

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-530423
(P2009-530423A)

(43) 公表日 平成21年8月27日(2009.8.27)

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

F 1

A 61 K 39/395 Z N A V
A 61 K 39/395 D
A 61 K 39/395 N
A 61 P 25/28

テーマコード(参考)

4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁)

(21) 出願番号 特願2009-501727 (P2009-501727)
 (86) (22) 出願日 平成19年3月21日 (2007.3.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年11月18日 (2008.11.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/064571
 (87) 国際公開番号 WO2007/109749
 (87) 国際公開日 平成19年9月27日 (2007.9.27)
 (31) 優先権主張番号 60/784,575
 (32) 優先日 平成18年3月21日 (2006.3.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/895,303
 (32) 優先日 平成19年3月16日 (2007.3.16)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 591011502
 ワイス
 W y e t h
 アメリカ合衆国O 7 9 4 0 - 0 8 7 4 ニュ
 ージャージー州マディソン、ファイブ・ジ
 ラルダ・ファームズ
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アミロイド生成性疾患を予防および処置するための方法

(57) 【要約】

R A G E に特異的に結合し、R A G E 結合パートナーの結合を阻害する抗体（すなわち、抗 R A G E 抗体）の治療有効量を被験体に投与する工程が含まれている、A のアミロイド沈着を特徴とする疾患または障害を処置するための方法が提供される。抗 R A G E 抗体は、被験体の中での A のアミロイド沈着の蓄積を阻害または軽減するために、被験体の神経変性を阻害または軽減するために、被験体の認識衰退を阻害または軽減するために、そして / あるいは、被験体の認識を改善するためにも使用することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

A のアミロイド沈着を特徴とする疾患または障害を有している被験体を処置するための方法であって、被験体に、RAGE に特異的に結合して、RAGE 結合パートナーの結合を阻害する抗体の治療有効量を投与する工程が含まれる、方法。

【請求項 2】

前記被験体がヒト被験体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記疾患または障害が、脳の中での A のアミロイド沈着を特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記疾患または障害がアルツハイマー病である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記疾患または障害が、臨床前アルツハイマー病である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体が、

(a) RAGE に対する結合について、XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M4 からなる群より選択される抗体と競合する、

(b) XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M4 からなる群より選択される抗体が結合する、RAGE のエピトープに結合する、

(c) XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M4 からなる群より選択される抗体の軽鎖または重鎖の 1 つ以上の相補性決定領域 (CDR) を含む、あるいは、

(d) (a)、(b)、または(c) の抗体の RAGE 結合断片である、

請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記抗体または RAGE 結合抗体断片に、

XT-M4 軽鎖可変領域の CDR を含む軽鎖可変領域 (配列番号 17) 、

XT-M4 重鎖可変領域配列の CDR を含む重鎖可変領域 (配列番号 16) 、

ヒト 軽鎖定常領域、および

30

ヒト IgG1 重鎖定常領域

が含まれている、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体またはその RAGE 結合断片に、

XT-M4 軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有している軽鎖可変領域 (配列番号 17) 、

XT-M4 重鎖可変領域配列のアミノ酸配列を有している重鎖可変領域 (配列番号 16) 、

ヒト 軽鎖定常領域、および

ヒト IgG1 重鎖定常領域

40

が含まれている、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項 1 に記載の方法

。

【請求項 10】

前記キメラ抗体またはヒト化抗体に、ヒト定常領域またはそれらが由来する定常領域が含まれている、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗体またはその RAGE 結合断片を、アルツハイマー病の処置に有用な 1 つ以上の薬剤と組み合わせて投与し、それにより相乗的な治療効果を誘発する工程が含まれる、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 12】

被験体の中での A のアミロイド沈着の蓄積を阻害または軽減する方法であって、被験体に、RAGE に特異的に結合して、RAGE 結合パートナーの結合を阻害する抗体の有効量を投与する工程が含まれる、方法。

【請求項 13】

前記被験体がヒト被験体である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

脳の中での A のアミロイド沈着の蓄積を阻害するまたは減少させる工程が含まれる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記脳の中での A のアミロイド沈着の蓄積がアルツハイマー病に関係している、請求項 14 に記載の方法。 10

【請求項 16】

前記脳の中での A のアミロイド沈着の蓄積が臨床前アルツハイマー病に関係している、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記抗体が、

(a) RAGE に対する結合について、XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M4 からなる群より選択される抗体と競合する、
(b) XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M4 からなる群より選択される抗体が結合する、RAGE のエピトープに結合する、
(c) XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M4 からなる群より選択される抗体の軽鎖または重鎖の 1 つ以上の相補性決定領域 (CDR) を含む、あるいは、

(d) (a)、(b)、または(c) の抗体の RAGE 結合断片である、請求項 12 に記載の方法。 20

【請求項 18】

前記抗体または RAGE 結合抗体断片に、

XT-M4 軽鎖可変領域の CDR を含む軽鎖可変領域 (配列番号 17)、

XT-M4 重鎖可変領域配列の CDR を含む重鎖可変領域 (配列番号 16)、 30

ヒト 軽鎖定常領域、および

ヒト IgG1 重鎖定常領域

が含まれている、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記抗体またはその RAGE 結合断片に、

XT-M4 軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有している軽鎖可変領域 (配列番号 17)、

XT-M4 重鎖可変領域配列のアミノ酸配列を有している重鎖可変領域 (配列番号 16)、 40

)、

ヒト 軽鎖定常領域、および

ヒト IgG1 重鎖定常領域

が含まれている、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 21】

前記キメラ抗体またはヒト化抗体に、ヒト定常領域またはそれらが由来する定常領域が含まれている、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記抗体またはその RAGE 結合断片を、A のアミロイド沈着を阻害するまたは軽減するために有用な 1 つ以上の薬剤と組み合わせて投与し、それにより相乗作用を誘発する 50

工程が含まれる、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 2 3】

被験体の中での神経変性を阻害または軽減する方法であって、該被験体に、RAGE に特異的に結合して、RAGE 結合パートナーの結合を阻害する抗体の有効量を投与する工程が含まれる、方法。

【請求項 2 4】

前記被験体がヒト被験体である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

脳の中での神経変性を阻害するまたは軽減する工程が含まれる、請求項 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 6】

前記神経変性がアルツハイマー病に関係している、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記神経変性が臨床前アルツハイマー病に関係している、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記抗体が、

(a) RAGE に対する結合について、XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、および XT-M4 からなる群より選択される抗体と競合する、

(b) XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、および XT-M4 からなる群より選択される抗体が結合する、RAGE のエピトープに結合する、

(c) XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、および XT-M4 からなる群より選択される抗体の軽鎖または重鎖の 1 つ以上の相補性決定領域 (CDR) を含む、あるいは、

(d) (a)、(b)、または (c) の抗体の RAGE 結合断片である、

請求項 2 3 に記載の方法。

20

【請求項 2 9】

前記抗体または RAGE 結合抗体断片に、

XT-M4 軽鎖可変領域の CDR を含む軽鎖可変領域 (配列番号 17)、

XT-M4 重鎖可変領域配列の CDR を含む重鎖可変領域 (配列番号 16)、

ヒト 軽鎖定常領域、および

30

ヒト IgG1 重鎖定常領域

が含まれている、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記抗体またはその RAGE 結合断片に、

XT-M4 軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有している軽鎖可変領域 (配列番号 17)、

XT-M4 重鎖可変領域配列のアミノ酸配列を有している重鎖可変領域 (配列番号 16)、

ヒト 軽鎖定常領域、および

ヒト IgG1 重鎖定常領域

が含まれている、請求項 2 9 に記載の方法。

40

【請求項 3 1】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記キメラ抗体またはヒト化抗体に、ヒト定常領域またはそれらが由来する定常領域が含まれている、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記抗体またはその RAGE 結合断片を、神経変性を阻害するまたは軽減するために有用な 1 つ以上の薬剤と組み合わせて投与し、それにより相乗作用を誘発する工程が含まれる、請求項 2 3 に記載の方法。

50

【請求項 3 4】

被験体の認識衰退を阻害もしくは軽減する、または認識を改善する方法であつて、被験体に、RAGEに特異的に結合して、RAGE結合パートナーの結合を阻害する抗体の有効量を投与する工程が含まれる、方法。

【請求項 3 5】

前記被験体がヒト被験体である、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記認識衰退がアルツハイマー病に関係している、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記認識衰退が臨床前アルツハイマー病に関係している、請求項34に記載の方法。 10

【請求項 3 8】

前記抗体が、

(a) RAGEに対する結合について、XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M4からなる群より選択される抗体と競合する、

(b) XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M4からなる群より選択される抗体が結合する、RAGEのエピトープに結合する、

(c) XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M4からなる群より選択される抗体の軽鎖または重鎖の1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む、あるいは、

(d) (a)、(b)、または(c)の抗体のRAGE結合断片である、 20

請求項34に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記抗体またはRAGE結合抗体断片に

XT-M4軽鎖可変領域のCDRを含む軽鎖可変領域(配列番号17)、

XT-M4重鎖可変領域配列のCDRを含む重鎖可変領域(配列番号16)、

ヒト 軽鎖定常領域、および

ヒトIgG1重鎖定常領域

が含まれている、請求項38に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記抗体またはそのRAGE結合断片に、 30

XT-M4軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有している軽鎖可変領域(配列番号17)、

XT-M4重鎖可変領域配列のアミノ酸配列を有している重鎖可変領域(配列番号16)、

ヒト 軽鎖定常領域、および

ヒトIgG1重鎖定常領域

が含まれている、請求項39に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項34に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記キメラ抗体またはヒト化抗体に、ヒト定常領域またはそれらが由来する定常領域が含まれている、請求項41に記載の方法。 40

【請求項 4 3】

前記抗体またはそのRAGE結合断片を、認識衰退を阻害もしくは軽減するか、または認識を改善するために有用な1つ以上の薬剤と組み合わせて投与し、それにより相乗作用を誘発する工程が含まれる、請求項34に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

関連する出願への相互参照

2007年3月16日に出願された米国仮特許出願第60/895,303号および2006年3月21日に出願された米国仮特許出願第60/784,575の、米国特許法§119(e)のもとでの優先権が主張され、米国仮特許出願第60/895,303号および同第60/784,575の両方の内容は、その全体が、本明細書において参考として援用される。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般的には、RAGE関連疾患および障害を処置または予防するための、糖化最終産物の受容体(RAGE)の特異的に結合する抗体とその断片、そのような抗体とその断片がヒト患者およびヒト以外の哺乳動物に投与される方法に関する。 10

【背景技術】

【0003】

発明の背景

アルツハイマー病(AD)は進行性であり、最終的には命にかかわる、主に高齢者が罹患する神経変性疾患である。これは認知症の最も一般的な形態であり、通常は、認識(記憶、推論、適応、および判断)が徐々に失われること、および多数の行動障害の進行が伴う。この疾患は、2つのカテゴリーに分けられる。すなわち、高齢(65歳以上)で起こる後期発症型と、老年期よりもはるかに前(すなわち、35歳から60歳の間)に発症する早期発症型である。いずれのタイプの疾患においても病状は同じであるが、より若い年齢で発症する場合には、異常性がより重症化し、そして広範囲に広がる傾向がある。この疾患は、脳の中の少なくとも2つのタイプの病変(神経原纖維のもつれと老人斑)を特徴とする。神経線維のもつれは2つ一組で互いにより合わさった2つの纖維からなる微小管結合tauタンパク質の細胞内沈着である。老人斑(すなわち、アミロイド斑)は、脳組織の切片の顕微鏡分析によって見ることができる、中心の細胞外アミロイドの沈着を有している150μmの直徑までのまとまりのない神経網の糸の領域である。脳の中でのアミロイド斑の蓄積は、ダウン症や他の認識障害(例えば、血清アミロイドA(SAA)アミロイドーシスおよび海綿状脳症)にも関係している。 20

【0004】

-アミロイドペプチドまたはAとも呼ばれるペプチドはアミロイド斑の主成分であり、ADの発症において欠かせない役割を担っていると考えられる。Aは、アミロイド前駆体タンパク質(APP)と呼ばれる大きな膜貫通糖タンパク質の39~43アミノ酸残基の、疎水性の4kDaの内部断片である。-セクレターゼおよび-セクレターゼによるAPPのタンパク質分解的プロセシングの結果として、Aは、主に、40アミノ酸の長さの短い形態と、42~43アミノ酸の長さの範囲の長い形態の両方で見られる。脳の中でのアミロイド斑の蓄積は、最終的には神経細胞の死を導く。アルツハイマー病(AD)の特徴である欠損症状や身体症状は、少なくとも一部、Aの神経毒性作用によって引き起こされた神経の損傷による結果と考えられる。Aの生産の阻害またはAのクリアランスの増大によるAレベルの低下は、アルツハイマー病の疾患を調節するストラテジーとして広く認識されている。 30

【0005】

APPタンパク質の中のいくつかの変異は、アルツハイマー病の存在と相関関係がある。そのような変異の例としては、バリン⁷¹⁷からイソロイシンへ、グリシンからフェニルアラニンへの変異、そしてリジン⁵⁹⁵-メチオニン⁵⁹⁶からアスパラギン⁵⁹⁵-ロイシン⁵⁹⁶への二重変異が挙げられる。このような変異は、APPのAへのプロセシングの増大または変化(特に、長期にわたるAの量の増加を生じるAPPのプロセシング(すなわち、A₁₋₄₂およびA₁₋₄₃))により、アルツハイマーを引き起こすと考えられる。他の遺伝子(例えば、プレセニリン遺伝子PS1およびPS2)の中での変異は、長い形態のAの增量を生じるようにAPPのプロセシングに間接的に影響を与えると考えられる。 40

【0006】

10

20

30

40

50

アルツハイマーにおけるアミロイド斑の重要性を決定するためには、マウスモデルがうまく使用されてきた（非特許文献1；非特許文献2）。具体的には、ヒトAPPの変異体形態を発現し、若い年齢でアルツハイマー病を発症するPAPPトランスジェニックマウスにA_βの長い形態を注射すると、彼らは、アルツハイマー病の進行の緩和と、A_βペプチドに対する抗体力値の増大の両方を示す（非特許文献3）。上記で議論した観察は、A_β（特に、その長い形態）がアルツハイマー病の原因となる要素であることを示している。

【0007】

A_βペプチドは、溶液中に存在することができ、そしてCNS（例えば、CSF）と血漿の中で検出することができる。特定の条件下では、可溶性A_βは、AD患者の老人斑および脳血管の中で見られる、纖維性の毒性のあるA_β-シートの形態に変換される。A_βに対するモノクローナル抗体での免疫化を含む処置が研究されている。能動免疫法と受動免疫法はいずれも、ADのマウスモデルで試験されている。能動免疫法によっては、脳の中のplaques負荷のいくらかの軽減が生じるが、鼻から投与された場合に限られる。PAPPトランスジェニックマウスの受動免疫法もまた研究されている（非特許文献4）。2つの機構（即ち、中心での分解と末梢での分解）が、効果的なクリアランスについて提案されている、中心での分解の機構は、血液-脳関門を通過してplaquesに結合し、すでに存在しているplaquesのクリアランスを誘導することができる抗体に依存する。クリアランスは、Fc受容体によって媒介される食作用によって促進されることが示されている（Barbourら、前出）。A_βのクリアランスの末梢での分解機構は、抗体の投与の際の脳、CSF、および血漿の間でのA_βの動的平衡の崩壊に依存し、これによって1つの区画から別の区画へのA_βの輸送が生じる。中心に位置しているA_βはCSFと血漿に輸送され、ここで分解される。最近の研究では、脳の中でのアミロイドの沈着が減少しない場合にもなお、可溶性の結合していないA_βが、ADに伴う記憶障害に関係していることが示唆されている（非特許文献5）。

10

20

30

30

【0008】

糖化最終産物の受容体（RAGE）は、複数のリガンドを有している、免疫グロブリンスーパーファミリーの細胞表面メンバーである。RAGEは、1つの細胞外ドメイン、1つの膜貫通ドメインと、1つの細胞質末端から構成されている。この受容体の細胞外ドメインは、1つのV型の免疫グロブリンドメインと、後に続く2つのC型免疫グロブリンドメインから構成されている。RAGEはまた、可溶性形態（sRAGE）でも存在する。RAGEは、多くの様々な組織（肺、心臓、腎臓、骨格筋、および脳を含む）の中の多くの細胞のタイプ（例えば、内皮細胞および平滑筋細胞、マクロファージおよびリンパ球）によって発現される。発現は、慢性の炎症の状態（例えば、間接リウマチおよび糖尿病性腎症）においては増大する。この生理学的機能は不明確であるが、これは炎症応答に関係しており、そして、筋芽細胞の分化および神経の発達を含む多様な発達プロセスにおいて役割を有している可能性がある。

【0009】

RAGEは、いくつかの様々なクラスの内因性の分子に結合して、様々な細胞性の応答（サイトカインの分泌、細胞性の酸化的ストレスの増大、神経突起の伸張、および細胞の移動を含む）を導く、特殊なパターンの認識受容体である。RAGEは、広範囲のアミロイド生成性の疾患および障害において活発な病原性役割を有していることが示されている。

40

【0010】

アルツハイマー病と他のアミロイド生成性疾患の処置のための新規の治療および試薬が必要である。

【非特許文献1】Gamesら、1995, Nature, 373:523

【非特許文献2】Johnson-Woodら、1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:1550

【非特許文献3】Schenkら、1999, Nature, 400:173

50

【非特許文献4】Bardら、2000、Nature Med., 6:916-19

【非特許文献5】Dodelら、2003、The Lancet, 2:215

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明の要旨

本発明により、RAGEに特異的に結合し、そしてRAGE結合パートナーの結合を阻害する抗体（すなわち、抗RAGE抗体）の治療有効量を投与することによる、Aのアミロイド沈着を特徴とする疾患または障害を有している被験体を処置する方法が提供される。開示される方法によって処置することができる疾患または障害は、例えば、アルツハイマー病において起こる、脳の中でのAのアミロイド沈着を特徴とし得る。抗RAGE抗体は、本明細書中に記載される場合にはまた、被験体の中でのAのアミロイド沈着の蓄積を阻害または軽減するために、被験体の神経変性を阻害または軽減するために、被験体の認識衰退を阻害または軽減するために、そして/あるいは、被験体の認識を改善するためにも使用することができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

発明の詳細な説明

抗RAGE抗体

本発明により、本明細書中に記載されるように、RAGE（可溶性RAGEと内因性の分泌型RAGEを含む）に特異的に結合する抗体が提供される。代表的な抗RAGE抗体には、配列番号16～49に示される抗体可変領域のアミノ酸配列の少なくとも1つが含まれ得る。

20

【0013】

本発明の抗RAGE抗体には、RAGEに特異的に結合し、配列番号16～49のいずれか1つと同じまたは実質的に同じであるアミノ酸配列を有している抗体が含まれる。実質的に同じ抗RAGE抗体のアミノ酸配列は、配列番号16～49のいずれか1つに対して少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%の同一性を有するアミノ酸配列である。

30

【0014】

本発明の抗RAGE抗体には、RAGEに特異的に結合し、そして(a)配列番号19、22、25、23、27、および17からなる群より選択される軽鎖可変領域を含むか、または(b)配列番号19、22、25、23、27、および17のいずれか1つに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有している軽鎖可変領域を含む抗体、あるいは、(a)または(b)の抗体のRAGE結合断片が含まれる。

【0015】

本発明の抗RAGE抗体にはまた、RAGEに特異的に結合し、そして(a)配列番号18、21、24、20、26、および16からなる群より選択される重鎖可変領域を含むか、または(b)配列番号18、21、24、20、26、および16のいずれか1つに対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有している重鎖可変領域を含む抗体、あるいは、(a)または(b)の抗体のRAGE結合断片も含まれる。

40

【0016】

本発明には、RAGEに特異的に結合し、そして以下である、抗RAGE抗体が含まれ、さらに

(a)XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M4からなる群より選択される抗体と、RAGEへの結合について競合する、

(b)XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M4からなる群より選択される抗体が結合したRAGEのエピトープに結合する、

(c)XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、およびXT-M5からなる群より選択される抗体が結合したRAGEのエピトープに結合する、

50

4 からなる群より選択される抗体の軽鎖または重鎖の 1 つ以上の相補性決定領域 (C D R) を含む、あるいは、

(d) (a)、(b)、または(c) の抗体の R A G E 結合断片である。

【 0 0 1 7 】

本発明には、インビトロおよびインビボで R A G E を発現する細胞に特異的に結合する抗 R A G E 抗体、および少なくとも約 1×10^{-7} M から約 1×10^{-10} M までの範囲の解離定数 (K d) でヒト R A G E に結合する抗体が含まれる。ヒト R A G E の V ドメインに特異的に結合する本発明の抗 R A G E 抗体、および R A G E 結合パートナーに対する R A G E の結合をブロックする抗 R A G E 抗体 (R A G E - B P) もまた含まれる。

【 0 0 1 8 】

本発明には R A G E に特異的に結合して、R A G E の R a g e 結合パートナー (例えば、H M G B 1、A G E、A 、S A A、S 1 0 0、アンフォテリン、S 1 0 0 P、S 1 0 0 A (S 1 0 0 A 8 と S 1 0 0 A 9 を含む) 、S 1 0 0 A 4、C R P、2 - インテグリン、M a c - 1、および p 1 5 0 , 9 5 のようなリガンド) に対する結合をブロックし、そして以下の特性のうちの 4 つ以上を有している C D R を有している抗体も含まれる (位置の番号付けは、図 6 および 7 の V H および V L の配列について示されたものと同じアミノ酸位置に関する) 。すなわち、

1 . V H C D R 1 の中にアミノ酸配列 Y - X - M (Y 3 2 ; X 3 3 ; M 3 4) があり、式中、X は W または N であることが好ましい。

2 . V H C D R 2 の中にアミノ酸配列 I - N - X - S (I 5 1 ; N 5 2 ; X 5 3 ; および S 5 4) があり、式中、X は P または N である。

3 . V H の C D R 2 の中の 5 8 位のアミノ酸がスレオニンである。

4 . V H の C D R 2 の中の 6 0 位のアミノ酸がチロシンである。

5 . V H の C D R 3 の中の 1 0 3 位のアミノ酸がスレオニンである。

6 . V H の C D R 3 の中に 1 つ以上のチロシン残基がある。

7 . V L の C D R 1 の中の 2 4 位に正電荷を有している残基 (A r g または L y s) がある。

8 . V L の C D R 1 の中の 2 6 位に親水性残基 (T h r または S e r) がある。

9 . V L の C D R 1 の中の 2 5 位に小さい残基 S e r または A l a がある。

1 0 . V L の C D R 1 の中の 3 3 位に負電荷を有している残基 (A s p または G l u) がある。

1 1 . V L の C D R 1 の中の 3 7 位に芳香族残基 (P h e または T y r または T r p) がある。

1 2 . V L の C D R 2 の中の 5 7 位に親水性残基 (S e r または T h r) がある。

1 3 . V L の C D R 3 の末端が P - X - T 配列であり、式中、X は疎水性残基 L e u または T r p であり得る。

【 0 0 1 9 】

本発明の抗 R A G E 抗体には、ヒト R A G E の V ドメインに特異的に結合して、R A G E のそのリガンドへの結合をブロックする、5、6、7、8、9、10、11、12、または 13 の特性の全てを有している C D R を有している抗体が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

本発明の抗 R A G E 抗体には、上記のような抗 R A G E 抗体、またはキメラ抗体、ヒト化抗体、单鎖抗体、四量体抗体、4 価抗体、多特異的抗体、ドメイン特異的抗体、ドメイン欠失抗体、融合タンパク質、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂ 断片、F v 断片、S c F v 断片、F d 断片、單一ドメイン抗体、d A b 断片、および F c 融合タンパク質 (すなわち、免疫グロブリン定常領域に融合させられた抗原結合ドメイン) からなる群より選択される R A G E 結合断片が含まれる。これらの抗体は、細胞傷害性物質、放射線治療薬、または検出標識と連結させることができる。

【 0 0 2 1 】

例えば、X T - M 4 抗体の V H および V L ドメインが含まれている S c F v 抗体 (配列

10

20

30

40

50

番号 6 3) が調製されており、細胞をベースとする E L I S A 分析によって、ヒビ、マウス、ウサギ、およびヒトの R A G E に対して、キメラおよび野生型の X T - M 4 抗体の結合親和性に匹敵する結合親和性を有していることが示されている。

【 0 0 2 2 】

本発明の抗体はさらに、抗体の少なくとも 1 つの C D R 領域によって付与された目的のポリペプチドの 1 つに対する親和性を有している、ヘテロ結合体、二重特異的、単鎖、およびキメラおよびヒト化された分子を含むように意図される。

【 0 0 2 3 】

R A G E に特異的に結合する本発明の抗体にはまた、本明細書中に記載される任意の抗体の変異体も含まれる。これらは、公知の分子生物学とクローニング技術を使用して容易に調製することができる。例えば、米国特許出願公開番号 2 0 0 3 / 0 1 1 8 5 9 2 、同 2 0 0 3 / 0 1 3 3 9 3 9 、同 2 0 0 4 / 0 0 5 8 4 4 5 、同 2 0 0 5 / 0 1 3 6 0 4 9 、同 2 0 0 5 / 0 1 7 5 6 1 4 、同 2 0 0 5 / 0 1 8 0 9 7 0 、同 2 0 0 5 / 0 1 8 6 2 1 6 、同 2 0 0 5 / 0 2 0 2 0 1 2 、同 2 0 0 5 / 0 2 0 2 0 2 3 、同 2 0 0 5 / 0 2 0 2 0 2 8 、同 2 0 0 5 / 0 2 0 2 5 3 4 、および同 2 0 0 5 / 0 2 3 8 6 4 6 と、それらの関連する特許ファミリーのメンバーを参照のこと。これらは全て、それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる。例えば、本発明の変異体抗体にはまた、結合ドメイン - 免疫グロブリン融合タンパク質も含まれ得る。これは、免疫グロブリンヒンジまたはヒンジ作用領域ポリペプチドに融合させられたか、または別の方法で連結させられた結合ドメインポリペプチド（例えば、 s c F v ）が含まれ、これは次いで、 C H 1 以外の免疫グロブリン重鎖（例えば、 I g G および I g A の C H 2 および C H 3 領域、または I g E の C H 3 および C H 4 領域）に由来する 1 つ以上の野生型または操作された定常領域を含む領域に融合させられるか、あるいは別の方法で連結させられる（例えば、 L e d b e t t e r , J . ら、による U . S . 2 0 0 5 / 0 1 3 6 0 4 9 、これは、さらに完全な記述のために引用により本明細書中に組み入れられる）。結合ドメイン - 免疫グロブリン融合タンパク質にはさらに、ヒンジ領域ポリペプチドに融合または別の方法で連結させられた野生型または操作された免疫グロブリン重鎖 C H 2 定常領域ポリペプチド（または I g E 全体または I g E の一部の中で誘導された構築物の場合には C H 3 ）、あるいは、 C H 2 定常領域ポリペプチド（または I g E 全体または I g E の一部の中で誘導された構築物の場合には C H 3 ）に融合または別の方法で連結させられた野生型または操作された免疫グロブリン重鎖 C H 3 定常領域ポリペプチドを含む領域が含まれ得る。通常は、このような結合ドメイン - 免疫グロブリン融合タンパク質は、少なくとも 1 つの免疫学的活性（例えば、 R A G E に対する特異的結合、 R A G E と R A G E 結合パートナーとの間での相互作用の阻害、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性の誘導、補体結合の誘導など）が可能である。

【 0 0 2 4 】

本発明の抗体にはまた、それに結合させられた、検出することができる標識が含まれ得る（例えば、標識は、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る）。

【 0 0 2 5 】

R A G E ポリペプチド

本発明によってはまた、配列番号 7 、 9 、 1 1 、または 1 3 に示されるアミノ酸配列を有している、ヒビ、カニクイザル、およびウサギの単離された R A G E タンパク質が提供され、さらに、配列番号 7 、 9 、 1 1 、または 1 3 に示されるアミノ酸配列と実質的に同じであり、配列番号 7 、 9 、 1 1 、または 1 3 のいずれか 1 つに対してアミノ酸配列において少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、 9 9 . 5 % 、または 9 9 . 9 % 同一であるアミノ酸配列を有している R A G E タンパク質も含まれる。

【 0 0 2 6 】

本発明にはまた、当該分野で公知の任意の手段により、本発明の抗 R A G E 抗体とその

10

20

30

40

50

RAGE結合断片を産生するための方法も含まれる。

【0027】

本発明にはまた、配列番号1、3、7、9、11、または13のいずれかに示されるRAGEアミノ酸配列の1つ以上のエピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体の精製された調製物も含まれる。

【0028】

定義

便宜上、明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲において使用される特定の用語がここに集められる。他の場所に定義されない限りは、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されている意味と同じ意味を有する。

10

【0029】

用語「a」と「an」は、本明細書中で使用される場合は、1つまたは1つ以上（すなわち、少なくとも1つ）の文法上の目的物をいう。例として、「1つのエレメント（a n element）」は、1つのエレメントまたは1つ以上のエレメントを意味する。

【0030】

用語「または（or）」は、状況が他の場所に明記されない限りは、用語「および／または（and/or）」を意味するように使用され、これと互換的に使用される。

【0031】

「単離された」もしくは「精製された」ポリペプチドまたはタンパク質（例えば、「単離された抗体」）は、それが自然界に存在している状態を超える状態にまで精製される。例えば、「単離された」もしくは「精製された」ポリペプチドまたはタンパク質（例えば、単離された抗体）は、タンパク質が由来する細胞または組織の供給源に由来する細胞性の材料または他の混入しているタンパク質が実質的に含まれないようにすることができ、あるいは、化学合成される場合には化学的前駆体または他の化合物が実質的に含まれてないようになることができる。抗体以外のタンパク質（本明細書中では「混入しているタンパク質」とも呼ばれる）または化学的前駆体が約50%未満含まれている抗体タンパク質の調製物は、「実質的に含まれていない」と考えられる。40%、30%、20%、10%、およびさらに好ましくは5%（乾燥重量で）の抗体以外のタンパク質または化学的前駆体は、実質的に含まれていないと考えられる。抗体タンパク質またはその生物学的活性のある部分が組み換えによって生産される場合には、これもまた、培養培地が実質的に含まれないこと、すなわち、培養培地が、タンパク質調製物の容積または質量の約30%未満、好ましくは約20%未満、さらに好ましくは約10%未満、そして最も好ましくは約5%未満を占めることが好ましい。「組み換え体」として本明細書中に記載されるタンパク質またはポリペプチドは、組み換え体核酸の発現によって生産されるタンパク質またはポリペプチドである。

20

【0032】

用語「抗体」は、本明細書中では用語「免疫グロブリン」と互換的に使用され、これには、完全な抗体、抗体の断片（例えば、Fab、F(ab')₂断片）、そしてそれらの定常領域および／または可変領域のいずれかが変異（例えば、キメラ抗体、部分的にヒト化された抗体、または完全なヒト化抗体を生じるような変異、ならびに、高いIL13結合および／または低いFcR結合のような所望される形質を有する抗体を生じるような変異）している完全な抗体と断片が含まれる。用語「断片」は、完全な抗体もしくは抗体全体または抗体鎖よりも少ないアミノ酸残基が含まれている、抗体または抗体鎖の一部あるいは部分をいう。断片は、完全な抗体または抗体全体または抗体鎖の化学的あるいは酵素的処理によって得ることができる。断片はまた、組み換え手段によって得ることもできる。例示的な断片としては、Fab、F(ab')₂、F(ab')₂、Fabc、Fd、dAb、ならびに、scFvおよび／またはFv断片が挙げられる。用語「抗原結合断片」は、抗原に結合するか、または完全な抗体（すなわち、それらが由来する完全な抗体）と、抗原結合（すなわち、特異的結合）について競合する、免疫グロブリンまたは抗体のポリペ

30

40

50

プチド断片をいう。このように、これらの抗体またはそれらの断片は、抗体または断片が R A G E に特異的に結合し、1つ以上の R A G E が関係している活性を中和するかまたは阻害する（例えば、R A G E に対する R A G E 結合パートナー（R A G E - B P s）の結合を阻害する）との条件で、本発明の範囲に含まれる。

【0033】

抗体には、ジスルフィド結合によって互いに連結された4つのポリペプチド鎖（2つの重（H）鎖と2つの軽（L）鎖）から構成される分子構造が含まれる。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域（本明細書中では H C V R または V H と略される）と重鎖定常領域から構成されている。重鎖定常領域は3つのドメイン C H 1、C H 2、および C H 3 から構成されている。個々の軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書中では L C V R または V L と略される）と軽鎖定常領域から構成されている。軽鎖定常領域は、1つのドメイン C L から構成されている。V H 領域と V L 領域は、さらに、フレームワーク領域（F R）と呼ばれるより保存された領域が間に散りばめられている、相補性決定領域（C D R）と呼ばれる超可変性の領域に分けることができる。V H と V L はそれぞれ、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端に向かって配置された3個の C D R と4個の F R から構成されている。すなわち、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4 である。

10

【0034】

用語「抗体」には、任意の供給源（例えば、ヒトとヒト以外の靈長類、および齧歯類、ウサギ、ヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなど）から得られた任意の I g クラスまたは任意の I g サブクラス（例えば、I g G の I g G₁、I g G₂、I g G₃、および I g G₄ サブクラス）が含まれる。

20

【0035】

用語「I g クラス」または「免疫グロブリンクラス」は、本明細書中で使用される場合は、ヒトまたは高等哺乳動物において同定されている5つの免疫グロブリンのクラス（I g G、I g M、I g A、I g D、およびI g E）をいう。用語「I g サブクラス」は、ヒトおよび高等哺乳動物において同定されているI g Mの2つのサブクラス（HとL）、I g Aの3つのサブクラス（I g A₁、I g A₂、および分泌型I g A）、およびI g Gの4つのサブクラス（I g G₁、I g G₂、I g G₃、およびI g G₄）をいう。抗体は、単量体形態で存在することができ、また、多量体形態でも存在することができる。例えば、I g M抗体は五量体形態で存在し、そしてI g A抗体は単量体、二量体、または多量体形態で存在する。

30

【0036】

用語「I g G サブクラス」は、免疫グロブリンの重鎖によってそれぞれ₁～₄としてヒトおよび高等哺乳動物において同定されている免疫グロブリンクラス I g G の4つのサブクラス（I g G₁、I g G₂、I g G₃、およびI g G₄）をいう。

【0037】

用語「单鎖免疫グロブリン」または「单鎖抗体」（本明細書中では互換的に使用される）は、抗原に特異的に結合する能力を有している、重鎖と軽鎖からなる2-ポリペプチド鎖構造を有しているタンパク質をいい、上記鎖は、例えば、鎖間ペプチドリンクによって安定化させられている。用語「ドメイン」は、例えば、-ブリーツシートおよび/または鎖間ジスルフィド結合によって安定化させられたペプチドループを含む（例えば、3個から4個のペプチドループを含む）、重鎖または軽鎖ポリペプチドの球状領域をいう。ドメインはさらに、本明細書中では、「定常」ドメインの場合には、様々なクラスのメンバーのドメインの中の配列のバリエーションが比較的少ないことに基づいて、「可変」ドメインの場合には、様々なクラスのメンバーのドメインの中での有意なバリエーションに基づいて、「定常」または「可変」と呼ばれる。抗体またはポリペプチド「ドメイン」は、多くの場合は、当該分野において抗体またはポリペプチド「領域」と互換的に言われる。抗体軽鎖の「定常」ドメインは、「軽鎖定常領域」、「軽鎖定常ドメイン」、「C L」領域、または「C L」ドメインと互換的に呼ばれる。抗体重鎖の「定常」ドメインは、「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「C H」領域、または「C H」ドメインと互換

40

50

的に呼ばれる。抗体軽鎖の「可変」ドメインは、「軽鎖可変領域」、「軽鎖可変ドメイン」、「V L」領域、または「V L」ドメインと互換的に呼ばれる。抗体重鎖の「可変」ドメインは、「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「V H」領域、または「V H」ドメインと互換的に呼ばれる。

【0038】

用語「領域」はまた、抗体鎖または抗体鎖ドメインの一部または部分（例えば、本明細書中で定義されるような、重鎖または軽鎖の一部もしくは部分、あるいは定常ドメインもしくは可変ドメインの一部または部分）、ならびに、上記鎖もしくはドメインのさらに放れている複数の一部分または部分をもいうことができる。例えば、軽鎖と重鎖、または軽鎖と重鎖の可変ドメインには、本明細書中で定義される場合には、「フレームワーク領域」すなわち「F R」が間に散りばめられている「相補性決定領域」すなわち「C D R」が含まれる。

10

【0039】

用語「立体構造」は、タンパク質またはペプチド（例えば、抗体、抗体鎖、ドメイン、またはその領域）の三次構造をいう。例えば、表現「軽鎖（または重鎖）立体構造」は、軽鎖（または重鎖）の可変領域の三次構造をいい、そして表現「抗体の立体構造」または「抗体断片の立体構造」は、抗体またはその断片の三次構造をいう。

【0040】

抗体の「特異的結合」は、抗体が、特定の抗原またはエピトープに対して相当の親和性を示し、通常は、有意な交差反応性を示さないことを意味する。用語「抗RAGE抗体」は、本明細書中で使用される場合は、RAGEに特異的に結合する抗体をいう。抗体は、交差反応性は示さない場合があり、例えば、RAGE以外のペプチドと、またはRAGE上の離れたエピトープとは交差反応しない。「相当の」結合には、少なくとも 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 $10^{-9} M^{-1}$ 、または $10^{-10} M^{-1}$ の親和性での結合が含まれる。 $10^{-7} M^{-1}$ または $10^{-8} M^{-1}$ より大きい親和性を有している抗体は、通常、対応してより大きな特異性で結合する。本明細書中に示した値の間の値もまた本発明の範囲に入るよう意図され、本発明の抗体は、例えば、 10^{-6} から $10^{-10} M^{-1}$ 、または 10^{-7} から $10^{-10} M^{-1}$ 、または 10^{-8} から $10^{-10} M^{-1}$ の範囲の親和性でRAGEに結合する。「有意な交差反応性を示さない」抗体は、その標的以外の物質（例えば、異なるエピトープまたは異なる分子）には感知できるほどには結合しないであろう抗体である。例えば、RAGEに特異的に結合する抗体はRAGEに相當に結合するであろうが、RAGE以外のタンパク質またはペプチドとは有意には反応しないであろう。特定のエピトープに特異的な抗体は、例えば、同じタンパク質またはペプチド上の離れたエピトープとは有意には交差反応しないであろう。特異的結合は、そのような結合を決定するための任意の当該分野で理解されている手段にしたがって決定することができる。好ましくは、特異的結合は、Scatchard分析および/または競合結合アッセイにしたがって決定される。

20

【0041】

本明細書中で使用される場合は、用語「親和性」は、1つの抗原結合部位の抗原決定基との結合の強さをいう。親和性は、抗体結合部位と抗原決定基との間での立体化学的適合の緊密さ、それらの間での接触面積の大きさ、電荷を有している基と疎水基の分布などによって様々である。抗体の親和性は、平衡透析によって、または動的BIA CORE（登録商標）法によって測定することができる。BIA CORE（登録商標）法は、表面プラズモン共鳴（SPR）の現象による。この現象は、表面プラズモン波が金属／液体界面で励起されると起こる。光が、試料と接触していない表面の側から当てられるかまたは反射され、そしてSPRが角度と波長の特異的な組み合わせで反射された光の強度の減少を生じる。二分子結合事象は、表面層の屈折率の変化を引き起こし、これがSPRシグナルの変化として検出される。

30

【0042】

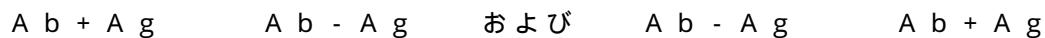
解離定数Kdと結合定数Kaは、親和性の量的測定値である。平衡状態では、遊離の抗原（A g）と遊離の抗体（A b）は、抗原・抗体複合体（A g - A b）とともに平衡状態

