

(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2007-77103

(P2007-77103A)

(43) 公開日 平成19年3月29日(2007.3.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18 Z N A	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2005-269545 (P2005-269545)	(71) 出願人	505155528 公立大学法人横浜市立大学 神奈川県横浜市金沢区瀬戸2番2号
(22) 出願日	平成17年9月16日(2005.9.16)	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
		(72) 発明者	田村 友一 富山県富山市弥生町1-8-19
		(72) 発明者	浜島 健治 神奈川県三浦市南下浦町上宮田1387-2-304
		(72) 発明者	松井 清彦 神奈川県座間市さがみ野3-6-14-503
		(72) 発明者	奥田 研爾 神奈川県横浜市磯子区洋光台4-6-35 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の予防又は治療剤

(57) 【要約】

【課題】 副作用が低減され、それにもかかわらず高い予防又は治療効果を発揮することができる、アルツハイマー病の予防又は治療剤を提供すること。

【解決手段】 アルツハイマー病の予防又は治療剤は、抗 - アミロイドペプチド抗体の F(ab')<sub>2</sub> フラグメント又は該フラグメントの一部であって少なくともその可変領域を含む断片若しくは該断片の結合物であって - アミロイドペプチドとの結合能を維持するものを有効成分として含有する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗 - アミロイドペプチド抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメント又は該フラグメントの一部であって少なくともその可変領域を含む断片若しくは該断片の結合物であって - アミロイドペプチドとの結合能を維持するものを有効成分として含有する、アルツハイマー病の予防又は治療剤。

## 【請求項 2】

抗 - アミロイドペプチド抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを有効成分として含有する請求項 1 記載の予防又は治療剤。

## 【請求項 3】

前記抗 - アミロイドペプチド抗体はモノクローナル抗体である請求項 1 又は 2 記載の予防又は治療剤。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、アルツハイマー病の予防又は治療剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

脳内に - アミロイドペプチド（以下、「A」ということがある）プラークが形成されることがアルツハイマー病の特徴である神経変性において中心的な役割を果たしている（非特許文献 1、2）。A ペプチドの能動免疫や抗 A モノクローナル抗体（以下、モノクローナル抗体を「mAb」と記載することがある）を全身投与することにより、マウスアルツハイマー病モデルにおいてアミロイドの沈着を減少させることができ（非特許文献 3～6）、認知行動が改善される（非特許文献 7、8）ことが報告されている。さらに、より最近、抗 A 抗体を脳室内投与することにより、アルツハイマー病のモデルである Tg マウスにおいて、脳内のアミロイド沈着及びそれに付随する神経病理学的症状が低減されることが報告された（非特許文献 9）。

20

## 【0003】

【非特許文献 1】Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279-282.

30

【非特許文献 2】Hyman BT. 1998. New neuropathological criteria for Alzheimer disease. *Arch. Neural.* 55:1174-1176.

【非特許文献 3】Schenk D, Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko., D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yendnock, T., Games, D., Seubert, P. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400.

40

【非特許文献 4】Bard F, Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberberg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B. 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid b-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 6:916-919.

【非特許文献 5】DeMattos RB, Bales, K.R., Cummins, D.J., Dodart, J.C., Paul, S.M., Holtzman, D.M. 2001. Peripheral anti-Aβ antibody alters CNS and plasma Ab clearance and decreases brain Ab burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:8850-8855.

50

【非特許文献6】Bard F, Barbour, R., Cannon, C., Carretto, R., Fox, M., Games, D., Guido, T., Hoenow, K., Hu, K., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, C., Lee, M., Motter, R., Nguyen, M., Reed, A., Schenk, D., Tang, P., Vasquez, N., Seubert, P., Yednock, T. 2003. Epitope and isotype specificities of antibodies to beta-amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuro pathology. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 100:2023-2028.

【非特許文献7】Dodart JC, Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R. B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M., Paul, S.M. 2002. Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. Nat. Neurosci. 5:452-457.

10

【非特許文献8】Schenk D, Yednock, T. 2002. The role of microglia in Alzheimer's disease: Neurobiol Aging 23:677-679.

【非特許文献9】Chauhan NB, Siegel GJ. 2003. Intracerebroventricular passive immunization with anti-Ab antibody in Tg2576. J. Neurosci. Res 74:142-147.

【非特許文献10】Check E. 2002. Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. Nature 415:462.

