

(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2014-513678

(P2014-513678A)

(43) 公表日 平成26年6月5日 (2014. 6. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	2 G O 4 5
C07K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 4
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
A61P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	4 H O 4 5
A61P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 O 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-504051 (P2014-504051)
 (86) (22) 出願日 平成24年4月6日 (2012. 4. 6)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年11月29日 (2013. 11. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/032635
 (87) 国際公開番号 W02012/139069
 (87) 国際公開日 平成24年10月11日 (2012. 10. 11)
 (31) 優先権主張番号 61/473, 107
 (32) 優先日 平成23年4月7日 (2011. 4. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513250798
 ネオトープ バイオサイエンス リミ
 テッド
 NEOTOPE BIOSCIENCES
 LIMITED
 アイルランド 1 ダブリン, 25-2
 8 ノース ウォール キー
 25-28 North Wall Quay,
 Dublin 1 (IE)
 (74) 代理人 110001139
 S K 特許業務法人
 (74) 代理人 100130328
 弁理士 奥野 彰彦
 (74) 代理人 100130672
 弁理士 伊藤 寛之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IC3B沈着を伴うタンパク質凝集に関する疾患を治療するための組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体を提供する。これらの抗体は、この断片の毒性を減らして、断片の沈着物と関連した様々な疾患の治療及び予防における用途を発見するのに役立つ。

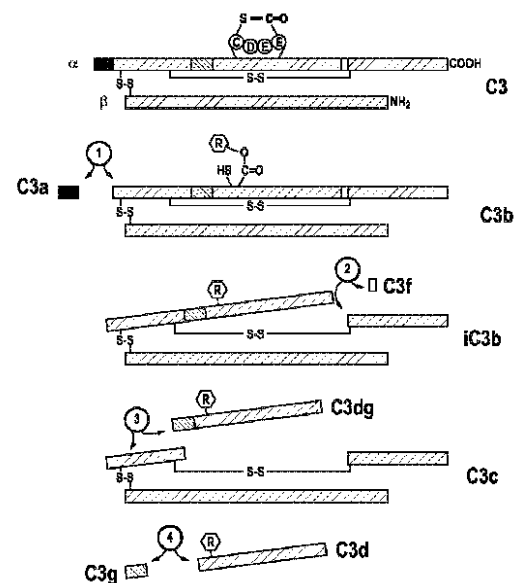


FIG. 2

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

C3bと比較してiC3bに優先的に結合する、キメラ、ヒト化、ベニヤ化又は単離されたヒト抗体。

【請求項 2】

請求項37-42のいずれかに記載の方法によって生産可能な抗体のキメラ、ヒト化又はベニヤ化形態である、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

モノクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。

【請求項 4】

配列番号:2中のiC3bのエピトープに結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 5】

配列番号:3中のiC3bのエピトープに結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 6】

iC3bに存在する高次構造的エピトープに結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体は、アルツハイマー病を患っている対象の脳組織におけるアミロイド斑に結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体は、ドルーゼンに結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 9】

前記抗体は、アルツハイマー病を患っている対象の脳組織のアミロイド斑に結合する、請求項8に記載の抗体。

【請求項 10】

Fabフラグメント、単鎖Fv、又は、単ドメイン抗体である、請求項1から9のいずれかに記載の抗体。

【請求項 11】

アイソタイプは、ヒトIgG1である、請求項1から10のいずれかに記載の抗体。

【請求項 12】

定常領域に少なくとも一つの変異を有する、請求項1から11のいずれかに記載の抗体。

【請求項 13】

前記変異は、前記定常領域によって補体結合反応又は活性を低下させる、請求項12に記載の抗体。

【請求項 14】

EU番号付けによる位置241、264、265、270、296、297、322、329及び331の1又は複数に変異を有する、請求項13に記載の抗体。

【請求項 15】

位置318、320及び322にアラニンを有する、請求項14に記載の抗体。

【請求項 16】

前記アイソタイプは、ヒトIgG2又はIgG4アイソタイプである、請求項1から10のいずれかに記載の抗体。

【請求項 17】

前記抗体は、非ヒトiC3bと交差反応する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 18】

前記抗体は、マウスiC3bと交差反応する、請求項17に記載の抗体。

【請求項 19】

前記抗体は、マウス抗体のヒト化バージョンであり、

前記マウス抗体は、表面プラズモン共鳴での測定によると、iC3bに対する K_D がC3と比較して少なくとも10倍低い、請求項1に記載の抗体。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

前記抗体は、マウス抗体のヒト化バージョンであり、

前記マウス抗体は、サンドイッチELISAでの測定によると、iC3bに対する K_D がC3b又はC3と比較して少なくとも2倍低い、請求項1に記載の抗体。

【請求項21】

前記抗体は、マウス抗体のヒト化バージョンであり、

前記マウス抗体は、免疫沈降での測定によると、iC3bに対する親和性がC3と比較して少なくとも5倍高い、請求項1に記載の抗体。

【請求項22】

前記抗体は、マウス抗体のヒト化バージョンであり、

前記マウス抗体は、免疫沈降での測定によると、iC3bに対する親和性がC3bと比較して少なくとも5倍高い、請求項1に記載の抗体。

10

【請求項23】

請求項1から22のいずれかに記載の抗体と医薬的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項24】

健常な個体と比較してiC3bの異常なレベル又は分布によって特徴づけられる疾患を治療する又は効果的に予防する方法であって、

iC3b凝集と関係がある疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、前記疾患を治療又は効果的に予防することを含む、方法。

20

【請求項25】

前記疾患は、慢性関節リウマチである、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記疾患は、全身性エリテマトーデスである、請求項24に記載の方法。

【請求項27】

前記疾患は、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)である、請求項24に記載の方法。

【請求項28】

前記疾患は、黄斑変性疾患である、請求項24に記載の方法。

【請求項29】

前記疾患は、補体関連性眼疾患である、請求項24に記載の方法。

30

【請求項30】

前記疾患は、加齢性黄斑変性症である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記疾患は、脈絡膜血管新生である、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

前記疾患は、ブドウ膜炎である、請求項29に記載の方法。

【請求項33】

前記疾患は、虚血関連性網膜症である、請求項29に記載の方法。

【請求項34】

前記疾患は、糖尿病性網膜症である、請求項33に記載の方法。

40

【請求項35】

前記疾患は、眼内炎である、請求項29に記載の方法。

【請求項36】

前記疾患は、糖尿病性黄斑浮腫、病的近視、フォンヒッペル-リンダウ病、目のヒストプラズマ症、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)、角膜新血管形成又は網膜新血管形成である、請求項29に記載の方法。

【請求項37】

前記疾患は、アルツハイマー病である、請求項24に記載の方法。

【請求項38】

ドルーゼン形成を阻害する方法であって、

50

ドルーゼン形成と関係がある疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、前記患者におけるドルーゼン形成を阻害することを含む、方法。

【請求項 39】

iC3b凝集を阻害する方法であって、

iC3b凝集と関係がある疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、前記患者におけるiC3b凝集を阻害することを含む、方法。

【請求項 40】

iC3bの無毒性高次構造を安定化させる方法であって、

iC3bと関係がある疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、iC3bの無毒性高次構造を安定化させることを含む、方法。

【請求項 41】

ドルーゼンを取り除く方法であって、

ドルーゼンを患っている患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、前記患者からドルーゼンを取り除くことを含む、方法。

【請求項 42】

iC3bを取り除く方法であって、

異常に高いiC3bレベルを患っている患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、前記患者からiC3bを取り除くことを含む、方法。

【請求項 43】

前記疾患は、加齢性黄斑変性症である、請求項42に記載の方法。

【請求項 44】

前記疾患は、アルツハイマー病である、請求項42に記載の方法。

【請求項 45】

iC3bと関係がある疾患を治療し効果的に予防する方法であって、

前記疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、前記疾患を治療又は効果的に予防することを含む、方法。

【請求項 46】

前記抗体は、請求項1から14のいずれかにおいて規定された抗体である、請求項45に記載の方法。

【請求項 47】

前記患者は、ApoE2保因者である、請求項45に記載の方法。

【請求項 48】

加齢性黄斑変性症を治療し効果的に予防する方法であって、

前記疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3と比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この疾患を治療又は効果的に予防することを含む、方法。

【請求項 49】

アルツハイマー病を治療し効果的に予防する方法であって、

前記疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、前記疾患を治療又は効果的に予防することを含み、

前記抗体は、AD脳の免疫組織化学的な分析において斑を染色する、方法。

【請求項 50】

アルツハイマー病患者のアミロイド斑を縮小させる方法であって、

10

20

30

40

50

前記疾患を患っている患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この疾患を治療又は効果的に予防することを含み、

前記抗体、AD脳の免疫組織化学的な分析において斑を染色する、方法。

【請求項 5 1】

前記投与計画は、局所的に、静脈内に、硝子体内に、経口的に、皮下に、動脈内に、頭蓋内に、クモ膜下腔内に、腹膜内に、鼻腔内に、又は、筋肉内に施される、請求項24から50のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 2】

前記投与計画は、硝子体内に施される、請求項24から50のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 5 3】

前記抗体は、ピアコアアッセイにおいて、iC3bに対する K_D がC3bより少なくとも10倍低い、請求項24から50のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 4】

前記抗体は、前記iC3bが抗体を介してプレートに間接的に固定されている免疫学的測定法において、iC3bに対する K_D がC3bよりも少なくとも2倍低い、請求項24から50のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 5】

C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する方法であって、
実質的に完全なiC3bで哺乳動物を免疫化して、抗体を生産しているB細胞を単離する工程と、

20

前記単離されたB細胞から不死化細胞株を形成する工程と、

C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する細胞株を同定するために前記細胞株をスクリーニングする工程と、を含み、

前記スクリーニングは、前記iC3bが抗体を介してプレートに間接的に固定されている免疫学的測定法によって実行される、方法。

【請求項 5 6】

前記哺乳動物は、齧歯類である、請求項55に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記哺乳動物は、マウスである、請求項56に記載の方法。

30

【請求項 5 8】

前記スクリーニングは、ピアコアアッセイによって実行される、請求項55に記載の方法。

【請求項 5 9】

C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する方法であって、
実質的に完全なiC3bで非ヒト動物を免疫化して、抗体を生産しているB細胞を単離する工程と、

前記単離されたB細胞から不死化細胞株を形成する工程と、

C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する細胞株を同定するために前記細胞株をスクリーニングする工程と、

40

ヒト化、キメラ、ベニヤ化形態の前記抗体を生産する工程と、を含む、方法。

【請求項 6 0】

C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する方法であって、
実質的に完全なiC3bでヒト免疫系遺伝子をもつ非ヒト動物又はヒトを免疫化して、抗体を生産しているB細胞を単離する工程と、

前記単離されたB細胞から不死化細胞株を形成する工程と、

C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する細胞株を同定するために前記細胞株をスクリーニングする工程と、を含む、方法。

【請求項 6 1】

iC3b沈着が生じるように処理された非ヒト動物にモノクローナル抗体を投与する工程と

50

、

前記モノクローナル抗体がiC3b沈着又はかかる沈着と関連した疾患の結果として生じる兆候又は症状を阻害するか、低減させるか又は遅らせるどうかを決定して、iC3bと関連した疾患に対して活性をもつモノクローナル抗体を同定する工程と、を更に含む、請求項55から60のいずれかに記載の方法。

【請求項62】

アルツハイマー病の特徴が生じるように処理されたトランスジェニック非ヒト動物にモノクローナル抗体を投与する工程と、

前記モノクローナル抗体がコントロールのトランスジェニック非ヒト動物と比較して前記特徴の進行の程度又は速度に影響を及ぼすかどうかを決定して、アルツハイマー病に対して活性を有するモノクローナル抗体を同定する工程と、を更に含む、請求項55から60のいずれかに記載の方法。

10

【請求項63】

アミロイド斑が生じるように処理された非ヒト動物にモノクローナル抗体を投与する工程と、

前記モノクローナル抗体がアミロイド斑の沈着又はかかるアミロイド斑と関連した疾患の結果として生じる兆候又は症状を阻害するか、低減させるか又は遅らせるどうかを決定して、アミロイド斑を低減させる活性をもつモノクローナル抗体を同定するステップと、を更に含む、請求項55から60のいずれかに記載の方法。

20

【請求項64】

iC3bと関連した疾患に対して活性をもつ薬剤のスクリーニングする方法であって、

iC3b沈着が生じるように処理された非ヒト動物に前記薬剤を投与する工程と、

前記薬剤がiC3b沈着又はかかる沈着と関連した疾患の結果として生じる兆候又は症状を阻害するか、低減させるか又は遅らせるどうかを決定する工程と、を含み、

前記薬剤は、

(i) C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体、又は、

(ii) かかる抗体を誘導する薬剤である、方法。

【請求項65】

アルツハイマー病に対して活性を有する薬剤をスクリーニングする方法であって、

アルツハイマー病の特徴を生じるように処理されたトランスジェニック非ヒト動物に薬剤を投与する工程と、

30

前記薬剤がコントロールのトランスジェニック非ヒト動物と比較してこの特徴の進行の程度又は速度に影響を及ぼすかどうかを決定する工程と、を含み、

前記薬剤は、

(i) C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体、又は、

(ii) かかる抗体を誘導する薬剤である、方法。

【請求項66】

アルツハイマー病に対して活性をもつ薬剤をスクリーニングする方法であって、

アミロイド斑を生じるように処理された非ヒト動物に薬剤を投与する工程と、

前記薬剤がアミロイド斑の沈着又はかかるアミロイド斑と関連した疾患の結果として生じる兆候又は症状を阻害するか、低減させるか又は遅らせるかどうかを決定する工程と、を含み、

40

前記薬剤は、

(i) C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体、又は、

(ii) かかる抗体を誘導する薬剤である、方法。

【請求項67】

患者におけるドルーゼンの沈着レベルを決定する方法であって、

C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体を投与する工程と、

前記患者において結合した抗体の存在を検出する工程と、を含む、方法。

【請求項68】

50

前記結合した抗体の存在は、ポジトロン放射形断層撮影によって決定される、請求項67に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願についてのクロス・リファレンス]

この出願は、2011年4月7日に出願の米国仮特許出願第61/473,107号の優先権を主張するものであり、この仮特許出願は、全ての目的のために完全に引用することによって組込まれている。

【0002】

配列表に対する参照

ファイルSequence_Listing_for_057450-417337.txtに記載されている配列表は、24,425バイトであり、2012年4月6日に作成されたものである。このファイルに含まれる情報は、引用によって本願に組込まれている。

【0003】

発明の背景

補体は、35個を超えるプラズマ又は膜蛋白質を含む抗菌防御及び免疫の補助システムである。補体は、タンパク分解過程のカスケードによって主に活性化される。3つの補体活性化経路(古典経路、レクチン経路及び副経路)は、すべて、C3a及びC3b断片へと切断する補体タンパク質C3の活性化を導く。

【0004】

古典補体活性化経路は、病原体表面に抗体が結合することから始まり、次にC1q補体成分が結合する。これによって、C3をその活性形態であるC3bへと最終的に切断させる、血清補体タンパク質に関するセリンプロテアーゼ触媒カスケードが誘導される。レクチン経路は、レクチンタンパク質によって糖質モチーフの認識を経て活性化する。副経路は、内部C3エステルと病原体表面上の認識モチーフとの直接反応によって補体を活性化する。

【0005】

C3は、アルファ鎖及びベータ鎖のヘテロダイマーであり、これらは、2つの鎖のN末端領域の間に形成されるジスルフィド結合によって互いを保持している。他のジスルフィド結合は、アルファ鎖のC末端領域とN末端領域との間に存在する。アルファ鎖には、互いに3つ離れた位置にあるシステインとグルタミン残基との間にチオエステルが含まれる。このチオエステルによって、活性化に依存して共有結合が形成されることが可能になる。C3コンベルターゼによってC3が活性化されることによって、C3a及びC3bが産生される。C3bは、その高次構造を変えて内部チオエステル結合を露出させ、近くの求核性物質(アクセプター分子)に結合する。これが、補体媒介オプソニン作用、即ち、病原体を(例えば、マクロファージによる)貪食の対象にすることの最初のステップである。C3bは自己増幅する能力を有し、プラズマ中の循環レベルは厳重な制御下にある。C3bの切断及びそれに伴う不活性化は、I因子及び補因子によってなされ、その結果、iC3bが産生される。iC3bは、通常、I因子及びCR1によって更に分解される。C3に対するC3bの比較から、この分子が各タンパク質分解による主要な高次構造の再配置を受けて、内部チオエステル結合だけでなく、細胞受容体と相互作用することができる更なる新規の分子表面も露出させることが示される。

【0006】

身体における不必要な補体の活性化を防止するために、多くの哺乳動物細胞は宿主細胞での補体増殖を遮断する制御因子を備えている。これらの内因性制御因子がないと、活性化補体タンパク質の発生が炎症及び組織損傷を促進してしまう。したがって、内因性補体制御因子を欠いている非細胞性表面は、特に補体攻撃を受けやすく、血清中の可溶性補体制御因子による防御に完全に依存している。無秩序な補体の活性化は、様々な慢性炎症性疾患及び変性疾患に関係している。補体分裂産物であるC3a及びC5aは、C3a及びC5a受容体を経た好中球及び炎症性マクロファージの活性化因子及び化学誘引物質として機能し、こ

10

20

30

40

50

の炎症カスケードにおける主要なものである。補体の活性化は、免疫複合体媒介疾患における慢性炎(例えば膜-増殖性糸球体腎炎、腎毒性腎炎及び関節炎)を引き起こし得る重要な成分であることが示されている。

【0007】

AMDは高齢者の失明の主な原因であり、世界で30,000,000~50,000,000人の初老の人々に及んでいる。遺伝子関連研究により、H因子、B因子及びC3の多型とAMDが関連付けられている。補体の活性化に関する副経路の制御欠如が、AMDにおける2つの主要な臨床型(湿潤(滲出性)型及び乾燥型)の主要な原因として仮定されている。湿潤型AMDは、一般的ではない型(全AMDケースの10-20%)であり、網膜における網膜色素上皮細胞層の絨毛膜様新血管形成によって特徴づけられる。

10

【0008】

AMDは、ドルーゼンとして知られている細胞外リポタンパク沈着によって特徴づけられる障害である。ドルーゼンは、網膜色素上皮細胞の基底面とブルック膜と呼ばれる基底膜複合体との間における目の組織に形成され、変質したRPE細胞及びプラズマ成分由来のリポフスチン(lipofuscin)色素が含まれている。リポフスチンに沈着している補体タンパク質は、ドルーゼンの構成要素の一つであり、変質した網膜色素上皮細胞及びAペプチドを起源とする(Johnson, Leitner et al. 2002; Dentchev, Milam et al. 2003; Yoshida, Ohno-Matsui et al. 2005; Luibl, Isas et al. 2006)。ドルーゼンは、C3断片及び他の補体タンパク質(例えば、iC3b、H因子及び膜侵襲複合体C5b-C9)に免疫反応性がある。

20

【0009】

発明の要約

本発明は、C3bと比較してiC3bに優先的に結合するキメラ、ヒト化、ベニヤ化又は単離されたヒト抗体を提供するものである。この抗体は、本発明の方法によって生産可能な抗体のキメラ、ヒト化、ベニヤ化形態であってもよい。この抗体は、モノクローナル抗体であってもよい。この抗体は、配列番号:2中のiC3bのエピトープに結合してもよい。この抗体は、配列番号:3中のiC3bのエピトープに結合してもよい。この抗体は、iC3bに存在する高次構造的エピトープに結合してもよい。この抗体は、アルツハイマー病を患っている対象の脳組織のアミロイド斑に結合してもよい。この抗体は、ドルーゼンに結合してもよい。この抗体は、アルツハイマー病を患っている患者の脳組織のアミロイド斑に結合してもよい。この抗体は、Fabフラグメント、単鎖Fv又は単一ドメイン抗体であってもよい。アイソタイプは、ヒトIgG1であってもよい。

30

【0010】

この抗体は、定常領域に少なくとも一つの変異を有してもよい。この変異は、定常領域によって補体結合反応又は活性を低下させてもよい。この変異は、EU番号付けによる位置241、264、265、270、296、297、322、329及び331の1又は複数(例えば位置318、320及び322)にあってもよい。アイソタイプは、ヒトIgG2又はIgG4アイソタイプであってもよい。

【0011】

この抗体は、非ヒトiC3b(例えば、マウスiC3b)と交差反応してもよい。

【0012】

この抗体は、マウス抗体のヒト化バージョンであり、マウス抗体は、表面プラズモン共鳴での測定によると、iC3bに対する K_D がC3と比較して少なくとも10倍低くてもよい。この抗体は、マウス抗体のヒト化バージョンであり、マウス抗体は、サンドイッチELISAでの測定によると、iC3bに対する K_D がC3b又はC3と比較して少なくとも2倍低くてもよい。この抗体は、マウス抗体のヒト化バージョンであり、マウス抗体は、免疫沈降での測定によると、iC3bに対する親和性がC3と比較して少なくとも5倍高くてもよい。この抗体は、マウス抗体のヒト化バージョンであり、マウス抗体は、免疫沈降での測定によると、iC3bに対する親和性がC3bと比較して少なくとも5倍高くてもよい。

40

【0013】

本発明は、上記抗体のいずれか及び医薬的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物を更に提供するものである。

50

【 0 0 1 4 】

本発明は、健常な個体と比較してiC3bの異常なレベル又は分布によって特徴づけられる疾患を治療する又は効果的に予防する方法を更に提供するものである。この方法は、iC3b凝集と関係がある疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この疾患を治療又は効果的に予防することを含む。疾患は、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、黄斑変性疾患、補体関連性眼疾患、加齢性黄斑変性症、脈絡膜血管新生、ブドウ膜炎、虚血関連性網膜症、糖尿病性網膜症、眼内炎、糖尿病性黄斑浮腫、病的近視、フォンヒッペル-リンダウ病、目のヒストプラスマ症、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)、角膜新血管形成、網膜新血管形成又はアルツハイマー病であつてもよい。

【 0 0 1 5 】

本発明は、ドルーゼン形成と関係がある疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この患者におけるドルーゼン形成を阻害することを含む、ドルーゼン形成を阻害する方法を更に提供するものである。

【 0 0 1 6 】

本発明は、iC3b凝集と関係がある疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この患者におけるiC3b凝集を阻害することを含む、iC3b凝集を阻害する方法を更に提供するものである。

【 0 0 1 7 】

本発明は、iC3bと関係がある疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、iC3bの無毒性高次構造を安定化させることを含む、iC3bの無毒性高次構造を安定化させる方法を更に提供するものである。

【 0 0 1 8 】

本発明は、ドルーゼンを患っている患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この患者からドルーゼンを取り除くことを含む、ドルーゼンを取り除く方法を更に提供するものである。

【 0 0 1 9 】

本発明は、異常に高いiC3bレベルを患っている患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この患者からiC3bを取り除くことを含む、iC3bを取り除く方法を更に提供するものである。この疾患は、加齢性黄斑変性症又はアルツハイマー病であつてもよい。

【 0 0 2 0 】

本発明は、iC3bと関係がある疾患を治療し効果的に予防する方法であつて、この疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この疾患を治療又は効果的に予防することを含む、方法を更に提供するものである。この抗体は、上述又は他の場所で述べた任意の抗体であつてもよい。ある方法において、この患者は、ApoE2保因者である。

【 0 0 2 1 】

本発明は、加齢性黄斑変性症を治療し効果的に予防する方法であつて、この疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3と比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この疾患を治療又は効果的に予防することを含む、方法を更に提供するものである。

【 0 0 2 2 】

本発明は、アルツハイマー病を治療し効果的に予防する方法であつて、この疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体

又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この疾患を治療又は効果的に予防することを含む、方法を更に提供するものである。この抗体は、AD脳の免疫組織化学的な分析において斑を染色する抗体であってもよい。

【0023】

本発明は、更に、アルツハイマー病患者のアミロイド斑を縮小させる方法であって、この疾患を患っている患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この疾患を治療又は効果的に予防することを含む、方法を更に提供するものである。この抗体は、AD脳の免疫組織化学的な分析において斑を染色する抗体であってもよい。

【0024】

ある方法において、投与計画は、局所的に、静脈内に、硝子体内に、経口的に、皮下に、動脈内に、頭蓋内に、クモ膜下腔内に、腹膜内に、鼻腔内に、又は、筋肉内に施される。ある方法において、投与計画は、硝子体内に施される。ある方法において、抗体は、ピアコアアッセイにおいて、iC3bに対する K_D がC3bよりも少なくとも10倍低い。ある方法において、抗体は、iC3bが抗体を介してプレートに間接的に固定されている免疫学的測定法において、iC3bに対する K_D がC3bよりも少なくとも2倍低い。

【0025】

本発明は、C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する方法を更に提供するものである。この方法は、実質的に完全なiC3bで哺乳動物を免疫化して、抗体を生産しているB細胞を単離する工程と、単離されたB細胞から不死化細胞株を形成する工程と、C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する細胞株を同定するために細胞株をスクリーニングする工程と、を含む。このスクリーニングは、iC3bが抗体を介してプレートに間接的に固定されている免疫学的測定法によって実行することができる。ある方法において、哺乳動物は、齧歯類(例えば、マウス)である。ある方法において、スクリーニングは、ピアコアアッセイによって実行される。本発明は、C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する方法を更に提供するものである。この方法は、実質的に完全なiC3bで非ヒト動物を免疫化して、抗体を生産しているB細胞を単離する工程と、単離されたB細胞から不死化細胞株を形成する工程と、C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する細胞株を同定するために細胞株をスクリーニングする工程と、ヒト化、キメラ、ベニヤ化形態の抗体を生産する工程と、を含む。本発明は、C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する方法を更に提供するものである。この方法は、実質的に完全なiC3bでヒト免疫系遺伝子をもつ非ヒト動物又はヒトを免疫化して、抗体を生産しているB細胞を単離する工程と、単離されたB細胞から不死化細胞株を形成する工程と、C3bよりもiC3bに優先的に結合するモノクローナル抗体を生産する細胞株を同定するために細胞株をスクリーニングする工程と、を含む。

【0026】

ある方法は、iC3b沈着が生じるように処理された非ヒト動物にモノクローナル抗体を投与する工程と、モノクローナル抗体がiC3b沈着又はかかる沈着に関連した疾患の結果として生じる兆候又は症状を阻害するか、低減させるか又は遅らせるどうかを決定して、iC3bと関連した疾患に対して活性をもつモノクローナル抗体を同定する工程と、を更に含む。ある方法は、アルツハイマー病の特徴が生じるように処理されたトランスジェニック非ヒト動物にモノクローナル抗体を投与する工程と、モノクローナル抗体がコントロールのトランスジェニック非ヒト動物と比較してこの特徴の進行の程度又は速度に影響を及ぼすかどうかを決定して、アルツハイマー病に対して活性を有するモノクローナル抗体を同定する工程と、を更に含む。ある方法は、アミロイド斑が生じるように処理された非ヒト動物にモノクローナル抗体を投与する工程と、モノクローナル抗体がアミロイド斑の沈着又はかかるアミロイド斑と関連した疾患の結果として生じる兆候又は症状を阻害するか、低減させるか又は遅らせるどうかを決定して、アミロイド斑を低減させる活性をもつモノクローナル抗体を同定する工程と、を更に含む。

