

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-529320

(P2009-529320A)

(43) 公表日 平成21年8月20日(2009.8.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00 Z N A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C 0 8 5
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 7
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-555489 (P2008-555489)  
 (86) (22) 出願日 平成19年2月15日 (2007.2.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年9月22日 (2008.9.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/062238  
 (87) 国際公開番号 W02007/095616  
 (87) 国際公開日 平成19年8月23日 (2007.8.23)  
 (31) 優先権主張番号 60/773, 320  
 (32) 優先日 平成18年2月15日 (2006.2.15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

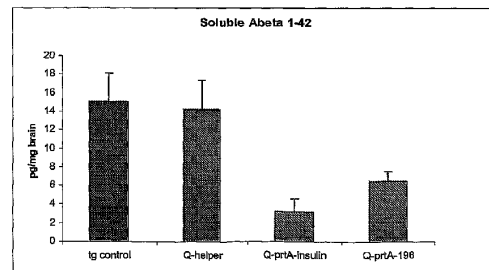
(71) 出願人 502435775  
 ラモット・アット・テルアビブ・ユニバー  
 シティ  
 イスラエル国、69975 テルアビブ、  
 ハイム・レバノン 32  
 (74) 代理人 100078662  
 弁理士 津国 肇  
 (74) 代理人 100113653  
 弁理士 東田 幸四郎  
 (74) 代理人 100116919  
 弁理士 齋藤 房幸  
 (72) 発明者 ソロモン, ベカ  
 イスラエル国、46399 ヘルツェリア  
 ・ピトゥアフ、ハナッシ 120

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳への送達のための抗体および免疫複合体のバインダーとしてのプロテインAをディスプレイする繊維状バクテリオファージ

(57) 【要約】

本発明は、プロテインAまたは抗体のFc部分に結合することができるそのフラグメントもしくは変異体を非繊維状バクテリオファージ分子としてその表面にディスプレイする繊維状バクテリオファージ、ならびにプロテインAまたはそのフラグメントもしくは変異体にそのFc部分により結合した抗体または抗原-抗体免疫複合体を含む、ファージディスプレイビヒクルに関する。このファージディスプレイビヒクルは、医薬組成物に処方されそして脳の疾患、障害または状態を処置/抑制または診断するのに使用することができる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

プロテイン A または抗体の Fc 部分に結合することができるそのフラグメントもしくは変異体を非ネイティブな繊維状バクテリオファージ分子としてその表面にディスプレイする繊維状バクテリオファージ、ならびに該プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体にその Fc 部分により結合した抗体または抗原 - 抗体免疫複合体、を含むファージディスプレイビヒクルであって、但し、該繊維状バクテリオファージは薬物にリンカーを介してまたは直接コンジュゲーションされておらず、そして該抗体または免疫複合体も固体担体上に固定化されていない、ファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 2】

繊維状バクテリオファージが M13、f1 および fd バクテリオファージおよびそれらの任意の混合物からなる群より選ばれる、請求項 1 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 3】

繊維状バクテリオファージが M13 である、請求項 1 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 4】

抗体が IgG クラスである、請求項 1 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 5】

前記プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体に結合した抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 6】

前記モノクローナル抗体が、A1-42 または A1-40 のアミロイド ペプチドに対して生じたモノクローナル抗体または該アミロイド ペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体である、請求項 5 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 7】

前記モノクローナル抗体が、脳の疾患、障害または状態と関連したターゲット分子に対して特異的である、請求項 5 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 8】

前記脳の疾患、障害または状態がプラーク形成疾患または障害である、請求項 7 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 9】

前記モノクローナル抗体が標識されている、請求項 7 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 10】

前記プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体に結合した前記免疫複合体が、インスリンと抗インスリン抗体の免疫複合体である、請求項 1 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 11】

前記繊維状バクテリオファージの表面にディスプレイされた前記非ネイティブな繊維状バクテリオファージ分子が、抗体または抗原 - 抗体免疫複合体に結合した、プロテイン A または抗体の Fc 部分に結合することができるそのフラグメントもしくはその変異体からなる、請求項 1 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 12】

プロテイン A または抗体の Fc 部分に結合することができるそのフラグメントもしくは変異体を非ネイティブな繊維状バクテリオファージ分子としてその表面にディスプレイする繊維状バクテリオファージ、ならびに該プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体にその Fc 部分により結合した抗体、を含むファージディスプレイビヒクルであって、該抗体が細胞表面にターゲットとして提示されていない分子に対して特異的であり、但し、該抗体は固体担体上に固定化されてもいない、ファージディスプレイビヒクル。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

繊維状バクテリオファージが M 13、f 1 および f d バクテリオファージおよびそれらの任意の混合物からなる群より選ばれる、請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 14】

繊維状バクテリオファージが M 13 である、請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 15】

抗体が Ig G クラスである、請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 16】

前記プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体に結合した抗体がモノクローナル抗体である、請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 17】

前記モノクローナル抗体が、A 1 - 42 または A 1 - 40 のアミロイド ペプチドに対して生じたモノクローナル抗体または該アミロイド ペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体である、請求項 16 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 18】

前記モノクローナル抗体が、脳の疾患、障害または状態と関連したターゲット分子に対して特異的である、請求項 16 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 19】

前記脳の疾患、障害または状態がプラーク形成疾患または障害である、請求項 18 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 20】

請求項 1 または請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクルと、薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤または佐剤を含む医薬組成物。

## 【請求項 21】

脳の疾患、障害または状態を処置または抑制することを必要としている被検体に有効量の請求項 1 または請求項 12 のファージディスプレイビヒクルを鼻腔内に投与して、脳の疾患、障害または状態を抑制または処置することを含む、脳の疾患、障害または状態を処置または抑制するための方法。

## 【請求項 22】

前記脳の疾患、障害または状態がプラーク形成疾患または障害である、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 23】

プラーク形成疾患または障害がアルツハイマー病である、請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 24】

ファージディスプレイビヒクル上にディスプレイされた前記プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体に結合した抗体が、アミロイド ペプチドに対して特異的な抗体である、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 25】

前記抗体がアミロイド ペプチド 1 - 42 または 1 - 40 に対して特異的である、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 26】

プラーク形成疾患がプリオン病である、請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記脳の疾患、障害または状態が脳腫瘍である、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記脳の疾患、障害または状態が、脳炎症性疾患、障害または状態である、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 29】

10

20

30

40

50

被検体が哺乳動物である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 0】

被検体がヒトである、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体に結合した前記免疫複合体が、インスリンと抗インスリン抗体の免疫複合体である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 2】

脳の疾患、障害または状態を診断することを必要としている被検体に請求項 1 または請求項 1 2 に記載のファージディスプレイビヒクルを鼻腔内に投与し；そしてファージディスプレイビヒクルを、脳の疾患、障害または状態と関連したターゲット分子に結合したその抗体成分により検出して、脳の疾患、障害または状態の存在を診断する、ことを含む、脳の疾患、障害または状態を診断するための方法。

10

【請求項 3 3】

抗体が検出可能に標識される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

抗体が、放射性核種により検出可能に標識されている、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

抗体が造影剤で検出可能に標識されている、請求項 3 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0 0 0 1】

本発明は、脳への抗体および免疫複合体の送達のための繊維状バクテリオファージディスプレイビヒクルならびに診断および治療におけるその使用に関する。

【0 0 0 2】

関連技術の説明

ファージディスプレイ

コンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリーは、タンパク質：タンパク質相互作用を研究するための効率的な手段を提供する。この技術は、対応する遺伝子的青写真と関連したランダムペプチドの非常に大きいコレクションの産生に頼る (Scott et al, 1990; Dower, 1992; Lane et al, 1993; Cortese et al, 1994; Cortese et al, 1995; Cortese et al, 19956)。ランダムペプチドの提示は、M 1 3、f d および f 1 などの繊維状バクテリオファージの外側表面に発現されたキメラタンパク質を構築することによりしばしば達成される。この提示は、所望の結合性を有するペプチドのアフィニティー単離および同定をもたらす結合アッセイを受けやすいレパートリーおよび特異化されたスクリーニングスキーム (バイオパニングと呼ばれる (Parmley et al, 1988)) を作る。この方法において、レセプターに結合するペプチド (Koivunen et al, 1995; Wrighton et al, 1996; Sparks et al, 1994; Rasqualini et al, 1996)、酵素に結合するペプチド (Matthews et al, 1993; Schmitz et al, 1996) または抗体に結合するペプチド (Scott et al, 1990; Cwirlla et al, 1990; Felici et al, 1991; Juzzaggo et al, 1993; Hoess et al, 1993; Bonnycastle et al, 1966) は効果的に選ばれた。

30

40

【0 0 0 3】

繊維状バクテリオファージは、F エピソームを担持する *Escherichia coli* 細胞に感染する非溶菌性雄特異的バクテリオファージである (概説として、Model et al, 1988 参照)。繊維状ファージ粒子は、環状一本鎖 DNA ゲノム (+ 鎖) を含有する 9 0 0 nm 長および 1 0 nm の細い管状構造のように見える。ファージのライフサイクルは、バクテリアの F 線毛へのファージの結合、次いで宿主への一本鎖 DNA ゲノムの侵入を含む。環状一本鎖 DNA は、宿主複製装置により認識されそして相補性第 2 DNA 鎖の合成はファージ ori (-) 構造において開始される。二本鎖 DNA 複製形体は、ori (+) 構造で開始する一本鎖 DNA 環状ファージゲノムの合成のためのテンプレートである。これらは、最終的にビリオンにパッケージされそしてファージ粒子は溶菌または宿主への見かけの損傷

50

を引き起こさないでバクテリアから押し出される。

【0004】

ペプチドディスプレイシステムは、ファージの2つの構造タンパク質：p I I I ( P 3 ) タンパク質および p V I I I タンパク質を利用した。p I I I タンパク質は、ファージ当たり5コピーで存在しそしてビリオンの1つの先端に排他的に見出される (Goldsmith et al, 1977)。p I I I タンパク質のN末端ドメインは、感染プロセスのために必要なノブ様構造を形成する。(Gray et al, 1981)。それは、F線毛の先端へのファージの吸着および次いでバクテリア宿主細胞への一本鎖DNAの透過およびトランスロケーションを可能とする (Holliger et al, 1997)。p I I I タンパク質は、広範な改変を許容することができ、したがってそのN末端にペプチドを発現するのに使用された。外来ペプチドは、65までのアミノ酸残基の長さであったが (Bluthner et al, 1996; Kay et al, 1993)、ある場合には、p I I I 機能に顕著に影響を与えることなく完全長タンパク質と同じ大きさですらあった (McCafferty et al, 1990; McCafferty et al, 1992)。

10

【0005】

一本鎖ファージDNAを取り囲んでいる円筒形タンパク質エンベローブは、2700コピーの主要コートタンパク質、p V I I I、50アミノ酸残基からなるヘリカルサブユニットからなる。p V I I I タンパク質それ自体は、タンパク質のヘリックスがビリオンの長軸に対して浅い角度で位置して、ヘリカルパターンで配置されている (Marvin et al, 1994)。このタンパク質の一次構造は、3つの別々のドメイン：(1) 酸性アミノ酸に富みそして外側環境に暴露されたN末端部分；(2) (i) ファージ粒子におけるサブユニット：サブユニット相互作用および (i i) ホスト細胞における膜貫通機能の責任を担う中心疎水性ドメイン；および(3) ファージの内部に埋め込まれておりそしてファージDNAと関連しているC末端でクラスター化された塩基性アミノ酸を含有する第3ドメインを含有する。p V I I I は、23アミノ酸リーダーペプチドを含有するプレコートタンパク質として合成され、該リーダーペプチドはバクテリアの内側膜を横切ってトランスロケーションされると開裂されて成熟50残基膜貫通タンパク質を生じさせる (Sugimoto et al, 1977)。ディスプレイスカフォールドとしてのp V I I I の使用は、それがそのN末端に6より長く残基のペプチドの付加を許容するという事実により妨害される。より大きいインサートはファージアセンブリーを妨害する。しかしながら、より大きいペプチドの導入は、リコンビナントペプチド含有p V I I I タンパク質を野生型p V I I I と *in vivo* 混合することにより、混合モザイクファージが産生されるシステムにおいて可能である (Felicity et al, 1991; Greenwood et al, 1991; Willis et al, 1993)。これは、ファージ粒子のアセンブリー期間中野生型コートタンパク質を点在させたファージ表面で低密度(粒子につき10~数100コピー)でキメラp V I I I タンパク質の組み込みを可能とする。モザイクファージの発生を可能とする2つのシステムが使用された：Smith (Smith, 1993)により命名された「タイプ8+8」および「タイプ88」システム。

20

30

【0006】

「タイプ8+8」はシステムは、2つの異なる遺伝子単位において別々に位置した2つのp V I I I 遺伝子を有することに基づいている (Felicity et al, 1991; Greenwood et al, 1991; Willis et al, 1993)。リコンビナントp V I I I 遺伝子は、ファージミド、即ち、その自身の複製起点に加えて、ファージの複製起点およびパッケージングシグナルを含有するプラスミド上に位置している。野生型p V I I I タンパク質は、ファージミドを抱えるバクテリアにヘルパーファージを重複感染させることにより供給される。更に、ヘルパーファージは、ファージミドおよびヘルパーゲノムの両方をビリオンにパッケージするファージ複製およびアセンブリー装置を与える。したがって、2つのタイプの粒子は、このようなバクテリア、ヘルパーおよびファージミドにより分泌され、その両方がリコンビナントp V I I I タンパク質および野生型p V I I I タンパク質の混合物を組み込んでいる。