40

50

にあり、速度定数（ k_a と k_d ）は個々の反応の速度の量を表す。

【0043】



平衡状態では、 $k_a [A_b] [A_g] = k_d [A_g - A_b]$ である。解離定数 K_d は、 $K_d = k_d / k_a = [A_g] [A_b] / [A_g - A_b]$ によって与えられる。 K_d は濃度の単位であり、最も一般的には、M、mM、μM、nM、pM などである。 K_d として表された抗体親和性を比較する場合には、RAGE に対してより大きな親和性を有していることはより低い値によって示される。結合定数 K_a は、 $K_a = k_a / k_d = [A_g - A_b] / [A_g] [A_b]$ によって与えられる。 K_a は濃度に反比例する単位であり、最も典型的には、M⁻¹、mM⁻¹、μM⁻¹、nM⁻¹、pM⁻¹ などである。本明細書中で使用される場合は、用語「親和力」は、可逆的な複合体の形成後の抗原・抗体結合の強さをいう。抗 RAGE 抗体は、「約（より低い K_d 値）から約（より高い K_d 値）までの範囲の解離定数（ K_d ）での結合として、RAGE タンパク質へのそれらの結合についての K_d に関する特性決定することができる。この状況では、用語「約」は、示される K_d 値 ± 20%、すなわち、約 1 の $K_d = 0.8$ から 1.2 までの範囲の K_d を意味するように意図される。 10

【0044】

本明細書中で使用される場合は、用語「モノクローナル抗体」は、構造および抗原特異性が均一である、抗体を生産する細胞（例えば、B リンパ球または B 細胞）のクローニング集団に由来する抗体をいう。用語「ポリクローナル抗体」は、それらの構造およびエピトープ特異性は不均一であるが、共通の抗原を認識する、抗体を生産する細胞の様々なクローニング集団に起源する複数の抗体をいう。モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、体液の中に粗調製物として存在する場合も、また、本明細書中に記載されるように精製される場合もある。 20

【0045】

用語抗体の「結合部分」（または「抗体部分」）には、1つ以上の完全なドメイン（例えば、完全なドメインの対）、ならびに、RAGE に特異的に結合する能力を保持している抗体の断片が含まれる。抗体の結合機能は、全長抗体の断片によって行われ得ることが示されている。結合断片は組み換え DNA 技術によって、あるいは完全な免疫グロブリンの酵素的または化学的切断によって生産される。結合断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fd、dAb、Fv、単鎖、単鎖抗体（例えば、scFv および単鎖ドメイン抗体）（Muylleidermansら、2001，26：230-5）、ならびに単離された相補性決定領域（CDR）が挙げられる。Fab 断片は、VL、VH、CL、および CH1 ドメインからなる1価の断片である。F(ab')₂ 断片は、ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結された2つの Fab 断片が含まれている2価の断片である。Fd 断片は、VH ドメインと CH1 ドメインからなり、Fv 断片は、抗体の1つのアームの VL ドメインと VH ドメインからなる。dAb 断片は VH ドメインからなる（Wardら、(1989) Nature 341：544-546）。Fv 断片の2つのドメイン（VL と VH）は、別の遺伝子によってコードされるが、これらは、組み換え方法を使用してそれらを、VL 領域と VH 領域の対が1価の分子を形成する1つのタンパク質鎖（単鎖 Fv (scFv) として知られている）とすることができる合成リンカーによって連結させることができる（Birdら、1988、Science 242：423-426）。そのような単鎖抗体もまた、用語抗体の「結合部分」に含まれるように意図される。単鎖抗体の他の形態（例えば、ダイアボディー）もまた含まれる。ダイアボディーは、2価の二重特異的抗体である。ここでは、VH ドメインと VL ドメインが1つのポリペプチド鎖上で発現されるが、同じ鎖の上にある2つのドメインの間での対合を可能にするには短すぎるリンカーが使用され、それによって、ドメインを別の鎖の相補ドメインと対合させて、2つの抗原結合部位が作成される（例えば、Holligerら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90：6444-6448 を参照のこと）。抗体またはその結合部分もまた、抗体または抗体部分の、1つ以上の他のタ 30

10

20

30

40

50

ンパク質またはペプチドとの共有結合または非共有結合によって形成されるより大きな免疫接着分子の一部であり得る。そのような免疫接着分子の例としては、4量体 s c F v 分子を作成するためのストレプトアビジンコア領域の使用 (Kipriyanov, S. M. ら、(1995) Human Antibodies and Hybridomas 6 : 93 - 101)、ならびに、2化のビオチニル化 s c F v 分子を作成するためのシステイン残基、マーカーペプチド、および C 末端ポリヒスチジンタグの使用 (Kipriyanov, S. M. ら、(1994) Mol. Immunol. 31 : 1047 - 1058) が挙げられる。結合断片 (例えば、F a b および F (a b ')₂ 断片) は、従来技術 (例えば、それぞれ、完全な抗体のパパインまたはペプシン消化) を使用して、完全な抗体から調製することができる。さらに、抗体、抗体部分、および免疫接着分子は、本明細書中に記載され、そして当該分野で公知であるような標準的な組み換え DNA 技術を使用して得ることができる。「二重特異的」または「二官能性」抗体以外の抗体は、それぞれが同一のその結合部位を有すると理解される。「二重特異的」または「二官能性抗体」は、2つの異なる重鎖 / 軽鎖の対と2つの異なる結合部位を有している人工的なハイブリッド抗体である。二重特異的抗体にはまた、定常領域が間に介在している2つの抗原結合領域も含まれ得る。二重特異的抗体は、ハイブリドーマの融合、または F a b ' 断片の連結を含む様々な方法によって生産することができる。例えば、Song Sivilaiら、Clin. Exp. Immunol. 79 : 315 - 321, 1990; Kostelnýら、1992, J. Immunol. 148, 1547 - 1553 を参照のこと。

【0046】

用語「逆変異 (backmutation)」は、ヒト抗体の体細胞変異したアミノ酸のいくつかまたは全てが、均一な生殖細胞系列抗体配列に由来する対応する生殖細胞系列の残基で置き換えられるプロセスをいう。本発明のヒト抗体の重鎖および軽鎖配列は、最も高い相同性を有している配列を同定するために、V B A S E データベースの生殖細胞系列の配列と別々にアラインメントされる。本発明のヒト抗体における相違は、そのような異なるアミノ酸をコードする定義されたヌクレオチド位置を変異させることによって、生殖細胞系列の配列に戻される。最終的なヒト抗体に含まれるべきではないヒト抗体の任意の所望される特性に影響を与える変異の後に見られる抗原結合と任意のアミノ酸における直接的または間接的役割について、このように骨格の候補として同定された個々のアミノ酸の役割が研究されるはずである。一例として、選択的突然変異誘発のアプローチによって同定された活性を高めるアミノ酸は、逆変異の対象ではないであろう。逆変異の対象となるアミノ酸の数を最少にするためには、最も近い生殖細胞系列の配列とは異なるが、第2の生殖細胞系列の配列の対応するアミノ酸と同じであることが明らかにこれらのアミノ酸の位置を、第2の生殖細胞系列の配列が本発明のヒト抗体の配列と、少なくとも 10、好ましくは 12 個のアミノ酸について、目的のアミノ酸のいずれの側においても同じであり同一鎖上にあるとの条件で、残すことができる。逆変異は、抗体の最適化の任意の段階で行うことができる。好ましくは、逆変異は、選択的突然変異誘発のアプローチの直前、または直後に行われる。さらに好ましくは、逆変異は、選択的突然変異誘発のアプローチの直前に行われる。

【0047】

完全な抗体 (免疫グロブリンとしても知られている) は、典型的には、それぞれがおよそ 25 kDa の 2 つの軽 (L) 鎖と、それぞれがおよそ 50 kDa の 2 つの重 (H) 鎖から構成されている四量体グリコシル化タンパク質である。とと呼ばれる 2 つのタイプの軽鎖が抗体の中で見られる。重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、5 つの主要なクラス (A、D、E、G、および M) に割り当てることができ、これらのいくつかは、サブクラス (イソ型) (例えば、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A 1、および Ig A 2) にさらに分けることができる。個々の軽鎖は、N 末端可変 (V) ドメイン (VL) と定常 (C) ドメイン (CL) から構成されている。個々の重鎖は、N 末端の V ドメイン (VH)、3 個または 4 個の C ドメイン (CH)、そしてヒンジ領域から構成されている。VH に最も近い CH ドメインは、CH1 と命名されてい

10

20

30

40

50

る。V H ドメインとV L ドメインは、フレームワーク領域と呼ばれる比較的保存されている配列の4つの領域からなる(F R 1、F R 2、F R 3、およびF R 4)。これらは、超可変配列の3つの領域(相補性決定領域、CDR)についての足場を形成する。CDRには、抗体の抗原との特異的相互作用を担っている残基のほとんどが含まれる。CDRは、CDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれる。したがって、重鎖上のCDR構成成分は、H 1、H 2、およびH 3と呼ばれ、一方、軽鎖上のCDR構成成分は、L 1、L 2、およびL 3と呼ばれる。CDR3は、抗体結合部位の分子多様性の最大の供給源である。例えば、H 3は、2つのアミノ酸残基のような短いものであっても、また、26個よりも多いアミノ酸であってもよい。様々なクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造と三次元立体配置は当該分野で周知である。抗体構造の概要については、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlowら編、1988を参照のこと。当業者は、個々のサブユニット構造(例えば、CH、V H、CL、V L、CDR、FR構造)に、Fc受容体および/または補体に結合し、そして/またはそれを活性化させる抗原(すなわち、結合断片)または例えば、CHサブユニットの一部に結合する、活性のある断片(例えば、V H、V L、またはCDRサブユニットの一部)が含まれることを理解するであろう。

10

【0048】

抗体の多様性は、可変領域をコードする複数の生殖細胞系列の遺伝子と様々な体細胞事象の使用によって作成される。体細胞事象としては、完全なV H 領域を作成するための、多様性(D)および連結(J)遺伝子セグメントでの可変遺伝子セグメントの組み換えと、完全なV L 領域を作成するための可変遺伝子セグメントと連結遺伝子セグメントの組み換えが含まれる。組み換えプロセス自体は不明確であり、V(D)J接合部位でアミノ酸の欠失または付加が生じる。多様性のこれらの機構は、抗原暴露前の発達中のB細胞において起こる。抗原性刺激の後、B細胞中で発現された抗体遺伝子は体細胞変異を受ける。生殖細胞系列の遺伝子セグメントの数の概算、これらのセグメントのランダムな組み換え、およびランダムなV H - V L 対合に基づくと、 1.6×10^7 種類までの様々な抗体を产生することができる(Fundamental Immunology, 第3版(1993), Paul, Raven Press編, New York, NY)。抗体の多様性に関係している他のプロセス(例えば、体細胞変異)を考慮すると、 1×10^{10} 種類を超える様々な抗体を作成することができると考えられる(Immunoglobulin Genetics, 第2版, (1995) Jonjioら編, Academic Press, San Diego, CA)。多くのプロセスが抗体多様性を生じることに関係しているとの理由から、同じ抗原特異性を有している個別に導かれたモノクローナル抗体が同じアミノ酸配列を有していることはありそうにない。

20

【0049】

用語「二量体化ポリペプチド」または「二量体化ドメイン」には、別のポリペプチドと二量体(またはさらに高次の複合体、例えば、三量体、四量体など)を形成する任意のポリペプチドが含まれる。状況に応じて、二量体化ポリペプチドは互いに同じ二量体化ポリペプチドと会合し、それによりホモ多量体を形成する。IgG Fcエレメントは、ホモ多量体を形成する傾向がある二量体化ドメインの一例である。状況に応じて、二量体化ポリペプチドは他のさまざまな二量体化ポリペプチドと会合し、それによってヘテロ多量体を形成する。JunロイシンジッパードメインはFosロイシンジッパードメインとともに二量体を形成し、したがって、これはヘテロ多量体を形成する傾向がある二量体化ドメインの一例である。二量体化ドメインは、25のヘテロ多量体およびホモ多量体の両方を形成することができる。

30

【0050】

用語「ヒト抗体」には、Kabatらに記載されているヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に対応する可変領域と定常領域を有している抗体が含まれる(Kabatら、(1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health

40

50

and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照のこと)。本発明のヒト抗体には、例えば、CDRの中、および特定のCDR3の中の、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列によってコードされるアミノ酸残基(例えば、インビトロでのランダムなもしくは部位特異的突然変異誘発、またはインビオでの体細胞変異によって導入された変異)が含まれ得る。変異は、好ましくは、本明細書中に記載される「選択的突然変異誘発アプローチ」を使用して導入される。ヒト抗体は、ヒトの生殖細胞系列の免疫グロブリン配列によってはコードされないアミノ酸残基(例えば、活性を増大させるアミノ酸残基)で置き換えられた少なくとも1つの位置を有し得る。ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列の一部ではないアミノ酸残基で置き換えられた20個までの位置を有することができる。さらに、10個まで、5個まで、3個まで、または2個までの位置が置き換えられる。これらの置換は、以下に詳細に記載されるようにCDR領域に含まれ得る。しかし、用語「ヒト抗体」は、本明細書中で使用される場合は、別の哺乳動物種(例えば、マウス)の生殖細胞系列に由来するCDRが、ヒトフレームワーク配列上に移植されている抗体を含むようには意図されない。

【0051】

表現「組み換え体ヒト抗体」には、組み換え手段によって調製された、発現させられた、作成された、または単離されたヒト抗体、例えば、宿主細胞にトランスフェクトされた組み換え体発現ベクターを使用して発現させられた抗体(以下のセクションIIにさらに記載される)、組み換え体である組み合わせヒト抗体ライブラリーから単離された抗体(以下のセクションIIにさらに記載される)、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物(例えば、マウス)から単離された抗体(例えば、Taylor, L. D.ら、(1992) Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295)、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列になるようにスプライシングすることを含む任意の他の手段によって調製された、発現させられた、作成された、もしくは単離された抗体が含まれる。そのような組み換え体ヒト抗体は、ヒトの生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域と定常領域を有している(Kabat, E. A.ら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照のこと)。しかし、そのような組み換え体ヒト抗体は、インビトロでの突然変異誘発(または、ヒトIg配列についてトランスジェニックである動物が使用される場合には、インビオでの体細胞突然変異誘発)に供することができ、したがって、組み換え体抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列のVHおよびVL配列に由来し、関係するが、インビオでヒト抗体の生殖細胞系列レパートリーにおいては自然界には存在しない可能性がある配列である。しかし、特定の実施形態においては、そのような組み換え体抗体は、選択的突然変異誘発アプローチまたは逆変異、あるいはそれらの両方の結果であり得る。

【0052】

「単離された抗体」には、様々な抗原特異性を有している他の抗体を実質的に含まない抗体が含まれる(例えば、RAGEに特異的に結合する単離された抗体には、hRAGE以外のRAGEに特異的に結合する抗体は実質的に含まれない)。RAGEに特異的に結合する単離された抗体は、他の種に由来するRAGE分子に結合する可能性がある。さらに、単離された抗体には、他の細胞性の物質および/または化合物は実質的には含まれない場合がある。

【0053】

「中和抗体」(または「RAGE活性を中和する抗体」)には、hRAGEへのその結合によってhRAGEの生物学的活性の調節が生じる抗体が含まれる。hRAGEの生物学的に活性のこの調節は、hRAGEの生物学的活性の1つ以上の指標(例えば、ヒトRAGE受容体結合アッセイにおける受容体への結合の阻害)を測定することによって評価することができる(例えば、実施例6および7を参照のこと)。hRAGEの生物学的活

10

20

30

40

50

性についてのこれらの指標は、当該分野で公知のインビトロまたはインビボでのアッセイにおいていくつかの基準のうちの1つ以上によって評価することができる（例えば、実施例6および7を参照のこと）。

【0054】

ヒト以外（例えば、マウス）の抗体の「ヒト化」形態は、ヒト以外の免疫グロブリンに由来する最小配列が含まれているキメラ抗体である。ほとんどの部分については、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、その中では、レシピエントの超可変領域に由来する残基が、所望される特異性、親和性、および能力を有している、マウス、ラット、ウサギ、またはヒト以外の靈長類のようなヒト以外の種（ドナー抗体）の超可変領域に由来する残基によって置き換えられている。いくつかの場合には、ヒト免疫グロブリンのFR残基は、対応するヒト以外の残基によって置き換えられる。さらに、ヒト抗体には、レシピエント抗体の中、またはドナー抗体の中には見られない残基が含まれる場合もある。これらの修飾は、抗体の能力をさらに高めるために行われる。一般的には、ヒト化抗体には、少なくとも1つ、そして典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てが含まれるであろう。その中では、ヒト以外の免疫グロブリンの超可変領域に対応する超可変領域の全てまたは実質的に全てと、FR領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体には、状況に応じて、免疫グロブリン定常領域（Fc）（典型的には、ヒト免疫グロブリン定常領域）の少なくとも一部も含まれるであろう。さらなる詳細については、Jonesら、Nature 321:522-525 (1986)；Riechmannら、Nature 332:323-329 (1988) および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992) を参照のこと。10

【0055】

用語「活性」には、抗原に対する抗体の結合特異性／親和性（例えば、RAGEに結合する抗RAGE抗体）、および／または抗体の中和能力（例えば、hRAGEへのその結合によって、ヒトRAGE受容体結合アッセイにおける受容体結合の阻害のようにRAGEの生物学的活性を阻害する抗hRAGE抗体）のような活性が含まれる。20

【0056】

「発現構築物」は、適切な宿主細胞の中で発現させることができる核酸タンパク質またはポリペプチドの発現を媒介するために十分な、発現させることができる核酸と調節エレメントが含まれている任意の組み換え体核酸である。30

【0057】

用語「融合タンパク質」および「キメラタンパク質」は互いに置き換えることができ、そして、2つ以上のタンパク質に由来するアミノ酸配列に対応する部分を有しているアミノ酸配列を有するタンパク質あるいはポリペプチドをいう。2つ以上のタンパク質に由来する配列は、タンパク質全体であっても、またタンパク質の一部（すなわち、断片）であってもよい。融合タンパク質はまた、タンパク質のアミノ酸に対応する部分の間に、アミノ酸の連結領域を有している場合もある。そのような融合タンパク質は、組み換え方法によって調製することができる。この場合、対応する複数の核酸がヌクレアーゼトリガーゼでの処理によって連結され、発現ベクターに組み込まれる。融合タンパク質の調製は、一般的には、当業者に理解されている。40

【0058】

用語「核酸」は、デオキシリボ核酸（DNA）、そして適切な場合には、リボ核酸（RNA）のようなポリヌクレオチドをいう。この用語にはまた、等価物、ヌクレオチドアナログから作成されたRNAまたはDNAのいずれかのアナログも含まれ、さらに、記載される一本鎖（センスまたはアンチセンス）および二本鎖ポリヌクレオチドである実施形態にも同様に適用すると理解されるはずである。

【0059】

用語「同一である割合（%）」または「パーセント同一性」は、2つのアミノ酸配列の間、または2つのヌクレオチド配列の間での配列同一性をいう。パーセント同一性は、比50

較の目的のためにアラインメントすることができるそれぞれの配列の中の位置を比較することによって決定することができる。同一性の割合(%)としての表現は、比較される配列によって共有される位置にある同じアミノ酸または核酸の数の関数をいう。FASTA、BLAST、またはENTREZを含む様々なアラインメントアルゴリズムおよび/またはプログラムを使用することができる。FASTAとBLASTは、GCG配列分析パッケージ(University of Wisconsin, Madison, Wis.)の一部として利用でき、そして例えば、デフォルト設定で使用することができる。ENTREZは、National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md. から入手することができる。2つの配列のパーセント同一性は、1のギャップ重量を用いてGCGプログラムによって決定することができる。例えば、個々のアミノ酸ギャップは、2つの配列の間に1つのアミノ酸またはヌクレオチドの不適合が存在しているかのように計算され得る。

10

【0060】

アラインメントのための他の技術は、Methods in Enzymology, 第266巻: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), Doolittle Academic Press, Inc. 編, a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USAに記載されている。配列の中にギャップを許容するアラインメントプログラムが、配列をアラインメントするために使用されることが好ましい。Smith-Watermannは、配列アラインメントの中にギャップを許容するアルゴリズムのうちの1タイプである。Meth. Mol. Viols. 70: 173 - 187 (1997)を参照のこと。また、Needleman and Wunschアラインメント法を使用するGAP Iプログラムも、配列をアラインメントするために利用することができる。別の検索ストラテジーでは、MPSEARCHソフトウェアが使用される。これは、MASPARコンピューター上で実行される。MPSEARCHは、大量の並列するコンピューター上で配列5をスコアするためにSmith-Watermannアルゴリズムを使用する。このアプローチにより、遠い関係にある適合を拾い上げる能力が改善され、これは、小さいギャップ、およびヌクレオチド配列の誤りに特に寛容である。核酸によってコードされるアミノ酸配列は、タンパク質とDNAデータベースの両方を検索するために使用することができる。

20

【0061】

用語「ポリペプチド」と「タンパク質」は、本明細書中では互換的に使用される。

【0062】

「RAGE」タンパク質は、当該分野で公知であるように、「糖化最終産物の受容体(Receptor for Advanced Glycation End Products)」である。代表的なRAGEタンパク質は図1A~1Cに示される。RAGEタンパク質には、可溶性RAGE(sRAGE)と内因性の分泌型RAGE(esRAGE)が含まれる。内因性の分泌型RAGEは、細胞の外側に放出され、ここでAGEリガンドに結合してAGE作用を中和することができる、RAGEスプライシング変異体である。例えば、Koyamaら、ATVE, 2005; 25: 2587 - 2593を参照のこと。逆相関が、ヒトの血漿esRAGEとメタボリックシンドロームのいくつかの構成要素(BMI、インシュリン抵抗性、BP、高トリグリセリド血症、およびIGT)との間で観察されている。血漿esRAGEレベルはまた、糖尿病の被験体または糖尿病ではない被験体において、頸動脈と大腿動脈のアテローム性動脈硬化症(超音波によって定量される)とも逆相間している。さらに、血漿esRAGEレベルは、年齢が一致している健常な対照よりも、血管造影法によって冠動脈疾患が証明されている糖尿病ではない患者においては優位に低い。

30

40

【0063】

50

「糖化最終産物の受容体のリガンド結合エレメント」または「RAGE-LBE」(本明細書中では、「RAGE-Fc」および「RAGE-strep」とも呼ばれる)には、RAGEリガンドに結合する能力を維持している膜貫通RAGEポリペプチドの任意の細胞外部分およびその断片が含まれる。この用語にはまた、RAGEポリペプチドと少なくとも85%の同一性、好ましくは、少なくとも90%の同一性、または、さらに好ましくは、少なくとも95%の同一性を有しているポリペプチド、例えば、それに対してRAGEリガンドまたはRAGE-BPが結合するであろうヒトまたはマウスのポリペプチドも含まれる。

【0064】

「糖化最終産物の受容体結合パートナー」または「RAGE-BP」には、RAGEタンパク質の細胞外部分(例えば、RAGEまたはRAGE-LBEのような受容体ポリペプチド)に対して生理学的設定において結合する任意の物質(例えば、ポリペプチド、低分子、炭水化物構造など)が含まれる。10

【0065】

「RAGE関連障害」または「RAGEが関係している障害」には、罹患した細胞または組織が、RAGEもしくは1つ以上のRAGEリガンドの発現および/または活性の増大あるいは低下を示す任意の障害が含まれる。RAGE関連障害にはまた、RAGE機能の低下(例えば、RAGE:RAGE-BP相互作用を破壊する物質の投与を含む)によって処置することができる(すなわち、1つ以上の兆候を排除するかまたは緩和することができる)任意の障害が含まれる。20

【0066】

「RAGEのVドメイン」は、Neeperら、「Cloning and expression of RAGE: a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins」, J. Biol. Chem. 267: 14998 - 15004 (1992)(その内容は引用により本明細書中に組み入れられる)の図5に示されているような、免疫グロブリン様可変ドメインをいう。Vドメインには、配列番号1および配列番号3に示される1位から120位までのアミノ酸が含まれる。

【0067】

ヒトRAGEのcDNAは1406塩基対であり、404アミノ酸の成熟タンパク質をコードする。Neeperら、1992の図3を参照のこと。30

【0068】

用語「組み換え体核酸」には、自然界においては一緒に存在しない少なくとも2つの配列が含まれている任意の核酸が含まれる。組み換え体核酸は、例えば、分子生物学の方法を使用することによってインビトロで、または例えば、相同組み換えもしくは非相同組み換えによる新規の染色体位置での核酸の挿入によってインビボで作成することができる。

【0069】

被験体に関する用語「処置する」は、被験体の疾患または障害の少なくとも1つの兆候を改善させることをいう。処置は、疾患もしくは症状の治癒である場合も、また、その改善である場合もある。40

【0070】

用語「ベクター」はそれに対して連結させられている別の核酸を輸送することができる核酸分子をいう。ベクターの1つのタイプはエピソーム、すなわち、染色体外複製が可能な核酸である。ベクターの別のタイプは、宿主細胞の遺伝的材料と組代わるように設計された組み込みベクターである。ベクターは、自律複製するもの、および組み込み型のもののいずれでもあり得、そしてベクターのレパートリーは細胞の状況に応じて様々であり得る(すなわち、ベクターは、1つの宿主細胞のタイプの中では自律複製することができ、そして別の宿主細胞のタイプの中では純粋な組み込み型であり得る)。それらが動作可能であるように連結させられる発現可能な核酸の発現を指示することができるベクターは、50

本明細書中では「発現ベクター」と呼ばれる。

【0071】

「特異的免疫反応性」は、抗体が特異的なペプチド配列と相互作用する場合の、特定のペプチド配列に対する化合物〔抗体〕の優先的結合をいう。

【0072】

表現「有効量」は、本明細書中で使用される場合は、動物においていくらかの所望される効果を生じるために有効である、1つ以上の薬剤、物質、または本発明の1つ以上の薬剤が含まれている組成物の量を意味する。薬剤が治療効果を得るために使用される場合には、「有効量」を含む実際の用量は、処置される特定の症状、疾患の重篤度、患者の大きさおよび健康状態、投与経路等多数の条件に応じて変化するであろう。熟練した医師であれば、医学の分野で周知である方法を使用して適切な用量を容易に決定できる。

10

【0073】

表現「薬学的に許容される」は、本明細書中では、合理的な利点／リスク比に見合う、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴うことなくヒトおよび動物の組織と接触させる使用に適している、適正な医学的判断の範囲である、そのような化合物、材料、組成物、および／または投薬形態をいうように使用される。

【0074】

表現「薬学的に許容される担体」は、本明細書中で使用される場合は、1つの臓器または体の一部から、別の臓器または体の部分への本発明の物質の保持または輸送に関係している、薬学的に許容される物質、組成物、または媒体（例えば、液体もしくは固体の增量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、またはカプセル化材料）を意味する。個々の担体は、処方物の他の成分と適合する意味で「許容され」なければならない。薬学的に許容される担体となり得る物質のいくつかの例としては以下が挙げられる。（1）糖（例えば、ラクトース、グルコース、およびスクロース）；（2）デンプン（例えば、トウモロコシデンプン、およびジャガイモデンプン）；（3）セルロースおよびその誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロース）；（4）粉末状トラガカント；（5）麦芽；（6）ゼラチン；（7）タルク；（8）賦形剤（例えば、ココアバター、および坐剤用ワックス）；（9）油（例えば、ピーナッツ油、菜種油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、および大豆油）；（10）グリコール（例えば、プロピレングリコール）；（11）ポリオール（例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール）；（12）エステル（例えば、オレイン酸エチル、ラウリン酸エチル）；（13）寒天；（14）緩衝剤（例えば、水酸化マグネシウム、および水酸化アルミニウム）；（15）アルギン酸；（16）発熱物質が含まれていない水；（17）等張性生理食塩水、（18）Ringer溶液、（19）エチルアルコール；（20）リン酸緩衝溶液；ならびに、（21）薬学的処方物において使用される他の毒性がない適合性の物質。

20

【0075】

モノクローナル抗体の調製

哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、またはウサギ）は、全長のタンパク質もしくはその断片、または、全長のタンパク質もしくはその断片をコードするcDNA、ペプチドの免疫原性の形態で免疫化することができる。タンパク質またはペプチドに免疫原性を付与するための技術としては、担体への結合、または当該分野で周知の他の技術が挙げられる。ポリペプチドの免疫原性部分は、アジュバントの存在下で投与することができる。免疫化の進行は、血漿または血清中の抗体力価の検出によってモニターすることができる。標準的なELISAまたは他の免疫アッセイを、抗体のレベルを評価するための抗原としての免疫原とともに使用することができる。

40

【0076】

本発明のポリペプチドの抗原性調製物での動物の免疫化の後、抗血清を得ることができ、所望される場合には、血清からポリクローナル抗体が単離される。モノクローナル抗体を产生するためには、抗体を生産する細胞（リンパ球）を免疫化した動物から回収し、そ

50

して骨髄腫細胞のような不死化細胞を用いる標準的な体細胞融合手順によって融合させて、ハイブリドーマ細胞を得ることができる。そのような技術は当該分野で周知であり、これには例えば、ハイブリドーマ技術 (Kohler and Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495 - 497 によって最初に開発された)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbarら、(1983) *Immunology Today*, 4: 72)、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技術 (Coleら、(1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77 - 96) が含まれる。ハイブリドーマ細胞は、RAGEポリペプチドのエピトープと特異的に反応する抗体の生産のために、免疫化学的にスクリーニングすることができ、そのようなハイブリドーマ細胞が含まれている培養物からモノクローナル抗体が単離される。

10

【0077】

ヒト化

キメラ抗体には、少なくとも2つの異なる種に由来する配列が含まれる。一例として、組み換えクローニング技術を使用して、様々な領域（ヒト以外の抗体、すなわち抗原で免疫化されたヒト以外の種の中で調製された抗体に由来する抗原結合部位と、ヒト免疫グロブリン由来の定常領域を含む）を含めることができる。

【0078】

ヒト化抗体はキメラ抗体の1つのタイプである。ここでは、抗原結合を担う可変領域の残基（すなわち、相補性決定領域の残基（相補性決定領域と略される）、または抗原結合に関与している任意の他の残基）はヒト以外の種に由来し、一方、残りの可変領域の残基（すなわち、フレームワーク領域の残基）と定常領域は、少なくとも一部、ヒト抗体の配列に由来する。ヒト化抗体のフレームワーク領域の残基と定常領域の残基のサブセットは、ヒト以外の供給源に由来する場合もある。ヒト化抗体の可変領域はまた、ヒト化（すなわち、ヒト化された軽鎖または重鎖可変領域）とも記載される。ヒト以外の種は、通常、抗原での免疫化に使用されるものであり、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒト以外の霊長類、または他のヒト以外の哺乳動物種である。ヒト化抗体は、通常は、伝統的なキメラ抗体よりも免疫原性が低く、ヒトへの投与後に改善された安定性を示す。例えば、Benincosaら、(2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 810 - 6; Kalofonosら、(1994) *Eur. J. Cancer* 30A: 1842 - 50; Subramanianら、(1998) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17: 110 - 5 を参照のこと。

20

【0079】

相補性決定領域（CDR）は、抗原結合に関与している抗体の可変領域の残基である。CDRを特定するためのいくつかの番号付けシステムが一般的に使用されている。Kabatの定義は、配列の可変性に基づき、そしてChothiaの定義は、構造上のループ領域の位置に基づく。AbMの定義は、KabatとChothiaのアプローチの間の妥協案である。軽鎖可変領域のCDRは、Kabat、Chothia、またはAbMアルゴリズムにしたがうと、24位から34位（CDR1-L）、50位から56位（CDR2-L）、そして89位から97位（CDR3-L）の残基に結合される。Kabatの定義に従うと、重鎖可変領域のCDRは、31位から35B位（CDR1-H）、50位から65位（CDR2-H）、そして95位から102位（CDR3-H）（Kabatの番号付け）の残基に結合される。Chothiaの定義にしたがうと、重鎖可変領域のCDRは、26位から32位（CDR1-H）、52位から56位（CDR2-H）、そして95位から102位（CDR3-H）（Chothiaの番号付け）の残基によって結合される。AbMの定義にしたがうと、重鎖可変領域のCDRは、26位から35B位（CDR1-H）、50位から58位（CDR2-H）、そして95位から102位（CDR3-H）（Kabatの番号付け）の残基によって結合される。Martinら、(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9268 - 9272; Martinら、(1991) *Methods Enzymol.* 203: 121 -

30

40

50

153; Pedersenら、(1992) Immunomethods 1:126; およびReesら、(1996) In Sternberg M.J.E. (編), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172頁を参照のこと。

【0080】

本明細書中で使用される場合には、用語「CDR」は、Kabatによる、またはChothiaによるかのいずれかで定義されたCDRをいう。さらに、本発明のヒト化抗体可変性は、Kabatによって定義される1つ以上のCDRを含み、そしてChothiaによって定義される1つ以上のCDRをも含むように構築することができる。

【0081】

特異性決定領域(SDR)は、抗原と直接相互作用するCDRの中の残基である。SDRは、超可変性の残基に対応する。(Padlanら、(1995) FASEB J. 9: 133-139)を参照のこと。

【0082】

フレームワーク残基は、超可変性残基またはCDR残基以外の抗体の可変性領域の残基である。フレームワーク残基は、自然界に存在しているヒト抗体に由来し得、例えば、本発明の抗RAGE抗体のフレームワーク領域と実質的に類似しているヒトフレームワークである。個々の配列の間でコンセンサスを示す人工的なフレームワーク配列もまた使用することができる。ヒト化のためにフレームワーク領域が選択される場合には、ヒトにおいて広く示される配列が、あまり多くない配列よりも好ましいであろう。ヒトフレームワークアクセプター配列のさらなる変異を、抗原の接触に関係していると考えられるマウス残基、および/または抗原結合部位の構造的完全性に関係している残基を回復させるために、あるいは抗体発現を改善するために作成することができる。ペプチド構造の予想を、ヒト化設計によって導入された翻訳後タンパク質修飾部位を特定し、回避するために、ヒト化された可変性の重鎖および軽鎖領域配列を分析するために使用することができる。

【0083】

ヒト化抗体は、ベニヤリング(veneering)、相補性決定領域(CDR)の移植、短縮型CDRの移植、特異性決定領域(SDR)の移植、およびFrankensteinアセンブリを含む様々な方法のうちの任意の1つを使用して、以下に記載されるように調製することができる。ヒト化抗体にはまた、1つ以上の変化がCDRの中に導入されている超ヒト化抗体も含まれる。例えば、ヒト残基で、CDRの中のヒト以外の残基を置換することができる。これらの一般的なアプローチは、任意の所望される配列の抗RAGE抗体を產生するために、標準的な突然変異誘発および合成技術と組み合わせることができる。

【0084】

ベニヤリングは、ヒトアミノ酸配列で抗体の溶媒と接触することができる外側に再度表面をつくることによって、齧歯類または他のヒト以外の抗体の中の潜在的な免疫原性アミノ酸配列を減らすという概念に基づく。したがって、ベニヤリングされた抗体(veneer antibody)は、修飾されていないヒト以外の抗体よりもヒト細胞に対して異質性が低い(less foreign)ようである。Padlan(1991) Mol. Immunol. 28: 489-98を参照のこと。ヒト以外の抗体は、ヒト抗体のフレームワーク領域の中の同じ位置の残基とは異なるヒト以外の抗体の中の露呈している外部フレームワーク領域の残基を特定すること、およびヒト抗体の中のこれらの同じ位置を通常占めているアミノ酸での特定された残基の置き換えによってベニヤリングされる。

【0085】

CDRの移植は、アクセプター抗体(例えば、ヒト抗体または所望されるフレームワーク残基を含む他の抗体)の1つ以上のCDRを、ドナー抗体(例えば、ヒト以外の抗体)のCDRで置き換えることによって行われる。アクセプター抗体は候補のアクセプター抗体とドナー抗体の間でのフレームワーク残基の類似性に基づいて選択することができる。

10

20

30

40

50

例えば、Frankensteinのアプローチにしたがうと、ヒトフレームワーク領域は、関連するヒト以外の抗体の個々のフレームワーク領域に対して実質的な配列相同性を有しているとして同定され、そしてヒト以外の抗体のCDRは、異なるヒトフレームワーク領域の構成材料の上に移植される。本発明の抗体の調製に有用な関連する方法はまた、米国特許出願公開番号2003/0040606にも記載されている。

【0086】

短縮型CDRの移植は関連するアプローチである。短縮型CDRには、特異性決定残基と隣接するアミノ酸が含まれ、これには、軽鎖の27d～34位、50～55位、および89～96位と、重鎖の31～35b位、50～58位、および95～101位の残基が含まれる(Kabatら、(1987)の番号付けの慣習)。Padlanら、(1995)FASEB J. 9: 133-9を参照のこと。特異性決定残基(SDR)の移植は、抗体結合部位の結合特異性と親和性が、個々の相補性決定領域(CDR)の中の最も高度に可変性である残基によって決定されるとの理解を前提とする。利用することができるアミノ酸配列のデータの分析と組み合わせた抗体-抗原複合体の三次元構造の分析を、CDRの中の個々の位置で起こるアミノ酸残基の構造的相違に基づいて配列可変性をモデル化するために使用することができる。SDRは、接触残基からなる最も小さい免疫原性ポリペプチド配列として同定される。Padlanら、(1995)FASEB J. 9: 133-139を参照のこと。

10

【0087】

CDRまたは短縮型CDRの移植のためのアクセプターフレームワークは、所望される残基を導入するためにさらに修飾することができる。例えば、アクセプターフレームワークには、ヒトサブグループIのコンセンサス配列の重鎖可変領域が、状況に応じて、1、28、48、67、69、71、および93位の1つ以上にあるヒト以外のドナー残基とともに含まれ得る。別の例としては、ヒトアクセプターフレームワークには、ヒトサブグループIコンセンサス配列の軽鎖可変領域が、状況に応じて、2、3、4、37、38、45、および60位の1つ以上にあるヒト以外のドナー残基とともに含まれ得る。移植後、さらなる変化を、抗体結合と機能性を最適化するために、ドナー配列および/またはアクセプター配列の中に作成することができる。例えば、PCT国際公開番号WO91/09967を参照のこと。

20

【0088】

ヒト化抗RAGE抗体を調製するために使用することができる重鎖可変領域のヒトフレームワークとしては、DP-75、DP54、DP-54、FW VH 3 JH4、DP-54 VH3 3-07、DP-8(VH1-2)、DP-25、VI-2bおよびVI-3(VH1-03)、DP-15およびV1-8(VH1-08)、DP-14およびV1-18(VH1-18)、DP-5およびV1-24P(VH1-24)、DP-4(VH1-45)、DP-7(VH1-46)、DP-10、DA-6およびYAC-7(VH1-69)、DP-88(VH1-e)、DP-3、ならびにDA-8(VH1-f)のフレームワーク残基が挙げられる。

30

【0089】

ヒト化抗RAGE抗体を調製するために使用することができる軽鎖可変領域のヒトフレームワークとしては、ヒト生殖細胞系列クローンDPK24、DPK-12、DPK-9、VK1、DPK-9 JK4、DPK9 VK1 02、ならびに生殖細胞系列クローンのサブグループV IIIおよびV Iのフレームワーク残基が挙げられる。DPK24生殖細胞系列の以下の変異によっては、抗体の発現が増大し得る。すなわちF10S、T45K、I63S、Y67S、F73L、およびT77Sである。

40

【0090】

本発明の代表的なヒト化抗RAGE抗体としては、配列番号16～27から選択される可変領域アミノ酸配列の1つ以上のCDRを有している抗体が挙げられる。例えば、ヒト化RAGE抗体には、配列番号16、18、21、24、20、および26のいずれか1つの重鎖可変領域、あるいは、配列番号17、19、22、25、23、および27のい