【0027】

本発明は、iC3bと関連した疾患に対して活性をもつ薬剤のスクリーニングする方法を更に提供するものである。この方法は、iC3b沈着が生じるように処理された非ヒト動物に薬剤を投与する工程と、この薬剤がiC3b沈着又はかかる沈着と関連した疾患の結果として生じる兆候又は症状を阻害するか、低減させるか又は遅らせるどうかを決定する工程と、を含む。本発明は、アルツハイマー病に対して活性を有する薬剤をスクリーニングする方法を更に提供するものである。この方法は、アルツハイマー病の特徴を生じるように処理されたトランスジェニック非ヒト動物に薬剤を投与する工程と、この薬剤がコントロールのトランスジェニック非ヒト動物と比較してこの特徴の進行の程度又は速度に影響を及ぼすかどうかを決定する工程と、を含む。本発明は、アルツハイマー病に対して活性をもつ薬剤をスクリーニングする方法を更に提供するものである。この方法は、アミロイド斑を生じるように処理された非ヒト動物に薬剤を投与する工程と、薬剤がアミロイド斑の沈着又はかかるアミロイド斑と関連した疾患の結果として生じる兆候又は症状を阻害するか、低減させるか又は遅らせるかどうかを決定する工程と、を含む。この薬剤は、(i) C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体、又は、(ii) かかる抗体を誘導する薬剤、であって

10

20

30

40

50

【0028】

本発明は、患者におけるドルーゼンの沈着レベルを決定する方法を更に提供するものである。この方法は、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体を投与する工程と、患者において結合した抗体の存在を検出する工程と、を含む。結合した抗体の存在は、ポジトロン放射断層撮影によって決定することができる。

【0029】

本発明は、C3bと比較してiC3bに優先的に結合するキメラ、ヒト化、ベニヤ化、又は単離されたヒト抗体を提供するものである。この抗体は、モノクローナル抗体であってもよい。この抗体は、iC3bのアルファ鎖のN末端断片のC末端(C3dのC末端と共通)におけるネオエピトープに結合してもよい。この抗体は、配列番号:2中のiC3bのエピトープに結合してもよい。この抗体は、配列番号:2の残基20を含むエピトープに結合してもよい。この抗体は、配列番号:2の残基20の遊離型カルボキシル基を含むエピトープに結合してもよい。この抗体は、iC3bのアルファ鎖のC末端断片のN末端におけるエピトープに結合してもよい。この抗体は、配列番号:3中のiC3bのエピトープに結合してもよい。この抗体は、配列番号:3の残基1を含むiC3bのエピトープに結合してもよい。この抗体は、配列番号:3の残基1の遊離型アミノ基を含むiC3bのエピトープに結合してもよい。この抗体は、Fabフラグメント、単鎖Fv又は単一ドメイン抗体であってもよい。アイソタイプは、ヒトIgG1であってもよい。この抗体は、定常領域に少なくとも一つの変異があってもよい。

【0030】

この変異は、定常領域による補体結合反応又は活性を低下させる。この変異は、EU番号付けによる位置241、264、265、270、296、297、322、329及び331の1又は複数(例えば位置318、320及び322)にあってもよい。アイソタイプは、ヒトIgG2又はIgG4アイソタイプであってもよい。

【0031】

本発明は、1又は複数の上述の抗体及び医薬的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物を更に提供するものである。この抗体は、iC3bのアルファ鎖のN末端断片のC末端においてエピトープに結合してもよい。この抗体は、iC3bのアルファ鎖のC末端断片のN末端においてエピトープに結合してもよい。

【0032】

本発明は、残基20を含む配列番号:2の3-10隣接残基又は残基1を含む配列番号:3の3-10残基を含む単離されたiC3b断片を更に提供するものである。単離された断片は、QLPSR又はSEETKからなるアミノ酸配列を有してもよい。この断片は、GGCリンカーに接続してアミノ酸配列CGGQLPSR又はSEETKGGCを形成してもよい。単離された断片は、任意に、断片に対する抗体の誘導を補助するスペーサーを介して担体分子に接続してもよい。

【0033】

本発明は、1又は複数の上記断片及びヒトへの投与に許容可能なアジュバントを含む医薬組成物を更に提供するものである。

【0034】

本発明は、iC3b凝集と関係がある疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この患者におけるiC3b凝集を阻害することを含む、ドルーゼンの凝集を阻害する方法を更に提供するものである。

【0035】

本発明は、iC3bと関係がある疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、iC3bの無毒性高次構造を安定化させることを含む、iC3bの無毒性高次構造を安定化させる方法を更に提供するものである。

10

【0036】

本発明は、ドルーゼンを患っている患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この患者からドルーゼンを取り除くことを含む、ドルーゼンを取り除く方法を更に提供するものである。本発明は、異常に高いiC3bレベルを患っている患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この患者からiC3bを取り除くことを含む、iC3bを取り除く方法を更に提供するものである。

【0037】

20

本発明は、iC3bと関係がある疾患を治療又は効果的に予防する方法であって、この疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この疾患を治療又は効果的に予防することを含む、方法を更に提供するものである。この抗体又は薬剤は、上述又は他の場所で述べた任意の抗体又は薬剤であってもよい。ある方法において、この患者は、ApoE2保因者である。

【0038】

本発明は、加齢性黄斑変性症を治療又は効果的に予防する方法であって、この疾患を患っている又はそのリスクがある患者に対して、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤の効果的な投与計画を施して、この疾患を治療又は効果的に予防することを含む、方法を更に提供するものである。

30

【0039】

本発明は、iC3bと関連した疾患に対して活性をもつ薬剤のスクリーニングをする方法であって、iC3b沈着が生じるように処理された非ヒト動物に薬剤を投与する工程と、この薬剤がiC3b沈着又はかかる沈着と関連した疾患の結果として生じる兆候又は症状を阻害するか、低減させるか又は遅らせるどうかを決定する工程と、を含み、この薬剤は、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導する薬剤である、方法を更に提供するものである。

【0040】

本発明は、iC3bと比較してC3bに優先的に結合する抗体を投与する工程と、患者において結合した抗体の存在を検出する工程と、を含む、患者におけるドルーゼンの沈着レベルを決定する方法を更に提供するものである。結合した抗体の存在は、ポジトロン放射断層撮影によって決定されてもよい。

40

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】図1は、ヒトC3タンパク質の前駆体の配列を示す。iC3bに存在するアルファ鎖のN末端及びC末端断片並びにベータ鎖には、下線が引かれている。

【0042】

【図2】図2は、C3からiC3bへのタンパク質の分解ステップを示す。CysとGluとの間に形成されるチオエステル結合(太線)は、ネイティブC3に示される(チオエステル領域のアミ

50

ノ酸は、円で囲まれている)。 (1) C3コンベルターゼによるネイティブC3の活性化によって、C3aと、アクセプターRに(ここでは、エステル結合を介して)結合したC3bが生じる。(2) I因子及び補因子によるC3b不活性化。(3) iC3bは、I因子及びCR1によって更に分解される。(4) アクセプター結合C3dgは、非特異的プラズマプロテアーゼによってトリミングされてC3dになる。

【 0 0 4 3 】

【図 3】図3は、サンドイッチELISAアッセイにおける、iC3b、C3b及びC3に対する抗体A209の相対的な結合性を示す。

【 0 0 4 4 】

【図 4】図4は、サンドイッチELISAアッセイにおける、iC3b、C3b及びC3に対する抗体2H8、2A10及び6G1の相対的な結合性を示す。 10

【図 5】図5は、サンドイッチELISAアッセイにおける、iC3b、C3b及びC3に対する抗体5D2の相対的な結合性を示す。

【 0 0 4 5 】

【図 6】図6Aは、抗体1A2、2A10、2H8及び6G1を用いたC3及びiC3bの両方の免疫共沈降のゲルを示すものであり、Abnovaラビットポリクローナル抗体を用いて検出した。図6Bは、抗体5D2を用いたC3及びiC3bの両方の免疫共沈降のゲルを示すものであり、コントロールとして、0.4 μ gのiC3b、C3b及びC3を別々のレーンに存在させ、図6Aと同じ抗体を用いて検出した。図6Cは、図6Aと同じ抗体を用いて検出したiC3b、C3b及びC3のウェスタンを示す。 20

【 0 0 4 6 】

【図 7】図7は、プロテインG-セファロースを用いて、抗体2A10、2H8又は6G1を用いたC3b又はiC3bの免疫沈降を示す。

【 0 0 4 7 】

【図 8】図8は、プロテインG磁気ビーズを用いて、抗体2A10、2H8又は6G1を用いたC3b又はiC3bの免疫沈降を示す。

【 0 0 4 8 】

【図 9】図9は、アルツハイマー病を患っている男性由来の脳組織におけるiC3b抗体の免疫組織化学的特性評価を示す。

【 0 0 4 9 】

【図 10】図10は、アルツハイマー病を患っている男性由来の脳組織に対する、様々な濃度の抗体6G1での免疫組織化学的染色を示す。 30

【 0 0 5 0 】

【図 11】図11は、アルツハイマー病を患っている男性由来の脳組織の免疫組織化学的染色の前に、iC3b、C3又はC3bタンパク質を用いて6G1を事前に吸着させた結果を示す。

【 0 0 5 1 】

【図 12】図12は、サンドイッチELISAアッセイにおける、マウスiC3bに対する5D2、2H8、2A10及び6G1の相対的な結合性を示す。

【 0 0 5 2 】

【図 13】図13Aは、10 μ g/mlの競合抗体(6G1、2H8、2A10、5D2、1A2又はMAB1-82814)の存在下又は非存在下で、ビオチン化抗体A209を用いてインキュベートしたiC3bのウェスタンを示す。図13B及び図13Cは、直接ELISAアッセイにおいて、競合抗体(6G1、2H8、2A10、5D2、1A2又はMAB1-82814)の存在下で、iC3bに対するビオチン化抗体A209の結合性を示す。 40

【 0 0 5 3 】

配列の簡単な説明

配列番号:1は、C3前駆体配列である。

【 0 0 5 4 】

配列番号:2は、ヒトiC3bにおけるアルファ鎖のN末端断片の最後の20アミノ酸である。

【 0 0 5 5 】

配列番号:3は、ヒトiC3bにおけるアルファ鎖のC末端断片の最初の20アミノ酸である。

【0056】

配列番号:4は、ヒトiC3bにおけるアルファ鎖のN末端断片である。

【0057】

配列番号:5は、ヒトiC3bにおけるアルファ鎖のC末端断片である。

【0058】

配列番号:6は、担体を免疫原に取り付けるためのトリペプチドリinkerである。

【0059】

配列番号:7は、マウスiC3bにおけるアルファ鎖のN末端断片の最後の20アミノ酸である

。

10

【0060】

配列番号:8は、マウスiC3bにおけるアルファ鎖のC末端断片の最初の20アミノ酸である

。

【0061】

配列番号:9は、C3前駆体配列(配列番号:1)のアミノ酸1293-1315の配列である。

【0062】

配列番号:10は、C3前駆体配列(配列番号:1)のアミノ酸1313-1328の配列である。

【0063】

配列番号:11は、C3前駆体配列(配列番号:1)のアミノ酸667から671の配列である。

【0064】

配列番号:12は、C3前駆体配列(配列番号:1)のアミノ酸1299-1303の配列である。

20

【0065】

配列番号:13は、C3前駆体配列(配列番号:1)のアミノ酸1321-1325の配列である。

【0066】

配列番号:14は、C3前駆体配列(配列番号:1)のアミノ酸1299-1303の配列である。

【0067】

配列番号:15は、C3前駆体配列(配列番号:1)のアミノ酸1321-1325の配列である。

【0068】

配列番号:16は、GGC-OHリンカーに結合したC3前駆体配列(配列番号:1)のアミノ酸1321-1325の配列である。

30

【0069】

定義

モノクローナル抗体及び他の治療薬剤は、単離された形態として典型的には提供される。これは、この薬剤は、天然の状態では一緒に存在している成分から少なくとも部分的に分離されているものであり、及び/又は、その産物又は精製物から生じるタンパク質及び他の巨大分子に対して純度が典型的には少なくとも50%w/wのものであるが、薬剤とその使用の促進を目的とする医薬的に許容可能な賦形剤の過剰量との組合せの可能性を排除しないことを意味する。時には、モノクローナル抗体は、産物又は精製物由来のタンパク質及び他の巨大分子に対して純度が少なくとも60%、70%、80%、90%、95%又は99%である。多くの場合、単離されたモノクローナル抗体又は他の治療薬剤は、その精製後に残る主要な高分子種である。単離されたモノクローナル抗体又は他の治療薬剤は、本質的に均質に精製されてもよい(すなわち、他のいかなる高分子種もゲル分析上に別々のバンドとして形成されないことを意味する)。

40

below

【0070】

本発明の抗体は、典型的には少なくとも 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 又は 10^{10} M^{-1} の会合定数(別名、親和定数)で、それらの所定の標的に結合する。かかる抗体のいくつかは、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 又は 10^{-10} M の K_D で、それらの標的に結合する。 K_D は、会合定数の逆数である。かかる結合性は、強度が検出可能に高く、そして少なくとも一つの無関係な標的に対して生じる非特異的結合と識別可能であるという点で特異的結合である。特異的結合は、特定

50

の機能的グループ間の結合の形成が特定の空間的適合(例えば、鍵と鍵穴型)の結果といえる一方で、非特異的結合は、通常ファンデルワールス力の結果である。しかしながら、特異的結合は、モノクローナル抗体が唯一の標的に結合することを必ずしも意味するわけではない。抗体が第二標的と比較して少なくとも2倍、5倍、10倍又はそれより大きな親和定数で第一標的に結合する場合、抗体は、他の標的と比較して1つの標的に優先的に結合することができる。これは、例えば、後述する方法によって決定できる。

【0071】

基本的な抗体構造単位は、サブユニットのテトラマーである。各テトラマーは、2つの同一ポリペプチド鎖対を含み、各対は、1つは「軽」鎖(約25kDa)であり、1つは「重」鎖(約50-70kDa)である。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識を主に担う、約100~110又はそれを超えるアミノ酸の可変領域を含む。この可変領域は、初めは切断可能なシグナルペプチドに連結して発現する。シグナルペプチドのない可変領域は、時に成熟可変領域と呼ばれる。従って、例えば、軽鎖成熟可変領域は、軽鎖シグナルペプチドのない軽鎖可変領域を意味する。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定する。定常領域は、CH1領域、ヒンジ領域、CH2領域及びCH3領域の一部又は全部を含むことができる。

【0072】

軽鎖は、カッパ又はラムダに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、ベータ又はイプシロンに分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEと規定される。軽鎖及び重鎖内において、可変及び定常領域は、約12又は12より多いアミノ酸のJ領域によって連結され、重鎖は、約10又は10より多いアミノ酸のD領域を含んでいる。(概略については、Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7を参照)(全ての目的のために完全に引用したものとする)。

【0073】

各軽鎖/重鎖対の成熟可変領域は、抗体結合部位を形成する。従って、完全な抗体は、2つの結合部位がある。二機能性抗体又は二重特異性抗体を除いて、2つの結合部位は、同じである。鎖のすべては、3つの超可変領域(相補性決定領域又はCDRとも呼ばれる)によって連結している比較的保存された複数のフレームワーク領域(FR)に関する同じ一般構造を示す。各対における2つの鎖由来のCDRは、フレームワーク領域によって整列配置され、特異的エピトープと結合することが可能になる。N末端からC末端にかけて、軽鎖及び重鎖の両方は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含む。N末端からC末端にかけて、軽鎖及び重鎖の両方は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含む。各ドメインに対するアミノ酸の割り当ては、カバット(Sequences of Proteins of Immunological Interest)による(National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)、又はコチアとレスク(J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));コチア外(Nature 342:878-883 (1989))の定義に従う。カバットは、広く使われている番号付け規則(カバット番号付け)も提供する。これは、異なる重鎖間又は異なる軽鎖間で対応する残基には、同じ番号を割り当てるものである。

【0074】

「抗体」という用語には、完全な抗体及びその結合性断片が含まれる。典型的には、断片は、完全な抗体と競合するものであり、標的に対して特異的に結合する抗体を由来とする。断片には、分離した重鎖、軽鎖 Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)_c, Fv及び単一ドメイン抗体が含まれる。単一(可変)ドメイン抗体は、VH領域がVL領域と関連していない種(例えば、ラクダ科又は軟骨魚類(例: テンジクザメ))由来のVH領域(時には、VHHとして知られているもの)も、従来の抗体におけるVLパートナーから分離されたVH領域(又は、その逆)(Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546)も含む(例えば、WO 9404678を参照)。元来のパートナーから分離された1つの鎖である単一ドメイン抗体は、時にDabsとして知られている。そして、ラクダ科(Camelidae)又は軟骨魚類由来の単一ドメイン抗体は、時にナノボディ(nanobody)として知られている。定常領域又は定常領域の一部は、単一ドメイン抗

体に存在しても存在しなくてもよい。例えば、ラクダ科由来の天然単一可変ドメイン抗体は、VHH可変領域並びにCH2及びCH3定常領域を含む。単一ドメイン抗体は、従来の抗体に対する手法と類似した手法によるヒト化の対象となり得る。Dabs型の抗体は、通常、ヒト起源の抗体から得られる。ナノボディ型の抗体は、ラクダ科又はサメ起源であり、ヒト化の対象となり得る。断片は、組換えDNA技術又は完全な免疫グロブリンの酵素的若しくは化学的分離によって生産することができる。単一の特異的抗体と同様に、「抗体」という用語は二重特異性抗体も含む。二重特異性抗体又は二機能性抗体は、2つの異なる重鎖/軽鎖対及び2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である(例えば、Songsivili and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148: 1547-53 (1992)を参照)。

10

【0075】

「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原上の部位をいう。エピトープは、連続したアミノ酸か、1又は複数のタンパク質に関する三次フォールディングが近接して並んだ非連続アミノ酸から形成することができる。連続したアミノ酸から形成されたエピトープは、変性溶媒に曝露しても典型的には保持される一方で、三次フォールディングによって形成されるエピトープは、変性溶媒処理により典型的には消失する。エピトープは、固有の空間的高次構造において、少なくとも3つ、より通常は少なくとも5つ又は8-10のアミノ酸を典型的には含む。エピトープの空間的高次構造を決定する方法には、例えば、X線結晶及び二次元NMRが含まれる。Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)を参照。「ネオエピトープ」は、前駆状態と比較してある程度の修飾(例えば、切断、共有結合修飾(例えば、リン酸エステル化)又は構造変化)だけでアクセス可能になるエピトープである。

20

【0076】

同一か重複するエピトープを認識する抗体は、標的抗原に対してある抗体の能力が他の抗体の結合性と競合することを明らかにする単純なイムノアッセイにて特定することができる。抗体のエピトープは、その抗原に結合した抗体のX線結晶解析で規定して接触残基を特定することができる。あるいは、ある抗体の結合性を低下させるか失わせる抗原のアミノ酸変異の全てが、別の抗体の結合性も低下させるか失わせる場合、2つの抗体は同じエピトープを有する。ある抗体の結合性を低下させるか失わせるアミノ酸変異のいくつか、別の抗体の結合性も低下させるか失わせる場合、2つの抗体は重複するエピトープを有する。

30

【0077】

抗体間の競合は、試験中の抗体が共通抗原に対する参照抗体の特異的な結合を阻害するアッセイによって決定される(例えば、Junghans et al, Cancer Res. 50:1495, 1990を参照)。競合結合アッセイでの測定により、過剰な試験抗体(例えば、少なくとも2x、5x、10x、20x又は100x)が参照抗体の結合性を少なくとも50%、好ましくは75%、90%又は99%阻害する場合、試験抗体は参照抗体と競合する。同様に、競合結合アッセイでの測定により、過剰な参照抗体(例えば、少なくとも2x、5x、10x、20x又は100x)が試験抗体の結合性を少なくとも50%、好ましくは75%、90%又は99%阻害する場合、参照抗体は試験抗体と競合する。競合アッセイによって同定される抗体(競合する抗体)には、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体と、参照抗体が結合するエピトープに充分近位の隣接エピトープに結合する抗体が含まれる。これは、立体障害が発生するためである。双方向競合(参照が試験と競合し、その逆でも競合する)は、一方向阻害(例えば、部分的に重複するか近接するエピトープ)よりエピトープ間の関係がより近いこと(例えば、同じか実質的に重複するエピトープ)を示す。

40

【0078】

「患者」という用語には、予防か治療処置を受けるヒト及び他の哺乳類被験体が含まれる。

【0079】

アミノ酸置換を保存的又は非保存的に分類する目的で、アミノ酸を以下のように分類し

50

てもよい：グループI(疎水性側鎖)：met、ala、val、leu、ile；グループII(中性の親水性側鎖)：cys、ser、thr；グループIII(酸性側鎖)：asp、glu；グループIV(塩基性側鎖)：asn、gln、his、lys、arg；グループV(鎖の立体構造に影響を及ぼす残基)：gly、pro；グループVI(芳香族側鎖)：trp、tyr、phe。保存的置換は、同じクラスにおけるアミノ酸間の置換に関するものである。非保存的置換は、これらのクラスの内の1つのメンバーをもう一方のメンバーと交換することから構成される。

【0080】

配列同一性のパーセンテージは、カバット番号付け規則によって最大限アライメントされた抗体配列によって決定される。アライメントの後、対象の抗体領域(例：重鎖又は軽鎖の全ての成熟可変領域)と、参照する抗体の同じ領域とを比較する場合、対象の抗体領域と参照する抗体領域との間における配列同一性のパーセントは、対象の抗体領域と参照する抗体領域の両方において同じアミノ酸によって占められる位置の数を、2つの領域においてアライメントされた位置の総数(ギャップは数に入れない)で割り、100を掛けることでパーセントに変換されるものである。

10

【0081】

「アジュバント」という用語は、抗原と共に投与すると抗原に対する免疫反応を増強及び/又は転換するが単独で投与すると抗原に対する免疫反応が生じない化合物をいう。アジュバントは、リンパ球動員、B及び/又はT細胞の刺激及びマクロファージの刺激を含むいくつかの機構によって、免疫反応を増やすことができる。

20

【0082】

対象が、危険因子のない個体よりも疾患を発病する危険性が統計的に有意に大きい危険因子を有する個体にしてしまう少なくとも一つの公知の危険-因子(例えば、遺伝的なもの、生化学的なもの、家族歴、環境性曝露)を有する場合、その個体は疾患の危険性が高い。

【0083】

「症状」という用語は、患者によって知覚される、疾患の主観的な根拠(例えば足取りの変化)を指す。「兆候」は、医師によって観察される疾患の客観的な根拠を指す。

【0084】

統計的有意差は、 $p < 0.05$ を意味する。

30

【0085】

発明の詳細な説明

I. 概要

本発明は、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体及びその抗体をを誘導する薬剤を提供するものである。これらの抗体は、iC3bの沈着と関連した疾患(例えばAMD又はAD)の兆候又は症状を低減するのに役立つ。機構の理解は本発明の実施に必要ではないが、抗体はかかる疾患の兆候及び/又は症状を低減させることができる。これは、この抗体が、iC3b(及び/又はその更なる分解産物(例えばC3d及びC3c))を除去することを促進する結果、又はiC3b又は更なる分解産物が相互凝集若しくは分子内凝集の阻害を促進したり、他の分子に対する結合の阻害を促進したりする結果、又は無毒性高次構造の安定化を促進する結果である。iC3b又はその更なる分解産物の除去は、貪食作用又は他の作用を介することができる、(例えば、血液において)沈着又はiC3bがない状態にすることができる。iC3bの除去は、iC3bが成分であるドルーゼンの既存の沈着を低減させる、及び/又は更なる沈着を阻害することができる。抗体はC3bよりもiC3bに優先的に結合するので、切り詰めたiC3bの毒性はC3bの免疫学的役割を容認できないレベルにまで低下させることなく阻害できる。

40

【0086】

iC3bに優先的に結合する抗体又はかかる抗体を誘導することができる薬剤は、AMD又はAD及びiC3bの存在と関連した他の疾患を治療又は効果的に予防する方法で使用するができる。

【0087】

II. C3前駆体、C3、C3a、C3b及びiC3b

50

C3、C3a、C3b及びiC3bは、C3前駆体のタンパク分解断片である。もしそれ以外に文脈から明らかでなければ、ポリペプチドのいずれかに対する参照はその天然のヒト形態を指す。C3前駆体タンパク質に関する例示的なヒト配列は、図1に再現したNCBI P01024.2又はGI:119370332である。(対応するSwiss Prot識別子は、P01024である)。この例示的な配列の天然ヒト変異体も含まれる。かかる22個の変異体は、Swiss-Protデータベースにリストされている。C3、C3a、C3b及びiC3bに関する例示的な配列は、図1に示されるC3前駆体の部分配列として見つけることができる。C3前駆体のアミノ酸1-22は、切断されるシグナルペプチドである。アミノ酸23-667は、ベータ鎖を形成する。ベータ鎖は、C3、C3b及びiC3bの各々に存在する。アミノ酸667~671(RRRR; 配列番号:11)は、C3へのC3前駆体処理において切断されるものであり、アルファ鎖とベータ鎖を分離している。残基672~1663は、C3のアルファ鎖を形成する。このアルファ鎖の残基672~748を切断してC3a断片(アナフィラトキシン)が形成される。C3のアルファ鎖の残部である残基749~1663は、C3bのアルファ鎖を形成する。iC3bへのC3bの変換の際に、C3bのアルファ鎖が切断されてN末端及びC末端断片並びに切断されたペプチドが生じる。N末端断片は残基1321~残基1663に、C末端断片は残基749~1303に及ぶ。iC3bには存在しない切断されたペプチド(C3f)は、残基1304~残基1320に及ぶ(Swiss Prot P01024の注釈)。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 8 】

iC3bへのC3の変換時におけるタンパク分解ステップは、図2に図示される。C3bは、ジスルフィド結合によって共に保持されるベータ鎖及びアルファ鎖を有する。iC3bは、血漿補体タンパク質の約0.5%を構成する。C3bに存在する完全なアルファ鎖の代わりにiC3bはジスルフィド結合によって共に保持される非隣接N及びC末端を含む点で、iC3bはC3bと異なる。iC3b及びC3bの種々の構造が、iC3bには存在するがC3bには存在しない少なくとも2つのネオエピトープを生じさせる。かかる一つのエピトープは、N末端断片のC末端(例えば、C3前駆体配列の位置1303のアルギニン残基)に生じる。参照を容易にするため、N末端断片の最後の20アミノ酸を再現して、配列番号:2を割り当てる(KDAPDHQELN LDVSLQLPSR)。このエピトープは、更なる分解産物C3dにも存在する(図2を参照)。他のエピトープは、C末端断片のN末端で生じる(この断片のN末端残基は、図2に示される例示的なC3前駆体配列の位置1321のSである)。C末端断片の最初の20アミノ酸を再現して、配列番号:3を割り当てる(SEETKENEGF TVTAEGKGQG)。このエピトープは、更なる分解産物C3cにも存在する(図2を参照)。

【 0 0 8 9 】

iC3bにおけるアルファ鎖のN末端断片は、以下の配列(配列番号:4)を有するARASHLGLARS NLDEDI IAEEN I VSRSEFPESWLWNVEDLKEPPKNG I STKLMN I FLKDS I TTWE I LAVSMSDDKKG I CVADPFEVTVMQDF FIDLRLPYSVVRNEQVE I RAVLYNYRQNLKVRVELLHNPFCSLATTKRRHQQT V I PPKSSLSVPYV I VPLKTGLQE VEVKAAVYHHF I SDGVRKSLKVVEG I RMNKTVAVRTLDPERLGREGVQKED I PPADLSDQVPDTESETR I LLQGTPVAQ MTEDAVDAERLKLH I VTPSGCGEQNM I GMTPTV I AVHYLDETEQWEKFGLEKRQGALEL I KKGYTQQLAFRQPSSAFAAF VKRAPSTWLTAYVVKVFSLAVNL I A I DSQVLCGAVKW I L E K Q K P D G V F Q E D A P V I H Q E M I G G L R N N N E K D M A L T A F V L I S L Q E A K D I C E E Q V N S L P G S I T K A G D F L E A N Y M N L Q R S Y T V A I A G Y A L A Q M G R L K G P L L N K F L T T A K D K N R W E D P G K Q L Y N V E A T S Y A L L A L L Q L K D F D F V P P V R W L N E Q R Y Y G G G Y G S T Q A T F M V F Q A L A Q Y Q K D A P D H Q E L N L D V S L Q L P S R

