

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 509020

(P2003 - 509020A)

(43)公表日 平成15年3月11日(2003.3.11)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* ( 参考 )
C 1 2 N 15/02	ZNA	A 6 1 K 35/74	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/74		35/76	4 C 0 8 4
35/76		39/395	D 4 C 0 8 5
38/00		A 6 1 P 19/08	4 C 0 8 7
39/395		25/28	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全143数 ) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 522381(P2001 - 522381)	(71)出願人	ラモット・ユニバーシティ・オーソリティ ・フォー・アプライド・リサーチ・アンド ・インダストリアル・ディベロップメント ・リミテッド RAMOT UNIVERSITY A UTHORITY FOR APPLI ED RESEARCH & INDU STRIAL DEVELOPMENT LTD . イスラエル61392テル・アビブ、ピー・オー ・ボックス39296、ハイム・レバノン・スト リート32番
(86)(22)出願日	平成12年8月31日(2000.8.31)	(74)代理人	弁理士 青山 葆 ( 外 1 名 )
(85)翻訳文提出日	平成13年5月2日(2001.5.2)		最終頁に続く
(86)国際出願番号	PCT/IL00/00518		
(87)国際公開番号	W001/018169		
(87)国際公開日	平成13年3月15日(2001.3.15)		
(31)優先権主張番号	60/152,417		
(32)優先日	平成11年9月3日(1999.9.3)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(31)優先権主張番号	09/473,653		
(32)優先日	平成11年12月29日(1999.12.29)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 ブラーク形成疾患の診断、治療、予防に有用な薬剤、組成物、その使用法

(57)【要約】

表示技術を使用してブラーク形成疾患に対する免疫を行う方法を提供する。この方法は、表示媒体上に抗原またはエピトープを提示して、ブラーク形成疾患を免疫するために、新規の薬剤または医薬組成物を利用する。この方法は、表示媒体上に抗体またはその活性部分を提示して、ブラーク形成疾患を免疫するための薬剤または医薬組成物を含む。抗原または抗体のいずれかをを用いると、免疫化に続きブラークの離解が生じる。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 プラーク形成疾患を処置するための方法であって、

(a) 表示媒体上にポリペプチドを表示し、該ポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示し、この少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体を創生でき、

(b) 表示媒体をレシピエントの体内に導入して、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体をつくる、  
工程を含む方法。

【請求項2】 プラーク形成疾患が、早期発症アルツハイマー病、後期発症アルツハイマー病、症候的アルツハイマー病、SAAアミロイド症、遺伝的アイスランド症候群、老化、多発性骨髄腫よりなる群から選ばれる、請求項1の方法。

【請求項3】 プラーク形成疾患が、スクレイピー、ウシ海綿状脳症(BSE)、クール(kuru)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカ病(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)よりなる群から選ばれる、請求項1の方法。

【請求項4】 該凝集タンパク質が、ベータ-アミロイド、血清アミロイドA、シスタンチンC、IgGカッパ軽鎖、プリオンタンパク質よりなる群から選ばれる、請求項1の方法。

【請求項5】 該表示媒体が、ウイルス、細菌、ポリペプチド担体よりなる群から選ばれる、請求項1の方法。

【請求項6】 該ウイルスが、2本鎖DNAウイルス、1本鎖DNAウイルス、ポジティブ鎖RNAウイルス、ネガティブ鎖RNAウイルスよりなる群から選ばれる、請求項5の方法。

【請求項7】 該ウイルスがバクテリアファージである、請求項5の方法。

【請求項8】 該バクテリアファージが糸状バクテリアファージである、請求項7の方法。

【請求項9】 該バクテリアファージがレシピエントの細菌相で増殖し得る

、請求項7の方法。

【請求項10】 該バクテリアファージが大腸菌内で増殖し得る、請求項7の方法。

【請求項11】 該バクテリアファージがfdである、請求項7の方法。

【請求項12】 該表示媒体がインビボで増殖し得ない粒子である、請求項1の方法。

【請求項13】 該表示媒体を選択し、 $10^{10}$ 単位の3倍量の30日間のレシピエントへの投与で、少なくとも1:50,000の抗体力価がELISAにより測定されるようにする、請求項1の方法。

【請求項14】 ポリペプチドを表示する表示媒体を含む、プラーク形成疾患を処置するための薬剤であって、該ポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示し、この少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体を創生できる、薬剤。

【請求項15】 プラーク形成疾患が、早期発症アルツハイマー病、後期発症アルツハイマー病、症候的アルツハイマー病、SAAアミロイド症、遺伝的アイランド症候群、老化、多発性骨髄腫よりなる群から選ばれる、請求項14の薬剤。

【請求項16】 プラーク形成疾患が、スクレイピー、ウシ海綿状脳症(BSE)、クール(kuru)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカ病(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)よりなる群から選ばれる、請求項14の薬剤。

【請求項17】 該凝集タンパク質が、ベータ-アミロイド、血清アミロイドA、シスタンチンC、IgGカッパ軽鎖、プリオンタンパク質よりなる群から選ばれる、請求項14の薬剤。

【請求項18】 該表示媒体が、ウイルス、細菌、ポリペプチド担体よりなる群から選ばれる、請求項14の薬剤。

【請求項19】 該ウイルスが、2本鎖DNAウイルス、1本鎖DNAウイルス、ポジティブ鎖RNAウイルス、ネガティブ鎖RNAウイルスよりなる群か

ら選ばれる、請求項18の薬剤。

【請求項20】 該ウイルスがバクテリアファージである、請求項18の薬剤。

【請求項21】 該バクテリアファージが糸状バクテリアファージである、請求項20の薬剤。

【請求項22】 該バクテリアファージがレシピエントの細菌相で増殖し得る、請求項20の薬剤。

【請求項23】 該バクテリアファージが大腸菌内で増殖し得る、請求項20の薬剤。

【請求項24】 該バクテリアファージがM13である、請求項20の薬剤。

【請求項25】 該表示媒体がインビボで増殖し得ない粒子である、請求項14の薬剤。

【請求項26】 該表示媒体を選択し、 $10^{10}$ 単位の3倍量の30日間のレシピエントへの投与で、少なくとも1:50,000の抗体力価がELISAにより測定されるようにする、請求項14の薬剤。

【請求項27】 ポリペプチドを表示する有効量の表示媒体を含んでなる、プラーク形成疾患を処置するための医薬組成物であって、該ポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示し、この少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体を創生できる。この医薬組成物は薬学的に許容される担体をさらに含み得る、医薬組成物。

【請求項28】 プラーク形成疾患が、早期発症アルツハイマー病、後期発症アルツハイマー病、症候的アルツハイマー病、SAAアミロイド症、遺伝的アイランド症候群、老化、多発性骨髄腫よりなる群から選ばれる、請求項27の医薬組成物。

【請求項29】 プラーク形成疾患が、スクレイピー、ウシ海綿状脳症(BSE)、クール(kuru)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン

・シュトロイスラー・シャインカ病（GSS）、致死性家族性不眠症（FFI）よりなる群から選ばれる、請求項27の医薬組成物。

【請求項30】 該凝集タンパク質が、ベータ-アミロイド、血清アミロイドA、シスタンチンC、IgGカッパ軽鎖、プリオンタンパク質よりなる群から選ばれる、請求項27の医薬組成物。

【請求項31】 該表示媒体が、ウイルス、細菌、ポリペプチド担体よりなる群から選ばれる、請求項27の医薬組成物。

【請求項32】 該ウイルスが、2本鎖DNAウイルス、1本鎖DNAウイルス、ポジティブ鎖RNAウイルス、ネガティブ鎖RNAウイルスよりなる群から選ばれる、請求項31の医薬組成物。

【請求項33】 該ウイルスがバクテリアファージである、請求項31の医薬組成物。

【請求項34】 該バクテリアファージが糸状バクテリアファージである、請求項33の医薬組成物。

【請求項35】 該バクテリアファージがレシピエントの細菌相で増殖し得る、請求項33の医薬組成物。

【請求項36】 該バクテリアファージが大腸菌内で増殖し得る、請求項33の医薬組成物。

【請求項37】 該バクテリアファージがfdである、請求項33の医薬組成物。

【請求項38】 該表示媒体がインビボで増殖し得ない粒子である、請求項27の医薬組成物。

【請求項39】 該表示媒体を選択し、 $10^{10}$ 単位の3倍量の30日間のレシピエントへの投与で、少なくとも1:50,000の抗体力価がELISAにより測定されるようにする、請求項27の医薬組成物。

【請求項40】 プラーク形成疾患を処置するための表示媒体をつくる方法であって、表示媒体のゲノムを遺伝子的に改変する工程を含んでなり、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示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挿入する

ことにより行い、この少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体を創生できるものであり、表示媒体が増殖したときに、該ポリペプチドを表示媒体が表示する方法。

【請求項41】 プラーク形成疾患が、早期発症アルツハイマー病、後期発症アルツハイマー病、症候的アルツハイマー病、SAAアミロイド症、遺伝的アイランド症候群、老化、多発性骨髄腫よりなる群から選ばれる、請求項40の方法。

【請求項42】 プラーク形成疾患が、スクレイピー、ウシ海綿状脳症(BSE)、クール(kuru)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカ病(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)よりなる群から選ばれる、請求項40の方法。

【請求項43】 該凝集タンパク質が、ベータ-アミロイド、血清アミロイドA、シスタンチンC、IgGカッパ軽鎖、プリオンタンパク質よりなる群から選ばれる、請求項40の方法。

【請求項44】 該表示媒体が、ウイルス、細菌、ポリペプチド担体よりなる群から選ばれる、請求項40の方法。

【請求項45】 該ウイルスが、2本鎖DNAウイルス、1本鎖DNAウイルス、ポジティブ鎖RNAウイルス、ネガティブ鎖RNAウイルスよりなる群から選ばれる、請求項44の方法。

【請求項46】 該ウイルスがバクテリアファージである、請求項44の方法。

【請求項47】 該バクテリアファージが糸状バクテリアファージである、請求項46の方法。

【請求項48】 該バクテリアファージがレシピエントの細菌相で増殖し得る、請求項46の方法。

【請求項49】 該バクテリアファージが大腸菌内で増殖し得る、請求項46の方法。

【請求項50】 該バクテリアファージがfdである、請求項46の方法。

【請求項51】 該表示媒体がインビボで増殖し得ない粒子である、請求項40の方法。

【請求項52】 該表示媒体を選択し、 $10^{10}$ 単位の3倍量の30日間のレシピエントへの投与で、少なくとも1:50,000の抗体力価がELISAにより測定されるようにする、請求項40の方法。

【請求項53】 プラーク形成疾患を処置するための方法であって、  
(a) 表示媒体上にポリペプチドを表示し、該ポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合する抗体の少なくとも1つの免疫学的部分を提示し、該抗体の免疫学的部分は、凝集タンパク質を離解し得るか、および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得、  
(b) 該表示媒体をレシピエントの体内に導入して、凝集タンパク質を離解するか、および/または凝集タンパク質の凝集を防止する、  
工程を含んでなる方法。

【請求項54】 該表示媒体をレシピエントの体内に導入して、凝集タンパク質を離解するか、および/または凝集タンパク質の凝集を防止することが、表示媒体をレシピエントに経鼻的に投与することによる、請求項53の方法。

【請求項55】 プラーク形成疾患が、早期発症アルツハイマー病、後期発症アルツハイマー病、症候的アルツハイマー病、SAAアミロイド症、遺伝的アイスランド症候群、老化、多発性骨髄腫よりなる群から選ばれる、請求項53の方法。

【請求項56】 プラーク形成疾患が、スクレイピー、ウシ海綿状脳症(BSE)、クール(kuru)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカ病(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)よりなる群から選ばれる、請求項53の方法。

【請求項57】 該凝集タンパク質が、ベータ-アミロイド、血清アミロイドA、シスタンチンC、IgGカッパ軽鎖、プリオンタンパク質よりなる群から選ばれる、請求項53の方法。

【請求項58】 該プリオンタンパク質の少なくとも1つのエピトープが、

配列番号25で規定されたアミノ酸配列の少なくとも部分により定義される、請求項53の方法。

【請求項59】 該表示媒体が、ウイルス、細菌、ポリペプチド担体よりなる群から選ばれる、請求項53の方法。

【請求項60】 該ウイルスが、2本鎖DNAウイルス、1本鎖DNAウイルス、ポジティブ鎖RNAウイルス、ネガティブ鎖RNAウイルスよりなる群から選ばれる、請求項59の方法。

【請求項61】 該ウイルスがバクテリアファージである、請求項59の方法。

【請求項62】 該バクテリアファージが糸状バクテリアファージである、請求項61の方法。

【請求項63】 該バクテリアファージがレシピエントの細菌相で増殖し得る、請求項61の方法。

【請求項64】 該バクテリアファージが大腸菌内で増殖し得る、請求項61の方法。

【請求項65】 該バクテリアファージがfdである、請求項61の方法。

【請求項66】 該表示媒体がインビボで増殖し得ない粒子である、請求項53の方法。

【請求項67】 ポリペプチドを表示する表示媒体を含んでなる、プラーク形成疾患を処置するための薬剤であって、該ポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合し得る抗体の少なくとも1つの免疫学的部分を提示し、該抗体の免疫学的部分は、凝集タンパク質を離解し得るか、および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る、薬剤。

【請求項68】 プラーク形成疾患が、早期発症アルツハイマー病、後期発症アルツハイマー病、症候的アルツハイマー病、SAAアミロイド症、遺伝的アイランド症候群、老化、多発性骨髄腫よりなる群から選ばれる、請求項67の薬剤。

【請求項69】 プラーク形成疾患が、スクレイピー、ウシ海綿状脳症(B



S E )、クール(kuru)、クロイツフェルト・ヤコブ病 ( C J D )、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカ病 ( G S S )、致死性家族性不眠症 ( F F I ) よりなる群から選ばれる、請求項 6 7 の薬剤。

【請求項 7 0】 該凝集タンパク質が、ベータ - アミロイド、血清アミロイド A、シスタンチン C、I g G カッパ軽鎖、プリオンタンパク質よりなる群から選ばれる、請求項 6 9 の薬剤。

【請求項 7 1】 該プリオンタンパク質の少なくとも 1 つの該エピトープが、配列番号 2 5 で規定するアミノ酸配列により形成される、請求項 6 9 の薬剤。

【請求項 7 2】 該表示媒体が、ウイルス、細菌、ポリペプチド担体よりなる群から選ばれる、請求項 6 9 の薬剤。

【請求項 7 3】 該ウイルスが、2 本鎖 D N A ウイルス、1 本鎖 D N A ウイルス、ポジティブ鎖 R N A ウイルス、ネガティブ鎖 R N A ウイルスよりなる群から選ばれる、請求項 7 2 の薬剤。

【請求項 7 4】 該ウイルスがバクテリアファージである、請求項 7 2 の薬剤。

【請求項 7 5】 該バクテリアファージが糸状バクテリアファージである、請求項 7 4 の薬剤。

【請求項 7 6】 該バクテリアファージがレシピエントの細菌相で増殖し得る、請求項 7 4 の薬剤。

【請求項 7 7】 該バクテリアファージが大腸菌内で増殖し得る、請求項 7 4 の薬剤。

【請求項 7 8】 該バクテリアファージが f d である、請求項 7 4 の薬剤。

【請求項 7 9】 該表示媒体がインビボで増殖し得ない粒子である、請求項 6 7 の薬剤。

【請求項 8 0】 ポリペプチドを表示する有効量の表示媒体を含んでなる、プラーク形成疾患を処置するための医薬組成物であって、該ポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも 1 つのエピトープに結合し得る抗体の少なくとも 1 つの免疫学的部分を提示し、該抗体の免疫学的部分は、凝集タンパク質を離解し得るか、および / または凝集タ

ンパク質の凝集を防止し、さらに薬学的に許容される担体を含んでなる医薬組成物。

【請求項 8 1】 プラーク形成疾患が、早期発症アルツハイマー病、後期発症アルツハイマー病、症候的アルツハイマー病、S A A アミロイド症、遺伝的アイランド症候群、老化、多発性骨髄腫よりなる群から選ばれる、請求項 8 0 の医薬組成物。

【請求項 8 2】 プラーク形成疾患が、スクレイピー、ウシ海綿状脳症 ( B S E )、クール(kuru)、クロイツフェルト・ヤコブ病 ( C J D )、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカ病 ( G S S )、致死性家族性不眠症 ( F F I ) よりなる群から選ばれる、請求項 8 0 の医薬組成物。

【請求項 8 3】 該凝集タンパク質が、ベータ - アミロイド、血清アミロイド A、シスタンチン C、I g G カッパ軽鎖、プリオンタンパク質よりなる群から選ばれる、請求項 8 0 の医薬組成物。

【請求項 8 4】 該表示媒体が、ウイルス、細菌、ポリペプチド担体よりなる群から選ばれる、請求項 8 0 の医薬組成物。

【請求項 8 5】 該ウイルスが、2 本鎖 D N A ウイルス、1 本鎖 D N A ウイルス、ポジティブ鎖 R N A ウイルス、ネガティブ鎖 R N A ウイルスよりなる群から選ばれる、請求項 8 4 の医薬組成物。

【請求項 8 6】 該ウイルスがバクテリアファージである、請求項 8 4 の医薬組成物。

【請求項 8 7】 該バクテリアファージが糸状バクテリアファージである、請求項 8 6 の医薬組成物。

【請求項 8 8】 該バクテリアファージがレシピエントの細菌相で増殖し得る、請求項 8 6 の医薬組成物。

【請求項 8 9】 該バクテリアファージが大腸菌内で増殖し得る、請求項 8 6 の医薬組成物。

【請求項 9 0】 該バクテリアファージが f d である、請求項 8 4 の医薬組成物。

【請求項 9 1】 該表示媒体がインビボで増殖し得ない粒子である、請求項

80の方法。

【請求項92】 プラーク形成疾患を処置するための表示媒体をつくる方法であって、表示媒体のゲノムを遺伝子的に改変する工程を含んでなり、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合し得る抗体の少なくとも1つの免疫学的部分をコードするポリヌクレオチドを挿入することにより行い、該抗体の免疫学的部分は、凝集タンパク質を離解し得るか、抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る、方法。

【請求項93】 プラーク形成疾患が、早期発症アルツハイマー病、後期発症アルツハイマー病、症候的アルツハイマー病、SAAアミロイド症、遺伝的アイランド症候群、老化、多発性骨髄腫よりなる群から選ばれる、請求項92の方法。

【請求項94】 プラーク形成疾患が、スクレイピー、ウシ海綿状脳症(BSE)、クール(kuru)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカ病(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)よりなる群から選ばれる、請求項92の方法。

【請求項95】 該凝集タンパク質が、ベータ-アミロイド、血清アミロイドA、シスタンチンC、IgGカッパ軽鎖、プリオンタンパク質よりなる群から選ばれる、請求項92の方法。

【請求項96】 該表示媒体が、ウイルス、細菌、ポリペプチド担体よりなる群から選ばれる、請求項92の方法。

【請求項97】 該ウイルスが、2本鎖DNAウイルス、1本鎖DNAウイルス、ポジティブ鎖RNAウイルス、ネガティブ鎖RNAウイルスよりなる群から選ばれる、請求項96の方法。

【請求項98】 該ウイルスがバクテリアファージである、請求項96の方法。

【請求項99】 該バクテリアファージが糸状バクテリアファージである、請求項98の方法。

【請求項100】 該バクテリアファージがレシピエントの細菌相で増殖し

得る、請求項98の方法。

【請求項101】 該バクテリアファージが大腸菌内で増殖し得る、請求項98の方法。

【請求項102】 該バクテリアファージがfdである、請求項98の方法。

【請求項103】 該表示媒体がインビボで増殖し得ない粒子である、請求項92の方法。

【請求項104】 工学処理標的化部分を欠く表示媒体をレシピエントの脳に導入する方法であって、該表示媒体をレシピエントに経鼻的に投与する工程を含んでなる方法。

【請求項105】 該表示媒体が、ウイルス、細菌、ポリペプチド担体よりなる群から選ばれる、請求項104の方法。

【請求項106】 該ウイルスが、2本鎖DNAウイルス、1本鎖DNAウイルス、ポジティブ鎖RNAウイルス、ネガティブ鎖RNAウイルスよりなる群から選ばれる、請求項105の方法。

【請求項107】 該ウイルスがバクテリアファージである、請求項105の方法。

【請求項108】 該バクテリアファージが糸状バクテリアファージである、請求項107の方法。

【請求項109】 該バクテリアファージがレシピエントの細菌相で増殖し得る、請求項107の方法。

【請求項110】 該バクテリアファージが大腸菌内で増殖し得る、請求項107の方法。

【請求項111】 該バクテリアファージがfdである、請求項107の方法。

【請求項112】 該表示媒体がインビボで増殖し得ない粒子である、請求項104の方法。

【請求項113】 表示媒体が、抗体の免疫学的部分を少なくとも表示する、請求項104の方法。

【請求項114】 該抗体の免疫学的部分が、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合するのに働き、該抗体の免疫学的部分が、該凝集タンパク質を離解し得るか、および/または該凝集タンパク質の凝集を防止し得る、請求項104の方法。

【請求項115】 プリオンタンパク質凝集体を離解し得るか、および/または該プリオンタンパク質の凝集を防止し得る抗体の少なくとも1つの免疫学的部分を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項116】 ポリヌクレオチドが、配列番号25で規定するアミノ酸配列により形成される少なくとも1つのエピトープに結合し得る、請求項115のポリペプチド。

【請求項117】 該プリオンタンパク質が、スクレイピー、ウシ海綿状脳症(BSE)、クール(kuru)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカ病(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)よりなる群から選ばれるプラーク形成疾患の形成に関連するスクレイピー・イソ形態(PrP<sup>Sc</sup>)である、請求項116のポリペプチド。

【請求項118】 生物サンプル中のプリオンタンパク質の存在または不存在を検出する方法であって、

(a) 抗プリオン抗体またはその免疫学的部分を生物サンプルとともにインキュベートし、

(b) 抗プリオン抗体またはその免疫学的部分で形成された抗原複合体の存在または不存在を測定することにより、生物サンプル中のプリオンタンパク質の存在または不存在を決定する、  
工程を含んでなる方法。

【請求項119】 プリオンタンパク質がプラーク形成に関連する凝集タンパク質である、請求項118の方法。

【請求項120】 該抗プリオン抗体または該その免疫学的部分が、配列番号25で規定するアミノ酸配列により形成される少なくとも1つのエピトープに対する、請求項118の方法。

【請求項121】 生物サンプルが、ヒト、霊長類、サル、ブタ、ウシ、ヒ

ツジ、シカ、エルフ、ネコ、イヌ、ニワトリから選ばれる哺乳類の組織および/  
または体液に由来する、請求項118の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 本発明の技術分野および背景

本発明は、ブラーク（斑）形成疾患の処置のための、薬剤および組成物およびその使用法に関する。殊に本発明による方法は（i）ブラーク形成の予防および既存ブラークの離解が可能な抗体をインビボで誘導するように表示媒体表面にクローニングされ、表示されたブラーク由来抗原；および（ii）少なくともその免疫原的部分がクローニングされ、媒体上に表示されており、その免疫原的部分がブラーク形成の予防および既存ブラークを離解が可能なブラーク由来抗原に対して産生された抗体；の使用を包含する。本発明は、さらにヒトを含む動物の脳に対して表示媒体を標的とする方法およびブラーク形成プリオンの存在を検出する方法に関する。

## 【0002】

ブラーク形成疾患は、脳におけるアミロイドブラーク沈着物の存在ならびにニューロン性の変性によって特徴付けられる。アミロイド沈着物は凝集して不溶性物質となったペプチドによって形成される。このペプチドの性質は様々な疾患において変化するが、多くの場合に凝集物は - プリーツシート構造を持ち、コンゴレッド色素によって染色される。アルツハイマー病（AD）に加えて、早期発症アルツハイマー病、後期発症アルツハイマー病、症候的アルツハイマー病などのアミロイド沈着によって特徴付けられる疾患は、例えば、SAAアミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫およびプリオン病がある。最も通常のプリオン疾患は、動物ではヒツジおよびヤギのスクレーピーおよびウシ科のウシ海綿状変性型脳症（BSE）がある（Wilesmith と Wells (1991) Curr. Top. Microbiol. Immunol., 172: 21-38）。ヒトでのプリオン病は：（i）クール病、（ii）クロイツフェルト・ヤコブ病（CID）、（iii）ゲルストマン・ストロイスラー・シェインカー病（GSS）、および（iv）致死性家族性不眠症（FFI）（Gajdusek (1977), Science, 197: 943-960; Medori, Tritschler et al., (1992), N. Engl. J. Med., 326: 444-449）の4種が確認されている。

## 【0003】

## (プリオン病の病因学)

プリオン病は正常な細胞プリオンタンパク質 ( $PrP^c$ ) から対応するスクレーピー型アイソフォーム ( $PrP^{Sc}$ ) への変換を含む。分光学的測定によって、 $PrP^c$  からスクレーピー型アイソフォーム ( $PrP^{Sc}$ ) への変換には主な遷移状態コンフォメーションを含み、その他のアミロイド原疾患と同様に、プリオン病はタンパク質コンフォメーションの疾患であることが示されている。 $PrP^c$  から  $PrP^{Sc}$  への遷移状態は  $\beta$ -ラセン二次構造の減少 (42% から 30% へ) および  $\beta$ -シート含量の顕著な増加 (3% から 43% へ) を伴う (Caughey et al., 1991, Pan et al., 1993)。この再配列には、非変性デタージェントへの不溶性およびタンパク分解に対する部分的な抵抗性を含む、物理化学的に異常な性質を伴う。以前の研究で、ヒト  $PrP$  ( $PrP^{106-126}$ ) の残基 106 ~ 126 と相同的な合成ペプチドが  $PrP^{Sc}$  の病原性および物理化学的特性の一部を示すことが証明されている (Selvaggini et al., 1993; Tagliavini et al., 1993; Forloni, et al., 1993)。このペプチドは顕著なコンフォメーション多形を示し、様々な環境の下で種々の二次構造を獲得する (De Gioia et al., 1994)。これは、緩衝液中で  $\beta$ -シートコンフォメーションをとり、凝集してプロテアーゼ消化に部分的な抵抗性を示すアミロイド原線維となる傾向がある。最近、抗体 3F4 とそのペプチドエピトープ ( $PrP^{104-113}$ ) との複合体に関する X 線結晶学的研究で、プリオン病の進行に必須なコンフォメーション再配列の成分であると思われる可焼性領域の構造的側面が提供された (Kanyo et al., 1999)。折りたたみ - ほどきおよび / または溶解 - 凝集過程に関与する一群の連続事象の確認は、凝集の予防および / または離解の誘導に基づいてプラーク形成疾患の処置に新しい治療指針をもたらすであろう (Silén と Agard, 1989; Frenkel et al., 1998; Horiuchi と Caughey, 1999)。

## 【0004】

## (アルツハイマー病 - 臨床的概観)

アルツハイマー病 (AD) は老人性痴呆を起こす進行性疾患である。広義には、この疾患は老齢 (典型的には 65 才以上) で発症する遅発型およびたとえば 3



5才と60才との間のように老齡期よりかなり前に進行する早発型の二型の類型に分類される。この疾患の両型での病理学は類似であるが、異常は若年に発症する症例でより重症であり、広範囲に及ぶ傾向がある。この疾患は老人斑および神経原繊維濃縮体の脳病変二型によって特徴付けられる。老人斑は脳組織切片の鏡検で見ることができ、中心に細胞外アミロイド沈着を持つ、破壊された好中球の、直径150mmまでの部分である。神経原繊維濃縮体は互いに対をなして撚り合わされたフィラメント2本からなるタンパク質の細胞内沈着物である。

#### 【0005】

##### (老人斑およびその他のアミロイドプラーク)

老人斑の基本的構成成分はA $\beta$  - または  $\text{A}\beta$  - アミロイドペプチド (  $\text{A}\beta$  ) と呼ばれるペプチドである。このアミロイド ペプチドは、アミロイド前駆体タンパク質 (  $\text{APP}$  ) と呼ばれる前駆体タンパク質の39~43アミノ酸を持つ内部断片である。  $\text{APP}$  タンパク質の中の変異体数種がアルツハイマー病の存在に関連付けられている (例えば、Goate et al., Nature, 349: 704, 1991, バリン717がイソロイシンに ; Chartier Harlan et al., Nature, 353: 844, 1991, バリン717がグリシンに ; Murrel et al., Science, 254: 97, 1991, バリン717がフェニルアラニンに ; Mullan et al., Nature Genet., 1: 345, 1992, リジン595 - メチオニン596からアスパラギン595 - ロイシン596への二重突然変異体 ; 参照 )。

#### 【0006】

このような変異体は、  $\text{APP}$  から  $\text{A}\beta$  - アミロイドへのプロセッシングの増大または変化、特に  $\text{A}\beta$  - アミロイドの長型 ( long form: すなわち、  $\text{A}\beta_{1-42}$  および  $\text{A}\beta_{1-43}$  ) を増量させる  $\text{APP}$  のプロセッシングによってアルツハイマー病を起こすと思われる。例えば、プレセニリン遺伝子  $\text{PS1}$  および  $\text{PS2}$  などの遺伝子における変異は長型  $\text{A}\beta$  - アミロイド作製を増量するように  $\text{APP}$  のプロセッシングに間接的な影響を与えている (Hardy, TINS, 20: 154, 1997参照)。これらの観察によると、  $\text{A}\beta$  - アミロイド、特に長型はアルツハイマー病における病因の一要素である。

#### 【0007】

自己凝集が知られているその他のペプチドまたはタンパク質も、限定でないが、例えば、アミリン (Young AA et al., 1994, FEBS Lett., 343(3): 237-41) ; ボンベシン、セルレイン、コレシストキニンオクタペプチド、エレドイシン、ガストリン関連ペンタペプチド、ガストリンテトラペプチド、(還元型)ソマトスタチン、サブスタンス P ; およびペプチドである黄体形成ホルモン放出ホルモン、ソマトスタチン・N - T y r (BanksとKastin, Prog. Brain Res., 91: 139-4, 1992) などが知られている。

#### 【0008】

高親和性モノクローナル抗体 (mAb) の該部分への結合は、全タンパク質鎖または会合の分子動力学を変化させるであろう。適当な選択によって、mAbは、不完全に折りたたまれたエピトープを認識し、部分的な折りたたみまたは正しくない折りたたみのタンパク質を在来型のコンフォメーションに誘導することが見出されている (Frauenfelder et al., 1979; Blond and Goldberg, 1987; Karplus and Petsko, 1990; Carlson and Yarmush, 1992; Solomon と Schwartz, 1995)。

#### 【0009】

(処置法)

Solomon の米国特許第5,688,561号はタンパク質凝集体の離解およびそのタンパク質の凝集を予防するために有効なモノクローナル抗体を確認する方法を教示している。特に米国特許第5,688,561号は、試験管内で - アミロイドブラークを離解し、また - アミロイドブラーク形成を予防するために有効な抗 - アミロイドモノクローナル抗体を示している。米国特許第5,688,561号は、 - アミロイドの凝集によるブラーク形成を予防するために、または既に形成されている - アミロイドブラークを離解するために、該抗体のインビボ使用を明記している。しかしながら、これらの教示は、該抗体を作製するために採用すべきエピトープを確認していない。これに加えて、これらの教示は、血液脳関門 (BBB) を経由して行われる抗体の脳への透過を可能にする手段を提供していない。さらにその上、この特許は、抗原または抗体に用いる送達手段としてファージ表示技術の使用を教示していない。なおその上に、米国特許第5,688,561号は該抗体の

インビボでの有効性を証明する実験結果を示していない。

【0010】

McMichaelの欧州特許第526,511号は、ADが確実になる前の患者に - アミロイドの同種療法用の用量（10 - 2 mg/日またはそれ以下）を投与する方法を教示している。血液約5 Lを持つ典型的なヒトでは、この用量の上限でも2 ng/mL以下の濃度にしか到らないと考えられる。ヒト血中 - アミロイドの正常な濃度は典型的には50 ~ 200 pg/mLの範囲内である（Seubert et al., Nature, 359: 325-327, 1992）。ここに提案された用量は内因性循環 - アミロイドのレベルを僅かに変化させるだけなので、また欧州特許第526,511号はアジュバントの使用を推奨していないので、なんらかの治療効果が得られとは考え難い。

【0011】

Schenkの出願 PCT/US98/25386 および Schenk et al. Nature文献（Nature, 400: 173-177, 1999）は、プラークの形成を予防するために、または存在するプラークを溶解するために、抗体を作製する目的で患者に - アミロイド免疫原を投与することを教示している。Schenk によれば、抗原50 mgから100 mgまで、アジュバントを採用すれば1 mgから10 mgまでの抗原が必要である。これらの両教示はまたどちらも、正常な状態では抗体の脳への侵入を妨害する血液脳関門を無視して、 - アミロイドに対する抗体の直接的な投与によって同様な効果が達成されるかもしれないと述べている。

【0012】

また、注目すべきことは、これらの教示が典型的には、“ - アミロイドペプチドの天然型のいずれか、殊にヒト型（すなわち、A<sub>39</sub>、A<sub>40</sub>、A<sub>41</sub>、A<sub>42</sub>またはA<sub>43</sub>）” または“例えば、 - アミロイドペプチド、活性断片、またはその他のアミノ酸を含む類似体などの、より長いポリペプチド” または“単量体性免疫原物質の多量体”の使用に限定されていることである。

【0013】

しかしながら、これらの教示は、 - アミロイドの最初の28アミノ酸が試験管内で - アミロイドプラークの凝集を離解および阻害の両者を行う抗体を誘導するために十分であると教示している既知のデータ（HananとSolomon, Amyloid:

Int. J. Exp. Clin. Invest., 3: 130-133, 1996; Solomon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93: 452-455, 1996; Solomon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94: 4109-4112, 1997) を無視している。

#### 【0014】

Schenk文献およびSchenk et al.文献は、  
- アミロイドペプチドの3位～6位に存在するアミノ酸残基の僅かに4個(EFRH、配列番号1)からなり、連続エピトープであることが知られている  
- アミロイドプラーク(Frenkel, D., J. Neuroimmunol., 88: 85-90, 1998)にあるN末端エピトープの使用を教示していない。その後、このエピトープに対する抗体は  
- アミロイド原線維を離解し、  
- アミロイドプラークの溶解を再生し、およびPC12細胞に及ぼす神経毒性効果を予防することが示されている(Solomon B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94: 4109-4112, 1997; Solomon B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93: 452-455, 1996)。

