

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4851348号
(P4851348)

(45) 発行日 平成24年1月11日(2012.1.11)

(24) 登録日 平成23年10月28日(2011.10.28)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 P 21/08 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)
A 61 K 39/395 (2006.01)
A 61 P 25/28 (2006.01)

C 12 P 21/08
C 12 N 15/00 Z N A A
A 61 K 39/395 D
A 61 K 39/395 N
A 61 P 25/28

請求項の数 2 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2006-554230 (P2006-554230)
(86) (22) 出願日 平成17年2月17日 (2005.2.17)
(65) 公表番号 特表2008-500279 (P2008-500279A)
(43) 公表日 平成20年1月10日 (2008.1.10)
(86) 國際出願番号 PCT/US2005/005198
(87) 國際公開番号 WO2005/082939
(87) 國際公開日 平成17年9月9日 (2005.9.9)
審査請求日 平成20年1月16日 (2008.1.16)
(31) 優先権主張番号 60/546,764
(32) 優先日 平成16年2月23日 (2004.2.23)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 594197872
イーライ リリー アンド カンパニー
アメリカ合衆国 インディアナ州 462
85 インディアナポリス リリー コー
ボレイト センター (番地なし)
(74) 代理人 100068526
弁理士 田村 恒生
(74) 代理人 100100158
弁理士 鮫島 瞳
(74) 代理人 100138900
弁理士 新田 昌宏
(74) 代理人 100126778
弁理士 品川 永敏
(74) 代理人 100162684
弁理士 吳 英燐

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗A β 抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗A β 抗体を製造する方法であつて、
a. A β ペプチドを内在的に発現する細胞において該抗体を発現し；
b. 該細胞を培養するのに用いる培地に、 -セクレターゼ阻害剤を加え；次いで
c. 該抗体を培養培地から精製する（ここで、精製された抗体は 0.02ng/mL
のA β ペプチドを含む）；

ステップを含む方法。

【請求項2】

該細胞が、CHO細胞である請求項1に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬の分野に属する。より詳細には、本発明はA β ペプチドを有さないか、又はA β ペプチドを許容可能な低いレベルで有する抗A β 抗体を含有する組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

アミロイドplaquesの主な構成要素は、39~43個のアミノ酸からなるA β ペプチドである。このペプチドは、タイプI内在性膜タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク

20

質（APP）から、タンパク質分解によって誘導される。細胞培地内で分泌される優位な種類はAペプチド（1～39/40又はX～39/40）であるが、より長い形態のAペプチド（1～42/43又はX～42/43）はより溶解性が低く、より凝集し易く、アミロイド沈着の核となる種を構成する。Aペプチド（1～42/43）を含むアミロイド沈着物は、例えばアルツハイマー病、ダウン症候群、脳アミロイドアンギオパシー、血管性痴呆、軽度認知機能障害、及び同様物のような状態及び疾患と関連している。

【0003】

Aペプチドを含む異常な沈着物と関連した状態及び疾患のための様々な治療的処置は、Aペプチドの産生及び／又はAペプチドのラークへの凝集の防止、並びにアミロイドラーカーの縮小又は排除に焦点を当ててきた。別の治療的アプローチの一つは、例えば能動免疫法（WO99/27944）等による、ペプチド投与を介したAペプチドに対する免疫原性反応の誘導である。しかしながら、合成ヒトA1～42ペプチドを用いた能動免疫的アプローチを利用する最近のフェーズ2A試験は、4人の患者が中枢神経系（CNS）内の炎症に一致した臨床的徴候を示し、間もなく中止された。中止以降、更に11人の患者がCNS炎症と関連した症状を発症した（Orgogozo等、Neurology、61：46～54（2003）、Schenk等、Curr. Opn. Immunol.、16：599～606（2004））。このように、アルツハイマー病を治療するためのAペプチドの投与は有害な結果を招き、患者に対する安全上の問題を提起した。

【0004】

Aペプチドを標的にする代替的な免疫学的手段では、例えば受動免疫法を用いてペプチドに特異的な抗体を投与する。受動免疫法は、能動免疫法のようにT細胞及びB細胞内で記憶を確立しないが、受動的アプローチは、能動免疫法を取り巻く安全上の問題を提起していない。

【0005】

以前に、例えばK562、M17、HEK293、CHO、及びHUVVECのような種々の細胞株が、Aペプチドを産生することが示された（Shoji等、Science、258：126～129（1992）、Haass等、Nature、359：322～325（1992））。従って、臨床的使用のためのヒト又はヒト化抗体の発現に使用できる多数の細胞株、例えばCHO及びHEK293は、APPホロタンパク質と、該APPを切断して自然にAペプチドを発現するのに必要な-及び-セクレターゼとを内生的に含有する。

【0006】

驚くべき事に、一般に組み換えによる抗体発現に使用される殆どの哺乳動物の細胞株内で内生的に産生されたAペプチドは、発現した抗A抗体に対して低いレベルで結合し、細胞培養及び精製工程を通して残り続けることが、抗A抗体の製造中に発見された。組み換えるに産生された抗A抗体材料のAペプチド汚染に伴い、患者の免疫原性反応が増大し、重要性の鍵を握るAペプチドが抑制、除去又は低減される可能性がある。更に、内生的に産生されたAペプチドが、CHO細胞株により産生されたペプチドのようにヒトのものでない場合、発現した抗A抗体に結合している非ヒトAペプチドの免疫原性の関与は、更に重大な患者の安全上の問題を引き起こすと考えられ、従ってAペプチドの抑制、除去又は低減は極めて重要である。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、ヒトである対象に投与するのに適した、Aペプチドを有さないか、又はAペプチドを許容可能な低いレベルで有する抗A抗体を含有する組成物を提供する。

