

(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.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A V	4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
	A 6 1 K 39/395 N	
	A 6 1 P 25/28	

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)	(71) 出願人	591011502
(86) (22) 出願日	平成19年3月21日 (2007.3.21)		ワイス
(85) 翻訳文提出日	平成20年11月18日 (2008.11.18)		W y e t h
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/064571		アメリカ合衆国〇794〇-〇874ニュー
(87) 国際公開番号	W02007/109749		ージャージー州マディソン、ファイブ・ジ
(87) 国際公開日	平成19年9月27日 (2007.9.27)		ラルダ・ファームズ
(31) 優先権主張番号	60/784, 575	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成18年3月21日 (2006.3.21)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/895, 303		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成19年3月16日 (2007.3.16)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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、R A G E に特異的に結合して、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) R A G E に対する結合について、X T - H 1、X T - H 2、X T - H 3、X T - H 5、X T - H 7、および X T - M 4 からなる群より選択される抗体と競合する、
 - (b) X T - H 1、X T - H 2、X T - H 3、X T - H 5、X T - H 7、および X T - M 4 からなる群より選択される抗体が結合する、R A G E のエピトープに結合する、
 - (c) X T - H 1、X T - H 2、X T - H 3、X T - H 5、X T - H 7、および X T - M 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、
- 請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記抗体または R A G E 結合抗体断片に、

X T - M 4 軽鎖可変領域の C D R を含む軽鎖可変領域 (配列番号 1 7)、

X T - M 4 重鎖可変領域配列の C D R を含む重鎖可変領域 (配列番号 1 6)、

ヒト 軽鎖定常領域、および

ヒト I g G 1 重鎖定常領域

30

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 R A G E 結合断片に、

X T - M 4 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 1 7)、

X T - M 4 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 1 6)

)、

ヒト 軽鎖定常領域、および

ヒト I g G 1 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 R A G E 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。

【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。

【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)、

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)

)、

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

10

20

30

40

50

工程が含まれる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 23】

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 24】

前記被験体がヒト被験体である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

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 23 に記載の方法。

10

【請求項 26】

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 25 に記載の方法。

【請求項 27】

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 25 に記載の方法。

【請求項 28】

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 23 に記載の方法。

20

【請求項 29】

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 28 に記載の方法。

30

【請求項 30】

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 29 に記載の方法。

40

【請求項 31】

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 23 に記載の方法。

【請求項 32】

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 31 に記載の方法。

【請求項 33】

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 23 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って、被験体に、R A G E に特異的に結合して、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、方法。

【請求項 3 5】

前記被験体がヒト被験体である、請求項 3 4 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 3 4 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 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

前記抗体が、

(a) R A G E に対する結合について、X T - H 1、X T - H 2、X T - H 3、X T - H 5、X T - H 7、および X T - M 4 からなる群より選択される抗体と競合する、

(b) X T - H 1、X T - H 2、X T - H 3、X T - H 5、X T - H 7、および X T - M 4 からなる群より選択される抗体が結合する、R A G E のエピトープに結合する、

(c) X T - H 1、X T - H 2、X T - H 3、X T - H 5、X T - H 7、および X T - M 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、

20

請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記抗体または R A G E 結合抗体断片に

X T - M 4 軽鎖可変領域の C D R を含む軽鎖可変領域 (配列番号 1 7)、

X T - M 4 重鎖可変領域配列の C D R を含む重鎖可変領域 (配列番号 1 6)、

ヒト 軽鎖定常領域、および

ヒト I g G 1 重鎖定常領域

が含まれている、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記抗体またはその R A G E 結合断片に、

X T - M 4 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 1 7)、

X T - M 4 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 1 6)、

)、

ヒト 軽鎖定常領域、および

ヒト I g G 1 重鎖定常領域

が含まれている、請求項 3 9 に記載の方法。

30

【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 3 4 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 4 1 に記載の方法。

40

【請求項 4 3】

前記抗体またはその R A G E 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 3 4 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

50

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。

【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)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(神経原繊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つの繊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の直径までのまとまりのない神経網の系の領域である。脳の中でのアミロイド斑の蓄積は、ダウン症や他の認知障害(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。

【0004】

- アミロイドペプチドまたはA_β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_β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_β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_β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_βの生産の阻害またはA_βのクリアランスの増大によるA_β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。

【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、パリン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_β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_βの量の増加を生じるAPPのプロセシング(すなわち、A_β1-42およびA_β1-43))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_βの増量を生じるように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。

【0006】

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A β 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PDAPP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価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、繊維性の毒性のある 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、脳の中のプラーク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。PDAPP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-脳関門を通過してプラークに結合し、すでに存在しているプラーク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（Bard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）。

【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。

【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

10

20

30

40

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-M

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、単鎖抗体、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、単ドメイン抗体、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 63) 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、ヒヒ、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。

【0022】

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。

【0023】

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 2003/0118592、同 2003/0133939、同 2004/0058445、同 2005/0136049、同 2005/0175614、同 2005/0180970、同 2005/0186216、同 2005/0202012、同 2005/0202023、同 2005/0202028、同 2005/0202534、および同 2005/0238646 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. 2005/0136049、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。

【0024】

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)。

【0025】

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、11、または 13 に示されるアミノ酸配列を有している、ヒヒ、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、11、または 13 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、11、または 13 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 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有している R A G E タンパク質も含まれる。

【0026】

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

R A G E 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 R A G E 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。

【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LEMENT (an element)」は、1 つのエLEMENT または 1 つ以上のELEMENT 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いないようにすることもできる。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。

【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、F a b、F (a b ')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 I L 1 3 結合および / または低い F c R 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处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ができる。例示的な断片としては、F a b、F a b '、F (a b ')₂、F a b c、F d、d A b、ならびに、s c F v および / または F v 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

10

20

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、ヒトとヒト以外の霊長類、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「単鎖免疫グロブリン」または「単鎖抗体」（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、鎖間ペプチドリッカーによって安定化させられている。用語「ドメイン」は、例えば、₁ - プ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「FR」が間に散りばめられている「相補性決定領域」すなわち「CDR」が含まれる。

10

【0039】

用語「立体構造」は、タンパク質またはポリペプチド（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пит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пит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に意図され、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。

20

「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пит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に相当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пит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пит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。

30

【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BIACORE（登録商標）法によって測定することができる。BIACORE（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。

40

【0042】

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

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】

$A b + A g$ $A b - A g$ および $A b - A g$ $A b + A g$
 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、 $R A G E$ 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 $R A G E$ 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、 $R A G E$ タンパク質へのそれらの結合についての K_d に関して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 $\pm 20\%$ 、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) のクローン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ン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、 $R A G E$ 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 $D N A$ 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、 $F a b$ 、 $F a b'$ 、 $F (a b')_2$ 、 $F a b c$ 、 $F d$ 、 $d A b$ 、 $F v$ 、単鎖、単鎖抗体 (例えば、 $s c F v$ および単鎖ドメイン抗体) (Muyldermansら、2001、26:230-5)、ならびに単離された相補性決定領域 ($C D R$) が挙げられる。 $F a b$ 断片は、 $V L$ 、 $V H$ 、 $C L$ 、および $C H 1$ ドメインからなる1価の断片である。 $F (a b')_2$ 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 $F a b$ 断片が含まれている2価の断片である。 $F d$ 断片は、 $V H$ ドメインと $C H 1$ ドメインからなり、 $F v$ 断片は、抗体の1つのアームの $V L$ ドメインと $V H$ ドメインからなる。 $d A b$ 断片は $V H$ ドメインからなる (Wardら、(1989) *Nature* 341:544-546)。 $F v$ 断片の2つのドメイン ($V L$ と $V H$) 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、 $V L$ 領域と $V H$ 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 $F v$ ($s c F v$)) 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、 $V H$ ドメインと $V L$ 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

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 (K i p r i y a n o v , S . M . ら、(1 9 9 5) H u m a n A n t i b o d i e s a n d H y b r i d o m a s 6 : 9 3 - 1 0 1)、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 (K i p r i y a n o v , S . M . ら、(1 9 9 4) M o l . I m m u n o l . 3 1 : 1 0 4 7 - 1 0 5 8) 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、S o n g s i v i l a i ら、C l i n . E x p . I m m u n o l . 7 9 : 3 1 5 - 3 2 1 , 1 9 9 0 ; K o s t e l n y ら、1 9 9 2 , J . I m m u n o l . 1 4 8 , 1 5 4 7 - 1 5 5 3 を参照のこと。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

用語「逆変異 (b a c k m u t a t i o n)」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な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 1 0、好ましくは 1 2 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。

【 0 0 4 7 】

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 2 5 k D a の 2 つの軽 (L) 鎖と、それぞれがおよそ 5 0 k D a 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、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、および I g 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 (V L) と定常 (C) ドメイン (C L) から構成されている。個々の重鎖は、N 末端の V ドメイン (V H)、3 個または 4 個の C ドメイン (C H)、そしてヒンジ領域から構成されている。V H に最も近い C H ドメインは、C H 1 と命名されてい

る。VHドメインとVL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(FR1、FR2、FR3、およびFR4)。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、H1、H2、およびH3と呼ばれ、一方、軽鎖上のCDR構成成分は、L1、L2、およびL3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、H3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、VH、CL、VL、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、VH、VL、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。

【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VH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VL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VH-VL対合に基づく、 1.6×10^7 種類までの様々な抗体を産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できると考えられる(Immunoglobulin Genes, 第2版, (1995) Jonio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。

【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。

【0050】

用語「ヒト抗体」には、Kabata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(Kabataら, (1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health

10

20

30

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、またはインビボ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III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) *Nucl. 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（Kabatt, 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、インビボ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、インビボ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、またはヒト以外の霊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

20

【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。

【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と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でき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 사용할 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-Waterman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. Biol. 70: 173-187 (1997)を参照のこと。また、Needlenan 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、MPSRCH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。MPSRCH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-Waterman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

30

【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、Koyamara, 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)とも逆相関している。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。

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、Neeperr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。Neeperr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増量剤、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）Ringier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

30

【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産生するためには、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

して骨髓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)、または抗原結合に關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

30

【0079】

相補性決定領域 (CDR) は、抗原結合に關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。Kabatt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、Kabatt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、Kabatt、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。Kabatt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) (Kabatt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) (Kabatt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 -

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 Chothic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(veneer ing)、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抗体を産生するために、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(veneered 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いう理解を前提とする。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させるために、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クローンのサブグループV I I I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。

【0091】

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

【0092】

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、そして抗体の生体内分布を変化させることができる。（R e f f ら、（2002）C a n c e r C o n t r o l 9 : 1 5 2 - 6 6）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、イントロン配列が欠失させられる場合がある。

20

【0093】

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、H a r l o w & L a n e (1 9 8 8) A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N e w Y o r k、および米国特許第 4 , 1 9 6 , 2 6 5 号；同第 4 , 9 4 6 , 7 7 8 号；同第 5 , 0 9 1 , 5 1 3 号；同第 5 , 1 3 2 , 4 0 5 号；同第 5 , 2 6 0 , 2 0 3 号；同第 5 , 6 7 7 , 4 2 7 号；同第 5 , 8 9 2 , 0 1 9 号；同第 5 , 9 8 5 , 2 7 9 号；同第 6 , 0 5 4 , 5 6 1 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 価抗体（H₄L₄）は、例えば、P C T 国際公開番号 W O 0 2 / 0 9 6 9 4 8 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（W o l f f ら、（1993）C a n c e r R e s . 5 3 : 2 5 6 0 - 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（S t e v e n s o n ら、（1989）A n t i c a n c e r D r u g D e s . 3 : 2 1 9 - 3 0）、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

40

【0094】

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（s a l v a g e r e c e p t o r b i n d i n g e p i t o p e）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 , 7 3 9 , 2 7 7 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 2 4 1 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。A n g a l ら、（1993）M o l . I m m u n o l . 3 0 : 1 0 5 - 1 0 8 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

50

とにおける効率を最適化させ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ル化イソ型が含まれる。例えば、Fcグリコシル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ADCC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、Kandra, *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ル化経路を操作することによって行うこともできる。グリコシル化はまた、糖-結合酵素（グリコシル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ル化することができる。N-グリカンのプロセシングの適切な低分子阻害剤の例としては、カストノスペルミン（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）、スワインソニン（Swainsonine）（Sw）、モネンシン（Monensin）（Mn）が挙げられる。

10

20

30

40

【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）（Cramer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

50

）。抗体はまた、トランスジェニック動物の中で (Houdeline (2002) Curr. Opin. 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、グリコシル化部位の数、エフェクター細胞機能、Fc受容体 (FcR) 結合、補体結合などを变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。

10

【0099】

抗体の定常領域を变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産生することができる（例えば、EP388,151 A1; 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。

20

【0100】

例えば、特定の残基（単数または複数）を、その側鎖上に適切な機能性を有している残基（単数または複数）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領域の親和性を变化させることが可能である（例えば、US5,624,821を参照のこと）。

30

【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、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、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、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、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、チオテバクロラムブシル、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、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-白金ジクロロジアミン (II) (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、

40

50

ミトラマイシン、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ブラスチン)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産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、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551(1993); Jakobovitsら、Nature, 362:255-258(1993); Bruggemann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

20

【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メと組み合わせられる場合もある。

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。

【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。

40

【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、R A G E に結合し、R A G E - B P の結合を阻害する。

【 0 1 0 7 】

本発明には、R A G E と R A G E - B P との間の相互作用を阻害すること、または R A G E 活性を調節することによって、R A G E 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、R A G E に対する抗体を投与する工程が含まれる。

【 0 1 0 8 】

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、c D N A、m R N A、および c R N A 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。

10

【 0 1 0 9 】

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 R A G E をコードする開示されている c D N A 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 R A G E をコードするゲノム D N A 配列に対応する配列番号 15 に示されている、R A G E 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。

20

【 0 1 1 0 】

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。

【 0 1 1 1 】

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 R A G E 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。

30

【 0 1 1 2 】

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 R A G E 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。

40

【 0 1 1 3 】

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 (q u e r y s e q u e n c e) 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、最大の一致のために比較される。

