

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-502276

(P2014-502276A)

(43) 公表日 平成26年1月30日(2014.1.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H O 4 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
	A 6 1 P 25/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2013-542218 (P2013-542218)	(71) 出願人	597025806 ワシントン・ユニバーシティ Washington University アメリカ合衆国63130ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ
(86) (22) 出願日	平成23年12月2日 (2011.12.2)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成25年7月30日 (2013.7.30)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義敦
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/063121	(72) 発明者	ホルツマン, デーヴィッド アメリカ合衆国 ミズーリ 63130, セント ルイス, ワン ブルッキング ス ドライブ
(87) 国際公開番号	W02012/075422		
(87) 国際公開日	平成24年6月7日 (2012.6.7)		
(31) 優先権主張番号	61/419,060		
(32) 優先日	平成22年12月2日 (2010.12.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/548,542		
(32) 優先日	平成23年10月18日 (2011.10.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイドブラーク関連症状の治療のための組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、Aブラーク関連症状の少なくとも一つの症状又は徴候を効果的に治療するため又はアミロイドブラーク負荷を低減させるための組成物及び方法を含む。本方法は、ヒトのような生存している哺乳動物の生物系に抗ApoE抗体の有効量を投与することを含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗体が A p o E に特異的に結合し、H J 6 . 1 (A T C C 特許寄託符号 P T - 1 1 8 0 5)、H J 6 . 2 (A T C C 特許寄託符号 P T - 1 1 8 0 6)、H J 6 . 3 (A T C C 特許寄託符号 P T - 1 1 8 0 7)、及び H J 6 . 4 (A T C C 特許寄託符号 P T - 1 1 8 0 8) からなる群から選択されるハイブリドーマに由来する単離抗体。

【請求項 2】

抗体が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、及び配列番号：16 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる請求項 1 に記載の単離抗体。

10

【請求項 3】

抗体が、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、及び配列番号：15 からなる群から選択される核酸配列を含んでなる核酸配列によりコードされる請求項 1 に記載の単離抗体。

【請求項 4】

抗体が、単鎖抗体、抗体断片、キメラ抗体、又はヒト化抗体からなる群から選択される請求項 1 に記載の単離抗体。

【請求項 5】

抗体が A p o E に特異的に結合し、0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：21 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 を含む単離抗体。

20

【請求項 6】

抗体が A p o E に特異的に結合し、0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：27 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 を含む単離抗体。

【請求項 7】

抗体が A p o E に特異的に結合し、0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：33 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 を含む単離抗体。

【請求項 8】

被験体の A プラーク関連症状の少なくとも一つの症状又は徴候を治療する方法において、少なくとも一つの抗 A p o E 抗体の有効量をその被験体に投与することを含む方法。

30

【請求項 9】

治療が、被験体の A プラーク関連症状の少なくとも一つの症状又は徴候を予防し、減弱し、逆転させ又は改善することを含む請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

A プラーク関連症状の症状又は徴候が、障害性認知機能、行動変化、異常な言語機能、情緒調節不全、発作、障害性神経系構造又は機能、及びアルツハイマー病又は脳アミロイド血管症の発症の危険性の増加を含む請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

抗 A p o E 抗体が、A p o E コード化配列内のエピトープに結合する請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 12】

投与が効果的な全身投与経路を含む請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

投与が、中枢神経系内への直接的なものを含む、効果的な局所投与経路を含む請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

被験体の脳内のアミロイドプラーク負荷を低減させる方法であって、少なくとも一つの抗 A p o E 抗体の有効量をその被験体に投与することを含む方法。

【請求項 15】

抗 A p o E 抗体が A p o E コード化配列内のエピトープに結合する請求項 14 に記載の方法。

50

【請求項 16】

投与が効果的な全身投与経路を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

投与が、中枢神経系内への直接的なものを含む、効果的な局所投与経路を含む請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

アミロイドプラーク負荷が海馬において減少している請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

アミロイドプラーク負荷が皮質において減少している請求項 14 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

(政府支援)

この発明は、N I Hにより付与された A G 0 1 3 9 5 6 の元、政府支援によりなされた。政府は本発明に所定の権利を有する。

【0002】

本発明は、A プラーク関連症状、例えば被験体のアルツハイマー病 (A D) に関連したものを遅延化又は防止するための組成物及び方法に関する。特に、本発明は、被験体の脳におけるアミロイド - (A) の濃度の調節に関する。

【背景技術】

20

【0003】

アルツハイマー病 (A D) は、認知症の最も一般的な原因であり、ますます増加する公衆衛生問題である。現在、アメリカ合衆国においてが 5 0 0 万の人々が苦しめられていると推定され、2 0 5 0 年までには 1 3 0 0 万人に増加すると予想されている。アルツハイマー病により、記憶の損失、認知機能、及び最終的には自我の損失に至る。対象者及び家族には、かなりの個人的及び財政的犠牲がかかる。人口における疾患の重篤度及び有病率の増加のため、より良い治療法を開発することが急務である。

【0004】

生化学、遺伝学及び動物モデルでの証拠では、A D の病原性ペプチドとしてアミロイド - (A) が関与している。A D の神経病理学的及び神経化学的特徴には、シナプス損失及び選択的ニューロン死、所定の神経伝達物質の低下、ニューロン (神経原線維変化) 内及び細胞外空間 (脳血管、びまん性、神経突起プラーク) における、異常なタンパク質沈着が含まれる。これらのプラークの主要な構成成分は、A 、アミロイド前駆体タンパク質 (A P P) から切断された 3 8 - 4 3 のアミノ酸配列ペプチドである。

30

【0005】

一生を通じて、可溶性 A は主として神経細胞から分泌されるが、他の種類の細胞タイプの場合もある。過剰の A 沈着は、家族性早期発症型 A D において生じ、又は脳内の A クリアランスが低下するので、A 合成の増加に起因しうる。A 生成が A D のより一般的な遅発型において生じるといふ説得力ある証拠がないことは、不十分な A クリアランスが、A 沈着とさらにはアミロイドプラーク形成を促進させうることを示唆している。

40

【0006】

アポリポタンパク質 E (A p o E) 遺伝子は、遅発型 A D の最も広く複製された遺伝的危険因子を保持したままであり、E 4 アレルのキャリアは 3 - 1 5 倍多いリスクを有し、より早い年齢で疾患を発病する。脳内で、A p o E は主として合成され、周囲のアミロイドプラークに見出されるアストロサイト及びミクログリアにより分泌される。本発明は、A D マウスモデルにおけるアミロイドプラーク負荷を低減するのに効果的な A p o E 抗体を提供する。

【発明の概要】

【0007】

50

本発明の一態様は、生存しているヒト患者に有効量の抗 A p o E 抗体を投与することを含む、少なくとも一つの臨床的に検出可能な A プラーク関連症状を効果的に治療する方法を包含する。他の態様では、本発明は、このような治療に有用な抗体を包含する。例えば、生存している哺乳動物において A ペプチドの毒性作用を治療的に減弱する抗体である。

【 0 0 0 8 】

本発明の他の態様は、少なくとも一つの抗 A p o E 抗体を含有する組成物を包含する。一態様では、本発明は、ハイブリドーマ H J 6 . 1、H J 6 . 2、H J 6 . 3、H J 6 . 4、又はその組合せから産生少なくとも一つの抗 A p o E 抗体を含んでなる組成物を包含する。一態様では、本発明は、少なくとも一つの抗 A p o E 抗体を含有する医薬組成物を包含する。一態様では、本発明は、ハイブリドーマ H J 6 . 1、H J 6 . 2、H J 6 . 3、H J 6 . 4、又はその組合せから産生される少なくとも一つの抗 A p o E 抗体を含有する医薬組成物を包含する。

10

【 0 0 0 9 】

さらなる本発明の他の態様は、少なくとも一つの臨床的に検出可能な A プラーク関連症状の治療に有用な医薬組成物を包含する。本組成物は、生存しているヒト被験体への投与に適合化された医薬的有効量の抗 A p o E 抗体を含有する。一態様では、このような治療に有用な抗体は、生存している哺乳動物における A ペプチドの毒性作用を治療的に減弱する抗体を含む。一態様では、医薬組成物は、生存している被験体に効果的に投与される。

20

【 0 0 1 0 】

本発明のさらなる他の態様は、生存しているヒト被験体への投与に適合化された医薬的有効量の抗 A p o E 抗体の機能的治療用医薬組成物を含む容器と、前記投与に使用される任意の医薬装置を具備する医薬キットを包含する。一態様では、このような治療に有用な抗体は、生存している哺乳動物における A ペプチドの毒性作用を治療的に減弱する抗体を含む。

【 0 0 1 1 】

本発明の他の態様及び繰り返しを以下に詳述する

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 2 】

【 図 1 】 図 1 は、抗 A 抗体 (H J 3 . 4)、又は 1 又は 2 の抗 A p o E 抗体 (H J 6 . 2 又は H J 6 . 3) のいずれかをを用い、月齢 3 ヶ月で始めて 7 ヶ月にまるまで、10 mg / k g で週に 1 回、腹腔内的に治療された P S / A P P マウスからの海馬のサンプル内の、アミロイドプラーク負荷の低減における抗 A p o E 抗体の強力な効果をグラフで表したものである。コントロール群はリン酸緩衝食塩水 (P B S) で治療した。評価した動物の数は、N = 7 (P B S)、N = 1 6 (H J 3 . 4)、N = 1 6 (H J 6 . 2)、N = 1 6 である。

30

【 図 2 】 図 2 は、抗 A 抗体 (H J 3 . 4)、又は 1 又は 2 の抗 A p o E 抗体 (H J 6 . 2 又は H J 6 . 3) のいずれかをを用い、10 mg / k g で週に 1 回、腹腔内的に治療された P S / A P P マウスからの大脳皮質のサンプル内の、アミロイドプラーク負荷の低減における抗 A p o E 抗体の強力な効果をグラフで表したものである。コントロール群はリン酸緩衝食塩水 (P B S) で治療した。評価した動物の数は、N = 7 (P B S)、N = 1 6 (H J 3 . 4)、N = 1 6 (H J 6 . 2)、N = 1 6 である。

