

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503789

(P2005-503789A)

(43) 公表日 平成17年2月10日(2005.2.10)

(51) Int.C1.⁷

C12N 15/09
A61K 38/00
A61K 39/395
A61P 25/28
A61P 43/00

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 39/395
A 61 P 25/28
A 61 P 43/00
C 07 K 16/18

Z N A A
N
A 61 P 25/28
A 61 P 43/00
1 1 1
C 07 K 16/18

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 B 06 4
4 B 06 5
4 C 08 4
4 C 08 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 121 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-521775 (P2003-521775)
(86) (22) 出願日 平成14年8月14日 (2002.8.14)
(85) 翻訳文提出日 平成16年2月17日 (2004.2.17)
(86) 國際出願番号 PCT/US2002/021322
(87) 國際公開番号 WO2003/016466
(87) 國際公開日 平成15年2月27日 (2003.2.27)
(31) 優先権主張番号 60/313,224
(32) 優先日 平成13年8月17日 (2001.8.17)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 590005922
イーライ・リリー・アンド・カンパニー
E L I L I L L Y A N D C O M P A
N Y
アメリカ合衆国46285インディアナ州
インディアナポリス市、リリー・コーポ
レイト・センター
(74) 代理人 1000683526
弁理士 田村 恭生
(74) 代理人 100103230
弁理士 高山 裕貢
(74) 代理人 100087114
弁理士 斎藤 みの里

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗A β 抗体

(57) 【要約】

本発明は、重鎖のCDR2内のN-グリコシル化部位を欠損するように遺伝子操作されている変異体266抗体、その医薬組成物、ならびに変異体抗体を発現するために有用な、ポリヌクレオチド配列、ベクターおよび形質転換細胞を提供する。変異体は、可溶性Aペプチドをヒトの生物流体から隔絶し、N-グリコシル化部位を保持するマウス抗体266またはヒト型266抗体のいずれよりも有意に高い親和性で、アミロイドペプチドAの13~28位に含まれるエピトープに特異的に結合する。変異体抗体は、Aと関連する病態および疾患(アルツハイマー病、ダウン症候群、大脳アミロイドアンギオパシー、軽度の認知障害等)の治療または予防に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軽鎖および重鎖を含む抗体またはそのフラグメントであって、軽鎖がマウスモノクローナル抗体266由来の3個の軽鎖相補性決定基(CDR)(配列番号1～3)を含み、重鎖がマウスモノクローナル抗体266由来の重鎖CDR1およびCDR3(それぞれ、配列番号4および6)、および配列番号5：

【化 1】

1

5

10

15

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

10

(配列番号5)

[配列中、

配列番号5の7位のXaaは任意のアミノ酸を表し(ただし、8位のXaaがAspでもProでもなく、9位のXaaがSerまたはThrである場合、7位のXaaはAsnではない)、

配列番号5の8位のXaaは任意のアミノ酸を表し(ただし、7位のXaaがAsnであり、9位のXaaがSerまたはThrである場合、8位のXaaはAspまたはProである)、および

配列番号5の9位のXaaは任意のアミノ酸を表す(ただし、7位のXaaがAsnであり、8位のXaaがAspでもProでもない場合、9位のXaaはSerでもThrでもない)。]

20

で示される配列を有する重鎖CDR2を有する、抗体またはそのフラグメント。

【請求項 2】

配列番号5の7位のXaaがAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrから選択され(ただし、9位のXaaがSerまたはThrである場合、7位のXaaはAsnではない)、

配列番号5の8位のXaaがAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され、および

配列番号5の9位のXaaがAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択される(ただし、7位のXaaがAsnである場合、9位のXaaはSerでもThrでもない)、請求項1に記載の抗体またはそのフラグメント。

30

【請求項 3】

配列番号5の7位のXaaがAla、Gly、His、Asn、Gln、SerまたはThrまたはHisであり、8位のXaaがSerであり、9位のXaaがThrである、請求項2に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 4】

配列番号5の7位のXaaがSerまたはThrであり、8位のXaaがSerであり、9位のXaaがThrである、請求項3に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 5】

配列番号5の8位のXaaがSerであり、9位のXaaがThrである、請求項1または2に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 6】

配列番号5の7位のXaaがAsnであり、8位のXaaがSerである、請求項1または2のいずれかに記載の抗体またはそのフラグメント。

40

【請求項 7】

配列番号7により示される配列の軽鎖可変部および配列番号8により示される重鎖可変部を有する、請求項1に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 8】

配列番号9により示される配列の軽鎖可変部および配列番号10により示される重鎖可変部を有する、請求項7に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 9】

配列番号11により示される配列の軽鎖および配列番号12により示される配列の重鎖を

50

有する、請求項 8 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 10】

重鎖において、56位のXaaがAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され（ただし、58位のXaaがSerまたはThrである場合、56位のXaaはAsnではなく、57位のXaaがAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され、そして58位のXaaがAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択される（ただし、56位のXaaがAsnである場合、58位のXaaはSerでもThrでもない）、請求項7～9のいずれか1項に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 11】

重鎖において、56位のXaaがAla、Gly、His、Gln、SerまたはThrであり、57位のXaaがSer 10 であり、58位のXaaがThrである、請求項10に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 12】

重鎖において、56位のXaaがSerまたはThrであり、57位のXaaがSerであり、58位のXaaがThr 11 である、請求項11に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 13】

重鎖において、57位のXaaがSerであり、58位のXaaがThrである、請求項7～12のいずれか1項に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 14】

重鎖において、56位のXaaがAsnであり、57位のXaaがSerである、請求項7～12のいずれか1項に記載の抗体またはフラグメント。 20

【請求項 15】

請求項1～14のいずれか1項に記載の抗体の酵素的切断により得られる、抗体フラグメント。

【請求項 16】

FabまたはF(ab')₂フラグメントである、請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体フラグメント。

【請求項 17】

F(ab')₂フラグメントである、請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体フラグメント。 30

【請求項 18】

Fabフラグメントである、請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体フラグメント。

【請求項 19】

IgG₁イムノグロブリンイソタイプである、請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 20】

抗体またはそのフラグメントが、骨髄腫細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、ゴールデンハムスター卵巣細胞およびヒト胚性腎細胞からなる群から選択される宿主細胞中で產生される、請求項1～19のいずれか1項に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 21】

請求項1～19のいずれか1項に記載の抗体またはそのフラグメントの軽鎖または重鎖をコードする配列を含む、ポリヌクレオチド化合物。 40

【請求項 22】

適切な宿主細胞中で発現させた場合に、請求項1～20のいずれか1項に記載の抗体の軽鎖または重鎖またはそれらのフラグメントを生じる、ポリヌクレオチド配列。

【請求項 23】

請求項21～22のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド配列を含む、請求項1～19のいずれか1項に記載の抗体を発現する発現ベクター。

【請求項 24】

請求項23の発現ベクターでトランスフェクトされた細胞。

【請求項 25】

50

請求項 2 3 に記載のベクター 2 種でトランスフェクトされている細胞であって、第 1 のベクターは軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含み、第 2 のベクターは重鎖をコードする配列を含む、細胞。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のヒト型抗体を発現し得る、細胞。

【請求項 2 7】

骨髓腫細胞、チャイニーズハイムスター卵巣細胞、ゴールデンハムスター卵巣細胞およびヒト胚性腎細胞からなる群から選択される、請求項 2 4 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のヒト型抗体またはフラグメント、および製薬上許容される賦形剤を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本出願は米国仮出願出願番号 60/313,224(2001年 8 月 17 日出願)の優先権を主張する(この内容全体を本明細書中に参照して組み込む)。

【0 0 0 2】

本発明は、重鎖の第 2 相補性決定基(CDR2)の N-グリコシル化部位を欠損した、抗体 266 のアナログに関する。このような抗体は A ペプチドに関連した病態(状態)(例えば、アルツハイマー病、ダウン症候群および大脳アミロイドアンギオパチー)の予防的および治療的処置に有用である。

【0 0 0 3】

多数の病態および疾患が、アミロイド ペプチド(A)を含有する、脳内の神経性(neuritic)および脳血管性のplaques(斑)に関連していると思われる。なかでも、発症前および臨床におけるアルツハイマー病、ダウン症候群、および発症前および臨床の大脳アミロイドアンギオパチー(CAA)がある。循環形態の A ペプチドは、前駆体タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質(APP)の切断から得られる 39 ~ 43 アミノ酸から構成される(ほとんどは 40 または 42 アミノ酸)。

【0 0 0 4】

アミロイド沈着を減少させるための免疫反応を誘発する方法は、PCT公報 WO99/27944(1999 年 6 月 10 日公開)に記載されている。この明細書は、全長凝集型 A ペプチドが有用な免疫原であると仮定している。ヒツジ抗マウス IgG に連結した A フラグメント(アミノ酸 13-28)の投与は皮質アミロイド負荷になんら変化を引き起こさず、A 13-28 フラグメント結合体の注射を受けた 9 匹の動物のうち 1 匹のみが、A に応答してリンパ球増殖を示した。また、この出願は、A ペプチドに特異的に結合する抗体が治療用薬剤として使用することを示している。しかしながら、添付データは、A 42 等を用いた能動免疫に関するプロトコルを反映しており、これは推測と思われる。

【0 0 0 5】

WO 00/72880 および Bard, F. ら、Nature Med. (2000) 6:916-919 は、トランスジェニックマウスアルツハイマー病モデルの皮質および海馬における斑が、A ペプチドの N 末端フラグメントおよびそれに結合する抗体を用いて処理した場合には顕著に減少するが、ヒツジ抗マウス IgG に連結した A 13-28 フラグメント、または 13-28 フラグメントに対する抗体である抗体 266 を用いて処理した場合には減少しないことを記載する。N 末端に対する抗体は、インビトロ研究で、血液脳関門を通過し、アミロイド斑の食作用を誘発すると主張している。

【0 0 0 6】

WO 00/77178 は、アミロイドの加水分解を触媒するように設計された抗体(フェニルアラニンスタチン(statine)転移化合物 Cys-A 10-25、スタチン Phe₁₉-Phe₂₀ および Cys-A 10-25 スタチン Phe₂₀-Ala₂₁ の混合物に対して惹起された抗体、および Phe₁₉ と Phe₂₀ との間に還元型アミド結合を有する A 10-25 に対して惹起された抗体を含む)を記載する。文献 50

は、これらの抗体の投与が、中枢神経系からのA_βの流入、斑形成の妨害、斑負荷の減少、抗体と組織サンプル中のA_βとの複合体の形成を引きこす、または認知に影響を与えるということについての、インピボでの証拠は示していない。

【0007】

米国特許第5,766,846号、同第5,837,672号および同第5,593,846号(これらを参考して本明細書中に組み込む)は、A_βペプチドの中央ドメインに対するマウスモノクローナル抗体の產生を記載する。A_βの13位から28位のアミノ酸に結合することが知られている抗体に、マウス抗体266、4G8および102が含まれる。

【0008】

これまでに、PCT/US/01/06191(2001年2月26日出願)に記載のように、24ヶ月齢ヘミ接合型トランスジェニックマウス(APP^{V717F})における長期間の週1回266抗体の投与の後、マウス抗体266の投与は認知(物体記憶)をほぼ完全に回復させることができた。また、抗体266の末梢投与は、CNSから血漿への比較的大量のA_βペプチドの迅速な流入を生じる。また、長期処置は、有効であるために必要とされる当該技術が教示する特性(すなわち、A_βアミロイド斑負荷の減少、血液脳関門の有意な程度での通過、斑の修飾(decorating)、細胞性メカニズムの活性化または凝集型A_βへの高い親和性での結合)を抗体が必ずしも有さない場合でさえ、可溶性A_βの変更されたクリアランス、斑形成の予防、および認知の改善を生じた。DeMattosら(Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)、早版、2001年7月3日)は、PCT/US/01/06191中にあるデータをいくつか公開した。また、PCT/US/01/06191はヒト型266抗体を開示した('Hu266'または'h266')。

10

20

30

40

【0009】

重鎖V領域の56位で開始すると、Mu266およびHu266は両方とも配列Asn-Ser-Thrを含有する。この配列は、N-連結型グリコシル化のためのAsn-X-Ser/Thrシグナルの1例であり、AsnはN-連結型グリコシル鎖の結合部位である。分泌型タンパク質中のAsn-X-Ser/Thrはほとんどグリコシル化されている(Gavel, Y.ら、Prot. Eng. (1990) 3:433-442)が、ポリペプチド中に存在するグリコシル化部位の配列の全てが実際に糖残基が結合している部位というわけではない(米国特許第5,714,350号)。特に、PCT/US/01/06191で報告されている結果は、重鎖の56位で完全にグリコシル化されている266抗体を用いて得られたものである。

【0010】

可変部フレームワークでのグリコシル化は、抗体結合親和性に負の影響(おそらく立体障害に起因する)を及ぼしうることが示されてきた(Co, M.S.ら、Mol. Immunol. (1993) 30:1361-1367)。対照的に、特定のマウス抗体の重鎖CDR2でのグリコシル化は、抗原に対する親和性を上昇させた(Wallick, S.C.ら、J. Exp. Med. (1988) 168:1099-1109; Wright, A.ら、EMBO J. (1991) 10:2717-2723)。これらの教示を鑑みると、VH CDR2のh266のグリコシル化による、A_βに対する親和性への影響は予測不可能である(すなわち、グリコシル化はA_βへの親和性に、正に影響を与えるかもしれないし、負に影響を与えるかもしれないし、またはまったく与えないかもしれない)。266のグリコシル化が親和性に影響を与えるかどうかを決定するための唯一の方法は、グリコシル化部位を取り除き、結合親和性を測定することである。

【0011】

全く予測できないことに、そして好都合なことに、重鎖CDR2中で脱グリコシル化されているHu266の、A_βペプチドに対する親和性は、h266の親和性よりも明らかに高い。

【0012】

本発明は、マウス抗A_β抗体266のCDRであって、重鎖CDR2中のN-グリコシル化部位がN-グリコシル化されないように修飾されている、マウス抗A_β抗体266のCDRを有する、ヒト型抗体およびそのフラグメントを提供する。それゆえ、広い意味では、本発明は、軽鎖がマウスモノクローナル抗体266由来の3個の軽鎖相補性決定基(CDR)(配列番号1～3)を含み、重鎖がマウスモノクローナル抗体266由来の重鎖CDR1およびCDR3(それぞれ、配列番号4および6)および以下の配列番号5により示される配列を有する重鎖CDR2を含む、軽鎖お

50

および重鎖を含む抗体またはそのフラグメントに関する。

【化1】

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

(配列番号5)

[配列中、

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

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

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

【0013】

また、本発明は、上記のヒト型抗体またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列、ヒト型抗体またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター、このベクターで形質転換しているか、またはヒト型抗体またはこのフラグメントを発現するポリヌクレオチドを組み込んでいる宿主細胞、本明細書中に記載のヒト型抗体およびそのフラグメントの医薬製剤およびこれらの製造方法および使用方法に関する。

【0014】

Aに対してもマウス266またはヒト型266よりも高い親和性を有するようなヒト型抗体およびそのフラグメントは、マウス266またはヒト型266に関して既に記載されている特性と同じ特性を示すと予測される。すなわち、それらはヒトにおいてAを隔離するため、ヒトの脳におけるA斑またはA毒性により特徴づけられる疾患および病態（アルツハイマー病、ダウン症候群、および大脳アミロイドアンギオパシーなど）の治療および予防のため、ヒトにおけるこれらの疾患の診断のため、およびヒト被検体がAに対するヒト型抗体を用いる治療に反応するかどうかを決定するために、有用である。

【0015】

本発明のヒト型変異体266抗体の、これまでに記載してきたヒト型266抗体を超える利点としては、より信頼性の高い製造容易性、グリコシル化におけるバッチ間の少変動性、およびこれまでに記載されているヒト型266抗体に匹敵するまたはそれよりも高い抗原に対する親和性があげられる。これにより、より低用量で、同等の結果を得ることができる。

【0016】

生体液中を循環するAペプチドを隔離するためのインビボでの本発明の抗体の投与は、脳におけるA含有びまん性の神経性および脳血管性斑の形成と関連した病態の予防的および治療的処置に有用である。本発明は、CDR2 N-グリコシル化部位の除去に起因する結合親和性の上昇を提供する。

【0017】

また、本発明はヒトにおけるアミロイドタンパク質を含有する斑の形成により特徴付けられる病態を治療および予防するために脱グリコシル型266抗体を用いる方法に関し、この方法はそのような治療を必要とするヒトに、脱グリコシル型266抗体またはその免疫学的に反応性のフラグメントを治療的または予防的に有効な量で、好ましくは末梢から投与することを含む。

【0018】

別の局面において、本発明はヒトにおけるアミロイド斑の形成を阻害する方法およびアミロイド斑を除去する方法に関し、この方法はこのような阻害を必要とするヒト被検体に本発明の脱グリコシル型266抗体を有効量で投与することを含む。

【0019】

また、本発明は、臨床上のまたは発症前のアルツハイマー病、ダウン症候群または臨床上

10

20

30

40

50

のまたは発症前の大脳アミロイドアンギオパチーを有すると診断された被検体における認知衰弱の反転、認知認識(cognitive cognition)の改善、認知衰弱の治療、および認知衰弱の予防のための方法を含み、これらの方法は、本発明の脱グリコシル型266抗体を有効量で被検体に投与することを含む。

【0020】

また、本発明は、ヒトにおける、アルツハイマー病、ダウン症候群または大脳アミロイドアンギオパチーの治療、予防または逆転のため、臨床上または発症前のアルツハイマー病、ダウン症候群または臨床上または発症前の大脳アミロイドアンギオパチーにおける認知衰弱を治療、予防または逆転させるため、またはアミロイド斑の形成または毒性可溶性A種の影響を阻害するための、医薬の製造用の本発明のヒト型抗体の使用を含み、これはヒト組織における抗体または抗体フラグメントの組換え配列の長期発現を含む。
10

【0021】

驚くべきことに、本発明者らは、CDRがマウスモノクローナル抗体266を起原とし、フレームワークおよび他の抗体の部分がヒト生殖細胞系を起原とし、重鎖のCDR2内のN-グリコシル化部位が除去されているヒト型抗体が、グリコシル型マウスまたはヒト型266抗体よりも驚くほど高い親和性でA 1-40およびA 1-42に結合することを見出した。このように、本発明者らは、ヒト型形態へと変換することにより免疫原性を低下するように修飾されている、ヒト型抗体のこの特異性が、A 1-40と関連した、ヒトにおける病態(発症前および臨床上のアルツハイマー病、ダウン症候群および発症前および臨床上の大脳アミロイドアンギオパチーを含む)を、予防的および治療的に処置するための機会を提供すると考える合理的な根拠を有する。
20

【0022】

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

【0023】

「抗体」は、モノクローナル抗体自体、または免疫学的に有効なそのフラグメント(例えば、 F_{ab} 、 $F_{ab'}$ または $F_{(ab')_2}$)を意味する。本明細書中の文脈において、フラグメントは具体的に強調して記載されているが、それ以外の場合にはフラグメントが特記されているか否かにかかわらず、用語「抗体」がそのようなフラグメントならびに1本鎖形態を含むことが理解される。タンパク質が、意図する標的に結合する特異的な能力を保持している限り、用語「抗体」の定義内に含まれる。また、定義「抗体」には1本鎖形態が含まれる。好ましくは、しかし必ずしも必須ではないが、本発明に有用な抗体は組換え技術により産生される。抗体は、グリコシル化されていても、グリコシル化されていなくとも良いが、CDR2のN-グリコシル化部位以外がグリコシル化された抗体が好ましい。周知であるように、抗体はジスルフィド結合を介して適切に架橋されている。
30

【0024】

基本的な抗体構造単位は、四量体を含むことが知られている。各四量体は2つの同一のポリペプチド鎖対からなり、各対は1本の「軽」鎖(約25kDa)および1本の「重」鎖(約50~70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主な抗原認識を担う約100~110以上のアミノ酸の可変部を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は主にエフェクター機能を担う定常部を規定する。
40

【0025】

軽鎖は および に分類される。重鎖は 、 μ 、 、 または に分類され、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEとして抗体イソタイプを規定する。各タイプの中にもサブタイプ(IgG₁、IgG₄など)が存在しうる。軽鎖および重鎖内で、可変部および定常部は約12以上のアミノ酸の「J」領域により連結され、また、重鎖は約3以上のアミノ酸の「D」領域を含んでいる。定常域の特有の同定部(identity)であるイソタイプ、またはサブタイプは本発明に影響を与えない。

【0026】

10

20

30

40

50

各軽鎖 / 重鎖対の可変部は抗体結合部位を形成する。従って、インタクトな抗体は2つの結合部位を有する。鎖は全て、3つの超可変部(相補性決定基またはCDRとも呼ぶ)により連結した比較的保存されているフレームワーク領域(FR)の同一の全体構造を示す。各対の2つの鎖に由来するCDRをフレームワーク領域により整列させて特異的エピトープに結合しうるようとする。N-末端からC-末端で、軽鎖および重鎖は両方とも、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。各ドメインに対するアミノ酸の配置は、周知の慣例に従って行う[Kabat 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」 National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987および1991; Chothiaら、J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothiaら、Nature 342:878-883 (1989)]。

【0027】

10

「ヒト型抗体」は、非ヒト相補性決定基(CDR)を有する抗体の配列を変更することによりヒト抗体生殖細胞系に由来するアミノ酸配列により部分的または完全に構成される抗体を意味する。ヒト型イムノグロブリンは、マウス可変部およびヒト定常部を有するキメラ抗体は含まない。しかしながら、抗体の可変部、およびCDRでさえも、当該分野において現在周知である技術によりヒト型にされる。可変部のフレームワーク領域を、対応するヒトフレームワーク領域で置換し、非ヒトCDRは実質的にインタクトなままで残す。上記のように、抗体の免疫学的に特異的なフラグメント(単鎖形態を示すフラグメントを含む)を用いることは、本発明の方法での使用に関して十分なものである。

【0028】

20

ヒト型抗体は、ヒト治療での使用に関して、非ヒトおよびキメラ抗体を超える少なくとも3つの利点の可溶性を有する。

1) エフェクター部分がヒトであるので、他の部分のヒト免疫系とよりよく相互作用するかもしれない(例えば、補体依存性細胞障害(CDC)または抗体依存性細胞性細胞障害(ADCC)により、より効率よく標的細胞を破壊する)。

2) ヒト免疫系はヒト型抗体のフレームワークまたはC部を異種として認識せず、それゆえ、このような注射抗体に対する抗体反応は完全に異種の非ヒト抗体または部分的に異種のキメラ抗体よりも少ない。

3) 注射した非ヒト抗体は、ヒト循環中においてヒト抗体の半減期よりもかなり短い半減期を有すると報告されている。注射したヒト型抗体は、基本的に、天然に存在するヒト抗体と同一の半減期を有し、より少量かつより頻度の低い、施すべき投薬を可能とする。

30

【0029】

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

(a) アクセプターイムノグロブリンのヒトフレームワーク領域内のアミノ酸がその位置にあるのはヒトイムノグロブリンにとっては一般的ではないが、ドナーイムノグロブリン内の対応するアミノ酸がその位置にあるのはヒトイムノグロブリンにとっては典型的なものである。

40

(b) アミノ酸の位置がCDRの1つに直ちに隣接している。または

(c) 3次元イムノグロブリンモデルにおいて、フレームワークアミノ酸の任意の側鎖原子は、CDRアミノ酸の任意の原子の約5~6オングストローム(中心~中心)内にある[Queenら、Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、およびCoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2869 (1991)]。アクセプターイムノグロブリンのヒトフレームワーク領域内のアミノ酸、およびドナーイムノグロブリン内の対応するアミノ酸がそれぞれ、その位置にあるのはヒトイムノグロブリンにとっては一般的ではない場合、このようなアミノ酸はその位置にあるのがヒトイムノグロブリンにとっては典型的なアミノ酸により置き換

50

えられる。

脱グリコシル型ヒト型266のCDRは以下のアミノ酸配列を有する。

軽鎖CDR1：

【化2】

1

5

10

15

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His

(配列番号1)

軽鎖CDR2：

【化3】

1

5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser (配列番号2)

軽鎖CDR3：

【化4】

1

5

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

10

重鎖CDR1：

【化5】

1

5

Arg Tyr Ser Met Ser (配列番号4)

重鎖CDR2：

【化6】

1

5

10

15

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

(配列番号5)

20

[配列中、

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

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

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

および重鎖CDR3：

【化7】

1

Gly Asp Tyr (配列番号6).