#### 【0015】

このエピトープはランダム組合せヘキサペプチド・ファージ表示法を用いて抗凝集抗体によって結合されるエピトープであることが独立に確認されている(Frenkel と Solomon, J. of Neuroimmunol., 88: 85-90, 1998)。

#### 【0016】

このEFRH(配列番号1)エピトープは、  
- アミロイドペプチドが溶液中にある時も凝集体中にある時も抗体結合が可能である。モノクローナル抗体によるこのエピトープの遮断は、自己凝集を予防し、既に形成されている凝集体の再溶解を可能にする。

#### 【0017】

これらの発見は、Schenkと協力者の教示がどうみても効果的でないことを示唆している。上記のように、ヒト血清中の  
- アミロイドの正常濃度は50～200 pg/mLであるから、このペプチドによる免疫化は抗体力価が低いか、または強力なアジバントを使えば高い毒性を示すと考えられ、治療には適用できないであろう。事実、  
- アミロイドに対する抗体の有意の血清中力価を達成するためには、一連の11ヶ月に及ぶ注射が必要であった(Schenk et al., Nature, 400:

173-177, 1999)。一定時間にわたって血清力価が持続する程度は未だに知られていないが、この点が早期発症アルツハイマー病に関して特に重大な問題である。

#### 【0018】

Schenkとその協力者によると、例えば、 $\beta$ -アミロイドのような免疫原ペプチドがウイルスまたはバクテリアの表面に表示されるかも知れない。しかしながら、そのように表示された抗原の使用して免疫することは教示していない。この報告では、エピトープを解明しておらず、実験データも提供されていない。これに加え、表示媒体上に表示された抗体の送達法についても、SchenkまたはSchenk et al.は全く教示していない。

#### 【0019】

総括すると、この先行技術は、インビボで短時間に抗凝集抗体の有効な力価を作製できる方法および/またはプラーク形成疾患の患者の脳内に導入するための方法を教示していない。さらに、先行技術の教示によって作製される力価の持続性が確立されていない。

#### 【0020】

このように、持続効果を持ち、効率が高く、作用発現が迅速で、治療される対象に及ぼす悪影響がなく、また多量生産が容易なアミロイドプラークをインビボで離解するのに効果的な手段は、広く認識された必要性が存在しており、また非常に有益であろう。

#### 【0021】

本発明は、ひとつの態様において、次の工程を含んでなり、プラーク形成疾患を処置するための方法を提供する。工程(a)表示媒体上にポリペプチドを表示する。このポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示する。この少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体を創生できる。工程(b)表示媒体をレシピエントの体内に導入して、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体をつくる。

## 【0022】

本発明は、別の態様において、ポリペプチドを表示する表示媒体を含んでなり、プラーク形成疾患を処置するための薬剤を提供する。このポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示する。この少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体を創生できる。

## 【0023】

本発明は、さらに別の態様において、ポリペプチドを表示する有効量の表示媒体を含んでなり、プラーク形成疾患を処置するための医薬組成物を提供する。このポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示する。この少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体を創生できる。この医薬組成物は薬学的に許容される担体をさらに含み得る。

## 【0024】

本発明は、さらに別の態様において、プラーク形成疾患を処置するための表示媒体をつくる方法を提供する。この方法は、表示媒体のゲノムを遺伝子的に改変する工程を含んでなり、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示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挿入することにより行う。この少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体を創生できるものであって、表示媒体が増殖したときに、ポリペプチドを表示媒体が表示する。

## 【0025】

本発明は、追加の態様において、次の工程を含み、プラーク形成疾患を処置するための方法を提供する。工程(a)プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合する抗体の少なくとも1つの免疫学的部分を提示するポリペプチドを表示する。この結合は、凝集

タンパク質を離解し得るか、および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る。工程(b)表示媒体をレシピエントの体内に導入して、凝集タンパク質を離解するか、および/または凝集タンパク質の凝集を防止する。

【0026】

本発明は、さらに追加の態様において、工学処理標的用部分を欠く表示媒体をレシピエントの脳に導入する方法を提供する。この方法は、表示媒体をレシピエントに経鼻的に投与する工程を含んでなる。

【0027】

下記する本発明の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、表示媒体をレシピエントの体内に導入して凝集タンパク質を離解する工程は、レシピエントの嗅覚系を経由して効果的となる。

【0028】

本発明は、別の追加の態様において、ポリペプチドを表示する表示媒体を含み、プラーク形成疾患を処置するための薬剤を提供する。このポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合し得る抗体の少なくとも1つの免疫学的部分を提示する。この抗体の免疫学的部分は、凝集タンパク質を離解し得るか、および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る。

【0029】

本発明は、さらに追加の態様において、ポリペプチドを表示する有効量の表示媒体を含んでなり、プラーク形成疾患を処置するための医薬組成物を提供する。このポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合し得る抗体の少なくとも1つの免疫学的部分を提示する。この抗体の免疫学的部分は、凝集タンパク質を離解し得るか、および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る。この医薬組成物は薬学的に許容される担体をさらに含んでなる。

【0030】

本発明は、さらに別の態様において、プラーク形成疾患を処置するための表示媒体をつくる方法を提供する。この方法は、表示媒体のゲノムを遺伝子的に改変

する工程を含んでなり、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合し得る抗体の少なくとも1つの免疫学的部分をコードするポリヌクレオチドを挿入することにより行う。この抗体の免疫学的部分は、凝集タンパク質を離解し得るか、抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る。

【0031】

本発明は、さらなる態様において、プリオンタンパク質凝集体を離解し得るか、および/または該プリオンタンパク質の凝集を防止し得る抗体の少なくとも1つの免疫学的部分を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0032】

下記する本発明の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、ポリヌクレオチドは、配列番号25で規定するアミノ酸配列により形成される少なくとも1つのエピトープに結合し得る。

【0033】

本発明は、さらなる態様において、次の工程を含んでなり、生物サンプル中のプリオンタンパク質の存在または不存在を検出する方法を提供する。工程(a)抗プリオン抗体またはその免疫学的部分を生物サンプルとともにインキュベートする。工程(b)抗プリオン抗体またはその免疫学的部分で形成された抗原複合体の存在または不存在を測定することにより、生物サンプル中のプリオンタンパク質の存在または不存在を決定する。

【0034】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、プラーク形成疾患は、早期発症アルツハイマー病、後期発症アルツハイマー病、症候的アルツハイマー病、SAAアミロイド症、遺伝的アイスランド症候群、老化、多発性骨髄腫よりなる群から選ばれる。

【0035】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、プラーク形成疾患は、スクレイピー、ウシ海綿状脳症(BSE)、クール(kuru)、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカ病(G



S S)、致死性家族性不眠症(F F I)よりなる群から選ばれる。

【0036】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、凝集タンパク質は、ベータ-アミロイド、血清アミロイドA、シスタンチンC、IgGカップ軽鎖、プリオンタンパク質よりなる群から選ばれる。

【0037】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、表示媒体は、ウイルス、細菌、ポリペプチド担体よりなる群から選ばれる。

【0038】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、ウイルスは、2本鎖DNAウイルス、1本鎖DNAウイルス、ポジティブ鎖RNAウイルス、ネガティブ鎖RNAウイルスよりなる群から選ばれる。

【0039】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、表示媒体はバクテリアファージである。

【0040】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、表示媒体は糸状バクテリアファージである。

【0041】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、バクテリアファージ表示媒体は宿主の細菌相で増殖し得る。

【0042】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、バクテリアファージ表示媒体は大腸菌内で増殖し得る。

【0043】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、バクテリアファージ表示媒体はfdである。

【0044】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、表示媒体はインビ

ポで増殖し得ない。

【0045】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、選択された表示媒体の $10^{10}$ 単位の3倍量が30日間の投与で少なくとも1:50,000の抗体価を誘導する。これはE L I S Aにより測定した。

【0046】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、該プリオンタンパク質の少なくとも1つのエピトープが配列番号25に規定するアミノ酸配列により形成される。

【0047】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、抗体の免疫学的部分は、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合するのに働く。この抗体の該免疫学的部分は、該凝集タンパク質を離解し得るか、および/または該凝集タンパク質の凝集を防止し得る。

【0048】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、プリオンタンパク質は、プラーク形成に関連する凝集タンパク質である。

【0049】

記載の好ましい実施態様における更なる特性にしたがって、生物サンプルは、ヒト、霊長類、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、シカ、エルフ、ネコ、イヌ、ニワトリの組織および/または体液に由来する。

【0050】

本発明は、プラーク形成疾患の進行予防や回復のための方法、薬剤、医薬組成物を提供して、現在知られている問題点を改善するものである。さらに、本発明は、プラーク形成疾患を予防または治療するのに有用な薬剤および医薬組成物をつくるための方法、および生物サンプル中の病原性プリオンタンパク質の存在を検出する方法を含む。

【0051】

## [図面の簡単な説明]

以下に添付の図面を参照しながら、例示のみを目的として本発明を説明する。詳細な図面に関連して特にここで強調するのは、示された細目は例示であって、本発明の好適な態様のみを図解検討するのを目的とし、最も有用であると信じられるものは何か、また、本発明の原理と概念的側面を容易に理解し得る説明の提供を目的として提示するということである。この点に関しては、本発明の基本的な理解に必要なことを越えて本発明の細部を詳細に示そうとするものではなく、図面によつての説明は、本発明ではどのように幾つかの形体が実際に具体化し得るのかを当業者に明らかにするものである。

図面においては、以下のとおりである。

## 【0052】

## [図1]

図1 aはIgM抗体の図式描写である。

図1 bは臭化エチジウムで染色した1.5%アガロース・ゲルの写真であり、IgM 508の軽鎖および重鎖のcDNA断片を示す。レーン1：Kb（ラダー）；レーン2および3：V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>断片であり、それぞれ矢印で示す。

図1 cは臭化エチジウムで染色した1.5%アガロース・ゲルの写真であり、抗体IgM 508由来のscFv DNA断片を示す。レーン1：Kb（ラダー）；レーン2：scFv 508 DNA（750bp）。

図1 dはscFvを表示する繊維状ファージの図式描写である。

図1 eは可溶性scFvの図式描写である。

## 【0053】

## [図2]

図2はlacプロモーターの制御下にscFv-508-CBD融合タンパク質（本明細書では508（Fv）-CBDともいう）の産生に使用するプラスミドpCC-508Fの物理的地図である。Amp<sup>r</sup> res： - ラクタマーゼをコードする遺伝子；V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>：それぞれscFv-508の重鎖および軽鎖の可変ドメインをコードする配列；Lin：可変ドメインV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>間に存在する（Gly<sub>4</sub> Ser）<sub>3</sub>（配列番号2）リンカーをコードする遺伝子。制限部位およ

びその位置も示す。

【0054】

[図3]

図3はT<sub>7</sub>プロモーターの制御下にs c F v - 508 - C B D融合タンパク質の細胞質発現のために本発明により使用されるプラスミドp f F E K C A - 508の物理的地図である。Amp<sup>r</sup> res： - ラクタマーゼをコードする遺伝子；V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>：それぞれs c F v - 508の重鎖および軽鎖の可変ドメインをコードする配列；L i n：可変ドメインV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>間に存在する（G l y<sub>4</sub> S e r<sub>3</sub>）（配列番号2）リンカーをコードする遺伝子。T<sub>7</sub>プロモーターおよびT<sub>7</sub>末端：それぞれT<sub>7</sub>プロモーターとT<sub>7</sub>ターミネーター。制限部位およびその位置も示す。

【0055】

[図4]

図4はE L I S Aアッセイにおいて抗体508（F v）- C B DによるA P結合の分析を示す。分析した抗体をA P被覆ウエルに加えた。結合した抗体はH R P接合第二抗体により検出した。親508 I g M抗体を陽性コントロールとして使用した。陰性コントロールとしては無関係の抗 - ガラクトシダーゼ抗体Gal 6（F v）- C B Dを使用した。

【0056】

[図5]

図5はファージDNA挿入片のP C R分析を示す。p C C - 508（F v）から単離したDNA（レーン2）およびp C C - Gal 6（F v）から単離したDNAをP C R増幅し、1.5%アガロース・ゲル上で分離した。臭化エチジウム染色およびU V照射によりバンドを可視化した。レーン1はDNAのサイズ・マーカーを含む。矢印は約750 b pに移動した未処理s c F vの位置を示す。

【0057】

[図6]

図6は508（F v）- C B Dの発現と精製を示している。14%S D Sポリアクリルアミド・ゲルの各レーンに5～10 μ gのタンパク質を負荷した。タン

パク質はクマシー・ブリリアント・ブルー染色により可視化した。矢印は s c F v - C B D 融合タンパク質の位置を示す。レーン 1 : 5 0 8 ( F v ) - C B D 発現ベクターを担持する非誘発 B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞からの全細胞抽出物。レーン 2 : I P T G により 3 時間誘発した 5 0 8 ( F v ) - C B D 発現ベクター担持非誘発 B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞からの全細胞抽出物。レーン 3 : 洗浄し、可溶化し、還元した、再生に用いた封入体。レーン 4 : セルロース補助再生に際してセルロースに結合しなかったタンパク質。レーン 5 : T B S によりセルロースから洗い出されたタンパク質。レーン 6 : 蒸留水により結晶性セルロースから洗い出されたタンパク質。レーン 7 : 高 p H 溶出および中和によりセルロースから回収した可溶性 5 0 8 ( F v ) - C B D。

#### 【 0 0 5 8 】

##### [ 図 7 ]

図 7 は 5 0 8 ( F v ) - C B D の安定性を示す。精製した 5 0 8 ( F v ) - C B D タンパク質を 1 日 ( 黒四角 ) または 1 週間 ( 黒丸 ) 4 で保存し、次いで、図 4 の説明文に記載したとおりに E L I S A アッセイにより A P 結合について分析した。無関係の抗体 Gal 6 ( F v ) - C B D を陰性コントロール ( 白四角 ) とした。

#### 【 0 0 5 9 】

##### [ 図 8 ]

図 8 は P C R によりアフィニティ濃厚化した 5 0 8 ( F v ) 変異体の定量と D N A 制限分析を示す。アフィニティ選択 1 サイクル前の 1 9 種の 5 0 8 ( F v ) 変異体マイクロライブラリー・クローンの D N A ( 図 8 a ) と選択 1 サイクル後に拾い上げた 1 1 種のクローンの D N A ( 図 8 b ) を分析した。D N A を P v u I により消化し、1.5 % アガロース・ゲル上で分離した。非変異 s c F v - C B D は未変化 1 2 5 0 b p 断片 ( 上方矢印 ) として現われた。変異したクローンは 7 0 0 b p ( 中央矢印 ) および 5 5 0 b p ( 下方矢印 ) 両方の出現により示される。レーン 1 は D N A サイズ・マーカーを示す。

#### 【 0 0 6 0 】

##### [ 図 9 ]

図9はE L I S Aアッセイにおける変異した508 (Fv) 誘導体のAP結合(図9a)および安定性(図9b)の分析を示す。分析した抗体をAP被覆ウエルに添加した。1日または1週間4で保存した結合抗体を図7の説明文に記載のとおりを検出した。508 (Fv) 野生型(白四角)、C96 (黒四角)、C96Y (黒丸)、C96S (黒三角)。無関係の抗 - ガラクトシダーゼ抗体Gal6 (Fv) - C B Dを陰性コントロールとして用いた(白四角)。

【0061】

[図10]

図10は競合E L I S Aアッセイにおける抗体508 (Fv) によりAP結合の特異的阻害の分析を示す。該抗体を競合するペプチドの様々な濃度で前温置した：AP被覆ウエルに添加する前のAP(配列番号3の酸1~16)(黒四角)または無関係ペプチドW V L D(配列番号4)(白四角)。結合した抗体は図7の説明文に記載のとおりを検出した。

【0062】

[図11]

図11aおよび11bはs c F v 508 F重鎖のヌクレオチド(配列番号5)および推定アミノ酸(配列番号6)配列(図11a)、および該軽鎖のリンカーと可変領域(図11b)を示す。アミノ酸配列は3文字コードで表す；C D Rおよびリンカーには下線を付す。

【0063】

[図12]

図12はP C 1 2細胞に対するAP介在毒性作用の508 (Fv) による防御作用を示す。細胞は繊維性Aのみにより、または指示された抗体/APの異なるモル比で抗体とインキュベートした繊維性Aによりインキュベートした。臭化3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム(M T T)アッセイ法を細胞生存の評価に使用した。

【0064】

[図13]

図13は508 (Fv) による繊維性Aの離解を示す。前形成原繊維の線維

状態は指示された抗体 / A P の異なるモル比の抗体とインキュベートした後またはインキュベートせずに測定した。原繊維 A に比例するチオフラビン - T ( T h T ) アッセイにおける T h T 試薬の蛍光を用い、原繊維の形態を評価した。

【 0 0 6 5 】

[ 図 1 4 ]

図 1 4 a ~ d は鼻腔内単回投与 1 日後の免疫蛍光による脳切片の繊維状ファージ ( f 8 8 - E F R H ) の検出を示す。蛍光ウサギ抗ファージ抗体を用いてのマウス嗅球と海馬切片における線維状ファージの出現 ( それぞれ図 1 4 a および 1 4 c ) は未処理マウス脳 ( それぞれ図 1 4 b および 1 4 d ) に比較した通りである。切片は蛍光顕微鏡により 1 0 倍の最終倍率で観察した。

【 0 0 6 6 】

[ 図 1 5 ]

図 1 5 a ~ d は単回鼻腔内投与 2 8 日後のマウス脳から繊維状ファージ ( f 8 8 - E F R H ) の消失したことを示す。マウス嗅球と海馬からの繊維状ファージの消失は、未処理マウス脳 ( それぞれ図 1 5 b および 1 5 d ) に比較するように、蛍光ウサギ抗ファージ抗体を用いて、これらの臓器の切片に証明される ( それぞれ図 1 4 a および 1 4 c ) 。切片は蛍光顕微鏡により 1 0 倍の最終倍率で観察した。

【 0 0 6 7 】

[ 図 1 6 ]

図 1 6 a ~ d はファージ f 8 8 - E F R H クリアランス後のマウス脳切片の組織所見を示す。ファージ f 8 8 - E F R H 投与 2 8 日後の嗅球臓器 ( 図 1 6 a ) と海馬 ( 図 1 6 c ) の脳切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、未処理マウス脳切片 ( それぞれ図 1 6 b および 1 6 d ) に比較した。染色した切片を試験し、最終倍率 4 0 倍で写真撮影した。

【 0 0 6 8 】

[ 図 1 7 ]

図 1 7 a ~ d は単回鼻腔内投与後のマウス脳切片におけるビオチニル化 A P ( 配列番号 3 の酸 1 ~ 1 6 ) に結合したファージ p C C - 5 0 8 F のビオチンの

蛍光検出を示す。マウス嗅球と海馬切片に s c F v 5 0 8 F を示す繊維状ファージに結合した A P (配列番号3の酸1～16)の出現(それぞれ図17 aおよび17 c)は、P Eに結合したストレプトアビジンを用い、未処理マウス脳(それぞれ図17 bおよび17 d)に比較した通りである。切片は蛍光顕微鏡により20倍の最終倍率で観察した。

【0069】

[図18]

図18 a～dはビオチニル化 A P (配列番号3の酸1～16)に結合したファージ p C C - 5 0 8 F 投与後のマウス脳の組織所見を示す。ファージ投与1日後に嗅球臓器(図18 a)と海馬(図18 b)の切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、未処理マウス脳切片(それぞれ図18 cおよび18 d)に比較した。染色した切片を試験し、最終倍率40倍で写真撮影した。

【0070】

[図19]

図19は - アミロイド・ペプチドの E F R H (配列番号1) エピトープを表す繊維状ファージによる免疫化スケジュールの図式である。

【0071】

[図20]

図20 aおよび20 bはファージ糖タンパク質III (g p III)の融合物として - アミロイド・ペプチドの E F R H (配列番号1) エピトープを表す f 3 繊維状ファージによる免疫化を示す。野生型繊維状ファージ・コートタンパク質(図20 a)および - アミロイドのN末端エピトープ(配列番号3の酸1～16)に対し、図19のスケジュールに従って E F R H ファージにより免疫したマウスからの異なる出血の血清 I g G 力価。

【0072】

[図21]

図21は f 3 繊維状ファージによる長期持続免疫を示す。野生型繊維状ファージ・コートタンパク質および - アミロイドのN末端(配列番号3の酸1～16)に対し、 E F R H ファージにより免疫したマウスからの異なる出血の血清 I g



G力価。

【0073】

[図22]

図22はf88ファージ・ライブラリーから選択されたペプチド提示ファージに、抗凝集 APモノクローナル抗体 (mAb 10D5) が結合するのを示す。アセチルコリン・レセプターに対し作製した無関係mAb 5.5を陰性コントロールとして使用した。抗体をファージ被覆ウエルに添加し、結合の検出にELISAを用いた。

【0074】

[図23]

図23はYYEFRH (配列番号7) ファージおよびVHEPHEFRHVALLNPV (配列番号8) ファージに抗凝集 AP mAb (10D5) が結合するのを示す。1 µg/ml濃度の抗体をファージ被覆ウエルに添加し、結合をELISAにより分析した。挿入片のない繊維状ファージをコントロールとして用いた。

【0075】

[図24]

図24a～bはファージ糖タンパク質VIII (gpVIII) の融合体としての - アミロイド・ペプチドEFRH (配列番号1) エピトープを表すf88繊維状ファージによる免疫を示す。野生型繊維状ファージ・コートタンパク質 (図24a) および - アミロイド・ペプチドのN末端エピトープ (配列番号3の酸1～16) (図24b) に対し、EFRHファージにより免疫したマウスからの異なる出血の血清IgG力価。

【0076】

[図25]

図25は - アミロイド・ペプチドのN末端から誘導される合成ペプチドによる、APへの結合における免疫マウスの血清阻害を示す。指示どおりに、ウエル当たり種々濃度の種々ペプチドと反応させたf88-EFRHにより3回免疫した後の血清を1:3000に希釈してアッセイを実施した。ペプチドWVLD

(配列番号4)を陰性コントロールとして用いた。

【0077】

[図26]

図26はf88-EFRHファージに対して作製した血清抗体によるPC12細胞へのAP介在毒性作用の防御を示す。細胞を繊維性Aのみにより、または3回目の出血からの血清と種々濃度でインキュベートした繊維性Aによりインキュベートした。陰性コントロールは非免疫マウスからの血清とした。MTTアッセイを用い、細胞生存を評価した。

【0078】

[図27]

図27はf88-EFRHファージに対して作製した血清抗体による繊維性-アミロイド形成の干渉を示す。指示どおりに希釈した血清サンプルの存在下に37℃1週間インキュベーションした後に形成される繊維性-アミロイドの量と相関するThT蛍光での評価。陰性コントロールは非免疫マウスからの血清とした。陽性コントロールは血清なしとした。原繊維形成はThTアッセイにより測定した。

【0079】

[図28]

図28はヒト・プリオン・タンパク質106-126(配列番号25)およびそのマウス同族体に対応するアミノ酸配列を示す。

【0080】

[図29]

図29はMTTアッセイにより測定したPrPペプチドの神経毒性作用を示す。PC12細胞を、2mMインスリン、2μM-L-グルタミンおよび100単位のペニシリン/ストレプトマイシン追加DMEM培地を容れた96ウエルプレートに播種した。細胞生存度はPrP106-126との(異なる濃度での)インキュベーション後にMTTアッセイにより評価した。PrP106-126は37℃で4日間前インキュベートし、次いで3日間細胞に加えるか(灰白色棒)、または37℃で4日間前インキュベートし、次いで5日間細胞に加えるか(白

棒)、または37 で7日間前インキュベートし、次いで5日間細胞に加える(黒棒)。

【0081】

[図30]

図30はThT結合アッセイによるPrPペプチドの凝集度合いを示す。PrP106-126(0~0.8mg/ml)を37 で7日間インキュベートし、482nmでの発光を測定して、凝集度合いを定量した。

【0082】

[図31]

PrPペプチドの神経毒性に対するmAb3-11、2-40の防御作用を示す。PC12細胞を、2mMインスリン、2mM-L-グルタミンおよび100単位のペニシリン/ストレプトマイシン追加DMEM培地を容れた96ウエルプレートに播種し、3日間インキュベートした。以下の処理を実施した:(1)陽性コントロール、未処理細胞;(2)37 7日間、前インキュベートした100μM-PrP106-126;(3、4、5)1時間、前インキュベートした凝集ペプチドであって、その後にmAb3-11(処理3)、2-40(処理4)および3F4(処理5)と共に細胞に露出した。細胞の生存度はMTTアッセイにより評価した。

【0083】

[図32]

図32はmAbによるPrPコンホメーションの変調を示す。PrP106-126(0.3mg/ml)を37 で7日間(1)、およびmAb2-40、3-11および3F4(それぞれ、処理2、3および4)とインキュベートする。抗体はPrPインキュベーションに先立ち(灰白色棒)、または1週間のPrPインキュベーションの後に(白棒)、24時間、サンプルとインキュベートした。原繊維形成はThT結合アッセイにより評価した。

【0084】

[図33]

図33はPrP繊維状凝集形成に対するmAb3-11の濃度依存性防御作用

を示す。PrP106-126(0.3mg/ml)を、希釈したmAb3-11(それぞれ処理1、2、および3に対応して1:1、1:10、1:50)と37で7日間インキュベートした。抗体はPrPインキュベーションに先立ち(灰白色棒)、または1週間のPrPインキュベーションの後に(白棒)、24時間、サンプルとインキュベートした。アミロイド原繊維形成をThT結合アッセイにより評価した。

#### 【0085】

(好適な実施例の説明)

本発明はプラーク形成疾患、例えば、これらに限定されるものではないが、アルツハイマー病およびプリオン生成プラーク形成疾患などの治療に使用し得る方法、薬剤および組成物の発明である。詳しくは、本発明は、(i)レシピエントにプラーク由来抗原に活性な免疫を誘発することであって、プラーク形成疾患において表示媒体上にプラークを形成することと関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープによりレシピエントを免疫し、その結果、免疫に応答して誘導された抗体がプラーク形成を防止するか、および/または既存のプラークを離解させ得るものとする；および(ii)プラーク形成疾患においてプラーク形成と関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合し得る抗体の少なくとも免疫部分を投与することにより受動免疫を誘発することであって、該抗体はプラーク由来抗原に対して作製し、クローン化し、表示媒体に表示するものであって、プラーク形成を防止し、かつ、既存のプラークを離解させ得るものである。この受動免疫は、採用した表示媒体がレシピエント内で複製し得るものであれば、並外れて長期間持続し得る。本発明はさらにヒトを含む動物の脳を表示媒体の標的とし、その結果として、脳内に存在するプラーク、例えば、アルツハイマー病患者脳内のベータ・アミロイドプラークを離解させる方法に関する。最後に、本発明は生物サンプル中の凝集形成プリオンタンパク質を検出する方法にも関する。

#### 【0086】

本発明の原理と操作は図面とその説明を参照することでよりよく理解し得る。

本発明の少なくとも一態様を詳細に説明する前に理解すべきことは、本発明が

その応用に際して、以下の説明文に述べた成分の構成の詳細と整頓に限定されるものではないということである。本発明は他の態様であってもよく、あるいは種々の方法で実用化または実施し得る。また、本明細書にて採用された表現法および用語は説明を目的とするものであって、限定するものと見なすべきではないことを理解すべきである。

#### 【0087】

以下に示す実施例の部の実施例1～15にさらに例示されるように、本発明の一態様を実用化する一方で、ベータ・アミロイドペプチドから誘導した抗原を、実験動物の免疫化に使用した繊維状ファージの表面に表示させた。採用したペプチドはすべてベータ・アミロイドペプチド(配列番号3)のEFRHエピトープ(配列番号1;残基3～6、配列番号3)を含んでいた。該エピトープはfdファージ被覆糖タンパク質IIIまたはVIIIの融合タンパク質として提示された。注射1回当たりの投与量を $10^{10}$ ないし $10^{12}$ ファージとし、8週令のBALB/cマウスに投与した。代表的な免疫化スケジュールは14日間隔での3回の注入であり、腹腔内または鼻腔内に投与された。

#### 【0088】

免疫化過程に際し、または免疫化の後に、被験マウスの抗体血清力価を、以下の方法と材料に詳述するように、酵素結合免疫ソルベントアッセイ(ELISA)によりA 特異抗体の産生について試験した。血清力価は次いで3回のみの免疫化を含むプロトコールに応答して11ヵ月間持続したことを示した。EFRHを含む試験したエピトープはすべてある力価を生じたが、表示媒体の表面上にエピトープを表示した場合には、遥かに高い予期せざる力価を生じた。これらの高い力価は本方法による免疫系に提示された多数のコピーの結果であると信じられ、この考えは血清量を調節した結合アッセイの結果により支持される。

#### 【0089】

ベータ・アミロイド原繊維形成に関連してEFRHエピトープに対して作製して得たポリクローナル抗体の抗凝集性はThT結合アッセイにより測定した。1:10および1:100に希釈した血清は、原繊維形態の広範な劣化と共にβ-アミロイドの原繊維構造形成を中断したが、これはThT蛍光の実質的低下によ

り示された。コントロールとして使用した無関係血清（未免疫マウスからの血清）は原繊維形成を有意には阻害しなかった。

#### 【0090】

すでに形成された A 原繊維の破壊に対する同一血清の作用（ A P の毒性形状）も定量した。前形成 A 原繊維とインキュベートした E F R H 免疫マウスの血清は原繊維構造を破壊した。無関係コントロール抗体は原繊維形態に有意な作用を示さなかった。まとめると、これらの結果は、適切な表示媒体により提示される E F R H エピトープの能力が抗凝集抗体の産生を引起し、それが原繊維形成の過程を阻害するか、または逆転し得ることを確認する。

#### 【0091】

本発明の態様に従い生成した希釈血清はベータ・アミロイドペプチドの神経毒性を防止した。この結果はアミロイドプラーク病罹患患者の脳劣化防止における有力な臨床用途を暗示する。

#### 【0092】

本発明の他の側面を実用化する一方、また、以下の実施例の部の実施例 15 ~ 21 にさらに例示するように、プリオン由来ペプチドに対し生成させた部位指向抗体（ m A b 3 - 11 および 2 - 40 と命名）は、プリオン生成プラークを防止または離解するのに有用である。

#### 【0093】

これら m A b に対するプリオン由来ペプチド（ P r P 106 - 126 ）の結合は、 T h T および M T T アッセイにより測定したように、凝集に対する有意な防御作用に導いた。本発明により生成した m A b はペプチド繊維性凝集を有意に低下させ、また、 T h T 結合アッセイにより検定されるように、凝集した形状を離解したコンホメーションに逆転させる。

#### 【0094】

m A b 3 - 11 および 2 - 40 が P r P ペプチドに溶液中でまたは凝集体に結合することは、このエピトープが凝集過程に関与しており、 P r P ペプチド、恐らく全 P r P ペプチドの安定化と離解過程両方をコントロールする調整部位として作用することを示唆している。

## 【0095】

即ち、本発明のある態様において、プラーク形成疾患の治療方法を提供するものである。本発明のこの態様による方法は、ポリペプチドの表示によって表示媒体を有効にし、かかるペプチドは、このプラーク形成疾患においてプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示し、この少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体をつくり得る。当該提示媒体をレシピエントの体内に導入し、凝集タンパク質を離解し得るか、および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体をつくる。

## 【0096】

本発明の好ましい実施態様において、表示媒体は、レシピエントに表示媒体の $10^{10}$ 単位の3倍量導入後30日以内であるように選択され、ELISAにより測定すると、レシピエントでの抗体力価は1:50,000以上である。

## 【0097】

本発明の別の態様において、プラーク形成疾患を処置するための方法が提供される。本発明のこの態様に関する薬剤は、ポリペプチドを表示する表示媒体を含み、このポリペプチドは、プラーク形成疾患においてプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示し、少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体を創生できる。

## 【0098】

本発明のさらに別の態様において、プラーク形成疾患を処置するための医薬組成物が提供される。本発明のこの実施態様の組成物は、ポリペプチドを表示する有効量の表示媒体を含み、このポリペプチドは、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示し、この少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体を創生できる。この医薬組成物は薬学的に許容される担体をさらに含む。

## 【0099】

本発明のさらなる別の態様により、プラーク形成疾患を処置するための表示媒体をつくる方法を提供する。本発明のこの態様に関する方法は、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを表示するポリペプチドをコードするポリペプチド配列をその中に挿入することによって表示媒体のゲノムを遺伝子的修飾による。この少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る抗体を創生できるものであって、表示媒体が増殖したときに、ポリペプチドを表示媒体により表示する。

#### 【0100】

免疫化を実施するためにベータ・アミロイドペプチド抗原をアジュバントと共に使用することは、高い毒性と得られる力価が低いために、以前は難しかった。出発点で先行技術の方法を用い、KLH（配列番号9）に接合したベータ・アミロイドの16個のアミノ酸からなるペプチドでマウスを免疫した。この免疫化ではベータ・アミロイドに対して低いが測定し得る抗体力価を生じた。

#### 【0101】

本発明の一側面を実用化する一方、免疫したマウスを脾臓摘出するとベータ・アミロイドに特異性を有するscFvAb発現IgMハイブリドーマ508の調製が容易になった。次いで、このハイブリドーマからRNAを抽出し、抗体クローニングに使用した。IgM508ハイブリドーマは、PC12細胞に対する毒性作用を防止するA $\beta$ に特異的活性を示した（Anavi, S. 1998; 理学修士論文、テルアビブ大学、分子微生物学・生物工学部門、イスラエル）。IgM508のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列を別々にクローン化し、抗ベータ・アミロイド特異性を有する一本鎖抗体を形成させるために市販のベクターを用いて結合した。次いで、この一本鎖抗体をファージ表示ライブラリー中に融合タンパク質として発現させ、抗ベータ・アミロイド活性クローンを大腸菌での増殖用を選択した。

#### 【0102】

さらなる実用化は、アミロイド・ベータに対する精製抗体提示ファージの見掛け上結合定数を定量することで証明したが、該定数はELISAテストにより測定し、結合半値は $8 \times 10^{-6}$  Mに相当する340 ng/mlの抗体濃度で得ら