【 0 1 1 4 】

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

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、ストリンジェ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、核酸増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、ストリンジェ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ェンシーに応じて、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ブロット分析）の状況におけるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とストリンジェ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、Tijssen (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、よりストリンジェンシ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、ストリンジェントな条件下では、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。極めてストリンジェントである条件が、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ブロット分析についてのストリンジェ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。より高ストリンジェントである洗浄条件の一例は、65 °の 0.1 × SSC の中で 15 分間である。ストリンジェントな洗浄条件の一例は、65 °の 0.2 × SSC 緩衝液の中で 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、高いストリンジェンシーの洗浄の前に、バックグラウンドのプロブシグナルを取り除くための低いストリンジェ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ェンシーの洗浄条件の一例は、45 °の 1 × SSC の中で 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ェンシーの洗浄の一例は、40 °の 4 × から 6 × SSC の中で 15 分間である。短いプロブ（例えば、約 10 から 50 ヌクレオチド）については、ストリンジェ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。ストリンジェントな条件はまた、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 の中で、50 °でハイブリダイズさせられ、その後、1 × SSC、0.1 % の SDS の中で、50 °で洗浄される。さらに好ましくは、プロ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 の中で、50 °でハイブリダイズさせられ、その後、0.5 × SSC、0.1 % の SDS の中で、50 °で洗浄される。さらに好ましくは、プロ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 の中で、50 °でハイブリダイズさせられ、その後、0.1 × SSC、0.1 % の SDS の中で、50 °で洗浄される。より好ましくは、プロ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 の中で、50 °でハイブリダイズさせられ、その後、0.1 × SSC、0.1 % の SDS の中で、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。ストリンジェ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 / またはデオキシイ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。Batzerら、(1991) *Nucleic Acids 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ェ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。

10

【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。

20

【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。

30

【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るか、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; Silhavy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

40

50

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、プラーク負荷の軽減、プラーク形成の阻害、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 - シート繊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_β）、血清アミロイド（SAA）（繊維状形態）、S100/カルグラーニン（例えば、S100A12、S100B、S100A8 - A9）、および高移動性グルーボックス - 1 染色体タンパク質1（HMGB1、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.）。RAGERリガンドアンホテリン（HMGB1）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_β 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、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障害は、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。本発明の治療方法は、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 IgG 1 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 IgG 1 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こともできる。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

10

20

30

40

50

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ユ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、AD）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、RAGE 位特異的に結合し、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。

【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の特徴とする。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おり、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、ADのリスクがある個体（例えば、AD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。AD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、AD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AD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、ADを発症する遺伝的素因があると特定する

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(Charrier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_βへのプロセシングの増加または変更、特に、多量のA_βの長い形態(すなわち、A_β1-42、およびA_β1-43)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_β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。

【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_β24とtauレベルの評価の組み合わせである。低いA_β24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。

【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)認知障害(例えば、2つ以上の認知領域)、(4)6ヶ月より長い障害の進行、(5)無意識の平穩(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。

【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知障害、言語に伴う問題、時間もしくは

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、プロセッシング、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。

【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ましい簡単な試験である。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。

【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。

【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、相互に関連している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ー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。

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。

10

【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 Crumら、(1993) J. Am. Med. Association 18: 2386 - 2391 を参照のこと。

20

30

【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の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当てられている、4セットの質問から構成されている。これにより、通常に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。

40

【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A β 42レベルの測定が含まれる。高いtauレベルと低いA β 42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、AD R D A基準によっても診断することができる。

50

【0156】

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っては、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つの薬剤によっ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

【0157】

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応答 (clearing 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応答は、Fc 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応答は、例えば、Fc 受容体結合ドメイン (例えば、Ig 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、リボソームなど) 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ってはまた、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る。

20

【0158】

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

【0159】

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ァイ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ァイ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ァイル値の有意な増大 (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

【0160】

他の方法においては、レベルまたはプロファイルの対照の値 (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ァイルの測定値が、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/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ァイルの対照値(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ァイルが処置に応答してプラトー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ァイルの測定値は、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ァイ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ァイルは、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べきであ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ァイル(例えば、ヒト化抗体のレベルまたはプロファイル)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ァイルが、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、PDAPP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が、その後にモニターされる。クリアー応答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ァイルは、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照値の - 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。

【0166】

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そのリガンドによる RAGE の調節（例えば、転写因子 NF- κ 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- κ B のリン酸化をブ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。

【0167】

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。

【0168】

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、ポリエチレングリコール、ミネラルオイル、または *petroleum* ゲル、プロピレングリコール、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、注射用静菌水（BFI）、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。

【0169】

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/または希釈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、ボーラス、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、トシル酸塩、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(naphthylate)、メシル酸塩、グルコヘプトネート、ラクトピオン酸塩、およびラウリルスルホン酸塩などが挙げられる。(例えば、Berger、(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、エタンスルホン酸、シュウ酸、イソチオン酸(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、Berger、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、塩酸システイン、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、 α -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。

【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(timely 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、ボラス、舐剤、またはペーストとして投与される場合もある。

【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)溶加剤または増量剤(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

10

20

30

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。

【 0 1 7 9 】

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、不活性な希釈剤、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、不活性な液体希釈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

【 0 1 8 0 】

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ィー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

30

【 0 1 8 1 】

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釈剤 (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、テトラヒドロフリルアルコール、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。

40

【 0 1 8 2 】

不活性な希釈剤に加えて、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。

【 0 1 8 3 】

懸濁液には、有効成分に加えて、懸濁化剤 (例えば、エトキシ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。

【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。

【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(s l a i n)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。

【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。

【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

10

20

30

40

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バントも含まれ得る。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）を組成物の中にも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、こう薬、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（s t e m）、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、R A G E 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。R A G E に特異的な抗体を検出する E L I S A 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。

【0200】

いくつかの方法においては、患者の中の R A G E 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の参照値の - 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目的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-streptタグ融合タンパク質とマウスRAGE-strept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-strept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HEL293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細胞上でのプラーク形成単位）、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-strept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

ry) (CHO) 細胞に、リポフェクチン (Invitrogen) を使用して安定にトランスフェクトした。安定なトランスフェクタントを、20 nM および 50 nM のメトトレキサ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。(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 - 237)。

【0205】

10

可溶性 RAGE 融合タンパク質を発現する CHO 細胞またはトランスフェクトされた 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】

(実施例 2)

マウス抗 RAGE モノクローナル抗体の作成

20

6 ~ 8 週齢の雌の BALB/c マウス (Charles River, Andover, MA) を、Gene Gun 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 の組み換え体ヒト 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 % のポリエチレングリコール (MW1500) (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 Origen (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 x ヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン (Sigma, St. Louis, MO) を含む RPMI 1640 選択培地の中で 1×10^5 細胞 / ウェルで培養した。

【0208】

(実施例 3)

40

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、Gene Gun (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、マウス骨髓腫細胞 P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 (A T C C , R o c k v i l l e , M D) と 4 : 1 の割合で、50%のポリエチレングリコール (M W 1 5 0 0) (R o c h e D i a g n o s t i c s C o r p , M a n n h e i m , G e r m a n y) 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Origen (I G E N I n t e r n a t i o n a l I n c . G a i t h e r s b u r g , M D) 、2mMのL - グルタミン、100U / m l のペニシリン、100μg / m l のストレプトマイシン、10mMのH E P E S 、および1×ヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン (S i g m a , S t . L o u i s , M O) 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 (H E L - 2 9 3) 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HMGB1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 (X T - M シリーズ) と7種類のマウスモノクローナル抗体 (X T - H シリーズ) を同定した。選択したハイブリドーマを、段階希釈によって4回、そしてFACS選別によって1回サブクロニングした。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 (M i l l i p o r e B i l l e r i c a , M A) を使用して精製した。個々のmAbのIgクラスを、マウスmAbイソ型分類キット (i s o t y p i n g k i t) 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 (I s o S t r i p ; B o e h r i n g e r M a n n h e i m C o r p .) 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】

【表1】

30

表 1					
ラットモノクローナル抗m u R A G E 抗体			マウスモノクローナル抗 h u R A G E 抗体		
ハイブリドーマクローン	Mabs	I g イソ型	ハイブリドーマクローン	Mabs	I g 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、100μlの試料 (希釈した免疫血清、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、FACSscanフローサイトフルオロメーター(Becton 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、すなわち希釈した免疫血清、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 ウェルプレートに、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $100 \mu\text{l}$ のブレインキュベート混合物 ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$) と、様々な形態の示した抗体調製物 (免疫血清の希釈物、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 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、または希釈した免疫血清を用いた、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。

【0214】

【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	+		+	-

10

20

30

40

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、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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希釈物の $100 \mu\text{l}$ のブ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、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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希釈物の $100 \mu\text{l}$ のブ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（BioF x 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

50

選択したマウス抗 R A G E 抗体とラット抗 R A G E 抗体の、ヒト R A G E およびマウス R A G E 抗体に対する結合、ならびに、ヒト R A G E およびマウス R A G E の V ドメインに対する結合を、B I A C O R E (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 R A G E - F c またはマウス R A G E - F c を使用して行った。2種類の濃度 (50 nM および 100 nM) の抗 R A G E 抗体の溶液を、2 連で、固定した R A G E - F c タンパク質上に流した。B I A C O R E (登録商標) 技術は、固定した R A G E 抗原に対して抗 R A G E 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。B I A C O R E (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 μ RAGE 抗体			マウス抗 $h\mu$ RAGE 抗体		
Mabs	huRAGE-Fc	μ RAGE-Fc	Mabs	huRAGE-Fc	μ RAGE-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	+++	-

20

ヒトおよびマウスの R A G E に対するマウスおよびラットの抗 R A G E 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、B I A C O R E (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 h RAGE-Fc に対する結合についての B I A C O R E (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。

30

【0217】

【表 5】

表 5						
h RAGE-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

40

B. ヒト R A G E V ドメインに対する結合

ヒト R A G E V ドメインに対するマウスおよびラットの抗 R A G E 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、B I A C O R E (登録商標) 直接結合アッセイによって決定した。ヒト R A G E 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 h RAGE V ドメイン - Fc に対するマウスおよびラットの抗 R A G E 抗体の結合の B I A C O R E (登録商標) 直接結合アッセイを、全長の R A G E - Fc に対する結合のアッセイについて上記

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つの抗体のアラインメントした重鎖可変領域アミノ酸配列を図6に示し、そしてアライン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】

(実施例10)

ウサギ、ヒヒ、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)とヒヒ(Papio cyanocephalus)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'-GGATCTGTCTGTGGGCCCTCAAGGCC)(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'-ACTAGACTAGTCGGACCATGGCAGCAGGGGCGAGCGGCCCGGA(配列番号61)および5'-ATAAGAAATGCGGCCGCTAAACTATTTCAGGGCTCTCTCCTGTACCGCTCTC(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ヒ、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。ヒヒ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。

【0220】

(実施例11)

ヒヒRAGEをコードするゲノムDNA配列の単離

RAGEをコードするヒヒのゲノム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ベクター中のヒヒ(Papio cyanocephalus)のゲノムライブラリー(Stratagene, La Jolla, CA)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ブランクを単離し、単一の単離物を得るためのさらに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

10

20

30

40

50

ために、サイズによって分画した。N o t I断片を、N o t Iで消化しておいたp B l u e s c r i p t S K +に連結させ、挿入断片を、R A G E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。ヒヒR A G Eをコードする、クローニングしたヒヒのゲノムDNAのヌクレオチド配列は、図12A～12Eに示す(配列番号15)。

【0221】

(実施例12)

キメラX T - M 4抗体

キメラX T - M 4を、ヒト 軽鎖定常領域およびI g G 1重鎖定常領域に対して、それぞれ、ラット抗マウスR A G E抗体X T - M 4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F c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L 2 3 4 AとG 2 3 7 Aを、ヒトI g G 1 F c領域のX T - M 4に導入した。キメラ抗体には、分子番号X T - M 4 - A - 1を与えた。キメラX T - M 4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。

【0222】

(実施例13)

R A G Eに対するキメラX T - M 4の結合の評価

キメラ抗体X T - M 4と、選択したラットおよびマウスの抗R A G E抗体の、ヒトR A G Eおよび他の種のR A G Eに結合する能力、ならびに、R A G Eリガンドの結合をブロックする能力を、E L I S AおよびB I A C O R E (登録商標)結合アッセイによって測定した。

【0223】

A . B I A C O R E (登録商標)結合アッセイによって測定した可溶性のヒトR A G Eに対する結合

キメラ抗体X T - M 4、もとのラット抗体X T - M 4、ならびに、マウス抗体X T - H 2およびX T - H 5の可溶性のヒトR A G E (h 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。アッセイは、5000～7000RUのC M 5 B I A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R A G E (h R A G E - S A)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、h R A G E - S A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。

【0224】

【表6】

表6						
h R A G E - S A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-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 X T - M 4	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

X T - M 4抗体とキメラ抗体X T - M 4は、同様の速度論で単量体の可溶性のヒトR A

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 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 (A m e r i c a n T i s s u e T y p e C u l t u r e , M a n a s s a n , V A) 細胞を、 10 cm^2 の組織培養プレートあたり 5×10^6 細胞でプレートし、37 で一晚培養した。翌日、細胞を、L F 2 0 0 0 試薬 (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d C A) 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 DNA 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 A d o r i 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、 2×10^6 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

$1\text{ }\mu\text{g}$ の一次抗体を、96 ウェルプレートの中の 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 で段階希釈した。無血清増殖培地の中の 2×10^6 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 ($50\text{ }\mu\text{l}$) を、 1×10^5 細胞 / ウェルの最終濃度となるように U 底 96 ウェルプレートに添加した。細胞を、 1600 rpm 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。10 % のウシ胎児血清 (F C S) を含む冷却した P B S 中の希釈した一次抗 R A G E 抗体またはイソ型適合対照抗体 ($100\text{ }\mu\text{l}$) 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、 $100\text{ }\mu\text{l}$ の希釈した二次抗 I g G 抗体 H R P 結合体 (P i e r c e B i o t e c h n o l o g y , R o c k f o r d , I L) 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。 $100\text{ }\mu\text{l}$ 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 ~ 30 分間インキュベートした。発色を、 $100\text{ }\mu\text{l}$ の 0 . 1 8 M の H_2SO_4 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、 450 nm で読み取った (S o f t M A X p r o 4 . 0 , M o l e c u l a r D e v i c e s C o r p o r a t i o n , S u n n y v a l e , C A) 。

40

50

【 0 2 2 9 】

細胞をベースとする E L I S A によって決定した、ヒトおよびヒヒの R A G E に結合する抗体キメラ X T - M 4 と X T - M 4 の能力を図 1 4 に示す。細胞をベースとする E L I S A 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、ヒヒ、サル、マウス、またはウサギの R A G E に対するキメラ抗体 X T - M 4 と X T - M 4 の結合についての E C 5 0 値を表 7 に示す。

【 0 2 3 0 】

【表 7】

表 7		
細胞をベースとする E L I S A によって決定した R A G E に対する結合についての E C 5 0 値		
	キメラ X T - M 4	ラット X T - M 4
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- ヒヒ RAGE	~1.25 nM	~1.33 nM

10

(実施例 1 5)