50

ずれか 1 つの軽鎖可変領域の C D R から選択される 2 つ以上の C D R が含まれ得る。ヒト化抗 R A G E 抗体にはまた、配列番号 1 6、1 8、2 1、2 4、2 0、および 2 6 のいずれか 1 つの 2 つまたは 3 つの C D R を有している可変領域が含まれている重鎖と、配列番号 1 7、1 9、2 2、2 5、2 3、および 2 7 のいずれか 1 つの 2 つまたは 3 つの C D R を有している可変領域が含まれている軽鎖もまた含まれ得る。

【 0 0 9 1 】

本発明のヒト化抗 R A G E 抗体は、第 1 の鎖の可変領域（すなわち、軽鎖可変領域または重鎖可変領域）がヒト化されており、そして第 2 の鎖の可変領域はヒト化されていない（すなわち、ヒト以外の種において生産される抗体の可変領域）状態で構築することができる。ここでは、これらの抗体は、半ヒト化抗体と呼ばれるヒト化抗体の 1 つのタイプである。10

【 0 0 9 2 】

キメラおよびヒト化抗 R A G E 抗体の定常領域は、I g A、I g D、I g E、I g G、I g M、およびそれらの任意のイソ型（例えば、I g G の I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 イソ型）のいずれか 1 つの定常領域に由来し得る。多くの抗体定常領域のアミノ酸配列が公知である。ヒトイソ型の選択と、そのイソ型の中の特定のアミノ酸の修飾によって、宿主防御機構の活性化を促進または排除することができ、そして抗体の体内分布を変化させることができる。（Reffら、(2002) Cancer Control 9 : 152 - 66）を参照のこと。免疫グロブリン定常領域をコードする配列のクローニングのためには、インtron 配列が欠失させられる場合がある。20

【 0 0 9 3 】

キメラおよびヒト化抗 R A G E 抗体は、当該分野で公知の標準的な技術を使用して構築することができる。例えば、可変領域は、可変領域をコードする重複しているオリゴヌクレオチドを互いにアニーリングさせること、そしてヒト抗体定常領域を含む発現ベクターの中にそれらを連結させることによって調製することができる。例えば、Harlow & Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York、および米国特許第 4,196,265 号；同第 4,946,778 号；同第 5,091,513 号；同第 5,132,405 号；同第 5,260,203 号；同第 5,677,427 号；同第 5,892,019 号；同第 5,985,279 号；同第 6,054,561 号を参照のこと。ホモ二量体とヘテロ二量体を含む 2 つの完全な四量体抗体が含まれている 4 倍抗体 (H₄L₄) は、例えば、PCT 国際公開番号 WO 02/096948 に記載されているように調製することができる。抗体二量体はまた、ヘテロ二官能性架橋リンカーの使用によって (Wolff ら、(1993) Cancer Res. 53 : 2560 - 5)、または二重定常領域を含めるための組み換え生産によって (Stevenson ら、(1989) Anticancer Drug Des. 3 : 219 - 30)、抗体定常領域の中へのシステイン残基（単数または複数）の導入によって（これは、鎖間ジスルフィド結合の形成を促進する）調製することもできる。本発明の抗体の抗原結合断片は、例えば、短縮型の抗体配列の発現によって、または全長の抗体の翻訳後消化によって、調製することができる。30

【 0 0 9 4 】

本発明の抗 R A G E 抗体の変異体は、様々な変化、置換、挿入、および欠失を含むように容易に調製することができる。例えば、抗体配列は、抗体の発現のために使用される細胞タイプの中でのコドン使用頻度について最適化することができる。抗体の血清半減期を増大させるためには、サルベージ受容体結合エピトープ (salvage receptor binding epitope) を、まだ存在していない場合には、抗体重鎖配列の中に取り込ませることができる。米国特許第 5,739,277 号を参照のこと。抗体の安定性を高めるためのさらなる修飾には 241 位にあるセリンをプロリンで置き換える I g G 4 の修飾が含まれる。Angal ら、(1993) Mol. Immunol. 30 : 105 - 108 を参照のこと。他の有用な変化としては、抗体を薬物と結合させるこ4050

とにおける効率を最適化するために必要な置換が挙げられる。例えば、抗体は、薬物の結合のためのアミノ酸を含めるために、そのカルボキシル末端で修飾することができる。例えば、1つ以上のシステイン残基を付加することができる。定常領域は、炭水化物または他の部分の結合のための部位を導入するように修飾することができる。

【0095】

さらなる抗体変異体には機能的特性の改善を生じるグリコシリ化イソ型が含まれる。例えば、Fcグリコシリ化の修飾によっては、エフェクター機能の変化（例えば、Fc受容体に対する結合の増大、およびADCの改善）を生じさせることができ、そしてあるいは、C1q結合およびCDCを減少させることができる（例えば、複合体形態から高マンノース型またはハイブリッド型へのFcオリゴ糖の変化により、C1q結合およびCDCが減少し得る（例えば、Kandaら、Glycobiology, 2007; 17: 104-118を参照のこと））。修飾は、細菌、酵母、植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を生体操作することによって行うことができる。これはまた、遺伝子操作された生物のタンパク質または自然界に存在している産物のグリコシリ化経路を操作することによって行うこともできる。グリコシリ化はまた、糖-結合酵素（グリコシリトランスフェラーゼ）が広範囲の様々な物質を寛容化するライブラリーを開発することによっても変化させることができる。最後に、当業者は、様々な化学的アプローチによって、低分子、酵素、タンパク質の連結、代謝生体工学、または完全な合成を用いて、タンパク質および自然界に存在している産物をグリコシリ化することができる。N-グリカンのプロセッシングの適切な低分子阻害剤の例としては、カスタノスペルミン（Castanospermine）（CS）、キフネンシン（Kifunensine）（KF）、デオキシマンノジリマイシン（Deoxymannojirimycin）（DMJ）、スワインソン（Swainsonine）（Sw）、モネンシン（Monensin）（Mn）が挙げられる。

【0096】

本発明の抗RAGE抗体の変異体は、部位特異的突然変異誘発または組み換えクローニングを含む標準的な組み換え技術を使用して生産することができる。抗RAGE抗体の多様化したレパートリーは、ヒト以外のトランスジェニック動物において、遺伝子の配置および遺伝子の変換の方法によって調製することができる（米国特許公開番号2003/0017534）。これは次いで、機能的アッセイを使用して関連する活性について試験される。本発明の特定の実施形態においては、変異体は、CDRを変異させるための親和性成熟プロトコール（Yangら、（1995）J.Mol.Biol.254:392-403）、鎖のシャッフリング（Marksら、（1992）Biotechnology（NY）10:779-783）、大腸菌の突然変異誘発因子株の使用（Lowら、（1996）J.Mol.Biol.260:359-368）、DNAシャッフリング（Pattenら、（1997）Curr.Opin.Biotechnol.8:724-733）、ファージディスプレイ（Thompsonら、（1996）J.Mol.Biol.256:77-88）、およびセクシュアルPCR（sexual PCR）（Crameriら、（1998）Nature 391:288-291）を使用して得られる。免疫療法での適用のためには、関連する機能アッセイには、本明細書中で以下に記載されるように、ヒトRAGE抗原への特異的結合、抗体のインターナライゼーション、そして、腫瘍を有している動物に投与される場合には腫瘍部位（単数または複数）への標的化が含まれる。

【0097】

本発明によってはさらに、本発明の抗RAGE抗体を発現する細胞および細胞株が提供される。代表的な宿主細胞としては、哺乳動物およびヒトの細胞、例えば、CHO細胞、HEK-293細胞、HeLa細胞、CV-1細胞、およびCOS細胞が挙げられる。異種構築物の宿主細胞への形質転換後に安定な細胞株を作成するための方法は当該分野で公知である。代表的な哺乳動物以外の宿主細胞としては昆虫細胞が挙げられる（Potterら、（1993）Int.Rev.Immunol.10(2-3):103-112

)。抗体はまた、トランスジェニック動物の中で(Houdebine(2002)Current Opinion Biotechnol. 13(6):625-629)、およびトランスジェニック植物の中で(Schillbergら、(2003)Cell Mol. Life Sci. 60(3):433-45)生産させることもできる。

【0098】

上記で議論されたように、例えば、抗体の他の部分(例えば、定常領域)が欠失させられる、付加される、または置換されることにより修飾されているモノクローナル抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体もまた、本発明の範囲に含まれる。例えば、抗体は以下のように修飾することができる。すなわち、(i)定常領域を欠失させること、(ii)定常領域を別の定常領域(例えば、生存期間、抗体の安定性もしくは親和性を増大させることを意図する定常領域、または別の種もしくは抗体のクラスに由来する定常領域)で置き換えること、あるいは(iii)例えば、グリコシリ化部位の数、エフェクター細胞機能、Fc受容体(FcR)結合、補体結合などを変化させるために定常領域の中の1つ以上のアミノ酸を修飾することによる。

【0099】

抗体の定常領域を変化させるための方法は当該分野で公知である。機能が変化した(例えば、細胞上のFcRまたは補体のC1構成成分のようなエフェクターリガンドに対する親和性が変化した)抗体は、様々な残基で抗体の定常部分の少なくとも1つのアミノ酸残基を置き換えることによって产生することができる(例えば、EP388,151A1; US5,624,821、およびUS5,648,260を参照のこと。これらの全ての内容は引用により本明細書中に組み入れられる)。同様のタイプの変更は、マウスまたは他の種に対して適用された場合には、免疫グロブリンがこれらの機能を低下させるかまたは排除することが記載され得る。

【0100】

例えば、特定の残基(单数または複数)を、その側鎖上に適切な機能性を有している残基(单数または複数)で置き換えることによって、あるいは、電荷を有している官能基(例えば、グルタミン酸もしくはアスパラギン酸)またはおそらくは、芳香族非極性残基(例えば、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、もしくはアラニン)を導入することによって、FcR(例えば、FcR1)に対する、またはC1qの結合に対する、抗体(例えば、ヒトIgGのようなIgG)のFc領域の親和性を変化させることが可能である(例えば、US5,624,821を参照のこと)。

【0101】

抗体またはその結合断片は、細胞毒素、治療薬、または放射活性金属イオンと結合させることができる。1つの実施形態においては、結合されるタンパク質は抗体またはその断片である。細胞毒素または細胞傷害性物質には、細胞に対して有害である任意の物質が含まれる。限定ではない例としては以下が挙げられる。すなわち、カリカエミシン、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムプロマイド、エメチン、マイトイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、およびそれらのアナログまたはホモログである。治療薬としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない。すなわち、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキセート、6-メルカバトブリン、6-チオグアニン、シタラビン、および5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトイシンC、およびシス-白金ジクロロジアミン(I I)(cis-dichlorodiamine platinum(II))(DDP)、シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルビシンおよびドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、

10

20

30

40

50

ミトライマイシン、およびアントラマイシン)、ならびに抗有糸分裂薬(例えば、ビンクリスチンおよびビンプラスチン)である。そのような部分をタンパク質に結合させるための技術は当該分野で周知である。

【0102】

あるいは、免疫化されると、内因性の免疫グロブリンの生産がない状態で、ヒト抗体の完全なレパートリーを產生することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作成することが、現在可能である。例えば、キメラである生殖細胞系列変異体マウスでの抗体重鎖結合領域(JM)遺伝子の相同欠失によって、内因性の抗体の生産の完全な阻害が生じることが記載されている。ヒトの生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子アレイのそのような生殖細胞系列変異体マウスへの導入によっては、抗原でチャレンジされると、ヒト抗体の生産が生じるであろう。例えば、Jackobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovitsら、Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermannら、Year in Immune, 7: 33 (1983); およびDuchosalら、Nature 355: 258 (1992)を参照のこと。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーから誘導することもできる(Hoogenboomら、J. Mol. Biol. 227: 381 (1991); Marksら、J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991); Vaughanら、Nature Biotech 14: 309 (1996))。

10

【0103】

特定の実施形態においては、本発明の抗体は、併用療法の一部として他の薬剤と組み合わせて投与することができる。例えば、炎症症状の場合には、本発明の抗体は、炎症性疾患または症状の処置において有用な1つ以上の他の薬剤と組み合わせて投与することができる。実質的な炎症性の構成成分を有していると考えられる心臓血管疾患の症状、そして特に、アテローム斑によって生じる心臓血管疾患の症状の場合には、本発明の抗体は、心臓血管疾患の処置に有用な1つ以上の他の薬剤と組み合わせて投与することができる。ガンの場合には、本発明の抗体は、1つ以上の抗血管形成因子、化学療法薬と組み合わせて、または放射線治療に対するアジュバントとして投与することができる。本発明の抗体の投与が、多くの様々なガン治療薬を組み合わせることができるガンの処置レジュメの一部となるであろうことがさらに予想される。IBDの場合には、本発明の抗体は、1つ以上の抗炎症薬とともに投与することができ、そしてさらに、改良された食事療法のレジュメと組み合わせられる場合もある。

20

30

【0104】

RAGE-LBEとRAGE-BPとの間の相互作用を阻害するための方法

本発明には、RAGEとRAGE-BPとの間の相互作用を阻害するか、またはRAGE活性を調節するための方法が含まれる。好ましくは、そのような方法は、RAGEが関係している障害を処置するために使用される。

40

【0105】

そのような方法には、本明細書中に開示されるような、RAGEに対して惹起させられた抗体を投与する工程が含まれ得る。そのような方法には、配列番号1、配列番号3、配列番号7、配列番号9、配列番号11、または配列番号13に示されるアミノ酸配列を有しているRAGEタンパク質の1つ以上のエピトープに特異的に結合する抗体を投与する工程が含まれる。なお別の実施形態においては、そのような方法には、1つ以上のRAGE-BPに対するRAGEの結合を阻害する化合物を投与する工程が含まれる。そのような化合物を同定するための例示的な方法が以下で議論される。

【0106】

特定の実施形態においては、相互作用は、インビトロで、例えば、精製されたタンパク質、細胞、生物学的試料、組織、人工組織などが含まれている反応混合物の中で阻害される。特定の実施形態においては、相互作用は、インビボで、例えば、RAGEまたはそのRAGE結合断片に結合する抗体を投与することによって阻害される。抗体またはその断

50

片は、RAGEに結合し、RAGE-BPの結合を阻害する。

【0107】

本発明には、RAGEとRAGE-BPとの間の相互作用を阻害すること、またはRAGE活性を調節することによって、RAGE関連障害を予防あるいは処置するための方法が含まれる。そのような方法には、相互作用を阻害するために有効な量で、そして上記障害を予防または処置するために十分な時間の間、RAGEに対する抗体を投与する工程が含まれる。

【0108】

核酸

核酸は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、および1本鎖、2本鎖、または3本鎖の形態のそれらのポリマーである。具体的に限定されない限りは、核酸には、参照の自然界に存在している核酸と類似する特性を有している自然界に存在しているヌクレオチドの公知のアナログが含まれ得る。核酸には、遺伝子、cDNA、mRNA、およびcRNAが含まれる。核酸は合成される場合も、また、任意の生物を含む任意の生物学的供給源から導かれる場合もある。

【0109】

本発明の代表的な核酸には、ヒヒ、カニクイザル、およびウサギのRAGEをコードする開示されているcDNAに対応する配列番号6、8、10、12のいずれか1つに示されているか、あるいは、ヒヒRAGEをコードするゲノムDNA配列に対応する配列番号15に示されている、RAGEをコードするヌクレオチド配列が含まれる。本発明の核酸にはまた、配列番号16～49に示される抗体可変領域のアミノ酸配列のうちのいずれかをコードするヌクレオチド配列も含まれる。

【0110】

本発明の核酸にはまた、配列番号6、8、10、12、および15のいずれか1つに対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%同一であるヌクレオチド配列を含む、配列番号6、8、10、12、および15のいずれか1つと実質的に同じであるヌクレオチド配列も含まれ得る。

【0111】

本発明の核酸にはまた、配列番号7、9、11、および13のいずれか1つに対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%同一であるヌクレオチド配列を含む、配列番号7、9、11、および13に示されるアミノ酸配列のうちのいずれかと実質的に同じであるアミノ酸配列を有しているRAGEタンパク質をコードするヌクレオチド配列も含まれ得る。

【0112】

本発明の核酸にはまた、配列番号16～49のいずれか1つに対して少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%同一であるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、配列番号16～49に示されるアミノ酸配列のうちのいずれかと実質的に同じであるアミノ酸配列を有している抗RAGE抗体可変領域をコードするヌクレオチド配列も含まれ得る。

【0113】

配列は、本明細書中で以下に記載されるように、配列番号16～49のいずれか1つの配列をコードする全長の可変領域、配列番号16～49に示される配列のいずれか1つを有している全長の可変領域をコードするヌクレオチド配列を検索配列(query sequence)として使用する配列比較アルゴリズムを使用して、または目視検査により、最大の一一致のために比較される。

【0114】

実質的に同じ配列は多形配列、すなわち、集団の中の別の配列または対立遺伝子であり

10

20

30

40

50

得る。対立遺伝子の相違は、1塩基対程度の少ない数であり得る。実質的に同じ配列にはまた、サイレント変異が含まれている配列を含む、変異誘発された配列も含まれ得る。変異には、1つ以上の残基の変化、1つ以上の残基の欠失、または1つ以上のさらなる残基の挿入が含まれ得る。

【0115】

実質的に同じ核酸はまた、配列番号6、8、10、12、または15のいずれか1つの全長に対して、あるいは、配列番号7、9、11、および13に示されるRAGEアミノ酸配列をコードするかまたは配列番号16～49に示される抗体可変領域のアミノ酸配列をコードする任意のヌクレオチド配列の全長に対して、ストリンジエントな条件下で特異的にハイブリダイズするか、あるいは実質的にハイブリダイズする核酸としても同定される。核酸のハイブリダイゼーションの状況においては、比較される2つの核酸配列は、指定されたプローブおよび標的であり得る。プローブは参照核酸分子であり、そして標的は、核酸分子の不均一な集団の中で頻繁に見られる試験核酸分子である。標的配列は、試験配列と同義である。

10

【0116】

ハイブリダイゼーション実験については、有用なプローブは、本発明の核酸分子の少なくとも約14から40ヌクレオチドの配列に相補的であるか、またはそのようなヌクレオチド配列を模倣する。好ましくは、プローブには、配列番号6、8、10、12、または15のいずれか1つの、14から20ヌクレオチド、または所望される場合にはさらに長い、例えば、30、40、50、60、100、200、300、もしくは500ヌクレオチド、または全長まで、あるいは、配列番号7、9、11、および13に示されるRAGEアミノ酸配列をコードするかまたは配列番号16～49に示される抗体可変領域のアミノ酸配列をコードする任意のヌクレオチド配列の全長までが含まれる。そのような断片は、例えば、断片の化学合成によって、核酸增幅技術の適用によって、または組み換え生産のための組み換えベクターへの選択された配列の導入によって、容易に調製することができる。

20

【0117】

特異的ハイブリダイゼーションは、その配列が複雑な核酸混合物（例えば、全細胞DNAまたはRNA）の中に存在する場合の、ストリンジエントな条件下での特定のヌクレオチド配列だけに対する分子の結合、二本鎖形成、またはハイブリダイゼーションをいう。特異的ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション条件のストリンジエンサーに応じて、プローブと標的配列との間での不適合を許容することができる。

30

【0118】

核酸のハイブリダイゼーション実験（例えば、サザンおよびノーザンプロット分析）の状況におけるストリンジエントなハイブリダイゼーション条件とストリンジエントなハイブリダイゼーション洗浄条件は、配列依存性であり、かつ環境依存性である。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションについての広範囲の指針は、Tijsse n (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, part I chapter 2, Elsevier, New York, New Yorkの中に見られる。一般的には、よりストリンジエンサーの高いハイブリダイゼーション条件と洗浄条件は、定義されるイオン強度とpHでの特異的配列の熱融解温度(T_m)よりも約5低くなるように選択される。通常、ストリンジエントな条件下では、プローブは、その標的サブ配列に特異的にハイブリダイズするであろうが、他の配列にはハイブリダイズしないであろう。

40

【0119】

T_m は、標的配列の50%が完全に適合するプローブに対してハイブリダイズする温度（定義されたイオン強度およびpH下で）である。極めてストリンジエントである条件が、特定のプローブについての T_m と等しくなるように選択される。約100個を超える相

50

補性残基を有している相補性核酸のサザンまたはノーザンプロット分析についてのストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の一例は、1 mg のヘパリンを含む 50 % のホルムアミドの中での、42 で一晩のハイブリダイゼーションである。より高ストリンジエントである洗浄条件の一例は、65 の 0.1 × SSC の中に 15 分間である。ストリンジエントな洗浄条件の一例は、65 の 0.2 × SSC 緩衝液の中に 15 分間である。SSC 緩衝液の記述については、Sambrook ら編、(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York を参照のこと。多くの場合は、高いストリンジエンシーの洗浄の前に、バックグラウンドのプローブシグナルを取り除くための低いストリンジエンシーでの洗浄が行われる。約 100 ヌクレオチドを超える二本鎖についての中程度のストリンジエンシーの洗浄条件の一例は、45 の 1 × SSC の中に 15 分間である。約 100 を超えるヌクレオチドの二本鎖についての低いストリンジエンシーの洗浄の一例は、40 の 4 × から 6 × SSC の中に 15 分間である。

短いプローブ(例えば、約 10 から 50 ヌクレオチド)については、ストリンジエントな条件には通常、pH 7.0 ~ 8.3 で、約 1 M 未満の Na⁺ イオンの塩濃度、通常は、約 0.01 から 1 M の Na⁺ イオン濃度(または他の塩)が含まれ、そして温度は通常は少なくとも約 30 である。ストリンジエントな条件はまた、ホルムアミドのような不安定化物質の添加によって行うことができる。一般的には、特定のハイブリダイゼーションアッセイにおいて無関係なプローブについて観察されるよりも 2 倍大きい(または高い)シグナル対ノイズ比は、特異的なハイブリダイゼーションの検出を示す。

【0120】

以下は、本発明の参照ヌクレオチド配列と実質的に同じであるヌクレオチド配列を同定するために使用することができる、ハイブリダイゼーション条件と洗浄条件の例である。すなわち、プローブ核酸配列は、好ましくは、7 % のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5 M の NaPO₄、1 mM の EDTA 中で、50 で標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズさせられ、その後、2 × SSC、0.1 % の SDS 中で、50 で洗浄される。より好ましくは、プローブ配列と標的配列は、7 % のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5 M の NaPO₄、1 mM の EDTA の中に、50 でハイブリダイズさせられ、その後、1 × SSC、0.1 % の SDS 中で、50 で洗浄される。さらに好ましくは、プローブ配列と標的配列は、7 % のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5 M の NaPO₄、1 mM の EDTA の中に、50 でハイブリダイズさせられ、その後、0.5 × SSC、0.1 % の SDS 中で、50 で洗浄される。さらに好ましくは、プローブ配列と標的配列は、7 % のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5 M の NaPO₄、1 mM の EDTA の中に、50 でハイブリダイズさせられ、その後、0.1 × SSC、0.1 % の SDS 中で、50 で洗浄される。より好ましくは、プローブ配列と標的配列は、7 % のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5 M の NaPO₄、1 mM の EDTA の中に、50 でハイブリダイズさせられ、その後、0.1 × SSC、0.1 % の SDS 中で、65 で洗浄される。

【0121】

2つの核酸配列が実質的に同じであることをさらに示すものは、核酸によってコードされるタンパク質が実質的に同じであり、全体的な三次元構造を共有しているか、または生物学的機能が等しいことである。これらの用語は本明細書中以下でさらに定義される。ストリンジエントな条件下で互いにハイブリダイズしない核酸分子もなお、対応するタンパク質が実質的に同じである場合には、実質的に同じである。これは、例えば、2つのヌクレオチド配列に、遺伝子コードによって許容される保存的に置換された変異体が含まれる場合に起こり得る。

【0122】

保存的に置換された変異体は、1つ以上の選択された(または全ての)コドンの3番目の位置が、混合された塩基および/またはデオキシノシン残基で置換された、縮重コド

10

20

30

40

50

ン置換を有している核酸配列である。Batzlerら、(1991) Nucleic Acid Res. 19: 5081; Ohtsukaら、(1985) J. Biol. Chem. 260: 2605 - 2608; および Rossoliniら、(1994) Mol. Cell Probes 8: 91 - 98 を参照のこと。

【0123】

本発明の核酸にはまた、配列番号 6、8、10、12、もしくは 15 のいずれか 1 つに相補的な核酸、あるいは、配列番号 7、9、11、および 13 に示される RAGE アミノ酸配列をコードするかまたは配列番号 16 ~ 49 に示される抗体可変領域アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、ならびに、それらの相補配列も含まれる。相補配列は、塩基対の間で水素結合が形成されると互いに対合することができる逆平行ヌクレオチド配列を含む 2 つのヌクレオチド配列である。本明細書中で使用される場合は、用語「相補配列」は、以下に示される同じヌクレオチド比較方法によって評価することができるか、または本明細書中に記載される条件のような比較的ストリンジエントな条件下で問題となっている核酸セグメントに対してハイブリダイズすることができると同定される場合には、実質的に相補的であるヌクレオチド配列を意味する。相補核酸セグメントの特定の例はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0124】

サブ配列は、より長い核酸配列の一部を含む核酸の配列である。例示的なサブ配列は、本明細書中で上記に記載されたようなプローブ、またはプライマーである。用語「プライマー」は、本明細書中で使用される場合は、約 8 個またはそれ以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、好ましくは、10 ~ 20 ヌクレオチド、さらに好ましくは、20 ~ 30 ヌクレオチドの選択された核酸分子を含む連続する配列をいう。本発明のプライマーには、本発明の核酸分子上での重合の開始を提供するために十分な長さであり、適切な配列であるオリゴヌクレオチドが含まれる。

【0125】

伸張された配列には、核酸に取り込まれたさらなるヌクレオチド（または他の同様の分子）が含まれる。例えば、ポリメラーゼ（例えば、DNA ポリメラーゼ）は、核酸分子の 3' 末端に配列を付加することができる。加えて、ヌクレオチド配列は、他の DNA 配列（例えば、プロモーター、プロモーター領域、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、イントロン配列、さらに別の制限酵素部位、マルチクローニング部位、および他のコードセグメント）と結合させることもできる。したがって、本発明によってはまた、開示される核酸が含まれているベクター（組み換え発現のためのベクターが含まれる）も提供される。ここでは、本発明の核酸は機能性プロモーターに動作可能であるように連結させられる。核酸に動作可能であるように連結されると、プロモーターは、核酸との機能性の組み合わせとなり、結果、核酸の転写がプロモーター領域によって制御され、調節される。ベクターは、宿主細胞の中で複製することができる核酸、例えば、プラスミド、コスミド、およびウイルスベクターをいう。

【0126】

本発明の核酸は、クローニングすることができるか、合成することができるか、変化させることができるか、突然変異させることができますか、またはそれらの組み合わせであり得る。核酸を単離するために使用される標準的な組み換え DNA および分子クローニング技術は、当該分野で公知である。塩基対の変化、欠失、または小さい挿入を作成するための部位特異的突然変異誘発もまた当該分野で公知である。例えば、Sambrook ら（編）(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Sihlavy ら、(1984) Experiments with Gene Fusion. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover & Hames (1995) DNA Cloning: A Practical Approach, 第 2 版, IRL P

ress at Oxford University Press, Oxford / New York ; Ausubel (編) (1995) Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, Wiley, New York を参照のこと。

【0127】

予防および治療方法

本発明により、A のアミロイド沈着を特徴とする疾患または障害（例えば、アルツハイマー病）を有している被験体を処置するための方法が提供される。この方法には、RAGE に特異的に結合し、RAGE 結合パートナーの結合を阻害する抗体の治療有効量を被験体に投与する工程が含まれる。

10

【0128】

本発明によってはまた、被験体のA のアミロイド沈着の蓄積を阻害するまたは減少させる方法も提供される。この方法には、被験体に、RAGE に特異的に結合し、RAGE 結合パートナーの結合を阻害する抗体の有効量を投与する工程が含まれる。被験体の神経変性を阻害するまたは少なくする方法もまた本発明に含まれる。この方法には、被験体に、RAGE に特異的に結合し、RAGE 結合パートナーの結合を阻害する抗体の有効量を投与する工程が含まれる。本発明にはさらに、被験体の認識衰退を阻害するもしくは軽減する、または認識を改善する方法が含まれる。この方法には、被験体に、RAGE に特異的に結合し、RAGE 結合パートナーの結合を阻害する抗体の有効量を投与する工程が含まれる。本発明によってはまた、アミロイド沈着を特徴とするアミロイド生成性の疾患または障害を有している被験体を処置するための方法も提供される。この方法には、RAGE に特異的に結合し、RAGE 結合パートナーの結合を阻害する抗体の治療有効量を投与する工程が含まれる。

20

【0129】

本発明により、A のアミロイド沈着を特徴とする疾患または障害（例えば、アルツハイマー病）を有している被験体を処置するための方法が提供される。この方法には、患者である被験体において有用な治療応答（例えば、ブラーク負荷の軽減、ブラーク形成の阻害、神経ジストロフィーの軽減、および認識の迅速な改善、および／または認識衰退の回復、処置、もしくは予防のような認識機能の改善）を生じる条件下で、被験体に、RAGE に特異的に結合し、RAGE 結合パートナーの結合を阻害する抗体の治療有効量を投与する工程が含まれる。

30

【0130】

脳でのA のアミロイド沈着が関係している疾患としては、アルツハイマー病、ダウン症、および他の認識障害が挙げられる。後者は、アミロイド生成性疾患の他の特徴とともに起こる場合も、また他の特徴を伴わずに起こる場合もある。

【0131】

長い高血糖性の状態において形成される糖化最終産物（AGE）に加えて、RAGE のリガンドには、アミロイドの沈着とプロ炎症性媒介因子の特徴である - シート纖維状構造を有しているタンパク質（ - アミロイドタンパク質（A）、血清アミロイド（SAA）（纖維状形態）、S100 / カルグラヌリン（例えば、S100A12、S100B、S100A8 - A9）、および高移動性グループボックス - 1 染色体タンパク質 1 (HMG B1、アンホテリンとしても知られている）を含む）が含まれる。アミロイド生成性の疾患の病理学的進行におけるRAGE の役割についての理解は深まりつつある。アルツハイマー病の病因に対するその関与に加えて、RAGE は、細胞ストレスと、脾臓の中の血清アミロイド A (SAA) の沈着に密接に関係していることが示されている (Yanら、2000、Nature Med., 6 : 643 - 51)。RAGE は、腎臓の中でのアミロイドの蓄積と組織の崩壊に関係しており、家族性アミロイド・ポリニューロパシー (FAP) の個体において腎不全を導く (Matsunagaら、2005, Scand. J. Clin. Lab. Invest.)。RAGE リガンドアンホテリン (HMG B1) にはまた、アミロイド生成性ペプチド - アルツハイマー病の A ペプチドに対して高

40

50

度に相同であり、自然界に存在しているタンパク質から遊離されるとアミロイド様ペプチドを形成するものも含まれる (Kallijarviら、2001, Biochem., 40: 10032-7)。

【0132】

A の血管壁の中の RAGE を有している細胞との相互作用によっては、脳 - 血液関門 (BBB) を通過する A の輸送と、プロ炎症性サイトカインとエンドセリン - 1 (ET-1) の発現が生じる。後者は、A によって誘導される血管収縮を媒介する。したがって、本発明によってはまた、A によって誘導される血管収縮を軽減するための方法も提供される。

【0133】

RAGE - リガンド相互作用の阻害は、アルツハイマー様疾患についてのトランスジェニックマウスにおいて脳実質の中での A の蓄積を抑制することが示されている (Deaneら、2003, Nature Medicine 9: 907-913)。広範囲のアミロイド生成性の疾患および障害における RAGE の活発な病原性の役割は、本発明の方法 (これにより、RAGE に特異的に結合して、RAGE 結合パートナーの結合を阻害する抗体が提供される) によるこれらのアミロイド生成性の障害を有している患者に対する治療的な有効な処置を提供することを可能にする。

【0134】

本発明の方法は、無症候性の患者、および疾患の兆候を現在示している患者の両方に対して使用することができる。そのような方法において使用される抗体は、本明細書中に記載されるような、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または非ヒト抗体、あるいはそれらの断片 (例えば、RAGE 結合断片) であり得る。なお別の態様においては、本発明は、ヒトが抗体で処置することができる患者であり得る、A ペプチドで免疫化されたヒトから調製された抗体 [本発明者らは、これは RAGE であるべきと考えているが、これはおそらくは単純に欠失させられるべきである] を投与することを特徴とする。本発明の治疗方法は、以下の抗体を使用して行うことができる。すなわち、

- (a) RAGE に対する結合について、XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、および XT-M4 からなる群より選択される抗体と競合する抗体、
- (b) XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、および XT-M4 からなる群より選択される抗体が結合する、RAGE のエピトープに結合する抗体、
- (c) XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、XT-H7、および XT-M4 からなる群より選択される抗体の軽鎖または重鎖の 1 つ以上の相補性決定領域 (CDR) を含む抗体、あるいは、
- (d) (a)、(b)、または (c) の抗体の RAGE 結合断片、である。

【0135】

例えば、本発明の方法は、XT-M4 軽鎖可変領域の CDR を含む軽鎖可変領域 (配列番号 17)、XT-M4 重鎖可変領域配列の CDR を含む重鎖可変領域 (配列番号 16)、ヒト 軽鎖定常領域、およびヒト IgG1 重鎖定常領域を含む抗体あるいは RAGE 結合断片を被験体に投与することによって行うことができる。本発明の方法はまた、XT-M4 軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有している軽鎖可変領域 (配列番号 17)、XT-M4 重鎖可変領域配列のアミノ酸配列を有している重鎖可変領域 (配列番号 16)、ヒト 軽鎖定常領域、およびヒト IgG1 重鎖定常領域を含む抗体あるいはその RAGE 結合断片を使用して行うともできる。これらの抗体、および本発明の方法においてうまく使用することができる多くの他の抗体についての詳細は本明細書中に記載される。

【0136】

本発明の治療薬は、通常は、望ましくない混入物質を含まない実質的に純粋なものである。これは、物質が、通常は少なくとも約 50% w/w (重量 / 重量) 純粋であり、さらに、干渉性のタンパク質と混入物質が実質的には含まれていないことを意味する。多くの場合には、物質は少なくとも約 80% w/w、より好ましくは、少なくとも 90% または約 95% w/w 純粋である。しかし、従来のタンパク質精製技術を使用して、少なくとも

99% w / w 純粋な均質なペプチドを得ることができる。

【0137】

本発明には、薬学的組成物として、薬学的担体とともに抗体を投与することが含まれる。あるいは、抗体は、少なくとも1つの抗体鎖をコードするポリヌクレオチドを投与することによって、患者に投与することができる。ポリヌクレオチドは患者の中で発現させられて、抗体鎖が生じる。ポリヌクレオチドは、抗体の重鎖と軽鎖をコードすることができる。ポリヌクレオチドは患者の中で発現させられて、重鎖と軽鎖が生じる。例示的な実施形態においては、患者は、患者の血液中の投与された抗体のレベルについてモニターされる。

【0138】

このように、本発明は、神経病理学、そしていくつかの患者においては、アルツハイマー病に関係している認識障害を予防または緩和するための治療レジュメについての以前からの必要性を満たす。

【0139】

認識衰退の軽減および／または認識の改善

本発明により、A 関連疾患もしくは障害、またはアミロイド生成性の疾患もしくは障害（例えば、A D）を有しているか、あるいはそれらに罹患するリスクがある患者において、認識衰退を阻害もしくは軽減する、そして／また、認識を改善するための方法が提供される。この方法には、被験体に、R A G E 位特異的に結合し、R A G E 結合パートナーの結合を阻害する抗体の有効量を投与する工程が含まれる。

【0140】

これらの方法は、認識衰退を軽減する、そして／または認識の改善が得られるように本発明の抗体の有効用量を投与することを特徴とする。例えば、患者の認識障害（例えば、手続き学習、および／または記憶、欠損）の1つ以上の改善が得られる。認識障害は、記憶を明示することの障害であり得（「陳述」記憶または「作業」記憶としても知られている）、これは、自覚することができる特異的な情報を保存し、読み出し、したがって、言語によって表すことができる能力（例えば、特定の事実または事象を記憶する能力）として定義される。あるいは、認識障害は、手続き記憶（「潜在」記憶または「文脈」記憶としても知られている）の障害であり得る。これは、自覚することができない一般的な情報または知識を獲得する、維持する、および読み出す能力として定義され、これには、技能の習得、交際、習慣、または表現するための複雑な反射が必要であり、例えば、特定業務を遂行する方法を記憶する能力である。手続き記憶の障害に罹患している個体は、それらの能力が、正常に機能することができないほど多く損傷している。したがって、手続き記憶の障害を改善することにおいて有効である処置が非常に望まれてあり、有効である。

【0141】

処置に適している患者

本発明による処置に適している患者としては、A 関連疾患もしくは障害、またはアミロイド生成性疾患もしくは障害のリスクがあるが、兆候を示していない個体、ならびに、現在兆候を示している患者が挙げられる。アルツハイマー病の場合には、実質的に誰でも、十分に長く生きていればアルツハイマー病に罹患するリスクがある。したがって、本発明の方法は、目的の患者のリスクを評価する必要なく、一般的な集団に対して予防的に投与することができる。

【0142】

本発明の方法は、A D のリスクがある個体（例えば、A D についてのリスクファクターを示す個体）に特に有用である。A D についての主要なリスクファクターは、年齢の上昇である。集団が高齢になればなるほど、A D の頻度は高まり続ける。現在の推定値は、65歳を超える集団の10%まで、そして85歳を超える集団の50%までがA D を有していることを示している。

【0143】

まれではあるが、特定の個体は、若年で、A D を発症する遺伝的素因があると特定する

10

20

30

40

50

ことができる。ADの遺伝性の形態（「家族性AD」または「早期発症型AD」として知られている）を有している個体は、変異するとADを付与することが知られている遺伝子（例えば、APPまたはプレセニリン遺伝子）の分析の、十分詳しく記録されたADの家族歴から特定することができる。十分に特性決定されたAPP変異には、APP770のコドン716と717での「Hardy」変異（例えば、バリン.sup.717からイソロイシン（Goateら、（1991），Nature 349：704）；バリン.sup.717からグリシン（Chartierら、（1991）Nature 353：844；Murrellら、（1991），Science 254：97）；バリン.sup.717からフェニルアラニン（Mullanら、（1992）Nature Genet. 1：345-7））、APP770の、コドン670と671での「Swedish」変異、およびAPP770のコドン692での「Flemish」変異が含まれる。そのような変異は、APPのAへのプロセシングの増加または変更、特に、多量のAの長い形態（すなわち、A 1-42、およびA 1-43）を生じるAPPのプロセシングによってアルツハイマー病を引き起こすと考えられる。他の遺伝子（例えば、プレセニリン遺伝子、PS1およびPS2）における変異は、多量の長い形態のAを生じるようにAPPのプロセシングに間接的に影響を与えると考えられる（Hardy, TINS 20：154（1997）；Kowalskaら、（2004），Polish J. Pharmacol., 56：171-8を参照のこと）。ADに加えて、APPの770アミノ酸イソ型のアミノ酸692位または693位での変異は、オランダ型アミロイドーシスを伴う遺伝性大脳出血（HCHWA-D）と呼ばれる脳のアミロイド生成性障害に関係している。10
20

【0144】

より一般的には、ADは患者によって遺伝的に受け継がれることはないが、様々な遺伝的要因の複雑な相互作用が原因で発症する。これらの個体は、「散発性AD」（「後期発症型AD」としても知られている）を有するといわれる。この形態は、診断することがさらに難しい。それにもかかわらず、患者の集団は、ADを引き起こすことではないが、一般的な集団よりも高い頻度でADを分離することが知られている、罹患しやすい対立遺伝子または形質（例えば、アポリポタンパク質Eの2、3、および4対立遺伝子）の存在についてスクリーニングすることができる（Corderら、（1993），Science, 261：921-923）。特に、4対立遺伝子が欠失している患者は、ADについてのいくつかのマーカーと共に、むしろADの「リスクがある」と特定することができる。例えば、ADを有しているか、または高コレステロール血症もしくはアテローム性動脈硬化症に罹患している親族がいる、4対立遺伝子が欠失している患者は、ADの「リスクがある」と特定することができる。別の可能性のある生体マーカーは、脳脊髄液（CSF）A 24とtauレベルの評価の組み合わせである。低いA 24と高いtauレベルは、ADのリスクがある患者を特定することにおける予測値を有する。30

