
25	410	415	420
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
30	425	430	435
	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
35	440		
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO:21)		

wherein:

Xaa at position 56 is any amino acid, provided that if Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 59 is Ser or Thr, then Xaa at position 56 is not Asn;

Xaa at position 57 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 58 is Ser or Thr, then Xaa at position 57 is Asp or Pro; and

Xaa at position 58 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 58 is neither Ser nor Thr.

Preferred deglycosylated 266 antibodies having the heavy variable region according to SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, and SEQ ID NO:21 are those wherein:

Xaa at position 56 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr, provided that if Xaa at position 58 is Ser or Thr, then Xaa at position 56 is not Asn;

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-32-

Xaa at position 57 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr; and

Xaa at position 58 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr, provided that if Xaa at position 56 is Asn, then Xaa at position 58 is 5 neither Ser nor Thr.

Preferred sequences for CDR2 (positions 56, 57, and 58) of the heavy chain SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, and SEQ ID NO:21 include those in which only a single amino acid is changed, those in which only two amino acids are changed, or all three are changed. It is preferred to replace Asn at position 56. It is preferred to replace Thr at 10 position 58 with an amino acid other than Ser. It is preferred to not destroy the N-glycosylation site in the CDR2 of the 266 heavy chain by replacing Ser at position 57 with Pro or Asp. Conservative substitutions at one, two, or all three positions are preferred. The most preferred species are those in which Asn at position 56 is replaced with Ser or Thr. Particularly preferred antibodies are those in which Ser or Thr is at position 56, Ser 15 is at position 57, and Thr is at position 58 of SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, or SEQ ID NO:21.

The most preferred species are antibodies comprising a light chain of SEQ ID NO:11 and a heavy chain of SEQ ID NO:21, wherein in SEQ ID NO:21, Xaa at position 56 is Ser, Xaa at position 57 is Ser, and Xaa at position 58 is Thr ("N56S"), or wherein in 20 SEQ ID NO:21, Xaa at position 56 is Thr, Xaa at position 57 is Ser, and Xaa at position 58 is Thr ("N56T").

The antibodies (including immunologically reactive fragments) are administered to a subject as identified above using standard parenteral, peripheral administration techniques, by intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, pulmonary, transdermal, 25 intramuscular, intranasal, buccal, sublingual, or suppository administration. The preferred routes of administration are intravenous, subcutaneous, and intraperitoneal.

The preparation of an acceptable pharmaceutical preparation of the antibodies used in the present invention, including its strength, excipients, pH, isotonicity, presentation, dosage form, and the like, is well known to the skilled person.

30 Pharmaceutical compositions for use in the present invention should be appropriate for the selected mode of administration, and pharmaceutically acceptable excipients such as, buffers, surfactants, preservatives, solubilizing agents, isotonicity agents, stabilizing

-33-

agents and the like are used as appropriate. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, latest edition, incorporated herein by reference, provides a compendium of formulation techniques as are generally known to practitioners.

Pharmaceutical preparations for use in the present invention should be sterile or at least 5 nearly so, and if necessary preserved or rendered bacteriostatic.

The following examples are intended to illustrate, not limit, the invention. The examples describe experiments conducted in murine systems, thus the use of murine monoclonal antibodies is satisfactory. However, in the treatment methods of the invention intended for human use, humanized or fully human antibodies are preferred.

10

EXAMPLES

Example 1

Rapid Improvement in Cognition after Administration of Anti-A_β Antibody 266

15 APPV717F transgenic mice (PDAPP mice, eleven month old) were used [Games et al., *Nature* 373:523-527 (1995)]. The mice were handled daily 5 days before the behavioral testing. All animals had free access to food and water. They were housed at a room temperature of 23 ± 1°C and with a light-dark cycle of 12:12 h with lights on at 6:00 a.m. Behavioral experiments were conducted during the light period, between 8:00 a.m.

20 and 2 p.m.

The object recognition task is based on the spontaneous tendency of rodents to explore a novel object more often than a familiar one [Ennaceur et Delacour, *Behavioral Brain Research*. 31:47-59 (1988); Dodart et al., *Neuroreport*. 8:1173-1178 (1997)]. This task was performed in a black Plexiglas™ open field (50 X 50 X 40 cm). The objects to 25 be discriminated were a marble (1.5 cm diameter) and a plastic dice (1.8 cm edge). After each trial, the objects were handled with disposable gloves and immersed in alcohol to eliminate olfactory cues. Before experiments, several male mice were placed in the open field in order to condition the testing environment. On the first day of testing, mice were submitted to a familiarization session by placing them in the empty open field for 30 min 30 and the distance traveled (cm) was recorded by at 5-minute intervals using a computer-assisted video tracking system (San Diego Instrument, CA). On the following day, mice were submitted to two 10 min trials with a 3 hour inter-trial delay. During trial 1, mice

-34-

were allowed to explore the open field in the presence of object A (marble or dice). The distance traveled (cm) and the time spent exploring the object (nose pointing toward the object at a distance \leq 1 cm) were recorded with the video tracking system and by hand, respectively. For trial 2, mice were allowed to explore the open field in the presence of 5 two objects: the familiar object ("object A") and a novel object ("object B") (e.g., a marble and a die).

A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $(t_B \times 100)/(t_A + t_B)$ where t_A and t_B are the time spent on object A and object B respectively. An observer blind to the treatment status of the animals recorded the object exploration 10 time.

15 Murine anti-A β antibody 266 [“m266”, Seubert, *et al.*, *Nature* 359:325-327 (1992)] and a purified mouse IgG1 isotype control (Pharmingen) were diluted from stock solutions in PBS prior to administration. Animals were injected (500 μ L, i.p.) with m266 (n=8, 1 mg/mL) control IgG solution (n=8, 1 mg/mL) or PBS (n=7) 3 hours before the familiarization session, which corresponds to 24 hours before trial 1. An additional control group of wild-type mice (WT) animals was tested in parallel in the object 20 recognition task (n=6).

25 After completion of trial 2, blood and CSF fluids were sampled, and brains were processed using a 3-step extraction procedure. The first step consisted of homogenizing samples in cold PBS and complex of proteinase inhibitors (CompleteTM, Boehringer-Mannheim, IN) followed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4°C, the supernatant was considered as the PBS “soluble” pool. The second step consisted of re-suspension of the pellet in RIPA (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% DOC, 1% NP40, 0.1% SDS and CompleteTM, pH 8.0) followed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4°C, the supernatant was designated the “detergent soluble” pool. Finally, the third step consisted of re-suspension of the pellet in 5M Guanidine-HCl, rocking the tubes for 2 hours at room temperature, followed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4°C. This step produced the “insoluble” pool. A β 40 and A β 42 were quantified in each pool using an ELISA [Bales, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15233-15238 (1999)].