【0008】

また本発明は、ヒトである対象に投与するのに適した、非ヒトAペプチドを有さないか、又は非ヒトAペプチドを許容可能な低いレベルで有する抗A抗体を含有する組成

10

20

30

40

50

物を提供する。

【0009】

本発明はさらに、ヒトである対象に投与するのに適した、検出不能な濃度のAペプチドを有する抗A抗体を含有する組成物を提供する。

【0010】

本発明はまた、Aペプチドを有さないか、又は許容可能な低いレベルで有する抗A抗体を製造するための方法を提供する。

【0011】

本発明の一実施態様では、抗体はNS0細胞内で発現される。別の一実施態様では、抗体は、例えばAPP、-セクレターゼ、若しくは-セクレターゼ遺伝子の一つ等をコードする特定の遺伝子の欠失によって、又は-セクレターゼ発現の増大によってA産生が失われた細胞内で発現される。更なる実施態様では、抗体は-又は-セクレターゼ阻害剤を含有する細胞培地内で產生される。更に別の一実施態様では、抗体は酸性化及びサイズ排除クロマトグラフィーによってAペプチドが除かれる。
10

【0012】

加えて本発明は、本発明の組成物を使用した、アルツハイマー病、ダウン症候群、脳アミロイドアンギオパシー、血管性痴呆、軽度認知機能障害及び同様物のような状態及び疾患に罹患したヒト患者の治療方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本願に開示され特許請求されている本発明のために、以下の用語を次のように定義する。
20

【0014】

「抗体」は、キメラ、ヒト化、ヒト、組み換え、トランスジェニック、移植及び単鎖抗体、並びに同様物、又はAペプチドに選択的に結合する一つ又は二つ以上のドメインを含む任意の融合タンパク質、複合体、断片、又はその誘導体を含むがこれらに限定されない全ての抗体を意味する。従って、抗体には全ての免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、又はこれらいずれかの免疫学的に有効な断片が含まれる。抗体断片は、当該技術分野にて公知のFv、ジスルフィド結合Fv、scFv、Fab、Fab'、又はF(ab')₂断片を意味する。「抗A抗体」という表現は、Aペプチドを認識する、即ちAペプチドに結合する抗体を意味する。
30

【0015】

用語「ヒト化抗体」は、その一部又は全部が、ヒト抗体の生殖細胞系又再編成配列に由来するアミノ酸配列からなる抗体を意味し、非ヒト相補性決定領域(CDR)を有する抗体の配列を変更することによって形成される。可変領域のフレームワーク領域が、非ヒトCDRを実質的に損なわずに、対応するヒトフレームワーク領域と置き換わる。ヒトフレームワーク領域は、ゲノムフレームワーク領域を含み、また一つ又は二つ以上のアミノ酸代替物を含むものも包含する。より詳細には、このような代替物には、ヒトフレームワーク内の特定の位置のアミノ酸が、非ヒトCDRのための天然フレームワークの対応位置からのアミノ酸に代替されている突然変異を含む。ヒト化抗体という用語の抗体とは、完全長抗体に限定されるものではなく、断片及び単鎖の形態も含む。
40

【0016】

本願の文脈において用語「Aペプチド」又は「A」は、インビボでアミロイド前駆体タンパク質(APP)タンパク質から、タンパク質分解により誘導された39、40、41、42、及び43個のアミノ酸からなるペプチド、並びにそれらペプチドの任意の断片、例えばそれらのペプチドから誘導されたN-末端短縮ペプチド(例、例えば、x~42で表され、ここでx=1、2、3等である。)、1~39、40、41、及び42ペプチドから誘導されたC-末端短縮ペプチド、及び両方の末端にて短縮されたペプチドを含む。各完全長アミノ酸ペプチド配列の詳細は、SEQ ID NO:1、ヒトAペプチド及びSEQ ID NO:2、齧歯動物Aペプチド(即ち、マウス、ハムスター)を
50

参照されたい。

【0017】

本願で使用されているように、用語「 - セクレターゼ」は、A P Pを切断してA ペプチドのアミノ末端を生成するA P P加工に関する酵素を意味する。用語「 - セクレターゼ」は、 - セクレターゼに続いてA P Pを切断して、A のカルボキシル末端を生成するA P P加工に関する酵素複合体を意味する。用語「 - セクレターゼ」は、可溶A P Pのための経路内においてA P PをA 配列内(A ペプチド残基16と17の間)で切断し、従ってA ペプチドが生成されないA P P加工に関する酵素を意味する。「 - 又は - セクレターゼ阻害剤」は、「 - 又は - セクレターゼ酵素活性を阻害(遮断又は低減)する分子を意味する。

10

【0018】

「許容可能な低いレベルのA ペプチド」は、安全であり、従って特に医薬組成物中でヒト対象に投与されるに許容可能な、又は投与に適すると考えられる抗A 抗体標本中の汚染A ペプチドのレベルを意味する。詳細には、許容可能な低いレベルのA ペプチドは、抗A 抗体を投与された患者の免疫原性反応を惹起しない、及び/又は免疫原性反応を増大させないと想定されるA ペプチドを意味する。許容可能な低いレベルは、医薬組成物及び製剤の開発にて通常使用及び許容されている安全性の慣習に従って、当業者により決定されるであろう。

