(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4796725号
(P4796725)

(45)発行日　平成23年10月19日(2011.10.19)　(24)登録日　平成23年8月5日(2011.8.5)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	ZNA
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02	
C12Q 1/48	(2006.01)	C12Q	1/48	Z
G01N 33/15	(2006.01)	G01N	33/15	Z
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z

請求項の数 28　(全 50 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001-515707(P2001-515707)
(86)(22)出願日　平成12年8月4日(2000.8.4)
(65)公表番号　特表2003-510023(P2003-510023A)
(43)公表日　平成15年3月18日(2003.3.18)
(86)国際出願番号　PCT/US2000/021458
(87)国際公開番号　WO2001/010900
(87)国際公開日　平成13年2月15日(2001.2.15)
審査請求日　平成19年8月3日(2007.8.3)
(31)優先権主張番号　09/369,236
(32)優先日　平成11年8月4日(1999.8.4)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　592048844
ユニバーシティ　オブ　サザン　カリフォルニア
アメリカ合衆国　９００８９－２５６１　カリフォルニア州，　ロサンゼルス　イーイービー　１３１，マックリントックアヴェニュー　３７４０
(73)特許権者　596057893
ノースウエスタン　ユニバーシティ
アメリカ合衆国，イリノイ　６０２０８－１１１１，エバンストン，クラーク　ストリート　６３３
(74)代理人　100102842
弁理士　葛和　清司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アミロイドβタンパク質（球状アセンブリー及びその使用）

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

外因的に添加された架橋剤を含まず、そして神経毒性活性を示す、１３～２４個のアミロイドβ１－４２タンパク質を含んでなる単離された可溶性非原線維性アミロイドβ１－４２オリゴマー構造体。

【請求項２】

前記オリゴマー構造体が、アミロイドβ１－４２タンパク質の１６－マー、２０－マー又は２４－マー凝集体を含んで成る請求項１記載の単離されたオリゴマー構造体。

【請求項３】

前記オリゴマー構造体が、非変性ゲル電気泳動により決定される場合、約３６ｋＤ～約１０８ｋＤの分子量を有する請求項１記載の単離されたオリゴマー構造体。

【請求項４】

前記オリゴマー構造体が、原子力顕微鏡により測定される場合、約６．５ｎｍ～約１１．０ｎｍの寸法の小球を含んで成る請求項１記載の単離されたオリゴマー構造体。

【請求項５】

前記オリゴマー構造体が、１６．５％のトリス－トリシンＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動により決定される場合、約３８ｋＤ～約１１６ｋＤの分子量を有する請求項１記載の単離されたオリゴマー構造体。

【請求項６】

請求項１記載のオリゴマー構造体の神経毒性効果をアッセイするための方法であって、

（ａ）動物（ヒトを除く）の海馬に前記オリゴマー構造体を投与し；
（ｂ）電気刺激を適用し；そして
（ｃ）長期の相乗作用応答を決定するために細胞体スパイク振幅を経時的に測定することを含んで成る方法。
【請求項７】
前記動物（ヒトを除く）の長期相乗作用応答が、前記電気刺激の適用の前、オリゴマー構造体の代わりに投与される塩溶液を有することを除いて、同じ態様で処理されるもう１つの動物（ヒトを除く）の長期相乗作用応答に比較される請求項６記載の方法。
【請求項８】
請求項１記載のオリゴマー構造体を、試験材料において検出するための方法であって、
（ａ）前記試験材料とβアミロイド特異的抗体とを接触せしめ；そして
（ｂ）前記抗体の前記オリゴマー構造体への結合を検出することを含んで成る方法。
【請求項９】
請求項１記載のオリゴマー構造体を、試験材料において検出するための方法であって、
（ａ）前記材料と血清－欠失された神経芽腫細胞とを接触せしめ；そして
（ｂ）前記試験材料と接触させなかった神経芽腫細胞に対して前記細胞の形態を比較することによって、前記細胞における形態学的変化を測定することを含んで成る方法。
【請求項１０】
請求項１記載のオリゴマー構造体を、試験材料において検出するための方法であって、
（ａ）前記試験材料と脳スライス培養物とを接触せしめ；そして
（ｂ）前記試験材料と接触させなかった脳スライス培養物に対して比較して、脳細胞の死を測定することを含んで成る方法。
【請求項１１】
請求項１記載のオリゴマー構造体を、試験材料において検出するための方法であって、
（ａ）前記試験材料と神経芽腫細胞とを接触せしめ；そして
（ｂ）前記試験材料と接触させなかった神経芽腫細胞におけるＦｙｎキナーゼ活性に対して前記細胞におけるＦｙｎキナーゼ活性を比較することによって、Ｆｙｎキナーゼ活性の上昇性を測定することを含んで成る方法。
【請求項１２】
請求項１記載のオリゴマー構造体を、試験材料において検出するための方法であって、
（ａ）前記試験材料と一次星状細胞の培養物とを接触せしめ；そして
（ｂ）前記試験材料と接触させなかった一次星状細胞の培養物に比較して、前記星状細胞の活性化を決定することを含んで成る方法。
【請求項１３】
請求項１記載のオリゴマー構造体を、試験材料において検出するための方法であって、
（ａ）前記試験材料と一次星状細胞の培養物とを接触せしめ；そして
（ｂ）前記試験材料と接触させなかった一次星状細胞の培養物におけるｍＲＮＡレベルに対して前記星状細胞における前記ｍＲＮＡレベルを比較することによって、インターロイキン１、誘導性酸化窒素シンターゼ、ＡｐｏＥ，　ＡｐｏＪ及びα１－抗キモトリプシンから成る群から選択されたタンパク質についてのｍＲＮＡの上昇性を前記星状細胞において測定することを含んで成る方法。
【請求項１４】
請求項１記載のオリゴマー構造体の神経毒性効果を調節する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）動物（ヒトを除く）の海馬に塩溶液又は試験化合物のいずれかを投与し；
（ｂ）電気刺激を適用し；
（ｃ）長期相乗作用応答を決定するために細胞体スパイク振幅を経時的に測定し；そして
（ｄ）試験化合物を投与された動物の長期相乗作用応答に対して、塩溶液を投与されている動物の長期相乗作用応答を比較することを含んで成り、

但し、前記オリゴマー構造体の投与は治療のためには行われない方法。
【請求項１５】
前記塩溶液又は試験化合物を投与する前、投与と共に又は投与の後、前記海馬にオリゴマー構造体を投与することをさらに含んで成る請求項１４記載の方法。
【請求項１６】
請求項１記載のオリゴマー構造体の神経毒性を阻止する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）前記試験化合物と接触させ又はさせないで前記オリゴマー構造体とニューロン細胞の別々の培養物とを接触せしめ；
（ｂ）個々の培養物における生存細胞の割合を測定し；そして
（ｃ）個々の培養物における生存細胞の割合を比較し、そして前記オリゴマー構造体の神経毒性を阻止する化合物が、前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体と接触させた対応の培養物に比較して前記培養物における生存細胞割合を高めるものとして同定されることを含んで成る方法。
【請求項１７】
請求項１記載のオリゴマー構造体の細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）前記試験化合物と接触させ又はさせないで前記オリゴマー構造体とニューロン細胞の別々の培養物とを接触せしめ；
（ｂ）前記オリゴマー構造体に結合する蛍光試験を添加し；
（ｃ）前記別々の細胞培養物を、蛍光活性化セルソーティングにより分析し；そして
（ｄ）前記培養物の蛍光を比較し、そして前記オリゴマー構造物の細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物が、前記試験化合物の不在下で前記構造体と接触させた対応の培養物に比較して前記培養物の蛍光を低めるものとして同定されることを含んで成る方法。
【請求項１８】
請求項１記載のオリゴマー構造体の細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）アミロイドβ１－４２タンパク質から前記オリゴマー構造体を、それが蛍光試薬と結合できる結合成分を含んで成るラベルされたオリゴマー構造体になるよう形成し；
（ｂ）前記試験化合物と接触させ又はさせないで前記ラベルされたオリゴマー構造体とニューロン細胞の別々の培養物とを接触せしめ；
（ｃ）前記オリゴマー構造体に結合する蛍光試薬を添加し；
（ｄ）前記別々の細胞培養物を、蛍光活性化セルソーティングにより分析し；そして
（ｅ）前記培養物の蛍光を比較し、そして前記オリゴマー構造物の細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物が、前記試験化合物の不在下で前記構造体と接触させた対応の培養物に比較して前記培養物の蛍光を低めるものとして同定されることを含んで成る方法。
【請求項１９】
請求項１記載のオリゴマー構造体の細胞表面タンパク質の形成又はそれへの結合を阻止する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）前記試験化合物と混合されているか又は混合されていないアミロイドβ１－４２タンパク質の別々のサンプルを調製し；
（ｂ）前記別々のサンプルにおいて前記オリゴマー構造体を形成し；
（ｃ）前記別々のサンプルとニューロンの細胞の別々の培養物とを接触せしめ；
（ｄ）オリゴマー構造体に結合する蛍光試薬を添加し；
（ｅ）蛍光活性化セルソーティングにより前記別々の細胞培養物を分析；そして
（ｆ）前記培養物の蛍光を比較し、そして前記オリゴマー構造物の細胞表面タンパク質の形成又はそれへの結合を阻止する化合物が、前記試験化合物の不在下で前記構造体と接触させた対応の培養物に比較して前記培養物の蛍光を低めるものとして同定されることを

含んで成る方法。
【請求項２０】
請求項１記載のオリゴマー構造体の細胞表面タンパク質の形成又はそれへの結合を阻止する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）前記試験化合物と混合されているか又は混合されていないアミロイドβ１－４２タンパク質の別々のサンプルを調製し；
（ｂ）前記別々のサンプルにおける前記オリゴマー構造体を、それが前記別々のサンプルにおける蛍光試薬と結合できる結合成分を含んで成るラベルされたオリゴマー構造体になるよう形成し；
（ｃ）前記別々のサンプルとニューロン細胞の別々の培養物とを接触せしめ；
（ｄ）オリゴマー構造体に結合する蛍光試薬を添加し；
（ｅ）蛍光活性化セルソーティングにより前記別々の細胞培養物を分析し；そして
（ｆ）前記培養物の蛍光を比較し、そして前記オリゴマー構造物の細胞表面タンパク質の形成又はそれへの結合を阻止する化合物が、前記試験化合物の不在下で前記構造体と接触させた対応の培養物に比較して前記培養物の蛍光を低めるものとして同定されることを含んで成る方法。
【請求項２１】
前記培養物の蛍光が、さらに、同じ態様で処理されている培養物の蛍光と比較され、但し、オリゴマー構造体の形成の前、試験化合物の添加する代わりに又は添加しない代わりに、前記試験化合物が、オリゴマー構造体の形成の後、添加されるか又は添加されず、
そしてオリゴマー構造体の形成を阻止する化合物が、前記化合物がオリゴマー構造体の前に添加される場合のみ、前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体と接触させた対応の培養物に比較して前記培養物の蛍光を低めるものとして同定され、そして
オリゴマー構造体の細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物が、前記化合物がオリゴマー構造体の前又は後に添加される場合、前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体と接触させた対応の培養物に比較して、前記培養物の蛍光を低めるものとして同定される、請求項１９記載の方法。
【請求項２２】
前記培養物の蛍光が、さらに、同じ態様で処理されている培養物の蛍光と比較され、但し、オリゴマー構造体の形成の前、試験化合物の添加する代わりに又は添加しない代わりに、前記試験化合物が、オリゴマー構造体の形成の後、添加されるか又は添加されず、
そしてオリゴマー構造体の形成を阻止する化合物が、前記化合物がオリゴマー構造体の前に添加される場合のみ、前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体と接触させ対応の培養物に比較して前記培養物の蛍光を低めるものとして同定され、そして
オリゴマー構造体の細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物が、前記化合物がオリゴマー構造体の前又は後に添加される場合、前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体と接触させた対応の培養物に比較して、前記培養物の蛍光を低めるものとして同定される請求項１９記載の方法。
【請求項２３】
請求項１記載のオリゴマー構造体の細胞表面タンパク質への結合を検出するための方法であって、
（ａ）アミロイドβ１－４２タンパク質から前記オリゴマー構造体を形成し；
（ｂ）前記オリゴマー構造体とニューロン細胞の培養物とを接触せしめ；
（ｃ）前記オリゴマー構造体に結合する、接合成分を包含する抗体を添加し；
（ｅ）結合されていない抗体を洗浄除去し；
（ｆ）前記オリゴマー構造体に結合される前記抗体に酵素を、前記接合成分により結合させ；
（ｇ）前記酵素により分解されて変色する無色の基質を添加し；そして
（ｈ）前記オリゴマー構造体の細胞表面のタンパク質への結合の規準として前記変色を決定することを含んで成る方法。

【請求項２４】
請求項１記載のオリゴマー構造体の細胞表面タンパク質への結合を阻害する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）前記試験化合物と混合されているか又は混合されていないアミロイドβ１－４２タンパク質の別々のサンプルを調製し；
（ｂ）前記別々のサンプルにおいて前記オリゴマー構造体を形成し；
（ｃ）前記別々のサンプルとニューロン細胞の別々の培養物とを接触せしめ；
（ｄ）前記オリゴマー構造体を結合する、接合成分を包含する抗体を添加し；
（ｅ）結合されていない抗体を洗浄除去し；
（ｆ）前記オリゴマー構造体に結合される前記抗体に酵素を、前記接合成分により結合させ；
（ｇ）前記酵素により分解されて変色する無色の基質を添加し；そして
（ｈ）前記別々のサンプルの個々による変色を比較し、そして前記オリゴマー構造体の細胞表面タンパク質の形成又はそれへの結合を阻止する化合物が前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体と接触させた対応の培養物に比較して前記培養物により生成される変色を低めるものとして同定されることを含んで成る方法。
【請求項２５】
前記培養物により生成される変色が、さらに、同じ態様で処理されている培養物により生成される変色と比較され、但し、オリゴマー構造体の形成の前、試験化合物の添加する代わりに又は添加しない代わりに、前記試験化合物が、オリゴマー構造体の形成の後、添加されるか又は添加されず、
そしてオリゴマー構造体の形成を阻止する化合物が、前記化合物がオリゴマー構造体の前に添加される場合のみ、前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体と接触させ対応の培養物に比較して前記培養物により生成される変色を低めるものとして同定され、そして
オリゴマー構造体の受容体結合を阻止する化合物が、前記化合物がオリゴマー構造体の前又は後に添加される場合、前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体と接触させた対応の培養物に比較して、前記培養物により生成される変色を低めるものとして同定される請求項２４記載の方法。
【請求項２６】
請求項１記載のオリゴマー構造体の形成を阻止する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）前記試験化合物と混合されているか又は混合されていないアミロイドβ１－４２タンパク質の別々のサンプルを調製し；
（ｂ）前記別々のサンプルにおいて前記オリゴマー構造体を形成し；
（ｃ）タンパク質アセンブリーが、電気泳動、免疫認識及び原子力顕微鏡から成る群から選択された方法を用いて、別々のサンプルに形成されているかどうかを評価し；そして
（ｄ）前記別々のサンプルにおける前記タンパク質アセンブリーの形成を比較し、そして前記オリゴマー構造体の形成を阻止する化合物が、前記オリゴマー構造体が前記試験化合物の不在下で形成されるサンプルと比較して前記サンプルにおける前記オリゴマー構造体の低形成を低めるものとして同定されることを含んで成る方法。
【請求項２７】
請求項１記載の単離された球状の可溶性、非原線維性アミロイドβ１－４２オリゴマー構造体の調製方法であって、
（ａ）前記オリゴマー構造体を形成できるモノマーアミロイドβ１－４２タンパク質の溶液を得；
（ｂ）前記アミロイドβ１－４２モノマーをヘキサフルオロイソプロアノールに溶解し；
（ｃ）固体ペプチドを得るために急速真空蒸発によりヘキサフルオロイソプロアノールを除去し；

（ｄ）前記固体ペプチドを、ＤＭＳＯ原液を得るためにＤＭＳＯに溶解し；
（ｅ）前記原液を適切な培地中に希釈し；
（ｆ）ボルテックスにかけ；そして
（ｇ）約４℃で約２４時間インキュベートすることを含んで成る方法。
【請求項２８】
請求項１記載のオリゴマー構造体を試験サンプルにおいて検出するための方法であって、
（ａ）前記試験化合物と神経細胞とを接触せしめ；そして前記細胞がＡＤＤＬ－誘導性異常ニューロンシグナルを示すかどうかを決定することを含んで成る方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
発明の技術分野：
本発明は、物質、すなわちアミロイドβ－由来の痴呆性リガンド（ADDL）の新規組成物に関する。ADDLは、特定細胞工程を活性化できる可溶性の球状非原線維性オリゴマー構造体にアセンブルされるアミロイドβペプチドを含んで成る。本発明はまた、ADDLの形成、存在、受容体タンパク質結合及び細胞活性をアッセイするための方法も提供する。またADDLの形成又は活性を阻止する化合物、及びそのような化合物を同定するための方法を提供する。ADDL形成及び活性は中でも、記憶及び学習に相当する。従って、ADDL形成又は活性の調節が、学習及び記憶障害、及びADDLの効果による他の疾病、障害又は疾病の処理に、本発明に従って使用され得る。
【０００２】
発明の背景：
アルツハイマー病は、明確な病理学、例えば神経細線維混乱、神経炎プラーク、ニューロン萎縮、樹状突起切除及びニューロン死により特徴づけられる進行性神経変性疾病である。歴史的な展望から、アルツハイマー病の決定的な診断は常に、特定の病理学的特徴、すなわち死亡及び死亡性ニューロンの崩壊された細胞骨格を表す神経細線維混乱、及び種々のタンパク質、脂質、炭水化物及び塩化合物；すなわちアミロイドβとして知られる39－43個の残基ペプチドである一次タンパク質成分の細胞外沈着物である神経炎プラクの同定に依存して来た。
【０００３】
しかしながら、疾病影響の観点から、それは、アルツハイマー病において明白な徴候、すなわち記憶の損失、認識機能の低下、及び最も有意である人格及び行動の有意な変化である。根本的なそれらの徴候的変化は、神経細胞の機能不全及び結果的に、変性及び死を引き起こす特定の細胞機能である。それらの細胞機構は疑いなく、いくらかのレベルの保護を付与するか、又は寄与し、そして悪化する効果を発揮するバックグラウンド環境内で作用する。その結果は、特定の原因を指摘する集団研究からの少々の手がかりを伴なって、非常に広い年齢/発揮分布曲線である。
【０００４】
分子遺伝子学は、家族性アルツハイマー病の明白な病像が出現する1つの研究範囲を提供する。下記でより詳細に記載されるように、アルツハイマー病を導く最終の共通する経路がそれらの異なった家族性AD突然変異のすべてにおいて存在するアミロイドβ１－42（及びアミロイドβ１－43）の高められた生成であることは、３種の異なったタンパク質、すなわちAPP及びプレセニン１及び２における突然変異を同定する研究から明白である。これは特に注目すべきことである。なぜならば、本発明の中心的目的であるADDLは、単にこの長い形のアミロイドから安定した実在体として形成し、そしてより一般的な短い形のAβ１－40からは形成しないからである。
【０００５】
アルツハイマー病におけるアミロイドβ：1984年、Glenner and Wongは、アルツハイマー病に関連する脳血管アミロイドを単離し、そして同定することに成功した（Glennerなど., Biochem. Biophys. Res. Commun., 120, 885-890, 1984a）。続いて、アミロイドβと

して現在知られている同じ39－43残基ペプチドが、アルツハイマー病神経炎プラークの主要タンパク質成分として同定された（Glennerなど., Biochem. Biophs. Res. Commun., 122, 1131-1135, 1984b; Mastersなど., EMBO）., 4, 2757-2764, 1985a; Mastersなど., Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 4245-4249, 1985b)。これは、別々の分子がアルツハイマー病に連結された最初であり、すなわちこの点に関する疾病は、神経解剖学及び神経病理学説明によってのみ特徴づけられて来た。アミロイドβはまた、ダウン症個人の脳においてプラーク成分として同定されており（Glennerなど., Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 1131-1135, 1984b; Mastersなど., EMBO J., 4, 2757-2764, 1985a; Mastersなど., proc. Natl. Acad. Sci. 82, 4245-4249, 1985b）、これは、それをコードする遺伝子が染色体21上に存在する提案を導く。1987年までに、多くのグループが、その提案を確認するためにアミロイドβ配列情報及び分子遺伝子学技法を使用し、アミロイド前駆体タンパク質（APP）についての遺伝子を同定した（Kangなど., Nature, 325, 733, 1987; Tanziなど., Science, 235, 880-884, 1987）。

【０００６】

APP遺伝子は、多くのAPPに分化的にスプライシングされる大きな多エキソン遺伝子である（Selkoe, Annual Review 1 Neuroseience, Cowan (Ed.), 17, ix＋623p, 489-517, 1994）。このタンパク質は、いくつかの経路（１又は複数のそれらの経路はアミロイドβを生成する）によりプロセッシングされることが現在知られている大きなトランスメンブランタンパク質である。APPプロセッシングの初期研究は、アミロイドβ形成が通常の工程ではないが（Eschなど., Science, 248, 1122-1124, 1990; Sisodia など., Science, 248, 492-495, 1990）、但し、培養された細胞における続く研究、及び血清及び脳脊髄液の分析は、アミロイドβ形成が、有力な全体的な経路を表さないが、多くの細胞型において通常の工程として生存することを示している。

