

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4509113号

(P4509113)

(45) 発行日 平成22年7月21日(2010.7.21)

(24) 登録日 平成22年5月14日(2010.5.14)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 M 1/36 (2006.01)

A 6 1 M 1/36 5 4 5

請求項の数 4 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2006-525566 (P2006-525566)	(73) 特許権者	506083604
(86) (22) 出願日	平成16年9月13日 (2004.9.13)		アフィリス・アクチェンゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2007-504863 (P2007-504863A)		A F F I R I S A G
(43) 公表日	平成19年3月8日 (2007.3.8)		オーストリア、アーー１０３０ヴィエンナ
(86) 国際出願番号	PCT/AT2004/000311		、カール・フェルカス・ガッセ２番
(87) 国際公開番号	W02005/025651	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成17年3月24日 (2005.3.24)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成19年6月21日 (2007.6.21)	(74) 代理人	100106518
(31) 優先権主張番号	A1444/2003		弁理士 松谷 道子
(32) 優先日	平成15年9月12日 (2003.9.12)	(74) 代理人	100127638
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)		弁理士 志賀 美苗
		(74) 代理人	100138911
			弁理士 櫻井 陽子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフェレーシス装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液または血漿の流れと接触することが出来る固体担体を含むアフェレーシス装置であって、固体担体がアミロイド-β前駆タンパク質(APP)-結合性受容体を含むことを特徴とし、

該APP-結合性受容体は、抗-APP 抗体、抗-A<sub>40</sub> 抗体、抗-A<sub>42</sub> 抗体；APP-結合性タンパク質；APP-結合性ペプチド；APP-結合性ガングリオシド；またはこれら受容体の混合物からなる群から選択され、

該APP-結合性タンパク質は、ゲルゾリン、apoJ、apoE、CETPおよびERABからなる群から選択され、

該APP-結合性ペプチドは、KTYNLKKGQT-C (ペプチド 4077)、GI AVASKTYNLKKGQHTLED FQRV LDV (ERAB 93-120)、SKTYNLKKGQHT (ERAB 98-110)、C-HQKL VFFAED (ペプチド 1323)、C-EVHHQKL VFFAEDVGS (ペプチド 1324)、C-HQKIVFFAED (ペプチド 1325) およびFGFPEH LLVDFLQSL S-C (ペプチド 1208) からなる群から選択され、

該APP-結合性ガングリオシドはGM1である、装置。

【請求項 2】

抗-APP 抗体、抗-A<sub>40</sub> 抗体、抗-A<sub>42</sub> 抗体が、3D6 (A<sub>1-5</sub>)、2H3 (A<sub>1-12</sub>)、2G3 (A<sub>33-40</sub>)、21F12 (A<sub>33-42</sub>)、12H7 (A<sub>33-42</sub>)、10D5、16C11、m266およびm243からなる群から選択されることを特徴とする請求項1の装置。

【請求項 3】

10

20

担体が無菌パイロジェン不含有カラムであることを特徴とする請求項1または2の装置。

【請求項4】

アルツハイマー病の治療または予防を提供するための請求項1～3のいずれかの装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液または血漿の流れと接触することが出来る固体担体を含むアフエーシス装置に関する。

【背景技術】

【0002】

アフエーシスとは、血液中の病原性タンパク質、タンパク質が結合した病原性物質、遊離の病原性物質または病原性細胞の体外への排除にその治療効果が基づく治療方法である。病原性タンパク質が細胞を含まない血漿からしか排除できない場合、その血漿は事前に膜血漿分離（血漿分離）または血液遠心分離（haemocentrifuge）によって血液細胞と分離される。非選択的血漿交換（プラズマフェレーシス）において、交換された患者の血漿は全体として分離され、病原体のみならず、その他のすべての重要なタンパク質も排除される。これを考慮すると、除かれた血漿の、電解質、ヒトアルブミンまたは新鮮な血漿による置換が必要である。選択的プラズマフェレーシス方法では、病原性タンパク質を、吸着、沈降またはろ過によって分離された血漿からきわめて選択的に排除することができ、排除が完了した後に有意な体積の減少をとまわずに血漿を再注入することが可能である。かかる選択的方法は置換溶液無しに行えるという利点を有する。選択的全血アフエーシス方法では、病原性タンパク質は、あらかじめ血漿分離を行わずに未処理血液から直接特異的に吸着され、それによって血漿分離方法とは対照的に、血漿分離と置換溶液の添加の両方を省くことが出来る。さらなる派生型のアフエーシスであるサイトアフエーシスでは、細胞が血液から除かれる。それにとまって、白血球、赤血球、血小板、顆粒球あるいは幹細胞までもが選択的に回収できる。

【0003】

アフエーシス（例えば、プラズマフェレーシスまたはサイトアフエーシス）は現在、ドナー血漿の回収に主に用いられているが（血漿パックとして、様々な血漿画分の単離のため、または血液製剤の回収のため）、アフエーシス法の治療分野における重要性が高まってきている。現在、非常に多くの代謝障害（例えば（家族性）高コレステロール血症、単離（isolated）Lp(a)上昇を伴う進行性冠状動脈性心臓病、乳糜血症、肝不全など）、腎障害（グッドパスチャー症候群、ループス腎炎を伴う全身性エリテマトーデス、ウェジナー肉芽腫症、溶血性尿毒症症候群、特発性限局性硬化性糸球体腎炎、異常蛋白血症関連症候群、クリオグロブリン血症性（cryoglobulinemic）紫斑病、腎臓移植の際のHLA感作など）、神経系障害（重症筋無力症、ギランバレー症候群、慢性脱髄性多発根神経炎、異常蛋白血症性多発性神経炎、ランバート・イートン症候群、レフサム症候群など）、免疫系障害（関節リウマチ、免疫阻害性血友病、天疱瘡など）、循環系および微小循環障害（過粘稠度症候群、抗リン脂質抗体症候群、骨髄移植後の血栓性微小血管症、加齢性黄斑変性症、急性難聴、微小循環の末梢障害、特発性遅延性心筋炎、心臓移植後の移植血管障害、ホモ接合性家族性高コレステロール血症、限局性分節性糸球体硬化症、溶血性尿毒症症候群など）、中毒、急性肝不全、腫瘍、水分過剰、甲状腺中毒症等がアフエーシス法によって治療されている（Pschyrembel（257. Edition）、キーワード ”Plasmapherese”；[www.nephrologie.de/172Apharese.htm](http://www.nephrologie.de/172Apharese.htm)を参照）。

【0004】

アルツハイマー病（AD）は、進行性神経疾患であり、この疾患の有効な治療は現在のところ不可能である。この疾患の特徴は、アミロイド ペプチドを含む大脳プラークおよび微小管関連 TAU タンパク質による繊維状のニューロン構造物である。アミロイド および TAU は発病に関係があると考えられているが、非常に最近の研究知見によると、アミロイド が発病における主な媒介物であると示唆されているようである。それゆえ、アミロ

10

20

30

40

50

イド 生産、アミロイド 凝集またはこれら凝集体から起こる神経毒性の現象を妨げるための治療薬が活発に開発されつつある。今日までのADの治療戦略の概要はWolfe (Nature Reviews Drug Discovery 1 (2002) 859-866)に記載されている。