【0019】

A ペプチドの「検出不能な濃度」とは、抗A 抗体の標本中のA ペプチドの濃度の測定に通常使用される方法の検出限界未満にあるA ペプチドの濃度を意味する。このような方法には、E L I S A法、酸-尿素ゲル/ウエスタンプロット分析法(実施例1~3に記載するような)、質量分光法、分析クロマトグラフ法、又は他の高感度な分析法が含まれるが、これらに限定されるものではない。例えば、実施例1~3に記載する酸ゲル/ウエスタンプロット分析は、A の1 p g / μ g I g Gまでの最大感度を有する一方で、実施例3で使用されるE L I S A法は、0 . 0 2 n g / m Lの検出限界を有する。これら各方法の検出限界を下回るA の濃度は、検出不能であると思われる。

20

【0020】

本発明の組成物は、当該技術分野にて公知の数種の方法によって製造することができる。以下の方法は例証であり、本発明を限定するものではない。

30

【0021】

一般に、組み換え抗体産生は、細胞株の生成、細胞培養、及び精製という3つの主な段階にまとめることができる工程により実現される。従って、細胞株を生成した後、細胞株内で抗体を発現させ、該抗体を精製することを含む工程によって、一般に本発明の抗A 抗体が製造される。これら任意の段階になされる変更は、生成する抗体の発現又は特徴に影響を与える。細胞株生成段階における多数の変更が抗体発現に影響を及ぼす可能性があり、その中には抗体の発現を可能にするよう細胞株の形質転換に使用されるベクター構造、及び該ベクター構造内に含まれるリーダー配列、細胞型の選択、トランスフェクト細胞の選択、遺伝子の増幅、並びに細胞株のスクリーニングが含まれる。選択された細胞株からの抗体発現は、細胞培養のための培地の使用に依存する。培地の改変、例えば温度、栄養分、及び溶解酸素における変化が、発現や生成物の品質に影響を与える。細胞培地内での抗体発現後、多様なクロマトグラフィー技術、濾過、及びバッファ交換等の精製技術により、所望の生成物の性質や、純度及び汚染物質の性質を変更し得る。これら一般的の組み換え抗体産生段階を考慮して、本発明は特定の技術を使用するか、又はそれら段階の各々に特定の変更を施して実現することができる。

40

【0022】

本発明の組成物の製造方法は、特定の細胞株源と、該細胞株に対する改変とに関係する。前述したように、細胞株は抗体発現に影響を与える。本発明の組成物の製造方法は、哺乳動物の細胞株を使用して抗A 抗体を発現させることを含む。哺乳動物細胞株はハムスター、ヒト、又はマウスの細胞株であることが好ましい。哺乳動物細胞株は、C H O、H

50

E K 2 9 3 、 P E R . C 6 、 又は N S 0 であることがより好ましい。哺乳動物細胞株は、 C H O 又は N S 0 であることが最も好ましい。 N S 0 細胞を使用した組み換えによる抗 A 抗体の産生により、検出不能な濃度の A ペプチドを有する抗 A 抗体が生成されることが好ましい(実施例 3 参照)。

【 0 0 2 3 】

組み換え抗体の発現には、 A P P 又はセクレターゼ(- 若しくは - セクレターゼ)の一つを欠いた哺乳動物細胞株を使用することができる。 A P P 、 - 若しくは - セクレターゼを欠いているか、又は低いレベルで有する細胞株は、様々な細胞株の操作又は改変を介して得られる。 A P P 、 - 又は - セクレターゼをコードする遺伝子(一つ又は複数)がノックアウトされた細胞株は、当該技術分野にて公知の方法で生成し得る。これに代わり、細胞株に対する改変が、この遺伝子欠損効果を生じることができる。有用な細胞株改変の一例では、 R N A 干渉として周知のプロセスを介して、望ましくないタンパク質(例、 A P P 又は - 若しくは - セクレターゼ)の R N A 転写物を分解することによって、発現する A ペプチドの量を有意に低下させる。 R N A 干渉を可能にするために、公知の方法に従って、細胞に D N A 配列を安定的又は一時的にトランスクレプト又は感染させ、プラスミド又はウイルス仲介によりショートヘアピン R N A 構造を発現させる。このショートヘアピン R N A 構造は特定の転写物に特異的に結合して、その転写物の切断及び分解を開始させる(B anan 及び Puri 、 Curr . Pharm . Biotech nol . 、 5 : 4 4 1 - 5 0 (2 0 0 4) 、 Nesterova 及び Cho - Chung 、 Curr . Drug Targets 、 5 : 6 8 3 - 9 (2 0 0 4) 、 Medema 、 Biochem J . 、 3 8 0 : 5 9 3 - 6 0 3 、 (2 0 0 4))。哺乳動物細の細胞培地の代替として、タンパク質の発現のために形質転換植物又は植物細胞培地が使用されており(Hellwig 等、 2 0 0 4 、 Nature Biotechnology 、 2 2 : 1 4 1 5 (2 0 0 4))、これらは A を欠いた抗体を産生するための別の一源であり得る。同様に、哺乳動物細胞培地の代替として様々な種のイーストが一般に使用されており、 A を欠いた抗体の発現に適用することができ得る。これらの方法の使用により、 A ペプチドの産生が低下又は抑制される。