40

【0007】

50

「タイプ 88」システムは、1つのおよび同じ感染性ファージゲノムにおいて2つの p V I I I 遺伝子を含有することにより恩恵を受ける。したがって、これはヘルパーファージおよび重複感染を不要にする。更にたった1つのタイプのモザイクファージが産生される。

#### 【0008】

ファージゲノムは、10のタンパク質をコードし ( P I ~ P X )、そのすべては感染性子孫の産生のために必須である (Felicity et al, 1991)。タンパク質のための遺伝子は、2つの非コード領域により分離された2つの堅く詰め込まれた転写単位において構成される (Van Wezenbeek et al, 1980)。「遺伝子間領域」( p I V と p I I 遺伝子間に位置しているものとして定義された) と呼ばれる1つの非コード領域は、D N A 複製の ( + ) および ( - ) 起点およびカプシド形成の開始を可能とするファージのパッケージングシグナルを含有する。この遺伝子間領域の一部は必須ではない (Kim et al, 1981; Dotto et al, 1984)。更に、この領域は、いくつかの部位で外来 D N A の挿入を許容することができることが見出された (Messing, 1983; Moses et al, 1980; Zacher et al, 1980)。ファージの第2非コード領域は、p V I I I と p I I I 遺伝子間に位置し、そして Pluckthun (Kreber et al, 1995) により例示されたとおり外来リコンビナント遺伝子を組み込むためにも使用された。

10

#### 【0009】

##### ファージディスプレイによる免疫化

エピトープからなる低分子合成ペプチドは、ペプチドの化学合成を必要とする一般に不十分な抗原でありそして大きな担体にカップリングされる必要があるが、その場合ですら、それらは低アフィニティー免疫応答を誘導する可能性がある。抗原として E F R H ペプチドのみをディスプレイする繊維状ファージを使用して抗 A P 抗体を生じさせるための免疫感作の方法が本発明者の研究所で開発された (Frenkel et al., 2000 and 2001)。繊維状バクテリオファージは、ファージコートタンパク質をコードする遺伝子の 5' 端部にランダムなオリゴヌクレオチドをクローニングすることにより発生したペプチドの大きなレパートリーのそれらの表面での「ディスプレイ」のために近年広範に使用されている (Scott and Smith, 1990; Scott, 1992)。最近報告されたとおり、繊維状バクテリオファージは、種々の生物学的製剤における外来ペプチドの発現および提示のための優れたビヒクルである (Greenwood et al., 1993; Medynski, 1994)。繊維状ファージの投与は、ファージ効果システムに対する強い免疫学的応答を誘導する (Willis et al., 1993; Meola et al., 1995)。上記したファージコートタンパク質 p I I I および p V I I I は、ファージディスプレイのためにしばしば使用されてきたタンパク質である。

20

30

#### 【0010】

その線状構造により、繊維状ファージは、異なる種類の膜に対する高い透過性を有し (Scott et al., 1990) そして、嗅索に続いて、大脳辺縁系を介して海馬区域に到達して疾患のある部位をターゲティングする。クロロホルムによる繊維状ファージの処理は、線状構造を環状構造に変え、環状構造は脳へのファージの送達を阻止する。

#### 【0011】

##### 抗体エンジニアリング

抗体エンジニアリング法は、m A b s の生物学的活性を維持しながら m A b s のサイズ ( 135 ~ 900 kDa ) を最小化するために適用された (Winter et al., 1994)。これらの技術および P C R 技術を適用して大きな抗体遺伝子レパートリーを作り出すことは、抗体ファージディスプレイを一本鎖 F v ( s c F v ) 抗体の単離および特徴付けのための多様なツールとする (Hoogenboom et al., 1998)。s c F v は更なる操作のためにファージの表面にディスプレイすることができ、または可溶性 s c F v ( ~ 25 kd ) フラグメントとして放出されうる。本発明者の研究所は、親 I g M 分子に類似した抗凝集性を示す s c F v を工学的に作成した (Frenkel et al., 2000a)。s c F v 構築のために、抗 A P I g M 508 ハイブリドーマからの抗体遺伝子をクローニングした。分泌された抗体は、A P 分子に対して、培養された P C 12 細胞に対するその毒性効果を阻止することにおいて

40

50

、特異的活性を示した。部位特異的一本鎖 F v 抗体は、細胞内または細胞外アプローチを介して脳に治療抗体をターゲティングための第 1 段階である。

【 0 0 1 2 】

プロテイン A :

Staphylococcus aureus のプロテイン A は、免疫グロブリン、特に I g G クラスの F c 部分へのそのアフィニティーにより特徴付けられた細胞壁構成成分である (Goding, 1978)。それはヒト、マウス、ブタ、モルモットおよびウサギの I g G 抗体に結合する。マウスにおいては、プロテイン A は高いアフィニティーで I g G 2 a および I g G 2 b 抗体に結合するが、I g G 1 および I g G 3 抗体にはあまりよく結合しない (Goudswaard et al., 1978)。プロテイン A は、アスパラギン酸およびグルタミン酸に富むかシステインを欠いた 4 つの反復ドメインを有する 4 2 kDa タンパク質である。I g G 結合ドメイン (ドメイン B) は、3 つの逆平行ヘリックスからなり、その第 3 はこのタンパク質が F c と複合体化されるとき分裂する (disrupted) (Graille et al., 2000)。

10

【 0 0 1 3 】

ブランク形成疾患

ブランク形成疾患は、脳におけるアミロイドブランク沈着の存在およびニューロン変性により特徴付けられる。アミロイド沈着物は、不溶性塊に凝集したペプチドにより形成される。ペプチドの性質は異なる疾患において変わるが、多くの場合に、凝集物はひだ状シート構造 (beta-pleated sheet structure) を有しそしてコンゴレッド染料で染まる。早期発症アルツハイマー病、後記発症アルツハイマー病および前兆アルツハイマー病を含むアルツハイマー病 (A D) の他に、アミロイド沈着により特徴付けられる他の疾患は、例えば、S A A アミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性ミエローマおよびプリオン病である。動物において最もよくあるプリオン病は、ヒツジおよびヤギのスクラピーおよびウシ海綿状脳症 (B S E) である (Wilesmith and Wells, 1991)。4 つのプリオン病: ( i ) クールー病、( i i ) クロイツフェルト - ヤコブ症候群、( i i i ) ゲルストマン - ストロイスラー - シヤインカー病 (Gerstmann-Streussler-Sheinker Disease (G S S) および ( i v ) 致死的家族性不眠症 (fatal familial insomnia (F E I) (Gajdusek, 1977; and Tritschler et al. 1992) が同定された。

20

【 0 0 1 4 】

プリオン病は、正常細胞プリオンタンパク質 (P r P C) の対応するスクラピーアイソフォーム (scrapie isogorm) (P r P S c) への転換を含む。顕微鏡的測定は、P r P C のスクラピーアイソフォーム (P r P S c) への転換が主要コンフォメーション転移 (major conformation transition) を伴うことを示しており、これは、他のアミロイドゲニック病 (amyloidogenic diseases) と同様に、プリオン病がタンパク質コンフォメーションの障害であることを示唆している。P r P C から P r P S c への転移は、ヘリカル二次構造の減少 (4 2 % から 3 0 %) およびシート含有率の顕著な増加 (3 % から 4 3 %) により伴われる (Caughey et al, 1991; and Pan et al, 1993)。この再構成 (rearrangement) は、非変性洗剤中への不溶性およびプロテオリシスに対する部分的抵抗を含む異常な物理化学的性質と関連している。これまでの研究は、ヒト P r P の残基 1 0 6 ~ 1 2 6 (P r p 1 0 6 ~ 1 2 6) と同性的の合成ペプチドは、P r P S c の病原性および物理化学的性質のいくらかを示すことを示した (Selvaggini et al, 1993; Tagliavini et al, 1993; and Forloni et al, 1993)。このペプチドは、種々の環境において異なる二次構造を獲得する、顕著なコンフォメーション多型を示す (De Gioia et al, 1994)。それは、緩衝化溶液中でシートコンフォメーションを採る傾向がありそしてプロテアーゼによる消化に対して部分的に抵抗性であるアミロイドフィブリルに凝集する傾向がある。抗体 3 F 4 とそのペプチドエピトープ (P r P 1 0 4 ~ 1 1 3) の複合体の X 線結晶学的研究は、プリオン病の進展に必須のコンフォメーション再構成 (conformational rearrangement) の成分であると考えられるこの柔軟性領域の構造的な見解を示した。 (Kanyo et al, 1999)。

30

40

【 0 0 1 5 】

50

アルツハイマー病 (AD) は、老人性痴呆をもたらす進行性疾患である。広く言えば、この疾患は2つの種類：老齢 (典型的には65歳以上) で起こる後期発症および老年期の前、例えば35~60歳でよく発生する早期発症に属する。両タイプの疾患において、病態は同様であるが、異常は、より早齢で始まる場合により重篤でありそして広がる傾向がある。疾患は、脳における2つのタイプの損傷、老人斑および神経原繊維変化 (neurofibrillary tangles) により特徴付けられる。老人斑は、脳組織の切片の顕微鏡解析により見ることができる、中心での細胞外アミロイド沈着物の直径で150nmまでの解体した好中球の区域である。神経原繊維変化はペアにおいてお互いのまわりに撚り合わされた2つのフィラメントからなるタウタンパク質の細胞内沈着物である。

【0016】

老人斑の主成分は、アミロイドベータ (A $\beta$ ) またはベータアミロイドペプチド (A $\beta$  または A $\beta$ ) と呼ばれるペプチドである。アミロイドベータペプチドは、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) と呼ばれる前駆体タンパク質の39~43アミノ酸の内部フラグメントである。APPタンパク質内のいくつかの突然変異は、アルツハイマー病の存在と関連していた (Goate et al., (1991)、パリリン717 がイソロイシンに; Chartier Harlan et al., (1991)、パリリン717 がグリシンに; Murrell et al., (1991)、パリリン717 がフェニルアラニンに; Mullan et al., (1992)、リシン595 - メチオニン596 をアスパラギン595 - ロイシン596 に変える二重突然変異)。

【0017】

このような突然変異は、APPのベータアミロイドへの増加したもしくは変化したプロセッシング、特にAPPの増加した量の長い形態のベータアミロイドへのプロセッシング (即ち、A $\beta$ 1-42 および A $\beta$ 1-43) によりアルツハイマー病を引き起こすと考えられる。プレセニリン遺伝子、PS1 および PS2 などの他の遺伝子における突然変異は、APPのプロセッシングに間接に影響を与えて増加した量の長い形態のベータアミロイドを発生させると考えられる (Hardy, TINS 20, 154, 1997参照)。これらの観察は、ベータアミロイドおよび特にその長い形態がアルツハイマー病における原因の要素であることを示す。

【0018】

アミロイド繊維に関する刊行物は、円筒形ベータシートがX線および電子顕微鏡データのいくらかと合致した唯一の構造でありそしてアルツハイマーA $\beta$ フラグメントおよび変異体の繊維は、多分、2つまたは3つの同心円筒形シートからなることを示す (Perutz et al., 2002)。完全なA $\beta$ ペプチドは、42残基、丁度円筒形シートの核を形成する (nucleate) ための正しい数、を含有し; この発見および、プロリンの不存在下にA $\beta$ ペプチドからなるシートにおける多くの可能な強い静電的相互作用は、A $\beta$ ペプチドのアルツハイマー患者において見出された細胞外アミロイドプラークを形成する傾向の原因となる。もしこの解釈が正しいとすれば、アミロイドは、中心が水で充填されたキャビティーを有する細いチューブ (ナノチューブ) からなる。in-vitroアミロイドプラーク成長の可逆性は、プラーク中のA $\beta$ と溶液中のA $\beta$ との定常状態平衡を示唆する (Maggio and Mantyh, 1996)。ひだ状シートフィブリルを形成するためのペプチド-ペプチド相互作用に対するA $\beta$ 重合の依存性、および反応に対する他のタンパク質の刺激的影響は、アミロイド形成がモデュレーションを受けることができることを示唆する。アミロイド形成を妨害することができる物質を発見するための多くの試みがなされた。中でも最も研究された化合物は、抗体、プロリンのようなベータブレイカーアミノ酸からなるペプチド、認識モチーフへの帯電した基の付加および構築ブロックとしてのN-メチル化アミノ酸の使用である (Gazit, 2002により概説された)。

【0019】

患者におけるアミロイド凝集により特徴付けられた疾患の予防または処置のための方法が提唱され、これは、アミロイド沈着物のペプチド成分に対する抗体が凝集したアミロイドまたは可溶性アミロイドと接触することを引き起こすことを含む。SchenkのWO99/27944およびSolomonのU. S. Patent5,688,651参照。各々の全内容は参照により本明細書に組

