

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5876014号
(P5876014)

(45) 発行日 平成28年3月2日(2016.3.2)

(24) 登録日 平成28年1月29日(2016.1.29)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 13 外国語出願 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-168464 (P2013-168464)	(73) 特許権者	507324681
(22) 出願日	平成25年8月14日(2013.8.14)		ユニバーシティ・オブ・チューリッヒ
(62) 分割の表示	特願2009-544399 (P2009-544399) の分割		UNIVERSITY OF ZURICH
原出願日	平成20年1月7日(2008.1.7)		スイス国、ツェーハー-8006 チュー
(65) 公開番号	特開2013-226162 (P2013-226162A)		リッヒ、レーミシュトラーセ 71、プロ
(43) 公開日	平成25年11月7日(2013.11.7)		レクトラート・フォルシュンク
審査請求日	平成25年8月14日(2013.8.14)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/878,831		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成19年1月5日(2007.1.5)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	07000211.8	(72) 発明者	ロゲール ニッヒ
(32) 優先日	平成19年1月5日(2007.1.5)		スイス国 ツェーハー-8126 ツミコ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ン、 ラングウィシュシュトラーセ 27

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾病に特異的な結合分子および標的を提供する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) を含む、単離されたヒト抗ペータアミロイド抗体またはその抗原結合フラグメントであって、該 VH および該 VL が、以下：

(1) 配列番号 17 のアミノ酸配列を持つ第 1 の相補性決定領域 (VHCDR1) と、配列番号 18 のアミノ酸配列を持つ VHCDR2 と、配列番号 19 のアミノ酸配列を持つ VHCDR3 を含む VH；および、配列番号 23 のアミノ酸配列を持つ VLCDR1 と、配列番号 24 のアミノ酸配列を持つ VLCDR2 と、配列番号 25 のアミノ酸配列を持つ VLCDR3 を含む VL；

(2) 配列番号 26 のアミノ酸配列を持つ第 1 の相補性決定領域 (VHCDR1) と、配列番号 27 のアミノ酸配列を持つ VHCDR2 と、配列番号 28 のアミノ酸配列を持つ VHCDR3 を含む VH；および、配列番号 29 のアミノ酸配列を持つ VLCDR1 と、配列番号 30 のアミノ酸配列を持つ VLCDR2 と、配列番号 31 のアミノ酸配列を持つ VLCDR3 とを含む VL；

(3) 配列番号 32 のアミノ酸配列を持つ第 1 の相補性決定領域 (VHCDR1) と、配列番号 33 のアミノ酸配列を持つ VHCDR2 と、配列番号 34 のアミノ酸配列を持つ VHCDR3 を含む VH；および、配列番号 35 のアミノ酸配列を持つ VLCDR1 と、配列番号 36 のアミノ酸配列を持つ VLCDR2 と、配列番号 37 のアミノ酸配列を持つ VLCDR3 を含む VL；

(4) 配列番号 32 のアミノ酸配列を持つ第 1 の相補性決定領域 (VHCDR1) と、

10

20

配列番号 33 のアミノ酸配列を持つ V H C D R 2 と、配列番号 34 のアミノ酸配列を持つ V H C D R 3 を含む V H ; および、配列番号 46 のアミノ酸配列を持つ V L C D R 1 と、配列番号 47 のアミノ酸配列を持つ V L C D R 2 と、配列番号 48 のアミノ酸配列を持つ V L C D R 3 を含む V L ; ならびに

(5) 配列番号 32 のアミノ酸配列を持つ第 1 の相補性決定領域 (V H C D R 1) と、配列番号 33 のアミノ酸配列を持つ V H C D R 2 と、配列番号 34 のアミノ酸配列を持つ V H C D R 3 を含む V H ; および、配列番号 49 のアミノ酸配列を持つ V L C D R 1 と、配列番号 50 のアミノ酸配列を持つ V L C D R 2 と、配列番号 51 のアミノ酸配列を持つ V L C D R 3 を含む V L

からなる群より選択される、抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 2】

以下：

- (1) 配列番号 4 および配列番号 8 ;
- (2) 配列番号 10 および配列番号 12 ;
- (3) 配列番号 14 および配列番号 16 ;
- (4) 配列番号 42 および配列番号 44 ; ならびに
- (5) 配列番号 43 および配列番号 45

からなる群より選択される V H および V L のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

20

一本鎖 F v フラグメント (s c F v)、F (a b') フラグメント、F (a b) フラグメントおよび F (a b')₂ フラグメントからなる群より選択される、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 6】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 5 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

30

【請求項 7】

ベータアミロイド特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントを調製するための方法であって、該方法は、

(a) 請求項 6 に記載の宿主細胞を培養する工程；および

(b) 該培養物から該抗体またはその抗原結合フラグメントを単離する工程を包含する、方法。

【請求項 8】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるか、または、請求項 7 に記載の方法によって取得可能である、抗ベータアミロイド抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 9】

請求項 1 ~ 3 または 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

(a) 検出可能に標識化されるか；または

(b) 薬物に結合される、

抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

前記検出可能な標識が、酵素、放射性同位体、フルオロフォアおよび重金属からなる群より選択される、請求項 9 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

50

請求項 1～3、8、9 または 10 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド、請求項 5 に記載のベクター、または、請求項 6 に記載の宿主細胞を含む、組成物。

【請求項 12】

前記組成物が診断用の組成物またはキットであり、そして、免疫または核酸ベースの診断方法に通常使用される試薬をさらに含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

アルツハイマー病の存在について対象を診断もしくはスクリーニングするため、または、アルツハイマー病を発症する対象の危険性を決定するための、請求項 11 に記載の組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明は、天然内因性タンパク質から派生し、異型において、および／または、それらの正常な生理学的状況から患者の体内に蔓延しているタンパク質ネオエピトープを含む、疾病関連エピトープを認識する、新規特異結合分子、特に、ヒト抗体、ならびに、そのフラグメント、誘導体、および変異体に関する。加えて、本発明は、このような結合分子、その抗体および模倣体を含む医薬組成物、ならびに、様々な疾患、特に、アルツハイマー病、アミロイド症、およびベータアミロイド病等の神経疾患の治療における、新規の結合分子（抗体である場合も、またはそうではない場合もある）、標的、および薬物に対するスクリーニングの方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

モノクローナル抗体を生成において成功するか否かは、Kohler and Milstein, Nature 256 (1975), 495-497 で最初に説明されたように、抗原刺激された B 細胞と、マウス骨髄腫細胞との十分かつ選択的な融合、及び、それに続くハイブリッドを産生する安定した抗体の選択にかかっている。しかしながら、ヒトにおけるマウスベースの抗体の治療的有用性は、非ヒト起源であるということで、ヒト抗マウス抗体（HAMA）反応により妨げられる。ヒトまたはヒト様モノクローナル抗体を作製するためのアプローチは、遺伝子組み換え技術を通して利用可能になる。しかしながら、今までの利用可能な方法は、生理学的ヒト免疫反応の経過において産生されるものの特性を有する抗体を産生するには適さないという欠点がある。さらに、このような抗体は、通常の生理学的機能の文脈において、他のタンパク質、および／または標的タンパク質との交差反応性のため、十分に特異性を有し得ない。アルツハイマー病または、パーキンソン病の場合において、例えば、アミロイド前駆体タンパク質（APP）またはアルファシヌクレインの生理学的誘導体を有する高親和性でまた交差反応する抗体は、生理学的標的構造の通常の機能に関して副作用を示すことが考えられる。この点において、望ましくない自己免疫疾患が完全に誘発されるであろうが、それは、変異体型において、同様に生理学的に生じるタンパク質構造を利用する活性免疫実験の概念設計において、ほとんど推定できない危険性である。標的構造に関さない副作用は、例えば、外因性タンパク質の全身投与の望ましくない、重篤な副作用として予期されるような、アナフィラキシー反応である。最近の発見によれば、これはまた、いわゆる、ヒト化抗体における場合であり得、非ヒト有機体、大抵、マウスから、元来起因する。一方、病理学的関連抗原を用いる能動免疫法は、患者が、このようなタンパク質の生理学的変異体も認識し、結果として、危険な、制御できない自己免疫反応を引き起こす、抗体および T 細胞反応を発現する、相当な危険性を抱える。

30

40

【0003】

したがって、疾患に関与する標的に対して特異的で、人体によって耐容される薬剤を提供する必要がある。

【発明の概要】

50

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明の目的は、診断的および治療的に有用な結合分子、特に、内因性タンパク質の病理学的変異体に対する抗体を同定、検証、および生成する方法である。さらに具体的には、本発明は、疾病に関連するタンパク質に特異的結合する分子を単離する方法に関し、

(a) 症状がない患者、または臨床的に異常に安定しているが、疾患に罹患している、もしくは疾患を発症する危険性がある患者から得たサンプルを、所定の病理学的特性がある病理的に変化した細胞もしくは組織の標本に供するステップと、

(b) 該標本に結合するが、健康な対象から派生し得るような病理学的特性がない対応する細胞または組織に結合しない結合分子を同定し、任意に単離するステップと、を含む。

10

【0005】

自己免疫疾患の場合、抗体は、既知の耐容機構を回避して、自己細胞およびタンパク質、または、該細胞により発現される糖脂質等の他の化合物に対して向けられるという事実が知られている。内因性新生物発生の場合、新生細胞への細胞性および体液性免疫が発現し得、ひいては、新生物組織変性に対して内因性免疫学的防御機構をもたらし得る事実も知られている。

【0006】

本発明は、抗体が、特に、病理学的に変化した転写、翻訳、または転写後もしくは転写後の修飾、またはタンパク質分解過程、または凝集により、形成される、ネオエピトープに対する、内因性タンパク質の病態生理学的に関連のある変異体に対して向けることができるという、驚くべき所見を活用する。このような抗体は、内因性タンパク質に対して向けられ、それらのタンパク質は、正常な生理学から逸脱する、それらの新しい構造のため、病理学的効果を発現させることによって、病態生理学的に関連する。しかしながら、自己免疫疾患の場合とは対照的に、免疫耐性のため、このような病理学的変異体において、ネオエピトープに応答する免疫反応と関連がある抗体は、生理学的に機能タンパク質に対していずれの交差反応も通常呈さない。これは、潜在的に交差反応性抗体の形成が、公知の耐性機構により特異的に抑制されるが、病理学的ネオエピトープへの免疫反応の発現は、耐性を回避することができるためである。

20

【0007】

故に、本発明は、同定可能な病理学的構造との相互作用により臨床的にあらかじめ選択されたヒト対象から診断的、治療的、および予防的活性結合分子、特に、抗体および抗体フラグメントを同定する新規の手法に関する。

30

【0008】

したがって、本発明は、天然内因性タンパク質から派生し、例えば、病理的タンパク質として、および／または、それらの正常な生理学的状况から外れたような異型において、患者の体内に蔓延している疾病関連タンパク質のネオエピトープを含むエピトープを認識することが可能である、抗体もしくは抗原結合フラグメント、および類似の抗原結合分子を対象にする。さらに、本発明は、該抗体を含む組成物、および該抗体を使用した免疫治療および免疫診断方法に関する。

40

【0009】

さらに、抗体同定において、本発明に従って方法は、単に病理学的に関連する構造とのその関連によって、その分子標的構造の同一性における以前の仮説を用いずに行うことができる。したがって、特異的疾患に対して今まで知られていない分子標的構造を同定するための可能性に加え、病理学的構造に対して独占的に向けられる抗体のさらなる利点は、その抗体が、その濃度およびシンク効果に関して緩和され、ひいては、治療効果のある濃度の決定を妨害するように、それらの薬力学的な可用性が、非疾病組織に結合することにより悪影響を受けないという事実に基づく。さらに、本発明の抗体および結合分子は、好ましくは、生体内の疾病関連タンパク質の変異体型、または細胞もしくは細胞膜と反応するという点と、病理学的に特徴付けられた疾病組織の切片において反応するという点とに

50

よって、それぞれ特徴付けられるが、同種タンパク質の生理学的変異体とは反応しない、または有意に少ない程度で反応する。例えば、実施例 2 も参照されたい。

【0010】

本発明は、異常細胞および組織における分子標的構造を同定および単離することが可能であるため、さらなる実施形態は、抗原および病理学的タンパク質、すなわち、疾病関連タンパク質に関し、それぞれ、本発明のネオエピトープ特異的抗体により結合される。

【0011】

特に好ましい実施形態は、下表 2 および 3 に記述される、可変領域 V_H および／または V_L により特徴付けられる任意の抗体の免疫学的結合特性を示す、ヒト抗体またはその抗原結合フラグメントである。代替として、抗体は、ヒト化抗体、異種抗体、またはキメラヒトマウス抗体であり、後者は、動物における診断方法および研究に特に有用である。抗体もしくはその活性フラグメント、またはアゴニストおよび類似分子、または交互に、そのアンタゴニストを含む治療組成物、およびこれらの組成物を使用した、疾病の予防、診断、もしくは治療におけるこのような組成物の使用方法もまた含まれ、有効な量の組成物が、このような治療を必要とする患者に投与される。

10

【0012】

抗体の抗原結合フラグメントは、一本鎖 F_v フラグメント、 $F(ab')$ フラグメント、 $F(ab)$ フラグメント、および $F(ab')_2$ フラグメント、またはいずれの他の抗原結合フラグメントであり得る。以下の特定の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、ヒト IgG イソタイプ抗体である。

20

【0013】

当然のことながら、本発明は、以下に定義されるように、異なる、独特の特性を有する抗体を生成する不死化されたヒト B 記憶リンパ球および B 細胞に、それぞれ、及ぶ。

【0014】

本発明はまた、本発明の抗体の免疫グロブリン鎖の少なくとも可変領域をコードするポリヌクレオチドに関する。好ましくは、該可変領域は、下表 2 および 3 に記述される、可変領域の V_H および／または V_L の少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) を含む。CDR の対応する群を下表 4 に掲載する。

【0015】

それ故に、本発明はまた、該ポリヌクレオチドおよびそれに変換される宿主細胞を含むベクター、ならびに、疾患、特に、アルツハイマー病およびパーキンソン病等の脳疾患に対して、それを表す、および／または原因となるネオエピトープに特異的である抗体および当量の結合分子の生成のための使用を包含する。

30

【0016】

その抗体、免疫グロブリン鎖、結合フラグメント、および該抗体に結合する抗原を、それぞれ、免疫療法および診断のための医薬および診断組成物に使用することができる。しかしながら、薬剤の調製における前述の組成物の使用が好ましい。

【0017】

故に、それぞれのタンパク質の自然的機能を妨げることなく、中枢神経系におけるタンパク質の異常蓄積および／または沈着を特徴とする神経疾患を治療または予防するための方法を提供することが、本発明の特定の目的である。本方法は、本抗体が病理学的型のタンパク質、またはタンパク質の通常の生理型よりも実質的に高い親和性を有するタンパク質沈着に結合する、対象への有効濃度の抗体または抗体誘導体を投与するステップを含む。好ましい実施形態において、本発明は、アルツハイマー病、ダウン症、軽度認知障害、脳アミロイド血管症、血管性認知症、多発梗塞性認知症等の対象における、アミロイド β ペプチドの蓄積および沈着と関連する疾病の発病を治療もしくは予防もしくは緩徐化するための方法を提供する。本方法は、本抗体が病理学的型のタンパク質、またはタンパク質の通常の生理型よりも高い親和性を有するタンパク質沈着に結合する、対象への有効濃度の抗体または抗体誘導体を投与するステップを含む。類似の治療的なアプローチは、パーキンソン病、ハンチントン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、嚢胞性線維症、またはゴー

40

50

シェ病等の治療のために想定される。

【0018】

本発明はまた、以下の項目も提供する。

(項目1)

疾患関連タンパク質特異的結合分子を単離する方法であって、

(a) 症状はないが、疾患に罹患する、または疾患を発症する危険性がある患者、または異常に安定な疾病経過がある患者から得たサンプルを、所定の臨床特性の病理的に変化した細胞もしくは組織の標本に供するステップと、

(b) 前記標本に結合するが、健康な対象の対応する細胞または組織に結合しない結合分子を同定し、任意に単離するステップと、を含む、方法。

10

(項目2)

前記サンプルは、体液または細胞サンプルを含有する、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記体液は、脳脊髄液、血漿、または尿である、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記結合分子は、抗体である、項目1～3のいずれか1項に記載の方法。

(項目5)

前記サンプルは、B細胞または記憶B細胞を含む、またはそれらから派生する、項目1～4のいずれか1項に記載の方法。

(項目6)

20

前記患者および対象は、それぞれ、ヒトである、項目1～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目7)

前記患者は、代理マーカーの存否により、まだ明確でない疾患に罹患しているかまたは前記疾患を発症する危険性があると判定されている、項目1～6のいずれか1項に記載の方法。

(項目8)

前記代理マーカーは、老齢期、脳アミロイド負荷、アポE遺伝子型、APP遺伝子型、P S 1遺伝子型、アミロイドβペプチド、イソプラスタン、タウ(Tau)、およびホスホタウ(phospho-Tau)の体液におけるレベルからなる群から選択される、項目7に記載の方法。

30

(項目9)

前記疾患は、神経疾患、自己免疫疾患、および腫瘍からなる群から選択される、項目1～8のいずれか1項に記載の方法。

(項目10)

前記疾患は、アルツハイマー病である、項目1～9のいずれか1項に記載の方法。

(項目11)

前記サンプルは、以下の基準：

(i) 65歳以上であること、

(ii) 十分な認知能力および良好な健康状態を有すること、

40

(iii) 認知症の臨床的兆候がないこと、または

(iv) アルツハイマー病であり得る確立された臨床診断の存在にもかかわらず、疾病の進行が異常に遅いこと、を満たす患者から採取される、項目10に記載の方法。

(項目12)

(i) 結合分子、例えば、前記標本に結合するが、健康な対象の対応する細胞または組織に結合しない抗体を含むことが確認されているサンプルからB細胞またはB記憶細胞を精製するステップと、

(ii) 前記B細胞またはB記憶細胞から前記抗体に対する免疫グロブリン遺伝子レパートリーを取得するステップと、

(iii) 前記レパートリーを使用して、前記抗体を発現するステップと、

50

をさらに含む、項目 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 3)

ステップ (i i) は、

(i v) 前記 B 細胞または記憶 B 細胞から mRNA を取得するステップと、

(v) ステップ (i v) の前記 mRNA から cDNA を取得するステップと、

(v i) プライマー伸長反応を使用して、前記 cDNA から前記抗体の重鎖 (H C) および κ 軽鎖 (L C) に対応するフラグメントを増幅するステップと、
を含む、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 1 4)

疾患関連タンパク質ネオエピトープを選択的に認識することが可能である、項目 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法により取得可能な結合分子。 10

(項目 1 5)

前記タンパク質をその非疾患関連型において実質的には認識しない、項目 1 4 に記載の結合分子。

(項目 1 6)

抗体またはその抗原結合フラグメントである、項目 1 4 または 1 5 に記載の結合分子。

(項目 1 7)

ヒト抗体である、項目 1 6 に記載の抗体。

(項目 1 8)

前記疾患は、神経疾患である、項目 1 4 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の結合分子。 20

(項目 1 9)

前記疾患は、脳の疾患である、項目 1 4 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

(項目 2 0)

病理学的事象の部位で血液脳関門を横断することが可能である、項目 1 4 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

(項目 2 1)

ベータアミロイド斑、脳血管アミロイド、拡散性アミロイド β 沈着、神経原線維変化、過リン酸化タウ、アルファシヌクレイン陽性レビー小体またはジストロフィー性軸索に関連したタンパク質凝集体に結合することが可能である、項目 1 4 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載の結合分子。 30

(項目 2 2)

正常な挙動に実質的に修復することができる、項目 1 4 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

(項目 2 3)

一本鎖 Fv フラグメント (s c Fv)、F (a b') フラグメント、F (a b) フラグメント、および F (a b')₂ フラグメントからなる群から選択される、項目 1 4 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

(項目 2 4)

表 4 に示される、少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) をその可変領域に含む、抗体またはその結合フラグメントである、項目 1 4 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載の結合分子。 40

(項目 2 5)

表 2 および 3 に示される、V_H および／または V_L 領域のアミノ酸配列を含む、項目 2 4 に記載の抗体または結合フラグメント。

(項目 2 6)

項目 1 4 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の結合分子により認識される抗原。

(項目 2 7)

前述の項目のいずれか 1 項に定義される、疾患関連タンパク質の少なくとも一部である、項目 2 6 に記載の抗原。 50

(項目 28)

項目 14～25 のいずれか 1 項に記載の結合分子、または項目 26 もしくは 27 に記載の抗原をコードするポリヌクレオチド。

(項目 29)

項目 24 もしくは 25 に記載の抗体または結合フラグメントの免疫グロブリン鎖の少なくとも可変領域をコードする項目 28 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 30)

任意に、前記抗体の他の免疫グロブリン鎖の可変領域をコードする項目 29 に記載のポリヌクレオチドと組み合わせて、項目 28 に記載のポリヌクレオチドもしくは項目 29 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

10

(項目 31)

項目 28 もしくは 29 に記載のポリヌクレオチド、または項目 30 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

(項目 32)

疾患関連タンパク質特異的結合分子、抗体、もしくはその結合フラグメント、または免疫グロブリン鎖を調製する方法であって、前記方法は、

(a) 項目 31 に記載の細胞を培養するステップと、

(b) 前記培養物から、前記結合分子、その抗体、もしくは結合フラグメント、または免疫グロブリン鎖を単離するステップと、を含む、方法。

(項目 33)

20

項目 28 もしくは 29 に記載のポリヌクレオチドによりコードされる、または項目 32 に記載の方法により取得可能である、結合分子、その抗体、免疫グロブリン鎖、または結合フラグメント。

(項目 34)

検出可能に標識化される、項目 14～25、もしくは 33 のいずれか 1 項に記載の結合分子、抗体、または結合フラグメント。

(項目 35)

前記検出可能な標識は、酵素、放射性同位体、フルオロフォア、および重金属からなる群から選択される、項目 34 に記載の結合分子、抗体、または結合フラグメント。

(項目 36)

30

薬剤に結合される、項目 14～25、もしくは 33～35 のいずれか 1 項に記載の結合分子、抗体、または結合フラグメント。

(項目 37)

項目 14～25、もしくは 33～36 のいずれか 1 項に記載の結合分子、抗体、もしくは結合フラグメント、項目 26 もしくは 27 に記載の抗原、項目 28 もしくは 29 に記載のポリヌクレオチド、項目 30 に記載のベクター、または項目 31 に記載の細胞を含む、組成物。

(項目 38)

医薬組成物であり、医薬的に許容可能な担体をさらに含む、項目 37 に記載の組成物。

(項目 39)

40

アルツハイマー病を治療するために有用な、有機小分子、抗アミロイドβ抗体、およびその組み合わせからなる群から選択される、追加剤をさらに含む、項目 38 に記載の医薬組成物。

(項目 40)

診断組成物であり、免疫または核酸ベースの診断方法に通常使用される、試薬をさらに含む、項目 37 に記載の組成物。

(項目 41)

アルツハイマー病を治療する、またはその進行を予防するため、アルツハイマー病に関連する症状の改善のため、アルツハイマー病の存在について対象を診断またはスクリーニングするため、もしくは対象のアルツハイマー病に発症する危険性を決定するための医薬ま

50

たは診断組成物を調製するための、項目14～25もしくは33～36のいずれか1項に記載の結合分子、抗体、もしくは結合フラグメント、またはそれらのいずれか1項に記載のものと実質的に同一の結合特異性を有する抗体、項目26もしくは27に記載の抗原、項目28もしくは29に記載のポリヌクレオチド、項目30に記載のベクター、もしくは項目31に記載の細胞の使用。

(項目42)

前記医薬組成物は、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、またはエアロゾルとして投与される、項目41に記載の使用。

(項目43)

中枢神経系におけるタンパク質の異常蓄積および／または沈着を特徴とする神経疾患を治療するための方法であって、それを必要とする対象に、治療上有効な量の、項目14～25もしくは33～36のいずれか1項に記載の結合分子、項目26または27に記載の抗原、項目28もしくは29に記載のポリヌクレオチド、項目30に記載のベクター、または項目31に記載の細胞を投与するステップを含む、方法。

10

(項目44)

前記疾患は、アルツハイマー病、ダウン症、軽度認知障害、脳アミロイド血管症、血管性認知症、多発脳梗塞性認知症、パーキンソン病、ハンチントン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、嚢胞性線維症、またはゴーシェ病からなる群から選択される、項目43に記載の方法。

(項目45)

20

投与は、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、またはエアロゾルとして行われる、項目43または44に記載の方法。

(項目46)

アルツハイマー病およびアミロイドβ沈着のそれぞれに関連する疾患を診断するおよび／または治療する方法であって、対象に、項目24もしくは25に記載の抗体もしくは結合フラグメント、または対応する抗イディオタイプ抗体の少なくとも1つのCDRを含む、治療上有効な量のリガンドアミロイドβ結合分子を投与するステップを含む、方法。

(項目47)

請求されるペプチドのいずれか1つに定義される疾患関連タンパク質の存在を伴う疾患の診断用のキットであって、前記キットは、項目14～25もしくは33～36のいずれか1項に記載の結合分子、抗体もしくは結合フラグメント、項目26もしくは27に記載の抗原、項目28もしくは29に記載のポリヌクレオチド、項目30に記載のベクター、または項目31に記載の細胞を、任意に、試薬および／または使用説明書と共に含む、キット。

30

(項目48)

脳内の疾患関連タンパク質の生体内検出、もしくは疾患関連タンパク質への治療薬および／または診断用薬の標的化、対象における病理学タンパク質凝集体もしくは構造の検出、それらの形成の抑制、もしくはそれらの低減、または認知の改善、もしくは疾病に関連する認知衰退の緩徐化または回復、または病理的化合物または体液からのそれらの前駆物質の体外への抽出のための、項目14～25もしくは33～36のいずれか1項に記載の、結合分子、その抗体、もしくは結合フラグメントの使用。

40

(項目49)

NI-101.10、NI-101.11、NI-101.12、NI-101.13、NI-101.12F6A、NI-101.13A、およびNI-101.13Bからなる群から選択される参照抗体と同一の、疾患関連タンパク質ネオエピトープに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目50)

前記抗体は、NI-101.10、NI-101.11、NI-101.12、NI-101.13、NI-101.12F6A、NI-101.13A、およびNI-101.13Bからなる群から選択される参照抗体が疾患関連ネオエピトープへ結合するのを競合

50

的に阻害する、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目51)

前記抗体は、N I - 1 0 1 . 1 0、N I - 1 0 1 . 1 1、N I - 1 0 1 . 1 2、N I - 1 0 1 . 1 3、N I - 1 0 1 . 1 2 F 6 A、N I - 1 0 1 . 1 3 A、およびN I - 1 0 1 . 1 3 Bからなる群から選択される抗体の抗原結合ドメインと同一の抗原結合ドメインを含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

本発明のさらなる実施形態は、以下の説明から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】ベータアミロイドに対する抗体。A：ヒト抗体。B：ヒトベータアミロイドに対する公知の抗体による対照染色。アルツハイマー病に罹患する臨床的に異常に安定した患者は、ベータアミロイド班への抗体を含む。病理学的に確認されたアルツハイマー病に罹患する患者から取得した脳切片上で臨床的に異常に安定した患者からの抗体による免疫組織化学染色は、ヒトベータアミロイドに対する公知の抗体によって確認されたベータアミロイド班に結合する抗体を明らかにする。

【図2】神経原線維変化に対する抗体。A：ヒト抗体。B：ヒトタウに対する公知の抗体による対照染色。健康なヒト対象は、神経原線維変化への抗体を有する。病理学的に確認されたアルツハイマー病に罹患する患者から取得した脳切片上で健康な対象からの抗体による免疫組織化学染色は、ヒトタウに対する公知の抗体によって確認された神経原線維変化に結合する抗体を明らかにする。

【図3】ジストロフィー性軸索に対する抗体。A：ヒト抗体。B：ヒトタウに対する公知の抗体による対照染色。健康なヒト対象は、ジストロフィー性軸索に対する抗体を有する。病理学的に確認されたアルツハイマー病に罹患する患者から取得した脳切片上で健康な対象からの抗体による免疫組織化学染色は、ジストロフィー性軸索に結合する抗体を明らかにする。

【図4】ベータアミロイドに対する抗体。図は、臨床的に異常に安定したアルツハイマー病患者から脳ベータアミロイド班に単離された組み換えヒトN I - 1 0 1 . 1 1抗体の特異的結合を示す。神経病理学的に確認されたアルツハイマー病に罹患する患者から取得した脳切片は、指示された濃度で、組み換えヒト抗体により染色された。50 pMの濃度でベータアミロイド班に結合する抗体は、高親和性結合を示唆する。

【図5】ベータアミロイド班への組み換えヒトN I - 1 0 1 . 1 1抗体の結合は、線状合成N末端アミロイドβポリペプチドにより競合しない。脳ベータアミロイド(0.5 nM)に対する組み換え抗体の結合は、最大1 μMまでの濃度で、1位~16位を示す、N末端アミロイドβ派生したポリペプチドにより競合することができない。

【図6】組み換えヒトN I - 1 0 1 . 1 1抗体は、単量体アミロイドβに存在しない立体構造アミロイドβエピトープを認識する。脳切片上でベータアミロイド班へのN I - 1 0 1 . 1 1の結合を、線状合成アミロイドβ1-42モノマーではないアミロイドβ1-42線維により競合することができる。

【図7】組み換えヒトN I - 1 0 1 . 1 1抗体は、ウエスタンブロット法での線状単量体合成アミロイドβに結合しない。単量体アミロイドβの調製物を非変性PAGEによって分離した。ブロットされたタンパク質を、ベータアミロイドに対するヒト組み換え抗体、およびN末端線状アミロイドβ配列(6E10)に対する対照抗体で精査した。単量体アミロイドβへのN I - 1 0 1 . 1 1の結合は、検出されなかった。本観察は、抗体が立体構造アミロイドβエピトープを認識することを示唆する。

【図8】ヒトN I - 1 0 1 . 1 1抗体は、合成アミロイドβ1-42ペプチドから調製された人工アミロイド線維に結合する。等しい被覆密度でELISAプレートに被覆された合成アミロイドβ原線維または単量体合成アミロイドβを、指示された濃度で脳ベータアミロイドに対する組み換えヒト抗体と共にインキュベートした。人工アミロイド線維(白抜き四角)への脳ベータアミロイドに対するヒト抗体の結合活性は、単量体アミロイドβ

10

20

30

40

50

(塗りつぶし四角)と比較すると、100倍以上高い。対照抗体22C4は、単量体アミロイドβ(塗りつぶし丸)に選択的に結合し、あまり線維(白抜き丸)に選択的に結合しない。これは、NI-101.11が合成アミロイドβペプチドから調製された人工アミロイド線維にも存在する立体構造エピトープを認識することを示唆する。

【図9】細胞全長APPへの、または培養細胞に生じるその生理学的誘導体のいずれかを有する、組み換えヒトNI-101.11抗体の交差反応性の非存在。細胞表面APPに結合する対照抗体(6E10)と対照的に、細胞表面で存在する全長APPへのNI-101.11の結合はない。これらのデータは、生理学的な細胞全長APPへのNI-101.11の交差反応性の非存在を実証する。

【図10】サイズ排除クロマトグラフィーを介して単量体アミロイドβへのNI-101.11の結合の非存在。図10Aおよび10Bは、単量体FITC標識化アミロイドβ1-42へのNI-101.11または非関連対照抗体の結合がないことを示すが、図10Cは、アミロイドβのC末端に存在する線状エピトープを認識する抗体22C4の顕著な結合を示す。

【図11】アミロイドβのN末端で線状エピトープに対して向けられる抗体である抗体6E10の結合は、超過濃度の単量体アミロイドβペプチドとの前インキュベーションにおいて完全に遮断することができたが、超過濃度のこれらの単量体アミロイドβペプチド調製物との前インキュベーションは、NI-101.11結合を除去しなかったことを示す競合ELISA。

【図12】アルツハイマー病のTg2676トランスジェニックマウスモデルから取得した脳切片へのNI-101.13AおよびNI-101.13Bの結合。

【図13】単量体アミロイドβと比較して、人工アミロイド線維へのNI-101.13AおよびNI-101.13Bの優先的な結合を示すELISA。

【図14】図14Aは、ELISAを介して合成アミロイドβ1-42ペプチドへの組み換えNI-101.12の結合を示す。図14Bは、NI-101.12結合が、超過アミロイドβ1-42ペプチドにより競合されたことを示す。

【図15】脳ベータアミロイドに対する組み換えヒトNI-101.11抗体は、アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデルにおいて、血液脳関門を横断し、生体内で脳ベータアミロイド斑に結合する。

【図16】組み換えヒトNI-101.11抗体は、アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデルにおいて、異常な認知挙動を改善する。24月齢のアーケアミロイドβマウスを、2ヶ月間、毎週、3mg/kgの抗体を腹腔内で処置した。自発的交替行動の測定(Y-maze behavioral testing)を処置の完了前後に行った。

【図17】末梢投与されたNI-101.11によるアミロイド斑の血液脳関門の浸透および装飾。NI-101.11は、NI-101.11処置されたマウス(左パネル)において、血液脳関門を横断し、ベータアミロイド沈着に結合することができるのに対し、ヒト対照抗体(右パネル)で処置された動物において、染色が見られない。組み換えヒトNI-101.11抗体は、2ヶ月間の全身的治療の後、脳ベータアミロイド斑負荷を軽減する。

【図18】NI-101.11を有する受動免疫付与は、アーケアミロイドβマウスにおいて、ベータアミロイド負荷を軽減する。(A、B)チオフラビンSおよびコンゴレッドの斑負荷分析は、対照抗体処理された動物と比較して、50%を超える有意な削減を示す(マンホイットニーU、チオフラビンSの皮質に対して $p=0.02$ 、海馬に対して $p=0.009$ 、およびコンゴレッド分析の皮質に対して $p=0.009$ 、および海馬に対して $p=0.04$)。スケールバー:200μm。(C~E)チオフラビンS分析は、対照で処置された動物と比較して、NI-101.11処置されたアーケアミロイドβマウスにおけるベータアミロイド負荷(C)、ベータアミロイド斑数(D)、および平均斑の大きさ(E)の有意な削減を示す。マンホイットニーU統計:皮質の斑エリアに対して $p=0.02$ 、海馬の斑エリアに対して $p=0.009$ 、皮質の斑数に対して $p=0.047$

10

20

30

40

50

、海馬の班数に対して $p = 0.047$ 、皮質の班の大きさに対して $p = 0.009$ 、海馬の班数に対して $p = 0.009$ 。

【図19】減少したベータアミロイド負荷は、減少した星状細胞増加症および小膠細胞症と同時に起こる。A) 抗GFAP染色の定量化は、対照処置されたトランスジェニックマウスと比較する場合、NI-101.11処置されたアークアミロイドβマウスの皮質において、反応性アストロサイトの数の有意な減少を示した。B) Iba-1染色の定量化は、皮質および海馬において、NI-101.11処置したマウスにおける、活性化した小神経膠細胞数の減少への傾向を示した。スケールバー：200 μm。

【図20】組み換えヒトNI-101.11抗体で治療してから2ヶ月後、脳微小出血の増加はない。証明済みの広範なコンゴレッド親和性のアミロイド脈管障害を有する24月齢のアークアミロイドβマウスは、2ヶ月間、毎週、3 mg/kgの抗体を腹腔内で処置した。Perlのプルシアンブルー染色により示されたアークアミロイドβマウスにおける脳微小出血の代表的な画像（左）。定量分析は、それらの野生型同腹子と比較してアークアミロイドβトランスジェニックマウスにおいて、有意に上昇した微小出血の頻度を示す。NI-101.11での慢性治療は、微小出血の増発をもたらさなかった。スケールバー：20 μm。

【図21】組み換えヒトNI-101.11抗体は、体外で合成アミロイドβ原線維の形成を阻害する。アミロイドβ原線維の形成における組み換えヒトNI-101.11抗体の効果は、蛍光分析により凝集されたアミロイドβに結合するチオフラビンSを測定することにより分析された。

【図22】BV-2小グリア細胞による抗体媒介の用量依存性のファゴサイトーシスFITC-アミロイドβ1-42線維は、スカベンジャー受容体系で阻害した後、測定された。NI-101.11は、アミロイドβ原線維の強力な用量依存性Fcガンマ受容体媒介ファゴサイトーシスを誘発する。

