

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6190113号
(P6190113)

(45) 発行日 平成29年8月30日(2017.8.30)

(24) 登録日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

C 0 7 K 2/00 (2006.01)

C 0 7 K 7/50 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 25/28

C 0 7 K 2/00

請求項の数 18 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-555265 (P2012-555265)
 (86) (22) 出願日 平成23年3月3日(2011.3.3)
 (65) 公表番号 特表2013-524774 (P2013-524774A)
 (43) 公表日 平成25年6月20日(2013.6.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2011/000238
 (87) 国際公開番号 W02011/106885
 (87) 国際公開日 平成23年9月9日(2011.9.9)
 審査請求日 平成26年2月27日(2014.2.27)
 審判番号 不服2016-7337 (P2016-7337/J1)
 審判請求日 平成28年5月19日(2016.5.19)
 (31) 優先権主張番号 61/310,167
 (32) 優先日 平成22年3月3日(2010.3.3)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 300066874
 ザ・ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュ
 ユ・コロンビア
 カナダ国 V 6 T 1 Z 3 ブリティッシ
 ユ・コロンビア、バンクーバー、アグロノ
 ミー ロード 1 0 3 - 6 1 9 0、ユニバ
 ーシティー・インダストリー リエゾン オ
 フィス
 (74) 代理人 100101454
 弁理士 山田 卓二
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稜
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴマー特異アミロイドベータエピトープおよび抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも S N K のアミノ酸配列を有し、該 K (リジン) が溶媒に露出された環状ペプチド上に存在する立体構造エピトープに特異的に結合する抗体であって、アミロイド (A) に特異的に結合でき、鎖状ペプチドおよび非オリゴマー形態のアミロイド (A) よりも、環状ペプチドおよびオリゴマー形態の A により大きな親和性で特異的に結合し、細胞表面のアミロイド前駆体タンパク質 (A P P) に対して有意に低い結合性を示す、単離された抗体。

【請求項 2】

配列番号：1 によって表されるアミノ酸配列を有し、該配列中の K (リジン) が溶媒に露出された、環状ペプチド上に存在する立体構造エピトープに特異的に結合する抗体であって、アミロイド (A) に特異的に結合でき、鎖状ペプチドおよび非オリゴマー形態のアミロイド (A) よりも、環状ペプチドおよびオリゴマー形態の A により大きな親和性で特異的に結合し、細胞表面のアミロイド前駆体タンパク質 (A P P) に対して有意に低い結合性を示す、単離された抗体。

【請求項 3】

非オリゴマー形態の A に対するよりも、オリゴマー形態の A に対してより大きな親和性をもって特異的に結合する、請求項 1 または 2 に記載の単離された抗体。

【請求項 4】

モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の単離された抗体。

10

20

【請求項 5】

ヒト化抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の単離された抗体。

【請求項 6】

エピトープが溶媒に露出された、抗体アクセス可能なオリゴマー A のナックル領域に対応する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 7】

半減期延長媒体と連結している、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

前記の半減期延長媒体が、Fc 領域、ポリエチレングリコール (PEG)、デキストランおよびその任意の組合せからなる群から選択される、請求項 7 記載の抗体。

10

【請求項 9】

検出可能な標識をさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体を含む、免疫複合体。

【請求項 10】

検出可能な標識が、放射線不透過性化合物、放射性同位体、発蛍光団、発色団、酵素、金属イオンおよびその任意の組合せからなる群から選択される、請求項 9 記載の免疫複合体。

【請求項 11】

治療上の有効量の請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体および医薬上許容される担体または賦形剤を含む、組成物。

20

【請求項 12】

アルツハイマー病の処置または予防を必要とする患者においてアルツハイマー病を処置または予防するための医薬組成物であって、医薬上有効量の請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 9 または 10 に記載の免疫複合体を含む、医薬組成物。

【請求項 13】

患者から単離した生体試料中のオリゴマー A の存在を検出する方法であって、

a) 前記の患者から単離した生体試料を、該試料中での抗原 / 抗体複合体の形成を可能にするのに十分な時間および条件下で、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体と接触させる工程；および

b) 前記試料中の抗原 / 抗体複合体の存在を検出する工程
を含み、ここで、前記複合体の存在が前記患者におけるアルツハイマー病の指標である、方法。

30

【請求項 14】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体；および
シグナルを生成する化合物と連結された抗原を含むコンジュゲート、
を含む、アルツハイマー病の同定用のキット。

【請求項 15】

1 つ以上の検出試薬を含む、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体；
シグナルを生成する化合物と連結された抗原を含むコンジュゲート；および
アルツハイマー病を診断するにあたっての使用説明書、
を含む、コマーシャルパッケージ。

40

【請求項 17】

アルツハイマー病の処置または予防用の医薬組成物の製造のための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 9 または 10 に記載の免疫複合体の使用。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体をコードする、核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

関連出願の相互参照

本願は2010年3月3日に出願された米国仮出願第61/310,167号の優先権の利益を主張し、前記仮出願は出典明示により完全に本明細書の一部とされる。

【 0 0 0 2 】

(分野)

本発明は、Aベータオリゴマーの新規の立体構造エピトープ、関連の抗体組成物および使用方法に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 3 】

10

(背景)

アルツハイマー病(AD)は、アミロイド前駆体タンパク質(APP)のタンパク分解産物であるAベータ(1-40)、(1-42)および(1-43)ペプチド(アミロイド またはとも称される)で主として構成される細胞外プラークの脳での蓄積に付随した一般的な認知症傾向(記憶障害および認知障害)の神経変性疾患である。加えて、異常にリン酸化されたタウタンパク質(ニューロン微小管関連タンパク質)で主として構成される神経原線維変化が、死に瀕したニューロンの細胞内に蓄積する。(1-42)はAD患者のアミロイドプラークにおいて主要な分子種である。

【 0 0 0 4 】

家族性型のADは、APP遺伝子における、又はそのタンパク産物がAPPのへのプロセッシングに関係するプレセニリン1もしくは2遺伝子における突然変異に起因し得る。アポリポタンパク質E対立遺伝子バリエーションも、孤発性および家族性のADの両方の発症年齢に影響を及ぼす。最近では、ペプチドがオリゴマー化したの特定の分子種が、ADおよび該疾患のマウスモデルで観察される神経毒性の主要な構成要素を媒介することが明らかにされた(Walsh et al. 2002)。オリゴマーの毒性は、ニューロンのインスリン受容体の機能不全によって(Zhao et al. 2008)、及び正常なシナプス機能に対する干渉、特に海馬での、グルタミン酸受容体の異所性活性化による干渉によって現れ得る(De Felice et al. 2007; Nimmrich et al. 2008)。Aオリゴマーと正常な細胞性アイソフォームのプリオンタンパク質PrPCとの間のナノモラーの親和性結合相互作用が報告された(Lauren et al. 2009)。さらに、PrPCと様々な毒性シグナル伝達経路との間の相互作用(Solforosi et al. 2004; Lefebvre-Roque et al. 2007)、例えばグルタミン酸受容体サブユニットとの相互作用(Khosravani et al. 2008)が、Aオリゴマーの毒性に関する統一メカニズムをもたらし得る。

20

30

【 0 0 0 5 】

の免疫認識が、ヒト変異体アミロイド前駆体タンパク質を発現するトランスジェニックマウスの病理学および挙動の両方の改善をもたらし得ることは広く認められている。しかしながら、「非選択的な」免疫療法によりヒトを治療するにあたっては内在する危険性がある。例えば、自己免疫髄膜脳炎が、非選択的免疫原を含有するアルツハイマーワクチンを受けた患者の約10%で発症した(Gelinas et al. 2004; Robinson et al. 2004; Brody et al. 2004; Malter 2004; Mathews and Nixon 2003)。結果として生じる髄膜脳炎はに対する細胞性免疫の活性化によるもののようであったが、細胞性免疫反応とは無縁の、受動注入されたモノクローナル抗体(mAb)が脳の微小出血と関係していることも示された(Goni and Sigurdsson 2005)。による非選択的免疫の別の危険性は、脳のニューロンおよび循環性単球(circulating monocyte)の表面に露出する親タンパク質APPの免疫認識である(Jung et al. 1996; Jung et al. 1990)。そのような細胞表面膜分子の認識は、溶解の引き金となり得るか、又は栄養学的活性を含み得るAPPタンパク質の細胞外ドメインの機能に対する干渉の引き金となり得る(Morimoto et al. 1998; Mileusnic et al. 2005; Mileusnic et al. 2000)。

40

【 0 0 0 6 】

ペプチドの「非特異的な」認識に関する別の問題は、ペプチドが単に毒性の

50

分子種、オリゴマーの前駆体であるということである。オリゴマーは、培養中の細胞系およびニューロンを殺すこと (Lambert et al. 2007; Lacor et al. 2007; Ronicke et al. 2008)、及びスライス培養および生きた動物における、長期増強 (LTP) と称される記憶に役立つ重要なシナプス活性を妨害することが示された (Balducci et al. 2010; Shankar et al. 2008; Selkoe 2008; Klyubin et al. 2005; Walsh et al. 2002; Wang et al. 2002)。マウスでの記憶障害の発症と相関する特異的オリゴマーが特定され、それを精製し、正常な若いラットに注入した場合、マウスで見られる拒否行動の欠陥 (negative behavioral defects) が再現される (Lesne et al. 2006)。同様の研究により、PrPCが、オリゴマーに対する受容体として働き得ること、及びその毒性作用をシナプスLTP妨害 (disruption) において変換し得ることが実証された (Lauren et al. 2009)。

10

【0007】

過去にAペプチドに対するワクチンおよびモノクローナル抗体が産生されたが、これまでのところ、望ましい治療効果を与え、また動物および/またはヒトで重篤な副作用を引き起こさないことが証明されたものはない。この疾患の進行を阻止または遅延させるが、人体に否定的な影響および潜在的に致死的な影響をもたらさない、生物製剤の開発に関する治療的必要性がある。この必要性は、一般集団の増加する寿命に鑑みて特に明白であり、この寿命の増加に伴って、アルツハイマー病と診断される年間患者数は増加している。疾患特異エピトープ (DSE) である免疫学的エピトープを同定し、毒性のオリゴマー分子種を特異的に標的とする免疫療法を開発することが望ましいであろう。また、毒性のオリゴマー分子種を標的とし、且つ細胞表面のAPPの自己免疫認識を避ける免疫療法の開発も望ましい。そのようなDSEエピトープは、標的タンパク質の毒性を特異的に中和する免疫療法および予防ワクチンの標的となり得る。また、ADを発症する危険性がある集団の指標を与える診断ツール、ADと他の認知症症候群を区別する鑑別診断のための診断ツール、およびAD治療に対するバイオマーカーをモニタする診断ツールを開発することも望ましい。

20

【0008】

従って、毒性のオリゴマー分子種に固有の疾患特異エピトープを提供することが望ましい。

【先行技術文献】

30

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Walsh, D.M., et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potentially inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 2002. 416(6880): p. 535-9.

【非特許文献2】Gelinas, D.S., et al., Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101 Suppl 2: p. 14657-62.

【非特許文献3】Robinson, S.R., et al., Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. *Neurobiol Aging*, 2004. 25(5): p. 609-15.

【非特許文献4】Broytman, O. and J.S. Malter, Anti-Abeta: The good, the bad, and the unforeseen. *J Neurosci Res*, 2004. 75(3): p. 301-6.

40

【非特許文献5】Mathews, P.M. and R.A. Nixon, Setback for an Alzheimer's disease vaccine: lessons learned. *Neurology*, 2003. 61 (1): p. 7-8.

【非特許文献6】Goni, F. and E.M. Sigurdsson, New directions towards safer and effective vaccines for Alzheimer's disease. *Curr Opin Mol Ther*, 2005. 7(1): p. 17-23.

【非特許文献7】Jung, S.S., J. Nalbantoglu, and N.R. Cashman, Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study. *J Neurosci Res*, 1996. 46(3): p. 336-48.

【非特許文献8】Jung, S.S., S. Gauthier, and N.R. Cashman, Beta-amyloid precursor

50

r protein is detectable on monocytes and is increased in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 1999. 20(3): p. 249-57.

【非特許文献 9】Morimoto, T., et al., Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. J Neurosci Res, 1998. 51 (2): p. 185-95.

【非特許文献 10】Mileusnic, R., C.L. Lancashire, and S.P. Rose, Amyloid precursor protein: from synaptic plasticity to Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci, 2005. 1048: p. 149-65.

【非特許文献 11】Mileusnic, R., et al., APP is required during an early phase of memory formation. Eur J Neurosci, 2000. 12(12): p. 4487-95.

10

【非特許文献 12】Lambert, M.P., et al., Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. J Neurochem, 2007. 100(1): p. 23-35.

【非特許文献 13】Lacor, P.N., et al., Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. J Neurosci, 2007. 27(4): p. 796-807.

【非特許文献 14】Ronicke, R., et al., Abeta mediated diminution of MTT reduction-an artefact of single cell culture? PLoS One, 2008. 3(9): p. e3236.

【非特許文献 15】Balducci, C, et al., Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010, 107(5): p. 2295-300.

20

【非特許文献 16】Shankar, G.M., et al., Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. Nat Med, 2008. 14(8): p. 837-42.

【非特許文献 17】Selkoe, D.J., Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. Behav Brain Res, 2008. 192(1): p. 106- 3.

【非特許文献 18】Klyubin, I., et al., Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. Nat Med, 2005. 11 (5): p. 556-61.

【非特許文献 19】Wang, H.W., et al., Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. Brain Res, 2002. 924(2): p. 133-40.

30

【非特許文献 20】Lesne, S., et al., A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature, 2006. 440(7082): p. 352-7.