10

20

30

40

50

み込まれる。抗体を、能動的ワクチン接種または受動的ワクチン接種により可溶性アミロイドもしくは凝集されたアミロイドと接触させることができる。能動的ワクチン接種においては、可溶性アミロイドおよび/または凝集したアミロイドに結合する抗体を *in vivo* で高めるために、全体アミロイドペプチドまたはその一部であることができるペプチドが投与される。受動的ワクチン接種は、アミロイドペプチドに特異的な抗体を直接投与することを含む。これらの方法は、アミロイドプラークを減少させるかまたはこのようなプラークの沈着速度を遅くすることによりアルツハイマー病の処置のために好ましくは使用される。

#### 【0020】

このような方法を試験するためのワクチンの臨床試験がElan CorporationおよびWyeth-Ayerst Laboratoriesにより着手されたことが報告された。試験されている化合物は、AN-1792であった。この製品は、アミロイド42の形態であることが報告されている。

10

#### 【0021】

本明細書における任意の文献の引用は、このような文献が適切な先行技術であるという承認または本願の特許請求の範囲の特許性に重要であると考えられることの承認であることを意図しない。任意の文献の内容または日付に関する任意の陳述は、出願時点で本出願人入手可能な情報に基づいておりそしてこのような陳述の正しさに関する承認を構成しない。

#### 【0022】

##### 発明の要約

本発明は、プロテインAまたは抗体のFc部分に結合することができるそのフラグメントもしくは変異体を非ネイティブな繊維状バクテリオファージ分子としてその表面にディスプレイする繊維状バクテリオファージ、ならびにプロテインAまたはそのフラグメントもしくは変異体に抗体のFc部分により結合した抗体または抗原-抗体免疫複合体、を含有するファージディスプレイビヒクルを提供する。

20

#### 【0023】

本発明は、治療剤または診断剤として使用するための本発明のファージディスプレイビヒクルを含有する医薬組成物も提供する。

#### 【0024】

脳の疾患、障害または状態を処置/抑制することまたは診断することを必要としている被検体に本発明のファージディスプレイビヒクルを鼻腔内に投与することにより、脳の疾患、障害または状態を処置/抑制するためまたは診断するための方法が本発明により更に提供される。

30

#### 【0025】

##### 発明の詳細な説明

繊維状バクテリオファージは、鼻腔内に投与されるとき脳を透過することを可能とする線形構造を有する。それらはそれらのコートタンパク質上に選別されたタンパク質またはペプチドを提示するように工学的に作成されうるので、それらを使用して抗体または分子(それらの特異的抗体との免疫複合体の形態にある)を哺乳動物被検体の脳に送達することができる。P3は、ファージがバクテリア*Escherichia coli*にそれを通して侵入するファージコートの先端の1つをアセンブリする構造タンパク質である。

40

#### 【0026】

本発明の1つの局面は、プロテインAまたは抗体のFc部分に結合することができるそのフラグメントもしくは変異体を非ネイティブな繊維状バクテリオファージ分子としてその表面にディスプレイする繊維状バクテリオファージを含み、そして更にプロテインAまたはそのフラグメントもしくは変異体にそのFc部分により結合した抗体または抗原-抗体免疫複合体を含む、ファージディスプレイビヒクルに関する。好ましい態様では、繊維状バクテリオファージは、薬物にリンカーを介してまたは直接にコンジュゲーションされておらず、そして抗体または抗原-抗体免疫複合体も固体担体上に固定化されていない

50

。他の好ましい態様では、繊維状バクテリオファージ上にディスプレイされたプロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体に結合した抗体は、細胞表面上にターゲットとして提示されていない分子に対して特異的でありそして抗体は固体担体上に固定化されていない。

【0027】

本発明者の研究所では、構造的レベルおよび遺伝子レベルでよく理解されている繊維状ファージ M13、f1 および fd (Greenwood et al., 1991) が使用された。この研究所は、繊維状バクテリオファージが、ベクターの不活性および外来分子を担持する能力を保存しながら、中枢神経系への透過性を示すことを最初に示した (Frenkel and Solomon, 2002)。

10

【0028】

繊維状バクテリオファージは、環状一本鎖 DNA ゲノムを含有する構造的に関連したウイルスのグループである。それらは、生産的感染期間中それらのホストを殺さない。F プラスミドを含有する *Escherichia coli* に感染するファージは、まとめて Ff バクテリオファージと呼ばれる。それらは哺乳動物細胞を殺さない。

【0029】

繊維状バクテリオファージは、DNA コアを取り囲んでいるタンパク質サブユニットのヘリカルシェルを有する、約 1 ~ 2 ミクロン長さおよび直径 6 nm の柔軟性ロッドである。2 つの主コートタンパク質、タンパク質 pIII および主要コートタンパク質 pVI は、ディスプレイされたタンパク質のコピーの数において異なる。pIII は 4 ~ 5 コピーにおいて提示されるが、pVI は ~ 3000 コピーにおいて見出される。約 50 残基の主要コートタンパク質 pVI サブユニットは、主としてヘリカルでありそしてヘリックスの軸は、ピリオンの軸と小さな角をなす。タンパク質シェルは、3 つの区域：取り囲んでいる溶媒と相互作用しそして低等電点をピリオンに与える酸性残基に富んだサブユニットの N 末端領域により占められた外側表面；タンパク質サブユニットが主としてお互いに相互作用する極性側鎖の 19 残基ストレッチを含むシェルの内側；および DNA コアと相互作用する塩基性残基に富んだサブユニットの C 末端領域により占められた内側表面；とみなされる。実質的にすべてのタンパク質側鎖相互作用は、サブユニット内よりはむしろコートタンパク質アレイにおける異なるサブユニット間にあるという事実は、これを高分子アセンブリにおけるヘリカルサブユニット間の相互作用の研究のための有用なモデルシステムとする。繊維状バクテリオファージは約 16.3 MD の質量を有しているが、その独特の構造は、脳へのその透過を可能とし、そして、ファージ構造はアミロイドフィブリルそれ自体に似ているので、A フィブリル化を妨害するその能力に寄与することができる。

20

30

【0030】

繊維状バクテリオファージは、M13、f1 または fd などの任意の繊維状バクテリオファージであることができる。M13 は下記の実施例で使用されたけれども、任意の他の繊維状バクテリオファージが、同様な方式で機能しそして挙動することが予想される。何故ならば、それらは同様な構造を有しておりそしてそれらのゲノムは 95% より高いゲノム同一性を有するからである。

40

【0031】

本発明に従うファージディスプレイビヒクルにおいて、プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体は、繊維状バクテリオファージの表面にディスプレイされる。このファージディスプレイは、ファージコートタンパク質との融合タンパク質としてプロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体の cDNA クローンの発現を伴う。従って、繊維状バクテリオファージゲノムは、その表面に非ネイティブポリペプチドをディスプレイするように遺伝子的に改変される。ファージコートタンパク質との融合としての外来タンパク質またはペプチドをディスプレイする繊維状バクテリオファージは当技術分野で周知である。M13 タンパク質 III、M13 タンパク質 VI、M13 タンパク質 VII、M13 タンパク質 VIII、および fd 少量コートタンパク質 pI

50

IIを含むがそれらに限定されない種々のファージおよびコートタンパク質を使用することができる(Saggio et al., 1995; Uppala and Koivunen, 2000)。ベクターの大きなアレイが入手可能である(Kay et al., 1996; Berdichevsky et al., 1999; and Benhar, 2001)。好ましい態様では、プロテインAまたはそのフラグメントもしくは変異体は、繊維状ファージの少ないコートタンパク質(タンパク質III)へのその融合によりディスプレイされる。ファージ遺伝子に外来コード配列を挿入するための方法は周知である(例えば、Sambrook et al., 1989; and Brent et al., 2003)。

#### 【0032】

Staphylococcus aureusのプロテインAは周知であり、そして抗体のFc部分に結合するために当技術分野でよく使用される。結合ドメイン(1つまたは複数)を含有するタンパク質のフラグメントも当技術分野でよく認識されている。抗体(免疫グロブリン)のFc部分への改良された結合(または異なるIgクラスおよびサブクラスからのFcへのディファレンシャルな結合)を有するプロテインAの変異体に関する多数の知見もある。好ましくはプロテインAまたはそのフラグメントもしくは変異体に結合される抗体はIgGクラスである。プロテインA変異体の最も好ましい態様は、配列番号4のアミノ酸配列を有する変異体である。

10

#### 【0033】

抗体のFc部分に結合することができるプロテインAまたはそのフラグメントもしくは変異体は、繊維状バクテリオファージの表面にディスプレイされて脳への送達のために抗体または抗原-抗体免疫複合体に結合する。

20

#### 【0034】

本発明は、脳にファージ送達ビヒクルを導入することにより脳の疾患、障害または状態(condition)を抑制または処理するための方法を提供する。更に本方法は、検出されうる、即ち標識されうるファージディスプレイビヒクルを脳に導入することにより脳の疾患、障害または状態を診断するための方法を提供する。本方法は、有効量の本発明のファージディスプレイビヒクルを、導入/投与することを必要としている被検体に導入/投与することを含む。

#### 【0035】

本明細書および特許請求の範囲の目的で、用語「患者」、「被検体」および「レシピエント」は相互交換可能に使用される。それらは、予防処置もしくは治療処置または診断の目的であるヒトおよび他の哺乳動物を含む。

30

#### 【0036】

本明細書および特許請求の範囲の目的で、用語「ベータアミロイドペプチド」は、「アミロイドペプチド」、「アミロイド ペプチド」、「AP」、「A」および「A」と同義である。これらの用語のすべては、アミロイド前駆体タンパク質に由来するプラーク形成ペプチドを指す。好ましい態様では、ファージ表面にディスプレイされたプロテインA(またはそのフラグメントもしくは変異体)に結合した抗体は、アミロイドペプチドに対して特異的である(特異的に結合する)。アミロイドペプチドは、好ましくはA<sub>1-42</sub>またはA<sub>1-40</sub>である。

#### 【0037】

本明細書で使用された、「PrPタンパク質」、「Prp」、「プリオン」は、適当な条件下に、プラーク形成疾患の原因となる凝集物の形成を誘導することができるポリペプチドを指す。例えば、正常な細胞プリオンタンパク質(PrPC)は、このような条件下で、ウシ海綿状脳症(BSE)、または狂犬病、ネコのネコ海綿状脳症、クールー病、クロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病(GSS)および致死的家族性不眠症(FFI)などの(それらに限定されない)プラーク形成疾患の原因となる対応するスクラピーアイソフォーム(PrPSc)に転換される。他の好ましい態様では、抗体は病原性PrPScアイソフォームに対して特異的である。

40

#### 【0038】

50

用語「処置する」は、疾患、障害または状態の進行を実質的に抑制すること、遅くすることまたは逆転させること、疾患、障害または状態の臨床的症候を実質的に改善することまたは、疾患、障害または状態の臨床的症候の出現を実質的に予防することを意味することを意図する。

【0039】

本発明のファージ送達ビヒクルおよび方法は、脳の疾患、障害または状態を指向する。好ましくは、脳の疾患、障害または状態は「プラーク形成疾患」である。

【0040】

用語「プラーク形成疾患」は、早期発症アルツハイマー病（AD）、後期発症アルツハイマー病、前兆アルツハイマー病、SAAアミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、老衰、多発性ミエローマならびに例えば、クールー病、クロイツフェルト-ヤコブ病（CJD）、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー病（GSS）および致死性家族性不眠症（FFI）などの（それらに限定されない）ヒトを冒すことが知られているプリオン病および例えば、スクラピーおよびウシ海綿状脳症（BSE）などの動物を冒すことが知られているプリオン病などの（それらに限定されない）疾患における、アミロイド、血清アミロイドA、シスタチンC、IgG 軽鎖またはプリオンタンパク質などの（それらに限定されない）凝集性タンパク質（プラーク形成ペプチド）によるプラークの形成により特徴付けられた疾患を指す。

【0041】

前記したプラーク形成疾患と関連したアミロイドプラーク（アミロイド沈着物としても知られている）の大部分は、脳内に位置しているので、任意の提唱された処置様式は、血液脳関門（BBB）を横切る能力およびアミロイドプラークを溶解する能力を示さなければならない。普通は、BBBを通過することができる分子の平均サイズは約2 kDaである。

【0042】

増加する数の証拠は、中枢嗅覚経路における嗅覚欠失および変性的変化は、ADの臨床的経過において早期に影響されることを示す。更に、ADに關与した解剖学的パターンは、嗅覚経路がADの進展における初期の段階でありうることを示唆する。

【0043】

嗅覚レセプターニューロンは、鼻腔の上皮ライニングにある二極性細胞である。それらの軸索は、篩状プレート(cribriform plate)を横断しそして脳の嗅球における嗅覚経路の第1シナプスに突き出す。鼻上皮からの嗅覚ニューロンの軸索は1000のミエリンのない繊維の束を形成する。この構成は、それらを、ウイルスまたは他の輸送された物質が血液脳関門（BBB）を横切ってCNSにアクセスすることができるハイウェイとする。

【0044】

前に示されたとおり、鼻腔内投与(Mathison et al, 1998; Chou et al, 1997; Draghia et al, 1995)は、脳脊髄液（CSF）またはCNSへのウイルスおよび高分子の直接侵入を可能とする。

【0045】

脳へのアデノウイルスベクターのための送達点として嗅覚レセプターニューロンの使用は、文献に報告されている。この方法は、報告によれば、見かけの毒性なしに12日間脳におけるレポーター遺伝子の発現を引き起こす(Draghia et al, 1995)。

