

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5249482号
(P5249482)

(45) 発行日 平成25年7月31日 (2013. 7. 31)

(24) 登録日 平成25年4月19日 (2013. 4. 19)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/18 (2006. 01)

C O 7 K 16/18 Z N A

C 1 2 P 21/08 (2006. 01)

C 1 2 P 21/08

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 P 25/28 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

A 6 1 P 25/28

請求項の数 32 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-503623 (P2001-503623)
 (86) (22) 出願日 平成12年6月15日 (2000. 6. 15)
 (65) 公表番号 特表2003-506321 (P2003-506321A)
 (43) 公表日 平成15年2月18日 (2003. 2. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/016551
 (87) 国際公開番号 W02000/077178
 (87) 国際公開日 平成12年12月21日 (2000. 12. 21)
 審査請求日 平成19年6月15日 (2007. 6. 15)
 (31) 優先権主張番号 60/139, 408
 (32) 優先日 平成11年6月16日 (1999. 6. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501484091
 ボストン・バイオメディカル・リサーチ・
 インステイテユート
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州 O 2 4 7
 2 ウォータータウン・グローブストリート
 6 4
 (74) 代理人 110000741
 特許業務法人小田島特許事務所
 (72) 発明者 ラソ, ビクター
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州 O 2 1 3
 5 ブライトン・ストラスモアロード 6 9 ビ
 ー

審査官 小暮 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インビボのβ-アミロイドレベルの免疫学的制御

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

予め定められたアミド結合においてβ-アミロイドの加水分解を触媒する抗体であって、加水分解中にβ-アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体で非ヒト動物を免疫感作することを含む方法により生産されたものであること、かつ、遷移状態類似体がスタチン類似体を含むことを特徴とする、上記の抗体。

【請求項 2】

β-アミロイドの残基 3 9 と 4 0 の間のアミド結合の加水分解を触媒する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

β-アミロイドの残基 4 0 と 4 1 の間のアミド結合の加水分解を触媒する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

β-アミロイドの残基 4 1 と 4 2 の間のアミド結合の加水分解を触媒する請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

予め定められたアミド結合における加水分解中にβ-アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体に優先的に結合し、しかも E L I S A を使用して検出するために十分な親和性で天然のβ-アミロイドにも結合する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

予め定められたアミド結合における加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体に優先的に結合し、そしてE L I S Aを使用して検出するために十分な親和性で天然の β -アミロイドに結合しない、請求項1に記載の抗体。

【請求項7】

血液脳関門をわたる能力および予め定められたアミド結合における β -アミロイドの加水分解を触媒する能力を特徴とし、かつ、加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体で非ヒト動物を免疫感作することを含む方法により生産されたものであること、および遷移状態類似体がスタチン類似体を含むことを特徴とする、ベクター化された抗体。

【請求項8】

二重特異性抗体である、請求項7に記載のベクター化された抗体。

【請求項9】

トランスフェリンレセプターに対する第1の特異性および加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態に対する第2の特異性を有する、請求項8に記載のベクター化された抗体。

【請求項10】

残基39と40の間の β -アミロイドアミドの加水分解を触媒する請求項9に記載のベクター化された抗体。

【請求項11】

有効成分として、 β -アミロイドに特異的な抗体を含んで成る動物の血流中の遊離 β -アミロイドを隔絶するための製薬学的製剤であって、該抗体が予め定められたアミド結合における加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体で非ヒト動物を免疫感作することを含む方法により生産されたものであり、遷移状態類似体がスタチン類似体を含むものであり、かつ、該抗体が動物の循環中の β -アミロイドの停留を増加させるために動物に静脈内投与されるものであることを特徴とする、上記の製薬学的製剤。

【請求項12】

動物の血流中の遊離 β -アミロイドを隔絶するための製薬学的製剤であって、有効成分として、内因性 β -アミロイド上に存在するエピトープを含有する抗原および予め定められたアミド結合における加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体で非ヒト動物を免疫感作することを含む方法により生産された抗体を含んでなり、該遷移状態類似体がスタチン類似体を含むものであり、該抗原が内因性 β -アミロイドに結合する抗体を生成するために動物を免疫感作するのに使用されるものである、ことを特徴とする上記の製薬学的製剤。

【請求項13】

有効成分として、内因性の β -アミロイドに特異的な抗体を含んで成る動物の脳内の β -アミロイドレベルを低下させるための製薬学的製剤であって、該抗体が予め定められたアミド結合における加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体で非ヒト動物を免疫感作することを含む方法により生産されたものであり、遷移状態類似体がスタチン類似体を含むものであり、かつ、該抗体が動物の循環中の β -アミロイドの停留を増加させるために動物に静脈内投与されるものであることを特徴とする、上記の製薬学的製剤。

【請求項14】

β -アミロイドに特異的な抗体が、予め定められたアミド結合で β -アミロイドの加水分解を触媒する触媒抗体である、請求項13に記載の製薬学的製剤。

【請求項15】

抗体がモノクローナルである請求項13に記載の製薬学的製剤。

【請求項16】

抗体がポリクローナルである請求項13に記載の製薬学的製剤。

【請求項17】

抗体が β -アミロイド₁₋₄₃のC-末端上のエピトープを特異的に認識する、請求項13

10

20

30

40

50

に記載の製薬学的製剤。

【請求項 18】

有効成分として、内因性の β -アミロイド上に存在するエピトープを含有する抗原を含んで成る動物の脳内の β -アミロイドレベルを低下させるための製薬学的製剤であって、該抗原がスタチン類似体を含む遷移状態類似体であり、予め定められたアミド結合における加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模するものであり、かつ、該抗原が内因性 β -アミロイドに結合する抗体を生成するために非ヒト動物を免疫感作するのに使用されるものであることを特徴とする、上記の製薬学的製剤。

【請求項 19】

抗原が、スタチン類似体を含む遷移状態類似体であり、かつ、予め定められたアミド結合における加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模するものである、請求項 18 に記載の製薬学的製剤。

10

【請求項 20】

抗原が、 $A\beta_{10-25}$ を含んで成る、請求項 18 に記載の製薬学的製剤。

【請求項 21】

生成した抗体が、天然の β -アミロイドよりも遷移状態類似体に対して高い親和性を有する、請求項 19 に記載の製薬学的製剤。

【請求項 22】

生成した抗体が内因性の β -アミロイドの加水分解を触媒する、請求項 19 に記載の製薬学的製剤。

20

【請求項 23】

有効成分として、内因性の β -アミロイド上に存在するエピトープを含有する抗原を含んで成る動物の脳内の β -アミロイド斑の形成を防止するための製薬学的製剤であって、該抗原がスタチン類似体を含む遷移状態類似体であり、予め定められたアミド結合における加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模するものであり、かつ、該抗原が内因性 β -アミロイドに結合する抗体を生成するために非ヒト動物を免疫感作するのに使用されるものであることを特徴とする、上記の製薬学的製剤。

【請求項 24】

有効成分として、内因性の β -アミロイドポリペプチドの予め定められたアミド結合における加水分解遷移状態の模造物であるエピトープを含有する抗原を含んで成る動物内の循環している β -アミロイドレベルを低下させるための製薬学的製剤であって、該抗原がスタチン類似体を含む遷移状態類似体であり、かつ、該抗原が β -アミロイド加水分解遷移状態に対する抗体を生成するために非ヒト動物を免疫感作するのに使用されるものであることを特徴とする、上記の製薬学的製剤。

30

【請求項 25】

有効成分として、内因性の β -アミロイドの加水分解を触媒する抗体を含んで成る動物内の循環している β -アミロイドレベルを低下させるための製薬学的製剤であって、該抗体が予め定められたアミド結合における加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体で非ヒト動物を免疫感作することを含む方法により生産されたものであり、遷移状態類似体がスタチン類似体を含むものであり、かつ、該抗体が動物に静脈内投与されるものであることを特徴とする、上記の製薬学的製剤。

40

【請求項 26】

有効成分として、予め定められたアミド結合において、動物により生成される β -アミロイドの加水分解を触媒する抗体を含んで成る動物の脳内の β -アミロイドレベルを低下させるための製薬学的製剤であって、該抗体が加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体で非ヒト動物を免疫感作することを含む方法により生産されたものであり、遷移状態類似体がスタチン類似体を含むものであり、かつ、該抗体が動物の血中の β -アミロイドレベルにおいて有意な低下を引き起こすために動物に投与されるものであることを特徴とする、上記の製薬学的製剤。

【請求項 27】

50

有効成分として、予め定められたアミド結合において動物の β -アミロイドの加水分解を触媒する、血液脳関門をわたって細胞輸送することができるベクター化された二重特異性抗体を含んで成る動物の脳内の β -アミロイドレベルを低下させるための製薬学的製剤であって、該抗体が加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体で非ヒト動物を免疫感作することを含む方法により生産されたものであり、遷移状態類似体がスタチン類似体を含むものであり、かつ、該抗体が動物に静脈内投与されるものであることを特徴とする、上記の製薬学的製剤。

【請求項 28】

ベクター化された二重特異性抗体がトランスフェリンレセプターに特異的に結合する、請求項 27 に記載の製薬学的製剤。

10

【請求項 29】

ベクター化された二重特異性抗体が、 β -アミロイドの残基39と40との間のアミド結合の加水分解を触媒する、請求項 27 に記載の製薬学的製剤。

【請求項 30】

有効成分として、予め定められたアミド結合において動物により生成された β -アミロイドの加水分解を触媒する、血液脳関門をわたって細胞輸送することができるベクター化された二重特異性抗体を含んで成る動物の脳内に存在するアミロイド斑を分解するための製薬学的製剤であって、該抗体が加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体で非ヒト動物を免疫感作することを含む方法により生産されたものであり、遷移状態類似体がスタチン類似体を含むものであり、かつ、該抗体が動物の脳内の β -アミロイドレベルに有意な減少を引き起こすために動物に静脈内投与されるものであることを特徴とする、上記の製薬学的製剤。

20

【請求項 31】

有効成分として、予め定められたアミド結合において内因性の β -アミロイドの加水分解を触媒する抗体を含んで成る動物の脳内に存在するアミロイド斑を分解するための製薬学的製剤であって、該抗体が加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体で非ヒト動物を免疫感作することを含む方法により生産されたものであり、遷移状態類似体がスタチン類似体を含むものであり、かつ、該抗体が動物に投与されるものであることを特徴とする、上記の製薬学的製剤。

【請求項 32】

30

β -アミロイドの加水分解を触媒する抗体の生成方法であって、

a) ポリペプチドの予め定められたアミド結合における加水分解遷移状態の立体配置を模するスタチン類似体を有するエピトープを含有し、かつ、 β -アミロイドである抗原を提供する工程、

b) 該加水分解遷移状態に対する抗体を生成するために適当な条件下で、該抗原で非ヒト動物を免疫感作する工程

を含んで成る、上記の抗体の生成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

40

発明の背景

アルツハイマー病は、高齢人口のかなりの部分に影響を及ぼす進行性の、そして最終的には致命的な痴呆の状態である。解剖による決定的診断は、高密度の老人性斑が顕著な神経病理学的な脳の創傷の存在による。これらの細胞外沈着は、新-皮質、海馬および扁桃ならびに髄膜および大脳血管の壁に見いだされる。このような斑の主成分は39~43残基の β -アミロイドペプチドである。各斑が、約20フェントモル(80ピコモル)のこの4 kDaペプチドを含む(Selkoe et al., J. of Neurochemistry 46:1820(1986))。アポリポタンパク質Eおよび微小管結合タウタンパク質により形成される神経細線維のもつれがアルツハイマー病に関係することが多い。

【0002】

50

β -アミロイドは、 β -アミロイド前駆体タンパク質と呼ばれる内在性膜タンパク質から、タンパク質溶解的に開裂される。ヒトのこのタンパク質をコードする遺伝子は、染色体21上に見いだされる (St George-Hyslop et al., *Science* 235:885(1987)、Kang et al., *Nature* 325:733(1987))。多数の培養された細胞および組織 (例えば脳、心臓、脾臓、腎臓および筋肉) がこの β -アミロイド前駆体タンパク質を発現し、そしてまた見かけ上、正常のプロセッシング経路の一部として 4 kDa の β -アミロイドフラグメントを培養基に分泌する。

【 0 0 0 3 】

β -アミロイドまたはそれが形成する斑と、アルツハイマー病との間の絶対的な因果関係を確立することは難しいが、 β -アミロイドの病因的役割を支持する十分な証拠がある。例えばダウン症候群の患者は染色体21の三染色体性により、 β -アミロイド前駆体タンパク質の過剰なコピーを有する (St George-Hyslop et al., *Science* 235:885(1987)、Kang et al., *Nature* 325:733(1987))。彼らは相そうじて早期発生のアルツハイマー病の神経病状を 30 ~ 40 歳で発症する。さらに早期発生の家族性アルツハイマー病は、 β -アミロイド配列内またはそれに隣接して存在する β -アミロイド前駆体タンパク質遺伝子内の突然変異から生じ得る (Hardy, J., *Nature Genetics* 1:233(1992))。これらの観察は、脳内の斑としての β -アミロイドの沈着がその細胞外濃度の上昇により加速されるという知見と一致する (Scheuner et al., *Nature Med.* 2:864(1996))。 β -アミロイドがインビトロおよびインビボの両方で直接的に神経毒性であるという知見 (Kowall et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:7247(1991)) は、斑自体ではなく可溶性の凝集した β -アミロイドが病状を生じる可能性があることを示唆している。

【 0 0 0 4 】

アミロイド斑の形成が結晶化型のメカニズムにより進行し得るという考察が示された (Jarrett et al., *Cell* 73:1055(1993))。このモデルによれば、斑の核形成を開始する種は、42または43アミノ酸長の β -アミロイドである ($A\beta_{1-43}$)。 $A\beta_{1-43}$ または $A\beta_{1-42}$ により形成される速度を決定する核 (rate-determining nucleus) は、ペプチド $A\beta_{1-40}$ またはより短いものをアミロイド沈着へ急速に成長させる原因である。この核形成現象は、 $A\beta_{1-42}$ が動力的に安定な過飽和の $A\beta_{1-40}$ 溶液の瞬間的凝集を引き起こす能力によりインビトロで証明された。この知見は、 $A\beta_{1-40}$ が核形成ペプチド $A\beta_{1-42}$ または $A\beta_{1-43}$ の不存在下では比較的無害であるかもしれないという可能性を導いた。実際には、これらの長いペプチドレベルの上昇が、家族性アルツハイマー病の患者の血液中では見いだされた (Scheuner et al., *Nature Med.* 2:864(1996))。さらに $A\beta_{1-42}$ または $A\beta_{1-43}$ が、多くのアルツハイマー病患者の脳の斑中に沈着する主要な形態となることが分かった (Gravina et al., *J. of Biol. Chem.* 270:7013(1995))。

【 0 0 0 5 】

β -アミロイドが果たす中心的役割を考慮すると、体内のこのような分子の様々なプール間の相互関係を解明することがますます重要になってきた。血液中に存在する遊離 β -アミロイドは、ほとんどが末梢組織中の細胞上に存在する β -アミロイド前駆体タンパク質のタンパク質溶解の開裂により放出されたペプチドから生じるらしい。同様に、脳および脳脊髄液に見いだされる遊離 β -アミロイドのほとんどが、恐らく脳細胞で発現された β -アミロイド前駆体タンパク質のセクレターゼ開裂により放出されたペプチドに由来するのであろう。このペプチドは起源とは無関係に同一であり、そして幾つかの研究結果からこのようなプール間の相互連絡が示唆されている。

発明の要約

本発明の 1 つの観点は、予め定められたアミド結合において β -アミロイドの加水分解を触媒する抗体である。1 つの態様では、抗体は予め定められたアミド結合における加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体に優先的に結合し、そしてまた ELISA を使用して検出するために十分な親和性で自然な β -アミロイドに結合する。別の観点では、抗体は予め定められたアミド結合における加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体に優先的に結合し、そして ELISA を使用して検出す

るために十分な親和性で自然な β -アミロイドには結合しない。生成される抗体は、それらが加水分解するアミド結合が特徴である。特異的抗体には、 β -アミロイドの残基39と40、40と41、および41と42の間のアミロイド結合での加水分解を触媒するものを含む。