【 0 0 9 0 】

iC3bにおけるアルファ鎖のC末端断片は、以下の配列(配列番号:5)を有するSEETKENEGFT VTAEGKGQGTLSVVTMYHAKAKDQLTCNKFDLKV I K P A P E T E K R P Q D A K N T M I L E I C T R Y R G D Q D A T M S I L D I S M M T G F A P D T D D L K Q L A N G V D R Y I S K Y E L D K A F S D R N T L I I Y L D K V S H S E D D C L A F K V H Q Y F N V E L I Q P G A V K V Y A Y N L E E S C T R F Y H P E K E D G K L N K L C R D E L C R C A E E N C F I Q K S D D K V T L E E R L D K A C E P G V D Y V Y K T R L V K V Q L S N D F D E Y I M A I E Q T I K S G S D E V Q V G Q Q R T F I S P I K C R E A L K L E E K K H Y L M W G L S S D F W G E K P N L S Y I I G K D T W E H W P E E D E C Q D E E N Q K Q C Q D L G A F T E S M V V F G C P N (配列番号:5)

【 0 0 9 1 】

iC3bの断片は、時に最初と最後のアミノ酸の範囲(配列番号:2のアミノ酸15-20又は配列番号:3のアミノ酸1-5)を提供することによって示される。かかる範囲は、断片の始点と終点を規定するが、異種分子(例えば複合体を形成する担体分子)に結合する断片を排除する

ものではない。同様に、抗体結合特異性は、時にアミノ酸の範囲によって規定される。例えば、抗体が配列番号:1のアミノ酸15-20の範囲内のエピトープに結合すると述べられている場合、それが意味するところは、エピトープは詳述されたアミノ酸の範囲(外側の限度の範囲を規定するアミノ酸を含む)内にあるということである。それは、その範囲内のすべてのアミノ酸がエピトープの一部を構成することを必ずしも意味するものではない。したがって、例えば、配列番号:2のアミノ酸15-20の範囲内のエピトープは、アミノ酸15-20、16-19、17-18、17-20又は配列番号:2の他のセグメントをからなるものであってもよい。

【0092】

III. 抗体

A. 結合特異性及び機能特性

本発明は、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する抗体を提供するものである。この抗体は、モノクローナルであったりポリクローナルであったりしてもよい。優先的結合とは、抗体が、例えば、より高い会合定数、より高い結合速度(on-rate)及び/又はより低い解離速度(off rate)を有して、実験誤差以上に、C3bよりもiC3bと強く検出可能に結合することを意味する。ある抗体は、iC3bに対する親和定数がC3bよりも少なくとも2、5又は10倍高い。ある抗体は、iC3bに対する K_D がC3bよりも2倍~20倍低い。ある抗体は、例えばピアコアアッセイにおける表面プラズモン共鳴で(例えば、実施例の手法によって)測定されるように、iC3bに対する親和定数がC3又はC3bよりも少なくとも10倍高い又はiC3bに対する K_D がC3又はC3bよりも少なくとも10倍低い。ある抗体は、iC3bが抗体を介してプレートに間接的に固定されている免疫学的測定法(例:例えば実施例に記載されているサンドイッチELISAアッセイ)で測定すると、iC3bに対する親和定数がC3bよりも少なくとも2倍高い。ある抗体は、iC3bには結合し、C3bに対する任意の有意な結合性を欠いている(すなわち、C3bと無関係なコントロールタンパク質とを区別できない結合性を持つ)。C3bよりもiC3bに優先的に結合するある抗体は、iC3bアルファ鎖N末端断片及びC3dのC末端の遊離C末端(例えば、配列番号:2のC末端)に対して末端特異的である。かかる抗体は、遊離型の配列番号:2のC末端アミノ酸(即ち、C3bのケースがそうであるように任意の他のアミノ酸に結合していないカルボキシル基を有するもの)を含むエピトープを認識することができる。末端特異的抗体は、例えば、配列番号:2内又はその残基6-20、7-20、8-20、9-20、10-20、11-20、12-20、13-20、14-20、15-20、16-20、17-20又は18-20内のエピトープに結合することができる。かかるペプチドの例は、CGG-QLPSR(配列番号:14; CGGはリンカー)のアミノ酸配列を有する。

【0093】

C3bよりもiC3bに優先的に結合するある抗体は、iC3b又はC3cのアルファ鎖のC末端断片の遊離N末端(例えば、配列番号:3の遊離N末端)に対して末端特異的である。かかる末端特異的抗体は、例えば、配列番号:3内又はその残基1-15、1-14、1-13、1-12、1-11、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4又は1-3内のエピトープに結合することができる。かかるペプチドの例は、SEETK-GGC-OH(配列番号:16; この場合も、GCCはリンカー)のアミノ酸配列を有する。

【0094】

C3bと比較してiC3bに優先結合性を示す、iC3bに対する末端特異的抗体は、C3bに対する任意の程度の特異的結合性を欠いても欠いていなくてもよい(言い換えると、C3bよりもiC3bに対する優先性は、絶対的であったり相関的であったりしてもよい)。C3bよりもiC3bに優先的に結合する他の抗体は、末端特異的でなくて、例えばiC3bとC3bとの間のフォールディングパターンの相違に起因してC3bに存在しないか又は少なくとも高次構造的若しくは熱力学的に正確に複製されなかった、iC3bに存在する高次構造的エピトープを認識可能であってもよい。

【0095】

iC3bのN末端断片のC末端(例えば、配列番号:2)に対する末端特異的抗体は、この配列のC末端アミノ酸を含むペプチドを用いて免疫化することによってデノボで生成することが

10

20

30

40

50

できる。通常、かかるペプチドは、C末端アミノ酸を含むC末端から3-10個連続したアミノ酸を有し、5又は6個連続したアミノ酸のペプチドが好ましい。iC3bのC末端断片のN末端(例えば、配列番号:3)に対する末端特異的抗体は、この配列のN-末端アミノ酸を含むペプチドを用いて免疫化することによってデノボで生成することができる。通常、かかるペプチドは、N末端アミノ酸を含むN末端から3-10個連続したアミノ酸を有し、5又は6個連続したアミノ酸のペプチドが好ましい。

【0096】

あるいは、後で詳しく述べるように、精製されたiC3bタンパク質又は特徴的な高次構造が生じる十分な長さ及び構造のその断片(例えば実施例にて説明する、Complement Technologyから利用可能なiC3b)又は表面に沈着したiC3bを含む細胞(例えばヒツジ赤血球(SRBC))は、免疫原として使用可能である。

10

【0097】

小さいペプチドは、好ましくは、複合体を形成する異種担体分子に結合する。担体分子は、ペプチドに対する抗体反応を誘発するのを助ける。結合は、直接であってもよくスペーサーペプチド又はアミノ酸を介してもよい。システインがスペーサーアミノ酸として用いられる。理由は、その遊離SH基が担体分子の結合を容易にするためである。ポリグリシンリンカー(例えば、2-6個のグリシン)は、グリシンとペプチドとの間にシステイン残基があってもなくても使用することができる。担体分子は、ペプチドに対する抗体反応を誘発するのを助けるT細胞エピトープを提供するのに役立つ。アオガイヘモシアニン(KLH)、オボアルブミン及びウシ血清アルブミン(BSA)を含む、いくつかの担体を用いることができる。ペプチドスペーサーは、固相ペプチド合成の一部として、ペプチド免疫原に加えることができる。担体は、化学的架橋によって典型的に加えられる。使用可能な化学架橋剤のいくつか例には、クロス-N-マレイミド-6-アミノカプロイルエステル又は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)が含まれる(例えばHarlow, E. et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1988; Sinigaglia et al., *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz et al., *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer et al., *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. et al., *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; and, Southwood et al. *J. Immunology*, 160:3363-3373 (1998)を参照)。ペプチドの遊離C末端に対する抗体の生成が目的の場合、担体及びスペーサー(存在する場合)はペプチドのN末端に典型的に結合する。これとは反対に、ペプチドの遊離N末端に対する抗体の生成が目的の場合、担体及びスペーサー(存在する場合)はペプチドのC末端に典型的に結合する。他のペプチドに対する末端特異的抗体を生成するための例示的な手順は、例えばKonig, *Ann NY Acad Sci* 777:344-355 (1996), Harrington, *Biochim. Biophys. Acta* 1158 (2):120-128 (1993); Gravina et al., *J. Biol. Chem.* 270: (13): 7013-6 (1995)に記載されている。

20

30

【0098】

任意のスペーサー及び担体を有するペプチド又は(任意にスペーサー及び担体を有する)iC3bタンパク質は、後で詳しく述べるように実験動物又はB細胞を免疫化するために用いることができる。ハイブリドーマ上清は、免疫原への結合性能に関して試験することができる。免疫原は、スクリーニングアッセイを容易にする担体又は他のタグに結合可能である。この場合、担体又はタグは、iC3bペプチドよりもスペーサー又は担体に対して特異的な抗体を除くために免疫化で使用するスペーサー及び担体分子の組合せとは選択的に異なっている。抗体は、ペプチド免疫原のネオエピトープが生じる切断サイトを架橋するペプチドに対してスクリーニングすることもできる。例えば、ペプチド免疫原が配列番号:2の残基20のところ(配列番号:1の残基1303に対応)で終わる場合、切断サイトを架橋するペプチドには配列番号:1の少なくとも残基1303及び1304(例えば、NLDVSLQLPSRSSKITHRIHWES、配列番号:9)が含まれる。同様に、ペプチド免疫原が配列番号:3の残基1のところ(配列番号:1の残基1321に対応)で終わる場合、切断サイトを架橋するペプチドには配列番号:1の少なくとも残基1320及び1321(例えば、WESASLLRSEETKENE、配列番号:10)が含まれる。抗体は、(完全又は実質的に完全なiC3bを使用して)iC3bに対する結合性、及び、C3bに対す

40

50

る結合性の欠如又は少なくとも低下した結合性に関してスクリーニングすることもできる。C3bに対する結合性の欠如又は低下した結合性(すなわち、C3bと比較してiC3bに対する優先結合性)に関するスクリーニングは、C3b自体又は少なくともiC3bに存在する配列が組み込まれているその断片又はC3bの前駆体(例えばC3)を用いて実施することができる。かかるスクリーニングアッセイに関して、結合標的(例えば、iC3b、C3b又はC3)は、抗体を介してプレートに間接的に固定することができる。

【0099】

A209抗体(Quidel)は、C3bと比較してiC3bに優先的に結合するマウスモノクローナル抗体の一例である。他の例は、Thermo Scientificの抗体、MAB1-82814である。本発明では、(同じ称呼のハイブリドーマによって生産される)6G1、2A10、2H8及び5D2と称される更に4つのマウスモノクローナル抗体の例を提供する。抗体6G1、2A10、2H8又は5D2の各々は、C3b又はC3と比較してiC3bに優先的に結合する。例えば、6G1、2A10、2H8又は5D2の各々は、サンドイッチELISAアッセイで測定するとiC3bに対する親和定数がC3bより少なくとも2倍高く、ピアコアアッセイで測定するとiC3bに対する親和定数がC3bより少なくとも10倍高い。抗体5D2はヒトとマウスiC3bとの間で交差反応を示す一方で、6G1、2A10及び2H8は特異的にヒトiC3bと結合し、マウスiC3bに対してはあとしてもほとんど結合性を示さない。抗体6G1及び2H8はアルツハイマー病患者由来の脳組織のアミロイド斑を染色するが、抗体2A10及び5D2はそうしない。抗体を(C3b又はC3ではなく)iC3bで事前に吸着させておくと、6G1を用いたアミロイド斑の染色の低下が観察された。このことから、C3b又はC3よりもiC3bに対して6G1の優先結合性が大きいということが示される。

10

20

【0100】

本発明のある抗体は、マウスモノクローナル抗体6G1、2A10、2H8又は5D2と同じか重複するエピトープに結合する。ある抗体は、マウスモノクローナル6G1、2A10、2H8、5D2と同じエピトープに結合する。ある抗体は、iC3bに対する特異的結合性について、マウスモノクローナル抗体6G1、2A10、2H8又は5D2と競合する。6G1及び2H8は、iC3bに対する特異的結合性について(一方向又は双方向競合分析において)、互いに競合しないかA209又はThermo Scientificの抗体MAB1-82814と競合しない。このことから、これらの3つの抗体の各々は、非重複エピトープに結合することが示される。2A10と5D2は、互いに競合しない。このことから、2A10と5D2は非重複エピトープに結合することが示される。2A10と5D2は、6G1又は2H8との競合アッセイにおいて、程度は小さいが一方向阻害を示す。このことから、2A10及び5D2は、6G1又は2H8とは異なるエピトープに結合するが、このエピトープは互いに重複するか近接している可能性があることが示される。

30

【0101】

選択されたマウス抗体(例えばA209、MAB1-82814、6G1、2A10、2H8及び5D2)の結合特異性を有し、その結果、これらの抗体のうちの1つの機能的特徴の少なくとも1つ、いくつか又は全部を共有する抗体は、いくつかの方法によって生産することができる。かかる一つの方法は、ファージディスプレイによって出発抗体(starting antibody)の変異体を生産する。Winter, WO 92/20791を参照。この方法は、ヒト抗体の生産に特に適している。この方法では、選択したマウス抗体の重鎖又は軽鎖可変領域が出発物質として使用される。例えば、軽鎖可変領域が出発物質として選択される場合、ファージライブラリーが構築される。そのファージディスプレイの構成要素は、同じ軽鎖可変領域(すなわち、マウス出発物質)と種々の重鎖可変領域を提示する。例えば、重鎖可変領域は、再構成されたヒト重鎖可変領域のライブラリーから得ることができる。iC3bに対して強い特異的結合を示すファージ(例えば、少なくとも 10^8 及び好ましくは少なくとも $10^9 M^{-1}$)が選択される。そして、このファージ由来の重鎖可変領域は、更なるファージライブラリーを構成するための出発物質として役に立つ。このライブラリーにおいて、各ファージは、同じ重鎖可変領域(すなわち、最初のディスプレイライブラリーから特定される領域)と、種々の軽鎖可変領域をディスプレイする。例えば、軽鎖可変領域は、再構成されたヒト可変軽鎖領域のライブラリーから得ることができる。再度、iC3bに対して強い特異的結合を示すファージが選択される。得られた抗体は、マウス出発物質と同一又は類似のエピトープ特異性を通常有

40

50

する。

【0102】

他の方法は、例示的な抗体(例えばA209、MAB1-82814、6G1、2A10、2H8及び5D2)の重鎖及び軽鎖をエンコードするcDNAに対して変異を生成することによって所定の抗体の変異体を生産する。A209、MAB1-82814、6G1、2A10、2H8又は5D2と成熟重鎖及び/又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列において少なくとも70%、80%、90%、95%又は99%同一であり且つその機能的特徴を維持する、及び/又はそれは、少数の機能的に重要でないアミノ酸が置換(例えば、保存的置換)、欠失又は挿入されることによってそれぞれの抗体と相違しているモノクローナル抗体は、本発明においても含まれる。ある抗体は、それぞれ、6G1、2A10、2H8又は5D2の6つのCDRを含むモノクローナル抗体である。

10

【0103】

他の方法は、iC3b又は所望のエピトープを含むその部分を用いて非ヒト動物(例えばマウス)を免疫化して、C3b又はC3と比較してiC3bに優先的に結合する性質に関して得られた抗体を(任意にマウスモノクローナル抗体6G1、2A10、2H8又は5D2と競合させて)スクリーニングする。例示抗体のうちの1つと同じ特異性を有する抗体は、完全又は実質的に完全なiC3bを用いて免疫化する工程と、iC3bに対する結合性をもつ例示抗体のうちの1つと競合する抗体の生産に関して、得られた抗体産生細胞をスクリーニングする工程によって得ることもできる。

【0104】

末端特異的ではないが、iC3bに存在するがC3bに存在しないか正確に再現されなかった高次構造的エピトープに結合する、iC3bとC3bとを識別する抗体は、特徴的な高次構造が生じるのに充分長いペプチド免疫原(例えばiC3b自体又はその構成鎖の一方又は両方の少なくとも50、100、200又は250個の隣接する残基)を用いて免疫化することによって生産することができる。より長いペプチドは、他の方法の中で、組換え発現によって生産することができる。かかる方法によって生じた抗体は、C3bと比較してiC3bに対する優先結合性に関してスクリーニングされる。

20

【0105】

C3b又はC3と比較してiC3bに優先的に結合するある抗体は、ドルーゼン及び/又はアミロイド斑(例えば、アルツハイマー病を患っている対象の脳組織のアミロイド斑又はそのトランスジェニックマウスモデルの脳由来のアミロイド斑)に存在するiC3b沈着を染色する。アミロイド斑は、アミロイドペプチド(例えばA β -42)の蓄積によって細胞外で形成される不溶性タンパク質の凝集体である。アミロイド斑沈着には、変性神経突起(dystrophic neuritis)、軸索終末(axonal terminal)及び樹状突起によって囲まれるアミロイド繊維の中核、ミクログリア及び線維性星状細胞が含まれる。実施例において詳述されるように、アミロイド斑を染色する抗体は、AD脳の免疫組織化学的アッセイにおいてスクリーニングすることができる。抗体は、AMDマウスモデル(例えば、後で更に詳細に記載されているモデルのいずれか(例:ApoE4-HFCマウス))由来の目及び/又は健常者並びにAMDの眼(例えば、ノースカロライナアイバンク、ライオンズアイバンク及びフロリダ州のメディカルアイバンクから得られるもの)から得られた人体組織の染色と比較することによって、ドルーゼンの染色に関してスクリーニングすることができる(Ding et al., PNAS 2011; Ramkumar et al., Progress in Retinal and Eye Research 29 (2010) 169-190)。

30

40

【0106】

C3bと比較してiC3bに優先的に結合するある抗体は、アミロイド斑負荷を低減させる。アミロイド斑負荷を低減させる抗体は、例えば、動物モデルでのインビボ又はアルツハイマー病患者の脳又はアルツハイマー病の病理学的特徴を有する動物モデル由来の組織サンプルを用いたインビトロで、スクリーニングすることができる。

【0107】

C3bと比較してiC3bに優先的に結合するある抗体は、ドルーゼン沈着に結合する及び/又はそれを低減させる。ドルーゼン沈着を低減させる抗体は、例えば、動物モデルでのインビボ又はAMDを患っている患者の目又はAMDの病理学的特徴を有する動物モデル由来の組織

50

サンプルを用いたインビトロでスクリーニングすることができる。

【0108】

C3b又はC3と比較してiC3bに優先的に結合するある抗体(例えば、6G1、2A10、2H8)は、非ヒト種由来のiC3bと有意に結合することなくヒトiC3bに結合する(すなわち、非ヒト種に対する結合性は、無関係なコントロール抗体の結合性と類似する)。C3b又はC3と比較してiC3bに優先的に結合するある抗体(例えば、5D2)は、ヒトiC3bに結合し且つ少なくとも一つの非ヒト哺乳類種由来の(C3bではなく)iC3bと交差反応を示す。例えば、交差反応を示す抗体は、ヒトiC3bに結合し、さらに、非ヒト霊長類(例えば、カニクイザルマカク、アカゲザル、サル、ヒヒ、チンパンジー、オランウータン又はゴリラ)、齧歯類(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ギニアブタ又はラビット)、ウシ、ヤギ、ロバ、ブタ、イヌ、ネコ又はウマ由来のiC3bにも結合する。交差反応を示す抗体について、ヒトiC3bに対する親和定数は、非ヒトiC3bの2又は5倍の範囲内になる。齧歯類iC3b(例えば、ネズミiC3b)と交差反応する抗体は、前臨床試験において有利である。

10

【0109】

B. 非ヒト抗体

例えば、免疫原に対する他の非ヒトモノクローナル抗体(例えば、マウス、モルモット、霊長類、ラビット又はラット)の製造は、上記の通りに免疫原を用いて動物を免疫化することによって実施できる。Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988)を参照(全ての目的のために参照によって組み込まれる)。かかる免疫原は、天然原料から、ペプチド合成によって、又は組換え発現によって得ることができる。

20

【0110】

C3bよりiC3bに優先的に結合する抗体は、実質的に完全なiC3bを用いて、非ヒト動物(例えば齧歯類(マウス、ラット、モルモット又はラビットを含む)、ラクダ科の動物又は軟骨魚類)を免疫化することによって作成することができる。免疫化は、非ヒト動物又はヒトから単離されたB細胞に対してインビトロで実施してもよい。インビトロでの動物又は細胞の免疫化後、B細胞を集取して、例えば、ハイブリドーマを形成することによって不死化する。ハイブリドーマ上清は、所望の特性、特にiC3bに対する結合性を有する抗体作成に関して試験される。抗体は、C3bに対する結合性の欠如又は低下した結合性に関して試験することもできる。

30

【0111】

実質的に完全なiC3bは、完全なiC3b又は完全なiC3bのようにジスルフィド結合によって共に保持されるその3つの構成鎖の各々の少なくとも一部を含む抗原を意味する。好ましくは、その構成鎖の各々の少なくとも50、100、200又は250個の隣接する残基は、完全なiC3bにおける鎖間のジスルフィド結合形成の原因となる全ての残基を含んでいる。

【0112】

任意に、免疫原は、アジュバントと共に投与することができる。後述するように、数種類のアジュバントを使用することができる。完全フロイントアジュバントに続く不完全アジュバントは、RIBIアジュバントの使用である実験動物の免疫化のための1つの適切な投与計画である。ラビット又はモルモットは、ポリクローナル抗体を作成するのに一般的に使用されている。マウスは、モノクローナル抗体を作成するのに一般的に使用されている。抗体は、iC3bに対する特異的な結合性に関してスクリーニングされる。抗体は、C3b又は上記の通りiC3bにおけるネオエピトープの切断サイトを含むC3bのペプチドに対する特異的結合性を欠くことに関して、更にスクリーニングされてもよい。かかるスクリーニングは、欠失変異体のコレクションに対する抗体の結合性を決定することと、どの欠失変異体が抗体に結合するかを決定することによって達成することができる。結合は、例えば、ウェスタンブロット、FACSTM又はELISAによって評価することができる。

40

【0113】

C. ヒト化抗体

ヒト化抗体は、遺伝的に改変された抗体であり、非ヒト「ドナー」抗体(例えば、6G1、2A10、2H8又は5D2)由来のCDRをヒト「アクセプター」抗体配列に移植された、遺伝子的に

50

改変された抗体である(例えば、Queen, US 5,530,101 and 5,585,089; Winter, US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557を参照)。ドナー抗体は、C3bと比較してiC3bに優先的に結合する任意の抗体(例えば上述の免疫原を用いて実験動物の免疫化から得られる抗体又はA209若しくはMAB1-82814)であってもよい。アクセプター抗体配列は、例えば、成熟ヒト抗体配列、かかる配列の複合体、ヒト抗体配列のコンセンサス配列又は生殖系列領域配列とすることができる。従って、ヒト化抗体は、完全に又は実質的にドナー抗体由来のいくつか又は全てのCDRと、もし存在するならば完全に又は実質的にヒト抗体配列由来の可変領域フレームワーク配列及び定常領域とを有する抗体である。同様に、ヒト化重鎖は、完全に又は実質的にドナー抗体重鎖由来の少なくとも1つ、2及び通常全3つのCDRと、もし存在するならば実質的にヒト重鎖可変領域フレームワーク及び定常領域配列由来の重鎖可変領域フレームワーク配列及び重鎖定常領域とを有する。同様に、ヒト化軽鎖は、完全に又は実質的にドナー抗体軽鎖由来の少なくとも1つ、2及び通常全3つのCDRと、もし存在するならば実質的にヒト軽鎖可変領域フレームワーク及び定常領域配列由来の軽鎖可変領域フレームワーク配列及び軽鎖定常領域とを有する。ナノボディ及びdAbsを除いて、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖及びヒト化軽鎖を含む。ヒト化抗体のCDRが非ヒト抗体の対応するCDRから実質的に由来するものといえるのは、対応する残基(カバットにより規定)と少なくとも85%、90%、95%又は100%の同一性がそれぞれのCDR間にある場合である。抗体鎖の可変領域フレームワーク配列又は抗体鎖の定常領域がそれぞれヒト可変領域フレームワーク配列又はヒト定常領域から実質的に由来するものといえるのは、カバットによって規定される対応する残基と少なくとも85、90、95又は100%の同一性がある場合である。

10

20

【0114】

ヒト化抗体は、しばしばマウス抗体由来の全6つのCDR(好ましくはカバットにより規定)が組み込まれるが、より少ないマウス抗体由来CDR(例えば、少なくとも3、4又は5つ)によって作ることにもできる(例:Pascalis et al., J. Immunol. 169: 3076, 2002; Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al, Journal of Immunology, 164: 1432-1441, 2000)。

【0115】

ある抗体においては、CDRの一部、すなわち、結合に必要なCDR残基のサブセット(SDRと称される)だけがヒト化抗体の結合性を保持するのに必要である。抗原に接触せずSDRに存在しないCDR残基は、以下のことに基づいて特定することができる;以前の研究(例えば、CDR H2中の残基H60-H65は、しばしば必要でない)に基づくこと、コチア(Chothia)超可変ループ(Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987)の外側に存在しているカバットCDRの領域を由来とすること、分子モデリング及び/又は経験的に、若しくはGonzales et al., Mol. Immunol. 41 : 863, 2004にて説明しているように特定すること。かかるヒト化抗体では、1又は複数のドナーCDR残基を欠いているか、完全なドナーCDRが除かれている位置において、上記位置を占有しているアミノ酸は、アクセプター抗体配列の対応する位置(カバット番号付けによる)を占有しているアミノ酸である。CDR中のドナーアミノ酸をアクセプターに含ませる置換の数は、競合する考慮すべき点のバランスを反映している。かかる置換は、ヒト化抗体におけるマウスアミノ酸の数を減少させて、その結果として潜在的な免疫原性を減少させるという、潜在的に有利な点がある。しかしながら、置換は、親和性の変化を引き起こす可能性があり、親和性の著しい減少は、好ましくは回避される。CDR中の置換の位置及び置換するアミノ酸は、経験的に選択することもできる。

30

40

【0116】

ヒトアクセプター抗体配列は、多くの公知のヒト抗体配列の中から任意に選択して、ヒトアクセプター配列可変領域フレームワークとドナー抗体鎖の対応する可変領域フレームワークとの間における高い配列同一性(例えば、65-85%の同一性)を提供することができる。

【0117】

50

ヒト可変領域フレームワーク残基由来のある種のアミノ酸は、CDR配座及び/又は抗原への結合に対する考え得る影響に基づいて置換を選択することができる。そのような考え得る影響の調査は、特定位置でのアミノ酸の特徴に関するモデル試験、又は特定アミノ酸の置換又は変異誘発の効果に関する経験的な観察によるものである。

【0118】

例えば、マウス可変領域フレームワーク残基と選択されたヒト可変領域フレームワーク残基との間でアミノ酸が異なる場合、ヒトフレームワークアミノ酸は、マウス抗体由来の等価なフレームワークアミノ酸によって置換することができる。なお、これは、アミノ酸が、

- (1) 非共有結合的に直接抗原と結合する、
- (2) CDR領域と隣接している、
- (3) さもなければCDR領域と相互作用する(例えば、CDR領域の約6 内である)(例えば、同種公知の免疫グロブリン鎖の解明済み構造物にならって軽鎖又は重鎖を作ることによって同定される)、
- (4) VL-VHインターフェースに関与している残基であることを相当に予想される場合である。