30 Briefly, for the ELISA, the monoclonal antibodies 2G3 and 21F12 were used to capture A β peptides terminating at residues 40 and 42 respectively [Johnson-Wood, *et al.*,

-35-

1997]. Biotinylated 3D6, which recognizes the A β 1-5 region, was used as the reporter antibody.

Proteins of plasma and CSF samples were separated by electrophoresis under non-denaturing conditions utilizing a 4-20% TBE gel (Criterion gel, Bio Rad, CA) and transferred in CAPS buffer (CAPS 10 mM, 0.01% SDS, 1% Methanol, pH 11) onto PVDF membrane. After a 1-hour block in SuperBlock blocking buffer (Pierce, IL), the membrane was probed with biotinylated 3D6 (0.045 mg/ml), thereafter reacted with StreptAvidin (1:200000) and visualized utilizing SuperSignal West Femto (Pierce, IL).

To compare behavioral data as well as the A β levels between groups, one-way or 10 two-way analyses of variance (ANOVA) and correlation analyses were performed using the Statview5 software (SAS Institute Inc., NC).

As shown in Fig. 1, the object recognition index differed significantly between treatment groups (group effect: $F_{3,25} = 25.085$, $p < 0.0001$). Performance of m266-treated tg mice was significantly higher than performance of saline-treated tg mice and control 15 IgG-treated tg mice ($p < 0.0001$) and comparable to WT mice. The object recognition index did not differ between saline- and control IgG-treated tg mice. Moreover, a within-group t-test analysis confirmed that m266- (t -value = 9.526, $p < 0.0001$) treated tg mice and WT mice (t -value = 9.581, $p < 0.0002$) performed above chance levels (50%) whereas saline- and control IgG-treated tg mice did not (t -values = 0.081 and 1.157 respectively, 20 NS). A group effect analysis also confirmed that there were no differences between groups in total object exploration time during trial 1 ($F_{3,25} = 0.555$, NS) or trial 2 ($F_{3,25} = 0.679$, NS). The distance traveled also did not differ between groups during the familiarization session (group x block interaction: $F_{15,125} = 1.455$, NS; group effect: $F_{3,25} = 1.200$, NS), during trial 1 (group effect: $F_{3,25} = 1.326$, NS) or during trial 2 (group effect: 25 $F_{3,25} = 1.334$, NS).

Following administration of m266, as detected by ELISA (Fig. 2a), the levels of both A β 40 and A β 42 peptides were significantly increased in plasma samples when compared to saline- and IgG-treated mice ($p < 0.0001$). The increase for A β 40, when compared to saline-treated mice was approximately 150-fold and the increase for A β 42, 30 was approximately 70-fold. Neither A β 40 nor A β 42 levels differed between saline- and control IgG-treated mice. Remarkably, the plasma levels of both A β peptides following

-36-

m266 treatment were highly correlated with object recognition memory performance ($r = 0.774$, $p < 0.0001$ for A β 40; $r = 0.781$, $p < 0.0001$ for A β 42) (Fig.2b).

In CSF samples, levels of A β 40 significantly differed between groups ($F_{2,19} = 4.798$, $p < 0.05$), m266-treated animals showing increased levels of this peptide compared to saline- or control IgG-treated animals ($p < 0.05$, levels of A β 40 in ng per ml of protein: saline, 7.79 ± 1.73 ; control IgG, 8.72 ± 2.9 ; m266, 16.57 ± 3.25). No difference in CSF levels of A β 42 was observed between groups ($F_{2,19} = 3.006$, NS).

In the cerebral cortex, a significant difference between groups was observed only for A β 40 in the PBS-soluble pool ($F_{2,20} = 7.785$, $p < 0.01$); m266-treated mice showing increased levels of soluble A β peptide. No significant differences in levels of A β were found between groups in the hippocampal extracts (data not shown). Interestingly, object recognition performance was also significantly correlated with levels of A β 40 in CSF and in the cortical PBS-soluble pool ($r = 0.491$, $p < 0.05$ and $r = 0.605$, $p < 0.01$).

Administration of 360 μ g of 3D6 per animal 24 hours prior to the habituation session in 11-12 month old APP^{V717F} tg mice improved OR performance in only 2 of 8 mice tested (Figure 8) ($p < 0.05$). This improvement was much less significant than that obtained using antibody 266 that has a significantly greater affinity for soluble A β than 3D6, and a significantly greater ability to cause flux of A β from brain than does 3D6.

These results demonstrate that administration of an antibody having a very high affinity for soluble A β (but a very low affinity for insoluble A β) rapidly and efficiently reverses object recognition memory impairments in APPV717F transgenic mice. This rapid improvement in cognitive function is accompanied by significant and marked increases in plasma, CSF and cortical soluble levels of A β , but not by any measurable changes in the brain insoluble pool of A β .

25

Example 2

Rapid Effect of Administration of Anti-A β Antibodies on Cognition Correlated with Affinity for Soluble A β

The anti-A β murine antibodies 21F12 (recognizing A β 42, but not A β 40), 2G3 (recognizing A β 40, but not A β 42), 4G8 (binding A β between 13 and 28), 10D5

-37-

(recognizing 1-16), and 3D6 (binding 1-5) are administered to transgenic PDAPP mice as described above.

The performance of the mice administered these antibodies is then determined in the object recognition test as described above. Performance will correlate positively with

- 5 the affinity of the antibody of soluble A β , that is, the higher the affinity of an antibody for soluble A β , the generally higher will be the performance in tests of cognition within a short time after administering the antibody.

Antibody m266 causes more significant flux of A β into the plasma and faster, more complete recovery of object recognition than does an antibody such as 3D6, which 10 has an affinity for soluble A β that is about 1,000-fold less than that of m266. Antibodies having higher binding affinity for soluble A β will cause more pronounced flux and significantly faster and better improvement in cognitive function.

Example 3

15 **Spatial Learning in APPV717F Mice Following a Single anti-A β Antibody Treatment**

The subjects were female APPV717F and wild-type mice approximately 11 months old. Each mouse was administered 355 μ g of murine 266 antibody or vehicle (PBS) administered 24 hours prior to start of testing (i.p.) Mice were tested in a 20 holeboard spatial learning assay for four consecutive days (Figure 3). Four holes were baited with access to a single food pellet and the remaining holes were baited beneath a screen without access. Mice were food-deprived each night before testing the next morning. Mice were tested for four, 180-second trials per day. Testing occurred for four consecutive days.