れた。この結果は調製した一本鎖抗体がインビボ条件下で有効であろうことを予期させる。このファージはまたすでに形成された原繊維構造を破壊し得るものであって、結合定数の定量が示唆するように、精製した一本鎖抗体が生物学的に活性であることを確認させる。

#### 【0103】

本発明の他の側面を実用化する一方で、プリオンタンパク質のペプチド配列に対し作製したモノクローナル抗体がプリオンプラークの離解または形成防止に有効であることが明らかとなった。

#### 【0104】

PrP106-126の毒性を評価するモデルは本発明者らが確立し、神経防御能力および凝集離解能力について2種の免疫グロブリンクローン[mAb3-11(IgM)およびmAb2-40(IgG1)と命名]の有効性を試験するために利用した。

#### 【0105】

実施例15～21にてさらに詳述するように、mAb3-11およびmAb2-40は共にPC-12細胞に対するPrP106-126の用量依存性毒性作用を低下させた。mAb3-11とPrP106-126との同時インキュベーションは繊維状凝集を防止したが、一方、すでに形成されている凝集にmAb3-11を添加すると50%のアミロイド原繊維が離解するに至る(実施例21)。

#### 【0106】

即ち、本発明の好ましい態様によれば、プラーク形成疾患を処置する方法が提供される。本発明のこの態様に関する方法では、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連のある凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを結合するために存在する抗体の少なくとも1つの免疫学的部分を提示するポリペプチドを表示する。この結合部分は、凝集タンパク質を離解し得るか、および/または凝集タンパク質の凝集を防止し得る。そしてこの表示媒体をレシピエントの体内に導入して、凝集タンパク質を離解するか、および/または凝集タンパク質の凝集を防止する。

## 【0107】

本発明の好ましい態様に従って、明細書中でさらに記載し、かつ実施例部分でも下記に説明するが、表示媒体はレシピエントの体内に導入され凝集タンパク質を離解しおよび／または凝集タンパク質の凝集を防止し、レシピエントの臭覚系を経由して効果的となる。

## 【0108】

本発明の追加の態様において、プラーク形成疾患を処置するための薬剤を提供する。本発明のこの態様に関する薬剤は、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合し得る抗体の少なくとも1つの免疫学的部分を提示するポリペプチドを表示する表示媒体を含んでなる。この抗体の免疫学的部分は、かかる凝集タンパク質を離解し得るか、および／または凝集タンパク質の凝集を防止し得る。

## 【0109】

本発明のさらなる追加の態様により、プラーク形成疾患を処置するための医薬組成物を提供する。本発明のこの態様に関する組成物は、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープに結合し得る抗体の少なくとも1つの免疫学的部分を提示するポリペプチドを表示する有効量の提示媒体を含んでなる。この抗体の免疫学的部分は、凝集タンパク質を離解することが可能であって、この医薬組成物は薬学的に許容される担体をさらに含み得る。

## 【0110】

本発明の追加の態様によれば、プラーク形成疾患を処置するための表示媒体をつくる方法を提供する。本発明のこの態様の方法は、表示媒体のゲノムを遺伝子的に改変する工程を含んでなり、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを結合し得る抗体の少なくとも1つの免疫学的部分をコードするポリヌクレオチド配列を挿入することにより行う。かかる抗体の免疫学的部分は凝集部分を離解し得るものである。

## 【0111】

本明細書とそれに付随する請求項の目的上、“患者”、“被験者”および“レ

シピエント”という用語は互換性あるものとして使用する。それらはヒトと他の動物を包含し、予防、実験、または治療処理の対象である。

【0112】

本明細書とそれに付随する請求項の目的上、“ベータ・アミロイドペプチド”という用語は“-アミロイドペプチド”、“AP”、“A”、および“A”と同義語である。これらの用語はすべてアミロイド前駆体タンパク質由来のプラーク形成ペプチドをいう。

【0113】

本明細書にて使用する場合、“PrPタンパク質”、“PrP”、“プリオン”および“プリオンタンパク質”は、適切な条件下で、プラーク形成疾患の原因となる凝集形成を誘発し得るポリペプチドをいう。例えば、正常細胞プリオンタンパク質(PrP<sup>C</sup>)はかかる条件下で相当するスクラピー・イソ型(PrP<sup>Sc</sup>)に変換され、それがプラーク形成疾患、例えば、これらに限定されるものではないが、牛海綿状脳症(BSE)すなわち狂牛病、ネコ海綿状脳症、クール、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルシュトマン・シュトラオスラー・シャインケル病(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)などの原因となる。

【0114】

本明細書および請求項において使用する場合、“離解”(disaggregating)という用語は、一般に非共有結合により結合している凝集タンパク質を可溶化することをいう。

【0115】

本明細書とそれに付随する請求項の目的上、“含んでなる”という用語は1つ以上の引用した要素を包含することをいうが、特定して引用していない他の要素を除外するものではない。例えば、Aペプチドを含んでなる組成物は単離されたAペプチドおよびより大きなポリペプチド配列の1成分としてのAペプチド両方を包含する。同様に、抗体の免疫学的部分は抗体のより大きな部分、すなわち、抗体全体の一部分として含まれていてもよい。

【0116】

本明細書および請求項において使用する場合、“治療する”という用語は疾患

の進行を実質的に阻止、遅延または逆転させること、疾患の臨床徴候を実質的に改善すること、または疾患の臨床徴候の発現を防止することを包含する。

#### 【0117】

本明細書および以下に続く請求項において使用する場合、“プラーク形成疾患”という用語は、例えば、これらに限定されるものではないが、早期発症アルツハイマー病、後期発症性アルツハイマー病、前症候性アルツハイマー病、SAAアミロイド症、遺伝性アイスランド症候群、老化、多発性骨髄腫、およびヒトに影響することの知られたプリオン病、例えば、クールー、クロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)、ゲルシュトマン-シュトラオスラー-シャインケル病(GSS)、および致死性家族性不眠症(FFI)など、および、動物のプリオン病、例えば、スクラピーおよびBSEなどの疾患における凝集性タンパク質(プラーク形成ペプチド)、例えば、これらに限定されるものではないが、ベータ-アミロイド、血清アミロイドA、シスタチンC、IgGカッパ軽鎖またはプリオンタンパク質などによるプラーク形成により特徴づけられる疾患をいう。

#### 【0118】

上記疾患と関連するアミロイドプラークは脳内に位置するため、提案された治療様式は血液脳関門(BBB)を通過することが可能であり、同様にアミロイドプラークを溶解し得るものであることを証明しなければならない。通常、BBBを浸透し得る平均分子サイズは約2kDaである。モノクローナル抗体は一般に135~900kDaの範囲にある。従って、将来アミロイドプラーク疾患の治療に抗体を治療的に使用する場合、活性の保持と同時にそのサイズを小さくするか、または新規の送達方策を開発するかなければならない。

#### 【0119】

抗原エピトープ、例えば、本明細書に記載のA<sub>β</sub>のEFRH(配列番号1)またはPrP106-126(配列番号25)などからなる小型の合成ペプチドは一般に不十分な抗原であり、より大きな担体に結合させる必要がある。また、結合させたとしても、それらが誘導するのは低い親和性の免疫応答のみである。例えば、A<sub>β</sub>-KLHまたはA<sub>β</sub>-原繊維を注射すると、非常にゆっくりした免疫応答を誘導する(Anavi, S. 1998; 理学修士論文、テルアビブ大学、分子微生物

学・生物工学部門)ため、低い親和性応答を回避する多くの努力がなされているが、成功は限られている。

#### 【0120】

プラーク形成ポリペプチドの病理的作用は中枢神経系(CNS)にのみ維持されるので、インビボでかかるプラークを防止する特異性の高いAbは血液脳関門(BBB)の浸透性に左右される。例えば、ADの進行段階において証拠が示すのは、BBBの浸透性の変化であり、それがかかる抗体を末梢からCNSに直接送達し、すでに形成されているプラークを離解させ、さらなる毒性作用を最少とするように導くことである(Schenk et al., Nature 1999, 100: 173-177)。本発明の好適な態様は表示媒体上に提示されるモノクローナルAbが血液脳関門を通過して脳に直接送達されることからなる。

#### 【0121】

増え続ける多数の証拠が示すのは、中枢嗅覚路における嗅覚欠損と変性変化がADの臨床経過の早期に影響を受けることである。さらに、ADに關与する解剖学的パターンは、嗅覚路がAD発症の初期段階にあり得ることを示唆する。

#### 【0122】

嗅覚受容体ニューロンは鼻腔の上皮内層に存在する双極性細胞である。その軸索は篩板を横切って、脳の嗅球における嗅覚路の嗅覚路第一シナプスに突き出している。この形状がそれらをハイウェイとすることにより、ウイルスまたはその他の輸送物質のBBB通過と、CNSへの接近を可能とする。

#### 【0123】

ADの早期段階では、BBBが末梢を循環する抗体のCNSへの侵入を制限している可能性がある。対照的に、ファージ表面に表示されたA抗凝集抗体は、鼻腔投与によりCNSに直接送達されるばかりでなく、患者においてAによる嗅覚の永久的損傷を防止する能力を有する。以前に示されているように、鼻腔投与(Mathison et al., J. Drug Target, (1998) 5(6), 415-441; Chou et al., Biopharm Drug Dispos. (1997) 18(4): 335-46; et al., Gene Therapy (1995) 2: 418-423)はウイルスと高分子がCSFとCNSに侵入するのを可能とする。

#### 【0124】

アデノウイルス・ベクターの脳への送達点として嗅覚受容体を用いることは文献に報告されている。報告によると、この方法では外見上毒性を示さずにレポーター遺伝子が12日間脳内で発現される(Draghia et al., Gene Therapy 2: 418-423, 1995)。

#### 【0125】

即ち、本発明の好ましい態様において、凝集し得る抗体の免疫学的部分を表示する媒体またはプラーク形成疾患に関連するポリペプチドの凝集物の免疫学的部分を表示する媒体は、この経路で脳に送達される。

#### 【0126】

A は末梢組織において細胞により連続的に産生され、それが血液脳関門(BB)を通過し、特定のニューロン集団に局所的毒作用を及ぼすので、かかる媒体を鼻腔内投与することでプラークを形成するために利用される得る末梢Aの量を最少とし、疾患の進行を防止することができる。

#### 【0127】

CNSへの薬物送達システムとして繊維性ファージなどの表示媒体を使用することが、アルツハイマー病に対し、また、例えば、プリオン生成疾患などのヒト・ペプチドの毒性細胞外凝集を含むその他の神経変性疾患に対し、新たな治療法の展望を開く。

#### 【0128】

本発明による表示媒体はウイルス(例えば、繊維性バクテリオファージなどのバクテリオファージ、例えば、fd)、細菌およびプリオン表示媒体を含むいずれのタイプであってもよい。このように、例えば、表示媒体は二本鎖DNAウイルス、一本鎖DNAウイルス、RNAウイルス(プラスまたはマイナス鎖)、細菌、およびポリペプチド担体などである。本発明の好適な態様によると、表示媒体はレシピエントにおいて増殖し得るものである。このように、例えば、バクテリオファージ表示媒体はレシピエントの体内に棲息する大腸菌などの細菌叢において増殖し得る。あるいは、表示媒体はインビボ非増殖性粒子である。

#### 【0129】

ファージまたはウイルス媒体は目標とし得るインビボ治療法として有望である

。自然界の腸内菌叢の潜在的感染について関心が示されているが (Delmastro et al., Vaccine 1997, 15: 1276-1285; Willis et al., Gene, 1993, 128: 79-83; Poul et al., J. Mol. Biol. 1999, 288, 203-211)、ファージをUV不活化すると、それらがその感染性相対物同様の免疫原であることを示した (Delmastro et al., Vaccine 1997, 15: 1276-1285)。不活化ファージの使用は、引続く宿主細胞内での発現のために、ファージ・コード導入遺伝子の核内取込みを不可能とし (Larocca et al., 1998, Hum. Gene Ther. 9: 2393-2399)、重要な実用上の問題である。それ故、代わり得る好適な態様に従い、本発明にて採用される表示媒体は複製用であっても、非複製用であってもよい。

#### 【0130】

ファージまたはウイルス表示は、ファージまたはウイルス・コートタンパク質との融合タンパク質としてcDNAクローンの発現を伴う。もし発現のために選択したcDNAが抗原をコードしているならば、そのファージまたはウイルスをレシピエントにおいて随意に複製し得る抗原提示媒体として採用してもよい。

#### 【0131】

上記のように、本発明の好適な態様によると、ファージまたはウイルスにより表示される抗原は、抗原精製せずに直接予防接種に使用してもよい。この事例では、コートタンパク質の塊が、予防接種被験者にとって“非自己”であるため、全身性免疫応答を刺激するように作用する。抗原コートタンパク質融合は表示されたcDNA遺伝子産物のエピトープに対し特異抗体を引出す。

#### 【0132】

抗体ファージまたはウイルス表示は、ファージまたはウイルス・コートタンパク質に抗体の可変領域のコーディング配列を融合することにより実施する。この目的のために、抗体産生細胞から単離される可変(V)領域( $V_H$ および $V_L$ ) mRNAをcDNAに逆転写し、重鎖と軽鎖が無作為に集合し、一本鎖Fv(scFv)をコードする。これらのカセットは発現用ファージミド・ベクターなどの適切なベクターに直接クローン化し、ファージまたはウイルス表面上に表示させる。抗体の遺伝子型と表現型間のこの結合が、非固相化または標識化抗原を用いる抗原特異ファージまたはウイルス抗体の濃厚化を可能とする。関連抗体を表

示するファージまたはウイルスは抗原で被覆した表面に保持される一方で、非粘着ファージまたはウイルスは洗い流される。結合したファージまたはウイルスを該表面から回収し、適切な宿主細胞に再感染させ、さらに濃厚化するため、また最終的には結合分析するために再増殖させる。

#### 【0133】

抗体ファージまたはウイルス表示の成功はこの表示と濃厚化方法の組合わせ次第で定まる。ファージまたはウイルス抗体遺伝子は、配列決定し、変異させ、選抜して抗原結合性を改善することが可能である。

#### 【0134】

抗体分子の様々な領域をコードする遺伝子は、抗原に対するその特異性と親和性が変わるように再配列することが可能である。該抗体はさらなる取扱いのためにファージまたはウイルス表面上に維持するか、または可溶性 s c F v ( ~ 2 5 k D a ) 断片として遊離させることができる。

#### 【0135】

1990年代初めのその発明以来、抗体ファージ表示はモノクローナル抗体の生成とその工学技術を革命的なものとしてきた。それはファージ表示がすべてインビトロで行う抗体作製を可能とするからであり、免疫系と免疫化操作を回避し、抗体の親和性と特異性のインビトロ調製を可能とする。従って、最も効率的な新規ワクチン開発計画にこの技術の採用されることが期待される。

#### 【0136】

さらなる特徴はその安全性を確保し、および/またはその治療効果を上昇させるベクターに追加し得る。かかる特徴は、例えば、抗生物質感受性などの組換えウイルスで感染させた細胞に対して負に選択するのに使用し得るマーカーを包含する。従って、負の選択は感染を制御し得る手段であるが、その理由はそれが抗生物質の添加による誘導可能な自殺手段を備えているからである。かかる防御は、もし、例えば、変異が起ってウイルスベクターまたは組換え配列の変化した形状を生じるならば、細胞の形質転換が起こらなくなることを確実なものとする。特定の細胞型に発現を限定する特徴もまた包含し得る。かかる特徴は、例えば、所望の細胞型に特異的なプロモーターおよび調節要素を含む。



## 【0137】

ウイルスは非常に特殊化された感染性作因物質であり、多くの場合、宿主の防御メカニズムを回避するように進化している。一般に、ウイルスは特定の細胞型に感染し、増殖する。ウイルスベクターの標的特異性は、予め定まった細胞型を特異的に標的化する本来備わった特異性を利用し、それによって組換え遺伝子を感染した細胞に導入する。

## 【0138】

本明細書および以下に続く請求項において使用する場合、ポリペプチドという用語はペプチド結合を介してそこで共有結合により連結したアミノ酸の伸長した連なりをいう。異なるポリペプチドは本発明による異なる機能性を有する。一態様によると、ポリペプチドはレシピエントにおいて活性な免疫応答を誘導するように設計された免疫原から誘導されるが、本発明の他の態様によると、ポリペプチドは、例えば、動物において活性な免疫応答誘導の結果として生じる抗体であって、レシピエントにおいて受動免疫応答を誘導するように作用し得る抗体から誘導される。しかし、両方の事例において、該ポリペプチドは可能なコドン使用法に従ってポリヌクレオチドによりコードされている。

## 【0139】

本明細書にて使用される場合、“免疫応答”またはその等価の“免疫学的応答”という語句は、レシピエントである患者において凝集性タンパク質（ブランク形成ペプチド）に対して向けられた有益な体液性（抗体介在）および/または細胞性（抗原特異T細胞またはその分泌産物）応答の発生をいう。かかる応答は免疫原の投与により誘発される能動的応答であるか、または抗体または感作T細胞の投与により誘発される受動的応答である。細胞性免疫応答はクラスIまたはクラスII MHC分子と会合したポリペプチド・エピトープの提示により誘出され、それが抗原特異CD4<sup>+</sup>Tヘルパー細胞および/またはCD8<sup>+</sup>細胞毒性T細胞を活性化する。この応答は単球、マクロファージ、NK細胞、好塩基球、樹枝状細胞、星状細胞、小膠細胞、好酸球、または先天性免疫のその他の成分の活性化に関与することも可能である。

## 【0140】

本明細書にて使用される場合、“能動免疫”とは抗原の投与により被験者に付与される免疫性をいう。

本明細書にて使用される場合、“受動免疫”とは抗原の投与なしに被験者に付与される免疫性をいう。従って、“受動免疫”とは、これらに限定されるものではないが、表示媒体の表面に提示される抗体の免疫学的部分を含む複製可能表示媒体をレシピエントに投与することからなる。かかる媒体の複製は能動的ではあるが、この免疫応答はレシピエントの観点からは受動的である。

#### 【0141】

本明細書とそれに付随する請求項の目的上、“エピトープ”および“抗原決定基”という用語は互換性あるものとして使用し、Bおよび/またはT細胞が応答する抗原上の部位をいう。B細胞エピトープはタンパク質の連続アミノ酸または三次折り返しにより並置した非連続アミノ酸から双方形成し得る。連続アミノ酸から形成されるエピトープは変性溶媒に接触させても一般に維持されるが、三次折り返しにより形成されるエピトープは変性溶媒で処理すると一般に失われる。エピトープは一般に少なくとも3個、より一般には少なくとも5または8～10個のアミノ酸を特異な空間コンホメーションで含んでいる。エピトープの空間コンホメーションを決定する方法は、例えば、X線結晶解析および2次元核磁気共鳴を包含する。例えば、Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)のエピトープ・マッピング・プロトコール参照。同一エピトープを認識する抗体は、1つの抗体が、標的抗原に対するもう1つの他の抗体の結合を阻害する能力を示す簡単なイムノアッセイにより同定することができる。T細胞はCD8細胞について約9個のアミノ酸、あるいはCD4細胞について約13～15個のアミノ酸の連続するエピトープを認識する。該エピトープを認識するT細胞は抗原依存性増殖を測定するインビトロアッセイ法により同定することができるが、その方法はエピトープに応答しての感作T細胞による<sup>3</sup>H-チミジン取込みにより(Burke et al., J. Inf. Dis. 170, 1110-19, 1994)、抗原依存性死滅により(細胞毒性Tリンパ球アッセイ、Tigges et al., J. Immunol. 156, 3901-3910)またはサイトカイン分泌により定量することである。

#### 【0142】

細胞介在免疫学的応答の存在は増殖アッセイ（ $CD4^+$ T細胞）またはCTL（細胞毒性Tリンパ球）アッセイにより測定することができる。免疫原の予防的または治療的作用に対する体液性および細胞性応答の相対的寄与は、免疫した同系動物からIgGとT細胞を別々に単離し、第二の被験者で予防的または治療的效果を測定することにより識別することができる。

#### 【0143】

本明細書および請求項にて使用する場合、“抗体”または“免疫グロブリン”という用語は互換性あるものとして使用し、動物またはレシピエントの免疫応答の部分として機能する数種の分類の構造的に関連するいずれかのタンパク質をいい、そのタンパク質はIgG、IgD、IgE、IgA、IgMおよび関連するタンパク質を包含する。

#### 【0144】

正常な生理的条件下で、抗体は血漿と他の体液に、またある種細胞の膜に見出され、B細胞と命名される型のリンパ球またはその等価物により産生される。IgGクラスの抗体はジスルフィド結合によりつながった4つのポリペプチド鎖からでき上がっている。未処理IgG分子の4つの鎖はH鎖と言われる2つの同じ重鎖とL鎖と言われる2つの同じ軽鎖である。

#### 【0145】

ポリクローナル抗体を作成するためには、ウサギもしくはヤギのような宿主を抗原もしくは抗原断片を用いて通常アジュバントと共に、もし必要ならば担体にカップルさせて、免疫する。次いで抗原に対する抗体を宿主の血清から採取する。ポリクローナル抗体は抗原に対する親和性を用いて精製し、単一特異性に行うことができる。以前の経験からポリクローナル抗体の標準的な作成法は、低力価および毒性の問題のため、プラーク形成ペプチドのための非凝集性抗体の調製法としては適していない。

#### 【0146】

モノクローナル抗体を作成するためには、抗原による適切なドナー、通常はマウス、の過免疫を実施する。次いで脾臓の抗体産生細胞を単離する。これらの細胞を骨髓腫細胞のような不死特性を有する細胞と融合させることにより、培養で

維持可能で、かつ求めるモノクローナル抗体を分泌する融合細胞雑種(ハイブリドーマ)が提供される。細胞を次いで大量培養し、培養液から使用のためのモノクローナル抗体を収穫する。定義より、モノクローナル抗体は単一のエピトープに特異的である。この理由によりモノクローナル抗体は類似の抗原に対して作成したポリクローナル抗体よりも、しばしば低い親和定数を有する。

#### 【0147】

モノクローナル抗体はまた脾臓細胞の初代培養もしくは脾臓由来の細胞株を用いて生体外で作成することもできる(Anavi, S., 1998. アルツハイマー - アミロイドペプチドのN末端が、組織培養で神経毒性を阻止する、修士論文)。遺伝子組換え抗体(一般的に、Huston et al., 1991; Johnson and Bird, 1991; Mernagh and Mernagh, 1995を参照)を作成するためには、動物の抗体産生Bリンパ球由来のメッセンジャーRNAもしくはハイブリドーマを逆転写して相補性DNA(cDNA)を得る。完全長または部分長の抗体cDNAを増幅しファージもしくはプラスミドにクローニングする。cDNAは重鎖もしくは軽鎖のcDNAの部分レンジでもよく、また分離していてもリンカーで結合されていてもよい。適切な発現系を用いて抗体もしくは抗体断片を発現させて遺伝子組換え抗体を得る。抗体のcDNAはまた、適切なライブラリーをスクリーニングして得ることもできる。

#### 【0148】

技術上周知のように、抗体は、固相の支持体基質に結合させ、もしくは検出可能な成分とコンジュゲートさせるか、または結合およびコンジュゲートの両方をさせることができる。蛍光もしくは酵素成分のコンジュゲーションの一般的な考察については、Johnstone & Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982を参照のこと。抗体の固相支持体基質への結合も技術上周知である。一般的な考察については、Harlow & Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988およびBorrebaeck, *Antibody Engineering A Practical Guide*, W. H. Freeman and Co., 1992を参照のこと。

#### 【0149】

明細書および請求項で用いる限りでは、語句“抗体の免疫学的部分”は、抗体の  $F(a b')_2$  断片、抗体の  $F a b$  断片、抗体の  $F v$  断片、抗体の重鎖、抗体の軽鎖、抗体の重鎖および軽鎖の非会合混合物、抗体の重鎖および軽鎖よりなるヘテロダイマー、抗体の重鎖の触媒領域、抗体の軽鎖の触媒領域、抗体の軽鎖の可変部断片、抗体の重鎖の可変部断片、ならびに  $s c F v$  としても知られている抗体の単鎖変異体を含む。加えて、この用語は異なる動物種に由来する融合遺伝子の発現産物であるキメラ免疫グロブリンを含み、その動物種の一つはヒトであってもよく、この場合キメラ免疫グロブリンはヒト化されたと言われる。典型的に、抗体の免疫学的部分はそれが由来した元の抗体と競合して抗原と特異的結合を行う。

#### 【0150】

任意に、抗体もしくは好ましくは抗体の免疫学的部分は他のタンパク質と化学的にコンジュゲートさせることができ、または融合タンパク質として発現させることができる。本明細書および付随する請求項の目的のために、全てのそのようなタンパク質は抗体もしくは抗体の免疫学的部分の定義に含まれる。

#### 【0151】

本明細書で用いる限りでは、用語“免疫原物質”もしくは“免疫原”または“抗原”は、単独で、アジュバントと共同して、もしくは表示媒体上に与えられてレシピエントに投与するときに、それ自身に対する免疫応答を誘起することのできる分子を記述するために互換的に使用される。

#### 【0152】

本明細書で用いる限りでは、用語“アジュバント”は、抗原と共同して投与した場合に抗原に対する免疫応答を増強するが、単独で投与した場合には抗原に対する免疫応答を生じない化合物をいう。アジュバントは、リンパ球動員、B細胞および/もしくはT細胞刺激、ならびにマクロファージ刺激を含むいくつかの機構で免疫応答を増強することができる。

#### 【0153】

本発明の医薬組成物は、活性な成分として、プラーク形成疾患におけるプラーク形成に関連する凝集タンパク質の少なくとも1つのエピトープを提示する表示

媒体を含んでなり、かかる少なくとも1つのエピトープは、凝集タンパク質を離解し得る抗体を創生できる。あるいは、本発明の医薬組成物は、活性成分として、当該ブランク形成疾患におけるブランク形成に関連する凝集タンパク質のエピトープを結合するために存在する抗体の少なくとも1つの免疫学的部分を表示する表示媒体を提示する。

【0154】

本発明の製剤はそれ自体を生体に投与することができ、または適切な担体もしくは添加物と混合した医薬組成物に入れて投与することもできる。

【0155】

本明細書で用いる限りでは、“医薬組成物”は、本明細書で記述する1以上の活性成分と、生理学的に適切な担体および添加物のような他の化学成分とによる製剤をいう。医薬組成物の目的は化合物の生体への投与を容易にすることにある。

【0156】

本明細書では、“活性成分”は生物学的効果の原因となる製剤をいう。

【0157】

以後、互換的に用いられ得る語句“生理学的に許容される担体”および“薬学的に許容される担体”は、生体に有意の刺激を起こさず、また投与化合物の生物学的活性および性質を妨げるもののない担体もしくは希釈剤をいう。アジュバントはこれらの語句に含まれる。

【0158】

本明細書では、用語“添加物”は、活性成分の投与を更に容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質をいう。添加物の例には炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖類および各タイプの澱粉、セルローズ誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0159】

薬剤の処方および投与の技術は、“Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing, Co., Easton, PA、最新版で見ることができるが、それは出典

明示により本明細書の一部とする。

【0160】

適切な投与経路は、例えば、経口、直腸、経粘膜、特に経鼻、腸管投与、もしくは筋肉内、皮下および脊髄内投与を含む非経口投与、ならびにクモ膜下、直接脳室内、静脈、腹腔内、鼻腔内または眼内注射を含む。

【0161】

あるいは、全身的よりむしろ局部的に、例えば製剤を患者の脳に直接注射することにより製剤を投与することができる。

【0162】

本発明の医薬組成物は技術上周知の工程、例えば、通常の混合、溶解、粉碎、糖衣錠作成、研和、乳化、カプセル化、捕捉、もしくは凍結乾燥工程によって製造することができる。

【0163】

本発明に従って使用する医薬組成物は、したがって、活性成分を薬剤学的に使用可能な製剤に加工するのを容易にするところの、添加物および補助剤よりなる1以上の生理学的に許容される担体を用いて通常の方法で処方することができる。適切な処方を選択される投与経路に依存する。

【0164】

注射用には、発明の活性成分を水溶液、好ましくはハanks液、リンゲル液、もしくは生理食塩水のような生理学的に適合性のある緩衝液、に処方してもよい。経粘膜投与には、バリアーに浸透するのに適切な浸透剤を処方に使用する。そのような浸透剤は技術上周知である。

【0165】

経口投与には、活性成分を薬学的に許容できる技術上周知の担体と合体させることにより化合物を容易に処方することができる。そのような担体は、発明の化合物を錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして患者の経口摂取用に処方することができる。経口用の薬理的製剤は、錠剤もしくは糖衣錠の核を得るために、固体の添加物を用いて得られた混合物を任意に粉碎し、そして望むならば助剤を加えた後、顆粒混合物を加

工することにより調製することができる。適切な添加物は、特に、乳糖、白糖、マニトール、もしくはソルビトールを含む糖類のような増量剤；例えばトウモロコシ澱粉、小麦澱粉、米澱粉、馬鈴薯澱粉、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルローズ、ハイドロキシプロピルメチルセルローズ、カルボメチルセルローズナトリウムのようなセルローズ製剤；および／もしくはポリビニルピロリドン(PVP)のような生理学的に許容されるポリマーである。もし望むならば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天もしくはアルギン酸またはそれらの塩のような崩壊剤を加えてもよい。

#### 【0166】

糖衣錠の核には適切なコーティングが施される。この目的のために、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液および適切な有機溶媒もしくは溶媒混合物を任意に含有する濃縮糖溶液を用いることができる。錠剤もしくは糖衣錠には、確認のためにまたは活性化化合物の用量の異なる組み合わせを特徴づけるために、染料もしくは色素を加えてもよい。

#### 【0167】

経口使用可能な医薬組成物は、ゼラチン製の押し嵌めカプセルならびにゼラチンおよびグリセリンもしくはソルビトールのような可塑剤から作成した密封軟カプセルを含む。押し嵌めカプセルは、乳糖のような増量剤、澱粉のような結合剤、タルクもしくはステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤および任意に安定剤との混和物として、活性成分を含有してもよい。軟カプセルでは、活性成分は脂肪油、流動パラフィンもしくは液状ポリエチレングリコールのような適切な液体に溶解もしくは懸濁してもよい。加えて、安定剤を添加してもよい。経口投与用の全ての処方を選択された投与経路にとって適切な用量でなければならない。

#### 【0168】

口腔内投与には、組成物は通常の方法で処方された錠剤もしくはトローチ剤の形状をとってもよい。

#### 【0169】

鼻吸入投与には、本発明により使用する活性成分は、加圧パックまたは、例え



ば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンもしくは二酸化炭素などの適切な噴射剤の使用により噴霧吸入器からエアロゾルスプレーの形状で好都合に供給される。加圧エアロゾルの場合は、用量単位は一定量を供給するバルブをつけることにより決定することができる。ディスペンサーで用いる、例えば、ゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物と乳糖もしくは澱粉のような適切な粉末基材との混合粉末を含有して処方してもよい。

#### 【0170】

本明細書で記載する製剤は、例えば、ボーラス注射もしくは連続注入による非経口投与用に処方してもよい。注射用処方は単位用量の形状、例えばアンプル、で提供されてもよく、もしくは任意に保存料を加えた多回投与用容器で提供されてもよい。組成物は懸濁液、溶液または油状もしくは水性添加物中のエマルジョンでもよく、また懸濁剤、安定剤および／もしくは分散剤のような処方剤を含有してもよい。

#### 【0171】

非経口投与のための医薬組成物は水溶性の形状をした活性成分の水溶液を含む。加えて、活性成分の懸濁液は、適宜、油もしくは水を基材とする注射用懸濁液として調製してもよい。適切な脂溶性溶媒もしくは溶剤は、胡麻油のような脂肪油、またはオレイン酸エチル、トリグリセリドもしくはリポゾームのような合成脂肪酸エステルを含む。水性注射用懸濁剤は、カルボキシメチルセルローズ、ソルビトールもしくはデキストランのような、懸濁液の粘度を高める物質を含有してもよい。任意に、懸濁剤は、適切な安定剤もしくは高度に濃厚な液の製剤ができるように活性成分の溶解性を高める物質を含有してもよい。

#### 【0172】

あるいは、活性成分は、使用前に適切な溶剤、例えば、無菌かつパイロジェンフリーの水を基材とする溶液で調製用の粉末の形状であってもよい。

#### 【0173】

本発明の製剤はまた、例えば、ココアバターもしくはその他のグリセリドのような通常の坐剤基剤を用いる、坐剤または保持浣腸剤のような直腸用組成物とし

て処方してもよい。

【0174】

本発明との関連において使用に適切な医薬組成物は、活性成分が意図する目的を達成するための有効量を含有されるところの組成物を含む。より具体的には、治療的有效量とは、治療を受ける患者の疾患の症状を予防、緩和、もしくは改善、または生存の延長に有効な活性成分の量を意味する。

【0175】

治療的有效量の決定は、特にここに提供される詳細な開示を考慮すれば、充分当業者の能力範囲内である。

【0176】

本発明の方法に用いられるいずれも製剤においても、治療的有效量すなわち用量はインビトロおよび細胞培養アッセイから先ず推定可能である。例えば、所望の循環抗体濃度もしくは力価を得るために、用量を動物モデルにおいて処方することができる。そのような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。

【0177】

本明細書で記載する活性成分の毒性および治療有効性はインビトロ、細胞培養もしくは実験動物で標準的な薬学的手順により決定することができる。これらのインビトロおよび細胞培養アッセイならびに動物実験から得られたデータはヒトにおける用量の範囲を処方するのに用いることができる。用量は用いる剤形および採用する投与経路により異なるであろう。正確な処方、投与経路および用量は患者の状態を見て個々の医師が選択することができる。(例えば、Finglet al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1, p. 1を参照)。

【0178】

投与の用量および間隔は、凝集を防止もしくは既存の凝集を離解させるために充分である抗体の血漿内もしくは脳内レベル(最少有効濃度(MEC))を与えるために、個々に調整してもよい。MECは製剤ごとに異なるであろうが、インビトロのデータから推測可能である。MECに到達するために必要な用量は個々の

特性および投与経路に依存するであろう。血漿中濃度測定のために結合アッセイを使用することができる。

【0179】

投与間隔もまたMEC値を用いて決定することができる。製剤は、血漿中濃度を期間の10～90%、好ましくは30～90%、最も好ましくは50～90%でMEC以上に維持する投与法を用いて投与しなければならない。