10

【0119】

Queen, US 5,530,101によって規定されるクラス(1)-(3)由来のフレームワーク残基は、時にその代わりとしてカノニカル及びバーニヤ残基と称される。CDRループの高次構造を決定づけるドナーCDRループのカノニカルクラスを規定するフレームワーク残基は、時にカノニカル残基と称される(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987), Thornton & Martin J. Mol. Biol., 263, 800-815, 1996)。抗原結合性ループ高次構造を支持するフレームワーク残基のレイヤーは、抗原に対する抗体で適当なものはバーニヤ残基として示され、時にはある微調整で役割を果たす(Foote & Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224, 487-499)。置換の他の候補は、潜在的な糖修飾サイトを生じさせる残基である。置換の他の候補は、その位置ではヒト免疫グロブリンにとって普通ではないアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。これらのアミノ酸は、マウスドナー抗体での相当する位置、又はより典型的なヒト免疫グロブリンでの相当する位置由来のアミノ酸によって置換することができる。置換の他の候補は、その位置ではヒト免疫グロブリンにとって普通ではないアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。

20

30

【0120】

D. キメラ及びベニヤ化抗体

本発明は、キメラ及びベニヤ化形態の非ヒト抗体(例えば上述の免疫原を用いた実験動物の免疫化から得られた抗体又はA209又はMAB1-82814、特に6G1、2A10、2H8及び5D2)を更に提供するものである。

【0121】

キメラ抗体は、非ヒト抗体(例えば、マウス)の軽鎖及び重鎖の成熟可変領域がヒト軽鎖及び重鎖定常領域と結合した抗体である。かかる抗体は、実質的又は完全にマウス抗体の結合特異性を保持し、約2/3がヒト定常領域に寄与するヒト配列であってもよい。

【0122】

ベニヤ化抗体は、非ヒト抗体のCDRの一部及び通常は全てと、非ヒト可変領域フレームワーク残基の一部とを保持するが、B細胞又はT細胞エピトープ(例えば露出した残基)(Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991)に関与できる他の可変領域フレームワーク残基をヒト抗体配列の対応する位置由来の残基に置換したヒト化抗体の一種である。その結果物は、CDRは完全に又は実質的に非ヒト抗体由来であり、非ヒト抗体の可変領域フレームワークは、置換によって、よりヒトのようになっている抗体である。

40

【0123】

E. ヒト抗体

iC3bに対するヒト抗体は、後述する様々な技術によって提供される。ヒト抗体を生産する方法には、以下のものが含まれる。トリオーマ法; Oestberg外(Hybridoma 2:361-367 (

50

1983)) : Oestberg (米国特許第4,634,664号) : 及びEngleman外(米国特許4,634,666)、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックマウスの使用(例えば、以下を参照、Lonberg et al., WO93/12227 (1993): US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kuchelapati, WO 91/10741 (1991)及びファージディスプレイ法(例えば、以下を参照、Dower et al., WO 91/17271及びMcCafferty et al., WO 92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743及びUS 5,565,332。インビトロでのトランスジェニックマウス又はB細胞の免疫化は、非ヒト抗体に関する記述の通りに実行することができる。加えて、iC3bに対するヒト抗体は、Wrammert et al. (2008) Nature 453:667-672 & Kashyap et al. (2008) PNAS 105:5986-5991に記載されている通り、当該抗原(例えば、この例ではiC3b)に関するヒトボランティア血清反応陽性者の血漿B細胞由来の抗体の直接クローニングを介して取得することもできる。

10

20

30

40

50

【0124】

F. 定常領域の選択

キメラ抗体、ヒト化(ペニヤ化を含む)抗体、又はヒト抗体の重鎖及び軽鎖可変領域は、少なくともヒト定常領域の一部に結合することができる。定常領域の選択は、一つには、抗体依存性補体及び/又は細胞媒介細胞傷害を望むかどうか次第である。例えば、ヒトアイソトープIgG1及びIgG3は補体媒介細胞傷害性である一方で、ヒトアイソタイプIgG2及びIgG4は補体媒介細胞傷害性が低いかその性質がない。軽鎖定常領域は、ラムダ又はカッパとすることができる。抗体は2つの軽鎖及び2つの重鎖を含むテトラマーとしてか、分離した重鎖、分離した軽鎖か、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFvか、重鎖及び軽鎖可変ドメインがスパーサーで結合される単鎖抗体として発現することができる。

【0125】

ヒト定常領域は、種々の個体間にアロタイプバリエーション及びイソアロタイプバリエーションを示す。すなわち、定常領域は、1又は複数の多型位置において種々の個体で異なることができる。イソアロタイプは、イソアロタイプが1又は複数の他のアイソタイプの非多型性領域に結合するという血清認識性の点でアロタイプと異なる。ヒト定常領域に対する参照は、任意の天然アロタイプをもつ定常領域又は天然アロタイプの多型性位置を占有している残基の任意の置換又は後述するようにエフェクター機能を低下させるか増加させるための3、5又は、10個までの置換を含む。

【0126】

軽鎖及び/又は重鎖のアミノ又はカルボキシ末端の1又は複数のアミノ酸(例えば重鎖のC末端リジン)は、分子に応じてか全ての分子が欠失されたり誘導体化されたりしてもよい。

【0127】

置換は、定常領域においてなされ、エフェクター機能(例えば補体媒介細胞傷害又はADC)を低減又は増加(例えば、Winter外、米国特許第5,624,821号; Tso外、米国特許第5,834,597号;そして、Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006を参照)させたり、ヒトの半減期を延長させたり(例えば、Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004を参照)することができる。

【0128】

本発明の抗体は補体の活性化型によって部分的に媒介される病状の疾患を治療するために用いられるため、補体媒介細胞傷害性を低減する1又は複数の置換を含むことが好ましい。補体媒介細胞傷害の低減は、変異の性質に依存するFcレセプターの結合性の低下の有無に関わらず達成できる。補体媒介細胞傷害性が低下しているがFcレセプターはほとんど又はまったく低下していない抗体は、(副作用の一因となり得る)補体を活性化させることなくiC3bのFc媒介貪食作用の所望の効果を可能にする。ヒト定常領域において補体媒介細胞傷害性を低減させることが知られている例示的な変異は、位置241、264、265、270、296、297、322、329及び331での変異を含む。位置318、320及び322での変異は、マウス抗体

における補体の活性化を低減させることが報告されている。アラニンは、変異定常領域においてこれらの位置を占めている好ましい残基である。利用されているある例示的なヒト変異には、ヒトIgG3のF241A、V264A、D265A、V296A、N297A、K322A及びP331S並びにヒトIgG1のD270A又はE、N297Q、K322A、P329A及びP331Sが含まれる。E318A、K320A、R322A変異の組合せは、特にヒト及びマウスIgG1抗体において、Fc領域に対するC1qの結合性を除去するために用いることもできる。ここで、他と同様に、EU番号付けスキームは、抗体の定常領域におけるアミノ酸の番号付けに用いられる。

【0129】

位置234、235、236及び/又は237の一部又は全部の置換は、Fc受容体、特にFcRI受容体に対する親和性を低減させ、補体の結合性及び活性化も低減させる(例えば、US 6,624,821 WO/2009/052439を参照)。位置234、235及び237のアラニン置換は、特にヒトIgG1の内容において、エフェクター機能を低下させる。任意に、Fcレセプターの結合性を低下させるために、ヒトIgG2における位置234、236及び/又は237をアラニンで置換し、位置235をグルタミンで置換する。(US 5,624,821を参照)

【0130】

半減期を増加させるための例示的な置換には、位置250のGln及び/又は位置428のLeuが含まれる。

【0131】

G. 組換え抗体の発現

キメラ、ヒト化(ペニヤ化を含む)及びヒト抗体は、組換え発現によって典型的には生産される。抗体をエンコードしている核酸は、所望の細胞型(例えば、CHO又はSp2/0)での発現のためにコドン最適化させることができる。組換えポリヌクレオチド構造物には、抗体鎖のコード配列に実施可能な状態で連結した発現制御配列(天然の付随プロモーター領域又は異種プロモーター領域を含む)が典型的には含まれる。好ましくは、発現コントロール配列は、真核生物宿主細胞に形質転換又はトランスフェクションできるベクターにおける真核生物プロモーターシステムである。かかるプロモーターの例には、CMV(例えば、ヒト、マウス又はチャイニーズハムスター)、ユビキチン又はチャイニーズハムスター伸長因子1(a)(CHEF)が含まれる。一旦ベクターが適切な宿主に組み込まれると、宿主はヌクレオチド配列の高レベル発現並びに交差反応抗体の回収及び精製に適する条件下で維持される。抗体鎖をエンコードしている1又は複数のベクターには、抗体鎖をエンコードしている核酸のコピー数の増幅を可能にするために、選択可能遺伝子(例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ又はグルタミン酸シンターゼ)を含ませることもできる。

【0132】

E. coliは、抗体、特に抗体断片を発現させるために用いることができる原核生物宿主である。微生物(例えば酵母)も発現に有用である。サッカロミセスは、好ましい酵母宿主であり、所望の発現制御配列、複製開始点、終了配列等を有する適切なベクターを持つ。典型的なプロモーターには、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ及び他の糖分解酵素が含まれる。誘導性酵母プロモーターには、とりわけ、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソチクロームC並びにマルトース及びガラクトース利用に寄与する酵素由来のプロモーターが含まれる。

【0133】

哺乳動物細胞は、免疫グロブリン又はその断片をコードしているヌクレオチド部分を発現するのに好ましい宿主である。Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987)を参照。完全な異種タンパク質を分泌することができる多くの適切な宿主細胞株は、従来技術において開発されており、それには、CHO細胞株(例:DG44)、様々なCOS細胞株、HeLa細胞、HEK293細胞、L細胞及びSp2/0及びNS0を含む非抗体産生ミエローマが含まれる。好ましくは、細胞は、非ヒトである。これらの細胞のための発現ベクターには、発現コントロール配列(例えば、複製開始点、プロモーター、エンハンサー(Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986))、そして、必要なプロセッシング情報サイト(例:リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写ターミネーター配列))を

含ませることができる。好ましい発現コントロール配列は、内因性遺伝子、ユビキチン、CHEF、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシバピローマウイルス等由来のプロモーターである。Co et al., J Immunol. 148: 1149 (1992)を参照。

【0134】

抗体重鎖及び軽鎖をエンコードしている核酸は、同一又は異なるベクターで発現させてもよい。抗体重鎖及び軽鎖をエンコードしているベクターを培養細胞に導入すると、細胞プールは、無血清培地における増殖生産性及び製品品質に関してスクリーニングすることができる。高い生産性の細胞プールは、モノクローナル株を生産させるためにFACSを基礎とする単一細胞クローニングを受けさせることができる。50pg又は100pg/細胞/日を超える特別な生産性が好ましく、これは7.5g/L培養物を超える生産力に相当する。単一細胞クローンによって生産される抗体は、濁度、濾過特性、PAGE、IEF、UVスキャン、HP-SEC、糖質-オリゴ糖マッピング、質量分析及び結合アッセイ(例えばELISA又はピアコア)について試験することもできる。選択したクローンを、後の使用のために、多数のバイアルに入れてバンクし、冷凍保存することが可能である。

10

【0135】

一旦発現すると、抗体は、タンパクA捕獲、カラムクロマトグラフィー(例えば、疎水性相互作用又はイオン交換)、ウイルス不活性化のための低pH等を含む、この技術分野の標準的処理(概して、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982を参照)に従って精製することが可能である。

【0136】

抗体の商業生産のための方法には、コドン最適化、プロモーター、転写要素及びターミネーターの選択、無血清单一細胞クローニング、細胞バンク、コピー数の増幅のための選択マーカーの使用、CHOターミネーター、無血清单一細胞クローニング、タンパク力価の向上が含まれる(例えば、US 5,786,464, US 6,114,148, US 6,063,598, US 7,569,339, WO 02004/050884, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2005/019442, WO2008/107388, 及び WO 02009/027471, 及びUS 5,888,809を参照)。

20

【0137】

IV. 能動的免疫原

薬剤は、免疫反応を誘導するために、患者における能動的免疫のために用いてもよい。この薬剤には、受動的免疫に関連する上述の結合特性及び機能的特性を有する抗体(例えばC3bよりもiC3bに優先的に結合する抗体)が含まれる。能動免疫のために使用する薬剤は、実験動物においてモノクローナル抗体を生成するために使用する免疫原と同じタイプ(例えば、配列番号:2のC末端又は配列番号:1のN末端から3-10個連続したアミノ酸のペプチド又はC3b又はC3と比較してiC3bの高次構造特性を生じさせるのに十分な長さのペプチド免疫原)であってもよい。使用可能なあるiC3b断片の例には、配列番号:2の残基18-20、17-20、16-20、15-20、14-20、13-20、12-20若しくは11-20又は配列番号:3の残基1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9若しくは1-10又はiC3b特徴的高次構造を生じさせるのに十分な長さの一方若しくは両方のiC3b構成鎖の少なくとも50、100、200若しくは250個の隣接する残基からなるiC3b断片がiC3b自体が含まれる。小ペプチド免疫原の例は、CGG-QLPSR(配列番号:14)又はSEETK-GGC(配列番号:15)からなるアミノ酸配列を有する。トリペプチドGGC(配列番号:6)は、担体を末端システイン残基に結合できるようにするリンカーである。

30

40

【0138】

異種担体及びアジュバントは、使用する場合、モノクローナル抗体の生産に使用するものと同じであってもよいが、ヒトにおける使用での医薬的適合性が良好なものを選択してもよい。適切な担体には、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、オボアルブミン、破傷風トキソイド又はジフテリア(例えば、CRM197)、E. coli、コレラ若しくはH. pylori等の他の病原性細菌由来のトキソイド、若しくは弱毒化毒素誘導体が含まれる。T細胞エピトープは、適切な担体分子でもある。ある複合体は、カップリング剤によって、本発明と、免疫賦活性高分子(例えば、ト

50

リパルミトイル-S-グリセリンシステイン(Pam3Cys)、マンナン(マンノースポリマー)又はグルカン(1-2ポリマー)、サイトカイン(例えばIL-1、IL-1アルファ及びベータペプチド、IL-2、-INF、IL-10、GM-CSF)及びケモカイン(例えば、MIP1-及び並びにRANTES)に対して形成させてもよい。免疫原は、スパーサーアミノ酸(例えば、gly-gly)によってか又はよらずに担体と結合させてもよい。更なる担体には、ウイルス様粒子が含まれる。ウイルス様粒子(VLP)は、擬ウイルス粒子又はウイルス由来粒子とも呼ばれ、インビボで明確な球対称のVLPに自己集合可能な、エンベロープタンパク質及び/又はウイルスカプシドの多数の複製物から構成されるサブユニット構造を表す。(Powilleit, et al., (2007) PLoS ONE 2(5):e415.)。あるいは、ペプチド免疫源は、MHCクラスII分子(例えばpan DR エピトープ(「PADRE」)の大部分に結合可能な少なくとも一つの人工T細胞エピトープに結合させてもよい。PADREは、US 5,736,142、WO 95/07707及びAlexander J et al, *Immunity*, 1:751-761 (1994)に記載されている。能動免疫原は、免疫原及び/又はその担体の多数の複製物が単一の共有結合分子として存在する多量体型で存在し得る。

10

【0139】

断片は、医薬的に許容可能なアジュバントと共に投与されることが多い。アジュバントは、ペプチドが単独で用いられる状況よりも、誘導された抗体の力価及び/又は誘導された抗体の結合親和性を向上させる。免疫反応を誘導させるためにiC3bの免疫原断片と組み合わせる様々なアジュバントを使用することができる。好ましいアジュバントは、反応の質に影響を及ぼす免疫原の構造変化を引き起こすことなく、免疫原に対する固有の反応を増大させる。好ましいアジュバントには、アルミニウム塩類(例えば水酸化アルミニウム及び燐酸アルミニウム、3デ-O-アシル化モノホスホリルリピドA(MPLTM))が含まれる(GB 2 220211(RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, now part of Corixa)を参照。StimulonTM QS-21は、南アメリカで見られるQuillaja Saponaria Molinaの木の樹皮から単離されたトリテルペングリコシド又はサポニンである(Kensil et al., in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5,057,540)(Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; now Antigenics, Inc., New York, NY)を参照。他のアジュバントは、水エマルジョンの油(例えばスクアレン又は落花生油)であり、任意に免疫刺激薬(例えば、モノホスホリルリピドA(Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)を参照)、ブルロニックポリマー及びマイコバクテリア死菌)と併用される。Ribiアジュバントは、水中油型エマルジョンである。Ribiには、生理食塩水含有Tween(登録商標)80によって乳化された代謝可能油(スクアレン)が含まれる。Ribiには、免疫賦活薬として作用する精製マイコバクテリウム産物及び細菌性モノホスホリルリピドAも含まれる。他のアジュバントは、CpG(WO 98/40100)である。アジュバントは、活性薬剤と共に治療組成物の構成成分として投与できたり、治療薬剤の投与とは別に、その前に、それと平行して、その後に投与できたりする。

20

30

【0140】

iC3bに対して抗体を誘導するiC3bの天然断片のアナログを用いてもよい。例えば、1若しくは複数又は全てのLアミノ酸は、かかるペプチドにおいてDアミノ酸に置換してもよい。また、アミノ酸の順序を逆転させてもよい(レトロペプチド)。任意に、ペプチドは、全てがD-アミノ酸で順序が逆のもの含む(レトロインベルソペプチド)。iC3bペプチドと有意なアミノ酸配列類似性を必ずしも有するというわけではないが、それにもかかわらずiC3bペプチドのミメティックとして役割を果たし且つ類似の免疫反応を誘導するペプチド及び他の化合物を用いてもよい。上記の通り、iC3bに対するモノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ抗体を用いることもできる。かかる抗イディオタイプ抗体は抗原を模倣し、それについての免疫反応を生じさせる(Essential Immunology, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., p. 181を参照)。

40

【0141】

ペプチド(そして、任意に、ペプチドに融合した担体)は、ペプチドをエンコードしている核酸の形で投与され、患者における本来の位置で発現させることもできる。免疫原をエンコードしている核酸セグメントは、患者の標的細胞のDNAセグメントの発現を可能にす

50

る調節エレメント(例えばプロモーター及びエンハンサー)に典型的には結合される。例えば、軽鎖又は重鎖免疫グロブリン遺伝子由来のプロモーター及びエンハンサーエレメント又はCMV主要中初期(major intermediate early)プロモーター及びエンハンサーは、血球での直接発現に適している。これは、免疫反応の誘導に望ましい。結合した調節エレメント及びコード配列は、多くの場合、ベクターにクローニングされる。抗体は、抗体の重鎖及び/又は軽鎖をエンコードしている核酸の形で投与することもできる。重鎖及び軽鎖の両方が存在する場合、鎖は好ましくは単鎖抗体として結合されている。受動的な投与のための抗体は、例えば、親和性クロマトグラフィによってペプチド免疫源での治療を受けた患者の血清から作成することもできる。

【0142】

DNAは、裸の形態にて(即ち、コロイド材料又はカプセル化材料を用いることなく)送り込むことができる。あるいは、以下のものを含む多くのウイルス性ベクターシステムを用いることができる。レトロウイルスシステム(例えば、Lawrie and Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)を参照);アデノウイルスベクター(例えば、Bett et al., *J. Virol.* 67, 591-1 (1993)を参照);アデノ随伴ウイルスベクター(例えば、Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)を参照)、ワクシニアウイルス及び鳥類ボックスウイルスを含むボックスファミリー由来のウイルスベクター、アルファウイルス属由来のウイルスベクター(例えば、シンドビス及びセムリキ森林ウイルスに由来するそれらのもの)(例えば、Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)を参照)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(US 5,643,576を参照)及びラブドウイルス(例えば、水疱性口内炎ウイルス)(WO 96/34625を参照)及びパピローマウイルス(Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629及びXiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996))。

【0143】

免疫原をエンコードしているDNA又はそれと同じものを含んでいるベクターをリポソームで包み込んでも良い。適切な脂質及び関連する類似体は、US 5,208,036、US 5,264,618、US 5,279,833及びUS 5,283,185に記載されている。ベクター及び免疫原をエンコードしているDNAは、粒子性担体(例：ポリメタクリル酸メチルポリマー及びポリ乳酸及びポリ(ラクチド-コ-グリコリド)を含む)に吸着させたりそれを伴っていたりしてもよい(例えば、McGee et al., *J. Micro Encap.* 1996を参照)。

【0144】

V. スクリーニング法

既に記載の通り、抗体を意図する結合特異性(例えば、C3bよりもiC3bに優先する結合性)に関して最初にスクリーニングすることもできる。能動的免疫原は、同様に、かかる結合特異性を有する抗体を誘導する能力に関してスクリーニングすることもできる。この場合、能動的免疫原を用いて実験動物を免疫化し、得られた血清を適切な結合特異性に関して試験する。抗体は、例えばFACSによって細胞表面に沈着したiC3bに結合し、色素凝集を阻害する能力に関して試験することもできる。

【0145】

あるスクリーニング法は、免疫学的測定法によって実行される。免疫学的測定法には、競合及び非競合性アッセイシステムを用いる技術(例えば、表面プラズモン共鳴、ピアコア分析、FACS分析、免疫蛍光法、免疫細胞化学、ウェスタンブロット解析、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、「サンドイッチ」免疫学的測定法、免疫沈降法、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散法、凝集反応法、補体-結合法、免疫放射線測定法、蛍光免疫学的測定法、プロテインA免疫学的測定法、質量分析、免疫ブロット、競合結合測定、ビーズ型アッセイ、ラジオ免疫沈降法、コロイド状金アッセイ、ラテラルフロー法、蛍光偏光測定法、核磁気共鳴及び化学ルミネセンス法)が含まれる(例えば、Ausubel et al., Editors, 1994-present, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.を参照)。

【0146】

実施例に示すように、C3b又はC3と比較してiC3bに優先的に結合する抗体の高次構造的エピトープはiC3bが固体担体(例えば、プレート)に直接固定されると消失する可能性がある一方で、高次構造的エピトープはiC3bが固体担体に間接的に固定されると検出することができる。従って、好ましいスクリーニング法は、iC3bが固体担体に(例えば、抗体を介して)間接的に固定される免疫学的測定法である。好ましくは、この方法は、サンドイッチELISAアッセイ及び/又はピアコアアッセイを含む。

【0147】

所望の結合特異性を有する抗体は、インビトロアッセイにおいてiC3bの貪食作用を誘導する能力に関して更に試験することができる。かかるアッセイには、試験用である抗体と沈着したiC3b及び食細胞が含まれる。沈着したiC3bは、細胞(例えば細胞表面に沈着したiC3bを有するSRBC)として提供することができる。沈着したiC3bは、iC3bの沈着物によって特徴づけられる疾患からの組織サンプル(例えばAMDの影響を受けた目由来の組織サンプル)として提供することもできる。サンプルは、抗体を欠くネガティブコントロールと比較して及び/又は抗体を供給する前のベースラインレベルと比較して、沈着iC3bレベルの減少についてモニターされる。

【0148】

AMD及びiC3b沈着物によって特徴づけられる他の疾患のいくつかのマウスモデルが記載されており、抗体又はかかる抗体を誘導するペプチドをスクリーニングするために原則として用いることができる。ヒトiC3bに対する抗体は、好ましくは対応するマウスiC3bとの交差反応性に関して最初に試験される。ネオエピトープ周辺に関して対応するヒト及びマウス配列は、以下の通りである:N末端断片のC末端に関するKDAPDHQELN LDVSLQLPSR(配列番号:2)(ヒト)及びTDVDPDHKDLN MDVSFHLPSR(配列番号:7)(マウス)並びにC末端断片のN末端に関するSEETKENEGF TVTAEGKGQG(配列番号:3)ヒト及びSEETKQNEAF SLTAKGKGRG(配列番号:8)(マウス)。N末端断片のC末端に関するネオエピトープの共通する4つの連続したアミノ酸及びC末端断片のN末端に関するネオエピトープの共通する5つのアミノ酸が存在する。抗体に応じて、これは、ヒトとマウスのエピトープの間において結合性に関して十分に保存的であってもそうでなくてもよい。あるいは、ヒトC3導入遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを用いてもよい。AMDの動物モデルの他の例には、H因子ノックアウトモデル(Coffey 2007)及びCcl-2又はCcr-2遺伝子の無発現変異を有するマウスが含まれる。これらのマウスは、6ヵ月後に脈絡膜血管新生(CNV)及び光受容体萎縮、網膜色素上皮(RPE)下のドルーゼン及びリポフスチンの蓄積を含むAMDの特徴的な兆候及び症状を発症する。ドルーゼン病状及びiC3bネオエピトープのポジティブ染色を示す他のAMDモデルは、Radu外(2010 ARVO Ann Conf 要約 D626)によって報告され、C3c(iC3bの更なる分解物)が報告されている(Ambati, Nat Med. 9, 1390-7 (2003))。他のモデルは、abca4-/-マウス+ライト(light)(G. Travis, UCLA); 高脂肪高コレステロール食を給餌されたApoE-マウス(Dithmar et al, (2000) Invest Ophthalmol Vis Sci 41:2035-2042);及び、C57BL/6で免疫化したCEP-MSA(J. Hollyfield, Cle Clinic)であり、C3d +veである。表1及び2(Prog. Retina I Eye Res. 29, 169-190 (2010)からの抜粋)には、これら及び他のマウスモデルの特徴が示されている。他のAMDマウスモデルは、Ding外(Proc Natl Acad Sci U S A. 108:E279-E287, 2012)、Sullivan外(J Biol Chem 272:17972-17980, 1997)によって報告されている。AMDの霊長動物モデルも記載されている(例えば、Hope et al., Brit. J. Ophthalmol. 76, 11-16 (1992)を参照)。

【0149】

表1は、トランスジェニック乾燥AMDマウスモデル、免疫学的に改良された乾燥AMDマウスモデル及び自然に発症の乾燥AMDマウスモデル及び関連疾患に関するマウス及びヒト遺伝的特徴の概要を示している。表2は、乾燥AMDマウスモデルに関する臨床的、生化学的及び網膜の病理学的所見の概要を示している。

10

20

30

【表 1】

表1 乾燥AMDモデルの遺伝的特徴									
#	マウス モデル	ヒト 疾患 関連性	ヒト 遺伝子	染色体位置	OMIM #	遺伝的改変	マウス 遺伝子	エンコード している タンパク質	参考文献
1	<i>abcr</i> ^{-/-}	スカルカルト病	<i>ABCA4</i>	1p21-p13	*601691	ノックアウト	<i>Abca4</i>	RmP	Weng et al., <i>Cell</i> 98:13-23, 1999; Mata et al., <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i> 42:1685-90, 2001
2	<i>ELOVL4</i> 変異体	スカルカルト ⁻³ 優勢遺伝病	<i>ELOVL4</i>	6q14	*605512	トランス ジェニック	<i>Elovl4</i>	Elov4	Karan et al., <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 102:4164-9, 2005
3	<i>Ejemp1</i> ^{K3 43W/R343W}	トイソ ハニカム 網膜ジストロフィー	<i>EFEMP1</i>	2p16	*601548	トランス ジェニック	<i>Ejemp1</i> ⁻³	トイソエリン ⁻³	Marmorstein et al., <i>Hum Mol Genet</i> , 16:2423-32, 2007; Fu et al., <i>Hum Mol Genet</i> , 16:2411-22, 2007
4	<i>Timp3</i> ^{S156 C/S156C}	トースビー 眼底変性症	<i>TIMP3</i>	22q12.1- q13.2	*188826	ノックアウト	<i>Timp3</i>	TIMP3	Weber et al., <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i> , 43:2732-40, 2002
5	<i>cfh</i> ^{-/-}	AMD	<i>CFH</i>	1q32	+134370	ノックアウト	<i>Cfh</i>	CFH	Coffey et al., <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 104:16651-6, 2007
6	<i>cc12</i> ^{-/-}	冠状動脈疾患、 結核	<i>CCL2</i> (<i>MCP1</i>)	17q11.2- q12	+158105	ノックアウト	<i>Mcp1</i>	MCP1	Ambati et al., <i>Nat Med</i> , 9:1390-7, 2003
7	<i>ccr2</i> ^{-/-}	アテローム硬化、 慢性関節リウマチ	<i>CCR2</i>	3p21	*601267	ノックアウト	<i>Ccr2</i>	MCP1 受容体	Ambati et al., <i>Nat Med</i> , 9:1390-7, 2003