40

【 図 3 】 図 3 は、E L I S A アッセイを使用する、ヒト a p o E に対する抗 A p o E 抗体 H J 6 . 1、H J 6 . 2、H J 6 . 3 及び H J 6 . 4 の結合性をグラフで表したものである。

【 図 4 】 図 4 は、(A) 血漿中のヒト a p o E に対する、H J 6 . 1、H J 6 . 2、H J 6 . 3 及び H J 6 . 4 の結合性、及び (B) H J 6 . 1、H J 6 . 2、H J 6 . 3 及び H J 6 . 4 抗体を受容した同じマウスにおけるコレステロールレベルをグラフで表したものである。

50

【図 5】図 5 は、末梢投与後の中枢神経系における、抗 a p o E 抗体 H J 6 . 1、H J 6 . 2、H J 6 . 3 及び H J 6 . 4 の存在をグラフで表したものである。

【図 6】図 6 は、10 日にわたって、H J 6 . 2 及び H J 6 . 3 (抗 a p o E 抗体)、及び H J 3 . 4 (抗 A 抗体)を短時間、マウスに投与した後のミクログリア活性をグラフで表したものである。

【図 7 - 1】図 7 は、(A) H J 6 . 1 重鎖可変領域及び第 1 定常領域 (配列番号: 4) ; (B) H J 6 . 1 軽鎖可変領域及び定常領域 (配列番号: 2) ; (C) H J 6 . 2 重鎖可変領域及び第 1 定常領域 (配列番号: 8) ; (D) H J 6 . 2 軽鎖可変領域及び定常領域 (配列番号: 6) のアミノ酸配列を表す。C D R を含む領域がハイライトされている。

【図 7 - 2】図 7 は、(E) H J 6 . 3 重鎖可変領域及び第 1 定常領域 (配列番号: 12) ; (F) H J 6 . 3 軽鎖可変領域及び定常領域 (配列番号: 10) ; (G) H J 6 . 4 重鎖可変領域及び定常領域 (配列番号: 16) ; (H) H J 6 . 4 軽鎖可変領域及び定常領域 (配列番号: 14) のアミノ酸配列を表す。C D R を含む領域がハイライトされている。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本出願人は、A プラーク関連症状を効果的に治療するための抗体及びその使用方法を発見した。本方法は、生存している被験体に製薬的有効量の抗 A p o E 抗体を効果的に投与することを含む。本発明は、抗 A p o E 抗体が、A プラーク関連症状に罹患した被験体に対する治療を提供するという発見を包含する。よって、本発明は、A プラーク関連症状の徴候及び症状が、少なくとも部分的には A p o E の悪影響のためでありうるという証拠を提供する。一態様では、少なくとも一つの前臨床的又は臨床的症状又は徴候は、その被験体により提示される。一態様では、このような治療に有用な抗体は、生存している哺乳動物における A ベプチドの毒性作用を治療的に減弱する抗体を含む。一態様では、このような治療に有用な抗体は、A p o E 内のエピトープに結合するものを含む。

【0014】

一態様では、抗 A p o E 抗体は、少なくとも一つの適切な適合性のあるアジュバント又は賦形剤と混合され、A プラーク関連症状に罹患している生存被験体、例えばヒトに、上手にかつ効果的に投与 (付与) される治療用の医薬組成物が得られる。典型的には、これは高純度の水性組成物である。

【0015】

ここで使用される場合、「治療する」又は「治療」なる用語は、A プラーク関連症状の少なくとも一つの症状又は徴候を、予防、減弱、又は改善することを含む。

【0016】

ここで使用される場合、「治療的減弱」なる用語は、そこから得られる有益な正の効果を有するか又は変化を誘導することを含む。

【0017】

A プラーク関連症状の一つの定義は、アミロイド線維と称される規則的に整列した原線維凝集体からなるアミロイドプラークの形成に起因する任意の症状を指す。A プラーク関連症状を有する例示的な疾患には、限定されるものではないが、アルツハイマー病、レビー小体型認知症、及び脳アミロイド血管症が含まれる。

【0018】

例示的な A プラーク関連症状には、障害性認知機能、行動変化 (altered behavior)、情緒調節不全、発作、障害性神経系構造又は機能、アルツハイマー病の発症の危険性の増加が含まれる。障害性認知機能には、限定されるものではないが、記憶、注意、集中、言語、論理的思考、創造性、実行機能、計画性、及び器質化が含まれる。行動変化には、限定されるものではないが、身体的又は言語的攻撃性、衝動性、抑制力の低下、アパシー、惹起の低下、人格変化、アルコール、たばこ又は薬剤の中毒、及び他の嗜好に関連した行動が含まれる。情緒調節不全には、限定されるものではないが、鬱、不安症、躁、易刺激性、及び情緒失調が含まれる。発作には、限定されるものではないが、全身性強直性間代

10

20

30

40

50

性発作、複雑部分発作、及び非てんかん性、心因性発作が含まれる。障害性神経系構造又は機能には、限定されるものではないが、水頭症、パーキンソン病、睡眠障害、精神病、バランスと協調性の障害が含まれる。これには、運動障害、例えば不全単麻痺、不全片麻痺、四肢不全麻痺、運動失調、パリズム、及び振戦が含まれる。また、これには、嗅覚、触覚、味覚、視覚及び聴覚を含む、感覚の消失又は機能不全が含まれる。さらに、これには、自律神経系障害、例えば大腸及び膀胱の機能不全、性機能不全、血圧、及び温度調節不全が含まれる。最後に、これには、視床下部及び脳下垂体の機能不全に起因するホルモン障害、例えば成長ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体ホルモン、濾胞刺激ホルモン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、プロラクチン、及び多くの他のホルモン及びモジュレーターの欠乏及び調節不全が含まれる。アルツハイマー病の発症の危険性の増加は、被験体の年齢、家族の病歴、遺伝状態、及び他の既知の危険因子がある場合の予期される危険性が上昇した危険を含む。

10

【0019】

A ペプチドは、アミロイド前駆体タンパク質 (A P P) と称されるより大きなタンパク質のカルボキシ末端における領域から誘導されるものである。A P P をコードする遺伝子は染色体 21 に位置する。毒性作用を有しているおそれのある多くの形態の A が存在する。A ペプチドは典型的には 38 - 43 のアミノ酸配列長であるが、それらの全体的な大きさを変えるトランスケーション及び修飾がなされている場合がある。それらは、モノマー、オリゴマー及び凝集体の形態で、細胞内又は細胞外的に、可溶性及び不溶性の区画に見出すことができ、他のタンパク質又は分子と複合体化している場合がある。A の副作用又は毒性作用は、上述した形態のいずれか又は全て、並びに特に記載していない他のものに起因している場合がある。

20

【0020】

一実施態様では、本発明は、本発明の脳内のアミロイドプラーク負荷を低下させるための方法を提供する。本方法は、被験体に、A p o E に特異的に結合する治療的有効量の抗体を投与することを含む。適切な抗体には、ここに開示されたものが含まれる。例示的な実施態様では、適切な A b は、以下の表 A に説明した抗体を含む。本発明の方法は、被験体の海馬におけるアミロイドプラーク負荷を低減させる。また本発明の方法は、被験体の大脳皮質におけるアミロイドプラーク負荷を低減させる。上述した実施態様のそれぞれにおいて、アミロイドプラーク負荷は、未治療又は負のコントロール体で治療された被験体と比較して、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は 20 % 低下している。いくつかの実施態様では、アミロイドプラーク負荷は、未治療又は負のコントロール体で治療された被験体と比較して、少なくとも 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、又は 95 % 低下している。他の実施態様では、アミロイドプラーク負荷は、未治療又は負のコントロール体で治療された被験体と比較して、少なくとも 100、125、150、200、250、300、350、400、450 % 低下している。アミロイドプラーク負荷を測定する方法は、当該技術分野で知られている。

30

【0021】

ここで有用な抗 A p o E 抗体は、A の副作用又は毒性作用を治療的に減弱させる全ての抗体を含む。有用な抗体には、限定されるものではないが、A p o E コード化配列内のエピトープに特異的に結合するものが含まれる。ここで有用な抗 A p o E 抗体には、A の副作用又は毒性作用を減弱させ、A p o E の特定の領域及び他の形態の A p o E に結合する抗体が含まれる。A p o E の特定の領域は、限定されるものではないが、C 末端、N 末端、及び他の中心ドメインが含まれる。他の形態の A p o E には、限定されるものではないが、切断、修飾、可溶性、不溶性、細胞内、細胞外、モノマー A p o E、オリゴマー A p o E、原線維、凝集化 A p o E、又は他のタンパク質又は分子と錯化した A p o E が含まれる。

40

【0022】

一態様では、ここで有用な抗体には、単離され、特徴付けされ、精製された抗体が、官

50

能化され、A プラーク関連症状を患っている生存している被験体に投与される、機能的治療用組成物に使用するために回収されるものが含まれる。

【0023】

「モノクローナル抗体」は、任意の真核生物、原核生物、又はファージクローンを含む、単一のコピー又はクローンから誘導される抗体を意味する。「モノクローナル抗体」はハイブリドーマ技術で産生されえる抗体に限定されない。モノクローナル抗体は、例えば、当該技術分野でよく知られているハイブリドーマ技術、ファージディスプレイ技術、合成技術、又はこのような技術の組合せ、及び当該技術分野で直ぐに知られている他の技術を使用し、生成することができる。さらに、モノクローナル抗体は、当該技術分野で知られている方法に従い、検出可能な標識で標識化されてよく、固相に固定されてもよく、及び/又は異種化合物（例えば、酵素又は毒素）とコンジュゲートされてもよい。

10

【0024】

さらに、「抗体」とは、機能的モノクローナル抗体、又は免疫学的に有効なその断片；例えば、F a b、F a b'、又はそのF (a b')₂断片を意味する。ここで本文の一部において、断片は特に強調されて記載されているが、それにもかかわらず、断片が特異的であるかどうかにかかわらず、「抗体」なる用語が、このような断片並びに単鎖形態を含むと理解されるであろう。タンパク質が、意図した標的に特異的に結合する能力を保持している限り、「抗体」なる用語に含まれる。例えば、「抗体」なる定義には、この特異性を有する抗体の単鎖形態、一般的にF vと称される領域が含まれる。好ましくは、必要ではないが、適切な特異性を有する典型的なマウス又は他の非ヒト抗体のマニピュレーションが、それらをヒト化形態に転換させるために必要である場合、この発見に有用な抗体は、組換え的に生成される。抗体は、グリコシル化されていてもされていなくてもよいが、グリコシル化された抗体が好ましい。知られているように、抗体はジスルフィド結合を介して適切に架橋している。

