

(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2017-532289

(P2017-532289A)

(43) 公表日 平成29年11月2日 (2017.11.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	Z N A 4 B O 6 4
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H 4 C O 8 5
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 H O 4 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 109 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-500952 (P2017-500952)	(71) 出願人	513144626
(86) (22) 出願日	平成27年7月6日 (2015.7.6)		アッヴィ・ドイチュラント・ゲー・エム・
(85) 翻訳文提出日	平成29年3月2日 (2017.3.2)		ペー・ハー・ウント・コー・カー・ゲー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/065362		ドイツ国、6 5 1 8 9・ピースバーデン、
(87) 国際公開番号	W02016/005328		マインツァー・シュトラッセ・8 1
(87) 国際公開日	平成28年1月14日 (2016.1.14)	(74) 代理人	110001173
(31) 優先権主張番号	62/021, 308		特許業務法人川口国際特許事務所
(32) 優先日	平成26年7月7日 (2014.7.7)	(72) 発明者	バルクホルン, シュテファン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ドイツ国、6 7 0 6 1・ルートウィヒスハ
			ーフエン、クノルシュトラッセ・5 0、ア
			ッヴィ・ドイチュラント・ゲー・エム・ペ
			ー・ハー・ウント・コー・カー・ゲー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 突然変異タンパク質アミロイドβ (Aβ) アミノ酸配列に基づく免疫原性産物およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、突然変異タンパク質アミロイド (A) アミノ酸配列に基づく免疫原性産物に関し、とりわけ A 突然変異タンパク質のオリゴマーに関し、またアミロイド症のような状態の診断、治療および防止における、ならびに前記産物に結合することができる作用物を同定するための前記産物の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列

V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃（配列番号 2）と 62.5% 以上の同一性を有するアミロイド（A）アミノ酸配列を含む免疫原性産物であって、

i) American Type Culture Collection 寄託番号 PTA-7240 により示されるハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体 7C6、American Type Culture Collection 寄託番号 PTA-7405 により示されるハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体 4D10 または American Type Culture Collection 寄託番号 PTA-7241 により示されるハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体 5F7 からなる群から選択されるモノクローナル抗体と反応性であり、

ii) 血小板因子 4（PF-4）に対する交差反応性を全く有さないまたは低い交差反応性を有するポリクローナル抗血清を誘導することができる免疫原性産物。

【請求項 2】

A アミノ酸配列が、異なるアミノ酸によって置換されている 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つのアミノ酸によりアミノ酸配列 V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃（配列番号 2）と異なっている、請求項 1 に記載の産物。

【請求項 3】

ポリクローナル抗血清が、マウスまたはウサギに由来するポリクローナル抗血清である、請求項 1 または 2 に記載の産物。

【請求項 4】

ポリクローナル抗血清が、産物に結合する抗体が富化された親和性精製抗血清である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 5】

PF-4 に対するポリクローナル抗血清の交差反応性が、PF-4 に対する参照抗 PF-4 抗体の交差反応性より少なくとも 10 倍、例えば、少なくとも 20 倍、少なくとも 30 倍または少なくとも 50 倍、より好ましくは少なくとも 100 倍、例えば、少なくとも 200 倍、少なくとも 300 倍または少なくとも 500 倍、さらにより好ましくは少なくとも 1000 倍、例えば、少なくとも 2000 倍、少なくとも 3000 倍または少なくとも 5000 倍、さらにより好ましくは少なくとも 10000 倍、例えば、少なくとも 20000 倍、少なくとも 30000 倍または少なくとも 50000 倍、最も好ましくは少なくとも 100000 倍小さい、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 6】

血小板因子 4 が、カニクイザル血漿中の PF-4 またはヒト血漿中の PF-4 である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 7】

交差反応性が、血漿 PF-4 に対する、固定化されているポリクローナル抗血清の結合である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 8】

固定化ポリクローナル抗血清が、固定化抗 IgG 抗体に結合したポリクローナル抗血清である、請求項 7 に記載の産物。

【請求項 9】

結合 PF-4 が、PF-4 に結合した抗 PF-4 抗体として検出される、請求項 7 または 8 に記載の産物。

【請求項 10】

抗 PF-4 抗体が、標識抗体であり、検出が、標識によって発せられたシグナルを測定

10

20

30

40

50

ポリクローナル抗血清が、A（１－４２）グロブリンおよび A（１２－４２）グロブリンからなる群から選択される少なくとも１つの A グロブリンに対する抗血清の親和性より少なくとも２倍、例えば、少なくとも３倍または少なくとも５倍、好ましくは少なくとも１０倍、例えば、少なくとも２０倍、少なくとも３０倍または少なくとも５０倍、より好ましくは少なくとも１００倍、例えば、少なくとも２００倍、少なくとも３００倍または少なくとも５００倍、さらにより好ましくは少なくとも１０００倍、例えば、少なくとも２０００倍、少なくとも３０００倍または少なくとも５０００倍、さらにより好ましくは少なくとも１００００倍、例えば、少なくとも２００００倍、少なくとも３

0 0 0 0 倍または少なくとも 5 0 0 0 0 倍、最も好ましくは少なくとも 1 0 0 0 0 0 倍大きい A (2 0 - 4 2) グロブロマーに対する親和性を有する、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 2 1】

モノクローナル抗体 7 C 6 が、 1×10^{-6} M の K_D またはより大きい親和性で産物に結合する、請求項 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 2 2】

モノクローナル抗体 4 D 1 0 が、 1×10^{-6} M の K_D またはより大きい親和性で産物に結合する、請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 2 3】

モノクローナル抗体 5 F 7 が、 1×10^{-6} M の K_D またはより大きい親和性で産物に結合する、請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 2 4】

A アミノ酸配列が、アミノ酸配列

V_{1 8} F_{1 9} F_{2 0} A_{2 1} E_{2 2} D_{2 3} V_{2 4} G_{2 5} S_{2 6} N_{2 7} K_{2 8} G_{2 9} A_{3 0} I_{3 1} I_{3 2} G_{3 3} (配列番号 2) と 6 8 . 7 5 % 以上、7 5 % 以上、8 1 . 2 5 % 以上、8 7 . 5 % 以上または 9 3 . 7 5 % 以上の同一性を有する、請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 2 5】

アミノ酸配列の少なくとも一部がループ、好ましくは、ヘアピンループを形成する、請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 2 6】

F_{1 9} F_{2 0} A_{2 1} (配列番号 8) および A_{3 0} I_{3 1} I_{3 2} (配列番号 9) に対応する産物のアミノ酸配列部分が、逆平行に配向している、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 2 7】

ループが、V_{2 4} G_{2 5} S_{2 6} N_{2 7} (配列番号 1 0) および D_{2 3} V_{2 4} G_{2 5} S_{2 6} N_{2 7} K_{2 8} (配列番号 1 1) から選択される配列を含む、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 2 8】

可溶性である、請求項 1 から 2 7 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 2 9】

前記 A アミノ酸配列を複数含むオリゴマーである、請求項 1 から 2 8 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 3 0】

複数が、2 から 2 8 個の A アミノ酸配列である、請求項 2 9 に記載の産物。

【請求項 3 1】

オリゴマーが、切断型オリゴマーである、請求項 2 9 または 3 0 に記載の産物。

【請求項 3 2】

(a) 前記 A アミノ酸配列を含む A ペプチドを溶媒に溶解するステップ、
(b) 両親媒性物質を A ペプチドの溶液に加えるステップ、および
(c) 得られた混合物をインキュベートして、オリゴマーを形成するステップ
を含む方法により得られる、請求項 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 3 3】

溶媒が、水素結合切断剤である、請求項 3 2 に記載の産物。

【請求項 3 4】

水素結合切断剤が、H F I P である、請求項 3 3 に記載の産物。

【請求項 3 5】

水素結合切断剤に溶解させた A ペプチドの濃度が、2 m g / m l から 5 0 m g / m l である、請求項 3 2 から 3 4 のいずれか一項に記載の産物。

10

20

30

40

50

【請求項 36】

A ペプチドを水素結合切断剤に溶解するステップが、22 から 37 で 15 分間から 5 時間振とうすることを含む、請求項 32 から 35 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 37】

両親媒性物質が、SDS、ラウリン酸、N-ラウロイルサルコシン、tert-オクチルフェノール x 9 - 10 EO、ノニルフェノール x 20 EO、3 - (3 - コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、ドデシル - N, N - ジメチル - 3 - アミノ - 1 - プロパンスルホネートまたはドデシルアミンである、請求項 32 から 36 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 38】

インキュベーションの時間が、5 分間から 48 時間である、請求項 32 から 37 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 39】

インキュベーションの温度が、15 から 50 である、請求項 32 から 38 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 40】

方法が、

(d) オリゴマーをタンパク質分解的に切断するステップをさらに含む、請求項 32 から 39 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 41】

オリゴマーが、トリプシン、キモトリプシン、サーモリシン、エラスターゼ、パパインおよびエンドプロテイナーゼ GluC からなる群から選択される酵素により切断される、請求項 40 に記載の産物。

【請求項 42】

A アミノ酸配列が、アミノ酸配列

V₁₈ F₁₉ F₂₀ A₂₁ E₂₂ D₂₃ V₂₄ G₂₅ S₂₆ N₂₇ K₂₈ G₂₉ A₃₀ I₃₁ I₃₂ G₃₃ L₃₄ M₃₅ V₃₆ G₃₇ G₃₈ V₃₉ (配列番号 3) と 72 % 以上の同一性を有する、請求項 1 から 41 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 43】

A アミノ酸配列が、アミノ酸配列

V₁₈ F₁₉ F₂₀ A₂₁ E₂₂ D₂₃ V₂₄ G₂₅ S₂₆ N₂₇ K₂₈ G₂₉ A₃₀ I₃₁ I₃₂ G₃₃ L₃₄ M₃₅ V₃₆ G₃₇ G₃₈ V₃₉ (配列番号 3) と 77 % 以上、81 % 以上、86 % 以上、90 % 以上または 95 % 以上の同一性を有する、請求項 1 から 42 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 44】

第 1 のアミノ酸配列 L^A₃₄ M^A₃₅ V^A₃₆ G^A₃₇ G^A₃₈ (配列番号 5) が、第 2 のアミノ酸配列 L^B₃₄ M^B₃₅ V^B₃₆ G^B₃₇ G^B₃₈ (配列番号 5) と平行に配向している、請求項 42 または 43 に記載の産物。

【請求項 45】

M^A₃₅ (NH) - V^B₃₆ (NH)、G^A₃₇ (NH) - G^B₃₈ (NH)、L^A₃₄ (NH) - L^B₃₄ (CH₃)、M^A₃₅ (NH) - V^B₃₆ (CH₃) からなる群から選択される少なくとも 1 つの原子対のプロトン間距離が、1.8 から 6.5 オングストロームである、請求項 44 に記載の産物。

【請求項 46】

第 1 のアミノ酸配列 G^A₃₃ L^A₃₄ M^A₃₅ V^A₃₆ G^A₃₇ G^A₃₈ V^A₃₉ (配列番号 6) が、第 2 のアミノ酸配列 G^B₃₃ L^B₃₄ M^B₃₅ V^B₃₆ G^B₃₇ G^B₃₈ V^B₃₉ (配列番号 6) と平行に配向している、請求項 42 から 45 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 47】

G^A₃₃ (NH) - G^B₃₄ (NH)、M^A₃₅ (NH) - V^B₃₆ (NH)、G^A₃₃

10

20

30

40

50

$G^B_{38}(NH) - L^A_{34}(NH) - L^B_{34}(CH_3)$ 、 $M^A_{35}(NH) - V^B_{36}(CH_3)$ 、 $G^A_{38}(NH) - V^B_{39}(CH_3)$ および $V^A_{39}(NH) - V^B_{39}(CH_3)$ からなる群から選択される少なくとも1つの原子対のプロトン間距離が、1.8から6.5オングストロームである、請求項46に記載の産物。

【請求項48】

2つのA アミノ酸配列間の分子間平行 シートを含む、請求項42から47のいずれか一項に記載の産物。

【請求項49】

分子間平行 シートが、第1のアミノ酸配列 $G^A_{33}L^A_{34}M^A_{35}V^A_{36}G^A_{37}G^A_{38}V^A_{39}$ (配列番号7) および第2のアミノ酸配列 $G^B_{33}L^B_{34}M^B_{35}V^B_{36}G^B_{37}G^B_{38}V^B_{39}$ (配列番号7) を含む、請求項42から48のいずれか一項に記載の産物。

10

【請求項50】

原子対 $G^A_{33}(CO) - L^B_{34}(N)$ 、 $L^B_{34}(CO) - M^A_{35}(N)$ 、 $M^A_{35}(CO) - V^B_{36}(N)$ 、 $V^B_{36}(CO) - G^A_{37}(N)$ および $G^B_{37}(CO) - G^A_{38}(N)$ が 3.3 ± 0.5 の距離にあり、COが主鎖酸素原子を示し、残基のファイ() 角度が -180 から -30 の範囲にあり、残基のプサイ() 角度が約 60 から 180 までまたは約 -180 から -150 までの範囲にある、請求項49に記載の産物。

20

【請求項51】

A アミノ酸配列が、アミノ酸配列

$V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}$ (配列番号4) の一部(X-Y)と62.5%以上、64%以上、67%以上、71%以上、75%以上、78%以上、82%以上、85%以上、89%以上、92%以上または96%以上の同一性を有し、Xが数12. . 18からなる群から選択され、Yが数33. . 39からなる群から選択される、請求項1から50のいずれか一項に記載の産物。

【請求項52】

アミノ酸配列の少なくとも2つの非隣接残基が互いに共有結合している、請求項51に記載の産物。

30

【請求項53】

V_{12} 、 H_{13} 、 H_{14} 、 Q_{15} 、 K_{16} 、 L_{17} 、 V_{18} 、 F_{19} 、 F_{20} 、 A_{21} 、 E_{22} または D_{23} に対応するアミノ酸残基の少なくとも1つおよび K_{28} 、 G_{29} 、 A_{30} 、 I_{31} 、 I_{32} 、 G_{33} 、 L_{34} 、 M_{35} 、 V_{36} 、 G_{37} 、 G_{38} 、 V_{39} に対応するアミノ酸残基の少なくとも1つが、互いに共有結合している、請求項51または52に記載の産物。

【請求項54】

アミノ酸残基が、直接共有結合によりまたはリンカーを介して共有結合している、請求項51から53のいずれか一項に記載の産物。

40

【請求項55】

V_{18} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる群から選択される、請求項1から54のいずれか一項に記載の産物。

【請求項56】

F_{19} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、アラニン、グリシン、プロリン、バリン、ロイシン、メチオニンおよびイソロイシンからなる群から

50

選択される、請求項 1 から 55 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 57】

F₂₀ に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、メチオニンおよびイソロイシンからなる群から選択される、請求項 1 から 56 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 58】

A₂₁ に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、グリシン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる群から選択される、請求項 1 から 57 のいずれか一項に記載の産物。

10

【請求項 59】

E₂₂ に対応するアミノ酸が、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アラニン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、プロリンおよびグルタミンからなる群から選択される、請求項 1 から 58 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 60】

D₂₃ に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニンおよびグルタミンからなる群から選択される、請求項 1 から 59 のいずれか一項に記載の産物。

20

【請求項 61】

V₂₄ に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる群から選択される、請求項 1 から 60 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 62】

G₂₅ に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される、請求項 1 から 61 のいずれか一項に記載の産物。

30

【請求項 63】

S₂₆ に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンからなる群から選択される、請求項 1 から 62 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 64】

N₂₇ に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される、請求項 1 から 63 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 65】

K₂₈ に対応するアミノ酸が、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニンおよびグルタミンからなる群から選択される、請求項 1 から 64 のいずれか一項に記載の産物。

40

【請求項 66】

G₂₉ に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびプロリンからなる群から選択される、請求項 1 から 65 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 67】

50

A₃₀に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、グリシン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびプロリンからなる群から選択される、請求項1から66のいずれか一項に記載の産物。

【請求項68】

I₃₁に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる群から選択される、請求項1から67のいずれか一項に記載の産物。

10

【請求項69】

I₃₂に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる群から選択される、請求項1から68のいずれか一項に記載の産物。

【請求項70】

G₃₃に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびプロリンからなる群から選択される、請求項1から69のいずれか一項に記載の産物。

20

【請求項71】

F₂₀に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、メチオニンおよびイソロイシンからなる群から選択され、E₂₂に対応するアミノ酸が、アラニン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、イソロイシン、トリプトファン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、チロシンおよびロイシンからなる群から選択される、請求項1から70のいずれか一項に記載の産物。

【請求項72】

F₂₀に対応するアミノ酸が、グリシンであり、E₂₂に対応するアミノ酸が、アラニンである、請求項1から71のいずれか一項に記載の産物。

30

【請求項73】

F₂₀に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、メチオニンおよびイソロイシンからなる群から選択され、I₃₁に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる群から選択される、請求項1から72のいずれか一項に記載の産物。

【請求項74】

A₂₁に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、グリシン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる群から選択され、E₂₂に対応するアミノ酸が、アラニン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、イソロイシン、トリプトファン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、チロシンおよびロイシンからなる群から選択される、請求項1から73のいずれか一項に記載の産物。

40

【請求項75】

A₂₁に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、グリシン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる群から選択され、D₂₃に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン

50

、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニンおよびグルタミンからなる群から選択される、請求項 1 から 7 4 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 7 6】

E₂₂ に対応するアミノ酸が、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アラニン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、プロリンおよびグルタミンからなる群から選択され、G₂₅ に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される、請求項 1 から 7 5 のいずれか一項に記載の産物。

10

【請求項 7 7】

E₂₂ に対応するアミノ酸が、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アラニン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、プロリンおよびグルタミンからなる群から選択され、S₂₆ に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンからなる群から選択される、請求項 1 から 7 6 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 7 8】

請求項 1 から 7 7 のいずれか一項に記載の産物を含む組成物。

20

【請求項 7 9】

ワクチンである、請求項 7 8 に記載の組成物。

【請求項 8 0】

医薬として許容される賦形剤をさらに含む、請求項 7 8 または 7 9 に記載の組成物。

【請求項 8 1】

医薬として許容される賦形剤が、アジュバントである、請求項 8 0 に記載の組成物。

【請求項 8 2】

アジュバントが、完全フロイントアジュバント (CFA) である、またはアルミニウム塩を含むアジュバントである、請求項 8 1 に記載の組成物。

【請求項 8 3】

アミロイド症の治療または防止に使用する、請求項 1 から 7 7 のいずれか一項に記載の産物。

30

【請求項 8 4】

能動免疫用である、請求項 8 3 に記載の使用のための組成物。

【請求項 8 5】

アミロイド症が、アルツハイマー病である、請求項 8 3 または 8 4 に記載の使用のための産物。

【請求項 8 6】

アミロイド症が、ダウン症候群のアミロイド症である、請求項 8 3 または 8 4 に記載の使用のための産物。

40

【請求項 8 7】

請求項 1 から 7 7 のいずれか一項に記載の産物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象におけるアミロイド症を治療または防止する方法。

【請求項 8 8】

産物を投与することが、能動免疫のためである、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

アミロイド症が、アルツハイマー病である、請求項 8 7 または 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

アミロイド症が、ダウン症候群のアミロイド症である、請求項 8 7 または 8 8 に記載の方法。

50

【請求項 9 1】

アミロイド症の診断に使用する、請求項 1 から 7 7 のいずれか一項に記載の産物。

【請求項 9 2】

アミロイド症が、アルツハイマー病である、請求項 9 1 に記載の使用のための産物。

【請求項 9 3】

アミロイド症が、ダウン症候群のアミロイド症である、請求項 9 1 に記載の使用のための産物。

【請求項 9 4】

アミロイド症を有すると疑われる対象からの試料を準備すること、試料を請求項 1 から 7 7 のいずれか一項に記載の産物と、産物および抗体を含む複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させることを含み、複合体の存在が、対象がアミロイド症を有することを示す、アミロイド症を診断する方法。

10

【請求項 9 5】

アミロイド症が、アルツハイマー病である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

アミロイド症が、ダウン症候群のアミロイド症である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 7】

請求項 1 から 7 7 のいずれか一項に記載の産物に結合することができる作用物を同定する方法であって、a) 目的の 1 つ以上の作用物を、1 つ以上の作用物が産物に結合するのに十分な時間および条件下で、産物に曝露するステップならびに b) 産物に結合する作用物を同定するステップを含む方法。

20

【請求項 9 8】

作用物が、抗体、非抗体結合分子、アプタマーまたは低分子量化合物である、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

請求項 1 から 7 7 のいずれか一項に記載の産物に結合することができる抗体を得る方法であって、

i) 産物を含む抗原を準備すること、

i i) 抗体レパートリーを抗原に曝露すること、および

i i i) レパートリーから産物に結合する抗体を選択すること

30

を含む方法。

【請求項 1 0 0】

【化 2】



10

20

30

40

からなる群から選択されるアミノ酸配列の一部 (X - Y) と同じアミノ酸配列を含み、 X
 が数 1 . . 1 8 からなる群から選択され、 Y が数 3 3 . . 4 3 からなる群から選択される
 分子、または前記アミノ酸配列の少なくとも 2 つの非隣接残基が互いに共有結合している

50

、そのクロスリンクされた誘導体。

【請求項 101】

X が、数 1 . . 18、4 . . 18、12 . . 18 からなる群から選択される、または 18 である、請求項 100 に記載の分子またはそのクロスリンクされた誘導体。

【請求項 102】

Y が、数 33 . . 43、33 . . 42、33 . . 41 または 33 . . 40 からなる群から選択される、請求項 100 または 101 に記載の分子またはそのクロスリンクされた誘導体。

【請求項 103】

(X - Y) が、(1 - 42)、(4 - 42)、(12 - 42) または (18 - 42) からなる群から選択される、請求項 100 から 102 のいずれか一項に記載の分子またはそのクロスリンクされた誘導体。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本願は、ASCII フォーマットで電子ファイルで提出し、その全体を参照により組み込む配列表を含む。2015 年 8 月 27 日に作成した、前記 ASCII コピーは、ABV12075W001__SL.txt という名称であり、サイズが 14095 バイトである。

20

【0002】

本発明は、突然変異タンパク質アミロイド (A) アミノ酸配列に基づく免疫原性産物に関し、とりわけ A 突然変異タンパク質のオリゴマーに関し、またアミロイド症のような状態の診断、治療および防止における、ならびに前記産物に結合することができる作用物を同定するための前記産物の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

アルツハイマー病 (AD) は、認知能力の進行性喪失により、また脳のいくつかの領域におけるアミロイドベータ (A) ペプチドの沈着、神経原線維変化および神経細胞脱落を含む特徴的な神経病理学的特徴により特徴付けられる神経変性障害である (Hardy および Selkoe、Science、297 巻、353 頁、2002 年; Mattson、Nature、431 巻、7004 頁、2004 年)。アルツハイマー病に認められるものと非常に類似した脳アミロイド沈着および認知障害は、出生 800 例に約 1 例の頻度で発生するダウン症候群 (21 トリソミー) の顕著な特徴でもある。

30

【0004】

A ペプチドは、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) からタンパク質分解プロセシングにより生じる。このプロセシングは、-、- および - セクレターゼと名付けられたいくつかのプロテアーゼの協同活動により達成され、異なる長さのいくつかの特異的断片をもたらす。A ペプチド沈着物は、主として 40 または 42 アミノ酸の長さを有するペプチド (A (1 - 40)、A (1 - 42)) からなる。このタンパク質は、水性環境中で重合する傾向があり、A フィブリルのような不溶性の形態、ならびに A オリゴマーのような可溶性の形態を含む、非常に異なる分子形態で存在し得る。

40

【0005】

不溶性タンパク質の沈着と、例えばアルツハイマー病のような認知症の発症または進行との単純な相関は、疑わしいことが証明された (Terry ら、Ann. Neurol.、30 巻、572 - 580 頁、1991 年; Dickson ら、Neurobiol. Aging、16 巻、285 - 298 頁、1995 年)。これと対照的に、シナプスおよび認知的知覚の喪失は、可溶 A 型とより良好な相関を示すようである (Lue ら、Am J Pathol、155 巻、853 - 862 頁、1999 年; McLean ら、Ann Neurol、46 巻、860 - 866 頁、1999 年)。

50

【0006】

可溶性A オリゴマーは、合成により生成し（Barghornら、J Neurochem、95巻、834 - 847頁、2005年）、APPトランスフェクト細胞培養から収集され（Walshら、Nature、416巻、535 - 539頁、2002年）、APPトランスジェニックマウスの脳から単離された（Lesnéら、Nature、440巻、352 - 357頁、2006年）。国際公開第2004/067561号は、A（1 - 42）ペプチドの球状オリゴマー（「グロブロマー」）およびそれらを調製する方法に言及している。国際公開第2006/094724号は、Xが数1 . . 24からなる群から選択される非拡散性球状A（X - 38 . . 43）に関する。国際公開第2004/067561号および国際公開第2006/094724号は、グロブロマーの限

10

【0007】

データから、A フォールディングおよび1つ以上のエピトープ（以後グロブロマーエピトープと呼ぶ）を示すA オリゴマーへのアセンブリーのアミロイドフィブリル非依存性経路の存在が示唆される。前記グロブロマーエピトープは、AD患者およびAPPトランスジェニックマウスの脳において検出され、A グロブロマーは、ニューロンに特異的に結合し、海馬の長期増強をブロックすることが見いだされた。可溶性A グロブロマーが本質的にはP/Q型シナプス前カルシウムチャンネルとの相互作用によりその有害効果をもたらし、したがって、この相互作用の阻害がアルツハイマー病のようなアミロイド症の治療に有用であることが見いだされた（国際公開第2008/104385号）。

20

【0008】

可溶性A グロブロマーとモノマーおよびフィブリルのような他のA 種とを区別することができるモノクローナル抗体が例えば、国際公開第2007/062852号に以前に記載された。A グロブロマーに対して選択的なモノクローナル抗体がインビトロおよびインビボでA オリゴマーの病理学的作用を妨げることが示された（Hillienら、J Neurosci、30巻（31号）、10369 - 10379頁、2010年）。これらの結果は、A グロブロマーの抗体によってもたらされる中和が前臨床ADモデルにおいて有効であり、したがって、ADおよび他のアミロイド症の治療および防止においても有効であり得ることを示すものである。

30

【0009】

受動免疫のためのモノクローナル抗A 抗体の他に、能動免疫のためのA 調製物の使用は、AD研究の問題であった。そのような研究の結果は、A オリゴマーワクチンの治療指数が病原性A 種に特異的である免疫応答を誘発するその能力に依存することを裏付けるものである。特異性の重要性は、以前のワクチン接種試験の結果により裏付けられる。アルツハイマー病患者における能動免疫の臨床試験における前凝集A（1 - 42）の使用により、例えば、生成した抗体が、細胞の裏打ちのために恐らく必要なA（1 - 42）形態も認識し、炎症反応をもたらしたので、患者の一部における著しい副作用（髄膜炎、出血）がもたらされた（D. Schenk、Nat. Rev. Neurosci、3巻、824 - 828頁（2002年））。

40

【0010】

A オリゴマーワクチンは、もちろん、病原性A 形態以外への自己抗体結合を誘発することを回避するべきでだけでなく、一般的に病原性交差反応の能力のある自己抗体の形成を誘発するべきでもない。しかし、特定の事例において、野生型A オリゴマーの調製物を用いて同定されたモノクローナル抗体が血小板因子4（PF - 4）に対する交差反応性を示し得ることが見いだされた。PF - 4は、ヘパリンに結合し、それによりネオエピトープを形成する。これは、ヘパリン誘発性血小板減少症（HIT）として公知の避

50

けられない血栓疾患をもたらす免疫反応を誘発し得る。HITは、ヘパリンの投与により引き起こされることが公知である。それにもかかわらず、HIT、血小板減少症および血栓症の症状、ならびに抗PF-4自己抗体がヘパリンの事前の投与を受けなかった患者においても認められた(Warkentinら、Am J Med、121巻(7号)、632-6頁、2008年)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】国際公開第2004/067561号

【特許文献2】国際公開第2006/094724号

【特許文献3】国際公開第2007/064917号

【特許文献4】国際公開第2008/104385号

【特許文献5】国際公開第2007/062852号

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】HardyおよびSelkoe、Science、297巻、353頁、2002年

【非特許文献2】Mattson、Nature、431巻、7004頁、2004年

【非特許文献3】Terryら、Ann. Neurol.、30巻、572-580頁、1991年

【非特許文献4】Dicksonら、Neurobiol. Aging、16巻、285-298頁、1995年

【非特許文献5】Lueら、Am J Pathol、155巻、853-862頁、1999年

【非特許文献6】McLeanら、Ann Neurol、46巻、860-866頁、1999年

【非特許文献7】Barghornら、J Neurochem、95巻、834-847頁、2005年

【非特許文献8】Walshら、Nature、416巻、535-539頁、2002年

【非特許文献9】Lesneら、Nature、440巻、352-357頁、2006年

【非特許文献10】Hillienら、J Neurosci、30巻(31号)、10369-10379頁、2010年

【非特許文献11】D. Schenk、Nat. Rev. Neurosci.、3巻、824-828頁(2002年)

【非特許文献12】WarkentinらAm J Med、121巻(7号)、632-6頁、2008年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

患者の身体に対する病的自己免疫反応のような負のおよび致命的であり得る副作用をもたらさず、アルツハイマー病および関連障害に対して有効であるAオリゴマーワクチンの開発のための多大な、満たされていない療法の必要性がある。一般集団の寿命の延び、ならびにこの延びによる、アルツハイマー病または関連障害と年間に診断される患者数の随伴する増加を考慮すると、そのような必要性は、とりわけ明らかである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

(発明の要旨)

本発明は、A グロブロマーエピトープに特異的に結合するが、血小板因子4(PF-

10

20

30

40

50

4) に対する交差反応性を全く有さないまたは低い交差反応性を有する抗血清を誘導することができる新規免疫原性産物を提供することによって前記必要性を満たす。したがって、新規免疫原性産物は、グロブリン特異的抗体により認識される1つ以上のエピトープを含む。そのようなエピトープに結合するモノクローナル抗体は、国際公開第2007/062852号に記載され、それぞれAmerican Type Culture Collection寄託番号PTA-7240、PTA-7405およびPTA-7241によって示されるハイブリドーマから得られる7C6、4D10および5F7を含む。

【0015】

したがって、本発明は、以下のアミノ酸配列との62.5%以上の同一性を有するアミロイド (A) アミノ酸配列を含む免疫原性産物であって、

【0016】

【化1】

V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃ [配列番号 :2; Aβ(18-33)]

【0017】

i) American Type Culture Collection寄託番号PTA-7240により示されるハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体7C6、American Type Culture Collection寄託番号PTA-7405により示されるハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体4D10またはAmerican Type Culture Collection寄託番号PTA-7241により示されるハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体5F7からなる群から選択されるモノクローナル抗体と反応性であり、

ii) 血小板因子4 (PF-4) に対する交差反応性を全く有さないまたは低い交差反応性を有するポリクローナル抗血清を誘導することができる免疫原性産物を提供する。

【0018】

本発明はまた、本明細書で開示する免疫原性産物を含む組成物に関する。

【0019】

本発明はさらに、本明細書で開示する免疫原性産物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象におけるアミロイド症を治療または防止する方法に関する。関連態様において、本発明は、アミロイド症を治療または防止するのに使用する本明細書で開示した免疫原性産物に関する。

【0020】

本発明はまた、アミロイド症を有すると疑われる対象からの試料を準備すること、試料を本明細書で開示した免疫原性産物と、該産物および抗体を含む複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させることを含み、該複合体の存在が、対象がアミロイド症を有することを示す、アミロイド症を診断する方法に関する。関連態様において、本発明は、アミロイド症を診断するのに用いる本明細書で開示した免疫原性産物に関する。

【0021】

本発明はまた、本明細書で開示した免疫原性産物に結合することができる作用物を同定する方法であって、a) 目的の1つ以上の作用物を、1つ以上の作用物が産物に結合するのに十分な時間および条件下で、産物に曝露するステップならびにb) 産物に結合する作用物を同定するステップを含む方法に関する。

【0022】

関連態様において、本発明は、

i) 免疫原性産物を含む抗原を準備すること、

ii) 抗体レパートリーを前記抗原に曝露すること、および

iii) 前記レパートリーから産物に結合する抗体を選択すること

を含む、本明細書で開示した免疫原性産物に結合することができる抗体を得る方法を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 3 】

本発明はさらに、

【 0 0 2 4 】

【 化 2 】

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈A₁₉F₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :13; Aβ(1-43)F19A];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉A₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :14; Aβ(1-43)F20A];

10

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁A₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :15; Aβ(1-43)E22A];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁F₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :16; Aβ(1-43)E22F];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁V₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :17; Aβ(1-43)E22V];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁L₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :18; Aβ(1-43)E22L];

20

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁E₂₂K₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :19; Aβ(1-43)D23K];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁E₂₂L₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :20; Aβ(1-43)D23L];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄V₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :21; Aβ(1-43)G25V];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉G₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :22; Aβ(1-43)A30G];

30

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉G₂₀A₂₁A₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :23; Aβ(1-43)F20G E22A];

$D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}A_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}A_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :24; A β (1-43)F20A I31A];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}C_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}C_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :25; A β (1-43)F20C I31C];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}Q_{21}L_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :26; A β (1-43)A21Q E22L];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}L_{21}Q_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :27; A β (1-43)A21L E22Q];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}Q_{21}E_{22}N_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :28; A β (1-43)A21Q D23N];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}A_{22}D_{23}V_{24}A_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :29; A β (1-43)E22A G25A];
 および
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}A_{22}D_{23}V_{24}G_{25}A_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :30; A β (1-43)E22A S26A]

10

20

からなる群から選択されるアミノ酸配列の一部 (X - Y) と同じアミノ酸配列を含み、 X
 が数 1 . . 18、 4 . . 18、 12 . . 18 からなる群から選択されもしくは 18 であり
 、 Y が数 33 . . 43、 33 . . 42、 33 . . 41 もしくは 33 . . 40 からなる群から
 選択される分子、またはアミノ酸配列の少なくとも 2 つの非隣接残基が互いに共有結合
 している、そのクロスリンクされた誘導体に関する。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1A】野生型 A (20 - 42) グロブロマーの Superose 12 HR10 /
 300 GL 上サイズ排除クロマトグラム (SEC) を示す図である。

30

【図1B】切断型 A E22A 突然変異タンパク質オリゴマーの Superose 1
 2 HR10 / 300 GL 上サイズ排除クロマトグラム (SEC) を示す図である。

【図1C】切断型 A F20G E22A 突然変異タンパク質オリゴマーの Super
 ose 12 HR10 / 300 GL 上サイズ排除クロマトグラム (SEC) を示す図であ
 る。

【図2】ELISAにおいて、列挙した A 突然変異タンパク質オリゴマーの切断型が、
 マウス A (20 - 42) グロブロマー反応性モノクローナル抗体 m7C6 および m4D
 10 と反応性であることが認められたかどうかを示す表である (+ + + : 強い反応性 ; +
 + : 良好な反応性 ; + : 中等度の反応性 ; + / - : 全くまたはほとんど反応性がない)。

40

【発明を実施するための形態】

【0026】

本明細書で特に定義しない限り、本発明に関連して使用される科学および技術用語は、
 当業者により一般的に理解されている意味を有するものとする。用語の意味および範囲は
 、明確であるべきであるが、潜在的な曖昧性がある場合には、本明細書に示す定義は、辞
 書または外部のいかなる定義に対しても優先される。さらに、文脈により特に要求されな
 い限り、単数形の用語は、複数状態を含むものとし、複数形の用語は、単数を含むもの
 とする。本願において、「または」の使用は、特に述べない限り、「および/または」を意
 味する。さらに、「を含む (including) 」という用語、ならびに「を含む (i
 ncludes) 」および「を含んだ (included) 」のような他の形の使用は、
 非限定的である。また、「要素」または「成分」のような用語は、特に具体的に述べない

50

限り、１つのユニットを含む要素および成分ならびに２つ以上のサブユニットを含む要素および成分の両方を包含する。

【００２７】

一般的に、本明細書で述べる細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションに関連して用いる術語およびそれらの技術は、当技術分野で周知であり、一般的に用いられているものである。本発明の方法および技術は、特に示さない限り、当技術分野で周知の通常の方法に従って、また本明細書を通して引用し、述べる様々な一般的小説およびより個別的参考文献に記載されている通りに一般的に実施される。酵素反応および精製技術は、当技術分野で一般的に遂行されているようにまたは本明細書で述べるように、製造業者の仕様書に従って実施される。本明細書で述べる分析化学、合成有機化学ならびに医薬および薬化学に関連して用いる術語ならびにそれらの実験室での手順および技術は、当技術分野で周知であり、一般的に用いられているものである。化学合成、化学分析、医薬品、製剤および送達ならびに患者の治療に標準的技術が用いられる。

