

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-531992

(P2010-531992A)

(43) 公表日 平成22年9月30日 (2010.9.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Z N A D	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H O 4 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-514187 (P2010-514187)	(71) 出願人	502205846
(86) (22) 出願日	平成20年6月26日 (2008.6.26)		サントル ナショナル ドウ ラ ルシェ
(85) 翻訳文提出日	平成22年2月22日 (2010.2.22)		ルシュ シアンティフィク
(86) 国際出願番号	PCT/IB2008/002671		フランス国 エフ-75016 パリ リ
(87) 国際公開番号	W02009/004494		ュ ミシエルーアンジュ 3
(87) 国際公開日	平成21年1月8日 (2009.1.8)	(74) 代理人	100065248
(31) 優先権主張番号	07290812.2		弁理士 野河 信太郎
(32) 優先日	平成19年6月29日 (2007.6.29)	(72) 発明者	ルージョン, フランソワ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		フランス、エフ-92310 セーブル、
			リュ デ フォンテーヌ、36
		(72) 発明者	ラファイエ, ピエール
			フランス、エフ-92240 マラコフ、
			ブルバール カメリナ 31
		F ターム (参考)	4B024 AA01 AA11 BA44 CA02 DA06
			EA04 GA11 HA01 HA15
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイドβペプチドのオリゴマー形態を検出するためのラクダ科動物の単一ドメイン抗体の使用及びその適用

(57) 【要約】

アミロイド ペプチド42のオリゴマー形態を検出するためのラクダ科動物単一ドメイン抗体の使用及びそれらの治療及び診断的応用。

【選択図】 なし

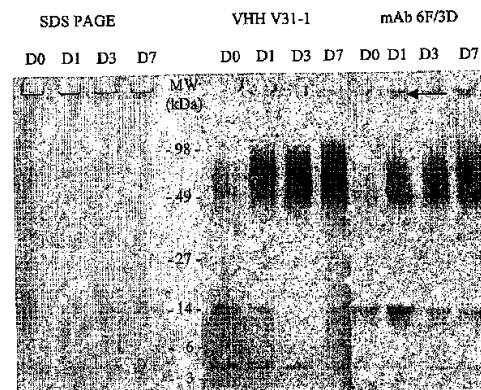


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

適切な生物学的サンプルにおいてインビトロで配列番号：2のアミノ酸配列を有するアミロイド ペプチド42のオリゴマー形態を検出するための、アミロイド ペプチド42のC末端部に位置するエピトープに結合するラクダ科動物のVHH抗体の使用。

【請求項 2】

前記エピトープが、配列番号：9のアミノ酸配列を有するペプチドA 29-40、配列番号：10のアミノ酸配列を有するペプチドA 33-42及び配列番号：11のアミノ酸配列を有するペプチドA 35-42からなる群より選択されるペプチドからなることを特徴とする請求項1に記載の使用。

10

【請求項 3】

前記VHH抗体が配列番号：1のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1又は2に記載の使用。

【請求項 4】

前記アミロイド ペプチド42のオリゴマー形態が、2-マー、3-マー、4-マー、5-マー、6-マー、7-マー、8-マー、9-マー、10-マー、11-マー、12-マー、13-マー、14-マー、15-マー、16-マー、17-マー、18-マー、19-マー、20-マー、21-マー、22-マー、23-マー、24-マーからなる群より選択され、より好ましくはダイマー、トリマー、テトラマー又はドデカマーであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 5】

前記生物学的サンプルにおけるアミロイド ペプチド42のオリゴマー形態の存在が、アミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患の出現の予後マーカーであることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の使用。

20

【請求項 6】

前記疾患がアルツハイマー病又はダウン症候群であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 7】

適切な生物学的サンプル又は組織を請求項1～3のいずれか1項に規定のVHH抗体と接触させることにより被験体におけるアミロイド ペプチド42のオリゴマー形態を検出する工程を含んでなることを特徴とする、アミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患の早期ステージを決定するためのインビトロ方法。

30

【請求項 8】

前記疾患がアルツハイマー病又はダウン症候群であることを特徴とする請求項7又は8に記載の方法。

【請求項 9】

a) インビトロ又はエキソピボで適切な生物学的サンプルを請求項1～3のいずれか1項に規定のVHH抗体と接触させる工程、及び
b) 前記生物学的サンプルへの前記抗体の結合を検出する工程
を含んでなり、結合がアミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患の存在のマーカーを構成する、被験体におけるアミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患の診断方法。

40

【請求項 10】

前記疾患がアルツハイマー病又はダウン症候群であることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

a) インビトロ又はエキソピボで適切な生物学的サンプルを請求項1～3のいずれか1項に規定のVHH抗体と接触させる工程、
b) 前記生物学的サンプルにおけるアミロイド ペプチド42オリゴマーの量を決定する工程、及び
c) 工程(b)で決定した量を標準と比較する工程

50

を含んでなり、量の差がアミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患の存在のマーカ-を構成する、被験体におけるアミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患の診断方法。

【請求項 1 2】

前記疾患がアルツハイマー病又はダウン症候群であることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記アミロイド ペプチド42のオリゴマー形態が、2-マー、3-マー、4-マー、5-マー、6-マー、7-マー、8-マー、9-マー、10-マー、11-マー、12-マー、13-マー、14-マー、15-マー、16-マー、17-マー、18-マー、19-マー、20-マー、21-マー、22-マー、23-マー、24-マーからなる群より選択され、より好ましくはダイマー、トリマー、テトラマー又はドデカマーであることを特徴とする請求項 7、9 又は 1 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

アミロイド ペプチドオリゴマー、好ましくはアミロイド ペプチド42オリゴマーにより媒介される疾患の治療用又は予防用の医薬の製造のための、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に規定のVHH抗体の使用。

【請求項 1 5】

前記医薬がアミロイド ペプチドフィブリルの形成を阻害するために被験体に投与されることを特徴とする請求項 1 4 に記載の使用。

【請求項 1 6】

前記医薬が前記疾患の進行を減速させるために被験体に投与されることを特徴とする請求項 1 4 又は 1 5 に記載の使用。

20

【請求項 1 7】

前記疾患が神経変性疾患であることを特徴とする請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 8】

前記神経変性疾患がアルツハイマー病又はダウン症候群であることを特徴とする請求項 1 7 に記載の使用。

【請求項 1 9】

a) インピトロ又はエキソピボで適切な生物学的サンプルをアミロイドフィブリルのような -シートアミロイド構造に結合する化合物と接触させる工程

30

b) -シートアミロイド構造の量を決定する工程、

c) こうして決定した量を被験体について以前に得た量と比較する工程

を含んでなり、量の減少がアミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患の後退のマーカ-を構成する、被験体におけるアミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患の後退に対する請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に規定のVHH抗体の治療効果をモニターする方法。

【請求項 2 0】

前記疾患がアルツハイマー病又はダウン症候群であることを特徴とする請求項 1 9 に記載の使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、オリゴマー形態のアミロイド ペプチド42を検出するためのラクダ科動物 (camelid) の単ドメイン抗体の使用及びその適用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

アルツハイマー病 (AD) は、原因も治療法も知られていない進行性で不可逆性の脳疾患である。細胞外原線維沈着及び老人斑は、顕著で普遍的なADの特徴である。これら凝集物の主要成分は、アミロイド (A β) と呼ばれる水溶性の40又は42アミノ酸ポリペプチドであ

50

る。しかし、AD病理における中心構造としての水不溶性原線維アミロイドへの当初の集中は、最近10年間の間に進展した。これは顕著な幾つかの発見に、例えばヒト脳においてオリゴマーAの水溶性画分が見出されたこと(Kuoら, 1996)に起因した。これら単離された可溶性オリゴマーは培養中のニューロンに対して毒性であった。次いで、オリゴマーAの存在及び毒性が確証され、その構造のためにADDL(A-由来拡散性リガンド)の名称が提案された(Lambertら, 1998)。条件に依存して、ADDL組成物はトリマー~ヘキサマーを優勢に含むことがあり、24-マーまでのより大きな構造を有することもある。ADDLは、重要な領域選択性神経毒性(小脳のニューロンには寛容である一方、海馬CA1領域及び嗅皮質中のニューロンを選択的に殺傷する)を示す(Kleinら, 2001)。更に、オリゴマーは、ラットにおいてインビボで(Walshら, 2002)及び海馬スライスで(Wangら, 2002; Wangら, 2004)、海馬長期増強(LTP)を抑制することができる。最近、認知障害はアミロイドの低量の可溶性オリゴマー形態に直接帰することができることが示されている; トリマー並びにより少ない程度でダイマー及びテトラマーが特に活性である(Clearyら, 2005; Townsendら, 2006)。