#### 【 0 0 0 5 】

アミロイド プラークは、内在性膜貫通性タンパク質であるいわゆるアミロイド 前駆タンパク質 (APP)から形成される (APPについての生理機能はまだ明らかに証明されていない;しかしながら、非常に最近の研究知見は、APPはキネシン Iのためのいわゆる膜積み荷受容体として機能していることを示唆している)。APPはいわゆるセクレターゼによりタンパク分解的に切断され、そして生理的には主に40 アミノ酸の長さのA<sub>40</sub>ペプチド(A<sub>40</sub>)が形成される。その他に、より短い形態のA<sub>38</sub>およびより長い形態のA<sub>42</sub>も形成され、主として高い凝集能力を示す42 アミノ酸 (A<sub>42</sub>)のバージョンが形成される。それゆえこのA<sub>42</sub>-形態もアミロイドプラークにおける卓越した形態である。セクレターゼ (α-、および主に α-および γ-セクレターゼ)はこれらの様々な切断の原因であり、それゆえ、可能性のあるAD 治療戦略による重要な標的を構成する。それゆえ、AD の治療においてかかる酵素の調節因子または阻害因子の使用が試みられている (例えば、ベンゾジアゼピン、スルホンアミド、ベンゾカプロラクタム)。

10

#### 【 0 0 0 6 】

ADと関係するさらなる遺伝子の例はアポリポタンパク質Eであり、これには3つの対立遺伝子多型が存在する(APOE2、APOE3およびAPOE4)。全集団と比較した場合、APOE4を1または2コピー保持するヒトは ADのリスクが高く、APOE2 を保持するヒトはリスクが低いということが示された。また、スタチン、即ちコレステロール生合成を阻害する医薬、を摂取したヒトでは顕著にADのリスクが低下していることが示された。それゆえADの治療のためのさらなる戦略は、例えばスタチンによるコレステロール生合成の阻害に焦点を当てている。

20

#### 【 0 0 0 7 】

ADの治療のためのさらなるアプローチは脳プラークにおけるアミロイド凝集の阻害に関するものであり、これもセクレターゼ-阻害因子によってなし得る。さらに亜鉛含量の低下も示唆されている。というのは、生理的に適切な濃度の亜鉛が、A<sub>42</sub>の凝集を誘導しうるからである。

#### 【 0 0 0 8 】

最後に、免疫学的戦略も記載されているがしかし、例えば、A<sub>42</sub>による免疫化は臨床試験の範囲内での重篤な副作用により停止されている(Willke、Bild der Wissenschaft、9 (2003)、24-28)。

30

#### 【 0 0 0 9 】

従来技術において示唆されているさらなるAD治療戦略は、APP発現の阻害およびA<sub>42</sub> クリアランスの上昇に関するものであり、APP発現の阻害に関して、APPのプロモーター領域と相互作用する物質が探索された。A<sub>42</sub> クリアランスに関しては、ある種のプロテアーゼ、例えば、インスリン分解酵素およびネプロライシン (neprolysin) の活性の上昇または抗-A<sub>42</sub>-抗体の末梢への投与 (De Mattos et al., PNAS 98 (15) (2001)、8850-8855)が示唆されている。最後に、既存のアミロイドプラークを再溶解するための試みがなされており、例えばそれは、AD 患者の血清中のアミロイド A<sub>42</sub>-レベルを低下させることによる。これに関して、α-アミロイドタンパク質を脳に貯蔵するプラークをアフエーシス法によって低下させるという示唆がなされている(米国特許第6551266号、ここには分子量が500kDを超える高分子をアフエーシスによって排除することが示唆されている)。しかしここではADについて正確に示されていない。また脳細胞における既存のプラークのアフエーシス法による直接の溶解は不可能である(プラーク、即ち500kDを超える分子は血液脳関門を通過することが出来ない)。

40

#### 【 発明の開示 】

#### 【 発明が解決しようとする課題 】

#### 【 0 0 1 0 】

50

したがって、本発明の目的は、アルツハイマー病の新規な治療および予防戦略を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

したがって、本発明によると、血液または血漿の流れと接触させることが出来る固体担体およびアミロイド 前駆タンパク質(APP)-結合性受容体を含むアフエーシス装置が提供される。本発明のアフエーシス装置によると、APPまたはAPP分解産物、特にA<sub>40</sub>またはA<sub>42</sub>の意図的なクリアランスが、AD患者またはADのリスクを有する患者においてアフエーシスによって行われうる。中枢神経系(CNS)と血漿との間にA<sub>42</sub>の動的平衡が存在することが知られている。マウスモデルにおいて、抗-A<sub>42</sub>-抗体の末梢への適用が、CNSおよび血漿A<sub>42</sub>クリアランスに影響を有し、抗-A<sub>42</sub>-抗体が血液脳関門を突破することなく脳内のA<sub>42</sub>量を減少させることが示されている(DeMattos PNAS 2001、前掲)。これらの結果は、抗体以外のA<sub>42</sub>-結合性分子(ゲルゾリンおよびG<sub>M1</sub>)の末梢への適用によりMatsuokaら(Journal of Neuroscience 2003: 29-33)によって確認されている。脳内でのプラーク形成過程はしたがって血中のA<sub>42</sub>を捕捉することによって妨げることが出来る。それを行う際に、患者の血液または血漿と接触されるアフエーシス装置内の受容体がA<sub>42</sub>またはその他のAPPの分解形態に特異的であるかどうかは重要ではない;「誤った」タンパク質分解(即ちA<sub>42</sub>への分解)が起こらないように、APPおよびその(タンパク分解性)分解産物、特にA<sub>42</sub>が、この特異的吸着によって血液から排除されることのみが重要である。したがって、本発明は、米国特許第6551266号のものと全く異なるアフエーシスの適用へのアプローチに基づく(即ち潜在的なプラーク構成単位の排除に基づき、プラーク自体の排除に基づくものではない)。さらに、アフエーシスによるプラークの排除はそもそもADの治療には有効ではないものとして却下されるにちがいない。というのは血液アフエーシスは、脳内のプラーク形成領域に到達することすらできないからである。

【0012】

一方、本発明によるアフエーシスは、体内自体でのA<sub>42</sub>の枯渇をもたらす方法(例えば、末梢抗-A<sub>42</sub>抗体に関する、DeMattos et al., PNAS 98(15) (2001)、8850-8855)よりも、自己免疫応答が引き起こされ得ない点で明らかに利点を有する。さらに、本発明によると体内でしか(おそらく特定の部位にそれらが移動した後のみ)適切に作用できない物質を患者に供給する必要がなく、病原体は選択的に排除され、即ち、疾患の原因が特異的に体外で分離され、体内の反応産物を排除する必要はない。