【非特許文献 21】Lauren, J., et al., Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. Nature, 2009. 457(7233): p. 1128-32.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

（概要）

40

本開示の目的は、アルツハイマー病の診断、処置および予防のための、従前のエピトープ、抗体、組成物および方法の少なくとも1つの不利な点を取り除く又は緩和することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

第一の態様において、本開示は、一部分において、選択的抗体結合に有益な特徴を有する A 中の新規な構造エピトープに関する驚くべき発見に基づく。

【0012】

1つの実施形態において、オリゴマー A の溶媒に露出された抗体アクセス可能な「ナックル領域 (knuckle region)」に対応する少なくとも S N K のアミノ酸配列を有する A

50

由来の環状ペプチドが提供される。

【 0 0 1 3 】

他の実施形態において、拘束された環状立体配置 (constrained cyclic configuration) を有するエピトープを含む抗原ペプチドであって、前記エピトープがオリゴマー A の溶媒に露出された抗体アクセス可能なナックル領域に対応する少なくとも S N K のアミノ酸配列を有する、抗原ペプチドが提供される。

【 0 0 1 4 】

他の実施形態において、拘束された環状立体配置を有するエピトープを含む抗原ペプチドであって、前記エピトープがオリゴマー A の溶媒に露出された抗体アクセス可能なナックル領域に対応する配列番号 1 に対応するアミノ酸配列を有する、抗原ペプチドが提供

10

【 0 0 1 5 】

1 つの態様において、該抗原ペプチドのエピトープは、オリゴマー A (1 - 4 0) またはオリゴマー A (1 - 4 2) の残基 2 5 ~ 2 9 に対応する。

【 0 0 1 6 】

他の実施形態において、由来の環状ペプチドに特異的に結合する単離された抗体であって、前記環状ペプチドがオリゴマー A の溶媒に露出された抗体アクセス可能なナックル領域に対応する少なくとも S N K のアミノ酸配列を有する立体構造エピトープを含む、単離された抗体が提供される。

【 0 0 1 7 】

20

他の実施形態において、由来の環状ペプチドに特異的に結合する単離された抗体であって、前記環状ペプチドがオリゴマー A の溶媒に露出された抗体アクセス可能なナックル領域に対応する配列番号 1 に対応するアミノ酸配列を有する立体構造エピトープを含む、単離された抗体が提供される。

【 0 0 1 8 】

1 つの態様において、単離された抗体は、非オリゴマー形態の A に対するよりも、オリゴマー形態の A に対してより大きな親和性をもって特異的に結合する。

【 0 0 1 9 】

別の態様において、単離された抗体はモノクローナルである。

【 0 0 2 0 】

30

他の態様において、単離された抗体はヒト化されたものである。

【 0 0 2 1 】

他の実施形態において、検出可能な標識でコンジュゲートされた、由来の環状ペプチドであってオリゴマー A の溶媒に露出された抗体アクセス可能なナックル領域に対応する少なくとも S N K のアミノ酸配列を有する立体構造エピトープを含む環状ペプチドと特異的に結合する単離された抗体を含む免疫複合体が提供される。

【 0 0 2 2 】

他の態様において、該単離された抗体をコードする核酸が提供される。

【 0 0 2 3 】

他の実施形態において、治療上有効量の A 由来の環状ペプチドと特異的に結合する単離された抗体および医薬上許容されるアジュバントを含む組成物であって、前記環状ペプチドがオリゴマー A の溶媒に露出された抗体アクセス可能なナックル領域に対応する少なくとも S N K のアミノ酸配列を有する立体構造エピトープを含む、組成物が提供される。

40

【 0 0 2 4 】

他の実施形態において、拘束された環状立体配置を有するエピトープを含む抗原ペプチドおよび医薬上許容されるアジュバントを含む抗オリゴマーワクチン組成物であって、前記エピトープがオリゴマー A の溶媒に露出された抗体アクセス可能なナックル領域に対応する少なくとも S N K のアミノ酸配列を有する、ワクチン組成物が提供される。

【 0 0 2 5 】

50

他の態様において、アルツハイマー病の処置を必要とする患者において該疾患を処置または予防する方法であって、医薬上有効量の単離された抗体または免疫複合体を投与することを含む、方法が提供される。

【0026】

他の態様において、アルツハイマー病の処置を必要とする患者において該疾患を処置または予防する方法であって、ワクチンを投与することを含む、方法が提供される。

【0027】

他の態様において、アルツハイマー病に罹患している疑いのある患者においてアルツハイマー病を診断する方法であって、a) 前記患者から生体試料を単離する工程；b) 前記生体試料中で抗原／抗体複合体の形成を可能にする十分な時間および条件下で、前記生体試料を単離された抗体と接触させる工程；およびc) 前記試料中の抗原／抗体複合体の存在を検出する工程を含み、ここで、前記複合体の存在が患者におけるアルツハイマー病の診断を示す、診断方法が提供される。

10

【0028】

他の実施形態において、単離された抗体、及びシグナル生成化合物と連結された抗原を含むコンジュゲートを含むキットが提供される。

【0029】

さらなる態様において、上記キットは1つ以上の検出試薬を含む。

【0030】

他の実施形態において、単離された抗体；シグナル生成化合物と連結された抗原を含むコンジュゲート；およびアルツハイマー病を診断する際の使用説明書を含む、製品が提供される。

20

【0031】

他の態様において、アルツハイマー病の処置または予防のための抗体または免疫複合体の使用が提供される。

【0032】

他の態様において、アルツハイマー病の処置または予防のためのワクチンの使用が提供される。

【0033】

他の実施形態において、A 由来の環状ペプチドに結合できる単離された抗体であって、前記環状ペプチドがオリゴマー A の溶媒に露出されたナックル領域に対応するアミノ酸配列 S N K を有する、単離された抗体が提供される。1つの態様において、そのような抗体は、非オリゴマー形態の A に対するよりも、オリゴマー形態の A に対してより大きな親和性をもって結合する。

30

【0034】

他の実施形態において、アルツハイマー病に罹患しているか又は罹患している疑いのある患者の処置方法であって、S N K 配列を含むアミノ酸組成物を有する A 由来の環状ペプチドに結合できる抗体の治療上の有効量を前記患者に投与することを含む処置方法が提供される。1つの態様において、非オリゴマー形態の A に対するよりも、オリゴマー形態の A に対してより大きな親和性をもって結合する。

40

【0035】

他の実施形態において、被検体における A D の発症または進行を予防する方法であって、オリゴマー A のナックル領域に対応するアミノ酸配列 S N K を有する拘束された環状立体配置を有するエピトープを含む抗原ペプチドの治療上の有効量を前記被検体に投与することを含む、予防方法が提供される。投与の際に、該抗原ペプチドはオリゴマー A に対する免疫応答を惹起する。産生される抗体は、オリゴマー A に特異的に結合できる。特定の実施形態において、該抗体は、非オリゴマー形態の A よりも、オリゴマー形態の A に対してより大きな親和性をもって結合する。

【0036】

本開示の他の態様および形態は、添付の図面とあわせて下記の具体的な実施形態を参酌

50

することで当業者には明らかとなるう。

【0037】

本開示の実施形態を、ここに、添付の図面を参酌しつつ単なる例示として記載する。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】モノマーAの動力学的特性を示す動的光散乱の結果を視覚的に示す図。

【図2】オリゴマーの動力学的特性を示す動的光散乱の結果を視覚的に示す図。

【図3】オリゴマーの動力学的特性を示す動的光散乱の結果を視覚的に示す図。

【図4】SNKエピトープを含むジスルフィド-環化ペプチドの3次元モデル。

【図5】SNKを含む立体構造ペプチドに結合する抗SNKモノクローナル抗体のスクリーニングに関する代表的な分析サイクルのBiacore(商標)の結果を視覚的に示す図。

10

【図6】SNKエピトープを含むBSAコンジュゲート鎖状または環状ペプチドの、鎖状(3F5、3G2)、環状(5E3、5D8)および中間特異的(intermediate-specific)(4D11、4D12)モノクローナル抗体の結合、及び前記抗体の合成A1-42オリゴマーに対する反応性を示す、Biacore(商標)センサーグラムのオーバーレイの結果を視覚的に示す図。

【図7】SNKエピトープを含む鎖状または環状ペプチドのBSAコンジュゲートの鎖状(3F5、3G2)、環状(5E3、5D8)および中間特異的(4D11、4D12)モノクローナル抗体に対する結合、及び前記抗体の合成A1-42オリゴマーに対する反応性を示す、Biacore(商標)センサーグラムのオーバーレイの結果を視覚的に示す図。

20

【図8】合成A1-42オリゴマーの種々の濃度の環状モノクローナル抗体5E3に対する結合を示す、Biacore(商標)分析の結果を視覚的に示す図。

【図9】細胞表面に位置するAPPに対する標識化6E10抗体および陰性対照を結合する細胞の比較を示す、フローサイトメトリートレース。

【図10】細胞表面に位置するAPPに対する標識化5E3抗体および陰性対照を結合する細胞の比較を示す、フローサイトメトリートレース。

【図11】種々の濃度の5E3抗体の存在下および非存在下でのモック対照、可溶性モノマーおよびオリゴマーA1-40と共にインキュベートした細胞の細胞生存の程度を示す、神経毒性分析の結果を視覚的に示す図。

30

【図12】TBS中に均質化し、トリス-トリシゲル中で分画し、pan-A6E10抗体を用いて免疫プロットした脳組織を示す、免疫プロットの結果。

【図13】TBS中に均質化し、トリス-トリシゲル中で分画し、pan-A5E3抗体を用いて免疫プロットした脳組織を示す、免疫プロットの結果。

【図14】抗体5E3存在下(「5E3」)または非存在下(「C」)でのAポリマー化を試験する静的光散乱実験の結果を示す図。

【図15】抗体5E3の重鎖および軽鎖の5'および3'端の読み取り(read)のヌクレオチド配列を示す図。

【発明を実施するための形態】

40

【0039】

(詳しい説明)

概して、本開示は、に由来する新規拘束ペプチドエピトープ(constrained peptide epitope)(以下で「新規エピトープ」または「新規立体構造エピトープ」とも称される)、及び関連する抗体組成物を提供する。新規立体構造エピトープと結合できる抗体は、アルツハイマー病の処置における診断法および治療薬として有効である。に由来する新規拘束ペプチドエピトープは、ADおよび関連する認知症の予防のためのワクチンに有用である。新規立体構造エピトープと結合できる抗体は、アルツハイマー関連の認知症の診断、治療および予防にも有用である。

【0040】

50

本明細書において直接定義されない用語はいずれも、本発明が属する分野において理解されるように、それらの用語に一般に付随する意味を有するものと理解されるべきである。

【0041】

本明細書で用いられる用語「単離された抗体」は、本明細書において、本質的に純粋で、別の抗原特性を有する他の抗体および抗体断片などの無関係の細胞外物質を含まない、新規立体構造エピトープに結合できる抗体を意味する。しかしながら、新規立体構造エピトープに特異的に結合する単離された抗体は、他の抗原との交差反応を有してもよい。当業者であれば、実験条件はいずれかの所定の抗体が特異的な結合を最大にするために最適化されなければならないことは容易に理解するであろう。用語「抗体」は本発明に関する新規立体構造エピトープと特異的に反応するその抗体断片を含むことを意図する。抗体は従来技術を用いて断片化することができ、該断片は上記と同じように有用性についてスクリーニングされる。例えば、断片は抗体をペプシンで処理することによって作製できる。結果として生じる断片をさらに処理し、ジスルフィド結合を還元してもよい。

10

【0042】

本明細書で用いられる用語「被検体」は動物、例えばトリまたは哺乳動物を意味する。具体的な動物には、ラット、マウス、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタまたは霊長類が挙げられる。被検体は、さらにヒトであってもよく、あるいは患者と呼ばれるヒトであってもよい。被検体は、さらにトランスジェニック動物であってもよい。被検体は、さらに齧歯動物、例えばマウスまたはラットであってもよい。

20

【0043】

本明細書で用いられる用語「エピトープ」は、特異抗体または特異抗体の形態を含むものにより認識され得る分子内の領域を意味する。

【0044】

本明細書で用いられる用語「立体構造エピトープ」は、アミノ酸配列が特定の三次元構造を有するエピトープを意味する。立体構造特異エピトープと特異的に結合する抗体は、その立体構造特異エピトープのアミノ酸の空間配置を認識する。

【0045】

本明細書で用いられる用語「A」は別には「アミロイドベータ」、「アミロイド」または「A」とも称されることがある。アミロイドベータは、アルツハイマー病患者の脳内のアミロイドプラークの主成分であると思われる39-43アミノ酸から成るペプチドである。本願明細書のいずれかで記載されるように、オリゴマー化はアルツハイマー病の神経毒性の鍵となる部分であることが示されている。

30

【0046】

本明細書で用いられる用語「より大きな親和性」は、本明細書において、抗体結合の程度を意味し、ここに、ある抗体Xが、標的Zに対するよりも標的Yに対してより強く且つより小さい解離定数でもって結合し、この文脈において、抗体Xは、標的Zに対するよりも、標的Yに対してより大きな親和性を有する。同様に、用語「より小さな親和性」は、本明細書において、抗体結合の程度を意味し、ここに、ある抗体Xが、標的Zに対するよりも標的Yに対してより小さい強さで且つより大きい解離定数でもって結合し、この文脈において、抗体Xは、標的Zに対するよりも、標的Yに対してより小さな親和性を有する。

40

【0047】

本明細書で用いられる用語「モノマー」は、本明細書において、単離された鎖状形態(linear form)のA(X-Y)ペプチド、好ましくは他のAペプチドと本質的に非共有結合相互作用に関係しないA(X-Y)ペプチドの形態を意味する。

【0048】

本明細書で用いられる用語「オリゴマー」は、本明細書において、前駆体Aモノマーが約50未満のモノマーから成る規則的な三次元構造に非共有結合で凝集されている単離された形態のAペプチドを意味する。

50

【0049】

本明細書で用いられる用語「A フィブリル」は、本明細書において、非共有結合で会合した個々のA (X-Y) ペプチドの会合体を含む分子構造であって、電子顕微鏡下で繊維構造を示す分子構造を意味する。繊維構造は典型的には「クロスベータ」構造であり；多量体のサイズに理論上の上限はなく、フィブリルは数千個のモノマーを含み得る。

【0050】

本明細書で用いられる用語「抗原」は、本明細書において、宿主の免疫系を刺激し、液性および/または細胞性抗原特異的応答を生じさせ得る1つ以上のエピトープを含む、タンパク質、ポリペプチド、またはその断片などの分子を意味する。この用語は、用語「免疫原」と交換可能に用いられる。抗イディオタイプ抗体またはその断片、および抗原もしくは抗原決定基を模倣し得る合成ペプチド模倣体などの抗体も、本明細書で用いられる抗原の定義のもとで把握される。同様に、生体内での、例えばDNA免疫適用での抗原決定基を示すオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、本明細書において、抗原の定義に含まれる。

【0051】

本発明のペプチドを記載するのに用いられる命名は、アミノ基を各アミノ酸残基の左に、カルボキシ基を右に表す慣行に従う。本発明の選択された特定の実施形態を示す配列において、アミノ末端およびカルボキシ末端の基は、特に示さないが、それらが生理的なpH値でとる形態であることは、特段の定めがない限り、理解されるであろう。

【0052】

本明細書において、説明を目的として、多くの詳細が、実施形態の完全な理解を提供するために記載される。しかしながら、これらの具体的な詳細は必須でないことは、当業者には明らかであろう。

【0053】

原子レベルのオリゴマーの構造は、溶液および固体状態のパラダイムにおける結晶学およびNMRの限界のために確実に原子レベルで解かれていない。生化学、生物物理学的および免疫化学的データは、モノマーがブロードヘアピン立体ジッパー構造(broad hairpin steric zipper structure)にパッキングされるフィブリル/オリゴマーモデルを示唆する(Luhrs et al. 2005; Sawaya et al. 2007; Rauk 2009)。天然のモノマーペプチドは、凝集の際に、フォールディングおよびヘアピン立体ジッパーの形成を伴う立体構造変化を受けて、オリゴマーA構造が結果的に生じる。(1-42)はシート凝集に対する傾向がより大きい。オリゴマーの詳細な構造は未知であるが、オリゴマー構造は、分子動力学シミュレーション、原子間力顕微鏡およびアミド水素交換測定の実験を用いて特徴づけられた。(1-42)および(1-40)オリゴマーの構造は上記方法を用いて分析された。オリゴマーのストランドの配向が、残基D23とK28の間に分子間塩架橋を含むことは当業者には公知である。この立体配置では、K28残基は実質的に内部に配向してD23とK28との間の塩架橋を形成し、ヘアピンターンを安定化させる(Lurs et al. 2005)およびRauk 2008)。