10

【0003】

A フィブリルの形成について種々のモデルが提案されている。Bitanら(2003)により提案された単純モデルは、A₄₂がどのように組み立てられ得るかを説明している。モノマーは迅速にオリゴマー化してパラヌクレインになり、次にこのパラヌクレインが会合して大きなオリゴマー及びプロトフィブリルを形成する。モノマー、パラヌクレイン(ペンタマー、ヘキサマー)及びオリゴマーは、優勢には未組織化(unstructured)であるが、幾らかの β -ストランド及び β -ヘリックスエレメントを含有する。プロトフィブリル形成は、実質的なコンホメーション再配置(rearrangement)が関与し、この間に、未組織化 β -ヘリックス及び β -ストランドエレメントが優勢なシート/ β -ターン構造に変換する。この経路における最終段階は、フィブリルへのプロトフィブリルの成熟(少なくとも動力学的には不可逆的であるように見えるプロセス)である(Lomakinら, 1997)。

20

【0004】

アミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患(例えば、AD又はダウン症候群)の正確な診断の必要性は、幾つかの症例では治療薬が利用可能になっているので、重要性が増している。したがって、Aオリゴマーの信頼できるアッセイは極めて役立つであろう。しかし、これらアッセイは、Aオリゴマーでの免疫化により生成され、オリゴマーに対して惹起されたモノクローナル及びポリクローナル抗体がフィブリルも認識するので、十分に機能を果たさない(Lacorら, 2004; Lambertら, 2001; Lambertら, 2007)。これら抗体は、AD脳切片において、期待されるADタイプの免疫反応性に加えて、細胞周囲の免疫反応性も示す(Lambertら, 2007; Lacorら, 2004; Gongら, 2003)。オリゴマーに対して惹起されたモノクローナル抗体は、Leeら(2006)によっても得られた。この抗体は、AD脳切片上で、オリゴマー、フィブリル及び成熟老人斑を認識する。Kayedら(2003)は、可溶性モノマー、低-MWオリゴマー及びフィブリルのものとは異なるA高-MWオリゴマーに特異的なコンホメーションを特異的に認識するポリクローナルウサギ抗体を調製した。Aの異なるコンホメーション間を識別する方法は、従来のものではないエピトープを認識し得る代替の「結合体(binder)」を使用することである。

30

40

【0005】

ラクダ科動物抗体の相当な割合は単ドメイン抗体であり、これは、軽鎖を欠く単重鎖結合性ドメインを介して抗原と相互作用する。このドメインは「VHH」又は「VHH抗体」と呼ばれる。組換えVHHは、最小サイズのインタクトな抗原-結合性ドメインである。VLドメインの不在により、VHHは、VLと結合しているVHドメインのものより高い構造的柔軟性を達成することができる。更に、VHHの相補性決定領域(CDR)、特にCDR3は、従来のVH-VL抗体のものより統計学的に長い(Muyldermansら, 2001)。小さなサイズ及び増大した可塑性は、VHHに独特な潜在能力を授けているようである: 例えば、幾つかのVHHは、酵素(例えば、 α -アミラーゼ、炭酸脱水酵素及び鶏卵リゾチーム)の活性部位腔と相互作用することにより、酵素活性を阻害し得る(Desmyterら, 1996; Desmyterら, 2002; Transueら, 19

50

98 ; Lauwereysら , 1998)。これら特徴により、ラクダ科動物のVHHは、従来の抗体に対して免疫原性が貧弱である他の独特なエピトープを認識することが可能となり得る。

【 0 0 0 6 】

国際出願第WO 2004/044204号は、アミロイド ペプチド42に特異的に結合し得るラクダ科動物単鎖抗体の可変フラグメント(VHH抗体)を記載している。これらVHH抗体の中でも、VHH V31-1と呼ばれる1つの特定の抗体は、原線維形態のA_β42ペプチド(A_β42)のカルボキシ末端部及びニューロン内A_β42沈着を特異的に認識することが示されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

ここで、本発明者らは、前記国際出願第WO 2004/044204号に記載されていることに反して、VHH V31-1抗体が水不溶性原線維形態のA_β42を認識しないが、A_β42の水溶性低分子オリゴマーを特異的に認識することを見出した。

【 0 0 0 8 】

更に、本発明者らはまた、前記VHH V31-1抗体がA_β42のC末端に特異的に結合するという事実にもかかわらず、該抗体が予想外にもフィブリル生成、すなわちA_β42フィブリルの形成を阻害することを見出した。実際、以前の研究により、A_β42の領域1～6(Solomon , 2002 ; Legleiterら , 2004)及び領域17～20(Liuら , 2004 ; Legleiterら , 2004)に特異的な抗体はA_β42のインビトロ凝集及び細胞毒性を阻害したが、C末端に特異的な抗体は凝集を阻害しなかった(Bardら , 2000 ; Liuら , 2004)ことが示されている。領域17～20及びC末端は、凝集で重要な役割を演じている(Ma及びNussinov , 2002 ; Balbachら , 2000 ; Halversonら , 1990 ; Jarrettら , 1993、及びHilbichら , 1991)。このことは、A_β42の中央領域に特異的な抗体が凝集を阻害した理由を説明し得る。しかし、以前に報告されたC末端特異的抗体がA_β42の凝集に対して効果を有さなかった理由の明確な説明は存在しない。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

【図1】 SDS PAGE電気泳動並びにV31-1及びmAb 6F/3Dによる免疫プロットを示す。

【図2】 DLSによるA_β42サイズの分析を示す。

【図3】 A_β42画分についてのVHH V31-1の結合を示す。

【図4】 VHH V31-1及びmAb 6F/3DによるA_β42のドットプロット免疫アッセイを示す。

【図5】 インビトロ血液脳関門(BBB)を横切るVHH抗体の移行を示す。

【図6】 種々のVHHによるAD患者のニューロン内A_β42ペプチド免疫反応性を示す

【図7】 コントロール及びAD患者のギ酸画分のドットプロット免疫アッセイによるA_β42免疫反応性を示す。

【図8】 ヒト皮質脳ギ酸画分中のA_β42トリマー及びテトラマーのVHH V31-1での免疫検出を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 0 】

したがって、第1の観点では、本発明は、アミロイド ペプチド42のC末端部に位置するエピトープに結合するラクダ科動物のVHH抗体の、適切な生物学的サンプル若しくは組織におけるインビトロでの、又は器官(例えば脳)におけるインビボでのアミロイド ペプチド42のオリゴマー形態の検出のための使用に関する。

【 0 0 1 1 】

ラクダ科動物(ラクダ(camel)、ヒトコブラクダ(dromedary)、ラマ(llama)、アルパカ(alpaca)、...)のVHH抗体とは、通常、ラクダ科動物の単鎖抗体の可変フラグメントをいい(Nguyenら , 2001 ; Muyldermans , 2001を参照)、本発明によれば、以下のものも含んでなる

：

- ラクダ科動物の単離VHH抗体、
- ラクダ科動物の組換えVHH抗体、又は
- ラクダ科動物の合成VHH抗体。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

好ましい実施形態では、本発明のVHH抗体は、配列番号：1のアミノ酸配列を有するラクダ科動物単鎖抗体の可変フラグメントである。このVHH抗体は国際出願第WO 2004/04420 4号に記載されている。VHH V31-1を発現する宿主細胞は、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM ; 28 rue du Dr. Roux , 75724 Paris Cedex 15 , France) から、番号I-2936で入手可能である。

【 0 0 1 3 】

本明細書中で使用する場合、「アミロイド ペプチド」とは、アミロイド前駆体タンパク質(APP)から - 及び -セクレターゼ媒介切断により生成されるペプチドをいう。好ましくは、アミロイド ペプチドは、配列番号：2のアミノ酸配列を有するアミロイド ペプチド42(A 42)である。

10

【 0 0 1 4 】

本明細書中で使用する場合、用語「オリゴマー」とは、代表的には、アミロイド形成反応において最初に形成される準安定なマルチマーをいう(Kodaliら , 2007)。幾つかのプロトフィブリルはオリゴマーとも考えることができる。

【 0 0 1 5 】

本発明の好ましい実施形態では、前記アミロイド ペプチド42のオリゴマー形態(オリゴマー)は、2-マー、3-マー、4-マー、5-マー、6-マー、7-マー、8-マー、9-マー、10-マー、11-マー、12-マー、13-マー、14-マー、15-マー、16-マー、17-マー、18-マー、19-マー、20-マー、21-マー、22-マー、23-マー、24-マーからなる群より、好ましくはダイマー、トリマー、テトラマー又はドデカマー(12-マー)からなる群より、より好ましくはトリマー及びテトラマーからなる群より選択される。