【0013】

その際、本発明によると既存の公知のアフエーシス装置はそれらの態様のすべてにおいて容易に本発明に適用させることが出来る。特に、固体担体(およびアフエーシス装置)を選択する際に、その医療技術的有用性を考慮すべきである。かかる担体、方法または装置はWO 97/48483 A、米国特許第5476715号、第6036614号、第5817528号または第6551266に記載されている。対応する市販のアフエーシス装置もFresenius、Affina、Plasma select、ASAHI、Kaneka、Braun、等のような会社によって市販されており、例えば、LDL-Therasorb(登録商標)、Immunosorba(登録商標)、Prosorba(登録商標)、Globaffin(登録商標)、Ig-Therasorb(登録商標)、Immusorba(登録商標)、Liposorba(登録商標)、HELP(登録商標)、DALI(登録商標)、ビリルビン胆汁酸吸着装置BR-350、Prometheus(登録商標)解毒(detoxication)、MARS(登録商標)、ADAsorb-System(Medicap)またはPlasma FLO-Systemが挙げられる。これらすべてのシステムは、たとえその市販の形態が必ずしも第一に単一のタンパク質の特異的排除を目的としているわけではないが、アフエーシスにおける当業者にとっての問題、例えば、免疫アフエーシス(immunapheresis)および/または本発明の固体担体(例えば、カラム)をアフエーシス装置に装着することによる問題を伴うことなく、本発明に適用することができる。

【0014】

それゆえ、本発明によると、「APP 結合性受容体」、またそのようなすべての物質は、

10

20

30

40

50

リガンド APPおよび特にA<sub>42</sub>のようなその生物学的副産物に対して親和性を有し、AD 患者またはADのリスクを有するものの血液または血漿からこれらのポリペプチドを排除することが出来るものとして理解されるべきである。これらAPP-またはA<sub>42</sub>-受容体はそれぞれ、好ましくは (ポリクローナルまたはモノクローナル)抗体、タンパク質、ペプチド、ガングリオシドまたは核酸であってよい。

#### 【 0 0 1 5 】

この点で特に好ましいのは、抗-APP 抗体、抗-A<sub>40</sub>-抗体または抗-A<sub>42</sub>-抗体、APP-結合性タンパク質、特に、ゲルゾリン、apoJまたはapoE、APP-結合性ペプチド、APP-結合性ガングリオシド、特にG<sub>M1</sub>、またはAPP-結合性核酸、特に、アプタマーまたはこれら受容体の混合物である。

#### 【 0 0 1 6 】

かかる抗体の例は、3D6 (A<sub>1-5</sub>)、2H3 (A<sub>1-12</sub>)、2G3 (A<sub>33-40</sub>)、21F12 (A<sub>33-42</sub>)、12H7 (A<sub>33-42</sub>) (Johnson-Wood et al., PNAS 1997:1550-1555)、10D5、16C11 (Bard et al., Nature Medicine 2000:916-919)、DeMattosら(2001)に記載の抗体(m266、m243)および同じ特異性を有する抗体である。かかる抗体は例えばAPP、A<sub>42</sub>またはそのフラグメントまたはバリエーションを含むワクチン製剤により哺乳類を免疫化することにより得られ、(モノクローナル抗体の場合は)所望により免疫化の後に細胞融合およびクローン選択プロトコールを行えばよい。

#### 【 0 0 1 7 】

ゲルゾリン (Matsuoka et al., 2003、前掲)、apoJ およびapoE (DeMattos et al., 2001、前掲)はAPP-結合性タンパク質受容体のさらなる例である。G<sub>M1</sub>はAPP-結合性ガングリオシド受容体の一例である(Matsuoka et al., 2003、前掲)。

#### 【 0 0 1 8 】

APP-結合性タンパク質のさらなる例としては、CETP (コレステリル-エステル-トランスファータンパク質)およびERAB タンパク質 (261アミノ酸サイズ; He et al., JBC 273 (17) (1998)、10741-10746; Lustbader et al., Science 304 (2004)、448-452; 特に、それぞれアミノ酸1-186および1-158)が挙げられる。APP-結合性ペプチドの例は、APP-結合性タンパク質由来のAPP-結合性フラグメントである。APP-結合性ペプチドの具体例は、KTYNLKKGQT-C (「ペプチド 4077」)、GIIVASKTYNLKKGQTHLEDFQRVLDV (ERAB 93-120)、SKTYNLKKGQTH (ERAB 98-110)、C-HQKLIVFFAED (「ペプチド 1323」)、C-EVHHQKLIVFFAEDVGS (「ペプチド 1324」)、C-HQKIVFFAED (「ペプチド 1325」) およびFGFPEHLLVDFLQSLC-C (「ペプチド 1208」) (そしてまたAPP-結合領域を含むすべてのその他のERAB、CETP、または -ブレイカー (breaker) のそれぞれのフラグメント) (これらペプチドにおいて、末端システインはネイティブなタンパク質配列の一部ではなく、ペプチドの結合のために単に結合している)。

#### 【 0 0 1 9 】

APP-結合性受容体としてのペプチドは、D-またはL-アミノ酸の集合であっても、DおよびL-アミノ酸の組み合わせであっても、さらなる修飾、閉環または誘導体化によって変化したものであってもよい。A<sub>42</sub>のための好適なペプチド受容体は、例えば市販のペプチドライブラリーから得ることが出来る。好ましくは、これらペプチドは、少なくとも5、好ましくは6のアミノ酸、特に少なくとも8アミノ酸の長さを有し、好ましい長さは11までであり、好ましくは14または20アミノ酸までである。しかし本発明によると、より長いペプチドであってもAPP-結合性受容体として何ら問題なく用いることが出来る。さらに、オリゴマー (例えば、ポリエチレン-イミンおよびポリリジン)は受容体として好適である。

#### 【 0 0 2 0 】

かかるAPP-結合性受容体を作るには、もちろん、ファージライブラリー、ペプチドライブラリー、例えばコンピナトリアル・ケミストリーにより作られたライブラリーまたは非常に多数の構造のためのハイスループットスクリーニング技術により作られたライブラリーも好適である (例えば、Phage Display: A Laboratory Manual by Carlos F. Barbas (Editor), et al.; Willats WG, Phage display: practicalities and prospects. Plant

10

20

30

40

50

Mol. Biol. 2002 Dec., 50(6): 837-54; <http://www.microcollections.de/showpublications.php#>を参照)。無作為化に基づいたファージライブラリーだけでなく、リボゾーム・ディスプレイまたは細菌ディスプレイを用いるライブラリーも好適である。適当なライブラリーおよびその作成方法は当業者に知られており、米国特許出願公開2004/0110281 A、WO 00/72880 AおよびWO 02/059148 Aに記載されている。

#### 【0021】

さらに、核酸に基づくAPP-結合性受容体(「アプタマー」; また、「デコイ」-オリゴデオキシヌクレオチド(その配列ゆえに転写因子のための結合部位を構成するdsオリゴヌクレオチド))も用いることが出来、ここで後者は非常に多様な(例えば2-180 核酸残基による)、(オリゴヌクレオチド-)ライブラリーによっても見いだされうる(例えば, Burgstaller et al., Curr. Opin. Drug Discov. Dev. 5 (5) (2002), 690-700; Famulok et al., Acc. Chem. Res. 33 (2000), 591-599; Mayer et al., PNAS 98 (2001), 4961-4965、その他多数)。核酸骨格は天然のホスホジエステル化合物によって形成されていてもよいが、ホスホロチオエートまたは組合せまたは化学的変形物(例えばPNA)によって形成されていてもよく、ここで、本発明によると、主にU、T、A、C、G、HおよびmC塩基を用いるのがよい。本発明によって用いられ得るヌクレオチドの2'-残基は、好ましくは、H、OH、F、Cl、NH<sub>2</sub>、O-メチル、O-エチル、O-プロピルまたはO-ブチルであり、核酸はその他の様式で修飾されていてもよく、即ち、オリゴヌクレオチド合成に通常用いられているような保護基を備えていてもよい。それゆえ、APP-結合性アプタマーもまた、本発明に含まれる好ましいAPP-結合親和性分子である。