【 0 0 2 4 】

本発明の組成物の製造方法には、細胞培地に対する改変も含まれる。その方法は、好ましくは - 又は - セクレターゼ阻害剤を細胞培地に組み込み、存在する A ペプチドが許容可能な低いレベルにある抗 A 抗体を産生させる。様々な - 及び - セクレターゼ阻害剤が公知であり(例、米国特許第 6 、 4 8 6 、 3 5 0 号、米国特許第 6 、 6 2 7 、 7 3 9 号、 Dovey 等、 J Neurochem . 、 7 6 : 1 7 3 - 1 8 1 (2 0 0 1) 、 Yue - Ming 等、 Nature 、 4 0 5 : 6 8 9 - 6 9 4 (2 0 0 0))、これらの方法に使用することができる。

【 0 0 2 5 】

本発明の組成物を製造する更なる方法では、細胞培地内で可溶な A P P の産生を増加させることによって、産生される A ペプチドの量を低下させる。可溶な A P P の産生は、細胞株内で - セクレターゼ活性を増大させることにより増加し得る。増大された - セクレターゼ活性を伴う細胞株は、当該技術分野で公知の方法により生成することができる。これに代わり、可溶な A P P の産生は C H O 細胞に銅を添加することにより増加する(Borchardt 等、 Biochem J . 、 3 4 4 : 4 3 1 - 4 6 7 (1 9 9 9))。銅の添加もまた親 C H O - K 1 細胞、及び銅耐性 C H O - C U R 3 細胞内の A ペプチドのレベルを相当低下させた。

【 0 0 2 6 】

本発明の組成物の製造方法は、多様な精製技術も含む。その技術には、抗体による細胞培地からのプロテイン A (Protein A) 捕捉が含まれる。続く精製工程では、薬剤を使用して A ペプチドから抗 A 抗体を分離し、次いでこれら二つの物質(entity)間のクロマトグラフィーによる差異に基づいて、抗原から抗体を分離する。好ましい分離薬剤には、酸、尿素、チオシアナート、及び洗浄剤がある。抗体と抗原とを分離した

10

20

30

40

50

後、A ペプチドから抗 A 抗体を分離することが可能なクロマトグラフィー技術を使用して、抗体又は抗体抗原複合体から抗原を除去する。このクロマトグラフィー技術は、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、及び疎水クロマトグラフィーが好ましい。更に、抗体から抗原を分離する別の一技術として、タンジェンシャルフロー濾過が使用される。好ましい精製方法において、本発明の組成物は、抗体のプロテイン A 捕獲、中和、希釀、酸性化、サイズ排除クロマトグラフィー、及び中和を含むステップにより精製される（実施例 2 参照）。

【0027】

別のクロマトグラフィー方法の一つでは、A ペプチドの別のエピトープに対する固定化抗体を使用して、又は A ペプチドに対する親和性がより高い抗体を使用して、抗体抗原複合体若しくは抗原を単離及び除去する。

10

【0028】

本発明の組成物は、例えばアルツハイマー病、ダウン症候群、脳アミロイドアンギオバチー、血管性痴呆、軽度認知機能障害、及び同様物等の状態及び疾患有するヒトの患者の治療に使用され得る。A ペプチドは、該 A ペプチドがヒト以外である場合、患者において潜在的な免疫原性の危険性、及び更にはより大きな潜在的な健康上の問題を生じ得る。従って、A ペプチドの抑制、除去又は低減が重要なポイントとなる。

【0029】

本発明の組成物は、抗 A 抗体、及び薬剤的に許容される賦形剤を含有する医薬組成物として、ヒトである患者に投与されるのに適している。許容される賦形剤の例には、選択された投与モードに適切であるように構成された緩衝剤、界面活性剤、保存剤、可溶化剤、等張剤、安定剤及び同様物が含まれる。参照により本願に援用される Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.、Easton PA、最新版は、従事者に通常知られた調剤技術の大要を提供する。

20

【0030】

以下の実施例は例証を意図し、本発明を限定するものではない。

【0031】

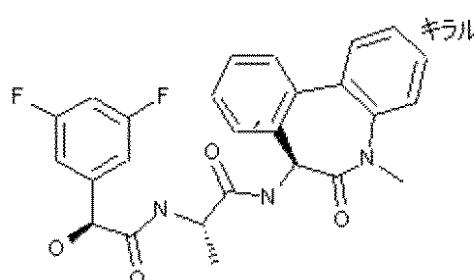
<実施例 1>

(- セクレターゼ阻害剤を含む細胞培地内における抗 A ペプチドの発現)

30

- セクレターゼ阻害剤、

【化1】



40

(WO 98 / 28268) を抗 A 抗体が発現している HEK293 細胞培地に加えて、細胞によって自然に発現される A ペプチドの量を低下させた。この実施例の細胞培地サンプルには、阻害剤を添加していないコントロール培地、時間 = 0 と、その後 5 日間 24 時間毎に 1 nM 阻害剤を添加した培地（5 日間のトランスフェクション用）、及び時間 = 0 に 1 nM 阻害剤を添加した培地が含まれていた。これらのサンプルをプロテイン A カラム、及びサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。サンプルの A ペプチド含有量を、以下に詳細に説明するように、酸 - 尿素ゲルセパレーション、及びその後のウエスタンプロット分析法により分析した。產生した、及びこの方法で分析した抗 A の結果を、後記の第 1 表に示す。