【非特許文献11】Hock C, Konietzko, U., Parassotiropoulos, A., Wollmer, A., Streffer, J., Von Rotz, R.C., Davey, G., Moritz, E., Nitsch, R.M. 2002. Generation of antibodies specific for beta-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. Nat. Med. 8:1270-1275.

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、上記した能動免疫又は受動免疫によるアルツハイマー病の予防又は治療は、副作用がある。能動免疫については、治験まで行なわれたが、一部の患者で髄膜脳炎が起き、治験は中止された（非特許文献10、11、8）。

【0005】

従って、本発明の目的は、副作用が低減され、それでいて高い予防又は治療効果を発揮することができる、アルツハイマー病の予防又は治療剤を提供することである。

【課題を解決するための手段】

30

【0006】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、抗A $\beta$ モノクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントが、抗A $\beta$ モノクローナル抗体と同様の優れた予防又は治療効果を発揮するにもかかわらず、副作用の炎症が低減されることを見出し本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明は、抗 $\beta$ -アミロイドペプチド抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメント又は該フラグメントの一部であって少なくともその可変領域を含む断片若しくは該断片の結合物であって $\beta$ -アミロイドペプチドとの結合能を維持するものを有効成分として含有する、アルツハイマー病の予防又は治療剤を提供する。

【発明の効果】

40

【0008】

本発明により、高い予防又は治療効果を発揮することができ、それでいて副作用が低減された新規なアルツハイマー病の予防又は治療剤が提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

上記の通り、本発明のアルツハイマー病の予防又は治療剤は、抗 $\beta$ -アミロイドペプチド抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメント又は該フラグメントの一部であって少なくともその可変領域を含む断片若しくは該断片の結合物であって $\beta$ -アミロイドペプチドとの結合能を維持するものを有効成分として含有する。ここで、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントの一部であって少なくともその可変領域を含む断片としては、FabフラグメントやFvフラグメントを例示する

50

ことができる。また、これらの結合物としては、scFvフラグメント、Fvフラグメントを2個～4個結合させた2価～4価抗体、Fabフラグメントを2個又は3個結合させたFab二量体及び三量体等を例示することができる。これらのフラグメントやその結合物は、抗体医薬の分野において周知である。また、抗体フラグメントは、遺伝子工学的手法によっても生産できるので、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント中の可変領域をそっくり含み、A との結合能を有するものであれば、遺伝子工学的手法により作製された任意の断片やその結合物を用いることも可能である。もっとも、これらのうち、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントが、薬効の観点から最も好ましい。

#### 【0010】

本発明に用いられるF(ab')<sub>2</sub>フラグメント等は、ポリクローナル抗体由来のものであってもよいが、薬効の再現性を高める観点からモノクローナル抗体由来のフラグメントが好ましい。抗A mAbは、A 又は抗原性を有するその断片を動物に免疫し、常法によりモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作出し、その培養上清や該ハイブリドーマを腹腔に投与した動物の腹水からモノクローナル抗体を回収することにより得ることができる。A の塩基配列及びアミノ酸配列は、公知であるので、A 又は抗原性を有するその断片は、ペプチド合成機や遺伝子工学的手法により容易に調製することができる。ヒトA のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。後述の実施例では、ヒトA (配列番号1)のN末端から1～42のアミノ酸残基から成るポリペプチド(配列番号2)をペプチド合成機により化学合成し、これを免疫原として動物に免疫した。なお、A の断片を免疫原として用いる場合には、十分な抗原性と特異性を確保するために、アミノ酸残基の数は20以上が好ましく、さらに好ましくは30以上である。モノクローナル抗体を得た後、酵素処理等の常法により有効成分として用いる抗体フラグメントを得ることができる。例えば、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、常法に従い、モノクローナル抗体をペプシンで処理することにより得られる。

10

20

#### 【0011】

本発明のアルツハイマー病の予防又は治療剤は、アルツハイマー病の予防及び治療の両方に有効である。なお、本発明において、「治療」には、軽症のアルツハイマー病がより重症に進行することを防止し、又はその進行速度を遅らせることも包含する。

#### 【0012】

本発明のアルツハイマー病の予防又は治療剤の投与経路は、特に限定されるものではないが、非経口投与が好ましく、特に静脈注射のような全身投与及び脳室内投与のような脳への局所投与が好ましい。投与量は、患者の症状や投与の目的(予防か治療か等)、有効成分の種類等により適宜設定されるが、通常、患者1人当たり、1日当たり有効成分の量として2.5mg～2500mg、好ましくは25mg～250mg程度である。