【0145】

ADのリスクがある患者についての他の指標には、インビボでの動的な神経病理学的データ（例えば、脳のアミロイドのインビボでの検出、脳の活性化のパターンなど）が含まれる。そのようなデータは、例えば、三次元核磁気共鳴画像法（MRI）、陽電子放出型断像撮影法（PET）スキャン、および単光子放射型コンピューター断層撮影法（SPECT）を使用して得ることができる。ADを有している可能性がある患者の指標としては、（1）認知症を有している患者、（2）40～90歳の年齢の患者、（3）認識障害（例えば、2つ以上の認識領域）、（4）6ヶ月より長い障害の進行、（5）無意識の平穏（consciousness undisturbed）、および／または（6）他の合理的な診断がないことが挙げられるが、これらに限定されない。40

【0146】

しかし、ADの散発性の形態または家族性の形態のいずれかに罹患している個体は、通常、ADの1つ以上の特徴的な兆候を示すことから診断される。ADの共通の兆候としては、日常の機能または作業の能力に影響を与える認識障害、言語に伴う問題、時間もしく50

は場所に対する見当識障害、判断力の不足または低下、抽象的思考の欠如、運動の制御が失われること、気分または行動の変容、人格変化、または自発性が失われるすることが挙げられる。患者が示す障害の数または認識障害の程度は、通常、疾患が進行した程度を反映する。例えば、患者は、穏やかな認識障害しか示さない場合があり、結果として、患者は、記憶（例えば、文脈の記憶）に問題を示すが、他の機能は十分に行うことができる場合がある。

【0147】

本発明の方法はまた、A 関連認識障害（例えば、A 関連認知症）を有している個体にも有用である。具体的には、本発明の方法は、中枢神経系（CNS）の中の（例えば、脳またはCSFの中の）可溶性オリゴマーA の存在によって引き起こされるか、または可溶性オリゴマーA の存在に起因すると考えられる認識障害あるいは異常を有している個体に特に有用である。A によって引き起こされるか、またはA が関係している認識障害にはまた、以下によって引き起こされるか、または以下が関係しているものも含まれる。すなわち、（1）脳の中での - アミロイド斑の発生、（2）異常なA 合成速度、プロセシング、分解、またはクリアランス、（3）（例えば、脳の中の）可溶性オリゴマーA 種の形成または活性、ならびに / あるいは、（4）異常な形態のA の形成である。実際の原因となる関連性が、特定の患者におけるA の異常性と認識障害との間で確立されることは必要ないが、関連性のいくらかは、例えば、A 免疫治療薬での処置によって利点があるとは予想されない、非A 関連認識障害に罹患している患者を区別するために、ADについての上記マーカーのうちの1つによって示されるべきである。

10

20

【0148】

ヒト被験体（例えば、認識障害（例えば、AD）の兆候または病状のリスクがあるか、その兆候または病状を有している被験体）において、認識技能または能力を評価するためのいくつかの試験が開発されている。認識障害は、これらの試験の能力の低下によって特定することができ、そしてこれらの試験において能力を改善するそれらの能力に基づいて、多くの処置が提案されている。解析方法のうちのいくつかは、被験体の行動または運動機能を評価するが、ほとんどの解析方法は、学習または記憶を試験するように設計されている。

【0149】

ヒトの認識は、以下の試験を含むがこれらに限定されない多種多様の試験を使用して評価することができる。ADAS-Cog (Alzheimer Disease Assessment Scale-Cognitive)は、11部の試験であり、完了するまでには30分を要する。ADAS-Cogは、言語学習と記憶能力についての好みの簡単な試験である。Rosenら、(1984) Am J Psychiatry. 141(11):1356-64; Ihlら、(2000) Neuropsychobiol. 41(2):102-7; およびWeyerら、(1997) Int Psychogeriatr. 9(2):123-38を参照のこと。

30

【0150】

Blessed Testは、日常生活および記憶、集中力および方向感覚の活性を評価する、認識力についての別の迅速な（約10分）試験である。Blessedら、(1968) Br J Psychiatry 114(512):797-811を参照のこと。

40

【0151】

Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB)は、神経変性疾患または脳の損傷を有しているヒトの認識障害の評価に使用される。これは、記憶、注意、および管理能力についての、コンピューターによる、相互に関係している13の試験から構成され、個人用コンピューターからのタッチセンサスクリーンによって行われる。試験は、言語であり、大部分はカルチャーフリー（culture free）であり、そしてアルツハイマー病の早期の検出および日常的なスクリーニングにおいて非常に感度が高いことが示されている。

50

Swainsonら、(2001) Dement Geriatr Cogn Disord. ; 12 : 265 - 280; およびFray and Robbins (1996) Neurotoxicol Teratol. 18 (4) 499 : 504. Robbinsら、(1994) Dementia 5 (5) : 266 - 81を参照のこと。

【0152】

Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) Clinical and Neuropsychological Testには、verbal fluency試験、Boston Naming Test、Mini Mental State Exam (MMSE)、10項目のword recall、構造の実習 (constructional praxis)、および実習項目を後で思い出すこと (delayed recall of praxis items) が含まれる。この試験には通常、20~30分を要し、これは、認識の低下を評価し、そして追跡することにおいて便利であり、有効である。Morrisら、(1988) Psychopharmacol Bull. 24 (4) : 641 - 52; Morrisら、(1989) Neurology 39 (9) : 1159 - 65; およびWelshら、(1991) Arch Neurol. 48 (3) : 278 - 81を参照のこと。

【0153】

Folsteinらによって1875年に開発されたMini Mental State Exam (MMSE)は、精神状態と認識機能の簡単な試験である。これは、他の精神的な表現形を測定することはできず、したがって、完全な精神状態の試験にとってかわることはできない。これは、認知症のスクリーニングに有用であり、そのスコアリングシステムは、長期にわたり進行を追跡することに役立つ。Mini-Mental State Examination MMSEは、年齢と教養について調整された基準とともに、広く使用される。これは、認識障害をスクリーニングするため、任意の時点での認識障害の重篤度を推定するため、経時的に個体の認識力の変化の経過を追跡するため、そして処置に対する個体の応答を記録するために使用することができる。被験体の認識力の評価には、9ヶ月以上に分けられた追跡試験を伴う、公式の神経心理学的試験が必要な場合がある(ヒトにおいて)。Folsteinら、(1975) J Psychiatr Res. 12 : 196 - 198; Cockrell and Folstein (1988) Psychopharm Bull. 24 (4) : 689 - 692; およびCrumbら、(1993) J. Am. Med. Association 286 : 2386 - 2391を参照のこと。

【0154】

Seven-Minute Screenは、アルツハイマー病について評価しなければならない患者の特定を助けるためのスクリーニングツールである。このスクリーニングツールは、様々なタイプの知的機能を評価するための一連の質問を使用する、ADの初期の兆候に非常に敏感なツールである。この試験は、方向感覚、記憶力、空間認識力、および言語表現力に焦点があてられている、4セットの質問から構成されている。これにより、通常の加齢のプロセスが原因である認識力の変化と、認知症が原因である認識障害とを区別することができる。Solomon and Pendlebury (1998) Fam Med. 30 (4) : 265 - 71, Solomonら、(1998) Arch Neurol. 55 (3) : 349 - 55を参照のこと。

【0155】

現在アルツハイマー病に罹患している個体は、特徴的な認知症、さらには、上記のリスクファクターの存在によって認識することができる。加えて、多数の診断試験を、ADを有している個体を特定するために利用することができる。これらには、CSF tauとAβ42レベルの測定が含まれる。高いtauレベルと低いAβ42レベルは、ADの存在を示す。アルツハイマー病に罹患している個体はまた、ADRDA基準によっても診断することができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 6 】**併用療法**

本発明の抗 R A G E 抗体は、被験体に同時に、またはいずれかの順序で連続して投与することができる、1つ以上のさらに別の薬剤と組み合わせて使用される場合がある。開示される併用療法によつては、相乗的な治療効果、すなわち、いずれかの薬剤の単独による効果を上回る効果が誘発される場合がある。測定することができる治療効果は、本明細書中で上記に記載されている。例えば、相乗的な治療効果は、1つの薬剤によつて誘発される治療効果よりも少なくとも約2倍大きい、または少なくとも約5倍大きい、または少なくとも約10倍大きい、または少なくとも約20倍大きい、または少なくとも約50倍大きい、または少なくとも約100倍大きい効果であり得る。

10

【 0 1 5 7 】

例えば、本発明には、R A G E に特異的に結合し、R A G E 結合パートナーの結合を阻害する抗体の治療有効量を、A に特異的に結合する別の抗体と組み合わせて投与する工程が含まれる。A に結合する抗体は、全長のアミロイド前駆体タンパク質 (A P P) には結合することなく A ペプチドに特異的に結合する抗体であり得る。あるいは、本発明の抗体は、可溶性 A に結合し、そして / またはこれを捕捉するか、あるいは、患者の中のアミロイド沈着に結合して、アミロイド沈着に対するクリアーアンス (c l e a r i n g response) を誘導する抗体と組み合わせて投与される場合もある。そのようなクリアーアンスは、F c 受容体によって媒介される食作用により影響を受け得る。そのようなクリアーアンスは、例えば、F c 受容体結合ドメイン (例えば、I g G 2 定常領域) を含めることによって、抗体の中に入れるように操作することができる。本発明の抗体はまた、A ワクチンが投与されたか、またはA ワクチンが投与されている患者に投与することもできる。脳の中にアミロイドの沈着が生じるアルツハイマー病およびダウン症の場合には、本発明の抗体はまた、本発明の薬剤の脳 - 血液関門を通過する移動を増大させる他の薬剤と組み合わせて投与することもできる。本発明の抗体はまた、標的細胞または組織 (例えば、リポソームなど) への治療薬の接近を促進する他の薬剤と組み合わせて投与することもできる。そのような薬剤の同時投与によつてはまた、所望される効果を得るために必要な治療薬 (例えば、治療用抗体または抗体鎖) の投与量を少なくすることができます。

20

【 0 1 5 8 】**治療経過のモニタリング**

本発明により、アルツハイマー病に罹患しているか、またはアルツハイマー病に罹患しやすい患者の処置をモニターする (例えば、患者に投与される処置の経過をモニターするための) 方法が提供される。この方法は、症候性の患者についての治療的処置、および無症候性の患者についての予防的処置の両方をモニターするために使用することができる。具体的には、これらの方法は、受動免疫をモニターする (例えば、投与された抗体のレベルを測定する) ために有用である。

30

【 0 1 5 9 】

いくつかの方法には、薬剤の投与量の投与前の、例えば、患者の抗体レベルまたはプロフィールのベースライン値を決定する工程と、これらを処置後のプロフィールまたはレベルについての値と比較する工程が含まれる。レベルまたはプロフィール値の有意な増大 (すなわち、そのような測定値の平均からの1標準偏差として表される、同じ試料の繰り返し測定における通常の大きさの実験誤差よりも大きい) は、ポジティブな処置結果 (すなわち、薬剤の投与によって所望される応答が得られたこと) を示す。免疫応答についての値が有意には変化しないかまたは低下する場合には、ネガティブな処置結果が示される。

40

【 0 1 6 0 】

他の方法においては、レベルまたはプロフィールの対照の値 (すなわち、平均と標準偏差) が、対照集団について決定される。通常、対照集団の個体には、前処置は投与されない。治療薬の投与後の、患者のレベルまたはプロフィールの測定値が、その後、対照の値と比較される。対照の値と比較した有意な増大 (例えば、平均から1標準偏差よりも大き

50

く上回る)は、ポジティブな、または十分な処置結果を示す。有意な増大または低下がないことは、ネガティブな、または不十分な処置結果を示す。薬剤の投与は、一般的には、レベルが対照値と比較して増大している間は続けられる。先と同様に、対照値と比較してプラトートに達したことは、処置の投与を中止できるか、または投与量およびノもしくは頻度を少なくできることの指標である。

【0161】

他の方法においては、レベルまたはプロフィールの対照値(例えば、平均と標準偏差)は、治療薬での処置を受けた、そのレベルまたはプロフィールが処置に応答してプラトートに達した個体の対照集団から決定される。患者におけるレベルまたはプロフィールの測定値は、対照値と比較される。患者において測定されたレベルが対照レベルと有意に(例えば、1標準偏差を上回る)は異なる場合には、処置は中止することができる。患者におけるレベルが対照値を有意に下回る場合には、薬剤の投与の継続が妥当である。患者におけるレベルが対照値を下回り続ける場合には、処置における変化は示されない場合がある。

10

【0162】

他の方法においては、現在処置を受けていないが、これまでに処置を受けていた患者が、処置の再開が必要であるかどうかを決定するために、抗体レベルまたはプロフィールについてモニターされる。患者において測定されたレベルまたはプロフィールは、以前の一連の処置の後に患者において以前に得られた値と比較することができる。以前の測定値と比較した有意な低下(すなわち、同じ試料の繰り返し測定における通常の誤差の大きさよりも大きい)は、処置が再開できることの指標である。あるいは、患者において測定された値は、一連の処置を受けた後の患者の集団において決定された対照値(平均+標準偏差)と比較することができる。あるいは、患者において測定された値は、疾患の兆候が残っていない予防的に処置された患者の集団、または疾患の特徴の緩和を示す治療的に処置された患者の集団の対照値と比較することができる。これらの全ての場合において、対照レベルと比較した有意な低下(すなわち、標準偏差を上回らない)は、患者において処置を再開することの指標である。

20

【0163】

分析される組織試料は、通常は、患者由来の血液、血漿、血清、粘膜液、または脳脊髄液である。試料は、例えば、RAGEペプチドに対する抗体のレベルまたはプロフィール(例えば、ヒト化抗体のレベルまたはプロフィール)について分析される。RAGEに特異的な抗体を検出するELISA方法は実施例に記載されている。いくつかの方法においては、投与された抗体のレベルまたはプロフィールが、クリアーアッセイを使用して、例えば、インビトロでの食作用アッセイにおいて、本明細書中に記載されるように決定される。このような方法においては、試験される患者に由来する組織試料は、アミロイドの沈着(例えば、PAPPマウスに由来する)、およびFc受容体を有している食作用細胞と接触させられる。続いて、アミロイドの沈着のクリアーアーが、その後モニターされる。クリアーアンサーの存在および程度により、試験を受けた患者の組織試料中のAをクリアーアーするために有効な抗体の存在とレベルの指標が提供される。

30

【0164】

受動免疫後の抗体プロフィールは、通常、すぐに抗体濃度のピークを示し、その後に指数関数的減衰が続く。さらに投与しなければ、減衰は、投与された抗体の半減期に応じて、数日間から数ヶ月の期間のうちに処置前のレベルに近づく。

40

【0165】

いくつかの方法においては、患者の中のRAGEに対する抗体のベースライン測定が投与前に行われ、2回目の測定は、ピーク抗体レベルを決定するためにその直後に行われる。そして、1回以上のさらなる測定が、抗体レベルの減衰をモニターするために間隔をあけて行われる。抗体のレベルがベースラインまたはベースラインよりも低いピークの予め決定された割合(例えば、50%、25%、または10%)にまで減衰すると、抗体のさらなる投与量の投与が行われる。いくつかの方法においては、ピーク、またはその後のバ

50

ックグラウンド未満である測定されたレベルは、他の患者に有用な予防的処置または治療的処置のレジュメを構成するために以前に決定された参照レベルと比較される。測定された抗体レベルが参照レベルを有意に下回る（下回るとは、例えば、処置による恩恵を受ける患者の集団における参考値の - 1 標準偏差を意味する）場合には、抗体のさらなる投与量の投与が指示される。

【 0 1 6 6 】

処置の経過と患者の状態をモニターするための測定可能な指標には、患者の脳の中の A のレベルのモニタリング（レベルの低下）、アミロイドシンク（amyloid sink）のモニタリング、および神経機能における A によって誘導される障害の緩和のモニタリングが含まれる。他の測定可能な指標としては、アルツハイマー病における脳アミロイド血管症（vascular congophilic amyloid angiopathy）（CAA）の病状の状態または変化のモニタリングが含まれ、そして患者のモニタリングには、A によって媒介される細胞内シグナル伝達と炎症の変化が含まれる。後者は、多種多様なシグナル伝達経路とのそのリガンドによる RAGE の調節（例えば、転写因子 NF - B の活性化）に関する情報を提供し、RAGE プロモーターを活性化させ、そして神経変性（neuroxic）応答は、活性化細胞シグナル伝達（MAP キナーゼカスケード（MAPKs）、ERK1 / 2、Akt、JNK、p38）によって媒介され、そして抗 RAGE Mab が、JNK、p38、NF B のリン酸化をプロックするであろう。有用な測定にはまた、RAGE によって強められる A によって誘導されるシグナル伝達およびシナプスの柔軟性をモニタリングすることも含まれ、そして、RAGE および LRP によって媒介される、血液 / 脳関門を通過する A のディファレンシャルな脳への流入 / 流出は、血液脳関門を通過する A のディファレンシャルな脳への流入 / 流出を媒介する可能性がある。したがって、本発明により、細胞内シグナル伝達を減少させる（例えば、MAPK カスケードを減少させる）ため、および A が関係している炎症を軽減するための方法が提供される。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 7 】

さらなる方法には、処置の経過全体を通じて、アミロイド生成性の疾患（例えば、アルツハイマー病）を診断またはモニターするために研究者または医師によって日常的に行われている、当該分野で認識されている任意の生理学的症状（例えば、身体症状または精神的症状）をモニタリングすることが含まれる。例えば、当業者は、認識障害をモニターすることができる。後者は、アルツハイマー病およびダウン症の兆候であるが、これらの疾患のいずれかの他の特徴は伴わずに起こる場合がある。例えば、認識障害は、処置の経過全体を通じて慣習にしたがって Mini - Mental State Exam で患者のスコアを決定することによってモニターすることができる。

【 0 1 6 8 】

薬学的調製物

本発明の目的のタンパク質または核酸は、適切な組成物の形態で投与されることが最も好ましい。必要に応じて、記載される全ての組成物であり得る組成物は、通常は、全身投与用の薬物または局所投与用の薬物に使用される。薬学的に許容される担体は、有効成分と一緒に作用しないように、実質的に不活性でなければならない。適切な不活性な担体としては、水、アルコール、ポリエチレンギリコール、ミネラルオイル、または petroleum ゲル、プロピレンギリコール、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、注射用静菌水（BWF I）、注射用滅菌水（SWFI）などが挙げられる。上記薬学的調製物（本発明の抗体または本発明の抗体をコードする核酸が含まれる）は、ヒトまたは家畜用の医薬品の中での使用のために、任意の従来の方法での投与のために処方することができる。

【 0 1 6 9 】

したがって、本発明の別の態様により、1つ以上の薬学的に許容される担体（添加剤）、および / または稀釀剤と一緒に処方された、有効量の抗体が含まれている薬学的に許容される組成物が提供される。以下に詳細に記載されるように、本発明の薬学的組成物は、固体の形態または液体の形態での投与のために特別に処方することができ、これには、以

下のために適応させられたものが含まれる。すなわち、(1)経口投与、例えば、ドレンチ(drenches)(水性もしくは非水性溶液または懸濁液)、錠剤、ポーラス、粉末剤、顆粒剤、舌への塗布のためのペースト；(2)非経口投与(例えば、滅菌溶液または懸濁液としての、皮下注射、筋肉内注射、または静脈内注射による)；(3)局所投与(例えば、皮膚に塗布されるクリーム剤、軟膏、または噴霧剤)；あるいは(4)腔内投与もしくは直腸内投与(例えば、ペッサリー、クリーム剤、または発泡剤として)である。しかし、特定の実施形態においては、本発明の薬剤は、単純に滅菌水の中に溶解させられる、または懸濁させられる場合もある。特定の実施形態においては、薬学的調製物は非発熱性であり、すなわち、患者の体温を上昇させることはない。非経口投与(具体的には、皮下注射および静脈内注射)が好ましい投与経路である。

10

【0170】

特定の実施形態においては、1つ以上の薬剤には、塩基性官能基(例えば、アミノまたはアルキルアミノ)が含まれ得、したがって、これは、薬学的に許容される酸とともに薬学的に許容される塩を形成することができる。これに関して、用語「薬学的に許容される塩」は、本発明の化合物の比較的毒性のない無機酸および有機酸付加塩をいう。これらの塩は、本発明の化合物の最終的な単離および精製の間にインサイチュで、または、その遊離の塩基の形態である本発明の精製された化合物を適切な有機酸もしくは無機酸と別々に反応させ、そしてそのように形成させられた塩を単離することによって、調製することができる。代表的な塩としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシリ酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩(naphthalate)、メシル酸塩、グルコヘプトネート、ラクトビオン酸塩、およびラウリルスルホン酸塩などが挙げられる。(例えば、Bergeら、(1977)「Pharmaceutical Salts」, J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照のこと)。

20

【0171】

薬剤の薬学的に許容される塩には、化合物の従来の非毒性の塩、または四級アンモニウム塩(例えば、非毒性の有機酸または無機酸に由来する)が含まれる。例えば、そのような従来の非毒性の塩には、無機酸(例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸など)から導かれたもの、および有機酸(例えば、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パルミチン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸(salicylic)、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シウ酸、イソチオノン酸(isothionic)など)から調製された塩が含まれる。

30

【0172】

他の場合には、1つ以上の薬剤には、1つ以上の酸性官能基が含まれ得、したがって、これらは、薬学的に許容される塩基とともに薬学的に許容される塩を形成することができる。同様に、これらの塩は、化合物の最終的な単離と精製の間にインサイチュで、または、その遊離の酸の形態である精製された化合物を適切な塩基と(例えば、薬学的に許容される金属陽イオンの水酸化物、炭酸塩、または重炭酸塩を、アンモニアと、または薬学的に許容される有機第1級、第2級、もしくは第3級アミンと)別々に反応させることによって、調製することができる。代表的なアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩としては、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、およびアルミニウム塩などが挙げられる。塩基付加塩の形成に有用な代表的な有機アミンとしては、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジンなどが挙げられる(例えば、Bergeら、前出を参照のこと)。

40

【0173】

湿潤剤、乳化剤、および潤滑剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム)、さらには着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤および香料

50

、保存剤および抗酸化剤もまた、組成物の中に存在させることができる。

【0174】

薬学的に許容される抗酸化剤の例としては以下が挙げられる。(1)水溶性抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸、塩酸システィン、重硫酸ナトリウム、メタ重硫酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど)、(2)油溶性抗酸化剤(例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、-トコフェロールなど)、および(3)金属キレート化剤(例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸など)。

【0175】

本発明の処方物には、経口投与、鼻腔投与、局所投与(口腔投与および舌下投与を含む)、直腸投与、膣投与、ならびに/または非経口投与に適している処方物が含まれる。処方物は、通常は、単位投薬形態で提示され得、そして製薬学の分野で周知の任意の方法によって調製することができる。担体材料とともに混合して1つの投薬形態とすることができる有効成分の量は、処置される宿主、特定の投与の態様などに応じて様々であろう。担体材料と混合して1つの投薬形態とすることができる有効成分の量は、一般的には、治療効果を生じる化合物の量であろう。一般的には、この量は、100パーセントのうちの約1パーセントから約99パーセントが有効成分であり、好ましくは、約5パーセントから約70パーセント、最も好ましくは、約10パーセントから約30パーセントの範囲であろう。

10

20

【0176】

これらの処方物または組成物を調製する方法には、薬剤を担体と、および状況に応じて1つ以上の副成分と会合させる工程が含まれる。一般的には、処方物は、本発明の薬剤を液体の担体、または時間とともに分解される(time ly divided)固体の担体、またはそれらの両方と均一に、そして親密に会合させること、そして必要であれば、生成物を成型することによって調製される。

【0177】

経口投与に適している本発明の処方物は、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、トローチ剤(風味のある基剤、通常は、スクロースとアカシアまたはトラガカントが使用される)、粉末剤、顆粒剤の形態である場合も、また、水性もしくは非水性の液体中の溶液もしくは懸濁液として存在する場合も、また、油中水もしくは水中油液体エマルジョンとして存在する場合も、また、エリキシル剤もしくはシロップ剤として存在する場合も、また、トローチ(pastilles)(不活性な基剤、例えば、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアが使用される)として存在する場合も、そして/また、歯磨き剤などとして存在する場合もある。これらにはそれぞれ、予め決定された量の本発明の化合物が有効成分として含まれる。本発明の化合物はまた、ボーラス、舐剤、またはペーストとして投与される場合もある。

30

【0178】

経口投与のための本発明の固体の投薬形態(カプセル剤、錠剤、丸剤、糖衣錠、粉末剤、顆粒剤など)においては、有効成分は、1つ以上の薬学的に許容される担体(例えば、クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム)、および/または以下のうちの任意のものと混合される。(1)溶加剤または增量剤(例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および/またはケイ酸)；(2)結合剤(例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、および/またはアカシア)；(3)保湿剤(例えば、グリセロール)；(4)崩壊剤(例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモデンプンまたはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウム)；(5)溶液緩染剤(例えば、パラフィン)；(6)吸収促進剤(例えば、四級アンモニウム化合物)；(7)湿潤剤(例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロール)；(8)吸収剤(例えば、カオリノンおよびベントナイトクレイ)；(9)潤滑剤(例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム)

40

50

ム、ステアリン酸マグネシウム、固体のポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびそれらの混合物) ; ならびに(10)着色剤。カプセル剤、錠剤、および丸剤の場合には、薬学的組成物にはまた、緩衝剤も含まれ得る。同様のタイプの固体の組成物はまた、ラクトースまたは乳糖、さらには、高分子量ポリエチレングリコールなどのような賦形剤を使用して、ソフトおよびハードゼラチンカプセルの中の溶加剤として使用される場合もある。

【0179】

錠剤は、状況に応じて1つ以上の副成分とともに、圧縮または成型によって作成され得る。圧縮された錠剤は、結合剤(例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース)、潤滑剤、不活性な稀釀剤、保存剤、崩壊剤(例えば、グリコール酸ナトリウムデンプン、架橋されたカルボキシメチルセルロースナトリウム)、界面活性剤または分散剤を使用して調製することができる。成型された錠剤は、適切な機械の中で、不活性な液体稀釀剤で湿らされた粉末状にされた化合物の混合物を成型することによって作成することができる。

10

【0180】

本発明の薬学的組成物の錠剤、または他の固体の投薬形態(例えば、糖衣錠、カプセル剤、丸剤、および顆粒剤)は、状況に応じて、コーティングおよび殻(例えば、腸溶コーティングおよび薬学的処方の分野で周知の他のコーティング)を用いてスコアすることができるかまたは調製することができる。これらはまた、例えば、所望される放出プロファイルを提供するための様々な割合でのヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマー・マトリックス、リポソーム、および/またはマイクロスフェアを使用して、その中の有効成分のゆっくりとした放出または徐放を提供するように処方される場合もある。これらはまた、例えば、細菌保持フィルターを通す濾過によって、または使用の直前に滅菌水もしくはいくつかの他の滅菌の注射可能な媒体の中に溶解させることができる滅菌の固体組成物の形態の中に滅菌剤を配合することによって、滅菌される場合もある。これらの組成物にはまた、状況に応じて、乳白剤が含まれる場合があり、そして、これは、有効成分(単数または複数)だけを放出するか、または消化管の特定の部分の中で優先的に、状況に応じて、遅延型の様式で有効成分(単数または複数)を放出する組成物であり得る。使用することができる埋め込み型の組成物の例としては、高分子物質およびワックスが挙げられる。有効成分はまた、適切である場合には、1つ以上の上記賦形剤とともに、マイクロカプセル化された形態でもあり得る。

20

【0181】

本発明の化合物の経口投与のための液体の投薬形態としては、薬学的に許容されるエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ剤、およびエリキシル剤が挙げられる。有効成分に加えて、液体の投薬形態には、当該分野で一般的に使用されている不活性な希釀剤(例えば、水、または他の溶媒)、可溶化剤および乳化剤(例えば、エチルアルコール、水、または他の溶媒)、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油(具体的には、菜種油、ラッカセイ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油)、グリセロール、テトラヒドロフルルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物が含まれる場合がある。

30

【0182】

不活性な稀釀剤に加えて、経口組成物にはまた、アジュバント、例えば、湿潤剤、乳化剤、および懸濁化剤、甘味剤、香味剤、着色料、香料、および保存剤も含めることができる。

40

【0183】

懸濁液には、有効成分に加えて、懸濁化剤(例えば、エトキシル化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール、およびソルビタンエステル、微結晶セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天、およびトラガカント、ならびにそれ

50

らの混合物)が含まれる場合がある。

【0184】

直腸投与または腔投与のための本発明の薬学的組成物の処方物は、坐剤として提示される場合がある、これは、本発明の1つ以上の化合物を、1つ以上の適切な刺激性のない賦形剤または担体(例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐剤用ワックス、またはサリチル酸塩)と混合することによって調製することができる。これは、室温では固体であるが、体温では液体であり、したがって、直腸または腔の体腔の中で融解して成分を放出するであろう。

【0185】

腔投与に適している本発明の処方物としては、また、適切であることが当該分野で公知であるそのような担体が含まれている、ペッサリー、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、発泡剤、または噴霧剤処方物も挙げられる。

10

【0186】

本発明の化合物の局所投与または経皮投与のための投薬形態としては、粉末剤、噴霧剤、軟膏、ペースト剤、クリーム剤、ローション、ゲル剤、溶液剤、パッチ、および吸入薬が挙げられる。活性のある化合物は、滅菌条件下で薬学的に許容される担体と、そして必要に応じて任意の保存剤、緩衝液、または推進剤と混合される場合がある。

【0187】

軟膏、ペースト剤、クリーム剤、およびゲル剤には、本発明の活性のある化合物に加えて、賦形剤(例えば、動物性脂肪および植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、タルク、および酸化亜鉛、またはそれらの混合物)が含まれる場合がある。

20

【0188】

粉末剤および噴霧剤には、本発明の化合物に加えて、賦形剤(例えば、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物)が含まれ得る。加えて、噴霧剤には、通例の推進剤(例えば、クロロフルオロヒドロカーボン、および揮発性の非置換炭化水素(例えば、ブタンおよびプロパン))が含まれ得る。

【0189】

経皮パッチは、体への本発明の化合物の制御された放出を提供するさらなる利点を有している。そのような投薬形態は、適切な媒体の中に薬剤を溶解させるかまたは分散させることによって作成することができる。吸収促進剤もまた、スライン(slain)を通過する薬剤の流入を増大させるために使用することができる。そのような流入速度は、速度制御膜を配置すること、またはポリマーマトリックスまたはゲルの中に化合物を分散させることのいずれかによって制御することができる。

30

【0190】

眼科用処方物、眼用軟膏、粉末剤、溶液剤などもまた、本発明の範囲に含まれるように意図される。

【0191】

非経口投与に適している本発明の薬学的組成物には、1つ以上の薬学的に許容される滅菌の等張性の水性もしくは非水性溶液、分散液、懸濁液、またはエマルジョン、あるいは、使用の直前に滅菌の注射可能な溶液もしくは分散液になるように再構成することができる滅菌の粉末(これには、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、処方物を意図されるレシピエントの血液と等張性にする溶質が含まれ得る)、あるいは、懸濁化剤または増粘剤と組み合わせて、本発明の1つ以上の化合物が含まれる。

40

【0192】

本発明の薬学的組成物において使用することができる適切な水性および非水性の担体の例としては、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの適切な混合物、植物性油(例えば、オリーブ油)、および注射可能な有機エステル(例えば、オレイン酸エチル)が挙げられ

50

る。適切な流動性は、例えば、コーティング材料（例えば、レシチン）の使用によって、分散液の場合には必要な粒子の大きさの維持によって、そして界面活性剤の使用によって維持することができる。

【0193】

これらの組成物にはまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤のようなアジュvantも含まれ得る。微生物の作用の阻止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸など）を含めることによって確保することができる。等張化剤（例えば、糖、塩化ナトリウムなど）を組成物の中に含めることもまた所望される場合がある。加えて、注射可能な薬学的形態の長時間にわたる吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような、吸収を遅らせる薬剤を含めることによってもたらされ得る。10

【0194】

いくつかの場合には、薬剤の効果を持続させるためには、皮下注射または筋肉内注射により薬剤の吸収を遅らせることが所望される。これは、水溶性が低い結晶性の物質または不定形の物質の液体懸濁液の使用によってもたらされ得る。この場合、薬剤の吸収速度は、その溶解速度に依存し、これは次いで、結晶の大きさおよび結晶形態にも依存し得る。あるいは、非経口投与された薬剤の吸収の遅延は、油性の媒体の中に薬剤を溶解または懸濁させることによってもたらされる。

【0195】

注射可能なデポー形態は、生体分解性ポリマー（例えば、ポリラクチド・ポリグリコリド）になるように目的の化合物のマイクロカプセル化マトリックスを形成させることによって作成される。ポリマーに対する薬剤の割合、および使用される特定のポリマーの性質に応じて、薬剤の放出速度を制御することができる。他の生体分解性ポリマーの例としては、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）が挙げられる。注射可能なデポー処方物はまた、体の組織と適合するリポソームまたはマイクロエマルジョンの中に薬剤を捕捉することによっても調製される。20

【0196】

本発明の化合物が、ヒトおよび動物に医薬品として投与される場合には、それら自体を投与することができ、また、これらは薬学的に許容される担体と組み合わせられた、例えば、0.1から99.5%（より好ましくは、0.5から90%）の有効成分が含まれている薬学的組成物として投与することもできる。30

【0197】

上記組成物とは異なり、適切な量の治療薬が含まれている、カバー（例えば、こう葉、包帯、包帯剤、ガーゼパッドなど）が使用される場合がある。上記に詳細に記載されたように、治療用組成物は、ステム（stem）、デバイス、補綴物、および移植物の上に投与する／送達される場合がある。

【0198】

分析される組織試料は、典型的には、患者由来の血液、血漿、血清、粘膜液、または脳脊髄液である。試料は、例えば、RAGEペプチドに対する抗体のレベルまたはプロフィール（例えば、ヒト化抗体のレベルまたはプロフィール）について分析される。RAGEに特異的な抗体を検出するELISA法は、実施例に記載される。40

【0199】

受動免疫後の抗体プロフィールは、通常、すぐに抗体濃度のピークを示し、その後に指數関数的減衰が続く。さらに投与しなければ、減衰は、投与された抗体の半減期に応じて、数日間から数ヶ月の期間のうちに処置前のレベルに近づく。

【0200】

いくつかの方法においては、患者の中のRAGEに対する抗体のベースライン測定が投与前に行われ、2回目の測定は、ピーク抗体レベルを決定するためにその直後に行われる。そして、1回以上のさらなる測定が、抗体レベルの減衰をモニターするために間隔をあけて行われる。抗体のレベルがベースラインまたはベースラインよりも低いピークの予め50

決定された割合（例えば、50%、25%、または10%）にまで減衰すると、抗体のさらなる投与量の投与が行われる。いくつかの方法においては、ピーク、またはその後のバックグラウンド未満である測定されたレベルは、他の患者に有用な予防的処置または治療的処置のレジュメを構成するために以前に決定された参考レベルと比較される。測定された抗体レベルが参考レベルを有意に下回る（下回るとは、例えば処置による恩恵を受ける患者の集団の参考値の-1標準偏差を意味する）場合には、抗体のさらなる投与量の投与が指示される。

【実施例】

【0201】

本発明は、ここに一般的に記載され、これは、以下の実施例を参照すればさらに容易に理解されるであろう。以下の実施例は、本発明の特定の態様および実施形態の説明のために含まれるにすぎず、本発明を限定することを意図するものではない。

【0202】

（実施例1）

RAGE構築物の調製

マウスRAGEのアミノ酸配列（mRAGE、Genbank登録番号NP_031451；配列番号3）およびヒトRAGEのアミノ酸配列（hRAGE、Genbank登録番号NP_00127.1；配列番号1）を図1A～1Cに示す。mRAGEをコードする全長のcDNA（登録番号NM_007425.1；配列番号4）とhRAGEをコードする全長のcDNA（登録番号NM_001136；配列番号2）を、Adori1-2発現ベクター（これには、cDNA配列の発現を駆動するサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターが含まれており、ウイルスの精製のためのアデノウイルスエレメントが含まれている）に挿入した。ヒトRAGEのアミノ酸1～344をヒトIgGのFcドメインに結合させることによって形成させたヒトRAGE-Fc融合タンパク質を、Adori発現ベクターを使用して、培養した細胞の中で融合タンパク質をコードするDNA構築物を発現させることによって調製した。ヒトIgGのFcドメインに対してヒトRAGEのアミノ酸1～118を結合させることによって形成させたヒトRAGE-V-領域-Fc融合タンパク質を、同様に調製した。ヒトまたはマウスのRAGEのアミノ酸1～344のそれぞれに対してストレプトアビジン（strept）タグ配列（WSHPQFEK）（配列番号5）を結合させることによって形成させた、ヒトRAGE-strepタグ融合タンパク質とマウスRAGE-strepタグ融合タンパク質を、これもまたAdori発現ベクターを使用して、RAGE-strepタグ融合タンパク質をコードするDNA構築物を発現させることによって調製した。全ての構築物を、大規模な制限消化分析によって、そしてプラスミドの中のcDNA挿入断片の配列分析によって確認した。

【0203】

全長RAGE、hRAGE-Fc、およびhRAGE-V-ドメイン-Fcを発現する組み換え体アデノウイルス（Ad5 E1a/E3が欠失している）を、ヒト胚性腎臓細胞293株（HEK293）（ATCC、Rockland MD）の中での相同組み換えによって作成した。組み換え体アデノウイルスを単離し、その後、HEK293細胞の中で増殖させた。ウイルスを、3サイクルの凍結解凍によって、感染させたHEK293細胞から放出させた。このウイルスを、2回の塩化セシウム濃度勾配遠心分離によってさらに精製し、pH7.2、4でリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）に対して透析した。透析後、グリセロールを10%の濃度になるように添加し、ウイルスを使用するまで-80で保存した。ウイルス構築物を、感染性（293細胞上でのplaques形成単位）、ウイルスのPCR分析、コード領域の配列分析、トランス遺伝子の発現、および内毒素の測定について特性決定した。

【0204】

ヒトRAGE-Fc、ヒトRAGE-V領域-Fc、ならびに、ヒトおよびマウスのRAGE-strepタグ融合タンパク質をコードするDNAが含まれているAdori発現ベクターを、チャイニーズハムスター卵巣（Chinese Hamster Ova

10

20

30

40

50

ry) (CHO) 細胞に、リポフェクチン (Invitrogen) を使用して安定にトランسفェクトした。安定なトランسفェクタントを、20 nM および 50 nM のメトトレキセートの中で選択した。馴化培地を個々のクローンから回収し、RAGE の発現を確認するためにドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロッティングを使用して分析した。(Kauffman, R. J., 1990, Methods in Enzymology, 185: 537-66; Kauffman, R. J., 1990, Methods in Enzymology, 185: 487-511; Pittman, D. D. ら、1993, Methods in Enzymology, 222: 236-237)。

【0205】

10

可溶性 RAGE 融合タンパク質を発現する CHO 細胞またはトランسفェクトされた HEK293 細胞を培養して、タンパク質精製のための馴化培地を回収した。タンパク質を、示したアフィニティータグ法を使用して精製した。精製したタンパク質について、還元性および非還元性 SDS-PAGE を行い、クマシーブルー (Coomassie Blue) 染色によって視覚化し (Current Protocols in Protein Sciences, Wiley Interscience)、そして予想した分子量であることを示した。