【0046】

抗体または免疫複合体の直接脳送達は、脳への輸送体として嗅覚ニューロンを使用することによりBBBを横切ることを克服する。嗅覚上皮において、一次嗅覚ニューロンの樹状細胞は、鼻腔と接触しており、そしてこれらのニューロンは、軸索を介して脳の嗅球にも接続されている。嗅覚上皮と接触しているファージは、一次嗅覚ニューロンに取り込まれることができ、嗅球に輸送されることができ、そして脳の他の区域にすら輸送される。

【0047】

10

20

30

40

50

脳腫瘍および脳炎症性疾患、障害または状態も、本発明に従う処置され/抑制されまたは診断される脳の疾患、障害または状態に含まれる。脳炎症は、インタクトな海馬形成における新しいニューロンの基礎的な連続的生成および脳発作に反応して増加した神経組織発生(neurogenesis)の両方において神経組織発生の抑制を引き起こす。神経組織発生の悪化(impairment)は、取り囲んでいる組織に損傷があるかないかにかかわらず、ミクログリア活性化の程度に依存する。脳炎症は、多分、パーキンソン病、リュウイ小体痴呆(Lewy Body Dementia)、A I D S 痴呆コンプレックス、外傷性脳損傷、緑内障等のようなA P 病理学的効果を含む、A D のほかの他の慢性神経変性障害の病原において多分重要な役割を演じる。

**【0048】**

外傷性脳損傷(T B I)は、アミロイド沈着および痴呆の早期発症を含む。このような記述にもかかわらず、これらの変化が起こる機構に関しては殆ど知られていない。T B Iにおけるアミロイドペプチドの発生について提唱された1つのソースは、外傷により損傷された軸索内の悪化した軸索原形質輸送の部位に蓄積することが示されたアミロイド前駆体タンパク質(A P P)の異常なタンパク分解開裂である。事実、A免疫反応性は、T B Iのブタモデルにおける膨潤した軸索と共に最近見出され(Smith et al., 1999)、これは、外傷的に損傷された軸索におけるA P Pの蓄積がT B Iにおけるアミロイドペプチド形成のためのソースでありうることを示唆する。

**【0049】**

神経変性疾患および障害の非限定的例は、アルツハイマー病(A D)、パーキンソン病、リュウイ小体痴呆、A I D S 痴呆コンプレックス、発作、並びに閉鎖性頭部損傷および外傷性脳損傷、例えば、弾丸傷、出血発作(hemorrhagic stroke)、虚血性発作、脳虚血、毒素、毒物、化学(細菌戦)剤、などの神経損傷剤により引き起こされる損傷または腫瘍切除などの外科手術により引き起こされる損傷を含む。

**【0050】**

好ましい態様では、ファージディスプレイされたプロテインA(またはそのフラグメントもしくは変異体)に結合した抗体は、アミロイドペプチドおよびPr P S cなどの、脳の疾患、障害または状態と関連したターゲット分子に対して特異的なモノクローナル抗体である。抗体は、発作、脳損傷または他の神経変性疾患もしくは障害の結果としての脳炎症を抑制/処置するための、T N F、I L 6等などの脳における炎症性サイトカインに対する抗体であることもできる。脳の疾患、障害または状態として脳腫瘍を診断するための方法の場合に、抗体は、脳腫瘍に特徴的なターゲット分子に対して特異的でありそしてその存在は特定の脳腫瘍の診断となる。

**【0051】**

あるいは、抗体のF c部分により抗原-抗体免疫複合体に結合したプロテインA(またはそのフラグメントもしくは変異体)をディスプレイするファージ送達ビヒクルは、脳に免疫複合体を送達するために使用されうる。免疫複合体における抗体により結合された抗原は、脳の疾患、障害または状態を処置することができる分子である。抗体により結合された抗原の非限定的例は、インスリン、ニューロン損傷および細胞死を減少させることができるエリスロポエチン(E P O)、インターフェロンおよび他の抗炎症性サイトカイン、例えばI L 1 0、および血液脳関門を通過しないニューロン保護分子を含む。

**【0052】**

本発明に従う脳の疾患、障害または状態を診断するための方法は、本発明のファージディスプレイビヒクルを鼻腔内に投与することを必要としている被検体に、本発明のファージディスプレイビヒクルを鼻腔内に投与することを含む。その抗体成分を有するファージディスプレイビヒクルが、脳の疾患、障害または状態と関連したターゲットに結合されると、脳の疾患、障害または状態の存在が検出される。繊維状バクテリオファージの表面にディスプレイされたプロテインA(または抗体のF c部分に結合することができるそのフラグメントもしくは変異体)に結合した抗体は、検出可能に標識されうる。

**【0053】**

標識される抗体は、好ましくは脳腫瘍に対する治療または診断放射線像形成において使用するために放射能標識される。標識のための放射性核種の非限定的例は、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を含む。好ましくは放射性ヨウ素化抗体である放射能標識された抗体は、ペプチドおよびタンパク質を放射能標識するための標準方法により調製され、次いで繊維状バクテリオファージの表面にディスプレイされたプロテインA（またはそのフラグメントもしくは変異体）に結合させられる。

【0054】

他の適当な検出可能な標識は、エンハンスドダイナミックMRI (enhanced dynamic MRI) のための好ましい試薬であるガドリニウム (Gd) などの造影剤および重元素 (例えば、Pt、AuおよびTl) の有機または無機化合物を含む。

10

【0055】

本発明に従う医薬製剤は、有効成分として、本発明のファージディスプレイビヒクルを含む。医薬製剤は、異なる繊維状バクテリオファージからのファージディスプレイビヒクルの混合物であることもできる。

【0056】

本発明に従う製剤は、生物それ自体に投与されうるかまたはそれが適当な担体もしくは賦形剤と混合されている医薬組成物において投与されうる。

【0057】

本明細書で使用された「医薬組成物」は、生理学的に適当な担体および賦形剤などの他の化学成分と本明細書に記載の1つ以上の有効成分の製剤を指す。医薬組成物の目的は、生物への化合物の投与を容易にすることである。

20

【0058】

用語「有効成分」は、生物学的効果の原因となる製剤を指す。診断用途に使用するための医薬組成物の状況において、用語「有効成分」は、脳の疾患、障害または状態に関連した分子をターゲティングする抗体であることを意図する。

【0059】

以後、相互交換可能に使用されうる語句「生理学的に許容されうる担体」および「薬学的に許容されうる担体」は、生物に対する有意な刺激を引き起こさずそして投与された化合物の生物学的活性および性質を妨げない担体または希釈剤を指す。

【0060】

用語「賦形剤」は、有効成分の投与を更に容易にするために医薬組成物に加えられた不活性物質を指す。賦形剤の非限定的例は、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖および種々のタイプのデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールを含む。

30

【0061】

薬物の処方および投与のための技術は、"Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, latest editionにおいて見出され得、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0062】

本発明の医薬組成物は、当技術分野で周知の方法、例えば、慣用の混合、溶解、顆粒化、糖剤製造 (dragee-making)、研和、乳化、カプセル化、エントラッピングまたは凍結乾燥によって製造されうる。

40

【0063】

従って、本発明に従って使用するための医薬組成物は、薬学的に使用されうる製剤への有効成分の加工を容易にする、賦形剤または佐剤を含む1つ以上の生理学的に許容されうる担体を使用して慣用の方式で処方されうる。

【0064】

鼻吸入による投与のために、本発明に従って使用するための有効成分を、適当な推進剤、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または二酸化炭素、の使用により加圧されたバックまたはネブライザーから

50

のエアゾル噴霧組成物の形態で便利に送達される。吸入スプレーにおけるように加圧されたパックまたはネブライザーを必要としない鼻中スプレーが替わりに鼻腔内投与のために使用されうる。加圧されたエアゾルの場合に、投薬単位は、弁を設けて計量された量を送達することにより決定されうる。化合物と適当な粉末基剤、例えばラクトースまたはデンプンの粉末混合物を含有する、ディスペンサーにおいて使用するための例えばゼラチンのカプセル剤およびカートリッジ剤が処方されうる。

【0065】

本発明の状況において使用するために適当な医薬組成物は、有効成分が意図した目的を達成するのに有効な量において含有される組成物を含む。更に詳しくは、治療の有効量は、疾患、障害または状態の症状を予防、軽減または改善するのにまたは処置さされるべき被検体の生存を延長するのに有効な有効成分の量を意味する。

10

【0066】

治療的もしくは診断的有効量の決定は、特に、本明細書に与えられた詳細な開示に照らして、当業者の能力の十分に範囲内にある。

【0067】

投薬量および間隔は、特定の脳疾患、障害または状態を処置または診断するのに十分なファージディスプレイビヒクルの脳レベル（最少有効濃度、MEC）を与えるように個々に調節されうる。MECは、各製剤について変わるであろうが、*in-vitro*データから評価されうる。MECを達成するのに必要な投薬量は個々の特徴に依存するであろう。

20

【0068】

投薬間隔は、MEC値を使用して決定することもできる。製剤は、間隔時間の10~90%、好ましくは30~90%、最も好ましくは50~90%の間MECより高い脳レベルを維持する方式を使用して投与されるべきである。

【0069】

処置されるべき状態の重篤さおよび応答性に依存して、投薬は、数日もしくは数週間続くまたは治癒が達成されるまでもしくは疾患状態の減退が達成されるまで続く処置のクール(course)で、1回または複数回の投与であることができる。

【0070】

投与されるべき組成物の量は、もちろん、処置もしくは診断されるべき被検体、苦痛の重篤さ、処方する医師の判断等に依存するであろう。

30

【0071】

本発明の組成物は、所望により、有効成分を含有する1つ以上の単位剤形を含有することができるパックまたはディスペンサー装置、例えばFDAで認可されたキットにおいて提供されうる。パックは、例えば、金属もしくはプラスチックフォイル、例えばプリスターパックを含むことができる。パックまたはディスペンサー装置は、投与のためのインストラクションを伴うことができる。パックまたはディスペンサーは、医薬の製造、使用または販売を規制する政府機関により規制された形態にある容器と関連した通達により適応させることができ、該通達は、組成物またはヒトもしくは獣医学的投与の形態について政府機関による認可の反映である。このような通達は、例えば、処方箋薬物についてU.S. Food and Drug Administrationにより認可されたラベリングまたは認可された製品インサート(product insert)であることができる。適合性薬学的担体において処方された本発明の製剤を含む組成物を調製し、適当な容器中に入れ、そしてさらに上記したとおり、指示された状態の処置についてラベリングすることができる。

40

【0072】

今や本発明を一般的に説明してきたが、本発明は、説明として与えられそして本発明の限定であることを意図しない下記の実施例を参照することにより容易に理解されるであろう。

【0073】

実施例

50

P 3 上にプロテイン A の変異体をディスプレイする繊維状ファージをこの研究において構築した。以前の研究はこの基本的なアイデアを使用した。異なる方法で使用した：即ち、Li et al. (1998) は、s c F v 分子に融合したプロテイン A の B ドメインをディスプレイするファージを使用した。Djojonegoro et al. (1994) は、M 1 3 ファージ上にディスプレイされたプロテイン A の B ドメインのみを使用し、そして Sampath et al. (1997) は、B ドメインを使用して、繊維状ファージをクローニングツールとして使用することができることを示した。すべてのこれらの以前の研究は、プロテイン A I g G 結合ドメインをヒト I g G s に結合させることにより、ファージディスプレイ技術を使用してファージ上にディスプレイされたプロテイン A の改良された形体の容易な選択を可能とした。この研究において下記に示した実験は、プロテイン A 変異体をディスプレイするファージが主として I g G 1 型のマウス抗体およびそれらのリガンドに結合することを示す。これらの複合体は、鼻腔内適用により h A P P t g マウスに投与された。それらは、マウス脳に入りそして下記で講じる効果を奏した。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 7 4 】

##### 物質および方法

##### プロテイン A 変異体の合成

使用されたプロテイン A の一部は、ドメイン B を含む 4 つの反復ドメインを含有する。2 つのプライマー：A T G コドンおよび N c o I 制限部位を有するフォワードプライマーおよび停止コドンを持たずそして N o t I 制限部位を有するリバースプライマーを合成した ( 図 1 A ) 。下記のプロトコールを使用して P C R を行った：Staphylococcus aureus のゲノム DNA 2  $\mu$ g を、Q i a g e n T a q ポリメラーゼの 1  $\times$  バッファー中の各プライマー 2 0  $\mu$ M と一緒にした。d N T P s ( 0 . 2 mM ) およびポリメラーゼ 2 . 5 単位を 1 0 0  $\mu$ l 反応容積に加えた P C R 条件は：9 4 での 3 分間の初期変性、次いで 9 4 での 3 0 秒間の変性 3 0 サイクル、5 5 での 1 分間のアニーリングおよび 7 2 での 1 分間の重合であった。P C R 産物を N c o I および N o t I で消化し、ゲル精製しそして、N c o I および N o t I で前もって線状化されたベクター p C A N T A B 5 E にクローニングした。このベクターにおけるプロテイン A 遺伝子のこの部分のクローニングは、繊維状ファージ ( M 1 3 ) の遺伝子 3 とのプロテイン A の翻訳融合を発生させた。ヘルパーファージを使用して、ファージ P r o t A と命名されたプロテイン A - P 3 融合物をディスプレイするファージを産生した。