【0006】

本発明の別の観点は、血液脳関門をわたる能力および予め定められたアミド結合において β -アミロイドの加水分解を触媒する能力を特徴とする、ベクター化された抗体である。1つの態様では、ベクター化された抗体は二重特異性抗体である。好ましくはベクター化された抗体はトランスフェリンレセプターに対する第1の特異性および加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態に対する第2の特異性を有する。特異的なベクター化された抗体は、 β -アミロイドの残基39と40、40と41、および41と42の間のアミロイド結合での加水分解を触媒するものを含む。

10

【0007】

本発明の別の観点は、循環中の β -アミロイドの停留を増加させるために十分な量で、 β -アミロイドに特異的な抗体を動物に静脈内投与することにより、動物の血流中の遊離 β -アミロイドを隔絶する方法である。この方法の治療的応用には、アルツハイマー病の、またはアルツハイマー病の危険性があると診断された患者を処置することを含む。

【0008】

本発明の別の観点は、内因性 β -アミロイドに結合する抗体を生成するために適切な条件下で、動物に対して内因性の β -アミロイド上に存在するエピトープを含んで成る抗原で動物を免疫感作することにより、動物の血流中の遊離 β -アミロイドを隔絶する方法である。この方法の治療的応用には、アルツハイマー病の、またはアルツハイマー病の危険性があると診断された患者を処置することを含む。

20

【0009】

本発明の別の観点は、動物の循環中の β -アミロイドの停留を増加させるために十分な量で、内因性の β -アミロイドに特異的な抗体を動物に静脈内投与することにより、動物の脳内の β -アミロイドレベルを低下させる方法である。1つの態様では、抗体は予め定められたアミド結合において β -アミロイドの加水分解を触媒する触媒抗体である。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルのいずれかでよい。1つの態様では、抗体は β -アミロイド₁₋₄₃のC-末端上のエピトープを特異的に認識する。

【0010】

30

本発明の別の観点は、内因性の β -アミロイドに結合する抗体を生成するために適切な条件下で、内因性の β -アミロイド上に存在するエピトープを含んで成る抗原で動物を免疫感作することにより、動物の脳内の β -アミロイドレベルを低下させる方法である。1つの態様では、抗原は、予め定められたアミド結合における加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する遷移状態類似体である。好適な態様では、抗原は $A\beta_{10-25}$ を含んで成る。好ましくは生成した抗体は自然な β -アミロイドよりも遷移状態類似体に対して高い親和性を有し、そして内因性の β -アミロイドの加水分解を触媒する。

【0011】

動物の循環している β -アミロイドのレベルを低下させるために、 β -アミロイドの加水分解を触媒する抗体を利用または生成する同様な方法、および動物の脳内のアミロイド斑の形成を防止するための方法も本発明により提供される。また β -アミロイドの加水分解を触媒する抗体を利用または生成することにより、動物の脳内に存在するアミロイド斑を分解する方法も提供する。

40

【0012】

本発明の別の観点は、動物の脳内の β -アミロイドレベルの有意な減少を引き起こすために十分な量で動物にベクター化された二重特異性抗体を静脈内投与することによる、動物の脳内に存在するアミロイド斑を分解する方法である。ベクター化された二重特異性抗体は、血液脳関門をわたり細胞輸送することができ、そして結合すると予め定められたアミド結合で内因性の β -アミロイドの加水分解を触媒する能力を有する。好ましくは、ベクター化された二重特異性抗体は、トランスフェリンレセプターに特異的に結合する。

50

【0013】

本発明の別の態様は、加水分解遷移状態に対する抗体を生成するために適当な条件下で、ポリペプチドの予め定められた加水分解遷移状態の立体配置を模するスタチン類似体を有するエピトープを含んで成る抗原で動物を免疫感作することにより、タンパク質またはポリペプチドの加水分解を触媒する抗体を生成する方法である。この方法は、 β -アミロイドに対する触媒的抗体を生成するために使用することができる。ポリペプチドの加水分解遷移状態の立体配置を模する還元されたペプチド結合類似体を利用する類似法も提供する。

発明の詳細な記述

本発明は動物体内の β -アミロイドのレベルを制御するための免疫学的に基づく方法に関する。本発明は β -アミロイドに特異的な抗体が生理学的レベルのヒト血清アルブミンの存在下で β -アミロイドに結合することができるという知見に基づく。本発明はまた、動物が血流中の β -アミロイドを隔絶するために十分な量で β -アミロイドに特異的な抗体の存在に耐容できるという知見に基づく。

【0014】

本発明の1つの観点は、動物の血流中の遊離 β -アミロイドを隔絶する方法に関する。動物中に存在する β -アミロイドの可溶性および不溶性形態は、力学的な平衡にある。可溶性 β -アミロイドは血液と脳脊髄液との間を転移すると考えられている。不溶性の β -アミロイド凝集物はアミロイド斑として脳内の可溶性プールから沈着する。以下の章の実施例に詳細に記載した結果は、 β -アミロイドに特異的な抗体の動物への静脈内投与が、末梢の循環からの可溶性 β -アミロイドの通過を妨げることを示す。これは末梢の循環に限定されている β -アミロイドに特異的な抗体が β -アミロイドに結合し、そして β -アミロイドを循環から隔絶(sequestering)するために起こる。そのような隔絶は、 β -アミロイドに特異的な抗体の適切な量を動物へ静脈内投与することを介して達成される。隔絶を生じるために十分な抗体の量は、種々の因子(例えば送達される抗体に特別な特性、サイズ、代謝および動物の全体的な健康状態)に依存し、そしてその場に応じて決定される。

【0015】

投与される抗体はモノクローナル抗体、異なるモノクローナル抗体の混合物、ポリクローナル抗体、またはそれらの任意の組み合わせ物であることができる。1つの態様では、抗体は β -アミロイドのC-末端領域に結合する。そのような抗体は小さく、そしてより害が少ない $A\beta_{1-40}$ とは反対に、量は少ないがより有害な $A\beta_{1-43}$ に特異的に血流中で結合する。別の態様では、 β -アミロイドの種々の領域に特異性を有する抗体の組み合わせ物を投与する。別の態様では、以下に詳細に検討する β -アミロイドの加水分解を触媒する抗体を、単独または他の抗- β -アミロイド抗体と組み合わせ投与する。

【0016】

抗体を投与される動物は、循環している可溶性 β -アミロイドを有する任意の動物である。1つの態様では、動物はヒトである。ヒトは健康な個体、または上昇した β -アミロイドレベルが役割を果たす疾患(例えばアルツハイマー病のような神経変性的疾患)に罹患しているか、またはその疾患の危険性にあってもよい。

【0017】

本発明の関連する観点は、内因性の β -アミロイドに対して動物内の免疫応答を刺激することにより、動物の血流中の遊離 β -アミロイドを隔絶する方法である。以下の実施例で詳細に記載する結果は、上に記載した β -アミロイド結合抗体の投与方法と同じ様式で、動物が内因性 β -アミロイドに対する抗体を生じる免疫応答の誘導に耐容でき、そしてそのような抗体の存在が体内の β -アミロイドの分布を改変することを示している。この内因性 β -アミロイドに対する免疫応答は、内因性 β -アミロイド上に存在するエピトープを含んで成る1以上の抗原で動物を免疫感作することにより生成される。接種した抗原上に存在するエピトープは、 β -アミロイド分子の任意の領域に存在するエピトープに対応することができる。好適な態様では、 β -アミロイドのC-末端領域上に見いだされるエピトープを、より小さい $A\beta_{1-40}$ とは反対に $A\beta_{1-43}$ に特異的に結合する抗体を生成するため

10

20

30

40

50

に使用する。別の態様では、種々のエピトープの組み合わせ物を投与して、 β -アミロイドに対する種々の抗体を生成する。より全身性の免疫応答は、異なる小さいペプチド抗原の混合物、または完全長の43残基の β -アミロイドペプチドのいずれかをを用いて免疫感作することにより生成される。別の態様では接種に使用する抗原は、以下に詳細に記載するように、 β -アミロイド加水分解に向けた触媒活性を有する抗体を誘導するために、 β -アミロイドペプチドの遷移状態類似体を含む。

【0018】

抗原の免疫反応性は種々の方法により強化することができるが、その多くには抗原の免疫原性キャリアーへのカップリングが含まれる。さらに内因性分子またはそれに含まれるエピトープの免疫原性を特異的に強化するための種々の方法が、当業者には既知であり、しかも利用可能である。アミロイド抗原をヒトの使用により適するようにするために、種々の修飾を本明細書に記載するアミロイド抗原（1つまたは複数）に作成することができる。例えばペプチド（1つまたは複数）は、適当な抗原性キャリアーに遺伝子操作することができ、またはDNAワクチンを設計することができる。

【0019】

循環から β -アミロイドを隔絶するための上記技法も、脳内の β -アミロイドレベルを低下させるために有用である。脳内のアミロイド斑の形成は少なくとも部分的には脳内に存在する遊離 β -アミロイドのレベルに依存するので、動物の脳の β -アミロイドのレベルを減少させることが、次に脳内のアミロイド斑の形成を減少させる。したがって上記技法は、動物の脳内のアミロイド斑の形成を防止するために有用である。これはアミロイド斑発生の危険性があると考えられる動物に特に応用することができ：この危険性は遺伝的な疾病素質から、または環境的な要因からもたらされ得る。 β -アミロイドに対する抗体の投与、すなわち内因性抗体を生成するための動物を免疫感作は、そのような動物（例えばアルツハイマー病の家系であるヒト、またはこの疾患と診断されたヒト）に対して治療的に有益となる。

【0020】

本発明の別の観点は、予め定められたアミド結合において β -アミロイドの加水分解を触媒する能力を特徴とする抗体に関する。実施例の章で詳細に記載する実験は、 β -アミロイドに対するタンパク質溶解的活性を有する様々な抗体の生成を示す。そのような抗体は動物を、 β -アミロイドペプチドの遷移状態類似体である抗原で免疫感作することにより生成される。遷移状態類似体は、予め定められたアミド結合の加水分解中に β -アミロイドがとる遷移状態を模する。触媒抗体の生成に有用な遷移状態類似体は、限定するわけではないが、スタチン、フェニルアラニンスタチン、ホスホネート、ホスホンアミデートおよび還元されたペプチド結合遷移状態類似体である。

【0021】

遷移状態に特有のエピトープに対して生成された抗体は、遷移状態の β -アミロイドに優先的に結合する。このような抗体の結合は遷移状態を安定化し、これは対応するアミド結合の加水分解を導く。加水分解される特定のアミド結合は、所望する開裂産物に基づき選択される。例えば、完全長の β -アミロイドのアミロイド斑に凝集することができない2つのペプチドフラグメントへの開裂は、本明細書に開示する方法において治療的に使用されるだろう。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルでよい。幾つかのそのような遷移状態模造物が作成され、そして示した結合での開裂を触媒するモノクローナル抗体の生成に抗原として使用される。これらの抗原および生成した抗体は、以下の実施例の章の表8に掲げる。特異的なアミド結合において取り込まれた遷移状態模造物を有する抗原に対して生成した抗体は、自然な β -アミロイド中のこのような結合の自然な加水分解遷移状態に結合し、遷移状態を安定化し、そしてその結合における開裂を触媒するはずである。

【0022】

少なくとも2つの異なる抗体が上記方法により生成される。1種類目は遷移状態類似体に優先的に結合し、そしてまた結合を検出するために、実施例の章に詳細に記載するELIS

10

20

30

40

50

Aを使用して自然な β -アミロイドと検出可能に交差反応する。2種類目は遷移状態類似体に結合し、そして結合を検出するために、実施例の章に詳細に記載するELISA手法を使用して自然な β -アミロイドと検出可能に交差反応しない。両種類の抗体も、触媒抗体として有力な価値がある。抗-遷移状態抗体の各結合親和性は、加水分解の触媒でその能力を反映するだろう。抗体がタンパク質の加水分解を触媒する活性を有するためには、抗体は少なくともタンパク質の自然な（非遷移）状態に結合する最小能力を保有しなければならないと考えられる。 β -アミロイドに対する重要な結合を保持する（自然な β -アミロイドと強力に交差反応する）抗体は、より高い効率の β -アミロイド結合により、加水分解をより効率的に触媒するだろう。いったん結合すれば、これらの抗体は加水分解的開裂のためにタンパク質を遷移状態の立体配置に強制する。あるいは自然な β -アミロイドとわず

10

【0023】

自然な β -アミロイドペプチドの予想される開裂産物に対して実質的な親和性を有する抗体は生産物阻害を受け、したがって低い代謝回転を表すかもしれない。そのような望ましくない抗体は、予想される開裂産物のエピトープを含むペプチドを使用した2次スクリーニングにより同定することができる（例えばELISAを介して）。

20

【0024】

好適な態様では、抗体はモノクローナルである。モノクローナル抗体は、動物（例えばマウス、モルモットまたはラット）を、遷移状態類似体抗原で免疫感作し、そして続いて標準的手法により動物からハルブリドーマを作成することにより生産される。所望のモノクローナル抗体を生産するハルブリドーマは、スクリーニングにより同定する。スクリーニング法の1例は、以下の実施例の章に提示する。別の態様では、抗体はポリクローナルである。ポリクローナル抗体は動物（例えばウサギ、ニワトリまたはヤギ）を抗原で免疫感作し、そして動物から血清を得ることにより生産する。所望の結合親和性を有するポリクローナル抗体は、日常的な実験過程を通して当業者により血清からさらに精製することができる。

30

【0025】

あるいは β -アミロイドに特異的な触媒抗体は、触媒抗体の生産を誘導するように設計された抗-イディオタイプワクチンの使用を通して個体で生成することができる。そのようなワクチンはRaso and Paulus（1998年6月22日に出版され、現在係属中の米国特許出願第09/102,451号明細書、触媒抗体を誘導するための抗-イディオタイプワクチン（ANTI-IDIOTYPE VACCINES TO ELICIT CATALYTIC ANTIBODIES））の開示に記載され、その内容は引用により本明細書に編入する。

【0026】

本発明の別の観点では、タンパク質溶解活性を有する触媒抗体を誘導するためのスタチンおよび還元されたペプチド結合類似体を使用することである。以下の実施例の章では、触媒抗体の生産において抗原としてスタチン類似体を使用するための方法を詳細に記載し、そしてまたこのような方法を使用して生成された抗-遷移-状態抗体の例を掲げる。「スタチル（statyl）」部分は、アマスタチン、ペプスタチンおよびベスタチンのような自然に放出されるプロテアーゼ遷移状態インヒビターに由来する。このような自然に存在するスタチンに基づくインヒビターは、アミノペプチダーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼおよびHIVプロテアーゼの活性を効果的に遮断するために使用され来た。スタチン残基を含有する合成ペプチドは、触媒抗体の誘導に新たな特徴を提供する。スタチル部分は四面体の結合構造を有し、その長さは2つの CH_2 単位により延長され、これは計画的に配置された0

40

50

H基を有し、そして構造は電荷をもたない。さらなるCH₂単位の存在により、より延長された抗体結合部位を誘導すると予想され、そしてこの延長部位を有する抗体は、ペプチド基質上にさらなる歪み (strain) を誘導し、加速された触媒作用を生成する。さらにこれらのスタチン類似体中の-OH基が、真の遷移状態の位置および化学によりよく近付けると考えられる。したがってスタチンに基づく遷移状態類似体は、より多く使用される負に荷電したホスホネート類似体から得られるものとは有意に異なる種類の抗体を誘導するはずである。

【 0 0 2 7 】

還元されたペプチド結合類似体は、アミノ酸残基間の距離を増すことなく四面体の立体配置を導入する。この特徴はこれまでに使用された類似体よりも真の遷移状態の構造により近付けはるはずである。正に荷電した2級アミンを自然なポリペプチドのアミド窒素に置き換え、そして抗体結合部位中の近位で完全に負に荷電した側鎖を誘導するはずである。抗体上のそのような補助的なグルタミンまたはアスパラギン基は、酸-塩基交換を介してペプチド開裂の抗体が媒介する触媒を補助するだろう。したがって還元されたペプチド結合に基づく遷移状態類似体は、より多く使用される負に荷電したホスホネート類似体を使用することから得られるものとは有意に異なる種類の抗体を誘導するはずである。還元されたペプチド結合類似体およびスタチン類似体は、広範なタンパク質またはポリペプチドに特異的な遷移状態類似体抗原を生成するために使用することができる。これらの抗原は次に、各触媒抗体を生成するために使用することができる。