#### 【0022】

APPに対するアプタマーは以下に記載の方法によって見いだすことができる。例えば、固定化 APP (または上記の別のいずれかの形態)を核酸混合物と接触させ、ここで高度に親和性の結合性核酸を、親和性がより低い結合性核酸、またはまったく結合しない核酸から分離する。この核酸の混合物は典型的には、コンビナトリアル・ケミストリーによって作られた核酸ライブラリーである。核酸ライブラリーは複数の互いに異なる核酸を含み、ここで少なくともも部分配列領域において、(天然および/または非天然ヌクレオチドによる) 無作為化が行われる。保存配列領域もあってもよいが、特に必要ではない。n個の位置でのm 種類のヌクレオチドにおける無作為化により、 $n^m$ の要素を備えたライブラリーが得られる。

#### 【0023】

APP-特異的親和性核酸を見いだすために、以下の工程を行う。

- a) カラム (内部) にAPP (等)をロードし、APP (等)をカラムに固定化する;
- b) カラムの第一の末端からカラムの第二の末端へと移動する所定の体積流量のキャリア物質を供給して核酸混合物をカラムの第一の末端にアプライする;
- c) 核酸を結合させ固定化させる、ここでカラムの第一末端からの距離が大きくなると核酸のAPP (等)に対する親和性が低下する;
- d) 体積流量のキャリア物質のカラムの通過を規定の移動時間後に完了する;
- e) カラムをいくつかに分けて分離しカラムセグメントを得る、ここで各セグメントは関連ランパス座標 (an associated run-path coordinate) を付与される;
- f) 少なくとも1つのセグメントから、固定化核酸が非特異的に脱離し、そのセグメントに関連していたランパス座標 (run-path coordinate) の分配により回収される。

「カラム内部に」という表現は、広い意味での内腔を意味する。「カラム」という表現は全てのタイプの固体担体システムを含み、完全に閉鎖していない担体システムでもよい。

#### 【0024】

APP (等)の固定化はカラムクロマトグラフィーの常套方法にしたがって行うとよい。カラムは、2つの末端を備えた内腔を有するいずれの機械的構造であってもよい。構成物質は、カラムに通常用いられているいずれの物質でもよく、例えば、金属、ガラスおよび/または合成物質でもよい。カラムは内部にAPP (等)が結合するマトリックスを備えていてもよく、および/または、構成物質は標的分子に好適であるか、または標的分子の直接結

合のために調製されたものであってよい。核酸混合物は、多数の、典型的には $10^6 \sim 10^{22}$ /Mol、特に $10^{10} \sim 10^{21}$ /Molの、互いに異なる核酸種を有する核酸ライブラリーを意味する。カラムにアプライされるライブラリーにおいて、各核酸種は統計的には、例えば、 $10 \sim 10^{17}$ 、特に $100 \sim 10^{13}$ の分子で表される。通常キャリア物質は、核酸ライブラリーがその中に溶解し、かつ安定である液体である。このため、核酸ライブラリーに通常用いられているすべてのバッファーなどが好適である。キャリア物質の体積流量は核酸ライブラリーをアプライする前に調節すればよい。次いで核酸ライブラリーをカラムの入口側のキャリア物質の流れに添加する。核酸ライブラリーはしかし、直接アプライしてもよい。カラムの構成および調節された体積流量によって決定される移動時間の後、核酸ライブラリーがアプライされた「プラグ」をカラムの出口側で再び開方し(拡散によるフォールディングのため広がっている)、結合した核酸は「プラグ」から分離されており、カラムに固定化されている。好適には、カラムを通る体積流量はわずかに、乱れが生じないように、好ましくは層流に調節する(カラム容積、特にカラム横断面にわたるキャリア物質の加速度ベクトルの和は最小とし、理想的には0とする)。カラム中のAPP分子の総数は典型的にはアプライした核酸ライブラリーの個々の種の核酸分子の数の $10^2 \sim 10^{16}$ 倍、特に $10^3 \sim 10^{15}$ 倍である。核酸のAPP分子への結合は、好ましくはアフエーシスの際に後で核酸を使用する条件にて起こらせる。例えば、温度、イオン強度、pHおよびバッファー条件に関して適当に調節した好適なバッファー条件とする。キャリア物質および核酸ライブラリーの溶媒はその成分にしたがって選択する。複数のカラムセグメントへのカラムの分離は、例えば、カラムをパーツになるよう切断することによって行えばよく、その切断は好ましくは体積流量ベクトルと直角にする。しかしカラムは前もってカラムセグメントの集まりにしておいてもよく、ここで1つのカラムセグメントは次のカラムセグメントに好ましくは体積流量ベクトルの方向にて緊密に結合している(横断面を体積流量ベクトルと直角にする)。次いでカラムセグメントの事前に形成された構成物を遊離させることによって分離を行う。非-特異的脱離は、十分に強力なりガンドでのAPPの置換、複合体化、修飾および/または破壊による溶出により、物理化学的または熱的に行うとよい。例えば超音波処理などの機械的方法も、脱離または脱離の促進に用いることが出来る。上記脱離方法の組み合わせを用いてもよい。使用した脱離方法によって核酸が分解してはならないことは当然である。

#### 【0025】

上記の工程は、核酸ライブラリーを、タンパク質混合物と同様に、標的分子、この場合にはAPP(等)、への親和性にしたがって親和性クロマトグラフィーによって、空間的に分離することが出来るという知見に基づく。本発明はさらに、非特異的脱離によって起こる様々な親和性の脱離核酸の混合を避けることが出来るという知見にも基づく。即ち、非特異的脱離の前に、核酸が結合しているカラムを、実質的に親和性セクションへと分割し、こうして得た親和性セクション即ちカラムセグメントに結合している核酸は、それぞれ容易かつ非特異的に、例えばPCRまたはRT-PCRにおいて、障害となるリガンド結合なしに脱離することができ、また、非特異的に増幅されうる。結果として選択のアーティファクトが回避される。リガンド、特に高濃度のリガンドはいずれも、脱離に要求されない。最後に、実質的にすべての、結合しており、後で脱離される核酸分子が増幅のために利用可能となる。これによって核酸濃度が低くても実行することが可能となる。基本的には、統計的平均内にあれば核酸ライブラリーにおけるいずれの種も1分子によって十分に表される。カラムセグメントにおけるAPP分子数が統計的に1であれば、単一の核酸種を標的分子へのその親和性によって分離することが出来ることになる。

#### 【0026】

この方法の具体的な利点を以下に説明する。親和性による核酸の分離によって、1つのカラムセグメントにおける核酸は同程度の親和性と異なる特異性を有することになる(APPの相異なる領域にAPP親和性核酸が結合し、即ちAPPの相異なる領域がAPP親和性核酸に対する結合部位となる)。