25 A single dose of A β antibody (266) significantly enhanced cognitive functioning of 11 month-old APPV717F mice compared to vehicle-treated transgenic mice (Figure 4).

A significant decrease in total errors was noted on Day 4 for vehicle-treated WT mice while the number of errors was similar across Days 3 and 4 for antibody-treated wild type mice (Figure 5).

30

Example 4

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-38-

Effect of administration of various antibodies on plasma and cortical soluble A β concentrations after 24 hours

Transgenic (+/-) mice (4 months of age) were administered 355 μ g of each antibody (intraperitoneal). Samples were obtained 24 hours later.

5

Table 1. Concentration of soluble A β 42 in cortex (μ g/g) 24 hours after administration of various anti-A β antibodies.

	Mean	S.E.M.
Control (5)	0.058	0.007
266 (4)	0.169	0.047
3D6 (5)	0.091	0.007
10D5 (5)	0.065	0.004

10 Table 2. Concentration (ng/mL) of A β in plasma samples 24 hours after administering various anti-A β antibodies.

	A β 40		A β 42	
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.
Control (4)	0.054	0.0045	0.064	0.004
266 (4)	5.0	0.13	9.2	0.055
10D5 (5)	0.19	0.022	0.20	0.002
Control (4)	0.50	0.02	0.13	0.005
3D6 (5)	3.0	0.35	1.18	0.15

15 Antibody 3D6 administration caused an increase in plasma A β 40 as well as A β 42 (6-fold, and 8-fold, respectively). Plasma A β 40 and A β 42 levels were increased by 10D5 administration as well (approx. 3-4 fold). Antibody 266 administration caused a very significant increase in both A β 40 and A β 42 (93-fold and 144-fold, respectively).

Soluble A β 40 from cortical tissue was significantly increased by 266 only. Administration of 3D6 or 10D5 was without effect on soluble A β 40 levels in brain.

20 In another study of the rapid effects of administration of antibodies, 355 μ g of each of 266, 3D6, and 4G8 was administered ip to hemizygous PDAPP transgenic mice (3 months old). Samples were obtained 24 hours later.

-39-

Table 3. Concentration (ng/mL) of A β 42 in plasma samples 24 hours after administering various anti-A β antibodies.

A β 42		
	Mean	S.E.M.
Control (7)	0.048	0.0018
2G3 (5)	3.8	0.30
4G8 (5)	0.23	0.035
Control (7)	0.088	0.0035
3D6 (5)	0.72	0.15

5 In another study of the rapid effects of administration of antibodies, 355 μ g of each of anti-A β antibodies 2G3 (recognizing the C-terminus of A β 40 but not A β 42), 10D5 (recognizing the N-terminus of A β), and 21F12 (recognizing the C-terminus of A β 42, but not A β 40) was administered intraperitoneally. Samples were obtained 24 hours later. The only significant difference in plasma A β 42 levels was in the 10D5 group.

10 Table 4. Concentration (ng/mL) of A β 42 in plasma samples 24 hours after administering various anti-A β antibodies.

A β 42		
	Mean	S.E.M.
Control (5)	0.065	0.0055
2G3 (5)	2.34	0.091
10D5 (5)	0.087	0.0044
Control (5)	0.058	0.0029
21F12 (5)	1.80	0.036

15 Table 5. Concentration (μ g/g) of soluble A β 40 and A β 42 in cortex 24 hours after administering various anti-A β antibodies.

	A β 40		A β 42	
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.
Control (5)	27	3	7.0	0.61
2G3 (5)	48	5	4.0	0.23
10D5 (5)	62	9	5.2	0.49
21F12 (5)	91	14	5.4	0.16

-40-

There were no significant differences in insoluble A β in any group.

Administration of 21F12 and 10D5 resulted in a statistically significant increase in soluble A β 40 levels in the brain. Soluble levels of A β 42 were significantly decreased following treatment with all 3 antibodies.

5 In yet another study, administration of 360 μ g of 266, 3D6, or 10D5 antibody per animal (5 animals per group, saline control) raised average plasma A β 1-40 approximately 334-, 92-, and 14-fold, respectively, and raised average plasma A β 1-42 approximately 168-, 32-, and 19-fold, respectively. Clearly the relative magnitudes of these responses are directly related to the relative affinities of the antibodies toward
10 soluble A β .

Taken together, these studies of the effects of administration of anti-A β antibodies after 24 hours shows a strong relationship between the levels of plasma A β and the affinity of the antibody for soluble A β 40 and A β 42. Also, an antibody that causes a significantly higher flux of A β (i.e., 266 compared with 3D6) after 24 hours also causes a
15 significantly higher recovery of cognition in the same period. Therefore, we believe that improvement in cognition will be faster and/or greater in magnitude when an antibody having a higher affinity for soluble A β is administered.

Example 5

20 Cognition after administration of antibodies having a range of affinities for soluble A β

Antibodies having affinities for soluble A β between about 1 nM and about 1 pM are obtained or prepared as described herein. The antibodies are administered to transgenic mice as described above in Example 1. Antibodies having higher affinity for soluble A β will generally cause greater flux of A β within a short time after administration
25 and also more greatly effect rapid improvement in cognition.

Example 6

Binding affinity for soluble A β

30 Antibody affinity for soluble A β is determined using a BIAcore biosensor 2000 and data analyzed with BIAevaluation (v. 3.1) software. A capture antibody (rabbit anti-

-41-

mouse Ig or anti-human Ig) is coupled via free amine groups to carboxyl groups on flow cell 2 of a biosensor chip (CM5) using N-ethyl-N-dimethylaminopropyl carbodiimide and N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS). A non-specific rabbit IgG is coupled to flow cell 1 as a background control. Test antibodies are captured to yield 300 resonance units (RU).

- 5 Soluble A β 1-40 or 1-42 (Biosource International, Inc.) is then flowed over the chip at decreasing concentrations (1000 to 0.1 times KD). To regenerate the chip, bound anti-A β antibody is eluted from the chip using a wash with glycine-HCl (pH 2). A control injection containing no amyloid-beta serves as a control for baseline subtraction.
- 10 Sensorsgrams demonstrating association and dissociation phases are analyzed to determine kd and ka. Using this method, the affinity of the following antibodies was determined for 1-42 and/or 1-40, and they are presented in Table 1. Two affinities were found for antibody 10D5.

Table 6. Affinity (nM) of various antibodies for soluble A β 1-40 and/or soluble A β 1-42.