【０００７】

家族性アルツハイマー病の初期開発を有する個人からのDNAの中枢的遺伝子研究は、単一の遺伝子、すなわちこの同じAPP遺伝子における突然変異がこの非常に重度の形の疾病の原因であったことを示した。興味あることには、APP遺伝子におけるいくつかの異なった突然変異、例えばVal717、すなわちアミロイドβ1－42C末端から４個の下流の残基での３種の異なった単一残基置換（Goateなど., Nature, 349, 704-6, 1991; Chartier-Harlanなど., Nature, 353, 844-6, 1991; Murrellなど., Science, 254, 97-9, 1991）、及びスウェーデン人家族における家族性アルツハイマー病の初期開始に関連する、アミロイドβ　N－末端のすぐ上流の２つの残基突然変異（670－671）（MullanなどNature Genetics 1, 345-347, 1992）が見出された、スウェーデン人変異体APP遺伝子のcDNAをコードするベクターがAPPプロセッシングを評価するために細胞系中にトランスフェクトされる場合、６～８倍多くのアミロイドβが、野生型APPからのレベルに比較して、形成されたことが見出された（Citronなど., Nature, 360, 672-674, 1992; Caiなど., Science, 259, 514-516, 1993）。生来のヒト脳プロテアーゼ活性を含む脳組織抽出物が、野生型配列に基づくその対応する基質よりも100倍早く、そのスウェーデン人突然変異を包含する蛍光原オクトペプチド基質をプロセッシングできることがまた示されている（Ladrorなど., J. Biol. Chem., 269, 184422-8, 1994）。それらの結果は、スウェーデン人突然変異が家族性アルツハイマー病の初期開始の原因である機構が、アミロイドβの実質的な過剰生成を包含することを示す。717変異体APPによりトランスフェクトされた細胞におけるアミロイド形成の類似する研究がまた行われたが、しかし生成されるアミロイドβのレベルは、野生型APPにより生成されるレベルとは異ならなかった。これは、アミロイドβ生成以外の何かがそれらの突然変異のための病原である機構的推測を導く。APP717変異体のプロセッシングの評価、及びYounkin及び共同研究者によるスウェーデン人変異体APP（Suzukiなど., Science, 264, 1336-1340, 1994）は、それらの遺伝的アルツハイマー病患者の統一された病像を提供する。この研究においては、アミロイドβ生成の合計レベルが評価されるのみならず、また生成されるアミロイドβペプチドの特定の長さも分析された。この結果は、717突然変異が、合計のアミロイドβレベルは変化しなかったとしても、アミロイド

β１－40（生理学的条件下で高い可溶性のペプチド）に対するアミロイドβ１－42の割合の倍増化を導いたことを確かめた。染色体14（Sherringtonなど., Nature, 375, 754-758, 1995）及び染色体１（Levy－Lahadなど., Science, 269, 970-973, 1995）上にそれぞれ存在する遺伝子における、最近発見されたプレセニン１及び２家族性アルツハイマー病突然変異は、アミロイドβ１－42の有意な過剰生成に関連している（Mannなど., Annals of Neurology, 40, 149-56, 1996; Schuenerなど., Nature Medicine, 2, 864-70, 1996）。それらの発見に基づけば、それらの明確に異なった家族性アルツハイマー病突然変異により介在される病原性工程は、高レベルのアミロイドβ１－42の生成であると思われる。これは、神経炎プラークを形成するためにアミロイドβの凝集を供給する（Roherなど., Neurochem., 61, 1916-1926, 1993; Tamaokaなど., Biochem. Biophys. Res. Commun., 205, 834-842, 1994）、最も容易に凝集するアミロイドの形（SnyderなどBiophys. J., 67, 1216-28, 1994）、及び意外とは、“ADDL”と称する、安定した高い程度のアセンブリーを形成する形である。

【０００８】

アルツハイマー病における非アミロイドプラーク成分：アミロイドβは、合計タンパク質の70％以上を占める、プラークの主要タンパク質成分である。しかしながら種々の他のタンパク質成分、例えばα１－抗キモトリプシン（ACT）、ヘパリン硫酸プロテオグリカン（HSPG）、アポリポプロテインE、及びブチリルコリンステアレート（BChE）、S－100B及びいくつかの補体成分が存在する。アルツハイマー病の開始及び進行におけるそれらの成分の重要性は確立されてはいないが、その疾病におけるapo Eイソフォームの関与が、アポプロプロテインE遺伝子、すなわちapo E4における多型現象が後期開始の家族性アルツハイマー病患者におけるアルツハイマー病の初期開始に相互関係していることを発現した、Roses及び共同研究者（Strittmatterなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1977-81, 1993）の遺伝子研究により確立されている。続く研究は、apo E4を有する個人のグループが、アルツハイマー病の有意に高い危険性を有し、そしてアルツハイマー病の開始がapo E4についての遺伝子用量におおまかに匹敵することを確認している。機構レベルに基づく研究は、apo E4が、アルツハイマー病の後期開始に関連するイソフォームである、apo E3又はapo E2よりもアミロイドβに対して低い親和性で結合することを示している。それらのイソフォームがアミロイドβ１－42沈着物のより効果的なクリアランスにより保護効果を発揮できることが示唆されている（Laduなど., J. Biol. Chem. 269, 23403-23406, 1995; Laduなど., J. Biol. Chem., 270, 9039-42, 1995）。

【０００９】

他のプラーク成分の役割は明確ではないが、但し、最近の研究（Odaなど., Exptl. Neurology, 136, 22-31, 1995）は、apo J (クラステリン)が凝集されたアミロイドβ１－42の毒性をインビトロで有意に増強できることを示した。HSPGがラット脳中に注入される場合、アミロイドβ１－40の毒性を増強することもまた、報告されている（Snowなど., Soc. Neurosci. Abstr., 18, 1465, 1992）。Wrightなど.（Ann. Neurol., 34, 373-384, 1993)は、アルツハイマー病の脳からのアミロイドプラークが有意なレベルのBChEを含み、そして老人の非－痴呆性個人からのアミロイドプラークはそれを含まないことを示している。急性相炎症タンパク質ACTはまた、アルツハイマー病の脳においてアップレギュレートされ、そしてそれは、アミロイドβのN－末端の16個の残基に関連していることが知られている。Maなど.（Maなど., Nature, 372, 92-94, 1994)は、ACTがアミロイドβ１－42の凝集を増強することを報告しており、そしてそれらの著者は、増強された凝集がその神経毒性に寄与することを推定している。

【００１０】

アミロイドβ細胞応答及びインビボ病理学：アルツハイマー病の特徴であるプラーク及び混乱の他に、広範囲の細胞応答が、ニューロン及び付随するグリア細胞において低められたことは明白である。生化学的レベルで、キナーゼ/ホスファターゼバランスの混乱に起因する、tauタンパク質の過リン酸化が明確である。転写レベルで、種々の遺伝子が、脳において通常存在しないか、又は低レベルで単に存在する広範囲のタンパク質を生成する

ために活性化される。炎症工程が活性化されている有意な証拠がまた存在する。特に、tauリン酸化は、分化されたSH－SY5Y細胞において凝集されたアミロイドβ１－42により誘発されることが示されており（Lambertなど., J. Neurosci. Res., 39, 377-384, 1994）、そしてこの結果は、アミロイドβが培養された一次ラット海馬ニューロンにおいてtauリン酸化を活性化することにより、Busciglioなど. (Nature, 14, 879-88, 1995)による最近の報告により確かめられた。

【００１１】

アルツハイマー病における原線維性アミロイドβ及び神経変：アミロイドβ１－42がアルツハイマー病を引き起こす機構は、解明されていないが、しかし文献は、アミロイドβ神経毒性の200以上の研究を包含し、それらの多くは最近、再考されている（例えば、Yanknerなど., Neuron, 16, 921-32, 1996; Iverseなど., Biochemical Journal, 311, 1-16, 1995）。その一致した観点は、アミロイドβを毒性にするためには、それが原線維性構造にアセンブルすべきであることである（Pikeなど., J. Neurosci., 13, 1676-87, 1993）。モノマー性アミロイドβのみを含む溶液は、培養物におけるニューロンに対して有害な効果を有さないことを、くり返して示されている。さらに、研究は、円二色法及び電子顕微鏡のような技法を用いて、アミロイドβ－シート含有原線維野形成、及び毒性のタイミング及び程度を相互関連して来た（Simmonsなど., Molecular Pharmacology, 45, 373-9, 1994）。1つの研究は、アミロイドβがそれを毒性におけるためには、原線維形で存在すべきであることを明確に結論づけた（Lorenzoなど., Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 91, 12243-12247, 1994）。アミロイドβ構造及び活性に関するこの一致にもかかわらず、アミロイド毒性に関する公開された実験作業の再現性の問題（Brining, Neurobiology of Aging, 18, 581-589, 1997）、及び同一の化学的組成にもかかわらず、アミロイドの異なったバッチ、又はわずかに異なった手段で取り扱いされたアミロイドの同じバッチにより得られた活性の広範囲の変化（Mayなど., Neurobiology of Aging, 13, 1676-87, 1993）の問題が連続して存在する。これは、その活性を担当するアミロイドβの正確な構造に関する問題を発生せしめた。

【００１２】

本発明は、従来技術における問題を克服しようとしている。従って、物質、すなわち意外には神経毒性である可溶性球状非原線維性オリゴマー構造体（ADDL）にアセンブルされるアミロイドベータペプチドの新規組成物を供給することが、本発明の目的である。本発明のそれらの及び他の目的及び利点、並びに追加の発明的特徴は、次の記載から明らかであろう。

【００１３】

発明の要約：

本発明は、アミロイドβ－由来の痴呆性リガンド又はアミロイドβ－由来の拡散性リガンド（ADDL）と称する物質の新規組成物を包含する。ADDLは、特定の細胞工程を活性化できる可溶性非原線維性オリゴマー構造体にアセンブルされるアミロイドβペプチドから成る。本発明のもう1つの観点は、ADDLの受容体タンパク質結合及び細胞活性の形成又は存在をアッセイするための方法から成る。本発明はさらに、ADDLの形成及び/又は活性を調節する（例えば、高めるか又は低める）化合物を同定するアッセイ方法を包含する。そのような化合物は、ADDLの効果による疾病、障害又は病状の処理に使用され得る。

【００１４】

発明の特定の記載：

アミロイドβの神経毒性サンプルにおいて、原線維構造体が存在するのみならず、又は意外には、神経毒性を担当すると思われるいくらかの球状タンパク質構造体が存在することが発見された。新規方法を用いて、それらの可溶性球状タンパク質アセンブリーを優先的に含むが、しかし原線維構造体を含まないサンプルが、本明細書に記載のようにして生成された。種々の方法により調製された不均質サンプルにおいては、遠心分離によるアミロイドβの大きな原線維形の除去は、上清液画分におけるアミロイドβのそれらの可溶性球状アセンブリーを除去しない。それらの上清液画分は、文献条件下で凝集される、分別さ

れていないアミロイドβサンプルよりも有意に高い神経毒性を示す。それらの新規で且つ予測できない神経毒性可溶性球状形は、本明細書において、アミロイドβ由来の痴呆性リガンド、アミロイドβ－由来の拡散性リガンド（ADDL）、アミロイドβ可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体、又は単純なオリゴマー構造体と呼ぶ。３週以上の間、標準の文献条件（例えば、Pikeなど., J. Neurosci., 13, 1676-1687, 1993）下で“老化された”アミロイドβのサンプルは、それらのサンプルが少々のADDLを含むか又は含まない原線維性構造体を優先的に含んだとしても、それらの神経毒性を失う。球状ADDLが神経毒性であるこの発見は、現在の考えがアミロイドβの毒性形から構成される原線維性構造体であることを維持しているので、特に驚くべきことである（Lorenzoなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 12243-12247, 1994; Howlettなど., Neurodegen. 4, 23-32, 1995）。

【００１５】

ADDLはインビトロで形成され得る。モノマーアミロイドβ１－42（又はさらに本明細書において記載される他の適切なアミロイドβ）を含む溶液（例えば、DMSO溶液）が冷組織培養培地（例えば、F12細胞培養培地）中に希釈され、約4℃で約２～約48時間インキュベートされ、そして4℃の温度で、約14,000gで約10分間、遠心分離される場合、その上清液画分は、ニューロン細胞及び脳スライス培養物において高い神経毒性である小さな可溶性のオリゴマー球体を含む。ADDLはまた、一定の適切な剤、例えばクラステリン（例えば、ApoIとしても知られている老人性プラークタンパク質）と共にアミロイドβをインキュベートすることにより、及び本明細書に記載されるような他の方法により形成され得る。

【００１６】

従って、特に、本発明は、単離された可溶性の非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体を供給する。そのようにして単離されたオリゴマー構造体は、添加された外因性架橋剤を含まない。オリゴマー構造体は所望には、いずれかの架橋剤も不在下で安定している。

【００１７】

原子力顕微鏡分析（AFM）は、当業界に知られており、そして本明細書に記載されているように、例えば例３に記載のようなDigital Instruments Atomic Force 顕微鏡を用いて行われ得る。そのような上清液画分（すなわち、原線維画除去されている上清液画分のAMFは、光の画分に存在する多くの異なったサイズの小球体（すなわち、異なったサイズのオリゴマー構造体）を表す。それらの小球体は約4.7～約11.0nmの範囲内であり、そして主要画分は約4.7～約6.2nmのサイズ範囲内にある。この範囲内にあり、そして特定のサイズのオリゴマー種、例えば図２及び16に示されるような、一定のゲル電気泳動システム上での分析により示されるそれらの種に対応する明確な種の小球体が存在すると思われる。表面のわずかな変動は、特定種がAFM分析の時点でマイカ表面上にいかにして密封されるかに起因する。しかしながらこのわずかな変動にもかかわらず、典型的なサンプルにおいてオリゴマー構造体の約50％を構成する、4.7～6.2nmのサイズ範囲、すなわち約4.9nm～約5.4nm、及び約5.7nm～約6.2nmの範囲のいくつかの優先サイズの小球体が存在すると思われる。また、約5.3nm～約5.7nmの寸法を有する明確なサイズ種の小球体が存在すると思われる。約6.5nm～約11.0nmのより大きな小球体はほとんど頻度は低いが、しかしより有力な小さな種に類似する神経毒性性質を有することができる。AFM上での約4.7nm～約6.2nmの寸法の小球体は、オリゴマーアミロイドβ（Aβ）タンパク質のペンタマー及びヘキサマー形を含んで成ることが明らかである。約4.2nm～約4.7nmのAFMサイズ小球体がAβテトラマーに対応すると思われる。約3.4nm～約4.0nmのサイズの小球体がトリマーに対応すると思われる。大きな小球体は、約13のアミロイドモノマー～約24のアミロイドモノマーのサイズ範囲のオリゴマー種に対応すると思われる。約2.8nm～約3.4nmのサイズの小球体はダイマーに対応する（Roherなど., J. Biol. Chem., 271, 20631-20635, 1996）。Aβモノマー AFMサイズは、約0.8nm～約1.8-2.0nmの範囲である。モノマー及びダイマーアミロイドβは、ニューロン細胞培養物において又は器官型脳スライス培養物において神経毒性ではない。

【００１８】

従って、本発明は、好ましくは、約３～約24個のアミロイドβタンパク質モノマー、特に約３～約20個のアミロイドβタンパク質モノマー、特に約３～約16個のアミロイドβタンパク質モノマー、最も好ましくは、約３～約12個のアミロイドβタンパク質モノマー、及び所望には、約３～約６個のアミロイドβタンパク質モノマーを含んで成る、単離された可溶性の非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体（すなわち、ADDL）を提供する。前に記載されたように、大きな小球体（ほとんど優性種ではない）は、約13～約24個のアミロイドβモノマーのサイズ範囲のオリゴマー種に対応すると思われる。従って、本発明は、オリゴマー構造体が好ましくは、前記オリゴマー構造体の約40％～約75％が、原子力顕微鏡により測定される場合、約4.9nm～約5.4nmの寸法、及び約5.7nm～約6.2nmの寸法の小球を含んで成る単離された可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体を供給する。特に、本発明は、オリゴマー構造体が、好ましくはトリマー、テトラマー、ペンタマー又はヘキサマーのアミロイドβタンパク質の凝集体を含んで成る単離された可溶性非原線維性アミロイドβタンパク質オリゴマー構造体を提供する。本発明のオリゴマー構造体は、最適には、神経毒性活性を示す。

【００１９】

可溶性非原線維性アミロイドβタンパク質オリゴマー構造体（オリゴマー構造体を形成するためのモノマーの凝集）の高次構造体は所望には、アミロイドβ１－42のみならず、また可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体を安定して形成できるいずれかのアミロイドβタンパク質から得られる。特に、アミロイドβ１－43もまた使用され得る。位置１でビオシチンを有するアミロイドβ１－42もまた使用あれ得る。N－末端でシステインを有するアミロイドβ（例えば、β１－42又はβ１－43）もまた使用され得る。同様に、アミノ末端で切断されたAβ（例えば、特にAβ１－42又はAβ１－43のアミノ酸残基１～８の配列の１又は複数を欠いている）、又はカルボキシル末端で１又は２個の追加のアミノ酸残基を有するAβ（例えば、Aβ１－42又は１－43）が使用され得る。対照的に、アミロイドβ１－40は、毒性であり得るADDL－様構造体を一時的に形成し得るが、しかしそれらの構造体は、安定した態様でそのような高次アセンブリーを形成するその能力を制限する、タンパク質の短くされた性質のために、安定しておらず、そして水溶液として単離され得ない。

【００２０】

所望には、本発明の単離された可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体は、原子力顕微鏡により測定され得る場合、約4.7nm～約11.0nm、特に約4.7nm～約6.2nmの寸法の小球体を含んで成る。また、好ましくは、単離された可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体は、原子力顕微鏡により測定される場合、約4.9nm～約5.4nm、又は約5.7nm～約6.2nm、又は約6.5nm～約11.0nmの寸法の小球体を含んで成る。特に好ましくは、単離された可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体は、前記アセンブリーの約30％～約85％、さらにより好ましくは、約40％～約75％が、原子力顕微鏡により測定される場合、約4.9nm～約5.4nm及び約5.7nm～約6.2nmの寸法の２種の有力なサイズの小球体を含んで成るようなものである。しかしながら、オリゴマー構造体は、約5.3nm～約5.7nmのAFMサイズの小球体を含んで成ることが所望される。オリゴマー構造体は、約6.5nm～約11.0nmのAFMサイズの小球体を含んで成ることが所望される。

【００２１】

非変性ゲル電気泳動によれば、ADDLに対応するバンドは約26kD～約28kDで進行し、そして別の広いバンドは約36kD～約108kDのサイズを表す。変性条件（例えば、15％のSDS－ポリアクリルアミドゲル上で）下で、ADDLは、約22kD～約24kDで進行するバンドを含んで成り、そして約18～約19kDで進行するバンドもさらに含んで成る。従って、本発明は好ましくは、非変性ゲル電気泳動により測定される場合、約26kD～約28kDの分子量を有する単離された可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体（すなわち、ADDL）を提供する。本発明はまた、好ましくは、15％SDS－ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動により測定される場合、約22kD～約24kDの分子量に対応するバンドとして進行する単離された可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体（すなわち、ADDL）を提供する。本発明はさら

に好ましくは、15%SDS－ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動により測定される場合、約18kD～約19kDの分子量に対応するバンドとして進行する単離された可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体（すなわち、ADDL）を提供する。

【００２２】

また、16.5%トリス－トリシンSDS－ポリアクリルアミドゲルを用いて、追加のADDLバンドが可視化され得る。このゲルシステムにより得られる高められた分解能は、16.5%トリス－トリシンSDS－ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動により測定される場合、約13kD～約116kDの範囲の分子量を有する単離されたオリゴマー構造体を、本発明に従って得る能力を確かにする。ADDLバンドは、明確なサイズの種に対応すると思われる。特に、このゲルシステムの使用は、約13kD～約14kDのサイズのトリマー、約17～約19kDのサイズのテトラマートリマー、約22kD～約23kDのサイズペンタマー、約26kD～約28kDのサイズのヘキサマー、約32kD～約33kDのサイズのヘプタマー、及び約36kD～約38kDのサイズのオクタマー、並びに約12～約24個のモノマーのサイズ範囲の大きな可溶性オリゴマーに対応するバンドの可視化を可能にする。従って、本発明は所望には、16.5%のトリス－トリシンSDS－ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動により決定される場合、約13kD～約14kD，約17kD～約19kD、約22kD～約23kD、約26kD～約28kD、約32kD～約33kD、及び約36kD～約38kDから成る群から選択された分子量を有する単離されたオリゴマー構造体を提供する。

【００２３】

本発明はさらに、単離された可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体を調製するための方法を提供する。この方法は任意には、

（ａ）モノマーアミロイドβタンパク質溶液を得：

（ｂ）前記タンパク質溶液を適切な培地に希釈し：

（ｃ）段階（ｂ）から得られる培地を、約４℃でインキュベートし；

（ｄ）前記培地約４℃で、約14,000ｇで遠心分離し；そして

（ｅ）アミロイドβオリゴマー構造体を含むような、前記遠心分離からの上清液を回収する段階を含んで成る。この方法の段階（ｃ）においては、前記溶液は所望には、約２～約48時間、特に約12～約48時間、及び最も好ましくは、約24～約48時間インキュベートされる。この方法の段階（ｄ）においては、遠心分離は、好ましくは、約５分～約１時間、特に約５分～約30分及び最適には約10分間、行われる。しかしながら、一般的には、これは、いずれかの発生期の原線維性又はプロト原線維性構造体を除去するために予防的な測定であり、そして特に、ADDL調製物の長期安定性が論点でなければ、必ずしも必要ではない。

【００２４】

Ａβタンパク質は、所望には、約5nM～約500μM、特に約5μM～約300μM、特に約100μMの最終濃度に、段階（ｂ）において希釈される。Ａβタンパク質溶液が段階（ｂ）において希釈される“適切な培地”は、ADDL形成を促進しないが、支持するであろういずれかの培地である。特に、F12培地（市販されており、そして容易に実験室において配合される）が、本発明の方法への使用のために好ましい。同様に、“置換F12培地”はまた所望には使用され得る。置換F12培地は、市販であるか、又は実験室において配合されるF12培地とは異なる。本発明によれば、置換F12培地は好ましくは、次の成分を含んで成る：N，N－ジメチルグリシン、D－グルコース、塩化カルシウム、硫酸銅・５水和物、硫酸鉄（II）・７水和物、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、及び硫酸亜鉛・７水和物。

【００２５】

特に、本発明の合成F12培地は任意には、次のものを含んで成る：N，N－ジメチルグリシン（約600～約850mg/l）、D－グルコース（約1.0～約3.0g/l）、塩化カルシウム（約20～約40mg/l）、硫酸銅・５水和物（約15～約40mg/l）、硫酸鉄（II）・７水和物（約0.4～約1.2mg/l）、塩化カリウム（約160～約280mg/l）、塩化マグネシウム（約40～約75mg/l）、塩化ナトリウム（約6.0～約9.0g/l）、炭酸水素ナトリウム（約0.75～約1.4g/l）、リン酸水素二ナトリウム（約120～約160mg/l）、及び硫酸亜鉛・７水和物（約0.7～1.1mg