20

様々な種の R A G E 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 X T - M 4、ラット X T - M 4 抗体と、マウス抗体 X T - H 1、X T - H 2、および X T - H 5 の、ヒト、カニクイザル、ヒヒ、およびウサギの肺組織の中の内因性の細胞表面 R A G E に結合する能力を、肺組織切片の免疫組織化学 (I H C) 染色によって決定した。

【 0 2 3 1 】

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 (C H O) 細胞を、マウスおよびヒトの全長の R A G E 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 R A G E c D N A を哺乳動物発現ベクターにクローニングし、直鎖状にし、そしてリポフェクション法を使用して C H O 細胞にトランスフェクトした (K a u f m a n , R . J . , 1 9 9 0 , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 1 8 5 : 5 3 7 - 6 6 ; K a u f m a n , R . J . , 1 9 9 0 , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 1 8 5 : 4 8 7 - 5 1 1 ; P i t t m a n , D . D . , 1 9 9 3 , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 2 2 : 2 3 6) 。細胞を、20 n M のメトトレキサートの中でさらに選択し、細胞抽出物を個々のクローンから回収し、発現を確認するために S D S 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 (S D S - P A G E) とウェスタンブロッティングによって分析した。

30

【 0 2 3 2 】

ヒヒ、カニクイザル、ウサギから単離した R A G E 肺組織、あるいはヒト R A G E 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 C H O 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。R A G E 抗体とラットの I g G 2 b イソ型対照またはマウスのイソ型対照を、1 ~ 1 5 m g で使用した。キメラ X T - M 4、X T - M 4 - h V H - V 2 . 0 - 2 m / h V L - V 2 . 1 0、X T - M 4 - h V H - V 2 . 0 - 2 m / h V L - V 2 . 1 1、X T - M 4 - h V H - V 2 . 0 - 2 m / h V L - V 2 . 1 4 をビオチニル化し、そして S i g m a I g G 1 ビオチニル化対照抗体を、0 . 2、1、5、および 1 0 μ g / m l で使用した。H R P および A l e x a F l u o r 5 9 4、A l e x a F l u o r 4 8 8、または F I T C 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 (D A P I) で染色した。

40

【 0 2 3 3 】

図 1 5 は、キメラ抗体 X T - M 4 が、カニクイザル、ウサギ、およびヒヒの肺組織の中

50

の R A G E に結合することを示す。ポジティブな I H C - 染色パターンは、R A G E を生産する細胞をキメラ X T - M 4 と接触させた試料の中で見ることができたが、R A G E または R A G E 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 1 6 は、ラット抗体 X T - M 4 が、正常なヒトの肺、および慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) のヒトの肺の中の R A G E に結合することを示している。肺組織切片の I H C 染色によって決定した、敗血症のヒト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 R A G E に対する、ラット X T - M 4 抗体と、マウス抗体 X T - H 1、X T - H 2、および X T - H 5 の結合を表 8 にまとめる。h R A G E をコードする D N A 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 C H O 細胞を、ポジティブ対照として使用する。

【 0 2 3 4 】

【表 8】

表 8									
ヒト以外の霊長類の肺の中の R A G E に対する結合ー I H C によってアッセイした									
	ヒトの肺 (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 1 6)

マウス抗ヒト R A G E 抗体 X T - H 2 をヒト化するための分子モデル化

マウス抗ヒト R A G E 抗体 X T - H 2 H V ドメインの分子モデル化

マウス X T - H 2 重鎖をモデル化するための抗体構造の鋳型を、P r o t e i n D a t a B a n k (P D B) 配列データベースについての B L A S T P 検索に基づいて選択した。マウス X T - H 2 の分子モデルを、6 つの鋳型構造 (1 S Y 6 (抗 C D 3 抗体)、1 M R F (抗 R N A 抗体)、および 1 R I H (抗腫瘍抗体)) に基づいて、I n s i g h t I I (A c c e l r y s , S a n D i e g o) の H o m o l o g y 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 (S C R) 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、S C R の中の対応する原子の最小 R M S 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 X T - H 2 V H 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、S C R 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 S C R の中で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 S C R に使用した。S C R に含まれないループと可変領域についての座標は、H o m o l o g y モジュールにおいて実行した S e a r c h L o o p 法または G e n e r a t e L o o p 法によって作成した。

【 0 2 3 5 】

簡単に説明すると、S e a r c h L o o p 法は、隣接している S C R 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、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によつ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 (splice 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で適応させ、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や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 Descent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。

10

20

【0236】

ヒト抗RAGE X T - H 2 H Vドメインの分子モデル化

ヒト化 (CDR移植) 抗RAGE抗体X T - H 2 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X T - H 2 抗体重鎖のモデル化について記載したものと同一手順にしたがって、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Erb B 2抗体)、1FGV (抗CD18抗体)、1JPS (抗組織抗体)、および1N8Z (抗Her 2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。

30

【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X T - M 4をヒト化するための分子モデル化

40

ラット抗マウスRAGE抗体X T - M 4 H Vドメインの分子モデル化

ラットX T - M 4 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BLASTP検索に基づいて選択した。ラットX T - M 4の分子モデルを、6つの鋳型構造 (1QKZ (抗ペプチド抗体)、1IGT (抗イヌリンバ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)、1H0D (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 (Accelerlys, 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

50

ックスに基づいて決定し、鑄型構造を、S C Rの中の対応する原子の最小R M S 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X T - M 4 V Hの配列を、重ね合わせた鑄型タンパク質の配列に対してアラインメントし、S C R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S C Rの中での標的鑄型間の配列類似性の程度に基づいて、様々な鑄型からの座標を、様々なS C Rに使用した。S C Rに含まれないループと可変領域についての座標は、H o m o l o g y モジュールにおいて実行したS e a r c h L o o pまたはG e n e r a t e L o o p法によって作成した。

【0240】

簡単に説明すると、S e a r c h L o o p法は、隣接しているS C R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S C Rの間の領域を模倣するタンパク質構造をスキャンする。S e a r c h L o o p法による出力を、隣接するS C R残基において、最小R M S 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G e n e r a t e L o o p法は、S e a r c h L o o p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、アミノ酸残基が鑄型と標的において同じである場合には、鑄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、鑄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S C Rの間でのスプライシング点(s p l i c e j u n c t i o n)を最適化するために、その座標を様々な鑄型、およびS C Rとループの間のもから適応させ、H o m o l o g y モジュールのS p l i c e R e p a i r 機能を使用した。S p l i c e R e p a i r の分子機構のシミュレーションを、2つのS C Rの間、またはS C Rと可変領域の間の接点の最適な結合の長さで結合角に導くように設定した。最後に、モデルを、5 k c a l (m o l) または500サイクルの最大偏差になるまでS t e e p e s t D e s c e n t s アルゴリズムを使用して、そして5 k c a l / (m o l) または2000サイクルの最大偏差になるまでG r a d i e n t s 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、H o m o l o g y モジュールのP r o S t a t / S t r u c t _ C h e c k u t i l i t y を使用して評価した。

【0241】

X T - M 4 軽鎖可変ドメイン

X T M 4 軽鎖可変ドメインの構造モデルを、M o d e l e r 8 v 2 を用いて、鑄型として1 K 6 Q (抗組織因子抗体)、1 W T L、1 D 5 B (抗体A Z - 2 8)、および1 B O G (抗p 2 4 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(p r o b a b i l i t y d e n s i t y f u n c t i o n) 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、S t e e p s e t D e s c e n t、C o n j u g a t e G r a d i e n t、およびA d o p t e d B a s i s N e w t o n R a p h s o n 法からなるエネルギー最小化カスケードを、0.01のR M S 勾配が満たされるまで、C h a r m m 2 7 f o r c e f i e l d (A c c e l r y s S o f t w a r e I n c .) とD i s c o v e r y S t u d i o 1 . 6 (A c c e l r y s S o f t w a r e I n c .) において実行したG e n e r a l i z e d B o r n i m p l i c i t s o l v a t i o n 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(m a s s f o r c e) の高調波の拘束(h a r m o n i c c o n s t r a i n t) を使用して抑制した。

【0242】

ヒト化抗R A G E X T - M 4 V Hドメインの分子モデル化

ヒト化(C D R 移植) 抗R A G E X T M 4 抗体重鎖の分子モデルを、使用した鑄型が異なることを除きラットX T M 4 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1H0D（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。

【0247】

30

（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】

40

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%

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 l 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	

(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 プレートに、1 μ g / m l のヒト R A G E - F c で一晚コーティングした。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ジン - 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。

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、プレートに、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とのラット X T - M 4 抗体を、ストレプトアビジン - 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 - M 4 抗体のヒト R A G E - F c に対する結合についての I 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、rhVCAM-1、rhICAM-1-Fc、rhTLR4 (C末端Hisタグ)、rhNCAM-1、rhB7-H1-Fc、mLox1-Fc、hLox1-Fc、およびhRAGE-Fc (ポジティブ対照として)であった。ELISAプレートを、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 (0.03 から $20\mu\text{g}/\text{ml}$) の上記に列挙したヒト化およびキメラXT-M4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IgG HRPで検出した。表12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XT-M4抗体の結合の直接結合ELISA分析の結果を示す。データは、受容体と $20\mu\text{g}/\text{ml}$ (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OD450値を示す。

10

【0254】

【表12】

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
rhVCAM-1	0.010	0.012	0.004
rhICAM-1-Fc	0.007	0.004	0.004
rhTLR4	0.001	0.003	0.000
rhNCAM-1	0.004	0.011	0.006
rhB7-H1-Fc	0.010	0.009	0.003
mLox1-Fc	0.016	0.010	0.010
hLox1-Fc	0.007	0.022	0.017
hRAGE-Fc	3.808	3.832	3.797

20

(実施例21)

可溶性ヒトRAGEに対する結合についてのBIACORE (登録商標) 結合アッセイ
キメラ抗体XT-M4とヒト化XT-M4抗体の、可溶性のヒトRAGE (hRAGE-S A) および可溶性のマウスRAGE (mRAGE-S A) に対する結合を、BIA
CORE (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5000RUのCM5 BIAチップ (pH5.0、7分) 上に抗ヒトFc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Fc抗
体上に $2.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 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)。100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM
、1.25nM、および0nM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
RAGE (hRAGE-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hRAGE-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。hRAGE-S AおよびmRA
GE-S Aに対する結合についての、キメラXT-M4およびヒト化抗体XT-M4-V
10、XT-M4-V11、およびXT-M4-V14の結合結果を、それぞれ、図23
および24に示す。

30

40

【0255】

(実施例22)

リード抗体XT-H2の種間交差反応性の最適化

種間交差反応性を、XT-H2抗体をランダムに変異させ、タンパク質変異体のライブ
ラリーを作成し、そしてマウス-ヒトRAGE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
(Hanesら、2000, Methods Enzymol., 328:404-30)
とファージディスプレイ技術 (McAfferlyら、1989, Nature, 348
:552-4) 技術を使用した。

50

【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。

【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 プレートに、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 で一晩コーティングし、P B S + T w e e n (0 . 0 5 %) 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。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。プレートをブロックし、抗 F l a g 抗体 (1 / 1 0 0 0 希釈)、その後にはウサギ抗マウス 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ことを示している。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。

【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

変異体のライブラリーを、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、このライブラリーを、確立されている手順を使用して転写させ、翻訳させた (例えば、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)。このライブラリーについて、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。作成したライブラリーについては、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。

【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

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 プレートに、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 (200 μ g / m l) で、4 で一晩コーティングし、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 m l 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 m l であり、そのうちの50 μ l を、2 % の粉乳 P B S を含む100 μ l の全量の中で、室温で1時間、1 / 1000 希釈の抗 H i s 抗体とともにブレ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 希釈のウサギ抗マウス 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、機能性の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まとめにされた、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) を使用してヒトピオチニル化 R A G E について選択した。ピ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

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バイオニル化マウス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、バイオニル化ヒト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pWRI L-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、バイオニル化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pWRI L-1にクローニングした。ピ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(artifact)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pWRI L-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つの戦略においては、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

40

【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

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(A_{sn}⁵²A_{sn}Ser)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、1.35 mL 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200 kDa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50 kDaで移動する1つの重鎖バンドと、およそ25 kDa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。

【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(Kabat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5 mg/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, 235 g·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ブラークを生じ、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、Aβ凝集物およびオリゴマーの増加が先行して起こる。Aβは、若い、ブラークを有していない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、Aβ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マウスモデルにおいて行った。

【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に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の中に希釈し、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日目に行った。

【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RAGE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

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C57BL6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30x24x21cm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; 1.5mAmp)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秒間のピン(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) の中に希釈し、2 0 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1 0 日目に単回用量としてi p 投与し、1 1 日目に訓練を行い、そして1 2 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 I n s t i t u t e , I n c .) を使用してp o s t h o t F i s c h e r 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1 A】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、1 4、1 1、1 3、7、9、1) のアラインメントを示す。

【図1 B】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、1 4、1 1、1 3、7、9、1) のアラインメントを示す。

【図1 C】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、1 4、1 1、1 3、7、9、1) のアラインメントを示す。

20

【図2】9 0 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、3 0 0 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】1 0 0 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。

【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。

40

【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1 0】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1 1】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1 2 A】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1 2 B】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 1 2 C】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 1 2 D】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 1 2 E】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 1 3】競合 E L I S A 結合アッセイによって決定した、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、キメラ X T - M 4 抗体とラット抗体 X T - M 4 の能力を示している 4 つのグラフを示す。

10

【図 1 4】抗体競合 E L I S A 結合アッセイによって決定した、抗体 X T - M 4 と X T - H 2 を用いた h R A G E - F c への結合について競合する、キメラ X T - M 4 の能力を示しているグラフを示す。

【図 1 5】カニクイザル、ウサギ、およびヒヒの肺組織の I H C 染色を示し、これは、X T - M 4 がこれらの組織の中の内因性の細胞表面 R A G E に結合することを示している。対照試料は、X T - M 4 と接している h R A G E を発現する C H O 細胞、R A G E を発現しない N G B C H O 細胞、そして対照 I g G 抗体に接している h R A G E を発現する C H O 細胞である。

【図 1 6】ラット抗体 X T - M 4 が、正常なヒトの肺と慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) のヒトの肺の中の R A G E に結合することを示している。

20

【図 1 7】ヒト化マウス X T - H 2 H V 領域のアミノ酸配列を示す。

【図 1 8】ヒト化マウス X T - H 2 H L 領域のアミノ酸配列を示す。

【図 1 9】ヒト化ラット X T - M 4 H V 領域のアミノ酸配列を示す。

【図 2 0 A】ヒト化ラット X T - H 2 H L 領域のアミノ酸配列を示す。

【図 2 0 B】ヒト化ラット X T - H 2 H L 領域のアミノ酸配列を示す。

【図 2 1】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 2 2】競合 E L I S A によって決定した、ヒト R A G E - F c に対するヒト化 X T - H 2 抗体の結合についての E D 5 0 値を示す。