15

	Soluble A β 1-40	Soluble A β 1-42
3D6	2.4	2.4
10D5	390	0.57/4,950
266	0.004	0.004
266	-	0.0025
N56S*		
266	-	0.0019
N56T†		
4G8	23	24
21F12	-	4.4
2G3	0.9	-

* deglycosylated 266 analog, wherein Asn at position 56 of the heavy chain variable region is replaced with Ser

† deglycosylated 266 analog, wherein Asn at position 56 of the heavy chain variable region is replaced with Thr

20 In Figure 6 is plotted log of flux vs. log affinity for soluble A β . Flux is defined as the fold increase in plasma A β (40 or 42) 24 hours after administration of antibody, as described in Example 4 above. Affinity is given in Table 2 above. Because 10D5

WO 03/016467

PCT/US02/21324

-42-

apparently had two affinities for soluble A β 42 that varied in the extreme, only data on A β 40 were used for 10D5. A distinct relationship between affinity for soluble A β and flux is evident.

In Figure 7 is plotted flux data against affinity for aggregated A β , using data taken 5 from Bard, *et al.*, *Nat. Med.* 6:916-919 (2000). Antibody 266 was reported not to bind to aggregated A β , and so no data are plotted for it. There is clearly no relationship between affinity for aggregated A β and flux.

As demonstrated herein, the affinity of anti-A β antibodies for soluble, not aggregated, A β is positively correlated with flux of A β from the brain into the plasma 10 within 24 hours after administering the antibody. Furthermore, the rate of flux of A β is also related to acute improvement in cognitive performance as demonstrated in Example 1 and Figure 2. Antibodies having higher affinity for soluble A β will cause more pronounced flux and will more quickly and more significantly effect improvement in cognitive function in conditions and diseases involving A β . Furthermore, chronic 15 administration of antibodies having high affinity for soluble forms of A β will more effectively cause flux of A β from brain and sequester A β forms away from brain tissues which are adversely affected in conditions and diseases related to A β . We conclusively demonstrate here that high affinity for soluble, not insoluble or aggregated, forms of A β is an important feature of anti-A β antibodies for treating cognitive impairment in A β related 20 conditions and diseases. We also believe that high affinity for soluble, not insoluble or aggregated, forms of A β is an important feature of anti-A β antibodies for treating cognitive impairment in A β related conditions and diseases.

Example 7

25 Alternate procedure for determining binding affinity for antibodies having high affinity
for soluble A β

The procedure is very similar to that used above in Example 6, with certain 30 modifications as described below. Protein A or protein A/G is immobilized via amine coupling to flow cells 1 and 2 of a B1 or CM5 sensor chip (BIAcore). The test antibody is then captured in flow cell 2 at desired levels (usually a 10 - 60 second injection of antibody) and 5 minutes is allowed for the antibody to stabilize. An aliquot of frozen A β

-43-

1-40 solution is thawed and then diluted to make up the highest concentration (e.g., 200 nM), which is then serially diluted (1:2 dilutions) to the lowest concentration (e.g., 6.25 nM). Each concentration is injected over the surface for 5 minutes at a flow rate of 50 μ L/min. To obtain an accurate measurement of off-rate for high affinity antibodies, the 5 dissociation of A β 1-40 is followed for 5 hours. A β 1-40 and antibody are then eluted from both flow cells with a 40 second injection of glycine (pH 1.5). The signal is allowed to stabilize for 2 minutes before the next cycle. The data from flow cell 1 is subtracted from flow cell 2 to account for any bulk shifts due to buffer differences or non-specific binding to the sensor chip or protein A. The various concentrations are injected randomly 10 and each concentration is run in duplicate. Two 0 nM runs are used to control for any dissociation of antibody from the protein A or A/G capture surface. The data is analyzed using the Biaevalution software. A 1:1 model with mass transfer and a local Rmax is used as the best fit for the data.

Using this alternate method, the affinity of humanized 266 antibody for soluble 15 A β 1-40 was found to be 0.4 M⁻⁹ (\pm 0.2 M⁻⁹). Using this value of affinity, together with data for other antibodies (above), the log of flux vs. log affinity for soluble A β 1-40 was plotted (Figure 8). The very distinct relationship between affinity for soluble A β and flux continues to be evident.

Soluble A β 1-40 stocks and diluted samples are prepared as follows. Solid A β 1- 20 40 (Biosource International, Camarillo California USA 93012) is dissolved to 1 mg/mL (about 230 μ M) in water, and the solution is immediately aliquoted into 20 – 50 μ L portions and then frozen (-70 °C). Alkaline conditions can be used to dissolve A β , as described by Fezoui, *et al.*, *Amyloid: Int'l J. Exp. Clin. Invest.* 7:166-178 (2000). An alternate method for preparing aggregate-free soluble stock A β solutions is that of 25 Zagorski, *et al.* [*Meth. Enzymol.* 309:189-204 (1999)]. This procedure involves, in sequence, dissolving the peptide in trifluoroacetic acid (TFA), evaporating the TFA, redissolving in hexafluoroisopropanol (HFIP), removing HFIP, and dissolving in water. Aliquoting and freezing may be performed either before or after removing HFIP. Stock A β solutions can be checked for aggregates by methods well known in the art, for 30 example, light scattering [Tomska, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 294:630-638 (1992)], thioflavin T binding [LaVine, *Meth. Enzymol.* 309:274-285 (1999)], or Congo red binding [Klunk *et al.*, *Anal. Biochem.* 266:66 (1999)]. Immediately before use, a stock aliquot is

-44-

thawed and diluted to the highest concentration to be used (typically, about a thousand-fold dilution to about 200 nM). This 1000-fold diluted sample is expected to contain soluble A β that is predominantly monomeric. The great tendency of A β to self-associate means that even when carefully prepared as described, samples of A β may contain small proportions of A β dimer especially, and perhaps even some higher order association states. Stock aliquots are not refrozen after they have been thawed. Stock aliquots are not used after the day on which they are thawed, nor are diluted samples used after the day on which they are prepared.

10 Example 8

Effect of administration of various humanized antibodies on plasma A β concentrations in male cynomolgus monkeys after 24 hours

The animals (2 to 4 kg, young adult to adult, 2 animals per group) were given a bolus intravenous administration of antibody (1 mg/kg; humanized 266 - expressed in a host cell transformed to express SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:12; N56S - expressed in a host cell transformed to express SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:21; or humanized 3D6 - US 60/287,539, filed 2001 April 30). Animals were housed individually in stainless steel cages. Environmental controls were set to maintain 18 to 29 degrees Centigrade, a relative humidity of 30% to 70%, and a 12-hour light/12-hour dark cycle. They received certified primate diet one or two times daily. Water was provided *ad libitum*. The animals were selected for study based on body weights, clinical observations, clinical pathology data, and other data as appropriate. Plasma samples (pre-dose and 24 hours post-dose) were collected in EDTA and frozen until analysis.