【発明を実施するための形態】

【0020】

I. 定義

「1つの（aまたはan）」の実体という用語は、1つ以上のその実体を指し、例えば、「1つの抗体」は、1つまたはそれ以上の抗体を示すことを理解されることに留意されたい。また、「1つの（a（またはan））」、「1つ以上の」、および「少なくとも1つの」という用語は、本明細書で同義的に使用することができる。

【0021】

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、単数の「ポリペプチド」、ならびに複数の「ポリペプチド」を包含することを意図し、アミド結合（また、ペプチド結合としても知られている）によって線形に連結されたモノマー（アミノ酸）からなる分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意の鎖（単数または複数）を指し、生成物の特定の長さを指さない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または2つ以上のアミノ酸の鎖（単数または複数）を指すために使用される任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれかの代わりに、またはそれらと同義的に使用され得る。

【0022】

「ポリペプチド」という用語はまた、グリコシル化、アセチル化、リン酸化反応、アミド化、公知の保護基／封鎖基による誘導体化、タンパク質分解的切断が挙げられるが、これらに限定されない、ポリペプチドの発現後の修飾、または非天然発生的なアミノ酸の修飾からなる生成物を指すことを意図する。ポリペプチドは、天然の生物起源から派生する、または組み換え技術によって生成され得るが、必ずしも指定された核酸配列から翻訳されるものではない。ポリペプチドは、化学合成によるものを含む、任意の方法で生成され得る。

【0023】

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドは、約3個以上、5個以上、10個以上、20個以上、25個以上、50個以上、75個以上、100個以上、200個以上、500個以上、1,000個以上、または2,000個以上のアミノ酸の大きさからなり得る。ポリペプチドは、定義された3次元の構造を有し得るが、必ずしもこのような構造を有するものではない。定義された3次元の構造を有するポリペプチドは、折り畳まれたと呼ばれ、定義された3次元の構造を有さず、むしろ、多数の異なる構造を取り入れることができるポリペプチドは、折り畳まれていないと呼ばれる。本明細書で使用される糖タンパク質という用語は、例えば、セリン残基またはアスパラギン残基等のアミノ酸残基の酸素含有もしくは窒素含有の側鎖を介してタンパク質に付加される、少なくとも1つの炭水化物部分と共役するタンパク質を指す。

10

【0024】

「単離（された）」ポリペプチドまたはそのフラグメント、変異体、もしくは誘導体により、その自然環境にはないポリペプチドを意図する。精製の特定の水準は必要とされない。例えば、単離ポリペプチドは、その天然または自然環境から除去することができる。組み換えによって生成されたポリペプチドおよび宿主細胞の発現したタンパク質は、任意の適した技法により、分離、断片化、または、部分的に、もしくは実質的には精製されている天然または組み換えポリペプチドである場合、本発明の目的のために単離されていると考えられる。

【0025】

また、本発明のポリペプチドとして、前述のポリペプチドのフラグメント、誘導体、類似体、または変異体、およびそれらのいずれかの組み合わせをも含む。「フラグメント」、「変異体」、「誘導体」、および「類似体」という用語は、本発明の抗体または抗体ポリペプチドを指す場合、対応する天然結合分子、抗体、またはポリペプチドの抗原結合特性の少なくとも幾つかを保持する任意のポリペプチドを含む。本発明のポリペプチドのフラグメントは、本明細書の他の部分で論じられる特異抗体フラグメントに加えて、タンパク質分解フラグメント、ならびに欠失フラグメントを含む。本発明の抗体および抗体ポリペプチドの変異体は、上に記載のフラグメント、およびアミノ酸置換、欠失、または挿入のため、変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドも含む。変異体は、自然発生、または非自然発生のものであり得る。非自然発生変異体は、当技術分野において既知の突然変異生成技術を使用して、生成され得る。変異体ポリペプチドは、保存的または非保存的なアミノ酸置換、欠失、または付加を含み得る。例えば、本発明の抗体および抗体ポリペプチド等のネオエピトープ特異的結合分子の誘導体は、天然ポリペプチドに認められない追加の特性を呈するために変化しているポリペプチドである。例としては、融合タンパク質が挙げられる。また、変異体ポリペプチドは、本明細書において、「ポリペプチド類似体」とも称され得る。本明細書で使用される、結合分子もしくはそのフラグメント、または抗体、または抗体ポリペプチドの「誘導体」は、官能側基の反応により化学的に誘導体化された1つ以上の残基を有する対象ポリペプチドを指す。また、「誘導体」として、20の標準アミノ酸からなる1つ以上の自然発生アミノ酸誘導体を含有する、これらのペプチドを含む。例えば、4-ヒドロキシプロリンは、プロリンと置換され得、5-ヒドロキシリジンは、リジンと置換され得、3-メチルヒスチジンは、ヒスチジンと置換され得、ホモセリンは、セリンと置換され得、オルニチンは、リジンと置換され得る。

20

30

40

【0026】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単数の核酸、ならびに複数の核酸を包含することを意図し、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）もしくはプラスミドDNA（pDNA）等の単離核酸分子もしくは構築物を指す。ポリヌクレオチドは、従来のリン酸ジエステル結合または非従来の結合（ペプチド核酸（PNA）に認められるような、例えば、アミド結合）を含み得る。「核酸」という用語は、ポリヌクレオチドに存在する、例えば、DNAまたはRNAフラグメント等のいずれか1つ以上の核酸セグメントを指す。「単離（された）」核酸またはポリヌクレオチドとは、その天然環境から除去されている、核酸分子、DNA、またはRNAを意図する。例えば、ベクター中に含有される抗体をコー

50

ドする組み換えポリヌクレオチドは、本発明の目的のためには、単離されることが考えられる。単離ポリヌクレオチドのさらなる例としては、異種宿主細胞中に維持される組み換えポリヌクレオチド、または溶液中で（部分的または実質的に）精製されるポリヌクレオチドを含む。単離RNA分子は、本発明のポリヌクレオチドの生体内または体外RNAの転写を含む。本発明に従って、単離ポリヌクレオチドまたは核酸は、合成的に生成される当該の分子をさらに含む。加えて、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネータ等の調節要素であり得る、または含み得る。

【0027】

本明細書で使用される「コーディング領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の一部である。「終止コドン」（TAG、TGA、またはTAA）は、アミノ酸に翻訳されないが、コーディング領域の一部であると考えられ得るが、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネータ、イントロン等の任意のランキング配列は、コーディング領域の一部ではない。本発明の2つ以上のコーディング領域が、例えば、単一ベクター上の単一ポリヌクレオチド構築物、または、例えば、別々の（異なる）ベクター上の別々のポリヌクレオチド構築物に存在することができる。さらに、任意のベクターは、単一コーディング領域を含み得る、または2つ以上のコーディング領域を含み得、例えば、単一ベクターは、免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を別々にコードし得る。加えて、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、結合分子、抗体、またはそのフラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードする核酸に融合される、あるいは融合していない、異種コーディング領域をコードし得る。異種コーディング領域としては、分泌シグナルペプチドまたは異種官能ドメイン等の特殊化した要素またはモチーフが挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

ある実施形態において、ポリヌクレオチドまたは核酸は、DNAである。DNAの場合は、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、プロモーターおよび／または1つ以上のコーディング領域と作用可能に連結する他の転写または翻訳調節要素を含み得る。作用可能な連結とは、例えば、ポリペプチド等の遺伝子生成物に対するコーディング領域が、調節配列の影響または制御下で、遺伝子生成物の発現を生じさせる方法において、1つ以上の調節配列に連結することである。2つのDNAフラグメント（ポリペプチドコーディング領域およびそれに連結するプロモーター等）は、プロモーター機能の導入によって所望の遺伝子生成物をコードするmRNAの転写が生じる場合、および2つのDNAフラグメント間の連鎖の性質が、遺伝子生成物の発現を誘導するための発現調節配列の能力を妨げない、または転写されるDNA鋳型の能力を妨げない場合、「作用可能に連結する」とされる。したがって、プロモーター領域は、プロモーターがその核酸の転写にもたらすことができる場合、ポリペプチドをコードする核酸と作用可能に連結する。プロモーターは、所定の細胞においてのみ、DNAの実質的な転写を誘導する細胞特異的なプロモーターであり得る。プロモーターのほかに、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、および転写終結シグナル等の他の転写調節要素が、細胞特異的な転写を誘導するために、ポリヌクレオチドと作用可能に連結することができる。適したプロモーターおよび他の転写調節領域を本明細書に開示する。

【0029】

様々な転写調節領域が、当業者には公知である。これらは、サイトメガロウイルス（イントロンAと共に、前初期プロモーター）、サルウイルス40（初期プロモーター）、およびレトロウイルス（ラウス肉腫ウイルス等）からのプロモーターおよびエンハンサーセグメント等に限定されない、脊椎動物細胞に作用する、転写調節領域が挙げられるが、これらに限定されない。他の転写調節領域は、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、およびウサギβグロビン等の脊椎動物遺伝子、ならびに、真核生物細胞において遺伝子発現を制御可能な他の配列から派生するものを含む。追加の適した転写調節領域は、組織特異的なプロモーターおよびエンハンサー、ならびにリンホカイン誘発プロモーター（例えば、インターフェロンまたはインターロイキンにより誘導できるプロモーター）

を含む。

【0030】

同様に、様々な翻訳調節要素は、当業者には公知である。これらとしては、リボソーム結合部位、翻訳開始および終止コドン、およびピコナウイルス（特に、内部リボソーム侵入部位、またはIRES、CITE配列とも称される）から派生する要素が挙げられるが、これらに限定されない。

【0031】

他の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）の形である、RNAである。

【0032】

本発明のポリヌクレオチドおよび核酸コーディング領域は、分泌ペプチドまたはシグナルペプチドをコードする追加のコーディング領域に連結し、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの分泌を誘導し得る。シグナル仮説によれば、哺乳類細胞により分泌されるタンパク質は、粗面小胞体にわたる成長タンパク質鎖の輸出が開始されると、成熟タンパク質から開裂されるシグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有する。当業者は、脊椎動物細胞により分泌されるポリペプチドは、通常、ポリペプチドのN末端に融合されるシグナルペプチドを有し、ポリペプチドの分泌型または「成熟型」を生成するために、完全または「全長」ポリペプチドから開裂されることを承知している。ある実施形態において、例えば、免疫グロブリン重鎖または軽鎖シグナルペプチド等の天然シグナルペプチド、または、それと作用可能に連結するポリペプチドの分泌を誘導する能力を保持するその配列の官能誘導体を使用する。代替として、異種哺乳類シグナルペプチド、またはその官能誘導体が使用され得る。例えば、野生型リーダー配列をヒト組織プラスミノゲン活性化因子（TPA）またはマウス β グルクロニダーゼのリーダー配列と置換され得る。

【0033】

別途記載されない限り、「疾患（disorder）」および「疾病（disease）」という用語は、本明細書で同義的に使用される。本発明の文脈で使用されるように、「結合分子」は、主として、抗体、およびそのフラグメントに関するが、ホルモン、受容体、リガンド、主要組織適合性複合体（MHC）分子、熱ショックタンパク質（HSP）等のシャペロン、ならびにカドヘリン、インテグリン、C型レクチン、および免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーのメンバー等の細胞間接着分子が挙げられるが、これらに限定されない、ネオエピトープに結合する他の非抗体分子も指し得る。したがって、以下の実施形態のほとんどは、明確にする目的のみのためで、本発明の範囲を限定せず、治療薬および診断用薬の開発のために好ましい結合分子を示す抗体および抗体様分子に関して論じられる。

【0034】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、本明細書で同義的に使用される。抗体または免疫グロブリンは、少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、通常は、少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む、抗原結合分子である。脊椎動物系の基本的な免疫グロブリン構造は、比較的よく理解されている。例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)を参照されたい。

【0035】

下記でより詳細に論じるように、「免疫グロブリン」という用語は、生化学的に区別することができる様々な広範なクラスのポリペプチドを含む。当業者ならば、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはエプシロン（ γ 、 μ 、 α 、 θ 、 δ 、 ϵ ）として分類され、それらのクラスの中で、幾つかのサブクラス（例えば、 $\gamma 1 \sim \gamma 4$ ）に分類されることを十分に理解するであろう。本鎖の特質が、抗体の「クラス」を、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgG、またはIgEとして決定する。例えば、IgG1、IgG

2、I g G 3、I g G 4、I g A 1等の免疫グロブリンのサブクラス（イソタイプ）は、よく特徴付けられており、機能的特殊性を与えることが知られている。これらのクラスおよびイソタイプのそれぞれの修飾された形は、本開示を考慮した当業者にはより容易に認識することができるので、それらは本発明の範囲内にある。すべての免疫グロブリンクラスは、明らかに本発明の範囲内にあるが、以下の議論は、概して、免疫グロブリン分子のI g Gクラスを対象とする。I g Gに関しては、標準免疫グロブリン分子は、分子量約23,000ダルトンの2本の同一の軽鎖ポリペプチド、および分子量約53,000~70,000ダルトンの2本の同一の重鎖ポリペプチドを含む。これらの4つの鎖は、典型的には、「Y」の立体配置で、ジスルフィド結合により連結され、軽鎖は、「Y」の入口で開始し、可変領域を通して継続する重鎖をひとまとめにする。

10

【0036】

軽鎖は、カッパあるいはラムダ（ κ 、 λ ）のいずれかとして分類される。各重鎖クラスは、カッパ軽鎖あるいはラムダ軽鎖のいずれかと結合され得る。一般的に、軽鎖および重鎖は、互いに共有結合し、2本の重鎖の「末端」部分は、免疫グロブリンがハイブリドーマ、B細胞、あるいは、遺伝子組み換え宿主細胞のいずれかにより産生される場合、ジスルフィド共有結合または非共有結合により互いに結合する。重鎖では、アミノ酸配列は、Y立体配置の二股の末端のN末端から各鎖の最後のC末端まで延びる。

【0037】

軽鎖および重鎖は共に、構造的および機能的相同性の領域で分けられる。「定常」および「可変」という用語を、機能的に使用する。これに関し、軽鎖（VL）および重鎖（VH）部分の両方の可変ドメインが、抗原認識および特異性を決定することは理解されよう。逆に、軽鎖（CL）および重鎖（CH1、CH2、またはCH3）の定常ドメインは、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合性、補体結合性等の重要な生化学的特性を与える。慣習的に、定常領域ドメインの番号は、抗原結合部位または抗体のアミノ末端から離れるほど大きくなる。N末端部分は、可変領域であり、C末端部分は、定常領域であり、CH3およびCLドメインは、それぞれ、重鎖と軽鎖のカルボキシ末端を実際に含む。

20

【0038】

上で示す通り、可変領域により、抗体は抗原のエピトープを選択的に認識し、それに特異的に結合することができる。すなわち、抗体のVLドメインおよびVHドメイン、または相補性決定領域（CDR）のサブセットは、一体となって可変領域を形成し、これは3次元の抗原結合部位を特徴付ける。この抗体の4次元構造は、Yの各アームの末端に存在するように抗原結合部位を形成する。さらに具体的には、抗原結合部位は、VH鎖およびVL鎖のそれぞれにある3つのCDRによって特徴付けられる。抗原に特異的に結合するのに十分な構造を含む、任意の抗体または免疫グロブリンフラグメントは、本明細書において、「抗原結合性フラグメント」または「免疫特異性フラグメント」として、同義的に示される。

30

【0039】

自然発生抗体では、各抗原結合ドメインに存在する6つの「相補性決定領域」または「CDR」は、抗体が水性環境中で3次元立体構造を取る際、抗原結合ドメインを形成するように特異的に位置するアミノ酸の短い不連続の配列である。「枠組み」領域と称される、抗原結合ドメイン内のアミノ酸の残りは、分子間変化がより少ない。枠組み領域は、主として β シート立体構造を採り、CDRは β シート構造と接続し、時には β シート構造の一部を形成するループを形成する。したがって、枠組み領域は、鎖間の非共有相互作用により、CDRを正しい配向に配置を提供する足場を形成するように作用する。配置されたCDRにより形成される抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原のエピトープと相補的な面を確定する。この相補的な面は、抗体がその類似したエピトープと非共有結合することを促進する。CDRおよび枠組み領域をそれぞれ含むアミノ酸は、正確に定義されているため、当業者により、任意の所定の重鎖または軽鎖可変領域に対して、容易に同定することができる（“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, Kabat, E., et al., U. S. Depar

40

50

tment of Health and Human Services, (1983)、および Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987) を参照されたく、これらは参照することによりその全体を本明細書に組み込む)。

【0040】

当技術分野内で使用される、および／または認められる、2つ以上の用語の定義がある場合、本明細書で使用される用語の定義は、別様に明記されない限り、かかるすべての意味を含むことを意図する。具体的な例は、「相補性決定領域」(「CDR」)という用語の使用であり、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内で認められる不連続の抗原結合部位を説明する。この特定の領域は、Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983) および Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) により記述されており、参照することにより本明細書に組み込まれ、定義には、互いに対して比較される場合、アミノ酸残基の重複またはサブセットが含まれる。それでもなお、抗体、あるいはその変異体の CDR を指すいずれの定義の適用も、本明細書で定義され使用される、用語の範囲内であることを意図する。上に記載のそれぞれの参考文献により定義される、CDR を包含する適切なアミノ酸残基は、比較として、表 I に示される。特定の CDR を包含する厳密な残基番号は、CDR の配列および大きさにより異なるであろう。当業者は、どの残基が抗体の可変領域アミノ酸配列を与えられた特定の CDR を含むのかを日常的に決定することができる。

【0041】

【表1】

表1: CDRの定義¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹ 表1中のすべてのCDR定義の番号付けは、Kabatらにより説明される番号付けの取り決めに従う(下記参照)。

【0042】

Kabatらはまた、任意の抗体に適用できる可変ドメイン配列に対する番号方式も定義した。当業者は、その配列自体を超えた任意の実験データに依存することなく、この、任意の可変ドメイン配列への「Kabat番号付け(numbering)」体系を明確に割り当てることができる。本明細書で使用される「Kabat番号付け(numbering)」は、Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983) により説明される番号付け体系を指す。別途指定されない限り、本発明のその抗体または抗原結合フラグメント、変異体、または誘導体の特異的アミノ酸残基配置の番号付けへの言及は、Kabat番号付け(numbering)体系に従うものである。

【0043】

本発明の抗体またはその抗原結合フラグメント、免疫特異性フラグメント、変異体、または誘導体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、霊長類抗体、またはキメラ抗体、一本鎖抗体、例えば、Fab、Fab'、および F(ab')₂ 等のエピトープ結合フラグメント、Fd、Fvs、一本鎖 Fv

s (s c F v)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合 F v s (s d F v)、V LあるいはV Hドメインのいずれかを含むフラグメント、F a b発現ライブラリーにより産生されるフラグメント、抗イディオタイプ (抗 I d) 抗体 (例えば、本明細書に開示される抗体への抗 I d抗体を含む) が挙げられるが、これらに限定されない。S c F v分子は、当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第 5, 8 9 2, 0 1 9号に記載される。本発明の免疫グロブリンまたは抗体分子は、任意の型 (例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、および I g Y)、免疫グロブリン分子のクラス (例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、および I g A 2) またはサブクラスからなり得る。

【0044】

一実施形態において、本発明の抗体は、I g Mでも、5価構造を有するその誘導体でもない。特に、本発明の特定の用途、特に治療上の使用において、I g Mは、それらの5価構造によるI g Mおよび親和性成熟の欠失が、多くの場合、非特異的交差反応および非常に遅い親和性を示すため、I g G、他の2価抗体、または対応する結合分子よりも有用ではない。

【0045】

一本鎖抗体を含む抗体フラグメントは、単独で、または、ヒンジ領域、C H 1、C H 2、およびC H 3ドメインの全体または一部と組み合わせて、可変領域を含み得る。また、本発明において、ヒンジ領域、C H 1、C H 2、およびC H 3ドメインを有する可変領域の任意の組み合わせを含む抗原結合フラグメントも含む。本発明の抗体またはその免疫特異性フラグメントは、鳥類および哺乳類を含む、任意の動物起源からであり得る。好ましくは、該抗体は、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、またはニワトリ抗体である。別の実施形態において、該可変領域は、軟骨魚綱 (例えば、サメから) 由来であり得る。本明細書で使用される「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、ヒト患者、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、または1つ以上のヒト免疫グロブリンに対してトランスジェニックな動物から単離された抗体を含み、以下に記載される、例えば、K u c h e r l a p a t i らによる米国特許第 5, 9 3 9, 5 9 8号において、内因性免疫グロブリンを発現しない抗体を含む。ヒト抗体は、例えば、結合特性を改善するために、アミノ酸置換を抗体で行う場合であっても、それでもなお「ヒト」である。

【0046】

本明細書で使用される「重鎖部分」という用語は、免疫グロブリン重鎖から派生するアミノ酸配列を含む。重鎖部分を含むポリペプチドは、C H 1ドメイン、ヒンジ (例えば、上部、中間、および/または下方ヒンジ領域) ドメイン、C H 2ドメイン、C H 3ドメイン、その変異体またはフラグメントのうちの少なくとも1つを含む。例えば、本発明で用いる結合ポリペプチドは、C H 1ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびC H 2ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1ドメインおよびC H 3ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびC H 3ドメインを含むポリペプチド鎖；またはC H 1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを含むポリペプチド鎖を含み得る。別の実施形態において、本発明のポリペプチドは、C H 3ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。さらに、本発明で用いる結合ポリペプチドは、C H 2ドメインの少なくとも一部 (例えば、C H 2ドメインのすべてまたはその一部) が欠失し得る。上記で説明される、これらのドメイン (例えば、重鎖部分) は、アミノ酸配列に関して、自然発生する免疫グロブリン分子と異なるように、修飾され得ることを当業者により理解されるであろう。

【0047】

本明細書に開示される、ある抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体において、マルチマーの1本のポリペプチド鎖の重鎖部分は、該マルチマーの第2のポリペプチド鎖上の重鎖部分に同一である。代替として、本発明の重鎖部分含有モノマーは、同一ではない。例えば、各モノマーは、例えば、異なる標的結合部位を含み得、

二重特異性抗体を形成する。

【0048】

本明細書に開示される、診断および治療方法で用いる結合ポリペプチドの重鎖部分は、異なる免疫グロブリン分子から派生され得る。例えば、ポリペプチドの重鎖部分は、I g G 1分子から派生するC H 1ドメインおよびI g G 3分子から派生するヒンジ領域を含み得る。別の例においては、重鎖部分は、一部において、I g G 1分子から派生するヒンジ領域、および一部において、I g G 3分子から派生するヒンジ領域を含むことができる。別の例において、重鎖部分は、一部において、I g G 1分子から派生するキメラヒンジ領域、および一部において、I g G 4分子から派生するキメラヒンジ領域を含むことができる。

10

【0049】

本明細書で使用される「軽鎖部分」という用語は、免疫グロブリン軽鎖から派生するアミノ酸配列を含む。好ましくは、該軽鎖部分は、V LまたはC Lドメインのうちの少なくとも1つを含む。

【0050】

抗体のためのペプチドまたはポリペプチドエピトープの最小の大きさは、約4～5個のアミノ酸であると考えられる。ペプチドまたはポリペプチドエピトープは、好ましくは、少なくとも7個、さらに好ましくは、少なくとも9個、最も好ましくは、少なくとも約15～約30個のアミノ酸を含む。C D Rが、その三級形態において、抗原ペプチドまたはポリペプチドを認識することができるため、エピトープを含むアミノ酸は、隣接する必要がなく、場合によっては、同じペプチド鎖上でなくてもよい。本発明において、本発明の抗体により認識されるペプチドまたはポリペプチドエピトープは、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、さらに好ましくは少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、または約15～30個のA β の連続または不連続アミノ酸の配列を含む。

20

【0051】

本発明に従って「ネオエピトープ」という用語は、疾病パターンに対して独特であり、他の非病理学的タンパク質からの病理学的変異体である、および／または健康な状態の生理学から逸脱する、疾患関連タンパク質に含まれる、またはそれにより形成される、エピトープを意味する。該病態生理学的変異体は、病理学的に変化した転写、病理学的に変化した翻訳、翻訳後の修飾、病理学的に変化したタンパク質分解過程、変化した共局在化という意味では生理学的もしくは病態生理学的相互作用パートナーもしくは細胞構造を有する病理学的に変化した複合体形成、または3次元または4次元構造が生理学的に活性な分子の構造とは異なる病理学的に変化した構造的立体構造（例えば、凝集、オリゴマー化、もしくはフィブリル化）によって形成することができる。さらに、病態生理学的変異体はまた、その通常の生理環境または細胞内コンパートメントに位置しないという点において、特徴付けることができる。一例として、ネオエピトープは、機能的障害を明らかに経験する、またはすでに経験している、脳組織のエリアにおいて病理学的に顕著な構造に位置し得る。所与の構造、例えば、細胞もしくは組織、またはタンパク質が、ネオエピトープを表示するか否かは、結合分子、例えば、該方法により同定される抗体を使用して、抗体に結合するためのサンプルをスクリーニングし、それにより、ネオエピトープの存在を決定するという点において、疾患関連タンパク質に特異的な結合分子を単離し、特徴付けるための、下に記載される、方法を逆に行うことにより、検証することができる。

30

40

【0052】

「疾患関連タンパク質に特異的」および「ネオエピトープに特異的」という語句は、「特異的に認識するネオエピトープ」という用語を用いて、本明細書で同義的に使用される。本明細書で使用される「交差反応性の非存在」、「特異的」、「特異的に認識する」、「特異的に結合する」、「選択的に結合する」等の用語は、結合分子の、疾患関連タンパク質と、その野生型および自然の文脈における天然タンパク質のネオエピトープとを識別する能力を指す。したがって、本発明の結合分子は、天然タンパク質抗原と比較して、少

50

なくとも2倍、好ましくは少なくとも5倍、通常、10倍以上、特に好ましくは、50倍、さらになお好ましくは、100倍を超える、ネオエピトープへの選択的結合親和性を有する。さらに、結合分子、例えば、特異的な標的エピトープ、例えば、ネオエピトープの抗体の相対値 K_D は、好ましくは、他のリガンド、もしくは疾病関連タンパク質の天然対応物への抗体の結合に対する K_D の、少なくとも10分の1、さらに好ましくは少なくとも100分の1、もしくは、それ以下である。

【0053】

本明細書で同義的に使用される「特異的に結合する」、または「特異的に認識する」により、結合分子、例えば、抗体は、その抗原結合ドメインを介してエピトープに結合し、結合は、抗原結合ドメインとエピトープとの間で幾つかの相補性を引き起こすことを一般的に意味する。本定義によれば、無作為な非関連エピトープに結合するよりもさらに容易に、その抗原結合ドメインを介して、そのエピトープに結合する場合、抗体は、エピトープに「特異的に結合する」とされる。「特異性」という用語は、本明細書では、ある抗体があるエピトープに結合する相対的親和性を示す。例えば、抗体「A」は、抗体「B」よりも所与のエピトープに対して高い特異性を有すると考えられる、または抗体「A」は、関連したエピトープ「D」に対して有するものよりも高い特異性があるエピトープ「C」に結合すると言われ得る。

10

【0054】

「選択的に結合する」とは、結合分子、例えば、抗体は、関連した、類似の、同種、または相似エピトープに結合するよりもさらに容易に、一つのエピトープに特異的に結合することを意味する。したがって、所与のエピトープに「選択的に結合する」抗体は、このような抗体が関連したエピトープと交差反応し得るとしても、関連したエピトープよりもそのエピトープに結合する可能性が高い。

20

【0055】

非限定の例のために、結合分子、例えば、抗体は、第1のエピトープに、第2のエピトープの抗体の K_D より少ない解離定数(K_D)で結合する場合、選択的に、該第1のエピトープに結合すると考えられ得る。別の非限定の例において、抗体は、第1のエピトープに、その抗体の第2のエピトープに対する K_D より少なくとも1桁分少ない K_D の親和性で結合する場合、選択的に、第1の抗原に結合すると考えられ得る。別の非限定の例において、抗体は、第1のエピトープに、その抗体の第2のエピトープに対する K_D より少なくとも2桁分少ない K_D の親和性で結合する場合、選択的に、第1のエピトープに結合すると考えられ得る。

30

【0056】

別の非限定の例において、結合分子、例えば、抗体は、第1のエピトープを第2のエピトープの抗体の K （オフ）より少ないオフ率(k （オフ））で結合する場合、選択的に、第1のエピトープに結合すると考えられ得る。別の非限定の例において、抗体は、第1のエピトープに、その抗体の第2のエピトープに対する K （オフ）より少なくとも1桁分少ない K （オフ）の親和性で結合する場合、選択的に、第1のエピトープに結合すると考えられ得る。別の非限定の例において、抗体は、第1のエピトープに、その抗体の第2のエピトープに対する K （オフ）より少なくとも2桁分少ない K （オフ）の親和性で結合する場合、選択的に、第1のエピトープに結合すると考えられ得る。

40

【0057】

結合分子、例えば、本明細書に開示された抗体もしくは抗原結合フラグメント、変異体、または誘導体は、本明細書に開示される標的ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは変異体に、 $5 \times 10^{-2} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-2} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ 、または 10^{-3} 秒^{-1} 以下のオフ率(k （オフ））で結合すると言える。さらに好ましくは、本発明の抗体は、本明細書に開示された標的ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは変異体は、 $5 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-4} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{ 秒}^{-1}$ 、もしくは 10^{-5} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-6} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{ 秒}^{-1}$ もしくは 10^{-7} 秒^{-1} 以下のオフ率(k （オフ））で結合すると言える。

50

【0058】

結合分子、例えば、本明細書に開示された抗体もしくは抗原結合フラグメント、変異体、または誘導体は、本明細書に開示された標的ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは変異体に、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、または $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 以上のオン率（ k （オン））で結合すると言える。さらに好ましくは、本発明の抗体は、本明細書に開示された標的ポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは変異体に、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、または $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ もしくは $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 以上のオン率（ k （オン））で結合すると言える。

【0059】

10

結合分子、例えば、抗体は、ある程度まで、そのエピトープへの参照抗体の結合を遮断するほど、選択的にそのエピトープに結合する場合、参照抗体を所与のエピトープに結合することを競合的に阻害すると言われる。競合阻害は、当技術分野において任意の方法、例えば、競合ELISAアッセイにより判定され得る。抗体は、参照抗体を、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%、所与のエピトープに結合することを競合的に阻害すると言えることができる。

【0060】

本明細書で使用される「親和性」という用語は、個々のエピトープを結合分子、例えば、免疫グロブリン分子のCDRで結合する強度の尺度を指す。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988)、27~28頁を参照されたい。本明細書で使用される「親和力」という用語は、免疫グロブリンの集団と抗原との間の複合体の総合安定性、つまり、免疫グロブリン混合物と抗原との機能的な混合強度を指す。例えば、Harlowの29~34頁を参照されたい。親和力は、特異的エピトープを有する集団における個々の免疫グロブリン分子の親和性、また、免疫グロブリンと抗原の結合価の両方に関連する。例えば、ポリマー等の2価のモノクローナル抗体と、高度に反復しているエピトープ構造を有する抗原との間の相互作用は、高親和力の1つである。

20

【0061】

本発明の結合分子、例えば、抗体もしくは抗原結合フラグメント、その変異体もしくは誘導体はまた、それらの交差反応性に関して説明される、または指定され得る。本明細書で使用される「交差反応性」という用語は、1つの抗原に対して特異的な抗体の、第2の抗原と反応する能力、すなわち、2つの異なる抗原物質の間での関連性の尺度を指す。したがって、抗体は、その形成を誘発するもの以外のエピトープに結合する場合、交差反応性がある。交差反応性エピトープは、一般に、誘発するエピトープと、多くの同一の相補的構造上の特色を含み、場合によっては、原型よりもよく実際に適合し得る。

30

【0062】

例えば、ある抗体は、関連するが、同一でないエピトープ、例えば、参照エピトープに対して、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、および少なくとも50%の同一性（当技術分野において公知の方法を使用して算出され、本明細書に記載されるような）を有するエピトープに結合するという点において、ある程度の交差反応性を有する。抗体は、参照エピトープに対して、95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、および50%未満の同一性（当技術分野において公知の方法を使用して算出され、本明細書に記載されるような）を有するエピトープに結合しない場合、交差反応性がほとんどない、または交差反応性がないと言われ得る。抗体は、あるエピトープに対して、そのエピトープのいずれの他の類似体、オースログ、またはホモログにも結合しない場合、「高度に特異的」と判断され得る。

40

【0063】

50

結合分子、例えば、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体はまた、本発明のポリペプチドへのそれらの結合親和性において、記載される、または特定され得る。好ましい結合親和性は、解離定数または K_d が 5×10^{-2} M未満、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、または 10^{-15} Mを有するものを含む。

【0064】

前に表されるように、サブユニット構造および様々な免疫グロブリンのクラスの定常領域の3次元構造は、公知である。本明細書で使用される「VHドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、「CH1ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖の第1の（ほとんどのアミノ末端）定常領域ドメインを含む。CH1ドメインは、VHドメインに隣接し、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域へのアミノ末端である。

【0065】

本明細書で使用される「CH2ドメイン」という用語は、例えば、従来の番号付けスキーム（244～360の残基、Kabat番号付け（numbering）体系、および231～340の残基、EU番号付け（numbering）体系）を使用して、抗体の約244～360の残基から延在する重鎖分子部分を含む。前掲書中のKabat EArを参照されたい。CH2ドメインは、別のドメインと密接して対にならないという点において、独特である。むしろ、2つのN結合型分枝炭水化物鎖を、無傷の天然IgG分子の2つのCH2ドメインの間に置く。また、CH3ドメインは、CH2ドメインからIgG分子のC末端に延在し、約108の残基を含むことも文書で十分に立証される。

【0066】

本明細書で使用される「ヒンジ領域」という用語は、CH1ドメインをCH2ドメインに連結する重鎖分子の部分を含む。本ヒンジ領域は、約25個の残基を含み、順応性がある故に、2つのN末端抗原結合領域を単独で移動させることが可能である。ヒンジ領域は、3つの異なるドメイン、すなわち上部、中間、および下方ヒンジドメインに再分割することができる（Roux et al., J. Immunol. 161:4083 (1998)）。

【0067】

本明細書で使用される「ジスルフィド結合」という用語は、2つの硫黄原子間で形成される共有結合を含む。アミノ酸システインは、ジスルフィド結合を形成する、または第2のチオール基で架橋することができる、チオール基を含む。ほとんどの自然発生するIgG分子において、CH1およびCL領域は、ジスルフィド結合により連結され、2本の重鎖は、Kabat番号付け（numbering）体系（226位または229位、EU番号付け（numbering）体系）を使用して、239位および242位に対応する、2つのジスルフィド結合により連結される。

【0068】

本明細書で使用される「改変抗体」という用語は、重鎖あるいは軽鎖またはその両方のいずれかにおける可変ドメインが、公知の特異性の抗体からの1つ以上のCDRの少なくとも部分的な置換、必要ならば、部分的な枠組み領域の置換および配列交換により変えられた抗体を指す。CDRは、同一クラスの抗体、あるいは枠組み領域を派生する抗体と同一のサブクラスの抗体から派生し得るが、CDRが、異なるクラスの抗体、好ましくは異なる種からの抗体から派生することを想定する。公知の特異性の非ヒト抗体からの1つ以上の「ドナー」CDRが、ヒト重鎖または軽鎖の枠組み領域にグラフトされる、改変抗体は、「ヒト化抗体」として本明細書に参照される。1つの可変ドメインから別のドメインに抗原結合能力を導入するために、ドナー可変領域から、すべてのCDRを完全なCDR

10

20

30

40

50

と置換することは必要ではない場合がある。むしろ、標的結合部位の活性を維持するために必要であるそれらの残基を導入することのみが必要な場合がある。例えば、米国特許第 5, 585, 089 号、第 5, 693, 761 号、第 5, 693, 762 号、および第 6, 180, 370 号に説明される、説明を前提とすると、日常的な実験を実行すること、あるいは、試験およびエラー試験の、いずれかにより、当業者は、機能的な改変またはヒト化抗体を取得するための十分な能力を有する。