【 0 0 2 8 】

上記のβ-アミロイド触媒抗体を投与は、1) 動物の血流中の遊離β-アミロイドを隔離するために、2) 動物の脳内のβ-アミロイドレベルを下げるために、そして3) 動物の脳内のアミロイド斑の形成を防止するために、上記の方法で使用して類似の結果を生じることができる。実施例に提示した実験では、遷移状態類似体を用いた動物の免疫感作により、免疫応答を生じて遷移状態を認識し、そしてβ-アミロイドタンパク質の加水分解を触媒する抗体の生成をもたらすことが証明される。これは遷移状態類似体がこれらの方法で抗原として使用されて、内因性のβ-アミロイドを認識し、そして開裂を触媒する抗体の動物中での生成を誘導できることを示している。

【 0 0 2 9 】

上記の触媒抗体のタンパク質溶解的作用を通して動物中の全体的なβ-アミロイドレベルを下げることを含む方法も、本発明により包含される。動物内の循環中に機能的な触媒抗体が存在すると、選択的な加水分解的開裂により循環中の完全なβ-アミロイドレベルを下げるだろう。したがって、本発明は動物に上記の触媒抗体を導入することにより、動物内で循環しているβ-アミロイドのレベルを下げる方法を提供する。動物への抗体の投与は、好ましくは静脈内投与を介する。そのような抗体はモノクローナル、混合モノクローナル、ポリクローナルまたはそれらの混合物である。抗体の起源は動物中の抗体の半減期に影響を及ぼすことができ；関連性が少ない種に由来する抗体は、動物の免疫系により外来であるとより認識されるだろう。好ましくは投与する抗体は、半減期を最大にし、そして宿主による悪い副反応を最小にするために、動物に親密に関連する種に由来する。

【 0 0 3 0 】

これに関して、単離された可変領域抗体フラグメントの投与は有益な結果を生じることができる。

【 0 0 3 1 】

本発明は内因性の触媒抗体を誘導するために、β-アミロイド遷移状態類似体で動物を免疫感作することにより、動物内に循環しているβ-アミロイドのレベルを低下させる方法も提供する。そのようなワクチンの使用および設計を上に記載し、そして以下の実施例の章で詳細に説明する。

【 0 0 3 2 】

動物の循環中のβ-アミロイドレベルの減少は、体内のβ-アミロイドの平衡を置き換え、そして最終的には大量の作用 (mass action) を通して動物の脳内におけるβ-アミロイ

10

20

30

40

50

ドレベルの減少を導くと期待される。これに関して、本発明は動物に触媒抗体を投与するいずれかにより、または内因性の抗体生成を誘導するために遷移状態類似体を投与することによるいずれかで、動物の脳内の β -アミロイドレベルを減少させる方法を提供する。生じた動物の脳内の β -アミロイドレベルの低下がアミロイド斑の形成を防止するはずであるので、続いてこのような手法はまた、動物の脳内に存在するアミロイド斑の形成を防止する方法としても価値がある。またこれらの手法は、脳のより低い β -アミロイドレベルが斑の分解(disaggregation)を導くことができる証拠が示されているので、動物の脳内に存在するアミロイド斑の分解法としての価値を有する。

【0033】

本発明の別の観点は、脳に抗- β -アミロイド抗体を実際に送達することにより、脳内の β -アミロイドの分布を改変させるより直接的な方法を提供する。脳内の β -アミロイドレベルを減少させるための、およびアミロイド斑の凝集を防止するための上記の方法は、血液、組織、脳脊髄液および脳内の β -アミロイドプール間の交換に依存し、この交換はこれらの異なるプール間の平衡分布の抗体が媒介する破壊により動かされる(driven)。対照的に、抗- β -アミロイド抗体の脳への送達は、 β -アミロイド凝集に直接影響を及ぼさずだろう。以下の実施例に提示される証拠は、特定の抗- β -アミロイド抗体の結合がインビトロで β -アミロイドの初期の凝集を阻害し、そしてまたインビトロの形成された β -アミロイド複合体を分解することを示す。さらに不溶性ペプチドが低レベルの可溶性 β -アミロイドと平衡にある場合、抗- β -アミロイド結合抗体がこのバランスを崩し、そして次第に沈殿を溶解する。このような観察は、脳内の β -アミロイドの存在がアミロイド斑の形成を直接阻害し、そしてまた可溶性 β -アミロイドと斑として沈着した線維性 β -アミロイドとの間の力学的平衡を破壊することにより、形成された斑を分解することを示している。さらに高度に活性な触媒抗体が発現されて、構成成分である凝集したペプチドを加水分解的に開裂することにより、不溶性 β -アミロイド斑を破壊すると期待される。

【0034】

脳に抗体を送達するための1方法は、血液脳関門をわたって細胞輸送することができるベクター化された抗体を生成することによる。ベクター化された抗体は、抗体を、循環から体内の予め定めた方向への送達を促進する作用物質に共有結合させることにより生成する。血液脳関門を横断することができるベクター化分子の例は、従来技術に見いだされる(Bickel et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2618-2622(1993); Broadwell et al., Exp. Neurol. 142:47-65(1996))。これらの実施例では、抗体を別の分子に連結し、抗体は高分子の送達を促進する作用物質である。そのような作用物質の1例は、細胞表面から移動させられるレセプターのような細胞表面成分に向かうようにされた抗体である。血液脳関門を細胞輸送するための能力を付与する抗体の例は限定するわけではないが、抗-インスリンレセプター抗体、およびまた抗-トランスフェリンレセプター(Saito et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:10227-31(1995); Pardridge et al., Pharm.Res. 12:807-816(1995); Broadwell et al., Exp.Neurol. 142:47-65(1996))を含む。この第1抗体を β -アミロイドに結合する抗体に共有結合する。あるいは β -アミロイド抗体をこのようなレセプターに結合するリガンド(例えばインスリン、トランスフェリンまたは低密度リポタンパク質)にカップリングすることは、循環から脳へ送達するためにベクター化された抗体成分を生成する(Descamps et al., Am.J.Physiol. 270:H1149-H1158(1996); Duffy et al., Brain Res. 420:32-38(1987); Dehouck et al., J.Cell.Biol. 138:877-889(1997))。

【0035】

ベクター部分は抗- β -アミロイド抗体に化学的に結合して、それを中枢神経系へ送達し易くすることができる。あるいは部分を組込み成分として抗体に遺伝的に操作することができる。このベクター成分は例えば、血液脳関門を作る脳の毛細管内皮細胞上に存在するレセプターに結合する抗-トランスフェリンレセプター抗体または抗-インスリンレセプター抗体であることができる(Bickel et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2618-22(1993); Pardridge et al., J.Pharmacol.Exp.Ther. 259:66-70(1991); Saito et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:10227-31(1995); Friden et al., J.Pharmacol.Exp.Ther. 278:1491-1498(1996))

)。生成した二機能性抗体は、管の管腔側上の適切なレセプターに結合する (Raso et al., J.Biol.Chem. 272:27623-27628(1997); Raso et al., J.Biol.Chem. 272:27618-27622(1997); Raso, V. Anal. Biochem. 222:297-304(1994); Raso et al., Cancer Res. 41:2073-2078(1981); Raso et al., トキシンに共有的または非共有的に結合した細胞標的キャリアーとしてのモノクローナル抗体。薬剤のレセプターが媒介するターゲッティング (Receptor mediated targeting of drugs)、第82巻で、G.Gregoriadis, G.Post, J.Senior and A.Trouet、編集。NATOアドバンスト スタディズ研究所 (Advanced Studies Inst.)、ニューヨーク、119-138(1984))。いったんレセプターに結合したら、二重特異性抗体の両成分は細胞輸送のプロセスにより血液脳関門をわたって進む。脳に入った抗- β -アミロイド抗体は、 β -アミロイド斑および可溶性 β -アミロイドプールの両方と、直接相互反応する。これらの脳毛細管に濃縮されたタンパク質標的部点を介するベクターが媒介する送達を使用して、脳内で $10^{-8} \sim 10^{-7} \text{M}$ の範囲の高分子の濃度が達成できると予想された (Maness et al., Life Science 55:1643-1650(1994); Lerner et al., Science 252:659-667(1991))。重要なことは、2週間、毎日抗-トランスフェリンレセプター抗体を投与された動物が、放射性シュクロースプローブを使用して血液脳関門の完全性の損失を示さなかったため、ベクターは安全であるという点である (Broadwell et al., Exp.Neurol. 142:47-65(1996))。

【0036】

実施例は、 β -アミロイドに結合するベクター化された二重特異性抗体の生成を詳細に記載する。二重特異性抗体はトランスフェリンレセプターに結合する第1の特異性を介して血液脳関門をわたって細胞輸送する。血液脳関門をわたる作用物質の送達のために、トランスフェリンレセプターに結合する抗体を使用することは、Friden et al.により米国特許第5,182,107号; 同第5,154,924号; 同第5,833,988号; および同第5,527,527号明細書に記載されており、その内容は引用により本明細書に編入する。

【0037】

以下の実施例の章で提示する実験結果は、生成された二重特異性抗体がそれらの別々の特異性を保持し、そして静脈内投与された時に血液脳関門をわたって生きている動物の脳の実質および脳の毛細管に送達されることを示す。

【0038】

二重特異性試薬を遺伝子操作するために、または2つの異なるハイブリドーマクローンを融合することにより二重特異性抗体を細胞内で生産するために、二重特異性抗体の別の生成法が記載された (Holliger et al. Proc.Natl.Acad.Sci. 90:6444-6448(1993); Milstein et al., Nature 305:537(1983); Mallander et al., J.Biol.Chem. 269:199-206(1994))。これらの技法により生成されたベクター化された二重特異性抗体も、本発明の方法に使用することができる。

【0039】

全抗体を脳に導入することは、抗体が補体を結合し、そして神経細胞の補体が媒介する溶解を促進すれば有害となるので、より小さいベクター化 $\text{F(ab}')_2$ 二重特異性試薬を生成し、そして使用することが有益となり得る。凝集した β -アミロイド自体は抗体無しで補体を結合することができ、そして生じた炎症がアルツハイマー病の病状に関与し得ることが示された。同様の効果を有する脳内抗体の可能性は、抗体のFc領域を排除することにより大きく下げることができる。さらに、 Fab' の半分をカップリングすることは本来のヒンジ領域システインを使用するので、外因性の代替連結基が加えられる必要がない。より速く、またはより効率的に脳に入ることは、より小さい $\text{F(ab}')_2}$ または Fv_2 試薬が脳内送達に提供することができる別の潜在的な利点を表している。さら2種類のベクター化分子は、異なる体内分布および血漿半減期特性を有することができる (Spiegelberg et al., J. Exp. Med. 121:323(1965))。

【0040】

抗- β -アミロイド二重特異性抗体の設計に依存して、それらは脳内で可溶性 β -アミロイドおよび β -アミロイド沈着を3つの有力なメカニズムにより減少させることができる。可溶性 β -アミロイドに強力に結合する抗- β -アミロイド二重特異性抗体はペプチドを

隔絶するだけではなく、中枢神経系からのペクター化分子の流出により (Kang et al., J. Pharm. Exp. Ther. 269:344-350(1994))、結合した β -アミロイドも脳外に運び、それらを血流中に放出することができる。そのようなクリアランスメカニズムは、脳から出る β -アミロイドの連続する循環を導くだろう。さらに抗体が触媒活性を有する場合、それらは分解により有害な β -アミロイドのレベルを直接下げるだろう。触媒抗体は代謝回転を示すので、各抗体は多くの β -アミロイド分子を不活性化することができる。すなわち β -アミロイドの所望する減少を達成するために、脳に送達されなければならないペクター化された二重特異性抗体はより一層少ない。

【0041】

効果的にするために、二重特異性抗体の抗- β -アミロイド部位は血液から出て、そして脳内に進む前に空でなければならない。したがって、動物内の二重特異性抗体の濃度は血液中を循環している β -アミロイドのレベルを越えなければならない。既知の β -アミロイドレベルに基づき行われる循環 (Scheuner et al., Nature Med. 2:864-870(1996)) および処置した動物において予想される二重特異性抗体の中程度の範囲の血漿レベルは、脳に入る99.9%の二重特異性抗体が非占有抗- β -アミロイド結合部位を有することを示した。

【0042】

抗体を脳に送達する別の方法は、抗- β -アミロイド抗体の動物の脳への直接的注入を介する。この技法は、血液脳関門を横断する必要無しに脳内の β -アミロイドにこれらの抗体を直ちに接近させる。直接注入は、直接実質に、または脳室内注入を介して行うことができる (Knof et al., J. Immunol. 161:692-701(199))。簡単に説明すると、動物に麻酔をかけ、そして定位フレイムに配置する。頭皮上に正中切開を行い頭蓋を露出し、そして下にある筋膜をかき出す。先端がおよそ脳内に位置するように定位に進行する滅菌したステンレス鋼製の皮下チューブの長さを受けるために、ドリルで穴をあける。次いでガイドカニューレを頭蓋につけ、そして密閉する。カニューレは脳に抗体を多数回注入するために正しい位置に留まる。モノクローナル抗- β -アミロイドの滅菌した50mg/ml溶液のボラスを、2~8分間にわたり固定化された動物に注入カニューレを介して注入することができる。

【0043】

上記の方法の1つを介して動物の脳に触媒抗体を送達することは、脳に存在するアミロイド判の分解にも使用することができる。脳への β -アミロイド特異的触媒抗体の送達の利点は2倍である。触媒作用は連続的であり、各抗体が脳内の多くの標的 β -アミロイド分子を不活性化するので、 β -アミロイドペプチドはそのような抗体により永久的に破壊される。すなわち β -アミロイドの所望する減少を達成するために、中枢神経系に注入しなければならない抗体は一層少ない。

【0044】

動物に投与または送達される抗体の量は、動物の脳内の β -アミロイドレベルに有意な減少を引き起こすために十分であるべきである。適切な量は種々のパラメーター (例えば使用する特定の抗体、動物のサイズおよび代謝、ならびに内因性 β -アミロイドレベル) に依存し、そしてその場に応じて決定されるべきである。そのような決定は、日常的に実験を行うだけで、平均的な当業者の技術範囲にある。

【0045】

脳の β -アミロイドレベルを下げ、そしてアミロイド斑を防ぐ、または分解することに関して、さらなる利点が上記方法の1以上の組み合わせを利用することにより達成することができる。と期待される。

【実施例】

【0046】

実施例

第1章：循環中 β -アミロイドの停留

β -アミロイドペプチド抗原の合成

43残基の β -アミロイドペプチド (A β) のアミノ酸配列を図1に掲げる。この β -ア

10

20

30

40

50

ミロイドペプチド上のどの部位が抗体が媒介する治療に最も適するかを決定するために、A β 43-merの3つの重要な領域（アミノ - 末端、中央およびカルボキシ - 末端）を選択して、エピトープに特異的なワクチンを生成した。これらの短縮化されたペプチドは、高度に特異的な抗体応答を誘導するために抗原性ペプチドとして役立てた。

【0047】

A β のアミノ - 末端領域に対するモノクローナル抗体は、A β 凝集物を可溶化する能力があると過去に示された（Solomon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(8):4109(1997); Solomon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(1):452(1996)）。A β のアミノ - 末端領域から成るペプチドは本実験のために同様に設計し（図2に示し、そして配列番号2に掲げる）、そしてA β に結合するアミノ - 末端特異的抗体を誘導するために使用した。Cys残基をA β 配列のC - 末端に加えて、このペプチドをマレイミド - 活性化キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)のような抗原性キャリアータンパク質にカップリングするための適当な連結基を提供した。

10

【0048】

A β の中央領域を包含するペプチドも合成した（図3に示し、そして配列番号3に掲げる）。Cys残基をA β 配列のN - 末端に配置して、このペプチドをマレイミド - 活性化KLHのような抗原性キャリアータンパク質にカップリングするためのスルフヒドリル連結基を提供した。