Plasma concentrations of immunoreactive A β ₁₋₄₀ or A β ₁₋₄₂ were determined using ELISA assays. Immunoreactive A β ₁₋₄₀ was captured on the ELISA plate using mouse monoclonal antibody 2G3 or A β ₁₋₄₂ was captured using mouse monoclonal antibody 21F12. The bound complex was detected using biotinylated-3D6 antibody, followed by addition of streptavidin-HRP. Color development was performed using TMB as a substrate. Optical density values were read at 450/630 nm, and raw data was analyzed with a 5-parameter logistic algorithm using STATLIA software (Brendan Scientific). Serum concentrations of immunoreactive A β ₁₋₄₀ were estimated using calibrators ranging from 16 to 1000 pg/ml prepared in heat-treated, charcoal stripped human serum. Based

-45-

on recovery of control samples and the back-fit of calibrators, the lower and upper limits of quantitation in this assay are estimated to be 50 and 1000 pg/mL, respectively. Results for A β 1-40 are shown below in Table 7. Flux could not be calculated for A β 1-42 because pre-dose concentrations were below the detection limit.

5

Table 7. Mean concentrations of immunoreactive antibodies and A β 1-40 in cynomolgus monkeys (two animals per group).

	humanized 266	N56S	humanized 3D6
[A β 1-40] _{Pre-dose} (ng/mL)	0.6	1.4	0.6
[A β 1-40] _{24 hour} (ng/mL)	109	124	12.2
Difference (ng/mL)	108	123	11.6
Flux (-fold increase)	181	87.6	19.3

The increase in plasma A β 1-40 24 hours after administration of humanized 266 and N56S was approximately the same, and much greater than the increase after administration of humanized 3D6. These data, obtained in normal monkeys (i.e., not having any known defect that affects A β metabolism or any known A β -related conditions or diseases), are consistent with the mouse studies described herein – that is, that the affinity of anti-A β antibodies for soluble, not aggregated, A β is positively correlated with flux of A β from the brain into the plasma within 24 hours after administering the antibody. N56S has a much faster turn-over than humanized 266 or 3D6 (5.5- and 8.6-times as much 266 and 3D6 in the plasma as N56S at 24 hours, though the doses were the same). Thus, the A β 1-40 levels at 24 hours for N56S are higher than those for humanized 266 when normalized to the concentration of antibody present, as would be expected on the basis of the present invention, because N56S has a higher affinity for soluble A β than humanized 266. Differences in flux caused by 266 and 3D6 cannot be attributed to differences in the pharmacokinetics for the two antibodies either in these monkeys or in the mice used in other experiments described herein.

We claim:

1. A method for treating cognitive symptoms of a condition or disease associated with A β in a subject, comprising administering to the subject an effective amount of an anti-A β antibody that has greater affinity for soluble A β than 10^{-9} M.
- 5 2. A method for reducing disease progression in a subject having a condition or disease associated with A β , comprising administering to the subject an effective amount of an anti-A β antibody that has greater affinity for soluble A β than 10^{-9} M.
- 10 3. A method for treating cognitive symptoms of a condition or disease associated with A β in a subject, comprising administering to the subject an effective amount of an anti-A β antibody that has affinity (KD) for soluble A β 1-40 or A β 1-42 higher than 10^{-9} M.
- 15 4. A method for reducing disease progression in a subject having a condition or disease associated with A β , comprising administering to the subject an effective amount of an anti-A β antibody that has affinity (KD) for soluble A β 1-40 or A β 1-42 higher than 10^{-9} M.
5. A method for treating cognitive symptoms of a condition or disease associated with A β in a subject, comprising administering to the subject an effective amount of an anti-A β antibody that has greater affinity for soluble A β than antibody 266 has.
- 20 6. A method for reducing disease progression in a subject having a condition or disease associated with A β , comprising administering to the subject an effective amount of an anti-A β antibody that has greater affinity for soluble A β than antibody 266 has.
- 25 7. The method any one of Claims 1-6, wherein the anti-A β antibody has greater affinity for soluble A β than 10^{-10} M.
8. The method of Claim 7, wherein the anti-A β antibody has greater affinity for soluble A β than 10^{-11} M.
9. The method of Claim 8, wherein the anti-A β antibody has greater affinity for soluble A β than 10^{-12} M.

-47-

10. The method of any one of Claims 1 – 9, wherein the affinity of the anti-A β antibody is measured with respect to soluble A β 1-40 or A β 1-42.

11. The method of any one of Claims 1 – 10, wherein the subject is human and the anti-A β antibody is a human or humanized antibody.

5 12. The method of any one of Claims 1 – 11, wherein the anti-A β antibody recognizes the same epitope that antibody 266 recognizes or competes with antibody 266 for binding to soluble A β .

13. The method of any one of Claims 1 – 12, wherein the condition or disease is Alzheimer's disease.

10 14. The method of any one of Claims 1 – 12, wherein the condition or disease is Down's syndrome.

15 15. The method of any one of Claims 1 – 12, wherein the condition or disease is cerebral amyloid angiopathy.

16. The method of any one of Claims 1 – 12, wherein the condition or disease 15 is vascular dementia.

17. The method of any one of Claims 1 – 12, wherein the condition or disease is mild cognitive impairment.

18. The use of an anti-A β antibody having affinity (KD) for soluble A β 1-40 or A β 1-42 higher than 10^{-9} M to prepare a medicament for treating cognitive symptoms of a 20 condition or disease associated with A β .

19. The use of an anti-A β antibody having affinity (KD) for soluble A β 1-40 or A β 1-42 higher than 10^{-9} M to prepare a medicament for reducing disease progression in a subject having a condition or disease associated with A β .

20. The use of an anti-A β antibody having greater affinity for soluble A β than 25 antibody 266 has to prepare a medicament for treating cognitive symptoms in a subject having a condition or disease associated with A β .

21. The use of an anti-A β antibody having greater affinity for soluble A β than antibody 266 has to prepare a medicament for reducing disease progression in a subject having a condition or disease associated with A β .