#### 【0027】

基本的には、所望の親和性が(単独で)割り当てられている1つのセグメントをさらに脱離のために処理すれば十分である。このための必要条件はしかし、アプライされた核酸ライブラリーにおける親和性分布の概念を持つことであり、ただし、最大親和性の場合を除き、その場合は、体積流量ベクトルとの関係で、第一カラムセグメントをさらに処理する。それゆえ、原則として、各セグメントの固定化核酸が別々に脱離および回収できることが好ましく、回収された核酸に対する各セグメントのランパス座標がそれぞれ割り当てられているのが好ましい。

#### 【0028】

基本的には、いずれのタイプの脱離も可能である。好ましくは、非特異的脱離は常套の物理化学的または熱的方法によって行われる。熱的脱離はカラムセグメント、即ちそこに含まれている溶液の加熱によって行われる。加熱は電氣的加熱またはマイクロ波の照射またはIRの何れで行ってもよい。PCR 技術に由来する加熱技術は特に好適である。核酸またはアプタマーのポリメラーゼによる増幅だけでなく、例えばリガーゼによる等のその他の増幅方法ももちろん用いることが出来る。非特異的脱離は、過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化などAPPの化学修飾によって、または例えば、炭水化物におけるシストランスジオール結合をブロックするホウ酸塩による非特異的複合体形成によって助けられる。

#### 【0029】

それゆえ、非特異的脱離は、好ましくは延長したPCRまたはRT-PCRの高温相において熱的脱離によって行われる。これによって、原則として、特に核酸種が低濃度である核酸ライブラリーを用いる場合、増幅がいずれにしても要求されるために相乗効果が達成される。収率を高めるために、それは例えば5~60、好ましくは20~60、もっとも好ましくは45~55 サイクル行われる。増幅の範囲内で、少なくとも1つの標識化プライマーを扱うことが可能である。プライマーは少なくとも1つのエンドヌクレアーゼ切断部位を有していてもよい。かかる切断部位は、例えば、プライマー配列のより大きな領域から増幅物質を遊離させるのに役立つ。ヌクレオチド構成単位は、プライマー内であっても選択される核酸内であっても、例えば、蛍光色素によって標識されていてもよい。蛍光色素としては、例えば、アレクサ (Alexa) (商標) フッ素 488、フッ素 532、フッ素 546、フッ素 568、フッ素 594、オレゴングリーン 488、フルオレセイン、ローダミン 6G、テトラメチルローダミン、ローダミン Bおよびテキサスレッドが挙げられる。増幅物質は、相異なる末端において2種類の異なる化学修飾によって標識してもよい。ただし、修飾において導入する基は、リガンドとしてそれぞれ相異なる親和性マトリックスに結合できるよう好適である必要がある。

#### 【0030】

非親和性 (non-affine) または低親和性 (low-affine) 核酸の信頼できる分離のためには、方法の好適な段階の間に洗浄方法工程を導入することが好ましい。特に、方法の工程 d) および e) の間に少なくとも1回の洗浄方法工程を行うことが好ましい。洗浄のためには例えば、溶媒、または核酸ライブラリーの媒体、またはキャリア物質がそれぞれ好適である。

#### 【0031】

APP (等) によるカラムの内側コーティングおよびその固定化は、好ましくは化学的に高度に反応性の基 (例えば、トレスルクロリド (tresyl chloride)、シアノプロミドおよび/または過ヨウ素酸 (periodate)) による活性化の後、または化学的に反応性の非常に低い基 (例えば、アミン、ヒドロキシ、ケト および/または カルボキシル) による修飾の後に官能性スパーサーリンクを介して、共有結合によって行うのが好ましい。好適なスパーサーリンクのためのスパーサー骨格の例を以下に挙げる: 置換および非置換  $C_2-C_{10}$  アルキル基、置換および非置換  $C_2-C_{10}$  アルケニル基、置換または非置換  $C_2-C_{10}$  アルキニル基、置換および非置換  $C_4-C_7$  カルボシクロアルキル基、置換および非置換  $C_4-C_7$  カルボシクロアルケニル基、置換および非置換  $C_7-C_{14}$  アラルキル基、窒素、酸素、硫黄から選択されるヘテロ原子を有する複素環分子、ここで該置換は以下からなるものとすればよい: アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、チオール、チオアルコキシ、ヒド

10

20

30

40

50



ロキシル、アリール、ベンジル、フェニル、ニトロ、ハロゲン、2~10の炭素原子および1~4の酸素または硫黄原子を有するエーテル基、ポリアルキルグリコール、ハロゲン、ヒドロキシル、チオール、ケト、カルボキシル、アミド、エーテル化合物、チオエーテル、アルニジン (arnidine) 誘導体、グアニジン誘導体、グルタミル誘導体、ニトラート ( $\text{ON O}_2$ )、ニトロ ( $\text{NO}_2$ )、ニトリル、トリフルオロメチル ( $-\text{CF}_3$ )、トリフルオロメトキシ ( $-\text{O CF}_3$ )、O-アルキル、S-アルキル、NH-アルキル、N-ジアルキル、O-アラルキル、S-アラルキル、NH-アラルキル、アミノ、アジド ( $\text{N}_3$ )、ヒドラジノ ( $\text{NHNH}_2$ )、ヒドロキシルアミノ ( $\text{ONH}_2$ )、スルホキシド ( $\text{SO}$ )、スルホン ( $\text{SO}_2$ )、スルフィド ( $\text{S}-$ )、ジスルフィド ( $\text{S-S}$ )、シリル。典型的には、スパーサーリンクは二官能性であり、ここで官能基は同じであっても異なっているとしてもよく例えば、「N-ヒドロキシスクシンイミドおよびヒドラジド」からなる群から選択される。

10

#### 【0032】

1つのカラムセグメントから得られる核酸内の多様性を低下させるためには、各カラムセグメントは、その統計的平均において、 $0.1 \sim 10^3$ 、好ましくは $1 \sim 10^2$ 、もっとも好ましくは $1 \sim 10$ の、APP (等) 分子を含んでいるのが好ましい。これと関係して、アプライされる核酸ライブラリーは、その統計的平均において、 $0.1 \sim 10^3$ 、好ましくは $1 \sim 10^2$ 、もっとも好ましくは $1 \sim 10$ の、1つの種の核酸分子を含むのがよい。

#### 【0033】

カラム構成物質としては、基本的には、親和性クロマトグラフィーに知られているすべての物質を用いることが出来る。それらのなかで、シリカゲルまたはポリマー、例えば化学的誘導体化による活性化または血漿活性化の後のポリエチレンのカラムが好ましい。カラムセグメントの長さは好適には $0.1 \mu\text{m} \sim 1 \text{mm}$ 、好ましくは $0.1 \sim 100 \mu\text{m}$ 、もっとも好ましくは $0.5 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲である。かかるセクションは例えばマイクロトームによって容易に作ることが出来る。カラムの内径は好適には $0.05 \sim 1 \text{mm}$ 、好ましくは $0.1 \sim 0.5 \text{mm}$ 、もっとも好ましくは $0.2 \sim 0.4 \text{mm}$ の範囲である。