【0206】

20

(実施例 2)

マウス抗 RAGE モノクローナル抗体の作成

6~8 週齢の雌の BALB/c マウス (Charles River, Andover, MA) を、GeneGun デバイス (BioRad, Hercules, CA) を使用して皮下で免疫化した。全長のヒト RAGE をコードする cDNA が含まれている pAdori 発現ベクターを、コロイド状の金粒子 (BioRad, Hercules, CA) 上に予め吸着させ、その後、皮下投与した。マウスを、2 週間の間、1 週間に 2 回、3 µg のベクターで免疫化した。マウスを、最後の免疫化の 1 週間後に採血し、抗体力価を評価した。最も高い RAGE 抗体力価を有していたマウスには、10 µg の組み換えヒト RAGE-strep タンパク質のさらに 1 回の注射を、細胞融合の 3 日前に投与した。

【0207】

30

脾細胞を、マウス骨髄腫細胞 P3X63Ag8.653 (ATCC, Rockville, MD) と 4:1 の割合で、50% のポリエチレンギリコール (MW 1500) (Roche Diagnostics Corp, Mannheim, Germany) を使用して融合させた。融合の後、細胞を播種し、そして 96 ウエルプレートの中で、20% の FBS、5% の Origin (IGEN International Inc. Gaithersburg, MD)、2 mM の L-グルタミン、100 U/ml のペニシリン、100 µg/ml のストレプトマイシン、10 mM の HEPES、および 1×ヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジン (Sigma, St. Louis, MO) を含む RPMI 1640 選択培地の中で 1×10⁵ 細胞 / ウエルで培養した。

【0208】

40

(実施例 3)

ラット抗 RAGE モノクローナル抗体の作成

LOU ラット (Harlan, Harlan, MA) ラットを、GeneGun (BioRad, Hercules, CA) を使用して皮下で免疫化した。全長のマウス RAGE をコードする cDNA が含まれている pAdori 発現ベクターを、コロイド状の金粒子 (BioRad, Hercules, CA) 上に吸着させ、その後、皮下投与した。ラットを、2 週間おきに 1 回の 3 µg のベクターで 4 回免疫化した。ラットを、最後の免疫化の 1 週間後に採血し、抗体力価を評価した。最も高い RAGE 抗体力価を有していたラットには、10 µg の組み換え体マウス RAGE-strep タンパク質のさらに 1 回の注射を、細胞融合の 3 日前に投与した。

【0209】

50

脾細胞を、マウス骨髄腫細胞 P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 (ATCC , Rockville , MD) と 4 : 1 の割合で、50% のポリエチレングリコール (MW 1500) (Roche Diagnostics Corp , Mannheim , Germany) を使用して融合させた。融合の後、細胞を播種し、そして 96 ウェルプレートの中で、20% の FBS 、5% の Origene (IGEN International Inc. Gaithersburg , MD) 、2 mM の L - グルタミン、100 U / ml のペニシリン、100 µg / ml のストレプトマイシン、10 mM の HEPES 、および 1 × ヒポキサンチン - アミノブテリン - チミジン (Sigma , St. Louis , MO) を含む RPMI 1640 選択培地の中で 1 × 10⁵ 細胞 / ウェルで培養した。

【 0210 】

10

(実施例 4)

ハイブリドーマのスクリーニング

ラット抗マウス RAGE およびマウス抗ヒト RAGE mAb のパネルを、Gene Gun と、マウスまたはヒト RAGE の全長のコード領域を発現する Adori 発現プラスミドを使用して、cRNA 免疫化によって作成した。ハイブリドーマの上清を、RAGE を一時的に発現するヒト胚性腎臓細胞 (HEL - 293) 上での ELISA および FACS 分析によって、組み換え体ヒトまたはマウス RAGE - Fc に対する結合についてスクリーニングした。ポジティブな上清を、リガンド HMG B1 に対する RAGE の結合を中和するそれらの能力についてさらに試験した。7種類のラットモノクローナル抗体 (XT - M シリーズ) と 7 種類のマウスモノクローナル抗体 (XT - H シリーズ) を同定した。選択したハイブリドーマを、段階稀釀によって 4 回、そして FACS 選別によって 1 回サブクローニングした。馴化培地を安定なハイブリドーマ培養物から回収し、免疫グロブリンをプロテイン A 抗体精製カラム (Millipore Billerica , MA) を使用して精製した。個々の mAb の Ig クラスを、マウスマ Ab イソ型分類キット (isotyping kit) またはラット mAb イソ型分類キットを用いて、示されているとおりに (IsoStrip ; Boehringer Mannheim Corp.) 決定した。選択したラットおよびマウスのモノクローナル抗体のイソ型を表 1 (以下) に示す。

20

【 0211 】

30

【 表 1 】

表 1

ラットモノクローナル抗 m u RAGE 抗体			マウスマノクローナル抗 h u RAGE 抗体		
ハイブリドーマ クローニング	Mabs	Ig イソ型	ハイブリドーマ クローニング	Mabs	Ig イソ型
1mRAGEP3/1*	XT-M1	ラット IgG2a, k	1hRAGEP3/6*	XT-H1	マウス IgG1, k
1mRAGEP3/7	XT-M2	ラット IgG2b, k	1hRAGEP3/16*	XT-H2	マウス IgG1, k
1mRAGEP3/8	XT-M3	ラット IgG2a, k	1hRAGEP3/18	XT-H3	マウス IgG1, k
1mRAGEP3/10*	XT-M4	ラット IgG2b, k	1hRAGEP3/48	XT-H4	マウス IgG1, k
1mRAGEP3/15	XT-M5	ラット IgG2a, k	1hRAGEP3/55*	XT-H5	マウス IgG1, k
1mRAGEP3/16	XT-M6	ラット IgG2b, k	1hRAGEP3/65	XT-H6	マウス IgG1, k
1mRAGEP3/18*	XT-M7	ラット IgG2b, k	1hRAGEP3/66	XT-H7	マウス IgG1, k

40

(実施例 5)

FACS 分析

ヒト 293 細胞株を、ヒトおよびマウスの RAGE アデノウイルスに感染させた。感染させた細胞を、1% の BSA を含む PBS の中に、4 × 10⁴ 細胞 / ml の密度で懸濁した。細胞を、100 µl の試料 (希釀した免疫血清、ハイブリドーマ上清または精製した

50

抗体)とともに、4で30分間インキュベートした。洗浄後、細胞を、PEで標識したヤギ、抗マウス、IgG、F(ab')₂(DAKO Corporation Glostrup Denmark)とともに、暗所にて4で30分間インキュベートした。細胞に結合した蛍光シグナルを、FACScanフローサイトフルオロメーター(Beckton Dickinson)によって、1回の処理に5000個の細胞を使用して測定した。ヨウ化プロピジウムを使用して、死亡した細胞を同定し、これを分析から排除した。7種類のマウスモノクローナル抗体XT-H1からXT-H7と7種類のラットモノクローナル抗体XT-M1からXT-M7が、細胞表面hRAGEに結合することがFACS分析によって示された(表2)。

【0212】

10

(実施例6)

ELISA結合アッセイ

抗体を、標準的な手順を使用してハイブリドーマ上清から精製した。精製した抗体を、ELISAを使用してRAGEの可溶性形態への結合について評価した。96ウェルプレート(Corning, Corning, NY)を、100μlの組み換え体ヒトRAGE-Fcまたは組み換え体ヒトRAGE V-領域-Fc(1μg/ml)でコーティングし、そして4で一晩インキュベートした。洗浄と、1%のBSAおよび0.05%のTween-20を含むPBSでのブロッキングの後、100μlの試料(示したように、試料はいくつかの形態、すなわち稀釀した免疫血清、ハイブリドーマ上清、または精製した抗体であった)を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを、PBS(pH7.2)で洗浄し、結合した抗RAGE抗体を、ペルオキシダーゼ結合ヤギ、抗マウスIgG(H+L)(IgG)(Pierce, Rockford, IL)を使用して、続いて基質TMB(BioFX Laboratories Owings Mills, MD Laboratories)とともにインキュベーションすることによって検出した。吸光度を分光光度計において450nmで決定した。モノクローナル抗体の濃度を、ペルオキシダーゼ標識ヤギ、抗マウスIgG(Fc)(Pierce Rockford, IL)を使用して決定し、検量線を、精製したイソ型が適合するマウスIgGによって作成した。7種類のマウス抗体XT-H1からXT-H7、および7種類のラット抗体XT-M1からXT-M7の、hRAGE-Fc、hRAGE V-領域-Fc、mRAGE-Fc、およびmRAGE-strepに結合する能力についてのELISAの結果を、表2にまとめた。図2および3に示すように、ラット抗体XT-M4およびマウス抗体XT-H2はいずれも、ヒトRAGE-Fcにも、そしてhRAGEのVドメインにも結合する。ヒトRAGEに対するXT-M4の結合、およびヒトRAGE Vドメインに対するXT-M4の結合についてのEC50値は、それぞれ、300pMおよび100pMであった。XT-H2のヒトRAGEおよびヒトRAGE Vドメインに対する結合についてのEC50値は、それぞれ、90pMおよび100pMであった。

20

30

【0213】

【表2】

表2						
Mabs	FACS hRAGE-Fc	FACS mRAGE-Fc	ELISA hRAGE-Fc	ELISA mRAGE-Fc	ELISA mRAGE- strep	ELISA hRAGE- V-Fc (CM)
XT-H1	+	+	+++	-	+	-
XT-H2	+	-	+++	-	-	++
XT-H3	+	-	+++		-	
XT-H4	+	-	+++		-	
XT-H5	+	-	+++	-	-	++
XT-H6	+	-	+++	-	-	
XT-H7	+	-	+++	-	+/-	
XT-M1	-	+	-	+++	+++	+++
XT-M2	+	+	++	+	+	+
XT-M3	+	+	-			
XT-M4	+	+	++	+	+	+
XT-M5	-	+	-			
XT-M6	+	+	++	+	+	+
XT-M7	+	+	++	+++	+++	+++

(実施例7)

RAGEリガンドおよび抗体競合ELISA結合アッセイ

RAGEモノクローナル抗体が、RAGEに対するRAGEリガンド(HMGB1; Sigma、St. Louis, MO)の結合に影響を与えるかどうかを決定するために、競合ELISA結合アッセイを行った。96ウェルプレートを、1 μg/mlのHMGB1で、4で一晩コーティングした。ウェルを洗浄し、上記のようにブロックし、そしてRAGE-FcまたはTrkB-Fc(非特異的Fc対照)の100 μlのブレインキュベート混合物(0.1 μg/ml)と、様々な形態の示した抗体調製物(免疫血清の稀釀物、ハイブリドーマ上清、または精製した抗体)に対して、室温で1時間、曝した。プレートをPBS(pH 7.2)で洗浄し、リガンドが結合した組み換え体ヒトRAGE-Fcを、ペルオキシダーゼ結合ヤギ、抗ヒトIgG(Fc)(Pierce, Rockford, IL)を使用して、続いて基質TMB(BioFX Laboratories Owings Mills, MD)とともにインキュベーションすることによって検出した。いずれの抗体も伴わないか、または稀釀したブレ免疫血清を用いた、リガンドに対する組み換え体ヒトRAGE-Fcの結合を対照として使用し、100%の結合と定義した。競合ELISA結合アッセイによって決定した、7種類のマウス抗体XT-H1からXT-H7、および7種類のラット抗体XT-M1からXT-M7の、hRAGE-Fcに対するHMGB1の結合をブロックする能力を表3に示す。表3はまた、hRAGEの異なるリガンドであるアミロイド1-42ペプチドのRAGEに対する結合をブロックするマウス抗体XT-H1、XT-H2、およびXT-H5の能力、ならびに、同様の競合ELISA結合アッセイによって決定した、マウスRAGE-Fcに対するHMGB1の結合をブロックするラット抗体XT-M1からXT-M7の能力をまとめている。図4に示すように、ラット抗体XT-M4およびマウス抗体XT-H2はいずれも、ヒトRAGEに対するHMGB1の結合をブロックした。

10
20
30
40

Owings Mills, MD Laboratories Owings Mills, MDとともにインキュベーションすることによって検出した。いずれの抗体も伴わないか、または稀釀したブレ免疫血清を用いた、リガンドに対する組み換え体ヒトRAGE-Fcの結合を対照として使用し、100%の結合と定義した。競合ELISA結合アッセイによって決定した、7種類のマウス抗体XT-H1からXT-H7、および7種類のラット抗体XT-M1からXT-M7の、hRAGE-Fcに対するHMGB1の結合をブロックする能力を表3に示す。表3はまた、hRAGEの異なるリガンドであるアミロイド1-42ペプチドのRAGEに対する結合をブロックするマウス抗体XT-H1、XT-H2、およびXT-H5の能力、ならびに、同様の競合ELISA結合アッセイによって決定した、マウスRAGE-Fcに対するHMGB1の結合をブロックするラット抗体XT-M1からXT-M7の能力をまとめている。図4に示すように、ラット抗体XT-M4およびマウス抗体XT-H2はいずれも、ヒトRAGEに対するHMGB1の結合をブロックした。

【表3】

表3				
	RAGEリガンド競合ELISA結合 アッセイ		RAGEリガンド競合 ELISA結合アッセイ	
Mabs	hRAGE-Fc + HMGB1	hRAGE-Fc + Aβ 1-42 ペプチド	mRAGE-Fc +HMGB1	ELISA hRAGE- V-Fc (CM)
XT-H1	-	+		
XT-H2	+	+++		
XT-H3	-			
XT-H4	+/-			
XT-H5	+	+++		
XT-H6	-			
XT-H7	+/-			
XT-M1	-		-	-
XT-M2	+		+	XT-H3およびXT-H7競合
XT-M3	-		-	
XT-M4	++		+	XT-H2およびXT-H7競合
XT-M5	-		-	
XT-M6	+		+	-
XT-M7	+		+	-

同様の競合アプローチを使用して、抗体の対の間で関連する結合エピトープを決定した。最初に、1 μg / mlの組み換え体ヒトRAGE-Fcを、96ウェルプレート上に、4で一晩コーティングした。洗浄およびブロッキング（上記を参照のこと）の後、ウェルを、ビオチニル化標的抗体と競合抗体の稀釀物の100 μlのプレインキュベート混合物に対して、室温で1時間暴露した。結合したビオチニル化抗体を、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン（Pierce）を使用して検出した。同様の競合アプローチを使用して、抗体の対の間での関係している結合エピトープを決定した。最初に、1 μg / mlの組み換え体ヒトRAGE-Fcを、96ウェルプレート上に、4で一晩コーティングした。洗浄およびブロッキング（上記を参照のこと）の後、ウェルを、ビオチニル化標的抗体と競合抗体の稀釀物の100 μlのプレインキュベート混合物に対して、室温で1時間暴露した。結合したビオチニル化抗体を、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン（Pierce, Rockford, IL）の使用、続く基質TMB（BioFx Laboratories Owings Mills, MD Laboratories）とのインキュベーションによって検出した。いずれの競合抗体も伴わない、組み換え体ヒトRAGE-Fcに対するビオチニル化抗体の結合を対照として使用し、100%と定義した。hRAGEに対する結合についてのラット抗体とマウス抗体との間での競合を分析した競合ELISA結合アッセイの結果を表3に示す。図5は、hRAGEに対する結合についての、ラットXT-M4と抗体XT-H1、XT-H2、XT-H5、XT-M2、XT-M4、XT-M6、およびXT-M7との間での競合を分析した競合ELISA結合アッセイによるデータのグラフを示す。図5に示した競合ELISA結合データはXT-M4とXT-H2がヒトRAGE上の重複する部位に結合することを明らかに示している。

【0215】

(実施例8)

ヒトおよびマウスのRAGE-Fcに対するマウスとラットの抗RAGE抗体の結合についてのBIACORE（登録商標）結合アッセイ

A. ヒトRAGEおよびマウスRAGEに対する結合

10

20

30

40

50

選択したマウス抗RAGE抗体とラット抗RAGE抗体の、ヒトRAGEおよびマウスRAGE抗体に対する結合、ならびに、ヒトRAGEおよびマウスRAGEのVドメインに対する結合を、BIACORE（登録商標）直接結合アッセイによって分析した。アッセイは、標準的なアミンカップリングを使用して、高密度（2000RU）でCMチップ上にコーティングしたヒトRAGE-FcまたはマウスRAGE-Fcを使用して行った。2種類の濃度（50nMおよび100nM）の抗RAGE抗体の溶液を、2連で、固定したRAGE-Fcタンパク質上に流した。BIACORE（登録商標）技術は、固定したRAGE抗原に対して抗RAGE抗体が結合した場合の表面層の屈折率の変化を利用する。結合を、表面から屈折するレーザー光線の表面プラズモン共鳴（SPR）によって検出した。BIACORE（登録商標）直接結合アッセイの結果を表4にまとめる。

10

【0216】

【表4】

表4

ラット抗muRAGE抗体			マウス抗huRAGE抗体		
Mabs	huRAGE-Fc	muRAGE-Fc	Mabs	huRAGE-Fc	muRAGE-Fc
XT-M1		+++	XT-H1	+++	+/-
XT-M2	+	++	XT-H2	+++	-
XT-M3			XT-H3	+	+
XT-M4	+++	+++	XT-H4	+	+
XT-M5			XT-H5	++	-
XT-M6	++	+++	XT-H6	+++	-
XT-M7	++	+++	XT-H7	+++	-

ヒトおよびマウスのRAGEに対するマウスおよびラットの抗RAGE抗体の結合についての動的速度定数（ k_a および k_d ）と、結合定数および解離定数（ K_a および K_d ）を、BIACORE（登録商標）直接結合アッセイによって決定した。結合速度（on-rate）および解離速度（off-rate）についてのシグナルの動的データの分析により、非特異的相互作用と特異的相互作用を区別することができる。マウスXT-H2抗体とラットXT-M4抗体のhuRAGE-Fcに対する結合についてのBIACORE（登録商標）直接結合アッセイによって決定した動的速度定数および平衡定数を表5に示す。

20

【0217】

【表5】

表5

huRAGE-Fcに対する結合についての動的速度定数と平衡定数						
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_a (1/M)	K_d (M)	R_{Max}	χ^2
XT-H2	5.76×10^6	5.04×10^{-4}	1.14×10^{10}	8.76×10^{-11}	55.7	2.68
XT-M4	1.16×10^6	1.16×10^{-3}	1.00×10^9	9.95×10^{-10}	89.9	14.3

30

B. ヒトRAGE Vドメインに対する結合

ヒトRAGE Vドメインに対するマウスおよびラットの抗RAGE抗体の結合についての動的速度定数と、結合定数および解離定数もまた、BIACORE（登録商標）直接結合アッセイによって決定した。ヒトRAGE V-ドメイン-Fcを、CM5チップ上にコーティングした抗ヒトFc抗体によって捕捉し、そして固定したhuRAGE Vドメイン-Fcに対するマウスおよびラットの抗RAGE抗体の結合のBIACORE（登録商標）直接結合アッセイを、全長のRAGE-Fcに対する結合のアッセイについて上記

40

50

に記載したとおりに行った。

【0218】

(実施例9)

抗RAGE抗体可変領域のアミノ酸配列

マウス抗RAGE抗体XT-H1、XT-H2、XT-H3、XT-H5、およびXT-H7、ならびにラット抗RAGE抗体XT-M4の軽鎖および重鎖可変領域をコードするDNA配列をクローニングし、配列決定した。そして可変領域のアミノ酸配列を決定した。これらの6つの抗体のアライメントした重鎖可変領域アミノ酸配列を図6に示し、そしてアライメントした軽鎖可変領域のアミノ酸配列を図7に示す。

【0219】

10

(実施例10)

ウサギ、ヒビ、およびカニクイザルのRAGEをコードするcDNA配列の単離 RAGEをコードするcDNA配列を、標準的な逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法を使用して単離し、クローニングした。RNAを、Trizol(Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用して製造業者のプロトコールにしたがって、肺組織から抽出し、精製した。TaqMan Reverse Transcription Reagent(Roche Applied Science Indianapolis, IN)と製造業者のプロトコールを使用して、mRNAを逆転写させてcDNAを作成した。カニクイザル(Macaca fascicularis)とヒビ(Papio cynocephalus)のRAGE配列を、Invitrogen Taq DNAポリメラーゼ(Invitrogen, Carlsbad CA)とプロトコール、オリゴヌクレオチド(5'-GACCCCTGGAAAGGAAGCAGGATG(配列番号59)および5'-GGATCTGTCTGTGGGCCCTCAAAGGCC)(配列番号60)(これらはSpeIおよびEcoRV制限部位を付加する)を使用して、cDNAから増幅させた。PCR増幅産物を、SpeI/EcoRVで消化し、プラスミドpAdori1-3の中の対応する部位にクローニングした。ウサギRAGEを、オリゴヌクレオチド:5'-ACTAGACTAGTCGGACCATGGCAGCAGGGCAGCGGCCGGA(配列番号61)および5'-ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATTCAAGGGCTCTCCCTGTACCGCTCTC(配列番号62)(これらはSpeIとNotI部位を付加する)を使用して上記のようにRT-PCRを使用してクローニングし、pAdori1-3の中の対応する部位にクローニングした。得られたプラスミドの中のヒビ、サルのRAGE、およびウサギRAGEの2つの異性体をコードするクローニングしたcDNA配列のヌクレオチド配列を決定した。ヒビRAGEをコードするヌクレオチド配列を図8に示し(配列番号6)、そしてカニクイザルRAGEをコードするヌクレオチド配列を図9(配列番号8)に示す。ウサギRAGEの2つの異性体をコードするヌクレオチド配列は、図10(配列番号10)と図11(配列番号12)に示す。

20

30

30

【0220】

(実施例11)

40

ヒビRAGEをコードするゲノムDNA配列の単離

RAGEをコードするヒビのゲノムDNA配列を、標準的なゲノムクローニング技術を使用して単離した(例えば、Sambrook, J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照のこと)。DASH IIベクター中のヒビ(Papio cynocephalus)のゲノムライブラー(Stratagene, La Jolla, C)を、³²PランダムプライムヒトRAGE cDNAを使用してスクリーニングした。ポジティブなファージplaquesを単離し、单一の単離物を得るためにさらに2回のスクリーニングを行った。一般的な手順を使用して、DNAを調製し、NotIで消化し、そしてゲノムアームから挿入断片であるDNAを分離する

50

ために、サイズによって分画した。Not I 断片を、Not I で消化しておいたpBluescript SK+に連結させ、挿入断片を、RAGE特異的プライマーを使用して配列決定した。得られたクローンは、クローン18.2と指定した。ヒトRAGEをコードする、クローニングしたヒトのゲノムDNAのスクレオチド配列は、図12A~12Eに示す(配列番号15)。

【0221】

(実施例12)

キメラXT-M4抗体

キメラXT-M4を、ヒト 軽鎖定常領域およびIgG1重鎖定常領域に対して、それぞれ、ラット抗マウスRAGE抗体XT-M4の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を融合させることによって作成した。抗体のFcによって媒介されるエフェクター活性の可能性を低下させるために、キメラ変異L234AとG237Aを、ヒトIgG1 Fc領域のXT-M4に導入した。キメラ抗体には、分子番号XT-M4-A-1を与えた。キメラXT-M4抗体には、ヒトアミノ酸配列が93.83%、そしてラットのアミノ酸配列が6.18%含まれている。

10

【0222】

(実施例13)

RAGEに対するキメラXT-M4の結合の評価

キメラ抗体XT-M4と、選択したラットおよびマウスの抗RAGE抗体の、ヒトRAGEおよび他の種のRAGEに結合する能力、ならびに、RAGEリガンドの結合をプロックする能力を、ELISAおよびBIACORE(登録商標)結合アッセイによって測定した。

20

【0223】

A. BIACORE(登録商標)結合アッセイによって測定した可溶性のヒトRAGEに対する結合

キメラ抗体XT-M4、もとのラット抗体XT-M4、ならびに、マウス抗体XT-H2およびXT-H5の可溶性のヒトRAGE(hRAGE-SA)に対する結合を、BIACORE(登録商標)捕捉結合アッセイによって測定した。アッセイは、5000~7000RUのCM5 BIAチップ上に抗体をコーティングすることによって行った。精製した可溶性のヒトストレプトアビジンタグ化RAGE(hRAGE-SA)の、100nM、50nM、25nM、12.5nM, 6.25nM、3.12nM、1.56nM、および0nMの濃度の溶液を3連で固定した抗体の上に流し、hRAGE-SAに対する結合について動的速度定数(k_a および k_d)と、結合定数および解離定数(K_a および K_d)を決定した。結果を表6に示す。

30

【0224】

【表6】

表6

hRAGE-SAに対する結合についての動的速度定数と平衡定数

40

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_a (1/M)	K_d (M)	R_{Max}	χ^2
XT-M4	3.78×10^6	1.86×10^{-2}	2.03×10^8	4.92×10^{-9}	61.5	0.563
キメラ抗体 XT-M4	4.39×10^6	2.48×10^{-2}	1.77×10^8	5.66×10^{-9}	33.1	0.436
XT-H2	1.10×10^6	1.16×10^{-3}	9.48×10^8	1.06×10^{-9}	48.1	2.7
XT-H5	1.66×10^6	4.51×10^{-3}	3.69×10^8	2.71×10^{-9}	24.5	0.996

XT-M4抗体とキメラ抗体XT-M4は、同様の速度論で単量体の可溶性のヒトRAGE

50

G E に結合する。ヒトの可溶性の単量体 R A G E に対するキメラ X T - M 4 の親和性は、およそ 5 . 5 n M である。

【 0 2 2 5 】

B . R A G E リガンド競合 E L I S A 結合アッセイ

キメラ抗体 X T - M 4 抗体とラット抗体 X T - M 4 が、 h R A G E - F c に対する R A G E リガンド H M G B 1 、アミロイド 1 - 4 2 ペプチド、 S 1 0 0 - A 、および S 1 0 0 - B の結合をブロックする能力を、実施例 7 に記載したリガンド競合 E L I S A 結合アッセイによって決定した。図 1 3 に示すように、キメラ抗体 X T - M 4 と X T - M 4 は、ヒト R A G E に対する H M B G 1 、アミロイド 1 - 4 2 ペプチド、 S 1 0 0 - A 、および S 1 0 0 - B の結合をブロックするそれらの能力はほぼ同じであった。

10

【 0 2 2 6 】

C . 抗体競合 E L I S A 結合アッセイ

h R A G E - F c に対する結合においてラット抗体 X T - M 4 とマウス抗体 X T - H 2 と競合するキメラ抗体 X T - M 4 抗体の能力を、抗体競合 E L I S A 結合アッセイによって、ビオチン結合 X T - M 4 抗体と X T - H 2 抗体を使用して、実施例 7 に記載した様式で決定した。図 1 4 に示すように、キメラ抗体 X T - M 4 は、 h R A G E - F c に対する結合において、ラット抗体 X T - M 4 と、そしてマウス抗体 X T - H 2 と競合する。

【 0 2 2 7 】

(実施例 1 4)

様々な種の R A G E に対する抗体の結合を、細胞をベースとする E L I S A によって測定した

20

細胞のトランスフェクション

ヒト胚性腎臓 2 9 3 細胞 (American Tissue Type Culture , Manassan , VA) 細胞を、 1 0 c m² の組織培養プレートあたり 5 × 1 0⁶ 細胞でプレートし、 3 7 ℃ で一晩培養した。翌日、細胞を、 L F 2 0 0 0 試薬 (Invitrogen , Carlsbad CA) を使用して、製造業者のプロトコールを使用して 4 : 1 の試薬対プラスミド D N A 比で、 R A G E 発現プラスミド (マウス、ヒト、ヒビ、カニクイザル、またはウサギの R A G E をコードする p Adori 1 - 3 ベクター) でトランスフェクトした。細胞を、トリプシンを使用してトランスフェクションの 4 8 時間後に回収し、リン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) で 1 回洗浄し、その後、 2 × 1 0⁶ 細胞 / m l の濃度で、無血清増殖培地の中に懸濁させた。

30

【 0 2 2 8 】

細胞をベースとする E L I S A

1 μ g の一次抗体を、 9 6 ウエルプレートの中の 1 % のウシ血清アルブミン (B S A) を含む P B S の中に、 1 : 2 または 1 : 3 で段階稀釀した。無血清増殖培地の中の 2 × 1 0⁶ 細胞 / m l の R A G E でトランスフェクトした 2 9 3 細胞または対照であるもとの 2 9 3 細胞 (5 0 μ l) を、 1 × 1 0⁵ 細胞 / ウエルの最終濃度となるように U 底 9 6 ウエルプレートに添加した。細胞を、 1 6 0 0 r p m で 2 分間遠心分離した。上清を、手で一度だけ振り回すことによって、穏やかに廃棄し、プレートを、細胞ペレットを緩ませるためにゆっくりとたたいた。1 0 % のウシ胎児血清 (F C S) を含む冷却した P B S 中の稀釀した一次抗 R A G E 抗体またはイソ型適合対照抗体 (1 0 0 μ l) を細胞に添加し、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を、 1 0 0 μ l の稀釀した二次抗 I g G 抗体 H R P 結合体 (Pierce Biotechnology , Rockford , IL) で、氷上で 1 時間染色した。一次抗体とのインキュベーション、および二次抗体とのインキュベーションのそれぞれの工程のあと、細胞を、氷冷した P B S で 3 回洗浄した。1 0 0 μ l の基質 T M B 1 成分 (B I O F X , T M B W - 0 1 0 0 - 0 1) をプレートに添加し、室温で 5 ~ 3 0 分間インキュベートした。発色を、 1 0 0 μ l の 0 . 1 8 M の H₂ S O₄ の添加によって停止させた。細胞を遠心分離し、上清を新しいプレートに移し、 4 5 0 n m で読み取った (Soft MAX pro 4 . 0 , Molecular Devices Corporation , Sunnyvale , CA) 。

40

50

【0229】

細胞をベースとするELISAによって決定した、ヒトおよびヒビのRAGEに結合する抗体キメラXT-M4とXT-M4の能力を図14に示す。細胞をベースとするELISAによって決定した、293細胞によって発現された細胞表面のヒト、ヒビ、サル、マウス、またはウサギのRAGEに対するキメラ抗体XT-M4とXT-M4の結合についてのEC50値を表7に示す。

【0230】

【表7】

表7

細胞をベースとするELISAによって決定したRAGEに対する結合についてのEC50値

	キメラXT-M4	ラットXT-M4
293- マウス RAGE	~1.5 nM	~2.2 nM
293- ヒト RAGE	~0.8 nM	~0.84 nM
293- カニクイザル RAGE	~1.66 nM	~2.33 nM
293- ヒビ RAGE	~1.25 nM	~1.33 nM

10

(実施例15)

20

様々な種のRAGEに対する結合 - 免疫組織化学染色によって決定したキメラ抗体XT-M4、ラットXT-M4抗体と、マウス抗体XT-H1、XT-H2、およびXT-H5の、ヒト、カニクイザル、ヒビ、およびウサギの肺組織の中の内因性の細胞表面RAGEに結合する能力を、肺組織切片の免疫組織化学(IHC)染色によって決定した。

【0231】

30

安定にトランスフェクトしたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を、マウスおよびヒトの全長のRAGEタンパク質を発現するように操作した。マウスおよびヒトのRAGE cDNAを哺乳動物発現ベクターにクローニングし、直鎖状にし、そしてリポフェクチン法を使用してCHO細胞にトランスフェクトした(Kaufman, R. J., 1990, Methods in Enzymology 185: 537-66; Kaufman, R. J., 1990, Methods in Enzymology 185: 487-511; Pittman, D. D.ら、1993, Methods in Enzymology 222: 236)。細胞を、20nMのメトトレキセートの中でもさらに選択し、細胞抽出物を個々のクローニングから回収し、発現を確認するためにSDS-PAGEをデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とウェスタンブロッティングによって分析した。

【0232】

40

ヒビ、カニクイザル、ウサギから単離したRAGE肺組織、あるいはヒトRAGEを過剰発現するチャイニーズハムスター卵巣細胞、または対照のCHO細胞についての免疫組織化学を、標準的な技術を使用して行った。RAGE抗体とラットのIgG2bイソ型対照またはマウスのイソ型対照を、1~15mgで使用した。キメラXT-M4、XT-M4-hVH-V2.0-2m/hVL-V2.10、XT-M4-hVH-V2.0-2m/hVL-V2.11、XT-M4-hVH-V2.0-2m/hVL-V2.14をビオチニル化し、そしてSigma IgG1ビオチニル化対照抗体を、0.2、1、5、および10μg/mlで使用した。HRPおよびAlexa Fluor 594、Alexa Fluor 488、またはFITCと結合させた抗ビオチンでの検出の後、切片をまた、4'-6-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI)で染色した。

【0233】

図15は、キメラ抗体XT-M4が、カニクイザル、ウサギ、およびヒビの肺組織の中

50

の RAGE に結合することを示す。ポジティブな IHC - 染色パターンは、RAGE を生産する細胞をキメラ XT - M4 と接触させた試料の中で見ることができたが、RAGE または RAGE 結合抗体のいずれかが存在しない試料の中では見ることはできなかった。図 16 は、ラット抗体 XT - M4 が、正常なヒトの肺、および慢性閉塞性肺疾患 (COPD) のヒトの肺の中の RAGE に結合することを示している。肺組織切片の IHC 染色によって決定した、敗血症のヒヒの肺および正常なカニクイザルの肺の中の内因性の細胞表面 RAGE に対する、ラット XT - M4 抗体と、マウス抗体 XT - H1、XT - H2、および XT - H5 の結合を表 8 にまとめる。hRAGE をコードする DNA を発現する発現ベクターで安定にトランスフェクトされた CHO 細胞を、ポジティブ対照として使用する。

【0234】

10

【表 8】

表 8

ヒト以外の靈長類の肺の中の RAGE に対する結合 - IHC によってアッセイした

	ヒヒの肺（敗血症）				サルの肺（正常）			hRAGE CHO	CHO
μg/ml	1	5	10	15	5	10	15	1	1
XT-M4	+++	+++	++++	++++	+	++		+++	-
XT-H1	++++	++++	++++	++++	+++	+++		+++	-
XT-H2	-	-	+	++	-	-		+++	-
XT-H5	++++	++++	++++	++++	-	-		+++	-
mRA109 対照			-	-		-	-	-	-
rSFR 対照			-	-		-	-	-	-

(実施例 16)

30

マウス抗ヒト RAGE 抗体 XT - H2 をヒト化するための分子モデル化

マウス抗ヒト RAGE 抗体 XT - H2 VH ドメインの分子モデル化

マウス XT - H2 重鎖をモデル化するための抗体構造の鋳型を、Protein Data Bank (PDB) 配列データベースについての BLASTP 検索に基づいて選択した。マウス XT - H2 の分子モデルを、6つの鋳型構造 (1SY6 (抗CD3 抗体)、1MRF (抗 RNA 抗体)、および 1RIH (抗腫瘍抗体)) に基づいて、Insight II (Accelrys, San Diego) の Homology モジュールを使用して構築した。鋳型の構造的に保存されている領域 (SCR) を、それぞれの分子についての C 距離マトリックスに基づいて決定し、鋳型構造を、SCR の中の対応する原子の最小 RMS 偏差に基づいて重ね合わせた。標的タンパク質であるラット XT - H2 VH の配列を、重ね合わせた鋳型タンパク質の配列に対してアラインメントし、SCR の原子座標を、標的タンパク質の対応する残基に割り当てた。個々の SCR の中の標的と鋳型との間での配列類似性の程度に基づいて、様々な鋳型からの座標を、様々な SCR に使用した。SCR に含まれないループと可変領域についての座標は、Homology モジュールにおいて実行した Search Loop 法または Generate Loop 法によって作成した。

40

【0235】

簡単に説明すると、Search Loop 法は、隣接している SCR 残基の C 距離マトリックスを、同じ数の隣接している残基と、所定の長さの介在するペプチドセグメントを有しているタンパク質構造に由来する予め計算したマトリックスと比較することによ

50

って、2つのSCRの間の領域を模倣するタンパク質構造をスキャンする。Search Loop法による出力を、隣接するSCR残基において、最小RMS偏差と最大の配列同一性を有している適合を最初に見出すために評価した。その後、一致の可能性と標的ループの配列との間での配列類似性の評価を行った。新しい原子座標を生じるGenerate Loop法は、Search Loopによっては最適な一致を見出すことができなかった場合に使用した。アミノ酸側鎖の立体構造は、アミノ酸残基が鋳型と標的において同じである場合には、鋳型と同じに維持された。しかし、回転異性体の立体構造の検索を行い、そしてエネルギー的にもっとも好ましい立体構造を、鋳型と標的において同じではない残基について保持した。2つの隣接するSCRの間でのスプライシング点(spliice junction)を最適化するために、その座標を様々な鋳型、およびSCRとループの間のものから適応させ、HomologyモジュールのSplice Repair機能を使用した。Splice Repair分子機構のシミュレーションを、2つのSCRの間、またはSCRと可変領域の間の接点の最適な結合の長さと結合角に導くように設定した。最後に、モデルを、5 kcal/(mol)または500サイクルの最大偏差になるまでSteepest Descentsアルゴリズムを使用して、そして5 kcal/(mol)または2000サイクルの最大偏差になるまでGradientアルゴリズムを使用して、エネルギーを最小化させた。このモデルの質を、HomologyモジュールのProStat/Struct_Check_utilityを使用して評価した。

【0236】

ヒト抗RAGE XT-H2 HVドメインの分子モデル化

ヒト化(CDR移植)抗RAGE抗体XT-H2重鎖の分子モデルを、使用した鋳型が異なることを除きマウスXT-H2抗体重鎖のモデル化について記載したものと同じ手順にしたがって、Insight IIを用いて構築した。この場合に使用した構造鋳型は、1L7I(抗Erbb2抗体)、1FGV(抗CD18抗体)、1JPS(抗組織抗体)、および1N8Z(抗Her2抗体)であった。

【0237】

モデルの分析とフレームワーク逆変異の予想 - ヒト化

もとのマウス抗体モデルを、以下の特徴の1つ以上の類似性および相違に関して、CDRを移植したヒト化バージョンのモデルと比較した。すなわち、CDR-フレームワークの接触、CDRの立体構造に影響を与える可能性がある水素結合、およびフレームワーク1、フレームワーク2、フレームワーク3、フレームワーク4、そして3つのCDRのような様々な領域の中でのRMSの偏差である。

【0238】

以下の逆変異は、単独で、または組み合わせにおいて、CDRの移植による良好なヒト化に重要であると予想した。E46Y、R72A、N77S、N74K、R67K、K76S、A23K、F68A、R38K、A40R。

【0239】

(実施例17)

ラット抗RAGE抗体XT-M4をヒト化するための分子モデル化

ラット抗マウスRAGE抗体XT-M4 HVドメインの分子モデル化

ラットXT-M4重鎖のモデル化のための抗体構造の鋳型を、Protein Data Bank(PDB)配列データベースについてのBLAST検索に基づいて選択した。ラットXT-M4の分子モデルを、6つの鋳型構造(1QKZ(抗ペプチド抗体)、1IGT(抗イヌリンパ腫モノクローナル抗体)、8FAB(抗-p-アゾフェニルアルソナート抗体(anti-p-azophenyl arsonate antibody))、1MQK(抗チトクロームCオキシダーゼ抗体)、1HOD(抗アンジオゲニン抗体)、および1MHP(抗1抗体)に基づいて、Insight II(Accelrys, San Diego)のHomologyモジュールを使用して構築した。鋳型の構造的に保存されている領域(SCR)を、それぞれの分子についてのC距離マトリ

10

20

30

40

50

マトリックスに基づいて決定し、鋳型構造を、SCRの中の対応する原子の最小RMS偏差に基づいて重ね合わせた。標的タンパク質であるラットXT-M4 VHの配列を、重ね合わせた鋳型タンパク質の配列に対してアラインメントし、SCRの原子座標を、標的タンパク質の対応する残基に割り当てた。個々のSCRの中での標的鋳型間の配列類似性の程度に基づいて、様々な鋳型からの座標を、様々なSCRに使用した。SCRに含まれないループと可変領域についての座標は、Homologyモジュールにおいて実行したSearch LoopまたはGenerate Loop法によって作成した。