30

#### 【0013】

有効成分の抗体フラグメントは、医薬製剤分野で常用されている方法により製剤して本発明のアルツハイマー病の予防又は治療剤を調製することができる。例えば、有効成分の抗体フラグメントを、注射剤用の担体(例えばリン酸緩衝液等)に溶解して注射液に製剤することができる。注射液の場合、注射液中の抗体フラグメントの濃度は特に限定されないが、通常、250mg/L～2500mg/L程度が適当である。

40

#### 【0014】

下記実施例において具体的に示されるように、本発明のアルツハイマー病の予防又は治療剤は、全抗体を用いる公知の方法に匹敵する予防又は治療効果を発揮し、それでいて、炎症の指標となる、脳組織内に生じるCD11b陽性細胞の数は非常に少ない。従って、本発明のアルツハイマー病の予防又は治療剤は、公知の予防又は治療剤と同様な高い予防又は治療効果を発揮することができ、それでいて副作用が低減されている。

#### 【0015】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例】

50

## 【0016】

## 材料と方法

## A 特異的ハイブリド - マの作製

ヒトA<sub>1-42</sub>の1-42アミノ酸を含むペプチド(A<sub>1-42</sub>)を合成し、BALB/c マウス1匹当たり100 $\mu$ gにて3回の免疫を行った。すなわち、初回免疫は合成したペプチドにフロインドの完全アジュバンドを混合し行い、初回免疫から2週間の後、ペプチドにフロインドの不完全アジュバンドを混合し追加免疫を行った。追加免疫から3週間の後、ペプチドのみにて最終免疫を行った後、A<sub>1-13</sub>に対する血清中の抗体価が高力価のマウスの脾臓を摘出した。摘出した脾臓よりリンパ球を採取し、常法により細胞融合を行い抗A<sub>1-13</sub>抗体産生ハイブリド - マ細胞を作製した。

10

## 【0017】

抗A<sub>1-42</sub>抗体産生ハイブリド - マ細胞の培養

抗A<sub>1-13</sub>抗体産生ハイブリド - マ細胞(以下IIA2と略)はKBM 450 (Kohjin Bio Co., Ltd, Saitama, Japan)無血清培地にて培養を行った。培養後、培養上清を回収し、硫酸アンモニウムにて塩析沈殿を行って培養上清中の抗A<sub>1-13</sub>抗体を粗精製した。粗精製した抗体はImmunopure F(ab')<sub>2</sub> preparation kit (Pierce Biotechnology, Rockford IL, USA)を用いてF(ab')<sub>2</sub>フラグメントとpFc'フラグメント(全抗体をペプシン処理して得られる、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントと異なるもう一方のフラグメント)の精製を行った。すなわち、5mg/mlになるように調整したサンプル1 mlはペプシンにて37 $^{\circ}$ C、6 hにて切断を行った。切断後、反応液をProtein AカラムにてF(ab')<sub>2</sub>とpFc'および切断されなかったIgGの分離を行った。このうち、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントはカラムから回収し、カットオフ分子量50,000 (MWC0: 50,000, Spectrum Medical Industries, Inc. CA, USA)のチューブを用いてリン酸緩衝液(PBS)に対して透析した。ペプシンで切断されなかったIgGとpFc'フラグメントはSephadex G-200カラム(商品名)にて分離を行った。これら精製したF(ab')<sub>2</sub>とpFc'をin vivoの実験に用いた。

20

## 【0018】

## ELISA

ハイブリド - マ細胞の培養上清中の抗A<sub>1-13</sub>抗体の測定にはELISAを用いて行った。ELISAは奥田らの方法(Okuda K, Kaneko T. 1993. Strong synergistic effects of polyvalent vaccine using synthetic peptide for human immunodeficiency virus. AIDS Res Hum Retrov 9 Suppl:S114; Okuda K, Bukawa H, Kawamoto S, Imai M, Saito T, Phanuphak P, Hamajima K. 1994. A serologic analysis and the amino acid sequence of the V3 region of human immunodeficiency virus from carriers in Bangkok. J Infect Dis 169:227-228.)に従って行った、すなわち、96穴のマイクロタイタ - プレ - トに0.15M PBSにて溶解した40 $\mu$ g/mlのA<sub>1-42</sub>ペプチドと陰性コントロールとしてHIVIIIB envペプチド(IRIQRGPGRAFVTIGKIGN)およびミオグロビンペプチド(ISEAIIHVLHSRHP)を固相化した。固相化したプレ - トはPBSにて洗浄し、3%ウシ血清アルブミン(BSA)にて1hブロッキングを行った。ブロッキングが終了した後、ハイブリド - マ細胞の培養上清と4 $^{\circ}$ Cにて6 h反応させた。反応終了後、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識した抗マウスIgG (Pierce Chemicals)と反応させて検出を行った。