20

【 0 0 1 6 】

アミロイド ペプチド42のC末端部に位置するエピトープへの本発明によるラクダ科動物VHH抗体の結合の特徴付けは、下記実施例2に記載のように、ELISA-ベースの結合アッセイにより実施することができる。有利には、前記VHH抗体の解離定数は、約 $2 \cdot 10^{-8}$ M又はそれ未満である。解離定数の測定は、当業者に公知の方法(Friguetら(1985)に記載の方法を使用することを含む)を用いてなされ得る。

【 0 0 1 7 】

用語「アミロイド ペプチド42のC末端部」とは、本明細書中で使用する場合、配列番号：2のアミロイド ペプチドのアミノ酸25~42、特にアミノ酸29~42をいう。

30

【 0 0 1 8 】

本発明の好ましい実施形態では、エピトープは、添付の配列表の配列番号：9のアミノ酸配列を有するペプチドA 29-40、配列番号：10のアミノ酸配列を有するペプチドA 33-42及び配列番号：11のアミノ酸配列を有するペプチドA 35-42からなる群より選択されるペプチドからなる。

【 0 0 1 9 】

用語「検出(する)」は、(例えば、脳の生検により得られる)適切な生物学的サンプル若しくは組織においてインビトロ若しくはエキソビボで、又は器官(例えば脳)においてインビボで上記のようなアミロイド ペプチド42のオリゴマー形態の存否を評価することを意味する。このプロセスには、(配列番号：1の)前記VHH抗体がアミロイド ペプチド42のオリゴマー形態に結合する能力が関与する。

40

【 0 0 2 0 】

検出は、適切な生物学的サンプル若しくは組織においてインビトロで、又は器官(例えば脳)においてインビボで、当該分野において公知の任意の方法により実施することができる。これら方法としては、下記のような適切な免疫化学的技法が挙げられる：

- ELISA、EIA、RIA、免疫蛍光、免疫細胞化学的、免疫組織化学的、
- 被験体からの生物学的サンプル又は組織(例えば、血液、血清、尿、脳脊髄液)において実施される免疫プロット分析、及び
- 脳イメージング。

50

【 0 0 2 1 】

例として、これは、可視化できるか若しくは測定できる検出可能な標識を前記VHH抗体に連結することによって達成してもよいし、又は前記VHH抗体に特異的に結合するリガンド(例えば、検出可能な標識に連結した抗体)を使用することによって達成してもよい。

【 0 0 2 2 】

結合のレベルは、好ましくは、定量的に検出される。

有利には、上記のようなアミロイド ペプチド42のオリゴマー形態の存在の検出は、アミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患、好ましくは神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病又はダウン症候群)の出現の予後マーカーである。

【 0 0 2 3 】

本発明の好ましい実施形態では、検出可能な標識は、以下からなる群より選択される：

- 酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-ホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ；
- 蛍光体、例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)、紫外(UV)部のスペクトル中の波長で励起される青色蛍光染料(例えば、AMCA(7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸)；Alexa Fluor 350)、青色光により励起される緑色蛍光染料(例えば、FITC、Cy2、Alexa Fluor 488)、緑色光により励起される赤色蛍光染料(例えば、ローダミン、Texas Red、Cy3、Alexa Fluor 546、564及び594)、又は近赤外光で励起され、電子検出器(CCDカメラ、光電子倍增管)で可視化される染料(例えばCy5)；

【 0 0 2 4 】

- 重金属キレート、例えば、ユーロピウム、ランタン又はイットリウム；
- 放射性同位体、例えば、 $[^{18}\text{F}]$ フルオロデオキシグルコース又は ^{11}C -、 ^{125}I -、 ^{31}I -、 ^3H -、 ^{14}C -、 ^{99}Tc -及び ^{35}S -標識化合物。
- 標識アビジンを用いて検出することができるビオチン。

【 0 0 2 5 】

第2の観点において、本発明は、適切な生物学的サンプル若しくは組織においてインビトロで、又は器官(例えば脳)においてインビボで、アミロイド ペプチドオリゴマー(好ましくは、A 42オリゴマー)により媒介される疾患(例えば、アルツハイマー病又はダウン症候群のような神経変性疾患)の早期ステージを決定する方法を提供する。ここで、該方法は、前記適切な生物学的サンプル、組織又は器官を、(好ましくは、上記のような検出可能な標識で標識された)上記のVHH抗体(好ましくは、配列番号：1のVHH抗体)と接触させることによって、被験体(哺乳動物、好ましくはヒト)において上記のようなアミロイド ペプチド42のオリゴマー形態を検出する工程を含んでなる。

【 0 0 2 6 】

別の観点によれば、本発明は、被験体(哺乳動物、好ましくはヒト)における、上記のようなアミロイド ペプチドオリゴマー(好ましくは、A 42オリゴマー)により媒介される疾患の診断方法であって、以下の工程：

a)適切な生物学的サンプル、組織又は器官を、上記のようなアミロイド ペプチド42のC末端部に位置するエピトープに結合するラクダ科動物のVHH抗体(好ましくは、配列番号：1のアミノ酸配列を有するVHH抗体)と接触させる工程、及び

b)前記VHH抗体の前記生物学的サンプル、組織又は器官への結合を検出する工程であって、結合が前記疾患(例えばアルツハイマー病又はダウン症候群)の存在のマーカーを構成する工程

を含んでなる方法に関する。

【 0 0 2 7 】

本発明によれば、前記接触工程は、インビトロ、エキソビボ又はインビボで実施され得る。

接触工程がインビボで実施される場合、器官は好ましくは脳である。

【 0 0 2 8 】

本発明はまた、被験体(哺乳動物、好ましくはヒト)における、アミロイド ペプチドオ

10

20

30

40

50

リゴマー(好ましくは、A 42オリゴマー)により媒介される疾患の診断方法であって、以下の工程：

a)適切な生物学的サンプル若しくは組織をインビトロ若しくはエキソビボで、又はインビボで(例えば脳)、上記のようなアミロイド ペプチド42のC末端部に位置するエピトープに結合するラクダ科動物のVHH抗体(好ましくは、配列番号：1のアミノ酸配列を有するVHH抗体)と接触させる工程、

b)前記生物学的サンプル、組織又は脳におけるアミロイド ペプチド42オリゴマーの量を決定する工程、及び

c)工程(b)で決定した量を標準と比較する工程であって、量の差が前記疾患(例えばアルツハイマー病又はダウン症候群)の存在のマーカーを構成する工程を含んでなる方法に関する。

10

【0029】

本明細書中で使用する場合、用語「標準」とは、アミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患に罹患していない被験体の大集団で決定された、前記適切な生物学的サンプル又は脳におけるアミロイド ペプチド42オリゴマーの量をいう。

【0030】

別の観点において、本発明は、上記のようなアミロイド ペプチド42のC末端部に位置するエピトープに結合するラクダ科動物のVHH抗体(好ましくは、配列番号：1のアミノ酸配列を有するラクダ科動物のVHH抗体)の、アミロイド ペプチドオリゴマー(好ましくは、アミロイド ペプチド42オリゴマー)により媒介される疾患を治療又は予防する医薬の製造のための使用に関する。

20

【0031】

用語「治療(する)」には、前記疾患、前記疾患の徴候又は前記疾患への素因を治癒(cure, heal)、緩和、軽減、改変、修復、寛解、改善するか又はこれらに影響を与える目的での、該疾患、該疾患の徴候又は該疾患への素因を有する患者への前記VHH抗体の投与が含まれる。

【0032】

用語「予防(する)」は、前記疾患の進行を低減及び/若しくは排除すること、又は前記疾患の発症を遅延若しくは排除することを意味する。

【0033】

好ましい実施形態では、前記医薬は、アミロイド ペプチドフィブリル(好ましくはA 42フィブリル)の形成を阻害し、及び/又は前記疾患の進行を減速させるように、被験体に投与される。

30

【0034】

本発明の特定の実施形態では、医薬は、被験体(哺乳動物又はヒト)に、脳に直接か、又は注射(好ましくは、静脈内、腹腔内、筋肉内又は皮下注射)によるかのいずれかで投与することができる。事実、本発明者らは、前記VHH抗体が血液脳関門モデルを横切って移行(transmigrate)できることを示した。

【0035】

別の好ましい実施形態では、前記疾患は、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病又はダウン症候群である。

40

【0036】

全てのアミロイドフィブリルは、古典的<<クロス->>パターンのβ-シートの高含量、電子顕微鏡でのフィブリル形態、及び異質染色性染料Congo red及びチオフラビンTに結合しその分光学的特性を改変する能力を含む共通の特徴を有する(Sumner Makin and Serpell, 2005; Westermark, 2005)。

【0037】

次いで、本発明はまた、被験体におけるアミロイド ペプチドオリゴマーにより媒介される疾患の後退に対する、上記のようなアミロイド ペプチド42のC末端部に位置するエピトープに結合するラクダ科動物のVHH抗体(好ましくは、配列番号：1のアミノ酸配列を