#### 【 0 0 7 5 】

##### E L I S A

異なる I g G 抗体へのファージプロテイン A の結合を、E L I S A により測定した：プロテイン A をディスプレイする 1 0 <sup>11</sup> ファージを、0 . 1 M リン酸ナトリウム、p H 8 . 5 中の抗体 1 0  $\mu$ g ( 1 5 ナノモル ) と混合した。混合物を 3 7 での 3 0 分間穏やかに振とうさせ、次いで 5 0  $\mu$ l アリコート、ウサギ抗ファージ抗体で前もってコーティングされそして 3 % ミルクでブロックされた E L I S A ウェルに四重 ( in tetraplicate s ) 加えた。ヤギ抗マウス - H R P コンジュゲーションされた抗体を二次抗体として使用した。H R P 反応を O P D およびペルオキシドで行った。結果を 4 9 2 nm での O D として示す。

#### 【 0 0 7 6 】

抗原結合後のファージ - プロテイン A - 抗体複合体の安定性を下記の方法によりチェックした：プロテイン A をディスプレイする 1 0 <sup>11</sup> ファージを、0 . 1 M リン酸ナトリウム、p H 8 . 5 中の抗体 1 0  $\mu$ g ( 1 5 ナノモル ) と混合した。混合物を 3 7 での 3 0 分間穏やかに振とうさせ、そしてついで抗原 ( 0 . 3 2 ナノモルのピオチニル化 A 1 - 1 6 ) を、抗体に有利に 5 0 : 1 のモル比で、ファージ - プロテイン A と抗体の混合物に更に 3 0 分間加えた。アリコート ( 5 0  $\mu$ l ) をウサギ抗ファージ抗体で前もってコーティングされそして 3 % ミルクでブロックされた E L I S A ウェルに四重で加えた。アビジン - H R P コンジュゲートを使用して E L I S A プレートに結合した複合体を検出した。まだ抗原に結合しているファージ - 抗体複合体のみがアビジン - H R P コンジュゲートと

反応するであろう。1 : 1000の希釈率でこれらの実験で使用された血清は、ERFHエピトープに対する力価を有するマウスから抜き取られた。

【0077】

異なる量の抗体に結合するのに必要なファージの数を力価測定するために、プロテインAへの最善の結合能力を示した抗体196を使用して、3つの異なる濃度で(50、100および250ng/ウェル)ELISAプレートをコーティングし、次いで3%ミルクでウェルをブロックした。異なる濃度( $10^9$ /ml~ $10^{12}$ /ml)におけるファージ-プロテインAを加えそして結合したファージをウサギ抗ファージ抗体およびヤギ抗ウサギ-HRP抗体により検出した。

【0078】

ファージ-プロテインAへの抗体-抗原複合体の結合を下記のとおり力価測定した： $10^9$ /ml~ $10^{12}$ /mlのファージを、2つの別々の濃度の抗体2H3、10ngまたは50ngおよび1 : 2モル比の抗体：抗原(抗体分子に対して2つの抗原分子)と一緒にした。混合物を、37で30分間穏やかに振とうさせ、そしてウサギ抗ファージ抗体で前もってコーティングされそしてPBS中の3%ミルクでコーティングされたELISAウェルに加えた。結合したファージの検出は、ビオチニル化抗原にのみ結合することができるアビジン-HRPコンジュゲートでなされた。

【0079】

ファージ-プロテイン抗体複合体のPEG沈殿がそれらの解離を引き起こすか起こさないかもチェックした：ELISAウェルを20μg/mlアビジンで40で一夜コーティングし、次いで1μg/mlビオチニル化A1-16ペプチドで室温にて30分間コーティングした。ウェルをPBS中の3%ミルクでブロックした。 $10^{12}$ ファージを、0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1ml中の1μgまたは5μgの抗体196と一緒にし、そして37で1時間穏やかに振とうさせた。混合物の半分をPEG-NaClを使用して沈殿させ、次いで前と同じく0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  500μl中に再懸濁させ、そして他の半分を沈殿させないで使用した。両混合物を前に述べたELISAプレートに37で1時間適用した(50μl混合物/ウェル)。結合したファージの検出をマウス抗ファージおよびヤギ抗マウス-HRPコンジュゲートにより行った。

【0080】

ファージプロテインAは、抗インスリンIgGとの複合体を発生することについてもチェックされた。ファージプロテインA( $10^{12}$ /ml)を異なる濃度の抗インスリン抗体と一緒にしそして37で30分間穏やかに振とうさせた。複合体をPEG沈殿させ、次いで0.25mg/mlインスリンで4で一夜コーティングされたELISAプレートに適用した。結合したファージを、マウス抗ファージおよびヤギ抗マウス抗体によりまたはヤギ抗マウスのみで検出した。この第2の検出法は、抗インスリン抗体がファージプロテインAとともに複合体において実際に存在することを証明するために使用された。

【0081】

*in vivo* 研究

9か月齢PDAPPマウスに、ファージ-プロテインA複合体(Ab196とのまたは抗インスリンAb+インスリンとの)を2週間毎に(4回の処置)、次いで次の6回の処置について1か月毎に、合計10回の処置のために与えた。複合体を、2つの鼻孔により分けて20マイクロリットルを鼻腔内適用により与えた。処置の終りに、マウスを安楽死させそして殺した。各マウスからの左脳半球を液体窒素中で凍結させた。各半球をホモジナイズしそして可溶性画分と不溶性画分に分けた。不溶性画分を後でグアニジン-HClで可溶化した。両画分を分析されるまで凍結して保った。アミロイド1-42は、捕捉抗体およびA1-42に対して特異的な検出抗体を使用して、サンドイッチELISAにより行った。サイトカインレベルの決定は、IL1またはIL10(R&Dシステム)のための特異的キットにより行った。

【0082】

結果および討論

10

20

30

40

50

プロテイン A 変異体を図 1 A に示されたプライマーを使用して合成した。PCR 産物を配列決定してその完全性 (integrity) を証明し、次いで p C A N T A B 5 E にクローニングした。ファージの p I I I に融合したプロテイン A 変異体を発現するファージを産生しそして E L I S A において使用した。

【 0 0 8 3 】

プロテイン A 変異体をディスプレイするするファージは主として I g G 1 抗体に結合する。

p r o t A ファージを、I g G タイプ抗体へのそれらの結合について E L I S A によりチェックした。

図 2 において 1 5 ナノモルの異なる抗体への  $10^{11}$  ファージ粒子の結合が示される。

10

【 0 0 8 4 】

ファージ - p r o t A 結合抗体はそれらがその抗原に結合した後ファージから離脱しない。

抗体は、それらがその抗原への結合の後ファージから解離するかしないかについてチェックされた。抗原として、アミロイドペプチドの N 末端からのアミノ酸残基 1 - 1 6 のピオチニル化ペプチドを使用した。この実験の結果は、図 2 に要約される。この実験について、プロテイン A をディスプレイする  $10^{11}$  ファージを、0 . 1 M リン酸ナトリウム、p H 8 . 5 中の 1 0  $\mu$ g ( 1 5 ナノモル ) の抗体と混合した。混合物を、3 7 °C で 3 0 分間振とうし、次いで抗体に有利に 5 0 : 1 のモル比の抗原 ( 0 . 3 2 モルのピオチニル化 A 1 - 1 6 ) を、追加の 3 0 分間ファージ - プロテイン A と抗体の混合物に加えた。複合体を、ウサギ抗ファージ抗体で前もってコーティングされそして 3 % ミルクでブロックされた E L I S A ウェルに加えた。コンジュゲーションされたアビジン - H R P を使用して、E L I S A プレートに結合した複合体を検出した。抗原の結合後まだ結合しているファージ - 抗体複合体のみがアビジン - H R P コンジュゲートと反応するであろう。これらの実験で使用された血清は E R F H エピトープに対する力価を有するマウスから抜き取られた。

20

【 0 0 8 5 】

図 3 は、プロテイン A が結合した抗体が、それらが認識する抗原に結合するとき、それらはプロテイン A から離脱しないことを示す。プレートに結合したファージ - プロテイン A から離脱する抗体 - 抗原複合体は、洗浄除去されそしてアビジン - H P R と反応しないであろう。図 2 に示されたとおり、1 2 B 4 はファージ - プロテイン A に弱く結合した。それはペプチド 1 - 1 6 に結合しないので、ここでは反応せず、そして他のネガティブコントロールとして使用された。結合結果は、E L I S A プレートが p H 6 . 0 の P B S バッファーで洗浄されるとき、変化しなかった。より低い p H は、ファージ - P r o t A からの抗体 - 抗原複合体の解離を引き起こさなかった。

30

【 0 0 8 6 】

m A b 196 へのプロテイン A の結合の力価測定

異なる量の抗体に結合するのに必要なファージの数は、結合が特異的であることを証明するために力価測定された。この実験において、プロテイン A への最善の結合能力を示した抗体 196 を使用して 3 つの異なる濃度で E L I S A プレートをコーティングし、次いで 3 % ミルクでウェルをブロックした。異なる濃度のファージ - プロテイン A を加えそして結合したファージをウサギ抗ファージ抗体により検出した ( 図 4 ) 。図 4 から、抗体 196 へのファージ - プロテイン A の結合は特異的であることは明らかであり ; それはファージ数および抗体濃度の関数として高められる。この実験セッティングにおいて、飽和した結合は観察されなかつた。プロテイン A をディスプレイするファージの数を評価するために、E L I S A ウェルを高められたファージ濃度でコーティングしそして抗ファージ抗体と反応させた ( 示されていない ) 。この分析と図 4 に示された以前の分析を 4 9 2 における O D を比較することにより、ファージの約 3 0 % ~ 3 6 % がプロテイン A をディスプレイすることが決定され得た。

40

【 0 0 8 7 】

50

ある量のファージ（結合される抗原の量も示すであろう）に結合するのに必要な抗体の量を決定するために、高められた数のファージを2つの別々の濃度の抗体（2H3）と一緒にしそして抗体：抗原のモル比を1：2とした（各抗体分子について2つの抗原分子）他の実験を行った（図5A）。混合物を、前もってウサギ抗ファージ抗体でコーティングさされそしてPBS中の3%ミルクでコーティングされたELISAウェルに加えた。結合したファージの検出を、ビオチニル化抗原にのみ結合することができるアビジン-HRPコンジュゲートにより行った。

**【0088】**

各抗体濃度に対する結合について観察された値は異なるファージ濃度間であまり異ならないので、結果は「平均の平均」として要約することもできそして図5Bに示されたとおりプロットすることもできる。

10

**【0089】**

これらの結果は、抗体濃度がこの実験セッティングにおける限定因子であり、ファージ濃度ではないことを証明する： $10^9$ /mlファージ-プロテインA（ELISAウェル当たり使用された $50\mu\text{l}$ 当たり $5 \times 10^7$ ファージ）で、約70ピコモルである50ngに結合するのに十分なプロテインA分子があり、そしてそれらは5×ファージ-プロテインA分子を飽和させるのに十分ではない。

**【0090】**

PEG-NaCl沈澱は、甚だしいファージ-抗体解離を引き起こさなかった

ファージ-タンパク質A-抗体複合体のPEG沈殿がそれらの解離を引き起こすか引き起こさないかもチェックした。ELISAウェルをアビジンおよび $1\mu\text{g/ml}$ ビオチニル化1-16ペプチドでコーティングした。ウェルをPBS中の3%ミルクでブロックした。 $10^{12}$ ファージを $0.1\text{M Na}_2\text{HPO}_4$ 中の $1\mu\text{g}$ または $5\mu\text{g}$ 抗体196と一緒にしそして $37^\circ\text{C}$ で1時間穏やかに振とうした。混合物の半分をPEG-NaClを使用して沈澱させ、次いで同じバッファーおよび前と同じ容積において再懸濁させ、そして他の半分を沈澱させないで使用した。両混合物を前に記載されたELISAプレート（ $50\mu\text{l}$ 混合物/ウェル）に $37^\circ\text{C}$ で1時間適用した。結合したファージの検出をマウス抗ファージおよびヤギ抗マウス-HRPコンジュゲートで行った。図6は、PEG沈澱が、ファージプロテインA-抗体複合体の約20%を解離させたことを示す。

20

**【0091】**

ファージプロテインAは、抗インスリン抗体とインスリンの免疫複合体に結合する

ファージ-プロテインAを抗インスリンIgGと一緒にしそして複合体を、 $0.25\text{mg/ml}$ インスリンでコーティングされたELISAプレート上で使用した。複合体をELISAプレートに適用される前にPEG沈澱させた。結合したファージをマウス抗ファージおよびヤギ抗マウス抗体で検出するか（図7A）またはヤギ抗マウスのみで検出した（図7B）。この第2の検出法を使用して抗インスリン抗体が実際にファージプロテインAとの複合体中に存在することを証明した。

30

**【0092】**

ファージ-プロテインA（ $10^{12}$ /ml）を異なる濃度の抗インスリン抗体と一緒にしそして $37^\circ\text{C}$ で30分間穏やかに振とうした。複合体を、ELISAプレートに適用される前にPEG沈澱させた。結合したファージをマウス抗ファージで検出し次いでヤギ抗マウス抗体で検出した。