【図 2 3】B I A C O R E (登録商標) 結合アッセイによって決定した、h R A G E - S A に対する、X T - M 4 と、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 の結合についての運動速度定数 (k i n e t i c r a t e c o n s t a n t) (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。

30

【図 2 4】B I A C O R E (登録商標) 結合アッセイによって決定した、m R A G E - S A に対する、X T - M 4 と、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 の結合についての運動速度定数 (k i n e t i c r a t e c o n s t a n t) (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 2 5】マウス X T - H 2 V L - V H S c F v 構築物のヌクレオチド配列 (配列番号 5 1) を示す。

40

【図 2 6】マウス X T - H 2 V H - V L S c F v 構築物のヌクレオチド配列 (配列番号 5 2) を示す。

【図 2 7】ラット X T - M 4 V L - V H S c F v 構築物のヌクレオチド配列 (配列番号 5 4) を示す。

【図 2 8】ラット X T - M 4 V H - V L S c F v 構築物のヌクレオチド配列 (配列番号 5 3) を示す。

【図 2 9】V L / V H または V H / V L 立体構造のいずれかの、X T - H 2 および X T - M 4 抗 R A G E 抗体の S c F v 構築物によるヒト R A G E - F c に対する結合を示している E L I S A データのグラフである。

50

【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 V L / V H または V H / V L 立体構造の X T - H 2 および X T - M 4 抗 R A G E 抗体の S c F v 構築物による、ヒト R A G E - F c と B S A に対する結合を示している E L I S A データのグラフである。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れる非結合タンパク質である。

【図31】X T - M 4 の C D R にスパイク変異 (s p i k e d m u t a t i o n) を導入するための P C R の使用を模式的に示す。

【図32】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 5 6) を示す。V H - C D R 3 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 5 7 ~ 5 8) 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 (s p i k i n g r a t i o) 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。

【図33】リボザイムディスプレイベクター p W R I L - 3 を模式的に示す。「T 7」は T 7 プロモーターを示し、「R B S」はリボソーム結合部位であり、「スパ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パーサーポリペプチドであり、「F l a g タグ」は、タンパク質の検出のための F l a g 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 p W R I L - 1 を模式的に示す。

【図35】F a b ディスプレイベクター p W R I L - 6 を使用した V L および V H 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。

【図36】5 2 位のグリコシル化部位を除去する変異の後の、h R A G E に対する X T - M 4 抗体の親和性の増大を示している抗体競合 E L I S A データのグラフである。

【図37】マウスへの 1 回の i v 投与後のキメラ X T - M 4 の血清濃度を示しているグラフである。

【図38】T g 2 5 7 6 マウスモデルの記憶障害に対するキメラ X T - M 4 の効果を示しているグラフである。

10

20

【図 1 A】

RAGEアミノ酸配列のアラインメント

	1	50
マウスRAGE	MPASTAARAV LVVLALMGAV AGQSNITARI GEPLVLCKG APKKFPQQL	
ラットRAGE	MPTQTVARAV LVVLALMGAV AGQSNITARI GEPLMLCKG APKKFTQKL	
ウサギRAGE1	MAAGAAAGAV LVVFLMGAA VGGQMITARI GEPLVLCKG APKKFPQQL	
ウサギRAGE2	MAAGAAAGAV LVVFLMGAA VGGQMITARI GEPLVLCKG APKKFPQQL	
ヒトRAGE	MAAGAAAGAV LVVFLMGAV VQAQMITARI GEPLVLCKG APKKFPQQL	
サルRAGE	MAAGAAAGAV LVVFLMGAV VQAQMITARI GEPLVLCKG APKKFPQQL	
ヒトRAGE	MAAGTAAGAV LVVFLMGAV VQAQMITARI GEPLVLCKG APKKFPQQL	
	51	100
マウスRAGE	WKLNTGRTEA WKVLSPQ.GG FWDSEARVLP NGSLLLPAVG IQDEGTFRCK	
ラットRAGE	WKLNTGRTEA WKVLSPQ.GD FWDSEARVLP NGSLLLPAIG IQDEGTFRCK	
ウサギRAGE1	WKLNTGRTEA WKVLSPQ.GG SWSSEARVLP NGSLLLPAVG IQDEGTFRCK	
ウサギRAGE2	WKLNTGRTEA WKVLSPQ.GG SWSSEARVLP NGSLLLPAVG IQDEGTFRCK	
ヒトRAGE	WKLNTGRTEA WKVLSPQ.GG FWDSEARVLP NGSLFLPAVG IQDEGTFRCK	
サルRAGE	WKLNTGRTEA WKVLSPQ.GG FWDSEARVLP NGSLFLPAVG IQDEGTFRCK	
ヒトRAGE	WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG FWDSEARVLP NGSLFLPAVG IQDEGTFRCK	
	101	150
マウスRAGE	ATNRGKEVK SNYKRVYQI PQKPEIVDPA SELTAGVPNK VGTCSBGGY	
ラットRAGE	ATNRGKEVK SNYKRVYQI PQKPEIVNPA SELTAGVPNK VGTCSBGGY	
ウサギRAGE1	TTNRGKETK SNYKRVYQI PQKPEILDPA SELTAGIPSK VGTCSBGGY	
ウサギRAGE2	TTNRGKETK SNYKRVYQI PQKPEILDPA SELTAGIPSK VGTCSBGGY	
ヒトRAGE	ANRNGKETK SNYKRVYQI PQKPEIIDA SELTAGVPNK VGTCSBGGY	
サルRAGE	ANRNGKETK SNYKRVYQI PQKPEIIDA SELTAGVPNK VGTCSBGGY	
ヒトRAGE	ANRNGKETK SNYKRVYQI PQKPEIVDPA SELTAGVPNK VGTCSBGGY	

Figure 1A

【図 1 B】

RAGEアミノ酸配列のアラインメント (続き)

	151	200
マウスRAGE	PAGTLSWHLG GKLLIPDQKG TVVKEETRRH PETGLFTLQS ELMTTPAQGG	
ラットRAGE	PAGTLSWHLG GKLLIPDQKG TVVKEETRRH PETGLFTLQS ELMTTPAQGG	
ウサギRAGE1	PLGTLSWHLG GKLLIPDQKG VSVKEETRRH PETGLFTLQS ELMTTPAQGG	
ウサギRAGE2	PLGTLSWHLG GKLLIPDQKG VSVKEETRRH PETGLFTLQS ELMTTPAQGG	
ヒトRAGE	PAGTLSWHLG GKLLIPDQKG VSVKEETRRH PETGLFTLQS ELMTTPAQGG	
サルRAGE	PAGTLSWHLG GKLLIPDQKG VSVKEETRRH PETGLFTLQS ELMTTPAQGG	
ヒトRAGE	PAGTLSWHLG GKLLIPDQKG VSVKEETRRH PETGLFTLQS ELMTTPAQGG	
	201	250
マウスRAGE	TTNPTFSCSF SLGLPERRPL NTAPIQLVRV SPGPPEGIGL LVSPEGGIVA	
ラットRAGE	TT.FTYSCEF SLGLPERRPL NTAPIQPRV EPLDPEGIGL LVSPEGGIVA	
ウサギRAGE1	GFPPTFSCSF SPGLPERRAS YTAPIQPSVW SPGL.EVRL LVSPEGGAVA	
ウサギRAGE2	GFPPTFSCSF SPGLPERRAS YTAPIQPSVW SPGL.EVRL LVSPEGGAVA	
ヒトRAGE	NPHPTFSCSF SPGLPERRAL HTAPIQPRVW SPVPLEVQL VVSPEGGAVA	
サルRAGE	NPHPTFSCSF SPGLPERRAL HTAPIQPRVW SPVPLEVQL VVSPEGGAVA	
ヒトRAGE	TNPTFSCSF SPGLPERRAL RTAPIQPRVW SPVPLEVQL VVSPEGGAVA	
	251	300
マウスRAGE	PGGTVLITCA ISAQPPFQIN WKDQGLPL APSPVILLPE VGHDEGITYS	
ラットRAGE	PGGTVLITCA ISAQPPFQIN WKDQGLPL APSPVILLPE VGHDEGITYS	
ウサギRAGE1	PGGTVLITCA ISAQPPFQIN WKDQGLPL APSPVILLPE VGHDEGITYS	
ウサギRAGE2	PGGTVLITCA ISAQPPFQIN WKDQGLPL APSPVILLPE VGHDEGITYS	
ヒトRAGE	PGGTVLITCA ISAQPPFQIN WKDQGLPL APSPVILLPE VGHDEGITYS	
サルRAGE	PGGTVLITCA ISAQPPFQIN WKDQGLPL APSPVILLPE VGHDEGITYS	
ヒトRAGE	PGGTVLITCA ISAQPPFQIN WKDQGLPL APSPVILLPE VGHDEGITYS	

Figure 1B

【図 1 C】

RAGEアミノ酸配列のアラインメント (続き)

	351	400
マウスRAGE	CVATHPSHGP QSEPPVSIRV TETGEGQAA QSVGGSGLGT LALALGILGG	
ラットRAGE	CVATHPSHGP QSEPPVNIKV TETGEGQAA QSVGGSGLGT LALALGILGG	
ウサギRAGE1	CVATHPSHGP QSELPISIS.V..... QSEGGSGLGT LALALGILGG	
ウサギRAGE2	CVATHPSHGP QSELPISIS.V..... QSEGGSGLGT LALALGILGG	
ヒトRAGE	CVATHPSHGP QSERAVSISI IEPGEGGPTA QSVGGSGPPT LALALGILGG	
サルRAGE	CVATHPSHGP QSERAVSISI IEPGEGGPTA QSVGGSGPPT LALALGILGG	
ヒトRAGE	CVATHPSHGP QSERAVSISI IEPGEGGPTA QSVGGSGLGT LALALGILGG	
	351	400
マウスRAGE	LQVALLVGA ILWRRKQPRR EERKAPENQE DEERAEELNQ SEEPAGESS	
ラットRAGE	LQVALLVGA ILWRRKQPRR EERKAPENQE DEERAEELNQ SEEPAGESS	
ウサギRAGE1	LQVALLVGV ILWRRKQPRR EERKAPENQE DEERAEELNQ SEEPAGESS	
ウサギRAGE2	LQVALLVGV ILWRRKQPRR EERKAPENQE DEERAEELNQ SEEPAGESS	
ヒトRAGE	LQVALLVGV ILWRRKQPRR EERKAPENQE DEERAEELNQ SEEPAGESS	
サルRAGE	LQVALLVGV ILWRRKQPRR EERKAPENQE DEERAEELNQ SEEPAGESS	
ヒトRAGE	LQVALLVGV ILWRRKQPRR EERKAPENQE DEERAEELNQ SEEPAGESS	
	401	
マウスRAGE	AGGP- (配列番号 3)	
ラットRAGE	AGGP- (配列番号 14)	
ウサギRAGE1	TGGF* (配列番号 11)	
ウサギRAGE2	TGGF* (配列番号 13)	
ヒトRAGE	TGGF* (配列番号 7)	
サルRAGE	TGGF* (配列番号 9)	
ヒトRAGE	TGGF- (配列番号 1)	

