

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7532571号  
(P7532571)

(45)発行日 令和6年8月13日(2024.8.13)

(24)登録日 令和6年8月2日(2024.8.2)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
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
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18

請求項の数 12 外国語出願 (全20頁)

(21)出願番号	特願2023-18535(P2023-18535)	(73)特許権者	594197872
(22)出願日	令和5年2月9日(2023.2.9)		イーライ リリー アンド カンパニー
(62)分割の表示	特願2021-99897(P2021-99897)の分割		アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 8 5 インディアナポリス リリー コーポレート センター (番地なし)
原出願日	平成30年4月16日(2018.4.16)	(74)代理人	100145403
(65)公開番号	特開2023-58623(P2023-58623A)		弁理士 山尾 憲人
(43)公開日	令和5年4月25日(2023.4.25)	(74)代理人	100126778
審査請求日	令和5年2月9日(2023.2.9)		弁理士 品川 永敏
(31)優先権主張番号	62/487,550	(74)代理人	100162684
(32)優先日	平成29年4月20日(2017.4.20)		弁理士 呉 英燦
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ロナルド・ブラッドリー・ディマツス
			アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス 6 2 8 8、イー
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗N3pGl uアミロイドベータペプチド抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号12で示されるアミノ酸配列を含む抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドおよび/または配列番号13で示されるアミノ酸配列を含む抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む、抗N3pGl u A 抗体を生成するための組成物。

【請求項2】

前記抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドが、配列番号15で示される配列を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドが、配列番号16で示される配列を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

配列番号12で示されるアミノ酸配列を含む抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドを含む哺乳動物細胞、および/または配列番号13で示されるアミノ酸配列を含む抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む哺乳動物細胞を含む、抗N3pGl u A 抗体を生成するための組成物。

【請求項5】

前記抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドが、配列番号15で示される配列を含む、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

10

20

前記抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 16 で示される配列を含む、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記哺乳動物細胞が、前記抗体重鎖および/または前記抗体軽鎖を発現することができる、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記哺乳動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) またはハムスター胎児腎臓 (HEK) である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 9】

抗 N3pGluA 抗体を生成するための方法であって、抗体重鎖のための配列番号 12 で示されるアミノ酸配列をコードする核酸を含む哺乳動物細胞、および抗体軽鎖のための配列番号 13 で示されるアミノ酸配列をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養することを含み、前記哺乳動物細胞が、前記抗体重鎖および/または前記抗体軽鎖を発現することができる、方法。

10

【請求項 10】

前記抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 15 で示される配列を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドが、配列番号 16 で示される配列を含む、請求項 9 に記載の方法。

20

【請求項 12】

前記哺乳動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) またはハムスター胎児腎臓 (HEK) である、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ヒト N3pGluA アミロイドベータペプチドに結合する抗体、およびアミロイドベータ (本明細書では A または A ベータと呼ぶ) ペプチドに関連する疾患の治療におけるそれらの使用に関する。

【0002】

アミロイド前駆体タンパク質の切断により、サイズが 38 ~ 43 アミノ酸の範囲の A ペプチドが得られる。可溶性形態から高シト含有量を有する不溶性形態への A の変換、および脳内の神経突起および脳血管プラークとしてのこれらの不溶性形態の沈着は、アルツハイマー病 (AD)、ダウン症候群、および脳アミロイド血管障害 (CAA) を含む、多くの病気に関連している。

30

【0003】

プラークに見られる沈着物は、A ペプチドの不均一な混合物で構成されている。N3pE、pE3-X、または A<sub>p3-X</sub> と呼ぶ N3pGluA は、A ペプチドの N 末端切断型であり、主にプラークに見出される。N3pGluA は、ヒト A の N 末端に最初の 2 つのアミノ酸残基がなく、3 番目のアミノ酸位置にグルタミン酸に由来するピログルタメートを持っている。N3pGluA ペプチドは脳に沈着した A の微量成分であるが、研究により、N3pGluA ペプチドは強い凝集特性を持ち、沈着カスケードの初期に蓄積することが示されている。

40

【0004】

N3pGluA に対する抗体は、当技術分野で知られている。例えば、米国特許第 8,679,498 号は、ヒト N3pGluA 抗体 (例えば、B12L、LY3002813 としても知られる) およびアルツハイマー病などの疾患を該抗体で治療する方法を開示している。臨床試験では、抗 N3pGluA 抗体に対する抗薬物抗体 (LY3002813) に関する懸念が示されている。この試験で治療されたほぼ全員の血漿中に抗薬物抗体が存在し、免疫反応に関連する問題は LY3002813 の半減期の短縮であった。したがって、代替の抗 N3pGluA 抗体の必要性が依然として残っている。

50

## 【 0 0 0 5 】

本発明の抗体は、インビボで低級プラーク（A<sub>1-42</sub>）であるN3pGlu A に結合するが、減少した免疫原性も示す、抗N3pGlu A 抗体を提供しようとするものである。そのような抗N3pGlu A 抗体は、血漿タンパク質への非特異的結合の減少も示す場合がある。加えて、そのような抗N3pGlu A 抗体は、予測されるT依存性Ab応答の減少ももたらし得る。そのような抗N3pGlu A 抗体はまた、より良い投与スケジュールのための薬物動態を有する有力なヒト治療薬についての抗体半減期の増加および安全性プロファイルの改善を提供し得る。本発明の範囲内の抗体は、これらの望ましい特徴の少なくとも1つを保有しようとするものである。

## 【 0 0 0 6 】

本発明は、LCVRとHCVRとを含む、ヒトN3pGlu A に結合する抗体を提供し、該LCVRは、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含み、該HCVRは、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含み、さらにアミノ酸配列が、LCDR1については配列番号4または5、LCDR2については配列番号6または7、LCDR3については配列番号8、HCDR1については配列番号1、HCDR2については配列番号2、およびHCDR3については配列番号3である。特定の実施形態では、抗N3pGlu A 抗体は、LCDR1については配列番号4のアミノ酸配列、LCDR2については配列番号6のアミノ酸配列、LCDR3については配列番号8のアミノ酸配列、HCDR1については配列番号1のアミノ酸配列、HCDR2については配列番号2のアミノ酸配列、およびHCDR3については配列番号3のアミノ酸配列、を含む。別の特定の実施形態では、抗N3pGlu A 抗体は、LCDR1については配列番号5のアミノ酸配列、LCDR2については配列番号7のアミノ酸配列、LCDR3については配列番号8のアミノ酸配列、HCDR1については配列番号1のアミノ酸配列、HCDR2については配列番号2のアミノ酸配列、およびHCDR3については配列番号3のアミノ酸配列を含む。

## 【 0 0 0 7 】

本発明はまた、ヒトN3pGlu A に結合する抗体を提供し、この抗体は、配列番号10または配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（LCVR）と配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（HCVR）と、を含む。特定の実施形態では、本発明は、ヒトN3pGlu A に結合する抗体を提供し、該抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（LCVR）と、配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（HCVR）と、を含む。別の特定の実施形態では、本発明は、ヒトN3pGlu A に結合する抗体を提供し、該抗体は、配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（LCVR）と、配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（HCVR）と、を含む。