【００２８】

本発明は、一方でモノクローナル抗体 7C6、モノクローナル抗体 4D10 またはモノクローナル抗体 5F7 のようなグロブリンエпитープに結合する抗体と反応性であり、他方で PF-4 に対する交差反応性を全く有さないまたは低い交差反応性を有するポリクローナル抗血清を誘導することができる免疫原性産物を提供する。

【００２９】

PF-4 は、CXCK ケモカインファミリーに属し、ケモカイン (C-X-C モチーフ) リガンド 4 (CXCL4) としても公知である小さい 70 アミノ酸サイトカインである。PF-4 は、血小板凝集中の活性化血小板のアルファ顆粒から放出され、ヘパリン様分子の作用を調節することにより血液凝固を促進する。これらの機能により、創傷修復および炎症に関与することが予測されている (Eismann ら、Blood、76 巻 (2 号)、336-44 頁、1990 年)。PF-4 は、通常プロテオグリカンとの複合体に見いだされ、血栓症の薬物治療として用いられている抗凝固剤ヘパリンと複合体を形成し得る。PF-4 は、抗凝固剤ヘパリンの投与に対する特質体質性自己免疫反応である、ヘパリン誘発性血小板減少症 (HIT) における十分に記載された病理学機能を有し (Warkentin N.、Engl. J. Med.、356 巻 (9 号) 891-3 頁、2007 年)、この場合、ヘパリン: PF-4 複合体が抗原である。PF-4 自己抗体は、血栓症および HIT と類似した特徴を有するが、ヘパリンの事前の投与のない患者にも認められた (Warkentin ら、Am. J. Med.、121 巻 (7 号)、632-6 頁、2008 年)。ヘパリン誘発性血小板減少症は、血小板減少症 (低血小板数) の発生を特徴とし、さらに HIT は、血栓症に罹患しやすくする。病理学的過程における PF-4 のこれらの機能および関与を考慮すると、対象に存在する PF-4 に対する結合 (例えば、交差反応性) を示すポリクローナル抗血清を誘導する抗原 (例えば、ワクチン) の投与は、前記 PF-4 機能に影響を及ぼし、ひいては有害 (副) 作用をもたらし得ると結論することができる。そのような有害作用の程度および性質は、PF-4 上のエピトープの場所およびサイズ、それぞれの抗血清の結合強度および性質のようなパラメーターによって異なり得る。

【００３０】

本発明の免疫原性産物は、血小板因子 4 (PF-4) に対する交差反応性を全く有さないまたは低い交差反応性を有するポリクローナル抗血清を誘導することができる。したがって、PF-4 交差反応性を有する産物による免疫化に起因し得る HIT のような有害反応の発生は、対象の能動免疫のために本発明の免疫原性産物を用いる場合に避けることができる。

【００３１】

本発明の一態様において、本明細書で述べた免疫原性産物により誘導される PF-4 に対する交差反応性を全く有さないまたは低い交差反応性を有するポリクローナル抗血清は

10

20

30

40

50

、マウスまたはウサギに由来するポリクローナル抗血清である。好ましくは、ポリクローナル抗血清は、該産物に結合する抗体が富化された親和性精製抗血清である。

【0032】

本発明の異なる態様において、PF-4は、カニクイザル血漿中のPF-4およびヒト血漿中のPF-4から選択される。

【0033】

血小板因子4 (PF-4) に対する交差反応性を全く有さないまたは低い交差反応性を有するポリクローナル抗血清を誘導する免疫原性産物の能力は、当技術分野で周知の標準的方法を用いて試験することができる。例えば、後にそのポリクローナル抗血清を得るために免疫原性産物を用いてマウスまたはウサギを免疫化することができる。一般的に公知のように、個々の抗血清において免疫化に用いられる免疫原性産物に対する抗体の量に関する変動があり得る。PF-4 反応性に関するアッセイにおける偽陰性結果を避けるために、ポリクローナル抗血清は、したがって免疫原性産物に結合する抗体について富化することができる。そのような富化は、例えば、固体担体 (例えば、セファロースビーズ) 上に免疫原性産物を固定化すること、固定化免疫原性産物への抗体の結合を可能にするように担体を抗血清と接触させること、および担体から結合した抗体を溶出すること (例えば、酸性溶出緩衝液を用いて) を含む親和性精製の標準的方法を用いて達成することができ、その場合、溶出液は、免疫原性産物に結合する抗体が富化された親和性精製抗血清である。固定化産物が (切断型) A 突然変異タンパク質オリゴマーである場合、モノマーまたは繊維状形態のような非オリゴマー A 形態にも結合し得るすべての抗 A 抗体が親和性精製されることを保証するために、免疫原性産物に含まれる A 突然変異タンパク質は、モノマー形で担体上にさらに固定化してもよい。

10

20

【0034】

本発明の特定の態様において、交差反応性は、血漿PF-4に対する、固定化されているポリクローナル抗血清の結合として決定され、ポリクローナル抗血清は、例えば、固定化抗IgG抗体に結合することにより固定化される。結合PF-4は、前記PF-4に結合した抗PF-4抗体として検出することができる。抗PF-4抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗血清であってよく、とりわけアミノ酸配列EAEEDGDLQCLCVKTTTSQVRPRHITSLIVIKAGPHCPTAQLIATLKNGRKICLDLQAPLYKKIIKKLLES (配列番号12) を有するPF-4と反応性である。抗PF-4抗体は、標識抗体であってよく、検出は、標識によって発せられたシグナルを測定することである。あるいは、結合抗PF-4抗体は、抗PF-4抗体に結合した標識抗IgG抗体として検出することができ、検出は、標識によって発せられたシグナルを測定することである。

30

【0035】

別の特定の実施形態によれば、本発明の免疫原性産物により誘導された抗血清のPF-4に対する交差反応は、(i) ヒトまたはカニクイザル血漿ならびに結合タンパク質および参照抗PF-4抗体の希釈系列を用いた整列化サンドイッチELISAを実施し、(ii) 検出シグナル (y軸) を抗血清または参照抗PF-4抗体の対数変換濃度 (x軸) に対してプロットし、(iii) 測定範囲内のこれらの非曲線当てはめデータから曲線下面積 (AUCまたは総ピーク面積) を決定することによって得られる前記抗血清および参照抗PF-4抗体のAUC値の比を指す。

40

【0036】

「参照抗PF-4抗体」は、本明細書で用いているように、PF-4、とりわけヒト (HPF4) と特異的に反応性である、抗体、とりわけモノクローナル抗体である。そのような抗体は、ヒトPF-4、例えば、アミノ酸配列EAEEDGDLQCLCVKTTTSQVRPRHITSLIVIKAGPHCPTAQLIATLKNGRKICLDLQAPLYKKIIKKLLES (配列番号12) を有するヒトPF-4を含む抗原を準備し、抗体レパートリーを前記抗原に曝露し、前記抗体レパートリーからヒトPF-4に特異的に結合する抗体を選択することによって得られる。抗体は、免疫原 (ヒトPF-4) を用

50

いて親和性精製してもよい。そのような参照抗PF-4抗体は、市販されており、例えば、Abcamカタログ番号ab49735のモノクローナル抗HPF4抗体である。

【0037】

本発明の特定の態様において、本明細書で述べた免疫原性産物は、PF-4に対する参照抗PF-4抗体の交差反応性より少なくとも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍または少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍または少なくとも500倍、さらにより好ましくは少なくとも1000倍、例えば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍または少なくとも5000倍、さらにより好ましくは少なくとも10000倍、例えば、少なくとも20000倍、少なくとも30000倍または少なくとも50000倍、最も好ましくは少なくとも100000倍小さいPF-4に対する交差反応性を有するポリクローナル抗血清を誘導することができる。

10

【0038】

さらに、本発明の免疫原性産物は、特定の抗体とのそれらの反応性を特徴とする。そのような抗体は、とりわけグロブロマーエピトープに結合する抗体、とりわけA (1-42)グロブロマーに対する抗体の結合親和性より大きいA (20-42)グロブロマーに対する結合親和性を有する抗体を含む。

【0039】

A (1-42)グロブロマーに対する抗体の結合親和性より大きいA (20-42)グロブロマーに対する結合親和性を有する抗体は、参照により本明細書に組み込む、国際公開第2007/062852号に記載されており、例えば、7C6、4D10および5F7からなる群から選択されるモノクローナル抗体を含む。

20

【0040】

したがって、本発明の一実施形態によれば、本発明の免疫原性産物は、American Type Culture Collection寄託番号PTA-7240により示されるハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体7C6またはAmerican Type Culture Collection寄託番号PTA-7405により示されるハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体4D10またはAmerican Type Culture Collection寄託番号PTA-7241により示されるハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体5F7からなる群から選択されるモノクローナル抗体と反応性である。

30

【0041】

本発明の一態様において、モノクローナル抗体7C6は、本明細書で述べた免疫原性産物に高い親和性で、例えば、 1×10^{-6} Mの K_D もしくはより大きい親和性でまたは 1×10^{-7} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-8} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、 1×10^{-8} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-9} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、 1×10^{-9} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-10} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、 1×10^{-10} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-11} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、または 1×10^{-11} Mの K_D もしくはより大きい親和性で結合する。

40

【0042】

本発明の別の態様において、モノクローナル抗体4D10は、本明細書で述べた免疫原性産物に高い親和性で、例えば、 1×10^{-6} Mの K_D もしくはより大きい親和性でまたは 1×10^{-7} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-8} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、 1×10^{-8} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-9} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、 1×10^{-9} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-10} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、 1×10^{-10} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-11} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、または 1×10^{-11} Mの K_D もしくはより大きい親和性で結

50

合する。

【0043】

本発明のさらなる別別の態様において、モノクローナル抗体5F7は、本明細書で述べた免疫原性産物に高い親和性で、例えば、 1×10^{-6} Mの K_D もしくはより大きい親和性でまたは 1×10^{-7} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-8} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、 1×10^{-8} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-9} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、 1×10^{-9} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-10} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、 1×10^{-10} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、例えば、 3×10^{-11} Mの K_D もしくはより大きい親和性で、または 1×10^{-11} Mの K_D もしくはより大きい親和性で結合する。

10

【0044】

グロブロマー特異的抗体と反応する本発明の免疫原性産物は、少なくとも1つのグロブロマーエピトープを示すと考えられる。したがって、本発明の免疫原性産物は、A (20-42) グロブロマーまたは他の切断型グロブロマーを免疫原として用いた場合に誘導される免疫反応と同様なプロファイルを有する免疫反応を誘導することができる。

【0045】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に対する特異的結合の能力のあるあらゆるポリペプチド抗原決定基 (polypeptide determinant) を含む。特定の実施形態において、エピトープ決定基 (epitope determinants) は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニルのような分子の化学的に活性な表面基を含み、特定の実施形態において、特異的3次元構造特性および/または特異的電荷特性を有し得る。エピトープは、結合タンパク質、とりわけ抗体により結合される抗原の領域である。特定の実施形態において、結合タンパク質または抗体は、それがタンパク質および/または巨大分子の複雑混合物中のその標的抗原に優先的に結合する場合に抗原に特異的に結合すると言われる。

20

【0046】

特定の実施形態によれば、本発明の免疫原性産物は、例えば、哺乳動物、例えば、ウサギまたはマウスを本発明の免疫原性産物により免疫化した場合にそのような特定の免疫応答を誘発するそれらの能力を特徴とする。

30

【0047】

免疫応答は、抗原 (免疫原) により宿主をチャレンジすること (免疫化すること) により生じる抗体の混合とみなすことができる。抗体の前記混合は、宿主から得ることができ、本明細書でポリクローナル抗血清と呼ぶ。

【0048】

一態様において、そのような特定の免疫応答、すなわち、対応するポリクローナル抗血清は、モノマーA (1-42)、モノマーA (1-40)、モノマーA (20-42)、フィブリロマーA (1-42) およびフィブリロマーA (1-40) からなる群から選択される少なくとも1つのA 形態、好ましくは前記A 形態のすべてに対する抗体の結合親和性より大きい本発明の免疫原性産物またはA グロブロマーに対する結合親和性を有する抗体を含むことを特徴とする。

40

【0049】

特定の実施形態によれば、免疫応答、すなわち、対応するポリクローナル抗血清は、モノマーA (1-42)、モノマーA (1-40)、モノマーA (20-42)、フィブリロマーA (1-42) およびフィブリロマーA (1-40) からなる群から選択される少なくとも1つのA 形態、好ましくは前記A 形態のすべてに対する抗血清の結合親和性より少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍または少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍または少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍または少なくとも500倍、さらにより好ましくは少なくとも1000倍、例え

50

ば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍または少なくとも5000倍、さらにより好ましくは少なくとも10000倍、例えば、少なくとも20000倍、少なくとも30000倍または少なくとも50000倍、最も好ましくは少なくとも100000倍大きい本発明の免疫原性産物またはA グロブロマーに対する親和性を有することを特徴とする。

【0050】

本発明の関連態様において、前記A グロブロマーは、A (1-42) グロブロマー、A (12-42) グロブロマーおよびA (20-42) グロブロマーからなる群から選択される。

【0051】

本明細書で用いているように、省略記号A . . Bは、両方を含め、AからBまでのすべての自然数を含むセットを意味し、したがって、例えば、「17 . . 20」は、17、18、19および20という数の群を意味する。ハイフンは、アミノ酸の連続した配列を意味する。すなわち、「X - Y」は、両方を含めて、アミノ酸Xからアミノ酸Yまでの配列を含む。したがって、「A . . B - C . . D」は、これらの2つのセットのメンバーの間のすべての可能な組合せを含む。例えば、「17 . . 20 - 40 . . 42」は、以下のすべてを含む：17 - 40、17 - 41、17 - 42、18 - 40、18 - 41、18 - 42、19 - 40、19 - 41、19 - 42、20 - 40、20 - 41および20 - 42。特に述べない限り、すべての数は、成熟ペプチドの開始を指し、1は、N末端アミノ酸を示す。

【0052】

「A (X - Y)」という用語は、本明細書で用いているようにXおよびYの両方を含むヒトアミロイドベータ(A)タンパク質のアミノ酸位置Xからアミノ酸位置Yまでのアミノ酸配列を有するポリペプチド、とりわけアミノ酸配列D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃(配列番号1)(ヒトAタンパク質のアミノ酸位置1から43に対応する)のアミノ酸位置Xからアミノ酸位置Yまでのアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはその突然変異タンパク質を指す。

【0053】

本明細書における「A (X - Y)モノマー」または「モノマーA (X - Y)」という用語は、単離された形態のA (X - Y)ペプチド、好ましくは他のA ペプチドとの本質的に非共有結合性相互作用に関与していない形態のA (X - Y)ペプチドを指す。実際に、A (X - Y)モノマーは、通常水溶液の形態で提供される。本発明の特に好ましい実施形態において、水性モノマー溶液は、0.05%から0.2%、より好ましくは約0.1% NH₄OHを含有する。本発明の別の特に好ましい実施形態において、水性モノマー溶液は、0.05%から0.2%、より好ましくは約0.1% NaOHを含有する。用いる(例えば、本発明の結合親和性を決定するために)場合、前記溶液を適切な方法で希釈することが好都合であり得る。さらに、前記溶液を、その調製後2時間以内、とりわけ1時間以内、とりわけ30分以内に使用することが通常好都合である。

【0054】

より具体的には、ここにおける「A (1 - 40)モノマー」という用語は、本明細書における参照例1に記載されているA (1 - 40)モノマー調製物を指し、本明細書における「A (1 - 42)モノマー」という用語は、本明細書における参照例2に記載されているA (1 - 42)調製物を指す。

【0055】

ここにおける「フィブリル」という用語は、電子顕微鏡下で繊維状構造を示し、コンゴレッドに結合し、偏光下で複屈折を示し、そのX線回折パターンがクロス構造である、非共有結合の個別A (X - Y)ペプチドのアセンブリーを含む分子構造を指す。

【0056】

10

20

30

40

50

本発明の別別の態様において、フィブリルは、24単位を超える、好ましくは100単位を超える凝集体の形成をもたらす、例えば、0.1M HCl中の界面活性剤の非存在下での適切なAペプチドの自己誘導性ポリマー凝集を含む方法により得られる分子構造である。この方法は、当技術分野で周知である。便宜上、A(X-Y)フィブリルは、水溶液の形で用いられる。本発明の特に好ましい実施形態において、水性フィブリル溶液は、Aペプチドを0.1% NH₄OHに溶解し、それを20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH7.4で1:4に希釈し、その後、pHを7.4に再調整し、溶液を37で20時間インキュベートした後、10000gで10分間遠心分離し、20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH7.4中に再懸濁することによって作製される。

10

【0057】

ここにおける「A(X-Y)フィブリル」という用語は、A(X-Y)サブユニットから本質的になるフィブリルを指し、サブユニットの平均で少なくとも90%がA(X-Y)型のものである場合、より好ましくはサブユニットの少なくとも98%がA(X-Y)型のものである場合、最も好ましくは非A(X-Y)ペプチドの含量が検出閾値を下回る場合にそれが好ましい。

【0058】

より具体的には、ここにおける「A(1-42)フィブリル」という用語は、本明細書における参照例6で述べるA(1-42)フィブリル調製物を指す。

20

【0059】

別の態様において、そのような免疫応答は、A(1-42)グロブロマーまたはA(12-42)グロブロマーに対する抗体の結合親和性より大きい本発明の免疫原性産物またはA(20-42)グロブロマーに対する結合親和性を有する抗体を含むことを特徴とする。

【0060】

したがって、本発明のさらなる態様において、本明細書で述べた免疫原性産物は、A(1-42)グロブロマーおよびA(12-42)グロブロマーからなる群から選択される少なくとも1つのAグロブロマーに対する抗血清の親和性より少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍または少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍または少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍または少なくとも500倍、さらにより好ましくは少なくとも1000倍、例えば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍または少なくとも5000倍、さらにより好ましくは少なくとも10000倍、例えば、少なくとも20000倍、少なくとも30000倍または少なくとも50000倍、最も好ましくは少なくとも100000倍大きい本発明の免疫原性産物またはA(20-42)グロブロマーに対する親和性を有するポリクローナル抗血清を誘導することができる。

30

【0061】

所定の抗原（本発明の免疫原性産物など）に対する抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）の結合親和性は、ELISA、ドットプロットのような標準化インビトロイムノアッセイまたは表面プラズモン共鳴解析を用いて評価することができる。「表面プラズモン共鳴」という用語は、本明細書で用いているように、例えば、BIAcoreシステム（Pharmacia Biosensor AB、Uppsala、SwedenおよびPiscataway、NJ）を用いるバイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化の検出により実時間生物特異性相互作用の解析を可能にする光学現象を指す。さらなる説明については、Jonsson U.ら（1993年）Ann. Biol. Clin.、51巻、19-26頁；Jonsson U.ら（1991年）Biotechniques、11巻、620-627頁；Johnsson B.ら（1995年）J. Mol. Recognit.、8巻、125-131頁；およびJohnsson B.ら（1991年）Anal. Biochem. 198、268-277を参照のこと

40

50

。

【0062】

特定の実施形態によれば、本明細書で定義する親和性は、本明細書で述べるドットプロットを実施し、それを濃度測定により評価することにより得られる値を意味する。本発明の特定の実施形態によれば、ドットプロットによる結合親和性の決定は、以下の手順を含む：一定量の抗原（例えば、本発明の免疫原性産物；上で定義した、A（X-Y）オリゴマー、A（X-Y）モノマーまたはA（X-Y）フィブリル）または好都合には、例えば、 $100\text{ pmol}/\mu\text{l}$ 、 $10\text{ pmol}/\mu\text{l}$ 、 $1\text{ pmol}/\mu\text{l}$ 、 $0.1\text{ pmol}/\mu\text{l}$ および $0.01\text{ pmol}/\mu\text{l}$ の抗原濃度への例えば、 $20\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ 、 140 mM NaCl 、 $\text{pH}7.4$ 、 0.2 mg/ml BSA による中その適切な希釈物をニトロセルロース膜上に滴下し、次いで非特異的結合を防ぐためにミルクで膜をブロックし、洗浄し、次いで目的の抗体または抗血清と接触させた後、酵素コンジュゲート二次抗体および比色反応により後者の検出を行い、規定の抗体濃度において、結合した抗体の量により親和性の決定が可能となる。したがって、1つの抗原に対する2つの異なる抗体もしくは抗血清の、または2つの異なる抗原に対する1つの抗体もしくは抗血清の相対親和性は、他の点では同じドットプロット条件下で2つの抗体/抗血清-抗原の組合せについて観測される抗原に結合した抗体のそれぞれの量の関係と本明細書で定義する。ウエスタンブロッティングに基づく同様のアプローチとは異なって、ドットプロットアプローチは、所定の抗原の自然立体配座における所定の抗原に対する抗体の親和性を決定し、またELISAアプローチとは異なって、ドットプロットアプローチは、異なる標的とマトリックスとの間の親和性の差の影響を受けず、それにより、異なる抗原の間のより精密な比較が可能となる。

10

20

【0063】

ここにおける「より大きい親和性」という用語は、一方で非結合抗体および非結合免疫原性産物またはグロブリンと他方で抗体-免疫原性産物/グロブリン複合体との間の平衡が複合体にさらに有利である、相互作用の程度を指す。同様に、ここにおける「より小さい親和性」という用語は、一方で非結合抗体および非結合免疫原性産物またはグロブリンと他方で抗体-免疫原性産物/グロブリン複合体との間の平衡が非結合抗体および非結合免疫原性産物/グロブリンにさらに有利である、相互作用の程度を指す。「より大きい親和性」という用語は、「より高い親和性」という用語と同義であり、「より小さい親和性」という用語は、「より低い親和性」という用語と同義である。

30

【0064】

「 K_D 」（また「 K_d 」または「 KD 」）という用語は、本明細書で用いているように、「平衡解離定数」を指すものとし、平衡状態における滴定測定で、または解離速度定数（ k_{off} ）を会合速度定数（ k_{on} ）で割ることにより得られる値を指す。会合速度定数（ k_{on} ）、解離速度定数（ k_{off} ）および平衡解離定数（ K_D ）は、抗原に対する結合タンパク質（例えば、抗体）の結合親和性を表すために用いられる。会合および解離速度定数を決定する方法は、当技術分野で周知である。蛍光ベースの技術を用いることは、平衡状態における生理的緩衝液中の試料を調べる高い感度および能力をもたらす。BIAcore（登録商標）（生体分子相互作用解析）アッセイのような他の実験アプローチおよび機器を用いることができる（例えば、BIAcore International AB、GE Healthcare company、Uppsala、Swedenから入手できる機器）。さらに、Sapidyne Instruments（Boise、Idaho）から入手できるKinExA（登録商標）（Kinetic Exclusion Assay）アッセイも用いることができる。

40

【0065】

特定の実施形態によれば、本発明の免疫原性産物は、可溶性、とりわけ水性媒体（例えば、 $5\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ および 35 mM NaCl の水溶液、より具体的には下記のような濃度の両親媒性物質を含む $5\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ および 35 mM NaCl の水溶液または8から10、8.0から9.5もしくは8.0から9.0のpHを有する5 m

50

M NaH_2PO_4 および 35 mM NaCl の水溶液) に可溶性である。1 mL の溶液当たり少なくとも 0.1、1 または 5 mg タンパク質の溶解度が好都合である。溶解度は、遠心分離により確認することができる。10000 × g および 10 から 40、例えば、37 の温度での遠心分離により沈殿しない場合、免疫原性産物は可溶性である。

【0066】

さらに、本発明の免疫原性産物が、例えば、2 から 28 種の本明細書で述べた A アミノ酸配列を複数有することが好ましい。

【0067】

したがって、本発明の免疫原性産物は、切断および/またはクロスリンク結合していてもよい、とりわけ、A 突然変異タンパク質のオリゴマーである。

10

【0068】

「A オリゴマー」または「A 突然変異タンパク質オリゴマー」という用語は、本明細書で用いているように、上で定義した A ポリペプチドおよび A 突然変異タンパク質の可溶性の、(意図的クロスリンク結合の非存在下) 非共有結合性会合を指す。一態様によれば、A オリゴマーは、イオン性界面活性剤とのインキュベーションにより得られる A (突然変異タンパク質) ポリペプチドの安定な非繊維状アセンブリーである。「A グロブロマー」という用語は、本明細書で用いているように、3次元球状構造(「モルテングロビュール」、Barghornら、J Neurochem、95巻、834-847頁、2005年参照)を有する A オリゴマーを指す。A (突然変異タンパク質) オリゴマーは、以下の構造の1つ以上を特徴とし得る。

20

【0069】

- ・切断型の A (突然変異タンパク質) オリゴマーを生じる乱交雑プロテアーゼ(サーモリシンまたはエンドプロテイナーゼ GluC のような)による N-末端アミノ酸 X-24 の少なくとも部分的切断性;

- ・乱交雑プロテアーゼおよび抗体による C 末端アミノ酸 25-Y の非接近性;

- ・これらのオリゴマーの切断型は、コアエピトープ A (18-33) のより十分な接近性を有する前記オリゴマーの 3次元コア構造を維持する。

【0070】

「切断型 A オリゴマー」または「切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマー」という用語は、本明細書で用いているように、A オリゴマーを限定的タンパク質分解消化にかけることによって得ることができる切断された形態の A (突然変異タンパク質) オリゴマーを指す。より具体的には、切断型 A (X-Y) (突然変異タンパク質) オリゴマーは、適切なプロテアーゼによる処理によって A (1-Y) (突然変異タンパク質) オリゴマーを切断することにより得られる、X が数 2、24 からなる群から選択され、Y が本明細書で定義した通りである N 末端が切断された形態を含む。例えば、A (20-42) オリゴマーは、A (1-42) オリゴマーをサーモリシンタンパク質分解にかけることにより得ることができ、A (12-42) オリゴマーは、A (1-42) オリゴマーをエンドプロテイナーゼ GluC タンパク質分解にかけることにより得ることができる。タンパク質分解の所望の程度に到達したとき、一般的に公知の方法でプロテアーゼを不活性化する。得られたオリゴマーは、本明細書で既に述べた手順に従って単離し、必要な場合、さらなる後処理および精製ステップによりさらに処理することができる。

30

40

【0071】

本発明のオリゴマーは、A アミノ酸配列を含む対応する A 突然変異タンパク質ペプチドのオリゴマー化により得られる。オリゴマー化は、本発明のオリゴマーが複数の A 突然変異タンパク質ペプチドからなると推測することができるようにモノマー A 突然変異タンパク質ペプチドの非共有結合性凝集を含む。

【0072】

出発物質、すなわち、A 突然変異タンパク質ペプチドは、公知のペプチド合成方法によりまたは組換えにより調製することができる。さらに、これらのタンパク質のいくつかは、市販されている。特定の実施形態において、A 突然変異タンパク質ペプチドは、合

50

成 A 突然変異タンパク質ペプチドである。

【0073】

前記ペプチドは、G. Barany および R. B. Merrifield、*「The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology」*; Volume 2 - *「Special Methods in Peptide Synthesis, Part A」*、3 - 284 頁、E. Gross および J. Meienhofer 編、Academic Press、New York、1980 年ならびに J. M. Stewart および J. D. Young、*「Solid-Phase Peptide Synthesis」*、第 2 版、Pierce Chemical Co.、Rockford、IL、1984 年に記載されているような様々な固相技術を用いる化学合成により生産することができる。この戦略は、アミノ酸側鎖の一時的保護のための tert-ブチル基と組み合わされた、 α -アミノ基の一時的保護のための Fmoc (9-フルオレニルメチルメチル-オキシカルボニル) 基に基づいている (例えば、E. Atherton および R. C. Sheppard、*「The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group」* *「The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology」*; 9 巻 - *「Special Methods in Peptide Synthesis, Part C」*、1 - 38 頁、S. Undenfriend および J. Meienhofer 編、Academic Press、San Diego、1987 年参照)。

10

【0074】

ペプチドは、ペプチドの C 末端から開始して不溶性ポリマー担体 (「樹脂」とも呼ぶ) 上で段階的に合成することができる。合成は、アミドまたはエステル結合の形成により樹脂にペプチドの C 末端アミノ酸を付加することによって開始させる。これは、得られたペプチドのそれぞれ C 末端アミドまたはカルボン酸としての最終的放出を可能にする。あるいは、C 末端アミノアルコールが存在する場合、本明細書で述べるように C 末端残基を 2-メトキシ-4-アルコキシベンジルアルコール樹脂 (SASRIN (商標)、Bachem Bioscience, Inc.、King of Prussia, PA) に結合させ、ペプチド配列アセンブリーの完結後に、得られたペプチドアルコールを THF 中で LiBH_4 により放出させる (J. M. Stewart および J. D. Young、前出、92 頁参照)。

20

30

【0075】

合成に用いられる C 末端アミノ酸およびすべての他のアミノ酸は、 α -アミノ保護基を合成中に選択的に除去できるように示唆的に保護されたそれらの α -アミノ基および側鎖官能基 (存在する場合) を有することが要求される。アミノ酸のカップリングは、そのカルボキシル基の活性化エステルおよび樹脂に付加された N 末端アミノ酸の非保護 α -アミノ基とのその反応により行われる。全配列がアセンブルされるまで、 α -アミノ基脱保護およびカップリングのシーケンスが反復される。次いでペプチドは、通常、副反応を制限するための適切な捕捉剤の存在下で、側鎖官能基の同時脱保護により樹脂から放出される。得られたペプチドは、逆相 HPLC により最終的に精製される。

【0076】

最終ペプチドの前駆体として必要なペプチジル樹脂の合成では、市販のクロスリンクポリスチレンポリマー樹脂 (Novabiochem、San Diego, CA; Applied Biosystems、Foster City, CA) を利用する。好ましい固体担体は、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル)-フェノキシアセチル-p-メチルベンズヒドリルアミン樹脂 (Rink アミド MBHA 樹脂); 9-Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ-Merrifield 樹脂 (Sieber アミド樹脂); C 末端カルボキサミド用 4-(9-Fmoc) アミノメチル-3, 5-ジメトキシフェノキシ) パレリル-アミノメチル-Merrifield 樹脂 (PAL 樹脂) を含む。最初およびその後のアミノ酸のカップリングは、それぞれ DIC/HOBT、HBTU/HOBT、BOP、PyBOP からまたは DIC/HOAT、H

40

50

A T U / H O A T から生産した H O B T または H O A T 活性化エステルを用いて達成することができる。好ましい固体担体は、保護ペプチド断片用の 2 - クロロトリチルクロリド樹脂および 9 - F m o c - アミノ - キサンテン - 3 - イルオキシ - M e r r i f i e l d 樹脂 (S i e b e r アミド樹脂) である。2 - クロロトリチルクロリド樹脂上への最初のアミノ酸の負荷は、F m o c 保護アミノ酸をジクロロメタンおよび D I E A 中で樹脂と反応させることによって最も良く達成される。必要な場合、アミノ酸の溶解を促進するために少量の D M F を加えることができる。

【 0 0 7 7 】

合成は、A d v a n c e d C h e m t e c h M u l t i p l e P e p t i d e S y n t h e s i z e r (M P S 3 9 6) または A p p l i e d B i o s y s t e m s I n c . ペプチド合成装置 (A B I 4 3 3 a) のようなペプチド合成装置を用いて実施することができる。

10

【 0 0 7 8 】

あるいは、1) 所望のペプチドをもたらす、ペプチド結合の酵素的または化学的切断のための適切な切断部位によって分離された所望のペプチドの複数のコピーの合成、2) 当業者に公知で、アミノ酸配列を含む任意のシステムにおける A P P の組換え発現とそれに続く所望のペプチドを生み出すための酵素的または化学的処理、3) 当業者に公知の任意のシステムにおける融合タンパク質としての所望のペプチドの組換え発現、4) 当業者に公知の任意のシステムにおける直接的な所望のペプチドの組換え発現を含む、当業者に公知の任意の他の適切な方法論を用いることもあり得る。

20

【 0 0 7 9 】

アミロイド ペプチドの組換え発現は、国際公開第 2 0 0 7 / 0 6 4 9 1 7 号に記載されている。さらに、組換え宿主における異種タンパク質の発現、ポリペプチドの化学合成およびインビトロ翻訳の一般的方法は、当技術分野で周知であり、M a n i a t i s ら、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l (1 9 8 9 年) 、第 2 版、C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . ; B e r g e r および K i m m e l 、M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 、1 5 2 巻、G u i d e t o M o l e c u l a r C l o n i n g T e c h n i q u e s (1 9 8 7 年) 、A c a d e m i c P r e s s , I n c . , S a n D i e g o , C a l i f . ; M e r r i f i e l d J . (1 9 6 9 年) J . A m . C h e m . S o c . , 9 1 巻、5 0 1 頁 ; C h a i k e n 1 . M . (1 9 8 1 年) C R C C r i t . R e v . B i o c h e m . 1 1 巻、2 5 5 頁 ; K a i s e r ら (1 9 8 9 年) S c i e n c e , 2 4 3 巻、1 8 7 頁 ; M e r r i f i e l d B . (1 9 8 6 年) S c i e n c e , 2 3 2 巻、3 4 2 頁 ; K e n t . S . B . H . (1 9 8 8 年) A n n . R e v . B i o c h e m . , 5 7 巻、9 5 7 頁 ; ならびに O f f o r d R . E . (1 9 8 0 年) S e m i s y n t h e t i c P r o t e i n s , W i l e y P u b l i s h i n g にさらに記載されている。

30

【 0 0 8 0 】

得られたペプチドは、次いでオリゴマーが生成することを可能にする条件にさらされる。オリゴマー形成に適する条件は、参照により本明細書に組み込む、例えば、国際公開第 2 0 0 4 / 0 6 7 5 6 1 号 ; 国際公開第 2 0 0 6 / 0 9 4 7 2 4 号 ; S . B a r g h o r n ら、J . N e u r o c h e m . , 9 5 巻、8 3 4 頁 (2 0 0 5 年) および国際公開第 2 0 0 7 / 0 6 4 9 1 7 号に記載されている。

40

【 0 0 8 1 】

第 1 のステップにおいて、モノマー A 突然変異タンパク質ペプチドを溶媒に溶解する。好ましくは、溶媒は、水素結合切断剤である。この処理の目的は、折りたたまれていないペプチドを得ることである。

【 0 0 8 2 】

適切な水素結合切断剤は、当技術分野で公知である。これらは、1, 1, 1, 3, 3, 3 - ヘキサフルオロ - 2 - プロパノール (H F I P) のような有機化合物ならびに水酸化ナトリウム、水酸化カリウムのような塩基、ギ酸、2, 2, 2 - トリフルオロエタノール

50

(T F E)、尿素および塩化グアニジニウムの水溶液を含む。

【 0 0 8 3 】

特定の実施形態によれば、水素結合切断剤は、H F I Pである。

【 0 0 8 4 】

A 突然変異タンパク質ペプチドの水素結合切断剤への溶解を促進するために、混合物を掻き混ぜることができる、例えば、振とうにかけることができる。温度が22から50である場合、溶解の時間は、数分から数時間まで、例えば、15分から5時間までで十分である。例えば、ペプチドは、それをH F I P中で約37で約2.5時間振とうすることによって好都合に溶解することができる。

【 0 0 8 5 】

A 突然変異タンパク質ペプチドの量は、2 mg / mLから50 mg / mL、5 mg / mLから40 mg / mLまたは5 mg / mLから30 mg / mLのペプチドが水素結合切断剤に溶解するような量である。例えば、水素結合切断剤に溶解したA 突然変異タンパク質ペプチドの濃度は、H F I P中約6 mg / mLに好都合に調整することができる。

【 0 0 8 6 】

A 突然変異タンパク質ペプチドを水素結合切断剤に溶解することにより透明な溶液が得られる場合、それは好都合である。

【 0 0 8 7 】

次いで水素結合切断剤を例えば、蒸発により除去し、残留物を適切な溶媒、例えば、D M S Oに再懸濁する。A 突然変異タンパク質ペプチドの量は、1 mMから10 mM、2 mMから8 mMまたは4 mMから6 mMのペプチドが溶媒に再懸濁されるようなものである。例えば、再懸濁A 突然変異タンパク質ペプチドの濃度は、D M S O中約5 mMに好都合に調整することができる。

【 0 0 8 8 】

さらなるステップにおいて、両親媒性物質をA 突然変異タンパク質ペプチドの水素結合切断剤中溶液に加える。両親媒性物質の添加により、ペプチドのオリゴマー化が誘導されてオリゴマーが生じる。