【0054】

当分野で公知の提案されたAオリゴマー構造に関する検討が、免疫応答を特異的に指令する領域およびAオリゴマー特異抗体を開発し得る領域を特定するために行われた。Aオリゴマーモデルの洞察は、結合に利用可能な溶媒に露出された潜在的に抗体アクセス可能な残基を有する3つの領域、即ちAペプチドのmA b 6E10により認識されるAオリゴマーのN末端(配列番号2として特定されたFRHDSG)(残基4-9)；mA b 4G8により認識されるAオリゴマーペプチドのN末端の第3の混合極性-疎水性(mixed polar-hydrophobic)ドメイン(配列番号3として特定されたLVFFAE DV)(残基17-24)；および残基25-29から成るAオリゴマーペプチドの拘束ターンドメイン(GSNKG)を明らかにした。残基26-28のSNKを含む拘束ターンドメインエピトープの発見は、立体構造上拘束されており、鎖状AまたはAPPには存在しないもののようである。この立体構造上拘束されたエピトープに対する抗体は

、鎖状 A または A P P には結合しないことが期待され、A オリゴマー特異抗体であり得る。

【 0 0 5 5 】

残基 2 5 - 2 9 (C G S N K G C : 配列番号 8) を含むジスルフィド結合した環状ペプチドの分子動力学モデリングの画像取得が行われ；非天然システインがジスルフィド結合のために加えられた。このモデリングは、文献 Lurs et al. (2005) および Rauk (2008) で予測された内側に配向されたリジン 2 8 側鎖に反して、図 4 で示されるようにリジン 2 8 の側鎖が外側に配向されることを明らかにする。このリジン 2 8 残基の外向きの配向という驚くべき発見は、リジン側鎖が溶媒に露出されて、大きく且つ - アミノ基を介して帯電されていることによる、残基 2 5 - 2 9 (C G S N K G C) を含むこの環状ペプチドの 10
高い免疫原性と一致する。少なくとも S N K 残基を含む立体構造上の環状エピトープ (cycle epitope) に対する抗体は、オリゴマーの毒性を効果的に中和することが以下の実施例で示された (図 1 1 を参照のこと)。このリジン 2 8 残基の外向きの配向という驚くべき発見は、抗体アクセス可能な様式では類似してリジン側鎖が溶媒に対して配向を示す信頼できる オリゴマーとも一致する。セリン 2 6、アスパラギン 2 7 およびリジン 2 8 残基の S N K は、オリゴマーのナックル領域に位置し、すべて荷電を有するか極性であり、小さい非極性アミノ酸より大きな免疫原性を有する。オリゴマーのナックル領域に位置する S N K 残基の環状立体構造は、溶媒に露出されており、抗体が結合するのに利用できる新規な立体構造エピトープを形成する。下記の実施例では、結合に関してこの 20
オリゴマーの立体構造上拘束された S N K エピトープの有効性に関する発見を確認する。オリゴマー表面のこの新規な構造的に拘束されたエピトープの発見は、選択的な抗体結合に有利な特性を有する。

【 0 0 5 6 】

新規立体構造エピトープは、S N K エピトープ配列のいずれかの端に位置する天然のグリシンをさらに含んでいてよい。新規立体構造エピトープは、S N K エピトープ配列の両端に天然のグリシン残基をさらに含んでいてよい。1つの態様において、天然のグリシン残基はこの新規立体構造エピトープの免疫原性に限定的な貢献もしくは全く貢献しない。しかしながら、グリシン残基は、ペプチドの環化に内在する幾分かの立体的な力の均衡 (tension) を軽減し得る。アミノ酸構造式において、各残基は一般に、以下の表 1 に従い、アミノ酸の慣用名に対応して 1 文字または 3 文字表記により示すことができる。 30

【 0 0 5 7 】

表 1 : 天然のペプチドに一般的に見出される 2 0 個の標準的な L アミノ酸の命名および略語。

【表 1】

アミノ酸のフルネーム	3文字略語	1文字略語
Alanine	Ala	A
Cysteine	Cys	C
Aspartic acid	Asp	D
Glutamic acid	Glu	E
Phenylalanine	Phe	F
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Methionine	Met	M
Asparagine	Asp	N
Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	T

10

20

【0058】

エピトープは、溶媒に露出され且つ A オリゴマー表面で構造的に拘束された強い極性 / 荷電残基から成る。エピトープは、環状の拘束された立体配置において少なくとも残基 26 - 28 の S N K から成る。他の態様において、エピトープは環状の拘束された立体配置において残基 25 - 28 の G S N K から成る。さらなる態様において、エピトープは環状の拘束された立体配置において残基 26 - 29 の S N K G から成る。他の態様において、エピトープは環状の拘束された立体配置において残基 25 - 29 の G S N K G (配列番号 1) から成る。

30

【0059】

1つの態様において、新規立体構造特異エピトープの構造は、アミノ酸残基の比較的堅い (rigid) 立体配置に依存する。

【0060】

公知の抗体 6 E 1 0 および 4 G 8 それぞれを結合し、A オリゴマーの溶媒に露出した表面および親タンパク質 A P P の発現を支持する細胞 (ニューロンと単球の両方) の表面に現れる、配列番号 2 および配列番号 3 として特定された公知のエピトープとは対照的に、拘束された環状立体配置を有する新規立体構造エピトープは、A P P の分子表面には存在せず、かくして A P P の自己免疫認識を制限する。ニューロンおよび単球の細胞表面に位置する A P P の G S N K G モチーフは十分に構造化されていない。拘束された環状立体配置を有する新規立体構造エピトープに結合する立体構造特異抗体は、以下の実施例で示されるさように、細胞表面の A P P 上の構造化されていない G S N K G モチーフを限定的に認識するか又は認識しない。この新規立体構造エピトープを認識する抗体は、モノマー A に対して殆ど若しくは全く認識を示さない。他の態様において、新規立体構造エピトープを認識する抗体は、エピトープの立体的な込み具合 (crowding) および / または好ま

40

50

しくない態様のために、フィブリル A に対して殆ど若しくは全く認識を示さない。

【 0 0 6 1 】

新規立体構造エピトープに対する抗体は、本開示の他の態様において提供される。分析は、拘束された環状立体配置を有する新規立体構造エピトープに結合する抗体が A オリゴマーのアミノ酸 25 - 29 の領域におけるサブユニット間の非鎖状エピトープ構造を認識することを示す。この新規立体構造エピトープに対する抗体の特異性は、前記抗体が A

オリゴマー形態を特異的に標的化することを可能にし、それにより、神経や免疫機能に影響を及ぼすことが知られていモノマー A や A P P を標的とすることを避けることができ、並びにモノマー A がオリゴマー A よりも大量に存在するため、抗体の結合に対する有用性は増大する。

10

【 0 0 6 2 】

新規立体構造エピトープに結合できる抗体は、アルツハイマー病の処置における診断薬と治療薬の両方に有用であり、A D 予防のためのワクチンが本発明の他の態様において提供される。

【 0 0 6 3 】

本明細書中で記載されるように A 由来の新規立体構造エピトープを含む環状ペプチドに特異的に結合する抗体は、前記新規立体構造エピトープを含むジスルフィド環状ペプチドから合成された抗体を含む。

【 0 0 6 4 】

治療としての使用に関し、A 由来の環状ペプチドであって、オリゴマー A のナックル領域に対応する少なくとも S N K のアミノ酸配列を有する立体構造エピトープを含む環状ペプチドと特異的に結合する抗体は、標準的な広く確立された抗体産生方法を用いて作製することができる。治療組成物は、A 由来の環状ペプチドであって、オリゴマー A のナックル領域に対応する少なくとも S N K のアミノ酸配列を有するエピトープを含む環状ペプチドと特異的に結合する抗体と、医薬上許容されるアジュバントを組合せて含む。そのような治療用組成物は、アルツハイマー病を処置または予防することを必要とする患者に投与することがきでる。1つの態様において、そのような治療用組成物は、アルツハイマー病の発症を遅延させ得る。

20

【 0 0 6 5 】

表現「医薬上許容される」は、医薬および獣医学分野での使用に許容されること、即ち許容されない毒性または他の不適當さが無いことを意味する。医薬上許容されるアジュバントの例は、ペプチド・ベースの薬に慣用されるもの、例えば希釈剤、賦形剤などがある。参照は、一般的な医薬製剤に対するガイダンスに関しては、"Remington's: The Science and Practice of Pharmacy", 21st Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005を参照することができる。アジュバントの選択は、組成物の意図された投与モードに依存する。本発明の1つの実施形態において、組成物は、点滴または皮下、筋注もしくは静脈注による投与用に製剤化され、したがって、滅菌および発熱性物質フリーの形態の水溶液として利用され、および所望により緩衝または等張されてよい。このように、組成物は、蒸留水、またはより望ましくは食塩水、リン酸緩衝塩水または5%デキストロース溶液中にて投与することができる。錠剤、カプセル剤または懸濁剤による経口投与のための組成物は、糖、例えばラクトース、グルコースおよびスクロース；澱粉、例えばコーンスターチおよびジャガイモ澱粉；セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロース；粉末トラガカント；モルト；ゼラチン；タルク；ステアリン酸；ステアリン酸マグネシウム；硫酸カルシウム；植物油、例えば落花生油、綿実油、胡麻油、オリーブ油およびトウモロコシ油；ポリオール、例えばプロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール；寒天；アルギン酸；水；等張食塩水およびリン酸緩衝液を用いて調製される。湿潤剤、潤滑油、例えばラウリル硫酸ナトリウム、スタビライザ、打錠剤 (tableting agent)、抗酸化剤、防腐剤、着色剤および風味量が存在してもよい。クリーム、ローションおよび軟膏は、適当なベース、例えばトリグリセリド・ベースを用いて、局所適用のため

30

40

50

に調剤され得る。そのようなクリーム、ローションおよび軟膏は界面活性剤を含有してもよい。エアゾール製剤、例えば経鼻送達用のエアロゾール製剤もまた調製されてよく、それらには適切なプロペラント・アジュバントが使用されてよい。投与される方法に拘らず、他のアジュバントも組成物に添加されてよく、例えば抗菌性物質が長期の貯蔵期間を越えて微生物成長を予防するために組成物に添加されてよい。治療用組成物は、概して製造および貯蔵の条件下で無菌かつ安定でなければならない。

【0066】

ワクチンとしての使用に関して、オリゴマーAのナックル領域に対応する少なくともS N Kのアミノ酸配列を有する立体構造上拘束されたエピトープを含む抗原ペプチドは、医薬上許容されるアジュバントと組合せて投与された場合に、オリゴマーAを特異的に標的化する抗体を産生する。これらの抗体は、オリゴマーのナックル領域に対応する少なくともS N Kのアミノ酸配列を有するエピトープに特異的に結合する。ワクチンは、オリゴマーAのナックル領域に対応する少なくともS N Kのアミノ酸配列を有する立体構造上拘束されたエピトープを含む抗原ペプチドを医薬上許容されるアジュバントと組合せて含む。ワクチンは、オリゴマーの中和を通じて脳アミロイドの発生を妨げ、ADの発現を妨げるよう作用する。オリゴマーが阻止される場合、それらの関連する毒性は阻止される。そのような毒性は、例えばシナプス機能不全および神経細胞死を含み得る。他の態様において、上記のワクチン投与に際して産生される抗体は、モノマーAの毒性のオリゴマーA形態への凝集を遅延させるので、オリゴマーの増幅を遅延させる。更なる態様において、上記のワクチンの投与に際して産生される抗体は、モノマーAの毒性のオリゴマーA形態への凝集を阻止するので、オリゴマーAの増幅を阻止する。

【0067】

医薬上許容されるアジュバントの例としては、水酸化アルミニウム、ミョウバン、アルハイドロゲル（Alhydrogel（登録商標）：アルミニウム三水和物）または他のアルミニウム含有塩類、ピロゾーム、C p Gモチーフを含む核酸、スクアレン、油、M F 5 9、Q S 2 1、さまざまなサポニン、ウイルス様粒子、モノホスホリル・リビッドAノトレハロース・ジコリノミラート、t o l l様受容体アゴニスト、コポリマー、例えばポリオキシプロピレンおよびポリオキシエチレンなどを含む。

【0068】

ワクチンは、進行性アルツハイマー病のリスクのある患者集団、例えば高齢集団、公知のAD促進性の変異を保有する「リスク」個人の既知集団に投与することができる。

【0069】

1つの実施形態において、ワクチンによる処置に関し、被検体は、1日1回、1週1回、1月1回、1年1回、10年1回まで様々であってよいスケジュールで免疫される。典型的なレジメンは、6週間隔でブースター注射される免疫を含む。他のレジメンは、1、2および12ヵ月後にブースター注射する免疫から成る。あるいは、ブースター注射は被検体の免疫反応および生理条件に応じて変更し得る。免疫に関して、抗オリゴマーワクチンは、処置あたり約0.0001マイクログラム～10グラム、約0.01マイクログラム～約1グラム、約1マイクログラム～約1mgおよび約100～250マイクログラムの範囲の投与量で投与し得る。1つの実施形態において、処置を施すタイミングは以下の1つ以上である：0ヵ月、2ヵ月、6ヵ月、9ヵ月および/または12ヵ月。1つのレジメンにおいて、投薬は第1免疫化後、2、6、9および12ヵ月である。他のレジメンにおいて、投薬は第1免疫化に続き2および4週で、その後は毎月である。他のレジメンにおいて、投薬は先の免疫に対する被検体の生理条件および/または被検体への反応に応じて変化する。投与経路は、限定するものではないが、随意に筋肉内および腹膜内注射を含む。1つの実施形態において、組成物は三角筋に注射される。

【0070】

診断または処置応答バイオマーカーとして使用するために、適切な生体試料を患者から単離する；前記試料を、オリゴマーAのナックル領域に対応する少なくともS N Kのアミノ酸配列を有するエピトープを含むA由来の環状ペプチドに特異的に結合する抗体と

、抗原／抗体複合体の形成を可能にするのに適した条件下である時間の間接触させる；および前記複合体の存在を検出する。複合体が検出される場合、ADの診断の兆候がその患者にある。この目的のための適切な生体試料は、組織、細胞およびバイオ液体、例えば脳脊髄液（CSF）と血液を含む。

【0071】

使用する場合、新規立体構造エピトープに結合する抗体はADにおいて大きな診断価値がある。本発明の抗体またはワクチン組成物による処置の候補となる被検体の特定を支援するために、本発明はさらに、試験管内または生体内診断法によるエピトープの検出を提供する。

【0072】

いずれかの所定の試料中のオリゴマーの存在を検出するために、本発明は、オリゴマーを含む疑いのある試料を、モノマーAおよびAPPと比較してオリゴマーAに独特に存在する新規立体構造エピトープに選択的に結合する抗体または結合断片を用いて処理し、抗原：抗体複合体が形成されたかどうかを決定し、ここで、その形成が、試料中にオリゴマーAが存在することの指標である、検出方法を提供する。抗原：抗体複合体の存在が患者におけるADの診断をさらに示す。