## 【 0 0 0 8 】

一実施形態では、本発明は、軽鎖（LC）と、重鎖（HC）と、を含むヒトN3pGlu A に結合する抗体を提供し、LCのアミノ酸配列は配列番号13または14であり、HCのアミノ酸配列は配列番号12である。より特定の実施形態では、本発明は、軽鎖（LC）と重鎖（HC）と、を含むヒトN3pGlu A に結合する抗体を提供し、LCのアミノ酸配列は配列番号13であり、HCのアミノ酸配列は配列番号12である。別の特定の実施形態では、本発明は、軽鎖（LC）と重鎖（HC）と、を含むヒトN3pGlu A に結合する抗体を提供し、LCのアミノ酸配列は配列番号14であり、HCのアミノ酸配列は配列番号12である。さらなる態様では、本発明は、2つのLCと、2つのHCと、を含む抗体を提供し、各LCのアミノ酸配列は配列番号13または14であり、各HCのアミノ酸配列は配列番号12である。より特定の実施形態では、本発明は、2つのLCと、2つのHCと、を含む抗体を提供し、各LCのアミノ酸配列は配列番号13であり、各HCのアミノ酸配列は配列番号12である。より特定の態様では、本発明は、2つのLCと、2つのHCと、を含む抗体を提供し、各LCのアミノ酸配列は配列番号14であり、各HCのアミノ酸配列は配列番号12である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 9 】

本発明はさらに、本発明の抗体および1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。さらに、本発明は、A の沈着を特徴とする疾患を治療する方法であって、それを必要とする患者に本発明の抗体を含む薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。別の実施形態では、本発明はA の沈着を特徴とする疾患を治療する方法であって、本発明の抗体の有効量を投与することを含む、方法を提供する。特に、本発明は、臨床的または前臨床的アルツハイマー病、ダウン症候群、および臨床的または前臨床的C A A から選択される状態を治療または予防する方法であって、本発明の抗体の有効量を該患者に投与することを含む、方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、臨床的または前臨床的アルツハイマー病、ダウン症候群、および臨床的または前臨床的C A A を治療または予防する方法であって、抗体を含む薬学的組成物の有効量を、それを必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、前駆期A D ( A 関連軽度認知障害、またはM C Iとも呼ばれる)、軽度A D、中等度A D、および重度A Dから選択される状態を治療または予防する方法であって、本発明の抗体の有効量を、それを必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、前駆期A D、軽度A D、中等度A D、および重度A Dから選択される状態を治療または予防する方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、方法を提供する。

10

## 【 0 0 1 0 】

別の実施形態では、本発明は、前臨床的アルツハイマー病、臨床的アルツハイマー病、ダウン症候群、または臨床的または前臨床的脳アミロイド血管障害と診断された患者の認知低下を遅らせる方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。より具体的には、本発明は、前駆期A D、軽度A D、中等度A D、および重度A Dから選択される状態と診断された患者の認知低下を遅らせる方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を投与することを含む、方法をさらに提供する。別のそのような実施形態では、本発明は、前臨床的アルツハイマー病、臨床的アルツハイマー病、ダウン症候群、または臨床的または前臨床的脳アミロイド血管障害と診断された患者の認知低下を遅らせる方法であって、有効量の抗体を投与することを含む、方法を提供する。より具体的には、本発明は、前駆期A D、軽度A D、中等度A D、および重度A Dから選択される状態と診断された患者の認知低下を遅らせる方法であって、本発明の抗体の有効量を投与することを含む、方法をさらに提供する。

20

30

## 【 0 0 1 1 】

別の実施形態では、本発明は、前臨床的アルツハイマー病または臨床的アルツハイマー病と診断された患者の機能低下を遅らせる方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。より具体的には、本発明は、前駆期A D、軽度A D、中等度A D、および重度A Dから選択される状態と診断された患者の機能低下を遅らせる方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、前臨床的アルツハイマー病または臨床的アルツハイマー病と診断された患者の機能低下を遅らせる方法であって、本発明の抗体の有効量を投与することを含む、方法を提供する。より具体的には、本発明は、前駆期A D、軽度A D、中等度A D、および重度A Dから選択される状態と診断された患者の機能低下を遅らせる方法であって、本発明の抗体の有効量を投与することを含む、方法を提供する。

40

## 【 0 0 1 2 】

別の実施形態では、本発明は、前臨床的または臨床的アルツハイマー病と診断された患者の脳A アミロイドプラーク負荷を減少させる方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。より具体的には、本発明は、前駆期A D、軽度A D、中等度A D、または重度A Dから選択される状態と診断された患者の脳A アミロイドプラーク負荷を減少させる方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。

50

## 【 0 0 1 3 】

別の実施形態では、本発明は、無症候患者の記憶喪失または認知低下を予防する方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物をその患者に投与することを含む、方法を提供する。好ましい実施形態では、患者は脳脊髄液（CSF）中のA $\beta$ 1-42または脳内のA $\beta$ プラークのレベルが低い。

## 【 0 0 1 4 】

別の実施形態では、本発明は、アルツハイマー病の原因となる遺伝子突然変異を有することが知られている無症候患者を治療する方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を患者に投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、本発明は、PSEN1 E280Aアルツハイマー病の原因となる遺伝子突然変異（Paisa突然変異）を有することが知られている無症候患者を治療する方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を該患者に投与することを含む、方法を提供する。別の特定の実施形態では、本発明は、常染色体優性アルツハイマー病を引き起こす、APP、PSEN1、またはPSEN2遺伝子の突然変異などの遺伝子突然変異を有する無症候患者を治療する方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を該患者に投与することを含む、方法を提供する。

10

## 【 0 0 1 5 】

別の実施形態では、本発明は、アルツハイマー病の原因となる遺伝子突然変異を有することが知られている無症候患者の記憶喪失または認知低下を予防する方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を該患者に投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、本発明は、PSEN1 E280Aアルツハイマー病の原因となる遺伝子突然変異（Paisa突然変異）を有することが知られている無症候患者の記憶喪失または認知低下を予防する方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を該患者に投与することを含む、方法を提供する。別の特定の実施形態では、本発明は、常染色体優性アルツハイマー病を引き起こす遺伝子突然変異を有する無症候患者の記憶喪失または認知低下を予防する方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を該患者に投与することを含む方法を提供する。

20

## 【 0 0 1 6 】

別の実施形態では、本発明は、アルツハイマー病の原因となる遺伝子突然変異を有することが知られている無症候患者の認知低下を遅らせる方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を該患者に投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、本発明は、PSEN1 E280Aアルツハイマー病の原因となる遺伝子突然変異（Paisa突然変異）を有することが知られている無症候患者の認知低下を遅らせる方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を該患者に投与することを含む、方法を提供する。別の特定の実施形態では、本発明は、常染色体優性アルツハイマー病を引き起こす遺伝子突然変異を有する無症候患者の認知低下を遅らせる方法であって、本発明の抗体を含む薬学的組成物を該患者に投与することを含む、方法を提供する。