30

40

## 【0019】

動物の免疫に用いたA<sub>1-42</sub>又はその部分ペプチドを被覆したビーズと、抗A<sub>1-13</sub>mAbとをインキュベートしてmAb吸着実験を行なった。ペプチド被覆ビーズは、mAbと4 $^{\circ}$ Cにて12時間反応させた。上記HIVペプチド又はミオグロビンペプチドを対照に用いた。次いで抗体力価をELISAにより測定した。

## 【0020】

## トランスジェニックマウスを用いたIn vivo 治療実験

ヒトのA $\beta$ を発現するTg 2576マウス(Hsiao K, Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G. 1996. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science 274:99-102.)

50

はTaconic Farms Inc. (German Town, NY, USA)より入手した。生後65週齢のマウスに0.5 mg/mlに調整した(溶媒はダルベッコズ PBS(-)、以下同様)0.5 mlのp-A mAb(以下、「p-」は精製、「p-p」は部分精製を意味する)、p-F(ab')<sub>2</sub> および p-pFc'(それぞれ、1群を6から7匹)を腹腔内に投与し治療を行った。これらのマウスが80週齢になった時点で脳を摘出した。さらに、60-70週齢と75-85週例のマウスについても同様に治療を行った。摘出した脳の左側を免疫染色に右側をELISAによる脳内のA 量の測定に用いた。

#### 【0021】

さらに、脳内の左右における前頭皮質に0.5 mg/mlに調整したp-A mAb, p-F(ab')<sub>2</sub>および p-pFc'の0.02 mlを直接注入し治療を行った。治療後、5日間経過したマウスの左半球はクリオスタットミクロトームにて切片を作製、右半球はA 量の測定に用いた。

10

#### 【0022】

##### マウスの脳検体の調整

摘出した脳の左半球はTissue-Tek OCT Compound(商品名、Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan)に埋め込み、右半球は小脳を取り除いた。これらの脳はドライアイス-アセトンにて急速に凍結し、使用時まで-80℃にて保存した。

#### 【0023】

##### メセナミン銀染色

脳内の海馬と大脳皮質におけるA の検出にはメセナミン銀染色を用いた。染色はHagaら方法に従って行い、同時にニッスル染色も行った。

#### 【0024】

##### 脳内A の蛍光染色

モノクローナル抗体にて治療を行ったマウスの左脳を摘出し凍結切片をクリオスタットにて作製し、A の蛍光染色を行った。蛍光染色は内因性の非特異反応をブロックするためアビジン/ビオチンブロッキング・キット(NICHIREI CORPORATION, Tokyo, JAPAN)を用いた。その後、抗ヒトA<sub>1-42</sub>ウサギ抗体(ABL Co., Ltd. Gunma, Japan)、ビオチン標識抗ウサギIgG抗体(MBL Co., Ltd. Nagoya, Japan)およびストレプトアビジン蛍光色素(FITC)(MBL Co., Ltd.)を用いて行った。同時に、自家調整したFITC標識A<sub>1-42</sub>ウサギIgG抗体による直接染色も行った。蛍光染色を行った後、高感度CCDカメラを搭載した共焦点レーザー走査顕微鏡(Carl Zeiss LSM510)を接続したOLYMPUS microscope BX60にて観察を行った。また、A<sub>1-42</sub>と同時にミクログリア細胞(Microglial cells)の染色を抗マウスCD11b(Mac-1)、PE(phycoerythrin、Ebioscience Inc. CA, USA)標識したモノクローナル抗体およびPE-抗マウスI-A<sup>b</sup>MHC Class II抗体(ebioscience Inc. CA, USA)を用いて行った。