【0073】

試験管内で適用される場合、検出方法は、被検体、通常ADを有する疑いのある被検体由来の体液または組織または器官試料の生体試料の分析を伴う。組織または器官試料、例えば固体もしくは半固体組織または器官から得られる試料は、消化、抽出または他の方法で液体の状態にしてもよい。生体試料または試料群は、被検体から適当な時期に、例えば被検体がADもしくは関連する認知症を有すると診断される前またはそれらを有することが疑われる前、該疾患または障害の症状の処置または緩和のための治療レジメンの間、被検体の死後（その原因または疑わし原因に関わりなく）に採取することができる。あるいは、生体試料は、提供された体液または組織を含み、例えば濃縮血液の供給組織または機関の場合には血液、血漿または血小板を含んでもよい。

【0074】

該抗体が検出可能な抗原：抗体複合体を形成した場合、試料中のオリゴマーAの存在が確認される。そのような複合体の形成は、様々なプロトコル、例えばELISA、RIA、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、免疫組織化学および類似のプロトコルを用いて決定することができる。試料中の複合体、それによる新規立体構造エピトープの存在を明らかにするために、抗体は望ましくは、視覚的にまたは機器の補助のいずれかにより検出可能な試薬にコンジュゲートまたはカップリングすることにより標識した抗体として提供される。当該試薬または標識は、直接または間接的に検出可能なシグナルを生成することができる。例えば、標識は放射線不透過体または放射性同位元素、例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I ；蛍光（発蛍光団）または化学発光（発色団）化合物、例えばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミンまたはルシフェリン；酵素、例えばアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼ；イメージング剤；あるいは金属イオンであってよい。あるいは、新規立体構造エピトープは、エピトープ抗体に結合する標識化二次試薬、例えばエピトープ抗体に結合する標識化抗体を用いて明らかにすることができ、間接的にエピトープの存在が明らかになる。抗原：抗体複合体の存在は、2つの試薬が溶液中にあることを要求しない間接的な方法により検出されてもよい。例えば、複合体はフローサイトメトリーを用いて間接的に検出可能であり、ここで、抗体は未処理の細胞（intact cell）表面上に存在するエピトープに結合して抗体：抗原複合体を形成する。抗原：抗体複合体は、抗体ベースでない方法、例えばサイズ、電荷および運動度に基づいてタンパク質を篩い分ける方法、例えば電気泳動、クロマトグラフィ、質量分析および類似の方法により特定することもできる。

【0075】

関連した実施形態において、本発明の標識化抗体またはその結合断片の標識化形態は、

10

20

30

40

50

生体内で、抗体が結合するオリゴマー の存在を画像化するのに用いることができる。この目的で、本発明は、生体内イメージングに有用な試薬、例えばテクネチウム、ガドリニウムなどの同位元素と連結された形式の抗体または断片を提供する。

【0076】

他の態様において、製造品（コマーシャルパッケージとも称する）は、包装材料および医薬品組成物を含んで提供される。組成物は、薬学的に許容されるアジュバントおよび

由来の環状ペプチドに特異的に結合する高次構造感受性の抗体の治療上の有効量を含み、前記環状ペプチドはオリゴマー のナックル領域に対応する少なくともS N Kのアミノ酸配列を有するエピトープを含む。包装材料は、その組成物がアルツハイマー病を処置するために有用であることを示すラベルが付されてもよい。包装材料は、医薬品を包装するのに一般に用いられるいずれかの適切な材料であってよく、例えば、ガラス、プラスチック、ホイルおよびボール紙を含む。

10

【0077】

他の態様において、製造品は、包装材料および医薬品組成物を含んで提供される。組成物は、本明細書中で提供されるように、オリゴマー のナックル領域に対応する少なくともS N Kのアミノ酸配列を有する立体構造上拘束されたエピトープを含むペプチドを、医薬上許容されるアジュバントと組合せて含む。組成物は、生理的に又は薬学的に許容される賦形剤を含んでもよく、包装材料は組成物の活性成分（例えばペプチド）を示すラベルを含んでいてもよい。ラベルは、組成物の意図された使用、例えば処置試薬もしくは予防試薬としてか、または、オリゴマー に特異的な抗血清もしくは抗体を産生することを目的として被検体での免疫応答を惹起させる組成物としての意図された使用を更に含んでいてもよく、本明細書中で記載されるようにキットで使用される。

20

【0078】

さらなる実施形態において、オリゴマー A の特定のための高次構造感受性の抗体を産生もしくはスクリーニングするための化合物または組成物の使用説明書と共に、本明細書で提供されるペプチドを含む組成物を含むキットが提供される。キットは、オリゴマー

特異抗体または抗血清の産生および/または同定に有用であり得るし、説明書は、例えば、服用濃度、服用間隔、好ましい投与方法、免疫学的スクリーニングもしくは試験方法またはそれに類する情報を含んでもよい。

【0079】

30

他の実施形態において、その使用説明書と共に、本明細書で提供される1つ以上のペプチドを含む組成物を含む、医薬調製用のキットが提供される。説明書は、医薬が投与された被検体における治療上もしくは予防上の免疫応答を惹起するのに有用な医薬を調製するための一連の工程を含んでいてもよい。キットは、A Dの1つ以上の症状または関連する認知症の治療、予防または改善のための処置における医薬の使用説明書、例えば服用濃度、服用間隔、好ましくは投与方法などをさらに含んでいてもよい。

【0080】

他の実施形態において、A Dまたは関する認知症を診断するためのキットが提供される。キットは、その使用説明書と共に、本明細書に記載の立体構造感受性の抗体および選択的抗体または抗血清を1つ以上含む。抗体は、さらに検出試薬にカップリングされていてよい。検出試薬の例としては、二次抗体、例えば抗マウス抗体、抗ウサギ抗体またはその類似のものを含む。そのような二次抗体は、適切な基質が提供された場合に検出可能な比色反応または化学発光反応を与える酵素にカップリングされてよい。キットは、検出反応を実行するための試薬、例えばプロテインゼンなどの酵素、ブロッキングバッファ、ホモジナイズ・バッファ、抽出バッファ、希釈剤バッファまたは類似のものをさらに含んでいてよい。

40

【0081】

他の実施形態において、生体試料中のオリゴマー A の存在を検出するためのキットが提供される。キットは、その使用説明書と共に、オリゴマー A に特異的に結合する高次構造感受性の抗体または抗血清を1つ以上含む。抗体は、さらに検出可能な試薬とカップ

50

リングされていてよい。検出試薬の例としては、二次抗体、例えば抗マウス抗体、抗ウサギ抗体またはその類似のものを含む。そのような二次抗体は、適切な基質が提供された場合に検出可能な比色反応または化学発光反応を与える酵素とカップリングされてよい。キットは、検出反応を実行するための試薬、例えばプロテインアーゼKなどの酵素、ブロッキングバッファ、ホモジナイズ・バッファ、抽出バッファ、希釈剤バッファまたは類似のものをさらに含んでいてよい。

【0082】

従来の方法は、高次構造感光性の抗体、例えばポリクローナル抗血清またはモノクローナル抗体を調製するために用いることができる。ポリクローナル抗体を産生するために、哺乳動物（例えばマウス、ハムスターまたはウサギ）を、該哺乳動物における抗体応答を惹起させる免疫原形態の新規立体構造エピトープを用いて免疫することができる。例えば、新規立体構造エピトープ配列を含むジスルフィド架橋した環状ペプチドを、このペプチドのN末端およびC末端のシステイン間のジスルフィド結合を用いてループ構造に拘束することができる。このジスルフィド架橋した環状ペプチドは、従来技術を用いて合成することができ、そして哺乳類に導入することができる。

10

【0083】

ペプチドに免疫原性を与えるための技術は、当該分野で周知であり、例えば担体へのコンジュゲーションを含む。ペプチドは、アジュバントの存在下で投与してもよい。免疫の進行は、血漿または血清中の抗体力価の検出によりモニタすることができる。標準的なELISAまたは他の免疫アッセイ手順を抗原としての免疫原と共に用いて、抗体レベルを評価することができる。免疫に続いて、抗血清を得ることができ、そして所望により該血清からポリクローナル抗体を単離することができる。

20

【0084】

モノクローナル抗体を産生するために、抗体産生細胞（Bリンパ球）を免疫した動物から採取し、標準的な体細胞融合手順により不死のミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる。このような技術は当該分野において周知であり（例えば、ハイブリドーマ技術は最初はKohlerおよびMilsteinにより開発された(Nature 256, 495-497(1975))、同様に他の技術、例えばB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., Immunol. Today 4, 72 (1983))、ヒトモノクローナル抗体を産生するEBVハイブリドーマ技術(Cole et al., Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) Allen R. Bliss, Inc., pages 77-96)、および立体構造抗体ライブラリーのスクリーニング(Huse et al., Science 246, 1275 (1989))も開発された。ハイブリドーマ細胞は、選択した新規高次構造エピトープと特異的な反応性のある抗体の産生のために免疫化学的にスクリーニングし、モノクローナル抗体を単離することができる。

30

【0085】

典型的な抗体は、2つの免疫グロブリン(Ig)“重鎖”および2つのIg“軽鎖”から成り、一般にY字型の高次構造をとるものと考えられている。抗体のクラスまたはアイソタイプを特定する種々異なる形態の重鎖が存在する。5種類の哺乳動物の免疫グロブリン重鎖が存在し： γ 、 μ 、 δ 、 α および ϵ 、これらは、免疫グロブリンのクラスをそれぞれ規定する：IgG、IgD、IgA、IgMおよびIgE。哺乳動物では2種類の軽鎖がある：カッパ(κ)鎖およびラムダ(λ)鎖。

40

【0086】

各重鎖は以下の2つの領域を有する：同じクラスの免疫グロブリンでは全て同じであるが、クラス間では相違する定常領域（重鎖 γ 、 μ および δ は、3つタンデム免疫グロブリンドメイン(CH1、CH2、CH3)から成る定常領域を有するが、付加される柔軟性に関するヒンジ領域も有する；重鎖 α および ϵ は、4つのドメインから成る定常領域を有する）；および異なるB細胞間では相違するが、同じB細胞もしくはB細胞クローンで産生される免疫グロブリンでは全て同じである可変領域(VH)。いずれの重鎖の可変領域も、単一の免疫グロブリンドメインから成る。これらのドメインは約110アミノ酸長である。

50

【 0 0 8 7 】

各軽鎖は2つのタンデム免疫グロブリンドメインから成る：1つの定常領域（C L）；および抗原を結合するのに重要な1つの可変領域（V L）。

【 0 0 8 8 】

幾つかの抗体部分は特有の機能を有する。例えば、「Y字」の腕は、2つの抗原（概して同一のもの）を結合することができ、かくして、特定の異物を認識することができる部位を有する。この抗体の領域は、「F a b」（fragment, antigen binding）領域と称される。それは、抗体の各重鎖および軽鎖由来の1つの定常領域と1つの改変領域から成る。「パラトープ」は重鎖および軽鎖由来の可変領域側の抗体単量体のアミノ末端で形成される。可変領域は、F V領域とも称され、抗原に結合するにあつたて最も重要な領域である。より詳細には、ストランドの可変ループ、軽鎖（V L）および重鎖（V H）上にそれぞれ3つのループが抗原に対する結合に役割を果たす。これらのループは、相補性決定領域（C D R s）と称される。

10

【 0 0 8 9 】

相補性決定領域（C D R s）は、これらのタンパク質が抗原の形状を補完する抗体内の領域である。したがって、C D R sはタンパク質の親和性および特定の抗原に対する特異性を決定する。C D R sは、この分子の最も可変的な部分であり、これらの分子の多様性に寄与し、抗体が膨大なレパートリーの抗原を認識することを可能にする。

【 0 0 9 0 】

抗原レセプターの可変領域のアミノ酸配列には、3つのC D R s（C D R 1、C D R 2 およびC D R 3）が非連続的に配置されている。抗原レセプターは典型的には2つの可変領域（2つの異なるポリペプチド鎖、重鎖および軽鎖上の）から成るため、集合的に抗原と接触することとなり得る各抗原レセプターには6つのC D R sがある。単一の抗体分子は、2つの抗原レセプターを有し、従って、抗体分子は12のC D R sを含む。

20

【 0 0 9 1 】

一般的な「Y」字型の抗体のベースは、免疫細胞活性を調整する役割を有する。この領域は、F c（Fragment, crystallizable）領域と称され、抗体のクラスに依存する2または3の定常領域に寄与する2つの重鎖から成る。このF c領域は、特定のクラスのF c受容体、および他の免疫分子、例えば補体タンパク質に結合することにより、抗体が所定の抗原に対して適当な免疫応答を生成することを保証する。これを行うことにより、抗体は、異なる生理学的効果、例えばオプソニン化される粒子の認識、細胞の溶解、または肥満細胞、好塩基球もしくは好酸球の脱顆粒を媒介する。

30

【 0 0 9 2 】

アミノ酸配列において指定されるC D R sに関する方法はたくさんある。「カバット（Kabat）」定義は、配列の変動性に基づいて、最も一般的に用いられる。「コチア（Chothia）」定義は構造ループ領域の位置に基づく。「A b M」定義は、オックスフォード・モレキュラーA b M抗体モデリング・ソフトウェアにより用いられる2つの定義の折衷法である。「接触（contact）」定義は、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。

【 0 0 9 3 】

当業者であれば、公知のパターンおよび配列アライメント方法を用いて、C D R sを含むいずれかの所定の配列中のC D R sを容易に特定できるであろう。他の態様において、当業者に既知のモデリングまたは他の方法もまたC D Rの特定に用いることができる。当該分野には抗体の配列中のC D R sを特定する際に当業者を支援するための、周知のガイドライン、例えば以下のウェブサイト（<http://www.bioinf.org.uk/abs/>）に提示されたものがある。

40

【 0 0 9 4 】

5 E 3抗体の重鎖および軽鎖が配列決定された。この重鎖配列および軽鎖配列は、図15で特定された配列に相当する。当業者であれば、抗原結合の決定要素である上記配列部分を他の抗体フレームワークに移し変え、例えば「キメラ」もしくは「ヒト化」抗体を生成することができることは理解できるであろう。

50

【 0 0 9 5 】

当業者は、図 1 5 で示される 5 ' 配列および 3 ' 配列の読み取り (read) をアライメントし、コンセンサス配列を容易に作り出すことができ (例えば、利用可能なソフトウェア・パッケージ、例えば G C G またはシーケンサー (Sequencer) を用いて)、そして、不一致を解消するために要求される配列トレースを試験することができる。残りの不一致はどのようなものでも再度の配列決定により解決し得る。不一致、例えばヌクレオチド配列の中程のストップコドンは、明らかなヌクレオチドの読み間違い (misread) として当業者には知られている。アミノ酸およびヌクレオチドを配列決定する場合に、配列決定方法が 1 以上の塩基を不正確にコールした場合、その配列決定エラーまたはミスコールが生じることとなり、不正確な読み取りとなることは当該分野で周知である。分子生物学の変動のため、研究室ベースの D N A 配列決定方法は完全に正確というわけではなく、それらは機械で稀に塩基をミスコールすることがよく知られている。そのようなミスコールは、その配列の読み取りを他の読み取りまたはリファレンスに対してアライメントした場合に明らかになる。