30

## 【 0 0 1 7 】

本発明はまた、治療に使用するための本発明の抗体を提供する。一実施形態では、本発明は、A $\beta$ の沈着を特徴とする疾患の治療に使用するための本発明の抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、臨床的または前臨床的アルツハイマー病、ダウン症候群、または臨床的または前臨床的脳アミロイド血管障害の治療に使用するための本発明の抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、前駆期AD、軽度AD、中等度AD、および重度ADから選択される状態の治療に使用するための本発明の抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、臨床的または前臨床的アルツハイマー病、ダウン症候群、または臨床的または前臨床的脳アミロイド血管障害と診断された患者の認知低下を遅らせるのに使用するための本発明の抗体を提供する。別の実施形態において、本発明は、前駆期AD、軽度AD、中等度AD、または重度ADと診断された患者の認知低下を遅らせるのに使用するための本発明の抗体を提供する。

40

## 【 0 0 1 8 】

50

本発明はまた、脳 A アミロイドプラーク負荷を減少させるのに使用するための本発明の抗体を提供する。別の実施形態において、本発明は、P S E N 1 E 2 8 0 A 遺伝子突然変異を有する患者における A の沈着を特徴とする状態の治療に使用するための本発明の抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、P S E N 1 E 2 8 0 A 遺伝子突然変異を有する患者の記憶喪失または認知低下を治療するのに使用するための本発明の抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、P S E N 1 E 2 8 0 A 遺伝子突然変異を有する患者の記憶喪失または認知低下を予防するのに使用するための本発明の抗体を提供する。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、臨床的または前臨床的 A D、ダウン症候群、および臨床的または前臨床的 C A A から選択される状態の予防に使用するための本発明の抗体を提供する。別の実施形態において、本発明は、前駆期 A D、軽度 A D、中等度 A D、および重度 A D から選択される状態の予防に使用するための本発明の抗体を提供する。

10

【 0 0 2 0 】

さらに、本発明は、治療に使用するための本発明の抗体を含む薬学的組成物を提供する。一実施形態では、本発明は、A の沈着を特徴とする疾患の治療に使用するための抗体を含む薬学的組成物を提供する。

【 0 0 2 1 】

本発明はまた、A の沈着を特徴とする疾患の治療のための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。一実施形態では、本発明は、臨床的または前臨床的アルツハイマー病、ダウン症候群、および臨床的または前臨床的脳アミロイド血管障害の治療のための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。一実施形態において、本発明は、前駆期 A D、軽度 A D、中等度 A D、または重度 A D の治療のための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。別の実施形態では、本発明は、臨床的または前臨床的アルツハイマー病、ダウン症候群、および臨床的または前臨床的脳アミロイド血管障害から選択される状態と診断された患者の認知低下を遅らせるための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。別の実施形態では、本発明は、前駆期 A D、軽度 A D、中等度 A D、および重度 A D から選択される状態と診断された患者の認知低下を遅らせるための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。

20

【 0 0 2 2 】

本発明はまた、脳 A アミロイドプラーク負荷を減少させるための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。別の実施形態では、本発明は、P S E N 1 E 2 8 0 A 遺伝子突然変異を有する患者における A の沈着を特徴とする状態を治療するための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。別の実施形態では、本発明は、P S E N 1 E 2 8 0 A 遺伝子突然変異を有する患者の記憶喪失または認知低下を治療するための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。別の実施形態では、本発明は、患者の記憶喪失または認知低下を予防するための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。好ましい実施形態では、患者は P S E N 1 E 2 8 0 A 遺伝子突然変異を有する。別の実施形態では、本発明は、臨床的または前臨床的 A D、ダウン症候群、および臨床的または前臨床的 C A A から選択される状態を予防するための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。別の実施形態では、本発明は、前駆期 A D、軽度 A D、中等度 A D、および重度 A D から選択される状態を予防するための薬剤の製造における本発明の抗体の使用を提供する。

30

40

【 0 0 2 3 】

一実施形態では、本発明は、配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む D N A 分子を提供する。一実施形態では、本発明は、配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む D N A 分子を提供する。一実施形態では、本発明は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む D N A 分子を提供する。さらなる実施形態では、本発明は、配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、かつ配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有するポリペ

50

プチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、DNA分子を提供する。別の実施形態では、本発明は、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、かつ配列番号14のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、DNA分子を提供する。別の実施形態では、本発明は、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子と、配列番号13のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子と、を提供する。別の実施形態では、本発明は、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子と、配列番号14のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子と、を提供する。特定の実施形態では、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は配列番号15であり、配列番号13のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は配列番号16である。特定の実施形態では、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は配列番号15であり、配列番号14のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は配列番号17であり、および配列番号13のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は配列番号16である。

10

**【0024】**

さらに、本発明は、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子と、配列番号13または14のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子と、を含む哺乳動物細胞を提供する。好ましくは、哺乳動物細胞は、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、配列番号13のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、をコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子を含む。別の実施形態では、哺乳動物細胞は、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、配列番号14のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、をコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子を含む。一実施形態において、哺乳動物細胞株は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)またはハムスター胎児腎臓(HEK)細胞株である。

20

**【0025】**

本発明はまた、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子および/または配列番号13のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子を含む、哺乳動物細胞を提供し、この細胞は、配列番号12のアミノ酸配列を有するHCと、配列番号13のアミノ酸配列を有するLCと、を含む抗体を発現することができる。好ましくは、哺乳動物細胞は、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、配列番号13のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、をコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子を含む。本発明はまた、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子および/または配列番号13のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子を含む、哺乳動物細胞を提供し、この細胞は、配列番号12のアミノ酸配列を有するHCと、配列番号13のアミノ酸配列を有するLCを含む抗体と、を発現することができる。好ましくは、哺乳動物細胞は、配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、配列番号13のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、を含むDNA分子を含む。一実施形態では、哺乳動物細胞株は、CHOまたはHEK細胞株である。

30

40

**【0026】**

別の実施形態において、本発明は、配列番号10のアミノ酸配列を有するLCVRと、配列番号9のアミノ酸配列を有するHCVRと、を含む抗体を産生するためのプロセスを提供し、このプロセスは、配列番号10のアミノ酸配列を有するLCVRをコードするDNAおよび/または配列番号9のアミノ酸配列を有するHCVRをコードするDNAを含む哺乳動物細胞を、抗体が発現するような条件下で培養することと、発現した抗体を回収

50

することと、を含む。本発明は、直前に記載された本発明の方法により得られる抗体を含む。本発明はまた、配列番号 11 のアミノ酸配列を有する L C V R と、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する H C V R と、を含む抗体を産生するためのプロセスを提供し、プロセスは、抗体が発現されるような条件下で、配列番号 11 のアミノ酸配列を有する L C V R および / または配列番号 9 のアミノ酸配列を有する H C V R をコードする D N A を含む哺乳動物細胞を培養することと、発現した抗体を回収することと、を含む。本発明は、直前に記載された本発明の方法により得られる抗体を含む。