20

30

#### 【0025】

##### ELISAによる脳内A 蛋白の測定

脳内のA 蛋白レベルを測定するため、ELISAを行った。ELISAはKawarabayashiらの方法(Kawarabayashi T, Younkin, L.H., Saido, C.T., Shoji, M., Hsiao, K., Younkin, S. 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and Plasma Amyloid b protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. J. Neurosci. Res 21:372-381.)に従って行った。すなわち、凍結した右脳は超音波にて破碎し遠心した。遠心後、沈渣を再度超音波にて破碎し、1% triton x-100(商品名)を含むトリス緩衝液を加えた。抽出したA は2%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)および70%ギ酸(FA)にて溶解した。溶解後、A 蛋白はヒトAmyloid 測定キット(ABL Co., Ltd. Gunma, JAPAN)を用いて定量を行った。

40

#### 【0026】

A F(ab')<sub>2</sub> の腹腔内投与後における脳内のA プラークの抗A F(ab')<sub>2</sub>フラグメントの結合の検出

腹腔内に投与したA F(ab')<sub>2</sub> が脳内に移行できるか検討を行った。検討には、A モノクローナル抗体(IIA2)より作製したF(ab')<sub>2</sub>フラグメントはビオチン標識(Biotinyl-N-hydroxysuccinimide, COSMO BIO CO., LTD Tokyo, Japan)を用いて行った。すなわち、1mg/

50

mlに調整した精製フラグメントの1 mlを0.1 Mの炭酸ナトリウムに溶解し、1 mg/mlの DMSO 60  $\mu$  lと混合した。混合した精製フラグメントとDMSOは、室温にて4 h 攪拌を行った。攪拌後、混合液は終濃度が1mg/mlになるように PBSにて調整し、60週齢のTg2576 マウスに0.5ml腹腔内に投与を行った。投与後、4時間経過したマウスの脳を摘出し凍結切片を作製した。この切片をストレプトアビジンFITCにて処置し蛍光顕微鏡下にて脳内のA の検出を行った。

【0027】

結果

Tg2576 マウスの脳内における A の分布

ヒトのアルツハイマー病を発現する遺伝子導入Tg2576 マウスの脳内における A プラークの分布を図1に示した。80週齢のマウスにおいては脳内の海馬および大脳皮質に多くのA プラークが認められた。

10

【0028】

ハイブリドーマ細胞から誘導した抗A モノクローナル抗体IIA2の解析

抗A モノクローナル抗体 (mAb) IIA2の解析ELISA の結果より作製したmAbはA<sub>1-42</sub> と A<sub>1-13</sub> ペプチドに反応する結果が得られた。しかしながら、A<sub>13-28</sub>、A<sub>28-42</sub> ペプチドおよびA とは関係ない蛋白には反応が見られなかった(表1)。さらに、mAbがA蛋白のN末端領域であるA<sub>1-13</sub>を固相化したビーズに特異的に反応したがA蛋白全領域には反応性は見られなかった(表2)。これらの結果より、ハイブリドーマ細胞から誘導した抗A モノクローナル抗体IIA2はA蛋白のN末端側の13アミノ酸に対して特異性があるものと示唆された。さらに、このmAbのアイソタイプはIgG1であった(データ示さず)。

20

【0029】

【表1】

表1 ハイブリドーマIIA2からの抗A $\beta$ -mAbの結合特異性

固相化ペプチド	抗体結合(波長490nmの吸光度)
A $\beta$ <sub>1-42</sub>	2.26
A $\beta$ <sub>1-13</sub>	1.93
A $\beta$ <sub>13-28</sub>	0.02
A $\beta$ <sub>28-42</sub>	0.01
HIV env ペプチド	0.03
ミオグロビンペプチド	0.02

30

【0030】

【表2】

表2 ペプチド吸着により測定された抗A $\beta$ -mAbの特異性

吸着に用いたビーズ	抗マウスIgG結合(波長405nmの吸光度)
無処理ビーズ	2.45
A $\beta$ <sub>1-42</sub> 被覆ビーズ	0.04
A $\beta$ <sub>1-13</sub> 被覆ビーズ	0.06
A $\beta$ <sub>13-28</sub> 被覆ビーズ	2.15
A $\beta$ <sub>28-42</sub> 被覆ビーズ	2.01
HIV env ペプチド被覆ビーズ	2.21
ミオグロビンペプチド被覆ビーズ	1.95

40

【0031】

上記の通り、mAb およびmAbから作製したF(ab')<sub>2</sub> を投与した80週齢のTg 2576マウスにおける脳内のA に対する親和性を調べた。すなわち、該80週齢のTg 2576マウスの切片を、10  $\mu$ g/mLの(A)IIA2培養液、(B)精製A<sub>1-42</sub>-mAb、(C)精製F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、(D)精製pFc'フラグメント又は(E)対照血清とインキュベートした。結合を、FITC結合第2抗体で逆染色し、顕微鏡観察(倍率200倍)して検出した。