【 0 0 8 9 】

両親媒性物質は、脂肪酸または界面活性剤を含み、それらの一部は、参照により本明細書に組み込む、国際公開第2007064917号に示されている。

【 0 0 9 0 】

例えば、硫酸塩、とりわけアルキル硫酸塩およびアルキルエーテル硫酸塩；スルホネート、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S)、脂肪酸、例えば、ラウリン酸のようなカルボン酸、サルコシン、例えば、N - ラウロイルサルコシン (サルコシル N L - 30またはG a r d o l (登録商標) としても公知)、オクチルフェノールポリオキシエチレンエーテル、例えば、t e r t - オクチルフェノール x 9 - 10 E O (T r i t o n (登録商標) X 100としても公知) のようなアルキルアリアルアルコールポリオキシエチレンエーテルまたはアルキルアリアルニルフェノールポリオキシエチレンエーテル、例えば、ノニルフェノール x 20 E O (T e r g i t o l (登録商標) N P - 40としても公知)、3 - (3 - コールアミドプロピル) ジメチルアンモニオ - 1 - プロパンスルホネート (C H A P S)、ドデシル - N , N - ジメチル - 3 - アミノ - 1 - プロパンスルホネート (D D A P) ならびにアミン、とりわけアルキルアミン、例えば、ドデシルアミンを本発明の方法に両親媒性物質として好都合に用いることができる。また、糖界面活性剤、とりわけ例えば、ポリエトキシ化ソルビトール脂肪酸エステル、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート (P o l y s o r b a t 80またはT w e e n (登録商標) 80としても公知) のようなポリエトキシ化ソルビトールエステルを本発明の方法に両親媒性物質として好都合に用いることができる。

【 0 0 9 1 】

特定の実施形態によれば、両親媒性物質は、両親媒性物質を含む水溶液の形で加える。前記溶液は、緩衝されていてよい。6.0から10.0、6.5から9.5または7.0

10

20

30

40

50

から 9.0 の範囲の pH 値が好都合であることがわかっている。例えば、約 7.4 の pH 値を有する緩衝水溶液は、好都合に用いることができる。適切な緩衝水溶液は当技術分野で公知である。例えば、5 mM NaH_2PO_4 および 35 mM NaCl を含む水溶液を好都合に用いることができる。

【0092】

水溶液を加えることにより A 突然変異タンパク質ペプチドを希釈する。再懸濁 A 突然変異タンパク質ペプチドの体積の 5 から 50、7 から 30 または 8 から 25 倍の範囲の加える水溶液の量が好都合であることがわかっている。例えば、加える水溶液の量は、好都合には再懸濁 A 突然変異タンパク質ペプチドの体積の約 10 倍であり得る。

【0093】

選択される両親媒性物質の濃度は、用いられる作用物に依存する。SDS を用いる場合、インキュベーション混合物中 0.05 から 0.7 重量%、0.075 から 0.4 重量% または 0.1 から 0.3 重量% の範囲の濃度が好都合であることがわかっている。例えば、約 0.2 重量% の SDS を含む緩衝水溶液を好都合に用いることができる。ラウリン酸または N-ラウロイルサルコシンを用いる場合、例えば、0.1 から 1.0 重量%、0.25 から 0.75 重量% または 0.4 から 0.6 重量% の範囲の多少より高い濃度が好都合である。例えば、約 0.5 重量% のラウリン酸または N-ラウロイルサルコシンを含む緩衝水溶液を好都合に用いることができる。ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート（例えば、Tween（登録商標）80）を用いる場合、インキュベーション混合物中 0.05 から 1 重量%、0.075 から 0.5 重量% または 0.1 から 0.3 重量% の範囲の濃度が好都合であることがわかっている。

【0094】

通常、再懸濁 A 突然変異タンパク質ペプチドおよび緩衝水溶液を好都合には掻き混ぜながら、例えば、ボルテックスしながら混合する。

【0095】

混合物をインキュベートしてオリゴマー形成を完結する前に、混合物から固体を除去することが好都合であり得る。

【0096】

オリゴマー形成のためのインキュベーションの時間は、数分から数時間までの範囲であり得る。インキュベーションの温度が 15 から 50、18 から 45 または 20 から 40 である場合、1 時間から 48 時間まで、2 時間から 36 時間までまたは 5 時間から 24 時間までが十分である。例えば、オリゴマー形成は、混合物を約 37 で約 24 時間インキュベートする場合、完結する。

【0097】

便宜上、インキュベーションを 2 段階で行う。すなわち、インキュベーションの第 1 の期間の後に調製物を希釈し（例えば、水で）、インキュベーションの第 2 の期間を後続させる。

【0098】

第 1 の期間におけるインキュベーションの時間は、数分から数時間までの範囲であり得る。インキュベーションの温度が 15 から 50、18 から 45 または 20 から 40 である場合、1 時間から 24 時間まで、2 時間から 12 時間までまたは 4 時間から 8 時間までが十分である。例えば、混合物を約 37 で約 6 時間インキュベートする。

【0099】

インキュベーション混合物の希釈は、それ自体が公知の方法で実施することができる。特定の実施形態によれば、希釈は、水を加えることを含む。便宜上、インキュベーション混合物は、約 2 倍から 20 倍、3 倍から 15 倍または 4 倍から 10 倍、例えば、4 倍（1:3）希釈する。

【0100】

オリゴマー形成を完結するための第 2 の期間におけるインキュベーションの時間は、数分から数時間までの範囲であり得る。インキュベーションの温度が 15 から 50、18

10

20

30

40

50

から45 または20から40 である場合、1時間から36時間まで、2時間から24時間までまたは4時間から18時間までが十分である。例えば、オリゴマー形成は、混合物を約37 で約18時間インキュベートする場合、完結する。

【0101】

オリゴマー形成が完結すると、インキュベーション混合物を遠心分離し、遠心分離インキュベーション混合物の上清を得ることが好都合であり得る。例えば、約3000 x gで約20分間の遠心分離が好都合であることがわかっている。

【0102】

特定の実施形態によれば、遠心分離インキュベーション混合物の上清は、次に凍結することができる。例えば、遠心分離インキュベーション混合物の上清は、好都合には - 30 で30分間凍結することができる。凍結上清を次に解凍することができ、解凍上清を再び遠心分離し（例えば、10000 x gで10分間）、遠心分離混合物の上清を得てもよい。

10

【0103】

この方法により得られるオリゴマー調製物は、そのまま用いるまたは例えば、オリゴマーを濃縮し、および/もしくは精製するためにさらなる後処理にかけることができる。

【0104】

特定の実施形態によれば、本発明の方法は、インキュベーション混合物を濃縮するステップを含む。

【0105】

インキュベーション混合物を濃縮することは、本質的に公知の方法で実施することができる。特定の実施形態によれば、濃縮は、超遠心分離により行われる。超遠心分離は、当技術分野で周知の方法である。10から100、20から80または25から50 kDa カットオフを含む超遠心分離は、好都合であることがわかっている。例えば、本発明のオリゴマーは、約30 kDa カットオフを含む超遠心分離により好都合に濃縮することができる。

20

【0106】

超遠心分離は、インキュベーション混合物中に存在するオリゴマーの量を維持しながらインキュベーション混合物の体積を減少させる。したがって、体積を1から40%、2から35または4から33%に減少させることは、好都合である。例えば、インキュベーション混合物の体積を超遠心分離により約32%、10%または5%に好都合に減少させることができる。

30

【0107】

特定の実施形態によれば、本発明の方法は、インキュベーション混合物または濃縮インキュベーション混合物の塩濃度を減少させるステップを含む。

【0108】

塩濃度（および両親媒性物質、その減少は、能動免疫に用いるのにとりわけ重要である）の減少は、本質的に公知の方法で実施することができる。特定の実施形態によれば、塩濃度は、インキュベーション混合物または濃縮インキュベーション混合物を透析にかけることによって減少させる。透析は、当技術分野で周知の方法である。例えば、インキュベーション混合物または濃縮インキュベーション混合物の透析は、5 mM NaH_2PO_4 および35 mM NaCl を含む溶液に対して好都合に実施することができる。溶液は、適量の両親媒性物質も含み得る。透析中に溶液を新たなものに置き換えることが好都合であり得る。

40

【0109】

透析は、塩の減少が完全になるまで実施する。例えば、約22 で約2.5時間が好都合であることがわかっている。

【0110】

透析物を遠心分離し、遠心分離透析物の上清を得ることがさらに好都合であり得る。例えば、約10000 x gで約10分間の遠心分離が好都合であることがわかっている。

50

【0111】

したがって、特定の実施形態によれば、本発明は、A 突然変異タンパク質オリゴマーを調製する方法であって、

- (i) モノマー A 突然変異タンパク質ペプチドを水素結合切断剤に溶解すること、
 - (ii) 両親媒性物質を加え、混合し、インキュベートすること、
 - (iii) 希釈し、インキュベートすること、ならびに
 - (iv) 任意選択的に、遠心分離すること、透析により塩および/または両親媒性物質濃度を減少させること、超遠心分離により濃縮することのうちの1つ以上、ならびに
 - (v) 上清を得ること
- を含む方法に関する。

10

【0112】

特定の実施形態によれば、免疫原性産物は、切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーである。

【0113】

そのような切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーは、A 突然変異タンパク質オリゴマーを調製する方法であって、(d) オリゴマーをタンパク質分解的に切断するステップをさらに含む方法により得られる。エンドペプチダーゼが優先され、例えば、トリプシン、キモトリプシン、サーモリシン、エラスターゼ、パパインおよびエンドプロテイナーゼ GluC からなる群から選択される酵素を用いる。オリゴマーをタンパク質分解的に切断するのに適する条件は、参照により本明細書に組み込む、例えば、国際公開第 2004/067561 号、国際公開第 2006/094724 号および国際公開第 2007/064917 号に記載されている。本発明の特定の切断型オリゴマーは、サーモリシンの作用により得られるものである。

20

【0114】

本発明の免疫原性産物は、配列番号 1 に示すアミノ酸配列 A (18-33) と 62.5% 以上の同一性を有する A アミノ酸配列を含む。したがって、本明細書で述べる免疫原性産物は、アミノ酸配列 V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃ [配列番号 2; A (18-33)] と 62.6% 以上、68.75% 以上、75% 以上、81.25% 以上、87.5% 以上または 93.75% の同一性を有する A アミノ酸配列を含む。

30

【0115】

「同一性」という用語は、特定の比較ウィンドウまたはセグメントにわたるアミノ酸ごとの 2 つの配列の近縁性を指す。したがって、同一性は、2 つのアミノ酸配列の間の同一性、一致または同等性の程度と定義される。「配列同一性の百分率」は、特定の領域にわたる 2 つの最適に整列させた配列を比較し、一致した位置の数を得るために同一のアミノ酸が両配列に存在する位置の数を決定し、そのような位置の数を比較しているセグメントにおける位置の総数で割り、結果に 100 を掛けることによって計算される。配列の最適な整列は、Smith & Waterman、Appl. Math., 2 巻、482 頁、1981 年のアルゴリズムにより、Needleman & Wunsch、J. Mol. Biol., 48 巻、443 頁、1970 年のアルゴリズムにより、Pearson & Lipman、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)、85 巻、2444 頁、1988 年の方法により、および関連アルゴリズムを実行するコンピュータプログラム (例えば、Clustal Macaw pileup (<http://cmgm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>; Higgins ら、CABIOS, 5:151-153, 1989 年)、FASTDB (Intelligent Genetics)、BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul ら、Nucleic Acids Research, 25 巻、3389-3402 頁、1997 年)、PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) または GAP、BESTFIT、FASTA および TFASTA (Wiscon

40

50

sin Genetics Software Package Release 7.0、Genetics Computer Group、Madison、WI))により行うことができる。

【0116】

本発明の一実施形態によれば、本発明の免疫原性産物により含まれるアミノ酸配列は、ループ（同義語：ターン）を含む特定の二次構造を特徴とする。ループ（またはターン）は、本明細書で用いているように、少なくとも2つのC 原子の近距離接近（通常<7）を定義することを意味する。

【0117】

適切なループは、 、 、 および ループである。本発明の一実施形態によれば、ループは、 ループである。 ループは、本明細書で用いているように、ドナーおよびアクセプター残基が3つの残基により分離されている水素結合（複数可）（ $i \quad i + n - 3 H$ 結合）を特徴とするループを定義することを意味する。

【0118】

本発明の特定の実施形態によれば、ループは、 ヘアピンループである。ヘアピンループは、本明細書で用いているように、ペプチド主鎖の方向が逆であり、側面にある二次構造要素が相互作用する、ループを定義することを意味する。

【0119】

本発明の特定の実施形態によれば、好ましくは ヘアピンループであり得る、ループは、 $V_{24} G_{25} S_{26} N_{27}$ [配列番号10; A (24-27)] および $D_{23} V_{24} G_{25} S_{26} N_{27} K_{28}$ [配列番号11; A (23-28)] から選択される配列を含む。

【0120】

特に、本明細書で述べた免疫原性産物のアミノ酸配列は、分子内逆平行 シートを形成する。逆平行 シートは、本明細書で用いているように、一般的にねじれたひだ折れシートを形成する、3つ以上の水素結合により横方向に連結された少なくとも2つの ストランドのアセンブリーを定義することを意味する。ストランドは、ペプチド主鎖がほぼ完全に伸びた一般的に3-10アミノ酸を含むアミノ酸の連なりである。

【0121】

本発明の関連態様において、本明細書で述べた免疫原性産物は、逆平行 シートを形成する ストランドが、ループ、好ましくは本明細書で定義した ヘアピンループを介して連結されているアミノ酸配列を含む。

【0122】

前記態様の特定の実施形態によれば、 $F_{19} F_{20} A_{21}$ [配列番号8; A (19-21)] および $A_{30} I_{31} I_{32}$ [配列番号9; A (30-32)] に対応する産物のアミノ酸配列部分は、逆平行に配向している。

【0123】

突然変異タンパク質A ペプチドのオリゴマーはさらに、2つ以上の突然変異タンパク質A ペプチドの間の固有の相互作用を特徴とする。

【0124】

本発明の一態様において、本明細書で述べた免疫原性産物は、アミノ酸配列 $V_{18} F_{19} F_{20} A_{21} E_{22} D_{23} V_{24} G_{25} S_{26} N_{27} K_{28} G_{29} A_{30} I_{31} I_{32} G_{33} L_{34} M_{35} V_{36} G_{37} G_{38} V_{39}$ [配列番号3; A (18-39)] と72%以上、77%以上、81%以上、86%以上、90%以上または95%以上の同一性を有するA アミノ酸配列を含む。

【0125】

本発明の関連態様において、前記免疫原性産物は、第2のアミノ酸配列 $L^B_{34} M^B_{35} V^B_{36} G^B_{37} G^B_{38}$ (配列番号5) と平行に配向している第1のアミノ酸配列 $L^A_{34} M^A_{35} V^A_{36} G^A_{37} G^A_{38}$ [配列番号5; A (34-38)] を含む。この場合、 $M^A_{35} (NH) - V^B_{36} (NH)$ 、 $G^A_{37} (NH) - G^B_{38} (NH)$

10

20

30

40

50

、 $L^A_{34}(NH) - L^B_{34}(CH_3)$ 、 $M^A_{35}(NH) - V^B_{36}(CH_3)$ からなる群から選択される少なくとも1つの原子対のプロトン間距離は、1.8から6.5オングストロームであり得る。

【0126】

本発明のさらなる関連態様において、前記免疫原性産物は、第2のアミノ酸配列 $G^B_{33}L^B_{34}M^B_{35}V^B_{36}G^B_{37}G^B_{38}V^B_{39}$ (配列番号6)と平行に配向している第1のアミノ酸配列 $G^A_{33}L^A_{34}M^A_{35}V^A_{36}G^A_{37}G^A_{38}V^A_{39}$ [配列番号6; A(33-38)]を含む。この場合、 $G^A_{33}(NH) - G^B_{34}(NH)$ 、 $M^A_{35}(NH) - V^B_{36}(NH)$ 、 $G^A_{37}(NH) - G^B_{38}(NH)$ 、 $L^A_{34}(NH) - L^B_{34}(CH_3)$ 、 $M^A_{35}(NH) - V^B_{36}(CH_3)$ 、 $G^A_{38}(NH) - V^B_{39}(CH_3)$ および $V^A_{39}(NH) - V^B_{39}(CH_3)$ からなる群から選択される少なくとも1つの原子対のプロトン間距離は、1.8から6.5オングストロームであり得る。

10

【0127】

本発明のさらなる関連態様において、前記免疫原性産物は、2つのAアミノ酸配列の間の分子間平行シートを含む。本発明の特定の態様において、前記分子間平行シートは、第1のアミノ酸配列 $G^A_{33}L^A_{34}M^A_{35}V^A_{36}G^A_{37}G^A_{38}V^A_{39}$ [配列番号7; A(33-39)]および第2のアミノ酸配列 $G^B_{33}L^B_{34}M^B_{35}V^B_{36}G^B_{37}G^B_{38}V^B_{39}$ (配列番号7)を含む。この場合、原子対 $G^A_{33}(CO) - L^B_{34}(N)$ 、 $L^B_{34}(CO) - M^A_{35}(N)$ 、 $M^A_{35}(CO) - V^B_{36}(N)$ 、 $V^B_{36}(CO) - G^A_{37}(N)$ および $G^B_{37}(CO) - G^A_{38}(N)$ は、 3.3 ± 0.5 の距離にあり得る。COは、主鎖酸素原子を示し、残基のファイ()角度は、 -180 から -30 の範囲にあり、残基のプサイ()角度は、約 60 から 180 までまたは約 -180 から -150 までの範囲にある。

20

【0128】

逆平行シートの構造を定めるプロトン間距離は、主鎖アミド間ならびに主鎖アミドおよび側鎖間の分子内核オーバーハウザー効果(NOE)により決定することができる。

【0129】

平行シートの構造を定めるプロトン間距離は、主鎖NH - NH間ならびに主鎖NHおよび側鎖のメチル基間の分子間NOEにより決定することができる。

30

【0130】

分子内NOEと分子間NOEは、例えば、参照により本明細書に組み込む、国際公開第2007/064917号、とりわけ実施例V、part G、NMR図に記載されているように、異なる同位体標識試料を用いて区別することができる。

【0131】

NMRデータの解析によるNOE由来の距離拘束を用いて、例えば、模擬アニーリングプロトコル[M. Nilgesら、FEB S Lett. 229巻、317-324頁、(1988年)]を用いることによりプログラムCNX[A. T. Brungerら、Acta Crystallogr. D54(Pt5)、905-21頁、(1998年)]を用いて構造を計算し、それにより、さらに2つの原子間の分子内および/または分子間距離を得ることができる。

40

【0132】

本発明の一態様において、本明細書で述べた免疫原性産物は、アミノ酸配列 $V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}$ [配列番号4; A(12-39)]の一部(X-Y)と62.5%以上、64%以上、67%以上、71%以上、75%以上、78%以上、82%以上、85%以上、89%以上、92%以上または96%以上の同一性を有するAアミノ酸配列を含み、Xは、数12. . . 18からなる群から選択され、Yは、数33. . . 39からなる群から選択される。

【0133】

50

本発明の関連態様において、前記アミノ酸配列の少なくとも2つの非隣接残基は、例えば、直接共有結合によりまたはリンカーを介して互いに共有結合している。特に、[配列番号4の残基2-12; A (12-39)]のV₁₂、H₁₃、H₁₄、Q₁₅、K₁₆、L₁₇、V₁₈、F₁₉、F₂₀、A₂₁、E₂₂またはD₂₃に対応するアミノ酸残基の少なくとも1つおよび[配列番号4の残基17-28; A (12-39)]のK₂₈、G₂₉、A₃₀、I₃₁、I₃₂、G₃₃、L₃₄、M₃₅、V₃₆、G₃₇、G₃₈、V₃₉に対応するアミノ酸残基の少なくとも1つが互いに共有結合している。

【0134】

2つのアミノ酸残基の間の共有結合は、当技術分野で周知の様々な手段により、例えば、ジスルフィド架橋形成またはクロスリンク技術により確立することができる。とりわけ、アミノ酸残基の側鎖を互いに結合させることができる。とりわけ官能基、例えば、チオール、アミノ、カルボキシルまたはヒドロキシル基を有する側鎖は、ジスルフィド架橋を形成する2つのシステイン残基のように、直接的に、またはリンカーを介して間接的に互いに結合させることができる。したがって、他のアミノ酸残基に共有結合するアミノ酸残基は、とりわけシステイン、リシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基であり得る。

【0135】

タンパク質のクロスリンク結合は、長く、網羅的歴史を有し、大量の文献先例がある。特異的な共有結合性クロスリンクが天然または非天然アミノ酸側鎖間に作製されることを可能にする当業者に公知のあらゆる方法論は、本発明で想定される位置特異的クロスリンクを形成するために用いることができる。この方法論のいくつかの例を下に示す。

【0136】

当業者に公知である多数の化学クロスリンク剤が存在する。本発明のために、好ましいクロスリンク剤は、ホモ二官能性およびヘテロ二官能性クロスリンク剤を含み、段階的にアミノ酸を連結する適切性のためヘテロ二官能性クロスリンク剤が好ましい。

【0137】

また、ヘテロ二官能性クロスリンク剤は、より特異的結合を確立し、それにより、望ましくない副反応の発生を低減させる能力を備えている。

【0138】

様々なヘテロ二官能性クロスリンク剤が当技術分野で公知である。

【0139】

これらは、2つのアミノ(-NH₂)基、1つのアミノおよび1つのチオール(もしくはスルフヒドリル、すなわち、-SH)基または2つのチオール基間の結合を形成するためのヘテロ二官能性クロスリンク剤を含む。

【0140】

ヘテロ二官能性クロスリンク剤の一部として有用な1つの反応性基は、アミン反応性基である。一般的なアミン反応性基は、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルを含む。NHSエステルは、わずかに酸性から中性(pH 6.5-7.5)条件下で遊離アミン(例えば、リシン残基)と数分で特異的に反応する。

【0141】

N-ヒドロキシスクシンイミド部分を有するクロスリンク剤は、一般的により大きい水溶解度を有する、それらのN-ヒドロキシスルホスクシンイミド類似体の形でも用いることもできることを注目されたい。

【0142】

ヘテロ二官能性クロスリンク剤の一部として有用な別の反応性基は、チオール反応性基である。一般的なチオール反応性基は、マレイミド、ハロゲンおよびピリジリジスルフィドを含む。マレイミドは、好ましくはわずかに酸性から中性(pH 6.5-7.5)条件下で、遊離チオール基(例えば、システイン残基における)と数分で特異的に反応する。ハロゲン(ヨードアセチル官能基)は、-SH基と生理的pHで反応する。これらの反応性基の両方は、安定なチオエーテル結合の形成をもたらす。

10

20

30

40

50

【0143】

例えば、スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (SMCC) またはスルホ - SMCC は、例えば、Lys 側鎖のアミンと例えば、Cys 側鎖の遊離 - SH との間のクロスを形成するために用いることができる。アミン反応性 N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルは、アミノ基 (例えば、Lys 残基のアミノ基) と反応して、安定なアミド結合を形成する。得られるマレイミド活性化ペプチドは、次に同じペプチドのスルフヒドリル基 (例えば、Cys 残基のそれ) と反応して、ジスルフィド結合を形成し、それにより共有結合を確立する。この化学は、文献に十分に記載されている。例えば、以下を参照のこと。Uto I. ら (1991 年)、J. Immunol. Methods、138 巻、87 - 94 頁; Bieniarz C. ら (1996 年)、Extended Length Heterobifunctional Coupling Agents for Protein Conjugations、Bioconjug. Chem.、7 巻、88 - 95 頁; Chrisey L. A. ら (1996 年)、Nucleic Acids Res.、24 巻 (15 号)、3031 - 3039 頁; Kuijpers W. H. ら (1993 年)、Bioconjug. Chem.、4 巻 (1 号)、94 - 102 頁; Brinkley M. A. (1992 年)、A survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents、Bioconjugate Chem.、3 巻、2 - 13 頁; Hashida S. ら (1984 年)、More useful maleimide compounds for the conjugation of Fab to horseradish peroxidase through thiol groups in the hinge、J. Appl. Biochem.、6 巻、56 - 63 頁; Mattson G. ら (1993 年)、A practical approach to crosslinking、Molecular Biology Reports、17 巻、167 - 183 頁; Partis M. D. (1983 年)、Crosslinking of proteins by omega-maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimide esters、J. Protein. Chem.、2 巻、263 - 277 頁; Samoszuk M. K. ら (1989 年)、A peroxide-generating immunoconjugate directed to eosinophil peroxidase is cytotoxic to Hodgkin's disease cells in vitro、Antibody、Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals、2 巻、37 - 45 頁; Yoshitake S. ら (1982 年)、Mild and efficient conjugation of rabbit Fab and horseradish peroxidase using a maleimide compound and its use for enzyme immunoassay、J. Biochem.、92 巻、1413 - 1424 頁。

10

20

30

40

【0144】

さらなるヘテロ二官能性クロスリンク剤、例えば、[N - - マレイミドカプロイルオキシ]スクシンイミドエステル、N - [- マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステル、N - [- マレイミドウンデカノイルオキシ]スクシンイミドエステル、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) またはそれらのスルホスクシンイミド類似体 (例えば、スルホ - MBS) を同様な方法で用いることができる。

【0145】

例えば、Lys 側鎖のアミンと例えば、Cys 側鎖の遊離 - SH との間のクロスを形成するために用いることができるヘテロ二官能性クロスリンク剤のさらなる例は、スクシンイミジル - 6 - [(3 - (2 - ピリジルジチオ) - プロピオネート) - ヘキサノエ

50

ート (LC-SPDP) またはスルホ-LC-SPDP である。アミン反応性 N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルは、アミノ基 (例えば、Lys 残基のそれ) と反応して、安定なアミド結合を形成する。得られるペプチドは、次に同じペプチドのスルフヒドリル基 (例えば、Cys 残基のそれ) と反応して、ジスルフィド結合を形成し、それにより共有結合を確立するピリジルジスルフィド基を有する。この化学は、文献に十分に記載されている。例えば、以下を参照のこと。Carlsson J. ら (1978 年)、Biochem. J., 173 巻、723-737 頁; Stan R. V. (2004 年)、Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 286 巻、H1347-H1353 頁; Mader C. ら (2004 年)、J. Bacteriol., 186 巻、1758-1768 頁。

10

【0146】

さらなるヘテロ二官能性クロスリンク剤、例えば、4-スクシンイミジルオキシカルボニル- -メチル- - (2-ピリジルジチオ)-トルエン (SMPT) またはスルホ-SMPT、N-スクシンイミジル-3- (2-ピリジルジチオ)-プロピオネート (SPDP) またはスルホ-SPDP を同様な方法で用いることができる。

【0147】

例えば、Lys 側鎖のアミンと例えば、Cys 側鎖の遊離-SH との間のクロスリンクを形成するために用いることができるヘテロ二官能性クロスリンク剤のさらなる例は、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート (SATA) またはスルホ-SATA である。アミン反応性 N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルは、アミノ基 (例えば、Lys 残基のそれ) と反応して、安定なアミド結合を形成する。得られるペプチドの保護-SH 基は、次にヒドロキシルアミンによる処理により脱保護され、得られる遊離-SH は、次に同じペプチドのスルフヒドリル基 (例えば、Cys 残基のそれ) と反応して、ジスルフィド結合を形成し、それにより共有結合を確立する。

20

【0148】

さらなるヘテロ二官能性クロスリンク剤、例えば、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオプロピオネートまたはそのスルホスクシンイミド類似体を同様な方法で用いることができる。

【0149】

さらなる適切なヘテロ二官能性クロスリンク剤は、N-スクシンイミジル- (4-ヨードアセチル)-アミノベンゾエート (SIAB) またはスルホ-SIAB を含む。

30

【0150】

特異的で、段階的なクロスリンクもアミノ (-NH₂) およびカルボキシ (-COOH) 基間に形成させることができる。

【0151】

例えば、1-エチル-3- (3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドヒドロクロリド (EDC) は、例えば、Lys 側鎖のアミンと酸側鎖の遊離 COOH とのクロスリンクを形成するために用いることができる。カルボキシ反応性カルボジイミドは、カルボキシ基 (例えば、Asp、Glu、Dab (2, 4-ジアミノ酪酸)、Dap (2, 4-ジアミノプロピオン酸) またはオルニチン残基のそれ) と反応して、不安定 o-アシルイソ尿素エステルを生成する。反応性 o-アシルイソ尿素エステルは、次に同じペプチドのアミノ基 (例えば、Lys 残基のそれ) と反応して、アミド結合を形成し、それにより共有結合を確立する。あるいは、反応性 o-アシルイソ尿素エステルは、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシスルホスクシンイミドまたはスルホ-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドと反応させて、準安定性アミン反応性 NHS エステルを得ることができ、これは、次に同じペプチドのアミノ基 (例えば、Lys 残基のそれ) と反応して、アミド結合を形成し、それにより共有結合を確立する。この化学は、文献に十分に記載されている。例えば、以下を参照のこと。DeSilva N. S. (2003 年)、Interactions of Surfactant Protein D with Fatty Acids、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 29 巻

40

50

、757 - 770頁；Grabarek Z. および Gergely, J. (1990年)、Zero length crosslinking procedure with the use of active esters、Anal. Biochem.、185巻、131 - 135頁；Sinz A. (2003年)、J. Mass Spectrom.、38巻、1225 - 1237頁；Staros J. V.、Wright R. W. および Swingle D. M. (1986年)、Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions、Anal. Biochem.、156巻、220 - 222頁；Taniuchi M. ら (1986年)、Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83巻、4094 - 4098頁。

10

【0152】

ヘテロ二官能性クロスリンク剤は、Lys (N3) およびプロパギルグリシンアミノ酸の反応も含む。この反応は、溶液中または樹脂上で行わせることができる（例えば、Jiang S.、(2008年)、Curr. Org. Chem.、12巻、1502 - 1542頁およびその中における参考文献に記載されているように）。

【0153】

特定のクラスのクロスリンク剤、とりわけヘテロ二官能性クロスリンク剤は、光反応性クロスリンク剤を含む。

20

【0154】

例えば、(SDA) は、例えば、Lys 側鎖のアミンと例えば、別の Lys 側鎖のアミンとの間のクロスリンクを形成するために用いることができる。アミン反応性 N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルは、アミノ基（例えば、Lys 残基のそれ）と反応して、安定なアミド結合を形成する。得られるペプチドは、UV 光への曝露により、同じペプチドのアミノ基（例えば、Lys 残基のそれ）と反応して、安定な結合を形成し、それにより共有結合を確立する、感光性ジアジリン部分を有する。

【0155】

さらなる適切な光反応性クロスリンク剤は、ビス - [- (4 - アジドサリチルアミド) - エチル] - ジスルフィド (BASED) および N - スクシンイミジル - 6 - (4' - アジド - 2' - ニトロフェニルアミノ) - ヘキサノエート (SANPAH) を含む。

30

【0156】

ヘテロ二官能性クロスリンク剤に加えて、ホモ二官能性クロスリンク剤を含むいくつかの他のクロスリンク剤が存在する。

【0157】

これらは、2つのアミノ (-NH₂) 基の間の結合を形成するためのホモ二官能性クロスリンク剤を含む。

【0158】

例えば、ジスクシンイミジルスベレート (DSS) は、例えば、Lys 側鎖のアミンと例えば、別の Lys 側鎖のアミンとの間のクロスリンクを形成するために用いることができる。アミン反応性 N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルは、アミノ基（例えば、Lys 残基のそれ）と反応して、安定なアミド基を形成する。得られるペプチドは、次に同じペプチドの別のアミノ基（例えば、Lys 残基のそれ）と反応して、さらなる安定なアミド基を形成し、それにより共有結合を確立する。

40

【0159】

さらなる適切なホモ二官能性クロスリンク剤は、ビスマレイミドヘキサノ (BMH) およびピメルイミド酸ジメチル (DMP) を含む。

【0160】

さらなる適切なホモ二官能性クロスリンク剤は、2つのシステイン間のメチレンジチオ

50

エーテル結合を含む。ペプチドとTBAF（テトラブチルアンモニウムフルオリド）との反応は、部分的に脱保護されたペプチドを含有する樹脂上で行わせ、その後、切断することができる（例えば、Uekiら、（1999年）Bioorg. Med. Chem. Lett.、9巻、1767-1772頁およびUekiら、in Peptide Science、1999、539-541頁を参照）。

【0161】

さらなる適切なホモ二官能性クロスリンクシステムは、アシルグリシン（例えば、Wells B.ら、（2005年）Bioorg. Med. Chem.、13巻、4221-4227頁参照）または修飾アミノ酸、例えば、（S）-Fmoc-（2'ペンテニル）アラニン（例えば、Walensky L. D.ら、（2004年）Science、305巻、1466-1470頁；Schafmeister C. E.ら、（2000年）J. Am. Chem. Soc.、122巻、5891-5892頁；Qiu W.ら、（2000年）Tetrahedron、56巻、2577-2582頁；Belokon Y. N.ら、（1998年）Tetrahedron: Asymmetry、9巻、4249-4252頁；Qiu W.、（2008年）Anaspec poster at 20th American Peptide Society Annual Meetingを参照）の間の閉環メタセシス反応を含む。これらの反応は、それぞれ保護ペプチド断片上または樹脂上で、溶液中で行わせることができる。

10

【0162】

ホモおよびヘテロ二官能性クロスリンク剤は、スペーサーアームまたは架橋を含み得る。架橋は、2つの反応性末端を連結する構造である。架橋の最も明らかな特性は、立体障害に対するその効果である。いくつかの場合に、より長い架橋は、2つのアミノ酸残基を連結するのに必要な距離により容易に橋架けすることができる。

20

【0163】

2つの非隣接アミノ酸残基の間の1つの共有結合は、十分な安定化をもたらし得るが、本発明の免疫原性産物は、2つ以上の共有結合を含み得る。

【0164】

結合が形成することを可能にする条件は、当然、形成する結合の種類に依存し、当業者により容易に決定され得る。本明細書に示す結合およびそれらの化学の説明に言及する。

【0165】

本発明の免疫原性産物が所望の二次構造を有することを保証するためにオリゴマーおよび結合の形成を独立に用いることができる。したがって、本発明は、そのような結合を含むA 突然変異タンパク質オリゴマーおよびそのような結合を有するモノマーA 突然変異タンパク質ペプチドを提供する。

30

【0166】

さらに、本発明の免疫原性産物が所望の二次構造を有することを保証するためにオリゴマーおよび結合の形成を用いることができる。例えば、結合形成は、適切なオリゴマー形成を促進する助けとなり、また逆の場合も同様であり得る。

【0167】

原則として、オリゴマー形成が結合形成に先行し得る。あらかじめ形成されたオリゴマーが、結合が形成されることを誘導または促進する場合、これは、有利である。あるいは、結合形成がオリゴマー形成に先行し得る。あらかじめ形成された結合がオリゴマー形成を誘導または促進する場合、これは、有利である。オリゴマー形成および結合形成は、同時に起こり得る。

40

【0168】

A 突然変異タンパク質ペプチドおよびオリゴマーの両方は、最終免疫原性産物により含まれるアミノ酸配列と異なるペプチドを用いて調製することができる。例えば、出発ペプチドは、その後、合成中に例えば、タンパク質分解的切断により除去されるそのCおよび/またはN末端における付加的なアミノ酸を含み得る。

【0169】

50

本発明の一実施形態において、オリゴマーは、ペプチドにより形成され、その後１つ以上のペプチド内共有結合（複数可）により安定化される。

【０１７０】

本発明の別の実施形態において、オリゴマーは、ペプチドにより形成され、１つ以上のペプチド内共有結合（複数可）により安定化され、その後化学的または酵素的手段によって関連構造要素をより十分に示す切断型に処理される。あるいは、オリゴマーは、ペプチドにより形成され、化学的または酵素的手段によって関連構造要素をより十分に示す切断型に処理され、その後、１つ以上のペプチド内共有結合（複数可）により安定化される。

【０１７１】

本発明のさらなる別の実施形態において、ペプチドを用いて、関連構造要素を形成する。ここで、ペプチドは、オリゴマーにおける隣接するペプチドとの相互作用によるのではなく、１つ以上のペプチド内共有結合によって適切な立体配座に保持されることとなる。適切なペプチド内共有結合（複数可）により安定化された、これらの免疫原性産物は、関連構造要素をモノマーとして示すことが想定される。