Figure 1C

【図 2】

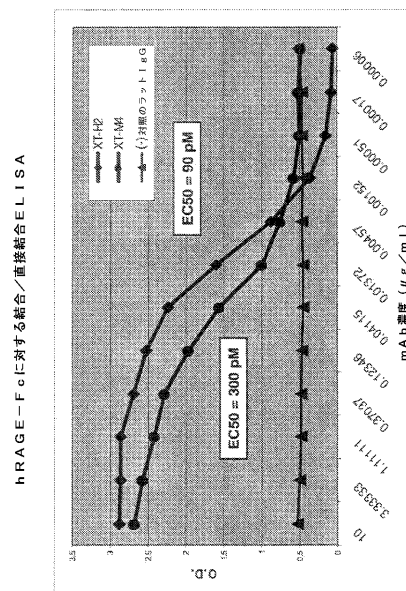


Figure 2

【図 3】

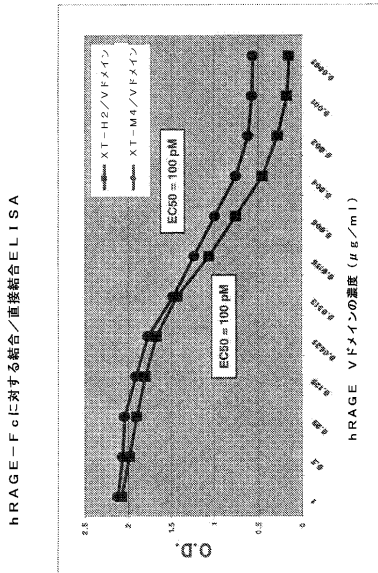


Figure 3

【図 4】

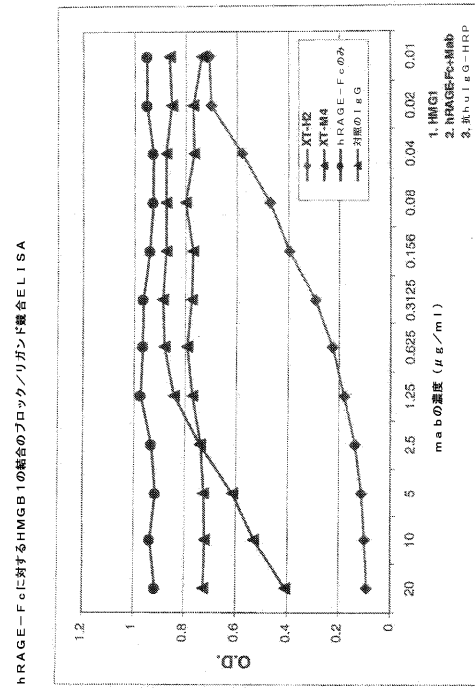


Figure 4

【図 5】

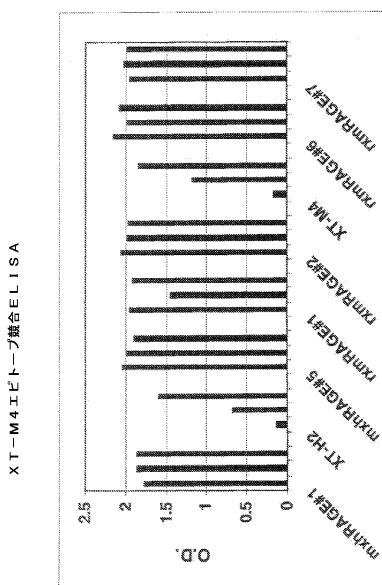


Figure 5

【図 6】

抗RAGE抗体VH領域のアミノ酸配列アラインメン

```

1                               50
XT-H1_VH CQQLKESGPG LVAPQSLSI TCTISGFSIT SYGVNVRQP PGKGLWLVV
XT-H2_VH CQQLQSGSGR LAKPGASVIM SCRASGYTPT TYNDEWVKQR PGGLWVIGY
XT-H3_VH CQQLQSGSGE LVRPGASVEL SCTISGYTPT TYNDEWVKQR PGGLWVIGY
XT-H5_VH EVLLQSGAPE LVRPGASVKI SCRASGYTPT DYNDWVKQS HGVELEWIGD
XT-H7_VH CQQLKESGPG LVAPQSLSI TCTISGFSIT SYGVNVRQP PGKGLWLVV
XT-M4_VH EVQLVESGGG LVQPGRSLEK SCTISGFSIT TYNDEWVKQR PGGLWVIGY

51                               100
XT-H1_VH INSDGRITTY NSTLKRSLSI SKMSKQVF LKNSLQTDN TATYVCAPYG
XT-H2_VH INPTQITTY NQPKKATIL TPKSSSTAY MLNLSLTSN SAVVYCTSLA
XT-H3_VH LYPSSGRITTY DERPKATIL TPKSSSTAY MLNLSLTSN SAVVYCTSLA
XT-H5_VH INPDGQITTY EQKPKATIL TPKSSSTAY MLNLSLTSN TATYVCAPYG
XT-H7_VH INHAGGSTTY NSALMSRLSI SKMSKQVF LKNSLQTDN TATYVCAPYG
XT-M4_VH INNSGQITTY PDSVKDRPTI SEINAKSTLY LQNSLRSN TATYVCAPYG

101                               120
XT-H1_VH GYFFTANDYW GQGTSTVTS66 (配列番号18)
XT-H2_VH G...YTIDYW GQGTSTVTS66 (配列番号21)
XT-H3_VH ...RPFVYW GQGTSTVTS66 (配列番号24)
XT-H5_VH HY...YALDYW GQGTSTVTS66 (配列番号20)
XT-H7_VH ...YIANDYW GQGTSTVTS66 (配列番号26)
XT-M4_VH DIT...GFDYW GQGTSTVTS66 (配列番号16)

```

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

```

1      50
XT-H1_VL  DIQMTQSPFS LSTSLGQKVT ITCKASQDIN ....KFLAW YQHTPKGGR
XT-H2_VL  DVVLDTQTPLS LPVNJGDAQS 16CKSTSL MSDGFTYLDW VLQKPSQSPQ
XT-H2_VL  NIVMTQSPFY MNSPFGERV ITCKASENVG ....STVSW YQKPSQSPK
XT-H5_VL  DIVLTQSPFAS LAVSLGQRAT 16CKASEVD N.YGISFPMN PQKPSQSPK
XT-H7_VL  DIQMTQSPFS LSAVLGQKVT ITCKASQDLY ....KFLAW YQKPSQSPK
XT-H4_VL  DIQMTQSPFS MVSLSGVTIT ITCKASQDV. ....GI.YVNW PQKPSQSPK

51      100
XT-H1_VL  LFIYTTSTLQ PGIPSRFSN GSGEDYSFSI SNLEPDIAT YYCLQ.YDNM
XT-H2_VL  LLIYLYSDRT SGVPRFSSS GSGTDTLTET SEVEARELDV YYCFQSNSLP
XT-H3_VL  LLIYVSAENET SGVPRFSSS GSATDTLTET SEVEARELDV YHGGTITTP
XT-H5_VL  LLIYVTSKQC SGVPRFSSS GSGTDTLTET SEVEARELDV YHGGTITTP
XT-H7_VL  LLIYVTSSTLQ PGIPSRFSSS GSGEDYSFSI SNLEPDIAT YYCLQ.YDNM
XT-H4_VL  RMIVRATHLA SGVPRFSSS RSGSIVSLTI SSLESDVAD YHDLFDEHP

101      112
XT-H1_VL  YTFGGGKLE IK (配列番号 10)
XT-H2_VL  LTFGGGKLE IK (配列番号 22)
XT-H3_VL  YTFGGGKLE IK (配列番号 25)
XT-H5_VL  WTFGGGKLE IK (配列番号 28)
XT-H7_VL  YTFGGGKLE IK (配列番号 27)
XT-H4_VL  LTFGGGKLE IK (配列番号 17)

```

Figure 7

【図 8】

ヒト RAGE をコードする cDNA のヌクレオチド配列

```

1  GACCTTGAAA GGAAGCAGGA TGACAGCCGG AGCAGCAGTT GAGCCCTGGG
51  TGCTGGTCTT CAGTCTGTGG GGGGAGTAG TAGGTGCTCA AATCATCACA
101  GCGCGGATCG GTGAGCCACT GGTGTCTGAG TGTAGGGGG CCCCAAGAA
151  ACCACCCGAG CAGCTGGAAAT GGAACCTGAA TACAGCCCGG ACAGAAGCTT
201  GGAAGGTCCT ATCTCCCGAG GAGGGCCCTT GGAATAGTGT GGTCTGTGTC
251  CTTCCTCAAG GCTCCCTCTT CTTCCGCTCT GTGGGATCC AGAATGAGGG
301  GATTTTCGCG TGCCAGGCAA TGAACAGGAA TGAAGAGGAG ACCAAGTCCA
351  ACTACCGAGT CCGTGTCTAC CAGATTCCTG GGAAGCCCGA AATTATAGAT
401  TCTGCTCTGT AACTCAGGCG TGGTGTTCCT AATAAGGTGG GACATGTGT
451  GTGAGAGGGA AGCTACCTCG CAGGAGCTCT TAGCTGGCAC TTGATGGGA
501  AGCCCTCTGT GCTATATGAG AAGGAGATAT CTGTGAAGGA AGAGACCCAG
551  AGACACCCCT GAGCCGGGCT CTTCACTG CAGTGGGAGC TAATGTGTAC
601  CCGAGCCCGG GGAAGAAATC CCGATCCGAC CTTCTCTGT AGCTTCAGCC
651  CAGGCTTCCG CCGAGCCCGG GCTTTCGACA CAGCCCTAT CCGAGCCCGT
701  GTCTGGGAGC CTGTGCTCTT GAGGAGGCTC CAATTGTGTG TAGAGCCAGA
751  AGGTGAGGCA GTAGCTCTCT GTGGAACCTT AACCTTGACC TGTGAAGTCC
801  CTGCCCCAGC CTCTCTCTAG ATCCACTGGA TGAAGAGATG TGTGCCCTTA
851  CCGCTTTCCT CCGAGCCCTG GCTGATCTCT CTTGAGATAG GGCCTCAGGA
901  CCGAGGAAAC TACAGGTGTG TGCCACCCA CCGAGCCAC GGGGCCCAGG
951  AAAGCCGTGC TGTGAGCATC AGCATCATCG AACCCAGGCA GGAAGGCCCA
1001  ACTGCAAGCT CTGTGGGAGG ATCAGGGCCA GGAATCTAG CCCTGCCCTT
1051  GGGGATCTCG GAGGCTCTGG GAGCAGGCGC TGTGTCTCAT GGGATCATCT
1101  TGTGGCAAGG GCGCGGAGCG CAACGAGAGG AGAGGAGGCG CTCGAAAGAC
1151  CAGGAGGAAG AGAGGAGGCG TGCAGAGCTG AATCAGTCGG AGGACCTGGA
1201  GGCAGGCGAG AGTGTACTTG GAGGCTCTTG AGGGGCCGAC AGACAGATCC (配列番号 6)

```

Figure 8

【図 9】

カニクイザル RAGE をコードする cDNA のヌクレオチド配列

```

1  GACCTTGAAA GGAAGCAGGA TGACAGCCGG AGCAGCAGTT GAGCCCTGGG
51  TGCTGGTCTT CAGTCTGTGG GGGGAGTAG TAGGTGCTCA AATCATCACA
101  GCGCGGATCG GTGAGCCACT GGTGTCTGAG TGTAGGGGG CCCCAAGAA
151  ACCACCCGAG CAGCTGGAAAT GGAACCTGAA TACAGCCCGG ACAGAAGCTT
201  GGAAGGTCCT ATCTCCCGAG GAGGGCCCTT GGAATAGTGT GGTCTGTGTC
251  CTTCCTCAAG GCTCCCTCTT CTTCCGCTCT GTGGGATCC AGAATGAGGG
301  GATTTTCGCG TGCCAGGCAA TGAACAGGAA TGAAGAGGAG ACCAAGTCCA
351  ACTACCGAGT CCGTGTCTAC CAGATTCCTG GGAAGCCCGA AATTATAGAT
401  TCTGCTCTGT AACTCAGGCG TGGTGTTCCT AATAAGGTGG GACATGTGT
451  GTGAGAGGGA AGCTACCTCG CAGGAGCTCT TAGCTGGCAC TTGATGGGA
501  AGCCCTCTGT GCTATATGAG AAGGAGATAT CTGTGAAGGA AGAGACCCAG
551  AGACACCCCT GAGCGGGGCT CTTCACTG CAGTGGGAGC TAATGTGTAC
601  CCGAGCCCGG GGAAGAAATC CCGATCCGAC CTTCTCTGT AGCTTCAGCC
651  CAGGCTTCCG CCGAGCCCGG GCTTTCGACA CAGCCCTAT CCGAGCCCGT
701  GTCTGGGAGC CTGTGCTCTT GAGGAGGCTC CAATTGTGTG TAGAGCCAGA
751  AGGTGAGGCA GTAGCTCTCT GTGGAACCTT AACCTTGACC TGTGAAGTCC
801  CTGCCCCAGC CTCTCTCTAA ATCCACTGGA TGAAGGATGG TGTGCCCTTA
851  CCGCTTTCCT CCGAGCCCTG GCTGATCTCT CTTGAGATAG GGCCTCAGGA
901  CCGAGGAAAC TACAGGTGTG TGCCACCCA CCGAGCCAC GGGGCCCAGG
951  AAAGCCGTGC TGTGAGCATC AGCATCATCG AACCCAGGCA GGAAGGCCCA
1001  ACTGCAAGCT CTGTGGGAGG ATCAGGGCCA GGAATCTAG CCCTGCCCTT
1051  GGGGATCTCG GAGGCTCTGG GAGCAGGCGC TGTGTCTCAT GGGATCATCT
1101  TGTGGCAAGG GCGCGGAGCG CAAGGAGAGG AGAGGAGGCG CTCGAAAGAC
1151  CAGGAGGAAG AGAGGAGGCG TGCAGAGCTG AATCAGTCGG AGGACCTGGA
1201  GGCAGGCGAG AGTGTACTTG GAGGCTCTTG AGGGGCCGAC AGACAGATCC (配列番号 6)

```

Figure 9

【図 10】

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  ACTAGACTAG TCGGACCAAT GACGAGGGGG CAGGCGCCGG AGCCTGGGTG
51  CTGTGCTTCA GTCTGTGGGG GGCAGCAGTA GGTGTCTGAG ACATCAGAGC
101  GCGGATTTGG GAGGCGCTGG TGTGAAATGG TAAGGGGGCC CCCAAGAGGC
151  CAGCCACGCA GCTGGAATGG AAATCTGACA CAGGCGGAGC AGAAGCTTGG
201  AAGGTCCTTT CTGCGGAGGG AGGTCTATGG GACAGTGTGG CCGCTGTCTT
251  CCGCAATGCG TCCCTCTCC TCCGCTCTGT TGGGATCCAG GATGAGGGGA
301  CTTTCCGCTG CCGGACACA AACGAGATG GNAAGGAGAC CAGGTCCAAT
351  TACCGAGTCC GGGTCTACCA GATTCCTGGG AAGCCAGAGA TCTGTGATCC
401  TGCTCTGAA CTCACGGCCG GTATCCCGAG TAAGGTGGGG ACATGTGTGT
451  CTGATGGGGG ATATCTCTCT GGGACTCTCA GCTGACACAT GGTGTGGAAA
501  CTCTCTGTAC CTGACGGGAA GGGAGTGTCT GTGAGGAGAC AGACAGGAG
551  GCACCTGAC ACAGGGGCTCT TCACCTGACA CTCAGAGCTG ATGTGTGATC
601  CAGCGGGGGG AGGAGGGGCT CCGCCAGCTT TCTCTGTAG CTTACGCCCC
651  GGGCTGCCCC GCGGCGGGCG CTGATACACA GCGCCATCC AGCCAGGTGT
701  CTGGGAGCCT GGGGCGGCTG AGGTTCGCTT GCTGTGGAG CCGAGAGGTG
751  GAGCAGTAGC TCTGTGTGAG ACTGTGACCC TGACTGTGCA AGCTCTCTGC
801  CAGGCGGCTG CTCGAATCCA CTGATGAGG GATGATATGT CCGTACCCCT
851  GCGCCCGGAG CCGCTCTGCG TCTCTCTGTA AGTGGGGGCT CAGATATAGG
901  GAGCTTACAG CTGCTGTGGC ACCCATCCA ACCGTGGGCG CAGGAAAGGC
951  CTTCCTACCA GCATCAGTGT CCGCTCTGAG GGTGTCTCAG GCTGTGGGAC
1001  TCTAGCTCTG GCGCTGGGGA TCTGTGGGAG CTTGGGAGCA GCTGCGCTGC
1051  TTGTCGAGAT CATCCTGTGG GGAAGGCGCA AACGCGCAGG AGAGCAGAGG
1101  AAGGTCCTTG AAACACAGGA GAGCAGGAGG GAGGCGCAGC AACTGTGATC
1151  GTGAGGAGCT CCGAGGGCGA TGGAGAGGCG TACAGAGAGG CCGTGAATAG
1201  TTTAGCGGCG CCAATTTTAT (配列番号 10)

```

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  ACTAGACTAG TCGGACGATG GCGACGAGGG GCGCGGCGGG AGCCTGGGTG
51  CTGGCTTTCA GTCTGTGGGG GGCAGCAGTA GGTGTGAGA ACHTACAGC
101  CCGGATTGGG GAGCCGCTGG TCTGAAATG TAAAGGGGCC CCGAAGAAGC
151  CACCCAGACA GCTGGAATGG AACTGAACA CAGGCAGAAC AGAAGCTTGG
201  AAGTCCCTTT CTCCCCAGGG AGGTCATGG GACAGTGTGG CCATGTCTCT
251  CCCCAGTGGC TCCCTCTCTC TTCCGGCTGT TGGGATCCAG GATGAGGGGA
301  CTTCGCGGTG CCGGACACCA AACGGAATG GAAGGAGGAC CAGTCCAAAT
351  TACGAGTCC GGGTCTADCA GATTCCTGGG AAGCCAGAGA TCTTGGATCC
401  TCCCTCTGAA CTCACGGGCG GTATCCCGAG TAAAGTGGGG ACATGTGTGT
451  CTGATGGGGG ATATCTCTCG GCGACTCTCA GCTGGACATG GATGGGAAA
501  CTCTCTGTAC CTGACGGGGA GGGAGTGTCT GTGAAGGAGC AGACAGGAG
551  GATCTGTGAC ACGGGGCTCT TCACCTGCA CTCAGAGCTG ATGGTACTTC
601  CAGCTGGGGG AGGAGGCTCT CCCCACACT TCTCTGTAG CTTCAGCCCC
651  GGCCTACCCC GCGCGCGGGC CTGATACACA GCGCCCATCC AGCCAGTGT
701  CTGGGAGCCT GGGGCCCTGG AGGTCGCTT GCTGTGGAG CCGAAGGATG
751  GAGCAGTAC TCTGTGTGAG ACTGTGACCC TGACCTGTGA AGCTCTGTCC
801  CAGCCCCCTC CTGAAATCCA CTGGATGAAG GATGGTATGT CCTACCCCT
851  GCGCCCGAGC CCGCTCTCTG TCTCTCTGTA GGTGGGCTCT CAGATGAGG
901  GATCTTACAG CTGCTGCGCC ACCATCCCA ACGTGGGCG CCGAGGAAGC
951  CTTCCTATCA GCATCAGTGT CGAGACAGCC GAGGATGGCG CACTGCAAG
1001  CTCTGAGGCT GCTCAGGCCC TGGGACTCTT AGCTCTGCCC CTGGGATCCC
1051  TGGGAGGCTT GCGAACAGCT GCGCTCTCTG TGGGATCAT CCTGTGGGGA
1101  AGCGGGAAG CCGCAGGAGA GCAGAGGAAA GTCCCGGAAA ACCAGGAGGA
1151  CAGGAGGAAA CCGCAGAGAC TGATCAGCT GAGGCTCGGG GAGGCGATGG
1201  AGAGCGGTAC AGGAGAGGCC TGAATATTT AGCGGCCGCA TTCTTAT (配列番号12)
```