【0180】

治療すべき病状の重症度および応答度に応じて、投与は単回投与もしくは複数回投与であってもよく、治療のクールは、数日間から数週間もしくは治癒が得られるか疾病状態の軽減が得られるまで続いてもよい。

【0181】

投与すべき組成物の量は、勿論治療を受ける被験者、病気の重症度、投与法、処方方を指示する医師の判断などによって異なるであろう。

【0182】

所望するならば、本発明の組成物は、FDA認可キットのようなパックもしくはディスペンサーに入れた状態で提供されてもよいが、これは活性成分を含有する単一もしくは複数の用量剤形を含んでもよい。パックは、例えば、PTPパックのような金属もしくはプラスチック箔より成っていてもよい。パックもしくはディスペンサーには投与のための説明書が付随していてもよい。パックもしくはディスペンサーの容器には、医薬品の製造、使用もしくは販売を規制する政府当局指定の形式による注意書きがつけられていてもよい。組成物またはヒトもしくは動物への投与の形状に関する当局による承認に従う注意書きである。そのような注意書きは、例えば、処方薬について米国医薬品庁の承認を受けた表示であってもよく、もしくは承認された添付文書のものでよい。適合する医薬担体で処方された本発明の製剤よりなる組成物はまた、上に詳細に記したように、適切な容器中に調製して入れ、適応疾患治療用の表示を貼ってもよい。

【0183】

本発明は、また、生物サンプル中のプリオンタンパク質病原性または非病原性形態の両方を検出する方法に関する。

即ち、本発明の別の態様において、生物サンプル中のプリオンタンパク質の存在または不存在を検出する方法を提供するものであり、該方法は次の工程からなる：(a) 抗プリオン抗体またはその免疫学的部分を生物サンプルとともにインキュベートする；および(b) 抗体-抗原複合体の存在または不存在を測定することにより、生物サンプル中のプリオンタンパク質の存在または不存在を決定する。

【0184】

そのような複合体は、いくつかの技術上周知の方法のいずれかの一つにより検出することができ、その方法は生化学的および/もしくは光学的検出法を用いることができる。

【0185】

即ち、本発明のこの態様は、生物サンプルをアッセイまたはスクリーンする方法を提供する。この生物サンプルは、本来の非疾患コンホメーションまたは疾患関連コンホメーションのいずれかにおけるプリオンタンパク質の含有が疑われる体組織や体液などである。

【0186】

本発明のこの態様に基づく検出法はまた、医薬品(天然物由来)、食品、化粧品もしくはプリオンを含有する可能性のある任意の材料などの産物の迅速で安価なスクリーニングに利用することができる。

【0187】

その検出法はまたプリオン凝集の防止もしくは離解に有用な潜在的抗プリオン薬の発見のためのアッセイにも利用できることが理解されよう。

【0188】

本発明の更なる目的、利点および新規な特徴は以下の実施例を検証することにより当業者には明らかであろうが、実施例は本発明を限定しようとするものではない。加えて、以上の説明および請求項に記載の本発明の種々の実施態様および態様の各々は、下記の実施例によりその実験的支持を得ている。

【0189】

(実施例)

以下の実施例に言及するが、これらは上の記述と相俟って本発明を非限定的に例証するものである。

【0190】

一般に、本明細書で使用する名称および本発明で利用する実験室手法は、分子的、生化学的、微生物学的および組換えDNAの技術を含む。そのような技術は文献に詳細に説明されている。例えば、"Molecular Cloning; A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 米国特許第4,666,828号; 4,683,202号; 4,801,531号; 5,192,659号および5,272,057号に記載の方法; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al., (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980)を参照のこと; 利用可能な免疫アッセイは特許および科学文献に詳細に記載されている、例えば、米国特許第3,791,932号; 3,839,153号; 3,850,752号; 3,850,578号; 3,853,987号; 3,867,517号; 3,879,262号; 3,901,654号; 3,935,074号; 3,984,533号; 3,996,345号; 4,034,074号; 4,098,876号; 4,879,219号; 5,011,771号および5,281,521号; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. and Higgins S. J., ed. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Fre

shney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marsak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996)を参照のこと; これらはいずれも、本明細書で完全に記述されているかのように、出典明示により本明細書の一部とする。その他の参考文献は本書類の全域に亘って提供される。これらに記載されている手法は技術上周知と考えられており、読者の便宜のために提供される。それらに含まれる全ての情報は、出典明示により本明細書の一部とする。

#### 【0191】

以下の材料および方法に言及するが、これらは以下の実施例に記載する実験に用いたものである。

#### 【0192】

(材料および実験方法)

以下の材料および実験方法を使用する一方において、以下の実施例で更に実証するように、本発明を実践できるようにした。

#### 【0193】

一般的組換えDNAおよびファージ手法:

標準的組換えDNA手法は既報(Sambrook et al., 1989)と実質的に同じ方法で行った。抗体 ファージ表示手法の一般的プロトコールはPharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)の組換えファージ抗体システム(P R A S)による。

#### 【0194】

ファージ表示上での508 scFvの構築:

抗体の可変領域の供給源として使用した508 IgMハイブリドーマは、担体として用いたスカシガイのヘモシアニンにコンジュゲートさせた、APのアミノ末端16残基に相当するペプチドで免疫したマウスの脾臓細胞から作成した。mRNA抽出、第1鎖のcDNA合成、可変重鎖( $V_H$ )および可変軽鎖( $V_L$ )配列のPCR増幅、ならびにscFvカセットの組み立ては記載(Pharmacia Biotech社R P A Sマニュアル)と実質的に同じプロトコールに従って行った。組み立

てた508 scFv DNAをSfi IおよびNot Iで消化し、100 ngをファージミドpCC - Gal 6 (Fv) (Berdichevsky Y et al., J Immunol Methods, 31; 228 (1-2): 151-62, 1999)をSfi IおよびNot Iを用いて消化して得たベクターDNA 150 ngと連結した。このファージ表示システムはscFvをClostridium thermocellum (Morag E et al., Appl Environ Microbiol., 61 (5): 1980-6, 1995)由来の、セルロース結合ドメイン(CBD)を有する融合タンパク質と同じ読み取り枠で発現するように設計されている。連結したDNAを形質転換によりXL - 1 Blue細胞(Stratagene, La Jolla, CA)に導入し、形質転換細胞をアンピシリン100 µg / mlおよびグルコース1%を含有する2XYT寒天プレートに撒き、一夜37℃で増殖させた。

#### 【0195】

アミロイド結合性scFv - CBD融合タンパク質の選択：

個々のクローンを拾い上げて各々を2XYT 5 ml、1%グルコース、100 µg / mlアンピシリン中で一夜30℃で増殖させた。IPTGを1 mM濃度で添加し3時間インキュベートした。誘発処理を行った細胞のペレットを音波処理して核クローンから可溶性scFv - CBD融合タンパク質を単離した。機能を有する可溶性508 (Fv)を非機能性のものから区別して確認するために、250 ng / ウェルのアミロイドペプチドをエポキシコーティングしたマイクロタイタープレートに4℃で16時間かけて共有結合させた(Solomon, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93: 452-455, 1996)。プレートをPBS / 0.05% - Tween 20 (PBST)で洗浄し、3%ウシ血清アルブミンおよび粉末ミルクのPBS溶液との混合物で4℃で16時間ブロックした。次いでプレートを洗浄し、クローンから回収した可溶性scFv - CBDと37℃で1時間インキュベートした。結合した抗体をウサギ抗CBD抗血清次いでHRPとコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ抗体により検出した。プレートをペルオキシダーゼの発色基質(ABTS)で発色させ、シグナルをELISAマイクロタイタープレートリーダーを用いて405 nmで記録した。陽性ファージクローン(pCC - 508 (Fv))を増幅させ、そのDNAの配列を自動373A型DNAシーケンサー(Applied Biosystems, USA)を用いて決定した。

## 【0196】

E. coliにおける508(Fv) - CBD融合タンパク質の生産：

E. coliでの高レベル発現のために、野生型(wt)および変異型508(Fv)誘導体を記載の方法(Berdichevsky Y et al., Protein Expr Purif., 17(2): 249-59, 1999)によりpFEKCA3ベクターにクローニングした。このベクターは強力なT7発現プロモーターを使用しており、そこでは、T7RNAポリメラーゼ遺伝子がE. coli BL21(DE3)のlacレプレッサーに制御されるIPTG誘導性遺伝子(Studier, F. W., et al., Methods Enzymol., 85, 60-89, 1990)として保持されている。IPTGで誘導すると、508(Fv) - CBDタンパク質が不溶性の封入体として蓄積した。これらを既報のセルローズ - 助成再生法(Berdichevsky Y et al., Protein Expr Purif., 17(2): 249-59, 1999)により回収した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS/PAGE)を用いて、変性条件下でタンパク質をそれらの分子量に従って分離した(Laemmli, U. K., Nature 227: 263-270, 1970)。

## 【0197】

精製508(Fv) - CBDタンパク質の安定性アッセイ：

精製した508(Fv) - CBDタンパク質の安定性を4℃で7日間保存前後でチェックした。250 ng / ウェルのアミロイドペプチドをマイクロタイタープレートのエポキシコーティングを施したウェルに4℃で16時間共有結合させた(Solomon B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 4109-4112, 1997)。ウェルを3%ウシ血清アルブミンとウシヘモグロビンのPBS溶液との混合物で37℃で2時間かけてブロックし、次いで洗浄し508(Fv) - CBDタンパク質(特記しない限り、0.5 µg / ml)と37℃で1時間インキュベートした。結合した抗体断片を、1:5,000希釈したHRP-ウサギ抗マウス抗体コンジュゲート(BioMakor, Rehovot, Israel)およびPBSTで1:10,000希釈したウサギ抗CBDとインキュベートして検出した。結合した抗体断片は上述の方法によってモニターした。

## 【0198】

508(Fv) AP結合変異株の単離用ファージライブラリーの構築：



スプライシングオーバーラップ伸長(SOE)PCR手法を用いて508(Fv)のV<sub>L</sub>のシステインコドン96を他のコドンと置き換えた。pCC-508(Fv)DNAを鋳型として使用した。第1ステップでは、鋳型DNAを以下のプライマーで増幅した。

【0199】

アンチセンスプライマー508-mut-FOR: 5' - CCCCCCTCCGAACGTSNATGGGTAACTc g a t c gCTGATGGCAGTA-3' (配列番号10)にはPvuI制限部位(下線部分)を挿入するが、SはヌクレオチドCもしくはGを、そしてNはA、C、TもしくはGを表す。このプライマーはシステインコドン96をフェニルアラニン(F)、ロイシン(L)、セリン(S)、チロシン(Y)もしくはトリプトファンコドンと置換するのに使用した。プライマーSfiI 5' BACK: 5' - ATCTATGC g g c c c a g c c g g c cATG-3' (配列番号11)はscFvの5'末端にSfiI部位を挿入する。得られたPCR産物(SfiI-508mut)は508(Fv)-CBDの5'側半分に相当する。2番目のPCRステップでは、ステップ1由来のSfiI-508mut PCR産物を5'末端プライマーとしCBD(BX): 5' - GTGGTGCTGAGT g g a t c c t aTACTACACTGCCACCGGG-3' (配列番号12)を3'末端プライマーとしてpCC-508(Fv)DNAを増幅することによって完全な508(Fv)CBDの再会合を行った。最終のPCR産物(SfiI-508mut-BX)はV<sub>L</sub>コドン96に置換を有し、PvuI部位を分析用にサイレント変異に改変した完全な508(Fv)-CBDカセットである。SfiI-508-BX DNAをSfiI、PvuIおよびNotIで消化し、抗E. coli ガラクトシダーゼscFvを表示するのに用いたファージミド(Berdichevsky Y et al., J Immunol Methods, 31; 228 (1-2): 151-62, 1999)であるところの、SfiIおよびNotIで線状化したpCC-Gal6(Fv)DNAと3断片連結を行った。得られた連結ファージミドDNAをエレクトロポレーションによりE. coli XL-Blue細胞に導入した。E. coliを培養し、M13KO7ヘルパーファージ(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)をヘルパーファージとして使用して表示用ファージを生産した。

## 【0200】

アミロイド結合性508(Fv)を表示するファージクローンの親和性選択：  
レスキュ・ファージ粒子を含有するサンプルを一巡の親和性選択(バイオパンニング)および増幅にかけた。選択サイクルには、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチニル化 アミロイド1-16アミノ酸ペプチド(AP(1-16)、配列番号3の酸1-16)を総容量1mlに加えて使用した。ファージをビオチニル化ペプチドと室温で2時間ブレインキュベートし、反応混合物を次いでストレプトアビジンをコーティングした30mm径のポリスチレン製ペトリ皿に重層し、室温で20分間インキュベートした。PBSTで充分洗浄して未結合のファージを除去した。グリシンでpH2.2に滴定した $0.1\text{M}$  HCl  $0.3\text{ml}$ を用いて結合したファージを溶出した。溶出液を $80 \mu\text{l}$ の $0.5\text{M}$  Tris(HCl) pH10で中和し、これをE. coli XL-Blue細胞に感染させた。増幅したファージ粒子を含有する個々の細菌コロニーを、プライマーSfiI5' BackおよびCBD(BX)を用いるコロニーPCR(Novagen Madison, USA)の鋳型として使用した。元のscFv-CBD断片(約1250bp)のサイズ付近のPCR産物を制限酵素PvuIで消化してアガロースゲル電気泳動で分析した。

## 【0201】

scFvのビオチニル化 AP(1-16)への結合：

scFvの AP(1-16)への結合をELISAで分析した。 $0.1\text{M}$  NaHCO<sub>3</sub>、pH9.6に溶解したストレプトアビジンの $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液 $50 \mu\text{l}$ でコーティングしたプレートをPBSTで3回洗浄し、次いで $6\text{ng}/\mu\text{l}$ のビオチニル化 AP(1-16) $50 \mu\text{l}$ をウェルに添加し37℃で30分間インキュベートした。ウェルを3%ウシ血清アルブミンおよびウシヘモグロビンのPBS溶液との混合物で37℃で2時間ブロックし、次いで洗浄しscFv(特記しない限り、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )と37℃で1時間インキュベートした。阻害実験では、ペプチドを抗体と37℃で30分間ブレインキュベートした後ペプチドでコーティングしたウェルに加えた。洗浄後、結合した抗体断片を上述の方法で検出した。AP特異的結合を行うファージクローンを増幅させ、そのDNAを上述の方法で単離し配列を決定した。

## 【0202】

細胞培養および A P の細胞毒性アッセイ：

ラットの褐色細胞腫 P C 1 2 細胞を 5 % ウマ血清、10 % ウシ胎児血清、2 m M L - グルタミン、および 100 単位 / m l ペニシリン / ストレプトマイシン添加 D M E M で 5 % C O<sub>2</sub> 下 37 ° でインキュベートした。神経毒性のアッセイには、培養 P C 1 2 細胞を 2 M インシュリン添加無血清培地中 10<sup>4</sup> 個 / 100 μ l / ウェルの密度で 96 ウェルプレートに撒いた。A P の神経毒性阻害効果は次のようにして測定した：0.12 m M アミロイドを 37 ° で 1 週間インキュベートして原線維を形成させ、更に 508 F (F v) - C B D 存在下、もしくは無関係な G a l 6 (F v) - C B D と共に A P 対 s c F v 比 15 : 1 もしくは 30 : 1 で 24 時間インキュベートした。A P / 抗体混合物を P C 1 2 細胞を含有したウェルに添加した。プレートを 37 ° で 2 日間インキュベートし、その後臭化 3 - (4, 5 - ジメチルチアゾール 2 - イル) - 2, 5 - ジフェニルテトラゾリウム (M T T) を用いて細胞の酸化還元活性を測定することによって、細胞の生存率を既報の方法 (Sladowski, D. et al., J. Immunol. Methods., 157 : 203-207, 1993) で測定した。プレートは 37 ° で一夜インキュベートした。M T T の還元は、550 n m にセットした E L I S A マイクロタイタープレートリーダーを用いて比色法により測定した。

## 【0203】

アミロイドペプチド凝集のチオフラビン T (T h T) 蛍光定量法による測定：

アミロイドペプチドの凝集はチオフラビン T (T h T) 結合アッセイによって測定したが、蛍光強度は アミロイド原線維形成の程度を反映する。T h T はアミロイド様沈着物を特徴的に染め (Levine, H. III, Protein Sci., 2: 404-410, 1993)、凝集した シート標品の懸濁液に加えた場合、435 n m で励起すると 485 n m に増強された蛍光放射を示す。0.1 M T r i s (H C l) p H 7.1 中の 0.12 M A P 溶液を 37 ° で 1 週間インキュベートし、更に 508 F (F v) - C B D 存在下、もしくは無関係な G a l 6 (F v) - C B D と共に A P 対 s c F v のモル比 15 : 1 もしくは 30 : 1 で 24 時間インキュベートした。T h T (50 m M グリシン、p H 9 中 2 μ M) 1 m l を加えた後 L S B -

50 (Perkin Elmer社、英国)分光光度計で測定した。

#### 【0204】

ファージ送達システムの作製：

雌性B a l b / c マウス12匹を各群3匹の4群に分けた。1群はコントロールとして使用した。10<sup>11</sup>個のファージ粒子(f d ファージ、George P. Smith, University of Missouri, Columbia, MOより提供された15量体ファージペプチドライブラリーより取ったもの)を単回鼻腔内投与した後、1、14および28日の間隔で各群のマウスを屠殺し、詳細な分析を行うためにその脳を取り出した。

#### 【0205】

s c F v を有するファージが脳に入り脳由来の A P 断片を除去する能力：

s c F v - 508 F を繊維状マイナーコート g p I I I に融合させたものを用いて、A P 凝集阻害活性を有する s c F v が繊維状ファージ表示システムによって直接C N S に運ばれる能力を検討した。

#### 【0206】

このs c F v は凝集阻害活性を有するハイブリドーマ508から上述の方法で調製し、その特異的結合活性を保持していた。3群に分けたB a l b / c マウス9匹を以下のように処理した。第1群のマウスは10<sup>-3</sup>Mのビオチン A (1 - 16) 0.2 ml のみで処理した。第2群のマウスは10<sup>-3</sup>Mのビオチン A (1 - 16) 0.2 ml と1時間ブレインキュベーションした508 F - s c F v 保持ファージ10<sup>10</sup>個の混合物で処理した。第3群のマウスはコントロールとして使用した。鼻腔内に単回投与した後、1、14および28日の間隔で各群のマウスを屠殺し、詳細な分析を行うために脳を取り出した。

#### 【0207】

組織切片作成：

断頭後直ちに脳を取り出し、正中矢状溝に沿って半分ずつに切断した。無作為に、半球を0.1Mリン酸緩衝液中の4%パラホルムアルデヒド溶液に4℃で2時間浸漬して固定し、次いで低温に対する保護のために0.1M P B S 中4.5%蔗糖溶液に一夜浸漬した。断片を次いで30%蔗糖液に移して4℃で2時間浸

漬した。嗅球と海馬を含有する冠状ブロックの断片をOCTに入れ、-20℃で6μmの厚さに切断し、スライドガラス上に載せた。スライドは-70℃に保持した。これらのスライドを免疫蛍光法を用いたファージ検出に使用した。

#### 【0208】

もう一方の正中矢状溝半球は組織学用のパラフィン組織切片の作製に使用した。断片を4%パラホルムアルデヒドで2時間固定し、次いで10%ホルマリン食塩水に移して室温2時間置き、次いでパラフィン包埋し、ミクロトームで4μmの厚さに切断してスライドガラス上に載せた。スライドは使用まで室温に保持した。

#### 【0209】

脳切片中の抗原検出：

免疫蛍光：切片をPBS中3%ウシ血清アルブミンで30分間ブロックし、次いでウサギポリクローナル抗f d血清(1:100)もしくはPE(Sigma社)とカップルしたストレプトアビジンと37℃で1時間インキュベートした。次いでスライドをPBS中で5分間ずつ3回洗浄し、再びブロッキング緩衝液で室温5分間処理し、次いで2次抗体rCy<sup>TM</sup>3ロバ抗ウサギIgG(ファージ検出用)の1:400希釈液(Sigma社)もしくはPEとカップルしたストレプトアビジンの1:50希釈液と室温で1時間インキュベートした。最後に標品をPBS中で3回洗浄し、蛍光顕微鏡を使って最終倍率10倍で観察し、浜松デジタルカメラ(C4742)およびMetamorph(Universal Imaging; West Chester, PA)を用いてフィルムに記録した。

#### 【0210】

組織学：6ミクロンの切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。染色した切片を最終倍率40倍で調べて写真に撮った。最後に、標品をPBS中で3回洗浄し、顕微鏡で観察し、フィルムに記録した。

#### 【0211】

f3-YYEFRHによる免疫：

マイナーコートgpIIIに融合したペプチドYYEFRH(配列番号7)を保持する遺伝子組換えf dファージで免疫を行った。注射当たり10<sup>10</sup>個のファ

ージの用量を用いて14日間隔で腹腔内注射して免疫を行った。1回目はフロイント完全アジュバント(Difco社)と共に、もしくはアジュバント無しでマウスに注射し、2回目はフロイント不完全アジュバント(Difco社)と共に注射した。各注射の7日後にマウスを放血し、そしてその血清についてファージコートタンパク質およびAに対する抗体IgGの反応性をELISAで試験した。

#### 【0212】

##### エピトープライブラリー

この研究で使用した15量体のファージライブラリーはGeorge P. Smith (University of Missouri, Columbia, MO)から提供された。ライブラリーは約 $1.9 \times 10^9$ 個のファージ粒子より成り、fdファージのコート糖タンパク質VIIに融合した15アミノ酸残基のランダムペプチドレパトリを形成する。このライブラリーを用いた実験は提供者(George P. Smith University of Missouri, Columbia, MO)の指示に従って実施した。

#### 【0213】

##### 抗体のビオチニル化：

抗体のビオチニル化には、0.1M  $\text{NaHCO}_3$ 中各抗体100 $\mu\text{g}$ をジメチルホルムアミドに溶かした1mg/ml ビオチンアミドカプロエートN-ヒドロキシサクシンイミドエステル(Sigma社、B2643)保存溶液5 $\mu\text{g}$ と室温で2時間インキュベートし、リン酸緩衝生理食塩水(PBS;  $\text{NaCl}$  / 0.01M リン酸緩衝液、pH 7.4)中4で一夜透析した。

#### 【0214】

##### ペプチドライブラリーからのエピトープ提示ファージ単離：

$10^9$ 個の感染性ファージ粒子を含有するライブラリーサンプルを3巡の選択(バイオパンニング)および増幅のサイクルにかけた。各選択サイクルで全容量25 $\mu\text{l}$ 中ビオチニル化モノクローナル抗体(1 $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$ )を使用した。ファージクローンをビオチニル化抗体と4で一夜プレインキュベートし、反応混合物を次いで0.5% Tween 20含有PBS 1ml中、ストレプトアビジンをコーティングした30mm径のペトリ皿に重層し、室温で20分間インキュベートした。未結合のファージはPBS / 0.05% Tween 20で充分洗浄(10分間

ずつ10回)して除去した。結合したファージをグリシンでpH2.2に合わせた0.1M HCl 0.3mlで溶出した。溶出液を中和し、E. coli K91細胞に感染させるのに使用した。パンニングを3回行った後、増幅した粒子を含有する個々の細菌コロニーをマイクロタイタープレート上で増殖させ、選択されたファージについて以下に記述する方法で研究対象の抗体に対する結合能をELISAで試験した。

#### 【0215】

単離されたファージに対する抗体の結合：

ファージへの抗体の結合はELISAで分析した。マイクロタイタープレート(Maxisorb, Nunc)のウェルをウサギ抗ファージ血清50 $\mu$ l(0.1M NaHCO<sub>3</sub>、pH8.6中1:1000希釈)でコーティングし、4 $^{\circ}$ Cで一夜インキュベートした。ウェルを3%ウシ血清アルブミンおよびヘモグロビンの1:1(PBS中)混合物を用いて2時間ブロックした。コーティングしたプレートをPBS/0.05%Tween20で3回洗浄し、10<sup>10</sup>個のファージ粒子を含有する富化されたファージクローン50 $\mu$ lをウェルに添加して37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。洗浄後、研究対象の抗体を添加し(特記しない限り、1 $\mu$ g/ml)4 $^{\circ}$ Cで一夜かけて結合させ、その結合定数を測定した。陽性ファージを増殖させ、そのDNA配列をApplied Biosystem Kit (United States, Applied Biosystem)を用いてWeizmann Institute of Science (Rehovot, Israel)のSequencing Unitにおける挿入領域中で決定した。

#### 【0216】

AP(1-16)のfdgpVIIIFa $\phi$ による表示：

線維状ファージのコート糖タンパク質VIIIFa $\phi$ はファージコート上約2700コピーが提示される。以下のオリゴヌクレオチドを作成した：センス - 5' - agctccGATGCTGAATTCTGGTGATAGCGGCTACGAAGTGCAATCATCAGAAAcctgcag - 3' (配列番号13)；およびアンチセンス - 5' - ggTTTCTGATGATGCACTTTCGTAGCCGCTATCATGACGAAATTCTAGCATCgg - 3' (配列番号14)。これらのオリゴヌクレオチドを用いて、ヒトAPのアミノ酸1-1

6をコードし以後の分析に有用な特異的制限部位(EcoRI)のサイレント変異を含有するところの二重らせんを形成した(68-70、10分間、次いで室温まで徐々に冷却)。二重らせんをリン酸化し、線維状ファージのgpVIIII上に融合ペプチドを表示するのに使用するベクターの、HindIII/PstIで線状化したf88-4ファージミドに連結した。得られた連結ファージミドDNAを形質転換でE. coli K91K細胞に導入し、形質転換細胞を10 µg/mlテトラサイクリンおよび1%グルコースを含有する2xYT寒天プレートに撒いて37℃で一夜増殖させた。ファージ粒子を含有する個々の細菌クローンをを用いて10 µg/mlテトラサイクリン含有2YT培地に接種し37℃で一夜増殖させた。各コロニーから得られたDNAファージミド生成物をEcoRIで分析した。陽性クローンを更に増殖させ抗原標品とした。

#### 【0217】

f88-EFRHによる免疫：

メジャーコート糖タンパク質VIIIIに融合させたペプチドVHEPHEFRHVALLNPV(配列番号8)を保持する遺伝子組換えfdファージで免疫を行った。注射1回当たり $10^{10}$ 個の用量のファージを用いて14日間隔で腹腔内注射して免疫した。1回目はフロイント完全アジュバント(Difco社)と共に、もしくはアジュバント無しでマウスに注射し、2回目はフロイント不完全アジュバント(Difco社)と共に注射した。各注射の7日後にマウスを放血し、そしてその血清についてファージコートタンパク質およびAに対する抗体IgGの反応性をELISAで試験した。

#### 【0218】

抗体の アミロイドペプチドへの結合の阻害：

抗体の AP(1-16)への結合に対する種々の小ペプチドによる阻害を、上述の方法でELISAプレートに共有結合させた250 ng/ウエルのビオチニル化 アミロイドペプチド(1-16)を用いて実施した。プレートを3%ウシ血清アルブミンおよびヘモグロビンの1:1(PBS中)混合物を用いて37℃で2時間ブロックした。ペプチドを、f88-EFRHによる3回目の免疫後の血清の1:3000希釈液とプレインキュベーションした後、APでコーティン



グしたウエルに添加しウエル中で4℃で一夜放置した。洗浄後、上述の方法でH R Pにコンジュゲートしたウサギ抗マウス免疫グロブリンとインキュベートすることによって結合した抗体を検出した。結果を用いて、抗体の結合を完全に阻害するペプチドの半分のモル濃度である $IC_{50}$ を算出した。ペプチドはThe Weizmann Institute of Scienceのthe Unit for Chemical Services中でApplied Biosystems Synergy Model430AによりFmoc化学を用いる固相で合成した。

#### 【0219】

細胞培養および細胞毒性アッセイ：

ラットの褐色細胞腫PC12細胞を5%ウマ血清、10%ウシ胎児血清、2 mM L-グルタミン、および100単位/ml ペニシリン/ストレプトマイシン添加DMEMで5%CO<sub>2</sub>下37℃でインキュベートした。神経毒性のアッセイには、培養PC12細胞を2 Mインシュリン添加無血清培地中10<sup>4</sup>個/100 μl /ウエルの密度で96ウェルプレートに撒いた。APの神経毒性阻害効果は次のようにして測定した：0.12 mM アミロイドを37℃で1週間インキュベートして原線維を形成させ、更にEFRH-ファージで免疫したマウスの血清および無関係なファージで免疫したマウスの血清の5：1および10：1希釈液存在下24時間インキュベートした。AP/抗体混合物をPC12細胞を含んだウエルに添加した。プレートを37℃で2日間インキュベートし、その後臭化3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム(MTT)を用いて細胞の酸化還元活性を測定することによって細胞の生存率を既報の方法(Sladowski, D. et al., J. Immunol. Methods., 157: 203-207, 1993)で測定した。プレートは37℃で一夜インキュベートした。MTTの還元は550 nmにセットしたELISAマイクロタイタープレートリーダーを用いて比色法により測定した。

#### 【0220】

抗PrP106-126モノクローナル抗体の作成

ヒトPrP106-126(配列番号25)に相当する合成ペプチド(Chiron Technologies, Clatton, Victoria, Australiaから入手)を大きな担体であるKLHにカップルさせたもので免疫したマウスを用いてKohlerおよびMilstein (Kohler

and Milstein 1975)の融合手法に従ってモノクローナル抗体を作成した。

#### 【0221】

ハイブリドーマはE L I S Aを用いて以下の方法でペプチド特異的抗体産生を試験した。ペプチドP r P 1 0 6 - 1 2 6をE u p e r g i t - Cでコーティングした96ウェルプレートのエポキシ基に共有結合させた。残ったエポキシ基はプレートを3%スキムミルク(ブロッキング液)でインキュベートすることによってブロックした。未希釈のハイブリドーマ上清を加えて37℃で1時間置いた。ウェルを充分洗浄(操作の各ステップ同様)し、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(H R P)で標識したマウスI g GもしくはI g M特異的ヤギ抗マウス抗体(ブロッキング溶液で希釈)と更にインキュベートした。洗浄後、オルトフェニレンジアミンをH R Pの基質に用いて抗体結合を視覚化した。吸光度を492nmで測定した。選択されたモノクローナル抗体をスケールアップし、公表の方法、すなわちプロテインAカラム(Harlow et al. 1998)によるI g G精製法およびKaptive MカラムによるI g M精製法を用いて精製した。2種のm A b、すなわち2 - 40および3 - 11を以後の研究に使用した。m A B 3 F 4はSenetek, Ca, USAから購入した。

#### 【0222】

ファージ表示ライブラリーを用いた抗体のエピトープ部位の探索：

抗体3 - 11(I g M)および2 - 40(I g G)をビオチニル化した。以下のライブラリー(G. P. Smithより提供)を既述の方法(Frenkel et al. 1998)で探索して研究対象の抗体のエピトープを探した。

1. 異種の15量体がp I I I Iの5個全てのコピー上に表示されているf U S E 5 / 15量体ライブラリー
2. 異種の6量体がp V I I I Iの最高約300個のコピー上に表示されているf 88 - 4 / 6量体ライブラリー(本ペプチドをコードする組換え遺伝子V I I I IはI P T Gで誘導可能)

#### 【0223】

抗体のエピトープを探すためのファージのバイオパンニングは既述の方法(Frenkel et al., 1998)で実施した。

## 【0224】

PrPに結合した抗体のペプチドNMKHによる競合阻害

共有結合したPrPペプチドへの上記の抗体のELISAによる競合的結合を上述の方法で行った。抗体をペプチドNMKHと等モル比でプレインキュベーションした後ウエルに添加した。

## 【0225】

PrP106-126の凝集および免疫複合体形成

PrP106-126(10mg/ml)の水溶液を37℃で種々の時間間隔でインキュベートすることにより、ペプチド106-126のインビトロ凝集を誘発させた。凝集したペプチドをモノクローナル抗体2-40、3-11もしくは3F4のいずれかと後述の条件でインキュベートした。

## 【0226】

PC12細胞を用いたPrP106-126の細胞毒性アッセイ

ラットの褐色細胞腫PC12細胞を8%ウマ血清、8%ウシ胎児血清、2mM L-グルタミン、および100単位/mlペニシリン/ストレプトマイシン添加DMEMで5%CO<sub>2</sub>下37℃でインキュベートした。

## 【0227】

神経毒性のアッセイには、培養PC12細胞を2Mインシュリン添加無血清培地中 $2 \times 10^4$ 個/100μl/ウエルの密度で96ウェルプレートに撒いた。細胞を、37℃で4-7日間プレインキュベーションした100μMのPrP106-126で3-5日間処理した。細胞の生存率は、生存細胞がテトラゾリウム塩である臭化3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム(MTT)をホルマザン生成物に変換するミトコンドリア酵素の活性を測定するMTTアッセイ(Hansen et al. 1989)によって測定した。MTTは終濃度1mg/mlになるようにウエルに添加し更に37℃で3時間細胞とインキュベートした。細胞溶解用緩衝液(50%ジメチルホルムアミド、pH4.7中20%wt/vol SDS)を添加し、プレートを37℃で一夜インキュベートした。MTTの還元を550nmの吸光度(OD)で比色測定した。

## 【0228】

### PrP106-126の神経毒性の阻害

PrP106-126の神経毒性に対するmAbの阻害効果を以下の方法で測定した。PrP106-126(10mg/ml)を37℃で7日間インキュベートしてペプチドの最大凝集を起こさせた。モノクローナル抗体3-11、2-40および3F4を、既に凝集している1mMのペプチドサンプルに添加して1時間置いた。抗体-ペプチド混合物ならびに凝集したペプチドのみをペプチドの終濃度が100μMになるように添加した。上記の反応混合物と37℃で3日間インキュベートした後、細胞の生存率を上記の方法で測定した。無処理の細胞でのMTTアッセイ値を生存率100%と定義した。