50

## 【0032】

その結果、(B)及び(C)では多数のプラークが蛍光染色された。(A)では(B)及び(C)よりは明らかに少ないが蛍光染色されたプラークが観察された。(D)及び(E)では蛍光はほとんど観察されなかった。このことから、 $F(ab')_2$ フラグメントは、全モノクローナル抗体と同様、脳内のA<sub>β</sub>によく結合することが明らかになった。

## 【0033】

Tg 2576 マウスを用いたmAbのA<sub>β</sub>に対する治療効果

65週齢のTg 2576マウスに毎週1回250 $\mu$ gのp-A<sub>β</sub>-mAb、p-F(ab')<sub>2</sub>又はpFc'を腹腔内投与した後、80週齢においてマウスの脳を摘出して脳内のA<sub>β</sub>を調べた。A<sub>β</sub>の沈着を、脳の左半球から調製した脳組織の免疫組織化学染色により調べた。倍率200倍で顕微鏡観察した。その結果、無処置のマウス及びpFc'を投与したマウスでは、多量のA<sub>β</sub>の沈着が観察されたが、p-A<sub>β</sub>-mAb又はp-F(ab')<sub>2</sub>を投与したマウスでは、染色された部分はほとんど認められず、A<sub>β</sub>の沈着がほとんど見られなかった。これにより、 $F(ab')_2$ フラグメントも、全抗体と同様、アルツハイマー病の治療効果を有することが確認された。

10

## 【0034】

p-A<sub>β</sub>-mAb、p-F(ab')<sub>2</sub>又はp-pFcにて治療したマウスの脳内のSDS可溶化A<sub>β</sub><sub>1-40</sub>とA<sub>β</sub><sub>1-42</sub>についてELISAを用いて定量した結果を図2Aに示した。p-A<sub>β</sub>-mAbで治療したマウスでは何も治療していないマウスと比較してA<sub>β</sub><sub>1-40</sub>とA<sub>β</sub><sub>1-42</sub>はそれぞれ90.1%と80.4%( $p < 0.01$ )の減少が見られた。同様に、p-F(ab')<sub>2</sub>で治療したマウスはA<sub>β</sub><sub>1-40</sub>とA<sub>β</sub><sub>1-42</sub>が92.8%と90.8%( $p < 0.01$ )の減少が見られた。しかしながら、p-pFcを投与したマウスでは治療効果が殆ど見られなかった。一方、ギ酸で処理した不溶化A<sub>β</sub><sub>1-40</sub>とA<sub>β</sub><sub>1-42</sub>の結果については図2Bに示したとおりである。可溶化A<sub>β</sub>と同様な結果が観察された。これらの結果からも、 $F(ab')_2$ フラグメントも、全抗体と同様、アルツハイマー病の治療効果を有することが確認された。

20

## 【0035】

Tg 2576 マウスの脳内に直接mAbを注入した治療効果

60-70週齢のTgマウスの脳内に一度だけ10 $\mu$ gのp-A<sub>β</sub>-mAb、p-F(ab')<sub>2</sub>又はp-pFcを注入し、アミロイドの沈着を調べた。p-A<sub>β</sub>-mAbを投与した場合、アミロイドプラーク形成は劇的に少なくなったが、p-A<sub>β</sub>-mAbではCD11b陽性細胞が多く観察された。一方、p-F(ab')<sub>2</sub>を注入した後も同様なパターンが観察されたが、この時はCD11b陽性細胞は殆ど観察されなかった。p-pFcでは、治療効果が認められないにも関わらずCD11b陽性細胞が活性化された。さらに、共焦点顕微鏡による観察では、CD11b陽性細胞ばかりでなくミクログリア細胞(microglial cell)も同様に観察された(データ示さず)。

30

## 【0036】

A<sub>β</sub>-mAbの治療によって脳内のアミロイドが排除された効果を2% SDS可溶化A<sub>β</sub>によって定量した結果を図3Aに示した。p-A<sub>β</sub>-mAbおよびp-F(ab')<sub>2</sub>を一度だけ脳室内注入したマウスではA<sub>β</sub><sub>1-40</sub>とA<sub>β</sub><sub>1-42</sub>のいずれにおいても効果が認められた。一方、p-pFc'を注入したマウスでは脳内のA<sub>β</sub><sub>1-40</sub>とA<sub>β</sub><sub>1-42</sub>のいずれにおいても効果は認められなかった。75-85週齢のマウスについても検討を行ったところ同様な結果が得られた(図3B、図3C、図3D)。