/l）。最適には、本発明の合成F12培地は次のものを含んで成る：N，N－ジメチルグリシン（約766mg/l）、D－グルコース（約1.802g/l）、塩化カルシウム（約33mg/l）、硫酸銅・５水和物（約25mg/l）、硫酸鉄（II）・７水和物（約0.8mg/l）、塩化カリウム（約223mg/l）、塩化マグネシウム（約57mg/l）、塩化ナトリウム（約7.6g/l）、炭酸水素ナトリウム（約1.18g/l）、リン酸水素二ナトリウム（約142mg/l）、及び硫酸亜鉛・７水和物（約0.9mg/l）。さらに、置換F12培地のpHは好ましくは、例えば0.1Mの水酸化ナトリウムを用いて、所望には約7.0～約8.5のpH、及び好ましくは、約8.0のpHに調節される。

【００２６】

前記方法はさらに、所望には、適切な剤、例えばクラステリンの存在下で、ゆっくり沈降するオリゴマー構造体を形成することによって行われ得る。例えば、これは、段階（ｃ）においてクラステリンを添加することによって、及び次の例に示されるようにして、行われる。

【００２７】

さらに、本発明はまた、例に記載されるように、本発明の可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体の調製方法を提供し、ここで前記方法は、

（ａ）前記オリゴマー構造体を形成できるモノマーアミロイドβタンパク質の溶液を得；

（ｂ）前記アミロイドβモノマーをヘキサフルオロイソプロアノールに溶解し；

（ｃ）固体ペプチドを得るために急速真空蒸発によりヘキサフルオロイソプロアノールを除去し；

（ｄ）前記固体ペプチドを、DMSO原液を得るためにDMSOに溶解し；

（ｅ）前記原液を適切な培地中に希釈し；

（ｆ）ボールテックスにかけ；そして

（ｇ）約４℃で約24時間インキュベートすることを含んで成る。

【００２８】

ADDLが10％のビオチニル化されたアミロイドβ１－42（又は他の適切なピオチニル化されたアミロイドβタンパク質）の組み込みにより調製される場合、中性細胞を用いて、受容体結合アッセイにおいて使用され得、そして例えば、蛍光アビジン接合体によるラベリングを伴なって、蛍光活性化された細胞分類（FACS）装置上で行われ得る。他方では、アミロイドβタンパク質へのビオチンの組み込みの代わりに、蛍光ラベルされた分子を形成するためにADDLを結合でき、そして蛍光ラベルされた接合体の一部ですでにあり得るもう１つの試薬が使用され得る。例えば、可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体は、アミロイドタンパク質が他の結合成分を含むよう形成され、ここで“結合成分”とは、本明細書において使用される場合、蛍光ラベルされた化合物又は接合体を形成するために試薬への結合のために使用され得る分子（例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ポリリシン及び同様のもの）を包含する。オリゴマー構造体が結合する“蛍光試薬”は、それ自体直接蛍光体である必要はないが、しかし代わりに、もう１つの剤への結合を通して蛍光を単に発することができる。例えば、オリゴマー構造体に結合する蛍光試薬は、βアミロイド特異的抗体（例えば、6E10）を含んで成り、そして蛍光は第２蛍光抗体の使用により生成される。

【００２９】

他の実験と共に、ラットCNS B103細胞のFACSscan分析は、ADDLインキュベーションを伴なわないで、及びそれを伴なって行われた。それらの及びさらなる研究の結果は、細胞表面への結合が飽和であることを確かめ、そしてトリプトシンによる簡単な処理が細胞表面タンパク質のサブセットを選択的に除去し、そしてADDLの結合を排除する。B103細胞の表面からトリプシンによる簡単な処理により切断できるタンパク質はまた、B103細胞又は培養された一次ラット海馬ニューロンへのADDLの結合を妨げる。それらの結果は、ADDLが特定の細胞表面受容体を通して作用し、そしてADDLにより介在される初期現象（すなわち、細胞殺害の前の現象）が好都合には、ADDLの形成及び活性（例えば、受容体結合を包含する）を阻止する化合物により調節され得ることを、全面的に支持する。

【００３０】

従って、本発明は、ADDLの活性（例えば、受容体結合を調節する（すなわち、促進するか又は阻止する）化合物を同定するための方法を提供する。この方法は好ましくは、
（ａ）前記試験化合物との接触の存在又は不在下で前記オリゴマー構造体とニューロン細胞の別々の培養物とを接触せしめ；
（ｂ）前記オリゴマー構造体に結合する蛍光試験を添加し；
（ｃ）前記別々の細胞培養物を、蛍光活性化セルソーティングにより分析し；そして
（ｄ）前記培養物の蛍光性を比較し、そして前記試験化合物の不在下で前記構造体により接触されたその応答する培養物に比較して、前記オリゴマー構造物の活性（すなわち、細胞表面タンパク質への結合）を阻止する化合物が、前記培養物の低められた蛍光性をもたらすものとして同定され、そして前記細胞表面タンパク質（すなわち、受容体）への結合を促進する化合物が、前記培養物の高められた蛍光性をもたらすものとして同定されることを含んで成る。他方では、それ自体、タンパク質複合体を結合できる蛍光試薬を添加する代わりに、オリゴマー構造体が、蛍光試薬を結合できる結合成分を含んで成るよう調製されたアミロイドβ１－42タンパク質（又は他のアミロイドβ）から形成される方法が所望には、行われる。

【００３１】

同様に、オリゴマー構造体の形成又は活性（例えば、細胞表面タンパク質、例えば受容体への結合性）を調節する（すなわち、促進するか又は阻止する）化合物を同定するための方法が使用され、ここで前記方法は、
（ａ）前記試験化合物と混合されているか又は混合されていないアミロイドβタンパク質の別々のサンプルを調製し；
（ｂ）前記別々のサンプルにおいて前記オリゴマー構造体を形成し；
（ｃ）前記別々のサンプルとニューロンの細胞の別々の培養物とを接触せしめ；
（ｄ）オリゴマー構造体に結合する、蛍光成である試薬を添加し；
（ｅ）蛍光活性化セルソーティングにより前記別々の細胞培養物を分析；そして
（ｆ）前記培養物の蛍光性を比較し、そして前記試験化合物の不在下で前記構造体により接触されたその応答する培養物に比較して、前記オリゴマー構造物の細胞表面タンパク質の形成又はそれへの結合を阻止する化合物が前記培養物の低められた蛍光性をもたらすものとして同定され、そして前記オリゴマー構造物の細胞表面タンパク質の形成又はそれへの結合を促進する化合物が前記培養物の高められた蛍光性をもたらすものとして同定されることを含んで成る。さらに、それ自体、タンパク質複合体を結合できる蛍光試薬を添加する代わりに、オリゴマー構造体が、蛍光試薬を結合できる結合成分を含んで成るよう調製されたアミロイドβタンパク質から形成される方法が所望には、行われる。

【００３２】

前記培養物の蛍光は、さらに、同じ態様で処理されている培養物の蛍光と比較され、但し、オリゴマー構造体の形成の前、試験化合物の添加する代わりに又は添加しない代わりに、前記試験化合物が、オリゴマー構造体の形成の後、添加されるか又は添加されない。この情況においては、前記化合物がオリゴマー構造体の前に添加される場合のみ、前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体と接触されるその対応する培養物に比較して、オリゴマー構造体の形成を阻止する化合物が、前記培養物の低められた蛍光をもたらすものとして同定され、そしてオリゴマー構造体の形成を促進するする化合物が、前記培養物の高められた蛍光をもたらすものとして同定される。

【００３３】

対照的に、前記化合物がオリゴマー構造体の前又は後に添加される場合、前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体と接触されるその対応する培養物に比較して、オリゴマー構造体の細胞表面タンパク質（例えば、受容体）への結合を阻止する化合物が、前記培養物の低められた蛍光をもたらすものとして同定され、そしてオリゴマー構造体の細胞表面タンパク質への結合を促進する化合物が、前記培養物の高められた蛍光をもたらすものとして同定される。

【００３４】

類似する態様で、細胞基材のアッセイ、特に細胞基材の酵素連結されたイムノソルベントアッセイ（ELISA）が、ADDL結合活性を評価するために、本発明に従って使用され得る。特に、細胞表面タンパク質へのオリゴマー構造体の結合を検出するための方法が使用され得る。この方法は好ましくは、

（ａ）アミロイドβタンパク質から前記オリゴマー構造体を形成し；

（ｂ）前記オリゴマー構造体とニューロン細胞の培養物とを接触せしめ；

（ｃ）前記オリゴマー構造体を結合する、接合成分（例えば、ビオチン、又は他の適切な試薬）を包含する抗体（例えば、6E10）を添加し；

（ｅ）結合されていない抗体を洗浄し；

（ｆ）前記オリゴマー構造体に結合される前記抗体に酵素（例えば、ホースラディシュペルオキシダーゼ）を、前記接合成分により結合し；

（ｇ）色彩の変化を生成するために前記酵素により分解される無色の基質（例えば、ABTS）を添加し；そして

（ｈ）前記オリゴマー構造体の細胞表面のタンパク質（例えば、受容体）への結合の測定として前記色彩の変化（例えば、分光学的に）又は色の変化の速度を決定することを含んで成る。始めの方で記載されたように、抗体は、ADDLを検出できるいずれかの抗体（例えば、アミロイドβ上の暴露された部位に向けられた抗体）であり得、そして抗体結合性分は検出の手段（例えば、酵素）を結合できるいずれかの剤であり得る。酵素は、検出の手段（例えば、基質の分解による色彩の変化）を提供し、そしてさらに、もう1つの成分（例えば、二次抗体）によりオリゴマー構造体に結合される抗体に結合され得る（例えば、共有又は非共有）いずれかの成分（例えば、たぶんタンパク質以外のもの）であり得る。また、好ましくは、本発明によれば、細胞が、アッセイを行う前、固体支持体（例えば、組織培養プラスチック）に付着される。所望する段階（ｂ）は、ADDLが細胞に結合できるよう、本明細書に記載される通りに行われるべきである。同様に、好ましくは、段階（ｃ）は、十分な時間（例えば、約10分～約２時間、所望には約30分間）、及びADDLへの抗体の結合を可能にする適切な条件（例えば、室温で、好ましくは軽い撹拌を伴なって）下で行われるべきである。さらに、適切な阻止段階は、抗体のいずれかの非特異的結合を低めるために適切な阻止試薬を用いて、当業者に知られているようにして行われ得る。当業者はELISAを良く知っており、そして当業者において知られているアッセイに改良できる。

【００３５】

アッセイは、所望には、オリゴマー構造体の細胞表面タンパク質の形成又はそれへの結合を調節する（すなわち、促進するか又は阻止する）化合物を同定するためにも行われ得る。この方法においては、試薬化合物についての従来の記載されるアッセイにおけるように、試験化合物は、細胞とADDLとを接触せしめる前、ADDL調製物に添加される。従って、このアッセイは、オリゴマー構造体の形成を調節する化合物を検出するために使用され得る。さらに、試験化合物は、細胞との接触の前（但し、ADDL形成の後）、ADDL調製物に、又はADDLとの接触の前、細胞に添加され得る。この方法（例えば、前で記載されたような）は細胞表面へのADDL結合を調節する化合物を検出するために使用され得る。また、試験化合物は細胞及びADDLの混合物に添加され得る。この方法（例えば、前で記載されたような）は、細胞表面タンパク質（例えば、ADDL受容体）に結合するADDLの下流で存在するADDL－介在性現象に対して影響を及ぼす化合物を検出するために使用され得る。ADDL－介在性の下流の効果に対して作用するための化合物の特異性は、例えば、ADDLとのいずれかの同時インキュベーションの不在下で試験化合物を単純に添加することによって確かめられ得る。もちろん、追加の適切な対照（例えば、次の例に示されるような及び当業者に知られているような）が、すべてのアッセイに関して包含するべきである。

【００３６】

同様に、本明細書に（例えば、例において）に記載される方法を用いて、本発明は、本発明のオリゴマー構造体の形成を阻止する化合物を同定するための方法を提供し、ここで前記方法は、

（ａ）前記試験化合物と混合されているか又は混合されていないアミロイドβタンパク質

の別々のサンプルを調製し；
（ｂ）前記別々のサンプルにおいて前記オリゴマー構造体を形成し；
（ｃ）いずれかのタンパク質アセンブリーが、電気泳動、免疫認識及び原子力顕微鏡から成る群から選択された方法を用いて、別々のサンプルに形成されているかどうかを評価し；そして
（ｄ）前記別々のサンプルにおける前記タンパク質アセンブリーの形成を比較し、そして前記オリゴマー構造体の形成を阻止する化合物が、前記オリゴマー構造体が前記試験化合物の不在下で形成されるサンプルと比較して、前記サンプルにおける前記オリゴマー構造体の低められた形成をもたらすものとして同定されることを含んで成る。

【００３７】
オリゴマー構造体の細胞表面タンパク質の形成及び/又は活性、例えば結合を調節する（すなわち、促進するか又は阻止する）化合物に対するこの情報は、ADDL－介在性疾病、病状又は障害の研究及び処理に使用され得る。本発明の方法は、ADDL自体の活性及び神経毒性を調べるために使用され得る。例えば、20nlのADDL調製物が、長期相乗効果（LTP）実験（例えば、Namgungなど., Brain Research, 689, 85-92, 1995）の実施の前、60～70分で、完熟マウスの海馬領域に注射される場合、この実験の刺激相は、塩溶液の対照の注入と同一の態様で生じるが、しかし硬化相は、シナプス活性が刺激相の間に示されるレベルに相当するレベルで残存する対照動物に比較して、２時間にわたって、細胞体スパイク振幅を規準にシナプス活性の有意に連続した低下を示した。実験の後の脳スライスの分析は、細胞の死が生じなかったことを示した。それらの結果、次の例に記載される他の結果は、ADDL処理がLTP応答を損うことを確かめる。これは、ADDLが、神経細胞死の誘導によるよりもむしろ、ニューロンシグナル化工程による妨害により、アルツハイマー病において観察される低められた学習及び記憶に寄与することを示す。

【００３８】
ADDLの効果に対する追加の情報（ADDL形成及び/又は活性を潜在的に調節する試験化合物の存在又は不在下で）は、本発明の追加のアッセイを用いて得られる。例えば、本発明は、ADDLの効果をアッセイするための方法を提供し、ここで前記方法は、
（ａ）動物の海馬に前記オリゴマー構造体を投与し；
（ｂ）電気刺激を適用し；そして
（ｃ）長期の相乗作用応答を決定するために細胞体スパイク振幅を時間にわたって測定することを含んで成る。前記動物の長期相乗作用応答が、前記電気刺激の適用の前、オリゴマー構造体の代わりに投与される塩溶液を有することを除いて、同じ態様で処理されるもう1つの動物の長期相乗作用応答に比較される方法が任意には、行われ得る。この方法はさらに、ADDLを単独で又は試験化合物と共に投与された動物におけるLTP反応を比較することによって、ADDLの効果を調節する（例えば、高めるか又は低める）化合物を同定するために使用され得る。

【００３９】
本発明は、ADDLオリゴマー構造体の効果を調節する化合物を同定するための方法を提供する。前記方法は好ましくは、
（ａ）動物の海馬に塩溶液又は試験化合物のいずれかを投与し；
（ｂ）電気刺激を適用し；
（ｃ）長期相乗作用応答を決定するために細胞体スパイク振幅を時間にわたって測定し；そして
（ｄ）試験化合物を投与された動物の長期相乗作用応答に対して、塩溶液を投与されている動物の長期相乗作用応答を比較することを含んで成る。前記方法はさらに、任意には、塩溶液又は試験化合物の投与の前、それと共に又はその後、海馬にオリゴマー構造体を投与することを含んで成る。

【００４０】
同様に、本発明は、ADDLタンパク質アセンブリーの神経毒性を調節する（すなわち、高めるか又は低めるか）化合物を同定するための方法を提供し、ここで前記方法は、

（ａ）前記試験化合物との接触の存在又は不在下で前記オリゴマー構造体とニューロン細胞の別々の培養物とを接触せしめ；
（ｂ）個々の培養物における生存細胞の割合を測定し；そして
（ｃ）個々の培養物における生存細胞の割合を比較することを含んで成る。前記オリゴマー構造体の神経毒性を阻止する化合物は、前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体により接触されたその対応する培養物に比較して、前記培養物における生存細胞の高められた割合をもたらすものとして同定される。前記オリゴマー構造体の神経毒性を高める化合物は、前記試験化合物の不在下で前記オリゴマー構造体により接触されたその対応する培養物に比較して、前記培養物における生存細胞の低められた割合をもたらすものとして同定される。

【００４１】

本発明の方法はまた、ADDLを試験材料において検出することに使用され得る（例えば、研究、診断及び/又は治療の一部として）。例えば、ADDLは血清欠失のB103細胞において急速な形態学的変化をもたらし、そしてそれらはまた、ADDL処理の30分以内にそれらの細胞においてFynキナーゼ活性を活性化する（データは示されていない）。ADDLはまた、Fynと付着キナーゼとの間での急速な複合体形成（FAK；Zhangなど., Neurosci. Letters, 211, 1-4, 1996）、及びTriton－不溶性画分へのいくつかのリン酸化されたタンパク質及びFyn－Fak複合体のトランスロケーション（Bergなど., J. Neurosci. Res., 50, 979-989, 1997）を誘発する。これは、Fyn及び他の活性化されたシグナル化経路が、ADDLにより誘発された神経変性工程に包含されることを示唆する。これは、ADDLの追加が、ビークル対照に比較して、高められた神経毒性をもたらさない、機能的fyn遺伝子を欠いている遺伝的に変更されたマウスからの脳スライス培養物における実験により確かめられている。

【００４２】

従って、１又は複数のFyn機能又はFyn再配置を、ADDLに対して影響を与えることによって阻止する化合物は、アルツハイマー病のための重要な神経保護薬剤であり得る。同様に、ADDLが一次星状細胞の培養物に添加される場合、その星状細胞は活性化され、そしていくつかのタンパク質、例えばIL－１、誘導性酸化窒素シンターゼ、ApoE、ApoJ及びα１－抗キモトリプシンのmRNAが高揚する。それらの現象は所望には、ADDLタンパク質アセンブリーを試験材料において検出するための方法において、本発明に従って使用される。そのような方法は、任意には、
（ａ）試験化合物と抗体（例えば、6E10抗体又は他の抗体）とを接触せしめ；
そして
（ｂ）前記抗体のオリゴマー構造体への結合を検出することを含んで成る。

【００４３】

同様に、前記方法は、所望には、
（ａ）前記材料と血清－欠失された神経芽腫細胞とを接触せしめ；そして
（ｂ）前記試験材料と接触されなかった神経芽腫細胞に対して前記細胞の形態学を比較することによって、前記細胞における形態学的変化を測定することを含んで成る。

【００４４】

前記方法はまた、好ましくは、
（ａ）前記試験材料と脳スライス培養物とを接触せしめ；そして
（ｂ）前記試験材料により接触されなかった脳スライス培養物に対して比較して、脳細胞の死を測定することを含んで成る。前記方法はさらに、所望には、
（ａ）前記試験材料と神経芽腫細胞（例えば、B103神経芽腫細胞）とを接触せしめ；そして
（ｂ）前記試験材料により接触されなかった神経芽腫細胞におけるFynキナーゼ活性に対して前記細胞におけるFynキナーゼ活性を比較することによって、Fynキナーゼ活性の上昇性を測定することを含んで成る。特に、Fynキナーゼ活性は、市販のキット（例えば、Oncogene Research Products, Cambridge, MAからのKit＃QIA－28）を用いて、又はBorowskiなど., J. Biochem. (Tokyo), 115, 825-829, 1994に記載されるアッセイに類似するアッ

セイを用いて比較され得る。

【００４５】

試験材料におけるADDLを検出するための方法のさらにもう1つの好ましい態様においては、前記方法は所望には、

（ａ）前記試験材料と一次星状細胞の培養物とを接触せしめ；そして

（ｂ）前記試験材料により接触されなかった一次星状細胞の培養物に比較して、前記星状細胞の活性化を決定することを含んで成る。この方法の変法においては、前記方法は任意には、

（ａ）前記試験材料と一次星状細胞の培養物とを接触せしめ；そして

（ｂ）前記試験材料により接触されなかった一次星状細胞の培養物におけるmRNAレベルに対して前記星状細胞における前記mRNAレベルを比較することによって、インターロイキン１、誘導性酸化窒素シンターゼ、ApoE，ApoJ及びα－抗キモトリプシンから成る群から選択されたタンパク質についてのmRNAの上昇性を前記星状細胞において測定することを含んで成る。もちろん、本明細書における開示の観点から、当業者に明らかである他のアッセイ方法、及び上記方法の追加の変法が存在する。

【００４６】

従って、明らかに、本発明のADDLはインビトロで使用される。そのようなADDLは中でも、細胞内のADDL結合及び相互作用の研究に、及びADDL活性のアッセイ方法において、研究手段として使用され得る。同様に、ADDL、及びADDL形成、活性及び調節の研究は、インビボで使用され得る。

【００４７】

特に、本発明の方法を用いて同定される化合物は、認識又は学習の欠失（すなわち、記憶の欠損のため）、及び/又は記憶自体の欠失をもたらす、多くの疾病、障害又は病状のいずれか1つを処理するために使用され得る。そのような処理又は予防は、ADDLの形成及び/又は活性を妨げるか、又はADDLが相互作用する（例えば、いわゆる、“下流”の現象）細胞剤を調節する（すなわち、所望には、ADDLに影響を及ぼす結果として活性を高めるか又は低める）化合物を投与することによってもたらされ得る。ADDLに影響を及ぼす能力を有するそのような化合物は、本明細書において、“ADDL－調節化合物”として言及される。ADDL－調節化合物は、負の態様で作用できるのみならず、また多くの場合、好ましくは、ADDLの形成及び/又は活性を高めるためにも使用され得る。

【００４８】

所望には、インビボで使用される場合、ADDLタンパク質アセンブリーの効果のために認識、学習又は記憶の低下に対して動物を保護するための方法が使用され得る。この方法は、ADDLの形成又は活性を阻止する化合物を投与することを含んで成る。同様に、認識、学習及び/又は記憶の損失がADDL形成及び/又は活性のために生じる程度まで、そのような欠損は、ADDLの活性（及び/又は形成）が阻止されると、逆転され、又は再生され得る。従って、本発明は、好ましくは、本発明のオリゴマー構造体の効果により、認識、学習又は記憶の低下を動物において逆転する（又は再生する）ための方法を提供する。この方法は好ましくは、ADDLの形成又は活性を阻止することを含んで成る。従って、本発明はまた、所望には、本発明の可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体の効果による学習又は記憶の低下を神経細胞において逆転する（可溶性非原線維性アミロイドβオリゴマー構造体の効果による長期の相乗作用の低化に対して神経細胞を保護する）ための方法を提供し、ここで前記方法は前記細胞と、前記オリゴマー構造体の形成又は活性を阻止する化合物とを接触せしめることを含んで成る。