10

【 0 0 9 6 】

「キメラ」抗体も本発明の範囲にあると考えられる。キメラ抗体は、2つの異なる抗体由来の配列を含み得る。それらは、2つの異なる種由来の抗体の配列を含んでいてもよい。キメラ抗体分子は、例えば、マウス、ラットまたは他の種由来の抗体の抗原結合ドメインをヒトの定常ペプチド領域と共に含み得る。従来法を用いて、本発明の新規立体構造エпитーブを認識する免疫グロブリン可変領域を含むキメラ抗体を作製することができる (例

20

【 0 0 9 7 】

「ヒト化抗体」は、非ヒト種由来の抗体配列を含み、そのタンパク質配列は、ヒトで天然に産生される抗体バリエーションに対する類似性を増大させるように改変されている。幾つかの場合に、これらヒト化抗体は、キメラ抗体の特定のサブセットと考えることができる。しかしながら、「ヒト化」は単純なキメラの生成とは通常、別のものと理解される。そうは言っても、ヒト化プロセスは、マウス - ヒトキメラの生成を最初の工程を含み得る (例

例えば、マウス F a b をヒト F c に再接合 (splice) してもよい)。その後、そのキメラを、分子の F a b 部分におけるアミノ酸配列の選択的な改変によって、さらにヒト化してもよい。このプロセスは、抗体が最初に創り出された特性を維持するために、通常「選択的」である。例えば、C D R 部分を除いて、ヒトの F a b 配列と異なる F a b 配列部分は、適当な個々のアミノ酸を交換することによって変異させることができる。これは、突然変異誘導を用いる D N A レベルで達成される。キメラ中間体を生成することなく、ヒト化抗体を生産することは可能である。ヒト化抗体の「直接的」な生成は、適切な C D R コーディング・セグメント (望ましい結合特性に関与する) をヒト抗体「スキャホールド」中に挿入することによって達成することができる。上記のように、これは適当なベクターを用いる組換え D N A 法および哺乳動物細胞での発現を通じて達成される。すなわち、抗体が所望の特性を示す (例えば) マウスで産生された後に、その抗体をコードする D N A を単離し、ベクター中にクローニングし、配列決定してもよい。抗体 C D R に対応する D N A 配列を、その後決定してもよい。所望の C D R の正確な配列が分かれば、これらの配列をヒト抗体バリエーション用の D N A を含有するコンストラクトに適当に挿入するストラテジーを考案することができる。このストラテジーは、C D R 配列の読み取りに基づく直鎖 D N A 断片の合成を使用してもよい。多様性ライブラリ (Diversity libraries) は、合成多様性含有 (diversity-containing) オリゴヌクレオチド・プライマーを使用して生成することができる。結果として生じるクローンのプールを、既知の方法を用いて更にスクリーニングし、最適化されたヒト化抗体クローンを特定してもよい。

30

40

【 0 0 9 8 】

50

幾つかの実施形態において、本明細書に記載の本発明に関する新規立体構造エピトープと特異的な反応性を有するモノクローナル抗体またはキメラ抗体は、ヒト定常領域のキメラを産生することにより更にヒト化することができ、その可変領域の一部、特に抗原結合ドメインの保存されたフレームワーク領域はヒト起源であり、超可変領域のみが非ヒト起源である。そのような免疫グロブリン分子は当分野で公知の技術により作製することができる（例えば、Teng et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 7308-7312 (1983); Kozbor et al., Immunology Today, 4, 7279 (1983); Olsson et al., Meth. Enzymol., 92, 3-16 (1982) 及び P C T 公開公報 W O 9 2 / 0 6 1 9 3 または欧州特許公報 E P 0 2 3 9 4 0 0 ）。ヒト化抗体は、商業的に生産することもできる（Scotgen Limited, 2 Hol ly Road, Twickenham, Middlesex, Great. Britain）。

10

【 0 0 9 9 】

1つの態様において、5 E 3 の重鎖および/または軽鎖配列を含むキメラ抗体またはヒト化抗体、その一部または複数の部分が提供される。その部分は、抗原結合に関する決定基であり得る。幾つかの実施形態において、決定基は、5 E 3 の C D R 配列を含み得る。当該抗体は、5 E 3 と同じエピトープと結合する。それらは、5 E 3 により結合されるエピトープと少なくとも部分的に重複するエピトープに結合してもよい。

【 0 1 0 0 】

幾つかの実施形態において、キメラ抗体またはヒト化抗体は、5 E 3 の C D R 配列と実質的に同一の C D R 配列を含んでいてもよい。幾つかの実施形態において、抗体は、5 E 3 の配列と比較して、保存的配列変化があってもよい。

20

【 0 1 0 1 】

一般のアミノ酸の間での「保存的アミノ酸置換」は、以下の群の各々の中でのアミノ酸間の置換により例証される：（1）グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン、（2）フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン、（3）セリンおよびトレオニン、（4）アスパラギン酸塩およびグルタミン酸塩、（5）グルタミンおよびアスパラギン、（6）リジン、アルギニンおよびヒスチジン。

【 0 1 0 2 】

当分野で周知の B L O S U M 6 2 表は、タンパク質配列セグメントの約 2 , 0 0 0 のローカルマルチプルアライメントに由来するアミノ酸置換マトリックスであり、関連タンパク質の 5 0 0 超のグループの非常に保全された領域を表す（Henikoff and Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)）。したがって、B L O S U M 6 2 置換頻度は、本発明のアミノ酸配列に導入され得る保存的アミノ酸置換を定義するのに用いることができる。単に化学的性質（上記のように）だけに基づくアミノ酸置換を設計することは可能であるが、用語「保存的アミノ酸置換」は好ましくは - 1 超の B L O S U M 6 2 値によって表される置換を意味する。例えば、アミノ酸置換が 0、1、2 または 3 の B L O S U M 6 2 値によって特徴づけられる場合、アミノ酸置換は保存的である。このシステムによれば、好ましい保存的アミノ酸置換は少なくとも 1（例えば 1、2 または 3）の B L O S U M 6 2 値によって特徴づけられるが、より好ましい保存的アミノ酸置換は、少なくとも 2（例えば 2 または 3）の B L O S U M 6 2 値によって特徴づけられる。

30

【 0 1 0 3 】

幾つかの実施形態において、抗体は、5 E 3 の C D R 配列と少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 % または少なくとも 9 0 % 同一の C D R 配列を含み得る。それらは、5 E 3 の C D R 配列と少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % または 9 9 % 超同一であってもよい。

40

【 0 1 0 4 】

抗体の製作に用いられる標準な組換え D N A 技術および分子クローン技術は、当該分野で周知であり、より完全には、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989（以下「Sambrook」と称する）に記載されている。

50

【 0 1 0 5 】

用語「組換え」は、2つの別の分離された配列セグメントの人工的な組合せ、例えば化学合成による、又は遺伝子工学技術による核酸の単離されたセグメント操作による組合せを意味する。

【 0 1 0 6 】

本発明の幾つかの実施形態の組成物または化合物の投与量は、投与経路（経口、静脈、吸入またはその他のもの）及び前記組成物または化合物を投与する形態（溶液、徐放又はその他のもの）に応じて変化し得る。適当な投与量の決定は、当業者の能力の範囲にある。

【 0 1 0 7 】

「医薬上許容される担体」は、いずれか及びすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、ならびに生理的に適合するその他のものを含む。医薬上許容される担体の例は、1つ以上の水、食塩、リン酸緩衝食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、及びそれらの組合せを含む。多くの場合、等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物に含むことが好ましい。医薬上許容される担体は、抗体または抗体部分の棚寿命または有効性を増強する、微量の補助剤、例えば湿潤剤または乳化剤、防腐剤または緩衝剤をさらに含んでもよい。

【 0 1 0 8 】

本発明の医薬組成物は、「有効量」、「治療上の有効量」または「予防上の有効量」の本発明の抗体または抗体部分を含んでもよい。「治療上の有効量」は、所望の治療結果を達成するために必要な投与量および期間での有効な量を意味する。抗体または抗体部分の治療上の有効量は、当業者により決定され得るものであり、個人の疾患の状態、年齢、性別及び体重などの要素、並びに個人における望ましい応答を誘発する抗体または抗体部分の能力に応じて変化し得る。治療上の有効量は、抗体または抗体部分の毒作用または有害効果のいずれかより治療上の有益な効果が勝る量でもある。「予防上の有効量」は、所望の予防上の結果を達成するのに必要な投与量および期間での有効な量を意味する。典型的には、予防上の用量は疾患前もしくは初期に用いられるため、予防上の有効量は治療上の有効量より少ないであろう。有効量は、量あたりの量の基準（例えば、被検体のキログラムあたりのマイクログラムもしくはミリグラム）で算出され得るか、又は容積あたりの量の基準（例えば、濃度、ミリリットルあたりのマイクログラムもしくはミリグラム）で算出され得る。容積あたりの量の単位を用いる場合、抗体は、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 約 $20 \text{mg}/\text{ml}$ の量で、又はそれらの間のいずれかの量、例えば、0.1、0.5、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000、5000、10000、20000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、若しくはそれらの間のいずれかの量；約 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 約 $2000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又はそれらの間のいずれかの量、例えば、1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、若しくはそれらの間の量；あるいは約 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 約 $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 又はそれらの間のいずれかの量、例えば10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又はそれらの間の量；あるいは約 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 約 $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又はそれらの間のいずれかの量、例えば、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の量で存在してもよい。

【 0 1 0 9 】

量および/または濃度は、量/量の基準（例えば被検体のキログラムあたりのマイクログラムまたはミリグラム）で算出されてよく、又は量/容積の基準（例えば、濃度、ミリリットルあたりのマイクログラムまたはミリグラム）で算出されてもよい。量/容積の単位を用いる場合、抗体またはペプチドは、約0.1 mg/ml～約20 mg/ml、若しくはそれらの間のいずれかの量、例えば0.1、0.5、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000、5000、10000、20000 $\mu\text{g/ml}$ 、もしくはそれらの間のいずれかの量、又は約1 $\mu\text{g/ml}$ ～約2000 $\mu\text{g/ml}$ 、もしくはそれらの間のいずれかの量、例えば1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000 $\mu\text{g/ml}$ 、もしくはそれらの間のいずれかの量、又は約10 $\mu\text{g/ml}$ ～約1000 $\mu\text{g/ml}$ 、若しくはそれらの間のいずれかの量、例えば、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g/ml}$ 、若しくはそれらの間のいずれかの量、又は約30 $\mu\text{g/ml}$ ～約1000 $\mu\text{g/ml}$ 、若しくはそれらの間のいずれかの量、例えば、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g/ml}$ の量で存在してもよい。

【0110】

本発明の抗体は、例えば、非経口投与に適した医薬組成物中に組み込まれていてもよい。好ましくは、抗体は、有効量の抗体を含有する注射可能な溶液として調製され得る。注射可能な溶液は、フリント（flint）またはアンバー（amber）バイアル、アンプルまたは充填済みのシリンジ中の、液体または凍結乾燥剤形のいずれかで構成されてよい。いずれかの適切な緩衝剤を、医薬組成物の調製に用いてもよい。緩衝剤の例としては、限定するものではないが、琥珀酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウムを含む。凍結防止剤および増量剤は、凍結乾燥剤形に含めてもよい。安定剤を、液剤および凍結乾燥剤形に用いてもよい。

【0111】

本発明の様々な実施形態に係る組成物は、治療組成物を含め、有効量の抗体またはペプチドを含む投薬として投与することができる。投与量は、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ ～約20 mg/kg（被検体の重量に基づく）、例えば0.1、0.5、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000、5000、10000、20000 $\mu\text{g/kg}$ 、若しくはそれらの間の量、例えば、1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000 $\mu\text{g/kg}$ 、若しくはその間の量、又は約10 $\mu\text{g/kg}$ ～約1000 $\mu\text{g/kg}$ 、若しくはそれらの間の量、例えば、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g/kg}$ 、若しくはそれらの間の量、又は約30 $\mu\text{g/kg}$ ～約1000 $\mu\text{g/kg}$ 、若しくはそれらの間の量、例えば30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g/kg}$ を含んでいてよい。

【0112】

当業者であれば、被検体の体重、医薬組成物の濃度、個々の成分又はそれらの組合せ、

或いは医薬組成物の容積、個々の成分又はそれらの組合せを考慮して、単位 (unit) を所望の適用に適した形式に、必要に応じて容易に相互変換することもできる。

【 0 1 1 3 】

本発明の医薬品組成物は様々な剤形であってよい。それらは、例えば、液体、半固体および固体投与形、例えば液剤 (例えば注射可能な溶液および注入溶液)、分散剤または懸濁剤、錠剤、ピル、粉剤、リボソームおよび坐剤を含む。好ましい形は、投与および治療適用の計画された方法に依存する。典型的な好ましい組成物は、注射可能な溶液または注入溶液、例えば他の抗体を用いたヒトの受動免疫に使用されるものと類似の組成物の剤形である。好ましい投与方法は非経口である (例えば、静脈内、皮下、腹膜内、筋肉内)。好ましい実施形態において、抗体は静脈内注入または注射により投与される。他の好ましい実施形態において、抗体は筋肉内または皮下注射により投与される。

10

【 0 1 1 4 】

本発明の抗体は、当該分野で公知の種々の方法により投与することができるが、多くの治療適用に関して、好ましい投与経路 / 方法は、皮下注射、静脈内注射もしくは注入である。当業者に明らかであるが、投与経路および / または方法は、所望の結果に応じて変更してもよい。特定の実施形態において、活性化合物は、化合物を迅速な放出から保護する担体を用いて、例えばインプラント、経皮性パッチおよびカプセル化送達系を含む徐放製剤を調製してもよい。生分解性の生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸を用いることができる。そのような製剤の調製に関する方法の多くは、特許されているか、又は一般に当業者には公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照のこと。

20

【 0 1 1 5 】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、例えば、不活性希釈剤または吸収可能な可食用担体と共に経口投与することができる。化合物 (及び、必要に応じて他の成分) は、ハードまたはソフト・シェルゼラチンカプセルに封入されてもよく、錠剤に圧縮されてもよく、又は直接被検体の食事に取り入れられてもよい。経口治療的投与に関し、化合物は賦形剤と共に組込まれて、摂取可能な錠剤、パッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁剤、シロップ、ウエハーなどの剤形で用いられてもよい。非経口投与以外で本発明の化合物を投与するために、その不活化を予防する材料を用いて、当該化合物をコーティングすること、又は合成物を同時投与することが必要であり得る。

30

【 0 1 1 6 】

補助活性化合物を、医薬組成物に組込んでもよい。特定の実施形態において、本発明の抗体は、ADまたは関連する認知症を処置するのに有用な1以上の付加的な治療剤を用いて、同時に製剤化および / または同時投与される。例えば、本発明の抗体の1つまたはその抗体部分を、他の標的に結合する付加的な1以上の抗体を用いて同時に製剤化および / または同時投与してもよい。

【 0 1 1 7 】

特定の実施形態において、本発明の抗体またはその断片は、当分野で公知の半減期延長媒体 (half-life extending vehicle) と連結されてもよい。そのような媒体は、限定するものではないが、Fc領域、ポリエチレングリコール (PEG) およびデキストランを含む。そのような媒体は、例えば米国特許出願第09 / 428082号および公開されたPCT出願WO99 / 25044に記載されており、それらはいずれの目的に対しても参照により本明細書の一部とされる。