【０１７２】

「Ａ 突然変異タンパク質」という用語は、本明細書で用いているように、１つ以上のアミノ酸置換によりヒトアミロイドベータ（Ａ）タンパク質と異なる変異型Ａポリペプチドを指す。とりわけ、Ａ 突然変異タンパク質は、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つまたはそれ以上の点突然変異により配列番号１に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドと異なるＡである。前記点突然変異は、好ましくはＡ（１８－３３）、Ａ（１８－２５）、Ａ（１９－２４）内、最も好ましくはＡ（２０－２２）内のホットスポットに位置する。

【０１７３】

本明細書で述べた免疫原性産物により含まれるＡアミノ酸配列に存在し得る例示的なアミノ酸置換を表１に要約する。

【０１７４】

【表１】

表１：本発明によるＡβアミノ酸配列に存在する例示的なアミノ酸置換。それぞれのホットスポットにおける好ましいアミノ酸置換を太字で示す。

アミノ酸置換ホットスポット (配列番号１の対応するアミノ酸として示す)	以下により置換
V18	H, R, K, D, E, C, N, S, T, Q, P , F, Y, W
F19	H, R, K, D, E, C, N, S, T, Q, A, G, P , V, L, M, I
F20	H, R, K, D, E, C, N, S, T, Q, P, A, G , V, L, M, I
A21	H, R, K, G, P , D, E, F, Y, W
E22	V, L, M, I, F, Y, W, A, C, N, S, T, P, Q

D23	H, R, K, V, L, M, I, F, Y, W, P, C, N, S, T, Q
V24	H, R, K, D, E, C, N, S, T, Q, P, F, Y, W
G25	H, R, K, V, L, M, I, F, Y, W, P, D, E
S26	H, R, K, P, D, E, F, Y, W
N27	H, R, K, V, L, M, I, F, Y, W, P, D, E
K28	D, E, A, G, V, L, M, I, F, Y, W, P, C, N, S, T, Q
G29	H, R, K, D, E, C, N, S, T, Q, V, L, M, I, F, Y, W, P
A30	H, R, K, D, E, C, N, S, T, Q, G, V, L, M, I, F, Y, W, P
I31	H, R, K, D, E, C, N, S, T, Q, P, F, Y, W
I32	H, R, K, D, E, C, N, S, T, Q, P, F, Y, W
G33	H, R, K, D, E, C, N, S, T, Q, V, L, M, I, F, Y, W, P

10

20

30

40

50

【 0 1 7 5 】

本発明の一態様において、本明細書で述べた免疫原性産物により含まれる A アミノ酸配列は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つのアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されていることにより配列番号2に示すアミノ酸配列と異なっている A (18-33)の変異体である。前記アミノ酸置換は、表1に示す点突然変異から選択することができる。例えば、本明細書で述べた免疫原性産物により含まれる A アミノ酸配列が2つのアミノ酸置換を有することにより配列番号2のアミノ酸配列と異なっている場合、これらのアミノ酸置換の1つまたは両方を表1に示す点突然変異から選択することができる。前記2つのアミノ酸置換は、好ましくは配列2のアミノ酸位置 E 2 2 / G 2 5、F 2 0 / E 2 2、F 2 0 / I 3 1、A 2 1 / E 2 2、A 2 1 / D 2 3 および E 2 2 / S 2 6 に対応するホットスポットに、とりわけアミノ酸位置 E 2 2 / G 2 5 および F 2 0 / E 2 2 に対応するホットスポット存在する。本明細書で述べた免疫原性産物により含まれる A アミノ酸配列が3つ、4つ、5つまたは6つのアミノ酸置換を有することにより配列番号2のアミノ酸配列と異なっている場合、これらのアミノ酸置換の1つ、2つ以上またはすべてを表1に示す点突然変異から選択することができる。

【 0 1 7 6 】

本発明の特定の実施形態において、本明細書で述べた免疫原性産物により含まれる A アミノ酸配列は、E 2 2 A および E 2 2 V から選択される1つのアミノ酸置換を有することにより配列番号2のアミノ酸配列と異なっている。

【 0 1 7 7 】

本発明のさらなる特定の実施形態において、本明細書で述べた免疫原性産物により含まれる A アミノ酸配列は、二重突然変異 F 2 0 G / E 2 2 A および E 2 2 A / G 2 5 A から選択される 2 つのアミノ酸置換を有することにより配列番号 2 のアミノ酸配列と異なっている。

【 0 1 7 8 】

本発明の関連態様において、本明細書で述べた免疫原性産物により含まれる A アミノ酸配列は、異なるアミノ酸によって置換されている 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つのアミノ酸によりアミノ酸配列 V_{1 8} F_{1 9} F_{2 0} A_{2 1} E_{2 2} D_{2 3} V_{2 4} G_{2 5} S_{2 6} N_{2 7} K_{2 8} G_{2 9} A_{3 0} I_{3 1} I_{3 2} G_{3 3} (配列番号 2 ; A (1 8 - 3 3)) と異なっている。前記アミノ酸配列の例は、

V_{1 8} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる群から選択され、

F_{1 9} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、アラニン、グリシン、プロリン、バリン、ロイシン、メチオニンおよびイソロイシンからなる群から選択され、

F_{2 0} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、メチオニンおよびイソロイシンからなる群から選択され、

A_{2 1} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、グリシン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる群から選択され、

E_{2 2} に対応するアミノ酸が、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アラニン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、プロリンおよびグルタミンからなる群から選択され、

D_{2 3} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニンおよびグルタミンからなる群から選択され、

V_{2 4} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、プロリン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなる群から選択され、

G_{2 5} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択され、

S_{2 6} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンからなる群から選択され、

N_{2 7} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択され、

K_{2 8} に対応するアミノ酸が、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニンおよびグルタミンからなる群から選択され、

G_{2 9} に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、グルタミン、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよ

10

20

30

40

50

$E_{2,2}$ に対応するアミノ酸が、バリン、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アラニン、システイン、アスパラギン、セリン、トレオニン、プロリンおよびグルタミンからなる群から選択され、 $S_{2,6}$ に対応するアミノ酸が、ヒスチジン、アルギニン、リシン、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸

50

、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 1 7 9 】

より具体的には、本発明の免疫原性産物は、

【 0 1 8 0 】

【 化 3 】

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈A₁₉F₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈
G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :13; Aβ(1-43)F19A];
D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉A₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈
G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :14; Aβ(1-43)F20A];
D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁A₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈
G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :15; Aβ(1-43)E22A];
D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁F₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈
G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :16; Aβ(1-43)E22F];
D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁V₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈
G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :17; Aβ(1-43)E22V]

10

20

$D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}L_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :18; Aβ(1-43)E22L];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}E_{22}K_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :19; Aβ(1-43)D23K];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}E_{22}L_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :20; Aβ(1-43)D23L];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}V_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :21; Aβ(1-43)G25V];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}G_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :22; Aβ(1-43)A30G];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}G_{20}A_{21}A_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :23; Aβ(1-43)F20G E22A];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}A_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}A_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :24; Aβ(1-43)F20A I31A];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}C_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}C_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :25; Aβ(1-43)F20C I31C];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}Q_{21}L_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :26; Aβ(1-43)A21Q E22L];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}L_{21}Q_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :27; Aβ(1-43)A21L E22Q];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}Q_{21}E_{22}N_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :28; Aβ(1-43)A21Q D23N];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}A_{22}D_{23}V_{24}A_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :29; Aβ(1-43)E22A G25A];
 および
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}A_{22}D_{23}V_{24}G_{25}A_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :30; Aβ(1-43)E22A S26A]

10

20

30

40

からなる群から選択されるアミノ酸配列の一部 (X - Y) と同一であるアミロイド (A) アミノ酸配列を含み、X は、数 1 . . 18、4 . . 18、12 . . 18 からなる群から選択されまたは 18 であり、Y は、数 33 . . 43、33 . . 42、33 . . 41 または 33 . . 40 からなる群から選択される。特定の実施形態において、(X - Y) は、(1 - 42)、(4 - 42)、(12 - 42) または (18 - 42) からなる群から選択される。

【0181】

本発明の免疫原性産物は、とりわけ、上で定義した複数の特定のアミロイド (A) アミノ酸配列を含むオリゴマーである。

【0182】

本発明はまた、本発明の精製免疫原性産物に関する。本発明の一実施形態によれば、精製免疫原性産物は、総 A ペプチドの 80 重量%を超える、好ましくは総 A ペプチドの 90 重量%を超える、好ましくは総 A ペプチドの 95 重量%を超える純度を有するものである。

50

【0183】

本発明の免疫原性産物は、アミロイド 由来のアミノ酸配列に加えて、1つ以上のさらなる部分を含むことが好都合であり得る。例えば、診断応用は、免疫原性産物を標識することを必要とし得る。また、能動免疫において、能動免疫応用において好都合であることがわかっている部分を結合させることは、有利であり得る。

【0184】

したがって、本発明はまた、検出を促進する共有結合した基、好ましくは蛍光色素分子、例えば、フルオレセインイソチオシアネート、フィコエリスリン、Alexa-488、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 蛍光タンパク質、ダイナンギンボ属 (*Dictyosoma*) 蛍光タンパク質またはいずれかの組合せもしくはその蛍光活性誘導体；発色団；化学発光団、例えば、ルシフェラーゼ、好ましくはホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼ、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) ルシフェラーゼまたはいずれかの組合せもしくはその蛍光活性誘導体；酵素的に活性な基、例えば、ペルオキシダーゼ、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはそのあらゆる酵素的に活性な誘導体；高電子密度基、例えば、重金属含有基、例えば、金含有基；ハプテン、例えば、フェノール由来ハプテン；強抗原性構造、例えば、抗原性であると予測されるペプチド配列、例えば、KolaskarおよびTongankarのアルゴリズムにより抗原性であると予測される；免疫原性産物に対する免疫応答を誘発することを促進する分子、例えば、血清アルブミン、オボアルブミン、スカシガイヘモシアニン、サイログロブリン、破傷風トキソイドおよびジフテリアトキソイドのような細菌由来のトキソイド、天然に存在するT細胞エпитープ、天然に存在するTヘルパー細胞エпитープ；pan DRエピトープ (「PADRE」；国際公開第95/07707号) のような人工T細胞エピトープまたは別の免疫刺激作用物、例えば、マンナン、トリパルミトイル-S-グリセリンシステインおよび同類のもの；別の分子に対するアプタマー；キレート基、例えば、ヘキサヒスチジニル；さらなる特異的タンパク質間相互作用を媒介する天然または天然由来タンパク質構造、例えば、fos/jun対のメンバー；磁性基、例えば、強磁性基；または放射性基、例えば、¹H、¹⁴C、³²P、³⁵Sもしくは¹²⁵Iまたはそのいずれかの組合せを含む基を含む、本明細書で定義した、免疫原性産物に関する。不都合な炎症誘発免疫応答Th1経路を避けることを視野に入れて、抗炎症経路 (Th2経路) に対する免疫応答を誘導することができる分子、例えば、PADREのようなB細胞エピトープを含む分子を含む免疫原性産物は、能動免疫における特別な利点をもたらすと予想される (Petrushina I.ら、The Journal of Neuroscience、2007年、27巻 (46号)、12721-12731頁、Woodhouse A.ら、Drugs Aging、2007年、24巻 (2号) 107-119頁も参照)。

【0185】

そのような基およびそれらを免疫原性産物に結合させる方法は、当技術分野で公知である。

【0186】

本発明の免疫原性産物は、多くの有用性を有する。例えば、それらは、1) 免疫化に基づく介入療法 (例えば、免疫原性産物は、アミロイド症を治療または防止するための能動免疫に使用することができる。)、2) 診断検査 (例えば、免疫原性産物は、アミロイド症を診断するために用いることができる。)、3) 免疫原性産物に結合する抗体およびアプタマーのような作用物を得ること、ならびに4) 免疫原性産物に結合する抗体およびアプタマーのような作用物を開発するための結晶学またはNMRに基づく構造ベースの設計研究に用いることができる。

【0187】

能動免疫において、A (20-42) グロブロマーは、アルツハイマー病トランスジェニックマウスにおける認知障害を反転させるのに有効であることが示された。本発明の免疫原性産物は、そのプロファイルがA (20-42) グロブロマーにより誘導される

免疫応答のプロファイルと同様である免疫応答を誘導することができる。

【0188】

したがって、本発明はまた、治療用の本明細書で定義した免疫原性産物に関する。

【0189】

一態様において、本発明は、本明細書で開示した免疫原性産物を含む組成物、とりわけ、ワクチンである、すなわち、能動免疫に用いることができる組成物に関する。特定の実施形態によれば、前記組成物は、医薬として許容される担体をさらに含む医薬組成物である。組成物は、完全フロイントアジュバント（CFA）またはアルミニウム塩を含むアジュバントのような医薬として許容されるアジュバントをさらに含み得る。

【0190】

本発明はまた、有効量の本明細書で開示した免疫原性産物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象におけるアミロイド症を治療または防止する方法に関する。好ましくは、該産物は、能動免疫用である。

【0191】

関連態様において、本発明は、アミロイド症を治療または防止するのに、またとりわけ能動免疫のために使用する本明細書で開示した免疫原性産物に関する。

【0192】

ここにおける「アミロイド症」という用語は、身体の種々の組織における特定のタンパク質（アミロイド、線維状タンパク質およびそれらの前駆体）の異常なフォールディング、クランピング、凝集および/または蓄積を特徴とするいくつかの障害を意味する。アルツハイマー病およびダウン症候群では、神経組織が侵され、脳アミロイド血管症（CAA）では、血管が侵される。本発明の特定の実施形態によれば、アミロイド症は、アルツハイマー病（AD）およびダウン症候群のアミロイド症からなる群から選択される。

【0193】

能動免疫に関連して、免疫原性産物が患者のCNSにかなりの量で入ることができないならば、それはとりわけ好ましい。

【0194】

免疫原性産物を含む医薬組成物がA オリゴマーに対する強い免疫反応、好ましくはA オリゴマーのみに対する強い免疫反応、より好ましくはA オリゴマーのみに対する強い非炎症性抗体ベースの免疫反応を誘導することができるならば、それもとりわけ好ましい。したがって、本発明の一実施形態において、医薬組成物は、免疫学的アジュバント、好ましくは免疫反応を非炎症性で、抗体ベースの型に向けて導くアジュバントおよびシグナル伝達分子、例えば、サイトカインを含む。そのようなアジュバントおよびシグナル伝達分子は、当業者に周知である。

【0195】

能動免疫用の医薬組成物が静脈内経路、筋肉内経路、皮下経路、鼻腔内経路および吸入からなる群から選択される経路を経て投与されるならば、それはとりわけ好ましい。組成物が、それぞれが1回、反復してまたは定期的に実施され得る、注射、ボーラス注入および連続注入から選択される方法により投与されるならば、それもとりわけ好ましい。

【0196】

本発明の特定の実施形態において、長期連続注入は、埋め込み型装置を用いることによって達成される。本発明のさらなる特定の実施形態において、組成物は、埋め込み型持続放出または制御放出デポ製剤として適用される。適切な製剤および装置は、当業者に公知である。任意の所定の経路に用いられる方法の詳細は、対象の疾患の病期および重症度ならびに総合医療パラメーターに依存し、好ましくは主治医または獣医の裁量で個別に決定される。

【0197】

本発明のとりわけ好ましい実施形態において、能動免疫用の医薬組成物は、医薬として許容される保存剤、医薬として許容される着色剤、医薬として許容される保護コロイド、医薬として許容されるpH調整剤および医薬として許容される浸透圧調節剤からなる群か

10

20

30

40

50

ら選択される１つ以上の作用物を含む。そのような作用物は、当技術分野で記載されている。

【０１９８】

本明細書で用いているように、「有効量」という用語は、障害の重症度および／もしくは持続期間もしくはその１つ以上の症状を低減もしくは改善するのに、障害の進展を防止するのに、障害の退行をもたらすのに、障害に伴う１つ以上の症状の再発、発現、発症もしくは進行を防止するのに、障害を検出するのに、または別の療法（例えば、予防もしくは治療剤）の予防もしくは治療効果（複数可）を増強もしくは改善するのに十分である療法の量を指す。

【０１９９】

グロブロマー仮説に沿って、アミロイド症に罹患している対象は、内因性グロブロマーエピトープに対する免疫反応を発現すると考えられる。本発明の免疫原性産物は、前記エピトープと特異的に反応性である抗体と反応するので、オリゴマーは、同一である、または非常に類似したエピトープを示すと考えられる。

【０２００】

したがって、本発明はまた、診断用の本明細書で定義した免疫原性産物に関する。

【０２０１】

一態様において、本発明は、アミロイド症を有すると疑われる対象からの試料を準備すること、試料を本明細書で開示した免疫原性産物と、該産物および抗体を含む複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させることを含み、複合体の存在が、対象がアミロイド症を有することを示す、アミロイド症を診断する方法に関する。特定の実施形態によれば、少なくとも試料を接触させるステップは、エキスピボで、とりわけインビトロで行う。

【０２０２】

関連実施態様において、本発明は、アミロイド症を診断するのに用いる本明細書で開示した免疫原性産物に関する。

【０２０３】

したがって、本発明の免疫原性産物は、様々な診断方法およびアッセイに用いることができる。

【０２０４】

一実施形態において、この疾患を有すると疑われた患者におけるアミロイド症を診断する方法は、a) 患者からの生体試料を単離するステップ、b) 生体試料を本発明の免疫原性産物と、抗体／産物複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させるステップ、c) 得られた抗体／産物複合体にコンジュゲートを加え、コンジュゲートが結合抗体に結合することを可能にするのに十分な時間および条件下で置くステップであって、コンジュゲートが、検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に結合した抗体を含む、ステップ、ならびにd) シグナル発生化合物により発生されるシグナルを検出することによって生体試料に存在し得る抗体の存在を検出するステップを含み、シグナルは、患者におけるアミロイド症の診断を示す。特定の実施形態によれば、ステップb)、c) およびd) の少なくとも１つは、エキスピボで、とりわけインビトロで行う。さらなる特定の実施形態によれば、方法は、ステップa) を含まない。

【０２０５】

さらなる実施形態によれば、この疾患を有すると疑われた患者におけるアミロイド症を診断する方法は、a) 患者からの生体試料を単離するステップ、b) 生体試料を試料中の抗体に対して特異的な抗抗体と、抗抗体／抗体複合体の形成を可能にするのに十分な時間および条件下で接触させるステップ、c) 得られた抗抗体／抗体複合体にコンジュゲートを加え、コンジュゲートが結合抗体に結合することを可能にするのに十分な時間および条件下で置くステップであって、コンジュゲートが、検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に結合した本発明の免疫原性産物を含む、ステップ、ならびにd) シグナル発生化合物により発生されるシグナルを検出するステップを含み、シグナル

10

20

30

40

50

は、患者におけるアミロイド症の診断を示す。特定の実施形態によれば、前記ステップ b) および c) の少なくとも 1 つは、エキスピボで、とりわけインビトロで行う。さらなる特定の実施形態によれば、方法は、ステップ a) を含まない。

【0206】

より具体的には、本発明の免疫原性産物は、グロブロマーエピトープを示し、グロブロマーエピトープは、内因性免疫反応を生じさせる内因性抗体であると考えられるので、アミロイド症の診断は、本発明の免疫原性産物に特異的に結合する自己抗体の存在の判定に関連付けることができる。

【0207】

したがって、本発明はまた、免疫原性産物に結合する自己抗体を対象において検出するための組成物を調製するための本明細書で定義した免疫原性産物の使用に関する。したがって、本発明はまた、対象における自己抗体を検出する方法であって、対象に本明細書で定義した免疫原性産物を投与し、抗体および免疫原性産物により形成される複合体を検出することを含み、複合体の存在が自己抗体の存在を示す、方法に関する。特定の実施形態によれば、少なくとも試料を接触させるステップは、エキスピボで、とりわけインビトロで行う。本発明の特定の実施形態において、対象は、いずれかの形のアミロイド症、例えば、アルツハイマー病を有すると疑われ、自己抗体を検出することは、対象におけるいずれかの形のアミロイド症、例えば、アルツハイマー病の存在または非存在を診断するためである。

10

【0208】

「試料」という用語は、本明細書で用いているように、その最も広い意味で用いられる。「生体試料」は、本明細書で用いているように、生物または以前に生存していたものからの任意の量の物質を含むが、それに限定されない。そのような生物は、ヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ウサギおよび他の動物を含むが、それらに限定されない。そのような物質は、血液、血清、尿、滑液、細胞、臓器、組織、骨髄、リンパ節および脾臓を含むが、それらに限定されない。

20

【0209】

適切な試料は、特に、本明細書で述べる方法で試験することができる生体液を含む。これらは、血漿、全血、乾燥全血、血清、脳脊髄液または組織および細胞の水性もしくは有機水性抽出液を含む。

30

【0210】

アミロイド症を有すると疑われる対象がアミロイド症を有するまたはアミロイド症になる高いリスクを有する対象であるならば、それはとりわけ好ましい。

【0211】

本発明の特定の実施形態によれば、本明細書で述べた自己抗体を検出することは、自己抗体 / 抗原複合体の解離をもたらす調製物 (試料) の前処理をさらに含む。抗原に依然として結合し得る自己抗体の量を決定するために前記前処理を含まない方法を用いることができるが、そのような前処理を含む方法は、したがって、調製物 (試料) に存在する自己抗体の総量を決定するために用いることができる。さらに、両方法は、複合体化自己抗体の量を間接的に決定することを可能にする。

40

【0212】

自己抗体 / 抗原複合体の解離を誘発するのに適する条件は、当業者に公知である。例えば、例えば、得られる調製物 (試料) の pH が 1 から 5 の範囲、好ましくは 2 から 4 の範囲、とりわけ 2 から 3 の範囲にあるような緩衝液を用いて、調製物 (試料) を酸で処理することが好都合であり得る。適切な緩衝液は、生理的濃度の塩、例えば、NaCl および酢酸を含む。抗体 / 抗原複合体の分離の方法は、その全体を本明細書に組み込む、国際公開第 2005 / 037209 号に記載された。

【0213】

手短に述べると、抗体 / 抗原複合体における抗原から抗体を解離することは、抗体 / 抗原複合体を含有する試料を解離緩衝液と接触させるステップ、試料をインキュベートする

50

ステップ、および試料を任意選択的に濃縮するステップを含む。

【0214】

解離緩衝液は、本明細書で示した範囲のpHを有するPBS緩衝液であり得る。例えば、約1.5%BSAおよび0.2Mグリシン-アセートpH2.5または140mM NaClおよび0.58%酢酸を含有するPBS緩衝液が適切である。

【0215】

20から40の範囲の温度における例えば、10から30、例えば、20分間のような数分間のインキュベーションが十分であることがわかった。

【0216】

濃縮は、それ自体が公知の方法で、例えば、試料をCentriprep YM30 (Amincon Inc.) 上に通すことによって達成することができる。

【0217】

本発明の一実施形態において、本発明の免疫原性産物を固相上に被覆する。次いで試料（例えば、全血、脳脊髄液、血清等）を固相と接触させる。抗体、例えば、自己抗体が試料中に存在する場合、そのような抗体は、固相上の免疫原性産物に結合し、次いで直接的または間接的方法により検出される。直接的方法は、複合体自体の存在、ひいては抗体の存在を単に検出することを含む。間接的方法において、コンジュゲートを結合抗体に加える。コンジュゲートは、シグナル発生化合物または標識に結合させた、一次結合抗体に結合する、二次抗体を含む。二次抗体が、結合一次抗体に結合した場合、シグナル発生化合物は、測定可能シグナルを発生する。そのようなシグナルは、試料中の一次抗体の存在を示す。

【0218】

診断イムノアッセイに用いられる固相の例は、多孔性および非多孔性材料、ラテックス粒子、磁性粒子、微粒子（米国特許第5,705,330号参照）、ビーズ、膜、マイクロタイターウエルおよびプラスチックチューブである。固相材料およびコンジュゲートに存在する抗原または抗体の標識の方法の選択は、所望の場合、所望のアッセイ方式の性能特性に基づいて決定される。

【0219】

本明細書で述べたように、コンジュゲート（またはインジケータ試薬）は、シグナル発生化合物または「標識」に結合させた、抗体（またはアッセイによって、おそらく抗抗体）を含む。このシグナル発生化合物または標識は、それ自体検出可能である、または1つ以上の追加の化合物と反応して検出可能な生成物を生成し得る。シグナル発生化合物の例は、本明細書に記載されており、とりわけ発色団、放射性同位体（例えば、 ^{125}I 、 ^{31}I 、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S および ^{14}C ）、化学発光化合物（例えば、アクリジニウム）、粒子（可視または蛍光）、核酸、錯化剤または酵素のような触媒（例えば、アルカリホスファターゼ、酸ホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼおよびリボヌクレアーゼ）を含む。酵素（アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ）を用いる場合、色素原、蛍光原または発光原基質の添加は、検出可能シグナルの発生をもたらす。時間分解蛍光法、内部反射蛍光法、増幅（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応）およびラマン分光法のような他の検出システムも有用である。

【0220】

キットも本発明の範囲内に含まれる。より具体的には、本発明は、対象における自己抗体のような抗体の存在を判定するためのキットを含む。とりわけ、試料中の前記抗体の存在を判定するためのキットは、a) 本明細書で定義した免疫原性産物、および任意選択的にb) 検出可能シグナルを発生することができるシグナル発生化合物に結合させた抗体を含むコンジュゲートを含む。キットは、抗原に結合する試薬を含む対照またはキャリブレーターも含有し得る。

【0221】

本発明はまた、試料中の自己抗体のような抗体を検出するための別の種類のキットを含む。キットは、a) 目的の抗体に対して特異的な抗抗体およびb) 本明細書で定義した免

10

20

30

40

50

疫原性産物を含み得る。免疫原性産物に結合する試薬を含む対照またはキャリブレーターも含有し得る。より具体的には、キットは、a) 自己抗体に対して特異的な抗抗体およびb) 免疫原性産物を含むコンジュゲートを含み得る。コンジュゲートは、検出可能シグナルを発生することができるシグナル発生化合物に結合されている。さらに、キットは、抗原に結合する試薬を含む対照またはキャリブレーターも含有し得る。

【0222】

キットは、それぞれの容器があらかじめ固定された固相を含む、バイアル、ビンまたはストリップのような1つの容器およびそれぞれのコンジュゲートを含有する他の容器も含み得る。これらのキットは、洗浄、処理およびインジケータ試薬のような、アッセイを実施するために必要な他の試薬のバイアルまたは容器も含有し得る。

10

【0223】

本発明の免疫原性産物は、免疫原性産物に結合することができる作用物を得るのにも有用である。そのような作用物は、例えば、抗体（以後、抗産物抗体とも呼ぶ）、非抗体結合分子（例えば、Handbook of Therapeutic Antibodies、Stefan Dubel編、II巻、7章、Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA、Weinheim、2007年に記載されている、アフィボディ（affibodies）、アフィリン分子、AdNectins、Anticalins、DARPin s、ドメイン抗体、エビボディ（evibodies）、ノチン（knotins）、Kunitz型ドメイン、マキシボディ（maxibodies）、テトラネクチン、トランスボディ（trans-bodies）およびV（NAR）sのような）、アプタマーまたは低分子量化合物を含む。

20

【0224】

一態様において、本発明は、したがって、免疫原性産物に結合することができる作用物をスクリーニングするための免疫原性産物の使用に関する。したがって、本発明はまた、本明細書で開示した免疫原性産物に結合することができる作用物を同定する方法であって、a) 目的の1つ以上の作用物を、1つ以上の作用物が産物に結合するのに十分な時間および条件下で、産物に曝露するステップならびにb) 産物に結合する作用物を同定するステップを含む方法に関する。

【0225】

前記作用物は、抗体、非抗体結合分子、アプタマーまたは低分子量化合物からなる群から選択することができる。

30

【0226】

別の態様において、本発明は、作用物を含む調製物中の免疫原性産物に結合することができる前記作用物を富化するための免疫原性産物の使用に関する。したがって、本発明はまた、前記作用物を含む調製物中のそのような作用物を富化する方法であって、a) 免疫原性産物に結合することができる作用物を含む調製物を、作用物が免疫原性産物に結合するのに十分な時間および条件下で、免疫原性産物に曝露するステップならびにb) 富化された形の作用物を得るステップを含む方法に関する。より具体的には、免疫原性産物を固定化することができ（例えば、樹脂上に）、これにより作用物が捕捉されることが可能となる。富化された形の作用物を得ることは、好ましくは捕捉剤を脱離させることが捕捉剤を高塩緩衝液または酸性溶液と接触させることを含むような方法で、捕捉剤を脱離させることを含み得る。この方法は、例えば、IVI GまたはOctagam（登録商標）（Octapharma Inc.、Vienna、Austria）のような市販の免疫グロブリン調製物をこの方法にかけることによって本明細書で述べた自己抗体を富化するために用いることができる。これらの免疫グロブリン調製物は、A に対する自己抗体を含有するので、対象を処置することによって、それらの体内の抗A 抗体のレベルが上昇すると考えられる。前記自己抗体が富化されている調製物は、より有効であると予想される。

40

【0227】

さらなる態様において、本発明は、免疫原性産物に結合する抗体を得るための免疫原性

50

産物の使用に関する。したがって、本発明は、

- i) 産物を含む抗原を準備すること、
- i i) 抗体レパートリーを前記抗原に曝露すること、および
- i i i) 前記レパートリーから産物に結合する抗体を選択すること

を含む、本発明の免疫原性産物に結合することができる抗体を得る方法を提供する。

【0228】

ここで「潜在的抗体レパートリー」は、アミノ酸もしくは対応する核酸配列の任意のライブラリー、コレクション、アセンブリーもしくはセットを、またはインビボもしくはインビトロで抗体レパートリーを生産するために用いることができるアミノ酸配列のそのようなライブラリー、コレクション、アセンブリーもしくはセットの任意のジェネレーターを指すことを理解すべきである。本発明の好ましい実施形態において、ジェネレーターは、動物の適応免疫系、とりわけ当業者に周知の組換え過程により抗体多様性を発生する哺乳動物の免疫系の抗原産生部である。本発明の別の好ましい実施形態において、ジェネレーターは、その後、適切な抗体フレームワークへの挿入により、インビトロで抗体レパートリーを生産するために用いることができるランダム核酸配列の生産のためのシステムである。

10

【0229】

本発明の好ましい実施形態において、抗原により生物体を免疫化することにより、抗体レパートリーまたは潜在的抗体レパートリーをインビボで抗原に曝露する。本発明の別の好ましい実施形態において、潜在的抗体レパートリーは、当技術分野で記載されているインビトロアフィニティスクリーニング、例えば、ファージディスプレイおよびパンニングシステムにより抗体に曝露される適切な核酸のライブラリーである。

20

【0230】

別の態様において、本発明はまた、本明細書で定義した免疫原性産物に結合する抗体を提供する。

【0231】

本発明の好ましい実施形態において、抗体は、本明細書で述べたレパートリーまたは潜在的レパートリーから抗体を選択することを含む方法により得られる。

【0232】

とりわけ好ましい実施形態によれば、本発明は、免疫原性産物特異的抗体を提供する。これらは、とりわけ、本発明の免疫原性産物に対するよりもモノマーおよびフィブリン型Aペプチドの両方に対する比較的、より小さい親和性を有する抗体を含む。特定の実施形態において、抗体がタンパク質および/または巨大分子の複雑混合物中のその標的抗原を優先的に認識する場合、抗体は、抗原に特異的に結合すると言われる。

30

【0233】

本発明の好ましい実施形態において、免疫原性産物に対する抗体の親和性は、モノマーA (1 - 42) に対する抗体の結合親和性より少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍または少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍または少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍または少なくとも500倍、さらにより好ましくは少なくとも1000倍、例えば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍または少なくとも5000倍、さらにより好ましくは少なくとも10000倍、例えば、少なくとも20000倍、少なくとも30000倍または少なくとも50000倍、最も好ましくは少なくとも100000倍大きい。

40

【0234】

本発明の好ましい実施形態において、免疫原性産物に対する抗体の親和性は、モノマーA (1 - 40) に対する抗体の結合親和性より少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍または少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍または少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍または少なくとも500倍、さらにより好まし

50

くは少なくとも1000倍、例えば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍または少なくとも5000倍、さらにより好ましくは少なくとも10000倍、例えば、少なくとも20000倍、少なくとも30000倍または少なくとも50000倍、最も好ましくは少なくとも100000倍大きい。

【0235】

好都合には、本発明の抗体は、1つのまたはより好ましくは、両方のモノマーに低い親和性で、最も好ましくは 1×10^{-8} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、例えば、 3×10^{-8} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、 1×10^{-7} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、例えば、 3×10^{-7} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、または 1×10^{-6} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、例えば、 3×10^{-5} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、または 1×10^{-5} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する。

10

【0236】

本発明の好ましい実施形態において、免疫原性産物に対する抗体の親和性は、フィブリノゲンA (1-42)に対する抗体の結合親和性より少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍または少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍または少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍または少なくとも500倍、さらにより好ましくは少なくとも1000倍、例えば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍または少なくとも5000倍、さらにより好ましくは少なくとも10000倍、例えば、少なくとも20000倍、少なくとも30000倍または少なくとも50000倍、最も好ましくは少なくとも100000倍大きい。

20

【0237】

本発明の好ましい実施形態において、免疫原性産物に対する抗体の親和性は、フィブリノゲンA (1-40)に対する抗体の結合親和性より少なくとも2倍、例えば、少なくとも3倍または少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍、例えば、少なくとも20倍、少なくとも30倍または少なくとも50倍、より好ましくは少なくとも100倍、例えば、少なくとも200倍、少なくとも300倍または少なくとも500倍、さらにより好ましくは少なくとも1000倍、例えば、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍または少なくとも5000倍、さらにより好ましくは少なくとも10000倍、例えば、少なくとも20000倍、少なくとも30000倍または少なくとも50000倍、最も好ましくは少なくとも100000倍大きい。

30

【0238】

好都合には、本発明の抗体は、1つのまたはより好ましくは、両方のフィブリルに低い親和性で、最も好ましくは 1×10^{-8} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、例えば、 3×10^{-8} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、 1×10^{-7} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、例えば、 3×10^{-7} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、または 1×10^{-6} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、例えば、 3×10^{-5} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、または 1×10^{-5} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する。

40

【0239】

「抗体」という用語は、本明細書で用いているように、2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖の4つのポリペプチド鎖からなるあらゆる免疫グロブリン(Ig)分子、またはIg分子の本質的なエピトープ結合特性を保持している、そのあらゆる機能性断片、突然変異体、変異体もしくは誘導体を広く指す。そのような機能性断片、突然変異体、変異体もしくは誘導体型抗体は、当技術分野で公知である。その非限定的な実施形態を下文で述べる。「全長抗体」は、本明細書で用いているように、2つの重鎖および2つの軽鎖という4つのポリペプチド鎖を含むIg分子を指す。鎖は、通常ジスルフィド結合により互いに連結されている。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書で「可変重鎖」とも呼ぶ、または本明細書でHCVRもしくはVHと短縮する)および重鎖定常領域からなっている。重

50

鎖定常領域は、C H 1、C H 2 および C H 3 という3つのドメインからなっている。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書で「可変軽鎖」とも呼ぶ、または本明細書でL C V RもしくはV Lと短縮する）および軽鎖定常領域からなっている。軽鎖定常領域は、C Lという1つのドメインからなっている。V HおよびV L領域は、フレームワーク領域（F R）と呼ばれる、より保存的である領域によって散在させられた相補性決定領域（C D R）と呼ばれる、超可変性の領域にさらに細分することができる。各V HおよびV Lは、次の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置されている、3つのC D Rおよび4つのF Rからなっている：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4。免疫グロブリン分子は、あらゆる種類（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g AおよびI g Y）、クラス（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）またはサブクラスであり得る。