#### 【0229】

チオフラビンT(ThT)蛍光アッセイによるPrPのコンフォーメーション変化の追跡

増加する量のPrP106-126ペプチド(0-0.8mg/ml)を37℃で7日間インキュベートした。プリオンアミロイド原線維形成をチオフラビンT(ThT)結合アッセイで測定した。特定の起源由来のアミロイド原線維へのThTの結合は特異的蛍光シグナルを発生しする：溶液中の遊離色素の励起スペクトルの励起ピークが336nmから114nm赤方偏移し、結合した色素では450nmの新しい励起ピークになる。加えて、結合した色素は増強された482nmの発光を有する(Naikiet al. 1989, LeVine 1993)。0.1M Tris/HCl pH7.1中37℃で7日間インキュベートしたPrP106-126(0.3mg/ml)のサンプルを用いて、mAb3-11、2-40および3F4の種々の希釈液の存在下および非存在下でプリオンペプチドの凝集を追跡した。既に形成されているプリオンアミロイド原線維の離解は、37℃で7日間インキュベートし次いでmAbを添加して更に24時間インキュベートしたPrP106-126を用いて行った。サンプルをThT(50mMグリシン、pH9中2μM)に添加した後、蛍光(435nmで励起した後の482nmの発光)を測定した。

#### 【0230】

実験結果

以下の実施例 1 - 6 は抗凝集性モノクローナル抗体の単鎖型の生産に関する。以下の実施例 7 - 8 はペプチドもしくは抗体を表示するファージの脳への送達に関する。以下の実施例 9 - 14 はファージ上に表示されたベータアミロイド抗原の直接免疫による高力価の抗凝集性ポリクローナル抗体生産、およびこれらの抗体の特性検討に関する。

### 【0231】

#### 実施例 1

##### I g M 産生ハイブリドーマ 508 の生成

K L H (配列番号 9) にコンジュゲートしたベータアミロイドの 16 アミノ酸ペプチド (配列番号 3 の酸 1 - 16) を用いたマウスの免疫は上述の方法で行った。繰り返し免疫により、最後にベータアミロイドに対する低力価ではあるが測定可能な力価の抗体が生成した。引き続いた免疫マウスの脾臓摘出により、ベータアミロイドに特異性を有する s c F v A b を発現する I g M 産生ハイブリドーマ 508 の作製が容易になった。次いでこのハイブリドーマから R N A を抽出した。I g M 508 産生ハイブリドーマは、A に特異的活性を有し P C 12 細胞に対するその毒性作用を阻止した (Anavi, S. 1998, the Department of Molecular Microbiology and Biotechnology of the Tel-Aviv University, I からの修士論文)。

### 【0232】

#### 実施例 2

##### 508 I g M 産生ハイブリドーマの可変領域 s c F v のクローニング

M A b は アミロイドに対する特異的認識を示し、P C 12 細胞に対するその毒性作用を阻止した (Anavi, S., 1998, 同上)。508 抗体を s c F v としてファージ表示ベクターにクローニングするために、 $10^8$  個の 508 ハイブリドーマ細胞から R N A を抽出し、これを抗体の可変領域をコードする配列の材料として使用した。可変領域を R T - P C R を用いて増幅し、実験材料および方法に記述した方法によりファージ表示ベクター p C C - G a l 6 (F v) にクローニングした。ハイブリドーマ由来の抗体を s c F v としてクローニングすると、クローンのいくつかは機能しない異常配列を含有する。したがって、機能的に

アミロイドに結合する部位を保持するファージミドを確認するために、10個の別々のクローンを無作為に取り出し、それらから s s F v - C B D 融合タンパク質を生産した。508 - s c F v 発現に使用したプラスミド p C C - 508 の物理的地図を図2に示す。C B D 領域は可溶性 s c F v の免疫学的検出に使用でき、もしくは過剰発現した可溶性 s c F v タンパク質封入体の再生のための新しいアプローチにも使用できる (Berdinchevsky Y et al., Protein Expr Purif., 17 (2): 249-59, 1999)。508 - s c F v の過剰発現に使用したプラスミドを図3に示す。選択されたクローン由来の可溶性 s c F v - C B D を、アミロイドペプチドでコーティングした E L I S A プレートのウエル中でインキュベートした。分析したクローンのうち50%が A P に対する特異的結合を示した。図1 a ~ e に I g M 抗体からの508 s c F v の作成を図示する。図4に、更なる分析のために選択された陽性クローンから生成した s c F v - C B D による A P 結合を示す。P C R を用いてその挿入 D N A の特性を検討した。陽性クローン (p C C - 508 (F v) と呼称) は未変化の挿入 D N A を含有することが判明した (図5)。p C C の D N A 配列決定から、当クローンが未変化の s c F v 断片を発現することが確認された (核酸およびアミノ酸配列、および以下に更に記述する方法で修飾された配列についてはそれぞれ図11 a ~ b ならびに配列番号5および6を参照のこと)。

### 【0233】

#### 実施例3

##### 508 - (F v) 抗体の位置指定変異誘発

p C C 508 - (F v) の D N A 配列分析から、V<sub>L</sub> C D R 3 の96番目の位置にシステイン残基が異常出現していることが判明した (Kabat, E. A. et al., Sequence of proteins of immunological interest, 5th Ed., 1991)。V<sub>L</sub> C D R 3 の推定アミノ酸配列は H<sup>89</sup> Q R S S Y P C T<sup>97</sup> (配列番号15) である。対を成していないシステイン残基が s c F v 内に存在することは折りたたみ収率を低下させ、また溶液中の安定性および保存半減期を減少させる可能性がある。したがって508 (F v) を実験材料および方法記述の方法で発現ベクターにサブクローニングし、E. coli で生産した。セルローズを助剤とする再生法 (Berdic

hevsky Yet al., Protein Expr Purif., 17(2): 249-59, 1999)による508(Fv)-CBDの生産工程を図6に要約する。508(Fv)-CBDはこの方法でほぼ均一に精製できたが(図6レーン7)、再生効率は比較的悪くまた4の保存で不安定であった(図7)。システインを異なる残基で置換すれば、親和性に有害な影響を及ぼすことなく可溶性scFvの生産収率と安定性を増加できると推測された(Kirpriyanov, M. S. et al., Protein Engineering, 10:445-453, 1997)。

#### 【0234】

508V<sub>L</sub>システイン96のコドンを置換するためにSOE PCRを用いたが、この方法でCys96のコドンフェニルアラニン、ロイシン、セリン、チロシンもしくはトリプトファンのコドンに置換することができた。加えて、使用したPCRスキームはシステイン残基がその位置に存続することも許容する。508(Fv)変異株をpCC-Gal6(Fv)ファージベクターにクローニングし、その結果(6種の潜在変異株を有する)マイクロライブラリーが生成した。選択された置換用残基はKabatのデータベース(Kabat, E.A. et al., Sequence of proteins of immunological interest, 5th Ed., 1991)の中の種々の抗体に見出されるので一般的にCDR3部位に許容される。しかしながら、異なる置換はAP結合に及ぼす影響も異なる可能性がある。どの置換がAP結合を保持しているかを試験するために、ビオチニル化AP(1-16)を捕捉抗原として用いて508(Fv)Mutマイクロファージライブラリーについて1巡の親和性選択を実施した。親和性選択サイクル後、PCR増幅および制限分析を用いてライブラリークローンの富化をモニターした。508Mut-(Fv)-CBD DNAをPvuIで消化すると、アガロースゲル電気泳動および臭化エチジウム染色により典型的な制限パターンが得られる。低分子側の750および500bp断片は508Mut-(Fv)-CBD DNAを表し、一方未変化の1250bp断片はベクターとして用いたpCC-Gal6(Fv) DNA由来のscFv-CBDを表す。親和性選択を実施する前に、ライブラリーがpCC-Gal6(Fv)ベクターDNAでひどく汚染されていることが判明した。このことは、無作為に拾い上げたライブラリークローンの19個のうち18個のDNAが、508V<sub>L</sub>

の部位96に隣接して組み込んだPvuI部位で切断されなかった事実から明らかである。分析した19個のうちの僅か1個のみが変異に関連して予期された制限パターンを示した(図8a)。しかし親和性選択の後には無作為に選択したクローン11個中5個が予期された制限パターンを示した(図8b)。これは富化係数が約10倍であることを示し、このことは508scFv変異株がAP(1-16)エピトープに結合する能力を有することを実証している。5個の変異株のDNA配列を決定し、それを下の表1に示す。508L<sub>1</sub>のシステイン96コドンの適切な置換はファニルアラニン、セリンもしくはチロシンであることが判明した。

### 【0235】

【表1】

表1

レーン(図8b)	アミノ酸配列	配列番号
4	<sup>89</sup> HQRSSYP-C <sup>96</sup> -T	16
5	<sup>89</sup> HQRSSYP-F <sup>96</sup> -T	17
6	<sup>89</sup> HQRSSYP-Y <sup>96</sup> -T	18
8	<sup>89</sup> HQRSSYP-F <sup>96</sup> -T	19
11	<sup>89</sup> HQRSSYP-S <sup>96</sup> -T	20

### 【0236】

#### 実施例4

scFv508変異株によるAP(1-16)の認識

変異508scFv誘導体を更に検討するために、野生型タンパク質について上述した方法で変異遺伝子を発現ベクターにサブクローンし、そしてE. coliで過剰発現させた。種々の変異508-(Fv)タンパク質(表1)とAP(1-16)の相互作用をELISAアッセイで試験した。図9a~bは、野生型508-(Fv)-CBDは半最大結合(HMB)濃度 $10^{-5}$ Mで結合するが、全ての変異株はAPに対する改善された結合を示すことを示している。すなわちC96



SおよびC96YのHMBは $5 \times 10^{-6}$  M、C96FのHMBは $10^{-7}$  Mである。更に検討するためにC96F変異を保持する508-scFv(508F(Fv))を選んだが、これはより高い親和性と保存安定性を示す(図9a~b)。508F(Fv)によるAP(1-16)結合の特異性を競合的ELISAで試験した。図10に示すように、精製した508F(Fv)-CBDのAPへの結合は液相の競合物質として加えた可溶性AP(1-16)ペプチドで用量依存的に阻害された。約1  $\mu$  Mの競合物質で50%結合阻害が得られた。結合は無関係のペプチド(WVLD、配列番号4)の影響を受けなかった。

### 【0237】

#### 実施例5

##### 508F(Fv)による アミロイドの神経毒作用の阻止

培養細胞に対するA仲介性神経毒の阻止において508F(Fv)が親IgM抗体と類似の保護効果を発揮するか否かを調べるために、ラット褐色細胞腫PC12を用いて上述の方法(Solomon B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 4109-4112, 1997)でインビトロ試験を行った。抗体の存在下および非存在下にAに曝露した細胞の生存率を測定した。図12に示すとおり、508F(Fv)はAP:scFvモル比15:1でAの神経毒性を阻止した(細胞生存率90%)が、無関係のscFvは影響を及ぼさなかった。精製したCBDもしくはscFvのみでは細胞に影響を及ぼさなかった。

### 【0238】

#### 実施例6

##### 508F(Fv)による アミロイド原線維の離解

A原線維(APの毒性型)の破壊に対する508F(Fv)の効果を調べるために、原線維構造に特異的に結合するThT試薬(Levine, H. III, Protein Sci., 2: 404-410, 1993)を使用した。既成のA原線維に対する干渉をAの神経毒性アッセイと同様にAP:scFvet al.,モル比で測定し、ThTの蛍光測定で定量した。図13は、ThTの蛍光の大幅(62%)な減少で実証されるように、既成のA原線維とインキュベートした508F(Fv)は原線維構造を破壊したことを示し、原線維の形態が著しく変質したことを示している。

## 【0239】

## 実施例7

線維状ファージが嗅覚路を介してCNSに入る活性

雌性B a l b / c マウスをファージベクター f 8 8 - E F R H の鼻腔内投与で処理した。この実験の目的は、線維状ファージが嗅覚路を介して海馬領域に到達する活性をチェックすることであった。ファージは神経細胞を標的とする特異的分子を一切保持していないので、投与数日後には何らの害も起こすことなく消失する筈である。嗅球および海馬領域でのファージの出現を調べるために、以下のように抗体による二重標識を使用した。すなわち抗線維状ファージウサギポリクローナル抗体、およびファージ表面の糖タンパク質V I I I に融合したE F R H エピトープに対するマウスモノクローナル抗体である。10<sup>11</sup>個のファージを単回鼻腔内投与して1日後に、動物はそのようなファージを嗅球および海馬に示した(図14a～d)。投与7日後には、ファージは試験した3匹のマウスのうち1匹のみに検出されたが、海馬にはファージは見られなかった。投与28日後には、ファージの証拠は検出されなかった(図15a～d)。図16a～dに示されるように、処置を受けたマウスのニューロン集団に変化の証拠は見られなかった。

## 【0240】

線維状ファージは活性抗体断片をCNSに運搬するための適切な媒体である

線維状ファージが嗅覚路を介して抗体をCNSに運搬し、そこで アミロイドに対する活性を保持しているか否かをチェックするために、抗原抗体免疫複合体を形成させるため508Fを表示している線維状ファージを10<sup>-3</sup>Mのピオチニル化 A P (1 - 16) とインキュベートした。B a l b / c マウスを2群に分け、2種の異なる抗原すなわち508F - A P (1 - 16) 免疫複合体および比較のための A P (1 - 6) のみを鼻腔内に投与した。単回投与後、マウスを屠殺し脳切片を作製し蛍光試薬にカップルしたストレプトアビジンと反応させた。蛍光は508F - A P (1 - 16) を投与したマウスの脳切片でのみ検出され、A P (1 - 6) のみを投与したマウスの脳切片では検出されないかもしくは遥かに少ない程度で検出された(図17a～d)。組織学的所見で処置マウスを特徴付

けるものはなかった(図18a~d)。

#### 【0241】

したがって、ファージは抗体を脳に運搬する不活性媒体として働き、AP(1-16)を脳内に運搬することが推測された。

#### 【0242】

### 実施例9

f3-EFRHファージでマウスを免疫することによる抗凝集性AP抗体の育成

AP中の抗凝集性エピトープ(EFRH, 配列番号1)は、APのアミノ酸配列の3-6番目に位置する。APに対する特異的免疫応答を引き起こすために、マウスをファージのマイナーコートgpIIIに融合させたペプチドYYEFRH(配列番号7)を保持する遺伝子組換えfdファージで図19に示すスケジュールにより免疫した。各投与当たり $10^{10}$ 個のファージを用いて14日間隔で腹腔内注射により免疫した。各注射の7日後にマウスを放血させ、その血清についてELISAで野生型ファージ(その表面にペプチドYYEFRHを保持しない)およびAPに対するIgG抗体の活性を試験した(図20a~b)。この投与経路では3回目の注射の後にAPに対する非常に高い応答が見られた(1:750)。更に、エピトープを保持するファージの注射は長期間持続し(図21)、毒性がなく、またアジュバントなしで投与が可能である。ファージベクターは1回目の注射から14日以内に高親和性の免疫応答を育成する免疫学的用具であることが見出された。ペプチドYYEFRH(配列番号7)に対する免疫応答は丸ごとのファージに対する応答と比較して低く、これはファージの外被上の融合gpIIIの低コピー数で説明できた。したがって、糖タンパク質VIIIIを通してエピトープを表示しているファージの更なる分析を行った。

#### 【0243】

### 実施例10

抗凝集性mAbによるf88-EFRHペプチド表示ファージの単離

離解性EFRHペプチドエピトープを同定するために、ファージエピトープライブラリーをビオチニル化抗体でスクリーニングした。3サイクルのパニング

およびファージ増幅の後、90個の個々に単離した最近コロニーをマイクロタイタープレート中で増殖させ、そのファージの抗体結合能をアッセイした。E L I S A分析により、選択し3回のバイアパンニングサイクルを行ったファージクローンの殆ど(約80%)はそれぞれ特異的に抗凝集性m A bに結合することが明らかになった。6個の陽性クローン由来のD N Aの配列を決定した(表2)。E F R H配列(配列番号1)が4個のクローンで出現し、もう1個のクローンはプロリンからフェニルアラニンへの1置換のみが起こっているE P R H配列(配列番号1)を有していた。も一つのクローンでは挿入ペプチドは3個の残基F R Hの配列(配列番号1の酸2 - 4)を有していて、グルタミン酸残基を欠如していた。

【0244】

【表2】

表2

アミノ酸配列(名称)	配列番号	ファージ数
V H E P H E F R H V A L N P V (C 3 - I I)	8	2
D T E F R H S S N N F S A V R (C 7 - I I)	2 1	1
S T E F R H Q T T P L H P N S (C 1 1 - I)	2 2	1
K E P R H H I Q H H E R V I R (F 8 - I I)	2 3	1
S A A D F R H G S P P I S A F (D 3 - I)	2 4	1

【0245】

E F R H保持ファージへの抗凝集性m A bの結合は濃度依存性である；半最大結合は抗体濃度100 n g / m lで得られたが、これは、これらの抗体が完全なペプチドに結合する場合のレベルと同程度の $10^{-9}$  M (図4)に相当する。1個の特定のf 88 - E F R Hファージ(C - I Iと命名、表2)は、他と比べてより高レベルの結合を示した(図22)。これはE F R Hエピトープがファージの表面により高レベルで露出していることによるのであろう。f 88 - E F R Hもしくはf 3 - E F R Hおよび同一濃度の抗凝集性抗体(1  $\mu$  g / m l)との結合試験は、ファージ当たりのE F R Hエピトープ数が多いほどファージの免疫応答によ

るより高い血清力価をもたらすことを示した(図23)。

#### 【0246】

##### 実施例11

マウスをf88ファージで免疫することによる抗凝集性 AP抗体の作成

APに対して同様の特異的免疫応答を起こすために、メジャーコートgpV  
IIIに融合させたペプチドVHEPHEFRHV ALNPY(配列番号8)を保持する遺伝子組換えfdファージでマウスを免疫した。このファージは15量体  
ファージペプチドライブラリーから抗凝集性 AP抗体で選択したもので、AP  
中のmA bエピトープ(下線部分)を提示している。このファージを用いて上述  
の方法でマウスを免疫した。10<sup>10</sup>個のファージ粒子(アジュバントなし)の各  
投与7日後にマウスを放血し、その血清について野生型ファージおよび APに  
対するIgG抗体の反応性をELISAで試験した。結果を図24a~bに要約  
する。いずれの動物も野生型ファージに対して測定可能なIgG抗体応答を示し  
、力価は2回目および3回目の注射で増加した。この投与経路はまた、3回目の  
注射後 APに対してより高い測定可能な力価の応答(1:50,000)を与え  
た(図24b)。

#### 【0247】

##### 実施例12

アミロイドペプチドへの抗体血清の結合に対する阻害

ファージf88-EFRHで免疫したマウスの血清と APとの相互作用を競  
合阻害実験で更にアッセイした。図25は AP由来の合成ペプチドによるマウ  
ス抗体の阻害を示したもので、各ペプチドは、DAEFRH(配列番号3の1-  
6番目)、DAEFRHD(配列番号3の1-7番目)、DAEFRHDSG(配列  
番号3の1-9番目)、および AP自身であるDAEFRHDSGYEVHH  
QKL VFFAEDVGSNKGAIIGLMVG GVV(配列番号3の1-  
40番目)のようなEFRH配列を含む。

#### 【0248】

図25は、EFRHモチーフ(配列番号1)を保持する合成ペプチドは全て、  
APへのマウス血清抗体の結合をIC<sub>50</sub>値約5×10<sup>-6</sup>Mで同程度に阻害し

たことを示している。これらのデータは、A P分子中のマウス血清抗体エピートープが、A分子の可溶化および離解過程の両方を調節する制御部位として作用することが見出されている、A P中の3 - 6番目の部位に相当する4個のアミノ酸残基よりなることを示している。

#### 【0249】

E F R Hファージに対して作成した血清抗体による アミロイドの神経毒性作用の阻止

f 8 8 - E F R Hで免疫したマウスの血清が、培養細胞に対する A 仲介性神経毒性阻止において親 I g G抗体同様に保護効果を示すか否かを調べるために、ラット褐色細胞腫 P C 1 2 を用いたインビトロ試験を上述の方法で行った(Solomon B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 4109-4112, 1997)。抗体存在下もしくは非存在下で A に曝露された細胞の生存率を測定した。図 2 6 に示すように、1 : 5 希釈した血清は A の神経毒性を阻止した(細胞生存率 8 0 %)が、無関係な血清は効果を示さなかった。

#### 【0250】

##### 実施例 1 4

E F R Hで免疫したマウスの血清による アミロイド原線維の離解

A原線維( A Pの毒性型)の破壊に対する f 8 8 - E F R H免疫マウスの抗体の効果を調べるために、原線維構造に特異的に結合する T h T 試薬 (Levine, H. III, Protein Sci., 2: 404-410, 1993)を使用した。 A Pサンプルを 3 7

で 1 週間インキュベートし、次いで種々の希釈度のマウス血清抗体に曝露した。原線維形成は T h T の蛍光結合アッセイで定量した。図 2 7 は、マウス血清が 1 : 5 および 1 : 2 0 希釈で、T h T の蛍光の 7 5 % ( 1 : 5 希釈) および 5 0 % ( 1 : 2 0 希釈) という大幅な減少に示されるように、原線維の形態の著しい変質を起こして A の構造を破壊したことを示している。コントロールとして使用した無関係な血清(非免疫マウスの血清)は免疫血清と比べて原線維形成を有意に阻害しなかった。この結果は、線維状ファージベクターによって表示される E F R Hエピートープが、免疫応答を誘起して抗凝固性抗体を生じる活性を強力に実証するものである。

## 【0251】

## 実施例15

本発明の教示はまたプラーク形成によっても特徴づけられるプリオン関連疾患にも応用することができる。

## 【0252】

PrPタンパク質が神経細胞変性およびグリア細胞反応に関与する可能性は、アミロイド形成に役割を果たすPrP配列の同定を導いた。アミノ酸106-126よりなるPrP断片はラット海馬神経(Forloni et al., 1993)ならびにマウス大脳皮質細胞および小脳細胞(Brownら、1994; 1997)に対して毒性を有し、そして特に高度に原線維形成誘発性である(Selvaggini et al., 1993)であることが示された。形成されたフィブリンはプロテアーゼ消化に対して部分的に抵抗性であり、またインシトゥのアミロイドの諸性質を示した(Selvaggini et al., 1993、Tagliavini et al., 1993)。PrPのこの領域に相当する合成ペプチドは、PrP<sup>C</sup>からPrP<sup>Sc</sup>へのコンホメーション変化に似た $\alpha$ -ヘリックスからベータ-シートコンホメーションへの変化を起こす柔軟性を示す。この領域のコンホメーション可塑性は、この領域内にタンパク質分解酵素による異なる切断部位を示す2種の異なるプリオン株の発見により更に強固に実証された(Bessen and Marsh, 1994; Telling et al., 1996)。

## 【0253】

以下に更に述べるように、本発明の発明者は、PrPタンパク質のアミノ酸106-126で形成されるエピトープに特異的なmAb類を作成した。このような抗体はプラーク形成およびその形態を研究において、ならびにプリオン誘発性プラーク疾患の治療もしくは予防のために有用である。

## 【0254】

ヒトPrp106-126のアミノ酸配列に相当する合成ペプチドで免疫したマウスを、より大きな担体であるKLHにカップルしたものをを用いて免疫したマウスを用いて、このペプチド上のエピトープに対して反応性を有するモノクローナル抗体を生成した。免疫マウスから得られた血清をELISAに供して、主として免疫グロブリンM(IgM)、およびより少数のIgG分子よりなるいくつか

の陽性クローンを検出して単離した。

【0255】

上述の方法で単離し、mAb3-11(IgM)およびmAb2-40(IgG1)と命名した2個の免疫グロブリンクローンを更なる研究に利用した。

【0256】

実施例16

ファージ表示ライブラリーによるエピトープ部位の探索

ヒトPrp106-126ポリペプチドの種々のペプチド断片を表示するファージ表示ライブラリーを、上の実験方法の項に記載した方法で生成した。mAb3-11もしくはmAb2-40と反応性のクローンはライブラリーの6サイクルのバイオパンニング(368個のクローンをスクリーニングした)で検出されず、このことはこれらの抗体で認識されるエピトープがコンホーメーション性のものである可能性を示している。

【0257】

実施例17

抗体のPrPへの結合に対するペプチドNMKHによる競合阻害

上述の抗PrP106-126抗体をアミノ酸配列NMKH(配列番号26)であるペプチドと等モル比でブレインキュベートした後、Prp106-126と反応させて、NMKHがヒトPrp106-126の抗体結合と競合する活性を測定した。図28に示すように、この配列は、M109がLの代わりにそしてM112がVの代わりに入っている2個のアミノ酸を除いてマウスおよびヒト(および他の動物)の配列の間で高度に保存されている。Prp106-126に相当するヒトの配列で免疫したマウス由来の抗体が、ペプチドPrp106-126に相当するマウスの配列と交差反応を示さなかったことから、これら2つの差が多分マウスおよびヒトの配列の間の抗原性の差に寄与していると思われる。

【0258】

NMKHおよび完全なペプチドとの間の競合(ELISAによる分析)は検出されなかったが、このことはこのエピトープが3次元コンホーメーションに依存し一次構造には依存しないという提案を支持している。加えて、mAb3F4(配



列MKHMを認識する)とmAb3-11と一緒にヒトPrp106-126と反応させても相加的な応答を生じなかったが、このことはこれらのエピトープが隣接もしくは一部重なり合っている可能性を示唆している(Solomon and Balas, 1991)。

#### 【0259】

##### 実施例18

###### PrPの凝集および免疫複合体形成

Prp106-126を種々の濃度で37℃でインキュベートすることにより、用量依存的に原線維の凝集を生じることがチオフラビンT結合蛍光アッセイで測定された(図30)。0.3mg/mlのPrp106-126濃度を更なる研究に選択した。

#### 【0260】

##### 実施例19

###### PC12細胞を用いたPrp106-126の毒性アッセイ

PrP<sup>Sc</sup>の主たる標的器官は神経組織であるので、インビトロのニューロンモデルシステムを用いてPrPの毒性を分析した。ニューロンの性質を示すクローン化細胞株がラット中枢神経の腫瘍から確立されている(Schubert et al., 1974)。ラット褐色細胞腫PC12細胞 - ニューロン様クローン化腫瘍細胞株(Green and Tischer, 1976) - インビトロでPrP<sup>Sc</sup>の複製を起こすことができることが示されている(Rubenstein et al., 1984)。そこで、PrP原線維誘導性の毒性を阻止する活性を有する分子の検出にこの細胞株を使用した。

#### 【0261】

このモデルシステムの使用によって、Prp106-126がPC12細胞に対し用量依存性の毒性を有し、その毒性がペプチドのコンホメーション状態および細胞の凝集ペプチドへの曝露時間に関連していることが見出された。細胞をPrp106-126と共に5日間インキュベートすると、3日間の曝露に比べて細胞の生存率がかなり減少した(MTTアッセイによる検出)。更に、細胞に添加する前にPrP106-126を37℃でプレインキュベートすると、多分アミロイド原線維を増加させることにより、その毒性が増加した。ペプチドを7日

間ブレインキュベートすると、濃度依存性の、有意に高い毒性をもたらした(図29)。MTTアッセイで測定によれば、記述した条件下で100  $\mu$ Mの濃度のPrp106-126で細胞生存率が10%に減少した。

#### 【0262】

##### 実施例20

##### Prp106-126の神経毒性の阻止

mAb3-11および2-40の細胞保護効果を図31に示す。mAb3-11および2-40は100  $\mu$ MのPrP106-126で誘起される細胞死を阻害した。いずれの抗体とペプチドとの混合物で処理した細胞の生存率は85-90%であり、これに対してペプチドのみで処理した細胞では40%の生存率であった(ペプチドなしの抗体のみでは細胞生存率に影響を及ぼさなかった)。このような保護はmAb3F4では示されなかった(生存率44%)ことから、抗体の保護効果はPrP分子上の特異的なエピトープと明らかに関連していた。

##### 実施例21

#### 【0263】

##### ThTアッセイで測定したモノクローナル抗体の抗凝集性

PrP106-126のアミロイド原線維形成をチオフラビン-T結合アッセイによって検出した。mAb3-11および2-40ともPrp106-126の原線維凝集を阻止し、そしてこのペプチドの凝集型を離解した。Prp106-126をmAb3-11および2-40存在下に37℃でインキュベートすると、アミロイド原線維形成の有意な減少(約80%阻止)が観察された。これらの抗体を既に形成されているPrp106-126凝集物に添加したところ、原線維の50%超が離解した。これとコントロール的に、mAb3F4はアミロイド原線維形成阻害においても、そしてそれらの離解の誘導においても低い効率を示した(図32)。アミロイド原線維形成阻害および離解の誘導共に、抗体の濃度とエピトープの部位に依存していた(図32~33)。

#### 【0264】

本発明のmAb3-11および2-40およびmAb3F4の保護効果は下の式1に示す方法で計算した。

## 【数1】

$$\text{保護効果(\%)} = 100 - \frac{482\text{nmの発光 (A bとインキュベートしたPrp106-126)}}{482\text{nmの発光 (Prp106-126のみをインキュベート)}} \times 100 \quad (\text{式1})$$

## 【0265】

本発明はその具体的な実施態様との関連において記載したが、多数の代替法、修飾および変更ができることは当業者には明らかである。したがって本発明は、添付した請求範囲の精神および幅広い範囲に含まれるそのような全ての代替法、修飾および変更を包含することを意図している。本明細書で引用した公表論文は、全体として出典明示により本明細書の一部とする。

## 【0266】

## (参考文献)

- Bessen, R.A. and Marsh, R.F. (1994)、 “ 独特なPrPの性質は伝染性ミンク脳症における緊張変化の分子的基礎を示唆する ”、J. Virol.68, 7859-7868.
- Blaney, J.M., Jorgensen, E.C., Connolly, M.L., Ferrin, T.E., Langridge, R., Oatley, S.J., Burrige, J.M. and Blake, C.C.F. (1982)、 “ 薬剤設計におけるコンピューターグラフィックス：甲状腺ホルモン - プレアルブミン相互作用の分子モデル作製 ”、J. Med. Chem.25, 785-790
- Blond, S. and Goldberg, M (1987)、 “ 在来型エピトープはトリプトファン合成酵素の折りたたみにおける早期中間体上にすでに部分的に存在する ”、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1147-1151
- Brown, D.R, Hernis, J.and Kretzschmar, H.A. (1994)、 “ 細胞性PrPを持たないマウス皮質細胞は神経無毒性PrP断片を有する培養液中で生存する ”、Neuroreport 5, 2057-2060
- Brown, D R., Herms, J.W., Schmidt, B. and Kretzschmar, H.A (1997)、 “ PrPおよび - アミロイド断片の神経毒性に関する様々な要件 ”、Neurosci. 9, 1162-1169
- Carlson, J.D and Yarmush, M.L. (1992)、 “ 抗体はタンパク質の再折りたたみを補助した ”、Biotechnology 10, 86-89
- Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Emst, D, Hayes, S.F., Caughey, W.S.