40

【 0 1 1 8 】

本発明の1つの実施形態において、拘束された環状立体配置を有するエピトープを含む抗原ペプチドであって、前記エピトープが少なくともSNKのアミノ酸配列を含み、オリゴマーAの溶媒に露出された抗体アクセス可能なナック領域に対応する抗原ペプチドが提供される。

【 0 1 1 9 】

50

本発明の他の実施形態において、拘束された環状立体配置を有するエピトープを含む抗原ペプチドであって、前記エピトープが配列番号1に対応するアミノ酸配列を有し、オリゴマーAの溶媒に露出された抗体アクセス可能なナックル領域に対応する抗原ペプチドが提供される。

【0120】

本発明の他の実施形態において、A由来の環状ペプチドに結合可能な抗体であって、前記環状ペプチドが少なくともS N Kのアミノ酸配列を有する立体構造エピトープを含み、オリゴマーAの溶媒に露出された抗体アクセス可能なナック領域に対応する抗体が提供される。

【0121】

本発明のさらなる実施形態において、A由来の環状ペプチドに結合できる抗体であって、前記環状ペプチドが配列番号1に対応するアミノ酸配列を有する立体構造エピトープを含み、オリゴマーAの溶媒に露出された抗体アクセス可能なナックル領域に対応する抗体が提供される。

【0122】

特定の実施形態において、そのような抗体は、非オリゴマー形態のAよりも、オリゴマー形態のAにより大きな親和性をもって結合できる。

【0123】

他の実施形態において、アルツハイマー病を有するか又は有する疑いのある被検体を処置する方法であって、前記被検体に、A由来の環状ペプチドと結合できる抗体の治療上の有効量を投与することを含み、ここで、前記環状ペプチドは、オリゴマーAの溶媒に露出された抗体アクセス可能なナックル領域に対応する少なくともS N Kのアミノ酸配列を有する、方法が提供される。特定の実施形態において、該抗体は、非オリゴマー形態のAよりも、オリゴマー形態のAにより大きな親和性をもって結合できる。

【0124】

他の実施形態において、被検体におけるADの進展または進行を予防する方法であって、前記被検体に、A由来の環状ペプチドに特異的に結合するペプチドと結合できる抗体の治療上の有効量を投与することを含み、ここで、前記環状ペプチドは、オリゴマーAの溶媒に露出された抗体アクセス可能なナックル領域に対応する少なくともS N Kのアミノ酸配列を有する立体構造エピトープを含む、方法が提供される。特定の実施形態において、該抗体は、非オリゴマー形態のAよりも、オリゴマー形態のAにより大きな親和性をもって結合できる。

【0125】

本発明の更なる態様は、本発明の好ましい実施形態の以下の記述を考慮することによって、より明らかとなるであろう。当業者は、本発明の他の実施形態が可能であり、本発明の細部は多くの点で、本発明の思想を逸脱することなく改変できることを理解し得る。このように、図面、詳細な説明および実施例は、実際は例示とみなされるべきものであり、限定と考えるべきではない。

【0126】

実施例

実施例1：A精製および凝集およびオリゴマーの特徴づけ

形質転換、発現および精製

大腸菌BL21(DE3)pLysS細胞および大腸菌DH5細胞を、A1-40をコードする構築物で形質転換した。1L培養からの大腸菌細胞を、25mLのリシスバッファ(50mMのTrisHCl pH8.0 + 1mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA))中に再懸濁して、均質化した懸濁液を得た(プロテアーゼ阻害剤は添加しなかった)。その懸濁液を、40mLの遠心分離管(JA-20)に移し、氷上に置き、強度6(即ち、小型の超音波処理チップでの最大の設定)および50Hz断続(intermittence)で3分間の超音波処理を行い、次いで4の18000gで10分間の遠心工程を行った。この超音波処理プロセスは3回繰り返した。可溶性画分を毎回回収し、SDS-P

10

20

30

40

50

A G Eにより分析した (T C A 沈殿はこの場合必要ではなかった)。最後に、ペレットを、8 Mの尿素、10 mMの T r i s H C l p H 8 . 0、1 mMの E D T Aを含有する 12 . 5 m Lの緩衝液中で再懸濁し、次いで1回の追加的な超音波処理処置工程および遠心分離工程 (18000 r p m、10分間)を行った。その後、この溶液を10 mMの T r i s p H 8 . 0 + 1 mMの E D T Aを用いて4倍希釈した (37 . 5 m Lの添加)。次いで、このタンパク質溶液を、精製用の実際の緩衝液 (25 mMの T r i s p H 8 . 0 + 1 mMの E D T A)を用いて最終的に平衡化した D E A E セルロース (Whatmanの D 52 ; これは最初に 0 . 5 Nの N a O Hを用いて15分間、次いで水での洗浄および 0 . 5 Mの H C l、続いて複数回の水での洗浄、最後に濃縮緩衝液 (50 mMの T r i s p H 8 . 0 + 1 mMの E D T A)により再生した)と共にインキュベートした。ペプチドは、
10 穏やかな振盪条件下 (即ち、磁気攪拌プレート上に置かれ内部に磁石を含む、ファルコンチューブにて) 20分間、パッチにて樹脂に結合させた。結合しなかったペプチドを通過画分 (flow through) 中に回収し、後の 1200 r p mで1分間の遠心分離によりビーズを沈殿させた。これらのビーズをピペットで取り出した。

【 0 1 2 7 】

複数回洗浄を行い、それぞれ5分間のインキュベート、そして短時間の遠心分離工程 (1200 r p mで1分間)により画分を取り出した : それぞれ 0、50、75、100、125、150、200、250、300、500 mMの N a C lを含む 25 mMの T r i s H C l p H 8 . 0 + 1 mMの E D T Aを用いた。溶出した画分を氷上で保ち、ペ
20 プチドのモノマー状態を維持した。

【 0 1 2 8 】

このアプローチにより、250 μ Lの濃縮画分を T C A 沈殿後に S D S - P A G Eにより分析した。T C A 沈殿のために、試料を氷上で少なくとも30分間20%のトリクロロ酢酸 (T C A) 中でインキュベートし、次いで 14,000 r p mで15分間遠心分離を行った。上清を破棄し、ペレットを750 μ Lの氷冷アセトンで洗浄し、次いで 14,000 r p mで5分間の遠心分離を行った。アセトンを除去し、残留物は蒸発させた。ペレットをプロテイン・ローディング・ダイを用いて再溶解し、8 ~ 10 μ Lを S D S - P A G Eで分析した。

【 0 1 2 9 】

A 凝集プロトコルおよび A のオリゴマー化

A のモノマー化を達成するために、精製した A を m i l l i Q 水に対して透析し、凍結乾燥した。凍結乾燥後に、A を T C A または 5% の酢酸のいずれかに再生させ、次いで蒸発させて、ガラス管上に単量体の分子層を形成させた。モノマー A を P B S (5 mM)、p H 約 6 . 8 中に再懸濁し、モノマー形態の A を維持した。

【 0 1 3 0 】

A のオリゴマー化を達成するために、モノマー A を出発物質として用い、200 μ Mで超音波処理しながら12時間33 でインキュベートした。この手順は、A 繊維よりも A オリゴマーの形成を導く。

【 0 1 3 1 】

オリゴマーの特徴づけ

懸濁液中の粒子のサイズ分布プロフィールを測定するために用いられ得る周知の技術である動的光散乱 (D L S) によって、オリゴマーのサイズを特徴づけた。光源はレーザーで単色かつコヒーレントであり、散乱強度における時間依存的な揺らぎを観察する。これらの揺らぎは、溶液中でブラウン運動を受ける小分子の結果であり、従って、溶液中での散乱体間の距離が時間と共に常に変化する。光が小粒子に当たると、光は全ての方向に散乱し、これはレイリー散乱として知られている。次いで、散乱した光は、周囲の粒子により構造的または破壊的な干渉のいずれかを受ける、そして、この強度の揺らぎには、散乱体の時間スケールの動きに関する情報が含まれる。D L S は、溶液中の A ベータ試料のサイズ分布を測定するために用い、A ベータがモノマー形態かオリゴマー形態かを確認した。

【 0 1 3 2 】

10

20

30

40

50

図1は、DLSを用いて分析したA 試料はモノマーA であったことを示す。商業的に入手可能なA (1-40)(50 μM)を5 mMのPBS中、10 でインキュベートした。1 nm未満の疎水半径(Rh)が算出された。これらの結果は、当業者にモノマーA の典型的なものと知られているモノマーA の約1 nm未満の期待されたRhと一致する。

【0133】

図2は、DLSを用いて分析したA 試料はオリゴマーA であったことを示す。商業的に入手可能なA (1-40)(80 μM)を150 mMのPBS中、10 でインキュベートした。この結果は、みかけの単分散集団を示す。200 nmの疎水半径(Rh)が算出された。この結果は、当業者にオリゴマーA の典型的なものと知られているオリゴマーA の約100 nm~200 nmの間の期待されたRhと一致する。

10

【0134】

図3は、DLSを用いて分析したA 試料はオリゴマーA であったことを示す。商業的に入手可能なA (1-40)(50 μM)を150 mMのPBS中、10 でインキュベートした。この結果は、みかけの単分散集団を示す。190 nmの疎水半径(Rh)が算出された。この結果は、当業者にオリゴマーA の典型的なRhと一致する。

【0135】

実施例2：立体構造上拘束されたエピトープを含む環状ペプチドの生成

新規立体構造エピトープを含む環状ペプチドは、ペプチドのN末端とC末端に位置するシステイン残基間のジスルフィド結合を用いて拘束されたループ構造体に構築した。2つの非天然システインをGSNKG配列、1つをそのC末端に1つをそのN末端に加えた。この2個のシステインを、調節された条件下で酸化して、ジスルフィド架橋を形成させた。

20

【0136】

環状ペプチドの構造は、新規立体構造エピトープを含むA オリゴマーのナックル領域の「ナックル」構造および配向を模倣するように構成した。

【0137】

図4は、新規立体構造SNKEピトープを含むジスルフィド環化ペプチドの3次元モデルを示す。

【0138】

30

当業者は、拘束されたエピトープを形成する他の方法が当該分野で公知であることを理解するであろう。例えば、ペプチドを、そのペプチドの2つの残基間での結合の形成により環化し、閉じたループを提供することができる。環状ペプチドは、ホモデチック(homodetic)(全ての結合がペプチド結合である)またはヘテロデチック(heterodetic)(ペプチド結合と、他のタイプの結合、例えばエステル結合、エーテル結合、アミド結合またはジスルフィド結合との両方がある)と形成され得る。ペプチドは、化学的方法または酵素的方法を用いて環化されてよい。米国特許公開第2009/0215172号は、ペプチドの配列に依存しない様式で、アミド結合を介したペプチドのヘッド-テイルの環化を触媒する組換えタンパク質を記載する。目的のペプチドを囲むプレペプチド中の認識配列は、環化に影響する。Bourne et al (Methods in Molecular Biology, 2005 298:151-166)は、セーフティー・キャッチ・リンカー(safety catch linker)および保存手順の使用を介した環状ペプチドアレイ調製についてのコンビナトリアル方法を記載する。米国特許公開第2004/0014100号は、環状ペプチドの生体内産生のための方法を開示する。米国特許公開第2010/0240865号、米国特許公開第2010/0137559号および米国特許第7,569,541号は、ペプチド環化のための様々な方法を記載し、例えば、ペプチドのN末端、C末端または内部のチオールもしくはメルカプタン含有残基の酸化を介して、該ペプチドを環化することができる。チオール含有残基の例は、システイン、ホモシステイン、ペニシラミンを含む。幾つかの実施形態において、第1のチオール含有残基はシステインである；幾つかの実施形態において、第1と第2のチオール含有残基はシステインである。ペプチド内の2個のチオール含有残基は酸化されて、

40

50

ジスルフィド結合によって連結された二量体アミノ酸システインを形成し得る。種々の酸化試薬を用いて、そのようなチオールジスルフィド転換を達成することができ、例えば酸素（空気）、ジメチルスルホキシド、酸化型グルタチオン、フェリシアン化カリウム、タリウム（ⅠⅠⅠ）トリフルオロアセテート、または当業者には既知であって当業者に既知のそのような方法で用いられ得る他の酸化試薬がある。そのような方法の例は、PCT国際公開WO 01/92466およびAndreu et al., 1994. Methods in Molecular Biology 35:91-169に記載されている。

【0139】

実施例3：A オリゴマー特異モノクローナル抗体の誘導およびスクリーニング

A オリゴマー特異立体構造エピトープ（配列番号1）に対するモノクローナル抗体（mAb）は、実施例2で記載されるようにこのペプチドのN末端およびC末端のシステイン間のジスルフィド連結を用いてループ構造内で拘束されたエピトープに対する抗体を産生することにより創り出した。

【0140】

BALB/Cマウスを、PrPおよびSOD1-ミスフォールディング・特異エピトープ（Paramithiotis et al. 2003; Rakhit et al. 2007）に用いられたマルチプルアンチゲンペプチド（MAP）またはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に連結された、本明細書中でGSNKG-CLEと称する新規な拘束されたループエピトープ（CLE）で免疫した。マウス血清は、ウシ血清アルブミン（BSA）に連結したGSNKG-CLEに対してスクリーニングをして、脾臓融合およびハイブリドーマ・スクリーニングを、それらのマウスにて、構造をとらない可溶性AではなくGSNKG-CLEとの特異的かつ強力な相互作用に関して実施した。陽性の選択したIgGを分泌するクローンを大規模生産し、次いで環状および鎖状GSNKG-BSA、合成AオリゴマーおよびAD脳由来のAオリゴマーを用いた免疫学的方法による特徴づけを行った。

【0141】

環状GSNKGペプチドに対するモノクローナル抗体（mAb）を創り出し、ペプチドELISAにより結合について予めスクリーニングした。GSNKG環状ペプチドに対して創り出された幾つかの抗体は、優先的に環状ペプチドを認識し、幾つかは鎖状ペプチド、幾つかは環状および鎖状の両方を認識した。鎖状と環状ペプチドの両方を認識する抗体の能力は、例えば、生体内でシステイン架橋の還元により部分的に又は完全に鎖状になった環状ペプチドの免疫認識に関係し得る。中間のGSNKGペプチドに対して創り出された抗体が、環状と鎖状ペプチドの両方を認識する抗体を表す。ELISAの結果に基づいて、2つの環状特異抗体（5D8、5E3）、2つの鎖状特異IgG（3F5、3G2）および2つの中間特異IgG（4D11、4D12）クローンを、更なる分析のために選出された。実時間で且つ標識する必要の無い生体分子間相互作用をモニタするための表面プラズモン共鳴の光学現象を利用した技術であるBiacore（商標）プラットフォームを更なる分析のために用いた。

【0142】

図5は、例示的なBiacore（商標）の結果を示す。モノクローナル抗体を、ラビット抗マウスFc特異（RAMFc）抗体を用いて組織培養上清から捕捉し、CM5センサーチップ上に共有結合で固定化した。次いで、BSAコンジュゲートGSNKGペプチド（鎖状および環状）およびオリゴマー（1-42）の結合は、捕捉したmAbに対してこれらのアナライトを流すことによって調べた。結合応答（Binding response）は、捕捉されたmAbではなく固定化されたRAMFcを含むフローセルを参照とし、さらに、1mg/mlのカルボキシメチル・デキストランを含むHepes緩衝塩溶液（HBS）から成るサンプル希釈液をブランクとした。加えて、観察された応答を、捕捉したmAbの量に対して規格化し、別のmAbとの正確な対比を可能にした。