50

有するラクダ科動物のVHH抗体)の治療効果をモニターする方法であって、以下の工程：

a) インビトロ又はエキソピボで適切な生物学的サンプルを -シートアミロイド構造(例えば、アミロイドフィブリル)に結合する化合物(好ましくは、Congo Red(ベンジジンジアゾ-ビス-1-ナフチルアミン-4-スルホン酸のナトリウム塩)又はチオフラビン T (ThT))と接触させる工程、

b) -シートアミロイド構造の量を決定する工程、

c) そのように決定した量を該被験体について以前に得た量と比較する工程であって、量の減少が前記疾患の後退のマーカーを構成する工程を含んでなる方法に関する。

【0038】

前記の特徴に加えて、本発明は、本発明を例示する実施例に言及する下記の記載及び添付の図面から明らかになる他の特徴を更に含んでなる。

【0039】

図1は、SDS PAGE電気泳動並びにV31-1及びmAb 6F/3Dによる免疫プロットを示す。A₄₂を37℃にて数日間インキュベートし、0日目、1日目、3日目及び7日目にアリコートを取り出した。この異なる画分を4～12%ゲル上で分離し、タンパク質をニトロセルロースメンブレン上に移した。ゲル-排除したA₄₂反応性材料(矢印)についてはV31-1の免疫反応性がないことに注目すべきである。分子量は、クーマシー染色と免疫プロットとの間にkDaで示されている。

【0040】

図2は、DLSによるA₄₂サイズの分析を示す。A₄₂を水に再懸濁し(0.20 µM)、37℃にて数日間インキュベートした。各R_h分布を100%強度に対して規格化した。ポリマー状及び凝集したA₄₂からの散乱強度が優勢になった。大きな粒子(>1000nm)は測定ウィンドウに含ませなかった。データは、少なくとも3つの独立した実験の各々において得られたものの代表である。

【0041】

図3はA₄₂画分についてのVHH V31-1の結合を示す。A₄₂を37℃にて数日間インキュベートし、t=1時間、1日目、10日目及び16日目にアリコートを取り出し、更なる使用まで-20℃にて保存した。画分のコーティングを4℃にて一晩行い、VHH V31-1の結合を4℃にて20分間行った。各VHH抗体希釈物について2つのウェルを使用した。結果は平均及び標準偏差で表す。この実験は独立した3つの実験の代表である。

【0042】

図4は、VHH V31-1及びmAb 6F/3DによるA₄₂のドットプロット免疫アッセイを示す。2 µlのA₄₂系列希釈物(1 µg、0.5 µg、0.25 µg、0.125 µg、0.062 µg)をドット-プロットした。

【0043】

図5はインビトロ血液脳関門(BBB)を横切るVHH抗体の移行を示す。輸送研究は、10～20 µg/mlのVHH V31-1又はL1-3抗体を頂部区画(apical compartment)(上部チャンバ)に添加することによって開始し、10分、30分及び60分にて下部チャンバにおけるVHH抗体の量を決定した。

【0044】

図6は、種々のVHHによるAD患者のニューロン内A₄₂ペプチド免疫反応性を示す。VHH V31-1(A及びB)、VHH L1-3(C)及びVHH 61-3(D)で染色した脳組織の代表的顕微鏡写真。VHH V31-1を使用前にA₄₂とプレインキュベートすると、かすかなニューロン染色のみが見出される(E)。顕微鏡写真Fは、VHH V31-1によるニューロン内A₄₂免疫反応性と、ニューロン外拡散ブランク染色の欠如との両方を証明している(ブランクは矢印で示されている)。シナプスはVHH V31-1により標識されている(G)。

【0045】

図7は、コントロール及びAD患者のギ酸画分のドットプロット免疫アッセイによるA₄₂免疫反応性を示す。2 µlの系列希釈物(1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128)をド

10

20

30

40

50

ット-プロットした。VHH V31-1(A)及びmAb 6F/3Dを使用した。A₄₂免疫反応性を全ての希釈物について濃度測定により決定した。相対吸光単位(R.A.U.)でのA₄₂量(AD患者とコントロール患者との間のシグナルの差に対応)は、サンプル希釈率の関数として表している(B)。

【0046】

図8は、ヒト皮質脳ギ酸画分中のA₄₂トリマー及びテトラマーのVHH V31-1での免疫検出を示す。

【0047】

以下の実施例は、本発明を説明するものであって、如何なる様式によっても本発明を制限するものではない。

【実施例】

【0048】

実施例1：材料及び方法

材料

使用したA₄₂(配列番号：2)及び種々のA₄₂フラグメント(配列番号：2の1～11、10～20、15～25、22～35、29～40及び33～42フラグメント；それぞれ配列番号：5、6、7、8、9及び10)はBachemから購入した。モノクローナル抗体(mAb)6F/3D抗-Ab 8-17(Dako)は、ドットブロッキング及びウェスタンブロッキングにより合成アミロイドペプチドを認識する。この抗体はまた、AD脳中の全てのタイプのアミロイド沈着を特異的に染色する。

【0049】

被験体

ヒト皮質脳組織は、Hopital Pitie-La Salpetriere(Paris, France)から入手した。代表的な神経学的に正常なコントロール及び(Braak及びBraak(1991)に従ってステージBraak-VIと判定された)AD患者からの死後脳組織を検査した。

【0050】

VHH抗体及びpETシステムにおけるその発現

VHH V31-1(配列番号：1)；VHH V31-1を発現する宿主細胞は、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM；28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France)において番号I-2936で入手可能である；これは2002年9月20日に寄託した；

VHH L1-3(配列番号：3)；VHH L1-3を発現する宿主細胞は、CNCM(28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France)において番号I-2934で入手可能である；これは2002年9月20日に寄託した；

VHH L35(配列番号：4)；VHH L35を発現する宿主細胞は、CNCM(28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France)において番号I-2935で入手可能である；これは2002年9月20日に寄託した；

VHH 61-3(配列番号：12)；VHH 61-3を発現する宿主細胞は、CNCM(28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France)において番号I-2933で入手可能である；これは2002年9月20日に寄託した。

【0051】

ベクターpHEN1(国際出願第WO 2004/044204号に記載)に挿入されたVHH V31-1、VHH L1-3、VHH L35及びVHH 61-3抗体のコーディング配列をベクターpET22に、製造業者の指示(Novagen, Darmstadt, Germany)に従い、NcoI及びNotI制限部位を用いてサブクローニングした。形質転換E. coli BL 21(DE3)細胞は、20℃にて3時間のIPTG 1mMによる誘導後に、周縁質でVHH抗体を発現した。周縁質抽出物は、20%スクロース及び1mM EDTAを含有する50mM硫酸ナトリウム緩衝剤(pH 8)中に懸濁した細胞をスフェロプラスト化(spheroplasting)、ペプチドグリカンプロテアーゼインヒビター(CompleteTM, Boehringer Mannheim, Germany)の存在下に5mg/mlリゾチームで4℃にて20分間加水分解することにより得た。次いで、懸濁物を10,000rpmで2分間遠心分離した。周縁質抽出物に対応する上清を4℃に維持した。精製VHH抗体は、Ni²⁺で荷電されたキレート性アガロースカラム(Superflo

10

20

30

40

50

w Ni-NTA, Qiagen Ltd, UK)を製造業者の指示に従って用いて、IMACにより得た。タンパク質含量は、Bradford試薬を使用して測定した。最終調製物の純度は、クーマシー染色を用いるSDS-PAGE及びウェスタンブロットにより評価した。

【0052】

ELISA

標準ELISAの変法を使用して培養上清中のVHH抗体の存在について試験した。マイクロタイタープレート(Nunc, Denmark)を、PBS中に希釈した1 µg/mlの抗原で、4 にて一晚のインキュベーションによりコーティングした。プレートを緩衝剤A (PBS中0.1% Tween 20)で4回洗浄し、VHHを緩衝剤B (緩衝剤A中0.5%ゼラチン)に希釈した。プレートを37 にて2時間インキュベートし、再度洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ-標識ウサギ抗-c-myc(A14) (Santa Cruz, Ca, USA)又はウサギ抗-Hisタグ抗体(Santa Cruz, Ca, USA)を添加した。次いで、プレートを緩衝剤Aで洗浄し、新たに調製した0.2%オルトフェニレンジアミン(Dakopatts A/S, Glostrup, Denmark)、0.1Mクエン酸緩衝剤(pH5.2)中0.03% H₂O₂を各ウェルに加えた。ペルオキシダーゼ反応を、3 M HClを添加して停止させ、光学密度を490nmで測定した。