- (1991) “赤外線スペクトルによる水中にあるスクレーピー関連タンパク質 Pr P 27 ~ 30 の二次構造分析”、*Biochemistry*.30, 7672-7680
- De Gioia, L., Selvaggini, C., Ghibaudi, E., Diomede, L., Bugiani, O. Porloni, G., Tagliavini, F. and Salmona, M. (1994)、 “プリオンタンパク質の残基 106 ~ 126 に相動的なアミロイド原性および神経毒性ペプチドのコンフォメーション多型”、*J Biol Chem*. 269, 7859-7862
- Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohen, F. E., Prusiner, S.B., Wright, P.E. and Dyson, H. (1997) ) “組換え全長ハムスター・プリオンタンパク質 Pr P ( 29 ~ 231 ) の構造：N末端は高度に可撓性である”、*Proc Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13452-13457
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., and Tagliavini, F. (1993) “プリオンタンパク質断片の神経毒性”、*Nature*362, 543-546
- Frauenfelder, H., Petsko, G.A. and Tsernoglou, D. (1979)、 “プロートのプローブとしての温度依存性X線回折”、*Nature* 280, 558-563
- Frenkel, D., Ballas, M. and Solomon, B. (1998) “アルツハイマー病 - アミロイドペプチドのN末端 E F R H 配列は抗凝集抗体のエピトープを表す”、*J. Neuroimmunology* 88, 85-90
- Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976)、 “神経成長因子に応答するラット副腎クロム親和性細胞腫細胞のノルアドレナリン作動性クローナル系統の樹立”、*Proc Natl Acad Sci USA* 73, 2424-2428
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. (1989)、 “細胞増殖 / 細胞死滅を測定するための精密で迅速な色素法の再検討およびさらなる発展”、*Immunol Methods* 119,203-210
- Harlow, E. and Lane, D. (1988)、 “抗体、実験室便覧 (Cold Spring Harbor Laboratory)”、Chapter 8
- Horiuchi, M. and Caughey B. (1999)、 “正常プリオンタンパク質が局所的ドメインを介してスクレーピー型に特異的に結合するとプロテアーゼ抵抗性状態への変換が開始される”、*EMBO J.* 18, 3193-3203

- Kanyo, Z.F., Pan, K.M., Williamson, R.A., Burton, D.R., Prusiner, S.B., Fletterick, R.J. and Cohen, F.E. (1999)、 “ 抗体のは結合はPrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup>へのコンフォメーション変化に関与するエピトープの構造を決定する ”、J Mol Biol. 293, 855-863
- Karplus, M. and Petsko, G.A. (1990)、 “ 生物学における分子動力学のシミュレーション ”、Nature 347, 631-639
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975)、 “ 予め決定した特異性を持つ抗体を分泌する融合細胞の連続培養 ”、Nature 256, 495-497
- LeVine, H. III (1993)、 “ チオフラビンTと合成アルツハイマー病 - アミロイドペプチドとの間の相互作用：溶液中におけるアミロイド凝集の検出 ”、Protein Sci. 2, 404-410
- Miroy, G.J., Lai, Z., Lashuel, H.A., Peterson, S.A., Strang, C. and Kelly, J.W. (1996)、 “ タンパク質安定化を介するトランスチレチンアミロイド原線維形成の阻害 ”、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 15051-15056
- Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1996)、 “ 106 アミノ酸を持つ組換えスクレーピー様プリオンタンパク質は可溶性である ”、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 15457-15462.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosakawa, M. and Takeda, T. (1989)、 “ 螢光色素を用いる試験管内アミロイド原線維の螢光定量分析 ”、Anal. Biochem., 177, 244-249
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1993)、 “  $\alpha$ -ラセン構造から  $\beta$ -シートへの変換はスクレーピープリオンタンパク質の形成に特徴的である ”、Proc Natl Acad Sci USA. 90, 10962-10966
- Peretz D., Williamson, R.A., Matsunaga, Y., Serban, H., Pinilla, C., Bastidas, R. B., Rozenshteyn, R., James, T.L., Houghten, R.A, Cohen, F.E., Prusiner, S.B. and Burton, D.R. (1997)、 “ プリオンタンパク質のN末端におけるコンフォメーション遷移状態はスクレーピーアイソフォームの形成に特徴的である ”、J. Mol. Biol. 273, 614-622

- Riek, R., Hornemarm, S., Wider, G., Glockshuber, R., Wuethrich, K (1997)、 “ 全長組換えマウスプリオンタンパク質mPrP ( 23 ~ 31 ) のNMR的特性 ”、FEBS Lett. 413, 282-288
- Rubenstein, R., Carp, R.I. and Callahan, S.M. (1984)、 “ ニューロンモデルにおけるスクレーパー剤の試験管内複製：PC12細胞の感染 ”、Gen Virol, 65, 2191-2198
- Schubert, D., Heinem~, S. Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick J. Steinbach, Jilt., Culp, W. and Brandt, BL (1974)、 “ ラット中枢神経系から得たクローナル細胞系統 ”、Nature 249, 224-227
- Selvaggini, C., De Gioia, L, Cantu, L., Ghibaudi, E., Diomede, L., Passerini, F., Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F. and Salmona, M. (1993)、 “ プリオンタンパク質の残基106 ~ 126と相同的であって、プロテアーゼ抵抗性を持ち、アミロイド原性であり、かつ神経毒性のあるペプチドの分子特性 ”、Biochem. Biophys. Res. Commun 194, 1380-1386
- Silen, J.L. and Agard, D.A. (1989)、 “ アルファ分解性プロテアーゼのプロ領域はインビボでプロテアーゼドメインを活性化するためには物理的結合を必要としない ”、Nature 341, 462-464
- Solomon, B. and Balas N. (1991)、 “ カルボキシペプチダーゼAとそのモノクローナル抗体との相互作用によるカルボキシペプチダーゼAの熱安定性 ”、Biotechnol Appl Biochem. 14, 202-211
- Solomon, B., Fleminger, G., Schwartz, F., Doolman, R. and Sela, B.A.(1992)、 “ ユーペルジット (Eupergit) Cを被覆したビーズに共有結合によって結合する抗体に基づくミクロアルブミン尿症の免疫検定 ”、Diabetes Care 15, 1451-1454
- Solomon, B., Schmitt S., Schwaltz, F., Levi, A and Flemminger, G.(1993)、 “ ヒトアルブミンの感受性免疫検定用固体支持体としてのユーペルジット (Eupergit) Cを被覆した膜 ”、J. Immunol. Methods 157, 209-215
- Solomon, B., and Schwartz, F.(1995)、 “ 熱変性カルボキシペプチダーゼAの再折りたたみみに及ぼすモノクローナル抗体のシャペロン様効果 ”、J. Mol. Re

cognit. 8, 72-76

Solomon, B., Koppel, R. Hanan, E. and Katzav, T. (1996)、 “モノクローナル抗体は試験管内でアルツハイマー・ - アミロイドペプチドの原線維凝集を阻害する”、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 452-455

Solomon, B., Koppel, R, Frankel, D., Ilanan-Aharon, E. (1997)、 “部位指向性mAbによるアルツハイマー - アミロイドの溶解”、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4109-4112.

Taglisvini, F., Prelli, F., Verge, L., Giaccone, G., Sarma, R., Gorevic, P., Ghetti, B., Passerini F., Ghibaudi, E, Forloni, G., Salmona, M., Bugiani, O. and Frangione, B. (1993) 、 “プリオンプロテイン残基106～147に相同性を持つ合成ペプチドは試験管内でアミロイド様原線維を形成する”、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9678-9682

Telling, G.C., Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortelli, P., Montagna, P., i Gabizon, R. Mastrianni, J, Lugaresi, E, Gambetti, P. and Prusiner, S.B. (1996)、 “プリオンの多様性を暗号化し、拡大するプリオンタンパク質の異常アイソフォームのコンフォメーションに関する証拠”、Science, 274, 2079-2082

Zahn, R. Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. and Wuthrich, K. (2000)、 “ヒトプリオンタンパク質のNMR溶液構造”、Proc Natl Acad Sci USA. 97, 145 - 150

#### 【配列表】

```

<110> Beka Solomon et al.
<120> Agents and compositions and methods utilizing same useful in treating or
preventing plaque forming diseases.
<130> 20100
<150> 60/152,417
<151> September 3, 1999
<160> 26
<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400>1
Glu Phe Arg His

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400>2
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
          5              10              15

<210> 3
<211> 43
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 3
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln lys
          5              10              15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
          20              25              30
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
          35              40

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 4
Trp Val Leu Asp

<210> 5
<211> 717
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 5
CAGGTCAAAC TGCAGGAGTC AGGGGCTGAG CTGGTGAGGC CTGGGGTCTC AGTGAAGATT 60
TCCTGCAAGG GTTCTGGGCTA CACATTCACT GATTATGCTA TGCACATGGGT GAAGCAGAGT 120
CATGCAAAAG GTCTAGAGTG GATTGGAGTT ATTAGTACTT ACTATGGTGA TGCTAGCTAC 180
AATCCAAAGT TCAAGGGCAA GGCCACAATG ACTGTAGACA AATCCTCCAG CACAGCCTAT 240
ATGGAACTTG CCAGACTGAC ATCTGAGGAT TCTGCCATCT ATTACTGTGC AAGAGGGGCT 300
ACTATGTCCT ACTTTGACTA CTGGGGCCAA GTGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGGA 360
GGCGGTTTCA GCGGAGTTGG CTCTGGCGGT GCGGGATCGG ACATCGAGCT CACTCAGTCT 420
CCAGCAATCA TGCTGTCATC TCCAGGGGAG AAGGTCACCA TGACCTGCGAG TGCCAGCTCA 480
AGTATAAGTT ACATGCACTG GTATCAGCAG AAGCCAGGCA CCTCCCCCAA AAGATGGATT 540
TATGACACAT CCAAACTGGC TTCTGGAGTC CCTGCTCGCT TCAGTGGCAG TGGGTCTGGG 600

```



ACCTCTTATT CTCTCACAAT CAGCAGCATG GAGGCTGAAG ATGCTGCCAC TTATTACTGC 660  
 CATCAGCGGA GTAGTTACCC ATTCACGTTT GGAGGGGGGG CCAAGCTGGA AATAAAA 717

<210> 6  
 <211> 244  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 6  
 Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
                   5                  10  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
                   20                  25                  30  
 Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
                   35                  40                  45  
 Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
                   50                  55                  60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
                   65                  70                  75                  80  
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95  
 Ala Arg Gly Ala Thr Met Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Val Thr  
                   100                 105                 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Val Gly Ser  
                   115                 120                 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met  
                   130                 135                 140  
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser  
                   145                 150                 155                 160  
 Ser Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro  
                   165                 170                 175  
 Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala  
                   180                 185                 190  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
                   195                 200                 205  
 Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser  
                   210                 215                 220  
 Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys  
                   225                 230                 235

<210> 7  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 7  
 Tyr Tyr Glu Phe Arg His  
                   5

<210> 8  
 <211> 15  
 <212> amino acid  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223>  
 <400> 8  
 Val His Glu Pro His Glu Phe Arg His Val Ala Leu Asn Pro Val  
                   5                  10                  15

<210> 9  
 <211> 3  
 <212> amino acid  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 9  
 Lys Leu His

<210> 10  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

```

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: primer

<400>10
CCCCCTCCG AACGTSNATG GGTAACTCGA TCGCTGATGG CAGTA 45

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: primer

<400> 11
ATCTATGCCG CCCAGCCGGC CATG 24

<210> 12
<211> DNA
<212> 38
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: primer

<400> 12
GTGGTGCTGA GTGGATCCTA TACTACACTG CCACCGGG 38

<210> 13
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: primer

<400>13
AGCTCCGATG CTGAATTCGG TGATAGCGGC TACGAAGTGC ATCATCAGAA ACCTGCAG 58

<210> 14
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: primer

<400> 14
GGTTCTGAT GATGCACTTC GTAGCCGCTA TCATGACGAA ATTGAGCATC GG 52

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 15
His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Cys Thr
5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 16
His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Cys Thr
5

<210> 17
<211> 9

```

```

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 17
His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
      5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 18
His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
      5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide
<223>

<400> 19
His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
      5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213>

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 20
His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Ser Thr
      5

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 21
Asp Thr Glu Phe Arg His Ser Ser Asn Asn Phe Ser Ala Val Arg
      5              10              15

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 22
Ser Thr Glu Phe Arg His Gln Thr Thr Pro Leu His Pro Asn Ser
      5              10              15

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

```

```

<400> 23
Lys Glu Pro Arg His His Ile Gln His His Glu Arg Val Ile Arg
          5              10              15

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 24
Ser Ala Ala Asp Phe Arg His Gly Ser Pro Pro Ile Ser Ala Phe
          5              10              15

<210> 25
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 25
Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val
          5              10              15
Gly Gly Leu Gly
          20

<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the Artificial sequence: synthetic peptide

<400> 26
Asp Met Lys His

```

### 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1 aはIgM抗体の図式描写である。図1 bは臭化エチジウムで染色した1.5%アガロース・ゲルの写真であり、IgM 508の軽鎖および重鎖のcDNA断片を示す。レーン1：Kb（ラダー）；レーン2および3：V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>断片であり、それぞれ矢印で示す。図1 cは臭化エチジウムで染色した1.5%アガロース・ゲルの写真であり、抗体IgM 508由来のscFv DNA断片を示す。レーン1：Kb（ラダー）；レーン2：scFv 508 DNA（750bp）。図1 dはscFvを表示する繊維状ファージの図式描写である。図1 eは可溶性scFvの図式描写である。

【図2】 図2はlacプロモーターの制御下にscFv-508-CBD融合タンパク質（本明細書では508（Fv）-CBDともいう）の産生に使用するプラスミドpCC-508Fの物理的地図である。Amp<sup>r</sup> res： -ラクタマーゼをコードする遺伝子；V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>：それぞれscFv-508の重鎖および軽鎖の可変ドメインをコードする配列；Lin：可変ドメインV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>間に存在する（Gly<sub>4</sub>Ser）<sub>3</sub>（配列番号2）リンカーをコードする遺伝子。

制限部位およびその位置も示す。

【図3】 図3はT<sub>7</sub>-プロモーターの制御下にs c F v - 5 0 8 - C B D融合タンパク質の細胞質発現のために本発明により使用されるプラスミドp f F E K C A - 5 0 8の物理的地図である。Amp<sup>r</sup> res: - ラクタマーゼをコードする遺伝子; V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>:それぞれs c F v - 5 0 8の重鎖および軽鎖の可変ドメインをコードする配列; Lin:可変ドメインV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>間に存在する(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>(配列番号2)リンカーをコードする遺伝子。T<sub>7</sub>-プロモーターおよびT<sub>7</sub>末端:それぞれT<sub>7</sub>プロモーターとT<sub>7</sub>ターミネーター。制限部位およびその位置も示す。

【図4】 図4はE L I S Aアッセイにおいて抗体5 0 8 ( F v ) - C B DによるA P結合の分析を示す。分析した抗体をA P被覆ウエルに加えた。結合した抗体はH R P接合第二抗体により検出した。親5 0 8 I g M抗体を陽性コントロールとして使用した。陰性コントロールとしては無関係の抗 - - ガラクトシダーゼ抗体Gal 6 ( F v ) - C B Dを使用した。

【図5】 図5はファージDNA挿入片のP C R分析を示す。p C C - 5 0 8 ( F v ) から単離したDNA ( レーン2 ) およびp C C - Gal 6 ( F v ) から単離したDNAをP C R増幅し、1.5%アガロース・ゲル上で分離した。臭化エチジウム染色およびU V照射によりバンドを可視化した。レーン1はDNAのサイズ・マーカーを含む。矢印は約750bpに移動した未処理s c F vの位置を示す。

【図6】 図6は5 0 8 ( F v ) - C B Dの発現と精製を示している。14%SDSポリアクリルアミド・ゲルの各レーンに5~10μgのタンパク質を負荷した。タンパク質はクマシー・ブリリアント・ブルー染色により可視化した。矢印はs c F v - C B D融合タンパク質の位置を示す。レーン1:5 0 8 ( F v ) - C B D発現ベクターを担持する非誘発B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞からの全細胞抽出物。レーン2:I P T Gにより3時間誘発した5 0 8 ( F v ) - C B D発現ベクター担持非誘発B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞からの全細胞抽出物。レーン3:洗浄し、可溶化し、還元した、再生に用いた封入体。レーン4:セルロース補助再生に際してセルロースに結合しなかったタンパク質。レーン5:T B Sによりセ

ルコースから洗い出されたタンパク質。レーン6：蒸留水により結晶性セルロースから洗い出されたタンパク質。レーン7：高pH溶出および中和によりセルロースから回収した可溶性508(Fv)-CBD。

【図7】 図7は508(Fv)-CBDの安定性を示す。精製した508(Fv)-CBDタンパク質を1日(黒四角)または1週間(黒丸)4℃で保存し、次いで、図4の説明文に記載したとおりにELISAアッセイによりAP結合について分析した。無関係の抗体Gal6(Fv)-CBDを陰性コントロール(白四角)とした。

【図8】 図8はPCRによりアフィニティ濃厚化した508(Fv)変異体の定量とDNA制限分析を示す。アフィニティ選択1サイクル前の19種の508(Fv)変異体マイクロライブラリー・クローンのDNA(図8a)と選択1サイクル後に拾い上げた11種のクローンのDNA(図8b)を分析した。DNAをPvuIにより消化し、1.5%アガロース・ゲル上で分離した。非変異scFv-CBDは未変化1250bp断片(上方矢印)として現われた。変異したクローンは700bp(中央矢印)および550bp(下方矢印)両方の出現により示される。レーン1はDNAサイズ・マーカーを示す。

【図9】 図9はELISAアッセイにおける変異した508(Fv)誘導体のAP結合(図9a)および安定性(図9b)の分析を示す。分析した抗体をAP被覆ウエルに添加した。1日または1週間4℃で保存した結合抗体を図7の説明文に記載のとおりを検出した。508(Fv)野生型(白四角)、C96(黒四角)、C96Y(黒丸)、C96S(黒三角)。無関係の抗-βガラクトシダーゼ抗体Gal6(Fv)-CBDを陰性コントロールとして用いた(白四角)。

【図10】 図10は競合ELISAアッセイにおける抗体508(Fv)によりAP結合の特異的阻害の分析を示す。該抗体を競合するペプチドの様々な濃度で前温置した：AP被覆ウエルに添加する前のAP(配列番号3の酸1~16)(黒四角)または無関係ペプチドWVLD(配列番号4)(白四角)。結合した抗体は図7の説明文に記載のとおりを検出した。

【図11】 図11aおよび11bはscFv508F重鎖のヌクレオチド

(配列番号5)および推定アミノ酸(配列番号6)配列(図11a)、および該軽鎖のリンカーと可変領域(図11b)を示す。アミノ酸配列は3文字コードで表す; CDRおよびリンカーには下線を付す。

【図12】 図12はPC12細胞に対するAP介在毒性作用の508(Fv)による防御作用を示す。細胞は繊維性Aのみにより、または指示された抗体/APの異なるモル比で抗体とインキュベートした繊維性Aによりインキュベートした。臭化3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム(MTT)アッセイ法を細胞生存の評価に使用した。

【図13】 図13は508(Fv)による繊維性Aの離解を示す。前形成原繊維の線維状態は指示された抗体/APの異なるモル比の抗体とインキュベートした後またはインキュベートせずに測定した。原繊維Aに比例するチオフラビン-T(ThT)アッセイにおけるThT試薬の蛍光を用い、原繊維の形態学を評価した。

【図14】 図14a~dは鼻腔内単回投与1日後の免疫蛍光による脳切片の繊維状ファージ(f88-EFRH)の検出を示す。蛍光ウサギ抗ファージ抗体を用いてのマウス嗅球と海馬切片における繊維状ファージの出現(それぞれ図14aおよび14c)は未処理マウス脳(それぞれ図14bおよび14d)に比較した通りである。切片は蛍光顕微鏡により10倍の最終倍率で観察した。

【図15】 図15a~dは単回鼻腔内投与28日後のマウス脳から繊維状ファージ(f88-EFRH)の消失したことを示す。マウス嗅球と海馬からの繊維状ファージの消失は、未処理マウス脳(それぞれ図15bおよび15d)に比較するように、蛍光ウサギ抗ファージ抗体を用いて、これらの臓器の切片に証明される(それぞれ図14aおよび14c)。切片は蛍光顕微鏡により10倍の最終倍率で観察した。

【図16】 図16a~dはファージf88-EFRHクリアランス後のマウス脳切片の組織所見を示す。ファージf88-EFRH投与28日後の嗅球臓器(図16a)と海馬(図16c)の脳切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、未処理マウス脳切片(それぞれ図16bおよび16d)に比較した。染

色した切片を試験し、最終倍率40倍で写真撮影した。

【図17】 図17a～dは単回鼻腔内投与後のマウス脳切片におけるビオチニル化 AP（配列番号3の酸1～16）に結合したファージpCC-508Fのビオチンの蛍光検出を示す。マウス嗅球と海馬切片にscFv508Fを示す繊維状ファージに結合した AP（配列番号3の酸1～16）の出現（それぞれ図17aおよび17c）は、PEに結合したストレプトアビジンを用い、未処理マウス脳（それぞれ図17bおよび17d）に比較した通りである。切片は蛍光顕微鏡により20倍の最終倍率で観察した。

【図18】 図18a～dはビオチニル化 AP（配列番号3の酸1～16）に結合したファージpCC-508F投与後のマウス脳の組織所見を示す。ファージ投与1日後に嗅球臓器（図18a）と海馬（図18b）の切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、未処理マウス脳切片（それぞれ図18cおよび18d）に比較した。染色した切片を試験し、最終倍率40倍で写真撮影した。

【図19】 図19は - アミロイド・ペプチドのEFRH（配列番号1）エピトープを表す繊維状ファージによる免疫化スケジュールの図式である。

【図20】 図20aおよび20bはファージ糖タンパク質III（gpIII）の融合物として - アミロイド・ペプチドのEFRH（配列番号1）エピトープを表すf3繊維状ファージによる免疫化を示す。野生型繊維状ファージ・コートタンパク質（図20a）および - アミロイドのN末端エピトープ（配列番号3の酸1～16）に対し、図19のスケジュールに従ってEFRHファージにより免疫したマウスからの異なる出血の血清IgG力価。

【図21】 図21はf3繊維状ファージによる長期持続免疫を示す。野生型繊維状ファージ・コートタンパク質および - アミロイドのN末端（配列番号3の酸1～16）に対し、EFRHファージにより免疫したマウスからの異なる出血の血清IgG力価。

【図22】 図22はf88ファージ・ライブラリーから選択されたペプチド提示ファージに、抗凝集 APモノクローナル抗体（mAb 10D5）が結合するのを示す。アセチルコリン・レセプターに対し作製した無関係mAb 5.5を陰性コントロールとして使用した。抗体をファージ被覆ウエルに添加し、結



合の検出にE L I S Aを用いた。

【図23】 図23はY Y E F R H (配列番号7) ファージおよびV H E P H E F R H V A L N P V (配列番号8) ファージに抗凝集 A P m A b (10 D 5) が結合するのを示す。1  $\mu$  g / m l 濃度の抗体をファージ被覆ウエルに添加し、結合をE L I S A Sにより分析した。挿入片のない繊維状ファージをコントロールとして用いた。

【図24】 図24 a ~ bはファージ糖タンパク質VIII ( g p V I I I ) の融合体としての - アミロイド・ペプチドE F R H (配列番号1) エピトープを表すf 8 8 繊維状ファージによる免疫を示す。野生型繊維状ファージ・コートタンパク質 (図24 a) および - アミロイド・ペプチドのN末端エピトープ (配列番号3の酸1 ~ 16) (図24 b) に対し、E F R Hファージにより免疫したマウスからの異なる出血の血清I g G力価。

【図25】 図25は - アミロイド・ペプチドのN末端から誘導される合成ペプチドによる、A Pへの結合における免疫マウスの血清阻害を示す。指示どおりに、ウエル当たり種々濃度の種々ペプチドと反応させたf 8 8 - E F R Hにより3回免疫した後の血清を1 : 3 0 0 0に希釈してアッセイを実施した。ペプチドW V L D (配列番号4) を陰性コントロールとして用いた。

【図26】 図26はf 8 8 - E F R Hファージに対して作製した血清抗体によるP C 1 2細胞へのA P介在毒性作用の防御を示す。細胞を繊維性Aのみにより、または3回目の出血からの血清と種々濃度でインキュベートした繊維性Aによりインキュベートした。陰性コントロールは非免疫マウスからの血清とした。M T Tアッセイを用い、細胞生存を評価した。

【図27】 図27はf 8 8 - E F R Hファージに対して作製した血清抗体による繊維性 - アミロイド形成の干渉を示す。指示どおりに希釈した血清サンプルの存在下に3 7 1週間インキュベーションした後に形成される繊維性 - アミロイドの量と相関するT h T 蛍光での評価。陰性コントロールは非免疫マウスからの血清とした。陽性コントロールは血清なしとした。原繊維形成はT h Tアッセイにより測定した。

【図28】 図28はヒト・プリオン・タンパク質106 - 126 (配列番

号25)およびそのマウス同族体に対応するアミノ酸配列を示す。

【図29】 図29はMTTアッセイにより測定したPrPペプチドの神経毒性作用を示す。PC12細胞を、2mMインスリン、2μM-L-グルタミンおよび100単位のペニシリン/ストレプトマイシン追加DMEM培地を容れた96ウエルプレートに播種した。細胞生存度はPrP106-126との(異なる濃度での)インキュベーション後にMTTアッセイにより評価した。PrP106-126は37℃で4日間前インキュベートし、次いで3日間細胞に加えるか(灰白色棒)、または37℃で4日間前インキュベートし、次いで5日間細胞に加えるか(白棒)、または37℃で7日間前インキュベートし、次いで5日間細胞に加える(黒棒)。

【図30】 図30はThT結合アッセイによるPrPペプチドの凝集度合いを示す。PrP106-126(0~0.8mg/ml)を37℃で7日間インキュベートし、482nmでの発光を測定して、凝集度合いを定量した。

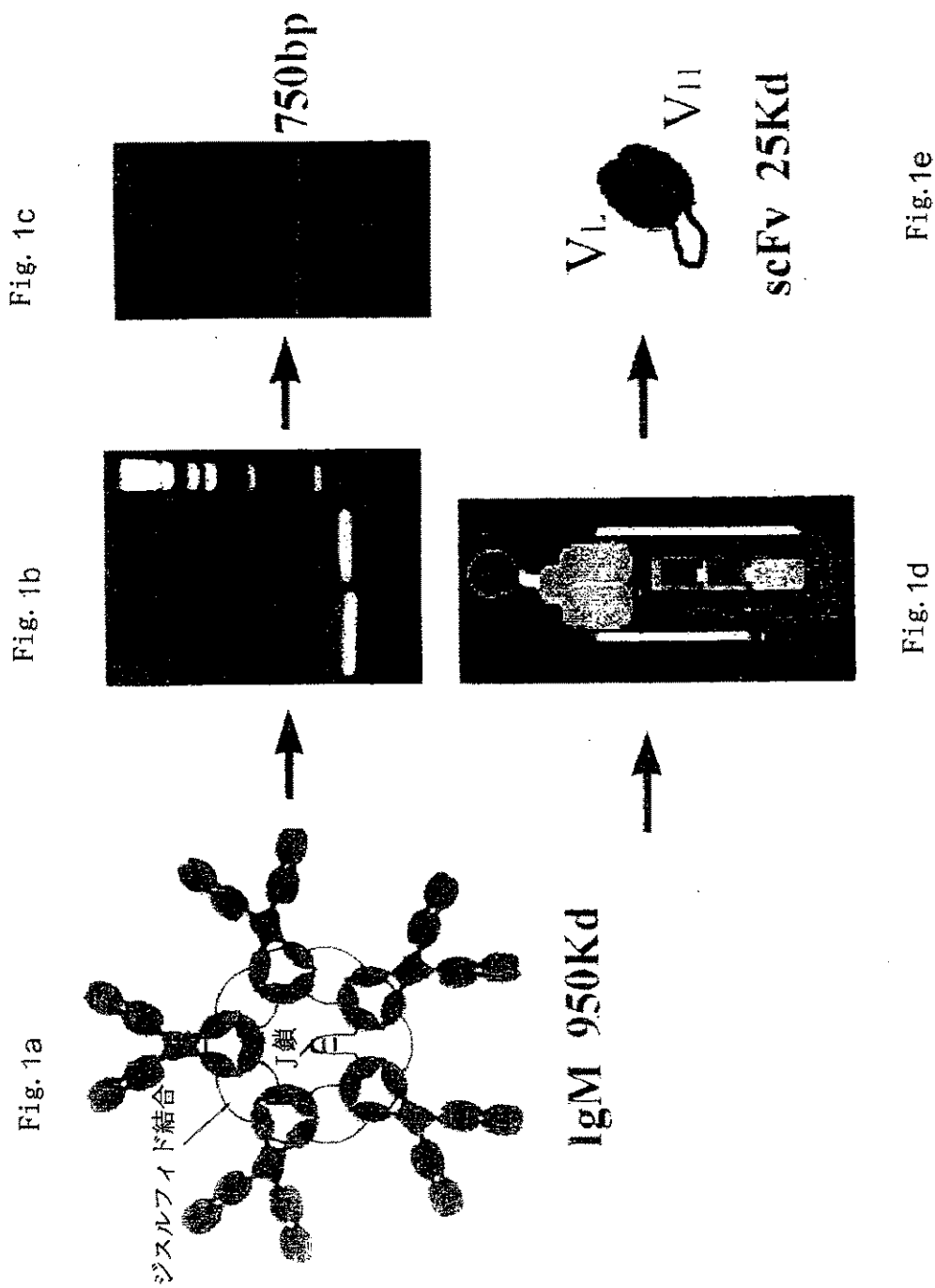
【図31】 PrPペプチドの神経毒性に対するmAb3-11、2-40の防御作用を示す。PC12細胞を、2mMインスリン、2mM-L-グルタミンおよび100単位のペニシリン/ストレプトマイシン追加DMEM培地を容れた96ウエルプレートに播種し、3日間インキュベートした。以下の処理を実施した:(1)陽性コントロール、未処理細胞;(2)37℃7日間、前インキュベートした100μM-PrP106-126;(3、4、5)1時間、前インキュベートした凝集ペプチドであって、その後にmAb3-11(処理3)、2-40(処理4)および3F4(処理5)と共に細胞に露出した。細胞の生存度はMTTアッセイにより評価した。

【図32】 図32はmAbによるPrPコンホメーションの変調を示す。PrP106-126(0.3mg/ml)を37℃で7日間(1)、およびmAb2-40、3-11および3F4(それぞれ、処理2、3および4)とインキュベートする。抗体はPrPインキュベーションに先立ち(灰白色棒)、または1週間のPrPインキュベーションの後に(白棒)、24時間、サンプルとインキュベートした。原繊維形成はThT結合アッセイにより評価した。

【図33】 図33はPrP繊維状凝集形成に対するmAb3-11の濃度

依存性防御作用を示す。PrP106-126 (0.3 mg/ml) を、希釈したmAb3-11 (それぞれ処理1、2、および3に対応して1:1、1:10、1:50) と37 で7日間インキュベートした。抗体はPrPインキュベーションに先立ち(灰白色棒)、または1週間のPrPインキュベーションの後に(白棒)、24時間、サンプルとインキュベートした。アミロイド原繊維形成をThT結合アッセイにより評価した。