【0143】

図6および図7は、結果として生じるBiacore（商標）のセンサーグラムを表し、ELISAで選択された鎖状優先（linear-preferential）のクローン（3F5、3G

10

20

30

40

50

2) は B i a c o r e チップ上の鎖状および環状 B S A コンジュゲートペプチドを結合しなかったことを示し; E L I S A で選択された中間のクローン (4 D 1 1、4 D 1 2) は B i a c o r e チップ上の鎖状および環状ペプチドの両方と結合したことを示し; ならびに、E L I S A で選択した環状クローン (5 D 8、5 E 3) は B i a c o r e チップ上の環状 B S A コンジュゲートペプチドと主に結合したことを示す。環状クローン 5 E 3 および 5 D 8 は、A (1 - 4 2) オリゴマーおよび環状ペプチドに最も強く結合することを実際に示し、また、一方で中間クローンと比較して鎖状ペプチドの結合はほとんど示さなかった。これらの結果は、実施例 2 の環状ペプチドを用いて産生した抗体のスクリーニングで、環状特異抗体のサブセットが A オリゴマーエピトープの選択的な抗体認識をもたらしたことを示す。

10

【0144】

図 8 は、m A b 5 E 3 である環状優先クローンが、A (1 - 4 2) オリゴマーに対して濃度依存的な様式で結合することを示す。この観察は、滴定可能な A オリゴマー中のアクセス可能で立体構造上拘束されたエピトープが、信頼できる免疫学的抗原抗体相互作用と一致することを実証する。このように、B i a c o r e 分析は、環状 G S N K G ペプチドおよび全長オリゴマー (1 - 4 2) が共通する分子的特徴、高次構造的に圧迫されたエピトープを共有することを実証し、立体構造感受性が高い m A b 5 E 3 により特異的に認識されることを実証する。

【0145】

(1 - 4 2) オリゴマー特異 m A b は、A D の細胞および動物モデルでの治療用途について、および オリゴマーにより損なわれたシナプス機能に関する神経生理学的アッセイで中和活性についてさらに試験してもよい。

20

【0146】

実施例 4: フローサイトメトリー分析

フローサイトメトリー分析は、細胞表面での A P P を結合する抗体の程度を測定するために行った。

【0147】

健康な生体 B l a c k / 6 マウスを二酸化炭素チャンバー内で安楽死させた。脳を直ぐに取り出し、リン酸緩衝食塩水 (P B S) 中に沈め、続いて P B S + 1 % ウシ胎児血清 (F B S) 中に沈めた。単一細胞懸濁液を、剥離鉗および 1 0 0 μ m および 7 0 μ m シーブを通じた連続継代で脳を細分することによって生成した。細胞を 3 0 分間室温でブロッッキング工程として P B S + 1 % F B S 中でインキュベートした。次いで、細胞を 1 0 μ g / m L または 1 μ g / m L の 6 E 1 0 および 5 E 3 のいずれかをそれぞれ加えた P B S + 1 % F B S 中でインキュベートした (又はしなかった)。室温で 1 時間後に、細胞を 2 回洗浄 (4 0 0 \times g で 5 分) し、1 % F B S およびアロフィコシアニン (A P C) またはフルオレセイン (F I T C) のいずれかとコンジュゲートした抗マウス抗体を含む P B S 中に 1 : 1 0 0 0 希釈で共に再懸濁した。非染色対照に加えて、幾つかの細胞を、非特異的相互作用の対照のために二次抗体単独と共にインキュベートした。二次抗体を 3 0 分間室温で試料と共にインキュベートし、その後、細胞を洗浄し、直ぐに分析するか、又は 4 % パラフォルムアルデヒド中、4 で一晩固定した。BD LSR II Flow Cytometer を用いてデータを収集し、FlowJo をデータ分析のために用いた。

30

40

【0148】

図 9 および図 1 0 は、フローサイトメトリー分析の結果を示す。図 9 は、フローサイトメトリートレースであり、細胞表面に位置する A P P に対する、細胞が結合する標識化 6 E 1 0 p a n - A 抗体と二次抗体陰性対照との比較を示す。図 1 0 は、細胞表面に位置する A P P に対する、細胞が結合する標識化 5 E 3 抗体と二次抗体陰性対照との比較を示す。図 9 で示される 6 E 1 0 抗体は、細胞表面に位置する A P P に対する、細胞が結合する F I T C 標識化 6 E 1 0 の有意な割合を示す。対照的に、図 1 0 で示される 5 E 3 抗体は、対照と比較して、F I T C 標識化 5 E 3 の非常に僅かな結合を示す。これらの結果は、F I T C 標識化 5 E 3 が、F I T C 標識化 6 E 1 0 と比較して、細胞表面の A P P に

50

対する有意に低い結合性を示すことを明確に表す。これらの分析の結果は、構造的に拘束されたオリゴマーに特異的な新規立体構造エピトープがニューロンの細胞表面に存在しないことを示し、これは天然のA P PにはG S N K Gモチーフの鎖状で構造化されていない性質と一致する。この細胞表面の構造的に拘束された新規な立体構造エピトープの欠如は、アルツハイマー病の治療に用いられる環状エピトープ (cyclic epitope) に対する免疫応答が天然のA P Pを標的としないことを示す。これらの結果は、オリゴマーの環状G S N K Gエピトープと特異的に結合する抗体が、既知の6 E 1 0抗体と比較して、好ましい安全性プロフィールを有することを実証する。

【 0 1 4 9 】

実施例 5：ニューロン分析

10

神経毒性分析を行い、種々の濃度の5 E 3抗体の存在下および非存在下でのモック (培地のみ) 対照、可溶性 (鎖状) A 1 - 4 0およびオリゴマー A 1 - 4 0と共にインキュベートした細胞についての細胞生存の程度を測定した。モック対照は、培地のみ (抗体なし) で処理した。

【 0 1 5 0 】

1 0 , 0 0 0個のラットの初期ニューロン/ウェルを含む9 6ウェルを、p o l y - L - リジン (ScienCell #0403; 2マイクログラム / c m ²、1時間、3 7 °C、P B Sで3回洗浄) 下、各ウェルにつき0 . 2 m lの神経培地 (ScienCell #1521) を用いて成長させた。培地を7日毎に交換した。可溶性A (1 - 4 0) およびオリゴマー (1 - 4 0) を、神経培地中に種々の濃度 (図 1 1を参照のこと) の5 E 3抗体の存在下または非存在下で回転装置にて室温で4時間インキュベートした。この混合液0 . 2 m lを、培地の除去後のニューロンに加えた。2 4時間の期間後に、細胞の生存をRoche Cell Proliferation kit II (#11465015001) を用いて製造業者のプロトコルに従って測定した。光学濃度はプレートリーダーを用いて測定した。

20

【 0 1 5 1 】

図 1 1は、ニューロン毒性アッセイの結果を示す。A は、鎖状A モノマー立体配置およびオリゴマーA 立体配置の両方でニューロンに対して有毒である。立体構造上拘束されたA エピトープに指向された抗体5 E 3は、A のオリゴマー型に対して保護的であることが示された。抗体5 E 3が鎖状A に関して保護的であることは示されなかった。これらの結果は、抗体5 E 3結合の立体構造特異性を実証する。

30

【 0 1 5 2 】

実施例 6：免疫プロット分析

6 E 1 0抗体および5 E 3抗体のA P P、モノマー およびオリゴマー に対する相対的な結合を決定するために、免疫プロット分析を行った。

【 0 1 5 3 】

均質化

脳組織試料の重量を測定し、次いで、脳組織の終濃度が2 0 %となるように新鮮な氷冷の大量T B S (5 m Mのエチレングリコール四酢酸 (E G T A)、5 m MのE D T Aおよびプロテアーゼ阻害剤カクテルを補充した) 中に沈めた。その組織を、以下のように、機械式ホモジナイザーを用いてこの緩衝液中で均質化した：組織をホモジナイザーに、3 0秒3回の均質化を行い、各均質化の間に3 0秒間氷上においた。次いでT B S均質化した試料を、超遠心分離 (7 0 , 0 0 0 × g、9 0分) にかけて。上澄みを集め、- 8 0 °Cで保存した。

40

【 0 1 5 4 】

T B S均質液のタンパク質濃度を、B C Aプロテインアッセイを用いて測定した。場合によっては、等量のタンパク質を、トリス - トリシン・サンプルバッファー (Invitrogen) 中でボイルした後にトリス - トリシン4 - 2 0 %ゲルを用いたS D S - P A G Eにより分画し、0 . 2 μ mのポリフッ化ビニリデン (P V D F) メンブレンに転写した。転写後に、メンブレンをP B S中に沈め、エピトープの熱回復 (heat recovery) のためにそれぞれ3分間のボイルを2回行った。メンブレンを、一次抗体として6 E 1 0またはオリゴ

50

マー特異抗体 5 E 3 を用いて免疫ブロットにかけた。双方とも、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度で用いた。

【 0 1 5 5 】

図 1 2 は、T B S 中で均質化し、トリス - トリシングルにて分画して p a n - A 6 E 1 0 抗体で免疫ブロットした脳組織を示す免疫ブロットの結果を表す。A P P との反応およびモノマー形態の A との反応は明らかであり、同様に、A オリゴマーのバンドに対する軽度の反応性は明らかである。

【 0 1 5 6 】

図 1 3 は、抗体 5 E 3 についての免疫ブロットの結果を示す。抗体 5 E 3 は、約 4 5 - 5 5 k D a で、明らかに S D S に安定なオリゴマー種を特異的に認識した。これは、オリゴマー種におけるモノマーの強固な非共有結合相互作用を示す。モノマー形態の A との相互作用は観察されなかったが、A P P との幾らかの限られた反応性はこの免疫ブロットでは明白であり、これはブロットメンブレン上での変性ならびに部分的な天然および非天然の再生と関連すると推定される。p a n - A 抗体 6 E 1 0 は、オリゴマー種に関する限定された認識もしくは認識しないことを示した。実施例 3 (実証的な B i a c o r e (商標) 常套手段に基づく、及び 5 E 3 と A 4 2 間の化学量論を 1 と仮定した) で述べた B i a c o r e (商標) データは免疫ブロットと一致しており、これは、5 E 3 と結合する A (1 - 4 2) 種が 1 0 量体から 1 3 量体の間であることを示し、モノマーあたりの分子量を 4 . 0 ~ 4 . 3 k D a とした場合、B i a c o r e データはオリゴマー種が ~ 5 0 k D a であることを示し、これは、5 E 3 抗体により検出されたメインバンドの分子量と整合する。

【 0 1 5 7 】

実施例 7 : A オリゴマー形成阻害の分析

阻害分析を行い、オリゴマーの増幅(propagation)における遅延を誘発する 5 E 3 抗体の能力を測定した。

【 0 1 5 8 】

静的光散乱 (S L S) は、ポリマーまたはタンパク質のような巨大分子の平均分子量 (M w) を得るために散乱光の強度を測定する物理化学の技術である。多くの角度での散乱強度の測定は、二乗平均平方根半径 (回転半径 (R g)) と称される) の算出を可能にする。様々な濃度で多くの試料の散乱強度を測定することによって、第 2 ビリアル係数 A 2 が算出できる。静的光散乱実験のために、高い強度の単色光、通常レーザーを、巨大分子を含む溶液に照射する。所定の波長 () で 1 または多くの角度 () の散乱強度を測定するために、1 または多くの検出器を用いる。

【 0 1 5 9 】

重量平均分子量を校正せずに光散乱強度から直接的に評価するために、レーザー強度、検出器の量子収率、及び全体の散乱容積、ならびに検出器の立体角が既知である必要がある。これは非実用的であるため、すべての商業機器は、トルエンのような強く、既知の散乱体を用いて補正する。これは、トルエンおよび他の幾つかの溶媒のレイリー比が絶対光散乱装置を用いて測定されているからである。

【 0 1 6 0 】

図 1 4 は、毒性のオリゴマー A 形態へのモノマー A の凝集を遅延させる 5 E 3 抗体の能力を示す。オリゴマー形成は、5 E 3 の非存在下 (図 1 4 中の「 C 」) 、又は 5 E 3 存在下 (図 1 4 中の「 5 E 3 」) で試験した。商業的に供給された (1 - 4 0) (2 3 μ) を、3 9 で反応容量 1 5 0 μ L にて抗体 5 E 3 (2 . 0 m c M) と共にインキュベートした。矢印で示される S L S 強度のシフトは、5 E 3 抗体の散乱強度の寄与に相当する。図 1 4 は、抗体 5 E 3 を用いたインキュベーションが結果的に A オリゴマー形成における有意な遅延をもたらしたことを示す。

【 0 1 6 1 】

この重合に対する抑制効果は、抗体 5 E 3 、それに関連するヒト化抗体およびキメラ抗体、並びに新規な立体構造エピトープ自体、例えばワクチン組成物の治療上の役割を支持

10

20

30

40

50

する。

【 0 1 6 2 】

実施例 8：生体試料中の A オリゴマーの検出

精製した 5 E 3 抗体は生体試料、例えば脳を含む組織由来の均質液中の A オリゴマーを検出するために用いることができると考えられる。この検出は、様々な検出プラットフォーム、例えば B i a c o r e (商 標) プラットフォームを用いて実施することができ、診断および / または予防上の価値を有し得る。

【 0 1 6 3 】

実施例 9：5 E 3 および関連抗体ならびにワクチンによる処置

5 E 3 抗体による処置は、毒性の A オリゴマーを特異的におよび / または選択的に排除するために提供することができ、ならびに A オリゴマーの毒性に関連した疾患、例えばアルツハイマー病の発症または進行を処置および / または予防するのに有用であり得る。5 E 3 と同じエピトープに対するヒト抗体またはヒト化抗体は、アルツハイマー病の処置および / または予防に有用であり得る。他の態様において、5 E 3 により認識されるエピトープと一部重複するエピトープは、アルツハイマー病を処置および / または予防するのに有用であり得る。

【 0 1 6 4 】

同様に、本明細書に記載の新規な立体構造エピトープは、A オリゴマーに対する特異的な免疫応答を惹起するのに有用であり、それは、例えばアルツハイマー病での処置または予防に有用であり得る。

【 0 1 6 5 】

上記の実施形態は、例示のみを目的とする。添付の特許請求の範囲によってのみ規定される範囲を逸脱することなく、当業者であれば、特定の実施形態に対して改変、修飾および変更を施すことができる。

【 0 1 6 6 】

【表 2】

References:

Gelinas, D.S., et al., Immunotherapy for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101 Suppl 2: p. 14657-62.

Robinson, S.R., et al., Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. Neurobiol Aging, 2004. 25(5): p. 609-15.

Broytman, O. and J.S. Malter, Anti-Abeta: The good, the bad, and the unforeseen. J Neurosci Res, 2004. 75(3): p. 301-6.

Mathews, P.M. and R.A. Nixon, Setback for an Alzheimer's disease vaccine: lessons learned. Neurology, 2003. 61(1): p. 7-8.