Figure 11

【図 1 2 A】

ヒDRAGE (クローン18.2) をコードするゲノムDNA配列

```
1  TTTTITAAAA ACTACTATTT GAAATTTGGA GGGGGAAGAG TGGGAAGGGA
51  GTATTGCAAA AATAATGTAA ATATGGGTGG GGGTGGTGT ATATGTATCT
101  TCTCAATTT CCCCAGAAAT GAGGTATCTT TTGTACAC CAAATACAA
151  TGGTAGGGAG AGGGAGGAGG TTGCAAAAAG CCAAGTGTGG GGGAAAAGTA
201  AATTCACAC TGTCCCATCC TCAGCCCTAA ACCCTACAT CTGATCCCTT
251  CAGACATCTT CAGGATTTTG CAGAGCTGTC AGAGTGGGGA ACCCTCCCA
301  TTAAGATCTT GGCAGGACT GGGGACAGGT TGGAGTGTG ATGGGTGGGG
351  GGGTGGGAGG CATGGGTGG GGCAGTCTCT CTCTCACTT GTAACTTGT
401  GTATTTTAC AGRAAAAAAA CAAATGTCAG TTITAAATAA AGAAGTTTCT
451  TTTTTCCTG GGTTAGTGT AGAATTTTT TCAAAAACA TGAGAAACCC
501  CAGAAAAAAA ATATATATTT TTCTTTACG AGCTCCAAA CAGGTTTCTC
551  TCTGTGCCC CAGCCTTGGC TTCAGATGC AGTCCCAAT GCACCTTGC
601  AATCAACAGT CTGGCTCAA CCTATTGAT GCAACCTTGC CAGTCAACA
651  TGGGCTCCA GTGGCTCAC AGGCAGCCTT GATGACTGA TGGAAATAA
701  AGGATAGGGG GCTCTGAGGG AATGAGACCC TAGAGGTAC ACTCCCATC
751  CCCCAGGAAA GTGACTGTGT CCGAGGCTGT GTAGTGCCA GGGGTGGGCT
801  GATAATTATT TCTCTAGTAC CTGAAGGACT CTGTCCCAA AGGCATGAAT
851  TCTTAGCAAT CCGTGTGACA AGATGACTGA AAGATGGGG CTGGAGAGAG
901  GTTACAGGCC CCACTAGGG GAGAGGCCAC AGCGCGGAGA GGGTCAGACA
951  GAGCTATGAG CCTGAAAGGA AGCAGGATGG CAGCGGAGC AGCATTTGGA
1001  GCTTGGGTGC TGGTCTGAG TCTGTGGGCT GAGGCATCC CCCCACCAAC
1051  TGACCTCTCC TAGAGAAAG ACTTGAAACC CATACCCAAA TTCCCTTAGA
1101  ACTTTTCCA GACCCAGGG AAGCTGTTTT CAGAGTCCCG CAGCAGCCTT
1151  GTCCAAATTT TGTAGGCTT CATTACCTC CTGCGCTCTT ACCAGATGC
```

Figure 12A

【図 1 2 B】

ヒDRAGE (クローン18.2) をコードするゲノムDNA配列(続き)

```
1201  TGTCTCCAG GGCAGTAGT AGGTGCTCAA AACATCAGG CCGGATCGG
1251  TGAGCCACTG GTGCTGAAGT GTAAAGGGGG CCCCAGAAA CACCCCAAGC
1301  AGCTGGAATG GAAACTGATA AGTGGGATCT CTGTGCAAG TTCCCAACTT
1351  CAGGGAGGAC CAGCAATGAT TCGGATCCCC ATCACTCTGC CTGCAATGAC
1401  TTTCCCAAG GCTTGCATCT GTTTAGGCCC TGCTCTCTG CTCTAGAAAT
1451  ACAGGCGGGA CAGAGCTTGG GAAGTCTCTA TCTCCCAAG GAGGCGCTG
1501  GATAGTGTGG GCTGTGTGTC TTCCCAAGGG CTCCCTCTTC CTTCGAGCTG
1551  TCGGATCCCA GATGAGGGGG ATTTCTGCTT GCGAGGCAAT GAACAGGAAT
1601  GGAAGAGGGA CCAAGTCCAA CTACGAGTCC GGTGTCTACC GTAAGATTC
1651  CAGGCGCTTC TCCAGGCCCC CCTCTCTTAT CTCAGAAAA GCTTCACCC
1701  CTAGCCTTGG CCAATGAGGG CCGTCTACTT CCACTGCCCC CATTTCCACA
1751  CACAGAGTTT GAGAACCCTC ACANTTACAG CCTCTGATTG GATTTTCTCT
1801  TCTTCAGAGA TTCTTGGGAA GCGGGAATTT ATAGATTCTG CCTCTGAATC
1851  CACGCTGTGT GTTCCCAACA AGTATGTGAA AGAAGAGAGA AGTAGAATAT
1901  GGTCTGTGGA ACAGGAGGCG AGTGTGTGTG GGTGTGTGGC ATCTCTCATT
1951  TTCAGAGGAT TGTGAGGTCA CCACTCTTTC CCGAGTGGG GACATGTGTG
2001  TCAGAGGGAA GCTACCTTGC AGGACCTTAT AGCTGACAT TGGATGGGAA
2051  GCGCCTGGTG CCTAATGAGA AGGTGATGTC CCAAGGTGCC CGCCAGCTG
2101  CTTCTCTCCT GATCTCACTG CCGACCCCA CTTGGGATAA TTGTCTTAT
2151  CTTCTTACCA TAGGATATC TGTGAAGGAA GAGCAGAGGA GACACCTGGA
2201  GCGGCGCTTC TTCACTTGC AGTGGAGCT ATGTGTGAGC CCGAGCCGGG
2251  GAGGAAATCC CCACTCCACC TTCTCTGATA GCTTCAAGCC AGGCTTCCC
2301  GAGCGCGGG CTTTGCACAC AGCCCCATC CAGCCCCGTC TGTGGGTGGA
2351  GCGAGGCTGG GAGAGGCTCC AAGCTCATGT GATGTGATTC TGGAAATGCG
```

Figure 12B

【図 1 2 C】

ヒDRAGE (クローン18.2) をコードするゲノムDNA配列(続き)

```
2401  ACCCTTAGGG AAGAGGAGG TCAAGCCCAT GGCCTATGG ATCACTCACA
2451  AGTGTACTTC TCCCTCTCAT AACCTTCCA ACTCCAGAG CCGTGTGCTC
2501  TGGAGGAGGT CCAATGTGTT GTAGAGCCAG AAGGTGGAGC AGTAGCTCTT
2551  GGTGGAACCG TAACTCTGAC CTGTGAAGTC CCGTCCGAGC CCTCTCTCTC
2601  GATCCACTGG ATGAAGGATG TGAATGACCT GGAAGAGGAG CTTGGAGGCT
2651  AGGGTGAAAC ATACTAGACA ACAGGAGGAG CAGAGGGCTA ACCAGGGAAG
2701  GGCAGGCTAG GAGCTGAGGA GGAAGAGAGG GTATTGGAAG ATGTGGAGAC
2751  AAAAAGATTA GAGTTTTGAA ATAGTCTCCT CTCCCTTCCC CCGACAGAGG
2801  TGTGCGCTTA CCGCTTTCCC CAGGCTCTGT GCTGATCCTC CCGTAGATAG
2851  GGGCTCAGGA CAGAGGAACC TACAGGTGTG TGGCCACCCA TCCCAAGCAC
2901  GGGGCCAGAG AAGCCCTGTC GTTCAGCATC AGCATCATCG GTGAGCTCTC
2951  TCTCCAGGCC CTACAGACCC TGGGCTTAGG GTGAGGATA GACAGGCTC
3001  TAAITTCCTG GCGCATCTCT GCCTTACCCC CAGAGCCAG CCGACCTCTC
3051  CTTCTCTGCA CCGACACCCA AACCTTCCCT GCGCCACTCA AATCTGTGCA
3101  AGAGAGCAGC CAGGCTCTCT CTTCTCTCCC TCTGAACATA AAAAGAGGAA
3151  AGACCGCTGG GCGAGGTGCG TCAGCCTGCT AATCCCAACA CTTTGGGAGG
3201  CTGAGGCTGG TGGATCACTT GAGGTGAGGA GTTCAAGACC AGTCTGACCA
3251  ACATGAGAGA ACCCATTTTC TACTAAAAAT ACAGAAATAG CCAATTTTGG
3301  TGGCAGCTGC CTGTATCCC AGCTACTTGG GAGGCTGAGA CAGGAAATAC
3351  ACTTGAACCC GGGAGGCTTA AGTTGGGCTG AGTCAAGATC CTGCCATTGC
3401  ATGCCAGGCT GCGCAACAG AGCGAAATCT CATCTGAA AAAAAGAGAA
3451  AAGAGAGGGA AAGACTCCAC TGGAGCTCCC ACTAAATAC CTTCTCTCAA
3501  CCGAAGTCT TCTTTCTGA CTGATCCAA CTTTGTCTTC CAGAACAGAG
```

Figure 12C

【図 12 D】

ヒト RAGE (クローン 18_2) をコードするゲノム DNA 配列 (続き)

```

3551  CGAGGAGGGG CCAATGACG GTGAGGGTTT CGAGAAAGTC AGGGAAGCAG
3601  AAGATAGCCC CCAACACATG TGACTGCGGG GATGCTCAGC AAGAAAGGAA
3651  TGGTGGCCGG GCGCGGTGGC TCAGGCGCTGT AATCCACAGCA CTTTGGGAGG
3701  CCGAGATGGG CGGATCAGCA GGTGAGGAGA TCGAGACCAT CTGGCTTAC
3751  ACAGTAAAC CCATCTCTA CCAAAAAA ATACAAAAA CTAGCCGGGC
3801  GACGTGGCGG GCGCTGTAG TCCAGCTAC TCGGAGGCT GAGGACAGAG
3851  AATGGTGTAA ACCCGGAGG CGGAGCTTGC AGTGAGCTGA GATCCGGCCA
3901  CTGACTTCCA GCCTGGGCAA CAGAGCCAGA CTCATCTCA AAAAAAATA
3951  AAAAGAAAGA AAGGATGCT GATGCTGGG GCTGTGCTC TCAATTTTC
4001  CTGTCTCCCT ACAGGCTCTG TGGGAGGATC AGGGGCAAGG ACTCTAGCCC
4051  TGGCCCTGGG GATCCTGGGA GCGCTGGGGA CAGCCGCTCT GTCATTGGG
4101  GTCATCTTGT GGCAGAGGCG GCGAGCCAA CGAGAGGAGA GTTGAAGTGA
4151  GAAGGCCAGA CTCCTCAGAC CTAGGGCTTC CAGGACAGCA GTGAGAGGG
4201  ATGGGGGTG GAACGACAC GTGAGGCTT CTCACATC TTCTCTCTCA
4251  GGAAGGCTTC AGAAACAGG GAGGAGAGG AAGAGCTGCG AGAGCTGAAT
4301  CAGTCGGAGG AACCTGAGGC AGGCGAGAGT GGTACTGGAG GCGCTTGAAG
4351  GCGCCACAGA GAGATCCCAT CCATCAGCTC CCTTTCTTC TTCCCTGAA
4401  CTGTTCTGGC CCCAGACAA CTCTCTCTG TATAACCCCA CCTTCCAAA
4451  CTTTCTCTCA CAGCAGAGC CCCCCAAT GATGAGTAA CACTGACAC
4501  ATCTTGCTCT TGTGTGTCTG TGTATATGTG TGTGAGACAC AACCTCACCC
4551  CTACACCTT GAGGCGCTG AAGGAAGGG ACTCACCCC ACATGACCC
4601  AAGCATCTAC TCAAGTTGGG GAGAAAGTGC TTCTGCAAG AGAGGAGGG
4651  AGGAGGCTG GGGGCAACT TGGGAAGAGA TCCCATCAT CATTTTCAAC