【図1】



【図2】

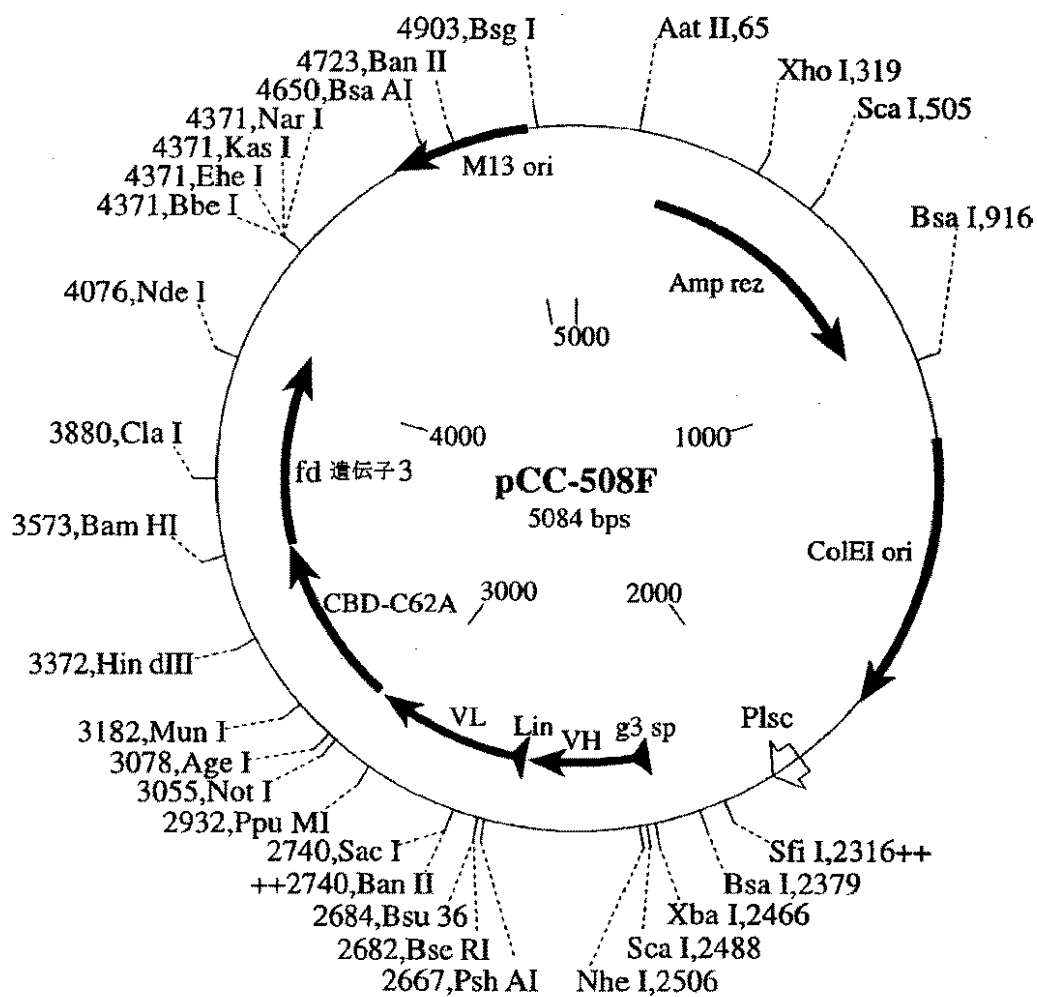


FIG.2

【図3】

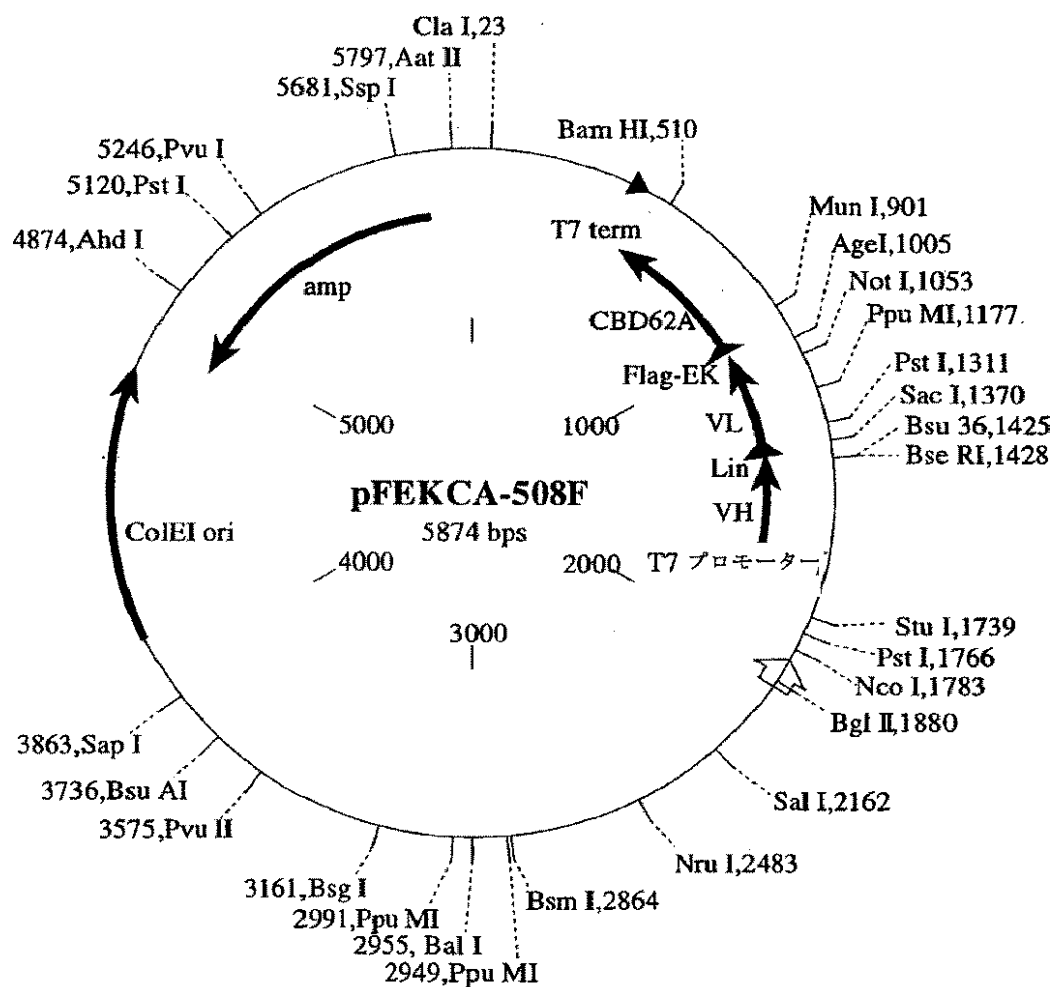


FIG.3

【図4】

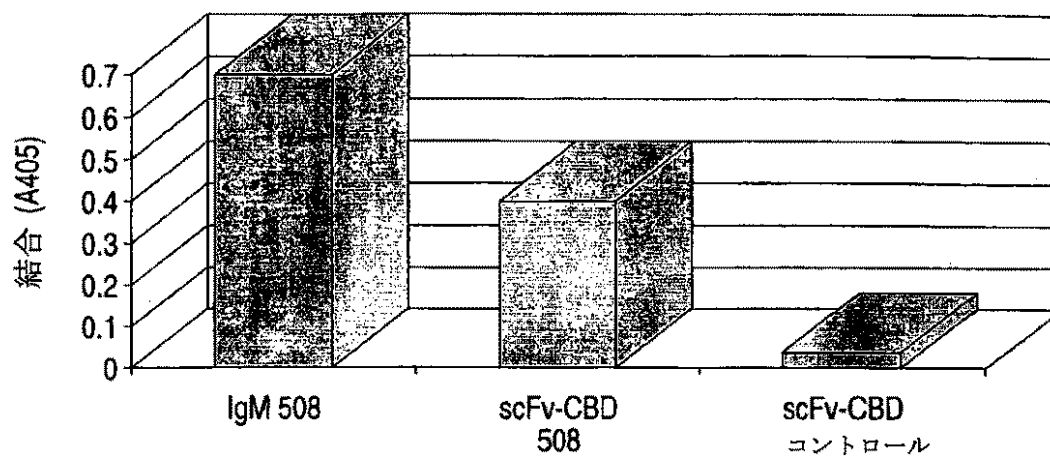


FIG.4

【図5】

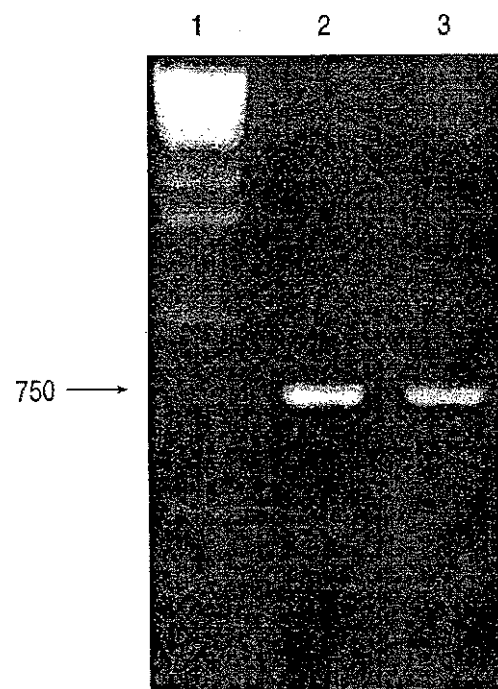


FIG.5

【図6】

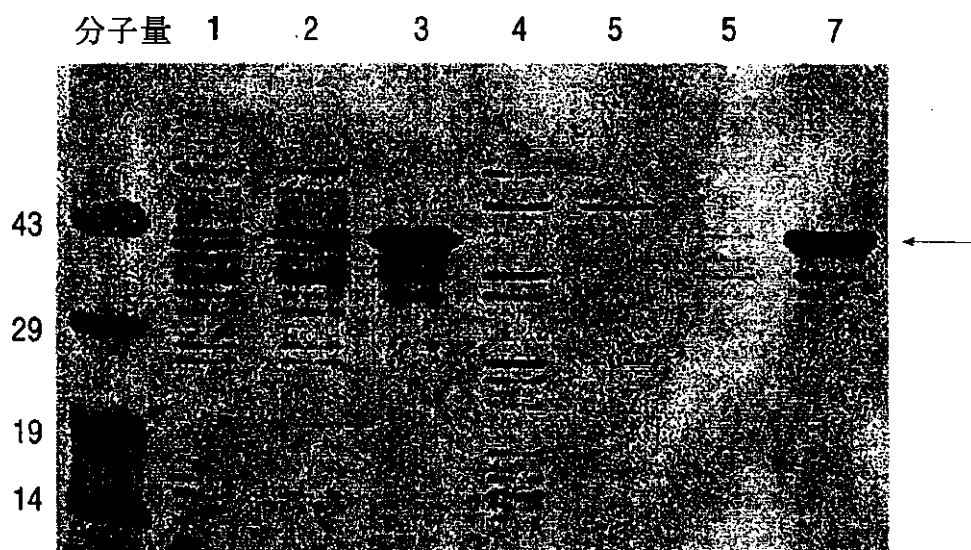


FIG.6

【図7】

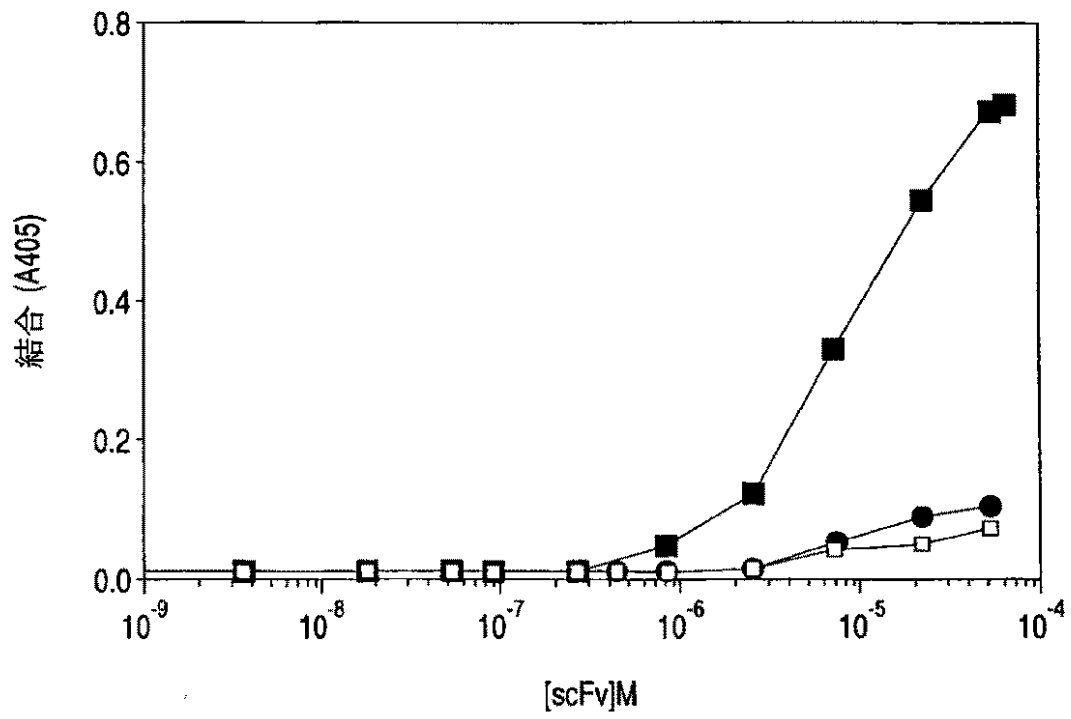


FIG.7



【図8a】

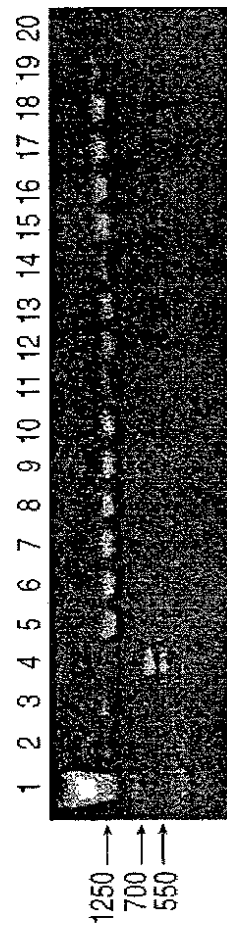


FIG.8a

【図8b】

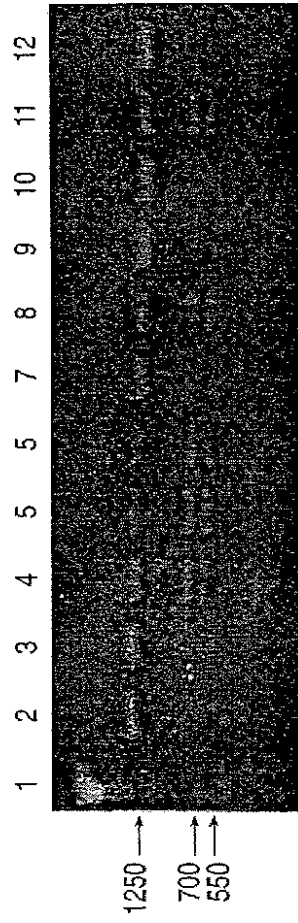


FIG.8b

【図9】

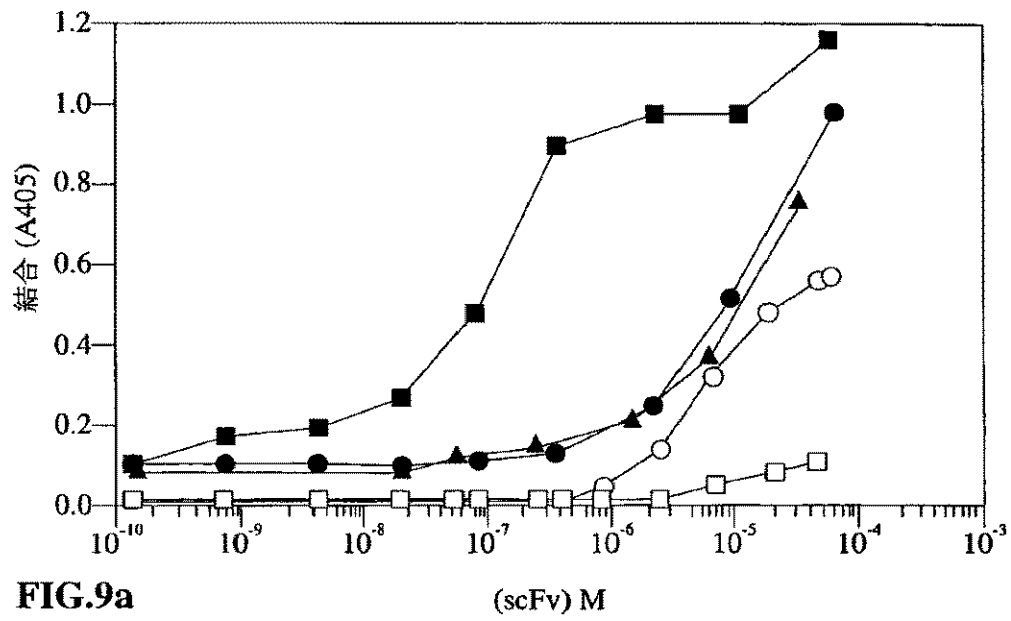


FIG.9a

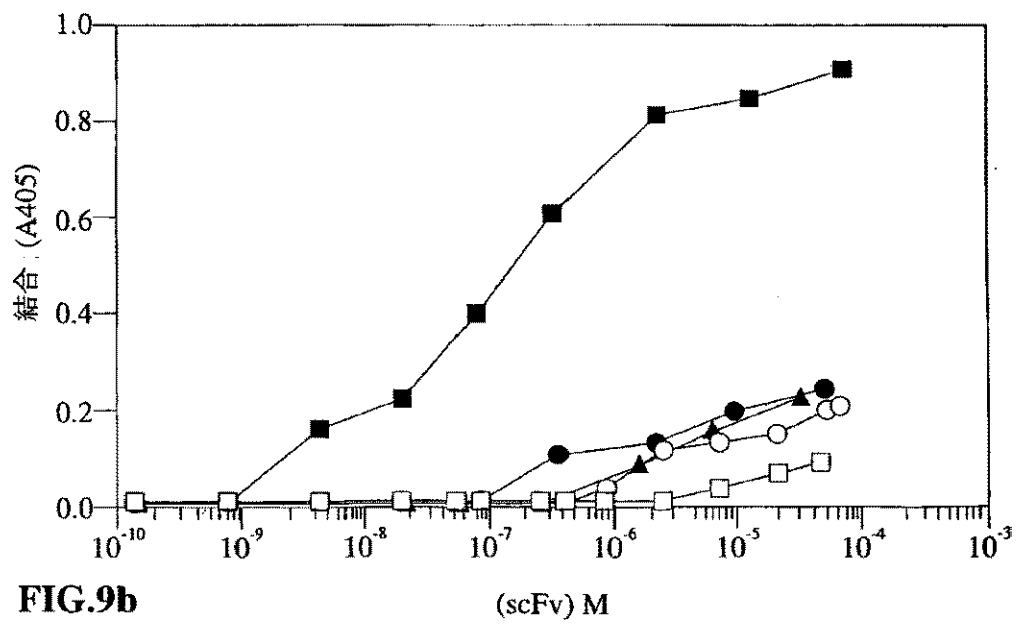


FIG.9b

【図10】

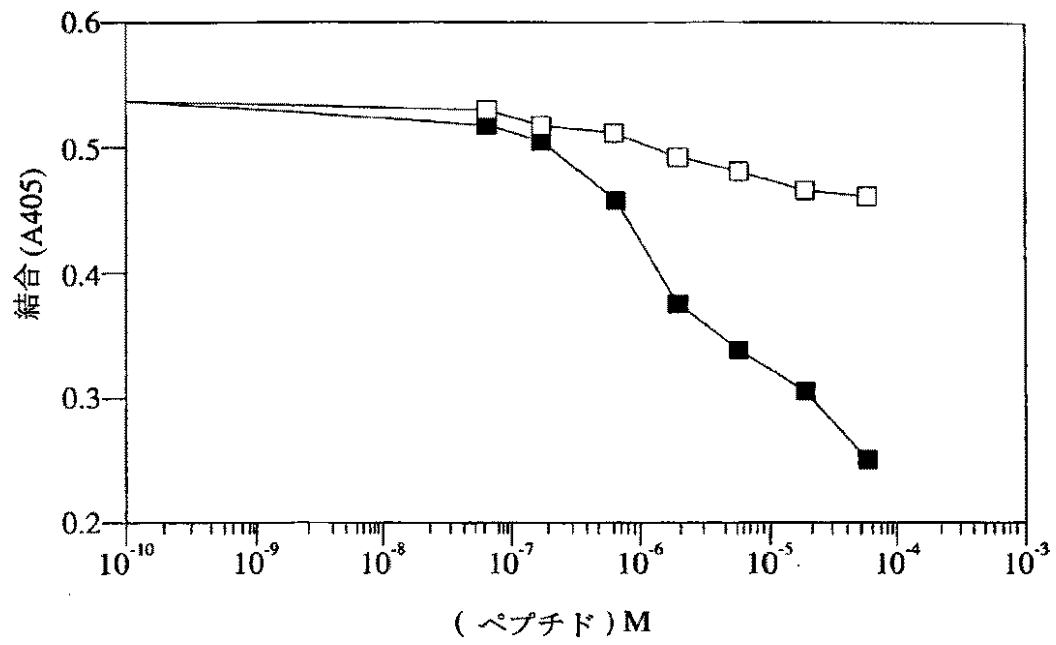


FIG.10

【図11a】

CAG GTC AAA CTG CAG GAG TCA GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GTC TCA GTG AAG ATT  
 gln val lys leu gln glu ser gly ala glu leu val arg pro gly val ser val lys ile  
 TCC TGC AAG GGT TCT GGC TAC ACA TTC ACT GAT TAT GCT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGT  
 ser cys lys gly ser gly tyr thr phe thr asp tyr ala met his trp val lys gln ser  
 CAT GCA AAG AGT CTA GAG TGG ATT GGA GTT ATT AGT ACT TAC TAT GGT GAT GCT AGC TAC  
 his ala lys ser leu glu trp ile gly val ile ser thr tyr tyr gly asp ala ser tyr  
 AAC CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA ATG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAT  
 asn gln lys phe lys gly lys ala thr met thr val asp lys ser ser thr ala tyr  
 ATG GAA CTT GCC AGA CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCC ATC TAT TAC TGT GCA AGA GGG GCT  
 met glu leu ala arg leu thr ser glu asp ser ala ile tyr tyr cys ala arg gly ala  
 ACT ATG TCC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GTG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA  
 thr met ser tyr phe asp tyr trp gly gln val thr val thr val ser ser gly gly  
 CDR 1  
 CDR 2  
 CDR 3

FIG.11a

【図11b】

```

ggc ggt tca ggc gga gtt ggc tct ggc ggt ggc gga tog gac atc gag ctg act cag tct
gly gly ser ser gly gly val gly ser gly gly ser asp ile glu leu thr gln ser

CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA
pro ala ile met ser ala ser pro gly glu lys val thr met thr cys ser ala ser ser
                                Linker
AGT ATA AGT TAC ATG CAC TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT
ser ile ser tyr met his trp tyr gln gln lys pro gly thr ser pro lys arg trp ile
                                cdr 1
TAT GAC ACA TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG
tyr asp thr ser ser lys leu ala ser gly val pro ala arg phe ser gly ser gly
                                cdr 2
ACC TCT TAT TCT CTC ACA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC
thr ser tyr ser leu thr ile ser ser met glu ala glu asp ala thr tyr tyr cys

CAT CAG CGG AGT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGA GGG GGC AAG CTG GAA ATA AAA
his gln arg ser ser tyr pro phe thr phe gly gly ala lys leu glu ile lys
                                cdr 3

```

FIG.11b

【図12】

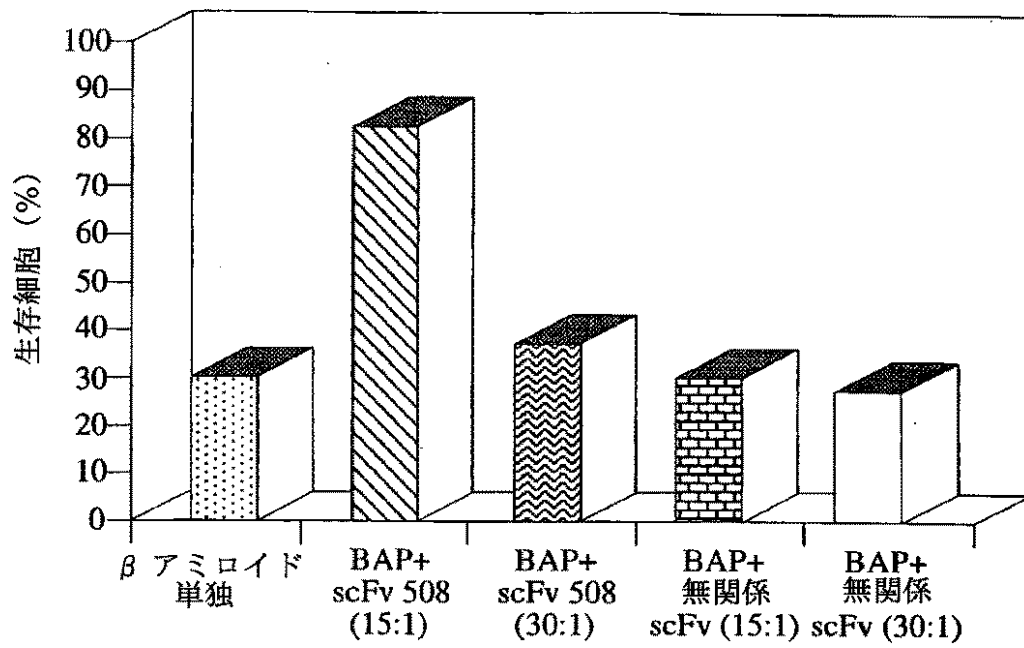


FIG.12

【図13】

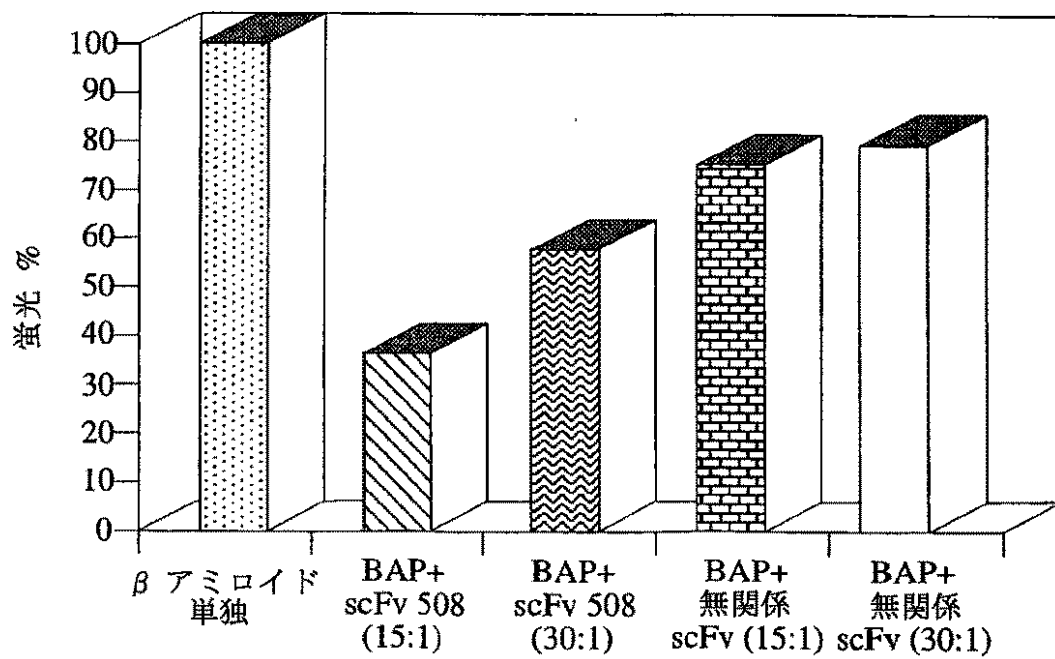


FIG.13

【図14a】

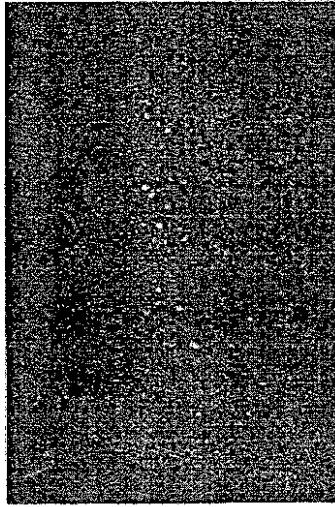


FIG.14a

【図14b】

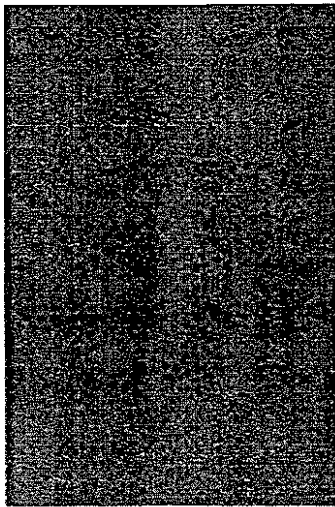
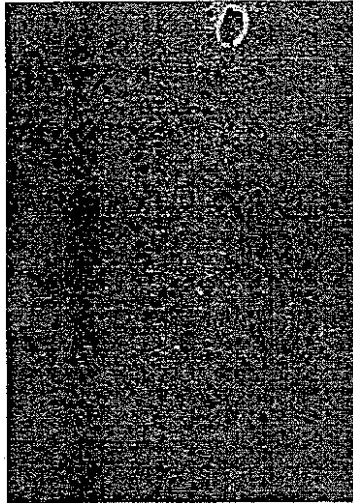


FIG.14b



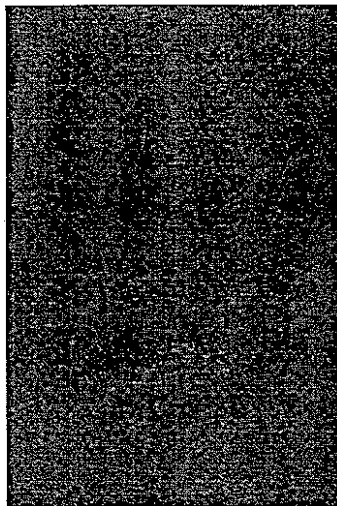
【図 1 4 c】

FIG.14c



【図 1 4 d】

FIG.14d



【図15a】

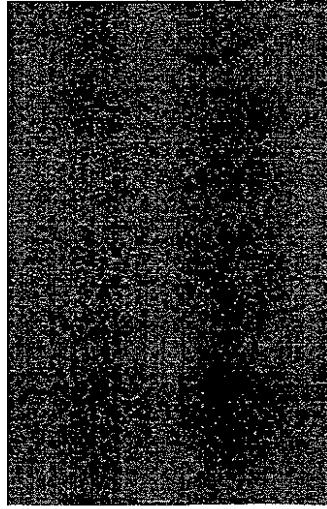


FIG.15a

【図15b】

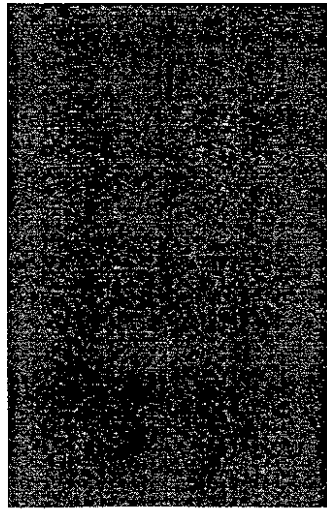
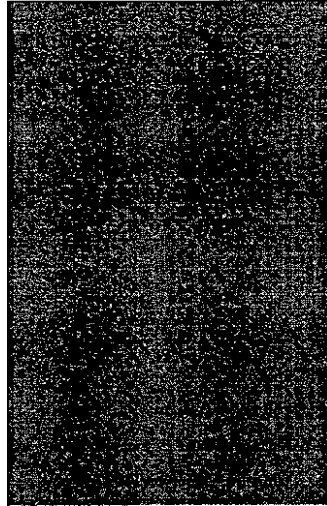


FIG.15b

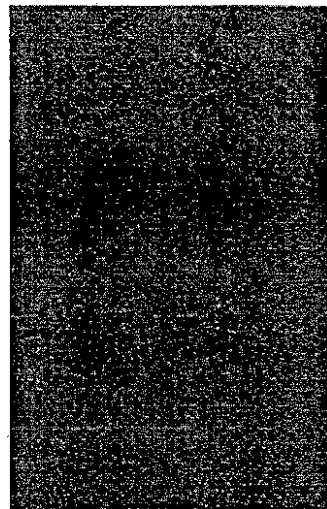
【図15c】

FIG.15c



【図15d】

FIG.15d



【図16a】



FIG. 16a

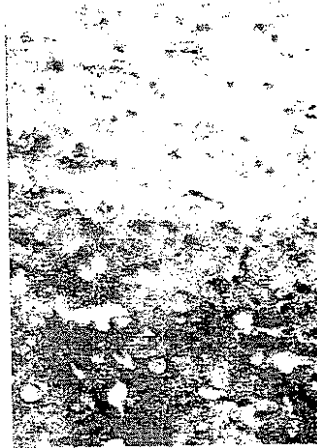
【図16b】



FIG. 16b

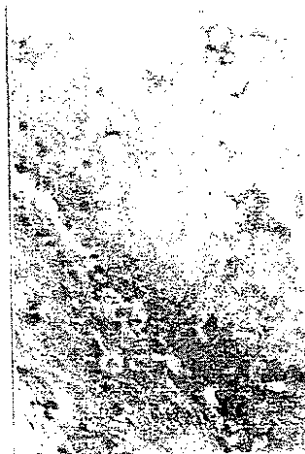
【図16c】

FIG. 16c



【図16d】

FIG. 16d



【図17a】

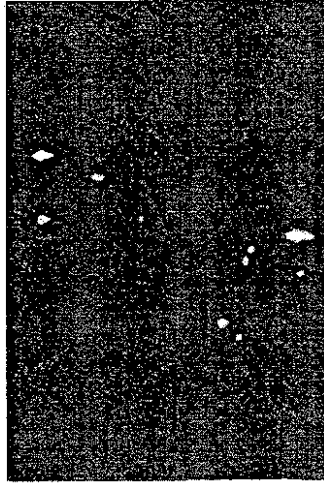


FIG.17a

【図17b】

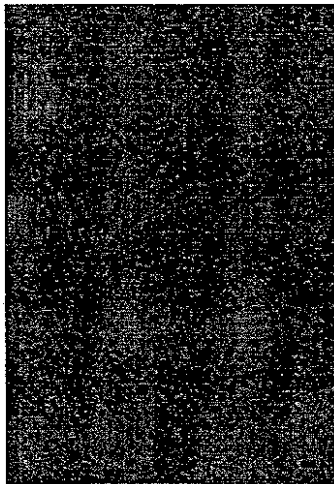
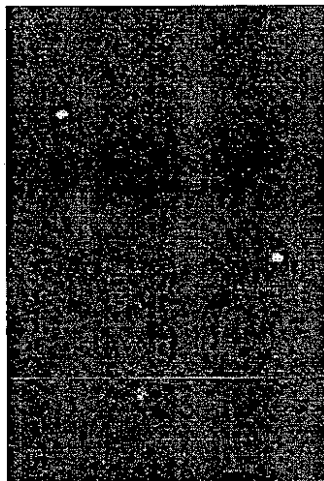


FIG.17b

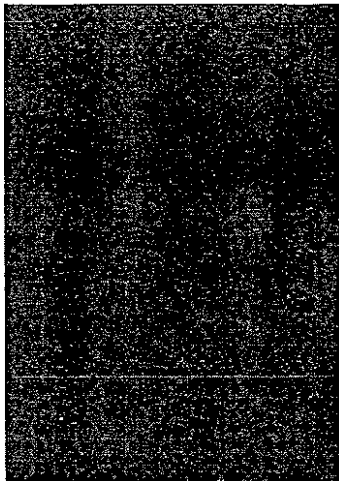
【図17c】

FIG.17c



【図17d】

FIG.17d



【図18a】

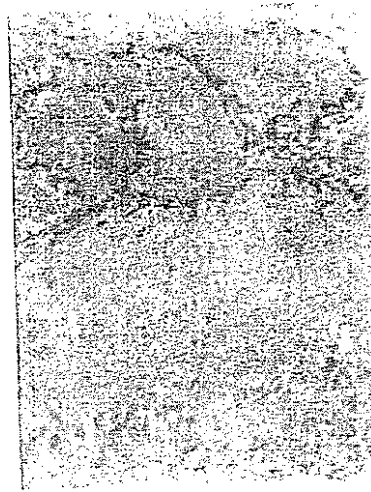


Fig 18a

【図18b】

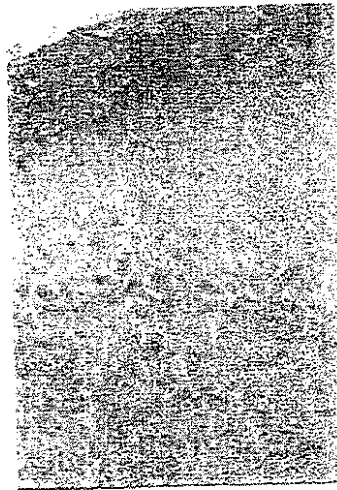
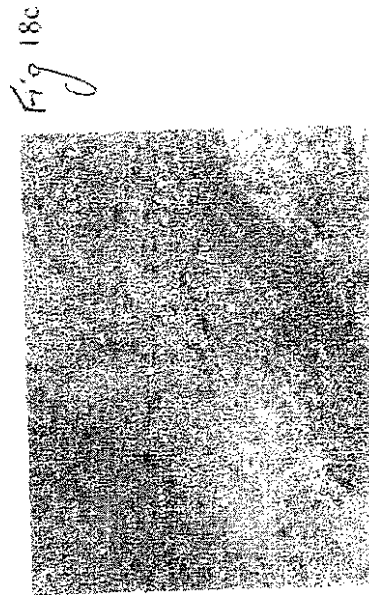