【００４９】

特に、この方法は、所望には、認識、学習及び/又は記憶の欠損とし明白であり、そしてADDL形成又は活性のためである、疾病、障害又は病状、特にアルツハイマー病、成人性ダウン症候群（すなわち、年齢40以上）、及び老人性痴呆症から成る群から選択された疾病、障害又は病状の処理又は予防に適用され得る。

【００５０】

また、この方法は所望には、疾病、障害又は病状自体の進行の前に明らかであり、そして有害な効果が疾病、阻害又は病状自体の進行に寄与するか又は究極的には、それらを構成する、細胞活性、認識、学習及び記憶に対する初期の有害な効果の処理又は予防に適用され得る。特に、前記方法は好ましくは、ADDL形成又は活性の結果としてもたらされる、神経細胞又は他の脳細胞の初期機能不生の処理又は予防に適用され得る。同様に、前記方法は好ましくは、文献（例えば、Linnなど., Arch. Neurol., 52, 485-490, 1995）に記載されるような集中的な記憶損失（FMD）の処理又は予防に適用され得る。本発明はさらに、所望には、ADDL－誘発性異常ニューロンシグナル化、高い程度の書くことの熟練の障害（例えば、Snowdonなど., JAMA, 275, 528-532, 1996）又は他の高い程度の認識機能障害の損害、ADDL形成または活性の結果として続く長期相乗作用の低下（又は不在）の処理又は予防に使用され得る。

【００５１】

本発明によれば、“ADDL－誘導性異常ニューロンシグナル発信”は、種々の手段により測定され得る。例えば、正常なニューロンシグナル発信（及び長期相乗作用応答の観察）に関しては、中でもFynキナーゼが活性化されるべきであり、FynキナーゼがNMDAチャネルをリン酸化すべきであり（Miyakawaなど., Science, 278, 698-701, 1997; Grant, J. Physiol. Paris, 90, 337-338, 1996）、そしてFynが適切な細胞位置（例えば、ADDLにより誘発される細胞認識再組織化において生じるように、Fyn－FAK複合体形成により妨害され得る）において存在すべきであると思われる。これに基づけば、ADDL－誘導された異常ニューロンシグナル発信（ADDLによる細胞経路の異常活性化により誘導されるシグナル発信機能障害である）及びその知識が、本発明の方法に使用され得、例えばそれらは当業者に明白である。例えば、ADD－誘導された異常細胞シグナル発信は、任意のそれらの規準、例えばFynキナーゼ活性（又はその変化）、Fyn－FAK複合体形成（又はその変化）、細胞骨格再組織化（又はその変化）、Fynキナーゼ非細胞局在化（又はその変化）、NMDAチャネルのFynキナーゼリン酸化（又はその変化）のいずれかを用いて、又は当業者に明らかなようにして、評価され得る（例えば、ADDL－調節活性について試験される化合物の存在又は不在下でさらに行われ得る。神経細胞とADDLとの接触の結果として）。

【００５２】

さらに、本発明の方法を用いて同定される化合物を用いる代わりに、特定のインビトロ及びインビボ効果を有することが知られている化合物が、上記処理方法においてADDLに影響を及ぼすために使用され得る。すなわち、アミロイド形成は、２相工程として形成され得る（但し、必ずしも必要ではない）。第1の相においては、アミロイド前駆体タンパク質の生成が開始される（前記アミロイド前駆体タンパク質は、Glennerなど.（アメリカ特許第4,666,829号）により同定された4kDaのβアミロイドコアタンパク質配列を、それらの配列内にそれぞれ有する、695個のアミノ酸（Kangなど., Nature, 325, 733-736 (1787)）、又は751個のアミノ酸タンパク質（Ponteなど., Nature, 331, 535-527 (1988) を有する）。第２相においては、高分子量の構造体中へのアミロイドのプロセッシング及び/又は付着が生じる（例えば、前記構造体とは、原線維、又はβアミロイドモノマーよりも高い分子量を有するβアミロイドのいずれか他の構造体、及びプラーク及びプレープラークよりも相当に小さい構造体を包含する）。いくつかの化合物は、それらの相の１つ又は両者に影響を及ぼすことができると思われる。いくつかの化合物に関して、有害な効果が得られるが、しかし阻害の位置がタンパク質生成上に、又はアミロイドプロセッシング及び/又は付着上に存在するかどうかは明確ではない。

【００５３】

従って、これに関しての発明は、第１又は第２相のいずれか、又は両相で作用する化合物である。特に、第２相を調節する化合物は、ADDLに影響を及ぼすために特別に使用され、そしてADDL調節に依存する処理方法に使用される。高分子量構造体へのアミロイドの付着を調節する（例えば、阻止する）そのような化合物は、高分子量の構造体、特に原線維へのβアミロイドモノマーの組み込みを調節する化合物（特に、妨害する化合物）を包含するが、但しそれらだけには限定されない。従って、所望には、本発明によれば、高分子量

構造体中へのβアミロイドモノマーの組み込みを妨害する化合物、特に原線維形成を阻害することが知られている（そして、従って、高分子量構造体中へのβアミロイドの組み込みを阻害することが確かめられている）化合物が、本発明の方法に従って、ADDL形成及び/又は活性に対して阻害効果を発揮するために使用され得る（すなわち、ADDLの形成を低めることにより）。もちろん、好ましくは、そのような使用の前、ADDLに影響を及ぼすモジュレーターの能力は、例えば本発明の方法を用いて確かめられる。所望には、本発明に使用され得るそのような既知のモジュレーターは、次の通りに記載されているが、しかしながら、他の類似するモジュレーターもまた使用され得る。

【００５４】

第２相で作用する化合物に関しては、PCT国際出願WO96/39834号及びカナダ出願第2222690号は、アミロイド又はアミロイド様付着物形成のためのタンパク質又はペプチドに対して疎水性構造決定基と相互作用できる新規ペプチドに関し、それにより、アミロイド及びアミロイド様付着物中へのタンパク質及びペプチドの異常折りたたみを阻害し、そして構造的に阻止する。特に、’834出願は、約３～約15個のアミノ酸残基の配列を含んで成り、そして少なくとも３個アミノ酸の疎水性クラスターを有する阻害性ペプチドに関し、ここで少なくとも１つの残基がPro，Gly，Asn及びHisから選択されたβシート阻害性アミノ酸であり、そして前記阻害性ペプチドは、アミロイド又はアミロイド様付着物中への異常折りたたみを構造的に阻止し、そして阻害するために、タンパク質又はペプチド上の構造決定基と結合することができる。

【００５５】

PCT国際出願WO95/09838号は、一連のペプチド作用性化合物、及びβアミロイドペプチドの異常付着を妨げるために患者へのそれらの投与に関する。

【００５６】

PCT国際出願WO98/08868号は、天然のβアミロイドペプチド凝集を調節するペプチドに関する。それらのペプチドモジュレーターは、３～５個のD－アミノ酸残基を含んで成り、そしてD－ロイシン、D－フェニルアラニン、及びD－バリンから成る群から選択された少なくとも２個のD－アミノ酸残基を包含する。

【００５７】

同様に、PCT国際出願WO96/28471号は、アミロイドモジュレーター化合物が、天然のアミロイドタンパク質又はペプチドと接触される場合、その天然のアミロイドタンパク質又はペプチドの凝集を調節するよう、少なくとも１つの変性基（例えば、環状、複素環式又は多環式基を含んで成り、cis-デカリン基を含み、コラニル構造体を含み、コリル基であり、ビオチン含有基、フルオレセイン含有基、等を含んで成る）に直接的に、又は間接的に結合される、アミロイドタンパク質又はペプチド、又はフラグメント（例えば、トランスチレチン（Transthyretin）、プリオンタンパク質、小島アミロイドポリペプチド、動脈ナトリウム排泄増加因子、κL鎖、λL鎖、アミロイドA、プロカルシトニン、シスタチンC、β２微小グロブリン、ApoA-1，ゲンゾリン、プロカルシトニン、カルシトニン、フィブリノーゲン及びリゾチーム）を含んで成るアミロイドモジュレーター化合物に関する。

【００５８】

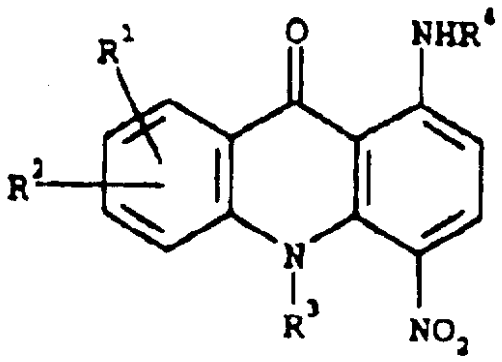
また、PCT国際出願WO97/21728号は、重合のために必要であるアミロイドβのLys-Leu-Val-Phe-Phe（KVLFF）を組み込んだペプチドに関する。この配列を組み込んだペプチドは、アミロイドβに結合し、そして原線維形成を阻止することができる。

【００５９】

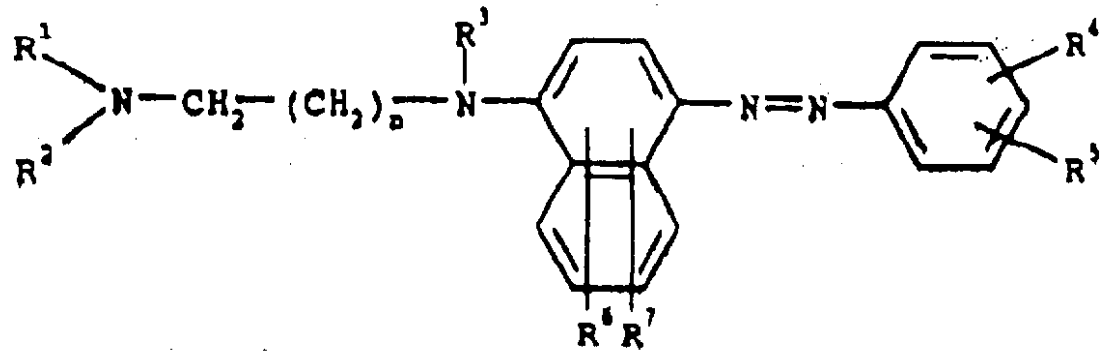
非－ペプチド剤に関しては、PCT国際出願WO97/16191号は、下記式：

【００６０】

【化１】

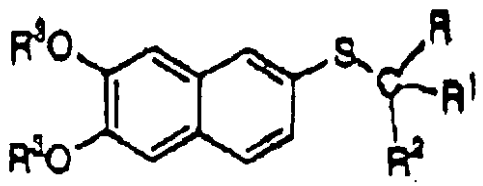


【００６１】
［式中、R^1及びR^2は水素、ハロ、ニトロ、アミノ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、アルキル、アルコキシ及びアルキルチオであり；R^3は水素又はアルキルであり；そしてR^4はアルキレン－NR^5R^6であり、ここでR^5及びR^6は、独立して、水素、C_1-C_4アルキル、又はそれらが結合される窒素と共に、ピペリジル又はピロリジニルである］で表される９－アクリジノン、及び医薬的に許容できるその塩を投与することによって、動物におけるアミロイドタンパク質の凝集を阻害するための剤に関する。開示される化合物は、抗微生物剤及び抗腫瘍剤（アメリカ特許第4,626,540号）として、及び抗腫瘍剤（Cholodyなど., J. Med. Chem., 33, 49-52 (1990); Cholodyなど., J. Med. Chem., 35, 378-382 (1992)）として同定されている。
【００６２】
PCT国際出願WO97/16194号は、下記式：
【００６３】
【化２】

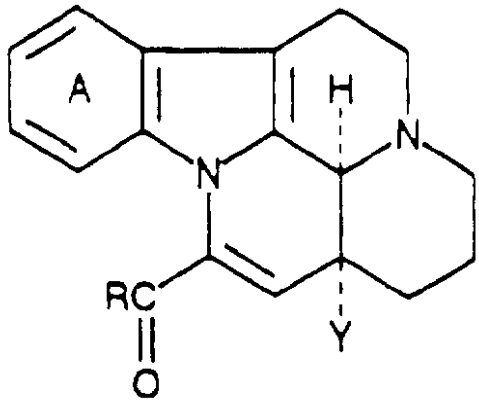


【００６４】
［式中、R^1及びR^2は独立して、水素、アルキル、置換されたアルキル、又は完全な複素環式環であり、R^3は水素又はアルキルであり、R^4、R^5、R^6及びR^7は、水素、ハロ、アルキル及びアルコキシから成る置換基（但し、それらだけには限定されない）である］で表されるナフチルアゾ化合物を投与することによってアミロイドたんぱく質の凝集を阻害するための剤に関する。
【００６５】

日本特許第9095444号は、下記式：
【００６６】
【化３】



【００６７】
［式中、Rは、OH又はCOOR[4]により置換された、１～５個の炭素原子のアルキルであり（任意には、アリール、ヘテロシクリル、COR[5]、CONHR[6]又はシアノにより置換される）；R[4]はH又は１～10個の炭素原子のアルキル、３～10個の炭素原子のアルケニル、３～10個の炭素原子の環状アルキル（すべては、任意に置換される）であり；R[5]及びR[6]は任意には、アリール又はヘテロシクリルにより置換され；R[1]およびR[2]はH，１～５個の炭素原子のアルキル又はフェニルであり；R[3]は水素、１～５個の炭素原子のアルキル又はCOR[7]であり；R[7]はOR’，-R’’又は-N(R’’)$_2$ であり；R’，R’’，R’’’は１～４個の炭素原子のアルキルである］で表されるチオナフタレン誘導体を含む剤によるアミロイドタンパク質の凝集及び/又は付着を阻害するための剤に関する。
【００６８】
日本特許第7309760号及びPCT国際出願WO95/11248号は、特定のリファマイシン誘導体である、アミロイドβタンパク質の凝集及び/又は付着のインヒビターに関する日本特許第7309759号は、特定のリファマイシンSV誘導体である、アミロイドβタンパク質の凝集及び/又は付着のインヒビターに関する。日本特許第7304675号は、特定の３－ホモピペラジニル－リファマイシン誘導体である、アミロイドβタンパク質の凝集及び/又は沈殿のインヒビターに関する。
【００６９】
日本特許第7247214号は、β－アミロイド形成又は付着のインヒビターとして使用され得るピリジン誘導体及びその塩又はプロドラックに関する。
【００７０】
アメリカ特許第5,427,931号は、プロテアーゼネキシン－２、又はそのフラグメント又は類似体のプラーク－付着阻害量を哺乳類に投与することを含んで成る、哺乳類におけるアミロイドプラークの付着を阻害するための方法ン関する。
【００７１】
第１又は第２相のいずれかで作用することができる（すなわち、作用の位置は下線が引かれている）化合物に関しては、PCT国際出願WO96/25161号は、下記式：
【００７２】
【化４】



【００７３】
［式中、環Aは任意には、置換されたベンゼンであり、RはOR[1]、下記式：
【００７４】
【化５】

【００７５】
又はSR[1]を表し、ここでR[1]，R[2]及びR[3]は同じであっても又は異なっていても良く、そしてそれぞれは、水素、任意に置換された炭化水素基から選択され、又はR[2]及びR[3]は、隣接する窒素原子と共に任意に置換された窒素－含有複素環式基を形成し、そしてYは任意に置換されたアルキル基である］で表される化合物、又は医薬物に許容できるその塩、及び必要なら、医薬的に許容できる賦形剤、キャリヤー又は希釈剤を含んで成る、アミロイドβタンパク質の生成又は分泌を阻害するための医薬組成物に関する。もちろん、好ましくは、それらの及び他の既知のモジュレーター（例えば、第１相又は第２相の）が、本発明に従って使用される。また好ましくは、ゴシポール及びゴシポール誘導体が使用される。さらに、ADDL活性に影響を及ぼす能力を有するモジュレーターが使用される（例えば、PCT国際出願WO93/15112号及び97/26913号）。
【００７６】
また、ADDL自体は処理において適用され得る。本明細書に記載されるそれらの新規アセンブリーが、治療のために適用され得る多くの予測できない効果を有することが発見されている。例えば、ADDLは、血管細胞と相互作用することが知られている内皮細胞を活性化する。ADDLは例えば、創傷の治癒において使用され得る。また、例えば、Botulinum Toxin TypeA（BoTox）は、神経伝達物質アセチルコリンの放出を阻止することにより作用する、細菌クロストリジウム・ボツリナム（Clostridium botulinum）により生成される神経筋肉連結阻止剤である。Botoxは、障害性筋肉痙攣、例えば失調症の処治において有用であることがわかっている。ADDL自体は理論的に、神経細胞機能を方向づけるために、又は標的化された神経細胞（例えば、中枢神経系、特に脳の癌の場合）を選択的に破壊するために適用され得る。ADDLはさらに、それらが細胞に対して非常に早い効果を有する場合、及

び細胞に対するそれらの効果（それらの細胞殺害効果は別として）が可逆性であると思われる場合、好都合であると思われる。

【００７７】

上記で論じられたように、本発明のADDL－調節化合物、高分子構造体中へのアミロイドβの組み込みに影響を及ぼすことが知られている化合物は、及びADDL自体が、インビトロ又はインビボで細胞に接触するために使用され得る。本発明によれば、細胞はいずれかの細胞であり、そして好ましくは、真核細胞である。真核細胞は典型的には、核膜により取り囲まれる核を、その寿命のある段階で有する細胞である。好ましくは、真核細胞は、多細胞種（例えば、単細胞酵母細胞に対抗するものとして）のものであり、そしてさらにより好ましくは、哺乳類（任意には、ヒト）細胞である。しかしながら、前記方法はまた、広範囲の種類の異なった細胞型、例えば鳥類細胞、及び哺乳類細胞、例えば嚙歯動物、霊長類（例えば、チンパンジー、モンキー、サル、ゴリラ、オランウータン、又はテナガザル）、ネコ、イヌ、有蹄動物（例えば、反芻動物又はブタ）、及び特にヒト細胞を用いて、効果的に行われ得る。好ましい細胞型は、脳において形成される細胞、例えば神経細胞及びグリア細胞である。本発明の特に好ましい細胞型は、神経細胞（正常又は異常、例えば形質転換された又は癌性細胞）である。組織培養物に使用される場合、所望には、神経芽腫細胞である。

【００７８】

細胞は単一の存在物として存在することができ、又は細胞の大きな収集物の一部であり得る。そのような“細胞の大きな収集物”は、例えば、細胞培養物（混合されているか又は純粋の）、組織（例えば、神経又は他の組織）、器官（例えば、脳又は他の器官）、器官系（例えば、神経系又は他の器官系）、又は生物（例えば、哺乳類又は同様のもの）を含んで成る。好ましくは、本発明の興味ある器官/組織/細胞は、中枢神経系（例えば、神経細胞）のものである。

【００７９】

また、本発明によれば、“接触”とは、それらの剤が物理的に細胞に接触するいずれかの手段を含んで成る。前記方法は、いずれか特定の導入手段に依存せず、そしてそのように解釈されるべきではない。導入の手段は、当業者に良く知られており、そしてまた、本明細書に例示されている。従って、導入は、例えばインビトロ（例えば、エクスビボ型の治療方法又は組織培養物研究において）、又はインビボでもたらされ得る。他の方法もまた、利用でき、そして当業者に知られている。

【００８０】

そのような“接触”は、当業者に知られているいずれかの手段により行われ、それにより、ADDL及びADDL－調節化合物及び細胞の明らかな接触又は相互接触がもたらされ得る。例えば、接触は、小体積の同じ溶液においてそれらの要素を混合することによって行われ得る。任意には、それらの要素はさらに、例えば当業者に知られている化学的手段又は他の手段により共有結合され得、又は好ましくは、非共有的相互作用（例えば、イオン結合、水素結合、ファン・デル・ワールスカ、及び/又は非極性相互作用）により結合され得る。比較すると、影響される細胞及びADDL又はADDL－調節化合物は、例えばADDL又はADDL－調節物化合物が宿主に投与され、そして複合体が血流又は他の体液、例えば脳脊髄液から、それが結合する細胞に移動する場合、必ずしも、小体積で接触せしめられる必要はない。細胞と、ADDL又はADDL－調節化合物との接触は時々、興味あるもう1つの化合物が投与される前、それと同時に、又はその後に行われる。所望には、この接触は、同時投与される剤が細胞又はADDLに対してそれらの効果を同時に発揮する時点が少なくとも存在するよう行われる。

【００８１】

当業者は、治療及び/又は診断、調査又は研究のために動物に本発明の剤（例えば、ADDL又はADDL－調節化合物）を投与するための適切な方法が入手でき、そして１つよりも多くの経路が投与のために使用され得るが、特定の経路が他の経路よりも直接的で且つ効果的な反応を提供することができることを理解するであろう。医薬的に許容できる賦形剤はま

た、当業者に良く知られており、そして容易に入手できる。賦形剤の選択は、剤を投与するために使用される特定の方法により一部決定されるであろう。従って、本発明への使用のために適切な種々の配合物が存在する。次の方法及び賦形剤は単なる例示であって、制限するものではない。

【００８２】

蛍光投与のために適切な配合物は、（ａ）液体溶液、例えば希釈剤、例えば水、塩溶液又はオレンジジュースに溶解された有効量の化合物；（ｂ）カプセル、サケット（Sachet）又は錠剤、個々は予定された量の活性成分を、固体又は顆粒として含む；（ｃ）適切な液体における懸濁液；及び（ｄ）適切なエマルジョンから成る。錠剤形は、１又は複数のラクトース、マンニトール、コーンスターチ、ジャガイモスターチ、微結晶性セルロース、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化珪素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸及び賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、保湿剤、保存剤、風味剤及び薬理学的に適合できる賦形剤を含むことができる。ロゼンジ形は、風味剤、通常スクロース及びアカシア又はトラガカントに活性成分を含んで成り、そして香剤は不活性塩基、例えばゼラチン及びグリセリン、エマルジョン、ゲル、及び活性成分の他に、当業界において知られているような賦形剤を含む同様のものに、活性成分を含んで成る。