【0032】

50

以下のプロトコールに、サンプルのギ酸変成、及びその後の酸 - 尿素ポリアクリルアミドマトリクスを介した電気泳動法の技術を説明する。

【0033】

1日目

[装置の設定]

1) キャスティングのためにアクリルアミドゲルプレートを洗浄及び組立てた。例えば、キャスティングスタンド内にHo e f f e r プレートを配置した(16 cm × 14 cm プレート及び1.5 mmスペーサー)。プレートを洗剤で徹底的に洗浄し、蒸留水(dH₂O)、アセトンでリーンスし、最後に100% EtOHでリーンスした。

2) 10 cm(22%分離ゲル)及び11.75 cm(10%ステップゲル)の箇所にてプレートに印を付けた。 10

【0034】

[ゲルの作成及びゲル濃度]

1) アクリルアミド(40%溶液、例えば予め作成されたBio-Rad/cat# 161-0148等)

2) ゲル成分

【表1】

		4%スタッカー	10%	22%
尿素		5.76 g	2.88 g	11.56 g
40%アクリルアミド		1.6 mL	2 mL	17.6 mL
GAA		1.6 mL	800 μL	3.2 mL
TEMED(2.5%)		450 μL	200 μL	600 μL
TEMED(10%)		100 μL	100 μL	100 μL
dH ₂ O		16 mLへ	8 mLへ	32 mLへ

【0035】

尿素、アクリルアミド、氷酢酸(GAA)、及びdH₂Oを50 mLコニカルチューブ内に加えた。短時間ボルテックスし、55℃の水浴内でインキュベートした。尿素が溶液中に完全に溶解するまで、2、3分毎にボルテックスした。22%及び10%溶液を脱気し、溶液を氷上に配置し、4%スタッカーを水浴内に残した。 20

【0036】

[ゲルの注ぎ込み(室温で)]

1) N、N、N'、N' - テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)を22%溶液に加え、数回穏やかに反転して混合した。次いで、10%APS(過硫酸アンモニウム)を加え、数回反転した。25 mLピペットを使用して、10 cmの印に到達するまで、溶液をプレート間にゆっくり注いだ。

2) 750 μLの5%GAAのオーバーレイを注意深く加えた。P1000ピペットを使用して、5%GAAをガラスプレートの片面を伝わらせ非常にゆっくりと22%分解ゲル上に下降させた。

3) 室温にて少なくとも1時間、重合させた。

4) TEMED及び10%APSを、22%の場合と同様に10%アクリルアミド溶液に加えた。オーバーレイを除去し、溶液を11.75 cmにおける第二の印に到達するまで加えた。再び、上記のように5%GAAのオーバーレイ750 μLを注意深く注いだ。ゲルを30分間重合させた。 40

5) 4%スタッカー溶液を加える前に、ゲルスタンドを37℃のインキュベーター内に15分間配置して、ゲルを暖めた。このことはウェル内での正確な重合を助ける。4%スタッカー溶液を脱気し、55℃に保持した。オーバーレイを除去した。TEMEDを加え、数回反転した後、10%APSを加えた。この溶液を急速に注ぎ、清浄な乾燥12ウェルコーム(comb)(又は15ウェルコーム)を挿入した。スタッカーを注いだ後、スタンドをインキュベーター内に戻し15分間配置した後、除去した。ベンチトップ上で重合させた。スタッカーの完全な重合には少なくとも1.5時間を要するであろう。 50

【0037】

* 注記：重合ステップ中、分解ゲル中に空洞部分が出現し得る。これらの部分は、重合前及び後のゲルの温度変化を原因として形成する。これらのスペースは、この技術の性能を損なうものではない。

【0038】

[サンプルの調製]

単一レーン内の 3 mg のタンパク質の上方への分析によって、妥当なバンド結果が得られるであろう。タンパク質分析の条件は、以下のようなものである。

【0039】

(サンプル)

10

100 mg / mL タンパク質（最大濃度のタンパク質）30 μL

80 μL ギ酸（98%）(ICN cat # 15162-90)

20 μL 酸性ローディングバッファ（80%ギ酸、60%ショ糖及び0.02%メチルグリーン、6 g ショ糖を約 8 mL の約 99%ギ酸に溶解してバッファを作成した。混合物を加熱しかきませた。ショ糖が溶解した後、溶液の容積を約 99%ギ酸で 10 mL に調節した。2 μL の 1%メチルグリーン溶液を加えた。

1 μl - メルカプトエタノール

【0040】

* 注記：必要に応じて容積を調節する。しかしながら、最終的なギ酸濃度が常に 70% ~ 90% にあることを確認する。

20

【0041】

(ラダー)

Pharmacia 分子量マーカー、M.W. Range 2、512-16、949 (cat # 80-1129-83)。タンパク質を 1 mL PBS 中で再構成した。10 μL アリコートを -20 で冷凍した。1 アリコートを必要とする各ラダー用に解凍し、ギ酸（98%）90 μL、酸性ローディングバッファ 20 μL、及び - メルカプトエタノール 1 μL を加えた。

【0042】

* 注記：これらラダーを製造業者の指示に従って再構成しないこと (SDS がラダーのスメアの原因となるため)。

30

【0043】

(BSAサンプル)