40

## 【0037】

抗A<sub>β</sub>- $F(ab')_2$ の腹腔内投与後に抗A<sub>β</sub>- $F(ab')_2$ が血液-脳関門(BBB)を通過しA<sub>β</sub>を排除できるかの検討

検討には、80週齢のADマウスを用い、抗A<sub>β</sub>フラグメント(0.8mg/ml)の腹腔内投与を行った。投与後、4時間を経過したマウスの脳の凍結切片を作製し蛍光染色を行った。染色には、抗ヒトA<sub>β</sub><sub>1-42</sub>ウサギ抗体、ビオチン標識抗ウサギIgG抗体とストレプトアビジンFITC抗体を用いた。蛍光染色の結果、腹腔内に投与した抗A<sub>β</sub>- $F(ab')_2$ がマウスの脳内のA<sub>β</sub>と結合していることが確認された。さらに、非特異的な染色であるか確認するためビオチン標識抗ウサギIgG抗体をストレプトアビジンFITCで処理したところ蛍光が見られなかった。このことから、抗A<sub>β</sub>- $F(ab')_2$ は特異的に脳内のA<sub>β</sub>と結合したものと推察

50



され抗 A  $F(ab')_2$  は血液 - 脳関門 (BBB) を通過したと考えられる。

【 0 0 3 8 】

ウサギ Ig と  $F(ab')_2$  の抗 A に対する結合の特異性の比較

アミロイド特異的ウサギ Ig による A プラークの抑制効果を評価した。 $F(ab')_2$  による治療を行ったマウスの脳切片を A 特異的ウサギ IgG によって直接染色を行った結果を顕微鏡観察した。その結果、 $F(ab')_2$  は脳切片の A プラークに特異的に結合している結果が得られた。さらに、この  $F(ab')_2$  抗体は A 特異的ウサギ IgG 抗体をブロックできなかったのでウサギ抗血清とはエピト プが異なることが示唆された。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 9 】

【 図 1 】皮質及び海馬における A の局在部位を示す顕微鏡写真である。A は、脳内の A プラークの概観を示す。黒の矢印は A プラークを示す。バーは  $500\mu\text{m}$  (倍率 10 倍) である。B は、海馬における A プラークを示す。バーは  $100\mu\text{m}$  (倍率 25 倍) である。C は、皮質における A プラークを示す。バーは  $100\mu\text{m}$  (倍率 25 倍) である。

10

【 図 2 A 】 pA -mAb、p- $F(ab')_2$  又は p-pFc' で治療した後の脳内の、2%SDS で抽出された A 濃度を示す図である。

【 図 2 B 】 pA -mAb、p- $F(ab')_2$  又は p-pFc' で治療した後の脳内の、70%ギ酸で抽出された A 濃度を示す図である。

【 図 3 A 】 pA -mAb、p- $F(ab')_2$  又は p-pFc' を 60~70 週齢のマウスに脳室内投与した後の脳内の、2%SDS で抽出された A 濃度を示す図である。

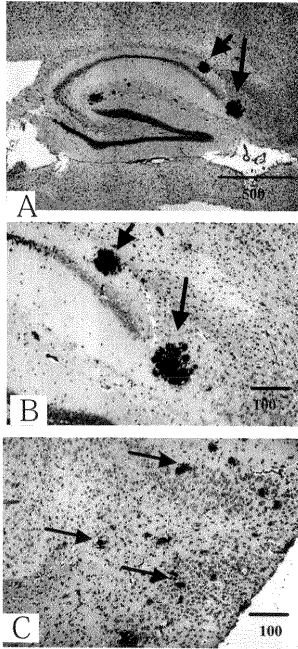
20

【 図 3 B 】 pA -mAb、p- $F(ab')_2$  又は p-pFc' を 75~85 週齢のマウスに脳室内投与した後の脳内の、2%SDS で抽出された A 濃度を示す図である。