【００８３】

本発明の剤は、単独で又は他の適切な成分と組合して、吸入を通して投与されるエーロゾル配合物に製造され得る。それらのユーロゾル配合物は、加圧された許可できる噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素及び同様のものに充填され得る。それらはまた、加圧されていない調製物のための医薬として、例えばネブライザー又は噴霧器において配合され得る。

【００８４】

非経口投与のために適切な配合物は、本発明において好ましく、そして酸化防止剤、緩衝液、静菌剤を含むことができる。水性及び非水性、等張性無菌注射用溶液、配合物と血液とを等張性にする溶質、及び沈殿防止剤、溶解剤、増粘剤、安定剤、及び保存剤を含むことができる水性及び非水性無菌懸濁液を包含する。配合物は、単位－用量又は多用量の密封された容器、例えばアンプル及びバイアルにおいて存在することができ、そして凍結乾燥された状態で貯蔵され得、これは、使用の直前、注射のための無菌液体賦形剤、例えば注射用水の添加によってのみ使用される。即座の注射溶液及び懸濁液は、これまで記載された種類の無菌粉末、顆粒及び錠剤から調製され得る。

【００８５】

動物、特にヒトに投与される用量は、興味ある剤、使用される組成物、投与の方法、及び処理される特定の部位及び動物により変化するであろう。しかしながら、好ましくは、有効量の剤（例えば、本発明のADDL又はADDL－調節化合物）に対応する用量が使用される。“有効量”とは、当業者に知られているいくつかのエンドポイントを用いてモニターされ得る、宿主において所望する効果を生成するために十分である量である。所望する効果の例は、学習、記憶、LTP応答、神経毒性、ADDL形成、ADDL細胞表面タンパク質（例えば、受容体）結合、抗体結合、細胞形態学変化、Fynキナーゼ活性、星状細胞活性化、及びタンパク質、例えばインターロイキン－１、誘発性酸化窒素シンターゼ、ApoE、ApoJ及びα１－抗キモトリプシンに関するmRNAレベルの変化に対する効果を包含するが、但し、それらだけには制限されない。記載されるそれらの方法は、決してすべてを例示するものではなく、そしてさらに、特定の用途のために適切な方法は当業者に明らかであろう。

【００８６】

さらに、特定の用途（例えば、インビトロ又はインビボ）に関しては、ADDL又はADDL－調節化合物の投与の実際の用量及びスケジュールは、組成物が、他の医薬組成物と組合して投与されるかどうかに依存して、又は薬物力学、薬物の性質及び代謝の個人間での差異に依存して変化することができる。同様に、量は、使用される特定細胞型、又はADDL又はADDL－調節化合物が培養物に移行される手段又は溶液に依存して、インビトロ用途において

は変化することができる。当業者は、特定の情況の必要条件と従って必要に応じて容易に調節することができる。

【００８７】

一定の化合物の使用に関しては、医薬組成物として、化合物（すなわち、剤）を、脳中に直接的に又は間接的に導入することが所望されるか、又は必要とされる。直接的な技法は、宿主の脳室系中への薬剤供給カテーテルの配置を包含し、それにより、血液－脳バリヤーを回避する。間接的な技法は、薬剤による血液－脳バリヤーの交差を可能にする。当業界において知られている技法を用いて（例えば、薬剤上に存在するヒドロキシ、カルボキシル、及び第１アミン基を阻止することにより）、脂質可溶性薬剤に親水性薬剤を転換するための組成物の配合を包含するが、但しそれだけには限定されない。さらに、親水性薬剤の供給は、例えば血液脳バリヤーを一時的に開放する高張溶液（又は他の溶液）の動脈内注入により改良され得る。

実施例

前述した説明は（以下に続く説明も同様に）代表的な例にすぎない。本発明の方法および構成要素の他の利用は当業者に対して明らかであろう。従って、以下の実施例は本発明をさらに説明するが、もちろん、本発明の範囲を限定するといかにしても解釈されるべきではない。

実施例１：アミロイドβオリゴマーの調製

本発明に従って、４４μＬの無水ＤＭＳＯに１ｍｇの固体アミロイドβ１－４２（例えば、ランバート（Ｌａｍｂｅｒｔ）ら「Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．　Ｒｅｓ．，３９，３７７－３９５，１９９４」に記載されたように合成されたもの）を溶解することによりＡＤＤＬを調製した。その後、この５ｍＭ溶液を冷たい（４℃）Ｆ１２媒体（ライフテクノロジーズ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）製のＧｉｂｃｏ　ＢＲＬ）中で２．２０ｍＬの全体積に希釈（５０倍希釈）し、約３０秒にわたり攪拌（ｖｏｒｔｅｘｅｄ）した。混合物を放置して約０℃～約８℃で２４時間にわたりインキュベーションし、その後、約４℃で約１０分にわたり１４，０００ｇで遠心分離した。脳切片培養製剤、細胞培養製剤または結合蛋白質製剤で培養する前に、上澄み液を特定の合成培地中で１：１０～１：１０，０００の倍率で希釈した。しかし、一般に、１００μＭのＡβ蛋白質の濃度でＡＤＤＬを生成させた。一般に、実験のために用いられた最高濃度は１０μＭであり、場合によって、（初期Ａβ濃度として測定された）ＡＤＤＬを（例えば、細胞培地中で）１ｎＭに希釈した。原子力顕微鏡（ＡＦＭ）による分析のために、１：１００希釈の２０μＬアリコートを新しく劈開したマイカ円板の表面に塗布し（ａｐｐｌｙ）、分析した。その他の操作は次のように記載した通りであったか、あるいは自明の通りである。

【００８８】

あるいは、成分、Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシン（７６６ｍｇ／Ｌ）、Ｄ－グルコース（１．８０２ｇ／Ｌ）、塩化カルシウム（３３ｍｇ／Ｌ）、硫酸銅五水和物（２５ｍｇ／Ｌ）、硫酸鉄（ＩＩ）七水和物（０．８ｍｇ／Ｌ）、塩化カリウム（２２３ｍｇ／Ｌ）、塩化マグネシウム（５７ｍｇ／Ｌ）、塩化ナトリウム（７．６ｇ／Ｌ）、炭酸水素ナトリウム（１．１８ｍｇ／Ｌ）、燐酸水素二ナトリウム（１４２ｍｇ／Ｌ）および硫酸亜鉛七水和物（０．９ｍｇ／Ｌ）を含有する緩衝液（すなわち、「代用Ｆ１２媒体」）にＦ１２媒体を代えたこと以外は、ＡＤＤＬの生成を上述したように行った。０．１Ｍ水酸化ナトリウムを用いて緩衝液のｐＨを８．０に調節した。

実施例２：アミロイドβオリゴマーの架橋

グルタルアルデヒドは様々な生化学系においてうまく用いられてきた。グルタルアルデヒドは、高濃度の単量体蛋白質との非特異反応とは対照的に、直接接触している蛋白質を架橋する傾向がある。この実施例において、アミロイドβのグルタルアルデヒド支配型架橋を調べた。

【００８９】

代用Ｆ１２媒体を用いて、オリゴマーの調製を実施例１に記載されたように行った。遠心分離（および場合によって分別）後に得られた上澄み液をグルタルアルデヒド（アルドリ

ッチ（Ａｌｄｒｉｃｈ））の２５％水溶液０．２２ｍＬで処理し、その後、０．１Ｍ・ＮａＯＨ中の０．１７５Ｍ硼化水素ナトリウム０．６７ｍＬで処理した（レビン（Ｌｅｖｉｎｅ）「Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ Ａｇｉｎｇ，１９９５」の方法に準拠して）。混合物を４℃で１５分にわたり攪拌し、２０％水性スクロース１．６７ｍＬの添加によってクエンチングした。混合物をＳｐｅｅｄ Ｖａｃで5倍濃縮し、そして透析して１ｋＤより小さい成分を除去した。ＳＤＳ ＰＡＧＥによって材料を分析した。ゲル濾過クロマログラフィーを以下に従って行った。濾過され脱気された０．１５％炭酸水素アンモニウム緩衝液（ｐＨ＝７．８）でＳｕｐｅｒｏｓｅ７５ＰＣ３．２／３．０カラム（ファーマシア（Ｐｈａｒｍａｃｉａ））を室温で１８時間の経過にわたって０．０２ｍＬ／分の流量で平衡させた。流量を０．０４ｍＬ／分に変え、２０ｍＬの溶媒を溶離させた。５０マイクロリットルの反応溶液をカラムに装填し、流量を０．０４ｍＬ／分で再開した。化合物の溶離を２２０ｎｍでのＵＶ検出を介して監視し、０．５～１．０ｍＬフラクションをクロマトグラフィーの過程中に集めた。ＵＶ吸光度の第３のピークに対応するフラクションＮｏ．３を単離し、小球４．９±０．８ｎｍを含むことをＡＦＭによって実証した（幅分析によって）。このフラクションは、以下に続く実施例において記載されるように、脳切片ニューロンと接触させた時に極めて神経毒性であった。

実施例３：ＡＤＤＬのサイズ特性分析

この実施例は、様々な方法（例えば、天然ゲル電気泳動、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ＡＦＭ、フィールドフロー分別および免疫認識）を用いる、実施例１の場合のように形成されたＡＤＤＬのサイズ特性分析を記載している。

【００９０】

本質的に以前に記載（例えば、スタイン（Ｓｔｉｎｅ）ら「Ｊ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｈｅｍ．，１５，１９３～２０３，１９９６」）されたようにＡＦＭを行った。すなわち、ｘｙレンジが１５０μのＪ－スキャナーを用いるＤｉｇｉｔａｌ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ（カリフォルニア州サンタバーバラ）Ｎａｎｏｓｃｏｐｅ ＩＩＩａ Ｍｕｌｔｉｍｏｄｅ原子力顕微鏡を用いて画像を得る。蝕刻シリコンＴＥＳＰ Ｎａｎｏｐｒｏｂｅｓ（ディジタル・インストルメンツ（Ｄｉｇｉｔａｌ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ））を用いるすべての画像についてＴａｐｐｉｎｇ Ｍｏｄｅを用いた。Ｎａｎｏｓｃｏｐｅ ＩＩＩａソフトウェアおよびＩＧＯＲ Ｐｒｏ（登録商標）波形分析ソフトウェアを用いてＡＦＭデータを分析した。ＡＦＭ分析のために、４μｍスキャン（すなわち、４μｍＸ４μｍ平方のアセスメント）を行った。本明細書において報告した寸法を切片分析によって得た。そして幅分析を用いた場合、寸法は幅分析によって得た値であるとして明記している。切片分析および幅分析は、Ｎａｎｏｓｃｏｐｅ ＩＩＩａソフトウェアにおける別個の分析モジュール内である。一般に、ＡＤＤＬ分析の場合、切片分析により得られたサイズと幅分析により得られたサイズとの間に系統的な偏りが存在する。すなわち、４μスキャンの場合、切片分析は、通常は約０．５ｎｍだけより高い高さを生じさせ、よって小球のサイズに関して得られた値において約０．５ｎｍの偏りを生じる。

【００９１】

ゲル電気泳動による分析を１５％ポリアクリルアミドゲルで行い、Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ青染色によって可視化した。非変性条件下の４～２０％トリスグリシンゲル（ノベックス（Ｎｏｖｅｘ））上にＡＤＤＬを分解した。電気泳動を２０ｍＡで約１．５時間にわたって行った。ザング（Ｚｈａｎｇ）ら「Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６９，２５２４７－２５２５０，１９９４」に記載されたようにＳＤＳ－ＰＡＧＥで蛋白質を分解した。その後、銀染色を用いて（例えば、シェルチェンコ（Ｓｈｅｒｃｈｅｎｋｏ）ら「Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．，６８，８５０－８５８，１９９６」に記載されたように）蛋白質を可視化した。ザング（Ｚｈａｎｇ）ら（「Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６９，２５２４７－５０，１９９４」）に従って天然ゲルとＳＤＳゲルの両方からのゲル蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。ビオチニル化（ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｅｄ）６Ｅ１０抗体（ミズーリ州セントルイスのセネタック（Ｓｅｎｅｔａｋ，Ｉｎｃ．，））を用いて免疫ブロット法を１：５０００で行い、ＥＣＬ（アマーシャム（Ａｍｅｒｓｈａｍ））を用いて可視化した。

一般に、デンシトメータを用いてゲルをスキャンした。これによって（例えば、ゲル自体の写真に対して）ゲルのコンピュータ作製画像の提供が可能となった。

【００９２】

ＡＦＭ切片分析（例えば、スタイン（Ｓｔｉｎｅ）ら「Ｊ．Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｈｅｍ．，１５，１９３～２０３，１９９６」に記載されたような）または幅分析（Ｎａｎｏｓｃｏｐｅ　ＩＩＩソフトウェア）によるＡＤＤＬのサイズ特性分析によると、主たる種がｚ軸に沿って約４．７ｎｍ～約６．２ｎｍの小球であることが示された。小さい球状蛋白質（Ａβ１～４０モノマー、アプロチニン、ｂＦＧＦ、炭酸脱水酵素）との比較によると、ＡＤＤＬが１７～４２ｋＤの間の質量（ｍａｓｓ）を有することが示唆された。別種であると思われるものを認識することが可能である。これらは、約４．９ｎｍ～約５．４ｎｍ、約５．４ｎｍ～約５．７ｎｍおよび約５．７ｎｍ～約６．２ｎｍの寸法の小球に対応すると思われる。約４．９～約５．４ｎｍおよび約５．７～約６．２ｎｍの寸法の小球は小球の約５０％を構成すると思われる。

【００９３】

ＡＦＭ分析と一致して、ＡＤＤＬのＳＤＳ－ＰＡＧＥ免疫ブロット法は、おそらく分解生成物である豊富な４ｋＤモノマーが存在することと併せて約１７ｋＤ～約２２ｋＤのＡβオリゴマーを特定した。この解釈と一致して、ＡＤＤＬの非変性ポリアクリルアミドゲルは、乏しいモノマー、主帯域が３０ｋＤ付近にあること、あまり豊富でない帯域が１７ｋＤ以下にあること、そしてフィブリルと凝集体の証拠がないことを示している。銀染色天然ゲルおよびＣｏｏｍａｓｓｉｅ染色ＳＤＡ－ポリアクリルアミドゲルのコンピュータ作製画像を図１および図２にそれぞれ記載している。ＳＤＳと非変性ゲルとの間の対応は、ＡＤＤＬの小オリゴマーサイズが洗浄作用に起因していたことを確認している。ＡＤＤＬ製剤中に見られたオリゴマーは、低いクラステリン濃度（１：１Ａβ－クラステリン複合としてのＡβの結合（ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ）を排除したＡβを基準として１／４０）の使用から予想されたように、クラステリンより小さかった（変性ゲルにおいてＭｒ８０ｋＤ、４０ｋＤ）。

【００９４】

本発明によるＡＤＤＬ製剤をＳｕｐｅｒｄｅｘ７５カラム（ファーマシア（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）、Ｓｕｐｅｒｏｓｅ７５ＰＣ３．２／３．０カラム）で分画した。ＡＤＤＬを含む画分は、カラムから溶離するＵＶ吸光度の第３の画分であり、ＡＦＭおよびＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析した。画分３の代表的なＡＦＭ分析を図３に示している。分画は、小球の大部分が約４．９ｎｍ～約５．４ｎｍの寸法をもつことと併せてＡＤＤＬに関するより高い均質性をもたらした。画分のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動によると、Ａβのモノマー／ダイマーに対応する重いより低い帯域が実証された。ＡＤＤＬの非分画製剤の場合にも観察されたように、これは、ＡＤＤＬの分解生成物であると思われる。画分のより重いローディングは、より大きなサイズの広帯域（多分ダブレット）を明らかにした。これは、非原線維性オリゴマーＡβ構造のＳＤＳに対する安定性をさらに確認している。

実施例４：アミロイドβのクラステリン処理

フィブリル構造がＡβの毒性形態に相当することが言われてきた（ロレンゾ（Ｌｏｒｅｎｚｏ）ら「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９１，１２２４３－１２２４７，１９９４」、ハウレット（Ｈｏｗｌｅｔｔ）ら「Ｎｅｕｒｏｄｅｇｅｎ，４，２３－３２，１９９５」）けれども、沈降性フィブリルとして挙動しない新しい神経毒素は、低用量のクラステリン（「Ａｐｏ　Ｊ」としても知られている）と合わせてＡβ１－４２をインキュベート時に生じる（オダ（Ｏｄａ）ら「Ｅｘｐｅｒ．Ｎｅｕｒｏｌ．，１３６，２２－３１，１９９５」、オダ（Ｏｄａ）ら「Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，２０４，１１３１－１１３６，１９９４」）。これらの徐々に沈降する毒素が小さいフィブリルまたは発生期のフィブリルをなお含有しうるか否かを試験するために、クラステリン処理済みＡβ製剤を原子力顕微鏡によって検査した。

【００９５】

実施例１に記載されたインキュベーションにおいてクラステリンを添加することにより基本的にオダ（Ｏｄａ）ら「Ｅｘｐｅｒ．Ｎｅｕｒｏｌ．，１３６，２２－３１，１９９５」に記載されたようにクラステリン処理を行った。あるいは、出発Ａβ１－４２をＤＭＳＯではなく、０．１ＮのＨＣｌに溶解してよく、そしてこの出発Ａβ１－４２が始めにフィブリル構造をもつことさえ可能であった。しかし、３７℃の室温で２４時間にわたりクラステリンと合わせてインキュベーションすると、主としてフィブリルのない製剤がもたらされ、それはフィブリルの遅い沈降と一致した。これは、添加されるクラステリンの量を増加させるにつれてフィブリルの生成が減少することを示す実験によって確認された。

【００９６】

クラステリン処理から生じる製剤は、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５ゲルカラムで分画されたＡＤＤＬのＡＦＭ分析によって決定してサイズが約５～６ｎｍの小さい球状構造を専ら含んでいた。慣用の電子顕微鏡によって同等の結果を得た。それに反して、クラステリンの存在しない状態で標準条件下（シンダー（Ｓｎｙｄｅｒ）ら「Ｂｉｏｐｈｙｓ，Ｊ．，６７，１２１６－２８，１９９４」）において自己会合していた（ｓｅｌｆ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ）Ａβ１－４２は、主として大きい非拡散性フィブリル種を示した。さらに、得られたＡＤＤＬ製剤をＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　１０ｋＤカットオフ膜に通し、ＳＤＳ－ポリアクリルアミド勾配ゲルで分析した。図４において分かるように、モノマーのみがＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　１０ｋＤフィルターを通過し、ADDLはフィルターにより保持された。分離後に見出せたモノマーはこのフィルターにより保持された大きめの分子量物質のみから形成され得る。

【００９７】

これらの結果は、毒性ADDL製剤がAβ１－４２の小フィブリルフリーオリゴマーを含んでなり、そしてADDLがアミロイドの適当なクラステリン処理により獲得し得ることを確証した。

実施例５：ADDLの生理学的形成

実施例４における毒性成分はオリゴマーAβ及びクラステリンを含んで成る希少な構造を含んで成り得る。一方、Oda等（Exper. Neurol., 136, 22-31, 1995)はクラステリンがAβ１－４２溶液の毒性を高めることが見出された旨報告し、その他の者はクラステリンが理論化学量レベルにおいてAβ１－４０毒性に対する保護を供することを見出した旨報告する（Boggs等、J. Neurochem., 67, 1324-1327, 1997)。従って、クラステリンフィ不在でのADDL形成を本実施例において特性決定した。

【００９８】

モノマーAβ１－４２溶液を適当な媒質の中で低温で維持すると、沈降性Aβフィブリルの形成がほぼ完璧に阻止された。しかしながら、Aβ自身はこのような低温溶液において自己会合し、クラステリンによりシャペロン化されたものと本質的に区別できないADDLを形成した。最後に、ADDLはモノマーAβ溶液を脳切片培養培地の中で３７℃において極めて低濃度（５０ｎM)でインキュベーションしたときも形成され、生理学的に形成される可能性を示唆した。ADDL製剤は全て比較的安定であり、そして２４時間の組織培養実験の間フィブリルへの変換を示さなかった。

【００９９】

これらの結果は、ADDLが生理学的条件下形成され、且つ安定であることを確証し、そしてそれらがin vivoで同様に形成され、且つ安定であることを示唆する。

実施例６：ADDLは拡散性であり、極めて有能なCNS神経毒素である

ADDLがクラステリン、低温又は低Aβ濃度で誘導されようと、形成される安定なオリゴマーは有能な神経毒素であった。毒性は器官型マウス脳切片培養物で検査した。これは、成熟CNSに関する生理学的に近縁なモデルを担う。脳組織をフィルターにより外気－培地界面に吊るし、コントロールにおける高い生育力を維持した。

【０１００】

これらの実験のため、脳切片をＢ６　１２９Ｆ２及びＪＲ２３８５変種（Jackson Laboratories)から獲得し、そして改良を伴って事前に発表されているとおりにして（Stoppini

等、J. Neurosci. Meth., 37, 173-182, 1992)。即ち、成マウスを二酸化炭素吸入、しかる後の素早い断頭により殺した。その頭部を低温無菌解剖バッファー（９４ｍｌのGeyバランス塩溶液、pH7.2；２ｍｌの０．５ＭのＭｇＣｌ$_2$、２ｍｌの１．０ＭのＨｅｐｅｓ添加）に浸漬し、しかる後脳を取り出し、そして無菌Sylgard被覆プレートに載せた。小脳を取り出し、そして中央線切開を入れて大脳半球を分離した。各半球を個別にスライスした。この半球の中央線切開部を下にし、そして背部側から３０°のスライスを設けて半球を方向付けした。この半球を切断側を下にしてCampden組織裁断器の（予めエタノールで拭っておいた）プラスチックステージの上に載せ、そして低温無菌バッファーに浸漬させた。２００μｍの切片を側面から中心方向にかけて作り、海馬が見える部分を集めた。

【０１０１】

各切片を無菌ピペットの頂部を用いて１０％の胎児牛血清、２％のＳ／Ｐ／Ｆ（ストレプトマイシン、ペニシリン及びフンギゾン；Life Technologies (Gibco, BRL), Gaithersburg, MD)を含むダルベッコ改良イーグル培地（ＤＭＥＭ）含有ペトリ皿に移し、海馬の存在を確認するために顕微鏡で観察し、そして深底組織培養皿(Falcon, ６穴皿）中のMillicell-CMインサート（Millipore)に入れた。核ウェルは１．０ｍｌの増殖培地を含み、そして通常は各インサート上に２枚の切片を載せた。切片をインキュベーター(6%のCO_2、湿度１００％）の中に一晩入れておいた。増殖培地を取り出し、そしてウェルを１．０ｍｌの暖かいHanks BSS (Gibco, BRL, Life Technologies)で洗った。インヒビター化合物の入った又は入っていない、アミロイドβオリゴマー含有規定培地（ＤＭＥＭ, N2サプリメント、ＳＰＦ、例えばBottenstein等、Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 514-517, 1979に記載）を各ウェルに加え、そしてインキュベーションを２４時間続けた。