【0069】

本明細書で使用される「適切に折り畳まれたポリペプチド」という用語は、ポリペプチドを含むすべての機能的ドメインが明らかに活性である、ポリペプチドを含む。本明細書で使用される「不適切に折り畳まれたポリペプチド」という用語は、ポリペプチドの少なくとも 1 つの機能的ドメインが活性でない、ポリペプチドを含む。一実施形態において、適切に折り畳まれたポリペプチドは、少なくとも 1 つのジスルフィド結合により連鎖されるポリペプチド鎖を含み、反対に、不適切に折り畳まれたポリペプチドは、少なくとも 1 つのジスルフィド結合により連鎖されないポリペプチド鎖を含む。

10

【0070】

本明細書で使用される「改変した」という用語は、合成手段（例えば、組み換え技術、体外ペプチド合成、ペプチドの酵素および化学的結合、またはこれらの技術の幾つかの組み合わせ）による核酸またはポリペプチド分子の操作を含む。

【0071】

本明細書で使用される「連鎖される」、「融合される」、または「融合」は、同義的に使用される。これらの用語は、化学的結合を含む、いかなる手段または組み換え手段による、2 つ以上の要素または成分の結合をも指す。「インフレームの融合」とは、元の ORF の正確な翻訳リーディングフレームを維持するように、連続したより長い ORF を形成するための 2 つ以上のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム (ORF) の結合を指す。したがって、組み換え融合タンパク質は、(セグメントは、本来は、通常、そのように結合しない) 元の ORF によりコードされるポリペプチドに対応する、2 つ以上のセグメントを含む、単一タンパク質である。本リーディングフレームは、このようにして、融合されたセグメントを通して連続するようにされるが、本セグメントは、例えば、インフレームのリンカー配列により、物理的に、または空間的に分離され得る。例えば、免疫グロブリン可変領域の CDR をコードするポリヌクレオチドは、インフレームで融合され得るが、「融合した」CDR が、連続ポリペプチドの一部として共翻訳される限り、少なくとも 1 つの免疫グロブリン枠組み領域、または追加の CDR 領域をコードするポリヌクレオチドにより分離し得る。

20

30

【0072】

ポリペプチドの文脈において、「線状配列」または「配列」は、配列において、互いに隣接する残基がポリペプチドの 1 次構造において連続する、アミノ末端からカルボキシル末端方向での、ポリペプチド中のアミノ酸の順序である。

【0073】

本明細書で使用される「発現」という用語は、遺伝子が、例えば、RNA またはポリペプチド等の生化学物質を生成する過程を指す。本過程は、遺伝子ノックダウン、ならびに、一時的発現および安定発現の両方が挙げられるが、これらに限定されない、細胞内での、遺伝子の機能的存在の任意の発現を含む。それは、メッセンジャー RNA (mRNA)、トランスファー RNA (tRNA)、低分子ヘアピン型 RNA (shRNA)、低分子干渉 RNA (siRNA)、またはいずれの他の RNA 生成物への遺伝子の転写、およびポリペプチドへのこのような mRNA の翻訳を含むが、これらに限定されない。最終の所望の生成物が生化学物質である場合、発現は、その生化学および任意の前駆体の生成を含む。遺伝子の発現は、「遺伝子生成物」を生成する。本明細書で使用される遺伝子生成物は、例えば、遺伝子の転写により生成されるメッセンジャー RNA 等の核酸、あるいは転写から翻訳されるポリペプチドのいずれかであり得る。本明細書に記載される遺伝子生成物は、例えば、ポリアデニル化等の転写後修飾した核酸、または、例えば、メチル化、グ

40

50

リコシル化、脂質の添加、他のタンパク質のサブユニットとの関連、タンパク質分解的切断等の転写後修飾したポリペプチドをさらに含む。

【0074】

本明細書で使用される「治療（処置）する」または「治療（処置）」という用語は、治療的処置および予防的もしくは再発防止の両方を指し、その目的は、癌の発生または転移等の望ましくない生理学的変化または疾患を予防する、または遅延する（軽減する）ことである。有益な、または所望の臨床結果は、検出可能または検出できないにかかわらず、症状の緩和、疾病の範囲の縮小、疾病の安定化（すなわち、悪化しない）状態、疾病の進行の遅延もしくは緩徐化、疾病状態の改善もしくは緩和、および鎮静（部分的または完全な）が挙げられるが、これらに限定されない。「治療」はまた、治療を受けない場合の予想される生存と比較して、生存期間の延長を意味することができる。治療を必要とする者は、状態もしくは疾患にすでに罹患する者、ならびに、状態もしくは疾患を有する傾向がある者、または状態もしくは疾患の発現を予防している者を含む。

10

【0075】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」、または「哺乳類」は、任意の対象、特に、哺乳類の対象、例えば、診断、予後、予防、または治療が望ましいヒト患者を意味する。

【0076】

I I. 結合分子を同定する方法

本発明は、一般に、臨床的にあらかじめ選択されたヒト対象から治療的に効率的な抗体を発見する手段および方法に関する。実施例において示されるように、ヒト脳疾患における異常構造に対するヒト抗体を、表現型的には健康な、または臨床的に異常に安定した患者から単離することができ、対応する組み換え抗体を、実質的な副作用のない脳機能障害の治療、病状の改善、および予防に有効に使用することができる。疾病の臨床的な安定または非進行は、例として、臨床状態、例えば、認知状態（例えば、神経心理学試験による）の経時的測定、全体的な機能水準の評価、日常生活の能力または行動の欠陥の評価、脳構造の容量分析、脳内の異常タンパク質の病理学的沈着または体液（例えば、タウタンパク質、またはアミロイドβペプチド）における生化学変数の生体内測定（例えば、PETベータアミロイド画像）、および疾病の自然経過／経歴との比較により、同定することができる。したがって、本発明は、天然内因性タンパク質から派生し、例えば、異常タンパク質として、異型において、および／または、それらの正常な生理学的状況から患者の体内に蔓延している疾病関連タンパク質のネオエピトープを認識することが可能である、抗体および結合分子を提供する。特に、実施例に説明される抗体に対して概説されるように、免疫学的結合特性、および／または生物学的特性を示す、抗体およびその抗原結合フラグメントを提供する。存在する場合、すべてのその文法型において、「免疫学的結合特性」という用語、または抗原を有する抗体の他の結合特性は、抗体の特異性、親和性、交差反応性、および他の結合特性を指す。必然的に、本発明はまた、細胞株および組み換え細胞を生成する抗体にまで及ぶ。本発明は、さらに、本発明の結合分子を含む診断アッセイおよびキット、ならびに治療方法、およびそれに基づいた治療効果評価に関する。

20

30

【0077】

本発明は、ヒト対象、および特定の臨床基準に従い、あらかじめ選択された患者において、年齢のため、アルツハイマー病等の神経疾患を発症する危険性を抱えており、体液性の防御に関連して、アミロイドβペプチド凝集、神経原線維変化、ジストロフィー性軸索、およびさらには細胞構造等の内因性病態生理学的変異体に対する抗体が認められ、それらは、疾患に対する神経病理学的特性であるという観察に基づく。これらの構造は、単独に、または他の病理学的構造と組み合わせることで、アミロイドβ凝集体および神経原線維変化の前駆体の場合のように、病理学的効果を発現し得る。しかしながら、該構造を特異的に認識するそれらの抗体は、自己免疫反応の公知の例とは異なり、病理学的構造の基礎をなすタンパク質の通常の生理学的に機能的な型への交差反応性がない、または著しく低い交差反応性を示す。

40

50

【0078】

理論により結合される意図はなく、本発明に従って実行された実験に基づくと、疾患は、感染の場合のように、特定のB細胞またはB記憶細胞の生成または活性化等の体液性免疫系の実験的に測定可能な活性を起こすために、明確である必要はなく、表現型的には感知できると考えられている。生理学的に処理されなければならない、腫瘍細胞または分化した細胞の場合、その機構はすでに公知であり、細胞免疫系のT4ヘルパー細胞および細胞傷害性のT細胞、およびナチュラルキラー細胞等のパートナーは、アポトーシスの誘導に関与する。また、健康なヒト、腫瘍細胞、またはその前駆体において、突然変異によって、日々形成されることも仮定しなければならない。しかしながら、これらは、体液性および細胞機構によって、直ちにアポトーシスに向かい、腫瘍を検出することは不可能となる。この意味において、「健康な、または臨床的に異常に安定した、患者」とは、疾病事象が起こらない個体ではなく、多様な疾病の事象が、表現型的に発現する前に、遮断または防御機構によって制御される個体を意味する。

10

【0079】

上述を考慮すると、標的構造エピトープ、例えば、ネオエピトープの分子的性状の事前の認知なく、臨床的基準に従って、あらかじめ選択された特定の患者集団または健康な対象からの抗体または抗体生成細胞を同定することが可能であることが、本発明に従って仮定され、例えば、自己免疫の非存在により証明される、ドナーの有機体にすでに広がる耐性の場合、抗体は、組み換えによって生成された薬剤の形式で疾病に対してうまく利用され得る。したがって、このような抗体を同定するステップは、標的構造の分子エピトープの事前の認知なしに、むしろ、それぞれの疾病のヒト患者から、または動物モデルから派生する、臨床病理学的に十分に特徴付けられる組織切片における、病理学的に特徴的な構造のネオエピトープに結合することのみによって、行うことができる。

20

【0080】

それ故に、第1の態様において、本発明は、疾患関連タンパク質特異的結合分子を単離する方法に関し、それには、

(a) 症状はない、または臨床的に異常に安定しているが、疾患に罹患する、または疾患を発症するもしくは疾患の兆候または発生を効果的に抑制される危険性がある患者から得たサンプルを、所定の臨床特性の病理的もしくは生理学的に変化した細胞もしくは組織の標本に供するステップと、

30

(b) 該標本に選択的に結合するが、健康な対象から派生し得る、このような病理学的特性がない対応する細胞または組織に結合しない、または著しく低い親和性を有する、結合分子を同定し、任意に単離するステップと、を含む。

【0081】

本発明の方法は、当業者に公知の手段で実施例の部分において概説されるように、実施することができる。例えば、患者から得た液体サンプルは、オブジェクトホルダーにしっかりと固定される標本標的構造と接触するダクトの第1の開口を通過することができ、それにより、推定的結合分子は、それぞれ、可溶型でサンプルに存在するか、あるいは細胞表面および膜上に発現するかのうちのいずれかで、該標的構造に結合することを可能にする。液体サンプルは、例えば、リンパ球、および／または抗体を含み得るが、標本は、病理学的標的構造に対して明確に異なる、組織切片、または分子もしくは分子の組み合わせで被覆される膜であり得る。

40

【0082】

任意の非結合物質を、第2のダクト開口を介して除去することができる。同時に、オブジェクトホルダーの温度は、例えば、標本に対して特異的な抗原のネオエピトープへの推定結合分子の自然結合がヒト体内で起こる温度で、オブジェクトホルダーの温度自動調節器により制御され得る。例えば、結合分子を含む液体サンプルを、好ましくは、体温で、標的構造にわたって通過させる、流動作用によって、結合相互作用の自然系をシミュレートすることができる。しかしながら、攪拌器または回転台等を用いて標本で、サンプルをインキュベートする他の方法を使用し得る。上述の系の特定の利点は、オブジェクトホル

50

ダーの温度自動調節器を用いて、オブジェクトホルダーの温度を低下させることにより、代謝過程の中断がいつでも可能であることである。そうすることにおいて、オブジェクトホルダーの温度は、例えば、2～10℃、特に、4℃まで低下させることができる。本発明の方法に従って使用することができる、対応する機器は、欧州特許第EP 1 069 431 A2号に説明される。故に、本発明の方法は、結合パートナーの同定および特性化、ならびに、同時に、分子クラス、分子群、および／または結合過程に必要とされる分子部分、すなわち、今まで知られていない可能性がある、標本の標的構造を同定し、特性化することを可能にする。これは、診断の新しい可能性のある方法を開拓するだけでなく、分子レベルにおける治療的なアプローチのための新しい試験システムも提供するであろう。

10

【0083】

しかしながら、特異的な代理マーカーによって、高確率の疾病の状況が予測される場合、患者は、本発明に従って、健康な志願者のプールに適格であり得るが、驚くことに、恐らく、特異的な内因性免疫反応のためであるが、臨床的に明確とはなっていない。本意義において、多様な疾病に関連させて、健康な高齢者は、アルツハイマー病またはパーキンソン病等の神経変性の疾病が、まだ臨床的に兆候がないが、病態生理学的タンパク質変異体、すなわち、疾患関連タンパク質の前臨床発現が、上述の意義において、免疫系の細胞成分の関与の有無にかかわらず、体液性免疫系の初期介入によって、健康であるが、臨床前でない患者が試験に参加するまで、疾病の臨床的な兆候が未だに生じていない程度まで制限または遅延される、個人である。好ましくは、自己免疫学過程を診断されていない、または副作用として他の可能性のある病理学的状態が副作用を起こしていない、不明確な志願者は、第1の例において、サンプル用のドナーとして採用される。

20

【0084】

原則として、生理学的タンパク質またはペプチドの変異体を有する能動免疫法を受ける、患者からのサンプルを使用してもよく、抗体開発は、免疫付与により促進されている。例えば、抗体を、アミロイドβペプチドの予防注射を受けているアルツハイマー病の患者から同定および単離することができる。例えば、Hock et al., Nature Medicine 8:1280-1275 (2002)、Hock et al., Neuron 38:547-554 (2003)、および国際公開第WO2004/095031号を参照されたく、それぞれ、参照することによりその全体を本明細書に組み込む。しかしながら、変異体病理学的タンパク質が関連する、および／または原因となる、疾患に関してこのような免疫付与、および対応する薬物療法を受けていない、志願者からのサンプルを使用することが好ましい場合がある。

30

【0085】

本発明によると、患者、例えば、臨床的にあらかじめ選択されている個体のサンプルは、例えば、臨床病理学的に特徴付けられるヒト患者もしくは、例えば、トランスジェニックマウス等の動物モデルからの生体外組織、または体外細胞構造、または病理学的に同種もしくは異種組織における、病理学的に特徴的な構造の標本を特異的に認識する結合分子の存在に対して分析される。好ましくは、該患者、および／または標本を提供する該対象は、ヒトであり、最も好ましくは、その両方がヒトである。

40

【0086】

特徴的な病理学的または生理学的に変化したサンプル、細胞、または組織標本は、好ましくは、結合分子、例えば、本発明の抗体と反応した後、光学的な検出により表示される。該標本は、細胞サンプル、組織切片、細胞塗布の試験、ヒト疾患の動物モデルの細胞もしくは組織サンプル、または体外培養された細胞および組織物質として／から得られ得る。好ましくは、該標本のうちの少なくとも1つは、スキャンする位置の形式でオブジェクトホルダーに存在し、それぞれのスキャンする位置は、特定の病理学的構造に対応し、スキャンする位置のうちの少なくとも2つは、抗体との反応の検出に付随して曝露される。例として、アルツハイマー病、パーキンソン病、もしくはベータアミロイド班、レヴィー小体、神経原線維変化、およびジストロフィー性軸索を含む、タウオパチー等の神経変性

50

病の神経病理学的特質への抗体は、それぞれの疾病実体の臨床病理学的に確認された診断を有するヒト検視脳組織から得られた切片上で検出され得る。これは、スライドガラス上に少量のパラフィン包埋した組織を取り付けることによって行われ、その後、患者または健康なドナーのサンプルで精査される。抗体との反応の検出は、免疫組織化学および顕微鏡走査の以下の標準手順で行われる。

【0087】

様々なヒト疾患組織を含む多数の組織のマイクロセクションをスライドガラス上に集めて、多数の組織マイクロアレイを形成することができる。同様に、ヒト疾患の動物モデルの組織サンプル、細胞塗布もしくは細胞からの追加の標本を、パラフィンに包埋する、および単独で、または上記のヒト検視アルツハイマー病の脳組織もしくは組織アレイと組み合わせ、スライドガラス上に集めることができる。したがって、スライドガラス上の単一試験の位置は、混合したアレイの組織、および病理学的に特徴的な構造を表示する他の標本を含むことができる。

10

【0088】

アッセイのスループットを増加させるために、1つ以上の試験の位置をスライドガラス上に取り付ける。好ましくは、8つの試験の位置を、96ウェルまたはマイクロタイター形式に適合する2×4の形式においてスライドガラス上に取り付ける。このマイクロタイターに適合する組織マイクロアレイのさらに詳細な説明を、以下の補正方法の項目において、以下に見ることができる。

【0089】

前述のように、分析されるサンプルは、体液、細胞サンプル、または細胞サンプルもしくはその誘導体の浮遊物を含み得る。腰部の脳脊髄液(CSF)、血漿、または尿等の体液は、患者の承諾を得た後、標準臨床手順に従い採取することができる。最も好ましくは、サンプルは、B細胞もしくは記憶B細胞を含む、またはB細胞もしくは記憶B細胞から派生する、および／または抗体を含む。

20

【0090】

好ましくは、該患者は、まだ明確でない疾患に罹患する、または代理マーカーの存否により、または異常に安定した疾病経過により、該疾患を発症する危険性があると判定されている。臨床基準は、前臨床状態という意味の本発明に従い、疾病の発生もしくは兆候の増大する可能性のいずれかを有する代理マーカーに関連して、あるいは反対に、例えば、疾病を促進する遺伝子の集まりが実在する、または極端な露顕もしくは生活様式が起こりそうな疾病の表現型発達を表すため、すでに発生しているこのような疾病の起こりそうにない可能性を条件として、検討されるべきである。アルツハイマー病の場合は、これは、本発明によると、このようなヒト志願者を、ベータアミロイド班におけるアミロイドβ凝集、オリゴマーアミロイドβ種およびベータアミロイド線維のような、神経病理学関連タンパク質複合体に対抗するB細胞または記憶B細胞に対して、神経原線維変化におけるタウ繊維に対して、レヴィー小体におけるアルファシヌクレインに対して、または、年齢に関して、アルツハイマー病の有病率が特に高い、あるいは、アルツハイマー病に対して高い危険性を抱えている集団から遺伝的に由来するかのいずれかの個体の群に所属することが、これまでに分子的に同定されない成分に対して、探索することを意味する。これらは、例えば、神経心理学的に測定可能な認識機能障害がない、またはごくわずかしかな、75歳を超えた人、または腫瘍の兆候の場合には、高度に表示する腫瘍マーカー、例えば、遺伝子腫瘍マーカーを有するが、疾病を患っていない人である(Alloulet al., Arch. Gerontology Geriatrics 27(1998), 189; Dunn et al., Immunity 21(2004) 137-148)。軽度認識障害の場合には、これらは、さらなる経過において、臨床的に明確かつ進行する神経変性病を発症することに対して20%を超える年間統計による危険性にもかかわらず、数年間、臨床的に、神経心理学的に、または認知的に安定したままである、患者である。したがって、一実施形態において、該代理マーカーは、年齢期、脳アミロイド負荷、アポE遺伝子型、APP遺伝子型、PS1遺伝子型、アミロイドβペプチド、イソプ

30

40

50

ロスタン、タウ (Tau)、およびホスホタウ (phospho-Tau) の体液におけるレベルからなる群から選択される。

【0091】

本発明による方法を利用する特定のアプローチは、全く異なるまたは関連した原発性疾患の病理学的に特徴的な組織の標本のアレイに対して、臨床的にあらかじめ選択された志願者からのB細胞およびB記憶細胞のサンプルを試験する。特に、このような病理学的組織は、神経変性病、タンパク質の折り畳み異常 (protein-misfolding diseases)、組織アミロイド症、および病理学的沈着に関連した他の疾病、自己免疫疾患、炎症性疾患、過剰増殖性および腫瘍性疾患、例えば、腫瘍、蓄積症、および封入体病を患っているヒト患者、ならびにヒト疾患の動物モデルから、特に、病理的関連ヒト遺伝子で変化したマウスに由来する。

10

【0092】

一特定の好ましい実施形態において、本発明は、アルツハイマー病に焦点を当てる。本実施形態において、サンプルは、対象、好ましくは、以下の基準を満たす対象から得られる。

- a) 65歳、好ましくは70歳、さらに好ましくは75歳以上であること、
- b) 十分な認知能力および良好な健康状態を有すること、
- c) 認知症の臨床的兆候がないこと、または
- d) アルツハイマー病であり得る確立された臨床診断の存在にもかかわらず、疾病の進行が異常に遅いこと、または
- e) 軽度認知障害 (MCI) から末期のアルツハイマー病までの異常に低い変換率を有すること。

20

【0093】

さらなる実施形態において、本発明の方法は、

- a) 結合分子、例えば、該標本に選択的結合するが、健康な対象の対応する細胞または組織に結合しない、または著しくより低い親和性を有する、抗体を含むことが同定されているサンプルからB細胞またはB記憶細胞を精製するステップと、
- b) 該B細胞またはB記憶細胞から該抗体をコードする免疫グロブリン遺伝子レパートリーを取得するステップと、
- c) 該レパートリーを使用して、該抗体を発現するステップであって、ステップ (b) には、
- d) 該B細胞または記憶B細胞からmRNAを取得するステップと、
- e) ステップ (iv) の該mRNAからcDNAを取得するステップと、を任意に含む、
- f) プライマー伸長反応を使用して、該cDNAから該抗体の重鎖 (HC) およびカッパ/ラムダ軽鎖 (LC) に対応するフラグメントを増幅するステップと、をさらに含む。

30

【0094】

多クローン性B細胞活性化因子の存在下で、エプスタイン・バー・ウイルス (EBV) を使用して、ヒトB記憶リンパ球を変換するステップを含む、不死化ヒトB細胞およびB記憶リンパ球のクローンを産生する方法が、国際公開第WO 2004/076677号に概説される。本国際公開はまた、関心対象となる抗体をコードする核酸配列を取得する方法も記載し、それには、不死化B細胞クローンを調製するステップ、ならびに関心対象となる抗体をコードするB細胞クローンから核酸を取得する/配列するステップ、ならびに関心対象となる抗体を発現することができる発現宿主を調製するために核酸をさらに挿入する、もしくは使用するステップ、関心対象となる抗体を発現する条件下で発現宿主を培養する、もしくは二次培養するステップ、ならびに任意に関心対象となる抗体を精製するステップを含む。核酸は、制限酵素認識部位を導入する、コドン使用頻度を変更する、および/または、調節配列の転写および/または翻訳を付加もしくは最適化するために上記のステップの合間に、操作され得ることは言うまでもない。例えば、核酸配列を、ベクタ

40

50

ーNTIソフトウェア等のソフトウェアを使用して、本発明のポリペプチド配列の逆翻訳により生成し、コドン最適化およびRNA安定性に対して最適化する核酸配列を生成することができる。すべての本技術は、最先端であり、過度な負担なく、当業者により行うことができる。ヒトB細胞を不死化するさらなる方法は、例えば、ヒトハイブリドーマまたはヒトマウスキメラハイブリドーマの構築等、当技術分野において公知である。

【0095】

さらなる態様において、本発明は、疾病関連タンパク質のネオエピトープを含む、疾病関連タンパク質のエピトープを選択的に認識することが可能な結合分子に関し、好ましくは、上述に記載され、実施例に説明される、本発明の方法により取得し得る、または検証され得る。有利には、本発明の結合分子は、その非疾患関連型における、該タンパク質を

10

【0096】

結合分子、特に、抗体およびその模倣体の組み換え生成の手段および方法、ならびに、抗体であり得る、またはそうではない場合がある、競合する結合分子に対してスクリーニングする方法は当技術分野において公知であり、例えば、ベータアミロイドに対する抗体、およびアルツハイマー病の治療／診断に関して、国際公開第WO2006/103116号に要約され、その開示内容は、治療または診断的適用のために設計され、投与される抗体の目的のために、本明細書に参照することにより組み込まれる。

【0097】

しかしながら、本明細書に記載される、特に、ヒトにおける治療的適用に関して、本発明の抗体は、ヒト抗体である。本文脈において、抗体によって認識される変異病理学的タンパク質は、好ましくは、神経疾患、好ましくは脳疾患に関連する。

20

【0098】

さらに、実施例3から5に示されるように、本発明の結合分子、特に、抗体は、幾つかの有利な生物学的特性を有し、そのうち一つ以上は、初めて、本発明により達成されている。それらの特性は、例えば、

(i) 例えば、病理学的事象の部位で、血液脳関門を横断することが可能である、

(ii) ベータアミロイド斑、脳血管アミロイド、拡散性アミロイドβ沈着、神経原線維変化、過リン酸化タウ、アルファシヌクレイン陽性レヴィー小体またはジストロフィー性軸索に関連する、タンパク質凝集体に結合することが可能である、

30

(iii) 脳内のベータアミロイド斑を除去、および／または脳内のアミロイド斑の形成を予防することができる、

(iv) 正常な挙動に実質的に修復することが可能である、および／または

(v) 微小出血を引き起こさないことが可能である。

【0099】

特に好ましい実施形態において、本発明の抗体または等価結合分子は、以下の特性のうちの1つ以上により他の抗体から区別され得、例えば、それらは、

1. 病理学的事象の部位で、少なくとも少量において、血液脳関門を通過することができる、

2. 1つ以上の病理生理学的に関連のある細胞外または細胞構造に結合することができる、

40

3. 体外または生体内で、病理生理学的に関連のある構造の減少をもたらすことができる、

4. 病理生理学的に関連のある構造の還元およびそれに関連する毒性の減少をもたらすことができる、

5. 疾病過程の遮断または遅延をもたらすことができる、

6. 細胞の再生、ならびに臓器特異および有機体機能、場合により、病理生理学的に関連のある構造と関連がある毒性の分解後、元の病態生理学の再発の第二次予防をもたらすことができる、および／または

7. 増大する微小出血と関連しない。

50

【0100】

さらに、生理学的前駆体または誘導体との交差反応性の非存在は、第一に、健康な組織構造において、シンク効果が避けられるので、濃度は、予想可能であり、第二に、望ましくない副作用において、自己免疫反応が実質的に欠失しているという因果関係をもたらす。加えて、前述の報告は、脳アミロイド血管症（CAA）を罹患するトランスジェニックマウスモデルにおいて、CAAと障害が起きた血液反応性との関連性を示唆した（Mueggler et al., J Neurosci 22 (2002), 7218-24.）。老齢のアークAβマウスにおいて発生する重度のCAA（Knobloch et al., Neurobiol. Aging 28:1297-1306 (2007) epub July 31, 2006）は、したがって、罹患した血管の血管拡張させる柔軟性を抑制し得る。本発明によると、本発明の抗体での処置は、老齢のAPPトランスジェニックマウスにおいて、血管反応性および脳血流を改善することができることを予測することは賢明なことである。これは、上記のKnobloch et al. (2006)に記載のアークAβマウスモデルを使用することにより認証され得、2007年6月11日出願の米国特許第60/934,291号による、Grimmらの“Transgenic animal model for Alzheimer's disease”に開示され、それらの開示内容は、参照することにより本明細書に組み込まれる。

10

【0101】

I I I. 抗体

本発明は、結合分子、例えば、表2および3に示される、抗体およびその結合フラグメント、変異体、および誘導体等をさらに対象にする。本発明は、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をさらに特異的に対象にし、抗体が、NI-101.10、NI-101.11、NI-101.12、NI-101.13、NI-101.12F6A、NI-101.13A、およびNI-101.13Bからなる群から選択される参照抗体として、疾患関連タンパク質の同一のネオエピトープに特異的に結合する。

20

【0102】

本発明は、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をさらに示し、該抗体は、NI-101.10、NI-101.11、NI-101.12、NI-101.13、NI-101.12F6A、NI-101.13A、およびNI-101.13Bからなる群から選択される参照抗体が、疾患関連タンパク質のネオエピトープへ結合するのを競合的に阻害する。

30

【0103】

本発明はまた、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体にも向けられ、本抗体は、NI-101.10、NI-101.11、NI-101.12、NI-101.13、NI-101.12F6A、NI-101.13A、およびNI-101.13Bからなる群から選択される抗体の抗原結合ドメインと同一の抗原結合ドメインを含む。

【0104】

本発明は、例えば、抗体およびその結合フラグメント等の幾つかのこのような結合分子をさらに例示し、それは、可変領域、例えば、結合ドメインにおいて、表2（V_H）および表3（V_L）に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含む、V_Hおよび／またはV_L可変領域の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含むことにより特徴付けられ得る。

40

【0105】

【表 2 - 1】

表 2：ネオエピトープ特異抗体のV_H領域のアミノ酸配列

抗体	可変重鎖配列
NI-101.10	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFAFSSYGHWVRQAPGKGLEWVAVIWFD GTKKYYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYC CARDRGIGARRGP YYMDVWGKGT TVTVSS (配列番号4)
NI-101.11	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWF DGTKKYYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYC CARDRGIGARRG PYYMDVWGKGT TVTVSS (配列番号6)
NI-101.12	EVQLVESGPGVLVKAETLSLTCTVSGGSIRSGSICWYWRQPPGKGLEWIGYFCYS GATFYTPSLRGLTISVDASKNQLSLSSVTAADTAVYYCARRAGENS GGIEPYY GMDVWGQGT TVTVSS (配列番号10)
NI-101.13	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISRRSYWGWIRQSPGKGLEWSGSIHYS GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRWGSSWVFDY WGQGT LTVSS (配列番号14)

10

【 0 1 0 6】

【表 2 - 2】

NI-101.12 F6A	QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWF DGTKKYYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYC CARDRGIGARRG PYYMDVWGKGT TVTVSS (配列番号39)
NI-101.13 A	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISRRSYWGWIRQSPGKGLEWSGSIHYS GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRWGSSWVFDY WGQGT LTVSS (配列番号 42)
NI-101.13 B	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISRRSYWGWIRQSPGKGLEWSGSIHYS GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRWGSSWVFDY WGQGT LTVSS (配列番号 43)

20

【 0 1 0 7】

30

【表 3】

表 3 : ネオエピトープ特異抗体のV_L領域のアミノ酸配列

抗体	可変軽鎖配列(カッパまたはラムダ)
NI-101.10	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKR (配列番号8)
NI-101.11	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKR (配列番号8)
NI-101.12	DEIVLTQSPSSLSASIGDRVITTCRASESINKYVNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG GAPSRV SGSGFGRDFSLTISGLQAEDFGAYFCQQSYSAPTYFGQGTKVEIKRT (配列番号12)
NI-101.13	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSNIGSNYVYWYQQPPGTAPKLLIYRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGKVTVLG (配列番号16)
NI-101.12 F6A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG GVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKR (配列番号41)
NI-101.13 A	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTRTFGQGTKVEIKR (配列番号44)
NI-101.13 B	DIQLTQSPSTLSASVGDRVITTCRASQSISSWLAWYQQIPGKAPKLLIYKASSLESG VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQYNSYSRTFGQGTKLEIKR (配列番号45)

上記の同定された可変領域をコードする対応するヌクレオチド配列を、添付した配列表に記載する。表 2 および 3 に示される、V_H および / または V_L 領域の上記のアミノ酸配列の例示的な組の C D R を表 4 に掲載する。しかしながら、以下に論じられるように、当業者は、加えて、または代替として C D R を使用し得るという事実を十分承知しており、それらのアミノ酸配列において、C D R 2 および C D R 3 の場合に、1 つ、2 つ、3 つ、またはさらにそれ以上のアミノ酸により、表 4 に記載されるものとは異なる。

【 0 1 0 8 】

【表 4 - 1】

表 4 : ネオエピトープ特異抗体の V_H および V_L 領域の K a b a t の命名法における C D R タンパク質配列の名称

抗体	可変重鎖	可変軽鎖
NI-101.10		
CDR1	SYGIH (配列番号17)	RASQSISSYLN (配列番号23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (配列番号18)	AASSLQS (配列番号24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (配列番号19)	QQSYSTPLT (配列番号25)
NI-101.11		
CDR1	SYGMH (配列番号20)	RASQSISSYLN (配列番号23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (配列番号21)	AASSLQS (配列番号24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (配列番号22)	QQSYSTPLT (配列番号25)
NI-101.12		
CDR1	SGSIC (配列番号26)	RASESINKYVN (配列番号29)
CDR2	WIGYFCYSGATFYTPSLRG (配列番号27)	AASSLQS (配列番号30)
CDR3	RAGENSGGIEPYGMDV (配列番号28)	QQSYSAPYT (配列番号31)
NI-101.13		
CDR1	RRSYYWG (配列番号32)	SGSSSNIGSNYVY (配列番号35)
CDR2	SIHYSGSTYYNPSLKS (配列番号33)	RNNQRPS (配列番号36)
CDR3	SRWGSSWVFDY (配列番号34)	AAWDDSLSGYV (配列番号37)
NI-101.12F6A		

【 0 1 0 9 】

【表 4 - 2】

CDR1	SYGMH (配列番号20)	RASQSISSYLN (配列番号23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (配列番号21)	AASSLQS (配列番号24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (配列番号22)	QQSYSTPLT (配列番号25)
NI-101.13A		
CDR1	RRSYYWG (配列番号32)	RASQSISSYLN (配列番号46)
CDR2	SIHYSGSTYYNPSLKS (配列番号33)	AASSLQS (配列番号47)
CDR3	SRWGSSWVFDY (配列番号34)	QQSYSTRT (配列番号48)
NI-101.13B		
CDR1	RRSYYWG (配列番号32)	RASQSISSWLA (配列番号49)
CDR2	SIHYSGSTYYNPSLKS (配列番号33)	KASSLES (配列番号50)
CDR3	SRWGSSWVFDY (配列番号34)	QQYNSYSRT (配列番号51)

一実施形態において、本発明の抗体は、表 2 および 3 に示される、 V_H および／または V_L 領域のアミノ酸配列を含む抗体のうちのいずれか 1 つである。代替として、本発明の抗体は、抗体またはその抗原結合フラグメントであり、表 2 および 3 に示される、 V_H および／または V_L 領域を有する抗体のうちの少なくとも 1 つとネオエピトープに結合することに関して競合する。それらの抗体は、マウス抗体でもあり得るが、しかしながら、特

に、治療用途において、ヒト化抗体、異種抗体、またはキメラヒトマウス抗体であることが好ましい。抗体の抗原結合フラグメントは、例えば、一本鎖Fvフラグメント(s c Fv)、F(ab')フラグメント、F(ab)フラグメント、およびF(ab')₂フラグメントであり得る。幾つかの用途では、抗体的可変領域のみを必要とし、それはFab'、Fab、またはF(ab')₂部分を生成するために、適切な試薬で抗体を処置することにより得られる。このようなフラグメントは、例えば、免疫グロブリンの免疫特異部位を放射性同位体等の検出試薬に結合することに関与する免疫診断の手順に使用するには十分である。

【0110】

本発明は、本発明の抗体を構成する単離されたポリペプチドをさらに対象とする。本発明の抗体は、例えば、免疫グロブリン分子から派生する、特異的抗原結合領域をコードするアミノ酸配列等のポリペプチドを含む。指定されたタンパク質「から派生する」ポリペプチドまたはアミノ酸配列とは、あるアミノ酸配列を有するポリペプチドの複製起点を指す。ある場合において、特定の出発ポリペプチドまたはアミノ酸配列から派生する、ポリペプチドまたはアミノ酸配列は、出発配列のアミノ酸配列またはその一部に本質的に同一のアミノ酸配列を有し、該部分は、少なくとも10～20個のアミノ酸、少なくとも20～30個のアミノ酸、少なくとも30～50個のアミノ酸からなる、またはそうでなければ、出発配列の複製起点を有することが、当業者に同定可能であるものである。

【0111】

別の実施形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)を含む、本質的には免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)からなる、または免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)からなる単離ポリペプチドを提供し、重鎖可変領域のうちの少なくとも1つのVH-CDR、または重鎖可変領域のVH-CDRのうちの少なくとも2つは、本明細書に開示された抗体からの参照重鎖VH-CDR1、VH-CDR2、またはVH-CDR3アミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、または95%同一である。代替として、VHのVH-CDR1、VH-CDR2、およびVH-CDR3領域は、本明細書に開示された抗体からの参照重鎖VH-CDR1、VH-CDR2、およびVH-CDR3アミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、または95%同一である。したがって、本実施形態によると、本発明の重鎖可変領域は、上表4に示される群に関連するVH-CDR1、VH-CDR2、およびVH-CDR3ポリペプチド配列を有する。表4は、Kabataシステムにより定義されるVH-CDRを示す一方、他のCDR定義、例えば、Chothiaシステムにより定義されるVH-CDRもまた、本発明に含み、表2および3に提示されるデータを使用して、当業者により容易に同定され得る。