20

#### 【0034】

望ましくない核酸は核酸の適切な分離(結合または機械的分離)の前に排除しておくのが好適である。望ましくない核酸は、例えば、カラムのAPP-不含有内側表面に結合する核酸である。したがって、APP-不含有カラムを上流に提供してもよく、核酸ライブラリーを前もってそれに通しておいてもよい。

30

#### 【0035】

以前に記載されたタイプの方法では、例えば連続してカラムを接続することによって、作業は連続的であってもよく、あるいは、例えば先のカラムからの溶出液を間で回収することによって非連続的であってもよい。

#### 【0036】

親和性分離をさらに改良するためには、基本的にはそれは様々な手法で行うことが出来る。したがって1または数個のセグメントから脱離した核酸を、所望により増幅の後に、繰り返し本発明の方法に供してもよく、および/または、脱離の際の条件のエルトロピー (elutropy) を上昇させてもよい(温度、イオン強度、pH、バッファー条件)。あるいは、APPの空間密度、およびしたがって、結合した核酸の空間密度、即ちカラムセグメントにおけるAPP分子の数を減らしてもよい。

40

#### 【0037】

APP-結合性アプタマー (上記の本発明によると、 $A_{42}$ -結合性アプタマーも含む)はそれゆえ本発明の範囲内の好ましいAPP-結合性受容体である。

#### 【0038】

本発明によると、それゆえ、好ましくは、ペプチド、抗体または核酸から構成されるAPP-結合性受容体は、アルツハイマー (リスク)の患者におけるAPPおよびそのタンパク分解産物の体外への排除のための好適な担体物質上で用いられる。

#### 【0039】

医学の常套プラクティスにおいて本発明を用いる場合、担体は無菌かつパイロジェン不

50

含有である必要があり、こういった要求を満たすいずれの担体物質またはいずれの受容体/担体組み合わせも本発明によると好ましい(例えば、米国特許第6030614号または第5476715号)。好適な例としては、多孔性ホモポリマー、ビニル含有モノマーのコポリマーまたはter-ポリマー(例えば、アクリル酸、例えば、TSK Toyopearl、Fractogel TSK)、オキシラン含有化合物(例えばエピクロロヒドリン)、および所望により、さらにNH<sub>3</sub>、アミノまたはカルボキシル含有化合物との反応物、またはCNBrあるいはCNCl 吸着剤で修飾(活性化)された担体が挙げられ、これらはEP 110 409 AおよびDE 36 17 672 Aに記載されている。治療目的において特に好ましい吸着物質は好適には、可能な限り、血液細胞を損失させず、補体系を活性化せず(活性化するとしてもわずかである)、そして体外循環において凝集物を形成させないものである。さらに、用いる担体物質は、好ましくは滅菌工程および受容体との結合(特に、エチレン-オキシド飽和、グルタルアルデヒド飽和、線照射、蒸気処理、UV処理、溶媒処理および/または界面活性剤処理等)について十分に安定なものであるべきである。セファロース、アガロース、アクリル、ビニル、デキストラン等に基づく製品も用いることが出来、それらは好ましくは、その市販の形態において既に、APP-結合性受容体に結合する好適な官能基を含むものである。さらなる好適な担体の例としては、モノリス(架橋したグリシジル-メタクリラート-コ-エチレングリコールジメタクリラート-ポリマーに基づく担体)、スポール(Supol)(Poschalko et al., J. Am. Chem. Soc. 2003, Nov. 5; 125 (44): 13415-26)が挙げられる。

#### 【0040】

受容体の好適な担体との結合(カップリング)には、当業者に公知の化学方法(例えば、  
20 パイコンジュゲート技術、Greg T. Hermanson, Ed., Academic Press Inc., San Diego, CA, 1995, 785pp.)を用いることが出来る。

#### 【0041】

さらなる態様において、本発明は、患者の治療用装置を好適に作成することにより、アルツハイマー病の治療を提供する、またはその治療手法を提供する、あるいはかかる疾患の予防のための本発明の装置の使用に関する。治療を行う場合は、患者はAPP ポリペプチドの有効な排除に十分な時間、アフエレーシス装置と連結され、ここで、患者の血液または血漿の流れがAPP-結合性受容体を含む固体担体と接触し、その際APP および/またはAPPのタンパク分解産物、特に A<sub>42</sub>が固体担体に結合する。アフエレーシス治療の過程において、もちろん、抗凝血が十分なように、末梢または中心静脈アクセスまたは動静脈瘻が  
30 確保される必要があり、また、必要とされた定量および測定データは記録しておかなければならない。さらに、ほとんどのアフエレーシス法において、血漿と血液細胞の一次分離が、適切な血漿処理の前に必要とされる。

#### 【0042】

予防手段が要求される具体的なヒトは、家族性疾患を有するヒト、老人(>50、>60または>70歳)またはさらに別のADの危険因子、特に遺伝因子を有するヒトである。

#### 【0043】

本発明を以下の実施例および図面によってさらに詳細に説明するがもちろんこれらに拘束されない。

#### 【0044】

図中、

図1はA<sub>42</sub>のペプチド 1208 (BSAに結合しており、ELISA プレートを被覆している)に対する結合を示す;

図2はペプチド 1208 (および1208-BSA)のA<sub>42</sub> (ELISA プレートを被覆している)に対する結合を示す;

図3は、A<sub>42</sub>の1208-BSAへの競合的結合を示す。

#### 【0045】

### 1. APP 受容体を担持する担体の生産

#### 1.1 モノリシック構造カラム

CIM(登録商標)エポキシモノリシック構造カラム (BIA Separations, SI)を製造業者

10

20

30

40

50

の指示にしたがって0.5 m Na リン酸バッファー (pH 8.0) で平衡化し、A ペプチドに対するモノクローナル抗体を製造業者の指示にしたがって活性化し、CIM カラムに結合させる。カラムをリン酸バッファー (+ 1 M NaCl) で数回洗浄し、過剰のエポキシ基を所望によりブロックする。

【0046】

品質保証は、洗浄および平衡化溶出液におけるチェックによって行う;活性のエポキシ基が無く、溶出液への抗体の漏出が無いカラムのみを次に用い、アフエレーシス装置に導入する。

【0047】

## 1.2 セファロースカラム

アガロースバルク材料(セファロース CL4B)を無菌環境下で、無菌かつパイロジェン不含有容器に満たし、材料を無菌環境下で洗浄し、ゲル材料を各洗浄工程の間に減圧下で完全に乾燥する。次いで、セファロースをオートクレーブ中で30 分115 で蒸気滅菌する。

【0048】

滅菌の後、セファロースを無菌容器中60%アセトン/水に取り出し、CNBrおよびトリエチルアミン(96 mlのアセトンあたり14 gのCNBr; 66.2 mlの87% アセトン中の30 mlのトリエチルアミン)で活性化する。次いでアセトン/HCl 溶液 (392 mlの無菌、パイロジェン不含有水; 16.3 mlの5N HCl、408 mlのアセトン)を添加した。活性化セファロースを洗浄して、活性化した基の加水分解を防ぐため2時間以内カップリング反応に供する。