```

Figure 12D

【図 12 E】

ヒト RAGE (クローン 18_2) をコードするゲノム DNA 配列 (続き)

```

4701  TTTTATTG AATTGTATT AAAGGAGGTA GTAGGGGGA GGAAGCACTT
4751  AAGATCAGA ACCCATATTA GACTCTGGG AGTGAATAA TAATTAAT
4801  CAATAAGATG GAGTGGGGG AAGATCAGA GGGAGCTTTC CCCCCCTTC
4851  AAGATCAAT CAAGAAATCA GGGAAAGCAA AGACTTAGAA GAGAGGAAG
4901  ACATCTCTTC AATCCATCCT CTTTCCCGAG GGCAGAGAT TATANTGTTA
4951  CTGAGTGAGG TTCTGAGCAG AAGGCTCTCC CATCTATGCA CAGACTTCAC
5001  TCCCTCTCCC CAGCTTTTCC TGGAGATGT CCAGGCTGG CCTTAGCCAA
5051  CAGAAATAGA GAGTCAAGS GGTCCATCA GTTAGGAAGG GTACGACGG
5101  ACCCCCAATA CTGATCTCC TCTGGTGA GGTGGGCGG AAGGAGACAT
5151  AGCTCAATA CTGAGCAGCC AAAAAAGGA GAGATGGCG AGAAACAGGA
5201  AAGAGGAATC CTGCGAGCTG GAGGCGGGGT GACCTGTCTC CAGATCCACA
5251  CCTGTGGGAG AGAGGAAGC TGTGAAGCA TATGCTCTA GGTGGGAGG
5301  G (配列番号 15)

```

Figure 12E

【図 13】

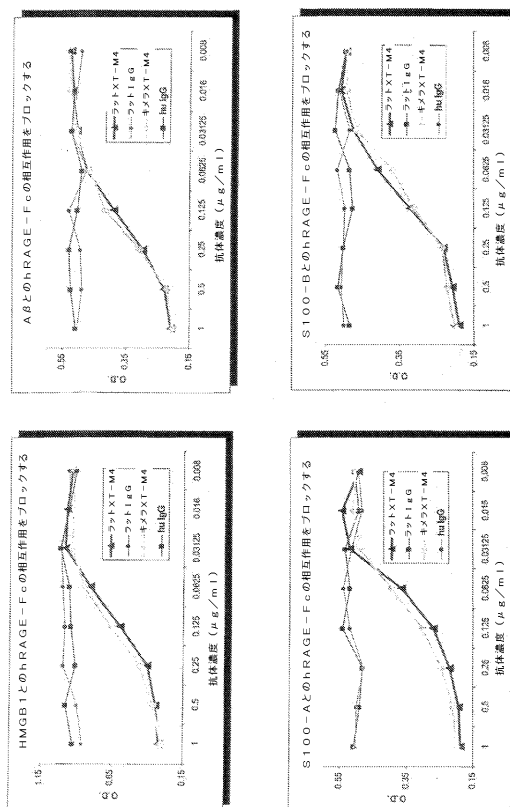


Figure 13

【図 14】

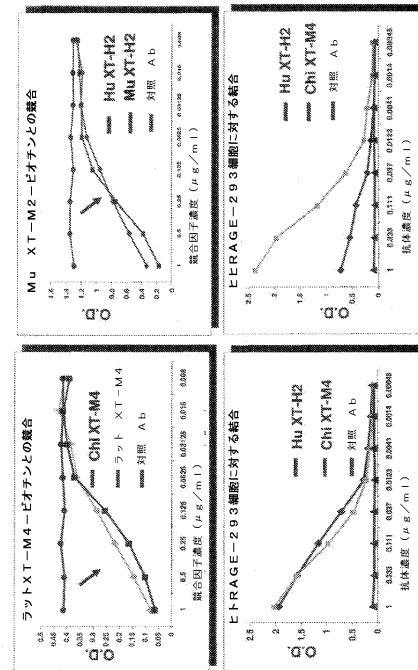


Figure 14

【図 15】

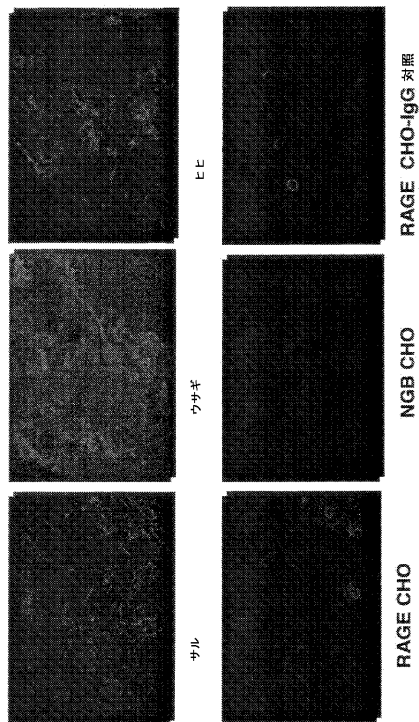


Figure 15

【図 16】

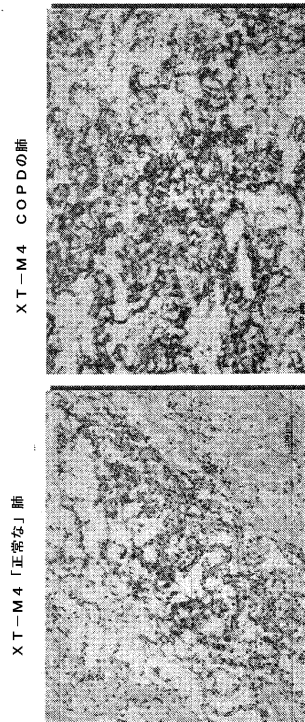


Figure 16

【図 17】

ヒト化マウスXT-H2抗体VH領域のアミノ酸配列

XT-H2_hvH_V2.0	1	50
XT-H2_hvH_V2.7	1	50
XT-H2_hvH_V4.0	1	50
XT-H2_hvH_V4.1	1	50
XT-H2_hvH_V2.0	51	100
XT-H2_hvH_V2.7	51	100
XT-H2_hvH_V4.0	51	100
XT-H2_hvH_V4.1	51	100
XT-H2_hvH_V2.0	101	117
XT-H2_hvH_V2.7	101	117
XT-H2_hvH_V4.0	101	117
XT-H2_hvH_V4.1	101	117

Figure 17

【図 18】

ヒト化マウスXT-H2抗体VL領域のアミノ酸配列

XT-H2_hvL_V2.0	1	50
XT-H2_hvL_V3.0	1	50
XT-H2_hvL_V4.0	1	50
XT-H2_hvL_V4.1	1	50
XT-H2_hvL_V2.0	51	100
XT-H2_hvL_V3.0	51	100
XT-H2_hvL_V4.0	51	100
XT-H2_hvL_V4.1	51	100
XT-H2_hvL_V2.0	101	112
XT-H2_hvL_V3.0	101	112
XT-H2_hvL_V4.0	101	112
XT-H2_hvL_V4.1	101	112

Figure 18

【 図 1 9 】

ヒト化マウスX T-H 2 抗体V H領域のアミノ酸配列

XT-M4_hvH_V1.0	EVQLVESGGG LVQFGKSRLLK SCVVEGPTFN	<u>HYWMTWIRQT</u>	PGKGLEKVAS
XT-M4_hvH_V1.1	EVQLVESGGG LVQFGGSRLLK SCASGPTFN	<u>HYWMTWVRKA</u>	PGKGLEKVAS
XT-M4_hvH_V2.0	EVQLVESGGG LVQFGGSRLLK SCASGPTFN	<u>HYWMTWVRKA</u>	PGKGLEKVAS
XT-M4_hvH_V1.0	<u>LDNSGNTTYY</u>	<u>PDSEVKDRFTI</u>	SRDNAKSTLY LQNNLSRSD TATYYCTWAG
XT-M4_hvH_V1.1	<u>LDNSGNTTYY</u>	<u>PDSEVKDRFTI</u>	SRDNANGLY LQNNLSRSD TATYYCARAG
XT-M4_hvH_V2.0	<u>LDNSGNTTYY</u>	<u>PDSEVKDRFTI</u>	SRDNANNSLY LQNNLSRSD TATYYCARAG
XT-M4_hvH_V1.0	101	119	(配列番号 3 6)
XT-M4_hvH_V1.1	<u>DIITGPDYWG</u>	<u>GGTLVTVSS</u>	(配列番号 3 7)
XT-M4_hvH_V2.0	<u>DIITGPDYWG</u>	<u>GGTLVTVSS</u>	(配列番号 3 8)

Figure 19

【 図 2 0 A 】

ヒト化マウスX T-H 2 抗体V H領域のアミノ酸配列

	1				50
XT-M4_hvL_v2.4	DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASQDVG	<u>IVYVNWQCKP</u>	GKAPKLLIYR
XT-M4_hvL_v2.5	DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASQDVG	<u>IVYVNWQCKP</u>	GKAPKLLIYR
XT-M4_hvL_v2.6	DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASQDVG	<u>IVYVNWQCKP</u>	GKAPKLLIYR
XT-M4_hvL_v2.7	DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASQDVG	<u>IVYVNWQCKP</u>	GKAPKLLIYR
XT-M4_hvL_v2.8	DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASQDVG	<u>IVYVNWQCKP</u>	GKAPKLLIYR
XT-M4_hvL_v2.9	DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASQDVG	<u>IVYVNWQCKP</u>	GKAPKLLIYR
XT-M4_hvL_v2.10	DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASQDVG	<u>IVYVNWQCKP</u>	GKAPKLLIYR
XT-M4_hvL_v2.11	DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASQDVG	<u>IVYVNWQCKP</u>	GKAPKLLIYR
XT-M4_hvL_v2.12	DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASQDVG	<u>IVYVNWQCKP</u>	GKAPKLLIYR
XT-M4_hvL_v2.13	DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASQDVG	<u>IVYVNWQCKP</u>	GKAPKLLIYR
XT-M4_hvL_v2.14	DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASQDVG	<u>IVYVNWQCKP</u>	GKAPKLLIYR
	51				100
XT-M4_hvL_v2.4	<u>ATNLADGVPS</u>	RFSGSGSDT	FTLTISSLQF	EDFATYTCLE	<u>FDEHPLTGGG</u>
XT-M4_hvL_v2.5	<u>ATNLADGVPS</u>	RFSGSGSDT	FTLTISSLQF	EDFATYTCLE	<u>FDEHPLTGGG</u>
XT-M4_hvL_v2.6	<u>ATNLADGVPS</u>	RFSGSGSDT	FTLTISSLQF	EDFATYTCLE	<u>FDEHPLTGGG</u>
XT-M4_hvL_v2.7	<u>ATNLADGVPS</u>	RFSGSGSDT	FTLTISSLQF	EDFATYTCLE	<u>FDEHPLTGGG</u>
XT-M4_hvL_v2.8	<u>ATNLADGVPS</u>	RFSGSGSDT	FTLTISSLQF	EDFATYTCLE	<u>FDEHPLTGGG</u>
XT-M4_hvL_v2.9	<u>ATNLADGVPS</u>	RFSGSGSDT	FTLTISSLQF	EDFATYTCLE	<u>FDEHPLTGGG</u>
XT-M4_hvL_v2.10	<u>ATNLADGVPS</u>	RFSGSGSDT	FTLTISSLQF	EDFATYTCLE	<u>FDEHPLTGGG</u>
XT-M4_hvL_v2.11	<u>ATNLADGVPS</u>	RFSGSGSDT	FTLTISSLQF	EDFATYTCLE	<u>FDEHPLTGGG</u>
XT-M4_hvL_v2.12	<u>ATNLADGVPS</u>	RFSGSGSDT	FTLTISSLQF	EDFATYTCLE	<u>FDEHPLTGGG</u>
XT-M4_hvL_v2.13	<u>ATNLADGVPS</u>	RFSGSGSDT	FTLTISSLQF	EDFATYTCLE	<u>FDEHPLTGGG</u>
XT-M4_hvL_v2.14	<u>ATNLADGVPS</u>	RFSGSGSDT	FTLTISSLQF	EDFATYTCLE	<u>FDEHPLTGGG</u>

Figure 20A

【 図 2 0 B 】

ヒト化マウスX T-H2抗体VH領域のアミノ酸配列(続き)

XT-M4_hvL_V2.4	101 10V	(配列番号 3 9)
XT-M4_hvL_V2.5	GTKVEIK	(配列番号 4 0)
XT-M4_hvL_V2.6	GTKVEIK	(配列番号 4 1)
XT-M4_hvL_V2.7	GTKVEIK	(配列番号 4 2)
XT-M4_hvL_V2.8	GTKVEIK	(配列番号 4 3)
XT-M4_hvL_V2.9	GTKVEIK	(配列番号 4 4)
XT-M4_hvL_V2.10	GTKVEIK	(配列番号 4 5)
XT-M4_hvL_V2.11	GTKVEIK	(配列番号 4 6)
XT-M4_hvL_V2.12	GTKVEIK	(配列番号 4 7)
XT-M4_hvL_V2.13	GTKVEIK	(配列番号 4 8)
XT-M4_hvL_V2.14	GTKVEIK	(配列番号 4 9)

【 図 2 3 】

情報要覧 T100 070125						定常状態の親和性
1 : 1結合 (Langmuir モデル (全体的な分析))						
抗体	フロセル	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	KD (M)
chi-X1-M4	FC2	3.42E+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	6.1E+06	5.0E-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	9.73E-03	3.18E-08	11.9	2.5E-08
	FC3	3.13E+06	5.69E-02	1.87E-08	29.8	2.4E-08
	FC4	3.47E+06	7.04E-02	2.027E-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	4.64E-02	1.17E-08	31.9	1.5E-08
	FC4	5.02E+06	6.61E-02	1.3152E-08	26.3	1.6E-08
	平均	3.88E+06	4.97E-02	1.29E-08		1.6E-08

Figure 23

【 図 2 5 】

マウスX T-H2 VL-VH ScFv構築物

GTGACCTAGGCGGCGCGCGCGACATCCGACACATCCAGATGACCGGATCCCGCTCTCCCTGTCCGCGCTCCG
TGACGCGCGCGCGGTCGACCATCTCCCTGCGGCTACCCAAAGTCCTCGCTGAACTCCAGCGTCTACCTCACTT
CGGCTGTGTGATGACGACGAGCGGCGGAGCGGCTCAAGCTCGTGATGATCACTCGTGTGTGCGACCGGCTCTCC
CGCGCTCGCTTCCGTTCAAGGCTCTCGGCTCGCGCAGCGCTTACGATCGACCACTCTCCCTCCCTCCCTCC
CTAGGAGCATCTGATCTACTCTACTCTGCTCAAGTCACTCTCGCTCTCCGCTTTGTGGCGGCGGAAACAA
GTGTGTGATACCAAGATTCGCGGTGATCTCGCGGCTGCTGGTGTGATCTGGAGAGAGGCTGGAAGCTCTGAG
CTGTGCGGATCTGACGCGCGGAGTGTGTGACATCTGGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ACACCTTCTACCCACCTACTGTGATGTCACTGGTGTGCGCGAGGCGCCCTGGCAAGGCGCTGGAGTGTGCGCTA
CTCAACCTCTCTACCGGGTACTACCGGATGACACCTGAGATCTGAAAGCGCGGTGTACCACTCTCGCGGAC
AACCGCAAGATCTCTTTTACCTCTGAGATGATCACTCTCGGCGCGAGACACCGGCTGTACTACTCTGCG
CCAGATGTGCGTGCTGACTACCATCTGACTCTAGTGGGCGAGGCGACCTGTGTGACCGTGTCTCTCATCTGATCA
GCTCTTAGCGGCGCT 783 bp (配列番号 5 1)