WO 03/016467

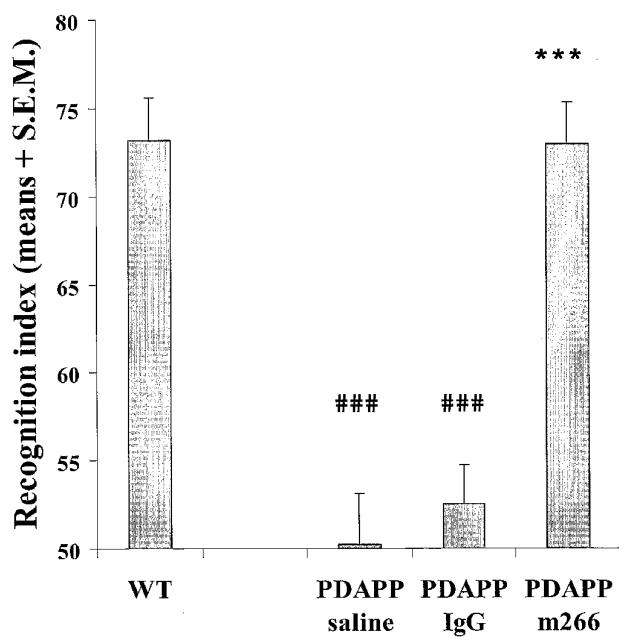
PCT/US02/21324

-48-

22. The use of an anti- $\text{A}\beta$ antibody to prepare a medicament for use in a method of any one of Claims 1 –17.

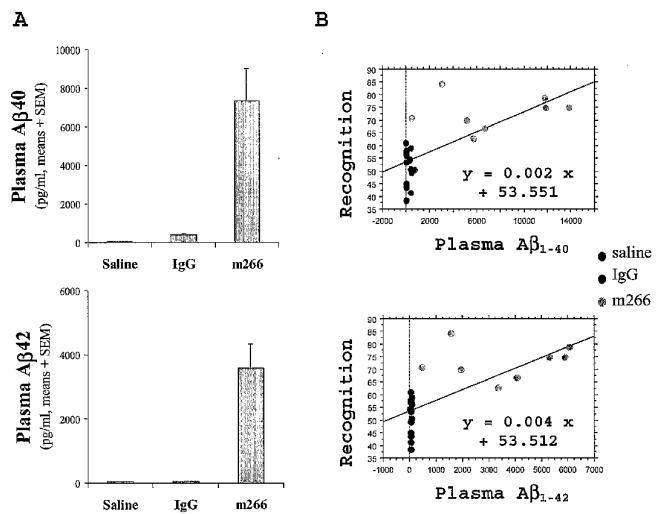
1/9

FIG. 1.



2/9

FIG. 2.

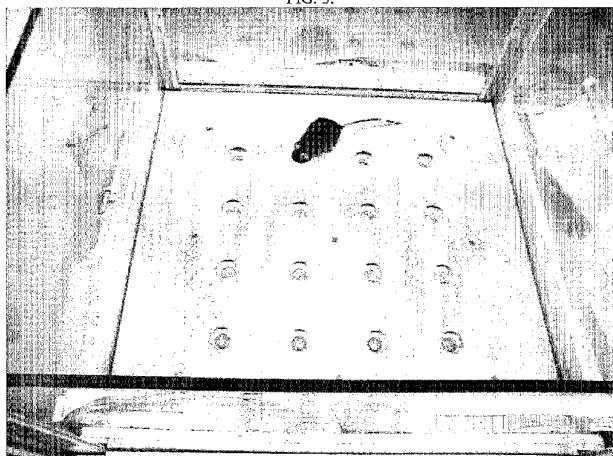


WO 03/016467

PCT/US02/21324

3/9

FIG. 3.

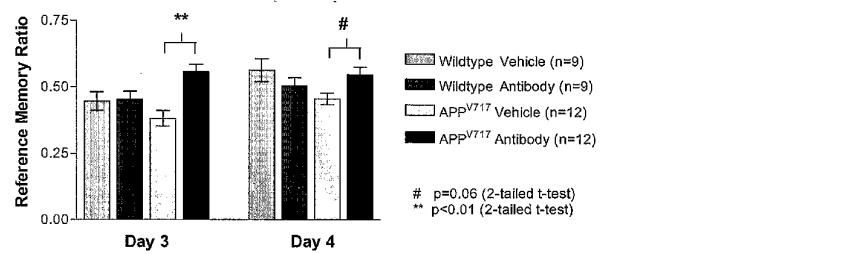


WO 03/016467

PCT/US02/21324

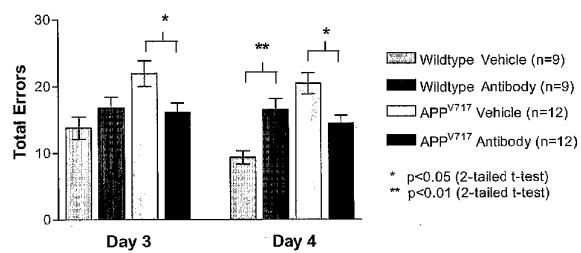
4 / 9

FIG. 4.



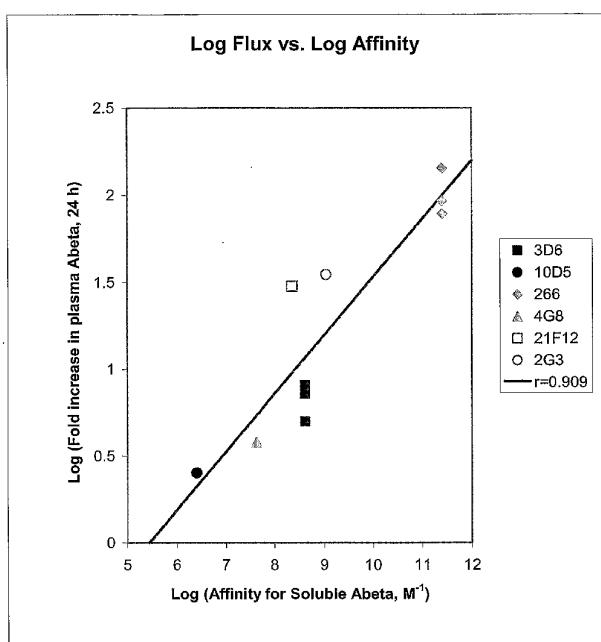
5/9

FIG. 5.