【 0 0 2 7 】

別の実施形態では、本発明は、配列番号 13 のアミノ酸配列を有する L C と、配列番号 12 のアミノ酸配列を有する H C と、を含む抗体を産生するためのプロセスを提供し、このプロセスは、抗体が発現されるような条件下で、配列番号 13 のアミノ酸配列を有する L C および / または配列番号 12 のアミノ酸配列を有する H C をコードする D N A を含む哺乳動物細胞を培養することと、発現した抗体を回収することと、を含む。本発明は、直前に記載された本発明の方法により得られる抗体を含む。本発明はまた、配列番号 14 のアミノ酸配列を有する L C と、配列番号 12 のアミノ酸配列を有する H C と、を含む抗体を産生するためのプロセスを提供し、このプロセスは、抗体が発現されるような条件下で、配列番号 14 のアミノ酸配列を有する L C および / または配列番号 12 のアミノ酸配列を有する H C をコードする D N A を含む哺乳動物細胞を培養することと、発現した抗体を回収することと、を含む。本発明は、直前に記載された本発明の方法により得られる抗体を含む。

【 0 0 2 8 】

本発明は、抗体が 2 つの H C および 2 つの L C を含む、抗体を産生するためのプロセスを含み、2 つの H C のそれぞれのアミノ配列は配列番号 12 であり、2 つの L C のそれぞれのアミノ酸配列は配列番号 13 であり、かつそのプロセスは、a) 抗体が発現されるような条件下で、上記の本発明の哺乳動物細胞を培養することと、および b) 発現された抗体を回収することと、を含む。本発明は、直前に記載された本発明の方法により得られる抗体を含む。本発明はまた、抗体が 2 つの H C および 2 つの L C を含む、抗体を産生するためのプロセスを含み、2 つの H C のそれぞれのアミノ配列は配列番号 12 であり、2 つの L C のそれぞれのアミノ酸配列は配列番号 14 であり、かつそのプロセスは、a) 抗体が発現されるような条件下で、上記の本発明の哺乳動物細胞を培養することと、b) 発現された抗体を回収することと、を含む。本発明は、直前に記載された本発明の方法により得られる抗体を含む。

【 0 0 2 9 】

本発明の抗体は、N 3 p G l u A に結合する。N 3 p G l u A の配列は、配列番号 22 のアミノ酸配列、およびそのカルボキシル末端変異体である。N 3 p G l u A のカルボキシル末端変異体の例には、A<sub>p3-40</sub> および A<sub>p3-43</sub> が含まれる。

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互接続された 2 つの重鎖 ( H C ) および 2 つの軽鎖 ( L C ) を含む免疫グロブリン分子を指す。各 L C および H C のアミノ末端部分には、そこに含まれる相補性決定領域 ( C D R ) を介した抗原認識に関与する可変領域が含まれる。C D R には、フレームワーク領域と呼ばれる、より保存された領域が散在している。本発明の抗体の L C V R および H C V R 領域内の C D R ドメインへのアミノ酸の割り当ては、周知の K a b a t 番号付け規則 ( K a b a t , e t a l . , A n n . N Y A c a d . S c i . 1 9 0 : 3 8 2 - 9 3 ( 1 9 7 1 ) 、 K a b a t e t a l . , S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , F i f t h E d i t i o n , U . S . D e p a r t m e n t o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s , N I H P u b l i c a t i o n N o . 9 1 - 3 2 4 2 ( 1 9 9 1 ) ) 、 および N o r t h 番号付け規則 ( N o r t h e t a l . , A N e w C l u s t e r i n g o f A n t i b o d y C D R L o o p C o n f o r m a t i o n s , J o u r n a l o f M o

10

20

30

40

50

l e c u l a r B i o l o g y , 4 0 6 : 2 2 8 - 2 5 6 ( 2 0 1 1 ) ) に基づいている。

【 0 0 3 1 】

本発明の抗体には、カップ LC および I g G H C が含まれる。特定の実施形態では、本発明の抗体は I g G 1 である。

【 0 0 3 2 】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体 ( 「 m A b s 」 ) である。

【 0 0 3 3 】

モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ技術、組換え技術、ファージ提示技術、合成技術、例えば C D R 移植、またはそのような技術または当該技術分野で既知の他の技術の組み合わせにより産生することができる。本発明の別の実施形態では、抗体または抗体をコードする核酸は単離形態で提供される。本明細書で使用する場合、「単離」という用語は、細胞環境に見出される任意の他の高分子種を含まないか、または実質的に含まない、タンパク質、ペプチド、または核酸を指す。「実質的に含まない」とは、本明細書中で使用する場合、目的のタンパク質、ペプチド、または核酸が存在する高分子種の 8 0 % 超 ( モル基準で ) 、好ましくは 9 0 % 超、より好ましくは 9 5 % 超の含むことを意味する。

10

【 0 0 3 4 】

抗体の発現と分泌に続いて、細胞を除去するために培地を清澄化し、清澄化された培地は多くの一般的に使用される技術のいずれかを使用して精製される。精製抗体は、非経口投与用、特に皮下、くも膜下腔内、または静脈内投与用のタンパク質および抗体を製剤化するための周知の方法に従って薬学的組成物に製剤化することができる。抗体は、適切な薬学的に許容される賦形剤とともに凍結乾燥され、その後、使用前に水性希釈剤で再構成されてもよい。あるいは、抗体を水溶液に製剤化し、使用前に最大 1 ~ 3 年間保存することもできる。いずれの場合も、抗体の薬学的組成物の保存形態および注射形態は、抗体以外の成分である薬学的に許容される賦形剤または複数の賦形剤を含むだろう。ある成分が薬学的に許容されるかどうかは、その安全性および有効性に対する効果、または薬学的組成物の純度、および効力に依存する。ある成分が、安全性または有効性 ( または純度または効力 ) に十分に好ましくない影響があると判断され、ヒトへの投与用の組成物に使用されないことが当然である場合、薬学的組成物に使用することは薬学的に許容されない。

20

30

【 0 0 3 5 】

本発明の抗体を含む薬学的組成物は、親経路 ( 例えば、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内 ) により、本明細書に記載の疾患または障害のリスクがある、または示す患者に投与することができる。皮下および静脈内経路が好ましい。本発明の薬学的組成物は、「有効」量の本発明の抗体を含む。有効量とは、所望の治療結果を達成するために必要な量 ( 投与量および期間および投与手段において ) を指す。有効量の抗体は、個人の病状、年齢、性別、および体重、ならびに個人における所望の応答を誘発する抗体の能力などの要因に応じて変動し得る。有効量は、当業者のような担当診断医者または医療専門家によって、既知の技法の使用によって、および結果を観察することによって、容易に決定され得る。投与の頻度は、ヒトの実際の薬物動態および薬力学に依存している。治療期間は多くの要因に応じて異なり、当技術分野の経験とスキルに基づいて、患者の診断医または治療を行う医療提供者によって決定される。治療の頻度と期間は適応症により異なる。「治療」、「治療すること」または「治療する」などの用語には、患者の既存の症状、状態、疾患、または障害の進行または重症度の抑制、遅延、または停止が含まれる。本明細書で使用される場合、「患者」という用語はヒトを指す。「予防する」および「予防すること」という用語は、患者が、A D などの神経変性疾患の症状または臨床的特徴を有しないようにするための、無症候患者への本発明の抗体の予防的投与を意味する。

40

【 0 0 3 6 】

「 A の沈着を特徴とする状態」という用語は、脳または脳血管系の A 沈着を病理学的に特徴とする疾患である。これには、アルツハイマー病、ダウン症候群、脳アミロイド