40

【0030】

「任意のアミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸を意味する。好ましい天然に存在するアミノ酸は、Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpおよびTyrである。

【0031】

好ましい抗体群は、軽鎖CDR1～CDR3として、それぞれ、配列番号1～3の配列、重鎖CDR1およびCDR3として、それぞれ、配列番号4および6の配列、および重鎖CDR2として、配列

50

番号 5 :

[配列中、

配列番号 5 の 7 位の Xaa は Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp および Tyr から選択され（ただし、8 位の Xaa は Asp でも Pro でもなく、9 位の Xaa は Ser または Thr である場合、7 位の Xaa は Asn ではない）、配列番号 5 の 8 位の Xaa は Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp および Tyr からなる群から選択され（ただし、7 位の Xaa が Asn であり、9 位の Xaa は Ser または Thr である場合、8 位の Xaa は Asp または Pro である）、そして

配列番号 5 の 9 位の Xaa は Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp および Tyr からなる群から選択される（ただし、7 位の Xaa が Asn であり、8 位の Xaa が Asp でも Pro でもない場合、9 位の Xaa は Ser でも Thr でもない）】

の配列を有するものである。

【0032】

好みしい群の別の説明は、軽鎖 CDR1-CDR3 としてそれぞれ配列番号 1 ~ 3 の配列、重鎖 CDR1 および CDR3 としてそれぞれ配列番号 4 および 6 の配列を有し、重鎖 CDR2 の配列が以下の配列群から選択される、抗体またはそのフラグメントである。

1) 配列番号 1 3

【化 8】

1

5

10

15

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

(配列番号13)

20

[配列中、

配列番号 1 3 の 7 位の Xaa は Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp および Tyr からなる群から選択され、

配列番号 1 3 の 8 位の Xaa は Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp および Tyr からなる群から選択され、

配列番号 1 3 の 9 位の Xaa は Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp および Tyr からなる群から選択される。】

2) 配列番号 1 4

【化 9】

1

5

10

15

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

(配列番号14)

[配列中、

配列番号 1 4 の 7 位の Xaa は Asn であり、

配列番号 1 4 の 8 位の Xaa は Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp および Tyr からなる群から選択され、

配列番号 1 4 の 9 位の Xaa は Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Val、Trp および Tyr からなる群から選択される。】

3) 配列番号 1 5

【化 10】

1

5

10

15

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

(配列番号15)

40

50

[配列中、

配列番号15の7位のXaaはAsnであり、

配列番号15の8位のXaaはAspおよびProからなる群から選択され、

配列番号15の9位のXaaはSerおよびThrからなる群から選択される。]

【0033】

重鎖のCDR2に好ましい配列としては、ただ1つのアミノ酸が変化している、アミノ酸2つのみが変化している、または3つ全てが変化している配列が挙げられる。7位のAsnを置換すること、または9位のThrを置換すること、または両方を置換することが好ましい。1、2または3箇所全ての位置での保存的置換が好ましい。最も好ましい種は、7位AsnのSerまたはThrによる置換を有するものである。8位のSerが置換されていないことが好ましく、8位のSerが置換されている場合には、AlaまたはThr等で保存的に置換されていることが好ましい。本発明に好ましい脱グリコシル型266抗体は、重鎖のCDR2内(すなわち、上記の配列番号5内)において、以下の点を有する；

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

8位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され、そして9位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択される(ただし7位のXaaがAsnである場合、9位のXaaはSerでもThrでもない)。

【0034】

他の好ましい脱グリコシル型266抗体は、軽鎖CDR1-CDR3としてそれぞれ配列番号1～3の配列、重鎖CDR1およびCDR3としてそれぞれ配列番号4および6の配列を有し、重鎖CDR2の配列が以下の配列群から選択される、抗体またはそのフラグメントである：

1) 配列番号16

【化11】

1	5	10	15
---	---	----	----

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

(配列番号16)

[配列中、

配列番号16の7位のXaaはAla、Gly、His、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され、

配列番号16の8位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され、

配列番号16の9位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択される。]

2) 配列番号17

【化12】

1	5	10	15
---	---	----	----

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

(配列番号17)

[配列中、

配列番号17の7位のXaaはAsnであり、

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

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

【0035】

別の好ましい脱グリコシル型266抗体群は、重鎖のCDR2中(すなわち、上記の配列番号5内)が以下で示されるものである：

7位のXaaがAla、Gly、Leu、Met、Gln、Ser、ThrおよびValからなる群から選択され、

8位のXaaがSerであり、

10

20

30

40

50

9位のXaaがThrである。

【0036】

別の好ましい脱グリコシル型266抗体群は、重鎖のCDR2中(すなわち、上記の配列番号5内)に、以下の点を有するものである。

7位のXaaがAsnであり、

8位のXaaがSerであり、

9位のXaaがAla、Gly、Asn、GlnおよびValからなる群から選択される。

【0037】

別の好ましい脱グリコシル型266抗体群は、重鎖のCDR2中(すなわち、上記の配列番号5内)に、以下の点を有するものである。

7位のXaaがAla、Gly、Leu、Met、Gln、Ser、ThrおよびValからなる群から選択され、

8位のXaaがSerであり、

9位のXaaがAla、Gly、Asn、GlnおよびValからなる群から選択される。

【0038】

別の好ましい脱グリコシル型266抗体群は、重鎖のCDR2中(すなわち、上記の配列番号5内)に、以下の点を有するものである。

7位のXaaがSerおよびThrからなる群から選択され、

8位のXaaがSer、AlaおよびThrからなる群から選択され、

9位のXaaがAla、Gly、Asn、Gln、ThrおよびValからなる群から選択される。

【0039】

別の好ましい脱グリコシル型266抗体群は、重鎖のCDR2中(すなわち、上記の配列番号5内)に以下の点を有するものである。

7位のXaaがSerおよびThrからなる群から選択され、

8位のXaaがSer、AlaおよびThrからなる群から選択され、

9位のXaaがThrである。

【0040】

本発明のヒト型抗体の好ましい軽鎖可変部は、免疫原性の可能性を低下させるために、配列中、フレームワークはヒト生殖細胞系V_kセグメントDPK18およびJセグメントJk1に由来し、同一のヒトVサブグループ中のコンセンサスアミノ酸にいくつかのアミノ酸置換を有するものである、以下のアミノ酸配列を有する。

【化13】

10

20

30

1	5	10	15
Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Leu Pro Val Xaa Xaa			
	20	25	30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa			
	35	40	45
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro			
	50	55	60
Gly Gln Ser Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe			
	65	70	75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
	80	85	90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val			
	95	100	105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa			
	110		
Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg			(配列番号7)

[配列中、

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

【0041】

本発明のヒト型抗体の好ましい重鎖可変部は、免疫原性の可能性を低下させるために、配列中、フレームワークはヒト生殖細胞系VHセグメントDP53およびJセグメントJH4に由来し、同一のヒトVサブグループ中のコンセンサスアミノ酸にいくつかのアミノ酸置換を有するものである、以下のアミノ酸配列を有する。

【化14】

10

20

30

40

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

(配列番号8)

[配列中、

1位のXaaはGluまたはGlnであり、

7位のXaaはSerまたはLeuであり、

46位のXaaはGlu、Val、AspまたはSerであり、

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

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

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

63位のXaaはThrまたはSerであり、

75位のXaaはAla、Ser、ValまたはThrであり、

76位のXaaはLysまたはArgであり、

89位のXaaはGluまたはAspであり、そして

107位のXaaはLeuまたはThrである。】

【0042】

本発明のヒト型抗体の特に好ましい軽鎖可変部は、免疫原性の可能性を低下させるために、配列中、フレームワークはヒト生殖細胞系V_kセグメントDPK18およびJセグメントJk1に由来し、同一のヒトVサブグループ中のコンセンサスアミノ酸にいくつかのアミノ酸置換を有するものである、以下のアミノ酸配列を有する。

【化15】

1 5 10 15
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu
20 25 30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro
50 55 60 10
Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
65 70 75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
80 85 90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
95 100 105 20
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
110
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg (配列番号9).
【0043】
本発明のヒト型抗体の特に好ましい重鎖可変部は、配列中、フレームワークがヒト生殖細胞系VHセグメントDP53およびJセグメントJH4に由来するものである、以下のアミノ酸配列を有する。
【化16】

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

[配列中、

56位のXaaは任意のアミノ酸であり（ただし、57位のXaaはAspでもProでもなく、59位のXaaがSerまたはThrである場合、56位のXaaはAsnではない）、
 57位のXaaは任意のアミノ酸であり（ただし、56位のXaaがAsnであり、58位のXaaがSerまたはThrである場合、57位のXaaはAspまたはProである）、そして
 58位のXaaは任意のアミノ酸である（ただし、56位のXaaがAsnであり、57位のXaaはAspでもProでもない場合、58位のXaaはSerでもThrでもない）。】

【0044】

本発明のヒト型抗体にとって好ましい軽鎖は、以下のアミノ酸配列を有する。

【化17-1】

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

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

35 40 45
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro
10

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

65 70 75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

80 85 90
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
20

95 100 105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln

【化17-2】

110	115	120
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val		
125	130	135
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala		
140	145	150
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
10		
155	160	165
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
170	175	180
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
185	190	195
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
20		
200	205	210
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
215		
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		(配列番号11).

【0045】

本発明のヒト型抗体にとって好ましい重鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

30

【化18-1】

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

【化18-2】

--

65

70

75

Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

80

85

90

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

95

100

105

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

10

110

115

120

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

125

130

135

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

140

145

150

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

20

155

160

165

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

170

175

180

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

185

190

195

30

Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

200

205

210

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

215

220

225

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

40

230

235

240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

245

250

255

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

260	265	270
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
275	280	285
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
290	295	300
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
10		
305	310	315
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
320	325	330
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
335	340	345
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
20		
350	355	360
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
365	370	375
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
380	385	390
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
30		
395	400	405
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
410	415	420
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
425	430	435
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
40		
440		
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		(配列番号 12)

[配列中、

56位のXaaは任意のアミノ酸であり（ただし、57位のXaaはAspでもProでもなく、59位のXaaがSerまたはThrである場合、56位のXaaはAsnではない）、
57位のXaaは任意のアミノ酸であり（ただし、56位のXaaがAsnであり、58位のXaaがSerまたはThrである場合、57位のXaaはAspまたはProである）、そして

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

【0046】

配列番号8、配列番号10および配列番号12に記載の重鎖可変部を有する好ましい脱グリコシル型266抗体は、配列中に以下の点を有する。

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

57位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択され、そして58位のXaaはAla、Gly、His、Asn、Gln、SerおよびThrからなる群から選択される（ただし、56位のXaaがAsnである場合、58位のXaaはSerでもThrでもない）。

10

【0047】

重鎖配列番号8、配列番号10および配列番号12のCDR2に好ましい配列（56位、57位および58位）としては、ただ1つのアミノ酸が変化している、アミノ酸2つのみが変化している、または3つ全てが変化している配列が挙げられる。56位のAsnが置換されていることが好ましい。58位のThrをSer以外のアミノ酸で置換することが好ましい。57位のSerをProまたはAspで置換するという以外の手段により、266重鎖のCDR2中のN-グリコシル化部位を破壊することが好ましい。1、2または3個全ての位置での保存的置換が好ましい。最も好ましい種は、56位のAsnがSerまたはThrで置換されているものである。特に好ましい抗体は、配列番号8、配列番号10または配列番号12の56位がSerまたはThr、57位がSer、そして58位がThrであるものである。

20

【0048】

最も好ましい種は、配列番号11の軽鎖および配列番号12の重鎖を含む抗体であって、配列番号12中、56位のXaaがSer、57位のXaaがSer、そして58位のXaaがThrである（「N56S」）か、または配列番号12中、56位のXaaがThr、57位のXaaがSer、そして58位のXaaがThr（「N56T」）である抗体である。

【0049】

本発明のヒト型抗体およびヒト型266に対する軽鎖および重鎖には、他の配列も可能である。イムノグロブリンは2対の軽鎖／重鎖複合体を有し、少なくとも1つの鎖はヒトフレームワーク領域セグメントに機能的に連結したマウス相補性決定基を1つ以上有する。

30

【0050】

別の局面において、本発明は、発現させると本発明の抗体由来の重鎖および軽鎖CDRを含む抗体をコードする組換えポリヌクレオチドに関する。発現させると本発明の重鎖および軽鎖CDRを含むポリペプチド鎖をコードする例示的なポリヌクレオチドを、図1～7に示す。ヒト型抗体266変異体N56SおよびN56Tを生じる顕著な重鎖変化（図2～6）の回復により、ヒト型抗体266にインタクトなCDR2 N-グリコシル化部位が提供される。コドン縮重に起因して、他のポリヌクレオチド配列でこれらの配列を簡単に置換することができる。本発明において特に好ましいポリヌクレオチドは抗体をコードし、これは発現すると、配列番号1～4および6、および配列番号5、13、14、16または17のCDR、または配列番号7～配列番号7～10の可変部のいずれか、または配列番号11および配列番号12の軽鎖および重鎖を有する。

40

【0051】

ポリヌクレオチドは、通常、ヒト型イムノグロブリンコード配列に作動可能に連結されている発現制御ポリヌクレオチド配列（天然で関連している、または異種性のプロモーター領域を含む）をさらに含む。好ましくは、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトし得るベクター中の真核細胞プロモーター系であるが、原核生物宿主に対する制御配列もまた使用することができる。一度、適切な宿主細胞株にベクターを組み込めば、宿主細胞をヌクレオチド配列の発現に適切な条件下で増殖させた後、必要に応じて、軽鎖、重鎖、軽鎖／重鎖二量体またはインタクトな抗体、結合フラグメント、または他のイムノグロブリン形態の回収および精製を行うことができる。

【0052】

50

最終的に所望のヒト型抗体を発現し得る本発明の核酸配列は、種々の異なるポリヌクレオチド(ゲノムまたはcDNA、RNA、合成オリゴヌクレオチドなど)および構成成分(例えば、V、J、DおよびC領域)から任意の種々の周知の技術を用いて形成することができる。適当なゲノム配列と合成配列とを連結する方法が一般的な產生方法であるが、cDNA配列を利用することもできる。

【0053】

ヒト定常部DNA配列は、種々のヒト細胞から周知の方法を用いて単離することができるが、好ましくは不死化B細胞由来である。ポリヌクレオチド配列に適した供給源細胞、およびイムノグロブリン発現および分泌用の宿主細胞は、当該分野において周知の多数の供給源から入手することができる。

10

【0054】

本明細書中に具体的に記載するヒト型イムノグロブリンに加えて、他の「実質的に相同な」修飾イムノグロブリンは、当業者に周知の種々の組換えDNA技術を用いて簡単に設計および製造することができる。例えば、フレームワーク領域は、種々のアミノ酸置換、末端および中間の付加および欠失などにより、一次構造レベルでネイティブな配列から変更することができる。さらに、種々の異なるヒトフレームワーク領域が、本発明のヒト型イムノグロブリンに対する基礎として、単独で、または組み合わせて使用されうる。通常、遺伝子の修飾は、種々の周知の技術(部位特異的変異誘発法など)により容易に達成することができる。

20

【0055】

あるいは、一次抗体構造の一部のみを含むポリペプチドフラグメントを製造することができ、このフラグメントは1種以上のイムノグロブリン活性(例えば、補体結合活性)を有する。これらのポリペプチドフラグメントは、当該分野において周知の方法によるインタクトな抗体のタンパク質分解性切断により、または部位特異性変異誘発法を用いて停止コドンをベクター中の所望の位置に挿入することにより、製造することができる(例えば、CH1の後にFabフラグメントを製造するため、またはヒンジ領域の後にF(ab')₂フラグメントを製造するためなど)。1本鎖抗体は、VLおよびVHをDNAリンカーと連結することにより製造することができる。

【0056】

先に記載したように、ポリヌクレオチドは、配列を発現制御配列に動作可能に連結した(すなわち、確実に機能し得るように配置した)後に、宿主中で発現される。これらの発現ベクターは、通常、エピソームまたは宿主染色体DNAの必須部分のいずれかとして、宿主生物中で複製可能である。通常、発現ベクターは、所望のDNA配列でトランスフェクトした細胞の検出を可能にするために選択マーカー(テトラサイクリンまたはネオマイシン)を含む。これらの細胞の発現ベクターは、発現制御配列(複製起点、プロモーター、エンハンサーおよびリボソーム結合部位、RNAスプライシング部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列のような必須のプロセシング情報部位)を含み得る。好ましい発現制御配列は、イムノグロブリン遺伝子、SV40、アデノウィルス、ウシ乳頭腫ウィルス、サイトメガロウィルスなどに由来するプロモーターである。

30

【0057】

目的のポリヌクレオチド配列(例えば、重鎖および軽鎖をコードする配列および発現制御配列)を含むベクターを、周知の方法(細胞宿主のタイプに応じて変わる)により宿主細胞にトランスフェクトすることができる。種々の宿主を、当該分野において周知の技術を用いて本発明の抗体を発現させるために使用することができる。哺乳動物組織培養物が好ましく、特に、CHO細胞株、COS細胞株、ゴールデンハムスター卵巣細胞株、HeLa細胞、骨髄腫細胞株、形質転換したB細胞、ヒト胚性腎細胞株またはハイブリドーマ細胞株等を用いることが好ましい。

40

【0058】

一旦発現させたら、標準的な方法にしたがって、抗体を精製することができる。医薬用途には、少なくとも約90~95%の均質性を有する実質的に純粋なイムノグロブリンが好まし

50

く、98~99%以上の均質性が最も好ましい。部分的または所望される均質性まで精製した後、本明細書中に記載するようにポリペプチドを治療的または予防的に使用することができる。

【0059】

抗体(免疫学的に反応性のフラグメント)は、臨床上または発症前のアルツハイマー病、ダウント症候群または臨床上または発症前の大脳アミロイドアンギオパシー等のA₁₀ 関連症状または病状の危険があるまたはこれらを示す被検体に、標準的な投与方法を用いて、好ましくは静脈内、腹膜内、皮下、経肺、経皮、筋肉内、経鼻、経頸粘膜、舌下または坐薬での投与により抹消から(すなわち、中枢神経系への投与によるものではない)、投与される。抗体は、脳室系(ventricular system)、髄液または脳実質に直接投与することができ、これらの位置を指向する方法が当該分野において周知であるが、これらのより難しい方法を用いる必要はない。本発明の抗体は、末梢性循環系による、より簡単な方法により投与した場合も有効である。本発明の利点としては、中枢神経系自体に直接投与しない場合でさえ、抗体が有利な効果を発揮し得ることがあげられる。さらに、本発明に用いるヒト型抗体を末梢から投与したとき場合に、A₂₀ ペプチドに結合した場合、または自由に循環する場合に、それらの有利な効果を有するために脳における細胞性免疫反応を誘発する必要がない。さらに、末梢から投与した場合に、有益な効果を有するために脳内の凝集型A₂₀ ペプチドに感知しうるほど結合しなくてもよい。事実、血液脳関門を通過する抗体の量が血漿レベルの0.1%未満であることが実証されている。