【0049】

A β のカルボキシ - 末端に対して向けられた免疫応答を誘導するための抗原を生成するために（Suzuki et al., *Science* 264:1336(1994)）、N - 末端にCys残基を付加したA β のN - 末端領域を包含するデカペプチドを合成した（図4に示し、そして配列番号4に掲げる）。Cys置換はこのペプチドをKLHのような抗原性キャリアータンパク質にカップリングするためのスルフヒドリル連結基を提供するために設計した。

20

ペプチドの抗原性キャリアータンパク質へのカップリング

様々なCysを含むA β ペプチドを、個々にマレイミド - 活性化KLHにチオエーテル結合させた。多価A β ワクチンも、3種のすべてのこのようなペプチドをマレイミド - 活性化KLHに同時に連結することにより生成した。さらに完全長A β 43-merをグルタルアルデヒドを使用してKLHに連結した。

β - アミロイドワクチンを用いて誘導された抗体

30

正常なBALB/cマウスは、標準的な手順により上記のKLH-連結A β ワクチンを用いて免疫感作した。マウスは採血するか、またはハイブリドーマ作成のために脾臓を摘出するために屠殺した。得られた血清およびモノクローナル抗体は、A β に対する結合について特性決定した。

【0050】

表1は、2匹の非免疫感作対照マウスからの血清で希釈した1/100 対 中央領域A β ペプチド-KLHワクチンで免疫感作したマウスからの血清で希釈した1/100および1/1000でのELISA実験からの結果を示す。血清中の抗-KLH抗体の検出を回避するために、遊離A β ペプチドをマイクロタイタープレートに直接吸着させた。

【0051】

40

【表 1】

表1 中央領域 A β ペプチドに対する結合に関する ELISA

結合した添加物		抗体 (O.D. 450nm)
対照血清 A	1/100	0.666
対照血清 B	1/100	0.527
マウス 1 抗血清	1/100	3.465
マウス 1 抗血清	1/1000	2.764

10

【 0 0 5 2 】

この中央領域 A β ペプチドに対して生成された、およびハイブリドーマ融合により生成されたモノクローナル抗体は、上記のELISAアッセイを使用して同定した。結合アッセイは、同定されたモノクローナル抗-A β 抗体が完全長の A β ペプチドにも結合するかどうかを決定するために行った。¹²⁵I-A β_{1-43} プローブは、示したクローンからのハイブリドーマ分泌物とインキューベーションした。標準的ポリエチレングリコール分離法を使用して、¹²⁵I-A β_{1-43} 結合抗体を検出した(表 2)。表 2 に示す結果は、ペプチドフラグメントに対して生成された抗体が完全長の A β_{1-43} にも結合することを示す。

20

【 0 0 5 3 】

【表 2】

表2 ¹²⁵I-A β_{1-43} 結合 アッセイ

添加物		¹²⁵ I-A β_{1-43} 結合 (cpm)
対照	Hy	3,171
対照	Hy	2,903
6E2		15,938
6E2	1/10	9,379
3B1		12,078
3B1	1/10	3,353
8E3		10,789
8E3	1/10	3,249

30

40

【 0 0 5 4 】

¹²⁵I-A β_{1-40} をヒト血漿に加えた時、~89%がアルブミンに結合することが報告された(Biere et al., J. of Biol. Chem. 271(51):32916(1996))。これは結合したアルブミンが抗体結合を妨害するという懸念を生じる。アルブミンの結合が抗体の A β への結合を妨害するのかどうかを決定するために、結合アッセイを血清アルブミンの存在および不存在

50

下で行った。精製した5A11モノクローナル抗-A β 抗体が ^{125}I -A β_{1-40} に結合する能力は、60mg/mlのヒト血清アルブミン(HSA)の存在により、たとえこれが抗体濃度よりも500倍モル過剰でも影響を受けなかった(表3)。これらの結果は、抗体が血中のA β に結合し、そして隔絶する能力が、他の結合タンパク質の存在により弱化されないことを示す。

【0055】

【表3】

表3 ヒト血清アルブミンの存在下での抗体への ^{125}I -A β_{1-40} 結合*

結合した 添加物	^{125}I -A β_{1-40} 結合	特異性
	(cpm)	(加えた全部に対する%)
対照	8,560	-
+ 5A11 抗-A β	64,589	79
対照 + HSA*	3,102	-
+ 5A11 抗-A β + HSA*	55,304	75

*60 mg/ml (~1 mM)でのHSA; 2×10^{-6} Mでの抗-A β 5A11; ~70,000 cpm
での ^{125}I -A β_{1-40} の添加

【0056】

モノクローナル抗体の生産

マウスは中央領域A β_{10-25} ペプチド(このペプチド抗原は、以下の章IIでさらに検討するフェニルアラニンスタチン遷移状態類似体をアミド結合で有する)のKLH結合物を用いて免疫感作した。ハイブリドーマの融合を行い、そして生産されたモノクローナル抗体を分析してワクチンに対する免疫応答の特異性を特性決定した。融合で生成されたハイブリドーマ上清は、ELISAを使用してスクリーニングしてそれらのA β_{1-43} ペプチドに

【0057】

生産されたモノクローナル抗体は、ELISAプレートに直接吸着されたA β_{1-43} ペプチドに結合すると決定された。強力な発色反応が、わずか10 μl のハイブリドーマ上清を使用したELISAで得られたが、培地を単独で加えると低いバックグラウンド色を生じた。これらの結果は抗体が小さいペプチド免疫原に結合するだけでなく、完全長のA β_{1-43} にも反応性であることを示している。重要なことは、抗体がマイクロタイタープレートに直接吸着したキャリアをもたないA β ペプチドに結合し、それらが免疫原性キャリアよりはむしろペプチドに対する特異性を示したことである。高親和性5A11モノクローナル抗体(表3)は、このハイブリドーマ融合から得られた。

【0058】

第2のマウスは、A β のC-末端領域を包含するA β_{35-43} 類似体のKLH結合物を用いて免疫感作した。マウスに由来する血清は、ELISAウェル上に直接吸着させたA β_{1-43} との反応性についてスクリーニングした。このアッセイ結果を表4に示す。このマウスからの脾臓は次いでハイブリドーマ融合に使用して、その免疫応答の特異性を特性決定した。重要なことは、A β ワクチンで免疫感作されたマウスまたは抗-A β 腹水-生産マウスのいずれもが、このような誘導された抗体の幾つかはマウスA β およびマウスアミロイド前駆体タンパク質と交差反応するにもかかわらず、病気を示さなかったことである。

【0059】

【表 4】

表4 カルボキシ-末端 A β ペプチドに対する抗血清の結合に関する ELISA

結合した抗体 (O.D. 450 nm)	
添加物	自然な A β_{1-43}
対照血清	0.484
マウス抗血清	1.765

10

【0060】

上記のように作成されたハイブリドマクロンに由来するモノクローナル抗体を、小さいカルボキシ-末端ペプチド A β_{35-43} および完全長 A β_{1-43} に対する結合に関してスクリーニングした。結果を図 5 に示す。モノクローナル抗体は、マイクロタイタープレートに直接吸着したこのようなキャリアーを含まない各 A β ペプチドのカルボキシ-末端部に結合し、それらの免疫キャリアーよりはむしろペプチドに対する特異性が確認された。クローンも A β_{1-40} を用いて試験して、この短縮化された 40 アミノ酸残基の A β 変異体とは反応しない抗体、すなわち A β_{1-43} のカルボキシ-末端に特異的に結合する抗体を同定した (図 5)。治療的に使用すると、このワクチンはより小さく、そしてより害が少ない A β_{1-40} ではなく、数は少ないが、より有害な血流中の A β_{1-43} 種に優先的に結合する。

20

【0061】

別の実験で、マウスを β -アミロイドの別個の領域を表す 3 種の異なる KLH-ペプチド抗原 (図 2 ~ 4) のカクテルから成るワクチンで免疫感作した (図 1)。対照マウスは KLH 単独で免疫感作した。抗原は、初回注射前に完全フロインドアジュバントで乳化し、そして続く注射には不完全フロインドアジュバントで乳化した。試験はこれらの A β -KLH 免疫感作マウスに由来する希釈した血清について行い、特異的な抗-A β 抗体の存在について測定した。A β_{1-16} 、A β_{14-25} 、A β_{34-43} 、A β_{1-40} および A β_{1-43} ペプチドを使用して、抗体の特異性を確認した。ペプチドを ELISA プレートに直接吸着させた。結果は表 5 に与える。この結果は 3 種ペプチド抗原のカクテルで免疫感作したマウスが、アミノ-末端、中央領域およびカルボキシ-末端ペプチド、ならびに完全長 A β 40-mer および 43mer と反応する抗体を含む血清を生成したことを示す。この抗-A β 抗体のスペクトルの一貫した存在は、予防接種した動物の末梢循環内のすべての可溶性 A β との結合に大変効果的である。

30

【0062】

【表 5】

表5 免疫感作したマウスに存在する血清抗体を測定するための ELISA

免疫原		ELISA 読みとり (O.D. 450 nm)				
		A β_{1-16}	A β_{14-25}	A β_{34-43}	A β_{1-40}	A β_{1-43}
マウス 1 (対照)	KLH	0.076	0.038	0.064	0.042	0.066
マウス 2	A β -KLH カクテル	3.013	1.258	3.191	2.337	2.598
マウス 3	A β -KLH カクテル	1.484	1.180	2.068	1.758	1.680
マウス 4	A β -KLH カクテル	1.486	1.072	2.276	1.444	1.709

40

【0063】

50

非ヒト霊長類におけるワクチン試験

アルツハイマー病のヒト患者について β -アミロイドワクチン療法の潜在的重要性を考慮して、ヒトに適合可能なalumに基づくA β ペプチドワクチン調製物を非ヒト霊長類で試験した。ヒトに適合可能な抗体生産および安全性試験は、カニクイザル (*Macaca fascicularis*) で実施した。この動物系はこれら霊長類の予想される β -アミロイドのアミノ酸配列がヒトと同一であり、そしてそれらの基本的な生理学および免疫学系が臨床的状況において遭遇する状況に極めて近いことから、ヒトへの応用と高度に関連している。カニクイザルは毎月予防接種し、そして血清中の抗-A β レベルをモニターするために周期的に採血した。

【0064】

10

カニクイザルは、水酸化アルミニウムゲルに吸着させた完全長の β -アミロイドペプチドを含んで成る最も単純なワクチン調製物の単回注射に対して強い免疫応答を生じた。そのような初期の抗- β -アミロイド抗体の特異性は、種々のA β ペプチドフラグメントを使用してELISAにより特性決定した(表6)。この分析はサルが完全長のペプチドに結合し、そしてそのアミノ末端、中央およびカルボキシ-末端領域で反応する抗体を生成したことを示した。

【0065】

【表6】

表6 A β 予防接種したカニクイザル (*Macaca fascicularis*) 中に存在する血清抗体を測定するためのELISA

20

予防接種スケジュール	ELISA 読みとり (O.D. 450 nm)				
	A β_{1-16}	A β_{1-25}	A β_{1-43}	A β_{1-42}	A β_{1-40}
前-予防接種	0.511	0.404	0.370	0.380	0.235
A β /Alum (1ヶ月目)	2.115	1.687	0.671	2.393	2.479

【0066】

重要なことは、予防接種したサルが完全に健康であり、そして3カ月間にわたりそれらの体内で循環していた抗-A β -抗体と適合性があると思われる点である。すなわち抗-A β -抗体と自然に存在する β -アミロイド前駆体タンパク質または他のウイルス成分との交差反応による明らかな副作用はない。これらの動物は獣医師により細かく観察され、そして自己免疫疾患、免疫複合体病または予防接種に対する任意の他の悪性/毒性反応を現さなかった。

30

【0067】

実験を続行して、常法のように追加免疫注射を行う。生成した血清は、免疫応答が強くなり、そして成熟した時に抗体の特異性および親和性パラメーターについてモニターする。最後に、サルについて完全な検死および組織病理学的検査を行う。以下に検討する遺伝子操作したA β ワクチンもカニクイザルで評価して、それらがさらによい免疫原となるかどうかを決定する。

40

正常なマウスにおける 125 I-A β の分布に及ぼす抗体の影響

循環中の抗-A β 抗体は血液脳関門を十分な程度で横断することができないので、 125 I-A β_{1-40} が脳に到達することを防止するシンク(sink)として作用するはずである。この停留効果は、マウスに等量の 125 I-A β_{1-40} を単独または我々の5A11抗-A β モノクローナル抗体と注射した4時間後に、マウスの血液レベルを測定することにより証明された(表7)。末梢の循環から出た 125 I-A β_{1-40} の通過は、特異的な抗-A β 抗体を同時に受容した動物において大きく縮小した。その知見は、実験動物でA β に効果的に結合することができる抗体を示すことにより、5A11抗体を用いて(表3)得たインビトロの結果に拡張される。この抗体で処置した動物が循環中に10倍多い 125 I-A β_{1-40} を停留すると

50

いう観察は、体内の A β の平衡分布を、血中の選択的隔絶により劇的に改変できることを示している。

【 0 0 6 8 】

【表 7】

表7 抗-A β 抗体は、循環から出る ^{125}I -A β_{1-40} の通過を妨げる

マウスを以下で注射した ;	血中の ^{125}I -A β_{1-40} (cpm/qm)
^{125}I -A β_{1-40} 単独	27,300
^{125}I -A β_{1-40} + 5A11 抗-A β	278,900

10

【 0 0 6 9 】

遺伝子操作したワクチン

防御レベルの抗- β -アミロイド抗体を誘導するために、ヒトに使用するための遺伝子操作した β -アミロイド抗原が現在開発されている。 β -アミロイドフラグメントは、高度に免疫原性のキャリアー部分を組込んだキメラ A β ワクチンに工作されて、ヒト患者の適切な免疫原性応答を上昇させる。使用に適するキャリアー部分は、ジフテリア毒素 (DT) および B 型肝炎コア抗原 (HBcAg) を含む。これらは β -アミロイドペプチドの強力な送達系を表し、そしてアジュバントとして alum を使用した時に優れた、高力価の免疫応答を誘導することが知られている。

20

【 0 0 7 0 】

DT は B 型インフルエンザ (*H. influenza*) 用の複合ワクチンとして使用が認可されており、そしてこの免疫原を T-細胞依存的とする。組換え大腸菌 (*E. coli*) での DT の発現は高い。1 以上の上記 β -アミロイドペプチドを DT の触媒ドメインの C-末端、あるいは DT の結合した膜貫通/レセプター結合ドメインのいずれかの末端で融合する。生成した融合物は水酸化アルミニウムゲルアジュバントと使用して有力なワクチンを生成する。

【 0 0 7 1 】

ヘテロロガスなエピトープに対する高力価の抗体が、HBcAg 送達系および水酸化アルミニウムゲルアジュバントを使用して生成された。HBcAg は、A β ペプチドの融合パートナーとして幾つかの顕著な利点を有する。アミノ酸 75 と 81 の間の免疫優勢な内部部位は、45 アミノ酸までのヘテロロガスな配列を収容することができる。コアは、高度に免疫原性の大きな 27nm 粒子に自己集合する。さらに HBcAg は組換え大腸菌 (*E. coli*) 中で高レベルで生産されることができる。

30

【 0 0 7 2 】

生産された遺伝子操作されたワクチンは、マウスおよび他の関連する動物モデルを使用して、斑を減少または防止することに対する効果を試験する。抗体生産およびワクチンに関する安全性試験は、カニクイザルで行う。

40

本発明の方法

ペプチド合成。40mer の A β_{1-40} 、43mer の A β_{1-43} および 3 種の小さい A β ペプチド A β_{1-16} 、A β_{10-25} および A β_{35-43} を、標準的な自動化 Fmoc 化学により合成した。新しく合成したペプチドは HPLC により精製し、そしてそれらの組成をマスマスペクトルおよびアミノ酸分析により確認した。A β_{43} mer は、市販のものから得た (バックム : Bachem、トランス、カリフォルニア州)。

β -アミロイドペプチドの免疫原性キャリアーへの連結。小さい A β ペプチドを抗原性にするために、KLH キャリアータンパク質に連結した。Cys 残基をこれら A β ペプチドの N-および C-末端に計画的に配置して、それらをマレイミド活性化キャリアータンパク質へのチオエーテル結合を介してカップリングするための適当な連結基を提供した。この連結