【0053】

ELISAによる解離定数の決定

VHH抗体の結合親和性をFriguetら(1985)に記載のように決定した。種々の濃度のA ペプチドを溶液で既知量のVHH抗体と、平衡に達するまで4 にて一晚インキュベートした。使用したVHH抗体濃度は、予備的なELISAキャリブレーションにより決定した。各混合物(100 µl)を、抗体を予めコーティングしたマイクロタイタープレートのウェルに移し、4 にて20分間インキュベートした。プレートを緩衝剤Aで洗浄し、-ガラクトシダーゼ-接合ヤギ抗-ウサギIg(Biosys, Compiègne, France)及び4-メチルウンベリフェリル-Dガラクトシド(Sigma)を添加して遊離VHH抗体を検出した。蛍光は、355nmでの励起後に、460nmで読み取った(Fluoroskan, Labsystem, Finland)。K_Dは、結合抗体の割合の逆数対抗原のモル濃度の逆数をプロットすることによって得られる回帰曲線の傾きから推定した。

【0054】

ウェスタンブロット

A ペプチドをPBS中に懸濁した。アリコート(5 µl)に、等量のゲルローディング緩衝剤を添加し、次いで100 にて5分間処理した。NuPAGE Novex 4-12% Bis-trisゲル(Invitrogen)を用いるポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)による分離後、半乾燥のままでHybond-C(Amersham)に移し、Xcell II blot module(Invitrogen)を使用してウェスタンブロットティングを行った。免疫化学反応の前に、メンブレンを4%脱脂乳溶液中でブロックした。メンブレンの免疫ブロットティングは、VHH抗体又はmAbのいずれかで達成し、それぞれペルオキシダーゼ-標識ウサギ抗-c-myc(A14)抗体(Santa Cruz, Ca, USA)によるか、又はウサギ抗-Hisタグ(Santa Cruz, Ca, USA)とその後のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗-ウサギ免疫グロブリンにより顕現した。最後に、化学発光キット(Amersham)を用いてペルオキシダーゼ活性を可視化した。

【0055】

ドット-ブロット

0,25% (W/v) ジチオトレイトール(DTT)を含有するLaemmliサンプル緩衝剤中で凍結脳サンプルをホモジナイズし(1:10(w/v))、10分間熱処理した。次いで、各サンプルを100,000 g にて60分間遠心分離した。得られたペレットを500 µlの100%ギ酸中に再懸濁し、撹拌下に室温にて3時間放置した。次いで、画分を14000 × g にて1時間遠心分離した(Permanneら, 1995)。上清を取り出し、Hybond-Cニトロセルロースメンブレン(Amersham)上に2 µlの系列希釈物(1/2 ~ 1/164)をドット-ブロットティングした。メンブレンをブロックし、ウェスタンブロットについて記載したように免疫顕現化のために加工処理した。Gel-doc(Biorad)上でドット-ブロットを72ドット/インチの解像度でデジタル化し、8-ビットグレースケールPICTファイル(256段階のグレー)に保存した。免疫反応性の強度は、Quantity

one software(Biorad)で各ドットについて算出した。

【 0 0 5 6 】

A 42モノマー及びプロトフィブリルの調製

A 42パウダーの1mgサンプルを500 μ lのヘキサフルオロイソプロパノール(Sigma)中に溶解し、4 にて7日間穏やかに攪拌し、Branson超音波バスソニケータを用いて10分間超音波処理し、次いで16000 \times gにて10分間遠心分離した。50 μ gのペプチドを含有するアリコートを各々凍結乾燥し、-20 で保存した。アリコートを二回蒸留水又はPBS(pH=7.4)中に溶解し、使用まで37 にてインキュベートした。

【 0 0 5 7 】

動的光散乱(DLS)

DLS(準弾性光散乱とも呼ばれる)を使用して、A 42粒子の粒子平均拡散係数分布を測定した。サンプル中に存在する各粒子は、その水力学的半径(R_H)(これは、測定値と等しい拡散係数を有する球の半径に対応する)により特徴付けられる。 R_H 測定は、ガリウムアルミニウムヒ素825nmレーザを備えたDynaPro MS800装置(Protein solution-Wyatt)で25 にて行った。A 42ペプチドのアリコートを二回蒸留水中0.20 μ Mに希釈し、37 にてインキュベートした。サンプル(110 μ l)を光路長3mmの石英キュベット(Hellma)中に直接配置し、10秒間の平均取得時間で角度90°での総光散乱強度を収集した。自己相関化光強度データ(通常、30~40点)から粒子並進拡散係数(D_T)を算出し、Stokes-Einstein等式を用いて R_H に変換した。Sedfit 9.3分析ソフトウェア(www.analyticalultracentrifugation.com)を用いて、強度対 R_H の分布プロットを算出し、各サブピークから強度-加重平均 R_H 値を得た。

【 0 0 5 8 】

チオフラビンT(ThT)蛍光アッセイ

ThTの蛍光発光は、 β -シート凝集体構造(例えば、アミロイドフィブリル)に結合するとシフトする(LeVine, 1993)。A 42ペプチドのアリコートを二回蒸留水又はPBS(pH7.4)中20 μ Mに希釈し、37 にてインキュベートした。インキュベーションサンプルから30 μ lアリコートを周期的に取り出し、2mlの5 μ M ThT溶液(50mMリン酸緩衝剤、pH=6.5)に添加することによって、A 42凝集を測定した。蛍光強度は、光路1cmの石英キュベットを用いて分光蛍光光度計で励起波長450nm及び発光波長482nmにてモニターした。励起波長幅及び発光波長幅は共に5nmであった。読取値は、遊離ThTの蛍光寄与を減算後の3値の平均の結果であった。各実験は二連で行った。

【 0 0 5 9 】

統計分析

抗体フラグメントの存在下又は非存在下でA 42の原線維発生を比較するために両側スチューデントのt検定を使用した。P値<0.05を統計学的に異なるとみなした。

【 0 0 6 0 】

免疫細胞化学

7 μ m厚のパラフィン切片上で脳組織の免疫染色を行った。切片をキシレン中で脱パラフィン化し、エタノール(100%、96%及び90%)で再水和させ、最終的には水に移した。それらを90%ギ酸中でインキュベートし、水中で再度洗浄し、3%過酸化水素及び20%メタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼについてクエンチし、最後に水中で洗浄した。TBS中2%ウシ血清アルブミン+0.5% Tween中で切片を10分間インキュベートすることにより非特異結合をブロックした。次いで、一次抗体の適切な希釈物を室温の湿潤化チャンバ内で一晚適用した(代表的には、VHHについては1 μ g/ml、6F/3D mAbについては1:200)。スライドをTBS-Tweenで洗浄し、TBS-Tween中、二次抗体(ウサギ抗-Hisタグ又はビオチン化抗-マウス免疫グロブリン)と室温にて2時間インキュベートした。次いで、スライドをペルオキシダーゼヤギ抗-ウサギ免疫グロブリン又はストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ融合体のいずれかとインキュベートし、ジアミノベンジジン(DAB)で2分間発現させた。TBS-Tweenで洗浄後、スライドをヘマトキシリン及びエオシンで対比染色した。

【 0 0 6 1 】

10

20

30

40

50

アミロイド抽出

ヒト皮質脳組織は、Hopital de la Pitie- Salpetriere(Paris, France)のGIE Neuro-C EBから入手した。Delacourteら(2002)に従ってアミロイド抽出を行った。簡潔には、合計50mgの脳組織を500 μ lの純粋なギ酸中でホモジネートした。窒素下で100 μ lを蒸発させ、2% -メルカプトエタノールを含有する100 μ lのLDSサンプル緩衝剤(NuPage, Invitrogen)中に可溶化し、10分間煮沸した後に電気泳動に供した。

【0062】

実施例2：VHH V31-1によるA₄₂のオリゴマー形態の認識の証明

1. VHH V31-1により認識されるエピトープの特徴付け

国際出願第WO 2004/044204号は、VHH V31-1がA₄₂のカルボキシ末端部を認識することを開示している。VHH V31-1により認識されるエピトープを更に特徴付けるために、異なるA₄₂フラグメント(1-11、10-20、15-25、22-35、29-40及び33-42)に対応するペプチドについてK_Dを決定した。VHH V31-1は、フラグメント1-10、10-20、15-25及び22-35を認識しなかった。A₂₉₋₄₀及びA₃₃₋₄₂についてのVHH V31-1のK_Dは、同程度のオーダーであり、A₂₉₋₄₀については $2(\pm 0.8) \cdot 10^{-8}$ M、A₃₃₋₄₂については $2 \cdot 10^{-8}$ Mであった。このことは、VHH V31-1がA₄₂のC末端部に位置するエピトープを認識することを示唆している。