【0060】

投与用医薬組成物は、選択した投与の態様にとって適切であるように設計されており、適切な場合には、緩衝剤、界面活性剤(surfactant)、保存剤、溶解補助剤、等張化剤、安定剤などの製薬上許容される賦形剤を用いる。Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, 最新版(本明細書中に参照して組み込む)は、通常、当業者に公知の製薬技術の要約を提供する。

【0061】

製剤中のヒト型抗体の濃度は、約0.1重量%の低い程度から、15または20重量%の高い程度であってよく、選択した特定の投与態様にしたがって、主に、流体の体積、粘性等に基づき選択する。したがって、注射用医薬組成物はリン酸緩衝化生理食塩水1mL中に本発明のヒト型抗体を1~100mg含有するように製造することができる。製剤は、製剤を作製した後に滅菌ろ過するか、そうでなければ微生物学的に許容できるようにする。静脈内注入用の通常の組成物は、250mLもの体積の流体(リンガー液等)、および1-100 mg/mL以上の抗体濃度を有しうる。本発明の治療薬剤は保存のために凍結させるか、または凍結乾燥させ、使用前に適切な滅菌キャリア中で再構成することができる。凍結乾燥および再構築は、種々の程度の抗体活性の損失を導くかもしれない(例えば、従来的な免疫グロブリンであるIgM抗体は、IgG抗体よりも活性を損失の程度が大きい傾向がある)。補うために投与量を調整する必要があり得る。製剤のpHは、(化学的および物理的な)抗体安定性のバランスをとるように、そして投与時に患者にとって快適であるように選択される。通常、4~8の間のpHが容認される。

【0062】

上記の方法はヒト型抗体のようなタンパク質の投与に最も都合がよく、最も適切な方法であるが、適切な製剤が設計されるならば、適切な適応により、他の投与方法(経皮投与および経口投与)を利用することができます。さらに、生分解性フィルムおよびマトリックス、または浸透圧ミニポンプ、またはデキストランビーズ、アルギナートまたはコラーゲンに基づく送達系を利用する、制御放出製剤を用いることが望ましいかもしれない。要約すると、製剤は、本発明の抗体の投与に利用可能であり、当該分野において周知であり、種々の選択肢から選択することができる。代表的な投薬レベルは、標準的な臨床技術を用いて最適化することができ、投与態様および患者の状態に依存する。

【0063】

以下の実施例は本発明を例示のためであって限定することを意図するものではない。本明

10

20

30

40

50

細書中以下の実施例では、特に「266」と表すマウスモノクローナル抗体を利用している。この抗体は、もともと、ヒトAペプチドの13~28残基から構成されるペプチドでの免疫感作により調製した。抗体はこのペプチドと免疫反応することを確認した。この抗体の調製は、米国特許第5,766,846号に記載されている(これは本明細書中に参照して組み込む)。これら実施例ではマウス系で行った実験について記載しているので、マウスモノクローナル抗体の使用で十分である。しかしながら、ヒトにおける使用を意図する本発明の治療方法においては、本発明のヒト化形抗体またはそのフラグメントが好ましい。

【0064】

実施例1

24ヶ月齢トランスジェニックヘミ接合型PDAPPマウスでの認知に対する抗体266投与の効果
10
16匹のヘミ接合性トランスジェニックマウス(APP^{V717F})を用いた。試験開始時、マウスは、およそ24ヶ月齢であった。注射は全て腹膜内(i.p.)であった。マウスの半数に週に一度、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS、「コントロール」)の注射を行い、残り半数にPBSに溶解したマウス抗体266(355 μ g)を投与した。7週間(42日)にわたり注射を合計6回行った。最後の注射後3日間、動物の行動を、原則的にJ.-C. Dodartら、Behavioral Neuroscience, 113 (5) 982-990 (1999)に記載されている物体認識課題を用いて評価した。認識指標($T_B \times 100)/(T_B - T_A)$ を計算した。結果を以下の表1に示す。

表1. 認識指標に関する記述統計学

【表1】

認識指標(分)				
	N	平均値	標準偏差	標準誤差
コントロール(PBS)	8	71.2**	8.80	3.11
抗体266	8	54.35	7.43	2.62

** p=0.0010

【0065】

24ヶ月齢ヘミ接合性トランスジェニックマウスへの週1回の抗体266(355 μ g)の投与は、行動における有意な変化と関連した。抗体処置したトランスジェニックマウスは、野生型コントロールマウスとよく似た認識指標を有した [J.-C. Dodartら]。認識指標における差は、0.001確率水準で統計的に有意であった。認識指標の上昇は、本発明の抗体を用いての処置が、このマウスアルツハイマー病モデルで示された行動欠陥を逆転させることを示している。したがって、マウス266よりも強くA_βに結合する本発明の抗体の投与は、アルツハイマー病およびダウン症候群のような疾患を治療し、通常、疾患の進行と関連している認知衰弱に歯止めをかける。

【0066】

上記のように、7週間にわたりマウス抗体266を用いて処置した24ヶ月齢の動物の脳由来の、海馬(帯状回および頭頂皮質の領域を含む)を覆っている隣接する皮質中のアミロイド負荷(抗A_β抗体3D6または21F12での染色後の免疫反応性物質により覆われた領域%)を定量した。結果を以下の表に示す。処置群間の差は、統計上、有意ではない。

表2. マウス266抗-A_β抗体での処置後のAPP^{V717F}+/-マウスにおけるアミロイド斑負荷

【表2】

斑負荷 (%)

コントロール (PBS)	N	3D6の使用		21F12の使用	
		平均値	標準誤差	平均値	標準誤差
	7	44.3	5.93	0.77	0.14
抗体 266	8	38.0	2.96	0.93	0.11

【 0 0 6 7 】

10

これらの非常に老齢の動物に関しては、3D6または21F12のいずれかを用いて測定した、マウス抗体266での処置は、PBS処置群と比較して、アミロイド負荷の有意差は生じなかった。さらに、A 負荷は、物体認識課題において新規な物体を見知った物体と正しく区別することができないより若い動物でのアミロイド負荷と比較すると実質的に高く、有意に上昇していた(以下を参照のこと)。最も驚くべきことに、これらの結果は、本発明の抗A抗体が、アミロイド負荷自体を減少させる必要なしに認知欠損をも逆転し得ることを大いに示している。

【 0 0 6 8 】

実施例 2

20

若年トランスジェニックヘミ接合型PDAPPマウスでの認知に対する抗体266の投与の効果 54匹のホモ接合性トランスジェニックマウス (APP^{V717F})を用いた。実験開始時、23匹のマウスはおよそ2ヶ月齢であった。残りのマウスは、実験開始時、およそ4ヶ月齢であった。治療期間は5ヶ月だった。従って、実験終了時には、マウスはおよそ7ヶ月齢であるか、または9ヶ月齢であった。

【 0 0 6 9 】

30

注射はすべて腹腔内(i.p.)であった。「PBS」コントロール群の各マウスには週に一度、リン酸緩衝化生理食塩水を注射した(PBS:200 μ L)。「IgG」コントロール群の各マウスには週に一度、IgG1 イソタイプコントロールを注射した(100 μ g/マウス/週)。「高用量」群の各マウスには、PBSに溶解した抗体266を355 μ g、週に一度投与した('HD')。「低用量」群の各マウスには、PBSに溶解した抗体266を71 μ g、週に一度投与した('LD')。最後の注射後3日間、動物の行動を、上記実施例1のように物体認識課題を用いて評価し、区別指標を、新規な物体に費やした時間と、見知った物体に費やした時間との差として計算した。結果を以下の表3に示す。データは、実験終了時のマウスの年齢でグループ分けする。

表3 . 区別指標に関する記述統計学

【表3】

区別指標(分)

	平均値	標準偏差	標準誤差
7ヶ月齢			
PBS	2.12	4.22	1.59
IgG	0.81	3.64	1.29
HD	10.04*	6.52	2.30
9ヶ月齢			
PBS	1.87	3.54	1.34
IgG	0.96	3.51	1.24
LD	10.75*	6.44	2.28
HD	12.06***	7.82	2.76

*p<0.05

***p<0.0001

10

20

30

【0070】

まとめると、これらのデータは、抗体266の投与が7～9ヶ月齢のAPP^{V717F}トランスジェニックマウスでの斑の沈着を減少すると共に、予め特徴付けられた行動欠損を逆転させるという結論を支持するものである。本発明の抗体を用いる患者の処置は、通常は疾患の進行と関連している認知減弱を阻害または予防し、および逆転させる。

【0071】

実施例3

ヒト型抗体266の合成

細胞および抗体。マウス骨髄腫細胞株Sp2/0はATCC (Manassas, VA)から得、10% FBS (カタログ番号SH30071.03, HyClone, Logan, UT)を含有するDME培地中で37℃でのCO₂インキュベーター中で維持した。マウス266ハイブリドーマ細胞を、最初は、10% FBS(HyClone)、10 mM HEPES、2 mMグルタミン、0.1 mM非必須アミノ酸、1 mMピルビン酸ナトリウム、25 µg/mlゲンタマイシンを含有するRPMI-1640培地中で生育させ、次いで2%低Ig FBS (カタログ番号30151.03, HyClone)を含有する無血清培地(Hybridoma SFM, カタログ番号12045-076, Life Technologies, Rockville, MD)中でローラー瓶中で2.5Lの体積まで広げた。マウスモノクローナル抗体266(Mu266)を、プロテインGセファロースカラムを用いる親和性クロマトグラフィーから培養上清から精製した。ビオチニル型Mu266を、EZ-連結スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン(EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin)(カタログ番号21338ZZ, Pierce, Rockford, IL)を用いて調製した。

【0072】

可変部cDNAのクローニング。全RNAを、TRIZOL試薬(Life Technologies)およびポリ(A)⁺ RNAを用いて約10⁷のハイブリドーマ細胞から抽出し、PolyATract mRNA Isolation System (Promega, Madison, WI)を、業者の取扱説明書に従って用いて単離した。二本鎖cDNAを、SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Palo Alto, CA)を業者の取扱説明書に従って用いて合成した。軽鎖および重鎖に対する可変部cDNAを、それぞれマウスおよび鎖定常部にアニーリングする3'プライマー、およびSMARTTMRACE cDNA Amplification Kit中の5'ユニバーサルプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。VL PCRに関しては、3'プライマーは、マウスCK領域にハイブリダイズする17-46残基を有する以下の配列を有する。

【化19】

40

5' -TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATAACAGTTGGTGC-3'

[配列番号 13]

VH PCRに関しては、3'プライマーはマウス鎖CH1にハイブリダイズする17-50残基を有する以下の縮重配列を有する。

【化20】

	A	G	T
5'	-TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGTCGTTTGGC-		
3'			
	T		

[配列番号 14]

配列決定のため、VLおよびVH cDNAをpCR4Blunt-TOP0ベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)にサブクローニングした。蛍光ジデオキシ鎖ターミネーター(Applied Biosystems, Foster City, CA)を取扱説明書の通りに用いてPCRサイクル配列決定反応によりDNA配列決定を行った。配列決定反応をModel 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems)で分析した。

【0073】

ヒト型266(Hu266)可変部の構築。軽鎖および重鎖可変部遺伝子を構築し、約65~80塩基の長さにわたる8個の重複合成オリゴヌクレオチドを用いて増幅した[He, X. Y.ら、J. Immunol. 160: 029-1035 (1998)]。オリゴヌクレオチドを対でアニーリングさせ、DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントを用いて伸長して二本鎖フラグメントを得た。得られたフラグメントを変性し、対でアニーリングさせ、Klenowで伸張し、2つのフラグメントを得た。これらのフラグメントを変性し、対でアニーリングさせ、再度伸張して全長遺伝子を得た。得られた生成物をExpand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)を用いてPCRにより増幅した。PCR増幅したフラグメントをゲル精製し、pCR4Blunt-TOP0ベクターにクローニングした。配列確認後、VLおよびVH遺伝子をMluIおよびXbaIで消化し、ゲル精製し、軽鎖および重鎖の発現のために、それぞれ、ベクター中にサブクローニングしてpV_k-Hu266(図8)およびpVg1-Hu266[Co, M. S.ら、J. Immunol. 148:1149-1154 (1992)]を作製した。これらのプラスミドから発現される成熟ヒト型266抗体は、配列番号11の軽鎖および配列番号12の重鎖を有する。

【0074】

安定なトランスフェクション。マウス骨髄腫細胞株Sp2/0への安定なトランスフェクションを、Gene Pulser装置(BioRad, Hercules, CA)を、記載(Coら、1992)の通りに360 Vおよび25 μFで用いてELECTRONICポレーションにより達成した。トランスフェクション前に、pV_k-Hu266およびpVg1-Hu266プラスミドDNAを、FspIを用いて線状化した。約10⁷ Sp2/0細胞をpV_k-Hu266(20 μg)およびpVg1-Hu266(40 μg)でトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を10% FBSを含有するDME培地に懸濁し、数枚の96ウェルプレートにプレーティングした。48時間後、選択培地(10% FBS、HT培地補充物、0.3 mg/mlキサンチンおよび1 μg/mlミコフェノール酸を含有するDME培地)を適用した。選択開始の約10日後、培地上清を、以下に示すように抗体産生についてELISAによりアッセイした。高収率クローナーを10% FBSを含有するDME倍地中に広げ、抗体発現に関してさらに分析した。次いで、選択したクローナーをHybridoma SFM中で増殖するように適合させた。

【0075】

ELISAによる抗体発現の測定。96ウェルELISAプレート(Nunc-Immunoプレート、カタログ番号439454, NalgeNunc, Naperville, IL)のウェルを、0.2M炭酸ナトリウム-重炭酸塩緩衝液(pH9.4)中1 μg/mlヤギ抗ヒトIgG、Fcフラグメント特異的ポリクローナル抗体(カタログ番号109-005-098, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)(100 μl)で、4で一

晚、コーティングした。洗浄緩衝液(0.1% Tween 20含有PBS)での洗浄後、ウェルを、Superblockプロッキング緩衝液(カタログ番号37535, Pierce)(400 μl)を用いて30分間プロックし、次いで洗浄緩衝液で洗浄した。Hu266を含有するサンプルを、ELISA緩衝液(1% BSAおよび0.1% Tween 20を含有するPBS)中で適切に希釈し、ELISAプレートに適用した(1ウェルあたり100 μl)。標準として、ヒト型抗-CD33 IgG1モノクローナル抗体 HuM195 (Cora, 1992、上記)を用いた。ELISAプレートを室温で2時間インキュベートし、ウェルを洗浄緩衝液で洗浄した。次いで、ELISA緩衝液中の1/1,000希釈HRP結合型ヤギ抗ヒトポリクローナル抗体(カタログ番号1050-05, Southern Biotechnology, Birmingham, AL)(100 μl)を各ウェルに適用した。1時間室温でインキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した後、ABTS基質(カタログ番号507602および506502, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)(100 μl)を各ウェルに加えた。2%シュウ酸を1ウェルあたり100 μl加えることにより呈色を停止した。OPTImaxマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Menlo Park, CA)を用いて415nmで吸光度を読み取った。

【0076】

Hu266の精製。高Hu266発現Sp2/0安定トランスフェクト体の1つ(クローン1D9)をHybridoma SFM中で生育するように適合させ、ローラー瓶中で2Lまで広げた。細胞生存率が10%以下に達した時点で消費培養上清を回収し、プロテインAセファロースカラムにロードした。抗体を0.1 Mグリシン-HCl(pH 2.5)、0.1 M NaClで溶離させる前にカラムをPBSで洗浄した。溶離したタンパク質を、PBS(2L)を3回交換して透析し、0.2 μmフィルターでろ過した後、4℃で保存した。280 nmでの吸光度を測定することにより抗体濃度を決定した(1 mg/ml = 1.4 A₂₈₀)。4~20%勾配ゲル(カタログ番号EC6025, Novex, San Diego, CA)で標準方法に従って、Tris-グリシン緩衝液中のSDS-PAGEを行った。精製ヒト型266抗体を還元し、SDS-PAGEゲルで泳動した。全抗体は、分子量約25 kDaおよび50 kDaの2つのバンドを示す。これらの結果は、アミノ酸組成から計算した軽鎖および重鎖または重鎖フラグメントの分子量と一致している。

【0077】

実施例4

ヒト型266抗体のインビトロ結合特性

ヒト型266抗体(上記のように合成および精製した)の結合効率を、比較ELISAでビオチニル型マウス266抗体を用いてマウス266抗体と比較した。96ウェルELISAプレート(Nunc-Immunoプレート、カタログ番号439454, NalgeNunc)のウェルを0.2 M炭酸ナトリウム/重炭酸塩緩衝液(pH 9.4)中で、BSAに結合したアミロイドペプチド(1-42)(10 μg/ml)(100 μl)で、一晩、4℃でコーティングした。A₁₋₄₂-BSA結合体を、A₁₋₄₂-Cys₄₃(C-末端システインA₁₋₄₂, AnaSpec)7.5mgをジメチルスルホキシド(500 μL)に溶解し、すぐに蒸留水1,500 μLを加えることにより調製した。マレイミド活性型(maleimide-activated)ウシ血清アルブミン(Pierce)2 mgを蒸留水200 μLに溶解した。この2種類の溶液をあわせ、徹底的に混合し、室温で2時間静置した。ゲルクロマトグラフィーカラムを用いて未反応のペプチドをA₁₋₄₂-Cys-BSA結合体から単離した。

【0078】

ウェルを、ELISAプレート洗浄器を用いて0.1%Tween 20(洗浄緩衝液)を含有するリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で洗浄した後、SuperBlock試薬(Pierce)を1ウェルあたり300 μL添加することによりウェルをプロックした。プロッキングの30分後、ウェルを洗浄緩衝液で洗浄し、過剰な液体を取り除いた。

【0079】

ELISA緩衝液中のビオチニル型Mu266(最終濃度0.3 μg/ml)および競合抗体(Mu266またはHu266、最終濃度750 μg/mlで開始して3倍系列希釈)の混合物を、最終体積1ウェルあたり100 μLで、3連で加えた。非競合コントロールとして、0.3 μg/mlビオチニル型Mu266を100 μl加えた。バックグラウンドコントロールとして、ELISA緩衝液100 μLを加えた。ELISAプレートを室温で90分間インキュベートした。洗浄緩衝液での洗浄の後、1 μg/ml HRP結合型ストレプトアビシン(カタログ番号21124, Pierce)100 μlを各ウェルに加えた。ブ

レートを室温で30分間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した。呈色のために、ABTSペルオキシダーゼ基質 (Kirkegaard & Perry Laboratories) 100 μL/ウェルを加えた。2%シユウ酸100 μL/ウェルを加えることにより呈色を停止させた。415nmで吸光度を読み取った。吸光度を競合物質濃度のlogに対してプロットし、曲線をデータ点に適合させ(Prismを用いる)、当該分野において周知の方法を用いて各抗体に対しIC50を決定した。

【0080】

マウス266に対する平均IC50は4.7 μg/mL(3回の独立した実験、標準偏差 = 1.3 μg/mL)であり、ヒト型266に対しては7.5 μg/mL(3回の独立した実験、標準偏差 = 1.1 μg/mL)であった。第2セットの3回の実験を、基本的には上に記載したとおりに行い、マウス266に対する平均IC50が3.87 μg/mL(SD = 0.12 μg/mL)であると決定し、ヒト266に関しては、IC 10 50は4.0 μg/mL(SD = 0.5 μg/mL)であると決定した。これらの結果に基づいて、本発明者らは、ヒト型266は、マウス抗体266の結合特性と非常に類似する結合特性を有すると結論付けた。したがって、本発明者らは、ヒト型266がマウス266と比較して非常に類似のインピトロおよびインピボ活性を有し、マウスにおいてマウス266を用いて実証したのと同じ効果がヒトにおいて示すと予測する。

【0081】

実施例5

マウス抗体266およびヒト型抗体266のインピトロ結合特性

抗体親和性(KD = Kd/Ka)をBIAcoreバイオセンサー2000を用いて測定し、データをBIAevaluation(v. 3.1)ソフトウェアを用いて分析した。補足抗体(ウサギ抗マウス)を、バイオセンサーチップのフローセル2(CM5)上でN-エチル-N-ジメチルアミノプロピルカルボジミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミド(EDC/NHS)を用いて、遊離アミン基を介してカルボキシル基にカップリングした。非特異的ウサギIgGをバックグラウンドコントロールとしてフローセル1にカップリングした。モノクロ-ナル抗体を補足して300共鳴単位(RU)を得た。次いで、アミロイド1-40または1-42(Biosource International, Inc.)を減少濃度でチップ上に流した(1000~0.1 × KD)。チップを再生させるために、結合型抗A抗体をグリシン-HCl(pH 2)を含む洗浄液を用いてチップから溶離させた。アミロイドを含まないコントロール注入は、ベースラインの除去のためのコントロールとして役立つ。結合相および解離相を示すセンサーグラムを分析してkdおよびkaを決定した。この方法を用いて、A₁₋₄₀およびA₁₋₄₂に対するマウス抗体266の親和性が4 pMであることを見出した。ヒト型266のA₁₋₄₂に対する親和性が4 pMであることを見出した。