【0049】

滅菌ろ過した抗体溶液 (それぞれm266、およびm243)を、反応槽に仕込み、少なくとも90 分攪拌する。最後に、反応溶液を(等張リン酸バッファーで) 溶出液中に反応産物が検出されなくなるまでよく洗浄し、抗体-結合セファロースを無菌の脱パイロジェンしたガラスカラムに充てんし、ガラスを焼結し、最終的な品質チェック(反応産物、重金属等)に関する溶出液分析; 粒子分析、パイロジェン性 (pyrogenicity) ; 無菌性)に供する。

【0050】

## 2. アルツハイマー患者のアフエレーシス治療のための動物モデル

糖尿病研究所 (the institute for diabetes) において、「Gerhardt Katsch」という、小型化した体外のシステムが、小動物モデルラットにおいてアフエレーシス療法を適用するために開発されている。世界中で、かかるアフエレーシス試験システムは非常に限られた程度でしか利用できない。同じ被験動物に対する繰り返しのアフエレーシス治療および次いで療法の成功を評価するための追跡期間における実験は非常に新規であり、今まで世界中の文献に記載されたことはない。

【0051】

アフエレーシスは体の外部で血液から病原性物質が取り出される代替療法である。ヒトの医療において、アフエレーシスは今まで100を超える疾患の治療に用いられてきた。アフエレーシスによって、疾患関連物質は完全に、または少なくとも部分的に以下のような疾患患者の血液から排除された: 自己免疫疾患、例えば、関節リウマチ、重症筋無力症、内分泌眼病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、全身硬直症候群および1型糖尿病。しかし今まで、アフエレーシスは非常に負荷が大きく、患者の生活の質が顕著に低下するような治療に抵抗性の慢性疾患の治療のための代替療法として受け入れられてきたに過ぎない。事実上この理由は今までアフエレーシス療法が成功する作用機作に関する詳細な知識がなかったことであった。

【0052】

承認された動物モデル、例えば、1型糖尿病および関節リウマチのモデルを用いることにより、アフエレーシス法の作用機作をさらに解明することが可能となり、アフエレーシス治療の新規な効能を臨床前に試験することができる。アフエレーシス治療を行うために、被験動物にまず長期血管カテーテルを与える。体外循環において、血液の血漿成分と細胞成分が次いで血漿フィルターによって分離される。細胞成分はすぐに動物に戻すが、血漿は戻す前に様々な吸着方法 (免疫吸着その他)によって精製するとよい。かかる繰り返

10

20

30

40

50

シアフェレーシス治療に対する良好な寛容性は、異なるラット系統で既に判明している（体重、血球容量、全身症状）。このアフエレーシス試験システムは体重が最低250gの動物について試験されており、自己免疫疾患についてラットモデルにおいて用いられている（I型糖尿病、コラーゲンII型-誘導性関節炎）。

#### 【 0 0 5 3 】

小動物モデルにおけるプラズマフェレーシスの体外システムは様々なタイプの吸着に使用することができる。慢性疾患モデルにおけるこの試験システムの使用により、以下が可能となる；(A)新規な治療および予防戦略の試験、(B)様々なアフエレーシス技術の作用機作の解明、および(C)個々のアフエレーシス療法に対する適応症の決定。IDKは新規に開発したアフエレーシス法の前臨床試験における有力なパートナーであり、動物実験における試験を介して開発段階から、患者における臨床適応への、新規治療方法の移行およびマーケティングに必須に寄与しうるものである（<http://www.praeklinik.de/>）。

10

#### 【 0 0 5 4 】

実験的アフエレーシス療法を開始する前、動物に動脈および静脈カテーテルを装備するが、長期にカテーテルを挿入されたラット（血管カテーテルは被験物質の適用、血液サンプルの採取およびアフエレーシス療法および動物モデルにおける固定実験の実施に好適なものである）を用いる。アフエレーシスにおいて、まず血液細胞と血漿とを第一段階において血漿フィルターにより分離する。血液細胞はすぐに動物に（静脈カテーテルを介して）再注入するが、分離した血漿は実施例1で調製した吸着手段（リガンドが固定化親和性ペプチドへの結合によって血漿から分離される手段）に供した後、動物に戻される。

20

#### 【 0 0 5 5 】

### 3. A<sub>42</sub> アプタマー

#### 3.1 トレシルクロリドによるシリカゲルカラムの活性化

カラムをアセトンですすぐ。活性化のために、無水溶液（2 mlのアセトン、1 mlのトレシルクロリド、数滴のピリジン）をカラムに通し（カラム容積の10倍）、それを氷上で一晩インキュベートする。次いで、カラム容積の20倍の100% アセトン（無水）でカラムをすすぐ。活性化したカラムは1 mM HCl中で保存できる。

#### 【 0 0 5 6 】

#### 3.2 ポリエチレンカラムの活性化

室温で、ポリエチレンチューブをカラム容積の20倍の溶液（濃硫酸（H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>）中の2% 過マンガン酸カリウム（KMnO<sub>4</sub>）（w/v））、次いで蒸留水ですすぐ。カラム表面でのさらなる結合（coupling）のために、二価または多価分子を架橋に用いることが出来、それは少なくとも1つの反応性アルデヒド基を含む（例えば、1% グルタルアルデヒド）。それらをカラムに4 で1時間通す。次いで、反応を還元条件下で（例えば、pH 3.9の0.15 M NaCl中のシアノホウ化水素ナトリウム（0.00025% w/v）によって）安定化する。

30

#### 【 0 0 5 7 】

#### 3.3 A<sub>42</sub>の活性化シリカゲルカラムへの結合（coupling）

トレシルクロリド-活性化カラムを0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>（pH 8.5）ですすぐ。結合（coupling）のために、ペプチドまたはタンパク質（2 mg/ml 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH 8.5）をカラムに、37 2時間、次いで氷上で4時間、数回通す。カラムの遊離結合部位をブロックするために、過剰の0.2 M グリシン、pH 8をカラムに通す。

40

#### 【 0 0 5 8 】

#### 3.4糖タンパク質の活性化ポリエチレンカラムへの結合（coupling）

活性化したカラムを0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>（pH 8.5）ですすぐ。結合（coupling）の目的で、A<sub>42</sub>（2 mg/ml、0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH 8.5）をカラムに37 2時間、次いで氷上で4時間、数回通す。カラムの遊離結合部位をブロックするために、過剰の0.2 M グリシン、pH 8をカラムに通す。反応を促進するために、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)、5% w/v、を添加してもよい。

#### 【 0 0 5 9 】

#### 3.5望ましくない分子の排除のためのカラムの作成

50

トレシルクロリド-活性化カラムを0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 8.5)ですすぐ。1または数個の一級または二級アミンを有する分子を排除の対象とする場合は、この分子、または混合物 (2 mg/ml 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 8.5) を一晩室温で数回カラムに通す。カラムの遊離結合部位をブロックするために、さらに過剰の0.2 M グリシン、pH 8をカラムに通す。特定の1以上の一級または二級アミンを有する分子の排除が望ましくない場合は、カラムのすべての結合部位をグリシンでブロックする。