【0112】

別の実施形態において、本発明は、VH-CDR1、VH-CDR2、およびVH-CDR3領域は、表4に示される、VH-CDR1、VH-CDR2、およびVH-CDR3群に同一である、ポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)を含む、本質的には免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)からなる、または免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)からなる単離ポリペプチドを提供する。

【0113】

別の実施形態において、本発明は、VH-CDR1、VH-CDR2、およびVH-CDR3領域は、いずれか1つのVH-CDRにおいて、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアミノ酸置換を除いて、表4に示される、VH-CDR1、VH-CDR2、およびVH-CDR3群に同一である、ポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)を含む、本質的には免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)からなる、または免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)からなる単離ポリペプチドを提供する。ある実施形態において、アミノ酸置換は、保存的である。

【0114】

別の実施形態において、本発明は、免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)を含む、本質的には免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)からなる、または免疫グロブリン軽鎖可変領

10

20

30

40

50

域（VL）からなる単離ポリペプチドを提供し、軽鎖可変領域のうちの少なくとも1つのVL-CDR、または軽鎖可変領域のうちの少なくとも2つのVL-CDRは、本明細書に開示された抗体からの参照軽鎖VL-CDR1、VL-CDR2、またはVL-CDR3アミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、または95%同一である。代替として、VLのVL-CDR1、VL-CDR2、およびVL-CDR3領域は、本明細書に開示された抗体からの参照軽鎖VL-CDR1、VL-CDR2、およびVL-CDR3アミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、または95%同一である。したがって、本実施形態に従い、本発明の軽鎖可変領域は、上表4に示されるポリペプチドに関連してVL-CDR1、VL-CDR2、およびVL-CDR3ポリペプチド配列を有する。表4は、Kabataシステムにより定義されるVL-CDRを示す一方、他のCDR定義、例えば、Chothiaシステムにより定義されるVL-CDRもまた、本発明に含む。

10

【0115】

別の実施形態において、本発明は、VL-CDR1、VL-CDR2、およびVL-CDR3領域は、表4に示される、VL-CDR1、VL-CDR2、およびVL-CDR3群に同一である、ポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン軽鎖可変領域（VL）を含む、本質的には免疫グロブリン軽鎖可変領域（VL）からなる、または免疫グロブリン軽鎖可変領域（VL）からなる単離ポリペプチドを提供する。

【0116】

別の実施形態において、本発明は、VL-CDR1、VL-CDR2、およびVL-CDR3領域は、いずれか1つのVL-CDRにおいて、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアミノ酸置換を除いて、表4に示される、VL-CDR1、VL-CDR2、およびVL-CDR3群に同一である、ポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン重鎖可変領域（VL）を含む、本質的には免疫グロブリン重鎖可変領域（VL）からなる、または免疫グロブリン重鎖可変領域（VL）からなる単離ポリペプチドを提供する。ある実施形態において、アミノ酸置換は、保存的である。

20

【0117】

免疫グロブリンまたはそのコードするcDNAは、さらに修飾され得る。したがって、さらなる実施形態において、本発明の方法は、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、Fab-フラグメント、二重特異的抗体、融合抗体、標識化抗体、またはそれらのうちのいずれか1つの類似体を生成するためのステップのうちのいずれか1つを含む。対応する方法は、当業者には公知であり、例えば、Harlow and Lane “Antibodies, A Laboratory Manual”, CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988に記載される。該抗体の誘導体は、ファージ提示法により得られる場合、BIAcoreシステムに利用される、表面プラズモン共鳴は、本明細書に記載の抗体のうちのいずれか1つのファージ抗体と同一のエピトープに結合するファージ抗体の効率を増大させるために使用することができる（Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105、Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13）。キメラ抗体の産生は、例えば、国際公開第WO89/09622号に記載される。ヒト化抗体の産生方法は、例えば、欧州特許第EP-A1 0 239 400号および国際公開第WO90/07861号に記載される。本発明に従って、利用される抗体のさらなる起源は、いわゆる異種抗体である。マウスにおけるヒト抗体等の異種抗体の産生のための一般の原理は、例えば、国際公開第WO91/10741号、第WO94/02602号、第WO96/34096号、および第WO96/33735号に記載される。上記に論じられるように、本発明の抗体は、様々な型に存在し、完全抗体のほか、例えば、Fv、Fab、およびF(ab)₂を含む、ならびに一本鎖を含み得る。例えば、国際公開第WO88/09344号を参照されたい。

30

40

【0118】

本発明の抗体またはそれらの対応する免疫グロブリン鎖は、当技術分野において既知の

50

従来の技法を使用して、例えば、アミノ酸の欠失、挿入、置換、付加、および／または組み換え、および／または単独、あるいは組み合わせのいずれかで、当術分野において既知のいずれの他の修飾を使用することにより、さらに修飾することができる。免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列の基礎をなすDNA配列におけるこのような修飾を導入する方法は、当業者に公知である。例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. および Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1994) を参照されたい。本発明の抗体の修飾は、1つ以上の構成アミノ酸における化学的および／または酵素的誘導体化を含み、例えば、側鎖修飾、骨格修飾、ならびにNおよびC末端修飾、例えば、アセチル化、水酸化、メチル化、アミド化、および炭水化物または脂質部分、共同因子等の付着を含む。同様に、本発明は、記載の抗体またはカルボキシル末端での免疫刺激リガンド等の異種分子に融合されたアミノ末端での幾つかのそのフラグメントを含む、キメラタンパク質の産生を包含する。例えば、対応する技術的詳細に関しては、国際公開第WO00/30680号を参照されたい。

【0119】

さらに、本発明は、上に記載される、結合分子を含むもの、例えば、重鎖CDR3 (HCDR3) は、抗原抗体相互作用において、さらに高い変動率、および優勢な関与を有する領域であることが、しばしば、観察されているため、言及された抗体、特に、重鎖のCDR3のうちのいずれか1つの可変領域のCDR3領域を含む、小ペプチドを包含する。このようなペプチドは、本発明に従って、有用な結合剤を生成するための組み換え手段により、容易に合成される、または生成され得る。このような方法は、当業者には公知である。ペプチドは、例えば、市販の自動ペプチドシンセサイザーを使用して、合成することができる。ペプチドは、ペプチドを発現するDNAを発現ベクターに組み込み、細胞を発現ベクターに変えてペプチドを産生することにより、組み換え技術によって、産生することができる。

【0120】

故に、本発明は、任意の結合分子、例えば、上に記載の手段に従って得られ、言及される特性を表示する、すなわち、ネオエピトープを特異的に認識する、抗体または結合フラグメントに関する。このような抗体および結合分子は、例えば、以前、本明細書に記載のネオエピトープ特異的結合分子を単離する方法を使用することにより、それらの結合特異性および親和性に対して試験することができる。

【0121】

不死化B細胞またはB記憶細胞の培養から直接免疫グロブリンを得るための代替手段として、不死化細胞を、その後の発現および／または遺伝子操作に対して、再配列された重鎖および軽鎖遺伝子座の起源として使用することができる。再配列された抗体遺伝子を適切なmRNAから逆転写し、cDNAを産生することができる。必要に応じて、重鎖定常領域は、異なるイソタイプの重鎖定常領域と交換する、または共に除去することができる。該可変領域は、一本鎖Fv領域をコードするために連結することができる。多数のFv領域を連結し、利用することができる、1つ以上の標的またはキメラ重鎖および軽鎖の組み合わせに結合能力を与えることができる。遺伝物質が利用可能となると、所望の標的に結合する能力を共に保有する上に記載の類似体の設計は容易である。抗体可変領域のクローニング方法、および組み換え抗体の産生方法は、当業者に公知であり、例えば、Gilliland et al., Tissue Antigens 47 (1996), 1-20、Doenecke et al., Leukemia 11 (1997), 1787-1792に記載される。

【0122】

一旦、適切な遺伝物質を得、必要に応じて、類似体をコードするために修飾されると、最小限に、重鎖および軽鎖の可変領域をコードするものを含むコード配列を、標準組み換

え宿主細胞にトランスフェクトすることができるベクター上に含まれる、発現系に挿入することができる。このような様々な宿主細胞を使用し得るが、効率的過程のためには、哺乳類細胞が好ましい。本目的のために有用な典型的な哺乳類細胞株としては、CHO細胞、HEK293細胞、またはNSO細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0123】

抗体または類似体の産生は、その後、宿主細胞の成長およびコード配列の発現に適切な培養状態で、修飾された組み換え宿主を培養することにより行われる。抗体は、その後、培養物からそれらを単離することにより回復される。発現系は、得られる抗体を培地中に分泌されるが、細胞内産生も可能であるように、シグナルペプチドを含むように設計されることが好ましい。

10

【0124】

標的構造、例えば、疾病関連タンパク質が、その中にサンプルおよびそれぞれの結合分子によりタグをつけられると、例えば、国際公開第WO00/11208号に記載される方法、およびHock et al., Nat Med 8 (2002), 1270-1275、Hock et al., Neuron 38 (2003), 547-554に記載される特定の等方法の質量分光(MS)法を使用して、当技術分野において公知の手段および方法により同定され得る。したがって、病理学的構造、例えば、病理学的な脳エリア切片中のベータアミロイド斑に結合するが、著しく健康な組織ではない、体外で産生される、本発明に従って同定される抗体の場合、病理学的組織から抗体に、その結合特性を介して、分子標的構造が実質的に濃縮および精製することができ、その結果、例えば、MALDI/TOF (Williams, Methods Cell Biol. 62 (2000), 449-453、Yates, J. Mass Spectrom. 33 (1998), 1-19)等のタンパク質分析法および質量分光法により同定および特徴付けることができる、有望な抗体候補が同定されている。

20

【0125】

それ故に、別の実施形態において、本発明は、結合分子、特に、上に記載の本発明の抗体により認識され、好ましくは、疾患関連タンパク質の少なくとも一部である、抗原に関する。

【0126】

上記に従って、本発明はまた、本発明の抗原または結合分子をコードするポリヌクレオチドに関し、該抗体の場合、好ましくは、上に記載の抗体の免疫グロブリン鎖の少なくとも可変領域である。典型的には、ポリヌクレオチドによりコードされる該可変領域は、該抗体の可変領域のV_Hおよび/またはV_Lの少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含む。当業者は、抗体のそれぞれの可変ドメイン(重鎖V_Hおよび軽鎖V_L)は、時々、4つの比較的に保存された枠組み領域または「FR」により側面に位置される、相補性決定領域または「CDR」と称される、3つの超可変領域を含み、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指すことを理解している。抗体のヒトIgGサブタイプの超可変領域またはCDRは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991)により記載される、軽鎖可変ドメインにおける、残基24~34(L1)、50~56(L2)、および89~97(L3)からのアミノ酸残基、ならびに重鎖可変ドメインにおける、31~35(H1)、50~65(H2)、および95~102(H3)からのアミノ酸残基、および/または、超可変環状からの残基、例えば、Chothia et al., J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917により記載される、軽鎖可変ドメインにおける、残基26~32(L1)、50~52(L2)、および91~96(L3)、ならびに重鎖可変ドメインにおける、残基26~32(H1)、53~55(H2)、および96~101(H3)からのアミノ酸残基を含む。枠組みまたはFR残基は、超可変領域以外、および超可変領域をひとまとめにする、可変ドメイン残基である。「特異結合」という用語

30

40

50

は、所定の抗原に結合する抗体を指す。典型的には、抗体は、 10^{-7} M未満の解離定数 (K_D) で結合し、所定の抗原以外の非特異性抗原 (例えば、BSA、カゼイン、またはいずれの他の特定ポリペプチド) に結合するために、その K_D よりも少なくとも2分の1少ない、 K_D を有する所定の抗原に結合する。「抗原を認識する抗体」および「抗原に対して特異的な抗体」という語句は、本明細書において、「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と、同義的に使用される。本明細書で使用される「高度に特異的」結合は、特異的な標的エピトープ、例えば、ネオエピトープに対する抗体の相対値 K_D は、他のリガンド、または疾病関連タンパク質の天然対応物への抗体を結合するための K_D の、少なくとも10分の1少ない K_D であることを意味する。

【0127】

抗原に対する抗体の親和性または親和力を、任意な適切な方法を使用して、実験的に決定することができる。例えば、Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, NY (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, NY (1992)、ならびに本明細書に記載の方法も参照されたい。抗原に対する抗体の親和性を測定するための一般的な方法は、ELISA、RIA、および表面プラズモン共鳴を含む。特定の抗体抗原の相互作用の測定された親和性は、例えば、塩濃度、pH等の異なる条件下で測定される場合、異なり得る。したがって、親和性、および、例えば K_D 、 IC_{50} の他の抗原結合パラメータの測定は、好ましくは、抗体および抗原の標準化された溶液、および標準化された緩衝液で作製される。

【0128】

当業者は、上に記載の可変ドメインを有する抗体の可変ドメインを、他のポリペプチドまたは所望の特異性および生物学的機能の抗体の構築物のために使用することができることを容易に理解するであろう。したがって、本発明はまた、上に記載の可変ドメインの少なくとも1つのCDRを含み、有利に、添付の実施例に記載される、抗体と同一または類似の結合特性を実質的に有する、ポリペプチドおよび抗体を包含する。当業者は、本明細書に記載の可変ドメインまたはCDRを使用して、抗体を、当技術分野において既知の方法、例えば、欧州特許第EP 0 451 216 A1号および第EP 0 549 581 A1号に記載される方法に従って構築することができることを容易に理解するであろう。さらに、当業者は、結合親和性が、CDR内または超可変環状内でアミノ酸置換を作製することにより増進し得ることを理解しており (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917)、それは、Kabataに定義されるように、CDRで部分的に重複する。したがって、本発明はまた、抗体に関し、1つ以上の記述されたCDRは、1つ以上のアミノ酸置換、好ましくは2つ以下のアミノ酸置換を含む。好ましくは、本発明の抗体は、その免疫グロブリン鎖のうちの1つまたは両方において、表4に記載されるように、可変領域の2つまたはすべて3つのCDRを含む。

【0129】

結合分子、例えば、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、当業者に公知のように、1つ以上のエフェクター機能を媒介する定常領域を含むことができる。例えば、相補体のC1成分の抗体定常領域への結合は、相補体系を活性化し得る。相補体の活性化は、細胞の病原体のオプソニン化および溶解において重要である。相補体の活性化はまた、炎症反応を刺激し、自己免疫過敏性にも関与し得る。さらに、抗体は、細胞上のFc受容体 (FcR) に結合する抗体Fc領域上におけるFc受容体結合部位で、Fc領域を介して、様々な細胞上の受容体に結合する。IgG (ガンマ受容体)、IgE (エプシロン受容体)、IgA (アルファ受容体)、およびIgM (ミュー受容体) を含む、抗体の異なるクラスに対して特異的である、多くのFc受容体が存在する。細胞表面上で抗体のFc受容体への結合は、多くの重要かつ様々な生物学的反応を

誘発し、それには、抗体被覆された粒子の巻き込みおよび破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞により抗体被覆された標的細胞の溶解（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害、またはADCCと称する）、炎症性メディエータの放出、免疫グロブリン産生の胎盤通過および制御が含まれる。

【0130】

従って、本発明のある実施形態は、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体を含み、1つ以上の定常領域ドメインのうちの少なくとも一部分は、ほぼ同一の免疫原性の全不変抗体と比較する場合、低減されたエフェクター機能、非共有結合的に二量化する能力、腫瘍の部位で特定するための増大する能力、血中半減期の低減、もしくは増大する血中半減期等の所望の生化学的性質を提供するために、削除される、またはそれ以外の方法で改変される。例えば、本明細書に記載される、診断および治療方法で用いる、ある抗体は、免疫グロブリン重鎖に類似するポリペプチド鎖を含むが、1つ以上の重鎖ドメインの少なくとも一部分を欠失する、ドメイン欠失抗体である。例えば、ある抗体において、修飾抗体の定常領域の1つの全ドメインを欠失する、例えば、CH2ドメインのすべてまたはその一部を欠失する。他の実施形態において、本明細書に記載される診断および治療方法で用いる、ある抗体は、定常領域、例えば、IgG重鎖定常領域を有し、グリコシル化を排除するために改変され、本明細書の他の部分にアグリコシル化抗体または「アグリ」抗体と言われる。このような「アグリ」抗体は、酵素的に、ならびに、定常領域において、合意のグリコシル化部位を改変することにより調製され得る。理論により結合されないが、「アグリ」抗体は、生体内で改善された安全かつ安定性のあるプロファイル

10

20

【0131】

本明細書に記載される、ある抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体において、当技術分野において既知の技術を使用して、Fc部分を変異させ、エフェクター機能を削減され得る。例えば、定常領域ドメインの欠失または不活性化（点変異または他の手段によって）は、循環する修飾抗体の結合するFc受容体を削減し、それにより、腫瘍局在を増大する。他の場合において、本発明と一致する定常領域修飾は、相補体結合を緩和し、ひいては、血中半減期および共役された細胞毒素の非特異性の関連性を削減し得る。定常領域のさらに別の修飾は、増大する抗原特異性または抗体柔軟性のため、局在化の強化を可能にするジスルフィド結合またはオリゴ糖部分を修飾するために使用され得る。得られる生理学的プロファイル、バイオアベイラビリティ、および腫瘍局在、生体内分布、ならびに血中半減期等の修飾の他の生化学的影響は、過度な実験を行うことなく、公知の免疫学的技法を使用して、容易に測定および定量化され得る。

30

【0132】

本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体の修飾型は、当技術分野において既知の技法を使用して、全前駆体または親抗体から作製され得る。例示的な技法は、本明細書でさらに詳細に論じられる。

【0133】

40

ある実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体の可変および定常領域は共に、完全なヒトである。完全なヒト抗体は、当技術分野において既知であり、本明細書に記載される技法を使用して、作製され得る。例えば、特異的抗原に対して完全なヒト抗体を、抗原投与に応じてこのような抗体を産生するように修飾されているが、内因性遺伝子座が無効にされている、トランスジェニック動物に抗原を投与することにより調製することができる。このような抗体を作製するために使用することができる例示的な技法を、米国特許第6,150,584号、第6,458,592号、第6,420,140号に記載する。他の技法は、当技術分野において既知である。同様に、完全なヒト抗体は、本明細書の他の部分でさらに詳細に記載されるように、様々な表示技法、例えば、ファージ提示、または他のウイルス表示システム等により、

50

産生され得る。

【0134】

本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体を、当技術分野において既知の技法を使用して、作製または製造することができる。ある実施形態において、抗体分子またはそのフラグメントは、「組み換え技術によって産生された」、すなわち、組み換えDNA技術を使用して産生される。抗体分子またはそのフラグメントを作製する例示的な技法は、本明細書の他の部分でさらに詳細に論じられる。

【0135】

本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体はまた、修飾される、例えば、共有結合は、抗体がその類似したエピトープに特異的に結合することを阻止しないように、抗体への任意の型の分子の共有結合による誘導体も含む。例えば、限定されないが、抗体誘導体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化反応、アミド化、公知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質分解的切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への結合等により修飾される、抗体を含む。任意の多数の化学修飾を、特異的の化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成等が挙げられるが、これらに限定されない、公知の技法により実施することができる。さらに、本誘導体は、1つ以上の非古典的なアミノ酸を含み得る。

【0136】

ある実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、処置される動物、例えば、ヒトにおける、有害免疫反応を引き出さない。ある実施形態において、結合分子、例えば、本発明の抗体もしくはその抗原結合フラグメントは、患者、例えば、ヒト患者から派生し、有害免疫反応の発生を緩和する、または最小化する、例えば、ヒトから派生する同一の種に実質的に使用される。

【0137】

脱免疫化をもまた、抗体の免疫原性を低減するために使用することができる。本明細書で使用される「脱免疫化」という用語は、T細胞エピトープを修飾するために、抗体の改変を含む（例えば、国際公開第WO9852976A1号、第WO0034317A2号を参照されたい）。例えば、出発抗体からのVHおよびVL配列を分析し、それぞれのV領域からのヒトT細胞エピトープ「マップ」は、相補性決定領域（CDR）および配列内の他の重要な残基に関してエピトープの配置を示す。T細胞エピトープマップからの個々のT細胞エピトープは、最終抗体の活性を変化させる危険性が低い、代替的アミノ酸置換を同定するために、分析される。一連の代替的VHおよびVL配列は、アミノ酸置換の組み合わせを含み、設計され、これらの配列は、本明細書に開示された診断および治療方法で用いる、一連の結合ポリペプチド、例えば、ネオエピトープ特異的抗体、またはその免疫特異性フラグメントに実質的に組み込まれ、それらは、その後、機能に対する試験をする。典型的には、12個から24個の変異抗体を生成し、試験する。修飾されたVおよびヒトC領域を含む、完全な重鎖および軽鎖遺伝子は、その後、発現ベクターにクローンされ、次のプラスミドを全抗体の産生のために細胞株に導入した。該抗体は、その後、適切な生化学的および生物学的アッセイで比較され、最適変異体を同定する。

【0138】

モノクローナル抗体を当技術分野において既知の広範な技法を使用して調製することができる、それらの技法には、ハイブリドーマ、組み換え、ファージ提示法、またはそれらの組み合わせの使用が含まれる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野において既知の、例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)、Hammerling et al., *in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N. Y., 563-681 (1981)に教示されているものを含む、ハイブリドーマ技法を使用して産生することができる（該参考文献は、その全体において、参照することにより組み込まれる）。本明細書で使用される「モノクロ

10

20

30

40

50

ーナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術を通して産生される抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、それを産生する方法でなく、任意の真核性、原核生物、またはファージクローンを含む、単一クローンから派生する抗体を指す。したがって、「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術を通して産生される抗体に限定されない。モノクローナル抗体を、当技術分野において既知の広範な技法を使用して、調製することができる。ある実施形態において、本発明の抗体は、本明細書に記載されるように、エプスタイン・バー・ウイルスでの転換を介して不死化されているヒトB細胞から派生される。

【0139】

公知のハイブリドーマ過程 (Kohler et al., Nature 256: 495 (1975)) において、哺乳類からの比較的短命、または致命的なリンパ球、例えば、本明細書に記載される、ヒト対象から派生されるB細胞が、不死腫瘍細胞株（例えば、骨髄腫細胞株）で融合され、したがって、ハイブリッド細胞、または「ハイブリドーマ」を産生し、それらは共に、不死であり、B細胞の遺伝的にコードされた抗体を産生することができる。得られるハイブリッドを、選択、希釈、および単一抗体の形成のための特異的遺伝子を含む、それぞれの個々の株で再生により、単一の遺伝子株に分離される。これらは、抗体を産生し、所望の抗原に対して同種であり、その純粋な遺伝起源 (genetic parentage) に関して「モノクローナル抗体」と呼ばれる。

【0140】

そのようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない、親骨髄腫細胞の成長または生存を阻害する1つ以上の物質を好ましくは含む、適した培養培地中に播種および培養する。当業者は、ハイブリドーマの形成、選択、および成長のための試薬、細胞株、および培地が、多くの供給元から市販され、標準化プロトコルが確立されていることを理解するであろう。一般に、ハイブリドーマ細胞が成長する培養培地は、所望の抗原に対してモノクローナル抗体の産生のために分析される。ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、本明細書に記載される、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ (RIA)、または酵素結合免疫吸着法 (ELISA)、ネオエピトープ結合法等の体外検定により決定される。所望の特異性、親和性および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンは、希釈過程を限定することによりサブクローン化し、標準方法により増殖され得る (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp 59-103 (1986))。サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、タンパク質A、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、もしくは親和性クロマトグラフィー等の従来の精製手順により、培養培地、腹水、もしくは血清から分離され得ることをさらに理解されよう。

【0141】

特異的エピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技法により生成され得る。例えば、FabおよびF(ab')₂フラグメントは、(Fabフラグメントを産生するための) パパインまたは(F(ab')₂フラグメントを産生するための) ペプシン等の酵素を使用して、組み換え技術、または免疫グロブリン分子のタンパク質分解的切断により産生され得る。F(ab')₂フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域、および重鎖のCH1ドメインを含む。

【0142】

本明細書に記載されるような完全ヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置に対して特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列から派生する抗体ライブラリーを使用する、上に記載のファージ提示法を含む、当技術分野において既知の様々な方法により作製することができる。また、米国特許第4,444,887号、および第4,716,111号、ならびに国際公開第WO98/46645号、第WO98/50433号、第WO98/24893号、第WO98/16654号、第WO96/34096号、第WO96/33735号、および第WO91/10741号を参照されたい。それらのそれぞれは、

その全体において参照することにより本明細書に組み込まれる。本発明のヒト抗体は、例えば、症状はないが、例えば、アルツハイマー病等の疾患を発現する危険性がある患者、または疾患に罹患するが、異常に安定な疾病経過がある患者から単離される。

【0143】

別の実施形態において、所望のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）、容易に単離および配列され得る。単離およびサブクローン化されたハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい起源としての役割を果たす。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに設置され、その後、大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞等に限定されない、原核生物もしくは真核生物宿主細胞、またはそうでなければ、免疫グロブリンを産生しない骨髓腫細胞にトランスフェクトされる。さらに具体的には、単離DNA（本明細書に記載されるように、合成され得る）は、本明細書に参照することにより組み込まれる、Newmanらの1995年1月25日出願の米国特許第5,658,570号に記載されるように、製造抗体に対する定常および可変領域配列をクローンするために使用され得る。本質的に、これは、Ig特異的プライマーを使用して、選択された細胞からのRNAの抽出、cDNAへの変換、およびPCRによる増幅を伴う。本目的のための適したプライマーはまた、米国特許第5,658,570号に記載される。以下にさらに詳細を論じられるように、所望の抗体を発現する形質転換された細胞は、比較的大量に増殖され、免疫グロブリンの臨床的かつ商業的供給品を提供し得る。

【0144】

一実施形態において、本発明の抗体は、抗体分子の少なくとも1つの重鎖または軽鎖CDRを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子からの少なくとも2つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子からの少なくとも3つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子からの少なくとも4つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子からの少なくとも5つのCDRを含む。別の実施形態において、本発明の抗体は、1つ以上の抗体分子からの少なくとも6つのCDRを含む。対象抗体に含まれ得る少なくとも1つのCDRを含む、例示的な抗体分子が、本明細書に記載される。

【0145】

特定の実施形態において、重鎖および／または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、例えば、他の重鎖および軽鎖可変領域の公知のアミノ酸配列との比較等の当技術分野において公知の方法により、相補性決定領域（CDR）の配列を同定するために検査され、配列超可変性の領域を決定し得る。通常の組み換えDNA技法を使用して、1つ以上のCDRを、例えば、ヒト枠組み領域等の枠組み領域内に挿入し得る。枠組み領域は、自然発生または合意枠組み領域、好ましくはヒト枠組み領域であり得る（例えば、ヒト枠組み領域の一覧表のためにChothia et al., J. Mol. Biol. 278:457-479 (1998)を参照されたい）。ある実施形態において、枠組み領域とCDRとの組み合わせにより生成されたポリヌクレオチドは、所望のポリペプチドの少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する抗体をコードする。ある実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換は、例えば、その抗原への抗体の結合を改善するために、枠組み領域内で作製され得る。さらに、このような方法を使用し、1つの鎖内のジスルフィド結合に共有する1つ以上の可変領域システイン残基のアミノ酸置換または欠失を行い、1つ以上の鎖内のジスルフィド結合を欠失する抗体分子を生成し得る。ポリヌクレオチドへの他の改変は、本発明により、および当技術分野の技術内に包含される。

【0146】

代替として、一本鎖抗体（米国特許第4,694,778号、Bird, Science 242:423-442 (1988)、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)、およびW

ard et al., Nature 334:544-554 (1989)) の産生のために記載の技法を適合し、一本鎖抗体を産生することができる。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重鎖および軽鎖フラグメントを連結することにより形成され、一本鎖抗体を生じる。大腸菌における機能的なFvフラグメントのアセンブリの技法も使用され得る (Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988))。

【0147】

別の実施形態において、リンパ球は、マイクロマニピュレーションにより選択し、可変遺伝子を単離することができる。例えば、末梢血単核細胞を、免疫がある、または免疫が生まれつきある、例えば、ヒト等の哺乳類から単離し、約7日間体外で培養することができる。培養物は、審査基準に合う特定のIgGに対してスクリーニングされる。陽性ウェルからの細胞を単離することができる。個々のIg産生B細胞を、FACSにより、または補体媒介溶血プラークアッセイにおいて、それらを同定することにより、単離することができる。Ig産生B細胞は、1つの管にマイクロマニピュレーションすることができる。VHおよびVL遺伝子は、例えば、RT-PCRを使用して、増幅することができる。VHおよびVL遺伝子は、抗体発現ベクターにクローン化し、発現のために細胞（例えば、真核生物または原核生物細胞）にトランスフェクトすることができる。

【0148】

代替として、抗体産生細胞株は、熟練者に公知の技法を使用して、選択および培養され得る。このような技法は、様々な実験マニュアルおよび主要な刊行物に記載される。この点において、以下に記載されるように、本発明で用いる適した技法は、Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991) に記載され、それは、その全体において参照することにより本明細書に組み込まれ、それには、付録物を含む。

【0149】

本発明の抗体は、抗体の合成のための当技術分野において既知の任意の方法、特に、化学合成により、または好ましくは、本明細書に記載される、組み換え発現技法により、産生することができる。

【0150】

一実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、合成定常領域を含み、1つ以上のドメインは、部分的に、または完全に欠失される（「ドメイン欠失抗体」）。ある実施形態において、適合する修飾抗体は、ドメイン欠失された構築物または変異体を含み、完全CH2ドメインは除去されている（ΔCH2構築物）。他の実施形態に関して、短い連結ペプチドは、欠失ドメインと置換され、可変領域に対して運動の柔軟性および自由度を提供し得る。当業者は、このような構築物が、抗体の異化作用率におけるCH2ドメインの調節特性の故、特に好ましいことを理解するであろう。ドメイン欠失構築物は、IgG₁ ヒト定常ドメインをコードするベクターを使用して、派生することができる（例えば、国際公開第WO02/060955A2号および第WO02/096948A2号を参照されたい）。本ベクターを改変し、CH2ドメインを欠失し、ドメインを欠失したIgG₁ 定常領域を発現する合成ベクターを提供する。

【0151】

ある実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、ミニ抗体である。ミニ抗体は、当技術分野に記載の方法を使用して生成することができる（例えば、米国特許第5,837,821号または国際公開第WO94/09817A1号を参照されたい）。

【0152】

一実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もし

10

20

30

40

50

くは誘導体は、単量体サブユニット間での関連を可能にする限り、数個のアミノ酸またはただ1個のアミノ酸だけの、欠失または置換を有する免疫グロブリン重鎖を含む。例えば、CH2ドメインの選択されたエリアにおける単一アミノ酸の変異が、Fc結合を実質的に低減するのに十分であり、それにより、腫瘍局在を増大し得る。同様に、調節されるエフェクター機能（例えば、相補体結合）を制御する1つ以上の定常領域ドメインの一部を単に欠失することが望ましい場合がある。定常領域のこのような部分的欠失は、対象の定常領域ドメインに関連する他の望ましい機能は無傷のままにする一方、抗体の選択された特性（血中半減期）を改善し得る。さらに、上記で触れたように、開示された抗体の定常領域は、得られる構築物のプロファイル強化する1つ以上のアミノ酸の変異または置換を通じて合成され得る。この点において、保存結合部位（例えば、Fc結合）により提供される活性を阻害し、修飾抗体の立体構造および免疫原性プロファイルを実質的に維持することが可能であり得る。さらに別の実施形態は、エフェクター機能等の望ましい特性を強化するために、定常領域への1つ以上のアミノ酸の付加を含み、または、さらに細胞毒素または炭水化物の付着を提供する。このような実施形態において、選択された定常領域ドメインから派生する特定配列を挿入または複製することが望ましい場合がある。

10

【0153】

本発明はまた、本明細書に記載の抗体分子（例えば、VH領域および／またはVL領域）の変異体（誘導体を含む）を含む、本質的にはそれらからなる、またはそれらからなる、抗体を提供し、抗体またはそれらのフラグメントは、疾患関連ポリペプチドまたはそれらのフラグメントもしくは変異体に免疫特異的に結合する。アミノ酸置換を生じる部位特異的な突然変異生成およびPCR媒介突然変異生成が挙げられるが、これらに限定されない当業者に既知の標準技法を、抗体をコードするヌクレオチド配列において、変異体を導入するために使用することができる。好ましくは、変異体（誘導体を含む）は、参照VH領域、VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL領域、VL-CDR1、VL-CDR2、またはVL-CDR3に関して、50個未満のアミノ酸置換、40個未満のアミノ酸置換、30個未満のアミノ酸置換、25個未満のアミノ酸置換、20個未満のアミノ酸置換、15個未満のアミノ酸置換、10個未満のアミノ酸置換、5個未満のアミノ酸置換、4個未満のアミノ酸置換、3個未満のアミノ酸置換、または2個未満のアミノ酸置換をコードする。「保存アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の電荷がある側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである。類似の電荷がある側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、無極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。代替として、変異体を、例えば、飽和突然変異生成等によって、コード配列のすべて、またはその一部に沿って無作為に導入し、結果として得られた変異体は、生物学的活性に対してスクリーニングされ、活性（例えば、疾患関連ポリペプチドに結合する能力）を維持する変異体を同定することができる。

20

30

40

【0154】

例えば、抗体分子の枠組み領域においてのみ、またはCDR領域においてのみ、変異を導入することは可能である。導入された変異は、例えば、抗原を結合するための抗体の能力に影響がない、またはほとんどない、サイレントまたは中性ミスセンス変異であり得、実際には、幾つかのこのような変異は、どんなものであれ、アミノ酸配列を変化しない。変異のこれらの型は、コドン使用頻度を最適化する、またはハイブリドーマの抗体産生を改善するために有用であり得る。本発明の抗体をコードするコドン向けに最適化されたコーディング領域は、本明細書の別の場所に開示される。代替として、非中性のミスセンス変異は、抗原を結合する抗体の能力を変化し得る。ほとんどのサイレントおよび中性ミス

50

センス変異体の局在は、枠組み領域内であり得るが、ほとんどの非中性ミスセンス変異の局在は、絶対条件ではないが、CDR内であり得る。当業者は、抗原結合活性において変化なし、または結合活性において変化あり（例えば、抗原結合活性における改善または抗体特異性における変更）等の所望の特性を有する、変異分子を設計し、試験することができるであろう。突然変異生成に続き、コードされたタンパク質は、定期的に発現され得、コードされたタンパク質（例えば、疾患関連ポリペプチドの少なくとも1つのエピトープを免疫特異的に結合する能力）の機能的および／または生物学的活性は、本明細書に記載の技法を使用して、または当技術分野において既知の定期的に修飾する技法により、決定することができる。

【0155】

IV. 抗体をコードするポリヌクレオチド

上記に従って、本発明はまた、例えば、抗体等の本発明の結合分子をコードするポリヌクレオチドに関する。抗体の場合には、ポリヌクレオチドは、上に記載の抗体の免疫グロブリン鎖の少なくとも可変領域をコードし得る。上に記載の抗体をコードする本発明のポリヌクレオチドは、例えば、DNA、cDNA、RNA、または合成的に産生されたDNAもしくはRNA、または単独で、あるいは組み合わせのいずれかで、これらのポリヌクレオチドのいずれかを含む、組み換え技術によって産生されたキメラ核酸分子であり得る。好ましくは、該ポリヌクレオチドは、ベクターの一部である。このようなベクターは、適した宿主細胞における、適した条件下で、該ベクターの選択を可能にするマーカー遺伝子等の遺伝子をさらに含み得る。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、原核生物または真核生物細胞における発現を可能にする、配列を制御する発現に作動可能的に連結される。該ポリヌクレオチドの発現は、翻訳可能なmRNAへのポリヌクレオチドの転写を含む。真核生物細胞、好ましくは哺乳類細胞における、発現を確保する調節要素は、当業者に公知である。それらは、通常、転写開始を確保する、調節配列、および転写の終結および転写の安定化を確保する、任意にポリAシグナルを含む。追加の調節要素は、転写、ならびに翻訳エンハンサー、および／または自然に関連した、もしくは異種プロモーター領域を含み得る。