【0082】

実施例6

脱グリコシル型ヒト型抗体266変異体N56SおよびN56Tの合成

部位特異的変異誘発法。QuikChange XL部位特異的変異誘発キット(カタログ番号200517, Stratagene, La Jolla, CA)を用いて部位特異的変異誘発を行った。Hu266のVH CDR2におけるN56SおよびN56T変異体を作製するために、所望のヌクレオチド置換を含むオリゴヌクレオチドプライマー対を、製造業者の取扱い指示に従って設計した。プライマーをPfuTurbo DNAポリメラーゼで、pVg1-Hu266プラスミドDNAを鋳型として用いて伸長させた。得られた生成物を、メチル型およびヘミメチル型DNAに特異的なDpn Iエンドヌクレアーゼで処理して親鋳型を消化した。得られた変異体プラスミドpVg1-Hu266 N56SおよびpVg1-Hu266 N56Tを、配列決定により確認した。

【0083】

細胞培養。マウス骨髄腫細胞株Sp2/0-Ag14(本文書中、Sp2/0と呼ぶ。カタログ番号CRL-1581, ATCC, Manassas, VA)を、10%FBS(カタログ番号SH32661.03, ロット番号AKE11827, HyClone, Logan, UT)を含有するDME培地の中で、CO₂インキュベーター中37℃で増殖させる。gpt発現に対する選択を、10%FBS、HT培地補充物(カタログ番号H-0137, Sigma, St. Louis, MO)、0.3 mg/mlキサンチン(カタログ番号X-3627, Sigma)および1 μg/mlミコフェノール酸(カタログ番号11814-019, Life Technologies, Rockville, MD)を含有するDME培地で行った。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

安定なトランスフェクション。変異体Hu266を產生する細胞株を確立するため、Sp2/0への安定なトランスフェクションを、基本的には実施例3に記載している方法と同じ方法で達成した。ELISA分析を選択の開始後7日行った。

【 0 0 8 5 】

ELISAによる抗体発現の測定。ELISAの詳細に関しては、実施例3を参照のこと。

【 0 0 8 6 】

Hu266軽鎖および変異体重鎖のcDNAの配列決定。全RNAを、TRIzol試薬(Life Technologies)を用いて約 2×10^7 ハイブリドーマ細胞から単離した。第1鎖cDNAを、全RNAを錆型として、およびランダムなヘキサデオキシヌクレオチドをプライマーとして用いて合成した。SuperScript II逆転写酵素(Life Technologies)を用いて、製造業者のプロトコルに従って反応を行った。Hu266軽鎖または変異体重鎖の全コード領域を含むDNAフラグメントを、それぞれ、5'および3'非コード領域に結合する5'および3'プライマーを用いるPCRにより増幅した。増幅したフラグメントをゲル精製し、適切なプライマーを用いて配列決定した。
10

【 0 0 8 7 】

変異体Hu266の精製。精製の詳細については実施例3を参照のこと。明確にするために、以下に差異を記載する。各変異体Hu266に対して、クローンA4はHu266 N56Sに対するものであり、クローンD2はHu266 N56Tに対するものであった。カラムをPBSで洗浄した後、抗体を0.1Mグリシン-HCl(pH 2.8)、0.1MNaClで溶離する。1MTrisHCl(pH 8)で中和した後、溶離したタンパク質をPBS(2L)を3回交換して透析し、0.2μmフィルターでろ過した後、4℃で保存した。4-12%NuPAGEゲル(カタログ番号NP0321, Invitrogen)で標準的な方法に従って、MES緩衝液中でSDS-PAGEを行った。製造業者のプロトコールに従って、コロイドブルー染色キット(Colloidal Blue Staining Kit)(カタログ番号LC6025, Invitrogen)を用いてゲル染色を行った。
20

【 0 0 8 8 】**実施例7**

マウス266、ヒト型抗体266変異体N56SおよびN56T ELISA競合の比較結合。96ウェルELISAプレート(Nunc-Immunoプレート、カタログ番号439454, NalgeNunc)のウェルを0.2M炭酸ナトリウム/重炭酸塩緩衝液(pH 9.4)中のアミロイドペプチドと結合したBSA(3μg/mL)100μlを用いて、一晩、4℃でコーティングし、洗浄緩衝液で洗浄し、Superblockブロッキング緩衝液で30分間、室温でブロックし、洗浄緩衝液で再度洗浄した。ビオチニル型Mu266(最終濃度0.6μg/ml)および競合抗体(Mu266または変異体Hu266、通常、最終濃度750μg/mlで開始して3倍系列希釈)のELISA緩衝液中の混合物を、最終体積1ウェルあたり100μLで、3連で加えた。非競合コントロールとして、0.6μg/mlビオチニル型Mu266(100μl)を用いた。バックグラウンドコントロールとして、ELISA緩衝液100μLを用いた。ELISAプレートを室温で2時間インキュベートした。ウェルを洗浄緩衝液で洗浄した後、10μg/mlHRP結合型ストレプトアビシン(カタログ番号21124, Pierce)100μlを各ウェルに加えた。ELISAプレートを室温で30分間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した。呈色のために、ABTS基質を100μl/ウェルで加えた。2%シュウ酸を100μl/ウェルで加えることにより呈色を停止させた。415nmで吸光度を読み取った。
30
40

【 0 0 8 9 】

Mu266、本来のHu266(野生型)、Hu266 N56SおよびHu266 N56Tの-アミロイドペプチドに対する親和性を、競合ELISAにより比較した。Mu266、野生型Hu266、Hu266 N56SおよびHu266 N56Tは、濃度依存性の様式でビオチニル型Mu266と競合した。Hu266 N56SおよびHu266 N56Tは、Mu266および本来のHu266よりも高い親和性を示した。Mu266、Hu266 N56SおよびHu266 N56TのIC₅₀値を、各変異体に対して3回の独立した実験から得た。値は、コンピューターソフトウェアPrism(GraphPad Software Inc., San Diego, CA)を用いて計算し、表4に示す。Hu266 N56SおよびHu266 N56Tの結合親和性比は、それぞれ、平均で、Mu266よりも6.2倍および5.8倍高かった。これは、グリコシリ型(56位で)マウス抗体と比較して
50

、脱グリコシル型変異体ヒト型抗体の親和性の有意な上昇を示す。

表4 . ELISA競合実験のまとめ

【表4】

IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)

競合物質	実験 I	実験 II	実験 III	平均	標準偏差
Mu266	3.8	4.5	6.1	4.8	0.96
Hu266 N56S	0.43	0.92	1.0	0.78	0.25
差	8.8 倍	4.9 倍	6.1 倍	6.2 倍	

10

IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)

競合物質	実験 I	実験 II	実験 III	平均	標準偏差
Mu266	4.3	6.4	6.4	5.7	0.99
Hu266 N56T	0.68	1.2	1.1	0.99	0.23
差	6.3 倍	5.3 倍	5.8 倍	5.8 倍	

20

【0090】

実施例 8

ヒト型抗体266変異体N56SおよびN56Tの親和性

抗体親和性($KD = Kd/Ka$)をBIAcoreバイオセンサー2000を用いて測定し、データを、基本的には実施例5に記載される方法と同じ方法で、BIAevaluation(v.3.1)ソフトウェアを用いて分析した。ELISA実験を、基本的には実施例7に記載の方法と同じ方法で行った。

【0091】

以下のデータは、脱グリコシル型ヒト型抗体変異体(N56S、N56T)が、グリコシル型形態(h266)よりも有意に良好な親和性を有することを示す。分析間で変動があるが、これらの差は、これらの脱グリコシル型変異体に関して示された、グリコシル型形態を超える、相対的な親和性の改善には有意な影響は与えない。

【表5】

親和性 - BIACore

KD (pM)	
N56S	2.5
H266	7.2
N56T	1.87
h266	3.47

競合結合 (IC50, μg/mL) - ELISA

	平均	S.D.	N
N56S	1.9	0.2	3
Hu 266	7.2	1.9	3
Mu 266	7.6	1.4	3
N56T	3.1	0.9	3
Hu 266	13.0	2.6	3
Mu 266	14.0	2.6	3
N56S	0.43	-	1
Mu 266	3.80	-	1
N56S	1.0	-	1
N56T	1.0	-	1
Hu 266	5.0	-	1
Mu 266	7.1	-	1

10

20

30

40

50

【0092】

実施例9

ヒト型抗体266の重鎖の56位でのグリコシル化の決定

基本的に上記のように発現および精製したヒト型266の2つの各ロットについて、約100 μgの抗体を含有するサンプルを調製した。ウレア(50mg)、50 mg/mL DTT (5 μL) および3 M トリス緩衝液(pH 8.0)(10 μL)を添加し、37 °Cで30分間インキュベートすることにより、各サンプルを還元した。50mg/mLヨードアセトアミド溶液(20 μL)を添加し、暗所で室温で30分間インキュベートすることにより、タンパク質をアルキル化した。P-6樹脂をパックしたスピンカラム(1 mL)で溶液を脱塩した。脱塩カラムを洗浄し、0.025M NH₄HCO₃緩衝液で溶離した。タンパク質画分(約250 μL)を各サンプルについて回収した。各タンパク質画分を1 mg/mL トリプシン溶液(2 ~ 3 μL)と混合し、次いで混合物を37 °Cで約2.5時間インキュベートした。残留するトリプシン活性を、溶液を100 °Cで3分間加熱することによりクエンチした。脱シアリン酸型(desialylated)サンプルに関しては、各サンプルのトリプシン消化物(10 μL)を、水中0.15% ギ酸(7 μL)およびノイラミニダーゼ(a.u.)溶液(1単位/mL、2 μL)と混合した。混合物を37 °Cで1 ~ 3時間インキュベートした後、HPLC/MS分析を行った。脱N-グリコシル型サンプルに関しては、トリプシン消化物(10 μL)をN-グリコシダーゼF(1 μL)で37 °Cで3時間処理した。

【0093】

全溶液を、以下の条件を用いてキャピラリーHPLC/MSにより直接分析した：HPLCはHP1100である；カラム：Zorbax C8, 2.1 × 150mmまたはVydac C18, 0.3 × 150 mm；温度：周囲温度；流速：Zorbaxに対しては200 μL/min、C18に対しては5-10 μL/min；注射体積：1 : 1希釈後、またはもともとの溶液を10 μL；HPLC溶媒：A - H₂O中0.15% ギ酸、B - ACN中0.12% ギ酸；勾配(時間, % B)：(0, 2), (40, 50), (43, 90), (45, 90), (46, 2), (50, 2)；質量分析：API 150EX MASS SPEC 03, ステップ 0.333, DP 25 V, ISV 5000 V, およびFP 250 V。

【0094】

分析した両方のロットで、グリコペプチドを含有する2つのピークが見出された。脱N-グリコシル化の後、ピークのうちの1つ(およそ13分ごろ溶離)に新規ペプチドの質量である1189.6および1672.5を見出した。これらの2つの質量は、重鎖288-296および284-296(脱N-グリコシル化の後の予測質量:1190.2および1672.8)と一致する。他方のピーク(約26分ごろ溶離)では、新規ペプチドの質量2369.4が脱N-グリコシル化の後に見出された。この質量は、重鎖ペプチド44-65と一致する。したがって、重鎖の潜在的なグリコシル化部位であるAsn56および292がグリコシル化されている可能性があった。トリプシン消化物のHPLC/MS分析からのペプチド288-296および44-65の再構成イオンクロマトグラムには明確なピークは見出されなかった。結果は、ヒト型266抗体の両方のロットに関して、Asn 56位が完全にグリコシル化されていることを示した。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1】ヒト型変異体266軽鎖を発現するpV_k-Hu266ポリヌクレオチド配列および発現型ヒト型266軽鎖に関する1文字アミノ酸コード。軽鎖遺伝子の完全な配列は、pV_k-Hu266のM1u1およびBamHI部位の間にある。ヌクレオチドの数はpV_k-Hu266中における位置を示す。V_kおよびC_kエキソンを1文字コードに翻訳する。点(ドット)は翻訳終止コドンを示す。成熟軽鎖は二重下線のアスパラギン酸(D)から始まる。イントロン配列はイタリック体である。

【図2】Hu266 N56S重鎖遺伝子の完全配列。pVg1-Hu266 N56S中のM1u1およびBamHI部位の間に位置するHu266 N56S重鎖遺伝子の完全配列。ヌクレオチドの数はpVg1-Hu266 N56S中における位置を示す。VHおよびCHエキソンを1文字コードに翻訳する。点(ドット)は翻訳終止コドンを示す。成熟重鎖は太文字の一重下線のグルタミン酸(E)から始まる。pVg1-Hu266の853位のヌクレオチドのアデニンはグアニン(太文字および二重下線)で置換されており、セリン残基(太文字および二重下線)へのアミノ酸変化を生じる。イントロン配列はイタリック体である。ポリAシグナルに下線を付す。

【図3】Hu266 N56T重鎖遺伝子の完全配列。pVg1-Hu266 N56T中のM1u1およびBamHI部位の間に位置するHu266 N56T重鎖遺伝子の完全配列。ヌクレオチドの数はpVg1-Hu266 N56T中における位置を示す。VHおよびCHエキソンを1文字コードに翻訳する。点(ドット)は翻訳終止コドンを示す。成熟重鎖は太文字の一重下線のグルタミン酸(E)から始まる。pVg1-Hu266の853位のヌクレオチドのアデニンはシトシン(太文字および二重下線)で置換されており、トレオニン残基(太文字および二重下線)へのアミノ酸変化を生じる。イントロン配列はイタリック体である。ポリAシグナルに下線を付す。

【図4】ミニエキソン中のHu266 N56Sの重鎖可変部のヌクレオチド配列および縮重型アミノ酸配列。235位のヌクレオチドのアデニンはグアニン(太文字および二重下線)で置換されており、セリン残基(太文字および二重下線)へのアミノ酸変化を生じる。シグナルペプチド配列はイタリック体である。Kabat (Johnson, J.ら、Nucleic Acids Res. (2000) 28:214-218) の定義に基づくCDRに下線を付す。成熟重鎖はグルタミン酸残基で始まる(太文字および一重下線)。示した配列は、唯一のM1u1 (ACGCGT)およびXbaI (TCTAGA)部位に隣接している。

【図5】ミニエキソン中のHu266 N56Tの重鎖可変部のヌクレオチド配列および縮重型アミノ酸配列。235位のヌクレオチドのアデニンはシトシン(太文字および二重下線)で置換されており、トレオニン残基(太文字および二重下線)へのアミノ酸変化を生じる。シグナルペプチド配列はイタリック体である。Kabat (Johnson, J.ら、Nucleic Acids Res. (2000) 28:214-218) の定義に基づくCDRに下線を付す。成熟重鎖はグルタミン酸残基で始まる(太文字および一重下線)。示した配列は、唯一のM1u1 (ACGCGT)およびXbaI (TCTAGA)部位に隣接している。

【図6】Hu266 N56S重鎖cDNAおよび翻訳型アミノ酸配列。アミノ酸は1文字コードで示す。点(ドット)は翻訳終止コドンを示す。成熟重鎖の第1アミノ酸を下線を付して太文字にし、これは前にシグナルペプチド配列がある。置換型アミノ酸であるセリンを太文字にす

10

20

30

40

50

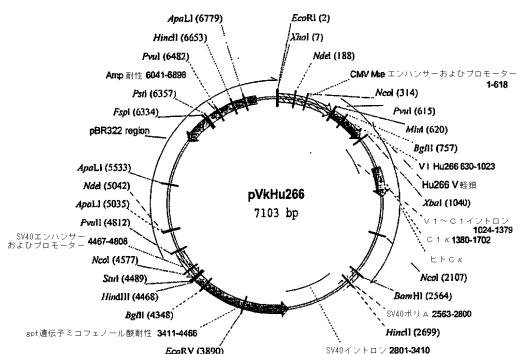
る。

【図7】Hu266 N56T重鎖cDNAおよび翻訳型アミノ酸配列。アミノ酸は1文字コードで示す。点(ドット)は翻訳終止コドンを示す。成熟重鎖の第1アミノ酸を下線を付して太文字にし、これは前にシグナルペプチド配列がある。置換型アミノ酸であるトレオニンを太文字にする。

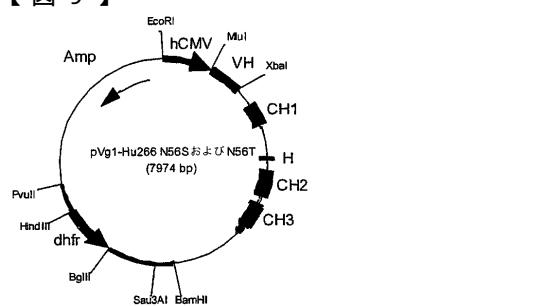
【図8】プラスミドpV_k-Hu266。

【図9】Hu266 N56SおよびN56Tの発現のためのプラスミド構築。Hu266変異体VH遺伝子を、MluIおよびXbaI部位に隣接したミニエキソンとして構築した。V領域を対応する発現ベクターに組み込んでpVg1-Hu266 N56SまたはN56Tを作製した。

【図8】



【図9】



【国際公開パンフレット】

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

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/016466 A2(51) International Patent Classification⁵: C12N

(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DL, DK (utility model), DK, DM, DZ, IC, IE (utility model), IJ, IS, F1 (utility model), F1, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, IJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/US02/21322

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/313,224 17 August 2001 (17.08.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): **LILLY AND COMPANY** [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **JIA, Audrey Yun-hua** [CN/US]; 34773 Chesapeake Drive, Union City, CA 94587 (US). **TSURUSHITA, Naoya** [JP/US]; 3719 Redwood Circle, Palo Alto, CA 94306 (US). **VASQUEZ, Maximiliano, J.** [US/US]; 3813 Louis Road, Palo Alto, CA 94303 (US).(74) Agents: **KELLEY, James, J.** et al.; Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US).

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

Published:

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

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

WO 03/016466 A2(54) Title: ANTI- $\text{A}\beta$ ANTIBODIES(57) Abstract: This invention provides variant 266 antibodies that are engineered to lack an N-glycosylation site within the CDR2 of the heavy chain, pharmaceutical compositions thereof, and polynucleotide sequences, vectors, and transformed cells useful to express the variant antibodies. The variants sequester soluble $\text{A}\beta$ peptide from human biological fluids and specifically bind an epitope contained within position 13-28 of the amyloid beta peptide $\text{A}\beta$ with significantly greater affinity than either mouse antibody 266 or humanized 266 antibodies retaining N-glycosylation sites. The variant antibodies are useful for treatment or prevention of conditions and diseases associated with $\text{A}\beta$, including Alzheimer's disease, Down's syndrome, cerebral amyloid angiopathy, mild cognitive impairment, and the like.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

1

ANTI-A β ANTIBODIES

This application claims the priority of US provisional application 60/313,224, filed August 17, 2001, the entire contents of which are incorporated by reference.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The invention relates to analogs of antibody 266 that lack an N-glycosylation site in the second complementarity determining region (CDR2) of the heavy chain. Such antibodies are useful for preventative and therapeutic treatment of conditions associated with the A β peptide, such as Alzheimer's disease, Down's syndrome, and cerebral amyloid angiopathy.

A number of conditions and diseases appear to be associated with neuritic and cerebrovascular plaques in the brain containing amyloid beta peptides (A β). Among these are both pre-clinical and clinical Alzheimer's disease, Down's syndrome, and pre-clinical and clinical cerebral amyloid angiopathy (CAA). The A β peptide in circulating form is composed of 39-43 amino acids (mostly 40 or 42 amino acids) resulting from the cleavage of a precursor protein, amyloid precursor protein (APP).

Methods to induce an immune response to reduce amyloid deposits are described in PCT publication WO99/27944 published 10 June 1999. The description postulates that full-length aggregated A β peptide would be a useful immunogen. Administration of a A β fragment (amino acids 13-28) conjugated to sheep anti-mouse IgG caused no change in cortex amyloid burden, and only one in nine animals that received injections of the A β 13-28 fragment-conjugate showed any lymphoproliferation in response to A β 40. The application also indicates that antibodies that specifically bind to A β peptide could be used as therapeutic agents. However, this appears to be speculation since the supporting data reflect protocols that involve active immunization using, for example, A β 42.

WO 00/72880 and Bard, F., *et al.*, *Nature Med.* (2000) 6:916-919 describe significant reduction in plaque in cortex and hippocampus in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease when treated using N-terminal fragments of A β peptides and antibodies that bind to them, but not when treated with the A β 13-28 fragment conjugated to sheep anti-mouse IgG or with an antibody against the 13-28 fragment, antibody 266.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

2

The N-terminal directed antibodies were asserted to cross the blood-brain barrier and to induce phagocytosis of amyloid plaques in *in vitro* studies.

WO 00/77178 describes antibodies that were designed to catalyze the hydrolysis of β amyloid, including antibodies raised against a mixture of the phenylalanine statine transition compounds Cys-A β 10-25, statine Phe₁₉-Phe₂₀ and Cys-A β 10-25 statine Phe₂₀-Ala₂₁ and antibodies raised against A β 10-25 having a reduced amide bond between Phe₁₉ and Phe₂₀. The document provides no *in vivo* evidence that administration of these antibodies causes efflux of A β from the central nervous system, interference with plaque formation, reduction in plaque burden, formation of complexes between the antibodies and A β in tissue samples, or affects cognition.