40

**【0093】**

図7Aに示されたのと同様な、しかしヤギ抗マウス抗体のみで検出されたアッセイの結果は、図7Bに示される。

**【0094】**

要約すると、IgGタイプの抗体に結合することができるプロテインAの変異体をディスプレイする繊維状ファージを発生させた。マウスIgG2aおよびIgG2bに強く結合するStaphylococcus aureusのネイティブなプロテインAとは反対に、このリコンビナントプロテインAは、最も豊富なタイプであるマウスIgG1分子によりよく結合する。

50

これらのファージは、抗体を精製するために *in vitro* で使用することができるか、または例えばある種の抗体を脳に送達するのに *in vivo* で使用することができる。

【0095】

*in vivo* 研究

ファージ - protA - 196

ファージ - protA - 196 複合体を、物質および方法の節で説明したとおり、PDAPPトランスジェニックマウスに適用した。可溶性画分および不溶性画分（凝集したペプチドおよびグアニジン - HCl で可溶化された膜）中のアミロイドペプチド 1 - 42 のレベル、ならびに不溶性画分中の A<sub>β</sub> 1 - 40 のレベルをチェックした。トランスジェニック非処理コントロールと比較して、可溶性画分中のおよび不溶性画分中の A<sub>β</sub> 1 - 42 の量の約 20% 減少が処理されたマウスにおいて観察された。しかしながら、結果は有意ではなかった（図 8）。A<sub>β</sub> 1 - 40 において、コントロール非処理サマウスと比較してファージ複合体で処理されたマウス間で差は観察されなかった。

10

【0096】

ファージ - protA - 抗インスリン - インスリン

PDAPPマウスをファージ - 抗体 - インスリン複合体で処理した。図 9A において、不溶性 A<sub>β</sub> 1 - 42 のレベルのより劇的な差、Tg 非処理マウスまたはファージ - 196 複合体で処理されたマウスと比較して、複合体で処理されたマウスにおける約 63% の減少が観察された。ファージのみで処理されたマウスは、A<sub>β</sub> 1 - 42 レベルの平均 23% 減少を伴うにすぎなかった。処理されたマウスにおける可溶性 A<sub>β</sub> 1 - 42 のレベルの減少は、より劇的でありそしてコントロールと比較して 80% に達した（図 9B）。

20

【0097】

IL1、プロ炎症性サイトカインおよび IL10、抗炎症性サイトカインのレベルをチェックした。トランスジェニック非処理マウスにおける IL1 のレベルは、非トランスジェニックマウスにおける IL1 のレベルより約 36% 高かったが（図 10A）、これは、この疾患がより高い IL1 濃度で現れる炎症を引き起こすことを意味している。しかしながら、複合体処理されたマウスは、非トランスジェニックマウスにおける IL1 のレベルと同様なレベルを含有していたが、これは処理されたマウスが脳の炎症を発生しなかったことを示唆する。抗炎症性サイトカイン、IL10 の濃度において同じ現象が観察された（図 10B）。ここで再び、平均して 18% 未満の IL10 を含有していたトランスジェニックコントロールマウスと比較して、非トランスジェニックマウスおよびトランスジェニック処理マウスにおいて IL10 のレベルは同様であった。ファージ - protA - 196 を受け取った PDAPPマウスにおけるサイトカインレベルは、処理されたマウスとトランスジェニックコントロール間で差はなことを示した（データは示されていない）。

30

【0098】

以前の研究は、脳脊髄液区画への物質の直接のアクセスを与えることが知られているインスリン投与の鼻腔内経路により記憶機能に対するインスリンの効果を急激に改善する効果を示唆した (Strachan, 2005)。先の結果は、辺縁および海馬領域におけるインスリンレセプターの普及、ならびに全身系インスリンによる記憶の改善を示す。インスリンをファージと組み合わせて、増加した数のファージが脳に導入されてアミロイドの過酷な負荷 (amyloid burden) の有効な減少をもたらすことを証明した。この効果は、脳におけるサイトカインプロフィルの改善を伴う。この蓄積効果は、ファージの抗凝集性 + AD の保護的処理としてインスリンを介するより良好な透過を得るのに有効な方法であることができる。

40

【0099】

今や本発明を完全に記述してきたが、本発明は、本発明の精神および範囲から逸脱することなくかつ過度の実験なしに、広い範囲の同等なパラメーター、濃度および状態の範囲内で同じことが行われうることは、当業者により認められるであろう。

【0100】

50

本発明は、その特定の態様に関して述べられたが、それは更に改変されうることは理解されるであろう。本願は、一般に、本発明の原理に従う、そして本発明が属する技術分野内の既知の実施または慣用の実施内に入るような、そして特許請求の範囲に示された本質的な特徴に適用されうるような、本発明の開示からの逸脱を含む、本発明の任意の変更、使用または適応を包含することを意図する。

【0101】

引用された文献中に提示されたすべてのデータ、表、図面およびテキストを含む、雑誌論文またはアブストラクト、公開されたもしくは対応するU.S.もしくは外国特許出願、発行されたU.S.特許もしくは外国特許、または任意の他の文献を含む本明細書で引用されたすべての参考文献は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。更に、本明細書に引用された参考文献内に引用された参考文献の全体の内容も、参照により完全に組み込まれる。

10

【0102】

既知の方法の工程、慣用の方法の工程、既知の方法もしくは慣用の方法の参照は、本発明のいかなる局面、説明または態様も、当該技術において開示され、教示されまたは示唆されていることを承認するものでは決してない。

【0103】

特定の態様の前記説明は、本発明の一般的性質を、他の人々が、当技術分野の熟練内の知識（本明細書に引用された参考文献の内容を含む）を適用することにより、過度の実験なしに、本発明の一般的概念から逸脱することなく、このような特定の態様を、種々の用途のために容易に改変および/または適合させることができるように、完全に本発明の一般的性質を明らかにするであろう。したがって、このような適合および改変は、本明細書に提示された教示および手引きに基づいて開示された態様の均等物の意味および範囲内にあることを意図する。本明細書における語句および用語は、説明の目的であって限定の目的ではなく、したがって、本明細書の利用または語句は、当業者の知見と組み合わせ、本明細書に提示された教示および手引きに照らして当業者により解釈されるべきであることは理解されるべきである。

20

【0104】

## 【表 1】

## 参考文献

- Adzamil et al., *Inves. Radiol.* 26(2):143-8, 1991
- Benhar et al., Phage display of single-chain antibodies. In: J. Colligen (Ed), *Current Proteocols in Immunology*, Vol. 10.19B, John Wiley & Sons, Inc, USA (2001)
- Berdichevsky et al., *J. Immunol. Methods*, 228:151-62 (1999) 10
- Bluthner et al, "Mapping of epitopes recognized by PM/Sc1 autoantibodies with gene-fragment phage display libraries", *J Immunol Methods* 198:187-198 (1996)
- Bonnycastle et al., "Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *J Mol Biol.*, 24;258(5):747-62 (1996)
- Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc. (2003)
- Caughey et al, "Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy", *Biochemistry* 30:7672-7680 (1991) 20
- Chartier Harlan et al, *Nature* 353:844 (1991)
- Chou et al, *Biopharm Drug Dispos.* 18(4):335-46 (1997)
- Cortese et al, "Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage", *Trends Biotechnol* 12:262-267 (1994)
- Cortese et al, "Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage", *Curr Opin Biotechnol* 6:73-80 (1995) 30
- Cortese et al, "Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries. *Curr Opin Biotechnol* 7:616-621 (1996)
- Cwirla et al, "Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands", *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6378-6382 (1990)
- De Gioia et al, "Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein", *J Biol Chem* 269:7859-7862 (1994) 40

- Djojonegoro BM, Benedik MJ, Willson RC., "Bacteriophage surface display of an immunoglobulin-binding domain of Staphylococcus aureus protein A" *Biotechnology* 12(2):169-72 (1994).
- Dotto et al, "The functional origin of bacteriophage f1 DNA replication: Its Signal and domains", *J Mol Biol* 172:507-521 (1984)
- Dower WJ, "Phage power", *Curr Biol* 2:251-253 (1992) 10
- Draghia et al, *Gene Therapy* 2:418-423 (1995)
- Felici et al, "Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector", *J Mol Biol* 222:301-310 (1991)
- Frenkel et al, "N-terminal EFRH sequence of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide represents the epitope of its anti-aggregating antibodies", *J Neuroimmunology* 88:85-90 (1998)
- Frenkel, D., Solomon, B. and Benhar, I. "Modulation of Alzheimer's beta-amyloid neurotoxicity by site-directed single-chain antibody" *J Neuroimmunol*, 106:23-31 (2000a). 20
- Frenkel, D., Katz, O. and Solomon, B. "Immunization against Alzheimer's  $\beta$ -amyloid plaques via EFRH phage administration" *PNAS* 97(21):11455-11459 (2000b).
- Frenkel, D., Kariv, N. and Solomon, B. "Generation of auto-antibodies towards Alzheimer's disease vaccination" *Vaccine* 19, 2615-2619 (2001).
- Frenkel and Solomon, *PNAS*, 99:5675-5679 (2002) 30
- Gajdusek, *Science* 197:943-960 (1991)
- Gazit E., "Mechanistic studies of the process of amyloid fibrils formation by the use of peptide fragments and analogues: implications for the design of fibrillization inhibitors" *Curr Med Chem.* 9(19):1725-35 (2002)
- Goding JW., "Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent" *J Immunol Methods.* 20:241-53 (1978)
- Goldsmith et al, "Adsorption protein of bacteriophage fd: Isolation, molecular properties, and location in virus", *Biochemistry* 16:2686-2694 (1977) 40

- Goate et al, *Nature* 349:704 (1991)
- Goudswaard J, van der Donk JA, Noordzij A, van Dam RH, Vaerman JP. "Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins" *J Scan Immunol.* 8(1):21-8 (1978)
- Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier JB, Silverman GJ. "Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(10):5399-404 (2000) 10
- Gray et al "Adsorption complex of filamentous fd virus", *J Mol Biol* 146:621-627 (1981)
- Greenwood et al, "Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage", *J Mol Biol* 220:821-827 (1991)
- Hardy, *TINS*, 20:154 (1997)
- Hoess et al, "Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3", *Gene* 128:43-49 (1993) 20
- Holliger et al, "A conserved infection pathway for filamentous bacteriophages is suggested by the structure of the membrane penetration domain of the minor coat protein g3p from phage fd", *Structure* 5:265-275 (1997)
- Hoogenboom, H.R., de Bruine, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M. Arends, J.W. and Roovers, R.C. "Antibody phage display technology and its applications" *Immunotechnology* 4:1-20 (1998). 30
- Horiuchi and Caughey, "Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state", *EMBO J* 18:3193-3203 (1999)
- Iannolo et al., "Modifying filamentous phage capsid: limits in the size of the major capsid protein", *J. Mol. Biol.*, May 12;248(4):835-44 (1995)
- Kay et al, "An M13 phage library displaying 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets", *Gene* 128:59-65 (1993) 40

- Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins, A Laboratory Manual*, Academic Press (1996)
- Kanyo et al, "Antibody binding defines a structure for an epitope that participates in the PrPC-->PrPSc conformational change", *J Mol Biol.* 293:855-863 (1999)
- Kim et al, "Viable deletions of the M13 complementary strand origin", *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6784-6788 (1981)
- Koivunen et al, "Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins", *Biotechnology* 13:265-270 (1995) 10
- Krebber et al, "Co-selection of cognate-antigen pairs by selectively-infective phages", *FEBS Lett* 377:227-231 (1995)
- Li Y, Cockburn W, Whitelam GC, Filamentous bacteriophage display of a bifunctional protein A::scFv fusion. *Mol Biotechnol.* 1998 Jun;9(3):187-93.
- Luzzago et al, "Mimicking of discontinuous epitopes by phage displayed peptides,  $\alpha$ . Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides", *Gene* 128:51-57 (1993) 20
- Maggio JE, Mantyh PW, "Brain amyloid -a physicochemical perspective" *Brain Pathol.* 6(2):147-62 (1996)
- Marvin et al, "Molecular model and structural comparisons of native and mutant class filamentous bacteriophages Ff (fd, f1, M13), f1 and Ke", *J Mol Biol* 235:260-286 (1994)
- Mathison et al, *J. Drug Target*, 5(6):415-441 (1998) 30
- Matthews et al, "Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display", *Science*, 260:1113-1116 (1993)
- McCafferty et al, "Phage enzymes: expression and affinity chromatography of functional alkaline phosphatase on the surface of bacteriophage", *Protein Eng* 4:955-961 (1992)
- McCafferty et al., "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains" *Nature*, 348(6301):552-4 (1990) 40