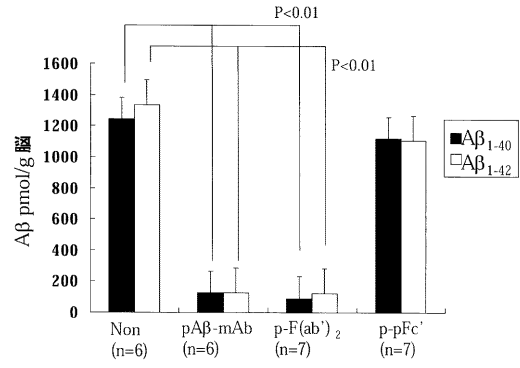
【 図 3 C 】 pA -mAb、p- $F(ab')_2$  又は p-pFc' を 60~70 週齢のマウスに脳室内投与した後の脳内の、70%ギ酸で抽出された A 濃度を示す図である。

【 図 3 D 】 pA -mAb、p- $F(ab')_2$  又は p-pFc' を 75~85 週齢のマウスに脳室内投与した後の脳内の、70%ギ酸で抽出された A 濃度を示す図である。

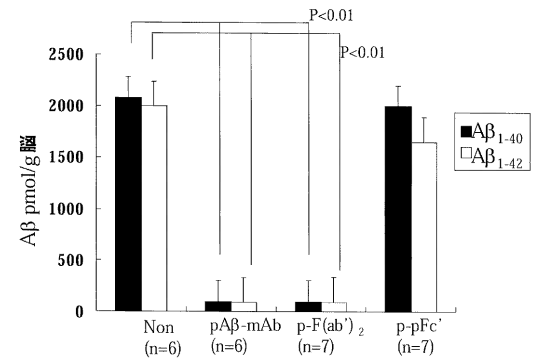
【 図 1 】



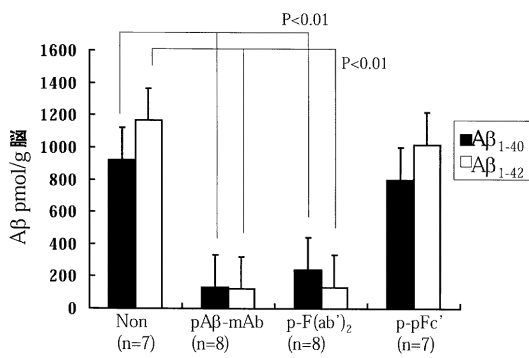
【 図 2 A 】



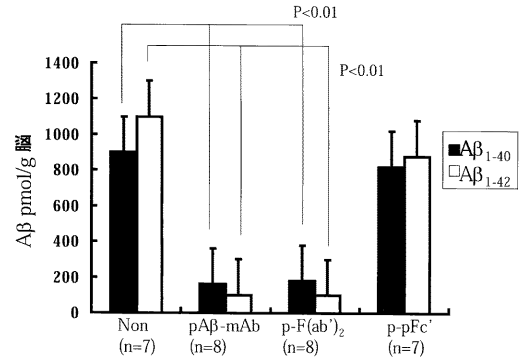
【 図 2 B 】



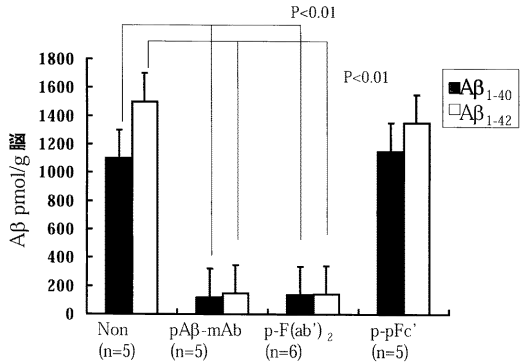
【 図 3 A 】



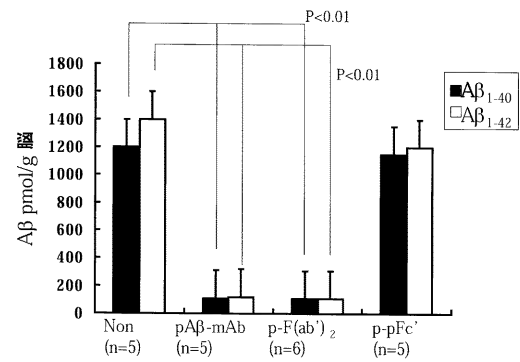
【 図 3 C 】



【 図 3 B 】



【 図 3 D 】



【配列表】

2007077103000001.app

---

フロントページの続き

Fターム(参考) 4C085 AA34 BB11 BB43 CC23 EE01 GG02 GG08  
4H045 AA30 BA19 BA21 CA45 DA76 EA21 FA74