U.S. patents 5,766,846, 5,837,672, and 5,593,846 (which are incorporated herein by reference) describe the production of murine monoclonal antibodies to the central domain of the A β peptide. Among antibodies known to bind between amino acids 13 and 28 of A β are mouse antibodies 266, 4G8, and 1C2.

It had previously been found, as described in PCT/US/01/06191, filed February 26, 2001, that administration of the mouse antibody 266 almost completely restores cognition following prolonged periods of weekly administration of the 266 antibody (object memory) in 24-month old hemizygous transgenic mice (APP^{V717F}). It was also observed that peripheral administration of antibody 266 results in rapid efflux of relatively large quantities of A β peptide from the CNS into the plasma. Prolonged treatment also resulted in altered clearance of soluble A β , prevention of plaque formation, and improvement in cognition, even without necessarily having the features the art teaches are required: for an antibody to be effective, namely, reducing A β amyloid plaque burden, crossing the blood brain barrier to any significant extent, decorating plaque, activating cellular mechanisms, or binding with great affinity to aggregated A β . DeMattos, *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) Early Edition*, July 3, 2001) published some of the data that are in PCT/US/01/06191. PCT/US/01/06191 also disclosed humanized 266 antibodies ("Hu266" or "h266").

Starting at position 56 of the heavy chain V region, both Mu266 and Hu266 contain the sequence Asn-Ser-Thr. This sequence is an example of the Asn-X-Ser/Thr signal for N-linked glycosylation, wherein the Asn is the site of attachment of N-linked

WO 03/016466

PCT/US02/21322

3

glycosyl chains. While most occurrences of Asn-X-Ser/Thr in secreted proteins are glycosylated (Gavel, Y. *et al.*, *Prot. Eng.* (1990) 3:433-442), not all glycosylation site sequences that are present in a polypeptide are sites where sugar residues are actually attached (U.S. patent 5,714,350). Notably, the results reported in PCT/US/01/06191 were generated using a 266 antibody that was fully glycosylated at position 56 of the heavy chain.
5

It has been shown that glycosylation in variable region framework can have a negative effect on antibody binding affinity, likely due to steric hindrance (Co, M.S., *et al.*, *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361-1367). In contrast, glycosylation in the heavy chain CDR2 of a particular murine antibody increased its affinity for the antigen (Wallick, S.C., *et al.*, *J. Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., *et al.*, *EMBO J.* (1991) 10:2717-2723). In light of these teachings, the effect of glycosylation of h266 in VH CDR2 on its affinity for A β was unpredictable, that is, glycosylation might affect affinity for A β positively, negatively, or not at all. The only way to determine whether glycosylation of 10 266 affected affinity was to remove the glycosylation site and determine the binding affinity.
15

Quite unpredictably and advantageously, the affinity of Hu266 that is deglycosylated in the heavy chain CDR2 for A β peptide is markedly higher than that of h266.
20

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention provides humanized antibodies and fragments thereof, having the CDR of mouse anti-A β antibody 266, wherein the N-glycosylation site in heavy chain CDR2 is modified so that it cannot be N-glycosylated. So, in its broadest extent, the 25 present invention is an antibody, or fragment thereof, comprising a light chain and a heavy chain, wherein the light chain comprises the three light chain complementarity determining regions (CDRs) from mouse monoclonal antibody 266 (SEQ ID NO:1-3), and wherein the heavy chain comprises heavy chain CDR1 and CDR3 from mouse monoclonal antibody 266 (SEQ ID NO: 4 and 6, respectively), and a heavy chain CDR2 30 having the sequence given by SEQ ID NO:5:

WO 03/016466

PCT/US02/21322

4

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

(SEQ ID NO:5)

wherein:

- 5 Xaa at position 7 is any amino acid, provided that if Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 7 is not Asn;
Xaa at position 8 is any amino acid, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 8 is Asp or Pro; and
Xaa at position 9 is any amino acid, provided that if Xaa at position 7 is Asn and
10 Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 9 is neither Ser nor Thr.

15 Also part of the invention are polynucleotide sequences that encode the humanized antibodies or fragments thereof disclosed above, vectors comprising the polynucleotide sequences encoding the humanized antibodies or fragments thereof, host cells transformed with the vectors or incorporating the polynucleotides that express the humanized antibodies or fragments thereof, pharmaceutical formulations of the humanized antibodies and fragments thereof disclosed herein, and methods of making and using the same.

20 Such humanized antibodies and fragments thereof having higher affinity for A β than mouse 266 or humanized 266 are expected to exhibit the same properties described previously for mouse 266 and humanized 266, namely, they are useful for sequestering A β in humans; for treating and preventing diseases and conditions characterized by A β plaques or A β toxicity in the brain, such as Alzheimer's disease, Down's syndrome, and cerebral amyloid angiopathy in humans; for diagnosing these diseases in humans; and for
25 determining whether a human subject will respond to treatment using humanized antibodies against A β .

25 The advantages of the present humanized, variant 266 antibodies over the previously described humanized 266 antibodies include more reliable manufacturability, less batch-to-batch variability in glycosylation, and comparable or higher affinity for the antigen than the previously described humanized 266 antibodies. This will permit lower doses to give equivalent results.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

5

Administration of an antibody of this invention *in vivo* to sequester A β peptide circulating in biological fluids is useful for preventive and therapeutic treatment of conditions associated with the formation of A β -containing diffuse, neuritic, and cerebrovascular plaques in the brain. This invention provides enhanced binding affinity due to the elimination of the CDR2 N-glycosylation site.

5 The invention also includes methods of using the deglycosylated 266 antibodies to treat and to prevent conditions characterized by the formation of plaques containing beta-amyloid protein in humans, which method comprises administering, preferably peripherally, to a human in need of such treatment a therapeutically or prophylactically effective amount of deglycosylated 266 antibodies, or immunologically reactive fragments thereof.

10 In another aspect, the invention is directed to a method to inhibit the formation of amyloid plaques and to clear amyloid plaques in humans, which method comprises administering to a human subject in need of such inhibition an effective amount of the 15 deglycosylated 266 antibodies of the present invention.

15 The invention also includes methods of reversing cognitive decline, improving cognitive cognition, treating cognitive decline, and preventing cognitive decline in a subject diagnosed with clinical or pre-clinical Alzheimer's disease, Down's syndrome, or clinical or pre-clinical cerebral amyloid angiopathy, comprising administering to the 20 subject an effective amount of the deglycosylated 266 antibodies of the present invention.

25 The invention also includes use of a humanized antibody of the present invention for the manufacture of a medicament, including prolonged expression of recombinant sequences of the antibody or antibody fragment in human tissues, for treating, preventing, or reversing Alzheimer's disease, Down's syndrome, or cerebral amyloid angiopathy; for treating, preventing, or reversing cognitive decline in clinical or pre-clinical Alzheimer's disease, Down's syndrome, or clinical or pre-clinical cerebral amyloid angiopathy; or to inhibit the formation of amyloid plaques or the effects of toxic soluble A β species in humans.

30 **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

Figure 1. pV_k-Hu266 polynucleotide sequences for expressing humanized variant 266 light chain and single amino acid codes for expressed humanized 266 light chains.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

6

The complete sequence of the light chain gene is located between the MluI and BamHI sites in pV_k-Hu266. The nucleotide number indicates its position in pV_k-Hu266. The V_k and C_λ exons are translated in single letter code; the dot indicates the translation termination codon. The mature light chain starts at the double-underlined aspartic acid (D). The intron sequences are in italic.

5 Figure 2. Complete sequence of the Hu266 N56S heavy chain gene. Complete sequence of the Hu266 N56S heavy chain gene located between the MluI and BamHI sites in pVg1-Hu266 N56S. The nucleotide number indicates its position in pVg1-Hu266 N56S. The VH and CH exons are translated in single letter code; the dot indicates the 10 translation termination codon. The mature heavy chain starts at the bold and underlined glutamic acid (E). The adenine at nucleotide position 853 of pVg1-Hu266 has been substituted with a guanine (bold and double-underlined), resulting in an amino acid change to a serine residue (bold and double-underlined). The intron sequences are in italics. The polyA signal is underlined.

15 Figure 3. Complete sequence of the Hu266 N56T heavy chain gene. Complete sequence of the Hu266 N56T heavy chain gene located between the MluI and BamHI sites in pVg1-Hu266 N56T. The nucleotide number indicates its position in pVg1-Hu266 N56T. The VH and CH exons are translated in single letter code; the dot indicates the 20 translation termination codon. The mature heavy chain starts at the bold and underlined glutamic acid (E). The adenine at nucleotide position 853 of pVg1-Hu266 has been substituted with a cytosine (bold and double-underlined), resulting in an amino acid change to a threonine residue (bold and double-underlined). The intron sequences are in italics. The polyA signal is underlined.

25 Figure 4. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the heavy chain variable region of Hu266 N56S in the mini exon. The adenine at nucleotide position 235 has been substituted with a guanine (bold and double-underlined), resulting in an amino acid change to a serine residue (bold and double-underlined). The signal peptide sequence is in italics. The CDRs based on the definition of Kabat (Johnson, J., et al., *Nucleic Acids Res.* (2000) 28:214-218) are underlined. The mature heavy chain begins with a glutamic acid residue (bold and underlined). The sequence shown is flanked by unique MluI (ACGCGT) and XbaI (TCTAGA) sites.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

7

Figure 5. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the heavy chain variable region of Hu266 N56T in the mini exon. The adenine at nucleotide position 235 has been substituted with a cytosine (bold and double-underlined), resulting in an amino acid change to a threonine residue (bold and double-underlined). The signal peptide sequence is in italics. The CDRs based on the definition of Kabat (Johnson, J., et al., *Nucleic Acids Res.* (2000) 28:214-218) are underlined. The mature heavy chain begins with a glutamic acid residue (bold and underlined). The sequence shown is flanked by unique MluI (ACGCGT) and XbaI (TCTAGA) sites.

Figure 6. Hu266 N56S heavy chain cDNA and translated amino acid sequence.
The amino acids are shown in single letter code; the dot indicates the translation termination codon. The first amino acid of the mature heavy chain is underlined and bold, preceded by its signal peptide sequence. The substituted amino acid, serine, is bold.

Figure 7. Hu266 N56T heavy chain cDNA and translated amino acid sequence.
The amino acids are shown in single letter code; the dot indicates the translation termination codon. The first amino acid of the mature heavy chain is underlined and bold, preceded by its signal peptide sequence. The substituted amino acid, threonine, is bold.

Figure 8. Plasmid pV_k-Hu266
Figure 9. Plasmid construct for expression of Hu266 N56S and N56T. The Hu266 variant VH genes were constructed as mini-exons flanked by MluI and XbaI sites. The V regions were incorporated into the corresponding expression vectors to make pVg1-Hu266 N56S or N56T.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

We have surprisingly found that humanized antibodies, wherein the CDRs originate from mouse monoclonal antibody 266 and the framework and other portions of the antibodies originate from a human germ line, and wherein an N-glycosylation site within the CDR2 of the heavy chain is removed, bind A β 1-40 and A β 1-42 with surprisingly higher affinity than glycosylated mouse or humanized 266 antibodies. Thus, we have a reasonable basis for believing that humanized antibodies of this specificity, modified to reduce their immunogenicity by converting them to a humanized form, offer the opportunity to treat, both prophylactically and therapeutically, conditions in humans

WO 03/016466

PCT/US02/21322

that are associated with A β , including, pre-clinical and clinical Alzheimer's, Down's syndrome, and pre-clinical and clinical cerebral amyloid angiopathy.

As used herein, the word "treat" includes therapeutic treatment, where a condition to be treated is already known to be present and prophylaxis - i.e., prevention of, or amelioration of, the possible future onset of a condition.

By "antibody" is meant a monoclonal antibody per se, or an immunologically effective fragment thereof, such as an Fab, Fab', or F(ab')2 fragment thereof. In some contexts, herein, fragments will be mentioned specifically for emphasis; nevertheless, it will be understood that regardless of whether fragments are specified, the term "antibody" includes such fragments as well as single-chain forms. As long as the protein retains the ability specifically to bind its intended target, it is included within the term "antibody." Also included within the definition "antibody" are single chain forms. Preferably, but not necessarily, the antibodies useful in the invention are produced recombinantly. Antibodies may or may not be glycosylated, though glycosylated antibodies are preferred, except at the N-glycosylation site on CDR2. Antibodies are properly cross-linked via disulfide bonds, as is well known.

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

Light chains are classified as kappa and lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, and define the antibody's isotype as IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively. Within each isotype, there may be subtypes, such as IgG1, IgG4, etc. Within light and heavy chains, the variable and constant regions are joined by a "J" region of about 12 or more amino acids, with the heavy chain also including a "D" region of about 3 or more amino acids. The particular identity of constant region, the isotype, or subtype does not impact the present invention.

The variable regions of each light/heavy chain pair form the antibody binding site. Thus, an intact antibody has two binding sites. The chains all exhibit the same general structure of relatively conserved framework regions (FR) joined by three hypervariable

WO 03/016466

PCT/US02/21322

9

regions, also called complementarity determining regions or CDRs. The CDRs from the two chains of each pair are aligned by the framework regions, enabling binding to a specific epitope. From N-terminal to C-terminal, both light and heavy chains comprise the domains FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 and FR4. The assignment of amino acids to each domain is in accordance with well known conventions [Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991; Chothia, et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia, et al., Nature 342:878-883 (1989)].

By "humanized antibody" is meant an antibody that is composed partially or fully of amino acid sequences derived from a human antibody germline by altering the sequence of an antibody having non-human complementarity determining regions (CDR). A humanized immunoglobulin does not encompass a chimeric antibody, having a mouse variable region and a human constant region. However, the variable region of the antibody and even the CDR are humanized by techniques that are by now well known in the art. The framework regions of the variable regions are substituted by the corresponding human framework regions leaving the non-human CDR substantially intact. As mentioned above, it is sufficient for use in the methods of the invention, to employ an immunologically specific fragment of the antibody, including fragments representing single chain forms.

Humanized antibodies have at least three potential advantages over non-human and chimeric antibodies for use in human therapy:

- 1) because the effector portion is human, it may interact better with the other parts of the human immune system (e.g., destroy the target cells more efficiently by complement-dependent cytotoxicity (CDC) or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)).
- 2) The human immune system should not recognize the framework or C region of the humanized antibody as foreign, and therefore the antibody response against such an injected antibody should be less than against a totally foreign non-human antibody or a partially foreign chimeric antibody.
- 3) Injected non-human antibodies have been reported to have a half-life in the human circulation much shorter than the half-life of human antibodies. Injected

WO 03/016466

PCT/US02/21322

10

humanized antibodies will have a half-life essentially identical to naturally occurring human antibodies, allowing smaller and less frequent doses to be given.

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

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

The CDRs of deglycosylated humanized 266 have the following amino acid sequences:

25 light chain CDR1:

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

30 light chain CDR2:

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

11

light chain CDR3:

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

5

heavy chain CDR1:

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

10 heavy chain CDR2:

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

wherein:

15 Xaa at position 7 is any amino acid, provided that if Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 7 is not Asn;
Xaa at position 8 is any amino acid, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 8 is Asp or Pro; and

20 Xaa at position 9 is any amino acid, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 9 is neither Ser nor Thr;
and, heavy chain CDR3:

1 5
Gly Asp Tyr (SEQ ID NO:6).

25 By "any amino acid" is meant any naturally-occurring amino acid. Preferred naturally-occurring amino acids are Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr.

A preferred group of antibodies are those having as light chain CDR1-CDR3 the sequences SEQ ID NO:1-3, respectively, as heavy chain CDR1 and CDR3 the sequences SEQ ID NO:4 and 6, respectively, and wherein the sequence of heavy chain CDR2 is SEQ ID NO:5, wherein:

30 Xaa at position 7 of SEQ ID NO:5 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr,

WO 03/016466

PCT/US02/21322

12

- Val, Trp, and Tyr, provided that if Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 7 is not Asn;
- 5 Xaa at position 8 of SEQ ID NO:5 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 8 is Asp or Pro; and
- 10 Xaa at position 9 of SEQ ID NO:5 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 9 is neither Ser nor Thr.
- Another description of the preferred group is: antibodies or fragments thereof having as light chain CDR1-CDR3 the sequences SEQ ID NO:1-3, respectively, as heavy chain CDR1 and CDR3 the sequences SEQ ID NO:4 and 6, respectively, and wherein the sequence of heavy chain CDR2 is selected from the group consisting of:
- 15 1) SEQ ID NO:13
- | | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly | | | |
- (SEQ ID NO:13)
- wherein:
- 20 Xaa at position 7 of SEQ ID NO:13 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr;
- 25 Xaa at position 8 of SEQ ID NO:13 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr; and
- Xaa at position 9 of SEQ ID NO:13 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr;
- 30 2) SEQ ID NO:14
- | | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly | | | |

WO 03/016466

PCT/US02/21322

13

(SEQ ID NO:14)

wherein:

Xaa at position 7 of SEQ ID NO:14 is Asn;

Xaa at position 8 of SEQ ID NO:14 is selected from the group consisting of Ala,

5 Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr,
Val, Trp, and Tyr; and

Xaa at position 9 of SEQ ID NO:14 is selected from the group consisting of Ala,

Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Val, Trp,
and Tyr;

10 and

3) SEQ ID NO:15

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

(SEQ ID NO:15)

15 wherein:

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

Xaa at position 8 of SEQ ID NO:15 is selected from the group consisting of Asp
and Pro; and20 Xaa at position 9 of SEQ ID NO:15 is selected from the group consisting of Ser
and Thr.

Preferred sequences for CDR2 of the heavy chain include those in which only a single amino acid is changed, those in which only two amino acids are changed, or all three are changed. It is preferred to replace Asn at position 7, or to replace Thr at position 9, or to replace both. Conservative substitutions at one, two, or all three positions are preferred. The most preferred species are those in which Asn at position 7 is replaced with Ser or Thr. It is preferred to not replace Ser at position 8, and if Ser at position 8 is replaced, then to replace it conservatively, for example, with Ala or Thr. Preferred deglycosylated 266 antibodies of the present invention are those in which in CDR2 of the heavy chain (i.e., within SEQ ID NO:5, as described above):

WO 03/016466

PCT/US02/21322

14

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

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

Xaa at position 9 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr, provided that if Xaa at position 7 is Asn, then Xaa at position 9 is neither Ser nor Thr.

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

15 1) SEQ ID NO:16

1 Gln Ile Asn Ser Val Gly Xaa Xaa Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly
(SEQ ID NO:16)

wherein:

20 Xaa at position 7 of SEQ ID NO:16 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Gln, Ser, and Thr;

Xaa at position 8 of SEQ ID NO:16 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr; and

Xaa at position 9 of SEQ ID NO:16 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr; and

25 2) SEQ ID NO:17

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

wherein:

30 Xaa at position 7 of SEQ ID NO:17 is Asn;

WO 03/016466

PCT/US02/21322

15

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

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

5 Another group of preferred deglycosylated 266 antibodies are those in which in CDR2 of the heavy chain (i.e., within SEQ ID NO:5, as described above):

Xaa at position 7 is selected from the group consisting of Ala, Gly, Leu, Met, Gln, Ser, Thr, and Val;

Xaa at position 8 is Ser; and

10 Xaa at position 9 is Thr.

Another group of preferred deglycosylated 266 antibodies are those in which in CDR2 of the heavy chain (i.e., within SEQ ID NO:5, as described above):

Xaa at position 7 is Asn;

Xaa at position 8 is Ser; and

15 Xaa at position 9 is selected from the group consisting of Ala, Gly, Asn, Gln, and Val.

Another group of preferred deglycosylated 266 antibodies are those in which in CDR2 of the heavy chain (i.e., within SEQ ID NO:5, as described above):

20 Xaa at position 7 is selected from the group consisting of Ala, Gly, Leu, Met, Gln, Ser, Thr, and Val;

Xaa at position 8 is Ser; and

Xaa at position 9 is selected from the group consisting of Ala, Gly, Asn, Gln, and Val.

25 Another group of preferred deglycosylated 266 antibodies are those in which in CDR2 of the heavy chain (i.e., within SEQ ID NO:5, as described above):

Xaa at position 7 is selected from the group consisting of Ser and Thr;

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

16

Xaa at position 9 is selected from the group consisting of Ala, Gly, Asn, Gln, Thr, and Val.

Another group of preferred deglycosylated 266 antibodies are those in which in CDR2 of the heavy chain (i.e., within SEQ ID NO:5, as described above):

- 5 Xaa at position 7 is selected from the group consisting of Ser and Thr;
Xaa at position 8 is selected from the group consisting of Ser, Ala, and Thr; and
Xaa at position 9 is Thr.

A preferred light chain variable region of a humanized antibody of the present invention has the following amino acid sequence, in which the framework originated 10 from human germline Vk segment DPK18 and J segment Jk1, with several amino acid substitutions to the consensus amino acids in the same human V subgroup to reduce potential immunogenicity:

1	5	10	15
Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Ieu Pro Val Xaa Xaa			
15			
20	25	30	
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa			
20			
35	40	45	
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro			
25			
50	55	60	
Gly Gln Ser Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe			
30			
65	70	75	
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
35			
80	85	90	
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val			
40			
95	100	105	
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa			
45			
Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys Arg			
(SEQ ID NO:7)			

WO 03/016466

PCT/US02/21322

wherein:

Xaa at position 2 is Val or Ile;
Xaa at position 7 is Ser or Thr;
5 Xaa at position 14 is Thr or Ser;
Xaa at position 15 is Leu or Pro;
Xaa at position 30 is Ile or Val;
Xaa at position 50 is Arg, Gln, or Lys;
Xaa at position 88 is Val or Leu;
10 Xaa at position 105 is Gln or Gly;
Xaa at position 108 is Lys or Arg; and
Xaa at position 109 is Val or Leu.