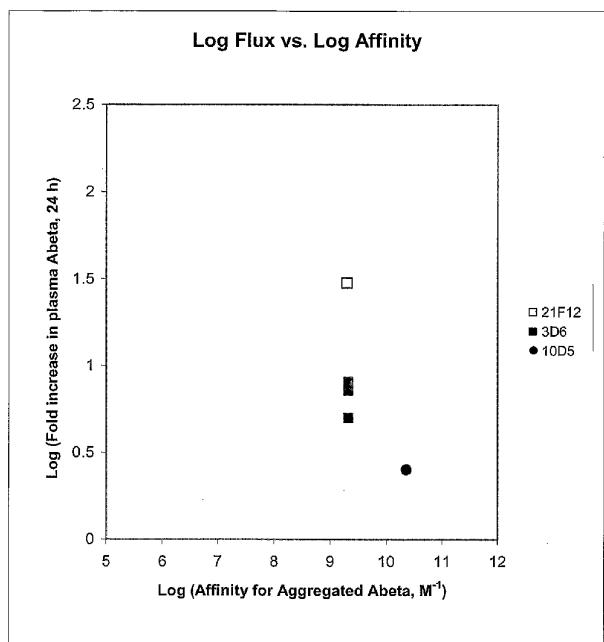
6/9

FIG. 6.



7/9

FIG. 7.



WO 03/016467

PCT/US02/21324

8/9

FIG. 8.

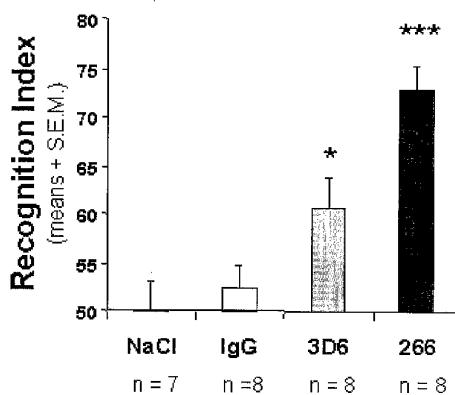
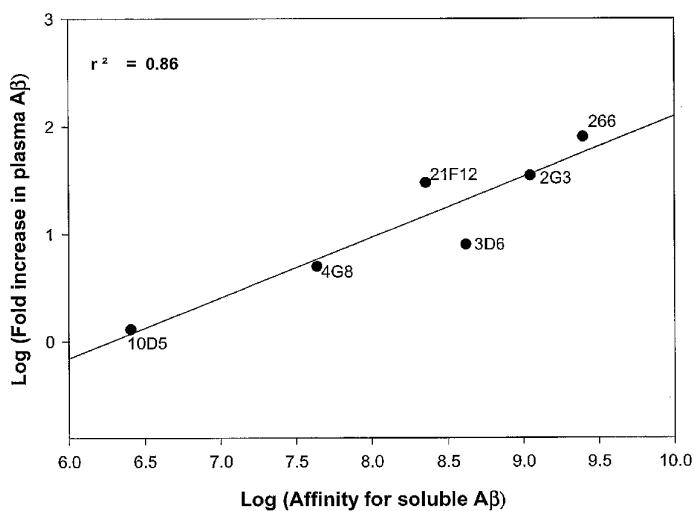


FIG. 9.



WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> ELI LILLY AND COMPANY

<120> USE OF ANTIBODIES HAVING HIGH AFFINITY FOR SOLUBLE A-BETA TO
TREAT CONDITIONS AND DISEASES RELATED TO A-BETA

<130> X-15047

<150> 60/313,576

<151> 2001-08-17

<150> 60/383,581

<151> 2002-05-28

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> LIGHT CHAIN CDR1

<400> 1

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 2

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> LIGHT CHAIN CDR2

<400> 2
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> LIGHT CHAIN CDR3

<400> 3
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.5T25.txt

<222> (1)..(5)

<223> HEAVY CHAIN CDR1

<400> 4

Arg Tyr Ser Met Ser
1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> HEAVY CHAIN CDR2

<400> 5

Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(3)

<223> HEAVY CHAIN CDR3

<400> 6

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

Gly Asp Tyr

<210> 7
<211> 113
<212> PRT
<213> humanized antibody

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Val or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> Humanized antibody 266 preferred light chain variable

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = Ser or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa = Thr or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> Xaa = Leu or Pro

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa = Ile or Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(50)
<223> Xaa = Arg, Gln, or Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (88)..(88)
<223> Xaa = Val or Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
<223> Xaa = Gln or Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (108)..(108)
<223> Xaa = Lys, or Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (109)..(109)
<223> Xaa = Val or Leu

<400> 7
Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Leu Pro Val Xaa Xaa Gly
Page 5

WO 03/016467

PCT/US02/21324

1 5 X-15047.5T25.txt 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa Tyr Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> humanized antibody

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Glu or Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
Page 6

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

<222> (7)..(7)
<223> Xaa = Ser or Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (46)..(46)
<223> Xaa = Glu, Val, Asp or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (63)..(63)
<223> Xaa = Thr or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (75)..(75)
<223> Xaa = Ala, Ser, Val, or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> Xaa = Lys or Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(89)
<223> Xaa = Glu or Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (107)..(107)
<223> Xaa = Leu or Thr

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

<400> 8
Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly 10 Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Xaa Leu Val
35 40 45
Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Xaa Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa Xaa Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 9
<211> 113
<212> PRT
<213> humanized antibody

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> Humanized antibody 266 preferred light chain variable

<400> 9
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

WO 03/016467

PCT/US02/21324

35 X-15047.ST25.txt 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> humanized antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(112)

<223> Humanized antibody 266 preferred heavy chain variable

<400> 10

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

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 11

<211> 219

<212> PRT

<213> humanized antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(219)

<223> Humanized antibody 266 preferred light chain variable

<400> 11

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
Page 10

WO 03/016467

PCT/US02/21324

130 135 X-15047.ST25.txt 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 12
<211> 442
<212> PRT
<213> humanized antibody

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(442)
<223> Humanized antibody 266 preferred heavy chain variable

<400> 12
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

WO 03/016467

PCT/US02/21324

x-15047.ST25.txt

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

WO 03/016467

PCT/US02/21324

x-15047.ST25.txt

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
340 345 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa at position 7 is any amino acid, provided that if Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 7 is not Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa is at position 8 is any amino acid, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 8 is Asp or Pro

<220>

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa at position 9 is any amino acid, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 9 is neither Ser nor Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> heavy chain CDR2

<400> 13
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa at position 7 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> heavy chain CDR2

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa at position 8 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Val, Trp, and Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa at position 9 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Val, Trp and Tyr

<400> 14

Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa at position 7 is Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa at position 8 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Val, Trp, and Tyr

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> xaa at position 9 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Val, Trp and Tyr

<400> 15
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> xaa at position 7 is Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> xaa at position 8 is selected from the group consisting of Asp and Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> xaa at position 9 is selected from the group consisting of Ser and Thr