20

【0025】

ここで有用な抗体の基本的な抗体構造単位は、テトラマーを含む。各テトラマーは2の同一のポリペプチド鎖対からなり、各対は1の「軽」（約25 kDa）及び1の「重」鎖（約50 - 70 kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識の主因である約100から110又はそれ以上のアミノ酸配列の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能の主因である定常領域を定める。

30

【0026】

ここで有用な抗ApoE抗体には、単離され、特徴付けされ、精製され、官能化され、それらの調製プロセスから回収される（得られる）もの、よって治療的及び医薬的に十分な量の有用な形態で、ここでの使用に有用なものが含まれる。

【0027】

軽鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ及びラムダに分類分けされている。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、又はイプシロンに分類分けされており、抗体アイソタイプは、それぞれIgO、IgM、IgA、IgF及びIgEと定められている。軽鎖及び重鎖において、可変及び定常領域は、約100以上のアミノ酸配列の「D」領域を含む重鎖と、約12又はそれ以上のアミノ酸配列の「J」領域とが結合している。

40

【0028】

各軽/重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成している。よって、無傷抗体は2の結合部位を有している。鎖は、相補性決定領域と称される（ここでは、以下「CDR」と称される）、3の高頻度可変領域に結合した、相対的に保存されているフレームワーク領域（FR）と同様の一般構造を示す。2の鎖からのCDRは、特異的エピトープに結合可能なフレームワーク領域に整列している。N末端からC末端へ、軽鎖及び重鎖の双方は、それぞれドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4を含む。各ドメインに対するアミノ酸配列の割当ては、既知の協定に従いなされている（Kabat「Sequences of Proteins of Immunological Interest」National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 及び 1991; Chothiaら, J. Mol. Bio. (1987) 196:901-917;

50

Chothiaら, Nature (1989) 342:878-883を参照)。

【0029】

一態様では、モノクローナル抗ApoE抗体は、哺乳動物の抗体生成細胞からハイブリドーマを形成させ、又はそれらを不死化させ、適切な特異性について、それらを評価するために、ハイブリドーマ又は不死化細胞を培養する、哺乳動物を免疫化させる標準的な技術により、適切な特異性を有するように作製される。本例では、このような抗体は、例えば、ApoEタンパク質をコードする配列の領域、又はそれらの適切な小領域を含むエピトープを表すペプチドを用いて、ヒト、ウサギ、ラット又はマウスを免疫化させることにより作製することができる。組換えマニピュレーション用の物質は、ハイブリドーマ、又はそれを生成する他の細胞からの所望の抗体をコードするヌクレオチド配列を回収することにより得ることができる。これらのヌクレオチド配列はマニピュレートされ、単離され、特徴付けされ、精製され、回収され、所望するならば、ここで使用するために、ヒト化形態でそれらを提供することができる。

10

【0030】

ここで使用される場合、「ヒト化抗体」には、非ヒト相補性決定領域(「CDR」)を有する抗体の配列を変えることにより、ヒト抗体生殖系列から誘導される、アミノ酸配列の一部又は全体からなる抗ApoE抗体が含まれる。最も簡単なこのような変化は、単に、マウス定常領域をヒト抗体の定常領域に置き換える、よって、製薬用途において許容可能な、十分低い免疫原性を有するヒト/マウスキメラにすることからなる。しかしながら好ましくは、抗体の可変領域、及びCDRは、当該技術でよく知られている技術により、ヒト化されてもよい。可変領域のフレームワーク領域は、ヒトゲノムから誘導された配列でCDRを置き換える、又は実質的に無傷の非ヒトCDRを残した、対応するヒトフレームワーク領域で置換される。またCDRは、ApoEに対する結合活性及び親和性が、完全なヒト生殖系列フレームワーク領域、又は実質的にヒトであるフレームワーク領域において保持される又は高められるように、ランダムに変異していてもよい。実質的にヒトフレームワーク領域は、公知のヒトフレームワーク配列と、少なくとも90%、95%又は99%の配列同一性を有する。完全に有用なヒト抗体は、その免疫系がヒト免疫系に対応するように変更された、遺伝的に修飾されたマウスにおいて生成される。上述したように、それは、単鎖形態を表す断片を含む、抗体の免疫学的に特異的な断片を使用するため、この発見の方法における使用に十分である。

20

30

【0031】

さらに、ここで使用される場合、「ヒト化抗体」なる用語は、ヒトフレームワーク、非ヒト抗体からの少なくとも一つのCDRを含む抗ApoE抗体を称し、存在する任意の定常領域は、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち少なくとも約85-90%、好ましくは少なくとも95%同一である。よって、可能ならばCDRを除く、ヒト化抗体の全ての部分は、一又は複数の天然ヒト免疫グロブリン配列の対応する対と、実質的に同一である。

【0032】

所望されるならば、ヒト化免疫グロブリンのデザインは以下の通りに実施されうる。アミノ酸配列が以下のカテゴリーに入る場合、使用されるヒト免疫グロブリン(アクセプター)のフレームワークアミノ酸配列は、CDR提供非ヒト免疫グロブリン(ドナー免疫グロブリン)からのフレームワークアミノ酸配列により置き換えられ：(a)アクセプター免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域におけるアミノ酸配列は、その位置でヒト免疫グロブリンとは異なるが、ドナー免疫グロブリンにおける対応するアミノ酸は、その位置でヒト免疫グロブリンに対して典型的であり；(b)アミノ酸配列の位置は、CDRの一つに近接しており；又は(c)フレームワークアミノ酸配列の任意の側鎖原子は、3次元免疫グロブリンモデルのCDRアミノ酸配列の任意の原子の約5-6オングストローム(中心間)内にある(Queenら, op. cit., 及びCoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2869)。アクセプター免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域におけるアミノ酸配列、及びドナー免疫グロブリンにおける対応するアミノ酸配列のそれぞれが、その位置

40

50

でヒト免疫グロブリンとは異なる場合、このようなアミノ酸配列は、その位置でヒト免疫グロブリンに対して典型的なアミノ酸配列に置き換えられる。

【0033】

全ての例において、本発明の抗体はA p o Eに特異的に結合する。例示的实施態様では、本発明の抗体はヒトA p o Eに特異的に結合する。ここで「特異的に結合」なる表現は、少なくとも $10^{-4} - 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ の範囲、好ましくは $10^{-7} - 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ の範囲の結合定数で、タンパク質に結合している抗体を意味する。多様な種のA p o Eの配列は当該技術で公知であり、抗体がA p o Eに結合するかどうかを測定する方法は、当該技術で公知である。例えば、実施例を参照。本発明の抗体は、A p o E 2、A p o E 3、A p o E 4、又はその対立遺伝子変異体を認識する。一実施態様では、本発明の抗体はヒトA p o E 4を認識する。

10

【0034】

好ましい抗体は、ハイブリドーマ命名でH J 6 . 1 (A T C C 特許寄託符号P T - 1 1 8 0 5)、H J 6 . 2 (A T C C 特許寄託符号P T - 1 1 8 0 6)、H J 6 . 3 (A T C C 特許寄託符号P T - 1 1 8 0 7)、又はH J 6 . 4 (A T C C 特許寄託符号P T - 1 1 8 0 8) から誘導されたマウス抗体のヒト化形態である。ここで使用される場合、「から誘導された」なる用語は、「誘導された」抗体が、H J 6 . 1、H J 6 . 2、H J 6 . 3、又はH J 6 . 4 により生成された抗体から少なくとも一つのC D R領域を含むことを意味する。換言すれば、「誘導された抗体」は、配列番号：17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、及び39からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、少なくとも一つのC D R領域を含む。

20

【0035】

一実施態様では、本発明の抗体は、ハイブリドーマH J 6 . 1 から誘導されてよく、配列番号：1の軽鎖可変領域と、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有する核酸配列によりコードされてよく、又は配列番号：2の重鎖可変領域と、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有する核酸配列によりコードされてよい。他の実施態様では、本発明の抗体は、配列番号：3の軽鎖可変領域と、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてよく、又は配列番号：4の重鎖可変領域と、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてよい。上述した実施態様のそれぞれにおいて、抗体はヒト化されていてよい。

30

【0036】

さらなる他の実施態様では、本発明の抗体は、ハイブリドーマH J 6 . 2 から誘導されてよく、配列番号：5の軽鎖可変領域と、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有する核酸配列によりコードされてよく、又は配列番号：6の重鎖可変領域と、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有する核酸配列によりコードされてよい。他の実施態様では、本発明の抗体は、配列番号：7の軽鎖可変領域と、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてよく、又は配列番号：8の重鎖可変領域と、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてよい。上述した実施態様のそれぞれにおいて、抗体はヒト化されていてよい。

40

【0037】

付加的な実施態様では、本発明の抗体は、ハイブリドーマH J 6 . 3 から誘導されてよく、配列番号：9の軽鎖可変領域と、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有する核酸配列によりコードされてよく、又は配列番号：10の重鎖可変領域と、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有する核酸配列によりコードされてよい。他の実施態様では、本発明の

50

抗体は、配列番号：１１の軽鎖可変領域と、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、又は９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてよく、又は配列番号：１２の重鎖可変領域と、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、又は９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてよい。上述した実施態様のそれぞれにおいて、抗体はヒト化されていてよい。

【００３８】

さらなる他の実施態様では、本発明の抗体は、ハイブリドーマＨＪ６．４から誘導されてよく、配列番号：１３の軽鎖可変領域と、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、又は９９％の同一性を有する核酸配列、又は配列番号：１４の重鎖可変領域と、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、又は９９％の同一性を有する核酸配列を有していてよい。他の実施態様では、本発明の抗体は、ハイブリドーマＨＪ６．４から誘導されてよく、配列番号：１５の軽鎖可変領域と、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、又は９９％の同一性を有するアミノ酸配列、又は配列番号：１６の重鎖可変領域と、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、又は９９％の同一性を有するアミノ酸配列を有していてよい。上述した実施態様のそれぞれにおいて、抗体はヒト化されていてよい。