15 A preferred heavy chain variable region of a humanized antibody of the present invention has the following amino acid sequence, in which the framework originated from human germline VH segment DP53 and J segment JH4, with several amino acid substitutions to the consensus amino acids in the same human subgroup to reduce potential immunogenicity:

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

18

95 100 105

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

110

5 Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser

(SEQ ID NO:8)

wherein:

Xaa at position 1 is Glu or Gln;
Xaa at position 7 is Ser or Leu;
10 Xaa at position 46 is Glu, Val, Asp, or Ser;
Xaa at position 56 is any amino acid, provided that if Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 59 is Ser or Thr, then Xaa at position 56 is not Asn;
Xaa at position 57 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 58 is Ser or Thr, then Xaa at position 57 is Asp or Pro; and
15 Xaa at position 58 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 58 is neither Ser nor Thr
Xaa at position 63 is Thr or Ser;
20 Xaa at position 75 is Ala, Ser, Val, or Thr;
Xaa at position 76 is Lys or Arg;
Xaa at position 89 is Glu or Asp; and
Xaa at position 107 is Leu or Thr.

25 A particularly preferred light chain variable region of a humanized antibody of the present invention has the following amino acid sequence, in which the framework originated from human germline V_k segment DPK18 and J segment Jk1, with several amino acid substitutions to the consensus amino acids in the same human V subgroup to reduce potential immunogenicity:

1 5 10 15
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu
20 25 30
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile

WO 03/016466

PCT/US02/21322

19

35	40	45
Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro		
50	55	60
Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe		
5		
65	70	75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp		
80	85	90
10 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val		
95	100	105
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln		
110		
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		(SEQ ID NO:9).

A particularly preferred heavy chain variable region of a humanized antibody of
the present invention has the following amino acid sequence, in which the framework
20 originated from human germline VH segment DP53 and J segment JH4:

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

20

95	100	105
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		

110

5	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	(SEQ ID NO:10)
---	-----------------------------	----------------

wherein:

- Xaa at position 56 is any amino acid, provided that if Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 59 is Ser or Thr, then Xaa at position 56 is not Asn;
- Xaa at position 57 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 58 is Ser or Thr, then Xaa at position 57 is Asp or Pro; and
- Xaa at position 58 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 58 is neither Ser nor Thr.

15 A preferred light chain for a humanized antibody of the present invention has the amino acid sequence:

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

21

110 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val	115 120	
125 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala	130 135	
140 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys	145 150	
155 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	160 165	
170 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu	175 180	
185 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys	190 195	
200 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val	205 210	

215
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEQ ID NO:11).
 A preferred heavy chain for a humanized antibody of the present invention has the
 amino acid sequence:

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

22

65 80 95 110 125 140 155 170 185 200 215 230 245	70 85 100 115 130 145 160 175 190 205 220 235 250	75 90 105 120 135 150 165 180 195 210 225 240 255	
Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			

WO 03/016466

PCT/US02/21322

23

260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

275 280 285

5 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

10 305 310 315

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

320 325 330

15 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

335 340 345

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

20 350 355 360

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

365 370 375

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

25 380 385 390

Trp Glu Ser Asn Gln Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

395 400 405

30 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

410 415 420

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

425 430 435

35 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

440
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO:12)

wherein:

WO 03/016466

PCT/US02/21322

24

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

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

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

Preferred deglycosylated 266 antibodies having the heavy variable region
10 according to SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:12 are those wherein:

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

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

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

Preferred sequences for CDR2 (positions 56, 57, and 58) of the heavy chain SEQ
20 ID NO:8, SEQ ID NO:10, and SEQ ID NO:12 include those in which only a single amino acid is changed, those in which only two amino acids are changed, or all three are changed. It is preferred to replace Asn at position 56. It is preferred to replace Thr at position 58 with an amino acid other than Ser. It is preferred to destroy the N-glycosylation site in the CDR2 of the 266 heavy chain by means other than replacing Ser
25 at position 57 with Pro or Asp. Conservative substitutions at one, two, or all three positions are preferred. The most preferred species are those in which Asn at position 56 is replaced with Ser or Thr. Particularly preferred antibodies are those in which Ser or Thr is at position 56, Ser is at position 57, and Thr is at position 58 of SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, or SEQ ID NO:12.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

25

The most preferred species are antibodies comprising a light chain of SEQ ID NO:11 and a heavy chain of SEQ ID NO:12, wherein in SEQ ID NO:12, Xaa at position 56 is Ser, Xaa at position 57 is Ser, and Xaa at position 58 is Thr ("N56S"), or wherein in SEQ ID NO:12, Xaa at position 56 is Thr, Xaa at position 57 is Ser, and Xaa at position 58 is Thr ("N56T").

Other sequences are possible for the light and heavy chains for the humanized antibodies of the present invention and for humanized 266. The immunoglobulins can have two pairs of light chain/heavy chain complexes, at least one chain comprising one or more mouse complementarity determining regions functionally joined to human framework region segments.

In another aspect, the present invention is directed to recombinant polynucleotides encoding antibodies which, when expressed, comprise the heavy and light chain CDRs from an antibody of the present invention. Exemplary polynucleotides, which on expression code for the polypeptide chains comprising the heavy and light chain CDRs of the present invention are given in Figures 1 - 7. Reversal of the noted heavy chain changes (Figures 2 - 6) that produce humanized antibody 266 variants N56S and N56T provides humanized antibody 266 with the CDR2 N-glycosylation site intact. Due to codon degeneracy, other polynucleotide sequences can be readily substituted for those sequences. Particularly preferred polynucleotides of the present invention encode antibodies, which when expressed, comprise the CDRs of SEQ ID NO:1-4 and 6, and SEQ ID NO:5, 13, 14, 15, 16 or 17, or any of the variable regions of SEQ ID NO:7 - SEQ ID NO:10, or the light and heavy chains of SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:12.

The polynucleotides will typically further include an expression control polynucleotide sequence operably linked to the humanized immunoglobulin coding sequences, including naturally-associated or heterologous promoter regions. Preferably, the expression control sequences will be eukaryotic promoter systems in vectors capable of transforming or transfecting eukaryotic host cells, but control sequences for prokaryotic hosts may also be used. Once the vector has been incorporated into the appropriate host cell line, the host cell is propagated under conditions suitable for expressing the nucleotide sequences, and, as desired, the collection and purification of the light chains, heavy chains, light/heavy chain dimers or intact antibodies, binding fragments or other immunoglobulin forms may follow.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

26

The nucleic acid sequences of the present invention capable of ultimately expressing the desired humanized antibodies can be formed from a variety of different polynucleotides (genomic or cDNA, RNA, synthetic oligonucleotides, etc.) and components (e.g., V, J, D, and C regions), using any of a variety of well known techniques. Joining appropriate genomic and synthetic sequences is a common method of production, but cDNA sequences may also be utilized.

Human constant region DNA sequences can be isolated in accordance with well known procedures from a variety of human cells, but preferably from immortalized B-cells. Suitable source cells for the polynucleotide sequences and host cells for immunoglobulin expression and secretion can be obtained from a number of sources well-known in the art.

In addition to the humanized immunoglobulins specifically described herein, other "substantially homologous" modified immunoglobulins can be readily designed and manufactured utilizing various recombinant DNA techniques well known to those skilled in the art. For example, the framework regions can vary from the native sequences at the primary structure level by several amino acid substitutions, terminal and intermediate additions and deletions, and the like. Moreover, a variety of different human framework regions may be used singly or in combination as a basis for the humanized immunoglobulins of the present invention. In general, modifications of the genes may be readily accomplished by a variety of well-known techniques, such as site-directed mutagenesis.

Alternatively, polypeptide fragments comprising only a portion of the primary antibody structure may be produced, which fragments possess one or more immunoglobulin activities (e.g., complement fixation activity). These polypeptide fragments may be produced by proteolytic cleavage of intact antibodies by methods well known in the art, or by inserting stop codons at the desired locations in vectors using site-directed mutagenesis, such as after CH1 to produce Fab fragments or after the hinge region to produce F(ab')2 fragments. Single chain antibodies may be produced by joining VL and VH with a DNA linker.

As stated previously, the polynucleotides will be expressed in hosts after the sequences have been operably linked to (i.e., positioned to ensure the functioning of) an expression control sequence. These expression vectors are typically replicable in the host

organisms either as episomes or as an integral part of the host chromosomal DNA. Commonly, expression vectors will contain selection markers, e.g., tetracycline or neomycin, to permit detection of those cells transformed with the desired DNA sequences. Expression vectors for these cells can include expression control sequences, such as an origin of replication, a promoter, an enhancer, and necessary processing information sites, such as ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, and transcriptional terminator sequences. Preferred expression control sequences are promoters derived from immunoglobulin genes, SV40, Adenovirus, Bovine Papilloma Virus, cytomegalovirus and the like.

10 The vectors containing the polynucleotide sequences of interest (e.g., the heavy and light chain encoding sequences and expression control sequences) can be transferred into the host cell by well-known methods, which vary depending on the type of cellular host. A variety of hosts may be employed to express the antibodies of the present invention using techniques well known in the art. Mammalian tissue cell culture is preferred, especially using, for example, CHO, COS, Syrian Hamster Ovary, HeLa, myeloma, transformed B-cells, human embryonic kidney, or hybridoma cell lines.

15 Once expressed, the antibodies can be purified according to standard procedures. Substantially pure immunoglobulins of at least about 90 to 95% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity most preferred, for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the polypeptides may then be used 20 therapeutically or prophylactically, as directed herein.

25 The antibodies (including immunologically reactive fragments) are administered to a subject at risk for or exhibiting A β -related symptoms or pathology such as clinical or pre-clinical Alzheimer's disease, Down's syndrome, or clinical or pre-clinical amyloid angiopathy, using standard administration techniques, preferably peripherally (i.e. not by administration into the central nervous system) by intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, pulmonary, transdermal, intramuscular, intranasal, buccal, sublingual, or suppository administration. Although the antibodies may be administered directly into the ventricular system, spinal fluid, or brain parenchyma, and techniques for addressing 30 these locations are well known in the art, it is not necessary to utilize these more difficult procedures. The antibodies of the invention are effective when administered by the more simple techniques that rely on the peripheral circulation system. The advantages of the

WO 03/016466

PCT/US02/21322

28

present invention include the ability of the antibody to exert its beneficial effects even though not provided directly to the central nervous system itself. In addition, humanized antibodies used in the invention, when administered peripherally, do not need to elicit a cellular immune response in brain when bound to A_β peptide or when freely circulating to have their beneficial effects. Further, when administered peripherally they do not need to appreciably bind aggregated A_β peptide in the brain to have their beneficial effects. Indeed, it has been demonstrated that the amount of antibody that crosses the blood-brain barrier is <0.1% of plasma levels.

The pharmaceutical compositions for administration are designed to be appropriate for the selected mode of administration, and pharmaceutically acceptable excipients such as, buffers, surfactants, preservatives, solubilizing agents, isotonicity agents, stabilizing agents and the like are used as appropriate. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA, latest edition, incorporated herein by reference, provides a compendium of formulation techniques as are generally known to practitioners.

The concentration of the humanized antibody in formulations from as low as about 0.1% to as much as 15 or 20% by weight and will be selected primarily based on fluid volumes, viscosities, and so forth, in accordance with the particular mode of administration selected. Thus, a pharmaceutical composition for injection could be made up to contain in 1 mL of phosphate buffered saline from 1 to 100 mg of the humanized antibody of the present invention. The formulation could be sterile filtered after making the formulation, or otherwise made microbiologically acceptable. A typical composition for intravenous infusion could have a volume as much as 250 mL of fluid, such as sterile Ringer's solution, and 1-100 mg per mL, or more in antibody concentration. Therapeutic agents of the invention can be frozen or lyophilized for storage and reconstituted in a suitable sterile carrier prior to use. Lyophilization and reconstitution can lead to varying degrees of antibody activity loss (e.g. with conventional immune globulins, IgM antibodies tend to have greater activity loss than IgG antibodies). Dosages may have to be adjusted to compensate. The pH of the formulation will be selected to balance antibody stability (chemical and physical) and comfort to the patient when administered. Generally, pH between 4 and 8 is tolerated.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

29

Although the foregoing methods appear the most convenient and most appropriate for administration of proteins such as humanized antibodies, by suitable adaptation, other techniques for administration, such as transdermal administration and oral administration may be employed provided proper formulation is designed. In addition, it may be
5 desirable to employ controlled release formulations using biodegradable films and matrices, or osmotic mini-pumps, or delivery systems based on dextran beads, alginate, or collagen. In summary, formulations are available for administering the antibodies of the invention and are well-known in the art and may be chosen from a variety of options.
10 Typical dosage levels can be optimized using standard clinical techniques and will be dependent on the mode of administration and the condition of the patient.

The following examples are intended to illustrate but not to limit the invention. The examples hereinbelow employ, among others, a murine monoclonal antibody designated "266" which was originally prepared by immunization with a peptide composed of residues 13-28 of human A β peptide. The antibody was confirmed to
15 immunoreact with this peptide. The preparation of this antibody is described in U.S. patent 5,766,846, incorporated herein by reference. As the examples here describe experiments conducted in murine systems, the use of murine monoclonal antibodies is satisfactory. However, in the treatment methods of the invention intended for human use, humanized forms of the antibodies of the present invention, or fragments thereof, are
20 preferred.

Example 1

Effect of administration of antibody 266 on cognition in 24-month old transgenic, hemizygous PDAPP mice

Sixteen hemizygous transgenic mice (APP^{V717F}) were used. The mice were approximately 24 months old at the start of the study. All injections were intraperitoneal (i.p.). Half the mice received weekly injections of phosphate buffered saline (PBS, "Control") and the other half received 355 micrograms of mouse antibody 266 dissolved in PBS. Injections were made over a period of seven weeks (42 days) for a total of six
30 injections. Three days following the last injection, the behavior of the animals was assessed using an object recognition task, essentially as described in J.-C. Dodart, *et al.*,

WO 03/016466

PCT/US02/21322

30

Behavioral Neuroscience, 113 (5) 982-990 (1999). A recognition index ($T_B \times 100)/(T_B - T_A)$) was calculated. Results are shown below in Table 1.

Table 1. Descriptive statistics for recognition index

	N	Recognition Index (minutes)		
		Mean	Standard Deviation	Standard Error
Control (PBS)	8	71.2**	8.80	3.11
Antibody 266	8	54.35	7.43	2.62

** p=0.0010

Administration of 355 micrograms of antibody 266 weekly to 24 month old, hemizygous, transgenic mice was associated with a significant change in behavior. Antibody treated transgenic mice had recognition indices which were similar to wildtype control animals [J.-C. Dodart, *et al*]. The difference in the recognition index was statistically significant at the 0.001 probability level. The increased recognition index is an indication that treatment with an antibody of the present invention will reverse the behavioral impairments that had been documented in this mouse model of Alzheimer's Disease. Therefore, the administration of the antibodies of the present invention, that bind A β more avidly than mouse 266, will treat diseases such as Alzheimer's disease and Down's syndrome and will halt the cognitive decline typically associated with disease progression.

The amyloid burden (% area covered by immunoreactive material after staining with anti-A β antibodies 3D6 or 21F12) was quantified in the cortex immediately overlying the hippocampus including areas of the cingulate and parietal cortex from the brains of the 24 month-old animals treated with mouse antibody 266 for seven weeks, as described above. The results are presented in the table below. The differences between the treatment groups are not statistically significant.

Table 2. Amyloid plaque burden in APP $V717F^{+/-}$ mice following treatment with
mouse 266 anti-A β antibody

Plaque Burden (%)

31

	N	Using 3D6		Using 21F12	
		Mean	Standard Error	Mean	Standard Error
Control (PBS)	7	44.3	5.93	0.77	0.14
Antibody 266	8	38.0	2.96	0.93	0.11

For these very old animals, treatment with mouse antibody 266 did not result in a significantly different amyloid burden compared with the PBS-treated group, measured using either 3D6 or using 21F12. Furthermore, the A β burden was substantially greater and significantly increased compared with the amyloid burden in younger animals (see below) who were not able to discriminate a novel object from a familiar one in the object recognition task. Most surprisingly, these results indicate that anti-A β antibodies of the present invention will most likely also be able to reverse cognitive deficits without the need to reduce amyloid burden *per se*.

10 **Example 2**

Effect of administration of antibody 266 on cognition in young transgenic, hemizygous PDAPP mice

Fifty-four (54) homozygous, transgenic mice (APP^{V717F}) were used. Twenty-three (23) mice were approximately two months old at the start of the study. The remaining mice were approximately four months old at the start of the study. The duration of treatment was five months. Thus, at study termination, the mice were either approximately seven (7) months old or approximately nine (9) months old.

All injections were intraperitoneal (i.p.). Each mouse in "PBS" control groups received a weekly injection of phosphate buffered saline (PBS; 200 μ L). Each mouse in the "IgG" control groups received a weekly injection of IgG1k isotype control (100 μ g/mouse/week). Each mouse in the "High Dose" groups received a weekly injection of 355 microgram of antibody 266 dissolved in PBS ("HD"). Each mouse in the "Low Dose" group received a weekly injection of 71 microgram of antibody 266 dissolved in PBS ("LD"). Three days following the last injection, the behavior of the animals was assessed using an object recognition task, as described in Example 1 above, and a discrimination index was calculated as the difference between the time spent on a

novel object and the time spent on a familiar object. Results are shown below in Table 3. The data are grouped by the age of the mice at the end of the study.

Table 3. Descriptive statistics for discrimination index

		Discrimination Index (minutes)		
		Mean	Standard Deviation	Standard Error
7 months old				
	PBS	2.12	4.22	1.59
	IgG	0.81	3.64	1.29
	HD	10.04*	6.52	2.30
9 months old				
	PBS	1.87	3.54	1.34
	IgG	0.96	3.51	1.24
	LD	10.75*	6.44	2.28
	HD	12.06***	7.82	2.76

*p<0.05

***p<0.0001

Taken together these data support the conclusion that administration of antibody 266 attenuates plaque deposition in 7-9 month old APP^{V717F} transgenic mice, as well as reverses the behavioral impairments previously characterized. Treatment of patients with an antibody of the present invention will inhibit or prevent cognitive decline typically associated with disease progression, and will reverse it.

10

15

20

Example 3**Synthesis of Humanized Antibody 266**

Cells and antibodies. Mouse myeloma cell line Sp2/0 was obtained from ATCC (Manassas, VA) and maintained in DME medium containing 10% FBS (Cat # SH30071.03, HyClone, Logan, UT) in a 37°C CO₂ incubator. Mouse 266 hybridoma cells were first grown in RPMI-1640 medium containing 10% FBS (HyClone), 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 25 µg/ml gentamicin, and then expanded in serum-free media (Hybridoma SFM, Cat # 12045-076, Life Technologies, Rockville, MD) containing 2% low Ig FBS (Cat #

WO 03/016466

PCT/US02/21322

33

30151.03, HyClone) to a 2.5 liter volume in roller bottles. Mouse monoclonal antibody 266 (Mu266) was purified from the culture supernatant by affinity chromatography using a protein-G Sepharose column. Biotinylated Mu266 was prepared using EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Cat # 21338ZZ, Pierce, Rockford, IL).

5 Cloning of variable region cDNAs. Total RNA was extracted from approximately 10^7 hybridoma cells using TRIzol reagent (Life Technologies) and poly(A)⁺ RNA was isolated with the PolyATract mRNA Isolation System (Promega, Madison, WI) according to the suppliers' protocols. Double-stranded cDNA was synthesized using the SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Palo Alto, CA) following the supplier's protocol. The variable region cDNAs for the light and heavy chains were 10 amplified by polymerase chain reaction (PCR) using 3' primers that anneal respectively to the mouse kappa and gamma chain constant regions, and a 5' universal primer provided in the SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit. For VL PCR, the 3' primer has the sequence:

15 5' -TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGAAAGATGGATACAGTTGGTGC- 3'

[SEQ ID NO:13]

with residues 17- 46 hybridizing to the mouse Ck region. For VH PCR, the 3' primers have the degenerate sequences:

20 A G T
5' -TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGCTGTCGTTTGCG-
3'
T

[SEQ ID NO:14]

25 with residues 17 - 50 hybridizing to mouse gamma chain CH1. The VL and VH cDNAs were subcloned into pCR4Blunt-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) for sequence determination. DNA sequencing was carried out by PCR cycle sequencing reactions with fluorescent dideoxy chain terminators (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instruction. The sequencing reactions were analyzed on a Model 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

30 Construction of humanized 266 (Hu266) variable regions. The light and heavy chain variable region genes were constructed and amplified using eight overlapping synthetic oligonucleotides ranging in length from approximately 65 to 80 bases [He, X,

WO 03/016466

PCT/US02/21322

34

Y., et al., J. Immunol. 160: 029-1035 (1998)]. The oligonucleotides were annealed pairwise and extended with the Klenow fragment of DNA polymerase I, yielding four double-stranded fragments. The resulting fragments were denatured, annealed pairwise, and extended with Klenow, yielding two fragments. These fragments were denatured, annealed pairwise, and extended once again, yielding a full-length gene. The resulting product was amplified by PCR using the Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). The PCR-amplified fragments were gel-purified and cloned into pCR4Blunt-TOPO vector. After sequence confirmation, the VL and VH genes were digested with MluI and XbaI, gel-purified, and subcloned respectively into vectors for expression of light and heavy chains to make pV_k-Hu266 (Figure 8) and pVg1-Hu266 [Co, M. S., et al., J. Immunol. 148:1149-1154 (1992)]. The mature humanized 266 antibody expressed from these plasmids has the light chain of SEQ ID NO:11 and the heavy chain of SEQ ID NO:12.