【0240】

抗体の「抗原結合部分（antigen-binding portion）」（または単に「抗体部分」）、「抗原結合部分（antigen-binding moiety）」（または単に「抗体部分」）という用語は、本明細書で用いているように、抗原（すなわち、本発明の免疫原性産物）に特異的に結合する能力を保持している抗体の1つ以上の断片を指すものであり、すなわち、抗体の機能的断片である。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の1つ以上の断片によって果たされ得ることが示された。そのような抗体実施形態はまた、二特異性、二重特異性、または多重特異性であり、2つ以上の異なる抗原に特異的に結合し得る。抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲内に包含される結合性断片の例は、(i) V L、V H、C HおよびC H 1ドメインからなる一価断片である、F a b断片；(ii) ヒンジ領域におけるジスルフィド架橋により連結された2つのF a b断片を含む二価断片である、F (a b')₂断片；(iii) V HおよびC H 1ドメインからなるF d断片；(iv) 抗体の単一アームのV LおよびV HドメインからなるF v断片；(v) 可変ドメインを含むd A b断片（参照により本明細書に組み込む、Wardら、Nature、341巻、544-546頁、1989年；Winterら、WO90/05144A1；ならびに(vi) 単離相補性決定領域（C D R）を含む。さらに、F v断片の2つのドメインであるV LおよびV Hは、別個の遺伝子によりコードされているが、それらは、V LおよびV H領域が一对となつて一価分子を形成している単一タンパク質鎖（単鎖F v (s c F v)）として公知；例えば、Birdら、Science、242巻、423-426頁、1988年；およびHoustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85巻、5879-5883頁、1988年を参照）としてそれらが作製されることを可能にする合成リンカーにより、組換え法を用いて結合させることができる。そのような単鎖抗体も抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲内に包含される。ダイアボディのような、他の形の単鎖抗体も包含される。ダイアボディは、V HおよびV Lドメインが単一ポリペプチド鎖上で発現するが、短すぎて、同じ鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にすることができず、それにより、ドメインが別の鎖の相補的ドメインと対を形成することを余儀なくさせ、2つの抗原結合部位を生じさせるリンカーを用いる二価二特異性抗体である（例えば、Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻、6444-6448頁、1993年；Poljakら、Structure、2巻、1121-1123頁、1994を参照）。そのような抗体結合部分は、当技術分野で公知である（KontermannおよびDubel編、Antibody Engineering、Springer-Verlag、New York、790頁、2001年、ISBN 3-540-41354-5）。

【0241】

「抗体」という用語は、本明細書で用いているように、抗体構築物も含む。「抗体構築物」という用語は、本明細書で用いているように、リンカーポリペプチドまたは免疫グロブリン定常ドメインに連結された本発明の1つ以上の抗原結合部分を含むポリペプチドを指す。リンカーポリペプチドは、ペプチド結合により結合した2つ以上のアミノ酸残基を含み、1つ以上の抗原結合部分を連結するために用いられる。そのような抗体結合部分は

当技術分野で公知である。(例えば、Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻、6444 - 6448頁、1993年；Poljakら、Structure、2巻、1121 - 1123頁、1994を参照)。

【0242】

免疫グロブリン定常ドメインは、重または軽鎖定常ドメインを指す。ヒトIgG重鎖および軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は、当技術分野で公知である。

【0243】

またさらに、本発明の結合性タンパク質(例えば、抗体)は、本発明の結合性タンパク質と1つ以上の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合性または非共有結合性会合により形成されたより大きい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は、四量体scFv分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanovら、Human Antibodies and Hybridomas、6巻、93 - 101頁、1995年)ならびに二価およびバイオチニル化scFv分子を作製するためのシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチジンタグの使用(Kipriyanovら、Mol. Immunol.、31巻、1047 - 1058頁、1994年)を含む。FabおよびF(ab')₂断片のような抗体部分は、全抗体のそれぞれパインまたはペプシン消化のような、従来の技術を用いて全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、本明細書で述べる標準的組換えDNA技術を用いて得ることができる。

【0244】

「単離抗体」は、本明細書で用いているように、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すものとする。しかし、本発明の免疫原性産物に特異的に結合する単離抗体は、A グロブリン、例えば、A (20 - 42) グロブリンまたは他のA 形態のような、他の抗原に対する交差反応性を有し得る。さらに、単離抗体は、他の細胞物質および/または化学物質および/または他の標的A 形態を実質的に含まないことがあり得る。

【0245】

「ヒト抗体」という用語は、本明細書で用いているように、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する抗体を意味するものとする。本発明のヒト抗体は、例えば、CDR、とりわけCDR3におけるヒト生殖系列免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでランダムもしくは部位特異的突然変異誘発によりまたはインビボでの体細胞突然変異により導入された突然変異)を含み得る。しかし、「ヒト抗体」という用語は、本明細書で用いているように、マウスのような別の哺乳類種の生殖系列に由来するCDRがヒトフレーム配列上にグラフトされた抗体を含むものではない。

【0246】

「組換えヒト抗体」という用語は、本明細書で用いているように、宿主細胞中にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現させた抗体(下文のB項でさらに述べる)、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体(Hoogenboom、TIB Tech.、15巻、62 - 70頁、1997年；AzzazyおよびHighsmith、Clin. Biochem.、35巻、425 - 445頁、2002年；Gavilondo J. V. およびLarrick J. W. (2002年) Bio Techniques、29巻、128 - 145頁；Hoogenboom H. およびChames P. (2000年) Immunology Today、21巻、371 - 378頁)、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年) Nucl. Acids Res.、20巻、6287 - 6295頁；Kellermann S - A. およびGreen L. L. (2002年) Current Opinion in Biotechnology 13巻、593 - 597頁；Little M. ら、(2000) Immunology Today、21巻、364 - 37

0 頁を参照) のような、組換え手段により調製され、発現させ、作製されもしくは単離されたすべてのヒト抗体、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他の DNA 配列へのスプライシングを含むあらゆる他の手段により調製され、発現させ、作製されもしくは単離された抗体を含むものとする。そのような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する。しかし、特定の実施形態において、そのような組換えヒト抗体は、インビトロで突然変異誘発(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を用いる場合、インビボでの体細胞突然変異誘発)を受け、したがって、組換え抗体の VH および VL 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列 VH および VL 配列に由来し、関連するが、インビボでのヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然で存在し得ない配列である。

10

【0247】

「キメラ抗体」という用語は、ヒト定常領域に連結されたマウス重および軽鎖可変領域を有する抗体のような、1つの種に由来する重および軽鎖可変領域配列ならびに別の種に由来する定常領域配列を含む抗体を指す。

【0248】

「CDR グラフト抗体」という用語は、マウス可変重および軽鎖領域の1つ以上がヒト可変重および軽鎖配列で置き換えられたマウス CDR (例えば、CDR 3) を有する抗体のような、1つの種に由来する重および軽鎖可変領域配列を含むが、VH および / または VL の CDR 領域の1つ以上の配列が別の種の CDR 配列で置き換えられている抗体を指す。

20

【0249】

「Kabatt 番号付け」、「Kabatt 定義」および「Kabatt ラベリング」という用語は、本明細書において互換的に用いられる。当技術分野で認識されている、これらの用語は、抗体の重および軽鎖可変領域またはその抗原結合部分における他のアミノ酸残基より可変(すなわち、超可変)であるアミノ酸残基を番号付けするシステムを指す(Kabatt (1971年) Ann. NY Acad. Sci., 190巻、382-391頁および Kabatt E. A. (1991年) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。重鎖可変領域については、超可変領域は、CDR 1のアミノ酸位置31から35、CDR 2のアミノ酸位置50から65および CDR 3のアミノ酸位置95から102の範囲にある。軽鎖可変領域については、超可変領域は、CDR 1のアミノ酸位置24から34、CDR 2のアミノ酸位置50から56および CDR 3のアミノ酸位置89から97の範囲にある。

30

【0250】

本明細書で用いているように、「アクセプター」および「アクセプター抗体」という用語は、1つ以上のフレームワーク領域のアミノ酸配列の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または100%を備えたまたはコードする抗体または核酸配列を指す。いくつかの実施形態において、「アクセプター」という用語は、定常領域(複数可)を備えたまたはコードする抗体アミノ酸または核酸配列を指す。また別の実施形態において、「アクセプター」という用語は、1つ以上のフレームワーク領域および定常領域(複数可)を備えたまたはコードする抗体アミノ酸または核酸配列を指す。特定の実施形態において、「アクセプター」という用語は、1つ以上のフレームワーク領域のアミノ酸配列の少なくとも80%、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または100%を備えたまたはコードするヒト抗体アミノ酸または核酸配列を指す。この実施形態によれば、アクセプターは、ヒト抗体の1つ以上の特定の位置において存在しない少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個または少なくとも10個のアミノ酸残基を含有し得る。アクセプターフレームワーク領域および / またはアクセプター定常領域(複数可)は、例えば、生殖系列抗体遺伝子、成熟抗体遺伝子、機能的抗体(

40

50

例えば、当技術分野で周知の抗体、発達過程における抗体または市販の抗体)に由来し得るまたはから得ることができる。

【0251】

本明細書で用いているように、「CDR」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を指す。可変領域のそれぞれについて、CDR1、CDR2およびCDR3と呼ばれている、重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれに3つのCDRが存在する。「CDRセット」という用語は、本明細書で用いているように、抗原に結合することができる単一可変領域に存在する3つのCDRの群を指す。これらのCDRの正確な境界は、異なるシステムによって異なって定義された。Kabatにより記載されたシステム(Kabatら、*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, Md. (1987年)および(1991年))は、抗体のあらゆる可変領域に適用可能な一義的な残基番号付けシステムを提供するだけでなく、3つのCDRを定義する正確な残基境界も提供する。これらのCDRは、Kabat CDRと呼ぶことができる。Chothiaおよび共同研究者ら(ChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol., 196巻、901-917頁(1987年)ならびにChothiaら、*Nature*, 342巻、877-883頁(1989年))は、アミノ酸配列のレベルで大きい多様性を有するのにもかかわらず、Kabat CDR内の特定の低位部分がほぼ同じペプチド主鎖立体配座をとることを見いだした。これらの低位部分は、L1、L2およびL3またはH1、H2およびH3と呼ばれ、「L」および「H」は、それぞれ軽鎖および重鎖領域を意味する。これらの領域は、Kabat CDRと重複する境界を有する、Chothia CDRと呼ぶことができる。Kabat CDRと重複するCDRを定義する他の境界は、Padlan (FASEB J., 9巻、133-139頁(1995年))およびMacCallum (J. Mol. Biol., 262巻(5号)、732-45頁(1996年))により記載された。さらなる他のCDR境界の定義は、上記のシステムの1つに厳密に従わないことがあり得るが、特定の残基または残基の群または全CDRさえも抗原結合に著しく影響を及ぼさないという予測または実験所見に照らして、それらが短縮または延長され得るが、それにもかかわらずKabat CDRと重複する。本明細書で用いた方法は、これらのシステムのいずれかに従って定義されるCDRを利用し得るものであり、特定の実施形態は、KabatまたはChothia定義のCDRを使用する。

【0252】

本明細書で用いているように、「規定」残基という用語は、Chothiaら(J. Mol. Biol., 196巻、901-907頁(1987年); ChothiaらJ. Mol. Biol., 227巻、799頁(1992年)、両方を参照により本明細書に組み込む)により定義された特定の規定CDR構造を定義するCDRまたはフレームワークにおける残基を指す。Chothiaらによれば、多くの抗体のCDRの重要な部分は、アミノ酸配列のレベルで大きい多様性を有するのにもかかわらず、ほぼ同じペプチド主鎖立体配座(confirmations)を有する。各規定構造は、ループを形成するアミノ酸残基の連続的セグメントの一連のペプチド主鎖ねじれ角を主として規定する。

【0253】

本明細書で用いているように、「ドナー」および「ドナー抗体」という用語は、1つ以上のCDRを備えている抗体を指す。一実施形態において、ドナー抗体は、フレームワーク領域が得られるまたは由来する抗体と異なる種からの抗体である。ヒト化抗体に関連して、「ドナー抗体」という用語は、1つ以上のCDRを備えている非ヒト抗体を指す。

【0254】

本明細書で用いているように、「フレームワーク」または「フレームワーク配列」という用語は、可変領域マイナスCDRの残存する配列を指す。CDR配列の正確な定義は、種々のシステムにより確定することができるので、フレームワーク配列の意味は、それに応じて異なる解釈を受ける。6つのCDR(軽鎖のCDR-L1、-L2および-L3な

らびに重鎖のCDR-H1、-H2および-H3)も軽鎖および重鎖上のフレームワークを各鎖上の4つの亜領域(FR1、FR2、FR3およびFR4)に分割し、CDR1は、FR1とFR2との間に、CDR2は、FR2とFR3との間に、CDR3は、FR3とFR4との間に位置する。個々の亜領域をFR1、FR2、FR3またはFR4と規定しない場合、他者により言及された、フレームワーク領域は、単一の天然に存在する免疫グロブリン鎖の可変領域内の統合されたFR'sを表す。本明細書で用いているように、FRは、4つの亜領域の1つを表し、FRは、フレームワーク領域を構成する4つの亜領域の2つ以上を表す。

【0255】

ヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列は、当技術分野で公知である。

10

【0256】

本明細書で用いているように、「生殖系列抗体遺伝子」または「遺伝子断片」という用語は、特定の免疫グロブリンの発現のための遺伝子再配列および突然変異につながる成熟過程を受けなかった非リンパ系細胞によりコードされる免疫グロブリン配列を指す(例えば、Shapiroら、Crit. Rev. Immunol.、22巻(3号)、183-200頁(2000年); Marchalonisら、Adv. Exp. Med. Biol.、484巻、13-30頁(2001年)を参照)。本発明の種々の実施形態によってもたらされる利点の1つは、生殖系列抗体遺伝子が成熟抗体遺伝子よりも当該種における個体に特有な必須アミノ酸配列構造を保存する可能性が高く、したがって、当該種において治療的に使用される場合に外来源に由来すると認識される可能性がより低いという認識から生じる。

20

【0257】

本明細書で用いているように、「基本(key)」残基という用語は、抗体、とりわけヒト化抗体の結合特異性および/または親和性に対するより大きい影響を有する可変領域内の特定の残基を指す。基本残基は、以下のものの1つ以上を含むが、それらに限定されない: CDRに隣接する残基、潜在的グリコシル化部位(N-またはO-グリコシル化部位であり得る)、希(rare)残基、抗原と相互作用することができる残基、CDRと相互作用することができる残基、規定残基、重鎖可変領域と軽鎖可変領域との間の接触残基、バーニアゾーン内の残基、および可変重鎖CDR1のChothia定義と第1の重鎖フレームワークのKabat定義との間で重複する領域における残基。

30

【0258】

本明細書で用いているように、「ヒト化抗体」という用語は、目的の抗原に免疫特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク(FR)領域および非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域(CDR)を含む抗体またはその変異体、誘導体、類似体もしくは一部である。本明細書で用いているように、CDRに関連する「実質的に」という用語は、非ヒト抗体CDRのアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同じアミノ酸配列を有するCDRを指す。ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)のそれらに対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のそれらである少なくとも1つ、一般的に2つの可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)の実質的にすべてを含む。一態様によれば、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、一般的にヒト免疫グロブリンのそれも含む。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖ならびに重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。抗体は、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3およびCH4領域も含み得る。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖のみを含有する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖のみを含有する。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖および/または重鎖のヒト化可変ドメインのみを含有する。

40

【0259】

ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEを含む免疫グロブリンの

50

いずれかのクラス、ならびに制限なく I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 を含むいずれかのアイソタイプから選択することができる。ヒト化抗体は、1つを超えるクラスまたはアイソタイプの配列を含み得るものであり、特定の定常ドメインは、当技術分野で周知の技術を用いて所望のエフェクター機能を最適化するために選択することができる。

【0260】

ヒト化抗体のフレームワークおよび C D R 領域は、親配列に正確に一致する必要はない。例えば、ドナー抗体 C D R またはコンセンサスフレームワークは、当該部位における C D R またはフレームワーク残基がドナー抗体またはコンセンサスフレームワークに一致しないように少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、挿入および/または欠失により突然変異を起こさせることができる。一実施形態において、そのような突然変異は、しかしながら、広範囲に及ぶものでない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%は、親 F R および C D R 配列のそれらに一致するものとする。本明細書で用いているように、「コンセンサスフレームワーク」という用語は、コンセンサス免疫グロブリン配列におけるフレームワーク領域を指す。本明細書で用いているように、「コンセンサス免疫グロブリン配列」という用語は、関連免疫グロブリン配列のファミリーにおける最も高頻度で存在するアミノ酸（またはヌクレオチド）から形成される配列を指す（例えば、Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987年) 参照）。免疫グロブリンのファミリーにおいて、コンセンサス配列における各位置は、ファミリーにおける当該位置に最も高頻度で存在するアミノ酸により占有されている。2つのアミノ酸が同等の頻度で存在する場合、いずれかをコンセンサス配列に含めることができる。

【0261】

本明細書で用いているように、「バーニア」ゾーンは、Footte および Winter (1992年、J. Mol. Biol., 224巻、487-499頁; 参照により本明細書に組み込む) により記載されたように C D R 構造を調整し、抗原への適合を微調節し得るフレームワーク残基のサブセットを指す。バーニアゾーン残基は、C D R に内在する層を形成し、C D R の構造および抗体の親和性に影響を及ぼし得る。

【0262】

「抗体」という用語は、本明細書で用いているように、多価結合タンパク質も含む。「多価結合タンパク質」という用語は、2つ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質を表すために本明細書で用いる。多価結合タンパク質は、3つ以上の抗原結合部位を有するように遺伝子操作され、一般的に天然に存在する抗体でない。「多重特異性結合タンパク質」という用語は、2つ以上の関連または非関連標的に結合することができる結合タンパク質を指す。二重可変ドメイン(DVD)結合タンパク質は、本明細書で用いているように、2つ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質であり、四価または多価結合タンパク質である。そのようなDVDは、単一特異性であり、すなわち、1つの抗原に結合する能力があり、または多重特異性であり、すなわち、2つ以上の抗原に結合する能力があり得る。2つの重鎖DVDポリペプチドおよび2つの軽鎖DVDポリペプチドを含むDVD結合タンパク質は、DVD Ig を指す。DVD Ig の各半分は、重鎖DVDポリペプチドおよび軽鎖DVDポリペプチドならびに2つの抗原結合部位を含む。各結合部位は、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含み、抗原結合部位当たり抗原結合に関与する合計6つのCDRを有する。DVD結合タンパク質およびDVD結合タンパク質を作製する方法は、米国特許出願第11/507,050号に開示されており、参照により本明細書に組み込む。

【0263】

「標識結合タンパク質」という用語は、本明細書で用いているように、結合タンパク質の同定を可能にする組み込まれた標識を有する結合タンパク質を指す。同様に、「標識抗体」という用語は、本明細書で用いているように、抗体の同定を可能にする組み込まれた

標識を有する抗体を指す。一態様において、標識は、検出可能マーカーであり、例えば、放射性標識アミノ酸の組込みまたは標示アビジンにより検出することができるビオチニル部分のポリペプチドへの結合である（例えば、光学的または比色法により検出することができる蛍光マーカーを含有するストレプトアビジンまたは酵素活性）。ポリペプチドの標識の例は、以下のものを含むが、それらに限定されない：放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm ）；蛍光標識（例えば、FITC、ドーダミン、ランタニドりん光体）；酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；化学発光マーカー；ビオチニル基；二次リポーターにより認識されるあらかじめ決定されたポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）；およびガドリニウムキレートのような磁性物質。

10

【0264】

「抗体」という用語は、本明細書で用いているように、抗体コンジュゲートも含む。「抗体コンジュゲート」という用語は、治療剤のような第2の化学的部分に化学的に連結された抗体のような、結合タンパク質を指す。

【0265】

本発明の抗体は、当技術分野で公知のいくつかの技術のいずれかにより作製することができる。

20

【0266】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え体およびファージディスプレイ技術またはそれらの組合せを含む当技術分野で公知の様々な技術を用いて調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で公知であり、例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版、1988年)；Hammerlingら、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas、563-681頁(Elsevier、N.Y.、1981年)（前記参考文献は、それらの全体を参照により組み込む）に教示されているものを含むハイブリドーマ技術を用いて生産することができる。「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書で用いているように、ハイブリドーマ技術により生産される抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核生物、原核生物またはファージクローンを含む、単一クローンに由来する抗体を指し、それが生産される方法を指さない。

30

【0267】

ハイブリドーマ技術を用いる特異的抗体を生産し、スクリーニングする方法は、当技術分野で常用され、周知である。一実施形態において、本発明は、モノクローナル抗体を生産する方法ならびに本発明の抗体を分泌するハイブリドーマを培養することを含む方法により産生される抗体であって、例えば、ハイブリドーマは、本発明の抗原により免疫化したマウスから単離した脾細胞を骨髓腫細胞と融合させ、次いで、融合により得られたハイブリドーマを、本発明のポリペプチドに結合することができる抗体を分泌するハイブリドーマクローンについてスクリーニングすることによって生成する、方法ならびに抗体を提供する。手短に述べると、マウスは、本発明の免疫原性産物により免疫化することができる。特定の実施形態において、抗原をアジュバントとともに投与して、免疫応答を刺激する。そのようなアジュバントは、完全もしくは不完全フロイントアジュバント、RIBI（ムラミルジペプチド）またはISCOM（免疫刺激複合体）を含む。そのようなアジュバントは、ポリペプチドを局所沈着物中に隔離することによって急速な分散からポリペプチドを保護し得る。またはそれらは、宿主がマクロファージおよび免疫系の他のコンポーネントに対して化学走性である因子を分泌することを刺激する物質を含有し得る。好ましくは、ポリペプチドを投与する場合、免疫化スケジュールは、数週間にわたるポリペプチドの2回以上の投与を含むものとする。

40

50

【0268】

本発明の免疫原性産物による動物の免疫化の後、抗体および/または抗体産生細胞を動物から得ることができる。抗産物抗体含有血清は、採血または動物を屠殺することによって得られる。血清は、それが動物から得られるときに用いることができ、免疫グロブリン画分は、血清から得ることができる。または抗産物抗体を血清から精製することができる。この方法で得られた血清または免疫グロブリンは、ポリクローナルであり、したがって、特性の異種アレイを有する。

【0269】

免疫応答が検出されたならば、例えば、本発明の免疫原性産物に対して特異的な抗体がマウス血清において検出されたならば、マウス脾臓を採取し、脾細胞を単離する。次いで脾細胞を、任意の適切な骨髓腫細胞、例えば、ATCCから入手できる細胞系SP20からの細胞に周知の技術により融合させる。ハイブリドーマを限界希釈により選択し、クローニングする。次いで、ハイブリドーマクローンを、当技術分野で公知の方法により本発明の免疫原性産物に結合することができる抗体を分泌する細胞についてアッセイする。一般的に高レベルの抗体を含有する、腹水は、陽性ハイブリドーマクローンによりマウスを免疫化することによって発生させることができる。

10

【0270】

別の実施形態において、抗体産生不死化ハイブリドーマは、免疫化動物から調製することができる。免疫化の後、動物を屠殺し、当技術分野で周知であるように脾B細胞を不死化骨髓腫細胞に融合させる（例えば、HarlowおよびLane、前出を参照）。特定の実施形態において、骨髓腫細胞は、免疫グロブリンポリペプチドを分泌しない（非分泌細胞系）。融合および抗生物質分泌の後、本発明の免疫原性産物もしくはその一部、または本発明の免疫原性産物を発現する細胞を用いてハイブリドーマをスクリーニングする。特定の実施形態において、最初のスクリーニングは、酵素結合イムノアッセイ（ELISA）またはラジオイムノアッセイ（RIA）を用いて実施する。ELISAスクリーニングの例は、参照により本明細書に組み込む、国際公開第00/37504に提供されている。

20

【0271】

下文でさらに述べるように、抗産物抗体産生ハイブリドーマを選択し、クローニングし、頑健なハイブリドーマの成長、高い抗体産生および望ましい抗体の特性を含む、望ましい特性についてさらにスクリーニングする。ハイブリドーマは、培養し、同遺伝子型動物において、免疫系を欠く動物、例えば、ヌードマウスにおいてインビボで、または細胞培養においてインビトロで拡大する。ハイブリドーマを選択し、クローニングし、拡大する方法は、当業者に周知である。

30

【0272】

特定の実施形態において、ハイブリドーマは、上述のようにマウスハイブリドーマである。別の特定の実施形態において、ハイブリドーマは、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマのような非ヒト、非マウス種において生産する。別の実施形態において、ハイブリドーマは、ヒト非分泌骨髓腫を抗産物抗体を発現するヒト細胞と融合させる、ヒトハイブリドーマである。

40

【0273】

特定のエピトープを認識する抗体断片は、公知の技術により生成することができる。例えば、本発明のFabおよびF(ab')₂断片は、パバイン（Fab断片を生産するため）またはペプシン（F(ab')₂断片を生産するため）のような酵素を用いて免疫グロブリン分子のタンパク質分解的切断により生産させることができる。F(ab')₂断片は、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のCH1ドメインを含有する。

【0274】

本発明の別の態様において、組換え抗体は、米国特許第5,627,052号、PCT国際公開第92/02551号およびBabcocock J. S.ら（1996年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、7843-7848頁に記載されて

50

いるように、選択リンパ球抗体法 (S L A M) と当技術分野で呼ばれている手順を用いて単一の単離リンパ球から生成する。この方法において、目的の抗体を分泌する単一細胞、例えば、1項に記載された免疫化動物のいずれか1つに由来するリンパ球を抗原特異的溶血プラークアッセイを用いてスクリーニングする。その場合、本発明の免疫原性産物またはそのサブユニットをビオチンのようなリンカーを用いてヒツジ赤血球に結合させ、本発明の免疫原性産物に対する特異性を有する抗体を分泌する単一細胞を同定するために用いる。目的の抗体分泌細胞の同定の後、重および軽鎖可変領域 c D N A を逆転写酵素 P C R により細胞から救出し、次いで、これらの可変領域を、C O S または C H O 細胞のような哺乳類宿主細胞において、適切な免疫グロブリン定常領域 (例えば、ヒト定常領域) との関連において、発現させることができる。選択されるリンパ球からインビボで得られた、増幅免疫グロブリン配列をトランスフェクトした宿主細胞は、次に、例えば、トランスフェクト細胞をパンニングして、A (20 - 42) グロブリンマーに対する抗体を発現する細胞を単離することにより、インビトロでのさらなる解析および選択にかけることができる。増幅免疫グロブリン配列は、P C T 国際公開第 97 / 29131 号および P C T 国際公開第 00 / 56772 号に記載されているようなインビトロ親和性成熟法によるなどのように、インビトロでさらに操作することができる。

【0275】

本発明の別の実施形態において、抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の一部またはすべてを含む非ヒト動物を免疫原性産物抗原により免疫化することによって産生される。特定の実施形態において、非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の大断片を含み、マウス抗体産生に欠けている遺伝子操作されたマウス系統である、X E N O M O U S E トランスジェニックマウスである。例えば、Green ら、Nature Genetics、7 巻、13 - 21 頁 (1994 年) ならびに米国特許第 5,916,771 号、第 5,939,598 号、第 5,985,615 号、第 5,998,209 号、第 6,075,181 号、第 6,091,001 号、第 6,114,598 号および第 6,130,364 号を参照のこと。1991 年 7 月 25 日に公開された国際公開第 91 / 10741 号、1994 年 2 月 3 日に公開された国際公開第 94 / 02602 号、両方が 1996 年 10 月 31 日に公開された国際公開第 96 / 34096 号および国際公開第 96 / 33735 号、1998 年 4 月 23 日に公開された国際公開第 98 / 16654 号、1998 年 6 月 11 日に公開された国際公開第 98 / 24893 号、1998 年 11 月 12 日に公開された国際公開第 98 / 50433 号、1999 年 9 月 10 日に公開された国際公開第 99 / 45031 号、1999 年 10 月 21 日に公開された国際公開第 99 / 53049 号、2000 年 2 月 24 日に公開された国際公開第 00 / 09560 号ならびに 2000 年 6 月 29 日に公開された国際公開第 00 / 037504 号も参照のこと。X E N O M O U S E トランスジェニックマウスは、完全にヒト抗体の成体様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を生成する。X E N O M O U S E トランスジェニックマウスは、ヒト重鎖遺伝子座および x 軽鎖遺伝子座のメガ塩基サイズの生殖系列コンフィギュレーション Y A C 断片の導入によりヒト抗体レパートリーの約 80% を含有する。参照によりそれらの開示を組み込む、Mendez ら、Nature Genetics、15 巻、146 - 156 頁 (1997 年)、Green および Jakobovits、J. E x p . M e d .、188 巻、483 - 495 頁 (1998 年) を参照のこと。

【0276】

インビトロでの方法は、本発明の抗体を作製するためにも用いることができ、抗体ライブラリーをスクリーニングして、所望の結合特異性を有する抗体を同定する。組換え抗体ライブラリーのそのようなスクリーニングの方法は、当技術分野で周知であり、例えば、参照によりそれらの内容を本明細書に組み込む、Ladner ら、米国特許第 5,223,409 号; Kang ら、P C T 国際公開第 92 / 18619 号; Dower ら、P C T 国際公開第 91 / 17271 号; Winter ら、P C T 国際公開第 92 / 20791 号; Markland ら、P C T 国際公開第 92 / 15679 号; Breitling ら、P C T 国際公開第 93 / 01288 号; McCafferty ら、P C T 国際公開第 92

10

20

30

40

50

/ 0 1 0 4 7 号 ; G a r r a d ら、P C T 国際公開第 9 2 / 0 9 6 9 0 号 ; F u c h s ら (1 9 9 1 年) B i o / T e c h n o l o g y、9 巻、1 3 7 0 - 1 3 7 2 頁 ; H a y ら (1 9 9 2 年) H u m A n t i b o d H y b r i d o m a s、3 巻、8 1 - 8 5 頁 ; H u s e ら (1 9 8 9 年) S c i e n c e、2 4 6 巻、1 2 7 5 - 1 2 8 1 頁 ; M c C a f f e r t y ら、N a t u r e (1 9 9 0 年) 3 4 8 巻、5 5 2 - 5 5 4 頁 ; G r i f f i t h s ら (1 9 9 3 年) E M B O J、1 2 巻、7 2 5 - 7 3 4 頁 ; H a w k i n s ら (1 9 9 2 年) J M o l B i o l、2 2 6 巻、8 8 9 - 8 9 6 頁 ; C l a c k s o n ら (1 9 9 1 年) N a t u r e、3 5 2 巻、6 2 4 - 6 2 8 頁 ; G r a m ら (1 9 9 2 年) P N A S、8 9 巻、3 5 7 6 - 3 5 8 0 頁 ; G a r r a d ら (1 9 9 1 年) B i o / T e c h n o l o g y、9 巻、1 3 7 3 - 1 3 7 7 頁 ; H o o g e n b o o m ら (1 9 9 1 年) N u c A c i d R e s、1 9 巻、4 1 3 3 - 4 1 3 7 頁 ; および B a r b a s ら (1 9 9 1) P N A S、8 8 巻、7 9 7 8 - 7 9 8 2 頁、米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 1 8 6 3 7 4 ならびに P C T 国際公開第 9 7 / 2 9 1 3 1 号に記載された方法を含む。

10

20

30

40

50

【0277】

組換え抗体ライブラリーは、本発明の免疫原性産物または本発明の免疫原性産物の一部により免疫化された対象に由来し得る。あるいは、組換え抗体ライブラリーは、本発明の免疫原性産物により免疫化されなかったヒト対象に由来するヒト抗体ライブラリーのような、ナীব対象、すなわち、本発明の免疫原性産物により免疫化されなかった対象に由来し得る。本発明の抗体は、本発明の免疫原性産物を含むペプチドにより組換え抗体ライブラリーをスクリーニングし、それにより本発明の免疫原性産物を認識し、A (1 - 4 0) および A (1 - 4 2) モノマー、A フィブリルおよび s A P P のような他の A 形態を識別する抗体を選択することによって選択される。そのようなスクリーニングおよび選択を行う方法は、先行するパラグラフにおける参考文献に記載されているなど、当技術分野で周知である。

【0278】

一態様において、本発明は、本発明の免疫原性産物に結合し、A (1 - 4 0) および A (1 - 4 2) モノマー、A フィブリルおよび s A P P を識別する単離抗体またはその抗原結合部分に関する。一態様によれば、抗体は、中和抗体である。様々な実施形態において、抗体は、組換え抗体またはモノクローナル抗体である。

【0279】

例えば、本発明の抗体は、当技術分野で公知の様々なファージディスプレイ法を用いて発生させることもできる。ファージディスプレイ法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面上にディスプレイされる。とりわけ、そのようなファージは、レポトリまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー (例えば、ヒトまたはマウス) から発現させた抗原結合ドメインをディスプレイするために利用することができる。目的の抗原を結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原により、例えば、固体表面またはビーズに結合させたまたは捕捉させた標識抗原もしくは抗原を用いて選択または同定することができる。これらの方法に用いられるファージは、一般的に、ファージ遺伝子 I I I または遺伝子 V I I I タンパク質に組換えにより融合させた F a b、F v またはジスルフィド安定化 F v 抗体ドメインを有するファージから発現された f d および M 1 3 結合ドメインを含む繊維状ファージである。本発明の抗体を作製するために用いることができるファージディスプレイ法の例は、それぞれをその全体を参照により本明細書に組み込む、B r i n k m a n ら、J . I m m u n o l . M e t h o d s、1 8 2 巻、4 1 - 5 0 頁 (1 9 9 5 年) ; A m e s ら、J . I m m u n o l . M e t h o d s、1 8 4 巻、1 7 7 - 1 8 6 頁 (1 9 9 5 年) ; K e t t l e b o r o u g h ら、E u r . J . I m m u n o l .、2 4 巻、9 5 2 - 9 5 8 頁 (1 9 9 4 年) ; P e r s i c ら、G e n e、1 8 7 巻、9 - 1 8 頁 (1 9 9 7 年) ; B u r t o n ら、A d v a n c e s i n I m m u n o l o g y、5 7 巻、1 9 1 - 2 8 0 頁 (1 9 9 4 年) ; P C T 出願番号 P C T / G B 9 1 / 0 1 1 3 4 ; P C T 国際公開第 9 0 / 0 2 8 0 9 号 ; 国際公開第 9 1 / 1 0 7 3 7 号 ; 国際公開第 9 2 / 0 1 0 4 7 号 ; 国際公開

第 9 2 / 1 8 6 1 9 号 ; 国 際 公 開 第 9 3 / 1 1 2 3 6 号 ; 国 際 公 開 第 9 5 / 1 5 9 8 2 号 ; 国 際 公 開 第 9 5 / 2 0 4 0 1 号 ; な ら び に 米 国 特 許 第 5 , 6 9 8 , 4 2 6 号 ; 第 5 , 2 2 3 , 4 0 9 号 ; 第 5 , 4 0 3 , 4 8 4 号 ; 第 5 , 5 8 0 , 7 1 7 号 ; 第 5 , 4 2 7 , 9 0 8 号 ; 第 5 , 7 5 0 , 7 5 3 号 ; 第 5 , 8 2 1 , 0 4 7 号 ; 第 5 , 5 7 1 , 6 9 8 号 ; 第 5 , 4 2 7 , 9 0 8 号 ; 第 5 , 5 1 6 , 6 3 7 号 ; 第 5 , 7 8 0 , 2 2 5 号 ; 第 5 , 6 5 8 , 7 2 7 号 ; 第 5 , 7 3 3 , 7 4 3 号 お よ び 第 5 , 9 6 9 , 1 0 8 号 に 開 示 さ れ て い る も の を 含 む 。

【 0 2 8 0 】

上 記 の 参 考 文 献 に 記 載 さ れ て い る よ う に 、 フ ァ ー ジ の 選 択 の 後 、 フ ァ ー ジ か ら 抗 体 コーディング領域を単離し、ヒト抗体または任意の他の所望の抗原結合断片を含む全抗体を生成するために用い、また例えば、下文で詳細に述べるように、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む任意の所望の宿主において発現させることができる。例えば、PCT国際公開第 9 2 / 2 2 3 2 4 号 ; M u l l i n a x ら 、 B i o T e c h n i q u e s 、 1 2 巻 (6 号) 、 8 6 4 - 8 6 9 頁 (1 9 9 2 年) ; お よ び S a w a i ら 、 A J R I 、 3 4 巻 、 2 6 - 3 4 頁 (1 9 9 5 年) ; お よ び B e t t e r ら 、 S c i e n c e 、 2 4 0 巻 、 1 0 4 1 - 1 0 4 3 頁 (1 9 8 8 年) (前 記 参 考 文 献 は そ れ ら の 全 体 を 参 照 に よ り 組 み 込 む) に 開 示 さ れ て い る 方 法 の よ う な 当 技 術 分 野 で 公 知 の 方 法 を 用 い て F a b 、 F a b ' お よ び F (a b ') 2 断 片 を 組 換 え に よ り 生 産 す る 技 術 も 用 い る こ と が で き る 。 単 鎖 F v s お よ び 抗 体 を 生 産 す る た め に 用 い る こ と が で き る 技 術 の 例 は 、 米 国 特 許 第 4 , 9 4 6 , 7 7 8 号 お よ び 第 5 , 2 5 8 , 4 9 8 号 ; H u s t o n ら 、 M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 、 2 0 3 巻 、 4 6 - 8 8 頁 (1 9 9 1 年) ; S h u ら 、 P N A S 、 9 0 巻 、 7 9 9 5 - 7 9 9 9 頁 (1 9 9 3 年) お よ び S k e r r a ら 、 S c i e n c e 、 2 4 0 巻 、 1 0 3 8 - 1 0 4 0 頁 (1 9 8 8 年) に 記 載 さ れ て い る も の を 含 む 。