【0060】

さらなる誘導体化方法は以下の文献に記載されている、例えば: Patterson, W. J., National Aeronautics and Space Administration, Technical Memorandum, NASA TMX-7331 1, U.S. Government Printing Office, Washington, D. C., 1976; Ma, S. M., Gregonis, D. E., von Wagenen, R. A., and Andrade, J. D., "Hydrogels for Medical and Related Applications" (J. D. Andrade, Ed.), Amer. Chem. Soc. Symp. Series, Vol. 31, p. 241, 1976; Harris, J. M., Struck, E. C., Case, M. G., Paley, M. S., Van Alstine, J. M., and Brooks, D. E., J. Polymer Sci., Polymer Chem. Ed., 22, 341 (1984); Regnier and Noel, Regnier, F. E., and Noel, R. J., J. Chromatog. Sci., 14, (1976); Yalpani, M. and Brooks, D. E., J. Polymer Sci., Polymer Chem. Ed., 23, 395 (1985)。

【0061】

### 3.6. 核酸のA<sub>42</sub>との接触とカラムの分離の実施

被覆されたカラムを漏出が起こらないように順番に連結する: 第一は望ましくない分子の排除用のカラムであり、次はA<sub>42</sub> カラムである。平衡化の目的で、好適なバッファー、例えば、バッファー溶液 (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> およびゼラチン 0.001% (w/v) pH 8.3) を氷上で1時間カラムに通す。コンビナトリアル核酸ライブラリーの核酸を1 ml の同バッファー中に取り出し、95 °Cで10分間加熱して二本鎖を解離させ、その後それらを数回(4-30回)カラムに通す。次いでカラムを分離し、選択したバッファー(前記)で一晩氷上で洗浄する。流れ方向におけるカラムの分離は好適な切断道具で行った。

【0062】

### 4. ペプチド 1208 (FGFPEHLLVDFLQSLS-C) に対するA<sub>42</sub>の結合研究

ペプチド 1208へのアミロイド-β結合の分析のために、まずペプチドを担体タンパク質 (BSA) にペプチド濃度500 μMol (およそ1 mg/ml) で結合(coupling)させた。1208-BSA コンジュゲートをELISA プレートに結合させ、ここでウェルあたり100 ngのペプチドが結合した。ELISA プレートをPBS、1% BSAで満たし、その後、アミロイド-β (1-42)の結合を濃度範囲8-1000ng/ウェルにて分析した。結合したアミロイド-βを特異的マウス抗体で検出した。最後に、結合したアミロイド-βの量を、ビオチン化抗-マウス抗体とストレプトアビジン結合ペルオキシダーゼを用いて定量した。基質としてABTSを用い、分析は405 nmの波長でELISA リーダーで行った(図1)。

【0063】

ペプチド 1208の結合の分析のために、アミロイド-β (1-42)をELISA プレートに結合させた(500 ng/ウェル)。次いで、ELISA プレートをPBS、1% BSAで満たし、遊離のペプチド 1208または1208-BSA コンジュゲートをそれぞれ添加した(0.8-50 ng)。結合したペプチドを特異的モノクローナル抗体で検出した。最終的な定量のために、ビオチン化抗-マウス抗体とストレプトアビジン結合ペルオキシダーゼを用いた。基質としてABTSを用い、分析は405 nmの波長でELISA リーダーで行った(図2)。

【0064】

1208-BSA コンジュゲートをELISA プレートに結合させ(100 ngペプチド/ウェル)、プレートをPBS、1% BSAで満たした。次いでアミロイド-β (1-42) (1000 ng/ウェル) の、遊離ペプチド 1208または対照-ペプチド (濃度範囲16-2000 ng/ウェル) の存在下での結合を分析した。結合したアミロイド-βの検出は前述のように行った(図3)。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

【図 1】図1はA<sub>42</sub>のペプチド 1208 (BSAに結合しており、ELISA プレートを被覆している)に対する結合を示す；

【図 2】図2はペプチド 1208 (および1208-BSA)のA<sub>42</sub> (ELISA プレートに被覆している)に対する結合を示す；

【図 3】図3は、A<sub>42</sub>の1208-BSAへの競合的結合を示す。

【図 1】

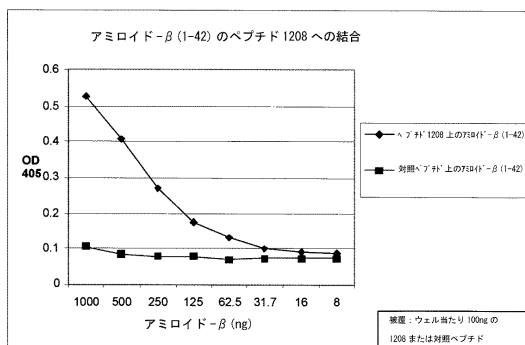


Fig.1

【図 2】

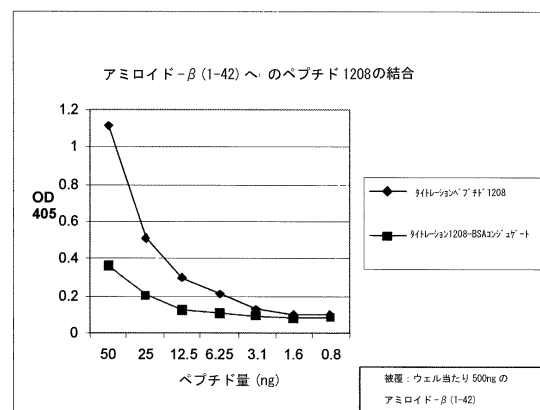


Fig.2

## 【図3】

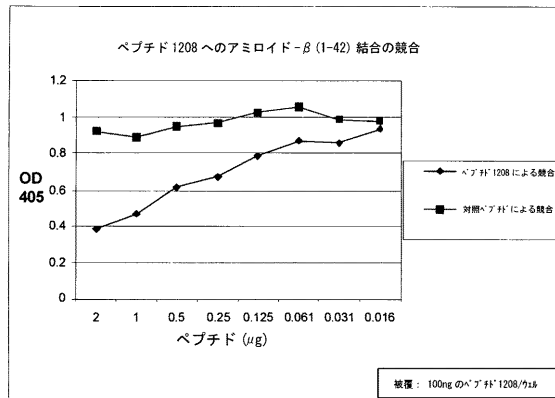


Fig.3

---

フロントページの続き

- (72)発明者 フランク・マットナー  
オーストリア、アー - 1 1 9 0 ヴィーン、クロッテンバッハシュトラッセ 2 6 7 番
- (72)発明者 ヴァルター・シュミット  
オーストリア、アー - 1 0 3 0 ヴィーン、シュタインガッセ 1 8 / 1 / 1 0 番

審査官 内山 隆史

- (56)参考文献 特公平 0 6 - 1 0 4 1 2 2 ( J P , B 2 )  
特表 2 0 0 3 - 5 2 3 7 6 4 ( J P , A )  
国際公開第 0 3 / 0 5 1 3 7 4 ( W O , A 1 )  
特表平 0 9 - 5 0 8 9 7 6 ( J P , A )  
特開 2 0 0 2 - 3 2 0 6 7 1 ( J P , A )  
特開平 0 1 - 1 7 1 6 3 8 ( J P , A )

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
A61M1/00-1/36