50

血管障害などの疾患が含まれる。アルツハイマー病の臨床診断、病期分類または進行は、既知の技術を使用し、結果を観察することにより、当業者のような担当診断医または医療専門家によって容易に決定され得る。これには通常、何らかの形態の脳ブランクイメージング、精神的または認知的評価（例えば、臨床的認知症重症度判定尺度の合計点数 *Clinical Dementia Rating - summary of boxes (CDR - SB)*）、簡易認知機能検査 (*Mini-Mental State Exam (MMSE)*) またはアルツハイマー病評価尺度の認知機能評価 (*Alzheimer's Disease Assessment Scale - Cognitive (ADAS - Cog)*) または機能的評価（例えば、アルツハイマー病共同研究 - 日常生活動作評価 (*Alzheimer's Disease Cooperative Study - Activities of Daily Living (ADCS - ADL)*)）が含まれる。本明細書で使用される「臨床的アルツハイマー病」は、アルツハイマー病の診断された段階である。これには、前駆期アルツハイマー病、軽度アルツハイマー病、中等度アルツハイマー病および重度アルツハイマー病と診断された状態が含まれる。「前臨床的アルツハイマー病」という用語は、臨床的アルツハイマー病に先行する段階であり、バイオマーカーの測定可能な変化 (*CSF Aβ42* レベルまたはアミロイドPETによる沈着した脳ブランク負荷など) は、臨床的アルツハイマー病に進行する、アルツハイマー病の患者の最も初期の兆候を示す。これは通常、記憶喪失や混乱などの症状が顕著になる前である。

#### 【0037】

以下の実施例およびアッセイは、本発明の抗体が、アルツハイマー病、ダウン症候群、およびCAAなどのAβの沈着を特徴とする疾患の治療に有用であることを示している。しかしながら、以下の実施例は、限定ではなく例示として示されており、当業者によって様々な修正がなされ得ることが理解されるべきである。

#### 【実施例】

#### 【0038】

改変N3pGlu A 抗体の発現および精製

本発明のN3pGlu A 抗体は、本質的に以下のように発現および精製することができる。配列番号13または14のLCアミノ酸配列をコードするDNA配列と、配列番号12のHCアミノ酸配列をコードするDNA配列とを含むグルタミンシンターゼ (*GS*) 発現ベクターを使用して、チャイニーズハムスター卵巣細胞株 (*CHO*) をエレクトロポレーションによりトランスフェクトする。この発現ベクターは、SV初期 (*Simian Virus 40 E*) プロモーターおよびGSの遺伝子をコードする。トランスフェクション後、細胞について、0 ~ 50 μMのL-メチオニンスルホキシミン (*MSX*) を用いてバルク選択 (*bulk selection*) を行う。次に、選択したバルク細胞またはマスターウェルを、産生に使用する無血清懸濁培養でスケールアップする。

#### 【0039】

抗体が分泌されている清澄化培地を、リン酸緩衝食塩水 (*pH 7.4*) などの適合緩衝液で平衡化したプロテインAアフィニティークラムに加える。カラムを1M NaClで洗浄して、非特異的結合成分を除去する。結合したN3pGlu A 抗体は、たとえばpH (約) 3.5のクエン酸ナトリウムで溶出し、画分を1M Tris緩衝液で中和する。N3pGlu A 抗体画分を、SDS-PAGEまたは分析的サイズ排除などによって検出し、プールの。本発明のN3pGlu A 抗体を、pH 7.4のPBS緩衝液または10mMのクエン酸Na緩衝液、pH約6の150mMのNaClのいずれかで濃縮する。最終材料は、一般的な手法を使用して滅菌ろ過できる。N3pGlu A 抗体の純度は95%以上である。本発明のN3pGlu A 抗体は、-70°Cで直ちに凍結することができ、または4°Cで数ヶ月間保存することができる。本発明の例示的な抗体のアミノ酸配列番号を以下に示す。

表1. 例示されたN3pGlu A 抗体のアミノ酸配列。

10

20

30

40

50

【表 1】

抗体配列番号				
抗体	軽鎖	重鎖	LCVR	HCVR
201c	13	12	10	9
201cYD	14	12	11	9

【表 2】

抗体配列番号			
抗体	LCDR1	LCDR2	LCDR3
201c	4	6	8
201cYD	5	7	8

10

【表 3】

抗体配列番号			
抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3
201cおよび201cYD	1	2	3

20

## 【0040】

結合キネティクスおよび結合親和性

N3pGluA 抗体の pE3-42A ペプチドへの結合キネティクスと結合親和性は、Biacore (登録商標) 3000 (GE Healthcare) を使用する表面プラズモン共鳴により測定される。結合親和性は、Biacore (登録商標) CM5 チップ上のアミンカップリングを介して約 120 RU pE3-42A ペプチドを固定し、2 倍連続希釈で 500 nM から開始して 15.6 nM まで N3pGluA 抗体を流すことで測定する。実験は、HBS-EP 緩衝液 (GE Healthcare BR100669、10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% 界面活性剤 P20、pH 7.4) 中、25 °C で行う。各サイクルで、250 μL の抗体試料をフローセル 1 および 2 に 50 μL / 分で流し、10 分間解離させる。チップ表面を、10 μL / mL の流量で pH 1.5 のグリシン緩衝液を 5 μL 注入することで再生させる。データを 1:1 の Langmuir バインディングモデルに適合させて  $k_{on}$ 、 $k_{off}$  を導き出し、 $K_D$  を計算する。基本的に上記の手順に従って、次のパラメーター (表 2 に示す) が観察された。

30

表 2 . 結合キネティクスおよび結合親和性。

【表 4】

抗体		$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{off}$ (1/s)	$K_D$ (M)
201c	平均値	1.64E+03	6.98E-05	4.57E-08
	S. D.	3.88E+02	1.36E-05	2.06E-08
201cYD	平均値	2.41E+03	6.39E-05	2.67E-08
	S. D.	2.01E+02	2.15E-06	2.61E-09

40

## 【0041】

これらのデータは、本発明の抗体が pE3-42A に結合することを示している。

## 【0042】

50

### エクスピボ標的エンゲージメント

固定されたPDAPP脳からの脳切片上のエクスピボ標的エンゲージメントを決定するために、本発明の外因的に添加されたN3pGlu A 抗体または201c H3B抗体を用いて免疫組織化学分析を実施した。201c H3B抗体は201c抗体と1つのアミノ酸で異なり、この違いは重鎖HCDR3にある(201c HCDR3の位置10のTyrは201c H3BではPheである)。201c H3B抗体は、配列番号20で示される重鎖アミノ酸配列と配列番号13で示される軽鎖アミノ酸配列を含む。

#### 【0043】

老齢PDAPPマウス(26または20ヶ月齢)からのクライオスタット連続冠状切片を、5 $\mu$ g/mLまたは20 $\mu$ g/mLの本発明の例示的なN3pGlu A 抗体(201cまたは201cYD)とともにインキュベートする。ヒトIgGに特異的な二次HRP試薬を使用し、沈着したブランクをDAB-Plus(DAKO)で視覚化する。ビオチン化マウス3D6抗体とそれに続くStep-HRP二次抗体を陽性対照として使用する。