【 0 2 8 1 】

ファージディスプレイによる組換え抗体ライブラリーのスクリーニングの代替法、大コンピナトリアルライブラリーをスクリーニングする当技術分野で公知の他の方法論は、本発明の二重特異性抗体の同定に適用することができる。1つのタイプの代替発現システムは、S z o s t a k お よ び R o b e r t s に よ る P C T 国 際 公 開 第 9 8 / 3 1 7 0 0 号 な ら び に R o b e r t s R . W . お よ び S z o s t a k J . W . (1 9 9 7 年) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、 9 4 巻 、 1 2 2 9 7 - 1 2 3 0 2 頁 に 記 載 さ れ て い る よ う に 、 組 換 え 抗 体 ライブラリーをRNA-タンパク質融合体として発現させるものである。このシステムにおいて、それらの3'末端にペプチジルアクセプター抗生物質であるピューロマイシンを有する合成mRNAのインビトロでの翻訳により、mRNAとそれがコードするペプチドまたはタンパク質との間の共有結合性融合体が生成する。したがって、特定のmRNAは、二重特異性抗原に対する抗体またはその一部の結合のような、コード化ペプチドまたはタンパク質、例えば、抗体またはその一部の特性に基づいてmRNAの複雑混合物(例えば、コンピナトリアルライブラリー)から富化することができる。そのようなライブラリーのスクリーニングにより回収された、抗体またはその一部をコードする核酸配列は、上述のような組換え手段により発現させることができ(例えば、哺乳類宿主細胞において)、さらに、突然変異が最初に選択された配列(複数可)に導入されたmRNA-ペプチド融合体の追加のラウンドのスクリーニングにより、または上述のように、組換え抗体のインビトロでの親和性成熟の他の方法により、さらなる親和性成熟にかけることができる。

【 0 2 8 2 】

別のアプローチにおいて、本発明の抗体は、当技術分野で公知の酵母ディスプレイ法を用いて生成することもできる。酵母ディスプレイ法において、遺伝的方法を用いて、抗体ドメインを酵母細胞壁にテザーし、それらを酵母の表面上にディスプレイする。とりわけ、そのような酵素は、レパートリーまたはコンピナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒトまたはマウス)から発現した抗原結合ドメインをディスプレイするために用いることができる。本発明の抗体を作製するために用いることができる酵母ディスプレイ法の例は

、参照により本明細書に組み込む、W i t t r u p ら、米国特許第 6 , 6 9 9 , 6 5 8 号に開示されているものを含む。

【 0 2 8 3 】

本発明の抗体は、当技術分野で公知のいくつかのいずれかにより生産することができる。例えば、重および軽鎖をコードする発現ベクター（複数可）を標準的技術により宿主細胞にトランスフェクトする、宿主細胞からの発現。様々な形の「トランスフェクション」という用語は、原核または真核宿主細胞への外因性 DNA の導入に一般的に用いられる様々な技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、D E A E - デキストラントランスフェクションなどを包含するものとする。本発明の抗体を原核または真核宿主細胞で発現させることも可能である。本発明の特定の態様によれば、抗体の発現は、
10 真核細胞、例えば、哺乳類宿主細胞を用いて実施する。その理由は、そのような真核細胞（およびとりわけ哺乳類細胞）は、原核細胞より、アSEMBルし、適切に折りたたまれ、免疫学的に活性な抗体を分泌する可能性が高いからである。

【 0 2 8 4 】

一態様によれば、本発明の組換え抗体を発現させるための哺乳類宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（C H O 細胞）（例えば、R . J . K a u f m a n および P . A . S h a r p （ 1 9 8 2 年 ） M o l . B i o l . 、 1 5 9 巻、 6 0 1 - 6 2 1 頁に記載されているような D H F R 選択可能マーカーとともに用いられる、U r l a u b および C h a s i n （ 1 9 8 0 年 ） P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、 7 7 巻、 4 2 1 6 - 4 2 2 0 頁の記載されている d h f r - C H O 細胞を含む）、N S 0 骨髓腫細胞、C O
20 S 細胞および S P 2 細胞を含む。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞に導入する場合、宿主細胞における抗体の発現または宿主細胞が成長している培地中への抗体の分泌を可能にするのに十分な時間にわたり宿主細胞を培養することによって抗体が産生される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を用いて培地から回収することができる。

【 0 2 8 5 】

宿主細胞は、F a b 断片または s c F v 分子のような機能的抗体断片を産生させるためにも用いることができる。上記の手順の変形形態が本発明の範囲内にあることが理解される。例えば、本発明の抗体の軽鎖および / または重鎖の機能的断片をコードする DNA を宿主細胞にトランスフェクトすることは、望ましいことであり得る。組換え DNA 技術は、
30 目的の抗原に結合するために必要でない軽および重鎖のいずれかまたは両方をコードする DNA の一部またはすべてを除去するためにも用いることができる。切断型 DNA 分子から発現された分子も本発明の抗体に包含される。さらに、1つの重鎖および1つの軽鎖が本発明の抗体であり、本発明の抗体を標準的化学的クロスリンク結合法により第2の抗体にクロスリンク結合させることによって、他の重および軽鎖が目的の抗原以外の抗原に対して特異的である、二官能性抗体を生産させることができる。

【 0 2 8 6 】

本発明の抗体またはその抗原結合部分の組換え発現のための特定のシステムにおいて、抗体重鎖および抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターをリン酸カルシウム媒介トランスフェクションにより d h f r - C H O 細胞に導入する。組換え発現ベクター内で
40 、抗体重および軽鎖遺伝子は、C M V エンハンサー / A d M L P プロモーター調節要素にそれぞれ作動可能に連結されて、遺伝子の高レベルの転写を駆動する。組換え発現ベクターは、メトトレキセート選択 / 増幅を用いてベクターをトランスフェクトした C H O 細胞の選択を可能にする、D H F R 遺伝子も保有する。選択された形質転換宿主細胞を培養して、抗体重および軽鎖の発現を可能にし、完全な抗体を培地から回収する。標準的分子生物学技術を用いて、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培地から抗体を回収する。またさらに本発明は、本発明の組換え抗体が合成されるまで本発明の宿主細胞を適切な培地中で培養することによって本発明の組換え抗体を合成する方法を提供する。該方法は、培地から組換え抗体を単離することをさらに含み得る。

10

20

30

40

50

【0287】

キメラ抗体は、マウスモノクローナル抗体に由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体のような、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。キメラ抗体を生産させる方法は、当技術分野で公知であり、本明細書で詳細に述べる。それらの全体を参照により本明細書に組み込む、例えば、Morrisson、Science、229巻、1202頁（1985年）；Oira、BioTechniques、4巻、214頁（1986年）；Gilliesら、（1989年）J. Immunol. Methods、125巻、191-202頁；米国特許第5,807,715号；第4,816,567号および第4,816,397号を参照のこと。さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子からの遺伝子を適切な生物学的活性のヒト抗体分子からの遺伝子と一緒にスプライシングすることによる「キメラ抗体」の生産のために開発された技術（それらの全体を参照により本明細書に組み込む、Morrissonら、1984年、Proc. Natl. Acad. Sci.、81巻、851-855頁；Neubergerら、1984年、Nature、312巻、604-608頁；Takedaら、1985年、Nature、314巻、452-454頁）が使用され得る。

10

【0288】

本発明のCDRグラフト抗体は、ヒト抗体の重および軽鎖可変領域配列を含み、VHおよび/またはVLの1つ以上のCDR領域が本発明のマウス抗体のCDR配列で置き換えられている。任意のヒト抗体のフレームワーク配列は、CDR移植のための鋳型としての役割を果たし得る。しかし、そのようなフレームワーク上への直鎖置き換えは、抗原に対する結合親和性のある程度の損失をしばしばもたらす。最初のマウス抗体に対するヒト抗体の相同性が高いほど、マウスCDRとヒトフレームワークとの組合せが、親和性を低下させ得るCDRにおける歪みを導入する可能性が低くなり得る。したがって、CDRから離れたマウス可変フレームワークを置き換えるために選択されるヒト可変フレームワークは、マウス抗体可変領域フレームワークとの例えば、少なくとも65%の配列同一性を有する。CDRから離れたヒトおよびマウス可変領域は、例えば、少なくとも70%、少なくとも75%の配列同一性、または少なくとも80%の配列同一性を有する。キメラ抗体を生産する方法は、当技術分野で公知であり、本明細書で詳細に述べる。（例えば、欧州特許第239,400号；PCT国際公開第91/09967号；米国特許第5,225,539号；第5,530,101号および第5,585,089号も参照）、ベニアリ 30
ングまたはリサーフェシング（欧州特許第592,106号；欧州特許第519,596号；Padlan、Molecular Immunology、28巻（4/5号）、489-498頁（1991年）；Studnickaら、Protein Engineering、7巻（6号）、805-814頁（1994年）；Roguskaら、PNAS、91巻、969-973頁（1994年））および鎖シャフリング（米国特許第5,565,352号）。

20

30

【0289】

ヒト化抗体は、非ヒト種に由来する1つ以上の相補性決定領域（CDR）およびヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域を有する所望の抗原に結合する非ヒト種抗体に由来する抗体分子である。

40

【0290】

公知のヒトIg配列は、開示されている。例えば、

【0291】

【表 2】

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-
 /query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/;
 www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
 www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-
 heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH- 05/kuby05.htm;
 www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
 www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-
 ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immuno- lo-
 gy.html.www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.- html;
 www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html-;
 www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-
 /Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin- ks.html;
 www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; ax-
 imtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP- Start.html; bas-
 erv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pu- blic/INTRO.html;
 www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/;
 www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
 abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOsem-
 inar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/;
 www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/h-
 umanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
 www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.abo-
 ut.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr oducts.htm;
 www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological
 Interest, U.S. Dept. Health (1983), いずれも、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

そのような移入配列は、免疫原性を減少させるために、または結合、親和性、オンレート、オフレート、結合活性、
 特異性、半減期もしくは当技術分野で公知の他の適切な特性を低下、増強もしくは修正するために用いることができる。

【0292】

ヒトフレームワーク領域におけるフレームワーク残基は、抗原結合を変化させる、好ま
 しくは改善するためにCDRドナー抗体の対応する残基で置換することができる。これら
 のフレームワーク置換は、当技術分野で周知の方法によって、例えば、抗原結合に重要な
 フレームワーク残基を同定するためのCDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデ
 リングならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較
 によって同定される（例えば、それらの全体を参照により組み込む、Queenら、米国
 特許第5,585,089号；Riechmannら、Nature、332巻、323
 頁（1988年）を参照）。3次元免疫グロブリンモデルは、一般的に利用でき、当業者
 によく知られている。選択される候補免疫グロブリン配列の推定3次元立体配座構造を説
 明し、表示するコンピュータプログラムが入手できる。これらの表示の調査により、候
 補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の解析、すなわち、その抗原
 に結合する候補免疫グロブリンの能力に影響を及ぼす残基の解析が可能となる。この方法

で、標的抗原（複数可）に対する親和性の増大のような所望の抗体の特性が達成されるように、コンセンサスおよび移入配列からFR残基を選択し、組み合わせることができる。一般的に、CDR残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接的に、そして最も実質的に関与する。抗体は、本明細書で引用した参考文献を含めた、それぞれを参照により本明細書に完全に組み込む、Jonesら、Nature、321巻、522頁（1986年）；Verhoeyenら、Science、239巻、1534頁（1988年）；Simsら、J. Immunol.、151巻、2296頁（1993）；ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol.、196巻、901頁（1987年）；Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、89巻、4285頁（1992年）；Prestaら、J. Immunol.、151巻、2623頁（1993年）；Padlan、Molecular Immunology、28巻（4/5号）、489-498頁（1991年）；Studnickaら、Protein Engineering、7巻（6号）、805-814頁（1994年）；Roguskaら、PNAS、91巻、969-973頁（1994年）；PCT国際公開第91/09967号；PCT/：米国特許出願公開第98/16280号、米国特許出願公開第96/18978号、米国特許出願公開第91/09630号、米国特許出願公開第91/05939号、米国特許出願公開第94/01234号、英国特許出願公開第89/01334号、英国特許出願公開第91/01134号、英国特許出願公開第92/01755号、国際公開第90/14443号、国際公開第90/14424号、国際公開第90/14430号、欧州特許第229,246号、欧州特許第592,106号、欧州特許第519,596号、欧州特許第239,400号、米国特許第5,565,332号、第5,723,323号、第5,976,862号、第5,824,514号、第5,817,483号、第5,814,476号、第5,763,192号、第5,723,323号、第5,766,886号、第5,714,352号、第6,204,023号、第6,180,370号、第5,693,762号、第5,530,101号、第5,585,089号、第5,225,539号、第4,816,567号に記載されているもののような、ただし、それらに限定されない、当技術分野で公知の様々な技術を用いてヒト化することができる。

【0293】

特定の実施形態において、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgMのような重鎖定常領域またはIgD定常領域を含む。一態様によれば、重鎖定常領域は、IgG1重鎖定常領域またはIgG4重鎖定常領域である。さらなる態様によれば、抗体は、軽鎖定常領域、カッパ軽鎖定常領域またはラムダ軽鎖定常領域を含む。一態様によれば、抗体は、カッパ軽鎖定常領域を含む。抗体部分は、例えば、Fab断片または単鎖Fv断片であり得る。

【0294】

抗体エフェクター機能を変化させるためのFc部分におけるアミノ酸残基の置き換えは、当技術分野で公知である（Winterら、米国特許第5,648,260号および第5,624,821号）。抗体のFc部分は、いくつかの重要なエフェクター機能、例えば、サイトカイン誘導、ADCC、食作用、補体依存性細胞傷害（CDC）ならびに抗体および抗原-抗体複合体の半減期/クリアランス速度を媒介する。ある場合には、これらのエフェクター機能は、治療用抗体について望ましいが、別の場合には、治療の目的によって不必要または有害でさえあり得る。特定のヒトIgGアイソタイプ、とりわけIgG1およびIgG3は、それぞれFcRsおよび補体C1qへの結合によりADCCおよびCDCを媒介する。新生児Fc受容体（FcRn）は、抗体の循環半減期を決定する重要なコンポーネントである。さらなる別の実施形態において、抗体のエフェクター機能は、抗体の定常領域、例えば、抗体のFc領域における少なくとも1つのアミノ酸残基が置き換えられている。

【0295】

一実施形態は、本発明の抗体が誘導体化されているまたは別の機能的分子（例えば、別

のペプチドもしくはタンパク質)に連結されている、標識抗体を提供する。例えば、本発明の標識抗体は、別の抗体(例えば、二特異性もしくはダイアボディ)、検出可能物質、医薬剤および/または抗体と別の分子(ストレプトアビジンコア領域もしくはポリヒスチジンタグ)との会合を媒介し得るタンパク質もしくはペプチドのような、1つ以上の分子実体に本発明の抗体を機能的に連結することによって(化学的結合、遺伝子融合、非共有結合性会合またはその他によって)誘導体化することができる。

【0296】

本発明の抗体を誘導体化することができる有用な検出可能物質は、蛍光化合物を含む。例示的な蛍光検出可能物質は、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリスリンなどを含む。抗体は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどのような検出可能酵素によっても誘導体化することができる。抗体を検出可能酵素により誘導体化する場合、それは、検出可能な反応生成物を生産するために酵素が用いる追加の試薬を加えることにより検出される。例えば、検出可能物質である西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加により、検出可能である着色反応生成物がもたらされる。抗体をビオチンで誘導体化して、間接的にアビジンまたはストレプトアビジンの結合を測定することによって検出することもできる。

【0297】

本発明の別の実施形態は、結晶化抗体を提供する。一態様によれば、本発明は、本明細書で開示した全抗A(20-42)グロブロマー抗体およびその断片の結晶ならびにそのような結晶を含む製剤および組成物に関する。さらなる態様によれば、結晶化抗体は、該抗体の可溶性カウンターパートよりインビトロで大きい半減期を有する。さらなる態様によれば、抗体は、結晶化後に生物学的活性を保持している。

【0298】

本発明の結晶化抗体は、当技術分野で公知であり、参照により本明細書に組み込む、国際公開第02/072636号に開示されている方法により生産することができる。

【0299】

本発明の別の実施形態は、抗体が1つ以上の炭水化物残基を含む、グリコシル化抗体を提供する。新生インビボタンパク質産生は、翻訳後修飾として公知のさらなるプロセッシングを受け得る。とりわけ、糖(グリコシル)残基は、グリコシル化として公知の過程であり、酵素的に加えることができる。共有結合オリゴ糖側鎖を担持する得られるタンパク質は、グリコシル化タンパク質または糖タンパク質として公知である。

【0300】

抗体は、Fcドメインならびに可変ドメインにおける1つ以上の炭水化物残基を有する糖タンパク質である。Fcドメインにおける炭水化物残基は、Fcドメインのエフェクター機能に対する重要な効果を有し、抗体の抗原結合または半減期に対しては軽微な効果を有する(R. Jefferys, Biotechnol. Prog., 21巻(2005年)、11-16頁)。これと対照的に、可変ドメインのグリコシル化は、抗体の抗原結合活性に対する効果を有し得る。可変ドメインのグリコシル化は、おそらく立体障害に起因して(Co M. S.ら、Mol. Immunol. (1993年)、30巻、1361-1367頁)、抗体結合親和性に対する負の効果を有し得る、または抗原に対する親和性の増大をもたらす(Wallick S. C.ら、Exp. Med. (1988年)、168巻、1099-1109頁; Wright A.ら、EMBO J. (1991年)、10巻、2717-2723頁)。

【0301】

本発明の一態様は、抗体のOまたはN結合型グリコシル化部位が突然変異したグリコシル化部位突然変異体の生成を対象とする。当業者は、標準的な周知の技術を用いてそのような突然変異体を生成することができる。生物学的活性を保持しているが、結合活性の増大または低下を有するグリコシル化部位突然変異体の作製は、本発明の別の目的である。

【0302】

さらなる別の実施形態において、本発明の抗体のグリコシル化を改変する。例えば、脱グリコシル化抗体を作製することができる（すなわち、抗体がグリコシル化を欠いている）。例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるためにグリコシル化を変更することができる。そのような炭水化物の改変は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1つ以上の部位を変更することによって達成することができる。例えば、1つ以上の可変領域グリコシル化部位の除去をもたらす1つ以上のアミノ酸置換を行い、それにより、当該部位におけるグリコシル化を消失させることができる。そのような脱グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させ得る。そのようなアプローチは、それらのそれぞれをその全体を参照により本明細書に組み込む、国際出願公開番号WO 03 / 016466 A 2ならびに米国特許第5,714,350号および第6,350,861号にさらに詳細に記載されている。

10

【0303】

さらにまたはあるいは、本発明の改変抗体フコシル残基量の低下を有する低フコシル化抗体またはバイセクティングGlcNAc構造の増加を有する抗体のような、異なる種類のグリコシル化を有する本発明の改変抗体を作製することができる。そのような変更されたグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を増加させることが示された。そのような炭水化物の改変は、例えば、グリコシル化機構の変化を有する宿主細胞における抗体の発現によって達成することができる。グリコシル化機構の変化を有する細胞は、当技術分野で記載されており、本発明の組換え抗体を発現し、それによりグリコシル化の変化を有する抗体を産生する宿主細胞として用いることができる。例えば、それらのそれぞれをその全体を参照により本明細書に組み込む、Shields R. L. ら、(2002年) J. Biol. Chem.、277巻、26733-26740頁；Umana ら、(1999年) Nat. Biotech.、17巻、176-1頁、ならびに欧州特許番号EP 1,176,195；国際出願公開番号WO 03 / 035835およびWO 99 / 5434280を参照のこと。

20

【0304】

タンパク質のグリコシル化は、目的のタンパク質のアミノ酸配列ならびにタンパク質が発現する宿主細胞に依存する。異なる生物体は、異なるグリコシル化酵素（例えば、グリコシルトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼ）を産生し、利用可能な異なる基質（ヌクレオチド糖）を有する。そのような因子に起因して、タンパク質グリコシル化パターンおよびグリコシル残基の組成は、特定のタンパク質が発現する宿主系によって異なり得る。本発明において有用なグリコシル残基は、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、n-アセチルグルコサミンおよびシアル酸を含み得るが、これらに限定されない。一態様によれば、グリコシル化抗体は、グリコシル化パターンがヒトであるようなグリコシル残基を含む。

30

【0305】

異なるタンパク質グリコシル化が異なるタンパク質特性をもたらし得ることは、当業者に公知である。例えば、酵母のような微生物宿主において産生され、酵母内因性経路を用いてグリコシル化された治療用タンパク質の有効性は、CHO細胞系のような哺乳類細胞において発現した同じタンパク質の有効性と比較して低いことがあり得る。そのような糖タンパク質は、ヒトにおいて免疫原性でもあり、投与後にインビボで半減期の低下を示し得る。ヒトおよび他の動物における特異的受容体は、特異的グリコシル残基を認識し、血流からのタンパク質の速やかなクリアランスを促進し得る。他の有害な作用は、タンパク質フォールディング、溶解度、プロテアーゼに対する感受性、トラフィッキング、輸送、コンパートメント化、分泌、他のタンパク質もしくは因子による認識、抗原性またはアレルギー性の変化、を含み得る。したがって、開業医は、グリコシル化の特定の組成およびパターン、例えば、ヒト細胞においてまたは意図した対象動物の種特異的細胞において産生されたそれと同一である、または少なくとも類似したグリコシル化の組成およびパターンを有する治療用タンパク質を好み得る。

40

50

【0306】

宿主細胞のそれと異なるグリコシル化タンパク質を発現させることは、異種グリコシル化酵素を発現するように宿主細胞を遺伝子操作することによって達成することができる。当技術分野で公知の技術を用いて、開業医は、ヒトタンパク質グリコシル化を示す抗体を生成することができる。例えば、酵母株において産生されたグリコシル化タンパク質（糖タンパク質）が動物細胞、とりわけヒト細胞のそれと同じタンパク質グリコシル化を示すように酵素株を遺伝子操作して、非天然グリコシル化酵素を発現させる（米国特許出願公開第20040018590号および第20020137134号ならびに国際公開第05/100584号）。

【0307】

別の実施形態は、本発明のそのような抗体に特異的な抗イディオタイプ（*anti-id*）抗体を対象とする。*anti-id*抗体は、別の抗体の抗原結合領域に一般的に関連する固有の決定基を認識する抗体である。*anti-id*は、抗体またはそのCDR含有領域により動物を免疫化することによって生産することができる。免疫化動物は、免疫抗体のイディオタイプ決定基を認識し、応答し、*anti-id*抗体を産生する。*anti-id*抗体は、また別の動物における免疫応答を誘導し、いわゆる*anti-id*抗体を産生する「免疫源」としても用いることができる。

【0308】

さらに、ライブラリーのメンバー宿主細胞が変異型グリコシル化パターンを有する目的のタンパク質を産生するように、様々なグリコシル化酵素を発現するように遺伝子操作された宿主細胞のライブラリーを用いて目的のタンパク質を発現させることができることは、当業者により十分に理解される。開業医は、特定の新規なグリコシル化パターンを有する目的のタンパク質を選択し、単離することができる。さらなる態様によれば、特別に選択された新規なグリコシル化パターンを有するタンパク質は、改善または変更された生物学的特性を示す。

【0309】

さらなる態様において、本発明はまた、免疫原性産物に結合するアプタマー（下文で抗産物アプタマーとも呼ぶ）を得るための本発明の免疫原性産物の使用に関する。したがって、本発明はまた、本明細書で定義した免疫原性産物に対する特異性を有するアプタマーを得るための方法であって、

- a) 免疫原性産物を含む結合標的を準備するステップ、
 - b) アプタマーレパートリーまたは潜在的アプタマーレパートリーを前記結合標的に曝露するステップ、および
 - c) 前記レパートリーから前記免疫原性産物に特異的に結合するアプタマーを選択するステップ
- を少なくとも含む方法に関する。

【0310】

「アプタマー」は、本明細書では、その標的に対する特異的な非共有結合性結合の能力のあるオリゴ核酸またはペプチド分子を指す。アプタマーは、1つの末端または両末端において、より大きい分子に、好ましくは生化学的機能を媒介するより大きい分子に、より好ましくは不活性化および/または分解を誘導するより大きい分子に、最も好ましくはユビキチンに、または好ましくは破壊を促進するより大きい分子に、より好ましくは酵素または蛍光タンパク質に結合し得る、好ましくはペプチド、DNAまたはRNA配列、より好ましくは約3から100個のモノマーのペプチド、DNAまたはRNA配列を含む。

【0311】

ここで「潜在的アプタマーレパートリー」は、アミノ酸配列または核酸配列の任意のライブラリー、コレクション、アセンブリーもしくはセットを、またはインビボもしくはインビトロでアプタマーレパートリーを生産するために用いることができるアミノ酸配列のそのようなライブラリー、コレクション、アセンブリーもしくはセットの任意のジェネレーターを指すことを理解すべきである。

【 0 3 1 2 】

別の態様において、本発明はまた、本明細書で定義した免疫原性産物に結合するアプタマーを提供する。

【 0 3 1 3 】

本発明の好ましい実施形態において、アプタマーは、本明細書で述べたレパートリーまたは潜在的レパートリーからアプタマーを選択することを含む方法により得られる。

【 0 3 1 4 】

特に好ましい実施形態によれば、本発明は、免疫原性産物特異的アプタマーを提供する。これらは、とりわけ、本発明の免疫原性産物に対するよりもモノマーおよびフィブリロマー型の A ペプチドの両方に対して比較的、より小さい親和性を有するアプタマーを含む。

10

【 0 3 1 5 】

本発明の免疫原性産物に結合することができる作用物も多くの潜在的な応用分野を有し、その一部を以下に述べる。それらは、治療および診断の目的のために特に有用である。

【 0 3 1 6 】

本発明はさらに、

【 0 3 1 7 】

【 化 4 】

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈A₁₉F₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :13; Aβ(1-43)F19A];

20

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉A₂₀A₂₁E₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :14; Aβ(1-43)F20A];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁A₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :15; Aβ(1-43)E22A];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁F₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :16; Aβ(1-43)E22F];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁V₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :17; Aβ(1-43)E22V];

30

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁L₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :18; Aβ(1-43)E22L];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁E₂₂K₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :19; Aβ(1-43)D23K];

D₁A₂E₃F₄R₅H₆D₇S₈G₉Y₁₀E₁₁V₁₂H₁₃H₁₄Q₁₅K₁₆L₁₇V₁₈F₁₉F₂₀A₂₁E₂₂L₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈

G₂₉A₃₀I₃₁I₃₂G₃₃L₃₄M₃₅V₃₆G₃₇G₃₈V₃₉V₄₀I₄₁A₄₂T₄₃ [配列番号 :20; Aβ(1-43)D23L];

40

$D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}V_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :21; A β (1-43)G25V];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}G_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :22; A β (1-43)A30G];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}G_{20}A_{21}A_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :23; A β (1-43)F20G E22A];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}A_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}A_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :24; A β (1-43)F20A I31A];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}C_{20}A_{21}E_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}C_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :25; A β (1-43)F20C I31C];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}Q_{21}L_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :26; A β (1-43)A21Q E22L];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}L_{21}Q_{22}D_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :27; A β (1-43)A21L E22Q];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}Q_{21}E_{22}N_{23}V_{24}G_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :28; A β (1-43)A21Q D23N];
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}A_{22}D_{23}V_{24}A_{25}S_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :29; A β (1-43)E22A G25A];
 および
 $D_1A_2E_3F_4R_5H_6D_7S_8G_9Y_{10}E_{11}V_{12}H_{13}H_{14}Q_{15}K_{16}L_{17}V_{18}F_{19}F_{20}A_{21}A_{22}D_{23}V_{24}G_{25}A_{26}N_{27}K_{28}$
 $G_{29}A_{30}I_{31}I_{32}G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}V_{40}I_{41}A_{42}T_{43}$ [配列番号 :30; A β (1-43)E22A S26A]

10

20

30

40

50

からなる群から選択されるアミノ酸配列の一部 (X - Y) と同一のアミノ酸配列を含み、
 X は、数 1 . . 1 8、4 . . 1 8、1 2 . . 1 8 からなる群から選択されまたは 1 8 であ
 り、Y は数 3 3 . . 4 3、3 3 . . 4 2、3 3 . . 4 1 または 3 3 . . 4 0 からなる群か
 ら選択される分子、またはアミノ酸配列の少なくとも 2 つの非隣接残基が互いに共有結合
 している、そのクロスリンクされた誘導体に関する。

【 0 3 1 8 】

前記分子またはそのクロスリンクされた誘導体の特定の実施形態において、(X - Y)
 は、(1 - 4 2)、(4 - 4 2)、(1 2 - 4 2) または (1 8 - 4 2) からなる群から
 選択される。

【 実施例 】

【 0 3 1 9 】

A 突然変異タンパク質ペプチドは、標準的な方法を用いて合成した。

【 0 3 2 0 】

[実施例 1]

A 突然変異タンパク質オリゴマーの調製

a) A (1 - 4 2) E 2 2 A 突然変異タンパク質オリゴマー :

ペプチド合成により得られた A (1 - 4 2) E 2 2 A ペプチド (M o B i T e c G
 m b H、G o t t i n g e n、G e r m a n y) を 6 m g / m l で 1 0 0 % 1 , 1 , 1 ,
 3 , 3 , 3 - ヘキサフルオロ - 2 - プロパノール (H F I P) に懸濁し、完全な可溶化の
 ために 3 7 ° で 2 . 5 時間振とうしながらインキュベートした。H F I P は、水素結合切
 断剤として作用するので、A ペプチドにおける先在性の構造的不均一性を解消するた
 めに用いられる。H F I P を S p e e d V a c で蒸発により除去し、A (1 - 4 2) E 2

2 A をジメチルスルホキシドに 5 mM の濃度で再懸濁し、20 秒間超音波処理した。H F I P 前処理 A (1 - 42) E 2 2 A をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) (20 mM N a H₂ P O₄、140 mM N a C l、p H 7.4) で 400 μ M に希釈し、1 / 10 容積の 2 % ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) (H₂ O 中) を加えた (0.2 % S D S の最終濃度)。溶液を 37 で 6 時間インキュベートした。次に、溶液を 3 容積の H₂ O でさらに希釈し、37 で 18 時間インキュベートした。これにより、A (1 - 42) E 2 2 A 突然変異タンパク質オリゴマーの生成がもたらされる。3000 g で 20 分間の遠心分離の後、試料を透析管中で 0.5 l の緩衝液 (5 mM リン酸ナトリウム、35 mM N a C l、p H 7.4) に対して室温で 2.5 時間にわたり 2 回透析した。透析物を限外濾過 (30 k D a カットオフ) により 15 倍濃縮し、10000 g で 5 分間遠心分離し、A (1 - 42) E 2 2 A 突然変異タンパク質オリゴマーを含む上清を抜き取った。

10

【0321】

b) 切断型 A E 2 2 A 突然変異タンパク質オリゴマー :

30 μ l の 1 mg / ml サーモリシンの H₂ O 中溶液 (S i g m a) を実施例 1 a に従って調製した 0.8 ml の A (1 - 42) E 2 2 A 突然変異タンパク質オリゴマーに加えた。反応混合物を 30 で 20 時間振とうした。次いで、p H 7.4 の 4 μ l の 100 mM E D T A の水中溶液を加え、混合物を、8 μ l の 10 % 濃度の S D S 溶液を用いて 0.1 % の S D S 含量にさらに調整した。反応混合物を室温で 10 分間振とうし、次いで透析管中で 0.5 l の緩衝液 (5 mM リン酸ナトリウム、35 mM N a C l、0.1 % S D S、p H 7.4) に対して室温で 6 時間、透析緩衝液の交換後にさらに 20 時間透析した。透析物を除去し、さらなる使用に備えて - 80 で保存した。

20

【0322】

c) エタノール沈殿切断型 A E 2 2 A 突然変異タンパク質オリゴマー :

能動免疫における抗原の使用のために、実施例 1 b の切断型 A E 2 2 A 突然変異タンパク質オリゴマーをエタノール沈殿させた。この目的のために、0.5 - 10 mg / ml の濃度を有する 1 部 (容積 / 容積 ; 例えば、1 ml) の切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーを室温で解凍した。次いで 8 部 (容積 / 容積 ; 例えば、8 ml) の氷冷エタノールを試料に加えた。試料を短時間混合し、1 部 (容積 / 容積、切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーの最初の容積に基づく ; 例えば、1 ml) の 10 x - P B S (F a . G i b c o、カタログ番号 14200 - 067) を加えた。その後、試料を再び短時間混合し、氷浴中で 30 分間インキュベートした。試料を 3000 g で 20 分間遠心分離し、上清を捨てた。残存するペレットを適切な容積の 5 mM N a H₂ P O₄、35 mM N a C l、p H 7.4 を用いて 1 mg / ml の最終濃度に懸濁した。氷浴中で 10 分間冷却した後、試料を超音波処理器 (U P 200 s D r . H i e l s c h e r G m b H) で最大出力の 50 % で氷浴中で 0 で 5 x 3 秒間 (氷上 10 秒間の中間冷却を含む) 超音波処理した。このステップの後、試料を分割し、さらなる使用時まで - 80 で凍結した。

30

【0323】

実施例 1 a、1 b および 1 c の手順を用いて、下の表 2 に示す A 突然変異タンパク質オリゴマーを調製し、タンパク質分解消化にかけ、エタノールから沈殿させた。

【0324】

40

[実施例 2]

切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーの A ペプチド組成物の表面増強レーザー脱離イオン化質量分析 (S E L D I - M S) 半定量的判定

実施例 1 b からの 1 μ l の切断型 A E 2 2 A 突然変異タンパク質オリゴマーを 249 μ l の 50 % アセトニトリル : 0.5 % T F A (500 μ l のアセトニトリル + 500 μ l の 1 % T F A) で希釈した。1 μ l の試料を H 4 タンパク質チップアレイ (B i o R a d ; カタログ番号 C 57 - 30028) 上にスポットした。スポットを 40 の温インキュベータープレート上で乾燥させた。C H C A 溶液を次のように調製した。5 mg の C H C A (B i o R a d ; カタログ番号 C 30 - 00001) を 150 μ l のアセトニトリル + 150 μ l の 1 % T F A に溶解した = 保存溶液 (- 20 で保存)。10 μ l の保存

50

溶液を $20\ \mu\text{l}$ のアセトニトリルおよび $20\ \mu\text{l}$ の 1% TFA で希釈して、作業 CHCA 溶液を得た。 $2\ \mu\text{l}$ の作業 CHCA 溶液をスポット上に加えた。スポットを 40°C の温インキュベータープレート上で乾燥させ、以下のパラメーターを用いて SELDI-MS (表面増強レーザー脱離イオン化質量分析; BioRad、Protein Chip SELDI system enterprise edition) により分析した。質量範囲: 500 から $10000\ \text{Da}$; フォーカス質量: $2220\ \text{Da}$; マトリックス減衰: $500\ \text{Da}$; サンプリング速度: $400\ \text{MHz}$; ウォーミングショット: エネルギー $1100\ \text{nj}$ による 2 ; データショット: エネルギー $1000\ \text{nj}$ による 10 ; 分割 $1/3$ 。表 2 に示す切断型の他の A 突然変異タンパク質オリゴマーを同じ処置に供した。

【0325】

切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーの A ペプチド組成が異なることが認められた。表 2 に、各切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーの特徴的な A ペプチド断片の量を示す。

【0326】

【表 3】

表2:種々の切断型A β 突然変異タンパク質オリゴマーのSeldi-MS分析

突然変異タンパク質	Seldi-MS
A β (1-42) V18A	< 5% A β 4-42
A β (1-42) F19A	< 5% A β 4-42
A β (1-42) F20A	約 5% A β 4-42
A β (1-42) A21G	< 5% A β 4-42
A β (1-42) E22A	>50% A β 24-42
A β (1-42) D23A	>80% A β 23-42
A β (1-42) V24A	< 5% A β 24-42
A β (1-42) G25A	約 10% A β 4-42
A β (1-42) S26A	60% A β 20-42 ; 40% A β 24-42
A β (1-42) N27A	< 5% A β 24-42
A β (1-42) K28A	約 10% A β 4-42
A β (1-42) G29A	約 5% A β 20-42 ; ca. 5% A β 4-42
A β (1-42) A30G	約 20% A β 24-42 ; ca.10% A β 4-42
A β (1-42) I31A	約 40% A β 4-42
A β (1-42) I32A	約 10% A β 4-42
A β (1-42) G33A	約 15% A β 24-42
A β (1-42) A21Q	約 15% A β 24-42
A β (1-42) A21L	約 50% A β 21-42, < 5% A β 4-30
A β (1-42) E22G	< 5% A β 24-42
A β (1-42) E22Q	約 20% A β 4-42 (旧来の手順)
A β (1-42) E22K	約 20% A β 4-42
A β (1-42) E22D	< 5% A β 4-42
A β (1-42) E22L	>80% A β 22-42 ; 20% A β 4-30 + A β 4-33
A β (1-42) D23N	>50% A β 24-42
A β (1-42) D23L	>80% A β 23-42 ; 20% A β 4-30 + A β 4-33
A β (1-42) E22F	10% A β 20-42 ; 60% A β 22-42 ; 30% A β 24-42
A β (1-42) E22V	20% A β 22-42 ; 20% A β 24-42 ; 60% 異なる未知ピーク