10

20

30

表1 乾燥AMDモデルの遺伝的特徴									
#	マウス モデル	ヒト 疾患 関連性	ヒト 遺伝子	染色体位置	OMIM #	遺伝的改変	マウス 遺伝子	エピソード している タンパク質	参考文献
8	<i>Cx3cr1</i> ^{-/-}	AMD, 冠状動脈疾患, HIV	<i>CX3CR1</i>	3pter-p21	*601470	ノックアウト	<i>Cx3cr1</i>	マクロファグ キル受容体 <i>CX3CR1</i>	Combariere et al., <i>J Clin Invest</i> . 117:2920-8, 2007
9	<i>ccl2</i> ^{-/-} / <i>Cx3cr1</i> ^{-/-}	冠状動脈疾患	<i>CCL2</i> , <i>CX3CR1</i>	17q11.2- q12, 3pter- p21	+158105 *, *601470	二重 ノックアウト	<i>Mcp1</i> , <i>Cx3cr1</i>	<i>MCP1</i> , <i>CX3CR1</i>	Tuo et al., <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i> . 48:3827-36, 2007
10	<i>sod1</i> ^{-/-}	筋萎縮性側索硬化症	<i>SOD1</i>	21q22.1	*147450	ノックアウト	<i>Sod1</i>	<i>SOD1</i>	Imamura et al., <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> . 103:11282-7, 2006
11	<i>sod2</i> ^{-/-}	レーバー遺伝性 視神経萎縮症, 特発性心筋症	<i>SOD2</i>	6q25.3	*147460	ノックアウト	<i>Sod2</i>	<i>SOD2</i>	Sandbach et al., <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i> . 42:2173-8, 2001; Justilien et al., <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i> . 48:4407-20, 2007
12	<i>Nepri- lysin</i> ^{-/-}	アルツハイマー病	<i>NEPRILY SIN</i>	3q21-q27	*120520	ノックアウト	<i>Nepri- lysin</i>	アミロイド β	Iwata et al., <i>Science</i> . 292:1550-2, 2001
13	<i>mcd/mcd</i> マウス	ニューロン セロイド リボナスチン蓄積症	<i>CTSD</i>	11p15.5	*116840	トランス ジェニック	<i>mcd</i>	カテプシン D	Rakozy et al., <i>Am J Pathol</i> . 161:1515-24, 2002
14	<i>Cp</i> ^{-/-} / <i>Heph</i> ^{-/-}	無セロプラスミン 血症	<i>CP</i>	3q23-q24	*117700	ノックアウト	<i>Cp</i> , <i>sla</i>	アミロイド アミロ セロロ プラスミン/ ヘパ エスチン	Hahn et al., <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> . 101:13850-5, 2004

10

20

30

表1 乾燥AMDモデルの遺伝的特徴									
#	マウス モデル	ヒト 疾患 関連性	ヒト 遺伝子	染色体位置	OMIM #	遺伝的改変	マウス 遺伝子	エンコード している タンパク質	参考文献
15	<i>ApoE</i> ^{+/+}	高リポタンパク 血症	<i>APOE</i>	19q13.2	+107741	ノックアウト	<i>ApoE</i>	<i>ApoE</i>	Dihmar et al., <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i> . 41:2035-42, 2000
16	<i>APO*E3- Leiden</i>	高リポタンパク 血症	<i>APOE</i>	19q13.2	+107741 .0015	トランス ジェニック	-	<i>apoE3</i>	Kliffen et al <i>Br. J Ophthalmol</i> . 84:1415-9, 2000
17	<i>ApoE4 TR</i>	Type III/V 高リポタンパク 血症, アルツハイマー病	<i>APOE</i>	19q13.2	+107741 .0016	トランス ジェニック	-	<i>apoE4</i>	Malek et al., <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> . 102:11900-5, 2005
18	<i>APO B100</i>	低βリポタンパク症	<i>APOB</i>	2p24	+107730	トランス ジェニック	-	<i>apoB100</i>	Espinosa-Heidmann et al. <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i> . 45:260-6 2004; Callow et al. 1994
19	<i>arrd2/ arrd2</i>	進行性杆体錐体変性, AMD	<i>MDM1</i>	12q14.3	*164785	なし	<i>Mdm1</i>	<i>Mdm1</i>	Chang et al., <i>Hum Mol Genet</i> . 17:3929-41 , 2008
20	<i>Mfhp</i> ^{rd6}	色素性網膜炎	<i>MFHP</i>	11q23	*606227	なし	<i>Mfhp</i>	<i>MFHP</i>	Kameya et al., <i>Hum Mol Genet</i> . 11:1879-86, 2002
21	<i>Nr2e3</i> ^{rd1}	エンハンスト S-コーン 症候群 (ESCS)	<i>NR2E3</i>	15q23	*604485	なし	<i>Nr2e3</i>	<i>NR2E3</i>	Akhmedov et al., Hahn et al., <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> . 97:5551-6, 2000

10

20

30

表1 乾燥AMDモデルの遺伝的特徴									
#	マウス モデル	ヒト 疾患 関連性	ヒト 遺伝子	染色体位置	OMIM #	遺伝的変異	マウス 遺伝子	エンコード している タンパク質	参考文献
22	<i>cpfl3</i>	色覚異常	<i>GNAT2</i>	1p13	+139340	なし	<i>Gnat2</i>	GNAT2	Chang et al., <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i> , 47:5017-21, 2006
23	SAMP	老化	不明	不明	不明	不明	<i>Mpmv</i> , <i>Pmv</i>	不明	Takada et al., <i>Nippon Ganka Gakkai Zasshi</i> , 98:955-61, 1994
24	SAMR	老化	不明	不明	不明	不明	<i>Pmv-35</i>	不明	

10

20

30

表2
乾燥AMDモデルの網膜病状

#	マウス モデル	臨床情報			生化学データ			病理学的情報			光受容体萎縮	CNV
		発病 年齢	臨床検査	病変の タイプ	ERG 変化	A2E レベル	RPE 変化	基底 沈着物	BM 変化	OSの短縮		
1	abc ^{-/-}	44 週	未検	-	減少 α波の 振幅	上昇	リポフスチン, メラノソーム 空胞変性	なし	濃厚化	PR OSの短縮	なし	
2	ELOVL4- 変異体	7 ヶ月	網膜病変	RPE 萎縮	減少 β波の 応答	上昇	リポフスチン, 破片, 中央 網膜RPE 萎縮	存在	なし	OSデイスク 組織崩壊, 部位的特萎縮	なし	
3	E ^{temp} _{43W/R345W} ^{R3}	4 ヶ月	病変なし	なし	正常 α波 及び β波	未測定	空胞変性, 基底陥入の減少	Blamd	アモルファス 破片	なし	なし	

【表 2】

10

20

30

表2
乾燥AMDモデルの網膜病状

#	マウス モデル	臨床情報			生化学データ			病理学的情報			CNV
		発病 年齢	臨床検査	病変の タイプ	ERG 変化	A2E レベル	RPE 変化	基底 沈着物	BM 変化	光受容体萎縮	
4	<i>Timp3</i> ^{Sl56} <i>Csl56C</i>	8 ヶ月	病変なし	なし	正常 β波	未測定	基底層 崩壊	存在	濃厚化	なし	存在
5	<i>cfh</i> ^{-/-}	2 年	網膜病変	過剰蛍光 (hyper- fluores- cent)	減少 α波 及び β波の 振幅	未測定	リポフスチン、 メラノソーム 乱れたオルガネラ	減少 d	菲薄化	無秩序なPR OS	
6	<i>Ccl2</i> ^{-/-}	9 ヶ月	網膜病変	ブルーゼン様	未実施	上昇	空胞のある、 リポフスチン、 メラノソーム	存在	濃厚化	ピクノーゼ PR, 部位的萎縮	存在
7	<i>Ccr2</i> ^{-/-}	9 ヶ月	網膜病変	ブルーゼン様	未実施	上昇	色素脱失症, 基底層入の減少	存在	濃厚化	ONL 萎縮, 部位的萎縮	存在
8	<i>Cx3cr1</i> ^{-/-}	12 ヶ月	網膜病変	ブルーゼン様	未実施	未測定	細胞内 脂質沈着 & フアゴソーム	存在	なし	外側の網膜 菲薄化, 進行性変性	レーザー 損傷の後 だけ

表2
乾燥AMDモデルの網膜病状

表2 乾燥AMDモデルの網膜病状											
#	マウス モデル	臨床情報		生化学データ			病理学的情報			CNV	
		発病 年齢	臨床検査	病変の タイプ	ERG 変化	A2E レベル	RPE 変化	基底 沈着物	BM 変化		光受容体萎縮
9	<i>Ccl2</i> ^{+/+} / <i>Cx3cr1</i> ^{-/-}	4-6 週	網膜病変	ホルマーゼン様	減少 α波 及び β波の 振幅	上昇	色素脱失症, 空胞変性, リポフスチン, メラノソーム 減少→ 変性	存在	濃厚化	OS 組織崩壊及び 萎縮	存在
10	<i>Sod1</i> ^{-/-}	7 ヶ月	網膜病変	ホルマーゼン様	未実施	未測定	空胞変性, 変性	存在	濃厚化	IS & OS 消失	存在
11	<i>Sod2</i> ノックダウン	4 ヶ月	未検	-	減少 α波 及び β波の 振幅	上昇	リポフスチン, 色素脱失症, 基底の層悪化, 空胞変性, ミトコンドリア 異常	Blamd	濃厚化	無秩序なPR OS, 内側網膜菲薄化,	なし

表2
乾燥AMDモデルの網膜病状

表2 乾燥AMDモデルの網膜病状												
#	モデル	臨床情報			生化学データ			病理学的情報			光受容体萎縮	CNV
		発病年齢	臨床検査	病変のタイプ	ERG変化	A2Eレベル	RPE変化	基底沈着物	BM変化			
12	nepriylsi n ₁₋₂	27ヶ月	未検	-	未実施	未測定	空腔変性、 * タイト及び接着 シヤンクシヨンの減少、 歪んだ基底陥入、 変性	Blamd & Blind	なし	なし	なし； VEGF 上方向制御， PEDF 下方向制御	
13	mcd/mcd ペウス	12ヶ月	網膜病変	RPE 色素変化 & ドルーゼン様 沈着物	減少 α波 及び β波の 振幅	未測定	肥大、 色素脱失症及び 減弱	Blamd & Blind	なし	ONL 菲薄化， INL 組織崩壊	なし	

10

20

30

表2 乾燥AMDモデルの網膜病状											
#	マウス モデル	臨床情報			生化学データ			病理学的情報			
		発病 年齢	臨床検査	病変の タイプ	ERG 変化	A2E レベル	RPE 変化	基底 沈着物	BM 変化	光受容体萎縮	CNV
14	$Cp^{-/-}/He^{ph}$	5-6 ヶ月	病変なし	なし	未実施	未測定	リボフスチン, リンゴ酸, エンピドリン, & フアゴソーム, 色素脱失症; RPE 肥大, 増殖 ネクロシス	存在	空胞化	PR減少の 網膜領域、 ISの最終的な 減少へ進行、 OS, & ONL 菲薄化	存在
15	$ApoE^{-/-}$	2 ヶ月	未検	なし	未実施	未測定	正常	Blind	空胞化	なし	なし
16	$ApoE4$ TR	65 週 127 週	未検	ボルネーゼン様	未実施	未測定	空胞変性, 色素過剰, 色素脱失症, 萎縮, 無秩序な基底膜入 いずれも 検出されず;	Blind	濃厚化	ONLの菲薄化	存在

10

20

30

表2
乾燥AMDモデルの網膜病状

#	マウス モデル	臨床情報		生化学データ			病理学的情報		光受容体萎縮	CNV
		発病 年齢	臨床検査	病変の タイプ	ERG 変化	A2E レベル	RPE 変化	基底 沈着物		
17	APOE3- eiden	9 ヶ月	未検	-	未実施	未測定	しかしながら 評価不能	BlamD	濃厚化	なし
18	APO B100	3 ヶ月	未検	-	未実施	未測定	副次的な 空胞変性	BlamD	濃厚化	なし
19	CEP- 免疫化 マウス (免疫後)	3 ヶ月	網膜病変	斑状 網様 変化	未実施	未測定	小水疱形成, 核濃縮, 溶解, 及び RPE減少面積	BlamD	濃厚化	膨張したPR レーザー 損傷の後 だけ
20	<i>arr12/arr d2</i>	4 ヶ月	網膜病変	RPE 色素過剰症 及び 色素脱失症 血管希薄化	減少 振幅, 最終的には 波は消滅	未測定	フアゴソーム, 先端突起の減少, 色素脱失症, 萎縮	なし	なし	INL & ONL 非薄化, ネクローシス シナプス, OS 断片化
21	<i>Mjfp^{td6}</i>	3 ヶ月	網膜病変	ドルーゼン様	減少 振幅, 最終的には 波は消滅	未測定	リボフスチン	なし	none	全ての層に おけるPR変性

10

20

30

表2
乾燥AMDモデルの網膜病状

#	マウス モデル	臨床情報			生化学データ			病理学的情報			CNV
		発病 年齢	臨床検査	病変の タイプ	ERG 変化	AZE レベル	RPE 変化	基底 沈着物	BM 変化	光受容体萎縮	
22	<i>Nr2e3^{fl/fl}</i>	1 ヶ月	網膜病変	ボルネーセン様	減少 α波 及び β波の 振幅	未測定	先端の絨毛 遅延	なし	なし	ONL 滴状紋及び ローゼットを 有する異形成症、 進行性非薄化	なし
23	<i>cpfl3</i>	8 ヶ月	病変なし	なし	減少 明順応反応	未測定	なし	なし	なし	空洞、 PR OS 短縮	なし
24	SAMP8	8ヶ月	未検	-	未実施	未測定	リボファスチン、 基底陥入の膨潤、 微絨毛破壊、 重症変性	Bland	濃厚化、 断片化	なし	存在

略称: RPE、網膜色素上皮; CNV、脈絡膜血管新生; ERG、網膜電図検査; BM、ブールツ膜; mo、月; AZE、N-レチニリデン-N-レチニルエタノールアミン;
Bland、基底の薄層状沈着物; Blind、基底の線形沈着物; PR、光受容体; OS、外側の核層; ONL、外側の核層; IS、内側の核層; VEGF、血管内皮成長因子;
PEDF、因子由来の色素上皮層

40

50

【0150】

本発明は、アミロイド斑又は関連する生物学的物質を減少させる所望の活性に関する抗体をスクリーニングする方法を提供する。アミロイド斑に対する活性をスクリーニングするために、アルツハイマー病患者又は特徴的なアルツハイマー病状を有する動物モデルの脳由来の組織サンプルを、インビトロにおける培地中での試験下で抗体とFcレセプターを有する食細胞(例えばミクログリア細胞)と接触させる。食細胞は、一次培養又は細胞株(例えばBV-2、C8-B4又はTHP-1)であってもよい。ある方法において、成分は顕微鏡観察を容易にするために顕微鏡スライドに固定される。ある方法において、複合の反応はマイクロタイターディッシュのウェルにおいて平行して実施される。かかるフォーマットにおいて、分離式小型顕微鏡スライドを分離式ウェルに搭載させてもよく、又は、非顕微鏡的検出フォーマット(例えばA のELISA検出)を用いてもよい。好ましくは、一連の測定値は、反応が進行する前のベースライン値からスタートするインビトロ反応混合物中におけるアミロイド斑の量及び反応中の1又は複数の試験値である。抗原は、例えば、A 又はアミロイド斑の他の成分に対する蛍光ラベル抗体を用いた染色によって検出することができる。

染色に使用する抗体は、除去活性に関して試験される抗体と同じでも同じでなくてもよい。アミロイド斑に関する反応中におけるベースラインとの相対的な減少は、試験抗体がアミロイド斑抑制活性を有することを示す。かかる抗体は、アルツハイマー病及び他のアミロイド形成的疾患の予防又は治療に有用な可能性がある。

【0151】

アルツハイマー病及びアミロイド斑によって特徴づけられる他の疾患に関するある動物モデルは以前から記載されており、アミロイド斑除去抗体又はアルツハイマー病に対する活性を有する抗体に関するスクリーニングに用いることができる。アルツハイマー病の動物モデルの例には、ヒト家族性アルツハイマー病(FAD)p-アミロイド前駆体(APP)を発現する動物、ヒト野生型APPを過剰発現する動物、p-アミロイド1-42(pA)を過剰発現する動物、FADプレセニリン(presenilin)-1(PS-1)を発現する動物(例えば、Higgins, LS, 1999, Molecular Medicine Today 5 : 274-276を参照)、グリコーゲンシンターゼキナーゼ(GSK)を過剰発現するマウス(Lucas et al, EMBO J. 20, p27-39, 2001を参照)、APP又はPS1の変異遺伝子を過剰発現するマウス、APP及びPS1の両方の変異遺伝子を過剰発現する二重(APP/PS1)トランスジェニックマウスモデル、変異APP株Tg2576と変異PS1M146Lトランスジェニック株との交配から得られた二重トランスジェニックマウス(Holcomb et al., Nat. Med. 4(1):97-100, 1998)、「スウェーデン」変異アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウス(APP; Tg2576; K670N/M671L; Hsiao et al, 1996, Science, 274:99-102)、トランスジェニックAPPV717Fマウス(別名:PDAPPマウス; Games et al., Nature 373: 523-527, 1995)、及びapoE欠損PDAPPマウスのコホート(Bales et al., Nat. Genet. 17: 263-64, 1997)が含まれる。

【0152】

能動的免疫原は、血清中における抗体の誘導に関して試験することもできる。受動的及び能動的免疫原は、脳血液関門を横切って動物モデルの目へ向かう抗体の経路に関して試験することができる。これらの実験において、抗体が動物のネイティブネオエピトープに結合することは必ずしも必要でない。

【0153】

抗体又は抗体を誘導する断片は、iC3bによって特徴づけられる疾患(例えばAMD、慢性関節リウマチ及びSLE)の症状を自然に又は誘導によって発病している非ヒト霊長類において試験することもできる。

【0154】

抗体又は活性薬剤に関する試験は、抗体又は活性薬剤が存在しない場合を除いて、平行しての実験が実施されるコントロールと共に(例えば、媒体と置き換えることによって)通常は実施される。試験中の抗体又は活性薬剤に起因する兆候又は症状、疾患の抑制、遅延又は阻害は、コントロールと比較して評価することができる。

【0155】

VI. 治療に適する患者

治療に適する患者は、iC3bに関連した障害を患っているか発病のリスクがある。障害は、異常なレベル又は健常な個体と比較したiC3bの分布によって特徴付けられる疾患、特にiC3bの凝集体によって(時には他のポリペプチド及び/又は脂質を伴って)形成された細胞外沈着物によって特徴付けられる疾患を意味する。かかる沈着物は、iC3bのネオエピトープ若しくは他のドルーゼン成分に対して結合する抗体を用いて染色される。かかる沈着物は、界面活性剤又は変性剤(例えばグアニジン)を含む水と比較して水に比較的溶解しない。かかる障害は、体液(例えばCSFのプラズマ)中のiC3bレベルの上昇と関連する可能性もある。iC3b関連障害には、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、黄斑変性疾患及び他の補体関連眼疾患が含まれる。補体関連眼疾患には、黄斑変性疾患(例えば、乾燥及び湿性(非滲出性及び滲出性)形態を含む全てのステージの加齢性黄斑変性症(AMD))、脈絡膜血管新生(CNV)、ブドウ膜炎、糖尿病性及び他の虚血関連網膜症、眼内炎及び他の眼内新生血管疾患、例えば糖尿病性黄斑浮腫、病的近視、フォンヒッペル-リンダウ病、目のヒストプラスマ症、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)、角膜新血管

形成並びに網膜新血管形成が含まれる。iC3bは、アルツハイマー病において現れる斑の成分でもある(Loeffler et al., J. Neuroinflamm.. 2008 5:9)ため、アルツハイマー疾患及び関連疾患(例えば軽度認知障害)は本方法によって治療することもできる。

【0156】

この方法は、特に加齢性黄斑変性症(AMD)を治療することに適している。AMDは、黄斑の年齢関連変性であり、60歳以上の個体における不可逆性視覚機能不全の主要な原因である。AMDには非滲出性(乾燥性)と滲出性(湿性)AMDの2種類が存在する。乾燥性又は非滲出性型は、網膜色素上皮(RPE)上の沈着物(ドルーゼン)と同様に、中央網膜(黄斑)下にあるRPEの萎縮性及び肥大性変化を伴う。非滲出性AMDを患う患者は、AMDの湿性(又は、滲出性)型へ進行する可能性があり、脈絡膜新生血管膜(CNVM)と呼ばれる異常な血管は、網膜下で発病し、体液及び血液を漏出させ、最終的には網膜中及びその下に目が見えなくなるような円板状の傷跡を生じさせる。非滲出性AMDは、通常、滲出性AMDの前兆であり、より一般的である。非滲出性AMDの提示は変化し、固いドルーゼン、柔らかいドルーゼン、RPE部位的萎縮及び色素凝集が現れる可能性がある。補体成分は、AMDの初期にRPEに沈着する。これは、ドルーゼンの主要な構成要素である。

10

【0157】

治療に適する患者には、現在症状が出ている患者と、疾患のリスクがあるが症状が出ていない個人が含まれる。疾患のリスクがある患者には、疾患に関する公知の遺伝的リスクを有する患者が含まれる。かかる個体には、この疾患を経験している親類もつ個体と、遺伝的及び生化学的マーカー分析によって決定されるリスクを有する個体が含まれる。リスクの遺伝的マーカーには、補体H因子(CFH)多型が含まれる。これは、AMD及び/又はCNVの発病のリスクと関連している。CFHにおける変異は、補体を活性化させることができ、続いてAMD/CNVを引き起こす可能性がある。CFH多型は、AMDの寄与リスクの50%を占める(Klein et al., Science 308:385-9 (2005))。CFH(HF1/CFH)における共通のハプロタイプが、個体における加齢性黄斑変性症の素因になることが明らかとなった(Hageman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(2):7227-7232 (2005))。AMDと関連する他の多型は、FB、C3又はLOC387715(組織プロテアーゼ)にて生じる。ApoE2は、AMD及びiCB3と関連する他の疾患リスクの遺伝的マーカーでもある。喫煙も、AMDのリスクを高める。

20

【0158】

iC3bと関連する疾患を患っている個体は、通常、従来の基準によって同定することができる。例えば、AMD診断技術には、眼底撮影及び血管撮影、光コヒーレンストモグラフィー及び超音波検査及び超音波生体顕微鏡検査が含まれる。

30

【0159】

ApoE4対立遺伝子の存在は、アルツハイマー病を含む多数の神経系疾患及び状態の発病のリスクの増加、その重症度及び/又は低年齢化の増加と関連している(例えば、Mayley et al., PNAS 103, 5644-5651 (2006)を参照)。神経系疾患及び状態とApoE4対立遺伝子との間の関連性のため、現在の投与計画では、iC3bの沈着と関連した任意の神経系疾患(例えば、アルツハイマー病)を患っているかその発病のリスクがあると考えられている、ApoE4対立遺伝子の保因者である任意の対象の治療又は予防に用いることができる。この投与計画は、ApoE4の保因状況に関係なく、かかる疾患の治療又は予防に用いることもできる。iC3b沈着と関連する神経系疾患のうち、本方法は、特にアルツハイマー病、特にApoE4保因者の患者における治療又は予防に適している。治療に適する患者には、現在症状が出ている患者と、アルツハイマー病のリスクがあるが症状が出ていない個体が含まれる。アルツハイマー病のリスクがある患者は、疾患に関する公知の遺伝的リスクを有する患者が含まれる。かかる個体には、この疾患を経験している親類をもつ個体と、遺伝的及び生化学的マーカー分析によって決定されるリスクを有する個体が含まれる。リスクの遺伝的マーカーには、特に、ヘテロ接合型、より多くはホモ接合型のApoE4対立遺伝子が含まれる。アルツハイマー病リスクの他のマーカーは、APP遺伝子の変異、特に、位置717並びに位置670及び671の変異(それぞれハーディ及びスウェーデン変異と称される)、プレセニリン遺伝子であるPS1及びPS2の変異、ADの家族歴、高コレステロール血症又はアテローム硬化

40

50

が含まれる。現在アルツハイマー病を患っている個体は、PET画像診断、特徴的な痴呆及び上述の危険因子の存在によって認識することができる。加えて、ADを患っている個体を同定するのに、多くの診断検査を利用することができる。これらには、CSFタウ及びA₄₂レベルの測定値が含まれる。タウレベルの増加とA₄₂レベルの減少は、ADの存在を示す。

【0160】

無症候性患者において、治療は、目におけるドルーゼン様病状の視覚確認及び/又は危険度に応じた任意の年齢(例えば、10、20、30歳)において開始することができる。しかしながら、通常、患者が40、50、60又は70歳に達するまで治療を開始する必要はない。

【0161】

VII. 医薬組成物及び治療の方法

予防の応用において、抗体又は抗体を誘導するための薬剤又はそれと同じものを含む医薬組成物は、疾患に関する少なくとも一つの兆候又は症状のリスクを減らすか、その重症度を低下させるか、その発症を遅延させるのに効果的な投与計画(用量、頻度及び/又は投与経路を含む)において、iC3bと関連する疾患(例えばAMD又はAD)に罹患しやすい、そうでなければそのリスクがある患者に投与される。特に、この投与計画は、患部組織におけるiC3b沈着を阻害又は遅延させる、及び/又はその毒性を阻害又は遅延させる、及び/又は機能障害(例えば、AMDの場合は視野、慢性関節リウマチの場合は運動能及びADの場合は認識力又は挙動)の進行を阻害及び/又は遅延させるために、好ましくは効果的である。治療の応用において、抗体又は抗体を誘導する薬剤は、疾患に関する少なくとも一つの兆候又は症状の更なる悪化を改善するか又は少なくとも阻害するのに効果的な投与計画(用量、頻度及び投与経路)において、疾患(例えば、AMD)を患っている疑いがある患者又は既にその疾患を患っている患者に投与される。特に、この投与計画は、好ましくは、毒性及び/又は機能障害に関連する、iC3bレベルの更なる増加を抑制する又は少なくとも阻害するのに効果的である。

【0162】

この投与計画は、治療を受けた個々の患者が本発明の方法によって治療されていない比較患者のコントロール集団における平均的な結果より良好な結果が達成される場合、又は、より良好な結果が比較臨床試験(例えば、第二相、第二/三相又は第三相試験)での治療患者対コントロール患者において $p < 0.05$ 若しくは0.01又は更に0.001のレベルで証明されている場合、治療的又は予防的に効果的であると考えられる。

【0163】

この治療は、個々の患者において、当該の疾患に関する従来の兆候又は症状と、障害と関連する沈着物か血液若しくは他の体液(例えば血液又はCSF)のいずれかにおけるiC3bのレベルから観察することができる。好ましい治療反応は、iC3b沈着物が経時的に減少すること、又は別の比較可能な無処置患者において予想される増加と比較して更なる増加が少なくとも阻害されることによって示される。眼疾患(例えばAMD又はCNV)の治療は、眼内疾患(例えば失明の程度又は進行)を評価する際に一般的に用いられる様々なエンドポイントによって観察することができる。失明は、ベースラインから所望の時点までの最良矯正視力(BCVA)の平均変化を測定すること(例えば、BCVAは、4メートルの試験距離で、糖尿病性網膜症の早期治療研究(Early Treatment Diabetic Retinopathy Study)(ETDRS)視力チャート及び評価に基づく)、ベースラインと比較して所望の時点での視力において15個よりも少ない数の文字を見落とす対象の割合を測定すること、ベースラインと比較して所望の時点での視力において15個よりも多くの数の文字を獲得する対象の割合を測定すること、所望の時点で20/2000相当かそれより悪いスネレン視力を有する対象の割合を測定すること、NEI視機能質問表(Visual Functioning Questionnaire)を測定すること、例えば、蛍光眼底血管造影法によって、所望の時点でのCNVのサイズ及びCNV漏出量を測定することによって、評価することができる。眼球評価には、眼検査を実施すること、眼圧を測定すること、視力を評価すること、スリットランプ圧を測定すること、又は、眼内炎を評価することを含めてもよい。