【0063】

2. VHH V31-1はA₄₂のオリゴマー形態を優先的に認識する

VHH V31-1を更に特徴付けるために、その結合をA₄₂について免疫プロットすることにより試験した。A₄₂を37℃にて数日間インキュベートし、0日目、1日目、3日目及び7日目にアリコートを取り出した。A₄₂標準調製物(すなわち、高濃度のA₄₂の37℃にて数日間のインキュベーションにより<<熟成(aging)>>)は、混合画分に導かれる。SDS変性後、この調製物は、ゲル-排除したA₄₂-反応性材料(すなわち、SDS-不溶性フィブリル)だけでなく、A₄₂モノマー及びオリゴマーも示さなかった(Hartleyら, 1999)。VHH V31-1は、モノマーに対応する4 kDaバンド、ダイマー、トリマー及びテトラマーに対応する8~16 kDaバンド、及び12-マーに対応する50~80 kDaバンドを標識したが、ゲルのまさに頂上部では更なるバンドを標識しなかった。このことは、V31-1がA₄₂のオリゴマー形態を特異的に認識し、原線維形態は認識しないことを示唆している(図1)。対照的に、mAb 6F/3Dは、ゲル-排除した画分を含む種々のバンドを全て標識した。

【0064】

次いで、DLSを使用して、オリゴマー化プロセスに沿ったA₄₂粒子のサイズ分布の進展を調べた。A₄₂ペプチドをヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)に溶解し、超音波処理し、次いで遠心分離して会合したペプチドを完全に除去した。凍結乾燥アリコートを20℃に維持し、二回蒸留水に再懸濁し、異なるインキュベーション時間でDLSにより分析した。T=1時間で、A₄₂のサイズ分布は、約40nmの加重平均水力学半径(R_H)を有する単一ピークを示した(図2)。1日目には、約80nmに中心を有する単一ピークが観察された。10日目には、2つのピークが観察された：一方は約40nmに中心を有し、他方は約400~500nmに中心を有していた。20日目にも、2つのピークが観察された：一方は約150nmに中心を有し、2番目は約600~800nmに中心を有していた。粒子光散乱強度は分子により充填された体積に比例する($I_D = f(R_H^3, C, 1/\lambda^4)$)ので、実際の大きな粒子の豊富さは、強度分布より示唆されるものより有意に低いことに留意することが重要である。Bitanらは、以前に、DLSによってA₄₂のオリゴマーサイズ分布を分析した(Bitanら, 2003)。2つのピークが観察され、一方はペンタマー/ヘキサマー単位に対応する約10~20nmであり、他方は、これらオリゴマーの更なる自己会合によって形成されるプロトフィブリルに対応する約60nmであった。観察された40nmピークは、10~20nm及び60nmで報告された2つのピークの加重平均であり得る。

【0065】

ThTアッセイを用いてフィブリル形成の動力学をモニターした(下記表I)。ThTは、原線維構造に特異的に結合する蛍光染料である。A₄₂を水に再懸濁し、アリコートを周期的

に取り出し、ThT溶液に加えた。時間依存性の増加が観察された。このことは、アミロイドフィブリルの進行性の形成が起こっていたことを示唆している。

【 0 0 6 6 】

【表 1】

表 I : A β 42原線維発生の動力学。ThT結合は、1日目及び6日目に増加を示す。

バックグラウンド経口(0.7 10⁵cpm)を各測定値から減算した。

インキュベーション時間	蛍光(10 ⁵ cpm)	相対的応答
T = 1時間	1.19	1.0
T = 1日目	4.86	4.1
T = 6日目	9.90	8.3

10

【 0 0 6 7 】

A 42の異なる画分へのV31-1の結合をELISAで分析した(図 3)。A 42へのVHH V31-1の結合は、1時間画分について16日目画分より有意に高かった。

【 0 0 6 8 】

37 にて20日間より長くインキュベートした(ほとんどがフィブリルから構成される)A 42に対してドットプロット免疫アッセイを行った。強いA 42免疫反応性がmAb 6F/3Dで得られた。対照的に、VHH V31-1とのA 42免疫反応性は弱かった(図 4)。このことは、VHH V31-1がA のオリゴマー形態に優先的に結合し、原線維構造には優先的に結合しないことを確認している。

20

【 0 0 6 9 】

3 . VHH V31-1はニューロン内A 42オリゴマーを認識するが、アミロイドブラークを認識しない

ヒトAD脳におけるVHH-特異的免疫反応性の分布を検査した。染色したAD脳組織スライスにより、VHH V31-1について顕著なニューロン内免疫反応性が明らかにされた一方、VHH 61-3のニューロン内免疫反応性は非常に微かであり、VHH L1-3のニューロン内免疫反応性は検出できなかった(図6A~D)。正常脳組織はVHHで標識されなかった。顆粒は細胞体の核周辺領域に局在していた。顆粒を含有する細胞は、その形状からニューロン性と同定された。内皮細胞は顆粒を決して含有していなかった。この標識の特異性は、A 42オリゴマーとVHH V31-1をプレインキュベートすることにより確認された(図6E)。VHHは、アミロイドブラークを検出しなかったが、該ブラーク周囲のニューロンの細胞内顆粒を検出した(図6G)。シナプスもまたV31-1で標識された(図6F)。

30

【 0 0 7 0 】

脳組織におけるVHH V31-1の免疫反応性を確認するために、AD患者及びコントロールから得られたギ酸画分に対してドットプロット免疫アッセイを行った。強いA 42免疫反応性がAD患者画分で得られた。対照的に、コントロール患者に対するA 42免疫反応性は弱かった(図7A)。VHH V31-1及びmAb 6F/3Dについて得られた結果を比較するために、全ての希釈物についてA 42免疫反応性を濃度測定により決定した。AD患者とコントロール患者との間のシグナルの差に対応するA 42の量は、サンプル希釈率の関数として表した。VHH V31-1及びmAb 6F/3Dで得られた結果は同様であった(図7B)。よって、本アッセイにより、VHH V31-1は脳組織においてA 42オリゴマーを検出することが可能であることが確認された。

40

【 0 0 7 1 】

4 . VHH V31-1はフィブリルの形成を阻害する

フィブリル形成に対するVHH抗体の効果を調べるために、A 42がインビトロで凝集することができ、VHH抗体がA 42に強固に結合することができる条件を選択した(凍結乾燥A 42を水に再懸濁し、次いで作用濃度にPBSで希釈し、超音波処理した)。ネガティブコントロールとして、無関係のVHH抗体(L35; 配列番号: 4; 国際出願第WO 2004/044204号に記載のもの)を用いて同様な実験を行った。VHH抗体の顕著な特徴は、37 での長時間のインキュベーションに耐える能力である(Arbabi Ghahroudiら, 1997)。

50

【 0 0 7 2 】

VHH V31-1の非存在下で、DLSデータは、A β 42が容易に凝集し、1日目に一方が約30nmで他方が約100～150nmである2つのピークを形成したことを示した。その後、2日目には早くも、約300nmに中心を有する新たなピークが検出された。これは7日目には600～700nmに発達した(表II)。

【 0 0 7 3 】

【表 2】

表II: A β 42の凝集に対するVHHの効果。光散乱によりモニターした、等モル濃度(0.20 μ M)のVHH V31-1及びVHH L35の非存在下及び存在下でのA β 42(0.20 μ M)の凝集の時間経過。大きな粒子(> 1000nm)は測定ウィンドウに含まれなかった。

	A β 42			A β 42+V31-1		A β 42+L35	
3時間							
R _H (nm)	88			97		109	
5時間							
R _H (nm)	95			84		116	
24時間							
R _H (nm)	24	125		10	101	14	128
2日目							
R _H (nm)	35	329		9	122	44	250
3日目							
R _H (nm)	36	208		25	256	33	232
4日目							
R _H (nm)	60	498		12	157	135	663
7日目							
R _H (nm)	41	142	665	25	151	107	701

【 0 0 7 4 】

したがって、A β 42の凝集は、水(図2)又はPBS(表II)に希釈したとき同様であるように見える。A β 42を等モル濃度のVHH L35と共にインキュベートすると、2つの主要ピーク約100～150nm及び600～700nmが形成される同様な凝集パターンが観察された。興味深いことに、フィブリル形成の動力学は、A β 42をVHH L35とインキュベートしたとき、A β 42が単独のときより速いように見えた。なぜなら、600～800nmのピークが、早くも4日目に現れたからである。A β 42を等モル濃度のVHH V31-1と共にインキュベートすると、1つが約10～25nmであり、1つが約150～200nmに中心を有する2つのピークが観察された。顕著なことに、600～800nmピークは、この複合体に関しては検出することができなかった。このことにより、高分子量の凝集体は、VHH V31-1の存在下で形成することができなかったことが示唆される。VHH抗体単独の平均光散乱強度は、A β 42とインキュベートしたVHH抗体の強度より遥かに低い。フィブリル形成がないことは、ThTアッセイによっても確認された：実際、蛍光は、A β 42を等モル濃度のVHH V31-1と共にインキュベートすると顕著に減少した一方、A β 42単独のときには増加した(表III)。