各ゲル泳動の 2 レーンの外側に、歪みが生じる。この歪みによる負の効果を最小にするため、BSA サンプルをゲルの両側の外側レーン内にロードした。BSA サンプル = 5% BSA 1 μL、ギ酸（98%）90 μL、酸性ローディングバッファ 20 μL、及び - メルカプトエタノール 1 μL。

【0044】

[ゲルの泳動]

予備泳動：冷室内で装置を組み立てた。底部チャンバ（容積の 3/4）を予め冷却した酸性ゲルランニングバッファで満たした。頂部リザーバに適量のバッファを加えた。ゲルをアノードからカソードへ、250 ボルトにて 30 分間予備泳動した。

40

【0045】

* ゲル底部の気泡を全て除去し、頂部リザーバからバッファが漏れていないか確認した。

* * 酸性ゲルランニングバッファ = 氷酢酸 250 mL + d H₂O 3750 mL

【0046】

サンプルのロード：サンプルをロードする前に、ウェルをバッファでリーンスして過剰の尿素を除去した。サンプル、ラダー、及び外側の BSA サンプルをロードした。2 つのラダーを泳動して、転写前に、ペプチドラダーを含む 1 つのレーンを切断し、クマシープル - で染色した。

50

【0047】

段階電圧：以下のように、ゲルをアノードからカソードへ泳動した。

25ボルトで15分間
50ボルトで15分間
100ボルトで15分間
200ボルトで15分間
275ボルトで～15時間

【0048】

* * 染料の先頭が底部から約2～2.5cmになるまで、ゲルを一夜泳動した。これは通常、ゲルを夕方前にスタートさせた場合、翌朝になる。

10

【0049】

2日目

[酸尿素ゲルの転写条件(4の冷室内で泳動)]

転写前の夜、以下のバッファを作成し、冷室にて貯蔵した。

転写バッファ

トリス塩基 12.36g
グリシン 57.6g
メタノール 800mL
dH₂O 4リットルまで

【0050】

20

転写前に酸尿素ゲルを中和した。ゲルを注意深く除去し、洗浄したガラストレー内に配置した。200mLの転写バッファを加え、15分間緩やかに搖すった。この洗浄ステップを合計4回繰り返した。転写を通常通り行った(100ボルトで2.5時間)。

【0051】

[ポンソーソ染色及び脱染]

転写後、ラダー中のタンパク質をポンソーソ染色により視覚化した。ニトロセルロースを5%酢酸中の0.1%ポンソーソ溶液中で5分間染色した。膜をdH₂Oで脱染後(3回の非常に短時間の洗浄)、膜をデジタルスキャンし、ラダーに先の丸い鉛筆で印をつけた。ファイルをセーブした。

【0052】

30

* 注記：このラダーは単に整合を目的として使用される。この技術によってペプチドはその分子量(サイズ)及び電荷に従って分離される。例えば、同一の分子量を有するが異なる電荷を有する2種のペプチドは、同一の正味の可動性を有さないであろう。この問題のため、少なくとも一ウェル中のAペプチドの基準を常に泳動させる。これにより正確なAペプチドの同定が可能となる。

* * 重要事項：ペプチド基準ラダーのバンド全てが転写されるわけではない。クマシブルーラダーがポンソーソ染色ニトロセルロースと整合した場合、10.7kDa及び6.2kDaバンドが転写されることは明らかである。

【0053】

40

[ウエスタンプロット条件]

ニトロセルロース膜をPBS中で5分間ボイルした。通常のウエスタン条件にて進行させた。

【0054】

[ブロッキング工程]

1Xトリス緩衝生理食塩水/0.125%Tween20(登録商標)(TBS/T)中の5%ミルクで、50mL容量にて45分間、膜をブロックした。

【0055】

[一次抗体]

選択された抗体の結合エピトープがAペプチドの異なる領域に結合するように、選択された数の抗A抗体(例、3個)を使用した。選択された抗体はまた少なくとも79p

50

g の基準の視覚化を可能にすることを確認した。一次抗体溶液は 0 . 5 % ミルク T B S / T 中にあり、選択された抗体は総容量 2 0 m L にて例えば 1 : 1 0 0 0 に希釈された。一次抗体を一夜ロッカー上にて放置した。

【 0 0 5 6 】

3 日目

[膜の洗浄]

膜を 3 回、各々につき 1 0 ~ 1 5 分間、T B S / T 中 1 % B S A で洗浄した。

【 0 0 5 7 】

[二次抗体]

二次抗体溶液は 1 % ミルク T B S / T 中にあり、抗マウス H R P (C e l l S i g n a l i n g からカタログ番号 7 0 7 6) は総容量 5 0 m L にて 1 : 6 0 0 0 に希釈された。二次抗体中で膜を 3 時間放置した。 10

【 0 0 5 8 】

二次抗体処理後、膜を 3 回、各々につき 1 5 分間、T B S / T で洗浄した。

【 0 0 5 9 】

[現像]

現像前に、膜を高感度ケミルミネッセンス (E C L) 溶液 (P i e r c e S u p e r S i g n a l W e s t P i c o C a t a l o g # 3 4 0 8 0) 中に 5 分間配置した。