10

20

30

40

50

【0164】

治療は、患者の血液又は他の体液において、又は、特定の体液において受動的に投与された抗体又は能動的に誘導された抗体のレベルを決定することによって観察することもできる。かかる抗体のレベルは、例えば、免疫アッセイ(例えばELISA)によって決定することができる。iC3b又はそのネオエピトープを含む断片は、かかるアッセイにおける結合パートナーとして用いることができる。しかしながら、かかる結合パートナーは、iC3bとC3bの両方に結合する抗体を検出することも可能であるが、ネオエピトープに特異的ではないかもしれない。ネオエピトープ特異的抗体は、C3b又はC3と比較してiC3bに優先的に結合する抗体を同定する上述の方法のいずれかによって、C3bに結合する抗体から区別することができる。あるいは、受動的な投与の場合、投与されたiC3bに対する抗体のレベルは、結合パートナーとして投与された抗体に対する抗イディオタイプ抗体を用いて決定することができる。かかるモニタリングは、効果的な抗体反応が生じるとき、そして、もし以前の免疫化と比べて弱まった抗体反応のレベルを回復させるために追加免疫が必要なとき、能動免疫の評価に特に有効である。

10

【0165】

効果的な抗体用量は、投与手段、標的部位、患者の生理的様相、患者が公知のiC3b関連性疾患の遺伝的リスクを有するか否か、患者がヒト又は動物であるか否か、投与される他の薬物、及び治療が予防的又は治療的であるか否かを含む多くの種々の要因に依存して変わる。

【0166】

抗体に関する例示的な用量範囲は、患者体重に対して約0.01~5mg/kg、より通常は0.1~3mg/kg又は0.15-2mg/kg又は0.15-1.5mg/kgである。抗体は、かかる用量を、毎日、隔日、毎週、隔週、毎月、四半期に、又は、実証的分析によって決定された任意の他のスケジュールに従って投与することができる。例示的な治療は、長期(例えば、少なくとも6ヵ月)にわたる複数回用量の投与を必要とする。更なる例示的な治療計画は、2週間毎に1回、又は1ヶ月に1回又は3~6ヵ月毎に1回の投与を必要とする。

20

【0167】

能動的投与に関する薬剤の量は、患者当たり0.1-500 µg、より通常はヒトへの投与に関する注射当たり1-100又は1-10 µgと異なるものである。注射剤のタイミングは、1日に1回から、1年に1回、十年に1回へ著しく変化させることができる。典型的な投与計画は、免疫化の後に時間を開けて(例えば6週間のインターバル又は2ヵ月)の追加注射をすることからなる。他の投与計画は、免疫化の1、2及び12ヵ月後に追加注射をすることからなる。他の投与計画は、死ぬまで2ヵ月毎に注射をすることを伴う。あるいは、追加注射は、免疫反応の観察によって指示される不定期であってもよい。

30

【0168】

抗体又は抗体を誘導する薬剤は、末梢ルート(即ち、投与された抗体又は誘導された抗体が血液網膜バリアを越えて目の目的部位に到達するもの)を介して投与することができる。投与ルートには、局所、静脈内、硝子体内、経口、皮下、動脈内、脳内、髄腔内、腹腔内、鼻腔内又は筋肉内が含まれる。抗体の投与に関する好ましいルートは、眼性障害に関して、静脈内、皮下及び眼(例えば点眼又は硝子体内)である能動免疫に関する好ましいルートは、皮下及び筋肉内である。この種の注射は、腕部又は脚部の筋肉に最も典型的に実施される。ある方法において、薬剤は、沈着物が蓄積している特定の組織に直接導入される。

40

【0169】

非経口的投与に関する医薬組成物は、好ましくは、無菌であり、実質的に等張であり、そしてGMP条件下で製造されている。医薬組成物は、単位用量の形態(すなわち、単回投与の用量)にて提供することができる。医薬組成物は、1又は複数の生理的に許容可能な賦形剤(例えば希釈液、緩衝液、安定剤、塩、糖、ポリソルベート又は他の助剤)を使用して調製することができる。剤形は、選択される投与ルート次第である。注射に関して、抗体は、水溶液に、好ましくは生理的に適合する緩衝液、例えばハンクス液、リンゲル液又は生

50

理食塩水又は酢酸緩衝液(注射部位での不快感を低減させるため)に調製することができる。この溶液は、製剤化剤(例えば、懸濁剤、安定剤及び/又は分散剤)を含むことができる。あるいは、抗体は、使用前に適切な媒体(例えば、滅菌された発熱性物質フリーの水)を用いて構成される凍結乾燥形態とすることができる。

【0170】

本投与計画は、治療される疾患の治療又は予防に効果的な他の薬剤と組み合わせて投与することができる。例えば、AMDの場合、存在する投与計画は、VEGF(例えばベバシズマブ、ranibizumab又はaflibercept)の抑制薬によって、又は、慢性関節リウマチNSAIDS、コルチコステロイド、immunosuppresants及びTNF-アルファ抑制薬及びNSAIDS(コルチコステロイド又はSLEのためのリツキシマブ)の場合結合されることができる。

10

【0171】

引用される全ての刊行物(GenBank登録番号、UniProtKB/Swiss-Prot登録番号等を含む)、特許及び特許出願は、あたかも個々の刊行物、特許及び特許出願が全ての目的に関してその全部が参照によって組み込まれていることが具体的且つ個々に明示されているのと同程度に全ての目的に関してそれら全部が参照によって本願明細書に組み込まれる。Genbank及びUniProtKB/Swiss-Prot登録番号等に関連する配列に何らかの相違がある場合、本願は、本願出願日に関する引用登録番号に関連する配列を指す。もし文脈から別途明らかされていなければ、本発明の任意のステップ、特徴、エレメント、実施形態、態様等は任意の他のものと組み合わせて使用することができる。本発明が明快さや理解のために図と例とをあげて幾らか詳細に記載しているが、ある種の変更及び修正は、添付の特許請求の範囲内で実施してもよいことは明らかである。

20

【実施例】

【0172】

実施例1. iC3b断片SEETKGGCでの免疫化

カップリングを容易にするためにGly, Gly, CysをSEETKペプチドのC末端に加えて、マレイミド(maleamide)結合を介してヒツジ抗マウスに結合させた。注射のスケジュールは、以下の通りとした。

【表3】

表3: AMD-2-SAM注射スケジュール

免疫原	名前	ペプチド	免疫化			力価		コメント
			ケージ#	マウス	アジュバント	対ペプチド	対iC3b	
AMD-2-SAM	SEETKGGC (配列番号:15)	1	Jax, A/J	RIBI	>200 K	1 to 7 K		
AMD-2-SAM	SEETKGGC (配列番号:15)	2	Jax, A/J	CFA/IFA	25から61 K	1から33 K	2つ融合物	
AMD-2-SAM	SEETKGGC (配列番号:15)	3	Jax, A/J	RIBI	39から161 K	1から15 K	cx w/ C3, C3b, & iC3b	
AMD-2-SAM	SEETKGGC (配列番号:15)	4	Jax, A/J	CFA/IFA	2から16 K	>17 K	cx w/ C3, C3b, & iC3b	

30

40

【0173】

ペプチドに対する力価は、高かった。iC3bに対する力価は低く、C3及びC3bに対して交差反応性を示した。

【0174】

実施例2. iC3b断片CGGQLPSRでの免疫化

Cys, Gly GlyをQLPRSペプチドのN末端に加えて、上記のように結合させた。注射スケジュールは、下記の通りである。

【表 4】

表4: EPSP.50-SAM注射スケジュール

免疫原 名前	ペプチド	免疫化			力価		コメント
		ケージ#	マウス	アジュバント	対ペプチド	対 iC3b	
EPSP.50-SAM	CGGQLPSR (配列番号:14)	1	Jax, A/J	CFA/IFA	>13,00		2つの融合物,
EPSP.50-SAM	CGGQLPSR (配列番号:14)	2	Jax, A/J	RIBI	80から250 K		2つの融合物
EPSP.50-SAM	CGGQLPSR (配列番号:14)	3	Jax, A/J	RIBI	24から237 K	<3 K	2つ融合させた, 1つ凍結させた
EPSP.50-SAM	CGGQLPSR (配列番号:14)	4	Jax, A/J	RIBI	15から333 K	1 から 18 K	cx w/ C3, C3b, & iC3b
EPSP.50-SAM	CGGQLPSR (配列番号:14)	5	Jax, A/J	CFA/IFA	90から264 K	7 から 32 K	cx w/ C3, C3b, & iC3b

【 0 1 7 5 】

ペプチドに対する力価は高かった; iC3bに対する力価は低かった。

【 0 1 7 6 】

実施例3. iC3bタンパク質での免疫化

注射のスケジュールは、以下の通りとした。

【表 5】

表5:iC3b注射スケジュール

免疫原 名前	ペプチド	免疫化			力価		コメント
		ケージ#	マウス	アジュバント	対 ペプチド	対 iC3b	
iC3b	ペプチド	1	Jax, A/J	RIBI		164から 2,400 K	2つ融合させた, 1つ凍結させた
iC3b	ペプチド	2	Balb/c	RIBI		17から419 K	3つ凍結させた

【 0 1 7 7 】

注射JS13: マウス#1-3を、RIBIアジュバントと混合した10 µgのiC3b/100 µlを用いて、6回(週一回)腹腔内投与(「IP」)を通じて免疫化した。iC3bは、Complement Technologyの#A115(Tyler, TX)及びEMD Milliporeの#204863(Darmstadt, Germany)から手に入れた。マウスにおけるiC3bに対する力価が1:405,000に高まった。注射の3日前に、10 µgのiC3bを含むPBSを、半分の量をIVによって、もう半分の量をIPによってマウスに追加した。

【 0 1 7 8 】

注射JS14: マウス#1-4を、RIBIアジュバントと混合した10 µgのiC3b/100 µlを用いて4回(週一回)、IPで免疫化した。マウスにおけるiC3bに対する力価が1:2,396,000に高まった。注射の3日前に、10 µgのiC3bを含むPBSを、半分の量を静脈内投与「IV」を介して、もう半分の量をIPによってマウスに追加した。

【 0 1 7 9 】

実施例4. ELISAによる抗体の特性評価

直接ELISAアッセイフォーマット: 一次スクリーニングのために、プレートをEPSP.50-OV A(オボアルブミン(ovabumin)にQLPRSを結合)で被覆した。融合プレートからの上清、コントロール抗体、免疫化されたマウスの血液を、それぞれ、検出抗体として用いた。ヤギ抗-マウス-HRP(Jackson ImmunoResearch #115-035-164)を二次抗体として用いた。1-Step A BTS(Thermo #37615)を基質として用いた。

【 0 1 8 0 】

10

20

30

40

50

二次スクリーニングのために、一次スクリーニングにおいて陽性であったものを、次に、サンドイッチELISAアッセイフォーマットにおいてスクリーニングした。

【0181】

サンドイッチELISAアッセイフォーマット:二次スクリーニングのために、C3、C3b及びiC3bを用いて交差反応性を試験した。プレートに、捕獲抗体としてのニトリ抗C3抗体(Le eBio #CC3-80A)で被覆した。一次スクリーニングのために、iC3bだけを抗原捕獲のために用いた。抗体特性評価のために、全てのC3タンパク質(C3(Complement Technology #A113)、C3b(Complement Technology #A114)、及びiC3b(Complement Technology #A115))を抗原捕獲に用いた。細胞からの上清、コントロール抗体、マウス抗ヒトiC3b(A209抗体(Quidel))を、それぞれ、検出抗体として用いた。ヤギ抗-マウス-HRP(Jackson ImmunoResearch #115-035-164)を二次抗体として用いた。1-Step ABTS(Thermo #37615)を基質として用いた。コントロール抗体A209は、C3b及びC3よりもiC3bに優先的な結合性を示す(図3を参照)。

10

【0182】

サンドイッチELISAは、実施例3の2匹のマウスに関して実施した。最初に、細胞上清だけ、iC3bに対する結合性を試験した。C3、C3b及びiC3bは、交差反応性試験に関する二次スクリーニングに用いた。2H8、2A10、6G1及び5D2は、ELISAスクリーニングとピアコア分析の両方においてiC3bに優先して結合することを示した。

【0183】

注射JS13(実施例3のマウス#1-3の注射)は、一次スクリーニングにおいて96のiC3b陽性があった。注射JS14(実施例3のマウス#1-4の注射)は、一次スクリーニングにおいて360のマウスIgG陽性があった。抗体2H8、2A10、6G1及び5D2は、C3又はC3bタンパク質よりもiC3bの方に2倍を超えるより良好な特異性を示した(図4及び5を参照)。

20

【0184】

C3、C3b及びiC3bがプレートに直接被覆されている直接ELISAにおいて、全ての抗体は特異性の欠如を示した。これは、サンドイッチELISAでは、iC3bに特異的に結合する抗体が、プレートに被覆されると失われてしまうiC3bの特異的な高次構造的エピトープを認識する可能性があることを示唆するものである。

【0185】

実施例5. ピアコアによる抗体の特性評価

予備的ピアコアアッセイは、相対的交差反応性を評価するために、iC3b又は潜在的に交差反応を起こし得る2つの補体種(例:C3b又はC3)のうちの1つを4種類の濃度を用いて実施した。ELISAとは異なり、 K_D が2倍差では、ピアコアアッセイにおいて特異性を立証するには十分ではない。抗マウスCM5チップは、製造業者の手順書に従って作成した。3つの抗体(2H8、2A10及び6G1)は、 R_{max} が25~50RU低下するようなレベルで捕獲させた。iC3b又は交差反応性タンパク質を4種類の濃度で用いた。両者とも上述したComplement Technologiesを由来とするものであった。

30

【0186】

2H8は、C3と比較してiC3bに特異性を示す(K_D の差が $>10X$)(表6)。2A10は、C3と比較してiC3bに特異性を示す(これらの条件下ではC3にほとんど結合しない)(表6)。6G1は、C3と比較してiC3bに特異性を示す(K_D の差が $>10X$)(表6)。

40

【表6】

表6. 抗体2H8、2A10、6G1の結合速度パラメーター

	抗原	会合速度 (ka)	解離速度 (kd)	解離定数 (K _D)
2H8	iC3b	2.9e4	4.5 e-3	153 nM
2H8 *	C3	-	-	$> 5 \mu\text{M}$
2A10 **	iC3b	-	-	-

50

2A10 **	C3	-	-	-
6G1	iC3b	9.8 e4	4.2e-3	43.3 nM
6G1	C3	1.3e4	2.8 e-2	2.1 μ M

*速度を決定できなかった。K_Dは、5 μ M超であると推定された(500nMでの観察された結合性に基づく。その実際のK_Dは少なくとも10倍超であった推定される)。

**速度を得ることができない。しかしながら、C3に対する2A10の親和性はiC3bより低い、理由は、速度を測定するためには、これらがiC3bと十分に結合しなかったが、C3とは全く結合しなかったためであると、推定することができる。

【 0 1 8 7 】

10

実施例6. 免疫沈降による抗体の特性評価

抗体を用いたC3及びiC3bの両方の共免疫沈降:20 μ gのC3及び2 μ gのiC3b(Complement Technologies)、5 μ gの試験抗体(1A2、2A10、2H8又は6G1)及び30 μ lの洗浄済みプロテインG-セファロース(GE Lifesciences)を、4 で一晩、200 μ lのリン酸緩衝食塩水(PBS)中でインキュベートした。沈殿物をPBSで二回洗浄して、放射性免疫沈降(radioimmuoprecipitation)アッセイ緩衝液(RIPA)で一回洗浄した。そして、結合したタンパク質を20 μ lの還元/変性サンプル緩衝液(Invitrogen)中でビーズスラリーをボイルすることで溶出させた。免疫沈降サンプルに加えて、1 μ gのC3及び0.1 μ gのiC3bタンパク質を添加(loading)コントロールとして含めた(図6Aの最も左側のレーン)。サンプルをSDS-PAGEによって10%ビシ-トリスゲル(Invitrogen)で分離させて、ニトロセルロースに転写した。ブロッキング緩衝液(Invitrogen)中で1時間、メンブレンをブロッキングした後、メンブレンを0.5 μ g/mlのラビット抗C3抗体(Abnova, cat#PAB5002)と共に一晩インキュベートし、PBSTを用いて洗浄して、ヤギ抗ラビット二次抗体(Licor)と共にインキュベートした。Licor Odysseyスキャナを使用して画像を取り込んだ。C3のアルファ鎖は、約110kDのサイズがあり、ベータ鎖は約75kDのサイズがある。C3bのアルファ鎖は、約101kDのサイズがある。iC3bのアルファ鎖のN末端断片は、約63kDのサイズがあり、iC3bのC末端断片は約43kDのサイズがある。5 μ gの5D2を2 μ gのC3、C3b又はiC3bと共にインキュベートし(図6Bのレーン1-3)、また20 μ gのC3及び2 μ gのiC3bと共にインキュベートした(図6Bのレーン5)。コントロールとして、0.4 μ gのiC3b、C3b及びC3タンパク質の各々をゲル上の別々のレーンで移動させ、Abnovaラビットポリクローナル抗体及びGAR-染料によって検出した(図6C)。図6Aに示すように、38と49kDと間の移動度のバンドと、同等の強度、それほど強くない強度を持つ約98kDのバンドが、1A2免疫沈降物におけるラビット抗C3/C3b/iC3b抗体によって検出されたことから、1A2は、C3とiC3bの両方を等しく沈降させる(即ち、C3と比較してiC3bを優先的に認識しない)ことが示唆された。38と49kDと間の移動度のバンドと、約98kDの弱バンドは、C3と比較して優先的にiC3bを認識することを示唆する。図6A及び6Bに示すように、6G1、5D2及び2A10は、C3よりもiC3bをより免疫沈降させた。2H8と比較して、6G1、5D2又は2A10での免疫沈降は、約98kDのバンドがより弱い検出不可能であることから、6G1、5D2及び2A10はiC3bに対する特異性の程度が更に高いことが示される。

20

30

【 0 1 8 8 】

抗体を用いたC3b又はiC3bの免疫沈降:2 μ gのC3b又はiC3b(Complement Technologies)、4 μ gの指示抗体(2A10、2H8及び6G1)、そして、30 μ lの洗浄済みプロテインG-セファロース(GE Lifesciences)を、4 で一晩、リン酸緩衝食塩水(PBS)中でインキュベートした。沈殿物をPBSで二回洗浄して、放射性免疫沈降アッセイ緩衝液(RIPA)で一回洗浄した。そして、結合したタンパク質を20 μ lの還元/変性サンプル緩衝液(Invitrogen)中でビーズスラリーをボイルすることで溶出させた。免疫沈降サンプルに加えて、0.4 μ gの各精製タンパク質を添加コントロールとして含めた。サンプルをSDS-PAGEによって10%ビシ-トリスゲル(Invitrogen)で分離させて、ニトロセルロースに転写した。ブロッキング緩衝液(Invitrogen)中で1時間、メンブレンをブロッキングした後、メンブレンを0.5 μ g/mLのラビット抗C3抗体(Abnova, cat#PAB5002)と共に一晩インキュベートし、TBSTを用いて洗浄して、ヤギ抗ラビット二次抗体(Licor)と共にインキュベートした。Licor Odysseyスキャナを使

40

50

用して画像を取り込んだ。C3bに結合する抗体を用いたC3bの免疫沈降は、還元/変性ゲルにおいて75kDと100kDのバンドが示された。iC3bに結合する抗体を用いたiC3bの免疫沈降は、43kD、63kD及び75kDのバンドが示された。C3bと比較してiC3bに特異性がある抗体は、iC3bレーンにおいて43kDバンドが検出され、100kDバンド(完全なアルファ鎖)はC3bレーンにおいてほとんど検出されなかった。図7に示すように、抗体6G1は、これらの条件下でC3bと比較してiC3bに特異性がある。2H8は、完全なアルファ鎖を有するC3bを免疫沈降させたようにも見える。New England Biolabs由来のプロテインG磁気ビーズを使うと、プロテインGセファロースを用いて実験を実施したときのiC3bの割に2H8によるC3bの沈殿が少ないことが観察された。(図8を参照)。

【0189】

10

実施例7. ヒトアルツハイマー病の脳に関するiC3b抗体の免疫組織化学的特性評価

一般的な手順:5つのiC3b親和性精製マウスモノクローナル抗体を作成し、ADと診断された患者及びコントロール由来のヒト大脳皮質の最小限に固定された凍結切片に対して免疫組織化学的試験を行った。一般的な染色結果を表7に示している。アルツハイマー病サンプルは、iC3bに対するいくつかの抗体に関して反応性を示し、ベータアミロイド斑のサブセットの中心が最も顕著に染色された。iC3b染色は、豊富且つ大部分は灰白質に限定され、ある程度の反応性が白質において検出された。対照的に、健常者コントロールの皮質は、血管系のまわりのわずかな反応性を除いて、大部分がネガティブな染色結果であった。反応した抗体の中で、6G1が最も強度が強く、ベータアミロイド斑の中心で一貫して検出され、精製ヒトiC3bタンパク質を用いて予め吸着させておくと最も強い特異性を示した。

20

【表7】

表7. iC3b抗体の免疫組織化学的特性評価

抗体	ロット#	アイソタイプ	染色AD組織	濃度(mg/ml)
2H8.F6.H7	NB-0100	IgG2b/k	Yes	0.1 µg/mL
6G1.G12.D11	NB-0101	IgG2b/k	Yes	0.1 µg/mL
2A10.D1.F1	NB-0102	IgG2b/k	No	-
5D2.B7.D7.B1	NB-0108	IgG1/k	No	-
1G3.A1.A3	NB-0109	IgG1+ IgG2b/k	Yes	0.1 µg/mL

30

【0190】

方法:新鮮凍結ヒト脳組織をUniversity of California at San Diego ADRC Brain Bankから取得した。ヒト脳皮質の切片は、アルツハイマー病及びラクナ梗塞と診断された91歳の女性の前頭皮質(死後間隔:不明; braak病期6.2)と、梗塞及び急性虚血性変化と診断される77歳の女性由来の正常皮質(PMI: 12時間; braak病期0)から得られた。組織を低温維持装置上で10 µMに切断し、帯電スライドに直接マウントし、室温で一晩乾燥させた。10 µmの、cryocutスライドにマウントされた組織切片を-20 °Cで10分間、アセトン(AX0125-4; EMD Chemicals; Gibbstown, NJ)で固定した。そして、切片を.01M リン酸緩衝食塩水(PBS, pH 7.4; Sigma; P3813-10Pak; St. Louis, MO)で3×5分間すすいだ。そして、小片を5、2.5、1.25及び、.625 µg/mlの濃度で様々なiC3b抗体を用いて免疫組織化学的に染色した。免疫ペルオキシダーゼ方法は、主要な検出系であり、ビオチン化ヤギ抗マウス二次抗体(JacksonImmuno Research; 115-065-166)、ペクターABC増幅ステップ(ABC Elite Standard; PK-6100; Vector Laboratories)及び茶色の沈着物を作り出すDAB基質キットを用いた視覚化(Liquid DAB + Substrate Chromogen System; Dako K3468)からなっている。ネガティブコントロールは、一連の切片上でIgG-アイソタイプコントロール抗体を加える工程と、一次抗体なしに隣接する切片上での完全な免疫組織化学的手法を実行する工程からなっている。組織は、また、ポジティブコントロール抗体(3D6及びGFAP)で染色してIHC分

40

50

析のために組織抗原にアクセスできるようにした。Olympus Nanozoomer 2.0HTを用いてスライドの画像を取得し、画像をTIFFファイルとして収集した。

【0191】

事前吸着: その標的抗原に対する抗体の特異性を評価するために、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ のiC3b抗体は、 $10 \mu\text{g/mL}$ (100倍過剰)の精製ヒトiC3b、C3又はC3b(Complement Technology, Tyler, TX)を用いて4で一晩事前吸着を行った。そして、既に概説した通り、抗体を組織に加えて免疫組織化学手法を実施した。

【0192】

結果: AD脳をポジティブに染色した抗体の免疫活性は、 $0.625 \mu\text{g/mL}$ の希釈溶液で非常に強度が強く、灰白質における様々な形態を有する斑をラベルした(白質では僅かな反応性)であった(図9)。参照マウスモノクローナル抗体(カタログ# A209; Quidel Corporation, San Diego, CA)は、同じ濃度の他のiC3b抗体と平行して染色すると、斑に対する免疫活性量が最少であることを示した。 $0.625 \mu\text{g/mL}$ の希釈溶液において、6G1は最も強度が強かったことから、マイクログラム未満のレベルで更に希釈した(図10)。6G1に関する最善の信号雑音比は、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ の時に達成された(図11の「非吸着」の見出しを参照)。

10

【0193】

iC3b、C3b及びC3に対する精製ヒトタンパク質を用いた様々なiC3b抗体の前吸着は、6G1をiC3bで予め吸着させておくと染色が減衰することが示された。6G1をC3b又はC3で予め吸着させておくと染色に影響が出なかった(図11)。

【0194】

20

パート1: スライドにマウントされた小片に対する一次抗体のインキュベーション

【0195】

(1)30分間、1%過酸化水素(H3410-1L; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO)を含むPBS中でインキュベートすることによる内在性ペルオキシダーゼのブロック

【0196】

(a) pH 7.4の.01M PBSでの3×5分間すすぐ。

【0197】

(2)5%熱不活化正常ヤギ血清(#005-000-121; Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA)と0.25%Triton X-100(X100-500ML; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO)を含む500 μL の.01Mリン酸緩衝食塩水を用いてスライドをインキュベートして、非特異的染色をブロックする(「5%ヤギブロッキング溶液」)。

30

【0198】

(3)Avidin/Biotin Blocking Kit(SP-2001; Vector Laboratories; Burlingame, CA)を用いてインキュベートすることによって組織中の内在性ビオチンをブロックする。

【0199】

(a) 250 μL のAvidin溶液で15分間、組織をインキュベートする。

【0200】

(b) PBSで3×5分間すすぐ。

【0201】

(c) 250 μL のビオチン溶液で15分間、組織をインキュベートする。

40

【0202】

(d) PBSで3×5分間すすぐ。

【0203】

(4)下記の表8で概説している通り、濃度に従って、5%ヤギブロッキング溶液での一次iC3b抗体を希釈する。

【表 8】

表8. アセトンで固定されたAD脳組織を染色するための推奨希釈剤

抗体	ロット#	アイソタイプ	染色AD組織	濃度 (mg/ml)
2H8.F6.H7	NB-0100	IgG2b/k	Yes	0.625 µg/mL
6G1.G12.D11	NB-0101	IgG2b/k	Yes	0.100 µg/mL
2A10.D1.F1	NB-0102	IgG2b/k	No	免疫反応性なし
5D2.B7.D7.B1	NB-0108	IgG1/k	No	免疫反応性なし
1G3.A1.A3	NB-0109	IgG1+ IgG2b/k	Yes	0.625 µg/mL

10

【 0 2 0 4 】

(5)500 µlの抗体溶液/スライドを加えて、室温で1時間インキュベートする。

【 0 2 0 5 】

パート 2 : ビオチン化二次抗体及びABC増幅

(1)ヤギ抗マウス二次抗体を調製する。

【 0 2 0 6 】

(a) 5%ヤギブロッキング溶液でヤギ抗マウス二次抗体("Biotin-SP-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (min X Rat,Hu,Bov,Hrs,Rb Sr Prot); JacksonImmuno Research; 11 5-065-166)を1:500に希釈する。