【００３９】

抗ＡｐｏＥに結合する本発明の抗体の例示的实施態様では、抗体は、配列番号：１の軽鎖核酸配列、及び配列番号：２の重鎖核酸配列を含む〔すなわち、ＨＪ６．１とここで称されるモノクローナル抗体〕。抗ＡｐｏＥに結合する本発明の抗体の他の例示的实施態様では、抗体は、配列番号：３の軽鎖アミノ酸配列、及び配列番号：４の重鎖アミノ酸配列を含む〔すなわち、ＨＪ６．１とここで称されるモノクローナル抗体〕。抗ＡｐｏＥに結合する本発明の抗体のさらなる他の例示的实施態様では、抗体は、配列番号：５の軽鎖核酸配列、及び配列番号：６の重鎖核酸配列を含む〔すなわち、ＨＪ６．２とここで称されるモノクローナル抗体〕。抗ＡｐｏＥに結合する本発明の抗体のさらなる他の例示的实施態様では、抗体は、配列番号：７の軽鎖アミノ酸配列、及び配列番号：８の重鎖アミノ酸配列を含む〔すなわち、ＨＪ６．２とここで称されるモノクローナル抗体〕。

【００４０】

ある実施態様では、本発明の抗体は、配列番号：９の軽鎖核酸配列、及び配列番号：１０の重鎖核酸配列によりコードされる〔すなわち、ＨＪ６．３とここで称されるモノクローナル抗体〕。他の実施態様では、本発明の抗体は、配列番号：１１の軽鎖アミノ酸配列、及び配列番号：１２の重鎖アミノ酸配列によりコードされる〔すなわち、ＨＪ６．３とここで称されるモノクローナル抗体〕。他の実施態様では、本発明の抗体は、配列番号：１３の軽鎖核酸配列、及び配列番号：１４の重鎖核酸配列によりコードされる〔すなわち、ＨＪ６．４とここで称されるモノクローナル抗体〕。さらなる他の実施態様では、本発明の抗体は、配列番号：１５の軽鎖アミノ酸配列、及び配列番号：１６の重鎖アミノ酸配列によりコードされる〔すなわち、ＨＪ６．４とここで称されるモノクローナル抗体〕。

【００４１】

一実施態様では、本発明の抗体は、軽鎖ＣＤＲ１、例えば表Ａの抗体１、４９、９７、及び１４５を含んでよい。他の実施態様では、本発明の抗体は、軽鎖ＣＤＲ２、例えば表Ａの抗体４、５２、１００、及び１４８を含んでよい。さらなる他の実施態様では、本発明の抗体は、軽鎖ＣＤＲ３、例えば表Ａの抗体６、５４、１０２、及び１５０を含んでよい。別の実施態様では、本発明の抗体は、２又は３の軽鎖ＣＤＲ、例えば表Ａの抗体２、３、５、５０、５１、５３、９８、９９、１０１、１４６、１４７、及び１４９の組合せを含んでよい。

【００４２】

同様に、一実施態様では、本発明の抗体は、重鎖ＣＤＲ１、例えば表Ａの抗体７、５５、１０３、及び１５１を含んでよい。他の実施態様では、本発明の抗体は、重鎖ＣＤＲ２、例えば表Ａの抗体１０、５８、１０６、及び１５４を含んでよい。さらなる他の実施態様では、本発明の抗体は、重鎖ＣＤＲ３、例えば表Ａの抗体１２、６０、１０８、及び１

5 6 を含んでよい。別の実施態様では、本発明の抗体は、2 又は 3 の重鎖 C D R、例えば表 A の抗体 8、9、1 1、5 6、5 7、5 9、1 0 4、1 0 5、1 0 7、1 5 2、1 5 3、及び 1 5 5 の組合せを含んでよい。

【 0 0 4 3 】

また、本発明の抗体は、一又は複数の軽鎖 C D R、及び一又は複数の重鎖 C D R、例えば、表 A の抗体 1 3 - 4 8、6 1 - 9 6、1 0 9 - 1 4 4、及び 1 5 7 - 1 9 2 を含んでよい。

【 0 0 4 4 】

表 A

抗体	軽鎖			重鎖		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
1	配列番号:17					
2	配列番号:17	配列番号:18				
3	配列番号:17	配列番号:18	LSP			
4		配列番号:18				
5		配列番号:18	LSP			
6			LSP			
7				配列番号:19		
8				配列番号:19	配列番号:20	
9				配列番号:19	配列番号:20	配列番号:21
10					配列番号:20	
11					配列番号:20	配列番号:21
12						配列番号:21
13	配列番号:17			配列番号:19		
14	配列番号:17			配列番号:19	配列番号:20	
15	配列番号:17			配列番号:19	配列番号:20	配列番号:21
16	配列番号:17				配列番号:20	
17	配列番号:17				配列番号:20	配列番号:21
18	配列番号:17					配列番号:21
19	配列番号:17	配列番号:18		配列番号:19		
20	配列番号:17	配列番号:18		配列番号:19	配列番号:20	
21	配列番号:17	配列番号:18		配列番号:19	配列番号:20	配列番号:21
22	配列番号:17	配列番号:18			配列番号:20	
23	配列番号:17	配列番号:18			配列番号:20	配列番号:21
24	配列番号:17	配列番号:18				配列番号:21
25	配列番号:17	配列番号:18	LSP	配列番号:19		
26	配列番号:17	配列番号:18	LSP	配列番号:19	配列番号:20	
27	配列番号:17	配列番号:18	LSP	配列番号:19	配列番号:20	配列番号:21
28	配列番号:17	配列番号:18	LSP		配列番号:20	
29	配列番号:17	配列番号:18	LSP		配列番号:20	配列番号:21
30	配列番号:17	配列番号:18	LSP			配列番号:21

10

20

30

40

31		配列番号:18		配列番号:19		
32		配列番号:18		配列番号:19	配列番号:20	
33		配列番号:18		配列番号:19	配列番号:20	配列番号:21
34		配列番号:18			配列番号:20	
35		配列番号:18			配列番号:20	配列番号:21
36		配列番号:18				配列番号:21
37		配列番号:18	LSP	配列番号:19		
38		配列番号:18	LSP	配列番号:19	配列番号:20	
39		配列番号:18	LSP	配列番号:19	配列番号:20	配列番号:21
40		配列番号:18	LSP		配列番号:20	
41		配列番号:18	LSP		配列番号:20	配列番号:21
42		配列番号:18	LSP			配列番号:21
43			LSP	配列番号:19		
44			LSP	配列番号:19	配列番号:20	
45			LSP	配列番号:19	配列番号:20	配列番号:21
46			LSP		配列番号:20	
47			LSP		配列番号:20	配列番号:21
48			LSP			配列番号:21
49	配列番号:22					
50	配列番号:22	配列番号:23				
51	配列番号:22	配列番号:23	配列番号:24			
52		配列番号:23				
53		配列番号:23	配列番号:24			
54			配列番号:24			
55				配列番号:25		
56				配列番号:25	配列番号:26	
57				配列番号:25	配列番号:26	配列番号:27
58					配列番号:26	
59					配列番号:26	配列番号:27
60						配列番号:27
61	配列番号:22			配列番号:25		
62	配列番号:22			配列番号:25	配列番号:26	
63	配列番号:22			配列番号:25	配列番号:26	配列番号:27
64	配列番号:22				配列番号:26	

10

20

30

40

65	配列番号:22				配列番号:26	配列番号:27
66	配列番号:22					配列番号:27
67	配列番号:22	配列番号:23		配列番号:25		
68	配列番号:22	配列番号:23		配列番号:25	配列番号:26	
69	配列番号:22	配列番号:23		配列番号:25	配列番号:26	配列番号:27
70	配列番号:22	配列番号:23			配列番号:26	
71	配列番号:22	配列番号:23			配列番号:26	配列番号:27
72	配列番号:22	配列番号:23				配列番号:27
73	配列番号:22	配列番号:23	配列番号:24	配列番号:25		
74	配列番号:22	配列番号:23	配列番号:24	配列番号:25	配列番号:26	
75	配列番号:22	配列番号:23	配列番号:24	配列番号:25	配列番号:26	配列番号:27
76	配列番号:22	配列番号:23	配列番号:24		配列番号:26	
77	配列番号:22	配列番号:23	配列番号:24		配列番号:26	配列番号:27
78	配列番号:22	配列番号:23	配列番号:24			配列番号:27
79		配列番号:23		配列番号:25		
80		配列番号:23		配列番号:25	配列番号:26	
81		配列番号:23		配列番号:25	配列番号:26	配列番号:27
82		配列番号:23			配列番号:26	
83		配列番号:23			配列番号:26	配列番号:27
84		配列番号:23				配列番号:27
85		配列番号:23	配列番号:24	配列番号:25		
86		配列番号:23	配列番号:24	配列番号:25	配列番号:26	
87		配列番号:23	配列番号:24	配列番号:25	配列番号:26	配列番号:27
88		配列番号:23	配列番号:24		配列番号:26	
89		配列番号:23	配列番号:24		配列番号:26	配列番号:27
90		配列番号:23	配列番号:24			配列番号:27
91			配列番号:24	配列番号:25		
92			配列番号:24	配列番号:25	配列番号:26	
93			配列番号:24	配列番号:25	配列番号:26	配列番号:27
94			配列番号:24		配列番号:26	
95			配列番号:24		配列番号:26	配列番号:27
96			配列番号:24			配列番号:27
97	配列番号:28					
98	配列番号:28	配列番号:29				