Figure 25

【 図 2 6 】

マウスX T-H2 VH-VL ScFv構築物

GTGGCCCAAGCGGCGCGGCGGCACTCGGAGGTGGAGCTCTGGTAGCTTGGCGGCGGAGCTGGTGCACGCTTG
CGCGCTCTGCTGGGCTGTGCTGGCGGCTCTCCGGCACCTCACTCAACCTACTGGATGCACCTGGGTGGC
CGAGGCGCCCTGAGAGGCGGCTGGAGTGGTGGCTGTACTCAACAACTGTCAACGGCTATACACGAGATAC
CAGAGATGTAACGACAGGCTGTACCATCTCCGGGACAGCGCAAGACCTTCCTGTATCCCAAGTGAACCT
CTCGGGGCGGCGAGGACACCGCGCTGTACTACCTGGCGAAGTGGCTGGTACACATGAGTCACTGGGG
CAGGCGACCTGGTGGGCTGTGCTAGATGGGCTGGTATCGCGCTGGTATGGTGGTATGGGAGTGGGAGTGA
CTGCTTGACATCTAGATGACACGATCGGCTCTCTCTCTGGCTCTGGTGCGGCTGAGGAGTGGGAGTCACTA
CCTCGAAGTGCACCAAGTCTCTGCTGAATCCGACGCTTCACTCACTGGATGCTTCACTACGACGAGAAGCC
TGGCAGAGGCCCTTAAGCTTCGATGATCTACCTGGTGTTCGACCGGCTGTGGTGGCTCTCTCGGTTACG
TGCTCGCGCTCGCGACGAGCTACTCTGCGACCATCTCTCTCTACGCTTGAGGAGTCTGCGCACTACT
ACTGCTGTCAAGTCAATCTCTCGCTGTGACCTTTGGCGGCGGACAAAGGTGGAATAAATTTGATATCA
GGCTCTCGGCGCT 783 bp

(配列番号 5 2)

Figure 26

【 図 2 4 】

SA-MU RAGE 1.1 統合		Langmuirモデル (全90°分布)		100°/0°/120°	
抗体	フローセル	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
chi-XT-M4	FC2	2.2E+06	4.2E-03	1.9E-09	33.5
	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	
XT-M4-V10	FC2	2.6E+06	7.8E-03	3.0E-09	32.9
	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	
XT-M4-V11	FC2	2.2E+06	4.3E-03	2.0E-09	32.6
	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	
XT-M4-V14	FC2	2.2E+06	4.3E-03	2.0E-09	29.6
	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 7 】

ラットXT-M4 VL-VH ScFv構築物

GTGGCCGCTAGGCGGCTGGGCGGACTCTCGACATCCAGATGACCCAGTCCGCCCTCTTCTCTGT
TCTGGCTCTTGTGGCGACAGATGACCATCACTCTCTGGGCTCTCTAGGATGTGGGACATC
TACTGTAAGCTGTGTCAGAGTAGAGCTGGGCAAGCTCGACGGCGGCTGATCACTCAGCGGCC
ACCAACCTTGGCGGATGGCTGGCTCTCCAGATCTCTCGGCTCTGGCTCTGGCAGCATTTTC
ACCTGACCATCTCTCTCTCCAGGCTTGAGGATTTTGGCGCACTCTCTCTGGTAGATTC
GACGAGCACCCTCTGACCTTTGGCGGCGGGAACAAGGTGGAGATCAAGGATCGCGGTGGA
TCCGGCTGGCTGGTGGATCTTGGAGGAGTAGAGGAGCTCTGAGCTGACGCTGGCTGGATCTGGC
GGCGGACTGTGGTCAAGCTTGGGAGGCTCTTGAGAGCTCTTGTCTGGCGCTCTGGGCTTCAAC
GCTTCAACAATCTGATGATACCTGGGTGAGGCGAGGCCCTTGGCAAGGGCGCTGGAGTGGGTG
GCCCTTCACTGACAGATCTGGCGCAACCACTACTACCCGCACTCTGTGTGAAGAACCGGTTCT
ACCATCTTCAGAGGAGCAACCGCAAGAACTGCTGTGATCTCGAGATGAATCTCTTGGAGGCC
GAGGATACACCGGCTGTACTACTCTGTCGACAGGGCGGATATACACCGGCTCTGCAACTCT
TGGCGGCAAGGCGACCTCTGCGGCTGCTGCTCTCTGATCAGGCGCTAGGGCGC (配列番号54)

Figure 27

【図 28】

ラットXT-M4 VH-VL ScFv構築物

GTGG/CCAGGCGGCGGCGGCACTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGCGGACTG
 GTGAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTGTGTGCGGCTCCGGCTTCACCTCAACAAC
 TACTGATGACCTGGGTGAGGCGAGGCGCTGGCAAGGCGCTGGAGTGGGTGGCTCCATC
 GACAACCTCGGCGACAACACTCTACCCCGACTCCGTGAAGGACCGGTTACCATCTCC
 AGGACAAACGCAAGAAGCTCCCTGTAACCTCAGATGAACCTCCCTGAGGCGGAGGATACC
 GCGGTGTACTACTGTGCGAGAGGCGGCGATATACCCACCGGCTTCGACTCTGGGCGCCAG
 GGCACCTGGTGACCTGTCTCTGATGGCGGTGGATCGGCGGCTGGATCTGGAGGA
 GGTGGAAGCTCTGACATCCAGATGACCCAGTCCCGCTCTCTCTCTGTCTGGCTCTGTGGC
 GACAGAGTGACCATCACTGTGGGCGCTCTCAGGATGTGGGCGATCTACGTGAATGGTCT
 CAGCAAGAGCTGGCAAGGCTCCAGGCGCTGATCTACCGGCGCACCAACTGCGCGAT
 GCGGTGCTTCCAGATCTCCGCTCTCTCTCTGGCACCGATTACCTTGACCATCTCC
 TCCCTCCAGCTTGAAGATTCCGCCACTACTGCTGAGATTGACGAGCACCTCTG
 ACCTTTGGCGCGGAACAAGGTGGAGTCAAGTCTGATCAGGCTCAGGGCC (配列番号53)
 774 bp

Figure 28

【図 29】

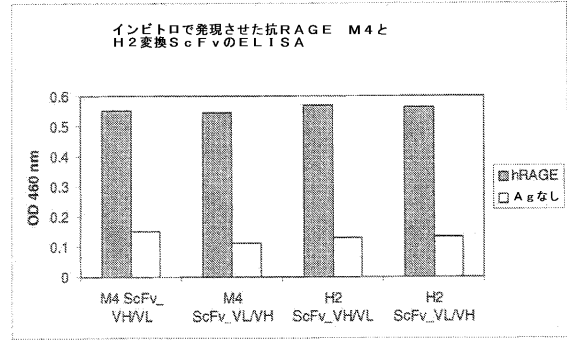


Figure 29

【図 30】

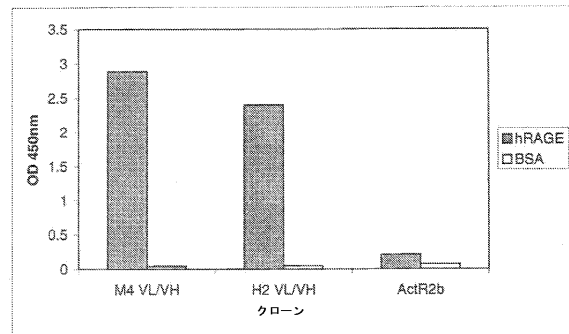


Figure 30

【図 31】

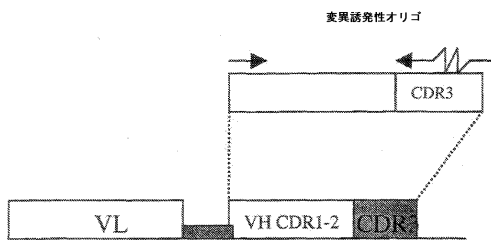


Figure 31

【図 32】

XT-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 CTGAGGCGCGAGATACCGCGGTGTACTAC
 GACTCCCGGCTCTATGCGGCGACTGATG
 C A R G D I T T G
 31 TGTGCCAGAGGCGCGATATCAACCGGC
 ACAGGCTCTCCGCGCTATAGTGTGGCGG
 F D Y H B Q S T L V
 61 TTCTGCTACTGCGGCGCGGCGACCGGTG
 AAGCTGATGACCCCGGTCGCGTGGACAC
 T V S S S D Q A S G
 91 ACCGTGCTCTCTCTGATCGGCGTCAGGG
 TGGCAGGAGAGACTAGTCCGAGTCC
 A (配列番号56)
 121 GCC (配列番号55)
 CGG

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

5' caggttgct GGC CCC TGA GGC CTG ATC AGA GGA CAC GGT CAC CAG GGT GCC CTG GCC
 CCA 241_243_211_233_224_224_214_143_233_233_TCT GGC ACA GTA GTA C 3'
 (配列番号57)

5' caggttgct CAG GGT GCC CTG GCC CCA 241_243_211_233_224_224_214_143_233_233
 TCT GGC ACR GTA GTA C 3' (配列番号58)

下線を付けた配列は、82%の野生型ヌクレオチドと残っている他の
 3つのヌクレオチド各6%の割合でスパイクした配列を示す。 io of 82% wild-type
 tides

1 = A = 82%A (野生型) + 6%C + 6%G + 6%T
 2 = G = 82%G (野生型) + 6%A + 6%C + 6%T
 3 = C = 82%C (野生型) + 6%A + 6%G + 6%T
 4 = T = 82%T (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】

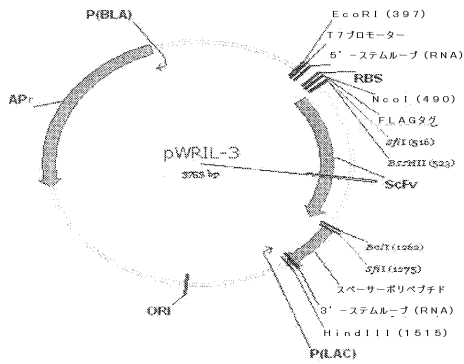


Figure 33

【図 34】

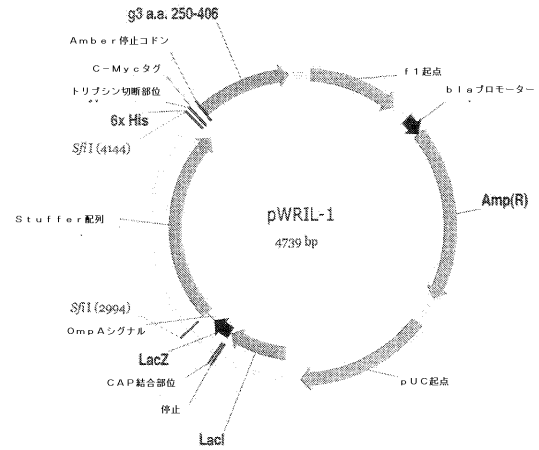


Figure 34

【図 35】

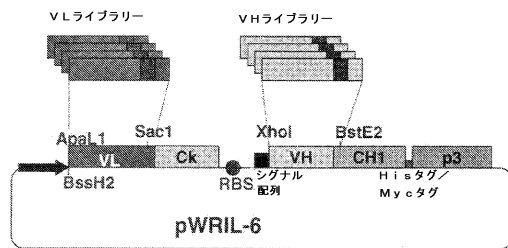


Figure 35

【図 37】

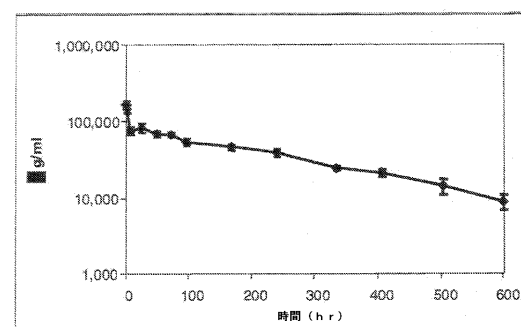
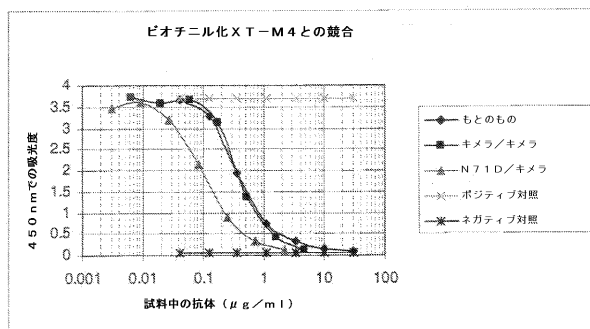


Figure 37

【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

【図 38】

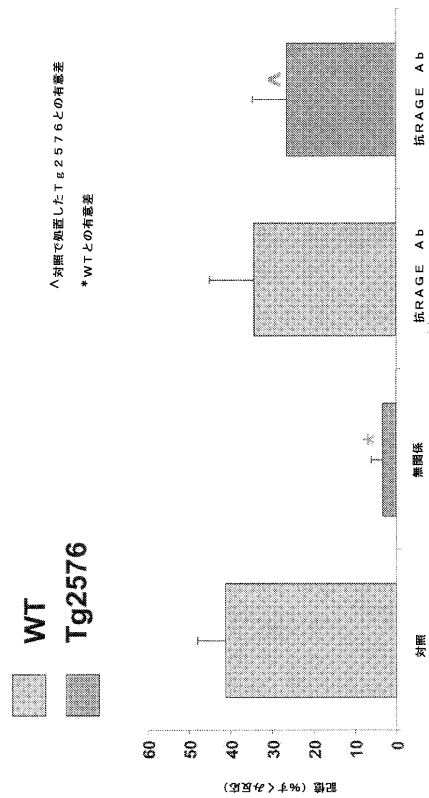


Figure 38

【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

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, 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	<p>LUE L-F ET AL: "PREVENTING ACTIVATION OF RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS 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</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	1-43

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier 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

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

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention 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.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 December 2007

Date of mailing of the international search report

20/12/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 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	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

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 allsearchable 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partment ナンバー 6

(72)発明者 タン, シャン-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, アンダーバー, 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, ウェストブルック, ケン ローズ テラス 30

(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