【0156】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドからなり得、それらは、非修飾RNAもしくはDNA、または修飾RNAもしくはDNAであり得る。例えば、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖と二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、および一本鎖と二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖、もしくはさらに典型的には、二本鎖もしくは一本鎖と二本鎖領域の混合物であり得るDNAおよびRNAを含む、ハイブリッド分子からなり得る。加えて、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNA、またはRNAおよびDNAの双方を含む、三本鎖領域からなり得る。抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドはまた、安定性もしくは他の理由のために修飾された、1つ以上の修飾塩基、またはDNAもしくはRNA骨格を含み得る。「修飾された」塩基は、例えば、トリチル化塩基およびイノシン等の異常塩基を含む。様々な修飾を、DNAおよびRNAに対して行なうことができるので、ポリヌクレオチドは、化学的に、酵素的に、または代謝的に修飾された型を包含する。

【0157】

免疫グロブリン（例えば、免疫グロブリン重鎖部分または軽鎖部分）から派生するポリペプチドの非自然的変異体をコードする単離ポリヌクレオチドは、1つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失がコードされたタンパク質に導入されるように、免疫グロブリンのヌクレオチド配列に1つ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失を導入することにより、生成することができる。変異は、部位特異的な突然変異生成およびPCR媒介突然変

10

20

30

40

50

異生成等の標準技法により導入され得る。好ましくは、保存アミノ酸置換は、1つ以上の非必須アミノ酸残基で行われる。

【0158】

公知のとおり、RNAは、元のハイブリドーマ細胞、あるいは、他の形質転換された細胞から、グアニジンイソシアネート抽出法および遠心分離またはクロマトグラフィーに続く調製法等の標準技法によって単離され得る。望ましい場合、mRNAは、オリゴdTセルロース上におけるクロマトグラフィー等の標準技法により総RNAから単離され得る。適した技法は、当技術分野においては熟知されている。

【0159】

一実施形態において、抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAは、公知の方法に従って、逆転写酵素およびDNAポリメラーゼを使用して、同時、あるいは別々のいずれかで行われ得る。PCRは、公開された重鎖および軽鎖DNA、ならびにアミノ酸配列に基づいて、合意定常領域プライマーまたはさらに特異的なプライマーにより開始され得る。上で論じられるように、PCRも、抗体軽鎖および重鎖をコードするDNAクローンを単離するために使用され得る。この場合において、ライブラリーは、合意プライマーまたはマウス定常領域プローブ等のさらに大きい相同プローブによりスクリーニングされ得る。

【0160】

DNA、典型的にはプラスミドDNAは、当技術分野において既知の技法を使用して、細胞から単離され、例えば、組み換えDNA法に関する前述の参照において、詳しく記載される標準の公知の技法に従って、制限地図および配列され得る。当然のことながら、DNAは、単離過程またはその後の分析中、任意の点で、本発明に従って合成され得る。

【0161】

一実施形態において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)をコードする核酸を含む、本質的には免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)をコードする核酸からなる、または免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)をコードする核酸からなる単離ポリヌクレオチドを提供し、重鎖可変領域のうちの少なくとも1つのCDR、または重鎖可変領域のうちの少なくとも2つのVH-CDRは、本明細書に開示された抗体からの参照重鎖VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3アミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、または95%同一である。代替として、VHのVH-CDR1、VH-CDR2、およびVH-CDR3領域は、本明細書に開示された抗体からの参照重鎖VH-CDR1、VH-CDR2、およびVH-CDR3アミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、または95%同一である。したがって、本実施形態によると、本発明の重鎖可変領域は、表4に示されるポリペプチド配列に関してVH-CDR1、VH-CDR2、またはVH-CDR3ポリペプチド配列を有する。

【0162】

別の実施形態において、本発明は、免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)をコードする核酸を含む、本質的には免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)をコードする核酸からなる、または免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)をコードする核酸からなる単離ポリヌクレオチドを提供し、軽鎖可変領域のうちの少なくとも1つのVL-CDR、または軽鎖可変領域のうちの少なくとも2つのVL-CDRは、本明細書に開示された抗体からの参照軽鎖VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3アミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、または95%同一である。代替として、VLのVL-CDR1、VL-CDR2、およびVL-CDR3領域は、本明細書に開示された抗体からの参照軽鎖VL-CDR1、VL-CDR2、およびVL-CDR3アミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、または95%同一である。したがって、本実施形態に従い、本発明の軽鎖可変領域は、表4に示されるポリペプチド配列に関してVL-CDR1、VL-CDR2、またはVL-CDR3ポリペプチド配列を有する。

【0163】

別の実施形態において、本発明は、表4に示される、VH-CDR1、VH-CDR2、およびVH-CDR3群に同一である、ポリペプチド配列を有する、免疫グロブリン重

鎖可変領域（VH）をコードする核酸を含む、本質的にはそれらからなる、またはそれらからなる単離ポリヌクレオチドを提供する。

【0164】

当技術分野において既知のとおり、2つのポリペプチドもしくは2つのポリヌクレオチドの間の「配列同一性」は、1つのポリペプチドもしくはポリヌクレオチドのアミノ酸もしくは核酸配列を、第2のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの配列と比較することにより決定される。本明細書で論じられる場合、任意の特定のポリペプチドが、別のポリペプチドに少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%同一であるか否かは、例えば、（それに限定されないが）BESTFITプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix（登録商標），Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711）等、当技術分野において既知の方法およびコンピュータプログラム／ソフトウェアを使用して、決定することができる。BESTFITは、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489（1981）の局在相同アルゴリズムを使用し、2つの配列の間で相同の最良のセグメントを見つける。特定の配列が、例えば、本発明に従って、参照配列に95%同一であるか否かを決定するために、BESTFITまたは任意の別の配列アラインメントプログラムを使用する場合、当然ながら、同一性のパーセンテージが参照ポリペプチド配列の全長にわたって算出され、参照配列におけるアミノ酸の総数の最大5%の相同性における格差が許容されるように、パラメータを設定する。

【0165】

10

20

【表 5 - 1】

表 5 : ネオエピトープ特異抗体のV_H領域のポリヌクレオチド配列

抗体	可変重鎖配列
NI-101.10 (配列番号 3)	GAGGTGCAGCTAGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTTCGCTTCAGTAGCTATGGCATACTGAGG TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATG GAACTAAAAAATACTATACAGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGGGCCGT ACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.11 (配列番号 56)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTTCGCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATG GAACTAAAAAATACTATACAGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGGGCCGT ACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.11 (配列番号 5) (コドン最 適化)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCCGGCCGAGCCT GCGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGCCTTCAGCAGCTACGGCATGCACTG GGTGCAGGAGGCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCGTGATCTGGTTTGA CGGCACCAAGAAGTACTACACCGACAGCGTGAAGGGCCGTTACCATCAGCC GGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACACCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGACCGGGGCATCGGCGCCCGGCGGGG CCCTACTACATGGACGTGTGGGGCAAAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
NI-101.12 (配列番号 9)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCCGCCGAGACCCT GAGCCTGACCTGCACCGTGAGCGGCGGCAGCATCCGGAGCGGCAGCATCTGCTG GTACTGGATCCGGCAGCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACTTCTG CTACAGCGGCGCCACCTTCTACACCCCGAGCCTGCGGGGCCGGCTGACCATCAG CGTGGACGCCAGCAAGAACCAGCTGAGCCTGAGCCTGAGCAGCGTGACCGCCG CCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGCGGGCCGGCGAGAACAGCGCGGC ATCGAGCCCTACTACGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTG

10

20

30

【 0 1 6 6 】

【表 5 - 2】

	AGCAGC
NI-101.13 (配列番号 13)	CAGGTACAGCTGCAGGAGTCAGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTG TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGAAGAAGTTACTACTGGG GCTGGATCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGAGTGGAAGTATCCATT ATAGCGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCTG TAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTTACCGCCGCAG ACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGATCACGTTGGGGCAGCAGCTGGGTATTG ACTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTCTCTTCG
NI-101.12 F6A(配列 番号38)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTGCGCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATG GAACTAAAAAATACTATACAGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCTGAGAGCCGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGGGCCGT ACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.13 A(配列番 号52)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTG TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGAAGAAGTTACTACTGGG GCTGGATCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGAGTGGAAGTATCCATT ATAGCGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCTG TAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTTACCGCCGCAG ACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGATCACGTTGGGGCAGCAGCTGGGTATTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG
NI-101.13 B (配列番号 53)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTG TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGAAGAAGTTACTACTGGG GCTGGATCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGAGTGGAAGTATCCATT ATAGCGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCTG TAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTTACCGCCGCAG ACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGATCACGTTGGGGCAGCAGCTGGGTATTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG

10

20

30

【 0 1 6 7 】

【表 6 - 1】

表 6 : ネオエピトープ特異抗体の V_L 領域のポリヌクレオチド配列

抗体	可変軽鎖配列(カッパまたはラムダ)
NI-101.10	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG

【 0 1 6 8 】

40

【表 6 - 2】

および NI-101.11 (配列番号 7)	TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATC AACAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGAG TTACAGTACCCCTCTCACTTTCCGGCGAGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGTAC G
NI-101.12 (配列番号 11)	GACGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCATCGGCGA CCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCGAGAGCATCAACAAGTACGTGAAGTGC GTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCA GCCTGCAGAGCGGGCGCCCCAGCCGGGTGAGCGGCAGCGGCTTCGGCCGGGAC TTCAGCCTGACCATCAGCGGCCTGCAGGCCGAGGACTTCGGCGCCTACTTCTGC CAGCAGAGCTACAGCGCCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATC AAGCGGACC
NI-101.13 (配列番号 15)	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCCGGAGCGCGAGCGGCACCCCGGGCCAGCGCGT GACCATTAGCTGCAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGCAGCAACTATGTGTATTG GTATCAGCAGCCCGCCGGGCACCGCGCCGAACTGCTGATTTATCGCAACAACCA GCGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCAAAAGCGGCACCAAGCG CGAGCCTGGCGATTAGCGGCCTGCGCAGCGAAGATGAAGCGGATTATTATTGCG CGGCGTGGGATGATAGCCTGAGCGGCTATGTGTTTGGCACCGGCACCAAAAGTGA CCGTGCTG
NI-101.12 F6A(配列 番号40)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTAT CAACAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGC CAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGA GTTACAGTACCCCTCTCACTTTCCGGCGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT
NI-101.13 A (配列番号 54)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGA GTTACAGTACCAGAACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACG
NI-101.13 B (配列番号)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG TCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCA GCAGATTCCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGA

10

20

30

【 0 1 6 9】

【表 6 - 3】

55)	AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCT CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTAT AATAGTTATTCTCGAACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACG
-----	--

40

この点において、当業者は、軽鎖および／または重鎖の少なくとも可変ドメインをコードするポリヌクレオチドは、双方の免疫グロブリン鎖または1つのみの可変ドメインをコードし得ることを容易に理解するであろう。同様に、該ポリヌクレオチドは、同一のプロモーターの制御下であり得る、または発現のために別々に制御され得る。例えば、大腸菌における P_L 、 lac 、 trp 、もしくは tac プロモーター等を含む、原核生物宿主細胞中で発現可能であると考えられる調節要素、および真核生物宿主細胞中で発現可能な調節要素の例は、酵母における $AOX1$ もしくは $GAL1$ プロモーター、または CMV 、

50

SV40-、RSV-プロモーター、CMV-エンハンサー、SV40-エンハンサー、または哺乳類および他の動物細胞中でグロビンイントロンである。転写の開始に關与する要素以外に、かかる調節要素は、SV40-ポリ-A部位またはtk-ポリ-A部位、ポリヌクレオチドの下流等の転写終結シグナルをも含み得る。さらに、使用される発現系に依存して、細胞内コンパートメントにポリペプチドを誘導する、または培地にポリペプチドを分泌することが可能なリーダー配列を、本発明のポリヌクレオチドのコード配列に加えることができ、そのような配列は、当技術分野において公知である。リーダー配列は、翻訳、開始、および終結配列で、適切な段階において構築され、好ましくは、リーダー配列は細胞膜周辺腔もしくは細胞外培地への翻訳されたタンパク質、もしくはその一部の分泌を指示することが可能である。任意に、異種配列は、例えば、発現組み換え産物の安定または簡易化した精製等の所望の特徴を与えるCもしくはN末端の同定ペプチドを含む、融合タンパク質をコードすることができる。この文脈において、適した発現ベクターは、Okayama-Berg cDNA発現ベクターpCDV1 (Pharmacia)、pCDM8、pRc/CMV、pCDNA1、pCDNA3 (Invitrogen)、またはpSPORT1 (GIBCO BRL)等、当技術分野において既知である。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することが可能なベクター中の真核プロモーター系であるが、原核生物宿主の制御配列もまた使用し得る。本ベクターを適切な宿主に組み込んだ後、宿主を、ヌクレオチド配列の高レベル発現に適する条件下で維持し、所望であれば、免疫グロブリン軽鎖、重鎖、軽鎖/重鎖二量体または無傷の抗体、結合フラグメントまたは他の免疫グロブリン型の収集および精製を行ない得る。Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N. Y., (1979)を参照されたい。

【0170】

本発明はまた、他の部分で記載されるように、本発明のポリヌクレオチドのフラグメントも含む。さらに、本明細書に記載されるように、融合ポリヌクレオチド、Fabフラグメント、および他の誘導体をコードするポリヌクレオチドもまた、本発明によ考慮される。

【0171】

ポリヌクレオチドは、当技術分野において任意の方法により産生または製造され得る。例えば、抗体のヌクレオチド配列が知られている場合、抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成したオリゴヌクレオチド（例えば、Kutmeier et al., BioTechniques 17:242 (1994)に記載されるもの）から構成され得、それらは、簡潔に述べると、抗体をコードする、これらのオリゴヌクレオチドをアニーリング、およびライゲーションする配列の一部を含む、重複するオリゴヌクレオチドの合成、その後、PCRによりライゲーションされたオリゴヌクレオチドの増幅に關与する。

【0172】

代替として、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、適した源からの核酸から生成され得る。特定の抗体をコードする核酸を含有するクローンを入手することができないが、抗体分子の配列が分かっている場合、抗体をコードする核酸は、3'および5'末端の配列にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用して、PCR増幅により、または、例えば、抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを同定するために、特定の遺伝子配列に対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用して、クローニングすることにより、適した源（例えば、抗体を発現するために選択されたハイブリドーマ細胞等の新抗原特異抗体を発現する任意の組織もしくは細胞から生成された抗体cDNAライブラリーまたはcDNAライブラリー、あるいはそこから単離された核酸、好ましくはポリA+RNA）から化学的に合成される、または得られ得る。PCRにより生成された増幅核酸は、その後、当技術分野において公知の任意の方法を使用して、複製可能なクローニングベクターにクロー

ニングされ得る。

【0173】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、そのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作のために当技術分野において公知の方法、例えば、組み換えDNA技法、部位特異的な突然変異生成、PCR等（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1990) および Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1998) に記載の技法であり、それらは、それらの全体において、本明細書に参照することにより共に組み込まれる）を使用して、操作され得、異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成するように、例えば、アミノ酸置換、欠失、および／または挿入を行う。

10

【0174】

V. 抗体ポリペプチドの発現

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを有する遺伝子組み換え細胞を含む、本発明の抗体を発現することが可能な細胞、またはその対応する免疫グロブリン鎖を産生する方法にも関与する。本発明の方法により得られる細胞は、例えば、本発明の抗体とその抗原との相互作用を試験するために、使用することができる。

20

【0175】

本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体を提供するために単離遺伝物質を操作した後、抗体をコードするポリヌクレオチドは、典型的には、所望の量の抗体を産生するために使用され得る宿主細胞に導入するために発現ベクターに挿入される。

【0176】

抗体もしくはそのフラグメント、誘導体、または類似体の組み換え発現、例えば、標的分子に結合する抗体の重鎖または軽鎖を、本明細書に記載した。本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖をコードするポリヌクレオチド、またはその一部（好ましくは、重鎖または軽鎖可変ドメインを含有する）が得られた後、抗体分子の産生のためのベクターは、当技術分野において公知の技法を使用して、組み換えDNA技術により産生され得る。したがって、ヌクレオチド配列をコードする抗体を含有するポリヌクレオチドを発現することによりタンパク質を調製する方法を本明細書に記載する。当業者に公知の方法を使用して、配列、ならびに適切な転写および翻訳制御シグナルをコードする抗体を含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、体外組み換えDNA技法、合成技法、および生体内遺伝子組み換えが挙げられる。本発明は、したがって、本発明の抗体分子をコードするヌクレオチド配列、またはその重鎖もしくは軽鎖、またはプロモーターに作動可能に連結される、重鎖もしくは軽鎖可変ドメインを含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含み得（例えば、国際公開第WO 86/05807号、国際公開第WO 89/01036号、および米国特許第5,122,464号を参照されたい）、抗体の可変ドメインを、重鎖または軽鎖全ての発現に対するこのようなベクターにクローンし得る。

30

40

【0177】

本発明は、抗原をコードするポリヌクレオチド、または好ましくは、本発明の抗体の免疫グロブリン鎖の可変ドメインを含む、任意に、本発明の抗体の他の免疫グロブリン鎖の可変ドメインをコードする本発明のポリヌクレオチドと組み合わせて、遺伝子組み換え技術に従来使用される、ベクター、特に、プラスミド、コスミド、ウイルス、およびバクテリオファージに関する。好ましくは、該ベクターは、発現ベクターおよび／または遺伝子導入、もしくは標的ベクターである。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ関連

50

性ウイルス、ヘルペス性ウイルス、またはウシパピローマウイルス等のウイルスから派生する発現ベクターを、標的細胞集団への本発明のポリヌクレオチドまたはベクターの送達のために使用することができる。当業者に公知の方法を使用し、組み換えウイルスベクターを構築することができる。例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. および Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1994) に記載の技法を参照されたい。代替として、本発明のポリヌクレオチドおよびベクターを、標的細胞に送達するために、リボソームに再構成することができ、本発明のポリヌクレオチドを含有するベクター（例えば、配列および発現制御配列をコードする免疫グロブリン鎖の重鎖および／または軽鎖可変ドメイン）は、公知の方法により宿主細胞に導入することができ、それは、細胞宿主の型により異なる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは、原核生物細胞に対して一般に利用されるが、リン酸カルシウム治療またはエレクトロポレーションを他の細胞宿主に使用し得る。上記の Sambrook も参照されたい。

10

【0178】

本明細書に使用される「ベクター」または「発現ベクター」という用語は、本発明に従って、宿主細胞における所望の遺伝子に導入し、発現する賦形剤として使用されるベクターを意味する。当業者に既知のとおり、このようなベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルス、およびレトロウイルスからなる群から容易に選択され得る。一般的に、本発明に適合するベクターは、選択マーカー、適切な制限部位を含み、所望の遺伝子のクローニング、および真核生物または原核生物細胞中に侵入する、および／または複製する能力を促進する。

20

【0179】

本発明の目的のために、多数の発現ベクター系を利用し得る。例えば、ベクターの1つのクラスは、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（RSV、MMTVもしくはMOMLV）、またはSV40ウイルス等の動物ウイルスから派生するDNA要素を利用する。他のベクターは、内部リボソーム結合部位を有するポリシストロニック系の使用を伴う。さらに、DNAを染色体に統合する細胞は、導入宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することにより選択され得る。マーカーは、栄養要求性宿主への原栄養性、バイオサイド耐性（例えば、抗生物質）、または銅等の重金属への耐性を提供し得る。選択可能なマーカー遺伝子を、発現するようにDNA配列に直接結合、または同時形質転換により同一の細胞への導入かのいずれかを行うことができる。追加の要素もまた、mRNAの最適合成に必要とされ得る。これらの要素は、シグナル配列、スプライスシグナル、ならびに、転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルを含み得る。

30

【0180】

特に好ましい実施形態において、クローン可変領域遺伝子を、上で論じられるように合成された重鎖および軽鎖定常領域遺伝子（好ましくは、ヒト）と共に、発現ベクターに挿入する。一実施形態において、これは、NEOSPLA（米国特許第6,159,730号に開示）と称される、Biogen IDEC, Inc. の専用発現ベクターを使用して達成される。本ベクターは、サイトメガロウイルスプロモーター／エンハンサー、マウスベータグロビン主要プロモーター、SV40複製起点、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼエクソン1およびエクソン2、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、およびリーダー配列を含有する。本ベクターは、可変および定常領域遺伝子の取り込み、CHO細胞におけるトランスフェクション、次いで、培地およびメトトレキサート増幅を含有するG418において選択すると、抗体の非常に高いレベルの発現を生じることが認められている。当然ながら、真核生物細胞における発現を引き出すことが可能な任意の発現ベクターを、本発明において使用し得る。適したベクターの例と

40

50

しては、プラスミド p c D N A 3、p H C M V / Z e o、p C R 3. 1、p E F 1 / H i s、p I N D / G S、p R c / H C M V 2、p S V 4 0 / Z e o 2、p T R A C E R - H C M V、p U B 6 / V 5 - H i s、p V A X 1、および p Z e o S V 2 (I n v i t r o g e n から市販、S a n D i e g o, C A)、およびプラスミド p C I (P r o m e g a から市販、M a d i s o n, W I) が挙げられるが、これらに限定されない。一般的に、免疫グロブリンが重鎖および軽鎖である場合、適切に高レベルを発現する多数の形質転換細胞のスクリーニングは、例えば、ロボットシステムにより実行することができる、日常的な実験である。ベクター系はまた、米国特許第 5, 7 3 6, 1 3 7 号および第 5, 6 5 8, 5 7 0 号に教示されるが、これらのそれぞれは、その全体において、本明細書に参照することにより組み込まれる。本系は、例えば、> 3 0 p g / 細胞 / 日等の、高い発現レベルを提供する。他の例示的なベクター系は、例えば、米国特許第 6, 4 1 3, 7 7 7 号に開示される。

10

【0181】

他の好ましい実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、2002年11月18日出願の米国特許出願公開第2003-0157641 A1号に開示されるもの等のポリシストロニック構築物を使用して、発現され得、その特許はその全体において、本明細書に組み込まれる。これらの新規の発現系において、抗体の重鎖および軽鎖等の関心対象となる多数の遺伝子生成物を、単一のポリシストロニック構築物から産生し得る。これらの系は、内部リボソーム侵入部位 (I R E S) を有利に使用し、抗体の比較的高いレベルを提供する。適合する I R E S 配列は、本明細書にも組み込まれる米国特許第 6, 1 9 3, 9 8 0 号に開示される。当業者は、このような発現系を使用し、本願に開示されるすべての抗体を効果的に産生し得ることを理解するであろう。

20

【0182】

さらに一般的には、抗体の単量体サブユニットをコードするベクターまたは DNA 配列が調製されると、発現ベクターを、適切な宿主細胞に導入することができる。宿主細胞へのプラスミドの導入は、当業者に公知の様々な技法により達成することができる。これらは、トランスフェクション (電気泳動およびエレクトロポレーションを含む)、原形質融合、リン酸カルシウム沈殿、エンベロープ DNA を使った細胞融合、マイクロインジェクション、および無傷のウイルスによる感染が挙げられるが、これらに限定されない。R i d g w a y, A. A. G. " M a m m a l i a n E x p r e s s i o n V e c t o r s " V e c t o r s, R o d r i g u e z a n d D e n h a r d t, E d s., B u t t e r w o r t h s, B o s t o n, M a s s., C h a p t e r 2 4. 2, p p. 4 7 0 - 4 7 2 (1 9 8 8) を参照されたい。典型的には、宿主へのプラスミド導入はエレクトロポレーションによってなされる。発現構築物を内部に持つ宿主細胞は、軽鎖および重鎖の産生に適切な条件下で増殖され、重鎖および / または軽鎖タンパク質合成に対して分析される。例示的なアッセイ技法は、酵素結合免疫吸着法 (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A)、または蛍光活性化細胞選別装置 (F A C S)、免疫組織化学等を含む。

30

【0183】

発現ベクターは、従来の技法により宿主細胞に導入され、トランスフェクト細胞は、その後、従来の技法により培養され、本明細書に記載の方法で用いるための、抗体を産生する。したがって、本発明は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞、または異種プロモーターに作動可能に連結される、その重鎖もしくは軽鎖を含む。二重鎖抗体の発現のために好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖を共にコードするベクターは、下記の詳細のように、全免疫グロブリン分子の発現のための宿主細胞において、共発現され得る。

40

【0184】

本発明は、さらに、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターで形質転換された宿主細胞に関する。該宿主細胞は、原核生物または真核生物細胞であり得る。宿主細胞中に存在

50

する本発明のポリヌクレオチドまたはベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込まれるか、または染色体外に維持することができる。宿主細胞は、細菌性、昆虫、真菌、植物、動物、もしくはヒト細胞等の任意の原核生物もしくは真核生物細胞であり得る。好ましい真菌細胞は、例えば、サッカロミセス属、特に、出芽酵母種のものである。「原核生物」という用語は、本発明の抗体の発現、または対応する免疫グロブリン鎖のために、DNAまたはRNA分子で形質転換またはトランスフェクトすることができるすべてのバクテリアを含むことを意味する。原核生物宿主は、例えば、大腸菌、サルモネラチフィウム、セラチア・マルセッセンス、および枯草菌等のグラム陰性、ならびにグラム陽性バクテリアを含み得る。「真核生物」という用語は、酵母、高等植物、昆虫、および好ましくは、哺乳類細胞、最も好ましくは、HEK293、NSO、およびCHO細胞を含むことを意味する。組み換え産生手順に利用される宿主により異なるが、本発明のポリヌクレオチドによりコードされる抗体または免疫グロブリン鎖は、グリコシル化または非グリコシル化され得る。本発明の抗体または対応する免疫グロブリン鎖はまた、初期メチオニンアミノ酸残基も含み得る。本発明のポリヌクレオチドは、当業者に一般に既知の任意の技法を使用して、宿主を形質転換またはトランスフェクトするために使用することができる。さらに、融合し、作動可能に連結された遺伝子を調製し、例えば、哺乳類細胞およびバクテリアにおいて、それらを発現するための方法は、当技術分野において公知である（Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989）。本明細書に記載の遺伝子構築物および方法は、真核生物または原核生物宿主において、本発明の抗体もしくは対応する免疫グロブリン鎖の発現に利用することができる。一般的に、挿入されたポリヌクレオチドの有効な転写を促進するプロモーター配列に含有する発現ベクターは、宿主に関連して使用される。発現ベクターは、典型的には、複製起点、プロモーター、およびターミネータ、ならびに形質転換細胞の表現型選抜を提供することが可能な特異遺伝子を含む。DNA配列のために適したソース細胞および免疫グロブリン発現および分泌のために宿主細胞は、アメリカ培養細胞系統保存機関（American Type Culture Collection）（“Catalogue of Cell Lines and Hybridomas”, Fifth edition (1985) Rockville, Maryland, U. S. A. であり、参照することにより本明細書に組み込まれる）等の多くのソースから得ることできる。さらに、本発明の細胞を含む、トランスジェニック動物、好ましくは、哺乳類を、本発明の抗体の大規模な産生のために使用することができる。

【0185】

したがって、さらに実施形態において、本発明は、疾患関連タンパク質に特異的に結合する分子、例えば、抗体またはその結合フラグメントまたは免疫グロブリン鎖の生成方法に関し、該方法は、

(a) 上に記載される、細胞を培養するステップと、

(b) 該培養物から、該抗原、その結合分子、抗体、もしくは結合フラグメント、または免疫グロブリン鎖を単離するステップと、を含む。

【0186】

形質転換宿主は、当技術分野において既知の技法に従って、発酵槽内で増殖し、培養され、最適細胞成長を達成することができる。発現された後、全抗体、二量体、個々の軽鎖および重鎖、または本発明の他の免疫グロブリン型は、当技術分野の標準手順に従って精製することができ、その精製手順には、硫酸塩析、親和性カラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等が含まれる。Scopes, “Protein Purification”, Springer Verlag, N. Y. (1982)を参照されたい。本発明の抗体またはその対応する免疫グロブリン鎖を、その後、成長培地、細胞溶解物、または細胞膜画分から単離することができる。例えば、本発明の組み換えによって発現された抗体または免疫グロブリン鎖の単離および精製は、例えば、本発明の抗体の定常領域に対して向けられる、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体の使用が関与する

もの等、例えば、分取クロマトグラフ分離および免疫学的分離等の任意の従来の手段により行われ得る。本発明の抗体が、例えば、薬物標的および撮像応用のために、他の部分にさらに結合され得ることは、当業者には明らかであろう。このような結合は、付着部位に抗体または抗原が発現した後、化学的に行われ得、もしくは、結合産物は、DNAレベルで本発明の抗体または抗原に改変され得る。DNAは、その後、適した宿主系において発現され、発現したタンパク質は、必要であれば、収集および復元される。

【0187】

少なくとも約90から95%の均一性の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、医薬的用途には、98から99%以上の均一性が最も好ましい。部分的に、または所望の均一性があるように精製された後、抗体は、その後、治療的に（体外を含む）、またはアッセイの手順を発展および実施するために使用され得る。

10

【0188】

宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクターである、ポリペプチドを派生した重鎖をコードする第1のベクター、およびポリペプチドを派生した軽鎖をコードする第2のベクターを用いて同時形質導入し得る。2つのベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの同じ発現を可能にする、同一選択可能なマーカーを含有し得る。代替として、重鎖および軽鎖ポリペプチドの双方をコードし得る単一ベクターを使用することができる。このような状況において、軽鎖は、過度の毒性のない重鎖を避けるために重鎖の前に有利に置かれる（Proudfoot, Nature 322:52 (1986)、Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)）。重鎖および軽鎖のためのコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含み得る。

20

【0189】

本明細書で使用される「宿主細胞」とは、組み換えDNA技法を使用し、少なくとも1つの異種遺伝子をコードし、構築されたベクターを内部に持つ細胞を指す。組み換え宿主からの抗体の単離のための過程の記述において、「細胞」および「細胞培養」という用語は、同義的に使用され、別途明らかに特定されない限り、抗体の起源を意味する。言い換えれば、「細胞」からのポリペプチドの回収とは、沈降された全細胞、または培地および懸濁した細胞の双方を含有する細胞培養からのいずれかからのものを意味し得る。

【0190】

様々な宿主発現ベクター系を、本明細書に記載の方法で用いる抗体分子を発現するために利用することができる。このような宿主発現系は、関心対象となるコード配列が、産生、次いで、精製され得る媒体を示すが、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされる際、そのままで、本発明の抗体分子を発現し得る細胞も示す。これらは、抗体をコードする配列を含有する、組み換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換されたバクテリア（例えば、大腸菌、枯草菌）等の微生物；抗体をコードする配列を含有する、組み換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、サッカロミセス属、ピチア属）、抗体をコードする配列を含有する、組み換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系、組み換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワー・モザイク・ウイルス（CaMV）、タバコモザイクウイルス（TMV））に感染した、もしくは抗体をコードする配列を含有する組み換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞系、または、哺乳類細胞のゲノム（例えば、メタロチオネインプロモーター）、もしくは哺乳類ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）から派生するプロモーターを含有する、組み換え発現構築物を内部に持つ哺乳類細胞系（例えば、COS、CHO、BLK、293、3T3細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、大腸菌等の細菌性細胞、さらに好ましくは、特に、全組み換え抗体分子の発現のための真核生物細胞が、組み換え抗体分子の発現のために使用される。例えば、ヒトサイトメガロウイルスからの主要中間早期遺伝子プロモーター要素等のベクターと共に、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）等の哺乳類細胞は、抗体のために有効な発現系である（Foecking et

30

40

50

al., Gene 45:101 (1986)、Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990))。

【0191】

タンパク質発現に使用される宿主細胞株は、多くの場合、哺乳類起源からなり、当業者は、その中で発現する所望の遺伝子生成物に最も適している、特定の宿主細胞株を選択的に決定する能力があると考えられる。例示的な宿主細胞株は、CHO (チャイニーズハムスター卵巣)、DG44、およびDUXB11 (チャイニーズハムスター卵巣株、DHFRマイナス)、HELA (ヒト子宮頸癌)、CVI (サル腎臓株)、COS (SV40 T抗原を有するCVIの誘導体)、VERY、BHK (ベビーハムスター腎臓)、MDC K、293、WI38、R1610 (チャイニーズハムスター線維芽細胞)、BALBC / 3T3 (マウス線維芽細胞)、HAK (ハムスター腎臓株)、SP2/O (マウス骨髓腫)、P3x63-Ag3.653 (マウス骨髓腫)、BFA-1c1BPT (ウシ内皮細胞)、RAJI (ヒトリンパ球)、および293 (ヒト腎臓)が挙げられるが、これらに限定されない。CHO細胞が、特に好ましい。宿主細胞株は、典型的には、商業源、アメリカ組織培養細胞系統保存機関 (American Tissue Culture Collection) から、または発表された文献から入手可能である。

10

【0192】

加えて、挿入配列の発現を調節、または所望の特定の方法において、遺伝子生成物を修飾および処理する、宿主細胞株を選ぶことができる。このような修飾 (例えば、グリコシル化) およびタンパク質生成物の過程 (例えば、切断) は、タンパク質の機能にとって重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子生成物の翻訳後の過程および修飾に対する、特性および特定の機構を有する。適切な細胞株または宿主系を選び、発現した異種タンパク質の正しい修飾および過程を確保することができる。この最後に、遺伝子生成物の1次転写、グリコシル化、およびリン酸化反応の適切な過程のための細胞機構を有する、真核生物宿主細胞を使用し得る。

20

【0193】

長期間、組み換えタンパク質の高収率生産には、安定発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定的に発現する細胞株を改変して生成得る。複製のウイルス起源を含有する発現ベクターを使用するよりむしろ、宿主細胞を、適切な発現制御要素 (例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネータ、ポリアデニル化部位等)、および選択可能なマーカーにより制御されたDNAで形質転換することができる。外来DNAを導入した後、改変細胞は、1~2日間、強化培地で増殖させ、その後、選択可能な培地に取り替えることができる。組み換えプラスミドにおいて選択可能なマーカーは、選択への耐性を与え、細胞が染色体へのプラスミドを安定的に取り込み、同様に、細胞株をクローンし、拡大することができる病巣を形成することを可能にする。本方法は、抗体分子を安定的に発現する細胞株を改変するのに有利に使用され得る。

30

【0194】

数多くの選択系を、すなわち、ヘルペスシンプレックスウイルスチミジンキナーゼ (Wigler et al., Cell 11:223 (1977))、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992))、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) 遺伝子を、それぞれ、tk⁻、hgprt⁻、またはaprt細胞で利用することができることを含むが、これらに限定されず、使用され得る。また、代謝拮抗物質耐性を、以下の各遺伝子の選択の基礎として使用することができる。メトトレキセートに対する耐性を与えるdhfr (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980))、O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981))、マイコフェノール酸に対する耐性を与えるgpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981))、アミノグ

40

50

リコシドG-418に耐性を与える neo Clinical Pharmacy 12 : 488-505、Wu and Wu, Biotherapy 3 : 87-95 (1991)、Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 : 573-596 (1993)、Mulligan, Science 260 : 926-932 (1993)、および Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 : 191-217 (1993)、TIB TECH 11 (5) : 155-215 (May, 1993)、およびハイグロマイシンに耐性を与える hygro (Santerre et al., Gene 30 : 147 (1984))。使用することができる組み換えDNA技術の当技術分野において一般に既知の方法は、Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)、Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)、および in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994)、Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150 : 1 (1981) に記載され、それらは、その全体において参照することにより組み込まれる。

【0195】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅により増加され得る (閲覧用として、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987) を参照されたい)。ベクター系発現抗体におけるマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養に存在する阻害剤のレベルの増加は、マーカー遺伝子の複製の数を増加させるであろう。増幅領域が抗体遺伝子に関連するため、抗体の産生はまた、増加するであろう (Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3 : 257 (1983))。

【0196】

体外生成は、大量の所望のポリペプチドを与えるためにスケールアップ (scale-up) を可能にする。組織培養条件下で、哺乳類細胞培養のための技法は、当技術分野において既知であり、例えば、エアリフト型リアクター、もしくは連続攪拌式リアクター等における均質懸濁物培養、または、例えば、ホローファイバー内、マイクロカプセル、あるいはアガロスマイクロビーズもしくはセラミックカートリッジ状での固定化もしくは捕捉化細胞培養が挙げられる。必要ならば、および/または所望であるならば、ポリペプチドの溶液は、例えば、合成ヒンジ領域ポリペプチドの選択的生合成後、または本明細書に記載のHICクロマトグラフィーステップ前もしくは、その後、例えば、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAEセルロースクロマトグラフィー、または(免疫)親和性クロマトグラフィー等の通常のクロマトグラフィー法により精製することができる。