50

は安定であり、そしてペプチドを定めた方向に結合する。この連結法により典型的には～20ペプチド/KLHの付加が得られる。より長い、完全長のA β ペプチドは、グルタルアルデヒドカップリング法を使用してキャリアタンパク質に連結した。

β -アミロイド抗原カクテル。図2～4に示した3種のA β ペプチドを、それぞれKLHに連結した。20 μ gのこれら各3種の結合物を次いで一緒に混合した。この混合物を完全フロイントアジュバントで乳化し、そしてマウスにi.p.注射した。続いて毎月のi.p.追加免疫注射は、不完全フロイントアジュバントで乳化した同じカクテル混合物を使用した。対照マウスは同様の免疫感作プロトコールを受けたが、A β ペプチドとは連結していないKLHを使用した。

マスの免疫感作。正常なBALB/cマウスは、上記のKLH-連結A β ワクチンを用いた標準的手法により免疫感作した。簡単に説明すると、マウスに完全フロイントアジュバントで乳化した抗原をi.p.注射し、続いて不完全フロイントアジュバントで2回目の感作を行った。マウスは採血またはモノクローナル抗体を生産するためのハイブリドーマ融合用に脾臓を取り出す3日前に、PBS中の抗原をi.v.により追加免疫感作した。

【0073】

A β ワクチンで免疫感作したマウスまたは抗-A β 腹水-生産マウスのいずれも、幾つかの抗体がマウスA β およびマウスアミロイド前駆体タンパク質と交差反応したにもかかわらず、病気の兆候を現さなかった。

ELISA。結合した抗-ペプチド抗体の存在は、ペルオキシダーゼで標識した抗-マウスIgGプローブを使用することにより、続いて発色体基質により明らかにされた(Engvall et al., *Immunochimistry* 8:871-875(1971))。

結合アッセイ。A β_{1-43} およびA β_{1-40} の両方を 125 Iで放射標識した。ヨウ素化ペプチドを非標識材料からHPLCにより分離して、本質的に定量的に特異的な活性を与えた(～2000Ci/mmol)(Maggio et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:5462(1992))。 125 I-A β_{1-43} プローブを23で1時間、モノクローナル抗-A β 抗体を生産しているハイブリドーマクローンから取ったHy培地とインキューベーションした。標準的なポリエチレングリコール分離法を使用して、抗体に結合した 125 I-A β_{1-43} の量を検出した。

霊長類用の β -アミロイドワクチン。使用した免疫原は、A β タンパク質のアミノ酸1～41を包含する合成A β ペプチドであった。このペプチドをHPLCにより精製し、そして凍結乾燥させ、そして次いで滅菌水に1.5mg/mlの濃度で再懸濁した。ワクチンは、本明細書ではalumゲルと呼ぶ7.5mlの2%水酸化アルミニウムゲルアジュバント(Alhydrogel、スパーホス バイオセクター(Superfos Biosector)、デンマーク)を、7.5mlのペプチドと混合することにより調製した。試験ではすべてのペプチドが25で12時間混合した後にalumゲルに吸着したことが示された。

【0074】

サルは最初に0.5mlのalum-吸着ペプチドを筋肉内(i.m.)注射することにより予防接種した。同じワクチン調製物(0.5ml)を用いた2回目の予防接種(追加免疫感作)は、1カ月後に投与した。続いて同一の毎月の注射(追加免疫感作)を、実験が終了するまで与える。

遺伝子操作したワクチン。高度に免疫原性のキャリア部分を使用して、キメラA β ワクチンを構築する。使用した部分は、ジフテリア毒素(DT)およびB型肝炎コア抗原(HBcAg)を含む。HBcAg発現系を使用する(Schodel et al., *Infect. and Immun.* 57:1347-1350); Schodel et al., *J. of Exer. Med.* 180:1037-1046(1994); Schodel et al., *J. of Virology* 66:106-114(1992); Milich et al., *Annals New York Academy of Sciences*:187-201(1993))。HBcAgの触媒ドメインのアミノ末端は、A β 融合タンパク質を培養基中に分泌させるべくシグナル配列を有する。培養基は、大きなアミコン(Amicon)超遠心デバイスを使用して濃縮し、そして濃縮物を大きなSuperdex 75カラムでカラムクロマトグラフィーにかける。溶解した細胞内から得られた組換え産物は、陰イオン交換体およびサイズ排除FPLCの組み合わせを使用して細菌タンパク質から分離する。

第II章：遷移状態抗原を用いたモノクローナル抗体の誘導

遷移状態ペプチド抗原

異なる型の遷移状態ペプチド抗原を合成して、予め定めたアミド結合位置でAβの遷移状態を優先的に認識（加水分解）する抗体の生成に使用した。

【0075】

Aβのカルボシ-末端領域(Cys-Met-Val-Gly-Gly-Val/Sta-Val/Sta-Ile/Sta-Ala-Thr)を包含する一連のスタチン(Sta)遷移状態類似体を合成した。提案したVal₃₉とVal₄₀、Val₄₀とIle₄₁、およびIle₄₁とAla₄₂の間の切れ易い(sicissile)ペプチド結合の、「スタチル」部分(-CHOH-CH₂-CO-NH-)への置き換えを設計して、これらの部位の1つで加水分解的にAβを開裂する触媒抗体を誘導した(図6)。Cys残基をこのようなペプチドのN-末端に配置し、マレイミド-
10

【0076】

Aβの中央領域(Cys-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe/PhSta-Phe/PhSta-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-アミド)を包含する一連のフェニルアラニンスタチン(PhSta)遷移状態類似体をこの研究室で合成した。

【0077】

提案したPhe₁₉とPhe₂₀、およびPhe₂₀とAla₂₁の間の切れ易いペプチド結合の、スタチル部分(-CHOH-CH₂-CO-NH-)への置き換えを設計して、これらの部位で加水分解的にAβを開裂する触媒抗体を誘導した(図7)。Cys残基をこのようなペプチドのC-末端に配置し、ペプチドをKLHのような抗原性のマレイミド-活性化キャリアタンパク質にカップリングするためにスルフヒドリル連結基を提供した。
20

【0078】

自然なAβペプチドと遷移状態フェニルアラニンスタチンAβペプチドとの間の構造的比較(図8)を、画像的ワークステーションを使用して行った。エネルギー最小化アルゴリズム(2000の繰り返し)を適用して、最も好ましい立体配置に各ペプチドを配列した。

【0079】

Phe₁₉とPhe₂₀との間のペプチド結合(-CO-NH-)を、延長した「スタチル」部分(-CHOH-CH₂-CO-NH-)に置き換え、そしてエネルギー最小化を適用した。この配置は、自然なAβ(左)の平面的なペプチド結合(-CO-NH-)と遷移状態ペプチド(右)の四面体:「スタチル」部分(-CHOH-CH₂-CO-NH-)との間の差異を示す。四面体スタチン遷移状態類似体に相補的な抗体結合部位は、Aβ基質の平面的なペプチド結合を遷移状態-様の立体配置に強制する。そのような歪みが、ペプチド配列中のその位置でAβの開裂を触媒する。
30

【0080】

アミド結合の加水分解中に遷移状態を模するために、還元されたペプチド結合を使用することの可能性も調査した。還元されたペプチド結合の連結は、Aβ分子のほとんどいかなる部位にも容易に配置して、還元型のペプチド結合遷移状態類似体を生成することができる。この類似体も選択した部位でAβを加水分解的に開裂する触媒抗体を誘導するために使用することができる。作成した還元型のペプチド結合遷移状態Aβ類似体は、(Gln-Lys-Leu-Val-Phe-CH₂-NH₂⁺-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Cys-アミド)中央領域ペプチドであった; [計算値1,342(M+1); 観察値1,344]。
40

【0081】

自然なAβペプチドと還元型のペプチド結合遷移状態Aβ類似体との間の構造的比較(図9)を、画像的ワークステーションを使用して行った。Phe₁₉とPhe₂₀との間のペプチド結合(-CO-NH-)を、還元型のペプチド結合(-CH₂-MH₂⁺-)に置き換え、そしてエネルギー最小化を適用した。示したこの配置は、自然なAβ(左)の平面的なペプチド結合(-CO-NH-)と対応する還元型のペプチド結合遷移状態類似体(右)の四面体部分(-CH₂-MH₂⁺-)との間の差異を示す。エネルギー最小化アルゴリズム(2000の繰り返し)を適用して、最も好ましい立体配置の各ペプチドを配列した。
50

【 0 0 8 2 】

A β のカルボキシ-末端領域のホスホンアミデート遷移状態類似体も合成した (図 1 0)。提案したGly₃₈とVal₃₉の間の切れ易いペプチド結合の、ホスホンアミデート部分 (-P O₂⁻-NH-) への置き換えを設計して、この部位で加水分解的に A β を開裂する触媒抗体を誘導した。N-アセチル-Cys残基をLeu₃₄の位置に配置して、このペプチドを抗原性のキャリアータンパク質へカップリングするために適当な連結基を提供した。図 1 1 の構造は、亜鉛ペプチダーゼによるペプチド加水分解に関する推定上の遷移状態 対 ホスホネートおよびホスホンアミデート模造物の構造を示す。同様な四面体の遷移状態中間体は、4 種類のタンパク質溶解酵素、セリン - 、システイン - 、アスパラギン酸 - およびメタロ - ペプチダーゼの各々を用いた反応により形成されることが知られている。

10

【 0 0 8 3 】

自然な A β ペプチドと遷移状態のホスホンアミデート A β ペプチドとの間の構造的比較 (図 1 2) を、画像的ワークステーションを使用して行った。Gly₃₈とVal₃₉の間のペプチド結合 (-CO-NH-) を、ホスホンアミデート結合 (-P O₂⁻-NH-) に置き換え、そしてエネルギーの最小化を適用した。図 1 2 に示した配置は、自然な A β (左) の平面的なペプチド結合 (-CO-NH-) と対応する四面体のホスホンアミデート結合 (-P O₂⁻-NH-) (右) との間の差異を具体的に説明する。

【 0 0 8 4 】

図 1 2 の右側の四面体の遷移状態類似体に相補的な抗体結合部位は、左側の A β 基質ペプチドの通常は平面の結合を、遷移状態様の配置に強制する。そのような結合の歪みが、Gly₃₈ - Val₃₉ 連結で A β ペプチドの加水分解的開裂を触媒する。

20

遷移状態ペプチド抗原を用いた免疫感作

マウスの免疫感作前に、ペプチド抗原を免疫原性キャリアーKLHにカップリングした。標準的なプロトコールを使用して、BALB/cマウスは前記の章に記載したKLHを連結した A β ペプチドで免疫感作した。簡単に説明すると、この手順はフロイントアジュバントで乳化した種々の抗原の i.p. 注射、続いて 2 回目は不完全アジュバントで乳化して使用した。ハイブリドーマ融合の 3 日前に、BALB/cマウスを i.v. で PBS 中の抗原を用いて追加免疫感作した。

【 0 0 8 5 】

ハイブリドーマ融合は、生成したフェニルアラニンスタチン遷移状態抗原の混合物 (図 7)、生成したスタチン (Sta) 遷移状態 A β 抗原の混合物 (図 6)、生成した還元型ペプチド結合遷移状態 A β 抗原 (Phe₁₉ - Phe₂₀ 間に位置する遷移状態模造物)、または生成したホスホンアミデート遷移状態 A β 抗原 (Gly₃₈ - Val₃₉ 間に位置する遷移状態模造物) のいずれかを用いて免疫感作したマウスの脾臓を使用して行った。表 8 に掲げるモノクローナル抗体は、このようなマウスから生成された。

30

【 0 0 8 6 】

【表 8】

表8

使用した類似体	修飾した結合	潜在的な開裂部位	生成された抗体
スタチン	Val ₃₉ -Val ₄₀ Val ₄₀ -Ile ₄₁ Ile ₄₁ -Ala ₄₂	Val ₃₉ -Val ₄₀ Val ₄₀ -Ile ₄₁ Ile ₄₁ -Ala ₄₂	2B2, 2H6, 3F2, 4D3, 6A6, 1E4, 11E9, 9D6, 5C7, 7C7, 1D12
フェニルアラニン- スタチン	Phe ₁₉ -Phe ₂₀ Phe ₂₀ -Ala ₂₁	Phe ₁₉ -Phe ₂₀ Phe ₂₀ -Ala ₂₁	6E2, 5A11, 6F11, 2E3, 8E3, 5G4, 4C7, 8D12, 2C12, 4G7, 5C7, 3C1, 4H9, 8E6, 1H2, 3B1, 2H11
還元型 ペプチド 結合	Phe ₁₉ -Phe ₂₀	Phe ₁₉ -Phe ₂₀	6E7, 6F6
ホスホアミデート	Glu ₃₈ -Val ₃₉	Gly ₃₈ -Val ₃₉	進行中

10

【 0 0 8 7 】

生成した抗体による A β 結合の証明

20

抗-A β および抗-遷移状態 A β モノクローナル抗体が、隔絶または開裂されるように設計された天然の A β₁₋₄₃ ペプチドに結合することを示すことは大変重要であった。このために、A β₁₋₄₀ および A β₁₋₄₃ を¹²⁵I で標識し、そしてヨウ素化ペプチドを非標識材料からHPLCにより分離した。プローブを精製した抗-A β 抗体または抗-A β 抗体を生産しているハイブリドーマクローンから取った培地のいずれかとインキューベーションした。抗体に結合した¹²⁵I-A β₁₋₄₃ の量は、ポリエチレングリコール分離法を使用して決定した。実験結果を表 3 に与える。

【 0 0 8 8 】

表 3 の結果は、精製した5A11モノクローナル抗-A β 抗体が高い割合で¹²⁵I-A β₁₋₄₀ に結合する能力を示す。この結合アッセイを使用して、クローンおよび精製した抗体(表 3)の A β に結合する能力をスクリーニングした。同様の手順が、種々の非標識 A β ペプチドの相対的結合強さを測定するために、競合的置換アッセイの基礎としても役立ち得る。(注意: 大変効率的な触媒抗体を用いる場合、インキューベーション時間中に A β の開裂が起こらないことを確実にするために、この結合アッセイは氷上で行なわなければならない。) このアッセイは、高い親和性の抗-A β 抗体を生産しているクローンを迅速に同定する。

30

【 0 0 8 9 】

フェニルアラニンスタチン遷移状態 A β-KLH抗原を使用して得たハイブリドーマに由来するモノクローナル抗体をELISAによりスクリーニングして、正常な A β₁₋₄₃ ペプチドおよびフェニルアラニンスタチン遷移状態 A β ペプチドの両方に対するそれらの結合を評価した。2つの主要なパターンが見いだされた(図 13)。

40

【 0 0 9 0 】

1つの群の抗体(図 13の左部分)は、免疫感作した遷移状態ペプチドに結合し、そして自然な A β₁₋₄₃ ペプチドと強力に交差反応した(各々が、ELISAプレートに直接吸着していた)。第2群(右部分)は、フェニルアラニンスタチン遷移状態 A β ペプチドに高い結合優先性を示し、そして自然な A β₁₋₄₃ との反応は最小であった。

【 0 0 9 1 】

強力な発色反応が、わずか10 μl のハイブリドーマ上清を使用してこのELISAにより得られたが、Hy培地単独またはPBSは低いバックグラウンドを与えた(図 13)。これらの結果は、競合的なELISAスクリーニングが結合の半定量的測定のみではあるが、遷移状態に

50

高度に選択的であり、しかも最も反応性のモノクローナル抗体を同定するための手段を提供することを示す。重要なことは、実験はマイクロタイタープレートに直接吸着したキャリアーを含まないA β ペプチドを用いて行ったことであり、キャリアーではなくA β ペプチドに対する抗体の特異性を示している点である。

【0092】

これらの知見は、生成した抗-A β 遷移状態抗体の幾つかが独特であることを示している。それらはフェニルアラニンスタチン - および正常 - A β ペプチドの両方に結合した。しかしそれらの遷移状態の選択的認識、および自然なA β_{1-43} との交差反応は、この結合する相互反応が従来の抗-天然A β 抗体とは大変異なることを示している。さらにこれらの新規抗体は天然のA β ペプチドを加水分解的開裂のために遷移状態に似た立体配置に強制することを示す。重要なことは、このELISAにおいてA β_{1-43} と最小の結合しか示さなかった抗体の中には、高度に感受性のある ^{125}I -A β_{1-43} 結合アッセイを使用して自然なペプチドとの交差反応性を示すものがあるという点である(表3)。

【0093】

ELISAを行って、抗-スタチン類似体抗体の正常A β_{1-43} ペプチドおよびスタチン遷移状態A β ペプチドへの結合も調査した(図14)。この抗体はこれらのキャリアーを含まないA β ペプチド(マイクロタイタープレートに直接吸着した)上のC-末端位置に結合し、それらの抗-ペプチド特異性が確認された。ほとんどの抗体がスタチンA β 遷移状態を優先的に認識したが、自然なA β_{1-43} と交差反応した。これはこれらの新規抗体が、天然のA β ペプチドを、そのC-末端アミノ酸の加水分解開裂のために遷移状態に似た立体配置に強制することを示す。そのような開裂はA β_{1-43} をA β_{1-40} またはA β_{1-39} のようなより害が少ない短いペプチドに転換すると予想される。

【0094】

クローン11E9はスタチン類似体について最強の選択性(preference)を有し、そして最大の触媒活性を有するらしい(図14)。幾つかのクローンは天然 対 スタチン遷移状態A β ペプチドで、それらの反応性に差異を表さなかった。このクローンもA β_{1-40} を用いて試験し、この短縮されたA β の40アミノ酸変異体と反応しない抗体を同定した(図14)。治療的に使用する場合、そのような抗体は小さく、しかも害が少ないA β_{1-40} に対して、血液中のより数が少ないがより有毒なA β_{1-43} 種に優先的に結合/開裂するはずである。

固相およびTLCのA β タンパク質溶解アッセイ

固相 ^{125}I -標識A β アッセイを開発して、特異的タンパク質溶解活性について抗-遷移状態抗体ハイブリドーマ上清をスクリーニングした。A β のアミノ酸14~25を包含するペプチドCys-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Tyr-アミド(配列番号5)を放射標識し、そしてチオール-反応性、ヨードアセチル-Sepharoseゲルにカップリングして、無関係な連結を作成した。生成物は抗-遷移状態抗体とインキューベーションし、そして固相マトリックスからの可溶性 ^{125}I -ペプチドの進行的放出をアッセイした。 ^{125}I -A β -Sepharoseからの放射活性の放出は、触媒活性を確認するために使用した(図15)。このアッセイは、このSepharoseを連結したA β 基質を迅速に加水分解するために、数種の異なるプロテアーゼの能力により確認した。インキューベーション時間に伴い上昇する可溶性 ^{125}I -ペプチドの放出により明らかにされるように、ペプチドは容易にタンパク質溶解的に開裂されることが可能であった。

【0095】

図15に示す結果は、幾つかのクローンの抗体を含有する培体が、この融合またはPBSおよびHy媒質対照からの他のクローンよりも大きな速度で ^{125}I -ペプチドを放出することを示す。大量のこれら抗体を得、精製し、そしてさらに一層早い開裂速度を達成するためにより高濃度で試験し、そして抗体が通常の酵素的動力学を使用した触媒様式で作用していることを確認することができる。 ^{125}I -ペプチドの組成の変化させることにより、この同じ方法を使用して、A β の異なる領域と反応性の抗体をアッセイすることができる。

【 0 0 9 6 】

A β の抗体が媒介する開裂についてより明確な証拠を得るために、薄層クロマトグラフィーに基づくオートラジオグラフィーアッセイを考案した。選択した抗-フェニルアラニンスタチン A β 遷移状態クローンを拡張し、そして腹水生産を誘導した。異なるモノクローナル抗体は、プロテイン A-Sepharose を使用して単離した。2つの¹²⁵I-標識ペプチド、A β_{1-40} および A β のアミノ酸9-25を包含する17merを使用して、ペプチド開裂について試験した。抗体を¹²⁵I-ペプチドに加えてインキューベートし、そして反応混合物をボリアミド薄層シートにスポット添加し、これを次いで異なる溶媒中で展開した。¹²⁵I-生成物の移動は、シートを定量的なホスホイメジャー (Phosphoimager) システムを使用して暴露することにより追跡した。生成された異なる標識ペプチドフラグメントの定量は、抗体の A β ペプチドへの添加が未処理ペプチドと比較して A β ペプチドの有意な分解を導くことを示した。

10

モノクローナル抗体による β -アミロイドの分解(disaggregation)

合成 A β ペプチドの自己-集合は、脳内でアミロイド斑に似た顕微鏡構造を導くと既に示され (Solomon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4109-12(1997) ; Solomon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:452-5(1996))、これがチオフラビン T に暴露すると同じ明るい緑色の蛍光を現す。これらの凝集物は大変安定であり、そして通常は溶解するために苛酷な界面活性剤または強酸が必要である。しかし特定の抗-A β モノクローナル抗体の結合がこのペプチドの初期の凝集を効果的に阻害し、そしてまた形成された A β 複合体を分解できることが証明された (Solomon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4109-12(1997) ; Solomon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:452-5(1996))。

20

【 0 0 9 7 】

放射活性のアッセイを使用して、本実験により生成された種々のモノクローナル抗体が、形成された A β 凝集物 (¹²⁵I 標識および非標識の可溶性 A β ペプチドを用いて作成した) を溶解する能力について迅速にスクリーニングした。標識した凝集物のアリコートに PBS、5A11抗-A β 抗体または等量の無関係なマウス抗体 (7D3、抗-ヒトトランスフェリンレセプター) とインキューベーションし、そして放出された放射活性のレベルを続いて測定した (表 9) 。 A β -特異的5A11抗体は A β 凝集物の80%を可溶化したが、等量の対照抗体はわずかな効果を有するだけで、平衡が可溶性 A β の抗体により媒介される結合により置き換わることを示唆していた。

30

【 0 0 9 8 】

【表 9】

表9 モノクローナル抗-A β 抗体による¹²⁵I-A β_{1-40} 凝集物の可溶化

添加	Ppt. 中の ¹²⁵ I-A β_{1-40} (cpm)	可溶化された量 (PBS 対照の%)
PBS 対照	3,420	-
+ 5A11 抗-A β	676	80
+ 7D3 抗-TfR	2,458	27

40

【 0 0 9 9 】

ベクター化された抗-A β / 抗-レセプター二重特異性抗体の生成

抗-A β 抗体は、抗-A β 抗体を脳に送達するためのベクターとして役立つ抗-トランス

50

フェリンレセプター抗体（抗-TfR）に連結した。7D3マウスモノクローナル抗体を構築物の抗-TfR部分として使用した。7D3はヒトレセプターに特異的であり、そして正常なヒトの脳組織中の皮質毛細管を選択的に免疫染色する（Recht et al., *J. Neurosurg.* 72:941-945 (1990)）。レセプターへの抗体のアタッチメントは、過剰なヒトのトランスフェリンにより遮断されない。この抗体により認識されるエピトープは、したがってレセプター-リガンド結合部位からは離れている。この7D3抗体および抗-A β 抗体を用いて構築された二重特異性抗体は、アルツハイマー病の患者の治療に有用となると予想される。

【0100】

アルツハイマー病のマウスモデルにおける実験のために、ラットで生成された抗-マウストランスフェリンレセプターモノクローナル抗体を得た。この抗体もリガンド結合に関与しないトランスフェリンレセプターエピトープを認識するように思われる。したがって抗体はマウス系に使用した時に、細胞増殖には効果を及ぼさない。

【0101】

合成の完了後に、抗-A β /抗-トランスフェリンレセプター二重特異性抗体の一連の機能アッセイ、精製およびサイズ分析を行った。マウストランスフェリンレセプターに対するラットモノクローナル抗体に加えて、5A11マウス抗-A β モノクローナル抗体から成るベクター化された二重特異性抗体を、トランスフェリン、レセプターを持つマウスの細胞に付く能力について試験した。二重特異性抗体の両成分は、この二重抗体(duplex)をトランスフェリンレセプター陽性マウス細胞と反応させ、そしてラットIgG-特異的またはマウス-IgG特異的蛍光2次抗体試薬のいずれかと反応させた時、細胞蛍光測定により細胞膜上に検出された（図16）。

【0102】

ハイブリッド試薬が 125 I-A β に結合する能力は、元の抗-A β 抗体の能力によく対応する（表10）。

【0103】

【表10】

表10 二重特異性抗体への 125 I-A β 結合

添加	125 I-A β_{1-40} 結合 (cpm)
対照	4,199
+抗-A β	23,301
+抗-A β /抗-レセプター	22,850

【0104】

これらの結合活性の両方が二重特異性抗体上にあることを確実にするために、トランスフェリンレセプター陽性細胞をハイブリッド試薬で処理し、非結合材料を洗い出し、そして次いで結合した抗体を持つ細胞を 125 I-A β_{1-40} に暴露した。非結合A β を洗い出した後、細胞に結合した放射活性を、二重特異性抗体を用いた前処理を除いて同一に調製した対照細胞と比較した。結果を表11に与え、そして抗体が同時に細胞膜に付き、そして 125 I-A β_{1-40} に結合できることを明らかに示すことにより、この二重特異性抗体の二重特異性を確認する。

【0105】

【表 11】

表11 二重特異性抗体が媒介する ^{125}I - $\text{A}\beta_{1-40}$ のレセプター陽性細胞への結合

細胞の前処理	^{125}I - $\text{A}\beta_{1-40}$ 結合 (cpm)
無し	2,367
+ 抗- $\text{A}\beta$ /抗-トランスフェリンレセプター	11,476

10

【0106】

脳への二重特異性抗体の細胞輸送

新規なベクター化された二重特異性構築物の脳への侵入(entry)をモニターすることができるよう、ラットモノクローナル抗-マウストランスフェリンレセプター抗体を、マウスモノクローナル抗体(アメリカン タイプ カルチャー コレクション(ATCC TIB 219)から得た。R17 217.1.3とも呼ばれる(Cell. Immunol. 83:14-25(1984))にカップリングした。二重特異性抗体を ^{125}I で標識し、そして正常なマウスにi.v.注射した。異なる時間の後、マウスを屠殺し、そして血液-脳バリアーを横断し、そして脳に入った ^{125}I -二重特異性抗体の量を、マウス毛細管消費法(mouse capillary depletion method)(Friden et al., J. Pharm. Exper. Ther. 278:1491-1498(1996); Triguero et al., J. Neurochem. 54:1882-1888(1990))により測定した。

20

【0107】

脳の実質または脳の毛細管画分に見いだされたベクター化二重特異性抗体の量は、脳のホモジネートの分別密度遠心後に測定した。これらの値をi.v.注射後の時間の関数としてプロットした(図17)。毛細管からの、そして実質への放射標識した二重特異性抗体の時間に依存した再分布は、大脳内皮の血液-脳バリアーをわたった通過と一致した(Joachim et al., Nature 341:6239:226-30(1989))。実質中でのさらにより多くの蓄積は、抗体が斑を持つマウスの大脳斑中の $\text{A}\beta$ に付いた時に起こると期待される。

30

生きているマウスにおける二重特異性抗体の脳分布のモニタリング

生きているマウスにおける脳内のベクター化された二重特異性抗体の侵入および蓄積を追跡する能力は、斑を持つマウスの脳内処置の開発で大いに援助されるだろう。そのような開発はタイム-コース実験を可能とし、そしてマウス間の変異性の問題を大きく減らすだろう。 ^{125}I -標識二重特異性抗体を用いた予備実験は、イムノシンチグラフィがこの系で利用できるかどうかを決定するために行った。第1段階として、放射性標識したベクター化二重特異性抗体(^{125}I -R17/5A11)または非-ベクター化対照二重特異性抗体を別個のマウスに投与した。連続的な脳の画像は、 ^{125}I -標識二重特異性抗体プローブをi.v.投与してから1、6、24および48時間後に累積した。この技法はどのくらい多くのシグナルが脳を通過して循環している血管-骨放射活性レベルによるものであるかを決定するには難点があるが、マウストランスフェリンレセプター反応性二重特異性抗体で処置したマウス対対照の二重特異性抗体を受容したマウスの脳で、有意な識別が記録された。ベクター化された作用物質を使用した時、脳のレベルは1から6時間の間に上昇し、そして次いで24から48時間の間に大変低いレベルに低下した。対照で処置したマウスは1から6時間の間に上昇を示さなかった。脳のレベルが24時間以降で低下した理由はわからないが、二重特異性抗体プローブの脱ハロゲン化により遊離の ^{125}I が放出されたのかもしれない。ヨウ素の使用が技術的な問題を与える場合には、ベクター化された二重特異性抗体に結合した ^{111}In (Sheldon et al., Nucl. Med. Biol. 18:519-526(1991))または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Texic et al., Nucl. Med. Biol. 22:451-457(1995))のような放射性標識を利用する別の方法を、さらなる実験で利用することができる。この造影法は、異なる物理的特性および改変された生物分

40

50

布を持つより小さいベクター化された二重特異性抗体（例えば $F(ab')_2$ ）が脳により効率的に浸透すかどうかを決定するために有用となるだろう。

ベクターが媒介する脳への輸送のための $F(ab')_2$ ヘテロ二量体

全抗体を脳に導入することは、それらが補体を結合し、そして補体が媒介する神経細胞の溶解を促進するならば、有害となるだろう。より小さいベクター化 $F(ab')_2$ 二重特異性試薬の開発は、この問題を回避するものと期待される。凝集した $A\beta$ 自体が任意の抗体の不存在下で補体を結合し、そして生じた炎症がアルツハイマー病の病状の原因となることが示された。類似の効果を有する脳内抗体の可能性は、抗体のFc領域を排除することにより大きく減少するだろう。さらにFab'の半分のカップリングには本来のヒンジ領域を利用するので、外来の置換連結基を加える必要はない。

10

【0108】

より速く、またはより効率的な脳内への侵入は、より小さい $F(ab')_2$ または Fv_2 試薬が脳内送達に提供する別の有力な利点を表す。そのような修飾された二重特異性試薬は、本明細書に記載する方法により調製し、そして完全なサイズのハイブリッド抗体と、それらの脳への到達における相対的効率、血液 - 脳バリアーの横断、および $A\beta$ 斑発生に及ぼす影響を比較することができる。しかし異なったサイズの抗-トランスフェリンレセプター二重特異性試薬のレセプターが媒介する細胞輸送によりトキシンを細胞に送達する能力を比較した時、わずかな差異しか見いだされなかったことは注目に値するほど重要である(Raso et al., *J. Biol. Chem.* 272:27623-27628(1997))。この観察は小さい変動が血液 - 脳バリアーを形成する脳の毛細管内皮細胞をわたる細胞輸送に少ししか見られないことを示しているかもしれない。しかし少なくとも、2種類のベクター化された分子は異なる生物分布および血漿半減期特性を有すると期待される (Spiegelberg et al., *J. Exp. Med.* 121:323(1965))。

20

発明の方法

抗原の合成。スタチンおよびフェニルアラニンスタチン遷移状態ペプチドは、自動化Fmoc化学を使用して合成した。Fmoc - スタチン (Sta)、[N-Fmoc-(3S,4S)-4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチル-ヘプタン酸] およびFmoc- " フェニルアラニンスタチン " (PhSta)、[N-Fmoc-(3S,4S)-4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸] は市販されているものを購入した。各ペプチドは純度をHPLCにより検査し、そしてその組成をマスペクトルおよびアミノ酸分析により確認した。

30

【0109】

ホスホンアミデート - およびホスホネートに基づく遷移状態ペプチドを合成するための設計計画および方法は簡単である (Bartlett et al., *Am. Chem. Society* 22:4618-4624(1983) ; Bartlett et al., *Biochemistry* 26:8553-8561(1987))。ペプチドのN - 末端部分 (N-アセチル-Cys-Met-Val-Gly) は、標準的な自動化Fmoc化学を使用して合成した。樹脂から開裂した後、N-アセチルテトラペプチドをピリジンジスルフィドで処理して、そのスルフヒドリル基を保護した。Cbz-グリシンホスホン酸モノメチルエステルの酸クロライド (Bartlett et al., *Am. Chem. Society* 22:4618-4624(1983) ; Bartlett et al., *Biochemistry* 26:8553-8561(1987)) は、自動化Fmoc化学を使用して合成したVal-Val-Ile-Ala-アミドにカップリングした。 $A\beta$ の最後のアミノ酸であるThrは、その非保護ヒドロキシル基を持つ潜在的問題により省略した。生成物であるCbz-Gly- PO_2^- -NH-Val-Val-Ile-Ala-アミドは、GlyとVal残基との間にホスホンアミデート(メチルエステル)結合を有する。次に保護されたN-アセチル-Cys-Met-Val-GlyペプチドがHBUT-活性化ペプチド結合によりこの遷移状態ペプチドのアミノ末端に付加できるように、Cbzブロッキング基を水素を使用して除去した。メルカプトエタノールおよびウサギ肝臓エステラーゼを用いた処理を使用してペプチドを脱ブロッキングした。合成スキーム中の各々の重要な成分は、HPLCにより純度を検査し、そしてその組成をマスペクトルおよびアミノ酸分析により確認した。

40

【0110】

還元されたペプチド結合連結は、 $A\beta$ 分子の示した部位に配置した。自動化Fmoc化学を使用してこのペプチドの合成を始めた。次いで前合成したFmocアミノアルデヒドを手で加

50

え、そしてイミドを還元した後、自動化合成を再開した(Meyer et al., J. Med. Chem. 38:3462-3468(1995))。

抗原のキャリアーへのカップリング。免疫応答を誘導するために、天然および遷移状態 A β ペプチドを、マレイミド-活性化KLHに標準的手法でカップリングした (Partis et al., J. Pro. Chem. 2:263-277(1983))。Cys残基を計画的にペプチドのN - またはC - 末端に配置して、それらをチオエーテル結合を介してマレイミド活性化キャリアータンパク質にカップリングさせるための適当な連結基を提供した。この安定な連結は、定めた方向にペプチドを付ける。~20ペプチド/KLHの付加が、この加水分解された結合物のアミノ酸分析により決定されたように、遷移状態アミノ酸含量に基づき得られた (Taso et al., Anal. Biochem. 197:137-142(1991))。

10

マウスの免疫感作。標準的なブルトコールを使用して、マウスを前記の章に記載したKLH-連結 A β ペプチドで免疫感作した。簡単に説明すると、この手法は完全フロイントアジュバントで、続いて2回目からは不完全フロイントアジュバント乳化した様々な抗原のi.v.注射を使用した。ハイブリドーマ融合の3日前、BALB/cマウスをPBS中の抗原で追加免疫感作した。

【0111】

~1カ月後、動物に不完全フロイントアジュバントで乳化した抗原を用いてi.p.追加免疫を与えた。これらの動物からの血清は、ELISAにより抗-ペプチド抗体について分析した。豊富な抗体生成を示すBALB/cマウスを、抗原を含むi.v.注射により追加免疫感作し、そして3日後、それらをモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマクローンの作成に使用した。

20

【0112】

A β ワクチンで免疫感作したマウスまたは抗-A β 腹水生成マウスのいずれもが、誘導された抗体の中にはマウス A β およびマウスアミロイド前駆体タンパク質と交差反応するものがあるにもかかわらず、病気の兆候を示さなかった。

ハイブリドーマの作成I。ハイブリドーマ融合は、フェニルアラニンスタチン遷移状態 A β -KLH抗原で免疫感作したマウスの脾臓を使用して行った。マウスから最高力価を持つ脾臓細胞をマウスミエローマNS-1細胞と融合して、標準的な手法に従いハイブリドーマを樹立した (Koehler et al., Nature 256:495(1975) ; R.H.Kennett、融合プロトコール。モノクローナル抗体 (Fusion Protocol. Monoclonal Antibodies)、R.H.Kennett、T.J.McKearn およびK.B.Bechtol編集。プレナム出版、ニューヨーク。365-367頁。(1980))。

30

¹²⁵I-A β 結合アッセイ。A β ₁₋₄₀およびA β ₁₋₄₃を¹²⁵Iで放射性標識し、そして次いでヨウ素化ペプチドを非標識材料からHPLCにより分離して、定量的な特異的活性を与えた (~2000Ci/ミリモル) (Maggio et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:5462-5466(1992))。このプローブを23 で1時間、精製した抗-A β 抗体または抗-A β 抗体を生産しているハイブリドーマクローンから取った培地とインキューベーションした。ポリエチレングリコール分離法を使用して、抗体に結合した¹²⁵I-A β ₁₋₄₃の量を検出した。連続希釈を使用することにより、このアッセイは異なるハイブリドーマ上清または精製抗体に関する相対的な結合親和性を提供することができる。

固相 A β タンパク質溶解アッセイ。固相¹²⁵I-標識 A β アッセイは、抗-遷移状態抗体ハイブリドーマ上清を特異的なタンパク質溶解活性についてスクリーニングするために開発した。A β のアミノ酸14~25を包含する C y s - H i s - G l n - L y s - L e u - V a l - P h e - P h e - A l a - G l u - A s p - V a l - G l y - T y r - アミド ペプチド (配列番号5) を¹²⁵Iで放射性標識し、そしてヨウ素化したペプチドを次いで非標識材料からHPLCにより分離した。高度に放射性のA β ペプチドをチオール-反応性のヨードアセチルSepharoseゲルにカップリングして、無関係な連結を形成した。抗体を標識したA β に加え、これを次いでpH7、25 で固相マトリックスから可溶性¹²⁵I-ペプチドの進行的放出についてアッセイした。このアッセイは、このSepharoseを連結したA β 基質を迅速に加水分解するために、数種の異なるプロテアーゼの能力により確認した。可溶性¹²⁵I-ペプチドの放出はインキューベーション時間に伴い上昇した。

40

50

【 0 1 1 3 】

A β は幾つかの自然に存在するプロテアーゼにより開裂されるが、予備試験では高レベルのバックグラウンド加水分解からの妨害が触媒抗体を生産するクローンのハイブリドーマ上清をアッセイした時には問題にならないことが示された。外因性のプロテアーゼに対してさらに注意しなければならないのは、すべてのハイブリドーマ細胞融合および無血清培地中での細胞培養を行うことである。

TLCによる A β タンパク質溶解アッセイ。 薄層クロマトグラフィーに基づくオートラジオグラフィーアッセイを使用して、A β の抗体が媒介する開裂に関するより明白な証拠を得た。選択した抗-フェニルアラニンスタチン A β 遷移状態クローンを拡張し、そして腹水生産を誘導した。異なるモノクローナル抗体は、プロテイン A-Sepharose を使用して単離した。開裂アッセイは ^{125}I -A β_{1-40} および A β のアミノ酸 9-25 を包含する ^{125}I -標識した 17-mer を使用した。2 つの ^{125}I -標識ペプチドの精製したモノクローナル抗体 5A11 および 6E2 への結合は、PEG 沈殿アッセイまたは同時 (co)-電気泳動法によるいずれかを使用することにより調査した。ペプチド開裂は抗体を ^{125}I -ペプチドに加え、インキューベートし、そして反応混合物をポリアミド薄層シートにスポット添加することにより試験した。クロマトグラフを異なる溶媒中 (例えば 0.5N HCl、0.5N NaOH、または pH 7 のリン酸バッファ) で展開し、 ^{125}I -生成物の移動はシートを定量的なホスホイメジャー (Phosphoimager) システムを使用して暴露することにより追跡した。

選択した抗-A β 抗体のスクリーニングおよび単離。 ELISA を使用して最初に抗-A β および抗-遷移状態 A β ペプチドモノクローナル抗体をスクリーニングした。遷移状態ペプチドおよび対応する自然な A β ペプチドの両方が別々のマイクロタイタープレートに吸着した。ハイブリドーマ上清は、天然および遷移状態 A β ペプチドの両方への相対的結合が定量できるように、2 つのアッセイを使用してスクリーニングした。拡張およびさらなる実験のために、遷移状態を優先的に認識したか、または高い親和性で A β に結合したモノクローナル抗体を生産しているクローンを選択した。

モノクローナル抗体の増殖および精製。 抗-A β 抗体を生産している選択したクローンおよび抗-レセプター抗体を生産しているクローンを、別個のプリスタン-適用マウスに注射した。腹水を集め、そして特異的モノクローナル抗体を単離した。腹水からの抗体の精製は、プロテイン A カラムを使用して行うか、あるいは抗体は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沈殿、そして S-300 カラムを通して 150kDa の免疫グロブリン面分を得ることにより腹水から単離した。一価の Fab フラグメントを調製し、そして確立された方法により単離した。それらの純度は還元および非還元条件下で SDS-PAGE により評価した。50 ~ 100mg の精製されたモノクローナル抗体が、各々の腹水を有するマウスから日常的に得られた。

A β 基質に対する触媒活性のさらなる特性決定。 単離された抗-遷移状態抗体の加水分解特性を完全に明確にするために、幾つかの大変重要な制御を行うことができる。第 1 に、適当な遷移状態ペプチドを用いて触媒抗体活性を完全に遮断する能力を確認した。この非開裂性「インヒビター」は、抗体結合部位により一層強く結合し、これにより基質が結合または開裂することを妨げるはずである。基質特異性は、異なるアミノ酸配列を有する偽ペプチドの開裂がないことを示すことによりさらに確立することができる。加水分解の生成物も HPLC、アミノ酸およびマスマスペクトル分析により完全に特性決定できる。遷移状態 A β には向けられていない対照抗体を試験し、そして触媒作用を生じないことを確認することができる。最後に触媒活性は、抗-遷移状態抗体の精製された Fab フラグメントに存在することを示すことができる。

精製した抗-A β 抗体は形成された A β 凝集物を溶解する。 (Walker et al., Soc. Neurosci. Abstr. 21:257(1995), Zlokovic, B.V., Life Science 59:1483-1497(1996))。A β 沈殿を形成し、そしてインビトロで測定した (Yankner et al., Science 250:279-282(1990)、Kowall et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:7247-7251(1991))。放射性アッセイを使用して生成された様々なモノクローナル抗体について、形成された A β 凝集物を溶解する能力を迅速にスクリーニングした。 ^{125}I -A β を非標識の可溶性ペプチドに加えた後、凝集物は pH 5 の溶液に入れるか、または PBS 中で一晩攪拌することにより形成された。標識した凝集物

10

20

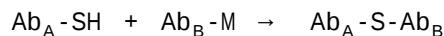
30

40

50

のアリコート PBS、5A11 抗-A β 抗体、または等量の無関係なマウス抗体 (7D3、抗-ヒトトランスフェリンレセプター) のいずれかと 1 時間、インキュベーションした。遠心後、沈殿中の放射活性のレベルを測定した。

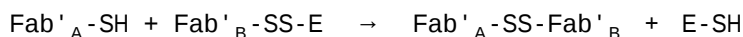
ベクター化された抗-A β / 抗-レセプター二重特異性抗体の作成。 抗-A β 抗体を化学的に抗-ヒトトランスフェリンレセプターおよび抗-マウストランスフェリンレセプター抗体に、異なる方法によりカップリングさせた (Raso et al., *J. Biol. Chem.* 272:27623-27628 (1997); Raso et al., トキシンに共有的または非共有的に結合した細胞標的キャリアーとしてのモノクローナル抗体。薬剤のレセプターが媒介するターゲッティング (Receptor mediated targeting of drugs)、第 82 巻で。G. Gregoriadis, G. Post, J. Senior and A. Trovet, 編集。NATO アドバンスト スタディーズ 研究所 (Advanced Studies Inst.)、ニューヨーク、119-138 (1984))。迅速なチオエーテル連結法を使用して、Traut's 試薬およびヘテロ二官能性 SMBP 試薬を使用した厳密に二重特異性ハイブリッドを形成した。1 成分をゆるやかにチオール基 (SH) に置換した。これらは以下の反応に従い、マレイミド-置換された (M) 第 2 成分と混合すると容易に反応してチオエーテル連結を形成する：



反応混合物の S-300 カラムでのゲル濾過により、300 kDa で、そして A β を結合する 2 つの部位に加えて脳毛細管内皮細胞上のトランスフェリンレセプターに付くための 2 つの部位を有する精製された二量体を得た。非-標的対照ハイブリッドは、非特異的 MOPC 抗体を抗-A β 抗体に連結することにより形成した。このハイブリッド抗体は A β に結合するが、トランスフェリンレセプターとは反応性ではなく、血液-脳バリアーを横断しないはずである。

【 0 1 1 4 】

2 つの異なる抗体型の F(ab')₂ フラグメントを同様にチオエーテルで連結して、補体が結合すれば神経毒効果を引き起こすが、補体に結合できない Fc を含まない試薬を形成することができる。このようなより小さい二重特異性ハイブリッド (100 kDa) は、F(ab')₂ フラグメントの重鎖を連結する本来のジスルフィドを還元することにより形成することができる (Raso et al., *J. Immunol.* 125:2610-2616 (1980))。生成したチオールを安定化し、そしてエルマン試薬 (E) を使用して、1 成分上のこれらの基を活性化する (Brennan et al., *Science* 229:81-83 (1985))。還元された Fab' を、別の特異性を有する活性化 Fab' と混合すると、反応：

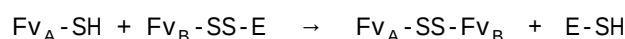


に従い、排他的に二重特異性 F(ab')₂ ハイブリッドを形成することができる。

S-200 カラムでの精製により、A β に結合するための 1 つの部位および脳の毛細管内皮細胞上の標的エピトープと相互反応するための 1 つの部位を有するハイブリッドを単離する。

【 0 1 1 5 】

同様の取り組みを使用して、血液-脳バリアーを横断するためにさらに小さいジスルフィド連結単鎖 Fv ヘテロ二重特異性二量体、Fv_A-SS-Fv_B (50 kDa) を作成することができる。可溶性 Fvs はカルボキシル-末端システインを保有するように構築して、以下の反応に示すジスルフィド交換をしやすくし、そして 50 kDa のヘテロ二量体を排他的に作成することができる：



全抗体と Fab' または Fv に基づく二重特異性試薬のいずれかとの間の平行比較では、後者がトランスフェリンレセプターが媒介する経路を介した細胞の取り込みについて、分子基準でより穏やかに効果的であることが示された (Raso et al., *J. Biol. Chem.* 272:27623-27628 (1997))。このようなより小さい構築物は細胞表面エピトープに対して一価であるので、このような知見は 2 つの表面レセプターの架橋結合が細胞の免疫複合体の取り込みには必要であるという懸念をめぐらせる。

二重特異性抗体の二重結合活性の機能的アッセイ。 ¹²⁵I-A β に結合するハイブリッド試薬の能力を、元の抗-A β 抗体と標準的な PEG 結合アッセイにより比較した (結合アッセイ

については表 10 を参照にされたい)。

【0116】

適当な二重特異性抗体が、トランスフェリンレセプターを持つヒトまたはマウス細胞に付く能力を、細胞蛍光測定により確認した。二重特異性抗体を、トランスフェリンレセプター陽性のヒトまたはマウス細胞と反応させ、そしてラットIgG-特異的またはマウスIgG-特異的蛍光2次抗体試薬を使用して釣り上げた。

^{125}I -A β を用いたA β 結合の測定およびポリエチレングリコール分離。二重特異性を確実とするために、ハイブリッド試薬の ^{125}I -A β のレセプターを持つ細胞への付着を媒介する能力を試験した。トランスフェリンレセプター陽性細胞を、ハイブリッド試験を用いて処理し、非結合材料を洗浄し、そして次いでこれらの細胞を ^{125}I -A β_{1-40} に暴露した。細胞を洗浄し、そして細胞に結合した放射活性の量を、二重特異性抗体での前処理を除き、同一に調製した対照細胞と比較した。

毛細管消費。二重特異性抗体を ^{125}I で標識し、そして正常マウスにi.v.注射した。異なる時間の後、マウスを屠殺し、そして血液-脳バリアーを横断し、そして脳に入った ^{125}I -二重特異性抗体の量を、マウス毛細管消費法(Friden et al., J.Pharm.Exper.Ther.278:1491-1498(1996); Triguero et al., J.Neurochem.54:1882-1888(1990))により測定した。脳の実質または脳の毛細管画分に見いだされたベクター化二重特異性抗体の量は、脳のホモジネートの分別密度遠心後に測定した。値をi.v.注射後の時間の関数としてプロットした。毛細管から実質への進行的通過は、血液-脳バリアーをわたった能動的な細胞輸送を示す。

イムノシンチグラフィー。生きてマウスの脳内への放射性標識された二重特異性抗体の侵入の視覚化が関与する脳内送達法をモニタリングするための非侵襲的方法を使用することができる。放射性標識されたベクター化された二重特異性抗体(^{125}I -R17/5A11)または非-ベクター化対照二重特異性抗体を別個のマウスに投与した。連続的な脳の画像は、 ^{125}I -標識二重特異性抗体プローブをi.v.投与してから1、6、24および48時間後に累積した。動物は、ケタミン/キシラジン麻酔を使用した暴露中に化学的に固定した。この造影法は、循環している抗-A β 抗体がi.v.投与した ^{125}I -A β が脳に入ることを防止するかどうかを決定するために大変有用となり得る。デジタルシンチグラフィーデータは標準および分析ソフトウェアで提供された積分関数を使用して定量した。

【図面の簡単な説明】

【図1】 43残基の β -アミロイドペプチド(A β)のアミノ酸配列表である(配列番号1)。

【図2】 β -アミロイドのN-末端配列から作成した抗原性ペプチド(A β_{1-16})のアミノ酸配列表である(配列番号2)。

【図3】 β -アミロイドの中央領域から作成した抗原性ペプチド(A β_{10-25})のアミノ酸配列表である(配列番号3)。

【図4】 β -アミロイドのC-末端配列から作成した抗原性ペプチドのアミノ酸配列表である(配列番号4)(A β_{35-43})。

【図5】 A β_{35-43} およびA β_{1-43} 対A β_{1-40} に結合するモノクローナル抗体を比較するELISAから得たデータの図表的表示である。

【図6】 ペプチドの異なるスタチン遷移状態類似体を作成するために、スタチル部分と独立して置き換えた β -アミロイドC-末端配列(配列番号4)から作成したペプチド中のアミド結合を示す。

【図7】 ペプチドの異なるフェニルアラニンスタチン遷移状態類似体を作成するために、スタチル部分と独立して置き換えた β -アミロイド中央配列(配列番号3)から作成したペプチド中のアミド結合を示す。

【図8】 自然な β -アミロイドペプチドと遷移状態フェニルアラニンスタチン β -アミロイドペプチド類似体との間の構造的比較である。

【図9】 自然な β -アミロイドペプチドと還元されたペプチド結合遷移状態 β -アミロイドペプチド類似体との間の構造的比較である。

【図10】 β -アミロイドの自然なC-末端領域、および β -アミロイドのC-末端領域($A\beta_{35-43}$)のホスホンアミデート遷移状態類似体の式的表示である。

【図11】 ホスホネートおよびホスホンアミデート模造物と比較した、亜鉛ペプチダーゼによるペプチド加水分解に関する推定上の遷移状態を示す。

【図12】 自然な β -アミロイドペプチドおよび、ホスホンアミデート結合に置き換えられたGly38とVal39との間のペプチド結合を有する遷移状態ホスホンアミデート β -アミロイドペプチドの構造的比較である。

【図13】 生成されたモノクローナル抗体の、遷移状態 β -アミロイドペプチド類似体への、正常 $A\beta_{1-43}$ への、そしてフェニルアラニンスタチン遷移状態 β -アミロイドペプチドへの結合を評価するELISAからのデータの図式的表示である。

10

【図14】 抗体の、スタチン遷移状態 β -アミロイドペプチド対自然な $A\beta_{1-43}$ および自然な $A\beta_{1-40}$ への結合を比較するELISAからのデータの図式的表示である。

【図15】 β -アミロイドの遷移状態類似体に対して生成されたモノクローナル抗体による ^{125}I - $A\beta$ -sepharoseの開裂を示すデータのグラフである。

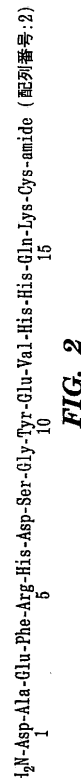
【図16】 二重特異性抗体のレセプター-陽性細胞への付着を定量するデータの図式的表示である。

【図17】 ベクター化された二重特異性抗体の脳への細胞輸送を追跡するために設計された実験から得たデータの図式的表示である。

【図1】



【図2】



【図 3】

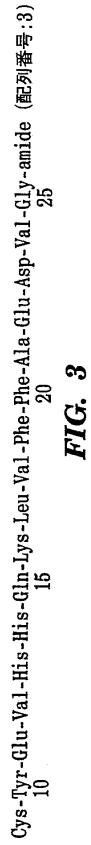


FIG. 3

【図 4】

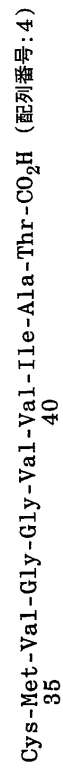


FIG. 4

【図 5】

□ 403-43 への結合
■ 403-44 への結合
▨ 403-40 への結合

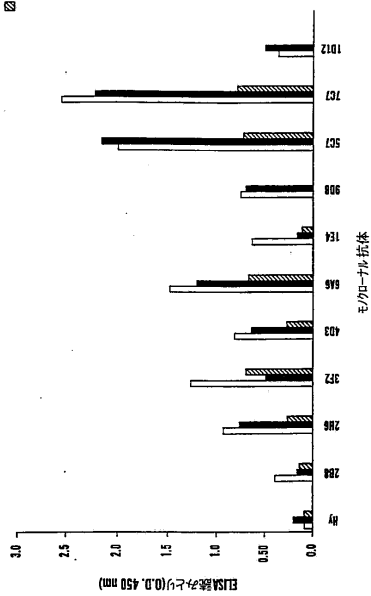


FIG. 5

【図 6】

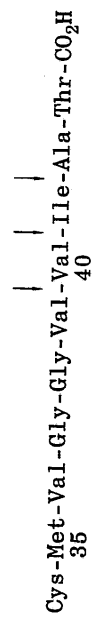
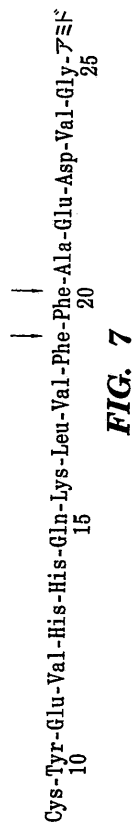
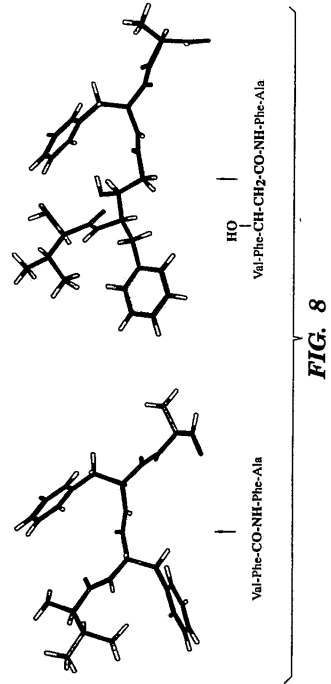


FIG. 6

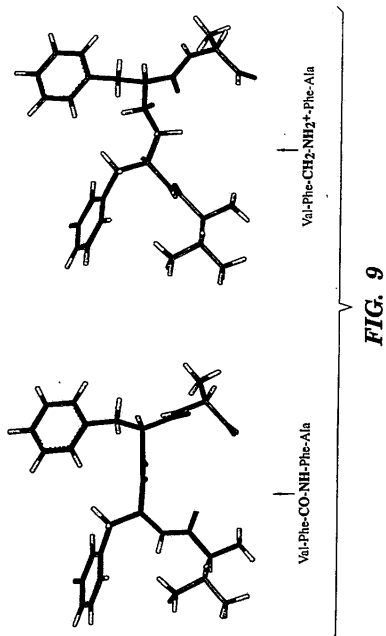
【 図 7 】



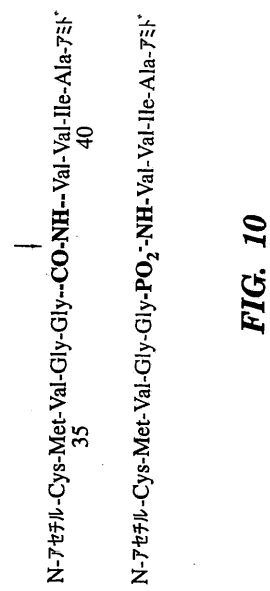
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【図 1 1】

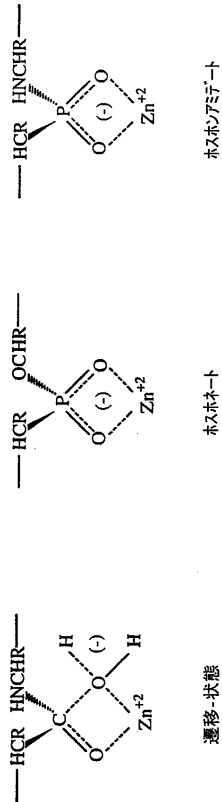
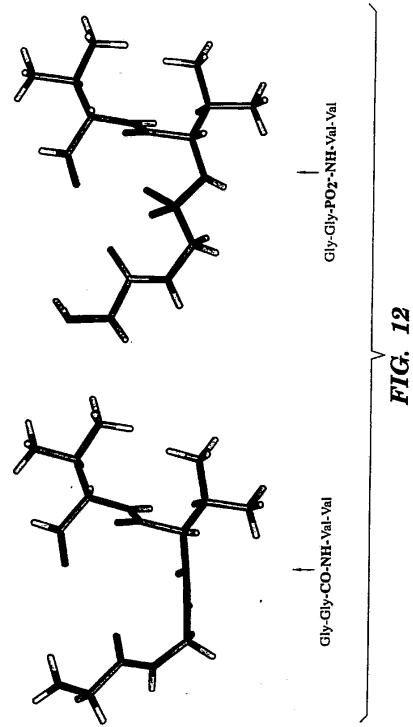


FIG. 11

【図 1 2】



【図 1 3】

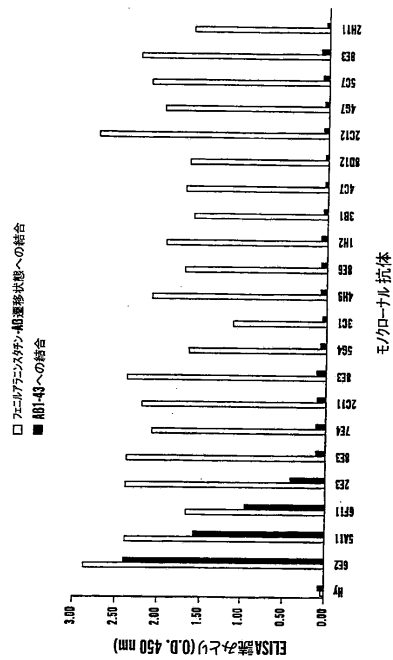


FIG. 13

【図 1 4】

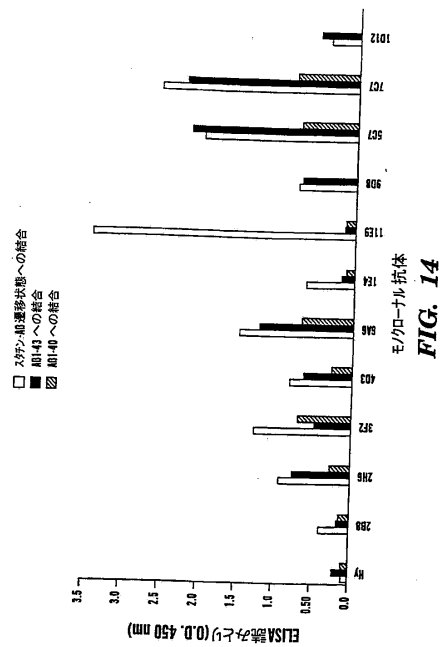


FIG. 14

【図 15】

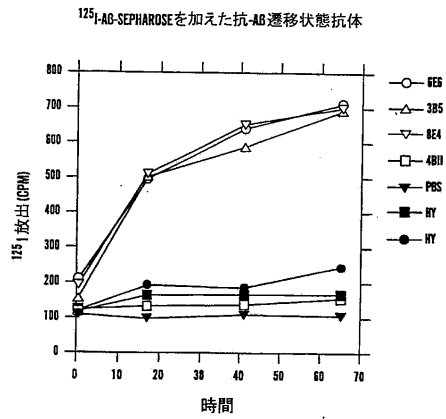


FIG. 15

【図 16】

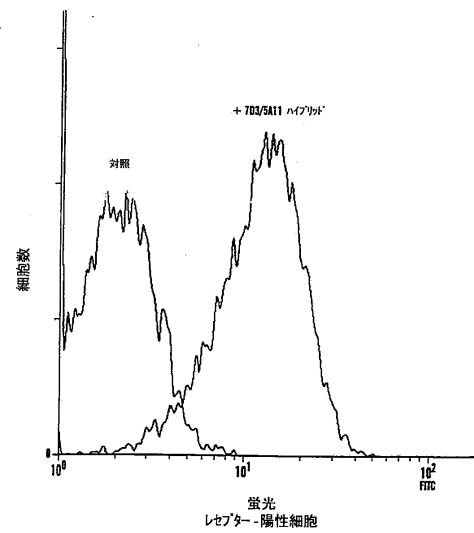


FIG. 16

【図 17】

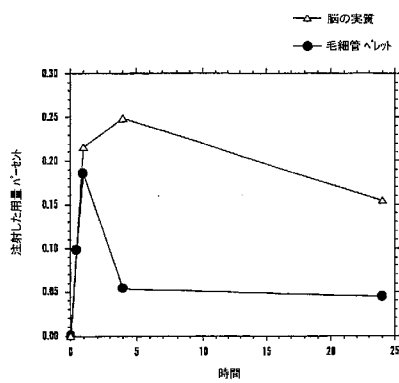


FIG. 17

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 G 0 1 N 33/577 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D
 G 0 1 N 33/577 B

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 0 6 0 6 6 (W O , A 1)
 特表平 0 3 - 5 0 4 1 3 0 (J P , A)
 特表平 0 9 - 5 0 0 0 1 0 (J P , A)
 特開平 0 8 - 2 6 8 9 1 1 (J P , A)
 特開昭 6 3 - 2 6 4 4 9 7 (J P , A)
 特開平 0 6 - 0 9 0 7 8 6 (J P , A)
 The Journal of Biological Chemistry, 1995, Vol.270, p.7013-7016
 Experimental Neurology, 1996, Vol.142, p.47-65
 小山次郎, 「免疫のしくみ」, (株)化学同人, 1 9 9 8 年, p.11
 Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1 9 9 0 年, Vol.29, pp.1296-1303

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 1 6 /
 C 1 2 N 1 5 /
 C A / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)

专利名称(译)	体内β-淀粉样蛋白水平的免疫控制		
公开(公告)号	JP5249482B2	公开(公告)日	2013-07-31
申请号	JP2001503623	申请日	2000-06-15
[标]申请(专利权)人(译)	波士顿生物医学研究中留特士		
申请(专利权)人(译)	在留特犹波士顿生物医学研究		
当前申请(专利权)人(译)	在留特犹波士顿生物医学研究		
[标]发明人	ラソビクター		
发明人	ラソ,ビクター		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 A61K39/395 A61P25/28 G01N33/53 G01N33/577 A61K38/00 C12N9/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/0007 A61P25/28 C12N9/0002 Y10S977/729 Y10S977/896 Y10S977/915 Y10S977/918 A61K39/3955 C07K16/18 C07K2317/34		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/28 G01N33/53.D G01N33/577.B		
优先权	60/139408 1999-06-16 US		
其他公开文献	JP2003506321A JP2003506321A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了双特异性抗体，其包含第一抗体结合特异性，其赋予双特异性抗体穿过血脑屏障的能力，和第二抗体特异性，赋予双特异性抗体结合β-淀粉样蛋白表位的能力。还公开了抑制人脑中β-淀粉样斑块形成或促进预先形成的β-淀粉样蛋白斑块解聚的方法。这些方法列举了双特异性抗体的给药。