20

【 0 2 0 7 】

(2)pH 7.4の.01M PBSで3回スライドをすすぐ。

【 0 2 0 8 】

(3)500 µLの二次抗体溶液/スライドを加えて、室温で1時間インキュベートする。

【 0 2 0 9 】

(4)ABC溶液(ABC Elite Standard; PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA)を、その使用の30分前にアビジン及びビオチン溶液を予め混合することによって調製する。

【 0 2 1 0 】

(a) 5mLのPBS毎に2滴のA溶液を加える。

30

【 0 2 1 1 】

(b) 5mLのPBS毎に2滴のB溶液を加える。

【 0 2 1 2 】

(c) 上記溶液をボルテックスする。

【 0 2 1 3 】

(5)pH 7.4の.01M PBSで3×5分間、スライドをすすぐ。

【 0 2 1 4 】

(6)予め混合しておいたアビジン-ビオチン溶液を用いて増幅して、組織切片を1時間インキュベートする。

【 0 2 1 5 】

(7)pH 7.4の.01M PBSで3×5分間すすぐ。

40

【 0 2 1 6 】

パート 3 : 色素原を用いた視覚化

(1)ABC溶液(ABC Elite Standard; PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA)をその使用の30分前にアビジン及びビオチン溶液を事前に混合することによって調製する。

【 0 2 1 7 】

(a) 5mLのPBS毎に2滴のA溶液を加える。

【 0 2 1 8 】

(b) 5mLのPBS毎に2滴のB溶液を加える。

【 0 2 1 9 】

50

(c) 上記溶液をボルテックスする。

【0220】

(2) pH 7.4の.01M PBSで3×5分間、スライドをすすぐ。

【0221】

(3) 予め混合しておいたアビジン-ビオチン溶液を用いて増幅して、組織切片を1時間インキュベートする。

【0222】

(4) pH 7.4の.01M PBSで3×5分間すすぐ。

【0223】

(5) DAB溶液(Liquid DAB + Substrate Chromogen System; Dako K3468; Carpinteria, CA)を調製する。 10

【0224】

(a) 1mLのDAB基質溶液あたり0.010mLのLiquid DAB(例えば、5mLのDAB基質溶液には0.050mL)を混合する。

【0225】

(b) 組織切片と500 µlの色素体及び基質とを、2分間又は染色が適切なレベルに達するまで反応させる。

【0226】

(6) 切片をそれぞれ3×5分間すすいで反応を止める。

【0227】

20

(7) ヘマトキシリン(Modified Harris Hematoxylin; # 72704; Richard-Allan Scientific; Kalamazoo, MI)でスライドを対比染色し、次に、アルコールが増加する系(50-、70-、95-、100-、100-及び100%)で脱水させ、新しいキシレンを3回変えることで洗浄し、そして、Cytoseal 60(#8310-4; Richard-Allan Scientific Kalamazoo, MI)を用いてカバースリップする。

【0228】

実施例8. 5D2は、マウスiC3bと交差反応する

Costar RIA/EIA(Costar #3590)プレートを、1ウェルあたり、マウスC3b/iC3b/C3cに特異的なラットモノクローナル抗体2/11(Hycult biotech, Cat. HM1065)が5 µg/ml含む50 µlのPBS中で被覆された。プレートを4で一晩被覆した。2日目に、プレートを洗浄緩衝液(TPBS + 0.05% Tween20)で5回洗浄して、室温で1時間、1ウェルあたりに50 µlのブロッキング緩衝液(1.5%PBS含有BSA)を用いてブロックした。そして、プレートを洗浄緩衝液で5回洗浄して、ブロッキング緩衝液で希釈したマウス血清(1:25に希釈)を1ウェルあたり50 µl用いてインキュベートした。マウス血清は、2匹のマウス由来の血清混合物である。1時間のインキュベーション後、指示の通り、プレートを5回洗浄して、種々の量のビオチン化iC3b抗体(50 µlのブロッキング緩衝液)を用いてインキュベートした。室温における1時間のインキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液を用いて再び5回洗浄して、1ウェルあたり、1:4000に希釈したストレプトアビジン-HRP(GE Healthcare, RPN 4401V)を含むブロッキングバッファーを用いてインキュベートした。プレートを、洗浄緩衝液を用いて5回洗浄して、室温で40分間、1ウェルにつき50 µlの1-step ABTS(Thermo Scientific, prod # 37615)を用いてインキュベートして、405nmで読み取った。マウス血清ELISAデータから、5D2は、マウスiC3bと交差反応する一方で、2H8、2A10及び6G1は、マウスiC3bと交差反応しないことが示されている(図12)。 30 40

【0229】

実施例9. Fortebioに基づく抗体競合アッセイ

iC3b結合に関して第一抗体(Ab1)が第二抗体(Ab2)と競合するか否かを試験するために、ストレプトアビジンセンサーを、初めに0.1%のBSAを含むPBSに10分間浸した。次に、センサーを以下の順序で様々な異なる成分を有する0.1%のBSAを含むPBSに浸した:(1) ステップ1: ベースラインを確立するために、センサーを0.1%のBSAを含むPBSに60秒間浸した;(2) ステップ2: Ab1を捕獲するために、センサーを、5 µg/mlのビオチン化Ab1を含む0.1%のBS 50

Aを含むPBSに120秒間浸した；(3) ステップ3:iC3bに結合する捕獲Ab1のために、センサーを、100nM(Ab1が2H8である場合)又は500nM(Ab1が2A10、5D2又は6G1である場合)の精製ヒトiC3bと0.1%のBSAとを含むにPBSに120秒間浸した；及び(4) ステップ4:Ab1によって捕獲されたiC3bにAb2が結合できるか否かを試験するために、センサーを、50 µg/mlのAb2と0.1%のBSAとを含むPBSに120秒間浸した。

【0230】

ビオチン化Ab1がAb2結合をブロックし、その逆の場合でもブロック(ビオチン化Ab2もAb1結合をブロック)する場合、Ab1及びAb2が同じエピトープに結合すると結論付けることができる。ビオチン化Ab1がAb2結合をブロックせず、その逆の場合もブロックしない場合、Ab1とAb2は互いに異なるエピトープに結合すると結論付けることができる。ビオチン化されたAb1がAb2結合をブロックするが、ビオチン化Ab2がAb1結合をブロックしない場合、Ab1とAb2は、重複したエピトープか互いの近くに位置する2つのエピトープに結合すると結論付けることができる。

10

【0231】

抗体2H8及び6G1は互いに競合せず、抗体2A10及び5D2は互いに競合しなかったことが判明した。加えて、抗体2H8も抗体6G1も抗体2A10又は抗体5D2と競合しなかった。しかしながら、抗体2A10又は抗体5D2は、抗体2H8及び6G1と競合することが判明した。

【0232】

従って、抗体2H8及び6G1はiC3b上における互いに異なるエピトープに結合し、抗体2A10及び5D2はiC3b上における互いに異なるエピトープに結合する。抗体2A10及び5D2は、2H8又は6G1と重複するエピトープか、その極近くのエピトープに結合する。

20

【0233】

実施例10. 6G1、2H8、2A10、5D2及び1A2は、A209及びMAB1-82814と競合しない

抗体6G1、2H8、2A10、5D2及び1A2が抗体A209と競合するか否かを試験するために、0.4 µgのiC3bを10%ビス-トリスゲル(Invitrogen)のSDS-PAGEによって分離して、ニトロセルロースに転写した。ブロッキング緩衝液(Invitrogen)中での1時間、メンブレンのブロック後、示される通り、10 µg/mlの競合Abの存在又は非存在下で1 µg/mlのビオチン化Quidel抗体を用いてメンブレンを室温でインキュベートした。メンブレンを、Tween-20を含むリン酸緩衝食塩水(PBST)を用いて洗浄し、ヤギ抗マウス二次抗体(Licor)と共にインキュベートした。Licor Odysseyスキャナを使用して画像を取得した。抗体6G1、2H8、2A10、5D2、1A2のいずれも抗体A209と競合しない一方で、MAB1-82814はA209と競合することが判明した(図13A)。

30

【0234】

抗体A209との競合は、また、直接ELISAを使用して試験した(図13B及びC)。プレートを10 µg/mlのiC3bで被覆した。ストレプトアビジン-HRP(GE Healthcare, RPN 4401V)を検出抗体として用いた。最初のELISA実験において、1 µg/mlのビオチン化抗体A209と10 µg/mlの競合Mab(6G1、2H8、2A10、5D2、1A2又はMAB1-82814)を一次抗体として用いた(図13B；レーン1:1 µg/mlのビオチン化A209；レーン2:1 µg/mlのビオチン化A209 + 10 µg/mlの1A2；レーン3:1 µg/mlのビオチン化A209 + 10 µg/mlの2A10；レーン4:1 µg/mlのビオチン化A209 + 10 µg/mlの2H8；レーン5:1 µg/mlのビオチン化A209 + 10 µg/mlの5D2；レーン6:1 µg/mlのビオチン化A209 + 10 µg/mlの6G1；レーン7:1 µg/mlのビオチン化A209 + 10 µg/mlのMAB1-82814；レーン8:ネガティブコントロール)。第二ELISA実験において、1 µg/mlのビオチン化Quidel Mabと100 µg/mlの競合Mab(6G1、2H8、2A10、5D2又は1A2)又は10 µg/mlのMAB1-82814を一次抗体として用いた(図13C；レーン1:1 µg/mlのビオチン化A209；レーン2:1 µg/mlのビオチン化A209 + 100 µg/mlの1A2；レーン3:1 µg/mlのビオチン化A209 + 100 µg/mlの2A10；レーン4:1 µg/mlのビオチン化A209 + 100 µg/mlの2H8；レーン5:1 µg/mlのビオチン化A209 + 100 µg/mlの5D2；レーン6:1 µg/mlのビオチン化A209 + 100 µg/mlの6G1；レーン7:1 µg/mlのビオチン化A209 + 10 µg/mlのMAB1-82814；レーン8:ネガティブコントロール)。ODは、405nmで測定した。抗体6G1、2H8、2A10、5D2、1A2のいずれも抗体A209と競合しない一方で、MAB1-82814がA209と競合することが明らかとなった(図13B及び13C)。

40

50

【0235】

ウェスタン及びELISA結果から、抗体6G1、2H8、2A10、5D2又は1A2は、A209及びMAB1-82814のものとは異なるエピトープに結合することが示された。

【0236】

実施例11. APOE4-HFCマウスモデルにおける受動免疫

E4ヒトapoEイソ型を発現するAPOE4標的交換マウスは、Sullivan外のJ Biol Chem 272:17972-17980、1997に説明されている通りに生み出した。複数の老いた雄APOE4マウス(n = 104; 65-87 wk)は、通常の齧歯類用固形食餌[通常の食餌(ND)、Isopurina 5001; Prolab]に維持され、これらのマウスのサブセット(n = 84; TD 88051; Harlan Teklad)はHFC食餌に8週間切り替えられる。APOE4-HFCマウスは、また、抗体治療に基づいて小群に分けられる。マウスは、年齢分布が等しくなるように、治療グループへと無作為割付けされる。抗iC3b抗体(2H8、2A10、6G1、5D2及びコントロール抗体)を用いて注射された動物は、抗体のi.p.注射(3mg/kg体重/注射)を週1回受ける。

10

【0237】

視覚機能は、b波網膜電図(ERG)、網膜活性の信頼性が高い測定及び視覚機能(Niemeyer, Digit J Ophthalmol 4(10), 1998)の分析によって観察される。視神経頭を通る目全体の切片の組織学的評価は、網膜色素上皮(RPE)の病変とAPOE4-HFCマウスにおけるサブRPE沈着の存在を明らかにするために実施される。RPE病変は、空胞化、核濃縮、色素過剰症及び色素脱失症並びに浸潤ミクログリアによって例証される。APOE4-HFCマウスにおけるRPE損傷は、RPEの平面マウント物を、タイトジャンクションタンパク質であるゾナオキュルデンツ 1(zona occludens 1)(ZO-1)を用いて免疫染色し、ヘキスト33342を用いて核を染色し、RPEサイズ、完全性及び数を分析することによって定量化される(Ding et al., Proc Natl Acad Sci USA 108:E279-E287, 2011)。

20

【0238】

ERG:ERGは、Espion E2システム(Diagnosys LLC)(Ding et al., Vision Res 48:339-345, 2008; Malek, et al., Adv Exp Med Biol 613:165-170, 2008)を使用して記録される。記載のとおり、データ分析及び適合を実行した(Herrmann et al., J Neurosci 30:3239-3253, 2010)。ERGの該当者及び病状の評価は、治療群の身元に対して隠されている。

【0239】

免疫組織化学:マウス後部眼杯を寒天で包埋し、ビブラトームにより50-100 µmで薄片にした。切片を10%の正常ロバ血清(Jackson Immunoresearch)中でブロックし、一次抗体を用いて一晚インキュベートし、Alexa蛍光体共役二次抗体(Invitrogen)中で2時間インキュベートし、ヘキスト33342(Invitrogen)で対比染色した。共焦点画像は、ライカSP5レーザー自動読み取りコンフォーカル顕微鏡を用いて取得した。

30

【0240】

組織学:マウスに深い麻酔をかけて、生理食塩水そしてその次に固定剤(免疫組織化学用の、4%のパラホルムアルデヒドを含むリン酸塩緩衝液(pH 7.4)、又は半薄切片及び超薄切片用の、2%のパラホルムアルデヒドと2%のグルタルアルデヒドを含むリン酸塩緩衝液の混合液)を用いて経心臓的に灌流させる。半薄切片のために、眼球を摘出し、角膜及びレンズを除去し、水分を抜き、Epon-Spurr樹脂に包埋し、500nmで切断し、ガラススライドにマウントし、トルイジンブルーを用いて染色する。切片をツァイスAxioplan 2顕微鏡(Thornwood)下で調べる。

40

【0241】

実施例12. ヒト網膜色素性上皮(RPE)細胞を染色する

RPE細胞培養:RPE細胞(Advanced Bioscience Resources)は、Hu及びBok(Mol Vis 7:14-19, 2001)によって記載されている通り、ヒト胎児の目に由来する。初期継代(p1-p2)細胞は、ラミニン被覆多孔性支持体(Millipore Millicell-HA Culture Plate Inserts, PIHA 01250)へ播種され、「ミラー培地」(Maminishkis et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 47:3612-3624, 2006)中で培養される。播種の1~3ヵ月後、培養物を補体コンピレントヒト血清、C1q、C5又は因子Bが除去されたヒト血清又は無血清ミラー培地中において24時間、

50

アガロースビーズに結合したプロテインA/G(Pierce)(10%(vol/vol))との吸着によってIgGが除去されたヒト血清に曝した。標本をPBS(3回、15分間)にてすすぎ、4%のパラホルムアルデヒドを含むPBS中で10分間固定し、切片化及び免疫組織化学的分析の待機中は0.4%のパラホルムアルデヒド中に保存する。

【 0 2 4 2 】

免疫組織化学:共焦点レーザー自動読取り免疫蛍光法画像診断は、Anderson外(Invest Ophthalmol Vis Sci 40:3305-3315, 1999)が説明している通り、固定されたRPE細胞培養物に関する100 μ mのビプラトーム切片又は平面マウント物に対して実行される。平面マウント物を10分間、漂白(Melanin Bleach Kit; Polysciences)してサブRPE沈着物の視覚化を可能にする。そうしなければ、これはRPE色素に隠れてしまうだろう。

10

【 0 2 4 3 】

電子顕微鏡法:RPE培養組織を、2%のグルタルアルデヒド及び2%のホルムアルデヒド中に固定し、その後2%の四酸化オスミウムにて固定し、100%まで段階的なエタノール系にて水分を除き、LX-112樹脂(Ladd Research)に包埋する。薄切片を、2%の酢酸ウラニル及びクエン酸鉛を用いて着色し、JEOL JEM-1230透過型電子顕微鏡にて画像化する。

【 図 1 】

1 MGPTSGPSLL LLLLTHLPIA LGSPMYSIIT PNILRESEEE TMVLEAHDAQ GDVFTVTVTH
 61 DFPGKKLVLS SEKTVLTPAT NHMGNVTFTI PANREFKSEK GRNKFVTVQA TFGTQVVEKV
 121 VLVSLSQSGYL FIQTDKTIYT PGSTVLYRIF TVNHKLLPVG RTVMVNIENP EGIPVKQDSL
 181 SSONQLGVLP LSWDIPELVN MGQWKIRAYY ENSPQQVFST EFEVKEYVLP SFEVIVEPTE
 241 KFYIYNEKG LEVTITARFL YGKKVEGTAF VIFGIQDGEQ RISLPESLKR IPIEDGSGEV
 301 VLSRKVLLDG VQNPRAEDLV GKSLYVSATV ILHSGSDMVQ AERSGPIVIT SPYQIHFTKT
 361 PKYFKPGMPF DLMVFVTNPD GSPAYRVFVA VQGEDTVQSL TQGDGVAKLS INTGPSQKPL
 421 SITVRTKKQE LSEAEQATRT MQALPYSTVG NSNNYLHLSV LRTELRPGET LNVNELLRMD
 481 RAHEAKIRYY TYLIMNKGRL LKAGRQVREP GQDLVVLPLS ITTDFIPSPR LVAYYTLIGA
 541 SGOREVADS VWVDVKDSCV GSLVVKSGQS EDRQPVPGQQ MTLKIEGDHG ARVVLVAVDK
 601 GVFLVNLKKNK LTQSKIWDVV EKADIGCTPG SGKDYAGVFS DAGLTFTSSS GQQTAAQRAEL
 661 QCPQPAARRR RSVQLTEKRM DKVGKYPKEL RKCCEDGMRE NPMRFSCQRR TRFISLGEAC
 721 KKVFLDCCNY ITELRRQHAR ASHLGLARSN LDEDIAEEN IVSRSEFPES WLWNVEDLKE
 781 PPKNGISTKL MNIFLKDSIT TWEILAVSMS DKKGICVADP FEVTVMQDFF IDLRLPYSVV
 841 RNEQVEIRAV LYNRYQNQEL KVRVELLHNP AFCSLATTKR RHQQTVTIPP KSSLVSPYVI
 901 VPLKTGLQEV EVKAAVYHHF ISDGVKSLK VVPEGIRMNK TVAVRTLDPE RLREGVQKE
 961 DIPPADLSDQ VPDTESETRI LLQGTQVQOM TEDAVDAERL KHLIVTPSGC GEQNMIGMTP
 1021 TVIAVHYLDE TEQWEKFGLE KROGALELIK KGYTQQLAFR QPSSAFAAFV KRAPSTWLTA
 1081 YVVKVFLAV NLIAIDSQVL CGAVKWLILE KQKPDGVFQE DAPVIHQEMI GGLRNNNEKD
 1141 MALTAFLVIS LQEAKDICEE QVNSLPGSIT KAGDFLEANY MNLQRSYTVA IAGYALQMG
 1201 RLKGPLLKNE LTTAKDKNRW EDPGKQLYNV EATSYALLAL LQKDFDFVP PVVRWLNEQR
 1261 YYGGYGSTQ ATFMVFOALA QYQKDAPDHO ELNLDVSLQL PSRSSKITHR IHWESASLLR
 1321 SEETKENEGF TVTAEGKGQG TLSVVMTYHA KAKDQLTCNK FDLKVTIKPA PETEKRPQDA
 1381 KNTMILEICT RYRGDQDATM SILDISMGTG FAPDTDDLKQ LANGVDRIYS KYELDKAFSD
 1441 RNTLIIYLDK VSHSEDDCLA FKVHQYFNVE LIQPGAVKVY AYYNLEESCT RFYHPEKEDG
 1501 KLNKLCRDEL CRCAEENCPI QKSDDKVILE ERLDKACEPG VDYVYKTRLV KVQLSNDFDE
 1561 YIMAIEQTIK SGSDEVQVQG QRTFISPIKC REALKLEKK HYLMWGLSSD FWGEKPNLSY
 1621 IIGKDTWEH WPEEDECQDE ENQKQCQDLG AFTESMVVFG CPN (配列番号:1)

FIG. 1

【 図 2 】

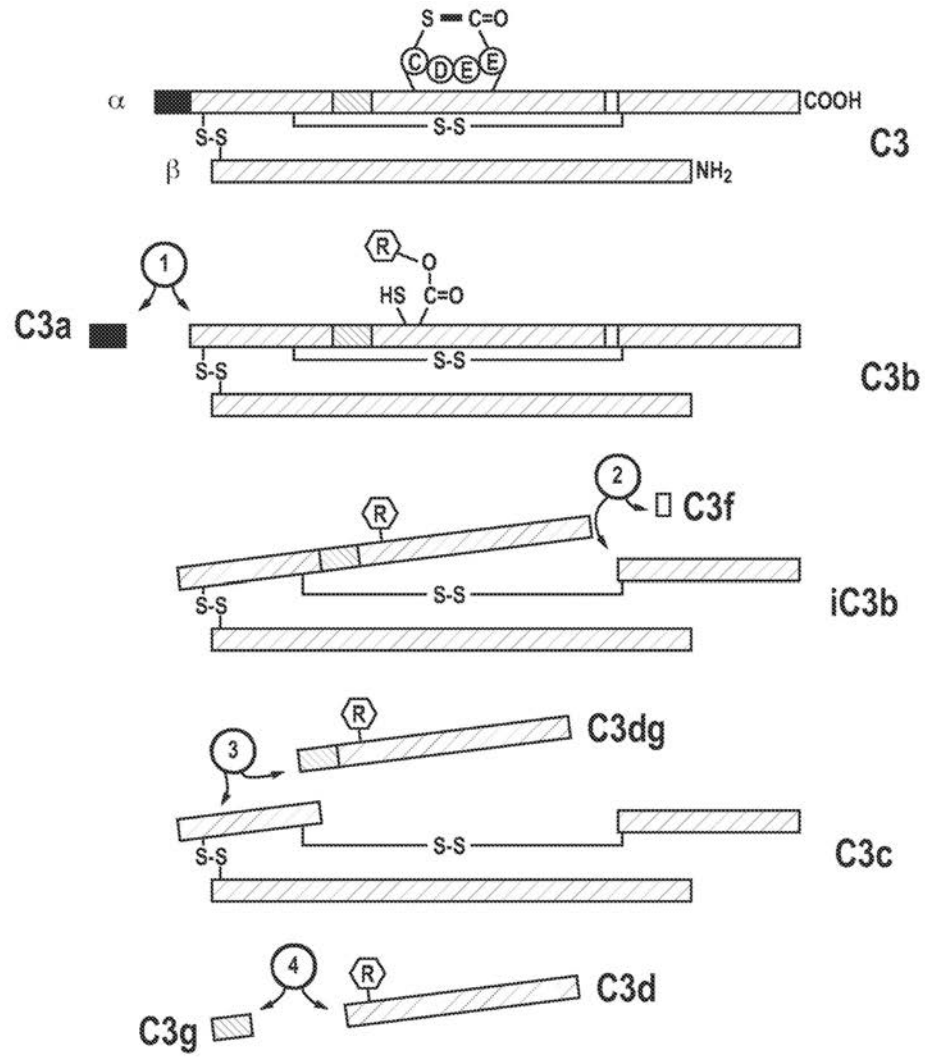


FIG. 2

【図 3】

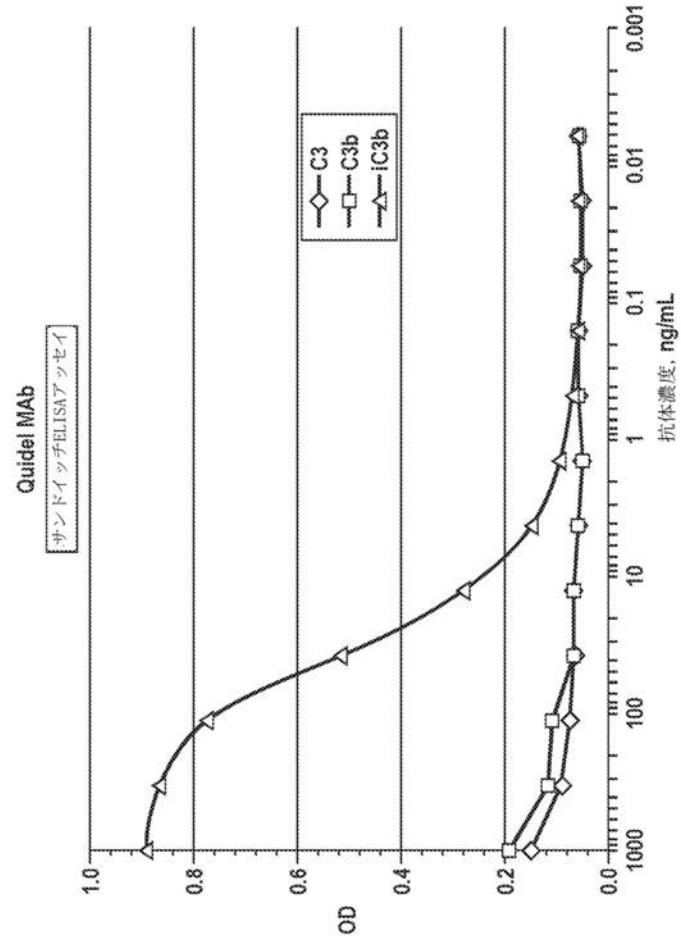
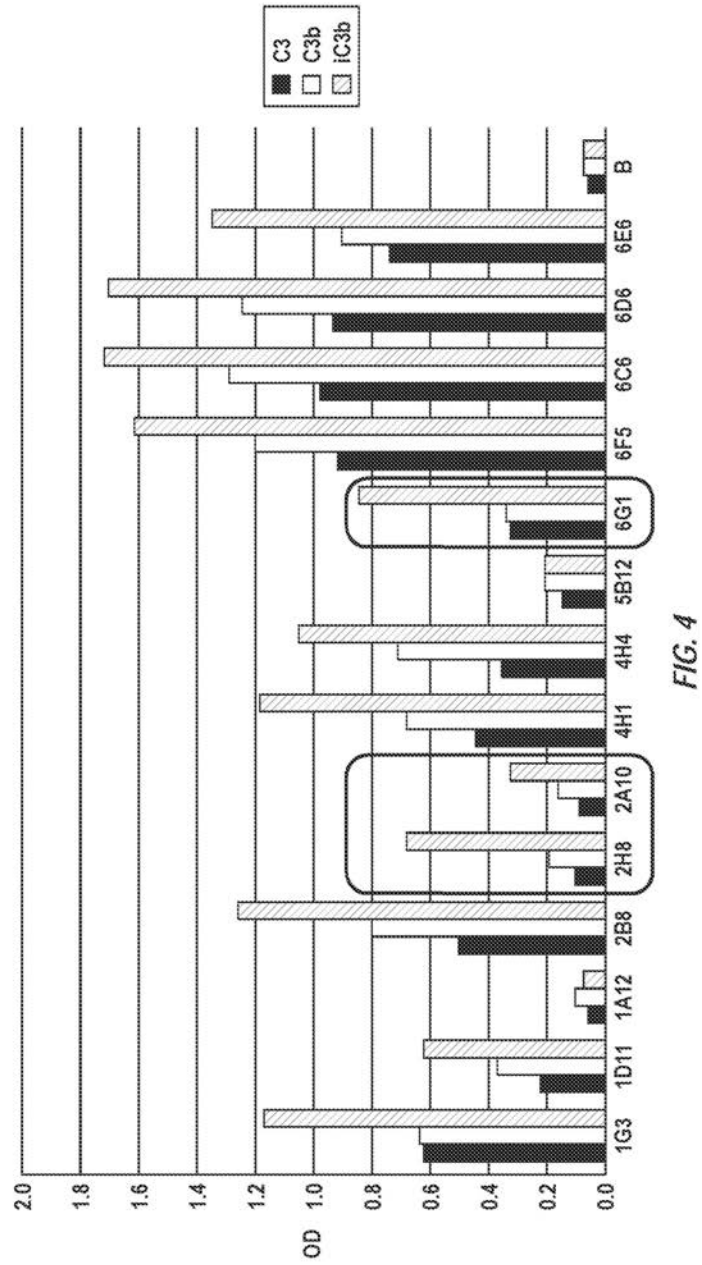