【0197】

本発明の遺伝子コード抗体、もしくはその抗原結合フラグメント、変異体、または誘導体はまた、バクテリアまたは昆虫または酵母または植物細胞等の非哺乳類細胞を発現することができる。核酸を容易に受け入れるバクテリアは、大腸菌もしくはサルモネラ属の株等の腸内細菌科、枯草菌等のバシラス科、肺炎球菌、連鎖球菌、およびインフルエンザ菌のメンバーを含む。バクテリアにおいて発現する場合、異種ポリペプチドは、典型的には、封入体の一部になることがさらに理解されるであろう。異種ポリペプチドは、単離、精製され、その後、機能分子に組織化されなければならない。抗体の四価型が望ましい場合には、サブユニットは、その後、四価抗体に自己組織化するであろう (国際公開第W O O

10

20

30

40

50

2/096948A2号)。

【0198】

バクテリア系において、数多くの発現ベクターが、発現される抗体分子を対象とした使用により異なるが有利に選択され得る。例えば、抗体分子の医薬組成物の生成のために、大量のこのようなタンパク質を産生する場合、容易に精製される融合タンパク質生成物の高レベルの発現を誘導するベクターは、望ましいものであり得る。このようなベクターとしては、大腸菌発現ベクターpUR278 (Rutherford et al., EMBO J. 2:1791 (1983)) が挙げられるが、これに限定されず、そこでは、抗体をコードする配列は、融合タンパク質を産生するように、lacZコーディング領域を有するフレーム内のベクター、およびpINベクター (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985)、Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)) 等に個々にライゲーションされ得る。pGEXベクターも、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) を有する融合タンパク質として、外来ポリペプチドを発現するために、使用され得る。一般的に、このような融合タンパク質は可溶性であり、溶解細胞から、マトリックスグルタチオンアガロースビーズへの吸着および結合、次いで、遊離グルタチオンの存在下での溶出により容易に精製することができる。このpGEXベクターは、このクローニングされた標的遺伝子生成物は、GST部分から放出できるように、トロンビンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

【0199】

原核生物に加えて、真核微生物も使用され得る。数多くの他の株、例えば、ピキアパストリス (*Pichia pastoris*) は、一般に入手可能であるが、出芽酵母、または一般のパン酵母は、真核微生物の中で最も一般に使用される。

【0200】

サッカロミセス属の発現のために、例えば、プラスミドYRp7 (Stinchcomb et al., Nature 282:39 (1979)、Kingsman et al., Gene 7:141 (1979)、Tschemper et al., Gene 10:157 (1980)) が一般に使用される。このプラスミドは、トリプトファン、例えば、ATCC受託番号44076またはPEP4-1に増殖する能力を欠失する酵母の変異株のための選択マーカーを提供するTRP1遺伝子をすでに含有する (Jones, Genetics 85:12 (1977))。酵母宿主細胞ゲノムの特徴としてのtrp1損傷部の存在は、そこで、トリプトファンの非存在下での増殖による形質転換を検出する有効環境を提供する。

【0201】

昆虫系において、*Autographa californica*核多角体病ウイルス (AcNPV) が、外来遺伝子を発現するためのベクターとして、典型的に使用される。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda*細胞において増殖する。抗体をコードする配列は、このウイルスの非必須の領域 (例えば、ポリヘドリン遺伝子) に個々にクローニングされ得、AcNPVプロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の制御下に置かれ得る。

【0202】

本発明の抗体分子が組み換えによって発現されると、免疫グロブリン分子の精製のための当技術分野において既知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換、親和性、特に、タンパク質A後の特異抗原のための親和性による、およびサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、示差的溶解、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準技法により、精製され得る。代替として、本発明の抗体の親和性を増大させるための好ましい方法は、米国特許第2002 0123057 A1号に開示される。

【0203】

VI. 融合タンパク質および複合体

本発明の抗体は、さらなるドメインを含むことができ、該ドメインは、共有または非共有結合により連結される。連鎖は、当技術分野において既知の、また、上に記載の方法に従って、遺伝子融合に基づいて行うことができ、例えば、国際公開第WO94/04686号に記載されるように、例えば、化学的架橋により実施することができる。本発明の抗体を含む、融合タンパク質に存在する追加のドメインは、好ましくは柔軟性リンカー、有利には、ポリペプチドリンカーにより連結され、該ポリペプチドリンカーは、該さらなるドメインのC末端部と、本発明の抗体のN末端部の間の距離、または反対の方向に、またがるのに十分な長さの複数の親水性のペプチド結合アミノ酸を含む。治療的または診断的な活性薬剤は、様々な方法により、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントに結合することができる。これは、例えば、治療的または診断的な活性薬剤へのペプチド結合等の共有結合法により結合される本発明の抗体の可変領域を含む一本鎖融合タンパク質を含む。さらなる例には、以下の非限定の一覧表のものを含む、共有結合的に、または非共有結合的に追加の分子に結合される、少なくとも抗原結合フラグメントを含む、分子が挙げられる。Traunecker, Int. J. Cancer Supp. SUDP7 (1992), 51-52は、CD3に向けられるFv領域を、可溶性CD4、またはOVCAおよびIL-7等の他のリガンドに結合する、二重特異性試薬ヤヌシン (janusin) を記載する。同様に、本発明の抗体の可変領域は、Fv分子に構築され、引用された文献に例示されるもの等の代替リガンドに結合することができる。Higgins, J. Infect Disease 166 (1992), 198-202は、GP120のV3領域において、特定配列を対象にする抗体に交差結合された、OKT3からなるヘテロ共役抗体を記載した。このようなヘテロ共役抗体はまた、本発明の方法の抗体に含有する少なくとも該可変領域を使用して、構築することができる。特異抗体の追加の例は、Fanger, Cancer Treat. Res. 68 (1993), 181-194、およびFanger, Crit. Rev. Immunol. 12 (1992), 101-124により記載されるものを含む。

【0204】

本発明のさらなる実施形態において、結合分子、抗体、免疫グロブリン鎖、またはその結合フラグメント、もしくは抗原を検出可能に標識化される。標識薬剤は、本発明の抗体または抗原に直接、あるいは間接のいずれかで結合することができる。間接結合の一例は、スパーサー部分の使用によるものである。

【0205】

それ故に、例えば、本明細書に同定される抗体などの、結合分子の生物活性は、それらが、異常細胞および組織のそれぞれの適切な表面構造を発現する細胞への薬物局在化のための有力候補にするために十分な親和性を有することを示唆する。細胞へのこの標的および結合は、治療的、または診断的な活性薬剤の送達、および遺伝子治療法／遺伝子の送達に有用であり得る。本発明の抗体を有する分子／粒子は、病理学的タンパク質の変異型を発現する細胞／組織に特異的に結合し、ひいては、診断および治療上の使用を有し得る。したがって、結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントを、標識化（例えば、蛍光、放射能、酵素、核磁気、重金属）、および使用して、生体内もしくは体外で特異的な標的を検出することができ、それには、「免疫化学」様の体外でのアッセイが挙げられる。生体内において、それらを、核医学画像法に類似する方法において使用し、組織、細胞、またはネオエピトープを発現する他の物質を検出することができ得る。したがって、さらなる実施形態において、本発明は、脳内の疾患関連タンパク質の生体内検出、もしくは疾患関連タンパク質への治療薬および／または診断用薬の標的化、対象における病理学タンパク質凝集体もしくは構造の検出、それらの形成の抑制、もしくはそれらの低減のため、または認知の改善、もしくは疾病に関連する認識衰退の緩徐化、または回復のため、または病理的化合物または体液からのそれらの前駆物質の体外への抽出のための組成物の調製のための、本発明の結合分子もしくは抗体、またはその結合フラグメントの使用に関する。

【0206】

ある実施形態において、抗体ポリペプチドは、アミノ酸配列、または通常、抗体と関連しない1つ以上の部分を含む。例示的な修飾物を、さらに詳細を以下に記載する。例えば、本発明の一本鎖 f v 抗体フラグメントは、柔軟性リンカー配列を含む、または修飾し、機能部分（例えば、PEG、薬物、毒素、または標識）を加えることができる。

【0207】

本発明の抗体ポリペプチドは、融合タンパク質を含む、本質的にはそれらからなる、またはそれらからなり得る。融合タンパク質は、例えば、少なくとも1つの標的結合部位、および少なくとも1つの異種部分、すなわち、本来は自然に連結されない一部を有する、免疫グロブリン抗原結合ドメインを含む、キメラ分子である。アミノ酸配列は、通常は、融合ポリペプチドにおいて統合される別々のタンパク質に存在し得る、またはそれらは、通常は、同一のタンパク質に存在し得るが、融合ポリペプチドにおいて新しい配置に置かれる。融合タンパク質は、例えば、ポリヌクレオチドを化学合成、または作成し、翻訳することにより、作成され得、ペプチド領域が所望の関係をもってコードされる。

10

【0208】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに適用される、「異種」という用語は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドが、比較される実体の残りのものとは異なる実体から派生することを意味する。例えば、本明細書で使用される、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくはその類似体に融合される、「異種ポリペプチド」は、同一の種の非免疫グロブリンポリペプチド、または異なる種の免疫グロブリンもしくは非免疫グロブリンポリペプチドから派生する。

20

【0209】

本明細書の他の部分でさらに詳細に論じられるように、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、さらに、NもしくはC末端で異種ポリペプチドに組み換えによって融合され得る、またはポリペプチドもしくは他の組成物に化学的に接合され得る（共有および非共有接合を含む）。例えば、抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子および、異種ポリペプチド、薬物、放射性核種、もしくは毒素等のエフェクター分子に、組み換えによって融合され得る、または接合され得る。例えば、国際公開第WO92/08495号、第WO91/14438号、第WO89/12624号、米国特許第5,314,995号、および欧州特許第EP396,387号を参照されたい。

30

【0210】

本発明の抗体、または抗原結合フラグメント、変異体もしくは誘導体は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合、すなわち、ペプチド等配電子体によって互いにつながれたアミノ酸からなり得、20個の遺伝子をコードするアミノ酸以外のアミノ酸を含有し得る。抗体は、翻訳後の過程等の自然過程、または当技術分野において公知の化学修飾法により修飾され得る。このような修飾は、基本の教科書、およびより詳細な論文、ならびに膨大な研究文献において十分に記載される。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノもしくはカルボキシル末端を含む抗体、または炭水化物等の部分においてなど、どこでも生じることができる。修飾の同一の型は、所与の抗体における幾つかの部位で、同一、または異なる程度で存在し得ることを理解されよう。また、所与の抗体は、修飾の多くの型を含有し得る。抗体は、例えば、ユビキチン化の結果として、分枝され得、それらは、分枝の有無にかかわらず、環状であり得る。環状、分枝、および分枝環状抗体は、翻訳後自然過程に由来し得る、または合成方法により作成され得る。修飾は、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、交差結合、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル反応、共有交差結合の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解過程、リン酸化反応、プレニル化、ラセミ化、セレノイレーション (selenoylation)、硫酸化、アルギニン

40

50

化等のトランスファーRNAが媒介するアミノ酸のタンパク質への付加、およびユビキチン化を含む。(例えば、Proteins-Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993)、Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983)、Seifter et al., Meth Enzymol 182:626-646 (1990)、Rattan et al., Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992)を参照されたい)。

10

【0211】

本発明はまた、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体、および異種ポリペプチドを含む、融合タンパク質も提供する。一実施形態において、本発明の融合タンパク質は、本発明の抗体の任意の1つ以上のVH領域のアミノ酸配列、または本発明の抗体、またはそのフラグメントもしくは変異体の任意の1つ以上のVL領域のアミノ酸配列、および異種ポリペプチド配列を有する、ポリペプチドを含む、本質的にはそれらからなる、またはそれらからなる。別の実施形態において、本明細書に開示された診断および治療方法で用いるための融合タンパク質は、抗体、またはそのフラグメント、変異体、もしくは誘導体の任意の1つ、2つ、3つのVH-CDRのアミノ酸配列、または抗体、またはそのフラグメント、変異体、もしくは誘導体の任意の1つ、2つ、3つのVL-CDRのアミノ酸配列、および異種ポリペプチド配列を有する、ポリペプチドを含む、本質的にはそれらからなる、またはそれらからなる。一実施形態において、融合タンパク質は、本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体、もしくは変異体のVH-CDR3のアミノ酸配列、および異種ポリペプチド配列を有する、ポリペプチドを含み、融合タンパク質は、疾患関連タンパク質の少なくとも1つのネオエピトープに特異的に結合する。別の実施形態において、融合タンパク質は、本発明の抗体の少なくとも1つのVH領域のアミノ酸配列、および本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体、もしくは変異体の少なくとも1つのVL領域のアミノ酸配列、および異種ポリペプチド配列を有する、ポリペプチドを含む。好ましくは、融合タンパク質のVHおよびVL領域は、疾患関連タンパク質の少なくとも1つのネオエピトープに特異的に結合する、単一源抗体(または

20

30

【0212】

文献に報告される例示的な融合タンパク質は、T細胞受容体(Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940 (1987))、CD4(Capon et al., Nature 337:525-531 (1989)、Traunecker et al., Nature 339:68-70 (1989)、Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA 9:347-353 (1990)、およびByrn et al., Nature 344:667-670 (1990))、L-セレクチン(ホーミング受容体)(Watson et al., J. Cell. Biol. 110:2221-2229 (1990)、およびWatson et al., Nature 349:164-167 (1991))、CD44(Aruffo et al., Cell 61:1303-1313 (1990))、CD28およびB7(Linsley et al.,

40

50

, J. Exp. Med. 173:721-730 (1991))、CTLA-4 (Lisley et al., J. Exp. Med. 174:561-569 (1991))、CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66:1133-1144 (1991))、TNF受容体 (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991))、Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27:2883-2886 (1991)、およびPeppel et al., J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991))、ならびにIgE受容体 (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. Vol. 115, Abstract No. 1448 (1991))等の融合を含む。

10

【0213】

本明細書の他の場所に論じられるように、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、当技術分野において既知の方法を使用して、ポリペプチドの生体内の半減期を増大する、またはイムノアッセイで用いるために、異種ポリペプチドに融合され得る。例えば、一実施形態において、PEGは、本発明の抗体に接合され、生体内の半減期を増大することができる。Leong, S. R., et al., Cytokine 16:106 (2001)、Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002)、またはWeir et al., Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002)を参照。

20

【0214】

さらに、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、それらの精製または検出を促進するためのペプチド等のマーカー配列に融合することができる。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、特に、pQEベクター (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)に提供されるタグ等のヘキサヒスチジン (hexahistidine) ペプチドであり、それらの多くは、市販されている。例えば、Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989)に記載されるように、ヘキサヒスチジン (hexahistidine) は、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質から派生するエピトープに対応する、「HA」タグ (Wilson et al., Cell 37:767 (1984))、および「フラッグ」タグが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0215】

融合タンパク質は、当技術分野において公知の方法を使用して、調製することができる (例えば、米国特許第5, 116, 964号および第5, 225, 538号を参照されたい)。融合が行われる精密な部位を、実験的に選択し、融合タンパク質の分泌または結合特性を最適化し得る。融合タンパク質をコードするDNAを、その後、発現のための宿主細胞にトランスフェクトする。

【0216】

本発明の抗体は、非接合型で使用され得る、または、例えば、分子の治療的な特性を改善するため、標的検出を促進するため、または画像化、もしくは患者の治療のために、様々な分子のうちの少なくとも1つに接合され得る。本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、精製を実施する場合、精製前または精製後のいずれかで、標識化または接合することができる。

40

【0217】

特に、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体は、治療薬、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物学的反応修飾物質、医薬品、またはPEGに接合され得る。

【0218】

従来の抗体を含む抗毒素である複合体は、当技術分野において広範に説明される。毒素

50

は、従来の結合技法により、抗体に結合され得る、またはタンパク質毒素部分を含有する抗毒素を融合タンパク質として産生することができる。本発明の抗体を、対応する方法で使用し、このような抗毒素を取得することができる。このような抗毒素の実例は、Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70およびFanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54により記載されるものである。

【0219】

上に記載の融合タンパク質は、プロテイナーゼの開裂可能なリンカーまたは切断部位をさらに含み得る。同様に、これらのスペーサー部分は、不溶性か、可溶性となり得 (Dienert et al., Science 231 (1986), 148)、標的部位で抗原から薬物放出を可能にするために選択することができる。免疫療法に対する本発明の抗体および抗原に結合することができる治療薬の例は、薬物、放射性同位体、レクチン、および毒素である。本発明の抗体および抗原に接合することができる薬物は、マイトマイシンC、ダウノルビシン、およびビンブラスチン等の薬物と古典的に称される化合物を含む。例えば、免疫療法等の本発明の放射性同位体接合された抗体または抗原を使用する際、ある同位体は、白血球分配、ならびに安定性および発光等の因子に依存して、異なる他のものよりもさらに好ましいものであり得る。自己免疫反応により異なるが、幾つかの放射体は、他のものに好ましいものであり得る。一般的に、 α および β 粒子を放射する放射性同位体が、免疫療法において好ましい。 ^{212}Bi 等の短距離、高エネルギー放射物質が好ましい。治療目的のために、本発明の抗体または抗原に結合することができる、放射性同位体の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{212}At 、 ^{211}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd 、および ^{188}Re が挙げられるが、これらに限定されない。結合分子、例えば、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、ならびに生体外および生体内の治療的プロトコルに結合することができる、他の治療薬は既知であるか、または当業者により容易に確認することができる。適切であれば、当業者は、上に記載の抗体、抗原、もしくはタンパク質性物質自体の代わりに対応するベクターのうちのいずれか1つをコードする本発明のポリヌクレオチドを使用することができる。

【0220】

当業者は、複合体がまた、接合される選択された薬剤により異なる様々な技法を使用して、組み立てられ得ることを理解するであろう。例えば、ビオチンを有する複合体は、例えば、結合ポリペプチドをビオチンN-ヒドロキスクシンイミドエステル等のビオチンの活性化エステルと反応させることにより調製される。同様に、蛍光マーカーを有する複合体は、結合剤、例えば、本明細書に記載されるものの存在下で、またはイソチオシアネート、好ましくは、フルオレセインイソチオシアネートとの反応により、調製され得る。本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体の複合体は、類似の方法において調製される。

【0221】

本発明は、診断もしくは治療薬に接合される、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体をさらに包含する。抗体を、例えば、所与の治療および/または予防レジメンの有効性を決定するための臨床試験の手順の一部として、例えば、神経系の疾病を発症または進行を観察するために、診断的に使用することができる。検出は、検出可能な物質に抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体を結合することにより促進することができる。検出可能な物質の例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、様々な陽電子断層法を使用して金属を放出する陽電子、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。例えば、本発明に従って、診断用の抗体に接合することができる、金属イオンに関しては、米国特許第4,741,900号を参照されたい。適した酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、適した補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／

ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられ、適した蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダン汁、もしくはフィコエリトリンが挙げられ、発光物質の一例としては、ルミノールが挙げられ、生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリン (aequorin) が挙げられ、適した放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、または ^{99}Tc が挙げられる。

【0222】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体はまた、化学発光化合物にそれを結合することにより検出可能に標的化することもできる。化学発光タグ抗体の存在は、その後、化学反応の経過中に起こる発光の存在を検出することにより決定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマティック (theromatic) アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、およびシュウ酸エステルである。

【0223】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体を検出可能に標的化することができる方法の1つは、それを酵素に連結することにより、および酵素イムノアッセイ (EIA) において、連結生成物を使用するものである (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978))、Voller et al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978)、Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981)、Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980)、Ishikawa, E. et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo (1981)。抗体に結合する酵素は、例えば、分光光度法、蛍光分析法、または視覚的方法により検出することができる、化学部分を産生するための方法において、適切な基質、好ましくは、発色性基質と反応するであろう。抗体を検出可能に標識化するために使用することができる酵素は、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌のヌクレアーゼ、デルター5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、アルファグリセロリン酸塩、デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、ブドウ糖酸化酵素、ベータガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコゼー6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、検出は、酵素に対する発色性基質を利用する比色分析法により達成することができる。検出はまた、同様に調製された標準と比較すると、基質の酵素反応の範囲の目視比較により達成され得る。

【0224】

検出はまた、様々な他のイムノアッセイを使用して、達成され得る。例えば、抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体を放射活性物質で標識することにより、ラジオイムノアッセイ (RIA) の使用を通して、抗体を検出することが可能である (例えば、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986))、それらは本明細書に参照することにより組み込まれる)。放射性同位体は、ガンマカウンター、シンチレーションカウンター、またはオートラジオグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない、手段により検出することができる。

【0225】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体はまた、 ^{152}Eu 、またはランタニド系列の他のもの等の蛍光放出金属を使用して、検出可能に標識することもできる。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）またはエチレンジアミン四酢酸（EDTA）等の金属キレート基を使用して、抗体に付着させることができる。

【0226】

抗体、またはその抗原結合フラグメント、変異体、もしくは誘導体に、様々な部分を接合するための技法は公知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985)、Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987)、Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)、"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985)、およびThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119-58 (1982)を参照されたい。

【0227】

ある実施形態において、結合分子、例えば、結合ポリペプチドの安定性または有効性を強化する一部分、例えば、抗体またはその免疫特異フラグメントを接合することができる。例えば、一実施形態において、PEGは、本発明の結合分子に接合され、生体内の半減期を増大することができる。Leong, S. R., et al., Cytokine 16:106 (2001)、Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002)、またはWeir et al., Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002)を参照されたい。

【0228】

VII. 組成物および使用方法

さらに、本発明は、当該の結合分子、例えば、本発明の抗体、またはその抗原結合フラグメント、もしくはその化学的誘導体、または本発明のポリヌクレオチド、ベクター、もしくは細胞を含む、組成物に関する。本発明の組成物は、医薬的に許容できる担体をさらに含み得る。「化学的誘導体」という用語は、通常は、元の分子の一部ではない、追加の化学部分を含有する分子を説明する。このような部分は、元の分子の溶解性、半減期、吸収等を改善し得る。代替として、該部分は、元の分子の望ましくない副作用を緩和、または塩基分子の毒性を低減し得る。さらに、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の使用目的により異なるが、インターロイキンまたはインターフェロン等の薬剤をさらに含み得る。例えば、アルツハイマー病の治療に用いる、追加の薬剤は、有機小分子、抗アミロイドβ抗体、およびこれらの組み合わせからなる群から選択され得る。このように、特に好まし

い実施形態において、本発明は、アルツハイマー病の治療する、またはその進行を予防するため、アルツハイマー病に関連する症状の改善のため、アルツハイマー病の存在について対象を診断またはスクリーニングするため、もしくは対象のアルツハイマー病を発症する危険性を決定するための、医薬または診断組成物を調製するための結合分子、例えば、本発明の抗体、もしくはその抗原結合フラグメント、またはそれらの任意の1つの同一の結合特異性を実質的に有する結合分子、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、もしくは細胞の使用に関する。該医薬組成物は、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、またはエアロゾルとして、投与するように設計することができる。以下も参照されたい。

【0229】

それ故に、一実施形態において、本発明は、中枢神経系におけるタンパク質の異常蓄積および／または沈着を特徴とする神経疾患を治療するための方法に関し、方法には、それを必要とする患者に、治療上有効な量の前述に記載の結合分子、本発明の抗体、抗原、ポリヌクレオチド、ベクターもしくは細胞のいずれか1つを投与するステップを含む。「神経疾患」という用語は、アルツハイマー病、軽度認知障害、前頭側頭型痴呆、レヴィー小体病、パーキンソン病、ピック病、ピンスワンガー病、コンゴレッド脳アミロイド血管症、脳アミロイド血管症、ダウン症、多発脳梗塞性認知症、ハンチントン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、エイズによる認知症、うつ病、不安障害、恐怖症、ベル麻痺、てんかん、脳炎、多発性硬化症；神経筋障害、神経腫瘍疾患、脳腫瘍、脳卒中を含む神経血管疾患、神経免疫学的疾患、神経麻酔性疾患、脊髄損傷を含む神経外傷、神経因性疼痛を含む疼痛、小児神経および精神神経疾患、睡眠障害、トゥレット・シンドローム、軽度認知障害、血管性認知症、多発脳梗塞性認知症、嚢胞性線維症、ゴーシェ病、他の運動性疾患、および一般の中枢神経系（CNS）疾患が挙げられるが、これらに限定されない。別途記載されない限り、神経変性（neurodegenerative）、神経（neurological）、または精神神経（neuropsychiatric）という用語は、本明細書で同義的に使用される。

【0230】

本発明において、免疫系が疾病の病変の発症に対応する免疫反応と反応しなかった患者に、診断的、治療的、および予防的にそれらを利用するために、多数の疾病に対するヒト抗体を特徴付け、次いで、また該抗体を産生する方法が開示される。特に、これは、周知であるように、免疫系の反応性が、年齢が増すにつれ、連続的かつ著しく低減するため、高齢で生じる疾病において予期されなければならないであろう。これらの場合において、治療効果のある、または予防効果のある活性抗体は、内因性病態生理学タンパク質変異体の濃縮を遮断することに関して、免疫系の年齢に関連した制限を補償し、ひいては、高齢でより良好な健康状態を導き得る。したがって、本発明の医学的用途は、上に記載の患者群、例えば、60歳、65歳、70歳、75歳、80歳、またはそれ以上で特に適用でき、原理上、任意の種類脱線形態、例えば、細胞内タンパク質分解、立体構造変化、翻訳後の修飾の変化、体細胞変異、またはそれらの組み合わせで、内因性タンパク質の病態生理学変異体を発現することにより、表現型的に、発現するすべての疾病に関連する。本発明の意味において、病態生理学変異体は、生理学から逸脱する病理学的ネオエピトープを含有する変異体であることが考えられる。上記を参照されたい。

【0231】

特に、治療的な用途は、腫瘍疾患、炎症性疾患、ならびに、アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、レヴィー小体認知症等、クロイツフェルト・ヤコブ病を含むプリオン疾患、進行性核上麻痺、多系統萎縮症、大脳皮質基底核変性症、第17染色体ハンチントン病様のパーキンソニズムを伴う前頭側頭型変性症、前頭側頭認知症、脳アミロイド血管症、軽度認知障害、ダウン症、遺伝性脳アミロイドダッチタイプおよびアイスランドタイプ遺伝性脳出血、脊髄小脳失調および筋萎縮性側索硬化症、ならびに緑内障、封入体筋炎、家族性アミロイド・ポリニューロパシーおよび以下の前駆タンパク質SAA（血清アミロイドタンパク質A）、AL（免疫グロブリンのkまたはl軽鎖）、AH（gl Ig

重鎖)、A T T R (トランスサイレチン、血清プレアルブミン)、A A p o - A - 1 (アポリポタンパク質A1)、A A p o A 2 (アポリポタンパク質A2)、A G e l (ゲルゾリン)、A C y s (シスタチンC)、A L y s (リゾチーム)、A F i b (フィブリノゲン)、ベータアミロイド(アミロイド前駆タンパク質)、ベータアミロイド2M(ベータ2-ミクログロブリン)、A P r P (プリオンタンパク質)、A C a l (プロカルシトニン)、A I A P P (臍島アミロイドポリペプチド); A P r o (プロラクチン)、A I n s (インシュリン); A M e d (ラクタドヘリン); A k e r (ケラトエプセリン); A L a c (ラクトフェリン)、A b r i (A b r i P P)、A D a n (A D a n P P); またはA A N P (心房性ナトリウム利尿ペプチド)、(S k o v r o n s k y a t a l . , A n n u . R e v . P a t h o l . M e c h . D i s . 2 0 0 6 ; 1 : 1 5 1 - 7 0 1 0、B u x b a u m , C u r r O p i n R h e u m a t o l 2 0 0 3 ; 1 6 : 6 7 - 7 5のうちの少なくとも1つから派生する線維性タンパク質を含む、アミロイドーシス、等の中樞神経系疾患を含む。

【0232】

本発明の治療的アプローチの特定の利点は、健康な前臨床または臨床的に異常に安定した有機体からのB細胞またはB記憶細胞から派生した抗体が、臨床的に明確な疾病を予防する、または臨床的に明確な疾病の発生の危険を減らす、もしくは臨床的に明確な疾病の発生の時期を遅延することが可能な可能性があるという事実根拠に根ざしている。典型的には、このような抗体はまた、体細胞成熟、すなわち、抗体の可変領域の体細胞変異によって、標的分子に高親和性結合の選択性および有効性に関する最適化もすでに正常に経過している。

【0233】

例えば、ヒトにおける、このような生体内細胞が、自己免疫学もしくはアレルギー反応という意味では、関連した、または他の生理学タンパク質、もしくは細胞構造によって、活性化されていないという知識は、臨床試験段階を通して、正常に存続する機会の大幅な増大を意味するため、医学的にも非常に重要である。いわば、効率、受容性および耐性が、少なくとも1つのヒト対象において、予防的または治療的抗体の前臨床発展前に、すでに実証されている。したがって、本発明に従う手順を用いて、治療薬として抗体の標的構造特異的な効率および副作用の減少する可能性は共に、成功の臨床的可能性を有意に増大することが期待され得る。

【0234】

前述から、本発明は、上に記載の抗体のうちの少なくとも1つのC D Rを含む、疾病特異的な結合分子、特に、アルツハイマー病およびアミロイドβ沈着に、それぞれ関連する疾患の診断および／または治療に対する任意の使用を包含することは明白である。好ましくは、該結合分子は、本発明の抗体またはその免疫グロブリン鎖である。加えて、本発明は、上に記載の抗体のうちの任意の1つの抗イディオタイプ抗体に関する。これらは、抗原結合部位付近の抗体の可変領域にある独特の抗原ペプチド配列に結合する抗体または他の結合分子である。

【0235】

別の実施形態において、本発明は、上に記載の結合分子、本発明の抗体、抗原結合フラグメント、ポリヌクレオチド、ベクター、または細胞のうちの任意の1つを含む、診断組成物、および免疫または核酸ベースの診断方法に従来使用される試薬等の検出の任意に適した手段に関する。本発明の抗体は、例えば、液相で利用できる、または固相担体に結合することができる、イムノアッセイで使用するのに適している。本発明の抗体を利用できるイムノアッセイの例は、直接あるいは間接形式のいずれかにおける、競合および非競合イムノアッセイである。このようなイムノアッセイの例は、ラジオイムノアッセイ(R I A)、サンドイッチ(イムノメトリックアッセイ)、フローサイトメトリー、およびウェスタンブロットアッセイである。本発明の抗原および抗体は、多くの異なる担体に結合し、それに特異的に結合する細胞を単離するのに使用することができる。公知の担体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ

カーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、自然および変性セルロース、ポリ
アクリルアミド、アガロース、およびマグネタイトが挙げられる。担体の特性は、本発明
の目的のために、可溶性か不溶性のいずれかであり得る。当業者に既知の多くの異なる標
識および標識方法がある。本発明に使用することができる標識型の例は、酵素、放射性同
位体、コロイド金属、蛍光化合物、化学発光化合物、および生物発光化合物を含む。上に
論じられる実施形態も参照されたい。

【0236】

さらなる実施形態により、結合分子、特に、本発明の抗体はまた、血液サンプル、リン
パサンプル、または任意の他の体液サンプルであり得る試験済みの個体からの体液サン
プルを取得する、および抗体抗原複合体の形成を可能にする条件下で、体液サンプルを本発
明の抗体と接触することにより、個体における、疾患の診断方法にも使用され得る。その
後、このような複合体のレベルは、当技術分野において既知の方法により決定され、対照
サンプルに形成されるものより著しく高いレベルは、試験された個体における疾病を示す
。同様に、本発明の抗体により結合される特異的抗原もまた、使用され得る。したがって
、本発明は、結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む体
外イムノアッセイに関する。

【0237】

この文脈において、本発明はまた、本目的のために具体的に設計された手段に関する。
例えば、タンパク質または抗体ベースのアレイを使用し得、例えば、神経疾患、特に、ア
ルツハイマー病に罹患する患者に存在し得る自己抗体を検出するために、言及された疾患
関連タンパク質から派生し、ネオエピトープを含有する抗原、あるいは、それらのタンパ
ク質のうちの任意の1つを特異的に認識する、本発明の抗体もしくは等価抗原結合分子の
いずれかで、装填される。例えば、関節リウマチにおける、自己抗体の抗原マイクロアレ
イプロファイリングは、Hueber et al., Arthritis Rheum.
52 (2005), 2645-2655により報告されている。マイクロアレイイムノ
アッセイの設計は、Kusnezow et al., Mol. Cell Proteo
mics 5 (2006), 1681-1696に要約される。このように、本発明はまた
、本発明に従って同定された結合分子または抗原を装填したマイクロアレイに関する。

【0238】

本発明はまた、例えば、結合分子、本発明の抗体、またはその結合フラグメント、抗原
、ポリヌクレオチド、ベクター、もしくは細胞等の上に記載の材料のうちの1つ以上で満
たされた1つ以上の容器を含む、それぞれ、医薬および診断用のパックまたはキットも提
供する。医薬または生理学的製剤の製造、使用または販売を規制する行政機関により規定
される型の通知を、このような容器に付随させることができ、その通知は、ヒト投与の製
造、使用または販売機関により認可を反映する。加えて、または代替として、キットは、
適切な診断アッセイで用いる、試薬、および／または使用説明書を含む。組成物、例えば
、本発明のキットは、当然のことながら、上記に定義される、疾患関連タンパク質、特に
、アミロイドーシスの存在を伴う、疾患の診断、予防、および治療に特に適しており、ア
ルツハイマー病 (AD) の治療に特に適用できる。

【0239】

本明細書に使用される、「治療」、「治療する」等の用語は、一般に、所望の薬理学的
および／または生理学的効果を取得する手段を意味する。効果は、疾病もしくはその症状
を完全にもしくは部分的に予防するという意味において、予防的であり得る、および／ま
たは疾病、および／または疾病によって起こる有害影響を部分的もしくは完全に治療す
るという意味において、治療的であり得る。本明細書で使用される「治療」という用語は、
哺乳類、特に、ヒトにおける疾病の任意の治療を対象とし、それには、(a) 疾病にかか
りやすいが、まだ罹患していると診断されていない対象に疾病が生じるのを防ぐ、(b)
疾病の阻害する、例えば、その発症を妨げる、または (c) 疾病を緩和する、例えば、疾
病の軽減をもたらすことを含む。

【0240】

さらに、「対象」または「患者」という用語は、状態、疾患、もしくは疾病に対する治療を必要とする哺乳類、好ましくは、ヒトを指す。

【0241】

本発明の医薬組成物は、当技術分野において公知の方法に従って、処方することができる。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN0-683-306472を参照されたい。適した医薬担体の例は、当技術分野において公知であり、リン酸緩衝生理食塩水、水、油／水エマルジョン等のエマルジョン、様々な型の湿潤剤、滅菌溶液等を含む。このような担体を含む組成物は、公知の従来の方法により処方することができる。これらの医薬組成物は、適した用量で対象に投与することができる。適した組成物の投与は、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所、または皮内投与等の異なる方法により達成され得る。鼻腔用スプレー剤等のエアロゾル剤は、精製された水溶液、または、防腐剤および等張剤を有する活性薬剤の他の溶液を含む。このような製剤は、好ましくは、鼻粘膜に適合するpH、および等張状態に調整される。直腸または腔内投与の製剤は、適する担体を有する座薬として示し得る。

10

【0242】

さらに、本発明は、本発明の薬物を投与するために、現在標準手順となっている頭蓋骨に小さな穴を開ける（幸いにも稀であるが）手順を含むが、一方、好ましい態様において、結合分子、特に、本発明の抗体または抗体ベースの薬物は、血液脳関門を横断することができ、静脈内または経口投与を可能にする。