【 0 0 7 5 】

10

20

30

40

【表 3】

表Ⅲ:抗体フラグメントの非存在下及び存在下でのA β 42の原線維発生の時間経過。A β 42(20 μ M)フィブリル形成の動力学を、等モル濃度(20 μ M)のVHH V31-1及びVHH L35の非存在下及び存在下でThT蛍光によりモニターした。サンプルを37°Cにてインキュベートし、30 μ lのサンプルを周期的に取り出して2mlの5 μ MのThTに添加した。対応のあるt検定分析から得られるP値:* P < 0.05;** P < 0.01;*** P < 0.001 (n=4)。この実験は2つの独立した実験の代表である。

インキュベーション 時間	蛍光(10 ⁵ cpm)		
	A β 42	A β 42+VHH V31-1	A β 42+VHH L35
0日目	2.3 \pm 0.15	1.86 \pm 0.15	1.66 \pm 0.18
1日目	4.47 \pm 0.63	2.85 \pm 0.48*	2.8 \pm 0.53*
5日目	3.33 \pm 0.14	1.3 \pm 0.14***	2.83 \pm 0.36
10日目	4.4 \pm 0.46	1.7 \pm 0.14***	3.07 \pm 0.33*
15日目	7.65 \pm 2.18	2.06 \pm 0.08**	4.21 \pm 1.3

10

【0076】

A 42を等モル濃度のVHH L35と共にインキュベートしたとき、蛍光の有意な減少は観察されなかった。

【0077】

Yan及びWang(2006)は、最近、A 42のC末端がA 40のものより剛性であり、フィブリル及びオリゴマーにおける α -コンホメーション用に予め用意されている可能性が高く、したがって凝集用の内部種子(internal seed)として作用する可能性が高いことを示した。この概念は、A 42のC末端の6残基がフィブリルの結晶構造中のNNQQNYコンホメーションに最適に適合していることを示す最近のA 42のバイオインフォマティック研究により支持されている(Thompsonら, 2006; Nelsonら, 2005)。VHH V31-1はオリゴマー中のこの種子を認識し、凝集体の形成を防止している可能性との仮説を立てることができる。

20

【0078】

5. VHH V31-1は、ヒト皮質脳組織中のA 42トリマー及びテトラマーを認識する

ヒト皮質脳組織におけるVHH-特異的免疫反応性の分布を調べた。A 42トリマー及びテトラマーに対応する16及び20kDaの2つの主要なバンドが、皮質脳ギ酸画分中にVHH V31-1

30

【0079】

実施例3: hCMEC/D3を横切るインビトロVHH抗体の移行
方法

不死化ヒト脳内皮細胞hCMEC/D3は、以前にWekslerら(2005)に詳細に記載されている。VHH抗体(VHH V31-1及びL1-3)の存在下での細胞生存能を、Wekslerら(2005)に記載されるMTTアッセイにより評価した。

【0080】

Wekslerら(2005)に記載されるように、transwellポリカーボネートインサートフィルター(孔サイズ3 μ m、Corning, Brumath, France)でVHH抗体に対するhCMEC/D3細胞単層の透過性を測定した。hCMEC/D3細胞をEGM-2培地中該フィルター上に2 \times 10⁵細胞/cm²のコンフルエント密度で播種した。

40

【0081】

播種の3日後に、Wekslerら(2005)に記載されるように輸送研究を行った。hCMEC/D3細胞を含まないか又は種々の薬理学的モジュレータに30分間予め曝露したhCMEC/D3細胞を含むコラーゲンでコーティングされたインサートのいずれかを含有する上方チャンバにVHH抗体を加えることにより、実験を開始した。輸送研究は37°Cで行った。種々の時間間隔(10、30及び60分)で下方チャンバをサンプリングし、VHH抗体の存在をELISA及びウェスタンブロットにより決定した(結果を参照)。

【0082】

50

結果

図5は、機能的VHH V31-1のトランスサイトシスが存在する一方、VHH L1-3はhCMEC/D3を通過しないことを示す。この通過は、時間依存性であり、30分間で最大に達した。60分の時点で、VHH V31-1抗体の約1%が下方チャンバに存在した。この結果は、VHH V31-1が血液脳関門を横切って移行することができることを示す。

【0083】

参考文献

- Arbabi Ghahroudi M. 他, FEBS Letters, 1997, 414, 521-6.
- Balbach J. J. 他, Biochemistry, 2000, 39, 13748-59.
- Bard F. 他, Nature Medicine, 2000, 6, 916-9. 10
- Bitan G. 他, Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100, 330-5.
- Cleary J. P. 他, Nat Neurosci, 2005, 8, 79-84.
- Delacourte A. 他, Neurology, 2002, 59, 398-407.
- Desmyter A. 他, Nature Structural Biology, 1996, 3, 803-11.
- Desmyter A. 他, Journal of Biological Chemistry, 2002, 277, 23645-23650.
- Friguet B. 他, Journal of Immunological Methods, 1985, 77, 305-319.
- Gong Y. 他, Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100, 10417-22.
- Halverson K. 他, Biochemistry, 1990, 29, 2639-2644.
- 【0084】
- Hartley D. M. 他, J Neurosci, 1999, 19, 8876-84. 20
- Hilbich C. 他, J Mol Biol, 1991, 218, 149-63.
- Jarrett J. T. 他, Biochemistry, 1993, 32, 4693-7.
- Kaye R. 他, Science, 2003, 300, 486-9.
- Klein W. L. 他, Trends in Neurosciences, 2001, 24, 219-224.
- Kodali S. 他, Current Opinion in Structural Biology, 2007, 17, 48-57.
- Kuo Y. M. 他, J Biol Chem, 1996, 271, 4077-81.
- Lacor P. N. 他, J Neurosci, 2004, 24, 10191-200.
- Lambert M. P. 他, Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95, 6448-53.
- Lambert M. P. 他, J Neurochem, 2001, 79, 595-605.
- Lambert M. P. 他, J Neurochem, 2007, 100, 23-35. 30
- 【0085】
- Lauwereys M. 他, Embo J, 1998, 17, 3512-20.
- Lee E. B. 他, J Biol Chem, 2006, 281, 4292-9.
- Legleiter J. 他, J Mol Biol, 2004, 335, 997-1006.
- LeVine H., Protein Sci, 1993, 2, 404-10.
- Liu R. 他, Biochemistry, 2004, 43, 6959-67.
- Lomakin A. 他, Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94, 7942-7.
- Ma B. 及び Nussinov R., Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99, 14126-31.
- Muyldermans S. 他, Trends in Biochemical Sciences, 2001, 26, 230-235.
- Nelson R. 他, Nature, 2005, 435, 773-8. 40
- Nguyen VK. 他, Adv. Immunol., 2001, 79, 261-96
- Permanne B. 他, Brain Res, 1995, 685, 154-62.
- 【0086】
- Solomon B., Current Medicinal Chemistry, 2002, 9, 1737-1749.
- Sumner Makin O. 及び Serpell L.C., FEBS Letters, 2005, 205, 5950-5961.
- Thompson M. J. 他, Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103, 4074-8.
- Townsend M. 他, J Physiol, 2006, 572, 477-92.
- Transue T. R. 他, Proteins, 1998, 32, 515-22.
- Walsh D. M. 他, Nature, 2002, 416, 535-9.
- Wang H. W. 他, Brain Res, 2002, 924, 133-40. 50

- Wang Q. *et al.*, J Neurosci, 2004, 24, 3370-8.
- Weksler B.B. *et al.*, The FASEB Journal, 2005, 19, 1872-1874
- Westermarck P., FEBS Letters, 2005, 272, 5942-5949.
- Yan Y. *et al.* Wang C., J Mol Biol, 2006, 364, 853-62.