【0240】

簡単に説明すると、Search Loop法は、隣接しているSCR残基のC距離マトリックスを、同じ数の隣接している残基と、所定の長さの介在するペプチドセグメントを有しているタンパク質構造に由来する予め計算したマトリックスと比較することによって、2つのSCRの間の領域を模倣するタンパク質構造をスキャンする。Search Loop法による出力を、隣接するSCR残基において、最小RMS偏差と最大の配列同一性を有している適合を最初に見出すために評価した。その後、適合の可溶性と標的ループ配列との間での配列類似性の評価を行った。新しい原子座標を生じるGenerate Loop法は、Search Loopを、最適な一致を見出すことができなかった場合に使用した。アミノ酸側鎖の立体構造は、アミノ酸残基が鋳型と標的ににおいて同じである場合には、鋳型と同じに維持される。しかし、回転異性体の立体構造の検索を行い、そしてエネルギー的にもっとも好ましい立体構造を、鋳型と標的ににおいて同じではない残基について保持した。2つの隣接するSCRの間でのスプライシング点(spliice junction)を最適化するために、その座標を様々な鋳型、およびSCRとループの間のものから適応させ、HomologyモジュールのSplice Repair機能を使用した。Splice Repairの分子機構のシミュレーションを、2つのSCRの間、またはSCRと可変領域の間の接点の最適な結合の長さと結合角に導くように設定した。最後に、モデルを、5 kcal/molまたは500サイクルの最大偏差になるまでSteepest Descentsアルゴリズムを使用して、そして5 kcal/(mol)または2000サイクルの最大偏差になるまでGradientsアルゴリズムを使用して、エネルギーを最小化させた。このモデルの質を、HomologyモジュールのProStat/Struct_Check_utilityを使用して評価した。

10

20

30

40

【0241】

XT-M4 軽鎖可変ドメイン

XT-M4 軽鎖可変ドメインの構造モデルを、Modeler 8v2を用いて、鋳型として1K6Q(抗組織因子抗体)、1WTL、1D5B(抗体AZ-28)、および1B0G(抗p24抗体)を使用して作成した。それぞれの標的について、100個の最初のモデルのうち、分子の確立密度関数(probability density function)によって定義される制限違反が最も少ない1つのモデルを、さらなる最適化のために選択した。モデルの最適化のために、Steepest Descent、Conjugate Gradient、およびAdopted Basis Newton-Raphson法からなるエネルギー最小化カスケードを、0.01のRMS勾配が満たされるまで、Charmm 27 force field(Accelrys Software Inc.)とDiscovery Studio 1.6(Accelrys Software Inc.)において実行したGeneralized Born implicit solvationを使用して行った。エネルギーの最小化の際には、骨格原子の運動は、10のマスフォース(mass force)の高調波の拘束(harmonic constraint)を使用して抑制した。

【0242】

ヒト化抗RAGE XT-M4 VHドメインの分子モデル化

ヒト化(CDR移植)抗RAGE XT-M4 抗体重鎖の分子モデルを、使用した鋳型が異なることを除きラットXT-M4 抗体重鎖のモデル化について記載したものと同じ手

50

順にしたがって、Insight IIを用いて構築した。この場合に使用した構造鑄型は、1MHP（抗-1抗体）、1IGT（抗イヌリンパ腫モノクローナル抗体）、8FAB（抗-p-アゾフェニルアルソナート抗体）、1MQK（抗チトクロームCオキシダーゼ抗体）、および1HOD（抗アンジオゲニン抗体）であった。

【0243】

ヒト化XT-M4軽鎖可変ドメイン

ヒト化(CDR移植)抗RAGE XT M4抗体軽鎖の分子モデルを、使用した鑄型が異なることを除きラットXT M4抗体重鎖のモデル化について記載したものと同じ手順にしたがって、Modeler 8v2を使用して構築した。この場合に使用した構造鑄型は、鑄型としての1B6D、1FGV(抗CD18抗体)、1UJ3(抗組織因子抗体)、および1WTLであった。

10

【0244】

モデルの分析とフレームワーク逆変異の予想 - ヒト化

もとのラット抗体モデルを、以下の特徴の1つ以上の類似性および相違に関して、CDRを移植したヒト化バージョンのモデルと比較した。すなわち、CDR-フレームワークの接触、CDRの立体構造に影響を与える可能性がある水素結合、フレームワーク1、フレームワーク2、フレームワーク3、フレームワーク4、および3つのCDRのような様々な領域の中でのRMSの偏差、ならびに、計算した残基-残基相互作用のエネルギーである。同定した可能性のある逆変異(単数または複数)を、Insight IIまたはModeler 8v2のいずれかを使用して構築した別の回のモデルに、単独で、または組み合わせて組み込んだ。そして変異体のモデルを、コンピューターでの変異の妥当性を評価するために、もとのラット抗体モデルに対して比較した。

20

【0245】

以下の骨格の変異は、単独で、または組み合わせにおいて、CDRの移植による良好なヒト化に重要であると予想した。

【0246】

重鎖：L114M、T113V、およびA88S

軽鎖：K45R、L46R、L47M、D70I、G66R、T85D、Y87H、T69S、Y36F、F71Y。

30

【0247】

(実施例18)

マウスXT-H2抗体とラットXT-M4抗体のCDRでヒト化した可変領域

ヒト化重鎖可変領域を、表9に示したヒト生殖細胞系列フレームワーク配列上にマウスXT-H2抗体およびXT-M4抗体のCDRを移植し、そして選択した逆変異を導入することによって調製した。

【0248】

【表9】

表9

抗体	イソ型	ヒト生殖細胞系列	同一性
XT-H2_VH	mG1/K	DP-75 VH1; 1-46	77.50%
XT-M4_VH	rG2b/K	DP-54 VH3; 3-07	77.50%
XT-H2_VL	mG1/K	DPK-12 VK2; A2	80.00%
XT-M4_VL	rG2b/K	DPK-9 VK1; 02	64.50%

40

ヒト化マウスXT-H2重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ、図17(配列番号28~31)と図18(配列番号32~35)に示す。

【0249】

50

ヒト化ラット X T - M 4 重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ、図 1 9 (配列番号 3 6 ~ 3 8) と図 2 0 A ~ 2 0 B (配列番号 3 9 ~ 4 9) に示す。

【 0 2 5 0 】

フレームワーク配列が由来する生殖細胞系列の配列と、ヒト化可変領域の中の特異的な逆変異を、表 1 0 において特定した。

【 0 2 5 1 】

標準的な手順を使用して、ヒト化可変領域をコードする D N A 配列を、ヒト免疫グロブリン定常領域をコードする配列を含む発現ベクターにサブクローニングし、全長の軽鎖および重鎖をコードする D N A 配列を、 C O S 細胞の中で発現させた。重鎖可変領域をコードする D N A を、 p S M E D 2 h 1 g G 1 m _ (L 2 3 4 , L 2 3 7) c D N A ベクターにサブクローニングして、ヒト化 I g G 抗体重鎖を生産させた。軽鎖可変領域をコードする D N A を p S M E N 2 h ベクターにサブクローニングして、ヒト化 抗体軽鎖を生産させた。図 2 1 を参照のこと。

【 0 2 5 2 】

【 表 1 0 】

表 1 0

ヒト化 V ドメイン	生殖細胞系列	逆変異
XT-H2_hVH_V2.0	DP-75	A40R, E46Y, M48I, R71A, および T73K
XT-H2_hVH_V2.7	DP-75	
XT-H2_hVH_V4.0	DP-54 FW, VH 3, JH4	
XT-H2_hVH_V4.1	DP-54 FW, VH 3, JH4	
XT-H2_hVL_V2.0	DPK-12	I2V, M4L および P48S
XT-H2_hVL_V3.0	DPK-24	
XT-H2_hVL_V4.0	DPK-9 Vk1	
XT-H2_hVL_V4.1	DPK-9 Vk1, Jk 4	
XT-M4_hVH_V1.0	DP-54, VH3; 3-07	
XT-M4_hVH_V1.1	DP-54, VH3; 3-07	
XT-M4_hVH_V1.0	DP-54, VH3; 3-07	
XT-M4_hVL_V2.4	DPK-9 Vk1; 02	G66R
XT-M4_hVL_V2.5	DPK-9 Vk1; 02	D70I
XT-M4_hVL_V2.6	DPK-9 Vk1; 02	T69S
XT-M4_hVL_V2.7	DPK-9 Vk1; 02	L46R
XT-M4_hVL_V2.8	DPK-9 Vk1; 02	
XT-M4_hVL_V2.9	DPK-9 Vk1; 02	F71Y
XT-M4_hVL_V2.10	DPK-9 Vk1; 02	
XT-M4_hVL_V2.11	DPK-9 Vk1; 02	
XT-M4_hVL_V2.12	DPK-9 Vk1; 02	
XT-M4_hVL_V2.13	DPK-9 Vk1; 02	
XT-M4_hVL_V2.14	DPK-9 Vk1; 02	

10

20

30

40

(実施例 1 9)

競合 E L I S A プロトコール

ヒト化 X T - H 2 および X T - M 4 抗体とキメラ X T - M 4 の、ヒト R A G E - F c に対する結合を、競合酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) によって特性決定した。競合因子を生成するために、もとのラット X T - M 4 抗体をビオチニル化した。 E L I S A プレートを、 1 μ g / m l のヒト R A G E - F c で一晩コーティングした。様々な濃度のビオチニル化 X T - M 4 (0 . 1 1 ~ 2 5 0 n g / m l) を、ウェルに 2 連で添加し、これをインキュベートし、洗浄し、そしてストレプトアビシン - H R P で検出した。ビオチニル化したもとのラット X T - M 4 について計算した E D 5 0 は 5 n g / m l であった。

50

キメラおよびそれぞれのヒト化 X T - M 4 抗体の I C 5 0 を、 1 2 . 5 n g / m l のビオチニル化したものとの X T - M 4 抗体と競合させた場合に計算した。簡単に説明すると、プレートを、 1 μ g / m l のヒト R A G E - F c で一晩コーティングした。 1 2 . 5 n g / m l のビオチニル化したものとのラット X T - M 4 と混合した様々な濃度のキメラ抗体またはヒト化抗体を、ウェルに 2 連で添加した (9 n g / m l から 2 0 n g / m l の範囲) 。ビオチニル化したものとのラット X T - M 4 抗体を、ストレプトアビシン - H R P で検出し、 I C 5 0 値を計算した。競合 E L I S A 分析によってヒト化抗体について決定した I C 5 0 値を表 1 1 に示す。

【 0 2 5 3 】

【 表 1 1 】

10

表 1 1

ヒト化 X T - M 4 抗体についての I C 5 0 値

重鎖	軽鎖	ラット X T - M 4 を用いた場合の競合 E L I S A における I C 5 0 、 ug/ml
hVH-V1.0	hVL-V1.0	1.5 - 2.5
hVH-V1.0	hVL-V2.0	7.5 - >8.6
hVH-V1.0	hVL-V2.1	1.5 - 2
hVH-V1.0	hVL-V2.2	1.5 - 2
hVH-V1.0	hVL-V2.3	4.5 - 8
hVH-V1.0	hVL-V2.4	4.5 - 8.5
hVH-V1.0	hVL-V2.5	6.5 - >20
hVH-V1.0	hVL-V2.6	>10.9
hVH-V1.0	hVL-V2.7	4 - 9.5
hVH-V1.0	hVL-V2.8	>17
hVH-V1.0	hVL-V2.9	>6.8
hVH-V2.0	hVL-V1.0	>9.5
hVH-V2.0	hVL-V2.0	10.4
hVH-V2.0	hVL-V2.1	1.1
hVH-V2.0	hVL-V2.2	>1.8
hVH-V2.0	hVL-V2.3	3.3
hVH-V2.0	hVL-V2.4	2.9
hVH-V2.0	hVL-V2.7	8.5
hVH-V2.0	hVL-V2.10	0.95
hVH-V2.0	hVL-V2.11	0.15 - 1.05
hVH-V2.0	hVL-V2.12	2.7
hVH-V2.0	hVL-V2.13	1.5
hVH-V2.0	hVL-V2.14	0.2
hVH-V2.0	hVL-V2.10	0.3 - 0.4
hVH-V2.0	hVL-V2.11	0.1 - 0.45
hVH-V2.0	hVL-V2.14	0.2

20

30

ヒト化 X T - H 2 抗体のヒト R A G E - F c に対する結合についての E C 5 0 値を競合 E L I S A によって同様に決定し、図 2 2 に示した。

40

(実施例 2 0)

他の細胞表面受容体に対するキメラおよびヒト化 X T - M 4 抗体の交差反応性

ヒト化 X T - M 4 抗体である X T - M 4 - h V H - V 2 . 0 - 2 m / h V L - V 2 . 1 0 と X T - M 4 - h V H - V 2 . 0 - 2 m / h V L - V 2 . 1 1 を、他の R A G E 様受容体との交差反応性についてキメラ X T - M 4 とともに試験した。これらの受容体は、これらが R A G E と同様に細胞表面で発現され、そしてリガンドとのそれらの相互作用が同様

50

に電荷に依存するとの理由から選択した。試験した受容体は、r h V C A M - 1、r h I C A M - 1 - F c、r h T L R 4 (C 末端 H i s タグ)、r h N C A M - 1、r h B 7 - H 1 - F c m L o x 1 - F c、h L o x 1 - F c、および h R A G E - F c (ポジティブ対照として) であった。E L I S A プレートを、 $1 \mu g / ml$ の列挙した受容体タンパク質で一晩コーティングした。様々な濃度 (0 . 0 3 から $2 0 \mu g / ml$) の上記に列挙したヒト化およびキメラ X T - M 4 抗体を、ウェルに 2 連で添加し、インキュベートし、洗浄し、そして抗ヒト I g G H R P で検出した。表 1 2 は、ヒトおよびマウスの細胞表面タンパク質に対する、キメラおよびヒト化 X T - M 4 抗体の結合の直接結合 E L I S A 分析の結果を示す。データは、受容体と $2 0 \mu g / ml$ (試験した最も高い濃度) の抗体との間で検出した結合についての O D 4 5 0 値を示す。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 4 】

【 表 1 2 】

表 1 2

	XT-M4-hVH-2.0-2m/ hVL-V2.10	XT-M4-hVH-V2.0-2m/ hVL-V2.11	キメラ XT-M4
r h V C A M - 1	0.010	0.012	0.004
r h I C A M - 1 - F c	0.007	0.004	0.004
r h T L R 4	0.001	0.003	0.000
r h N C A M - 1	0.004	0.011	0.006
r h B 7 - H 1 - F c	0.010	0.009	0.003
m L o x 1 - F c	0.016	0.010	0.010
h L o x 1 - F c	0.007	0.022	0.017
h R A G E - F c	3.808	3.832	3.797

(実施例 2 1)

可溶性ヒト R A G E に対する結合についての B I A C O R E (登録商標) 結合アッセイキメラ抗体 X T - M 4 とヒト化 X T - M 4 抗体の、可溶性のヒト R A G E (h R A G E - S A) および可溶性のマウス R A G E (m R A G E - S A) に対する結合を、B I A C O R E (登録商標) 捕捉結合アッセイによって測定した。アッセイを、フローセル 1 ~ 4 の中で 5 0 0 0 R U の C M 5 B I A チップ (p H 5 . 0 、 7 分) 上に抗ヒト F c 抗体をコーティングすることによって行った。個々の抗体を、フローセル 2 ~ 4 の中で抗 F c 抗体上に $2 . 0 \mu g / ml$ で流すことによって捕捉した (フローセル 1 を参照として使用した) 。 1 0 0 n M 、 5 0 n M 、 2 5 n M 、 1 2 . 5 n M 、 6 . 2 5 n M 、 3 . 1 2 5 n M 、 1 . 2 5 n M 、および 0 n M の濃度の精製した可溶性のヒトストレプトアビジンタグ化 R A G E (h R A G E - S A) の溶液を、2 連で固定化した抗体上に流し、5 分間解離させ、そして h R A G E - S A に対する結合についての動的速度定数 (k_a および k_d) と結合定数および解離定数 (K_a および K_d) を決定した。 h R A G E - S A および m R A G E - S A に対する結合についての、キメラ X T - M 4 およびヒト化抗体 X T - M 4 - V 1 0 、 X T - M 4 - V 1 1 、および X T - M 4 - V 1 4 の結合結果を、それぞれ、図 2 3 および 2 4 に示す。

【 0 2 5 5 】

(実施例 2 2)

リード抗体 X T - H 2 の種間交差反応性の最適化

種間交差反応性を、X T - H 2 抗体をランダムに変異させ、タンパク質変異体のライブライマーを作成し、そしてマウス - ヒト R A G E 交差反応性を生じる変異を獲得したこれらの分子を選択的に富化させるプロセスによって操作した。リボソームディスプレイ技術 (H a n e s ら、 2 0 0 0 , M e t h o d s E n z y m o l . , 3 2 8 : 4 0 4 - 3 0) とファージディスプレイ技術 (M c A f f e r t y ら、 1 9 8 9 , N a t u r e , 3 4 8 : 5 5 2 - 4) 技術を使用した。

【0256】

抗体 X T - H 2 および H T - M 4 をベースとする S c F v 抗体の調製

A . X T - H 2 をベースとする S c F v 抗体

X T - H 2 の V 領域を含む 2 つの S c F v 構築物を、可撓性リンカー D G G G S G G G G S G G G G S S (配列番号 5 0) によって連結した V H / V L 形式または V L / V H 形式のいずれかで合成した。 V L - V H および V H - V L として立体配置した S c F v 構築物の配列を、それぞれ図 2 5 (配列番号 5 1) と図 2 6 (配列番号 5 2) に示す。

【0257】

B . X T - M 4 をベースとする S c F v 抗体

X T - M 4 の V 領域を含む 2 つの S c F v 構築物を、可撓性リンカー D G G G S G G G G S G G G G S S (配列番号 5 0) によって連結した V H / V L 形式または V L / V H 形式のいずれかで合成した。 V L - V H および V H - V L として立体配置した S c F v 構築物の配列を、それぞれ図 2 7 (配列番号 5 4) と図 2 8 (配列番号 5 3) に示す。

10

【0258】

図 2 9 は、インビトロで転写され、翻訳された M 4 および H 2 構築物についての E L I S A データを示す。 E L I S A プレートを、重炭酸緩衝液中のヒト R A G E - F c (5 μ g / m l) または B S A (2 0 0 μ g / m l) で、 4 度で一晩コーティングし、 P B S + Tween (0 . 0 5 %) で洗浄し、そして 2 % の粉乳 P B S で、室温で 1 時間、プロックした。プレートを、インビトロで翻訳された S c F v とともに、室温で 2 時間インキュベートした。プレートをプロックし、抗 F 1 a g 抗体 (1 / 1 0 0 0 希釈) 、その後にウサギ抗マウス H R P (1 / 1 0 0 0 希釈) で検出した。データは、 V L / V H または V H / V L のいずれの立体配置においても、 X T - H 2 および X T - M 4 抗 R A G E 抗体の可変領域の S c F v 構築物が、ヒト R A G E に特異的に結合する機能性の折り畳まれたタンパク質を生産することができる事を示している。 B I A C O R E (登録商標) によって決定した場合には、いずれの形式においても、 S c F v の K d の値を使用して、選択実験に最適な抗原濃度を決定した。

20

【0259】

C . 改善されたマウス / ヒト R A G E 交差反応性を有している変異体を回収するための選択およびスクリーニングストラテジー

変異体のライプラリーを、変異性 P C R (e r r o r - p r o n e P C R) によって作成した (G r a m ら、 1 9 9 2 、 P N A S 8 9 : 3 5 7 6 - 8 0) 。この突然変異誘発ストラテジーによって、 S c F v 遺伝子の長さ全体にわたってランダムな変異を導入した。その後、このライプラリーを、確立されている手順を使用して転写させ、翻訳させた (例えは、 H a n e s ら、 2 0 0 0 , M e t h o d s E e z y m o l . , 3 2 8 : 4 0 4 - 3 0) 。このライプラリーについて、ヒト R A G E - F c についての 1 回目の選択を行い、そして結合していないリボゾーム複合体を洗い流し、そして抗原が結合したリボゾーム複合体を溶出させた。 R N A を回収し、 R T - P C R によって c D N A に変換させ、そしてマウス R A G E - F c についての 2 回目の選択を行った。この別の選択ストラテジーによって、ヒト R A G E - F c とマウス R A G E - F c の両方に結合するクローンを優先的に富化させた。この選択による出力について、その後、 2 回目の変異性 P C R を行った。作成したライプラリーについては、その後、ヒト R A G E - F c とマウス R A G E - F c についてそれぞれ 3 回目の選択を行った。このプロセスを必要に応じて繰り返した。それぞれの選択工程による R N A の出力プールを c D N A に変換し、そしてタンパク質発現ベクター p W R I L - 1 にクローニングして、変異体 S c F v の種間交差反応性を評価した。多様性のプールもまた配列決定して、選択が種間交差反応性を有している優性クローンに向かって動いているかどうかを決定するために多様性を評価した。

30

40

【0260】

(実施例 2 3)

リード抗体 X T - M 4 の親和性成熟

改善された親和性は投与回数もしくは投与頻度の減少、および / または高い効力という

50

可能性のある利点になって現れる。h R A G E に対する親和性を、無作為な変異性 P C R 突然変異誘発と組み合わせた V H - C D R 3 に対する標的化された突然変異誘発の組み合わせプロセスを使用して、親和性成熟によって改善した (G r a m ら、1992, P N A S 89 : 3576 - 80)。これによって抗体変異体のライブラリーを作成し、そこから、マウス R A G E - F c についての種間交差反応性を維持したままヒト R A G E に対する親和性が改善された分子を回収した。リボソームディスプレイ技術 (H a n e s ら、1997, 前出) とファージディスプレイ技術 (M c A f f e r t y ら、1989, 前出) 技術を使用した。

【0261】

図30は、大腸菌 (*E s c h e r i c h i a c o l i*) の中で可溶性タンパク質として発現させ、そしてヒト R A G E - F c と B S A に対する結合について試験した、V L - V H 形式の p W R I L - 1 の中の X T - M 4 および X T - H 2 S c F v 構築物についての E L I S A 結合データを示す。A c t R I I b は、ネガティブ対照として同じベクターから発現させた非結合タンパク質を示す。E L I S A プレートを、重炭酸緩衝液中のヒト R A G E - F c (5 μg / ml) または B S A (200 μg / ml) で、4 で一晩コードィングし、P B S + T w e e n (0.05%) で洗浄し、そして 2% の粉乳 P B S で、室温で 1 時間、ブロックした。200 ml の大腸菌培養物のペリプラズムの調製を、標準的な手順を使用して行った。精製していない S c F v 抗体のペリプラズム調製物の最終容量は 1 ml であり、そのうちの 50 μl を、2% の粉乳 P B S を含む 100 μl の全量の中で、室温で 1 時間、1 / 1000 稀釀の抗 H i s 抗体とともにインキュベートした。架橋したペリプラズム調製物を E L I S A プレートに添加し、室温でさらに 2 時間インキュベートした。プレートを、P B S + 0.05% の t w e e n で 2 回、P B S で 2 回洗浄し、そして 2% の粉乳 P B S の中の 1 / 1000 稀釀のウサギ抗マウス H R P とともにインキュベートした。プレートを先と同様に洗浄し、結合を、標準的な T M B 試薬を使用して検出した。データは、V L / V H 立体構造の X T - M 4 および X T - H 2 抗体の S c F v 構造が、大腸菌 (*E . c o l i*) の中で、ヒト R A G E に特異的に結合する、機能性的折り畳まれた可溶性タンパク質を生産することができることを示している。両方の形式において、B I A C O R E (登録商標) によって決定した S c F v の出発時点の K d 値を使用して、親和性選択に最適な抗原濃度を決定した。

【0262】

(実施例 24)

種間交差反応性を維持したまま h R A G E - F c に対する親和性が改善された変異体を回収するための選択とスクリーニングストラテジー

変異体のライブラリーを、P C R を使用した X T - M 4 の V H - C D R 3 のスパイク突然変異によって作成した。図31は、P C R を使用して X T - M 4 の C D R にスパイク変異を導入する方法を模式的に示す。(1) C D R ループの長さ全体にわたって多様性の領域を有しており、F R 3 と F R 4 の中の標的 V 遺伝子の中に相同性の領域によってひととめにされた、スパイクされたオリゴヌクレオチドを設計した。(2) オリゴヌクレオチドを、標的 V 遺伝子の 5' 末端にアニーリングし、F R 1 領域と相同である特異的プライマーを用いた P C R 反応において使用した。図32は、X T - M 4 V L - V H S c F v 構築物の C 末端のヌクレオチド配列 (配列番号 56) を示す。V H - C D R 3 に下線を付けた。また、その部位での変異のために使用したスパイク比を示す、個々の変異部位での数字とともに、2つのスパイクオリゴヌクレオチド (配列番号 57 ~ 58) を示す。数字に対応するスパイク比のヌクレオチド組成もまた特定した。

【0263】

X T - M 4 - V H C D R 3 でスパイクした P C R 産物を、ライブラリーを作成するための S f i 1 断片として、リボソームディスプレイベクター p W R I L - 3 にクローニングした。このライブラリーを、リボソームディスプレイ (H a n e s a n d P l u c k t h u n . , 2000) を使用してヒトビオチニル化 R A G E について選択した。ビオチン標識した抗原を使用した。なぜなら、これにより、プロセス全体のさらなる速度制御が

10

20

30

40

50

可能であり、親和性の高いクローンを優先的に富化させる可能性を高める、溶液ベースの選択が可能となるからである。選択は、最初の親和性と比較して抗原濃度を低下させる平衡様式において、または、改善された解離速度が、経験的に決定した時間枠全体にわたって、未標識の抗原との競合を使用するために特異的に選択される動的様式のいずれかで行った。結合していないリボソーム複合体を洗い流し、抗原が結合したリボソーム複合体を溶出させた。RNAを回収し、RT - PCRによってcDNAに変換させ、そして種間交差反応性を維持するためにビオチニル化マウスRAGE-Fcについての2回目の選択を行った。VH-CDR3の中に変異を有しているScFv編異体が含まれている、この選択工程による出力について、その後、突然変異誘発の工程を2サイクル行った。この突然変異誘発工程には、変異性PCRを使用するランダム突然変異の作成を含めた。作成したライブラリーについては、その後、10倍低い抗原濃度で、ビオチニル化ヒトRAGE-Fcについて3回目の選択を行った。このプロセスを必要に応じて繰り返した。それぞれの選択工程によるRNAの出力プールをcDNAに変換し、そしてタンパク質発現ベクター-pWRL-1にクローニングして、変異体ScFvの親和性と種間交差反応性をランク付けした。多様性のプールもまた配列決定して、選択が優性クローンに向かって動いているかどうかを決定するために多様性を評価した。

10

【0264】

(実施例25)

ファージディスプレイを使用するXT-M4の親和性成熟

VH-CDR3でスパイクしたライブラリーを、ビオチニル化hRAGEの選択のために図34に示したファージディスプレイベクター-pWRL-1にクローニングした。ビオチン標識した抗原を使用した。なぜなら、この形式は、溶液中での親和性によって駆動される選択とさらに相性がいいからである。選択は、最初の親和性と比較して抗原濃度を低下させる平衡様式において、または、改善された解離速度が、経験的に決定した時間枠全体にわたって、未標識の抗原との競合を使用するために特異的に選択される動的様式のいずれかで行った。ファージディスプレイのための標準的な手順を使用した。

20

【0265】

ScFvは二量体化することができ、これにより、選択およびスクリーニングの手順は面倒なものになる。二量体化したScFvは、親和力に基づく結合を示す可能性があり、この高い結合活性は選択を決定付けることができる。親和性における任意の固有の改善ではなく、ScFvの二量体化する能力におけるそのような改善は、最終的な治療用抗体(これは、通常はIgGである)にはほとんど関係がない。二量体化する能力の変化によって生じる不自然な結果(arbitrary)を回避するために、Fab抗体形式を使用した。なぜなら、これらは通常は二量体化しないからである。XT-M4を、Fab抗体として再度変換させ、そして新しいファージディスプレイベクター-pWRL-6にクローニングした。このベクターは、HV領域とVL領域の両方に広がる制限部位を有しており、ヒトの生殖細胞系列V遺伝子の中では頻繁に切断されることはない。これらの制限部位は、VLレパートリーとVHレパートリーのシャッフルリングおよび組み合わせアセンブリのために使用することができる。1つのストラテジーにおいては、VH-CDR3およびVL-CDR3でスパイクしたライブラリーを、いずれも、図34に示すようにFabディスプレイベクターに組み合わせてアセンブリさせ、そして親和性の改善について選択した。

30

【0266】

(実施例26)

キメラ抗体XT-M4の物理的特徴

オンラインMS検出を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)/質量スペクトル分析(MS)によるペプチドのマッピングおよびサブユニット分析による事前の特性決定によって、アミノ酸配列がキメラXT-M4-DNA配列から予想したとおりであることを確認した。これらのMSデータはまた、Asn²⁹⁹SerThrでの予想したN結合オリゴ糖配列のコンセンサス部位が占有されており、そして2つの主要な種が、それぞ

40

50

れ、0個または1個の末端ガラクトース残基を含む、複雑なN結合二分岐コアフコシル化グリカンであることも示していた。分子のFc領域の中には存在している予想したN結合オリゴ糖に加えて、N結合オリゴ糖は、キメラXT-M4の重鎖のCDR2領域の中に配列コンセンサス部位(Asn⁵²AsnSer)で観察された。別のN結合オリゴ糖は、重鎖のわずかに1つの上で主に見られ、これには、CEX-HPLC分析によって決定した分子のうちのおよそ38%が含まれていた(一次構造によって区別することができない他の酸性種が存在する可能性があり、これは、全体的な酸性の種の割合に寄与する可能性がある)。優性の種は、2つのシアル酸とともにコアがフコシル化された二分岐構造である。A₂₈₀を測定することによって、吸光係数を使用して濃度を計算した。キメラXT-M4についての理論上の吸光係数は、1.35mL mg⁻¹ cm⁻¹であると計算した。

10

【0267】

非還元性SDS-PAGEによって決定したキメラXT-M4の見かけの分子量はおよそ200kDaであった。抗体は、その配列から予想したよりもゆっくりと移動した。この表現形は、今日までに分析した全ての組み換え体抗体について観察された。還元条件下では、キメラXT-M4は、およそ50kDaで移動する1つの重鎖バンドと、およそ25kDaで移動する1つの軽鎖バンドを有している。重鎖のバンドのすぐ上に移動するさらに別のバンドもまた存在した。このバンドを自動Edman分解によって特性決定し、キメラXT-M4の重鎖に対応するNH₂末端を有していることを決定した。これらの結果は、SDS-PAGEによって観察した分子量の増大と一緒に、さらに別のバンドが、CDR2領域の中の別のN結合オリゴ糖を有している重鎖と一致することを示している。

20

【0268】

アミノ酸配列に基づいてキメラXT-M4について予想した等電点(pI)は7.2であった(重鎖の中にはCOOH末端Lysは含まれない)。IEFによって、キメラXT-M4はおよそ7.4~8.3のpIの範囲に移動するおよそ10個のバンドに分解され、これには、およそ7.8のpIで移動する1つの優性なバンドが含まれていた。キャピラリー等電点電気泳動によって決定したpIは、およそ7.7であった。

20

【0269】

陽イオン交換高速液体クロマトグラフィー(CEX-HPLC)によって現れた物質の分析により、分子電荷が異なるキメラXT-M4種についての分析がさらにもたらされた。観察された電荷の不均質性の大部分は、ほぼおそらく、重鎖のCDR2の中に存在しているさらに別のN結合オリゴヌクレオチド上で見られるシアル酸の関与が原因である。観察された電荷の不均一性のごく一部は、COOH末端リジンの不均一性が原因であり得る。

30

【0270】

(実施例27)

グリコシル化部位の除去

抗体XT-M4の重鎖可変領域の52位(Kabantの番号付けによる)のアスパラギン(N)をアスパラギン酸(D)に変換する変異により、図36に示すように、hRAGE-Fcに対する直接結合のELISA分析によって決定した、ヒトRAGEに対するXT-M4抗体の結合が改善した。N52D変異は、抗体XT-M4の重鎖可変領域のCDR2の中にある。

40

【0271】

(実施例28)

キメラ抗RAGE抗体の効力についてのインビボでの前臨床アッセイ

薬物動態(PK)

雄のBALB/cマウス(n=3)への5mg/kgの単回のIV投与後のキメラ抗体キメラXT-M4の血清濃度を、キメラXT-M4について評価した。経時的な抗体の血清濃度を、IgG ELISAで測定した。キメラXT-M4の平均血清暴露は(23, 235g·hr/mL)であり、半減期はおよそ1週間(152時間)であった。図37

50

を参照のこと。

【0272】

(実施例29)

記憶障害のCFCモデル

文脈的恐怖条件付け (contextual fear conditioning (CFC)) パラダイムを利用して、アミロイド沈着が原因である認識機能の低下の動物モデルにおける認識能力に対するキメララット抗体XT-M4 (RAGEに特異的に結合し、RAGE結合パートナーの結合を阻害する) の投与の効果を試験した。

【0273】

Tg2576モデルマウスは、18ヶ月までにアミロイドplaquesを生じ、これには、生後6ヶ月までに、海馬CA1と歯状回の中でのLTP障害、改良型の水迷路における空間記憶障害、シナプス可塑性の機能障害、ならびに、A凝集物およびオリゴマーの増加が先行して起こる。Aは、若い、plaquesを有していないTg2576マウスにおいて、文脈的記憶の障害を誘導する。海馬に依存する学習および記憶についての試験である文脈的恐怖条件付け (CFC) を、A形成およびアミロイド沈着についてのTg2576トランスジェニックヒトAPPマウスマodelにおいて行った。

【0274】

状況学習 (contextual learning) には、ショックが起こった特異的なケージの環境 (状況) を用いて嫌悪刺激 (フットショック) の関連づけを含めた。状況についての記憶を、ショックを与えなかった場合の状況依存性のすくみ反応 (context-dependent freezing) として表した。軽く肢で衝撃を与えた状況を対にすることによって、マウスを操作チャンバーの中に馴化させた。訓練は、その間に動物に2回の軽い衝撃を与える、操作チャンバーの中の5分間のセッションから構成した。記憶試験は、以前に衝撃を与えた環境に動物を再び入れた後、およそ24時間後に行った。活動のレベルを、記憶試験の間に記録し、「すくんだ」状態ですごした時間を、全時間に対する割合として表し、処置グループ間でANOVAによって分析した。活動レベルの低下は、嫌悪事象についての完全な記憶を示す。トランスジェニックではない同腹子とは対照的に、Tg2576は、14~16週齢の間には、状況記憶の障害を発症し、完全な欠損が20週齢まで観察されたことを決定した。

【0275】

抗体の投与

マウスRAGEに特異的なキメラXT-M4抗体をPBSの中に稀釀し、20週齢のTg2576と年齢が一致するトランスジェニックではない(野生型)同腹子に、1用量(10mg/kg)で、1日目、4日目、7日目、および10日目にip投与した。中性(不活性な)抗体(neutral antibody)を対照として投与した。マウスの訓練は、11日目に、抗体の4回目の投与の24時間後に開始し、試験は12日目に行つた。

【0276】

記憶スコア(すくみ反応が増えること)を、12日目の試験セッションの間に試験した。効力は、PBSで処置したトランスジェニック動物と比較して、記憶障害の撤回を明らかにすることによって決定した。最小有効用量(MED)を、0.1から30mg/kgまでの範囲の用量で用量応答曲線を作成することによって決定した。確立したMEDでの1回の免疫化後の効力の持続期間を、時間的経過の分析、および認識の改善に対する訓練前の時間の間隔の延長を評価することによって決定した。

【0277】

キメラXT-M4抗体(、IgG1)は、状況記憶障害の有意な撤回を示した。対照的に、無関係な抗体およびPBS対照を投与したマウスは、Tg2576マウスまたは野生型同腹子のCFCに対しては効果を示さなかった。データは、マウスRGEに対するキメラモノクローナルXT-M4抗体の投与が、アルツハイマー病のAPPトランスジェニックモデルにおいて認識を改善するために有効であることを示している(図38を参照の

10

20

30

40

50

こと)。

【0278】

材料と方法

マウス

実験において使用したマウスは、ヒトAPPタンパク質を発現するヘテロ接合型の雄のトランスジェニックTg257618マウスであった。遺伝子型をPCRによって確認し、Retinal Degeneration (Rd) 変異についてホモ接合型である全ての動物は排除した。バックグラウンド株はC57BLと129SJLの交配による。文脈的恐怖条件付け実験を、20週齢のマウスについて行った (n = 8 ~ 12 / 遺伝子型 / 年齢)

10

試験装置

文脈的恐怖条件付け (CFC) を、アルミニウムの側壁とプレキシガラス製の天井、ドア、および後壁によって構築した6個の30 × 24 × 21 cmの操作チャンバー (Med Associates, Inc., St. Albans, VT) の中で行った。それぞれのチャンバーには、肢で衝撃を与えることができる36本のステンレス鋼製の棒からなる床を取り付けた。加えて、それぞれのチャンバーには、2つの刺激光線を設け、1つは家の電気およびソレノイドである。光、フットショック (US)、およびソレノイド (CS) は全て、PCによって実行するMED-PCソフトウェアによって制御した。チャンバーを、赤色光の存在下で音を隔離した部屋に入れた。

20

【0279】

文脈的恐怖条件付け

Tg2576マウス、またはそれらの年齢が一致する野生型同腹子の訓練は11日目に、そしてキメラXT-M4抗RAGE抗体のそれらの4回目の用量をマウスに投与した1日後に開始した。

【0280】

訓練は、操作チャンバーの中にマウスを入れること、刺激と家の光の両方を照射すること、およびそれらを2分間調査することからなる。2分間の最後に、聴覚による合図 (ソレノイドによる2Hzのクリック音; CS) を、15秒間提示した。フットショック (US; 1.5 mAmp) を、CSの最後の2秒間に与え、CSの提示と同時に終了した。この手順を繰り返し、30秒後に、2回目のフットショックを与え、マウスをチャンバーから取り出し、それらのもとのケージ (home cage) に戻した。

30

【0281】

訓練の24時間後、動物を、先に訓練を行ったチャンバーに戻した。その後、衝撃を与えたものと同じ環境 (Context) 下でのすくみ反応の行動を、5分間の間、10秒間のビン (bins) のサンプリング時間を使用して、経験者によって記録させた (30のサンプル点)。すくみ反応は、呼吸に必要な動きを除いて動きがないとして定義した。5分間の最後に、マウスを彼らのもとのケージに戻した。

【0282】

Novel条件とCue条件でのすくみ反応についてのデータを、Contextにおいて全てのマウスを試験した (最初のContext試験のおよそ60分後) 後で回収した。新しい環境は、後方の右側の角から前方左側への透明なプレキシガラス製の仕切り板、プレキシガラス製の床、さらには下げた照度 (家の電気のみ) を含む改良された操作チャンバーから構成した。マウスを新しい (Novel) 状況にいれ、時間サンプリングを使用して、3分間 (18のサンプル点)、すくみ反応についてのスコアを集めた。3分間の最後に、聴覚による合図 (CS) を、すくみ反応を再びスコアした3分間 (18のサンプル点) に提示した。個々の動物についてのすくみ反応のスコアを、試験のそれぞれの部分についてのすくみ反応の割合 (%) に変換した。個々の動物について、状況についての記憶 (文脈的記憶) を、その状況において観察した新規の条件 (定常活性の測定) におけるすくみ反応の割合 (%) を引き算することによって得た。

40

【0283】

50

抗体での処置

キメラ X T - M 4 抗体を P B S (1 0 m g / k g) の中に稀釈し、20週齢の T g 2 5 7 6 マウスまたはそれらの年齢が一致する野生型の同腹子に、1日目、4日目、7日目、および10日目に単回用量として i p 投与し、11日目に訓練を行い、そして12日目に試験した。