10

20

30

40

99	配列番号:28	配列番号:29	配列番号:30			
100		配列番号:29				
101		配列番号:29	配列番号:30			
102			配列番号:30			
103				配列番号:31		
104				配列番号:31	配列番号:32	
105				配列番号:31	配列番号:32	配列番号:33
106					配列番号:32	
107					配列番号:32	配列番号:33
108						配列番号:33
109	配列番号:28			配列番号:31		
110	配列番号:28			配列番号:31	配列番号:32	
111	配列番号:28			配列番号:31	配列番号:32	配列番号:33
112	配列番号:28				配列番号:32	
113	配列番号:28				配列番号:32	配列番号:33
114	配列番号:28					配列番号:33
115	配列番号:28	配列番号:29		配列番号:31		
116	配列番号:28	配列番号:29		配列番号:31	配列番号:32	
117	配列番号:28	配列番号:29		配列番号:31	配列番号:32	配列番号:33
118	配列番号:28	配列番号:29			配列番号:32	
119	配列番号:28	配列番号:29			配列番号:32	配列番号:33
120	配列番号:28	配列番号:29				配列番号:33
121	配列番号:28	配列番号:29	配列番号:30	配列番号:31		
122	配列番号:28	配列番号:29	配列番号:30	配列番号:31	配列番号:32	
123	配列番号:28	配列番号:29	配列番号:30	配列番号:31	配列番号:32	配列番号:33
124	配列番号:28	配列番号:29	配列番号:30		配列番号:32	
125	配列番号:28	配列番号:29	配列番号:30		配列番号:32	配列番号:33
126	配列番号:28	配列番号:29	配列番号:30			配列番号:33
127		配列番号:29		配列番号:31		
128		配列番号:29		配列番号:31	配列番号:32	
129		配列番号:29		配列番号:31	配列番号:32	配列番号:33
130		配列番号:29			配列番号:32	
131		配列番号:29			配列番号:32	配列番号:33
132		配列番号:29				配列番号:33

10

20

30

40

133		配列番号:29	配列番号:30	配列番号:31		
134		配列番号:29	配列番号:30	配列番号:31	配列番号:32	
135		配列番号:29	配列番号:30	配列番号:31	配列番号:32	配列番号:33
136		配列番号:29	配列番号:30		配列番号:32	
137		配列番号:29	配列番号:30		配列番号:32	配列番号:33
138		配列番号:29	配列番号:30			配列番号:33
139			配列番号:30	配列番号:31		
140			配列番号:30	配列番号:31	配列番号:32	
141			配列番号:30	配列番号:31	配列番号:32	配列番号:33
142			配列番号:30		配列番号:32	
143			配列番号:30		配列番号:32	配列番号:33
144			配列番号:30			配列番号:33
145	配列番号:34					
146	配列番号:34	配列番号:35				
147	配列番号:34	配列番号:35	配列番号:36			
148		配列番号:35				
149		配列番号:35	配列番号:36			
150			配列番号:36			
151				配列番号:37		
152				配列番号:37	配列番号:38	
153				配列番号:37	配列番号:38	配列番号:39
154					配列番号:38	
155					配列番号:38	配列番号:39
156						配列番号:39
157	配列番号:34			配列番号:37		
158	配列番号:34			配列番号:37	配列番号:38	
159	配列番号:34			配列番号:37	配列番号:38	配列番号:39
160	配列番号:34				配列番号:38	
161	配列番号:34				配列番号:38	配列番号:39
162	配列番号:34					配列番号:39
163	配列番号:34	配列番号:35		配列番号:37		
164	配列番号:34	配列番号:35		配列番号:37	配列番号:38	
165	配列番号:34	配列番号:35		配列番号:37	配列番号:38	配列番号:39
166	配列番号:34	配列番号:35			配列番号:38	

10

20

30

40

167	配列番号:34	配列番号:35			配列番号:38	配列番号:39
168	配列番号:34	配列番号:35				配列番号:39
169	配列番号:34	配列番号:35	配列番号:36	配列番号:37		
170	配列番号:34	配列番号:35	配列番号:36	配列番号:37	配列番号:38	
171	配列番号:34	配列番号:35	配列番号:36	配列番号:37	配列番号:38	配列番号:39
172	配列番号:34	配列番号:35	配列番号:36		配列番号:38	
173	配列番号:34	配列番号:35	配列番号:36		配列番号:38	配列番号:39
174	配列番号:34	配列番号:35	配列番号:36			配列番号:39
175		配列番号:35		配列番号:37		
176		配列番号:35		配列番号:37	配列番号:38	
177		配列番号:35		配列番号:37	配列番号:38	配列番号:39
178		配列番号:35			配列番号:38	
179		配列番号:35			配列番号:38	配列番号:39
180		配列番号:35				配列番号:39
181		配列番号:35	配列番号:36	配列番号:37		
182		配列番号:35	配列番号:36	配列番号:37	配列番号:38	
183		配列番号:35	配列番号:36	配列番号:37	配列番号:38	配列番号:39
184		配列番号:35	配列番号:36		配列番号:38	
185		配列番号:35	配列番号:36		配列番号:38	配列番号:39
186		配列番号:35	配列番号:36			配列番号:39
187			配列番号:36	配列番号:37		
188			配列番号:36	配列番号:37	配列番号:38	
189			配列番号:36	配列番号:37	配列番号:38	配列番号:39
190			配列番号:36		配列番号:38	
191			配列番号:36		配列番号:38	配列番号:39
192			配列番号:36			配列番号:39

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

種々の実施態様では、本発明の抗体はヒト化されている。例えば、一実施態様では、本発明のヒト化抗体は、0から2のアミノ酸置換を伴う配列番号：17のアミノ酸配列のCDR1、0から2のアミノ酸置換を伴う配列番号：18のアミノ酸配列のCDR2、及びアミノ酸配列LSPのCDR3を含む軽鎖可変領域を有していてもよく、又は0から2のアミノ酸置換を伴う配列番号：19のアミノ酸配列のCDR1、0から2のアミノ酸置換を伴う配列番号：20のアミノ酸配列のCDR2、及び0から2のアミノ酸置換を伴う配列番号：21のアミノ酸配列のCDR3を含む重鎖可変領域を有していてもよい。好ましい実施態様では、本発明のヒト化抗体は、0から2のアミノ酸置換を伴う配列番号：17のアミノ酸配列のCDR1、0から2のアミノ酸置換を伴う配列番号：18のアミノ酸配列のCDR2、アミノ酸配列LSPのCDR3を含む軽鎖可変領域、0から2のアミノ酸置換を伴う配列番号：19のアミノ酸配列のCDR1、0から2のアミノ酸置換を伴う配列番号：20のアミノ酸配列のCDR2、及び0から2のアミノ酸置換を伴う配列番号：21のアミノ酸配列のCDR3を含む重鎖可変領域を有していてもよい。例示的な実施態様では、本発明のヒト化抗体は、配列番号：17のアミノ酸配列のCDR1、配列番号：18のアミノ酸配列のCDR2、アミノ酸配列LSPのCDR3を含む軽鎖可変領域、配列番号：19のアミノ酸配列のCDR1、配列番号：20のアミノ酸配列のCDR2、及

び配列番号：２１のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を有していてもよい。また本発明は、当業者により容易に決定可能で、ベクター又は他の大きなＤＮＡ分子、例えば染色体に導入されて、本発明の抗体を発現する配列番号：１７、１８、１９、２０、及び２１の対応する核酸配列も含む。

【００４６】

他の実施態様では、本発明のヒト化抗体は、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２２のアミノ酸配列のＣＤＲ１、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２３のアミノ酸配列のＣＤＲ２、及び０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２４のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を有していてもよく、又は０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２５のアミノ酸配列のＣＤＲ１、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２６
１０のアミノ酸配列のＣＤＲ２、及び０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２７のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を有していてもよい。好ましい実施態様では、本発明のヒト化抗体は、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２２のアミノ酸配列のＣＤＲ１、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２３のアミノ酸配列のＣＤＲ２、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２４のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域、及び０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２５のアミノ酸配列のＣＤＲ１、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２６のアミノ酸配列のＣＤＲ２、及び０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２７のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を有していてもよい。例示的な実施態様では、本発明のヒト化抗体は、配列番号：２２のアミノ酸配列のＣＤＲ１、配列番号：２３のアミノ酸配列のＣＤＲ２、配列番号：２４のアミノ酸配列
２０のＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域、配列番号：２５のアミノ酸配列のＣＤＲ１、配列番号：２６のアミノ酸配列のＣＤＲ２、及び配列番号：２７のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を有していてもよい。また本発明は、当業者により容易に決定可能で、ベクター又は他の大きなＤＮＡ分子、例えば染色体に導入されて、本発明の抗体を発現する、配列番号：２２、２３、２４、２５、２６、及び２７の対応する核酸配列も含む。

【００４７】

さらなる他の実施態様では、本発明のヒト化抗体は、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２８のアミノ酸配列のＣＤＲ１、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２９
３０のアミノ酸配列のＣＤＲ２、及び０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：３０のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を有していてもよく、又は０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：３１のアミノ酸配列のＣＤＲ１、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：３２のアミノ酸配列のＣＤＲ２、及び０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：３３のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を有していてもよい。好ましい実施態様では、本発明のヒト化抗体は、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２８のアミノ酸配列のＣＤＲ１、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：２９のアミノ酸配列のＣＤＲ２、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：３０のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域、及び０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：３１のアミノ酸配列のＣＤＲ１、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：３２のアミノ酸配列のＣＤＲ２、及び０から２
４０のアミノ酸置換を伴う配列番号：３３のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を有していてもよい。例示的な実施態様では、本発明のヒト化抗体は、配列番号：２８のアミノ酸配列のＣＤＲ１、配列番号：２９のアミノ酸配列のＣＤＲ２、配列番号：３０のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域、配列番号：３１のアミノ酸配列のＣＤＲ１、配列番号：３２のアミノ酸配列のＣＤＲ２、及び配列番号：３３のアミノ酸配列のＣＤＲ３を含む重鎖可変領域を有していてもよい。また本発明は、当業者により容易に決定可能で、ベクター又は他の大きなＤＮＡ分子、例えば染色体に導入されて、本発明の抗体を発現する、配列番号：２８、２９、３０、３１、３２、及び３３の対応する核酸配列も含む。

【００４８】

さらなる他の実施態様では、本発明のヒト化抗体は、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：３４のアミノ酸配列のＣＤＲ１、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：３５
５０のアミノ酸配列のＣＤＲ２、０から２のアミノ酸置換を伴う配列番号：３０のアミノ酸配