【図 1】

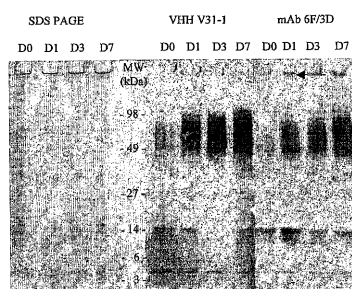
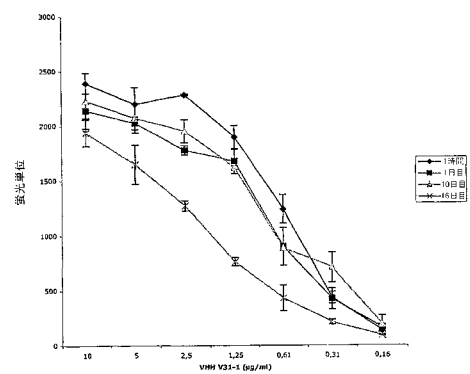
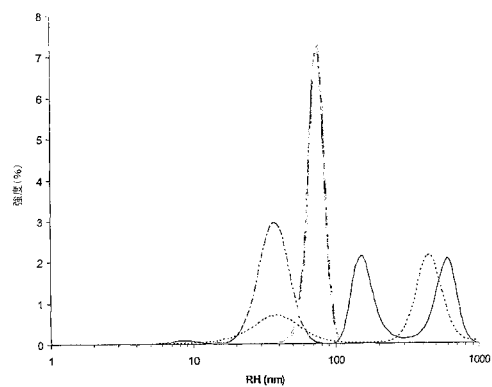


Figure 1

【図 3】



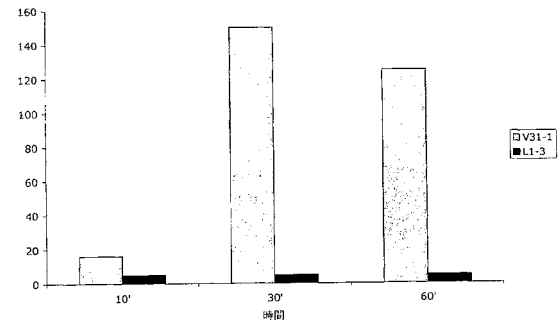
【図 2】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 A 】

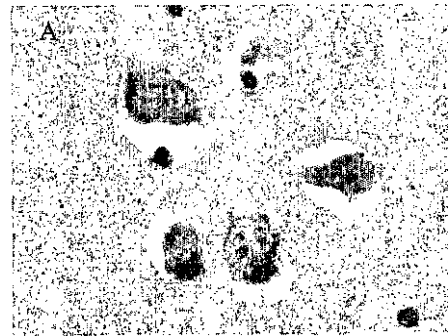
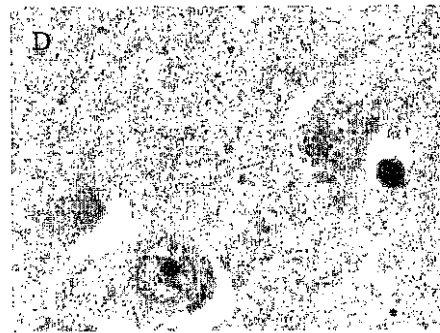


Figure 4

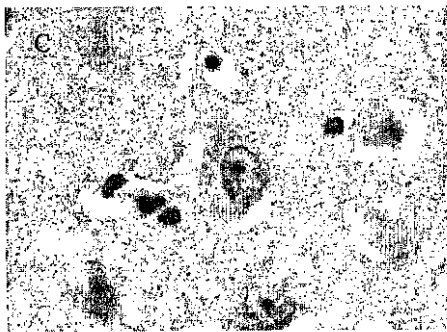
【 図 6 B 】



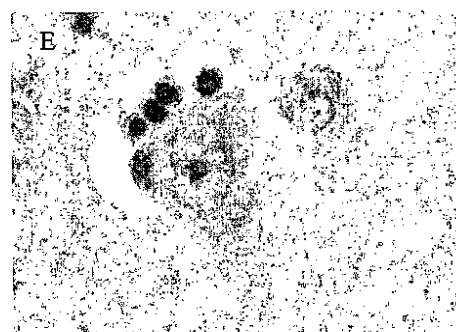
【 図 6 D 】



【 図 6 C 】



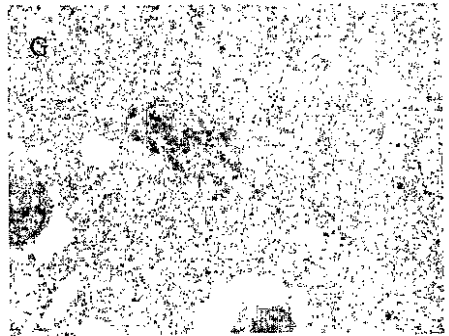
【 図 6 E 】



【図 6 F】



【図 6 G】



【図 8】

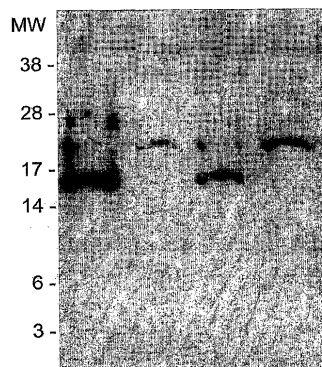
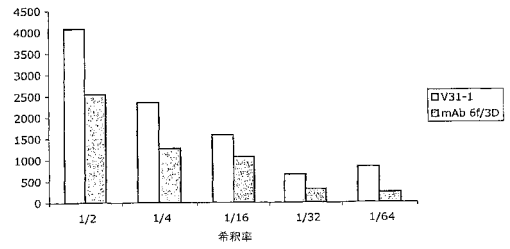
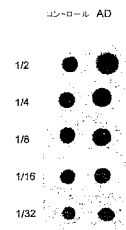


FIGURE 8

【図 7】

A)



B)

【配列表】

2010531992000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2008/002671

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 C07K14/47 C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/040153 A (ABLYNX N V [BE]; LAUWEREYS MARC [BE]; VAN LEUVEN FRED [BE]; VAN DER AU) 20 April 2006 (2006-04-20)	1,3-20
Y	figures 1-3 claims 24-26 page 1, line 4 - page 3, line 7 page 13, lines 16-25 page 16, line 17 - page 17, line 16 page 43, line 14 - page 47, line 30 page 151, line 25 - page 152, line 31 page 155, line 25 - page 156, line 17 page 172, line 23 - page 175, line 12 ----- -/-	2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 February 2009		Date of mailing of the international search report 10/02/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Boiangiu, Clara

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2008/002671

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/044204 A (PASTEUR INSTITUT [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; ROUGEON FRANCOIS []) 27 May 2004 (2004-05-27)	1, 3-20
Y	page 1, lines 15-21; sequence 9 pages 4-6 page 27, line 31 - page 28, line 2 claims 1-18 the whole document	2
Y	WO 2006/055178 A (MERCK & CO INC [US]; ACUMEN PHARMACEUTICALS INC [US]; UNIV NORTHWESTER) 26 May 2006 (2006-05-26)	2
	claims 1, 2, 6-10 page 3, line 11 - page 4, line 14 page 60, lines 6-15 example 13 table 1	
Y	WO 2005/072777 A (CURIX APS [DK]; OLESEN OLE FRILEV [DK]; BIRKELUND ANDERSEN SVEND [DK];) 11 August 2005 (2005-08-11)	2
	example 1 pages 4, 5 pages 18, 20 page 23, lines 30-35 page 27, paragraph 10 page 30; figures 9, 10	
Y	EP 1 491 889 A (ELAN PHARM INC [US]) 29 December 2004 (2004-12-29)	2
	the whole document	
Y	WO 96/25435 A (BAYER AG [US]) 22 August 1996 (1996-08-22)	2
	claims 1-20; figure 6; example 3	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2008/002671

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006040153 A	20-04-2006	AU 2005293752 A1	20-04-2006
		CA 2583017 A1	20-04-2006
		EP 1814917 A2	08-08-2007
		JP 2008515446 T	15-05-2008
		KR 20070084170 A	24-08-2007
		US 2008107601 A1	08-05-2008
WO 2004044204 A	27-05-2004	AU 2003290158 A1	03-06-2004
		FR 2846667 A1	07-05-2004
WO 2006055178 A	26-05-2006	AU 2005306997 A1	26-05-2006
		BR PI0516962 A	30-09-2008
		CA 2584859 A1	26-05-2006
		EP 1812062 A2	01-08-2007
		JP 2008520553 T	19-06-2008
		KR 20070094890 A	27-09-2007
		US 2008175835 A1	24-07-2008
WO 2005072777 A	11-08-2005	EP 1711208 A2	18-10-2006
		JP 2007522119 T	09-08-2007
		US 2007172496 A1	26-07-2007
EP 1491889 A	29-12-2004	NONE	
WO 9625435 A	22-08-1996	AT 365750 T	15-07-2007
		AT 210681 T	15-12-2001
		DE 69617916 D1	24-01-2002
		DE 69617916 T2	16-05-2002
		DE 69637150 T2	28-02-2008
		DK 809656 T3	18-03-2002
		EP 0809656 A1	03-12-1997
		ES 2288896 T3	01-02-2008
		ES 2167548 T3	16-05-2002
		JP 3115606 B2	11-12-2000
		JP 10509736 T	22-09-1998
		PT 809656 T	28-06-2002
		US 5786180 A	28-07-1998
		US 5693753 A	02-12-1997
		US 5679531 A	21-10-1997

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 16/18

C 1 2 N 15/00

A

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

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 AA17 BB11 CC05 CC21 CC22 DD62 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA21 EA50 FA74