【 0 2 8 4 】

データの分析

文脈的記憶を、2元 A N O V A を使用して分析し、S A S 統計ソフトウェア (S A S Institute, Inc.) を使用して post hot F ischer の一対比較を行った。全てのデータを平均 ± S E M で表した。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 8 5 】

【図1A】マウス、ラット、ウサギ（2つの異性体）、ヒヒ、カニクイザル、およびヒトの R A G E のアミノ酸配列（配列番号 3、14、11、13、7、9、1）のアラインメントを示す。

【図1B】マウス、ラット、ウサギ（2つの異性体）、ヒヒ、カニクイザル、およびヒトの R A G E のアミノ酸配列（配列番号 3、14、11、13、7、9、1）のアラインメントを示す。

【図1C】マウス、ラット、ウサギ（2つの異性体）、ヒヒ、カニクイザル、およびヒトの R A G E のアミノ酸配列（配列番号 3、14、11、13、7、9、1）のアラインメントを示す。

20

【図2】90 p M の E C 5 0 での h R A G E に対する X T - H 2 の結合と、300 p M の E C 5 0 での h R A G E - F c に対する X T - M 4 の結合を示している、直接結合 E L I S A によるデータのグラフである。

【図3】100 p M の E C 5 0 での h R A G E V ドメイン - F c に対する、抗体 X T - M 4 と X T - H 2 の結合を示している、直接結合 E L I S A 分析によるデータのグラフである。

【図4】h R A G E - F c に対する H M G 1 の結合をブロックする X T - H 2 と X T - M 4 の能力を示しているリガンド競合 E L I S A 結合アッセイによるデータのグラフである。

30

【図5】X T - H 2 と X T - M 4 が類似するエピトープを共有しており、ヒト R A G E 上の重複している部位に結合することを示している、抗体競合 E L I S A 結合アッセイによるデータのグラフである。

【図6】マウス抗 R A G E 抗体 X T - H 1 、 X T - H 2 、 X T - H 3 、 X T - H 5 、および X T - H 7 と、ラット抗 R A G E 抗体 X T - M 4 の重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号 1 8 、 2 1 、 2 4 、 2 0 、 2 6 、 1 6 ）のアラインメントを示す。

【図7】マウス抗 R A G E 抗体 X T - H 1 、 X T - H 2 、 X T - H 3 、 X T - H 5 、および X T - H 7 と、ラット抗 R A G E 抗体 X T - M 4 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号 1 9 、 2 2 、 2 5 、 2 3 、 2 7 、 1 7 ）のアラインメントを示す。

40

【図8】ヒヒ R A G E をコードする c D N A のヌクレオチド配列（配列番号 6 ）を示す。

【図9】カニクイザル R A G E をコードする c D N A のヌクレオチド配列（配列番号 8 ）を示す。

【図10】ウサギ R A G E イソ型 1 をコードする c D N A のヌクレオチド配列（配列番号 1 0 ）を示す。

【図11】ウサギ R A G E イソ型 2 をコードする c D N A のヌクレオチド配列（配列番号 1 2 ）を示す。

【図12A】ヒヒ R A G E をコードする、クローニングされたヒヒのゲノム D N A (クローン 1 8 . 2) のヌクレオチド配列（配列番号 1 5 ）を示す。

【図12B】ヒヒ R A G E をコードする、クローニングされたヒヒのゲノム D N A (クローン 1 8 . 2) のヌクレオチド配列（配列番号 1 5 ）を示す。

50

【図12C】ヒヒRAGEをコードする、クローニングされたヒヒのゲノムDNA（クローン18.2）のヌクレオチド配列（配列番号15）を示す。

【図12D】ヒヒRAGEをコードする、クローニングされたヒヒのゲノムDNA（クローン18.2）のヌクレオチド配列（配列番号15）を示す。

【図12E】ヒヒRAGEをコードする、クローニングされたヒヒのゲノムDNA（クローン18.2）のヌクレオチド配列（配列番号15）を示す。

【図13】競合ELISA結合アッセイによって決定した、hRAGE-Fcに対する、RAGEリガンドHMG B1、アミロイド1-42ペプチド、S100-A、およびS100-Bの結合をブロックする、キメラXT-M4抗体とラット抗体XT-M4の能力を示している4つのグラフを示す。

【図14】抗体競合ELISA結合アッセイによって決定した、抗体XT-M4とXT-H2を用いたhRAGE-Fcへの結合について競合する、キメラXT-M4の能力を示しているグラフを示す。

【図15】カニケイザル、ウサギ、およびヒヒの肺組織のIHC染色を示し、これは、XT-M4がこれらの組織の中の内因性の細胞表面RAGEに結合することを示している。対照試料は、XT-M4と接しているhRAGEを発現するCHO細胞、RAGEを発現しないNGBCCHO細胞、そして対照IgG抗体に接しているhRAGEを発現するCHO細胞である。

【図16】ラット抗体XT-M4が、正常なヒトの肺と慢性閉塞性肺疾患(COPD)のヒトの肺の中のRAGEに結合することを示している。

【図17】ヒト化マウスXT-H2 HV領域のアミノ酸配列を示す。

【図18】ヒト化マウスXT-H2 HL領域のアミノ酸配列を示す。

【図19】ヒト化ラットXT-M4 HV領域のアミノ酸配列を示す。

【図20A】ヒト化ラットXT-H2 HL領域のアミノ酸配列を示す。

【図20B】ヒト化ラットXT-H2 HL領域のアミノ酸配列を示す。

【図21】ヒト化軽鎖および重鎖ポリペプチドを作成するために使用した発現ベクターを示す。

【図22】競合ELISAによって決定した、ヒトRAGE-Fcに対するヒト化XT-H2抗体の結合についてのED₅₀値を示す。

【図23】BIACORE（登録商標）結合アッセイによって決定した、hRAGE-SAに対する、XT-M4と、ヒト化抗体XT-M4-V10、XT-M4-V11、およびXT-M4-V14の結合についての運動速度定数（kinetic rate constant）（k_aおよびk_d）と、結合定数および解離定数（K_aおよびK_b）を示す。

【図24】BIACORE（登録商標）結合アッセイによって決定した、mRAGE-SAに対する、XT-M4と、ヒト化抗体XT-M4-V10、XT-M4-V11、およびXT-M4-V14の結合についての運動速度定数（kinetic rate constant）（k_aおよびk_d）と、会合定数および解離定数（K_aおよびK_b）を示す。

【図25】マウスXT-H2 VL-VH ScFv構築物のヌクレオチド配列（配列番号51）を示す。

【図26】マウスXT-H2 VH-VL ScFv構築物のヌクレオチド配列（配列番号52）を示す。

【図27】ラットXT-M4 VL-VH ScFv構築物のヌクレオチド配列（配列番号54）を示す。

【図28】ラットXT-M4 VH-VL ScFv構築物のヌクレオチド配列（配列番号53）を示す。

【図29】VL/VHまたはVH/VL立体構造のいずれかの、XT-H2およびXT-M4抗RAGE抗体のScFv構築物によるヒトRAGE-Fcに対する結合を示しているELISAデータのグラフである。

【図30】大腸菌(*Escherichia coli*)の中で可溶性タンパク質として発現されるVL/VHまたはVH/VL立体構造のXT-H2およびXT-M4抗RAGE抗体のScFv構築物による、ヒトRAGE-FcとBSAに対する結合を示しているELISAデータのグラフである。ActRIIbは、ネガティブ対照として同じベクターから発現される非結合タンパク質である。

【図31】XT-M4のCDRにスパイク変異(spike mutation)を導入するためのPCRの使用を模式的に示す。

【図32】XT-M4 VL-VH ScFv構築物のC末端のヌクレオチド配列(配列番号56)を示す。VH-CDR3に下線を付ける。2つのスパイクオリゴヌクレオチド(配列番号57~58)はまた、その部位での変異について使用されるスパイク比(spike ratio)を特定する個々の変異部位での数字とともに示す。数字に対応しているスパイク比のヌクレオチド組成もまた特定した。10

【図33】リボザイムディスプレイベクターpWRL-3を模式的に示す。「T7」はT7プロモーターを示し、「RBS」はリボソーム結合部位であり、「スペーサーポリペプチド」は、リボソームに対して折り畳まれたタンパク質を連結するスペーサーポリペプチドであり、「Flagタグ」は、タンパク質の検出のためのFlagエピトープタグである。

【図34】ファージディスプレイベクターpWRL-1を模式的に示す。

【図35】FabディスプレイベクターpWRL-6を使用したVLおよびVHスパイクライブラリーの組み合わせアセンブリを模式的に示す。20

【図36】52位のグリコシル化部位を除去する変異の後の、hRAGEに対するXT-M4抗体の親和性の増大を示している抗体競合ELISAデータのグラフである。

【図37】マウスへの1回のiv投与後のキメラXT-M4の血清濃度を示しているグラフである。

【図38】Tg2576マウスモデルの記憶障害に対するキメラXT-M4の効果を示しているグラフである。

【図1A】

RAGEアミノ酸配列のアラインメント

1	50
マウスRAGE	MFACTAARAN VLVLA LWGAV AGGQNI TARI GEP LVL CCKG APKKP PQQLE
ラットRAGE	NPTGTVA RAR VLVLA LWGAV AGGQNI TARI GEP LML SCKG APKKP PQQLE
ウサギRAGE1	MAAGRAAGAA VLVFSI LWGAV VGGQNI TARI GEP LVL CCKG APKKP PQQLE
ウサギRAGE2	MAAGRAAGAA VLVFSI LWGAV VGGQNI TARI GEP LVL CCKG APKKP PQQLE
ヒトRAGE	MAAGRAAGAA VLVFSI LWGAV VGGQNI TARI GEP LVL CCKG APKKP PQQLE
サルRAGE	MAAGRAAGAA VLVFSI LWGAV VGGQNI TARI GEP LVL CCKG APKKP PQQLE
ヒトRAGE	MAAGTAVGAK VLVLSL WGAV VGGQNI TARI GEP LVL CCKG APKKP PQQLE
51	100
マウスRAGE	WKLNTGRTEA WKVLS PQQ.GG PWDSVAQILP NGSLLLPATG IVDEGTFRCR
ラットRAGE	WKLNTGRTEA WKVLS PQQ.GG PWDSVARILP NGSLLLPAIG IVDEGTFRCR
ウサギRAGE1	WKLNTGRTEA WKVLS PQQ.GG SWDSVARILP NGSLLLPAIG IQDEGTFRCR
ウサギRAGE2	WKLNTGRTEA WKVLS PQQ.GG SWDSVARILP NGSLLLPAIG IQDEGTFRCR
ヒトRAGE	WKLNTGRTEA WKVLS PQQ.GG FWDSVARILP NGSLLFPAVG IQDEGTFRCQ
サルRAGE	WKLNTGRTEA WKVLS PQQ.GG FWDSVARILP NGSLLFPAVG IQDEGIFRCQ
ヒトRAGE	WKLNTGRTEA WKVLS PQQGG PWDSVARILP NGSLLFPAVG IQDEGIFRCQ
101	150
マウスRAGE	ATNRRGKEVK SNYRV RVYQI PGKPEIVDPA SELTAGVPNK VGT CVSEGGY
ラットRAGE	ATHRLGKEVK SNYRV RVYQI PGKPEIVDPA SELTAGVPNK VGT CVSEGGY
ウサギRAGE1	TTNRNGKETK SMYRV RVYQI PGKPEILDPA SELTAGLPSK VGT CVSEGGY
ウサギRAGE2	TTNRNGKETK SMYRV RVYQI PGKPEILDPA SELTAGLPSK VGT CVSEGGY
ヒトRAGE	AMNRNGKETK SMYRV RVYQI PGKPEILDPA SELTAGVPNK VGT CVSEGGY
サルRAGE	AMNRNGKETK SMYRV RVYQI PGKPEILDPA SELTAGVPNK VGT CVSEGGY
ヒトRAGE	AMNRNGKETK SMYRV RVYQI PGKPEIVDPA SELTAGVPNK VGT CVSEGGY

Figure 1A

【図1B】

RAGEアミノ酸配列のアラインメント（続き）

151	200
マウスRAGE	PAGTLSWHL D GKLLIPDGK E TLVKEETRHH PTGLFTLQS ELTVIPTQGG
ラットRAGE	PAGTLSWHL D GKLLIPDGK E TLVKEETRHH PTGLFTLQS ELTVIPTQGG
ウサギRAGE1	PLGLTSWHLND GKLLIPDGK E SVVKKEETRHH PTGLFTLQS ELMVTPARGG
ウサギRAGE2	PLGLTSWHLND GKLLIPDGK E SVVKKEETRHH PTGLFTLQS ELMVTPARGG
ヒトRAGE	PAGTLSWHL D GKLLIPDGK E SVVKKEETRHH PTGLFTLQS ELMVTPARGG
サルRAGE	PAGTLSWHL D GKLLIPDGK E SVVKKEETRHH PTGLFTLQS ELMVTPARGG
ヒトRAGE	PAGTLSWHL D GKPLVPNPKG E SVVKKEETRHH PTGLFTLQS ELMVTPARGG
201	250
マウスRAGE	TTHPFTSCSF SGLPLP RRRPL NTAPIQ I RLVR BPGP PEGIQL LVEPREGIVVA
ラットRAGE	TT-RTYSCSF SGLPLP RRRPL NTAPIQ I RLVR BPLP PEGIQL LVEPREGIVVA
ウサギRAGE1	GFPFTSCSF SGLPLP RRRAS YTAPIQ I SVW BPGP L E VRL LVEPREGIVVA
ウサギRAGE2	GFPFTSCSF SGLPLP RRRAS YTAPIQ I SVW BPGP L E VRL LVEPREGIVVA
ヒトRAGE	NPHPFTSCSF SPGLPLP RRRAL HTAPIQ I SVW BPGP L E VRL LVEPREGIVVA
サルRAGE	NPHPFTSCSF SPGLPLP RRRAL HTAPIQ I SVW BPGP L E VRL LVEPREGIVVA
ヒトRAGE	DPRPTFSCSF SPGLPLP RRRAL RTAPIQ I SVW BPGP L E VRL LVEPREGIVVA
251	300
マウスRAGE	PGGT VTLTCR ISAQ QPP PQWH WIKDGA PFLP APSPV LILPS VGHADEGTYS
ラットRAGE	PGGT VTLTCR ISAQ QPP PQWH WIKDGA PFLP APSPV LILPS VGHADEGTYS
ウサギRAGE1	PGGT VTLTCR APRQ QPP PQWH MMKDGM SLP L PPSPV LILPS VGHADEGTYS
ウサギRAGE2	PGGT VTLTCR APRQ QPP PQWH MMKDGM SLP L PPSPV LILPS VGHADEGTYS
ヒトRAGE	PGGT VTLTCR VPAQ QSPQWH MMKDGVPLP SPSPV LILPS IGPQDQGTYR
サルRAGE	PGGT VTLTCR VPAQ QSPQWH MMKDGVPLP SPSPV LILPS IGPQDQGTYR
ヒトRAGE	PGGT VTLTCR VPAQ QSPQWH MMKDGVPLP SPSPV LILPS IGPQDQGTYR

Figure 1B

【図1C】

RAGEアミノ酸配列のアラインメント（続き）

361	390
マウスRAGE	CVATHPSHGP QKSPPPVSIRV TEYGDEGPAP GSVGEGSGLGT LALALGILGG
ラットRAGE	CVATHPSHGP QKSPPPVNIRV TEYGDEQQA GSVGEGSGLGT LALALGILGG
ウサギRAGE1	CVATHPSHGP QESLPI SIS. V..... GSEGGSGLGT LALALGILGG
ウサギRAGE2	CVATHPSHGP QESLPI SIS. V..... GSEGGSGLGT LALALGILGG
ヒトRAGE	CVATHPSHGP QESRAV SISI IEPGEHGP TA GSVGGGSPGT LALALGILGG
サルRAGE	CVATHPSHGP QESRAV SISI IEPGEHGP TA GSVGGGSPGT LALALGILGG
ヒトRAGE	CVATHPSHGP QESRAV SISI IEPGEHGP TA GSVGGGSPGT LALALGILGG
391	400
マウスRAGE	LGVALLVGA ILMRKRQPRP EERKAPESQE DEERERALNQ SEERAEPMENG
ラットRAGE	LGVALLVGA ILMRKRQPRP EERKAPESQE DEERERALNQ SEERAEPMENG
ウサギRAGE1	LGVALLVGA ILMRKRQPRP EERKAPESQE DEERERALNQ SEERAEPMENG
ウサギRAGE2	LGVALLVGA ILMRKRQPRP EERKAPESQE DEERERALNQ SEERAEPMENG
ヒトRAGE	LGVALLVGA ILMRKRQPRP EERKAPESQE DEERERALNQ SEERAEPMENG
サルRAGE	LGVALLVGA ILMRKRQPRP EERKAPESQE DEERERALNQ SEERAEPMENG
ヒトRAGE	LGVALLVGA ILMRKRQPRP EERKAPESQE DEERERALNQ SEERAEPMENG
401	410
マウスRAGE	AGGP- (配列番号3)
ラットRAGE	AGGP- (配列番号14)
ウサギRAGE1	TGEP* (配列番号11)
ウサギRAGE2	TGEP* (配列番号13)
ヒトRAGE	TGEP* (配列番号7)
サルRAGE	TGEP* (配列番号9)
ヒトRAGE	TGEP- (配列番号1)

Figure 1C

【図2】

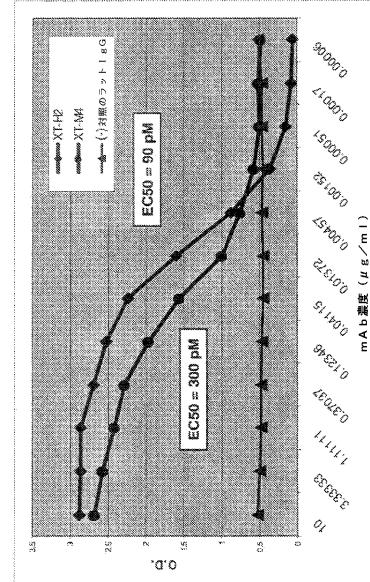


Figure 2

【図3】

hRAGE-Fcに対する結合／直接結合ELISA

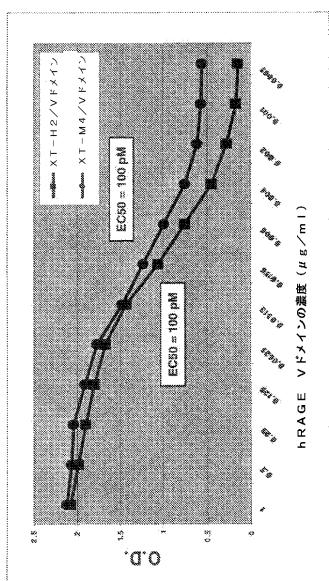


Figure 3

【図4】

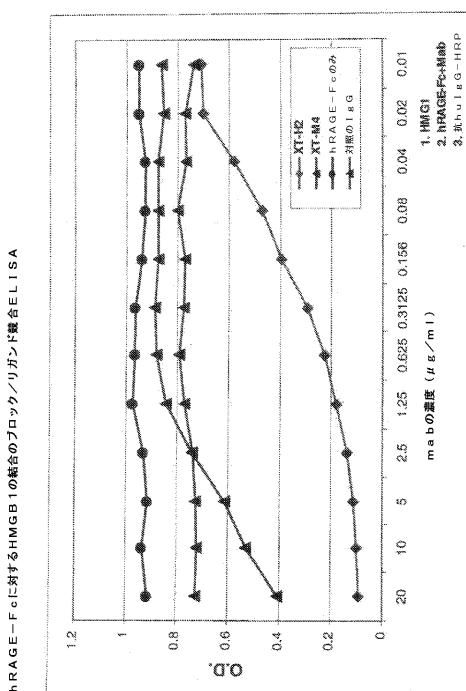


Figure 4

【図5】

XT-M4エビトープ融合ELISA

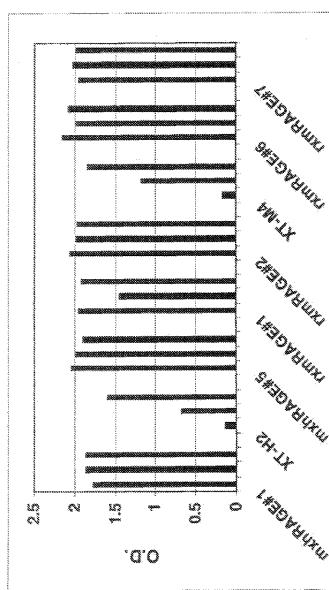


Figure 5

【図6】

抗体VH領域のアミノ酸配列アラインメント

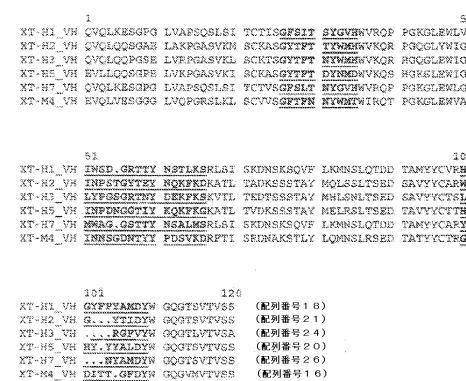


Figure 6

【図7】

抗RAGE抗体VL領域のアミノ酸配列アラインメント

<pre> 3 I DQMTQSTFS LSTSLGGKVIT ITCKASQDINKFIAW YQHPTGKGPR XT-H1_VI XT-H2_VI XT-H3_VI XT-H4_VI XT-H5_VI XT-H6_VI XT-H7_VI XT-M1_VI XT-M2_VI </pre>	<pre> 50KFIAW YQHPTGKGPR MSDGPFTYLD YLQKPGKGSPKSYTWS YQKQPSBSPK MSLGKPSFNS YQJLQPSFNSKYLAM YQHPTGKGPRKLWVY YQHPTGKGPR MSVSLGGTIT ITCKASQDINKYLAM YQHPTGKGPR ITCKASQDINKLWVY YQHPTGKGPR </pre>
---	---

```

51 6LIVYVSTLQ EGIPCRPSGSN GCGREDXGPGSI SMLNEPDRIAT YVCLG_YDNL 100
52 LLYVLSVDSRE SGWSPFPGSNS GCGSTADTILTI SVRVEADLGV YVCLG_CGNSLE
53 LLYVGSNSRY TGVEDPRTGS GCGSTADTILTI TSVQACDGLV YVCLG_QCTTY
54 LLVYTSVNSQG SGWSPFPGSNS GCGSTIPFSNL HMEBDMTDAT YVCLG_QKHEVS
55 LLYVHTSTLC EGISPRPSGSN GCGSDYPSFLN SMLNRPDRAT YVCLG_YDNL
56 RMYIATNLQ DGIVCRPSGSNS RSGSIIYSLTI SSLESSEDVAD YVCLG_DPEP

```

Figure 7

【 図 8 】

ヒヒRAGEをコードするcDNAのヌクレオチド配列

1 GACCCCTGAA GGAAGCAGGG TAGCGCKGG AGCAGCAGTT GGAGGCCTGG
51 TGCTGTGCTT CAGTCCTGTC GGGGCGAGAG TAGTGTCCTA AAACATCACA
101 GCGCGATGCG GGGAGGCACT CGGTGCGTGGAG TGTAGGGGGG CCCCGGCGAA
151 ACCAACCCCG CAGCTGGAAT GGAAGCTGAA TACAGGGCGG ACKGRAGCTT
201 GGGAGGCTT ATCTCCCGAG GGAGGCCCTT GGATAGTGTT GGCTGGTGTG
251 CTTCGGCAAGG GCTCCCTTCTT CCTTCGGCTCT GTCGGGGATTC AGATGGGG
301 GATTITTCGGG TGCCAGGCAAA TGAAACGGAA TGGAAGGGGG ACCAGGGTCCA
351 ACTACCGAGT CGGTGTCCTAC CAGATTCCTG GGAAGCCCGA AATTATGAT
401 TCTGCGCTTG AACTCAGGGG TGTTGTTCCC AATAAGCTGG GGACATGTST
451 GTGAGGAGGA AGCTACCCCTG CAGGGACTCT TAGTGTGGRC TTGGATGGGA
501 AGGCCCTGTG GCGTAATGAG AAGGGGATAT CTGTGAAAGGA AGAGACCCGG
551 AGACACCCCTG AGGAGGGGGT CTTCACACTG CAGTCGGAGC TATGGTGTGAC
601 CGGAGCCCGG GGAGGAGGG CCCTACCCAC CTCTCTCTCT AGCTTACGGC
651 CAGGGCTTCG CGGAGCGGGG CCTCTGGCTCA CAGGGCCCTTG CGGGCGCTGT
701 GTCTGGGGAGC CTGTGGCTCT GGAGGGAGTC CAATGGTTGG TAGAGGCGA
751 AGGTGAGAGCA GTAGCTCTG GGGAGACCGT AACCTTGACCC TGTGGAATGTC
801 CTACCCAGGC CTCTCTCTAG ATTCATGGA TGAAAGATGG TGAGGCGCTTA
851 CCCCTTTCCG CGGAGCGGGT GTCTGGATCTC CCTGGAGATAG GGCTTCRAGGA
901 CGAGGGACCC TACAGGTGTC TGCGCCACCA TCCCGACCCG GGGCCCCCG
951 AAAGCCGTCG TGTAGGATC AGCATCTGAC AACCAAGGCGA GGAGGGGGCCA
1001 ACTGCGAGCT CTGTGGGGAGG ATCAGGGCGCA GGAACTCTAG CCUTGGCCCT
1051 GGGGGATCTCG GGAGGGCTGGG GGCAGCGGGC TGTGCTCATTT GGGGGCTCATCT
1101 TGTGGCGAAAG GGGCGCGACGC CAGCAGGNGG AGGGAGGGCC CTCAGAARAC
1151 CAGGAGGAAG AGGGAGGAAGG TGCAAGCTTAAATCAGTGGG AGGACCTGAA
1201 GGGCGGGCGAG AGTGGTACTG GAGGGCTCTTAAAGGGGGCCAC AGACAGATCC (配列番号6)

Figure 8

【 図 9 】

カニクイザルRAGEをコードするcDNAのスクレオチド配列

2 GACCTCTGAA GGAAACGAAA TGGAGCCCGG ACCAGGAGT 999GACCTGG
52 TGCTGTCTC CAGTCCTGTCG GGGCACTGG TAGTGCTCTA AAGATCTACA
181 GCGCGGTTG GTGAGGCACTG GGTGCTGAGG TGTAAGGGGG CCCCGAAGAA
151 ACCACCCCGA CAGCTGGATG GGAAGACTGAA TACRGGCCGG AGRGAGCTT
261 GGGAGGFCGT ATCTCCCGCG 99AGGGCCCT 99GATAGTGT 99TCGCTGTC
251 CTTCGAGGAGG GTCGCTCTTCTT CCTTCGGGTT GTGGGGATCC AGGATGAGGG
361 GATTTTCGCG TGCGAGGGAA TGAGCAGGGAA TGGGAGGAG ACCAAGATCCA
151 ACTACCCAGGT CGGTGCTCTAG CAGATTCCTG GGAAGGCGG AATTATAGT
461 TCTTCGCTCTA AACTACCGCG 99TGTTTCCC AATAGATGTC 99GATAGTGT
451 GTAGAGGAGA AGCTACACTG CAGGGACTCT TTAGTGAC 99TGGATGAGA
501 AGGCCCTGTG GCCTANTGAG BAGGGAGTCT CTGTGAGGR AGGRGGCCAG
551 AGACACCGTG AGQAAGGGCTG CTTCRCACTG CAGTCGGGJC TAATGGTGC
601 CCCAGGGCGG GAGAGGAACTC CCACATCCAC 99CTTCCTCT 99CTTCAGCC
651 CAGGGCTTCG CGAGACCGGG GCCTTGGACA CAGGCCCCAT CCAGGCCCCCT
701 GTCTGGAGAC CTGTGCCCCCTT GGGAGGGGTC CAAATGGTGG TGAGGCGRA
751 GTAGGGAGCA GTAGCTCTG GTGGAAAGCTT AACCTGGGAC TGTGGAGHTCC
601 CTGGCCAGAC CTCGCTCTAA ATCTACGAA TGGAGGATG TGTGGCCCTTA
851 CCCCTTCTTC CCGCCCTGTG GCTGATCTC CTCGAGAGAT 99GCTTCAGGA
801 CCGAGGAGAC TACAGGTTTGT TGCCACCCU CTCAGGCCC 99GGGGCCAGG
951 AAAGGGCGTC TTTCAGCACTC AGCATCTCTG AACCMGGGCA 99AGGGGCCCA
1001 ACTGCAAGGT CTGTGGAGAC ATCAAGGCTA 99GAGCTCTG 99CTTCCTTA
1051 GGGGATCTG GGGAGGCTCG 99GAGAGGCG 99CTTCCTCT 99GCTTCATCT
1101 TGTGGAGAG GGGGGAGGCTC CAGAGGAGGG AGGGAGGAGG 99CTGAAAC
1151 CAGGAGGAGG AGGGAGGACCG TGAGAGCTG ANTACTGAGG AGGGAGCTGA
1201 GGCAGGGGG AGCTGGTACTG GAGGGCTTG AGGGGCCAC AGGGAGATCC (列記番号8)

Figure 9

【 図 1 0 】

ウサギRAGEイソ型1をコードするcDNAのヌクレオチド配列

1 ACTAGACTG TGGGACCCATC GCGCAGGGGG CAGCOSCCCG AGCGCTGGTG
51 CTGGTGTTCGA GTCTGTTGGGG GGACGAGCTGA GTGTGCTGAGA ACATCTCAGC
101 CGGATTGGG GAGGCGCTTG TGCTGTAAGTG TAAGGGGGCC CCORGARGAGC
151 CCCCCCAGGA GCTGCGATGG AAACCTGACCA CAGGCGAGGC AGAACTGTTGG
201 AAAGTCCTTCTT CTCCCCAGGG AGGCTCATGG GACATGTTGG CCCTGTGCTCT
251 CCCRATGGC TCCCTCTCTCC TTCCGGCTCTT TGGGATCCAG GATAGGGGG
301 CTTPCCGGTG CGGGACACAA AACAGGATG GAAAGGGAGC CRAGTCCAAAT
351 TACCGGAGTC GGGTCTTACCA GATTCCTGGG AAAGCCAGAGA TCTGTGATCC
401 TGCGTCTGAA CTCAAGGCCG GTATCCCGAG TAAAGTGGGG AGCATGTTGTT
451 CTGARGTGGGG ATATTCCTCTG GGAACTCTCA GCTGGACAT GGGATGGGAAA
501 CTCCGTGTCAC CTGACGGGAA GGAACTCTT GTGAGGGAGC AGACCAAGGAG
551 GCACCTGAC AGCGGGCTCT TCCCTCTGCA STGAGAGCTG ATGGTGAATC
601 GAGCCGGGGGG AGGAAGGGGCTT GCGGCGCTCT TCTCGCTGTG CTGAGCTCC
651 GGCGCTGCCG GCGCGGGGGC CTGATACACA GCGGCGCTCC AGCCCCAGTG
701 CTGGGGACCTT GGGGGCGCTGG AGGTGGCTCTT GCTGGTGGAG CCGRRAGGTG
751 GAGCGATGAG TCTCTGGTGG AGCTTGRCGC GAGCTGGTGA AGCTGGCTGGC
801 CAGCGCCCTG CTGACATCA CTGATGATGAG GTAGTGTATGCT CGTACACGCT
851 GCGCCCGAGC CGCGCTCTGCG TCTCTCCCTGA GTGGGGGGCTT CAACATGAGG
901 GGACTTACAG CTGGCTGGGG ACCCCATCCGA ACCTGTTGGCC CCAAGUAAGC
951 CTTCCTCATCA CGCATCACTGT CGGCTCTGAG GAGGCTCTGAG GCGCTGGGAC
1001 TCTAGCTCTG GCGCTGGGGG TCTCTGGGAGG CCTGGGGAGCA GCGCTGGCTGC
1051 TTGFCGGAGT CATCTCTGCG CGAAGGGGGAA AACGCGCAAGG AGAGCAGAGG
1101 AAAGTCCTCTTAAACCGAGGA GGACGAGGGAG GAGCGCAAGC AACTGCTCATCA
1151 GTCGGGAGGTG CGGGGGGGCA TGGGAGGGGG TACAGGAGAG CGCTGTGATAG
1201 TTTAGCGGCC GCGATTCTTAT (配列番号1)

Figure 10

【 図 1 1 】

ウサギRAGEイソ型2をコードするcDNAのヌクレオチド配列

1 ACTGAGTACTG TCGGACGATC GCAAGGGGCG CAGCGCCCG AGCTCTGGTC
 51 CTGCTCTTCTT CTCTGTGCGG GCGAGCACTG GGTGTCCTGA ACATCACAGC
 101 CGGGATTGCG GACCCGCTGG TGCTGAATG TGAGGGGGCC CCGAAAGAAC
 151 CRCCCGACAG CCGTGGAAATGG AAAGTCAACA CAGGGCAAGAC AGAGCTTGG
 201 AAAGTCCTTT CTCCCCAGGG AGGTCACTGG GACAGTGTGG CCATGTTCT
 251 CGCCAATKGC TCCCTCTTC TTCTGGCTGT TGGGTTCTAG GATSAHHGGGA
 301 CTTTCCGGGT CGGGACACAA AACGGGAAAT GAAAGGAGAC CAGTCTCCTA
 351 TACCGAGTCG CGGTCTTACCA GTTCTGGG PACCACAGA TCCCTGGATCC
 401 TCCCTCTGAA CTACGCCCGG GTTAACCCCGG TAAGGTGGGG ACATGTGTGT
 451 CTGAGATGGG ATATCTCTCG GGGACTCTCA GCTGCGACAT GGATGGGGAAA
 501 CTCTCTGGTC CTGACGGGAA GGGAGTCTCT GTAAAGGAGC AGACCRGGAG
 551 GCATCCCTGC ACAGGGGCTGT TCAACCTGCA GTCAGAGCTG ATGGTGAATC
 601 CAGCTTGCGG AGGGGGCTGT CCCCGCATCT TCTCTTGAT CTTCAGCCCG
 651 GGCCTACCGG CGGGCCCGGG CTCTAGACAA GCGCCCATCC AGCCCAGTGT
 701 CTGGGAGCTCT GGGCCCTGGG AGGTGGCTT GCTGTTGGAG CGAGGAAGGTG
 751 GAGGCTGAGG TCTCTGGAG ACTCTGACCC TGACCTGTA AGCTCTGGCT
 801 GGGCCCCCTC CTGAAATCCA CTGAGTACAG GATGGTATCT CCTACCTCC
 851 GCGCCCCCGG CGCCGCTCTG TCTCTCCCTGA GGTGGGGGGCT CAAGAGTAGG
 901 GUACCTACAG CTUGCTGGCG ACCCCATCCA ACCGTTGGGC CCAGGGAAAGC
 951 CTTCGATCCAG CGATCTAGGT CGAATACAGGCG GGGGTTGGGC CAGATGAGG
 1001 CTCTGGAGGT GGCTGAGGCG TGGGGGACTCT AGCTTGGGGC CTGGGGATCC
 1051 TGCGGAGGCT GGGAAACAGGT GCGCTCTCTG TGCGGAGTCAT CCTTGTGGCGA
 1101 AGAGGGAAAC GCGCAAGGAGA GCAAGGGAA GTCCTCCCAA ACAGGAGGAGA
 1151 CGAGGGAGGA CGCGCAAGAC TCGATGACTG GGAGGCTCTGG GAGAGGATGG
 1201 AGAGGCGTCA AGGAGGACCC TGAATGTTT AGCGGCGCGA TTCTTTAT (配列番号1-2)

Figure 11

【 図 1 2 A 】

ヒヒRAGE（クローン18.2）をコードするゲノムDNA配列

1 TTTTTTAAACTAATTTT GAAATTGGG GGGGGAAAGG TGGGAGGGAA
51 GTTATTGCGA AATATGTGTTA ATATGGGGTG GGCTCTCTGT ATATGTATCT
101 TCCCTCAATTG CCCCCAGAAAAT GGGGTTACCTT TTTCGTCACAC CAAATAACG
151 TGGTAGGGAGG AGGGAGGGGGG TTGGAAAGAA CGAACCTGGG GGGAAAGGTA
201 AARTCRACAC TGTCCCCATTC TGAACCTUAA ACCCTACCAT CTGATCCCC
251 CAGACATCTT CAGGAAATTG CAAAGACTGC AGAGCTGGGA ACCCTCTCCA
301 TTAAGGATTC GGGCAGGACT GGGGAGGAGT TGGAAGGGTG ATGGGTGGGG
351 GGGGGGGGGG CATGGGCTGG GGGGAGGTTCT CTCTCTACCT GTAAACTGT
401 GTAGTTTTCAG AGAAAAAAA CAARATGCGA TTAAATTAAGA AGAAGTTTCT
451 TTTTTTCTCGG GTGTTAGTGT AGAATTTTTT TCRAAAACAC TGAGAAACCC
501 CAGAAAAAAA AATATATTTT TTCTTCACCG AAGCTCCAA CAGGGTTTCTG
551 TCTTGTCGCCA CAGGCCCTGGC TTCAAGGAGC AGTCCCAATT GCACCCCTTG
601 AAACACAGCT CTGGCCCTCAAC CGCTTATGAT GCACCCCTGC CGAACCTCACA
651 TGGGGGCTTCGA GTGGGGTCAAC AGGGAGGCTCT GATGGGACTGA TGGAATAAAT
701 AGGGATAGGGG GCTCTGGGGG AATGAGACCC TAGAGGGTAC ACTCCCCCAC
751 CCCCGGGGAA GTGACTGTGTG CGAGGGCTG STAGTGCCCC GGGGGGGGGG
801 GATATTTTAT TCTCTGTAC CTGAAGGAGCT CTGGTCCCCA AGGGCTGTAT
851 TCTCTGCAAT CCTCTGTGACA AGATGACTGAA AGATGAGGGGG CTGGAGAGAG
901 GGTRACAGGGC CCACCTAGGG CGGAGGGCCAC AGCCGCGGGKA GGGGGAGACA
951 GRGCTTAAGG CCTGGAAAGGA AGCAGGAGTG CAGGGCGGAC AGCAGTTGGG
1001 GCCTGGGTCTC TGCTCTTCAGC TCTGTGGGGT GAGGCCACTCC CCCCCACCCG
1051 TGACCCCTTCG TACAGAAAGC ACTTGAAACCC CATAACCCCGA TTGCCCCCTAGA
1101 ACTTTTCCCA GAAACCGGGG AACCTGTTTT CAAGGTTCCG CACGGCACCT
1151 GTCCTAAATTG TGTTAGGCGT CATTACCTTC CTGCCCCCTG ACCAGGATGCG

Figure 12A

【図12B】

HHRAGE (クローン 18, 2) をコードするゲノムDNA配列(続き)