Goni, F. and E.M. Sigurdsson, New directions towards safer and effective vaccines for Alzheimer's disease. Curr Opin Mol Ther, 2005. 7(1): p. 17-23.

10

20

30

40

【表 3】

- Jung, S.S., J. Nalbantoglu, and N.R. Cashman, Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study. *J Neurosci Res*, 1996. 46(3): p. 336-48.
- Jung, S.S., S. Gauthier, and N.R. Cashman, Beta-amyloid precursor protein is detectable on monocytes and is increased in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 1999. 20(3): p. 249-57.
- Morimoto, T., et al., Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*, 1998. 51(2): p. 185-95.
- Mileusnic, R., C.L. Lancashire, and S.P. Rose, Amyloid precursor protein: from synaptic plasticity to Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1048: p. 149-65.
- Mileusnic, R., et al., APP is required during an early phase of memory formation. *Eur J Neurosci*, 2000. 12(12): p. 4487-95.
- Lambert, M.P., et al., Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J Neurochem*, 2007. 100(1): p. 23-35.
- Lacor, P.N., et al., Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2007. 27(4): p. 796-807.
- Ronicke, R., et al., Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture? *PLoS One*, 2008. 3(9): p. e3236.
- Balducci, C., et al., Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(5): p. 2295-300.
- Shankar, G.M., et al., Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*, 2008. 14(8): p. 837-42.
- Selkoe, D.J., Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res*, 2008. 192(1): p. 106-13.
- Klyubin, I., et al., Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med*, 2005. 11(5): p. 556-61.
- Walsh, D.M., et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 2002. 416(6880): p. 535-9.
- Wang, H.W., et al., Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res*, 2002. 924(2): p. 133-40.
- Lesne, S., et al., A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 2006. 440(7082): p. 352-7.
- Lauren, J., et al., Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*, 2009. 457(7233): p. 1128-32.
- Luhers, T., et al., 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(48): p. 17342-7.
- Rauk, A., Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? *Dalton Trans*, 2008(10): p. 1273-82.

【図 1】

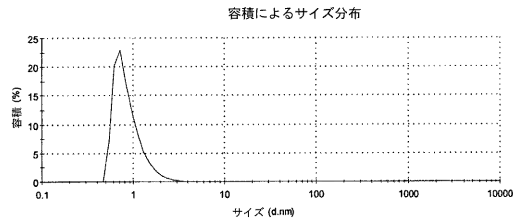


Fig. 1

【図 3】

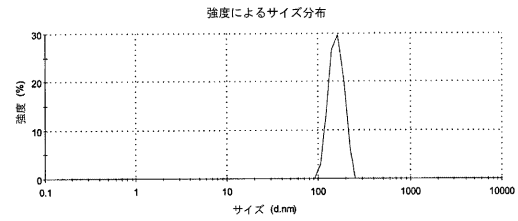


Fig. 3

【図 2】

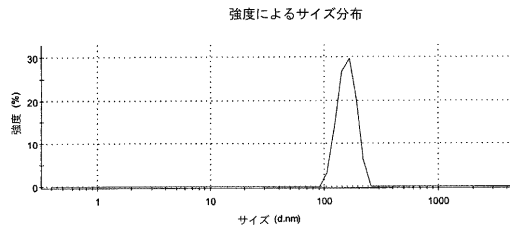


Fig. 2

【図 4】

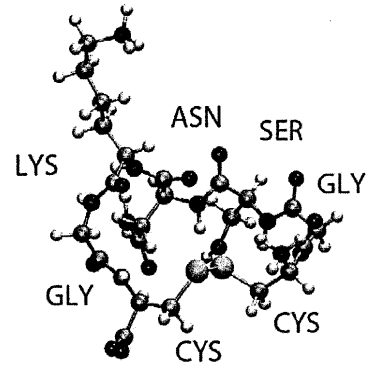


Fig. 4

【図 5】

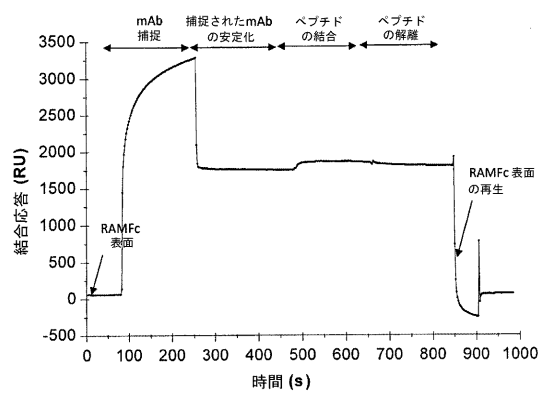


Fig.5

【図 6】

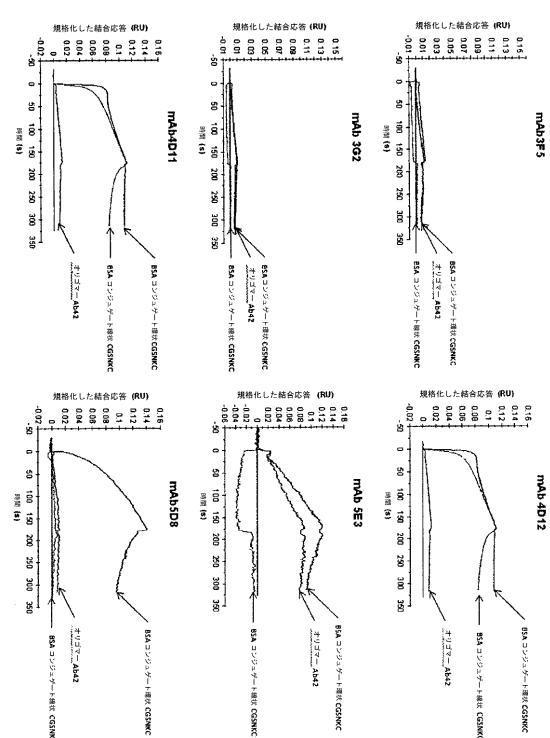


Fig. 6

【図 7】

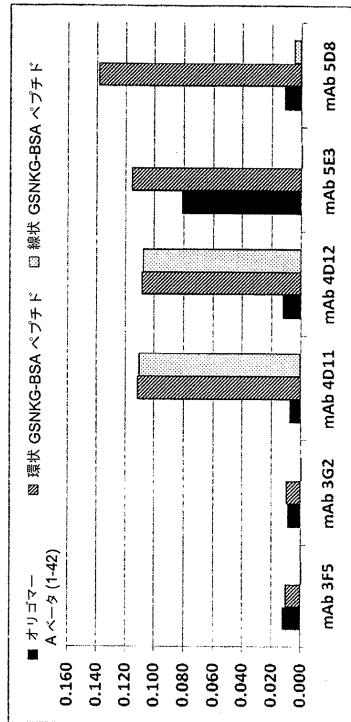


Fig. 7

【図 8】

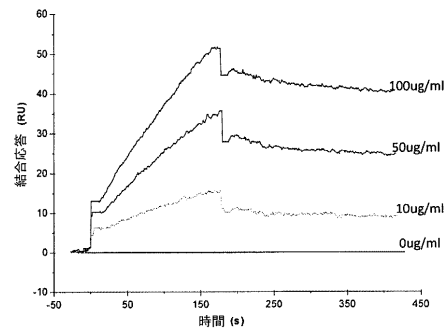


Fig. 8

【図 9】

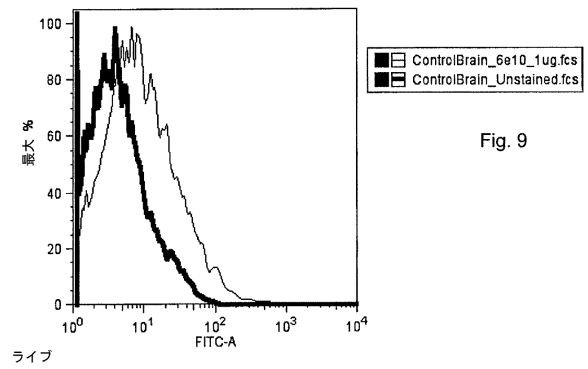


Fig. 9

【図 10】

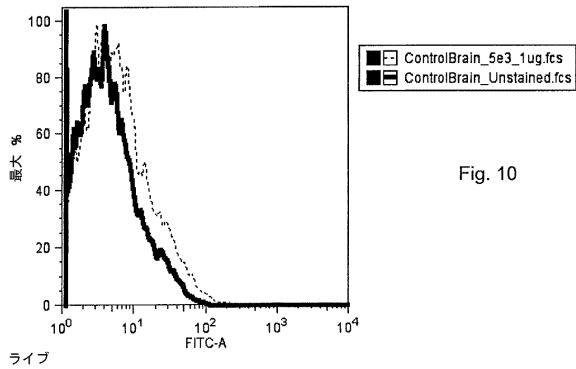


Fig. 10

【図 12】

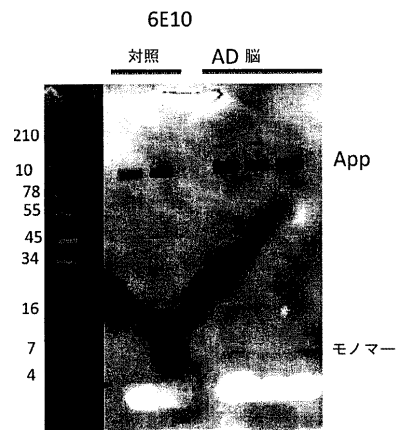


Fig. 12

【図 11】

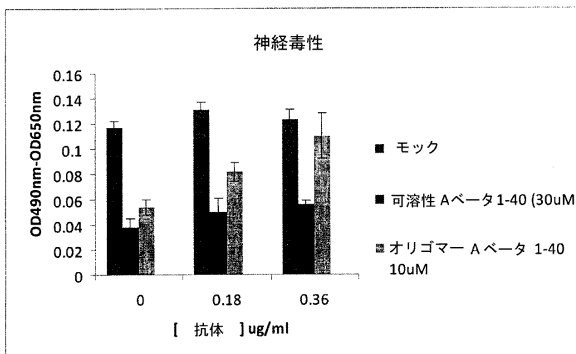


Fig. 11

【図 13】

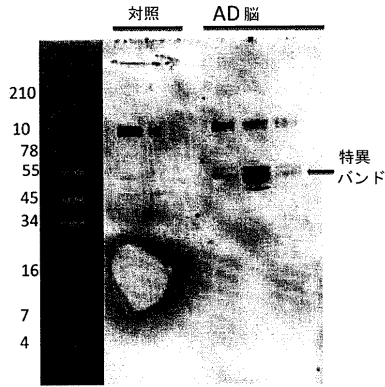


Fig. 13

【図 14】

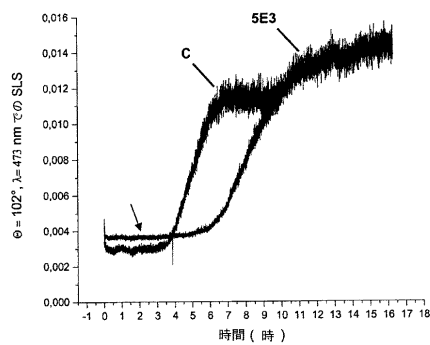


Fig. 14

【配列表】

0006190113000001.app

【図 15】

配列番号 : 4
H-IgH1st3prime 489 48 426 0.05

```
NNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANNATAGCCCTTGNNNNGCATCCAGGGTCACCAT
GGAGTTAGTTTGGGCAGCAGATCCAGGGGCCAGTGGATAGACAGATGGGGGTGCTGTTTGGCTGAGGA
GACTGTGAGAGTGGTGCCTTGGCCCCAGTAGTGAGCTCGTAATCCATCCTTGACACAGAAATAGACCGCA
GAGTCTCAGAGGTCAATCTGCTGAGCTGCATGTAGGCTGTGCTGGAGGATTGTCTGCAGTCAGTGTGG
CCTTGCCCTTGAACTTCTCATTGTACTTAGTATTAAACATTCCAGGATAAATCCATCCAATCCAATCAAGTCC
CTGTCCAGGCTGTGTATCACCACCTGTATATAGTAGCTGTGAATATGTAGCCAGAAGCCTTGACAGGATA
TCCTCACTGAAGCCCCAGGCTTCACCACTCAGTCCAGACTCCTGCAGCTGCACCTCNAATNNNNNN
N
```

配列番号 : 5
H-IgH1st5prime 486 16 450 0.05

```
NNNNNNNNNTGGNGANCCTGGGGCTTCNGTGAGGANATCTGCAAGGCTTCTGGCTACATATTACAAGC
TACTATATACAGTGGGTGATACACAGGCTTGACAGGACTTGAGTGATTGGATGGATTATCTCGGAA
ATGTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCTCCAGCAC
AGCCTACATGCACTCAGCAGATTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGGATGGATTACG
AGGCTCACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAGCTCTCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT
CCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAACTAACTCATGGTGACCTGGGATGCTGTGTCAGGGGCTATT
CCCTGACGCACTGACAGTGACCTGGAATCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGNNNNNAACCTTNNN
```

配列番号 : 6
3prime Kappa

```
NNNNNNNNNNNGTTTNNNNNGCTTGGTGCCTCTCCGAACGTCCGAGGATAATTATGATATTGTAGA
CAGTTGTTGCTGCACAATCTCTCACTAAGGGTGCTGATGGGGAGAGAATAATCTGACACCCACCTACT
GCCACTGAGCCTTTTGGACACCTCAATCTTGAGTGGATGCGCGTAAATCANGCGTTTAAATGTTCCGT
CTGGTTTCTGCTGAAGCCAGGTAAAGTAACCACTAATTTCTGACTTGCCCGACGAGTGAGACTGACTCTT
CTCCCTCAGAGGCAGATAANGAGGATGGANACTGGGTCACTGGATGTCACATCTGGTACTGNGAAAC
NGANNNCAAAAAANCAGCAA
```

配列番号 : 7
5prime Kappa

```
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTNNNTCTCTCTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAAAGTCCGTCTCAC
TTGTGGGGCAAGTCNAGAAATTAGTGTTACTTAACCTGGCTCAGCAGAGACCCCATGGAACTATTAGAC
GCCGATCTAACCCCATCCTCTTTAGATTCTGGTGTCCCAAAAAGGGTCCCTGCCAGGATGTCTGGGTCA
GATTATTCTATCAACATCACCATCCTTGAGTCTGAAGATTATGAAGACGATGCTGTCTACAATATGGTAAT
TATCTCGGAAGTTCACTGGAGGCAACGAGCTAGAAATCTAACAGGCTGATGCTGCAACAACGTATCCA
TCTTCCACCATCACCATCA
```

Fig. 15

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 0 7 K</i>	<i>14/47</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 7/50
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/18</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 14/47
<i>C 0 7 K</i>	<i>16/46</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 16/18
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 16/46
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> 21/08
			<i>G 0 1 N</i> 33/53 D

(74)代理人 100156144

弁理士 落合 康

(72)発明者 ニール・アール・キャッシュマン

カナダ、ブイ6エス・1エム8、プリティッシュ・コロンビア、バンクーバー、ウエスト・キング
・エドワード・アベニュー3793番

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 山本 匡子

審判官 瀬下 浩一

(56)参考文献 国際公開第2010/002251(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C07K 1/00-19/00

C12P 21/08