10

20

30

40

Aβ(1-42) D23K	30% Aβ24-42
Aβ(1-42) D23V	ピークが検出できず
Aβ(1-42) G25V	60% Aβ20-42 ; 40% Aβ24-42
Aβ(1-42) G25T	70% Aβ20-42 ; 30% Aβ24-42
Aβ(1-42) S26L	20% Aβ24-42
Aβ(1-42) A21G, E22Q	< 5% Aβ4-42
Aβ(1-42) A21G, E22K	< 5% Aβ4-42
Aβ(1-42) A21Q, E22L	>80% Aβ22-42 ; 20% Aβ4-30 + Aβ4-29
Aβ(1-42) A21L, E22Q	>50% Aβ21-42 , 30% Aβ24-42
Aβ(1-42) A21G, D23N	< 5% Aβ4-42
Aβ(1-42) F20A, I31A	20% Aβ4-42;30% Aβ19-42 および Aβ20-42;20% Aβ17-42
Aβ(1-42) F20G, E22A	10% Aβ4-42;20% Aβ20-42 および Aβ24-42;50% Aβ21-42
Aβ(1-42) E22A, D23A	-
Aβ(1-42) E22A, G25A	40% Aβ20-42 ; 60% Aβ24-42
Aβ(1-42) E22A, S26A	40% Aβ20-42 ; 60% Aβ24-42
Aβ(1-42) G25A, S26A	40% Aβ20-42 ; 60% Aβ24-42
Aβ(0-42) F20C, I31C	>80% Aβ12-42

10

20

30

40

50

【 0 3 2 7 】

[実施例 3]

切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーのサイズ排除クロマトグラフィー

サイズ排除クロマトグラフィーは、SECカラム Superose 12 HR 10 / 300 GL (GE Health Care、カタログ番号 17-5173-01) および 0.5 ml / 分の流量を用いて実施した。移動相は、20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、0.5% SDS、pH 7.4 であった。実施例 1b からの 30 μg の切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーを移動相で希釈して、200 μg / ml の濃度を有する 150 μl を得た。100 μl のこの混合物をカラム上に負荷した。215 nm における消光を有するペプチドが検出された。

【 0 3 2 8 】

切断型 A E22A 突然変異タンパク質オリゴマーの得られたサイズ排除クロマトグラム (図 1B) は、26 kDa に対応する 11.37 ml における主ピークならびに 45 kDa、120 kDa および 4 kDa の微小ピークを示している。切断型 A F20G、E22A 突然変異タンパク質オリゴマー (図 1C) は、32 kDa に対応する 10.83 ml における主ピークおよび 5 kDa の小ピークのみを有するより均一なサイズ分布を示す。参考として、それぞれ 30 kDa および 21 kDa に対応する 11.04 ml および 11.85 ml における主二重ピークならびに 150 kDa および 4 kDa の微小ピークを有する野生型 A (20-42) グロブロマー (図 1A) のサイズ排除クロマトグラムを示す。総合すれば、サイズ排除クロマトグラフィーにより、切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーのオリゴマーとしての本質は、野生型 A (20-42) グロブロマーと類似していることが確認された。

【 0 3 2 9 】

[実施例 4]

切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーの直接 ELISA

切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーが P F - 4 に対する望ましくないポリクローナル交差反応性を誘発する傾向を予測するためにマウス A (2 0 - 4 2) グロブローマ反応性モノクローナル抗体である m 7 C 6 および m 4 D 1 0 を用いることによって実施例 1 b からの切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーの免疫反応性をさらに特徴付けた。抗体 m 7 C 6 は、P F - 4 と交差反応することが示されたが、m 4 D 1 0 は、P F - 4 と交差反応しないことが証明された。

【 0 3 3 0 】

切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマー認識の判定のために用いた直接 E L I S A プロトコール：

試薬：

1 . F 9 6 C e r t . M a x i s o r p N U N C - I m m u n o プレート カタログ番号：4 3 9 4 5 4

2 . 抗原：実施例 1 b からの切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマー

3 . コーティング緩衝液：1 0 0 m M 炭酸水素ナトリウム；p H 8 . 2

4 . E L I S A 用ブロッキング試薬；R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H カタログ番号：1 1 1 2 5 8 9

5 . P B S T 緩衝液：2 0 m M N a H ₂ P O ₄；1 4 0 m M N a C l；0 . 0 5 % T w e e n 2 0；p H 7 . 4

6 . P B S T + 0 . 5 % B S A 緩衝液：2 0 m M N a H ₂ P O ₄；1 4 0 m M N a C l；0 . 0 5 % T w e e n 2 0；p H 7 . 4 + 0 . 5 % B S A；S e r v a カタログ 1 1 9 2 6

7 . 一次抗体：

抗 A m A b クローン 7 C 6；濃度：2 . 8 3 m g / m l O D 2 8 0 n m；- 8 0 で保存

抗 A m A b クローン 4 D 1 0；濃度：8 . 6 0 m g / m l O D 2 8 0 n m；- 8 0 で保存

8 . 標識試薬：抗マウス P O D コンジュゲート；J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L t d . カタログ番号：7 1 5 - 0 3 5 - 1 5 0

9 . 染色：T M B；R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H カタログ番号：9 2 8 1 7 0 6 0；D M S O 中 4 2 m M；水中 3 % H ₂ O ₂；1 0 0 m M 酢酸ナトリウム、p H 4 . 9

1 0 . 停止溶液：2 M スルホン酸

【 0 3 3 1 】

試薬の調製に用いた方法

1 . 抗原溶液：

1 2 μ g の切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーを 1 2 m l のコーティング緩衝液で 1 μ g / m l に希釈した。

【 0 3 3 2 】

2 . ブロッキング試薬：

ブロッキング試薬を 1 0 0 m l の水に溶解して、ブロッキング保存溶液を調製し、1 0 m l のアリコートをして - 2 0 で保存した。各プレートをブロックするために 3 m l のブロッキング保存溶液を 2 7 m l の水で希釈した。

【 0 3 3 3 】

3 . 一次抗体の希釈：

A) 抗 A m A b クローン 7 C 6 を P B S T + 0 . 5 % B S A で 1 0 0 n g / m l の濃度に希釈した (= 保存溶液 A)。

【 0 3 3 4 】

B) 抗 A m A b クローン 4 D 1 0 を P B S T + 0 . 5 % B S A で 1 0 0 n g / m l の濃度に希釈した (= 保存溶液 B)。

【 0 3 3 5 】

10

20

30

40

50

【表 4】

一次抗体曲線(A)クローン7C6および(B)クローン4D10について作成した)

No	保存溶液A)またはB)	PBST + 0.5 % BSA	最終濃度
1	2ml 100 ng/ml	0ml	100 ng/ml
2	0.633 ml (1)	1.367 ml	31.6 ng/ml
3	0.633 ml (2)	1.367 ml	10 ng/ml
4	0.633 ml (3)	1.367 ml	3.16 ng/ml
5	0.633 ml (4)	1.367 ml	1 ng/ml
6	0.633 ml (5)	1.367 ml	0.316 ng/ml
7	0.633 ml (6)	1.367 ml	0.1 ng/ml
8	0 ml	2 ml	0.0 ng/ml

10

【0336】

4. 標識試薬

抗マウスPODコンジュゲート凍結乾燥物を0.5mlの水で再構成した。500μlのグリセロールを加え、100μlのアリコートをし、さらなる使用に備えて-20℃で保存した。濃縮標識試薬をPBST緩衝液で1/10000に希釈した。試薬は、直ちに用いた。

20

【0337】

5. TMB溶液:

20mlの100mM酢酸ナトリウムpH4.9を200μlのTMB溶液および29.5μlの3% H₂O₂溶液と混合した。溶液は、直ちに用いた。

【0338】

標準プレート設定: 数は、ng/ml単位の最終抗体濃度を示す。各抗体の標準を2連で扱った。

30

【0339】

【表 5】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	m7C6		m4D10									
A	100	100	100	100								
B	31.6	31.6	31.6	31.6								
C	10	10	10	10								
D	3.16	3.16	3.16	3.16								
E	1	1	1	1								
F	0.316	0.316	0.316	0.316								
G	0.1	0.1	0.1	0.1								
H	0.0	0.0	0.0	0.0								

40

【0340】

50

手順：

1. 1 ウエル当たり 100 μ l の抗原溶液を加え、4 で一夜インキュベートした。

【0341】

2. 抗原溶液を捨て、ウエルを 250 μ l の PBST 緩衝液で 3 回洗浄した。

【0342】

3. 1 ウエル当たり 265 μ l のブロック溶液を加え、室温で 2 時間インキュベートした。

【0343】

4. ブロック溶液を捨て、ウエルを 250 μ l の PBST 緩衝液で 3 回洗浄した。

【0344】

5. 抗体曲線の作成の後、1 ウエル当たり 100 μ l の希釈系列をプレートに適用した。プレートを室温で 2 時間インキュベートした。

【0345】

6. 抗体溶液を捨て、ウエルを 250 μ l の PBST 緩衝液で 3 回洗浄した。

【0346】

7. 1 ウエル当たり 200 μ l の標識溶液を加え、室温で 1 時間インキュベートした。

【0347】

8. 標識溶液を捨て、ウエルを 250 μ l の PBST 緩衝液で 3 回洗浄した。

【0348】

9. 100 μ l の TMB 溶液を各ウエルに加え、室温で 5 - 15 分インキュベートした。

【0349】

10. 色染色を観察し、1 ウエル当たり 50 μ l の停止溶液を加えた。

【0350】

11. 450 nm における吸光度を測定した。

【0351】

結果：

アミノ酸位置 20 - 23 の領域に単一または二重アミノ酸点突然変異を導入することにより、抗体 m7C6 による得られた切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーの認識は、低下したのに対して、m4D10 による認識は、低下しないまたは限定された程度に低下したに過ぎない（図 2 参照）。これと対照的に、エピトープをさほど正確にマッピングできないが、非 PF - 4 交差反応性抗体 4D10 による A (20 - 42) オリゴマーの認識は、主としてアミノ酸位置 27 - 30 の領域における点突然変異により低下する。m7C6 認識が低下しているが、m4D10 認識は維持されている領域は、PF - 4 交差反応性を付随して誘発しないそれぞれの A (20 - 42) 突然変異オリゴマーによる免疫化によりポリクローナル免疫応答を誘発するのに関係するホットスポットを含むと解釈することができる。

【0352】

[実施例 5]

切断型 A E22A 突然変異タンパク質オリゴマーは、A グロブリン特異的免疫応答を誘導する

反応性 A 突然変異タンパク質オリゴマーの抗原性をげっ歯類（ウサギ、マウス）の能動免疫により試験した。前記動物から得られたポリクローナル抗血清を親和性精製し、その後、ドットプロット法を用いて異なる型の A に対するそれらの特異性について試験した。個々の型の A を連続希釈でプロットし、免疫反応で産生された抗 A 抗体を含有する対応する親和性精製マウス抗血清とともにインキュベートした。個々のドットプロットは、免疫化げっ歯類の異なる個体に対応する。

【0353】

[実施例 5A]

10

20

30

40

50

切断型 A E 2 2 A 突然変異タンパク質オリゴマーによるマウスの能動免疫

実施例 1 c に従って調製し、完全フロイントアジュバント、アラムアジュバントと混合したまたはアジュバントと混合していない、30 μ g のエタノール沈殿切断型 A E 2 2 A 突然変異タンパク質オリゴマーを、マウス (B a l b / c マウス) に、0 日目に皮下に投与した。マウスを次のスキームに従って追加抗原刺激した。ブースト 1 : 17 日目、ブースト 2 : 35 日目およびブースト 3 : 52 日目。力価の決定のために、ブースト 2 および / または 3 の 7 - 10 日後に血漿を抜き取った。

【0354】

アジュバントの調製 :

アラムアジュバントの調製 :

pH 7.4 の 1 ml の 1.4 M NaCl 溶液を 9 ml の水酸化アルミニウムゲル (Sigma ; カタログ番号 A 8 2 2 2 - 2 5 0 ml) に加えた。混合物を使用前に室温で 24 時間インキュベートした。

【0355】

完全フロイントアジュバント (CFA) :

CFA は、既製のアジュバント溶液として入手し、最初の免疫化のために用いた。すべてのその後の追加免疫のために不完全フロイントアジュバント (IFA) を用いた。

【0356】

アジュバント無し :

アジュバントを用いなかった場合、1/4 PBS 緩衝液 (5 mM NaH₂PO₄ ; 35 mM NaCl ; pH 7.4) を代わりに用いた。

【0357】

能動免疫の前に、100 μ l の切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマー (抗原) を等容積の各アジュバントと混合した。抗原 / アジュバント混合物を室温で 1 時間インキュベートし、短時間振とうした。次いで、200 μ l の全量をマウスの頸部の皮下に注射した。CFA または IFA をアジュバントとして用いた場合、抗原および CFA または IFA アジュバント溶液を、懸濁液が形成されるまで混合し、それを直ちに注射に用いた。

【0358】

[実施例 5 B - 1]

セファロースビーズによるマウス血漿試料からのポリクローナル抗体の親和性精製

セファロースビーズ上への A (20 - 42) 突然変異タンパク質オリゴマーの固定化試薬 :

H₂O 中 1 mM HCl 中 30 % イソプロパノール (氷浴中 0 で予冷)

H₂O 中 1 mM HCl (氷浴中 0 で予冷)

50 mM NaHCO₃ ; pH 7.5 (氷浴中 0 で予冷)

1/4 PBS (5 mM NaH₂PO₄ ; 35 mM NaCl ; pH 7.4)

100 % イソプロパノール中 NHS 活性化セファロースビーズ (Fa . GE # 17 - 0906 - 01)

TBS : (25 mM トリス ; 150 mM NaCl ; pH 7.5)

【0359】

手順 :

2 ml の NHS 活性化セファロースビーズ (= 2.8 ml イソプロパノール中懸濁液) を 10 ml の H₂O 中 1 mM HCl 中 30 % イソプロパノール (氷浴中 0 で予冷) で 4 回、10 ml の H₂O 中 1 mM HCl (氷浴中 0 で予冷) で 4 回および 10 ml の 50 mM NaHCO₃ ; pH 7.5 (氷浴中 0 で予冷) で 4 回洗浄した。実施例 1 b からの 0.2 mg の切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーを 50 mM NaHCO₃ pH 7.5 + 0.1 % SDS で希釈して、0.5 mg / ml の濃度を得た。切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマー溶液を 0.2 g の洗浄済み NHS 活性化セファロースビーズに加え、混合物を室温で 2 時間振とうした。3000 g で 5 分間の遠心分離の後、1 ml の 50 mM NaHCO₃ / 250 mM エタノールアミン、pH 7.5 + 0.1 % SDS

10

20

30

40

50

をセファロースビーズに加え、混合物を室温で1時間振とうした。試料をPoly Prep クロマトグラフィーカラム (Fa. Biorad #731-1550) 中に移し、1 ml のPBS (5 mM NaH_2PO_4 ; 35 mM NaCl ; pH 7.4) + 0.1% SDS で5回、次いで1 ml のTBSで5回洗浄した。最終洗浄ステップの後、固定化A (20-42) 突然変異タンパク質オリゴマーを有するセファロースビーズを1.5 ml チューブ中に移し、さらなる使用に備えて6 で保存した。

【0360】

セファロースビーズ上へのA (1-42) モノマーの固定化

試薬：

上記を参照のこと。

10

【0361】

手順：

2 ml のNHS 活性化セファロースビーズ (= 2.8 ml イソプロパノール中懸濁液) を10 ml の H_2O 中1 mM HCl 中30% イソプロパノール (氷浴中0 で予冷) で4回、10 ml の H_2O 中1 mM HCl (氷浴中0 で予冷) で4回および10 ml の50 mM NaHCO_3 ; pH 7.5 (氷浴中0 で予冷) で4回洗浄した。0.81 mg のA (1-42) 合成ペプチド (H-1368、Bachem、Bubendorf、Switzerland) を80 μl の H_2O 中0.1% NaOH に溶解した。50 μl のこの10 mg/ml A (1-42) モノマー溶液を950 μl の50 mM NaHCO_3 ; pH 7.5で希釈して、0.5 mg/ml の濃度を得た。A (1-42) モノマー溶液を0.5 g の洗浄済みNHS 活性化セファロースビーズに加え、混合物を室温で2時間振とうした。3000 gで5分間の遠心分離の後、1 ml の50 mM NaHCO_3 / 250 mM エタノールアミン、pH 7.5をセファロースビーズに加え、混合物を室温で1時間振とうした。試料をPoly Prep クロマトグラフィーカラム中に満たし、1 ml のPBS (5 mM NaH_2PO_4 ; 35 mM NaCl ; pH 7.4) で5回、次いで1 ml のTBSで5回洗浄した。最終洗浄ステップの後、A (1-42) モノマーを有するセファロースビーズを1.5 ml チューブ中に移し、さらなる使用に備えて6 で保存した。

20

【0362】

マウス血漿試料からのポリクローナル抗体の親和性精製：

30

試薬：

TBS (25 mM トリス; 150 mM NaCl ; pH 7.5)

Complete; プロテアーゼ阻害剤カクテル錠剤; Roche、カタログ番号 11697498001

1/10 TBS (2.5 mM トリス; 15 mM NaCl ; pH 7.5)

溶出緩衝液: 0.58% CH_3COOH / 140 mM NaCl

中和緩衝液: 2 M トリス / HCl ; pH 8.5

固定化切断型A 突然変異タンパク質オリゴマーを有するセファロースビーズ

A (1-42) モノマーを有するセファロースビーズ

切断型A 突然変異タンパク質オリゴマーによるマウスの免疫化により生成された抗原特異的抗体を、親和性捕捉タンパク質としてのそれぞれの切断型A 突然変異タンパク質オリゴマーおよびモノマーA (1-42) ペプチドの混合物を用いて親和性精製した。モノマーA (1-42) ペプチドは、抗血清中に存在する可能性がある、非グロブローエピトープに、例えば、sAPP、モノマーまたは繊維状A ペプチドに結合する抗体を含む、すべての抗A 抗体が親和性精製されることを保証するために用いた。

40

【0363】

手順：

250 μl の各マウス血漿試料を250 μl のTBS + 1/50 Complete (1 ml の H_2O に溶解した1錠剤) と混合し、溶液を10000 gで10分間遠心分離した。上清を除去し、マウスの免疫化に用いた抗原に対応する切断型A 突然変異タンパク

50

質オリゴマーを有する50 μ lのセファロースビーズを加えた。室温で5分間振とうした後、A (1-42)モノマーを有する12.5 μ lのセファロースビーズを加えた。混合物をEppendorf Thermomixer Comfort中で室温で1100rpmで20時間振とうした。次いで、セファロースビーズを2 \times 100 μ l TBSを用いて、PolyPrepクロマトグラフィーカラム中に移し、250 μ lのTBSで4回、250 μ lの1/10TBSで2回洗浄した。最終洗浄ステップの後、ビーズを100 μ lの0.58%CH₃COOH/140mM NaClで2回、次いで120 μ lの0.58%CH₃COOH/140mM HClで1回溶出した。溶出液(約250-270 μ l)を、22 μ lの2Mトリス/HCl、pH8.5を前負荷した1.7mlチューブに収集した。溶出ステップの後、試料を直ちに混合し、次いでさらなる使用に備えて-80 $^{\circ}$ Cで保存した。マウス血漿からの親和性精製ポリクローナル抗体のタンパク質濃度は、TBSのみの参照ブランクと対照して280nmにおける各親和性精製溶出液の吸収を測定することによって決定した。A グロブロマーに対する親和性精製ポリクローナル抗体の結合は、直接ELISAにより確認した。

【0364】

[実施例5B-2]

磁性ダイナビーズによるマウス血漿試料からのポリクローナル抗体の親和性精製

トシル活性化ダイナビーズ上への切断型A 突然変異タンパク質オリゴマーの固定化：

試薬：

ダイナビーズM-280トシル活性化、Invitrogen、カタログ番号142-04；2 \times 1E09ビーズ/ml

100mMホウ酸ナトリウム、pH9.5

100mMホウ酸ナトリウム、pH9.5+0.5%BSA

PBS(20mM NaH₂PO₄；140mM NaCl；pH7.4)

PBS(20mM NaH₂PO₄；140mM NaCl；pH7.4)+0.1BSA

PBS(20mM NaH₂PO₄；140mM NaCl；pH7.4)+0.1BSA+0.02%アジ化ナトリウム

【0365】

手順：

ダイナビーズの保存懸濁液を発泡を防ぐために注意深く振とうすることによって均一化した。66 μ lの懸濁液を除去し、1.5ml反応バイアルに移した。ダイナビーズを200 μ lの100mMホウ酸ナトリウム、pH9.5で2 \times 2分洗浄した。洗浄手順において、磁気セパレータスタンド(MSS)を用いて反応バイアルの壁にダイナビーズを固定化すると同時に上清を注意深く除去した。洗浄済みダイナビーズを100mMホウ酸ナトリウム、pH9.5中で100 μ gの切断型A 突然変異タンパク質オリゴマーとともにインキュベートした。試料を37 $^{\circ}$ Cで20分間振とうした。次いで、試料を100mMホウ酸ナトリウム、pH9.5+0.5%BSAで1：2に希釈し、37 $^{\circ}$ Cで一夜振とうした。固定化切断型A 突然変異タンパク質オリゴマーを有するダイナビーズを200 μ lのPBSで2 \times 5分(再びMSSを用いて)、200 μ lのPBS、0.1%BSAで2 \times 5分洗浄し、最後に0.2mlのPBS、0.1%BSA、0.02%アジ化ナトリウムに再懸濁し、短時間遠心分離した。固定化切断型A 突然変異タンパク質オリゴマーを有する洗浄済みダイナビーズをさらなる使用まで4 $^{\circ}$ Cで保存した。

【0366】

マウス血漿試料からのpMabの親和性精製：

試薬：

PBS(20mM NaH₂PO₄；140mM NaCl；pH7.4)

PBST(PBS+0.05%Tween20)

PBST+0.5%BSA

溶出緩衝液：0.58%CH₃COOH/140mM NaCl

中和緩衝液：2 M トリス / HCl ; pH 8 . 5

固定化切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーを有するダイナビーズ

【0367】

手順：

10 μ l のマウス血漿試料を 80 μ l の PBST + 0 . 5 % BSA で希釈した。固定化切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーを有する、10 μ l のダイナビーズを加えた。室温で一夜（約 20 時間）振とうすることによって免疫沈降を行った。MSS を用いてダイナビーズを固定化した。上清を注意深く除去し、捨て、ダイナビーズを 500 μ l の PBST で 1 \times 5 分、500 μ l の PBS で 1 \times 5 分および 500 μ l の 2 mM NaH₂PO₄、14 mM NaCl ; pH 7 . 5 で 1 \times 3 分洗浄した。洗浄緩衝液の最終除去の後、反応バイアルを再度遠心分離し、残存する液体を注意深く、完全に除去した。ダイナビーズを 25 μ l の溶出緩衝液に懸濁し、室温で 2 分間振とうした。反応バイアル 4000 rpm で 15 秒間遠心分離し、MSS に戻し、上清（すなわち、溶出液）を注意深く除去し、975 μ l の PBST + 0 . 5 % BSA に加えた。1 μ l の中和緩衝液を加え、試料を直ちに約 2 - 3 秒間混合した。A グロブロマーに対する親和性精製ポリクローナル抗体の結合は、ELISA により確認した。

【0368】

[実施例 5 C]

ドットプロットによる抗体選択性の解析

A (20 - 42) 突然変異タンパク質グロブロマー誘導性免疫応答の選択性を特徴付けるために、親和性精製ポリクローナル抗血清を種々の A 形態に対する結合について試験した。この目的のために、0 . 2 mg / ml の BSA を補充した PBS 中 100 pmol / μ l から 0 . 00001 pmol / μ l の範囲の個々の A 形態の連続希釈物を調製した。各希釈物 1 μ l をニトロセルロース膜上にプロットした。検出は、対応する親和性精製ポリクローナル抗体（0 . 2 μ g / ml）とともにインキュベートした後、ペルオキシダーゼ - （POD - ）コンジュゲート IgG（マウスの抗血清については抗マウス - POD、ウサギ抗血清については抗ウサギ - POD）および BM Blue POD 基質（Roche）で免疫染色することによって行った。

【0369】

ドットプロット用の A 標準

1 . A (12 - 42) グロブロマー

A (12 - 42) グロブロマーは、参照例 4 に記載されている通りに調製した。

【0370】

2 . A (1 - 42) グロブロマー

A (1 - 42) グロブロマーは、参照例 3 に記載されている通りに調製した。

【0371】

3 . A (20 - 42) グロブロマー

A (20 - 42) グロブロマーは、参照例 5 に記載されている通りに調製した。

【0372】

4 . A (1 - 40) モノマー、0 . 1 % NaOH

A (1 - 40) モノマーは、参照例 1 に記載されている通りに調製した。

【0373】

5 . A (1 - 42) モノマー、0 . 1 % NaOH

A (1 - 42) モノマー、0 . 1 % NaOH は、参照例 2 に記載されている通りに調製した。

【0374】

6 . A (1 - 42) フィブリル

A (1 - 42) フィブリルは、参照例 6 に記載されている通りに調製した。

【0375】

7 . sAPP

s A P P は、参照例 7 に記載されている通りに調製した。

【0376】

ドットプロット用の材料

100 pmol / μ l、10 pmol / μ l、1 pmol / μ l、0.1 pmol / μ l、0.01 pmol / μ l、0.001 pmol / μ l、0.0001 pmol / μ l および 0.00001 pmol / μ l の濃度を得るための 20 mM NaH_2PO_4 、140 mM NaCl 、pH 7.4 + 0.2 mg / ml BSA 中 A 標準 (上記の 1. から 7. 参照) の連続希釈物

【0377】

ニトロセルロース: Trans - Blot 転写媒体、純ニトロセルロース膜 (0.2 μ m) ; BIO - RAD 10

抗マウス - POD: カタログ番号: 715 - 035 - 150 (Jackson Immuno Research)

検出試薬: BM Blue POD 基質、沈殿、カタログ番号: 11442066001 (Roche)

ウシ血清アルブミン (BSA): カタログ番号: 11926 (Serva)

ブロッキング試薬: TBS 中 5% 低脂肪乳

緩衝溶液:

TBS: 25 mM トリス / HCl 緩衝液 pH 7.5 + 150 mM NaCl

TTBS: 25 mM トリス / HCl 緩衝液 pH 7.5 + 150 mM NaCl + 0.05% Tween 20 20

PBS + 0.2 mg / ml BSA: 20 mM NaH_2PO_4 緩衝液 pH 7.4 + 140 mM NaCl + 0.2 mg / ml BSA

抗体溶液 I: 20 ml の TBS 中 1% 低脂肪乳中 0.2 μ g / ml 抗体

抗体:

抗 A マウスモノクローナル抗体クローン 6E10; 濃度: 1 mg / ml; カタログ番号: SIG39320 (Covance); -80 で保存

実施例 5B - 1 からの親和性精製マウスポリクローナル抗 A 抗体、-80 で保存

抗体溶液 II: マウス抗体の検出用: TBS 中 1% 低脂肪乳中抗マウス POD の 1: 5000 希釈物 30

ドットプロットの手順:

1) 8 つの濃度の異なる A 標準 (連続希釈により得られた) のそれぞれの 1 μ l をニトロセルロース膜上の互いから約 1 cm の距離の箇所に滴下した。

【0378】

2) A 標準のドットをニトロセルロース膜上で室温で少なくとも 10 分間風乾した (= ドットプロット)。

【0379】

3) ブロッキング: ドットプロットを 30 ml の TBS 中 5% 低脂肪乳とともに室温で 1.5 時間インキュベートした。 40

【0380】

4) 洗浄: ブロッキング溶液を捨て、ドットプロットを 20 ml の TTBS とともに振とうしながら室温で 10 分間インキュベートした。

【0381】

5) 抗体溶液 I: 洗浄緩衝液を捨て、ドットプロットを抗体溶液 I とともに室温で 2 時間インキュベートした。

【0382】

6) 洗浄: 抗体溶液 I を捨て、ドットプロットを 20 ml の TTBS とともに振とうしながら室温で 10 分間インキュベートした。洗浄溶液を捨て、ドットプロットを 20 ml の TTBS とともに振とうしながら室温で 10 分間インキュベートした。洗浄溶液を捨て 50

て、ドットプロットを20 mlのTBSとともに振とうしながら室温で10分間インキュベートした。

【0383】

7) 抗体溶液II: 洗浄緩衝液を捨て、ドットプロットを抗体溶液IIとともに室温で1時間インキュベートした。

【0384】

8) 洗浄: 抗体溶液IIを捨て、ドットプロットを20 mlのTTBSとともに振とうしながら室温で10分間インキュベートした。洗浄溶液を捨て、ドットプロットを20 mlのTTBSとともに振とうしながら室温で10分間インキュベートした。洗浄溶液を捨て、ドットプロットを20 mlのTBSとともに振とうしながら室温で10分間インキュベートした。

10

【0385】

9) 展開: 洗浄溶液を捨てた。ドットプロットを7.5 mlのBM Blue POD基質により5分間展開した。展開は、 H_2O pH 5.3 (pHはリン酸二水素ナトリウム結晶で調整) によるドットプロットの強い洗浄により停止した。

【0386】

10) 定量的評価は、GS800濃度計(BioRad)およびソフトウェアパッケージQuantity one、Version 4.5.0(BioRad)を用いてドット強度の濃度測定解析に基づいて行った。最後の光学的に明確に同定されたA (20 - 42) グロブロマーのドットの相対密度の20%を超える相対密度を有するドットのみを評価した。この閾値は、すべてのドットプロットについて独立に決定した。計算値は、所定の抗体についてのA (20 - 42) グロブロマーおよびそれぞれのA 形態の認識の間の関係を示す。

20

【0387】

ドットプロット分析は、異なるマウスモノクローナル(m6E10)およびポリクローナル抗A 抗体を用いて行った。ポリクローナル抗A 抗体は、切断型A 突然変異タンパク質オリゴマーによるマウスの能動免疫とその後の親和性精製によって得た(実施例5参照)。個々のA 形態を連続希釈に適用し、免疫反応のために各抗体とともにインキュベートした(1 = A (1 - 42) グロブロマー; 2 = A (20 - 42) グロブロマー; 3 = A (1 - 40) モノマー、0.1% NaOH; 4 = A (1 - 42) モノマー、0.1% NaOH; 5 = A (1 - 42) フィブリル調製物; 6 = sARP (Sigma) (第1のドット: 1 pmol); 7 = A (12 - 42) グロブロマー)。結果を表3に示す。

30

【0388】

【表 6】

表3:マウスポリクローナル抗体のドットブロット定量データ

A)切断型A β E22A突然変異タンパク質オリゴマーによる免疫化
(マウス、アラムアジュバント)

抗原	マウス#のポリクローナル抗体			
	1	2	3	4
A β (1-42) グロブロマー	0.86	>10	>100	>100
A β (12-42) グロブロマー	2.82	1.97	1.98	2.61
A β (20-42) グロブロマー	1	1	1	1
A β (1-40) モノマー	76.55	>10	>100	>100
A β (1-42) モノマー	36.45	>10	>100	>100
A β (1-42) フィブリル	269.51	>10	>100	>100
sAPP α	1.01	>10	>1	>1

10

20

【 0 3 8 9 】

【表 7】

B)切断型A β E22A突然変異タンパク質グロブロマーによる免疫化
(マウス、アジュバントを用いない)

抗原	マウス#のポリクローナル抗体			
	1	2	3	4
A β (1-42) グロブロマー	>1000	>1000	>10	>10
A β (12-42) グロブロマー	2.43	2.54	1.23	0.79
A β (20-42) グロブロマー	1	1	1	1
A β (1-40) モノマー	>1000	>1000	>10	>10
A β (1-42) モノマー	1950.71	>1000	>10	>10
A β (1-42) フィブリル	>1000	>1000	>10	>10
sAPP α	>10	>10	1-10	>0.38

30

40

【 0 3 9 0 】

【表 8】

C)切断型A β F20G、E22A突然変異タンパク質オリゴマーによる免疫化
(マウス、アラムアジュバント)

抗原	マウス#のポリクローナル抗体		
	1	2	3
A β (1-42) グロブロマー	4.91	0.01	0.05
A β (12-42) グロブロマー	1.61	0.30	0.23
A β (20-42) グロブロマー	1	1	1
A β (1-40) モノマー	>10	2.81	13.41
A β (1-42) モノマー	>10	>10	0.44
A β (1-42) フィブリル	>10	15.56	>10
sAPP α	0.29	1-10	0.001

10

【 0 3 9 1 】

20

【表 9】

D)切断型A β G25V突然変異タンパク質オリゴマーによる免疫化
(マウス、アラムアジュバント)

抗原	マウス#のポリクローナル抗体	
	1	2
A β (1-42) グロブロマー	>100	>10
A β (12-42) グロブロマー	>100	0.72
A β (20-42) グロブロマー	1	1
A β (1-40) モノマー	>100	>10
A β (1-42) モノマー	>100	>10
A β (1-42) フィブリル	>100	>10
sAPP α	>1	1-10

30

【 0 3 9 2 】

40

【表 1 0】

E)切断型A β E22V突然変異タンパク質オリゴマーによる免疫化
(マウス、アラムアジュバント)

抗原	マウス#のポリクローナル抗体			
	1	2	3	4
A β (1-42) グロブロマー	3.51	1.27	233.46	49.86
A β (12-42)グロブロマー	0.68	1.82	3.65	4.99
A β (20-42)グロブロマー	1	1	1	1
A β (1-40) モノマー	286.00	>100	>100	>100
A β (1-42) モノマー	19.78	31.74	272.33	>100
A β (1-42) フィブリル	172.65	125.59	>100	>100
sAPP α	0.092	0.039	1	>1

10

【 0 3 9 3 】

【表 1 1】

20

F)切断型A β E22A、G25A突然変異タンパク質オリゴマーによる免疫化
(マウス、アラムアジュバント)

抗原	マウス#のポリクローナル抗体			
	1	2	3	4
A β (1-42) グロブロマー	1323.08	2171.70	>1000	1864.35
A β (12-42) グロブロマー	1.74	5.32	2.75	1.92
A β (20-42) グロブロマー	1	1	1	1
A β (1-40) モノマー	>1000	3203.50	3899.23	3119.49
A β (1-42) モノマー	1063.72	395.32	4406.81	724.17
A β (1-42) フィブリル	>1000	2687.77	>1000	2896.99
sAPP α	43.11	31.29	45.86	72.75

30

【 0 3 9 4 】

【表 1 2】

G) 切断型A β E22A、S26A突然変異タンパク質オリゴマーによる免疫化
(マウス、アラムアジュバント)

抗原	マウス#のポリクローナル抗体			
	1	2	3	4
A β (1-42) グロブロマー	4.45	0.09	76.46	>1
A β (12-42) グロブロマー	0.46	0.18	2.12	1.39
A β (20-42) グロブロマー	1	1	1	1
A β (1-40) モノマー	>10	5.96	>100	>1
A β (1-42) モノマー	9.98	0.40	408.41	>1
A β (1-42) フィブリル	2.37	0.01	>100	>1
sAPP α	1-10	0.0047	>1	10-100

10

【 0 3 9 5】

20

【表 1 3】

H) 切断型A β E22F突然変異タンパク質オリゴマーによる免疫化
(マウス、アラムアジュバント)

抗原	マウス#のポリクローナル抗体	
	1	2
A β (1-42) グロブロマー	350.78	3116.21
A β (12-42) グロブロマー	1.35	1.57
A β (20-42) グロブロマー	1	1
A β (1-40) モノマー	>1000	528.23
A β (1-42) モノマー	>1000	812.97
A β (1-42) フィブリル	87.19	11.56
sAPP α	8.58	83.83