20

【0243】

用量レジメンは、主治医および臨床学的因子により決定されるであろう。医学的分野において公知のとおり、任意の1人の患者に対する用量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与時間および経路、健康状態全般、および同時に投与される他の薬物を含む、多くの因子により異なる。典型的な用量は、例えば、0.001から1000 μg （または本範囲における発現もしくは発現の抑制のための核酸の）範囲であり得るが、特に、前述の要因を考慮して、本例示的範囲を下回るもしくは上回る用量も想定される。一般に、用量は、例えば、宿主体重の約0.0001から100 mg/kg 、さらに通常は、0.01から5 mg/kg （例えば、0.02 mg/kg 、0.25 mg/kg 、0.5 mg/kg 、0.75 mg/kg 、1 mg/kg 、2 mg/kg 等）の範囲であり得る。例えば、用量は、体重あたり1 mg/kg もしくは体重あたり10 mg/kg 、または1～10 mg/kg の範囲内、好ましくは、少なくとも1 mg/kg であり得る。上記の範囲の用量中間体はまた、本発明の範囲内であることを意図する。対象は、このような用量を毎日、代替日に、毎週、または実証的分析により決定される任意の他の計画に従って、投与され得る。例示的な治療は、長期、例えば、少なくとも6ヶ月にわたって、反復投与における投与を必要とする。追加の例示的な治療レジメンは、2週間に1回、または1ヶ月に1回、または3～6ヶ月に1回の投与を伴う。例示的な用量計画は、連続日において、1～10 mg/kg もしくは15 mg/kg 、代替日において、30 mg/kg 、または毎週、60 mg/kg を含む。幾つかの方法において、異なる結合特異性を有する2つ以上のモノクローナル抗体が同時投与され、そこでは、投与されるそれぞれの抗体の用量は指示された範囲内である。経過は、定期評価により監視され得る。非経口的投与の調製は、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液、およびエマルジョンを含む。非水溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油、およびオレイン酸エチル等の注射用有機エステルである。水溶性担体は、食塩水および緩衝培地を含む、水、アルコール性／水性溶液、エマルジョン、または懸濁液を含む。非経口用賦形剤は、塩化ナトリウム液、リンガーデキストロース、デキストロース、および塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル、または固定油を含む。静脈内賦形剤は、液体および栄養補給液、電解質補給液（リンゲルのデキストロース等に基づく等）等を含む。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス等の保存剤および他の添加剤も存在し

30

40

50

得る。さらに、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の使用目的により異なるが、ドーパミン等の薬剤または精神薬理薬物をさらに含み得る。さらに、医薬組成物はまた、例えば、本発明の医薬組成物が、受動免疫付与のための抗A β 抗体を含む場合、ワクチンとして処方され得る。

【0244】

加えて、他の薬剤の同時投与または連続投与は、望ましいものであり得る。治療効果のある用量または量は、症状または状態を改善するのに十分な活性成分の量を指す。このような化合物の治療効果および毒性は、細胞培養または実験動物における、標準医薬手順、例えば、ED₅₀（集団の50%において、治療効果のある用量）およびLD₅₀（集団の50%において、致死的な用量）により決定することができる。治療効果と毒性効果との間の用量比は、治療指数であり、比率、LD₅₀/ED₅₀として表現され得る。好ましくは、組成物における治療薬は、アルツハイマー病の場合、正常な反応および/または認知特性を修復するのに十分な量で存在する。

【0245】

本発明に従う医薬組成物は、好ましくは、アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、レヴィー小体認知症、クロイツフェルト・ヤコブ病を含むプリオン疾患、進行性核上麻痺、多系統萎縮症、大脳皮質基底核変性症、第17染色体ハンチントン病様のパーキンソニズムを伴う前頭側頭型変性症、前頭側頭認知症、脳アミロイド血管症、軽度認知障害、ダウン症、遺伝性脳アミロイドダッチタイプおよびアイスランドタイプ遺伝性脳出血、脊髄小脳失調、筋萎縮性側索硬化症、ベル麻痺、てんかん、脳炎、神経筋障害、緑内障、封入体筋炎、家族性アミロイド・ポリニューロパシーおよび以下の前駆タンパク質SAA（血清アミロイドタンパク質A）、AL（免疫グロブリンのkまたはl軽鎖）、AH（glIg重鎖）、ATTR（トランスサイレチン、血清プレアルブミン）、ApoA-1（アポリポタンパク質A1）、ApoA2（アポリポタンパク質A2）、AGel（ゲルゾリン）、ACys（シスタチンC）、ALys（リゾチーム）、AFib（フィブリノゲン）、ベータアミロイド（アミロイド前駆タンパク質）、ベータアミロイド2M（ベータ2-ミクログロブリン）、APrP（プリオンタンパク質）、ACal（プロカルシトニン）、AIApP（臍島アミロイドポリペプチド）；APro（プロラクチン）、AIns（インシュリン）；AMed（ラクタドヘリン）；Aker（ケラトエプセリン）；ALac（ラクトフェリン）、Abri（AbriP）、ADan（ADanP）；またはAANP（心房性ナトリウム利尿ペプチド）、（Skovronsky et al., Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2006;1:151-70、Buxbaum, Curr Opin Rheumatol 2003;16:67-75）、神経腫瘍学、神経免疫学、神経腫瘍学的疼痛、小児神経学、恐怖症、情動障害、睡眠障害、トゥレット・シンドローム、他の運動障害、一般的な中枢神経系（CNS）疾患のうちの少なくとも1つから派生する線維性タンパク質を含む、アミロイドーシス等の中枢神経系疾患が挙げられるが、これらに限定されない、神経疾患の治療に使用することができる。

【0246】

これらおよび他の実施形態は、本発明の詳細および実施例により開示および包含される。本発明に従って利用される、物質、方法、使用、および化合物のうちの任意の1つに関してさらなる文献は、例えば、電子デバイスを使用して、公共のライブラリーおよびデータベースから検索され得る。例えば、全米バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）および/または国立衛生研究所（National Institutes of Health）の国立医学図書館（National Library of Medicine）により提供される、公共のデータベース「Medline」を利用し得る。ヨーロッパ分子生物学研究所（European Molecular Biology Laboratory: EMBL）の一部である、欧州バイオインフォマティクス研究所（European Bioinformatics Institute: EBI）の

もの等のさらなるデータベースおよびウェブアドレスは、当業者に知られており、インターネット検索エンジンを使用しても取得することができる。バイオテクノロジーにおける特許情報の概説および遡及検索および現状認識に有用な特許情報の関連源の調査は、Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364において得られる。

【0247】

上記の開示は、一般に、本発明に記載する。別途指定のない限り、本明細書で使用される用語には、Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997年、2000年改訂、および2003年再印刷、ISBN 0 19 850673 2に定められているような定義が与えられる。本明細書の本文を通して幾つかの文書を引用する。全書誌的引用は、請求項に直接先行する本明細書の終わりに求められ得る。すべての引用文献（本明細書および製造業者の仕様書、取り扱い説明書等を通して引用されるような、文献参照、交付済み特許、公表された特許出願を含む）の内容は、参照することによって本明細書に明示的に組み込まれるが、引用された任意の文書は、本発明に関して実際に先行技術であるという承認はない。

10

【0248】

さらに完全な理解は、説明のみの目的のために本明細書に提供される以下の特定の実施例に、参照することにより得られ得るが、本発明の範囲を限定することを意図しない。

【実施例】

【0249】

20

以下の実施例は、本発明をさらに例示するが、決して、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に利用される、従来の方法の詳述は、記載の文献に見ることができる。BeersおよびBerkowにより編集された“The Merck Manual of Diagnosis and Therapy” Seventeenth Ed. (Merck & Co., Inc. 2003)も参照されたい。

【0250】

本発明の実行は、別途指示がない限り、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子組み換え生物学、微生物学、組み換えDNA、および免疫学の従来技術を利用し、それらは当技術分野の技術内である。本発明の実行に有用な一般技術のさらなる詳細に関しては、実行者は、細胞生物学および組織培養における標準の教科書および総説を参照することができる。実施例に記載の参考文献も参照されたい。分子および細胞生化学における一般方法を、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001)、Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999)、DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985)、Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984)、Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins eds. 1984)、Transcription And Translation (Hames and Higgins eds. 1984)、Culture Of Animal Cells (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987)、Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, eds.)、Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (Ausubel et al., eds.)、およびRecombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press)として、当該の標準教科書に認められる。Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos, eds., 1987

30

40

50

, Cold Spring Harbor Laboratory)、Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al., eds.), Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986)、Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984)、the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987)、Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986)。Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996)、Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999)、Viral Vectors (Kaplit & Loewy eds., Academic Press 1995)、Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997)、およびCell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)。本開示において参照される遺伝子操作の試薬、クローニングベクター、およびキットは、BioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-Aldrich、およびClonTech等の商業的業者から入手可能である。細胞培養および媒体回収における一般技術は、Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148)、Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73)、Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375)、およびSuspension Culture of Mammalian Cells (Birch et al., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251)、Extracting information from cDNA arrays, Herzel et al., CHAOS 11 (2001), 98-107に概説される。

【0251】

以下の実験を例示し、抗体NI-101.11に関して記載する。しかしながら、NI 101系の他の抗体、特に、NI 101.10は、構造的に類似であり、したがって、同様の結果を提供することが予想され得る。

【0252】

追加の方法

記憶B細胞の表示

例えば、危険因子の存在下で疾病の臨床的兆候がない異常に陽性の臨床経過、もしくは、疾病の発現がない中度または前駆兆候の安定した経過により特徴付けられる、臨床的に厳選されたヒト対象、または長期末発症者を、記憶B細胞の単離のための出発材料として、末梢血リンパ球を提供するように採用した。この戦略は、対象の記憶B細胞プールは、抗体特異性、場合により、前述の抗原遭遇中、生成された抗体頻度も保存するという、感染免疫学に構築される概念に基づく (McHeyzer-Williams and Ahmed Curr. Opin. Immunol. 11 (1999), 172-179、Bernasconi et al., Science 298 (2002), 2199-202、Traggiai et al., Nat. Med. 10 (2004), 871-875)。本概念は、感染性因子に対する適応免疫、ならびに、液性免疫の

説明、次いで、1次感染症を説明するように発展された。本理論によれば、自然に、あるいは予防接種後、対象の経歴において抗体反応を誘発していたすべての抗原に対する抗体の全相補体は、記憶B細胞プール内で完全に示されるはずである。本発明に従って、本理論は、通常は生理学的に関連するタンパク質の異常な凝集または配座の結果として生成される内在性抗原に適用され、したがって、生理学的免疫学耐性に影響されず、したがって、抗原特性を獲得し、立体構造新エピトープ（ネオエピトープ）に対する免疫反応を誘発することができる。

【0253】

記憶B細胞は、パンB細胞マーカーCD22を含む、表面マーカーで単離され、IgM、IgD、IgE、およびIgAを発現した、陰性選択された抗原未熟B細胞と組み合わせられる。本技術を用いて、約10,000~150,000の記憶B細胞を30mlのヒト血液から取得することができる。これらは、例えば、エプスタイン・バー・ウイルスで不死化され、照射ヒト線維芽細胞支持細胞層上でオリゴクローン性に培養される（Zubler et al., J Immunol. 134 (1985), 3662-3668、Traggiai et al., Nat. Med. 10 (2004), 871-875）。抗体分泌記憶B細胞の転換および不死化の有効性を改善するために、細菌性非メチル化CpG-ジヌクレオチドの活性を模倣するCpG2006（Hartmann and Krieg J Immunol 164 (2) (2000), 944-953）を使用することができる。

【0254】

実験プロトコル：

MACS技術およびCD22マイクロビーズを使用して、PBLのバルクからB細胞の選択を実施した（Miltényi, Bergisch Gladbach, Germany）。PBLを、MACS抗ヒトCD22、フィコエリトリン接合抗ヒトIgD、およびAPC接合抗体抗ヒトIgM、IgA、CD3、CD8、CD56で標識化した（Becton Dickinson, Basel, Switzerland）。CD22陽性細胞を、LSカラムおよびMidi MACSデバイス（Miltényi）を使用して、単離し、次いで、MoFloセルソーターを使用して、フィコエリトリンおよびAPC陰性細胞を選択した（Dako, Fort Collins, USA）。CD22陽性、IgM、IgD、IgA、およびIgE陰性B細胞を、その後、B細胞培地（10%ウシ胎仔血清（Hyclone, Perbio, Lausanne, Switzerland）が補完されるRPMI1640）中の2.5mg/lの濃度で、B95-8細胞およびCpG2006（Sigma, Buchs, Switzerland）から得られる浮遊物を含むエプスタイン・バー・ウイルスと共にインキュベートした。任意ドナーから調製された30,000個の照射されたヒトPBL上のB細胞培地中のCostar丸底型96ウェルプレート（Corning, Vitaris, Baar, Switzerland）において、ウェルあたり5~50個の細胞を播種した。記憶B細胞培養を、加湿した細胞培養インキュベーターにおいて、37℃、5%CO₂で2~4週間維持した後、培養の馴化培地をELISAおよび組織アレイにおいて検査した。

【0255】

抗体スクリーニング

馴化培地における抗体を、アルツハイマー病が挙げられるが、これに限定されない、病理学的に確認された診断を有するヒト患者から得られた組織切片、またはヒト疾患のトランスジェニックマウスモデルの組織切片から得られた、または高齢の非ヒト霊長類を含むヒト疾患の動物モデルから得られた組織切片から、または凝集合成ペプチド調製のELISAにより、タンパク質凝集体、および異常かつ病理学的関連構造を含む、病理学的エピトープに結合するためにスクリーニングされる。本発明の意味において、異常かつ病理学的構造としては、βアミロイド班、神経原線維変化、レヴィー小体におけるアルファシヌクレイン凝集体、およびジストロフィー性軸索に沈着されるタンパク質凝集体が挙げられるが、これらに限定されない。ヒト組織はまた、正常な細胞または超細胞組織構造を有す

る抗体の交差反応性を除外するためにも使用される。選択された抗体は、クラスおよび軽鎖サブクラスの決定のためにさらに分析される。記憶B細胞培養からの選択された病理学関連抗体メッセージを、RT-PCRを使用して、転写し、クローン化し、および組み換え生成のために発現ベクターに組み合わされる。

【0256】

実験プロトコル：

マイクロタイターに適合する組織マイクロアレイを使用する、馴化培地のB細胞のスクリーニング

アレイ生成

パラフィン包埋したヒト検視アルツハイマー病脳組織を、直径1～2mm、長さ10mmのロッドに切断した。4本のロッドをパラフィン内で垂直に埋め込み、9×9mmのマイクロタイター型に適合する正方形を形成した。5μmの組織スライスを、ミクロトームを用いて、本アセンブリから切断し、2枚のスライスをスライドガラスに、互いに隣接するように取り付け、96ウェルマイクロタイター型に適合する2×4ロッドのアセンブリを得た。代替として、APPトランスジェニックマウスからの組織を使用して、組織アレイを調製した。

10

【0257】

B細胞スクリーニング

記憶B細胞培養からの馴化培地を、マルチチャンネルピペットを使用して、組織アレイスライドに移し、室温で2時間インキュベートした。洗浄ステップ後、組織切片へのヒト抗体の結合を、ヒトIgGへのCy3共役した第2抗体を使用して、分析した(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK)。蛍光分析を逆蛍光顕微鏡で実施した(Leica, Heerbrugg, Switzerland)。

20

【0258】

ELISA

96ウェルの半エリアマイクロプレート(Corning)を、4℃で一晩、コーティング緩衝剤(15mM Na₂CO₃、35mM NaHCO₃、pH9.42)中で1μg/mlの標準濃度で、合成アミロイドβペプチドを用いて被覆した。プレートを洗浄し、非特異結合部位を、室温で1時間、2%BSA(Sigma, Buchs, Switzerland)を含有する、PBSで遮断した。B細胞の馴化培地を、記憶B細胞培養プレートからELISAプレートに移し、室温で2時間インキュベートした。ヒト抗体の結合を、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)共役ロバ抗ヒトIgGポリクローナル抗体(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, UK)を使用して決定した後、標準比色分析において、HRP活性の測定をした。

30

【0259】

関心対象となる特異性を表示する抗体の分子クローニング

選択された記憶B細胞培養の生体B細胞を、セルソーターを使用して採取する。mRNAを調製し、3'プライマーとしてのすべてのヒトJ-Hセグメントに対して特異的なプライマーと組み合わせて、5'プライマーとしてのすべてのヒト可変重鎖および軽鎖枠組み1(FR1)ファミリーに対するIg枠組み特異的プライマーを使用して、免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列を得る(Marks et al., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597)。代替として、記憶B細胞培養からの単一選別された細胞の単一細胞RT-PCRを、Ig重鎖および軽鎖配列の起源として使用することができる(Babcock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 7843-7848, Brezinschek et al., J. Immunol. 155 (1995), 190-202, Coronella et al., Nucleic Acids Research 28 (2000), Owens, et al., J. Immunol. 171 (2003), 2725-2733)。単

40

50

一細胞選別は、B細胞培養において、最初に産生される抗体クローンの免疫グロブリン重鎖および軽鎖の正しい対合を保存する。

【0260】

所望の特異性を持つ抗体クローンの同定は、完全抗体の組み換え発現後、マイクロタイター上で適合する組織マイクロアレイおよびELISAにおける再スクリーニングにより実施される。完全IgG1抗体の組み換え発現は、適切な定常ドメインをコードする配列を有する、5'主要末端および3'末端で、シグナルペプチドをコードする配列を有する、可変領域配列を相補する発現ベクターに、「正確なリーディングフレーム内」の可変重鎖および軽鎖配列を挿入した後、達成される。その目的のため、プライマーは、抗体発現ベクターへの可変重鎖および軽鎖配列のクローニングを促進するように設計された制限部位を含有した。重鎖免疫グロブリンは、シグナルペプチドおよびヒト免疫グロブリンの定常ドメインを持つ重鎖発現ベクターに、フレーム内の免疫グロブリン重鎖RT-PCR生成物を挿入することにより発現される。カッパ軽鎖免疫グロブリンは、シグナルペプチドおよびヒトカッパ軽鎖免疫グロブリンの定常ドメイン1を提供する軽鎖発現ベクターに、フレーム内のカッパ軽鎖RT-PCR生成物を挿入することにより発現される。代替として、ラムダ軽鎖免疫グロブリンは、シグナルペプチドおよびヒトラムダ軽鎖免疫グロブリンの定常ドメイン1を提供するラムダ軽鎖発現ベクターに、フレーム内のラムダ軽鎖RT-PCR生成物を挿入することにより発現される。

10

【0261】

Ig重鎖発現ベクターおよびカッパもしくはラムダIg軽鎖発現ベクターのHEK293細胞（または任意の他の適切な受容細胞株）への同時トランスフェクション後、機能する組み換えモノクローナル抗体を得た。組み換えヒトモノクローナル抗体は、次いで、標準タンパク質Aカラム精製を使用して、馴化培地から精製される。組み換えヒトモノクローナル抗体を、一時的にトランスフェクトした細胞か、安定的にトランスフェクトした細胞のいずれかを使用して、無制限の量で、産生することができる。組み換えヒトモノクローナル抗体を産生する細胞株は、Ig発現ベクターを直接使用するか、または異なる発現ベクターにIg可変領域の再クローニングをするかのいずれかにより、構築することができる。F(ab)、F(ab)₂、およびscFv等の誘導体を、これらのIg可変領域から生成することもできる。

20

【0262】

実験プロトコル：

バルクB細胞のRT-PCR

選択された記憶B細胞培養の前方および横への光散乱特性により同定される、生体細胞を、MoFloセルソーターを使用して、20μlのRNAlater (Ambion, Huntingdon, UK)で満たされた0.2mlのPCR管中に直接、100~2000個の細胞のアリコートに選別した。mRNAを、mRNA-Direct Microキット (Dynal, Invitrogen, Basel, Switzerland)を使用して、調製した。cDNAは、“RT for PCR”キット (Clontech Becton Dickinson, Basel, Switzerland)を使用して、調製され、Advantage2 PCRキット (Clontech)を使用し、3'プライマーとしての、ヒトIg重鎖、またはIgカッパもしくはIgラムダ軽鎖の定常ドメインに対して特異的なプライマーと組み合わせて、5'プライマーとしてすべてのヒト可変重鎖および軽鎖フレームワーク1 (FR1)ファミリーに対して特異的なプライマーを使用して、免疫グロブリン (Ig) 重鎖および軽鎖可変配列のPCRを実施する。プライマーは、Microsynth (Balgach, Switzerland)から購入した。

30

40

【0263】

すべての発現ベクターに使用されるシグナルペプチドは、V-Baseで記載されるように、ヒト免疫グロブリンカッパ軽鎖ファミリー1 L5配列 (MDMRVPAQLGLLLWFPGSRC、配列番号2) から得、PCR増幅された可変領域

50

(ATGGACATGCGGGTGCCCCGCCAGCTGCTGGGCCCTGCTGCTGCTGCTGTTCCCCGGCTCTAGATGC, 配列番号1)

のクローニングを促進するために、制限部位XbaIに提供するために設計された。XbaIは、サイレント突然変異生成により導入された。可変重鎖領域のクローニングのために使用される3'制限部位として、制限部位SalIをベクターにより提供されるIgG1のC1に導入した。同様に、制限部位BsiWIをカッパ軽鎖のC1に導入し、XhoIをラムダ軽鎖のC1に導入した。PCR生成物の制限消化およびレシピエントベクター (recipient vector) へのライゲーションを、標準手順に従って、実施した。プラスミドDNAは、標準キット (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) を使用して、調製された。レシピエントベクターは、哺乳類細胞において、抗体遺伝子の発現のためのCMVプロモーターを含有した。

【0264】

単一細胞RT-PCR

培養されたB細胞からのIg重鎖および軽鎖可変領域の単一細胞RT-PCRのために、Owensらによって記載される方法の改変形態を使用した (Owens et al., 2003)。単一細胞を、MoFloセルソーターを使用して、0.2mlのPCR管のアレイのそれぞれの管に直接沈着させた。それぞれの管を、スーパースクリプトII逆転写酵素 (Invitrogen) 用の10μlのRT緩衝剤を含有するように調製した。PCR管を、ドライアイス上で衝撃冷却し、RT-PCR前に直ちに凍結した。cDNAは、ランダムヘキサマー (Clontech) およびスーパースクリプトII逆転写酵素 (Invitrogen) を使用して、調製した。Ig可変領域ファミリーの間で保存されるすべてのシグナルペプチドで抗原刺激を受けた1組のプライマーを、5'プライマーとして、使用して、免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域の第1ラウンドPCRを実施した。3'位では、IgC1重鎖またはIgカッパもしくはIgラムダ軽鎖の定常領域に対して特異的な単一プライマーを使用した。バルクB細胞RT-PCRのために記載される、プライマーを使用して、第2ラウンドのPCRを、第1ラウンドPCR中に得られたPCR生成物に対して実施した。このように、レシピエントベクターへのクローニングを実施した。

【0265】

代替的細胞クローニング

クローニングを、標準限定された希釈法を使用して、またはセルソーター (MoFlo, Dako, Fort Collins, USA) を使用して、96ウェル培養プレートに単一細胞を沈着することにより、実施した。限定希釈のために、記憶B細胞培養の細胞を採取し、培地中に再懸濁された30μmのナイロンメッシュ (Falcon, Becton Dickinson, Basel, Switzerland) を通過させ、ウェルあたり0.3細胞の濃度で、96ウェルプレートもしくは384ウェルプレートに播種した。

【0266】

セルソーターを用いて播種するために、当該機器を、B細胞培地が補完される96ウェルプレートに直接、ウェルあたり1つの単一細胞 (単一モード) を沈着させるように設定された。培養培地は、活性化したT細胞により馴化された培地で補完された。代替として、30.000照射支持細胞を培地に加えた。

【0267】

免疫グロブリン可変領域配列の配列分析

クローン免疫グロブリン可変領域配列の配列決定を、発現ベクターにおいて、5'の挿入Ig可変領域配列に存在するCMVプロモーターに対して特異的なプライマーを使用して、実施した。代替として、Ig重鎖および軽鎖の定常ドメインで抗原刺激を受けたプライマーを使用した。得られた配列を、ベクターNTIソフトウェア (Informax-Invitrogen) を使用して、分析および整列した。リーダーペプチドおよび定常ドメインを有するフレーム内に完全免疫グロブリン可変領域をコードする配列を含有する

プラスミドを発現のために使用した。

【0268】

機能する組み換えモノクローナル抗体の発現

抗体は、当技術分野において既知の技術を使用して、組み換え発現による十分な量で産生することができる (Trill et al., Curr. Opin. Biotechnol. 6 (1995), 553-601)。最大1mgまでの組み換えヒトモノクローナル抗体を、293HEK細胞の過渡的トランスフェクション後、産生した。最大100mgまでの組み換えヒトモノクローナル抗体を、組み換えレンチウイルスベクターを使用して、293HEK細胞またはマウスNSO細胞の安定な形質導入後、産生した。

【0269】

過渡的トランスフェクションによるヒト組み換え抗体の小規模産生

Ig重鎖ベクターおよびIg軽鎖ベクターを、標準リン酸カルシウム共沈法を使用して、HEK293細胞に同時遺伝子導入した。組み換え抗体を、タンパク質Aカラム精製 (GE-Healthcare, Oetelfingen, Switzerland) を使用して、トランスフェクトHEK293細胞により馴化された培地から精製した。

【0270】

安定な形質導入によるヒト組み換え抗体の大規模産生

ここで、レンチウイルスベクターのトランスフェクション系を利用して、ヒト組み換え抗体を産生する安定に形質導入された細胞株を生成した (Zufferey et al., J. Virol. 72 (1998), 9873-9880)。HEK293細胞を、組み換え抗体のIg重鎖の発現カセットを持つものと、もう1つはIg軽鎖のカセットを持つものの、2つのはっきり異なるレンチベクターを用いて同時形質導入した。形質導入のこの方法は、CHOおよびNSO細胞等の広範囲の哺乳類細胞株に使用することができる。

【0271】

ヒト疾患のトランスジェニックマウスモデルにおける検証

トランスジェニックマウスを、C57Bl/6およびDBA2のハイブリッドバックグラウンドにおいて前に記載されるように、生成した (Knobloch et al., Neurobiol. Aging July 28 (2006))。試験群を、一度、C57Bl/6に戻し交配した。マウスは、12時間：12時間の明／暗サイクルで反転する標準居住条件下で飼育され、餌および水を自由に摂取させた。処置群は、年歳（第1の試験で24月齢、第2の試験で26月齢）および性別に対してバランスを保った。マウスは、動物あたり8回の注射を行う2ヶ月の期間にわたって週1回の腹腔内注射による抗体 (3mg/kg体重) で処置される。

【0272】

Y字型の迷路における行動の測定

アーム寸法40×20×10cmを有するY字型のプラスチック製の迷路を使用して、交替行動の自然発生率を評価した。5分間のセッション中、一連のアーム侵入を記録し、交替行動は、重複する三重項セットにおける、3つのアームへの連続侵入として定義された。交替行動率は、実際の交替行動数と起こり得る交替行動数との比率により算出した。抗体処置から2ヶ月後、マウスをY字型の迷路で再度試験した。実験者は、常に、全実験中、処置および遺伝子型の両方に対してブラインド試験で行う。

【0273】

脳における血液脳関門の浸透および異常構造への結合

選択された抗体またはそのフラグメントが、血液脳関門に浸透し、脳において、それらの異常に凝集された、または立体構造的に変化したタンパク質標的に結合することができるかを評価するために、有効量の抗体を、脳において、凝集された、または立体構造的に変化したタンパク質標的の非生理学的な蓄積により特徴付けられる、トランスジェニック動物に、全身的、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下、または鼻腔内投与する。脳における病理学的特定構造への抗体の結合は、その後、標識化抗ヒトIg第2の抗体で免疫染色

10

20

30

40

50

した後、標準免疫組織化学的検出により評価される。

【0274】

実験プロトコル：

アルツハイマー病のP S-1/AP P s w eトランスジェニックモデルマウスは、1日目と3日目に、150 μ gのN I-101.11を2回末梢注射した。マウスを2回目の注射をしてから24時間後に殺処分し、P B Sで還流した。脳を冷凍し、組織スライスを、クライオトームを使用して、冷凍した組織から調製した。クリオスタット切片上のヒト抗体の存在を、C y 3標識化抗ヒトI g G抗体(J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h E u r o p e, S u f f o l k, U K)で染色することにより分析した。アミロイド班の局在を、マウスアミロイド β -特異対照抗体6 E 1 0 (C o v a n c eから市販、カタログ番号S I G-39320)、次いで、F I T C標識化抗マウスI g G抗体でクリオスタット切片を同時染色することにより、実施した。代替として、C y 3標識化抗ヒトI g G抗体で染色したものを単独で使用した。蛍光分析を逆蛍光顕微鏡において実施した(L e i c a)。

10

【0275】

脳病理学の低減

脳において、凝集された、または立体構造的に変化したタンパク質標的のレベルにおける抗体処置の効果を、抗体の全身的治療または標的脳送達(頭蓋内、くも膜下腔内、または脳室内)、ならびに脳において、凝集された、または立体構造的に変化したタンパク質標的の特徴のある非生理学的な蓄積を有するトランスジェニック動物への非関連抗体対照により評価する。処置効果は、変化した、もしくは凝集されたタンパク質標的の免疫染色または組織化学的染色、ならびに異なる脳エリアにおける、このような凝集により覆われたエリア、凝集の大きさ、凝集数、およびタンパク質標的の濃度の生化学的定量を測定することにより、評価される。

20

【0276】

抗体処置関連の副作用の非存在

抗体処置の起こり得る標的関連の有害効果を、抗体の全身的投与または標的脳送達(頭蓋内、くも膜下腔内、または脳室内)、ならびに脳において、凝集された、または立体構造的に変化したタンパク質標的の特徴のある非生理学的な蓄積を有するトランスジェニック動物への非関連抗体対照により評価する。起こり得る副作用は、免疫染色または組織化学的染色(例えば、微小出血、ヘマトキシリン-エオシン、活性化した白血球に対するプルシアンブルー)および生化学的定量(例えば、E L I S Aによるサイトカインレベル)により評価される。

30

【0277】

生体細胞の免疫蛍光染色

H E K 2 9 3細胞を、黄色蛍光タンパク質変異体シトリンに、細胞内C末端で融合されたヒト野生型A P Pを発現するベクターで、一時的にトランスフェクした。細胞をトランスフェクションしてから24時間後、4℃で30分間、ヒト組み換え抗体または対照抗体と共にインキュベートした。洗浄ステップ後、細胞を固定し、表面結合抗体を、ヒトまたはマウスI g G(J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h)へのC y-3標識化2次抗体を使用して、検出した。蛍光分析を共焦点顕微鏡において実施した(L e i c a)。

40

【0278】

アミロイド β 原線維の調製

アミロイド β ペプチドを、B a c h e m (B u b e n d o r f, S w i t z e r l a n d)から購入した。凍結乾燥ペプチドを、アッセイにおいて、単量体アミロイド β として使用する直前に、T F A中で再構成し、P B S中で再懸濁した。アミロイド β 原線維を、37℃で24時間P B S中で、100 μ g/mlの濃度で、単量体アミロイド β 1-42ペプチドをインキュベートすることにより調製した。単量体アミロイド β ペプチドおよび線維調製物はまた、E L I S Aプレートを被覆するための基質としても使用された。

50

【0279】

ウェスタンブロット法

単量体アミロイドβペプチドをローディングダイと混合し、熱変性させ、レーンごとに0.2μgを装填し、勾配SDS-PAGE上で分離した。ブロットを、2時間、1次抗体と共にインキュベートした。1次ヒトモノクローナル抗体またはマウス対照抗体6E10の結合を、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)で共役された2次抗ヒトまたは抗マウス抗体を使用して、示した。ブロットは、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate(Pierce, Fisher Scientific, Wohlen, Switzerland)を使用して、発達させた。

10

【0280】

組織アミロイド班結合の競合

組み換えヒトNI-101.11抗体を、アミロイドβペプチド調製物と共に、2時間、インキュベートした。抗体/アミロイドβ調製物をその後、神経病理学的に確認されたアルツハイマー病に罹患する患者から取得した脳切片の免疫組織化学染色のために使用した。5μmの低温切開片を調製し、室温で1時間、PBS中で4%BSA、5%ヤギ血清、および5%ウマ血清で遮断し、室温で1時間、NI-101.11/アミロイドβ調製物で染色した。洗浄ステップ後、組織切片へのヒト抗体の結合を、ヒトIgGへのCy3共役した第2抗体を使用して、分析した(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd)。蛍光分析を逆蛍光顕微鏡において実施した(Leica, Heerbrugg, Switzerland)。

20

【0281】

(実施例1)

ヒト脳疾患に蔓延している異常構造に対するヒト抗体の検出

表現型上は健康な対象からの抗体、またはアルツハイマー病に罹患する臨床的に異常に安定した患者を、病理学的に確認されたアルツハイマー病に罹患する患者から取得した脳切片上で免疫組織化学により試験した。図1Aは、ヒトベータアミロイドに対して公知の抗体(抗体4G8、図1B)で共染色することにより確認されるように、ベータアミロイド斑に結合する、臨床的に異常に安定した患者における抗体の存在を示す。アルツハイマー病に罹患する患者から得られた組織切片における、健康なヒト対象における神経原線維変化への抗体の存在を図2Aに示す。本結果は、ヒトタウ(HT7)に対する公知の抗体で共染色することにより確認された。図3Aは、健康なヒト対象における、アルツハイマー病に罹患する患者から得られた組織切片における、ジストロフィー性軸索に対する抗体の存在を表す。ヒトタウ(HT7)に対する公知の抗体を有する対照染色を図3Bに示す。これらの結果は、病理組織学的に確認された診断を有するヒト組織サンプルにおいて、同定可能な病理学的構造に対する、表現型上では健康な、または臨床的に異常に安定した患者の抗体における存在を実証する。

30

【0282】

(実施例2)

組み換えヒト抗体は、生体内の異常構造への特異性を維持し、生理学的前駆体またはその非病原性誘導体ではなく、脳アミロイド班における疾病関連ベータアミロイドタンパク質の立体構造エピトープを認識する

40

抗体NI-101.11、NI-101.12、NI-101.13A、およびNI-101.13Bを、認識衰退率が著しく低下した、臨床的に異常に安定したアルツハイマー病患者から得た。補正方法に指定されるように、抗体単離および組み換え生成を実施した。

【0283】

NI-101.11

組み換えNI-101.11を脳ベータアミロイド班への結合について試験した(図4)。神経病理学的に確認されたアルツハイマー病に罹患する患者から得た脳切片を、指示

50

された濃度で染色した。50 pMの濃度でベータアミロイド班に結合する抗体は、高親和性結合を示唆する。0.5 nMの濃度による抗体NI-101.11のベータアミロイド班との結合は、最大1 μMまでの濃度で1位～16位を示す、線状合成N末端アミロイドβから派生されたポリペプチドの超過量の追加によって競合することができない（図5）。さらに、8 nMの濃度による脳切片上でのNI-101.11のベータアミロイド班との結合は、アミロイドβ 1-42原線維（4 μM）の超過量により競合し、4 μMの濃度の線状合成アミロイドβ 1-42モノマーでは競合しなかった。これは、NI-101.11が、単量体のアミロイドβには存在しない立体構造エピトープを認識することを示唆する（図6）。

【0284】

10

ヒト組み換えNI-101.11抗体の線状単量体合成アミロイドβへの結合をさらに評価するために、単量体アミロイドβの調製物を非変性PAGEによって分離した。プロットされたタンパク質を、N末端線状アミロイドβ配列（6E10）に対して、ヒト組み換えNI-101.11抗体および対照抗体で精査した。6E10は、単量体アミロイドβペプチドの顕著な染色をもたらしたが、ヒトNI-101.11に対する結合は検出されず、NI-101.11は、線状単量体アミロイドβペプチドに結合しないが、立体構造アミロイドβエピトープを認識することを示唆した。（図7）

組み換えNI-101.11の、合成アミロイドβ 1-42ペプチドおよび単量体アミロイドβから調製された人工アミロイド原線維への結合は、ELISAによって判定された（図8）。等しい被覆密度でELISAプレートに被覆された合成アミロイドβ原線維または単量体合成アミロイドβを、指示された濃度でNI-101.11と共にインキュベートした。人工アミロイド線維（白抜き四角）への結合は、単量体アミロイドβ（塗りつぶし四角）と比較して、100倍以上高い。アミロイドβのC末端に対する対照抗体22C4は、単量体アミロイドβ（塗りつぶし丸）に選択的に結合し、あまり線維（白抜き丸）に選択的に結合しない。これは、NI-101.11が合成アミロイドβペプチドから調製された人工アミロイド線維にも存在する立体構造エピトープを認識することを示唆する。