【 0 0 6 0 】

この手法の最大感度は、ウエスタンプロット工程中に使用する試薬に依存する。上記した実施例については、このアッセイの最大感度は、約 1 p g / μ g I g G である。サンプルの I g G 濃度 (m g / m L) は、 2 8 0 n m における吸収を測定し、その値を消散係数 1 . 4 で除算して決定した。 20

【 0 0 6 1 】

この実施例に従って生成したサンプルの分析により、以下の結果を得た。

【 0 0 6 2 】

第 1 表 - セクレターゼ阻害剤を含むか、又は含まない細胞由来の精製抗体の酸尿素ゲル分析

【 表 2 】

サンプル	F L ¹ (p g / μ g I g G)	T 1 ² (p g / μ g I g G)	T 2 ³ (p g / μ g I g G)	総 h A β 4 0 (p g / μ g I g G)
阻害剤を含まない	70	38	70	178
5 日間、2 4 時間毎に阻害剤	4	0	3	7
T = 0 に阻害剤	56	27	52	135
1 完全長 h A β 4 0				
2 N - 末端切断 h A β 4 0, # 1				
3 N - 末端切断 h A β 4 0, # 2				

【 0 0 6 3 】

< 実施例 2 >

[抗体及び A ペプチドの酸解離による抗 A 抗体の精製]

抗 A 抗体を、細胞培地内で増殖した H E K 2 9 3 細胞で発現させた。培地をプロテイン A - アガロースカラムにかけ、1 0 0 m M グリシンバッファ、p H 3 . 1 で溶出することによって抗体を精製した。プロテイン A から溶出した分画の集合 (p o o l) を、1 M トリスバッファ、p H 8 . 0 の小量を加えることによって約 p H 7 . 4 に調整した。次に、この溶出した画分の集合を 1 M グリシン、p H 2 中で 1 : 1 に希釈することによって約 p H 2 に調整した。室温で約 1 0 分間のインキュベーション後、酸性化した集合を、5 0 40

mMグリシン、150mM NaCl、pH 2の移動相を使用した流速30cm/時間の26/60 Superdex 200カラム(Amersham)上のサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。サイズ排除カラムから溶出した抗体を、トリスバッファを加えて中和し、pH 7.4のPBSに対して透析した。

【0064】

变成酸/尿素傾斜ポリアクリルアミドゲル分析(本技術の更なる解説は、実施例1を参照)は、この酸解離法による精製で生成したサンプルのpg/μg IgG単位でのAペプチドの質量の推定値を提供する。この酸解離精製法を用いた抗-A抗体の精製の後、以下の結果を得た。

【0065】

第2表 HEK293細胞由来の精製抗体の酸尿素ゲル分析：サイズ排除クロマトグラフィーのみ(酸性化せず)、又は酸性化及びサイズ排除クロマトグラフィー

【表3】

サンプル	FL ¹ (pg/μgIgG)	T1 ² (pg/μgIgG)	T2 ³ (pg/μgIgG)	総hAβ40 (pg/μgIgG)
HEK293、酸性化せず、SEC	39	0	0	39
HEK293、酸性化及びSEC	11	0	0	11
1完全長hAβ40				
2N-末端切断hAβ40、#1				
3N-末端切断hAβ40、#2				

【0066】

<実施例3>

[NS0細胞内での抗A抗体の発現]

抗A抗体を細胞培養内で増殖したNS0細胞から発現させた。培地をプロテインAアガロースカラムにかけ、100mMグリシンバッファ、pH 3.1で溶出することによって抗体を精製した。プロテインAから溶出した画分の集合を、1Mトリスバッファ、pH 8.0を加えることにより約pH 7.4に調整した。この溶出画分の集合を次にPBSで1:1に希釈し、PBS、150mM NaCl、pH 7.4の移動相を使用した流速30cm/時間の26/60 Superdex 200カラム(Amersham)上のサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。サイズ排除カラムから溶出した抗体を、pH 7.4のPBSに対して透析した。变成酸/尿素傾斜ポリアクリルアミドゲル分析によれば、この方法で生成した抗A抗体内で、Aペプチドは検出されなかった。

【0067】

ELISA分析を用いてAペプチドの濃度を測定した。96ウェルのELISAプレート(Nunc Maxisorp(登録商標)F96又はC96)のウェルに、中央Aペプチド(例、17~25)結合領域の外側のエピトープを認識する抗A抗体(例、2又はそれ以上)を、各抗体につき例えば、被覆バッファ中で7.5μg/mLの濃度で、冷却条件下で一夜被覆した。プレートから被覆溶液を吸引した後、ウェルを300μL/ウェルのHBST/B1otto(0.25%w/v無脂肪ドライミルクを含むHEPES緩衝生理食塩水(各々、150mM及び10mM)と、EDTA(3mM)及びTween 20(登録商標)(0.5%w/v))で1~2時間、室温でブロッキングし、その後洗浄バッファ(1XPBS及び0.1%v/v Tween 20(登録商標))で1回洗浄して、吸引した。抗体を含むサンプルをHBST/B1otto中で適切に希釈して、ELISAプレートに添加した(ウェル毎100μL)。等量の希釈物に更なる0.4ng/mL合成齧歯動物Aペプチド1~40を加えて、希釈サンプルマトリックスに