10 Stable transfection. Stable transfection into mouse myeloma cell line Sp2/0 was accomplished by electroporation using a Gene Pulser apparatus (BioRad, Hercules, CA) at 360 V and 25 µF as described (Co et al., 1992). Before transfection, pV_k-Hu266 and pVg1-Hu266 plasmid DNAs were linearized using FspI. Approximately 10⁷ Sp2/0 cells were transfected with 20 µg of pV_k-Hu266 and 40 µg of pVg1-Hu266. The transfected cells were suspended in DME medium containing 10% FBS and plated into several 96-well plates. After 48 hr, selection media (DME medium containing 10% FBS, HT media supplement, 0.3 mg/ml xanthine and 1 µg/ml mycophenolic acid) was applied. 15 Approximately 10 days after the initiation of the selection, culture supernatants were assayed for antibody production by ELISA as shown below. High yielding clones were expanded in DME medium containing 10% FBS and further analyzed for antibody expression. Selected clones were then adapted to growth in Hybridoma SFM.

20 Measurement of antibody expression by ELISA. Wells of a 96-well ELISA plate (Nunc-Immuno plate, Cat # 439454, NalgeNunc, Naperville, IL) were coated with 100 µl of 1 µg/ml goat anti-human IgG, Fc_γ fragment specific, polyclonal antibodies (Cat # 109-005-098, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) in 0.2 M sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.4) overnight at 4°C. After washing with Washing Buffer (PBS containing 0.1% Tween 20), wells were blocked with 400 µl of Superblock Blocking Buffer (Cat # 37535, Pierce) for 30 min and then washed with Washing Buffer. Samples 25

WO 03/016466

PCT/US02/21322

35

containing Hu266 were appropriately diluted in ELISA Buffer (PBS containing 1% BSA and 0.1% Tween 20) and applied to ELISA plates (100 µl per well). As a standard, humanized anti-CD33 IgG1 monoclonal antibody HuM195 (Co, et al., 1992, above) was used. The ELISA plate was incubated for 2 hr at room temperature and the wells were washed with Wash Buffer. Then, 100 µl of 1/1,000-diluted HRP-conjugated goat anti-human kappa polyclonal antibodies (Cat # 1050-05, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) in ELISA Buffer was applied to each well. After incubating for 1 hr at room temperature and washing with Wash Buffer, 100 µl of ABTS substrate (Cat # 507602 and 506502, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) was added to each well. Color development was stopped by adding 100 µl of 2% oxalic acid per well. Absorbance was read at 415 nm using an OPTImax microplate reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Purification of Hu266. One of the high Hu266-expressing Sp2/0 stable transfectants (clone 1D9) was adapted to growth in Hybridoma SFM and expanded to 2 liter in roller bottles. Spent culture supernatant was harvested when cell viability reached 10% or below and loaded onto a protein-A Sepharose column. The column was washed with PBS before the antibody was eluted with 0.1 M glycine-HCl (pH 2.5), 0.1 M NaCl. The eluted protein was dialyzed against 3 changes of 2 liter PBS and filtered through a 0.2 µm filter prior to storage at 4°C. Antibody concentration was determined by measuring absorbance at 280 nm (1 mg/ml = 1.4 A₂₈₀). SDS-PAGE in Tris-glycine buffer was performed according to standard procedures on a 4-20% gradient gel (Cat # EC6025, Novex, San Diego, CA). Purified humanized 266 antibody is reduced and run on an SDS- PAGE gel. The whole antibody shows two bands of approximate molecular weights 25 kDa and 50 kDa. These results are consistent with the molecular weights of the light chain and heavy chain or heavy chain fragment calculated from their amino acid compositions.

Example 4

In vitro binding properties of humanized 266 antibody

The binding efficacy of humanized 266 antibody, synthesized and purified as described above, was compared with the mouse 266 antibody using biotinylated mouse 266 antibody in a comparative ELISA. Wells of a 96-well ELISA plate (Nunc-Immuno

WO 03/016466

PCT/US02/21322

plate, Cat # 439454, NalgeNunc) were coated with 100 µl of β -amyloid peptide (1-42) conjugated to BSA in 0.2 M sodium carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.4) (10 µg/mL) overnight at 4°C. The $\text{A}\beta_{1-42}$ -BSA conjugate was prepared by dissolving 7.5 mg of $\text{A}\beta_{1-42}$ -Cys₄₃ (C-terminal cysteine $\text{A}\beta_{1-42}$, AnaSpec) in 500 µL of dimethylsulfoxide, and then immediately adding 1,500 µL of distilled water. Two (2) milligrams of maleimide-activated bovine serum albumin (Pierce) was dissolved in 200 µL of distilled water. The two solutions were combined, thoroughly mixed, and allowed to stand at room temperature for two (2) hours. A gel chromatography column was used to separate unreacted peptide from $\text{A}\beta_{1-42}$ -Cys-BSA conjugate.

After washing the wells with phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween 20 (Washing Buffer) using an ELISA plate washer, the wells were blocked by adding 300 µL of SuperBlock reagent (Pierce) per well. After 30 minutes of blocking, the wells were washed Washing Buffer and excess liquid was removed.

A mixture of biotinylated Mu266 (0.3 µg/ml final concentration) and competitor antibody (Mu266 or Hu266; starting at 750 µg/ml final concentration and serial 3-fold dilutions) in ELISA Buffer were added in triplicate in a final volume of 100 µL per well. As a no-competitor control, 100 µL of 0.3 µg/ml biotinylated Mu266 was added. As a background control, 100 µL of ELISA Buffer was added. The ELISA plate was incubated at room temperature for 90 min. After washing the wells with Washing Buffer, 100 µL of 1 µg/ml HRP-conjugated streptavidin (Cat # 21124, Pierce) was added to each well. The plate was incubated at room temperature for 30 min and washed with Washing Buffer. For color development, 100 µL/well of ABTS Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories) was added. Color development was stopped by adding 100 µL/well of 2% oxalic acid. Absorbance was read at 415 nm. The absorbances were plotted against the log of the competitor concentration, curves were fit to the data points (using Prism) and the IC₅₀ was determined for each antibody using methods well-known in the art.

The mean IC₅₀ for mouse 266 was 4.7 µg/mL (three separate experiments, standard deviation = 1.3 µg/mL) and for humanized 266 was 7.5 µg/mL (three separate experiments, standard deviation = 1.1 µg/mL). A second set of three experiments were carried out, essentially as described above, and the mean IC₅₀ for mouse 266 was determined to be 3.87 µg/mL (SD = 0.12 µg/mL) and for human 266, the IC₅₀ was

determined to be 4.0 µg/mL (SD = 0.5 µg/mL). On the basis of these results, we conclude that humanized 266 has binding properties that are very similar to those of the mouse antibody 266. Therefore, we expect that humanized 266 has very similar *in vitro* and *in vivo* activities compared with mouse 266 and will exhibit in humans the same effects demonstrated with mouse 266 in mice.

5

Example 5In vitro binding properties of mouse antibody 266 and humanized antibody 266

Antibody affinity ($K_D = K_d / K_a$) was determined using a BIAcore biosensor 10 2000 and data analyzed with BIAevaluation (v. 3.1) software. A capture antibody (rabbit anti-mouse) was coupled via free amine groups to carboxyl groups on flow cell 2 of a biosensor chip (CM5) using N-ethyl-N-dimethylaminopropyl carbodiimide and N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS). A non-specific rabbit IgG was coupled to flow cell 1 15 as a background control. Monoclonal antibodies were captured to yield 300 resonance units (RU). Amyloid-beta 1-40 or 1-42 (Biosource International, Inc.) was then flowed over the chip at decreasing concentrations (1000 to 0.1 times K_D). To regenerate the chip, bound anti-A β antibody was eluted from the chip using a wash with glycine-HCl (pH 2). A control injection containing no amyloid-beta served as a control for baseline subtraction. Sensorgrams demonstrating association and dissociation phases were 20 analyzed to determine K_d and K_a . Using this method, the affinity of mouse antibody 266 for both A β 1-40 and for A β 1-42 was found to be 4 pM. The affinity of humanized 266 for A β 1-42 was found to be 4 pM.

20

25

Example 6Synthesis of Deglycosylated Humanized Antibody 266 Variants N56S and N56T

Site-directed mutagenesis. Site-directed mutagenesis was performed using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Cat # 200517, Stratagene, La Jolla, CA). To generate N56S and N56T variants in the VH CDR2 of Hu266, a pair of oligonucleotide primers containing the desired nucleotide substitution was designed 30 according to the manufacturer's instructions. The primers were extended with *PfuTurbo* DNA polymerase using pVg1-Hu266 plasmid DNA as a template. The resulting product

was treated with *Dpn* I endonuclease specific for methylated and hemimethylated DNA to digest the parental template. The resulting variant plasmids pVg1-Hu266 N56S and pVg1-Hu266 N56T were confirmed by sequencing.

Cell culture. Mouse myeloma cell line Sp2/0-Ag14 (referred to as Sp2/0 in this document; Cat #CRL-1581, ATCC, Manassas, VA) was grown in DME medium containing 10% FBS (Cat # SH32661.03, Lot # AKE11827, HyClone, Logan, UT) in a 37°C CO₂ incubator. Selection for gpt expression was performed with DME medium containing 10% FBS, HT media supplement (Cat # H-0137, Sigma, St. Louis, MO), 0.3 mg/ml xanthine (Cat # X-3627, Sigma) and 1 µg/ml mycophenolic acid (Cat # 11814-019, Life Technologies, Rockville, MD).

Stable transfection. To establish cell lines producing variant Hu266, stable transfection into Sp2/0 was accomplished in essentially the same manner as described in Example 3. ELISA analysis occurred approximately 7 days after initiation of selection.

Measurement of antibody expression by ELISA. See Example 3 for ELISA details.

Sequencing of Hu266 light and variant heavy chain cDNA. Total RNA was isolated from approximately 2 x 10⁷ hybridoma cells using TRIzol reagent (Life Technologies). First-strand cDNA was synthesized using total RNA as a template and random hexadeoxynucleotides as primers. The reaction was performed with SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies) according to the supplier's protocol. DNA fragments containing the entire coding region of Hu266 light or variant heavy chain were amplified by PCR using 5' and 3' primers which bind to 5' and 3' non-coding regions, respectively. The amplified fragments were gel-purified and subjected to sequencing with appropriate primers.

Purification of variant Hu266. See Example 3 for purification details. The following differences are noted for clarity. For each variant Hu266, clone A4 was for Hu266 N56S and clone D2 for Hu266 N56T. The column was washed with PBS before the antibody was eluted with 0.1 M glycine-HCl (pH 2.8), 0.1 M NaCl. After neutralization with 1 M TrisHCl (pH 8), the eluted protein was dialyzed against 3 changes of 2 liters PBS and filtered through a 0.2 µm filter prior to storage at 4°C. SDS-PAGE in MES buffer was performed according to standard procedures on a 4-12% NuPAGE gel

WO 03/016466

PCT/US02/21322

39

(Cat # NP0321, Invitrogen). Gel staining was performed with the Colloidal Blue Staining Kit (Cat # LC6025, Invitrogen) according to the supplier's protocol.

Example 7

Comparative Binding of mouse 266, Humanized Antibody 266 Variants N56S and N56T

5 ELISA competition. Wells of 96-well ELISA plates (Nunc-Immuno plate, Cat # 439454, NalgeNunc) were coated with 100 µl of 3 µg/ml of BSA conjugated with \square -amyloid peptide in 0.2 M sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.4) overnight at 4°C, washed with Wash Buffer, blocked with Superblock blocking buffer for 30 min at room temperature, and washed again with Wash Buffer. A mixture of biotinylated Mu266 (0.6 µg/ml final concentration) and competitor antibody (Mu266 or variant Hu266; typically starting at 750 µg/ml final concentration with serial 3-fold dilutions) in ELISA Buffer were added in triplicate in a final volume of 100 µl per well. As a no-competitor control, 100 µl of 0.6 µg/ml biotinylated Mu266 was used. As a background control, 100 µl of ELISA Buffer was used. ELISA plates were incubated at room temperature for 2 hr.

10 After washing the wells with Washing Buffer, 100 µl of 10 µg/ml HRP-conjugated streptavidin (Cat # 21124, Pierce) was added to each well. ELISA plates were incubated at room temperature for 30 min and washed with Washing Buffer. For color development, 100 µl/well of ABTS substrate was added. Color development was stopped by adding 100 µl/well of 2% oxalic acid. Absorbance was read at 415 nm.

15

20 The affinities of Mu266, the original Hu266 (wild-type), Hu266 N56S and Hu266 N56T to β -amyloid peptide were compared by competition ELISA. Mu266, wild-type Hu266, Hu266 N56S and Hu266 N56T were competed with biotinylated Mu266 in a concentration-dependent manner. Hu266 N56S and Hu266 N56T showed affinities higher than Mu266 and the original Hu266. The IC₅₀ values of Mu266, Hu266 N56S and Hu266 N56T were obtained in three independent experiments for each variant. The 25 values were calculated using the computer software Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) and are shown in Table 4. The relative binding affinities of Hu266 N56S and Hu266 N56T were on average 6.2-fold and 5.8-fold greater than that of Mu266, respectively. This represents a significant increase in affinity of the deglycosylated, 30 variant humanized antibodies compared with the glycosylated (at position 56) mouse antibody.

Table 4. Summary of ELISA competition experiments

IC ₅₀ (μg/ml)					
Competitor	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Average	Std. Dev.
Mu266	3.8	4.5	6.1	4.8	0.96
Hu266 N56S	0.43	0.92	1.0	0.78	0.25
Difference	8.8 fold	4.9 fold	6.1 fold	6.2 fold	

5

IC ₅₀ (μg/ml)					
Competitor	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Average	Std. Dev.
Mu266	4.3	6.4	6.4	5.7	0.99
Hu266 N56T	0.68	1.2	1.1	0.99	0.23
Difference	6.3 fold	5.3 fold	5.8 fold	5.8 fold	

Example 8Affinity of Humanized Antibody 266 Variant N56S and N56T

Antibody affinity (KD = Kd / Ka) was determined using a BIAcore biosensor 10 2000 and data analyzed with BIAevaluation (v. 3.1) software in essentially the same manner as described in Example 5. ELISA experiments were conducted in essentially the same manner as described in Example 7.

The data below show that the deglycosylated humanized antibody variants (N56S, 15 N56T) have significantly better affinity than the glycosylated form (h266). While interanalysis variations exist, these differences have no significant affect on the relative affinity improvement demonstrated for these deglycosylated variants over the glycosylated form.

Affinity - BIAcore

	KD (pM)
N56S	2.5
H266	7.2

	KD (pM)
N56T	1.87
h266	3.47

20 Competitive Binding (IC₅₀, μg/mL) - ELISA

	Mean	S.D.	N
N56S	1.9	0.2	3
Hu 266	7.2	1.9	3

41

Mu 266	7.6	1.4	3
N56T	3.1	0.9	3
Hu 266	13.0	2.6	3
Mu 266	14.0	2.6	3
N56S	0.43	-	1
Mu 266	3.80	-	1
N56S	1.0	-	1
N56T	1.0	-	1
Hu 266	5.0	-	1
Mu 266	7.1	-	1

Example 9**Determination of glycosylation at position 56 of the heavy chain of humanized antibody****266**

For each of two lots of humanized 266 that had been expressed and purified essentially as described above, a sample was prepared containing approximately 100 µg antibody. Each sample was reduced by adding 50 mg urea, 5 µL of 50 mg/mL DTT and 10 µL of 3 M tris buffer, pH 8.0 and incubating at 37°C for 30 min. The protein was alkylated by adding 20 µL of 50 mg/mL iodoacetamide solution and incubating at room temperature in the dark for 30 min. The solution was desalted on 1 mL spin column packed with P-6 resin. The desalting columns were washed and eluted with 0.025 M NH₄HCO₃ buffer. About 250 µL of protein fraction was collected for each sample. Each protein fraction was mixed with 2 to 3 µL of 1 mg/mL trypsin solution, and then the mixture was incubated at 37°C for about 2.5 hours. The remaining trypsin activity was quenched by heating the solution at 100°C for 3 minutes. For desialylated samples, 10 µL of tryptic digests of each sample was mixed with 7 µL of 0.15% formic acid in water and 2 µL of neuraminidase (a. u.) solution (1 unit/mL). The mixture was incubated at 37°C for 1 to 3 hours before HPLC/MS analysis. For de-N-glycosylated sample, 10 µL of tryptic digest was treated with 1 µL of N-glycosidase F at 37°C for 3 hours.

All the solutions were directly analyzed by capillary HPLC/MS with the following conditions: HPLC was an HP1100; Column: Zorbax C8, 2.1x150mm or Vydac C18, 0.3x150 mm; Temperature: ambient; Flow rate: 200 µL/min for Zorbax, 5-10 µL/min for C18; Injection volume: 10 µL after 1:1 dilution or original solution; HPLC solvents: A - 0.15% formic acid in H₂O, B - 0.12% formic acid in ACN; Gradient (time, %B): (0,2),

WO 03/016466

PCT/US02/21322

42

(40,50), (43,90), (45,90), (46,2), (50,2); mass spectrometry: API 150EX MASS SPEC 03, step 0.333, DP 25 V, ISV 5000 V, and FP 250 V.

In both lots analyzed, two peaks were found to contain glycopeptides. After de-N-glycosylation, new peptide masses, 1189.6 and 1672.5, in one of the peaks (eluted around 13 minutes) were found. These two masses match the heavy chain 288-296 and 284-296 (expected masses after de-N-glycosylation: 1190.2 and 1672.8). In the other peak (eluted about 26 minutes) a new peptide mass, 2369.4, was found after de-N-glycosylation. This mass matches the heavy chain peptide 44-65. Hence, the potential glycosylation sites, Asn 56 and 292 of the heavy chain were glycosylated. No clear peaks were found on the reconstructed ion chromatograms of peptides 288-296 and 44-65 from HPLC/MS analysis of tryptic digests. The results indicated that the Asn 56 site was fully glycosylated for both lots of humanized 266 antibody.

5
10

WO 03/016466

PCT/US02/21322

We claim:

1. An antibody, or fragment thereof, comprising a light chain and a heavy chain, wherein the light chain comprises the three light chain complementarity determining regions (CDRs) from mouse monoclonal antibody 266 (SEQ ID NO:1-3), and wherein the heavy chain comprises heavy chain CDR1 and CDR3 from mouse monoclonal antibody 266 (SEQ ID NO: 4 and 6, respectively), and a heavy chain CDR2 having the sequence given by SEQ ID NO:5:

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

(SEO ID NO:5)

wherein,

Xaa at position 7 of SEQ ID NO:5 is any amino acid, provided that if Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 7 is not Asn;

15

(SEO ID NO:5)

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

Xaa at position 8 of SEQ ID NO:5 is any amino acid, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 8 is Asp or Pro; and

Xaa at position 9 of SEQ ID NO:5 is any amino acid, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 9 is neither Ser nor Thr.

2. The antibody or fragment of Claim 1, wherein:

Xaa at position 7 of SEQ ID NO:5 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr, provided that if Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 7 is not Asn;

Xaa at position 8 of SEQ ID NO:5 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr; and

WO 03/016466

PCT/US02/21322

44

Xaa at position 9 of SEQ ID NO:5 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr, provided that if Xaa at position 7 is Asn, then Xaa at position 9 is neither Ser nor Thr.

5. The antibody or fragment of Claim 2, wherein Xaa at position 7 of SEQ ID NO:5 is Ala, Gly, His, Gln, Ser, or Thr, or His, Xaa at position 8 is Ser, and Xaa at position 9 is Thr.

4. The antibody or fragment of Claim 3, wherein Xaa at position 7 of SEQ ID NO:5 is Ser or Thr, Xaa at position 8 is Ser, and Xaa at position 9 is Thr.

10. 5. The antibody or fragment of either one of Claims 1 or 2, wherein Xaa at position 8 of SEQ ID NO:5 is Ser and Xaa at position 9 is Thr.

6. The antibody or fragment of either one of Claims 1 or 2, wherein Xaa at position 7 of SEQ ID NO:5 is Asn and Xaa at position 8 is Ser.

15. 7. The antibody or fragment of claim 1 having a light chain variable region of the sequence given by SEQ ID NO:7 and a heavy chain variable region given by SEQ ID NO:8.

8. The antibody or fragment thereof of claim 7 having a light chain variable region of the sequence given by SEQ ID NO:9 and a heavy chain variable region given by SEQ ID NO:10.

20. 9. The antibody or fragment thereof of claim 8 having a light chain of the sequence given by SEQ ID NO:11 and a heavy chain of the sequence given by SEQ ID NO:12.