列の C D R 3 を含む軽鎖可変領域を有していてもよく、又は 0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：37 のアミノ酸配列の C D R 1、0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：38 のアミノ酸配列の C D R 2、及び 0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：39 のアミノ酸配列の C D R 3 を含む重鎖可変領域を有していてもよい。好ましい実施態様では、本発明のヒト化抗体は、0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：34 のアミノ酸配列の C D R 1、0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：35 のアミノ酸配列の C D R 2、0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：36 のアミノ酸配列の C D R 3 を含む軽鎖可変領域、0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：37 のアミノ酸配列の C D R 1、0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：38 のアミノ酸配列の C D R 2、及び 0 から 2 のアミノ酸置換を伴う配列番号：39 のアミノ酸配列の C D R 3 を含む重鎖可変領域を有していてもよい。例示的な実施態様では、本発明のヒト化抗体は、配列番号：34 のアミノ酸配列の C D R 1、配列番号：35 のアミノ酸配列の C D R 2、配列番号：36 のアミノ酸配列の C D R 3 を含む軽鎖可変領域、配列番号：37 のアミノ酸配列の C D R 1、配列番号：38 のアミノ酸配列の C D R 2、及び配列番号：39 のアミノ酸配列の C D R 3 を含む重鎖可変領域を有していてもよい。また本発明は、当業者により容易に決定可能で、ベクター又は他の大きな D N A 分子、例えば染色体に導入されて、本発明の抗体を発現する、配列番号：34、35、36、37、38、及び 39 の対応する核酸配列も含む。

10

【0049】

一態様では、免疫学的に反応性のある断片を含む、好ましくは製薬グレードの製薬的有効量の抗体が、A プラーク関連症状を治療するために、生存している被験体等の被験体に投与される。投与は、好ましくは標準的な効果的技術を使用して実施され、中枢神経系への局所的又は末梢的（すなわち、中枢神経系への投与によらない）なものを含む。末梢的投与には、限定されるものではないが、静脈内、腹腔内、皮下、肺、経皮、筋肉内、経鼻、口腔、舌下、又は坐薬的投与が含まれる。中枢神経系（C N S）への直接的なものを含む局所投与には、限定されるものではないが、腰部、脳室内、又は実質内カテーテルを介して、又は外科的に移植された徐放製剤の使用が含まれる。

20

【0050】

有効投与のための製薬用組成物は、選択された投与方式に適したように意図的に設計されており、製薬的に許容可能な賦形剤、例えば適合性のある分散剤、バッファー、界面活性剤、防腐剤、可溶化剤、等張剤、安定剤等が、適切に使用される。その全体が参照としてここに導入される、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa., 16Ed ISBN: 0-912734-04-3, 最新版により、一般的に実施が知られているような、製剤化技術の概要が提供される。それは、この発見に有用な抗体の可溶性を変えるために特に有用であり、例えば、それらをリボソームにカプセル化させ、極性基をブロックすることにより、さらに親油性にされる。

30

【0051】

静脈内又は腹腔内又は皮下注射による効果的な末梢系送達は、生存している被験体への好ましい投与方法である。このような注射に適したビヒクルは容易である。しかしながら、さらに、投与は鼻用エアゾール又は坐薬の手段で、粘膜を介してもたらされてもよい。このような投与方式に適した製剤はよく知られており、典型的には、経膜移動を容易にする界面活性剤を含む。このような界面活性剤は多くの場合ステロイド類から誘導され、カチオン性脂質、例えば N-[1-(2,3-ジオレオイル)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(D O T M A)、又は種々の化合物、例えばコレステロールヘミスクシナート、ホスファチジルグリセロール等である。

40

【0052】

投与される製剤におけるヒト化抗体の濃度は有効な量であり、少なくとも約 0.1 重量%、多くて約 15 又は約 20 重量%の範囲であり、所望するならば、選択された特定の投与方式に従い、流体の容量、粘度等に基づき、主として選択される。生存している被験体への注射用の典型的な組成物は、リン酸緩衝食塩水の滅菌緩衝水を 1 m L、及び本発見のヒト化抗体の任意の一つ又は組合せを約 1 - 1000 m g 含有するように作製することがで

50

きる。製剤は、処方後、又は微生物学的に許容可能なように、滅菌濾過されることができる。静脈内注入用の典型的な組成物は、1 - 250 mL の流体、例えば滅菌リンガー液の容量で、mL 当たり 1 - 100 mg 又はそれ以上の抗 A p o E 抗体濃度とすることができる。本発見の治療剤は、保管用に凍結又は凍結乾燥させ、使用前に適切な滅菌担体において再構成させることができる。凍結乾燥及び再構成は、種々の程度の抗体活性損失に至る可能性がある（例えば、従来の免疫グロブリンを用いると、I g M は、I g G 抗体よりも大きな活性損失を有する傾向にある）。投与される用量は有効な用量であり、補償するように調節されなくてはならない。一般的に、製薬グレード品質の製剤の pH は、投与された被験体の痛みを和らげ、抗体の安定性（化学的及び物理的）が釣り合うように選択されるであろう。一般的に、pH 4 ~ 8 が許容される。用量は、成功裏に投与を受容する個人の、サイズ、体重、及び他の生理学的特徴に基づき、ヒトによって変わるであろう。

10

【0053】

ここで使用される場合、「有効量」なる用語は、物質が投与される被験体に対して、測定可能な有益な効果に至らしめる、すなわち有意な有効性のある化合物等の物質の量を意味する。この発見に従い投与される化合物の有効量又は用量は、投与される化合物、投与経路、治療される症状の状態、同様の被験体、及び他の考慮事項のなかでも、投与状況の考慮事項を含む、本ケースを囲む状況により決定されるであろう。一態様では、典型的な用量は、ここで記載の抗 A p o E 抗体を約 10 mg / kg ~ 約 100 mg / kg 含む。用量は、約 0.05 mg / kg ~ 約 50 mg / kg、好ましくは約 0.1 mg / kg ~ 約 25 mg / kg の範囲とすることができる。投与頻度は、症状を効果的に治療するのに必要ならば、毎日、又は週毎もしくは月毎に 1、2、3 回又はそれ以上である。

20

【0054】

疾患それ自体に対する治療の投与のタイミング及び治療時間は、本ケースを囲む状況により決定されるであろう。緊急医療従事者により投与される場合、治療は、例えば損傷の部位にて、直ちに始められる。治療は、病因又は診療所で、もしくは病院を退院した後、又は外来クリニックで診察された後に始めることもできる。治療時間は、1 回基本で投与された単一用量から、治療的治療の生涯コースの範囲とすることができる。

【0055】

先の方法は、適切に適応させることにより、ヒト化抗体等のタンパク質の投与に対して、最も簡便で最も適切で効果的であると思われるが、投与のための他の効果的な技術、他の脳室内投与、経皮投与及び経口投与も、提供された適切な製剤をここで利用するために使用することができる。

30

【0056】

さらに、生物分解性フィルム又はマトリックス、又は浸透圧ミニポンプ、又はデキストランビーズ、アルギナート、又はコラーゲンをベースにした送達システムを使用して、徐放性製剤を使用することが望ましい。

【0057】

典型的な用量レベルは、標準的な臨床技術を使用して決定及び最適化され、投与方式に依存するであろう。

【0058】

次の実施例は、本発明の好ましい実施態様を証明するために含まれる。当業者には、以下の実施例に開示される技術が、本発明の実施においてよく機能すると本発明者により見出された技術を表していることが理解されなければならない。しかしながら、当業者であれば、本開示に鑑み、開示された特定の実施態様において多くの変更をなすことができ、本発明の精神及び範囲を逸脱しないで同様の結果が得られ、よって付随する実施例及び図に説明された又は示された全ての事項は、例証のためであり、限定する意味ではないと理解すべきである。

40

【実施例】

【0059】

以下の実施例は、本発明の種々の反復を例証するものである。

50

【0060】

A p o E タンパク質に特異的な抗体を、以下の実施例 1 及び 2 に記載されるように、ハイブリドーマ技術を使用して産生した。特に、4 のハイブリドーマを産生し、A p o E 抗体をハイブリドーマから得た。ハイブリドーマ H J 6 . 1、H J 6 . 2、H J 6 . 3 及び H J 6 . 4 には、それぞれ A T C C 特許寄託符号 P T - 1 1 8 0 5、P T - 1 1 8 0 6、P T - 1 1 8 0 7、及び P T - 1 1 8 0 8 が割り当てられた。

【0061】

実施例 1：ハイブリドーマの調製

最初に、生理食塩水に $100\mu\text{l}$ の抗原ペプチド (A p o E、 $1\text{mg}/\text{ml}$) が入ったものを、同量のフロイント完全アジュバントと混合し、乳化させ、マウス (B a l b / c、6 週齢) の背中に接種した。2 週間後、フロイント不完全アジュバントと抗原ペプチド (A p o E、 $1\text{mg}/\text{ml}$) の生理食塩水 $50\mu\text{l}$ の混合物を、超音波処理で乳化させたものにてマウスを再免疫化し、その後、追加免疫を週毎に実施した。免疫化の 40 日後、脾臓を取り出し、P R M 1 6 4 0 培地 (ペニシリンとストレプトマイシンを補填) にリンパ球を収集し、 0.17M の塩化アンモニウムで処理し、赤血球を除去した。単離されたリンパ球を、ポリエチレングリコール法 (P E G 4 0 0 0) により、マウス骨髄腫瘍から誘導された骨髄腫細胞 P 3 U 1 株と融合させ、ハイブリドーマ細胞を得た。このようにして得られたハイブリドーマ細胞を、フィーダー細胞を有する H A T 培地に懸濁させ、ついで、96 ウェルプレートに分配させ、15 日間培養した。

【0062】

実施例 2：モノクローナル抗体のスクリーニング

培養培地上清を、実施例 1 で得られたハイブリドーマ細胞が培養されたウェルから回収し、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) 法により、抗原ペプチドと反応するモノクローナル抗体を選択した。

【0063】

最初に、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗原ペプチド $100\mu\text{l}$ を、96 ウェルプレートの各ウェルに添加し、4 で一晩保持した後、固相に固定化し、37 で一晩、10% の仔ウシ血清 $200\mu\text{l}$ でブロックした。ついで、ハイブリドーマ細胞の培養培地上清 $100\mu\text{l}$ を各ウェルに添加し、37 で 2 時間反応させ、ついで、100 に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) - コンジュゲート抗マウス抗体を添加し、37 で 1 時間反応させた。基質として、テトラメチルベンジジンマイクロウェルペルオキシダーゼ基質 (T M B) を使用し、発色させた。