- Medynski, D. "Phage display: all dressed up and ready to role"  
*Biol Technol* 12, 1134-1136 (1994).
- Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P. et al. "Derivation of vaccines from mimotopes: Immunological properties of human B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage" *J Immuno* 154:3162-3172 (1995).
- Messing J, "New M13 vectors for cloning", *Methods Enzymol* 101:20-78 (1983)
- Model et al, "Filamentous Bacteriophage", in *The Bacteriophages, Calendar R (ed.)*, Plenum Press, New York and London, Vol. 2, p. 375 (1988) 10
- Monaci P., et al., *Curr Opin Mol Ther.*, 3(2):159-69 (2001)
- Moses et al, "Restructuring the bacteriophage f1 genome: Expression of gene VIII in the intergenic space", *Virology* 104:267-278 (1980)
- Mullan et al, *Nature Genet.* 1:345 (1992)
- Murrell et al, *Science* 254:97 (1991) 20
- Pan et al, "Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins", *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10962-10966 (1993)
- Parmley et al, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes", *Gene* 73:305-318 (1988)
- Peretz et al, "A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform", *J Mol Biol* 273:614-622 (1997) 30
- Rasqualini et al, " Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries", *Nature* 380:364-366 (1996)
- Saggio et al., *Gene*, 152:35-39 (1995)
- Sambrook et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)
- Sampath A, Abrol S, Chaudhary VK., "Versatile vectors for direct cloning and ligation-independent cloning of PCR-amplified fragments for surface display on filamentous bacteriophages" *Gene*. 190(1):5-10 (1997) 40

- Schmitz et al, "Catalytic specificity of phosphotyrosine kinases Blk, Lyn, c-Src and Syk as assessed by phage display", *J Mol Biol* 260:664-677 (1996)
- Scott et al, "Searching for peptide ligands with an epitope library", *Science* 249:386-390 (1990)
- Scott, J.K. "Discovering peptide ligands using epitope libraries" *Trends in Biochem Sci*, 241-245 (1992)
- Selvaggini et al, "Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein", *Biochem Biophys Res Commun* 194:1380-1386 (1993) 10
- Silen and Agard, "The alpha-lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain *in vivo*", *Nature* 341:462-464 (1989)
- Smith GP "Surface display and peptide libraries", *Gene* 128:1-2 (1993)
- Smith DH. et al. "Accumulation of Amyloid and Tau and the Formation of Neurofilament Inclusions Following Diffuse Brain Injury in the Pig" *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58(9):982-992 (1999) 20
- Sparks et al, "Identification and characterization of Src SH3 ligands from phage-displayed random peptide libraries", *J Biol Chem* 269:23853-23856 (1994)
- Strachan M. W. J., "Insulin and cognitive function in humans: experimental data and therapeutic considerations" *Biochemical Society Transactions*. 33:1037-1040 (2005) 30
- Sugimoto et al, "Studies on bacteriophage fd DNA. IV. The sequence of messenger RNA for the major coat protein gene", *J Mol Biol* 111:487-507 (1977)
- Tagliavini et al, "Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils *in vitro*", *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9678-9682 (1993)
- Uppala and Koivunen, *Chem. High Throughput Screen*, 3:373-392 (2000)

Van Wezenbeek et al, "Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd", *Gene* 11:129-148 (1980)

Wilesmith and Wells, *Curr Top Microbiol Immunol* 172:21-38 (1991)

Willis et al., "Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage", *Gene* 128:79-83 (1993)

Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R. "Making antibody by phage display technology" *Annu Rev Immunol* 12:433-455 (1994). 10

Wrighton et al, "Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin", *Science* 273:458-463 (1996)

Zacher et al, "A new filamentous phage cloning vector: fd-tet", *Gene* 9:127-140 (1980)

【図面の簡単な説明】

【0105】

20

【図1A】プロテインA変異体のPCR合成のために使用された、プライマーProtA-fwd(配列番号1)およびProtA-rev(配列番号2)を示す。図1Bは、プロテインA変異体のヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。図1Cは、プロテインA変異体のアミノ酸オープンリーディングフレームを示す(配列番号4)。

【図1B】プロテインA変異体のPCR合成のために使用された、プライマーProtA-fwd(配列番号1)およびProtA-rev(配列番号2)を示す。図1Bは、プロテインA変異体のヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。図1Cは、プロテインA変異体のアミノ酸オープンリーディングフレームを示す(配列番号4)。

【図1C】プロテインA変異体のPCR合成のために使用された、プライマーProtA-fwd(配列番号1)およびProtA-rev(配列番号2)を示す。図1Bは、プロテインA変異体のヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。図1Cは、プロテインA変異体のアミノ酸オープンリーディングフレームを示す(配列番号4)。 30

【図2】ファージ-プロテインAがIgG1タイプの抗体(196、10D5、6C6および2H3)に結合することを示すグラフである。それはIgG2a(3D6)にも結合しそしてIgG2b(12B4)にも弱く結合する。

【図3】A1-16に対するファージ-ProtA結合抗体は、一旦それらがA1-16に結合するとプロテインAから離脱しないことを示すグラフである。

【図4】mAb196に結合しているファージ-ProtA1の力価測定を示すグラフである。

【図5A】図5Aおよび5Bは2つの別々の濃度の抗体2H3によるファージの力価測定を示すグラフである。 40

【図5B】図5Aおよび5Bは2つの別々の濃度の抗体2H3によるファージの力価測定を示すグラフである。

【図6】PEG沈殿の後の抗体196からのファージプロテインA解離をチェックするためのELISAの結果を示すグラフである。処理は、1、5μg196と組み合わせたファージ-プロテインAおよびPEG沈殿；2、PEG沈殿なしで1と同じ；3、抗体196のみ-PEG沈殿；4、3における同じであるが、PEG沈殿なし；4、抗体なしかつPEG沈殿なしのファージ-プロテインAのみ。

【図7A】図7Aおよび7Bは、インスリンに対するファージ-ProtA-抗インスリンの結合(図7A)およびヤギ抗マウス抗体で検出されたファージ-ProtA-インスリン 50

- 抗インスリン免疫複合体の結合 (図 7 B) を示すグラフである。

【図 7 B】図 7 A および 7 B は、インスリンに対するファージ - P r t A - 抗インスリンの結合 (図 7 A) およびヤギ抗マウス抗体で検出されたファージ - P r t A - インスリン - 抗インスリン免疫複合体の結合 (図 7 B) を示すグラフである。

【図 8】ファージ複合体で処理されたマウスおよびコントロール非処理マウスにおける可溶性および不溶性 A 1 - 4 2 および不溶性 A 1 - 4 0 のレベルを比較するグラフである。

【図 9 A】図 9 A および 9 B は、非処理コントロールマウスと比較したファージ - 1 9 6 複合体で処理された P D A P P マウスにおける不溶性および可溶性 A 1 - 4 2 のレベルを示すグラフである。

【図 9 B】図 9 A および 9 B は、非処理コントロールマウスと比較したファージ - 1 9 6 複合体で処理された P D A P P マウスにおける不溶性および可溶性 A 1 - 4 2 のレベルを示すグラフである。

【図 1 0 A】図 1 0 A および 1 0 B は、複合体で処理されたマウスおよび非トランスジェニックマウスおよびトランスジェニックコントロールマウスにおける I L 1 および I L 1 0 のサイトカインレベルを示すグラフである。

【図 1 0 B】図 1 0 A および 1 0 B は、複合体で処理されたマウスおよび非トランスジェニックマウスおよびトランスジェニックコントロールマウスにおける I L 1 および I L 1 0 のサイトカインレベルを示すグラフである。

10

【図 1 A】

ProtA-fwd

5'- CATGCCATGGATCAACAAGCGCCTTCTATG

NcoI 部位は下線を施されている

ProtA-rev

5'- ATAAGAATGCGGCCGCAGGCTTGTGTTGTCTTCCTC

Not I 部位は下線を施されている

【図 1 B】

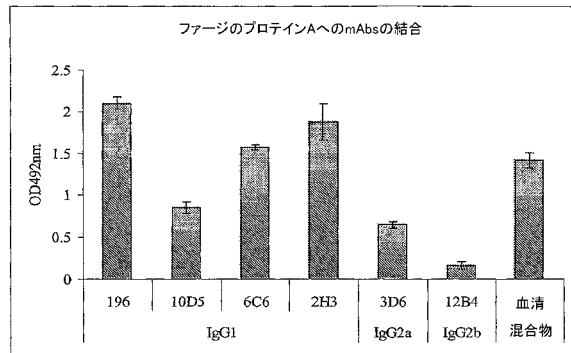
Figure 1B

Atcaacaag cgctttotat gaaatcttgaa catgctaac ttaaacgaag agcaa
cgcaatggtt tcattcaag tcattcaag gatccaagc aaagcaactaa
cgtttaggt gaagctaaaa aattaacaaga atctcaagca cggaaagctg
acaacaattt caacaagaag caacaagaatg cttctatga aatcttgaac
atgcctaact tgaacgaaga acaacgcaat ggttcaacc aaagctaaa
agatgaccca agtcaagtg ctaaccttt agcgaagct aaaaagttaa
atgaactca agcaccgaaa gctgataaca aattcaacaa agaacaaca
aatgctttct atgaaatctt acattacct aacttaaatg aagaacaag
caatggttc atccaagct taaaagatga cccaagcca agcgtcaac
tttagcaga agctaaaaag ctaaatgatg cacaagcacc aaaagctgac
acaattca acaagaaca acaaatgct ttctatgaaa tttacattt
acctaacta actgaagac aacgtaacgg ctctcatcoba agccttaag
acgatccttc agtgagcaa gaaattttag cagaagctaa aaagctaac
gatgctcaag caccaaaaga ggaagacaac acaagcct

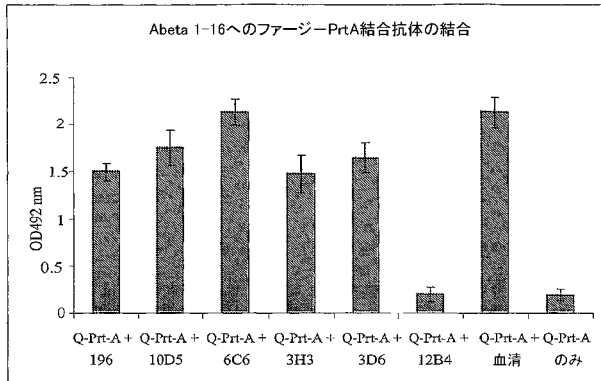
【図 1 C】

M- CQSNFYELIIMFNIIEQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLIGAKKINISQAPKAEENFNK
EQQNIFYELIIMFNIIEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLEAKKINISQAPKADNKNFK
EQQNIFYELIHLFNIIEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLEAKKINDAQAPEADNKNFK
EQQNIFYELIHLFNIIEQRNGFIQSLKDDPSVSKELIIEAKKINDAQAPEADNKNP-AAA-
ファージのタンパク質