10

#### 【0044】

本発明の例示されたN3pGlu A 抗体は、これらの脳切片中の沈着A を標識した。しかし、外因性20 $\mu$ g/mL濃度での201c H3B抗体ではより高いバックグラウンド染色が観察された。これらの組織学的研究は、例示された本発明のN3pGlu A 抗体がエクスピボで沈着したA 標的にエンゲージすることを示した。

#### 【0045】

### エクスピボ食作用

本発明のN3pGlu A 抗体がブランクのミクログリア食作用を促進できるかどうかを調べるために、エクスピボ食作用アッセイを実施する。ヒトアルツハイマーの脳からの凍結切片(20 $\mu$ m)を、10 $\mu$ g/mLの本発明の例示的なN3pGlu A 抗体(201cまたは201cYD)、対照、または201c H3B抗体とともに、37で1時間、24ウェルプレート中で、プレインキュベートする。1処理あたり4つのウェルである。次に、初代マウスミクログリア細胞(8 $\times$ 10<sup>5</sup>、C57/BL6)を添加し、24時間インキュベートする。各ウェルの組織を5.2Mグアニジン緩衝液で均質化し、A<sub>1-42</sub>含有量をELISAで評価する。A<sub>1-42</sub>の含有量は複数の切片範囲にわたって変化する可能性があるため、すべての試験ウェルに対して姉妹切片対照が装備され、試験ウェルの内容は姉妹切片の内容に正規化される。

20

30

#### 【0046】

陽性対照試料と比較して、本発明の例示的なN3pGlu A 抗体(201cおよび201cYD)と201c H3Bは、A<sub>1-42</sub>を有意に減少させた。陰性対照試料では、沈着したA<sub>1-42</sub>のクリアランスはごくわずかであった。したがって、エクスピボの食作用分析は、本発明の例示されたN3pGlu A 抗体が食作用によってエクスピボでブランクを除去できることを示している。

#### 【0047】

### インビボ標的エンゲージメント

血液脳関門を通過し、沈着したブランクにインビボで結合する、本発明のN3pGlu A 抗体の能力を測定する。老齢PDAPPトランスジェニックマウス(18.5~32ヶ月齢)にN3pGlu A 抗体(201c)または陰性対照IgGを腹腔内注射する。1群あたり6匹のマウスは、1日目と3日目に抗体の40mg/kg注射を1回受ける。マウスを殺し、組織化学分析のために脳を収集する6日目に、インビボでの標的エンゲージメントを決定する。

40

#### 【0048】

姉妹切片での外因性3D6抗体免疫染色で定義される総ブランク領域で正規化されたインビボN3pGlu A 抗体エンゲージメントに対する陽性面積割合として、インビボ標的エンゲージメントの程度を定量化する(TE比)。TE比は、抗体が結合する面積の割合を測定し、可能性のある標的の面積の合計割合(姉妹切片上の陽性対照抗体(3D6

50

)を用いた外因性免疫組織化学によって視覚化された総沈着A )に対して値を正規化することによって生成される。

#### 【0049】

基本的に上記の手順に従って、201c抗体のTE比は2.8%であった。201c抗体は、海馬内および皮質内の限られた範囲で、インビボでの標的エンゲージメントを示したが、対照IgGを注射した動物はブランク特異的染色を示さない。

#### 【0050】

##### インビボブランククリアランス

老齢PDAPPマウスのインビボでのブランククリアランスを評価するために、マウス定常カッパ領域およびIgG2aFcに融合した201cまたは201cH3BのLCVRおよびHCVRを有するキメラ代用抗体を用いて研究を行う。老齢PDAPPマウス(21カ月齢、1群あたりn=23~25)に、7週間、週に1回、12.5mg/kgのキメラ201c抗体、キメラ201cH3B抗体、または対照IgGを皮下注射する。対照の老齢PDAPPマウス(研究の開始時に殺した)を使用して、治療の処置の前に既存の沈着のレベルを評価する。

#### 【0051】

研究の終わりに、血漿中の最終薬物レベルを測定し、A<sub>1-42</sub>のレベルについてELISAにより脳を評価する。対照IgGによる7週間の処置期間にわたってA<sub>1-42</sub>の有意でないさらなる増加によって証明されるように、老齢PDAPPマウスは、ブランクの上限にある。201cキメラ抗体群および201cH3Bキメラ抗体群は、対照と比較してA<sub>1-42</sub>の有意な減少を示す(それぞれ26%、p<0.0182および26%、p=0.0121)。抗体曝露レベルは7週間の投与期間の終わりに測定され、201cキメラのレベルは91μg/mL、201cH3Bのレベルは56μg/mLであった。この研究は、例示されたキメラN3pGluA抗体201cがインビボでブランク(A<sub>1-42</sub>)を低下させることができることを示した。

#### 【0052】

##### 低親和性血漿結合の欠如

本発明の抗N3pG抗体(201cおよび201cYD)と血漿タンパク質との潜在的な低親和性相互作用を調査するために、インビトロ研究を行う。抗体201c、201cYD、または201cH3Bをセファロースビーズに共有結合させ、カラムクロマトグラフィーを実行する前に10mLの正常ヒト血漿と37で2時間インキュベートする。ビーズ/プラズマ混合物をカラムに詰めて洗浄した。選択的に結合したタンパク質は、異なる画分でグリシン(pH2.5)にて溶出される。その後、各画分を高分解能ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)勾配ゲル(4%~16%)で分析する。銀染色を使用してタンパク質を視覚化し、目的のバンドを切除して質量分析で分析した。並行して、複数の対照ヒトIgG1抗体を分析する。

#### 【0053】

基本的に上記の手順に従って、銀染色ゲルの視覚化により、対照IgG1抗体と比較した201cH3B抗体溶出からフラクション5にヒスチジンリッチ糖タンパク質(約64kDaバンド)、フィブリノゲンアルファ鎖(約60kDaバンド)、およびフィブリノゲンベータ鎖(約50kDaバンド)が存在することが示された。逆に、201cおよび201cYD抗体は、対照IgGおよび201cH3B抗体と比較して、ヒト血漿タンパク質へのかなり低い親和性結合を欠いていた。

#### 【0054】

##### エクスピボT細胞増殖EpiScreenアッセイ

本発明(201c)の例示N3pGluA抗体または201cH3B抗体に応答したヒトCD4+T細胞の活性化(増殖、サイトカイン分泌)を測定するために、EpiScreen(登録商標)エクスピボヒトT細胞アッセイを使用する。EpiScreen(登録商標)は、欧州/北米および世界人口で発現されるHLA-DRおよびDQアロタイプの数や頻度を最も良く表す50人の健康なドナーからの試料を利用する。アッセイに

10

20

30

40

50

2つの陽性対照、ヒト化A33、診療所で高いレベルの免疫原性を示し(73%)かつEpiScreen(登録商標)アッセイで20-30%のT細胞応答を日常的に誘発する臨床ベンチマーク抗体と、KLH(キーホールリンペットヘモシアニン)、新抗原を含むマイトジェン様タンパク質と、が含まれている。適合した緩衝液の陰性対照もアッセイに含まれている。

【0055】

T細胞増殖の割合は、時間経過(5~8日目)で観察されたすべての陽性ドナー応答の平均から計算される。T細胞増殖の割合は、陽性対照A33およびKLHではそれぞれ20%および94%であり、201c H3Bでは24%であった。ただし、T細胞の増殖率は201cで10%であった。これらのデータは、201c抗体が陽性対照および201c H3B抗体と比較してT細胞応答率が低いことを示している。