FIG. 3

【 図 4 】



【 図 5 】

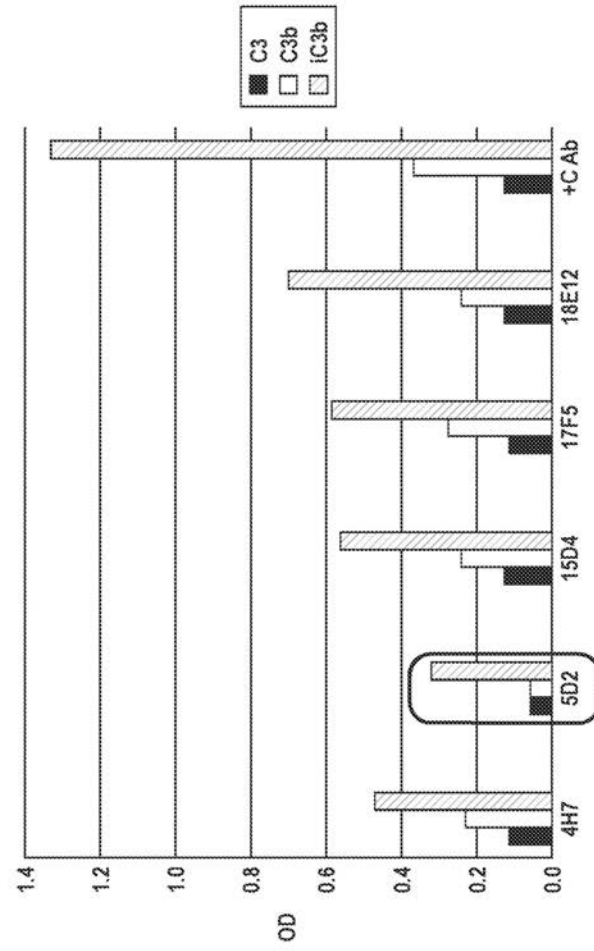


FIG. 5

【 図 6 】

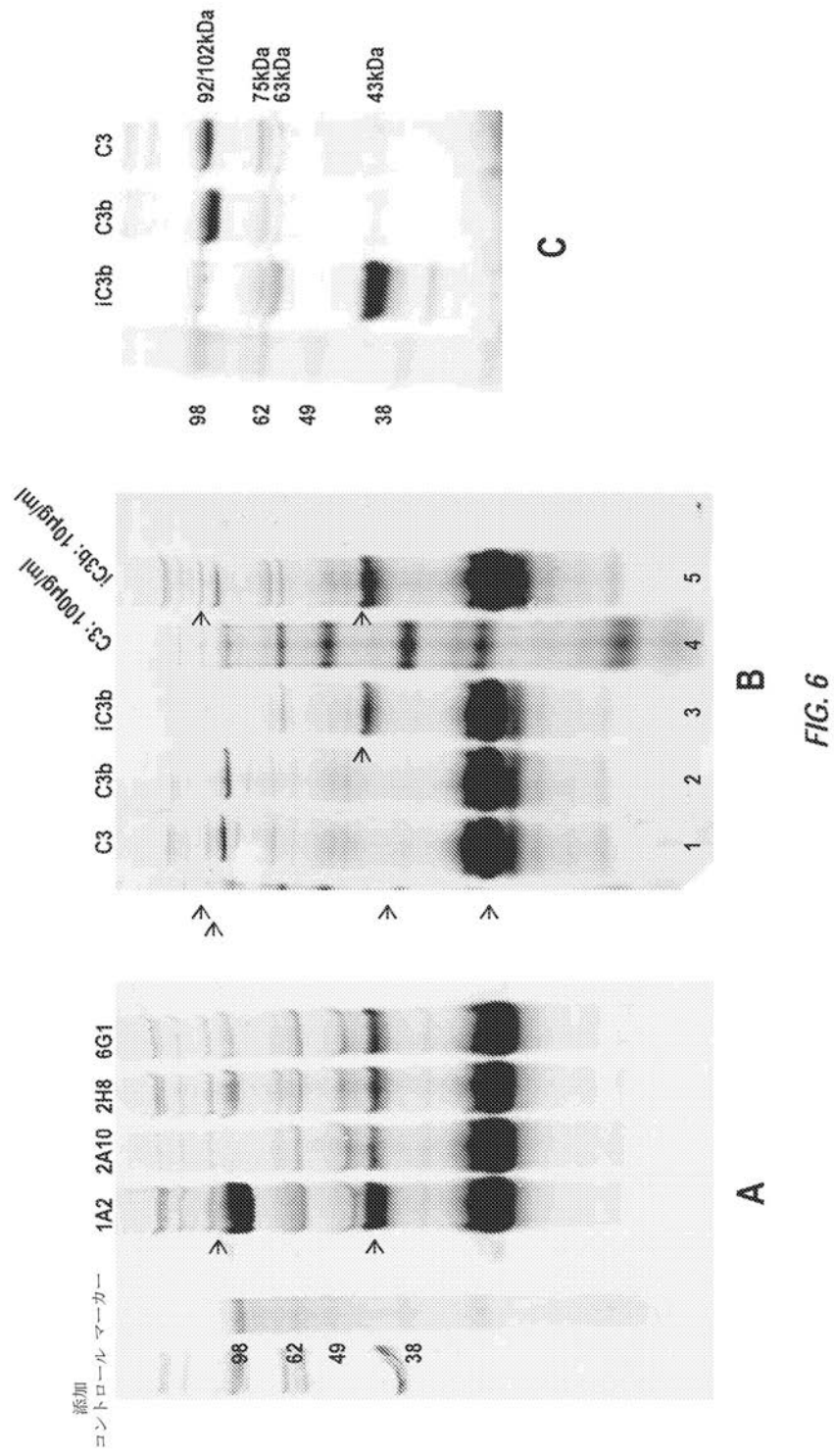


FIG. 6

+

【 図 7 】

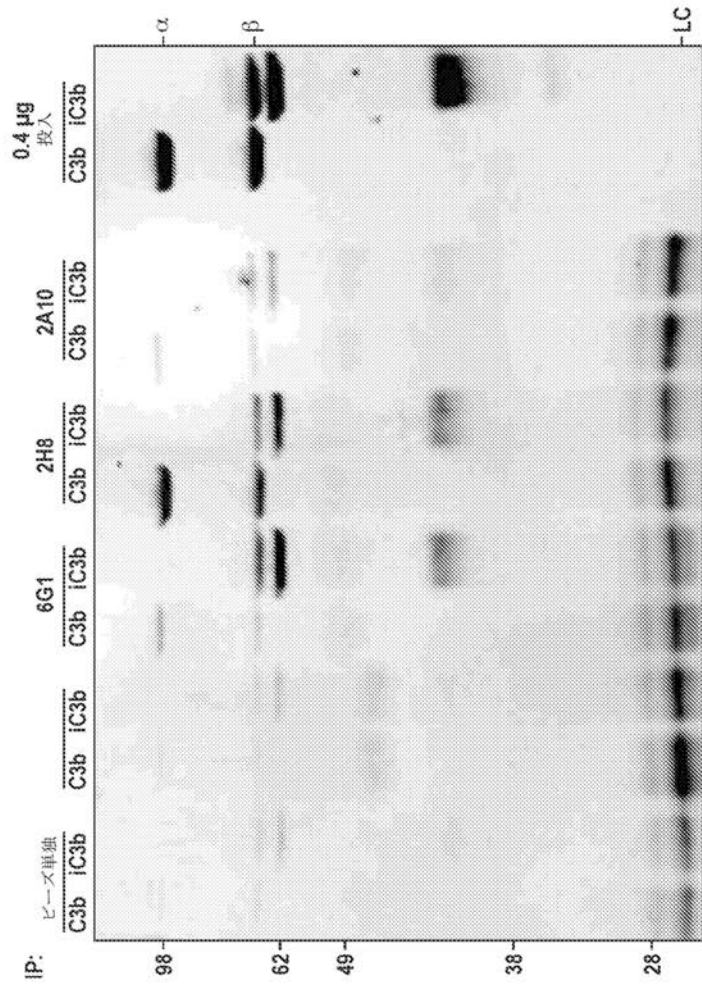
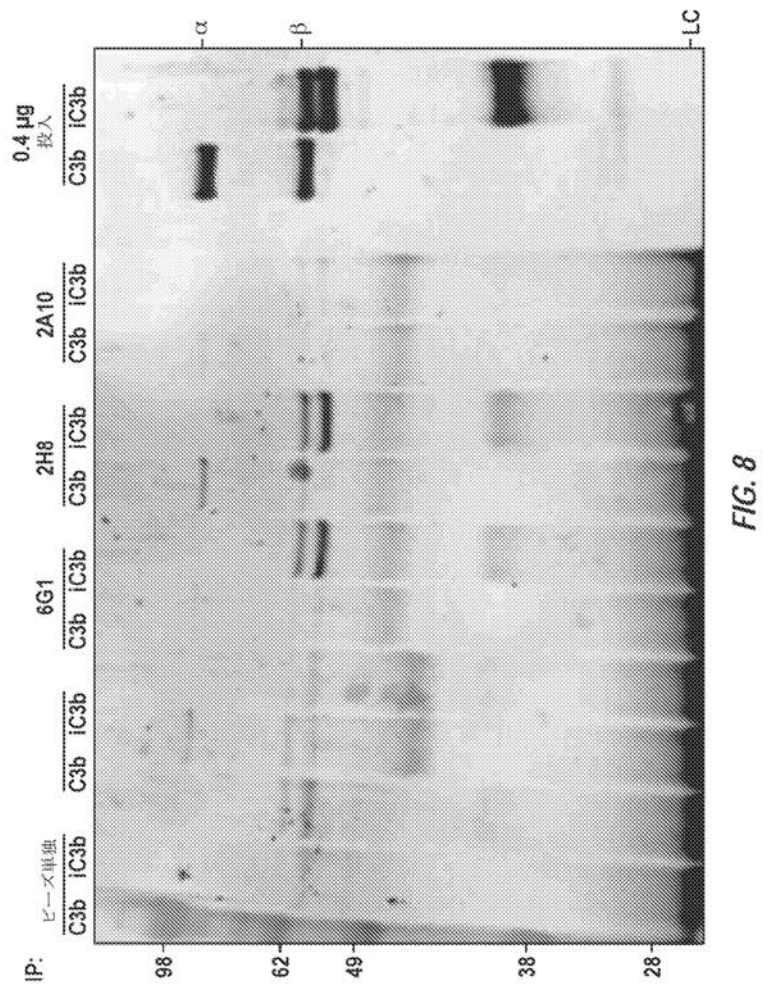


FIG. 7

【 図 8 】



【 図 9 】

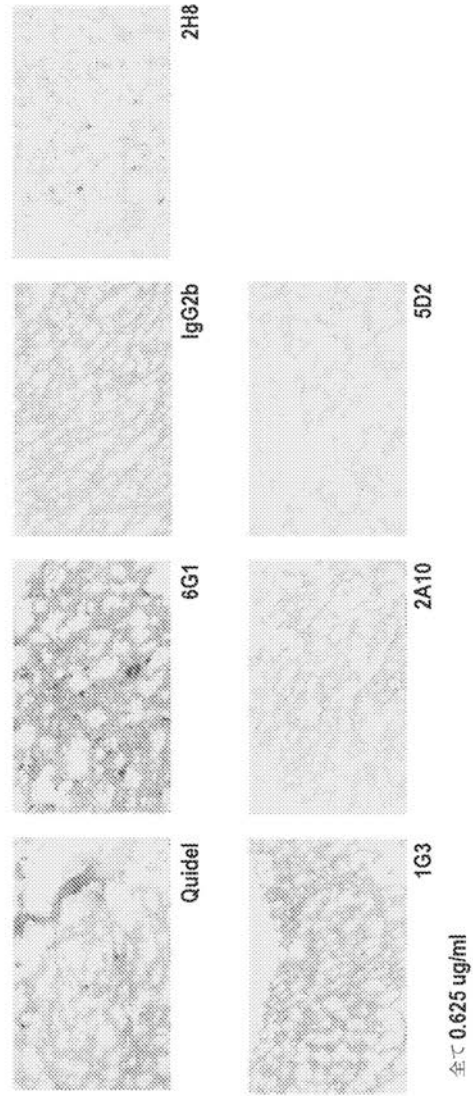


FIG. 9

【図 10】

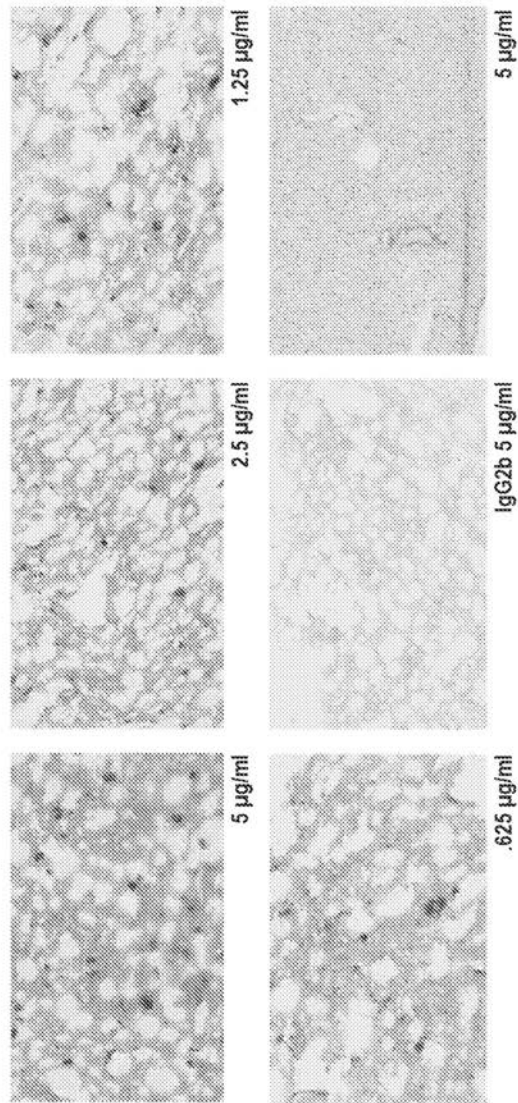
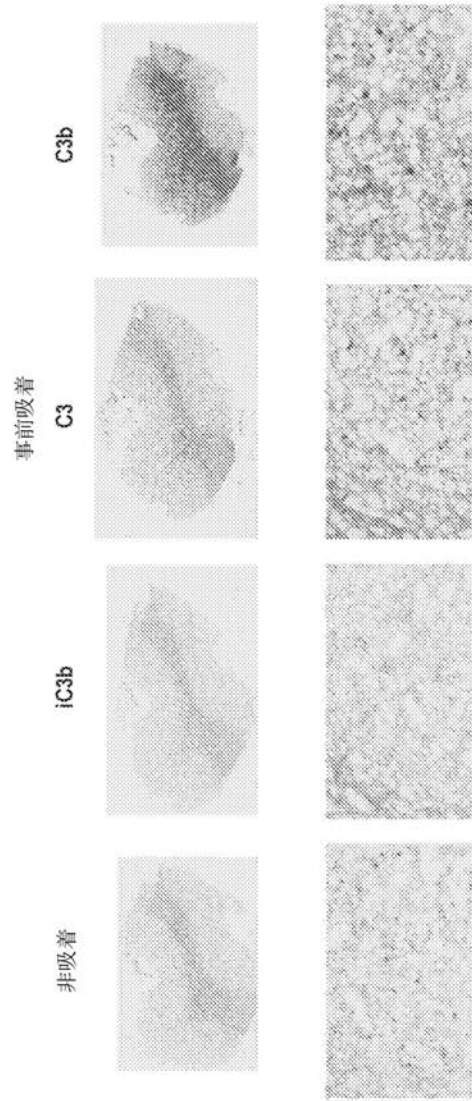


FIG. 10

【図 1 1】



【 図 1 2 】

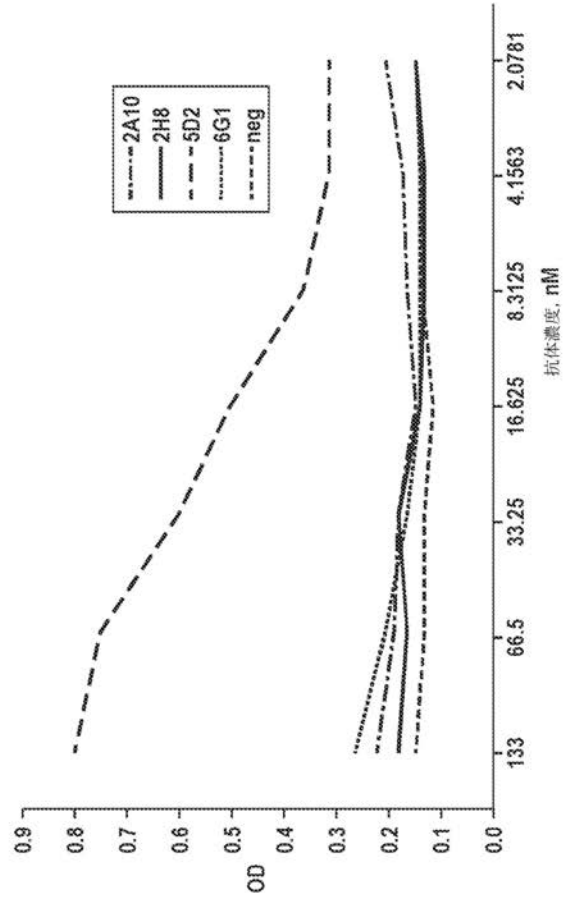


FIG. 12

【 図 1 3 A 】

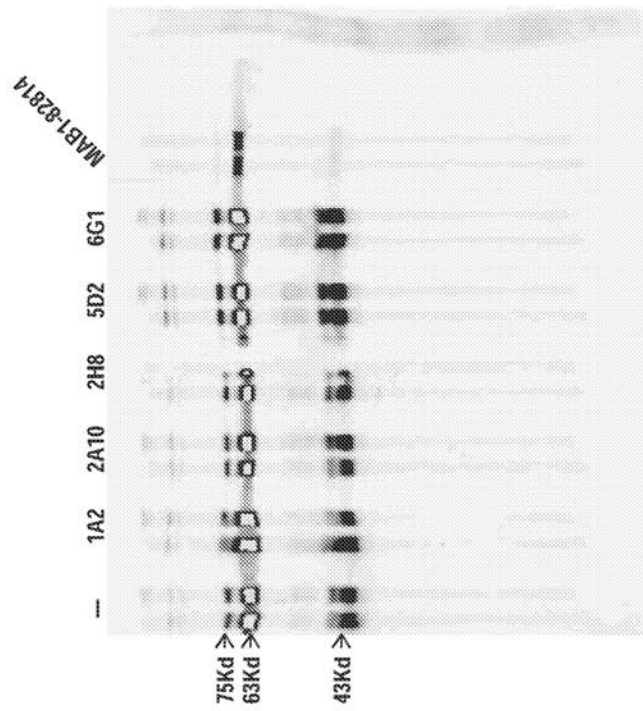
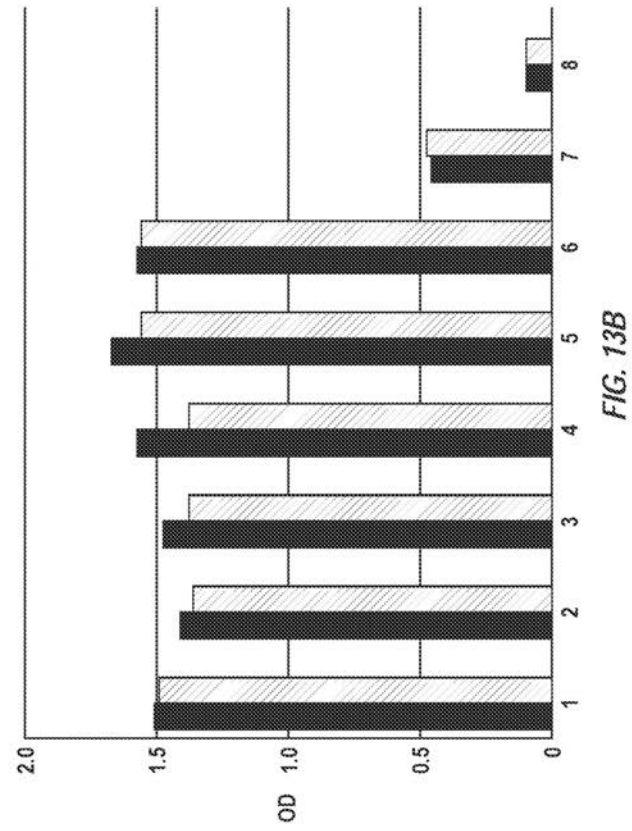
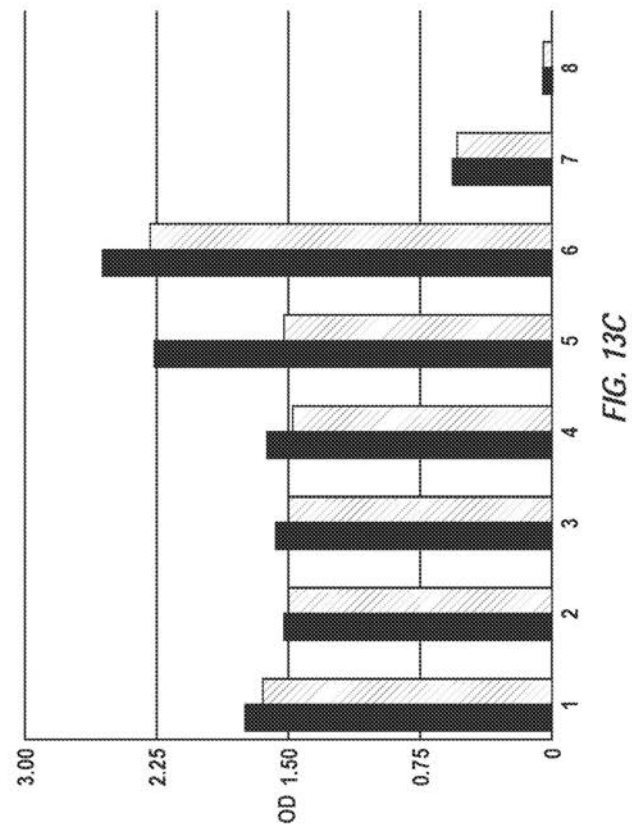


FIG. 13A

【図 13 B】



【図 13 C】



【配列表】

2014513678000001.app

【 国際調査報告 】

61400120014



PCT/US2012/032635 04.09.2012 /

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 57450-417337	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2012/032635	International filing date (day/month/year) 06 April 2012	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 07 April 2011
Applicant NEOTOP BIOSCIENCES LIMITED		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant.
☒ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 2
☒ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

PCT/US2012/032635 04.09.2012 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/032635

Box No. 1 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 filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☐

in the international application as filed

☒

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

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 in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

PCT/US2012/032635 04.09.2012 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/032635

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.: 2, 10-16, 23, 46, 51-54, 61-63
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 Extra 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 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.:
1, 3-9, 17-22, 24-45, 47-50

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.

PCT/US2012/032635 04.09.2012 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/032635

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The invention provides chimeric, humanized, veneered, monoclonal, or isolated human antibodies that preferentially bind to iC3b relative to C3b. These antibodies serve to reduce the toxicity of this fragment and find use in treatment and prophylaxis of a variety of diseases associated with deposits of the fragment such as Alzheimer's disease.

PCT/US2012/032635 04.09.2012 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/032635

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/577 (2012.01) USPC - 424/136.1 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) IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/18; C12Q 1/70; G01N 33/53, 577 (2012.01) USPC - 424/136.1, 145.1; 435/5; 530/350, 387.9 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) PatBase, Google Patents, Google, PubMed, NCBI BLAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/135717 A2 (ZHANG et al) 25 November 2010 (25.11.2010) entire document	1, 3, 6, 17-22, 24-26, 28-32, 36, 39, 45, 48
Y		4, 5, 7-9, 27, 33-35, 37, 38, 40-44, 47, 49, 50
Y	US 2004/0005538 A1 (CHEN et al) 08 January 2004 (08.01.2004) entire document	4
Y	US 2003/0235594 A1 (HUMPHREYS et al) 25 December 2003 (25.12.2003) entire document	5
Y	US 2009/0182358 A1 (ALARD et al) 25 June 2009 (25.06.2009) entire document	7-9, 38, 41
Y	US 2007/0190054 A1 (ASHKENAZI et al) 16 August 2007 (16.08.2007) entire document	27, 33-35, 37, 42-44
Y	US 7,879,577 B2 (SPRINGER et al) 01 February 2011 (01.02.2011) entire document	40
Y	US 2011/0020237 A1 (GLABE et al) 27 January 2011 (27.01.2011) entire document	47, 49, 50
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 August 2012		Date of mailing of the international search report 04 SEP 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

PCT/US2012/032635 04.09.2012 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2012/032635

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I: claims 1, 3-9, 17-22, 24-45, 47-50 are drawn to treatment of iC3b associated diseases.

Group II: claims 55-60 are drawn to a method of antibody development.

Group III: claims 64-66 are drawn to a method of screening agents for activity against diseases.

Group IV: claims 67 and 68 are drawn to a method of determining the level of drusen in patients.

The inventions listed in Groups I through IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Group I, the treatment of complement protein C3 related diseases by the administration of an effective regime of antibodies, are not present in Groups II-IV; the special technical features of Group II, producing a monoclonal antibody by immunizing a mammal with iC3b, isolating B-cells producing antibodies, forming immortalized cell lines from the B-cells, and screening for a desired antibody are not present in Groups I, III, and IV; the special technical features of Group III, the screening of agents for activity against diseases associated with iC3b by administering said agent to a non-human animal disposed to develop deposits of iC3b, and determining whether the agent inhibits, reduces, or delays deposits of iC3b are not present in Groups I, II, and IV; and the special technical features of Group IV, determining a level of drusen deposits in a patient by administering an antibody and detecting the presence of bound antibody in the patient are not present in Groups I-III.

Groups I through IV share the technical features of an antibody which preferentially binds iC3b relative to C3b and wherein the antibody is humanized, chimeric or veneered. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art. Specifically, WO 2010/135717 A2 to Zhang et al. teaches an antibody which preferentially binds iC3b relative to C3b (In some embodiments a monoclonal antibody that specifically binds to a neoepitope of iC3b and substantially does not bind to intact C3 or to C3b is used as a capture agent for iC3b, Para. [0064]) and wherein the antibody is humanized (an "antibody" may be a "humanized" antibody, Para. [0027]).

Since none of the special technical features of the Groups I through IV inventions are found in more than one of the inventions, unity is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 11/16	(2006.01)	A 6 1 P 11/16	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 9/14	(2006.01)	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 27/14	(2006.01)	A 6 1 P 27/14	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 27/10	(2006.01)	A 6 1 P 27/10	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/543	(2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 8 5
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/48	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	G 0 1 N 33/48	P
		G 0 1 N 33/53	Y
		C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,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,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(72)発明者 バシ , グリクバル エス .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 3 , パロ アルト , 5 1 4 ローズ ドライブ

(72)発明者 バーブアー , ロビン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 9 8 , ウォールナット クリーク , 2 5 0 ノルマ
ンディー レーン

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB17

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01

4C085 AA14 AA16 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08

4H045 AA11 AA30 BA40 CA40 DA76 EA20 FA74