【０１０２】

ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）アッセイキット（オレゴン州ユージーンのモレキュラープローブズ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ））を用いて細胞死を測定した。これは、カルセイン－ＡＭをカルセインに開裂し、よって緑の蛍光を生じさせるエステル分解酵素の存在によって生存細胞を検出する二重標識蛍光アッセイである。死亡細胞は、ＤＮＡを挿入し赤の蛍光をもつエチジウムホモダイマーを吸い上げた（ｔａｋｅｎ　ｕｐ）。エチジウムホモダイマー２μＭおよびカルセイン４μＭで製造者の指示に従ってアッセイを行った。エピ蛍光が装備されたＮｉｋｏｎ　Ｄｉａｐｈｏｔ顕微鏡を用いて３０分以内に画像を得た。緑または赤の蛍光を示す細胞の数および／または領域を定量化するために、ＭｅｔａＭｏｒｐｈ画像分析システム（ペンシルバニア州フィラデルフィアのユニバーサルイメージングコーポレーション（Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を用いた。

【０１０３】

これらの実験の場合、ＡＤＤＬは、全Ａβの最大５μＭ用量で２４時間にわたり存在した（すなわち、全Ａβは、どのＡＤＤＬ実験においても５μＭを決して超えなかった）。「偽黄染色」によって示されるような細胞死は、層状三角骨（ＣＡ３－４）および歯状回（ＤＧ）に殆ど完全に限定され、よって海馬の主ニューロン（それぞれ錐体細胞および顆粒細胞）がＡＤＤＬ誘発毒性の標的であることを強く示唆している。さらに、グルア生存度は、トリパンブルー排除およびＭＴＴアッセイ（フィンチ（Ｆｉｎｃｈ）ら、未公表）によって決定して、一次ラット脳グリアの２４時間ＡＤＤＬ処理によって影響を受けない。歯状回（ＤＧ）およびＣＡ３領域は特に影響されやすく、そして年齢Ｐ２０（幼児）～Ｐ８４（青少年）の動物から得られたあらゆる培養組織においてＡＤＤＬ誘発細胞死を示した。この領域内の４０％以下の細胞がＡＤＤＬに対する慢性暴露後に死んでいる。ニューロン死のパターンは、ＤＧおよびＣＡ１においてニューロンを殺したがＣＡ３に危害を加えなかったＮＭＤＡについて観察されたパターンと同じではなかった。

【０１０４】

２０日を超える年齢の動物の海馬ＤＧおよびＣＡ３領域からの幾つかの培養組織をフィブリルＡβの従来の製剤で処理した。フィブリルの非拡散性と一致して、２０μＭでさえ細胞死（黄染色）が証明されなかった。この培養組織中の生存細胞に関する染色パターンは

、海馬のＣＡ３／歯回状領域が検査されることを立証した。慣用のＡβ処理後（即ち、フィブラーＡβ製剤）に観察される細胞死の程度は、培養物に培地を与えた、又はクラステリンを補給した培地を与えたネガティブコントロールと区別できなかった。典型的なコントロールでは、細胞死は５％未満であった。事実、コントロールの高い生存力は典型的な実験で数日間維持した培養物においてさえも認められ、細胞生存力が標準の培養条件で損なわれないことを立証した。

【０１０５】

用量－依存式実験を行い、ＡＤＤＬが細胞死を誘導する能力を決定した。イメージ解析を用い、ＤＧ／ＣＡ３領域を含む場における細胞死及び生存細胞染色を定量した。図５は初期アミロイドβ１－４２濃度（ｎＭ）として測定したＡＤＤＬ濃度に対する％細胞死を示す。脳切片の定量の困難性を理由に、これらの結果はＥＣ５０を正確に測定するには十分ではなかった。しかしながら、図５からわかるとおり、１０００倍に希釈した後でさえも（～５ｎＭのＡβ）、ＡＤＤＬ誘導細胞死は２０％超であった。毒性は０．３ｎＭのＡＤＤＬでさえも観察された。この結果は、約２０～約５０μＭにおいて培養ニューロンに対し毒性である慣用の加齢Ａβで得られる結果とは対照的であった。これらのデーターは、ＡＤＤＬがフィブラーＡβ実験で用いたものの約１０００～１００００分の一の用量で有効であることを示す。

【０１０６】

かくして、海馬切片由来のこれらのデーターはＡＤＤＬの超毒性特質を確証する。更に、ＡＤＤＬは細胞死を及ぼすのに培養物－支持体フィルターを通過しなければならないため、これらの結果はＡＤＤＬが拡散性であることを確証し、その小さなオリゴマーサイズと一致する。また、本明細書に記載の方法は細胞生存力におけるＡＤＤＬ仲介変化のアッセイとして採用できる。詳しくは、このアッセイはＡＤＤＬ形成及び／又は活性を潜在的に増大又は低下させ得るＡＤＤＬ因子との同時インキュベーション又は同時投与により実施することができる。かかる同時インキュベーション又は同時投与により得られる結果をＡＤＤＬだけを含ませて得られる結果と比較すればよい。

実施例７：ＭＴＴ酸化ストレス毒性アッセイ－ＰＣ１２細胞

この実施例は、アミロイドβオリゴマーに応じた早期毒性変化を検出するために使用できるアッセイを記載している。

【０１０７】

これらの実験のために、ＰＣ１２細胞を９６ウェルの培養皿上で４Ｘ１０^{4}細胞／ウェルにおいて培養し、ＤＭＥＭ＋１０％ウシ胎児血清＋１％Ｓ／Ｐ／Ｆ（ステプトマイシン、ペニシリンおよびフンギゾン）中で２４時間にわたり増殖させた。細胞接着力を強化するために細胞平板培養の前に２００μｇ／ｍＬポリ－ｌ－リジンで２時間にわたり皿を処理した。６ウェル一組を処理しないままにし、そして新しい媒体を供給した一方で、もう一つのウェル組をビヒクル対照（室温で熟成された、１０％の０．０１Ｎ・ＨＣｌを含有するＰＢＳ）で処理した。標準増殖媒体中のトリトン（１％）およびアジ化ナトリウム（０．１％）で陽性対照を処理した。インヒビター化合物が存在する、および存在しない、実施例１に記載されたように調製されたアミロイドβオリゴマーまたはクラステリンと共培養して得られたアミロイドβオリゴマーを２４時間にわたり細胞に添加した。２４時間のインキュベーション後に、ＭＴＴ（０．５ｍｇ／Ｌ）を２．５時間にわたり細胞に添加した（ＰＢＳに可溶化された５ｍｇ／ｍｌの種１１μＬを媒体１００μＬに）。健全細胞はホルマザンブルー着色製品に向けＭＴＴを減少させる。ＭＴＴと合わせてインキュベーション後、媒体を吸引し、１００％ＤＭＳＯ１００μＬを添加して細胞を溶解させ、そして青い結晶を溶解させた。皿を室温で１５分にわたりインキュベーションし、５５０ｎｍにおいて皿読取機（ＥＬＩＳＡ）で読みとった。

【０１０８】

一つのこうした実験の結果を図６に示している。この図から分かるように、ＡＤＤＬにさらされなかった対照細胞（「対照」）、クラステリンのみにさらされた細胞（「ＡｐｏＪ」）およびモノマーＡβにさらされた細胞（「Ａβ」）は、細胞毒性を示さなかった。

それに反して、クラステリンと合わせて共凝集され、そして一日熟成されたアミロイドβにさらされた細胞（「Ａβ：Ａｐｏ　Ｊ」）は、ＭＴＴ減少の低下を示し、よって早期毒性変化を証明している。最後のアミロイド製剤は、アミロイドフィブリルがないことがＡＦＭによって確認された。

【０１０９】

従って、この実験の結果は、クラステリンによって媒介されたＡβの共凝集から得られたＡＤＤＬ製剤の毒性が改善されていることを確認した。さらに、この結果は、ＡＤＤＬに起因する早期細胞変化を検出するためのアッセイとしてＰＣ１２酸化ストレス応答を採用できることを確認している。ＡＤＤＬの生成および／または活性を潜在的に増加または減少させうるＡＤＤＬ剤に加えて、共培養または共投与によってアッセイを行うことができる。こうした共培養または共投与により得られた結果は、ＡＤＤＬのみを含めることによって得られた結果と比較することが可能である。

実施例８：ＭＴＴ酸化ストレス毒性アッセイ－ＨＮ２細胞

この実施例は、ＡＤＤＬ媒介細胞変化の別のアッセイを記載している。すなわち、前の実施例において提示されたＭＴＴ酸化ストレス毒性アッセイをＰＣ－１２細胞の代わりにＨＮ２細胞を用いて行うことができる。その他の適切な細胞を同様に用いることが可能である。

【０１１０】

このアッセイのために、ＨＮ２細胞を９６ウェルの培養皿上で４Ｘ１０^{4}細胞／ウェルにおいて培養し、ＤＭＥＭ＋１０％ウシ胎児血清＋１％Ｓ／Ｐ／Ｆ（ステプトマイシン、ペニシリンおよびフンギゾン）中で２４時間にわたり増殖させた。細胞粘接力を強化するために細胞平板培養の前に２００μｇ／ｍＬポリ－ｌ－リジンで２時間にわたり皿を処理した。細胞を５μＭレチン酸で２４～４８時間にわたり分化させ、増殖を１％血清でさらに抑制した。ウェル一組を処理しないままにし、そして新しい媒体を与えた。もう一つのウェル組をビヒクル対照（０．２％ＤＭＳＯ）で処理した。トリトン（１％）およびアジ化ナトリウム（０．１％）で陽性対照を処理した。インヒビター化合物が存在する、および存在しない、実施例１に記載されたように調製されたアミロイドβオリゴマーを２４時間にわたり細胞に添加した。２４時間のインキュベーション後に、ＭＴＴ（０．５ｍｇ／ｍＬ）を２．５時間にわたり細胞に添加した（５ｍｇ／ｍｌの種１１μＬを媒体１００μＬに）。ＭＴＴと合わせてインキュベーション後、培地を吸引し、１００％ＤＭＳＯ１００μＬを添加して細胞を溶解させ、そして青い結晶を溶解させた。皿を室温で１５分にわたり培養し（ｉｎｃｕｂａｔｅｄ）、５５０ｎｍにおいて皿読取機（ＥＬＩＳＡ）で読みとった。

【０１１１】

ＡＤＤＬの生成および／または活性を潜在的に増加または減少させうるＡＤＤＬ剤に加えて、共培養または共投与によってアッセイを同様に行うことができる。こうした共培養または共投与により得られた結果は、ＡＤＤＬのみを含めることによって得られた結果と比較することが可能である。

実施例９：位相差顕微鏡法による細胞の形態学

この実施例は、ＡＤＤＬ媒介細胞変化のなおもう一つのアッセイである位相差顕微鏡法による細胞形態学のアッセイを記載している。

【０１１２】

このアッセイのために、培養組織を低密度に増殖させた（合流５０～６０％）。実験を開始するために、細胞をＦ１２媒体中で１時間にわたり血清不足にさせた。その後、インヒビター化合物を２４時間にわたり細胞に添加して、および添加しないで、実施例１に記載されたように調製されたアミロイドβオリゴマーと合わせて細胞を３時間にわたり培養した。３時間後に、細胞の形態学的相違を検査し、免疫蛍光標識付けのために細胞を固定した。ＭｅｔａＭｏｒｐｈ　Ｉｍａｇｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓシステムおよびｍｒｉビデオカメラ（ユニバーサルイメージング（Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｉｎｃ．）を用いてサンプルを検査した。

【０１１３】
アッセイの結果を以下に続く実施例において提示している。特に、ＡＤＤＬの生成および／または活性を潜在的に増加または減少させうるＡＤＤＬ剤に加えて、共培養または共投与によってアッセイを同様に行うことができる。こうした共培養または共投与により得られた結果は、ＡＤＤＬのみを含めることによって得られた結果と比較することが可能である。
【０１１４】
実施例10：　細胞表面に対するADDLの結合についてのFACScanアッセイ
普通に調製されたAβについてグリア胞上で細胞表面レセプターが最近同定され（Yan他、Nature、382：685－691、1996；El　Khoury他、Nature、382：716－719、1996）、そして低いADDL投与量における神経細胞死はシグナル発信メカニズムの掛かり合いの可能性を示唆したので、神経細胞上の特異的細胞表面結合部位がADDLについて存在するかどうかを決定するために実験を実施した。
【０１１５】
フローサイトメトリーのために、細胞を0.1％トリプシンで解離させ、少なくとも一夜組織培養プラスチック上に低密度でプレートした。冷リン酸塩緩衝液（PBS）／0.5mM　EDTAで取出し、3回洗浄し、氷冷PBSの中に500,000細胞／mlの最終濃度で再懸濁させた。実施例1に記載されているように調製したアミロイドβオリゴマーと冷PBS中で細胞をインキュベートしたが、ただしアミロイドβの10％は位置1においてアスパラギン酸塩と置換するビオシチンを含有するアミロイドβ1－42である。存在するインヒビター化合物を含むか、あるいは含まないオリゴマーを細胞に24時間添加した。細胞を冷PBS中で2回洗浄して、遊離、非結合アミロイドβオリゴマーを除去し、フルオレセインに結合したアビジンの1：1,000希釈物の中に再懸濁し、おだやかに撹拌しながら4℃において1時間インキュベートした。あるいは、アミロイドβ特異的抗体およびおよび蛍光性二次抗体をアビジンの代わりに使用して、10％のビオチニル化アミロイドβアナローグを組込む必要性を排除した。すなわち、ビオチニル化6E10モノクローナル抗体（1μl、Senetec，Inc.、ミゾリー州セントルイス）を細胞懸濁液に添加し、30分間インキュベートした。細胞をペレット化し、FITC結合ストレプトアビジン（1：500、Jackson　Laboratories）を使用して30分間500μlのPBS中に再懸濁した後、結合した抗体を検出した。
【０１１６】
Becton－Dickenson　Fluorescence　Activated　Cell　Scanner（FACScan）により、細胞を分析した。典型的には、前方向スキャッター（サイズ）および蛍光強度の両方について、10,000または20,000事象を収集し、Consort　30ソフトウェア（Becton－Dickenson）によりデータを解析した。平均蛍光に全事象数を掛け、6E10およびFITCの存在下にバックグラウンドの細胞蛍光値を減ずることによって、結合を定量した。
【０１１７】
これらの実験において、対数期酵母細胞（大部分炭水化物表面）およびB103　CNS神経細胞系統の懸濁液中でADDLの免疫反応性を比較するために、FACScan分析を実施した（Schubert他、Nature、249：224－227、1974）。B103細胞について、ADDLを添加すると、第7図に示すように、細胞に関連する蛍光が主として増加した。B103細胞をトリプシンで1分間処理すると、ADDLの結合が排除された。対照的に、対照酵母細胞（データは示されていない）はADDLの結合を証明せず、細胞表面上に存在するタンパク質に対するADDLの選択性を立証した。また、海馬細胞（トリプシン処理し、次いで2時間代謝回復させた）の懸濁液はADDLを結合したが、標識化ピークの蛍光強度の減少により証明されるように、B103細胞と比較して結合事象の数は減少した。これは第8図において標識化ピークの左方へのシフトとして現れる。
【０１１８】
こうして、これらの結果が示唆するように、ADDLは特異的細胞表面レセプターに結合することによってそれらの作用を発揮する。特に、B103細胞のトリプシン感受性により示されるように、それらのADDL結合部位は細胞表面タンパク質であり、そしてこれらのタンパク

質内の特定部位のサブセットについて結合は選択的であった。

【０１１９】

そのうえ、ADDL仲介細胞結合についてのアッセイとして、このアッセイをまた使用した。特に、ADDLの形成および／または活性を潜在的に増加または減少することができるADDL因子と一緒に共インキュベートまたは共投与することによって、このアッセイを実施することができる。ADDL単独を添加して得られた結果と、このような共インキュベートまたは共投与を使用して得られた結果を比較した。

【０１２０】

実施例11：　ゴシポルによりADDL形成の阻害

ADDL形成は、例えば、ゴシポル（gossypol）を使用して、阻害可能であることを、この実施例により説明する。

【０１２１】

これらの実験において、実施例1に記載されているようにしてADDLを調製した。Aβタンパク質のインキュベーションの間にゴシポル（Aldrich）を100μMの濃度に添加した。前述したようにLIVE／DEAD^{R}アッセイキットを使用して、生ずる調製物を神経細胞毒性についてアッセイした。ゴシポル／ADDL調製物に対して24時間暴露した後、発生した細胞死の量は5％より少なかった。これは対応するDMSO対照調製物について得られた毒性レベル（すなわち、6％）、またはADDLを含有しないゴシポル対照調製物について得られた毒性レベル（すなわち、4％）に匹敵した。

【０１２２】

こうして、これらの結果は、ADDL形成を阻害するために、ゴシポルのような化合物を使用できることを確証する。

【０１２３】

実施例12：　トリプシンペプチドによるADDL結合の阻害

B103細胞トリプシン化は引き続くADDL結合をブロックすることが見出されたので、この実施例に記載するように細胞表面から解放されたトリプシンフラグメントがADDL結合活性を遅延するかどうかを試験するために、実験を実施した。

【０１２４】

ほぼ3分間のトリプシン化（0.025％、Life　Technologies）により除去された、4枚の100mm皿からのB103細胞を使用して、トリプシンペプチドを調製した。トリプシン－キモトリプシンインヒビター（Sigma、ハンク緩衝化生理食塩水中の0.5mg／l）を添加し、500×gにおける5分間の遠心により細胞を除去した。上清（約12ml）をCentricon　3フィルター（Amicon）によりほぼ1.0mlに濃縮し、タンパク質濃度を測定した後、凍結した。ブロッキング実験のために、無菌濃トリプシンペプチド（0.25mg／ml）を器官特徴的脳スライスまたは懸濁B103細胞にFACsアッセイにおいて添加すると同時にADDLを添加した。

【０１２５】

FACScanアッセイにおいて、培地の中に解放されたトリプシンペプチド（0.25mg／ml）は、第9図に示すように、ADDL結合を＞90％だけ阻害した。比較により、BSAに暴露された対照細胞は、100mg／mlにおいてさえ、結合低下を示さなかった。ADDLが既に細胞に結合している場合、トリプシンペプチドは蛍光強度を有意に低下させなかった。これにより示されるように、ペプチドは結合したADDLを定量するアッセイの能力を危うくしなかった。また、トリプシンペプチドは、ADDL結合をブロックするほかに、ADDL誘発細胞死のアンタゴニストであった。すなわち、第9図に示すように、トリプシンペプチドを添加すると、細胞死は75％減少した、$p<0.002$。

【０１２６】

これらのデータが確証するように、特定の細胞表面タンパク質はADDL結合を仲介し、細胞表面から可溶化されたトリプシンペプチドは神経細胞保護的、ADDL中和活性を提供する。その上、ADDL細胞結合または細胞活性に対するADDL作用を仲介する因子についてのアッセイとして、このアッセイをまた使用することができる。特に、ADDL形成および／または活性を潜在的に増加または減少することができるADDL因子と一緒に共インキュベートまたは

共投与することによって、このアッセイを実施することができる。ADDL単独を含めて得られた結果と、このような共インキュベーションまたは共投与を使用して得られた結果と比較することができる。その上、細胞表面に対するADDLの結合の前または後における因子の添加を比較して、このような結合に衝撃を与える因子、または結合が起こった後に作用する因子を同定することができる。

【０１２７】

実施例13：　ADDL細胞結合についての投与量応答曲線

この実施例において、細胞表面に対するADDL結合が飽和可能であるかどうかを決定するための投与量応答実験を記載する。ADDLが事実特定の細胞表面レセプターと相互作用する場合、このような飽和可能性が期待されるであろう。

【０１２８】

これらの研究において、B103細胞を増加する量のADDLとインキュベートし、FACScan分析によりADDL結合を定量した。結果を第10図に示す。これらの結果により、ADDL結合について独特なプラトーが達成されることが確証される。約250nmの相対Ａβ１－42濃度（すなわち、Ａβに関するADDL濃度）において、ADDL結合の飽和可能性は起こる。

【０１２９】

こうして、これらの結果により、ADDL結合が飽和可能であることが確証される。このようなADDL結合の飽和可能性により、特にトリプシン研究の結果とともに考慮するとき、ADDLは特定の細胞表面レセプターを通して作用することが確認される。

【０１３０】

実施例14：　ADDL結合活性についての細胞をベースとするELISA

この実施例において、ADDL結合をアッセイするために使用できる、細胞をベースとするアッセイ、特に細胞をベースとする酵素結合イムノアッセイ（ELISA）を説明する。

【０１３１】

これらの研究において、実験を実施する48時間前に、100μｌのDMEM中の懸濁液として存在する2.5×10^4B103細胞を96ウェルのマイクロタイタープレートの各アッセイウェルの中に入れ、37℃においてインキュベーターの中に保持する。実験を実施する24時間前に、実施例1に記載する方法に従いADDLを調製した。アッセイを開始するために、細胞を含有する各マイクロタイタープレートのウェルを室温において50μｌの固定剤（DMEM中の3.7％ホルマリン）で10分間処理した。この固定剤／DMEM溶液を除去し、50μｌのホルマリン（無DMEM）を使用する第2処理を室温において15分間実施した。固定剤を除去し、100μｌのリン酸塩緩衝液（PBS）を使用して各ウェルを2回洗浄した。200μｌのブロッキング剤（PBS中の1％BSA）を各ウェルに添加し、室温において1時間インキュベートした。100μｌのPBSで2回洗浄した後、50μｌのADDL（前もってPBS中で1：10に希釈した）を適当なウェルまたは対照としてPBS単独を添加し、生ずるウェルを37℃において1時間インキュベートした。100μｌのPBSで3回洗浄し、1％BSA／PBS中で1：1000に希釈した50μｌのビオチニル化6E10（Senetek）を適当なウェルに添加した。他のウェルにおいて、PBSを対照として添加した。回転器上で室温において1時間インキュベートした後、ウェルを50μｌのPBSで3回洗浄し、50μｌのABC試薬（Elite　ABCキット、Vector　Labs）を添加し、回転器上で室温において30分間インキュベートした。50μｌのPBSで4回洗浄した後、50μｌのABTS基質溶液を各ウェルに添加し、プレートを暗所で室温においてインキュベートした。プレートを405nmにおける吸収増加について分析した。ADDL、細胞、および6E10が存在するとき、第11図に図解するように、有意なシグナルが存在した。