1201 TGTCCTCCCG CGGGCACTAGT AGGTGCTCAA AACATCACAC CCCGGGATCGG
1251 TGAGGCCACTG GTGCTGAAAGT GAAAGGGGGCCC CCCAACAGAA CCACCCAGC
1301 AGCTTGGAATG GAAACTGTTA AGTGGGGGGTC CTGTTGGAGC TTCCCAACTT
1351 CCAGGGGAGAC CAGCAGTGTG TGGATTCGCC ATCACTCTGC CTGACAGTAC
1401 TTTCCTCAGG GCCTTCACGT GTTGTAGGCCG TCTTCTCTG CTTCCTAGAAAT
1451 ACAGGGCGGA CAGAGGCTTC GAAGGGCTTA TCTCCCGGAGG GAGGGGGCTTG
1501 GGATAGTGTG GCTGCGTGTCC TCCTAACCGG CTCCCTCTTC CTGGGGGGCTG
1551 TCGGGGATCCA GGAAGGAGGGG ATTTCCTGCTT GCGAGGCGAT GAAAGGGAAT
1601 GGAAGGGAGA CCAAGTCGAA TCAACGGGGTC GGTGTTTACG GAAAGGATTG
1651 CAGHGTCTTC TCCAGGGCCC CCTCTCTTAT CTAGAANAAA GCTTCACCG
1701 CTAGCTCTGG CCCCAGGGG CCTCTGACTT CCATGGGCC CATTCCTCCAA
1751 CACAGAGTT GAGAACCTTC ACATAATACG CCTCTGATTTG GATTTTTCTT
1801 TCTTCAGAGA TTCTGGGAA CGGGGAAATT ATAGATTCCTG CCTCTGAACTT
1851 CACGGCTGGT GTTCCCAACAA ATGGTAGTGA AGAGGGAGGA AGTAAAGAATT
1901 GGTCTCTGTA ACAGGGGGCG AGTGTGTTG GGTCTCTGGC ATCTCTCATTT
1951 TTCAAGGGAT TCTGGGGTCA CCCTCTCTTC CCCAGGGGG GACATGTTG
2001 TCTAGGGGAA CCTACCTTC AGGGTTTCTT AGCTGGACT TGGATGAGGAA
2051 GCGCTCTGGT CCTAATGGAGA AGGGTGGAGTC CGAAAGGTTCC CGGGCAAGCTG
2101 CCTCTCTGCT AGCTTCACTC CTCRACCCCA CCTGGGATRA TTGTCTTCTT
2151 CCTCTTACCA TAGKJAGTACT TGTAGGGAA GAGGCGGG GACACCTGAA
2201 GCGGGGGGTC TTCAACTCTG AGTGGGAGGT ATGGTGGACG CGGGGGGGGG
2251 GAGGGAAATCC GCACTCCCAAGG TTCTCTCTGA GGTTCAGGCC AGGGCTTCTCC
2301 CGAGGGCGGG CCTGGCACAC AGGGCTTCTAC CGGGGGGGTCTG GGGGGGGGAA
2351 GCGAGGGTGG GGAGGGGGTC AGGGTCACTG GAGGGGATTC TGGAGGGTGG

Figure 12B

【図12C】

ヒヒ目AGEE(クローン1.8-3)をコードするDNA配列(続き)

2401 ACCTCCCTGGG ARAGAGGGSAG TCGAGGCCAT GGCCTACTGG ATCACTCACA
2451 AGTGTAACTC TCGCCCTCAT AACCTTTCCA ACTCCGAGG CTCGAGGCTCT
2501 TGGGGGGGKT CCAGTTGGTG STAGAGGCTG AGAGGTTGGG AGTAGGCTCT
2551 GGTRRRAACCGG TTAACCTTAC CTGTCGAATCT CCTTCACCGG CCTCTCTCTA
2601 GATCCACTTG ATGAGGAGATG TTAGGTGACCT GGAGAGGAGG GCTGGGGAGGT
2651 AGGGGTGARCC ATTAACTAGCC AACGGGGGGG CAGAGGCTCA ACCGGGGGAA
2701 GGCACCTAG GAGCTGAGGA CGAGGAGGGT GTATTGAGG ATGTTGGAGAC
2751 AAAAGAGTAA GAGTTTGTAA ATGAGTCTCTT CTCCCCCTTC CCCACCRGGG
2801 TGTGCGCTTA CCCTCTTCCTC CAAGCCCTGT GCTGATCTTC CCTGAGATAG
2851 GGGGTCAGGG CAAGGGAAACCC TACAGGGTG TGCGCCACCA TCCGGACGCC
2901 GGGGCCCGGG AAAGCCCGTC TGTGCGCATC AGCATATCG GTGAGGACCTC
2951 TCTCCAGGC CTACAGAACCC TGGGGCTGGG GTGCGAGATA GCACRGGGCTC
3001 TAACTCTCTG CCACCATCTG GCTTCAACCC CGAGGCGAC CGACCCCTTC
3051 CCTTCGTTCA CCACACACCA AACCTTCTCT GGCCTACTCA ATTCCTGCA
3101 AGAGAGGAGC CAAGCTCTC CTCTTCCTCC TCTGAACTAA RAALAGGGAA
3151 AGACGGCTGG CGGGCTGGG TCAAGCTCTT ATACCCAAAC CTTGGGGAGG
3201 CTGGAGGCTG TGGATCTCTG GAGGTGAGGA GTTCAAGACG AGTGTGAGCA
3251 ACATGGAGGA ACCCCATTCG TAACTAAATAAC ACCAAATTTAG CGACTTGTGG
3301 TGTGAGGCTC CTGTAATCTC AGCTACTTGG GAGGCTGAGA CCGAAAGAA
3351 ATCTGACCCG GUGAGGCGCTA AGTGGCGGTT AGCGCAAGTC CTGCGATTC
3401 ATGCCAGCTT GGGCAACAGS AGCGAAACCT CATCTCAAA AAAAAAAAAA
3451 AAGAAAGGGAA AAGAGTCACAC TTGAGGCTCC ACTAAATTAAC CCTCTCTCAA
3501 CCCGGAGGTCT CCTCTTCTGAA CTGGAGCTCA CTGGCTCTTC CAGAACCAGG

Figure 12C

【図 12D】

ヒRAGE (クローン 18_2) をコードするゲノムDNA配列 (続き)

```

3551 CGAGGAGGCG CCACTTCAAG GTGAGGGGTT CTGAAAGTC AGGGAGCAG
3601 AAGATAGCCC CCACACATG TGACTGCAGG GATGGTCAC AGAAAGGA
3651 TGGT99CCGG CGCGCGTGGC TCAAGCTGT ATCTCCAGA CCTTGGGAGG
3701 CGAGGATGGG CGGATCCAGA GGTCAAGGAGG TGAGACCAT CCTGGCTAAC
3751 CAGCTAAAC CCCATCTCTA CCaaaaaaa ATACAAAAA CTAGGGGGCC
3801 GRCUTGGGGG CGCGCTGTAG TCCGAGCTAC TGGAGGAGG GAGGAGGAG
3851 CATGGGTTAA ACCCGGGAGG CGGAGCTTCG AGTGAGCTGA GATCCGGCA
3901 CTGACTUCG GCTGGCGCA CGAGGCCAGA CTCCATTCTA AAAAAGAAA
3951 AAAGAAAGKA AGAAATGTT GAGTGGTGGG GGCTGTGCTC TCATCTTCC
4001 CTGCTCTCC ACAGGCTCTG TGGAGGAGTC AGGGGGAGGA ACTCTAGCC
4051 TGGCCTGGGG GATCCCTGGGA CGCCCTGGGG CAGCGCTCT GCTCACTGG
4101 GTGCTCTGTG GCGCAAGGG CGGAGCGCAA CGAGAGAGA GTGAGGAGG
4151 GAAGGCCAGA CTCTCTGRC CTAGGGCTTC CAGGAGCGAA GTGAGGAGG
4201 ATGGGGGGTS GAAACGACAG GTGAGCAGCTT CTGACAAATC TTCTCTCTCA
4251 GGAGGCGT AGAAACCCAG GGAGAGAGG AGAGAGCTGC AGAGCTGAAT
4301 CAGTCGAGG AGCTTGAGG AGCTTGAGT GCTACTGAG GGCCTTGAGG
4351 GGCACACAGA GAGATCCAT CCTAGAGTC CCTTTCTCTG TTCCCTGAA
4401 CTGFTCTGGG CGCGAGCCAA CTCTCTCTG TATAACCCCA CCTTGCCCCAA
4451 CTTCCTCTA CAACAGAGC CGCCACACAT GATGAGTAA CCTCTGACAC
4501 ATCTTGCTCT TGTTGTTCTG TGTATATG TGTTGAGACAC AACCTCACCC
4551 CTACACCTTG GGGGGCTCTG AAGGAAAGGG ACTCACCCCC ACACTGACC
4601 AAACATCTAC TCAAGTTGGG GAGGAGATGC TTCTGTCAG AGAGGAGGG
4651 AGGAAGGTG GGGGCAACT TGGAAAGAGA TCCCATCAT ACATTCAAC

```

Figure 12D

【図 12E】

ヒRAGE (クローン 18_2) をコードするゲノムDNA配列 (続き)

```

4701 TTTTTTNTG AATTTTATT AAGGGAGGTA GTAGGGGGG GAAAGCATT
4751 ARGAGTCAGA ACCCATATTA GACTCTGGGG AGTGAATAAT TAATTTAAT
4801 CTATAAGATO GGAGT999999 AAGAGTCAGA GOGAGCTTTCG CCCCCCTTTC
4851 AGATCAATC CTAGAAATCA CGGAAGGCA AGACTTAAAGA GAGAAGRAAG
4901 AGATTCCTC ATTCATCCTT CCTTCCTTCA GGGAGAGAT TATAATGTTA
4951 CTGAGTGGC TTCTGAGGAG AGGGCTCTCC CATCTATGCA GAGACTTCAC
5001 TCTCTCTCC CAGAGTTTCG TGGAGATGT CCAGGGCTGG CCTTAGCCAA
5051 CGAAATAGA GAGGTCAGG CGTCCTCATCA GTAGGGAGG GTCAGAGGG
5101 ACCCCCCAATA CTGATCTCC TTCTGCTGAA GGTGGGCAGG AGGAGACAT
5151 AGCTCAATA CTGAGGAGCC AAAGAAAGAA GAGATGGGG AGAAACCGGA
5201 AGAGGANTC CTGCCAGCTG GAGGCCGGGT GACCCTCTCC CAGATCCACAA
5251 CCTGTGGGAG AGAGGAAACG TGTGAAACCA TATGTTCTA GGCTGGGAGG
5301 G (配列番号 1~5)

```

Figure 12E

【図 13】

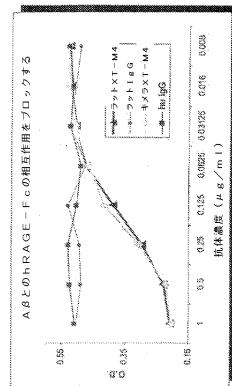


Figure 13

【図 14】

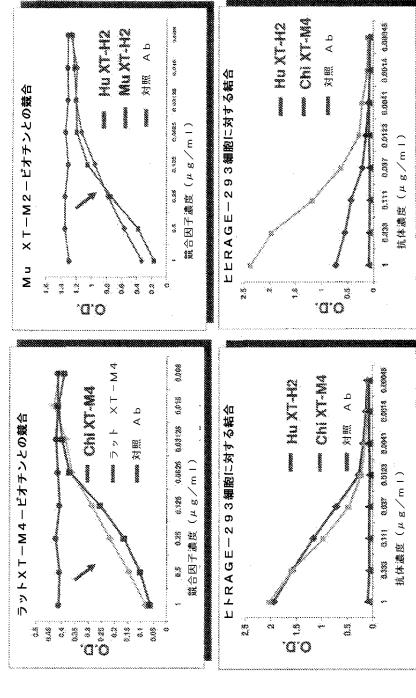


Figure 14

【図15】

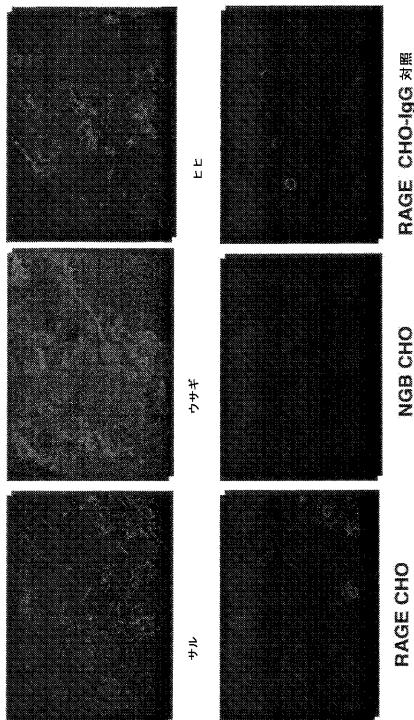


Figure 15

【図16】

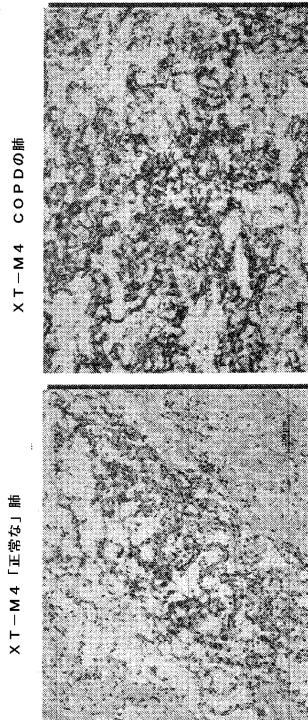


Figure 16

【図17】

ヒト化マウス×T-H2抗体VH領域のアミノ酸配列

1	50
XT-H2_HVH_V2_0	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT TYMMHHWVRQK PGQGLYNNIGY
XT-H2_HVH_V2_7	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT TYMMHHWVRQK PGQGLYNNIGY
XT-H2_HVH_V4_6	EVLQVLESGGG LVQPGGSSLRL SCRASGYTFT TYMMHHWVRQK PGKGLEENVAY
XT-H2_HVH_V4_1	EVLQVLESGGG LVQPGGSSLRL SCRASGYTFT TYMMHHWMSMV RQAPGKGLYW
51	100
XT-H2_HVH_V2_0	<u>INPSTGYTET</u> HQKFKDRVTM TADTSISTAY MELSLRLSDD TAVYYCARWA
XT-H2_HVH_V2_7	<u>INPSTGYTET</u> HQKFKDRVTM TRDKSISTAY MELSLRLSDD TAVYYCARWA
XT-H2_HVH_V4_0	<u>INPSTGYTET</u> HQKFKDRFTI SRDNAKNSLY LQMNGLKARD TAVYYCARWA
XT-H2_HVH_V4_1	VAYINPSTGY TEYNQKFKDR FTISADMAKS GLYLQMNSLR AEDTAVYYCA
101	150
XT-H2_HVH_V2_0	GTYIDYWQGG TLTVVSS (配列番号28)
XT-H2_HVH_V2_7	GTYIDYWQGG TLTVVSS (配列番号29)
XT-H2_HVH_V4_0	GTYIDYWQGG TLTVVSS (配列番号30)
XT-H2_HVH_V4_1	RWAGYTIDW QQGTLVVSS (配列番号31)

Figure 17

【図18】

ヒト化マウス×T-H2抗体VL領域のアミノ酸配列

1	50
XT-H2_BVL_V2_0	DVVLQTQPLS LSVTPQQFAS ISCKSTTKSLL NSDGFTYLDW YLQKPKQSPQ
XT-H2_BVL_V3_0	DIVMTQSPGS LSVSILGERAT INCSTTKSLL NSDGFTYLDW YQQKPKQOPK
XT-H2_BVL_V4_6	DIQMTQSPGS LSASVGDRVT ITCKSTTKSLL NSDGFTYLDW YQQKPKQAKP
XT-H2_BVL_V4_1	DVQMTQSPGS LSASVQDRVT ITCKSTTKSLL NSDGFTYLDW YQQKPKQAKP
51	100
XT-H2_BVL_V2_0	LLIYLVSDRE SGVPDRFSGS GSSTDPTLKI SVRVAEUVGV YYCFQSNSLPE
XT-H2_BVL_V3_0	LLIYLVSDRE SGVPDRFSGS GSSTDPTLTI SSLQAEDEVAV YYCFQSNSLPE
XT-H2_BVL_V4_0	LLIYLVSDRE SGVPDRFSGS GSSTDPTLTI SSLQPEDFAT YYCFQSNSLP
XT-H2_BVL_V4_1	LLIYLVSDRE SGVPDRFSGS GSSTDPTLTI SSLQPEDFAT YYCFQSNSLP
101	150
XT-H2_BVL_V2_0	LTFGGGTTKVE IJK (配列番号32)
XT-H2_BVL_V3_0	LTFGGGTTKVE IJK (配列番号33)
XT-H2_BVL_V4_0	LTFGGGTTKVE IJK (配列番号34)
XT-H2_BVL_V4_1	LTFGGGTTKVE IJK (配列番号35)

Figure 18

【図19】

ヒト化マウスX T-H2抗体VH領域のアミノ酸配列

XP-M4_hVH_V1.0 1 EVQLVESGGG LVQFGRSLRL SCVVSGFTFN NYWMTWIRQT PGKGLEWVAE
 XT-M4_hVH_V1.1 50 EVQLVESGGG LVQFGRSLRL SCAASGFTFN NYWMTWIRQA PGKGLEWVAE
 XT-M4_hVH_V2.0 EVQLVESGGG LVQFGRSLRL SCAASGFTFN NYWMTWIRQA PGKGLEWVAE

XT-M4_hVH_V1.0 51 INNSGENTTVY PDSVKDRFTI SDRNAKSTLY LQMNSLRSED TATYYCTRG
 XT-M4_hVH_V1.1 IDNSGENTTVY PDSVKDRFTI SDRNAKNSLY LQMNSLRSED TAVYYCARG
 XT-M4_hVH_V2.0 IDNSGENTTVY PDSVKDRFTI SDRNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARG

XT-M4_hVH_V1.0 101 DITTGFDYNG QGRNVTVSS (配列番号3-6)
 XT-M4_hVH_V1.1 DITTGFDYNG QGTLTVSS (配列番号3-7)
 XT-M4_hVH_V2.0 DITTGFDYNG QGTLTVSS (配列番号3-8)

Figure 19

【図20A】

ヒト化マウスX T-H2抗体VH領域のアミノ酸配列

XT-M4_hVH_V2.4 1 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.5 5 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.6 10 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.7 15 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.8 20 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.9 25 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.10 30 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.11 35 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.12 40 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.13 45 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.14 50 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.4 51 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.5 56 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.6 61 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.7 66 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.8 71 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.9 76 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.10 81 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.11 86 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.12 91 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.13 96 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR
 XT-M4_hVH_V2.14 101 DIQMTQSPSS LSASVGRDVT ITCRASQDVG IYVNNYQQKP GKAPKLLIVR

Figure 20A

【図20B】

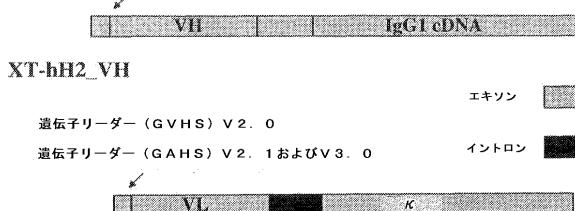
ヒト化マウスX T-H2抗体VH領域のアミノ酸配列(続)

XT-M4_hVH_V2.4 101 107 GTKVEIK (配列番号3-9)
 XT-M4_hVH_V2.5 GTKVEIK (配列番号4-0)
 XT-M4_hVH_V2.6 GTKVEIK (配列番号4-1)
 XT-M4_hVH_V2.7 GTKVEIK (配列番号4-2)
 XT-M4_hVH_V2.8 GTKVEIK (配列番号4-3)
 XT-M4_hVH_V2.9 GTKVEIK (配列番号4-4)
 XT-M4_hVH_V2.10 GTKVEIK (配列番号4-5)
 XT-M4_hVH_V2.11 GTKVEIK (配列番号4-6)
 XT-M4_hVH_V2.12 GTKVEIK (配列番号4-7)
 XT-M4_hVH_V2.13 GTKVEIK (配列番号4-8)
 XT-M4_hVH_V2.14 GTKVEIK (配列番号4-9)

Figure 20B

【図21】

遺伝子リーダー(GVHS)



XT-hH2_VH

エキソン



遺伝子リーダー(GVHS) V2.0

遺伝子リーダー(GAHS) V2.1およびV3.0

イントロン



XT-hH2_VL

構造物		COS発現 μg/ml/24時間	混合ELISA ED.O.p.M
VH (マウス-ヒトへ変更)	VL (マウス-ヒトへ変更)	2.056	6.11
WT	WT	5.75	6
(R60, Y46, A71, K73)	(R60, Y46, A71, K73)	4.15	6
(V2.1)Y46E	(V2.1)Y46E	5.5	6
(V2.3)Y46E	(V2.3)Y46E	2.6	6
(V2.4)A71S	(V2.4)A71S	1.8	6
(V2.5)K73I	(V2.5)K73I	2.9	6
(V2.1)(R60, Y46E)	(V2.1)(R60, Y46E)	2.465	6
(V2.0)(V2.1, 546, 646)	(V2.0)(V2.1, 546, 646)	4.58	7
WT	WT	3.76	6
(R60, Y46, A71, K73)	(V2.0)(V2.1, 546)	4.195	4
(V2.1)R60D	(V2.0)	4.205	4
(V2.2)Y46E	(V2.2)	5.44	4.5
(V2.3)Y46E	(V2.3)	2.32	5
(V2.4)A71S	(V2.4)	2.26	5
(V2.5)K73I	(V2.5)	2.405	5
(V2.1)(R60, Y46E)	(V2.0)	7.5	7
(V2.0)(V2.1, 546, 646)	(V2.1)	4.01	4.0
(R60, Y46, A71, K73)	(V2.1)(R60, Y46E)	2.01	5
(V2.1)R60D	(V2.1)	3.28	7.5
(V2.2)Y46E	(V2.2)	2.365	5
(V2.3)Y46E	(V2.3)	2.22	5
(V2.4)A71S	(V2.4)	2.45	5
(V2.5)K73I	(V2.5)	2.405	5
(V2.1)(R60, Y46E)	(V2.1)	4.01	5
(V2.0)(V2.1, 546, 646)	(V2.0)	1.435	6
(R60, Y46, A71, K73)	(V2.0)DP24 grafted	2.11	5
(V2.1)R60D	(V2.1)	2.125	5
(V2.2)Y46E	(V2.2)	2.175	5
(V2.3)Y46E	(V2.3)	1.73	5
(V2.4)A71S	(V2.4)	1.69	5
(V2.5)K73I	(V2.5)	1.39	4.3

Figure 22

Figure 21

【 図 2 3 】

備考欄							実験結果		
1：1結合 (Langmuir モデル - 全体的分析)			T100 - 070125				定常圧の吸着性		
	振幅	Ka	kd	KD	Rmax	KD	(M)	(RU)	(M)
chi-XT-M4	FC2	3.49E+06	2.81E-02	8.20E-09	20.9				1.1E-08
	FC3	3.70E+06	2.71E-02	7.33E-09	31.1				1.1E-08
	FC4	6.11E-06	5.05E-02	8.2E-09	27.3				1.1E-08
平均	-	4.41E+06	3.51E-02	7.91E-09	-				1.1E-08
XT-M4-V10	FC2	3.06E+05	9.72E-03	3.18E-08	11.9				2.5E-08
	FC3	3.12E+05	5.69E-02	1.82E-08	5.8				2.4E-08
	FC4	3.47E+06	7.04E-02	2.0277E-08	27.9				2.6E-08
平均	-	2.30E+06	4.57E-02	2.34E-08	-				2.5E-08
XT-M4-V11	FC2	2.5E+06	3.3E-02	1.3E-08	24.8				1.6E-08
	FC3	3.4E+06	3.9E-02	1.2E-08	30.8				1.5E-08
	FC4	3.2E+06	4.1E-02	1.3E-08	25.9				1.7E-08
平均	-	3.01E+06	3.74E-02	1.25E-08	-				1.6E-08
XT-M4-V14	FC2	2.66E+06	3.66E-02	1.38E-08	23.6				1.6E-08
	FC3	3.96E+06	6.44E-02	1.17E-08	31.9				1.5E-08
	FC4	5.02E+06	6.61E-02	1.31552E-08	26.3				1.6E-08
平均	-	3.88E+06	4.97E-02	1.29E-08	-				1.6E-08

Figure 23

【 図 2 4 】

SA-MU PAGE 1 : 総合						
Langmuir モデル－全般的な分析－						
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)		
流体	フローセル					
	FC2	2.2E+06	4.2E-03	1.9E-09	33.5	
chi-XT-M4	FC3	2.1E+06	4.1E-03	1.9E-09	39.1	
	FC4	2.1E+06	4.1E-03	2.0E-09	31.7	
平均		2.1E+06	4.1E-03	1.9E-09		
	FC2	2.6E+06	7.8E-03	3.0E-09	32.9	
XT-M4-V10	FC3	2.6E+06	7.6E-03	2.9E-09	38.7	
	FC4	2.6E+06	7.8E-03	3.0E-09	31.1	
平均		2.6E+06	7.7E-03	3.0E-09		
	FC2	2.2E+06	4.3E-03	2.0E-09	32.6	
XT-M4-V11	FC3	2.1E+06	4.2E-03	2.0E-09	38.2	
	FC4	2.0E+06	4.1E-03	2.0E-09	30.7	
平均		2.1E+06	4.2E-03	2.0E-09		
	FC2	2.2E+06	4.3E-03	2.0E-09	29.6	
XT-M4-V14	FC3	2.1E+06	4.0E-03	1.9E-09	34.6	
	FC4	2.1E+06	4.1E-03	2.0E-09	27.8	
平均		2.1E+06	4.2E-03	2.0E-09		

Figure 24

【 図 2 5 】

【 図 27 】

マウスXT-H2 VL-VH ScFv構築物

ラット X T-M4 Y L-Y H S c E x 構築物

Figure 25

【 26 】

マウスXT-H2 VH-VL ScFv構築物

G T G G G C A D G G G G C C G C A C T C G G A C T C C A G A T G A C C O C A G T G G C C C C T C T C T C G
 T C G C T C T G G C G C A G A G T G A C C A T C C T G G C C G C T C T G G A T T G G G A T C
 T A C G T G A C T G G T T G C A C G A G T G C G C A G G T C C G C G C G C T G A T C T C G G G G C
 A C C A E C T B G C C G A T T G G C G C A C T C C T G G A C T T T C G C G C T C T G C T C T G G C A C C G A T T T C
 A C C G T G A C C A T C C T G G C G C A C T C C T G G A C T T T C G C G C T C T G C T C T G G C A C C G A T T T C
 G A G A G E A C C C T T G A C M T T G G C C A C G C G C A C T C C T G G C G C A C C A T C T O C C G G T G A G T G A
 T C G G G G G T G G T G A C T T G A G G A G G T G G A G A G I C T C T G A G G T G C G A C G T G G G G G T G A G T G C
 G C G C G C G T G G T G A G C C G G G G G C T C T G A G G T G C G C T G G C C C G C C G C T C T G A C
 T T C A C A C A T C G G T G A T C A C T G G G G G G C G C A G G C C C C T G G A C A G G C U C T G G A G G F G G T G
 G C C T C A C A A C T C C G G C G A C A C A C C T A C C C C G C A C T C C G G C C T G G A A G G A C G G T T C
 A C C A T C C T G G G G G G A C A C C G G C G A A G T C C C G T A C T C C G G C G A C T C C G G C C
 G A G T A T C C G G G G G T A C T C A C T G G T G A G G G C C G C T G A C C T G G A T C T C C G G G G C
 T G G G G C A G G C A C C G C T G G A C G C T G G C C T G A C C T G G A T C C A C C G G C C T G A C T C
 T G G G G C A G G C A C C G C T G G A C G C T G G C C T G A C C T G G A T C C A C C G G C C T G A C T C
 (配列番号 54)

Figure 26

【図 28】

ラットX T-M4 VH-VL ScFv構築物

```

GTGGGCCAGCGCCGGGGGGGCACTCGAGGTGAGCTGGTGGAGCTGGCGCGGACTG
GTGCAAGCTGGCGGCTCTGAGACTGTCCTTGCGCCCTCGGGCTCACCTCAACAAAC
TACTGAGACTGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGTGGCGCTCATC
GACAACCTGGCGAACACACCTACTACCCGACTCCGTGAAGGGACCGGTTACACATCTCC
AGGGACACCGCAAGAACTCCCCGTACCTTCAGATGAACCTCTGAGGGCCCGAGATACCC
GGCTGTGACTACTGTGCGAGGGGGATATCACCAACCGGCTTCGACTACTGGGCCAG
GGCACCCCTGGTGACCTGGTCTCTGATGGCGGTGATCGGCGGTGATCTGGAGGA
GGTGGAACTCTGACATCCAGATGACCEAATCCCCCTCTCTGCTGGCAGGTTACCCYCTCC
TCCCCTGAGGATTTCGGCACTACTGCTGAGTGGAGGACGGACCCYCTG
ACCTTGGCGGGGAACAAAGTGGAGATCAAGTGTGATCAGGCCCTAGGGGG (配列番号53)
774 bp

```

Figure 28

【図 29】

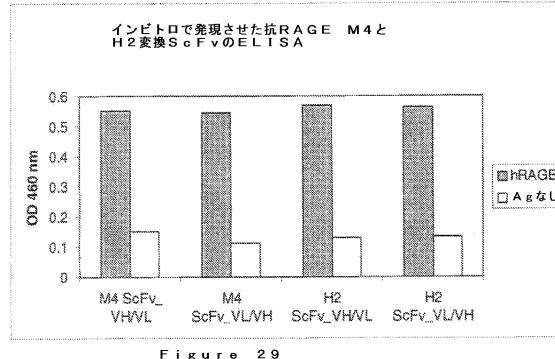


Figure 29

【図 30】

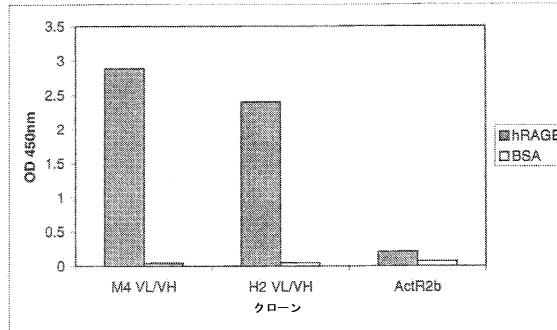


Figure 30

【図 31】

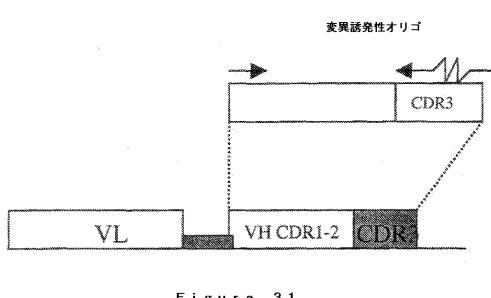


Figure 31

【図 32】

X T-M4 ScFv-VL/VH形式のC末端
-VH-CDR3に下線を付けた

```

L R A E D T A V Y Y
1 CTGGAGGCCAGGATACTACCGCGGTTACTAC
GACTCCGGCTCTATGCGCGCAGATGATG
C A R G G D I T T G
31 TGTCGCGAGGGCGCGGNTACACCGCGC
ACACGSGTTCGCGCGCTATGTCGCG
F D Y W G Q G T L V
61 TTDGACTACTGCGGCGAGGCGACCTGGTG
AAGCTGATGACCCCGGCTCCGTTGAGACAC
T V S S D Q A S S
91 ACCGTTGCTCTCTGATCTGGCTCAAGG
TGGCGCGGAGAGACTAGTCGGGAGTCC
Z (配列番号56)
121 GCC (配列番号56)
CGG

```

M4-VL/VHのVH-CDR3突然変異誘発のための
スパイクオリゴマスクレオチド

```

5' cgggttgc GGC CCC TGA GGC CTG ATC AGA GGA CAC GGT CAC CAG GGT GGC CTG ACC
CCA 241_243_231_223_224_224_214_143_233_233_TCT GGC ACG GTA GTC C 3'
(配列番号57)

```

```

5' cgggttgc CAG GGT GGC CTG GGC CCA 241_243_231_233_224_224_214_143_233_233
TCT GGC ACG GTC C 3' (配列番号58)

```

下線を付けた配列は、8.2%の野生型スパイクレオチドと残っている他の3つのスパイクレオチド各6%の割合でスパイクした配列を示す。

is of 8.2% wild-type tides

1 = A = 8.2% (野生型) + 6% C + 6% G + 6% T
2 = G = 8.2% (野生型) + 6% A + 6% C + 6% T
3 = C = 6% (野生型) + 6% A + 6% G + 6% T
4 = T = 6% (野生型) + 6% A + 6% C + 6% G

スパイク比は、10残基あたり、平均で3.2の変異を生じる

10 residue

Figure 32

【図33】

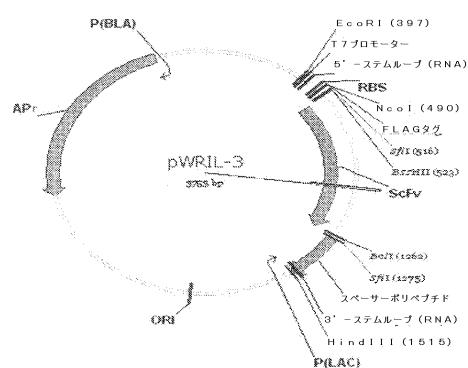


Figure 33

【図34】

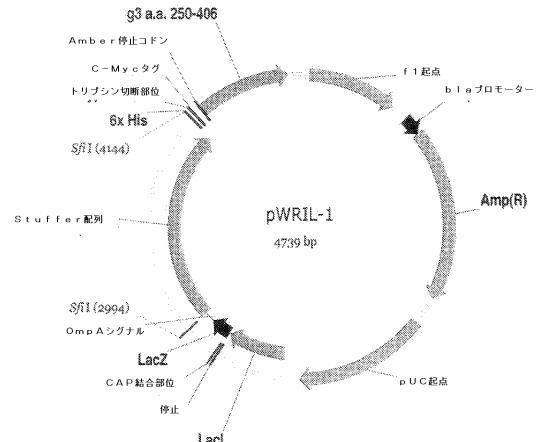


Figure 34

【図35】

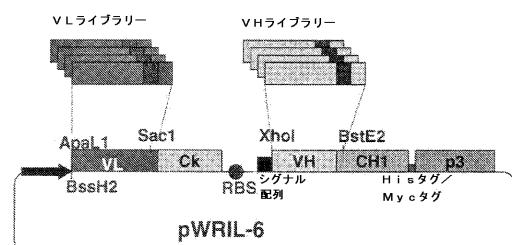
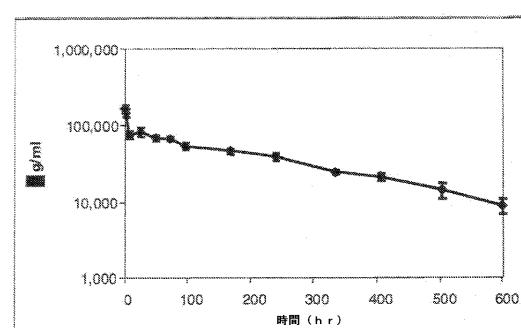
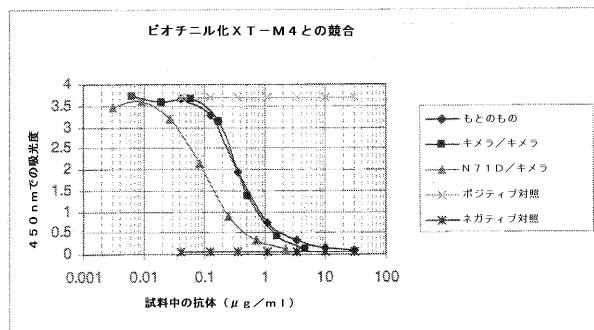


Figure 35

【図37】



【図36】



N52D (標識したN71D) は、HCのCDR2の中のグリコシル化変異である

Figure 36

Figure 37

【図 3 8】

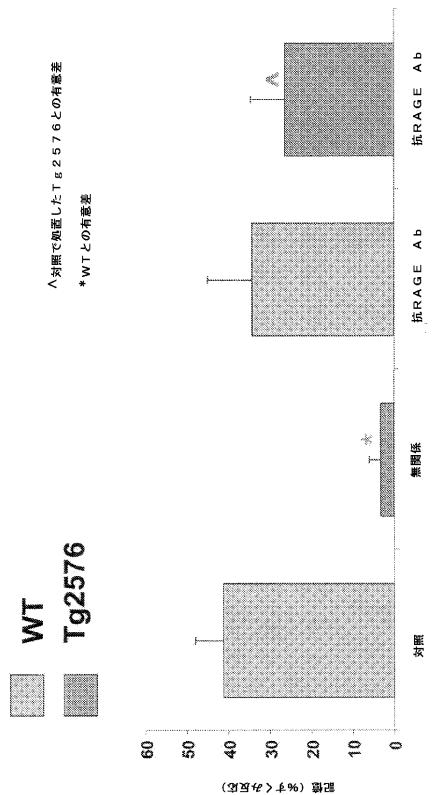


Figure 38

【配列表】

2009530423000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				
				International application No PCT/US2007/064571
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C07K16/46 C12N15/13 A61K39/395 A61P25/28 C07K19/00 ADD. C07K14/705 <small>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</small>				
B. FIELDS SEARCHED <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> C07K C12N A61K A61P				
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small>				
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)</small> EPO-Internal, Sequence Search, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
X	LUE L-F ET AL: "PREVENTING ACTIVATION OF RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION ENPRODUCTS IN ALZHEIMER'S DISEASE" CURRENT DRUG TARGETS. CNS & NEUROLOGICAL DISORDERS, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, HILVERSUM, NL, vol. 4, no. 3, June 2005 (2005-06), pages 249-266, XP009058262 ISSN: 1568-007X the whole document ----- -/-			1-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<small>* Special categories of cited documents :</small> <ul style="list-style-type: none"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *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 				
<small>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</small>				
<small>*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</small>				
<small>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</small>				
<small>*&* document member of the same patent family</small>				
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
4 December 2007		20/12/2007		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Luyten, Kattie		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/064571

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEANE RASHID ET AL: "RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain." NATURE MEDICINE JUL 2003, vol. 9, no. 7, July 2003 (2003-07), pages 907-913, XP002460976 ISSN: 1078-8956 cited in the application the whole document	1-43
X	LUE L F ET AL: "Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism." EXPERIMENTAL NEUROLOGY SEP 2001, vol. 171, no. 1, September 2001 (2001-09), pages 29-45, XP002460977 ISSN: 0014-4886 the whole document	1-43
X	WO 97/26913 A (UNIV COLUMBIA [US]) 31 July 1997 (1997-07-31) page 25 – page 44; claims 1,9,16-26,36,43-48; figures 4-11	1-43
A	YAN SHI DU ET AL: "Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 6, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 643-651, XP002316616 ISSN: 1078-8956 cited in the application the whole document	1-43
A	WO 01/12598 A (UNIV COLUMBIA [US]; STERN DAVID [US]; YAN SHI DU [US]; SCHMIDT ANN MAR) 22 February 2001 (2001-02-22) the whole document	1-43
L	WO 2007/109747 A (WYETH CORP [US]) 27 September 2007 (2007-09-27) L: double patenting the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/064571

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-43 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/064571

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9726913	A	31-07-1997	AU	1832797 A		20-08-1997
WO 0112598	A	22-02-2001	AU	6766800 A		13-03-2001
			CA	2382095 A1		22-02-2001
			EP	1307219 A2		07-05-2003
			JP	2003507013 T		25-02-2003
WO 2007109747	A	27-09-2007	WO	2007109749 A2		27-09-2007

フロントページの続き

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

(72)発明者 ジェイコブセン, ジャック スティーブン
アメリカ合衆国 ニュー ジャージー 07446, ラムジー, マルベリー ロード 229
, アパートメント ナンバー 6

(72)発明者 タン, シヤン - ヤン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01867, レディング, ガゼボ サークル 811

(72)発明者 チスティアコバ, リウドミラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01810, アンドーバー, アボット ブリッジ ドラ
イブ 19

(72)発明者 コダンガッティル, スレクマー ラマン
アメリカ合衆国 コネチカット 06498, ウエストブルック, ケン ローズ テラス 3
0

(72)発明者 ウィドム, アンジェラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01720, アクトン, チェロキー ロード 19
F ターム(参考) 4C085 AA13 AA14 AA16 AA33 BB31 BB36 CC02 CC13 DD61