【0064】

4N の硫酸 $100\mu\text{L}$ を添加することにより反応を終結させた後、 $450\sim 540\text{nm}$ の吸光度を測定し、約 3 の吸光度を示すモノクローナル抗体を選択肢、限界希釈法でクローン化した。

【0065】

7 日目、及び 3 日前に、腹腔内的に 0.5ml のプリスティンが注射されたマウス (B a l b / c) を、選択されたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を用いて、腹腔内的に接種し、腹水を約 10 日後に収集した。収集した腹水を室温で 30 分、4 で一晩保持し、 $15000\times\text{rpm}$ で 10 分間、遠心分離にかけ、ついで、上清を回収した。

【0066】

選択されたモノクローナル抗体の力価を E L I S A 法で測定した。A p o E をマイクロウェルプレートに固定化し、モノクローナル抗体を添加し、反応後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) - コンジュゲート抗マウス抗体と T M B を使用して発色させた。結果には、選択されたモノクローナル抗体が濃度依存方式で反応したことが示された。

【0067】

実施例 3：抗 A p o E 抗体がプラーク負荷の低減を生じる

アルツハイマー病被験体において観察されたのと同様の年齢関連性アミロイドプラーク形成を示す P S / A P P マウスを、アルツハイマー病のマウスモデルとして使用した。P

10

20

30

40

50

S / A P P マウスを、抗 A 抗体 (H J 3 . 4)、又は 1 又は 2 の抗 A p o E 抗体 (H J 6 . 2 又は H J 6 . 3) のいずれかを使用し、10 mg / k g にて、1 週間に 1 回、腹腔内に治療した。他のグループを、コントロール体として、P B S で治療した。治療は 3 - 7 月齢であった。海馬 (図 1) 及び皮質 (図 2) の双方において示されるように、A プラク負荷の低減に関連して、抗 A p o E 抗体の強い効果が存在した。

【 0 0 6 8 】

実施例 4 : ヒト A p o E への抗 A p o E 抗体の結合性

E L I S A サンドイッチアッセイを使用し、ヒト A p o E に対する、抗 a p o E H J 6 . 1、H J 6 . 2、H J 6 . 3、及び H J 6 . 4 抗体の結合性を測定した。ヒト a p o E に結合するモノクローナル抗体 W U E 4 を、まず、E L I S A プレートにおいてコーティングした。ついで、異なる濃度のヒト a p o E を適用した。ビオチン化抗 a p o E 抗体 H J 6 . 1、H J 6 . 2、H J 6 . 3、及び H J 6 . 4 を最後に適用し、光学密度 (O D) をプレートリーダーにて読み取った (図 3)。

10

【 0 0 6 9 】

これらの結果は、抗 a p o E 抗体が、低減する効力で、E L I S A フォーマットにおいて、ヒト a p o E に結合することを示している。しかしながら、抗 a p o E 抗体 H J 6 . 4 は、このアッセイでヒト a p o E に結合しなかった。

【 0 0 7 0 】

実施例 5 : 抗 a p o E 抗体は血漿中のヒト a p o E に結合するが血漿コレステロールに影響を与えない

20

これらの実験では、ヒト A p o E 4 ノックインマウスを使用し、血漿 a p o E / 抗体複合体を測定した。A p o E 4 ノックインマウスに、500 マイクログラムのビオチン化 H J 6 m A b s を腹腔内に受容させた。24 時間後、血漿を希釈 (1 : 1000) し、ヒト a p o E に結合する、5 µ g / m l の W U E 4 でコーティングされた E L I S A プレートに充填した。A p o E / 抗体複合体を、1 : 5000 に希釈した H R P 40 で検出した。光学密度 (O D) をプレートリーダーにて読み取った (図 4 A)。これらの結果は、H J 6 . 1、H J 6 . 2、及び H J 6 . 3 抗体は、血漿においてヒト a p o E に結合するが、H J 6 . 4 は、血漿においてヒト a p o E に結合しないことを示している。この実験を a p o E - / - マウスで実施したときには、何のシグナルも得られなかった。

【 0 0 7 1 】

30

また、血漿コレステロールを、500 マイクログラムの H J シリーズのモノクローナル抗体 H J 6 . 1、H J 6 . 2、H J 6 . 3、及び H J 6 . 4 の腹腔内注射を投与した同じ a p o E 4 + / + マウスにおいて測定した。血漿コレステロールは、リン酸緩衝食塩水を投与した動物に対して、変化はなかった (図 4 B)。

【 0 0 7 2 】

実施例 6 : 末梢投与後の中枢神経系 (C N S) に見出されたヒト a p o E に対する H J 6 シリーズ抗体

H J 6 シリーズ m A b s 又は P B S を受容した A p o E 4 + / + 又は A p o E 4 - / - マウスの脳脊髄液 (C S F) (図 4 を参照) を希釈し (1 : 23)、C S F に a p o E / ビオチン化抗体複合体が入ったものを、W U E 4 に捕捉させ、ついで、H R P 40 で検出した。結果は、C S F に、抗 a p o E 抗体 H J 6 . 1 B、H J 6 . 2 B、又は H J 6 . 3 B (図 5) と a p o E 4 との複合体が存在することを示しており、a p o E m A b s のフラクションが C S F 区画に挿入可能で、a p o E に結合することが示唆される。O D₅₀ は H J 6 . 1 B > H J 6 . 2 B = H J 6 . 3 B > > H J 6 . 4 B の順であり、これらの抗体が、E L I S A プレート (図 3) 及び血漿 (図 4) において、a p o E に結合する能力を示すパターンと一致した。

40

【 0 0 7 3 】

実施例 7 : H J 6 シリーズの抗体が投与されたマウスにおけるミクログリア活性

P B S に希釈した 10 mg / k g の H J 6 . 2、H J 6 . 3 及び H J 3 . 4、又は同量の P B S を、0 日目、3 日目、6 日目、及び 9 日目の時点で、腹腔内に P S A P P マウ

50

スに注射した。10日目、脳を取り出し、固定し、活性化ミクログリアを標識した、抗体CD45で染色した。HJ6.3及びHJ3.4が注射されたマウスにおいて、活性化ミクログリアでコーティングされた皮質の量が増加した。この実験において、PSAPPマウスはマウスapoEを発現した。これらの結果には、HJ6.3（抗apoE抗体）及びHJ3.4（抗A抗体）の、既に10日にわたってアミロイドプラークを有している、6月齢のPSAPPマウスへの短期間投与により、ミクログリアの活性化に至るが、抗apoE抗体（HJ6.2）は、この効果を有するとは思われないことが示されている（図6）。

【図1】

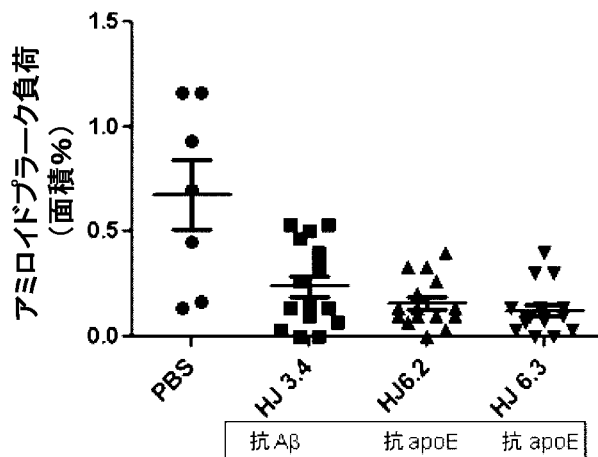


FIG. 1

【図2】

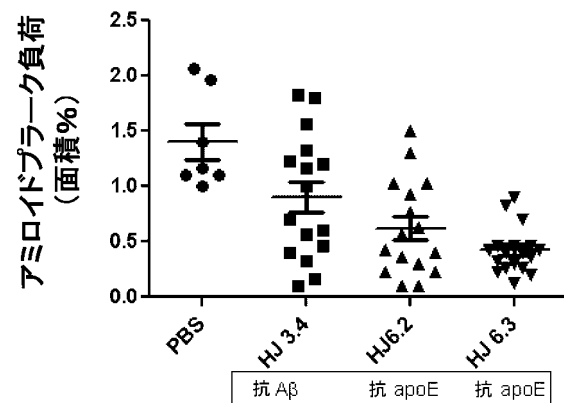
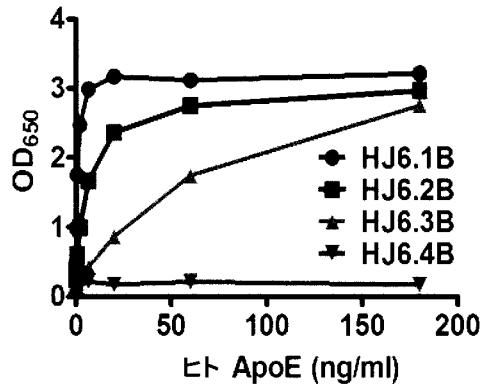
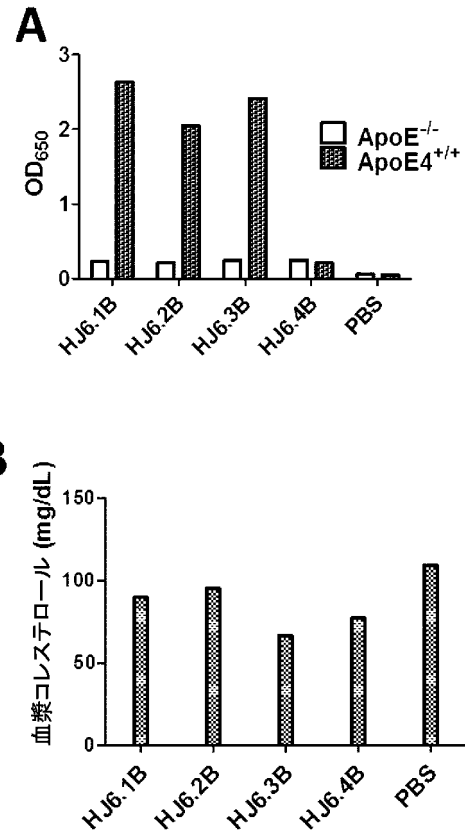