【０１３２】

これらの結果によりさらに確証されるように、ADDL仲介細胞結合についてのアッセイとして、細胞をベースとするELISAを使用することができる。特に、ADDL形成および／または活性を潜在的に増加または減少することができるADDL因子と一緒に共インキュベートまたは共投与することによって、このアッセイを実施することができる。ADDL単独を含めて得られた結果と、このような共インキュベーションまたは共投与を使用して得られた結果と比較することができる。

【０１３３】
実施例15：　Fynキナーゼノックアウトは ADDL神経細胞毒性に対して保護する
ADDL毒性におけるシグナルトランスダクションの潜在的掛かり合いをさらに研究するために、この実施例の実験において、同質遺伝子fyn－／－およびfyn＋／＋動物からの脳スライスに対するADDLの衝撃を比較した。Fynはプロテインチロシンキナーゼの Src－ファミリーに属する。プロテインチロシンキナーゼは多数の細胞シグナルおよび応答に対して中心的な役割を果たす（Clarke他、Science、268：233－238）。FynはAD苦しめられた神経細胞においてアップレギュレートされるので、Fynは特に重要である（Shirazi他、Neurorep ort、4：435－437、1993）。また、Fynは慣用Aβ調製物により活性化されるように見え（Zhang他、Neurosci． Lett.、211：187－190、1996）これらの調製物は引き続いてAFMによりADDLを含有することが示された。その上、Fynノックアウトマウスは発生する海馬におけるアポトーシスを減少させた（Grant他、Science、258：1903－1910、1992）。
【０１３４】
これらの研究において、前の実施例に記載されているように、ADDLで処理したまたは処理しないマウスの脳スライスの画像を24時間比較して、DGおよびCA3領域において死んだ細胞を決定することによって、Fynノックアウトマウス（Grant他、Science、258：1903－19 10、1992）を処置した。定量的比較（第12図に示す）が得られ、エラーバーは4～7スライスについての平均＋／－SEMを表す。
【０１３５】
野生型動物からの培養物と対照的に、fyn－／－動物からの培養物は、第12図に示すように、無視できるADDL誘発細胞死を示した。ADDLについて、fyn＋／＋スライス中の細胞死レベルはfyn－／－培養物におけるそれの5倍より大きかった。fyn－／－培養物において、ADDLの存在下の細胞死はバックグラウンドレベルであった。神経細胞保護的応答は選択的であった；NMDAレセプターアゴニストにより誘発された海馬細胞死（Bruce他、Exper． Neurol.、132：209－219、1995；Vornov他、Neurochem.、56：996－1006、1991）は影響を受けなかった（示されていない）。Tukey多重比較を使用する解析（ANOVA）は、すべての他の条件に対して比較したADDLfyn＋／＋データについてP＜0.001値を与えた。
【０１３６】
これらの結果により、Fynキナーゼの喪失はDGおよびCA3領域をADDLにより誘導される細胞死から保護したことが確証される。Fynプロテインチロシンキナーゼのノックアウトによりブロックされたメカニズムにより、ADDL毒性は仲介されることがこれらの結果から確認される。さらに、これらの結果が示唆するように、Fynプロテインチロシンキナーゼの活性またはFynプロテインキナーゼをコードする遺伝子の発現を阻害する処理により、神経細胞保護的利益が得られる。
【０１３７】
実施例16：　星状細胞活性化実験
ADDL毒性におけるシグナルトランスダクションの潜在的掛かり合いをさらに研究するために、この実験の実験において、星状細胞の活性化に対するADDLの衝撃を比較した。
【０１３８】
これらの実験において、以前に記載されているように（Hu他、J． Biol． Chem.、271：2543－2547、1996）LevisonおよびMcCarthyの方法（Levison他、In：Banker他（編者）、Culturing Nerve Cell、MIT press、マサチュセッツ州ケンブリッジ、309－36、1991）により、新生児（1～2日齢）SDラットの子から皮質星状細胞を調製した。簡単に述べると、脳皮質を解剖し、トリプシン処理し、10％胎仔ウシ血清（Hyclone Laboratories Inc .、ユタ州ローガン）および抗体（100U／mlのペニシリン、100mg／mlのストレプトマイシン）を含有するα－MEM（Gibco、BRL）中で細胞を培養した。11日間培養した後、細胞をトリプシン処理し、100mmプレートの中に約6×10^5細胞／プレートの密度で再プレートし、コンフルエントまで成長させた（Hu他、J． Biol． Chem.、271：2543－2547、1996）。
【０１３９】

実施例1に従い調製したADDL、またはAβ17－42（Lambert他、J. Neurosci. Res.、39：377－384、1994、に従い合成した；また、商業的に入手可能である）で、星状細胞を処理した。星状細胞のコンフルエント培養物をトリプシン処理し、60mm組織培養皿上に1×10^6細胞／皿の密度で（例えば、RNA分析およびELISAのために）、4ウェルのチャンバースライドの中に5×10^4細胞／ウェル（例えば、免疫組織化学のために）、または96ウェルのプレートの中に5×10^4細胞／ウェル（例えば、NOアッセイのために）プレートすることによって、処理を実施した。24時間インキュベートした後、細胞をPBSで2回洗浄して血清を除去し、N2補充物質を含有するα－MEM中で培養物をさらに24時間インキュベートした後、Aβペプチドまたは対照緩衝液（すなわち、希釈剤を含有する緩衝液）を添加した。

【０１４０】

Javelin SmartCamカメラ、Sonyビデオモニターおよびカラービデオプリンターを装備したNikon倒立顕微鏡下に、細胞を検査することによって、星状細胞の形態を検査した。典型的には、4つの無作為に選択した顕微鏡視野（倍率20×）を各実験条件について写真撮影した。NIH画像を使用して写真から、4つの視野中の活性化細胞（少なくとも1つの細胞本体長さにおいて1またはそれ以上のプロセスを有する細胞として定義する）の数を計数することによって、形態学的活性化を定量した。

【０１４１】

ノザンブロットおよびスロットブロットを使用して、培養物中のmRNAレベルを測定した。これは細胞をADDLまたは対照緩衝液に24時間暴露することによって実施した。その後、細胞をジエチルピロカーボネート（DEPC）処理PBSで2回洗浄し、製造業者が推奨するようにRNeasy精製ミニカラム（Qiagen, Inc.、カリフォルニア州チャツワース）により、全RNAを単離した。RNAの典型的な収量は8～30mgのRNA／皿であった。ノザンブロットのために、5mgの全RNA／試料をアガロース－ホルムアルデヒドゲル上で分離し、毛管作用によりHybond－N膜（Amersham、イリノイ州アーリントンハイツ）に移し、UV架橋した。スロットブロット分析のために、200ngの全RNA／試料をDuralon－UV膜（Stratagene、カリフォルニア州ラジョラ）上に真空下にブロットし、UV架橋した。臭化エチジウム染色またはGAPDHプローブを使用するハイブリダイゼーションおよび正規化により、等価RNA負荷の確証を実施した。

【０１４２】

プラスミドの制限酵素消化、および引き続く適当なフラグメントのゲル精製により、プローブを発生させた。すなわち、ラット皮質星状細胞からの全RNAを使用するRT－PCRにより、cDNAフラグメントを調製した。Superscript II（GIBCO／BRL）を使用してRNAを逆転写し、下記の設定において35サイクルを使用してPTC－100サーマルコントローラー（MJ Research Inc.、マサチュセッツ州ウォータータウン）上でPCRを実施した：52℃40秒間；72℃40秒間；96℃40秒間。ラットIL－1βの447bpフラグメントを増幅するために使用したプライマー対は次の通りであった：前方向：5'GCACCTTCTTTCCCTTCATC3'（配列番号1）。逆方向：5'TGCTGATGTACCAGTTGGGG3'（配列番号2）。ラットGFAPの435bpフラグメントを増幅するために使用したプライマー対は次の通りであった：前方向：5'CAGTCCTTGACCTGCGACC3'（配列番号3）。逆方向：5'GCCTCACATCACATCCTTG3'（配列番号4）。Invitrogen TAクローニングキットを使用してPCR生成物をpCR2.1の中にクローニングし、構築物をDNA配列決定により確認した。ベクターをEcoRI消化し、次いで適当なフラグメントをゲル精製することによって、プローブを調製した。プラスミドはラットiNOS cDNAプラスミドpAstNOS－4であり、ラットiNOS cDNA塩基3007－3943（Galea他、J. Neurosci. Res.、37：406－414、1994）、およびラットGAPDH cDNAプラスミドpTRI－GAPDH（Ambion, Inc.、テキサス州オースチン）に対応した。

【０１４３】

Prime－a－Gene Random－Prime標識化キット（Promega、ウイスコンシン州マディソン）を使用して、プローブ（25ng）を^{32}P－dCTPで標識化し、プッシュ－カラム（Stratagene）を使用して非組込みヌクレオチドから分離した。ストリンジェントハイブリダイゼーションについて推奨されているプロトコルに従い、QuikHyb溶液（Stratagene）を使用して

ストリンジェント条件下にハイブリダイゼーションを実施した。簡単に述べると、プレハイブリダイゼーションを68℃において約30～60分間実施し、そしてハイブリダイゼーションを68℃において約60分間実施した。次いで、ブロットをストリンジェント条件下に洗浄し、オートラジオグラフィーまたはホスホイメージングプレートに対して露出した。オートラジオグラムをBioRad GS－670レーザースキャナーで走査し、バンド密度をMolecular Analyst v2.1（BioRad、カリフォルニア州ハーキュレス)画像解析ソフトウェアで定量した。ホスホイメージをStorm 840システム（Molecular Dynmics、カリフォルニア州サニイベイル）で捕捉し、バンド密度をImage Quant v1.1（Molecular Dynmics）画像解析ソフトウェアで定量した。

【０１４４】

亜硝酸塩アッセイによりNOを測定するために、細胞をＡβペプチドまたは対照緩衝液と48時間インキュベートし、次いで以前に記載されているようにGriess反応（Hu他、J. Biol. Chem.、271：2543－2547、1996）により、コンディショニングした培地中の亜硝酸塩レベルを測定した。NOSインヒビターN－ニトロ－L－アルギニンメチルエステル（L－name）または不活性D－name異性体を使用したとき、これらの物質をＡβと同時に培養物に添加した。

【０１４５】

これらの実験の結果を第13図に示す。この図面から理解できるように、星状細胞をADDLとインキュベートするとき、グリア細胞の活性化は増加するが、星状細胞をＡβ17－42とインキュベートするとき、グリア細胞の活性化は増加しない。

【０１４６】

これらの結果により、ADDLはグリア細胞を活性化することが確証される。グリア細胞タンパク質は、例えば、アルツハイマー病において起こるように、神経細胞の欠如に寄与することがあり、そしてADDLのある作用はグリア細胞の活性化により間接的に仲介されることがある。特に、グリア細胞タンパク質は、ADDL形成を促進するか、あるいはレセプター結合より下流で起こるADDL仲介作用を促進することがある。また、クラステリンはアルツハイマー病被検体の脳においてアップレギュレートされ、そしてクラステリンは活性化されたグリア細胞においてのみ増加したレベルでつくられることが知られている。これに基づいて、非ADDL、非アミロイド刺激因子によるグリア細胞の活性化はクラステリンを産生し、クラステリンは引き続いてADDLに導くことができ、ADDLは引き続いて神経細胞を損傷し、グリア細胞のそれ以上の活性化を引き起こすであろう。

【０１４７】

メカニズムに無関係に、これらの結果がさらに示唆するように、ADDL仲介グリア細胞活性化をモジュレートする（すなわち、増加または減少する）処理により、神経細胞保護の利益を得ることができる。さらに、これらの結果が示唆するように、神経細胞作用のブロッキングは別として、グリア細胞に対するこれらの作用のブロッキングは有益である。

【０１４８】

実施例17： LTPアッセイ － ADDLはLTPを崩壊させる

長期間強化（LTP）は、シナプス柔軟性の古典的範例であり、そして初期段階ADにおいて選択的に喪失される、記憶および学習の機能のモデルである。この実施例において、LTPに対するADDLの作用、特に内側貫通路－顆粒細胞LTPを検査するために実施した実験を説明する。

【０１４９】

無傷動物の注入： マウスをウレタンで麻酔し、脳定位固定装置の中に配置した。加熱したジャケットパッドを使用して、体温を維持した。頭蓋の中に孔を空けて、脳表面を暴露させた。海馬の中央分子層の中への注入のためにブレグマおよびラムダ位置はブレグマに対して後部に2mm、中線に対して横方向に1mm、そして脳表面に対して腹側に1.2～1.5mmである。直径約10nmのガラスピペットを通す窒素パフにより、アミロイドβオリゴマーを注入した。20～50nlの体積のアミロイドβオリゴマー溶液（リン酸塩緩衝液、PBS中のアミロイドβの180nM）を1時間にわたって投与した。動物を変化する時間の間安静にさせた後

、LTP刺激を与える（典型的には60分）。

【０１５０】

注入した動物におけるLTP：　実験はマウスにおけるLTPのためにRouttenbergおよび同僚により確立された範例に従う（Namgung他、Brain　Research、689：85－92、1995）。内側皮質からの貫通路刺激を使用し、中央分子層および歯状回の細胞本体から記録した。電気的に刺激すると、集団励起シナプス後ポテンシャル（pop－EPSP）および集団スパイクポテンシャル（pop－スパイク）が観測された。3トランスの400Hz、8×0.4msパルス／列の刺激により、これらの応答においてLTPを誘導することができた（Namgung他、Brain　Research、689：85－92、1995）。刺激（すなわち、時間0において加えた）後2～3時間に記録して、LTPが保持されるかどうかを決定した。次いで動物を直ちに殺すか、あるいは1、3または7日間回復させ、次いで前述したように殺した。脳を30％スクロースで極低温保護し、次いでマイクロトームで切断した（30μM）。いくつかの切片をゼラチンで下塗りしたスライド上に配置し、他の切片を自由浮遊性プロトコルで分析した。免疫組織化学を使用してGAP－43、PKCサブタイプ、およびタウ（PHF－1）、パクシリン、およびフォーカル接着キナーゼのタンパク質リン酸化の変化をモニターした。以前に記載された機械により波形を解析した（Colley他、J.　Neurosci.、10：3353－3360、1990）。2－方向ANOVAにより、処置グループと未処置グループとの間のスパイク振幅の変化を比較した。

【０１５１】

第14図は、全動物におけるADDLのスパイク振幅の効果を図解する。この図面から明瞭に理解できるように、内側皮質に加えられた高周波数の電気刺激により誘導され、歯状回の中央分子層における細胞本体のスパイク振幅として測定された、LTPの持続相をADDLはブロックする。

【０１５２】

LTP実験を実施した後、動物を種々の時間の間回復させ、次いでナトリウムペントバルビトール麻酔剤および4％パラホルムアルデヒドを使用する灌流により殺した。生活能力を研究するために、3時間、24時間、3日、および7日の時間を使用した。脳を30％スクロースで極低温保護し、次いでマイクロトームで切断した（30μM）。切片をゼラチンで下塗りしたスライド上に配置し、最初にクレシルバイレットで染色した。歯状回、CA3、CA1、および内側皮質における細胞本体を計数することによって、細胞喪失を測定し、ADDLの投与量および暴露時間と相関させた。これらの実験結果により、LTP実験後24時間まで細胞死が起こらなかったことが確証された。

【０１５３】

同様に、若い成体ラットからの海馬スライスにおいてLTP応答を検査した。第15図において見ることができるように、ラット海馬スライスとADDLとのインキュベーションは、細胞変性の明白な徴候前に、LTPを十分に防止する。以前に500nM　ADDLに45分間暴露させた海馬スライス（n＝6）は、活動電位のための容量を連続させたにもかかわらず、テタヌス刺激（平均振幅90％＋／－7.6）後30分に集団スパイクの増強を示さなかった。対照的に、LTPはベヒクルとインキュベートしたスライス（n＝6）において容易に誘導され、最後の10分間の振幅は138％＋／－8.1であった；この値はこの日齢のグループにおいて以前に証明された値に匹敵する（Trommer他、Exper.　Neurol.、131：83－92、1995）。LTPはADDL処理スライスの中に存在しないが、それらの細胞はコンピテントであって活動電位を発生し、変性の徴候を示さなかった。

【０１５４】

これらの結果により、全動物および組織スライスの両方において、ADDLの添加は1時間より短い時間で、細胞が変性または殺される前に、LTPの有意な崩壊を生ずることが確認される。こうして、これらの実験により、ADDLは非常に早い作用を発揮し、ADDL形成および／または活性を妨害し、こうして疾患、障害、または症状（例えば、アルツハイマー病）が細胞死が生ずる段階に進行する前に、治療効果を得るために使用することができる。換言すると、これらの結果により、記憶の低下は神経細胞が死亡する前に起こることが確証される。こうして、記憶の低下を進行を逆転し、潜在的に回復するために、このような細

胞死前の干渉を使用することができる。

【０１５５】

実施例18： in vivoにおけるADDLの初期作用

この実施例において、in vivoにおけるADDLの初期作用およびこのような初期作用の知識を操作できる方法を説明する。

【０１５６】

アルツハイマー病の主要な症候は、学習および記憶の欠乏を含む。しかしながら、行動的欠陥と凝集したアミロイド沈着との間の関係を確立することは困難であった。トランスジェニックマウスにおいて、血小板由来増殖因子プロモーターの制御下に突然変異体APPが過剰に発現されると、大量のアミロイドの沈着が生ずる（Games他、Nature、373：523－527、1995）。対照的に、この系を使用して行動の欠陥が報告された。トランスジェニックマウスを使用して研究している他の研究者ら（すなわち、Nalbantoglu他、Nature、387：500－505、1997およびHolcomb他、Nat. Med.、4：97－100、1998）は、凝集したアミロイドの有意な沈着が観測されるかなり前に、起こる行動および認識の欠陥が観測されることを報告している。これらの行動および認識の欠陥は長期間増強の不全を包含する（Nalbantoglu他、前掲）。これらのモデルを総合すると、示唆されるように、アミロイドの非沈着形態は、神経細胞機能障害の結果として起こる、初期の行動および認識の欠陥に関係づけられる。本明細書に記載する新規なADDLが、初期の行動および認識の欠陥を引き起こす、この非沈着形態のアミロイドであるということは、これらのモデルと一致する。これにかんがみて、本発明によるADDLモジュレーション化合物は、ADDL誘導神経細胞機能障害を生ずる、これらの初期の行動および認識の欠陥の治療および／または予防において使用することができるか、あるいはADDLそれら自体は、例えば、動物モデルにおいて適用して、このような誘導された神経細胞機能障害を研究することができる。

【０１５７】

同様に、中年過ぎのヒトにおいて、確からしい段階Iのアルツハイマー病の診断を行うかなり前に、認識低下およびフォーカル記憶欠陥が起こることがある（Linn他、Arch. Neurol.、52：485－490、1995）。これらのフォーカル記憶欠陥は、細胞死よりむしろ、神経細胞において誘導された異常なシグナリングから生ずることがある。他の機能、例えば、高次の筆記技量（Snowdon他、JAMA、275：528－532、1996）は、また、細胞死よりもかなり前に起こる異常な神経細胞機能により影響を受けることがある。それはこれらの欠陥に関して知られている事実、および本明細書において提供されたADDLに関する情報、すなわち、ADDLは弱体化LTP機能、例えば、ADDLにより誘導される機能に類似する方法で、これらの欠陥を誘導するという情報、と一致する。これらのラインに沿って、本発明によるADDLをモジュレートする化合物は、ADDL形成または活性から生ずる、初期の認識欠陥およびフォーカル記憶欠陥、および高次の筆記技量の障害の治療および／または予防において使用することができるか、あるいはADDLそれら自体は、例えば、動物モデルにおいて適用して、このような誘導された欠陥を研究することができる。特に、このような研究は、この分野において知られているように、例えば、処置したまたはプラシーボ処置した年齢合致被検体を比較することによって実施することができる。

【０１５８】

実施例19： アミロイドβオリゴマーを製造する変更された方法

この実施例において、例えば、実施例1および4に記載する方法の代わりに使用できる、ADDLを製造する別法を説明する。

【０１５９】

ヘキサフルオロイソプロアノール（HFIP）中にモノマーを溶解し、引き続いてヘキサフルオロイソプロアノールを速度真空蒸発により除去することによって、アミロイドβモノマーのストック溶液をつくる。固体ペプチドを乾燥DMSOに5mMで再溶解してDMSOストック溶液を形成し、1μlのDMSOストック溶液を49μlのF12培地（無血清、無フェノールーレッド）の中に希釈することによってADDLを製造する。この混合物を撹拌し、次いで4℃において24時間インキュベートする。