10

20

30

40

50

おける正確な定量を確実にした。基準として、合成齧歯動物A ペプチド1～40を、精製抗A 抗体と共に使用した(<1 ppm総齧歯動物A ペプチド)。抗体(総A ペプチドのコントロールのための)及び抗体内に加えた合成齧歯動物A ペプチド1～42(A ペプチド1～42のコントロールのための)を含むコントロールサンプルも試験した。ELISAプレートを1～2時間、室温でインキュベートした。ウェルを洗浄バッファで4回洗浄し、吸引した。次いで、100 µL / ウェルのHBST / Block中の希釈した(1:10、000)ロバ抗-ヒトIgG - アルカリホスファターゼ複合体(Jackson Immunoresearch、#709-056-149)を、各ウェルに添加した。室温で1～2時間インキュベートした後、洗浄バッファで4回洗浄し、ウェルを吸引し、各ウェルに100 µlの1XDEAバッファ溶液中の1.0 mg / mL pNPP基質(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.、#50-80-00)溶液を加えた。ELISAプレートを室温で周期的に振盪しながらインキュベートした。基準に関して色が十分に発現したとき(通常2.0～2.5吸収単位)、マイクロプレートリーダーを使用して405 nmにおける吸収を読み取った。検出限界は0.02 ng / mLであった。定量限界は0.1 ng / mLであった。基準のための濃度決定はAAA分析を使用した。サンプルのIgG濃度(mg / mL)は280 nmにおける吸収を測定し、その値を消散係数1.4で除算して決定した。このELISA分析を、上述したようにNS0細胞内で発現した抗A 抗体の分析に使用したが、A ペプチドは検出されなかった。

【0068】

10

<実施例4>

[ヒト化抗A 抗体標本中のA ペプチドの陽イオン交換による低減]

ヒト化抗A 抗体の標本を、CHO細胞内で発現させた。プロテインA - アガロースカラムにかけ、100 mMグリシンバッファ、pH 3.1で溶出することによって抗体を生成した。プロテインAから溶出した画分の集合を、1 Mトリスバッファ、pH 8.0を加えることによって約pH 7.4に調整した。ELISA法による測定によれば、抗体標本は15～20 ppmのハムスターA ペプチドを含有していた。

【0069】

20

以下のように、抗体を陽イオン交換クロマトグラフィーで更に精製した。出発抗体材料をpH 5.2の50 mM酢酸ナトリウムに対して透析(diafiltrer)して(5容量、30 kカットオフPESTアンジエンシャルフロー超フィルターを使用)、陽イオン交換カラムにロードするために標本の導電率を低下させた。次いで透析したタンパク質溶液を、50 mM酢酸ナトリウム中でpH 5.2に平衡させたSP Sepharose High Performance(GE Healthcare)カラム(0.66 × 15 cm、15 mgタンパク質 / mLカラム容積にてロード)に添加した。全操作は室温で行われ、線流速は115 cm / 時間であった。ロード後、カラムを5カラム容積のpH 5.2の50 mM酢酸ナトリウムで洗浄し、抗体を段階的に(5カラム容積の50 mM酢酸ナトリウム、135 mM NaCl、pH 5.2)、又は15カラム容積のpH 5.2の50 mM酢酸ナトリウム中0～150 mMの傾斜NaClにより連続的に溶出した。主ピークからの画分をまとめた(約90%の收率を達成するため)。この方法によって精製された集合した抗A 抗体は、出発物質と比較して低いA ペプチド含有量を有していた(段階的な溶出物質では10 ppm、及び傾斜溶出物質では9 ppm)。

30

【0070】

40

<実施例5>

[抗A 抗体中のA の免疫精製による低減]

アミノ酸13～28間のヒトA の中央ドメインに対して結合する抗A 抗体を、細胞培地内で増殖したHEK293細胞により発現させた。この抗体から汚染ヒトA ペプチドを、アガロースビーズに連結した、A 40のカルボキシル末端に向けられたモノクローナル抗体2G3を使用した免疫精製によって分離した。抗体標本を10:1容量比にて、2G3に連結したビーズと共に一夜回転させた。一夜インキュベートした後、アガロ-

50

スピーズをペレット化して 2 G 3 - A 複合体を除去した。次いで E L I S A 法により、免疫精製前及び後の抗 A 抗体内に存在する A ペプチドの量を測定した。

【 0 0 7 1 】

この方法で免疫精製し、E L I S A 法により分析した抗 A 抗体標本は、精製前 10 ~ 25 p g / μ g IgG の A を有し、精製後は検出可能な A が存在しないことが見出された。汚染 A の低下を、実施例 1 に記載したように、酸ゲル / ウエスタンプロット分析により確認した。

【配列表】

0004851348000001.app

10

フロントページの続き

(74)代理人 100087114

弁理士 斎藤 みの里

(72)発明者 ロナルド・ブラッドリー・デマットス

アメリカ合衆国46060インディアナ州ノーブルズビル、リングテイル・プレイス10474番

(72)発明者 ウマ・クチボトラ

アメリカ合衆国46236インディアナ州インディアナポリス、ベント・オーク・レイン1260
4番

(72)発明者 シュウ - チウン・ヤン

アメリカ合衆国46203インディアナ州インディアナポリス、イースト・メリル・ストリート6
73番

(72)発明者 ドン・ビー・マックルーア

アメリカ合衆国46256インディアナ州インディアナポリス、マラード・ウェイ7816番

審査官 宮坂 隆

(56)参考文献 国際公開第02/046237 (WO, A1)

国際公開第02/088306 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 21/08

C12N 15/09

A61K 39/395

A61P 25/28

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed