

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-269804

(P2007-269804A)

(43) 公開日 平成19年10月18日(2007.10.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
審査請求 有 請求項の数 21 O L (全 87 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-139180 (P2007-139180)	(71) 出願人	501457567 ニューララブ・リミテッド
(22) 出願日	平成19年5月25日 (2007. 5. 25)		イギリス領バミューダ・エフェルO4スミス・フラッツ・セントジエームズコート102
(62) 分割の表示	特願2001-511319 (P2001-511319)の分割	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
原出願日	平成12年5月26日 (2000. 5. 26)	(72) 発明者	デイル・ビー・シエンク アメリカ合衆国カリフォルニア州94010バーリングラム・ロスアルトスドライブ1542
(31) 優先権主張番号	09/322, 289	(72) 発明者	フレデリク・バード アメリカ合衆国カリフォルニア州94404パシファイカ・パークパシファイカアベニュー1111
(32) 優先日	平成11年5月28日 (1999. 5. 28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 アミロイド形成疾患の予防および処置用医薬製剤

(57) 【要約】

【課題】患者の脳内のA のアミロイド沈着物が関連する疾患の処理のための改良された作用物質および手段を提供する。

【解決手段】アミロイド沈着物に対する有益な免疫原性応答を誘導する有効成分を含んでなる患者の脳内のA のアミロイド沈着物が関連する疾患の処置用の医薬製剤が提供される。かような有効成分は、A のN-末端フラグメントおよびそれらに結合する抗体を含む。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

有効成分として、

( i ) A 1 - 7 もしくは A 3 - 7、またはそのマルチマー、または  
 ( i i ) A 1 - 7 もしくは A 3 - 7 に対して免疫応答を特異的に誘発する A 1 - 7  
 もしくは A 3 - 7 のパリアント、アナログもしくはミメティック、またはそのマルチマ  
 ー  
 を含んでなる患者の脳内の A のアミロイド沈着物が関係する疾患を予防または処置する  
 ための医薬製剤。

## 【請求項 2】

有効成分が A 1 - 7 もしくは A 3 - 7 である請求項 1 記載の医薬製剤。

10

## 【請求項 3】

A 1 - 7 もしくは A 3 - 7 がその C 末端でヘテロロガスなタンパク質に連結している、請求項 1 または 2 記載の医薬製剤。

## 【請求項 4】

A 1 - 7 もしくは A 3 - 7 がその N 末端でヘテロロガスなタンパク質に連結している、請求項 1 または 2 記載の医薬製剤。

## 【請求項 5】

請求項 1 記載の医薬製剤であって、( i i ) における有効成分が A 1 - 7 もしくは A 3 - 7 と少なくとも 90% の配列同一性を示すアナログである、上記医薬製剤。

20

## 【請求項 6】

請求項 1 記載の医薬製剤であって、( i i ) おける有効成分が A 1 - 7 もしくは A 3 - 7 ついてのモノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ抗体である、上記医薬製剤。

## 【請求項 7】

有効成分がキャリアーに連結したコンジュゲートである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一つに記載の医薬製剤。

## 【請求項 8】

キャリアーが組織を横切る輸送を増強するペプチドである請求項 7 記載の医薬製剤。

## 【請求項 9】

キャリアーが A 1 - 7 もしくは A 3 - 7 に対する免疫応答を増強する請求項 7 記載の医薬製剤。

30

## 【請求項 10】

キャリアーが、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、卵白アルブミン、病原性細菌に由来する毒素、ユニバーサル T 細胞エピトープ、サイトカインおよびケモカインからなる群より選ばれる請求項 9 記載の医薬製剤。

## 【請求項 11】

キャリアーが、破傷風毒素、ジフテリア毒素、大腸菌毒素、コレラ毒素もしくはピロリ菌 ( *Helicobacter pylori* ) 毒素または弱毒化された該毒素の誘導体である請求項 10 記載の医薬製剤。

40

## 【請求項 12】

キャリアーが、インフルエンザ赤血球凝集素：HA<sub>307-319</sub> (PKYVKQNTLKLAT)、PADRE (AKXVAAWTLKAAA)、マラリア CS：T3 エピトープ (EKKI AKMEKASSVFNV)、B 型肝炎表面抗原：HBsAg<sub>19-28</sub> (FFLLTRILTI)、熱ショックタンパク質 65：hsp65<sub>153-171</sub> (DQSIGDLIAEAMDKVGNEG)、BCG (QVHPQPLPPAVVKL)、破傷風毒素 TT<sub>830-844</sub> (QYIKANSKFIGITEL)、破傷風毒素 TT<sub>947-967</sub> (FNNFTVSWRLVPKVSASHLE) および HTV<sub>gp120TI</sub> (KQIINMWQEVGKAMYA) からなる群より選ばれるユニバーサル T

50

細胞エピトープである請求項 10 記載の医薬製剤。

【請求項 13】

有効成分がキャリアーに化学的架橋により連結されている請求項 7 ~ 12 のいずれか一つに記載の医薬製剤。

【請求項 14】

有効成分がキャリアーとの融合タンパク質として発現される請求項 7 ~ 12 のいずれか一つに記載の医薬製剤。

【請求項 15】

製薬学的に許容されうるアジュバントをさらに含んでなる請求項 1 ~ 14 のいずれか一つに記載の医薬製剤。

10

【請求項 16】

アジュバントが有効成分と同時に投与される形態にある請求項 15 記載の医薬製剤。

【請求項 17】

有効成分がアジュバントにカップルされている、請求項 15 記載の医薬製剤。

【請求項 18】

アジュバントが有効成分の投与される前または後に投与される形態にある請求項 15 記載の医薬製剤。

【請求項 19】

有効成分がウイルスまたは細菌により提供される請求項 15 ~ 18 のいずれか一つに記載の医薬製剤。

20

【請求項 20】

(i) A<sub>1-7</sub>もしくはA<sub>3-7</sub>、またはそのマルチマー、または  
(ii) A<sub>1-7</sub>もしくはA<sub>3-7</sub>に対して免疫応答を特異的に誘発するA<sub>1-7</sub>もしくはA<sub>3-7</sub>のバリエーション、アナログもしくはミメティック、またはそのマルチマーと、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、卵白アルブミン、病原性細菌に由来する毒素、ユニバーサルT細胞エピトープ、サイトカインおよびケモカインからなる群より選ばれるキャリアーのコンジュゲート。

【請求項 21】

キャリアーがインフルエンザ赤血球凝集素：HA<sub>307-319</sub> (PKYVKQNTLKLAT)、PADRE (AKXVAAWTLKAAA)、マラリア CS : T3 エピトープ (EKKI AKMEKASSVFNV)、B型肝炎表面抗原：HBsAg<sub>19-28</sub> (FFLLTRILTI)、熱ショックタンパク質65：hsp65<sub>153-171</sub> (DQSIGDLIAEAMDKVGNEG)、BCG (QVHPQPLPPAVVKL)、破傷風毒素TT<sub>830-844</sub> (QYIKANSKFIGITEL)、破傷風毒素TT<sub>947-967</sub> (FNNFTVSVFWRLVPKVSASHLE) およびHTV<sub>gp120TI</sub> (KQIINMWQEVGKAMYA) からなる群より選ばれるユニバーサルT細胞エピトープである、請求項 20 記載のコンジュゲート。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、免疫学および医学の技術分野に属する。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病 (AD) は、老年痴呆をもたらす進行性の疾患である (例えば、非特許文献 1 ; 特許文献 1 ; 非特許文献 2 ; 非特許文献 3 ; 非特許文献 4、参照)。おおまかにこの疾患は2つのカテゴリーに分けられる：高齢 (65+年) に発生する後期発生、および老年期からかなり前、すなわち35から60歳の間には発生する早期発生。両種類の疾患において、病状は同じであるが、より若い年代で始まる場合が異常はより重篤であり、しかも広範になる傾向がある。この疾患は脳内の少なくとも2種類の創傷、老人性斑および神経細

50

線維変化が特徴である。老人性斑は、脳組織の切片の顕微鏡分析により中央で見ることが  
できる細胞外のアミロイド沈着物を含む最高150 $\mu$ mにわたる組織崩壊した神経網の領域で  
ある。神経細線維変化は、対になって互いにねじれた2つのフィラメントから成るタン  
パク質に結合した微小管の細胞内沈着物である。

#### 【0003】

斑の主要構成成分は、A $\beta$  または  $\beta$ -アミロイドペプチドと呼ばれるペプチドである。  
A $\beta$  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タンパク質内の幾つかの突然変異がアルツ  
ハイマー病の存在と関連付けられている (非特許文献5の (バリン<sup>717</sup>からイソロイシン  
) ; 非特許文献6の (バリン<sup>717</sup>からグリシン) ; 非特許文献7の (バリン<sup>717</sup>からフェニ  
ルアラニン) ; 非特許文献8の (リシン<sup>595</sup>-メチオニン<sup>596</sup>からアスパラギン<sup>595</sup>-ロイシ  
ン<sup>596</sup>への二重突然変異変化)、参照)。かような突然変異は、APPからA $\beta$  への増加また  
は改変したプロセッシングにより、特に、APPの増加した量のA $\beta$  の長い形態 (すなわち  
、A $\beta$  1-42およびA $\beta$  1-43) へのプロセッシングによりアルツハイマー病を引き起こすと  
考えられている。プレセニリン (presenilin) 遺伝子、PS1およびPS2のような他の遺伝子  
の突然変異は、APPのプロセッシングに間接的に影響を及ぼし、長い形態のA $\beta$  の量を増  
加させると考えられている (非特許文献9、参照)。このような考察は、A $\beta$  そして特に  
その長い形態がアルツハイマー病の原因であることを示している。

10

#### 【0004】

A $\beta$  のホメオパティックな投薬用量 (10<sup>-2</sup> mg/日以下) を安定化される前のAD患者  
に投与することが提案されている (特許文献2、参照)。約5リットルの血漿を有する典  
型的なヒトでは、この投薬用量の上限は多くても2 pg/mlの濃度を生じると予想される。  
ヒトの血漿中のA $\beta$  の正常な濃度は、典型的には50~200pg/mlの範囲である (非特許文  
献10、参照)。特許文献2で推奨されている投薬用量は循環している内因性のA $\beta$  レベル  
を単に上昇させるだけであるので、しかも特許文献2では免疫刺激剤としてアジュバント  
の使用をすすめていないので、治療的利益を生じるとは思えない。

20

#### 【0005】

【特許文献1】Hardy et al., 国際公開第92/13069号明細書

【特許文献2】McMichael、欧州特許第526,511号明細書

【非特許文献1】Selkoe, TINS, 16, 403-409 (1993)

30

【非特許文献2】Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-447 (1994)

【非特許文献3】Duff et al., Nature 373, 476-477 (1995)

【非特許文献4】Games et al., Nature 373, 523 (1995)

【非特許文献5】Goat et al., Nature 349, 704 (1991)

【非特許文献6】Chartier Harlin et al., Nature 353, 844 (1991)

【非特許文献7】Murrell et al., Science 254, 97 (1991)

【非特許文献8】Mullan et al., Nature Genet. 1, 345 (1992)

【非特許文献9】Hardy, TINS 20, 154 (1997)

【非特許文献10】Seubert et al., Nature 359, 325-327 (1992)

#### 【発明の開示】

40

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

本発明は、患者に有益な免疫応答を生じる条件下で、A $\beta$  のフラグメントまたはA $\beta$  内  
の特定のエピトープに対する抗体を患者に投与することにより、とりわけアルツハイマー  
病および他のアミロイド形成疾患を処置することを対象とする。すなわち本発明は、神経  
病理学、そして患者の中にはアルツハイマー病に付随する認知障害を予防または緩和する  
ための治療的処方について、長い間の必要性を満たす。

#### 【0007】

本出願は、1998年11月30日に出願された国際公開第99/27944号明細書、1997年12月2日  
に出願されたUSSN60/067,740号明細書、1998年4月7日に出願されたUSSN 60/080,970号明

50

細書および1998年11月30日に出願されたUSSN09/201,430号明細書を引用することによりすべての目的について各々の内容を全部、本明細書の内容とする。

【0008】

1つの観点では、本発明は患者の脳内のA $\beta$ のアミロイドの沈着物が関係する疾患を予防または処置する方法を提供する。そのような疾患には、アルツハイマー病、ダウン症候群および認知障害を含む。後者はアミロイド形成疾患の他の特徴を含んでも、含まなくても生じ得る。幾つかの方法は、アミロイド沈着物の成分に特異的に結合する抗体の有効用量を患者に投与することを必要とする。そのような方法は、ヒト患者のアルツハイマー病を予防または処置するために特に有用である。幾つかの方法は、A $\beta$ に結合する抗体の有効用量を投与することを必要とする。幾つかの方法は、A $\beta$ の残基1-10内のエピトープに特異的に結合する抗体の有効用量を投与することを必要とする。幾つかの方法では、抗体はA $\beta$ の残基1-6内のエピトープに特異的に結合する。幾つかの方法では、抗体はA $\beta$ の残基1-5内のエピトープに特異的に結合する。幾つかの方法では、抗体はA $\beta$ の残基1-7内のエピトープに特異的に結合する。幾つかの方法では、抗体はA $\beta$ の残基3-7内のエピトープに特異的に結合する。幾つかの方法では、抗体はA $\beta$ の残基1-3内のエピトープに特異的に結合する。幾つかの方法では、抗体はA $\beta$ の残基1-4内のエピトープに特異的に結合する。幾つかの方法では、抗体はA $\beta$ の遊離N-末端残基を含んで成るエピトープに結合する。幾つかの方法では、抗体はA $\beta$ の1-10の残基内のエピトープに結合し、ここでA $\beta$ の残基1および/または残基7はアルハラギン酸である。幾つかの方法では、抗体は完全長のアミロイド前駆体タンパク質（APP）に結合することなくA $\beta$ ペプチドに特異的に結合する。幾つかの方法では、抗体のアイソタイプはヒトIgG1である。

10

20

【0009】

幾つかの方法では、抗体は患者のアミロイド沈着物に結合し、そしてアミロイド沈着物に対する除去（clearing）応答を誘導する。例えば、そのような除去応答はFcレセプターが媒介する食作用により行うことができる。

【0010】

この方法は、無症候性患者および疾患の症状を現在示している患者の両方に使用することができる。そのような方法に使用する抗体は、ヒト、ヒト化、キメラまたは非ヒト抗体であることができ、そしてモノクローナルまたはポリクローナルであることができる。幾つかの方法では、抗体はA $\beta$ ペプチドで免疫感作したヒトから調製され、このヒトは抗体で処置されるヒトであることができる。

30

【0011】

幾つかの方法では、抗体は医薬組成物として医薬キャリアーと共に投与される。幾つかの方法では、抗体は0.0001~100mg/kg、好ましくは少なくとも1mg/kg体重の抗体の用量で投与される。幾つかの方法では、抗体は長期間、例えば少なくとも6カ月間にわたり多回の投薬用量を投与される。幾つかの方法では、抗体は徐放性組成物として投与される。抗体は例えば、腹腔内、経口的、皮下、頭蓋内、筋肉内、局所的、鼻内または静脈内に投与することができる。

【0012】

幾つかの方法では、抗体は少なくとも1つの抗体鎖をコードするポリヌクレオチドを患者に投与することにより投与される。ポリヌクレオチドは、患者内で発現して抗体鎖を生成する。場合により、ポリヌクレオチドは抗体の重および軽鎖をコードする。ポリヌクレオチドは患者内で発現して重および軽鎖を生成する。幾つかの方法では、患者は患者の血中の投与された抗体レベルをモニタリングされる。

40

【0013】

別の観点では、本発明は患者の脳内のA $\beta$ のアミロイド沈着物が関係する疾患を予防または処置する方法を提供する。例えばこの方法は、アルツハイマー病またはダウン症候群または認知障害を処置するために使用することができる。そのような方法は、A $\beta$ 内の特定のエピトープに対する免疫原性応答を誘導するA $\beta$ のフラグメントまたはそれらの同族体を投与することを必要とする。幾つかの方法は、A $\beta$ の少なくとも残基1-5のN-末端セ

50

グメントを含んで成るポリペプチドの有効用量を患者に投与することを必要とし、A の第一残基がポリペプチドのN-末端残基であり、ここでポリペプチドにはA のC-末端セグメントが無い。

【0014】

したがって、例えば、本発明によれば、

1の態様として、有効成分として、(i) A<sub>1-7</sub>もしくはA<sub>3-7</sub>、またはそのマルチマー、または(ii) A<sub>1-7</sub>もしくはA<sub>3-7</sub>に対して免疫応答を特異的に誘発するA<sub>1-7</sub>もしくはA<sub>3-7</sub>のバリエーション、アナログもしくはミメティック、またはそのマルチマーを含んでなる患者の脳内のA のアミロイド沈着物が関係する疾患を予防または処置するための医薬製剤が提供される。

10

A<sub>1-7</sub>もしくはA<sub>3-7</sub>そのC末端でヘテロロガスなタンパク質に連結されているもよいし、そのN末端でヘテロロガスなタンパク質に連結しているもよい。

【0015】

さらなる態様の発明は、上記有効成分がキャリアーに連結したコンジュゲートの形態にあってもよい。

【0016】

また、他の態様の方法では、A のN-末端セグメントを含んで成るポリペプチドの有効用量を患者に投与することを必要とし、セグメントはA の残基1-3で始まり、そしてA の残基7-11で終わる。幾つかの方法は、A<sub>43</sub>の残基12-43内のエピトープに対する免疫原性応答を誘導せずに、A のN-末端セグメントに対する免疫原性応答を誘導する作用物質の有効用量を患者に投与することを必要とし、セグメントはA の残基1-3で始まり、そしてA の残基7-11で終わる。

20

【0017】

上記の幾つかの方法では、A のN-末端セグメントがそのC-末端でヘテロロガスなポリペプチドに連結されている。上記の幾つかの方法では、A のN-末端セグメントがそのN-末端でヘテロロガスなポリペプチドに連結されている。上記の幾つかの方法では、A のN-末端セグメントがそのNおよびC末端で第一および第二のヘテロロガスなポリペプチドに連結されている。上記の幾つかの方法では、A のN-末端セグメントがそのN末端でヘテロロガスなポリペプチドに連結し、そしてそのC-末端でN-末端セグメントの少なくとも1つのさらなるコピーに連結されている。上記の幾つかの方法では、ヘテロロガスなポリペプチドおよびそれによるB細胞応答はN-末端セグメントに対している。上記の幾つかの方法では、ポリペプチドはさらにN-末端セグメントの少なくとも1つのさらなるコピーを含んで成る。上記の幾つかの方法では、ポリペプチドはN-末端からC-末端、A のN-末端セグメント、N-末端セグメントの複数のさらなるコピー、およびヘテロロガスなアミノ酸セグメントを含んで成る。上記の幾つかの方法では、N-末端セグメントはA<sub>1-7</sub>から成る。上記の幾つかの方法では、N-末端セグメントはA<sub>3-7</sub>から成る。

30

【0018】

幾つかの方法では、フラグメントはA<sub>43</sub>内の少なくとも5個のC-末端アミノ酸を含まない。幾つかの方法では、フラグメントはA<sub>43</sub>からの最高10個の連続するアミノ酸を含んで成る。フラグメントは典型的には患者に1用量あたり10マイクログラムより多く投与される。

40

【0019】

幾つかの方法では、フラグメントはA<sub>43</sub>ペプチドに対する免疫応答を強化するアジュバントと共に投与される。アジュバントおよびフラグメントは、いずれかの順序で、または組成物として一緒に投与することができる。アジュバントは例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、MPL(商標)、QS-21(Stimulon(商標))または不完全フロイントアジュバントであることができる。

【0020】

本発明はさらに、A のフラグメントまたは上記のようなA の同じエピトープに対す

50

る免疫原性応答を誘導する他の作用物質、およびアジュバントを含んで成る医薬組成物を提供する。本発明はまた、上記の任意の抗体および医薬的に許容され得るキャリアーを含んで成る医薬組成物も提供する。

#### 【0021】

別の観点では、本発明は患者の脳内のA の沈着物が関係する疾患（例えばアルツハイマー病）の処置における活性について、抗体をスクリーニングする方法を提供する。そのような方法は、抗体を、A の1と3の間の残基で始まるA のN-末端セグメントの少なくとも5個の連続するアミノ酸を含んで成るポリペプチドと接触させることを必要とし、ポリペプチドにはA のC-末端セグメントが無い。次に抗体がポリペプチドに特異的に結合するかどうかを決定し、特異的結合は抗体が疾患の処理に活性を有することの指標を提供する。

10

#### 【0022】

別の観点では、本発明は抗原が会合した生物学的物体の除去における活性について、抗体をスクリーニングする方法を提供する。このような方法は、抗原に会合した生物学的物体および抗体およびFcレセプターを持つ食作用細胞を、媒質中で合わせることを必要とする。媒質中に残る抗原が会合した生物学的物体の量をモニタリングする。抗原が会合した生物学的物体の量の減少は、抗体が抗原に会合した生物学的物体に対する除去活性を有することを示す。抗原は組織サンプルまたは単離された形態として提供され得る。例えば抗原は、アルツハイマー病患者またはアルツハイマーの病状を有する哺乳動物の脳に由来する組織サンプルとして提供され得る。抗体の除去活性が試験される他の組織サンプルには、ガン性組織サンプル、ウイルスに感染した組織サンプル、炎症性細胞、非悪性の異常な細胞増殖を含んで成る組織細胞、または異常な細胞外マトリックスを含んで成る組織サンプルが含まれる。

20

#### 【0023】

別の観点では、本発明は患者のアミロイド沈着物を検出する方法を提供する。そのような方法は、A のアミノ酸1-10内のエピトープに特異的に結合する抗体を患者に投与し、そして患者の脳内に抗体の存在を検出することを必要とする。幾つかの方法では、抗体はA の残基4-10内のエピトープに特異的に結合する。幾つかの方法では、抗体が常磁性標識で標識され、そして核磁気共鳴断層撮影法により検出される。

#### 【0024】

本発明はさらに、上記方法に使用するために適する診断キットを提供する。そのようなキットは、A の残基1-10内のエピトープに特異的に結合する抗体を含んで成る。幾つかのキットは、アルツハイマー病をインビボ診断またはモニタリングする抗体の使用を記載するラベルを有する。

30

#### 【0025】

< 発明の詳細な記述 >

< 定義 >

用語「実質的に同一」とは、2つのペプチド配列をプログラムGAPまたはBESTFITによりデフォルトギャップ加重値を使用して最適に並べた時、少なくとも65パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも80または90パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも95パーセント以上（例えば99パーセント以上の配列同一性）の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは同一ではない残基の位置は、保存的アミノ酸置換により異なる。

40

#### 【0026】

配列比較に関しては、典型的には1つの配列が参照配列として作用し、それに対して試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用して、試験および参照配列をコンピューターに入力する時、必要ならば配列の座標を設計し、そして配列アルゴリズムプログラムのパラメーターを設計する。次に配列比較アルゴリズムは、設計されたプログラムのパラメーターに基づき、参照配列に対して試験配列（1つまたは複数）のパーセント配列同一性を計算する。

50

## 【0027】

比較のための最適な配列の整列は、例えばSmith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 48 2 (1981)の部分的相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性整列アルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85 : 2444 (1988)の類似性方法に関する調査により、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行により(ウィスコンシン州、マジソンの575サイエンスドクター、遺伝子コンピュータグループのウィスコンシン 遺伝子ソフトウェア パッケージ中のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)、あるいは視覚的観察により(一般的に、Ausubel et al., 同上を参照にされたい)行うことができる。パーセント配列同一性および配列類似性を決定するために適するアルゴリズムの1例は、BLASTアルゴリズムであり、これはAltschul et al., J. Mol. Biol. 215 : 403-410 (1990)に記載されている。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、バイオテクノロジー情報に関する国立センター(National Center for Biotechnology Information)を通して公に入手可能である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。典型的にはデフォルトプログラムのパラメーターを使用して配列比較を行うことができるが、カスタマイズされたパラメーターも使用することができる。アミノ酸配列に関しては、BLASTプログラムはデフォルトとして3のワード長(W)、10の予想値(E)およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用する(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915 (1989)を参照にされたい)。

10

## 【0028】

保存的または非保存的とアミノ酸置換を分類する目的で、アミノ酸を以下のように分類する：グループI(疎水性側鎖)：ノルロイシン、met、ala、leu、ile；グループII(中性の親水性側鎖)：cys、ser、thr；グループIII(酸性側鎖)：asp、glu；グループIV(塩基性側鎖)：asn、gln、his、lys、arg；グループV(鎖の方向に影響を与える残基)：gly、pro；およびグループVI(芳香族側鎖)：trp、tyr、phe。保存的置換には同じ種類中のアミノ酸間での置換を含む。非保存的置換は、これらの1種類の員を別の種類の員と交換することから成る。

20

## 【0029】

本発明の治療薬は、典型的には望ましくない混入物の混じりがない。これは薬剤が典型的には少なくとも約50重量/重量%の純度であり、ならびに実質的に妨害タンパク質および混入物を含まないことを意味する。時折、この薬剤は少なくとも80重量/重量%、そしてより好ましくは少なくとも90または約95重量/重量%の純度である。しかし通例のタンパク質精製法を使用して、少なくとも約99重量/重量%の均一なペプチドを得ることができる。

30

## 【0030】

2つの物体間の特異的結合とは、少なくとも $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  M<sup>-1</sup>または $10^{10}$  M<sup>-1</sup>の親和性を意味する。 $10^8$  M<sup>-1</sup>より大きい親和性が好ましい。

## 【0031】

用語「抗体」または「免疫グロブリン」とは、完全な抗体およびそれらの結合フラグメントを含むように使用する。典型的には、フラグメントはそれらが由来した完全な抗体と抗原フラグメントに対する特異的結合を競合し、フラグメントには別れた重鎖、軽鎖Fab、Fab'F(ab')<sub>2</sub>、FabcおよびFvを含む。フラグメントは組換えDNA法により、または完全な免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的分離により生成される。または用語「抗体」は他のタンパク質との融合タンパク質として、化学的に結合または発現された1以上の免疫グロブリン鎖を含む。また用語「抗体」は、二重特異性抗体も含む。二重特異性または二官能性抗体は、2種類の重/軽鎖対および2種類の結合部位を有する人工的ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'フラグメントの連結を含め、種々の方法により生成することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990)； Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)を参照にされたい。

40

## 【0032】

50

APP<sup>695</sup>、APP<sup>751</sup>およびAPP<sup>770</sup>とは、それぞれヒトAPP遺伝子によりコードされる695、751および770アミノ酸残基長のポリヌクレオチドを称する。Kanget al., *Nature* 325, 773 (1987); Ponte et al., *Nature* 331, 525 (1988); およびKitaguchi et al., *Nature* 331, 530 (1988)を参照にされたい。ヒトのアミロイド前駆体タンパク質 (APP) 内のアミノ酸は、APP770アイソフォームの配列に従い番号が割り当てられている。A 39、A 40、A 41、A 42およびA 43のような用語は、アミノ酸残基1 - 39、1 - 40、1 - 41、1 - 42および1 - 43を含むA ペプチドを言う。

【0033】

「抗原」とは、抗体が特異的に結合する物体である。

【0034】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」とは、Bおよび/またはT細胞が反応する抗原上の部位を称する。B-細胞エピトープは、隣接アミノ酸またはタンパク質の3次元折り畳みにより並列した非隣接アミノ酸の両方から形成することができる。隣接アミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には変性溶媒に暴露されてもそのままであるが、3次元的な折り畳みにより形成されたエピトープは、典型的には変性溶媒を用いた処理で失われる。エピトープは典型的には少なくとも3個、そしてより多くは少なくとも5または8~10個のアミノ酸を独特な空間的立体配置で含む。エピトープの空間的立体配置を決定する方法は、例えばx-線結晶回折および2次元核磁気共鳴を含む。例えば、エピトープマッピング プロトコール イン メソッズ イン モレキュラー バイオロジー (*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*)、第66巻、Glenn E. Morris, 編集 (1996)を参照にされたい。同じエピトープを認識する抗体は、標的抗原に対する別の抗体の結合を遮断する1抗体の能力を示す単純な免疫アッセイで同定することができる。T-細胞は、CD8細胞について約9個のアミノ酸またはCD4細胞について約13~15個のアミノ酸の連続するエピトープを認識する。エピトープを認識するT細胞は、エピトープに应答して、適用したT細胞による<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みにより測定されるような、抗原-依存的増殖を測定するインビトロアッセイにより (Burke et al., *J. Inf. Dis.* 170, 1110-19 (1994)、抗原-依存的致死作用により (細胞傷害性Tリンパ球アッセイ、Tigges et al., *J. Immunol.* 156, 3901-3910)、またはサイトカイン分泌により同定することができる。

【0035】

用語「免疫学的」または「免疫」应答とは、受容する患者中のアミロイドペプチドに対する有益な体液性 (抗体により媒介される) および/または細胞性 (抗原特異的なT細胞またはそれらの分泌産物により媒介される) 应答である。そのような应答は免疫原の抗原により誘導される能動的应答、あるいは抗体または適用したT細胞の投与により誘導される受動的应答であることができる。細胞性免疫应答は、抗原特異的なCD4<sup>+</sup>Tヘルパー細胞および/またはCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞を活性化するために、クラスIまたはクラスII MHC分子に会合したポリペプチドエピトープの提示により誘導される。应答は単球、マクロファージ、NK細胞、好塩基球、樹状細胞、星状細胞、ミクログリア細胞、好酸球または他の先天性免疫成分の活性化も含むことができる。細胞性免疫学的应答の存在は、増殖アッセイ (CD4<sup>+</sup>T細胞) またはCTL (細胞傷害性Tリンパ球) アッセイにより測定することができる (Burke、同上; Tigges、同上を参照にされたい)。免疫原の防御的または治療的效果に対する体液性および細胞性应答の相対的貢献度は、抗体およびT細胞を免疫感作した同系動物から別個に単離し、そして防御的または治療的效果を第二個体で測定することにより識別することができる。

【0036】

「免疫原性作用物質 (immunogenic agent)」または「免疫原」は、場合によりアジュバントと一緒に哺乳動物に投与すると、それに自身に対する免疫学的应答を誘導することができる。

【0037】

用語「裸 (naked) のポリヌクレオチド」とは、コロイド状の材料を複合していないポリヌクレオチドを称する。裸のポリヌクレオチドは時折、プラスミドベクター中にクロー

10

20

30

40

50

ン化される。

【0038】

用語「アジュバント」は、抗原と一緒に投与した時に抗原に対する免疫応答を増強するが、単独で投与した時には抗原に対する応答を生じない化合物を称する。アジュバントはリンパ球の再集合、Bおよび/またはT細胞の刺激、およびマクロファージの刺激を含む幾つかのメカニズムにより免疫応答を強化することができる。

【0039】

用語「患者」には、予防的または治療的処置のいずれかを受けるヒトおよび他の哺乳動物個体を含む。

【0040】

分かれたまたは単量体 A とは、A の可溶性の単量体ペプチド単位を意味する。単量体 A を調製するための一方法は、凍結乾燥したペプチドをDMSOのみに超音波処理しながら溶解する。生成した溶液を遠心して不溶性粒子を除去する。凝集したA はオリゴマーの混合物であり、ここで単量体単位は非共有結合により一緒に保持されている。

【0041】

抗体間の競合は任意のアッセイで測定され、ここで試験下の免疫グロブリンは参照抗体の、A のような共通抗原に対する特異的結合を阻害する。多種類の競合的結合アッセイ、例えば：固相直接または間接ラジオイムノアッセイ (RIA)、固相直接または間接酵素イムノアッセイ (EIA)、サンドイッチ競合アッセイ (Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9: 242-253 (1983)を参照にされたい)；固相直接ビオチン - アビジンEIA (Kirkland et al., *J. Immunol.* 137: 3614-3619 (1986)を参照にされたい)；固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ (Harlow and Lane, *抗体、アラボラトリーマニュアル (Antibodies, A Laboratory Manual)*、コールドスプリングハーバー出版(1988)を参照にされたい)；I-125標識を使用した固相直接標識RIA (Morelet et al., *Molec. Immunol.* 25(1): 7-15 (1988)を参照にされたい)；固相直接ビオチン - アビジンEIA (Cheung et al., *Virology* 176: 546-552 (1990))；および直接標識RIA (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82 (1990))が知られている。典型的には、そのようなアッセイには固体表面に結合した精製された抗原またはこれらのいずれかを持つ細胞、非標識試験免疫グロブリンおよび標識参照免疫グロブリンの使用を含む。競合阻害は、試験免疫グロブリンの存在下で固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することにより測定する。通常、試験免疫グロブリンは過剰に存在する。競合アッセイにより同定される抗体は (競合抗体) には、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体および立体傷害が起こるために参照抗体が結合するエピトープに十分近い隣接するエピトープに結合する抗体を含む。通常、競合抗体が過剰に存在する時、競合抗体は共通する抗原に対する参照抗体の特異的結合を少なくとも50または75%まで阻害する。

【0042】

1以上の述べた要素を「含んで成る」組成物または方法は、具体的に述べていない他の要素を含んでもよい。例えばA ペプチドを含んで成る組成物は、単離したA ペプチドおよびより大きなポリペプチド配列の成分としてのA ペプチドの両方を包含する。

【0043】

< 概論 >

幾つかのアミロイド形成疾患および症状は、患者の脳内で不溶性塊にまで凝集したA ペプチドの沈着物の存在を特徴とする。そのような疾患にはアルツハイマー病、ダウン症候群および認知障害が含まれる。後者はアルツハイマー病およびダウン症候群の症状ではあるが、このような両疾患の他の特徴を含むことがない。例えば、軽度な認知障害または加齢に関係する記憶喪失は、未だに発症していない、あるいは完全なアルツハイマー病を発症することはない患者にも起こることがある。軽度な認知障害は、慣例に従いミニ - 精神 - 状態試験 (Mini-Mental-State-Exam) に基づく採点により定めることができる。そのような疾患は - プリーツ化したシート構造を有し、コンゴレッド色素により染色されるA の凝集を特徴とする。患者のアミロイド沈着物の成分に対する免疫原性応答を生成

10

20

30

40

50

することにより、アルツハイマー病または他のアミロイド形成疾患の予防または処置の基本的取り組みは、国際公開第99/27944号明細書（引用により本明細書に編入する）に記載されている。本出願は基本的な取り組みの効力を反復し、そして確認する。しかし本出願は、主に改良された試薬および方法を対象とする。このような改良は、一部は出願人が免疫原性応答が向けられるべき A 内の好適なエピトープの位置を定めたことが前提となる。A 内の好適なエピトープの同定は、増強した効力を有する作用物質および方法をもたらし、副作用の可能性を減らし、かつ/または製造、配合および投与の容易さを増す。

【0044】

< 治療薬 >

免疫原性応答は、免疫原が投与されて患者の A に反応性の抗体を誘導した時に能動的となり得るか、あるいは自身が患者の A に結合する抗体が投与された時に受動的となり得る。

【0045】

1. 能動的免疫応答を誘導する薬剤

治療薬は A ペプチド内の特定のエピトープに特異的に向けられた免疫原性応答を誘導する。好適な薬剤は A ペプチド自身およびそれらのセグメントである。A ペプチドの好適なエピトープに対する抗体を誘導し、かつ/またはそれと交差反応するそのような種々のセグメント、同族体および自然な A ペプチドの模造物も使用することができる。

【0046】

-アミロイドペプチドとも知られている A 、または A 4 ペプチド（米国特許第4,666,829号明細書；Glennner & Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)を参照にされたい）は39~43アミノ酸のペプチドであり、これはアルツハイマー病の特徴的な斑の主成分である。A はより大きなタンパク質APPを、および セクレターゼと呼ばれる2種類の酵素によりプロセッシングすることにより生成される（Hardy, TINS 20, 154 (1997)を参照にされたい）。アルツハイマー病と関係するAPPの既知の突然変異は、または -セクレターゼの部位の近位、すなわち A 内で起こる。例えば717位はAPPの A へのプロセッシングでAPPの -セクレターゼ開裂部位に近く、そして670/671位は、-セクレターゼ開裂の部位に近い。突然変異は、A が形成される開裂反応と相互作用することにより、生成した A の42/43アミノ酸形の量が増えたためにADを引き起こすと考えられている。

【0047】

A は、古典的でしかも代替的な補体カスケードを固定(fix)し、そして活性化する異常な特性を有する。特に、A はC1qそして最終的にはC3biに結合する。この会合はマクロファージの結合を容易とし、B細胞の活性化を導く。加えてC3biはさらに分解し、そして次にT細胞依存的様式でB細胞上のCR2に結合し、これらの細胞の活性化を10,000上昇させる。このメカニズムはA に過剰な他の抗原の免疫応答の中で免疫応答を生じさせる。

【0048】

A は、数種の自然に存在する形態を有する。ヒトのA 形は、A 39、A 40、A 41、A 42およびA 43と呼ばれている。これらのペプチドの配列およびそれらのAPP前駆体との関係は、Hardy et al., TINS 20, 155-158(1977)の図1により具体的に説明されている。例えばA 42は配列：

【0049】

【表1】

**H2N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-  
Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-  
Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH(配列番号:42)**

10

20

30

40

## 【0050】

を有する。

## 【0051】

A 41、A 40およびA 39はA 42とは、C-末端からそれぞれAla、Ala-IleおよびAla-Ile-Valの省略により異なる。A 43はC-末端のトレオニン残基の存在によりA 42とは異なる。

## 【0052】

A の免疫原性フラグメントは、幾つかの理由により本方法では完全な分子よりも有利である。第一に、A 内の特定のエピトープのみがアルツハイマー病の処置に有用な免疫原性応答を誘導するので、そのようなエピトープを含むフラグメント塊の等しい投薬用量は、完全なA の投薬用量よりも有用な免疫原性エピトープをより高いモル濃度で提供する。第二に、A の特定の免疫原性フラグメントは、A が由来するAPPタンパク質に対して有意な免疫原性応答を生じることなくアミロイド沈着物に対する免疫原性応答を生成する。第三に、A のフラグメントはそれらサイズが短いので完全なA よりも製造が単純である。第四に、A のフラグメントは完全なA と同じ様式で凝集せず、医薬的組成物の調製およびそれらの投与を単純化する。

10

## 【0053】

A の免疫原性フラグメントの幾つかは、自然なペプチドに由来する少なくとも2、3、5、6、10または20個の連続するアミノ酸の配列を有する。幾つかの免疫原性フラグメントは、A から多くても10、9、8、7、5または3個の連続する残基を有する。A のN-末端半分に由来するフラグメントが好適である。好適な免疫原性フラグメントには、A 1-5、1-6、1-7、1-10、3-7、1-3および1-4を含む。A 1-5の表示は、例えばA の残基1-5を含み、そしてA の他の残基を欠いているフラグメントを示す。A の残基1-3で始まり、そしてA の残基7-11で終わるフラグメントが特に好適である。フラグメントA 1-12も使用することができるが、それほど好ましくはない。幾つかの方法では、フラグメントはA 1-10以外のN-末端フラグメントである。それほど好ましくはないが他のフラグメントには、A 13-28、17-28、1-28、25-35、35-40および35-42を含む。これらのフラグメントは、使用前に実施例に記載するようなアミロイド沈着物を除去または防止する活性について、スクリーニングする必要がある。

20

## 【0054】

A の自然に存在する形態中に存在する少なくとも1つ、そして時には少なくとも5または10個のC-末端アミノ酸を欠くフラグメントを使用する方法もある。例えば、A 43のC-末端から5個のアミノ酸を欠くフラグメントは、A のN-末端から最初の38個のアミノ酸を含む。アミロイド斑の他の成分、例えばシヌクレイン (synuclein) およびそれらのエピトープ性フラグメントも免疫原性応答を誘導するために使用することができる。

30

## 【0055】

特に示さない限り、A に関しては上記に示した自然なヒトのアミノ酸配列ならびに対立遺伝的、種および誘導された変異体を含む同族体を含む。同族体は典型的には、しばしば保存的置換により1、2または幾つかの位置で自然に存在するペプチドとは異なる。同族体は典型的には少なくとも80または90%の自然なペプチドとの配列同一性を現す。幾つかの同族体は、1、2または幾つかの位置での非天然アミノ酸またはNもしくはC末端アミノ酸の修飾も含む。例えば、A の位置1および/または7での自然なアスパラギン酸残基は、イソアスパラギン酸に置き換えることができる。非天然アミノ酸の例は、D-アミノ酸、 $\beta$ -二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、4-ヒドロキシプロリン、 $\beta$ -カルボキシグルタメート、 $\epsilon$ -N,N,N-トリメチルリシン、 $\epsilon$ -N-アセチルリシン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、 $\epsilon$ -N-メチルアルギニンおよびイソアスパラギン酸を含む。フラグメントおよび同族体は、以下に記載するように、トランスジェニック動物モデルで未処理またはプラセボ対照と比較した予防的または治療的効力をスクリーニングすることができる。

40

50

## 【0056】

A、そのフラグメントおよび同族体は、固相ペプチド合成または組換え発現により合成することができ、あるいは自然な供給源から得ることができる。自動化ペプチド合成器が、カリフォルニア州、ホスター市のアプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)のような様々な供給元から市販されている。組換え発現は、大腸菌(E. coli)のような細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞中で行うことができる。組換え発現に関する手法は、Sambrook et al., *モレキュラー クローニング: アラボラトリー マニュアル* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (C.S. H. P. 出版、NY 第2版、1989)により記載されている。A ペプチドの幾つかの形態も市販されている(例えば、アメリカンペプチドカンパニー社(American Peptides Company, Inc.)、サニーヴァレ、カリフォルニア州およびカリフォルニアペプチドリサーチ社(California Peptide Research Inc.)、ナバ、カリフォルニア州)。

10

## 【0057】

治療薬には、より長いポリペプチド、例えば他のアミノ酸と一緒に含むA ペプチドの活性フラグメントも含む。例えば好適な薬剤は、ヘテロロガスなアミノ酸配列に対してヘルパーT-細胞応答を誘導し、これによりA セグメントに対するB-細胞応答を誘導するヘテロロガスなアミノ酸配列に融合したA のセグメントを含んで成る融合タンパク質を含む。そのようなポリペプチドは以下に記載するように、動物モデルで未処理またはプラセボ対照と比較する予防的または治療的効力をスクリーニングを行うことができる。A ペプチド、同族体、活性フラグメントまたは他のポリペプチドは、会合して、または多量体形または解離形で投与することができる。治療薬は、単量体の免疫原性薬剤の多量体も含む。

20

## 【0058】

さらなる変更態様では、A のフラグメントのような免疫原性ペプチドは、免疫原性組成物の一部としてウイルスまたは細菌により提示され得る。免疫原性ペプチドをコードする核酸は、ウイルスまたは細菌のゲノムまたはエピソームに包含される。場合により核酸は免疫原性ペプチドが分泌されるタンパク質として、またはペプチドが表示されるようにウイルスの外表面タンパク質または細菌の膜貫通タンパク質との融合タンパク質として発現される様式で包含される。そのような方法に使用されるウイルスまたは細菌は、非病原性であるか、または弱毒化されている。適当なウイルスはアデノウイルス、HSV、ベネゼエラのウマの脳脊髄炎ウイルスおよび他のアルファウイルス、水痘性口内炎ウイルスおよび他のラドウイルス、痘疹および鶏痘を含む。適当な細菌には、サルモネラ属および赤痢菌属を含む。免疫原性ペプチドのHBVのHBsAgへの融合が特に適当である。治療薬はA と有意なアミノ酸配列類似性を必ずしも持つ必要はないが、それでもA の模造物として役立つ、そして同様な免疫応答を誘導するペプチドおよび他の化合物も含む。例えば、-ブリーツ化シートを形成する任意のペプチドおよびタンパク質を適性についてスクリーニングすることができる。A または他のアミロイド形成ペプチドに対するモノクローナル抗体に対する抗-イディオタイプ抗体も使用することができる。そのような抗-Id抗体は抗原を模し、そしてそれに対する免疫応答を生じる(エッセンシャルイムノロジー(Essential Immunology) (Roit 編集、ブラックウェルサイエンティフィック出版社(Blackwell Scientific Publications)、パロアルト、第6版)、181頁を参照にされたい)。A ペプチド以外の薬剤は、上記のA の好適な1以上のセグメント(例えば1-10、1-7、1-3および3-7)に対する免疫原性応答を誘導すべきである。好ましくはそのような薬剤は、A の他のセグメントに対することなくこれらのセグメントの1つに特異的に向けられた免疫原性応答を誘導する。

30

40

## 【0059】

ペプチドおよび他の化合物のランダムライブラリーも、適性についてスクリーニングすることができる。段階的様式で合成することができる多くの種類の化合物については、組み合わせライブラリーを作成することができる。そのような化合物には、ポリペプチド、ペータ-ターン模造物、多糖、リン脂質、ホルモン、プロスタグランジン、ステロイド、

50

芳香族化合物、複素環化合物、ベンゾジアゼピン、オリゴマー性N-置換グリシンおよびオリゴカルバメートを含む。化合物の大きな組み合わせライブラリーは、Affymax、国際公開第95/12608号明細書、Affymax、国際公開第93/06121号明細書、コロンビア大学、国際公開第94/08051号明細書、薬局方、国際公開第95/35503号明細書およびScripps、国際公開第95/30642号明細書（すべての目的のためにこれらの各々を引用により本明細書に編入する）に記載された、コードされた合成ライブラリー（ESL）法により構築することができる。ペプチドライブラリーも、ファージ表示法により作成することができる。例えばDevlin、国際公開第91/18980号明細書を参照にされたい。

#### 【0060】

組み合わせライブラリーおよび他の化合物は、A または他のアミロイド形成ペプチド 10  
 に対して特異的であることが知られている抗体またはリンパ球（BまたはT）に結合する  
 それらの能力を決定することにより適性を最初にスクリーニングされる。例えば最初のスク  
 リーニングは、A またはそれらのフラグメントに対する任意のポリクローナル血清また  
 はモノクローナル抗体を用いて行うことができる。化合物を次いで、A 内の特異的エ  
 ピトープ（例えば1-10、1-7、1-3、1-4、1-5および3-7）への結合についてスクリーニ  
 ングすることができる。化合物は、抗体のエピトープ特異性をマッピングするために記載し  
 たものと同じ手法により試験することができる。そのようなスクリーニングにより同定さ  
 れた化合物は、さらにA またはそれらのフラグメントに対する抗体または反応性リンパ  
 球を誘導する能力について分析する。例えば血清の多回希釈物は、A またはそれらのフラ  
 グメントをプレコートしたマイクロタイタープレート上で試験することができ、および標 20  
 準的なELISAを行ってA またはフラグメントに対する反応性抗体についての試験を行う  
 ことができる。次いで化合物は、実施例に記載するように、アミロイド形成疾患に罹患し  
 易くしたトランスジェニック動物で予防的および治療的効力を試験することができる。そ  
 のような動物には、例えばGames et al., 同上により記載されたAPPの717突然変異を持つ  
 マウス、およびMcConlogue et al., 米国特許第5,612,486およびHsiao et al., *Science*  
 274, 99 (1996); Staufenbiel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1  
 977); Sturchler-Pierrat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1977)  
 ; Borchelt et al., *Neuron* 19, 939-945(1997)に記載されたようなAPPの670/671スウェ  
 ーデン突然変異を持つマウスを含む。同じスクリーニング法を、上記のように、A の他  
 の有力な薬剤の同族体およびA のフラグメントを含むより長いペプチドに使用すること 30  
 ができる。

#### 【0061】

##### 2. 受動免疫応答を誘導する薬剤

本発明の治療薬は、A またはアミロイド斑の他の成分に特異的に結合する抗体も含む  
 。そのような抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであることができる。そのよ  
 うな抗体の中には、解離形には結合せずにA の凝集形に特異的に結合するものもある。  
 中には凝集形には結合せずに解離形に特異的に結合するものもある。凝集形および解離形  
 の両方に結合するものもある。そのような抗体の中には、自然に存在するA の長い形（  
 すなわちA<sub>42</sub>およびA<sub>43</sub>）には結合せずに、自然に存在するA の短い（すなわちA<sub>39</sub>、  
 A<sub>40</sub>またはA<sub>41</sub>）には結合するものもある。抗体の中には短い形には結合せずに長い形 40  
 に結合するものもある。抗体の中には完全長のアミロイド前駆体タンパク質には結合せず  
 に、A に結合するものもある。治療法に使用する抗体は通常、完全な定常領域またはFc  
 レセプターと相互反応するために少なくとも十分な定常領域を有する。ヒトアイソタイプ  
 IgG1は、食作用細胞上のFcRIレセプターについて、最高の親和性を有するヒトアイソタイ  
 プなので好適である。二重特異性Fabフラグメントも使用することができ、ここで抗体の  
 1つの腕はA に対する特異性を有し、そして他の腕はFcレセプターに対する特異性を有  
 する。抗体の中には約 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ または $10^{10} \text{ M}^{-1}$ 以上の結合親和性でA に結合  
 するものもある。

#### 【0062】

ポリクローナル血清は、典型的にはA 長にわたり幾つかのエピトープに結合する混合 50

した抗体群を含む。しかしポリクローナル血清は、A 1-10のようなA の特定のセグメントに特異的であり得る。モノクローナル抗体は、立体配置的または立体配置的不是なエピトープとなり得るA 内の特異的エピトープに結合する。抗体の予防的および治療的効力は、実施例に記載するトランスジェニック動物モデル法を使用して試験することができる。好適なモノクローナル抗体は、A の残基1-10内のエピトープに結合する（自然なA の第一N末端残基を1と呼ぶ）。好適なモノクローナル抗体の中には、アミノ酸1-5内のエピトープ、および中には5-10内のエピトープに結合するものもある。幾つかの好適な抗体は、アミノ酸1-3、1-4、1-5、1-6、1-7または3-7内のエピトープに結合する。幾つかの好適な抗体は、A の残基1-3で始まり、そして残基7-11で終わるエピトープに結合する。それほど好ましくはない抗体は、A の残基10-15、15-20、25-30、10-20、20、30または10-25を含むエピトープに結合するものを含む。そのような抗体は、使用前に実施例に記載するマウスモデルで活性についてスクリーニングされる。例えば、残基10-18、16-24、18-21および33-42内のエピトープに結合する特定の抗体には活性が無いことが分かった。幾つかの方法では、異なるエピトープに対する結合特異性を有する多数のモノクローナル抗体を使用する。そのような抗体は、連続的に、または同時に投与することができる。A 以外のアミロイド成分に対する抗体も使用することができる。例えば抗体をタンパク質であるシヌクレインに会合したアミロイドに向けることができる。

10

#### 【0063】

抗体が例えばA 1-5のような具体的残基内のエピトープに結合すると言われる時、これは具体的な残基（すなわちこの例ではA 1-5）を含むポリペプチドに特異的に結合することを意味する。そのような抗体はA 1-5内の各残基と接触する必要はない。またA 1-5内の各々の1つのアミノ酸置換または欠失が、結合親和性に有意に影響を及ぼす必要もない。抗体のエピトープ特異性は、例えばファージ表示ライブラリーを形成することにより決定することができ、ここで種々の員がA の異なるサブ配列を表示する。次いでファージ表示ライブラリーは、試験下で抗体に特異的に結合する員を選択される。配列のファミリーが単離される。典型的には、そのようなファミリーは共通するコア配列を含み、そして種々の員でフランキング配列の長さが異なる。抗体に対して特異的結合を表す最短のコア配列が、抗体に結合するエピトープを定める。また抗体は、すでにエピトープ特異性が決定された抗体との競合アッセイでエピトープ特異性について試験することもできる。例えばA に対する結合について3D6抗体と競合する抗体は、3D6と同じかまたは類似するエピトープ、すなわち残基A 1-5内に結合する。同様に、10D5抗体と競合する抗体は、同じかまたは類似するエピトープ、すなわち残基A 3-6内に結合する。エピトープ特異性に関して抗体をスクリーニングすることは、治療効力の有用な予測である。例えば、A の残基1-7内のエピトープに結合すると決定された抗体は、アルツハイマー病の予防および処置に有効であると思われる。

20

30

#### 【0064】

A の他の領域に結合することなく、A の好適なセグメントに特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体は、他の領域に結合するモノクローナル抗体または完全なA に結合するポリクローナル血清に比べて多数の利点を有する。第一に、等しい塊の投薬用量について、好適なセグメントに特異的に結合する抗体の投薬用量は、アミロイド斑の除去に有効なより高いモル投薬用量の抗体を含む。第二に好適なセグメントに特異的に結合する抗体は、完全なAPPポリペプチドに対する除去応答を誘導せずに、アミロイド沈着物に対する除去応答を誘導することができ、これにより副作用の可能性を減らす。

40

#### 【0065】

##### i. 免疫グロブリンの一般的特性

基本的な抗体構造単位は、四量体サブユニットから構成されることが知られている。各四量体は、2つの同一なポリペプチド鎖の対から成り、各対は1つの「軽」（約25kDa）および1つの「重」鎖（約50~70kDa）を有する。各鎖のアミノ-末端部分は、抗原認識の原因である約100~110以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ-末端部分

50

は、主にエフェクター機能の原因である定常領域を定める。

【0066】

軽鎖は または のいずれかに分類される。重鎖は  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$  または  $\epsilon$  に分類され、そしてそれぞれ IgG、IgM、IgA、IgD および IgE として抗体のアイソタイプを定める。軽鎖および重鎖内で、可変および定常領域は約12以上のアミノ酸の“J”領域により連結され、重鎖は約10以上のアミノ酸の“D”領域も含む。(一般に、基礎免疫学(Fundamental Immunology)(Paul. W. 編集、第2版、ラベン(Raven)出版、N.Y.、(1989)、第7章を参照にされたい)(これはすべての目的のために、引用により本明細書に編入する)。

【0067】

各軽/重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。すなわち、完全な抗体は2つの結合部位を有する。二官能性または二重特異性抗体を除き、2つの結合部位は同じである。鎖はすべて、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域により連結された比較的保存された枠組み構造領域(framework region: FR)の同じ一般構造を表す。各対の2つの鎖に由来するCDRは、枠組み構造領域により整列され、特異的エピトープへの結合を可能とする。N-末端からC-末端へ、両重および軽鎖は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含んで成る。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabata, 免疫学的に興味深いタンパク質の配列(Proteins of Immunological Interest(国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランド州、1987および1991)、または Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989)の定義に従う。

【0068】

iii. 非ヒト抗体の生産

非ヒト、すなわちマウス、モルモット、霊長類、ウサギまたはラットのモノクローナル抗体の生産は、例えば動物をAで免疫感作することにより行うことができる。AまたはAの免疫原性フラグメントを含んで成る、より長いポリペプチドまたはAに対する抗体に対する抗-イデオタイプ抗体も使用することができる。Harlow & Lane、抗体：アラボラトリーマニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)(CSHP NY, 1988)(すべての目的のために、引用により本明細書に編入する)。そのような免疫原は、自然な供給源から、ペプチド合成により、または組換え発現により得ることができる。場合により、免疫原を以下に記載するようにキャリアタンパク質と融合するか、またはそうではなく複合化して投与することができる。場合により、免疫原はアジュバントと共に投与することができる。数種類のアジュバントを、以下の記載のように使用することができる。完全フロイントアジュバント、続いて不完全アジュバントは、実験動物の免疫感作に好適である。ラビットまたはモルモットは、典型的にはポリクローナル抗体を作成するために使用する。マウスは典型的にはモノクローナル抗体を作成するために使用する。抗体はAに対する特異的結合についてスクリーニングされる。場合により抗体は、Aの特異的領域に対する結合についてさらにスクリーニングされる。後者のスクリーニングは、抗体がAペプチドの欠失突然変異体の集合に対する結合を測定することにより行い、そしてどの欠失突然変異体が抗体に結合するかを決定することができる。結合は例えばウエスタンブロットまたはELISAにより評価することができる。抗体に対する特異的結合を示す最小のフラグメントが、抗体のエピトープを定める。あるいはエピトープの特異性は、競合アッセイにより決定することができる。ここで試験および参照抗体はAに対する結合を競合する。試験および参照抗体が競合するならば、それらは1つの抗体の結合が他の結合を妨害する十分に近位の同じエピトープ(1つまたは複数)に結合する。そのような抗体の好適なアイソタイプは、マウスのアイソタイプIgG2aまたは他の種の均等なアイソタイプである。マウスのアイソタイプIgG2aは、ヒトのアイソタイプIgG1の均等物である。

【0069】

iii. キメラおよびヒト化抗体

キメラおよびヒト化抗体は、キメラおよびヒト化抗体の構築のための出発材料を提供するマウスまたは他の非ヒト抗体と同様な結合特異性および親和性を有する。キメラ抗体は

、その軽および重鎖遺伝子が典型的には遺伝子工学により、異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから構築された抗体である。例えばマウスのモノクローナル抗体に由来する遺伝子の可変(V)セグメントを、IgG1およびIgG4のようなヒトの定常(C)セグメントに連結することができる。ヒトのアイソタイプIgG1が好適である。典型的なキメラ抗体は、このようにマウス抗体に由来するVまたは抗原-結合ドメイン、およびヒト抗体に由来するCまたはエフェクタードメインから成るハイブリッドタンパク質である。

【0070】

ヒト化抗体は、実質的にヒト抗体(受容抗体と呼ぶ)に由来する可変領域の枠組み構造残基および実質的にマウス-抗体(供与抗体免疫グロブリンと呼ぶ)に由来する相補性決定領域を有する。Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989) および国際公開第90/07861号明細書、米国特許第5,693,762号、同第5,693,761号、同第5,585,089号、同第5,530,101号明細書およびWinter、米国特許第5,225,539号明細書(すべての目的のために全部、引用により本明細書に編入する)を参照にされたい。存在するならば定常領域(1つまたは複数)も、実質的にまたは全部ヒトの免疫グロブリンに由来する。ヒトの可変ドメインは通常、枠組み構造配列がCDRが由来したマウス可変領域ドメインとの高度な配列同一性を表すヒトの抗体から選択される。重および軽鎖可変領域の枠組み構造残基は、同じかまたは異なるヒトの抗体配列に由来することができる。ヒトの抗体配列は自然に存在するヒト抗体の配列であるか、または幾つかのヒト抗体のコンセンサス配列であることができる。Carter et al., 国際公開第92/22653号明細書を参照にされたい。ヒトの可変領域の枠組み構造残基に由来する特定のアミノ酸が、CDRの立体配置および/または抗原への結合に及ぼす可能な影響に基づき、置換のために選択される。そのような可能な影響の調査は、特定位置でアミノ酸の特性をモデリングし、調査することにより、または特定のアミノ酸の置換または突然変異誘発の効果の経験的観察による。

10

20

【0071】

例えば、アミノ酸がマウスの可変領域の枠組み構造残基と選択したヒトの可変領域の枠組み構造残基との間で異なる時、通常ヒトの枠組み構造のアミノ酸は、マウスの抗体に由来する均等な骨格アミノ酸が：

- (1) 非共有的に抗原に直接結合する、
- (2) CDR領域に隣接する、
- (3) あるいはCDR領域と相互作用する(例えば、CDR領域の約6Å内である)、あるいは
- (4) VL-VH界面に参加する

30

と論理的に予測される時に、それと置き換えるべきである。

【0072】

置換のための別の候補は、その位置でのヒトの免疫グロブリンに通常ではない受容体のヒト枠組み構造格アミノ酸である。これらのアミノ酸は、マウス供与体抗体の均等な位置に由来するか、あるいはより多くのヒトの免疫グロブリンの均等な位置に由来するアミノ酸と置換することができる。置換のための他の候補は、その位置でヒトの免疫グロブリンには通常ではない受容体のヒト枠組み構造アミノ酸である。通常ヒト化免疫グロブリンの可変領域枠組み構造は、ヒトの可変領域枠組み構造配列またはそのような配列のコンセンサスと少なくとも85%の配列同一性を示す。

40

【0073】

iv. ヒト抗体

A に対するヒト抗体は、以下に記載する種々の技法により提供される。ヒト抗体の中には競合結合実験により、あるいは実施例XIに記載するマウスモノクローナル抗体の1つのような、特定のマウス抗体と同じエピトープ特異性を有するように選択される。ヒト抗体は、免疫原としてA のフラグメントのみを使用することにより、かつ/またはA の欠失突然変異体の収集物に対する抗体をスクリーニングすることにより、特定のエピトープ特異性についてもスクリーニングすることができる。ヒト抗体は、好ましくはアイソタイプ特異性ヒトIgG1を有する。

【0074】

50

### (1) トリオーマ (trioma) 法

基本的な取り組みおよびこの取り組みに使用する例示の細胞融合パートナー、SPAZ-4は、Oestberg et al., Hybridoma 2: 361-367 (1983); Oestberg、米国特許第4,634,664号明細書; およびEngelman et al., 米国特許第4,634,666号明細書に記載された(その各々は、すべての目的のために全部、引用により本明細書に編入する)。この方法により得られる抗体生産細胞系は、3種の細胞(2つのヒトおよび1つのマウス)に由来するので、トリオーマと呼ばれる。最初にマウスミエローマ系をヒトB-リンパ球と融合して、Oestberg、同上により記載されたSPAZ-4細胞系のような非-抗体-生産異種(xenogenic)ハイブリッド細胞を得る。この異種細胞を次いで免疫感作したヒトB-リンパ球と融合して抗体-生産トリオーマ細胞系を得る。トリオーマはヒト細胞から作成した通例のハイブリドーマより安定に抗体を生産することが分かった。

10

#### 【0075】

免疫感作したB-リンパ球は、ヒト供与体の血液、脾臓、リンパ節または骨髄から得られる。特異的抗原またはエピトープに対する抗体を所望する場合、免疫感作には抗原またはそれらのエピトープを使用することが望ましい。免疫感作はインビボまたはインビトロのいずれかであることができる。インビボの免疫感作には、B細胞は典型的にはA<sub>1</sub>、それらのフラグメント、A<sub>2</sub> またはフラグメントを含むより大きなポリペプチド、あるいはA<sub>1</sub> に対する抗体に対する抗-イディオタイプ抗体で免疫感作したヒトから単離される。幾つかの方法ではB細胞は、最終的に抗体治療を投与される同じ患者から単離される。インビトロの免疫感作にはB-リンパ球は、典型的には10%ヒト血漿を補充したRPMI-1640 (Engleman、同上を参照にされたい)のような培地中で7~14日間、抗原に暴露する。

20

#### 【0076】

免疫感作したB-リンパ球は、周知な方法によりSPAZ-4のような異種ハイブリッド細胞に融合する。例えば細胞をMW1000~4000の40~50%ポリエチレングリコールで約37℃にて約5~10分間処理する。細胞を融合混合物から分離し、そして所望のハイブリッドを選択するための培地中で増殖させる(例えばHATまたはAH)。必要な結合特異性を有する抗体を分泌する細胞は、A<sub>1</sub> またはそれらのフラグメントに結合する能力についてトリオーマ培養基をアッセイすることにより同定する。所望の特異性を有するヒト抗体を生産するトリオーマを、限界希釈法およびインビトロで培養基中で成長させることによりサブクローニング化する。得られたトリオーマ細胞系は、次いでA<sub>1</sub> またはそれらのフラグメントに結合する能力について試験する。

30

#### 【0077】

トリオーマは遺伝的に安定であるが、それらは大変高いレベルで抗体を生産しない。発現レベルは、トリオーマからの抗体遺伝子を1以上の発現ベクターにクローニングし、そしてベクターを標準的な哺乳動物、細菌または酵母細胞系で形質転換させることにより上げることができる。

#### 【0078】

### (2) トランスジェニック非ヒト哺乳動物

A<sub>1</sub> に対するヒト抗体も、ヒトの免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも1セグメントをコードする導入遺伝子を有する非-ヒトトランスジェニック哺乳動物から生産することができる。通常、そのようなトランスジェニック哺乳動物の内因性の免疫グロブリン遺伝子座は、機能的に不活性化されている。好ましくはヒトの免疫グロブリン遺伝子座のセグメントは、重および軽鎖成分の再整列していない配列を含む。内因性の免疫グロブリン遺伝子の不活性化および外因性の免疫グロブリン遺伝子の導入の両方は、標的とする相対的組換えにより、あるいはYAC染色体の導入により達成され得る。この方法からもたらされるトランスジェニック哺乳動物は、免疫グロブリン成分配列を機能的に再配列することができ、そして内因性の免疫グロブリン遺伝子を発現せずにヒトの免疫グロブリン遺伝子によりコードされる種々のアイソタイプの抗体のレパートリーを発現することができる。このような特性を有する哺乳動物の作出および特性は、例えばLonberget al., 国際公開第93/12227号明細書(1993); 米国特許第5,877,397号、同第5,874,299号、同第5,814,318号、

40

50

同第5,789,650号、同第5,770,429号、同第5,661,016号、同第5,633,425号、同第5,625,126号、同第5,569,825号、同第5,545,806号明細書、Nature148, 1547-1553 (1994)、Nature Biotechnology 14, 826 (1996)、Kucherlapati、国際公開第91/10741(1991)号明細書に詳細に記載されている(これらの各々は、すべての目的のために全部、引用により本明細書に編入する)。トランスジェニックマウスが、特に適している。抗-A 抗体は、LonbergまたはKucherlapati、同上により記載されたようなトランスジェニック非ヒト動物を、A またはそれらのフラグメントで免疫感作することにより得られる。モノクローナル抗体は、通例のKohler-Milstein法を使用して、例えばそのような哺乳動物に由来するB-細胞を適当なミエローマ細胞系に融合することにより調製する。ヒトポリクローナル抗体も、免疫原性作用物質で免疫感作したヒトに由来する血清の状態を提供され得る。場合により、そのようなポリクローナル抗体は、アフィニティー試薬としてA または他のアミロイドペプチドを使用したアフィニティー精製により濃縮することができる。

10

## 【0079】

## (3) ファージ表示法

ヒト抗-A 抗体を得るためのさらなる取り組みは、Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989) に概説された一般的プロトコールに従い、ヒトB細胞からのDNAライブラリーをスクリーニングすることである。トリオーマ法について記載したように、そのようなB細胞は、A 、フラグメント、A またはフラグメントを含んで成る長いポリペプチドまたは抗-イディオタイプ抗体で免疫感作したヒトから得ることができる。場合により、そのようなB細胞は、最終的に抗体処置を受ける患者から得る。A またはそれらのフラグメントに結合する抗体を選択する。そのような抗体(または結合フラグメント)をコードする配列を、次にクローン化し、そして増幅する。Huseにより記載されたプロトコールは、ファージ-表示技術と組み合わせにより効率的になる。例えば、Dower et al., 国際公開第91/17271号明細書および McCafferty et al., 国際公開第92/01047号明細書、米国特許第5,877,218号、同第5,871,907号、同第5,858,657号、同第5,837,242号、同第5,733,743号および同第5,565,332号明細書を参照にされたい(この各々がすべての目的のために全部、引用により本明細書に編入する)。これらの方法では、ファージのライブラリーを作成し、この中の員はそれらの外面上の様々な抗体を表示する。抗体は通常、FvおよびFabフラグメントとして表示される。所望する特異性を有する抗体を表示するファージを、A ペプチドまたはそれらのフラグメントに対する親和性の濃縮(enrichment)により選択する。

20

30

## 【0080】

ファージ-表示法の変法では、選択したマウス抗体の結合特異性を有するヒトの抗体を生成する。Winter、国際公開第92/20791号明細書を参照にされたい。この方法では、選択したマウス抗体の重または軽鎖可変領域のいずれかを、出発材料として使用する。例えば、軽鎖可変領域を出発材料として選択した場合、員が同じ軽鎖可変領域(すなわち、マウスの出発材料)および異なる重鎖可変領域を表示するファージライブラリーを構築する。重鎖可変領域は、ヒトの再配列した重鎖可変領域のライブラリーから得られる。A に対する強力な特異的結合(例えば少なくとも $10^8$ 、そして好ましくは少なくとも $10^9 M^{-1}$ )を示すファージを選択する。このファージに由来するヒトの重鎖可変領域は、さらなるファージライブラリーを構築するための出発材料として役立つ。このライブラリーでは、各ファージは同じ重鎖可変領域(すなわち、最初の表示ライブラリーから同定された領域)および異なる軽鎖可変領域を表示する。軽鎖可変領域は、ヒトの再配列した軽鎖可変領域のライブラリーから得られる。ここでもA に対する強力な特異的結合を示すファージを選択する。これらのファージは、完全なヒト抗-A 抗体の可変領域を表示する。これらの抗体は通常、マウス出発材料として同じかまたは類似するエピトープ特異性を有する。

40

## 【0081】

## v. 定常領域の選択

キメラ、ヒト化またはヒト抗体の重鎖および軽鎖可変領域は、ヒト定常領域の少なくとも一部に連結することができる。定常領域の選択は、部分的には抗体-依存的補体および

50

／または細胞性の毒性が所望されるか否かに依存する。例えば、アイソタイプIgG1およびIgG3は補体活性を有し、そしてアイソタイプIgG2およびIgG4は持たない。アイソタイプの選択は抗体の脳への通過にも影響を及ぼし得る。ヒトのアイソタイプIgG1が好適である。軽鎖定常領域は、またはであることができる。抗体は2つの軽鎖および2つの重鎖を含む四量体として、分かれた重鎖、軽鎖として、Fab、Fab'(ab')<sub>2</sub>およびFvとして、あるいは重鎖および軽鎖可変ドメインがスパーサーを通して連結された単鎖抗体として発現され得る。

#### 【0082】

##### vi. 組換え抗体の発現

キメラ、ヒト化およびヒト抗体は、典型的には組換え発現により生産される。組換えポリヌクレオチドは構築物は、典型的には自然に会合したまたはヘテロロガスなプロモーター領域を含め、抗体鎖のコード配列に操作可能に連結された発現制御配列を含む。好ましくは発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションすることができるベクター中の真核プロモーター系である。いったんベクターが適当な宿主に導入されれば、宿主はヌクレオチド配列の高レベルな発現、ならびに回収および交差反応する抗体の精製について適当な条件下で維持される。

#### 【0083】

これらの発現ベクターは典型的には、エピソームとして、または宿主の染色体DNAに組み込まれた部分のいずれかとして宿主生物中で複製可能である。通常は、発現ベクターは選択マーカー、例えばアンピシリン-耐性またはヒグロマイシン-耐性を含み、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能とする。

#### 【0084】

大腸菌 (*E. coli*) は、本発明のDNA配列をクローニングするために特に有用な原核宿主の1つである。酵母のような微生物も発現に有用である。サッカロミセス (*Saccharomyces*) は好適な酵母宿主であり、発現制御配列、複製起点、終結配列等を所望するように有する適当なベクターを含む。典型的なプロモーターには、3-ホスホグリセリンキナーゼおよび他の解糖酵素を含む。誘導性の酵母プロモーターには、中でもアルコールデヒドロゲナーゼ、イソチクロームCおよびマルトースおよびガラクトース利用に關与する酵素を含む。

#### 【0085】

哺乳動物細胞は、免疫グロブリンまたはそれらのフラグメントをコードするヌクレオチドセグメントを発現するための好適な宿主である。Winnacker、遺伝子からクローンへ (*From Gene to Clones*) (VCH出版、NY、1987) を参照にされたい。完全なヘテロロガスタンパク質を分泌することができる多数の適当な宿主細胞系が当該技術分野では開発され、そしてそれらにはCHO細胞系、種々のCOS細胞系、HeLa細胞、L細胞およびミエロマ細胞系を含む。好ましくは細胞は非ヒトである。これらの細胞のための発現ベクターには、複製起点、プロモーター、エンハンサー (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89: 49 (1986)) のような発現制御配列、ならびにリボゾーム結合部位、RNAスプライシング部位、ポリアデニレーション部位および転写終結点配列のような必要なプロセッシング情報部位を含むことができる。好適な発現制御配列は、内因性遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス等に由来するプロモーターである。Coet al., *J. Immunol.* 148: 1149 (1992) を参照にされたい。

#### 【0086】

あるいは抗体コード配列は、トランスジェニック動物のゲノムに導入され、そして後にトランスジェニック動物のミルク中で発現させるために、導入遺伝子中に組み込まれることができる (例えば、米国特許第5,741,957号、同第5,304,489号、同第5,849,992号明細書を参照にされたい)。適当な導入遺伝子には、カゼインまたはベータラクタグロブリンのような乳腺特異的遺伝子に由来するプロモーターおよびエンハンサーに操作可能に連結した軽鎖および／または重鎖のコード配列を含む。

#### 【0087】

10

20

30

40

50

目的のDNAセグメントを含むベクターは、宿主細胞の種類に依存して周知の方法により宿主細胞に移すことができる。例えば塩化カルシウムトランスフェクションは原核細胞に通常利用されており、一方リン酸カルシウム処理、電気穿孔、リポフェクション、バイオリスティクス (biolistics) またはウイルスに基づくトランスフェクションは、他の宿主細胞に使用することができる。哺乳動物細胞を形質転換するための他の方法には、ポリブレン、プロトプラスト融合、リポソーム、電気穿孔およびマイクロインジェクションの使用を含む (一般に、Sambrook et al., 同上を参照にされたい)。トランスジェニック動物の作出には、導入遺伝子を受精した卵母細胞にマイクロインジェクションすることができ、または胚性幹細胞のゲノムに包含することができ、そしてそのような細胞の核を除核した卵母細胞に移す。

10

## 【0088】

いったん発現すれば、抗体をHPLC精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む当該技術分野で標準的な手順に従い精製することができる (一般に、Scopes、タンパク質精製 (Protein Purification) (スプリング (Springer) ー出版、NY、1982を参照にされたい)。

## 【0089】

## 3. キャリアータンパク質

免疫応答を誘導するための作用物質の中には、アミロイド沈着物に対する免疫応答を誘導するが、免疫原としては小さすぎる適当なエピトープを含むものもある。このような状況では、ペプチド免疫原を適当なキャリアーに連結して、免疫応答の誘導を助けることができる。適当なキャリアーには、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、卵白アルブミン、破傷風毒素、またはジフテリア、大腸菌 (*E. coli*)、コレラまたはピロリ (*H. pylori*) のような他の病原性細菌に由来する毒素、あるいは弱毒化した毒素の誘導體を含む。他のキャリアーには、多数のMHC対立遺伝子、例えばすべてのヒトのMHC対立遺伝子の少なくとも75%に結合するT-細胞エピトープを含む。そのようなキャリアーは、しばしば当該技術分野では「ユニバーサルT-細胞エピトープ」として知られている。ユニバーサルT-細胞エピトープの例には以下を含む：

20

## 【0090】

## 【表2】

インフルエンザ赤血球凝集素: HA<sub>307-319</sub> PKYVKQNTLKLAT (配列番号:43)

PADRE (共通残基は太字) AKXVAAWTLKAAA (配列番号:44)

マリアアCS:T3Eヒトーフ EKKI AKMEKASSVFNV (配列番号:45)

B型肝炎表面抗原: HBsAg<sub>19-28</sub> FLLTRILTI (配列番号:46)

熱ショックタンパク質 65: hsp65<sub>153-171</sub> DQSIGDLIAEAMDKVGNEG (配列番号:47)

カルメット-ゲラン菌 QVHFQPLPPAVVKL (配列番号:48)

40

破傷風毒素: TT<sub>830-844</sub> QYIKANSKFIGITEL (配列番号:49)

破傷風毒素: TT<sub>947-967</sub> FNNFTVSEFLRVPKVSASHLE (配列番号:50)

HIV gp120 T1: KQIINMWQEVGKAMYA (配列番号:51)

## 【0091】

免疫応答を刺激または強化する他のキャリアーは、IL-1、IL-1 および ペプチド、IL-2、INF、IL-10、GM-CSFのようなサイトカイン、およびMIPI および および RANTESの

50

ようなケモカインを含む。免疫原性作用物質は、O'Mahony、国際公開第97/17613号および同第97/17614明細書に記載されているように、組織にわたり輸送を強化するペプチドに連結することもできる。

【0092】

免疫原性作用物質は、化学的架橋によりキャリアーに連結することができる。免疫原をキャリアーに連結するための技法には、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジル-チオ)プロピオネート (SPDP) およびスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC) (ペプチドがスルフィドリル基を欠く場合、これはさらにシステイン残基の付加により提供することができる) を使用したジスルフィド結合の形成を含む。これらの試薬は、それら自身と1タンパク質上のペプチドのシステイン残基との間にジスルフィド結合を、そしてリシン上の -アミノ酸、あるいは他のアミノ酸中の遊離アミノ基を通じたアミド結合を作成する。そのような種々のジスルフィド/アミド-形成剤は、Immun. Rev. 62, 185 (1982) に記載されている。他の二官能性カップリング剤は、ジスルフィド結合ではなくチオエーテルを形成する。多くのチオ-エーテル形成剤が市販されており、そして6-マレイミドカプロン酸、2-プロモ酢酸および2-ヨード酢酸、4-(N-マレイミド-メチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の反応性エステルを含む。カルボキシル基はスクシンイミドまたは1-ヒドロキシ-2-ニトロ-4-スルホン酸、ナトリウム塩と混合することにより活性化することができる。

10

【0093】

免疫原性ペプチドは、キャリアーとの融合タンパク質 (ヘテロロガスペプチド) として発現することもできる。免疫原性ペプチドはそのアミノ末端で、そのカルボキシル末端で、またはその両方でキャリアーに連結することができる。場合により、免疫原性ペプチドの多数の反復が融合タンパク質中に存在することができる。場合により、免疫原性ペプチドは例えばペプチドの両NおよびC末端でヘテロロガスなペプチドの多数のコピーに連結することができる。キャリアーペプチドの中には、キャリアーペプチドに対するヘルパーT-細胞応答を誘導するために役立つものもある。誘導されたヘルパーT-細胞は、次にキャリアーペプチドに連結された免疫原性ペプチドに対するB-細胞応答を誘導する。

20

【0094】

本発明の作用物質の中には、A のN末端フラグメントがそのC末端でキャリアーペプチドに連結している融合タンパク質を含んで成るものもある。そのような作用物質は、A のフラグメントのN-末端残基が融合タンパク質のN-末端残基を構成する。したがってそのような融合タンパク質は、遊離形態であるA のN-末端残基を必要とするエピトープへ結合する抗体を誘導するために有効である。本発明の幾つかの作用物質は、C末端でキャリアーペプチドの1以上のコピーに連結するA のN-末端セグメントの複数の反復を含んで成る。そのような融合タンパク質に取り込まれたA のN-末端フラグメントは時々、A 1-3で始まり、そしてA 7-11で終わる。A 1-7、A 1-3、1-4、1-5および3-7がA の好適なN-末端フラグメントである。幾つかの融合タンパク質は、A の異なるN-末端セグメントを直列に含んで成る。例えば融合タンパク質はA 1-7、続いてA 1-3、続いてヘテロロガスペプチドを含んで成ることができる。

30

【0095】

幾つかの融合タンパク質では、A のN-末端セグメントがそのN-末端でヘテロロガスがキャリアータンパク質に融合される。A の同じ変化のN-末端セグメントを、C-末端融合で使用することができる。幾つかの融合タンパク質は、A のN-末端セグメントのN-末端に連結されたヘテロロガスなペプチドを含んで成り、これは次に1以上のさらなるA のN-末端セグメントに直列に連結される。

40

【0096】

本発明の使用に適する融合タンパク質の幾つかの例を以下に示す。これらの融合タンパク質の幾つかは、米国特許第5,196,512号明細書、欧州特許第378,881号および同第427,347明細書に記載されているような破傷風毒素エピトープに連結されたA のセグメントを含んで成る。幾つかの融合タンパク質は、米国特許第5,736,142号明細書に記載されてい

50

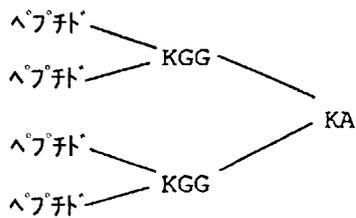
るようなキャリアーペプチド質に連結された A のセグメントを含んで成る。幾つかのヘテロロガスなペプチドは、ユニバーサル T-細胞エピトープである。幾つかの方法では、投与するための作用物質は直線的な立体配置でヘテロロガスなセグメントに連結された A セグメントを含む 1 つの融合タンパク質である。幾つかの方法では、作用物質は式  $2^x$  (式中、 $x$  は 1 ~ 5 の整数である) により表される融合タンパク質の多量体である。好ましくは、 $x$  は 1、2 または 3 であり、2 が最も好ましい。 $x$  が 2 である時、そのような多量体は、MAP4 と呼ばれる好適な立体配置で連結された 4 つの融合タンパク質を有する (米国特許第 5,229,490 号明細書を参照にされたい)。A のエピトープに下線が引かれている。

【 0 0 9 7 】

MAP4 の立体配置を以下に示し、ここで分枝構造はリシンの N 末端および側鎖アミンの両方でペプチド合成が始まることにより生成される。リシンが配列に取り込まれ、そして分枝化される回数に依存して、生成する構造には多数の N 末端が存在するだろう。この例では、4 つの同一な N 末端がコアを含む分枝化リシン上に生成された。そのような多重度は、コグネイト B 細胞の反応性を大きく強化する。

【 0 0 9 8 】

【表 3】



AN90549 (MAP4立体配置の Aβ 1-7/破傷風毒素 830-844):

DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL (配列番号:52)

AN90550 (MAP4立体配置の Aβ 1-7/破傷風毒素 947-967):

DAEFRHDFNFTVSFWLRVPKVSASHLE (配列番号:53)

AN90542 (直線状の立体配置の Aβ 1-7/破傷風毒素 830-844 + 947-967):

DAEFRHDQYIKANSKFIGITELFNFTVSFWLRVPKVSASHLE (配列番号:54)

AN90576 (MAP4立体配置の Aβ 3-9/破傷風毒素830-844):

EFRHDSGQYIKANSKFIGITEL (配列番号:55)

US 5,736,142 に記載されたペプチド(すべて直線状の立体配置):

AN90562 (Aβ 1-7/ ペプチド) AKXVAAWTLKAAADAEFRHD (配列番号:56)

AN90543 (Aβ1-7 x 3/ ペプチド): DAEFRHDDAEFRHDDA $\epsilon$ FRHDAKXVAAWTLKAAA (配列番号:57)

融合タンパク質の他の例(Aβの免疫原性エピソードは太字)は

**AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (配列番号:58)

**DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA** (配列番号:59)

**DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR** (配列番号:60)

**FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR** (配列番号:61)

**EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR** (配列番号:62)

**PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (配列番号:63)

**DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD** (配列番号:64)

**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT** (配列番号:65)

【 0 0 9 9 】

10

20

30

40

## 【表 4】

DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (配列番号:66)

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-

QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (配列番号:67)

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (配列番号:68)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (配列番号:69)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-

DAEFRHD (配列番号:70)

10

2分枝化樹脂

ペプチド
   
 ペプチド
   
 Lys-Gly-Cys 上の DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (配列番号:52)

EQVTNVGGAISQAVHAAHAEINEAGR (配列番号:71)(MAP4立体配置の

シクレイン融合タンパク質)を含む。

20

## 【0100】

受動免疫感作に使用するための A に対する抗体の生成に使用される免疫原を作成するためには、同じまたは類似のキャリアータンパク質および連結法を使用することができる。例えば A に対するモノクローナル抗体の生産において、キャリアーに連結された A またはフラグメントを実験動物に投与することができる。

## 【0101】

## 4. 治療薬をコードする核酸

アミロイド沈着物に対する免疫応答も、A ペプチドのセグメントおよびそれらのフラグメント、他のペプチド免疫原をコードする核酸、あるいは受動免疫感作に使用する抗体およびそれらの成分鎖の投与により誘導することができる。そのような核酸は、DNAまたはRNAであることができる。免疫原をコードする核酸セグメントは、典型的には、患者の意図する標的細胞中でDNAセグメントの発現を可能にするプロモーターおよびエンハンサーのような調節要素に連結される。免疫応答を誘導するために望ましい血液細胞中の発現には、軽または重鎖免疫グロブリン遺伝子に由来するプロモーターおよびエンハンサー要素またはCMV主要中間初期 (major intermediate early) プロモーターおよびエンハンサーが、発現を支配するために適当である。連結された調節要素およびコード配列はしばしばベクターにクローン化される。二重鎖抗体を投与するために、2つの鎖を同じか、または別のベクター中にクローン化することができる。

30

## 【0102】

多数のウイルスベクター系が、レトロウイルス系 (例えば、Lawrie and Tumin *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)を参照にされたい); アデノウイルスベクター (例えば Bett et al., *J. Virol.* 67, 5911 (1993)を参照にされたい); アデノ-随伴ウイルスベクター (例えば、Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)を参照にされたい)、ワクシニアウイルスおよび鳥類ポックスウイルスを含むポックスファミリーに由来するウイルスベクター、シンドビスおよびセムリキ森林ウイルスに由来するようなアルファウイルス属に由来するウイルスベクター (例えば、Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)を参照にされたい)、ベネゼエラのウマ脳脊髄炎ウイルス (米国特許第5,643,576号明細書を参照にされたい) および水痘性口内炎ウイルスのようなラブドウイルス (国際公開第96/34625号明細書を参照にされたい) およびパピローマウイルス (Ohe et al.

40

50

, Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo et al., 国際公開第94/12629号明細書およびXiao & Brandsma, Nucleic Acids Res. 24, 2630-2622 (1996))を含め入手することができる。

【0103】

免疫原をコードするDNAまたはそれを含むベクターは、リポソーム中にパッケージすることができる。適当な脂質および関連する同族体は、米国特許第5,208,036号、同第5,264,618号、同第5,279,833号および同第5,283,185号明細書に記載されている。免疫原をコードするベクターおよびDNAは、特定のキャリアーに吸着または結合させることもでき、そのキャリアーの例には、ポリメチルメタクリレートポリマーおよびポリラクチドおよびポリ(ラクチド-コ-グリコライド)を含み、例えばMcGee et al., J. Micro Encap. (1996)を参照にされたい。

10

【0104】

遺伝子療法ベクターまたは裸(naked)のDNAは、典型的には全身投与により(例えば静脈内、腹腔内、鼻内、胃内、皮内、筋肉内、皮下または頭蓋灌流)あるいは局所的適用(例えば米国特許第5,399,346号明細書を参照にされたい)により、個々の患者に投与することによりインビボ送達され得る。そのようなベクターはさらにプピバカイン(米国特許第5,593,970号明細書)のような促進剤を含むことができる。またDNAは遺伝子銃を使用して投与することができる。Xiao & Brandsma、同上を参照にされたい。免疫原をコードするDNAを、顕微鏡的な金属ビーズの表面に沈殿させる。このマイクロプロジェクティル(microprojectile)をショック波または膨張するヘリウムガスで加速し、そして幾つかの細胞層の深さまで組織を透過させる。例えば、ウィスコンシン州、ミドルトンのアガセタス社(Agacetus Inc.)により製造されているAccel(商標)遺伝子送達デバイスが適当である。あるいは、化学的または機械的刺激によりDNAを皮膚上に単にスポット適用することにより、裸のDNAを皮膚を介して血流に通すことができる(国際公開第95/05853号明細書を参照にされたい)。

20

【0105】

さらなる変法では、個々の患者から外植された細胞(例えば、リンパ球、骨髄アスピレート、組織検体)、あるいは汎用的な供与体の造血幹細胞、続いて細胞の患者への再移植(通常は、組み込まれたベクターを有する細胞を選択した後)のように、免疫原をコードするベクターをエクスピボで細胞に送達することができる。

30

【0106】

### III. 除去活性に関する抗体のスクリーニング

本発明は、アミロイド沈着物または任意の他の抗原、あるいは付随する生物学的物体の除去における活性について、除去活性が望まれる抗体をスクリーニングする方法を提供する。アミロイド沈着物に対する活性をスクリーニングするために、アルツハイマー病を有する患者または特徴的なアルツハイマーの病状を有する動物モデルの脳の組織サンプルを、ミクログリア細胞のようなFcレセプターを持つ食細胞および抗体と、インビトロの媒質中の試験下で接触させる。食細胞は、BV-2、C8-B4またはTHP-1のような初代培養または細胞系であることができる。幾つかの方法では、成分を顕微鏡スライド上で合わせて顕微鏡でのモニタリングを行い易くする。幾つかの方法では、マイクロタイター皿のウェル中で、平行して多数の反応を行う。そのような形式では、分かれた小型の顕微鏡スライドを分かれたウェルに乗せることができ、あるいはAのELISA検出のような非顕微鏡的検出形式を使用することができる。好ましくは、一連の測定は、反応が進行する前のベースライン値から出発し、そして反応中の1以上の試験値をインビトロ反応混合物中のアミロイド沈着物の量から作成する。抗原は、例えばAまたは他のアミロイド斑の成分に対する蛍光的に標識した抗体を用いて染色することにより検出することができる。染色に使用する抗体は、除去活性を試験する抗体と同じでも同じでなくてもよい。アミロイド沈着物の反応中、ベースラインに対する減少は抗体が試験下で除去活性を有することを示す。そのような抗体は、アルツハイマーおよび他のアミロイド形成疾患を予防または処置するために有用であろう。

40

50

## 【0107】

類似の方法を使用して、他の種類の生物学的物体を除去する活性について抗体をスクリーニングすることができる。このアッセイは、ほとんどの種類の生物学的物体に対して、除去活性を検出するために使用することができる。典型的には、生物学的物体はヒトおよび動物疾患に幾つかの役割を有する。生物学物体は組織サンプルまたは単離された状態で提供され得る。組織サンプルとして提供される場合、組織サンプルは好ましくは組織サンプルの成分を直ちに利用でき、そして固定にありがちな成分の立体配置の攪乱を避けるために固定されていない。このアッセイで試験することができる組織サンプルの例には、ガン組織、前ガン組織、突起または奇胎のような良性の成長を含む組織、病原性微生物に感染した組織、炎症性細胞が浸潤した組織、細胞間に病原性マトリックスを持つ組織（例えば、線維性心膜炎）、異常な抗原を持つ組織および癒痕組織を含む。使用できる単離された生物学的物体の例には、A<sub>β</sub>、ウイルス抗原またはウイルス、プロテオグリカン、他の病原性微生物の抗原、腫瘍抗原および接着分子を含む。そのような抗原は、中でも天然の起源、組換え発現またはキメラ合成から得ることができる。組織サンプルまたは単離された生物学的物体は、単球またはミクログリア細胞のようなFcレセプターを持つ食細胞および試験される抗体と媒質中で接触させる。抗体は試験下で生物学的物体に向けられるか、あるいは物体と会合した抗原に向けられる。後者の状況では、目的は生物学物体が抗原で代償的に食作用を受けるかどうかを試験する。通常は必ずしも必要ではないが、抗体および生物学的物体（時折、抗原と会合している）を、互いに接触させた後に食細胞を加える。媒質中に残る生物学的物体および/または会合した抗原が存在するならば、その濃度がモニタリングされる。媒質中の抗原または会合した生物学的物体の量または濃度における減少は、抗体が抗原および/または会合した生物学的物体に対する除去応答を、食細胞と一緒に有することを示す（例えば実施例14を参照にされたい）。

## 【0108】

## IV. 処置に反応する患者

処置に反応する患者は、症状を表さないが疾患の危険性にある個体ならびに現在症状を表している患者が含まれる。アルツハイマー病の場合、彼または彼女が十分に長く生きていれば、実際、誰でもアルツハイマー病に罹患する危険性がある。したがって、本発明は主題となる患者の危険性を評価する必要が無い一般的集団に予防的に投与することができる。本発明の方法は、アルツハイマー病の既知の遺伝的危険性を有する個体に特に有用である。そのような個体には、この疾患をすでに経験した親類を有する個体、および遺伝子または生化学的マーカーの分析により危険が決定された個体を含む。アルツハイマー病に対する危険性の遺伝子マーカーは、APP遺伝子に突然変異を含み、特にそれぞれハーディ(Hardy)およびスウェーデンの突然変異と呼ばれる717位ならびに670および671位での突然変異を含む(Hardy, TINS, 同上を参照にされたい)。危険性の他のマーカーは、プレセニリン遺伝子、PS1およびPS2中の突然変異、およびApoE4、ADの家系、高コレステロール血症またはアテローム硬化症である。現在アルツハイマー病に罹患している個体は、特徴的な痴呆ならびに上記の危険因子の存在により認識され得る。さらに、ADを有する個体を同定するために多数の診断試験を利用することが可能である。これらにはCSF およびA<sub>β</sub> 42レベルの測定を含む。上昇した および減少したA<sub>β</sub> 42レベルは、ADの存在を意味する。アルツハイマー病に罹患している個体は、実施例の部で検討するようなAD/DA基準により診断することもできる。

## 【0109】

無症候性患者では、処置は任意の年齢（例えば10、20、30）で始めることができる。しかし通常、患者が40、50、60または70に達するまで処置を始める必要はない。処置は典型的には一定期間にわたり多回の投薬を必要とする。処置は期間中、抗体をアッセイすることにより、あるいは治療薬（例えばA<sub>β</sub> ペプチド）に対して活性化されたT-細胞またはB-細胞応答をモニタリングすることができる。応答が落ちれば、追加免疫投与が指示される。ダウン症候群の可能性のある患者の場合は、処置は母親に投与することにより出生前に、または出生直後に始めることができる。

## 【0110】

## V. 処置処方

予防的応用では、医薬組成物または薬剤をアルツハイマー病に罹患し易いか、または危険性のある患者に、疾患の生化学的、組織学的および/または行動的症候、疾患の発生中に現れるその合併症および中間的な病状の表現型を含め、危険性を排除または下げるために、重篤度を下げるために、または疾患の発症を遅らせるために十分な量で投与する。治療的応用では、組成物または薬剤をそのような疾患に罹患したと疑われるか、またはすでに罹患した患者に、疾患の発生における合併症および中間的な病状の表現型を含め、疾患の症状（生物化学的、組織学的および/または行動的症候）を治癒するか、あるいは少なくとも部分的に停止するために十分な量で投与する。幾つかの方法では、薬剤の投与が特徴的なアルツハイマーの病状を未だに発症していない患者において、ミオコグニティブ（mycognitive）障害を減らすか、または排除する。治療的または予防的処置を行うために十分な量は、治療的に - または予防的に - 有効な用量であると定める。予防的または治療的処方の両方で、薬剤は通常、十分な免疫応答に達するまで何回かの投薬用量を投与される。典型的には免疫応答をモニタリングし、そして免疫応答が弱くなり始めたら繰り返して投薬が与えられる。

10

## 【0111】

上記の症状を処置するために本発明の組成物の有効な投薬用量は、投与の手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトまたは動物であるかどうか、投与する他の薬剤、および処置が予防的または治療的であるかどうかを含む多くの異なる因子に依存して変動する。通常、患者はヒトであり、しかしトランスジェニック哺乳動物を含め非ヒト哺乳動物も処置することができる。処置の投薬用量は、安全性および効力を至適化するために滴定する必要がある。免疫原の量は、アジュバントが投与されるかどうかにも依存し、より高い投薬用量がアジュバントの不存在では必要である。投与のための免疫原の量は時折、患者あたり1~500 $\mu$ gで変動し、そしてより通常はヒトの投与について1回の注射あたり5~500 $\mu$ gである。時には1回の注射あたりより多い用量の1~2mgを使用する。典型的には約10、20、50または100 $\mu$ gを各ヒトの注射に使用する。免疫原の塊も、免疫原全体の塊に対する免疫原内の免疫原性エピトープの塊比（mass ratio）に依存する。典型的には、 $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$ マイクロモルの免疫原性エピトープが、マイクログラムの免疫原について使用される。注射の時期は1日1回から、1年に1回まで、10年に1回まで有意に変動し得る。免疫原の投薬用量が与えられる任意の日に、投薬用量は1 $\mu$ g/患者より多く、そして通常はアジュバントも投与されるならば10 $\mu$ g/患者より多く、そして通常はアジュバントが不存在である場合、100 $\mu$ g/患者より多い。典型的な処方法は、免疫感作に続いて6週間の間隔のような間隔での追加免疫注射から成る。別の処方法は、免疫感作に続いて1、2そして12カ月後の追加免疫注射から成る。別の処方法は、一生、2カ月毎の注射を必要とする。あるいは追加免疫注射は、免疫応答をモニタリングすることにより示されるように、不定期ベースで行うことができる。

20

30

## 【0112】

抗体を用いた受動免疫感作について、投薬用量範囲は、宿主の体重に基づき約0.0001は、1mg/kg体重または10mg/kg体重または1~10mg/kgの範囲内である。例示する処置計画は、2週間毎に1回、または1カ月に1回、または3~6カ月に1回の投与を必要とする。幾つかの方法では、異なる結合特異性を有する2以上のモノクローナル抗体を同時に投与し、この場合は投与する各抗体の投薬用量は、示した範囲にある。抗体は通常、多回投与される。1回毎の間隔は、毎週、毎月または毎年であることができる。間隔は患者中のAに対する抗体の血中レベルを測定することにより、示した不定期であることができる。幾つかの方法では、投薬用量は1~1000 $\mu$ g/ml、そして幾つかの方法では25~300 $\mu$ g/mlの血漿抗体濃度を達成するように調整する。あるいは抗体は徐放性製剤として投与ことができ、この場合はより低い頻度の投与が必要である。投薬用量および頻度は、患者内の抗体の半減期に依存して変動する。一般にヒト抗体が最長の半減期を示し、ヒト化抗体、キメラ抗体そして非ヒト抗体が続く。投薬用量および頻度は、処置が予防的かまたは治

40

50

療的であるかどうか依存して変動する。予防的応用では、比較的低い投薬用量が長期間にわたり、比較的低い頻度の間隔で投与される。患者の中には生涯、処置を受け続ける人もいる。治療的応用では、時折、比較的短い間隔で比較的高い投薬用量が疾患の進行が低下または停止するまで、そして好ましくは患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで必要とされる。その後、患者は予防的処方投与される。

【0113】

免疫原をコードする核酸の用量は、患者あたり約10ng~1g、100ng~100mg、1μg~10mg、または30~300μg DNAである。感染性のウイルスベクターは、用量あたり10~100以上のピリオンで変動する。

【0114】

免疫応答を誘導する作用物質は、予防的および/または治療的処置のために経口的、局所的、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、腹腔内、鼻内または筋肉内手段で投与することができる。免疫原性作用物質の最も多い投与経路は皮下であるが、他の経路も同等に有効である。次に最も多い経路は、筋肉内注射である。この種の注射は、最も典型的には腕または足の筋肉に行く。幾つかの方法では、作用物質を沈着物が蓄積している特定の組織に直接注射、例えば頭蓋内注射する。抗体の投与には、静脈内灌流の筋肉内注射が好適である。幾つかの方法では、特定の治療用抗体を、頭蓋に直接注射する。幾つかの方法では、抗体を徐放性組成物またはMedipad(商標)デバイスのようなデバイスとして投与する。

10

【0115】

本発明の作用物質は、アミロイド形成疾患の処置に少なくとも部分的に有効な他の作用物質と組み合わせて投与することができる。アミロイド沈着物が脳で生じるアルツハイマー病およびダウン症候群の場合、本発明の作用物質は血液-脳バリアをわたって本発明の作用物質の通過を増加させる他の作用物質と一緒に投与することができる。

20

【0116】

ペプチドのような本発明の免疫原性作用物質は、時折アジュバントと組み合わせて投与される。種々のアジュバントをAのようなペプチドと組み合わせて使用して、免疫応答を誘導することができる。好適なアジュバントは、応答の質的な形態に影響を及ぼす免疫原に立体配置的变化を生じることなく、免疫原への固有の応答を増す。好適なアジュバントには、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウム、3 De-0-アシル化モノホスホリルリピドA (MPL(商標))(英国特許第2220211号明細書(リビウムノケム リサーチ社(RIBI Immuno Chem Research Inc.))、ハミルトン、モンタナ州、コリキサ(Corixa)の新しい部門、を参照にされたい)。Stimulon(商標)QS-21はトリテルペングリコシドまたは南アフリカで見られるキラヤ(Quillaja Saponaria Molina)の木の樹皮から単離されるサポニンである(Kensil et al., ワクチンの設計: サブユニットおよびアジュバント法(Vaccine Design: The Subunits and Adjuvant Approach)) (Powell & Newman 編集、プレナム出版、NY、1995): 米国特許第5,057,540号明細書(アクイラバイオファルマシューティカルズ(Aquila BioPharmaceuticals)、フラミンガム、マサチューセッツ州)を参照にされたい)。他のアジュバントは、場合によりモノホスホリルリピドAと組み合わせた水中油型のエマルジョン(スクアレンまたはピーナツ油)である(Stoute et al., N. Engl. J. Med. 340, 86-91 (1997)を参照にされたい)。別のアジュバントはCpG(国際公開第98/40100号明細書)である。あるいはAをアジュバントにカップリングすることができる。しかしそのようなカップリングは、Aに対する免疫応答の性質に影響を及ぼさないように、Aの立体配置を実質的に変えるべきではない。アジュバントは活性な作用物質を含む治療用組成物の成分として投与ことができ、あるいは治療剤の投与前、同時、または後に別に投与することができる。

30

40

【0117】

好適な種類のアジュバントは、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムのようなアルミニウム塩(alum)である。そのようなアジュバントは、MPLまたは3-DMP、QS-21、ポリグルタミン酸またはポリリシンのようなポリマー性またはモノマー性

50

アミノ酸のような他の特異的免疫刺激剤を用いて、または用いずに使用することができる。別の種類のアジュバントは、水中油型のエマルジョン製剤である。そのようなアジュバントは、ムラミルペプチド（例えばN-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(nor-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'-2'ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(MTP-PE)、N-アセチルグルコサミニル-N-アセチルムラミル-L-Al-D-イソグル-L-Ala-ジパルミトキシプロピルアミド(DTP-DPP)テラミドTM)、または他の細菌細胞壁成分のような他の特異的免疫刺激剤を用いて、または用いずに使用することができる。水中油型のエマルジョンには、(a)モデル110Yミクロ流動装置(ミクロフルイディクス(Microfluidics)、ニュートン、マサチューセッツ州)のようなミクロ流動装置を使用してサブミクロン粒子に配合した、5%スクアレン、0.5%Tween80および0.5%Span85(場合により種々の量のMTP-PEを含む)MF59(国際公開第90/14837号明細書)、(b)サブミクロンのエマルジョンにミクロ流動化されたか、またはボルテックス混合してより大きな粒子サイズのエマルジョンに生成した、10%スクアレン、0.4%Tween80、5%プルロニック-ブロックポリマーL121およびthr-MDPを含むSAF、および(c)2%スクアレン、0.2%Tween80、およびモノホスホリルリピドA(MPL)、トレハロースジミコレート(TDM)および細胞壁骨格(CWS)から成る群からの1以上の細菌細胞壁成分、好ましくはMPL+CWS(Detox(商標)を含むRibi(商標)アジュバント系(RAS)(リビウムノケム、ハミルトン、マサチューセッツ州)を含む。別の種類の好適なアジュバントは、Stimulon(商標)(QS-21、アクイラ、フラミンハム、マサチューセッツ州)またはISCOMs(免疫刺激複合体)およびISCOMATRIXのようなそれらから生成した粒子のようなサポニンアジュバントである。他のアジュバントには、完全フロインドアジュバント(CFA)および不完全フロインドアジュバント(IFA)を含む。他のアジュバントには、インターロイキン類(IL-1、IL-2およびIL-12)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)のようなサイトカインを含む。

10

20

30

40

50

#### 【0118】

アジュバントは1つの組成物として免疫原と投与することができ、あるいは免疫原の投与前、投与と同時にまたは投与後に投与することができる。免疫原およびアジュバントは包装され、そして同じバイアルで供給することができ、あるいは別のバイアルに包装され、そして使用前に混合することができる。免疫原およびアジュバントは、典型的には目的とする治療的応用を示すラベルと共に包装される。免疫原およびアジュバントが別個に包装される場合、包装には典型的には使用前の混合のために使用説明書を含む。アジュバントおよび/またはキャリアーの選択は、アジュバントを含有する免疫原製剤の安定性、投与経路、投薬計画、予防接種される種に関するアジュバントの効力、およびヒトでは、医薬的に許容されるアジュバントが適切な調節体(pertinent regulatory body)によるヒト投与に認可されているか、または認可され得るものである、ということに依存する。例えば完全フロインドアジュバントはヒトへの投与に適さない。Alum、MPLおよびQS-21が好適である。場合により、2以上の異なるアジュバントを同時に使用することができる。好適な組み合わせは、alumとMPL、alumとQS-21、MPLとQS-21およびalum、QS-21とMPLが一緒の場合を含む。また不完全フロインドアジュバントも、場合によってはalum、QS-21、およびMPLおよびそれらのすべてと組み合わせ使用することができる(Chang et al., 進歩したドラッグデリバリーの総説(Advanced Drug Delivery Reviews 32, 173-186 (1998))。

#### 【0119】

本発明の作用物質は、しばしば活性な治療薬、すなわち、および他の様々な医薬的に許容される成分を含んで成る医薬組成物として投与される。レミングトンの製薬科学(Remington's Pharmaceutical Science)、第15版、マック(Mack)出版社編集、イーストン、ペンシルバニア州、1980を参照にされたい)。好適な形態は意図する投与様式および治療的応用に依存する。また組成物は所望する製剤に依存して、医薬的に許容され得る、非毒性のキャリアーまたは希釈剤を含むこともでき、これは動物またはヒトへ投与する医薬組成物を製剤するために通例使用する賦形剤と定める。希釈剤は組み合わせの生物学的活性に

影響を及ぼさないように選択される。そのような希釈剤の例は、蒸留水、リン酸緩衝化生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液およびハックス溶液である。さらに医薬組成物または製剤は、他のキャリアー、アジュバントまたは非毒性の非治療的、非免疫原性安定化剤等を含んでもよい。

#### 【0120】

また医薬組成物は、タンパク質、キトサンのような多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコポリマー（ラテックス官能化sepharose（商標）、アガロース、セルロース等）、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマー、および脂質凝集物（油滴またはリポソームのような）のような大きく、ゆっくりと代謝される高分子を含むことができる。さらにこれらのキャリアーは、免疫刺激剤（すなわちアジュバント）としても機能することができる。

10

#### 【0121】

非経口投与には、本発明の作用物質は水、油、塩水、グリセロールまたはエタノールのような滅菌液体であることができる医薬キャリアーを含む生理学的に許容されうる希釈剤中で、物質の溶剤または懸濁剤の注入可能な投薬用量として投与することができる。さらに湿潤剤または乳化剤、表面活性剤、pH緩衝化物質等のような補形剤が組成物中に存在できる。医薬組成物の他の成分は、石油、動物、植物または合成起源の、例えばピーナッツ油、ダイズ油および鉱物油である。一般に、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールのようなグリコール類は、特に注入溶剤として好適な液体キャリアーである。抗体は、有効成分の徐放性放出を可能とする様式に製剤することができる、デポー注入（depot injection）またはインプラント調製物の状態で投与することができる。例示的な組成物には、HClでpH6.0に合わせた50mM L-ヒスチジン、150mM NaClを含む水性バッファー中に配合された5 mg/mLのモノクローナル抗体を含んで成る。

20

#### 【0122】

典型的には、組成物は液体溶剤または懸濁剤のいずれかとしての注入剤；溶液中に、または懸濁液中に適する固体形態として調製され、注入前に液体賦形剤を調製することもできる。また調製物は、上記のようにアジュバント効果を強化するため、乳化またはリポソームまたはポリラクチド、ポリグリコライドのような微粒子またはコポリマー中にカプセル化することもできる（Langer, Science 249, 1527 (1990) および Hanes、進歩したドラッグデリバリーの総説（Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997)を参照に

30

#### 【0123】

典型的には、組成物は液体、溶剤または懸濁剤のいずれかとして注入剤として；溶液中または懸濁液中に適する固体形態として調製され、注入前に液体賦形剤も調製することができる。調製物は乳化またはされるか、またはポリラクチド、ポリグリコライド、または強化するアジュバント効果のためにコポリマーにカプセル化され得る（Langer, Science 249, 1527 (1990) および Hans、進歩したドラッグデリバリーの総説（Advanced Drug Delivery Reviews）28, 97-119 (1997)を参照にされたい）。本発明の作用物質は、有効成分の徐放性または拍動性放出を可能とする様式のように製剤することができる、沈積注入またはインプラント調製物を形態で投与することができる。

40

#### 【0124】

他の投与様式に適当なさらなる製剤は、経口、鼻内および肺への製剤、坐薬および経皮適用を含む。

#### 【0125】

坐薬には、結合剤およびキャリアー、例えばポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドを含み；そのような坐薬は、0.5% ~ 10%、好ましくは1 ~ 2%の範囲で有効成分を含有する混合物の状態から形成することができる。経口製剤には、医薬級のマンニトール

50

ル、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロースおよび炭酸マグネシウムのような賦形剤を含む。これらの組成物は、溶剤、懸濁剤、錠剤、ピル、カプセル、徐放性製剤または粉剤の形態をとり、そして10% ~ 95%の有効成分、好ましくは25% ~ 70%を含む。

#### 【0126】

局所適用は、経皮または皮内送達をもたらすことができる。局所投与は、コレラトキシンまたはそれらの解毒誘導体またはそれらのサブユニットあるいは他の類似の細菌毒素を含む作用物質の同時投与(co-administration)により行うことができる(Glenn et al., *Nature* 391, 851 (1988)を参照にされたい)。同時投与は、成分を混合物として、あるいは化学的架橋により得られる連結分子を使用することにより、または融合タンパク質として

10

#### 【0127】

あるいは経皮送達は、皮膚パッチを使用して、またはトランスフェロソーム(transferosome)を使用して行うことができる(Paul et al., *Eur. J. Immunol.* 25,3521-24 (1995); Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15 (1998))。

#### 【0128】

### VI. 診断法

本発明は、アルツハイマー病に罹患しているか、またはその疑いがある患者中のAβペプチドに対する免疫応答の検出法を提供する。本発明は、患者に投与する処置の経過をモニタリングするために特に有用である。この方法は、症状を有する患者の治療的処置に、および無症候性患者の予防的処置の両方をモニタリングするために使用することができる。この方法は、能動免疫感作(例えば、免疫原の投与に反応する抗体の生産)および受動免疫感作(例えば投与した抗体のレベルの測定)の両方をモニタリングするために有用である。

20

#### 【0129】

### 1. 能動免疫感作

幾つかの方法は、作用物質の用量を投与する前に、患者の免疫応答のベースライン値を決定し、そしてこれを処置後の免疫応答の値と比較する必要がある。免疫応答の値において、有意な上昇(すなわち、同じサンプルの繰り返し測定で、典型的な許容される実験誤差より大きく、そのような測定の平均からの標準偏差で表されるような)は、陽性の処置結果を示す(すなわち、その作用物質の投与が免疫応答を達成したか、または増した)。免疫応答の値が有意に変化しないか、または減少したならば、陰性の処置結果を示す。一般に、免疫原性作用物質を用いた最初の処置のコースを受けている患者は、連続的な投薬で免疫応答の上昇を示すと予想され、これは最終的には安定水準に達する。作用物質の投与は一般に、免疫応答が上昇している間、続けられる。安定水準への到達は、処置の投与を中断できるか、または投薬用量または頻度を低下できることを示すものである。

30

#### 【0130】

別の方法では、免疫応答の対照値(すなわち、平均および標準偏差)が対照群について決定される。典型的には対照群の個体は前処置を受けなかった。治療薬を投与された後に測定された患者の免疫応答の値は、次に対照値と比較される。対照値に対して有意な上昇(例えば、平均から1標準偏差よりも大きい)は、陽性の処置結果を示す。有意な上昇がないか、または減少のシグナルは、陰性の処置結果を示す。作用物質の投与は一般に、対照値に対して免疫応答が上昇している間は続行される。前記のように、対照値に比べて安定水準に達すると、処置の投与を中断できるか、または投薬用量または頻度を低下できることの指標である。

40

#### 【0131】

別の方法では、免疫応答の対照値(例えば平均および標準偏差)は、治療薬での処置を受け、そしてその免疫応答が処置に反応して安定水準に達した個体の対照群から決定される。患者の免疫応答の測定値は、対照値と比較される。患者で測定されたレベルが対照値と有意に異ならないならば(例えば、1標準偏差よりも大きい)、処置を中断することがで

50

きる。患者のレベルが対照値よりも有意に下ならば、投与の続行が認められる。その患者のレベルが対照値よりも低いままならば、処置計画の変更、例えば異なるアジュバントの使用を示しているのかもしれない。

#### 【0132】

別の方法では、現在処置は受けていないが、既に処置のコースを受けたことがある患者を、処置の再開が必要であるかどうかを決定するために免疫応答をモニタリングする。患者の免疫応答の測定値は、患者が以前に達成した免疫応答の値と、前の処置コースの後に比較できる。以前の測定に比べて有意な減少（すなわち、同じサンプルの繰り返し測定で、典型的な許容誤差範囲よりも大きい）は、処置を再開できることを示している。あるいは患者の測定値を、処置のコースを受けた後の患者群で決定した対照値（平均に標準偏差を加えた）と比較することができる。あるいは患者の測定値を、疾患の症状がないままの予防的に処置した患者群または疾患の特徴の改善を示す治療的に処置した患者の群の対照値と、比較することができる。すべての場合で、対照レベルに対して有意な低下（すなわち、標準偏差よりも大きい）は、患者の処置を再開すべきであることを示す。

10

#### 【0133】

分析用の組織サンプルは、典型的には患者に由来する血液、血漿、血清、粘膜もしくは脳脊髄液である。サンプルは任意の形態のA ペプチド、典型的にはA<sub>42</sub>に対する免疫応答の指標について分析する。免疫応答は、例えばA ペプチドに特異的に結合する抗体またはT-細胞の存在から決定される。A<sub>42</sub>に特異的な抗体を検出するELISA法は、実施例の部に記載する。反応性T-細胞を検出する方法は、すでに記載した（定義を参照にされたい）。幾つかの方法では、免疫応答を上記第III章に記載したような除去アッセイを使用して決定する。そのような方法では、試験する患者からの組織サンプルを、アミロイド沈着物（例えばPDAPPマウスに由来する）、およびFcレセプターを持つ食細胞と接触させる。続いてアミロイド沈着物の除去をモニタリングする。除去応答の存在および程度は、試験下の患者の組織サンプル中のA<sub>42</sub>を除去するために有効な抗体の存在およびレベルの指標を提供する。

20

#### 【0134】

##### 2. 受動免疫感作

一般に、受動免疫感作をモニタリングする手順は、上記の能動免疫感作をモニタリングする手順と同様である。しかし受動免疫感作後の抗体プロフィールは、典型的には抗体濃度の即座のピーク、続いて指数的減少を示す。さらなる投薬用量なしで、この減少は投与した抗体の半減期に依存して、数日から数カ月の期間内に前処置レベルに達する。例えばヒトの抗体の中には半減期が20日の単位のものもある。

30

#### 【0135】

幾つかの方法では、患者のA<sub>42</sub>に対する抗体のベースライン測定は投与前に行い、第二測定はピーク抗体レベルを決定するためにその後すぐに行い、そして1以上のさらなる測定を抗体レベルの減少をモニタリングするための間隔で行う。

#### 【0136】

抗体のレベルがベースラインまたは予め定めた割合のピーク低下ベースライン（例えば、50%、25%または10%）に達した時、さらなる抗体の投薬用量の投与を投与する。幾つかの方法では、ピークまたは続いて測定されるバックグラウンド未満のレベルを、既に定めた参照レベルと比較して、他の患者に有益な予防的または治療的処置計画を構成する。測定される抗体レベルが参照レベルよりも有意に低いならば（例えば、平均から処置の利益を享受する患者群の参照値の1標準偏差を引いたものより低い）、抗体のさらなる投薬用量を示している。

40

#### 【0137】

##### 3. 診断キット

本発明はさらに、上記の診断法を行うための診断キットを提供する。典型的には、そのようなキットはA<sub>42</sub>に対する抗体に特異的に結合する作用物質を含む。キットは、標識も含むことができる。A<sub>42</sub>に対する抗体を検出するために、標識は典型的には標識された抗

50

-イディオタイプ抗体の状態である。抗体の検出には、作用物質をマイクロタイター皿のウェルのような固体相に予め結合して供給することができる。またキットは、典型的にはキットの使用について指示するラベルを含む。このラベルはA に対する抗体のレベルと測定したラベルのレベルを相関させるチャートまたは他の対応する型 (regime) を含んでもよい。用語ラベルとは、製造、輸送、販売または使用の任意の時にキットに付けられた、または関連する記載または記録されたデータを称する。例えば、用語ラベルには広告用リーフレットおよび小冊子、包装材料、使用説明書、オーディオまたはビデオカセット、コンピューターディスク、ならびにキットに直接印字された記載を包含する。

【0138】

また本発明は、インビボ撮影を行うための診断キットを提供する。そのようなキットは典型的には、A の、好ましくは残基1-10内のエピトープに結合する抗体を含む。好ましくは抗体は標識されているか、または2次標識試薬がキットに含まれている。好ましくはキットにはインビボ撮影アッセイを行うための使用説明書が貼られている。

【0139】

#### VII. インビボ撮影

本発明は、患者内のアミロイド沈着物をインビボで撮影する方法を提供する。そのような方法は、アルツハイマー病またはそれに対する罹患性を診断または確認するために有用である。例えばこの方法は、痴呆の症状を表す患者について使用することができる。患者が異常なアミロイド沈着物を有するならば、患者はアルツハイマー病に罹患しているだろう。この方法は無症候性の患者にも使用することができる。アミロイドの異常な沈着物の存在は将来、症状のある疾患に対する罹患性を示す。またこの方法は、アルツハイマー病と以前に診断された患者において、疾患の進行および/または処置に対する応答をモニタリングするためにも有用である。

【0140】

この方法は、患者のA に結合する抗体のような試薬を投与し、そして次に作用物質を結合した後に検出することにより行う。好適な抗体は、完全長のAPPポリペプチドに結合せずに患者内のA 沈着物に結合する。アミノ酸1-10内のA のエピトープに結合する抗体は、特に好適である。幾つかの方法では、抗体はA のアミノ酸7-10内のエピトープに結合する。そのような抗体は、典型的には実質的な除去応答を誘導せずに結合する。別の方法では、抗体はA のアミノ酸1-7内のエピトープに結合する。そのような抗体は典型的には結合し、そしてA に対する除去応答を誘導する。しかし除去応答は、Fabのような完全長の定常領域を欠く抗体フラグメントを使用することにより回避することができる。幾つかの方法では、同じ抗体を処置および診断試薬として両方に役立てることができる。恐らくC-末端エピトープはアミロイド沈着物内に接近できないので、一般にA の残基10内のエピトープC-末端に結合する抗体は、A の残基1-10内のエピトープに結合する抗体として強いシグナルを示さない。したがって、そのような抗体はそれほど好ましくない。

【0141】

診断試薬は、患者の体内に静脈内注入により、あるいは頭蓋内注入によりまたは頭骨に穴を空けることにより脳に直接投与することができる。試薬の投薬用量は、処置法と同じ範囲内にあるべきである。典型的には試薬を標識するが、方法によってはA に親和性を有する1次試薬を標識せず、そして2次標識試薬を使用して、1次試薬に結合させる場合もある。標識の選択は、検出手段に依存する。例えば、蛍光標識は光学的検出に適當である。常磁性標識は外科的介入なしで断層撮影的検出に適當である。放射性標識も、PETまたはSPECTを使用して検出することができる。

【0142】

診断は、対応するベースライン値と、標識した位置の数、サイズおよび/または強度を比較して行う。ベースライン値は、罹患していない個体群の平均レベルを表すことができる。またベースライン値は、同じ患者で測定した以前の値を表すこともできる。例えばベースライン値は、処置を始める前の患者で決定し、そして測定した値をその後にベースラ

イン値と比較することができる。ベースラインに対する値の減少は、処置に対する陽性の応答を示す。

【0143】

<実施例>

I. ADに対するA<sub>42</sub>の予防的効力 これらの実施例は、アルツハイマー様の神経病状を発症し易い717位 (APP<sub>717V F</sub>)での突然変異を有するAPPを過剰発現しているトランスジェニックマウスへのA<sub>42</sub>ペプチドの投与を説明する。これらのマウス(PDAPPマウス)の作出および特性は、Gemset al., Nature、同上に記載されている。これらの動物はそれらのヘテロ接合体状態で、6カ月齢から先にA<sub>42</sub>を沈着し始める。15月齢までに、それらはアルツハイマー病に見られるものに等しいA<sub>42</sub>沈着物のレベルを表す。PDAPPマウスには凝集したA<sub>42</sub>(凝集A<sub>42</sub>)またはリン酸緩衝化生理食塩水を注射した。凝集したA<sub>42</sub>は、A<sub>42</sub>の多くのエピトープに対する抗体を誘導できる能力から選択した。

10

【0144】

A. 方法

1. マウスの起源

30匹のPDAPP異質メスマウスを、無作為に以下の群に分けた：10匹のマウスには凝集A<sub>42</sub>を注射し(1匹は移動中に死亡した)、5匹はPBS/アジュバントまたはPBSを注射し、そして10匹は未注射対照であった。5匹のマウスには血清アミロイドタンパク質(SAP)の配列から誘導したペプチドを注射した。

【0145】

2. 免疫原の調製

凝集A<sub>42</sub>の調製：2ミリグラムのA<sub>42</sub>(USペプチド社：ロットK-42-12)を、0.9mlの水に溶解し、そして0.1mlの10×PBSを加えて1mlとした。これをボルテックスで混合し、そして37℃で一晩、インキューベーションし、この条件下でペプチドが凝集した。使用しなかったA<sub>42</sub>は乾燥した凍結乾燥粉末として次に注射するまで-20℃で保存した。

20

【0146】

3. 注射の準備

各注射には、マウスあたりPBS中に100μgの凝集A<sub>42</sub>を、初回の免疫感作には1:1で完全フロイントアジュバント(CFA)と最終容量400μlのエマルジョンに乳化し、続いて同量の免疫原の追加免疫は、完全フロイントアジュバント(IFA)中で2週間目に行った。IFA中さらに2回の用量を1カ月の間隔で与えた。後の免疫感作は1カ月の間隔で500μlのPBS中で行った。注射は腹腔内(i.p.)に行った。

30

【0147】

PBSの注射は同じスケジュールに従い、そしてマウスにはPBS/アジュバントの1:1の混合物をマウスあたり400μlで、またはマウスあたり500μlのPBSを注射した。SAP注射は、注射あたり100μgの用量を使用して同様に同じスケジュールに従った。

【0148】

4. マウス採血の滴定、組織プレパレーションおよび免疫組織化学

上記の方法は、以下の一般的な材料および方法に記載する。

【0149】

B. 結果

PDAPPマウスに、凝集したA<sub>42</sub>(凝集A<sub>42</sub>)、SAPペプチドまたはリン酸緩衝化生理食塩水のいずれかを注射した。PDAPPマウスの群は、注射しない陽性対照としても残した。凝集A<sub>42</sub>に対するマウスの力値は、4回目の追加免疫から1カ月おきに、マウスが1年齢になるまでモニタリングした。マウスを13カ月目に屠殺した。調査したすべての時点で、9匹のうちの8匹の凝集A<sub>42</sub>マウスが、高い抗体力価を生じ、これは一連の注射を通して高いままであった(1/10000よりも高い力価)。9匹目のマウスは低い、約1/10000の測定可能な力価であった(図1、表1)。SAPP-注射マウスは、この免疫原について1:1,000~1:30,000の力価を有し、1匹のマウスだけが1:10,000を越えた。

40

【0150】

50

PBS-処置マウスは、凝集 A 42 に対して 6、10 および 20 カ月目に滴定した。1/100 希釈で、PBS マウスは凝集 A 42 に対して滴定した時、1 つのデータ点でバックグラウンドの 4 倍を越えただけで、それ以外はすべての時点でバックグラウンドより 4 倍少なかった (表 1)。SAP-特異的応答は、すべての力価が 300 未満のこのような時点はすべて、無視することができた。

#### 【0151】

凝集 A 1-42 処置群の 9 匹のうちの 7 匹のマウスが、それらの脳内に検出可能なアミロイドが無かった。対照的に、SAP および PBS 群のマウスに由来する脳組織は、海馬ならびに前頭および帯状束皮質に多数のアミロイド沈着物を含んだ。沈着物のパターンは未処置対照のパターンに類似し、歯状回の外側分子層のような脆弱なサブ領域の特徴的な関与があった。A 1-42 注射群からの 1 匹のマウスには、海馬に限定されたアミロイド負荷量の大きな減少があった。単離した斑は別の A 1-42 処置マウスで確認された。

10

#### 【0152】

海馬中のアミロイド負荷量の定量的な画像分析では、A 42 (AN1792)-処置動物で劇的な減少が達成されたことが証明された (図 2)。PBS 群 (2.22%) および未処置対照群 (2.65%) のアミロイド負荷量は、AN1792 で免疫感作した群よりも有意に大きかった (0.00%、 $p = 0.0005$ )。対照的に、SAP ペプチド (SAPP) で免疫感作した群の中央値は 5.74% であった。未処置、対照マウスに由来する脳組織は、海馬ならびに夾板骨後皮質に、A - 特異的モノクローナル抗体 (mAb) 3D6 で視覚化される多数の A アミロイド沈着物を含んだ。同様なアミロイド沈着物パターンが、SAPP または PBS で免疫感作したマウスでも見られた (図 2)。さらにこれらの 3 つの後者の群には、すべての 3 つのこのような群で歯状回の外側分子層のような、A D で古典的に見られる脳の脆弱なサブ領域の特徴的な関与があった。

20

#### 【0153】

A 沈着物を含まなかった脳は、典型的には PDAPP マウスでヒトの APP 抗体 8E5 を用いて視覚化される神経炎斑も無かった。残りの群 (SAP-注射、PBS および非注射マウス) の脳のすべてが、未処置 PDAPP マウスに典型的な多数の神経炎斑を有した。少数の神経炎斑が、AN1792 で処置した 1 匹のマウスに存在し、そして異栄養性の神経突起の 1 クラスターが AN1792 で処置した第二マウスで見られた。海馬の画像分析および図 3 では、PBS 受容体と比較して (中央値 0.28%、 $p = 0.0005$ )、AN1792-処置マウスにおける異栄養性の神経突起のほとんどの排除が実質的に示された (中央値 0.00%)。

30

#### 【0154】

斑が関係する炎症の星状細胞増加症の兆候も、A 1-42 注射群の脳には存在しなかった。他の群のマウスに由来する脳は、豊富な、しかもクラスターとなった A 斑が関係するグリオーシスに典型的な GFAP-陽性星状細胞を含んだ。GFAP-反応したスライドのサブセットを、A 沈着物の位置を定めるためにチオフラビン S によりカウンター染色した。GFAP-陽性の星状細胞は、SAP、PBS および未処置対照で A 斑に関連した。そのような関連は、斑 - 陰性の A 1-42 処置マウスでは見られず、一方、最小の斑が関係するグリオーシスは AN1792 で処置した 1 匹のマウスで確認された。

#### 【0155】

図 4 に示す夾板骨後皮質に関する画像分析は、星状細胞増加症の減少が AN1792 で処置した群について 1.56% の中央値で有意であるが、SAP ペプチド、PBS で免疫感作した群または未処置では 6% より大きい中央値と確認された ( $p = 0.0017$ )。

40

#### 【0156】

A 1-42 および PBS-注射マウスのサブセットからの証拠は、斑が関係する MHC II 免疫反応性が A 1-42 注射マウスでは存在しないことを示し、A - 関連炎症反応の欠如と一致した。

#### 【0157】

マウス脳の切片も、MAC-1、細胞表面タンパク質に特異的なモノクローナル抗体に特異的な mAb と反応した。MAC-1 (CD11b) はインテグリンファミリーの員であり、そして CD18 と

50

のヘテロ二量体として存在する。CD11b/CD18複合体は単球、マクロファージ、好中球およびナチュラルキラー細胞上に存在する (Mak and Simard)。脳内に存在するMAC-1-反応性細胞型は、MAC-1と免疫反応した切片中の類似する表現型的形態に基づきミクログリアであろう。斑が関係するMAC-1標識は、PBS対照群と比べてAN1792で処置したマウスの脳では低く、A が誘導した炎症応答の欠如と一致することが分かった。

【0158】

#### C. 結論

A 1-42-注射マウスの脳におけるA 斑の欠如および反応性ニューロンおよび膠状の変化は、それらの脳内に沈着物したアミロイドが無いが、または極めて少なく、そしてグリオーシスおよび神経炎的な病状といった病理学的な結末は存在しないことを示していた。A 1-42で処置したPDAPPマウスは、本質的に対照の非トランスジェニックマウスと同じ病状の欠如を示す。したがってA 1-42の注射は脳組織からヒトA を沈着物の予防または除去に、そして続いてニューロンおよび炎症変性的変化の排除に高度に有効である。すなわちA ペプチドの投与は、ADの防止に予防的および治療的利益の両方を有することができる。

10

【0159】

#### II. 投与量応答実験

5週齢のメスのスイス ウェブスターマウス(1群あたりN=6)を、腹腔中に投与したCFA/IFA中に配合した300、100、33、11、3.7、1.2、0.4または0.13 $\mu$ gのA で免疫感作した。3回の用量を隔週の間隔で、続いて4回目を1カ月後に与えた。第一用量はCFAで乳化し、そして残りの用量はIFAで乳化した。動物は抗体力価を測定するために、2回目の投与量から始めて各免疫感作から4~7日後に採血した。11、33または300 $\mu$ gの抗原で免疫感作した3群のサブセットの動物は、さらに免疫原製剤の投与量範囲にわたり抗体応答の減少をモニタリングするために、4回目の免疫感作後から4カ月間、およそ1カ月の間隔で採血した。これらの動物は実験開始後7カ月目に5回目の最終免疫感作を受けた。動物はAN1792に対する抗体応答を測定し、そして毒性学的分析を行うために1週間後に屠殺した。

20

【0160】

減少する用量応答は、300から3.7 $\mu$ gで観察され、2つの低い用量では応答が無かった。平均抗体力価は、11~300 $\mu$ gの抗原を3回の投与後に約1:1000、4回投与後に約1:10,000である(図5を参照にされたい)。

30

【0161】

抗体力価はすべてについて劇的に上昇したが、最低の投与量群は3回目の免疫感作後に5-から25-倍の範囲でGMTが上昇した。低い抗体応答は、0.4 $\mu$ gの受容体でも検出できた。1.2および3.7 $\mu$ gの群は約1000のGMTに匹敵する力価を有し、そして最高から4つの用量は約25,000のGMTと一緒に集まったが、33 $\mu$ gの投与量群が3000の低いGMTであった。4回目の免疫感作後、力価の上昇はほとんどの群でより緩和であった。検出できる抗体が無い0.14 $\mu$ gの受容体から、36,000のGMTの11 $\mu$ gの受容体まで、0.14 $\mu$ gから11 $\mu$ gのより低い抗原投与量群の範囲で明らかな用量応答があった。ここでも、11~300 $\mu$ gの4つの最高の投与量群の力価は、一緒になった。このように2回の免疫感作後、抗原用量に依存する抗体力価は、0.4~300 $\mu$ gの広い範囲にわたった。第3の免疫感作までに、4つの最高の投与量の力価はすべて同等であり、そしてそれらはさらなる免疫感作後も安定水準のままであった。

40

【0162】

4回目の免疫感作から1カ月後、300 $\mu$ gの群で力価は免疫感作から5日後の血液からの測定値よりも2-から3-倍高かった(図6)。この観察は、ピークの既往性抗体応答が免疫感作から5日後よりも遅れて生じることを示唆している。より緩和な(50%)上昇が33 $\mu$ gの群で見られた。300 $\mu$ gの用量群は最後の投与から2カ月後に、GMTが約70%まで鋭く減少した。さらに1カ月後、この傾斜は45%(100 $\mu$ g)、および33および11 $\mu$ gで約14%と弱くなった。すなわち、免疫感作を終了した後の循環している抗体力値傾斜の速度は、ピ

50

ーク応答の後に最初の月で鋭く傾斜し、続いてその後によりゆるやかな減少速度の2つの局面で現れる。

【0163】

抗体力価およびこれらのスイス ウェブスターマウスの反応の動力学は、平行する様式で免疫感作した若いヘテロ接合性PDAPPトランスジェニックマウスのも のと類似する。ヒトで免疫応答を誘導するために有効な投薬用量は、典型的にはマウスで有効な投薬用量に類似する。

【0164】

III. 安定したADに対する治療的効力のスクリーニング

このアッセイは、加齢マウスにおけるADの神経病理学的特徴を停止または好転する活性について、免疫原性作用物質を試験するために設計する。42アミノ酸長のA $\beta$  (AN1792)を用いた免疫感作を、PDAPPマウスの脳にすでにアミロイド斑が存在する時点で開始した。 10

【0165】

この実験を行った期間に、未処置PDAPPマウスはADに見られるものに似た多数の神経変性的変化を生じる (Games et al., 同上およびJohnson-Wood et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1550-1555(1997))。アミロイド斑中へのA $\beta$ の沈着物は、異栄養性の神経突起と呼ばれる迷走性の軸索および樹状突起要素から成る変性的なニューロン応答が付随する。異栄養性の神経突起に取り囲まれ、そしてそれを含むアミロイド沈着物は、神経炎症性局面と呼ぶ。ADおよびPDAPPマウスの両方において、異栄養性の神経突起は顕著な球状構造を有し、APPおよび細胞骨格成分を認識する抗体パネルと免疫反応性であり、そして超微細構造レベルで複雑な細胞下の変性的変化を表す。これらの特徴は、PDAPP脳において疾患に関連する選択的かつ再現性のある神経炎症性局面形成の測定を可能とする。PDAPP神経炎症性局面の異栄養性のニューロン成分は、ヒトAPPに特異的な抗体(モノクローナル抗体8E5)を用いて容易に視覚化され、そしてコンピューターによる画像分析で容易に測定可能である。したがって、アミロイド斑形成に及ぼすAN1792の効果を測定することに加えて、我々はこの処置が神経炎症性のジストロフィーの発生に及ぼす効果を監視した。 20

【0166】

星状細胞およびミクログリアは、ニューロン傷害の程度に応答し、そして影響を与える非-ニューロン細胞である。GFAP-陽性星状細胞およびMHC II-陽性ミクログリアはADで通常観察され、それらの活性化は疾患の重篤度を増す。したがって我々はAN1792-処置マウスにおける反応性星状細胞増加症および小膠細胞症の発生も監視した。 30

【0167】

A. 材料および方法

チャールズ リバー (Charles River) から得た48匹の、11~11.5週齢のヘテロ接合性のメスPDAPPマウスを無作為に2群に分けた: 24匹のマウスは100 $\mu$ gのAN1792で免疫感作し、そして24匹のマウスはPBSで免疫感作した(それぞれフロイントアジュバントと合わせた)。AN1792およびPBS群は再度、それらが~15月齢に達した解きに分けた。15月齢で、各AN1792-およびPBS-処置動物のおよそ半分を安楽死させ(それぞれn=10および9)、残りは~18カ月で終了するまで免疫感作を受け続けた(それぞれn=9および12)。全部で8匹の動物(5匹のAN1792および3匹のPBS)が、実験中に死亡した。免疫感作した動物に加えて、1年齢(n=10)、15月齢(n=10)および18月齢(n=10)の未処置PDAPPマウスを、脳内のA $\beta$  およびAPPレベルをELISAで測定するために比較に含め; 1年齢の動物も免疫組織化学的分析に含めた。 40

【0168】

方法は外に示さない限り、実施例1の通りである。AN1792のUSペプチドロット12およびカリフォルニアペプチドロットME0339を使用して、15カ月時点以前に投与する6回の免疫感作用の抗原を調製した。カリフォルニアペプチドロットME0339およびME0439は、15から18カ月の間に3回のさらなる免疫感作投与に使用した。 50

## 【0169】

免疫感作には、200 $\mu$  IPBS中の100 $\mu$  gのAN1792またはPBS単独を、完全フロイントアジュバント (CFA) または不完全フロイントアジュバント (IFA) またはPBSに、400 $\mu$  lの最終用量で1:1 (容量/容量) に乳化した。初回免疫感作は、アジュバントとしてCFAを用いて送達し、次の4回の投与量はIFAを用いて与えられ、そして最後の4回の投与量はアジュバント無しのPBSのみを用いて与えられた。全部で9回の免疫感作を、7カ月間にわたり2週間のスケジュールで最初の3回の投与量を、続いて4週間の間隔で残りの注射を与えた。15月齢で安楽死させた4カ月の処置群は、最初の6回の免疫感作を受けただけであった。

## 【0170】

## B. 結果

## 1. アミロイド負荷量に及ぼすAN1792処置の効果

定量的な画像分析により決定した皮質のアミロイド負荷量に及ぼすAN1792処置の結果を図7に示す。皮質のアミロイド負荷量の中央値は、未処置の12月齢PDAPPクウス群では0.28%であり、実験の開始でマウスの斑の負荷量を表す値であった。18カ月で、アミロイド負荷量はPBS-処置マウスで17-倍を超えて4.87%まで増加し、一方、AN1792-処置マウスはわずか0.01%のアミロイド負荷量に大きく減少し、12カ月の未処置および15-および18-カ月の両PBS-処置群よりも顕著に低かった。このアミロイド負荷量は、15-(96%の減少;  $p = 0.003$ ) および18-カ月 ( $> 99\%$  減少;  $p = 0.0002$ ) の両AN1792受容体で、有意に減少した。

## 【0171】

典型的には、PDAPPマウスの皮質アミロイド沈着物は、前頭および夾板骨後皮質 (RSC) から始まり、そして腹-側方向へ進行して側頭-エントルヒナル (entorhinal) 皮質 (EC) を含む。ほぼAN1792が最初に投与された時期である12月齢のマウスのECにはアミロイドはほとんど見いだされないか、または見いだされななかった。AN1792処置から4カ月後、アミロイド沈着物はRSCでは大きく減少し、そして進行的なECの関与はAN1792処置により完全に排除された。後者の観察はAN1792が、通常は側頭および側頭皮質を襲うアミロイドの進行を完全に止め、しかもRSC中の沈着物を停止させるか、あるいは好転させることを示した。

## 【0172】

AN1792処置がPDAPPマウスの皮質アミロイド負荷量の発生に及ぼす甚大な効果は、さらに18-カ月までの7カ月間処置された群で示された。皮質アミロイドのほぼ完全な不在がAN1792-処置マウスで見られ、拡散した斑が全体的に欠如し、しかも緻密な沈着物に減少した。

## 【0173】

## 2. AN1792-処置に関連する細胞的および形態学的変化

A -陽性細胞群は、典型的にはアミロイド沈着物を含む脳の領域で見いだされた。注目すべきは、AN1792受容体の幾つかの脳で、皮質アミロイド斑がほとんど無いか、または全く見られなかったことであった。A 免疫反応性の大部分が、大きな小葉または凝集細胞体を含む細胞内に含まれるようであった。表現型的には、これらの細胞は似ている活性化されたミクログリアまたは単球である。それらは活性化された単球およびミクログリア (MHCIIおよびCD11b) により発現されるリガンドを認識する抗体と免疫反応性であり、そして場合により血管の壁および管腔に付随していた。A およびMHCII-特異的抗体で標識した近-隣切片の比較により、これらの細胞の類似パターンの形成が両クラスの抗体によりされたことが明らかとなった。AN1792-処置脳の詳細な調査により、MHCII-陽性細胞はこのような動物内に残る限定されたアミロイド付近に限られていることが明らかとなった。使用した固定条件下で、細胞はT細胞 (CD3、CD3e) またはB細胞 (CD45RA、CD45RB) リガンドまたは白血球共通抗原 (CD45) を認識する抗体と免疫反応性ではなかったが、単球と交差反応するロイコシアリン (CD43) を認識する抗体と反応性であった。そのような細胞はPBS-処置マウスでは見いだされなかった。

10

20

30

40

50

## 【0174】

PDAPPマウスは、海馬歯状回の外側分子層に重いアミロイド沈着物を一定して発生する。この沈着物はパーホラント(perforant)経路、ADで古典的にアミロイド斑を含む領域下に明らかなすじを形成する。PBS-処置マウスにおけるこれらの沈着物の特徴的な出現は、未処置PDAPPマウスですでに特徴つけられたものと似ていた。アミロイド沈着物は連続的バンド内に拡散および緻密化した斑の両方から成った。対照的に、AN1792-処置マウスに由来する多数の脳では、このパターンは劇的に変化した。海馬のアミロイド沈着物はすでに拡散したアミロイドを含まず、そしてバンド化したパターンは、完全に破壊された。代わりに抗-A 抗体と反応性の多数の異常な点状構造が存在し、これらの幾つかはアミロイドを含有する細胞らしかった。

10

## 【0175】

MHCII-陽性細胞は、AN1792-処置動物の細胞外アミロイド付近に観察されることが多かった。A -陽性細胞とアミロイドとの会合パターンは、AN1792-処置マウスに由来する幾つかの脳で大変類似した。このような単球性細胞の分布は、アミロイド沈着物の近位に限定され、そしてA 斑が無い他の脳の領域には全く存在しなかった。MHCII-およびA -標識切片の共焦点顕微鏡では、斑の成分が多く単球性細胞内に含まれることが明らかとなった。

## 【0176】

MHCII-およびMACI-標識切片の定量的画像分析では、海馬におけるMACI反応性の測定を用いて、有意に達したPBS群に比較して、AN1792-処置マウスのRSCおよび海馬中で免疫反

20

## 【0177】

これらの結果は、斑を持つ脳の領域中のアミロイドの活発な細胞性除去を示している。

## 【0178】

## 3. A レベルに及ぼすAN1792効果：ELISA測定

## (a) 皮質レベル

未処置PDAPPマウスでは、12カ月時点の皮質中の全A の中央値レベルは1,600ng/gであり、これが15カ月までに8,700ng/gに増大した(表2)。18カ月で値は22,000ng/gであり、実験期間中に10倍以上に上昇した。PBS-処置動物は8,600ng/gの全A を15カ月で有し、これは18カ月で19,000ng/gに上昇した。対照的に、AN1792-処置動物は15カ月の時点(1,600ng/g)で、PBS-免疫感作群よりも全A が81%少なかった。有意に少ない( $p = 0.0001$ )全A (5,200ng/g)は、18カ月でAN1792およびPBS群を比較した時に見いだされ(表2)、存在する場合のA に72%の減少を表す。同様な結果がA 42の皮質レベルを比較した時に得られ、すなわちAN1792-処置群はより少ないA 42を含むが、この場合、AN1792とPBS群との間の差異は15カ月( $p = 0.04$ )および18カ月( $p = 0.0001$ 、表2)で有意であった。

30

## 【0179】

【表5】

表2:皮質中のAβレベルの中央値(ng/g)

月齢	未処置			PBS			AN1792		
	全	Aβ42	(n)	全	Aβ42	(n)	全	Aβ42	(n)
12	1,600	1,300	(10)						
15	8,700	8,300	(10)	8,600	7,200	(9)	1,600	1,300*	(10)
18	22,200	18,500	(10)	19,000	15,900	(12)	5,200**	4,000**	(9)

\* p = 0.0412

\*\* p = 0.0001

10

## 【0180】

## (b) 海馬レベル

未処置PDAPPマウスでは、12月齢で全A<sub>β</sub>の海馬レベルの中央値は15,000ng/gであり、これは15カ月で51,000ng/g、そしてさらに18カ月で81,000ng/gにまで上昇した(表3)。同様に、PBS免疫感作マウスは、15カ月および18カ月でそれぞれ40,000ng/gおよび65,000ng/gの値を示した。AN1792免疫感作動物は、少ない全A<sub>β</sub>を表し、特に15カ月および18カ月の時点でそれぞれ25,000ng/gおよび51,000ng/gであった。18カ月のAN1792-処置群の値は、PBS処置群よりも有意に低かった(p = 0.0105; 表3)。A<sub>β</sub>42の測定では同じ結果のパターンを与え、すなわちAN1792-処置群のレベルは、18カ月の評価でPBS群よりも有意に低かった(それぞれ39,000ng/g対57,000ng/g; p = 0.002)(表3)。

20

## 【0181】

## 【表6】

表3:海馬のAβレベルの中央値(ng/g)

月齢	未処置			PBS			AN1792		
	全	Aβ42	(n)	全	Aβ42	(n)	全	Aβ42	(n)
12	15,500	11,100	(10)						
15	51,500	44,400	(10)	40,100	35,70	(9)	24,50	22,100	(10)
18	80,800	64,200	(10)	65,400	57,10	(12)	50,90	38,900**	(9)

\* p = 0.0105

\*\* p = 0.0022

30

## 【0182】

## (c) 小脳レベル

12カ月の未処置PDAPPマウスでは、全A<sub>β</sub>の小脳レベルの中央値は15ng/gであった(表4)。15カ月で、この中央値は28ng/gに上昇し、そして18カ月までに35ng/gまで上昇した。PBS-処置動物は15カ月で21ng/g、そして18カ月で43ng/gの全A<sub>β</sub>値の中央値を示した。AN1792-処置マウスは15カ月で22ng/gの全A<sub>β</sub>を有し、そして18カ月で対応するPBS群よりも有意に低い(p = 0.002)全A<sub>β</sub>(25ng/g)を有することが見いだされた(表4)。

40

## 【0183】

## 【表 7】

表4:小脳のA $\beta$ レベルの中央値(ng/g)

月齢	未処置		PBS		AN1792	
	全A $\beta$	(n)	全A $\beta$	(n)	全A $\beta$	(n)
12	15.6	(10)				
15	27.7	(10)	20.8	(9)	21.7	(10)
18	35.0	(10)	43.1	(12)	24.8*	(9)

\* p = 0.0018

10

## 【0184】

## 4. APPレベルに及ぼすAN1792処置の効果

APP- および完全長のAPP分子は、両方ともA配列の全部または一部を含み、すなわちAN1792-が向けられる免疫応答の生成により影響を受け得る可能性がある。今日までの研究では、PDAPPマウスに神経病状が増えるとAPPレベルのわずかな上昇が記録された。皮質では、APP- が18カ月の時点でAN1792-処置対PBS-処置で19%まで減少したことを除き、APP- /FL(完全長)またはAPP- のいずれのレベルも本質的には変化しなかった。18カ月のAN1792-処置APP値は、12カ月および15カ月の未処置ならびに15カ月のPBS群の値とは有意に異ならなかった。すべての場合に、APP値はPDAPPマウスで正常に見られる範囲内に留まった。

20

## 【0185】

## 5. 神経変性的およびグリオティック(Gliotic)病状に及ぼすAN1792処置の効果

神経炎症性局面の負荷量は、PBS群に比較してAN1792-処置マウスの前頭皮質において15月齢(84%; p = 0.03)および18月齢(55%; p = 0.01)の両方で有意に減少した(図8)。神経炎症性局面の負荷量の中央値は、15月齢から18月齢の間でPBS群において0.32%から0.49%へと増加した。これは15月齢および18月齢の群でそれぞれ0.05%および0.22%の神経炎症性局面負荷量の中央値を有するAN1792群における神経炎症性局面の発生の大きな減少とは好対照であった。

30

## 【0186】

AN1792を用いた免疫感作は十分に寛容であり、しかも反応性の星状細胞増加症も、両15月齢(56%; p = 0.011)および18月齢(39%; p = 0.028)でPBS群と比べた時、AN1792-処置したマウスのRSCで有意に減少したようだ(図9)。PBS群の星状細胞増加症のパーセントの中央値は、15カ月から18カ月の間で4.26%から5.21%へと増加した。AN1792-処置は両時点での星状細胞増加症の発生を、それぞれ1.89%および3.2%まで抑制した。これは神経網が除去プロセスにより損傷されなかったことを示唆している。

## 【0187】

## 6. 抗体応答

上記のように、11月齢のヘテロ接合性PDAPPマウス(N = 24)は、フロイントアジュバントで乳化した100 $\mu$ gのAN1792で、0、2、4、8、および12週に一連の5回の免疫感作を腹腔内に投与され、そして6回目はPBSのみ(フロイントアジュバント無し)の免疫感作を16週に受けた。陰性対照として、平行した24匹の月齢を合わせたトランスジェニックマウスの組が、同じアジュバントで乳化され、そして同じスケジュールで送達されるPBSでの免疫感作を受けた。動物は2回目の投与から出発して各免疫感作から3~7日以内に採血した。AN1792に対する抗体応答は、ELISAにより測定した。AN1792で免疫感作した動物に関する幾何平均力価(GMT)は、2回目、3回目および最後(6回目)の投与後にそれぞれ約1,900、7,600そして45,000であった。6回目の免疫感作後に対照動物のA特異的抗体は測定しなかった。

40

## 【0188】

約1/2の動物はさらに3カ月間、約20、24および27週に免疫感作を受ける処置を行っ

50

た。これらの各投与量はフロイントアジュバントを含まないPBS賦形剤単独で送達された。平均抗体力価はこの期間中、変化しないままだった。実際には、抗体力価は5回目から9回目の注射を網羅する期間に対応する4回目から8回目の採血にわたり、安定であるように見えた。

【0189】

AN1792処置マウスの血清中に検出されるA<sub>β</sub>-特異的抗体が免疫感作により誘導されたかどうかを決定することは、沈着物した脳アミロイドにも関連し、AN1792-およびPBS-処置マウスの切片のサブセットを、マウスIgGに特異的な抗体と反応させた。PBS群とは対照的に、AN1792-処置脳内のA<sub>β</sub>斑は内因性のIgGに覆われていた。この2群の間の差異は、15-および18-カ月の両群で見られた。これらのマウスには重度のアミロイド負荷量が存在するにもかかわらず、特に目立ったのはPBS群の標識が無かったことであった。これらの結果は、合成のA<sub>β</sub>タンパク質を用いた免疫感作が、アミロイド斑中のA<sub>β</sub>をインビボで認識し、そして結合する抗体を生成することを示す。

10

【0190】

#### 7. 細胞性免疫応答

脾臓を9匹のAN1792-免疫感作マウスおよび12匹のPBS-免疫感作した18月齢のPDAPPマウスから、9回目の免疫感作から7日後に摘出した。脾細胞を単離し、そして72時間、A<sub>β</sub>40、A<sub>β</sub>42またはA<sub>β</sub>40-1(逆順序のタンパク質)の存在下で培養した。マイトジェンCoAを陽性対照として役立てた。最適な応答は $>1.7\mu\text{M}$ タンパク質で得られた。すべての9匹のAN1792-処置動物に由来する細胞は、A<sub>β</sub>1-40またはA<sub>β</sub>1-42タンパク質のいずれかに応答して増殖し、両方のタンパク質について等レベルで取り込まれた(図10、上パネル)。A<sub>β</sub>40-1逆タンパク質には反応しなかった。対照動物からの細胞は、いずれのA<sub>β</sub>タンパク質にも応答しなかった(図10、下パネル)。

20

【0191】

#### C. 結論

この実験の結果は、現存するアミロイド沈着物を有するPDAPPマウスのAN1792免疫感作が、進行性のアミロイド沈着物を遅らせ、そして防止し、そして結果的に加齢したPDAPPマウスの脳内を神経病理学的変化を遅らせることを示す。AN1792を用いた免疫感作は、通常はアミロイドーシスに圧倒される構造上のアミロイド発生を本質的に停止する。すなわちA<sub>β</sub>ペプチドの投与は、ADの処置に治療的利益を有する。IV. A<sub>β</sub>フラグメントのスクリーニング 9~11月齢の100匹のPDAPPマウスを、APPおよびA<sub>β</sub>の9種の異なる領域で免疫感作し、どのエピトープが効力のある応答をもたらすかを決定した。9種の異なる免疫原および1つの対照を、上記のようにi.p.注射した。免疫原は4種のヒトA<sub>β</sub>ペプチド結合体1-12、13-28、32-42、1-5を含み、すべてヒツジ抗-マウスIgGにシステイン連結を介してカップリングした; APPポリペプチドアミノ酸592-695、凝集ヒトA<sub>β</sub>1-40および凝集ヒトA<sub>β</sub>25-35および凝集齧歯類A<sub>β</sub>42。凝集A<sub>β</sub>42およびPBSは、それぞれ陽性および陰性対照として使用した。1つの処置群あたり10匹のマウスを使用した。力価は上記のようにモニタリングし、そしてマウスは注射から4カ月の終わりに安楽死させた。組織化学、A<sub>β</sub>レベルおよび毒性学分析は死後に分析した。

30

【0192】

40

#### A. 材料および方法

##### 1. 免疫原の調製

結合したA<sub>β</sub>ペプチド: 4種のヒトA<sub>β</sub>ペプチド結合物(それぞれがヒツジ抗-マウスIgGに結合したアミノ酸残基1-5、1-12、13-28および33-42)は、架橋試薬スルホ-EMCSを使用してA<sub>β</sub>ペプチドに連結した人工的なシステインを通してカップリングすることにより調製した。A<sub>β</sub>ペプチド誘導體は、以下の最終アミノ酸配列を用いて合成した。各々の場合で、挿入したシステイン残基の位置は、下線で示した。A<sub>β</sub>13-28ペプチド誘導體も、示したカルボキシル末端システイン前に2つのグリシン残基を有した。

【0193】

## 【表 8】

AB1-12 ペプチド	NH <sub>2</sub> -DAEFRHDSGYEVC-COOH (配列番号:72)
AB1-5 ペプチド	NH <sub>2</sub> -DAEFRC-COOH (配列番号:73)
AB33-42 ペプチド	NH <sub>2</sub> -C-アミノ-ペプチン酸-GLMVGGVVIA-COOH (配列番号:74)
AB13-28 ペプチド	Ac-NH-HHQLVFFAEDVGSNKGGC-COOH (配列番号:75)

## 【0194】

10

カップリング反応を調製するために、10mgのヒツジ抗-マウスIgG(ジャクソン イムノリサーチ ラボラトリーズ:Jackson ImmunoResearch Laboratories)を、10mM ホウ酸ナトリウムバッファー、pH8.5に対して一晩透析した。透析した抗体を次いでアミコン(Amicon)のCentriprepチューブを使用して2mLの容量に濃縮した。10mgスルホ-EMS。

## 【0195】

[N(-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド](モレキュラーサイエンス社:Molecular Science Co.)を、1mLの脱イオン水に溶解した。40-倍のモル過剰のスルホ-EMCSを攪拌しながらヒツジ抗-マウスIgGに滴下し、そして溶液をさらに10分間攪拌した。活性化したヒツジ抗-マウスIgGを精製し、そしてバッファーは0.1MNaPO<sub>4</sub>、5mM EDTA、pH6.5により平衡化した10mLのゲル濾過カラム(ピアスケミカルズ((Pierce Chemicals)から得たピアスPresto Column)を通すことにより交換した。280nmの吸収により同定した抗体含有画分をプールし、そして吸光係数としてODあたり1.4mgを使用して約1mg/mLの濃度に希釈した。40-倍モル過剰なA ペプチドを20mLの10mMNaPO<sub>4</sub>、pH8.0に溶解したが、A 33-42ペプチドに関しては10mgを最初に0.5mLのDMSOに溶解し、そして次いで10mM NaPO<sub>4</sub>バッファーで20mLに希釈した。ペプチド溶液をそれぞれ10mLの活性化ヒツジ抗-マウスIgGに加え、そして室温で4時間、振盪した。生成した結合物は、アミコンのCentriprepチューブを使用して10mL未満の最終容量に濃縮し、そして次いでPBSに対して透析して、バッファーを交換し、そして遊離ペプチドを除去した。結合物は滅菌のために0.22µm-孔サイズのフィルターを通し、そして1mgの画分に分け、そして-20 で凍結保存した。結合物の濃度は、BCAタンパク質アッセイ(ピアスケミカルズ)を使用してウマIgGを標準曲線として用いて決定した。結合は、活性化ヒツジ抗-マウスIgGに対して結合ペプチドの分子量の増加により証明された。A 1-5ヒツジ抗マウス結合物は2つの結合のプールであり、残りは1つの調製物に由来した。

20

30

## 【0196】

## 2. 凝集A ペプチドの調製

ヒト1-40(AN1528:カリフォルニアペプチド社、ロットME0541)、ヒト1-42(AN1792:カリフォルニアペプチド社、ロット ME0339およびME0439)、ヒト25-35および齧歯類1-42(カリフォルニアペプチド社、ロットME0218)ペプチドは、-20 で乾燥して保存しておいた凍結乾燥粉末から、各組の注射物の調製に新たに可溶化した。この目的には、2mgのペプチドを0.9mlの脱イオン水に加え、そして混合物をボルテックス混合して、比較的均一な溶液または懸濁液を作成した。4つの中のAN1528が、この段階で可溶性の唯一のペプチドであった。100µlの10×PBSのアリコート(1×PBS:0.15MNaCl、0.01Mリン酸ナトリウム、pH7.5)を次いで加え、この時点でAN1528が沈殿し始めた。懸濁液を再度ボルテックス混合し、そして翌日使用するために37 で一晩、インキューベーションした。

40

## 【0197】

pB×6タンパク質の調製:pB×6(100アミノ酸のバクテリオファージMS-2ポリメラーゼN-末端リーダー配列、続いてAPP(APP)のアミノ酸592-695から成る融合タンパク質)をコードする発現プラスミドを、Oltersdorf et al., J.Biol. Chem. 265, 4492-4497(1990)により記載されているように構築した。プラスミドを大腸菌(E.coli)にトランスフェクトし、そしてタンパク質をプロモーターの誘導により発現させた。細菌は8M尿素中で

50

溶菌させ、そしてpB×6を調製用SDS PAGEにより部分精製した。pB×6を含有する画分は、ウサギ抗-pB×6ポリクローナル抗体を使用してウエスタンブロットにより確認し、プー  
 1 し、アミコンCentriprepチューブを使用して濃縮し、そしてPBSに対して透析した。クマ  
 ーシブルー染色したSDSPAGEにより推定される調製物の純度は、約5～10%であった。

【0198】

## B. 結果および考察

### 1. 実験計画

9-ないし11月齢の100匹のオスおよびメスのヘテロ接合性PDAPPトランスジェニックマ  
 ウスを、チャールズリバーラボラトリーおよびタコニックラボラトリー (Taconic Labora  
 tory) から得た。マウスは、フロイントアジュバントと組み合わせた異なる領域のA また  
 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50  
 またはAPPで免疫感作される10群に分けられた。動物はできるかぎり群内の性別、月齢、血  
 統および供給源を合わせるように分割した。免疫原はヒト起源の配列1-5、1-12、13-28お  
 よび33-42に由来する4種のA ペプチドを含み、各々がヒツジ抗-マウスIgGに結合して  
 いた；4種の凝集したA ペプチド、ヒト1-40 (AN1528)、ヒト1-42 (AN1792)、ヒト25-3  
 5、および齧歯類1-42；ならびに融合ポリペプチド、pB×6として設計し、APPアミノ酸残  
 基592-695を含む。10番目の群は対照としてアジュバントと組み合わせたPBSで免疫感作し  
 た。

【0199】

各免疫感作には、初回免疫感作用に、100μgの各A ペプチド(200μlのPBS中)、また  
 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50  
 または200μgのAPP誘導体pB×6(同じ容量のPBS中)またはPBS単独を、1:1(容量:容量)の完  
 全フロイントアジュバント(CFA)で400μlの最終容量に乳化し、続いて不完全フロイント  
 アジュバント(IFA)中に同量の免疫原の追加免疫感作を次の4回の投与に、そして最後  
 の投与はPBSを用いた。免疫感作は、最初の3回の投与量は隔週のスケジュールで、次に  
 その後は毎月、腹腔内に送達された。抗体力価を測定するために、動物は2回目の投与後  
 から始めて、各免疫感作から4～7日後に採血された。動物は最終投与から約1週間後に  
 安楽死させた。

【0200】

### 2. 脳内のA およびAPPレベル

種々のA ペプチドまたはAPP誘導体での免疫感作から約4カ月後に、塩類-灌流動物  
 から脳を摘出した。1つの半球は免疫組織化学分析に調製し、そして2つ目はA および  
 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50  
 APPレベルの定量に使用した。種々の形態の アミロイドペプチドおよびアミロイド前駆  
 体タンパク質の濃度を測定するために、半球を切開し、そして海馬、皮質および小脳領域  
 のホモジネートを5Mグアニジンで調製した。これらを希釈し、そしてアミロイドおよびA  
 PPのレベルは、ELISA形式で既知濃度のA ペプチドまたはAPPの一連の標準希釈物と比較  
 することにより定量した。

【0201】

PBSで免疫感作した対照群に関する全A の中央値濃度は、皮質よりも海馬で5.8倍高か  
 った(皮質の4,221ng/gに対して24,318ng/gの海馬の中央値)。対照群の小脳中の中央値  
 レベル(23.4ng/g)は、海馬よりも約1,000倍低かった。これらのレベルはこの月齢のヘ  
 テロ接合性PDAPPトランスジェニックマウスについて以前に報告したレベルと同様であっ  
 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50  
 た(Johnson-Woods et al., 1997, 同上)。

【0202】

皮質に関して、処置群のサブセットは対照群とは有意に異なる全A の中央値およびA  
 1-42レベルを有し( $p < 0.05$ )、これらの動物は図11に示すようにAN1792、齧歯類A  
 1-42またはA 1-5ペプチド結合物を受容した。これらの処置群について全A の中央  
 値レベルは、対照に比べてそれぞれ75%、79%および61%まで減少した。いかなる群にも  
 脳内の皮質領域にA -特異的抗体力価とA レベルとの間に識別できる相関はなかった  
 。

【0203】

海馬では、AN1792処置に関連した全A の中央値の減少(46%、 $p = 0.0543$ )は、皮質 50

で観察されるよりも大きかった (75%、 $p = 0.0021$ )。しかし減少の規模は皮質よりも海馬で一層大きく、皮質で正味3,171ng/g組織の減少に対して海馬では正味11,186ng/g組織の減少であった。齧歯類 A<sub>1-42</sub>または A<sub>1-5</sub>を受けた動物群については、全 A<sub>1-42</sub> レベルの中央値は、それぞれ36%および26%まで減少した。しかし群のサイズが小さいこと、および両群内の動物毎のアミロイドペプチドレベルの高い変動性を考慮すると、このような減少は有意ではなかった。A<sub>1-42</sub>レベルを海馬で測定した時、処置が誘導した減少が有意しなかったものはなかった。すなわち皮質中のより小さい A<sub>1-42</sub> 負荷量から、この領域での変化は処置効果のより敏感な指標である。皮質中でELISAにより測定される A<sub>1-42</sub> レベルの変化は同様であるが、免疫組織化学的分析からの結果とは同一ではない (以下を参照のこと)。

10

## 【0204】

全 A<sub>1-42</sub> は、AD病により典型的には最も影響を受けることが小さい小脳でも測定した。種々の A<sub>1-42</sub> ペプチドまたはAPP誘導体で免疫感作したいずれの群の A<sub>1-42</sub> 濃度の中央値も、脳のこの領域において対照群と異ならなかった。この結果は、処置により A<sub>1-42</sub> の非病理学的レベルは影響を受けないことを示唆している。

## 【0205】

APP濃度は、処置および対照動物に由来する皮質および小脳中でELISAでも決定した。2種の異なるAPPアッセイを使用した。第1はAPP-FLと呼び、APP-アルファ (A<sub>1-42</sub> 配列内が開裂されたAPPから分泌した)、およびAPPの完全長の形態 (FL) を認識し、一方2つ目は、APP- $\beta$  のみを認識する。処置群のサブセットでは処置が関係する A<sub>1-42</sub> の減少とは対照的に、APPのレベルが対照動物と比較してすべての処置で変化しなかった。これらの結果は、A<sub>1-42</sub> ペプチドでの免疫感作がAPPを減らさず;むしろ処置効果は A<sub>1-42</sub> に特異的であることを示す。

20

## 【0206】

要約すると、全 A<sub>1-42</sub> および A<sub>1-42</sub> レベルは皮質中でAN1792、齧歯類 A<sub>1-42</sub> または A<sub>1-5</sub> 結合物を用いた処置により有意に減少した。海馬では、全 A<sub>1-42</sub> がAN1792処置でのみ有意に減少した。海馬、皮質または小脳における他の処置が関与する A<sub>1-42</sub> またはAPPレベルの変化は、有意ではなかった。

## 【0207】

## 2. 組織化学的分析

組織化学的分析用に6群のサブセットに由来する脳を調製し、A<sub>1-42</sub> ペプチド結合物 A<sub>1-5</sub>、A<sub>1-12</sub> および A<sub>13-28</sub> で免疫感作した3群;完全長の A<sub>1-42</sub> 凝集物AN1792およびAN1528で免疫感作した2群、およびPBSで処置した対照群。これらの群からの脳切片中のアミロイド負荷量を画像分析の結果を、図12に示す。

30

## 【0208】

3つの処置群対対照動物の皮質領域中で、アミロイド負荷量には有意な減少があった。アミロイド負荷量の最大の減少はAN1792を受けた群で観察され、ここで平均値は97%まで減少した ( $p = 0.01$ )。有意な減少はAN1528 (95%、 $p = 0.005$ ) および A<sub>1-5</sub> ペプチド結合物 (67%、 $p = 0.02$ ) で処置した動物でも観察された。

## 【0209】

ELISAによる全 A<sub>1-42</sub> または A<sub>1-42</sub> の定量および画像分析によるアミロイド負荷量により得られた結果は、ある程度異なった。AN1528による処置は、定量的な画像分析により測定した時に皮質アミロイド負荷量のレベルに有意な影響を与えたが、ELISAにより測定した時の同じ領域の全 A<sub>1-42</sub> 濃度には影響がなかった。このような2つの結果の差異は、アッセイの特異性によるものだろう。画像分析は斑への不溶性の A<sub>1-42</sub> 凝集物のみを測定する。対照的に、ELISAは可溶性および不溶性の両方、単量体および凝集物のすべての A<sub>1-42</sub> の形態を測定する。疾患の病状は不溶性の斑が関連する A<sub>1-42</sub> の形態であると考えられているので、画像分析法が処置の効果を明らかにするためにより感度がある。しかしELISAはより迅速で容易なアッセイであり、スクリーニングの目的には大変有用である。さらにELISAは A<sub>1-42</sub> の処置が関連する減少を、全 A<sub>1-42</sub> よりも斑に関連してより大きく明らかにすること

40

50

ができる。

【0210】

処置動物の免疫感作により誘導されたA<sub>β</sub>-特異的抗体が、脳に沈着物したアミロイドと反応したかどうかを決定するために、処置動物および対照マウスに由来する切片のサブセットを、マウスIgGに特異的な抗体と反応させた。PBS群とは対照的に、A<sub>β</sub>ペプチド結合物A<sub>β</sub>1-5、A<sub>β</sub>1-12およびA<sub>β</sub>13-28；および完全長A<sub>β</sub>凝集物AN1792およびAN1582で免疫感作した動物については、A<sub>β</sub>-含有斑は内因性のIgGに覆われた。他のA<sub>β</sub>ペプチドまたはAPPペプチドpB×6で免疫感作した動物に由来する脳はこのアッセイで分析しなかった。

【0211】

3. 抗体力価の測定

マウスは2回目の免疫感作から始めて全部で5回、各免疫感作から4～7日後に採血した。抗体力価はA<sub>β</sub>1-42で被覆したプラスチック製のマルチ-ウェルプレートを使用を用いたサンドイッチELISAを使用してA<sub>β</sub>1-42結合抗体として測定した。図13に示すように、ピーク抗体力価は4種の免疫原製剤について4回目の投与後に誘導され、AN1792-特異的抗体の最大力価が誘導された：AN1792（ピークGMT:94,647）、AN1528（ピークGMT:88,231）、A<sub>β</sub>1-12結合物（ピークGMT:47,216）および齧歯類A<sub>β</sub>1-42（ピークGMT:10,766）。これらの群の力価は5および6回目の投与後にいくぶん減少した。残りの5種の免疫原については、ピーク力価に5または6回目の投与後に到達し、そしてこれらは4種の最高の力価群よりも大変低い規模であった：A<sub>β</sub>1-5結合物（ピークGMT:2,356）、pB×6（ピークGMT:1,986）、A<sub>β</sub>13-28結合物（ピークGMT:1,183）、A<sub>β</sub>33-42結合物（ピークGMT:658）、A<sub>β</sub>25-35結合物（ピークGMT:125）。ホモログスペプチドに対する抗体力価も同じELISAサンドイッチ形式を使用して、免疫原のサブセットについて測定し、このような群をA<sub>β</sub>1-5、A<sub>β</sub>13-28、A<sub>β</sub>25-35、A<sub>β</sub>33-42および齧歯類A<sub>β</sub>1-42で免疫感作した。ホモログスな免疫原に対する抗体力価が約2倍高い齧歯類A<sub>β</sub>1-42免疫原に関する力価を除き、これらの力価はA<sub>β</sub>1-42に対して測定した力価とおよそ同じであった。個々の動物のAN1792-特異的抗体力価の規模、または処置群の平均値は、皮質内のA<sub>β</sub>の減少として測定された効力とは相関しなかった。

【0212】

4. リンパ球増殖的応答

A<sub>β</sub>-依存的なリンパ球増殖を、最後の6回目の免疫感作から約1週間後に回収した脾臓細胞を使用して測定した。新しく回収した細胞（105/ウェル）を、5μMの刺激濃度のA<sub>β</sub>1-40の存在下で、5日間培養した。10群のうちの7群からのサブセットも、逆ペプチドA<sub>β</sub>40-1の存在下で培養した。陽性対照として、さらなる細胞をT細胞マイトジェン（PHA）と培養し、そして陰性対照として、細胞をペプチドを加えずに培養した。

【0213】

大部分の動物に由来するリンパ球は、PHAに応答して増殖した。A<sub>β</sub>40-1逆ペプチドに対する有意な応答はなかった。より大きな凝集したA<sub>β</sub>ペプチド、AN1792、齧歯類A<sub>β</sub>1-42およびAN1528で免疫感作した動物に由来する細胞は、A<sub>β</sub>1-40で刺激した時にしっかりと増殖し、最高のcpmはAN1792の受容体であった。A<sub>β</sub>1-12結合物、A<sub>β</sub>13-28結合物およびA<sub>β</sub>25-35で免疫感作した各群からの1動物は、A<sub>β</sub>1-40に応答して増殖した。A<sub>β</sub>1-5結合物、A<sub>β</sub>33-42結合物pB×6またはPBSを受けた残りの群は、A<sub>β</sub>が刺激した応答を有する動物はいなかった。これらの結果を以下の表5にまとめる。

【0214】

10

20

30

40

【表 9】

表5			
免疫原	結合物	A $\beta$ アミノ酸	応答数
A $\beta$ 1-5	Yes	5-mer	0/7
A $\beta$ 1-12	Yes	12-mer	1/8
A $\beta$ 13-28	Yes	16-mer	1/9
A $\beta$ 25-35		11-mer	1/9
A $\beta$ 33-42	Yes	10-mer	0/10
A $\beta$ 1-40		40-mer	5/8
A $\beta$ 1-42		42-mer	9/9
r A $\beta$ 1-42		42-mer	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-mer	0/8

10

## 【0215】

これらの結果は、AN1792およびAN1528が強力なT細胞応答、最も多くはCD4+表現型を刺激することを示す。A $\beta$  1-5で免疫感作した動物においてA $\beta$  特異的T細胞応答の不存在は、CD4+T細胞により認識されるペプチドのエピトープが通常は約15アミノ酸長であるが、より短いペプチドが低い効率で機能できるので、驚くことではない。すなわち4種の結合物ペプチドに対するヘルパーT細胞エピトープの大部分が、A $\beta$  領域ではなくIgG結合物パートナー中にあるらしい。この仮説は各処置群中の動物について、大変低い増殖応答の発生率に支持される。A $\beta$  1-5結合物は脳内でA $\beta$  レベルを有意に下げることにより有効であるので、A $\beta$  -特異的T細胞の明らかな不存在で、このペプチドによる免疫感作により誘導された鍵となるエフェクター免疫応答は、抗体となるだろう。

20

## 【0216】

すべてのA $\beta$  残基を含むAPPアミノ酸592-695を包含する融合ペプチドpBx6からのT-細胞の欠如および低い抗体応答は、この特別な調製物の悪い免疫原性によるものかもしれない。A $\beta$  25-35凝集物の悪い免疫原性は、ペプチドが小さすぎて抗体応答を誘導するために役立つ良いT細胞エピトープを含まないからであろう。このペプチドがキャリアタンパク質と結合すれば、おそらくより免疫原性となるだろう。

30

## 【0217】

## V. 受動防御用のポリクローナル抗体の調製

125匹の非-トランスジェニックマウスを100 $\mu$ gのA $\beta$  1-42にCFA/IFAアジュバントを加えて免疫感作し、そして4~5カ月で安楽死させた。血液を免疫感作したマウスから集めた。IgGは他の血液成分から分離した。免疫原に特異的な抗体は、アフィニティークロマトグラフィーにより部分精製した。マウスあたり約0.5~1mgの免疫原に特異的な抗体が得られ、全部で60~120mgとなった。

40

## 【0218】

VI. A $\beta$  に対する抗体により受動免疫感作

7~9月齢のPDAPPマウス群の各々を、以下に示すようにPBS中に0.5mgのポリクローナル抗-A $\beta$  または特異的抗-A $\beta$  モノクローナルを用いて注射した。すべての抗体調製物は低いエンドトキシンレベルを有するように精製した。モノクローナルはマウスにA $\beta$  のフラグメントまたはA $\beta$  のより長い形態を注射することによりフラグメントに対して調製することができ、ハイブリドーマを調製し、そしてA $\beta$  の他の非重複フラグメントに結合することなくA $\beta$  の所望のフラグメントに特異的に結合する抗体のハイブリドーマをスクリーニングした。

50

【 0 2 1 9 】

【 表 1 0 】

表6

抗体	ヒト-7°
2H3	Aβ 1-12
10D5	Aβ 1-12
266	Aβ 13-28
21F12	Aβ 33-42
マウスポリクローナル 抗-ヒト	抗-凝集化

10

【 0 2 2 0 】

マウスは、A 42または他の免疫原に対してELISAにより定めた1/1000より大きいELISA 20  
力価により測定された循環抗体濃度を維持するために、4カ月の期間中、必要に応じてip  
注射された。力価は上記のようにモニタリングし、そしてマウスは注射の6カ月の終わりに  
安楽死させた。組織化学、A レベルおよび毒性学は、死後に行った。1群あたり10匹  
のマウスを使用した。受動免疫感作に関するさらなる実験は、以下の実施例XIおよびXII  
に記載する。

【 0 2 2 1 】

## VII. 様々なアジュバントの比較

この実施例は、CFA、alumおよび水中油型エマルジョンおよびMPLの免疫応答を刺激する 30  
能力について比較する。

【 0 2 2 2 】

## A. 材料および方法

## 1. 実験計画

エルム ヒル(Elm Hill)から得た100匹の6週齢のメスHartley種モルモットを、種々の  
アジュバントと組み合わせたAN1792またはそれらのパルミトイル化誘導体で免疫感作する  
ために10群に分けた。7群がa) PBS、b) フロイントアジュバント、c) MPL、d) スク  
アレン、e) MPL/スクアレン、f) 低用量のalumまたはg) 高用量のalum (300 μg AN179  
2)と組み合わせたAN1792 (特定しない限り33 μg) の注射を受けた。2群はAN1792のパル  
ミトイル化誘導体 (33 μg) の注射をa) PBSまたはb) スクアレンと組み合わせて受けた  
。最後に10番目の群は、抗原およびさらなるアジュバント無しでPBSのみを受けた。フロ  
イントアジュバントを受ける群は、最初の投与量をCFAで乳化し、そして4投与量はIFAで 40  
乳化した。抗原は高投与量のalum群を除きすべての群で33 μgの用量で投与され、高用量  
のalum群は300 μgのAN1792を受けた。注射はCFA/IFAには腹腔内に、そしてすべての他の  
群については右および左側の後脚四頭筋に交互に筋肉内投与した。最初の3回の投与は隔  
週のスケジュールで、続いて毎月の間隔で与えた。抗体力価を測定するために血液は2回  
目の投与後から開始して各免疫感作から6~7日後に採血した。

【 0 2 2 3 】

## 2. 免疫原の調製

2 mgのA 42(カリフォルニアペプチド ロットME0339) を、0.9mlの脱イオン水に加え  
、そして混合物をボルテックス混合して比較的な懸濁液を作成した。100 μlの10×PBSの  
アリコート (1×PBS、0.15M NaCl、0.01M リン酸ナトリウム、pH7.5) を加えた。この懸濁 50

液を再度ボルテックス混合し、そして翌日使用するために37℃で一晩、インキュベーションした。未使用のA 1-42は-20℃で凍結乾燥した粉末として乾燥剤と一緒に保存した。

#### 【0224】

パルミトイル化したAN1792の誘導体は、ジメチルホルムアミドに溶解した無水パルミチン酸をAN1792のアミノ末端残基にカップリングにさせた後、樹脂から、付いているペプチドをフッ化水素酸を用いた処理により取り出した。

#### 【0225】

完全フロイントアジュバント(CFA)を用いて配合用量を調製するために(群2)初回免疫感作には33µgのAN1792(200µlのPBS中)を、1:1(容量:容量)のCFAで400µlの最終容量に乳化した。続く免疫感作には、抗原を不完全フロイントアジュバント(IFA)を用いて同様に乳化した。

#### 【0226】

群5および8については、MPLを用いて配合用量を調製するために、凍結乾燥粉末(リビウムノケミリサーチ社、ハミルトン、マサチューセッツ州)を0.2%の水性トリエチルアミンに加え、1mg/mlの最終濃度とし、そしてボルテックス混合した。混合物を65~70℃に30秒間加熱して、わずかに不透明で均一なミセルの懸濁液を作成した。溶液は各組の注射に新しく調製した。群5の各注射には、33µgのAN1792(16.5µlのPBS中)、50µgのMPL(50µl)および162µlのPBSを、使用直前にホウ珪酸試験管中で混合した。

#### 【0227】

低い水中油型のエマルションを用いて配合用量を調製するために、PBS中のAN1792を5%スクアレン、0.5% Tween80、PBS中の0.5% Span85に加えて、250µl中に33µgの濃度のAN1792の最終単回投与量に達した。混合物は、エマルションの液滴が顕微鏡下で見た時に1.0µm直径の標準ラテックスビーズのおよそ等しい直径になるまで、2つのチャンバーを持つ手で持つデバイス(two-chambered hand-held device)に15~20回通すことにより乳化した。生成した懸濁液は不透明な乳白色であった。エマルションは各々の一連の注射のために新たに調製した。群8に関しては、0.2%トリエチルアミン中のMPLを投与量あたり50µgの濃度でスクアレンおよび上記のような乳化のための界面活性剤混合物に加えた。パルミトイル化誘導体(群7)については、33µgのパルミトイル-NH-A 1-42をスクアレンに加え、そしてボルテックス混合した。Tween80およびSpan85を次いでボルテックス混合しながら加えた。混合物をPBSに加えて5%スクアレン、0.5% Tween80、0.5% Span85の最終濃度に到達し、そして混合物を上記のように乳化した。

#### 【0228】

alumを用いて配合用量を調製するために(群9および10)、PBS中のAN1792をAlhydrogel(水酸化アルミニウムゲル、アキュレート(Accurate)、ウエストベリー、ニューヨーク州)に加えて、250µlの最終投与量中に5mgのalumあたり、33µg(低投与量、群9)または300µg(高投与量、群10)の濃度に到達した。懸濁液をRTで4時間、穏やかに混合した。

#### 【0229】

##### 3. 抗体力価の測定

モルモットは、2回目の免疫感作から始めて免疫感作から6~7日後に全部で4回採血した。A 42に対する抗体力価は、一般材料および方法に記載したようにELISAにより測定した。

#### 【0230】

##### 4. 組織プレパレーション

約14週後、すべてのモルモットはCO<sub>2</sub>を投与することにより安楽死させた。脳脊髄液を集め、そして脳を摘出し、そして3つの脳領域(海馬、皮質および小脳)を切開し、そしてELISAを使用して全A タンパク質濃度を測定するために使用した。

#### 【0231】

##### B. 結果

10

20

30

40

50

## 1. 抗体応答

免疫感作後にAN1792に対する抗体応答として測定した時、種々のアジュバントに広い範囲の効力があつた。図14に示すように、AN1792をPBS中で投与した時、2または3回の免疫感作後に抗体は検出されず、そして無視できる応答が4および5回目の投与後にたった約45の幾何平均力価(GMT)で検出された。o/wエマルションは3回の投与後に適度の力価を誘導し(GMT255)、これは4回目の投与後も維持され(GMT 301)、そして最終投与で落ちた(GMT 54)。alumに結合したAN1792に関して明らかな抗原投与量応答があり、すべての時点で300 $\mu$ gが33 $\mu$ gよりも免疫原性であつた。抗体応答のピークで、4回目の免疫感作後に、2つの投与量の差異はGMTで約1940(33 $\mu$ g)および3400(300 $\mu$ g)であつた。MPLを加えた33 $\mu$ gのAN1792に対する抗体応答は、alumに結合したほぼ10倍高い用量の抗原(300 $\mu$ g)用量で生成された応答に大変類似した。MPLをo/wエマルションに加えると、配合物の効力はMPLを単なるアジュバントとした場合に比べて最大75%まで減少した。AN1792のアルミトイル化誘導体は、PBS中で投与した時に完全に非免疫原性であり、そしてo/wエマルション中に存在する時に、3回目そして4回目の採血について340および105のGMTの適度な力価を与えた。最高の抗体力価は、フロイントアジュバントで生成され、約87,000のピークGMTであり、次に最も効力のある配合物MPLおよび高用量AN1792/alumのGMTよりもほぼ30倍大きい値であつた。

10

### 【0232】

この実験で最も有望なアジュバントは、MPLおよびalumである。これら2つの中で、MPLはalumで得られるものと同じ抗体力価を生成するために必要な抗原用量が、10倍低いので好ましい。応答は抗原かつ/またはアジュバントの用量を増すことにより、ならびに免疫感作スケジュールを最適化することにより上昇させることができる。o/wエマルションはAN1792には大変弱いアジュバントであり、そしてMPLアジュバントにo/wエマルションを加えることにより、MPL単独の固有のアジュバント活性が減少した。

20

### 【0233】

## 2. 脳内のA レベル

約14週で、モルモットに深く麻酔をかけ、脳脊髄液(CFS)を引き抜き、そしてフロイントアジュバント(群2)、MPL(群5)、高投与量、300 $\mu$ gのAN1792を含むalum(群10)、およびPBSを免疫感作した対照群(群3)の動物のサブセットから脳を摘出した。Aペプチドのレベルを測定するために、1つの海馬を切開し、そして海馬、皮質および小脳領域のホモジネートを5Mグアニジンで調製した。これらを希釈し、そしてELISA形式で一連の既知濃度のA標準タンパク質の希釈物と比較することにより定量した。海馬、皮質および小脳中のAタンパク質のレベルは、これらの配合物により誘導されるAに対する広い範囲の抗体応答にもかかわらず、すべての4群で大変類似した。約25ng/g組織の平均Aレベルは海馬で、皮質で21ng/g、そして小脳で12ng/gが測定された。すなわちAに対する循環抗体力価の存在は、ほぼ3カ月間、これらの動物の幾匹かで脳内の全Aレベルを変化させなかつた。CFS中のAレベルも群間でほぼ同様であつた。内因性Aに及ぼすAN1792免疫感作の大きな効果の欠如は、免疫応答がAの病理学的状態の形成に集中していることを示す。

30

### 【0234】

## VIII. マウスにおける種々のアジュバントに対する免疫応答

6週齢のメスのスイスウェブスターマウスを1群あたり10~13匹でこの実験に使用した。免疫感作は200 $\mu$ lの投与量で0、14、28、60、90および20日に皮下に与えた。PBSはバッファーとしてすべての配合に使用した。動物はELISAによる抗体力価の分析のために、2回目の投与後から開始して各免疫感作から7日後に採血した。各群の処置計画を表7にまとめる。

40

### 【0235】

【表 1 1】

表7

実験計画					
群	N <sup>a</sup>	アジュバント <sup>b</sup>	投与量	抗原	投与量 ( $\mu$ g)
1	10	MPL	12.5 $\mu$ g	AN1792	33
2	10	MPL	25 $\mu$ g	AN1792	33
3	10	MPL	50 $\mu$ g	AN1792	33
4	13	MPL	125 $\mu$ g	AN1792	33
5	13	MPL	50 $\mu$ g	AN1792	150
6	13	MPL	50 $\mu$ g	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		None	
9	10	スクアレン乳化	5%	AN1792	33
10	10	スクアレン乳化	5%	AN1792	33
11	10	Alum	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL + Alum	50 $\mu$ g/2 mg	AN1792	33
13	10	QS-21	5 $\mu$ g	AN1792	33
14	10	QS-21	10 $\mu$ g	AN1792	33
15	10	QS-21	25 AN1792	AN1792	33
16	13	QS-21	25 AN1792	AN1792	150
17	13	QS-21	25 AN1792	AN1528	33
18	13	QS-21 + MPL	25 $\mu$ g/50 $\mu$ g	AN1792	33
19	13	QS-21 + Alum	25 $\mu$ g/2 mg	AN1792	33

脚注:

<sup>a</sup> 実験の開始時点の各群中のマウス数<sup>b</sup> アジュバントを記入する。すべての配合についてバッファーはPBSであった。群8については、アジュバントおよび抗原を含まなかった。

【 0 2 3 6 】

各群の A 42に対する抗体のELISA力価を、以下の表 8 に示す。

【 0 2 3 7 】

【表 1 2】

表8

幾何平均抗体力価					
採血の週					
処置群	2.9	5.0	8.7	12.9	16.7
1	248	1797	2577	6180	4177
2	598	3114	3984	5287	6878
3	1372	5000	7159	12333	12781
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504
7	37	395	484	972	2149
8	25	25	25	25	25
9	25	183	744	952	1823
10	25	89	311	513	817
11	29	708	2618	2165	3666
12	198	1458	1079	612	797
13	38	433	566	1080	626
14	104	541	3247	1609	838
15	212	2630	2472	1224	1496
16	183	2616	6680	2085	1631
17	28	201	375	222	1540
18	31699	15544	23095	6412	9059
19	63	243	554	299	441

この表は、最高の力価が群4、5および18で得られ、ここでアジュバントは125 $\mu$ gのMPL、50 $\mu$ gのMPLおよびMPLを加えたQS-21であった。

10

20

30

## 【0238】

## IX. 種々のアジュバントの治療的効力

治療的効力の実験は、A に対する免疫応答を強化し、そして脳内のアミロイド沈着物の免疫性除去を誘導するアジュバントの能力を決定するために、ヒトの使用において適するアジュバントの組を用いて、PDAPPトランスジェニックマウスで行った。

## 【0239】

180匹のオスおよびメスの7.5~8.5月齢のヘテロ接合性PDAPPトランスジェニックマウスを、チャールズリバーラボラトリーから得た。マウスは種々のアジュバントと組み合わせたAN1792またはAN1528で免疫感作する群あたり15~23匹の動物を含む9群に分けた。動物は群内でできるだけ性別、月齢および動物の血統を合わせるように分配した。アジュバントにはalum, MPLおよびQS-21を含み、各々を両抗原と合わせ、そしてAN1792のみと合わせたフロイントアジュバント(FA)を含んだ。さらなる群は保存剤チメロサルを加え、アジュバントを含まないPBSバッファー中に配合したAN1792で免疫感作した。9群目は陰性対照としてPBS単独で免疫感作した。

40

## 【0240】

凝集したA ペプチドの調製：ヒトA 1-40(AN1528; カリフォルニア ペプチド社、ナバ、カリフォルニア州; ロット ME0541) およびヒトA 1-42(AN1792; カリフォルニアペプチド社; ロット ME0439) ペプチドは、-20 で乾燥して保存しておいた凍結乾燥粉末から、各組の注射物の調製に新たに可溶化した。この目的のために、2mgのペプチドを0.9mlの脱イオン水に加え、そして混合物をボルテックス混合して、比較的均一な溶液ま

50

たは懸濁液を作成した。AN1792とは対照的に、AN1528はこの段階で可溶性のペプチドであった。100 $\mu$ lの10 $\times$ PBSのアリコート(1 $\times$ PBS:0.15MNaCl、0.01Mリン酸ナトリウム、pH7.5)を次いで加え、この時点でAN1528が沈殿し始めた。懸濁液を再度ボルテックス混合し、そして翌日使用するために37 $^{\circ}$ Cで一晩、インキューベーションした。

#### 【0241】

alumを用いて配合用量を調製するために(群1および5)、PBS中のA ペプチドをAlhydrogel(2%の水性水酸化アルミニウムゲル、サルジェント社(SargentInc.)、クリフトン、ニュージャージー州)に加えて、1mgのalumあたり100 $\mu$ gのA ペプチド濃度に到達した。10 $\times$ PBSを加えて、1 $\times$ PBS中に200 $\mu$ lの最終投与量とした。次いで懸濁液は注射前にRTで約4時間、穏やかに混合した。

10

#### 【0242】

MPLを用いて配合用量を調製するために(群2および6)、凍結乾燥粉末(リビウムノケミリサーチ社、ハミルトン、マサチューセッツ州:ロット67039-E0896B)を0.2%の水性トリエチルアミンに加え、1mg/mlの最終濃度とし、そしてボルテックス混合した。混合物を65~70 $^{\circ}$ Cに30秒間加熱して、わずかに不透明で均一なミセルの懸濁液を作成した。溶液は4 $^{\circ}$ Cに保存した。各組の注射には、投与(50 $\mu$ lのPBS中)あたり100 $\mu$ gのペプチド、投与量(50 $\mu$ l)あたり50 $\mu$ gのMPLおよび投与量あたり100 $\mu$ lのPBSを、使用直前にハウ珪酸試験管中で混合した。

#### 【0243】

QS-21を用いて配合用量を調製するために(群3および7)、凍結乾燥粉末(アクイラ: Aquila、フラミンガム、マサチューセッツ州:ロットA7018R)をPBS、pH6.6~6.7に加えて、1mg/mlの最終濃度とし、そしてボルテックス混合した。溶液を-20 $^{\circ}$ Cで保存した。各組の注射には、用量あたり100 $\mu$ gのペプチド(50 $\mu$ lのPBS中)、用量あたり25 $\mu$ gのQS-21(25 $\mu$ lのPBS中)および用量あたり125 $\mu$ lのPBSを、使用直前にハウ珪酸試験管中で混合した。

20

#### 【0244】

フロイントアジュバントを用いて配合用量を調製するために(群4)、初回免疫感作には100 $\mu$ gのAN1792(200 $\mu$ lのPBS中)を、1:1(容量:容量)で完全フロイントアジュバント(CFA)と400 $\mu$ lの最終容量に乳化した。続く免疫感作には、抗原を不完全フロイントアジュバント(IFA)を用いて同様に乳化した。アジュバントalum、MPLまたはQS-21を含む配合には、投与量あたり100 $\mu$ gのAN1792またはAN1528を200 $\mu$ lPBSの最終投与量でalum(投与量あたり1mg)またはMPL(投与量あたり50 $\mu$ g)と合わせ、そして肩甲骨の間に皮下接種により送達した。FAを受ける群については、100 $\mu$ gのAN1792をを、1:1(容量:容量)の完全フロイントアジュバント(CFA)で400 $\mu$ lの最終容量に乳化し、そして初回の免疫感作には腹腔内に送達し、続いて5回の投与には不完全フロイントアジュバント(IFA)中の同量の免疫原を追加免疫感作した。アジュバントを含まないAN1792を受ける群には、10 $\mu$ gのAN1792を最終容量50 $\mu$ lのPBS中で5 $\mu$ gのチメロサルと合わせ、そして皮下で送達した。9番目の対照群は皮下送達された200 $\mu$ lのPBSのみ受けた。免疫感作は最初の3回については隔週のスケジュールで与え、次いでその後は毎月のスケジュールで、0、16、28、56、85および112日に与えた。動物は抗体力価を測定するために、2回目の投与後に初めて各免疫感作から6~7日後に採血した。動物は最終投与から約1週間後に安楽死させた。結果は脳内のA およびAPレベルのELISAアッセイにより、そして脳切片内のアミロイド斑の存在の免疫組織化学的評価により測定した。さらにA -特異的抗体力価、およびA 依存的増殖およびサイトカイン応答を決定した。

30

40

#### 【0245】

表9は、A 1-42に対する最高の抗体がFAおよびAN1792により誘導されることを示し、その力価は4回目の免疫感作後にピークとなり(ピークGMT:75,386)、そして最後の6回目の免疫感作までには59%まで減少した。AN1792を含むMPLにより誘導されたピーク平均力価は、FA(ピークGMT:28,867)での生成よりも62%低く、そしてまた3回目の投与後の免疫感作スケジュールの初期に到達し、続いて6回目の免疫感作後にはピークの28%

50

まで減少した。AN1792と合わせたQS-21で生成したピーク平均力価(GMT: 1,511)は、MPLにより得られた価よりも約5倍低かった。さらに応答の動力学は、ピーク応答に達するまでにさらなる免疫感作が必要とされたので、ゆっくりとしていた。alum-結合AN1792により生成された力価は、QS-21で得た価よりもわずかに大きく、そして応答の動力学はより急速であった。チメロサルを含むPBS中で送達されたAN1792については、力価の頻度およびサイズがPBS単独よりもかろうじて大きかった。MPLおよびAN1528で生成したピーク力価(ピークGMT3099)は、AN1792を用いた価よりも約9倍低かった。alum-結合AN1792は大変悪い免疫原であり、低い力価が数匹の動物に生じただけであった。PBS単独で免疫感作した対照動物に観察された抗体応答は無かった。

【 0 2 4 6 】

【表 1 3】

表9

幾何平均抗体力価 <sup>a</sup>					
採血の週					
処置	3.3	5.0	9.0	13.0	17.0
Alum/	102	1,081	2,366	1,083	572
AN1792	(12/21) <sup>b</sup>	(17/20)	(21/21)	(19/21)	(18/21)
MPL/	6241	28,867	1,1242	5,665	8,204
AN1792	(21/21)	(21/21)	(21/21)	(20/20)	(20/20)
QS-21/	30	227	327	1,511	1,188
AN1792	(1/20)	(10/19)	(10/19)	(17/18)	(14/18)
CFA/	10,076	61,279	75,386	41,628	30,574
AN1792	(15/15)	(15/15)	(15/15)	(15/15)	(15/15)
Alum/	25	33	39	37	31
AN1528	(0/21)	(1/21)	(3/20)	(1/20)	(2/20)
MPL/	184	2,591	1,653	1,156	3,099
AN1528	(15/21)	(20/21)	(21/21)	(20/20)	(20/20)
QS-21/	29	221	51	820	2,994
AN1528	(1/22)	(13/22)	(4/22)	(20/22)	(21/22)
PBSにチメロサルを 加えた	25	33	39	37	47
	(0/16)	(2/16)	(4/16)	(3/16)	(4/16)
PBS	25	25	25	25	25
	(0/16)	(0/16)	(0/15)	(0/12)	(0/16)

脚注:

<sup>a</sup> Aβ 1-42に対して測定された幾何平均抗体力価<sup>b</sup> 群あたりの反応体数

## 【 0 2 4 7】

ELISAにより決定される12月齢のマウスにおける皮質アミロイド負荷量に及ぼす種々のアジュバントを用いたAN1792またはAN1528処置、あるいはチメロサールの結果を図15に示す。PBS対照PDAPPマウスでは、12カ月での皮質中の全A $\beta$ の中央値レベルは1,817ng/gであった。顕著なA $\beta$ の減少レベルは、CFA/IFAを加えたAN1792、alumを加えたAN1792、MPLを加えたAN1792およびAN1792を加えたQS-21で処置したマウスで観察された。統計的に有意(p < 0.05)に達したのは、CFA/IFAを加えたAN1792であった。しかし実施例IおよびIIIに示すように、免疫感作がA $\beta$ レベルの減少に及ぼす効果は、15カ月および18カ月の

10

20

30

40

50

マウスで実質的に大きくなった。すなわち少なくともalumを加えたAN1792、MPLを加えたAN1792およびQS-21を加えたAN1792の組成物は、より老年のマウスの処置で統計的な有意に到達するだろう。対照的に、保存剤チメロサルを加えたAN1792は、PBS処置マウスとおよそ同じA<sub>42</sub>の中央値レベルを示した。同様な結果がA<sub>42</sub>の皮質レベルを比較した時に得られた。PBS対照におけるA<sub>42</sub>の中央値レベルは、1624ng/gであった。403、1149、620および714の中央値レベルが、それぞれCFA/IFAを加えたAN1792、alumを加えたAN1792、MPLを加えたAN1792およびQS-21を加えたAN1792で観察され、減少はCFA/IFAを加えたAN1792処置群について統計的に有意であった (p = 0.05)。AN1792チメロサル処置マウスにおける中央値レベルは、1619ng/g A<sub>42</sub>であった。

【0248】

さらなる治療的アジュバント/免疫原効力実験を9~10.5月齢のオスおよびメスのヘテロ接合性PDAPPトランスジェニックマウで行った。実験の期間は処置群あたり29~40匹の動物を用いて25週間であった；したがって動物は終了時に15~16.5月齢であった。処置群を以下の表10に確認する。

【0249】

【表14】

	アジュバント	免疫原	希釈バッファー	投与
群1:	MPL-SE	AN1792-GCS (75 µg)	PBS	SC (250 µl)
群2:	ISA 51	AN1792-GCS (75 µg)	PBS	IP (400 µl)
群3:	QS21	AN1792-GCS (75 µg)	PBS	SC (250 µl)
群4:	QS21 略	AN1792-GCS (75 µg)	PBS	SC (250 µl)
群5:	PBS	-----	-----	SC (250 µl)

【0250】

表10略号：MAP - 多-抗原性ペプチド；TT - 破傷風毒素 t-細胞エピトープ (830-844)；QS - 皮下；IP - 腹腔内；PBS - リン酸緩衝化生理食塩水；ISA-51は市販されているIFAに類似するアジュバント；GCSはグリシン/クエン酸塩/シュクロース配合物、MPL-SEは安定化された水および油エマルジョンである。

【0251】

免疫感作のスケジュールは、略記したスケジュール群QS21/AN1792である群3を除き、すべての処置群で同一であった。マウスに0、2、4、8、12、16、20、24週に注射し、3、5、9、13、17、21および25週に採血した。群1、2は8回の注射を受け、そして群3は実験の25週間の実験中に4回の注射を受けた。スケジュール群を略記したQS21/AN1792の群4は、0、2、4および8週のみ注射を受けた。この群は、残りの実験で注射を受けなかったが、力価の減少を追跡するために実験の残りでは同じ採血スケジュールで採血した。それぞれQS-21/AN1792およびPBSである群3および5は、この実験の陽性および陰性対照として役立てた。

【0252】

力価は抗-A<sub>42</sub>抗体力価アッセイにより決定した。

【0253】

群1、MPL-SE/AN1792群は、9週で17,100のピーク幾何平均力価 (GMT) に上昇し、25週で10,000のGMTに落ちた。最初にMPL-SE力価はQS-21/AN1792対照群 (群4) よりも幾分高い速度で上昇した。

【0254】

群2、ISA 51/AN1792群は、実験を通じて高い力価を生成し、実験の最後の9週で100,000を越えるGMTに達した。

10

20

30

40

50

## 【0255】

群3、QS-21/AN1792対照群は、17週にそのピーク力価16,000のGMTに達した。次いで力価は次の8週にわたり落ちて、8,700のGMTで終了した。この群では1動物が実験の全期間にわたり力価を上げることができなかった。

## 【0256】

群4、略記した注射スケジュール群であるQS-21/AN1792は、最終注射から5週間後の13週で7,300のピーク力価に到達した。次いで力価は最終採血で(25週)2,100のGMTに落ちた。対照群におけるように、1匹の動物が検出できる力価に上げることができず、一方別の動物は減少期間の終わりまでにすべての力価を失った。

## 【0257】

群5、PBS単独群は力価が無かった。

## 【0258】

皮質A $\beta$ レベルを評価するために、全A $\beta$ およびA $\beta_{1-42}$ をELISAにより測定した。簡単に説明すると、1つの脳半球を皮質、海馬および小脳組織に切開し、続いて5Mグアニジンバッファーで均質化し、そして脳のア $\beta$ についてアッセイした。皮質の全A $\beta$ およびA $\beta_{42}$ は同じ結果をもたらした。Mann-Whitney統計分析を行って、群間の有意を決定し、0.05の値がA $\beta$ における有意な変化を示す。

## 【0259】

すべての処置群がPBS対照群と比較して、全A $\beta$ レベルを有意に下げた(表11を参照にされたい)。MPL-SE/AN1792群はA $\beta$ において最大の変化を示し、これは他の処置群よりも有意に良好であった。略記したQS-21/AN1792群は、そのA $\beta$ の全体的変化においてすべての8回の注射を受けたQS-21対照群と同様であった。ISA51/AN1792群のA $\beta$ レベルは、CFA/IFA:MAP(A $\beta_{1-7}$ )群と比較して同様に下がった。

## 【0260】

## 【表15】

表11 皮質A $\beta$ レベル

	PBS	MPL-SE	ISA	QS-21	QS-21 (4)
中央値 (ng/g 組織)	7,335	1,236	3,026	2,389	2,996
範囲 (ng/g 組織)	550-18,358	70-3,977	23-9,777	210-11,167	24-16,834
p値	—	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
N	38	29	36	34	40

## 【0261】

結論すると、AN1792と組み合わせたMPL-SE、ISA51およびQS21アジュバントは、皮質内のA $\beta$ 沈着物を防止するために十分な免疫応答を有意に誘導するために有効である。

## 【0262】

## X. 毒性分析

実施例2、3および7に記載の実験の終わりに、組織病理学的調査のために組織を集めた。さらに血液学および臨床化学を、実施例3および7からの最終血液サンプルについて行った。脳、肺、リンパ、胃腸管、肝臓、腎臓、甲状腺および生殖巣を含む主な器官のほとんどを評価した。散発性の損傷が実験動物に見られたが、AN1792処置と未処置動物間で影響を受けた組織または損傷の重篤度のいずれにも明らかな差異はなかった。PBS-処置または未処置動物と比較して、AN-1528-免疫感作動物に記録された独特な組織病理学的損傷はなかった。また実施例7でアジュバント群とPBS処置群との間に臨床的な化学的プロフィールにおいて差異は無かった。実施例7ではPBS処置動物に比べてAN1792とフロイン

10

20

30

40

50

トアジュバントで処置した動物間で、幾つかの血液学的パラメーターに有意な上昇があったが、これらの効果の型は、フロイントアジュバントの処置から予想され、そして腹膜炎を伴い、そしてAN1792処置からの悪い効果は示していない。毒性学的評価の一部ではないが、PDAPPマウスの脳の病状を効力の終点の一部として徹底的に評価した。脳の形態学に及ぼす処置に関連した悪影響の兆候はいずれの実験にも無かった。これらの結果は、AN1792の処置が十分に耐容され、そして少なくとも実質的に副作用が無いことを示している。

【0263】

#### XI. 抗-A 抗体を用いた治療的処置

この実施例は、ヘテロ接合性トランスジェニックマウスの脳内で、A の沈積を抑制するためのA に対する種々のモノクローナルおよびポリクローナル抗体の能力を試験する。

10

【0264】

##### 1. 実験計画

8.5~10.5月齢の6匹のオスおよびメスのヘテロ接合性PDAPPトランスジェニックマウスは、チャールズリバーラボラトリーから得た。マウスはA に対する種々の抗体で処置する6群に分けた。動物はできる限り群内の動物の性別、月齢、血統および供給源を合わせるように分配した。図10に示すように、抗体には4種のマウスA -特異的モノクローナル抗体、2H3(A 残基1-12に向けられた)、10D5(A 残基1-16に向けられた)、266(A 残基13-28に向けられ、そして単量体には結合するが、凝集したAN1792には結合しない)、21F12(A 残基33-42に向けられた)を含んだ。5番目の群は、A -特異的ポリクローナル抗体画分(凝集したAN1792による免疫感作により生じた)で処置した。陰性

20

対照群は抗体を含まない希釈物PBSを受けた。

【0265】

モノクローナル抗体を、約10mg/kgの容量で注射した(マウスは50gと想定された)。注射は平均7日毎に1000より高い抗-A 力価を維持するために投与した。mAb266はこのアッセイで捕捉抗原として使用した凝集したAN1792にはよく結合しないので低い力価が観察されたが、同じ投与スケジュールをこの群でも維持した。モノクローナル抗体2H3を受けた群は、抗体がインピボで急速に除去されすぎたので、最初の3週間内で中止した。動物は各抗体力価を測定するために、各投与前に採血された。処置は6カ月間、全部で196日にわたり続行した。動物は最終投与から1週間後に安楽死させた。

【0266】

30

【表 16】

表12

実験計画				
処置群	N <sup>a</sup>	処置抗体	抗体特異性	抗体アイソタイプ <sup>c</sup>
1	9	なし (PBSのみ)	NA <sup>b</sup>	NA
2	10	ポリクローナル	Aβ1-42	混合
3	0	mAb <sup>c</sup> 2H3	Aβ1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	Aβ1-16	IgG1
5	6	mAb 266	Aβ13-28	IgG1
6	8	mAb 21F12	Aβ33-42	IgG2a

## 脚注

<sup>a</sup> 実験の終了時点での群内マウスの数。すべて群は1群あたり10匹の動物から出発した。

<sup>b</sup> NA:認められず

<sup>c</sup> mAb:モノクローナル抗体

## 【0267】

## 2. 材料および方法

## a. 抗体の調製

抗-A ポリクローナル抗体は、2群の動物から集めた血液から調製した。第1群は、6～8週齢の100匹のメスのスイスウェブスターマウスから成った。それらは、0、15および29日にCFA/IFAと合わせた100μgのAN1792で免疫感作した。4回目の注射は、1/2の用量のAN1792を36日に与えた。動物は42日の屠殺時に全採血し、血清を調製し、そして血清をプールして全部で64mlとした。第2群はPDAPPマウスと同系であるが、ヒトAPP遺伝子に関しては非トランスジェニックな24匹の6～9週齢のメスから成った。それらは0、14、28および56日にCFA/IFAと合わせた100μgのAN1792で免疫感作した。これらの動物も63日の屠殺時に全採血し、血清を調製し、そして全14ml血清をプールした。血清の2ロットをプールした。抗体画分は連続して2回の50%飽和硫酸アンモニウム沈殿を使用して精製した。最後の沈殿物をPBSに透析し、そしてエンドトキシンについて試験した。エンドトキシンのレベルは1EU/mgで未満であった。

## 【0268】

抗-A モノクローナル抗体は腹水から調製した。流体は最初に濃硫酸デキストランナトリウムを氷冷腹水に氷上で攪拌しながら加えて脱脂して0.238%の最終濃度とした。濃CaCl<sub>2</sub>を次いで攪拌しながら加えて64mMの最終濃度とした。この溶液を10,×000gで遠心し、そしてペレットを捨てた。上清は等容量の飽和硫酸アンモニウムを滴下しながら氷上で攪拌した。溶液を再度10,×000gで遠心し、そして上清を捨てた。ペレットを再懸濁し、そして20mM Tris-HCl、0.4M NaCl、pH7.5に対して透析した。この画分をファルマシア (Pharmacia) FPLC Sepharose Qカラムに添加し、そして0.4Mから0.275M NaCl (20mM Tris-HCl、pH7.5中) の逆勾配から溶出した。

## 【0269】

抗体ピークは280nmの吸収により同定し、そして適切な画分をプールした。精製した抗

体調製物はBCA法を使用してタンパク質濃度を、そしてSDS-PAGEを使用して純度を測定した。このプールもエンドトキシンについて試験した。エンドトキシンのレベルは1 EU/mgで未満であった。力価は、100未満の力価を25の力価として任意に割り当てた。

【0270】

### 3. 脳内のA およびAPPレベル

種々の抗-A 抗体調製物を用いた処置からおよそ6カ月後、塩類の灌流後に動物から脳を摘出した。1つの半球は免疫組織化学的分析のために調製し、そして2つ目はA およびAPPレベルの定量に使用した。アミロイドペプチドおよびアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の種々の形態の濃度を測定するために、半球を切開し、そして海馬、皮質および小脳領域のホモジネートを5 Mグアニジンで調製した。これらは連続的に希釈して、ELISA形式で一連の既知濃度のA ペプチドまたはAPPの希釈物と比較することにより、アミロイドペプチドまたはAPPのレベルを定量した。

【0271】

ELISAにより測定した皮質および海馬のホモジネート中の全A およびA<sub>1-42</sub>のレベル、ならびに小脳中の全A のレベルを、それぞれ表11、12および13に示す。PBSを接種した対照群の全A レベルの中央濃度は、皮質よりも海馬で3.6倍高かった(皮質の17,818ng/gと比較して、海馬組織は63,389ng/gの中央値)。対照群の小脳中の中央値レベル(30.6ng/g組織)は、海馬中よりも2,000倍高かった。これらのレベルはこの月齢のヘテロ接合性PDAPPトランスジェニックマウスで我々が以前に報告した値と同様である(Johnson-Wood et al., 1997)。

【0272】

皮質については、1匹の処置群が対照群とは有意に異なる( $p < 0.05$ ) A<sub>1-42</sub>として測定されたA レベル中央値を有し、これらの動物は表13に示すポリクローナル抗-A 抗体を受容した。A<sub>1-42</sub>の中央値レベルは、この処置群に関する対照と比べて65%まで減少した。A<sub>1-42</sub>の中央値レベルは、1つのさらなる処置群において対照と比べて55%まで減少し、これらの動物はmAb10D5を投与された( $p = 0.0433$ )。

【0273】

10

20

【表 17】

表13  
皮質

処置群	N <sup>a</sup>	中央値						平均	
		全Aβ			Aβ42			全Aβ	Aβ42
		LISA値 <sup>b</sup>	P値 <sup>c</sup>	%変化	ELISA値	P値	%変化	ELISA値	ELISA値
PBS	9	17818	NA <sup>d</sup>	NA	13802	NA	NA	16150+/-7456 <sup>e</sup>	12621+/-5738
ポリクローナル抗-Aβ42	10	6160	0.0055	-65	4892	0.0071	-65	5912+/-4492	4454+/-3347
mAb 10D5	8	7915	0.1019	-56	6214	0.0433	-55	9695+/-6929	6943+/-3351
mAb 266	6	9144	0.1255	-49	8481	0.1255	-39	9204+/-9293	7489+/-6921
mAb 21F12	8	15158	0.2898	-15	13578	0.7003	-2	12481+/-7082	11005+/-6324

脚注:

- a. 実験の終了時の1群あたりの動物数  
b. ng/g 組織  
c. 分析  
d. 認められず  
e. 標準偏差

10

20

30

40

## 【0274】

海馬では、ポリクローナル抗-Aβ抗体を用いた処置に関連する全Aβの減少パーセント中央値(50%、p=0.0055)は、皮質で観察された値よりも大きくなかった(65%)(表14)。しかし、減少の絶対的規模は皮質のほぼ3倍大きく、正味の減少は海馬の31,683ng/g組織対皮質の11,658ng/g組織であった。全AβではなくAβ42のよりアミロイド形成性状態のAβ1-42のレベルとして測定した時、ポリクローナル抗体を用いて達成された

50

減少が有意であった ( p = 0.0025 )。mAb10D5および266を用いて処置した群の中央値レベルは、それぞれ33%および21%まで減少した。

【 0 2 7 5 】

【 表 1 8 】

表 14

処置群	N <sup>a</sup>	中央値						平均		
		全Aβ			Aβ42			全Aβ		Aβ42
		ELISA 値 <sup>b</sup>	P値 <sup>c</sup>	% 変化	ELISA 値	P値	% 変化	ELISA 値	ELISA 値	
PBS	9	63389	NA <sup>d</sup>	NA	54429	NA	NA	58351+/-13308 <sup>e</sup>	52801+/-14701	
ポリクローナル抗-Aβ42	10	31706	0.0055	-50	27127	0.0025	-50	30038+/-22454	24853+/-18262	
mAb 10D5	8	46779	0.0675	-26	36290	0.0543	-33	44581+/-18632	36465+/-17146	
mAb 266	6	48689	0.0990	-23	43034	0.0990	-21	36419+/-27304	32919+/-25372	
mAb 21F12	8	51563	0.7728	-19	47961	0.8099	-12	57327+/-28927	50305+/-23927	

脚注:

a. 実験の終了時の1群あたりの動物数

b. ng/g 組織

c. 分析

d. 認められず

e. 標準偏差

10

20

30

40

【 0 2 7 6 】

全 A は、小脳でも測定した (表 1 5 )。ポリクローナル抗 - A および266抗体を投与したそれらの群は、有意な全 A レベルの減少を示し (それぞれ43%および46%、 p = 0.

50

0033および  $p = 0.0184$  )、そして10D5で処置した群はほぼ有意な減少を示した (29%、 $p = 0.0675$ )。

【 0 2 7 7 】

【 表 1 9 】

表15

小脳					
処置群	N <sup>a</sup>	中央値			平均
		全A $\beta$			全A $\beta$
		ELISA値 <sup>b</sup>	P値 <sup>c</sup>	% 変化	ELISA 値
PBS	9	30.64	NA <sup>d</sup>	NA	40.00+/-31.89 <sup>e</sup>
ポリクローナル抗-A $\beta$ 42	10	17.61	0.0033	-43	18.15+/-4.36
mAb 10D5	8	21.68	0.0675	-29	27.29+/-19.43
mAb 266	6	16.59	0.0184	-46	19.59+/-6.59
mAb 21F12	8	29.80	>0.9999	-3	32.88+/-9.90

脚注:

- a. 実験の終了時の1群あたりの動物数
- b. ng/g 組織
- c. 分析
- d. 認められず
- e. 標準偏差

【 0 2 7 8 】

APP濃度も、抗体-処置および対照、PBS-処置マウスに由来する皮質および小脳でELISAにより決定した。2つの異なるAPPアッセイを使用した。第1に、APP- /FLと名付けたアッセイは、APP-アルファ(、A配列内で開裂されたAPPから分泌)、およびAPPの完全長形態 (FL) を認識し、一方2番目のアッセイはAPP-のみを認識する。処置が関係するAの減少とは対照的に、処置群のサブセットでは、対照動物と比較してすべての処置においてAPPのレベルがほとんど変らなかった。これらの結果は、A抗体を用いた免疫感

【 0 2 7 9 】

まとめると、AレベルはAN1792に対するポリクローナル抗体で処置した動物の皮質、海馬および小脳で有意に減少した。程度は低いがA1-42のアミノ末端領域、特にアミノ酸1-16および13-28に対するモノクローナル抗体も有意な処置効果を示した。

【 0 2 8 0 】

#### 4. 組織化学的分析:

PBS、ポリクローナルA42、21F12、266および10D5処置群のマウスに由来するサブセット中のA-免疫応答性斑の形態を、A42を用いた標準的な免疫感作手順に従った以前の実験と定量的に比較した。

10

20

30

40

50

## 【0281】

アミロイド斑の程度および出現の両方において最大の変化は、ポリクローナル A<sub>42</sub>抗体で免疫感作した動物で生じた。アミロイド負荷量の減少、衰退する斑の形態および細胞性の A<sub>42</sub> 免疫反応性は、標準的な免疫感作手順により生じた効果に極めて似ていた。これらの観察は、全 A<sub>42</sub> および A<sub>42</sub> の両方で有意な減少がポリクローナル A<sub>42</sub> 抗体の投与により達成された ELISA の結果を指示している。

## 【0282】

同様な定量的評価で、10D5群におけるアミロイド斑も数および外観が減少し、幾つかの細胞性 A<sub>42</sub> 免疫反応性の証拠を示す。対照-処置動物に関して、A<sub>42</sub> に対するポリクローナル Ig 画分およびモノクローナル抗体の 1 つ (10D5) が、斑負荷量をそれぞれ 93% および 81% まで減少させた ( $p < 0.05$ )。21F12 は斑の負荷量に対して比較的小さな効果を有するようであった。pab A<sub>1-42</sub> 処置後の脳の顕微鏡写真は、対照処置動物に対して pab A<sub>1-42</sub> 処置群で、拡散した沈着物、および多くのより大きな緻密な斑が存在しないことを示した。

## 【0283】

## 5. 抗体力価の測定:

各群からの 3 つの無作為に選択したマウスのサブセットから、各腹腔内接種の直前に全部で 30 匹から採血した。抗体力価は一般材料および方法で詳細に記載しように、A<sub>1-42</sub> を被覆したプラスチック製のマルチ-ウェルプレートを使用したサンドイッチ ELISA で A<sub>1-42</sub> 結合抗体として測定した。各採血の平均力価は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体 10D5 および 21F12 については、図 16 ~ 18 にそれぞれ示す。ポリクローナル抗体調製物について、この期間にわたる力価は平均約 1000 を越え、そして 10D5-および 21F12-処置動物よりもこのレベルはわずかに高かった。

## 【0284】

## 6. リンパ球増殖応答:

A<sub>42</sub>-依存的なリンパ球増殖を、最後の抗体注入から 8 日後に回収した脾細胞を使用して測定した。新しく回収した細胞 (105/ウェル) を、5  $\mu$ M の刺激濃度の A<sub>1-40</sub> の存在下で、5 日間培養した。陽性対照として、さらなる細胞を T 細胞マイトジェン (PHA) と培養し、そして陰性対照として、細胞はペプチドを加えずに培養した。種々の抗-A<sub>42</sub> 抗体で受動免疫感作した老いた PDAPP マウスに由来する脾細胞は、インビトロで AN1792 をいて刺激し、そして増殖およびサイトカイン応答を測定した。これらのアッセイの目的は、受動免疫感作が抗原提示を可能にするかどうか、すなわち AN1792 に特異的な T 細胞応答をプライミング (priming) するかどうかを決定することであった。AN1792-特異的増殖またはサイトカイン応答が、抗-A<sub>42</sub> 抗体で受動免疫感作したマウスで観察された。

## 【0285】

## XII. 受動免疫感作のさらなる実験

第 2 実験では、10D5 による処置を繰り返し、そして 2 つのさらなる抗-A<sub>42</sub> 抗体、モノクローナル抗体 3D6 (A<sub>1-5</sub>) および 16C11 (A<sub>33-42</sub>) を試験した。対照群は PBS または無関係なアイソタイプが合った抗体 (TM2a) のいずれかを受けた。マウスは以前の実験よりも年老いており (11.5 ~ 12 月齢のヘテロ接合性)、それ以外は実験計画は同じであった。ここでもう一度、6 カ月間の処置後に、10D5 は斑の負荷量を PBS またはアイソタイプが合った抗体対照のいずれに対しても 80% 以上減少させた ( $p = 0.003$ )。A<sub>42</sub> に対する他の抗体、3D6 は同等に有効であり、86% の減少を生じた ( $p = 0.003$ )。対照的に、ペプチドに対する第 3 抗体、16C11 は斑の負荷量に効果を及ぼすことができなかった。同様な知見は、A<sub>42</sub> ELISA 測定を用いて得られた。これらの結果は、A<sub>42</sub> ペプチドに対する抗体応答が T 細胞免疫の不存在下で、PDAPP マウスのアミロイド沈着物を減少させるために十分であるが、すべての抗-A<sub>42</sub> 抗体に効力があるわけではないことを示している。A<sub>42</sub> のアミノ酸 1-5 または 3-7 を含んで成るエピトープに対する抗体が特に効力を有する。

## 【0286】

まとめると、我々は受動的に投与された A<sub>42</sub> に対する抗体がアルツハイマー病のマウス

モデルにおいて斑の沈着物の程度を減少させることを示した。適度な血清濃度 (25~70  $\mu\text{g/ml}$ ) に保持される時、抗体は  $\text{A}\beta$ -アミロイド斑を修飾する (decorate) ために十分なレベルで CNS への接近を獲得した。CNS へ抗体が入ることは、PDAPPマウスでエバンスブルー (Evans Blue) により測定される脈管透過性が上昇しなかったため、血管-脳バリアの異常な漏れによるものではなかった。さらに、年老いた PDAPPマウスの脳実質中の抗体濃度は非トランスジェニックマウスでの濃度と同じであり、血清中 0.1% の抗体濃度を表した (アイソタイプにかかわらず)。

#### 【0287】

#### XIII. 抗体結合のモニタリング

A  $\beta$  に対する抗体が CNS 中で実際に作用できたのかどうかを決定するために、実施例 XII の終わりに塩類を灌流したマウスから摘出した脳を、末梢に投与した抗体の存在について調査した。非固定の凍結保持脳切片をマウス免疫グロブリン (ヤギ抗-マウス IgG-Cy3) に対する蛍光試薬に暴露した。10D5 および 3D6 群の脳内の斑は、抗体により強く修飾され、一方 16C11 群には染色はなかった。完全な程度の斑の沈着物を明らかにするために、各脳の連続切片を最初に抗-A  $\beta$  抗体と免疫反応させ、そして次に 2 次試薬と反応させた。末梢投与後に 10D5 および 3D6 は、CNS 内のほとんどの斑への接近を得た。斑の付加量は 16C11 群に比べてこのような処置群で大いに減少した。これらのデータは、末梢に投与した抗体がアミロイド除去を直接引き起こす (trigger) ことができる場所の CNS へ入ることができることを示す。16C11 も斑に接近できるが、結合できなかつたらしい。XIV. アミロイド沈着物に対する抗体の活性に関するエキスピボスクリーニングアッセイ

抗体の斑除去に及ぼす効果を調査するために、我々は初代ミクログリア細胞を PDAPPマウスまたはヒト AD 脳の非固定の凍結保持切片と培養するエキスピボアッセイを樹立した。ミクログリア細胞は、新生児 DBA/2N マウス (1~3 日) の大脳皮質から得た。皮質は 50  $\mu\text{g/ml}$  の DNase I (シグマ (Sigma)) を含む HBSS<sup>-</sup> (ハンクスバランス塩溶液、シグマ) 中で機械的に切開した。解離した細胞を 100  $\mu\text{m}$  細胞ステイナー (ファルコン: Falcon) で濾過し、そして 1000 rpm で 5 分間遠心した。ペレットを成長培地に再懸濁し (高グルコース DMEM、10% FBS、25 ng/ml GM-CSF)、そして細胞を T-75 プラスチック培養フラスコあたり 2 個の脳密度でまいた。7~9 日後、フラスコを軌道シェーカー上で 200 rpm にて、37  $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間回転させた。細胞懸濁液を 1000 rpm で遠心し、そしてアッセイ媒質中に再懸濁した。

#### 【0288】

PDAPPマウスまたはヒト AD 脳 (死後間隔 < 3 時間) の 10- $\mu\text{m}$  の凍結保持切片を、ポリ-リシンを被覆したガラスカバースリップ上で解凍し、そして 24 ウェル組織培養プレート中に置いた。カバースリップは、H-SFM (ハイブリドマ-無血清培地、ギブコ (Gibco)-BRL)、1% FBS、グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 5 ng/ml rmGM-CSF (R & D) から成るアッセイ媒質で 2 回洗浄した。対照または抗-A  $\beta$  抗体を 2  $\times$  濃度 (最終 5  $\mu\text{g/ml}$ ) で 1 時間加えた。次いでミクログリア細胞を  $0.8 \times 10^6$  細胞/ml アッセイ媒質の密度でまいた。培養は加湿インキュベーター (37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ ) 中で 24 時間以上維持した。インキュベーションの終わりに、カルチャーを 4% パラホルムアルデヒドで固定し、そして 0.1% Triton-X100 で透過した。切片をピオチン化 3D6、続いてストレプトアビジン Cy3 結合物 (ジャクソンイムノリサーチ) により染色した。外因性のミクログリア細胞を核染色により視覚化した (DAPI)。カルチャーを逆転蛍光顕微鏡 (ニコン (Nikon)、TE300) で観察し、そして顕微鏡写真を SPOT ソフトウェア (ダイアグノスティックインスツルメンツ (Diagnostic instruments)) を使用して、SPOT デジタルカメラで取った。ウエスタンブロット分析に関しては、カルチャーを 8 M 尿素で抽出し、還元トリシンサンプルバッファー中で 1:1 に希釈し、そして 16% トリシゲル (ノベックス (Novex)) に乗せた。イモビロン (immobilon) 上に移した後、ブロットを 5  $\mu\text{g/ml}$  の pabA<sub>42</sub>、続いて HRP-結合化抗-マウス抗体に暴露し、そして ECL (アマーシャム (Amersham)) で現像させた。アッセイを 16C11 (インビボで効力の無い、A  $\beta$  に対する抗体の 1 つ) の存在下にて PDAPP 脳切片で行った時、 $\text{A}\beta$ -アミロイド斑は完全なまま残り、そして食作用は観察されなかった。対照的に、隣接する切片を 10D5 の存在下で培養した時、アミロイド沈着物は大部分が無くなり、そし

てミクログリア細胞は A を含有する多数の食作用小胞を示した。同一の結果が A D 脳切片でも得られた；10D5は A D 斑の食作用を誘導したが、16C11は有効ではなかった。さらに、アッセイではマウスまたはヒトのミクログリアに細胞のいずれか、および A に対するマウス、ウサギまたは霊長類の抗体で行った時に匹敵する結果を提供した。

【0289】

表16は結合および/または食作用が数種の異なる抗体結合特異性について得られるかどうかを示す。aa1-7内のエピトープに結合する抗体は両方とも結合し、そしてアミロイド沈着物を除去することが分かるが、アミノ酸4-10内のエピトープに結合する抗体は、アミロイド沈着物を除去せずに結合した。残基10のエピトープ C-末端に結合する抗体は、結合もアミロイド沈着物の除去もしなかった。

10

【0290】

【表20】

表16:ヒト- $\beta$ 特異性の分析

	抗体		染色	食作用
	ヒト- $\beta$	アイソタイプ		
<b>N-Term</b>				
<b>mab</b>				
<b>3D6</b>	1-5	IgG2b	+	+
<b>10D5</b>	3-6	IgG1	+	+
<b>22C8</b>	3-7	IgG2a	+	+
<b>6E10</b>	5-10	IgG1	+	-
<b>14A8</b>	4-10	rat IgG1	+	-
<b>13-28</b>				
<b>18G11</b>	10-18	rat IgG1	-	-
<b>266</b>	16-24	IgG1	-	-
<b>22D12</b>	18-21	IgG2b	-	-
<b>C-Term</b>				
<b>2G3</b>	-40	IgG1	-	-
<b>16C11</b>	-40/-42	IgG1	-	-
<b>21F12</b>	-42	IgG2a	-	-
免疫性血清				
ウサギ (CFA)	1-6		+	+
マウス (CFA)	3-7		+	+
マウス (QS-21)	3-7		+	+
サル (QS-21)	1-5		+	+
マウス (MAP1-7)			+	+

20

30

40

【0291】

表17は、A に対する幾つかの抗体を用いて得られた結果を示し、受動輸送実験においてエキスビボアッセイで食作用を誘導し、そしてインビボの斑の負荷量を減少させる抗体の能力を比較する。16C11および21F12は凝集した合成 A ペプチドに高い親和力で結合し、これらの抗体は非固定脳切片中の  $\beta$ -アミロイド斑と反応することができず、エクス

50

ピボアッセイで食作用を引き出すことができず、そしてインピボで効力的ではなかった。A に対する10D5、3D6およびポリクローナル抗体は、すべてのこれらの測定で活性であった。22C8抗体は、1および7位のアスパラギン酸がイソ-アスパラギン酸に置き換えられた自然なA の同族形態により強く結合する。これらの結果は、インピボの効力がCN S中の斑の直接的な抗体が媒介する除去によることを示し、そしてエキスビボのアッセイがインピボの効力を予報することを示す。

## 【0292】

同じアッセイを使用して、NACと呼ばれるシヌクレインのフラグメントに対する抗体の除去を試験した。NACに対する抗体はアミロイド斑を含む脳組織サンプル、ミクログリア細胞と前のように接触させる。ウサギの血清を対照として使用した。続くモニタリングでは、抗体の除去活性を示す斑の数およびサイズの著しい減少を示した。

## 【0293】

## 【表21】

表17 インピボ効力の予報としてのエキスビボアッセイ

抗体	アイソタイプ	凝集化 A $\beta$ の 親和力	$\beta$ -アミロイド斑 への結合	エキスビボ 効力	インピボ 効力
<b>モノクローナル</b>					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
<b>ポリクローナル</b>					
1-42	ミックス	600	+	+	+

20

30

## 【0294】

共焦点顕微鏡を使用して、A がエキスビボアッセイ中に内面化したことを確認した。対照抗体の存在下で、外因性ミクログリア細胞は、組織上の共焦点板に残り、A を含む食作用小胞は無く、そして斑は切片内に完全に残った。10D5の存在下で、ほとんどすべての斑材料が外因性ミクログリア細胞内の小胞に含まれた。内面化されたペプチドの運命を決定するために、10D5処理カルチャーを8M尿素で様々な時点で抽出し、そしてウエスタンブロット分析により調査した。1時間の時点で、食作用は未だに起こっていない時、A に対するポリクローナル抗体との反応で強い4kDバンド(A ペプチドに対応する)が明らかとなった。A 免疫反応性は、1日で減少し、そして3日までに無かった。すなわち抗体性のA の食作用はその分解を導く。

40

## 【0295】

エキスビボアッセイにおける食作用がFc-媒介であるかどうかを決定するために、抗-A抗体3D36のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを調製した。F(ab')<sub>2</sub>フラグメントはそれらが斑と反応するための完全な能力を保持するが、ミクログリア細胞による食作用を引き出す(trigger)ことができなかつた。さらに全抗体での食作用は、マウスFcレセプターに対する試薬(抗-CD16/32)により遮断された。これらのデータは、A のインピボ除去がFc-レセプターが媒介する食作用を通して起こることを示している。

## 【0296】

## XV. 抗体の血管脳バリアの通過

この実施例では、正常またはPDAPPマウスの抹消組織に静脈注射された後に、脳に送達

50

された抗体の濃度を測定する。PDAPPまたは対照正常マウスは、0.9% NaClを灌流した。脳領域（海馬または皮質）を切開し、そして急速に冷凍した。脳は0.1% トライトン + プロテアーゼインヒビター中で均質化した。免疫グロブリンが抽出物中でELISAにより検出された。捕捉試薬としてFab'2ヤギ抗-マウスIgGを、RIAプレート上に被覆した。血清または脳抽出物を1時間インキュベーションした。アイソタイプを抗-マウスIgG1-HRPまたはIgG2a-HRPまたはIgG2b-HRP（カルタグ:Caltag）で検出した。アイソタイプにかかわらず抗体はCNSに、血中に見られる濃度の1:1000で存在した。例えば、IgG1の濃度が血中のIgG2aの3倍である時、脳にもIgG2aの3倍で存在し、両方ともそれぞれの血中レベルの0.1%で存在する。この結果はトランスジェニックおよび非トランスジェニックマウスの両方で観察されるので、PDAPPで独自に血管脳バリアを漏れたのではなかった。

10

【0297】

XVI. MAPの立体配置におけるA<sub>β</sub>ペプチドの治療的効力

治療的アジュバント/免疫原効力実験を、9~10.5月齢のオスおよびメスのヘテロ接合性PDAPPトランスジェニックマウスで行い、上記のような四量体のMAP立体配置でA<sub>β</sub>1-7を含んで成る融合タンパク質の効力を試験した。試験期間は処置群あたり20~40動物を用いて25週間であり；したがって動物は終了時に15~16.5月齢であった。この実験に使用した方法は、上記実施例VIIIの種々のアジュバントの治療的実験で使用した方法と同じである。処置群は以下の表8で確認する。

【0298】

【表22】

20

表18

	アジュバント	免疫原	希釈バッファー	投与
群1:	CFA/IFA	MAP(AB 1-7:TT) (100 µg)	PBS	IP (400 µl)
群2:	QS21	AN1792-GCS (75 µg)	PBS	SC (250 µl)
群3:	PBS	----	----	SC (250 µl)

【0299】

表の略号：MAP - 多 - 抗原性ペプチド；TT - 破傷風毒素 t - 細胞エピトープ（830-844）；SC - 皮下；IP - 腹腔内；PBS - リン酸緩衝化生理食塩水；GCSはグリシン/クエン酸塩/シクロロース配合物。

30

【0300】

免疫感作スケジュールは、すべての処置群で同一であった。マウスは0、2、4、8、12、16、20、24週に注射し、3、5、9、13、17、21および25週に採血した。群1、2、3、4および6は8回の注射を受け、群2および3はそれぞれQS21/AN1792およびPBSを受け、この実験の陽性および陰性対照とした。

【0301】

力価は抗-A<sub>β</sub>抗体力価アッセイにより測定した。

40

【0302】

群1、CFA/IFA:MAP(A<sub>β</sub>1-7:TT)群は、力価レベルが低かった。ピークGMTは13週に1,200に達し、25週までに600のGMTに落ちた。力価が上がらなかったマウスが30匹の内3匹おり、そして別の7匹のマウスは実験の終わりまでに400の力価を越えなかった。

【0303】

群2、QS21/AN1792対照群は、17週で16,000のGMTのそのピーク力価に達した。次いで力価は次の8週にわたり落ちて、8,700のGMTで終了した。この群の1匹の動物は実験の全経過にわたり力価が上がらなかった。群3、PBS単独群は力価が無かった。

【0304】

両処置群が、PBS対照群と比較して皮質でA<sub>β</sub>レベルの有意な減少を示した（表19を

50

参照にされたい)。CFA/IFA:MAP(A 1-7)群は、抗-A 抗体の比較的低い力価にもかかわらず、PBS対照群に比べて有意にA を下げた。

【0305】

【表23】

表19 皮質Aβレベル

	PBS	MAP	QS-21
中央値(ng/g組織)	7,335	3,692	2,389
範囲(ng/g組織)	550-18,358	240-10,782	210-11,167
p値	—	0.0003	<0.0001
N	38	30	34

10

【0306】

結論すると、A 1-7MAP免疫原は、皮質のA 沈着物を有意に阻止するために十分な免疫応答を誘導のに有効である。 20

【0307】

XVII. サルを対象としたA に対する免疫原性応答のエピトープマッピング

この実施例では、AN1792(すなわちA 1-42)を用いた免疫感作に対する霊長類の応答を分析する。11群のサル(4/性別/群)を、QS-21アジュバント(50または100μg/投与量)または水中5%の滅菌デキストロース(D5W、対照群)と組み合わせたAN1792(75または300μg/投与量)で免疫感作した。すべての動物は、表20に示す3つの注射スケジュールの1つで、1M注射を全部で4、5または8投与を受けた。実験の175日目に集めた血清サンプル(4匹のサル/性別/群から)、および実験の176日目に集めた(6カ月目の検死)CSFサンプル(3匹のサル/性別/群から)を、それらがA 1-40ペプチドおよびA 30 PPに結合する能力について評価した。

【0308】

【表 2 4】

表20：群の割り当ておよび投与レベル

群 No.	スケジュール <sup>a</sup>	# サル (M/F)	AN1792 投与 (μg/用量)	QS-21 投与 (μg/用量)	投与経路
1 <sup>b</sup>	1	4/4	0	0	IM
2	1	4/4	賦形剤 <sup>c</sup>	50	IM
3	1	4/4	賦形剤	100	IM
4	1	4/4	75	50	IM
5	1	4/4	300	50	IM
6	1	4/4	75	100	IM
7	1	4/4	300	100	IM
8	2	4/4	75	100	IM
9	2	4/4	300	100	IM
10	3	4/4	75	100	IM
11	3	4/4	300	100	IM

10

20

## 【0309】

a . スケジュール 1、投与日 1、15、29、57、85、113、141、169;スケジュール 2、投与日 1、29、57、113、169;スケジュール 3、投与日 1、43、85、169。

b . D 5 W 注射対照群

c . AN1792の補形剤であるグリシン/クエン酸塩/シクロオスバッファーから成る賦形剤。

## 【0310】

AN1792により免疫感作した動物に由来する血清サンプル中の抗体により認識される直線状ペプチドの正確な配列は、このような抗体の全 A 1-42配列を網羅する重複ペプチドへの結合を測定するELISAにより決定した。AN1792の部分配列を有するビオチン化ペプチドは、ペプチドあたり9個の残基の重複および1残基のステップを含む10アミノ酸ペプチドとして、キロンテクノロジーズ (Chiron Technologies) から得た (合成番号5366、番号5331および番号5814)。最初の32ペプチド (AN1792のN-末端の上流の8アミノ酸位から、AN1792の24番目のアミノ酸に下がる) を、GGKのリンカーを用いてC-末端でビオチン化する。最後の10ペプチド (前の連続から32番目のペプチドを繰り返す) を、EGEG (配列番号: 76) から成るリンカーを用いてN-末端でビオチン化する。凍結乾燥したビオチン化ペプチドを、5 mMの濃度でDMSO中に溶解した。これらのペプチドストックをTTBS (0.05% Tween20、25mM Tris HCl、137mM NaCl、5.1mM KCl、pH=7.5) 中、5 μMに希釈した。この5 μM溶液の100 μlのアリコートは、ストレプトアビジンを前-被覆した96-ウェルプレート (ピラス: Pierce) に2連で加えた。プレートを室温で1時間インキュベーションし、次いで4回、TTBSで洗浄した。血清サンプルは力値を標準化するためにアザイドを含まない検体希釈液で希釈し、そしてウェルあたり100 μlを加えた。これらのプレートを室温で1時間インキュベーションし、そして次いで4回、TTBSで洗浄した。HRP-結合ヤギ抗-ヒト抗体 (ジャクソン イムノリサーチ: Jackson ImmunoResearch) を、1:10,000でアザイドを含まない検体希釈液で希釈し、そしてウェルあたり100 μlを加えた。プレートを再度インキュベーションし、そして洗浄した。発色反応を行うために、TMB (ピラス) をウェルあたり100 μlで加え、そして15分間インキュベーションした後に、30 μlの2 NH<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>を加えて、反応を止めた。光学密度はVmax またはSpectramax 比色プレートリーダーで450nmにて測定した。

30

40

50

## 【0311】

AN1792での免疫感作は、175日までですべての投与群で100%の動物に抗体の生産をもたらした。群内の平均力価は14596～56084の範囲であった。より高い抗原および/またはより高いアジュバント濃度の存在下の免疫感作スケジュール内でより高い力価となる傾向があったが、免疫感作に対する個々の動物応答における高い変動性のために有意差は示すことができなかった。

## 【0312】

AN1792に対して陽性の血清は、A 1-40に対する抗体についても陽性であった。群内の平均力価は36867～165991の範囲であり、そして抗-AN1792力価に関しては、175日で群間の統計的な有意差は示されなかった。AN1792への結合は、A 1-40への結合と高い陽性の相関 (Spearmanr=0.8671) を示した。

10

## 【0313】

AN1792により様々なスケジュールで免疫感作した48匹のサルの中で、33匹が分析に十分な容量および量のCSFサンプルを生じた。このような中の32匹(97%)が、AN1792に対して陽性の力価を有した。この力価は2～246の範囲であり、 $49.44 \pm 21.34$ の平均であった。CSF抗-AN1792レベルは血清中で測定されたものの $0.18 \pm 0.11\%$ であり、そして血清力価との高い陽性の相関を示した (Spearmanr=0.7840)。CSF中の抗体の割合に群差または性差は見られなかった。CSF中の抗体のレベルは血管脳-バリアから中枢神経経路をわたって、末梢に生成された抗体の受動輸送に合致する。

## 【0314】

抗-AN1792陽性CSFサンプルのサブセットの試験では、血清サンプル中の抗体のように、A 1-40と交差反応するCSF中の抗体を示した。A 1-40に対する力価は、それらの各々のAN1792力価と高い相関を示した (Spearmanr=0.9634)。AN1792に対して最高の力価を持つCSFのサンプルのサブセットの試験では、血清抗体に関するようにAPPへの結合は示さなかった。

20

## 【0315】

175日からの血清を一連の重複10-merペプチドに対して試験した時、すべてのサルからの抗体がAN1792ペプチドのアミノ酸1-10を網羅する配列 (APPのアミノ酸653-672) のペプチドに結合した。幾つかの動物では、これが結合を測定できた唯一のペプチドであった (図19を参照にされたい)。

30

## 【0316】

別の動物では他の反応性を測定することができたが、すべての場合でN-末端ペプチド配列に対する反応性が優占するものであった。さらなる反応性は2群に分かれた。第1の、そして多くの結合は、N-末端1-10AN1792ペプチドの中央を囲むペプチドへの結合であった (図20)。他の種類の結合は、AN1792ペプチドのアミノ酸1-8、1-9および2-11を網羅するペプチドに向けられた。これらの反応性は、1-10ペプチドへの反応性と合わせると、すべての動物において圧倒的な大部分の反応性を表す。期間中の個々の動物のエピトープマッピングは、1-10ペプチドに対する抗体反応性が隣接するペプチドへの広がりを進めることを示す。これはAN1792ペプチドのN-末端のその遊離末端アスパラギン酸残基への免疫反応性に強力に傾くことを示す。数匹の動物中でわずかに検出可能な2つ目の活性は、主領域およびAN1792ペプチドのアミノ酸7-16、11-20および16-25を覆う中央部ペプチドへに対してC-末端に位置するペプチドへの結合であった。これらの反応性はサルのわずか10～30%で見られた。

40

## 【0317】

種々の動物間の応答の変動は (例えば、アミノ酸1-10が排除されているか、または優勢な反応性エピトープであるかにかかわらず)、抗原/アジュバント用量、投与スケジュール、または抗体力価と相関せず、そしておそらく個々の動物の遺伝的構成 (make-up) の影響によるものだろう。

## 【0318】

XVIII. ヒト個体の予防および処置

50

ヒトでの安全性を決定するために、単回投与のフェイズI試験を行う。治療薬は効力が予想される約0.01のレベルから始めて、有効なマウス投薬用量の約10倍のレベルに達するまで3の因子で増加させて、異なる患者に対して投薬用量を増して投与する。

【0319】

フェイズII試験は、治療効力を決定するために行う。アルツハイマーの可能性についてアルツハイマー病および関連障害随伴基準(ADRD)を使用して定めた初期から中期アルツハイマー病の患者を選択する。適当な患者はミニ-精神-状態試験(MMSE)において12~26点の範囲である。他の選択基準は、患者が試験期間中に生存し、そして妨害するかもしれない併用薬剤の使用といった複雑化する問題が無いことである。患者の機能のベースライン評価は、MMSEおよびアルツハイマー病状態および機能を持つ患者を評価するための総合的尺度であるADASのような古典的な精神測定を使用する。 10

【0320】

このような精神的尺度はアルツハイマー症状の進行の測定を提供する。適当な定性的生活尺度も処置をモニタリングするために使用できる。疾患の進行はMRIによりモニタリングすることもできる。患者の血液プロフィールも、免疫原-特異的抗体およびT-細胞応答のアッセイを含め、モニタリングすることができる。

【0321】

ベースライン測定の後、患者は処置を受け始める。彼らは無作為化され、そして治療薬またはプラセボをいずれかにより盲検的様式で処置される。患者は少なくとも6カ月間、監視される。効力はプラセボ群に対して処置群で進行における有意な減少により決定する。 20

【0322】

第2フェイズIIの試験は、非アルツハイマー病の初期の記憶喪失(時折、加齢による記憶障害(AAMI)とも呼ばれるが)、または軽度の認知障害(MCI)から、ADRD基準により定められる恐らくはアルツハイマー病への転換を評価するために行う。アルツハイマー病への転換の高い危険性を持つ患者は、記憶喪失の初期の兆候または前-アルツハイマー病の総合的症状に付随する他の困難について参照群をスクリーニングすることにより非臨床的群から、アルツハイマー病の家系から、遺伝的危険因子、年齢、性別およびアルツハイマー病について高い危険性を示すことが分かっている他の特徴から選択する。MMSEおよびADASを含む適当な測定基準のベースライン採点が、より正常な群を評価するために設計された他の測定基準と一緒に集められる。これらの患者群は適当な群に分割し、プラセボを薬剤を含む投与選択肢に対して比較する。これらの患者群は約6カ月の間隔で追跡され、そして各患者の終点は、彼または彼女が観察の終了時にADRD基準により定められるアルツハイマー病を好転させているかどうかである。 30

【0323】

XIX. 一般材料および方法

マウスは尾の静脈に小さい傷を作ることにより採血し、そして約200 $\mu$ lの血液をマイクロ遠心管に集めた。モルモットは最初に後膝領域の毛を剃り、18ゲイジ針を使用して中足骨静脈に傷をつけ、そして血液をマイクロ遠心管に集めることにより採血した。血液は室温(RT)で1時間凝固させ、ボルテックス混合し、次いで14,000 $\times$ gで10分間遠心して、血清から凝固物を分離した。次いで血清を清浄なマイクロ遠心管に移し、そして滴定するまで4で保存した。 40

【0324】

抗体力価は、ELISAにより測定した。96-ウェルマイクロタイタープレート(コスター(Costar)EIAプレート)は、10 $\mu$ g/mlのA<sub>42</sub>またはSAPPあるいは他の抗原のいずれかを含む100 $\mu$ lの溶液(ウェルコーティングバッファー:0.1Mリン酸ナトリウム、pH8.5、0.1%アジ化ナトリウム)で個別の報告にそれぞれ記載されているように被覆し、そしてRTで一晩保持した。ウェルを吸引し、そして血清を検体希釈液(0.014Mリン酸ナトリウム、pH7.4、0.15M NaCl、0.6%ウシ血清アルブミン、0.05%チメロサル)で1/100希釈から始めてウェル加えた。サンプルの3倍づつ7回の連続希釈物をプレートに直接作成して、最終的 50

に1/218,000の希釈物を作成した。この希釈物を被覆したプレートウェル中でRTにて1時間インキュベーションした。次いでプレートを4回、0.05% Tween20を含むPBSバッファで洗浄した。2次抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したヤギ抗-マウスIg(ペーリンガーマンハイム(Boehringer Mannheim)から得た)をウェルに100 $\mu$ lの1/3000希釈物(検体希釈液中)として加え、そしてRTで1時間インキュベーションした。プレートを再度4回、PBS、Tween20で洗浄した。色原体を発色させるために、100 $\mu$ lのSlow TMB(ピアスケミカルズから得た3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)を各ウェルに加え、そしてRTで15分間インキュベーションした。反応は25 $\mu$ lの2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加することにより停止した。次に色の強度を、モレキュラー デバイスイズ(Molecular Devices)のVmaxで読んだ(450nm~650nm)。

10

#### 【0325】

力価は血清の相互の希釈として定め、最大ODの1/2を与えた。最大ODは、一般に大変高い力価の場合(この場合は、最大ODを確立するために、より高い初期の希釈が必要であった)を除き最初の1/100希釈から取られた。50%点が2つの希釈の間に落ちたら、直線的挿入を行って最終力価を算出した。幾何平均抗体力価を算出するために、100未満の力価は任意に25の力価に割り当てた。

#### 【0326】

##### 2. リンパ球増殖アッセイ

マウスにイソフルランで麻酔をかけた。脾臓を摘出し、そして10%熱-不活性化ウシ胎児血清を含む5mlのPBS(PBS-FBS)で2回洗浄し、そして50 のCentriconユニット(ダコ社(DacoA/S)、デンマーク)中、1.5mlのPBS-FBSで10秒間、100rpmでMedimachine(ダコ)にて均質化し、続いて100ミクロン孔サイズのナイロンメッシュを通して濾過した。脾細胞を15mlのPBS-FBSで1回洗浄し、次いで200 $\times$ gで5分間遠心することによりペレットとした。赤血球はペレットを5mlのバッファ(0.15M NH<sub>4</sub>Cl、1 M KHC0<sub>3</sub>、0.1M NaEDTA、pH7.4を含む)中にRTで5分間、再懸濁することにより溶解した。次いで白血球は上記のように洗浄した。新しく単離した脾細胞(ウェルあたり10<sup>5</sup>細胞)を、96-ウェルのU-底組織培養-処理マイクロタイタープレート(コーニング(Corning)、ケンブリッジ、マサチューセッツ州)中、2.05mM グルタミン、1% ペニシリン/ストレプトマイシンおよび10%熱-不活性化FBSを補充したRPMI1640培地(JHR バイオサイエンス(Bioscience)、レネキサ、カンザス州)に3連で準備して、37 で96時間培養した。種々のA ペプチド、A 1-16、A 1-40、A 1-42またはA 40-1逆配列タンパク質も、4段階で5~0.8マイクロモルの範囲の用量で加えた。対照ウェル中の細胞は、タンパク質を加えずにコンカナバリンA(ConA)(シグマ(Sigma)、カタログ#C-5275、1マイクログラム/ml)で培養した。細胞は3H-チミジン(イリノイ州、アーリントンのアマーシャム社(Amersham Corp.)から得た1 $\mu$ Ci/ウェル)を最後の24時間適用した。次いで細胞をUniFilterプレート上に回収し、そしてTop Count Microplate シンチレーション カウンターでカウントした(パックカード ルンズツルメンツ(Packard Instruments)、ダウナーズ グローブ、イリノイ州)。結果は分あたり不溶性高分子中に取り込まれた放射活性のカウントとして示す(cpm)。

20

30

#### 【0327】

##### 4. 脳組織プレパレーション

麻酔後に脳を摘出し、そして1つの半球を免疫組織化学分析用に調製し、一方3つの脳領域(海馬、皮質および小脳)を別の半球から切開し、そして種々のA タンパク質およびAPP形態の濃度を特異的ELISAを用いて測定するために使用した(Johnson-Wood et al.、同上)。

40

#### 【0328】

ELISA用の組織を10容量の氷-冷グアニジンバッファ(5.0Mグアニジン-HCl、50mM Tris-HCl、pH8.0)中で均質化した。ホモジネートはAdams Nutator(フィッシャー:Fisher)を使用してRTにて3~4時間、ゆるやかに攪拌し、次いでA およびAPPの定量前に-20 で保存した。事前の実験では、被検体はこの保存条件下で安定であり、そして合成A タンパク質(バッケム:Bachem)がマウスの同腹子に由来する対照脳組織のホモジネート