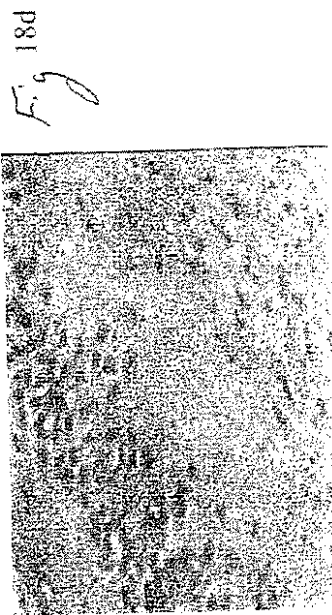
Fig 18b



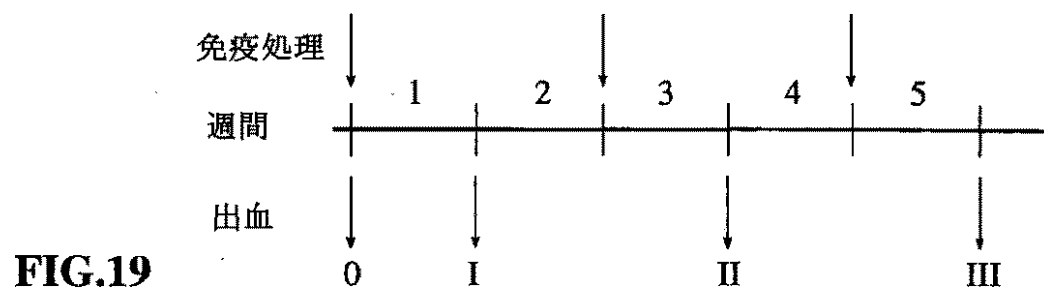
【図18c】



【図18d】



【図19】



【図20】

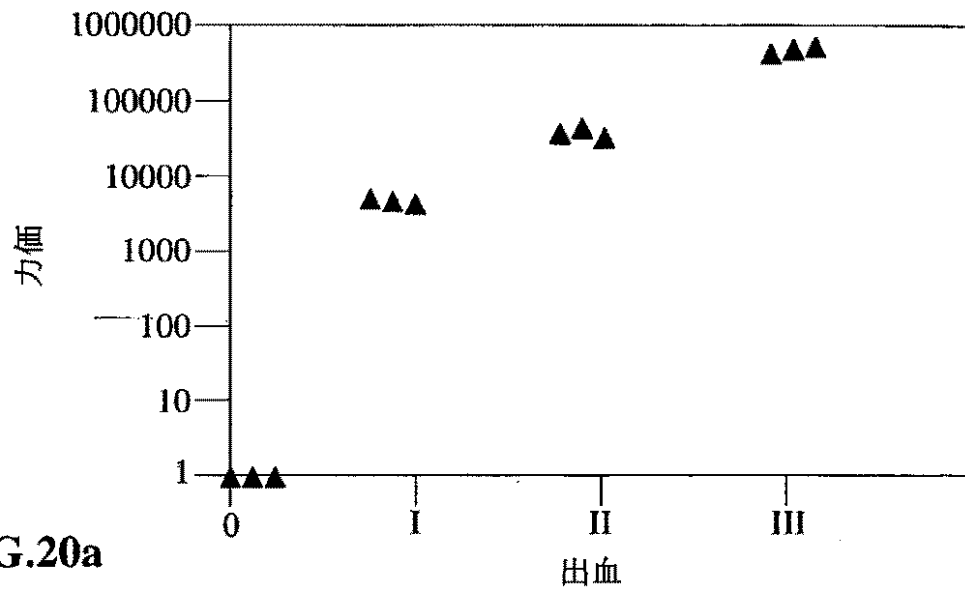


FIG.20a

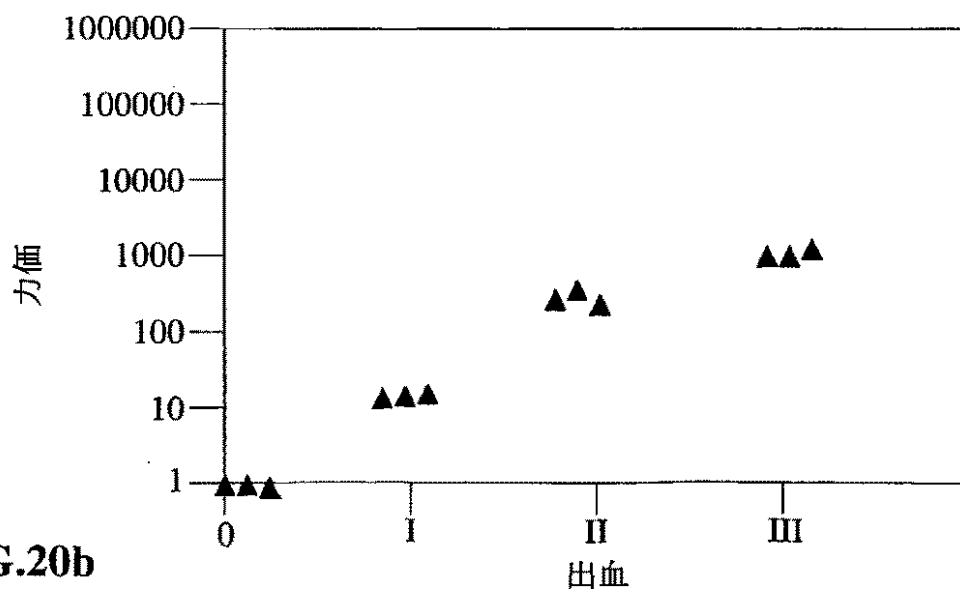


FIG.20b

【図21】

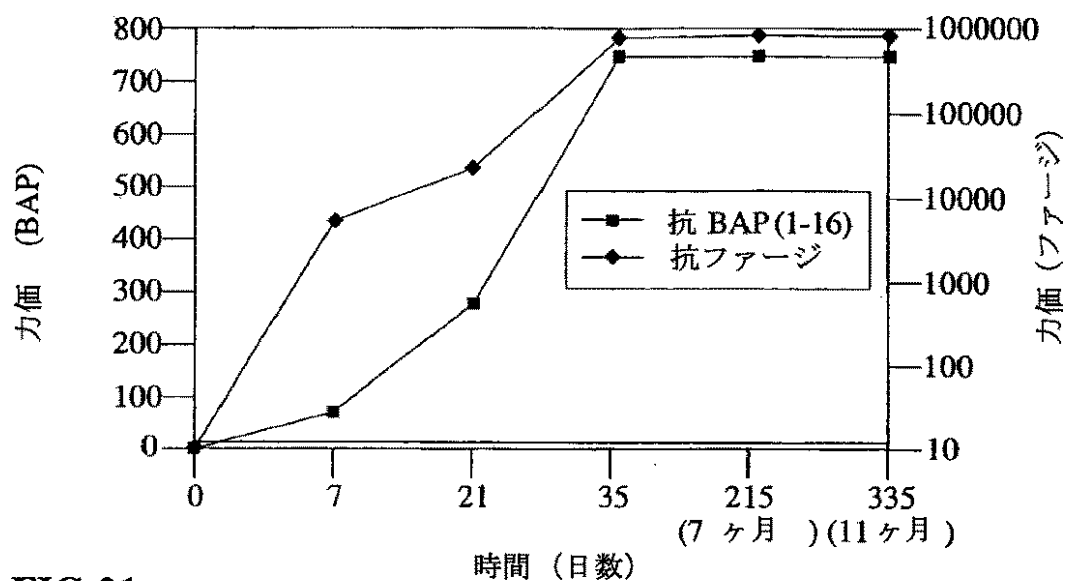


FIG.21

【図22】

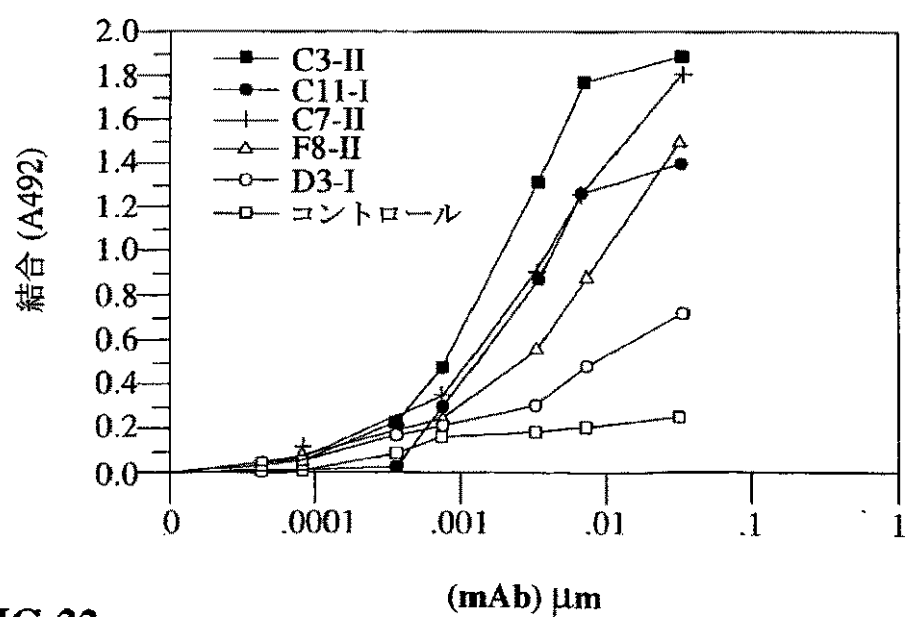


FIG.22

【図23】

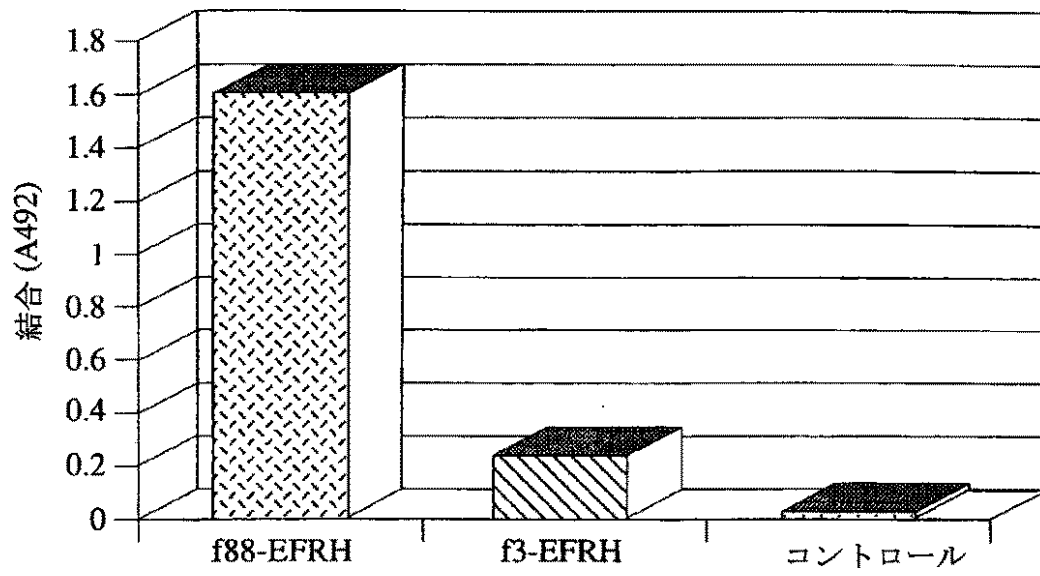


FIG.23

【図24】

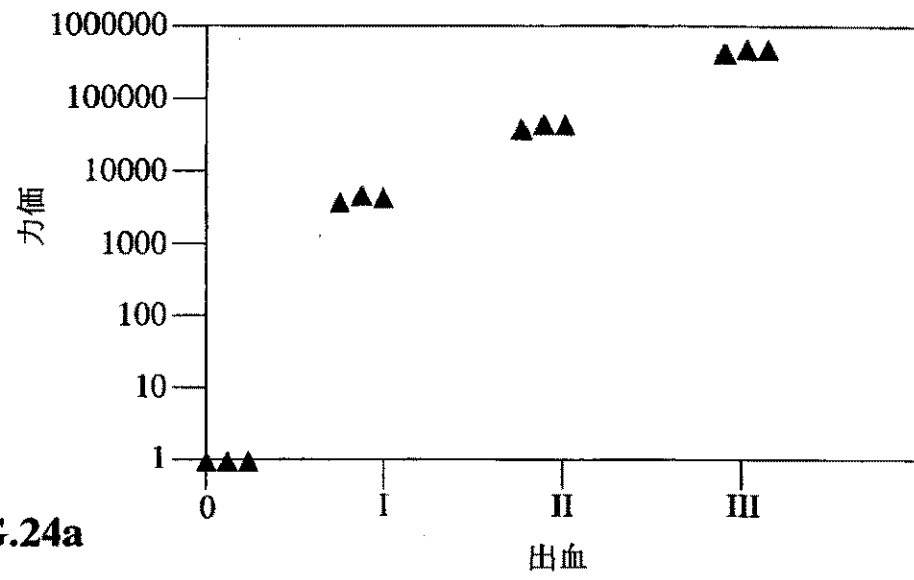


FIG.24a

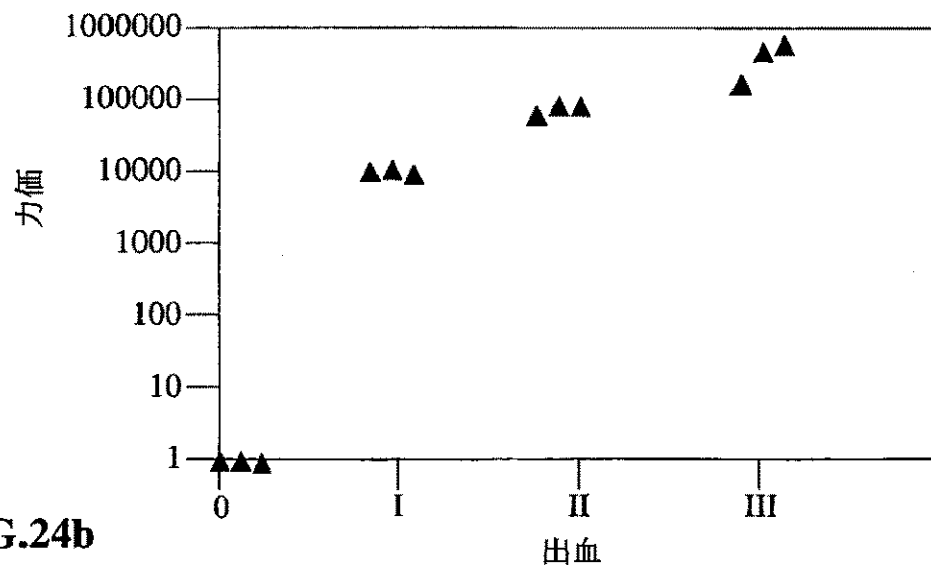


FIG.24b

【図25】

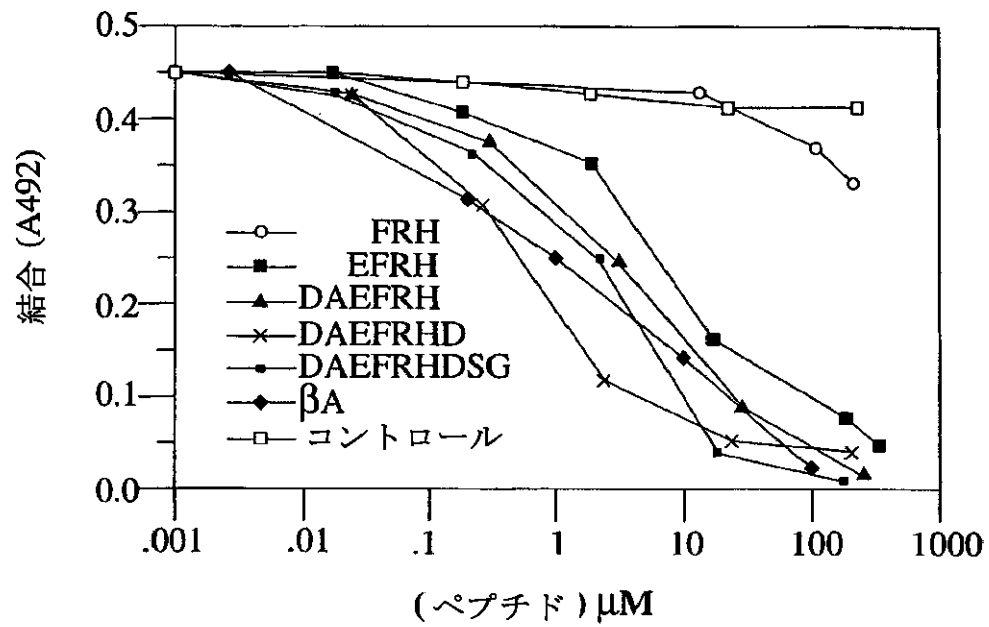


FIG.25

【図26】

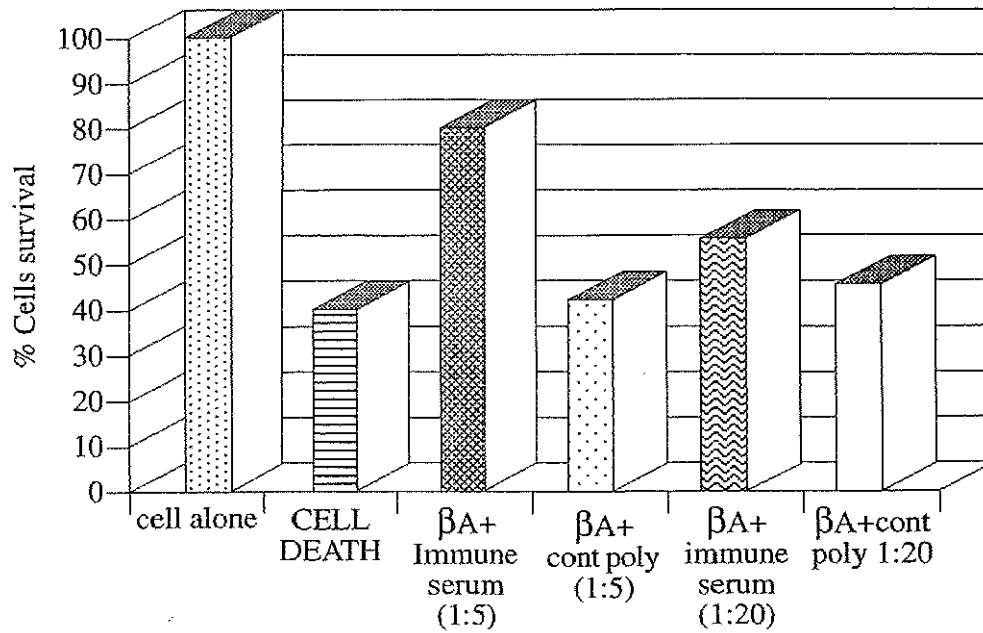


FIG.26

【図27】

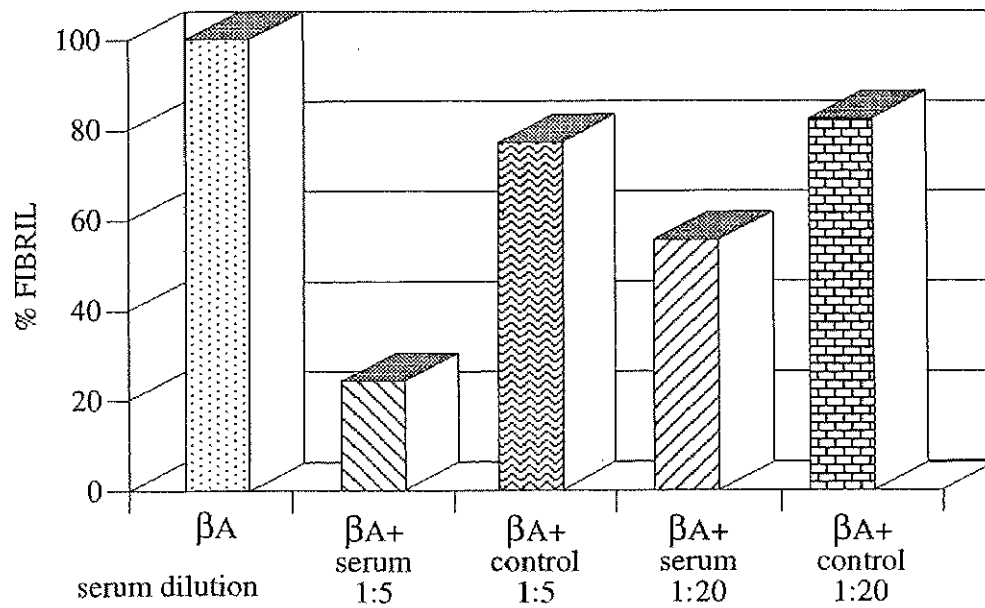


FIG.27

【図28】

Human	PrP 106-126:	KTNMKH <b>M</b> AGAAAAGAVVGGLG
Mouse	PrP 105-125:	KTNLKH <b>V</b> AGAAAAGAVVGGLG

FIG.28

【図29】

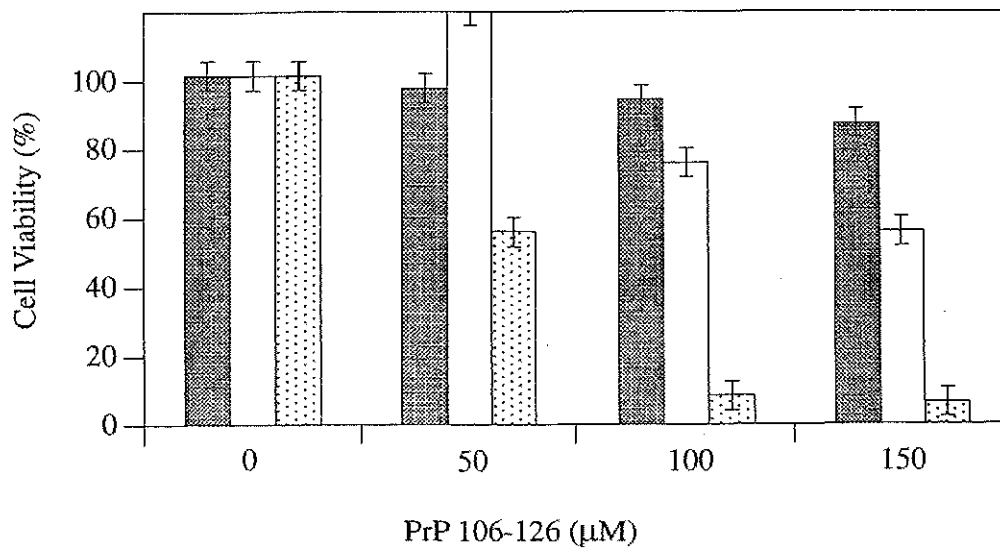


FIG.29

【図30】

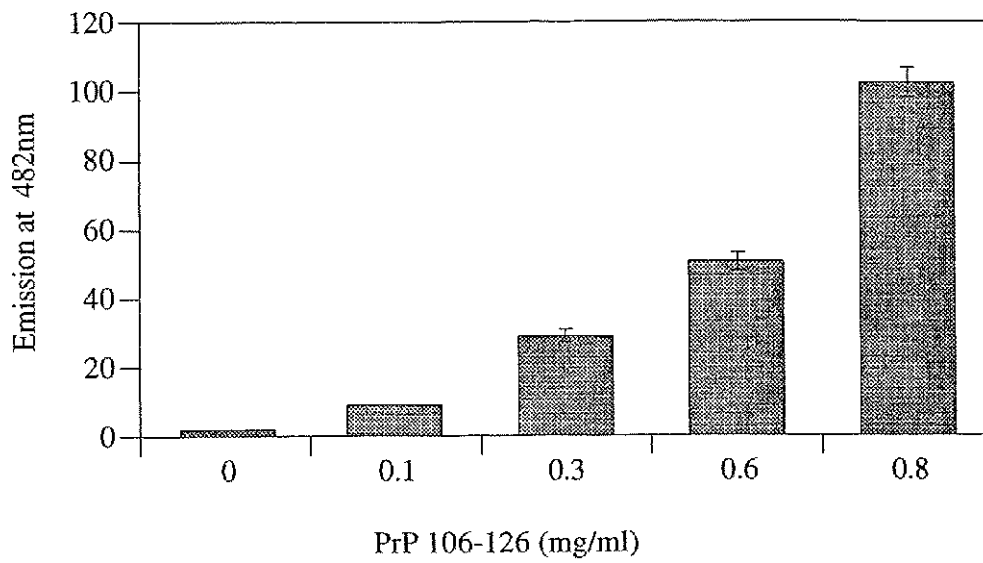


FIG.30



【図31】

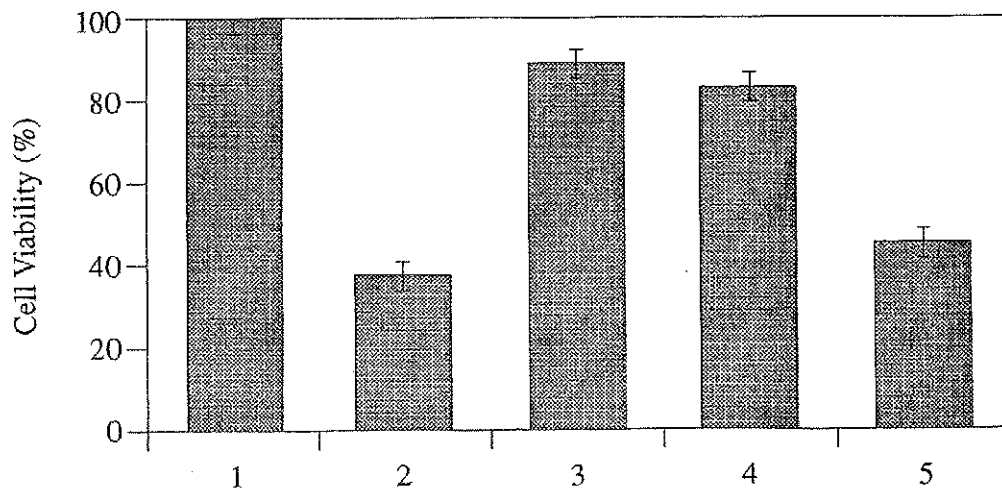


FIG.31

【図32】

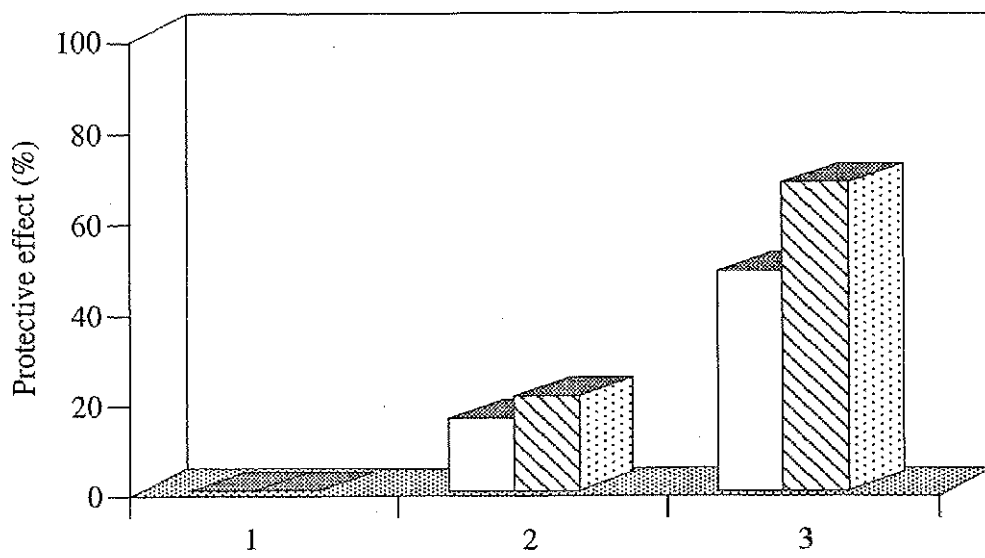


FIG.32

【図33】

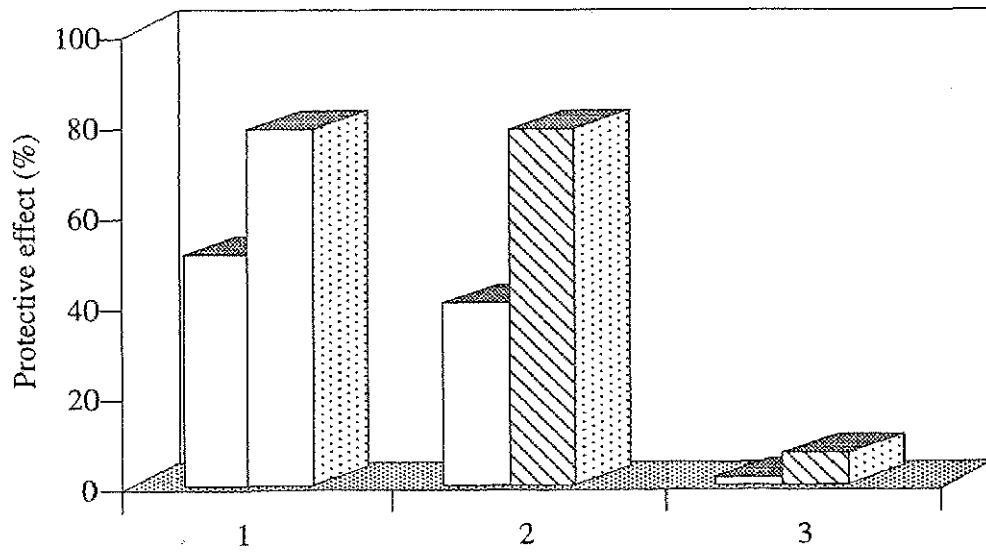


FIG.33

## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/IL00/00518
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : 424/93.1; 435/7.1, 235.1, 455; 530/387.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.1; 435/7.1, 235.1, 455; 530/387.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,811,093 A (MERRILL et al.) 22 September 1998, col. 2, lines 57-60; col. 4, line 6 to col. 5, line 4; and col. 4, lines 17-25.	1-13, 53-57 and 59-66
Y	DELMASTRO, P. et al. Immunogenicity of Filamentous Phage Displaying Peptide Mimotopes After Oral Administration. Vaccine, 1997, Vol. 15, No. 11, pp. 1276-1285, especially pages 1279-1284.	1-57, 59-70 and 72-114
Y	MOTTI, C. et al. Recognition by Human Sera and Immunogenicity of HBsAg Minitopes Selected from an M13 Phage Display Library. Gene, 1994, Vol. 146, pp. 191-198, see especially pages 192-197.	1-57, 59-70 and 72-114
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 23 MAY 2001		Date of mailing of the international search report 28 JUN 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer TERRY J. DEY DEBORAH CROUCH PARALEGAL SPECIALIST TECHNOLOGY CENTER 1600 Telephone No. (703) 305-1235

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IL00/00518

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HANAN, E. et al. Inhibitory Effect of Monoclonal Antibodies on Alzheimer's $\beta$ -Amyloid Peptide Aggregation. Amyloid: International Journal of Experimental Clinical Investigation. 1996, Vol. 3, pages 130-133, see pages 131-132	1-57,59-70 and 72-114
Y	SOLOMON, B. et al. Dissagregation of Alzheimer $\beta$ -Amyloid by Site-Directed mAb. Proceedings National Academy of Science (USA). April 1997, Vol. 94, pages 4109-4112, see especially 4110-4112.	1-57,59-70 and 72-114
Y	SOLOMON, B. et al. Monoclonal Antibodies Inhibit In Vitro Fibrillar Aggregation of the Alzheimer $\beta$ -Amyloid Peptide. Proceedings of the National Academy of Science (USA). January 1996, Vol. 93, pages 452-455, see especially pages 453 and 454.	1-57,59-70 and 72-114
X	FRENKEL, D. et al. N-Terminal EFRH Sequence of Alzheimer's $\beta$ -Amyloid Peptide Represents the Epitope of its Anti-Aggregating Antibodies. Journal of Neuroimmunology. 1998, Vol. 88, pages 85-90, see especially pages 87-90.	67-70 and 72-114 -----
Y	SCHENK, D. et al. Immunization with Amyloid- $\beta$ Attenuates Alzheimer-Disease-Like Pathology in the PAPP Mouse. Nature. 08 July 1999, Vol. 400, pages 173-177, see especially pages 173-177.	1-13, 53-57 and 59-66
X	SOMERVILLE, R. A. et al. Immunodetection of PrPsc in Spleens of Some Scrapie-Infected Sheep but not BSE-Infected Cows. Journal of General Virology. 1997, Vol. 78, pages 2389-2396, see especially pages 2391-2394.	116,118, 119 and 121

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IL00/00518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:  
IPC (7):

A01N 63/00, 65/00; G01N 33/53; C12N 7/00, 15/63, 15/85, 15/87; C07K 16/00

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト <sup>*</sup> (参考)
A 6 1 P 19/08		A 6 1 P 35/00	
25/28		43/00	
35/00			1 0 5
43/00			
	1 0 5	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18		G 0 1 N 33/53	S
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A C
		A 6 1 K 37/02	
(31)優先権主張番号	0 9 / 6 2 9 , 9 7 1		
(32)優先日	平成12年7月31日(2000.7.31)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(71)出願人	RAMOT UNIVERSITY AUTHORITY FOR APPLIED RESEARCH & INDUSTRIAL DEVELOPMENT LTD.		
(72)発明者	ベカ・ソロモン イスラエル46399ヘルズリア、イツハク・ハナシ・ストリート120番		
(72)発明者	ダン・フレンケル イスラエル76227レホポート、ゴロデスキ・ストリート32番		
(72)発明者	エイラット・ハナン イスラエル67200テル・アビブ、モシェ・ダヤン・ストリート111番		

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA58 CA04  
DA05 EA02 EA03 EA04 GA03  
GA11 HA08 HA09 HA15  
4C084 AA02 BA44 CA62 DC50 NA20  
ZB011  
4C085 AA13 CC32  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA13  
ZA16 ZA96 ZB21 ZB26 ZC52  
ZC54  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09  
BA54 CA40 DA75 DA76 EA20  
EA31 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	药物，用于诊断，治疗和预防噬斑形成疾病的组合物，组合物，其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003509020A</a>	公开(公告)日	2003-03-11
申请号	JP2001522381	申请日	2000-08-31
申请(专利权)人(译)	拉莫特 - 大学管理局应用研究和实业发展有限公司		
[标]发明人	ベカソロモン ダンフレンケル エイラットハナン		
发明人	ベカ・ソロモン ダン・フレンケル エイラット・ハナン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/74 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K39/395 A61K49/00 A61P19/08 A61P25/28 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N7/01 C12N15/02		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K39/0007 A61K49/0004 A61K2039/6075 A61P19/08 A61P25/28 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/4711 C07K16/18 C07K2317/622 C07K2317/74 C07K2319/00		
FI分类号	A61K35/74 A61K35/76 A61K39/395.D A61P19/08 A61P25/28 A61P35/00 A61P43/00 A61P43/00.105 C07K16/18 G01N33/53.S C12N15/00.ZNA.C A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA58 4B024/CA04 4B024/DA05 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA15 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/CA62 4C084/DC50 4C084/NA20 4C084/ZB011 4C085/AA13 4C085/CC32 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA13 4C087/ZA16 4C087/ZA96 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4C087/ZC52 4C087/ZC54 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA54 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/152417 1999-09-03 US 09/473653 1999-12-29 US 09/629971 2000-07-31 US		
其他公开文献	JP2003509020A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了使用展示技术针对斑块形成疾病进行免疫的方法。该方法利用新型试剂或药物组合物在展示介质上呈递抗原或表位以免疫噬菌斑形成疾病。该方法包括用于将抗体或其活性部分呈递到展示介质上以免疫噬菌斑形成疾病的试剂或药物组合物。免疫后，使用抗原或抗体进行噬菌斑分解。

表2

アミノ酸配列(名称)	配列番号	ページ数
VHEPHEFRHVALNPV(C3-II)	8	2
DTEFRHSSNNFSAVR(C7-II)	21	1
STEFRHQTTPLHPNS(C11-I)	22	1
KEPRHHIQHHERVIR(F8-II)	23	1
SAADFRHGSPISAF(D3-I)	24	1