10. The antibody or fragment of any one of Claims 7-9, wherein in the heavy chain:

WO 03/016466

PCT/US02/21322

45

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

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

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

10 11. The antibody or fragment of Claim 10, wherein in the heavy chain Xaa at position 56 is Ala, Gly, His, Gln, Ser, or Thr, Xaa at position 57 is Ser, and Xaa at position 58 is Thr.

12. The antibody or fragment of Claim 11, wherein in the heavy chain Xaa at position 56 is Ser or Thr, Xaa at position 57 is Ser, and Xaa at position 58 is Thr.

15 13. The antibody or fragment of any one of Claims 7-12, wherein in the heavy chain Xaa at position 57 is Ser and Xaa at position 58 is Thr.

14. The antibody or fragment of any one of Claims 7-12, wherein in the heavy chain Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 57 is Ser.

15. An antibody fragment obtainable by enzymatic cleavage of the antibody of
20 any one of claims 1 - 14.

16. An antibody fragment of any one of claims 1-15 which is an Fab or F(ab')₂ fragment.

17. An antibody fragment of any one of claims 1-15, which is an F(ab')₂ fragment.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

46

18. An antibody fragment of any one of claims 1-15, which is an Fab fragment.

19. The antibody or fragment of any one of claims 1 - 18 that is an IgG₁ immunoglobulin isotype.

5 20. The antibody or fragment of any one of claims 1 - 19, wherein the antibody or fragment thereof is produced in a host cell selected from the group consisting of a myeloma cell, a chinese hamster ovary cell, a syrian hamster ovary cell, and a human embryonic kidney cell.

10 21. A polynucleotide compound, comprising a sequence coding for the light chain or the heavy chain of the antibody or fragment of any one of claims 1 - 19, or a fragment thereof.

22. A polynucleotide sequence, which when expressed in a suitable host cell, yields a light chain or a heavy chain of the antibody of any one of claims 1 - 20, or a fragment thereof.

15 23. An expression vector for expressing the antibody of any one of claims 1 - 19 comprising the polynucleotide sequence of any one of claims 21 - 22.

24. A cell transfected with the expression vector of claim 23.

20 25. A cell transfected with two expression vectors of claim 23, wherein a first vector comprises the polynucleotide sequence coding for the light chain and a second vector comprises the sequence coding for the heavy chain.

26. A cell that is capable of expressing a humanized antibody of any one of claims 1-19.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

47

27. The cell of any one of claims 24-26, wherein the cell is selected from the group consisting of a myeloma cell, a Chinese hamster ovary cell, a Syrian hamster ovary cell, and a human embryonic kidney cell.

28. A pharmaceutical composition that comprises the humanized antibody or fragment of any one of claims 1-19, and a pharmaceutically acceptable excipient.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

1/13

FIG. 1

40

WO 03/016466

PCT/US02/21322

2/13

FIG. 2

WO 03/016466

PCT/US02/21322

3/13

3419 ACTCCGGGACAGAACCTGAACTCTGCGCCCTGTGGAGGGACTGGTGCAGATGCCACACACACTCAGCCCAGACCGTTCA
3499 ACATAACCCCGACTGAGGTTGGCGGCCACACGGCCACCAACACACACGTCAGGCTCACACGGGAGCTCACCCCG
3579 GCGAAACTGCAAGACCCAGCCAGGAGCAAGGTCCTGCCACACCTGGACACAGGGCCACCGAGCCCA
3659 CGCGGCCTCAAGGCCACAGGCTCTCGCAGCTTCACATGCTGCTGACACAAACCCAGCCCTCTCTCA
3739 CAAGGGTGCCCCCTGGAGCCACACACACAGGGATCACACACACCGTCACGTO CCTGGCCACTTCCAG
3819 TGCCTGCCCTGCAAGATTC

WO 03/016466

PCT/US02/21322

4/13

FIG. 3

WO 03/016466

PCT/US02/21322

5/13

3419 ACTCGGGGACATGCACTTCGGGCCCTGGAGGGACTGGCAGATGCCACACACACACTCAGCCAGACCGTTCA
3429 ACAGAACCGCGACGTAGGTTGGCCGGCCACAGGGCCACACACACCGTGCACGGCTCAACACGGCTCACCCCG
3579 CGCGAACCTGACAGCAACCAGCCAGGCAAGGTCCTGCAACAGTGAAACACTCTCGGACACAGGCCCCACAGGCCCA
3659 CGGGCACCTCAAGGGCCACGAGCTTCAGGAGCTTCACATGCTGACCTGCTAGACACACCCAGGCTCTCTCA
3739 CAGGGGCGCCCCCTGAGCGOCACACACACAGGGATCACACACACAGTGACGTCCTGGCCCTGGCCACTTCCCAG
3819 TGGCGCCCTTCCCTGAGATCC

WO 03/016466

PCT/US02/21322

6/13

FIG. 4

30

WO 03/016466

PCT/US02/21322

7/13

FIG. 5

5	ACCGGTCCACCATGAA <u>TTCGGGCTCAGCTGATTTCTTGTCTTGTTAAAGGTG</u>	30	60
	M N F G L S L I F L V L V L K G		
	90	120	
10	TCCCTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCC		
	V L C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S		
	150	180	
15	TGAGACTCTCTGTGCAGGCCCTGGATTCACTTTAGTAGGTATTCCATGCTTGGGTTC		
	L R L S C A A S G F T F S R Y S M S W V		
	210	240	
20	GCCAGGCTCAGGAAGGGCTGGAA <u>TGGTCGCACAAAATAATAGTGTGGTAGCA</u>		
	R Q A P G K G L E L V A Q I N S V G T S		
	270	300	
25	CCTACTATCCAGACACTGTAA <u>GGGCCATTACCATCTCCAGAGAACATGCCAAGAAC</u>		
	T Y P D T V K G R F T I S R D N A K N		
	330	360	
30	CCCTGTACCTGCAA <u>ATGAACTCCCTGAGGGCGAAGACACGGCGTGATTA</u> TACTGTGCAA		
	T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A		
	390	420	
35	GGGGAGACTACTGGGCCAAGGACCCCTGGTGACAGTCTCTCAGGTGAGTCCTCACAA		
	S G D Y W G Q G T L V T V S S		
	427		
	CTCTAGA		

WO 03/016466

PCT/US02/21322

8/13

FIG. 6

1 ATGAATTTCGGGCTCAGCTTGATTTCCCTGTCCCTGTTAAAAGGTGTCTGTGAA
 M N F G L S L I F L V L V L K G V L C E
 5 61 GTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGAGGTTTACTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
 V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S
 121 TGTGCAGCCTCTGGATTCACITTTAGTAGGTATCCATGTCCTGGGTTGCCAGGCTCCA
 C A A S G F T F S R Y S M S W V R Q A P
 181 GGCAAGGGCCTGGATTGGTCGACAAAAATAATAGTGGTAGTAGCACCTACTATCCA
 10 10 K G K L E L V A Q I N S V G S S T Y Y P
 241 GACACTGAAAAGGGCGATTCCACATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACCCCTGTACCTG
 D T V K G R F T I S R D N A K N T L Y L
 301 CAATGAACTCCCTGAGGGCGAAGACACGGCGTGATTACTGTGCAAGCGGAGACTAC
 Q M N S L R A E D T A V Y Y C A S G D Y
 15 361 TGGGGCCAAGGCACCCCTGGTGACAGTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATGGCTTC
 W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F
 421 CCCCTGGCACCCCTCCAGCAAGACCTCTGGGGCACAGGGCCCTGGCTGGTC
 P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V
 481 AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGRACTCAGGGCCCTGACCRGCGC
 20 20 K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G
 541 GTGCACACCTTCCCGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCTCCACGAGCGTGGTG
 V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V
 601 ACCGTGCCCCAAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTAATCACAGGCC
 T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P
 661 AGCAACACCAAGGTTGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGACAAAAGTACACATGC
 25 25 S N T K V D K K V B P K S C D K T H T C
 721 CCACCGTGCCCCAGCACCTGAGCTCCCTGGGGGACCGTCAGTCCTCTTCCCCAAAAA
 P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K
 781 CCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGGTGGGTGGACCGTG
 30 30 P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V
 841 AGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGATAAT
 S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N
 901 GCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAACCGTGAGCTCAGCGCTC
 A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L
 961 ACCGTCTGGAACACGGACTGGCTGAACTGAGCAAGGACTACAGTGTGACGGTCTCCACAAA
 35 35 T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K
 1021 GCCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGGCAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P
 1081 CAGGTGTACACCCCTGCCCGATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCGGTACGCTGACC

WO 03/016466

PCT/US02/21322

9/13

Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T
1141 TGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGCGAGAGCAATGGCAG
C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q
1201 CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCCTCTCC
5 P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L
1261 TACAGCAAGGTCAACCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCATGCTCC
Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S
1321 GTGATGGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGT
V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
10 1381 AAATGA
K •

WO 03/016466

PCT/US02/21322

10/13

FIG. 7

1 ATGAATTCGGCTCAGCTGATTTCCCTGCCTGGTTAAAGGTGTCCCTGAA
 M N F G L S L I F L V L V L K G V L C E
 5 61 GTGCAGCTGGTGGAGCTCTGGGGAGGTTAGTCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
 V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S
 121 TGTGCAGCTCTGGATTACATTTAGTAGGTATTCCATGCTTGGGTTGCCAGGTCCA
 C A A S G F T F S R Y S M S W V R Q A P
 181 GGCAAGGGCCTGGAATTGGTCGACAATAATAGTGTGGTACTAGCACCTACTATCCA
 10 G K G L E L V A Q I N S V G T S T Y P
 241 GACACTGTAAAGGGCGATTCCACCATCTCCACAGACAAATGCCAGAACACCCCTGTACCTG
 D T V K G R F T I S R D N A K N T L Y L
 301 CARATGAACCTCCCTGAGGGCGAAGACACGGCGTGTATTACTGTCAAGCGGAAGACTAC
 Q M N S L R A E D T A V Y Y C A S G D Y
 361 TGGGCCRAGGCACCCCTGGTACAGTCCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGCTTC
 W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F
 421 CCCCTGGCACCCCTCCAAAGACACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTCCCTGGTC
 P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V
 481 AAGGACTACTTCCCCAACCGGTGACGGTGTGGAAACTCAGGCCTGACCAGCGC
 K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G
 541 GTGCACACCTTCCCCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACCTTCAGCAGCTGGTG
 V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V
 601 ACCGTGCCCCACAGCGCTTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAGGCC
 T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P
 661 AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGTGGCCAAATCTGTGACAAAACACACATGC
 S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C
 721 CCCAGGTGCCCCAGCACCTGAACTCCCTGGGGGACCGTCAGTCCTCCCTTCCCCAAA
 P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K
 781 CCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCTGGTGGTGG
 P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V
 841 AGCCACGAAGACCCCTGGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCTTAAT
 S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N
 901 GCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
 A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L
 961 ACCGTCCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCACAAA
 T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K
 1021 GCGCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P
 1081 CAGGTGTACACCCCTGCCCTCCGGATGAGCTGACCAAGAACCGGTGACCCCTGACC

WO 03/016466

PCT/US02/21322

11/13

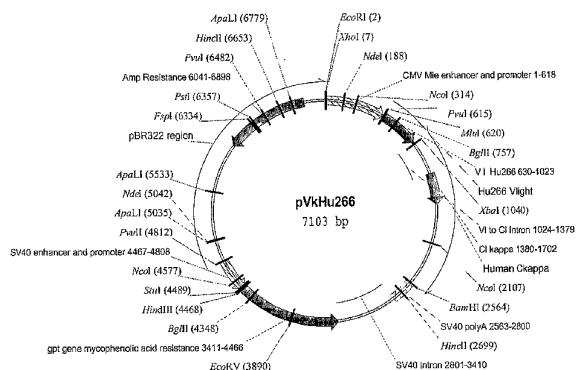
Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T
1141 TCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGAGCAATGGCAG
C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q
1201 CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCCTC
5 P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L
1261 TACAGCAAGCTCACCGTGGACAGAGCAAGTGGCAGCAGGGGAACGTCCTCTCATGCTCC
Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S
1321 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
10 1381 AAATGA
K •

WO 03/016466

PCT/US02/21322

12/13

FIG. 8

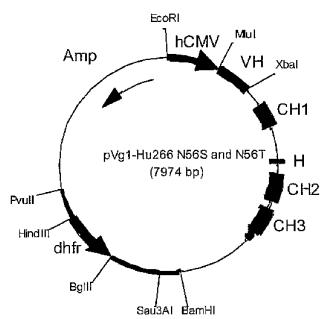


WO 03/016466

PCT/US02/21322

13/13

FIG. 9



WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> ELI LILLY AND COMPANY

<120> ANTI-AB ANTIBODIES

<130> X-15113

<150> 60/313,224

<151> 2001-08-17

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> LIGHT CHAIN CDR1

<400> 1

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

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> LIGHT CHAIN CDR2

<400> 2
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

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

<400> 3
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5
<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> HEAVY CHAIN CDR1

<400> 4

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

Arg Tyr Ser Met Ser
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Mouse variant

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> HEAVY CHAIN CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa at position 7 is any amino acid, provided that if Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 9 is Ser or Thr, then Xaa at position 7 is Asn

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa at position 9 is any amino acid, provided that if Xaa at position 7 is Asn and Xaa at position 8 is neither Asp nor Pro, then Xaa at position 9 is neither Ser nor Thr

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

x-15113.st25.txt

Gly

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(3)
<223> HEAVY CHAIN CDR3

<400> 6
Gly Asp Tyr
1

<210> 7
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized antibody
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> HUMANIZED ANTIBODY LIGHT CHAIN VARIABLE REGION

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> HUMANIZED ANTIBODY LIGHT CHAIN VARIABLE REGION

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (88)..(88)
<223> Xaa at position 88 is Val or Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
<223> Xaa at position 105 is Gln or Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (108)..(108)
<223> Xaa at position 108 is Lys or Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (109)..(109)
<223> Xaa at position 109 is Val or Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa at position 14 is Thr or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> Xaa at position 15 is Leu or Pro

<220>

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa at position 30 is Ile or Val

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa at position 7 is Ser or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa at position 2 is Val or Ile

<400> 7

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

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

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

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

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

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized antibody
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> HUMANIZED ANTIBODY HEAVY CHAIN VARIABLE REGION

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

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (107)..(107)
<223> Xaa at position 107 is Leu or Thr

<220>

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa at position 1 is Glu or Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa at position 7 is Ser or Leu

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (56)..(56)
<223> Xaa at position 56 is any amino acid, provided that is Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 59 is Ser or Thr, then Xaa at position 56 is not Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> Xaa at position 57 is any amino acid, provided that is Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 58 is Ser or Thr, then Xaa at position 57 is Asp or Pro

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.str25.txt

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(63)

<223> Xaa at position 63 is Thr or Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (75)..(75)

<223> Xaa at position 75 is Ala, Ser, Val, or Thr

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Humanized antibody

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(113)

<223> HUMANIZED ANTIBODY LIGHT CHAIN VARIABLE REGION

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(112)

WO 03/016466

PCT/US02/21322

<223> X-15113.ST25.txt
<223> HUMANIZED ANTIBODY HEAVY CHAIN VARIABLE REGION

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (56)..(56)
<223> Xaa at position 56 is any amino acid, provided that if Xaa at position 57 is neither Asp nor Pro and Xaa at position 59 is Ser or Thr, then Xaa at position 56 is not Asn

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> Xaa at position 57 is any amino acid, provided that if Xaa at position 56 is Asn and Xaa at position 58 is Ser or Thr, then Xaa at position 57 is Asp or Pro

<400> 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

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

<210> 11

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Humanized antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(219)

<223> HUMANIZED ANTIBODY LIGHT CHAIN

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 12

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Humanized antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(442)

<223> HUMANIZED ANTIBODY HEAVY CHAIN

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(56)

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

<220>

<221> MISC_FEATURE

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

<222> (57)..(57)

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

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(58)

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

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	115		130	135		120		125							

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

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

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

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

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized antibody
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> HEAVY CHAIN CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa at position 7 of Seq ID No. 13 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa at position 8 of Seq ID No. 13 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa at position 9 of Seq ID No. 13 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

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

Gly

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Humanized antibody
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> HEAVY CHAIN CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa at position 7 of Seq ID No. 14 is Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa at position 8 of Seq ID No. 14 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, and Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)

WO 03/016466

PCT/US02/21322

<223> Xaa at position 9 of Seq ID No. 14 is selected from the group consisting of Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Val, Trp, and Tyr

<400> 14

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

Gly

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Humanized antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> HEAVY CHAIN CDR

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa at position 7 of Seq ID No. 15 is Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa at position 8 of Seq ID No. 15 is selected from the group consisting of Asp and Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

<222> (9)..(9)

<223> Xaa at position 8 of seq ID No. 15 is selected from the group con
sisting of Ser and Thr

<400> 15

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

Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Humanized antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> HEAVY CHAIN CDR

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa at position 7 of seq ID No. 16 is selected from the group con
sisting of Ala, Gly, His, Gln, Ser, and Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa at position 8 of seq ID No. 16 is selected from the group con
sisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa at position 9 of seq ID No. 16 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr

<400> 16

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

Gly

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Humanized antibody

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> HEAVY CHAIN CDR

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa at position 7 of seq ID No. 17 is Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa at position 8 of seq ID No. 17 is selected from the group consisting of Ala, Gly, His, Asn, Gln, Ser, and Thr

WO 03/016466

PCT/US02/21322

X-15113.ST25.txt

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa at position 9 of seq ID No. 17 is selected from the group con-
sisting of Ala, Gly, His, Asn, and Gin

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

Gly

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/016466 A3(51) International Patent Classification⁵: **A61K 39/395**

CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EB

(21) International Application Number: PCT/US02/21322

EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, IIR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ

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

LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MN, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD

(25) Filing Language: English

SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/313,224 17 August 2001 (17.08.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BL, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EL, ES, FI, FR, GR, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BJ, BJ, CP, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NE, SN, TD, TG).

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **JIA, Audrey, Yun-hua** [CN/US]; 34772 Chesapeake Drive, Union City, CA 94587 (US). **TSURUSHITA, Naoya** [JP/US]; 3719 Redwood Circle, Palo Alto, CA 94306 (US). **VASQUEZ, Maximiliano, J.** [US/US]; 3813 Louis Road, Palo Alto, CA 94303 (US).

Published:
*with international search report
 before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(74) Agents: **KELLEY, James, J.** et al.; Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, IN 46206-6288 (US).(88) Date of publication of the international search report:
23 October 2003

(81) Designated States (national): AI, AG, AI, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,

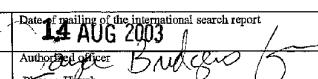
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

**WO 03/016466 A3**

(54) Title: ANTI-AB ANTIBODIES

(57) Abstract: This invention provides variant 266 antibodies that are engineered to lack an N-glycosylation site within the CDR2 of the heavy chain, pharmaceutical compositions thereof, and polynucleotide sequences, vectors, and transformed cells useful to express the variant antibodies. The variants sequester soluble AB peptide from human biological fluids and specifically bind an epitope contained within position 13-28 of the amyloid beta peptide AB with significantly greater affinity than either mouse antibody 266 or humanized 266 antibodies retaining N-glycosylation sites. The variant antibodies are useful for treatment or prevention of conditions and diseases associated with AB, including Alzheimer's disease, Down's syndrome, cerebral amyloid angiopathy, mild cognitive impairment, and the like.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/21322
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 39/395 US CL : 424/133.1 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) U.S. : 424/133.1		
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) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,393,846 A (SCHENK et al) 14 January 1997, (14.01.1997), column 13, lines 37-60.	1-12
A	US 5,837,672 A (SCHENK et al) 17 November 1998, (17.11.1998), column 9, lines 40-60, column 12, line 46, column 13, line 17.	1-12
A	US 5,766,846 A (SCHLOSSMACHER et al) 16 June 1998 (16.06.1998), column 13, line 35.	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <ul style="list-style-type: none"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt 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 <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"Y" 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 in combination with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 22 May 2003 (22.05.2003)	Date of mailing of the international search report 14 AUG 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer  Phuong Huynh Telephone No. (703) 308-0196 <input checked="" type="checkbox"/>	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US02/21322
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet) This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> Claim 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. <input checked="" type="checkbox"/> Claim Nos.: 13-28 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(s).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet) This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	PCT/US02/21322
<p>Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3: EMBASE, BIOSIS, SCISEARCH, CAPLUS, MEDLINE on STN; GENESEQ, PIR_73, SWISSPROT_40, and STREMBL_21</p>	

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/46	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/46	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 N 5/10	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジャ・オードリー・ユンファ

アメリカ合衆国 9 4 5 8 7 カリフォルニア州ユニオン・シティ、チェサピーク・ドライブ 3 4 7 7
2 番

(72)発明者 鶴下 直也

アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォルニア州パロ・アルト、レッドウッド・サークル 3 7 1 9 番

(72)発明者 マクシミリアノ・ホタ・バスケス

アメリカ合衆国 9 4 3 0 3 カリフォルニア州パロ・アルト、レイス・ロード 3 8 1 3 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA61 CA04 CA20 DA02 EA04 GA14 GA18
 GA25 HA01 HA03 HA20
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA91X AA91Y AA93Y AB01 AC14 BA02
 BA03 BA16 CA25 CA43 CA44
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA02 BA08 BA18 BA21 BA23 CA23 DC50
 NA14 ZA152 ZA162 ZC022
 4C085 AA14 CC05 DD23
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA40 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26