FIG. 2

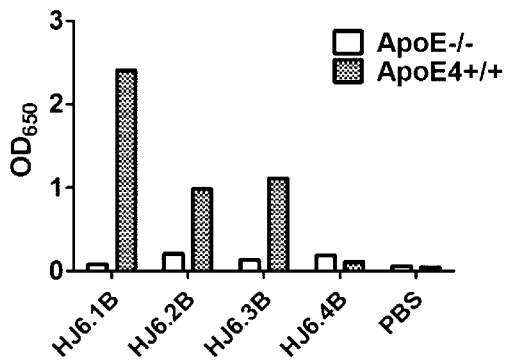
【 図 3 】

**FIG. 3**

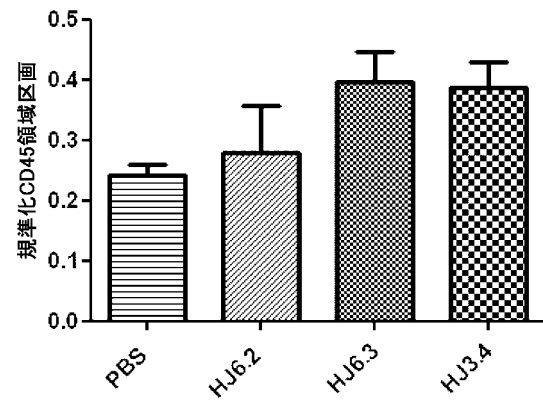
【 図 4 】

**FIG. 4**

【 図 5 】

**FIG. 5**

【 図 6 】

**FIG. 6**

【図 7 - 1】

A

M S S P Q T L N T L V L T L T M G W S W I F L F L S E T A G V L S E V
Q L Q Q S H G K S T A Y K P V P S T V N K P N N S C K G T A V Y Y A Q C T F L N S P A S
T V N K S S S S S A K P V P S T V N K P N N S C K G T A V Y Y A Q C T F L N S P A S
G T T L T V F F P P E P V P S T V N K P N N S C K G T A V Y Y A Q C T F L N S P A S
C L V K G S S S V T V P S T V N K P N N S C K G T A V Y Y A Q C T F L N S P A S
L Y T L S S S V T V P S T V N K P N N S C K G T A V Y Y A Q C T F L N S P A S

B

M E S D T L L L W L L L W V P G S T G D I V L Q Q Y S P A K S L G A V S
L G Q R A T I S C N V C R A S E G V P A R P Y F T F G S G G T K L N N T Y S M
K L L I Y A A M Y P S S Q Q Q L T L N S E A T H K T S T S P I
E D D I I A M Y P S S Q Q Q L T L N S E A T H K T S T S P I
P T V S I D G S E R Q N G S W T D Q V C S K S P I
K W K I D G S E R Q N G S W T D Q V C S K S P I
L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

C

M D W V W T L L F L I A A A Q S A Q A Q I Q L V Q S G P E L K K P G
E T V K I S C G E P T Y F E F K G Y L F S M V L Q Q A P S A N T T Y F P E P
M I Y T K I S C G E P T Y F E F K G Y L F S M V L Q Q A P S A N T T Y F P E P
N N L K N E D T A T Y F E F K G Y L F S M V L Q Q A P S A N T T Y F P E P
T T P P S V Y P L A S S G V H T F P A S
P S S T W P S Q T V T C N V A H T F P A S

D

M E S Q T Q V F L S L L L W V S G T C S N Q I M M T Q S P Y Q Q S L K A V S
A G E K L L I Y W A S A R K S G Y L P S S R Y T F G G G T K L N N T Y S M
S P K L L I Y W A S A R K S G Y L P S S R Y T F G G G T K L N N T Y S M
S V Q A E D L A V Y S E Q L T L N S S W T D Q V C S K S P I
A P T V S I D G S E R Q N G S W T D Q V C S K S P I
V K W K I D G S E R Q N G S W T D Q V C S K S P I
T L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

FIG. 7

【図 7 - 2】

E

M A A A Q S I A Q A I Q V Q S G P E L K K K P G E T V K I S C K A S
G Y A E D F T A G M Q F S Y L V K M P S A S T A Y L Q I S A K T N L K N E D T
Y F C A R M G G F A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T N L K N E D T

F

M D M R T P A Q F L G I L L L W F P G I K C D I K T Q S P S M Y
A S L G E R V R L V T D G V C K P S E D D F I N S G S G S Q L S W Q D L F Q Q S L T K P G K S S P K Y
E D M G I Y P S S C L Q Q L T L N S E A T H K T S T S P I
K I D E Y E R H N S E N G Y T C E A T H K T S T S P I

G

M D W V W T L L F L I A A Q S A Q A Q I Q L V Q S G P E L K K P G
E T V K I S C G E P T Y F E F K G Y L F S M V L Q Q A P S A N T T Y F P E P
M I Y T K I S C G E P T Y F E F K G Y L F S M V L Q Q A P S A N T T Y F P E P
N N L K N E D T A T Y F E F K G Y L F S M V L Q Q A P S A N T T Y F P E P
T T P P S V Y P L A S S G V H T F P A S
P S S T W P S Q T V T C N V A H T F P A S

H

M E S Q T Q V F L S L L L W V S G T C S N Q I M M T Q S P S S L A V S
A G E K L L I Y W A S A R K S G Y L P S S R Y T F G G G T K L N N T Y S M
S P K L L I Y W A S A R K S G Y L P S S R Y T F G G G T K L N N T Y S M
S V Q A E D L A V Y S E Q L T L N S S W T D Q V C S K S P I
A P T V S I D G S E R Q N G S W T D Q V C S K S P I
V K W K I D G S E R Q N G S W T D Q V C S K S P I
T L T K D E Y E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I

FIG. 7

【配列表】

2014502276000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/63121
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/00; C12P 21/08 (2012.01) USPC - 424/130.1, 141.1; 530/388.1, 388.25 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 39/395; C07K 16/00; C12P 21/08 (2012.01) USPC: 424/130.1, 141.1; 530/388.1, 388.25 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 424/133.1, 158.1; 530/387.1, 387.3; 435/326, 328, 337 (Text Search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (USPT,EPAB,JPAB,PGPB); Google Scholar; GenCore sequence search (NT, AA) Search terms: apolipoprotein E (ApoE), monoclonal antibody, HJ6.1, Alzheimer's disease, PT11805, PT-11805, PT 11805, ATCC.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,787,248 A (ROSES et al.) 16 June 1998 (16.06.1998) Especially claim 1	1-5
A	US 2010/0111852 A1 (YOSHIDA) 06 May 2010 (06.05.2010). Especially abstract; para [0041], SEQ ID NOs: 19, 183, 184, 185.	1-5
A	US 2007/0160585 A1 (FUJINAGA et al.) 12 July 2007 (12.07.2007) Especially SEQ ID NO: 1; para [0021]-[0022]	1-4
A	US 2009/0074763 A1 (PADHI et al.) 19 March 2009 (19.03.2009). Especially SEQ ID NO: 155.	1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 July 2012 (13.07.2012)		Date of mailing of the international search report 27 JUL 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/63121

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☐

in the international application as filed

☒

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.3: SEQ ID NOS: 1-4 and 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/63121

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: claims 1-7, directed to an isolated antibody that specifically binds ApoE and is derived from a hybridoma selected from the group consisting of HJ6.1 (ATCC Patent Deposit Designation PT-11805), HJ6.2 (ATCC Patent Deposit Designation PT-11806), HJ6.3 (ATCC Patent Deposit Designation PT-11807), and HJ6.4 (ATCC Patent Deposit Designation PT-11808); wherein the first invention is limited to HJ6.1 and its corresponding amino acid and nucleotide sequences, SEQ ID NOs: 1-4 (claims 1-5). (Applicants may opt for additional antibodies and hybridomas to be searched by specifying the antibody and paying an additional invention search fee for each elected antibody).

Group II: claims 8-19, directed to a method of treating at least one symptom or sign of amyloid beta plaque-associated symptoms in a subject, comprising administering an effective amount of at least one anti-ApoE antibody to the subject.

-----continuation on Extra Sheet-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-7, limited to antibody HJ6.1 (SEQ ID NOs: 1-4), namely, claims 1-5

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/63121

Continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)

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

The special technical feature of the claims of Groups I+ and II are indicated above in the group descriptions.

The only common technical element shared by all of the above groups is that they are related to anti-ApoE antibodies. The subgroups of Group I+ share the common technical elements of being related to an isolated anti-ApoE antibody that is produced by a hybridoma. These common technical elements do not represent an improvement over the prior art of US 2004/0157267 A1 to Huang et al, which teaches an isolated anti ApoE antibody produced by a hybridoma (para [0085], [0088]).

Therefore, the inventions of Groups I+ and Group II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

In view of para [0018] of the specification, and the sequence listing which accompanies the filing, claims 2 and 3 are considered to be errant. This is because SEQ ID NOs: 2, 6, 10 and 14 are not amino acid sequences, but nucleic acid sequences. In a parallel manner, SEQ ID NOs: 3, 7, 11 and 15 are not nucleic acid sequences, but amino acid sequences. Therefore, for the purpose of this search and opinion, claim 2 has been considered to read as follows:

2. The isolated antibody of claim 1, wherein the antibody comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:15, and SEQ ID NO:16.

and claim 3 has been considered to read as follows:

The isolated antibody of claim 1, wherein the antibody is encoded by a nucleic acid sequence comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:13, and SEQ ID NO:14.

フロントページの続き

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

(72)発明者 キム, ジュンス

アメリカ合衆国 ミズーリ 63130, セント ルイス, ワン ブルッキングス ドライブ

(72)発明者 チャン, ホン

アメリカ合衆国 ミズーリ 63130, セント ルイス, ワン ブルッキングス ドライブ

(72)発明者 エルトライ, アダム

アメリカ合衆国 ミズーリ 63130, セント ルイス, ワン ブルッキングス ドライブ

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 CC23 DD63 DD88 EE01

4H045 AA11 AA30 BA09 CA40 DA75 EA23 FA74