50

に注射した (spiked) 時、定量的に回収された (Johnson-Wood et al., 同上)。

#### 【0329】

##### 5. A レベルの測定

脳のホモジネートを氷冷カゼイン希釈液 (0.25% カゼイン、PBS、0.05% アジ化ナトリウム、20  $\mu$ g/ml アプロチニン、5 mM EDTA pH8.0、10  $\mu$ g/ml ロイペプチン) で1:10に希釈し、そして16,000 $\times$ gで4 にて20分間遠心した。合成A タンパク質標準 (1-42アミノ酸) およびAPP標準は、最終組成物に0.5Mグアニジンおよび0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含むように調製した。「全」A サンドイッチELISAは、捕捉抗体としてA 13-28のアミノ酸に特異的なモノクローナル抗体モノクローナル抗体266、レポーター抗体としてA のアミノ酸1-5に特異的なビオチン化モノクローナル抗体3D6 (Johnson-Wood et al. ) を利用する。3D6モノクローナル抗体は分泌されたAPPまたは完全長APPを認識せず、アミノ末端アスパラギン酸を含むA 種のみを検出する。このアッセイは $\sim$ 50ng/ml (11nM) の感度の下限を有し、そして1 ng/mlの濃度まで内因性のマウスA タンパク質との交差反応を示さない (Johnson-Wood et al., 同上)。

#### 【0330】

A 1-42特異的サンドイッチELISAは、捕捉抗体としてA のアミノ酸33-42に特異的なmA 21F12を利用する。このアッセイにも約125  $\mu$ g/ml (28  $\mu$ M、Johnson-Wood et al.) の感度の下限を有するビオチン化mA D6をレポーター抗体として使用する。A ELISAには、100  $\mu$ lのmA 266 (10  $\mu$ g/ml) またはmA 21F12 (5  $\mu$ g/ml) のいずれかを、RTで一晩インキュベーションすることにより96-ウェルのイムノアッセイプレート (コスター) に被覆した。溶液を吸引除去し、そしてウェルは200  $\mu$ lの0.25% ヒト血清アルブミンをPBSバッファーに少なくともRTで1時間、加えることによりブロッキングした。ブロッキング溶液を除去し、そしてプレートを使用するまで4 で乾燥保存した。プレートは洗浄バッファー [ Tris-緩衝化生理食塩水 (0.15M NaCl、0.01M Tris-HCl、pH7.5) に0.05% Tween20を加えた ] で使用前に再水和した。サンプルおよび標準をウェルあたり100  $\mu$ lの3連のアリコートで加え、そして次いで4 で一晩インキュベーションした。プレートを少なくとも3回、アッセイの各工程間で洗浄バッファーを用いて洗浄した。カゼインアッセイバッファー (0.25% カゼイン、PBS、0.05% Tween20、pH7.4) 中に0.5  $\mu$ g/mlに希釈したビオチン化mA 3D6を加え、そしてウェル中でRTにて1時間、インキュベーションした。カゼインアッセイバッファーで1:4000に希釈したアビジン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ結合物 (カリフォルニア州、バーリンガムのベクター (Vector) から得たアビジン - HRP) をウェルにRTで1時間加えた。比色基質、SlowTMB-ELISA (ピラス) を加え、そしてRTで15分間反応させ、その後酵素反応を25  $\mu$ lの2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えることにより停止した。反応生成物はモレキュラーデバイスサイズのV<sub>max</sub>を、450nmおよび650nmの異なる吸収で測定することにより定量した。

#### 【0331】

##### 6. APPレベルの測定

2種類のAPPアッセイを利用した。第一は、APP- /FLと呼ばれ、APP-アルファ ( ) およびAPPの完全長 (FL) 形態の両方を認識する。第二アッセイは、APP- に特異的である。APP- /FLアッセイは、A の最初の12アミノ酸を含む分泌したAPPを認識する。レポーター抗体 (2H3) は -クリップ- 部位に特異的ではないので、APP695のアミノ酸612-613間で起こる (Esch et al., Science 248, 1122-1124 (1990) ; このアッセイは完全長APP (APP- FL) も認識する。脳のAPP-FLのホモジネートを消費させるために、APP-FLの細胞質テイルに固定化したAPP抗体を使用した予備実験では、APP- /FLの約30~40%がFLであることを示唆している (データは示さず) 。APP- /FLおよびAPP- アッセイの両方のための捕捉抗体は、mAb8E5であり、APP695形態のアミノ酸444~592に対して生じた (Games et al., 同上) 。APP- /FLアッセイ用のレポーターmAbは、APP695のアミノ酸597~608に特異的なmAb2H3であり (Johnson-Wood et al., 同上) 、そしてAPP- アッセイ用のレポーター抗体は、APPのアミノ酸605~611に対して生じたmAb16H9のビオチン化誘導体である。APP- /FLアッセイの感度の下限は約11ng/ml (150pM) であり (Johnson-Wood et al.) 、そしてAPP-

特異的アッセイの下限は22ng/ml(0.3nM)である。両APPアッセイについて、mAb8E5を96-ウェルEIAプレートのウェルにmAb 266について記載したように被覆した。精製した組換え分泌APP- を、APP- アッセイおよびAPP- /FLアッセイの参照標準として使用した(Esch et al., 同上)。5 M グアニジン中の脳ホモジネートサンプルを、ELISA検体希釈液(0.014M リン酸バッファー、pH7.4、0.6%ウシ血清アルブミン、0.05%チメロサル、0.5MN aCl、0.1%NP40)に1:10で希釈した。それらを次いで0.5M グアニジンを含有する検体希釈液で1:4に希釈した。希釈したホモジネートを次いで16,000×gでRTにて15秒間遠心した。APP標準およびサンプルを、プレートに2連のアリコートで加え、そしてRTで1.5時間インキュベーションした。ビオチン化レポーター抗体2H3または16H9をサンプルとRTで1時間インキュベーションした。検体希釈液で1:1000に希釈したストレプトアビジン - アリカリホスファターゼ(ベーリンガーマンハイム: Boehringer Mannheim)を、ウェル中でRTで1時間インキュベーションした。蛍光基質、4-メチル-ウンベリフェリル-ホスフェートをRTで30分間インキュベーションに加え、そしてプレートをCytofluortm 23 50蛍光計(ミリポア: Millipore)で365nmの励起および450nmの発光で読んだ。

10

### 【0332】

#### 7. 免疫組織化学

脳は40Cで3日間、4%パラホルムアルデヒド(PBS中)で固定し、そして次に1~7日間、4%で1%パラホルムアルデヒド、PBS中に切開するまで保存した。40ミクロン厚の冠状面区分をビプラトーム(vibratome)上でRTにて切断し、そして免疫組織化学処理前に、低温保護下(リン酸塩バッファー中の30%グリセロール、30%エチレングリコール)に - 20 で保存した。各脳について、背側海馬のレベルで連続する240μmの間隔により各々が分けられた6つの切片を、以下の1つの抗体と一晩インキュベーションした:(1)PBSおよび1%ウマ血清中に2μg/ml濃度に希釈されたビオチン化抗-A (mAb、3D6、ヒトA に特異的);または(2)PBSおよび1.0%ウマ血清中に3μg/ml濃度に希釈された、ヒトAPPに特異的なビオチン化mAb;または(3)0.25%TritonX-100および1%ウマ血清(Tri s-緩衝化生理食塩水、pH7.4(TBS)中)で1:500に希釈された、グリアの原線維性酸性タンパク質に特異的なmAb(GFAP;シグマケミカル社);または(4)0.25%TritonX-100および1%ウサギ血清(TBS中)で1:100に希釈された、CD11b、MAC-1抗原に特異的なmAb;または(5)0.25%TritonX-100および1%ウサギ血清(TBS中)で1:100に希釈された、MHCII抗原に特異的なmAb(ファミンゲン);または(6)PBS中の1%ウサギ血清で1:100に希釈された、CD43に特異的なmAb(ファミンゲン)または(7)PBS中の1%ウサギ血清で1:100に希釈された、CD45RAに特異的なラットmAb(ファミンゲン);または(8)PBS中の1%ウサギ血清で1:100に希釈された、CD45RBに特異的なラットモノクローナルA (ファミンゲン);または(9)PBS中の1%ウサギ血清で1:100に希釈された、CD45に特異的なラットモノクローナルA ;または(10)PBS中の1%ウサギ血清で1:100に希釈された、CD3eに特異的なビオチン化ポリクローナルハムスターA (ファミンゲン)または(11)PBS中の1%ウサギ血清で1:200に希釈された、CD3に特異的なラットmAb(セロテック; Serotec);または(12)1%正常ウマ血清を含有する1次抗体を欠くPBS溶液。

20

30

### 【0333】

上記1、2および6~12に掲げた抗体溶液と反応させた切片は、1.0%TritonX-100、0.4%過酸化水素(PBS中)でRTにて20分間前処理し、内因性のペルオキシダーゼをブロックした。それらを次いで1次抗体と4%で一晩インキュベーションした。3D6または8E5またはCD3emAbと反応させた切片は、次いでRTで1時間、PBS中で1:75に希釈したキット成分“A”および“B”を含む西洋ワサビペルオキシダーゼ-アビジン-ビオチン-複合体(Vector Elite Standard キット、ベクターラボズ(Vector Labs)、ベーリンガム、カリフォルニア州)と反応させた。CD45RA、CD45RB、CD45、CD3に特異的な抗体および1次抗体を含まないPBS溶液と反応した切片を、RTで1時間、PBSで1:75に希釈したビオチン化抗-ラットIgG(ベクター)と、またはPBSで1:75に希釈したビオチン化抗-マウスIgG(ベクター)と、それぞれインキュベーションした。切片を次いでRTで1時間、PBS中で1:75に希釈したキット成分“A”および“B”を含む西洋ワサビペルオキシダーゼ-アビジン-ビオチ

40

50

ン-複合体と反応させた (Vector Elite Standard キット、ベクターラボズ、ベーリンガム、カリフォルニア州)。

#### 【0334】

切片はRTで0.01%過酸化水素、0.05%3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)中にて発色させた。GFAP-、MAC-1-およびMHCII-特異的抗体とのインキュベーションのための切片は、0.6%過酸化水素によりRTで前処理し、内因性のペルオキシダーゼをブロックし、そして1次抗体と共に4で一晚インキュベーションした。GFAP抗体と反応した切片を、RTで1時間、TBSで1:200に希釈したウマで作成したビオチン化抗-マウスIgG(ベクターラボズ; Vectastain Elite ABCキット)と反応させた。次いで切片を1時間、TBSで1:1000に希釈したアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(ベクターラボラトリーズ; Vectastain Elite ABCキット)と反応させた。1次抗体としてMAC-1またはMHCII-特異的モノクローナル抗体とインキュベーションした切片は、続いてRTで1時間、TBSで1:200に希釈したウサギで作成したビオチン化抗-ラットIgGと反応させ、続いて1時間、TBSで1:1000に希釈したアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体とインキュベーションした。GFAP-、MAC-1-およびMHCII-特異的抗体とインキュベーションした切片は、次いでRTで0.05% DAB、0.01%過酸化水素、0.04%塩化ニッケル、TBSを用いて、それぞれ4および11分間処理することにより視覚化した。

10

#### 【0335】

免疫標識した切片をスライドガラスに乗せ(VWR、Superfrostスライド)、一晚風乾し、Propar(アナテック:Anatech)に浸し、そしてマウンティング媒質としてPermount(フ

20

#### 【0336】

A 斑をカウンター染色するために、GFAP-陽性切片のサブセットをSuperfrostスライドに乗せ、そして免疫組織化学的処理後に水性1%Thioflavin S(シグマ)中に7分間インキュベーションした。切片を次いで脱水し、そしてPropar中で清浄化し、そしてPermountを用いてカバースリップをかぶせた。

#### 【0337】

##### 8. 画像分析

ニコン(Nikon)Microphot-FX顕微鏡をCCDビデオカメラおよびソニー(Sony) Trinitron モニターに連結したVideometric 150 ImageSystem(オンコール社(Oncor, Inc.)、ゲチ

30

40

50

## 【 0 3 3 8 】

前述の発明は理解を明確する目的で詳細に記載してきたが、特定の修飾が前記の特許請求の範囲内で実施できることは明らかである。本明細書に引用したすべての公報および特許明細書は、それぞれが個別に記載しているものと同じ程度で、すべての目的のためにそれらの全部を引用により本明細書に編入する。

## 【 0 3 3 9 】

前述の記載から、本発明が多くの用途を提供することが明らかであろう。例えば本発明は、アミロイド形成性疾患の処置、予防または診断に、あるいは同じ用途の薬剤または診断用組成物の製造において、上記の A 沈着物に対する任意の抗体の使用を提供する。同様に本発明は、アミロイド形成性疾患の処置または予防に、あるいは同じ用途の薬剤の製造において、上記の A の任意のエピトープフラグメントの使用を提供する。

10

## 【 0 3 4 0 】

【表 2 5】

表1										
50%最大O.D.での力価										
凝集したA-Bを注射したマウス										
マウス100	マウス101	マウス102	マウス103	マウス104	マウス105	マウス106	マウス107	マウス108		
4	70000	150000	120000	1000	15000	50000	80000	100000		
6	15000	30000	55000	300	15000	15000	50000	60000		
8	20000	50000	50000	400	15000	18000	50000	60000		
10	40000	20000	50000	900	15000	50000	20000	40000		
12	25000	30000	40000	2700	20000	70000	25000	20000		
両免疫原についてPBSを注射したマウス										
1/100で										
PDAPPの月齢	マウス113	マウス114	マウス115	マウス116	マウス117					
6	< 4x bkg									
10	5 x bkg	< 4x bkg	< 4x bkg	< 4x bkg	< 4x bkg					
12	< 4x bkg									

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0341】

【図1】トランスジェニックマウスにA 1-42を注射した後の抗体力価である。

【図2】海馬のアミロイド負荷量。A -特異的抗体 3D6との反応性により定めたアミロイド斑に占有された海馬領域の面積の割合は、免疫反応した脳切片のコンピューターによる定量的画像分析により決定した。個々のマウスに関する値は、処置群により分けて示す。各群の水平線は、分布の中央値を示す。

【図3】海馬内の神経炎性ジストロフィー。ヒトAPP-特異的抗体 8E5との反応性により定

50

めたジストロフィー軸索により占有される海馬領域の面積の割合は、免疫反応した脳切片の定量的なコンピューターによる画像分析により決定した。個々のマウスに関する値は、AN01792-処置群およびPBS-処置対象群について示す。各群の水平線は、分布の中央値を示す。

【図4】夾板骨後皮質の星状細胞増加症。グリアの原線維性酸性タンパク質 (GFAP)-陽性星状細胞により占有される皮質領域の面積の割合は、免疫反応した脳切片の定量的なコンピューターによる画像分析により決定した。個々のマウスに関する値は処置群に分けて示し、そして水平線により示す。

【図5】0、14、0.4、1.2、3.7、11、33、100または300  $\mu$ g AN01792を含む8種の投与量範囲で免疫感作した後のA<sub>1-42</sub>に対する幾何平均抗体力価。

【図6】AN01792での免疫感作に対する抗体応答の動力学。力価は各群6匹の動物に関する値の幾何平均として表す。

【図7】PBS-およびAN01792-処置マウスにおける皮質のアミロイド負荷量の定量的画像分析。

【図8】PBS-およびAN01792-処置マウスにおける神経炎病状局面の負荷量の定量的画像分析。

【図9】PBS-およびAN01792-処置マウスにおける、星状細胞増加症により占有される夾板骨後皮質の割合の定量的画像分析。

【図10】AN01792-処置 (上パネル) およびPBS-処置 (下パネル) に由来する脾細胞のリンパ球増殖アッセイ。

【図11】皮質中の全A<sub>1-42</sub>レベル。フロイントアジュバントと組み合わせたA<sub>1-42</sub>またはAPP誘導体で免疫感作したマウスにおける各A<sub>1-42</sub>プロファイルの散布プロット。

【図12】皮質中のアミロイド負荷量を、A<sub>1-42</sub>ペプチド結合物1-5、A<sub>1-12</sub>およびA<sub>1-3-28</sub>; 完全長A<sub>1-42</sub>の凝集化AN01792 (A<sub>1-42</sub>) およびAN1528 (A<sub>1-40</sub>)で免疫感作したマウスおよびPBS-処置対照群に関して免疫反応した脳切片の定量的画像分析により決定した。

【図13】フロイントアジュバントと組み合わせたA<sub>1-42</sub>またはAPP誘導体で免疫感作したマウス群に関するA<sub>1-42</sub>-特異的抗体の幾何平均力価。

【図14】種々のアジュバントと組み合わせたAN1792またはそれらのパルミトイル化誘導体で免疫感作したモルモット群に関するA<sub>1-42</sub>-特異的抗体の幾何平均力価。

【図15A】種々のアジュバントを含むAN1792またはAN1528で処置した12月齢のPDAPPマウスの皮質中のA<sub>1-42</sub>レベル。

【図15B】種々のアジュバントを含むAN1792またはAN1528で処置した12月齢のPDAPPマウスの皮質中のA<sub>1-42</sub>レベル。

【図15C】種々のアジュバントを含むAN1792またはAN1528で処置した12月齢のPDAPPマウスの皮質中のA<sub>1-42</sub>レベル。

【図15D】種々のアジュバントを含むAN1792またはAN1528で処置した12月齢のPDAPPマウスの皮質中のA<sub>1-42</sub>レベル。

【図15E】種々のアジュバントを含むAN1792またはAN1528で処置した12月齢のPDAPPマウスの皮質中のA<sub>1-42</sub>レベル。

【図16】A<sub>1-42</sub>に対するポリクローナル抗体で処置したマウスの平均力価。

【図17】A<sub>1-42</sub>に対するモノクローナル抗体10D5で処置したマウスの平均力価。

【図18】A<sub>1-42</sub>に対するモノクローナル抗体2F12で処置したマウスの平均力価。

【図19】エピトープマップ：拘束されたN-末端応答。カニクイザルに由来する175日の血清は、完全なAN01792配列を網羅する一連の10-mer重複ペプチド (配列番号：1-41) に対して、ELISAにより試験した。動物番号F10920Mは、免疫感作の抗原として使用したAN1792ペプチドのアミノ酸1-10を網羅するペプチドDAEFRHDSGY (配列番号：9) に対する各々のN-末端拘束応答を示す。

【図20】エピトープマップ：非-拘束N-末端応答。カニクイザルに由来する175日の血清は、完全なAN01792配列を網羅する一連の10-mer重複ペプチド (配列番号：1-41)

10

20

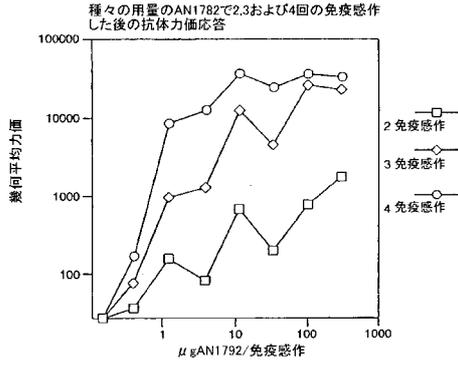
30

40

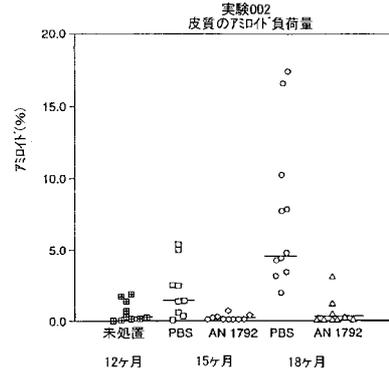
50



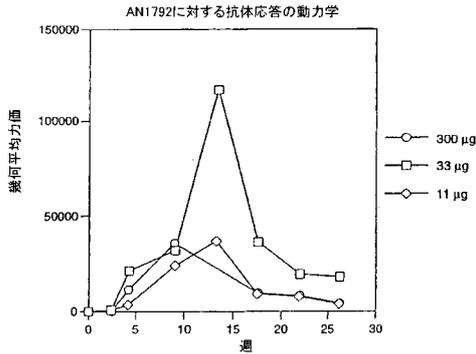
【 図 5 】



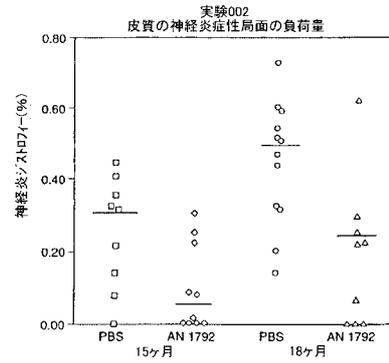
【 図 7 】



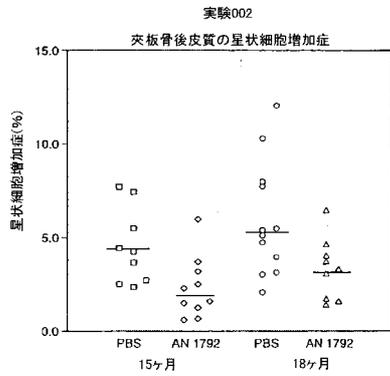
【 図 6 】



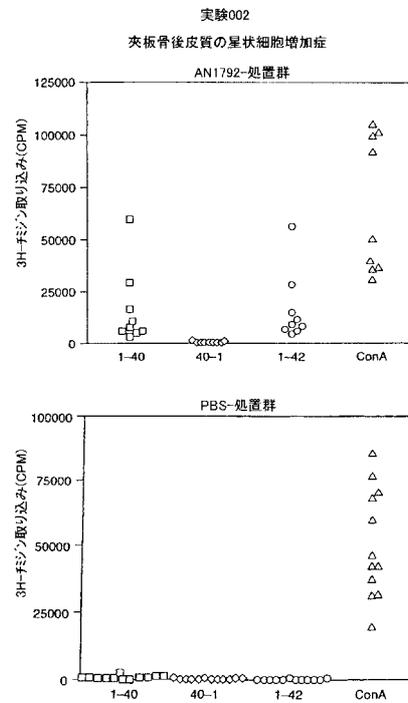
【 図 8 】



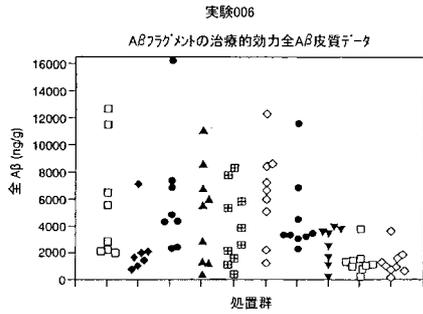
【 図 9 】



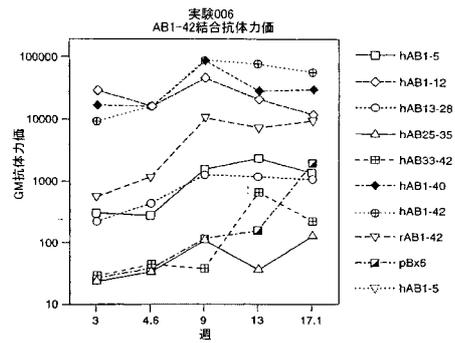
【 図 10 】



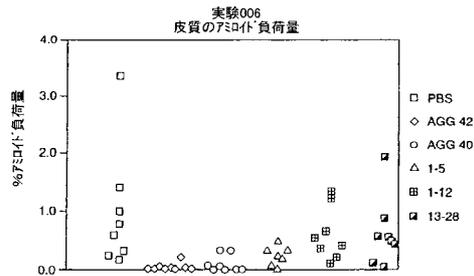
【 図 1 1 】



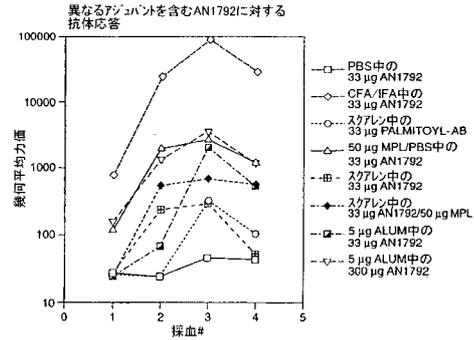
【 図 1 3 】



【 図 1 2 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 A 】

皮膚		未処置対照	
対照			
624-165	272	764-181	3470
625-166	1602	785-182	171
626-167	62	786-183	91
633-168	4696	767-184	6692
634-169	3090	768-185	1353
671-170	2417	771-186	1153
672-171	2840	772-187	3800
829-172	3320	780-188	3740
830-173	1833	843-189	163
831-174	416	844-190	122
792-175	126	845-191	427
793-176	2559	846-192	2674
794-177	289	887-193	453
732-178	179	888-194	2996
733-179	1329	889-195	1075
734-180	5665		
中央値	1817	中央値	1153
p値 (M-W)		p値(M-W)	
平均	1931	平均	1825
標準偏差	1718	標準偏差	1769
% CV	89	% CV	97
p値 (t 試験)		p値 (t 試験)	
	n=16		n=15

【 図 1 5 B 】

皮膚			
2 mg ALUM 100 µg AN1528		50 µg MPL 100 µg AN1528	
660-083	295	643-105	385
661-084	3180	644-106	2640
662-085	2480	645-107	2403
663-086	3014	654-108	1741
664-087	5870	655-109	3053
665-088	5978	656-110	5990
693-089	1620	678-111	3360
694-090	35	679-112	1230
695-091	3400	704-114	2680
697-092	2630	705-115	78
698-093	983	706-116	1290
699-094	5327	729-117	3180
701-095	1862	730-118	1833
702-096	1849	731-119	4590
703-097	2239	736-120	1112
739-098	806	737-121	1653
740-099	5303	757-122	992
741-100	459	758-123	4692
800-103	154	808-124	785
801-104	852	809-125	244
		810-126	32
中央値	2051	中央値	1741
p値 (M-W)		p値 (M-W)	
平均	2407	平均	2140
標準偏差	1913	標準偏差	1659
% CV	79	% CV	78
p値 (t 試験)		p値 (t 試験)	
	n=20		n=21

【 図 1 5 C 】

皮膚

25 µg QS21 100 µg AN1528		CEA/FA 100 µg AN1792	
615-128	1257	539-068	693
616-129	361	640-069	508
617-130	1008	641-070	440
536-131	3290	642-071	467
637-132	2520	690-072	42
638-133	3880	691-073	2491
744-134	627	692-074	121
745-135	56	795-075	137
746-136	2610	796-076	822
747-137	1509	797-077	475
769-138	1788	748-087	600
770-139	988	749-079	78
773-140	1199	750-080	1267
774-141	339	751-081	1351
775-142	402	761-082	69
776-143	537		
840-144	1119		
841-145	194		
821-146	1259		
822-147	5413		
823-148	2233		
中央値 p値 (M-W)	1199	中央値 p値 (M-W)	475 0.0481
平均 標準偏差 % CV p値 (t 試験)	1552 1364 88 n=21	平均 標準偏差 % CV p値 (t 試験)	637 655 103 0.0106 n=15

【 図 1 5 D 】

皮膚

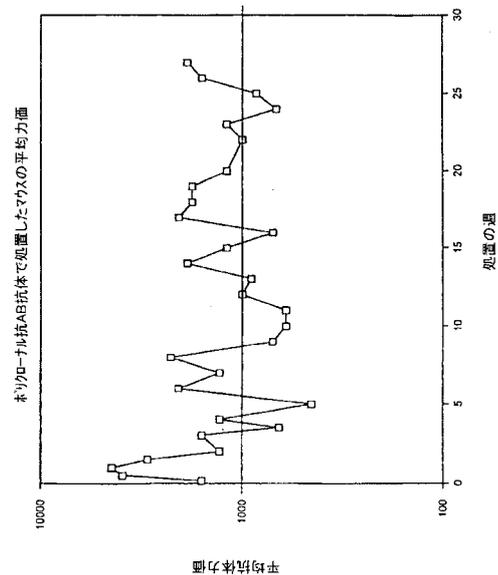
5 µg 7H7-1/PBS 10 µg AN1792		2 µg ALUM 100 µg AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
中央値 p値 (M-W)	1687	中央値 p値 (M-W)	1375 0.5000
平均 標準偏差 % CV p値 (t 試験)	2718 2685 99 n=15	平均 標準偏差 % CV p値 (t 試験)	1394 1166 84 0.2650 n=21

【 図 1 5 E 】

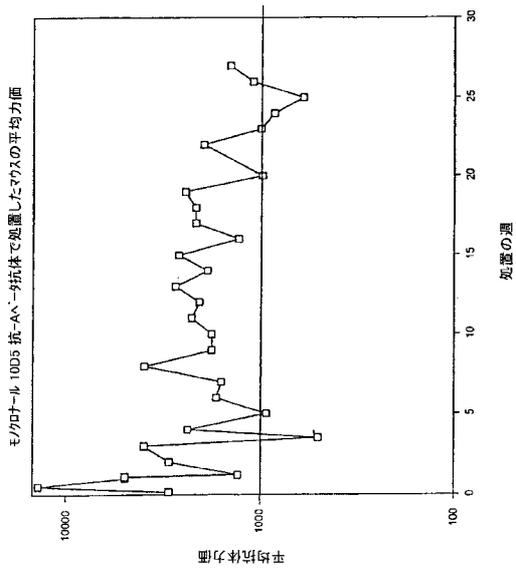
皮膚

50 µg MPL 100 µg AN1792		25 µg QS21 100 µg AN1792	
646-023	2002	627-045	91
647-024	147	628-046	3397
648-025	1304	631-049	3702
649-026	34	632-050	1776
650-027	980	667-052	1832
724-028	1282	668-053	3023
726-030	1966	686-054	189
727-031	733	687-055	891
720-032	2563	688-056	240
721-033	5563	689-057	110
802-034	113	712-059	3311
803-035	671	825-061	1009
804-036	51	826-082	18165
811-037	613	827-063	73
812-038	332	829-064	78
813-039	1454	837-065	1051
814-040	2441	838-066	270
833-014	742	839-067	371
834-042	40		
836-044	807		
中央値 p値 (M-W)	774 0.1710	中央値 p値 (M-W)	950 0.4076
平均 標準偏差 % CV p値 (t 試験)	1192 1299 109 0.1506 n=21	平均 標準偏差 % CV p値 (t 試験)	2199 4187 190 0.8131 n=18

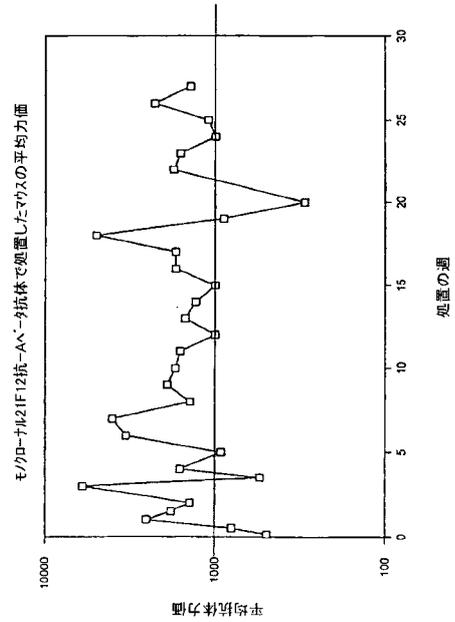
【 図 1 6 】



【 図 17 】

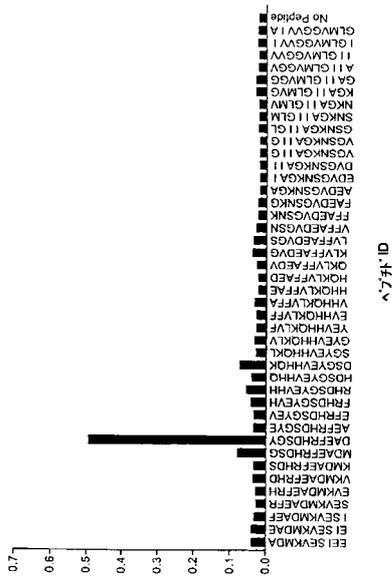


【 図 18 】



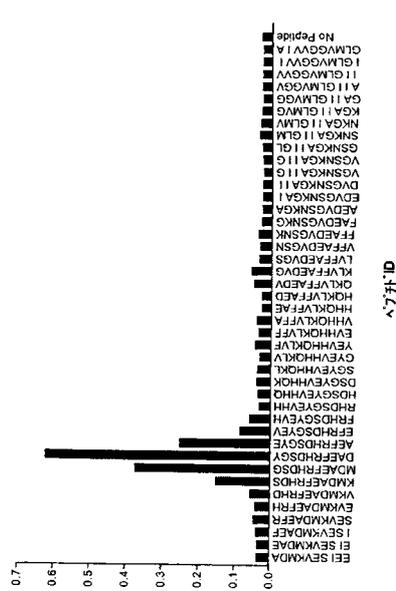
【 図 19 】

群9: F10920M, 300μg AN1792 + 100μg QS21  
投与スケジュール2力値=84,484 (8に標準化)



【 図 20 】

群11: F10975F, 300μg AN1792 + 100μg QS21  
投与スケジュール3力値=38,632(8に標準化)



【配列表】

2007269804000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K	14/33	(2006.01)	C 0 7 K	14/33	
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06	
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K	7/08	

(72)発明者 ニキ・ジエイ・バスケス  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 1 4 サンフランシスコ・サンチエスストリート 3 1 0

(72)発明者 テッド・ノエドノク  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 9 3 3 フォレストノルズ・アロヨロード 1 8 4

Fターム(参考) 4C076 EE41 EE59  
4C084 AA02 BA44 MA05 NA14 ZA16  
4C085 AA15 EE06 FF02 FF03  
4H045 AA11 AA30 BA10 BA13 BA16 BA18 BA19 CA40 DA86 EA20  
FA71 GA22 GA26

专利名称(译)	用于预防和治疗淀粉样蛋白形成疾病的药物制剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007269804A</a>	公开(公告)日	2007-10-18
申请号	JP2007139180	申请日	2007-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	Niyu香格里拉拉爱Rimite每次		
申请(专利权)人(译)	Niyurarabu-Rimitetsudo		
[标]发明人	デイルビーシエンク フレデリクバード ニキジエイバスケス テツドノエドノク		
发明人	デイル・ビー・シエンク フレデリク・バード ニキ・ジエイ・バスケス テツド・ノエドノク		
IPC分类号	A61K38/00 A61P25/28 A61K47/48 A61K47/42 A61K39/395 C07K14/33 C07K7/06 C07K7/08 G01N33/50 A61K38/17 A61K38/19 A61K39/00 A61K39/39 A61K48/00 A61K49/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K38/193 A61K39/00 A61K39/0005 A61K39/0007 A61K2039/505 A61K2039/53 A61K2039/55505 A61K2039/55555 A61K2039/55566 A61K2039/55572 A61K2039/55577 A61K2039/6037 A61K2039/605 A61P25/00 A61P25/28 C07K14/4711 C07K16/18 C07K2317/34 C07K2317/70 C07K2317/77 C07K2319/00 G01N2800/2821 Y02A50/412 A61K2300/00		
FI分类号	A61K37/02.ZNA A61P25/28 A61K47/48 A61K47/42 A61K39/395.D C07K14/33 C07K7/06 C07K7/08 A61K38/00 A61K47/50 A61K47/64 A61K47/68		
F-TERM分类号	4C076/EE41 4C076/EE59 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/MA05 4C084/NA14 4C084/ZA16 4C085/AA15 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/FF03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA13 4H045/BA16 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA71 4H045/GA22 4H045/GA26		
优先权	09/322289 1999-05-28 US		
其他公开文献	JP5039432B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供改善的药剂和方法，用于治疗患者脑中与Aβ淀粉样蛋白沉积相关的疾病。提供了一种药物制剂，用于治疗与患者脑中Aβ的淀粉样沉积物相关的疾病，所述疾病包含诱导对淀粉样沉积物的有益免疫原性应答的活性成分。这些活性成分包括Aβ的N-末端片段和与其结合的抗体。【选择图】无

月龄	未処置			PBS		AN1792	
	全	AB42	(n)	全	AB42 (n)	全	AB42 (n)
12	15,500	11,100	(10)				
15	51,500	44,400	(10)	40,100	35,70	(9)	24,50 22,100 (10)
18	80,800	64,200	(10)	65,400	57,10	(12)	50,90 38,900** (9)

\* p=0.0105