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

<400> 16
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa at position 7 is selected from the group consisting of Ala, G
ly, His, Gln, Ser, and Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> heavy chain CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa at position 8 is selected from the group consisting of Ala, G
ly, His, Asn, Gln, Ser and Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa at position 9 is selected from the group consisting of Ala, G
ly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.5T25.txt

<400> 17
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> xaa at position 7 is Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> xaa at position 8 is selected from the group consisting of Ala, G
ly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa at position 9 is selected from the group consisting of Ala, G
ly, His, Asn and Gln

<400> 18
Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

WO 03/016467

PCT/US02/21324

x-15047.ST25.txt

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> humanized antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> xaa at position 1 is Glu or Gln

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(112)

<223> humanized antibody heavy chain variable

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> xaa at position 7 is Ser or Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (46)..(46)

<223> xaa at position 46 is Glu, Val, Asp, or Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(56)

<223> xaa at position 56 is any amino acid, provided that if xaa at position 57 is neither Asp nor Pro and xaa at position 59 is Ser or Thr, then xaa at position 56 is not Asn

<220>

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> Xaa at position 57 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 58 is Ser or Thr, then Xaa at position 57 is Asp or Pro

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(58)
<223> Xaa at position 58 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 58 is neither Ser nor Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (63)..(63)
<223> Xaa at position 63 is Thr or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (75)..(75)
<223> Xaa at position 75 is Ala, Ser, Val, or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> Xaa at position 76 is Lys or Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(89)
<223> Xaa at position 89 is Glu or Asp

<220>

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

<221> MISC_FEATURE

<222> (107)..(107)

<223> Xaa at position 107 is Leu or Thr

<400> 19

Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Xaa Leu Val
35 40 45

Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Xaa Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa Xaa Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> humanized antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(56)

<223> Xaa at position 56 is any amino acid, provided that if Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 59 is Ser or Thr, then Xaa at position 56 is not Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

WO 03/016467

PCT/US02/21324

x-15047.ST25.txt

<222> (1)..(112)

<223> heavy chain variable

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (57)..(57)

<223> Xaa at position 57 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 58 is Ser or Thr, then Xaa at position 57 is Asp or Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(58)

<223> Xaa at position 58 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro then Xaa at position 58 is neither Ser nor Thr

<400> 20

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

<210> 21

<211> 442

WO 03/016467

PCT/US02/21324

x-15047.ST25.txt

<212> PRT

<213> humanized antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(56)

<223> xaa at position 56 is any amino acid provided that if xaa at position 57 is neither Asp nor Pro and xaa at position 59 is Ser or Thr, then xaa at position 56 is not Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(442)

<223> heavy chain antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (57)..(57)

<223> xaa at position 57 is any amino acid, provided that if xaa at position 56 is Asn and xaa at position 58 is Ser or Thr, then xaa at position 57 is Asp or Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(58)

<223> xaa at position 58 is any amino acid, provided that if xaa at position 56 is Asn and xaa at position 57 is neither Asp nor Pro, then xaa at position 58 is neither Ser nor Thr

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

WO 03/016467

PCT/US02/21324

x-15047.ST25.txt

Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

WO 03/016467

PCT/US02/21324

X-15047.ST25.txt

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
340 345 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization International Bureau

(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/016467 A3

(51) International Patent Classification? A61K 39/395, 39/40, 39/42, 38/00, C01N 33/53, C07K 14/00, 16/00 TR, OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) International Application Number: PCT/US2002/021324

Declarations under Rule 4.17:
— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SJ, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(22) International Filing Date: 14 August 2002 (14.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/13.576 17 August 2001 (17.08.2001) US
60/383,851 28 May 2002 (28.05.2002) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ELI LILLY AND COMPANY [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): BALES, Kelly, Renee [US/US]; 8835 Running Creek Court, Indianapolis, IN 46268 (US). PAUL, Steven, Marc [US/US]; 1145 Laurelwood, Carmel, IN 46032 (US).

(74) Agents: KELLEY, Jones, J. et al.; Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DE, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SJ, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(54) Title: USE OF ANTIBODIES HAVING HIGH AFFINITY FOR SOLUBLE A β TO TREAT CONDITIONS AND DISEASES RELATED TO A β (57) Abstract: This invention provides a method for treating a subject having a condition or disease related to the A β peptide comprising administering to the subject an antibody that recognizes A β , wherein the antibody has an affinity for soluble A β higher than 10 9 M.

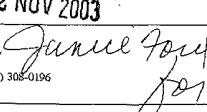
WO 2003/016467 A3

Declarations under Rule 4.17:
— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SJ, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report: 15 January 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/21324																				
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER																						
IPC(7) : A61K 39/395, 39/40, 39/42, 38/00; G01N 33/53; C07K 14/00, 16/00 US CL : 424/139.1, 133.1; 435/7.1; 530/387.1, 300, 388.15 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) U.S. : 424/139.1, 133.1; 435/7.1; 530/387.1, 300, 388.15																						
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 practicable, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS, USPTAFUL																						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																				
A	WO 99/27944 a1 (SCHEINER) 10 June 1999 (10.06.99), whole document	1-22																				
A	JANUS, et al. Abeta peptide immunization reduces behavioral impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. Nature, 28 December 2000, Vol. 408, pages 979-982	1-22																				
A	DEMATTOS, et al. Peripheral anti-Abeta antibody alters CNS and plasma Abeta clearance and decreases brain Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. PNAS. 17 July 2001, Vol 98, No. 15, pp.8850-8855	1-22																				
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art, which is not considered to be of particular relevance</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may show claims on priority (stating) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> </tr> <tr> <td>"T"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and no in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"X"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention can 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</td> </tr> <tr> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		"A"	document defining the general state of the art, which is not considered to be of particular relevance	"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"L"	document which may show claims on priority (stating) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T"	later document published after the international filing date or priority date and no in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"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	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention can 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	"&"	document member of the same patent family
* Special categories of cited documents:																						
"A"	document defining the general state of the art, which is not considered to be of particular relevance																					
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date																					
"L"	document which may show claims on priority (stating) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)																					
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																					
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																					
"T"	later document published after the international filing date or priority date and no in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																					
"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																					
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention can 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																					
"&"	document member of the same patent family																					
Date of the actual completion of the international search 29 September 2003 (29.09.2003)	Date of mailing of the international search report 12 NOV 2003																					
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-5230	Authorized officer  Olga N. Chernyshev Telephone No. (703) 308-0196																					

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ケリー・ルネ・ベイルズ

アメリカ合衆国 4 6 2 6 8 インディアナ州インディアナポリス、ランニング・クリーク・コート 8
8 3 3 番

(72)発明者 スティーブン・マーク・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

F ターム(参考) 4C085 AA13 AA14 CC03