10

【0056】

インシリコ免疫原性分析

EpiMatrix(登録商標)アッセイは、潜在的なT細胞エピトープについてのタンパク質配列を走査し、免疫原性を予測するアルゴリズムを使用する。また、Tレジトープ(Tregitope)の含有量および免疫原性応答の負の調節への影響も考慮する。抗体201c、201cYD、およびB12L(抗体B12Lは、配列番号23によって示される軽鎖と配列番号24によって示される重鎖とを含む)のアミノ酸配列はEpiMatrix(登録商標)によって分析した。EpiMatrix(登録商標)は、以下の表3に示すスコアを予測した。

20

表3. EpiMatrix(登録商標)スコア。

【表5】

抗体	EpiMatrix タンパク質スコア	Tレジトープ調整 EpiMatrix タンパク質スコア	予測したT依存性 Ab応答
201c	39.14	-35.49	0.28%
201cYD	24.76	-49.87	0.00%
B12L	0.44	-17.92	4.03%

30

【0057】

これらのデータは、予測したT細胞依存性抗体応答が、B12L抗体と比較して、本発明のN3pGluA抗体(201cおよび201cYD)の方が低いことを示している。

【0058】

抗薬物抗体(ADA)認識の欠如

LY3002813抗体に対する抗薬物抗体が201cまたは201cYDに結合できるかどうかを評価するために、ビオチンとルテニウムで標識された201cまたはビオチンとルテニウムで標識された201cYDを使用するAffinity Capture Elution(ACE)Bridgeアッセイを実行する。

40

【0059】

このアッセイ形式では、ADAは2つの標識抗体(例えば、ビオチンとルテニウムで標識された201c)の間を橋渡しする。その後、複合体はストレプトアビジンでコーティングされたプレートに結合し(ビオチン標識抗体を介して)、検出はルテニウムを使用してメソスケールプラットフォームでシグナルを生成する。ADAが201cまたは201cYD抗体を認識しない場合、シグナルは生成されない。ウサギ抗ヒトIgGはFcに優先的に結合する可能性が最も高く、標識201cまたは201cYDが抗体に結合できることを示す陽性対照として使用される。

【0060】

50

LY3002813に対する抗体には、LY3002813投与後の臨床試験（I5T-MC-AACC NCT01837641）からの2人の患者サンプルからアフィニティ精製された抗体が含まれる。これらの患者は、ACEブリッジの陽性結合シグナルで示されるように、LY3002813のADA応答を経時的に発達させていた。

【0061】

基本的に上記の手順に従って、LY3002813に対する抗体への201cまたは201cYDの結合を検出した場合、バックグラウンドを超えるシグナルは観察されなかった。これらのデータは、ヒトのLY3002813に対するADAが201cおよび201cYDを認識しないことを示している。

【0062】

[配列表]

抗体201c、抗体201cYD、および抗体201c H3B HCDR1（配列番号1）  
AASGFTFSSYPMS

抗体201c、抗体201cYD、および抗体201c H3B HCDR2（配列番号2）  
AISGSGGSTYYADSVKG

抗体201cおよび抗体201cYD HCDR3（配列番号3）  
AREGSGSGSYNGFDY

抗体201cおよび抗体201c H3B LCDR1（配列番号4）  
RASQSLGNWLA

抗体201cYD LCDR1（配列番号5）  
RASQSLGNVLA

抗体201cおよび抗体201c H3B LCDR2（配列番号6）  
YQASTLES

抗体201cYD LCDR2（配列番号7）  
YDASTLES

抗体201c、抗体201cYD、および抗体201c H3B LCDR3（配列番号8）  
QH YKGSFWT

抗体201cおよび抗体201cYD HCVR（配列番号9）  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQA  
PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAREGSGSGSYNGFDYWGQGT LVTV  
SS

抗体201cおよび抗体201c H3B LCVR（配列番号10）  
DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSLGNWLA WYQQKPK  
GKAPKLLIYQASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQP  
DDFATYYCQH YKGSFWTFGQGTKVEIK

抗体201cYD LCVR（配列番号11）  
DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSLGNVLA WYQQKPK  
GKAPKLLIYDASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQP  
DDFATYYCQH YKGSFWTFGQGTKVEIK

抗体201cおよび抗体201cYD重鎖（配列番号12）  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQA  
PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAREGSGSGSYNGFDYWGQGT LVTV  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSR

10

20

30

40

50

DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
 PVLDS DGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNH  
 YTQKSLSLSPG

抗体201cおよび抗体201c H3B軽鎖(配列番号13)

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSLGNWLAWYQQKRP  
 GKAPKLLIYQASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPP  
 DDFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFI FPP  
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
 ESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC

10

抗体201c YD軽鎖(配列番号14)

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSLGNYLAWYQQKRP  
 GKAPKLLIYDASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPP  
 DDFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFI FPP  
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
 ESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC

配列番号12の抗体重鎖を発現させるための例示的なDNA(配列番号15)

g a g g t g c a g c t g t t g g a g t c t g g g g g a g g c t t g g t a c a g c  
 c t g g g g g g t c c c t g a g a c t c t c c t g t g c a g c c t c t g g a t t  
 c a c c t t t a g c a g c t a t c c t a t g a g c t g g g t c c g c c a g g c t  
 c c a g g g a a g g g g c t g g a g t g g g t c t c a g c t a t t a g t g g t a  
 g t g g t g g t a g c a c a t a c t a c g c a g a c t c c g t g a a g g g c c g  
 g t t c a c c a t c t c c a g a g a c a a t t c c a a g a a c a c g c t g t a t  
 c t g c a a a t g a a c a g c c t g a g a g c c g a g g a c a c g g c c g t a t  
 a t t a c t g t g c g a g a g a g g g g g c t c a g g g a g t t a t t a t a a  
 c g g c t t t g a t t a t t g g g g c c a g g g a a c c c t g g t c a c c g t c  
 t c c t c a g c c t c c a c c a a g g g c c c a t c g g t c t t c c c g c t a g  
 c a c c c t c c t c c a a g a g c a c c t c t g g g g g c a c a g c g g c c c t  
 g g g c t g c c t g g t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c g g t g a c g  
 g t g t c g t g g a a c t c a g g c g c c c t g a c c a g c g g c g t g c a c a  
 c c t t c c c g g c t g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t a c t c c c t  
 c a g c a g c g t g g t g a c c g t g c c c t c c a g c a g c t t g g g c a c c  
 c a g a c c t a c a t c t g c a a c g t g a a t c a c a a g c c c a g c a a c a  
 c c a a g g t g g a c a a g a a a g t t g a g c c c a a a t c t t g t g a c a a  
 a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c a g c a c c t g a a c t c c t g  
 g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c c c c c a a a a c c c a a g g  
 a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c c t g a g g t c a c a t g c g t  
 g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a c c c t g a g g t c a a g t t c  
 a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a  
 c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c a a c a g c a c g t a c c g t g t  
 g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a c c a g g a c t g g c t g a a t  
 g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c t c c a a c a a a g c c c t c c  
 c a g c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a  
 g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c c c t g c c c c a t c c c g g  
 g a c g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g  
 t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a  
 g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a c t a c a a g a c c a c g c c c  
 c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c t t c t t c c t c t a t a g c a  
 a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t g g c a g c a g g g g a a c g t