30

【 0 3 9 6】

40

ドットプロット結果から、切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーによるマウスの免疫化により、野生型 A (20 - 42) グロブロマーについても以前に示された、A グロブロマーエピトープに対する高度に選択的な免疫応答が誘導されることがわかる。ドットプロットにおいて、ポリクローナル免疫応答の認識を、アルツハイマー病患者の脳に存在するグロブロマーエピトープを提示する野生型 A (20 - 42) グロブロマーと対照して試験した。我々は、切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーは、ヒト体内で生じないと推測している。しかし、切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーによる免疫化により、所望の通りに、野生型 A グロブロマーエピトープをまだ認識することができた免疫応答が誘導された。したがって、切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーによる能動免疫は、アルツハイマー病トランスジェニックマウスモデルにおける認知障害を反転するの

50

に有効であると予期することができる。その理由は、誘発された抗体反応のポリクローナル抗血清ドットプロットプロファイルが、インビボでのグロブロマーエピトープの認識に関して野生型 A (20 - 42) グロブロマーによる能動免疫により誘発された反応のそれと同等であるからである。後者は、物体認識課題における認知障害を反転することが証明された。

【0397】

[実施例6]

整列化サンドイッチ ELISA によるカニクイザル血漿中の PF - 4 との交差反応の判定

【0398】

10

[実施例6A]

セファロースビーズにより親和性精製したポリクローナルマウス抗体の PF - 4 交差反応性

材料：

F96 Cert. Maxisorp NUNC - Immunoプレート：カタログ番号 439454

実験における結合抗体：

・実施例5B - 1からの種々の切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーによる免疫化後のマウス血漿試料からセファロースビーズにより親和性精製したポリクローナル抗体

・市販の参照抗 PF - 4 抗体：モノクローナル抗 HPF 4 抗体 (Abcam カタログ番号 ab49735)

20

コーティング緩衝液：100 mM 炭酸水素ナトリウム：pH 9.6

ELISA 用ブロッキング試薬；Roche Diagnostics GmbH カタログ番号：1112589

PBST 緩衝液：20 mM NaH_2PO_4 ；140 mM NaCl ；0.05% Tween 20；pH 7.4

PBST + 0.5% BSA 緩衝液：20 mM NaH_2PO_4 ；140 mM NaCl ；0.05% Tween 20；pH 7.4 + 0.5% BSA；Serva カタログ番号 11926

カニクイザル血漿：13匹の異なるドナーからのカニクイザル EDTA 血漿プール；-30 で保存

30

トリプシン阻害剤：Sigma カタログ番号 T7902

整列化抗体：抗マウス IgG (Fc 特異的；ヤギにおいて産生；Sigma カタログ番号：M3534；2.3 mg/ml；-20 で保存

検出抗体：ポリクローナルウサギ抗 PF - 4 抗体 pRab - HPF 4；0.5 mg/ml；Abcam カタログ番号：ab9561

標識試薬：抗ウサギ POD コンジュゲート；Jackson ImmunoResearch Ltd. カタログ番号：111-036-045

染色溶液：DMSO 中 42 mM TMB (Roche Diagnostics GmbH カタログ番号：92817060)；水中 3% H_2O_2 ；100 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.9

40

停止溶液：2 M スルホン酸

試薬の調製：

整列化抗体：整列化抗体をコーティング緩衝液で 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した。

【0399】

ブロッキング溶液：ブロッキング試薬を 100 ml の水に溶解して、ブロッキング保存溶液を調製し、10 ml のアリコートをして -20 で保存した。ブロックする各プレートについて 3 ml のブロッキング保存溶液を 27 ml の水で希釈した。

【0400】

各結合抗体を PBST + 0.5% BSA 緩衝液で 3.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した (保存

50

溶液)。各親和性精製ポリクローナル抗体調製物の希釈系列を以下のように調製した。

【 0 4 0 1 】

【 表 1 4 】

No	抗体希釈物の容積	PBST+0.5% BSA緩衝液の容積	最終抗体濃度
1	250 μ l 保存溶液	0 ml	3160 ng/ml
2	79 μ l (1)	171 μ l	1000 ng/ml
3	79 μ l (2)	171 μ l	316 ng/ml
4	79 μ l (3)	171 μ l	100 ng/ml
5	79 μ l (4)	171 μ l	31.6 ng/ml
6	79 μ l (5)	171 μ l	10 ng/ml
7	79 μ l (6)	171 μ l	3.16 ng/ml
8	0 μ l	250 μ l	緩衝液のみ

10

【 0 4 0 2 】

カニクイザル血漿：

20

5 ml のカニクイザル血漿 プールを 1 0 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離した。4 . 5 ml の上清を除去し、4 0 . 5 ml の P B S T + 0 . 5 % B S A で希釈した (= 1 : 1 0 希釈)。次いで 4 5 0 μ l の H₂ O 中 1 0 m g / m l トリプシン阻害剤を加えた。室温で 1 0 分間のインキュベーションの後、試料を 0 . 2 2 μ m フィルター (M i l l i p o r e カタログ番号 S L G S 0 2 5 0 S) を通して濾過した。

【 0 4 0 3 】

標識試薬：

凍結乾燥された抗ウサギ P O D コンジュゲートを 0 . 5 m l の水で再構成した。5 0 0 μ l のグリセロールを加え、1 0 0 μ l のアリコートをし、さらなる使用に備えて 2 0 で保存した。濃縮標識試薬を P B S T 緩衝液で希釈した。希釈係数は、1 : 5 0 0 0 であった。試薬は、直ちに使用した。

30

【 0 4 0 4 】

結合抗体プレートの設定：数は、結合抗体の最終濃度を n g / m l の単位で示す。各結合抗体の各濃度を 2 連で扱った。

【 0 4 0 5 】

【表 1 5】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	ポリクローナル抗体		ポリクローナル抗体		ポリクローナル抗体		ポリクローナル抗体		ポリクローナル抗体		ポリクローナル抗体	
A	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160	3160
B	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
C	316	316	316	316	316	316	316	316	316	316	316	316
D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
E	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6
F	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16
H	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

10

20

【0 4 0 6】

手順：

1. 1 ウエル当たり 1 0 0 μ l の整列化抗体溶液を加え、6 で一夜インキュベートした。

【0 4 0 7】

2. 抗体溶液を捨て、ウエルを 2 5 0 μ l の P B S T 緩衝液で 3 回洗浄した。

【0 4 0 8】

3. 1 ウエル当たり 2 6 5 μ l のブロッキング溶液を加え、室温で 2 時間インキュベートした。

30

【0 4 0 9】

4. ブロッキング溶液を捨て、ウエルを 2 5 0 μ l の P B S T 緩衝液で 3 回洗浄した。

【0 4 1 0】

5. 各結合抗体の希釈系列の調製の後、1 ウエル当たり 1 0 0 μ l のこれらの抗体希釈物をプレートに加えた。プレートを室温で 2 時間インキュベートした。

【0 4 1 1】

6. 抗体溶液を捨て、ウエルを 2 5 0 μ l の P B S T 緩衝液で 3 回洗浄した。

【0 4 1 2】

7. 1 ウエル当たりカニクイザル血漿の 1 : 1 0 希釈物 1 0 0 μ l を加え、室温で 2 時間インキュベートした。

40

【0 4 1 3】

8. 血漿溶液を捨て、ウエルを 2 5 0 μ l の P B S T 緩衝液で 3 回洗浄した。

【0 4 1 4】

9. 1 ウエル当たり 1 0 0 μ l の一次抗体溶液を加え、室温で 1 時間インキュベートした。

【0 4 1 5】

1 0. 一次抗体溶液を捨て、ウエルを 2 5 0 μ l の P B S T 緩衝液で 3 回洗浄した。

【0 4 1 6】

1 1. 1 ウエル当たり 2 0 0 μ l の標識試薬を加え、室温で 1 時間インキュベートし

50

た。

【0417】

12. 標識試薬を捨て、ウエルを250 µlのPBST緩衝液で3回洗浄した。

【0418】

13. 100 µlのTMB溶液を各ウエルに加えた。

【0419】

14. 展開中(周囲温度で5 - 15分)プレートの色をモニターし、適切な色が発現した場合に50 µl / ウエルの停止溶液を加えることにより反応を終結させた。

【0420】

15. 450 nmにおける吸光度を測定した。

10

【0421】

データ解析：

結合抗体濃度(X値)を式 $X = \log(X)$ を用いて対数変換した。データは、抗体の量(ng/mlで表した)として表したX軸上に対数変換X値を用いてプロットした。行HにおけるそれぞれのPBSTブランクのOD(450 nm)値を行A - Gにおける各縦列のポリクローマウス抗体希釈系列の値から差し引いた。得られたバックグラウンド補正OD(450 nm)値をY軸上にプロットした。濃度効果曲線は、データ解析ソフトウェアパッケージGraphPad Prism (Version 5.03; GraphPad Software Inc.)を用いて、「最小二乗(通常)適合」適合法(「S字形用量反応(可変勾配)適合法」に等しい)による非線形回帰「四パラメーターロジスティック式」を用いた曲線当てはめによりこれらのデータポイントから計算した。曲線当てはめは、データの視覚化の目的のためにのみ実施したのであって、さらなる計算、すなわち、曲線下面積の計算のための基礎としては一切用いていない。曲線下面積(AUC、または総ピーク面積)は、測定範囲(3.16 ng/mlから3160 ng/mlの最終血漿希釈物)における非曲線当てはめデータである対数変換X値およびOD(450 nm)値に基づいて決定した。以下の計算設定をデータ解析ソフトウェアパッケージGraphPad Prism (Version 5.03; GraphPad Software Inc.)内で用いた。

20

【0422】

・ベースラインをY = 0.0に設定した。

30

【0423】

・最小ピーク高：最小値から最大値Yまでの距離の10%未満であるピークを無視する。

【0424】

・ピークの方角：定義により、すべてのピークは、ベースラインより上に行かなければならない。

【0425】

各抗体について、PF4認識についての参照抗体としての市販の抗HPF4抗体(Abcamカタログ番号ab49735)を用いてPF4識別係数(discrimination factor)を計算した。

40

【0426】

【数1】

$$[\text{PF4 識別係数}] = \frac{[\text{抗HPF4抗体ab49735の総ピーク面積}]}{[\text{判定される抗体の面積}]}$$

【0427】

実施例6Aの結果を表4A、4Bおよび4Cに示す。

【0428】

【表 16】

表4A-C:対数変換データから計算したAUC(または総ピーク面積)

A				
実験 1	アジュバント	AUC	抗-HPF4 AUC平均値	AUC比
抗-HPF4	n.a.	2,939	2,79	1,00
抗-HPF4	n.a.	2,631		
mMAb 7C6	n.a.	1,577		1,77
mMAb 4D10	n.a.	0,127		21,93
マウス 1 (wt)	CFA	0,512		5,44
マウス 2 (wt)	CFA	0,610		4,57
マウス 3 (wt)	CFA	2,993		0,93
マウス 4 (wt)	CFA	0,675		4,13
マウス 37 (E22A)	CFA	0,115		24,15
マウス 38 (E22A)	CFA	0,053		52,33
マウス 39 (E22A)	CFA	0,097		28,57
マウス 40 (E22A)	CFA	0,083		33,57
マウス 73 (E22A)	CFA	0,017		159,23
マウス 74 (E22A)	CFA	0,002		1274,02
マウス 75 (E22A)	CFA	0,013		217,58
マウス 76 (E22A)	CFA	0,036		76,36
マウス 41 (D23A)	CFA	0,356		7,83
マウス 42 (D23A)	CFA	0,110		25,41
マウス 43 (D23A)	CFA	0,098		28,28
マウス 44 (D23A)	CFA	0,045		61,71
マウス 49 (S26A)	CFA	3,099		0,90
マウス 50 (S26A)	CFA	0,696		4,00
マウス 51 (S26A)	CFA	0,352		7,92
マウス 52 (S26A)	CFA	0,143		19,43

【0429】

【 表 1 7 】

B			
実験 1	アジュバント	AUC	AUC 比
抗 -HPF4	n.a.	3,784	1,00
mMAb 7C6	n.a.	2,882	1,31
mMAb 4D10	n.a.	0,243	15,57
m13 WT	アラム	1,287	2,94
m14 WT	アラム	3,557	1,06
m15 WT	アラム	3,999	0,95
実験 2			
抗 -HPF4	n.a.	3,844	1,00
m17 E22A	アラム	0,150	25,70
m18 E22A	アラム	0,228	16,88
m19 E22A	アラム	0,100	38,44
m20 E22A	アラム	0,069	55,61
m21 E22A	アラム	0,040	96,80
実験 3			
抗 -HPF4	n.a.	3,868	1,00
m22 E22A	アラム	0,112	34,66
m23 E22A	アラム	0,168	23,04
m24 E22A	アラム	0,152	25,43
m25 G25A	アラム	2,929	1,32
m26 G25A	アラム	0,250	15,47
実験 4			
抗 -HPF4	n.a.	3,637	1,00
mMAb 7C6	n.a.	2,997	1,21
mMAb 4D10	n.a.	0,248	14,64
m28 G25A	アラム	2,779	1,31
m29 G25A	アラム	1,167	3,12
m31 G25A	アラム	0,557	6,53

10

20

30

40

【表 1 8】

C			
実験 1	アジュバント	AUC	AUC比
抗 -HPF4	n.a.	3,043	1,00
m1 WT	アラム	0,065	47,00
m2 WT	アラム	0,063	48,21
m3 WT	アラム	2,288	1,33
m4 WT	アラム	0,254	11,96
m5 E22A	アラム	0,018	167,66
m6 E22A	アラム	0,084	36,40
m7 E22A	アラム	0,029	104,00
m8 E22A	アラム	0,047	65,27
m9 E22A - アラム	アラム	0,064	47,47
m10 E22A - アラム	アラム	0,019	161,95
m11 E22A - アラム	アラム	0,125	24,40
m12 E22A - アラム	アラム	0,024	125,54
m13 F20G,E22A	アラム	0,057	53,42
m14 F20G,E22A	アラム	0,001	4642,97
m15 F20G,E22A	アラム	0,039	78,77
m17 G25T	アラム	0,076	40,11
m18 G25T	アラム	1,639	1,86
m19 G25T	アラム	0,026	116,46
m20 G25T	アラム	1,657	1,84
m21 G25V	アラム	0,022	140,75
m22 G25V	アラム	0,031	99,77
m23 G25V	アラム	0,020	148,87
実験 2			
抗 -HPF4	n.a.	2,862	1,00
m24 G25V	Alum	0,012	247,15
m25 E22V	Alum	0,053	54,39
m26 E22V	Alum	0,066	43,59
m27 E22V	Alum	0,061	47,21
m28 E22V	Alum	0,053	53,88
m29 E22A,G25A	Alum	0,040	70,82

10

20

30

40

m30 E22A,G25A	アラム	0,037	78,28
m31 E22A,G25A	アラム	0,101	28,22
m32 E22A,G25A	アラム	0,012	238,90
m33 G25A,S26A	アラム	0,141	20,37
m34 G25A,S26A	アラム	0,004	751,18
m35 G25A,S26A	アラム	0,043	66,56
m36 G25A,S26A	アラム	0,092	30,99
m37 E22A,S26A	アラム	0,047	61,06
m38 E22A,S26A	アラム	0,155	18,49
m39 E22A,S26A	アラム	0,039	74,03
m40 E22A,S26A	アラム	0,022	132,38
m41 D23K	アラム	0,112	25,67
m43 S26L	アラム	0,022	130,86
m44 S26L	アラム	0,328	8,72
m45 E22F	アラム	0,066	43,12
m46 E22F	アラム	0,041	70,04

10

20

【 0 4 3 1 】

[実施例 6 B]

磁性ダイナビーズにより親和性精製したポリクローナルマウス抗体の P F - 4 交差反応性

材料および試薬の調製は、以下の実験における結合抗体を除いて、実施例 6 A におけるものに対応している。

【 0 4 3 2 】

・実施例 5 B - 2 からの各種切断型 A 突然変異タンパク質オリゴマーによる免疫化後のマウス血漿試料から活性化ダイナビーズにより親和性精製したポリクローナル抗体

・市販の参照抗 P F - 4 抗体：モノクローナル抗 H P F 4 抗体 (A b c a m カタログ番号 a b 4 9 7 3 5)

磁性ダイナビーズによるマウス血漿の親和性精製後に実施例 5 B - 2 で得られた試料は、1 : 1 0 0 の前希釈を有していた。この親和性精製血漿保存溶液は、ここでさらなる希釈系列に用いた。各親和性精製ポリクローナル抗体調製物の希釈系列は、以下のように調製した。

【 0 4 3 3 】

【 表 1 9 】

No	抗体希釈物の容積	PBST + 0.5% BSA 緩衝液の容積	さらなる血漿希釈係数	最終血漿希釈係数
1	250 μ l 保存溶液 (1:100 前希釈)	0 ml	直接	1:100
2	50 μ l (1)	200 μ l	1:5	1:500
3	50 μ l (2)	200 μ l	1:25	1:2500
4	50 μ l (3)	200 μ l	1:125	1:12500

40

【 0 4 3 4 】

50

カニクイザル血漿および標識試薬は、実施例 6 A と同様に調製した。

【 0 4 3 5 】

結合抗体プレートの設定：数は、結合抗体の希釈度を示す。各結合抗体の各濃度を 2 連で扱った。

【 0 4 3 6 】

【表 2 0】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	ポリクローナル抗体		ポリクローナル抗体		ポリクローナル抗体		ポリクローナル抗体		ポリクローナル抗体		ポリクローナル抗体	
A	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
B	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500
C	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500
D	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500
E	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	PBST	PBST
F	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	PBST	PBST
G	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	1:2500	PBST	PBST
H	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	1:12500	PBST	PBST

10

20

【 0 4 3 7 】

手順は、実施例 6 A の手順に対応している。

【 0 4 3 8 】

データ解析：

結合抗体の希釈係数（X 値）を式 $X = \log(X)$ を用いて対数変換した。データは、血漿の希釈度（1：X）として表した X 軸上に対数変換 X 値を用いてプロットした。それぞれの P B S T ブランクの O D（450 nm）値を各縦列の血漿希釈系列の値から差し引いた。得られたバックグラウンド補正 O D（450 nm）値を Y 軸上にプロットした。希釈度効果曲線は、データ解析ソフトウェアパッケージ Graph Pad Prism（Version 5.03；Graph Pad Software Inc.）を用いて、「最小二乗（通常）適合」適合法（「S 字形用量反応（可変勾配）適合法」に等しい）による非線形回帰「四パラメーターロジスティック式」を用いた曲線当てはめによりこれらのデータポイントから計算した。曲線当てはめは、データの視覚化の目的のためにのみ実施したのであって、さらなる計算、すなわち、曲線下面積の計算のための基礎としては一切用いていない。曲線下面積（AUC、または総ピーク面積）は、測定範囲（1：100 から 1：12500 の最終血漿希釈係数）における非曲線当てはめデータである対数変換 X 値および O D（450 nm）値に基づいて決定した。以下の計算設定をデータ解析ソフトウェアパッケージ Graph Pad Prism（Version 5.03；Graph Pad Software Inc.）内で用いた。

30

40

【 0 4 3 9 】

・ベースラインを Y = 0.0 に設定した。

【 0 4 4 0 】

・最小ピーク高：最小値から最大値 Y までの距離の 10% 未満であるピークを無視する。

【 0 4 4 1 】

・ピークの方角：定義により、すべてのピークは、ベースラインより上に行かなければ

50

ならない。

【0442】

[参照例 1]

A (1 - 40) モノマー (0 . 1 % NaOH)

1 mg の A (1 - 40) (Bachem Inc . 、カタログ番号 H - 1194) を 232 . 6 μ l の H₂O 中 0 . 1 % NaOH (新たに調製した) に溶解し (= 4 . 3 mg / ml = 1 nmol / 1 μ l) 、直ちに室温で 30 秒間振とうして、透明な溶液を得た。試料をさらなる使用に備えて - 20 で保存した。

【0443】

[参照例 2]

A (1 - 42) モノマー (0 . 1 % NaOH)

1 mg の A (1 - 42) (Bachem Inc . 、カタログ番号 H - 1368) を 222 . 2 μ l の H₂O 中 0 . 1 % NaOH (新たに調製した) に溶解し (= 4 . 5 mg / ml = 1 nmol / 1 μ l) 、直ちに室温で 30 秒間振とうして、透明な溶液を得た。試料をさらなる使用に備えて - 20 で保存した。

【0444】

[参照例 3]

A (1 - 42) グロブロマー

A (1 - 42) 合成ペプチド (H - 1368 、 Bachem 、 Bubendorf 、 Switzerland) を 100 % 1 , 1 , 1 , 3 , 3 , 3 - ヘキサフルオロ - 2 - プロパノール (HFIP) に 6 mg / ml で懸濁し、完全な可溶化のために振とうしながら 37 で 1 . 5 時間インキュベートした。HFIP は、水素結合切断剤として作用するので、A ペプチドにおける先在性の構造的不均一性を解消するために用いられる。HFIP を Speed Vac で蒸発により除去し、A (1 - 42) をジメチルスルホキシドに 5 mM の濃度で再懸濁し、20 秒間超音波処理した。HFIP 前処理 A (1 - 42) をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (20 mM NaH₂PO₄、140 mM NaCl、pH 7 . 4) で 400 μ M に希釈し、1 / 10 容積の 2 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) (H₂O 中) を加えた (0 . 2 % SDS の最終濃度) 。37 での 6 時間のインキュベーションにより 16 / 20 kDa の A (1 - 42) グロブロマー中間体がもたらされた。3 容積の H₂O でさらに希釈し、37 で 18 時間インキュベートすることによって 38 / 48 kDa の A (1 - 42) グロブロマーが生成された。3000 g で 20 分間の遠心分離の後に試料を限外濾過 (30 kDa カットオフ) により濃縮し、5 mM NaH₂PO₄、35 mM NaCl、pH 7 . 4 に対して透析し、10000 g で 10 分間遠心分離し、38 / 48 kDa の A (1 - 42) グロブロマーを含む上清を抜き取った。

【0445】

[参照例 4]

A (12 - 42) グロブロマー

参照例 3 の 2 ml の A (1 - 42) グロブロマー調製物を 38 ml の緩衝液 (5 mM リン酸ナトリウム、35 mM 塩化ナトリウム、pH 7 . 4) および 150 μ l の水中 1 mg / ml GluC エンドプロテイナーゼ (Roche) と混ぜ合わせた。反応混合物を室温で 6 時間攪拌し、続いてさらなる 150 μ l の水中 1 mg / ml GluC エンドプロテイナーゼ (Roche) を加えた。反応混合物を室温でさらに 16 時間攪拌した後、8 μ l の 5 M DIFP 溶液を加えた。反応混合物を 15 ml の 30 kDa Centriprep チューブにより約 1 ml に濃縮した。濃縮物を 9 ml の緩衝液 (5 mM リン酸ナトリウム、35 mM 塩化ナトリウム、pH 7 . 4) と混ぜ合わせ、再び 1 ml に濃縮した。濃縮物を透析管中で 1 l の緩衝液 (5 mM リン酸ナトリウム、35 mM NaCl) に対して 6 で 16 時間透析した。透析物は、1 % 濃度の SDS の水中溶液を用いて 0 . 1 % の SDS 含量に調整した。試料を 10000 g で 10 分間遠心分離し、A (12 - 42) グロブロマー上清を抜き取った。

【 0 4 4 6 】

[参 照 例 5]

A (2 0 - 4 2) グロブロマー

参照例 3 の 1 . 5 9 m l の A (1 - 4 2) グロブロマー調製物を 3 8 m l の緩衝液 (5 0 m M M E S / N a O H 、 p H 7 . 4) および 2 0 0 μ l の 1 m g / m l サーマリシン水中溶液 (R o c h e) と混ぜ合わせた。反応混合物を室温で 2 0 時間攪拌した。次いで 8 0 μ l の 1 0 0 m M E D T A 水中溶液、p H 7 . 4 を加え、混合物を 4 0 0 μ l の 1 % 濃度の S D S 溶液を用いて 0 . 0 1 % の S D S 含量にさらに調整した。反応混合物を 1 5 m l の 3 0 k D s C e n t r i p r e p チューブにより約 1 m l に濃縮した。濃縮物を 9 m l の緩衝液 (5 0 m M M E S / N a O H 、 0 . 0 2 % S D S 、 p H 7 . 4) と混ぜ合わせ、再び 1 m l に濃縮した。濃縮物を透析管中で 1 l の緩衝液 (5 m M リン酸ナトリウム、3 5 m M N a C l) に対して 6 で 1 6 時間透析した。透析物は、2 % 濃度の S D S の水中溶液を用いて 0 . 1 % の S D S 含量に調整した。試料を 1 0 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離し、A (2 0 - 4 2) グロブロマー上清を抜き取った。

10

【 0 4 4 7 】

[参 照 例 6]

A フィブリル

1 m g の A (1 - 4 2) (B a c h e m I n c . 、カタログ番号 H - 1 3 6 8) を 5 0 0 μ l の水性 0 . 1 % N H ₄ O H (E p p e n d o r f f 管) に溶解し、試料を室温で 1 分間攪拌した。試料を 1 0 0 0 0 \times g で 5 分間遠心分離し、上清を抜き取った。1 0 0 μ l のこの新たに調製した A (1 - 4 2) 溶液を 3 0 0 μ l の 2 0 m M N a H ₂ P O ₄ ; 1 4 0 m M N a C l 、p H 7 . 4 で中和した。p H を 1 % H C l で p H 7 . 4 に調整した。試料を 3 7 で 2 4 時間インキュベートし、遠心分離した (1 0 0 0 0 g で 1 0 分) 。上清を捨て、フィブリルペレットを 4 0 0 μ l の 2 0 m M N a H ₂ P O ₄ ; 1 4 0 m M N a C l 、p H 7 . 4 で 2 回洗浄し、次いで最後に 4 0 0 μ l の 2 0 m M N a H ₂ P O ₄ ; 1 4 0 m M N a C l 、p H 7 . 4 を用いて 1 分間ボルテックス混合することによって再懸濁した。

20

【 0 4 4 8 】

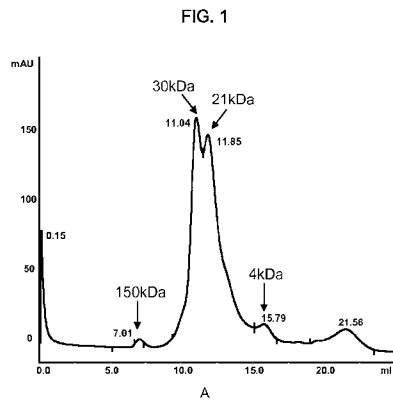
[参 照 例 7]

s A P P

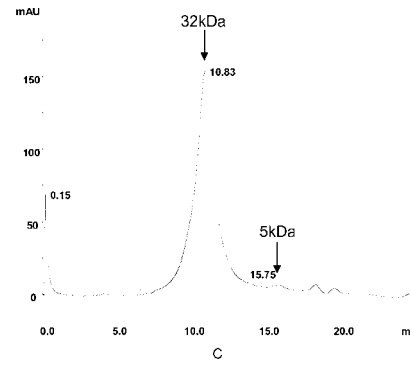
S i g m a から供給された (カタログ番号 S 9 5 6 4 ; 2 0 m M N a H ₂ P O ₄ ; 1 4 0 m M N a C l 、p H 7 . 4 中 2 5 μ g) 。s A P P は、2 0 m M N a H ₂ P O ₄ ; 1 4 0 m M N a C l 、p H 7 . 4 、0 . 2 m g / m l B S A で 0 . 1 m g / m l (= 1 p m o l / μ l) に希釈した。

30

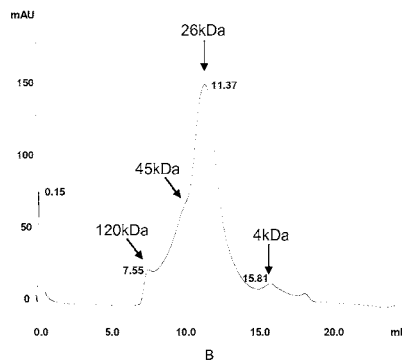
【図 1 A】



【図 1 C】



【図 1 B】



【図 2】

FIG. 2

抗原	ELISA検出		エпитーブマッピング
	7C6	4D10	
Aβ(1-42) V18A	+++	+	
Aβ(1-42) F19A	+++	++	
Aβ(1-42) F20A	+/-	+/-	
Aβ(1-42) A21G	++	++	
Aβ(1-42) A21Q	+/-	+/-	
Aβ(1-42) A21L	+/-	+++	
Aβ(1-42) A21G, E22Q	+/-	+++	
Aβ(1-42) A21G, E22K	+/-	+	
Aβ(1-42) A21Q, E22L	+/-	+++	
Aβ(1-42) A21L, E22Q	+/-	+++	
Aβ(1-42) A21G, D23N	+	+++	
Aβ(1-42) E22A	+/-	+++	7C6 エピトープ破壊
Aβ(1-42) D23A	+	+++	
Aβ(1-42) A21Q	+/-	+/-	
Aβ(1-42) A21L	+/-	+++	
Aβ(1-42) E22G	+	+++	
Aβ(1-42) E22Q	+	++	
Aβ(1-42) E22K	+/-	++	
Aβ(1-42) E22D	++	+	
Aβ(1-42) E22L	+/-	+++	
Aβ(1-42) D23N	++	+++	
Aβ(1-42) D23L	+/-	+++	
Aβ(1-42) V24A	+++	+	
Aβ(1-42) G25A	+++	++	
Aβ(1-42) S26A	+++	+++	
Aβ(1-42) N27A	+++	+	4D10 エピトープ破壊
Aβ(1-42) K28A	++	+	
Aβ(1-42) G29A	+++	++	
Aβ(1-42) A30G	+++	+	
Aβ(1-42) I31A	+++	+++	
Aβ(1-42) I32A	+++	+	
Aβ(1-42) G33A	+++	++	

【配列表】

2017532289000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2015/065362

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2015/065362**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:

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:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/065362

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/18 C07K14/47 C07K7/08 A61K39/00
ADD.

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 A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 2007/062852 A2 (ABBOTT LAB [US]; ABBOTT GMBH & CO KG [DE]; BARGHORN STEFAN [DE]; EBERT) 7 June 2007 (2007-06-07) page 64 - page 66 page 71 page 73, line 7 - line 11 page 88 - page 89 examples 5-8</p> <p style="text-align: center;">----- -/-</p>	1-99

☒ 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 application or patent 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 2016

Date of mailing of the international search report

11/04/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Domingues, Helena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/065362

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/011947 A2 (ABBOTT LAB [US]; ABBOTT GMBH & CO KG [DE]; BARGHORN STEFAN [DE]; HILLE) 28 January 2010 (2010-01-28) page 3, line 38 - line 40; figure 1 page 5, line 23 - line 25; sequence 248 page 15 page 84 - page 85 page 87 - page 88 page 119, line 21 - line 33 claims 19-20; examples 3-5 -----	1-54, 78-99
Y	WO 2012/024187 A1 (ABBOTT LAB [US]; ABBOTT GMBH & CO KG [DE]; BARGHORN STEFAN [DE]; HILLE) 23 February 2012 (2012-02-23) page 33, line 24 - line 26 example 1; sequence 45 -----	1-99
X	WO 2011/130377 A2 (ABBOTT LAB [US]; BARGHORN STEFAN [DE]; HILLEN HEINZ [DE]; STRIEBINGER) 20 October 2011 (2011-10-20) sequence 32 page 2 - page 30 examples 1-3 -----	1-51, 78-99
Y	HEINZ HILLEN ET AL: "Generation and Therapeutic Efficacy of Highly Oligomer-Specific beta-Amyloid Antibodies", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, US, vol. 30, no. 31, 4 August 2010 (2010-08-04), pages 10369-10379, XP002650836, ISSN: 0270-6474, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5721-09.2010 the whole document -----	1-99

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/065362

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007062852 A2	07-06-2007	AU 2006319358 A1	07-06-2007
		BR P10619249 A2	20-09-2011
		CA 2628703 A1	07-06-2007
		CN 101432302 A	13-05-2009
		CR 9969 A	24-08-2009
		DK 1954718 T3	15-12-2014
		EC SP088462 A	30-06-2008
		EP 1954718 A2	13-08-2008
		EP 2289909 A1	02-03-2011
		ES 2524984 T3	16-12-2014
		ES 2527661 T3	28-01-2015
		GT 200800082 A	22-05-2009
		JP 5475994 B2	16-04-2014
		JP 2009517057 A	30-04-2009
		JP 2014040453 A	06-03-2014
		KR 20080090408 A	08-10-2008
		PT 1954718 E	16-12-2014
		PT 2289909 E	10-02-2015
		US 2009191190 A1	30-07-2009
		US 2014127191 A1	08-05-2014
		WO 2007062852 A2	07-06-2007
		ZA 200804346 A	29-04-2009
WO 2010011947 A2	28-01-2010	CA 2730804 A1	28-01-2010
		CN 102203124 A	28-09-2011
		EP 2303920 A2	06-04-2011
		JP 2011529084 A	01-12-2011
		US 2011092445 A1	21-04-2011
		WO 2010011947 A2	28-01-2010
WO 2012024187 A1	23-02-2012	CA 2808187 A1	23-02-2012
		CN 103298833 A	11-09-2013
		EP 2603524 A1	19-06-2013
		JP 2013537424 A	03-10-2013
		US 2014227291 A1	14-08-2014
		US 2015368299 A1	24-12-2015
		WO 2012024187 A1	23-02-2012
WO 2011130377 A2	20-10-2011	AR 080914 A1	16-05-2012
		CA 2796339 A1	20-10-2011
		CN 102933601 A	13-02-2013
		CN 104744591 A	01-07-2015
		EP 2558494 A2	20-02-2013
		JP 2013523182 A	17-06-2013
		US 2011256138 A1	20-10-2011
		US 2015218261 A1	06-08-2015
		WO 2011130377 A2	20-10-2011

International Application No. PCT/ EP2015/ 065362

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-99

Concerns aspects related to an immunogenic product comprising an amyloid A? amino acid sequence having 62.5% or higher identity to the amino acid sequence shown in claim 1 [Abeta(18-33); SEQ ID NO: 2] or 72% identity or higher identity to the amino acid sequence shown in claim 42 [Abeta(18-33); SEQ ID NO: 3], wherein the product is reactive with mAbs 7C6, 5F7 or 4D10 and is capable of eliciting a polyclonal serum which has no or low reactivity with PF-4.

2. claims: 100-103(partially)

Concerns aspects related to a molecule comprising an amino acid sequence identical to a portion (X-Y) of SEQ ID NO: 13 [Abeta(1-43)], with X being selected from the group consisting of the numbers 1 .. 18 and Y being selected from the group consisting of the numbers 33 .. 43; or a crosslinked derivative thereof, wherein at least 2 non-contiguous residues of the amino acid sequence are covalently linked with each other.

3-18. claims: 100-103(partially)

Each of these inventions concerns aspects related to a molecule comprising an amino acid sequence identical to a portion (X-Y) of each of the Abeta(1-43) sequences defined in claim 100, with the exception of SEQ ID NO: 13, with X being selected from the group consisting of the numbers 1 .. 18 and Y being selected from the group consisting of the numbers 33 .. 43; or a crosslinked derivative thereof, wherein at least 2 non-contiguous residues of the amino acid sequence are covalently linked with each other. Concretely, invention 3 concerns aspects related to SEQ ID NO: 14 and invention 18 concerns aspects related to SEQ ID NO: 30.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53		D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N	33/53		N
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08		
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K	7/08		
	C 0 7 K	16/18		

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

(72)発明者 ヒレン , ハイנטツ

ドイツ国、 6 7 0 6 1 ・ ルートウィヒスハーフェン、 クノルシュトラッセ ・ 5 0、 アッヴィ ・ ドイツ
チュラント ・ ゲー ・ エム ・ ベー ・ ハー ・ ウント ・ コー ・ カー ・ ゲー

(72)発明者 シュトリーピンガー ・ アンドレアス

ドイツ国、 6 7 0 6 1 ・ ルートウィヒスハーフェン、 クノルシュトラッセ ・ 5 0、 アッヴィ ・ ドイツ
チュラント ・ ゲー ・ エム ・ ベー ・ ハー ・ ウント ・ コー ・ カー ・ ゲー

(72)発明者 ギアイジ , ジモーネ

ドイツ国、 6 7 0 6 1 ・ ルートウィヒスハーフェン、 クノルシュトラッセ ・ 5 0、 アッヴィ ・ ドイツ
チュラント ・ ゲー ・ エム ・ ベー ・ ハー ・ ウント ・ コー ・ カー ・ ゲー

F ターム (参考) 4B064 AG26 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01

4C085 AA03 AA38 CC21 EE01 FF02 FF20

4H045 AA11 AA30 BA17 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50 FA10 FA16

FA74