【0285】

細胞全長APPに対する、またはその生理学的誘導体のいずれかとの、組み換えヒトNI-101.11抗体の交差反応性を細胞結合アッセイにより決定した（図9）。

【0286】

マーカーとしてシトリンに融合されるヒトAPPを安定的に発現する生きているHEK293細胞を、4℃で30分間インキュベートし、組み換えヒトNI-101.11抗体またはN末端線状アミロイドβ配列に対する対照抗体6E10で、内因性を回避する。シトリン陽性シグナルは、APP発現細胞を表す。融合構築体を発現するすべての細胞における細胞表面APPに結合する対照抗体（6E10）と対照的に、全長APPへの組み換えヒトNI-101.11抗体の結合は検出されない。これらのデータは、生理学的な細胞APPへのNI-101.11の交差反応性の非存在を実証する。

【0287】

単量体アミロイドβへのNI-101.11の結合の欠失は、サイズ排除クロマトグラフィーによりさらに実証された。NI-101.11または非関連対照抗体の結合は、単量体FITC標識化アミロイドβ 1-42に対して観察されなかった（図10A、10B）。対照的に、抗体22C4は、FITC-アミロイドβ 1-42モノマーで共溶出されるアミロイドβのC末端に存在する線状エピトープに対して向けられた（図10C）。

【0288】

競合ELISAにおいて、6E10の結合、すなわち、アミロイドβのN末端で線状エピトープに対して向けられる抗体は、超過濃度の単量体アミロイドβ 1-16、アミロイドβ 1-28、およびアミロイドβ 1-40ペプチドと共にインキュベートする前に完全に遮断することができた。対照的に、超過濃度の線状アミロイドβペプチドと共にインキ

50

ュベートする前にN I - 1 0 1 . 1 1 結合を破壊せず、N I - 1 0 1 . 1 1 が立体構造エピトープを必要とすることを示唆する（図11）。

【0289】

N I - 1 0 1 . 1 3 A および 1 3 B

組み換えヒト抗体N I - 1 0 1 . 1 3 A および 1 3 B はを、アルツハイマー病のA P P トランスジェニックマウスモデル（T g 2 5 7 6）から取得した脳切片への結合について試験した。N I - 1 0 1 . 1 3 A および N I - 1 0 1 . 1 3 B は、1 0 n M の濃度で、ベータアミロイド班の顕著な染色を生成した（図12）。合成アミロイドβ 1 - 4 2 ペプチドおよび単量体アミロイドβから調製された人工アミロイド線維への組み換えN I - 1 0 1 . 1 3 A および N I - 1 0 1 . 1 3 B への結合は、E L I S A によって判定された。等しい被覆密度でE L I S A プレートに被覆された合成アミロイドβ原線維または単量体合成アミロイドβを、指示された濃度でN I - 1 0 1 . 1 3 A および N I - 1 0 1 . 1 3 B と共にインキュベートした。単量体アミロイドβと比較して、人工アミロイド線維への優先的な結合が試験した両方の抗体に対して観察された。（図13）

N I - 1 0 1 . 1 2

合成アミロイドβ 1 - 4 2 ペプチドへの組み換えN I - 1 0 1 . 1 2 の結合は、E L I S A により確認された（図14A）。1 3 3 n M の濃度で、N I - 1 0 1 . 1 2 結合は超過のアミロイドβ 1 - 4 2 ペプチドにより競合された（図14B）。

【0290】

（実施例3）

脳ベータアミロイドに対する組み換えヒト抗体は、アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデルにおいて、血液脳関門を横断し、生体内で脳ベータアミロイド班に結合する

生体内において組み換えヒトN I - 1 0 1 . 1 1 抗体が、血液脳関門を横断し、脳ベータアミロイド班に結合するか否かを測定するために、トランスジェニックP S - 1 / A P P s w e アルツハイマー病モデルマウスは、1日目と3日目に1 5 0 μ g のN I - 1 0 1 . 1 1 を2回末梢注射で受けた。マウスを2回目の注射をしてから24時間後に殺処分し、P B S で還流した。脳を摘出し、脳切片をヒトI g G に対するF I T C 標識化抗体またはマウスモノクローナル抗体アミロイドβ抗体6 E 1 0、次いで、マウスI g G に対するF I T C 標識化抗体で染色し、脳ベータアミロイド班の存在を確認した。抗ヒトI g G を有するアミロイド班の強い染色は、組み換えヒトN I - 1 0 1 . 1 1 抗体がトランスジェニックマウスの血液脳関門を横断し、生きている動物において、脳ベータアミロイド班に結合することを示した（図15）。

【0291】

（実施例4）

ベータアミロイドに対する組み換えヒト抗体は、微小出血の頻度を増加することなく、アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデルにおいて、異常な認知挙動を改善し、ベータアミロイド班負荷、星膠症（A s t r o g l i o s i s）および小膠細胞症を低減する。

【0292】

24月齢のアークアミロイドβマウスおよび年齢を一致させた野生型同腹子を、毎週、3 m g / k g の組み換えヒトN I - 1 0 1 . 1 1 抗体、またはイソタイプを一致させたヒト対照抗体を腹腔内で2ヶ月間処置した。トランスジェニックマウスにおいての、異常挙動における治療効果を評価するために、自発的交替行動の測定（Y - m a z e b e h a v i o r a l t e s t i n g）を処理の完了前後に行った。アーム寸法40×20×10cmを有するY字型のプラスチック製の迷路を使用して、交替行動の自然発生率を評価した。5分間のセッション中、一連のアーム侵入を記録し、交替行動は、重複する三重項セットにおける、3つのアームへの連続侵入として定義された。交替行動率は、実際の交替行動数と起こり得る交替行動数との比率（アーム侵入の総数-2と定義）に100%を

乗じることにより算出した。未処置のアーケアミロイドβマウスおよび野生型同腹子の対照のY字型の行動を不對t-検定を使用して比較した。すべての4群において、処置した後の改善を比較するために非母数のクラスカルワリス検定を使用した。非母数のマンホイットニーU検定を、異なる群のペアワイズ比較のために選んだ。交替行動率0のマウス（すなわち、置かれたアームを離れなかったマウス）を分析から除外した。

【0293】

前述の試験において観察されたように、未処置の24月齢アーケアミロイドβマウスは、野生型同腹子と比較した場合、著しく機能が損なわれた（図16A、処置前、不對t-検定、 $p=0.0007$ ）。

【0294】

NI-101.11処置したアーケアミロイドβマウスは、処置してから2ヵ月後、NI-101.11処置済みの野生型対照マウスと比較した場合、明らかに強化された交替行動レベルを示した。改善の分析（すなわち、処置後の性能から処置前の性能を差し引く）は、4つの群間で有意な差異を示した（図16B、クラスカルワリス検定、 $p=0.03$ ）。すべての群間のペアワイズ事後分析は、NI-101.11処置したアーケアミロイドβマウスが、野生型マウスよりも有意に認識能力を改善したことを示した（マンホイットニーU、 $p=0.05$ NI-101.11 tg対NI-101.11 wt； $p=0.008$ NI-101.11 tg対対照tg）。本群のマウスはまた、対照抗体処置したトランスジェニック同腹子（マンホイットニーU、 $p=0.08$ NI-101.11 tg対対照tg）と比較して、性能の改善への強い傾向を示した。すべてのマウスは、再検定では、約10%の行動の改善を示したが、これは、課題環境に慣れたためである可能性が高い。

【0295】

アミロイド負荷、星膠症、および小膠細胞症における、2ヶ月NI-101.11処置の慢性効果を定量的組織化学的および免疫組織化学的分析により分析した。その目的のため、マウスを、行動の測定の完了後、麻酔し、PBSで、経心的に還流した。1つの脳半球を4%のパラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンにおいて包埋した。5μmの矢状断面をLeica RM2135ミクロトームを用いて切断した（Bannockburn, Illinois）。皮質および海馬において、ベータアミロイド班負荷を、標準プロトコルに従って、チオフラビンSおよびコンゴレッドで染色した脳切片上で定量化した。免疫組織化学のために、スライスを、脱蠟し、室温で1時間、PBS中で4%BSA、5%ヤギ血清、および5%ウマ血清で遮断した。抗体を以下の希釈液を使用して、4℃で一晩インキュベートした。抗GFAP（Advanced Immunochemicals）1:500、抗IBA1（WAKO）1:500。第2のフルオロフォア結合抗体を、室温で2時間、インキュベートした。75μmの間隙を介して、マウス脳あたり2~3の切片をそれぞれの染色に使用した。切片あたり2枚の画像を、皮質分析のために、10倍拡大で撮影した（頭頂部および前頭部）。全海馬エリア（ROIに切り取られた5倍の）を、海馬分析のために撮影した。自動画像解析を、ソフトウェアImageJを用いて行った。

【0296】

6E10および抗ヒトIgGの免疫があるアーケアミロイドβマウスからの脳切片の二重染色は、NI-101.11のアミロイドβへの沈着結合を示し（図17、左パネル）、NI-101.11が、血液脳関門を交差し、脳ベータアミロイド班に結合することができることを示した。アミロイドβ沈着へのヒト抗体のこのような結合は、対照抗体で処置したアーケアミロイドβマウスにおいて見られなかった（図17右パネル）。

【0297】

3mg/kgのNI-101.11での慢性処置は、チオフラビンSおよびコンゴレッド染色により示されるように、アミロイド班負荷の有意な減少をもたらした。この減少は、対照抗体処置したアーケアミロイドβマウスと比較して、皮質および海馬において、50%を超えるレベルに達した（図18A、B）。班エリア（図18C）に加えて、有意な

減少はまた、班数（図18D）および平均班の大きさ（図18E）にも観察された。

【0298】

NI-101.11での慢性処置がアークアミロイドβマウスにおいて神経炎症反応に影響を及ぼすか否かを試験するために、反応性アストロサイトおよび小神経膠細胞を、免疫組織学的染色後、定量化した。対照抗体処置した動物と比較して、NI-101.11で処置したアークアミロイドβマウスの皮質に、反応性アストロサイト数（抗GFAP染色）の減少が観察された（図19A、マンホイットニーU； $p=0.047$ ）。海馬において、変化は検出されなかった。小神経膠細胞およびマクロファージのマーカーに対する抗体（抗Iba1）での染色はまた、炎症軽減への統計的傾向を示した（図19B、マンホイットニーU；皮質および海馬の双方に対して、 $p=0.075$ ）。星状細胞増加症および小膠細胞症の減少は、NI-101.11処置後に観察された、減少したベータアミロイド負荷に一致する。

10

【0299】

アミロイドβに対して向けられる、あるモノクローナル抗体を用いる受動免疫療法は、脳における微小出血の増発と関連があり得る（Pfeiffer et al., Science 298 (2002), 1379; Wilcock et al., J Neuroinflammation 1 (2004), 24）。NI-101.11を用いた長期治療の効果を評価するために、長期NI-101.11処置後、アークアミロイドβおよび野生型マウスからの脳切片上でPerlのプルシアンブルー染色を行った。この染色は、ヘモグロビンの分解産物であり、以前の微小出血示すマーカーである、ヘモジデリンの存在を示す（図20）。対照抗体で処置した高齢のアークアミロイドβマウスにおいて、プルシアンブルー陽性プロファイルの頻度は、野生型同腹子と比較すると、有意に上昇した（マンホイットニーU、 $p=0.001$ ）。NI-101.11での処置は、対照抗体処置したアークアミロイドβマウスと比較すると、微小出血数の増加をもたらさず（マンホイットニーU、 $p=0.347$ ）、受動アミロイドβ免疫療法で頻繁に観察される副作用なしで、NI-101.11処置の有益な治療効果を示した。

20

【0300】

（実施例5）

脳ベータアミロイドに対する組み換えヒト抗体は、体外への合成アミロイドβ原線維の形成を阻害する。

30

【0301】

アミロイドβ原線維の形成における組み換えヒトNI-101.11抗体の効果を、蛍光分析により凝集されたアミロイドβに結合するチオフラビンSを測定することにより分析した。単量体アミロイドβ溶液を、増加する濃度のNI-101.11の存在または不在下で、37℃で24時間インキュベートした。体外での合成アミロイドβ原線維の形成は、濃度に依存して、組み換えヒトNI-101.11により阻害された（図21）。

【0302】

（実施例6）

BV-2小グリア派生細胞によるアミロイドβ原線維の生体外でのファゴサイトーシスにおけるNI-101.11の効果

40

アミロイドβ原線維のFcガンマ受容体媒介ファゴサイトーシスにおけるNI-101.11の効果をBV-2小グリア派生細胞株内で研究した。BV-2細胞を、5% FBS、Pen/Strep、およびグルタミンが補完されるDMEMに維持した。細胞をトリプシン処理し、120,000個のBV-2細胞/ウェルを平底24ウェルプレートにおいて、播種した。12時間後、培地を、20mMのHEPES（pH7.3）、1% BSA、10μg/mlのPen/Strepが補完される400ulのDMEM/F12/ウェルで置き換えた。100μg/mlのフコイダン、すなわち、スカベンジャー受容体の阻害剤を、実験の30分前に加えた。50μMのFITC標識化アミロイドβ原線維を、指示された濃度の抗体と共に、37℃で30分間ブラインキュベートし、2回洗浄し、次い

50

で、5分間、 $14'000 \times g$ で遠心分離した。本懸濁液を組織培養プレートに加えた。30分後、BV-2細胞をHBSSで2回洗浄し、非関連の線維状アミロイド β を除去した。

【0303】

細胞を $250 \mu g/ml$ のトリプシン/EDTAで、 $4^{\circ}C$ で20分間処理し、2回洗浄し、 $4^{\circ}C$ で5分間、 $500 \times g$ で遠心分離した。細胞をFACS-Fix (PBS、2% FA、2%のグルコース、5mMのNaN)中で、20分間固定し、FACS洗剤 (PBS、 $5 \mu M$ のEDTA、0.2%のBSA)で2回洗浄した。 $10'000$ 個の細胞の蛍光 (FL-1)を、FACS分析 (Webster SD et al, JI2001に基づく)により判定した。

10

【0304】

FITC標識化アミロイド β 1-42線維のFcガンマ受容体依存性ファゴサイトーシスを、スカベンジャー受容体系で阻害した後、測定した。ヒトNI-101.11とアミロイド β ペプチド (6E10)のN末端における線状エピトープに向けられる市販の抗体の比較分析は、アミロイド β 原線維のファゴサイトーシスの用量依存性の誘導を実証した。NI-101.11により媒介された線維の摂取は、6E10抗体に対して観察されたものよりも最大3倍高い (図22)。これらのデータは、NI-101.11が、小グリア細胞によるアミロイド β 原線維の強力な用量依存性のFcガンマ受容体媒介ファゴサイトーシスを誘発することを表す。

【0305】

20

結論

本発明に従って実施された上記の実験において示されるように、表現型の上では健康な、無症候性ヒト対象、ならびに、認識機能障害もしくはアルツハイマー病の診断にもかかわらず、異常に安定した臨床的経過を有する患者において、驚くことには、保護および治療効果のある抗体および抗体産生B細胞を検出することが可能であった。さらに具体的には、ヒト抗体の新クラスを、検出および単離することができ、抗原から生理学的に機能的な型を識別し、それによって、免疫療法において問題がある、従来の自己細胞原性の副作用の危険性を最小化する。したがって、病理生理学的に関連のある構造において、抗原の変異体の特異的に認識する抗体および等価結合分子が提供される。その構造に、その抗体は、例えば、FcR発現マクロファージもしくは小神経膠細胞のための病原体を可視化することによって、その毒性を減退、またはその濃度を低減、またはその分解を促進する、ひいては、それを無害の状態にするために、結合することが予期される。実施例においてさらに示されるように、このような抗体は、治療効果があり、脳微小出血の頻度を増加することなく、異常病理学的タンパク質およびその凝集の有害効果の中断ならびに防止の両方を可能にする。

30

【図 1】



FIG. 1

【図 2】

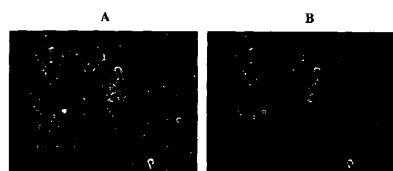


FIG. 2

【図 3】

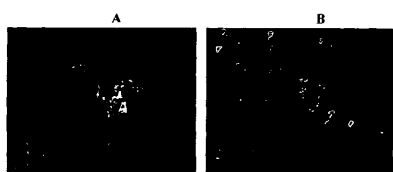


FIG. 3

【図 7】

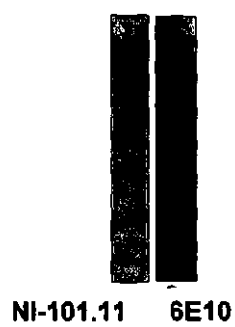


FIG. 7

【図 4】

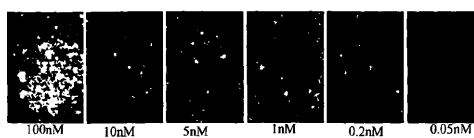


FIG. 4

【図 5】

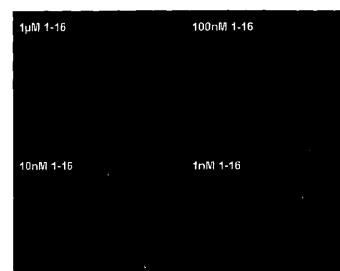
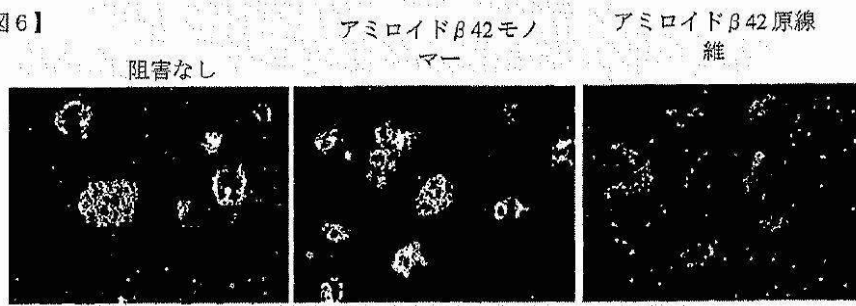


FIG. 5

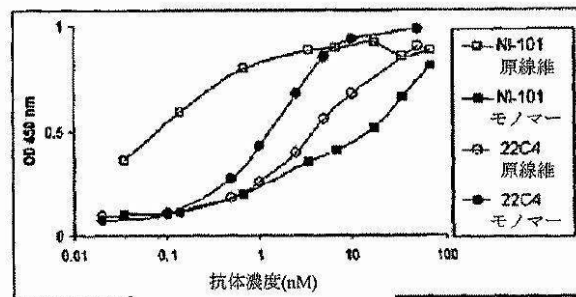
【図6】

【図6】



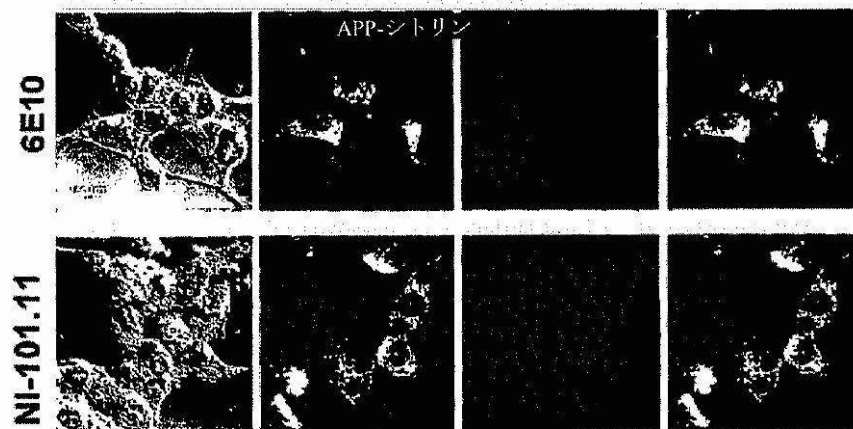
【図8】

【図8】



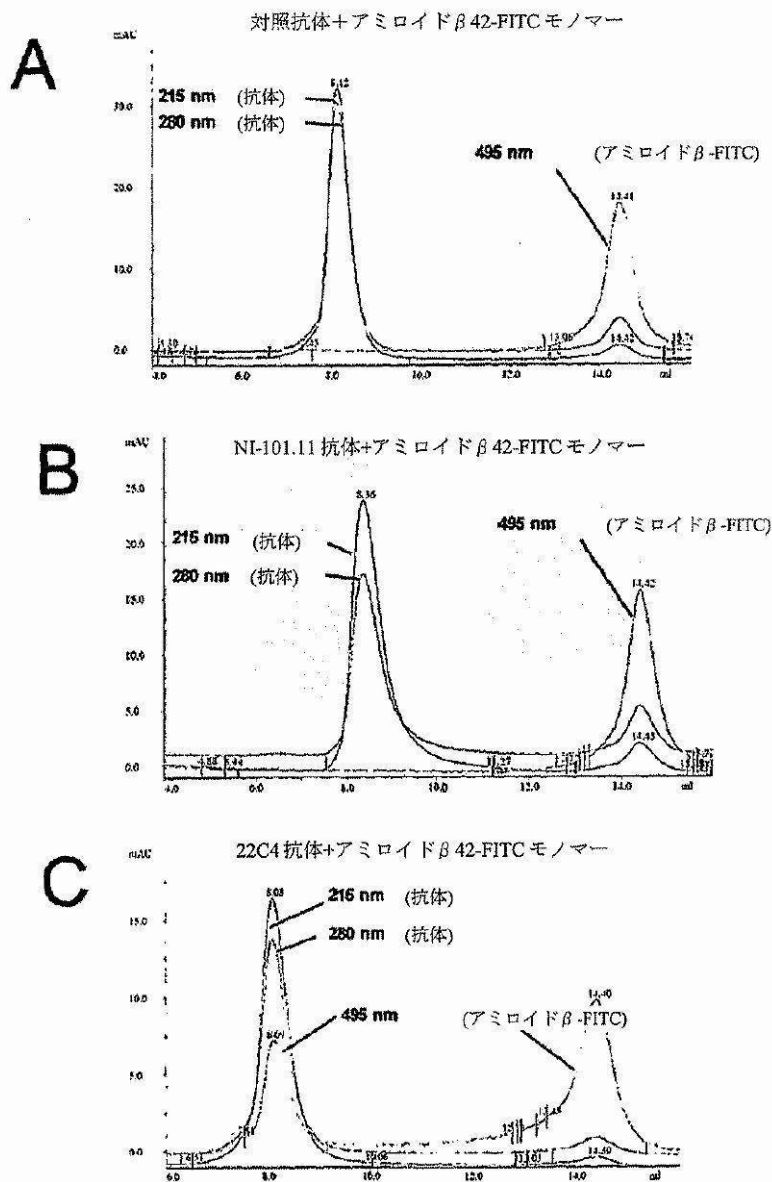
【図9】

【図9】



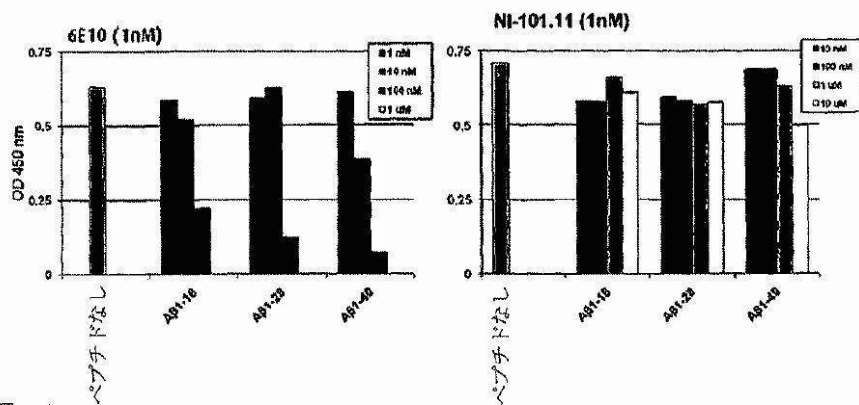
【図10】

【図10A-C】



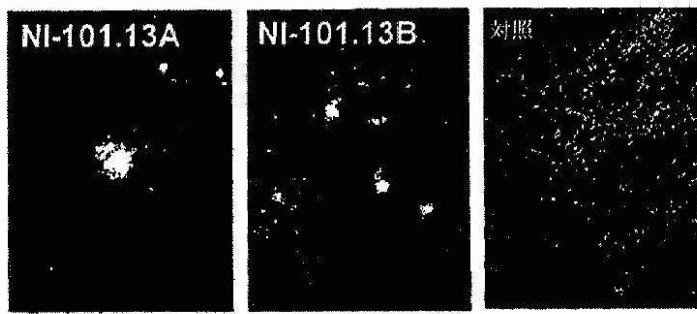
【図11】

【図11】



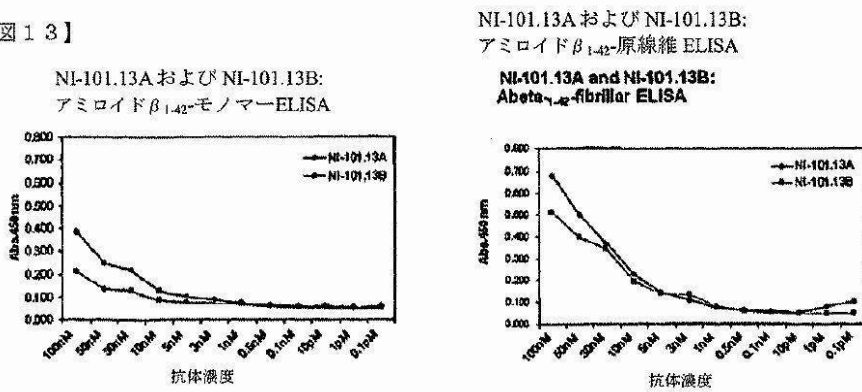
【図 1 2】

【図 1 2】



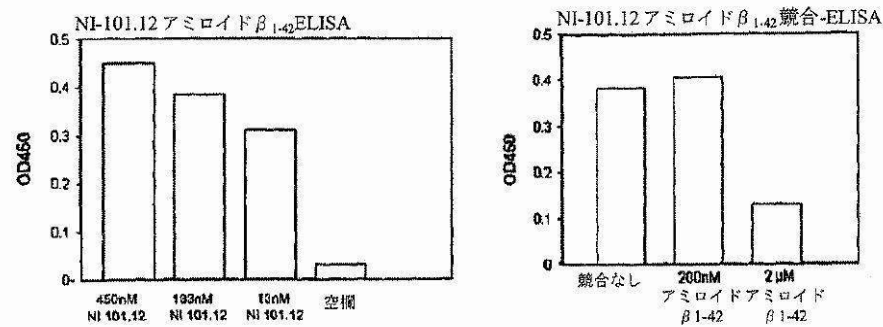
【図 1 3】

【図 1 3】



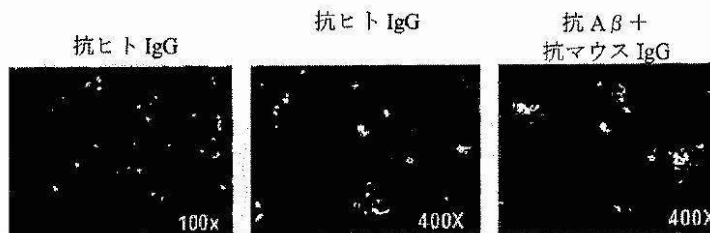
【図 1 4】

【図 1 4 A-B】



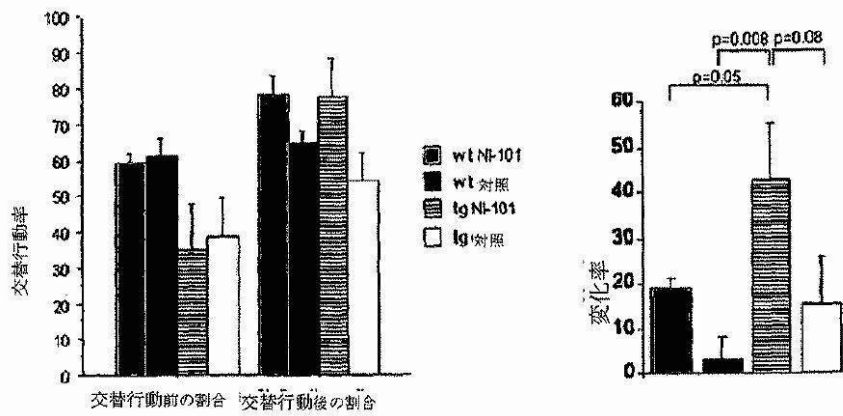
【図 1 5】

【図 1 5】



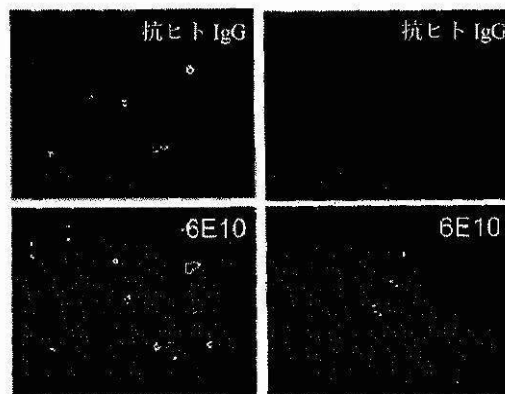
【図 16】

【図 16 A-B】



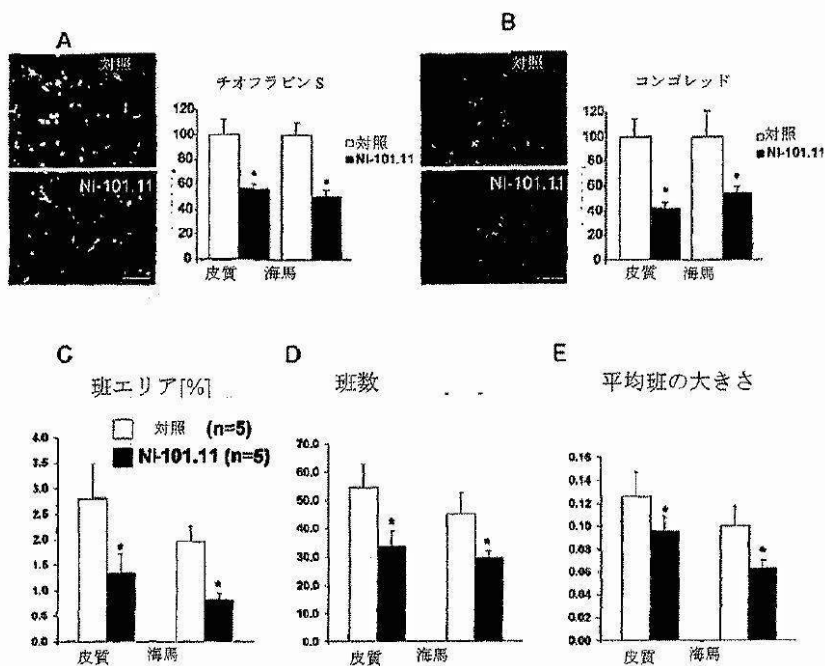
【図 17】

【図 17】



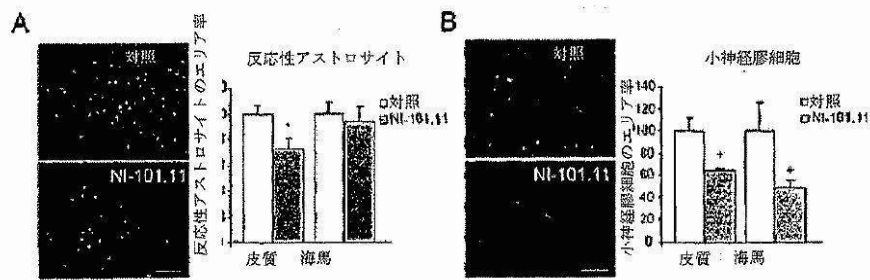
【図 18】

【図 18 A-E】



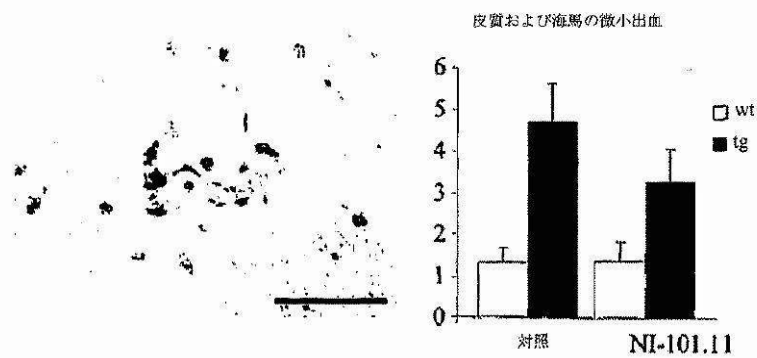
【図 19】

【図 19A-B】



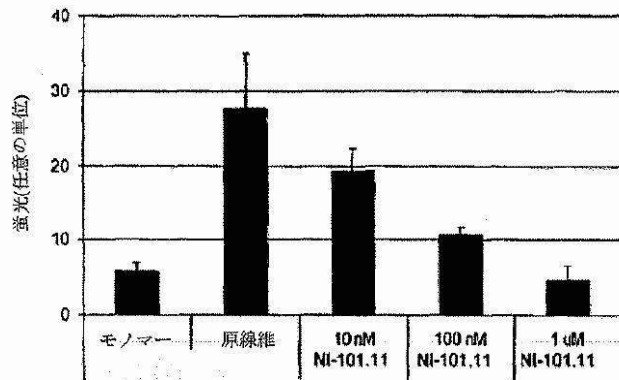
【図 20】

【図 20】



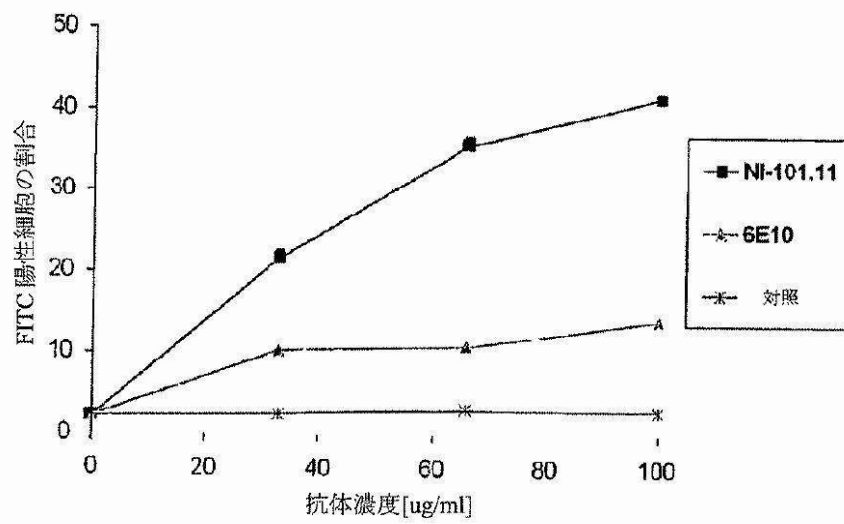
【図 21】

【図 21】



【図 2 2】

【図 2 2】



【配列表】

[0005876014000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
			G 0 1 N 33/53 D

(31)優先権主張番号 60/934,291

(32)優先日 平成19年6月11日(2007.6.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 07020341.9

(32)優先日 平成19年10月17日(2007.10.17)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(72)発明者 クリストフ ホック

スイス国 ツェーハー 8703 エレンバッハ, ライトシュトラッセ 43

(72)発明者 クリストフ エシュリンゲール

スイス国 ツェーハー 8008 チューリッヒ, ツォリケルシュトラッセ 3

(72)発明者 マーレン ノブロッヒ

スイス国 ツェーハー 8037 チューリッヒ, カイブルクシュトラッセ 26

(72)発明者 カスリン ティソット

スイス国 ツェーハー 8049 チューリッヒ, セガンティニシュトラッセ 35

(72)発明者 ジャン グリム

スイス国 ツェーハー 8600 デューベンドルフ, ビュールグリシュトラッセ 16

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特開2006-265189 (JP, A)

Neurobiology of Aging, 2005年, Vol.26, p.597-606

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00

C 0 7 K 16/18

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)