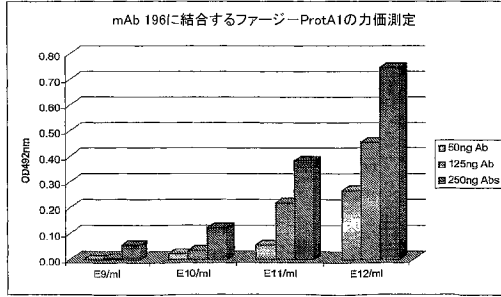
【図 2】



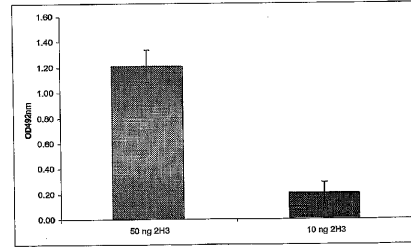
【図 3】



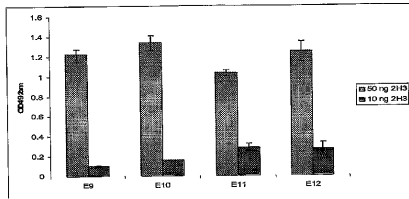
【 図 4 】



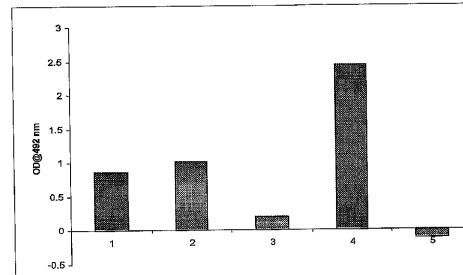
【 図 5 B 】



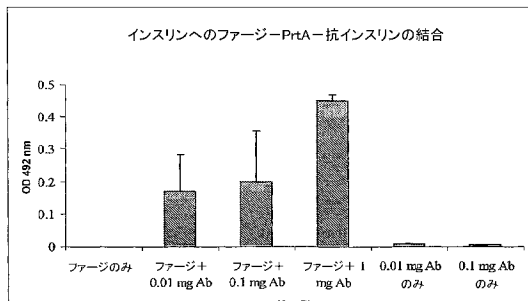
【 図 5 A 】



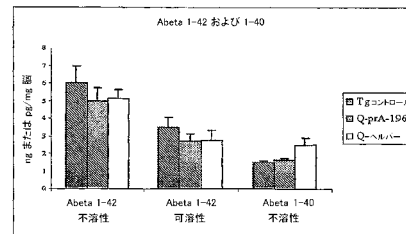
【 図 6 】



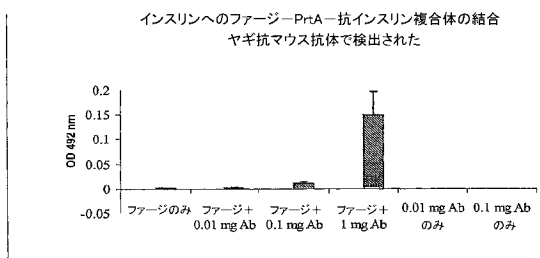
【 図 7 A 】



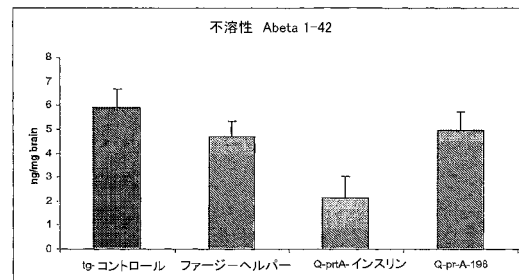
【 図 8 】



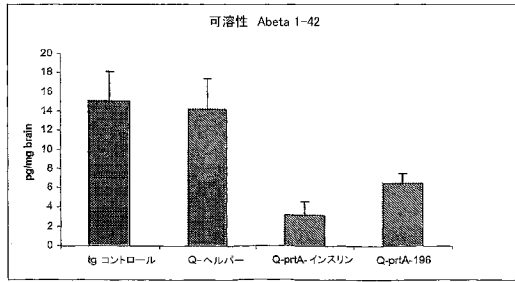
【 図 7 B 】



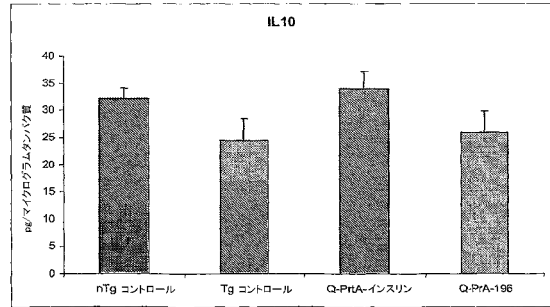
【 図 9 A 】



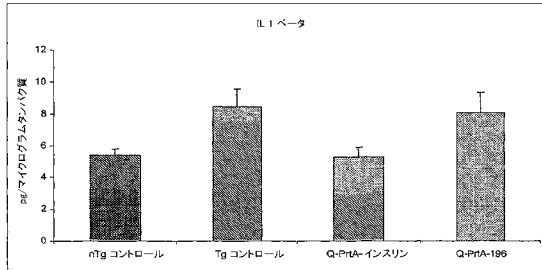
【図9B】



【図10B】



【図10A】



【手続補正書】

【提出日】平成20年10月16日(2008.10.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

プロテイン A または抗体の Fc 部分に結合することができるそのフラグメントもしくは変異体を非ネイティブな繊維状バクテリオファージ分子としてその表面にディスプレイする繊維状バクテリオファージ、ならびに該プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体にその Fc 部分により結合した抗体または抗原-抗体免疫複合体、を含むファージディスプレイビヒクルであって、但し、該繊維状バクテリオファージは薬物にリンカーを介してまたは直接コンジュゲーションされておらず、そして該抗体または免疫複合体も固体担体上に固定化されていない、ファージディスプレイビヒクル。

【請求項2】

繊維状バクテリオファージが M13、f1 および fd バクテリオファージおよびそれらの任意の混合物からなる群より選ばれる、請求項1に記載のファージディスプレイビヒクル。

【請求項3】

繊維状バクテリオファージが M13 である、請求項1に記載のファージディスプレイビヒクル。

【請求項4】

抗体が IgG クラスである、請求項1に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 5】

前記プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体に結合した抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 6】

前記モノクローナル抗体が、A 1 - 42 または A 1 - 40 のアミロイド ペプチドに対して生じたモノクローナル抗体または該アミロイド ペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体である、請求項 5 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 7】

前記モノクローナル抗体が、脳の疾患、障害または状態と関連したターゲット分子に対して特異的である、請求項 5 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 8】

前記脳の疾患、障害または状態がプラーク形成疾患または障害である、請求項 7 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 9】

前記モノクローナル抗体が標識されている、請求項 7 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 10】

前記プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体に結合した前記免疫複合体が、インスリンと抗インスリン抗体の免疫複合体である、請求項 1 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 11】

前記繊維状バクテリオファージの表面にディスプレイされた前記非ネイティブな繊維状バクテリオファージ分子が、抗体または抗原 - 抗体免疫複合体に結合した、プロテイン A または抗体の Fc 部分に結合することができるそのフラグメントもしくはその変異体からなる、請求項 1 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 12】

プロテイン A または抗体の Fc 部分に結合することができるそのフラグメントもしくは変異体を非ネイティブな繊維状バクテリオファージ分子としてその表面にディスプレイする繊維状バクテリオファージ、ならびに該プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体にその Fc 部分により結合した抗体、を含むファージディスプレイビヒクルであって、該抗体が細胞表面にターゲットとして提示されていない分子に対して特異的であり、但し、該抗体は固体担体上に固定化されてもいない、ファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 13】

繊維状バクテリオファージが M13、f1 および fd バクテリオファージおよびそれらの任意の混合物からなる群より選ばれる、請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 14】

繊維状バクテリオファージが M13 である、請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 15】

抗体が IgG クラスである、請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 16】

前記プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体に結合した抗体がモノクローナル抗体である、請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 17】

前記モノクローナル抗体が、A 1 - 42 または A 1 - 40 のアミロイド ペプチドに対して生じたモノクローナル抗体または該アミロイド ペプチドに対して特異的なモノクローナル抗体である、請求項 16 に記載のファージディスプレイビヒクル。

## 【請求項 18】

前記モノクローナル抗体が、脳の疾患、障害または状態と関連したターゲット分子に対

して特異的である、請求項 16 に記載のファージディスプレイビヒクル。

【請求項 19】

前記脳の疾患、障害または状態がプラーク形成疾患または障害である、請求項 18 に記載のファージディスプレイビヒクル。

【請求項 20】

請求項 1 または請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクルと、薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤または佐剤を含む医薬組成物。

【請求項 21】

脳の疾患、障害または状態を処置または抑制することを必要としている被検体に有効量の請求項 1 または請求項 12 のファージディスプレイビヒクルを鼻腔内に投与して、脳の疾患、障害または状態を抑制または処置することを含む、脳の疾患、障害または状態を処置または抑制するための方法。

【請求項 22】

前記脳の疾患、障害または状態がプラーク形成疾患または障害である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

プラーク形成疾患または障害がアルツハイマー病である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

ファージディスプレイビヒクル上にディスプレイされた前記プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体に結合した抗体が、アミロイド ペプチドに対して特異的な抗体である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記抗体がアミロイド ペプチド 1 - 42 または 1 - 40 に対して特異的である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

プラーク形成疾患がプリオン病である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 27】

前記脳の疾患、障害または状態が脳腫瘍である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 28】

前記脳の疾患、障害または状態が、脳炎症性疾患、障害または状態である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 29】

被検体が哺乳動物である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 30】

被検体がヒトである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 31】

前記プロテイン A またはそのフラグメントもしくは変異体に結合した前記免疫複合体が、インスリンと抗インスリン抗体の免疫複合体である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 32】

脳の疾患、障害または状態を診断することを必要としている被検体に請求項 1 または請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクルを鼻腔内に投与し；そしてファージディスプレイビヒクルを、脳の疾患、障害または状態と関連したターゲット分子に結合したその抗体成分により検出して、脳の疾患、障害または状態の存在を診断することを含む、脳の疾患、障害または状態を診断するための方法。

【請求項 33】

抗体が検出可能に標識される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

抗体が、放射性核種により検出可能に標識されている、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

抗体が造影剤で検出可能に標識されている、請求項 33 に記載の方法。

**【請求項 36】**

前記抗体が、IL-6 に特異的である、請求項 1 または請求項 12 に記載のファージディスプレイビヒクル。

**【請求項 37】**

前記抗体が、IL-6 に特異的である、請求項 20 に記載の医薬組成物。

**【請求項 38】**

前記抗体が、IL-6 に特異的であり、前記脳炎症が、発作、脳損傷または他の神経変性疾患の結果である、請求項 28 に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/062238

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. A61K39/00 C12N15/10 A61P3/06		
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) C12N A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, PAJ, WPI Data, 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.
X	DJOJONEGORO B M ET AL: "BACTERIOPHAGE SURFACE DISPLAY OF AN IMMUNOGLOBULIN-BINDING DOMAIN OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS PROTEIN A" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 12, no. 2, February 1994 (1994-02), pages 169-172, XP002945519 ISSN: 0733-222X the whole document ----- -/--	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts 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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 September 2007		09/10/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Lechner, Oskar

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/062238

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUSHWAHA A ET AL: "Construction and characterization of M13 bacteriophages displaying functional IgG-binding domains of Staphylococcal protein A" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 151, no. 1, 30 December 1994 (1994-12-30), pages 45-51, XP004042612 ISSN: 0378-1119 the whole document	1-20
A	US 2004/013647 A1 (SOLOMON BEKA [IL] ET AL) 22 January 2004 (2004-01-22) the whole document	1-35
A	FRENKEL DAN ET AL: "Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 16 APR 2002, vol. 99, no. 8, 16 April 2002 (2002-04-16), pages 5675-5679, XP002451994 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-35
A	MIE MASAYASU ET AL: "Intracellular delivery of antibodies using TAT fusion protein A." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 24 OCT 2003, vol. 310, no. 3, 24 October 2003 (2003-10-24), pages 730-734, XP004461154 ISSN: 0006-291X the whole document	1-35
A	BANKS WILLIAM A ET AL: "Passage of amyloid beta protein antibody across the blood-brain barrier in a mouse model of Alzheimer's disease." PEPTIDES (NEW YORK), vol. 23, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 2223-2226, XP002451995 ISSN: 0196-9781 the whole document	1-35
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2007/062238
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MURUGANANDAM ARUMUGAM ET AL: "Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY FEB 2002, vol. 16, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 240-242, XP002451996 ISSN: 1530-6860 the whole document	1-35
A	LEE C V ET AL: "Bivalent antibody phage display mimics natural immunoglobulin" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 284, no. 1-2, January 2004 (2004-01), pages 119-132, XP004485591 ISSN: 0022-1759	1-35
A	GEYLIS ET AL: "Immunotherapy of Alzheimer's disease (AD): From murine models to anti-amyloid beta (Abeta) human monoclonal antibodies" AUTOIMMUNITY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 5, no. 1, January 2006 (2006-01), pages 33-39, XP005203566 online: 1.8.2005 ISSN: 1568-9972	1-35
A	LI Y ET AL: "FILAMENTOUS BACTERIOPHAGE DISPLAY OF A BIFUNCTIONAL PROTEIN A: SCFV FUSION" MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, TOTOWA, NJ, US, vol. 9, no. 3, June 1998 (1998-06), pages 187-193, XP009078465 ISSN: 1073-6085 the whole document	1-35

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2007/062238**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2007 /062238

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

Continuation of Box II.1

Although claims 21-22 are directed to a method of treatment of the human/animal body by surgery, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 32-35 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2007/062238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004013647	A1	22-01-2004	NONE

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	P
	G 0 1 N 33/536	B
	G 0 1 N 33/536	E

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 コーエン・クピーク, レイチェル

イスラエル国、6 9 6 4 3 テルアビブ、アハロン・ベイカー・ストリート・ナンバー 3 / 1 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA01 DA06 EA03 HA01  
 4B065 AA98X AB01 BA21 CA25 CA44  
 4C085 AA13 AA14 AA19 BB36 CC08 CC22 CC23 EE05 GG10  
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA13 MA59 NA10 NA13 NA14 ZA01  
 ZA02 ZA16 ZB11 ZB26  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA21 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009529320A5</a>	公开(公告)日	2009-12-10
申请号	JP2008555489	申请日	2007-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	特拉维夫大学拉莫特有限公司		
申请(专利权)人(译)	拉莫特在特拉维夫大学		
[标]发明人	ソロモンベカ コーエンクピークレイチエル		
发明人	ソロモン,ベカ コーエン・クピーク,レイチエル		
IPC分类号	C12N7/00 C07K16/18 C12N15/09 A61K35/76 A61P25/00 A61P25/28 A61K39/395 A61P35/00 A61P29/00 G01N33/53 G01N33/536		
CPC分类号	A61K39/0007 A61K2039/543 A61P25/00 A61P25/28 A61P29/00 C07K16/18 C07K16/26 C07K2317/77 C07K2319/735 C12N7/00 C12N15/1037 C12N2795/00042		
FI分类号	C12N7/00.ZNA C07K16/18 C12N15/00.A A61K35/76 A61P25/00 A61P25/28 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P29/00 G01N33/53.P G01N33/536.B G01N33/536.E		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/HA01 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/BA21 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB36 4C085/CC08 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE05 4C085/GG10 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA13 4C087/MA59 4C087/NA10 4C087/NA13 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA02 4C087/ZA16 4C087/ZB11 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 田畑幸四郎		
优先权	60/773320 2006-02-15 US		
其他公开文献	JP2009529320A		

#### 摘要(译)

本发明是丝状噬菌体在其表面上显示的其片段或变体可以结合到蛋白A或抗体作为非丝状噬菌体分子的Fc部分，以及蛋白质A或其片段或变体包含通过其Fc部分结合的抗体或抗原 - 抗体免疫缀合物至噬菌体展示载体。噬菌体展示载体可以配制成药物组合物并用于治疗/抑制或诊断脑中的疾病，病症或病症。