20

30

40

50

c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c  
t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g t c t c c g g g t

配列番号13の抗体軽鎖を発現させるための例示的なDNA (配列番号16)

G a c a t c c a g a t g a c c c a g t c t c c t t c c a c c c t g t c t g c a t  
c t g t a g g a g a c a g a g t c a c c a t c a c t t g c c g g g c c a g t c a  
g a g t c t t g g t a a c t g g t t g g c c t g g t a t c a g c a g a a a c c a  
g g g a a a g c c c c t a a a c t c c t g a t c t a t c a g g c g t c t a c t t  
t a g a a t c t g g g g t c c c a t c a a g a t t c a g c g g c a g t g g a t c  
t g g g a c a g a g t t c a c t c t c a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c t  
g a t g a t t t t g c a a c t t a t t a c t g c c a a c a t t a t a a a g g t t  
c t t t t t g g a c g t t c g g c c a a g g g a c c a a g g t g g a a a t c a a  
a c g g a c c g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c a  
t c t g a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g t  
g c c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c a  
g t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a g  
g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c a  
g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g c t g a g c a a a g c a g a c t a c g a  
g a a a c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g c  
c t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g g a g a g t  
g c

10

20

配列番号14の抗体軽鎖を発現させるための例示的なDNA (配列番号17)

G a c a t c c a g a t g a c c c a g t c t c c t t c c a c c c t g t c t g c a t  
c t g t a g g a g a c a g a g t c a c c a t c a c t t g c c g g g c c a g t c a  
g a g t c t t g g t a a c t a t t t g g c c t g g t a t c a g c a g a a a c c a  
g g g a a a g c c c c t a a a c t c c t g a t c t a t g a t g c g t c t a c t t  
t a g a a t c t g g g g t c c c a t c a a g a t t c a g c g g c a g t g g a t c  
t g g g a c a g a g t t c a c t c t c a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c t  
g a t g a t t t t g c a a c t t a t t a c t g c c a a c a t t a t a a a g g t t  
c t t t t t g g a c g t t c g g c c a a g g g a c c a a g g t g g a a a t c a a  
a c g g a c c g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c a  
t c t g a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g t  
g c c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c a  
g t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a g  
g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c a  
g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g c t g a g c a a a g c a g a c t a c g a  
g a a a c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g c  
c t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g g a g a g t  
g c

30

抗体201c H3B HCDR3 (配列番号18)

A R E G G S G S Y F N G F D Y

40

抗体201c H3B HCVR (配列番号19)

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

抗体201c H3B重鎖 (配列番号20)

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

50

VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT  
 QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPEL  
 GGPSVFLFPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
 PVLDS DGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNH  
 YTQKSLSLSPG

配列番号 20 の抗体重鎖を発現するための例示的な DNA (配列番号 21)

g a g g t g c a g c t g t t g g a g t c t g g g g g a g g c t t g g t a c a g c  
 c t g g g g g g t c c c t g a g a c t c t c c t g t g c a g c c t c t g g a t t  
 c a c c t t t a g c a g c t a t c c t a t g a g c t g g g t c c g c c a g g c t  
 c c a g g g a a g g g g c t g g a g t g g g t c t c a g c t a t t a g t g g t a  
 g t g g t g g t a g c a c a t a c t a c g c a g a c t c c g t g a a g g g c c g  
 g t t c a c c a t c t c c a g a g a c a a t t c c a a g a a c a c g c t g t a t  
 c t g c a a a t g a a c a g c c t g a g a g c c g a g g a c a c g g c c g t a t  
 a t t a c t g t g c g a g a g a g g g g g c t c a g g g a g t t a t t t t a a  
 c g g c t t t g a t t a t t g g g g c c a g g g a a c c c t g g t c a c c g t c  
 t c c t c a g c c t c c a c c a a g g g c c c a t c g g t c t t c c c g c t a g  
 c a c c c t c c t c c a a g a g c a c c t c t g g g g g c a c a g c g g c c c t  
 g g g c t g c c t g g t c a a g g a c t a c t t c c c g a a c c g g t g a c g  
 g t g t c g t g g a a c t c a g g c g c c c t g a c c a g c g g c g t g c a c a  
 c c t t c c c g g c t g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t a c t c c c t  
 c a g c a g c g t g g t g a c c g t g c c c t c c a g c a g c t t g g g c a c c  
 c a g a c c t a c a t c t g c a a c g t g a a t c a c a a g c c c a g c a a c a  
 c c a a g g t g g a c a a g a a a g t t g a g c c c a a a t c t t g t g a c a a  
 a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t g c c c a g c a c c t g a a c t c c t g  
 g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c c c c a a a a c c c a a g g  
 a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c c t g a g g t c a c a t g c g t  
 g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a c c c t g a g g t c a a g t t c  
 a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a  
 c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g t a c a a c a g c a c g t a c c g t g t  
 g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a c c a g g a c t g g c t g a a t  
 g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c t t c a a c a a a g c c c t c c  
 c a g c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a  
 g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c c c t g c c c c a t c c c g g  
 g a c g a g c t g a c c a a g a a c c a g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g  
 t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a  
 g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a c t a c a a g a c c a c g c c c  
 c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c t t c t t c c t c t a t a g c a  
 a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t g g c a g c a g g g g a a c g t  
 c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c  
 t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g t c t c c g g g t

10

20

30

40

N3pGlu A (配列番号 22)

[pE]FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV  
 VIA

抗体 B12L 重鎖 (配列番号 23)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYDFTRYYYINWVRQA  
 PGQGLEWMGWINPGSGNTKYNEKFKGRVTITADESTSTAY  
 MELSSLRSEDTAVYYCAREGITVYWGQGTTVTVSSASTKG

50

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

抗体 B 1 2 L 輕鎖 ( 配列番号 2 4 )

10

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

【配列表】

0007532571000001.app

20

30

40

50

## フロントページの続き

- ライ・リリー・アンド・カンパニー内
- (72)発明者 ジロン・ル  
アメリカ合衆国46206-6288インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス6288、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内
- (72)発明者 タン・イン  
アメリカ合衆国46206-6288インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス6288、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内
- 審査官 藤山 純
- (56)参考文献 特許第7227312(JP, B2)  
特表2013-536191(JP, A)  
JEFFREY L CUMMINGS; ET AL, ALZHEIMER'S DISEASE DRUG-DEVELOPMENT PIPELINE: FEW CANDIDATES, FREQUENT FAILURES, ALZHEIMER'S RESEARCH & THERAPY, 英国, BIOMED CENTRAL LTD, 2014年07月03日, VOL:6, NR:4, PAGE(S):37-1/7, <http://dx.doi.org/10.1186/alzrt269>  
Ryman, Davis C et al., Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis, Neurology, vol.83, no.3, 2014年, pp.253-260
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
C12N 15 / 13  
C12N 5 / 10  
C12P 21 / 08  
C07K 16 / 18  
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)  
Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)  
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq  
UniProt / GeneSeq  
PubMed