【０１６０】
実施例20：　アミロイドβオリゴマーのそれ以上のゲル研究
この実験において、アミロイドβオリゴマーについて実施したそれ以上のゲル研究を説明する。
【０１６１】
アミロイドβオリゴマー（すなわち、前の実施例に記載するように製造したオリゴマー）の製造後のゲル分析において、1μlのオリゴマー溶液を4μlのF12および5μlのトリス－トリシン負荷緩衝液に添加し、次いで前もって作った16.5%トリス－トリシンゲル（Biorad）上に負荷する。電気泳動を100Vにおいて2.25時間実施する。電気泳動後、Silver　Xpressキット（Novex）を使用してゲルを染色する。あるいは、ゲルを染色する代わりに、SDSを含有する転移緩衝液中で4℃、100Vにおいて1時間、アミロイドβ種をゲルからHybond－ECL（Amersham）に移す。室温において5%ミルクを含有するTBS－T1中でブロットをブロックする。ブロットを一次抗体（26D6、1：200）と室温において1.5時間インキュベートする。26D6抗体はアミロイドβのアミノ末端領域を認識する。さらに洗浄した後、ブロットを二次抗体（抗マウスHRP, 1：3500）と室温において1.5時間インキュベートする。さらに洗浄した後、ブロットをWest　Pico　Supersignal（各500μl、Pierceにより供給される）および3mlのddH_2Oと5分間インキュベートする。最後に、ブロットをフィルムに対して露出し、現像する。
【０１６２】
このようなそれ以上の研究の結果を第16図に描写し、この図面はデンシトメーター走査した16.5%トリス－トリシンSDS－ポリアクリルアミドゲル（Biorad）のコンピューターで発生した画像を示す。この図面により、ある範囲のオリゴマーの、可溶性ADDL（「ADDLs」と標識する）、二量体（「Dimer」と標識する）、およびモノマー（「Monomer」と標識する）が確証される。こうして、このゲル系は、少なくとも3モノマー～約24モノマーまでを含んでなる明確なADDLを可視化を可能とする。
【０１６３】
第16図に描写されていないが、凝集の前後に得られたゲル／ウェスタン比較すると明らかになることは、テトラマーのバンドが凝集時に増加するが、24マーのオリゴマー種を通るペンタマーは凝集後にのみ出現するという事実である。銀染色とオリゴマー（特に二量体およびテトラマー）の免疫不全量との間の差は、オリゴマーが凝集時に得られた異なるコンフォメーションを表すことができることを示唆する。
【０１６４】
実施例21：　アミロイドβオリゴマーのそれ以上のAFM研究
この実施例において、アミロイドβオリゴマーについて実施したそれ以上のAFM研究を説明する。
【０１６５】
AFMは実施例3に記載されているように実施したが、ただしSuperdex　75カラム上の分画を実行せず、視野中のより大きいサイズの球が測定されるように、視野を特別に選択した。分析は技術的観点から実施例3において実施した分析と同一であるが、この場合において、特別に選択し、かつ検査した視野は、切片分析により測定されたサイズより大きいサイズを有するオリゴマーの可視化を可能とする。Tapping　Model^{R}（Digital　Instruments、カリフォルニア州サンタバルバラ）を使用してNanoScope^{R}III　MultiMode　AFM（MMAFM）ワークステーションにより、AFMを実施した。
【０１６６】
このような研究の結果を第17図に描写し、この図面は異なるアミロイドβオリゴマーの種々のサイズの構造を示す、ADDLのAFM分析のコンピューターで発生した画像を示す。接着した構造は1～10.5nmのz高さのサイズの範囲である。この特性決定に基づいて、構造は3～24のモノマーのサブユニットを含んでなり、トリス－トリシンSDS－PAGE上に示されたバンドと一致する。別の実験（示されていない）において、約11nm程度に高い種が観測された。

【０１６７】
特許、特許出願、刊行物、およびその他を包含する本明細書において引用するすべての参考文献は、それらの全体において引用することによって本明細書の一部とされる。
【０１６８】
好ましい態様を強調して本発明を説明したが、種々の好ましい態様を使用することができることは当業者にとって明らかなであり、そして本発明は本明細書に特別に記載する以外に実施することができることを意図する。したがって、本発明は特許請求の範囲により規定される精神および範囲内に包含されるすべての変更を包含する。
【図面の簡単な説明】
【図１】　ADDL電気泳動を示す、濃度計－走査された銀－染色されたポリアクリルアミドゲルのコンピューター処理された像であり、そして一次バンドは約30kDに対応し、約17kDに対応するバンドは薄く、そして原線維又は凝集体の形跡は存在しなかった。
【図２】　ＡＤＤＬ電気泳動を示す、濃度計－走査されたクーマシー染色されたSDS－ポリアクリルアミドゲルのコンピューター処理された像を示し、そして一次バンド（上部のダブレット）は約17～約22kDのサイズに対応し、そしてもう1つのバンド（下記の黒のバンド）は、たぶん分解された生成物を表す4kDのモノマーを示す。レーン：１、分子サイズマーカー；２：ADDL調製物；３：重負荷量のADDL調製物。
【図３】　ADDL－含有“画分３”のAFM分析の代表的なコンピューター処理された像である（Superdex75ゲル濾過カラム上で分別された）。
【図４】　クラステリン（レーンA）又は冷F12培地（レーンB）と共に同時インキュベーションすることにより調製されたADDL、及びクラステリンと共に同時インキュベートすることにより調製され、そしてCentricon 10kDカット－オフ膜（レーンC）を通され、又はCentricon 10kDカット－オフ膜（レーンD）により保持されたADDLの濃度計－走査されたクーマシー染色されたSDS－ポリアクリルアミドグラジエントゲルのコンピューター生成された像を示す：MW、分子サイズマーカー。
【図５】　ADDL調製物により処理されたマウスからの脳スライスについての％細胞死亡率に対する、アミロイドβ１－42濃度（nM）として測定されたADDL濃度のグラフである。
【図６】　ADDLに暴露されていない対照のPC12細胞（“cont.”）、クラステリンのみに暴露されたPC12細胞（“Apo Ｊ”）、モノマーAβに暴露されたPC12細胞（“Ａβ）、クラステリンと共に同時凝集され、そして１日、熟成されたアミロイドβに暴露されたPC12細胞（“Ａβ：ApoJ”）についての％MTT低化を示す棒図表である。
【図７】　ADDLに暴露されていないB103細胞（陰影部でないピーク）及び蛍光ラベルされたADDLに結合されたB103細胞に関する事象（０－300）に対する蛍光強度（０－170）を示すFACScanである。
【図８】　ADDLに暴露されていない海馬細胞（陰影部でないピーク、“－ADDL”）及び蛍光ラベルされたADDLに結合された海馬細胞（陰影部のピーク、“＋AADL”）についての事象（０－300）に対する蛍光強度（０－200）を示すFACScanである。
【図９】　B103細胞のトリプシン処理により開放されたペプチドに暴露されていないか（“－”）、又は同時暴露されている（“＋”）、B103細胞についての最大％のADDL結合又はADDL－誘導された死亡率の棒図表である。
【図１０】　ADDL調製物により処理されたマウスからの脳スライスについての％死亡細胞にたいする相対的ADDL濃度のグラフである。相対的濃度を決定するために、初期濃度の10μMのAβタンパク質が、最高のデータ点（点“16”）でADDLを形成するために使用され、続いてこれは、1/2（点“８”）、1/4（点“４”）及び同様に希釈された。
【図１１】　ADDL結合ELISAにおいて得られた光学密度を示す棒図表であり、ここでB103細胞はADDL及び6E10抗体と共に同時インキュベートされ（“細胞、ADDL，6E10”の棒）、B103細胞はADDLと共に同時にインキュベートされ（“細胞、ADDL”の棒）、B103細胞は6E10抗体と共に同時インキュベートされ（“細胞、6E10”の棒）、B103細胞は単独でインキュベートされ（“細胞”の棒）、6E10抗体は単独でインキュベートされ（“6E10”の棒）、又は希釈剤の光学剤の光学密度が読み取られた（“ブラウングの棒）。

【図１２】　ADDLにより処理されていないか（培地）、又はADDLにより培養せしめられた（“ADDL”）、fyn＋/＋（野生型、“Fyn＋”；斜線の棒）又はfyn－１－（ノックアウト、“Fyn－”黒くぬりつぶされた棒）における％死亡細胞の棒図である。
【図１３】　ADDL（ぬりつぶされた三角）又はＡβ17－42（ぬりつぶされた四角）と共に星状細胞をインキュベートした後得られる活性化されたグリア（数）に対するＡβ濃度（μM）のグラフである。
【図１４】　ADDLにより処理されていない対照マウス（ぬりつぶされた三角）、又はADDLにより処理されたマウス（ぬりつぶされた四角）についての％基線細胞スパイク振幅に対する時間（分）のグラフである。
【図１５】　ADDLに暴露されたラット海馬スライス（ぬりつぶされた四角）及びADDLに暴露されていない対照のラット海馬スライス（ぬりつぶされた三角）についての平均スパイク振幅に対する時間（分）のグラフである。
【図１６】　広範囲のオリゴマーの可溶性ADDL（ラベルされた“ADDL”）、及びアミロイドβダイマー（ラベルされた“ダイマー”）及びモリマー（ラベルされた“モノマー”）を示す濃度計－走査された16.5％トリス－トリシンSDS－ポリアクリルアミドゲル（Biorad）のコンピューター処理された像である。レーン：１、銀染色されたMark XII分子量標準（Novex, San Diego, California）;2, 銀染色されたADDL；モノクローナル抗体26D6（Sibia Neurosciences, San Diego, Californiaを用いての第２レーンのウェルターンブリド。
【図１７】　ADDLのAFM分析のコンピューター生成された像である。上部の抜粋された像は、新たに分離されたマイカ上にスポットされた、凝集されたアミロイドβ分子の高倍率図（2.0μm×2.0μm）を示す。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:
(A) NAME: Grant A. Krafft, William L. Klein, Brett A. Chromy, Mary P. Lambert, Caleb E. Finch, Todd Morgan, Pat Wals, Irina Rozovsky, Ann Barlow

(ii) TITLE OF INVENTION: Amyloid β Protein (Globular Assembly and Uses Thereof)

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff
(B) STREET: 300 South Wacker Drive
(C) CITY: Chicago
(D) STATE: IL
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 60606

(v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (US)

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: unassigned
(B) FILING DATE: 04-AUG-1999
(C) CLASSIFICATION DATA:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: US 08/796,089
(B) FILING DATE: 05-FEB-1997

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

GCACCTTCTT TCCCTTCATC 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

TGCTGATGTA CCAGTTGGGG 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 19 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

CAGTCCTTGA CCTGCGACC 19

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 19 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

GCCTCACATC ACATCCTTG 19

【図１】

Figure 1

【図２】

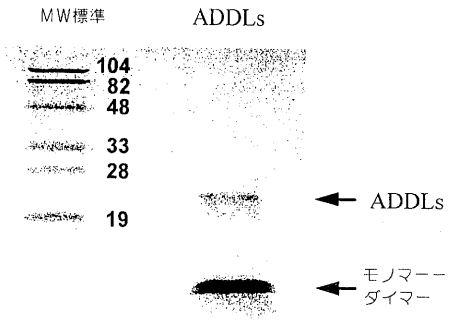


Figure 2

【図３】

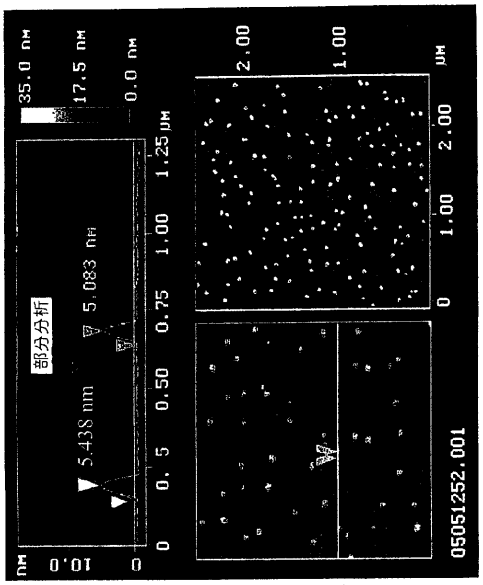


Figure 3

【図４】

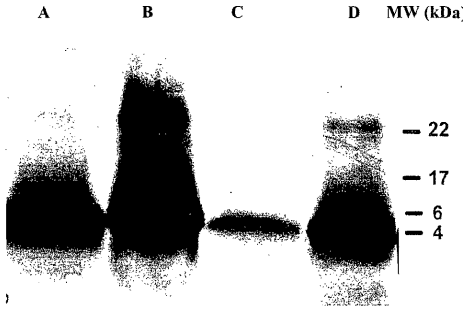


Figure 4

【図５】

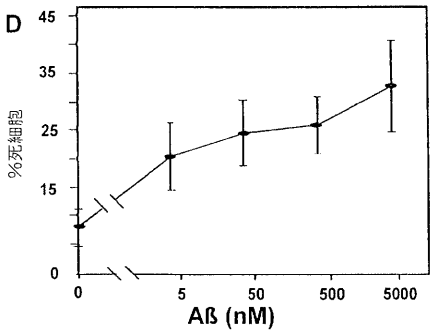


Figure 5

【図６】

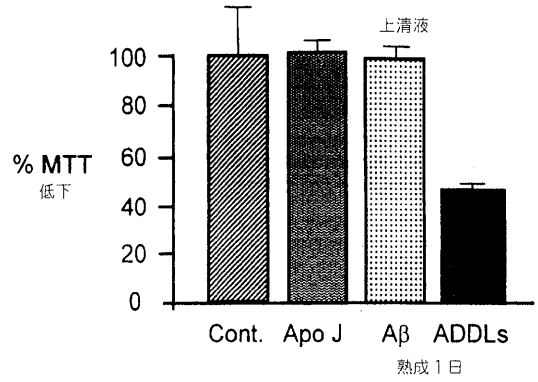


Figure 6

【図７】

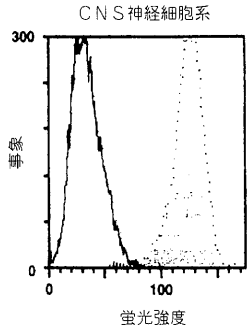


Figure 7

【図８】

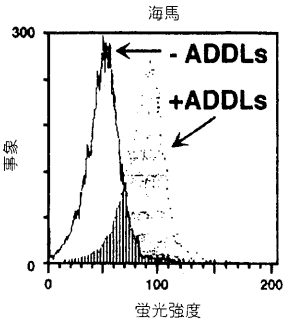


Figure 8

【図９】

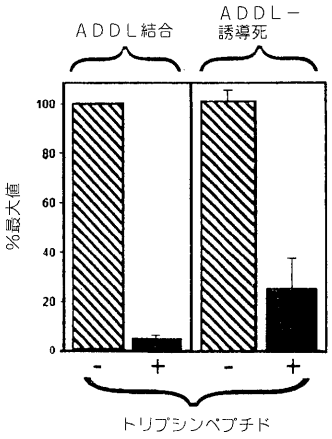


Figure 9

【図１０】

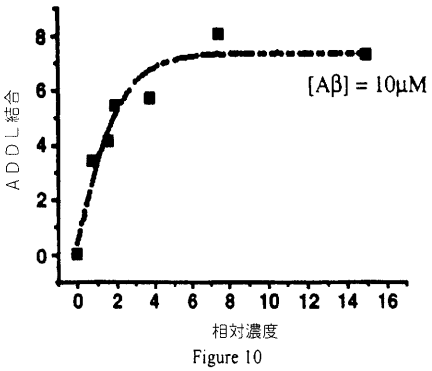


Figure 10

【図１１】

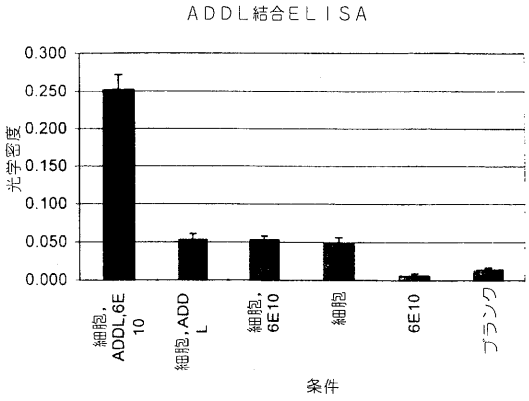


Figure 11

【図１２】

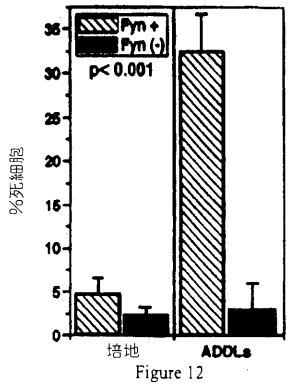


Figure 12

【図１３】

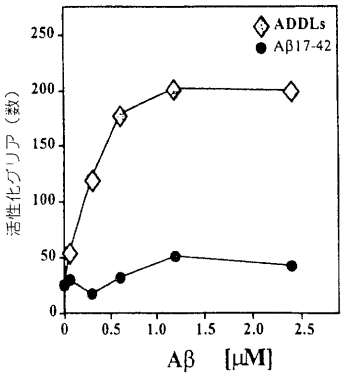


Figure 13

【図１４】

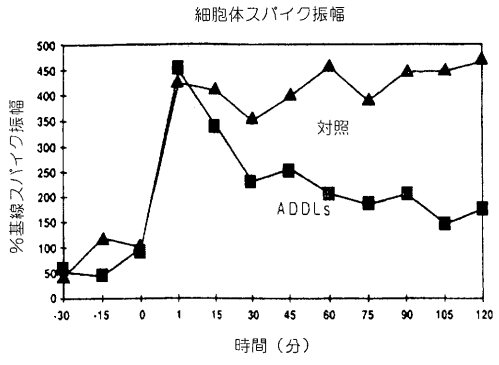


Figure 14

【図１５】

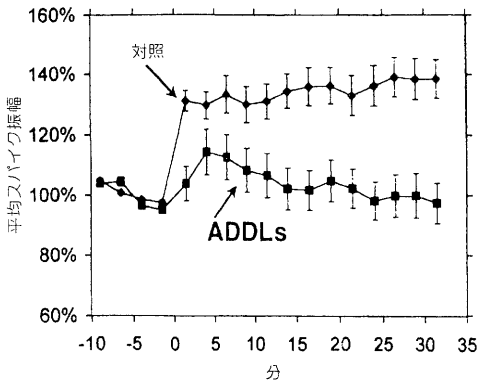


Figure 15

【図１６】

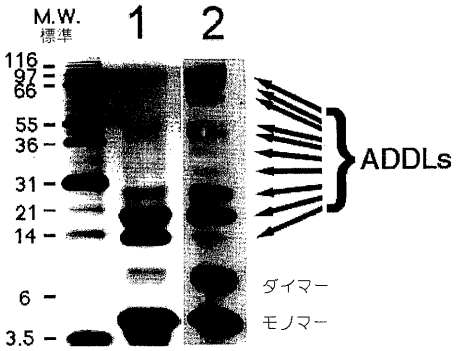


Figure 16

【図１７】

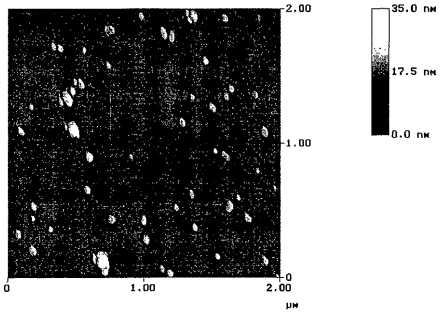


Figure 17

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/53 S

(72)発明者 クラフト, グラント エー.
アメリカ合衆国, イリノイ ６００２５, グレンビュー, エバーグリーン コート １３０９
(72)発明者 クレイン, ウィリアム エル.
アメリカ合衆国, イリノイ ６００９３, ウィネッカ, チャットフィールド ロード １１４５
(72)発明者 チロミー, ブレット エー.
アメリカ合衆国, イリノイ ６０２０１, エバンストン, コルファックス ストリート ２００４
(72)発明者 ランバート, メアリー ピー.
アメリカ合衆国, イリノイ ６００２５, グレンビュー, リネマン ストリート １９５６
(72)発明者 フィンチ, カレブ イー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９１１０１, アルタデナ, クレセント ドライブ ２１４４
(72)発明者 モーガン, トッド
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９０２６６, マンハッタン ビーチ, フィフティーンス プレイス ３１２
(72)発明者 ウォルズ, パット
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９００６５, ロサンゼルス, エリーリア ドライブ ９２４
(72)発明者 ロゾフスキー, イリナ
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９１１０７, パサデナ, サン パスカル ストリート ２４３７
(72)発明者 バーロー, アン
アメリカ合衆国, イリノイ ６０２０１, エバンストン, ノイズ ストリート ２５２５

審査官 松原 寛子

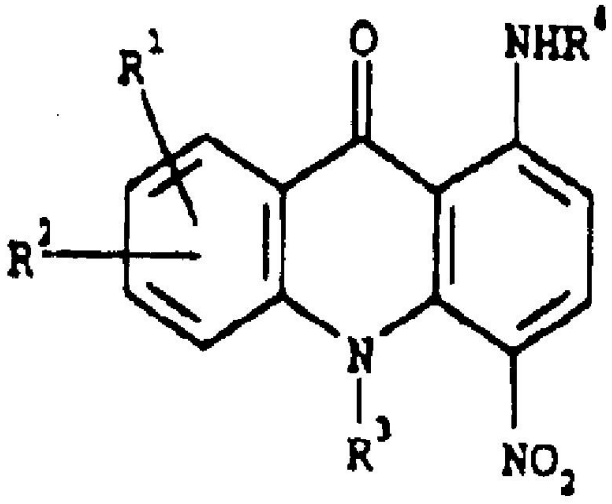
(56)参考文献 国際公開第９８／０３３８１５（WO, Ａ１）
国際公開第９８／０４００７１（WO, Ａ１）
ＰＮＡＳ, １９９８年, Vol.95, p.6448-6453
ＪＢＣ, １９９６年, Vol.271, p.4077-4081

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K 14/47
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	淀粉样β蛋白（球形组装及其用途）		
公开(公告)号	JP4796725B2	公开(公告)日	2011-10-19
申请号	JP2001515707	申请日	2000-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	南加利福尼亚大学		
申请(专利权)人(译)	南加州大学 西北大学		
当前申请(专利权)人(译)	南加州大学 西北大学		
[标]发明人	クラフトグラントエー クレインウィリアムエル チロミーブレットエー ランバートメアリーピー フィンチカレブイー モーガントッド ウォルズパット ロゾフスキーイリナ バーローアン		
发明人	クラフト,グラント エー. クレイン,ウィリアム エル. チロミー,ブレット エー. ランバート,メアリー ピー. フィンチ,カレブ イー. モーガン,トッド ウォルズ,パット ロゾフスキー,イリナ バーロー,アン		
IPC分类号	C07K14/47 C12Q1/02 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/48 A61K38/00 A61K45/00 A61P25/28 C12Q1/68 G01N13/16 G01N21/78 G01N27/447 G01N33/483 G01N33/58		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/28 C07K14/4711		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C12Q1/02 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.S		
优先权	09/369236 1999-08-04 US		
其他公开文献	JP2003510023A5 JP2003510023A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供淀粉状蛋白β衍生的痴称配体（ADDL），其包含淀粉样蛋白2蛋白组装体，其被打入能够激活特定细胞过程的球状非纤维状寡聚结构中。本发明提供了测定ADDL的形成，存在，受体蛋白结合和细胞活性的方法，以及阻断ADDL形成或活性的化合物，以及鉴定这些化合物的方法。本发明进一步提供了使用ADDL和调节ADDL形成和/或活性的方法，尤其是治疗学习和/或记忆障碍。


R1
O
NHR4
R2
N
R3
NO2